

Trần Thị Thanh



CÔNG NGHỆ VI SINH



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

Trần Thị Thanh

CÔNG NGHỆ VI SINH

(Tái bản lần thứ ba)

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

LỜI NÓI ĐẦU

Công nghệ vi sinh là một bộ phận quan trọng trong Công nghệ sinh học, là một môn khoa học nghiên cứu những hoạt động sống của vi sinh vật để áp dụng nó một cách tốt nhất vào các quy trình sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Tuy là một ngành khoa học còn non trẻ, nhưng do những đóng góp quan trọng cho nhân loại về mặt lí luận cũng như thực tiễn, nên trong vài thập niên gần đây nó đã tiến những bước đáng kể và sẽ phát triển một cách đầy hứa hẹn ở thế kỉ XXI.

*Để giúp cho sinh viên và các bạn quan tâm đến lĩnh vực này, bên cạnh giáo trình Vi sinh vật học đại cương, **CÔNG NGHỆ VI SINH** sẽ cung cấp thêm những hiểu biết về thế giới vi sinh vật với những ứng dụng thực tiễn rất phong phú.*

CÔNG NGHỆ VI SINH trình bày một cách khái quát những hiểu biết cơ bản về các vấn đề sau :

- Những tiến đề cơ bản về hoá sinh học, di truyền học của Công nghệ vi sinh.*
- Các nguyên tắc cơ bản trong nuôi cấy vi sinh vật công nghiệp.*
- Một số quy trình công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong sản xuất một số sản phẩm.*

Lĩnh vực Công nghệ vi sinh rất rộng và đa dạng nên khó tránh khỏi những sai sót, hoặc chưa đáp ứng được mọi mong muốn của các bạn.

Xin chân thành tiếp thu và cảm ơn sự góp ý của bạn đọc.

TÁC GIẢ

CHƯƠNG I

MỞ ĐẦU

I. MỘT SỐ KHÁI NIỆM CƠ BẢN

Trước hết chúng ta cần làm quen với khái niệm CÔNG NGHỆ SINH HỌC. Đây là một thuật ngữ mà từ những năm 60 của thế kỉ XX trở lại đây luôn được nhắc tới và được coi như một sự kiện nổi bật của thời đại.

Vậy chúng ta hiểu thế nào là Công nghệ sinh học ? Để giúp hiểu rõ khái niệm này, trong các sách, tạp chí đã có rất nhiều định nghĩa, lí giải khác nhau. Trong số đó, định nghĩa của Liên đoàn châu Âu về Công nghệ sinh học (năm 1981) như sau : Công nghệ sinh học được coi là *một tập hợp của các ngành sinh hóa học, vi sinh vật học, tế bào học, di truyền học với mục tiêu đạt tới sự ứng dụng công nghệ các vi sinh vật, các mô, các tế bào nuôi và các cấu phần của tế bào.*

Công nghệ sinh học là một lĩnh vực khoa học công nghệ rộng lớn. Nếu xếp theo các đối tượng sinh học, có thể chia Công nghệ sinh học thành các ngành sau đây :

– **Công nghệ vi sinh** : Là ngành công nghệ nhằm khai thác tốt nhất khả năng kì diệu của cơ thể vi sinh vật. Thực chất có thể coi vi sinh vật là các nhà máy cực kì nhỏ và cực kì tinh vi. Nhiệm vụ của Công nghệ vi sinh là tạo ra được điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật hoạt động với hiệu suất cao nhất.

– **Công nghệ tế bào** (*tế bào động vật và thực vật*) : Các tế bào động vật, thực vật với bộ máy di truyền đặc trưng cho từng loài, giống được tạo điều kiện phát triển trong các môi trường xác định và an toàn. Kỹ thuật nuôi cấy mô được coi là kĩ thuật chủ yếu của Công nghệ tế bào.

– **Công nghệ gen** : Là ngành công nghệ sử dụng hệ thống các phương pháp thực nghiệm ứng dụng các thành tựu của Sinh học phân tử, Di truyền học phân tử để tạo nên các tổ hợp tính trạng di truyền mong muốn ở một loài sinh vật. Từ đó giúp điều khiển một cách định hướng tính di truyền của sinh vật. Ngày nay, ngành Công nghệ gen được suy tôn là mũi nhọn tiến công xung kích của Công nghệ sinh học. Kỹ thuật di truyền là kĩ thuật chủ yếu của Công nghệ gen. Một điều hết sức lí thú là vi sinh

vật được coi là một trong những đối tượng thực nghiệm lí tưởng để nghiên cứu về kĩ thuật di truyền.

Ở chuyên đề này, chúng ta sẽ đi sâu tìm hiểu chủ yếu vào lĩnh vực Công nghệ vi sinh. Và để hiểu một cách thấu đáo Công nghệ vi sinh, chúng ta cần tìm hiểu thêm một số vấn đề về Công nghệ gen – cụ thể là một số vấn đề về kĩ thuật di truyền – được coi là chìa khóa để giúp mở ra những ứng dụng mới của Công nghệ vi sinh.

II. CÁC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH

Cũng như các lĩnh vực khoa học khác, Công nghệ vi sinh mà tiền thân của nó là công nghệ lên men cổ điển đã trải qua những chặng đường phát triển đầy khó khăn, phức tạp với nhiều phát minh và cả những lỗi lầm, những kì công và cả những ngộ nhận. Để rồi từ một lĩnh vực sinh học ứng dụng các thuộc tính của vi sinh vật một cách thụ động, đến nay Công nghệ vi sinh đã trở thành một nền công nghệ tiên tiến với những khía cạnh ứng dụng mới mẻ, đã thu hút sự quan tâm sâu sắc của các nhà khoa học, công nghệ gia và cả các thương gia.

Công nghệ vi sinh đã phát triển qua nhiều thế hệ. Có nhiều quan điểm khác nhau về việc phân chia các giai đoạn phát triển.

Theo cách chia tương đối hợp lí thì Công nghệ vi sinh đã trải qua các thế hệ chủ yếu sau :

1. Thế hệ thứ 1

Đặc trưng giai đoạn này là con người sử dụng các thuộc tính của vi sinh vật một cách thụ động, bởi vậy người ta còn gọi là *giai đoạn lên men cổ điển*.

Thời tiền sử, khoảng hơn 6000 năm trước Công nguyên, con người đã biết sản xuất khá nhiều loại rượu, bia và một số thực phẩm lên men bằng vi sinh vật. Tuy vậy, ở giai đoạn này, tất cả đều dựa vào kinh nghiệm, sản xuất chỉ ở quy mô thủ công. Con người thiếu sự hiểu biết về sự tồn tại và vai trò của vi sinh vật trong các quá trình lên men.

2. Thế hệ thứ 2

Thời gian khoảng từ những năm ba mươi đến những năm sáu mươi của thế kỉ XX.

Giai đoạn này được mở đầu bằng sự kiện Alexander Fleming tìm ra chất kháng sinh penicillin năm 1928. Đúng về thời gian, thế hệ thứ hai rơi vào thời kì của Đại chiến Thế giới lần hai. Thời kì chiến tranh đã đặt ra một yêu cầu hết sức cấp bách về một số dược phẩm dùng để chữa bệnh,

chủ yếu là các loại kháng sinh, vaccine... Từ đó thúc đẩy nhanh việc tìm kiếm các chất kháng sinh, vaccine và đưa việc sản xuất các chế phẩm này ở quy mô lớn hơn. Đồng thời cũng do yêu cầu của chiến tranh và thời kì sau chiến tranh, vấn đề lương thực và thức uống cũng được đặt ra một cách hết sức cấp bách, góp thêm động lực thúc đẩy các nhà nghiên cứu tìm kiếm gây tạo khản trương các chủng vi sinh vật dùng cho sản xuất lớn. Cũng từ đây, công nghệ lên men lớn ra đời và ngày một phát triển.

3. Thế hệ thứ 3

Thời gian từ những năm sáu mươi trở lại đây (*Thời đại chúng ta đang sống*).

Đến giai đoạn này Công nghệ vi sinh đã cố gắng vươn lên đáp ứng những nhu cầu ngày một cao hơn về dinh dưỡng, năng lượng của con người, đã cố gắng tham gia giải quyết vấn đề ô nhiễm của môi trường, tạo sự cân bằng sinh thái ...

Thực tế ở giai đoạn này Công nghệ vi sinh đã phát triển thành một ngành độc lập, là công cụ đắc lực phục vụ cho sản xuất bằng vi sinh vật các sản phẩm cần thiết cho nhu cầu đời sống con người như protein, enzyme, amino acid, thuốc trừ sâu, phân bón ... Những hiểu biết mới về thiên nhiên đã giúp con người sử dụng các phế phẩm, phụ phẩm của các ngành khác (nông nghiệp, công nghiệp dầu khí, công nghiệp thực phẩm) để thông qua công nghệ lên men tạo ra các sản phẩm có giá trị như protein, vitamin, enzyme ... Ở giai đoạn này, các quá trình sinh tổng hợp xảy ra ở vi sinh vật đã được con người can thiệp và điều khiển một cách tích cực hơn. Cũng ở giai đoạn này chúng ta thấy hé mở tương lai tươi sáng của thế hệ thứ tư của Công nghệ vi sinh : *giai đoạn Công nghệ vi sinh mới*. Thế hệ này sẽ phát triển một cách đầy hứa hẹn ở thế kỉ XXI.

Tuy hiện nay rất nhiều vấn đề đang còn trong phạm vi nghiên cứu, nhưng Công nghệ vi sinh lúc này đã đạt được những thành công bước đầu rất đáng khích lệ. Trong đó vi sinh vật được sử dụng một cách định hướng nhằm tìm kiếm các biện pháp hữu hiệu nhất (*thông qua Công nghệ gen – Kỹ thuật di truyền*) để giải quyết một cách triệt để các vấn đề đặt ra của thế hệ thứ ba. Có thể mạnh dạn nói rằng : chúng ta đang đứng trước ngưỡng cửa của thế hệ thứ tư. Những thành công đầy hứa hẹn của thế hệ thứ tư sẽ cho chúng ta những sản phẩm vô giá như *những giống cây trồng lai tạo không cần phân bón (vì chúng tự bón phân bằng quá trình cố định đạm), những cây trồng chống chịu được những điều kiện khắc nghiệt của khí hậu, chống sâu rầy ... vì chúng đã được mang trên mình những gen chịu khô hạn, kháng sâu rầy ... hoặc tạo được những cá thể vi sinh vật sản xuất với hiệu suất cao nhất các chất như kháng thể,*

insulin, kháng sinh ... Hoặc thông qua kĩ thuật di truyền với đối tượng là các vi sinh vật, chúng ta sẽ tìm ra *biện pháp hữu hiệu để trị các bệnh nan y của thế kỉ như ung thư, AIDS ...*

Tất cả còn đang ở phía trước, nhưng hiện nay đã có nhiều cơ sở để chúng ta vững tin vào hiện thực của nó trong tương lai.

III. ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH

Công nghệ vi sinh được ứng dụng một cách rộng rãi và có hiệu quả trên nhiều lĩnh vực sản xuất và đời sống.

1. Trong lĩnh vực y tế, bảo vệ sức khỏe con người

Tình hình sức khỏe chung của nhân loại hiện đang ở trong tình trạng rất đáng lo ngại. Hầu như lúc nào cũng có khoảng 1/3 nhân loại đang ở trong trạng thái đau ốm. Vì vậy vấn đề tìm thuốc trị bệnh, nhất là những bệnh nan y hiện đang được đặt ra hết sức cấp bách. Công nghệ vi sinh đã đóng góp trong việc tìm kiếm nhiều loại dược phẩm quan trọng.

a) Vaccine thể hệ mới:

Trong quá trình tìm kiếm các biện pháp, thuốc phòng và trị một số bệnh truyền nhiễm, một thành công đáng kể của Công nghệ vi sinh là tạo ra các vaccine thể hệ mới.

Trong khoảng hơn hai thập kỉ gần đây, con người đã tạo ra nhiều vaccine thể hệ mới như vaccine ribosome, vaccine kĩ thuật gen, vaccine chế tạo từ các thành phần của virus ...

Vaccine thể hệ mới có những ưu điểm sau:

- Rất an toàn vì không sử dụng trực tiếp vi sinh vật gây bệnh.
- Giá thành hạ vì không cần nuôi virus trên phôi gà hay các tổ chức mô của động vật vốn rất phức tạp và tốn kém, giảm bớt được chi phí vận chuyển và chi phí kiểm tra tính an toàn trước khi dùng ...

* **Vaccine ribosome:** Cấu tạo từ các ribosome của từng loại vi khuẩn gây bệnh (thương hàn, tả, dịch hạch ...). Ưu điểm của loại vaccine này là ít độc, tính miễn dịch cao.

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

* **Vaccine kĩ thuật gen:** Là vaccine chế tạo từ những vi khuẩn hay nấm men tái tổ hợp, có mang gen mã hóa việc tổng hợp một protein kháng nguyên của một virus hay vi khuẩn gây bệnh nào đó.

b) Insulin:

Việc sản xuất insulin ở quy mô công nghiệp ngày nay có lẽ là một trong những thành công rực rỡ nhất, sớm nhất của Công nghệ gen.

Insulin là một protein được tuyến tụy tiết ra nhằm điều hòa lượng đường trong máu. Cơ thể thiếu hụt insulin trong máu sẽ làm rối loạn hầu hết các quá trình trao đổi chất ở cơ thể, dẫn đến tích nhiều đường trong nước tiểu. Để điều trị bệnh này, người ta thường tiêm insulin cho người bệnh. Chế phẩm insulin này được trích từ tuyến tụy của gia súc.

Để có 100 gam insulin người ta phải sử dụng tụy tạng của 4000 - 5000 con bò. Vì vậy giá thành của insulin rất cao. Vả lại cũng có bệnh nhân không nhạy cảm với insulin tách chiết từ động vật.

Người ta đã cố gắng tổng hợp insulin bằng con đường hóa học. Quá trình này rất phức tạp, phải trải qua trên một trăm bước khác nhau.

Vào tháng 9 năm 1978, H. Boger lần đầu tiên bằng kĩ thuật di truyền thông qua vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) đã thu nhận được một lượng lớn insulin. Cụ thể người ta đã chuyển gen chỉ phối tính trạng tạo insulin của người sang cho *E. coli*. Với *E. coli* đã được tái tổ hợp gen này, qua nuôi cấy ở nổi lên men có dung tích 1000 lít, sau một thời gian ngắn có thể thu được 200 gam insulin, tương đương với lượng insulin chiết rút từ 8000 - 10000 con bò. Thành công này đã chứng minh một điều hết sức mới mẻ và lí thú: gen của con người có thể làm việc một cách có hiệu quả trong bộ gen của vi sinh vật.

c) Interferon:

Interferon có bản chất protein, là yếu tố miễn dịch không đặc hiệu, là chất giúp cơ thể chống lại nhiều loại bệnh (nó có phổ tác dụng kháng virus rộng).

Thông thường để thu nhận interferon, người ta phải tách chiết chúng từ huyết thanh của máu nên rất tốn kém.

Bằng phương pháp tương tự như đối với insulin, hiện nay người ta có thể thu nhận một lượng lớn interferon thông qua các cơ thể vi sinh vật đã được tái tổ hợp gen để phục vụ cho việc điều trị các bệnh nhiễm trùng.

Tháng 1 năm 1980, Gilbert đã đoạt giải thưởng Nobel nhờ thành công trong việc thu nhận interferon từ *E. coli* đã được tái tổ hợp gen. Đến tháng 3 năm 1981, Bộ môn Di truyền ở Đại học Washington đã thành công trong việc thu nhận interferon từ nấm men *Sac. cerevisiae* có hiệu suất cao gấp 10.000 lần so với ở tế bào *E. coli*.

d) Kích tố sinh trưởng HGH (*Human growth hormone*):

HGH được tuyến yên tạo nên. Thông thường muốn có chế phẩm này người ta phải trích li nó từ tuyến yên của tử thi. Mỗi tử thi cho được từ 4 - 6 mg HGH. Theo tính toán, muốn chữa khỏi cho một người lùn sẽ cần lượng HGH thu được từ 100 - 150 tử thi ! Điều này cho thấy một trở ngại rất đáng kể khi chữa trị chứng lùn cho trẻ em.

Đến năm 1983, một thành công của Công nghệ vi sinh đã giúp con người một lối thoát trong việc điều chế HGH. Người ta đã thành công trong việc thu nhận một lượng lớn HGH từ vi khuẩn *E. coli* đã được tái tổ hợp gen (từ một lít dịch lên men của *E. coli* thu được lượng HGH tương đương với lượng chất này thu được từ 60 tử thi).

e) Chất kháng sinh:

Kháng sinh là một trong những thuốc được Công nghệ vi sinh đầu tư sản xuất từ rất lâu. Cho đến nay, người ta đã tìm được hơn 2500 loại kháng sinh với cấu trúc phân tử rất đa dạng. Trong số đó chủ yếu là các kháng sinh có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Trong giai đoạn phát triển mới của Công nghệ vi sinh, người ta cố gắng nâng năng suất tạo kháng sinh lên gấp hàng trăm, ngàn lần so với chủng vi sinh vật gốc thông qua việc gây tạo đột biến hay tạo các môi trường tối ưu cho sự tạo thành kháng sinh của các chủng vi sinh vật.

Ngoài ra, người ta cũng đã sử dụng kĩ thuật di truyền nhằm mục đích tạo ra các chủng vi sinh vật có khả năng sinh kháng sinh mới có phổ tác dụng rộng, chống được các vi sinh vật đã lờn thuốc kháng sinh. Theo hướng này, người ta có thể áp dụng phương pháp chuyển gen tạo một loại kháng sinh đã biết (*kháng sinh actinorhodin*) ở một loại xạ khuẩn (*Streptomyces coelicolor*) sang cho một loại xạ khuẩn khác (*Actinomyces spp.*). Kết quả là loài *Actinomyces spp.* đã tạo ra được ba loại kháng sinh mới với phổ tác dụng khác với loại kháng sinh có ở *Streptomyces coelicolor*.

2. Trong lĩnh vực sản xuất nông nghiệp

a) Cải tạo giống cây trồng:

Thông qua kĩ thuật di truyền với sự hỗ trợ của vi sinh vật, con người đã và đang tạo ra những cơ thể thực vật có những đặc tính quý báu: chống chịu sâu rầy, chịu được thuốc diệt cỏ, chịu được phèn, chịu hạn ... Một trong những thành tựu của hướng đóng góp này là việc tạo ra những cây trồng có sức đề kháng với chất diệt cỏ. Cụ thể là: khi sử dụng hecboxit phun diệt cỏ cho cây đậu tương, người ta nhận thấy một số cỏ đã quen

(lòn) với thuốc nên cỏ không chết mà cây trồng lại bị chết vì thuốc diệt cỏ. Trước thực tế này, các nhà khoa học đã quyết định vay mượn gen chịu trách nhiệm về tính bền vững với hecboxit của cỏ dại để chuyển sang cho cây trồng (cây đậu tương) và đã tạo được cây đậu tương chống chịu lại với thuốc diệt cỏ hecboxit. Hiện nay một số công ty thương mại đã dự kiến bán ra những túi hàng chứa cả thuốc trừ cỏ lẫn hạt giống đã được xử lí "miễn dịch" với thuốc chống cỏ dại.

b) Tạo chế phẩm thuốc trừ sâu có nguồn gốc vi sinh vật:

Hiện nay nếu không dùng thuốc hóa học thì sâu rầy sẽ phá hoại mùa màng (có nơi, có lúc bị mất trắng vì sâu hại), ruồi muỗi gây dịch bệnh nghiêm trọng.

Để bảo vệ cây trồng, chống các vụ dịch bệnh, con người đã và đang phải dùng thuốc hóa học trừ sâu, rầy, bọ gây. Đó là những hợp chất hữu cơ phần lớn có chứa Cl, P. Điều này khiến cho môi trường sống ngày càng bị đầu độc, trạng thái ô nhiễm của không khí, đất, nước ngày một trầm trọng hơn.

Trước thực tế này, con người đã không thể không quan tâm đến hướng sử dụng các chế phẩm vi sinh vật để trừ các côn trùng có hại. Những chế phẩm này hoàn toàn vô hại đối với người, động vật, gia súc, gia cầm (ngoại trừ tầm nuôi). Hiện nay người ta đã xây dựng hàng loạt các nhà máy sản xuất các chế phẩm vi sinh vật diệt côn trùng với sản lượng ngày một gia tăng. Trên thị trường thế giới hiện nay người tiêu dùng rất quen với các loại chế phẩm vi sinh vật có tên như: Thuricide (của Mĩ), Bathurin (của Tiệp Khắc cũ), Entobacterin (của Liên Xô cũ), Biospore (của Cộng hòa Liên bang Đức) ...

c) Phân bón cho cây trồng:

Hiện nay các loại phân bón hóa học được sản xuất ra chưa đủ cung cấp cho nhu cầu trồng trọt. Đây là chưa tính tới giá thành của phân bón hóa học ngày một tăng cao vì nhiều lí do. Vì vậy hướng sử dụng phân bón có nguồn gốc vi sinh vật ngày càng thu hút sự chú ý của con người.

*** Phân vi sinh vật cố định đạm:** Các loại phân vi khuẩn nốt sần - vi khuẩn *Rhizobium* cộng sinh với cây họ đậu, chế phẩm *Azotobacterin* từ vi khuẩn cố định đạm sống tự do *Azotobacter* được sử dụng để tăng nguồn đạm, kích thích sinh trưởng, tăng tỉ lệ nảy mầm của hạt. Để mở rộng khả năng cố định đạm của vi sinh vật, con người hiện đang thực hiện chuyển gen cố định đạm - nif (nitrogen fixation) từ vi khuẩn cố định đạm (hiện đang lấy từ vi khuẩn cố định đạm yếm khí, sống tự do *Klebsiella*) sang cho những vi sinh vật không có khả năng cố định đạm như Agro-

bacterium tumefaciens, *E. coli*. Cho đến nay đã có kết quả khả quan ở quy mô phòng thí nghiệm. Về nguyên lý thì không có lý do gì không chuyển được gen nif sang cho cây hòa thảo – thực vật bậc cao. Tuy vậy, cần phải có thời gian vì người ta nhận thấy hoạt động gen ở vi khuẩn (tế bào *Procaryote*) và ở thực vật (tế bào *Eucaryote*) tồn tại sự khác biệt rất lớn.

*** Phân phức hợp hữu cơ vi sinh *Phytohormone*:**

Đây là loại phân bón mà ngoài thành phần các hợp chất hữu cơ mùn cao cấp, các hợp chất hữu cơ chuyên dùng còn có hỗn hợp vi sinh vật cố định đạm và các vi sinh vật phân giải lân, cellulose tạo mùn và các vi sinh vật sinh các chất có hoạt tính sinh học như kháng sinh, amino acid, vitamin. Các vi sinh vật này được tuyển chọn thích ứng với điều kiện sản xuất, được sản xuất trong điều kiện vô trùng, theo một công nghệ hiện đại, bảo đảm các vi sinh vật sẽ có khả năng sống và hoạt động tốt trong điều kiện đất canh tác. Việc sử dụng phân phức hợp vi sinh vật liên tục trong một thời gian dài có tác dụng phục hồi chất lượng của đất, hạn chế hiện tượng rửa trôi chất dinh dưỡng, chống sự xói mòn, chai cứng của đất. Do vậy bảo vệ môi trường sinh thái bền vững.

d) Chế phẩm vi sinh vật hữu hiệu EM (*Effective Microorganisms*):

Chế phẩm EM là phát minh của giáo sư, tiến sĩ Teruo Higa, Đại học Ryu Kyus, Okinawa, Nhật Bản. Chế phẩm này chứa khoảng 80 loài vi sinh vật. Chúng bao gồm các nhóm vi sinh vật chủ yếu sau: vi khuẩn lactic, vi khuẩn quang hợp, nấm men, nấm mốc, xạ khuẩn Các vi sinh vật này có nguồn gốc tự nhiên – tức không phải những vi sinh vật thu được từ kỹ thuật tái tổ hợp gen. Tất cả chúng có mối quan hệ tương hỗ thích hợp với nhau về mặt sinh lý và có thể cùng sống chung với nhau trong một môi trường nhân tạo không vô trùng. Khi đưa chúng trở lại môi trường tự nhiên, vai trò tác dụng của từng nhóm vi sinh vật sẽ tăng lên rất nhiều. Chế phẩm EM có những tác dụng sau:

- Cải thiện môi trường lí, hóa, sinh của đất và tiêu diệt các tác nhân gây bệnh, sâu hại trong đất.
- Tăng khả năng quang hợp của cây trồng.
- Thúc đẩy khả năng nảy mầm, ra hoa, kết trái và làm chín ở thực vật.
- Giúp xử lý ô nhiễm môi trường.

Hiện nay chế phẩm EM đã được ứng dụng rộng rãi ở các quốc gia trên thế giới, đặc biệt là ở các nước châu Á. Việc áp dụng chế phẩm này đã thu được những kết quả đáng kể, do đó Hội nghị Quốc tế tổ chức vào

tháng 11/1987 tại Thái Lan đã giới thiệu công nghệ này với khu vực châu Á - Thái Bình Dương. Và cũng tại hội nghị này, mạng lưới nông nghiệp thiên nhiên châu Á - Thái Bình Dương (APNAN - Asia Pacific Nature Agriculture Network) đã được thành lập để kích thích việc nghiên cứu, thử nghiệm và áp dụng chế phẩm EM.

3. Tham gia giải quyết vấn đề năng lượng, bảo vệ môi trường

a) Giải quyết vấn đề năng lượng phục vụ con người:

Nguồn năng lượng truyền thống (than đá, thủy điện, dầu khí) ngày một cạn dần và thậm chí có nơi lại không có nguồn tài nguyên này. Để bổ sung nguồn nhiên liệu đang bị cạn kiệt, Công nghệ vi sinh đã góp phần đưa thêm nguồn năng lượng mới.

- Cồn (*cồn ethanol*): Hiện nay ở một số nước vì không có nguồn dầu khí, giá xăng dầu nhập tăng cao, người ta nghĩ đến giải pháp sử dụng cồn chạy xe với hỗn hợp xăng - cồn gọi là gasohol (*xăng pha 10 - 20% cồn*). Một trong những nước đi đầu và ứng dụng mạnh nguồn năng lượng mới này để chạy xe là Brasil. Brasil vào năm 1985 đã sản xuất 1 tỉ lít cồn/năm để dùng chạy hàng trăm ngàn xe hơi. Cồn ethanol có được do công nghệ lên men rượu cung cấp. Ở đây người ta cho lên men rượu từ nguồn nguyên liệu rẻ tiền (dịch thủy phân của gỗ và cellulose, đường và ri đường ...).

- Khí sinh học (*biogas*): Thường biogas chứa khoảng 60 - 80% khí methane (CH_4). Biogas được sinh ra do quá trình lên men các phụ, phế phẩm nông nghiệp, các loại rác giàu cellulose cùng với phân, nước tiểu của người, gia súc, gia cầm ... Nguyên lí của quá trình sản xuất này là sự phân giải yếm khí của khu hệ vi sinh vật lên men methane. Qua quá trình lên men người ta thu khí biogas, cặn bã còn lại ở bể lên men được dùng làm phân bón. Kết quả là con người cùng một lúc giải quyết hai vấn đề đặt ra của cuộc sống:

- + Tăng nguồn năng lượng.
- + Xử lí rác, phế thải, bảo vệ môi trường không bị ô nhiễm.

Với ưu điểm nói trên lại không cần các trang thiết bị hiện đại, đắt tiền nên hướng giải quyết năng lượng này được các nước quan tâm áp dụng.

Đứng đầu là Trung Quốc. Hiện ở Trung Quốc có khoảng 7 triệu bể khí sinh học đang hoạt động, cung cấp khoảng 30% nhu cầu về năng lượng cho xã hội. Người ta sản xuất biogas ở quy mô nhỏ và vừa bằng cách xây bể xi măng hay dùng túi bằng cao su. Mỗi bể thường có dung

tích 8 – 10 m³. Đến năm 2000, Trung Quốc có khoảng 30 triệu bể, cho phép xử lý 1 tỉ tấn phế thải/năm và tạo ra khoảng 500 tỉ m³ khí tương đương với 500 triệu tấn nhiên liệu, trị giá 100 tỉ USD.

Nước kế tới là Ấn Độ. Ở Ấn Độ năm 1985 có 400 ngàn bể, đến năm 1992 tăng lên đến 1 triệu bể.

Rõ ràng đây là hướng giải quyết tốt nạn khủng hoảng về năng lượng hiện nay.

b) Bảo vệ môi trường, tạo cân bằng sinh thái :

Đây là vấn đề được quan tâm toàn cầu và là vấn đề sống còn của loài người hiện nay. Công nghệ vi sinh đã tích cực tham gia giải quyết một số vấn đề thuộc lĩnh vực này nhằm giúp con người đạt được những thành tựu trong lĩnh vực bảo vệ môi trường sống như lợi dụng thuộc tính quý báu của vi sinh vật có khả năng đồng hoá nguồn cơ chất rất phong phú từ các dạng hydrocarbon đến các dạng cellulose, cao su và các dẫn xuất của cao su ... để thực hiện các quá trình xử lý các nguồn nước thải và chất thải. Khi tiến hành phân giải các loại nước thải, chất thải (*qua hoạt động hiếu khí và yếm khí*) vi sinh vật đã chuyển hoá chúng thành những hợp chất có cấu trúc đơn giản dễ phân huỷ, và còn tạo được một nguồn sinh khối giàu protein, khoáng, vitamin ... Kết quả các quá trình xử lý này góp phần làm môi trường sống trong sạch hơn, tạo sự cân bằng sinh thái trên hành tinh chúng ta.

Tóm lại, chỉ mới lược qua vài khía cạnh của cuộc sống, chúng ta đã thấy rõ vai trò to lớn và cực kì quan trọng của Công nghệ vi sinh. Trong sự phát triển tới đây, tin rằng, Công nghệ vi sinh sẽ tiếp tục đóng góp cho nhân loại những điều kì thú hơn, hữu hiệu hơn, đúng với sự tin tưởng và mong đợi của con người : thế kỉ XXI là kỉ nguyên của Công nghệ sinh học nói chung và Công nghệ vi sinh nói riêng.

IV. ĐÔI ĐIỀU SUY NGẪM

Giờ đây không ai có thể phủ nhận những đóng góp to lớn của Công nghệ sinh học nói chung và Công nghệ vi sinh nói riêng vào tiến bộ của loài người. Nó nâng cao sản lượng vật chất, cải thiện sức khoẻ con người và môi trường sống.

Song qua thực tế cho thấy, bất kì một tiến bộ nào của khoa học cũng có thể đem lại những lợi ích to lớn cho loài người, ngược lại cũng có thể trở thành một hiểm hoạ lớn đối với đời sống con người. Điều này còn tùy thuộc vào con người sử dụng nó. Những thành tựu về vật lí hạt nhân đã giúp ta khẳng định điều trên. Các nhà vật lí từ buổi bình minh của các

phản ứng phân rã nguyên tử đã lo âu rằng một thí nghiệm bình thường trong phòng thí nghiệm có thể dẫn đến những kết quả khủng khiếp. Họ đã nói rằng: bất kì một tên ngu xuẩn nào trong phòng thí nghiệm cũng có thể làm nổ tung Trái Đất. Sự kiện những năm sau này cho thấy, đáng sợ không phải là “những kẻ ngu xuẩn trong phòng thí nghiệm” mà chính là những kẻ vô lương tâm trong các chính phủ hiếu chiến. Nguy hiểm không phải là các sai lầm thực nghiệm vô tình, mà là những hoạt động định hướng và có ý thức hấn hoi của những kẻ chạy đua vũ trang, chủ trương sản xuất các loại vũ khí hạt nhân có sức công phá khủng khiếp để sử dụng trong chiến tranh chống lại loài người.

Nhưng để sản xuất bom nguyên tử, bom hydrogen trong bất kì quốc gia nào cũng đòi hỏi phải có nền công nghiệp nặng phát triển, và điều đó khó giấu ai được. Còn để tạo ra những vi khuẩn nguy hiểm có bộ gen đã được tái tổ hợp qua việc tiếp nhận những gen đáng sợ như gen gây ung thư, gen kháng các chất kháng sinh ... để tạo ra những quả bom vi trùng thì vấn đề lại khác. Nó không cần sự đầu tư lớn lao về nguyên liệu, năng lượng. Cơ sở vật chất không cần to lớn, lộ liễu. Nó có thể núp bóng dưới vỏ bọc của một công trình bình thường, thậm chí là “nhân đạo” như sản xuất chất kháng sinh, vaccine. Con đường này thật hấp dẫn đối với những kẻ muốn triển khai một cuộc chiến tranh vi trùng. Nếu như chiến tranh bằng bom vi trùng xảy ra thì sức tàn phá của nó sẽ khốc liệt, mang tính toàn cầu chẳng kém gì so với các loại bom hạt nhân. Lịch sử đã cảnh báo cho chúng ta phải biết chặn sớm những nguy cơ đáng sợ này trước khi nó trở thành hiện thực.

Một trong những thành tựu của Công nghệ sinh học nói chung và Công nghệ vi sinh nói riêng là việc ứng dụng Kỹ thuật di truyền để tạo nên những sinh vật đã được biến đổi di truyền GM (*Genetically Modified*). Từ đó đã tạo nên những biến đổi thần kì ở cây trồng và vật nuôi. Kết quả gặt hái được trong các phòng thí nghiệm cũng như trên đồng ruộng thực nghiệm khiến các quốc gia tiên tiến, các tư bản tư nhân không chần chừ đầu tư vào lĩnh vực này những khoản kinh phí khổng lồ. Với sự đầu tư đáng kể này, họ đã thu được những kết quả rất khả quan. Có thể nói không ngoa rằng: hầu như mỗi ngày con người đều tạo ra được những loài mới.

Những thực vật chuyển gen đầu tiên được trồng thực nghiệm ngoài đồng ruộng vào năm 1983 như cà chua Flavr-Savr do hãng Calgene sản xuất. Loại cà chua này có đặc điểm, có thể bảo quản, tồn trữ lâu hơn so với cà chua thường, vì ở nó người ta đã cắt bỏ gen có vai trò kích hoạt để sản xuất ra một hóa chất làm cho trái cà chua mềm đi khi chín. Và

cà chua GM đã được bán trên thị trường nước Anh vào 1996. Cũng năm đó, đậu nành GM cũng được trồng, và cho đến nay loại đậu này đã chiếm khoảng 15% sản lượng đậu nành sản xuất trên thế giới. Ở Hoa Kỳ, một số loại cây trồng GM thu được đã cho năng suất cao, chống chịu tốt đối với các tác nhân gây hại (sâu rầy, cỏ dại) như cây ngô GM đã được hãng Ciba Geigy lai tạo đã trồng trên diện tích 200.000ha, cây bông có ghép gen chống thuốc diệt cỏ, cây lúa có ghép gen Bt chống được côn trùng gây hại và các cây củ cải đường GM, đậu nành GM cũng được lần lượt lưu hành trên thị trường. Cây đậu nành GM đã được sử dụng làm vật liệu chính, phụ hay chất phụ gia trong khoảng 30.000 loại thực phẩm bán khắp thế giới.

Theo Le Figaro Magazine, năm 1996 trên thế giới đã có 2,5 triệu ha đất được trồng các giống cây lai tạo gen. Ước tính thị trường này sẽ đạt 20 tỉ USD chỉ trong vòng 4 năm (từ 1996 đến 2000).

Khi các sản phẩm GM đi vào đời sống xã hội, nó được con người đón nhận và sử dụng một cách hồ hởi. Nhưng cũng từ thực tế triển khai nghiên cứu, ứng dụng này đã làm nảy sinh ở mọi người những suy tư đáng lưu ý. Hiện nay trong nội bộ cộng đồng các nhà khoa học có nhiều ý kiến rất khác nhau đánh giá về các sản phẩm GM. Có những người ủng hộ, có ý kiến đánh giá cao các sản phẩm GM. Ngược lại, cũng có những người bên cạnh ý kiến đánh giá những mặt ưu việt của các sản phẩm GM còn có những ý kiến dè dặt, lo âu. Họ cho rằng các nghiên cứu về các sản phẩm này còn chưa đầy đủ, và đặc biệt họ quan tâm đến những nguy cơ tiềm ẩn chưa biết được hết có thể gây ra do các sản phẩm GM lên người tiêu dùng. Theo họ cần phải có những hiểu biết nhiều hơn nữa về sản phẩm GM trước khi bật đèn xanh cho sự phổ biến sử dụng rộng rãi. Với những băn khoăn nói trên, hàng trăm nhà nghiên cứu thực vật, vi sinh vật, di truyền và các chuyên gia về sinh thái học thuộc nhiều quốc gia đã kí vào một văn bản kêu gọi "Cần có một sự kiểm soát các phát minh về di truyền", trong đó họ lưu tâm đến các sinh vật đã được tái tổ hợp gen do con người tạo nên. Theo ý kiến của các nhà khoa học, điều mà họ lo âu nằm ở ba vấn đề sau:

- Bằng cách cài một gen lạ vào một cơ thể, người ta làm thay đổi tổ chức sinh học của nó. Một cách ngẫu nhiên, các mảnh của chế phẩm DNA của thể cho có thể tái tổ hợp với DNA của tế bào thể nhận. Kết quả là sẽ tổng hợp nên những chất lạ (có thể là những chất độc) gây hại cho cá thể nhận. Và virus - cụ thể là bacteriophage khi được sử dụng làm thể mang chịu trách nhiệm đưa một gen nào đó vào tế bào nhận có thể gây nên những đột biến và do đó dẫn đến ung thư ở những sinh vật nhận gen.

Người ta cho rằng: chưa có gì bảo đảm cho tính an toàn trong việc lai ghép gen giữa các cá thể !

- Vấn đề thứ 2: Chưa khống chế được kĩ thuật ghép gen. Do đó chưa tạo được sự ổn định của các giống cây, con GM được tạo thành. Cụ thể: người ta lo ngại các loại gen kháng cự (gen kháng kháng sinh, gen chống chất diệt cỏ ...) sẽ rất có thể “nhảy” từ cá thể này sang cá thể khác trong quần thể sinh vật. Kết quả sẽ tạo nên những loài cỏ dại “siêu cỏ” không thể tiêu diệt được vì chúng đã vô tình tiếp nhận các gen chống thuốc diệt cỏ. Ở một thí nghiệm khác, các nhà khoa học Anh đã phát hiện gen kháng ampicillin được cấy vào cây bắp Ciba Geigy đã được truyền sang các vi khuẩn sống trong ống tiêu hóa của bò được nuôi bằng bắp sống. Kết quả là số vi khuẩn ở trong ống tiêu hóa này cũng trở nên kháng ampicillin.

- Vấn đề cuối cùng là tính đa dạng sinh học vốn làm nên sự phong phú của hành tinh liệu có bị đe dọa bởi sự chọn lọc mạnh mẽ bằng công nghệ mới này không? Người ta ái ngại khi nghĩ rằng đến một thời điểm nào đó chỉ còn lại vài loại lúa, ngô, đậu có những đặc tính ưu việt nhất được con người trồng và thu hoạch. Các loại cây trồng khác bị lãng quên sẽ bị mất dần đi. Điều này chắc chắn sẽ ảnh hưởng lớn đến sự cân bằng sinh thái trong tự nhiên, một quy luật mà con người đang phấn đấu gìn giữ.

CHƯƠNG II

CƠ SỞ HÓA SINH HỌC, DI TRUYỀN HỌC CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH

I. PHÂN LOẠI SẢN PHẨM

Các chất được sản xuất bằng con đường lên men nhờ vi sinh vật rất đa dạng. Để tiện cho việc nghiên cứu và ứng dụng, người ta đã tiến hành phân loại sản phẩm lên men công nghiệp dựa vào các tiêu chuẩn sinh lý trao đổi chất của vi sinh vật. Sự phân loại nêu dưới đây đã được đơn giản hóa đi nhiều (vì không dẫn ra các sản phẩm phụ).

1. Vật chất tế bào (*sinh khối*)

Việc tổng hợp sinh khối tế bào là quá trình thực hiện để sản xuất protein vi sinh vật. Quá trình này trùng với quá trình sinh trưởng của vi sinh vật.

Theo chức năng này, trong quá trình tiến hóa đã phát triển những cơ chế điều hòa trao đổi chất bảo đảm một phần lớn đến mức cho phép các chất dinh dưỡng cung cấp sẽ được sử dụng vào quá trình tổng hợp các thành phần của tế bào.

2. Các sản phẩm trao đổi chất

Gồm 4 loại sản phẩm sau:

a) Các sản phẩm cuối cùng của sự trao đổi năng lượng:

Đó là các sản phẩm của quá trình lên men.

Lên men là một trong những con đường của quá trình trao đổi năng lượng. Ngoài việc cung cấp năng lượng cho tế bào, lên men còn cung cấp các sản phẩm rất có giá trị đối với đời sống con người. Đó là các sản phẩm: ethanol, acid acetic, acid lactic, acid propionic, khí methane ...

b) Các chất trao đổi bậc I:

– Là những viên gạch cấu trúc nên vật chất của tế bào. Trong số các cao phân tử sinh học thì đây là những chất có phân tử lượng thấp: các amino acid, nucleoside, nucleotide, đường.

- Là sản phẩm của quá trình trao đổi chất trung gian. Ví dụ như các acid hữu cơ của chu trình Tricarboxylic.

c) Các chất trao đổi bậc II:

Là những chất trao đổi có phân tử lượng thấp, không gặp trong mọi cơ thể vi sinh vật. Những chất này không có chức năng chung trong trao đổi chất của tế bào. Ví dụ: các chất kháng sinh, các độc tố, các chất có hoạt tính kích thích sinh trưởng như gibberellin.

Có ý kiến cho rằng các chất trao đổi bậc II là những chất có chức năng nào đó trong việc giúp sinh vật tồn tại trong những điều kiện sinh thái nhất định. Ví dụ: chất kháng sinh có vai trò giúp vi sinh vật đối kháng với những cơ thể khác trong môi trường sống tự nhiên, độc tố do nấm gây bệnh tạo ra có hại cho cây, con chủ mà nó kí sinh ...

d) Enzyme:

Là những protein xúc tác cho sự biến đổi các chất của tế bào. Mỗi tế bào vi sinh vật có khoảng 1.000 loại enzyme, với số phân tử lên đến 10^6 , bao gồm enzyme nội và ngoại bào. Đó là các enzyme: amylase, protease, cellulase... trong đó enzyme nội bào chiếm đa số.

3. Các sản phẩm của sự chuyển hóa chất

Tiền sản phẩm $\xrightarrow{\text{Tế bào vi sinh vật}}$ Sản phẩm.

Tế bào vi sinh vật thông qua hệ enzyme của mình đóng vai trò xúc tác cho các phản ứng chuyển hóa các chất. Về mặt lí thuyết, những phản ứng này có thể xảy ra nhờ những xúc tác hóa học nào đó. Tuy nhiên các quá trình này đôi khi không thể thực hiện được ở điều kiện bình thường mà chỉ thực hiện được trong điều kiện đặc biệt như ở nhiệt độ và áp suất cao. Trong trường hợp này, sản xuất bằng phương pháp hóa học thuần túy là không kinh tế, người ta sẽ chuyển sang sản xuất bằng công nghệ vi sinh.

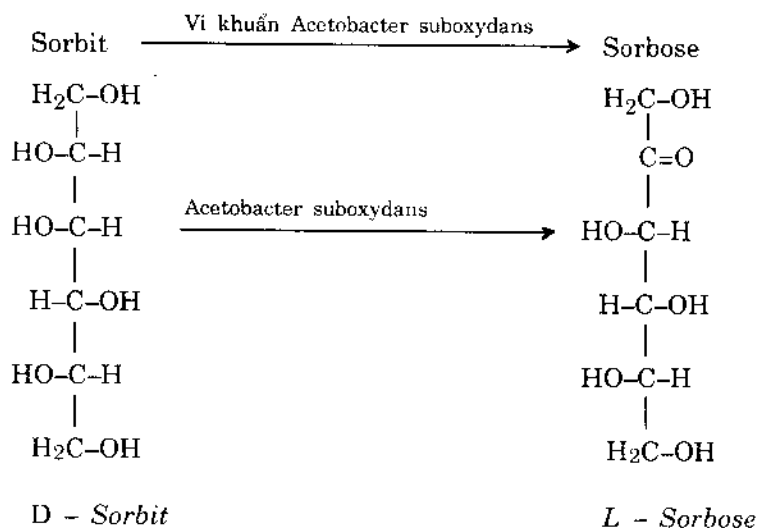
Ta có thể đơn cử một vài quá trình chuyển hóa do vi sinh:

* Sự chuyển hóa ethanol:

Ethanol $\xrightarrow{\text{Vi khuẩn acetic}}$ Acid acetic

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

*** Sự chuyển hóa sorbit:**



(Sorbit sử dụng ở đây thu nhận được bằng con đường tổng hợp hóa học từ glucose. Sorbose thành phẩm là nguyên liệu khởi đầu dùng để tổng hợp hóa học acid ascorbic, tức vitamin C).

II. MỐI LIÊN QUAN GIỮA SINH TRƯỞNG VÀ SỰ TẠO THÀNH SẢN PHẨM

Trong điều kiện nuôi cấy tĩnh, quá trình sinh trưởng của một quần thể vi sinh vật trải qua bốn pha và được biểu diễn thành một đồ thị có dạng hình chữ S. Trong điều kiện nuôi cấy này, toàn bộ quá trình sinh trưởng của vi sinh vật gắn liền với sự thay đổi theo thời gian của các điều kiện nuôi cấy. Trong môi trường, các chất dinh dưỡng theo thời gian sẽ giảm, tương ứng lúc ấy số lượng tế bào vi sinh vật sẽ tăng lên. Đồng thời hoạt tính trao đổi chất của tế bào cũng sẽ thay đổi. Lúc này các sản phẩm trao đổi chất có thể có vai trò khác nhau đối với tế bào.

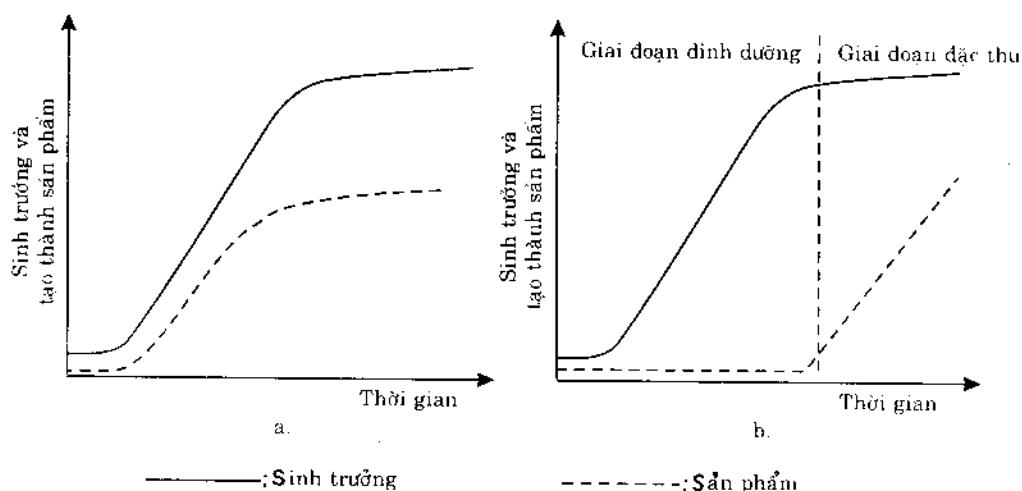
Ta có thể tạm chia các sản phẩm ra làm hai loại:

- Loại sản phẩm mà sự hình thành của nó gắn liền với sinh trưởng của vi sinh vật, như các chất trao đổi bậc I, các enzyme, các sản phẩm của quá trình lên men. Sự tổng hợp các sản phẩm này xảy ra trong thời gian sinh trưởng và còn có thể tiếp diễn sau khi sinh trưởng đã kết thúc.

- Loại các sản phẩm mà sự hình thành của chúng không cần thiết cho sinh trưởng của vi sinh vật, như các chất trao đổi bậc II. Sự tổng hợp các chất này xảy ra sau khi sinh trưởng đã kết thúc (ở vào pha cân bằng).

Giai đoạn này của sự tạo thành sản phẩm được gọi là giai đoạn sản xuất, hay là giai đoạn đặc thù. Tương ứng với giai đoạn sinh trưởng người ta gọi là giai đoạn dinh dưỡng.

Mối liên quan giữa sinh trưởng và sự tạo thành sản phẩm được trình bày ở hình 1.



Hình 1 : Động học của sự sinh trưởng và tạo thành sản phẩm ở vi sinh vật

- Sinh trưởng và sự tạo thành sản phẩm diễn ra đồng thời;
- Sự tạo thành sản phẩm bắt đầu sau khi sinh trưởng đã kết thúc

Tuy vậy cũng có nhiều sản phẩm mà sự hình thành của nó không nằm trong hai trường hợp trên. Tạm gọi là dạng trung gian. Ví dụ như sự hình thành amino acid. Mặc dù sản phẩm này được hình thành ở giai đoạn dinh dưỡng, nhưng nó vẫn còn tiếp diễn sau khi sinh trưởng đã kết thúc vì quá trình tổng hợp các amino acid tiếp diễn trên cơ sở của một sai hỏng về điều hòa trao đổi chất tổng hợp.

Từ đó cho thấy, trong công nghệ lên men đòi hỏi nhà sản xuất phải biết sản phẩm mình cần thu được sinh ra ở giai đoạn nào của quá trình nuôi cấy, đồng thời phải biết tìm mọi biện pháp để tối ưu hóa quá trình nuôi cấy để từ đó sẽ cho hiệu suất tạo sản phẩm cao nhất. Để đạt được sự tối ưu hóa các quá trình lên men, điều cần thiết là phải tìm ra trạng thái sinh lý của vi sinh vật mà ở đó năng suất tạo sản phẩm đạt cao nhất và duy trì nó trong thời gian dài. Có thể coi phương pháp nuôi cấy liên tục là một ví dụ về sự thành công trong việc tìm ra điều kiện nuôi cấy bảo đảm cho vi sinh vật đạt trạng thái sinh trưởng, phát triển tối ưu. Tuy vậy, trong sản xuất các sản phẩm, nhiều khi người ta cũng gặp phải trường hợp vi sinh vật đạt trạng thái sinh trưởng, phát triển tối ưu

không đồng thời với việc cho ra một sản phẩm với hiệu suất cao nhất. Đây quả là một vấn đề khá phức tạp cần có sự đầu tư nghiên cứu.

Trong công nghệ lên men, cái đích cuối cùng cần phải đạt tới là: từ cơ chất ban đầu với một dung tích nổi lên men nhỏ đến mức cho phép, trong thời gian ngắn, có thể thu hoạch sản phẩm mong muốn với năng suất cao nhất. Có như vậy giá thành sản phẩm mới hạ. Một quy trình công nghệ như vậy mới hoàn thiện.

III. NHỮNG NGUYÊN TẮC ĐIỀU HÒA TRAO ĐỔI CHẤT

Trong hoạt động sống của mình, vi sinh vật tạo các sản phẩm trao đổi chất và các thành phần cấu tạo nên tế bào chỉ ở mức cần thiết cho sinh trưởng, phát triển, sinh sản duy trì loài. Có nghĩa là, trong tự nhiên không có sự sản sinh dư thừa các sản phẩm trao đổi chất bậc I, II...

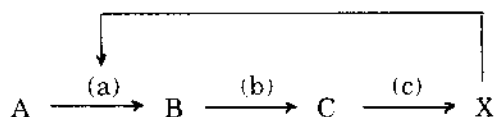
Sự trao đổi chất của tế bào có tính kinh tế này được bảo đảm là nhờ ở vi sinh vật tồn tại các cơ chế điều hòa trao đổi chất tổng hợp phát triển ở mức độ cao.

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

Người ta nhận thấy: sản phẩm cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp một chất có khả năng gây ra sự ức chế quá trình tổng hợp của chính nó.

Sản phẩm cuối cùng dù được tế bào tổng hợp nên hay thu nhận từ môi trường ngoài, khi ở nồng độ dư thừa so với nhu cầu của cơ thể vi sinh vật sẽ ảnh hưởng đến enzyme đầu tiên trong chuỗi sinh tổng hợp.

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



Enzyme đầu tiên (a) là một enzyme dị lập thể. Nó có đặc điểm thay đổi cấu hình không gian khi có mặt sản phẩm cuối cùng nhằm giảm bớt hoạt tính xúc tác của mình. Ở enzyme này, ngoài vị trí gắn với cơ chất A (trung tâm xúc tác), nó còn có một hay nhiều vị trí gắn với sản phẩm cuối cùng X gọi là trung tâm dị lập thể. Trung tâm xúc tác và trung tâm dị lập thể tách biệt nhau về không gian và khác nhau về cấu trúc. Trạng thái hoạt động của enzyme này được đặc trưng ở chỗ: nó có khả năng gắn với cơ chất A và nếu bên cạnh cơ chất A còn có sự hiện diện của X ở mức độ dư thừa so với nhu cầu của cơ thể vi sinh vật, thì sẽ xảy ra sự bao vây của trung tâm dị lập thể, làm cho trung tâm xúc tác bị biến đổi

cấu hình không gian đến mức khiến cho enzyme (a) không thể gắn được với cơ chất A mà chỉ gắn với X. Như vậy enzyme (a) sẽ không có hiệu lực trong việc chuyển hóa A thành B. Chuỗi sinh tổng hợp X sẽ bị gián đoạn. Do đó X sẽ bị giảm số lượng.

Sự ức chế quá trình sinh tổng hợp này xảy ra nhanh và rất có hiệu quả. Người ta nhận thấy enzyme (a) tuy vẫn được cơ thể vi sinh vật tổng hợp nên nhưng bị bất hoạt.

Sự điều hòa này ở mức độ enzyme.

2. Sự cảm ứng và ức chế quá trình tổng hợp enzyme

Khi trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật có một chất khó đồng hóa, vi sinh vật phải tiết vào môi trường một hoặc vài enzyme tương ứng để phân hủy cơ chất đó thành những chất có thể đồng hóa được. Enzyme được hình thành này gọi là enzyme cảm ứng. Cơ chất kích thích quá trình này - tức chất khó đồng hóa - được gọi là chất cảm ứng.

Sự cảm ứng và ức chế quá trình tổng hợp enzyme ở vi sinh vật đã được F. Jacob và J. Monod giải thích dựa trên cơ sở của học thuyết Operon. Đây là học thuyết đã được F. Jacob và J. Monod đề ra khi nghiên cứu trên đối tượng vi khuẩn đường ruột *Escherichia coli*. Hai ông đã được nhận giải Nobel năm 1966.

Học thuyết Operon giúp làm sáng tỏ cơ chế điều hòa chương trình làm việc của bộ gen đối với quá trình sinh tổng hợp protein - enzyme. Theo Jacob và Monod, phân tử DNA nhiễm sắc thể được phân hóa về mặt chức phận thành một số gen (hình 2).

a) Nhóm gen cấu trúc: Nhóm gen này đảm nhận việc mã hóa cấu trúc của các phân tử protein - enzyme. Các gen này thường xếp liền nhau. Trong trường hợp Lac operon của *E. coli*, các gen cấu trúc gồm ba gen kí hiệu là A, B và C.

- Gen A : mã hóa thứ tự amino acid của β -galactosidase.

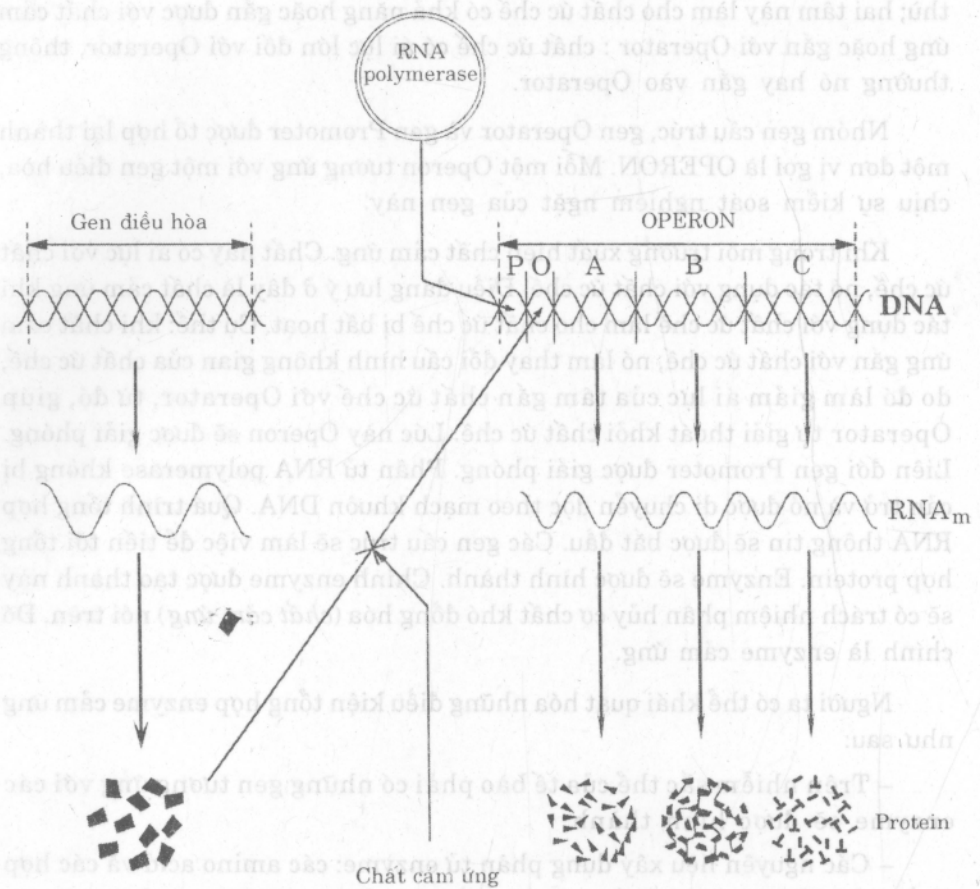
- Gen B : mã hóa cấu trúc của enzyme thẩm thấu galactosidepermease, cần thiết cho quá trình vận chuyển lactose vào tế bào.

- Gen C : mã hóa cấu trúc của enzyme thiogalactoseacetyltransferase.

Cả ba gen cấu trúc nói trên tạo thành một đơn vị phiên mã.

b) Gen điều khiển (Operator):

Là đoạn DNA nằm kề bên nhóm gen cấu trúc, kí hiệu là O. Nhờ tác dụng gắn với chất ức chế, Operator làm việc như một "công tắc" phụ trách việc "đóng mở" hoạt động của nhóm gen cấu trúc.



Hình 2 : Sơ đồ điều hòa sinh tổng hợp protein-enzyme (Theo F. Jacob và J. Monod)

c) Gen khởi động (*Promoter*) – kí hiệu là P:

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

d) Gen điều hòa (*Regulator*):

Gen này chịu trách nhiệm mã hóa việc tổng hợp nên một protein đặc biệt đóng vai trò chất ức chế. Thường nó chỉ được tổng hợp với một lượng không đáng kể trong tế bào (khoảng 10 - 20 phân tử/tế bào). Đặc điểm của chất ức chế: là một protein biến cấu oligomer; có hai tâm đặc

thù; hai tâm này làm cho chất ức chế có khả năng hoặc gắn được với chất cảm ứng hoặc gắn với Operator : chất ức chế có ái lực lớn đối với Operator, thông thường nó hay gắn vào Operator.

Nhóm gen cấu trúc, gen Operator và gen Promoter được tổ hợp lại thành một đơn vị gọi là OPERON. Mỗi một Operon tương ứng với một gen điều hòa, chịu sự kiểm soát nghiêm ngặt của gen này.

Khi trong môi trường xuất hiện chất cảm ứng. Chất này có ái lực với chất ức chế, nó tác dụng với chất ức chế. Điều đáng lưu ý ở đây là chất cảm ứng khi tác dụng với chất ức chế làm cho chất ức chế bị bất hoạt. Cụ thể: khi chất cảm ứng gắn với chất ức chế, nó làm thay đổi cấu hình không gian của chất ức chế, do đó làm giảm ái lực của tâm gắn chất ức chế với Operator, từ đó, giúp Operator tự giải thoát khỏi chất ức chế. Lúc này Operon sẽ được giải phóng. Liên đới gen Promoter được giải phóng. Phân tử RNA polymerase không bị cản trở và nó được di chuyển dọc theo mạch khuôn DNA. Quá trình tổng hợp RNA thông tin sẽ được bắt đầu. Các gen cấu trúc sẽ làm việc để tiến tới tổng hợp protein. Enzyme sẽ được hình thành. Chính enzyme được tạo thành này sẽ có trách nhiệm phân hủy cơ chất khó đồng hóa (*chất cảm ứng*) nói trên. Đó chính là enzyme cảm ứng.

Người ta có thể khái quát hóa những điều kiện tổng hợp enzyme cảm ứng như sau:

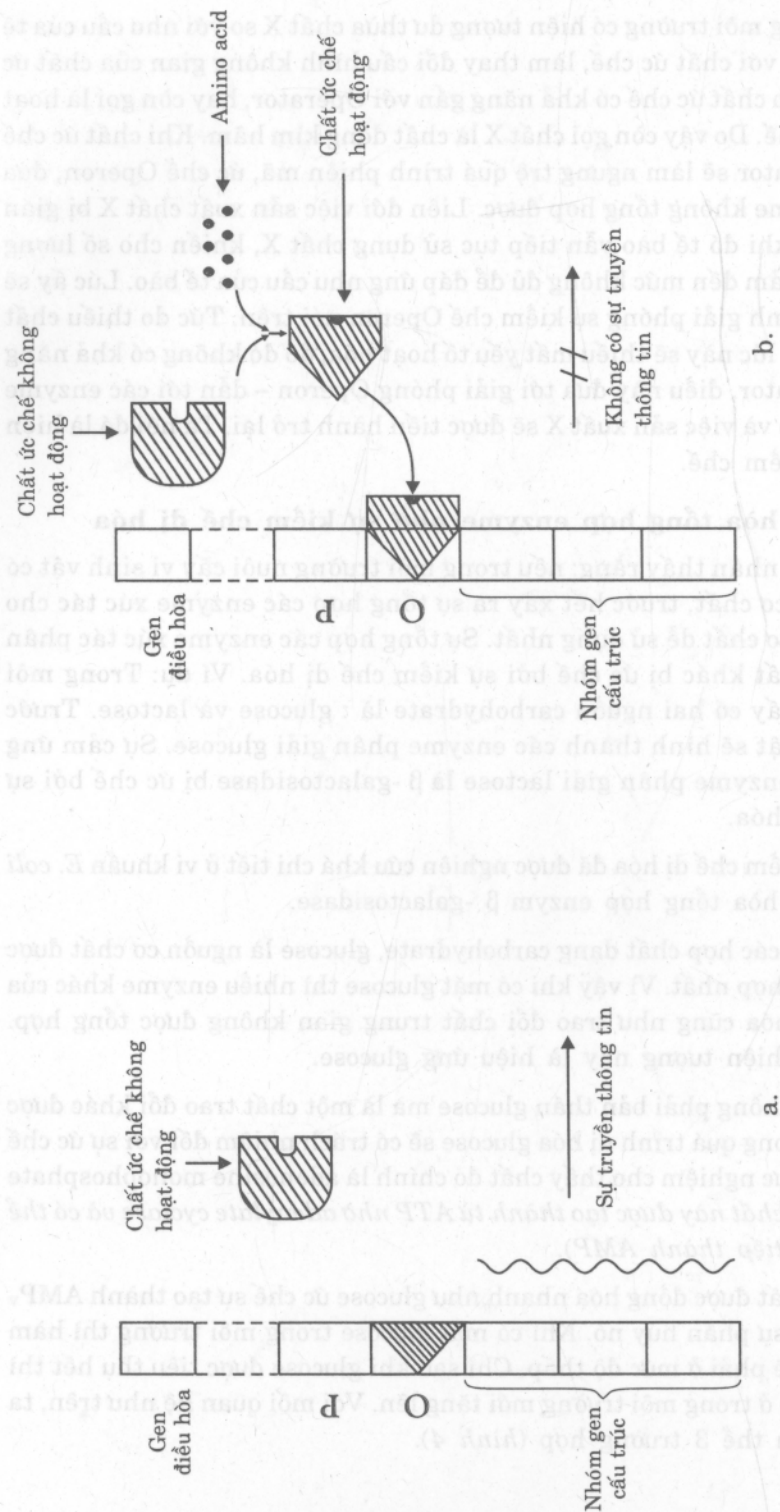
- Trên nhiễm sắc thể của tế bào phải có những gen tương ứng với các enzyme sẽ được hình thành.
- Các nguyên liệu xây dựng phân tử enzyme: các amino acid và các hợp phần của nhóm ngoại (*nếu enzyme cần có nhóm này trong phân tử*).
- Năng lượng cần thiết cho việc hình thành các liên kết.
- Chất cảm ứng.

Theo sơ đồ của Jacob và Monod, dù có ba điều kiện trên mà không có chất cảm ứng thì enzyme cảm ứng cũng không được tạo thành. Như vậy, để hình thành một enzyme cảm ứng phải hội đủ bốn điều kiện: gen, nguyên liệu xây dựng, năng lượng và chất cảm ứng.

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

Trong cơ chế này chúng ta lại gặp lại chất X – là những chất có phân tử khối thấp, là sản phẩm cuối cùng của một chuỗi sinh tổng hợp. Ví dụ X ở đây là một loại amino acid chẳng hạn (*hình 3*).

Người ta nhận thấy X có tác dụng đặc hiệu với chất ức chế (*chất do gen điều hòa tổng hợp nên*).



Hình 3 : Điều hòa tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiểm chế

- a. Không có amino acid, enzyme được tổng hợp;
- b. Có amino acid, enzyme không được tổng hợp

Khi trong môi trường có hiện tượng dư thừa chất X so với nhu cầu của tế bào, X sẽ gắn với chất ức chế, làm thay đổi cấu hình không gian của chất ức chế, khiến cho chất ức chế có khả năng gắn với Operator, hay còn gọi là hoạt hóa chất ức chế. Do vậy còn gọi chất X là chất đồng kim hãm. Khi chất ức chế gắn với Operator sẽ làm ngưng trệ quá trình phiên mã, ức chế Operon, đưa đến các enzyme không tổng hợp được. Liên đới việc sản xuất chất X bị gián đoạn. Trong khi đó tế bào vẫn tiếp tục sử dụng chất X, khiến cho số lượng chất này bị giảm đến mức không đủ để đáp ứng nhu cầu của tế bào. Lúc ấy sẽ xảy ra quá trình giải phóng sự kiểm chế Operon nói trên. Tức do thiếu chất X, chất ức chế lúc này sẽ thiếu mất yếu tố hoạt hóa, do đó không có khả năng gắn với Operator, điều này đưa tới giải phóng Operon – dẫn tới các enzyme được tổng hợp và việc sản xuất X sẽ được tiến hành trở lại. Ta nói đó là hiện tượng giải kiểm chế.

4. Điều hòa tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế dị hóa

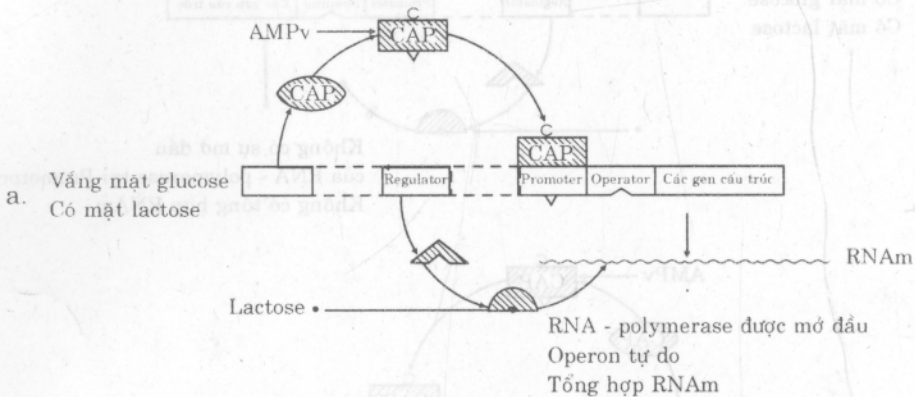
Người ta nhận thấy rằng: nếu trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật có nhiều nguồn cơ chất, trước hết xảy ra sự tổng hợp các enzyme xúc tác cho sự phân giải cơ chất dễ sử dụng nhất. Sự tổng hợp các enzyme xúc tác phân hủy các cơ chất khác bị ức chế bởi sự kiểm chế dị hóa. Ví dụ: Trong môi trường nuôi cấy có hai nguồn carbohydrate là : glucose và lactose. Trước tiên vi sinh vật sẽ hình thành các enzyme phân giải glucose. Sự cảm ứng để tổng hợp enzyme phân giải lactose là β -galactosidase bị ức chế bởi sự kiểm chế dị hóa.

Cơ chế kiểm chế dị hóa đã được nghiên cứu khá chi tiết ở vi khuẩn *E. coli* với việc điều hòa tổng hợp enzym β -galactosidase.

Trong số các hợp chất dạng carbohydrate, glucose là nguồn cơ chất được sử dụng thích hợp nhất. Vì vậy khi có mặt glucose thì nhiều enzyme khác của quá trình dị hóa cũng như trao đổi chất trung gian không được tổng hợp. Người ta gọi hiện tượng này là hiệu ứng glucose.

Thật ra không phải bản thân glucose mà là một chất trao đổi khác được hình thành trong quá trình dị hóa glucose sẽ có trách nhiệm đối với sự ức chế này. Nhiều thực nghiệm cho thấy chất đó chính là adenosine monophosphate vòng (AMP_v) (*chất này được tạo thành từ ATP nhờ adenylate cyclase và có thể bị phân giải tiếp thành AMP*).

Các cơ chất được đồng hóa nhanh như glucose ức chế sự tạo thành AMP_v và kích thích sự phân hủy nó. Khi có mặt glucose trong môi trường thì hàm lượng AMP_v sẽ phải ở mức độ thấp. Chỉ sau khi glucose được tiêu thụ hết thì nồng độ AMP_v ở trong môi trường mới tăng lên. Với mối quan hệ như trên, ta sẽ xem xét cụ thể 3 trường hợp (hình 4).



Hình 4 : Điều hòa tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế dị hóa

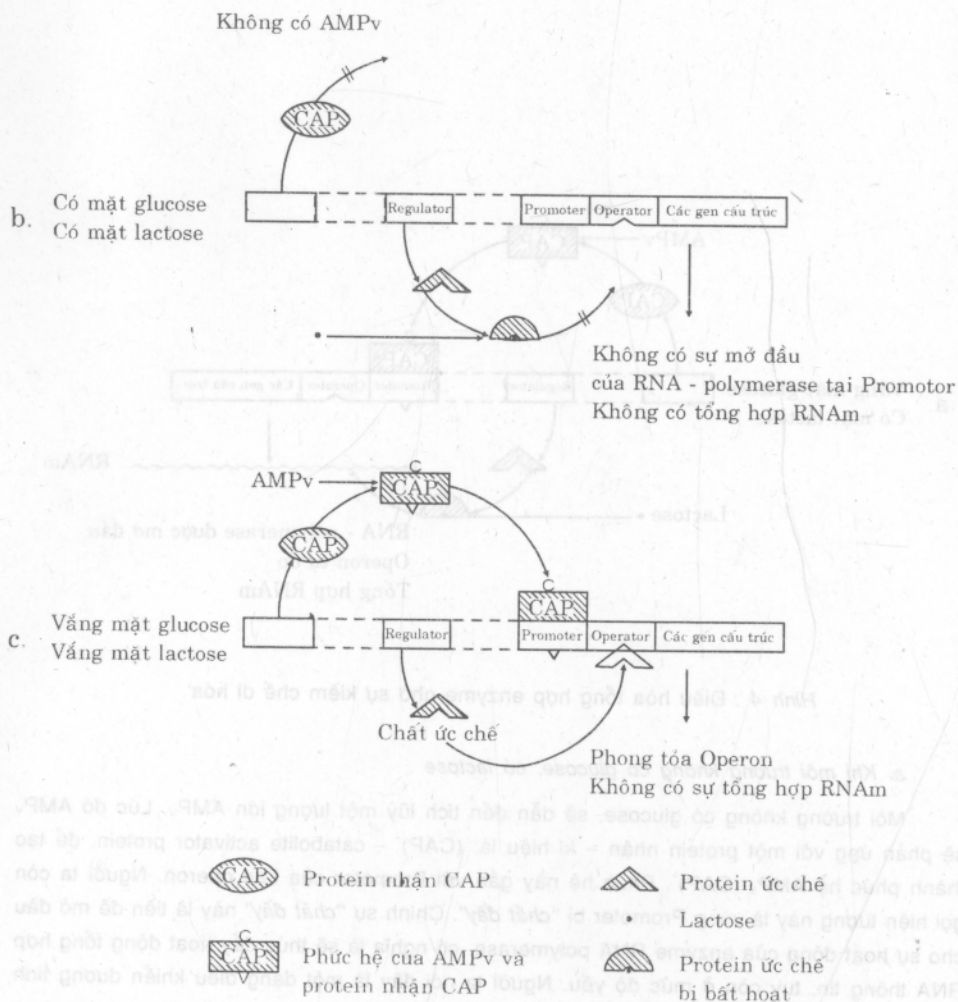
a. Khi môi trường không có glucose, có lactose

Môi trường không có glucose, sẽ dẫn đến tích lũy một lượng lớn AMP_v. Lúc đó AMP_v sẽ phản ứng với một protein nhận -- kí hiệu là: (CAP)⁻ -- catabolite activator protein, để tạo thành phức hệ AMP_v-(CAP)⁻. Phức hệ này gắn với Promoter của Lac operon. Người ta còn gọi hiện tượng này là vùng Promoter bị "chất đầy". Chính sự "chất đầy" này là tiền đề mở đầu cho sự hoạt động của enzyme RNA polymerase, có nghĩa là sẽ thúc đẩy hoạt động tổng hợp RNA thông tin, tuy còn ở mức độ yếu. Người ta nói đây là một dạng điều khiển dương tính trong đó gen được hoạt hóa nhờ sự "chất đầy".

Đồng thời trong môi trường còn có mặt lactose. Lactose sẽ đóng vai trò là một cơ chất cảm ứng. Nó sẽ phản ứng với chất ức chế, làm thay đổi cấu hình không gian của chất ức chế, tạo phức hệ chất ức chế - chất cảm ứng. Điều này khiến cho chất ức chế không gắn được với Operator.

Như vậy Lac operon sẽ được giải phóng.

Ta thấy ở đây RNA polymerase được hai yếu tố hỗ trợ kích thích hoạt động để dẫn tới tổng hợp RNA thông tin và tổng hợp nên β -galactosidase. Người ta nói Lac operon được điều khiển kép.



Hình 4 : Điều hòa tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế dị hóa (tiếp theo)

b. Khi môi trường có lactose, có glucose :

Trong môi trường nếu ngoài lactose còn được bổ sung glucose, thì lúc ấy hàm lượng AMPv sẽ bị giảm đi, hậu quả là (CAP) không tạo được phức hệ với AMPv, do đó không có sự "chất đầy" ở Promotor. Liên đới RNA polymerase sẽ không được mở đầu hoạt động hoặc mở đầu hoạt động yếu. Vì vậy ngay cả khi có mặt cơ chất cảm ứng (lactose) cũng không có sự tổng hợp RNA thông tin -- có nghĩa không có sự tạo thành enzyme.

c. Khi môi trường không có glucose và lactose:

Khi trong môi trường không có glucose như đã phân tích ở trên, RNA polymerase sẽ được mở đầu hoạt động. Tuy nhiên, nếu vắng mặt cả lactose - cơ chất cảm ứng thì chất ức chế sẽ gắn vào Operator nên Operon vẫn bị phong tỏa. Do đó RNA thông tin không được tổng hợp. Không có sự tổng hợp protein - enzyme.

IV. NHỮNG SAI HỒNG DI TRUYỀN CỦA ĐIỀU HÒA TRAO ĐỔI CHẤT VÀ HIỆN TƯỢNG SIÊU TỔNG HỢP

Với những cơ chế điều hòa nói trên, rõ ràng đã giúp cho cơ thể vi sinh vật đảm bảo được hoạt động sống của mình tiến hành một cách nhịp nhàng trên cơ sở tiết kiệm nguyên liệu, năng lượng một cách khéo léo. Đó là *"tính kinh tế"* của quá trình sinh tổng hợp các chất ở vi sinh vật.

Tuy nhiên nếu mọi vi sinh vật đều có hoạt động sống bình thường như vậy, thì không có lí do gì khiến con người quan tâm đặc biệt tới chúng. Vấn đề là trong thực tế tồn tại những cơ thể vi sinh vật mà trong quá trình sống chúng sản sinh một lượng đáng kể các sản phẩm nào đó. Những sản phẩm này lại rất cần cho con người. So với nhu cầu cơ thể vi sinh vật nhỏ bé kia thì lượng sản phẩm đáng kể được tạo thành chắc chắn sẽ dư thừa. Người ta nói: Những cơ thể vi sinh vật này có khả năng siêu tổng hợp một chất nào đó.

Với những thành tựu của khoa học, hiện nay con người đã cố gắng tạo được rất nhiều chủng vi sinh vật có khả năng siêu tổng hợp các chất. Đây là kết quả của quá trình chọn lọc nhân tạo với các phương pháp gây đột biến. Những chủng đột biến này có những sai hỏng di truyền rất đáng được quan tâm. Ta có thể đơn cử một vài ví dụ về các dạng đột biến nói trên như sau:

- Các chủng đột biến bị mất đi cơ chế điều hòa hoạt tính enzyme bằng sản phẩm cuối cùng:

Lợi dụng cơ chế điều hòa hoạt tính enzyme bằng sản phẩm cuối cùng, con người đã tìm cách gây đột biến, làm hỏng trung tâm dị lập thể của enzyme (a), làm cho nó mất khả năng gắn với chất X nhưng bản thân enzyme (a) vẫn còn hoạt tính xúc tác đối với cơ chất A. Do vậy khi có mặt chất X – sản phẩm cuối cùng với số lượng dư thừa so với nhu cầu của vi sinh vật, enzyme (a) vẫn xúc tác chuyển A thành B... đưa đến chất X vẫn được tiếp tục tổng hợp. Chính đây là điều con người mong muốn.

- Các chủng đột biến có sự sai hỏng cơ chế điều hòa tổng hợp enzyme:

Người ta dùng các chất gây đột biến để làm sai hỏng cơ chế điều hòa tổng hợp enzyme. Cụ thể là dùng chạp đến gen điều hòa (*Regulator*) – gen chi phối tạo nên chất ức chế, dẫn đến sự sai hỏng của chất ức chế hoặc thậm chí có thể phá hủy quá trình tổng hợp chất ức chế. Hay có khi đột biến dùng chạp đến gen điều khiển (*Operator*) làm cho gen này mất khả năng gắn với chất ức chế. Kết quả của những tác động trên là ngay cả khi một chất nào đó có nồng độ dư thừa so với nhu cầu của vi

sinh vật, các enzyme cần thiết cho sự tổng hợp của chúng vẫn được hình thành và các chất này vẫn được tiếp tục tổng hợp trong tế bào.

Và còn rất nhiều những ví dụ về các chủng đột biến có khả năng siêu tổng hợp một chất nào đó mà ở đây chưa đề cập đến được.

V. Ý NGHĨA CỦA KỸ THUẬT DI TRUYỀN

Để thu nhận những chủng vi sinh vật đột biến mang những tính trạng mong muốn, con người đã tìm cách tác động vào các quy luật điều khiển quá trình trao đổi chất của vi sinh vật. Kết quả là các tác nhân gây đột biến đã làm thay đổi cấu trúc di truyền của các tế bào. Quá trình này diễn ra trong tế bào vi sinh vật (*in vivo*).

Việc tạo nên những chủng đột biến này dựa trên cơ sở của những hiểu biết về các quy luật di truyền và biến dị của vi sinh vật, dựa trên những kinh nghiệm của công tác lai tạo giống. Những kết quả này tuy cũng đã đánh dấu những bước tiến đáng kể so với phương pháp lai tạo giống bằng cách thu nhận các đột biến qua quá trình chọn lọc tự nhiên, nhưng rõ ràng ở đây con người chưa chủ động tạo được các DNA tái tổ hợp trong điều kiện *in vitro*.

Những thành công của Công nghệ sinh học gần đây cho phép chúng ta dần dần khắc phục được những hạn chế nói trên. Những hiểu biết về sinh học phân tử, di truyền học và công nghệ gen – cụ thể là các phương pháp của kỹ thuật di truyền, đã tạo điều kiện cho sự gây tạo các chủng đột biến một cách định hướng hơn và có hiệu quả tốt hơn nhiều. Cụ thể là con người có thể kiến tạo một cách có định hướng một bộ gen ở bên ngoài cơ thể trong điều kiện *in vitro*, rồi sau đó đưa vào cơ thể sống để cuối cùng sẽ tạo nên những cơ thể có những tính trạng mà con người mong muốn một cách chủ động. Đây là một hình thức gây tạo giống hết sức chủ động.

Như vậy ở đây nổi lên một vấn đề: có quá trình chuyển gen, tức truyền nguyên liệu di truyền từ cơ thể sống này sang cơ thể sống khác.

Qua thực nghiệm người ta đã phát hiện ra một điều hết sức lí thú: con người có thể chuyển những đoạn gen từ sinh vật này sang một sinh vật khác có mức độ khác biệt rất lớn về di truyền. Nếu nói văn hoa một chút có nghĩa là: con người đã cắt đi cái hàng rào giữa các loài do tạo hóa gây dựng nên để cản trở sự giao phối khác loài, nhằm bảo tồn tính đặc trưng của loài.

Tuy vậy những cố gắng nêu trên mới chỉ là những thành công bước đầu.

VI. NHỮNG HIỂU BIẾT VỀ CHUYỂN TẢI GEN

Đây là một vấn đề khá mới mẻ và phức tạp. Chúng ta sẽ tìm hiểu khái quát hai vấn đề sau đây của kĩ thuật di truyền:

- Những cấu trúc tham gia chuyển tải gen.
- Quá trình thuần hóa và chuyển tải gen nhờ vi sinh vật.

1. Những cấu trúc tham gia chuyển tải gen, còn gọi là thể mang (*vector*)

Các vector chuyển gen phải thỏa mãn những yêu cầu tối thiểu sau:

- Là các đoạn phân tử DNA có khả năng tự sao chép tích cực trong tế bào chủ, tồn tại độc lập trong tế bào không phụ thuộc sự sao chép của bộ gen tế bào chủ.

- Có kích thước nhỏ, càng nhỏ càng tốt vì vector có kích thước càng nhỏ thì càng dễ xâm nhập vào tế bào vi khuẩn khác và càng được sao chép nhanh và có hiệu quả.

- Có những trình tự nhận biết duy nhất của các enzyme giới hạn (RE).

- Có khả năng chứa mẫu DNA ngoại lai.

- Có gen đánh dấu - tức gen chỉ phối hình thành tính trạng có khả năng biểu hiện ra bên ngoài để dễ nhận biết. Gen đánh dấu được gọi là Marker. Chính nhờ Marker, người nghiên cứu nhận biết và dễ dàng tách các tế bào có chứa gen cần chuyển tải ra khỏi quần thể vi khuẩn. Ví dụ: người ta thường dùng gen chỉ phối tính trạng đề kháng với chất kháng sinh làm gen đánh dấu. Trong môi trường có chứa kháng sinh thì chỉ những vi khuẩn có mang gen kháng kháng sinh mới sống sót.

Trong số các cấu trúc được sử dụng tham gia chuyển tải gen có thể kể đến plasmid, phage, cosmid, YAC.... Ở đây sẽ tìm hiểu kĩ hai *thể mang* chính và phổ biến dùng cho vi sinh vật là plasmid và phage. Số còn lại ít thông dụng hơn và mục đích sử dụng mang tính đặc hiệu hơn.

a) Plasmid:

Ở tế bào Prokaryote, mà cụ thể là ở vi khuẩn, qua kính hiển vi điện tử có thể quan sát được chất nhân là phân tử DNA nguyên vẹn có dạng vòng tròn hình chiếc nhẫn. Đây là nhiễm sắc thể của vi khuẩn - nơi chứa nguyên liệu di truyền của tế bào. Đồng thời bên cạnh nhiễm sắc thể, người ta còn quan sát thấy những cấu trúc dạng hình nhẫn nhỏ hơn gọi là plasmid.

Người ta đã tách plasmid dưới dạng tinh khiết để tìm hiểu cấu trúc và những tính chất của nó. Đặc điểm nổi bật của plasmid: có cấu tạo từ DNA, có khả năng tự nhân đôi một cách độc lập, có khả năng tồn tại

một cách độc lập với bộ gen của vi khuẩn cũng như có thể gắn vào bộ gen của vi khuẩn. Người ta coi plasmid là phần tử di truyền nằm ngoài bộ máy di truyền của vi khuẩn.

Cho đến nay con người đã phát hiện được plasmid ở tế bào của nhiều nhóm Prokaryote; ở Eukaryote chỉ mới thấy ở nấm men.

Ngoài ra plasmid còn có hàng loạt những đặc điểm riêng rất thú vị khác.

*** Plasmid tham gia vào cơ chế tái tổ hợp gen nội bào:**

Khi plasmid thực hiện quá trình tự nhân đôi, nó sẽ tạo ra những vòng nhẵn dính liền nhau tựa như một chuỗi nhẵn. Những cấu trúc này gọi là các caten. Các caten sẽ đứt đoạn ra, đưa các plasmid về dạng thẳng. Và nếu như lúc đó bên cạnh có nhiễm sắc thể lớn của vi khuẩn khi sinh sản cũng bị đứt ra tạo thành những đoạn thẳng thì các đoạn thẳng của plasmid và nhiễm sắc thể của vi khuẩn có thể gắn lại với nhau tạo thành một thể thống nhất.

Diễn biến trên cho thấy quá trình hình thành của DNA tái tổ hợp trong một tế bào. Như vậy các plasmid của vi khuẩn có thể lọt vào trong phân tử DNA nhiễm sắc thể của vi khuẩn và ngược lại những đoạn DNA của nhiễm sắc thể của vi khuẩn có khả năng xâm nhập vào trong các plasmid hình nhẵn nhỏ. Sự trao đổi thông tin như vậy trong tế bào khi vi khuẩn nhân lên sẽ truyền cho các tế bào con cháu. Những tế bào con có thể không giống mẹ nó ở một điểm nào đó bởi vì chúng chứa một nhiễm sắc thể khác và một plasmid khác. Đây là cơ chế tái tổ hợp gen nội bào.

Chính nhờ cơ chế tái tổ hợp gen nội bào này mà ta có thể giải thích tại sao xảy ra sự biến đổi tính chất rất kì lạ của vi khuẩn, sự phản ứng tức thì của chúng đáp lại những thay đổi của môi trường ngoài hay khả năng sống sót mãnh liệt của chúng...

*** Plasmid có khả năng di chuyển từ một vi khuẩn này sang vi khuẩn khác bằng cầu nối tiếp hợp** – nghĩa là bằng con đường “hữu tính”. Khả năng này chỉ xảy ra ở những plasmid cỡ lớn (từ 20.000 đến 40.000 cặp nucleotide).

Ở vi khuẩn, tế bào chưa có sự phân hóa về giới tính (nghĩa là không có cá thể đực, cái như ở sinh vật bậc cao). Tuy vậy, người ta cũng quan sát thấy có những dấu hiệu ban đầu của sự phân hóa giới tính ở vi khuẩn. Trong số các plasmid ở tế bào vi khuẩn có plasmid được gọi là *plasmid giới tính*, chúng mang nhân tố giới tính F (*Fertility Factor*). Các tế bào mang nhân tố giới tính F được gọi là tế bào “đực”, còn tế bào không mang nhân tố giới tính F được gọi là tế bào “cái”. Plasmid giới tính chứa gen mã hóa

một loại enzyme đặc biệt. Hoạt động của enzyme này thể hiện ở chỗ tạo ra trên bề mặt của vỏ tế bào vi khuẩn những sợi nhung mao hình ống, có bản chất protein. Thông qua những sợi nhung mao hình ống này DNA được vận chuyển từ tế bào vi khuẩn này sang tế bào vi khuẩn khác. Quá trình di chuyển xảy ra như sau: thoát tiên một trong hai mạch đơn DNA của vi khuẩn “đực” (có mang một phần hay toàn bộ plasmid) đứt ra ở chỗ gọi là “điểm vận chuyển”; sau đó, phân tử DNA này theo đường ống nhung mao đột nhập vào tế bào chất của vi khuẩn “cái”. Ở tế bào mới, nó sẽ sinh sản, tức tự nhân lên. Ở tế bào có plasmid hợp nhất với nhiễm sắc thể của vi khuẩn thì tần suất tái tổ hợp giữa tế bào “đực” và tế bào “cái” sẽ cao hơn. Tế bào đó gọi là tế bào Hfr (*High frequency of recombination*).

Diễn biến này cho chúng ta một liên tưởng: hiện tượng này giống với hiện tượng bacteriophage xâm nhập vào trong tế bào vi khuẩn bằng cách bơm DNA của chúng vào trong tế bào vi khuẩn.

Có ý kiến cho rằng: plasmid vốn dĩ là những phage mà vi khuẩn “nuốt” vào nhưng không tiêu hóa được, nhưng cũng không cho nó phát triển. Kết cục đưa tới một kiểu chung sống hòa bình độc đáo về phương diện tiến hóa và có lợi cho cả hai cơ thể.

* Plasmid có khả năng vận chuyển gen:

Trên cơ sở của tính chất thứ hai, người ta nhận thấy plasmid có đặc điểm cực kì quý báu là có khả năng chuyển gen.

Plasmid có thể làm “vật chủ trung gian” – vector, tức là những cấu trúc có khả năng tự sinh sản, có khả năng gắn kết vào mình những gen lạ, rồi lại chuyển giao những gen lạ này cho một tế bào khác. Các vector như vậy rất hấp dẫn đối với các nhà nghiên cứu.

Cùng với việc chuyển giao thông tin di truyền với các cơ thể khác, các plasmid còn truyền cho các tế bào nhận những đặc điểm quan trọng của mình như:

- Tính đề kháng với các chất kháng sinh, kim loại nặng (như Hg, Cd ...) và tia cực tím.

- Đặc tính tham gia trực tiếp hay gián tiếp vào quá trình sinh tổng hợp một số chất kháng sinh, trong đó có cả những kháng sinh bị đề kháng bởi chính vi khuẩn đó.

- Đặc điểm sử dụng nguồn carbon khó đồng hóa như: camphor, octane, cồn octane ... làm nguồn dinh dưỡng.

Đây là những đặc điểm quý báu mà hiện nay con người đang cố gắng sử dụng trong Công nghệ vi sinh.

*** Khả năng sinh sản cực kì nhanh chóng và hoạt tính mạnh của plasmid:**

Đây là một đặc điểm hết sức quan trọng trong việc sử dụng plasmid để chuyển gen.

Plasmid có thể ngao du từ tế bào vi khuẩn này sang tế bào vi khuẩn khác với tốc độ lớn. Sau một thời gian ngắn, plasmid có thể xâm nhập vào tất cả các cá thể của chủng vi khuẩn ấy. Có sự kết hợp với DNA của nhiễm sắc thể của vi khuẩn, plasmid tăng hoạt tính của mình lên hàng trăm lần (đường ống nhung mao được xây dựng nhanh hơn, tăng cường sự tiếp xúc giữa các tế bào cho và nhận thông tin di truyền).

Từ khi được phát hiện cho đến nay, các plasmid đã không ngừng được cải tiến, ngày càng mang thêm nhiều đặc tính quý phục vụ cho việc chuyển tải gen. Trong số đó ta có thể đơn cử các plasmid sau:

- **Plasmid thế hệ thứ 2:** Để khắc phục những nhược điểm của plasmid thế hệ thứ 1, các nhà nghiên cứu đã tạo ra một loại plasmid nhân tạo - thế hệ thứ 2. Các plasmid này được tạo nên bằng cách tập trung các đặc tính quý của nhiều plasmid tự nhiên vào một cấu trúc duy nhất. Trong số này được sử dụng nhiều nhất là plasmid pBR 322. Plasmid pBR 322 có kích thước 4.363 bp (cặp base), mang hai gen kháng kháng sinh (Ap^R - kháng ampicillin, Tc^R - kháng tetracycline) và 20 vị trí nhận biết duy nhất của các RE (enzyme giới hạn). Trong một số điều kiện nuôi cấy có thể khuếch đại có chọn lọc làm tăng số plasmid loại này lên đến hơn 1000 bản sao cho một tế bào. Các nhà thực nghiệm cho rằng hầu hết các plasmid hiện nay đều bắt nguồn từ plasmid pBR 322.

- **Plasmid thế hệ thứ 3:** Đây là các plasmid mạnh nhất hiện nay, chúng có được các đặc tính cơ bản sau:

+ Có kích thước nhỏ, nên sao chép rất nhanh trong tế bào vi khuẩn, tạo một số lượng lớn các bản sao.

+ Có mang một chuỗi nucleotide tổng hợp nhân tạo tương ứng với một chuỗi các vị trí nhận biết duy nhất của các RE.

b) Bacteriophage (Phage hay còn gọi là thực khuẩn thể):

Những hiểu biết chi tiết về phage đã được trình bày trong giáo trình Vi sinh vật học đại cương. Ở đây chỉ nêu vắn tắt những đặc điểm của phage có liên quan đến việc sử dụng làm thể mang trong quá trình chuyển gen:

- Phage có kích thước cực nhỏ, qua được nén lọc vi khuẩn.

- Phage thể hiện tính độc đối với vi khuẩn qua chu trình sinh sản gây độc của phage: Phage có khả năng xâm nhập vào tế bào vi khuẩn,

định chỉ quá trình trao đổi chất của tế bào vi khuẩn, lấy nguyên liệu từ tế bào vi khuẩn để xây dựng nên các thành phần của nó kể cả nguyên liệu di truyền. Do vậy hình thành những đoạn DNA tái tổ hợp, bao gồm những đoạn gen của phage và của vi khuẩn. Người ta nhận thấy trong quá trình lắp ráp các thành phần của hạt phage, có từ 1 - 2% phage con vô tình mang đoạn DNA của vi khuẩn có chứa gen mà người ta cần chuyển tải. Sau khi lắp ráp, protein phân hủy (lysozyme) được sản sinh ra làm tan tế bào vi khuẩn và giải phóng các phage con.

- Đồng thời phage mới được hình thành này (ở giai đoạn *prophage*) lại thể hiện tính ôn hòa đối với một loại vi khuẩn khác. Tức khi xâm nhập vào tế bào vi khuẩn này, phage có thể sinh sản mà không gây chết vi khuẩn. Quá trình tái tổ hợp gen xảy ra làm gen cần chuyển tải vô tình được gắn vào bộ nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhận.

Kết quả là vi khuẩn nhận đã có được một đoạn gen từ vi khuẩn cho thông qua nhân vật trung gian là phage.

Qua thực nghiệm cho thấy, việc sử dụng phage làm thể mang có nhiều ưu điểm hơn so với plasmid vì phage có những đặc điểm giúp sự xâm nhập vào tế bào vi khuẩn hiệu quả hơn nhiều so với sự chuyển plasmid vào vi khuẩn.

Một ưu điểm nữa của phage là kích thước đoạn DNA mà nó có thể tiếp nhận lớn hơn nhiều so với plasmid (*plasmid có thể gần 8 - 10 kb DNA* lại, còn *phage có thể tiếp nhận đoạn DNA lại có kích thước 15 - 20 kb*).

2. Quá trình thuần hóa và chuyển tải gen nhờ vi sinh vật

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

Trong kĩ thuật sinh học phân tử, chúng ta không thể không nhắc tới vai trò của enzyme, một công cụ quan trọng giúp các nhà nghiên cứu thực hiện các thao tác trên gen. Enzyme được sử dụng ở đây gồm nhiều loại: nuclease, ligase, polymerase (DNA polymerase và RNA polymerase) ...

Để phục vụ cho quá trình phân tích, xử lí các chế phẩm DNA (RNA), người ta sử dụng hai nhóm enzyme phục vụ hai hướng chính là phân cắt và gắn DNA (RNA).

* **Các enzyme phân cắt DNA (RNA)** được gọi là nuclease. Các nuclease gồm hai nhóm: endonuclease và exonuclease.

Endonuclease là những enzyme cắt DNA ở giữa phân tử. Còn exonuclease cắt từ hai đầu mút của phân tử DNA.

Trong nhóm endonuclease có các enzyme giới hạn (*RE - restriction enzyme*), những enzyme này được các nhà nghiên cứu đặc biệt chú ý vì chúng có những đặc tính rất quý (có tính đặc hiệu rất cao, chỉ cắt DNA ở những chỗ nhất định chứ không linh động). Chúng nhận biết DNA mạch kép ở những trình tự nhất định thường được gọi là những điểm nhận biết và cắt DNA ở ngay điểm này hay điểm kế cận. Các điểm nhận biết này thường có trình tự 4-6 cặp nucleotide đối xứng đảo ngược nhau được gọi là các palindrome. Mỗi RE có trình tự nhận biết đặc trưng. Đã có nhiều nghiên cứu về nhóm enzyme này. Từ năm 1962, V. Arber đã chứng minh rằng có những enzyme đặc biệt hoạt động trong tế bào vi khuẩn. Chúng có khả năng phân biệt DNA "của mình" với DNA "lạ" của phage. Các enzyme này "hạn chế" khả năng sinh sản của phage trong tế bào vi khuẩn bằng cách phân hủy DNA của phage một cách chọn lọc. Do vậy các enzyme này được gọi là enzyme giới hạn. Hiện nay người ta đã phát hiện trên 500 loại RE, trong đó có hơn 100 loại RE đã được bán trên thị trường. Cho tới nay hệ thống các RE chỉ được phát hiện ở các nhóm sinh vật nhân sơ Prokaryote, chưa có hệ thống nào tương tự được phát hiện ở Eucaryote - nhóm sinh vật có nhân hoàn chỉnh.

Do đặc tính cơ bản của các RE là có khả năng nhận biết và cắt ở một trình tự xác định trên phân tử DNA, nên dựa vào khả năng này, người ta chia RE làm ba loại:

- *Loại I*: Khi enzyme nhận biết được trình tự, nó sẽ di chuyển trên phân tử DNA đến cách đó khoảng 1000 - 5000 nucleotide và cắt.
- *Loại II*: Enzyme nhận biết được trình tự và cắt ngay tại vị trí đó.
- *Loại III*: Enzyme nhận biết một trình tự và cắt DNA ở vị trí cách đó khoảng 20 nucleotide.

Trong ba loại RE nói trên, RE loại II được quan tâm và sử dụng nhiều trong lĩnh vực thực nghiệm sinh học phân tử.

*** Các enzyme gắn:**

Trong nhóm này, người ta sử dụng phổ biến các enzyme xúc tác sự hình thành liên kết nối 2 đoạn DNA (*DNA ligase*) hay RNA (*RNA ligase*). Trong số các ligase thường sử dụng có thể kể đến:

- *E. coli* DNA ligase: Enzyme được trích li từ trực khuẩn *E. coli* và xúc tác phản ứng nối hai trình tự DNA có đầu so le.

- T₄ DNA ligase: Có nguồn gốc từ phage T₄ xâm nhiễm *E. coli*. Enzyme này có cùng chức năng với ligase trích từ *E. coli* nói trên, nhưng đặc biệt còn có khả năng nối hai trình tự DNA đầu bằng nên là ligase được chuộng nhất trong kĩ thuật tạo dòng.

- T₄ RNA ligase: Enzyme được trích li từ phage T₄ xâm nhiễm *E. coli*, xúc tác quá trình nối hai trình tự RNA bằng liên kết phosphodiester.

Quá trình thuần hóa và chuyển gen có thể tạm chia làm 3 bước như sau :

a) Thu nhận gen cần chuyển :

Có thể thu nhận gen trực tiếp từ bộ gen bằng cách lacc cơ học hay cắt bằng RE hoặc tổng hợp hóa học theo trình tự nucleotide đã biết của gen hoặc sinh tổng hợp gen từ RNA_m của nó nhờ enzyme phiên mã ngược reverse transcriptase.

b) Tạo vector tái tổ hợp :

Sau khi có được gen ở dạng thuần khiết, người ta gắn nó vào các vector để tạo vector tái tổ hợp.

Trước tiên người ta cắt vector và gen bằng cùng một loại RE tại những trình tự nhận biết của nó. Như vậy, ở 2 đầu đoạn gen cần chuyển và 2 đầu vector bị cắt có những đầu dính (trình tự DNA mạch đơn bổ sung nhau). Trộn lẫn DNA cần chuyển và vector, các đầu dính sẽ bắt cặp với nhau. Dùng ligase để hàn dính lại, người ta có vector tái tổ hợp.

Nếu đoạn gen cần chuyển có đầu mút bằng, người ta dùng biện pháp tạo đoạn nối linker bằng cách tổng hợp hóa học. Đó là những đoạn gồm 10 - 20 nucleotide, có trình tự nhận biết của RE. Các linker được gắn vào 2 đầu đoạn gen cần chuyển (dùng ligase), sau đó cắt bằng RE, rồi cũng trộn với vector và hàn dính bằng ligase.

Một cách khác là xử lí đoạn gen và vector bằng enzyme terminal transferase để tạo các đầu dính là các đuôi homopolymer ở đầu mút 3'OH. Sau đó xử lí với DNA polymerase I và ligase thích hợp để thu vector tái tổ hợp.

c) Chuyển vector vào tế bào nhận, làm clone hóa các gen (tức nhân bản các gen) vừa được tạo nên trong tế bào nhận, chọn ra dòng tế bào chứa gen mong muốn.

Bước quan trọng tiếp theo của quá trình chuyển tải gen là chuyển các vector tái tổ hợp đã tạo thành trong điều kiện *in vitro* vào tế bào nhận thích hợp. Đối với vector là plasmid, đây là quá trình biến nạp, được hỗ trợ bằng nhiều cách khác nhau. Đối với vector là phage, nó có khả năng tự động thực hiện tải nạp với hiệu suất cao hơn nhiều. Tùy đối tượng nhận gen và yêu cầu cụ thể mà người ta lựa chọn áp dụng phương pháp nào hiệu quả nhất.

- Ở vi sinh vật : Ở *E. coli*, xử lí tế bào bằng CaCl₂ ở nhiệt độ thấp để làm cho màng tế bào trở nên dễ tiếp nhận plasmid. Ở một số vi khuẩn

khác và nấm men, phải xử lí để tạo dạng tế bào trần (protoplast) vì chỉ như vậy biến nạp mới thực hiện được.

- Ở tế bào thực vật: Hiện có hai kĩ thuật chuyển gen chủ yếu vào tế bào thực vật.



Hình 5 : *Agrobacterium tumefaciens* tạo khối u ở cây cà chua

+ Phương pháp thứ 1: Dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và *Agrobacterium rhizogens* làm phương tiện (vector) chuyển gen. Những vi khuẩn này thường tạo những khối u cho cây (hình 5), chúng tạo ra các vết thương ở cây và thông qua đó chuyển một phần DNA của nó (các *Ti plasmid* và *Ri plasmid*) vào tế bào thực vật.

+ Phương pháp thứ 2: Sử dụng các phương pháp cơ, lí như tạo sốc điện, điện thấm và bắn bi bọc DNA vào tế bào thực vật.

- Đối với tế bào động vật: Vì không có những vector chuyển gen chuyên biệt thích hợp cho tế bào động vật như ở tế bào thực vật và vi sinh vật có thể sử dụng các phương pháp như:

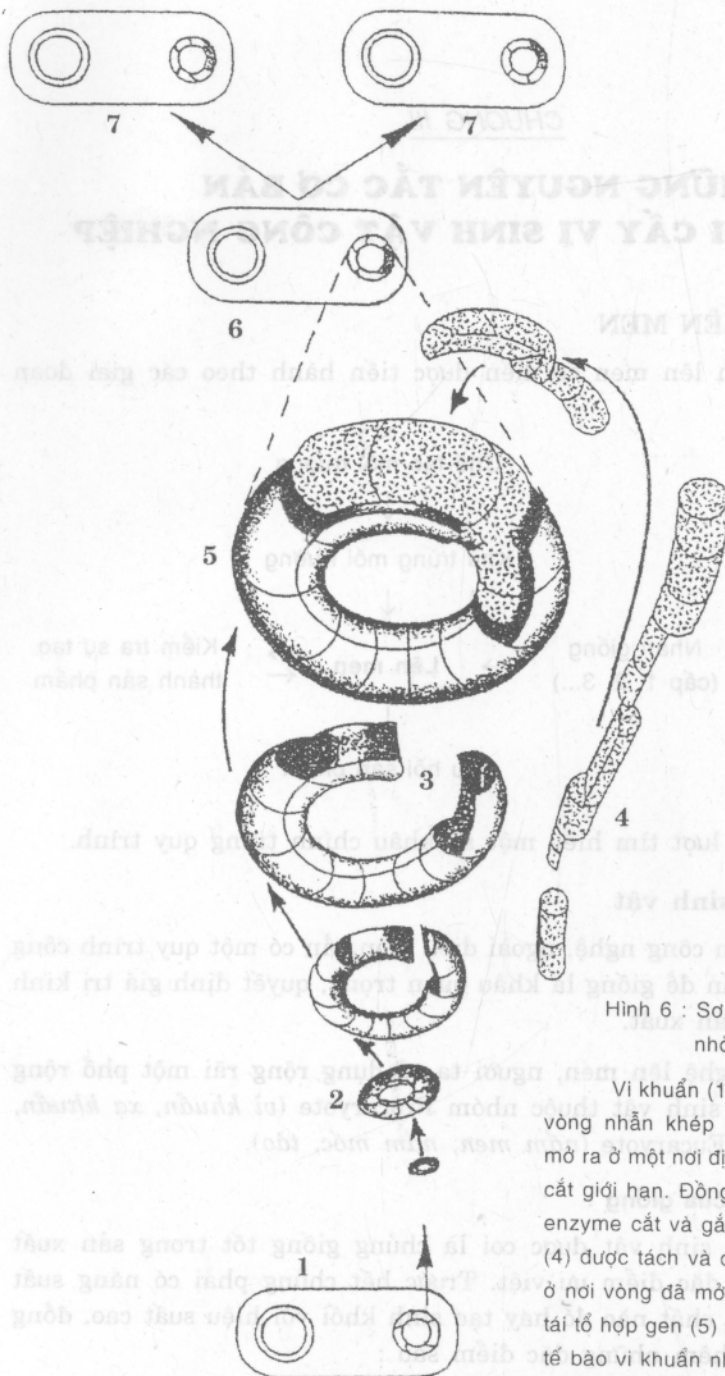
+ Phương pháp hấp thụ ngẫu nhiên DNA.

+ Phương pháp vi tiêm (Microinjection).

+ Phương pháp thấm điện (Electroporation).

Từ quần thể tế bào thu được sau quá trình chuyển gen nói trên, người ta kiểm tra lại để xác nhận sự có mặt của các gen cần chuyển tải. Sau đó cho các dòng tế bào này nhân lên một cách liên tục và như vậy các gen cần chuyển tải được nhân lên vô số bản sao.

Ta có thể theo dõi quá trình chuyển tải gen nhờ thể mang là plasmid qua hình 6.



Hình 6 : Sơ đồ chuyển tải gen nhờ plasmid

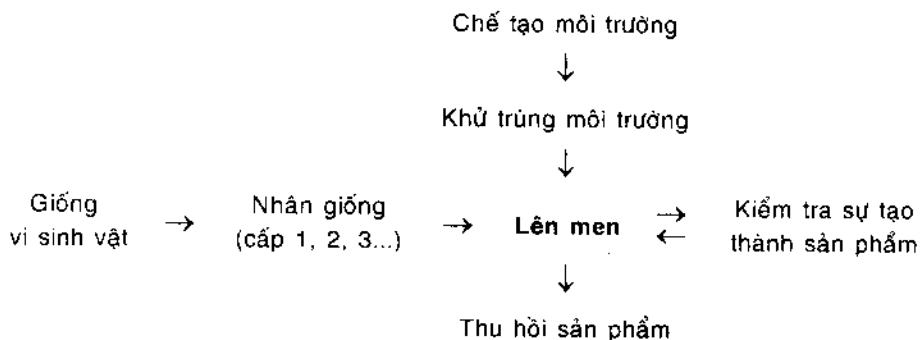
Vi khuẩn (1) với plasmid (2) là một vòng nhân khép kín, plasmid này được mở ra ở một nơi định sẵn (3) nhờ enzyme cắt giới hạn. Đồng thời cũng nhờ các enzyme cắt và gắn, gen cần chuyển tải (4) được tách và được ghép vào plasmid ở nơi vòng đã mở sẵn. Plasmid đã được tái tổ hợp gen (5) sẽ được đưa trở lại vào tế bào vi khuẩn nhận (6) và sự nhân lên của tế bào (6) có chứa plasmid với gen cần chuyển tải tạo ra các thế hệ tế bào thể nhận tiếp theo (7).

CHƯƠNG III

NHỮNG NGUYÊN TẮC CƠ BẢN CỦA NUÔI CẤY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

I. QUY TRÌNH LÊN MEN

Một quy trình lên men cổ điển được tiến hành theo các giai đoạn chính sau:



Chúng ta lần lượt tìm hiểu một số khâu chính trong quy trình.

1. Giống vi sinh vật

Trong lên men công nghệ, ngoài điều kiện cần có một quy trình công nghệ hợp lý, thì vấn đề giống là khâu quan trọng, quyết định giá trị kinh tế của quy trình sản xuất.

Trong công nghệ lên men, người ta sử dụng rộng rãi một phổ rộng gồm nhiều loại vi sinh vật thuộc nhóm Procaryote (*vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn lam*) và Eucaryote (*nấm men, nấm mốc, tảo*).

a) Tiêu chuẩn của giống :

Một chủng vi sinh vật được coi là chủng giống tốt trong sản xuất phải hội tụ nhiều đặc điểm ưu việt. Trước hết chủng phải có năng suất sinh tổng hợp một chất nào đó hay tạo sinh khối với hiệu suất cao, đồng thời còn phải có thêm những đặc điểm sau :

– Có khả năng sử dụng được các nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm như các phụ phẩm, các nguyên liệu thô ...

- Trong quá trình lên men không tạo sản phẩm phụ không mong muốn đối với nhà sản xuất.

- Ít mắc cảm đối với sự tạp nhiễm do vi sinh vật khác và phage.

- Có sản phẩm hay sinh khối có thể tách dễ dàng ra khỏi môi trường dinh dưỡng.

Tuy nhiên không phải các tiêu chuẩn trên luôn luôn gắn liền nhau và cùng tồn tại ở một đối tượng vi sinh vật nào đó. Các vi sinh vật thuộc nhóm Eucaryote hầu hết có kích thước tế bào lớn hay đa bào dạng sợi. Do vậy việc tách chúng khỏi môi trường dinh dưỡng rất dễ dàng bằng các phương pháp lọc, li tâm thường. Nhưng ở chúng thường tồn tại một quy tắc chung là kích thước tế bào tỉ lệ nghịch với hoạt tính trao đổi chất.

Việc chọn giống vi sinh vật cho một quy trình công nghệ là điều hết sức quan trọng. Để có giống vi sinh vật có hoạt tính cao, người ta phải tìm cách hoàn thiện genotype với các phương pháp: chọn lọc, lai tạo, gây đột biến trong chất liệu di truyền của tế bào hoặc trong hệ thống điều hòa trao đổi chất. Trong vài thập niên gần đây, con người đã sử dụng các phương pháp của kỹ thuật di truyền hiện đại để tạo các chủng giống có những tính chất mong muốn một cách chủ động. Rõ ràng việc hoàn thiện genotype của chủng giống là một việc làm không có điểm dừng và phải làm thường xuyên. Chính vì vậy các chủng giống được dùng trong sản xuất có tính chất ngày một hoàn hảo hơn, đáp ứng ngày một tốt hơn các yêu cầu của con người.

b) Các công việc chủ yếu của công tác giống trong sản xuất :

Trong sản xuất, việc hoạt hóa giống, thường xuyên kiểm tra chất lượng của giống là điều hết sức cần thiết. Phòng kỹ thuật của xí nghiệp lên men phải làm những phần việc sau đây:

- Kiểm tra độ thuần khiết của giống trong lên men.

- Kiểm tra khả năng hồi biến của giống. Hầu hết các chủng vi sinh vật dùng trong sản xuất là những chủng đột biến. Ở các chủng đột biến, khả năng hồi biến (*trở về tính chất của chủng gốc*) là hiện tượng rất hay xảy ra.

- Hoạt hóa giống sau một thời gian sử dụng. Để hoạt hóa giống người ta sử dụng môi trường có thành phần giàu các chất kích thích sinh trưởng như dịch cao nấm men, nước chiết cà chua, hỗn hợp vitamin, acid béo (Tween-80).

- Giữ giống bằng những phương pháp thích hợp để có thể duy trì tính chất cần có của chủng giống.

c) Các phương pháp giữ giống :

Hiện có 4 phương pháp chính để giữ giống vi sinh vật.

* *Bảo quản trên môi trường thạch, định kì cấy chuyển:*

Giống vi sinh vật được giữ trên môi trường thạch nghiêng (đối với vi sinh vật hiếu khí) hoặc chích sâu vào thạch (đối với vi sinh vật kỵ khí). Các ống giống này được bảo quản ở tủ lạnh ở nhiệt độ 4 - 6°C, được định kì cấy chuyển. Thời gian cấy chuyển có sự khác nhau ở các nhóm vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc ...) nhưng nằm trong giới hạn tối đa là ba tháng.

Phương pháp bảo quản giống này rất đơn giản và thường được dùng phổ biến để bảo quản giống vi sinh vật. Tuy nhiên, nó cho hiệu quả bảo quản không cao vì tính chất của chủng giống dễ bị thay đổi qua nhiều lần cấy chuyển, phải tốn nhiều công sức cho việc cấy chuyển và việc bảo quản chiếm nhiều diện tích.

Để khắc phục nhược điểm của phương pháp cấy chuyển thường xuyên, cụ thể là hạn chế sự phát triển của vi sinh vật trong thời gian bảo quản, tránh cho lớp thạch chứa môi trường bị khô, người ta phủ lên môi trường thạch đã có vi sinh vật phát triển một lớp dầu khoáng như paraffin lỏng. Lớp paraffin này sẽ hạn chế được sự tiếp xúc của vi sinh vật đối với oxygen không khí và hạn chế sự thoát hơi nước của môi trường thạch. Do vậy, ống giống có thể bảo quản được một năm mà giống không bị thoái hóa và tạp nhiễm. Với phương pháp này giống có thể bảo quản ở tủ lạnh ở nhiệt độ 4 - 6°C hay ở nhiệt độ phòng đều được.

* *Giữ giống trong cát hoặc đất sét vô trùng:*

Do cấu trúc hóa lí, cát và đất sét là những cơ chất tốt mang các tế bào vi sinh vật - chủ yếu là các bào tử.

Cát hoặc đất sét được xử lí qua các khâu: làm sạch, sàng lọc qua rây, xử lí bằng hóa chất để bảo đảm đạt độ trung tính, sấy khô và khử trùng để có độ vô trùng tuyệt đối. Sau đó bằng thao tác vô trùng trộn bào tử của các giống vi sinh vật cần bảo quản vào cát hay đất sét trong các ống nghiệm. Dùng paraffin nóng chảy phết lên nút bông của ống nghiệm để giúp cho ống giống không bị ẩm trở lại.

Ngoài cát và đất sét, người ta còn có thể giữ giống trên hạt ngũ cốc, trên silicagel

Phương pháp bảo quản giống này chủ yếu áp dụng cho các nhóm vi sinh vật sinh bào tử như nấm mốc hoặc xạ khuẩn.

* *Giữ giống bằng phương pháp lạnh đông :*

Giữ giống theo phương pháp này dựa trên nguyên tắc ức chế sự phát triển của vi sinh vật bằng cách đưa chúng vào điều kiện lạnh sâu ở -25°

đến -70°C . Để bảo đảm tế bào vi sinh vật không bị chết khi bị làm lạnh sâu người ta cần trộn sinh khối của giống cần bảo quản với dung dịch bảo vệ (hay còn gọi là dung dịch nhũ hóa) như glycerin 15%, huyết thanh ngựa (*loại không cho chất bảo quản*), dung dịch glucose hoặc lactose 10%.... Việc làm lạnh được tiến hành một cách từ từ. Khi độ lạnh đạt -20°C , việc tiếp tục làm lạnh cần đạt tốc độ $1-2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$.

Với phương pháp này cũng cần cấy chuyển và làm lại, nhưng thời gian giữa các lần cấy chuyển được kéo dài hơn so với phương pháp 1. Thời gian cấy chuyển như sau:

Nếu giữ ở $t^{\circ} = -15^{\circ}\text{C}$ đến -20°C : 6 tháng cấy chuyển và làm lại một lần

Nếu giữ ở $t^{\circ} = -30^{\circ}\text{C}$: 9 tháng cấy chuyển và làm lại một lần.

Nếu giữ ở $t^{\circ} = -40^{\circ}\text{C}$: 1 năm cấy chuyển và làm lại một lần.

Nếu giữ ở $t^{\circ} = -50^{\circ}\text{C}$ đến -60°C : 3 năm cấy chuyển và làm lại một lần.

Nếu giữ ở $t^{\circ} = -70^{\circ}\text{C}$: 10 năm cấy chuyển và làm lại một lần.

Phương pháp bảo quản giống này khá đơn giản và tiện lợi, lại cho hiệu quả bảo quản khá cao. Hiện nay nó là một trong những phương pháp được sử dụng khá phổ biến để bảo quản giống vi sinh vật.

*** Giữ giống bằng phương pháp đông khô:**

Về nguyên tắc, cách giữ giống này giống với phương pháp giữ giống bằng lạnh đông, tức vi sinh vật trong quá trình xử lý sẽ được đưa vào nhiệt độ thấp (*lạnh sâu*) ở $t^{\circ} = -60^{\circ}\text{C}$ đến -70°C một cách từ từ với sự có mặt của chất bảo vệ như:

- Glutamate 3% hay
- Lactose 1,2% + pepton 1,2% hay
- Saccharose 8% + sữa 5% + gelatin 1,5% ...

Điều khác biệt với phương pháp lạnh đông là: Để bảo đảm an toàn hơn cho sự sống của tế bào giống, người ta làm thăng hoa phần nước ở trong tế bào và môi trường có chất bảo vệ trong thiết bị đông khô ở áp suất 1.10^{-4} mmHg. Hỗn hợp tế bào giống và dung dịch bảo vệ được chứa trong những ampul thủy tinh có $\phi = 10$ mm hay $\phi = 15$ mm được hàn kín để bảo đảm độ khô và chân không cần thiết. Những ampul này được bảo quản ở $t^{\circ} = 4 - 6^{\circ}\text{C}$ hay ở nhiệt độ phòng.

Phương pháp này được coi là tối ưu, cho hiệu suất bảo quản cao nhất vì có thể giữ giống vi sinh vật qua hàng chục năm vẫn có tỉ lệ sống cao và không bị biến đổi về di truyền, đồng thời chiếm diện tích bảo quản ít nhất.

Thời gian gần đây, cùng với sự phát triển của Công nghệ gen, phương pháp giữ giống vi sinh vật bằng ngân hàng gen cũng được nghiên cứu áp dụng. Tuy có tính ưu việt cao của phương pháp về việc giữ gìn những đặc tính quý hiếm của vi sinh vật nhưng phương pháp đòi hỏi phí tổn cho trang thiết bị và kĩ thuật còn quá cao.

2. Nhân giống vi sinh vật

Mục đích của quá trình nhân giống là tăng số lượng tế bào giống.

Trong các quy trình lên men, với các đối tượng vi sinh vật khác nhau sẽ cần giống dưới các dạng khác nhau. Thường có hai dạng giống: tế bào sinh dưỡng và bào tử.

– Trường hợp giống là tế bào sinh dưỡng:

Để có thể thu được lượng giống là tế bào sinh dưỡng, người ta cần tạo điều kiện môi trường nuôi cấy, thành phần môi trường bảo đảm tối ưu cho sự sinh trưởng nhanh (*tức tăng số lượng tế bào, không tạo sản phẩm*). Trong trường hợp này sử dụng phương pháp nuôi cấy dịch thể: (nuôi cấy chìm).

– Trường hợp giống là bào tử (*đối với xạ khuẩn và nấm mốc*): Thông thường người ta thực hiện nhân giống thu bào tử trên môi trường đặc (*nuôi cấy bán rắn có cám, bột bắp, thóc, trấu...*).

Người ta nuôi nấm mốc, xạ khuẩn trong một thời gian khá dài để tạo bào tử. Bào tử được thu hồi bằng nhiều cách: dùng máy hút (*như hút bụi*) hay dùng chổi lông mềm đã tiệt trùng quét lên bề mặt của môi trường bán rắn. Bào tử thu được ở dạng khô, được đựng trong các bình kín có gắn paraffin, bảo quản nơi sạch, mát, có thể giữ dùng dần hàng năm.

Tùy theo quy mô của quá trình lên men mà ta có quá trình nhân tế bào giống với số lượng nhiều, ít khác nhau. Quá trình nhân giống vi sinh vật cho sản xuất ở quy mô công nghiệp thường được tiến hành qua các bước sau:

a) *Giai đoạn phòng thí nghiệm*: Đây là giai đoạn cấy giống vi sinh vật từ ống giống thuần khiết vào môi trường dinh dưỡng vô trùng và nuôi chúng trong điều kiện phòng thí nghiệm.

b) *Giai đoạn ở xưởng*: Nuôi cấy giống ở giai đoạn này được thực hiện qua một số lần cấy giống từ lượng môi trường ít đến môi trường nhiều dần nhằm tăng lượng giống thu được – người ta gọi là nhân giống cấp 1, 2, 3.... Tỷ lệ giống cấy trong nhân giống cũng như lên men dao động từ 1 - 10% thể tích môi trường dinh dưỡng tùy từng chủng giống.

Điều cần lưu ý: Kết thúc khâu nhân giống cần phải kiểm tra số lượng, chất lượng giống trước khi cấy vào nồi lên men.

3. Lên men

Là giai đoạn nuôi vi sinh vật để chúng tạo sản phẩm hoặc là sinh khối vi sinh vật, hoặc là các sản phẩm trao đổi chất bậc 1, 2... Đây là khâu quyết định kết quả của một quy trình lên men.

Để thực hiện lên men, người ta thường sử dụng hai phương pháp chủ yếu sau: lên men bề mặt và lên men chìm.

a) Khái niệm về lên men bề mặt:

Lên men bề mặt là thực hiện nuôi cấy vi sinh vật trên bề mặt môi trường dịch thể hoặc môi trường bán rắn.

*** Nuôi cấy bề mặt sử dụng môi trường dịch thể** (dùng cho vi sinh vật hiếu khí): Môi trường ở đây có thể là những nguồn dinh dưỡng khác nhau như nước đường hóa, nước bã rượu, dịch kiềm sulfite ... được pha loãng theo những tỉ lệ cần thiết; sau đó bổ sung thêm nguồn nitrogen (N), nguồn khoáng ... Khi cho môi trường vào thiết bị lên men, phải bảo đảm cột môi trường có chiều cao từ 3 - 5cm, bề mặt thoáng, rộng.

Nuôi cấy tạo acid citric có thể coi là một ví dụ điển hình về sử dụng phương pháp lên men bề mặt trong môi trường lỏng. Người ta xây những phòng lên men trong đó để hệ thống các giá, đặt các khay lên men trên các giá này theo hướng chồng lên nhau. Lưu ý giữa các khay cần có một khoảng cách nhất định để tạo độ thông thoáng. Ngoài ra còn có hệ thống thổi khí vô trùng vào các khay lên men với mục đích cung cấp O_2 cho tế bào vi sinh vật, loại bỏ ảnh hưởng của CO_2 được tạo thành trong lên men, đồng thời giữ nhiệt độ của phòng lên men ổn định ở mức cần thiết.

Phương pháp lên men này yêu cầu thiết bị đơn giản, nhưng đòi hỏi diện tích sử dụng lớn, khó tự động hóa quy trình sản xuất. Hiện nay phương pháp này ít được sử dụng.

*** Nuôi cấy bề mặt sử dụng môi trường bán rắn hay lên men bán rắn (solid state fermentation)** - có thể dùng cho vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí.

Ở phương pháp lên men này, nguyên liệu thường dùng là :

- Các loại hạt: thóc, gạo, nếp, đậu tương ...
- Các loại mảnh: mảnh sắn, mảnh bắp ...
- Các loại phế liệu: bã mía, bã thơm, trấu, cọng rơm, rạ...

Các nguyên liệu có chứa tinh bột, trước khi sử dụng làm môi trường phải được xử lý: nấu chín (*mảnh bắp, mảnh sắn, đậu tương...*), đồ lên (*gạo, nếp...*). Ngoài các nguyên liệu nói trên, để làm môi trường lên men người ta cần trộn thêm các chất dinh dưỡng khác (các hợp chất có N, khoáng hòa tan trong nước). Nguyên liệu sau khi xử lý, bảo đảm độ ẩm 60 - 75% sẽ được tãi ra nia, khay có độ dày 2 - 3cm (đối với vi sinh vật hiếu khí) hay vun đống, ủ kín (dùng cho vi sinh vật kỵ khí).

Đối với các vi sinh vật hiếu khí cần phải có hệ thống quạt, thổi khí vô trùng.

Trong lên men bán rắn, ngoài yêu cầu nguyên liệu môi trường có độ ẩm 60 - 75%, cần phải bảo đảm lên men trong điều kiện bầu không khí có độ ẩm 95 - 100%.

Phương pháp lên men bán rắn hiện nay được các nước đang phát triển sử dụng nhiều.

Phương pháp này thường sử dụng để:

- Sản xuất kháng sinh dùng cho chăn nuôi.
- Sản xuất enzyme từ nấm mốc.
- Làm tương, chao (giai đoạn đầu).
- Đường hóa tinh bột (khi sử dụng nấm mốc trong giai đoạn xử lý nguyên liệu) để sản xuất rượu ethanol từ nấm men.

b) Khái niệm về lên men chìm:

Dùng cho cả vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí.

Khi lên men chìm, vi sinh vật được nuôi cấy ở môi trường dịch thể, chúng sẽ phát triển theo chiều đứng của cột môi trường.

Trong quá trình lên men này, cần liên tục theo dõi và thực hiện một số công việc sau:

*** Thực hiện quá trình khuấy đảo và sục khí:**

Trong lên men chìm, vi sinh vật phát triển trong các nổi lên men cần được trộn đều để tăng cường diện tiếp xúc giữa tế bào và môi trường dinh dưỡng đồng thời ngăn cản sự kết lắng của tế bào. Để thực hiện việc này, trong các thiết bị lên men người ta lắp hệ thống các cánh khuấy. Hệ thống khuấy đảo này cần cho cả vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí. Đối với vi sinh vật hiếu khí, bảo đảm cung cấp O₂ đầy đủ theo nhu cầu của từng loại vi sinh vật là một trong những chức năng rất quan trọng của thiết bị lên men. Do vậy trong trường hợp này, người ta còn lắp thêm hệ thống sục khí. Không khí trước khi được bơm vào nổi lên men phải xử lý để bảo đảm sạch

về cơ học (sạch bụi) và vô trùng (không có vi sinh vật) bằng cách cho đi qua hệ thống lọc bằng bông thủy tinh và khử trùng bằng hơi nóng.

Cũng cần ghi nhớ một điều: tùy từng chủng loại vi sinh vật và tùy từng giai đoạn của quá trình lên men mà nhu cầu về cường độ thông khí sẽ khác nhau.

**** Theo dõi sự tạo bọt trong lên men và có biện pháp phá bọt:***

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

Do vậy trong quá trình lên men, người ta cần kiểm soát lượng bọt tạo thành và tìm cách phá hủy chúng. Muốn phá bọt, người ta dùng các chất phá bọt với nhiều loại bao gồm các chất tự nhiên như các loại dầu thực vật (dầu phộng), mỡ cá heo ... và cả các chất được tổng hợp bằng con đường hóa học.

**** Điều chỉnh pH của môi trường lên men:***

Mỗi loài vi sinh vật thích hợp với một giá trị pH nhất định của môi trường nuôi cấy. Thậm chí cùng một chủng vi sinh vật, pH thích hợp cho sự sinh trưởng khác với pH cần cho việc thực hiện sinh tổng hợp một sản phẩm. Trong quá trình lên men, vi sinh vật lại tạo ra những sản phẩm trao đổi chất có tính acid hay kiềm, khiến pH của môi trường không còn thích hợp cho hoạt động sống của mình. Vì vậy việc chủ động điều chỉnh pH của môi trường luôn ở giá trị thích hợp trong suốt quá trình lên men là điều rất cần thiết.

Người ta có thể điều chỉnh độ pH của dịch lên men bằng các dung dịch NaOH, HCl, NH_4OH , urea ... hay bổ sung dung dịch đệm (thường dùng hệ đệm phosphate) để ổn định pH của môi trường mà vẫn đảm bảo điều kiện vô trùng.

**** Theo dõi và điều chỉnh nhiệt độ của môi trường lên men:***

Cũng như độ pH của môi trường, nhiệt độ là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của vi sinh vật và hiệu quả lên men. Mỗi loại vi sinh vật đều thích hợp với nhiệt độ nhất định để sinh trưởng hoặc để tạo sản phẩm.

Quá trình lên men luôn có sự tỏa nhiệt rất mạnh nên nhiệt độ trong các thiết bị lên men thường có xu hướng gia tăng vượt quá ngưỡng nhiệt độ thích hợp đối với hoạt động sống của vi sinh vật đó. Vì vậy phải thường xuyên giám sát và điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu của quá trình lên men.

Muốn đạt được nhiệt độ thích hợp cho một quá trình lên men, người ta đã trang bị hệ thống làm nóng và làm nguội bằng nước chảy quanh nồi hoặc được đưa vào trong nồi dưới dạng các ống ruột gà làm nguội.

*** Tiếp thêm nguyên liệu và bổ sung các chất tiền thể:**

Ở một số quy trình lên men, người ta còn thực hiện bổ sung một số nguyên liệu vào môi trường trong khi quá trình lên men đang tiến hành. Cần thiết phải làm việc này vì có một số chất không cho phép đưa vào môi trường lên men ngay từ đầu với nồng độ cao (ví dụ như đường) mà phải bổ sung làm nhiều đợt với nồng độ thấp.

Đối với một số quy trình sinh tổng hợp một số chất (như vitamin B12) cần thiết phải bổ sung chất tiền thể (của vitamin B12 là 5,6 dimethylbenzimidazol) sau một thời gian lên men nhất định.

Ngoài các công việc theo dõi kể trên, trong quá trình lên men cần phải lấy mẫu kiểm tra các chỉ số sau:

- Trạng thái của tế bào chủng giống cần lên men và độ tạp nhiễm của các vi sinh vật lạ khác (gồm vi sinh vật và phage).

- Kiểm tra sự tiêu hao nguyên liệu, sự tạo thành sản phẩm trong quá trình lên men.

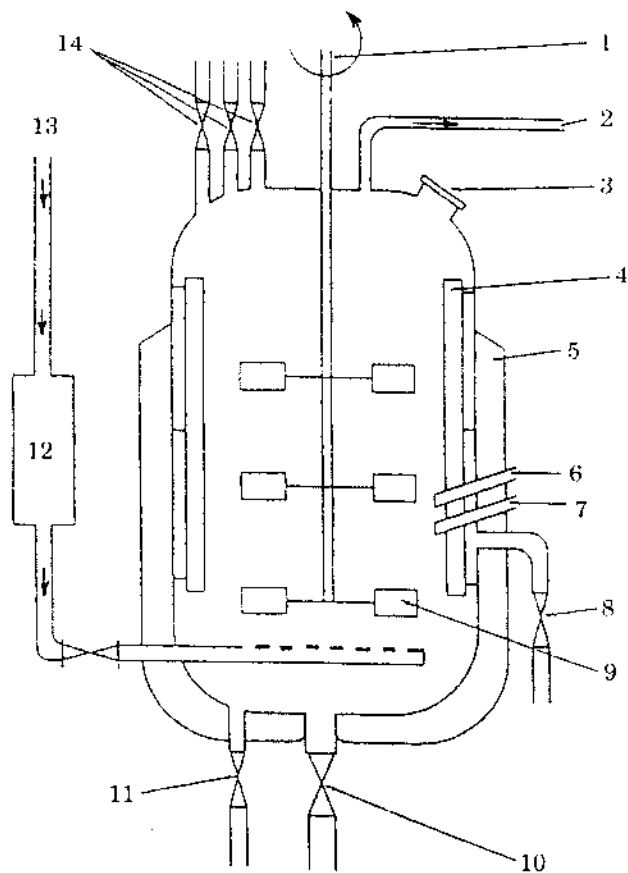
Điều cuối cùng và cũng là điều hết sức quan trọng là xác định thời gian của một quy trình lên men. Thời gian này sẽ rất khác nhau ở các quy trình lên men khác nhau. Điểm mấu chốt ở đây là người sản xuất phải biết dừng quá trình lên men đúng lúc để bảo đảm thu sản phẩm với hiệu suất cao nhất.

Lên men chìm là phương pháp lên men được sử dụng phổ biến nhất trong lên men công nghiệp. Ở quá trình lên men này, do có hệ thống khuấy trộn nên toàn bộ môi trường nuôi cấy là một thể thống nhất, vì vậy người ta có thể kiểm soát được quy trình lên men một cách dễ dàng. So với phương pháp lên men bề mặt, phương pháp lên men chìm ít choán mặt bằng, dễ cơ giới hóa và tự động hóa trong quá trình theo dõi.

Tuy vậy, phương pháp lên men này đòi hỏi đầu tư nhiều kinh phí cho trang thiết bị. Ngoài ra, nếu các mẻ lên men vì một lý do gì đó bị hỏng thì không thể xử lý cục bộ (như ở lên men bề mặt) mà quá trình xử lý sẽ rất phức tạp, đa phần phải hủy bỏ toàn bộ đợt lên men, gây thất thu, tổn kém rất lớn. Cũng chưa hết, khi lượng môi trường lên men lớn (có khi hàng ngàn lít) thải ra ngoài, nếu không được xử lý kỹ sẽ là nguồn ô nhiễm đáng kể đối với môi trường sống.

c) Nồi lên men (Fermentor):

Để giúp làm quen với các thiết bị lên men công nghiệp, chúng tôi giới thiệu sơ đồ một nồi lên men đơn giản nhưng có trang bị khá đầy đủ các chi tiết cần thiết (hình 7).



Hình 7 : Cấu tạo nồi lên men

- | | |
|--|--|
| 1. Trục khuấy. | 8. Van lấy mẫu. |
| 2. Không khí đi ra. | 9. Cánh khuấy. |
| 3. Nắp phía trên với kính nhìn. | 10. Van xả dung dịch sau lên men. |
| 4. Tấm thép giúp gia, giảm nhiệt nhanh. | 11. Van điều chỉnh hơi nước để khử trùng. |
| 5. Lớp nước để làm nguội và làm nóng. | 12. Bộ phận lọc không khí. |
| 6. Nơi đo pH và nồng độ O ₂ . | 13. Đường vào của không khí. |
| 7. Nơi đo và điều chỉnh nhiệt độ. | 14. Các van của đường nạp môi trường lên men, giống vi sinh vật và chất phá bọt. |

Thiết bị chính dùng trong quy trình công nghệ tổng hợp vi sinh vật là nổi lên men. Nổi lên men là thiết bị để nuôi cấy chìm vi sinh vật, thể tích của chúng từ dưới 1 lít đến 200 lít (nổi lên men trong phòng thí nghiệm) và có thể đạt thể tích rất lớn : 500.000 lít (nổi lên men công nghiệp). Các nổi lên men được thiết kế sao cho có thể tạo được những điều kiện tối ưu cho từng quá trình lên men. Có rất nhiều kiểu nổi lên men.

Nổi lên men thường được chế tạo từ thép không rỉ để tránh sự ăn mòn và sự giải phóng các ion sắt. Đối với các quy trình lên men vô trùng thì nổi lên men, kể cả các van phải có tính chịu áp suất cao để có thể chịu được khi thực hiện khử trùng bằng áp lực cao.

Nổi lên men thông thường gồm có buồng chứa môi trường lên men hình trụ thẳng đứng có nắp và đáy. Trên nắp của nổi có thiết kế các lỗ cho phép gắn đường dẫn môi trường nuôi cấy, đường dẫn chủng giống vi sinh vật cần nuôi cấy, đường dẫn chất phá bọt từ thùng chứa dầu vào nổi lên men... Đặc biệt trên nắp của nổi có thiết kế một cửa nhỏ có lắp kính trong suốt để có thể quan sát được dịch lên men bên trong nổi.

Trên thành bên của nổi lên men có van để lấy mẫu thử của dịch nuôi cấy, có lắp các thiết bị để đo và điều chỉnh độ pH, t° , O_2 hoà tan. Phần đáy nổi có lắp ống thải có đường kính lớn để tháo dịch lên men ra khi kết thúc quá trình lên men.

Để thực hiện khuấy đảo và sục khí, ở nổi lên men được lắp hệ thống trục có cánh khuấy và bộ sục khí. Trên đây là những mô tả rất sơ lược về cấu tạo một nổi lên men.

Để có thể xác định được nhiều thông số kĩ thuật, gần đây người ta đã phát triển các kĩ thuật xác định liên tục và tự động. Việc áp dụng các phương pháp kiểm tra quá trình lên men một cách tự động cũng đồng thời tạo điều kiện cho việc điều khiển quá trình lên men bằng máy vi tính. Các nổi lên men hiện đại được trang bị khá nhiều các thiết bị đo đạc, kiểm tra, kèm theo việc sử dụng rộng rãi máy vi tính. Các máy này có nhiệm vụ kiểm soát và ổn định các chỉ số của quá trình, thực hiện những phân tích cần thiết, chỉnh lí việc bổ sung thêm thành phần của môi trường nuôi cấy, theo dõi diễn biến của quá trình lên men. Cụ thể với sự hỗ trợ của máy vi tính, người ta có thể nhanh chóng tính toán và điều chỉnh các thông số sau :

- Tốc độ tiêu thụ oxygen, tốc độ thải khí CO_2 , hệ số hô hấp.
- Tốc độ toả nhiệt tạo ra bởi các chất chuyển hoá.
- Tốc độ sử dụng các chất dinh dưỡng (C, N).
- Nồng độ, sinh khối của tế bào ...

Trong nổi lên men này, bất kì một sai lệch nào xuất hiện đều bị phát hiện và điều chỉnh ngay ở giai đoạn đầu của nó. Do vậy, các nổi lên men cỡ lớn dùng trong sản xuất công nghiệp nếu được trang bị hệ điều khiển và kiểm tra bằng vi tính, bao giờ cũng cho năng suất và chất lượng sản phẩm tốt hơn.

4. Thu hồi sản phẩm

Việc thu hồi sản phẩm với hiệu suất cao có ý nghĩa quyết định đối với tính kinh tế của một quy trình công nghệ. Bởi vậy việc tách và thu hồi sản phẩm phải được tính toán lưu ý ngay từ lúc chọn chủng giống vi sinh vật để lên men, chọn nguyên liệu cũng như môi trường dinh dưỡng.

Khi quá trình lên men kết thúc, người ta tiến hành thu hồi sản phẩm. Các sản phẩm của quá trình tổng hợp vi sinh vật thường được tích lũy hoặc bên trong tế bào hoặc ở trong pha lỏng của dịch nuôi cấy ; cũng có trường hợp sản phẩm vừa nằm trong tế bào, vừa nằm trong pha lỏng của dịch nuôi cấy.

Việc đầu tiên sau khi kết thúc lên men là tìm cách tách tế bào vi sinh vật ra khỏi pha lỏng của dịch lên men.

– Nếu là các vi sinh vật có cấu tạo hệ sợi như nấm, tảo ... người ta dùng phương pháp lọc, vắt.

– Nếu là các vi sinh vật đơn bào, có kích thước tế bào nhỏ như nấm men, vi khuẩn... dùng phương pháp li tâm thường hay li tâm tốc độ cao ...

Việc xử lí tiếp theo còn tùy thuộc sản phẩm mà ta cần thu nằm trong pha lỏng của môi trường hay ở trong tế bào vi sinh vật.

Khi chọn phương pháp tách cần đặc biệt chú ý độ bền vững của một số sản phẩm cần tách, nếu sản phẩm là enzyme thì có thể nó dễ bị thủy giải bởi enzyme protease có trong bản thân dịch nuôi cấy.

Bản chất hoá học của sản phẩm quyết định phương pháp xử lí tiếp theo. Thông thường người ta sử dụng các phương pháp sau : chiết rút, hấp phụ, kết tủa, kết tinh, sắc kí, điện di, phân tích quang phổ ...

Để tăng tính kinh tế của một quy trình công nghệ cũng như tính khả thi của các nhà máy lên men, người ta xây dựng các nhà máy lên men và phục vụ lên men thành một khu liên hợp bao gồm nhiều nhà máy, xí nghiệp có mối quan hệ sản xuất gắn gũi ở cạnh nhau để giải quyết một số vấn đề chung, tiện lợi và tiết kiệm nguyên liệu, năng lượng.

– *Về vấn đề năng lượng* : Sẽ sử dụng được triệt để hơn nguồn năng lượng của các nổi hơi. Ví dụ : Một nổi hơi hoạt động phục vụ cho xí nghiệp

này sản xuất, xí nghiệp khác có thể ở giai đoạn chuẩn bị. Để tiếp theo khi xí nghiệp này kết thúc lên men, xí nghiệp khác lại bắt đầu hoạt động. Nối hơi hoạt động như vậy sẽ có hiệu suất sử dụng cao.

Ngoài ra còn có thể sử dụng năng lượng dư thừa để sấy sản phẩm, sưởi ấm các phòng, phân xưởng (ở những vùng khí hậu lạnh).

-- Về vấn đề nguyên liệu:

Do đặc điểm của từng quy trình công nghệ lên men mà xí nghiệp này có thể sử dụng phụ phẩm, phế liệu của xí nghiệp kia làm nguyên liệu. Như vậy sẽ sử dụng triệt để nguyên liệu và giảm chi phí vận chuyển. Ví dụ: Nhà máy sản xuất acid glutamic cần cao ngô. Người ta sẽ xây dựng xí nghiệp sản xuất cao ngô ngay cạnh nhà máy này. Đồng thời hạt ngô sau khi ngâm lấy nước chiết làm cao ngô sẽ được sử dụng làm nguyên liệu cho xí nghiệp sản xuất tinh bột ...

-- Về vấn đề xử lí nước thải, chất thải:

Xử lí ô nhiễm do hoạt động của các xí nghiệp thực phẩm là một vấn đề được đòi hỏi rất bức bách và cũng rất tốn kém. Các xí nghiệp thực phẩm được bố trí ở cạnh nhau sẽ dễ dàng kết hợp để xây dựng hệ thống xử lí chung các loại nước thải và chất thải, bảo đảm vừa tiết kiệm vừa đồng bộ.

II. DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT VÀ NGUYÊN LIỆU NUÔI CẤY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

Giống với khi lên men ở quy mô phòng thí nghiệm, khi lên men ở quy mô công nghiệp, vi sinh vật cũng phải được cung cấp đủ các nguyên tố cần thiết cho sinh trưởng và sự tạo thành sản phẩm.

Trong lên men công nghiệp, các môi trường từ giữ giống, nhân giống đến lên men đều chứa các nguyên tố đa lượng (C, H, O, N, S, P, Mg) và một lượng nhỏ các nguyên tố vi lượng (Mn, Bo, Co, Cu ...).

Tuy vậy, trong lên men công nghiệp cũng có những nét khác biệt đáng lưu ý. Ở đây người ta không bổ sung các nguyên tố vi lượng ở dạng dung dịch tinh khiết vào môi trường lên men mà có sự kết hợp bổ sung các nguyên tố vi lượng cùng lúc với các nguyên tố đa lượng. Người ta có thể thực hiện được điều trên dễ dàng vì trong công nghệ lên men các nguyên tố đa lượng (N, C ...) thường được bổ sung dưới dạng các tạp chất (rỉ đường, cao ngô, dịch tự phân nấm men...). Thông thường những tạp chất này luôn chứa một lượng các nguyên tố vi lượng đủ dùng cho vi sinh vật.

Chúng ta sẽ lần lượt tìm hiểu vi sinh vật sử dụng các nguồn dinh dưỡng khác nhau ở quy mô lên men công nghiệp như thế nào.

1. Các hợp chất cung cấp nguồn carbon

Carbon tham gia trong hầu hết các cấu trúc của tế bào, từ tế bào chất đến thành tế bào, từ phân tử enzyme đến acid nucleic. Vì vậy các hợp chất dạng carbohydrate có ý nghĩa hàng đầu đối với sự sống của tế bào vi sinh vật.

Nguồn carbohydrate vi sinh vật sử dụng được rất phong phú. Từ dạng tinh khiết (*glucose, saccharose...*) đến dạng tạp chất (*rỉ đường, dịch kiềm sulfite...*). Một số nhóm vi sinh vật sử dụng được cả khí thiên nhiên, hydrocarbon (*methane, alkan ...*).

Trong thực tế, để nâng cao giá trị của một quy trình công nghệ, đặc biệt là để tiến tới hạ giá thành sản phẩm, người ta đã sử dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm như các nguyên liệu thô, phụ phẩm của một số ngành công nghiệp khác để làm nguyên liệu nuôi cấy vi sinh vật ở quy mô công nghiệp. Nguồn nguyên liệu này còn được gọi là nguồn carbon, nitrogen kĩ thuật. Rõ ràng điều đó sẽ ảnh hưởng đến sức sinh trưởng và hiệu suất tạo sản phẩm của chủng giống. Do vậy khi sử dụng một nguyên liệu nào thay thế hay khi đưa ra sản xuất ở quy mô lớn một sản phẩm nào đó cần thiết phải qua giai đoạn sản xuất thử (khâu trung gian giữa phòng thí nghiệm với nhà máy), với mục đích giúp cho vi sinh vật làm quen một cách từ từ với điều kiện môi trường mới. Sản xuất thử giúp ta xác định được các thông số kĩ thuật của quy trình một cách nhanh chóng mà ít tốn kém trước khi đưa ra sản xuất lớn.

Một số nguồn carbon kĩ thuật sau đây được sử dụng trong công nghệ lên men:

a) Rỉ đường: Có hai loại là rỉ đường mía và rỉ đường củ cải.

*** Rỉ đường mía:** Rỉ đường mía là phụ phẩm thu được của công nghiệp ép mía thành đường sau khi đã thu saccharose.

-- Thu nhận rỉ đường mía trong quá trình sản xuất đường saccharose:

Đường mía thô gồm hai hợp phần: Các tinh thể đường saccharose và mật bao bọc phía ngoài có chứa đường, các chất phi đường và các chất màu.

Theo quy trình sản xuất đường tinh của Viện Trung tâm Nghiên cứu Đường (*Liên Xô cũ*) thì đường thô được tinh luyện, li tâm, lắng trong, làm sạch bằng phương pháp carbonate (*lắng trong bằng vôi*) cho bão hòa CO_2 , sau đó được đem lọc và sulfite hóa. Tiếp theo, dịch đã làm sạch được cô trong thiết bị chân không, ta thu được dịch đường non I. Dịch này sẽ đem li tâm cho đường trắng. Còn cặn có màu được xử lí ba lần để thu đường loại II, III và IV. Phần cuối cùng còn lại là rỉ đường.

Có thể nói, rỉ đường là một hỗn hợp khá phức tạp. Bên cạnh hàm lượng đường lên men được khá cao, trong rỉ đường còn chứa một lượng đáng kể các hợp chất chứa nitrogen, các vitamin và các hợp chất vô cơ. Ngoài ra trong rỉ đường còn chứa một số chất keo và vi sinh vật tạp nhiễm làm bất lợi cho quá trình lên men sau này. Vì vậy, tùy theo mục đích sử dụng khác nhau người ta cần phải xử lý rỉ đường trước khi dùng làm môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

- *Thành phần rỉ đường* : Thành phần rỉ đường phụ thuộc vào phương pháp sản xuất đường, điều kiện bảo quản rỉ đường cũng như phụ thuộc vào giống mía và điều kiện trồng trọt đối với cây mía.

Trong rỉ đường mía có: 15 - 20% nước, 80 - 85% chất khô hòa tan.

Trong chất khô ta thấy có các thành phần sau:

+ Đường - thường gọi là đường tổng số hay đường lên men được: $\geq 50\%$, trong đó đường saccharose chiếm 30 - 35%, đường khử chiếm 15 - 20% (*glucose, fructose*). Đôi khi có cả *rafinose* cũng như các chất khử không lên men được. Các chất khử này là caramel và melanoidin - sản phẩm ngưng tụ giữa đường và amino acid, các chất khử không lên men được có khi chiếm 1,7% khối lượng rỉ đường.

+ Thành phần chất khô còn lại $\leq 50\%$, trong đó 30 - 32% chất hữu cơ (*acid aconitic chiếm 5%*), 18 - 20% chất vô cơ.

Đặc biệt trong rỉ đường mía chứa khá nhiều loại vitamin, trong đó đáng lưu ý hơn cả là biotin. Theo tài liệu của Andecofler, hàm lượng vitamin trong rỉ đường mía như sau (*γ/gr rỉ đường*):

Thiamine : 8,3

Riboflavine : 2,5

Acid nicotinic : 21,4

Acid folic : 0,038

Pyridoxine (Vitamin B₆ - C₈H₁₁NO₃) : 6,5

Biotin : 12,0

Khi bảo quản lâu ngày, rỉ đường mía bị tổn thất đường khá lớn. Để giảm tổn thất này người ta đổ lên bề mặt rỉ đường một lớp mỏng dầu khoáng.

BẢNG 1: *Thành phần các nguyên tố tro của rỉ đường mía*

Tài liệu	Thành phần (%)								
	K ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	Tổng
Mac-Djinnisa	3,5	1,5	0,1	0,2	0,2	0,5	1,6	0,4	8,0
Andercofler và Khiki	3,6	0,5	0,07	0,9	-	-	3,93	-	9,0

***Rỉ đường củ cải:** Là nước cốt sinh ra trong sản xuất đường từ củ cải đường. Dịch này được cô đặc có thể dùng lâu dài.

Thành phần của rỉ đường củ cải (theo %):

Saccharose: 48

Rafinose: 1

Đường chuyển hóa khác: 1

Các acid hữu cơ: 2.

Rỉ đường củ cải chứa một số vitamin trong đó hàm lượng biotin thấp hơn trong rỉ đường mía (hàm lượng biotin = 0,13γ/g rỉ đường).

Trong rỉ đường (cả rỉ đường mía và rỉ đường củ cải), ngoài thành phần kích thích sinh trưởng còn chứa một số chất mà nếu dùng nó ở nồng độ cao sẽ kìm hãm sinh trưởng của vi sinh vật như SO₂, hydroxymethylfurfurol...

b) Dịch kiềm sulfite: Là một loại phế phẩm của công nghiệp sản xuất cellulose.

Khi sản xuất 100 tấn cellulose gỗ dẻ sẽ thải ra ngoài 1.000m³ dịch kiềm sulfite. Dịch kiềm sulfite có thành phần: 80% chất khô là đường hexose (*glucose, mannose, galactose*), phần còn lại là đường pentose (*cylose, arabinose*). Ngoài ra trong dịch kiềm sulfite có chứa acid ligninsulfuric. Acid này chưa được vi sinh vật sử dụng, hiện nay đang có hướng nghiên cứu để vi sinh vật có thể sử dụng được acid này trong công nghệ lên men. Một điểm đáng lưu ý của dịch kiềm sulfite là có đặc tính hấp phụ nhiều O₂, cho nên khi nuôi cấy các vi sinh vật hiếu khí có thể giảm mức cung cấp oxygen tới 60% so với mức bình thường.

c) Tinh bột và cellulose:

Tinh bột được sử dụng dưới dạng hạt hoặc bột của khoai, sắn, lúa, đại mạch... Dạng nguyên liệu này trước khi sử dụng làm môi trường nuôi cấy phải qua khâu xử lý và đường hóa. Đối với các chủng vi sinh vật có

hệ enzyme amylase phát triển, người ta có thể sử dụng trực tiếp tinh bột (tinh bột sống không qua khâu đường hóa) để nuôi cấy vi sinh vật. Những chủng vi sinh vật này hiện nay được các nhà nghiên cứu tìm kiếm phân lập vì nó giúp nhà sản xuất tiết kiệm phí tổn và năng lượng cho khâu khử trùng và đường hóa.

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

d) Dầu thực vật (dầu đậu nành, dầu dừa, dầu đậu phộng (dầu lạc), dầu hạt bông, dầu hướng dương):

Các loại dầu nói trên được dùng cho vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật với tư cách vừa là nguồn carbon, vừa là chất phá bọt. Cũng cần lưu ý thêm rằng, các loại dầu có mặt trong môi trường chỉ có vai trò là nguồn carbon khi vi sinh vật được nuôi cấy sinh enzyme lipase. Lúc đó các chất béo này được enzyme lipase phân hủy thành glycerin và các acid béo, vi sinh vật có thể sử dụng được như là nguồn thức ăn carbon.

Các loại dầu thực vật này là các triglyceride, trong đó chủ yếu là các acid béo chưa bão hòa (*acid oleic, acid linoleic...*).

Lượng chất béo bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật phải phù hợp với mức độ tạo bọt của môi trường. Nếu ta bổ sung quá nhiều sẽ làm chậm quá trình đồng hóa nguồn carbohydrate của vi sinh vật. Cụ thể sẽ làm tăng độ nhớt của môi trường, tạo các hạt nhũ tương của các loại xà bông, đặc biệt là khi môi trường có CaCO_3 sẽ dẫn đến hiện tượng giảm lượng oxygen hòa tan, vi sinh vật sẽ phát triển kém, ảnh hưởng đến hiệu suất lên men.

BẢNG 2: Thành phần hóa học của các loại dầu thực vật
(theo L.A. Popova và những người cộng sự, 1961)

Các loại dầu	Acid béo (%)				
	<i>Acid oleic</i>	<i>Acid linoleic</i>	<i>Acid palmitic</i>	<i>Acid stearic</i>	<i>Acid arachidic</i>
Dầu đậu phộng (dầu lạc)	50 - 70	13 - 26	6 - 11	2 - 6	5 - 7
Dầu bắp	< 45	< 48	< 7,7	3,6	< 0,4
Dầu đậu nành	25 - 36	52 - 65	6 - 8	3 - 5	0,4 - 10
Dầu bông	30 - 35	40 - 45	20 - 22	2,0	0,1 - 0,6
Dầu lanh	13 - 29	15 - 30	9 - 11	6 - 7	-

g) Hydrocarbon: Từ lâu người ta đã biết có rất nhiều vi sinh vật sống được ở các mỏ dầu, mỏ khí đốt, ở đáy các bể chứa dầu, trên mặt đường nhựa ... Hầu như trên mỗi thành phần của dầu mỏ đều có thể tìm thấy những vi sinh vật có khả năng chuyển hóa hydrocarbon thành các vật liệu xây dựng tế bào, cấu trúc các phân tử protein.... Trong quá trình tìm kiếm nguồn carbon cho môi trường nuôi cấy vi sinh vật ở quy mô công nghiệp, con người đã phân lập được một số vi sinh vật có khả năng sử dụng được nguồn hydrocarbon là dầu mỏ và khí đốt. Các đại diện này có ở hầu hết các nhóm vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, xạ khuẩn...). Nguồn dầu mỏ và khí đốt là nguồn nguyên liệu rất dồi dào và rẻ tiền, vì vậy việc sử dụng vi sinh vật nuôi cấy trên môi trường dầu mỏ và khí thiên nhiên đã và đang là vấn đề hấp dẫn các nhà nghiên cứu cũng như nhà sản xuất.

Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy n-paraffin là loại nguyên liệu tương đối vạn năng hơn cả để nuôi cấy vi sinh vật. Theo số liệu của Fuch (1961) đã thống kê có 26 giống vi sinh vật, trong đó 75 loài có khả năng phân hủy hydrocarbon mạch thẳng, 25 loài phân hủy hydrocarbon mạch vòng. Trong đó, vi khuẩn có khả năng phát triển trên nhiều loại hydrocarbon hơn nấm men và nấm mốc. Cụ thể, nó có thể phát triển tốt trên các dãy alkan mạch thẳng, mạch nhánh, hydrocarbon thơm và khí thiên nhiên như methane, ethane, propane.... Nấm men chỉ phát triển trên n-alkan và alken. Nấm mốc phát triển trên n-alkan còn trên alkan mạch nhánh sinh trưởng kém hơn.

Khả năng sử dụng hydrocarbon của vi sinh vật còn phụ thuộc vào các điều kiện sau:

- Khả năng thâm nhập vào tế bào của hydrocarbon.
- Sự tồn tại hệ thống enzyme cần thiết để chuyển hóa các nguồn carbon này, đặc biệt ở giai đoạn đầu của sự ôxy hóa.
- Vi sinh vật phải bền vững với độc tính của hydrocarbon khi nồng độ cao....

2. Các hợp chất cung cấp nguồn nitrogen

Nitrogen tham gia trong các thành phần cấu trúc nên tế bào vi sinh vật, giúp tế bào hoàn thiện được mọi chức năng của hoạt động sống. Nguồn nitrogen là nguồn dinh dưỡng quan trọng không kém gì nguồn carbon.

Nitrogen được cung cấp cho tế bào dưới nhiều dạng khác nhau:

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

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

*** Dịch thủy phân nấm men:**

Một trong những lí do khiến người ta quan tâm đến nấm men vì trong tế bào nấm men chứa nhiều chất dinh dưỡng có giá trị, nổi bật là nguồn protein và vitamin. Hàm lượng protein của nấm men dao động trong khoảng 40-60% chất khô của tế bào. Về tính chất, protein của nấm men gần giống protein nguồn gốc động vật, có chứa khoảng 20 loại amino acid, trong đó có đủ các loại amino acid không thay thế. Thành phần amino acid của nấm men cân đối hơn so với ở lúa mì và các hạt ngũ cốc khác, kém chút ít so với sữa và bột cá ... Vì vậy, dịch thủy phân nấm men là một dung dịch rất giàu chất bổ dưỡng, gồm các amino acid, các peptid, các vitamin (đặc biệt là các vitamin nhóm B). Người ta sử dụng dịch nấm men thủy phân với mục đích bổ sung nguồn nitrogen và nguồn các chất kích thích sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

Có thể thu nhận dịch thủy phân nấm men bằng nhiều phương pháp khác nhau: bằng tác động của enzyme; phương pháp tự phân ở 45 - 50°C, pH = 6,2; phương pháp tiêu nguyên sinh chất bằng dung dịch NaCl ở nồng độ cao... Thành phần hóa học của các dịch thủy phân nấm men phụ thuộc vào nguyên liệu và quy trình sản xuất. Ta có thể tham khảo thành phần của dịch thủy phân nấm men ở bảng 3.

*** Bột đậu nành:** Bột đậu nành sau khi tách lấy dầu là một nguyên liệu lí tưởng dùng trong Công nghệ vi sinh. Loại bột này chứa tới 40-50% protein, 30% carbohydrate (saccharose, arabinose...), hàm lượng dầu còn lại: 1%, lecithin: 1,8%.

*** Cao ngô:** Có dạng lỏng sền sệt màu nâu thẫm được tạo nên từ nước chiết ngâm ngô thông qua quá trình cô đặc. Thành phần của cao ngô: lượng chất khô chiếm 40 - 50%. Trong thành phần chất khô chứa 3 - 5% đạm tổng số, 1 - 3% đạm amine.

Trong cao ngô còn chứa một ít protein, một số các amino acid tự do và các peptid có phân tử lượng thấp.

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

*** Nước mắm, nước tương:** Ở Việt Nam, nước mắm, nước tương cũng được sử dụng với vai trò là nguồn nitrogen vì nó có chứa khá đầy đủ các amino acid cần thiết:

- *Nước mắm*: Là sản phẩm chế biến từ các quá trình lên men tự nhiên, phân hủy protein của cá dưới tác dụng của hệ enzyme protease. Nước mắm có giá trị dinh dưỡng cao, có đầy đủ các amino acid hợp phần của protein.

Thành phần của nước mắm : đậm tổng số là 15 - 25 g/l (nồng độ đậm cao, thấp tùy thuộc vào nguồn nước mắm), đậm amine chiếm 60 - 70% đậm tổng số.

BẢNG 3: *Thành phần của dịch thủy phân nấm men (Theo F. Ohly)*

Thành phần (%)	Phương pháp tự phân	Phương pháp tiêu nguyên sinh chất bằng NaCl
Chất khô	70	80
Nitrogen tổng số	8,8	7,4
Protein (N ⁺ 6,25)	5,5	46
NaCl	<1	18
Các amino acid (% so với protein tổng số)		
Alanine	3,4	2,3
Acid butyric	0,1	0,1
Arginine	2,1	1,1
Asparagine	3,8	3,1
Cystine	0,3	0,2
Acid glutamic	7,2	5,1
Glycine	1,6	1,6
Histidine	0,9	0,8
Isoleucine	2,0	1,6
Leucine	2,9	2,3
Lisine	3,2	2,9
Methionine	0,5	0,5
Ornithine	0,3	0,9
Phenylalanine	1,6	1,6
Proline	1,6	1,5
Serine	1,9	1,5
Thyroxine	0,8	0,5
Threonine	1,9	1,4
Valine	2,3	1,9
Các vitamin (mg/ 100 g nấm men)		
Thiamine	20 - 30	10 - 15
Riboflavine	50 - 70	50 - 70
Pyridoxine	25 - 35	20 - 30
Acid pantothenic	200	350

– *Nước tương* : Là dịch thủy phân từ bánh dầu phộng hay bánh dầu đậu nành bằng HCl hoặc thông qua quá trình thủy phân bằng enzyme của nấm mốc. Thành phần của nước tương (*thu được bằng phương pháp thủy phân bằng HCl*): đậm tổng số là 20 - 25 g/l, đậm amine là 70 - 75% đậm tổng số. Dịch amino acid thu được này sẽ thiếu hai amino acid là tryptophan và cysteine vì hai amino acid này bị phá hủy trong môi trường acid. Do vậy, nếu nước tương thu được bằng thủy phân bánh dầu do enzyme của nấm mốc sẽ có thành phần amino acid đầy đủ hơn.

3. Các nguyên tố khoáng

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

Trong các nguyên tố khoáng, người ta đặc biệt lưu ý đến vai trò rất quan trọng của phosphorus (P).

Trong lên men lớn, người ta bổ sung P dưới dạng bột đậu, bột bắp, bã rượu, hay ở dạng muối phosphate vô cơ (P mono hay dibasic của K^+ , Na^+ , NH_4^+ ...)

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

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

Tuy có vai trò quan trọng nhưng nhu cầu về nguyên tố khoáng chỉ giới hạn ở những nồng độ thích hợp. Nếu vượt qua những giới hạn đó (*khi ở nồng độ quá cao chẳng hạn*) sẽ làm giảm hiệu suất lên men (ví dụ như đối với nguyên tố Fe). Vì vậy trong các thiết bị lên men, người ta dùng các nồi lên men được chế tạo từ thép carbon, bên trong nồi còn quét lớp keo bảo vệ.

4. Vitamin và nhân tố sinh trưởng

Cũng giống như các nguyên tố khoáng, trong lên men ở quy mô công nghiệp, người ta bổ sung vitamin, các chất kích thích sinh trưởng thông qua việc bổ sung các nguyên liệu giàu vitamin như cao ngô, rỉ đường.

CHƯƠNG IV

VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT RƯỢU

Rượu đã được con người sản xuất và sử dụng từ cách đây rất lâu - vào khoảng 6.000 năm trước Công nguyên. Do nhu cầu và lợi ích của sản phẩm này nên cho đến nay, việc nghiên cứu và mở rộng sản xuất chúng ngày càng được con người quan tâm.

Có rất nhiều loại rượu và mỗi loại đều có thành phần, quy trình sản xuất khác nhau. Có thể tạm chia chúng làm ba loại chủ yếu sau:

- Rượu trắng - hay còn gọi là rượu cất (*ethanol*).
- Rượu mùi (*liquor*).
- Rượu vang quả (*wine*).

I. VI SINH VẬT VÀ QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT RƯỢU TRẮNG (Rượu cất)

Rượu trắng được sản xuất bằng hai phương pháp chính: phương pháp lên men bằng vi sinh vật và phương pháp tổng hợp hóa học.

Phương pháp lên men nhờ vi sinh vật là phương pháp chủ yếu.

Rượu trắng thu được là kết quả của quá trình lên men rượu của nấm men và một số vi sinh vật, trong đó nấm men là đối tượng chính được sử dụng để sản xuất rượu ở quy mô công nghiệp.

Lên men rượu là một quá trình sinh hóa phức tạp chuyển đường thành rượu, có sự tham gia của nấm men trong điều kiện kỵ khí.

Phương trình tổng quát của sự lên men rượu:



Trong quá trình lên men rượu, dịch lên men thu được sau khi kết thúc quá trình lên men ngoài sinh khối nấm men còn có các thành phần sau: sản phẩm chính là ethanol (C_2H_5OH), CO_2 và các sản phẩm phụ như glycerin, acid succinic, các aldehyde, một số loại rượu bậc cao (isoamyllic, isobutylic, propiolic ...).

Quy trình sản xuất ethanol bằng phương pháp lên men rượu bởi nấm men được thực hiện theo các bước sau:

- Chế biến nguyên liệu thành dịch đường để có thể lên men bằng nấm men.
- Lên men biến đường thành rượu.
- Chưng cất và tinh chế cồn ethanol.

1. Chế biến các nguyên liệu thành dịch đường

a) Nguyên liệu : Trong sản xuất rượu người ta thường sử dụng các nguyên liệu sau:

- Nguyên liệu có sẵn đường: mật rỉ đường ...
- Nguyên liệu có tinh bột: bắp, khoai mì, khoai lang, bột gạo ...
- Nguyên liệu có cellulose: gỗ vụn, mặt cưa, rơm rạ ...

Dùng phổ biến trong công nghệ để sản xuất rượu hiện nay là hai loại nguyên liệu có sẵn đường và tinh bột.

Trừ nguyên liệu từ đường, rỉ đường, các loại khác phải qua quá trình đường hóa.

b) Các phương pháp đường hóa:

Các nguyên liệu chứa cellulose, hemicellulose được đường hóa bằng acid (HCl , H_2SO_4) và nhiệt độ cao. Các nguyên liệu chứa tinh bột được đường hóa bằng nhiều phương pháp khác nhau.

*** Đường hóa bằng bánh men thường hay bánh men thuốc bắc :**

Đây là phương pháp dùng khá phổ biến trong dân gian để đường hóa các nguyên liệu có chứa tinh bột. Trong bánh men, nấm mốc được nuôi cấy và phát triển trên môi trường tinh bột sống. Nếu là bánh men thuốc bắc thì có bổ sung thêm một số vị thuốc bắc (khoảng từ 10 - 20 vị). Nấm mốc trong bánh men có hệ enzyme amylase phân giải tinh bột. Về vai trò của các vị thuốc bắc, có ý kiến cho rằng có tác dụng sát khuẩn, cũng có ý kiến cho rằng các vị thuốc bắc có tác dụng kích thích sinh trưởng các vi sinh vật trong bánh men. Quá trình đường hóa: Nguyên liệu chứa tinh bột không nhất thiết phải hồ hóa thành dung dịch mà chỉ cần làm chín như kiểu đồ xôi ở $t^0 = 130 - 140^0\text{C}$ để các cấu trúc phân tử tinh bột dễ bị phá vỡ. Lúc này tinh bột chuyển sang dạng dễ tan, như vậy hệ enzyme amylase mới phân hủy tinh bột được dễ dàng. Tuy vậy, do tinh bột không ở dạng dung dịch nên hạn chế tác dụng của amylase lên các mạch tinh bột, làm cho hiệu suất đường hóa không cao. Dùng bánh men để đường hóa tinh bột dễ bị nhiễm tạp khuẩn. Do những hạn chế nói

trên, quá trình lên men rượu sau này tạo ra nhiều sản phẩm trung gian, hiệu suất tổng thu hồi thấp.

Hiện nay phương pháp này chủ yếu sử dụng để đường hóa tinh bột khi sản xuất rượu theo phương thức thủ công.

*** Phương pháp maltase:**

Người ta sử dụng enzyme (chủ yếu là các α và β -amylase) của thóc đại mạch, tiểu mạch đã nảy mầm (malt) để chuyển hóa tinh bột (đã được hồ hóa) thành đường lên men. Ở Việt Nam ta từ lâu cũng đã sử dụng thóc tẻ hay nếp, có khi cả hạt bắp cho nảy mầm để sản xuất mạch nha theo phương pháp trên.

Sử dụng phương pháp maltase có ưu điểm:

- Thời gian hồ hóa tinh bột ngắn.
- Chất lượng rượu không bị ảnh hưởng mà thường tạo ra những hương vị đặc trưng dễ chịu.
- Ít bị nhiễm khuẩn.

Tuy vậy, phương pháp này cũng có nhiều nhược điểm lớn sau:

- Hiệu suất đường hóa không cao, không triệt để vì phức hệ amylase trong mầm thóc không hoàn chỉnh.
- Thường chỉ áp dụng ở những nước xứ lạnh vì điều kiện trồng và nảy mầm đại mạch đòi hỏi nhiệt độ thấp.
- Tỷ lệ malt sử dụng so với hàm lượng tinh bột có trong nguyên liệu tương đối cao (8 - 20%).
- Giá thành sản phẩm cao, nhất là ở những nước không sản xuất được thóc malt.

Chính vì vậy, người ta cố gắng nghiên cứu bổ sung hay thay thế dần phức hệ amylase của mầm thóc malt bằng amylase của nấm mốc và vi khuẩn.

*** Phương pháp myco - malt:**

Đây là phương pháp được dùng phổ biến hơn ở cả trong và ngoài nước. Quá trình đường hóa ở đây dùng enzyme của vi sinh vật, chủ yếu của nấm mốc.

Nấm mốc được sử dụng có khá nhiều loài của chi *Aspergillus* như *Asp. oryzae*, *Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. awamori*. Gần đây có xu hướng dùng chi *Endomycopsis*.

Các chủng nấm mốc được sử dụng để đường hóa tinh bột được nuôi cấy theo hai phương pháp sau: nuôi cấy bề mặt và nuôi cấy chìm.

- **Nuôi cấy bề mặt:** Thường dùng các chủng của *Asp. awamori* và *Asp. oryzae*. Người ta dùng môi trường đặc có sử dụng các loại nguyên liệu như cám mì, cám gạo, bột ngô trộn với trấu theo tỉ lệ cân đối đã được quy định. Hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu không nhỏ hơn 20%. Ngoài ra, còn có đầy đủ các chất dinh dưỡng khác như nguồn N (muối ammonium, amino acid), thành phần khoáng và vi lượng. Môi trường sau khi chuẩn bị xong, tạo độ ẩm 55 - 60%, được tải ra nong, nia có độ dày 3,0 - 5,0cm, có thông khí hay tạo độ thoáng thích hợp. Cấy chủng nấm mốc vào.

- **Nuôi cấy chìm:** Thường dùng các loài *Asp. niger*, *Asp. batatae*. Hiện nay trên thế giới cũng như ở Việt Nam, sản xuất chế phẩm enzyme từ nấm mốc có xu hướng sử dụng kĩ thuật chính là dùng phương pháp nuôi cấy chìm. Với phương pháp này, nổi lên men có lắp hệ thống sục khí và khuấy đảo.

Thời gian thực hiện quá trình đường hóa dài hay ngắn còn tùy thuộc vào chủng giống nấm mốc và nguyên liệu được sử dụng, thông thường từ 24 đến 40 giờ.

Chất lượng quá trình đường hóa được đánh giá theo hoạt lực của amylase, dextrinase, gluco-amylase.

Kết quả quá trình đường hóa cho các sản phẩm gồm hỗn hợp dextrin, maltose, glucose. Trong đó glucose chiếm tỉ lệ cao nhất.

2. Lên men biến đường thành rượu

Đây là giai đoạn quan trọng nhất trong sản xuất rượu - quyết định chất lượng sản phẩm tạo thành.

Sau khi có dịch đường hóa hay dịch rỉ đường đã được xử lí, người ta sẽ bổ sung thêm một số thành phần để cung cấp thêm vitamin và amino acid như muối ammonium, muối phosphate, dịch tự phân nấm men. Môi trường có thành phần như trên có thể sử dụng để lên men.

a) Giống : Giống sử dụng chủ yếu là các chủng của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Các chủng nấm men dùng trong sản xuất phải có những đặc điểm sau:

- Có đầy đủ đặc điểm đặc trưng của nấm men.
- Tốc độ phát triển mạnh, hoạt lực lên men cao.
- Lên men được nhiều loại đường khác nhau và đạt được tốc độ lên men nhanh.
- Chịu được độ cồn cao: 10 - 12%.
- Thích nghi được với những điều kiện không thuận lợi của môi trường, đặc biệt là đối với chất sát trùng.

Riêng đối với các chủng nấm men ở Việt Nam đòi hỏi phải có khả năng lên men ở nhiệt độ tương đối cao, $\geq 35^{\circ}\text{C}$, có khả năng hoạt động ở $\text{pH} = 4,5 - 5$ (môi trường acid).

Giống trước khi được cấy vào nổi lên men cần được kiểm tra để có những yêu cầu sau: không có vi khuẩn nitrite, không có men dại *Saccharomyces spp.* (Men dại nhiễm vào môi trường trong quá trình đường hóa khi sử dụng nấm mốc. Men dại có hình thái hơi khác với men chính, sống từng đám nổi lên bề mặt của môi trường lên men, chịu được nhiệt độ cao $60 - 65^{\circ}\text{C}$ và ở $t^{\circ} = 42 - 45^{\circ}\text{C}$ vẫn phát triển rất mạnh. Nó lấn át men chính, do vậy làm giảm hiệu suất lên men), không nhiễm *Candida*, *Trerula* ..., vi khuẩn lactic không quá 4 - 6 tế bào/ hiển vi trường.

b) Quá trình lên men: Môi trường lên men sau khi được khử trùng, kiểm tra độ đường đạt 90 - 120 g/l và $\text{pH} = 4,5 - 4,8$, có thể cấy giống vào.

Thời gian lên men: Từ 65 - 72 giờ. Trong đó, 10 giờ đầu có sục khí để nấm men sinh sôi nảy nở, sau đó cho lên men tĩnh (yếm khí).

Ta có thể giải thích cơ chế quá trình lên men rượu xảy ra như sau: Đường và các chất dinh dưỡng của môi trường lên men được hấp thụ và khuếch tán vào trong tế bào nấm men qua màng tế bào. Trong khi nước ra vào tự do qua màng tế bào nấm men, thì đường và các chất dinh dưỡng khác được màng tế bào chỉ cho đi vào mà không cho quay ra. Trong tế bào nấm men, nhờ hoạt động sống của tế bào, nhờ hoạt động xúc tác của hàng loạt men mà những phản ứng sinh hóa phức tạp xảy ra và dẫn đến tổng hợp chất này, phân hủy chất kia. Rượu ethanol và CO_2 tạo thành liền thoát ra khỏi tế bào. Rượu ethanol tan tốt trong nước, do vậy nó khuếch tán rất nhanh vào môi trường xung quanh.

Trong quá trình lên men, cần phải định kì lấy mẫu để kiểm tra vi sinh vật tạp nhiễm, trạng thái của tế bào nấm men.

Nấm men trong lên men phải đạt các chỉ số sau:

- Số lượng tế bào nảy chồi: 10 - 15%.
- Lượng tế bào chết không quá 2%. Số tế bào chết tăng chứng tỏ có những tác động gây kìm hãm hoạt động của nấm men.
- Số tế bào chứa glycogen không ít hơn 70%.
- Không có loại vi khuẩn tạp nhiễm chuyển động; loại không chuyển động có thể có nhưng không được quá 4 - 6 tế bào/ hiển vi trường.
- Số tế bào nấm men trong 1ml phải đạt 120 - 140 triệu.

3. Chứng cất và tinh chế cồn

Khi kết thúc lên men rượu, sau khi đã loại bỏ tế bào men, muốn được rượu tinh khiết cần chưng cất dịch lên men để loại bỏ tạp chất.

Kỹ thuật cất rượu ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng rượu thu được. Đồng thời tỉ lệ tạp chất và chất lượng rượu lại chịu ảnh hưởng bởi nguyên liệu nuôi cấy.

Quá trình chưng cất rượu diễn ra theo các giai đoạn sau:

* Khi kết thúc lên men, đem cất dịch lên men ta được rượu thô (*quá trình chưng cất sẽ tách cồn cùng các chất dễ bay hơi ra khỏi dịch lên men*).

* Tiếp theo là quá trình tinh chế: tách các tạp chất ra khỏi cồn thô để ta có cồn tinh khiết. Trong cồn thô ngoài rượu ethanol còn có nhiều tạp chất. Dựa vào trọng lượng phân tử, khả năng bay hơi người ta chia tạp chất ra làm ba nhóm:

- *Tạp chất đầu*: Bao gồm các chất có độ sôi thấp hơn rượu ethanol như aldehyde acetic, ethyl acetate, methyl acetate, rượu methanol ... Các tạp chất đầu được lấy ra ở giai đoạn đầu của quá trình tinh chế nên còn gọi là rượu đầu hay rượu kỹ nghệ.

- *Tạp chất cuối*: Số này có nhiệt độ sôi cao hơn rượu ethanol và khó bay hơi. Đây là các loại rượu cao phân tử như isoamyllic, isobutylic ... Số tạp chất này ít hòa tan trong nước nên còn gọi là dầu fusel hay dầu rượu tạp.

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

Sau khi tinh chế, tách ba loại tạp chất nói trên, ta có rượu tinh khiết. Tuy nhiên, muốn có rượu tinh khiết, loại dùng trong thực phẩm, người ta phải chưng cất rượu ở những tháp chưng cất có thiết kế đúng quy cách (*như tháp chưng cất của nhà máy rượu Bình Tây, thành phố Hồ Chí Minh*).

Rượu tinh khiết dùng trong thực phẩm là rượu bảo đảm các chỉ tiêu sau đây (*Theo Nguyễn Đức Lượng, 1996*):

- + Trong suốt, không màu, không mùi lạ.
- + pH: 6,5 - 7,0
- + Hàm lượng ethanol: 96,5% thể tích.

- + Furfurol: không có.
- + Aldehyde: 6 - 10 mg/l.
- + Ester : 30 - 35 mg/l.
- + Dầu fusel: 30 - 60 mg/l.

Hỗn hợp rượu - nước là hỗn hợp đẳng phí (có điểm sôi chung) nên với phương pháp chưng cất thông thường không thể tinh chế được rượu ethanol có nồng độ rượu hơn 95,5% (thể tích). Vậy muốn có cồn tuyệt đối, tức cồn > 99% ta phải tinh chế thêm. Tùy ở quy mô sản xuất lớn nhỏ sẽ có phương pháp tinh chế khác nhau.

- Ở phòng thí nghiệm: Người ta dùng những chất háo nước như CaCO_3 , KCl , CuSO_4 ... để tinh chế cồn 99,5 - 99,7%. Nhưng phương pháp này cho hiệu suất thu hồi thấp, chỉ 60 - 65% so với rượu thô ban đầu.

- Trong sản xuất lớn: Người ta tinh chế bằng phương pháp chưng luyện dưới áp suất thấp ($p \approx 0,0525 \text{ atm}$) để hỗn hợp rượu - nước không có điểm sôi chung và cuối cùng sẽ thu được cồn tuyệt đối.

II. VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT RƯỢU VANG QUẢ

Danh từ *rượu vang quả* được dùng để chỉ loại rượu lên men từ dịch ép trái cây (nho, dâu, thơm (dứa), táo, lê...) của một số chủng nấm men. Rượu vang thu được không qua chưng cất, có hương vị thơm ngon của trái cây tự nhiên, có độ cồn nhẹ (10 - 15%) là loại nước giải khát thơm ngon giàu chất bổ dưỡng, đặc biệt rất thích hợp đối với phụ nữ.

1. Thành phần và giá trị dinh dưỡng của rượu vang quả

Rượu vang có thành phần rất phức tạp, đến nay ngay cả ở các nước có công nghệ sản xuất rượu vang lâu đời cũng chưa biết hết các chất cấu thành của rượu vang.

Thành phần chủ yếu của rượu vang bao gồm:

- Thành phần đầu tiên phải kể đến là cồn ethanol - là một trong những thành phần quan trọng nhất của rượu vang. Cồn ethanol có được do lên men tự nhiên từ dịch trái cây, do đó nó là thứ cồn tinh khiết, không lẫn aldehyde, ester. Độ cồn của rượu vang từ 10° - 12° ; nếu dưới 10° rượu sẽ hơi lạt; 12° trở lên là độ cồn hơi cao, uống mau say. Có thể nói rượu vang chứa một lượng cồn trung bình, không nhẹ quá như bia, không nặng quá như rượu trắng. Do vậy nhiều người uống được, kể cả phụ nữ và người cao tuổi.

- Cùng với cồn ethanol, rượu vang còn chứa nhiều các chất bổ dưỡng khác. Đường trong rượu vang vào khoảng 62 - 132g/l, chủ yếu là đường fructose, glucose và một ít galactose. Khi cho thêm đường saccharose vào dịch quả trước khi lên men, thì toàn bộ số đường này sẽ bị phân hủy thành đường khủ. Điều này cho thấy, nếu phát hiện được saccharose trong rượu vang thành phẩm, thì ta hiểu ngay là đường này được pha thêm vào sau lên men. Tùy theo lượng đường khủ còn lại trong rượu vang sau khi đã lên men xong, người ta phân biệt : *rượu vang khô* (dưới 10g đường/l), *nửa khô* (20 - 30g đường/l), *nửa ngọt* (45g đường/l) và *rượu ngọt* (80 - 110g đường/l). Người ta nhận thấy rằng: lượng đường khủ càng cao, lượng cồn càng phải cao để cho cân đối giữa độ cồn và độ ngọt, gây cảm giác ngon hơn cho người uống.

- Trong rượu vang còn chứa một lượng các acid vô cơ và hữu cơ như acid tatric, acid malic, acid citric, acid oxalic ... Có thể nói rượu vang là thức uống có độ chua cao, với hàm lượng acid tổng số = 4 - 7g/l (quy ra acid malic). Độ pH của rượu vang = 2,9 - 3,9. Ở các nước phương tây, độ chua của rượu vang là thành phần quan trọng ngang với độ cồn. Tuy có độ chua cao, nhưng rượu vang vẫn dễ uống, vì vị chua của acid được cân đối với vị ngọt của đường, cồn, glycerin, vị chất của polyphenol.

- Trong rượu vang, chứa một lượng phong phú các loại muối - tuy với hàm lượng rất thấp - đó là muối của các nguyên tố: P, S, K, Na, Ca, Fe, Cu, Mn Khi phân tích, một lít rượu vang chỉ có 1,5 - 3g tro, nhưng chất muối trong rượu vang giữ vai trò rất quan trọng là làm tăng hương vị của rượu và làm tăng giá trị dinh dưỡng cung cấp nguồn vi lượng cho cơ thể.

- Một giá trị dinh dưỡng đáng kể của rượu vang là giàu vitamin các loại. Ai cũng biết nước quả giàu vitamin. Vấn đề là các vitamin này có bị phá hủy trong quá trình lên men không ? Thực tế cho thấy, lên men trong làm rượu vang là một quá trình điều chỉnh lại thành phần vitamin của nước quả và là kĩ thuật tốt để giữ lại các vitamin trong nước quả. Có một số vitamin được lưu giữ lại tốt trong nước quả qua lên men, một số vitamin lại được bổ sung thêm, ngược lại có một số bị mất đi trong quá trình lên men. Bảng dưới đây cho thấy thành phần vitamin của dịch quả (cụ thể là nước nho) và của rượu vang nho.

BẢNG 4: Thành phần vitamin của nước nho tươi và của rượu vang nho (Theo Lafon-Lafourcade, 1975).

Vitamin	Nước nho	Rượu vang	
		Trắng, lên men không xác quả	Đỏ, lên men có xác quả
Thiamine (B ₁) - microgram	160 - 450	2 - 58	103 - 245
Riboflavine (B ₂) - microgram	3 - 60	8 - 133	0,47 - 1,9
Acid pantothenic - miligram	0,5 - 1,4	0,55 - 1,2	0,12 - 0,68
Pyridoxine (B ₆) - miligram	0,16 - 0,5	0,12 - 0,67	0,13 - 0,68
Nicotinamide (PP) - miligram	0,68 - 2,6	0,44 - 1,3	0,79 - 1,7
Biotin (H) - microgram	1,5 - 4,2	1 - 3,6	0,6 - 4,6
Cobalamine (B ₁₂) - microgram	0	0 - 0,16	0,04 - 0,10
Acid P-aminobenzoic - microgram	15 - 92	15 - 133	15 - 133
Cholin - miligram	19 - 39	19 - 27	20 - 43

2. Quy trình sản xuất rượu vang (hình 8)

a) Nguyên liệu và chế biến nguyên liệu:

Nói đến rượu vang trái cây thì nguyên liệu chính dùng trong sản xuất là trái cây các loại. Tất cả các loại quả nếu có chứa đường, protein, muối khoáng và không chứa các chất độc hại đối với nấm men đều có thể sử dụng để chế biến lên men tạo rượu vang. Vấn đề cần lưu ý là các loại quả khác nhau có thành phần khác nhau sẽ được xử lý bằng những phương pháp khác nhau và có sự bổ sung hay không các chất khác nhau.

Tóm lại: Phải chọn được quả thích hợp để bảo đảm lên men tốt, cho chất lượng rượu cao và hợp thị hiếu người tiêu thụ.

* Nguyên liệu:

Các loại quả như nho, táo, dâu, cam, xoài ... thậm chí cả cóc, bưởi, mận đều có thể dùng làm nguyên liệu để chế biến lên men rượu vang. Tuy vậy, trong số đó có những loại quả có chất lượng nước quả thích hợp hơn để lên men rượu vang, lý tưởng nhất là nho.

Nho là nguyên liệu thích hợp nhất vì :

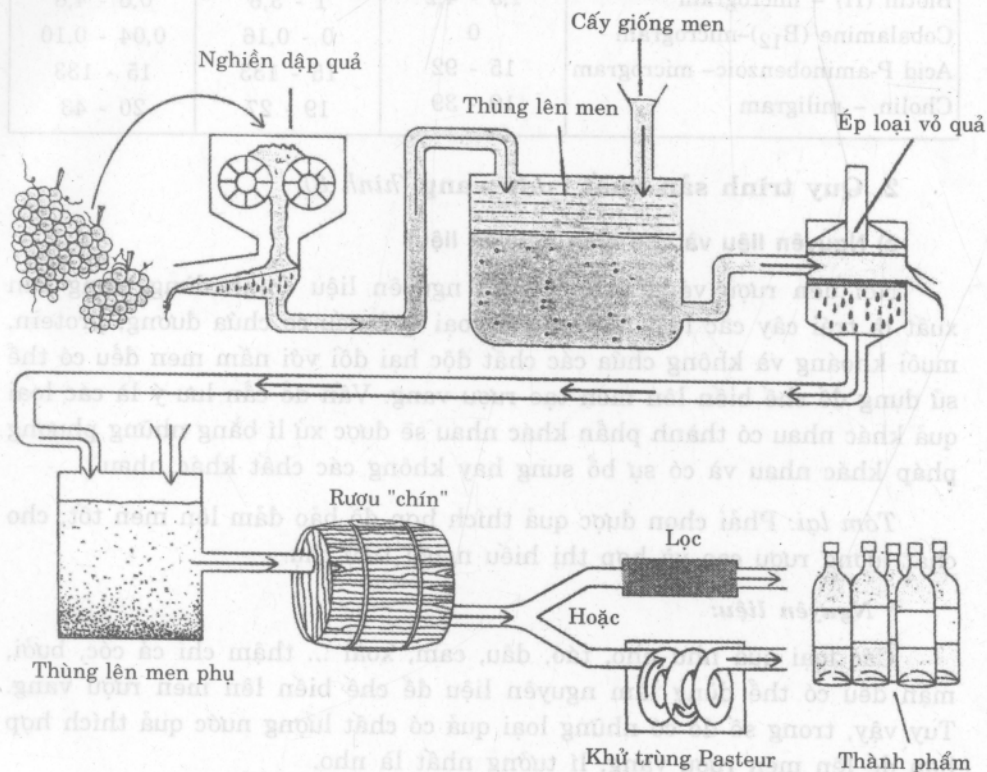
- Nho cho chất lượng rượu tốt nhất, hương vị đậm đà, có vị ngọt, nồng của cồn ethanol, cân đối với vị chua, chất của acid và tannin.
- Thành phần nước quả thích hợp với việc lên men.
- Nho cho sản lượng nước quả cao trên diện tích thâm canh tốt (1 ha có thể đạt 2 - 3 vạn lít nước quả).

Sau nho, các loại quả dâu, thơm cũng cho nước quả rất thích hợp với lên men tạo rượu vang.

*** Phương pháp chế biến nguyên liệu:**

Ở đây đề cập đến các biện pháp xử lý đối với nguyên liệu là quả nho.

– Quả hái về không để dập nát khi vận chuyển cũng như lúc bảo quản. Loại bỏ quả hư dập, rửa, để ráo. Cũng có trường hợp chỉ loại bỏ quả hư, xấu, không cần rửa, quả được đem sử dụng ép lấy nước ngay sau khi thu hoạch. Lí do của việc làm trên là do người sản xuất muốn sử dụng ngay những tế bào nấm men trên vỏ quả làm men giống trong lên men sau này mà không cần cấy giống nấm men thuần khiết.



Hình 8 : Quy trình sản xuất rượu vang đỏ

– Bước xử lý tiếp theo sẽ khác nhau tùy quy mô sản xuất :

+ Trong sản xuất nhỏ: Quả đem giã dập bằng cối sành, cối đá hay cối gỗ. Tuyệt đối không dùng dụng cụ bằng sắt, đồng (vì nước quả chua sẽ công phá sắt, đồng làm các ion này tan trong dịch quả, sau này gây kết tủa rượu, gây mất màu tự nhiên của rượu). Sau đó, vắt lấy nước

quả bằng tay, hay qua túi lọc bằng vải. Trường hợp lên men cả vỏ quả thì không cần lọc bỏ vỏ quả.

Quá trình xử lý trên được tiến hành khẩn trương, vì thời gian xử lý kéo dài nước quả sẽ bị ôxy hóa, dễ bị nhiễm tạp khuẩn, dẫn đến giảm chất lượng.

+ *Trong sản xuất ở quy mô công nghiệp*: Quả được ép bằng máy ép rồi lọc trong phòng chứa CO₂ với mục đích ngăn chặn dịch quả bị ôxy hóa do tiếp xúc với O₂.

Nước quả thu được sau khi tách ra từ quả không được tùy tiện bổ sung các chất mà phải tuân thủ theo những quy định chung để đảm bảo chất lượng của rượu.

++ *Để chống dịch quả bị ôxy hóa và tiêu diệt vi khuẩn tạp nhiễm* (vi khuẩn acetic, vi khuẩn lactic), người ta cho SO₂ vào dịch quả. Hóa chất này được các tổ chức quốc tế sản xuất rượu vang cho phép sử dụng với liều lượng quy định là 30 - 120mg/l dịch quả.

++ *Pha loãng dịch quả bằng nước*: Thường thì không được pha loãng dịch quả bằng nước, nhưng nếu sử dụng nhiều loại quả khác nhau, thành phần của dịch quả có loại chưa đủ lượng nước cần cho quá trình lên men, vì vậy có thể linh động bổ sung lượng nước để bảo đảm cho quá trình lên men được thực hiện tốt.

Việc bổ sung cũng phải tuân thủ theo những quy định cụ thể như sau:

- Không cho thêm nước vào dịch quả đối với nho, dâu, cam, dứa...
- Pha loãng với 15 - 20% nước tính theo khối lượng của phần quả ăn được (đối với măng cầu, xoài).
- Pha thêm 30% nước đối với mơ, mận, đào, dâu da ...

++ *Thêm đường*: Đường là thành phần quan trọng nhất trong dịch quả vì từ đường qua chuyển hóa của vi sinh vật sẽ tạo rượu. Tùy theo loại quả mà ta sẽ bổ sung thêm đường. Điều này theo quy định chung của Tổ chức các nước Sản xuất Rượu vang cũng có những chỉ định cụ thể rất chặt chẽ. Cùng một loại quả thu hoạch ở các vùng địa lý khác nhau, vào những mùa khác nhau cũng sẽ bổ sung lượng đường khác nhau.

++ *Điều chỉnh độ chua*:

Acid hữu cơ là thành phần quan trọng của nước quả. Hàm lượng acid không chỉ ảnh hưởng đến chất lượng nước quả mà quan trọng hơn là làm thay đổi pH của dịch nước quả, từ đó ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật và các enzyme.

Người ta nhận thấy các vi sinh vật gây hỏng rượu hoạt động tốt ở pH >3,5. Trong khi đó *Saccharomyces* lại phát triển bình thường ở pH = 3 - 3,5. Vì vậy giữ pH của dịch quả = 3 - 3,5 là cần thiết để nấm men phát triển tốt và ức chế sự phát triển của vi sinh vật có hại.

Do vậy phải điều chỉnh dịch quả đến pH thích hợp bằng CaCO_3 , acid tartaric, acid citric ... Phương pháp giản tiện hơn cả là trộn nước quả chín và nước quả của trái còn xanh để có được dịch quả có độ chua theo yêu cầu.

++ *Điều chỉnh một số chỉ tiêu khác*: Có thể bổ sung thêm nguồn N bằng muối ammonium, thêm nguồn vitamin bằng vitamin B1 ...

Sau khi thực hiện các bước điều chỉnh nói trên, nước quả được khần trương cho lên men.

Trong trường hợp nước quả thu được không bảo đảm độ tinh sạch cần thiết, dịch quả sẽ được tiệt trùng bằng nhiệt ở 65 - 70°C trong 10 phút.

b) Quá trình lên men tạo rượu vang:

* *Giống*: Để lên men rượu vang, người ta có thể sử dụng hai nguồn giống sau:

- *Nguồn giống đã được chuẩn bị sẵn* dưới các dạng sau:

+ *Dịch men giống*: Cấy từ ống giống thuần khiết qua khâu nhân giống các cấp, cấy vào dịch lên men với tỉ lệ giống cấy từ 3 - 10%.

+ *Bánh men khô*: Cấy vào dịch lên men với tỉ lệ 15 - 20g/l dịch lên men.

+ *Dịch lên men đang ở giai đoạn lên men mạnh*, tỉ lệ 1/3 - 1/5 thể tích nổi lên men (*lấy từ lần lên men trước*).

Người ta hay sử dụng nguồn giống này đối với các chủng nấm men: *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces oviformis*, *Torulopsis*.

- *Dùng nấm men dính trên vỏ*, rơi vào dịch nước quả một cách tự nhiên để lên men. Ở một số nước có vùng tồn tại nghề chế biến rượu vang rất lâu đời, nổi tiếng ngon, tập trung một số đông những người hành nghề làm rượu vang. Ở những vùng này bào tử nấm men rượu khuếch tán, vương vãi, bám ở khắp mọi nơi (ở đất, vỏ quả nho, dụng cụ làm rượu...). Côn trùng (*chủ yếu là ruồi dấm*) là đối tượng phát tán nấm men. Người sản xuất khi thu hoạch quả nho, loại bỏ quả dập, xấu, đem ép lấy nước mà không rửa quả nho. Dịch quả sẽ chứa một số lượng tế bào nấm men nhất định đủ để thực hiện quá trình lên men rượu. Tuy vậy, phương pháp lên men tự nhiên này thường cho độ rượu thấp, dễ bị tạp nhiễm.

Do nhiều hệ vi sinh vật tham gia chuyển hóa đường nên sản phẩm sau lên men không thuần khiết, có nhiều sản phẩm phụ ảnh hưởng đến chất lượng thơm ngon của rượu thành phẩm. Muốn bổ sung lượng men giống, sau một thời gian cho lên men, người ta sẽ bổ sung thêm lượng nấm men thuần khiết vào dịch đang lên men.

Để khắc phục nhược điểm của phương pháp lên men sử dụng giống nấm men tự nhiên nói trên, hiện nay để ổn định quá trình lên men ở quy mô công nghiệp, người ta phải sử dụng chủng nấm men thuần khiết được nuôi cấy nhân giống qua các cấp, cấy vào dịch lên men.

*** Theo dõi quá trình lên men qua một số chỉ tiêu sau :**

– *Hàm lượng đường* : Khi lên men phải tạo điều kiện để nấm men hoạt động mạnh, cho lên men nhanh, tiêu thụ hết đường. Vì vậy cần theo dõi hàm lượng đường thay đổi trong quá trình lên men. Nếu vì một lí do nào đó nấm men ngưng hoạt động, trong môi trường còn nhiều đường khử, các vi sinh vật khác (*không phải nấm men*) phát triển dễ dàng, đưa đến thành phần rượu không còn như bình thường.

– *Nhiệt độ* : Nếu thực hiện lên men trong những thiết bị có dung tích lớn, người sản xuất phải đo nhiệt độ vài lần trong ngày, vì trong quá trình lên men nhất là ở giai đoạn đầu, quá trình lên men mạnh, sủi bọt nhiều, năng lượng tỏa ra nhiều, lúc ấy nhiệt độ cũng tăng lên nhiều. Quá trình lên men thích hợp với khoảng $t^{\circ} = 20^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$.

Qua thực nghiệm và sản xuất, người ta thấy rằng : tốt nhất là từ đầu đến cuối của quá trình cho lên men ở cùng một nhiệt độ. Độ nhiệt ổn định dù ở mức khá cao $t^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$, nhưng giữ ổn định liên tục vẫn tốt hơn là lúc đầu $t^{\circ} = 20^{\circ}\text{C}$, sau tăng lên $t^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$.

– *Hàm lượng O_2* : Mặc dù lên men rượu là một quá trình yếm khí nhưng nhất thiết trong giai đoạn đầu của quá trình lên men phải cho nước quả tiếp xúc với O_2 không khí bằng cách sục khí. Giai đoạn sau cho lên men yếm khí.

Trong lên men ở quy mô sản xuất nhỏ người ta cho lên men ở bình có miệng to và nút bình bằng nút bông. Khi lên men ở quy mô lớn, người ta sử dụng các nôi lên men hay các bể, khi đổ môi trường lên men vào phải để trống một thể tích thích hợp khoảng $1/3 - 1/5$ thể tích nôi hay bể lên men.

*** Các giai đoạn lên men rượu vang :**

– *Giai đoạn hình thành rượu*: Là giai đoạn từ lúc cấy men giống vào, cho lên men đến khi dịch lên men hết sủi bọt mạnh. Nếu giữ được nhiệt

độ ổn định, thời gian lên men này kéo dài từ 4 - 5 ngày. Kết quả của giai đoạn này ta được “rượu non”.

Trong thời gian này nấm men hoạt động mạnh nhất, tiêu thụ nguyên liệu (*đường, đạm, vitamin*) mạnh, biến đường thành rượu, giải phóng CO₂. Kết thúc giai đoạn này thành phần nước quả thay đổi rất lớn.

- *Giai đoạn phát triển*: Khi kết thúc lên men ở giai đoạn một, người ta tiến hành gạn cặn, tách xác quả bằng biện pháp lọc (*đối với vang đỏ - vang thu được do lên men dịch quả có kèm xác quả*). Trong các cơ sở lên men ở quy mô lớn người ta dùng hệ thống ống hút xiphông để hút dịch lên men sang nổi hay bể lên men khác. Đây là lần gạn thứ nhất.

Khi được “rượu non”, ta tiếp tục cho lên men, nhưng ở giai đoạn này quá trình lên men xảy ra không ồ ạt - người ta còn gọi là lên men phụ, phân hủy những gam đường cuối cùng có trong dịch lên men. Đồng thời ở giai đoạn này có quá trình lên men malolactic. Kết quả quá trình này, acid malic được chuyển thành acid lactic, làm cho rượu được chuyển từ vị chua gắt sang vị chua nhẹ dễ chịu (*của acid lactic*), CO₂ còn được tiếp tục giải phóng nhưng có xu hướng ít dần. Dung dịch lên men ở trạng thái tĩnh lặng, xác men lắng xuống đáy bình hay bể.

Tiếp theo, thực hiện gạn cặn lần 2 (sau lần 1 khoảng từ 20 - 30 ngày), lần 3 (sau lần 2 hơn 30 ngày). Nếu rượu còn đục ta lại gạn tiếp... để có dung dịch trong suốt. Sau lần gạn cuối cùng rượu cơ bản ổn định về thành phần.

Ở giai đoạn này nếu nếm thử ta thấy rượu chưa thể uống được, vì có vị cay, đắng, hơi chua. Ta gọi là “rượu sống”.

LƯU Ý: Sau mỗi lần gạn cặn, các dụng cụ đựng dung dịch lên men như chai, bình, (*lên men ở quy mô nhỏ*), nổi lên men (*ở quy mô công nghiệp*) được đổ dịch lên men đầy hơn, tạo điều kiện lên men yếm khí nghiêm ngặt hơn. Đến lần cuối cùng đầy kín hoàn toàn, tạo sự cách li nghiêm ngặt với O₂.

- *Giai đoạn vang chín*:

Sau giai đoạn 2, “rượu non” đã ổn định thành phần nhưng rượu vẫn còn “sống”, người ta phải áp dụng một số biện pháp kĩ thuật để làm tăng chất lượng của rượu, để rượu được “chín”. Những biện pháp này rất đơn giản nhưng lại quyết định chất lượng của rượu thành phẩm. Cụ thể cách tiến hành:

+ Nút chai, bình đựng “rượu non” thật chặt.

+ Hạ thổ ở độ sâu 50 - 60cm ở vùng đất cao, mát, không bị ngập nước. Vị trí tốt nhất là dưới hầm ở trong nhà nơi nhiệt độ ít dao động.

Nếu không có điều kiện chôn sâu thì có thể để ở trong thùng đổ cát vùi kín. Hạ thổ với thời gian từ 4 - 5 tháng, rượu có thể uống được tuy chất lượng chưa hoàn hảo. Nếu để qua hai năm trở lên ta được rượu có chất lượng hoàn hảo gọi là rượu chín.

Trong thời gian chuyển từ rượu vang "sống" sang rượu vang "chín" đã xảy ra rất nhiều biến đổi sinh hóa phức tạp để chuyển từ rượu ít ngọt, ít thơm có vị chua lấn át, có vị đắng của CO_2 và aldehyde sang rượu chín trong vắt, có màu đỏ (hoặc vàng), có vị chua - ngọt cân đối của cồn - đường, vị đắng nhẹ của glycerin, vị chất của polyphenol. Khi có đầy đủ những tính chất như vậy ta được rượu thành phẩm.

III. MỘT SỐ SẢN PHẨM RƯỢU DÂN GIAN CỦA VIỆT NAM ĐƯỢC SẢN XUẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN TRUYỀN THỐNG

Hầu như mỗi dân tộc trên thế giới đều có những sản phẩm thực phẩm lên men truyền thống của riêng mình. Đó là các loại thực phẩm được sản xuất bằng phương thức thủ công mang sắc thái riêng biệt của từng dân tộc, được truyền từ đời này sang đời khác. Quy trình sản xuất các thực phẩm này đều dựa trên những quá trình lên men bởi vi sinh vật. Theo thời gian, các sản phẩm lên men truyền thống càng được mở rộng ra cả về chủng loại lẫn phương thức chế biến. Hiện nay ở một số nước có nền kinh tế phát triển (như Nhật, Hà Lan, Hàn Quốc...), một số sản phẩm lên men truyền thống đã được đưa vào sản xuất ở quy mô công nghiệp, sản phẩm thu được thỏa mãn nhu cầu trong nước và cả xuất khẩu, mang lại lợi ích to lớn cho nền kinh tế quốc dân.

Trong lĩnh vực làm rượu, ở Việt Nam chúng ta cũng có rất nhiều sản phẩm dân gian được sản xuất bằng phương pháp lên men truyền thống.

Dưới đây xin giới thiệu về hai loại rượu: rượu nếp than và rượu cần, là những thức uống khá quen thuộc trong đời sống ẩm thực của cộng đồng các dân tộc Việt Nam chúng ta.

1. Rượu nếp than (rượu cẩm)

Là thức uống có cồn ethanol, được sản xuất hoàn toàn bằng phương pháp thủ công từ nguyên liệu là một loại gạo nếp đặc biệt : nếp than. Giống như quy trình sản xuất rượu vang, rượu nếp than thu được không qua chưng cất, nhưng lại có chút khác biệt ở chỗ: sản phẩm cuối cùng là loại rượu bao gồm cả dịch lên men và bã lên men đã được làm nhuyễn. Tức sản phẩm rượu được dùng dưới dạng không trong suốt. Trong thành phần của mình, ngoài một lượng rượu và đường với nồng độ nhất định, rượu nếp than còn chứa một số các chất không thể có ở rượu chưng cất như nhiều vitamin, đặc biệt là vitamin nhóm B (B_1 , B_2 , B_{12}), các amino acid như asparagine, lisine, acid glutamic ... Vì vậy, rượu nếp than là một

loại thức uống bổ dưỡng, giúp tiêu hóa tốt thức ăn nếu sử dụng có mức độ. Ở rượu nếp than, người sành rượu sẽ thích thú với cảm giác vừa cay nồng, vừa ngọt và có hương thơm rất đặc trưng, hấp dẫn không có ở những loại rượu chưng cất khác.

Quy trình sản xuất rượu nếp than qua các khâu sau:

a) Nguyên liệu và chế biến nguyên liệu:

*** Nguyên liệu :**

Rượu nếp than được sản xuất với một loại nguyên liệu duy nhất là gạo nếp than (có nơi còn gọi là nếp cẩm). Gạo nếp than là loại gạo nếp đặc biệt được trồng nhiều ở các tỉnh Nam Bộ. Vì vậy rượu nếp than hầu như chỉ được sản xuất ở Nam Bộ. Gạo nếp than có 4 loại (tùy thuộc vào giống được sản xuất ở địa phương nào, mà người ta quen gọi gạo nếp than mang tên vùng đó):

- Nếp cẩm Đức Hòa.
- Nếp than Khánh Vĩnh.
- Nếp than Long Đất.
- Lúa lức nếp cẩm.

Hiện nay người dân còn có thói quen dựa vào màu của nếp than để chia nếp than ra làm hai loại:

- Nếp than đen huyền.
- Nếp than hồng đỏ.

Các sắc tố tạo nên màu của hạt nếp rất dễ hòa tan trong nước nên khi làm rượu từ các loại màu hạt nếp khác nhau sẽ cho màu rượu nếp than khác nhau. Chính vì vậy, ngoài giá trị dinh dưỡng, rượu nếp than còn được tăng thêm sự hấp dẫn cho người uống.

Tuy các loại nếp than có khác nhau về màu sắc nhưng thành phần hóa học của chúng không khác nhau nhiều. Có thể tham khảo bảng 5.

BẢNG 5: Thành phần hóa học của gạo nếp than
(Theo Nguyễn Đức Lượng, 1996).

Thành phần	Hàm lượng (%)
Protein	8,2
Lipid	1,5
Glucid	74,9
Acid hữu cơ	0,6
Tro	0,8
Nước	14,0

*** Quá trình chế biến nguyên liệu:**

- Gạo nếp than vo sạch, ngâm 3 - 4 giờ, với mục đích làm sạch gạo và hạt gạo khi ngâm sẽ mềm ra, trương nở, dễ nấu chín.

- Gạo sau khi ngâm, để ráo, được đem nấu chín, để nguội, dùng làm môi trường cấy giống lên men.

b) Giống vi sinh vật:

Trong sản xuất rượu nếp than, người ta chủ yếu dùng giống từ bánh men. Trong dân gian, người ta sử dụng nhiều loại bánh men khác nhau như bánh men thường, bánh men thuốc bắc và bánh men lá. Khi sản xuất rượu nếp than, người ta sử dụng bánh men thường hay bánh men thuốc bắc.

Các loại bánh men được sản xuất theo lối thủ công và có thành phần khác nhau.

*** Bánh men thường:** Thành phần chính của bánh men thường là bột gạo và giống vi sinh vật. Một trong những cách làm bánh men thường được thực hiện như sau:

Gạo ngâm nước (3 giờ) để ráo → xay thành bột → nhào bột với men giống + nước → định hình bánh men → ủ men ở $29^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$ trong 48 giờ → sấy khô ở 40°C hay phơi nắng → bánh men thành phẩm.

*** Bánh men thuốc bắc:** Thành phần ngoài bột gạo, giống vi sinh vật như trong bánh men thường còn có các vị thuốc bắc. Trong bánh men thuốc bắc ở Mai Động - Văn Hà (Hà Bắc) có 10 - 20 vị thuốc bắc như bạch truật, nhục đậu khấu, nhục quế ...

Bàn về vai trò của các vị thuốc bắc trong bánh men thuốc bắc còn có nhiều ý kiến khác nhau. Có ý kiến cho rằng các vị thuốc bắc có tác dụng kích thích sinh trưởng của vi sinh vật trong bánh men, có ý kiến cho rằng tác dụng sát trùng trong bánh men là chính, còn tác dụng tạo hương vị cho rượu cũng có nhưng không đáng kể...

*** Bánh men lá:** Bánh men lá thường được đồng bào các dân tộc thiểu số sản xuất và tiêu thụ. Đồng bào các dân tộc thiểu số thường dùng bánh men lá để sản xuất rượu cần. Ở bánh men lá thay cho các vị thuốc bắc, người ta dùng các loại lá rừng có nhiều tinh dầu. Tùy mỗi địa phương mà các loại lá sử dụng có thể khác nhau. Chất lượng rượu phụ thuộc rất nhiều vào số lượng và thành phần các loại lá cho vào này. Thường bánh men lá có 3 loại: loại men một lá, hai lá và ba lá.

Một đặc điểm đáng lưu ý trong lên men cổ truyền ở phương Đông nói chung và ở Việt Nam nói riêng là dùng hỗn hợp vi sinh vật làm tác nhân gây lên men. Hỗn hợp vi sinh vật trong bánh men bao gồm nấm mốc, nấm men và vi khuẩn. Hệ vi sinh vật này được giữ trong bột gạo

ở trạng thái khô của bánh men. Lúc này vi sinh vật tồn tại ở trạng thái nghỉ, các hoạt động sinh lí giảm thiểu. Chúng chỉ hoạt động mạnh khi được cấy vào nguyên liệu khi thực hiện lên men.

Hệ vi sinh vật trong bánh men gồm 2 nhóm có khả năng sinh tổng hợp enzyme đường hóa và rượu hóa.

- Nấm mốc thường có mặt trong bánh men là các chủng của *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Amycomyces*. Chúng giữ vai trò đường hóa.

- Nấm men:

+ *Endomycopsis fibuligenes* vừa có khả năng đường hóa, vừa có khả năng rượu hóa.

+ Nhóm *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces*, *Candida* ... có tác dụng rượu hóa.

- Vi khuẩn: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, chưa rõ chức năng.

c) **Quá trình lên men:** Lên men trong sản xuất rượu nếp than là một dạng lên men bán rắn. Người ta nhận thấy nuôi cấy vi sinh vật ở môi trường bán rắn gần gũi hơn đối với sinh thái của vi sinh vật trong tự nhiên. Trong điều kiện như vậy, vi sinh vật sẽ có khả năng tạo nhiều enzyme và trao đổi chất tốt hơn trong môi trường lên men chìm.

Sau khi nguyên liệu (cơm nếp) được làm nguội, người ta rắc bột bánh men vào với tỉ lệ 2 - 3%, tức 20 - 30g bột bánh men /1kg nguyên liệu, trộn đều và cho vào hũ hay vại có miệng nhỏ. Trong 4 giờ đầu của lên men, người ta không đậy kín miệng hũ mà phủ bằng miếng vải màn hoặc có thể đậy nắp hờ (không chặt), với mục đích tạo điều kiện hiếu khí tốt cho vi sinh vật phát triển, tăng sinh khối. Từ giờ thứ 5 trở đi, người ta đậy kín bình, hũ lại, tạo điều kiện yếm khí để quá trình lên men được tiến hành.

Quá trình lên men ở đây thực chất có 3 quá trình song song xảy ra, tuy mức độ có khác nhau. Đó là các quá trình tăng sinh khối, đường hóa và rượu hóa.

Trong lên men ở giai đoạn đầu, nấm mốc và nấm men *Endomycopsis* phát triển mạnh sẽ tạo nên hệ enzyme amylase, glucoamylase phân giải tinh bột. Nấm men *Saccharomyces* đóng vai trò chủ chốt trong việc biến đường thành rượu. Song song với các quá trình này là quá trình chuyển hóa đường, các acid hữu cơ thành các sản phẩm phụ khác. Các quá trình chuyển hóa nói trên xảy ra xen kẽ nhau, hỗ trợ cho nhau và tạo nên một quá trình chung hài hòa, để cuối cùng tạo ra ngoài cồn ethanol, còn có hỗn hợp các sản phẩm phụ khác. Do vậy tạo cho rượu nếp than có hương vị đặc biệt, giá trị cảm quan rất khác biệt với các loại rượu khác.

Trong lên men rượu nếp than, độ cồn chỉ đạt khoảng 7 - 10%. Với nồng độ thấp như vậy, ethanol rất dễ dàng bị oxy hóa tiếp thành acid acetic, CO_2 và H_2O . Do đó, sau khi lên men xong, người ta phải bổ sung thêm một lượng rượu tinh khiết, vừa để nâng cao hàm lượng cồn trong rượu nếp than, vừa để tránh khả năng oxy hóa rượu bởi vi khuẩn acetic. Lượng cồn được bổ sung nhiều ít tùy theo đối tượng phục vụ của người sản xuất.

Sản phẩm cuối cùng thu được sau lên men có thể dưới 2 dạng:

- Rượu nếp than dạng đục: Sau khi lên men xong, đem cả khối lên men này xay nhuyễn, bổ sung cồn và đem lưu trữ ở kho.

- Rượu nếp than dạng trong: Sau khi lên men xong, đem xay nhuyễn xác bã, bổ sung cồn. Sau đó đem lọc và thu phần dịch trong đem lưu trữ ở kho.

Người ta đem lưu trữ rượu nếp than ở nơi có nhiệt độ ổn định và mát ít nhất là 6 tháng trước khi đưa ra thị trường với mục đích ổn định chất lượng rượu và tạo hương cho sản phẩm.

2. Rượu cần

Rượu cần là thức uống mang bản sắc dân tộc rất độc đáo của người miền núi. Nó được dùng phổ biến ở các dịp lễ hội, ma chay, cưới hỏi trong cộng đồng người dân tộc thiểu số, nhất là đồng bào ở Tây Nguyên (hình 9).

Rượu cần là loại rượu có vị ngọt so với rượu cất, có độ rượu nhẹ và giàu chất bổ dưỡng. Cũng như rượu nếp than, rượu cần thu được qua quá trình lên men theo phương pháp cổ truyền, không thông qua chưng cất. Tuy là một sản phẩm được sản xuất từ rất lâu đời, nhưng cho đến nay đây còn rất ít các công trình nghiên cứu đầy đủ về cơ sở khoa học của quá trình lên men cũng như chất lượng sản phẩm.

Dưới đây giới thiệu qua về quy trình sản xuất rượu cần của đồng bào các dân tộc Tây Nguyên.

a) Nguyên liệu và chế biến nguyên liệu:

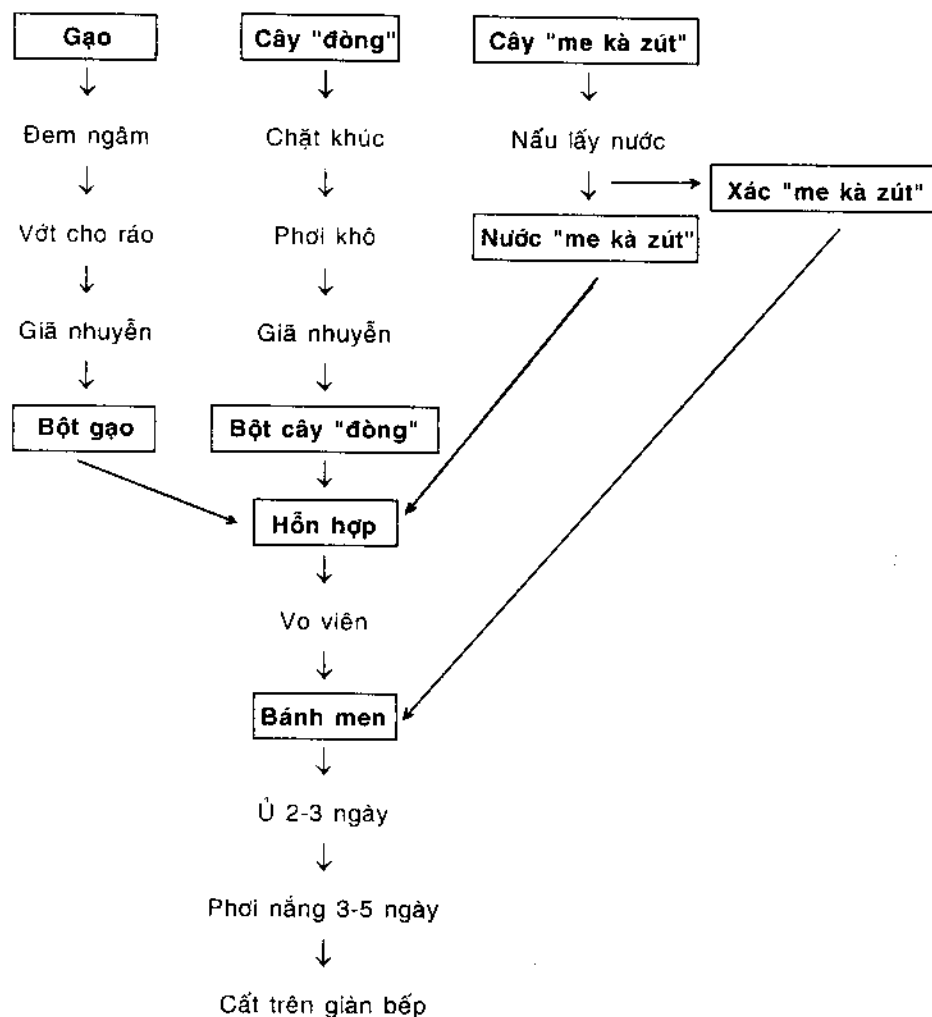
Nguyên liệu để sản xuất rượu cần là các loại gạo của lúa nương (lúa cấy trên cạn ở sườn đồi, núi). Hiện nay, do nhiều nguyên nhân, trong đó có nguyên nhân chính là do thiếu lương thực nên bà con các dân tộc đã thay gạo bằng các loại hoa màu khác như khoai mì, bắp ...

Ở đây, đề cập đến việc sử dụng nguyên liệu là gạo. Gạo được nấu chín thành cơm. Gạo đem nấu, theo cách làm của người K'Ho: không được vo sạch, chỉ đổ nước vào và đem nấu. Cơm được nấu cần bảo đảm không khô, không nhão, xới cơm tãi trên một tấm đệm, để nguội.

Một nguyên liệu phụ khác là trấu. Trấu được dùng để trộn với cơm (trước khi cấy men) hoặc dùng lót thành lớp mỏng ở đáy gùi và phủ lên bề mặt của gùi khi dùng gùi ủ cơm với bột bánh men. Mục đích sử dụng trấu là làm tăng độ tơi xốp của cơm cũng như cản trở sự giảm độ ẩm của nguyên liệu.

b) Giống vi sinh vật:

Trong sản xuất rượu cần, người ta chủ yếu dùng giống vi sinh vật từ bánh men lá. Quy trình làm bánh men lá của người dân tộc K'Ho được trình bày ở sơ đồ 1 sau đây (theo Nguyễn Thị Kim Huệ, 1996).



SƠ ĐỒ 1: Quy trình làm men lá của người dân tộc K'Ho

Nguyên liệu sử dụng là gạo, cây “đồng” và cây “me kà zút” (tên gọi của người dân tộc K’Ho). Hai loại cây này có tính kháng khuẩn, diệt côn trùng. Cả hai loại cây đều sử dụng cả thân và lá.

Sự hiện diện của vi sinh vật trong bánh men là do nhiễm từ trong không khí hoặc đã có sẵn trên hai loại cây nói trên. Qua điều tra của Nguyễn Thị Kim Huệ, 1996, từ bánh men lá của người dân tộc K’Ho, đã phân lập được:

- Hai chủng nấm mốc thuộc chi *Mucor* và *Rhizopus*. Hai chủng này có khả năng đường hóa.

- Hai chủng nấm men (chưa định danh), một trong hai chủng này vừa có khả năng đường hóa, vừa có khả năng rượu hóa.

- Một số chủng vi khuẩn tạp nhiễm khác (chưa định danh) và chưa rõ chức năng.

Với cách làm bánh men của người K’Ho nói trên ta thấy thành phần vi sinh vật trong bánh men là hoàn toàn không ổn định. Do vậy sẽ ảnh hưởng lớn đến chất lượng của rượu được tạo thành. Trong quá trình sản xuất rượu cần, việc dùng bánh men lá còn phụ thuộc vào mùa. Trong năm có mùa thích hợp cho sự thu hái của các cây dùng trong men lá, có mùa lại không thu hái được vì chúng không mọc. Do vậy, ngày nay đồng bào dân tộc miền núi khi sản xuất rượu cần hầu như ít sử dụng bánh men lá mà dùng bánh men thuốc bắc hay bánh men thường do người Kinh sản xuất.

c) Quy trình lên men rượu cần

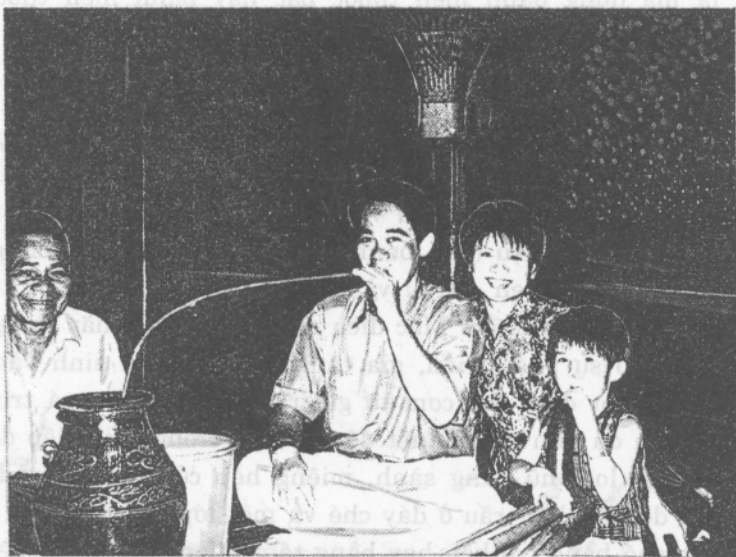
Như đã trình bày ở trên, gạo sau khi nấu chín, để nguội, được trộn thêm với trấu. Hỗn hợp cơm - trấu sẽ là nguyên liệu để cấy bánh men lá vào. Bánh men lá được trộn đều vào hỗn hợp cơm - trấu với tỉ lệ 3 bánh men / 5kg nguyên liệu (mỗi bánh men có khối lượng khoảng 40g). Chuyển hỗn hợp cơm - men - trấu vào gùi, ủ qua đêm (Lưu ý: trên và dưới đáy gùi phủ một lớp trấu). Mục đích của giai đoạn ủ này là tạo điều kiện thích hợp cho sự phát triển, gia tăng sinh khối vi sinh vật trong gùi ủ. Sau khi ủ một đêm, tải cơm từ gùi ra để nguội (vì quá trình lên men qua một đêm đã làm tăng nhiệt độ của cơm trong gùi), tiếp đến cho cơm vào ché (một loại hũ bằng sành, miệng hẹp của đồng bào dân tộc thiểu số), cũng để một lớp trấu ở đáy ché và một lớp phủ lên trên miệng ché. Bịt miệng ché bằng tro bếp hay bằng tấm nilon. Quá trình lên men rượu trong ché kéo dài khoảng một tháng. Lúc này cơm trong ché đã bị phân hủy mạnh, nên phần cơm rượu trong ché chỉ còn bằng 1/2 ché.

Trước khi sử dụng rượu, người ta dần một lớp lá chuối hoặc lá buông phía trên cơm rượu rồi đổ nước vào đầy ché. Nước đổ vào thường là nước mưa hay nước suối sạch. Lượng nước đổ vào khoảng 20 lít/20kg gạo. Lúc này ta có rượu thành phẩm có thể uống được. Rượu cần được coi là ngon, có chất lượng, là thứ rượu có sự hài hòa giữa các thành phần của acid hữu cơ, cồn, đường và hương thơm. Nồng độ rượu ethanol có trong rượu cần tương đương hoặc cao hơn một ít so với độ rượu của bia.

Một điều rất độc đáo khi uống rượu cần là khi uống gần hết rượu trong ché, người ta lại đổ thêm nước vào. Chính vì vậy rượu càng về sau càng trở nên nhạt hơn so với thứ rượu ở lần đổ nước đầu tiên. Cứ như thế cho đến khi rượu nhạt không sử dụng được nữa. Ta có thể hình dung nghi lễ thưởng thức rượu cần của dân tộc Lat như sau (theo Nguyễn Thị Kim Huệ, 1996):

- Bắt đầu buổi lễ, họ chào mừng khách bằng tiếng trống, cồng, chiêng. Sau đó chế rượu được mở nắp.

- Rượu được sử dụng khi cơm đã bị phân hủy gần hết, nên phần cơm rượu chỉ còn khoảng nửa ché. Họ dần một lớp lá chuối hay lá buông phía trên cơm rượu trước khi đổ nước vào cho đầy ché.



Hình 9 : Rượu cần – một sản phẩm của lên men cổ truyền.

8
05/07
2022

- Già làng sẽ lấy cần hút bằng tre hay mây (đã được đục lỗ thông qua các đốt) để mời tất cả khách chạm tay vào cần. Khách đã chạm tay vào cần tức là đã chấp nhận lời mời uống rượu. Người khách nào quan trọng nhất sẽ được mời cầm cần hút vào ché rượu. Già làng sẽ nhấp thử trước để chứng tỏ cho khách thấy rượu không có thuốc độc. Sau đó vị khách này sẽ là người đầu tiên thưởng thức rượu cần.

Qua tìm hiểu sơ bộ về quy trình làm rượu cần cũng như các thức uống lên men dân gian cổ truyền khác, chúng ta thấy cần có trách nhiệm tìm hiểu kĩ hơn về các quy trình này để có thể bảo vệ và phát triển những sản phẩm độc đáo của các dân tộc, góp phần vào triển khai phục vụ khách du lịch trong và ngoài nước. Đồng thời thiết thực giúp khắc phục tình trạng chất lượng không ổn định và bảo đảm các chỉ tiêu về vệ sinh thực phẩm cho các sản phẩm được sản xuất theo lối lên men truyền thống của các dân tộc thiểu số vùng cao.

CHƯƠNG V

VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT BIA

Bia là một loại nước giải khát lên men rất bổ dưỡng. Bia có độ rượu nhẹ (*hàm lượng rượu khoảng 3-6%*), có gas (*hàm lượng CO_2 khoảng 3-4 g/l*), có bọt mịn xốp, có hương vị thơm ngon rất đặc trưng. Ngoài ra, bia còn chứa một số chất bổ dưỡng:

- *Chất đạm*: Đặc biệt là đạm hòa tan chiếm 8 - 10% chất tan, bao gồm : protein, peptid và amino acid.

- *Glucid*: Glucid tan (70% là *dextrin, pentosan* - sản phẩm caramel hóa).

- *Vitamin*: Chủ yếu là vitamin nhóm B (vitamin B_1 , B_2 ...).

Ngoài ra trong bia chứa một lượng các enzyme khác nhau. Đặc biệt CO_2 hòa tan trong bia có tác dụng làm giảm nhanh cơn khát cho người uống bia, giúp tiêu hóa nhanh thức ăn và ăn uống ngon miệng, giảm mệt mỏi, tăng phần tỉnh táo nếu như người uống sử dụng một liều lượng thích hợp.

Nhờ những đặc điểm nêu trên, bia được sản xuất và sử dụng rộng rãi ở hầu hết các nước trên thế giới.

Cũng như các công nghệ khác, quy trình sản xuất bia bao gồm ba công đoạn chính sau (hình 10):

- Xử lý nguyên liệu.
- Lên men.
- Thu hồi - tạo thành phẩm.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ XỬ LÝ NGUYÊN LIỆU

Công thức nguyên liệu chủ yếu cho sản xuất bia:

$$\text{Bia} = \text{Malt đại mạch} + \text{hoa huplong} + H_2O$$

Ta có thể điếm qua các bước trong khâu xử lý nguyên liệu.

1. Malt đại mạch

Malt là tên chung gọi ngũ cốc đã nảy mầm (*đại mạch, tiểu mạch, thóc nếp, tẻ, lúa mì...*). Hiện nay trong sản xuất bia người ta dùng chủ

yếu là đại mạch nảy mầm. Do vậy danh từ malt cũng được hiểu và gọi cho đại mạch nảy mầm.

Hạt đại mạch là nguồn cung cấp tinh bột cho quá trình đường hóa, tạo đường cho sự lên men rượu về sau này. Đồng thời trong quá trình nảy mầm của đại mạch sẽ tích tụ nhiều enzyme cũng như tăng hoạt tính của nhiều enzyme có trong hạt như amylase, protease, maltase ... Vì vậy nguyên liệu cho sản xuất bia phải dùng đại mạch đã nảy mầm.

Malt đạt tiêu chuẩn phải là hạt malt mọng nước, có rễ dài 1,5 - 2cm, có độ dài lá mầm khoảng 2/3 - 3/4 chiều dài hạt thóc khi sản xuất bia sáng màu hay bằng chiều dài hạt thóc khi sản xuất bia thẫm màu. Sở dĩ người ta quan tâm đến chiều dài lá mầm vì nó đặc trưng cho sự dễ hòa tan của nột nhũ.

- Trong sản xuất bia, người ta không dùng malt tươi mà dùng malt đã qua sấy khô, vì bản thân malt tươi có mùi và vị tươi sống không thích hợp cho làm bia. Hơn nữa, malt sấy khô dễ bảo quản, có thể trữ số lượng lớn để dùng dần.

Khi quá trình nảy mầm thóc đại mạch xảy ra, trong hạt sẽ có một số biến đổi sinh hóa sau:

- Tinh bột thủy phân một phần (20 - 25%) thành đường đơn nhờ enzyme amylase. Các đường đa (polysaccharide) sẽ bị phân giải một phần thành đường mono-, trisaccharide.

- Protein sẽ được phân giải thành pepton, peptid và các amino acid nhờ protease. Vì vậy sau nảy mầm, đạm amine tăng 3 - 6 lần.

- Lipid phân giải thành acid béo và glycerin nhờ lipase...

Tiêu chuẩn quan trọng để đánh giá chất lượng của malt là hoạt lực enzyme. Vì vậy trước khi sử dụng malt phải kiểm tra hoạt lực enzyme.

Sấy khô malt cũng là một công việc quan trọng và cần tuân thủ đúng phương pháp mới bảo đảm có chế phẩm malt khô có chất lượng, tức không làm ảnh hưởng xấu đến chất lượng enzyme trong malt.

Ngoài malt từ đại mạch, hiện nay để giảm giá thành sản phẩm, người ta đã cố gắng thay một tỉ lệ thấp malt đại mạch bằng malt của một số loại ngũ cốc có chứa nhiều tinh bột như hạt lúa mì, hạt gạo ... Nếu không đủ enzyme từ malt người ta có thể bổ sung chế phẩm enzyme từ nấm mốc.

Để chuẩn bị cho lên men bia, người ta *đường hóa thóc malt*. Thực chất ở đây không chỉ xảy ra quá trình đường hóa mà cả quá trình thủy phân protein để tạo các sản phẩm dễ tiêu như các amino acid, poly- hay

diamino acid. Các bước tiến hành đường hóa: malt xay nhỏ trộn với nước thành dịch; sau đó nâng dần nhiệt độ lên và giữ nó liên tục ở 45 - 50°C trong 1 giờ; sau nâng lên ở nhiệt độ 62 - 70°C trong 30 - 45 phút; sau nữa, lại nâng lên nhiệt độ 75°C cho đến khi đường hóa kết thúc; lọc dịch đường hóa để sau này sử dụng.

2. Hoa huplong

Cây huplong có tên khoa học là *Humulus lupulus L.*

Một đặc điểm đáng lưu ý của cây là hoa đực và hoa cái sinh ra trên hai cây khác nhau. Hoa cái chưa thụ phấn được dùng làm nguyên liệu sản xuất bia. Vì vậy phải nhổ bỏ sớm cây hoa đực kịp thời, nếu không, hoa cái bị thụ phấn, tạo hạt, sẽ giảm chất lượng của hoa trong sản xuất bia.

Khi hoa huplong sắp chín, ở phần hình nón xuất hiện những hạt tròn có màu xanh óng ánh và nhẵn dĩnh. Đó là những hạt lupulin - phần giá trị nhất của hoa. Những hạt này có chứa các chất thơm, các chất có vị đắng đặc trưng, nhờ đó bia có vị đắng dễ chịu, có hương thơm, bọt lâu tan và giữ được phẩm chất khi thời gian bảo quản kéo dài.

Hoa huplong được nhiều nước trên thế giới trồng như Cộng hòa Liên bang Đức, Ba Lan, Pháp ..., trong đó Tiệp Khắc (nay là Cộng hòa Séc và Cộng hòa Slovakia) là nước trồng hoa này có chất lượng và năng suất đứng hàng đầu. Bia của Tiệp Khắc ngon nổi tiếng là vì lý do đó.

Hoa huplong được thu hoạch ở thời kì gọi là "*chín kĩ thuật*". Lúc này, các cánh hoa hình nón còn đóng chặt, có màu vàng xanh hay xanh vàng, các hạt lupulin còn nằm trong hoa với đặc điểm: nhẵn dĩnh và có hương thơm. Nếu không thu hoạch đúng, thời kì "*chín kĩ thuật*" sẽ qua đi và tiếp theo là thời kì "*chín sinh lí*" của hoa: các cánh hoa hình nón mở ra, các hạt lupulin rơi rụng, hoa mất phần giá trị nhất.

Hoa tươi vừa hái về có độ ẩm khoảng 70 - 75%. Độ ẩm này khiến hoa không bảo quản được lâu, vì vậy phải tiến hành sấy, để hoa có độ ẩm 10 - 13%. Hoa sấy xong được bảo quản rất chu đáo ở phòng có độ ẩm không khí khoảng 85 - 90%, ở $t^{\circ} = 20 - 30^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 10 - 15 ngày. Với thời gian bảo quản như vậy, độ ẩm sẽ phân bố đều trong hoa, cánh hoa không bị giòn gãy. Để ức chế sự phát triển của vi sinh vật trên hoa người ta xử lí bằng SO_2 ; sau đó hoa được đóng bánh, bao kín bằng giấy chống mốc, bảo quản ở kho lạnh, khô, tối, ở $t^{\circ} = 0,5 - 2^{\circ}\text{C}$.

Để bảo quản hoa được lâu hơn, người ta có thể chế biến hoa huplong thành dạng cao.

Hoa qua chế biến phải bảo đảm các tiêu chuẩn sau:

- + Độ ẩm: 12,5%
- + Chất xơ: 13,3%
- + Các chất chứa nitrogen: 17,5%
- + Ester: 0,4%.

+ Các chất có vị đắng (*humulone, lupulone*): 18,3%, tannin: 3%...

Chính các acid đắng, nhựa đắng của hoa có tác dụng sát trùng cho bia. Tannin cũng tạo vị đắng và gây kết tủa protein do đó làm trong bia.

3. Nước

Nước trong sản xuất bia là yếu tố rất quan trọng, chất lượng của nước phần nào quyết định chất lượng của bia. Điều này nhiều khi người sản xuất chưa ý thức được, thậm chí còn coi thường.

Chất lượng nước được quyết định bởi các chỉ tiêu sau: độ cứng, pH, hàm lượng chất rắn và các chỉ tiêu sinh học.

- Độ cứng của nước được quyết định bởi hàm lượng Ca^{2+} và Mg^{2+} có trong nước. Xử lý nước trong sản xuất bia là phải loại các ion này ra khỏi nước. Nước đúng tiêu chuẩn dùng cho sản xuất bia là nước mềm, rất mềm càng tốt. Thích hợp nhất là nước có độ cứng tạm thời là 0,7 mili đương lượng/l.

- pH của nước trong sản xuất bia $\approx 6,8 - 7,3$.

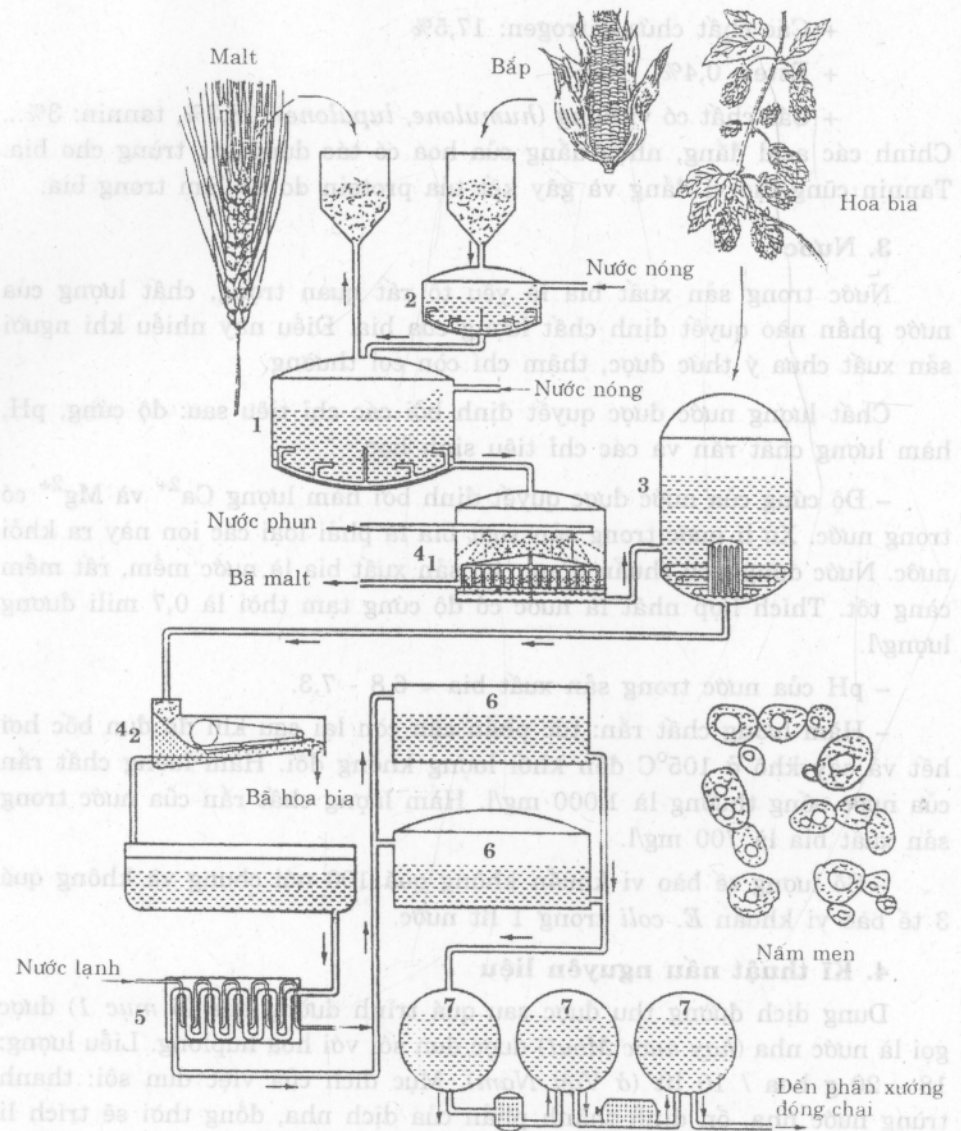
- Hàm lượng chất rắn: tức phần cặn còn lại sau khi đã đun bốc hơi hết và sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi. Hàm lượng chất rắn của nước uống thường là 1.000 mg/l. Hàm lượng chất rắn của nước trong sản xuất bia là 700 mg/l.

- Số lượng tế bào vi khuẩn không quá 100 nói chung và không quá 3 tế bào vi khuẩn *E. coli* trong 1 lít nước.

4. Kỹ thuật nấu nguyên liệu

Dung dịch đường thu được sau quá trình đường hóa (ở mục 1) được gọi là nước nha (hay nước Mout) được đun sôi với hoa huplong. Liều lượng: 18 - 20 g hoa / 10 lít (ở Việt Nam). Mục đích của việc đun sôi: thanh trùng nước nha, ổn định thành phần của dịch nha, đồng thời sẽ trích li các chất từ hoa huplong vào dung dịch như các acid đắng, nhựa đắng, tinh dầu ... làm cho bia sau này có vị đắng nhẹ rất đặc trưng. Ngoài ra khi đun sôi sẽ xảy ra phản ứng melanoidin và caramel hóa tạo màu vàng đẹp cho bia sau này. Đồng thời đun sôi sẽ giết các tạp trùng, khử hoạt tính của enzyme, làm đông tụ protein và cô đặc hơn dịch nha thích hợp cho từng loại bia.

Sau khi đun sôi, làm lạnh, lọc để loại bỏ xác hoa và các tạp chất
tủa, người ta dùng dịch này để cho lên men bia. Nếu lượng đường trong
dịch này không đủ dùng cho quá trình lên men ta có thể bổ sung thêm.



Hình 10 : Quy trình sản xuất bia

1. Thùng nấu malt
2. Thùng nấu nguyên liệu phụ
3. Thùng nấu hoa huplong
- 4.1, 2. Hệ thống lọc ép hoa loại bã
5. Hệ thống làm lạnh
6. Nồi lên men chính
7. Hệ thống lên men phụ

II. GIỐNG VI SINH VẬT VÀ QUY TRÌNH LÊN MEN BIA

Lên men bia là giai đoạn quan trọng, quyết định chất lượng của bia và hiệu suất sản xuất. Quá trình lên men sẽ chuyển hóa đường thành ethanol do tác nhân gây lên men là chủng nấm men *Sac. cerevisiae* hay *Sac. carlsbergensis*. Đồng thời trong quá trình lên men còn có quá trình tạo acid hữu cơ và rượu bậc cao. Rượu và acid tác dụng với nhau tạo ester, chính sản phẩm này có ảnh hưởng tốt đến quá trình tạo hương vị của bia.

Trong lên men bia, có thể sử dụng hai phương pháp sau:

- *Lên men chìm*: Thường sử dụng chủng nấm men *Sac. carlsbergensis*.
- *Lên men nổi*: Thường sử dụng chủng *Sac. cerevisiae*.

Dù dùng phương pháp nào, lên men bia cũng cần qua hai giai đoạn: lên men chính và lên men phụ.

1. Lên men chính (*chủ yếu dùng lên men chìm*)

Đặc điểm của giai đoạn này:

- Tế bào nấm men sinh trưởng, phát triển mạnh, cơ chất tiêu hao một lượng đáng kể, một lượng đường khá lớn được chuyển thành ethanol, CO_2 và H_2O . Song song với lên men ethanol còn có sự hình thành rượu bậc cao từ các amino acid (ví dụ tyrosol được sinh ra từ tyrosine). Chất tyrosol có vị đắng mạnh và là một trong những chất chính sinh ra mùi thơm đặc trưng của bia.

- Thời gian lên men: 6 - 10 ngày. Thời gian lên men dài hay ngắn còn phụ thuộc vào nồng độ chất hòa tan ban đầu của nước nha và yêu cầu về chất lượng bia.

- Nhiệt độ: Yêu cầu về nhiệt độ ở giai đoạn đầu này cao hơn giai đoạn sau. Cụ thể $t^\circ = 28 - 30^\circ\text{C}$.

- pH của môi trường lên men: Trong quá trình lên men chính, pH của môi trường sẽ có sự thay đổi, từ pH = 5,3 - 6 giảm xuống còn pH = 4,2 - 4,5 (do có tạo các acid hữu cơ và CO_2). pH giảm sẽ đưa đến hiện tượng đông tụ protein, sản phẩm của quá trình đông tụ sẽ kết lắng cùng với tế bào nấm men.

- Hiện tượng tạo bọt trong lên men: Khí CO_2 tạo ra lúc đầu tan trong dung dịch, sau với liều lượng cao sẽ tách ra tạo thành túi khí, tạo cơ sở cho sự tạo bọt.

Kết thúc giai đoạn lên men chính ta được sản phẩm gọi là bia non. Bia non có đặc điểm: còn đục, có mùi vị đặc trưng của bia nhưng chưa thích hợp cho việc giải khát.

2. Lên men phụ

Sau khi lên men chính kết thúc, người ta chuyển bia non sang lên men phụ.

Khác với lên men chính xảy ra trong các thiết bị lên men hở, lên men phụ thực hiện trong các bình kín gọi là nhà lên men phụ, ở $t^{\circ} = 0 - 5^{\circ}\text{C}$.

Đặc điểm của lên men phụ:

- Quá trình lên men xảy ra chậm, tiêu hao một lượng đường không đáng kể, dịch lên men được lắng đọng và bão hòa CO_2 . Giai đoạn này còn gọi là quá trình ủ chín bia.

- Thời gian của lên men phụ kéo dài từ vài tuần đến vài tháng, phụ thuộc vào chất lượng bia cần có. Kết thúc giai đoạn này ta thu được bia là một sản phẩm ở dạng dung dịch bão hòa CO_2 , có hương vị thơm ngon, dễ chịu nhờ những quá trình chuyển hóa xảy ra ở nhiệt độ thấp.

- Khí CO_2 sinh ra trong lên men tồn tại ở các dạng:

- + Dạng khí

- + Dạng hòa tan

- + Dạng liên kết: Tạo ester giữa CO_2 và acid nucleic. Những chất này không bền vững. Chính nhờ những chất này làm cho khí CO_2 có khả năng thoát ra khỏi bia một cách từ từ mỗi khi bị đột ngột làm giảm áp suất cao trong dụng cụ chứa bia (*khi ta mở nắp lon hay bia chai*).

Trong giai đoạn lên men phụ ở nhiệt độ thấp, sẽ xảy ra quá trình đông tụ nhựa hoa huplong, các hợp chất tannin - protein; tế bào men lắng xuống đáy bình và tiếp tục lên men một cách từ từ. Kết quả làm bia trong dần. Tuy không trong hoàn toàn nhưng nhờ vậy, quá trình li tâm và lọc bia thành phẩm sau này cũng dễ dàng hơn.

Tóm lại: Qua lên men phụ, mùi nấm men tươi, vị đắng của hoa huplong nấu (*hai đặc điểm nổi bật của bia non*) sẽ biến mất.

III. TẠO THÀNH PHẨM

Qua hai giai đoạn lên men chính, phụ, để đạt được bia thành phẩm cần phải tiếp tục xử lý thêm những khâu sau đây:

1. Làm trong bia Chủ yếu dùng phương pháp lọc hoặc li tâm.

Mục đích của quá trình này là tách các hạt protein, tế bào men, hoa huplong ra khỏi bia để thu được bia trong.

- Muốn lọc tốt, người ta dùng bột trợ lọc diatomite (*là chất có màu sáng xám, dạng bột không gây ảnh hưởng về mùi, màu cho bia*).

– Ngoài phương pháp lọc, có thể dùng phương pháp li tâm. Nhưng sau khi li tâm bia cũng chưa trong suốt. Muốn cho bia trong và lấp lánh, sau khi li tâm cần lọc bia qua lọc ống, lọc khung bản không cần chất trợ lọc.

2. Bảo hòa CO₂

Khí CO₂ sinh ra trong lên men khá nhiều, nhất là trong các thiết bị kín (*cả lên men phụ và lên men chính*), nhưng trong quá trình xử lý bia như gạn lọc, li tâm ... để loại bỏ xác men, các chất tủa ... , nó bị thất thoát đáng kể.

Trong quá trình sản xuất bia, người sản xuất sử dụng các túi chất dẻo hay cao su thu hồi CO₂ thoát ra, xong đem bơm vào các bình chịu áp lực cao. Số khí CO₂ này sẽ được sử dụng trở lại khi cần bảo hòa CO₂ trong bia hay đem bán như một mặt hàng phụ của nhà máy bia. Do thất thoát nên muốn bia thành phẩm có đủ CO₂ cần thiết phải dùng CO₂ thu được từ các nồi lên men nói trên để nạp lại vào trong bia. Quá trình này người ta gọi là nạp gas.

Ở những cơ sở sản xuất bia thủ công thường dễ thất thoát CO₂ nhiều, lại không thực hiện quy trình nạp gas đầy đủ nên chất lượng bia sẽ không bảo đảm.

3. Tăng độ bền của bia

Độ bền của bia được đo bằng đơn vị thời gian (tính bằng ngày đêm) từ lúc đóng chai, lon bia đến lúc bia bắt đầu bị vẩn đục.

Muốn giữ bia trong thời gian dài, cần ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật và các quá trình biến đổi trong bia. Người ta sử dụng biện pháp khử trùng bia theo kiểu Pasteur ($t^{\circ} = 60 - 70^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút).

Ngoài ra còn sử dụng một biện pháp khác để tăng độ bền của bia là xử lý bằng enzyme và các chất ổn định khác. Thông thường, người ta sử dụng enzyme để thủy phân các chất như protein vào giai đoạn lên men phụ và ủ chín bia.

Biện pháp thứ ba để tăng độ bền của bia là dùng polyamide để xử lý bia (*Polyamide là loại nhựa nhân tạo, là sản phẩm phản ứng ngưng tụ giữa amino acid hoặc các acid có hai nhóm carboxyl với các diamine*). Polyamide có tính chất hấp thụ một cách có chọn lọc các polyphenol, các protein cao phân tử, các chất mang đặc tính phenol ... là các chất có khả năng tủa trong điều kiện lạnh gây đục bia.

Bia sau khi xử lý như trên được coi là bia thành phẩm. Nó có màu vàng, trong suốt, hương vị thơm ngon, không có hương vị lạ, bọt nhiều, có vị đắng chất nhẹ đặc trưng. Bia thành phẩm được bảo quản trong kho lạnh. $t^{\circ} = 0 - 10^{\circ}\text{C}$.

CHƯƠNG VI

VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM TỪ SỮA

Để bảo quản dài hạn kết hợp với chế biến sữa thành những sản phẩm dùng trong thực phẩm, người ta đã chế biến sữa thành các sản phẩm như sữa lên men, bơ, phomat ... Ở quy trình sản xuất các sản phẩm này, vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn lên men lactic đóng vai trò quan trọng.

I. VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT SỮA LÊN MEN (SỮA CHUA)

Sữa lên men – hay người tiêu dùng quen gọi là sữa chua, là sản phẩm thu được thông qua hoạt động của một số sinh vật lên men sữa, trong đó chủ yếu là khu hệ vi khuẩn lactic và nấm men (*men sữa*). Dưới tác động của nhóm vi sinh vật này, đường lactose của sữa sẽ được chuyển thành acid lactic và một lượng rất nhỏ rượu ethanol (*nếu có sử dụng men sữa*). Protein bước đầu bị pepton hóa, sau chuyển thành các amino acid – những sản phẩm dễ tiêu hóa.

Sữa chua, tùy theo nguyên liệu và phương pháp chế biến khác nhau và tùy theo từng địa phương, sẽ có các tên gọi khác nhau như sữa chua, yogurt, sữa chua đặc acidophilin (*do vi khuẩn lactic lên men*), kefir (*do hỗn hợp vi khuẩn lactic và men sữa lên men*).

1. Thành phần dinh dưỡng và giá trị của sữa chua

– Sữa chua chứa 2 - 3% acid lactic được tạo nên do kết quả lên men đường lactose của vi khuẩn lactic. Sự có mặt của acid lactic trong sữa chua làm tăng khả năng tiêu hóa của con người, đặc biệt sự chuyển hóa các thức ăn giàu P, Ca.

– Ở một số loại sữa lên men (*kefir*) chứa một lượng nhỏ (0,6 - 3%) rượu ethanol do men sữa tạo nên. Trong lên men sữa, ngoài vi khuẩn lactic, để tăng giá trị của sản phẩm, đặc biệt để tạo một độ rượu vừa phải cho sản phẩm người ta còn sử dụng nấm men (*còn gọi là men sữa*). Đây là loại nấm men đặc biệt không giống các chủng nấm men sử dụng trong lên men tạo rượu, chúng chỉ phân giải được đường lactose mà không phân giải đường saccharose.

- Ngoài hai quá trình lên men nói trên, trong lên men sữa chua còn có các quá trình lên men phụ - lên men tạo hương. Kết quả tạo nên các chất gây hương đặc trưng của sữa chua như diacetyl và acetonyl.

- Đồng thời trong quá trình lên men sữa chua, protein của sữa được protease phân giải tạo thành pepton, các amino acid ...

- Trong sữa chua còn chứa một lượng vitamin nhóm B, vitamin PP ...

- Ngoài thành phần dinh dưỡng kể trên, sữa chua còn chứa một lượng lớn vi khuẩn lactic. Khi uống sữa chua, số vi khuẩn này vào ruột sẽ cạnh tranh với vi khuẩn gây thối (*thường sinh độc tố*) có trong ruột già. Do vậy sẽ hạn chế sự phát triển của vi khuẩn gây thối, tránh được các độc tố xâm nhập vào máu đầu độc cơ thể. Đặc biệt đối với những bệnh nhân bị nhiễm khuẩn phải sử dụng kháng sinh liều cao, dài ngày sẽ bị rối loạn hay bị hỏng hệ vi sinh vật đường ruột có lợi cho tiêu hóa. Đối với những người này uống sữa chua sẽ giúp phục hồi hệ vi sinh vật có lợi cho cơ thể.

- Giá trị của sữa chua còn đặc biệt ở chỗ vi khuẩn lactic và men sữa có khả năng tạo chất kháng sinh chống được *Staphylococcus* và một số tác nhân gây bệnh đường ruột khác.

Tóm lại: Sữa chua là một thực phẩm rất bổ dưỡng cho tất cả mọi người, đặc biệt là cho người mới lành bệnh và cho trẻ em.

2. Quy trình sản xuất sữa chua

Sữa chua là một sản phẩm lên men dân gian mà con người phát hiện được trong quá trình sử dụng và bảo quản sữa. Người ta còn ghi nhận người đầu tiên mở được xưởng sản xuất sữa chua (tuy quy mô còn nhỏ) là một thương gia người Tây Ban Nha. Sau Đại chiến Thế giới lần II, người này qua Hoa Kỳ mở xưởng lớn hơn và tổ chức quảng cáo rộng rãi. Dần dần sữa chua trở thành món ăn phổ biến ở các nước châu Mỹ, sau lan sang châu Âu, và hiện nay phổ biến trên toàn thế giới.

Sữa chua được sản xuất theo hai phương pháp: thủ công đơn giản và quy mô công nghiệp.

a) Nguyên liệu và xử lý nguyên liệu:

Trong sản xuất sữa chua, nguyên liệu duy nhất là sữa. Ở một số quốc gia hay ở một số địa phương có thói quen dùng sữa chua có đường. Trong quá trình sản xuất loại sữa chua này người ta cho thêm đường saccharose vào sữa tươi trước khi lên men (*như ở Việt Nam*). Thông thường ở hầu hết các nước người ta sản xuất sữa chua không đường.

Sữa là một nguyên liệu rất giàu chất bổ dưỡng.

BẢNG 6: *Thành phần của một số loại sữa*

Thành phần	Sữa bò tươi	Sữa bột	Sữa đặc có đường
Nước (g%)	86,2	2,0	25,4
Đạm hữu cơ protein (g%)	3,9	27,0	8,1
Lipid (g%)	4,4	28,0	8,8
Glucid (g%)	4,8	37,0	56,0
Khoáng (g%)	0,2	6,0	1,7
Ca (mg%)	120,0	900,0	307,0
P (mg%)	95,0	750,0	219,0
Fe (mg%)	0,1	0,8	0,6
Vitamin A (mg%)	0,05	0,47	0,03
Vitamin B ₁ (mg%)	0,05	0,15	0,06
Vitamin B ₂ (mg%)	0,19	0,61	0,3
Vitamin PP (mg%)	0,1	0,6	0,2

Chú thích: g% : số g trong 100 g.

mg% : số mg trong 100 g

Sữa dùng trong sản xuất sữa chua có thể gồm nhiều loại:

- Sữa tươi nguyên hay sữa đã tách béo.
- Sữa khô nguyên hay sữa sấy phun không béo.
- Sữa đặc nguyên hay sữa đặc không đường.

Các loại sữa nói trên muốn đưa vào sử dụng trong lên men cần được xử lí qua các khâu:

- Nếu là sữa khô phải *phục hồi sữa* bằng cách hòa sữa vào nước ở $t^{\circ} = 45^{\circ} - 65^{\circ}\text{C}$; khuấy, lọc qua rây, làm nguội đến $t^{\circ} = 8 - 10^{\circ}\text{C}$.

- *Bình thường hóa sữa*: Là bước điều chỉnh lại hàm lượng lipid cho thích hợp, với tỉ lệ 3,2 - 6%, nếu thừa lipid thì bổ sung thêm sữa đã tách béo, nếu thiếu thì bổ sung váng sữa.

- *Tiệt trùng sữa*: Diệt vi sinh vật gây bệnh (*truyền từ gia súc, người chăn nuôi, người vắt sữa*) và cả những vi sinh vật không gây bệnh, vì dù là loại nào cũng đều gây trở ngại cho lên men sữa sau này của chúng giống.

- *Đồng thể hóa sữa*: Bình thường khi sữa để yên một thời gian, trên bề mặt sẽ xuất hiện váng sữa. Sữa dùng trong lên men phải ở trong trạng thái là một thể đồng nhất. Muốn vậy, cần tiến hành làm đồng thể hóa sữa. Người ta sử dụng máy đồng thể hóa có áp lực cao, đánh tan các hạt lipid có $\phi = 3\mu\text{m}$ xuống còn $\phi = 0,2\mu\text{m}$, do đó các hạt với ϕ cỡ nhỏ

này không nổi lên trên bề mặt tạo vầng sữa. Tiếp theo, sữa sẽ được làm lạnh đến nhiệt độ cần cho sự lên men, và được cấy giống vào.

b) Giống:

Trong sản xuất sữa chua, người ta sử dụng các nguồn giống sau:

– Các chủng vi khuẩn lactic thuần khiết gồm một số loại : *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*.

Thường hai chủng đầu được sử dụng cùng với nhau với số lượng bằng nhau. Nếu *Streptococcus thermophilus* có số lượng nhiều hơn, lúc đó sữa chua thu được sẽ quá chua và kém mịn. Nếu muốn sữa chua có lên men rượu, người ta cấy thêm vào chủng vi khuẩn *Klebsiella*.

Đối với sản xuất sữa chua ở quy mô thủ công, người ta không sử dụng phương pháp cấy các chủng vi khuẩn lactic thuần khiết mà thường có thể cấy giống dưới dạng sau :

– Dùng sữa chua có được ở lần lên men trước làm giống. Một cốc sữa chua có thể gây giống cho 30 - 40 cốc khác.

– Hoặc dùng vi khuẩn lactic đông khô được các xí nghiệp dược phẩm sản xuất dưới dạng thuốc uống dùng cho các bệnh nhân bị bệnh đường ruột.

c) Quá trình lên men tạo sữa chua:

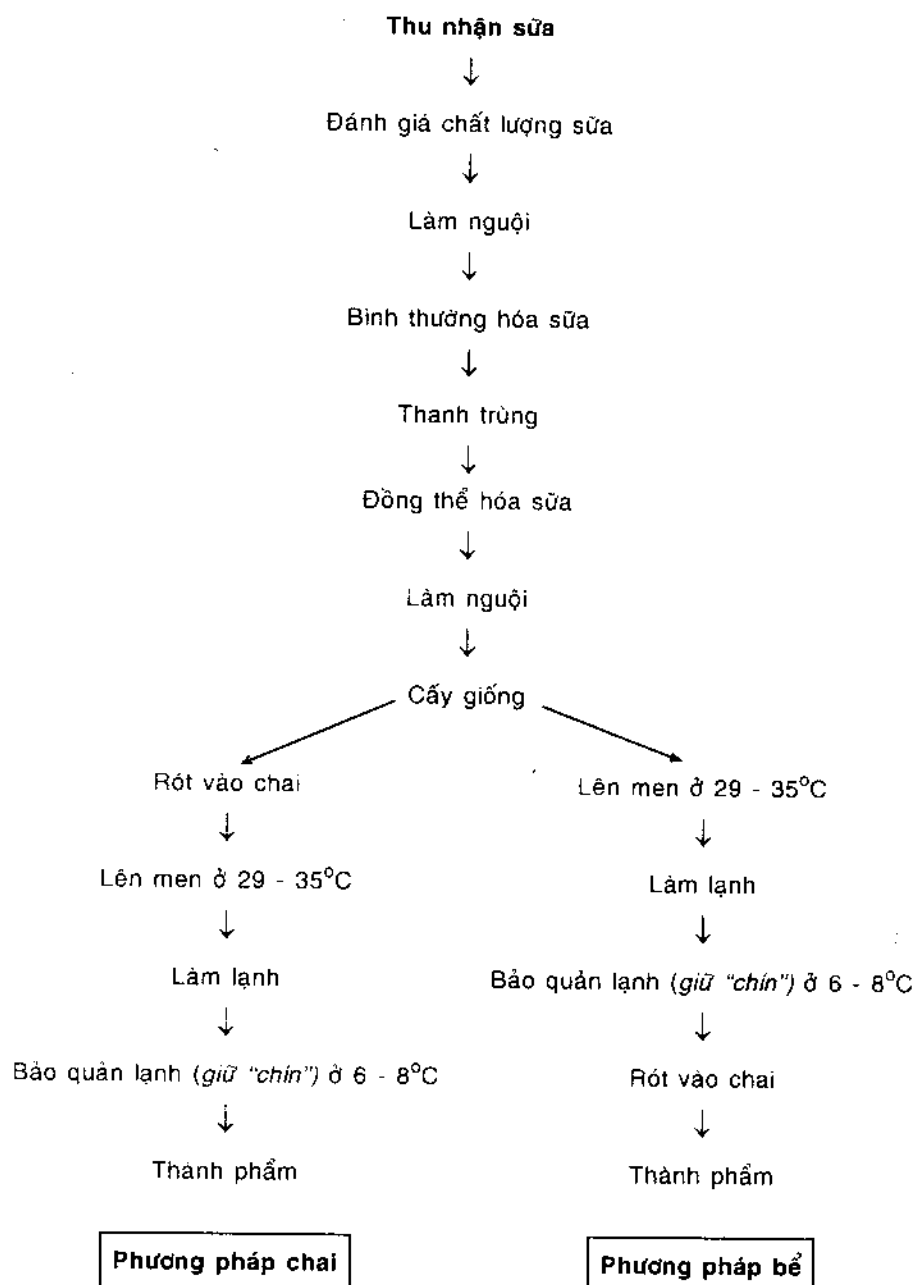
Dù sản xuất theo lối thủ công hay ở quy mô công nghiệp, quy trình sản xuất sữa chua đều tiến hành qua hai giai đoạn: giai đoạn làm đông tụ sữa và giai đoạn giữ "chín" sữa chua.

* **Giai đoạn làm đông tụ sữa:** Sữa các loại (sữa tươi, sữa bột, sữa đặc) sau khi qua các khâu xử lý nói trên, được khử trùng theo kiểu Pasteur ở $t^{\circ} = 85 - 90^{\circ}\text{C}$ trong 15 - 20 phút (sản xuất sữa chua ở điều kiện gia đình : nấu sữa đến vừa sôi, ngừng nấu ngay). Sữa được làm nguội tới $t^{\circ} = 40 - 50^{\circ}\text{C}$. Cấy giống vào.

– Trong sản xuất ở quy mô công nghiệp : Cấy giống vi khuẩn lactic ở dạng thuần khiết sau khi qua khâu nhân giống.

– Trong sản xuất thủ công ở gia đình: Phổ biến hơn cả là sử dụng sữa chua có được ở lần lên men trước để lại, được bảo quản trong điều kiện ở tủ lạnh. Cũng có khi người ta sử dụng ngay cả các gói vi khuẩn lactic dưới dạng đông khô (như đã trình bày ở phần giống).

Sau khi cấy giống, khuấy trộn đều giống vào trong sữa. Tiếp theo tùy thuộc vào sử dụng phương pháp lên men loại bề hay phương pháp lên men loại chai (xem sơ đồ 2) mà quá trình lên men sẽ được tiến hành tiếp tục.



SƠ ĐỒ 2: Quy trình sản xuất sữa chua theo hai phương pháp: phương pháp đóng chai riêng và phương pháp bể.

Ở giai đoạn này, quá trình lên men được tiến hành ở 29 - 35°C. Quá trình lên men lactic xảy ra một cách mạnh mẽ. Lúc này casein sữa bị kết tủa ở điểm pH đẳng điện, sữa được đông tụ, đạt độ chua cần thiết. Người ta căn cứ vào cục đông của sữa và độ chua để kết thúc quá trình lên men: cục đông phải đặc, đồng nhất, không có hiện tượng nước - sữa tách rời nhau ra; độ chua phải đạt 60 - 80°T (1°T (một độ Tesner) = số ml NaOH hay KOH cần để trung hòa 100 ml sữa).

Tùy thuộc vào từng chủng giống vi khuẩn được sử dụng và nhiệt độ lên men mà thời gian lên men dài - ngắn khác nhau. Thông thường 8 - 12 giờ. Khi sữa có độ chua đạt yêu cầu thì phải kết thúc nhanh quá trình lên men bằng phương pháp làm lạnh nhanh. Nếu không làm lạnh nhanh, độ chua tăng, nước sẽ tách ra khỏi sữa. Ở quy mô sản xuất công nghiệp điều nói trên cần được lưu ý một cách thích đáng.

*** Giai đoạn giữ sữa "chín":** Kết thúc giai đoạn trên, dịch lên men được chuyển sang điều kiện $t^{\circ} = 6 - 8^{\circ}\text{C}$ (cho vào ngăn dưới của tủ lạnh nếu sản xuất ở gia đình; cho vào phòng lạnh nếu sản xuất ở quy mô công nghiệp). Trong giai đoạn này quá trình lên men lactic vẫn còn nhưng chỉ xảy ra ở mức độ yếu, sữa tiếp tục đông tụ. Lúc này lipid trong sữa trở nên rắn, nước tự do liên kết với protein làm sữa đông đặc thêm. Ngoài ra ở giai đoạn này còn xảy ra quá trình tạo hương cho sữa, làm cho sữa chua có mùi rất đặc trưng.

Để tăng thêm sự hấp dẫn của sữa chua, người ta có thể gây thêm hương vị bằng cách bổ sung vaniline, hương vị của trái cây tự nhiên (như dâu, cam, dứa ...) hay hương tổng hợp, màu thực phẩm. Thời gian của giai đoạn giữ chín là 12 - 14 giờ.

Theo dõi quá trình lên men nói trên cho thấy ở quy mô sản xuất thủ công và ở quy mô công nghiệp cơ bản giống nhau. Có khác nhau ở chỗ, ở quy mô công nghiệp đòi hỏi lên men trong điều kiện vô trùng nghiêm ngặt, sử dụng giống vi khuẩn lactic ở dạng thuần khiết do đó đảm bảo quá trình lên men ổn định hơn, thu được sản phẩm có chất lượng cao hơn.

II. VI SINH VẬT TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT PHOMÁT

Phomát là sản phẩm lên men được chế biến từ sữa (sữa bò, sữa dê...) với sự tham gia của một số nhóm vi sinh vật. Đây là một thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, bảo quản được lâu.

Trong phomát chứa: protein 20% (dưới dạng pepton, amino acid), lipid 30%, các muối khoáng, các vitamin (A, B₁, B₂, C, ...).

Phomat có mùi vị thơm ngon, kích thích quá trình tiết dịch tiêu hóa, làm tăng khả năng đồng hóa thức ăn cho cơ thể. Phomat tuy chưa được sử dụng phổ biến ở Việt Nam, nhưng là một thực phẩm rất phổ biến và hợp khẩu vị của người châu Âu, châu Mỹ.



Hình 11 : Phomat- một sản phẩm của Công nghệ Vi sinh

Quy trình sản xuất phomat được tiến hành qua 4 giai đoạn, trong đó các vi sinh vật đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình chế biến. Cũng như quá trình sản xuất sữa chua, ở đây nguyên liệu chính cũng là sữa.

1. Giai đoạn làm đông sữa

Từ nguyên liệu sữa ban đầu, sữa được làm đông lại. Về mặt hóa học, đó là giai đoạn làm kết tủa: những micell của casein dính lại với nhau để hình thành một gel đặc, rắn chứa huyết thanh sữa bên trong.

Quá trình được tiến hành như sau:

Sữa sau khi được khử trùng theo phương pháp Pasteur ở 85 - 90°C trong 15 - 20 phút, được đem đi xử lý bằng rennin - là enzyme do niêm mạc dạ dày tiết ra. Dạ dày này là của động vật nhai lại còn non (bê, cừu non) được nuôi bằng sữa.

Khi cho rennin với một lượng nhỏ vừa đủ vào sữa, sau một thời gian nhất định sữa sẽ đông lại thành một khối nhầy phủ gelatin, mềm dẻo, không thấm nước.

Để làm đông tụ sữa, ngoài vai trò của enzyme (*rennin*) người ta còn sử dụng vi khuẩn lactic. Vi khuẩn lactic được tạo điều kiện hoạt động ở 30°C. Khi tiến hành làm đông tụ sữa, người ta cấy vi khuẩn lactic vào môi trường sữa. Quá trình lên men lactic được tiến hành, chuyển đường lactose của sữa thành acid lactic. Kết quả là quá trình này cũng gây ra sự đông tụ sữa như đã trình bày ở trên (các sợi micell của casein sữa lại kết thành cục rắn chứa huyết thanh sữa ở bên trong). Các khảo sát bằng thực nghiệm cho thấy: 3/4 số vi khuẩn lactic sẽ nằm trong cục rắn, 1/3 số vi khuẩn lactic còn lại sẽ nằm trong dịch huyết thanh ở bên ngoài cục rắn của sữa.

Đồng thời khi có quá trình lên men lactic xảy ra, pH của môi trường sẽ giảm. pH ngã về môi trường acid là pH thích hợp cho hoạt động của enzyme đông tụ sữa. Điều này đưa đến sự đông tụ sữa càng xảy ra nhanh hơn.

Ở giai đoạn này, dưới tác dụng của enzyme *rennin*, casein và paracasein của sữa sẽ bị phân giải tạo pepton và amino acid (*tyrosine, tryptophan ...*) tập trung lại trong cục đông. Huyết thanh sữa ở bên ngoài cục đông tồn tại ở dạng dung dịch.

2. Giai đoạn nén ép cục đông sữa để tách huyết thanh sữa (giai đoạn khử nước)

Tiếp theo giai đoạn trên là giai đoạn tiến hành ép cục sữa để tách huyết thanh ra khỏi cục đông sữa. Quá trình này tiến hành trong 20 - 24 giờ, ở 35 - 50°C.

Trong thời gian này, quá trình lên men lactic vẫn tiếp tục. Sau khi ép huyết thanh ra khỏi cục đông sữa, số lượng tế bào vi khuẩn lactic trong 1 gam phomat đạt đến hàng tỉ. Phomat lúc này có thành phần chủ yếu là casein và lipid. Khi ép, phần huyết thanh bị loại ra ngoài cục đông sữa có thành phần gồm đường lactose, lactalbumin, lactoglobulin ...

3. Giai đoạn muối phomat

Ngay sau khi ép cục đông để tách huyết thanh, phomat được ngâm vào bể nước muối NaCl với nồng độ 24% trong vài ngày.

Mục đích của giai đoạn ngâm muối là:

- Tăng vị mặn cho phomat.
- Tạo sự đồng nhất về thành phần cho khối phomat.
- Ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật có hại, chủ yếu là trực khuẩn đường ruột.

Kết quả của quá trình ngâm muối nói trên là các chất ở bề mặt của khối phomát như đường, muối khoáng sẽ khuếch tán ra ngoài, ngược lại muối NaCl từ ngoài dung dịch ngâm sẽ thấm vào bên trong khối phomát. Muối ăn thấm vào lớp bề mặt của phomát, tạo lớp bảo vệ chống lại sự xâm nhập của vi sinh vật có hại.

4. Giai đoạn ủ chín phomát

Ở giai đoạn cuối cùng này phomát được đưa vào hầm làm chín ở 50 - 57°C, có độ ẩm là 80 - 90%.

Quá trình làm chín phomát kéo dài khá lâu, từ vài tháng đến hàng năm, bao gồm nhiều khâu chuyển hóa hóa sinh rất phức tạp, có nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau tham gia cùng với men đông tụ sữa.

Động học của quá trình như sau:

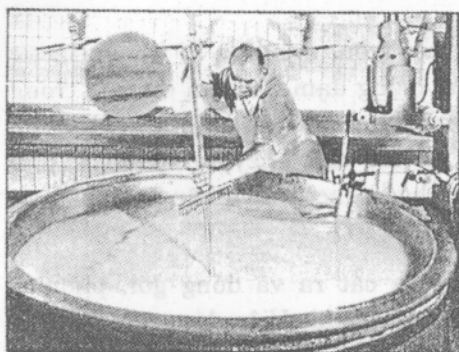
Trước tiên vi khuẩn lactic *Streptococcus lactic* lên men phân đường lactose còn lại tạo acid lactic. Đến khi lactose hết, số vi khuẩn này cũng chết dần và được thay bằng trực khuẩn lactic. Số này sử dụng lipid có trong cục đông của sữa chuyển hóa thành các acid béo bay hơi. Tiếp đến trực khuẩn lactic cũng chết dần, nhường chỗ cho sự phát triển của nhóm vi khuẩn lên men propionic. Đó là giống vi khuẩn *Propionibacterium*. Giống này có một số loài như *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium pentosaceum* ... chịu được nồng độ muối cao của phomát. Các loài vi khuẩn *Propionibacterium* nói trên thực hiện lên men propionic chuyển lactate thành acid propionic, acid acetic và CO₂. Hai acid bay hơi này làm cho phomát có vị hơi chua và hăng đặc trưng cho phomát. Khí CO₂ tạo cho phomát những hình vế, những khe hổng, túi khí gọi là "mắt" phomát. Quá trình lên men propionic kéo dài từ 2 - 2,5 tháng.

Người ta còn nhận thấy hoạt động của vi khuẩn lactic và enzyme rennin tạo cục đông sữa có mối liên hệ với nhau rất mật thiết, dẫn đến làm tăng chất lượng của phomát trong quá trình làm chín phomát.

Qua khảo sát bằng thực nghiệm người ta nhận thấy rằng:

- Nếu chỉ có một mình enzyme đông tụ sữa hoạt động thì lượng đạm hòa tan trong phomát chỉ = 11,8% đạm tổng số, không tìm thấy các đạm ở dạng amino acid.

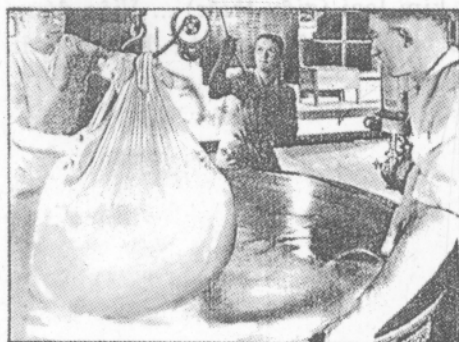
- Nếu chỉ một mình vi khuẩn lactic (*Streptococcus lactic*) hoạt động thì lượng đạm hòa tan sẽ là 2,5% đạm tổng số, đạm ở dạng các amino acid = 2,2%.



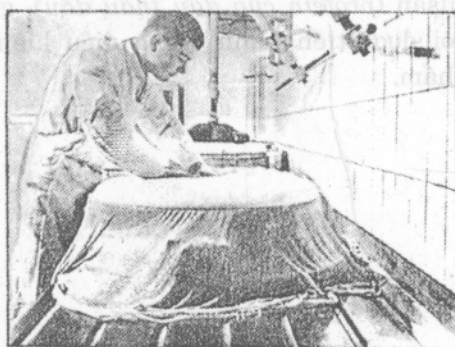
a.



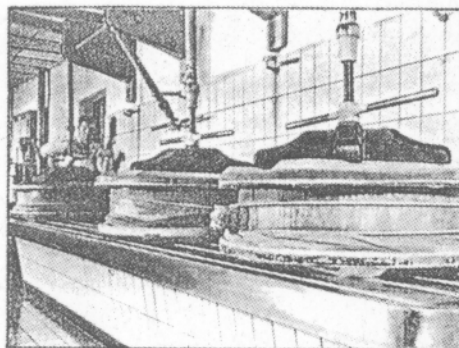
b.



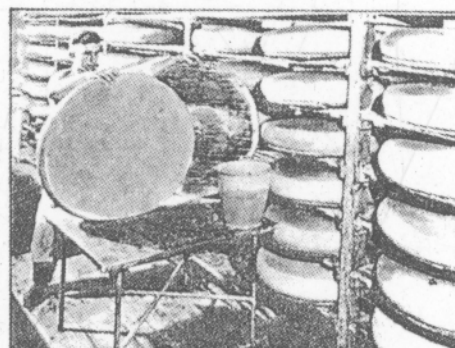
c.



d.



e.



f.

Hình 12 : Quy trình sản xuất phomát Thụy Sĩ

Hình 12 cho thấy hình ảnh một số công đoạn của quy trình sản xuất phomát Thụy Sĩ. Sữa sau khi được cho chất đông tụ sữa và vi khuẩn lactic vào sẽ được đông lại, tạo thành khối đông (a). Người ta dùng dây đồng cắt khối đông thành những tảng nhỏ (b), lấy phần khối đông ra khỏi huyết thanh sữa bằng hệ thống ròng rọc (c). Khối sữa đông được nén trong những đai tròn bằng gỗ, dùng tay đập nhẹ lên bề mặt khối đông để lún cục đông vào đai và tạo mặt phẳng của khối sữa đông (d). Dùng hệ thống nén ép để tách huyết thanh sữa ra khỏi cục đông (e), sau khoảng 24h sẽ hình thành những bánh phomát. Các bánh phomát được ngâm trong nước muối (nồng độ khoảng 24%) trong thời gian vài ngày, sau đó được chuyển qua hầm lên men làm "chín" phomát ở 50 - 57°C, với độ ẩm $\approx 90\%$, trong thời gian ≈ 2 tuần. Kết thúc quá trình ủ chín, phomát được kiểm tra chất lượng, đóng gói và đem đi tiêu thụ (f).

- Nếu có sự kết hợp hai đối tượng nói trên, nghĩa là vi khuẩn lactic và enzyme rennin cùng hoạt động sẽ đưa lượng đạm hòa tan dễ tiêu trong phomat lên 60,5% đạm tổng số và lượng đạm của các amino acid tự do sẽ lên đến 5,5%. Có kết quả trên là do lúc đầu enzyme sẽ phân giải protein thành các pepton, tiếp theo vi khuẩn lactic sẽ phân hủy pepton tạo các amino acid tự do và NH_3 .

Sau khi chế biến xong, trước khi được cất ra và đóng gói, phomat được khử trùng bằng biện pháp chiếu tia tử ngoại. Việc đóng gói thường sử dụng những bao bì đặc biệt như dùng oliofilm (*cao su xử lý bằng HCl*), rilsan (*protein của dầu thầu dầu*), giấy kim loại (*giấy thiếc*) ... Việc đóng gói được tiến hành trong điều kiện vô trùng. Cuối cùng ta được thành phẩm.

CHƯƠNG VII

THU NHẬN PROTEIN TỪ VI SINH VẬT

I. VAI TRÒ CỦA NGUỒN PROTEIN TỪ VI SINH VẬT

Loài người đang gặp khó khăn về lương thực, thực phẩm, đặc biệt protein. Hai phần ba nhân loại đang bị đói protein, tập trung nhiều ở các nước thuộc châu Phi, Mĩ La Tinh và châu Á. Dự tính đến năm 2000, thế giới sẽ có khoảng 6 tỉ người, trong đó một nửa là ở lứa tuổi cần nhiều protein trong khẩu phần thức ăn. Trong khi đó, tốc độ tăng sản lượng lương thực, thực phẩm như hiện nay không kịp để đáp ứng với tốc độ tăng dân số.

Lượng protein thiếu hụt lên đến trên 20 triệu tấn/năm. Trước nguy cơ đó, con người đang tìm cách xoay xở để khắc phục.

Nguồn protein chủ yếu hiện nay được con người khai thác là sản phẩm của hai ngành trồng trọt và chăn nuôi. Đây là nguồn protein có trữ lượng đáng kể, đã góp phần một cách xứng đáng giải quyết nạn thiếu hụt protein. Tuy vậy, nó cũng có những hạn chế nhất định vì loài người đang gặp phải sự thiếu hụt về nguyên liệu và năng lượng. Vả lại diện tích đất canh tác phục vụ cho trồng trọt, chăn nuôi đang bị co lại do xu hướng đô thị hóa ngày càng cao ở các nước. Hiện nay khoa học cũng chưa giải quyết được một cách hoàn hảo những vấn đề đặt ra về giống, phân bón, thức ăn gia súc ... phục vụ cho trồng trọt và chăn nuôi. Bởi vậy, hiệu suất khai thác protein ở lĩnh vực này chưa cao.

Nguồn protein khác khá phong phú là thủy hải sản. Tuy đây là nguồn protein khá lớn nhưng không phải vô tận. Khai thác nguồn protein theo hướng này, con người cũng gặp không ít khó khăn:

- 90% diện tích của đại dương là "sa mạc sinh học" (*không có sinh vật phát triển*).

- 10% diện tích còn lại là thềm lục địa, hiện đang bị con người khai thác tối đa. Thêm vào đó, sinh vật ở đây đang bị đe dọa bởi một hiểm họa lớn là ô nhiễm môi trường sống do chất thải của các ngành công nghiệp hóa chất, hóa dầu, hạt nhân, phóng xạ ...

Từ những thực tế trên con người càng chú ý hơn đến việc khai thác nguồn protein từ vi sinh vật. Sự chú ý đó càng gia tăng vì việc khai thác nguồn protein từ vi sinh vật có những ưu việt đáng kể.

II. ĐẶC ĐIỂM CỦA QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT PROTEIN TỪ VI SINH VẬT

- Không giống với quá trình trồng trọt, sản phẩm protein thu được qua quá trình nuôi cấy vi sinh vật - tức sinh khối vi sinh vật - có thể thu hoạch toàn bộ và dễ dàng, hiệu suất thu hồi sản phẩm cao.

- Trồng trọt, chăn nuôi chiếm diện tích lớn, nuôi cấy vi sinh vật chỉ cần diện tích nhỏ (*để xây dựng xí nghiệp với hệ thống nổi lên men*).

- Tốc độ sinh sản của vi sinh vật rất cao, tương ứng tốc độ sinh tổng hợp protein cũng cao, có thể gấp 100 - 1.000 lần so với các đại gia súc như trâu, bò. Ta có thể dùng một so sánh nhỏ sau đây để thấy rõ điều đó:

Muốn có 1 tấn protein cần trồng 4 ha đậu tương trong 3 tháng, hoặc nuôi 40 con bò trong 15 - 18 tháng, hoặc nuôi cấy vi sinh vật với dung tích 300 m³ trong 24 giờ.

- Nuôi cấy vi sinh vật không phụ thuộc vào khí hậu, thời tiết của từng địa phương, vì điều kiện của môi trường nuôi cấy có thể điều chỉnh được khá dễ dàng.

- Có thể phân lập và lựa chọn các chủng vi sinh vật thích hợp cho từng quy trình công nghệ, cho từng loại nguyên liệu tương đối nhanh và dễ dàng. Ngoài ra, thành phần và giá trị dinh dưỡng của sinh khối vi sinh vật có thể điều chỉnh được bằng cách thay đổi thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy, hoặc bằng cách tác động làm thay đổi cơ cấu di truyền của chúng giống.

- Một ưu việt nổi bật cần nhắc tới là trong sản xuất protein từ vi sinh vật lại sử dụng nguyên liệu phi protein - là loại phế liệu, phụ phẩm của một số ngành công nghiệp khác. Nguồn nguyên liệu này rất phong phú, đa dạng lại rẻ tiền, dễ kiếm như rỉ đường, dịch đường khi thủy phân gỗ tạp, rơm rạ, bã mía... Do vậy giá thành của sản phẩm sẽ thấp. Đồng thời sử dụng nguồn nguyên liệu này sẽ góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường do chất thải và nước thải.

Cũng cần nói rõ thêm: chế phẩm protein từ vi sinh vật ở đây được hiểu là toàn bộ các tế bào vi sinh vật, hay còn gọi là sinh khối vi sinh vật. Sinh khối vi sinh vật chứa hàm lượng protein từ 40 - 60% phần chất khô của tế bào (*như ở tế bào nấm men, vi khuẩn lam*).

Tuy vậy, nguồn protein thu nhận từ vi sinh vật còn có những hạn chế: đa số protein sản xuất bằng con đường vi sinh vật mới được sử dụng làm thức ăn cho gia súc, nuôi thủy sản; chỉ một lượng rất nhỏ được sử dụng làm thức ăn cho người, vì muốn sử dụng cho người cần phải có một số nghiên cứu tiếp tục :

- Loại bỏ tạp chất, tinh chế để được chế phẩm protein tinh, có thành phần phù hợp với nhu cầu dinh dưỡng của con người như: loại bột acid nucleic (có tới 10% trong sinh khối vi sinh vật, mà với con người chỉ 2% đã gây ngộ độc ...).

- Tạo thêm hương vị thơm ngon hợp khẩu vị hơn.

Tuy nhiên cần xem xét thêm về khả năng hấp thụ của con người đối với nguồn protein này, cũng như khả năng gây ngộ độc cấp tính, trường diễn, gây ung thư, vô sinh ...

III. SẢN XUẤT PROTEIN TỪ CÁC NHÓM VI SINH VẬT KHÁC NHAU

Để sản xuất protein từ vi sinh vật, người ta có thể sử dụng nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau như nấm men, nấm mốc, vi khuẩn, tảo ... Trong số này đáng chú ý và được sử dụng phổ biến hơn cả là nấm men, vi khuẩn, tảo.

1. Thu nhận protein từ nấm men

Trong số các đối tượng vi sinh vật được sử dụng để thu protein, nấm men là loại được nghiên cứu sớm nhất và đến nay đã được áp dụng rộng rãi ở nhiều nước.

Nấm men là nhóm vi nấm có cấu tạo đơn bào và sinh sản theo lối nảy chồi. Nấm men có sức sống cao, sinh sôi nảy nở nhanh chóng, có thể phát triển trong điều kiện nuôi cấy bán vô trùng.

Nấm men được con người nghiên cứu và ứng dụng không những thông qua khả năng lên men rượu (chế bia và rượu các loại, làm nở bột mì...) mà còn do một đóng góp to lớn khác: sinh khối nấm men là nguồn bổ sung rất đáng kể về nguồn protein, vitamin cho chăn nuôi. Chính vì được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực chế tạo làm thức ăn cho gia súc nên nấm men còn được gọi là *men gia súc*.

Về mặt dinh dưỡng, sinh khối nấm men rất giàu protein và vitamin, đặc biệt là các vitamin nhóm B. Tùy từng chủng giống, tùy thuộc vào môi trường nuôi cấy, hàm lượng protein của nấm men dao động trong khoảng từ 40 - 60% khối lượng chất khô của tế bào. Về tính chất protein: protein của nấm men gần giống với protein có nguồn gốc động vật, chứa khoảng 20 loại amino acid, trong đó có đầy đủ các amino acid không thay thế. Thành phần các amino acid của nấm men cân đối hơn so với lúa mì, kém chút ít so với sữa, bột cá và các sản phẩm động vật nói chung.

a) Các giống nấm men sử dụng trong sản xuất protein:

Cho đến nay người ta sử dụng khá nhiều chủng loại nấm men để sản xuất thu nhận protein như *Endomyces fibuligera*, *Torulopsis utilis*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula capsulata*, *Monilia candida*, *Mycotorula japonica* ...

Trong số này, các chủng thuộc ba giống *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* được sử dụng phổ biến hơn cả, vì chúng có khả năng chuyển hóa các chất rất cao, đa dạng và quy trình công nghệ sản xuất tương đối đơn giản. Trong đó *Saccharomyces* ít được sử dụng trong sản xuất protein hơn vì quy trình sản xuất đòi hỏi phức tạp hơn hai giống kia.

b) Sản xuất protein nấm men từ các nguồn nguyên liệu khác nhau:

*** Sử dụng các nguồn carbohydrate thông thường:**

Các chủng nấm men được sử dụng theo hướng này thường phải có những đặc điểm sau:

- Có khả năng đồng hóa nhiều nguồn carbohydrate khác nhau, nhất là các loại pentose (*silose*, *arabinose* ...) và các acid hữu cơ.
- Có khả năng phát triển nhanh
- Có sức đề kháng cao với CO₂.
- Có thể phát triển tốt trên môi trường có nồng độ chất khử cao.

*** Sử dụng nguồn rỉ đường (rỉ đường mía và rỉ đường củ cải) :**

Hiện nay để sản xuất protein từ nấm men, chủ yếu (khoảng 90%) người ta sử dụng rỉ đường mía và rỉ đường củ cải.

Thành phần chính của nguồn nguyên liệu này là đường saccharose (khoảng 35 - 40%). Rỉ đường mía rất giàu các chất sinh trưởng. Trong 100 g rỉ đường mía có 70 - 300γ biotin, 5,4mg acid pantothenic, 600 mg inositol. Còn nhu cầu về các chất sinh trưởng của nấm men khi phát triển trên rỉ đường là : biotin 29γ %, acid pantothenic 5γ %, inozit 12 mg%.

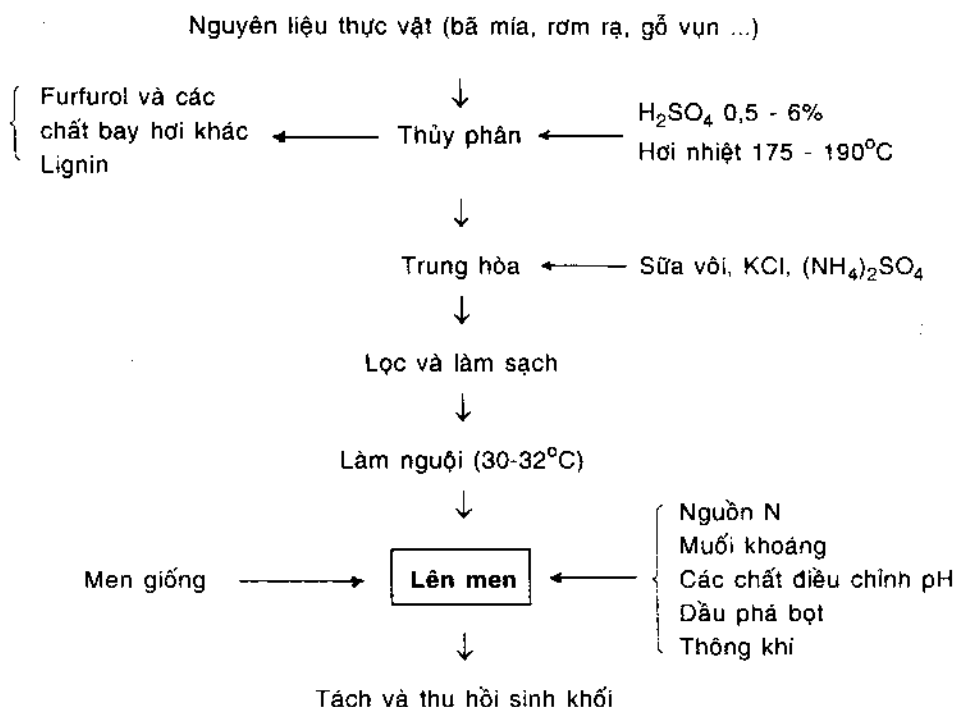
Vì vậy, khi dùng rỉ đường mía làm nguồn carbon trong nuôi cấy nấm men ở giai đoạn nhân giống cần phải hòa loãng dịch rỉ đường để có hàm lượng đường từ 4 - 6% và các chất dinh dưỡng cũng có nồng độ vừa phải như nhu cầu nói trên của nấm men. Đồng thời phải bổ sung các muối khoáng cần thiết và hỗn hợp các amino acid dưới dạng protein thủy phân như dịch tự phân nấm men, dịch thải trong sản xuất nước chấm. Độ pH của môi trường = 3,5 - 4,5.

Nấm men được nuôi cấy trong điều kiện hiếu khí (có thông khí liên tục), ở 25 - 35°C.

Dịch nấm men thu được đem li tâm thu sinh khối ở dạng bột nhão, đem ép loại bớt nước, sấy khô đến độ ẩm 7%. Chế phẩm này được đem nghiền thành bột hay ép thành viên.

*** Sử dụng dịch kiềm sulfite (nước thải của các nhà máy giấy):** Thành phần của dịch kiềm sulfite khá phong phú, bao gồm pentose, lignin, acid hữu cơ bay hơi, lignin sulfonate ... Trong đó chủ yếu là các đường pentose – một loại đường rất phù hợp với trao đổi chất của nấm men. Sử dụng dịch kiềm sulfite làm nguồn carbon sẽ giảm mức cung cấp O_2 cho dịch lên men tới 60%, vì bản thân dịch kiềm sulfite có đặc tính hấp thụ O_2 .

*** Sử dụng các nguồn cellulose từ thực vật:** Gỗ vụn, rơm rạ, bã mía... được tận dụng để làm nguyên liệu với vai trò là nguồn carbohydrate trong sản xuất protein từ nấm men. Những loại nguyên liệu này muốn được nấm men sử dụng phải qua khâu đường hóa. Có thể thủy phân bằng enzyme của mầm thóc hay của vi sinh vật, hay bằng acid H_2SO_4 (xem sơ đồ 3).



SƠ ĐỒ 3: Sơ đồ công nghệ sản xuất nấm men từ các nguyên liệu thực vật (được thủy phân bằng H_2SO_4)

Nếu không dùng biện pháp thủy phân nguyên liệu nói trên, người ta áp dụng biện pháp nuôi hỗn hợp nấm men và nấm mốc. Đã có những kết quả rất tốt trong việc nuôi cấy hỗn hợp giữa một số chủng nấm mốc *Trichoderma* hoặc *Endomycopsis fibuliger* (loại có phong phú nguồn enzyme amylase và cellulase) với nấm men *Candida utilis*. Ở đây sẽ có sự “phân công” rất khéo léo của vi sinh vật: nấm mốc *Endomycopsis fibuliger* sẽ phân giải cellulose thành đường. Nấm men *Candida utilis* sẽ chuyển đường thành protein. Nuôi hỗn hợp như trên vẫn còn nhiều vấn đề cần giải quyết. Ví dụ như các cá thể phải được nuôi với một tỉ lệ như thế nào để bảo đảm sản phẩm tạo thành (như glucose) được tạo ra và tiêu thụ thích hợp (vì chính bản thân glucose tồn tại sẽ ức chế sự tổng hợp enzyme cellulase – enzyme phân giải cellulose).

*** Sử dụng nguồn dầu mỏ và khí đốt :** Vài chục năm gần đây thế giới chú ý nhiều đến việc sử dụng các sản phẩm dầu mỏ để nuôi cấy nấm men thu protein. Các nhà khoa học đã nhận ra một điều thú vị là hầu như trên mỗi thành phần của dầu mỏ đều có thể tìm thấy những vi sinh vật có khả năng chuyển hóa hydrocarbon thành các vật liệu xây dựng tế bào, cấu tạo các phân tử protein.

Việc dùng vi sinh vật nuôi cấy trên dầu mỏ và khí thiên nhiên đã và đang là vấn đề rất hấp dẫn các nhà khoa học (hóa sinh học, vi sinh vật học), các công nghệ gia. Vào năm 1968, ở Liên Xô (cũ) đã xây dựng được nhà máy sản xuất protein của nấm men từ paraffin đầu tiên trên thế giới với công suất 12.000 tấn/năm. Sau đó, đã có hàng loạt các nhà máy dùng nguyên liệu là hydrocarbon để sản xuất protein với công suất rất lớn: ở Nhật có nhà máy sản xuất nấm men từ dầu mỏ với công suất 120.000 - 150.000 tấn men khô/năm, ở Ý có hai nhà máy sản xuất nấm men với công suất 100.000 tấn/năm...

Để sản xuất protein từ dầu mỏ và khí đốt, người ta thường sử dụng các chủng nấm men sau:

- Đa số các loài thuộc giống *Candida* như *Candida tropicalis*, *Candida lipolitica*, *Candida pelliculosa*.
- *Rhodotorula sp.*
- *Torulopsis famata*

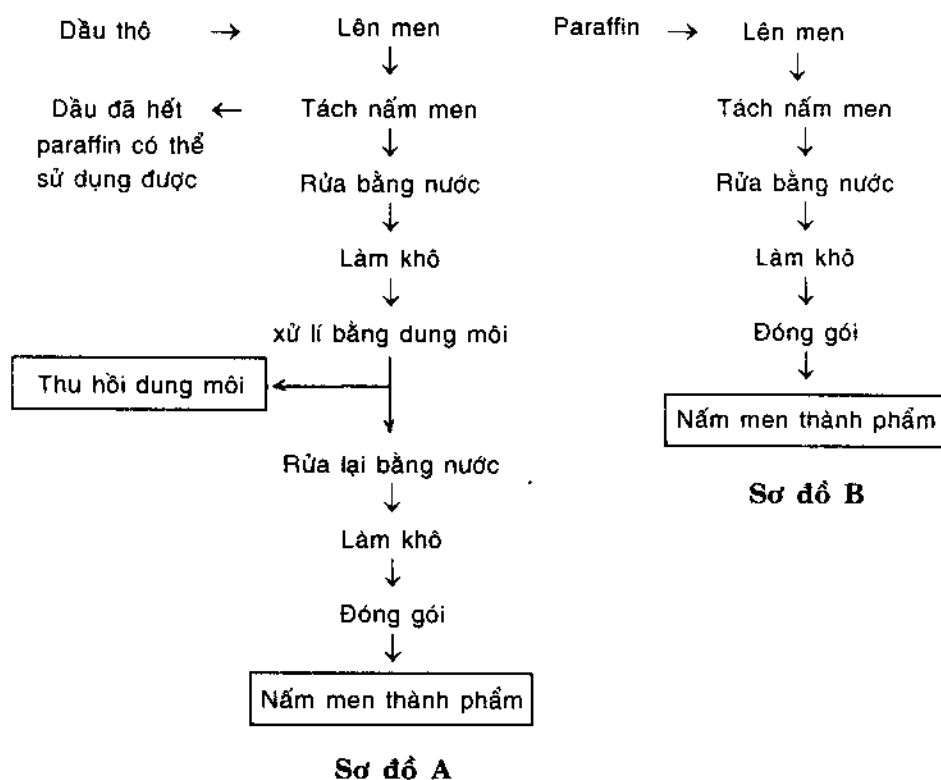
Các chủng nấm men được sử dụng sản xuất protein từ nguồn hydrocarbon phải có những đặc điểm sau:

- Sử dụng hydrocarbon làm nguồn carbon duy nhất để trao đổi chất tổng hợp và trao đổi năng lượng.
- Phải bền vững với độ độc của hydrocarbon ở nồng độ cao.

- Phải có khả năng để hydrocarbon được hấp thụ vào tế bào. Khả năng này đang được nghiên cứu, hiện chưa được sáng tỏ lắm.

Quy trình công nghệ sản xuất nấm men từ các nguồn carbon khác nhau như nguồn carbohydrate thông thường và hydrocarbon về nguyên lí đều giống nhau, trong đó có một số giai đoạn là khác nhau (*xử lí nguyên liệu, tách bỏ môi trường thừa sau khi lên men ...*).

Ở đây giới thiệu một số quy trình sản xuất protein từ nấm men trên các nguồn nguyên liệu khác nhau: từ các nguyên liệu thực vật (gỗ vụn, rơm rạ, bã mía) (*Sơ đồ 3*), từ nguồn nguyên liệu dầu mỏ thô (*Sơ đồ 4A*) và từ paraffin (*Sơ đồ 4B*).



SƠ ĐỒ 4: *Sơ đồ công nghệ sản xuất nấm men từ dầu mỏ thô (Sơ đồ A) và từ paraffin (Sơ đồ B)*

2. Thu nhận protein từ vi khuẩn lam (Cyanobacteria) và vi tảo (Microalgae)

Vi tảo (*Microalgae*) không phải là một nhóm phân loại trong tảo. Tất cả mọi loài tảo có kích thước nhỏ bé và có thể thích hợp được với việc sử dụng các phương pháp nuôi cấy đối với vi sinh vật, đều gọi là vi tảo.

Vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*) trước đây được gọi là tảo lam, hay tảo lam - lục.

Trong phần tìm hiểu nguồn protein này, chúng ta xếp hai đối tượng vi khuẩn lam và vi tảo với nhau vì giữa chúng có nhiều đặc điểm sinh lí khi nuôi cấy giống nhau. Do đó quy trình sản xuất thu sinh khối của chúng về cơ bản là giống nhau.

a) Giá trị dinh dưỡng và ứng dụng của nguồn sinh khối vi tảo và vi khuẩn lam:

Sinh khối của cả hai nhóm vi khuẩn lam và vi tảo đều có chứa một lượng đáng kể các chất có hoạt tính sinh học. Trong đó hàm lượng protein chiếm khá cao. Ở vi tảo, hàm lượng protein chiếm đến 40-60% khối lượng khô (ở *Chlorella*), hay 50 - 55% khối lượng khô (ở *Scenedesmus*). Ở vi khuẩn lam, đặc biệt ở chi *Spirulina* hàm lượng protein lên đến 60-70% khối lượng khô. Hàm lượng các amino acid của những protein ở vi tảo và vi khuẩn lam khá cân đối, gần với quy định của protein tiêu chuẩn (xem bảng 7, 8).

BẢNG 7: Thành phần và hàm lượng amino acid của *Spirulina platensis* (g/100g protein)
(Theo Đặng Đình Kim và những người cộng sự)

Amino acid (%)	Số liệu Đức	Số liệu Mehico	Số liệu Việt Nam	Trứng	Tiêu chuẩn FAO
Isoleucine	6,8	5,7	5,54	5,8	4,00
Leucine	9,8	8,7	6,95	9,0	7,00
Lysine	5,5	5,1	5,03	6,7	5,50
Methionine	2,5	2,6	3,33	3,0	3,50
Phenylalanine	5,3	5,0	4,61	5,3	6,00
Threonine	6,2	5,4	5,33	5,3	4,00
Tryptophane	0,3	1,5	1,66	1,8	1,00
Valine	5,0	7,5	6,72	7,2	5,00
Alanine	9,5	7,9	7,99	-	-
Arginine	7,3	7,6	6,72	6,4	-
Acid aspartic	11,8	9,1	9,68	10,7	-
Cysteine	0,9	0,9	1,86	2,1	-
Acid glutamic	10,3	12,7	16,59	12,3	-
Glycine	5,7	4,8	4,74	3,8	-
Histidine	2,2	1,5	1,47	3,6	-
Proline	4,2	4,1	1,57	4,3	-
Serine	5,1	5,3	4,91	7,7	-
Tyrosine	5,3	4,6	4,80	4,3	-

BẢNG 8: *Thành phần và hàm lượng amino acid của vi tảo Scenedesmus acutus (g/100g protein)*
(Theo Đặng Đình Kim)

Amino acid (%)	Tiêu chuẩn FAO	Protein trứng	Sc. acutus
Valine	5,0	6,6	4,7
Leucine	7,0	8,6	7,0
Isoleucine	4,0	5,4	3,1
Phenylalanine	6,0	9,3	6,0
Tyrosine	6,0	9,3	6,0
Lysine	5,5	7,0	4,6
Methionine	3,5	5,7	3,2
Cysteine	3,5	5,7	3,2
Tryptophan	1,0	1,7	1,7
Threonine	4,0	4,7	4,9

Đáng lưu ý là lượng amino acid không thay thế trong protein rất cao, có khi lên tới 42%. Giá trị dinh dưỡng của sinh khối vi tảo, vi khuẩn lam còn thể hiện ở chất lượng và số lượng các vitamin chứa trong đó. *Chlorella* chứa nhiều vitamin A, vitamin nhóm B, vitamin K, acid pantothenic; tảo ở dạng tươi còn chứa vitamin C. Vi khuẩn lam *Spirulina* chứa vitamin B₁₂ nhiều hơn hẳn so với tảo *Chlorella* và cũng giàu các loại vitamin khác không kém (xem bảng 9, 10, 11). Ngoài ra, vi khuẩn lam và vi tảo còn là nguồn sắc tố tự nhiên, có thể thay thế cho chất màu tổng hợp đang được con người khai thác sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm để làm màu thực phẩm, mỹ phẩm bôi mắt, môi không thấm nước, không bị nước rửa trôi (phycocyanin, phycoerythrin, sắc tố lam ...) (Xem bảng 9, 12). Đặc biệt sắc tố vàng - xanthophyl, ngoài vai trò là phẩm nhuộm còn là sắc tố đặc biệt quan trọng đối với ngành chăn nuôi gia cầm (vì nó có trong thức ăn của gà đẻ sẽ làm cho lòng đỏ trứng gà có màu vàng thắm; da, thịt của gà cũng có màu vàng thơm ngon hơn). Điều này người tiêu dùng rất ưa chuộng.

BẢNG 9: Hàm lượng vitamin của *Scenedesmus* so với trứng.
(Theo Đặng Đình Kim và những người cộng sự).

Vitamin (mg/kg khối lượng khô)	Scenedesmus	Trứng
Thiamine (vit. B ₁)	3,19	0,77
Riboflavine (vit. B ₂)	7,34	2,35
Niacinamide	13,10	0,63
Acid folic	0,15	0,04
Cyanocobalamine (vit. B ₁₂)	0,07	0,02
Tocopherol (vit. E)	26,30	7,90
Biotin	0,04	0,79
Acid ascorbic (vit. C)	38,00	-
β- Carotene	45,58	-
Carotenoid tổng số	394,65	-
Acid pantothenic	2,20	12,20

BẢNG 10: Hàm lượng vitamin của *Spirulina*
(Theo Đặng Đình Kim và những người cộng sự).

Vitamin	Hàm lượng (mg/kg khối lượng khô)
β - Carotene (tiền vit. A)	1700,0
Cyanocobalamine (vit. B ₁₂)	1,6
D - Ca - pantothenate	11,0
Acid folic	0,5
Inositol	350,0
Niacin (vit. B ₃)	118,0
Pyridoxine (vit. B ₆)	3,0
Thiamine (vit. B ₁)	55,0
Tocopherol (vit. E)	190,0

BẢNG 11: Thành phần hóa học của *Chlorella*
(Theo Đặng Đình Kim và những người cộng sự).

Thành phần (1)	Hàm lượng (%) (2)
Protein tổng số	40 - 60% khối lượng khô
Carbohydrate	25 - 35% "
Lipid	10 - 15% "
Sterol	0,1 - 0,2% "
Stearine	0,1 - 0,5% "
Xanthophyll	3,6 - 6,6% "

(1)	(2)
Chlorophyll a	2,2% khối lượng khô
Chlorophyll b	0,58%
Nucleic acid	6,0 %
Tro	10 - 34%
Vitamin B ₁	18,0 mg/g
Vitamin C	0,3 - 0,6 mg/g
Vitamin K	6,0 mg/g
Vitamin B ₆	2,3 mg/100g
Vitamin B ₂	3,5 mg/100g
Vitamin B ₁₂	7 - 9 mg/100g
Choline	302 mg/100g
Acid nicotinic	145 mg/100g

BẢNG 12: *Hàm lượng các sắc tố trong vi khuẩn lam Spirulina*
($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)

(Theo Đặng Đình Kim và những người cộng sự)

Sắc tố	S. platensis sản xuất ở Việt Nam	S. platensis 8005	S. maxima
Oscillaxanthine	0,224	0,175	0,157
Myxoxanthophyll	1,026	1,342	1,538
Zeaxanthine	1,278	1,980	1,521
Cis-zeaxanthine + Hydroxyechinenone	0,195	0,246	0,211
Chlorophyll a + phyophytine	20,145	26,201	24,760
β - carotene	1,385	1,665	1,927
Epoxy - β - carotene	0,084	0,093	0,162
β - cryptoxanthine	0,030	-	-
Echinenone	0,038	0,034	0,055
Phycobiliprotein	240,000	240,000	250,000

Đặc biệt trong sinh khối vi khuẩn lam còn chứa kháng sinh (*chống vi khuẩn, nấm mốc*) do vậy bảo quản tảo được lâu, không bị nhiễm vi sinh vật khác.

Do có thành phần dinh dưỡng rất giàu protein, vitamin ... nên vi tảo, vi khuẩn lam được coi là nguồn thức ăn cho người, gia súc, gia cầm, tôm cá và cả động vật nhuỷên thể... góp phần khắc phục nạn thiếu hụt protein hiện nay một cách đáng kể.

b) Đặc điểm của một số chủng vi khuẩn lam và vi tảo được sử dụng để nuôi trồng thu sinh khối:

Để sử dụng vi tảo, vi khuẩn lam tốt hơn, con người đã đi sâu tìm hiểu đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chúng. Đặc biệt là khi sử dụng chúng vào sản xuất ở quy mô lớn, cần có sự tuyển chọn các chủng giống có những đặc điểm thích hợp cho việc nuôi trồng cũng như cho năng suất tạo sinh khối cao.

Những chủng vi tảo, vi khuẩn lam được sử dụng để nuôi trồng phải có những đặc điểm sau về mặt sinh học:

- Tốc độ sinh trưởng nhanh.
- Năng suất quang hợp cao.
- Có sức chống chịu tốt với sự dao động của điều kiện ngoại cảnh như nhiệt độ, độ chiếu sáng, nồng độ muối cao, một số bệnh tật...
- Sinh khối có thành phần hóa học thích hợp, không chứa độc tố, dễ tiêu hóa...

Về mặt công nghệ:

- Tế bào luôn ở trạng thái huyền phù, không dính kết vào thành bể nuôi hoặc lắng xuống đáy.
- Dễ tách bằng các cách: vớt, lọc, li tâm.

Trong hướng nuôi trồng thu sinh khối hiện nay, con người sử dụng phổ biến một số chi sau:

- Vi tảo: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*.
- Vi khuẩn lam: *Spirulina*.

* *Chlorella* là một trong những nhóm vi tảo được phân lập thành dòng sớm nhất (từ những năm 1890) do Beijerincki. Nhưng nghiên cứu nuôi trồng đại trà *Chlorella* mới chỉ được bắt đầu từ năm 1950 ở Hoa Kỳ, châu Âu và gần đây ở châu Á.

Chlorella là tảo đơn bào, kích thước rất nhỏ (khoảng 0,0001 mm). Tất cả các loài của *Chlorella* đều là các cơ thể tự dưỡng, tức có khả năng thực hiện quá trình quang hợp nhờ vào năng lượng của ánh sáng Mặt Trời. Tuy vậy, cũng có một số loài có thể sinh trưởng trong bóng tối và sử dụng các nguồn carbon hữu cơ như glucose, acetate ...

Một số loài của *Chlorella*: *Chl. elipsoidea*, *Chl. vulgaris*, *Chl. pyrenoidosa*.

* *Scenedesmus*: *Scenedesmus* là chi gồm một số loài rất ít khác nhau về các đặc tính sinh lí và sự khác nhau đó không đặc trưng cho loài.

Scenedesmus có một số đặc điểm sinh lí, sinh hóa sau:

- *Scenedesmus* là những sinh vật tự dưỡng nhưng cũng có khả năng phát triển trong tối, giải phóng CO_2 và H_2O nhờ sử dụng các hợp chất hữu cơ (đường đơn, acetate ...).

- *Scenedesmus* có khả năng sinh protease và amylase ngoại bào.

- Do có hoạt tính hydrogenase, các loài *Scenedesmus* khi được chiếu sáng sẽ giải phóng H_2 ở áp suất O_2 và H_2O cục bộ thấp và sẽ khử CO_2 bằng H_2 hoặc H_2S .

- *Scenedesmus* có tính chống chịu thấp với nồng độ NaCl .

- Cũng giống như *Chlorella*, các chủng của *Scenedesmus* được nuôi trồng với diện tích khá rộng và cho năng suất tạo sinh khối khá cao (khoảng $54\text{g khối lượng khô}/\text{m}^2\text{ngày}$ hay $>90\text{ tấn}/\text{ha năm}$). Sinh khối của *Scenedesmus* có hàm lượng protein cao, khoảng 50 - 55% khối lượng khô và được coi là nguồn protein đơn bào đáng chú ý để sử dụng làm thức ăn cho gia súc, gia cầm.

Scenedesmus thường sử dụng là các loài *Sc.acuminatus*, *Sc. acutiformis*, *Sc. costulatus*.

* **Spirulina:** *Spirulina* là một chi gồm một số loài được sử dụng khá phổ biến để nuôi trồng thu sinh khối như *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*.

Trước đây người ta tập trung nhiều vào việc nghiên cứu, sản xuất và sử dụng *Chlorella*, nhưng dần dần do những ưu việt nổi bật, *Spirulina* đã vươn lên hàng đầu trong số các loài vi khuẩn lam và vi tảo được nuôi trồng. Người ta quan tâm đến *Spirulina* vì chúng có những đặc điểm đáng lưu ý sau:

- *Spirulina* có cơ thể dạng sợi đa bào, có dạng xoắn lò xo, sống tự nhiên ở môi trường nước giàu NaHCO_3 .

- *Spirulina* có vòng đời ngắn, đơn giản: 1 ngày (trong điều kiện tối ưu của phòng thí nghiệm), 3 - 5 ngày (trong điều kiện bán tự nhiên, tùy thuộc vào thời tiết). Vì vậy có thể thu hoạch tảo quanh năm.

- *Spirulina* sinh sống trong môi trường nước, cho phép ta dễ dàng tạo điều kiện nuôi tối ưu để thu sinh khối đậm đặc.

- Hiệu suất sử dụng năng lượng Mặt Trời cao (3 - 4,5%), trong khi đó đậu tương, lúa chỉ đạt hiệu suất sử dụng 0,25%; hiệu suất sử dụng khí CO_2 để làm nguồn carbon chỉ 30%, trong khi đó đậu tương và lúa rất cao (80 - 85%).

- Năng suất (tính trên đơn vị diện tích nuôi trồng) rất cao.

BẢNG 13: So sánh năng suất một số đối tượng nuôi trồng

Đối tượng	Sản lượng (kg/ha.năm)	
	Sinh khối	Protein
Bắp	3.600	400
Đậu tương	6.250	2500
<i>Spirulina</i>	25.000	15.000
(ở điều kiện nuôi cấy tối ưu)	45.000	24.000

- *Spirulina* có xu hướng nổi lên mặt nước và tụ tập sinh khối lại, đồng thời do kích thước của chúng lớn, dài 0,25 - 0,5 mm, nên dễ dàng thu hoạch bằng cách vớt, lọc.

c) Quy trình công nghệ sản xuất protein từ sinh khối vi khuẩn lam và vi tảo:

*** Các phương pháp nuôi trồng:**

Tùy theo tập quán của từng địa phương, cũng như hoàn cảnh kinh tế, địa lí mà phương pháp nuôi trồng các loại vi tảo, vi khuẩn lam có sự khác nhau. Nhưng về quy mô thường có hai loại:

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

- Nuôi ở quy mô bán công nghiệp: Có thể lấy mô hình nuôi trồng *Chlorella* đầu tiên ở Hoa Kỳ làm ví dụ. Tại đây người ta nuôi tảo trong các ống chất dẻo trong suốt, hình chữ U, dài hơn 20m, $\phi = 1,2m$. Cho môi trường vào trong ống với độ cao (khi ống nằm ngang) $\approx 0,625m$. Khí CO₂ được bơm vào môi trường, đồng thời khối môi trường luôn được vận chuyển tuần hoàn trong ống nhờ một máy bơm khác. Nhiệt độ của môi trường $\approx 25 - 26^{\circ}C$ (nhờ năng lượng của ánh sáng Mặt Trời).

- Nuôi ở quy mô công nghiệp: Để nuôi trồng vi tảo, vi khuẩn lam ở quy mô lớn, người ta sử dụng hai hệ thống trồng cơ bản là hệ thống kín và hệ thống mở.

Trong nuôi trồng dù áp dụng hệ kín hay mở, việc khuấy đảo, sục khí để tạo điều kiện cho tế bào tiếp xúc với ánh sáng và khí CO₂ là yêu cầu tối cần thiết để các chủng giống thực hiện quá trình quang hợp. Do vậy, các hệ thống nuôi trồng được thiết kế gắn liền với hệ thống khuấy đảo và sục khí.

+ **Hệ kín:** Ở hệ nuôi trồng này, vi tảo, vi khuẩn lam được nuôi trong các bể lên men chủ yếu dùng ánh sáng nhân tạo (ánh sáng đèn)

có cường độ cao và hệ thống sục khí CO₂ với cường độ tùy theo yêu cầu của từng quy trình công nghệ.

Ưu việt của phương pháp nuôi trồng này là không phụ thuộc vào khí hậu, thời tiết, điều kiện nuôi cấy được kiểm tra, khống chế một cách chủ động, do vậy cho năng suất tạo sinh khối cao. Nhưng với phương thức sản xuất này, giá thành khá cao nên ít được áp dụng rộng rãi.

+ *Hệ mở*: Hệ này có đặc điểm chủ yếu là quá trình quang hợp của vi tảo, vi khuẩn lam được gắn liền với việc sử dụng ánh sáng tự nhiên (*ánh sáng Mặt Trời*). Thông thường ở các bể nuôi loại này, người ta tạo chiều cao của cột môi trường là 15 - 18cm. Tuy cột môi trường có chiều cao không đáng kể so với trường hợp nuôi ở hệ kín, nhưng lớp tế bào ở phần đáy của bể nuôi thực tế sẽ không được tiếp xúc với ánh sáng Mặt Trời để tiến hành quang hợp nếu không có biện pháp khuấy đảo thích hợp. Bên cạnh đó việc khuấy đảo còn có mục đích ngăn không cho các tế bào bị lắng xuống đáy bể và bảo đảm sự phân bố đều chất dinh dưỡng cho toàn bộ tế bào trong hệ thống nuôi.

***Môi trường nuôi trồng và cung cấp CO₂ :**

Khi tiến hành nuôi trồng đại trà ngoài trời vi tảo và vi khuẩn lam, một trong những vấn đề trở ngại lớn là việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy. Khi nuôi trồng các đối tượng này ở phòng thí nghiệm, môi trường được chuẩn bị từ những hóa chất tinh khiết. Khi đưa ra sản xuất lớn, nếu vẫn áp dụng phương pháp trên để chuẩn bị môi trường thì sẽ rất tỉ mỉ và tốn kém.

Trong thực tế người ta áp dụng tương tự như đã làm với các quy trình nuôi cấy các vi sinh vật khác ở quy mô công nghiệp tức là dựa trên môi trường chuẩn, người ta sẽ tìm cách thay thế bằng các nguyên liệu thô, rẻ tiền, dễ kiếm mà vẫn bảo đảm được tế bào có tốc độ phát triển cao, sinh khối thu được có chất lượng tốt.

Với nguyên tắc nói trên, người ta đã đề ra ba giải pháp đơn giản hóa môi trường chuẩn (*môi trường dùng ở quy mô phòng thí nghiệm*) dựa trên việc sử dụng các nguyên liệu sau để tạo môi trường nuôi đại trà vi tảo và vi khuẩn lam:

- Nước máy có pha thêm chất khoáng ở dạng phân bón khô.
- Nước biển có bổ sung muối khoáng.
- Nước thải từ các khu nuôi gia súc hoặc từ nhà máy xử lý nước thải.

Trong quá trình nuôi trồng, việc cung cấp CO₂ với vai trò là nguồn carbon trong quang hợp là một trong những công đoạn quan trọng và khá

phức tạp, đòi hỏi có sự tính toán rất cụ thể ở từng loại hệ thống nuôi và đối tượng nuôi.

Người ta cung cấp CO_2 bằng nhiều phương thức khác nhau:

- Sục khí CO_2 lấy trực tiếp từ các quá trình lên men khác như lên men rượu ethanol, lên men bia. Bằng cách này sẽ giảm đến mức thấp nhất việc cung cấp NaHCO_3 .

- Sục không khí có chứa CO_2 (1 - 3%) kết hợp với sục CO_2 100% ngắt quãng ...

Để đảm bảo nguồn CO_2 đủ cung cấp cho quá trình nuôi trồng vi tảo và vi khuẩn lam, khi xây dựng các cơ sở nuôi trồng, người ta cần nghĩ đến việc chọn nguồn CO_2 sao cho tiện lợi đối với quá trình sản xuất. Sẽ rất có giá trị kinh tế nếu các cơ sở nuôi trồng được xây dựng gần những nơi có nguồn CO_2 như nhà máy rượu, bia, nơi có nguồn nước khoáng nóng giàu HCO_3^- và CO_2 tự do.

***Thu hồi sản phẩm:**

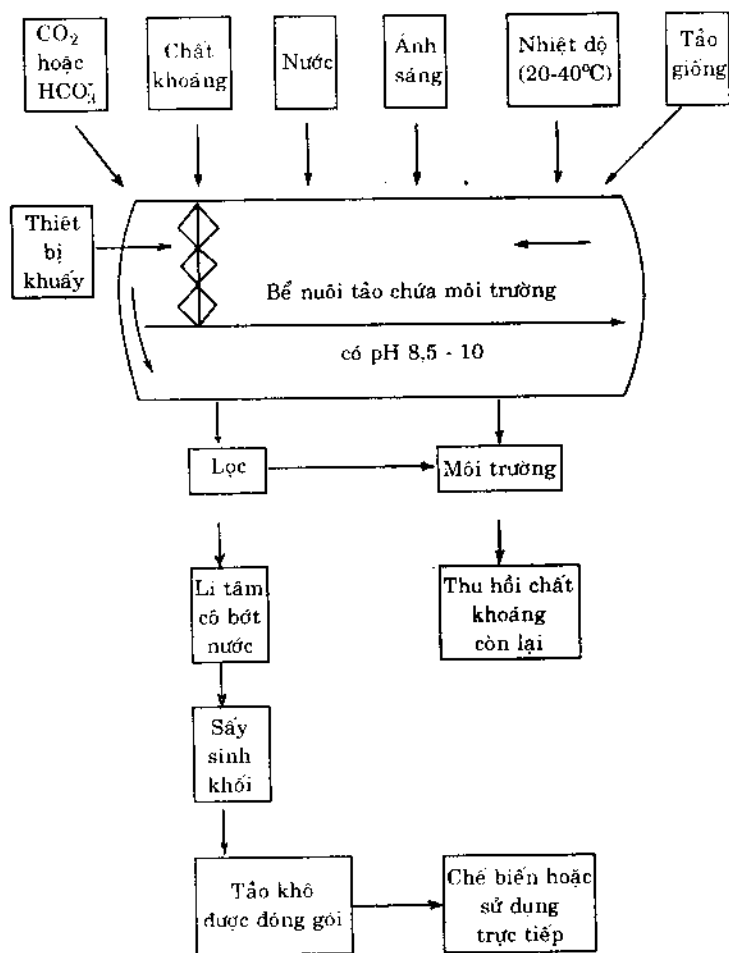
Việc thu hoạch sinh khối vi tảo và vi khuẩn lam trong nuôi trồng đại trà là công đoạn rất quan trọng ảnh hưởng đến giá thành sản phẩm. Người ta áp dụng nhiều phương pháp thu sinh khối khác nhau như li tâm, vớt, lắng kết hóa học, lắng kết bằng điện trường, tự lắng kết ... Các loại vi tảo như *Chlorella*, *Scenedesmus* ... có kích thước tế bào nhỏ thì chủ yếu dùng phương pháp li tâm thu sinh khối. Tuy vậy phương pháp này đòi hỏi chi phí bảo dưỡng thiết bị khá cao và tốn nhiều năng lượng. Hiện nay người ta đang tìm kiếm giải pháp ít tốn kém hơn, như áp dụng phương pháp tự kết lắng, phương pháp lắng kết hóa học nhưng cũng chưa có được kết quả khả quan.

Với *Spirulina* người ta sử dụng phương pháp lọc. Thu hoạch sinh khối vi khuẩn lam này bằng màng lọc nghiêng kết hợp với hút chân không. Đây là phương pháp lọc hiện đại và cho hiệu quả thu hồi sản phẩm cao.

Sau khi tách khỏi môi trường, sinh khối được cô đặc sơ bộ, và được đem sấy khô bằng nhiều phương pháp khác nhau như sấy đông khô, sấy chân không, sấy hình trống ...

Cuối cùng ta có thành phẩm.

Để sáng tỏ hơn các vấn đề nêu trên, xin giới thiệu một quy trình công nghệ sản xuất đại trà vi tảo (Sơ đồ 5).



SƠ ĐỒ 5: Quy trình công nghệ sản xuất đại trà vitamin D₂

CHƯƠNG VIII

SỬ DỤNG VI SINH VẬT PHÒNG CHỐNG CÔN TRÙNG VÀ CÁC BỆNH CÓ HẠI CHO CÂY TRỒNG

I. VAI TRÒ CỦA BIỆN PHÁP ĐẤU TRANH SINH HỌC BẰNG VI SINH VẬT PHÒNG CHỐNG SÂU BỆNH HẠI CÂY TRỒNG

Thống kê của Tổ chức Lương - Nông Thế giới cho thấy: các loại cây trồng trên đồng ruộng hiện nay phải chống đỡ với 100.000 loài sâu hại khác nhau, 10.000 loài nấm, 200 loài vi khuẩn, 600 loài tuyến trùng và 600 loài virus gây bệnh. Quả là một lực lượng hùng hậu tấn công cây trồng, gây tổn thất đáng kể cho mùa màng. Hàng năm khoảng 20% (tức 1/5) sản lượng lương thực thực phẩm trên thế giới bị mất trắng.

Để khắc phục tình trạng trên, con người đã tích cực tìm kiếm các biện pháp phòng chống các tác nhân gây hại. Từ đó ra đời nền công nghiệp hóa học thuốc trừ sâu, diệt các mầm bệnh cho cây trồng. Cho đến nay, không ai có thể phủ nhận vai trò tích cực của thuốc hóa học trừ sâu bệnh hại cây trồng. Có thể nói không một biện pháp bảo vệ mùa màng nào hơn biện pháp hóa học về mặt hiệu quả và quy mô. Nhưng biện pháp hóa học cũng có những mặt hạn chế của nó. Người ta đã biết quá nhiều trường hợp ô nhiễm môi trường khi dùng chất diệt cỏ hoặc thuốc trừ sâu hóa học, làm cho người bị ngộ độc, súc vật bị chết và cả khu hệ sinh vật đi kèm quanh cây trồng cũng bị ảnh hưởng. Cân bằng sinh thái bị phá hủy nghiêm trọng. Đáng ngại hơn, một số thuốc trừ sâu chậm bị phân hủy và có thể giữ tác dụng của mình rất lâu trong đất (ví dụ DDT giữ được 25 năm). Như vậy các hợp chất này được tích lũy lại trong đất và nồng độ của chúng tăng dần theo thời gian. Đặc biệt nghiêm trọng hơn là sự tùy tiện về liều lượng và thời gian phun thuốc hóa học chống sâu bệnh đã tạo nên dư lượng thuốc không cho phép trên các loại rau màu và lương thực, gây nên những vụ ngộ độc thực phẩm rất tai hại cho sức khỏe con người. Trước thực trạng này, con người không chịu bó tay. Những cuộc tìm kiếm, thử nghiệm các biện pháp mới để phòng chống sâu bệnh đã được tiến hành và cuối cùng đã thu được những kết quả rất khả quan. Cũng từ đó các chế phẩm thuốc trừ sâu bệnh cho cây trồng có nguồn gốc sinh học được ra đời. Thoạt tiên, người ta chỉ chú ý tới những loài côn trùng có lợi trong đấu tranh sinh học như bọ rùa, bọ xít, ong kí sinh ... Sau một thời gian, người ta lại phát hiện được

vai trò tích cực của vi sinh vật trong việc điều chỉnh cân bằng sinh học của sinh quần. Biện pháp đấu tranh sinh học được hoàn thiện thêm dần khi người ta sử dụng vi sinh vật để phòng trừ sâu bệnh cho cây trồng. Ở nhiều nước, chế phẩm vi sinh vật được sản xuất ở quy mô lớn và được sử dụng rộng rãi trong công tác phòng trừ sâu bệnh cho hàng triệu hecta cây trồng và cây rừng. Có thể nói biện pháp đấu tranh sinh học bằng vi sinh vật đã thực sự trở thành một nội dung quan trọng của hệ thống phòng trừ sâu bệnh tổng hợp.

Chế phẩm thuốc trừ sâu bệnh có nguồn gốc vi sinh vật có nhiều điểm ưu việt như sau:

- Không gây độc hại cho người, động vật và cây trồng; có khả năng tiêu diệt một cách chọn lọc các loại sâu bệnh. Người ta nói chúng có tính đặc hiệu cao trong việc tiêu diệt các loại côn trùng. Trong khi đó, thuốc trừ sâu hóa học gây độc đối với con người, gia súc nếu tiếp xúc lâu dài, một số còn là tác nhân gây ung thư. Do không độc hại đối với con người, lại không ảnh hưởng xấu đối với sự phát triển của khu hệ vi sinh vật quanh hệ rễ của cây trồng, nên chế phẩm thuốc trừ sâu bệnh có nguồn gốc vi sinh vật không phá vỡ cân bằng sinh thái, không gây ô nhiễm môi trường sống.

- Việc sử dụng các chế phẩm vi sinh vật diệt sâu bệnh cho đến nay chưa phát hiện thấy hiện tượng "lờn thuốc" ở các loại côn trùng. Đó là điều rất đáng được quan tâm, vì ở các thuốc hóa học trừ sâu bệnh, do đã được sử dụng lâu dài trước nay và việc sử dụng còn quá tùy tiện nên hiện nay tính lờn thuốc xuất hiện ngày một nhiều ở các loại sâu bệnh, bắt buộc người ta phải nâng dần nồng độ sử dụng lên mà hiệu quả lại cứ giảm dần.

- Con người đã và đang nghiên cứu mở rộng tác dụng của chế phẩm thuốc trừ sâu có nguồn gốc vi sinh vật bằng nhiều biện pháp. Một trong những biện pháp đó là thực hiện chuyển các gen chỉ phối việc tạo tính độc đối với côn trùng gây hại sang cho nhiều loại cây trồng, tạo nên những cây trồng tự nó có khả năng kháng được các loại sâu hại. Đây là tác dụng mà những chế phẩm thuốc trừ sâu hóa học không thể có được.

- Các chế phẩm sinh học diệt côn trùng có nguồn gốc vi sinh vật khác với các hợp chất hóa học trừ sâu hại bởi bản chất sống của nó, tức nó chứa các nhân tố gây bệnh, làm chết côn trùng là những sinh vật sống. Do vậy việc bảo quản hoặc xử lý các chế phẩm này ngoài đồng ruộng cũng có những yêu cầu khác biệt so với các hợp chất hóa học trừ sâu hại. Một hiện tượng tự nhiên tạo thuận lợi lớn cho con người sử dụng chế phẩm sinh học có nguồn gốc vi sinh vật để diệt sâu hại là khi phun ra ngoài thiên nhiên, các vi sinh vật trong chế phẩm đều có khả năng thích nghi cao, hội nhập

vào tự nhiên một cách khá thuận lợi để có thể tham gia vào các hoạt động đấu tranh sinh học một cách tích cực. Cụ thể khi ta phun chế phẩm lên một loại cây trồng nào đó, các vi sinh vật trong chế phẩm (ví dụ như vi khuẩn, nấm ...) đều có khả năng trở thành một thành viên trong sinh quần nơi đó, và chúng tự sinh sôi nảy nở tăng lên về số lượng.

- Các vi sinh vật diệt côn trùng có thể nhiễm lên côn trùng bằng nhiều cách khác nhau: bằng con đường tiêu hóa (ở vi khuẩn), qua da, tầng cuticun (ở nấm) ... Điều đó cho phép tăng cường khả năng nhiễm thành công của vi sinh vật vào côn trùng.

- Các vi sinh vật diệt côn trùng có thể tồn tại trong điều kiện môi trường không thuận lợi (không vật chủ, điều kiện khí hậu khắc nghiệt ...) ở nhiều dạng khác nhau: dạng bào tử (vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*), dạng hạch nấm hay giả hạch nấm (các giống nấm *Beauveria*, *Metarrhizium*).

- Khả năng phát tán rộng trong tự nhiên của các giống vi sinh vật có ý nghĩa rất lớn trong việc tăng cường lây lan tạo thành dịch bệnh ở côn trùng. Ở một số nấm có khả năng bắn bào tử của nó tới một nơi có khoảng cách gấp hàng ngàn lần so với kích thước của bào tử. Ngoài ra, một số nấm, vi khuẩn, virus còn có thể được lan truyền rộng, nhờ dòng không khí, nước mưa và côn trùng...

Với những đặc điểm sinh học như trên, các vi sinh vật diệt côn trùng có thể xuất hiện bất ngờ, với một tốc độ nhanh, mang tính chất một ổ bệnh, dẫn đến gây chết côn trùng trên một địa bàn rộng. Do vậy giúp bảo vệ cây trồng có hiệu quả đáng kể.

Do những đặc tính ưu việt của chế phẩm diệt côn trùng có nguồn gốc vi sinh vật nên các chế phẩm này được ứng dụng ngày một rộng rãi hơn.

Hiện nay trên thị trường các dạng chế phẩm sinh học diệt côn trùng được tiêu thụ ngày một nhiều hơn. Ta có thể làm quen với một số chế phẩm sau:

- Chế phẩm có nguồn gốc vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*.

Agritol (Hoa Kỳ)	: 60 - 70 bào tử/g
Larvatrol (Hoa Kỳ)	: 5 - 150 bào tử/g.
Thuricide (Hoa Kỳ)	: 5 - 50 bào tử/g
Bathurin (Tiệp Khắc)	: 3 - 300 bào tử/g
Entobakterin (Nga)	: 50 - 90 bào tử/g
Biospore (CHLB Đức)	: 20 - 30 bào tử/g

Tùy từng nước mà các chế phẩm của cùng một loại vi khuẩn có thể mang các tên gọi rất khác nhau. Như chế phẩm sinh học từ vi khuẩn

Bac. thuringiensis được sản xuất ở Hoa Kỳ mang các nhãn hiệu khác nhau như Agritol, Larvatrol, Biotrol BTB; ở Pháp lại có các tên: Bactospeine, Sporeine ...

- Từ vi khuẩn *Bac. lentimorbus* có chế phẩm Japidemic (ở Nhật), và từ *Bac. popilliae* có chế phẩm Doom (ở Hoa Kỳ) ...

- Chế phẩm có nguồn gốc từ nấm *Beauveria bassiana* được sản xuất từ Hoa Kỳ có tên Beauverine hay Biotrol FBB.

- Chế phẩm có nguồn gốc từ virus:

- + Biotrol VHZ, Vinex, Viron H : Diệt sâu hại bông.
- + Polyviocide: Diệt sâu cắn lá.
- + Spodoptera Bitrol VSE: Diệt sâu khoang hại cải.
- + Biotrol VPO: Diệt sâu khoang sọc vàng ...

II. CÁC NHÓM VI SINH VẬT ĐƯỢC SỬ DỤNG ĐỂ SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM THUỐC TRỪ SÂU BỆNH CHO CÂY TRỒNG

Hiện nay người ta đã biết tới 1500 loại vi sinh vật hoặc sản phẩm của chúng có khả năng tham gia vào công việc phòng trừ sâu bệnh, trong đó bao gồm nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, virus ...

1. Vi khuẩn

a) Một số loài vi khuẩn sinh bào tử điển hình có khả năng diệt sâu hại (Theo Nguyễn Lân Dũng, 1981):

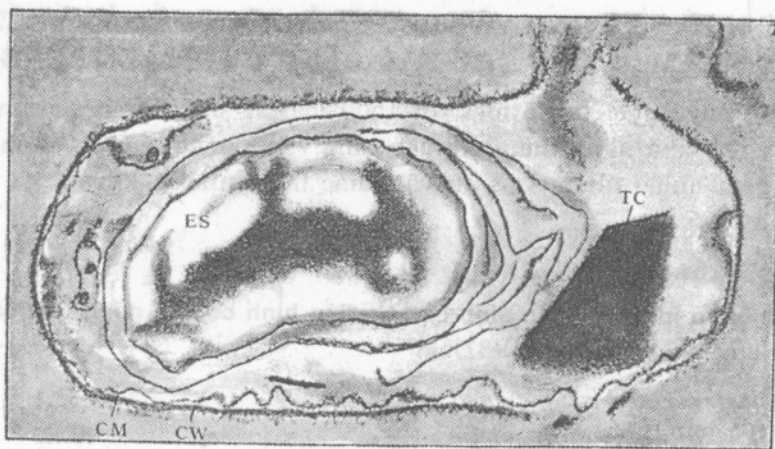
- *Clostridium brevifaciens*
- *Clostridium malacosomae*
- *Bacillus cereus*
- *Bac. thuringiensis*
- *Bac. thuringiensis* var. *entomocidus*
- *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*
- *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*
- *Bac. popilliae*

b) Một số loài vi khuẩn không sinh bào tử điển hình có khả năng diệt sâu hại (Theo Nguyễn Lân Dũng, 1981):

- *Serratia marcescens*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Ps. putida*
- *Proteus vulgaris*

- *Proteus mirabilis*
- Nhiều loài của chi *Aerobacter*
- Nhiều loài của chi *Cloaca*

Trong số rất nhiều các loài vi khuẩn có khả năng gây bệnh cho côn trùng nói trên thì *Bacillus thuringiensis* (thường được gọi tắt là loài Bt) là loài chủ yếu, thường được dùng để tạo chế phẩm giết sâu hại. Có tới trên 300 chủng *Bac. thuringiensis* khác nhau đã được xác định. Ta có thể làm quen với một vài đặc điểm của *Bac. thuringiensis* như sau: tế bào Bt điển hình có dạng hình que, kích thước tương đối lớn so với các loài vi khuẩn khác ($3 - 6 \times 0,8 - 1,3\mu\text{m}$), gram (+), có tiên mao mọc khắp cơ thể, thường đứng riêng lẻ hay tạo thành chuỗi, khi tế bào trưởng thành thường xuất hiện một bào tử hình trứng và một tinh thể độc hình quả trám có bản chất protein (hình 13).



Hình 13 : *Bacillus thuringiensis* ($\times 18.000$)

TC : Tinh thể độc, ES : Bào tử, CM : Màng tế bào, CW : Thành tế bào.

Trong loài Bt, căn cứ vào các đặc điểm khác nhau về khả năng hình thành leucitinase, cấu trúc tinh thể, khả năng gây bệnh cho các loại côn trùng và đặc tính huyết thanh học mà người ta lại chia ra rất nhiều thứ (variety) khác nhau. Ví dụ như căn cứ vào kháng nguyên tiên mao (kháng nguyên H), người ta chia loài Bt thành trên 20 type huyết thanh học khác nhau: $H_1, H_2, H_3, \dots, H_{20}$.

c) Một số loài sâu bị vi khuẩn *Bac. thuringiensis* gây chết :

Có khoảng hơn 200 loài côn trùng có thể bị vi khuẩn Bt gây chết, trong số này đa số là các loài sâu hại cây trồng và cây rừng.

Đơn cử một số loài sâu sau (Theo Nguyễn Lâm Dũng, 1981),
(hình 14 - 22) :

- Sâu xanh hại bông (*Heliothis armigera*).
- Sâu xám hại rau (*Agrotis upsilon*).
- Ngải đêm hại su hào, bắp cải (*Barathra brassicae*).
- Sâu xanh hại ớt (*Heliothis assulta*).
- Bọ lá khoai tây (*Leptinotarsa decemlineata*).
- Bọ xít rùa (*Eurygaster integriceps*).
- Sâu cắn lá ngô (*Leucania separata* Walker).
- Mọt lúa mì (*Sitophilus granarius* Linne).
- Sâu non đục củ khoai tây (*Gnorimoschema operculella* Zeller).
- Sâu đục thân bắp (*Pyrausta nubilalis* Hiibner)....

Danh sách các loài sâu bị gây chết bởi chế phẩm thuốc trừ sâu có nguồn gốc vi sinh vật ngày càng dài thêm ra bởi vì các nhà khoa học không ngừng tìm kiếm các chủng vi sinh vật có khả năng diệt côn trùng và thử tác dụng trên các loài sâu khác nhau.

d) Cơ chế tác động của chế phẩm vi khuẩn Bt lên côn trùng:

Trong quá trình nghiên cứu cơ chế tác động diệt côn trùng của các vi khuẩn Bt, người ta đã phát hiện 4 loại độc tố khác nhau do loài vi khuẩn này sinh ra:

- Nội độc tố δ (delta - endotoxin) hay còn gọi là tinh thể độc.
- Ngoại độc tố β (beta - exotoxin) hay còn gọi là ngoại độc tố bền nhiệt.
- Ngoại độc tố α (alpha - exotoxin) hay còn gọi là leucitinase - C.
- Độc tố tan trong nước.

Người ta đã cố gắng tìm hiểu về cơ chế tác động của các độc tố này. Cho đến nay ít nhiều đã có được những lí giải khá xác đáng.

* Nội độc tố δ hay là tinh thể độc.

Nội độc tố δ dễ dàng được nhận biết vì nó tồn tại dưới dạng tinh thể. Những hiểu biết về độc tố này phong phú hơn hẳn so với các độc tố khác.

- Hình thái, cấu trúc tinh thể độc δ :

Tinh thể thường có hình quả trám, có kích thước khá lớn (dài > 1 μ m, ngang > 0,5 μ m), chiếm tới 30% khối lượng khô của tế bào. Có thể quan sát tinh thể khá dễ dàng dưới kính hiển vi quang học bằng phương pháp nhuộm thông thường. Muốn quan sát rõ hơn có thể dùng kính hiển vi đối pha. Ở các loài, thứ khác nhau của vi khuẩn *Bacillus* có thể quan sát thấy hình dáng tinh thể khác nhau (hình 23).

Trong các nghiên cứu đầu tiên với kính hiển vi điện tử, C.L. Hannay đã chứng minh là tinh thể độc của Bt có hình hai kim tự tháp úp vào nhau, trên bề mặt có những luống nổi lên, luống nọ cách luống kia khoảng 29nm. Sau đó, bằng phương pháp nhiễu xạ tia X, người ta đã xây dựng được mô hình cấu tạo mặt ngoài của tinh thể độc. Đến năm 1969, người ta đã biết được các cấu trúc siêu phân tử bên trong tinh thể này có dạng hình que, kích thước khoảng $4,7 \times 11,8\text{nm}$.



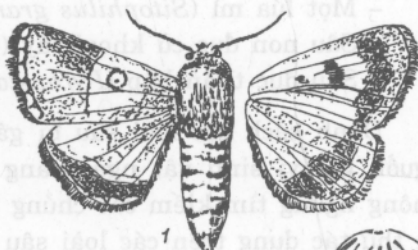
1



2

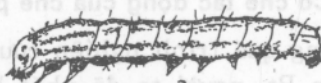
Hình 14 : Ngài đêm hại su hào, bắp cải
(*Barathra brassicae*)

1. Bướm ; 2. Ấu trùng



1

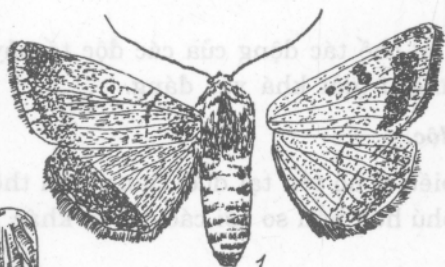
2



3

Hình 15 : Sâu xanh hại ớt (*Heliiothis assulta*)

1. Bướm ; 2. Trứng ; 3. Ấu trùng



1



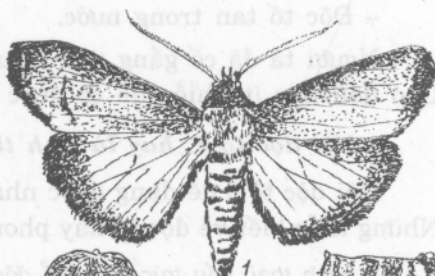
2



3

Hình 16 : Sâu xanh hại bông
(*Heliiothis armigera*)

1. Bướm ; 2. Trứng ; 3. Ấu trùng



1



2



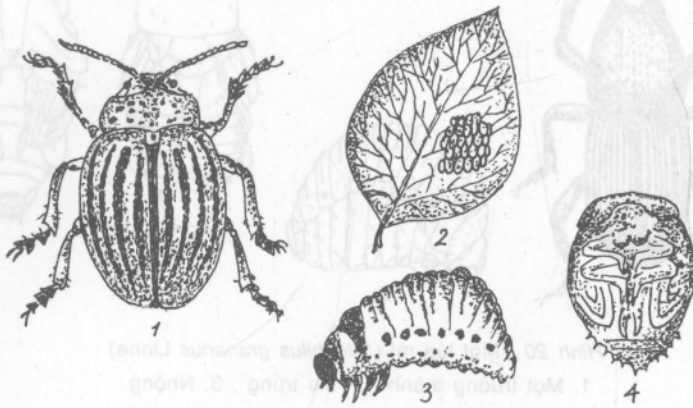
3



4

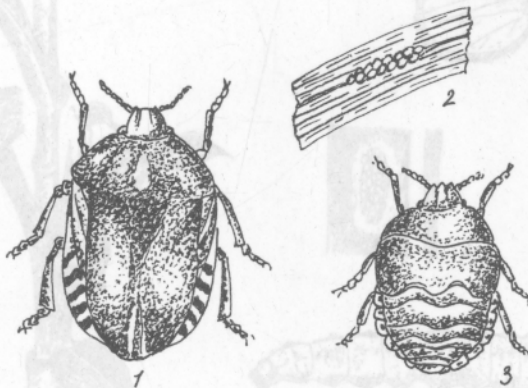
Hình 17 : Sâu xám hại rau (*Agrotis upsilon*)

1. Bướm ; 2. Trứng ; 3. Ấu trùng ; 4. Đốt bụng thứ 4 của ấu trùng (trông phía lưng)



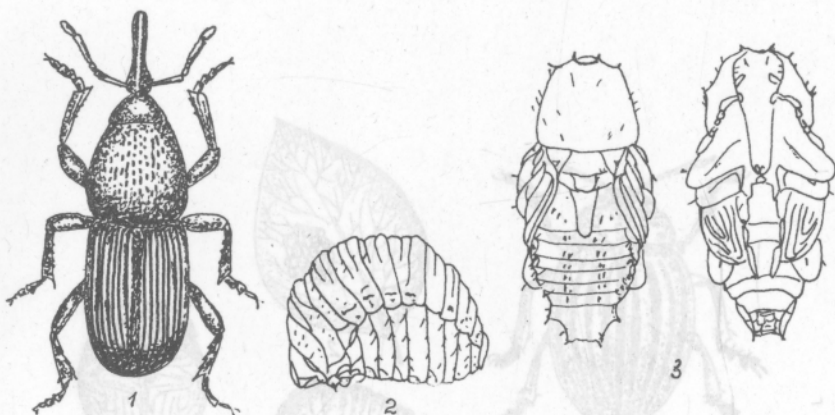
Hình 18 : Bọ lá khoai tây (*Leptinotarsa decemlineata*)

1. Bọ ; 2. Khối trứng ;
3. Ấu trùng ; 4. Nhộng

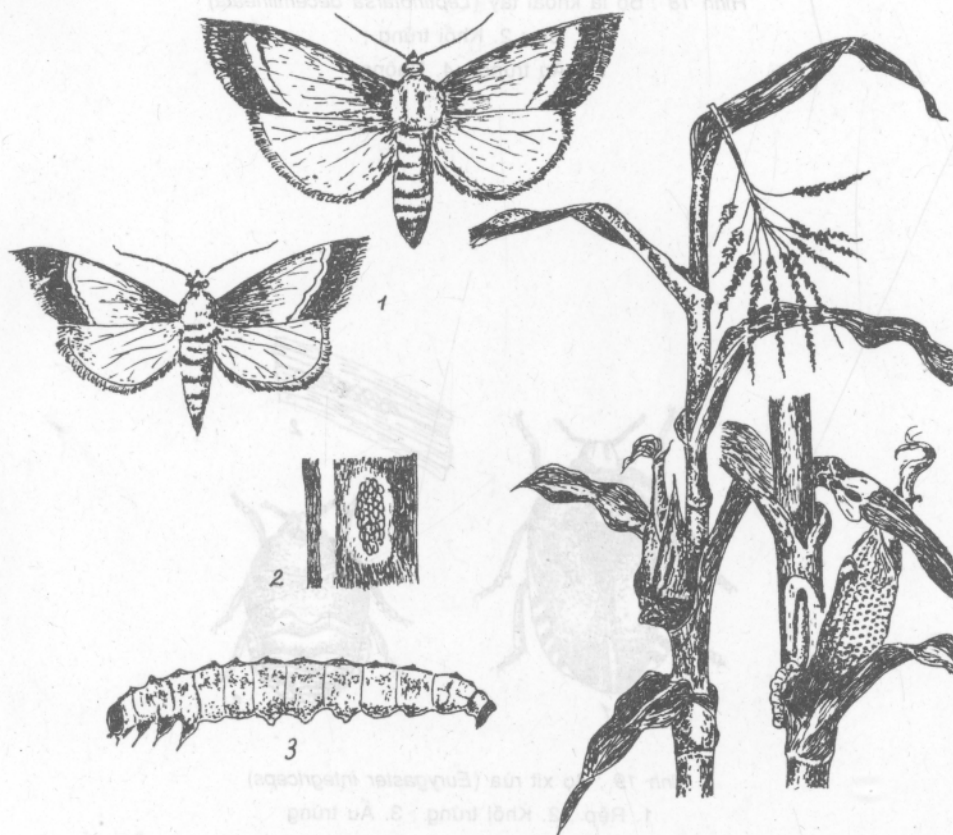


Hình 19 : Bọ xít rùa (*Eurygaster integriceps*)

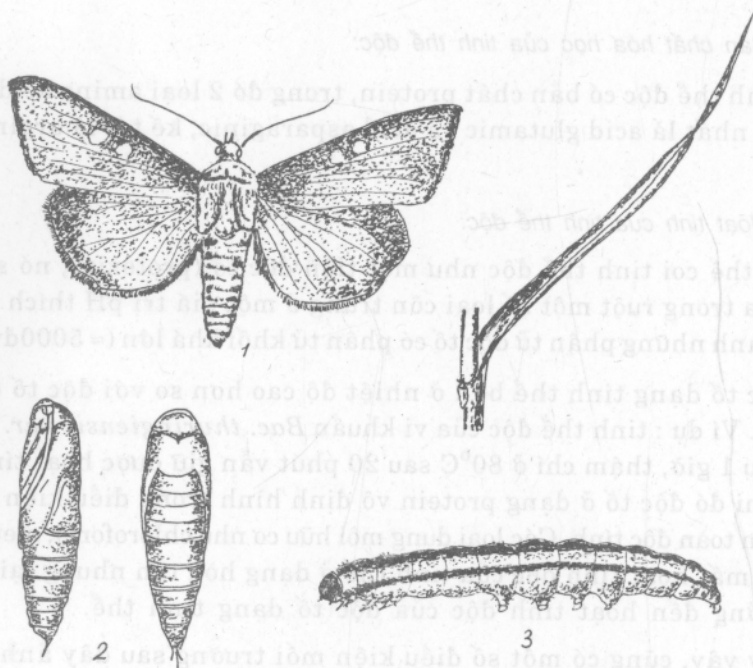
1. Rệp ; 2. Khối trứng ; 3. Ấu trùng



Hình 20 : Mọt lúa mì (*Sitophilus granarius* Linne)
1. Mọt trưởng thành ; 2. Ấu trùng ; 3. Nhộng

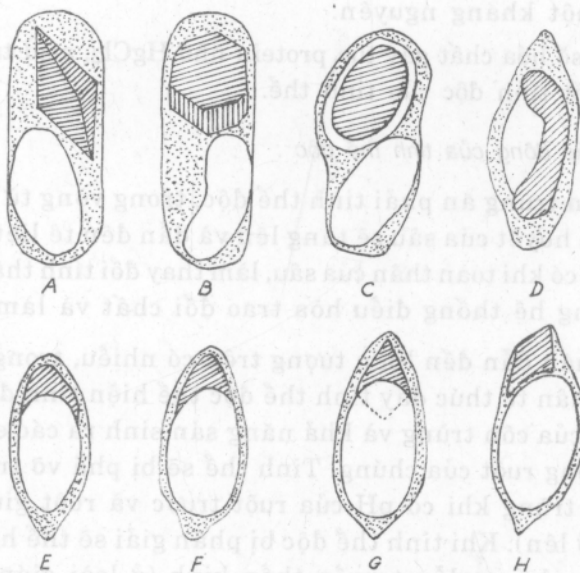


Hình 21 : Sâu đục thân bắp (*Pyrausta nubilalis* Hübner)
1. Bướm ; 2. Trứng ; 3. Ấu trùng



Hình 22 : Sâu ăn lá bắp (*Leucania separata* Walker)

1. Bướm ; 2. Nhộng ; 3. Ấu trùng



Hình 23 : Các dạng tinh thể độc của một số loài của vi khuẩn *Bacillus*

A, B. *Bacillus thuringiensis* ; C. *Bacillus medusa*; D. *Bacillus laterosporus* ;

E, F, G, H. *Bacillus popilliae*

– Bản chất hóa học của tinh thể độc:

Tinh thể độc có bản chất protein, trong đó 2 loại amino acid chiếm tỉ lệ cao nhất là acid glutamic và acid asparaginic, kế tới là arginine và leucine.

– Hoạt tính của tinh thể độc:

Có thể coi tinh thể độc như một tiền độc tố (protoxin), nó sẽ được hoạt hóa trong ruột một số loại côn trùng ở một giá trị pH thích hợp và hình thành những phân tử độc tố có phân tử khối khá lớn (≈ 5000 đvC).

Độc tố dạng tinh thể bền ở nhiệt độ cao hơn so với độc tố ở dạng hòa tan. Ví dụ : tinh thể độc của vi khuẩn *Bac. thuringiensis var. sotto* ở 65°C sau 1 giờ, thậm chí ở 80°C sau 20 phút vẫn giữ được hoạt tính độc, trong khi đó độc tố ở dạng protein vô định hình trong điều kiện này sẽ mất hoàn toàn độc tính. Các loại dung môi hữu cơ như chloroform, methanol... tuy làm mất hoạt tính độc của tinh thể ở dạng hòa tan nhưng lại không ảnh hưởng đến hoạt tính độc của độc tố dạng tinh thể.

Tuy vậy, cũng có một số điều kiện môi trường sau đây ảnh hưởng mạnh đến hoạt tính của tinh thể độc:

+ pH của môi trường: quá cao ($\text{pH} > 12$) hay quá thấp ($\text{pH} < 3,3$) sẽ làm cho tinh thể mất tính độc – cụ thể mất năng lực phản ứng với tinh chất là một kháng nguyên.

+ Một số hóa chất gây rửa protein như HgCl_2 , acid trichloroacetic cũng sẽ làm mất tính độc của tinh thể.

– Cơ chế tác động của tinh thể độc :

Sau khi côn trùng ăn phải tinh thể độc, trong vòng từ 1 - 7 giờ, pH của máu – bạch huyết của sâu sẽ tăng lên và dẫn đến tê liệt đường ruột, xoang miệng và có khi toàn thân của sâu, làm thay đổi tính thấm của thành ruột, tổn thương hệ thống điều hòa trao đổi chất và làm sâu chết.

Nguyên nhân dẫn đến hiện tượng trên có nhiều, trong đó người ta cho là do hai nhân tố thúc đẩy tinh thể độc thể hiện tính độc của mình: pH đường ruột của côn trùng và khả năng sản sinh ra các enzyme phân giải protein trong ruột của chúng. Tinh thể sẽ bị phá vỡ trong ruột của nhiều loài côn trùng khi có pH của ruột trước và ruột giữa khá kiềm (khoảng 8,9 trở lên). Khi tinh thể độc bị phân giải sẽ thể hiện tính độc, ví dụ gây phong bế sự dẫn truyền thần kinh (ở loài gián *Periplaneta americana*). Tinh thể không bị phân giải sẽ không gây ra tác động này. Nhưng không phải lúc nào điều nhận xét trên cũng đúng. Có một số loài côn trùng, có pH đường ruột cao hơn 8,9 gây phá vỡ tinh thể, nhưng lại

không gây độc cho sâu. Như vậy cho thấy cần có nhân tố thứ 2 giúp tính độc của tinh thể phát huy tác dụng lên côn trùng, đó là khả năng sinh enzyme protease trong đường ruột của côn trùng, những enzyme này sẽ chuyển hóa dạng tiền độc tố của tinh thể thành dạng độc đối với cơ thể của côn trùng.

Ở đa số các thứ trong loài vi khuẩn Bt, thành tế bào sẽ bị phân giải sau khi bào tử và tinh thể độc được tạo thành. Khi đó bào tử và tinh thể độc sẽ phóng thích một cách riêng rẽ vào trong môi trường. Riêng ở thứ *Bac. thuringiensis var. finitimus* (type huyết thanh H₂), bào tử và tinh thể sau khi giải phóng ra khỏi tế bào vẫn còn dính liền nhau.

*** Ngoại độc tố β hay còn gọi là ngoại độc tố bền nhiệt :**

Ở một số type huyết thanh của vi khuẩn Bt không sinh tinh thể độc mà lại có khả năng tạo ngoại độc tố β . Ngoại độc tố β có nhiều đặc điểm khác với nội độc tố δ .

– Ngoại độc tố β có đặc điểm đặc trưng là rất bền với nhiệt, ở 120°C sau 15 phút vẫn còn hoạt tính độc; bền ở áp suất khá cao khi khử trùng.

– Độc tố β có phân tử khối = 707 - 850đvC, trong phân tử có chứa adenine - phosphate - ribose, glucose và acid allomucic.

– Ở vi khuẩn Bt có một số type huyết thanh là : H₁, H_{4a}, H_{4c}, H₅, H₈, H₉ và H₁₀ có khả năng sinh ngoại độc tố β .

– Cơ chế tác động của ngoại độc tố β là cản trở sự tổng hợp RNA thông tin của cơ thể sâu.

*** Ngoại độc tố α hay còn gọi là leucitinase-C :**

Loại độc tố này sẽ phát huy tác dụng gây độc hại ở những côn trùng nào có độ pH đường ruột phù hợp với độ pH hoạt động thích hợp của enzyme leucitinase-C. Nó cũng sẽ gây nên những tổn thương ở đường ruột của côn trùng.

*** Độc tố tan trong nước:**

Đây là loại độc tố có phân tử khối lớn hơn 30.000đvC và có thành phần cấu tạo gồm các peptid và một số amino acid tự do. Loại độc tố này có thể gây ra những triệu chứng bệnh lí ở côn trùng tương tự như độc tố dạng tinh thể.

Ngoài vi khuẩn Bt, còn có một số loài vi khuẩn khác có khả năng sử dụng để sản xuất các chế phẩm vi khuẩn giết côn trùng. Đó là các loài: *Bac. popilliae*, *Bac. lentimorbus*, *Bac. moritae*, *Bac. sphaericus*.

Đặc biệt loài vi khuẩn *Bac. sphaericus* và loài phụ *Bac. thuringiensis esraelensis* (type huyết thanh H₁₄) có khả năng tiêu diệt mạnh mẽ các loại bọ gây - ấu trùng của muỗi gây bệnh sốt rét.

2. Xạ khuẩn

Các loại cây trồng ngoài việc phải chống chịu với côn trùng phá hại còn gặp mỗi hiểm họa lớn là các bệnh do các loại vi sinh vật gây ra. Trong số các tác nhân gây bệnh cho cây trồng thì nấm chiếm khoảng 60% và trong số các loại vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm thì xạ khuẩn có tỉ lệ đối kháng cao (40 - 60%). Vì vậy, việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn đối kháng và các chế phẩm kháng sinh kháng nấm gây bệnh để áp dụng vào công tác bảo vệ thực vật có tầm quan trọng đặc biệt.

Thực tế cho thấy hiện nay con người ngày một sử dụng rộng rãi nhiều chế phẩm kháng sinh và các chủng vi sinh vật đối kháng làm phân vi sinh vật sử dụng trong sản xuất nông nghiệp mang lại hiệu quả kinh tế cao và khắc phục được các yếu tố bất lợi của thuốc hóa học.

Trong số các chủng xạ khuẩn, chi *Streptomyces* với các loài như: *Strep. hygroscopicus*, *Strep. rurgersensis*, *Strep. longisporus*, *Strep. sp.* được sử dụng để sản xuất các chế phẩm thuốc trừ các bệnh ở cây trồng như bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia oryzae* gây ra ở cây lúa, cà chua ..., bệnh thối nhũn do *Fusarium oxysporum* gây ra ở cây thông ..., bệnh khô vằn do nấm *Rhizoctonia solani* gây ra ở cây bắp, lúa ...

Riêng loài *Strep. diclowii* có khả năng ức chế sự đẻ trứng và tiêu diệt đối với các nhóm tuyến trùng như *Criconebella*, *Ditylenchus*, *Globodera* ... gây bệnh cho cây trồng hoặc sống tự do trong đất.

Các chất kháng sinh do các chủng xạ khuẩn nói trên sinh ra cũng như chính bản thân xạ khuẩn đã thỏa mãn được những tính chất cần thiết để có thể sử dụng trong việc bảo vệ thực vật như:

- Không gây ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng, phát triển của cây trồng. Ở một số nồng độ thích hợp, các kháng sinh này còn kích thích khả năng nảy mầm của hạt và sinh trưởng của cây.

- Không gây độc hại cho người và gia súc.

- Có hiệu lực trong một thời gian nhất định ở ngoài môi trường tự nhiên.

- Một đặc điểm quan trọng thể hiện tính ưu việt của chế phẩm thuốc là có tác dụng tiêu diệt các sinh vật một cách có chọn lọc: kháng nấm mốc mạnh, kháng các nhóm vi khuẩn gram (+) hơi yếu, với vi khuẩn gram (-) không thể hiện rõ tính đối kháng ...

Các chế phẩm được chế tạo dưới hai dạng: dạng nuôi cấy xạ khuẩn và dạng dịch bào tử của xạ khuẩn.

Phương thức sử dụng: Có thể sử dụng chế phẩm để xử lý hạt giống trước khi gieo hoặc xử lý đất trồng trước lúc gieo hạt, trồng cây để phòng bệnh cho cây. Để trị bệnh: Xử lý cùng lúc với gieo, ươm cây hay khi bệnh phát sinh.

3. Nấm sợi

Rất nhiều loài nấm sợi có khả năng gây bệnh cho sâu hại cây trồng. Tuy vậy cho đến nay chỉ mới có các loài sau đây được sử dụng để sản xuất các chế phẩm nấm diệt sâu hại:

- *Aschersonia* spp.
- *Beauveria bassiana*
- *Conidiobolus obscurus*
- *Culicinomyces clavosporus*
- *Metarrhizium anisopliae*
- *Hirsutella thompsoni*
- *Zoophthora radicans* ...

Trong các loài trên, có một số được sử dụng phổ biến hơn và đạt hiệu quả cao hơn để phòng trừ sâu hại cây trồng và cây rừng là các loài:

- *Beauveria bassiana* - nấm bạch cương.
- *Metarrhizium anisopliae* - nấm lục cương

a) Nấm bạch cương (*Beauveria bassiana*)

Người ta phát hiện được nấm bạch cương trong trường hợp nấm này gây bệnh làm chết hàng loạt tằm của nghề nuôi tằm. Sau đó người ta đã tìm cách phân lập và nuôi cấy chúng trên môi trường nhân tạo.

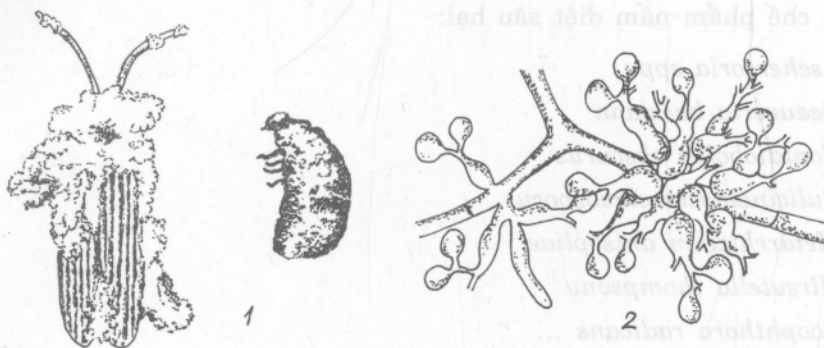
Nấm bạch cương có dạng sợi phân nhánh, có vách ngăn ngang, rất mảnh ($\phi = 3 - 5\mu\text{m}$), màu trắng. Hệ sợi nấm phát triển nhanh, tạo thành khối xốp màu trắng, do vậy người ta gọi nấm này là nấm bạch cương hay còn gọi là nấm vôi. Trên cơ thể côn trùng, khi khô sợi nấm chuyển từ màu trắng sang màu crem hay đôi khi có pha một ít màu đỏ, da cam.

Nấm có bào tử trần, đơn bào, không màu, có dạng hình cầu ($\phi = 1 - 4\mu\text{m}$) hay hình trứng ($1,5 - 5,5 \times 1,3\mu\text{m}$).

Nấm bạch cương thể hiện tính độc với côn trùng nhờ độc tố beauvericin. Độc tố này có công thức nguyên là $\text{C}_{45}\text{H}_{57}\text{O}_9\text{N}_3$. Đó là một loại depsipeptid vòng, có điểm sôi vào khoảng $93 - 94^\circ\text{C}$.

Từ một lít dịch nuôi cấy *Beauveria bassiana* người ta tách được 1,5g độc tố beauvericin, hay từ 1kg môi trường lên men đặc tách được 3,8g beauvericin.

Diễn biến tác động của nấm lên côn trùng như sau: Khi phun chế phẩm nấm, những bào tử của nấm sẽ phát tán trong không khí hay bám trên thân, lá cây. Khi gặp cơ thể sâu, bào tử sẽ nảy mầm mọc thành sợi nấm đâm xuyên qua tầng vỏ kitin của sâu và phát triển trong cơ thể của chúng. Sợi nấm mọc rất nhanh trên cơ thể côn trùng và chằng máy chốc phủ kín bề mặt cơ thể côn trùng (hình 24).



Hình 24 : Nấm bạch cương (*Beauveria bassiana*)

1. Sợi nấm mọc trên cơ thể côn trùng ;
2. Bào tử trần và cuống sinh bào tử

Lúc đó côn trùng huy động các tế bào bạch huyết (lymphocyte) đến để chiến đấu chống lại độc tố beauvericin của nấm. Nhưng độc tính của độc tố quá mạnh nên khi nấm tiêu diệt được hầu hết các tế bào bạch huyết cũng là lúc côn trùng bị chết.

Cho đến nay, người ta đã xác định được loài nấm này có khả năng kí sinh và gây chết đối với khoảng hơn 100 loài côn trùng. Ta có thể đơn cử một số loài sau đây:

- *Aporia crataegi*
- *Aradua cinnamomeus*
- *Balaninus glandium*
- *Bembidion* sp.
- *Cacoecia crataegana*
- *Chrysomela* sp.
- *Chrysopa vulgaris*

- *Cionus sp.*
- *Rhizotrogus sp.*
- *Scolytus scolytus*

b) Nấm lục cương (*Metarrhizium anisopliae*):

Đây cũng là nấm sợi có khả năng kí sinh và làm chết nhiều loại côn trùng hại cây trồng.

Năm 1878 khi nghiên cứu về loài sâu *Anisoplia austriaca*, nhà khoa học người Nga I.I. Metchnikov đã phát hiện thấy một loài nấm có bào tử màu lục có thể gây chết hàng loạt côn trùng. Lúc đó ông đặt tên cho loài nấm này là *Entomophthora anisopliae*. Về sau này khi kiểm tra lại, người ta đã xếp chúng vào giống *Metarrhizium*.

Nấm *Metarrhizium anisopliae* có dạng sợi phân nhánh, có vách ngăn ngang, có $\phi = 3 - 4\mu\text{m}$. Sợi có màu từ trắng tới hồng. Bào tử của nấm là bào tử trần, dạng hình que, kích thước: $3,5\mu\text{m} \times 7,2\mu\text{m}$, có màu từ xám đến oliu - lục. Bào tử xếp thành chuỗi khá chặt chẽ và nhìn bằng mắt thường thấy bào tử tạo ra trên bề mặt côn trùng một lớp phấn khá rõ.

Nấm có thể phát triển trong giới hạn pH = 6,9 - 7,4. Nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển là 24°C - 25°C. Nếu $t^\circ > 28^\circ\text{C}$ sợi nấm sẽ không sản sinh ra bào tử trần. Ngoài ra muốn nấm có bào tử cần phải có độ ẩm của không khí khá cao.

Người ta cũng đã nghiên cứu nhiều về độc tố của nấm này.

Độc tố diệt sâu của nấm bao gồm nhiều ngoại độc tố có tên là destrucin A, B, C và D. Destrucin A và B có thể tách từ dịch nuôi cấy nấm lục cương. Destrucin A có công thức nguyên là $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_7\text{N}_5$, điểm sôi = 188°C (Theo A. Suzuki và những người cộng sự 1966, 1970). Destrucin B có công thức nguyên là $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_7\text{N}_5$, điểm sôi = 234°C (Theo Tamura, 1965). Đó là những depsipeptid vòng.

Diễn biến tác động lên côn trùng như sau: Tương tự như ở nấm bạch cương, bào tử của nấm lục cương khi rơi lên bề mặt của côn trùng trong khoảng 24 giờ sẽ nảy mầm, tạo thành ống mầm chui xuyên qua vỏ của côn trùng, sau đó tiếp tục phân nhánh tạo thành một mạng sợi nấm chằng chịt trên khắp bề mặt của cơ thể côn trùng. Lúc này ngoại độc tố được tiết ra sẽ tác động lên côn trùng, khiến cho côn trùng chết.

Cho đến nay người ta đã biết được trên 70 loài côn trùng bị nấm này tiêu diệt, trong số đó có tới 34 loài côn trùng cánh cứng và chỉ có 5

loài côn trùng cánh vảy. Có thể dẫn một số loài côn trùng điển hình mắc bệnh với nấm này là:

- *Melolontha melolontha*
- *Melolontha hippocastanei*
- *Anisoplia austriaca*
- *Oryctes rhinoceros*
- *Otiorrhynchus ligustici*
- *Plusia gamma*

4. Virus

Virus cũng là đối tượng được sử dụng để tiêu diệt côn trùng có hại với vai trò là những cơ thể có khả năng kí sinh trên các vi sinh vật gây bệnh và các côn trùng có hại cho cây trồng. Chúng thuộc vào 3 loại sau:

- Virus đa diện dạng nhân (Nuclear polyhedrosis virus).
- Virus thể hạt (Granulosis virus)
- Virus đa diện dạng tế bào chất (Cytoplasmic polyhedrosis).

Cho đến nay người ta đã tìm được rất nhiều loài virus tiêu diệt được sâu hại. Có thể đơn cử một số loài côn trùng sau bị virus tiêu diệt (Theo M.H. Rogoff, 1973) như sau :

*** Các loài bị virus đa diện tiêu diệt :**

- *Antheraea eucalypti*
- *Antheraea pernyi*
- *Barathra brassicae* (Ngài đêm hại su hào, bắp cải)
- *Bombyx mori*
- *Prodenia litura* (Sâu khoang)
- *Heliothis zea* (Sâu hại cây bắp)
- *Spodoptera exigua* (Sâu hại đậu)

*** Các loài bị virus thể hạt tiêu diệt :**

- *Argyrotaenia velutinana*
- *Pieris brassicae* (Sâu hại cải)
- *Eucosma griseana*
- *Spodoptera sp.*

III. NUÔI CẤY VÀ TẠO CHẾ PHẨM VI SINH VẬT DIỆT CÔN TRÙNG

Để xây dựng quy trình sản xuất các chế phẩm vi sinh vật diệt côn trùng, người ta đã phải dành nhiều nỗ lực cho việc phân lập các chủng vi sinh vật từ bệnh phẩm của côn trùng bị hại, nuôi cấy chúng ở dạng thuần khiết, ở quy mô nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm đến quy mô sản xuất lớn ở mức độ công nghiệp.

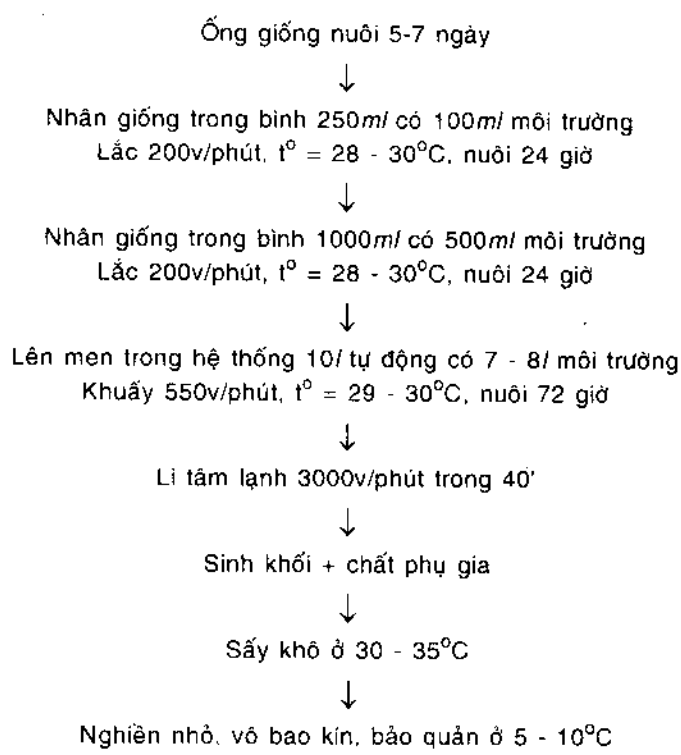
Tùy từng đối tượng vi sinh vật diệt côn trùng (như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, virus), người ta sẽ xây dựng các quy trình nuôi cấy thu nhận chế phẩm diệt sâu hại khác nhau. Cho đến nay ở hầu hết các nhóm vi sinh vật, người ta cũng đã xây dựng được những quy trình thu nhận các chế phẩm diệt sâu khá hoàn chỉnh và đã được áp dụng vào thực tế sản xuất lớn ở quy mô công nghiệp. Tuy vậy, ở một số đối tượng vi sinh vật vẫn còn đang trong giai đoạn tìm kiếm phương pháp lên men, chọn nguyên liệu nuôi cấy sao cho thích hợp ở quy mô lớn để có giá thành rẻ, dễ kiểm ...

Để thu nhận chế phẩm giết sâu hại, tùy từng đối tượng vi sinh vật, người ta sẽ áp dụng các phương pháp lên men khác nhau.

1. Lên men chìm

Bằng phương pháp lên men chìm sẽ giúp ta dễ dàng thu nhận sinh khối, bào tử, tinh thể độc và các sản phẩm khác như chất kháng sinh, các độc tố ở dạng hoà tan trong môi trường dinh dưỡng của các vi sinh vật diệt côn trùng. Ngoài ra ở phương pháp lên men chìm luôn có ưu điểm là môi trường dinh dưỡng có thể đáp ứng hoàn toàn với nhu cầu sinh lý của từng giống vi sinh vật, do vậy cho hiệu suất lên men thu sản phẩm cao. Đồng thời bằng phương pháp lên men chìm, việc sản xuất sẽ dễ áp dụng cơ khí, tự động hóa lại ít tốn nhân công và diện tích mặt bằng dùng cho lên men không lớn.

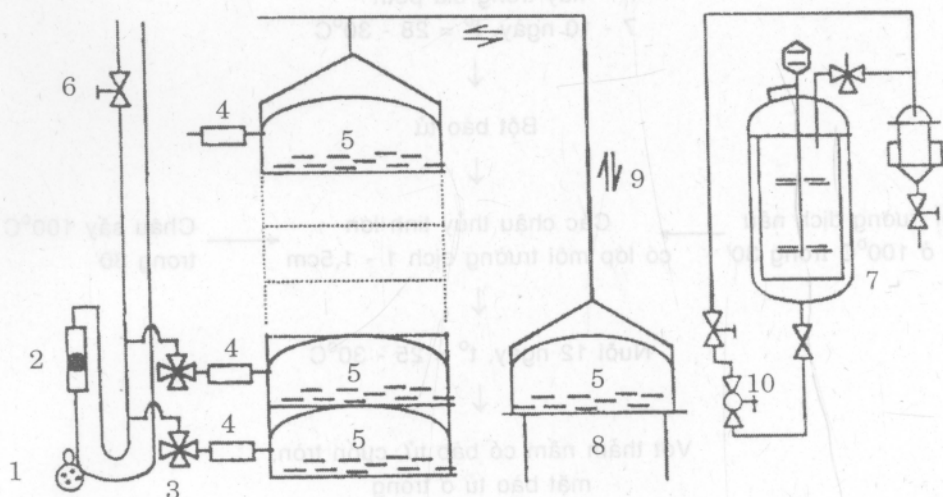
Ta có thể tham khảo quy trình lên men chìm tạo chế phẩm nấm diệt sâu hại ở sơ đồ 6 (Theo Nguyễn Ngọc Tú, 1997).



SƠ ĐỒ 6 : Quy trình lên men chìm tạo chế phẩm nấm diệt sâu

Trong phương pháp lên men chìm, ngoài việc sử dụng các nồi lên men thông thường, người ta còn áp dụng nuôi cấy trong các đệm plastic trên quy mô công nghiệp khi nuôi cấy các chủng nấm mốc *Beauveria bassiana* và *Verticillium lecali* để thu nhận chế phẩm diệt sâu hại (hình 23 – Theo Nguyễn Ngọc Tú, 1997).

Khi sử dụng phương pháp lên men chìm, bên cạnh những ưu việt, người ta cũng gặp phải những hạn chế như đòi hỏi trang thiết bị phức tạp, tốn nhiều kinh phí cho việc khử trùng toàn bộ hệ thống lên men, khuấy đảo, sục khí ... (đối với các chủng vi sinh vật hiếu khí). Cá biệt trong trường hợp áp dụng lên men chìm đối với các chủng nấm mốc diệt côn trùng như *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* chỉ thu được chế phẩm ở dạng bào tử chồi (blastospore). Bào tử ở dạng này thường có thời gian sống ngắn, cấu trúc không bền vững, dễ bị mất hoạt tính (Theo Nguyễn Ngọc Tú, 1997).

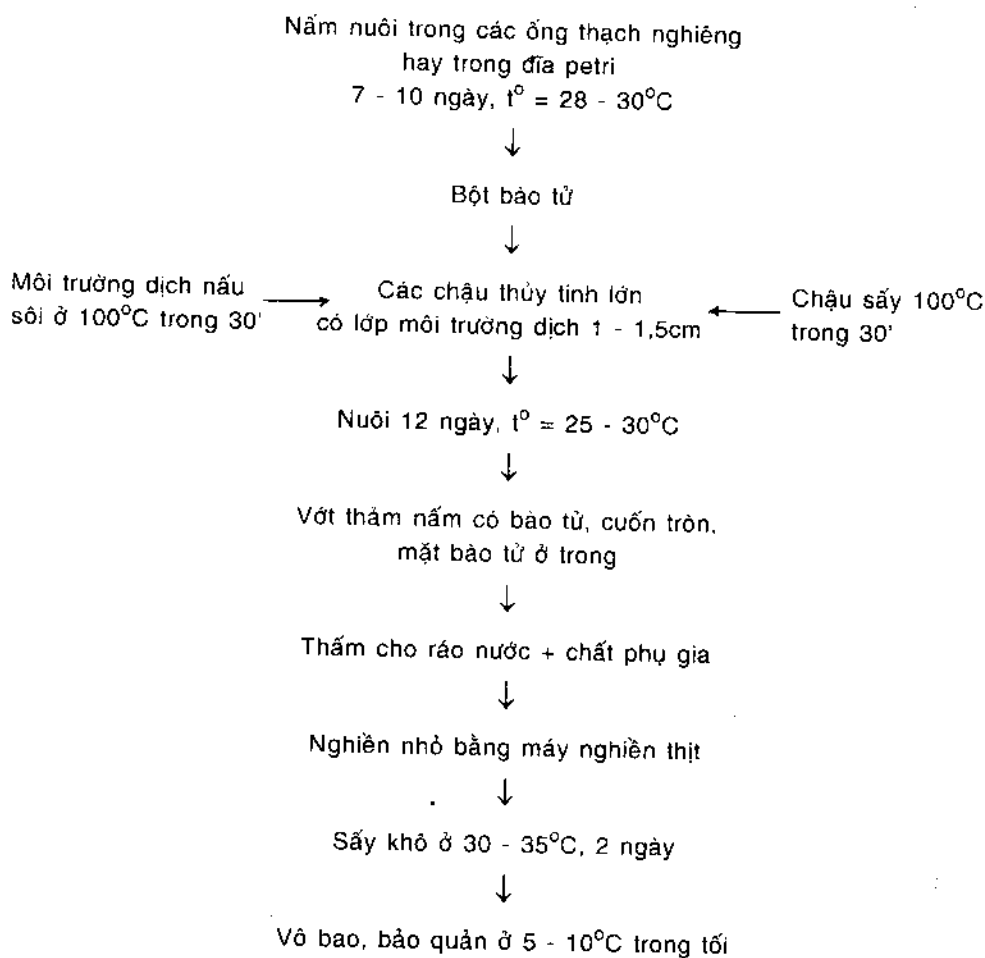


Hình 23 : Hệ thống lên men tĩnh trong bao plastic trên quy mô công nghiệp

- | | |
|--|--|
| 1. Máy thổi khí ; | 6. Van vòng (by-pass valve); |
| 2. Máy đo khí ; | 7. Thùng lên men nhân giống chuẩn |
| 3. Ống nối 3 đường có van điều khiển ; | bị môi trường nuôi cấy ; |
| 4. Bộ phận lọc khí ; | 8. Bàn đặt vật liệu ; |
| 5. Các bao plastic nuôi cấy nấm được | 9. Băng tải chuyển xếp các bao plastic ; |
| giữ trên băng tải giá ủ ; | 10. Van đo (metering valve) |

2. Lên men bề mặt không vô trùng

Trong điều kiện thiếu trang thiết bị hoàn chỉnh để lên men chìm, người ta có thể sử dụng phương pháp lên men bề mặt không vô trùng để thu nhận chế phẩm diệt côn trùng từ một số chủng vi sinh vật như nấm, vi khuẩn. Khó khăn nhất của quy trình sản xuất này là hạn chế sự nhiễm tạp của vi sinh vật lạ trong quá trình nuôi cấy. Không vô trùng ở đây được thể hiện: môi trường dinh dưỡng không được hấp khử trùng ở điều kiện nhiệt độ, áp suất như thông lệ. Ta có thể tham khảo quy trình lên men bề mặt không vô trùng để nuôi cấy nấm mốc *Beauveria bassiana* làm ví dụ (sơ đồ 7). Trong quy trình này, để bảo đảm không bị tạp nhiễm bởi các tạp khuẩn, môi trường dinh dưỡng được đun sôi 100°C trong 30 phút, khi nguội, người ta cho thêm chất kháng sinh (streptomycin) với nồng độ 0,01%.



SƠ ĐỒ 7: Quy trình lên men bề mặt không vô trùng tạo chế phẩm nấm diệt sâu

Ngoài ra để đảm bảo được sự phát triển áp đảo của chủng giống cần nuôi cấy, người ta phải tuân thủ một số nguyên tắc sau:

- Môi trường dinh dưỡng sau khi đun sôi ở 100°C trong 30 phút sẽ được cấy bào tử nấm vào, số bào tử này sẽ tự điều hòa khuếch tán thành một màng mỏng loang khắp bề mặt môi trường. Trong một thời gian nhất định, chúng sẽ ngăn cản không cho không khí thấm thấu vào môi trường, do vậy cũng sẽ ngăn chặn sự xâm nhập, phát triển của vi sinh vật lạ từ bên ngoài vào và cả số vi sinh vật còn sống sót trong môi trường. Lượng

238.26
bào tử cấy vào đủ áp đảo được sự phát triển ban đầu của vi sinh vật lạ là 1 - 2 tỉ bào tử/cm³.

- pH của môi trường = 5,0 - 5,5. Đây là pH thích hợp hơn cho sự phát triển của nấm, ức chế sự phát triển của vi khuẩn.

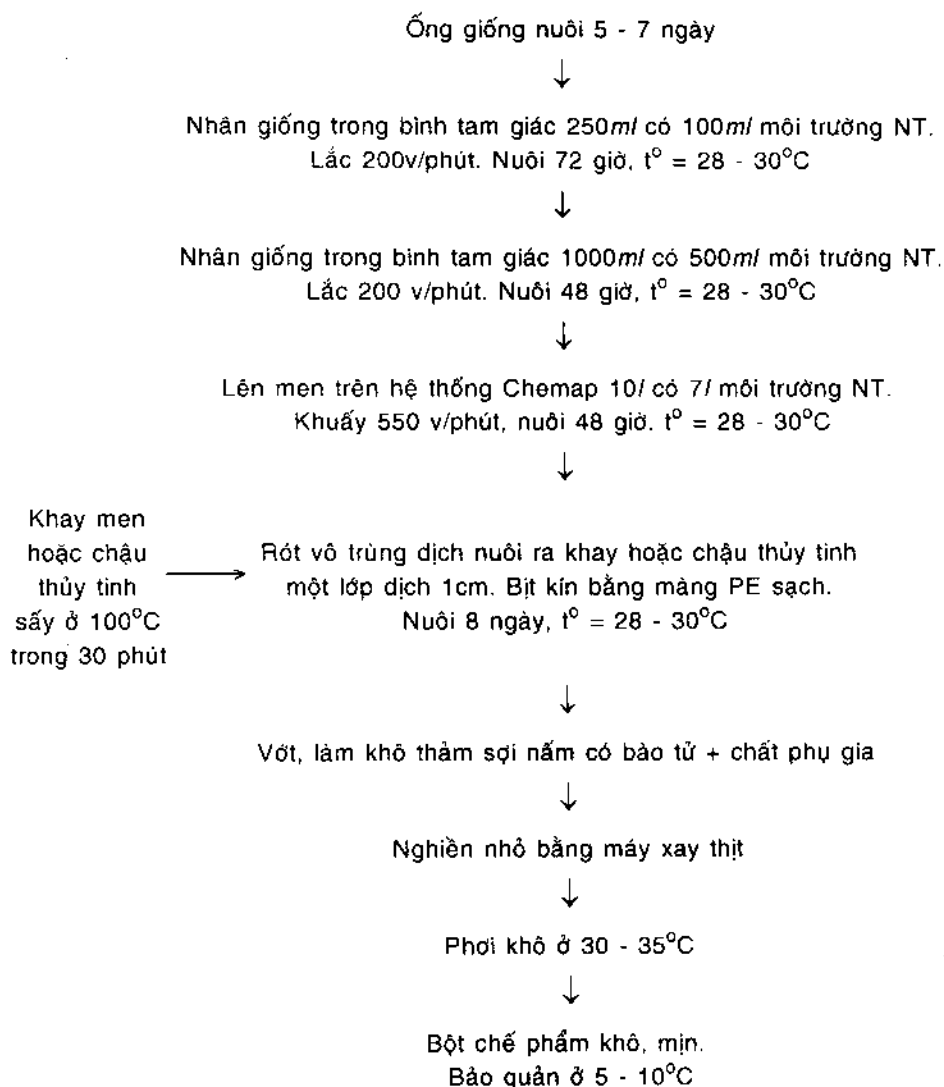
- Cần lưu ý sử dụng dụng cụ, thiết bị, phòng nuôi cấy sạch sẽ bảo đảm giảm đến tối thiểu sự tạp nhiễm các loại vi sinh vật lạ.

Một đặc điểm rất đáng được lưu ý của các chủng nấm mốc nuôi cấy theo kiểu này là ngay sau khi nảy mầm, các bào tử của các chủng nấm mốc diệt sâu này sẽ tiết ra các chất trao đổi giống chất kháng sinh đủ ức chế sự phát triển của vi khuẩn và nấm lạ (Calvish, 1972, Eblachova, 1966, 1968, 1974). Điều này góp phần quan trọng cho việc nuôi cấy không vô trùng đối với các chủng nấm mốc nói trên được thành công.

3. Lên men hai giai đoạn

Ngoài hai phương pháp lên men nói trên, để thu nhận chế phẩm vi sinh vật diệt sâu hại từ các chủng nấm, người ta đã áp dụng phương pháp lên men hai giai đoạn: lên men chìm sau đó chuyển sang lên men bề mặt. Với phương pháp lên men này, ta có thể thu được một lượng lớn đỉnh bào tử (conidiospore). Đỉnh bào tử có cấu trúc bền vững, có thời gian sống lâu, và giữ hoạt tính diệt sâu hại bền hơn so với dạng bào tử chồi (blastospore). Chính vì vậy, trong quy trình lên men kiểu này, người ta quan tâm nhiều đến điều kiện tạo đỉnh bào tử khi lên men bề mặt ở giai đoạn hai.

Hiệu suất tạo đỉnh bào tử cao nhất thấy ở $t^{\circ} = 28^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm không khí tương đối $\approx 90-95\%$. Ta có thể tham khảo quy trình lên men hai giai đoạn tạo chế phẩm diệt côn trùng ở sơ đồ 8.

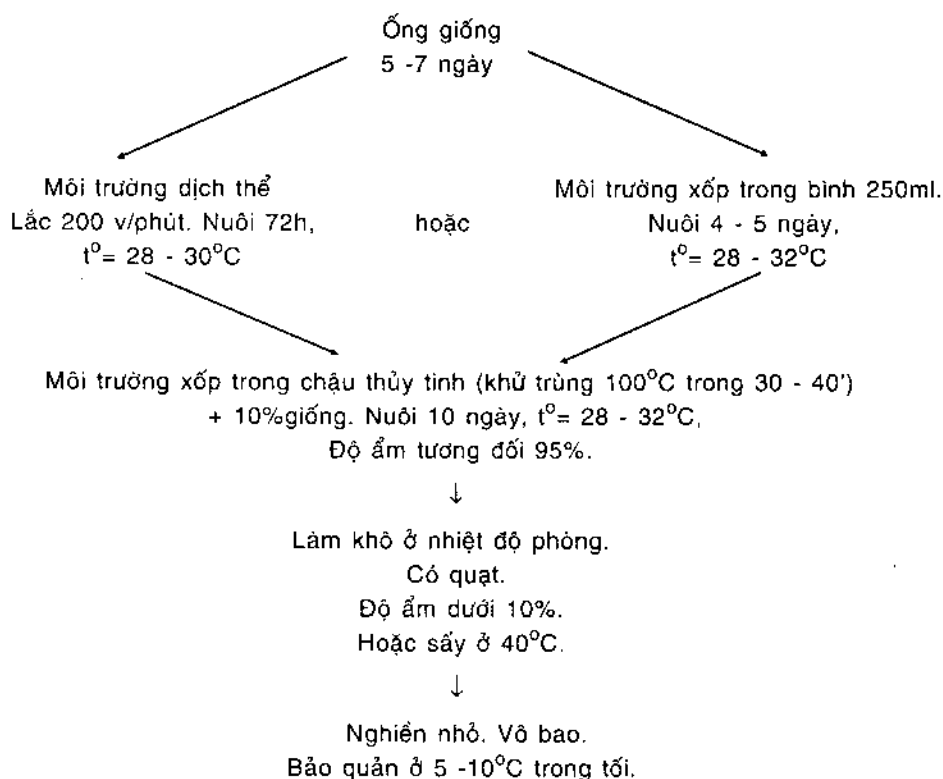


**SƠ ĐỒ 8 : Quy trình lên men 2 giai đoạn tạo chế phẩm
nấm diệt sâu**

4. Lên men xốp

Sử dụng phương pháp lên men xốp tạo chế phẩm diệt côn trùng, người ta thành công hơn cả khi thực hiện với các đối tượng nấm. Trong quy trình lên men xốp, nhiều loại cơ chất khác nhau được sử dụng như bột đậu nành, bã đậu phụ, cám, lúa, gạo, bột mánh bắp ... cùng với dịch dinh dưỡng để nuôi cấy nấm.

Các chủng nấm có khả năng diệt côn trùng thường được áp dụng nuôi cấy bằng phương pháp lên men xộp là *B. bassiana*, *M. anisopliae* ... Ở các chủng nấm này sử dụng lên men xộp khá thích hợp, cho sản phẩm diệt côn trùng có chất lượng cao vì khi lên men xộp sẽ thu nhận được chế phẩm sinh học chứa nhiều bào tử dạng dính bào tử. Bào tử loại này có nhiều đặc điểm như đã nói ở trên phù hợp với chức năng diệt sâu của chế phẩm hơn là so với bào tử dạng chổi. Ta có thể tham khảo quy trình lên men xộp tạo chế phẩm nấm diệt côn trùng ở sơ đồ 9 (Theo Nguyễn Ngọc Tú và những người cộng sự, 1997).



SƠ ĐỒ 9: Quy trình lên men xộp tạo chế phẩm nấm diệt sâu

CHƯƠNG IX

VI SINH VẬT VỚI QUÁ TRÌNH XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG NƯỚC

Cùng với sự phát triển mạnh mẽ của khoa học kỹ thuật, sự phát triển của sản xuất và tiêu dùng của khoảng 6 tỉ người dân trên hành tinh hàng năm đã tạo ra một lượng chất thải khổng lồ, từ đó đã gây ra ô nhiễm trầm trọng môi trường sống: ô nhiễm nguồn nước, mặt đất và không khí. Trước thực trạng này, con người đã và đang tích cực khắc phục tình trạng ô nhiễm, cố gắng trả lại cho hành tinh sự trong sạch ban đầu của nó. Hiện nay, việc xử lý ô nhiễm môi trường được đặt ra một cách khẩn cấp và có ý nghĩa rất lớn. Nó vừa liên quan đến việc bảo vệ môi trường, tạo cân bằng sinh thái, đồng thời lại giúp tiết kiệm lương thực, nguyên liệu và tạo ra nguồn năng lượng mới.

Trong phần này, chúng tôi đề cập chủ yếu đến vấn đề xử lý ô nhiễm nguồn nước thải mà cụ thể là quan tâm đến vi sinh vật và quá trình xử lý ô nhiễm nguồn nước.

I. CÁC LOẠI NƯỚC THẢI

Có rất nhiều loại nước thải khác nhau, thông thường người ta phân làm 2 loại chính:

- Nước thải sinh hoạt.
- Nước thải công nghiệp.

1. Nước thải sinh hoạt

Là nước thải từ các khu tập trung dân cư. Nước thải này được sinh ra từ sinh hoạt như ăn uống, tắm giặt cũng như phân, nước tiểu con người hàng ngày thải ra được xả vào hệ thống cống rãnh của thành phố. Trong nước thải loại này chứa nhiều phân rác, các hợp chất hữu cơ và các muối hòa tan, đặc biệt là chứa nhiều loại vi sinh vật gây bệnh, các loại trứng giun, sán ... Đây là loại nước thải phổ biến và có số lượng nhiều nhất. Mức độ ô nhiễm của loại nước thải này tùy thuộc vào nếp sống văn minh, trình độ dân trí của từng đô thị, của từng quốc gia.

2. Nước thải công nghiệp

Là nước thải của một nhà máy hay khu công nghiệp tập trung với các loại hình sản xuất khác nhau:

- Các nhà máy chế biến thực phẩm như đường, rượu bia, đồ hộp, sữa, giết mổ gia súc...

- Các nhà máy sản xuất nguyên vật liệu như giấy, xà phòng, công nghiệp dệt, công nghiệp hóa dầu, sản xuất các loại hóa chất ...

Ở nước thải công nghiệp, ngoài việc chứa hàm lượng cao các hợp chất hữu cơ như protein, các dạng carbohydrate, dầu mỡ (từ công nghệ chế biến thực phẩm), hemicellulose, lignin (công nghiệp sản xuất giấy), còn có các hợp chất hóa học khó phân hủy như các hợp chất vòng thơm có N, các alkyl benzensulfonate (công nghiệp sản xuất bột giặt), các loại dung môi, các kim loại nặng như chì, thủy ngân ...

Nói chung, so với nước thải sinh hoạt, nước thải công nghiệp có các chỉ số BOD (nhu cầu oxygen sinh hóa) và COD (nhu cầu oxygen hóa học) cao hơn nhiều. Nước thải công nghiệp có độ ô nhiễm cao hơn so với nước thải sinh hoạt.

Theo các quy phạm, luật về bảo vệ môi trường, mỗi nhà máy phải có công trình xử lý nước thải của mình trước khi xả nước thải ra hệ thống thoát nước của thành phố. Nhưng thực tế cho thấy hiện nay quy định nói trên ít được quan tâm thực hiện nghiêm túc. Nhiều nhà máy còn tùy tiện xả trực tiếp nước thải chưa qua xử lý ra hệ thống cống thoát nước của thành phố. Thậm chí có nơi, có lúc còn xả trực tiếp ra đồng ruộng hay khu vực dân cư, sông, rạch gần đó. Kết quả là hiện nay ở các đô thị tình trạng ô nhiễm sông, rạch, kênh, hồ trở nên phổ biến và nhiều nơi đang ở mức báo động.

II. KHU HỆ VI SINH VẬT VÀ CÁC TÁC NHÂN GÂY BỆNH TRONG NƯỚC THẢI

1. Khu hệ vi sinh vật trong nước thải

Trong nhiều trường hợp, mỗi loại nước thải có một khu hệ vi sinh vật đặc trưng. Nước thải sinh hoạt chứa phân, nước rửa ráy, tắm giặt, thức ăn thừa ... chứa rất nhiều vi khuẩn, trung bình từ vài triệu đến vài chục triệu cá thể trong 1ml. Trong đó chủ yếu là:

- Vi khuẩn gây thối như *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bac.cereus*, *Bac. subtilis*, *Enterobacter cloacae* ...

- Đại diện của các nhóm khác như vi khuẩn phân giải đường, tinh bột, cellulose, urea ...

– Các vi khuẩn thuộc nhóm Coliform, là vi sinh vật chỉ thị cho mức độ ô nhiễm phân trong nước ở mức độ cao, có thể dao động từ vài chục nghìn đến vài trăm nghìn cá thể trong 1ml nước thải.

Trong nước thải giàu chất hữu cơ, các vi khuẩn có dạng hình ống giữ vai trò rất quan trọng, trước hết phải kể đến một đại diện là vi khuẩn *Sphaerotilus natans*, thường hay bị nhầm là “nấm nước thải”. Nó phủ lên mặt đáy của vùng nước cực bẩn một lớp sinh khối tế bào dày đặc, bằng mắt thường cũng có thể quan sát được. Trên sông nó tạo thành các sợi và các búi. Khi bị đứt ra sẽ trôi nổi đầy trên mặt nước. Bọn này thường phát triển mạnh ở vùng nước có đủ oxygen. Ngoài việc xuất hiện ở nước thải sinh hoạt, *Sphaerotilus natans* thường được thấy có trong nước thải của các nhà máy cellulose và thực phẩm. Do sự phát triển mạnh của *Sphaerotilus*, oxygen bị tiêu thụ nhiều. Khi một lượng lớn *Sphaerotilus natans* tích tụ ở những vùng nước lặng sẽ xuất hiện tình trạng báo động về oxygen. Nó sẽ nhanh chóng làm cho oxygen trong nước biến mất hoàn toàn. Cuối cùng rồi cả khối *Sphaerotilus natans* cũng chết và bị thối rữa, H_2S sẽ xuất hiện cùng với một số chất khác. Trong môi trường lúc này khí H_2S được tạo thành còn do quá trình phản sulfate hóa của vi khuẩn phản sulfate hóa như *Desulfovibrio desulfuricans*.

Bên cạnh vi khuẩn, trong nước thải giàu chất hữu cơ cũng có chứa nhiều loài nấm. Thường nước thải sinh hoạt chứa nhiều nấm men. Có thể dao động từ vài ngàn đến vài chục ngàn tế bào nấm men trong 1ml. Phổ biến nhất là đại diện của chi *Saccharomyces*, kể là *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*.

Trong nước thải sinh hoạt cũng chứa nhiều bào tử và sợi của nấm mốc. Nấm mốc tiêu biểu là *Leptomitius lacteus*, *Fusarium aquaeducteum*. Giống như *Sphaerotilus natans*, ở những nơi ô nhiễm mạnh (như nhiễm dịch kiềm sulfite của công nghiệp chế biến gỗ), các giống nấm này phát triển rộ lên và tạo thành những đám nấm đáng sợ.

Một số nước thải cũng chứa vi khuẩn ôxy hóa lưu huỳnh như *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Beggiatoa* ... bọn này cũng sẽ sinh sản nhanh nhờ sự tạo thành H_2S .

Ngoài ra, trong nước thải cũng phát hiện nhiều vi khuẩn phản nitrat hóa như *Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans*; vi khuẩn sinh methane (CH_4)...

Trong nước thải chứa dầu, người ta cũng tìm thấy các vi khuẩn phân giải hydrocarbon như *Pseudomonas*, *Nocardia* ...

Trong nước thải có thể còn có một tập hợp khá đông đúc các loài tảo (Algae), gồm khoảng 15.000 loài. Chúng thuộc Tảo silic (*Bacillariophyta*), Tảo lục (*Chlorophyta*), Tảo giáp (*Pyrrophyta*) ...

2. Các tác nhân gây bệnh trong nước thải

Ngoài những nhóm sinh lí khác nhau của vi sinh vật có trong nước thải như đã nói trên, người ta còn đặc biệt quan tâm đến sự có mặt của các vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt là ở những địa phương còn tệ nạn phóng uế bừa bãi trên sông rạch hoặc hệ thống nhà vệ sinh chưa hợp lí.

Các vi sinh vật gây bệnh thường không sống lâu trong nước thải vì đây không phải là môi trường thích hợp, nhưng chúng cũng có thể tồn tại trong một thời gian nào đó tùy từng loài vi khuẩn. Trong thời gian này nếu gặp các điều kiện thuận lợi, tiếp xúc với người, gia súc, chúng sẽ gây các bệnh truyền nhiễm. Trong số các đối tượng gây bệnh sống trong nước, phải kể đến một số đại diện gây các bệnh rất nguy hiểm và rất phổ biến là:

- Vi khuẩn gây bệnh thương hàn (*Salmonella dysenteria*): Vi khuẩn này sống được trong nước tùy thuộc vào chất dinh dưỡng và nhiệt độ của nguồn nước. Thông thường sống được trong vòng 20 ngày vào mùa hè và 60 ngày vào mùa đông.

- Vi khuẩn gây bệnh kiết lị (*Shigella*): Sống tối đa 12 ngày ở 20°C trong nước cống, và nhiệt độ càng thấp chúng càng sống lâu hơn.

- Xoắn khuẩn (*Leptospira*): Gây nên các chứng sưng gan, sưng thận và tê liệt hệ thần kinh trung ương. Chúng có thể sống tối đa 33 ngày ở 25°C.

- Trực trùng đường ruột (*E. coli*): Có thể sống tối đa trong nước từ 9 đến 14 ngày ở 20°C.

- Vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*): Cũng sống tối đa được 3 tuần trong nước thải.

- Phẩy khuẩn tả (*Vibrio cholera*): Sống tối đa 13 ngày trong nước thải.

- Các virus (*Adenovirus*, *Echo*, *Coxsackie* ...) cũng có chu trình sống ngắn như các vi khuẩn.

Các vi sinh vật gây bệnh nói trên phân tán tương đối chậm trong đất khô, trong nước phân tán theo chiều ngang cũng ít (khoảng 1m), trong khi đó ảnh hưởng theo chiều sâu khá nhiều (khoảng 3m).

III. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG SỰ TỰ LÀM SẠCH CỦA CÁC NGUỒN NƯỚC

Trước khi đề cập đến các biện pháp tích cực của con người nhằm xử lý ô nhiễm môi trường nước, chúng ta cần xem xét một hiện tượng rất đáng được quan tâm trong tự nhiên. Đó là quá trình tự làm sạch các nguồn nước do các yếu tố sinh học mà trong đó vi sinh vật đóng một vai trò rất quan trọng.

Các ao hồ, dòng sông cũng như một số vùng bờ biển luôn bị làm bẩn với các mức độ khác nhau do rác và nước thải của con người. Việc làm sạch các nguồn nước này có một ý nghĩa rất to lớn. Nhờ các quá trình này, các chất bẩn thường xuyên được loại khỏi môi trường nước. Ta sẽ xem xét quá trình tự làm sạch các nguồn nước xảy ra như thế nào.

Ở đây các quá trình vật lý, hóa học như các hiện tượng sa lắng và ôxy hóa giữ một vai trò quan trọng, song đóng vai trò quyết định vẫn là các quá trình sinh học. Tham gia vào các quá trình tự làm sạch này có rất nhiều loại sinh vật, từ các loại cá, chim đến nguyên sinh động vật và vi sinh vật.

Ở chỗ nước thải đổ ra, nước còn đục, có nhiều rác cặn bẩn của thức ăn, thường tụ tập nhiều loài chim khác nhau và cả cá nữa. Chúng sẽ nhặt nhanh các mẩu thức ăn lớn và rác thải. Tuy vậy, chúng chỉ có thể sử dụng một phần rất nhỏ của các chất bẩn làm thức ăn. Các động vật bậc thấp mà trước hết là các ấu trùng của côn trùng, giun và nguyên sinh động vật có vai trò lớn hơn một chút, chúng có thể sử dụng các hạt nhỏ và cực nhỏ của thức ăn. Song vi khuẩn và nấm giữ vai trò quyết định hơn cả. Chúng có thể sử dụng các hợp chất hữu cơ tồn tại ở thể rắn cũng như hòa tan trong dung dịch nước, và phân giải chúng đến muối vô cơ, CO_2 và H_2O trong những trường hợp thuận lợi nhất của môi trường. Nói cách khác, trong những điều kiện thuận lợi của môi trường vi sinh vật có khả năng khoáng hóa một cách hoàn toàn nhiều chất bẩn hữu cơ.

Bên cạnh vai trò tích cực của các nhóm vi khuẩn, nấm mốc, trong nước thải còn có các loài tảo cũng đóng góp một phần quan trọng trong quá trình chuyển hóa các chất gây ô nhiễm môi trường khác. Trong nước thải, thông qua hoạt động sống của mình tảo cung cấp oxygen cho môi trường. Chúng còn tiết vào môi trường các chất kháng sinh, những chất này là vũ khí lợi hại diệt các mầm bệnh có trong nước thải (đặc biệt là khu hệ vi sinh vật gây bệnh đường ruột). Đối với các vi sinh vật gây bệnh, tảo còn gây cản trở sự phát triển của chúng bằng cách gây kiềm hóa môi trường sống của một số vi khuẩn, cạnh tranh nguồn thức ăn đối với các nhóm vi khuẩn này. Ngoài ra tảo còn tiết ra một số chất có hoạt tính sinh học, giúp kích thích sự phát triển của một số vi sinh vật có lợi

trong môi trường nước thải. Một đóng góp không thể không nhắc tới của tảo là một số trong chúng có khả năng hấp thụ mạnh các kim loại nặng (chì, cadimi ...) và các tia phóng xạ.

Thông thường, protein, đường và tinh bột được phân giải nhanh nhất. Cellulose, lignin, mỡ, sáp bị phân giải chậm hơn nhiều, và sự phân giải xảy ra không hoàn toàn. Do vậy quần thể vi sinh vật cũng thay đổi tùy theo tiến độ của sự tự làm sạch và thành phần của chất thải có trong nước thải.

Trong thực tế cho thấy lực tự làm sạch các nguồn nước luôn thay đổi và phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố. Ta có thể khảo sát ở vài yếu tố sau làm ví dụ:

– Lực tự làm sạch đạt trị số cực đại ở những vùng nước có sự chuyển động mạnh, tạo dòng chảy, làm chia đều nước thải và giúp trao đổi khí giữa nước và không khí xảy ra mạnh. Người ta nhận thấy sự phân giải mạnh các chất bẩn chỉ xảy ra khi có mặt của oxygen. Khi có dòng chảy của nước, oxygen hòa tan được cung cấp nhiều hơn. Ngược lại ở những thủy vực thiếu sự chuyển động của nước như ao tù, nơi nước đọng, nước thải đổ vào sẽ bị ứ đọng, thiếu oxygen, sự phân giải các chất bẩn kém. Quá trình tự làm sạch bị cản trở.

– Lực tự làm sạch cũng thay đổi theo mùa. Ở những nước có mùa hè-đông cách biệt về nhiệt độ rõ rệt thì lực tự làm sạch ở mùa hè sẽ lớn hơn ở mùa đông. Điều này xảy ra do hai nguyên nhân: vào mùa hè, nhiệt độ cao, có ánh nắng chiếu nhiều sẽ kích thích vi khuẩn phát triển nhanh và các thực vật nổi sẽ cung cấp thêm nhiều oxygen cho nước.

Khi nói đến ảnh hưởng của yếu tố khí hậu, người ta cũng nhận thấy ở vùng nhiệt đới quá trình tự làm sạch xảy ra nhanh hơn nhiều so với ở vùng ôn đới ...

Quá trình tự làm sạch nguồn nước một cách tự nhiên nói trên chỉ xảy ra ở những địa điểm mà thành phần và số lượng các chất bẩn phù hợp với lực tự làm sạch của các thủy vực. Thực tế hiện nay, các thủy vực bị chứa quá nhiều nước thải và rác so với khả năng tự làm sạch của nó, ngay cả ở những điều kiện môi trường thuận lợi nhất.

Tóm lại, quá trình tự làm sạch các nguồn nước là do các tác nhân sinh học. Đây là một hiện tượng rất quý trong tự nhiên. Hiểu và nắm được quy luật hoạt động của nó, con người đã lợi dụng nó để làm sạch các nguồn nước thải có độ ô nhiễm vừa phải hoặc nước thải đã qua xử lý sinh học trong điều kiện nhân tạo.

IV. XỬ LÝ NƯỚC THẢI BẰNG BIỆN PHÁP SINH HỌC

Trong nhiều biện pháp xử lý ô nhiễm, biện pháp sinh học được mọi người đặc biệt quan tâm sử dụng. So với các biện pháp vật lý, hóa học, biện pháp sinh học chiếm vai trò quan trọng về quy mô cũng như giá thành đầu tư, do chi phí năng lượng cho một đơn vị khối lượng chất khử là ít nhất. Đặc biệt xử lý bằng biện pháp sinh học sẽ không gây tái ô nhiễm môi trường – một nhược điểm mà biện pháp hóa học hay mắc phải. Biện pháp sinh học sử dụng một đặc điểm rất quý của vi sinh vật, đặc điểm đã thu hút sự chú ý của các nhà nghiên cứu và các nhà sản xuất là khả năng đồng hóa được rất nhiều nguồn cơ chất khác nhau của vi sinh vật, từ tinh bột, cellulose, cả nguồn dầu mỡ và dẫn xuất của nó đến các hợp chất cao phân tử khác như protein, lipid, cùng các kim loại nặng như chì, thủy ngân ... Thực chất của phương pháp này là nhờ hoạt động sống của vi sinh vật (sử dụng các hợp chất hữu cơ và một số chất khoáng có trong nước thải làm nguồn dinh dưỡng và năng lượng) để biến đổi các hợp chất hữu cơ cao phân tử có trong nước thải thành các hợp chất đơn giản hơn. Trong quá trình dinh dưỡng này vi sinh vật sẽ nhận được các chất làm vật liệu để xây dựng tế bào, sinh trưởng và sinh sản, nên sinh khối được tăng lên.

Biện pháp sinh học để xử lý nước thải có thể làm sạch hoàn toàn các loại nước thải công nghiệp chứa các loại chất bẩn hòa tan hoặc phân tán nhỏ. Do vậy biện pháp này thường dùng sau khi loại bỏ các tạp chất phân tán thô ra khỏi nước thải.

Đối với nước thải chứa các tạp chất vô cơ thì biện pháp này dùng để khử các muối sulfate, muối ammonium, muối nitrate, tức là những chất chưa bị ôxy hóa hoàn toàn.

*** Điều kiện để áp dụng xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học:**

Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học có nhiều ưu việt và hiện nay được sử dụng rất rộng rãi trong thực tế. Tuy nhiên, việc áp dụng nó cũng đòi hỏi những điều kiện nhất định. Muốn áp dụng được biện pháp sinh học, thành phần các chất hữu cơ có trong nước thải phải là những chất dễ bị ôxy hóa. Nồng độ các chất độc hại, các kim loại nặng cũng phải nằm trong giới hạn cho phép. Chính vì vậy, khi xử lý cần điều chỉnh nồng độ nước thải cho phù hợp. Có thể tham khảo ở bảng 14 (Theo tài liệu của Trần Hiếu Nhuệ, 1992).

BẢNG 14: Nồng độ giới hạn cho phép của các chất trong nước thải đưa vào các công trình làm sạch bằng biện pháp sinh học.

TÊN CHẤT	C _{cp} *	TÊN CHẤT	C _{cp} *
Acid acrylic	100	Mỡ bôi trơn	100
Rượu amylic	3	Acid butyric	500
Aniline	100	Đồng (ion)	0,4
Acetaldehyde	750	Metacrylamide	300
Acid benzoic	150	Rượu metylic	200
Benzene	100	Acid monochloacetic	100
Vanadium (ion)	5	Arsen (ion)	0,2
Vinyl acetate	250	Nickel (ion)	1
Vinilinden chlorua	1000	Sản phẩm của dầu	100
Hydroquinol	15	Pyridine	400
Acid dichloacetic	100	Tributylphosphate	100
Dichlocyclohexane	12	Triethylamine	85
Diethylamine	100	Trinitrotoluene	12
Diethyleneglycol	300	Triphenylphosphate	10
Caprolactan	100	Phenol	1000
Rezorcin	100	Formaldehyde	160
Amon rodanua	500	Chlobenzene	10
Chì (ion)	1	Toluene	200
Acid stearic	300	Sulphanole	10
Sulfur (theo H ₂ S)	20	Antimon (ion)	0,2
Kerosene (dầu lửa)	500	Crezol	100
Lactonitryl	160		

(*): Ghi chú: C_{cp} là nồng độ giới hạn cho phép của các chất (g/m³ nước thải)

Ngoài ra, các điều kiện của môi trường như hàm lượng O₂, pH, nhiệt độ của nước thải... cũng phải nằm trong một giới hạn nhất định để bảo đảm sự sinh trưởng, phát triển bình thường của các vi sinh vật tham gia vào quá trình xử lý.

1. Thành phần và cấu trúc các loại vi sinh vật tham gia xử lý nước thải

Yếu tố quan trọng nhất của biện pháp sinh học để xử lý nước thải là sử dụng bùn hoạt tính (activated sludge) hoặc màng sinh vật.

Bùn hoạt tính cũng như màng sinh vật là tập hợp các loại vi sinh vật khác nhau. Bùn hoạt tính là bông màu vàng nâu dễ lắng, có kích thước 3 - 150µm. Những bông này bao gồm các vi sinh vật sống và cơ chất rắn (40%). Những vi sinh vật sống bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, một số nguyên sinh động vật, dòi, giun.

Màng sinh vật phát triển ở bề mặt các hạt vật liệu lọc có dạng nhầy, dày từ 1 - 3mm hoặc hơn. Màu của nó thay đổi theo thành phần của nước thải, từ vàng xám đến nâu tối. Màng sinh vật cũng bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc và một số động vật nguyên sinh khác. Trong quá trình xử lý, nước thải sau khi qua bể lọc sinh vật có mang theo các hạt của màng sinh vật với các hình dạng khác nhau, kích thước từ 15 - 30 μ m, có màu vàng xám và nâu.

Muốn đưa bùn hoạt tính vào các thiết bị xử lý, cần thực hiện một quá trình gọi là “khởi động” tức là quá trình để cho loại bùn gốc ban đầu (thường kém về khả năng lắng và hoạt tính) được nuôi dưỡng để trở thành loại bùn có hoạt tính cao và có tính kết lắng tốt. Có thể gọi đó là quá trình “hoạt hóa” bùn hoạt tính. Cuối thời kì “khởi động” bùn sẽ có dạng hạt. Các hạt này có độ bền cơ học khác nhau, có mức độ vỡ ra khác nhau khi chịu tác động khuấy trộn. Sự tạo hạt của bùn ở dạng này hay dạng khác phụ thuộc vào tính chất và nồng độ của bùn gốc, chất lượng môi trường cho thêm vào để hoạt hóa bùn, phương thức hoạt hóa và cuối cùng là thành phần các chất có trong nước thải.

Loại bùn gốc tốt nhất lấy từ bùn ở các thiết bị xử lý nước thải đang hoạt động. Nếu không có loại này thì có thể lấy loại bùn chưa thích nghi như bùn lấy từ các bể xử lý theo kiểu tự hoại, bùn cống rãnh, kênh rạch ô nhiễm nhiều, bùn phân heo, phân bò đã phân hủy... Các vi sinh vật chứa trong bùn này nghèo về số lượng nhưng đa dạng về chủng loại.

2. Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện tự nhiên

Cơ sở khoa học của phương pháp này là dựa vào khả năng tự làm sạch của đất và nước dưới tác động của các tác nhân sinh học có trong tự nhiên, nghĩa là thông qua hoạt động tổng hợp của các tác nhân từ động vật, thực vật đến vi sinh vật để làm biến đổi nguồn nước thải bị nhiễm bẩn bởi các hợp chất hữu cơ và vô cơ, và từ đó tiến tới giảm được các chỉ số COD và BOD của nước thải xuống tới mức cho phép khiến các nguồn nước này có thể sử dụng để tưới cho cây trồng hay dùng để nuôi các loại thủy sản.

Biện pháp xử lý này thường áp dụng đối với các loại nước thải công nghiệp có độ nhiễm bẩn không cao hoặc nước thải sinh hoạt.

Việc xử lý nước thải này được thực hiện bằng các cánh đồng tưới, bãi lọc hoặc hồ sinh học.

Diễn biến của quá trình xử lý như sau: Người ta cho nước thải chảy qua các khu ruộng đang canh tác hoặc những cánh đồng trống không canh

2021-2022
18/05/2022

tác được ngăn bờ tạo thành những ô thửa, hoặc cho nước thải chảy vào các ao, hồ có sẵn. Nước thải ở trong các thủy vực này sẽ thấm qua các lớp đất bề mặt, cần sẽ được giữ lại ở đáy. Trong quá trình tồn lưu nước ở đây, dưới tác động của các vi sinh vật cùng các loại tảo, thực vật sẽ xảy ra quá trình ôxy hóa sinh học, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản hơn, thậm chí có thể bị khoáng hóa hoàn toàn. Như vậy, sự có mặt của oxygen không khí trong các mao quản của đất hoặc oxygen được thải ra do hoạt động quang hợp của tảo và thực vật sẽ là yếu tố quan trọng, cần cho quá trình ôxy hóa nguồn nước thải. Càng xuống lớp đất ở dưới sâu lượng oxygen càng ít đi, vì vậy sẽ ảnh hưởng đến quá trình ôxy hóa, làm quá trình này giảm dần. Cuối cùng đến một độ sâu nhất định chỉ còn lại hoạt động của vi khuẩn gây quá trình khử nitrat.

Quá trình xử lý này cho thấy ngoài việc làm sạch nguồn nước thải, con người còn sử dụng chính nguồn nước đã được xử lý này để phục vụ tưới cho cây trồng trên đồng ruộng hay để nuôi các loại thủy sản.

Tùy theo phương pháp xử lý mà nguồn nước sau xử lý sẽ được ứng dụng khác nhau:

– Ở phương pháp xử lý bằng cánh đồng tưới và bãi lọc chức năng xử lý nước thải là chủ yếu, còn tác dụng phục vụ nông nghiệp (nước tưới cho cây trồng) là thứ yếu.

– Ở biện pháp hồ sinh học thì ngoài nhiệm vụ xử lý nước thải, biện pháp này còn phục vụ cho việc nuôi trồng thủy sản, cung cấp nguồn nước tưới cho cây trồng và giúp điều hòa dòng chảy của nước mưa trong hệ thống nước thải của các đô thị.

Ở các đô thị của Việt Nam có rất nhiều ao hồ, sông rạch, do vậy việc xử lý nước thải sinh hoạt thành phố bằng biện pháp sinh học trong điều kiện tự nhiên là khá thích hợp. Biện pháp này ít tốn kém vốn đầu tư, việc bảo trì, vận hành không đòi hỏi có người quản lý thường xuyên. Ngoài ra, các hình thức xử lý này ít nhiều cũng quen thuộc với người dân Việt Nam qua việc trước nay thường sử dụng ao hồ để thả bèo, nuôi tôm cá.

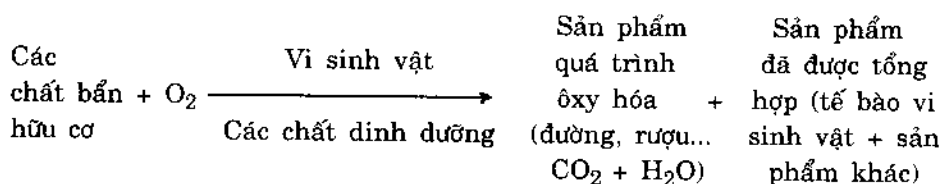
3. Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện nhân tạo

a) Xử lý hiếu khí :

*** Nguyên lý chung của quá trình ôxy hóa sinh học trong điều kiện hiếu khí :**

Khi nước thải tiếp xúc với bùn hoạt tính, các chất thải có trong môi trường như các chất hữu cơ hòa tan, các chất keo và phân tử nhỏ sẽ được chuyển hóa bằng cách hấp phụ và keo tụ sinh học trên bề mặt các

tế bào vi sinh vật. Tiếp sau đó là giai đoạn khuếch tán và hấp thụ các chất bản từ mặt ngoài của tế bào vào trong tế bào qua màng bán thấm (tức màng nguyên sinh). Các chất vào trong tế bào dưới tác động của hệ enzym nội bào sẽ được phân hủy. Quá trình phân giải các chất bản hữu cơ xảy ra trong tế bào chất của tế bào sống là các phản ứng oxy hóa khử, có thể biểu diễn ở dạng tổng quát như sau:



Sự oxy hóa các hợp chất hữu cơ và một số chất khoáng trong tế bào vi sinh vật nhờ vào quá trình hô hấp. Nhờ năng lượng do vi sinh vật khai thác được trong quá trình hô hấp mà chúng có thể tổng hợp các chất để phục vụ cho quá trình sinh trưởng, sinh sản ... Kết quả là số lượng tế bào vi sinh vật không ngừng được tăng lên.

Các quá trình trên liên tục xảy ra, nồng độ của các chất ở xung quanh tế bào sẽ giảm dần. Các thành phần thức ăn mới từ môi trường bên ngoài (nước thải) lại khuếch tán và bổ sung thay thế vào. Thông thường quá trình khuếch tán các chất trong môi trường xảy ra chậm hơn quá trình hấp thụ qua màng tế bào, do vậy nồng độ các chất dinh dưỡng xung quanh tế bào bao giờ cũng thấp hơn nơi xa tế bào. Đối với các sản phẩm của tế bào tiết ra thì ngược lại, nhiều hơn so với nơi xa tế bào.

* Các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến môi trường xử lí

Để bảo đảm quá trình xử lí bằng biện pháp sinh học trong điều kiện hiếu khí được tiến hành tốt, người ta theo dõi và điều chỉnh các yếu tố môi trường sau đây:

- *Oxygen (O₂)* : Trong các công trình xử lí hiếu khí, O₂ là một thành phần cực kì quan trọng của môi trường. Công trình phải bảo đảm cung cấp đầy đủ lượng O₂ một cách liên tục và hàm lượng O₂ hòa tan trong nước ra khỏi bể lắng đợt hai không nhỏ hơn 2mg/l.

- *Nồng độ các chất bản hữu cơ* phải thấp hơn ngưỡng cho phép. Có nhiều chất bản hữu cơ nếu ở nồng độ quá cao, vượt quá mức cho phép sẽ ảnh hưởng xấu đến hoạt động sống của vi sinh vật tham gia xử lí. Do vậy khi đưa nước thải vào các công trình xử lí, cần kiểm tra các chỉ số BOD và COD của nước thải. Cụ thể: hỗn hợp nước thải công nghiệp và nước thải sinh hoạt chảy vào công trình xử lí là bể lọc sinh học phải có

BOD toàn phần (BOD_{tp}) $\leq 500\text{mg/l}$, nếu dùng bể aeroten, thì BOD_{tp} không được quá 1000mg/l . Nếu nước thải có chỉ số BOD_{tp} vượt quá các giới hạn nói trên, cần thiết phải dùng nước thải đã qua xử lý hay nước sông để pha loãng.

- *Nồng độ các chất dinh dưỡng cho vi sinh vật* : Để vi sinh vật tham gia thực hiện các quá trình ôxy hóa nước thải một cách có hiệu quả, cần thiết phải cung cấp cho chúng đầy đủ các chất dinh dưỡng trong môi trường sống. Lượng các chất dinh dưỡng cần thiết để các quá trình sinh hóa xảy ra bình thường không được thấp hơn giá trị nêu ở bảng 15.

BẢNG 15: *Nồng độ các chất dinh dưỡng cần thiết*
(Theo M.X. Moxitrep, 1982)

BOD_{tp} của nước thải (mg/l)	Nồng độ nitrogen trong muối ammonium (mg/l)	Nồng độ phosphor trong P_2O_5 (mg/l)
< 500	15	3
500 - 1000	25	8

Ngoài nguồn nitrogen, phosphor có nhu cầu như đã nêu ở bảng 15, các nguyên tố dinh dưỡng khoáng khác như K, Ca, S ... trong nước thải thường cũng đủ cung cấp cho nhu cầu của vi sinh vật, ta không cần phải cho thêm vào nữa.

Các chất dinh dưỡng nói trên rất cần cho hoạt động sống của vi sinh vật tham gia xử lý nước thải, nếu thiếu sẽ kìm hãm và ngăn cản các quá trình ôxy hóa sinh học. Nếu thiếu nitrogen một cách lâu dài, ngoài việc cản trở các quá trình sinh hóa, còn làm cho bùn hoạt tính khó lắng và dễ trôi theo nước ra khỏi bể lắng.

Để xác định sơ bộ lượng các nguyên tố dinh dưỡng cần thiết đối với nhiều loại nước thải công nghiệp, có thể chọn tỉ lệ sau:

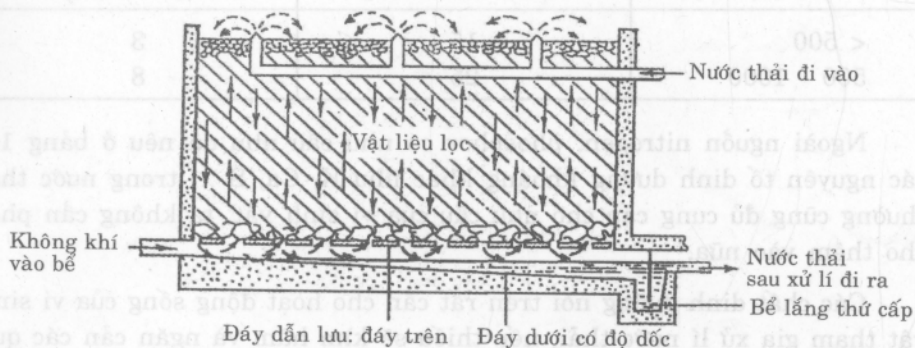
$$BOD_{tp} : N : P = 100 : 5 : 1$$

Ngoài ra các yếu tố khác của môi trường như pH, t° cũng có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hoạt động của vi sinh vật trong các thiết bị xử lý. Qua thực nghiệm cho thấy, thường giá trị pH tối ưu cho hoạt động phân giải của các vi sinh vật trong bể xử lý hiếu khí là 6,5 - 8,5 và nhiệt độ của nước thải trong các công trình nằm trong khoảng 6°C - 37°C .

* Để xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học trong điều kiện hiếu khí, thường sử dụng hai loại công trình là bể lọc sinh học (biofilter) và bể sục khí (aeroten).

– Bể lọc sinh học (biofilter):

Là thiết bị xử lý nước thải dựa theo nguyên tắc lọc với sự tham gia của vi sinh vật. Thiết bị này làm bằng bê tông có dạng hình tròn hay hình chữ nhật có hai đáy (hình 26). Đáy trên gọi là đáy dẫn lưu, được cấu tạo bằng bê tông cốt thép có thủng lỗ với tổng diện tích các lỗ thủng không nhỏ hơn 5 - 8% diện tích của đáy. Đáy dưới được xây kín, có độ dốc nhất định (để nước dễ dàng chảy về một phía) và thông với bể lắng thứ cấp, là nơi nước thải sau khi được xử lý xong đổ ra. Ở bể này nước được lưu lại một thời gian ngắn để được lắng cặn trước khi đổ ra ngoài hòa vào hệ thống thoát nước của thành phố. Chiều cao của bể lọc (hay chiều cao của cột nguyên liệu) sẽ phụ thuộc vào thành phần của nước thải cũng như khả năng oxy hóa của màng sinh vật. Lưu lượng dòng chảy của nước thải phụ thuộc vào khả năng oxy hóa của màng sinh vật.



Hình 26 : Bể lọc sinh học

Để tạo điều kiện hiếu khí cho quá trình xử lý, từ phía dưới của đáy dẫn lưu, người ta cho không khí đi lên qua vật liệu lọc hoặc tấm mang bằng thông khí tự nhiên (do chênh lệch nhiệt độ trong bể lọc) hay thổi khí bằng quạt.

Vật liệu dùng trong bể lọc là các loại đá cuội, đá dăm và xỉ than đá (theo phương pháp cổ điển). Hiện nay để tăng diện tiếp xúc giữa vi sinh vật và nước thải và nhất là để tránh tình trạng tắc nghẽn của dòng chảy trong các thiết bị lọc sinh học, người ta thay các vật liệu lọc bằng những tấm mang làm bằng vật liệu nhẹ, xếp có cấu tạo dạng ống hoặc dạng miếng, được thiết kế sao cho có nhiều nếp gấp khúc (để tăng diện tích bề mặt).

Nước thải có chứa vi sinh vật tham gia xử lý được tưới từ trên xuống lớp vật liệu lọc hay tấm mang theo nguyên tắc chênh lệch thế năng. Khi

822.622.7
1980
1.00

dòng nước thải chảy qua vật liệu lọc hay tấm mang, vi sinh vật sẽ phát triển tạo thành màng sinh vật bám vào khắp bề mặt của nguyên liệu lọc và tấm mang, và khu trú ở đây. Như vậy, khi dòng nước thải chảy liên tục với một vận tốc nhất định từ trên bề mặt của bể lọc xuống sẽ tiếp xúc trực tiếp với màng sinh vật. Và lúc đó sẽ xảy ra quá trình ôxy hóa các chất bẩn có trong nước thải, để cuối cùng khi đến bể lắng thứ cấp, nước thải sẽ có chỉ số BOD₅ giảm đi rất nhiều so với nước thải chưa xử lí.

Trong quá trình vận hành của bể lọc sinh học, sự sinh trưởng và chết đi của màng sinh vật xảy ra không ngừng. Màng sinh vật bị chết sẽ bị tách ra khỏi nơi bám và bị cuốn theo dòng chảy, chảy ra khỏi bể lọc, cuối cùng sẽ được lắng lại ở bể lắng thứ cấp cùng với cặn bùn.

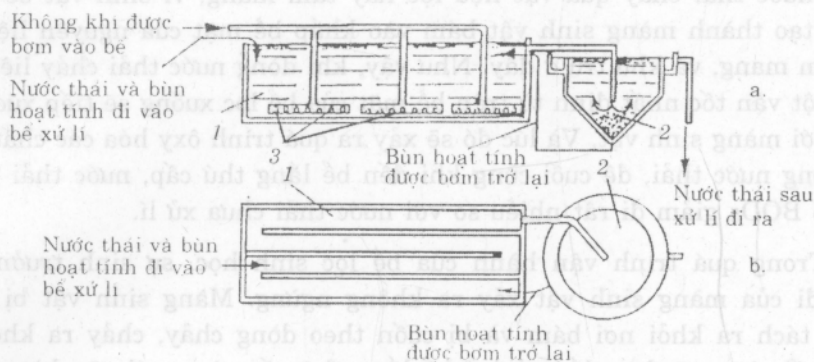
Hiệu quả làm sạch nước thải của bể lọc sinh học khá cao. Nếu hệ thống bể lọc hoạt động tốt có thể xử lí làm giảm 90% chỉ số BOD₅ của nước thải.

-- *Bể sục khí (Aeroten):*

Ngoài việc dùng bể lọc sinh học, trong xử lí nước thải bằng biện pháp sinh học ở điều kiện hiếu khí, người ta có thể sử dụng bể sục khí (aeroten).

Bể sục khí (*hình 27*) là hệ thống bể ôxy hóa (1) có dạng hình chữ nhật được ngăn ra làm nhiều buồng (3 đến 4 buồng) nối với bể lắng (2). Giống như ở bể lọc sinh học, quá trình xử lí nước thải ở bể sục khí được tiến hành nhờ hoạt động của hệ vi sinh vật ở bùn hoạt tính. Nhưng quá trình này được thực hiện trong điều kiện có thông khí mạnh nhờ hệ thống sục khí từ dưới đáy bể lên (3). Cường độ thông khí: $5\text{m}^3/\text{m}^2/\text{giờ}$, bảo đảm oxygen tối đa cho quá trình ôxy hóa. Ở bể ôxy hóa, bùn hoạt tính lấy từ bùn gốc sau khi qua giai đoạn khởi động hay sử dụng bùn lắng lấy từ bể lắng cặn (2) chuyển vào. Ở đây bùn hoạt tính gặp oxygen của không khí được bơm vào bể sẽ tiến hành quá trình ôxy hóa và khoáng hóa các chất bẩn trong nước thải một cách khá triệt để. Sau khi chảy suốt qua các buồng của bể ôxy hóa, nước thải sẽ chảy vào bể lắng. Ở đây cũng sẽ xảy ra quá trình lắng cặn xuống đáy bể, phần nước ở trên là nước đã được xử lí sẽ được dẫn ra ngoài.

Trong quá trình vận hành, ở bể ôxy hóa, theo thời gian lượng bùn hoạt tính sẽ tăng lên, đồng thời cũng tích lũy nhiều tế bào vi sinh vật già cỗi khiến hoạt tính của bùn sẽ giảm. Người ta nói bùn bị già. Vì vậy khi cho bùn thu ở bể lắng trở lại bể ôxy hóa, không nhất thiết cho toàn bộ số bùn có trong bể lắng, mà chỉ cho một phần, để bảo đảm nồng độ bùn hoạt tính là 2 - 4g/l.



Hình 27 : Bể sục khí (Aeroten)

a. Mặt cắt dọc ; b. Mặt cắt ngang

Xử lý nước thải bằng bể aeroten phức tạp hơn và đòi hỏi nhiều công sức hơn so với ở bể lọc sinh học. Người ta phải theo dõi liên tục và kịp thời điều chỉnh các chỉ số như :

- + Nồng độ bùn hoạt tính.
- + Chế độ thông khí.
- + Nồng độ các chất bẩn trong nước thải.
- + Nồng độ các chất dinh dưỡng cho vi sinh vật.

b) Xử lý kỵ khí:

Quy trình xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện kỵ khí là quy trình sinh học phân hủy một cách yếm khí các chất hữu cơ chứa trong nước thải để tạo thành khí CH_4 , các sản phẩm vô cơ kể cả CO_2 và NH_3 .

Quy trình này có những ưu điểm sau:

- Nhu cầu về năng lượng không nhiều.
- Ngoài vai trò xử lý nước thải, bảo vệ môi trường, quy trình còn tạo được nguồn năng lượng mới là khí sinh học, trong đó CH_4 chiếm tỉ lệ 70 - 75%.
- Cũng như xử lý sinh học hiếu khí, ở quy trình này, bùn hoạt tính cũng được sử dụng làm tác nhân gây biến đổi thành phần của nước thải. Bùn hoạt tính được sử dụng ở đây có lượng bùn dư thấp, có tính ổn định khá cao, để duy trì hoạt động của bùn không đòi hỏi cung cấp nhiều chất dinh dưỡng, bùn có thể tồn trữ trong thời gian dài.
- Về mặt thiết bị: Công trình cấu tạo khá đơn giản, có thể làm bằng vật liệu tại chỗ với giá thành không cao.

Bên cạnh những ưu việt nêu trên, cho đến nay quy trình xử lý sinh học kỵ khí cũng còn có những hạn chế sau:

- Quy trình này nhạy cảm với các chất độc hại, với sự thay đổi bất thường về tải trọng của công trình. Do vậy, khi sử dụng cần có sự theo dõi sát sao các yếu tố của môi trường.

- Xử lý nước thải chưa triệt để, cần phải xử lý hiếu khí sau đó.

- Cho đến nay, những hiểu biết về quy trình xử lý loại này còn nhiều hạn chế (còn thiếu những kinh nghiệm về vận hành công trình, thiếu những hiểu biết về các vi sinh vật kỵ khí tham gia trong quá trình xử lý).

Thấy được những ưu điểm của loại quy trình này nên các nhà khoa học đã cố gắng đầu tư nghiên cứu từ quy mô pilot với các mô hình có khối tích nhỏ : $6m^3$, $30m^3$, $200m^3$... đến quy mô lớn. Đến nay đã có trên dưới vài chục nhà máy xử lý sinh học kỵ khí nước thải ở các nước như Hà Lan, Hoa Kỳ, Thụy Sĩ, Cộng hòa Liên bang Đức ...

*** Các quá trình chuyển hóa chủ yếu trong phân hủy kỵ khí:**

-- *Quá trình thủy phân (Hydrolysis) :*

Muốn hấp thụ được các chất hữu cơ có trong nước thải, vi sinh vật phải thực hiện các công đoạn chuyển hóa các chất này. Việc đầu tiên là phải thủy phân các chất có phân tử lượng cao thành các polymer có phân tử lượng thấp và monomer. Vì chỉ khi đó các chất này mới có khả năng được hấp thụ qua màng tế bào vi sinh vật. Để thực hiện quá trình thủy phân, các vi sinh vật này phải có hệ enzyme các loại như proteinase, lipase, cellulase ... Sau thủy phân, các sản phẩm sẽ được tạo thành như các amino acid, đường, rượu, các acid béo mạch dài...

Quá trình thủy phân xảy ra khá chậm, phụ thuộc vào nhiều yếu tố của môi trường như nhiệt độ, pH, cấu trúc của các chất hữu cơ cần phân giải.

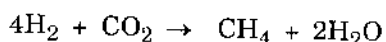
-- *Quá trình acid hóa (Acidogenesis) :*

Các sản phẩm của quá trình thủy phân sẽ được tiếp tục phân giải dưới tác động của các vi sinh vật lên men acid để tạo thành các acid béo dễ bay hơi như acid acetic, acid formic, acid propionic. Ngoài ra còn có một số dạng khác như rượu methanol, ethanol, acetone, NH_3 , CO_2 , H_2 ...

-- *Quá trình acetate hòa (Acetogenesis) :*

Các acid là sản phẩm của quá trình trên lại được tiếp tục thủy phân để tạo lượng acid acetic cao hơn. Sản phẩm của quá trình này phụ thuộc vào áp suất riêng phần của H_2 trong môi trường. Áp suất riêng phần của

H_2 được giữ $< 10^{-3}$ atm để vi sinh vật có thể thực hiện biến đổi H_2 thành CH_4 theo phản ứng sau:



Thực tế cho thấy khi áp suất riêng phần của H_2 lớn thì sản phẩm của quá trình này chứa nhiều acid béo trung gian như acid propionic (C_3), acid butyric (C_4).... Do vậy, làm chậm quá trình tạo methane.

-- *Quá trình methane hóa (Methanogenesis) :*

Đó là giai đoạn cuối cùng của quá trình phân hủy các sản phẩm hữu cơ đơn giản của những giai đoạn trước để tạo thành CH_4 và CO_2 nhờ các vi khuẩn lên men methane. Chúng có hai nhóm sau:

+ Nhóm biến đổi acetate: Nhóm này có tốc độ phát triển chậm và đây là nguyên nhân đòi hỏi công trình xử lý kỵ khí phải có thời gian lưu các chất thải ở công trình lâu.

+ Nhóm biến đổi hydrogen: Nhóm này có tốc độ phát triển nhanh hơn nhiều, do đó có khả năng giữ áp suất riêng phần của H_2 thấp, tạo điều kiện tốt cho quá trình biến đổi acetate từ các acid béo.

*** Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân hủy kỵ khí :**

-- *Oxygen :* Trong xử lý kỵ khí nước thải, oxygen được coi là độc tố đối với các vi sinh vật. Do đó lý tưởng nhất là tạo được điều kiện kỵ khí tuyệt đối trong bể xử lý.

-- *Chất dinh dưỡng:* Chất dinh dưỡng có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, liên quan mật thiết đến quá trình phân hủy các chất hữu cơ chứa trong chất thải. Do đó việc cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cho vi sinh vật trong quá trình phân hủy nói trên là rất cần thiết. Cũng như các vi sinh vật khác, vi sinh vật phân giải kỵ khí đòi hỏi các chất dinh dưỡng chính yếu bao gồm các hợp chất chứa carbon, nitrogen, phosphor và một số các nguyên tố vi lượng với một tỉ lệ thích hợp. Nếu không cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng sẽ ảnh hưởng đến các quá trình phân giải các chất trong nước thải. Chẳng hạn, nếu không đủ nitrogen sẽ ảnh hưởng đến sự hình thành các enzyme thực hiện quá trình phân giải. Nhưng nếu cung cấp quá nhiều nitrogen sẽ làm hạn chế sự phát triển của vi sinh vật có trong nước thải. Việc cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết sẽ tạo cho bùn có tính lắng tốt và hoạt tính cao, hoạt động tốt trong quá trình xử lý.

-- *Nhiệt độ:*

Nhóm các vi sinh vật kỵ khí có 3 vùng nhiệt độ thích hợp cho sự phân hủy các hợp chất hữu cơ, và ở mỗi vùng nhiệt độ sẽ thích hợp với mỗi nhóm vi sinh vật kỵ khí khác nhau.

- + Vùng nhiệt độ cao: 45°C - 65°C (thermophilic).
- + Vùng nhiệt độ trung bình: 20°C - 45°C (mesophilic).
- + Vùng nhiệt độ thấp: dưới 20°C (psychrophilic).

Hai vùng nhiệt độ đầu thích hợp cho hoạt động của nhóm các vi sinh vật lên men methane, ở vùng nhiệt độ này lượng khí methane tạo thành cao. Đối với vùng nhiệt độ cao (45°C - 65°C), để duy trì nhiệt độ này cần thiết phải cung cấp thêm nhiệt lượng, điều này sẽ gây tốn kém cho công trình, tính kinh tế của công trình xử lý sẽ bị hạn chế.

Ở nước ta, nhiệt độ trung bình từ 20°C - 32°C , sẽ thích hợp cho nhóm vi sinh vật ở vùng nhiệt độ trung bình phát triển.

-- *pH:*

Trong quy trình xử lý kỵ khí, pH của môi trường có ảnh hưởng lớn đến tốc độ phân hủy các chất hữu cơ, cụ thể là ảnh hưởng đến 4 quá trình chuyển hóa cơ bản của sự phân hủy kỵ khí. Ở các quá trình xử lý, người ta nhận thấy các quá trình chuyển hóa cơ bản chịu ảnh hưởng trực tiếp lẫn nhau, khi một trong các quá trình này bị cản trở hoặc thúc đẩy sẽ ảnh hưởng đến quá trình xảy ra tiếp theo, do đó sẽ làm tốc độ phân hủy các chất xảy ra chậm lại hoặc nhanh hơn. Ví dụ: Khi nhiệt độ thay đổi hoặc khi thành phần nước thải thay đổi (do nạp mới vào công trình) thì nhóm vi sinh vật acid hóa thích nghi hơn so với nhóm vi sinh vật sinh methane. Khi pH giảm mạnh (ví dụ: $\text{pH} < 6$) sẽ làm giảm quá trình sinh khí CH_4 . Hơn nữa khi pH giảm, các acid trung gian tích lũy nhiều, làm các phản ứng phân hủy khó thực hiện và dẫn đến dừng quá trình acetate hóa...

pH tối ưu trong quá trình phân hủy kỵ khí là 6,5 - 8,5.

-- *Các độc tố:*

Qua tìm hiểu đặc điểm sinh lý các vi sinh vật tham gia xử lý nước thải bằng phương pháp kỵ khí, người ta nhận thấy:

+ Một số các hợp chất như CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2 ... và các ion tự do của các kim loại nặng có nồng độ 1mg/l sẽ thể hiện tính độc đối với các vi sinh vật kỵ khí.

+ Các hợp chất như formaldehyde, SO_2 , H_2S với nồng độ 50 - 400mg/l sẽ gây độc hại với các vi sinh vật kỵ khí trong công trình xử lý.

+ S^{2-} được coi là tác nhân gây ức chế quá trình tạo methane. Sở dĩ có lập luận này là do nhiều nguyên nhân khác nhau : S^{2-} làm kết tủa các nguyên tố vi lượng như Fe, Ni, Co, Mo ... do đó hạn chế sự phát triển của vi sinh vật; đồng thời, các electron giải phóng ra từ quá trình oxy hóa các chất hữu cơ sử dụng cho quá trình sulfate hóa và làm giảm quá trình sinh methane.

+ Các hợp chất NH_4^+ ở nồng độ 1,5 - 2mg/l gây ức chế quá trình lên men kỵ khí.

*** Các dạng công trình xử lý kỵ khí :**

Các công trình xử lý kỵ khí đã được ứng dụng từ rất lâu đời và có quá trình phát triển từ đơn giản đến phức tạp, ngày một hoàn thiện hơn, đáp ứng yêu cầu xử lý nước thải.

Vào nửa đầu thế kỷ XX, Công nghệ sinh học kỵ khí đã được ứng dụng để xử lý cặn, chất thải đậm đặc ... được thể hiện qua một số công trình quen biết cổ điển như:

-- *Bể tự hoại (hình 28-1)* : Đây là loại công trình xử lý nước thải loại nhỏ dùng cho từng hộ gia đình. Loại công trình này thực hiện hai chức năng: lắng và chuyển hóa cặn lắng của nước thải (chủ yếu là nước thải từ các nhà vệ sinh) bằng quá trình phân giải sinh học kỵ khí.

-- *Bể lắng hai vỏ (hình 28-2)* : Có nguyên tắc hoạt động và thực hiện hai chức năng tương tự như bể tự hoại, nhưng ở quy mô lớn hơn, xử lý nước thải với công suất lớn hơn.

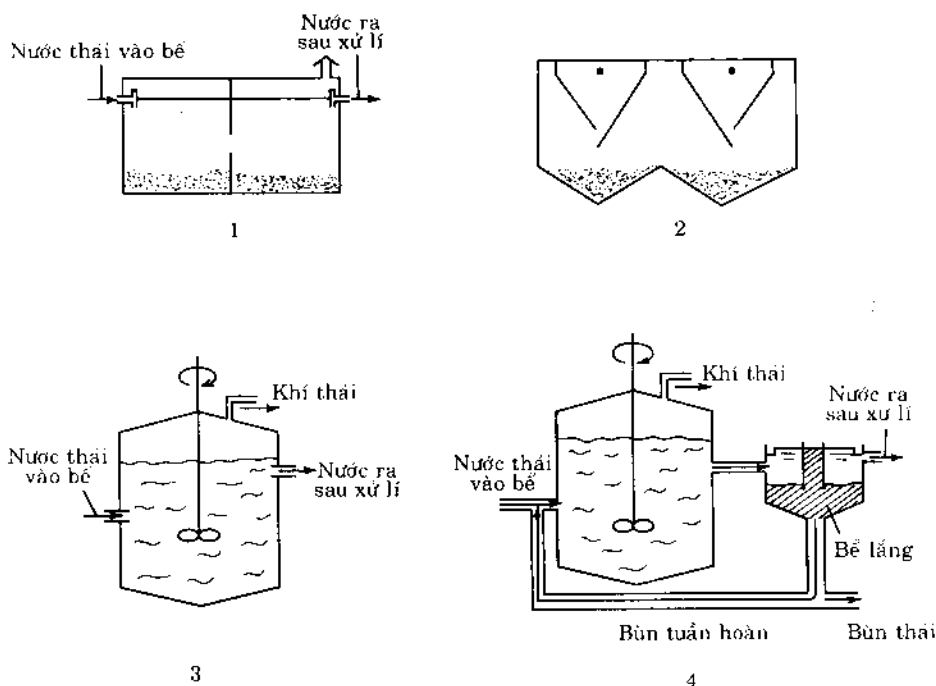
Từ những năm của thập niên 70 trở về sau, công trình xử lý nước thải áp dụng biện pháp sinh học kỵ khí đã phát triển thêm một bước mới hoàn thiện hơn. Thời gian này xuất hiện hàng loạt các công trình nghiên cứu đã được đưa vào ứng dụng thực tế để xử lý nước thải sinh hoạt và cả một số loại nước thải công nghiệp giàu chất hữu cơ. Trong số đó, đáng lưu ý có các dạng công trình sau:

-- *Bể methane cổ điển (hình 28-3, 28-4)* : Được ứng dụng 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 của thành phố đều sử dụng loại công trình này.

-- *Bể lọc kỵ khí AF (Anaerobic Filter) (hình 28-5)* : Ở công trình này quá trình xử lý được thực hiện qua vật liệu lọc để vi sinh vật kỵ khí dính bám vào và thực hiện quá trình chuyển hóa sinh hóa các chất hữu cơ chứa trong nước thải và đồng thời tránh sự rửa trôi của màng vi sinh vật.

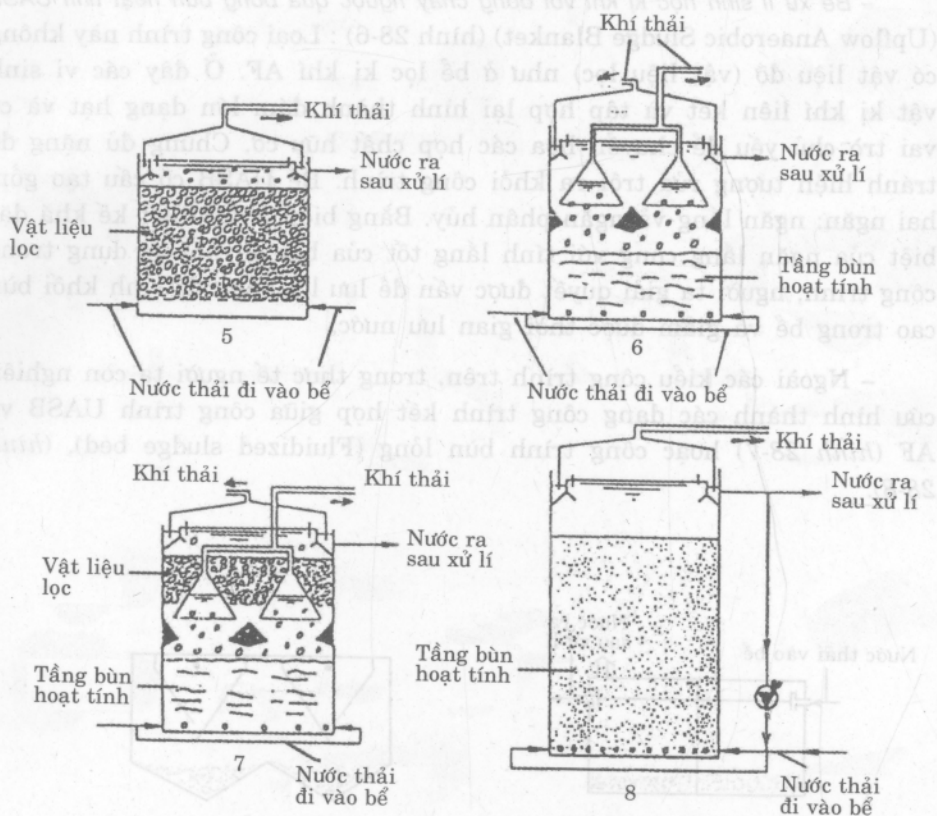
– *Bể xử lý sinh học kỵ khí với dòng chảy ngược qua bông bùn hoạt tính UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (hình 28-6) : Loại công trình này không có vật liệu đỡ (vật liệu lọc) như ở bể lọc kỵ khí AF. Ở đây các vi sinh vật kỵ khí liên kết và tập hợp lại hình thành đám lớn dạng hạt và có vai trò chủ yếu để chuyển hóa các hợp chất hữu cơ. Chúng đủ nặng để tránh hiện tượng rửa trôi ra khỏi công trình. Bể UASB có cấu tạo gồm hai ngăn: ngăn lắng và ngăn phân hủy. Bằng biện pháp thiết kế khá đặc biệt của ngăn lắng cùng với tính lắng tốt của bùn kỵ khí sử dụng trong công trình, người ta giải quyết được vấn đề lưu lại nồng độ sinh khối bùn cao trong bể và giảm được thời gian lưu nước.*

– Ngoài các kiểu công trình trên, trong thực tế người ta còn nghiên cứu hình thành các dạng công trình kết hợp giữa công trình UASB và AF (hình 28-7) hoặc công trình bùn lỏng (Fluidized sludge bed), (hình 28-8).



Hình 28 : Các dạng bể xử lý kỵ khí

1. Bể tự hoại; 2. Bể lắng hai vò; 3, 4. Bể methane cổ điển;

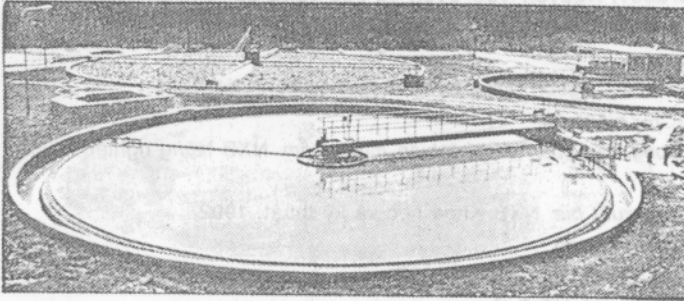


Hình 28 : Các dạng bể xử lý kỵ khí (tiếp theo)

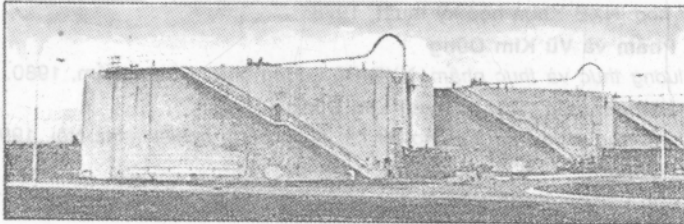
5. Bể lọc kỵ khí AF; 6. Bể UASB;

7. Bể hỗn hợp UASB + AF; 8. Bể bùn nổi;

Ngoài các sơ đồ thể hiện cách xử lý nước thải đã nêu trên, ta có thể quan sát hiện trạng xây dựng các công trình xử lý qua các hình chụp (hình 29).



a.



b.

Hình 29 : Hệ thống xử lý nước thải

a. Hình chụp hệ thống xử lý nước thải bằng phương pháp hiếu khí. Bể ở gần có thể nhìn rõ là bể lắng. Bể ở xa là bể lọc với những tia nước thải được tưới xuống các lớp vật liệu lọc (đá, cát ...).

b. Hình chụp hệ thống xử lý nước thải bằng phương pháp kỵ khí. Hệ thống các bể chứa nước thải và bùn hoạt tính. Phần lớn của bể nằm chìm dưới đất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **A.M. Bezborodov, Nguyễn Văn Uyển và các cộng sự**
Công nghệ sinh học và một số ứng dụng tại Việt Nam. Tập I, II. NXB Nông nghiệp, 1994.
2. **G. Rheinelmer**
Vi sinh vật học các nguồn nước. NXB Khoa học kỹ thuật, 1985.
3. **Hồ Sưởng (Chủ biên)**
Vi sinh vật trong bảo quản và chế biến thực phẩm. NXB Nông nghiệp, 1982.
4. **Hồ Sưởng**
Công nghệ sản xuất bia. NXB Khoa học và kỹ thuật, 1992.
5. **Hồ Huỳnh Thủy Dương**
Sinh học phân tử. NXB Giáo dục, 1997.
6. **Lương Đức Phẩm và Hồ Sưởng**
Vi sinh tổng hợp. NXB Khoa học kỹ thuật, 1978.
7. **Lương Đức Phẩm và Vũ Kim Dũng**
Vi sinh vật lương thực và thực phẩm. NXB Bộ Lương thực - thực phẩm, 1980.
8. **GS. TS. Lê Văn Nhương, GS. Nguyễn Lân Dũng**
Công nghệ sinh học - một cơ hội cho tất cả. NXB Nông nghiệp - Hà Nội, 1992.
9. **Nguyễn Lân Dũng**
Sử dụng vi sinh vật để phòng trừ sâu hại cây trồng. NXB Khoa học kỹ thuật, 1985.
10. **Nguyễn Văn Tuyên**
Sinh thái và môi trường. Tủ sách Đại học Sư phạm, TP HCM, 1996.
11. **Nguyễn Kim Huệ**
Tìm hiểu về quá trình lên men rượu cần của vài dân tộc thiểu số ở Lâm Đồng. Luận văn Thạc sĩ Khoa học, 1996.
12. **Nguyễn Ngọc Tú và cộng sự**
Bảo vệ cây trồng bằng các chế phẩm từ Vi nấm. NXB Nông nghiệp, 1997.
13. **Trần Hiếu Nhuệ**
Thoát nước và xử lý nước thải công nghiệp. Tập II. NXB Khoa học kỹ thuật, 1992.
14. **Vũ Công Hậu**
Chế rượu vang trái cây trong gia đình. NXB Nông nghiệp, 1983.
15. **Wolfgang Fritsche**
Cơ sở hóa sinh của vi sinh vật học công nghiệp. NXB Khoa học và kỹ thuật, 1983.
16. **Nguyễn Văn Phước**
Kỹ thuật sản xuất rượu etylic. Bộ Lương thực - thực phẩm, tài liệu lưu hành nội bộ, 1979.
17. **Carl P. Swanson, Timothy Merz and William J. Yuong**
Cytogenetics (second edition). Prentice - Hall of India Private Limited, 1990.
18. **Dennis E. Ohman**
Experiment in gene manipulation. University of California at Berkeley, 1989.
19. **E. Jawetz, J.L. Melnick and E.A. Adelberg**
Review of medical microbiology (seventeenth edition). A Publishing Division of Prentice Hall, 1987.
20. **I. Edward Alcamo**
Fundamentals of microbiology. Third Edition. The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc., 1991.
21. **Smith, C.A, Wood, E.J.**
Molecular biology and biotechnology. First Edition. Avon: Chapman Hall limited, 1991.

MỤC LỤC

Lời nói đầu

CHƯƠNG I. MỞ ĐẦU

I. Một số khái niệm cơ bản	4
II. Các giai đoạn phát triển của Công nghệ vi sinh	5
III. Ứng dụng của Công nghệ vi sinh	7
IV. Đôi điều suy ngẫm	13

CHƯƠNG II. CƠ SỞ HÓA SINH, DI TRUYỀN HỌC CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH

I. Phân loại sản phẩm	17
II. Mối liên quan giữa sinh trưởng và sự tạo thành sản phẩm	19
III. Những nguyên tắc điều hòa trao đổi chất	21
IV. Những sai hỏng di truyền của điều hòa trao đổi chất và hiện tượng siêu tổng hợp	29
V. Ý nghĩa của kĩ thuật di truyền	30
VI. Những hiểu biết về chuyển tải gen	31

CHƯƠNG III. NHỮNG NGUYÊN TẮC CƠ BẢN CỦA NUÔI CẤY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

I. Quy trình lên men	40
II. Dinh dưỡng của vi sinh vật và nguyên liệu nuôi cấy vi sinh vật công nghiệp	52

CHƯƠNG IV. VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT RƯỢU

I. Vi sinh vật và quá trình sản xuất rượu trắng (rượu cất)	61
II. Vi sinh vật trong sản xuất rượu vang quá	67
III. Một số sản phẩm rượu dân gian của Việt Nam được sản xuất bằng phương pháp lên men truyền thống	75

CHƯƠNG V. VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT BIA

I. Nguyên liệu và xử lí nguyên liệu	84
II. Giống vi sinh vật và quy trình lên men bia	89
III. Tạo thành phẩm	90

CHƯƠNG VI. VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM TỪ SỮA

I. Vi sinh vật trong sản xuất sữa lên men (sữa chua)	92
II. Vi sinh vật trong quá trình sản xuất phomat	97

CHƯƠNG VII. THU NHẬN PROTEIN TỪ VI SINH VẬT

I. Vai trò của nguồn protein từ vi sinh vật	103
II. Đặc điểm của quá trình sản xuất protein từ vi sinh vật	104
III. Sản xuất protein từ các nhóm vi sinh vật khác nhau	105

CHƯƠNG VIII. SỬ DỤNG VI SINH VẬT PHÒNG CHỐNG CÔN TRÙNG VÀ CÁC BỆNH CÓ HẠI CHO CÂY TRỒNG

I. Vai trò của biện pháp đấu tranh sinh học bằng vi sinh vật phòng chống sâu bệnh hại cây trồng	120
II. Các nhóm vi sinh vật được sử dụng để sản xuất các chế phẩm thuốc trừ sâu bệnh cho cây trồng	123
III. Nuôi cấy và tạo chế phẩm vi sinh vật diệt côn trùng	137

CHƯƠNG IX. VI SINH VẬT VỚI QUÁ TRÌNH XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG NƯỚC

I. Các loại nước thải	144
II. Khu hệ vi sinh vật và các tác nhân gây bệnh trong nước thải	145
III. Vai trò của vi sinh vật trong sự tự làm sạch của các nguồn nước	148
IV. Xử lí nước thải bằng biện pháp sinh học	150
Tài liệu tham khảo	166

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

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung :

Phó Tổng Giám đốc kiêm Giám đốc NXBGD tại TP. Hồ Chí Minh

VŨ BÁ HOÀ

Biên tập lần đầu :

ĐỖ MẠNH HÙNG

TRẦN MINH HƯƠNG

Biên tập tái bản :

NGÔ THỊ LINH PHƯƠNG

Trình bày bìa :

VŨ CÔNG MINH

Biên tập kĩ - mỹ thuật :

TRẦN THÀNH TOÀN

Sửa bản in :

THANH VÂN

Chế bản tại :

PHÒNG SẮP CHỮ ĐIỆN TỬ - NXBGD TẠI TP.HCM

CÔNG NGHỆ VI SINH

Mã số : 7K433t7-DAI

In 2.000 bản, khổ 17 x 24cm. Tại Nhà in Hà Nam
Số 29 - QL 1A - P. Quang Trung - TX. Phú Lý - Hà Nam
Số in: 450. Số XB: 11-2007/CXB/235-2119/GD
In xong và nộp lưu chiểu tháng 01 năm 2007

TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO BỘ MÔN SINH HỌC CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

- Sinh học 10-11-12 nâng cao *Đỗ Mạnh Hùng - Trần Thanh Thủy*
- Bài tập tuyển chọn Sinh học 10-11-12, *tập I và II* *Đỗ Mạnh Hùng*
- Tuyển chọn câu hỏi Sinh học 10-11-12 *Đỗ Mạnh Hùng*
- Tuyển tập đề thi Olympic 30-4 *Sở Giáo dục và Đào tạo TP.Hồ Chí Minh*
Sinh học lần thứ VIII - 2002 *Trường THPT chuyên Lê Hồng Phong*
- Giới thiệu đề thi olympic quốc tế *Ngô Văn Hưng - Đỗ Mạnh Hùng*
môn Sinh học *Trần Minh Hương*
- Di truyền học *Phạm Thành Hồ*
- Những kiến thức cơ bản về Di truyền học *Nguyễn Sỹ Mai*
- Sinh học phân tử *Hồ Huỳnh Thùy Dương*
- Sinh học của sự sinh sản *Phan Kim Ngọc*
Hồ Huỳnh Thùy Dương
- Những kiến thức cơ bản về Công nghệ sinh học *Nguyễn Văn Uyên*
Nguyễn Tiến Thắng
- Nguồn gốc loài người *Phạm Thành Hồ*
- Sinh thái môi trường *Nguyễn Văn Tuyên*
- Phương pháp phân tích vi sinh vật *Trần Linh Thuộc*
trong nước, thực phẩm và mĩ phẩm
- Hướng dẫn thực hành Vi sinh vật học *Trần Thanh Thủy*
- Cây cỏ có ích ở Việt Nam, *tập I và II* *Võ Văn Chi - Trần Hợp*

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

- **Tại TP. Hà Nội** : 187 Giảng Võ ; 232 Tây Sơn ;
23 Tràng Tiền ; 25 Hàn Thuyên.
- **Tại TP. Đà Nẵng** : 15 và 62 Nguyễn Chí Thanh.
- **Tại TP. Hồ Chí Minh** : 104 Mai Thị Lựu, Quận 1 ;
451 B – 453, Hai Bà Trưng, Quận 3 ;
240 Trần Bình Trọng, Quận 5.
- **Tại TP. Cần Thơ** : 5/5, đường 30/4.

Website : www.nxbgd.com.vn



Giá: 14.500đ