

	Trang
MỤC LỤC	
<u>Chương 1: MỞ ĐẦU</u>	
1. Đối tượng, nhiệm vụ và nội dung của vi sinh vật học công nghiệp	4
2. Lược sử phát triển của vi sinh vật học công nghiệp	5
3. Vị trí và yêu cầu môn học	7
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	3
<u>Chương 2: CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP</u>	
1. Đặc điểm cấu tạo và hoạt động sống của vi sinh vật	8
2. Cơ sở hóa sinh của vi sinh vật học công nghiệp	13
3. Cơ sở di truyền vi sinh vật	21
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	32
<u>Chương 3: SỰ PHÂN LOẠI SẢN PHẨM</u>	
1. Phân loại theo tính chất thương mại	33
2. Phân loại theo sinh lý trao đổi chất	34
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	47
<u>Chương 4: CÁC PHƯƠNG PHÁP VÀ KỸ THUẬT LÊN MEN</u>	
1. Quá trình lên men	48
2. Vi sinh vật	52
3. Cơ chất dinh dưỡng	55
4. Nhu cầu về oxy và sự thông khí trong quá trình lên men	61
5. Khử trùng	62
6. Phương pháp nuôi	66
7. Nồi lên men	70
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	74
<u>Chương 5: SỰ THU NHẬN SINH KHỐI TẾ BÀO</u>	
1. Tiêu chuẩn về chủng	75
2. Mối quan hệ với sinh trưởng	76
3. Chất lượng sản phẩm	80
4. Giống khởi động	82
5. Protein đơn bào (SCP)	92
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	98
<u>Chương 6: CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN</u>	
1. Lên men ethanol	99

2. Lên men lactic	114
3. Lên men 2,3 butadiol	120
4. Lên men butanol -aceton	125
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	127
<u>Chương 7: CÁC CHẤT TRAO ĐỔI BẬC MỘT</u>	
1. Nguyên lý của sự tổng hợp thừa	129
2. Các phương pháp tạo ra thể đột biến tổng hợp thừa	134
3. Aminoacid	138
4. Sản xuất các purin nucleotit	146
5. Vitamin	150
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	151
<u>Chương 8: CÁC CHẤT TRAO ĐỔI BẬC HAI</u>	
1. Các chất kháng sinh	153
2. Các độc tố nấm	172
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	180
<u>Chương 9: CÁC SẢN PHẨM CHUYỂN HÓA</u>	
1. Sự chuyển hóa các steroid	182
2. Sự tạo thành phenyl-axetylcacbinol	187
3. Sản phẩm từ vi khuẩn axetic	187
4. Sản xuất vitamin C	190
5. Sản xuất destran	198
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	202
<u>Chương 10: XỬ LÝ NƯỚC THẢI BẰNG BIỆN PHÁP SINH HỌC</u>	
1. Vi sinh vật học của các nguồn nước uống	204
2. Xử lý nước thải	208
3. Lên men methane	210
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	218
<u>Chương 11 : SỰ TUYỀN KHOÁNG NHỜ VI SINH VẬT</u>	
1. Các vi khuẩn ngấm chiết	220
2. Cơ chế tác động của vi khuẩn	221
3. Một số quá trình thủy luyện kim sinh học	223
4. Sự tích lũy kim loại nhờ vi khuẩn và tảo	233
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	234
<u>Chương 12: CÁC BÀI TẬP CƠ SỞ VÀ NÂNG CAO</u>	
1. Phần câu hỏi	236
2. Trả lời một số câu hỏi	245

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
APG	Acid 3-phosphoglyceric
A-1,3-DPG	Acid 1,3 diphosphoglyceric
ATP	Adenosine triphosphate
A-6PA	Acid 6-penicillanic
CoA	Coenzyme A
CKS	Chất kháng sinh
DNA	Deoxiribonucleic acid
R-1,5-DP	Ribulose-1,5-diphosphate
R-5-P	Ribulose-5-diphosphate
RNA	Ribonucleic acid
VSV	Vi sinh vật
F-6-P	Fructose-6-phosphate
FAD	Flavin adenine dinucleotide
G-6-P	Glucose-6-phosphate
GAP	Glyceraldehyde phosphate
KDPG	2-Keto-3-deoxi-6-phosphogluconate
N	Nitrogen
NAD	Nicotinamid adenine dinucleotide dạng oxi hóa
NADH	Nicotinamid adenine dinucleotide dạng khử
NADP	Nicotinamid adenine dinucleotide phosphat dạng oxi hóa
NADPH	Nicotinamid adenine dinucleotide phosphat dạng khử
PP	Pentose phosphate
X-5-P	Xylulose-5-phosphate

Người biên soạn	Biên soạn các chương
1. PGS.TS. Kiều Hữu Ảnh	7, 8, 9, 10
2. TS. Biền Văn Minh (Chủ biên)	1, 2, 3, 11 và 12
3. TS. Phạm Ngọc Lan	4, 5
4. ThS. Đỗ Bích Thủy	6

Chương 1

Mở đầu

1. Đối tượng, nhiệm vụ, nội dung của vi sinh vật học công nghiệp

Vi sinh vật học công nghiệp (*Industrial Microbiology*) là một ngành của Vi sinh học, trong đó vi sinh vật (VSV) được xem xét để sử dụng trong công nghiệp và những lĩnh vực khác nhau của kỹ thuật.

Vi sinh vật học công nghiệp (VSVHCN) giải quyết hai vấn đề chính trái ngược nhau:

- Một mặt, nó dẫn tới làm rõ hoàn toàn những tính chất sinh học và sinh hoá của những cơ thể sống là nguyên nhân cơ bản và trực tiếp của sự chuyển hoá hoá học, những chất có ở cơ chất này hay cơ chất kia. Trong trường hợp này, VSVHCN sử dụng những VSV để thu những sản phẩm quan trọng và có giá trị thực tế bằng con đường lên men. Phương pháp sinh hoá để thu nhiều sản phẩm là phương pháp duy nhất có lợi về kinh tế.

- Mặt khác, chúng ta cũng biết sự lên men do VSV gây ra không luôn luôn diễn ra theo một hướng như mong muốn. Sự phá huỷ một quá trình lên men thường xảy ra do sự hoạt động của những VSV lạ. Trong trường hợp này, điều rất quan trọng là không những phải biết những VSV gây ra quá trình cần thiết mà còn phải biết cả những VSV có hại gây tổn thất cho sản xuất. Nhà VSVHCN có kinh nghiệm phải khám phá ra chúng, làm rõ tính chất có hại do chúng gây ra và tìm ra những phương pháp đấu tranh với chúng.

1.1. Mục tiêu môn học

Sau khi học xong học phần này, sinh viên cần hiểu được các ứng dụng công nghiệp quan trọng của vi sinh vật, sự khác biệt giữa công nghệ sinh học vi sinh vật hiện đại và vi sinh vật học truyền thống, phân biệt được các nhóm sản phẩm và quá trình công nghiệp, vai trò của vi sinh vật trong tuyển khoáng và trong xử lý nước thải bằng con đường sinh học.

1.2. Mô tả môn học

VSVHCN là một bộ phận quan trọng trong công nghệ sinh học, là 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 và các lĩnh vực khác nhau của kỹ thuật.

VSVHCN là một ngành khoa học mới phát triển, nhưng do ý nghĩa quan trọng của nó về mặt lý thuyết cũng như thực tiễn nên đã phát triển hết sức nhanh chóng.

2. Lược sử phát triển của vi sinh vật học công nghiệp

Sự phát triển của VSVHCN được chia thành 3 giai đoạn chính:

Giai đoạn đầu, tính đến nửa sau thế kỷ 19. Việc ứng dụng tiềm năng của VSV đã có từ buổi đầu của nền văn minh nhân loại như sản xuất rượu vang, bia, dấm. Ở Việt Nam nghề nấu rượu, làm dấm, làm tương cũng có từ rất xa xưa. Tuy một số quá trình được thực hiện ở quy mô rộng rãi, nhưng những sự thành công đó còn phụ thuộc vào sự ngẫu nhiên hay kinh nghiệm của những người thợ giỏi truyền cho các thế hệ sau. Vai trò của VSV trong sự chuyển hoá các chất hữu cơ được con người biết đến khoảng hơn 100 năm trước đây.

Những công trình nghiên cứu VSVHCN đã bắt đầu từ Pasteur (1878). Như ta thấy Pasteur đã nghiên cứu nhiều quá trình lên men áp dụng trong sản xuất và học thuyết về mầm bệnh. Pasteur cũng đã đề ra phương pháp thanh trùng Pasteur để tiệt trùng rượu nho, bia mà không làm hỏng phẩm chất. Phương pháp này hiện nay có ứng dụng rất lớn. Bởi vậy Pasteur được coi là người sáng lập ra VSVHCN.

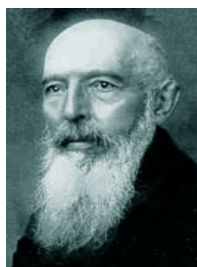
Việc nghiên cứu và sử dụng các chủng nấm men thuần khiết trong sản xuất bia (Hansen, 1886) có thể xem là bước mở đầu cho công nghiệp lên men dựa trên cơ sở khoa học.

Năm 1898 Buchner cũng đã nghiên cứu tác dụng lên men của nhiều nấm men, đã vạch ra mối liên hệ giữa nấm men và hoá học về men, và ứng dụng hoạt động của nấm men vào sản xuất tiếp giống ngoài. Ông đã nghiên cứu nấm men lấy ra dung dịch có men zymase và cho lên men rượu.

Như vậy giai đoạn thứ nhất là giai đoạn sử dụng các hoạt tính của VSV- giai đoạn này được đánh dấu bằng việc đặt cơ sở khoa học cho quá trình sản xuất đồ uống chứa rượu.



1



2



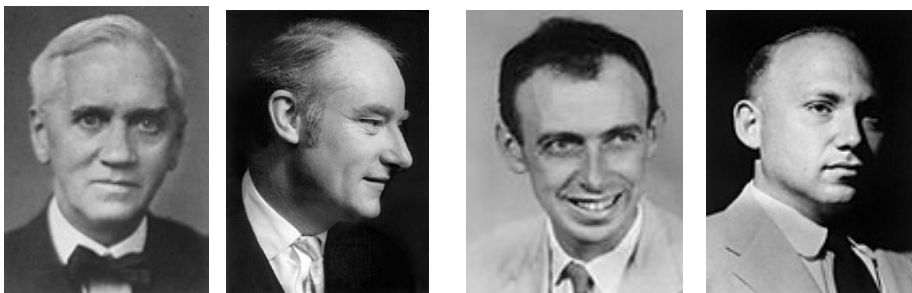
3

Hình 1.1: Các nhà vi sinh vật học công nghiệp tiền bối

- 1. Louis Pasteur (1822-1895); 2. Gerhard H. A. Hansen (1841-1912);
3. Eduard Buchner (1860-1917)**

Giai đoạn thứ hai của VSVHCN được tính đến giữa thế kỷ XX, bao gồm sự xuất hiện của các chất kháng sinh, những tiến bộ về di truyền học trong việc chọn lọc các thể đột biến vi khuẩn, sự nghiên cứu các điều kiện lên men tối ưu, kỹ thuật học lên men, việc tách và tinh chế sản phẩm...

Giai đoạn thứ ba được đặc trưng bởi sự phát triển của một nền công nghiệp VSV độc lập. Người ta đã điều khiển được các quá trình siêu tổng hợp ở VSV và tạo ra được hàng loạt các chủng đột biến ở VSV. Nhờ các thành tựu này mà người ta đã sản xuất ở quy mô lớn mì chính, lysine và nhiều loại aminoacid khác.



1

2

3

4

**Hình 1.2: 1. Alexander Fleming(1881-1955); 2. Francis Crick (1916-2004);
3. James Dewey Watson (1928-); 4. Joshua Lederberg(1925-)**

Giai đoạn thứ tư (giai đoạn hiện nay) được đánh dấu bằng sự phát hiện ra các enzyme cắt giới hạn restrictase và các plasmid với sự gắn các gene lạ mang các thông tin tổng hợp các protein đặc biệt vào một cơ thể đã trở thành một phương pháp thông dụng và sự kiểm soát ngày càng tốt hơn sự biểu hiện của các gene này.



1

2

3

4

**Hình 1.3: 1.Daniel Nathans (1928-1999); 2.Werner Arber(1929-);
3.Hamilton Othanel Smith (1931-); 4.Herbert Boyer (1936-).**

3. Vị trí và yêu cầu môn học

Môn VSVCN nhằm cung cấp cho người học những kiến thức và kỹ năng ứng dụng VSV trong một số quy trình công nghệ phục vụ khoa học và đời sống con người, ngoài ra còn giúp cho sinh viên phương pháp nắm bắt được một số quy trình kỹ thuật và giải thích được quá trình sản xuất trên cơ sở khoa học, tiến tới có thể chủ động hướng dẫn giúp đỡ một số cơ sở sản xuất trong những trường hợp cần thiết, đồng thời cung cấp thêm những kiến thức sâu, rộng về VSV học ứng dụng, góp phần đẩy mạnh sản xuất, tăng thêm của cải vật chất, cải thiện đời sống cho nhân loại.

Câu hỏi ôn tập

1. Đối tượng nghiên cứu của vi sinh vật học công nghiệp là gì ?
2. Các giai đoạn phát triển của vi sinh vật học công nghiệp ?
3. Giai đoạn phát triển đầu tiên của vi sinh vật học công nghiệp được đánh dấu bằng công trình của Pasteur (1878) chứng minh vi sinh vật là tác nhân của sự lên men, và sau đó là các công trình của:.....(1886) dùng các chủng nấm men thuần khiết trong sản xuất bia, và(1898) phát hiện ra dịch chiết nấm men có khả năng gây ra quá trình lên men rượu (chứng minh lên men thực chất là một quá trình enzyme).
4. Tại sao có người nói vi sinh vật vừa là người bạn thân thiết, vừa là kẻ thù nguy hiểm của con người.

Chương 2

Cơ sở khoa học của vi sinh vật học công nghiệp

I. Đặc điểm cấu tạo và hoạt động sống của vi sinh vật

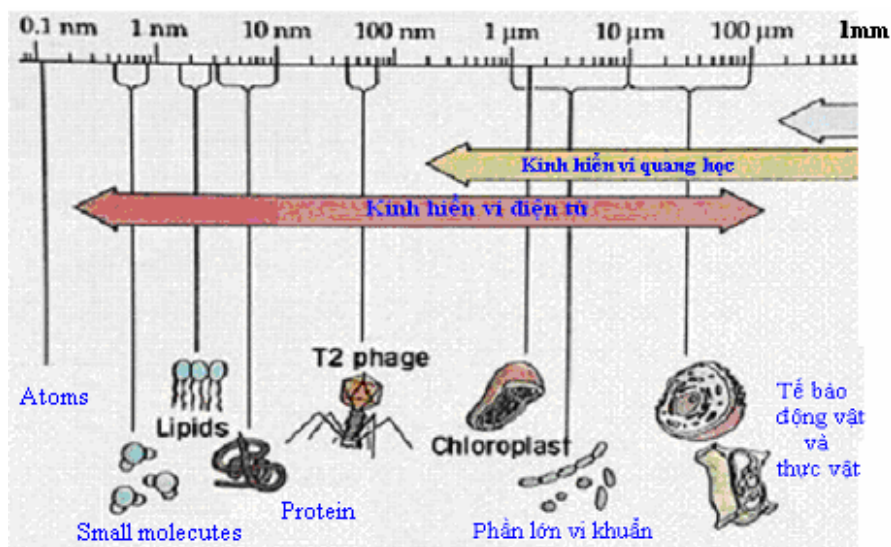
Vi sinh vật (*Microorganisms*) là tên gọi chung để chỉ tất cả các loại sinh vật nhỏ bé, chỉ có thể nhìn rõ dưới kính hiển vi quang học hoặc kính hiển vi điện tử.

Vi sinh vật bao gồm nhiều nhóm khác nhau: Các virus (nhóm chưa có cấu tạo tế bào), các vi khuẩn và vi khuẩn lam (nhóm sinh vật nhân sơ), các vi nấm (nhóm sinh vật nhân chuẩn) và cả một số động vật nguyên sinh cũng như tảo đơn bào cũng thuộc nhóm này.

Giữa các nhóm trên không có mối liên hệ chặt chẽ về mặt hình thái hay phân loại, nhưng người ta gộp chúng lại vì chúng cùng có một số phương pháp nuôi dưỡng, nghiên cứu và hoạt động sinh lý gần giống nhau và đều có các đặc điểm chung.

1. Đặc điểm chung của các vi sinh vật

1.1. Kích thước nhỏ bé



Hình 2.1: Các phương pháp quan sát thế giới sống (từ nguyên tử đến tế bào)

Các Vi sinh vật có kích thước rất bé, đo bằng đơn vị nanomet ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$) như các virus hoặc micromet ($1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$) như các vi khuẩn, vi nấm. Chẳng hạn:

- Các thể thực khuẩn (hay phage) T2, T4, T6 có kích thước biến thiên trong khoảng: (65 - 95) x (25 - 100) nm.
- Các vi khuẩn có kích thước thay đổi trong khoảng (0,2 - 2) x (2,0 - 8,0) μm ; trong đó vi khuẩn *Escherichia coli* rất nhỏ: 0,5 x 2,0 μm .
- Các tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có đường kính 5 - 10 μm .

Kích thước càng bé thì diện tích bề mặt của vi sinh vật trong 1 đơn vị thể tích càng lớn. Chẳng hạn đường kính của 1 cầu khuẩn (*Coccus*) chỉ có 1mm, nhưng nếu xếp đầy chúng thành 1 khối lập phương có thể tích là 1 cm^3 thì chúng có diện tích bề mặt rộng tới ...6 m^2 !

1.2. Hấp thu nhiều, chuyển hóa nhanh

Tuy vi sinh vật có kích thước rất nhỏ bé nhưng chúng lại có năng lực hấp thu và chuyển hoá vượt xa các sinh vật khác. Chẳng hạn 1 vi khuẩn lactic (*Lactobacillus*) trong 1 giờ có thể phân giải được một lượng đường lactose lớn hơn 100-10 000 lần so với khối lượng của chúng, tốc độ tổng hợp protein của nấm men cao gấp 1000 lần so với đậu tương và gấp 100 000 lần so với trâu bò.

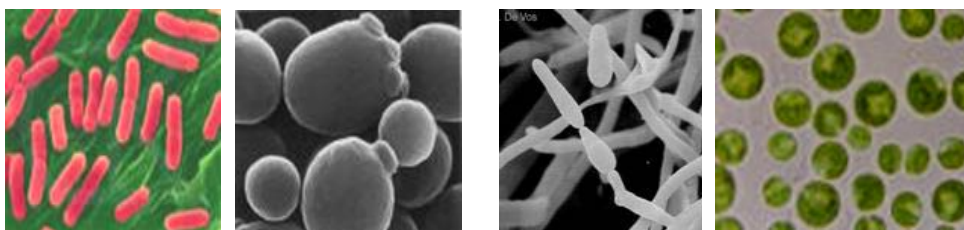
Năng lực chuyển hóa sinh hóa mạnh mẽ của VSV dẫn đến các tác dụng vô cùng to lớn của chúng trong thiên nhiên cũng như trong hoạt động sống của con người.

1.3. Khả năng sinh sản nhanh

Chẳng hạn, 1 trực khuẩn đại tràng (*Escherichia coli*) trong các điều kiện thích hợp chỉ sau 12-20 phút lại phân cắt một lần. Nếu lấy thời gian thế hệ là 20 phút thì mỗi giờ phân cắt 3 lần, sau 24 giờ phân cắt 72 lần và tạo ra (4 722 366. 10¹⁷) tế bào- tương đương với 1 khối lượng ... 4722 tấn. Tất nhiên trong tự nhiên không có được các điều kiện tối ưu như vậy (vì thiếu thức ăn, thiếu oxy, dư thừa các sản phẩm trao đổi chất có hại...). Trong nồi lên men với các điều kiện nuôi cấy thích hợp từ 1 tế bào có thể tạo ra sau 24 giờ khoảng 100 000 000- 1 000 000 000 tế bào.

Thời gian thế hệ của nấm men dài hơn, ví dụ với men rượu (*Saccharomyces cerevisiae*) là 120 phút. Với nhiều vi sinh vật khác còn dài hơn nữa, ví dụ với tảo Tiểu cầu (*Chlorella*) là 7 giờ, với vi khuẩn lam *Nostoc* là 23 giờ...Có thể nói không có sinh vật nào có tốc độ sinh sôi nảy nở nhanh như vi sinh vật.

Đây là đặc điểm quan trọng được con người lợi dụng để sản xuất nhiều sản phẩm hữu ích như rượu, bia, tương chao, mỳ chính, các chất kháng sinh...



Vi khuẩn
Escherichia coli

Nấm men
Saccharomyces cerevisiae

Nấm sợi
Alternaria

Vi tảo
Chlorella

Hình 2.3: Một số vi sinh vật được sử dụng trong VSVHCN

1.4. Khả năng thích ứng rất cao và phát sinh biến dị mạnh

Trong quá trình tiến hoá lâu dài vi sinh vật đã tạo cho mình những cơ chế điều hoà trao đổi chất để thích ứng được với những điều kiện sống rất khác nhau, kể cả những điều kiện hết sức bất lợi mà các sinh vật khác thường không thể tồn tại được. Có vi sinh vật sống được ở môi trường nóng đến 130°C , lạnh đến $0-5^{\circ}\text{C}$, mặn đến nồng độ 32% muối ăn, ngọt đến nồng độ mật ong, pH thấp đến 0,5 hoặc cao đến 10,7, áp suất cao đến trên 1103 at. hay có độ phóng xạ cao đến 750 000 rad. Nhiều vi sinh vật có thể phát triển tốt trong điều kiện tuyệt đối kỵ khí, có loài nấm sợi có thể phát triển dày đặc trong bể ngâm tử thi với nồng độ Formol rất cao...

Vi sinh vật đa số là đơn bào, đơn bội, sinh sản nhanh, số lượng nhiều, tiếp xúc trực tiếp với môi trường sống ... do đó rất dễ dàng phát sinh biến dị. Tần số biến dị thường ở mức $10^{-5}-10^{-10}$. Chỉ sau một thời gian ngắn đã có thể tạo ra một số lượng rất lớn các cá thể biến dị ở các hệ hệ sau. Những biến dị có ích sẽ đưa lại hiệu quả rất lớn trong sản xuất. Nếu như khi mới phát hiện ra penicillin hoạt tính chỉ đạt 20 đơn vị/ml dịch lên men (1943) thì nay đã có thể đạt trên 100 000 đơn vị/ml. Khi mới phát hiện ra acid glutamic chỉ đạt 1-2g/l thì nay đã đạt đến 150g/ml dịch lên men (VEDAN-Việt Nam).

1.5. Phân bố rộng, chủng loại nhiều

Vi sinh vật có mặt ở khắp mọi nơi trên Trái đất, trong không khí, trong đất, trên núi cao, dưới biển sâu, trên cơ thể, người, động vật, thực vật, trong thực phẩm, trên mọi đồ vật...

Vi sinh vật tham gia tích cực vào việc thực hiện các vòng tuần hoàn sinh-địa-hoá học (biogeochemical cycles) như vòng tuần hoàn C, vòng tuần hoàn N, vòng tuần hoàn P, vòng tuần hoàn S, vòng tuần hoàn Fe...

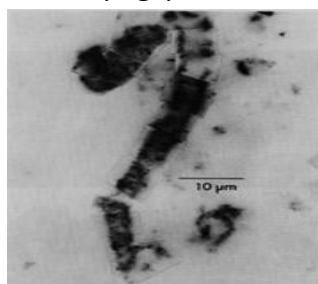
Trong nước vi sinh vật có nhiều ở vùng duyên hải (littoral zone), vùng nước nông (limnetic zone) và ngay cả ở vùng nước sâu (profundal zone), vùng đáy ao hồ (benthic zone)...

Trong không khí thì càng lên cao số lượng vi sinh vật càng ít. Số lượng vi sinh vật trong không khí ở các khu dân cư đông đúc cao hơn rất nhiều so với không khí trên mặt biển và nhất là trong không khí ở Bắc cực, Nam cực...

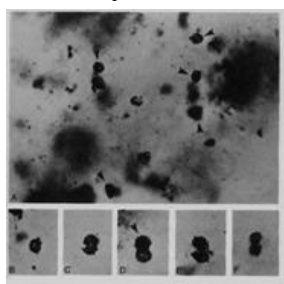
Hầu như không có hợp chất carbon nào (trừ kim cương, đá graphít...) mà không là thức ăn của những nhóm vi sinh vật nào đó (kể cả dầu mỏ, khí thiên nhiên, formol, dioxin...). Vi sinh vật có rất phong phú các kiểu dinh dưỡng khác nhau: quang tự dưỡng (photoautotrophy), quang dị dưỡng (photoheterotrophy), hoá tự dưỡng (chemoautotrophy), hoá dị dưỡng (chemoheterotrophy), tự dưỡng chất sinh trưởng (auxoautotroph), dị dưỡng chất sinh trưởng (auxoheterotroph)...

1.6. Là sinh vật xuất hiện đầu tiên trên trái đất

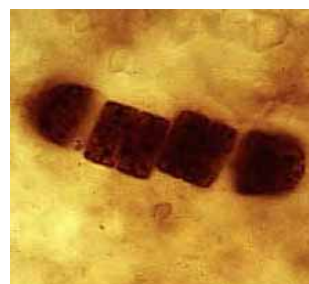
Trái đất hình thành cách đây 4,6 tỷ năm nhưng cho đến nay mới chỉ tìm thấy dấu vết của sự sống từ cách đây khoảng 3,5 tỷ năm. Đó là các vi sinh vật hoá thạch còn để lại vết tích trong các tầng đá cổ. Vi sinh vật hoá thạch cổ xưa nhất đã được phát hiện là những dạng rất giống với Vi khuẩn lam ngày nay. Chúng được J. William Schopf tìm thấy tại các tầng đá cổ ở miền Tây Australia. Chúng có dạng đa bào đơn giản, nổi thành sợi dài đến vài chục mm với đường kính khoảng 1-2 mm và có thành tế bào khá dày. Trước đó các nhà khoa học cũng đã tìm thấy vết tích của chi *Gloeodiniopsis* có niên đại cách đây 1,5 tỷ năm và vết tích của chi *Palaeolyngbya* có niên đại cách đây 950 triệu năm.



Vết tích vi khuẩn lam
Cyanobacteria
cách đây 3,5 tỷ năm



Vết tích
Gloeodiniopsis
cách đây 1,5 tỷ năm



Vết tích
Palaeolyngbya
cách đây 950 triệu năm

Hình 1.2: Các vi sinh vật hoá thạch cổ xưa
(còn để lại vết tích trong các tầng đá cổ ở miền Tây Australia)

2. Những điểm khác biệt giữa các tế bào sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn

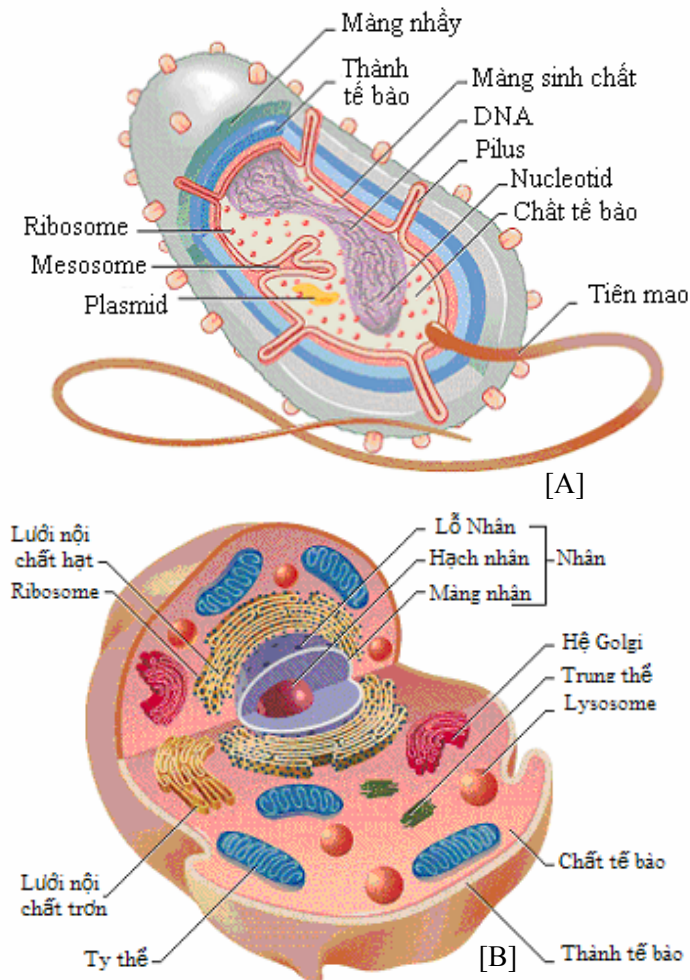
Các sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn có một số đặc điểm giống nhau: đều có tế bào là đơn vị cấu tạo, chức năng là đơn vị di truyền; vật chất di truyền trong các tế bào là DNA xoắn kép cùng các sản phẩm của nó là RNA, protein...

Tuy nhiên giữa chúng có nhiều nét sai khác rất rõ. Thậm chí ngay cả các tế bào nhân chuẩn nhỏ nhất cũng khác biệt một cách căn bản so với các tế bào nhân sơ trong cấu tạo, cách tổ chức thông tin di truyền cũng như trong các kiểu tổng hợp RNA và protein của chúng (bảng 2.1).

Bảng 2.1: Những sai khác giữa các tế bào sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn

Đặc điểm	Sinh vật nhân sơ	Sinh vật nhân chuẩn
<p>1. Tổ chức di truyền</p> <ul style="list-style-type: none"> - Màng nhân - Số nhiễm sắc thể khác nhau - Các nhiễm sắc thể chứa histon - Hạch nhân - Trao đổi di truyền 	<p>Không có</p> <p>1</p> <p>Không có</p> <p>Không có</p> <p>Không có</p> <p>Một chiều, qua plasmid</p>	<p>Có</p> <p>> 1</p> <p>Có</p> <p>Có</p> <p>Bằng sự kết hợp giao tử</p>
<p>2. Các cấu trúc của tế bào</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lưới nội chất - Bộ máy Golgi - Các lysosome - Các ty thể - Các lạp thể - Kích thước ribosome - Sợi thoi vô sắc - Vách tế bào chứa peptidoglycan 	<p>Không có</p> <p>Không có</p> <p>Không có</p> <p>Không có</p> <p>Không có</p> <p>70 S</p> <p>Không có</p> <p>Có, ngoại trừ Mycoplasma và vi khuẩn cổ</p>	<p>Có</p> <p>Có</p> <p>Có</p> <p>Có</p> <p>Có ở thực vật</p> <p>80 S</p> <p>Có</p> <p>Không có</p>
<p>3. Một số đặc tính chức năng</p> <ul style="list-style-type: none"> - Thực bào - Ẩm bào (uống bào) - Vị trí vận chuyển điện tử - Dòng tế bào chất 	<p>Không có</p> <p>Không có</p> <p>Màng tế bào</p> <p>Không có</p>	<p>Đôi khi có</p> <p>Đôi khi có</p> <p>Màng bào quan</p> <p>Có</p>

(Nguồn: Stanier et al, 1976; dẫn theo Watson et al, 1987. p. 97)



Hình 2.2: Cấu trúc tế bào vi khuẩn [A] ; tế bào động vật [B]

II. Cơ sở hóa sinh của vi sinh vật học công nghiệp

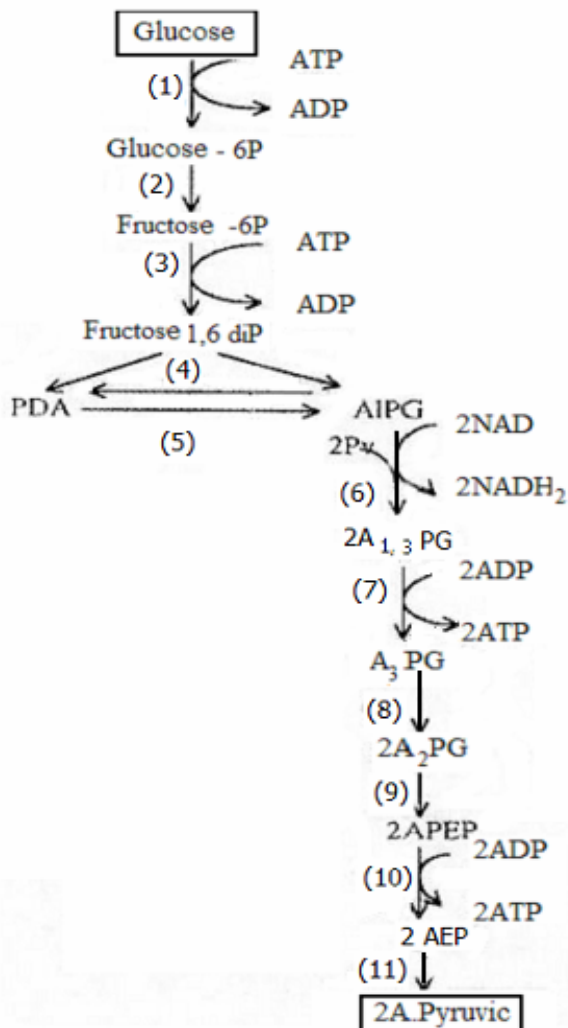
1. Đường phân.

Đường phân là quá trình phân hủy phân tử glucose ($C_6H_{12}O_6$) tạo thành acid pyruvic và $NADH + H^+$. Điểm đặc biệt của đường phân là không phải phân tử glucose tự do bị phân hủy mà phân tử đường glucose đã được hoạt hoá bởi việc gắn gốc P vào tạo dạng đường phosphate.

Quá trình đường phân gồm 2 giai đoạn với nhiều phản ứng phức tạp:

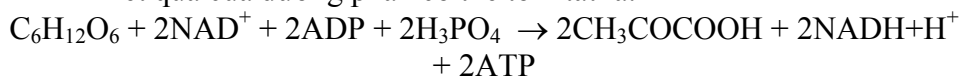
- Phân cắt phân tử glucose thành 2 phân tử triose là AIPG và PDA.

- Biến đổi 2 phân tử triose thành 2 phân tử acid pyruvic.
Quá trình đường phân có thể tóm tắt theo sơ đồ sau:

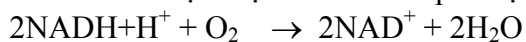


Hình 2.3. Sơ đồ đường phân

Kết quả của đường phân có thể tóm tắt là:



Trong hô hấp hiếu khí, acid pyruvic tiếp tục phân huỷ qua chu trình Krebs, còn 2NADH+H thực hiện chuỗi hô hấp để tạo H₂O.



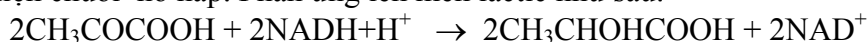
Phản ứng này kèm theo việc tổng hợp được 6ATP qua quá trình phosphoryl hoá.

Vậy kết quả của đường phân trong hô hấp hiếu khí là:



Đồng thời tạo ra được 8 ATP

Trong hô hấp kỵ khí, $2\text{NADH} + \text{H}^+$ sẽ được dùng khử $\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H}$ (trong lên men lactic) hay khử CH_3CHO (trong lên men rượu) nên không thực hiện chuỗi hô hấp. Phản ứng lên men lactic như sau:



Vậy kết quả của đường phân trong hô hấp kỵ khí là



Quá trình này chỉ tạo ra được 2ATP

2. Chu trình Krebs.

Sản phẩm của đường phân là acid pyruvic sẽ được decarboxyl hóa tạo acetyl-CoA và một phân tử CO_2 . Acetyl-CoA tiếp tục phân huỷ qua chu trình Krebs trong hô hấp kỵ khí.

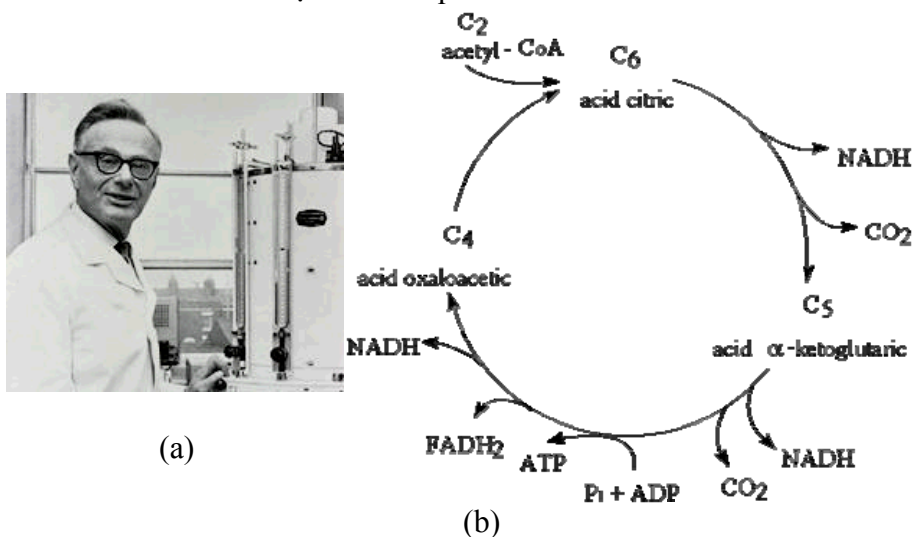
Quá trình phân huỷ acid pyruvic qua chu trình Krebs được thực hiện tại ty thể do nhiều hệ enzyme xúc tác.

Chu trình xảy ra qua 2 giai đoạn:

- Phân huỷ acid pyruvic. Trong quá trình này sẽ tạo ra nhiều coenzyme khử ($\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2).

- Thực hiện chuỗi hô hấp qua các coenzyme khử được tạo ra do phân huỷ acid pyruvic.

Chu trình Krebs được tóm tắt qua sơ đồ sau:

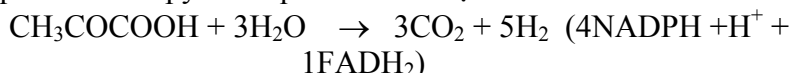


(a)

(b)

**Hình 2.4: a) Krebs, Sir Hans Adolf (1900-1981);
b) Sơ đồ minh họa chu trình Krebs**

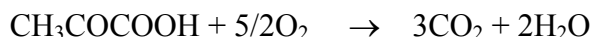
Từ phân tử acid pyruvic qua chu trình tạo ra



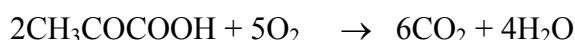
Các coenzyme (NADH + H⁺, FADH₂) thực hiện chuỗi hô hấp:



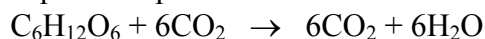
Vậy kết quả chu trình sẽ là:



Từ 1 phân tử glucose qua đường phân tạo ra 2 phân tử acid pyruvic với kết quả đã phân tích ở trên. Từ 2 acid pyruvic qua chu trình Krebs tạo ra:



Kết hợp với giai đoạn đường phân, ta được kết quả tổng quát của quá trình phân huỷ glucose qua hô hấp hiếu khí là:



Trong quá trình phân huỷ acid pyruvic qua chu trình Krebs sẽ tạo được 4 NADH+H⁺ và 1 FADH₂. Các coenzyme khử này qua chuỗi hô hấp sẽ tổng hợp ATP với kết quả:

-4NADFH+H⁺ tạo ra 12 ATP

-1FADH₂ tạo ra 2ATP

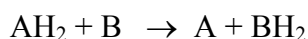
-Trong chu trình tạo ra 1ATP.

Như vậy, phân huỷ 1 phân tử acid pyruvic qua chu trình Krebs tạo ra 15ATP. Nếu phân huỷ 2 acid pyruvic sẽ tạo ra 30ATP, kết hợp với giai đoạn đường phân thì phân huỷ 1 phân tử glucose tạo ra được 38ATP.

3. Chuỗi hô hấp và phosphoryl hoá

3.1. Chuỗi hô hấp

Trong tế bào sự trao đổi năng lượng luôn gắn với phản ứng oxi hoá-khử. Trong hệ thống oxi hoá khử hai phản ứng oxi hoá và khử luôn đi kèm nhau.



Trong tế bào để phản ứng trên xảy ra thường cần hệ thống các chất truyền điện tử và H⁺ trung gian, đó là hệ enzyme oxi hoá-khử. Các enzyme này cùng với cơ chất hoạt động trong một chuỗi phản ứng chặt chẽ để chuyển H₂ từ cơ chất đến O₂ tạo nên chuỗi hô hấp.

Khởi đầu của chuỗi là cơ chất dạng khử AH₂. AH₂ làm nhiệm vụ là chất cho H₂. H₂ tách ra từ cơ chất được hệ thống các coenzyme của hệ enzyme oxi hoá-khử vận chuyển đến khâu cuối cùng của chuỗi là O₂ để khử O₂ tạo phân tử H₂O.

Trong chuỗi hô hấp điện tử được chuyển từ cơ chất là chất có năng lượng cao nhất đến oxi có năng lượng thấp nhất, thế oxi hoá cao nhất (+0,81V). Giữa hai thành phần trên là các coenzyme có thể oxi hoá-khử trung gian, thế khử giảm dần từ cơ chất đến O₂. Bởi vậy chuỗi hô hấp là quá trình giải phóng năng lượng.

Năng lượng thải ra trong chuỗi hô hấp được xác định theo phương trình:

$$\Delta G' = -nF \cdot \Delta E^{\circ} \text{ (kCal/mol)}$$

Trong đó:

$\Delta G'$: mức biến đổi năng lượng của phản ứng oxi hoá-khử

n: số điện tử trao đổi trong phản ứng.

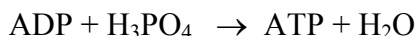
F: số Faraday (23,06) (hằng số Faraday).

ΔE° : chênh lệch thế oxi hoá-khử của 2 chất tham gia phản ứng.

Với phương trình trên có thể xác định được năng lượng thải ra của từng phản ứng trong chuỗi trên cơ sở thế oxi hoá-khử của các hệ đã xác định.

3.2. Phosphoryl hoá

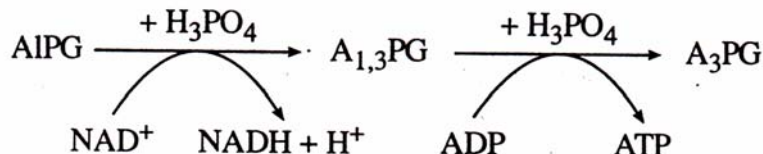
Quá trình tổng hợp ATP trong tế bào là quá trình phosphoryl hoá:



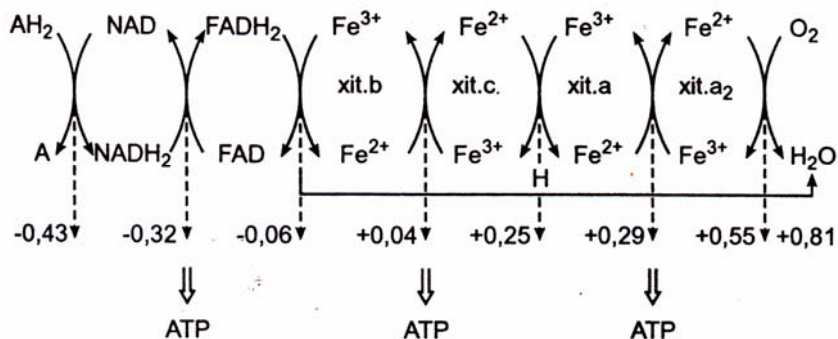
Phản ứng này đòi hỏi năng lượng tương đương năng lượng của liên kết cao năng thứ nhất (7,3 Kcal/mol - trong điều kiện chuẩn). Tùy nguồn năng lượng cung cấp mà có các hình thức phosphoryl hoá quang hóa (xảy ra trong quang hợp) và phosphoryl hóa oxi hóa (xảy ra trong hô hấp).

Trong hô hấp có hai hình thức tổng hợp ATP

- Phosphoryl hoá mức cơ chất: là quá trình tổng hợp ATP nhờ năng lượng thải ra của phản ứng oxi hoá trực tiếp cơ chất.



- Phosphoryl hoá qua chuỗi hô hấp: là quá trình tổng hợp ATP nhờ năng lượng thải ra của các phản ứng trong chuỗi hô hấp. Chuỗi hô hấp xảy ra nhiều phản ứng, phản ứng nào thoả mãn các điều kiện của quá trình phosphoryl hoá thì quá trình tổng hợp ATP xảy ra ở đó. Trong chuỗi hô hấp có 3 vị trí đủ điều kiện để tổng hợp ATP. Như vậy, cứ vận chuyển được H₂ từ cơ chất đến O₂ sẽ tạo ra được 3 ATP cho tế bào.



4. Sự trao đổi protein, lipid, acid nucleic trong tế bào vi sinh vật

4.1. Sự trao đổi protein

4.1.1. Sự tổng hợp protein

Tổng hợp protein là quá trình rất phức tạp nhưng có vai trò rất quan trọng trong hoạt động sống của VSV. Con đường tổng hợp protein chủ yếu là tổng hợp theo cơ chế khuôn, tức là quá trình giải mã. Phân tử protein được mã hoá trong gene theo mã bộ ba: cứ 3 nucleotide trên mạch khuôn của gene mã hoá một amino acids trên cấu trúc bậc I của protein. Bộ ba mã gốc trên gene được phiên mã sang bộ mã hoá trên mRNA thông qua quá trình phiên mã - tổng hợp mRNA. Từ mRNA là khuôn chuỗi polypeptid-protein bậc I sẽ được tổng hợp tại ribosome.

Quá trình tổng hợp protein xảy ra qua nhiều giai đoạn:

- Hoạt hoá amino acids nhờ ATP và gắn amino acids vào tRNA;
- Tổng hợp chuỗi polypeptid tại ribosome;
- Hoàn thiện phân tử protein.

4.1.2. Phân huỷ protein

Protein trong tế bào VSV luôn luôn được đổi mới. Bởi vậy quá trình phân huỷ protein xảy ra thường xuyên cùng với quá trình tổng hợp. Sự phân huỷ protein xảy ra qua 2 giai đoạn

- Thủy phân protein thành các amino acids nhờ enzyme thủy phân protease.
- Các amino acids không cần thiết sẽ bị phân huỷ tiếp hay chuyển hoá thành các amino acids cần thiết khác.

Sự phân huỷ amino acids xảy ra bằng nhiều con đường: khử amin, khử cacboxyl, chuyển vị amin.

4.2. Trao đổi acid nucleic.

4.2.1. Tổng hợp acid nucleic

Tổng hợp acid nucleic là quá trình quan trọng trong cơ chế truyền đạt thông tin di truyền. Tổng hợp acid nucleic gồm tổng hợp DNA và quá trình tổng hợp RNA.

* Sao chép DNA: Từ 1 phân tử DNA gốc qua sao chép tạo ra 2 phân tử DNA mới hoàn toàn giống nhau và giống DNA gốc. Quá trình sao chép xảy ra bằng nhiều cơ chế trong đó cơ chế bán bảo thủ là phổ biến và quan trọng nhất.

Trên DNA khuôn, hai chuỗi có chiều ngược nhau do vậy quá trình sao chép xảy ra trên hai chuỗi khác nhau.

- Trên chuỗi có chiều 3'-5' của DNA gốc: sau khi enzyme helicase tháo xoắn, tách 2 mạch của phân tử DNA gốc, trên mạch 3'-5' tiến hành tổng hợp một đoạn RNA mới ngắn nhờ primase xúc tác. Từ RNA mới các nucleotide mới tiếp tục đến kéo dài chuỗi theo chiều 5'-3' nhờ DNA-polymerase III xúc tác. Quá trình nối các nucleotide tự do vào mạch mới theo nguyên tắc bổ sung với mạch gốc. Sau khi tổng hợp bổ sung xong cả mạch, đoạn RNA mới bị cắt bỏ và thay vào đó bằng mạch DNA tương ứng nhờ DNA-polymerase I xúc tác.

- Trên mạch có chiều 5'-3' của DNA gốc: do trên mạch này chiều tổng hợp mạch mới ngược chiều tháo xoắn nên diễn ra phức tạp hơn. Quá trình tổng hợp mạch bổ sung xảy ra theo từng đoạn ngắn. Cứ mở xoắn một đoạn vài trăm nucleotide quá trình tổng hợp xảy ra ngược chiều tháo xoắn theo tuần tự tổng hợp đoạn RNA mới rồi tổng hợp tiếp đoạn DNA. Tổng hợp xong đoạn này, tháo xoắn tiếp và lại tổng hợp như đoạn trước đó. Cứ như vậy trên mạch này DNA được tổng hợp theo từng đoạn ngắn-đoạn Okazaki. Sau đó các RNA mới được cắt bỏ, thay vào các đoạn DNA tương ứng, nhờ ligase nối các đoạn Okazaki lại.

* Phiên mã: xảy ra qua 2 giai đoạn. Giai đoạn đầu phiên mã từ gene thành pro RNA. Sau đó từ pro-RNA sẽ biến đổi thành mRNA tương ứng. RNA tổng hợp trên DNA khuôn hay trên RNA khuôn (với virus chứa RNA).

DNA khuôn nhờ RNA polymerase tháo xoắn cục bộ tạo nên bóng phiên mã. Bóng phiên mã có chiều dài 30 cặp nucleotide. Nhờ yếu tố sigma (δ) của RNA-polymerase nhận biết điểm mở đầu và chuỗi DNA dùng làm khuôn. Nhờ lõi enzyme polymerase tiến hành tổng hợp chuỗi RNA bổ sung với chuỗi khuôn trên DNA. Quá trình tiếp diễn cho đến khi yếu tố rho (ρ) nhận biết điểm kết thúc trên DNA và kết thúc quá trình

tổng hợp chuỗi RNA bổ sung. RNA tách khỏi DNA khuôn tạo ra pro-RNA.

Từ proRNA qua nhiều biến đổi phức tạp để tạo mRNA trưởng thành.

- Nối thêm mũ;

- Nối thêm đuôi;

- Nhờ enzyme cắt ghép tiến hành cắt bỏ các đoạn không mã hoá intron (I) và nối các đoạn mã hoá exon (E) lại với nhau sẽ tạo ra mRNA.

Kết quả là từ 1 đoạn DNA (gene) tạo nên một phân tử mRNA. Thành phần trật tự các nucleotide trên các đoạn exon của DNA qui định thành phần, trật tự các ribonucleotide trên mRNA.

4.2.2. Phân huỷ acid nucleic

Trong tế bào acid nucleic luôn biến đổi, nhất là các phân tử RNA. Đời sống các phân tử mRNA, tRNA rất ngắn. Chúng thường xuyên bị phân huỷ để thay thế các loại mới.

Sự phân huỷ acid nucleic xảy ra qua 3 giai đoạn:

- Thủy phân acid nucleic thành nucleotide nhờ các nuclease tương ứng xúc tác;

- Thủy phân nucleotide thành các đơn phân (base-nitrogen, đường pentose và H_3PO_4) nhờ enzyme thủy phân nucleotidase xúc tác;

- Biến đổi tiếp base-nitrogen, đường pentose thành các sản phẩm khác nhau.

4.3. Trao đổi lipid

4.3.1. Tổng hợp lipid

Trong tế bào lipid phổ biến nhất là chất béo. Chất béo được tổng hợp từ glycerin và các acid béo qua các bước:

- Glycerin + ATP \rightarrow glycerol-P + ADP

- Glycerol-P + acid béo 1 \rightarrow monoglyceric.

- Monoglyceric + acid béo 2 \rightarrow diglyceric.

- Diglyceric + acid béo 3 \rightarrow Triglyceric + H_3PO_4 .

4.3.2. Phân huỷ lipid.

Quá trình phân huỷ chất béo xảy ra qua 2 giai đoạn

- Thủy phân acid béo thành glycerin và các acid béo.

- Phân huỷ tiếp glycerin và các acid béo.

- + Glycerin + ATP \rightarrow glycerol-P + ADP

+ Glycerol-P → AIGP → đường phân.

Các acid béo phân huỷ bằng nhiều con đường trong đó phổ biến nhất là phân huỷ theo con đường β -oxi hoá. Các acid béo phân huỷ theo con đường β -oxi hoá tạo nên các acetyl-CoA. Từ acetyl-CoA phân huỷ tiếp bằng chu trình Krebs.

Sự phân huỷ acid béo tạo ra năng lượng ATP khá lớn cho tế bào VSV. Ví dụ khi phân huỷ acid palmitic tạo ra được 130 ATP.

III. Cơ sở di truyền vi sinh vật

Như chúng ta đều biết, cho đến đầu thập niên 1940 các VSV mới bắt đầu được sử dụng trong nghiên cứu di truyền học. Từ đây hình thành nên di truyền học VSV và di truyền sinh-hóa, mở đường cho sự ra đời của di truyền học phân tử (1953) và công nghệ DNA tái tổ hợp sau này (1972).

1. Di truyền học virus

Theo R.M. Atlas (1994) thì “Virus là một thực thể vô bào có chứa một lượng tối thiểu protein và acid nucleic mà chỉ có thể sao chép sau khi đã xâm nhập vào những tế bào sống chuyên biệt. Chúng không có quá trình trao đổi chất nội tại, sự sao chép dựa vào việc điều khiển trao đổi chất tế bào nhờ hệ gene của virus. Trong tế bào chủ các thành phần của virus được tổng hợp riêng rẽ, rồi lắp ráp thành dạng thành thực”.

1.1. Đặc điểm và cấu tạo của virus

- Virus là các thể sống chưa có cấu tạo tế bào, ký sinh nội bào bắt buộc. Mỗi kiểu virus có một phạm vi vật chủ nhất định. Chúng nhận diện tế bào chủ theo nguyên tắc “ổ khóa và chìa khóa” giữa các protein vỏ của nó với các điểm nhận trên bề mặt màng tế bào. Các virus của vi khuẩn gọi là *bacteriophage* (thể thực khuẩn), gọi tắt là *phage*.

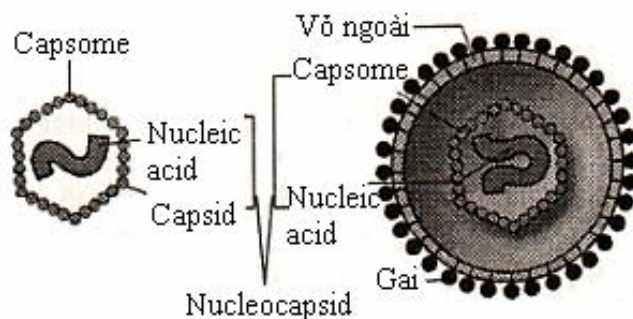
- Virus không có hệ thống sinh năng lượng, không có ribosome, không có hệ thống biến dưỡng riêng và do vậy các virus không tăng trưởng.

- Virus không tạo màng lipid riêng;

- Virus không có khung sườn tế bào;

- Virus không bị tác động bởi các chất kháng sinh;

- Mỗi hạt virus thường gồm 1 phân tử acid nucleic ở trong, gọi là lõi, và lớp vỏ (*capsid*) bao bên ngoài là các protein (tổ hợp theo các đơn vị gọi là *capsomere*), có mang các thành phần kháng nguyên. Kết cấu cơ bản đó gọi là *nucleocapsid*.



Hình 2.5. Virus trần và virus có vỏ ngoài

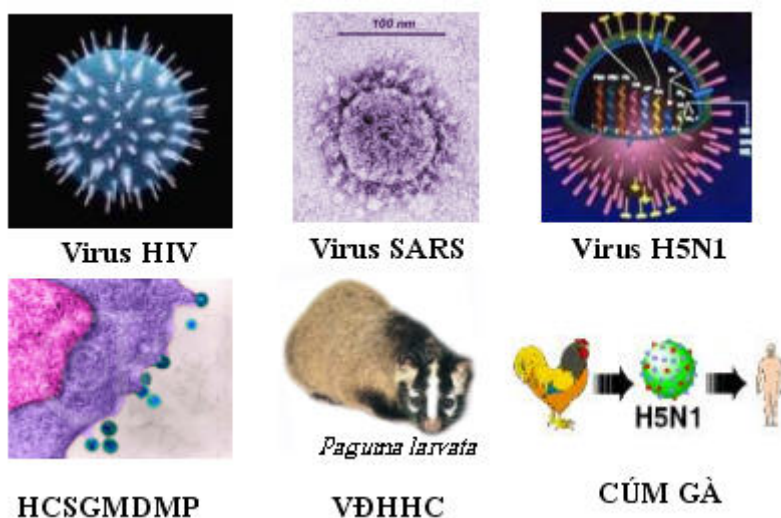
Hệ gene của virus rất đặc biệt (bảng 2.2), mỗi loại virus chỉ chứa một loại acid nucleic, hoặc là DNA hoặc là RNA, chuỗi đơn hay chuỗi kép, dạng sợi thẳng hay dạng vòng. Virus bé nhất khoảng 4 gene và lớn nhất khoảng vài trăm gene.

Một số virus ngoài vỏ protein còn có thêm vài lớp màng bao khác gồm (protein + phospholipid) bắt nguồn từ màng sinh chất tế bào chủ, hoặc cả (protein + glycoprotein) từ virus HIV, virus SARS, H5N1 là một ví dụ.

(HIV gây hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (HCSGMDMP); Virus SARS gây hội chứng viêm đường hô hấp cấp (VĐHHC); H5N1 gây bệnh cúm gà)

Bảng 2.2. Phân biệt quá trình truyền bệnh AIDS, SARS, CÚM GÀ

Bệnh	Acid nucleic	Tên virus	Vật chủ	Phương thức lan truyền
AIDS	RNA	HIV1, HIV2	Người, khi	-Qua máu -Quan hệ tình dục -Mẹ sang con
SARS	RNA	SARS	Cây hương, người	-Hô hấp
CÚM GÀ	RNA	H5N1	Gia cầm	-Hô hấp, tiêu hóa



Hình 2.6: Virus và đường truyền bệnh AIDS, SARS, CÚM GÀ
Bảng 2.3: Dạng acid nucleic và kích thước hệ gene một số virus

Virus	Vật chủ	Dạng acid nucleic	Kích thước hệ gene (số cặp base)
Phage MS2, f2, R17	<i>E. coli</i>	RNA sợi đơn-thẳng	3.569
Virus TMV	Thuốc lá	“	~ 6.000
Các Reovirus	Thú	RNA sợi kép-thẳng	~ 50.000
Phage Φ X174	<i>E. coli</i>	DNA sợi đơn-vòng	5.375
Virus SV40	Thú	DNA sợi kép-vòng	5.243
Baculovirus	Côn trùng	“	$(100-150) \times 10^3$
Adenovirus Ad5	Người	DNA sợi kép-thẳng	~ 36.000
Phage λ (Lambda)	<i>E. coli</i>	“	48.502
Phage T ₂ , T ₄	<i>E. coli</i>	“	~ 200.000

Ghi chú: Các virus gây bệnh ở người và động vật có hệ gene chủ yếu là DNA sợi kép-thẳng, như: các virus thuộc họ *Adenoviridae* gây bệnh đường hô hấp, họ *Herpesviridae* gây mụn rộp herpes ở người, bệnh đậu gà, họ *Poxviridae* gây đậu mùa, đậu bò ... Hoặc là RNA sợi đơn-thẳng, như các virus thuộc họ *Retroviridae*

gây ung thư, AIDS, bạch cầu ..., họ *Paramyxoviridae* gây sởi, quai bị, bệnh gà toi, họ *Rhabdoviridae* với bệnh dại, họ *Orthomyxoviridae* với bệnh cúm, họ *Picornaviridae* với các bệnh viêm tủy xám, viêm gan A do virus, bệnh lở mồm long móng ở trâu bò...

1.2. Phương thức sinh sản và vòng đời của virus

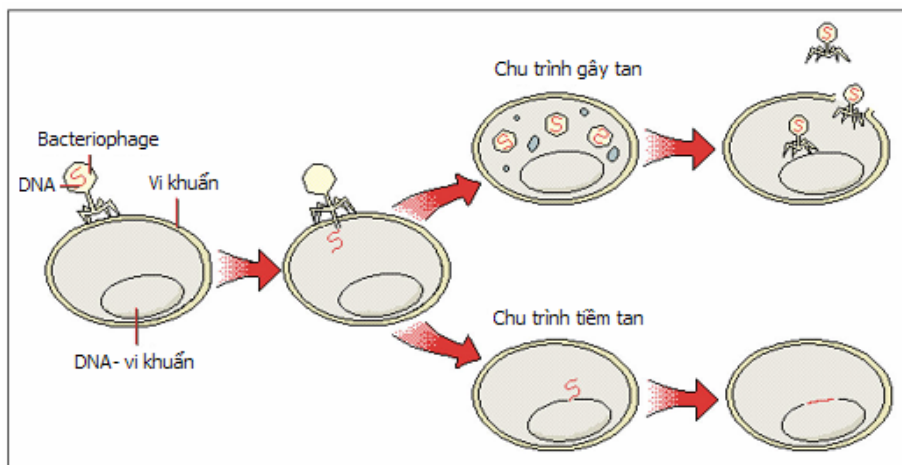
Ở đây chúng ta sẽ tìm hiểu những nét chung nhất trong chu trình sống-sinh sản của virus qua đại diện là các phage ký sinh ở *E. coli*. Thông thường được chia làm 5 giai đoạn: Hấp thụ → Xâm nhập → Sao chép → Thành thực → Phóng thích, hoặc 3 giai đoạn như sau:

(1) Phage bám bằng phần đuôi trên bề mặt tế bào vi khuẩn và tiết enzyme tiêu hủy vách tế bào;

(2) Phage dùng phần đuôi để tiêm lõi acid nucleic (DNA) vào trong tế bào chủ;

(3) Trong tế bào chủ, tùy loại DNA các phage khác nhau mà có thể diễn ra một trong hai trạng thái: gây tan hoặc tiềm tan.

+ Đối với các *phage độc* như T_2 và T_4 , lúc này DNA của chúng sẽ sao chép nhiều lần và tổng hợp đủ các protein cần cho tạo vỏ và đuôi, để sau đó chúng lắp ráp với nhau tạo ra các phage thế hệ con. Sau đó, dưới tác dụng của lysozyme làm tan tế bào chủ và phóng thích chừng 100-200 phage con.

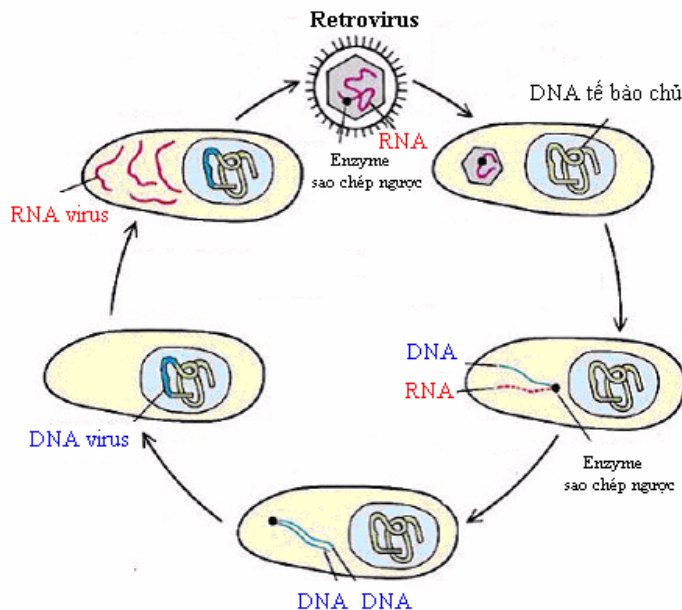


Hình 2.7: Chu trình hoạt động gây tan (lytic cycle) và tiềm tan (lysogenic cycle) của phage λ ở *E. coli*.

+ Đối với *phage ôn hòa* như lambda (λ), có thể gây tan hoặc không gây tan. Trường hợp tiềm tan (lysogeny) xảy ra là do: sau khi chui vào tế bào chủ, DNA của phage tự đóng vòng (nhờ có các đầu dính và xúc tác

của ligase), rồi xen vào nhiễm sắc thể chính của vi khuẩn bằng sự tái tổ hợp vị trí đặc hiệu và nó tiềm ẩn ở trạng thái đó, gọi là tiền virus (prophage). Tuy nhiên, các prophage này có thể hoạt động trở lại để gây tan. Chẳng hạn, nếu có tác động của tia UV gây tổn thương nhiễm sắc thể vật chủ thì một trao đổi chéo ngược trở lại sẽ xảy ra, nhờ vậy DNA - phage được tách ra khỏi nhiễm sắc thể vi khuẩn chủ và bắt đầu chu trình sinh sản gây tan.

+ Đối với virus thuộc nhóm retrovirus (virus gây ung thư, gây bệnh AIDS, gây bệnh bạch cầu tế bào T...) có chu trình sống điển hình (hình 2.6).



Hình 2.8: Chu trình sống của virus nhóm retrovirus

Ở đây cần để ý hai điểm quan trọng liên quan công nghệ gene:

+ *Tái tổ hợp*:

Khi có nhiều virus nhiễm đồng thời tế bào chủ thì giữa chúng xảy ra sự trao đổi gene, tạo ra các thể tái tổ hợp. Nhờ vậy có thể lập bản đồ di truyền ở virus. Dạng tái tổ hợp điển đặc hiệu để gắn DNA phage vào nhiễm sắc thể vi khuẩn chủ và tách ra (khi bị cảm ứng tia UV) được xúc tác bởi cặp enzyme tương ứng là *integrase* và *excisionase*. Lợi dụng đặc điểm này, người ta sử dụng phage làm vector trong kỹ thuật gene.

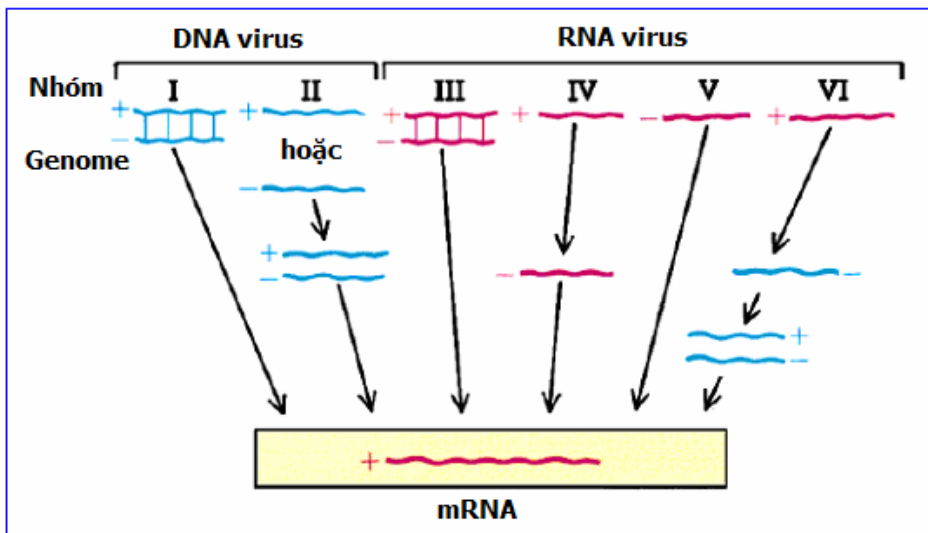
+ *Sao chép*:

Do vật liệu di truyền của các virus rất đa dạng, nên sự sao chép/sao chép của chúng cũng khác nhau, theo 3 con đường:

DNA → DNA; RNA → RNA; và RNA → cDNA kép → RNA.

Trong đó, các retrovirus có hệ gene RNA gây ung thư, bệnh AIDS (HIV), bệnh bạch cầu tế bào T (HTLV-I)...đều có chứa enzyme phiên mã ngược (*reverse transcriptase*) để tổng hợp cDNA sợi đơn trên khuôn RNA của nó, rồi sau đó là cDNA sợi kép để có thể xen vào nhiễm sắc thể vật chủ ở trạng thái provirus ổn định. Lợi dụng enzyme này để tổng hợp và tạo dòng cDNA.

+ *Phiên mã*:



Hình 2.8: Sơ đồ minh họa quá trình phiên mã ở một số virus

2. Di truyền học vi khuẩn

2.1. Vật liệu di truyền của vi khuẩn

Vi khuẩn là một nhóm lớn của Prokaryote, có cấu trúc tế bào nhưng chưa có nhân điển hình. Bộ máy di truyền của vi khuẩn phức tạp hơn virus nhiều, thường gồm 1 phân tử DNA sợi kép-vòng kích thước lớn (ví dụ ở *E. coli* là $4,6 \times 10^6$ cặp base). Nó liên kết với các protein tương tự histon tạo thành cấu trúc siêu xoắn tập trung ở một vùng gọi là *vùng nhân* (nucleoid). Và trong dịch bào có rất nhiều phân tử DNA trần sợi kép, dạng vòng, kích thước bé bằng khoảng 0,05-10% kích thước nhiễm sắc thể vi khuẩn và có khả năng sao chép độc lập, gọi là các *plasmid*.

Ở *E. coli* có nhiều loại plasmid với tính chất và số bản sao có mặt khác nhau trong tế bào, ở đây đề cập 2 loại:

- Các plasmid kháng thuốc, gọi là *plasmid R* (R-resistance), thường có mang nhiều gene mã hóa các enzyme có khả năng phân hủy chất kháng

sinh tương ứng có mặt trong môi trường. Ví dụ, plasmid pBR322 (4362 cặp base) có 2 gene kháng ampicilline (Amp^R) và tetracycline (Tet^R).

Loại plasmid này thuộc loại sao chép mạnh, có thể tạo ra khoảng 50 bản sao (copies) trong một tế bào. Đó là những đặc điểm chính mà người ta lợi dụng nó làm công cụ đặc lực (vector) trong kỹ thuật di truyền.

- Các plasmid giới tính, tức *plasmid F* (F-fertility) có chứa các gene truyền và bắt buộc tham gia vào quá trình tiếp hợp ở *E. coli*. Các tế bào vi khuẩn có mang plasmid F, ký hiệu F^+ và tế bào không có F, ký hiệu F^- . Nhân tố F có kích thước lớn (khoảng 100.000 cặp nucleotide), được sao chép chỉ 1 lần trong chu kỳ tế bào (nhờ xen vào trong nhiễm sắc thể vi khuẩn) và phân ly về cả 2 tế bào con. Cho nên trong 1 tế bào F^+ điển hình thường có 1-2 bản sao của plasmid F.

2.2. Ba phương thức trao đổi vật liệu di truyền ở vi khuẩn

Lần đầu tiên, năm 1946 Lederberg và Tatum phát hiện ra sự tái tổ hợp ở vi khuẩn. Cho đến nay, ta biết rằng ở vi khuẩn có các quá trình sinh sản tương đương sinh sản hữu tính, gọi là *cận hữu tính* (parasexuality), đó là: *tiếp hợp*, *biến nạp* và *tái nạp*. Các quá trình này có các đặc điểm sau:

(1) Truyền thông tin 1 chiều từ tế bào cho (donor) sang tế bào nhận (recipient);

(2) Tạo ra hợp tử từng phần (merozygote), vì thể cho chỉ truyền sang thể nhận một phần bộ gene của nó;

(3) Vì bộ gene chỉ là một phân tử DNA trần nên chỉ có một nhóm liên kết và tái tổ hợp về thực chất là lai phân tử.

Những hiểu biết sâu sắc về các quá trình sinh sản cận hữu tính ở vi khuẩn đã góp phần quan trọng trong sự phát triển của di truyền học phân tử cũng như của kỹ thuật gene sau này.

a) Tiếp hợp (*Conjugation*)

Tiếp hợp là sự tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào vi khuẩn, trong đó diễn ra sự truyền đi một phần vật liệu di truyền từ thể cho sang thể nhận.

Ở đây, nhân tố F được truyền từ tế bào F^+ sang F^- trong quá trình tiếp hợp, nhờ kiểu *sao chép* “*vòng lăn*” (rolling circle) hay còn gọi là *sao chép sigma* (σ). Kết quả của sự tiếp xúc là tế bào F^- cũng trở thành F^+ , nghĩa là có sự thay đổi giới tính (cái \rightarrow đực). Tuy nhiên, tần số lai $F^+ \times F^-$ rất thấp, khoảng 10^{-6} .

Về sau, người ta còn phát hiện một dạng vi khuẩn, trong đó plasmid F được xen cài vào trong nhiễm sắc thể vi khuẩn, dạng này có khả năng lai với tế bào F^- với tần số cao hơn khoảng 10^4 lần, gọi là *tế bào Hfr* (*High*

Frequency of recombination). Khác với các tế bào F^+ , các tế bào Hfr còn có thể truyền đi một phần nhiễm sắc thể vi khuẩn qua ống tiếp hợp. Lợi dụng đặc tính này người ta đã lập bản đồ di truyền bằng tiếp hợp cho hơn 700 gene của nhiễm sắc thể *E. coli* và cho thấy nó có dạng vòng.

b) Biến nạp (*Transformation*)

Biến nạp là hiện tượng xâm nhập của DNA ngoại bào vào tế bào thể nhận và gây biến đổi một số đặc tính của thể nhận bởi ảnh hưởng của DNA thể cho.

Hiện tượng biến nạp được Frederick Griffith phát hiện lần đầu tiên năm 1928 và về sau được Oswald T. Avery, Colin MacLeod và Maclyn McCarty cùng phát hiện lại năm 1944.



**Hình 2.9: 1. Frederick Griffith; 2. Oswald T. Avery (1877-1955);
3. Colin MacLeod (1909-1972); 4. Maclyn McCarty (1911-)**

Khác với tiếp hợp và tải nạp, biến nạp là quá trình chuyển DNA trực tiếp tách ra từ tế bào thể cho sang tế bào thể nhận.

Đặc trưng của biến nạp là ở chỗ DNA thể cho phải ở dạng xoắn kép. Hiệu quả của nó phụ thuộc vào khả năng dung nạp của tế bào nhận, kích thước đoạn DNA và nồng độ DNA. Tế bào có khả năng tiếp nhận đoạn DNA ngoại lai đó gọi là tế bào khả biến, và có thể xảy ra lưỡng bội hóa ở một phần bộ gene (hợp tử từng phần). Sự gắn kết đoạn DNA ngoại lai vào DNA tế bào nhận được thực hiện nhờ cơ chế tái tổ hợp tương đồng.

Vì sau khi chui qua màng tế bào nhận, một sợi của đoạn DNA ngoại lai bị phân hủy, cho nên nếu như đoạn sợi đơn còn lại không được gắn vào thì sẽ bị phân hủy luôn.

Nói chung, tần số xuất hiện các tế bào khả biến là rất thấp (ngay cả ở các loài vi khuẩn có khả năng biến nạp) và tần số biến nạp (đối với các tế bào khả biến) cũng chỉ khoảng 10^{-3} . Vì vậy, biến nạp chỉ được dùng làm

kỹ thuật lập bản đồ gene cho 1 số loài. Tuy nhiên, ngày nay biến nạp được ứng dụng rất rộng rãi như là một khâu cơ bản trong kỹ thuật di truyền: cấy-chuyển gene, tiêm lắp-ghép gene,... ở *E. coli*, nấm men bia, thực vật, động vật và cả ở người.

c) Tải nạp (*Transduction*)

Tải nạp là quá trình truyền DNA từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận nhờ phage. Có 2 kiểu tải nạp: tải nạp chung và tải nạp đặc hiệu.

* *Tải nạp chung* là trường hợp phage truyền bất kỳ gene nào của vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận ở *E. coli*, phage P₁ là phage tải nạp chung đã được nghiên cứu kỹ. Trong khi nhiễm vào vi khuẩn, phage P₁ sản ra nuclease cắt DNA vi khuẩn chủ thành từng đoạn một cách ngẫu nhiên. Về sau, trong quá trình lắp ráp vỏ protein với DNA phage, có khoảng 10⁻³ - 10⁻² hạt phage con mang đoạn DNA vật chủ. Khi các phage tải nạp này xâm nhập vi khuẩn khác, sẽ xảy ra sự tái tổ hợp tương đồng với NST vật chủ mới. Đoạn gene tải nạp thường chứa khoảng 50 gene và tải nạp có thể được dùng để lập bản đồ gene.

* *Tải nạp đặc hiệu* là trường hợp phage chỉ truyền đi những gene nhất định từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận. Kiểu tải nạp này có một số đặc điểm sau:

Được thực hiện bởi *prophage lambda* (λ);

Những gene được chuyển nằm sát chỗ prophage xen vào;

Do kết quả của sự cắt sai của phage khi tách khỏi NST vật chủ;

Các vi khuẩn tái tổ hợp có thể lưỡng bội một phần. Tuy nhiên, do sự cắt sai của *phage lambda* rất hiếm nên tải nạp đặc hiệu có tần số thấp.

3. Di truyền học vi nấm

Sau đây là một vài nét sơ lược về nấm men. Hiện nay, *S. cerevisiae* và *Schizosaccharomyses pombe* đang được nghiên cứu rộng rãi ở mức phân tử. Chúng có chu trình sống đơn giản có liên quan tới tất cả pha đơn bội (n) và pha lưỡng bội (2n). Đối với các tế bào (2n) diễn ra những phân chia giảm nhiễm thông thường để tạo ra các bào tử (n). Toàn bộ 4 sản phẩm của giảm phân được bọc bên trong một cái nang dày có chia ô. Điều đó cho phép kiểm tra các đoạn NST trao đổi chéo thuận nghịch riêng biệt.

Các tế bào nấm men *S. cerevisiae* phân chia bằng quá trình nảy chồi làm tách các tế bào cha mẹ ra khỏi các tế bào con (chồi) của chúng. Ngược lại, *S. pombe* là nấm men phân đôi (fission), các tế bào cha mẹ sinh trưởng và sau đó ngắt đôi tạo ra 2 tế bào giống nhau về hình thái.

Trung bình hệ gene đơn bội của nấm men *S. cerevisiae* có chứa khoảng 14×10^6 cặp base, nghĩa là có hàm lượng DNA lớn hơn *E. coli* khoảng 3,5 lần, trong khi ruồi giấm *Drosophila* lớn gấp 25 lần và các tế bào thực vật bậc cao chứa nhiều gấp ít nhất là 1.000 lần. Như vậy, dùng nấm men trong nghiên cứu di truyền nhân chuẩn quả là đơn giản và rẻ hơn. Ở *S. cerevisiae* DNA được phân phối trong 16 NST với khoảng 5 - 6 ngàn gene, trong khi *S. pombe* chỉ có 3 NST khác nhau. Tính đến 1996, đã có 6000 gene của *S. cerevisiae* được lập bản đồ.

Điều đáng nói là nhiều tế bào nấm men cũng có các bản sao phức của các DNA-plasmid nội sinh dạng vòng 2 μm (6300 cặp base) có khả năng sao chép độc lập, thường có 50 - 200 bản sao trên một tế bào. Bình thường chúng không mang một gene thiết yếu nào. Đây là loại vector quan trọng trong kỹ thuật di truyền.

Trong số rất nhiều loài nấm men đã được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất bia, rượu, nước giải khát, tạo sinh khối ..., loài *S. cerevisiae* hiện đang được dùng như một công cụ đắc lực để mang các DNA tái tổ hợp có các gene quan trọng của động vật và người, nhằm sản xuất các protein có hoạt tính sinh học, như: các interferon, insulin, hormon sinh trưởng, hirudin, các kháng nguyên virus v.v.. dùng trong chăn nuôi, phòng và chữa bệnh.

4. Các sinh vật mang gene tái tổ hợp

4.1. Các vi sinh vật tái tổ hợp

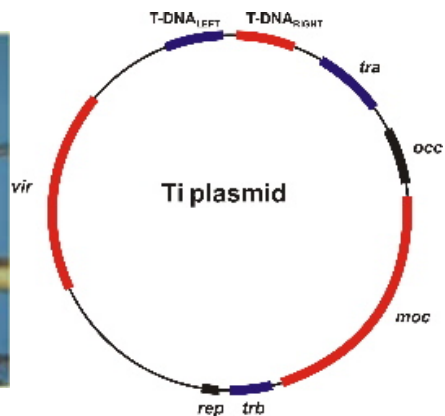
Một trong những ứng dụng đầu tiên của kỹ thuật di truyền là tạo ra một chủng *Pseudomonas syringae*. Chủng hoang dại của vi khuẩn này thông thường chứa một gene tạo băng, gene này kích thích sự tạo băng trên các bề mặt lạnh và ẩm. Sự biến đổi gene này tạo ra một thể tái tổ hợp có khả năng ngăn ngừa sự tạo thành băng. Được tạo ra dưới tên gọi là Frostban, vi khuẩn này đã mang lại một thành công khiêm tốn trong việc chống lại việc tạo thành băng trên các cây dâu tây và khoai tây ngoài đồng ruộng. *Pseudomonas fluorescens* đã được tái tổ hợp với các gene sản sinh chất diệt côn trùng sinh học của *Bacillus thuringiensis*. Các vi khuẩn này được thả vào đất, chúng sẽ bám vào rễ và giúp tiêu diệt các côn trùng đang tấn công.

Năm 1979 xuất hiện thông báo đầu tiên về sự biểu hiện gene insulin người sau khi được gép vào vi khuẩn *E. coli*, năm 1982 insulin được sản xuất bằng kỹ thuật này được bán ra trên thị trường với tên thương phẩm Humulin (*Human insulin*). Hiện nay người ta dần thay thế vi khuẩn *E. coli* mang gene tái tổ hợp bằng các VSV khác như nấm men thuộc chi *Saccharomyces*, xạ khuẩn- *Streptomyces*....

4.2. Các thực vật tái tổ hợp

Tham gia vào hầu hết các thao tác của kỹ thuật di truyền ở thực vật có một loài vi khuẩn hấp dẫn, đó là *Agrobacterium tumefaciens*. Vi khuẩn này là một tác nhân gây bệnh tự nhiên ở thực vật, nó xâm nhập vào rễ và tạo nên một khối u được gọi là bệnh mụn tán.

A. tumefaciens chứa một plasmid lớn (Ti), nó được gắn vào gene nom của các tế bào rễ bị nhiễm khuẩn và làm biến đổi các tế bào này. Ngay cả khi các vi khuẩn đã bị chết ở trong khối u thì khối u vẫn tiếp tục phát triển. Plasmid này là một vector hoàn hảo để đưa các gene lạ vào gene nom thực vật. Trong đa số trường hợp, Plasmid Ti được lấy ra, ghép vào một gene đã được lựa chọn rồi lại đưa trở lại vào *Agrobacterium*.



Hình 2.10: Khối u thực vật chứa *A.tumefaciens* chứa Ti plasmid

Khi thực vật bị nhiễm khuẩn, các vi khuẩn tái tổ hợp sẽ tự động chuyển gene mới vào các tế bào rễ của cây. Việc gắn gene theo cách này lúc đầu được tiến hành ở các cây hai lá mầm như khoai tây, cà chua, thuốc lá và bông. Cho đến nay, các thực vật tái tổ hợp, hay *chuyển gene*, chủ yếu là các cây bông hoặc thuốc lá đề kháng với chất diệt cỏ, các thực vật có khả năng diệt côn trùng, nhiều loại đề kháng với virus hoặc với nấm và một loại cà chua không chín quá sớm và không bị vỡ khi vận chuyển.

4.3. Các động vật tái tổ hợp

Không chỉ virus, vi khuẩn, nấm và thực vật mà cả động vật cũng có thể được thiết kế về mặt di truyền. Trong một số điều kiện động vật cũng có thể biểu hiện các gene được gắn nhân tạo bởi *chuyển nhiễm*. Các động vật đầu tiên được chuyển gene là những con ruồi giấm mà những khuyết

hạt về màu mắt của chúng đã được sửa chữa nhờ việc đưa các gene bình thường vào trứng khiếm khuyết.

Chuột là những động vật đặc biệt dễ bảo trong việc chấp nhận gene theo cách này. Phôi của chuột đã thụ tinh được cấy các gene quy định các hormone sinh trưởng của người đã sinh ra các con chuột khổng lồ lớn gấp hai so với chuột bình thường.

Trong một thí nghiệm khác, các hợp tử của chuột do mang một khiếm khuyết di truyền thường làm cho chúng bị bệnh run, đã được sửa chữa nhờ chứa gene bình thường mới được đưa vào.

Ngành chăn nuôi đã nhanh chóng tiếp thu một số trong số kỹ thuật này. Năm 1987, phôi lợn đã được cấy bằng gene hormone sinh trưởng của bò trong một thí nghiệm nhằm tăng tốc độ sinh trưởng của lợn và cắt giảm lượng mỡ tạo thành trong khẩu phần thịt. Những con lợn đầu tiên đã có ít mỡ hơn, song thật không may, chúng cũng có những vấn đề về sức khoẻ nghiêm trọng: viêm khớp, bệnh tim và bệnh thận.

Khuynh hướng gần đây nhất trong các thí nghiệm chuyển gene là thiết kế trứng đã thụ tinh của các động vật nuôi như lợn, cừu với các gene của người. Các động vật tái tổ hợp này sẽ được dùng làm các hệ thống sống để sản sinh ra một lượng lớn các protein có giá trị của người như hemoglobin, yếu tố đông máu và hormone.

Câu hỏi ôn tập

1. Vi sinh vật có những đặc điểm chung nào ?
2. Hãy giải thích tại sao trong thiên nhiên vi sinh vật tăng lên không tương ứng với tốc độ sinh sản vô cùng nhanh chóng của nó.
3. Vật liệu di truyền của virus ? Mối quan hệ di truyền giữa virus và tế bào vật chủ ?
4. Vật liệu di truyền ở sinh vật nhân sơ khác với sinh vật nhân chuẩn ở những đặc điểm nào ?
5. Thế nào là tiếp hợp, biến nạp và tải nạp ? Tại sao nói các quá trình này tương đương với sinh sản hữu tính ở sinh vật bậc cao ? Ý nghĩa của việc phát hiện ra hiện tượng biến nạp ở vi khuẩn.

Chương 3

Sự phân loại sản phẩm

I. Phân loại theo tính chất thương mại

Theo Thomas D. Brock (1995), các sản phẩm vi sinh vật có ý nghĩa công nghiệp được phân thành 5 loại chính:

- Bản thân các tế bào vi sinh vật (sinh khối) là các sản phẩm mong muốn.
- Các enzyme do vi sinh vật tạo nên: amylase, protease, lipase...
- Các dược phẩm: các chất kháng sinh và các alcaloit.
- Các hoá chất đặc biệt và các chất điều vị thực phẩm: bột ngọt nhân tạo aspartam là một dipeptide giữa aspartic và phenylalanin; acid glutamic, lysine và triptophan, một số vitamin.
- Các hoá chất thông dụng được sản xuất bằng con đường vi sinh vật bao gồm ethanol, acid acetic, acidlactic và glycerine

1. Sinh khối tế bào

Đó là các trường hợp của nấm men dùng cho mục đích dinh dưỡng và làm nở bột mỳ, trường hợp các nấm ăn dùng làm thức ăn. Các vi khuẩn và vi tảo cũng được nuôi cho mục đích dinh dưỡng, song cho đến nay chưa có ý nghĩa lớn về mặt thương mại. Ở đây cần phân biệt hai trường hợp:

Thuật ngữ "protein đơn bào" (SCP) thường được dùng để chỉ các tế bào các vi sinh vật như là các sản phẩm công nghiệp với lý do là hàm lượng protein trong chúng cao và được quan tâm về mặt thương mại. Còn "giống khởi động" (starter culture) là các sản phẩm công nghiệp trong đó bản thân các tế bào vi sinh vật được dùng làm nguyên liệu cấy. Chẳng hạn các giống vi khuẩn lactic được bán ra dưới dạng các nguyên liệu cấy (inoculants) để sản xuất các sản phẩm sữa lên men và xúc xích.

2. Các enzyme do vi sinh vật tạo nên

Nhiều enzyme quan trọng có ý nghĩa thương mại đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp nhờ vi sinh vật, bao gồm các enzyme phân giải tinh bột (các amylase), các enzyme phân giải protein- protease, các enzyme phân giải chất béo (các lipase)...

Một enzyme quan trọng về mặt công nghiệp là gluco-isomerase được sử dụng với số lượng lớn để sản xuất fructose có độ ngọt cao hơn glucose. Một enzyme vi sinh vật quan trọng khác là penicillin -acilase được sử dụng trong công nghệ sản xuất các penicillin tổng hợp.

3. Các dược phẩm

Các chất kháng sinh và các alkaloid nằm trong nhóm các sản phẩm bậc 2. Đó là các hợp chất không được tạo thành trong pha sinh trưởng đầu tiên mà vào lúc sinh trưởng đã bước vào pha cân bằng. Việc hiểu biết bản chất của sự trao đổi chất bậc hai có tầm quan trọng trong việc phát triển các quá trình sản xuất mới.

Công ty Công nghiệp hoá chất Takeda (Nhật Bản) sản xuất và cung cấp loại thuốc kháng sinh validacina dùng để phòng trừ nhiều loại bệnh hại cây trồng do nấm gây ra. Validacina đặc biệt có hiệu lực với bệnh khô vằn lúa, trực tiếp bảo vệ, làm tăng năng suất và chất lượng lúa. Thuốc không gây bất cứ hiện tượng ngộ độc nào cho cây trồng, rất an toàn cho người, vật nuôi, cá... và những động vật có ích khác; không tồn dư trong đất và nông sản sau khi thu hoạch. Validacina có thể hỗn hợp với hầu hết các loại thuốc khác để phun. Thuốc validacina có các dạng thương phẩm: Validacin 3L, Validacin 5L, Validacin 5SP.

4. Các hóa chất đặc biệt và các chất điều vị thực phẩm

Chất điều vị thực phẩm: bột ngọt nhân tạo aspartam là một dipeptide giữa acid aspartic và phenylalanin, cả hai amino acid này đều được sản xuất bằng con đường lên men vi sinh vật. Các amino acids khác cũng được sản xuất bằng con đường này là: acid glutamic, lysine và tryptophan. Một số vitamin cũng được sản xuất bằng con đường vi sinh vật, đó là riboflavin, vitamin B₁₂ và acid ascorbic (vitamin C).

5. Các hóa chất thông dụng là những chất có giá thành thấp và do vậy được bán ra với số lượng lớn. Các hóa chất thường được dùng làm nguyên liệu khởi đầu để tổng hợp hóa học các phân tử phức tạp hơn. Các hóa chất thông dụng được sản xuất bằng con đường vi sinh vật bao gồm ethanol, acid acetic, acid lactic và glycerol. Trong số này ethanol là sản phẩm quan trọng nhất. Ethanol được sản xuất nhờ nấm men, bọn này có thể tạo ra một sản lượng ethanol và CO₂ từ đường. Hiện nay ethanol được dùng để làm nguyên liệu tổng hợp hóa học và làm nhiên liệu chạy các động cơ (gazohol).

II. Sự phân loại sản phẩm theo sinh lý trao đổi chất

Khác với sự phân chia sản phẩm mang tính thương mại (Fritsche, 1978) chia các sản phẩm của vi sinh công nghiệp thành 3 loại.

1. *Vật chất tế bào* (sinh khối) bao gồm các loại protein đơn bào và các loại giống khối động như men bánh mì các vi khuẩn lactic.

Bảng 3.1: Một số enzyme công nghệ và ứng dụng

<i>Enzyme</i>	<i>Nguồn</i>	<i>Ứng dụng chính</i>
Amylase	<i>Aspergillus, Bacillus, Rhizopus</i>	Bổ sung vào bột, công nghệ dẹt, trợ giúp tiêu hóa
Catalase	<i>Micrococcus, Aspergillus</i>	Phòng oxy hóa thực phẩm, sản xuất phomat
Cellulase	<i>Aspergillus, Trichoderma</i>	Thủy phân gỗ, trợ giúp tiêu hóa
Glucosylase	<i>Aspergillus</i>	Loại glucose hoặc oxy trong thực phẩm, xác định glucose lâm sàng
Pectinase	<i>Aspergillus, Sclerotinia</i>	Làm trong vang, dấm, bia, dịch quả
Penicillinase	<i>Aspergillus</i>	Loại penicillin trong nghiên cứu
Protease	<i>Aspergillus, Bacillus, Streptomyces</i>	Làm trong sake, chế biến thịt, loại gelatin
Streptokinase	<i>Streptococcus</i>	Làm lành các vết thương vết bỏng

2. Các sản phẩm trao đổi chất bao gồm:

- Các sản phẩm lên men. Ví dụ ethanol, acid lactic, methane, acetol-butanol...
- Các chất trao đổi bậc 1: Ví dụ amino acids, nucleotide, vitamins, đường,....
- Các chất trao đổi bậc 2: Ví dụ chất kháng sinh, alcaloid, gibberellin, IAA...
- Các loại enzyme: Ví dụ các enzyme ngoại bào như protease, amylase; các enzyme nội bào như asparaginase, penicillinase.

3. Các sản phẩm chuyển hoá

Các sản phẩm chuyển hoá bao gồm steroids và các sản phẩm của sự oxi hoá không hoàn toàn như sự tạo thành acid acetic và socbose.

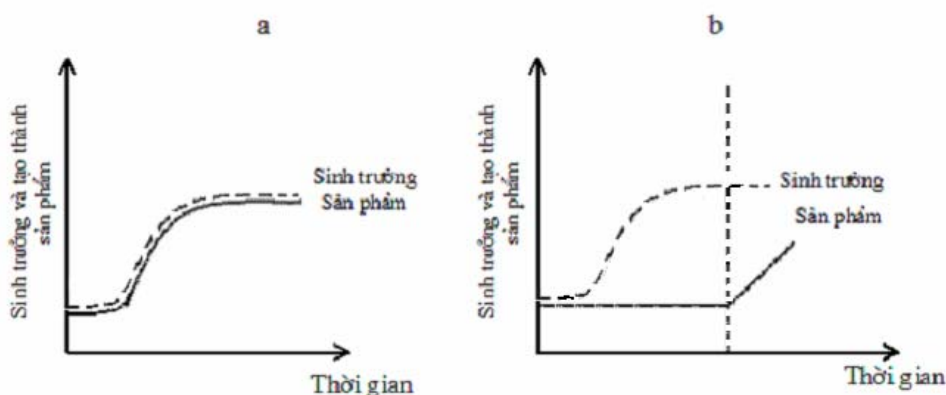
II. Sinh trưởng và sự tạo thành sản phẩm

Trong điều kiện nuôi cấy tĩnh, quá trình sinh trưởng của một quần thể VSV trải qua 4 giai đoạn (Tiềm phát → logarit → cân bằng động → suy vong). Toàn bộ quá trình nuôi cấy gắn liền với sự thay đổi kéo dài của các

điều kiện nuôi. Chất dinh dưỡng giảm đi, số lượng tế bào tăng lên rồi giảm dần, đồng thời hoạt tính trao đổi chất cũng thay đổi.

Sự liên quan của các sản phẩm trao đổi chất với tế bào có thể phân biệt thành 2 nhóm: các sản phẩm bậc một và các sản phẩm bậc hai.

Một chất trao đổi bậc một là một chất được tạo thành trong pha sinh trưởng đầu tiên của VSV trong khi một chất trao đổi bậc hai là một chất được tạo thành gần vào lúc kết thúc của pha sinh trưởng, thường là vào gần chính pha cân bằng.



Hình 3.1: Động học của sự sinh trưởng và tạo thành sản phẩm ở VSV

a. Sinh trưởng và tạo sản phẩm diễn ra đồng thời

b. Sự tạo thành sản phẩm bắt đầu sau khi sinh trưởng đã kết thúc

*Đặc điểm của sản phẩm trao đổi bậc hai:

- Các sản phẩm bậc 2 chỉ được tạo thành bởi một số tương đối ít cơ thể và dường như không cần thiết cho sinh trưởng và sinh sản.

- Sự tạo thành các sản phẩm bậc hai phụ thuộc vào các điều kiện sinh trưởng, đặc biệt là thành phần của môi trường.

- Chúng thường được tạo thành dưới dạng một nhóm các chất có cấu trúc gần gũi. Chẳng hạn, một chủng *Streptomyces* đã sản sinh ra 32 chất kháng sinh antracyclin khác nhau nhưng có cấu trúc gần giống nhau.

- Thường có thể nhận được sự tổng hợp thừa đột ngột mạnh các sản phẩm bậc hai, điều này thường không gặp ở các sản phẩm bậc một là loại sản phẩm có liên quan chặt chẽ đến pha sinh trưởng.

Trong trao đổi chất bậc hai có hai pha trao đổi chất khác biệt nhau được gọi là pha sinh trưởng (trophophase) và pha sản xuất (idiophase). Nếu chúng ta định sản xuất các sản phẩm bậc hai thì chúng ta phải đảm bảo rằng các điều kiện thích hợp cần được tạo ra trong pha đầu để sinh

trường diễn ra tối ưu và các điều kiện phải được thay đổi đúng lúc để sự tạo thành sản phẩm có thể diễn ra tối ưu.

Trong trao đổi chất bậc hai, sản phẩm mong muốn có thể không bắt nguồn từ cơ chất sinh trưởng ban đầu mà từ một sản phẩm được tạo thành từ cơ chất sinh trưởng ban đầu. Như vậy, nói chung sản phẩm bậc hai được sinh ra từ một số sản phẩm trung gian tích lũy trong môi trường nuôi cấy hoặc trong tế bào trong quá trình trao đổi chất bậc một.

Một trong các đặc điểm đặc trưng của các chất trao đổi bậc hai là các enzyme tham gia vào sự tạo thành chúng được điều hoà một cách độc lập với các enzyme của trao đổi chất bậc một.

3. Sinh tổng hợp thừa

Quá trình lên men công nghệ đòi hỏi sự tạo thành sản phẩm mong muốn với lượng cao nhất. VSV tồn tại trong tự nhiên sinh ra các sản phẩm trao đổi chất và các thành phần tế bào chỉ ở mức độ cần thiết cho sự sinh sản tối ưu và cho sự duy trì loài. Có nghĩa là, trong tự nhiên không có sự sản sinh dư thừa các sản phẩm trao đổi chất bậc 1, bậc 2. Bởi vậy những thí nghiệm nhằm phân lập các chủng có khả năng sinh tổng hợp dư thừa từ nơi sống tự nhiên thường không đem lại kết quả mong muốn. Chỉ khi nào những cơ thể thích hợp thu được do xử lý bằng các tác nhân gây đột biến định hướng, được chọn lọc trong điều kiện phòng thí nghiệm về những khả năng nhất định, thì ta mới có thể thu được các chủng tổng hợp thừa bị sai hỏng trong cơ chế điều hoà. Những chủng này được coi là những chủng có năng suất cao để dùng trong công nghiệp.

3.1. Những nguyên tắc điều hoà trao đổi chất

- Điều hoà hoạt tính enzyme nhờ ức chế bằng sản phẩm cuối cùng hay còn gọi là sự kim hãm do liên hệ ngược;
- Sự cảm ứng và ức chế quá trình tổng hợp enzyme;
- Điều hoà tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiểm chế;
- Điều hoà tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế dị hoá.

3.2. Những sai hỏng di truyền của điều hoà trao đổi chất và hiện tượng tổng hợp thừa

Các cơ chế điều hoà trao đổi chất có thể bị thay đổi do những đột biến dẫn đến sự sinh tổng hợp thừa các chất trao đổi.

Toàn bộ những sai hỏng có thể biểu hiện ở sự cảm ứng enzyme. Nhờ những sai hỏng mà các enzyme cảm ứng trở thành các enzyme cấu trúc, nghĩa là chúng tồn tại trong tế bào không phụ thuộc vào cơ chất.

Nhiều hoạt tính của các chủng sản xuất là do sai hỏng di truyền. Việc lựa chọn các chủng sản xuất trước hết là theo kinh nghiệm. Những thành tựu của sinh học phân tử như chủ động gây đột biến định hướng, chuyển gộp gen... tạo điều kiện cho việc lựa chọn định hướng hơn và do đó có hiệu quả cao hơn.

4. Công nghệ DNA tái tổ hợp

Như đã biết, hai sự kiện nổi bật nhất trong giai đoạn đầu của Sinh học phân tử là sự khám phá ra cấu trúc phân tử DNA năm 1953 bởi James Watson và Francis Crick (nhận giải Nobel-1962) và sự giải mã thành công hệ thống mật mã di truyền năm 1966 bởi Marsall Nirenberg và Har Gobind Khorana nhận giải Nobel-1968 cùng với nhiều nhà khoa học khác.

Giai đoạn tiếp theo của đỉnh cao phát triển sinh học phân tử là sự ra đời của *Công nghệ DNA tái tổ hợp (recombinant DNA technology)*, vào giữa thập niên 1970, với các tên gọi khác như: công nghệ gen, kỹ thuật di truyền (*genetic engineering*).

Công nghệ DNA tái tổ hợp bắt đầu như một khoa học từ 7/1972 khi nhóm nghiên cứu của Paul Berg (Viện hàn lâm khoa học quốc gia Mỹ) hoàn thành việc chế tạo bộ gen lai giữa virus SV40 của khỉ với phage lambda.

Lần đầu tiên kết nối hai virus khác nhau hoàn toàn về mặt di truyền thành một chỉnh thể và được nhân lên dưới dạng plasmid trong tế bào vi khuẩn. Phân tử DNA lai chứa các thông tin di truyền của virus SV40, thông tin điều khiển quá trình tự sao của DNA phage lambda cũng như toàn bộ chức năng của operon galactosidase của vi khuẩn *E. coli*.



1

2

3

4

Hình 3.2: 1. Har Gobind Khorana (1922-); 2. Temin, Howard Martin (1934-1994); 3. Daniel Nathans (1928-1999); 4. Paul Berg (1926-)

4.1. Khái niệm công nghệ DNA tái tổ hợp

Đó là công nghệ bao gồm một tập hợp các kỹ thuật như phân cắt và lai ghép các phân tử nucleic acid nhờ các enzyme giới hạn, ligase...nhân dòng DNA trong các plasmid hoặc virus được tăng cường ở vi khuẩn hoặc tế bào nấm men; xác định trình tự nucleotide DNA ở đoạn được nhân dòng; biểu hiện của gen được nhân dòng dưới dạng sản phẩm protein...

Sự ra đời của công nghệ DNA tái tổ hợp và gần đây là công nghệ chíp DNA, sinh tin học, nuôi cấy tế bào gốc, công nghệ nano gắn liền với các sự kiện khoa học sau:

- 1965, Xác lập được các gen kháng thuốc ở vi khuẩn nằm trong các plasmid.

- 1967, SB Zimmerman và cộng sự tách chiết thành công DNA-ligase.

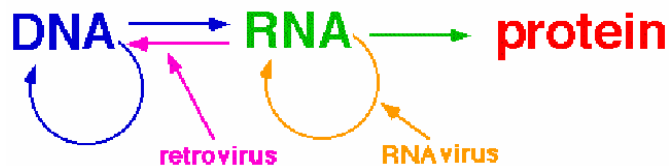
- 1970, Hamilton Smith và các cộng sự đã phân lập được enzyme giới hạn đầu tiên từ vi khuẩn *Haemophylus influenzae* được gọi là Hind II.

-1970, Har Gobind Khorana tổng hợp được một gen nhân tạo đầu tiên đó là gen mã hóa việc tổng hợp tRNA^{ala} vận chuyển amino acid alanine ở nấm men. Gene này dài 77 cặp nucleotide, không có các trình tự điều hòa và vì thế không có hoạt tính, đến 1973 một gen nhân tạo khác có thể hoạt động bình thường trong tế bào sống, đó là gene mã hóa tRNA^{tyr} vận chuyển của tyrosin ở *E. coli* có chiều dài khoảng 200 cặp nucleotide.

- 1972, Paul Berg kiến tạo được phân tử DNA tái tổ hợp đầu tiên trong ống nghiệm.

- 1973, H. Boyer, S. Cohen, A. Chang và R. Helling - lần đầu sử dụng plasmid để tạo dòng DNA ở *E. coli*.

-1975, Temin, Howard Martin, phát hiện ra enzyme phiên mã ngược (*reversetranscriptase*) mở ra sự tổng hợp gene nhân tạo.



- 1977, Đề xuất các phương pháp hóa học (Maxam và Gilbert) và phương pháp enzyme học (Frederick Sanger và cộng sự) xác định trình tự nucleotide của nucleic acid.

- 1977, Thành lập hãng công nghệ gen đầu tiên ở Mỹ (Genetech) để sản xuất các chế phẩm y học bằng phương pháp DNA tái tổ hợp.

- 1978, Giải thưởng Nobel đầu tiên trong lĩnh vực khám phá và sử dụng enzyme giới hạn được trao cho Daniel Nathans; Werner Arber; Hamilton Othanel Smith.

- 1983, Giải thưởng Nobel được trao cho bà Barbara McClintock phát hiện ra yếu tố di truyền vận động hay gen nhảy.

- 1986, Binnig, Gerd Karl (Nhà khoa học Đức, giải Nobel 1986) khám phá ra loại kính hiển vi hoạt động không theo nguyên tắc quang học, mở đầu cho công nghệ nano.

- Tháng 4 năm 1996, men nở bột mỳ *S.cerevisiae* đã giải mã xong gồm 6.000 gene

- Tháng 12/ 2002, tập đoàn Genome Sequencing Chuột quốc tế hoàn thành một bản thảo genome chuột và so sánh với genome người có khoảng 3.000 gene chung.

- Năm 2003, giải Nobel được trao cho hai nhà bác học Paul C. Lauterbur và Peter Mansfield đã có công phát minh những ứng dụng của hiện tượng cộng hưởng từ (*magnetic resonance*).

- Năm 2005, giải Nobel Y học 2005 được trao cho hai nhà khoa học Australia - Barry J. Marshall và J. Robin Warren - do đã khám phá ra vi khuẩn *Helicobacter pylori* và vai trò của chúng trong bệnh viêm loét hệ tiêu hoá (chứng viêm dạ dày, loét dạ dày hoặc tá tràng



1



2



3



4

Hình 3.3: 1. Frederick Sanger (1918-); 2. Barbara McClintock (1902-1992); 3. Binnig, Gerd Karl (1947-); 4. Paul C. Lauterbur (1929-)

4.2. Các enzyme thông dụng trong kỹ thuật di truyền

Năm 1962, Werner Arber lần đầu tiên chứng minh rằng có những enzyme đặc biệt hoạt động trong tế bào vi khuẩn, chúng có khả năng phân biệt DNA "của mình" và DNA "lạ" của phage. Các enzyme này có khả năng hạn chế sự nhân lên của phage lạ trong tế bào vi khuẩn bằng cách phân hủy chúng một cách đặc hiệu, do đó được gọi là "restriction

enzyme". Chử restrion (hạn chế) có nguồn gốc lịch sử từ đó và được dùng đến nay.

Thông thường, khi đề cập đến các enzyme được sử dụng trong kỹ thuật di truyền, chủ yếu là nói đến các *enzym giới hạn* (*restriction endonuclease*, hay gọi tắt là *restrictase*), tức các enzyme từ vi khuẩn có khả năng nhận biết và cắt DNA tại những vị trí xác định và ngoài ra là nhóm hỗn hợp các polymerase, ligase và nuclease.

Nhìn chung, có hai kiểu cắt: cắt thẳng và cắt so le.

+ Kiểu cắt thẳng tạo ra các đầu bằng (*blunt ends*): Một số enzyme giới hạn cắt hai mạch DNA tại cùng một điểm, ví dụ: AluI, SmaI (Bảng 3.2).

+ Kiểu cắt so le tạo ra các đầu dính (*cohesive ends*): Một số enzyme giới hạn cắt đoạn DNA nhận biết tại vị trí so le trên hai mạch. Kết quả là tạo ra các đầu sợi đơn chứa vài base bổ sung có thể dính chập trở lại. Các enzyme này được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật tái tổ hợp DNA. Ví dụ: BamHI, EcoRI, XmaI (Bảng 3.2).

Bảng 3.2 : Một số enzyme giới hạn và đoạn nhận biết của chúng (mũi tên chỉ vị trí cắt)

Vi sinh vật	Enzym giới hạn	Đoạn nhận biết $5' \rightarrow 3'$ $3' \leftarrow 5'$
<i>Arthrobacter luteus</i>	AluI	\downarrow AGCT TCGA \uparrow
<i>Bacillus amyloxyquefaciens H</i>	BamHI	\downarrow GGATCC CGTAGG \uparrow
<i>Escherichia coli RY13</i>	EcoRI	\downarrow GAATTC CTTAAG \uparrow
<i>Serratia marcescens Sb</i>	SmaI	\downarrow CCCGGG GGGCCC \uparrow
<i>Xanthomonas malvaccarum</i>	XmaI	\downarrow CCCGGG GGGCCC \uparrow

** Các enzyme thông dụng khác*

Trong kỹ thuật di truyền, bên cạnh sử dụng các enzyme giới hạn như “con dao mổ tinh vi”, còn phải dùng tới nhóm enzyme sau:

- Các DNA- và RNA-polymerase: xúc tác các phản ứng tổng hợp DNA và RNA. Chúng được dùng khi cần thiết tạo ra một số lượng lớn các bản sao acid nucleic (để tạo các mẫu dò, để xác định trình tự nucleotide...). Trong đó phải kể đến DNA polymerase I của *E. coli*, enzyme phiên mã ngược từ các retrovirus, enzyme transferase đầu cùg.

- Các DNA- và RNA-ligase xúc tác phản ứng nối hai đầu của các đoạn DNA hoặc RNA thường dùng trong tạo dòng.

- Các nuclease. Đây là nhóm enzyme phân cắt DNA (DNase) và RNA (RNase) không mang tính chuyên biệt cao như các enzyme giới hạn.

4.3. DNA tái tổ hợp và các vector

4.3.1. Khái niệm DNA tái tổ hợp

DNA tái tổ hợp là phân tử DNA được tái tạo trong ống nghiệm bằng cách kết hợp DNA từ các nguồn khác nhau theo một qui trình kỹ thuật nhất định. Thông thường, một phân tử DNA tái tổ hợp gồm một DNA của plasmid hoặc phage nguyên vẹn (gọi là vector) có mang một đoạn DNA cần cho nghiên cứu (gọi là DNA ngoại lai).

4.3.2. Khái niệm vector: Vector (thể tải, thể truyền) là một phân tử DNA đóng vai trò là vật trung gian mang một đoạn DNA cần nhân dòng có khả năng xâm nhập vào tế bào chủ và mượn bộ máy tế bào chủ để tạo ra nhiều bản sao của vector.

Các ứng dụng chủ yếu của vector là:

- Tạo dòng nhằm khuếch đại số bản sao của một đoạn DNA xác định (nhiều bản sao giống nhau).

- Nghiên cứu sự biểu hiện của một đoạn trình tự của DNA.

- Đưa gen vào tế bào hay cơ thể (nhằm biến đổi đặc tính di truyền mong muốn ở sinh vật được truyền gen).

- Sản xuất RNA với số lượng lớn từ DNA được tạo dòng.

- Sản xuất protein với số lượng lớn từ DNA được tạo dòng.

4.3.3. Các đặc tính của một vector

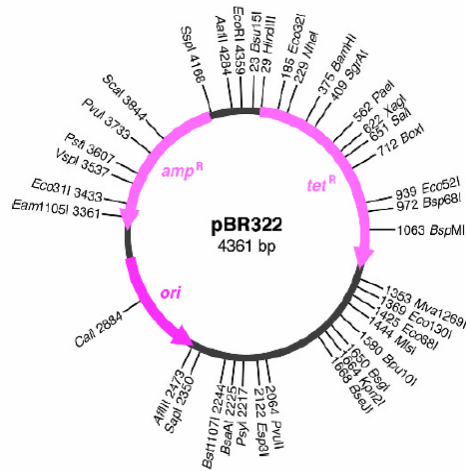
- Có khả năng xâm nhập vào tế bào chủ và tồn tại được qua nhiều thế hệ.

- Có khả năng tự sao chép mạnh và độc lập với sự tái bản của bộ gen tế bào chủ.

- Phải có các đặc tính (được mã hóa bởi các gen chọn lọc) cho phép dễ dàng phát hiện tế bào chủ có chứa chúng.

Chẳng hạn, nếu vector là plasmid thì tế bào chủ có thể được phát hiện theo kiểu hình của plasmid có mặt trong tế bào chủ, tức đặc tính kháng thuốc giúp vi khuẩn sống được trên môi trường có chất kháng sinh tương ứng.

4.3.4. Các loại vector chuyên gen



Hình 3.4: Bản đồ enzyme hạn chế của plasmid pBR322 cải biến, mang hai gen kháng thuốc (tet^R đề kháng tetracycline và amp^R đề kháng ampicillin) và một loạt vị trí cắt của enzyme hạn chế trong đó mỗi enzyme này chỉ có một vị trí phân cắt, nhờ vậy plasmid vector này áp dụng được với nhiều DNA khác nhau.

Có nhiều loại vector được sử dụng trong kỹ thuật di truyền: plasmid, phage M13, cosmid, vector là virus của eukaryotes, YAC (nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men).

* Cosmid là vector được cấu tạo nên từ plasmid có gắn thêm gene cos của phage λ . Gene cos giúp cho DNA của phage λ từ dạng thẳng nối đầu lại thành dạng vòng. Cosmid có khả năng chứa đoạn gene lạ dài đến 45kb hiện được dùng để lập thư viện gene ở ruồi dấm, chuột, người.

* Phage M13 là phage thể sợi có DNA mạch đơn dùng làm vector nhằm:

- + Xác định trình tự nucleotide của gene;
- + Sản xuất các mẫu thử (hay mẫu dò);
- + Thực hiện đột biến điểm định hướng.

* Phagemid là vector được cấu tạo từ plamid gắn thêm một đoạn DNA của phage M13.

Việc lựa chọn loại vector tùy thuộc vào kích thước đoạn DNA cần tạo dòng và mục đích tạo dòng, ở đây chỉ đề cập hai loại vector thông dụng: plamid và phage.

- Các plamid nói chung có kích thước 2-5kb, nên chỉ chứa rất ít gene chọn lọc và chỉ có thể nhận 8-9 kb DNA cần tạo dòng.

- Các phage là những virus xâm nhiễm và làm tan vi khuẩn chủ. Việc sử dụng phage làm vector có nhiều ưu điểm hơn vector plamid ở chỗ hiệu quả xâm nhiễm mạnh và khả năng sinh sôi nảy nở nhanh; kích thước đoạn DNA mà vector có thể tiếp nhận được là lớn hơn rất nhiều. Tuy nhiên, thao tác trên phage thì phức tạp hơn trên plamid.

Trong số các phage được sử dụng làm vector, phần lớn bắt nguồn từ phage lambda (hệ gene chứa 48.502 cặp base, được giải xong năm 1983; nó có hai đầu dính tự nhiên khoảng 12 cặp base, cho phép DNA- λ đóng vòng sau khi xâm nhập vào tế bào chủ).

4.4. Các phương pháp thành lập phân tử DNA tái tổ hợp

4.4.1. Phương pháp sử dụng các đầu dính

Bất kỳ đoạn DNA nào nếu được cắt bởi cùng một loại enzyme giới hạn (ví dụ EcoRI) tạo các đầu dính thì có thể dính lại với nhau và được nối bởi DNA ligase (hình 3.4). Năm 1973, H. Boyer và tập thể của S. Cohen đã tạo ra được phân tử DNA tái tổ hợp đầu tiên gồm vector là plamid nhỏ pSC101 của *E. coli* và DNA “ngoại lai” là một plamid khác. Chính sự kiện này đặt ra triển vọng to lớn cho kỹ thuật DNA tái tổ hợp sau này.

4.4.2. Phương pháp nối trực tiếp hoặc tổng hợp các đầu bổ sung

Đối với các đoạn DNA được tạo ra bằng việc sử dụng enzyme giới hạn cắt thẳng, như HindII chẳng hạn, thì việc nối các đoạn DNA đầu bằng được thực hiện theo một trong hai cách sau:

(1) Nối trực tiếp nhờ DNA-ligase của phage T₄

(2) Tổng hợp bổ sung các đầu dính vào các đầu 3' một số nucleotid, ví dụ: poly (dA) vào đầu 3' của đoạn này và poly (dT) vào đầu 3' của đoạn kia, nhờ enzyme transferase đầu mút. Sau đó các đoạn này được nối lại nhờ xúc tác của DNA-ligase vi khuẩn.

4.5. Tạo dòng DNA tái tổ hợp

Mục đích của việc tạo dòng là nhằm thu được một số lượng lớn bản sao của một đoạn DNA xác định.

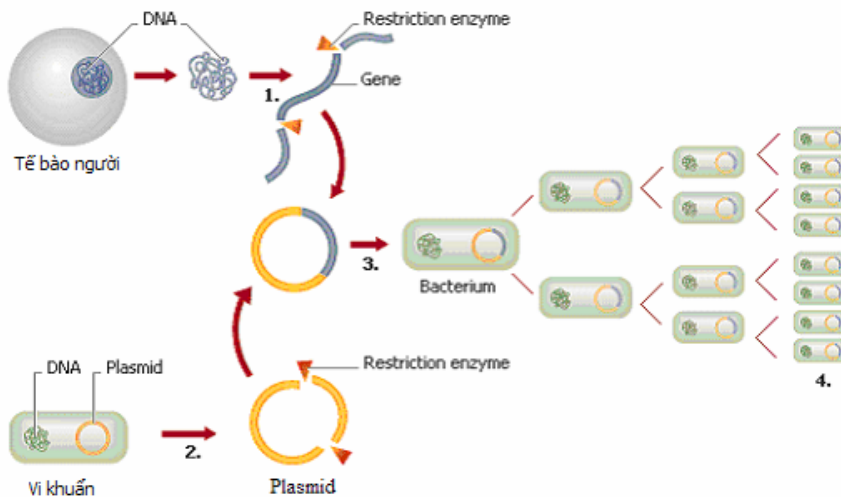
Về nguyên tắc, một quy trình kỹ thuật DNA tái tổ hợp (tạo dòng) gồm các bước cơ bản sau :

Bước 1: Tách DNA và plasmid ra khỏi tế bào, chọn lọc và xử lý DNA thuộc các nguồn khác nhau, một làm vector và một cần cho tạo dòng.

Đối với vector, việc chọn lọc tùy thuộc nhiều yếu tố: kích thước đoạn cần tạo dòng, mục đích tạo dòng... Đối với DNA cần tạo dòng, cần chọn sơ khởi các đoạn có kích thước gần nhau và tương ứng với loại vector. Sau đó, xử lý cả hai loại DNA trên bởi cùng một loại enzyme giới hạn (ví dụ: EcoRI) để tạo ra các đầu (dính) so le.

Bước 2: Kiến tạo phân tử DNA tái tổ hợp trong ống nghiệm.

Trộn chung vector và DNA cần tạo dòng đã được xử lý theo một tỷ lệ nhất định với sự có mặt của ligase. Nhờ sự xúc tác của DNA-ligase mà vector tái tổ hợp sẽ được tạo thành; sau đó được tinh sạch qua tách chiết và tủa.



Hình 3.4: Sơ đồ minh họa các bước cơ bản của kỹ thuật di truyền

Bước 3: Đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ.

Có hai loại tế bào chủ thông dụng nhất là: (1) Tế bào vi khuẩn, thường là *E. coli*; (2) Tế bào sinh vật nhân chuẩn, ví dụ nấm men *S. cerevisiae* hoặc tế bào động-thực vật nuôi cấy. Tùy loại tế bào chủ mà sử dụng kỹ thuật biến nạp thích hợp. Nói chung, mục đích của bước này là lợi dụng đặc tính sinh sôi nảy nở nhanh của tế bào chủ và sử dụng bộ máy tế bào chủ để tái bản vector tái tổ hợp thành một số lượng lớn bản sao hoặc có thể cho biểu hiện gen (protein) mong muốn.

Bước 4: Phát hiện dòng DNA tái tổ hợp đặc hiệu.

Để phát hiện dòng cần tìm, người ta có thể sử dụng công cụ là *mẫu dò* (probe). Mẫu dò có thể là một kháng thể đặc trưng cho protein được mã hóa bởi gen cần tìm hoặc một đoạn DNA hoặc RNA bổ sung cho gen cần tìm.

4.6. Ứng dụng của công nghệ DNA tái tổ hợp

Trong suốt hai thập kỷ qua, công nghệ DNA tái tổ hợp đã mang lại những tiến bộ to lớn cho sinh học. Những ứng dụng chủ yếu của nó là:

- Sản xuất các protein, enzyme, vaccine... hữu ích; tạo ra các vi khuẩn, nấm men có khả năng tổng hợp các chất có ý nghĩa về mặt kinh tế.

- Gây ra những biến đổi kiểu gen ở các cơ thể sinh vật liên quan đến những đặc tính mong muốn. Tạo nguồn DNA và RNA cho các nghiên cứu.

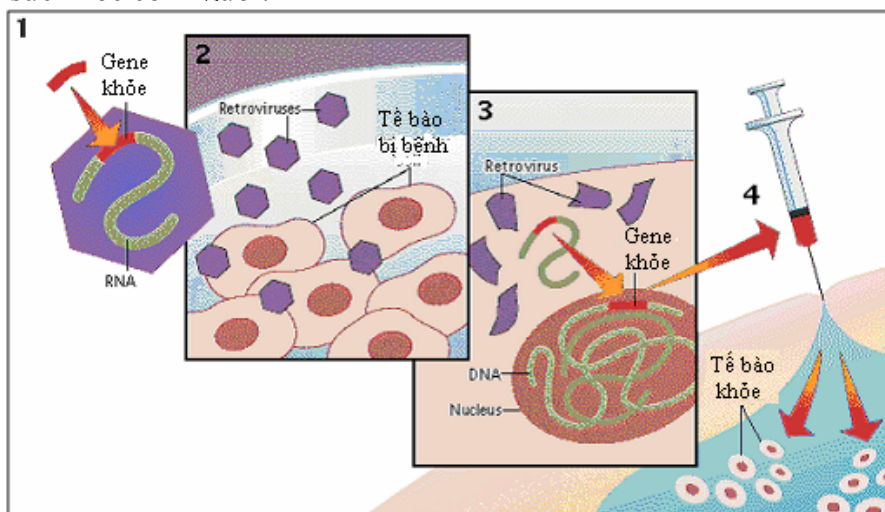
- Tạo ra khả năng sửa chữa các khuyết tật di truyền ở động vật và người (liệu pháp gen hình 3.5)

- Chèn gene khỏe vào trong ribonucleic acid (RNA) của Retroviruses; - Cho retrovirus tiếp cận tế bào bị bệnh;

- Thêm gene khỏe vào deoxyribonucleic acid (DNA) tế bào bị bệnh;

- Tiêm vào bệnh nhân.

Công nghệ DNA tái tổ hợp mở ra một triển vọng to lớn trong tương lai gần để giúp con người khám phá bí ẩn của cơ thể vi sinh vật và con người, trên cơ sở đó có thể nâng cao năng suất vật nuôi, cây trồng và bảo vệ sức khỏe con người.



Câu hỏi ôn tập

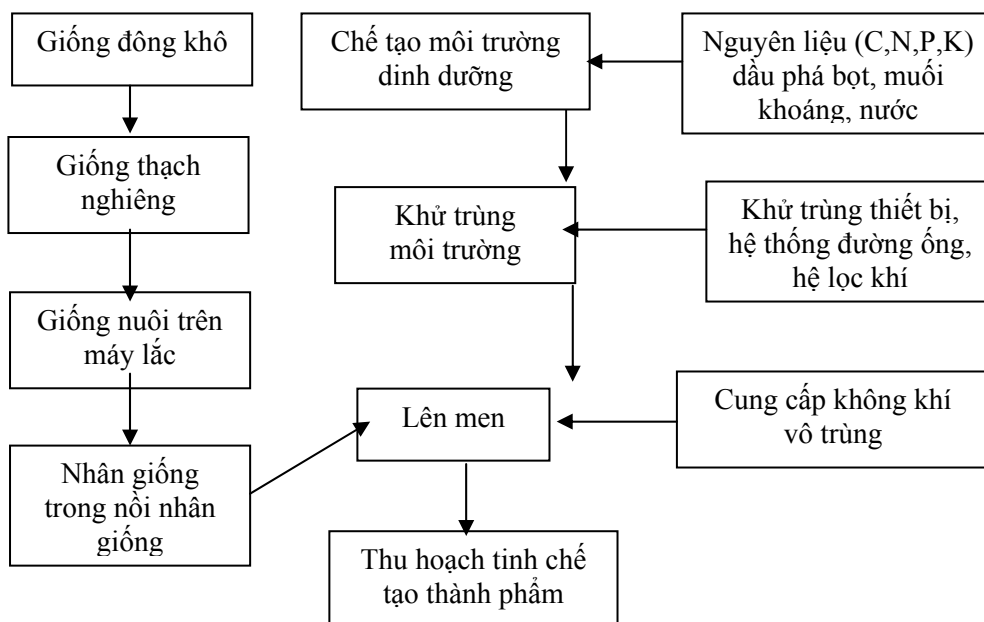
1. Các kiểu phân loại sản phẩm hiện nay ? Theo anh (chị) kiểu phân loại nào hợp lý nhất ? Vì sao ?
2. Đặc điểm của sản phẩm bậc hai ?
3. Ý nghĩa thực tiễn của việc nghiên cứu sinh tổng hợp thừa ?
4. Thế nào là enzyme hạn chế ? Chúng có các vai trò và tính chất nào được coi là quan trọng đối với kỹ thuật DNA tái tổ hợp ?
5. Bằng hai ví dụ về enzyme cắt hạn chế, hãy chứng tỏ rằng ít nhất có hai phương pháp thành lập các phân tử DNA tái tổ hợp trong ống nghiệm (*in vitro*).
6. Thế nào là phân tử DNA tái tổ hợp, vector tách dòng ? Hãy nêu các bước của quy trình tạo dòng và cho sơ đồ minh họa.
7. Anh (chị) hãy nêu một số ứng dụng khác nhau của công nghệ DNA tái tổ hợp.

Chương 4

Các phương pháp và kỹ thuật lên men

I. Quá trình lên men

1. Quy trình lên men (hình 4.1)



Hình 4.1 Sơ đồ quá trình lên men

2. Chọn giống

Để chọn được giống vi sinh vật thuần chủng, bước đầu tiên phải phân lập chúng từ các nguồn tự nhiên như nước, không khí, đất, các vật liệu hữu cơ, vô cơ đã bị phân hủy... Từ những kỹ thuật vi sinh vật học cổ điển từ thời L. Pasteur và R. Koch đề ra, nhiều phương pháp đặc biệt dùng để phân lập chủng giống thuần khiết dùng cho công nghiệp đã được phát triển, nhất là trong việc tìm chủng sản xuất những chất kháng sinh mới. Từ những ổ sinh thái tự nhiên sẽ phân lập được các chủng hoang dại. Các chủng này có một số hoạt tính sinh enzyme, tích tụ các chất trao đổi bậc 1, bậc 2 ... nhưng thường cho năng suất thấp.

Theo kỹ thuật vi sinh vật cổ điển việc phân lập các chủng thuần khiết mất nhiều công sức và chậm. Ngày nay, người ta dùng phương pháp sàng lọc vừa nhanh vừa có hiệu quả. Phương pháp sàng lọc chủ yếu được sử dụng trong việc tìm chủng sản các chất kháng sinh. Từ nguyên lý cơ bản

phương pháp đã được cải tiến ngày một phong phú. Để chọn các chủng sản sinh aminoacid người ta đã sử dụng kiểu chọn lọc theo kỹ thuật penicillin. Trong phương pháp này các điều kiện được lựa chọn sao cho các tế bào hoang dại có thể phát triển trong môi trường dinh dưỡng thiếu một aminoacid nào đó và bị giết chết bằng penicillin. Các tế bào cần aminoacid (tự dưỡng acid amin) không sinh trưởng được nên sẽ sống sót. Đối với vi khuẩn không mẫn cảm với penicillin thì dùng chất kháng sinh khác, như canamycin hay xycloserin, đối với nấm men thì dùng nystatin là thích hợp. Để phân lập những chủng có tính chất đặc biệt, ví dụ như chuyển hóa steroid, người ta dùng hỗn hợp của nhiều chủng vi sinh vật đem nuôi cấy trong cùng một môi trường có chất mà ta muốn thực hiện sự biến đổi. Sau khi nuôi, chiết xuất và tách sản phẩm phân tích theo phương pháp sắc ký.

3. Nguyên liệu cấy

Giống sản xuất thường được bảo quản để tránh giảm hoạt tính. Do đó, việc cấy giống trên môi trường thạch nghiêng trước khi nhân giống là việc làm rất cần thiết. Có thể coi đây là việc “đánh thức” chủng giống đồng thời để kiểm tra hoạt tính của giống sau một thời gian bảo quản ở nhiệt độ thấp. Từ những những tế bào hoặc bào tử riêng rẽ của chủng bảo quản, cấy ra một số culture, những culture này được nhân giống trong phòng thí nghiệm và được kiểm tra hoạt tính. Nếu có sự khác nhau thì dùng culture có hoạt tính mạnh nhất để gây nguyên liệu cấy và tạo thành chủng mới.

4. Nhân giống

Cũng giống như trong phòng thí nghiệm và qui mô pilot, muốn thực hiện một quá trình lên men ở qui mô công nghiệp phải tiến hành nhân giống, đảm bảo số lượng tế bào với tuổi sinh lý đang ở thời kỳ hoạt động mạnh nhất để cấy vào môi trường lên men. Nhân giống ở đây có thể phải qua 2-3 bước, ta thường gọi là nhân giống cấp 1, cấp 2, cấp 3 v.v... tùy thuộc vào quy mô sản xuất. Việc nhân giống thường diễn ra bằng cách nuôi chìm. Các điều kiện nuôi được lựa chọn sao cho chỉ xảy ra sự sinh trưởng chứ không xảy ra sự tạo thành sản phẩm. Khi sử dụng nấm sinh bào tử và xạ khuẩn, trước khi nuôi chìm, người ta thực hiện nhân bào tử trên môi trường đặc như môi trường cám, bột ngô...

Nhân giống cấp 1 được tiến hành trên máy lắc với nhiệt độ và thời gian tùy thuộc vào nội nhân giống (tương tự nội lên men) có sự khuấy và ổn nhiệt. Tỷ lệ nhân giống từ ống nghiệm vào bình tam giác có thể chỉ một vòng que cấy hoặc cả dịch huyền phù của một ống giống. Từ nhân giống cấp 1 sang cấp 2 (hoặc từ cấp 2 sang cấp 3) tỷ lệ giống thường là 1- 10%

thể tích dịch lên men hoặc là cao hơn, từ dịch nhân giống cuối cùng vào nồi lên men khoảng 0,5-10% tùy thuộc vào đặc tính từng chủng vi sinh vật.



Hình 4.2: Máy lắc ổn nhiệt (Personal-11 , TAITEC)

Thành phần môi trường nhân giống và môi trường lên men gần giống nhau. Thông thường thì hàm lượng carbon ở môi trường nhân giống thấp hơn môi trường lên men, nhưng các thành phần khác thì giàu hơn, đặc biệt là các chất sinh trưởng để phục vụ cho sinh sản và phát triển của giống vi sinh vật.

Chế độ nuôi đặc biệt là nhiệt độ giữa nhân giống và lên men cũng khác nhau (nếu cùng chế độ nhiệt độ thì không cần phải quan tâm lắm). Nhưng nếu nhiệt độ lên men thấp (như lên men bia) thì cần phải nhân giống với nhiệt độ giảm dần để khi vào lên men, giống không bị choáng sốc. Chế độ sục khí ở các công đoạn này cũng khác nhau, thường thì trong thời gian nhân giống nhu cầu về ôxy cao như trong pha sinh trưởng của lên men hoặc cao hơn.

Nói chung một chủng vi sinh vật nhân giống để đưa vào lên men đảm bảo các yêu cầu công nghệ như sau:

- Dịch giống không được tạp nhiễm, đặc biệt là thực khuẩn thể (*Bacteriophage*).

- Các tế bào đảm bảo ở độ tuổi sinh lí ở thời gian sinh trưởng tốt nhất, có hoạt tính cao nhất, thường là nửa sau của pha chỉ số.

- Các thông số kĩ thuật như OD, pH, màu sắc, mùi vị... đúng như quy định của từng dây chuyền công nghệ.

5. Nồi lên men

Các nồi lên men được thiết kế và chế tạo sao cho có thể tạo được những điều kiện tối ưu cho từng quá trình lên men. Những yêu cầu có thể đạt được hoạt tính tối đa của vi sinh vật được thực hiện thông qua một số nguyên tắc kỹ thuật.

Nồi lên men chứa môi trường nuôi có khả năng tạo thành sản phẩm với năng suất cao. Trong quá trình lên men cần theo dõi liên tục sự tạo thành sản phẩm và trạng thái vô trùng để dừng quá trình đúng vào thời điểm thu hoạch tốt nhất.



Hình 4.3: Nồi lên men 75 lít ở Trung tâm CNSH-ĐHQGHN

6. Thu nhận sản phẩm và xử lý sau thu hoạch

Việc thu nhận sản phẩm được bắt đầu bằng cách tách riêng tế bào ra khỏi môi trường dinh dưỡng. Nếu là những cơ thể có dạng hệ sợi thì người ta thường lọc, còn đối với vi khuẩn và nấm men thì li tâm. Việc xử lý tiếp theo là tùy theo sản phẩm được tiết ra môi trường dinh dưỡng hay tồn tại trong tế bào.

Bản chất hoá học của sản phẩm quy định các biện pháp xử lý tiếp theo. Các biện pháp được sử dụng là chiết rút, hấp phụ, sàng phân tử và kết tủa. Các bước tinh chế tiếp theo được tiến hành kế tiếp ngay sau bước tách sản phẩm thường phải qua nhiều cấp, trước khi sản phẩm cuối cùng được đóng gói.

Việc thu nhận sản phẩm với hiệu suất cao có ý nghĩa quyết định đối với tính kinh tế của một phương pháp. Bởi vậy, vấn đề tách và cô lập sản phẩm phải được chú ý ngay từ khi chọn chủng và chọn dịch dinh dưỡng. Việc tối ưu hoá phương pháp có liên quan đến tất cả các bước. Việc loại

bỏ và sử dụng các phế và phụ phẩm cũng cần được chú ý tránh gây ô nhiễm môi trường.



Hình 4.4: Máy li tâm (centrifuge)

II. Vi sinh vật

1. Sinh vật nhân chuẩn

1.1. Nấm men

Nấm men (*Yeast, Levure*) thường tồn tại ở dạng đơn bào, đa số sinh sản theo lối nảy chồi, cũng có khi theo hình thức phân cắt tế bào, nhiều loại có khả năng lên men đường và thích nghi với môi trường chứa đường cao, có tính acid cao. Nấm men phân bố rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong môi trường có chứa đường, có pH thấp, chẳng hạn như trong hoa quả, rau dưa, ri đường, trong đất trồng các loại cây ăn quả, trong đất có nhiễm dầu mỏ. Nhiều loài nấm men có ứng dụng cao trong sản xuất công nghiệp như lên men bia rượu, glycerine, sản xuất nấm men bánh mì, thức ăn gia súc...

1.2. Nấm sợi

Nấm sợi (*Microfilamentous fungi*) là tất cả các nấm không phải nấm men và cũng không sinh mũ nấm. Nấm sợi còn gọi là nấm mốc, có dạng sợi phân nhánh, không hoặc có vách ngăn, lối sống hiếu khí, chủ yếu là hoại sinh. Nấm sợi phân bố rộng rãi trong tự nhiên, tham gia tích cực vào các vòng tuần hoàn vật chất, nhất là quá trình phân giải chất hữu cơ và hình thành chất mùn. Rất nhiều loài nấm được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghiệp enzyme, công nghiệp dược phẩm, sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, kích thích tố sinh trưởng thực vật... Nhiều nấm sợi kí sinh trên người, động vật và thực vật gây ra các bệnh nấm nguy hiểm. Một số nấm sợi phát triển nhanh trên các chất hữu cơ gây hư hỏng lương thực, thực phẩm, nguyên vật liệu...

1.3. Tảo (Algae)

Vi tảo (Microalgae) gồm các đại diện có khả năng quang hợp, có dạng đơn bào sống thành tập đoàn, phân bố chủ yếu ở môi trường nước ngọt, nước mặn và ở đất ẩm. Vi tảo có thể sinh sản theo hình thức dinh dưỡng, vô tính và hữu tính. Nhiều loài vi tảo có ứng dụng trong sản xuất và đời sống như thu sinh khối giàu protein làm thức ăn cho người và gia súc (*Chlorella*), nuôi tảo silic (*Skeletonema costatum*) làm thức ăn cho ấu trùng tôm, tách acid béo không no. Sử dụng vi tảo cho xử lý môi trường (*Scenedesmus*) hoặc làm sinh vật chỉ thị trong môi trường nghèo calcium (calcium) (tảo lục *Desmid*).

1.4. Nấm quả thể

Nhiều loài nấm có quả thể được sử dụng để làm thực phẩm, do nấm giàu protein, chất khoáng, các vitamin A, B₁, B₂, C, D, E. Ngoài ra chúng còn có nhiều đặc tính của biệt dược, có khả năng phòng và chữa bệnh hạ huyết áp, chống béo phì, đường ruột, hỗ trợ chữa ung thư. Đa số nấm ăn thuộc ngành nấm đảm (Basidiomycota), thường gặp nấm ăn thuộc bộ Agaricales như nấm rơm *Volvariella volvaceae*, *Agaricus bisporus*... Ngoài giá trị tài nguyên, thực phẩm và dược phẩm, nhiều loài nấm có ý nghĩa trong công nghệ sinh học và đời sống do chúng có khả năng sản sinh ra nhiều chất có ích như eter, acid acetic, acid tanic, các chất kháng sinh... Nhiều loài nấm có khả năng hấp thụ và đào thải các chất phóng xạ, một số loài nấm được sử dụng để phân giải các chất thải độc hại và các nguồn phế liệu gây ô nhiễm môi trường.

2. Sinh vật nhân sơ

2.1. Vi khuẩn

Vi khuẩn (Bacteria) có nhiều hình thái và cách sắp xếp khác nhau, kích thước khá nhỏ so với nấm sợi và nấm men. Phần lớn vi khuẩn thuộc nhóm dị dưỡng, đời sống có thể hiếu khí, kỵ khí hoặc là dạng sống tùy nghi. Nhiều vi khuẩn có ứng dụng trong sản xuất công nghiệp. Điển hình như các loài vi khuẩn lên men các acid hữu cơ (lactic, propionic...), sản sinh enzyme, acid acetic, acid glutamic, lysine, vitamin, lên men methane, sản xuất phân bón, thuốc trừ sâu sinh học...

2.2. Xạ khuẩn

Xạ khuẩn (Actinomycetes) thuộc nhóm vi khuẩn thật (Eubacteria) phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Phần lớn xạ khuẩn là hiếu khí, hoại sinh, có cấu tạo dạng sợi phân nhánh (khuẩn ti). Xạ khuẩn là một trong những nhóm vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong tự nhiên. Chúng tham gia vào các quá trình chuyển hóa nhiều hợp chất trong tự nhiên. Trên 80%

chất kháng sinh được phát hiện là do xạ khuẩn sinh ra. Xạ khuẩn còn được dùng để sản xuất nhiều loại enzyme, vitamin, acid hữu cơ...

2.3. Vi khuẩn lam

Trước đây vi khuẩn lam (Cyanobacteria) được gọi là tảo lam (Cyanophyta) hay tảo lam lục. Thực ra đây là một nhóm vi sinh vật nhân nguyên thủy thuộc vi khuẩn thật. Vi khuẩn lam có khả năng tự dưỡng quang năng nhờ có chứa sắc tố quang hợp. Vi khuẩn lam phân bố rộng rãi trong tự nhiên, nhiều loài có ý nghĩa trong sản xuất sinh khối giàu protein, cố định đạm hay sử dụng trong công nghiệp xử lý nước thải...

3. Các tiêu chuẩn của một vi sinh vật dùng trong công nghiệp

3.1. Khả năng sử dụng nguyên liệu

Tính kinh tế của một quá trình sản xuất đòi hỏi phải sử dụng các nguồn nguyên liệu rẻ tiền, đơn giản và các chủng vi sinh vật không đòi hỏi quá cao về nhu cầu dinh dưỡng. Thông thường, nguồn carbon và nitơ (nitrogen) dùng cho sản xuất là những nguồn thông dụng như các loại rỉ đường, tinh bột, dịch kiềm sulfid, nguồn nitơ kĩ thuật như cao ngô, bột đậu tương.

3.2. Tính chất sản phẩm phụ

Yêu cầu các chủng vi sinh vật dùng trong sản xuất là không tạo thành các sản phẩm phụ không mong muốn. Thực ra thì trong quá trình sống vi sinh vật luôn tạo thành nhiều sản phẩm trao đổi chất tích lũy trong môi trường, một số sản phẩm trao đổi chất có thể không có lợi cho chính trao đổi chất của tế bào và có thể gây ức chế tế bào. Sự tích lũy nhiều các sản phẩm phụ trong môi trường một mặt làm giảm hiệu suất tạo thành sản phẩm chính, mặt khác gây nhiều khó khăn cho quá trình thu nhận và tinh khiết sản phẩm.

3.3. Mức độ miễn cảm với sự lây tạp và khả năng tách sản phẩm khỏi môi trường

Trong quá trình lên men thường bị nhiễm các vi sinh vật lạ. Nguồn lây nhiễm có thể từ nguyên liệu, không khí hay từ thiết bị lên men. Nếu các vi sinh vật lạ cũng thích nghi với điều kiện sống trong môi trường lên men thì chúng sẽ cạnh tranh với chủng sản xuất đồng thời tạo ra các chất có tác dụng ức chế hoặc gây chết đối với chủng sản xuất. Do đó, các chủng sản xuất phải được lựa chọn sao cho không miễn cảm với sự tạp nhiễm do các vi sinh vật lạ và đặc biệt là với *bacteriophage*. Trong trường hợp bị nhiễm *bacteriophage* lượng giống trong môi trường lên men có thể giảm rất nhanh. Ví dụ trong môi trường bị nhiễm vi khuẩn butirc có thể

ảnh hưởng mạnh đến sức sống của giống bởi vì một lượng nhỏ của acid butiric tạo thành đã gây độc đối với tế bào.

Ngoài các chỉ tiêu trên, khả năng tách sản phẩm ra khỏi môi trường lên men cũng là một tiêu chuẩn để chọn chủng vi sinh vật cho sản xuất, bởi vì có nhiều quá trình sản xuất cho sản phẩm nhiều nhưng việc tách sản phẩm khó thực hiện và hiệu quả kinh tế thấp.

III. Cơ chất dinh dưỡng

1. Nguyên tố đại lượng C, O, N, H, P, S, Mg, Ca, Fe

Môi trường dinh dưỡng phải chứa tất cả các nguyên tố cần thiết cho sinh trưởng và tạo thành sản phẩm. Các môi trường để nuôi cấy vi sinh vật cần thiết bổ sung các nguyên tố khoáng. Những nguyên tố khoáng mà vi sinh vật đòi hỏi phải được cung cấp với liều lượng lớn được gọi là các nguyên tố đại lượng, bao gồm các nguyên tố như C, O, N, H, P, S, Mg, Ca, Fe. Nhu cầu về chất khoáng của vi sinh vật khác nhau phụ thuộc loài, giai đoạn sinh trưởng phát triển. Nồng độ cần thiết về muối khoáng của các nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn thường thay đổi trong các phạm vi sau (bảng 4.1).

2. Nguyên tố vi lượng Mn, Na, B, Mo, Zn, Cu, Ni, Va, Cl, Si

Bảng 4.1: Nồng độ cần thiết về muối khoáng của nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn

Muối khoáng	Nồng độ cần thiết (g/l)	
	Đối với vi khuẩn	Đối với nấm và xạ khuẩn
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,2 - 0,5	1 - 2
KH ₂ PO ₄	0,2 - 0,5	1 - 2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 - 0,2	0,2 - 0,5
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,005 - 0,01	0,02 - 0,1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005 - 0,01	0,05 - 0,2
Na ₂ MoO ₄	0,001 - 0,005	0,01 - 0,02
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	0,02 - 0,1
CoCl ₂	tới 0,03	tới 0,06
CaCl ₂	0,01 - 0,03	0,02 - 0,1
CaSO ₄ .5H ₂ O	0,001 - 0,005	0,01 - 0,05

Những nguyên tố khoáng mà vi sinh vật chỉ đòi hỏi với liều lượng rất nhỏ được gọi là các nguyên tố vi lượng, bao gồm các nguyên tố như Mn, Na, B, Mo, Zn, Cu, Ni, Va, Cl, Si... Nồng độ cần thiết của từng nguyên tố vi lượng trong môi trường thường chỉ vào khoảng 10⁻⁶ - 10⁻⁸ M.

Thông thường, khi chế tạo môi trường nuôi cấy vi sinh vật không cần bổ sung các nguyên tố vi lượng vì trong các thành phần khoáng đại lượng hoặc trong nguyên liệu hay nước để pha chế môi trường đã có đủ thành phần vi lượng. Ngoại trừ một số trường hợp như bổ sung Zn vào môi trường nuôi cấy nấm mốc, Co vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn sinh tổng hợp vitamin B₁₂ nhưng với hàm lượng thấp (khoảng 3-5 µg/l).

3. Dịch dinh dưỡng cho các vi sinh vật dị dưỡng

Trong quá trình lên men, một môi trường nuôi cấy tốt nhất phải là môi trường đảm bảo cho sản xuất với hiệu suất cao trong thời gian ngắn nhất và giá thành thấp nhất đối với chủng giống vi sinh vật.

Những chủng vi sinh vật dùng cho công nghiệp đều là các giống dị dưỡng, trừ các chủng tảo thuộc giống tự dưỡng. Các chủng của tảo thường được nuôi cấy trong các quá trình khử bản cho nước thải hoặc nuôi tảo thu sinh khối. Những vi sinh vật dị dưỡng chỉ sản sinh năng lượng trong ATP dùng cho sinh trưởng nhờ quá trình ôxy hoá những hợp chất hữu cơ. ATP là thành phần quan trọng nhất mà tế bào dùng để vận chuyển năng lượng. Trong những phản ứng không thuận lợi về phương diện nhiệt động, ATP cho phép thực hiện những phản ứng với tốc độ thích hợp.

Trong công nghệ vi sinh, môi trường nuôi cấy những chủng dị dưỡng thường có các thành phần như sau:

3.1. Nguồn carbon và năng lượng

Nguồn carbon và năng lượng thường được sử dụng là tinh bột, mật rỉ, saccharose, glucose, dịch thủy phân từ bột hoặc gỗ v.v... Một số loài vi sinh vật có khả năng sử dụng cellulose, hemicellulose đặc biệt là carbua hydro (alkan, methane). Chủ yếu nguồn carbon sử dụng là carbohydrate. Lượng carbon được bổ sung vào môi trường tùy thuộc chủng giống vi sinh vật. Một số chủng hiếu khí sử dụng khoảng 50% cơ chất, còn các chủng kỵ khí tùy tiện chỉ dùng tới 10% cho sinh trưởng.

3.2. Nguồn nitơ

Nguồn nitơ chủ yếu trong công nghệ lên men là nước amoniac và muối ammon. Dùng vào mục đích này còn có các nguồn nitơ hữu cơ như cao ngô, dịch thủy phân nấm men, thủy phân khô lạc, đậu tương, hạt bông, các bã thải của công nghệ bia (dịch ngâm malt hoặc rễ mầm malt), bã thải rau quả, khoai tây, sữa loại bỏ mỡ, phụ phẩm khi chế biến pho mát, thịt cá... Các nguồn nitơ hữu cơ với vai trò làm nguồn nitơ và cả nguồn carbon, đồng thời còn cung cấp các chất sinh trưởng. Vì vậy, khi sử dụng các nguồn nitơ hữu cơ, vi sinh vật thường phát triển mạnh hơn.

3.3. Nguồn phospho (phosphorus)

Nguồn phospho cung cấp cho môi trường lên men ở dạng muối phosphate hoặc acid phosphoric. Phospho hữu cơ (phytin) còn có trong cao ngô, bột đậu tương, trong các loại cám....

3.4. Các nguồn khoáng khác

- Nguồn lưu huỳnh bổ sung vào dịch lên men ở dạng muối sulfate.

- Nguồn Mg và K thường được đưa vào dưới dạng cation của muối phosphate và sulfate. Trong một số quá trình lên men, calcium được đưa vào môi trường ở dạng muối carbonate để duy trì pH ở vùng trung tính hoặc gần trung tính khi acid được tạo thành (ví dụ như lên men tạo các acid hữu cơ)

- Nguồn Fe: thông thường trong các nguyên liệu sử dụng đã có đủ sắt, nên ít khi phải bổ sung.

3.5. Vitamin và các yếu tố sinh trưởng khác

Trong các môi trường dinh dưỡng dùng cho công nghiệp, vitamin và các yếu tố sinh trưởng thường được bổ sung ở dạng nguyên liệu làm giàu vitamin như cao ngô, rỉ đường, cao nấm men. Chúng chứa hỗn hợp các acid amin, vitamin và cả một số yếu tố khác chưa biết rõ, ví dụ như các dịch chiết động vật hay thực vật. Lượng có ích của các yếu tố đặc biệt đó đôi khi chỉ cần rất ít. Ví dụ α - alanine có hiệu lực ở nồng độ 1/100.000.000, còn acid pantotenic có hiệu lực ở nồng độ 1/50.000. Những yếu tố chưa biết rõ đó gọi chung là các yếu tố sinh trưởng.

Cao ngô, cao nấm men, dịch thủy phân từ nguồn protein thực vật, động vật vừa đóng vai trò là nguồn nitơ hữu cơ vừa là nguồn cung cấp các chất sinh trưởng cần thiết. Ngoài ra, trong công nghệ vi sinh còn dùng nước chiết cám, dịch ép khoai tây, dịch ép giá đậu, dịch ép cà chua, bắp cải hoặc một số rau quả khác cũng chứa nhiều vitamin và dùng làm nguồn kích thích sinh trưởng trong nuôi cấy vi sinh vật.

Dịch dinh dưỡng chứa các chất dinh dưỡng ở một nồng độ đủ đảm bảo suốt quá trình nuôi. Như vậy, nguồn carbon và năng lượng được đưa vào ở phạm vi 10-100g/l. Ở nhiều cơ thể, nồng độ cần thiết để duy trì tốc độ sinh trưởng cực đại là rất nhỏ; đối với đường thì khoảng 1-10mg/l. Với aminoacid và vitamin thì tế bào chỉ cần nồng độ 1-100 μ g/l. Các trị số có tính đặc hiệu cơ thể và đặc hiệu quá trình. Dịch dinh dưỡng dùng trong lên men chứa các thành phần cần thiết thường không ở một tỷ lệ cân đối mà sinh trưởng đòi hỏi. Nhờ những điều kiện như tỷ lệ C : N cực trị hoặc sự thiếu phosphate mà trao đổi chất có thể được điều khiển theo hướng có ý nghĩa cho việc tổng hợp sản phẩm mong muốn. Điều đó đúng với các nguyên tố đại lượng cũng như vi lượng. Chẳng hạn bằng cách đưa Co vào

mà đạt được thu hoạch cao về vitamin B₁₂, hay sự thiếu sắt kích thích quá trình tổng hợp acid citric.

4. Nguồn carbon kĩ thuật và nguồn nitơ kĩ thuật

4.1. Rỉ đường

Trong công nghiệp đường thường thu được mật rỉ là dịch đường sau khi đã kết tinh. Các loại mật rỉ gồm có:

- Mật rỉ hydrol: dịch thu được sau khi kết tinh glucose ở các xí nghiệp thủy phân bột bằng acid để sản xuất glucose. Trong hydrol có tới 40 - 50% glucose và có một hàm lượng đáng kể NaCl.

- Rỉ đường: ở các nhà máy đường sản xuất saccharose có một phụ phẩm với tỉ lệ khá lớn, đó là rỉ đường. Đây là một loại nước cốt được tách ra sau khi kết tinh đường. Có hai loại rỉ đường là rỉ đường củ cải và rỉ đường mía (tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu của nhà máy đường). Cả hai loại rỉ này đều có màu nâu sẫm do được nấu và cô nhiều lần nên có nhiều caramen và melanoid tạo thành. Trong rỉ đường có tới 70 - 80% chất khô, trong đó chủ yếu là đường saccharose 46 - 54%, đường khử 6 - 9%, rafinose 1 - 2%, N tổng 0,45 - 2,88% và chất khoáng 3 - 4%. Các chất hữu cơ có trong rỉ đường là các acid, rượu, acid amin, purine và các vitamin. Hàm lượng các muối phosphate trong rỉ đường thường rất thấp. Phần lớn các hợp chất phospho nằm ở phần cặn lắng. Do đó, khi dùng rỉ đường đã xử lí và loại bỏ cặn thì nhất thiết phải bổ sung nguồn phospho vào môi trường dinh dưỡng. Trong rỉ đường có chứa các hợp chất có tác dụng kích thích sinh trưởng vi sinh vật, nhưng nếu dùng rỉ đường với nồng độ cao thì sinh trưởng của các chủng sản xuất sẽ bị kìm hãm, vì trong rỉ đường có chứa các chất có tác dụng ức chế như SO₂, hydroxy-methyl-fucfural hay kalium - imido - disulfonate, chất này có thể sinh ra từ sulfate và nitrate do vi khuẩn tạo thành.

Trong rỉ đường có chứa hàm lượng lớn biotine (vitamin H) là chất sinh trưởng rất cần thiết đối với nhiều loài vi sinh vật và là chất điều hòa trong quá trình sinh tổng hợp acid amin, hàm lượng khoảng 20 - 120 mg/kg trong rỉ đường mía và 0,01 - 0,13 mg/kg trong rỉ đường củ cải. Các vitamin trong rỉ đường ngoài biotine còn có vitamin B₁, B₂, PP, acid pantotenic...

4.2. Dịch kiềm sulfid

Trong công nghiệp men còn sử dụng dung dịch thủy phân từ gỗ - dịch kiềm sulfid là phế thải của công nghiệp giấy. Thành phần chính của dịch kiềm sulfid là lincosunfonate và các đường pentose. Thành phần của dịch kiềm sulfid từ gỗ của cây lá bản và cây lá kim là khác nhau. Ngoài ra,

thành phần này cũng thay đổi nhiều tùy theo mức độ khai thác. Dịch kiềm sulfid của gỗ cây lá bản chiếm tỉ lệ cao các đường pentose (khoảng 80% đường) thường sử dụng để nuôi cấy thu sinh khối nấm men. Còn dịch kiềm sulfid gỗ cây lá kim thì các hexose lại chiếm ưu thế (khoảng 70% đường) dùng để lên men thu rượu.

Việc tiền xử lý chất thải này trước lên men là tối thiểu. Bơm hơi nước hoặc thông khí ở pH 1,5 - 3,0 là cần thiết để loại SO_2 là chất vốn kìm hãm sinh trưởng của vi sinh vật. Sau đó pH sẽ được điều chỉnh tới tối ưu (pH khoảng 5) và môi trường được bổ sung các chất dinh dưỡng chứa nitơ và phosphate.

4.3. Các nguyên liệu thủy phân tinh bột

Để cung cấp nguồn carbon chủ yếu là glucose thì bột sắn có lẽ là nguồn nguyên liệu tốt nhất. Trong bột sắn chứa chủ yếu là tinh bột, hàm lượng N hữu cơ, chất khoáng, vitamin có với lượng rất nhỏ.

Thủy phân các loại tinh bột thường thực hiện theo hai cách:

- Thủy phân bằng acid với áp lực dư. Dịch thủy phân thu được qua trung hòa bằng Na_2CO_3 hoặc NaOH, nếu dùng H_2SO_4 làm tác nhân thủy phân thì có thể dùng CaCO_3 hoặc nước vôi để trung hòa, sau đó đem lọc qua lọc ép khung bản với than hoạt tính khử màu. Dịch thủy phân này chứa chủ yếu là đường glucose, một lượng nhỏ các acid amin, có mặt các chất bẩn, khoáng được dùng để chuẩn bị môi trường nuôi cấy hoặc đem cô đặc tới 60 - 70% chất khô để sử dụng dần.

- Thủy phân bằng enzyme: Các chế phẩm enzyme chủ yếu là từ nấm mốc được nuôi cấy bề mặt hoặc bề sâu, dùng với tư cách là phức hệ amylase gồm có α , β - amylase và glucoamylase. Sản phẩm thu được là hỗn hợp maltose và glucose. Cũng có trường hợp dùng phối hợp chế phẩm enzyme từ mốc và chế phẩm enzyme từ vi khuẩn nuôi bề sâu (α - amylase chịu nhiệt) nên hiệu quả của quá trình sẽ cao hơn. Phương pháp thủy phân các loại bột (bột sắn, gạo, ngô, bột mì, cao lương, khoai tây) bằng các chế phẩm enzyme này được dùng trong công nghiệp sản xuất rượu cồn.

4.4. Hạt và bột ngũ cốc

Các loại bột ngũ cốc thường được dùng là bột gạo, bột ngô được tách phôi, bột mỳ, bột đại mạch... Ngoài thành phần chủ yếu là tinh bột, các loại bột này còn chứa khoảng vài phần trăm các hợp chất protein, các chất xơ (chủ yếu là cellulose) và các chất khoáng. Bột sắn là loại nguyên liệu khá rẻ tiền so với các loại bột khác hiện nay đang được sử dụng nhiều cho công nghệ lên men đặc biệt là lên men cồn.

Các nguyên liệu tinh bột trong lên men có thể dùng trực tiếp làm thành phần của môi trường dinh dưỡng cho các chủng sinh ra enzyme amylase ngoại bào, đặc biệt là trong phương pháp nuôi cấy bề mặt. Ngoài ra, nguồn nguyên liệu này còn qua một giai đoạn thủy phân thành dung dịch các loại đường rồi mới dùng chuẩn bị môi trường dinh dưỡng.

Ngoài ra, các parafin có mạch từ $C_8 - C_{18}$, khí methane... có thể được sử dụng làm nguồn carbon nuôi cấy vi sinh vật thu cồn hoặc protein đơn bào cho sản xuất thức ăn gia súc.

4.5. Nguồn nitơ kĩ thuật

- Bột đậu tương được dùng như là một nguồn nitơ kĩ thuật tương đối phổ biến trong nhiều môi trường dinh dưỡng. Trong bột đậu tương có tới gần 40% là protein và khoảng 19% chất béo, có đủ các acid amin. Đối với sinh tổng hợp nhiều chất kháng sinh không những chỉ có các hợp chất protein mới có tác dụng mà còn phải kể đến các chất béo có trong đậu tương. Cùng với bột đậu tương hoặc khô dầu đậu tương người ta còn dùng bột khô lạc (lạc sau khi ép dầu), bột hoặc khô dầu các loại hạt bông, hạt hướng dương... vào trong mục đích này.

- Nước chiết ngô và cao ngô là sản phẩm phụ trong công nghiệp chế biến bột ngô. Trước khi xay, ngô được ngâm với dung dịch natrium sulfid. Trong khi ngâm, các acid amin, vitamin được chiết ra và hòa tan vào dung dịch. Nước chiết ngô có thể dùng trực tiếp để pha chế môi trường dinh dưỡng, nhưng thông thường người ta cô trong điều kiện chân không tới 50% chất khô ở dạng sệt gọi là cao ngô. Trong cao ngô có 6,4 - 8% N tổng số, khoảng một phần nửa là các acid amin, phần còn lại là peptide và protein, hàm lượng carbohydrate dao động trong phạm vi khá rộng do có liên quan đến lên men lactic, hàm lượng tro 15 - 20%, nhiều vitamin đặc biệt là vitamin nhóm B và biotine.

- Nước chiết nấm men và cao nấm men: sinh khối men bia hoặc men rượu được rửa sạch và cho tự phân ở $48 - 52^{\circ}\text{C}$ trong 2 - 3 ngày, lọc bỏ bã, thu được dịch thủy phân gọi là nước chiết nấm men, cô đặc có cao nấm men. Các sản phẩm này giàu acid amin, peptid cùng nhiều vitamin nhóm B và các chất khoáng. Trong cao nấm men có 40 - 50% chất khô, 0,6 - 1,5 N tổng số, 0,3 - 0,5 N - amin (trong đó có mặt 18 loại acid amin).

- Dịch thủy phân các loại khô dầu (đậu tương, lạc, bông, hướng dương) và thịt, cá giàu nitơ hữu cơ, nhiều acid amin. Nếu thủy phân bằng acid thì nhiều vitamin và một hay hai aminoacid bị phá hủy (như triptophan và một phần cysteine), còn thủy phân bằng enzyme thì các thành phần này đầy đủ hơn. Dùng các dịch thủy phân này làm nguồn nitơ

hữu cơ trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật và một phần là nguồn chất dinh dưỡng.

IV. Nhu cầu về ôxy và sự thông khí trong quá trình lên men

1. Độ hoà tan của ôxy trong nước

Tế bào sử dụng ôxy để hô hấp và làm giảm lượng ôxy trong môi trường. Vì thế trong nuôi cấy hiếu khí phải cung cấp ôxy một cách đều đặn. Thiếu ôxy nhất thời tại một thời điểm nào đó trong môi trường sẽ dẫn đến sự phá vỡ quá trình trao đổi chất của tế bào. Vi sinh vật sử dụng ôxy trong môi trường lỏng. Lượng ôxy hoà tan trong nước thường là rất ít. Phải cung cấp ôxy sao cho tốc độ hoà tan của nó bằng tốc độ tiêu thụ ôxy của vi sinh vật.

Tốc độ hoà tan của ôxy vào môi trường lỏng được tính theo công thức:

$$R = \frac{dc}{dt} = K \cdot (C - C_1)$$

Trong đó: R- tốc độ hoà tan ôxy, C - nồng độ ôxy bão hoà ở áp suất riêng đã biết, C₁- nồng độ ôxy hoà tan ở thời điểm lựa chọn, K - hằng số tỉ lệ, t - thời gian.

Độ hoà tan ôxy còn phụ thuộc vào nhiệt độ khi nuôi cấy, vào nồng độ các chất hợp phần và độ nhớt của môi trường. Khi nhiệt độ tăng lên thì độ hoà tan của ôxy giảm. Độ hoà tan của ôxy trong môi trường giảm đi 2 lần khi nhiệt độ tăng từ 30 - 37⁰C. Điều này có thể khắc phục bằng cách cho sục khí mạnh hơn trong quá trình lên men. Nồng độ ôxy hoà tan cũng sẽ giảm khi dùng các chất hoạt động bề mặt, các chất phá bọt và hàm lượng sinh khối vi sinh vật tăng.

Trong quá trình nuôi cấy không khí nén được thổi vào thùng lên men có hệ thống cánh khuấy. Tốc độ sục khí mạnh sẽ tăng tốc độ hoà tan ôxy và trộn đều cơ chất dinh dưỡng trong môi trường. Nhưng không nên khuấy quá mạnh vì có thể dẫn đến sự hư hỏng cơ học các tế bào và dẫn đến hiện tượng tự phân.

2. Nồng độ ôxy giới hạn

Ôxy rất cần đối với đời sống của vi sinh vật hiếu khí. Tăng thông khí đến giới hạn nhất định thì sự phát triển của vi sinh vật cũng tăng lên theo. Đối với nhiều vi sinh vật, thông khí sẽ làm tăng tốc độ sinh trưởng, rút ngắn pha tiềm phát, nâng cao lượng sinh khối. Khi tăng tốc độ hoà tan ôxy từ 0 - 5 milimol O₂ /l.phút, lượng sinh khối cuối cùng của *Serratia marsescens* sẽ tăng một cách đáng kể; sinh khối cực đại đạt được khi

cường độ thông khí khoảng 5 milimol O_2 /l.phút. Nếu tiếp tục tăng thông khí hơn nữa thì lượng sinh khối cuối cùng sẽ giảm. Hiện tượng này còn gặp ở rất nhiều giống vi sinh vật.

Để duy trì việc cung cấp oxy tối thích cho tế bào không cần thiết phải làm bão hoà môi trường bằng oxy hoà tan. Chỉ cần một nồng độ oxy nhỏ hơn rất nhiều cũng đủ để cung cấp cho các enzyme phản ứng với cơ chất đó. Nồng độ oxy gây ra hô hấp tối đa được gọi là nồng độ oxy tới hạn (hoặc áp suất riêng phần của oxy). Đó không phải là một đại lượng cố định mà là một hàm số của tốc độ sinh trưởng hoặc của tốc độ hô hấp có liên quan với nó. Trị số này vào khoảng 10 $\mu\text{mol/l}$. Khi sự vận chuyển oxy bị cản trở bởi những tập hợp tế bào (các cục sợi nấm) hoặc bởi lớp chất nhầy bao quanh các tế bào thì nồng độ oxy giới hạn có trị số cao hơn.

3. Sự cung cấp oxy cho các tế bào chìm

Sự cung cấp oxy cho các tế bào chìm là một quá trình chuyển dịch chất, trong đó oxy được chuyển từ bóng không khí vào môi trường dinh dưỡng và từ đó vào tế bào. Quá trình xảy ra nhờ dòng chảy và sự khuếch tán. Lực đẩy là sự chênh lệch nồng độ oxy. Sự chuyển dịch chất từ tương khí sang tương lỏng được quy định bởi bề mặt giới hạn giữa hai tương và do vậy bởi số lượng và kích thước các bóng không khí. Chỉ một phần nhỏ của không khí được cung cấp đi vào dung dịch. Bởi vậy trong thực tiễn, người ta thường sử dụng tỷ số của thể tích không khí/thể tích nồi lên men/phút.

Đối với mỗi quá trình lên men cần phải nghiên cứu ảnh hưởng của cường độ thông khí đối với hiệu suất tạo thành sản phẩm. Trong sản xuất công nghiệp không khí được nén qua máy nén, qua một hệ thống làm nguội, qua hệ thống lọc để loại hết tạp khuẩn rồi thổi vào các thùng lên men. Trong các thùng lên men và các thùng nuôi cấy nhân giống đều có hệ thống khuấy tùy thuộc vào yêu cầu của từng loại vi sinh vật, vào từng điều kiện nuôi cấy để nhằm thu được hiệu suất tối đa.

V. Khử trùng

1. Lên men không vô trùng

Để cho quá trình lên men diễn ra có kết quả thì cần phải ngăn cản sự phát triển của các cơ thể lạ. Trong nhiều quá trình lên men (sản xuất acid amin, enzyme, chất kháng sinh...) điều đó được thực hiện thông qua việc khử trùng môi trường dinh dưỡng, không khí và các thiết bị lên men (lên men vô trùng). Trái lại trong việc sản xuất sinh khối như sinh khối nấm men, sinh khối vi khuẩn, tảo thường tiến hành lên men không vô trùng. Sự phát triển của các cơ thể lạ bị ngăn cản mạnh mẽ bằng cách tạo ra những

điều kiện nuôi sao cho chủng sản xuất có thể sinh trưởng trội hơn, ví dụ nhờ cơ chất đặc hiệu hay pH môi trường.

2. Lên men vô trùng

Nhiệm vụ thanh trùng là diệt hết vi sinh vật có mặt trong môi trường do có sẵn từ trong thành phần như nước, nguyên liệu, không khí và trên bề mặt các thiết bị tiếp xúc với môi trường. Những vi sinh vật này còn sống sót sẽ phát triển cạnh tranh với chủng sản xuất, làm hỏng quá trình lên men. Các vi sinh vật thường có sức bền với nhiệt, một số có mặt trong nguyên liệu dưới dạng bào tử, muốn diệt được chúng phải gia nhiệt tới $120 - 121^{\circ}\text{C}$ trong vài chục phút.

3. Khử trùng bằng nồi hấp



Hình 4.5: Nồi hấp áp lực cho lên men xộp (Autoclaver)



Hình 4.6: Thiết bị khử trùng Pasteur

Hiện nay phương pháp thanh trùng trong công nghệ vi sinh phổ biến là dùng hơi nước quá nhiệt do nồi hơi cung cấp. Trong lên men từng mẻ các thiết bị sau khi làm vệ sinh được khử trùng bằng hơi nóng tới 120 – 130⁰C, sau đó mới cho môi trường lỏng vào các nồi lên men khử trùng môi trường cùng với cả hệ thống khuấy và các đoạn đường ống, van tiếp cận. Việc gia nhiệt cao có thể dẫn đến sự phá huỷ các thành phần dinh dưỡng mất cảm với nhiệt và caramen hoá các nguồn đường cũng như xảy ra các phản ứng melanoid giữa đường với aminoacid hoặc các vitamin bị phá hỏng. Những thành phần mất cảm với nhiệt có khi phải khử trùng riêng, sau đó mới trộn lẫn hoặc khử trùng theo phương pháp khác như lọc qua phin vô trùng.

Ngoài cách khử trùng theo phương pháp hơi nước gián đoạn này, người ta còn dùng phương pháp khử trùng bằng hơi liên tục bằng cách cho môi trường chảy qua thiết bị khử trùng chuyên dùng ở nhiệt độ 140⁰C trong vài phút.

*** Khử trùng môi trường nuôi cấy bề mặt**

Môi trường nuôi cấy bề mặt thường là những hợp chất rắn, gồm có cám, bột và các chất dinh dưỡng. Trong sản xuất công nghiệp môi trường rắn được khử trùng bằng hơi nóng trong thiết bị chuyên dùng với áp suất dư 0,05 Mpa để đạt nhiệt độ 104 - 110⁰C. Điều chỉnh pH môi trường thích hợp bằng acid clohydric, sulfuric hoặc lactic.

Thanh trùng bằng hơi nóng có thể qua 2 giai đoạn. Giai đoạn đầu nâng nhiệt độ tới 100⁰C và đảo khối môi trường liên tục trong 15 - 20 phút. Giai đoạn sau nâng nhiệt độ tới 110⁰C khoảng 60 - 90 phút và cứ sau 15 phút lại đảo môi trường 3 - 5 phút.

*** Khử trùng môi trường lỏng để lên men bề sâu**

Khử trùng môi trường lỏng có thể chọn một trong những phương pháp gián đoạn hoặc liên tục. Phương pháp gián đoạn thường dùng trong trường hợp khối dịch không lớn, thí dụ dịch dùng trong các bình lên men thí nghiệm, các nồi nhân giống và các nồi lên men không quá lớn. Tiến hành lên men từng mẻ ngay ở trong nồi theo nguyên lí nồi hấp áp lực qua một số giai đoạn:

- Khử trùng nồi lên men và hệ thống đường ống tiếp xúc với môi trường bằng hơi nóng trực tiếp hoặc gián tiếp.

- Cho dịch môi trường đã pha chế vào nồi (lượng dịch bằng 3/4 thể tích của nồi và phải tính thêm phần nước ngưng khi cho hơi trực tiếp vào môi trường).

- Gia nhiệt tới nhiệt độ thanh trùng. Có 2 bước gia nhiệt: cho hơi vào vỏ nồi hoặc ống xoắn trao đổi nhiệt khi dịch tới gần 100°C thì cho hơi vào nồi trực tiếp với dịch để nâng nhiệt đến nhiệt độ tới hạn.

- Giữ ở nhiệt độ này trong khoảng thời gian thanh trùng cần thiết.

- Làm nguội dịch ở ngay trong nồi bằng cách cho nước vào vỏ hoặc ống xoắn trao đổi nhiệt cùng với hệ thống khuấy làm việc.

Phương pháp khử trùng này tương đối lâu và để tránh biến đổi trong thành phần dinh dưỡng của môi trường nên chỉ tiến hành ở áp suất 0,05 - 0,1Mpa với nhiệt độ 110 - 120°C trong khoảng 1 - 1,5 giờ từ lúc đạt được nhiệt độ tới hạn. Ngoài ra, có thể tiến hành thanh trùng liên tục ở nhiệt độ cao hơn ($140 - 145^{\circ}\text{C}$) và giữ ở thời gian ngắn hơn (5 - 15 phút) ở nhiệt độ này.

4. Khử trùng bằng hoá chất

Đối với những chất kém bền nhiệt dễ bị phân huỷ ở nhiệt độ cao thì việc khử trùng có thể bằng cách lọc qua phin lọc hoặc bằng các hoá chất diệt khuẩn. Nhưng việc sử dụng các hoá chất diệt khuẩn cần phải cân nhắc kĩ càng về tính gây độc cho vi sinh vật nuôi cấy, cho người sử dụng sản phẩm cũng như về vệ sinh an toàn lao động.

Một số hoá chất được dùng để khử trùng trong một số trường hợp ngoại lệ, như etylenoxyl, propiolacton rất thích hợp cho việc khử trùng các chất kém bền nhiệt như enzyme chẳng hạn. Etylenoxyl hỗn hợp với không khí theo tỉ lệ 3 - 8 % sẽ gây nổ, vì vậy khi dùng phải trộn lẫn với CO_2 hoặc N_2 . β - propiolacton có tác dụng mạnh hơn nhưng có độc tính (có thể gây ung thư đối với người).

5. Lọc khử trùng

Không khí dùng để cung cấp oxy được khử trùng bằng cách lọc khử trùng. Nguyên liệu lọc thường dùng là bông đá, bông thủy tinh hoặc bông. Hiện nay trong công nghệ vi sinh còn phổ biến loại lọc màng. Lọc khử trùng có thể sử dụng để làm sạch không khí.

Cung cấp khí sạch cho nuôi cấy bề mặt là một bộ phận những máy điều hoà và làm sạch khí đặt ở bên trên hoặc bên cạnh phòng nuôi cấy. Trong các xí nghiệp sản xuất quy mô lớn có thể thiết kế để sử dụng khí tuần hoàn. Không khí sau khi qua phòng nuôi cấy được đưa trở lại các máy điều hoà riêng chỉ bay ra khí quyển khoảng 10%. Đồng thời với việc cung cấp khí sạch còn có bộ phận điều nhiệt và điều ẩm để đảm bảo nhiệt độ và độ ẩm tối ưu cho quá trình nuôi cấy tránh làm khô môi trường.

Cung cấp khí sạch cho môi trường nuôi cấy chìm khá phức tạp. Đó là hệ thống các máy nén khí và phin lọc, ngoài ra còn có các bộ phận khác

như lọc sơ bộ, làm nguội khí, thùng chứa khí. Không khí sạch vô trùng được đưa vào nồi lên men qua các bộ phận phun tia kết hợp với khuấy đảo hoặc ống hồi lưu để tăng thêm độ hoà tan của ôxy trong môi trường.

VI. Phương pháp nuôi

1. Nuôi không liên tục

Trong phương pháp nuôi không liên tục (batch - culture) hay còn gọi là nuôi gián đoạn, thông thường vi sinh vật sinh trưởng đến chùng nào một thành phần chủ yếu của môi trường dinh dưỡng bị giới hạn. Khi đó culture chuyển từ pha lũy thừa sang pha cân bằng. Sinh trưởng gắn liền với sự thay đổi kéo dài của điều kiện nuôi, sự giảm chất dinh dưỡng và sự tăng khối lượng tế bào. Trong quá trình đó trạng thái sinh lí của tế bào cũng thay đổi. Thông thường việc tạo thành sản phẩm mong muốn liên quan với một trạng thái sinh lí nhất định trong pha sinh trưởng. Không thể duy trì được trạng thái này trong một thời gian dài.

Phương pháp nuôi gián đoạn được sử dụng trước hết cho sự lên men vô trùng, vì cách nuôi này là dễ dàng về mặt kỹ thuật.

1.1. Nuôi chìm

Phương pháp này dùng cho cả vi sinh vật kỵ khí và hiếu khí. Đối với nuôi vi sinh vật kỵ khí trong quá trình nuôi không cần sục khí chỉ thỉnh thoảng khuấy trộn còn với vi sinh vật hiếu khí thì phải sục khí liên tục. Đây là phương pháp hiện đại đã được dùng trong khoảng nửa cuối thế kỉ XX và cho kết quả rất to lớn đối với công nghệ vi sinh.

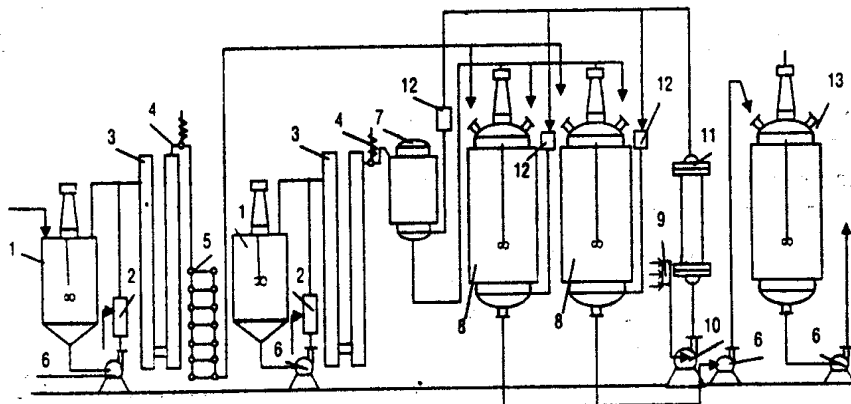
Nuôi cấy chìm hay nuôi cấy bề sâu dùng môi trường dịch thể. Chúng vi sinh vật cấy vào môi trường được phân tán khắp mọi điểm và chung quanh bề mặt tế bào được tiếp xúc với dịch dinh dưỡng. Đặc điểm này đòi hỏi trong suốt quá trình nuôi cấy phải khuấy và cung cấp ôxy bằng cách sục khí liên tục. Ngày nay phương pháp nuôi cấy chìm được dùng phổ biến trong công nghệ vi sinh để sản xuất men bánh mì, protein đơn bào, các chế phẩm vi sinh làm phân bón, thuốc trừ sâu, các enzyme, các acid amin, vitamin, các chất kháng sinh, các chất kích thích sinh học v.v...

Phương pháp nuôi cấy chìm có một số ưu điểm:

- Tốn ít mặt bằng trong xây dựng và lắp đặt dây chuyền.
- Chi phí điện năng, nhân lực và các khoản phụ cho một đơn vị sản phẩm thấp.
- Dễ tổ chức được xí nghiệp có sản lượng lớn.
- Các thiết bị lên men chìm dễ cơ khí hoá, tự động hoá .

Song phương pháp chìm cũng có một số nhược điểm sau:

- Đòi hỏi trang bị kỹ thuật cao, dễ bị nhiễm trùng toàn bộ. Vì vậy, những thiết bị lên men chìm cần phải chế tạo đặc biệt cẩn thận, chịu áp lực cao, đòi hỏi kín và làm việc với điều kiện vô trùng tuyệt đối (trong nuôi cấy bề mặt có thể loại bỏ phần đã nhiễm trùng, các phần khác vẫn còn dòn)

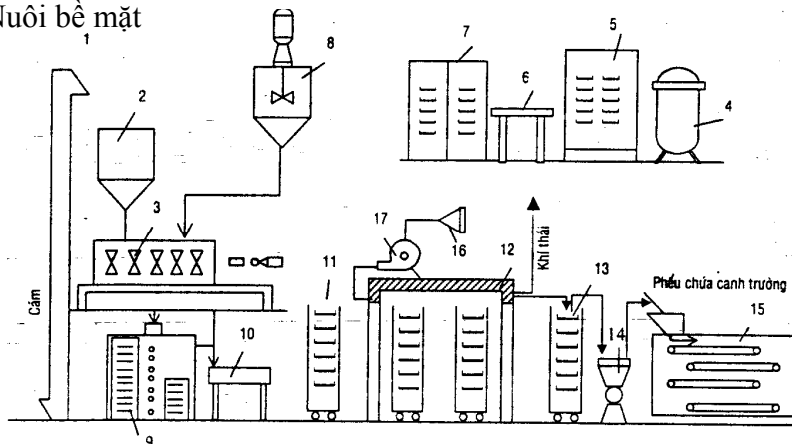


Hình 4.7: Sơ đồ nuôi chìm

1.Thùng trộn môi trường, 2.Nồi thanh trùng, 3.Thùng chứa, 4.Van xả, 5.Thiết bị trao đổi nhiệt, 6.Bơm li tâm, 7.Thùng chứa dịch, 8.Thùng lên men, 9.Lọc khí sơ bộ, 10.Nén khí, 11.Lọc khí bước một, 12.Lọc khí bước hai, 13.Thùng canh trường thành phẩm.

- Trong lên men chìm cần phải khuấy và sục khí liên tục vì vi sinh vật chỉ sử dụng được ôxy hoà tan trong môi trường. Khí được nén qua một hệ thống lọc sạch tạp trùng, hệ thống này tương đối phức tạp và dễ gây nhiễm cho môi trường nuôi cấy .

1.2. Nuôi bề mặt



Hình 4.8: Sơ đồ nuôi bề mặt

1. Gầu tải cám, 2. Thùng chứa cám, 3. Thiết bị khử trùng, 4. Nồi hấp, 5. Tủ chứa khay mốc giống đã vô trùng, 6. Bàn trung gian, 7. Phòng nuôi giống, 8. Thùng chuẩn bị môi trường, 9. Phòng hấp khay đựng giống, 10. Bàn trung gian, 11. Tủ chứa khay đã cấy giống, 12. Phòng nuôi giống sản xuất, 13. Tủ đựng khay giống sau sản xuất, 14. Máy nghiền, 15. Phòng sấy, 16. Lọc khí, 17. Quạt nén khí.

Trong phương pháp nuôi bề mặt hay nuôi nổi các cơ thể tồn tại ở bề mặt môi trường, do đó mà các tế bào hướng về khoảng không khí được cung cấp đầy đủ oxy. Ở các vầng nấm, chất dinh dưỡng của môi trường chỉ được hấp thu nhờ các tế bào chìm và được chuyển vào sợi nấm khí sinh. Sự tạo vầng trong phương pháp nuôi bề mặt dẫn tới một trạng thái sinh lí có ý nghĩa quan trọng đối với việc sản xuất các chất trao đổi nhất định của nấm, ví dụ như sản xuất acid citric hay các enzyme. Tuy nhiên người ta vẫn cố gắng đạt đến trạng thái sinh lí tương ứng với nuôi cấy chìm (hình 4.9).

1.3. Nuôi cấy xốp

Phương pháp nuôi cấy này thường thích hợp cho một số nấm mốc và xạ khuẩn. Việc nuôi thường được tiến hành trên các khay phẳng xếp chồng lên nhau và ủ trong các buồng chứa vô trùng đóng kín, giống được cấy vào bằng cách thổi bào tử vào bên trong buồng chứa. Một hình thức khác là nuôi hệ sợi nấm trên các cơ chất rắn như lúa mì, cám hoặc lúa nước trong các thùng quay chậm. Phương pháp này được dùng để sản xuất một số enzyme.

Theo phương pháp này, giống vi sinh vật hiếu khí sau khi cấy sẽ phát triển trên bề mặt và dần dần lan xuống phía dưới theo các kẽ hở giữa các cấu tử thành phần môi trường. Vi sinh vật sử dụng oxy của không khí để hô hấp đồng thời thải CO_2 ra môi trường xung quanh và toả nhiệt. Phương pháp này thường thích hợp cho các quá trình nuôi cấy nấm mốc, một số xạ khuẩn và vi khuẩn cũng có thể sản xuất theo phương pháp này.

Nuôi cấy vi sinh vật trên bề mặt môi trường rắn hoặc bán rắn có cơ chất dinh dưỡng là cám có trộn các loại bột ngũ cốc, đậu tương và một số thành phần dinh dưỡng khác. Nguồn carbon cho môi trường dinh dưỡng là các loại hạt như ngô, gạo, mì, đại mạch, đậu tương... được nghiền vỡ thành mảnh kích thước khoảng 1 - 3 mm. Độ ẩm của môi trường khoảng 55 - 60%. Khi vi sinh vật phát triển sẽ thải CO_2 gây hiện tượng toả nhiệt làm nóng và khô môi trường. Cần phải thông gió, phun mù hoặc làm ẩm trực tiếp để giữ cho độ ẩm tương đối của không khí khoảng 90%.

Nhược điểm của phương pháp:

- Tốn nhiều diện tích mặt bằng, khó cơ khí hoá và tự động hoá.
- Chi phí nhân công, điện nước... cho một đơn vị sản phẩm cao.

2. Nuôi cấy liên tục

Các phương pháp nuôi cấy liên tục có thể là:

- Phương pháp đơn cấp: nuôi vi sinh vật trong một nồi lên men, môi trường dinh dưỡng được bổ sung cũng như môi trường đã lên men rút ra khỏi nồi lên men một cách liên tục với cùng một tốc độ. Phương pháp này đơn giản, dễ ứng dụng vào sản xuất đối với tế bào nấm men để thu sinh khối hoặc sản phẩm là các chất chuyển hoá gắn trực tiếp với sự phát triển của tế bào.

- Phương pháp nhiều cấp: Vi sinh vật được nuôi ở hệ thống nồi lên men đặt làm nhiều cấp. Nồi thứ nhất được dùng cho vi sinh vật phát triển tốt nhất, các nồi sau để các tế bào tiết ra chất chuyển hoá. Môi trường dinh dưỡng mới được bổ sung vào nồi thứ nhất và từ đó lần lượt chảy vào nồi tiếp theo.

Trong các hệ thống hở của phương pháp nuôi liên tục thì nồi lên men thường xuyên được cung cấp thêm dung dịch dinh dưỡng mới, và cũng với mức độ như vậy, môi trường đã bị sử dụng một phần và các tế bào đã được rút đi. Việc khuấy và thông khí nhằm trộn đều chất chứa trong nồi lên men (hệ thống đồng nhất). Nhờ vậy các tế bào trong nồi lên men luôn luôn sinh trưởng theo hàm số mũ và luôn luôn tồn tại trong cùng những điều kiện sinh lí. Tuy nhiên, các tế bào đang phân chia và các tế bào không phân chia cùng tồn tại vì không có sự sinh sản đồng bộ.

Hệ thống liên tục được điều khiển bởi các yếu tố hoá học chemostas. Khi chuyển từ trạng thái này sang trạng thái khác thì trạng thái cân bằng mới đạt được sau một thời gian. Nhờ việc tăng tốc độ dòng vào mà sinh trưởng có thể được tăng gần tốc độ cực đại. Tốc độ pha loãng (D) và tốc độ sinh trưởng (μ) là bằng nhau trong phạm vi của tốc độ pha loãng tiêu chuẩn.

Các hệ thống liên tục có ý nghĩa công nghiệp. Đặc điểm của những hệ thống này là ở chỗ, các tế bào ở lại trong hệ thống hoặc đưa trở lại đó, trong khi môi trường chảy đi không ngừng. Vì các tế bào chỉ hoạt động trong một thời gian nhất định nên sau một thời gian nào đó cần phải thay thế hoặc bổ sung chúng. Thực chất thì hệ thống này là sự kéo dài pha cân bằng của sự nuôi gián đoạn nhờ việc đưa cơ chất vào một cách liên tục. Các tế bào, hoặc được giữ lại trong hệ thống như trường hợp của vi khuẩn acetic sinh trưởng trên vỏ bào gỗ của phương pháp lên men nhanh, hoặc được tách ra và đưa trở lại như trong sản xuất bia rượu. Trong việc làm sạch nước thải, các đám vi khuẩn cũng bị giữ lại trong các bể bùn sống. Một kiểu khác là cho dòng dung dịch dinh dưỡng chảy vào những váng nấm. Đó là kiểu nuôi nổi của hệ thống liên tục kín. Ở quy mô phòng thí

nghiệm, các hệ thống được kiểm tra, trong đó tế bào và cơ chất được tách riêng bằng các màng hoặc dụng cụ lọc (nồi lên men - màng).

Hiện nay việc nuôi liên tục được ứng dụng nhiều trong công nghiệp để sản xuất sinh khối và các sản phẩm lên men. Việc sản xuất các chất trao đổi bậc một và bậc hai cũng như các enzyme thường được tiến hành theo cách không liên tục.

Ưu điểm của phương pháp nuôi cấy liên tục:

- Giảm bớt thời gian làm vệ sinh thiết bị, khử khuẩn và làm nguội.
- Giảm bớt thể tích của toàn bộ thiết bị.
- Lao động dễ dàng và có khả năng tự động hoá các thao tác.
- Tăng hiệu suất của toàn bộ quá trình công nghệ nhờ chọn lọc tốt nhất các điều kiện thao tác.

Nhược điểm:

- Đòi hỏi cán bộ và công nhân thành thạo chuyên môn. Khi hoạt động, cùng một lúc phải có đủ các dạng năng lượng cần thiết, giá thành cao đối với tự động hoá và dụng cụ đo lường hiện đại.

- Trong quá trình nuôi cấy tế bào vi sinh vật có thể có những đột biến bất ngờ xảy ra làm hỏng cả quá trình.

- Phải vô khuẩn tuyệt đối trong toàn bộ thời gian thao tác. Vì trong quá trình nuôi liên tục đã tạo ra các điều kiện tối ưu cho chủng nuôi cấy thì cũng tối ưu đối với nhiều loài tạp khuẩn.

- Đối với các vi sinh vật sinh hệ sợi như nấm mốc và xạ khuẩn rất khó tách hệ sợi một cách vô khuẩn và đặc biệt là hiệu suất chuyển hoá thường thấp hơn so với nuôi cấy từng mẻ với những chủng sản ra chất chuyển hoá không gắn với sự phát triển.

VII. Nồi lên men

1. Sơ đồ chung

Nồi lên men công nghiệp có hình trụ, có tỷ lệ chiều cao với đường kính của nồi thích hợp, thể có thể từ vài m³ đến khoảng 100m³ hoặc có khi đến 500m³ tùy thuộc vào quy mô sản xuất. Nồi thường được làm bằng thép không gỉ. Đối với quá trình lên men vô trùng thì nồi lên men và cả các van đường ống phải có tính chịu áp suất để có thể khử trùng ở áp suất cao và trong thời gian lên men áp suất dư được duy trì suốt cả quá trình ngăn cản sự xâm nhập của vi sinh vật lạ.

Các nồi lên men được thiết kế và chế tạo sao cho có thể tạo được những điều kiện tối ưu cho từng quá trình lên men. Những yêu cầu có thể đạt được hoạt tính tối đa của vi sinh vật được thực hiện thông qua một số

nguyên tắc kỹ thuật. Về chi tiết có sự khác nhau rất lớn giữa các kiểu nồi lên men. Mỗi một loại lên men đều có một số yêu cầu riêng biệt. Đối với lên men chìm vô trùng những yêu cầu đó là giống nhau. Vì vậy, ở đây chủ yếu giới thiệu nồi lên men thuộc dạng nuôi cấy hiếu khí (chìm, vô trùng và sục khí).

Ngoài hệ thống thông khí và hệ thống làm nóng và làm lạnh, trong nồi lên men còn có các hệ thống ống cây, ống nạp môi trường, ống lấy mẫu, ống nạp chất chống bọt hoặc các chất khác. Ngoài ra còn có một số máy đo như các điện cực đo pH, điện cực đo oxy hoà tan, điện cực chống bọt, ống nhiệt kế nối với nhiệt kế tự ghi và một áp kế đặt trên ống thoát. Sau cùng có các cửa quan sát để kiểm soát bên trong nồi và một cửa để thường kỳ tổng vệ sinh nồi .



Hình 4.9: Nồi lên men liên tục thu sinh phẩm

Đáy dưới ở phần cuối cùng là ống thải có đường kính lớn để tháo bã dịch, gồm bã môi trường và xác vi sinh vật. Nồi lên men được đặt trên các chân chữ y, bằng sắt hoặc các bộ gắn vào nền nhà và hàn chắc vào vỏ nồi. Chiều cao của chân đỡ này phải đảm bảo cho người ta vào xem xét phần đáy nồi một cách dễ dàng. Ở phần trên, có sàn lửng với lan can và cầu thang cho phép nhân viên đi lại kiểm tra sự hoạt động của thiết bị, gọi là giàn thao tác.

2. Hệ thống thông khí và hệ thống khuấy

Sự thông khí được thực hiện nhờ việc cung cấp và phân bố không khí cùng với sự khuấy trộn. Các hệ thống thông khí và khuấy trộn rất đa dạng. Nhiều kiểu thông khí nhờ các trục khuấy rỗng, ống thông khí đặc

biệt, phân tán khí thành các tia nhỏ nhờ các ống hình vành khuyên hoặc lắp thành giàn có khoan các lỗ nhỏ... Cũng có nổi lên men không bố trí cánh khuấy mà dùng nguyên lý bơm vòng liên tục khối dịch kết hợp với sục khí có ống hồi lưu.

Khuấy trộn và thông khí cũng làm cho các tế bào và cơ chất được phân bố đồng đều và các bọt sinh ra bị phá vỡ. Trong lên men kỵ khí việc khuấy trộn cũng cần thiết để đảm bảo sự phân bố đồng đều và ngăn cản sự lắng đọng của tế bào.

Bên trong nồi lên men, ngoài trục khuấy có gắn máy khuấy nằm ngang còn có thiết bị thông khí. Những bọt không khí thoát ra từ các lỗ khoan trên mặt ống hình vành khuyên được phân tán vào môi trường nhờ cánh khuấy nằm ngang đặt ở phía trên. Ngoài công cụ đó, ống hình vành khuyên dùng thông khí cũng còn được dùng để dẫn hơi vào nồi khi khử khuẩn. Các tấm chắn hàn dọc theo thành trong của nồi được dùng để tăng độ khuấy trộn và thông khí.

3. Hệ thống làm nóng và làm nguội

Nhiệt độ lên men tối ưu được điều chỉnh bằng cách cho nước nóng hoặc nước lạnh vào vỏ kép hay đưa vào trong nồi nhờ các ống xoắn ruột gà. Trong lên men công nghiệp thường phải bơm nước lạnh để làm nguội khối dịch vì trong quá trình hoạt động của vi sinh vật toả nhiệt rất lớn.

Những nồi lên men hiếu khí làm việc ở điều kiện vô trùng được chế tạo bằng thép cuộn tròn, bề dày đủ chịu đựng áp lực của hơi nước dùng khử trùng, hàn với đáy bán bán cầu như trong chế tạo nồi hơi. Vì dùng hơi nước nên các nồi lên men cũng được kiểm tra như nồi hơi. Nắp trên thường hàn giá đỡ khoẻ để đỡ động cơ máy khuấy và hộp giảm tốc. Trục khuấy đứng được lắp ghép với bộ phận giảm tốc và đi vào nồi lên men thông qua một hộp đệm trục có gioăng hơi nước để ngăn tạp khuẩn gây nhiễm môi trường. Trên những nồi lên men thể tích nhỏ, có làm thêm vỏ dẫn nước làm nguội, còn ở những nồi lớn hơn 10m³ có các ống cuộn tròn theo thành nồi để dẫn chất lỏng điều chỉnh nhiệt độ và để dẫn hơi nóng dùng khử trùng. Ở những nồi có thể tích lớn, ống ruột gà cuộn theo chiều đứng của thành nồi.

4. Các thiết bị kiểm tra

- Kiểm soát sự tạo thành bọt: Những môi trường dùng trong công nghiệp vi sinh, khi thông khí và khuấy mạnh liên tục tạo ra rất nhiều bọt, có thể tràn ra khỏi nồi lên men và gây nhiễm tạp môi trường.

Việc sử dụng những thiết bị phá bọt là những cánh khuấy đặt trên trục khuấy ở phần trên của nồi lên men không đem lại kết quả, nên người

ta thiên về dùng những chất phá bọt. Những chất chống bọt thiên nhiên hay tổng hợp là những dầu thực vật, mỡ cá voi, những alcol đồng đẳng cao, những silicon hay các chất hoạt động bề mặt. Những chất đó được dùng riêng hay hỗn hợp hoặc pha thành dung dịch. Trước khi có các máy tự động phá bọt, bắt buộc phải thường xuyên theo dõi sự tạo bọt và cho chất phá bọt vào một cách thủ công.

Hiện nay tất cả các nồi lên men đều được lắp thiết bị tự động, ngay khi bọt bắt đầu hình thành là máy tự động nạp vào nồi một lượng nhất định chất phá bọt.

- Đo công suất tiêu thụ: Trong các cơ sở công nghiệp, công suất tiêu thụ thường được đo bằng một oát-mét biểu thị công suất của động cơ máy khuấy. Công suất tiêu thụ này thay đổi trong quá trình lên men cùng với sự gia tăng của độ nhớt môi trường.

Trong những nồi lên men quy mô phòng thí nghiệm, việc đo lường này cũng đặc biệt quan trọng bởi vì nó cho phép xác định những trị số cần thiết cho việc tính toán thiết kế những nồi lên men công nghiệp.

Những số lượng đo được bằng oát-mét đối với nồi lên men nhỏ không chính xác vì ma sát của trục với hộp đệm trục, vì thế người ta dùng những lực kế dựa theo nguyên tắc của cầu Uytson cho phép đo rất chính xác lực kéo, diện trở của nhánh cầu đặt trong trục biến đổi với sự biến dạng rất nhỏ do lực kéo trục gây nên.

- Đo ôxy hoà tan: Đo ôxy hoà tan trong nồi lên men có tầm quan trọng hàng đầu. Đo ôxy hoà tan theo phương pháp cực phổ rất chính xác nhưng đòi hỏi phải làm trên những mẫu vô khuẩn lấy từ nồi lên men.

Việc sử dụng các màng mỏng bằng teflon có thể khử khuẩn ở nhiệt độ cao và có độ thấm ôxy khá đủ, cho phép thiết kế những thiết bị đo ôxy hoà tan trong môi trường.

Trong quá trình lên men, nhu cầu ôxy của môi trường nuôi cấy luôn thay đổi theo thời gian, vì vậy có thể điều chỉnh thông số này bằng máy tự động thay đổi lưu lượng không khí và tốc độ khuấy để giữ cho lượng ôxy hoà tan cần thiết trong môi trường.

- Đo độ nhớt: trong quá trình phát triển của vi sinh vật, nhất là của các nấm sợi, môi trường lỏng trở thành nhớt và có đặc tính “giả dẻo” gây cản trở cho việc khuấy trộn và thông khí. Độ nhớt của môi trường được đo bằng một máy quay có tốc độ không đổi ở một nhiệt độ xác định, khi tốc độ giảm là do độ nhớt tăng lên.

-Đo mật độ quang học được thực hiện bằng quang kế điện. Một trong hai cốc của máy so màu được đậy kín và có dòng môi trường vô

khuẩn đi qua rồi trở về nồi nhờ một bơm nhu động. Mặt khác, người ta thử dùng máy đo độ đục có bộ phận quang điện bọc kín, đặt ngay bên trong nồi lên men để đo mật độ quang. Cũng theo nguyên tắc đó, việc đo lường liên tục số lượng đường do vi sinh vật tiêu thụ trong quá trình phát triển được thực hiện bằng khúc xạ kế.



Hình 4.10: Máy so màu tử ngoại (spectrophotometer Shimadzu)

Câu hỏi ôn tập chương 4

1. Những điều kiện cần thiết cho một quá trình lên men trong sản xuất công nghiệp?
2. Yêu cầu chung của giống vi sinh vật dùng cho công nghệ lên men?
3. Các phương pháp khử trùng thường sử dụng trong sản xuất công nghiệp?
4. Những ưu và nhược điểm của phương pháp nuôi cấy gián đoạn và liên tục ?

Chương 5

Sự thu nhận sinh khối tế bào

I. Tiêu chuẩn về chủng

1. Sử dụng nguyên liệu rẻ tiền

Các nguyên liệu thích hợp là carbohydrate (ri đường, dịch kiềm sulfid, cellulose, tinh bột, cặn sữa), cacbua hydro (parafin, methane, các hoá chất từ dầu hoả như methanol). Ngoài ra, năng lượng bức xạ của mặt trời cũng được tảo sử dụng vào việc cố định CO₂ tự dưỡng. Vi sinh vật có thể sử dụng nguồn carbon và năng lượng với hiệu suất cao. Carbohydrate được chuyển tới 50%, cacbua hydro tới 100% thành chất khô của tế bào.

2. Tốc độ sinh trưởng

Vi sinh vật khác với sinh vật khác ở chỗ thời gian nhân đôi rất ngắn. Ở vi khuẩn, thời gian này khoảng 0,3 - 2 giờ, ở nấm men và tảo là 2 - 6 giờ. Do vậy, với vi sinh vật có thể sản xuất được nhiều sinh khối trên đơn vị thời gian. Đối với tính kinh tế của một phương pháp thì sinh khối được tổng hợp trên một đơn vị thời gian có ý nghĩa cơ bản.

3. Hàm lượng protein cao

Vi sinh vật đơn bào có hàm lượng protein khoảng 50 - 60% chất khô. Hàm lượng này có tính đặc hiệu loài và chịu ảnh hưởng nhiều bởi điều kiện nuôi. Cần tạo ra các phương pháp nhằm duy trì những thành phần khác của tế bào, ví dụ chất dự trữ, ở mức càng thấp càng tốt để đạt được một hàm lượng protein tương đối cao. Cần chú ý rằng, hàm lượng protein chỉ bao hàm protein “thật sự” chứ không gồm các thành phần nitơ phi protein khi xác định nitơ theo Kjeldahl, như nucleic acid và các peptide của thành tế bào vi khuẩn.

4. Chất lượng protein cao

Hàm lượng các amino acid không thay thế qui định chất lượng protein. Tiêu chuẩn này cũng có tính đặc hiệu loài và ở mức độ nhất định chịu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi. Nhiều amino acid có mặt trong các protein vi sinh vật với hàm lượng cao giống như trong các sản phẩm thịt, sữa. Protein vi sinh vật đặc biệt giàu lysine. Trái lại, hàm lượng các amino acid chứa lưu huỳnh thấp.

5. Khả năng tiêu hoá cao của protein

Khả năng được tiêu hoá của protein vi sinh vật một mặt bị hạn chế

bởi các thành phần nitơ phi protein (ví dụ nucleic acid, peptide của thành tế bào vi sinh vật), mặt khác bởi sự “bao bọc” protein bằng thành tế bào của vi sinh vật, thành này rất khó cho các enzyme tiêu hoá đi qua. Đối với protein đã tách khỏi tế bào thì không cần quan tâm đến vấn đề này. Tuy nhiên, để tách riêng protein thì vấn đề cơ bản lại là khả năng hoà tan của thành tế bào. Vì thế bản chất của thành tế bào là một tiêu chuẩn cho việc lựa chọn vi sinh vật thích hợp.

6. An toàn về độc tố

Vi sinh vật gây bệnh và các cơ thể chứa những thành phần độc hoặc nghi ngờ về sinh lý dinh dưỡng ở dạng khó tách riêng thì không được dùng để sản xuất protein đơn bào. Việc chứng minh rằng những thành phần như vậy không tồn tại ở dạng vết là rất khó khăn và đòi hỏi sự xét nghiệm kéo dài nhiều năm về mặt độc tố và sinh lý dinh dưỡng. Vì thế cho tới nay protein đơn bào hầu như chỉ được dùng trong dinh dưỡng động vật.

7. Thuận tiện về kỹ thuật

Vi sinh vật sử dụng cho sản xuất công nghiệp phải dễ tách và dễ xử lý. Các tế bào lớn như nấm men được tách bằng ly tâm dễ hơn nhiều so với tế bào vi khuẩn. Chỉ khi nào vi sinh vật sinh trưởng tốt ở mật độ cao thì mới có thể đạt được năng suất cao. Khả năng sinh trưởng tốt ở nhiệt độ cao hơn của các cơ thể ưa nhiệt và chịu nhiệt làm giảm chi phí cho việc làm nguội. Tính không mẫn cảm với sự nhiễm tạp là một tiền đề cho việc sản xuất protein không vô trùng.

II. Mối quan hệ với sinh trưởng

1. Tốc độ sinh trưởng

Tốc độ sinh trưởng có tính đặc hiệu loài và phụ thuộc vào điều kiện nuôi. Nói chung vi khuẩn có tốc độ sinh trưởng cao là do kích thước nhỏ nhưng tỷ lệ giữa diện tích bề mặt với thể tích tế bào lớn. Sự phối hợp các quá trình trao đổi chất riêng rẽ được điều khiển bởi nhiều cơ chế điều hoà có tính đặc hiệu loài.

Ngoài ra, tốc độ sinh trưởng cực đại có thể có của một chủng trên các môi trường khác nhau trong những điều kiện nuôi như nhau thường không giống nhau. Chẳng hạn, *Escherichia coli* trên môi trường phức hợp như canh thang có thời gian thế hệ là 20 phút, trên môi trường tổng hợp chứa glucose - 50 phút, chứa acetate - 80 phút. Sự khác biệt này được quyết định bởi hệ enzyme cần cho sinh trưởng trên các cơ chất khác nhau.

Trên môi trường muối khoáng với glucose là nguồn carbon và năng

lượng, tế bào sinh trưởng với tốc độ nhỏ hơn so với trên môi trường phức hợp hữu cơ. Khi nuôi cấy trong môi trường acetate thì vi sinh vật còn phải tổng hợp các enzyme của quá trình tái tạo glucose. Trong việc sử dụng những cơ chất như vậy và những cơ chất khác bên ngoài trao đổi chất trung gian trung tâm của các cơ chất thông thường (ví dụ cacbuahydro) thì một phản ứng enzyme trong phạm vi trao đổi chất ngoại vi cũng có thể có vai trò chủ chốt hạn chế tốc độ sinh trưởng. Chẳng hạn sự hoạt hoá acetate có thể là một “phản ứng chốt”.

Để có thể nuôi cấy vi sinh vật với tốc độ sinh trưởng cực đại thì tiền đề cơ bản là nghiên cứu những điều kiện nuôi tối ưu (thành phần dịch dinh dưỡng, sự thông khí, nhiệt độ).

2. Trao đổi protein và nucleic acid

Khoảng 90% protein của tế bào vi sinh vật là các protein enzyme, 10% còn lại là các protein cấu trúc của màng và thành tế bào. Các protein có khả năng hoạt động có một cấu trúc xác định do trật tự các amino acid quy định. Do đó, trong tổng hợp protein, vấn đề không chỉ là sự nối các amino acid với nhau nhờ liên kết peptide mà sự nối còn phải diễn ra theo một trật tự xác định.

Thông tin về trật tự amino acid của protein được chứa trong chất liệu di truyền của tế bào, tức là trong DNA, ở dạng trật tự các bazơ của nucleotide. Để truyền thông tin di truyền từ nhân sang ribosome là nơi tổng hợp protein, thông tin về một hoặc nhiều protein được ghi lên RNA thông tin (RNAm). Sự phiên âm này được thực hiện bằng việc tổng hợp RNAm. RNAm một sợi chứa thông tin di truyền của một operon. Đó là thông tin về một hay nhiều enzyme hoặc về các dưới đơn vị của các enzyme, những dưới đơn vị này tạo thành một đơn vị chức năng. Operon lactose của *Escherichia coli* chứa thông tin về ba enzyme. Ở *Salmonella typhimurium* thì operon tham gia vào tổng hợp histidine chứa 9 enzyme.

Trong quá trình phức tạp của tổng hợp protein, một quá trình gắn liền với sự phối hợp của ba thành phần phản ứng có tính đặc hiệu, tức là của 20 amino acid khác nhau, của aminoacyl - RNAt - synthetase và của phân tử RNAt, ngoài ra còn có cả sự nhận biết và phản ứng của codon và anticodon thì rất có thể sự tổng hợp protein là phản ứng quy định tốc độ sinh trưởng cực đại. Trong quá trình sinh trưởng không phải mỗi gen đều được biểu hiện vì tế bào có các cơ chế điều hoà hoạt động sao cho chỉ những enzyme cần thiết cho tế bào trong những điều kiện nuôi nhất định mới được tổng hợp. Cũng không phải mọi gen đều là gen cấu trúc. Tức là gen chứa thông tin cho một protein hay cho chuỗi polypeptide của một

protein enzyme. Nhiều gen có chức năng điều hoà. Khoảng 1000 gen được biểu hiện tác dụng. Tế bào chứa khoảng 1000 protein khác nhau. Có một số loại protein mà tế bào chỉ chứa vài phân tử (ví dụ protein chất kiềm chế) nhưng tế bào lại chứa tới hàng nghìn bản sao các enzyme của các con đường trao đổi chất trung tâm. Những enzyme xúc tác tổng hợp các chất trao đổi mà tế bào chỉ chứa một lượng nhỏ (ví dụ vitamin) thì tồn tại với khoảng một trăm bản sao.

3. Sự đồng hoá các nguồn carbon khác nhau

3.1. Carbohydrate

Những phụ phẩm và phế phẩm sau đây của công nghiệp được dùng để sản xuất protein đơn bào:

- Các sản phẩm chứa saccharose của công nghiệp đường (rỉ đường củ cải và rỉ đường mía, bã mía, cặn rỉ đường, nước rửa thô) và những quả khác chứa nhiều đường.

- Nước thải của xí nghiệp sữa chứa lactose.

- Dịch kiềm sulfid chứa pentose và hexose là dịch thuỷ phân gỗ cũng như cặn bã của chúng.

- Việc sử dụng các phần thực vật giàu tinh bột (khoai lang, sắn, khoai tây) và cellulose (ví dụ rơm rạ) không qua thuỷ phân trước thành monosaccharide hoặc disaccharide chưa được phổ biến trong sản xuất. Để có thể sử dụng các cơ chất giàu tinh bột người ta đã mô tả một phương pháp nuôi hỗn hợp giữa *Endomycopsis fibuliger* và *Candida utilis* (phương pháp Symba). Các nguyên liệu chứa cellulose (rơm rạ được xử lý bằng NaOH) đã được chuyển hoá có kết quả thành protein ở qui mô phòng thí nghiệm nhờ sự phối hợp *Trichoderma viride* với *Candida utilis* hoặc *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. Hydrocarbua

- Methane là thành phần chính của khí mỏ, nó còn được tạo thành qua con đường vi sinh vật nhờ sự lên men methane và sinh ra trong các bể chứa bùn mục nát của các thiết bị làm sạch. Việc đồng hoá methane nhờ vi khuẩn đang được nghiên cứu mạnh mẽ nhằm mục tiêu sản xuất protein ở qui mô công nghiệp. Sử dụng methane có một số ưu điểm so với alkan mạch dài. Chẳng hạn không phải rửa tế bào một cách tốn kém bằng hexan hoặc các dung môi khác cần thiết cho việc loại bỏ các parafin còn sót lại.

Việc cung cấp tối ưu cơ chất ở dạng khí cho các tế bào nuôi chìm gặp nhiều khó khăn. Việc cung cấp methane còn khó khăn hơn do nhu cầu

về ôxy để ôxy hoá CH_4 là cơ chất có tính khử mạnh nhất trong tất cả các nguồn carbon. Vì thế người ta nghiên cứu sử dụng hỗn hợp ôxy - methane (có bổ sung CO_2 và N_2) nhưng cần phải tránh một tỉ lệ hỗn hợp gây nổ. Do tính hoà tan kém của O_2 và CH_4 cho nên nếu chỉ đưa dòng khí vào một lần thì cơ chất không được sử dụng hoàn toàn; việc tái tuần hoàn dòng khí sẽ nâng cao mức độ sử dụng cơ chất. Có thể tránh được những vấn đề nêu lên nếu thay methane bằng methanol thu được từ methane nhờ sự ôxy hoá hoá học. Tuy nhiên methanol đắt hơn nhiều so với methane hoặc khí mỏ. Thu hoạch tế bào từ methanol cũng thấp hơn. Nhưng vì methanol dễ tan trong nước nên có thể được dùng ở nồng độ cao hơn (2 - 3%).

- Alkan: Việc sản xuất protein vi sinh vật trên cơ sở alkan được thực hiện nhờ nấm men thuộc giống *Candida* (ví dụ *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*). Vi khuẩn, đặc biệt là đại diện của các giống *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* và *Nocardia* có khả năng sử dụng các alkan (C_6 - C_{18}) và những hydrocarbua khác, nhưng khả năng này hiện nay chưa được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp.

3.3. Sự cố định CO_2 tự dưỡng

CO_2 là nguồn C được tái sinh không ngừng trong vòng tuần hoàn của tự nhiên, đã sớm được chú ý đặc biệt đối với việc sản xuất protein đơn bào. Hai quá trình có ý nghĩa đối với vi sinh vật học công nghiệp là:

- Sự cố định CO_2 quang hợp nhờ tảo.

- Sự cố định CO_2 hoá tổng hợp với hydro là nguồn năng lượng nhờ vi khuẩn hydro.

Sự ôxy hoá hydro: những loài được tập hợp dưới tên chung là vi khuẩn khí nổ có khả năng ôxy hoá hydro ở dạng khí tạo ra năng lượng để thực hiện quá trình đồng hoá CO_2 theo con đường Calvin. Thuộc về nhóm vi khuẩn này có những đại diện của giống *Hydrogenomonas*, thuộc loại tự dưỡng không bắt buộc. Một số loài vi khuẩn khác như *Nocardia opaca* cũng có khả năng này.

Trong việc nuôi tảo thì các loại tảo lục đơn bào như *Chlorella* và *Scenedesmus* được chú ý hơn cả. Sản lượng protein tảo trên một ha có thể đạt được 10 - 15 tấn/năm, cao hơn nhiều lần so với cây nông nghiệp. Muốn đạt được sản lượng này cần có điều kiện khí hậu thuận lợi, ánh sáng mặt trời mạnh và kéo dài để có đầy đủ năng lượng. Ngoài ra, quá trình nuôi tảo đòi hỏi những thiết bị nuôi cấy đặc biệt. Thông thường người ta dùng những bể phẳng hoặc những máng phẳng uốn khúc có các hệ thống lật đảo nhằm hạn chế sự lắng của tế bào và đưa tế bào luôn trở lại bề mặt

chiếu sáng. Việc cung cấp nồng độ CO₂ tối ưu (4 - 5%) là cần thiết. Sự phát triển sản xuất protein đơn bào từ tảo được đẩy mạnh nhờ việc dùng tảo lam *Spirulina maxima*. Tảo này sinh trưởng thành sợi và có thể tách ra bằng phương pháp lọc. Chúng cho sản lượng cao, protein có giá trị và không đáng ngại về mặt độc tố. Về phương diện kinh tế thì việc nuôi tảo có thể góp phần làm sạch môi trường trong các thủy vực tránh được hiện tượng phú dưỡng

III. Chất lượng sản phẩm

1. Chất lượng protein

Chất lượng protein được quy định trước hết bởi hàm lượng và tỷ lệ cân đối của các amino acid không thay thế trong protein của tế bào. Thông tin di truyền của DNA quy định thành phần amino acid. Tương ứng với những sai khác trong thông tin di truyền của các cơ thể ta thấy có sự khác nhau về thành phần amino acid giữa các nhóm cơ thể riêng biệt cũng như giữa các loài của một giống. Vì vậy, việc tìm kiếm những cơ thể có hàm lượng đặc biệt cao về các amino acid không thay thế là có triển vọng.

Cũng có sự khác biệt nhỏ về thành phần amino acid giữa các culture của một chủng trên những môi trường khác nhau và ở những pha nuôi cấy khác nhau. Trong những điều kiện khác nhau sẽ diễn ra sự tạo thành những hệ enzyme khác nhau. Thành phần amino acid của các protein enzyme riêng biệt là khác nhau. Chẳng hạn pyrophosphatase của nấm men bánh mì chứa 1,6% methionin, còn triosophosphatdehydrogenase chứa 2,8%. Những sự khác nhau như vậy chỉ biểu hiện yếu trên toàn bộ protein vì chúng được san bằng bởi vô số các protein enzyme khác. Như vậy, sự khác nhau chỉ biểu hiện khi các protein tương ứng chiếm tỷ lệ phần trăm lớn trong tổng số protein. Nhờ đột biến có thể tăng lượng một enzyme lên khoảng 5% hoặc hơn trong protein tổng số của tế bào. Những thể đột biến như vậy chỉ được duy trì trong quá trình nuôi liên tục nếu tốc độ sinh trưởng của nó không bị giảm so với chủng ban đầu.

Việc nghiên cứu di truyền ở vi khuẩn có khả năng đưa vào vật liệu thông tin di truyền đối với một protein đặc hiệu giàu các amino acid không thay thế. Tính ổn định và tính thích hợp của các chủng như vậy đối với sự lên men công nghiệp còn cần được kiểm tra. Sinh học phân tử và di truyền học nêu ra những điểm tựa nhằm tối ưu hoá chất lượng protein của vi sinh vật trong phạm vi nhất định.

Khi xem xét hàm lượng amino acid của tế bào cũng cần lưu ý, các amino acid hoà tan chiếm khoảng 5% chất khô của tế bào. Đối với chất

lượng protein đơn bào thì các vitamin cũng có ý nghĩa; một số chúng tồn tại trong phần protein như những cofactor của các enzyme. Vitamin chiếm tỷ lệ nhất định so với protein trong tế bào. Hàm lượng vitamin ergosterine của *Candida utilis* có thể được chuyển thành vitamin D₂ (calciferol) khi chiếu tia UV lên chúng. Thông thường, hàm lượng ergosterine của nấm men chiếm khoảng 0,5 - 1% chất khô.

2. Hàm lượng protein

Một tế bào vi khuẩn đang sinh trưởng nhanh dưới những điều kiện nuôi tối ưu có hàm lượng protein khoảng 50%, tế bào nấm men là khoảng 40%. Không thể nâng cao tỷ lệ này, bởi vì phần còn lại của vật chất tế bào là cần thiết cho khả năng sống của tế bào. Trong số này có RNA (10 - 20%), DNA (2%), các thành phần của thành tế bào (20% là murein ở vi khuẩn, polysaccharide và kitine ở nấm men và nấm sợi), lipid của màng tế bào (5 - 10%), cũng như các viên gạch cấu trúc có phân tử lượng thấp và các chất trao đổi của trao đổi chất trung gian (5 - 10%).

Trên những môi trường không cân đối hàm lượng các chất dự trữ tăng lên mạnh, chúng có thể chiếm tới hơn 50% chất khô. Khi thừa carbohydrate và thiếu nitơ thì việc tổng hợp mỡ nhờ vi sinh vật (sự tích lũy mỡ nội bào) có thể diễn ra. Ở vi khuẩn, chất dự trữ thường gặp là acid poly - β - hydroxybutyric, ở nấm men, nấm sợi và tảo là mỡ hoặc glycogen. Sự tích lũy chất dự trữ có thể tránh được, phổ biến là thông qua quá trình nuôi cấy. Cũng có thể do đột biến mà khả năng tổng hợp chất dự trữ bị ngừng.

Hàm lượng các thành phần của tế bào cần cho sự sống như nucleic acid, polymer thành tế bào, lipid của màng không thể giảm đi một cách đáng kể mà không gây tổn hại hoặc làm mất đi những hoạt tính trao đổi chất cần thiết cho sự sinh trưởng. Trong phạm vi nhất định thì thành tế bào là một ngoại lệ. Cho tới nay vẫn chưa rõ liệu thành phần và độ dày của thành tế bào ở các chủng tồn tại trong tự nhiên có cần thiết đối với các chủng sản xuất hay không. Có lẽ do đột biến mà thành phần tế bào bị giảm nhưng không ảnh hưởng đến sinh trưởng. Làm giảm độ dày của thành tế bào và thay đổi thành phần của nó không những có tác dụng dương tính đến phần protein, mà còn đến sự hấp thụ chất và đến tính bị phân huỷ của tế bào trong việc tách protein, hoặc đến độ tiêu hoá của protein.

3. Hàm lượng nucleic acid

Hàm lượng cao về nucleic acid của vật chất tế bào vi sinh vật không những làm hạ thấp phần protein mà còn bất lợi cho việc sử dụng vật chất

tế bào vào dinh dưỡng của con người. Khi tiêu hoá nucleic acid thì các nucleotide được giải phóng, và sau khi được hấp thụ lại chúng sẽ bị phân huỷ qua adenine hoặc guanine tới acid uric. Sự phân huỷ tiếp tục acid này không xảy ra ở người vì không có uricase. Nếu nồng độ nucleic acid trong cơ thể cao sẽ gây ra chứng thấp khớp, ngoài ra còn có nguy cơ tạo sỏi thận và sỏi bàng quang do độ hoà tan thấp của acid này. Lượng nucleic acid hấp thụ qua dinh dưỡng không được quá 2g mỗi ngày. Trong dinh dưỡng động vật vấn đề này ít quan trọng hơn, vì chúng có khả năng phân huỷ tiếp tục acid uric. Hàm lượng nucleic acid của sinh khối có thể bị giảm nhờ các biện pháp sau đây:

- Giảm mạnh tốc độ sinh trưởng. Mặc dù điều này có thể thực hiện được thông qua giai đoạn thứ hai của sự nuôi liên tục nhưng không kinh tế.

- Chiết rút RNA, ví dụ bằng dung dịch NaCl 10% nóng.

- Thủy phân RNA bằng kiềm và tách protein hoà tan trong đó bằng kết tủa.

- Phân huỷ RNA bởi enzyme nhờ các nuclease đưa vào hay nuclease của bản thân tế bào. Các nucleotide sinh ra khi phân huỷ nucleic acid có thể được dùng như những chất thơm và chất gây vị (IMP, GMP), hoặc như những chất ban đầu của các hoạt chất (ví dụ kinetine và các hợp chất sinh học).

IV. Giống khởi động

1. Nấm men bánh mì

1.1. Vi sinh vật

Nấm men sử dụng trong các xí nghiệp sản xuất men bánh mì là loại *Saccharomyces cerevisiae*. Trong công nghiệp tuyển chọn chủng nấm men phải đảm bảo các đặt tính sau:

- Có khả năng nở bột tốt, làm khối bột nhào nhẹ và xốp.

- Dễ hoà với nước.

- Có đặt tính sinh hoá ổn định và độ bền vững tốt (khó bị tự phân).

- Bền nhiệt, có thể kéo dài hoạt tính enzyme ở nhiệt độ cao.

- Có khả năng lên men các nguồn đường glucose, fructose, maltose, saccharose.

- Khả năng sinh sản nhanh, cho năng suất cao trong quá trình lên men.

- Dễ tách sinh khối và dễ bẻ gãy sau khi ép.

1.2. Sinh hóa và điều hoà

- Kiểm chế dị hoá bởi glucose: trong sự sinh trưởng hiếu khí của nấm men bánh mì, ở các nồng độ 20 - 40 mg/l glucose trong môi trường, hoạt tính của các enzyme hô hấp đã bị ức chế. Nhờ oxy hiệu ứng này sẽ được giảm nhẹ hoặc bị triệt tiêu. Khi có mặt của oxy thì ngay cả ở nồng độ glucose cao (30%) sự tạo các cytochrome vẫn không bị ức chế hoàn toàn.

- Cạnh tranh về ADP và phosphate vô cơ: quá trình phosphoryl hoá cơ chất và phosphoryl hoá chuỗi hô hấp đều cần đến ADP và Pvc. Do đó hai phản ứng này sẽ có sự cạnh tranh về ADP và Pvc. Khi giảm nồng độ ADP và Pvc trong tế bào sẽ dẫn đến sự giảm tiêu thụ glucose và ngược lại.

Sự điều hoà phosphofructokinase: enzyme này ở *S. cerevisiae* bị kìm hãm hiệu quả bởi ATP, ITP, GTP, CTP là các chất cho P song không phải là các chất kìm hãm giống như ATP, chúng cũng không có vai trò điều hoà. Trong khi tính đặc hiệu ở trung tâm xúc tác nhỏ thì ở trung tâm điều hoà tính đặc hiệu lại cao đối với enzyme dị lập thể này. AMP là một chất hiệu ứng dương, nó triệt tiêu sự kìm hãm bởi ATP. Ở *Escherichia coli*, ADP có tác động như một chất hiệu ứng dương. Phosphofructokinase còn bị kìm hãm bởi citrate, ATP tăng cường sự kìm hãm này. Ở *S. cerevisiae* còn có mối phụ thuộc giữa hoạt tính của enzyme với tỉ lệ ATP/AMP. Khi ở các tế bào nấm men sinh trưởng kỵ khí, do bị loại oxy mà sự phosphoryl hoá qua chuỗi hô hấp không thể xảy ra thì có thể quan sát thấy một sự biến đổi tỉ lệ ATP/AMP về phía tăng AMP. Kết quả là phản ứng phosphofructokinase sẽ được thúc đẩy.

- Tác dụng của nồng độ CO₂ cao: ở nồng độ 40% CO₂ có mặt trong không khí sẽ bắt đầu kìm hãm sự sinh trưởng và ở nồng độ 50% thì sự kìm hãm này biểu hiện rõ rệt.

- Ảnh hưởng của oxy: sự tổng hợp cytochrome ở *S. cerevisiae* phụ thuộc vào oxy. Ở nồng độ oxy hoà tan 0,05 µM/l hoặc thấp hơn các cytochrome a, b, c sẽ không được tổng hợp. Tuy nhiên, nấm men bánh mì là loại vi sinh vật tùy tiện có khả năng sinh trưởng cả trong điều kiện có và không có oxy. Khi sinh trưởng trong điều kiện có oxy, nấm men cần bổ sung biotin, còn nhu cầu về inositol và acid pantotenic thay đổi tùy chủng. Ngoài các nhu cầu này, khi sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt nấm men cần thêm các thành phần khác như các acid béo chưa bão hoà, ergosterol và một số chủng còn cần cả acid nicotinic. Thiếu các thành

phần này trong môi trường sinh trưởng của nấm men chỉ diễn ra sau vài thế hệ sau đó sẽ dừng hẳn.

Quan hệ của nấm men đối với ôxy rất phức tạp. Ngoài “hiệu ứng Pasteur” còn có hiệu ứng “Pasteur ngược” (sự kiềm chế dị hoá) và “hiệu ứng Pasteur âm”.

Nồng độ đường là nhân tố cơ bản qui định sự sinh trưởng và tốc độ lên men của nấm men. Sinh trưởng của *S.cerevisiae* trong môi trường chứa glucose có thông khí được xem như một sự sinh trưởng kép trên glucose - ethanol. Glucose trước hết được chuyển hoá thành ethanol trong pha sinh trưởng logarid thứ nhất trong đó tế bào có tốc độ sinh trưởng cao. Pha sinh trưởng thứ hai bắt đầu khi đường trong môi trường gần như bị tiêu thụ hết. Pha này được tách biệt với pha đầu bằng một thời gian pha lag khá rõ. Tốc độ sinh trưởng của tế bào trong pha thứ hai thấp hơn trong pha lên men và thể hiện trên một đường cong sinh trưởng có độ dốc ít hơn. Ngược lại, tốc độ sinh trưởng trong pha hô hấp phụ thuộc rõ rệt vào mức độ thông khí. Trong sản xuất công nghiệp men bánh mì người ta đã quan sát thấy một độ dài thế hệ là 3 - 4 giờ khi rượu được tạo thành nhiều và 5 - 6 giờ trong môi trường không có rượu. Trong nuôi cấy tĩnh, cường độ thông khí chỉ gây hiệu quả nhỏ hoặc không gây hiệu quả gì lên giai đoạn lên men hoặc lên vị trí của pha lag.

Trong pha sinh trưởng logarid đầu tiên, chu trình TCA hoạt động chỉ để tạo ra bộ khung carbon cho các mục đích sinh tổng hợp. Hoạt tính của các enzyme thuộc chu trình ôxy hoá là thấp, hoạt tính này sẽ tăng lên trong pha thứ hai của sinh trưởng kép. Nếu nồng độ glucose vượt quá mức độ nhất định thì các enzyme này sẽ không được tạo thành hoặc được tạo thành ở mức độ rất thấp.

Có thể tránh hiện tượng kiềm chế dị hoá bằng cách nuôi cấy nấm men theo phương thức nồng độ đường được duy trì ở mức độ rất thấp như trong một hệ thống nuôi cấy liên tục. Nấm men chứa các enzyme hoạt động cho trao đổi chất ôxy hoá sẽ chuyển trao đổi chất của nó từ ôxy hoá sang lên men khi nồng độ đường vượt quá một giới hạn nhất định. Ngoài khả năng ức chế sự tạo thành các enzyme ôxy hoá (kiềm chế dị hoá), glucose cũng có khả năng kiềm chế hoạt tính của các enzyme này.

1.3. Kỹ thuật sản xuất

* Cơ chất: Nấm men bánh mì có thể phát triển tốt trong môi trường có nguồn carbon là glucose, fructose, maltose, saccharose, nhưng trong công nghiệp thường dùng rỉ đường mía hoặc rỉ đường củ cải để sản xuất

sinh khối nấm men. Nguồn nitơ và photpho được bổ sung với tỉ lệ phù hợp (tỉ lệ P_2O_5/N tổng số khoảng 1/3). Trong sản xuất thường dùng superphosphate hoặc ammonphosphate làm nguồn cung cấp photpho. Các nguyên tố khoáng khác nói chung trong rỉ đường đã cung cấp đủ cho nấm men phát triển ngoại trừ Mg là phải bổ sung dưới dạng $MgSO_4$. Khi sử dụng đường mía cũng cần bổ sung thêm K và các muối ammon như $(NH_4)_2SO_4$, urea, NH_4OH hoặc $(NH_4)_2HPO_4$.

Dung dịch muối khoáng cần bổ sung tăng dần trong suốt quá trình lên men thành phẩm nhưng cần phải bổ sung hết trước khi kết thúc lên men 3 - 4 giờ. Ngoài glucide, hợp chất nitơ và các muối khoáng cần thiết khác, nấm men bánh mì còn cần một số vitamin để tăng sinh khối nhanh như biotin, inositol, acid pantotenic... Thông thường rỉ đường mía có đủ biotin hoặc thay thế 20% rỉ đường củ cải bằng rỉ đường mía. Ngược lại, trong rỉ đường củ cải thường có nhiều inositol và acid pantotenic, các amino acid nên năng suất sinh khối vẫn cao hơn so với khi dùng rỉ đường mía.

Ngoài thành phần môi trường dinh dưỡng, các yếu tố như nhiệt độ, độ pH, nồng độ oxy hoà tan có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của nấm men bánh mì. Nấm men phát triển tốt ở pH 4,5 - 5,0. Trong công nghiệp sản xuất men bánh mì thường lên men ở pH 4,2 - 4,5 để hạn chế vi khuẩn tạp nhiễm. Vào giờ cuối của giai đoạn lên men thành phẩm cần phải tăng pH lên 4,8 - 5,2 để nấm men có màu sáng đẹp (vì nấm men dễ hấp phụ màu của rỉ đường khi pH thấp).

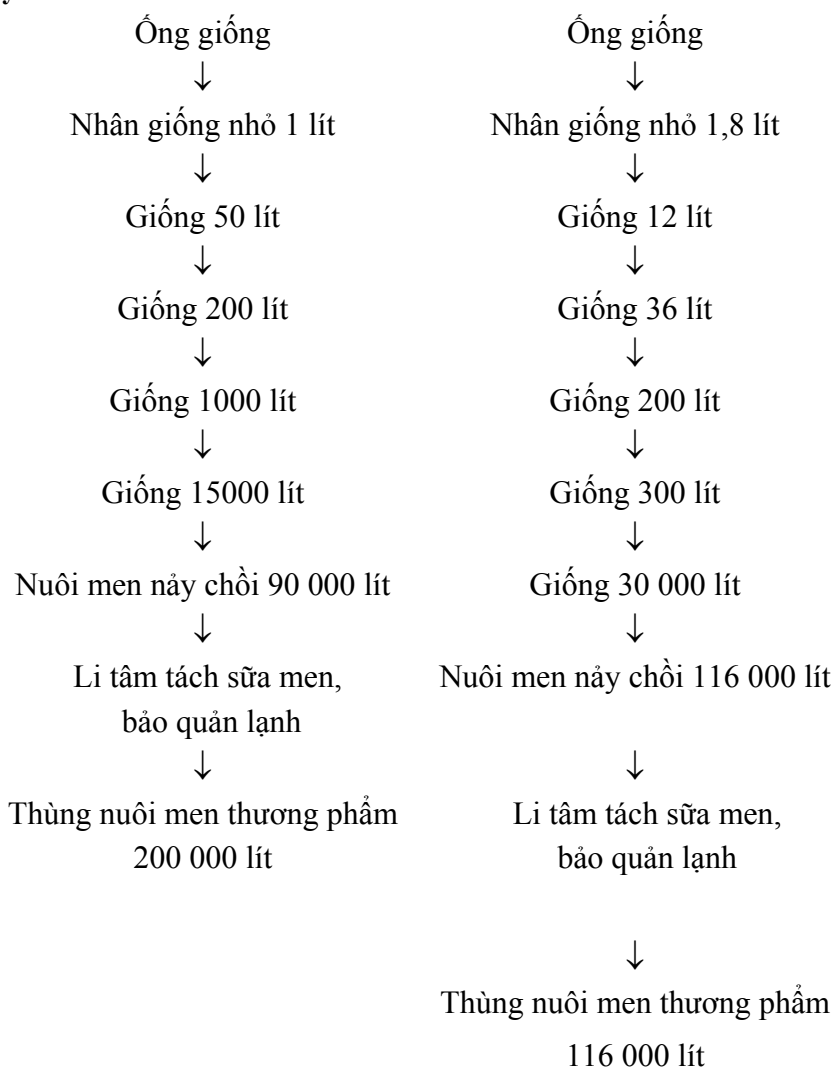
Trong sản xuất men bánh mì cần thiết phải bổ sung rỉ đường từ từ trong quá trình lên men nhằm hạn chế sự tạo thành rượu, giảm nồng độ glucose trong dịch lên men để nâng cao hiệu suất sinh khối. Với nồng độ glucose khoảng 5% trong dịch lên men, các enzyme hô hấp hoạt động kém làm giảm sinh khối tế bào. Cần phải thông khí mạnh mới đủ lượng oxy cần thiết cho sinh trưởng.

Trước khi lên men rỉ đường cần được xử lý để loại bỏ các tạp chất, diệt các vi sinh vật gây nhiễm, pha loãng đến 40-50⁰ Brix và dùng acid H_2SO_4 để hạ pH xuống 4,5, đun nóng ở 90⁰C trong 30 phút và khuấy trộn. Sau đó rỉ đường được làm lạnh và để lắng trong, có thể dùng máy li tâm tách chuyên dùng hoặc ép lọc khung bản để lọc rỉ đường.

* Phương pháp sản xuất: Sản xuất men bánh mì là quá trình nuôi cấy qua nhiều giai đoạn: nhân giống trong phòng thí nghiệm, nhân giống thuần khiết và lên men trong điều kiện sản xuất.

Từ ống giống thạch nghiêng lấy một vòng que cấy chuyển vào môi trường lỏng ở nhiệt độ 25 - 28⁰C trong 24 - 48h. Ban đầu được nuôi cấy tĩnh sau đó nuôi cấy lắc rồi chuyển sang giai đoạn nhân giống thuần khiết trong những thùng nuôi cấy nhỏ và được sục khí nhẹ bằng không khí vô trùng nhưng không được bổ sung môi trường trong quá trình nuôi. Sau đó dịch giống được bơm sang thùng nuôi cấy lớn hơn có trang bị hệ thống bổ sung môi trường và sục khí mạnh hơn. Tùy thuộc vào quy mô và yêu cầu của xí nghiệp có thể tiếp tục nhân giống trong những thùng nuôi cấy lớn hoặc rút bớt số thùng nhân giống để có lượng giống vừa đủ.

Quy trình sản xuất men bánh mì:



Trong quá trình nhân giống ta thu được men giống thế hệ A. Sử dụng men thế hệ A để sản xuất men thế hệ B hay còn gọi là men nảy chồi. Sau khi nuôi cấy thế hệ B, dùng máy li tâm để tách men giống dưới dạng sữa men và bảo quản lạnh ở 2 - 4⁰C để chuẩn bị cho sản xuất men thương phẩm.

Men thương phẩm được phát triển trong những thùng nuôi cấy lớn. Rỉ đường, dung dịch muối khoáng, không khí được cung cấp tăng dần trong quá trình lên men và ở mức độ lớn nhất. Khi kết thúc lên men pH khoảng 5-5,5, rượu khoảng 0,03 - 0,05%. Mức độ sục khí cũng giảm mạnh trong giờ nuôi cấy cuối cùng. Thời gian nuôi men thương phẩm phụ thuộc vào chất lượng và số lượng nấm men, nhiệt độ, chế độ sục khí, môi trường dinh dưỡng và nhiều nhân tố khác, trong công nghiệp thường là 12 giờ.

Sau khi nuôi men thương phẩm, dịch men được làm lạnh nhanh, li tâm và rửa nước vài lần, men được tách ra dưới dạng sữa men. Sữa men được rửa nước vài lần nữa cho thật sạch rồi lọc ép và cuối cùng là ép khuôn, đóng gói và bảo quản lạnh để vận chuyển đến các cơ sở sản xuất bánh mì hoặc dùng để sản xuất men khô (có độ ẩm khoảng 8 - 10%) để dễ vận chuyển và bảo quản dài ngày.

Giám sát kỹ thuật: Trong khi theo dõi quá trình bổ sung cần tiến hành các bước kiểm tra sau:

- Kiểm tra pH
- Xác định hàm lượng đường và rượu trong dịch lên men.
- Xác định sự tăng trưởng của nấm men.
- Xác định hàm lượng chất dinh dưỡng của dịch lên men.

Cả sự thông khí cũng phải được điều chỉnh vì nó có ảnh hưởng rõ rệt lên hoạt tính sinh hoá của nấm men. Từ lượng rượu tạo thành và lượng tế bào nấm men có mặt người ta có thể xác định các quá trình lên men và các quá trình hô hấp đang diễn ra theo tỉ lệ nào.

Để bảo quản, men ép chứa 67 - 71% độ ẩm được nén trong các thùng gỗ hoặc nhôm để tránh không khí xâm nhập và giữ trong các phòng lạnh. Dịch toả ra do hô hấp của nấm men trong quá trình bảo quản phải được loại bỏ ngay, nếu không độ bền của men ép sẽ bị giảm rõ rệt. Trong quá trình bảo quản, carbohydrate dự trữ sẽ bị phân giải, khả năng lên men sẽ bị giảm đi. Khi xuất xưởng, hàm lượng nước của nấm men được nâng lên 72 - 75% và nấm men sẽ được đóng gói. Bằng cách sấy khô nhờ không

khí nóng người ta thu được men khô có trọng lượng khô 95 - 96% có hoạt tính lên men cao.

Chất lượng của men được xác định bằng thời gian làm nở bột (thường từ 45 - 60 phút), thời gian bảo quản ở nhiệt độ 35⁰C là 2 - 3 ngày. Men ép tốt có màu xám nhạt, có mùi vị đặc trưng, không đắng, cấu tạo chặt chẽ, dễ bẻ gãy và không được chảy nhão trong khoảng 40h sau khi tới tay người tiêu dùng.

* Vi sinh vật tạp nhiễm: Sự xuất hiện các vi sinh vật sinh acid như các vi khuẩn lactic (đa số trường hợp là các vi khuẩn lactic dị hình), các vi khuẩn acetic và đặc biệt là các vi khuẩn butiric thường có ảnh hưởng tới sự phát triển của nấm men một cách rõ rệt. Do sự tạo thành acid butiric của *Clostridium* trong men ép mà xuất hiện mùi thiu khó chịu.

Trong việc nuôi cấy nấm men cần ngăn cản sự xuất hiện của các loài nấm men khác như *Torula*, *Candida*... Bọn này thường phát triển rất nhanh và lấn át *Saccharomyces cerevisiae*. Các loài nấm men kể trên thường khó ép và làm giảm đáng kể năng lực lên men của men ép.

Hàng loạt vi sinh vật xâm nhập về sau vào men ép và gây nên các hiện tượng hư hỏng. Nguy hiểm nhất là *Oidium lactis* thường gây cho men ép mùi ủng. Các nấm khác như *Penicillium* tạo nên đám màu lục trên men ép, *Aspergillus* tạo nên các đám màu vàng nhạt tới màu xám, *Mucor* và *Fusarium* tạo các vết vàng và đỏ trên men ép. *Dematium pullulans* tạo nên các vết màu nâu bẩn, các vi khuẩn acetic tạo nên những vùng ó trên bề mặt, *Serratia marcescens* tạo nên các vết đỏ trên men ép. *Bacillus mesenteroides* là bọn thường gây ra hiện tượng kéo sợi của bánh mì khi chúng có mặt với số lượng lớn trong nấm men. Có thể ngăn ngừa hiện tượng này bằng cách bổ sung acid propionic.

2. Vi sinh vật dùng cho kỹ thuật và y học

2.1. Giống khởi động trong công nghiệp thực phẩm

Từ lâu trong ngành sữa người ta đã sử dụng các loại giống thuần khiết và giống hỗn hợp để sản xuất các sản phẩm khác nhau như phomat, các loại sữa chua v.v... Vào khoảng từ năm 1955 người ta bắt đầu sử dụng vi sinh vật cho các sản phẩm thịt khác nhau, đặc biệt là xúc xích thô và các thực phẩm ướp muối. Các vi sinh vật này được cấy vào thực phẩm để tiến hành quá trình lên men nhất định. Chẳng hạn *Pediococcus cerevisiae* được dùng làm giống khởi động cho loại xúc xích “mùa hè” của Mỹ, hay các chủng *Micrococcus* được dùng cho các loại xúc xích của châu Âu. Thông thường, các vi khuẩn này được cấy dưới dạng hỗn hợp với các loài

Lactobacillus, đặc biệt là *L. plantarum*. Các vi sinh vật này giữ vai trò tạo màu, làm giảm độ pH và tạo thành các chất thơm đặc thù. Ngoài ra, chúng còn ngăn cản sự phát triển của các vi sinh vật không mong muốn.

Khi sử dụng các chủng nấm sợi cho các quá trình làm chín các sản phẩm thịt thì điều quan trọng là phải loại trừ sự có mặt của các loài nấm tạo thành độc tố trong giống khởi động. *Penicillium nalgioversis* được coi là loài thích hợp có thể dùng làm giống khởi động để cấy vào các loại xúc xích. Loài này có ảnh hưởng đến vẻ ngoài, mùi, vị và độ bền trong bảo quản của các loại sản phẩm thịt ướp muối và xúc xích thô sản xuất theo kiểu Hungari và kiểu Ý.

2.2. Nguồn bổ sung thức ăn gia súc

Brevibacterium divaricatum do giàu hàm lượng acid glutamic và protein nên được đề nghị bổ sung vào thức ăn của gia cầm, lợn, cừu, bê, chó và các động vật khác. *Bacillus megatherium* do giàu các vitamin nhóm B cũng được sử dụng làm nguồn bổ sung dưới dạng sinh khối khô.

Vi khuẩn, tảo hiển vi và các động vật nổi cũng được sử dụng làm thức ăn trong các trang trại nuôi động vật biển như tôm, sò, trai v.v... và cá các loại.

2.3. Dùng cho điều trị

Để điều trị các bệnh về đường ruột bằng vi sinh vật sống người ta thường dùng các tế bào của *Lactobacillus acidophilus* hoặc của các loài *Lactobacillus* khác, các chủng không gây bệnh của *Escherichia coli* hoặc hỗn hợp của các loài này. Mặc dù kết quả của những sự điều trị này vẫn còn tranh cãi, song đã có nhiều công trình đặc biệt chú ý tới việc nuôi cấy thu nhận sinh khối của các loài vi khuẩn nói trên và của các vi khuẩn khác như các chủng không gây bệnh của *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis* và *Clostridium* cũng như của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, *Dispora caucasica* v.v...

Ngoài ra, người ta cũng tìm cách sử dụng các chủng *Lactobacillus acidophilus* hoặc *E. coli* kháng kháng sinh để phục hồi lại khu hệ vi sinh vật đường ruột đã bị huỷ hoại do việc điều trị bằng kháng sinh. Nhiều hỗn hợp khác của các loại vi sinh vật kháng kháng sinh cũng đã được sản xuất, chẳng hạn như hỗn hợp của các vi khuẩn lactic với *Streptococcus faecalis*, của các vi khuẩn lactic, acid lactic và tanin, của *Saccharomyces fragilis* và *Streptococcus lactis* với *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis* và *S. thermophilus*.

Ngoài việc sử dụng vi khuẩn cho việc điều trị qua đường miệng, từ lâu con người đã sử dụng các vi sinh vật còn sống hoặc đã bị giết chết, đặc biệt là các vi khuẩn, làm kháng nguyên hoặc làm độc tố. Trong việc sản xuất các vaccine, các vi khuẩn gây bệnh thường được nuôi đại trà. Trước đây sản xuất vaccine thường dùng phương pháp bề mặt, ngày nay hay dùng phương pháp chìm, sau đó vi sinh vật được giết chết bằng nhiệt, acid, formalin, phenol... sao cho tính kháng nguyên của chúng vẫn được giữ lại, rồi được chế thành thuốc tiêm. Các vaccine từ vi khuẩn đã được sản xuất với số lượng lớn.

Để sản xuất các độc tố nhằm tạo ra các kháng độc tố thường là trong các cơ thể động vật, người ta cũng thường nuôi chìm các vi khuẩn chẳng hạn *Clostridium tetani* hay *C. botulinum*, sau đó tiêm vào các động vật thích hợp, chẳng hạn ngựa. Kháng độc tố lấy từ huyết thanh động vật sẽ được thuần khiết bằng biện pháp hoá sinh học ở mức cao nhất rồi đem điều trị.

4. Dùng cho bảo vệ thực vật

Giữ vai trò quan trọng trong ngành bảo vệ thực vật là các sinh vật gây bệnh cho côn trùng và các sinh vật gây hại khác cho cây trồng. Chúng bao gồm cả vi rút, vi khuẩn, nấm và động vật nguyên sinh. Trong nhiều trường hợp, chúng giữ vai trò điều hoà tự nhiên trong nội bộ các quần thể côn trùng.

Vi khuẩn gây bệnh đối với côn trùng biết rõ nhất là *Bacillus thuringiensis*. Tác dụng gây bệnh dựa trên các tinh thể kèm (hay nội độc tố) mà sự xuất hiện của nó có liên quan với sự tạo thành nội bào tử. Các tinh thể protein này ở trong ruột côn trùng, chúng sẽ hoà vào dung dịch và trong vòng vài phút sẽ làm ngưng quá trình ăn ở côn trùng do việc phá huỷ các biểu mô ruột. Liều lượng được nuốt vào càng cao thì biểu mô càng nhanh bị phá huỷ và côn trùng sẽ càng nhanh bị tiêu diệt. Dưới liều lượng gây chết, nội độc tố sẽ gây nên sự ngừng ăn tạm thời. Có thể các biểu mô lại được phục hồi và ấu trùng lấy được khả năng ăn bình thường.

Vi khuẩn có thể sản xuất đại trà bằng phương pháp nuôi chìm ở quy mô công nghiệp trong điều kiện hoại sinh. Các bào tử cùng với tinh thể có thể giữ được khá lâu. Loại chế phẩm chứa bào tử này đã được sử dụng thành công để chống lại nhiều loại côn trùng như *Colias eurytheme*, *Pieris brassicae* và các loại côn trùng cánh vẩy khác hại bắp cải, cải dầu và một số cây thân gỗ cũng như sâu đục thân ngô (*Ostrina nubilalis*) và loài sâu hại *Datana integerrima*.

Bacillus popilliae var *popilliae* là một vi khuẩn gây bệnh cho bọ hung Nhật Bản (*Popilla japonica*) và cũng được sử dụng để chống lại sâu đục thân ngô (*Melolontha melolontha*). Vi khuẩn này được nuôi cấy đại trà bằng phương pháp chìm. Các loài *Bacillus* khác như *B. alvei*, *B. circulans*, *B. sphaericus* có tác dụng diệt ấu trùng côn trùng. *Serratia picatorum*, *Streptococcus faecalis* và *Enterobacter aerogenes* làm giảm pH trong ruột ấu trùng bướm, qua đó có tác dụng gây bệnh, trong một số trường hợp có thể giết chết chúng.

Một số nước sử dụng *Salmonella typhimurium* và *S. enteritidis* để diệt chuột. Chúng được nuôi cấy chìm và trộn với thức ăn cho chuột. Trong khi ở Đan Mạch và một số nước Đông Âu chế phẩm này được dùng nhiều thì ở Đức và Mỹ, do mặc cảm về vệ sinh người ta lại cấm dùng.

Trong số nấm, *Beauveria tenella* là loài gây bệnh cho sâu đục thân ngô. Mật độ quần thể của ấu trùng trong đất càng cao, mức nhiễm nấm càng mạnh. Tới 80% ấu trùng có thể bị nhiễm. Cũng đã có các thử nghiệm về nấm này để chống côn trùng cánh cứng trên khoai tây nhưng hiệu quả còn thấp. Để gây nhiễm, nấm phải nảy mầm trên côn trùng. Sau khi nảy mầm, nhờ nhiều loại enzyme trong đó có kitinase, sợi nấm sẽ đâm sâu vào cơ thể côn trùng và phát triển mạnh mẽ. Côn trùng lúc này bị ướp xác hoàn toàn, sau đó sợi nấm sẽ phát triển ra phía ngoài. Beauverixin là một chế phẩm chống côn trùng mạnh thu được từ *Beauveria bassiana*.

Nhiều loại nấm khác cũng được phát hiện là có khả năng diệt côn trùng, chẳng hạn *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *Penicillium rugulosum*, *Mycrothecium verrucaria* có tác dụng kìm hãm sự phát triển của ruồi dấm (*Drosophila melanogaster*). *Spicaria rileyi* và *Cordyceps militaris* cũng là nấm gây bệnh cho côn trùng. *Entomophthora thaxteriana* là loài nấm gây bệnh cho ruồi nhà có thể tạo thành tới 50.000 bào tử/ ml khi được nuôi chìm trong môi trường chứa dung dịch peptone - cao nấm men - glucose sau 15 ngày ở nhiệt độ 28°C.

5. Phân bón vi sinh vật

Để nuôi cấy đại trà các tế bào *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ dùng làm phân vi sinh vật cần phải sử dụng các cơ chất rất nghèo nitơ. Các tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 25 - 30°C, pH 6,5 - 7,0 và thông khí liên tục trong một môi trường chứa glucose. Sau 36 - 58 giờ sinh trưởng kết thúc. Tế bào được li tâm và đông khô trong chân không rồi trộn với đất vô trùng. Vi khuẩn cũng có thể được làm khô trong không khí ở 30 - 35°C sau đó được hấp phụ trên bột lignin.

Phân vi sinh vật đặc biệt là với *Rhizobium leguminosagum* hoặc *R. phaseoli* là một loại phân thông dụng ở nhiều nước từ cuối thế kỉ trước. Sản lượng của các cây họ đậu tăng lên rất nhiều ở những vùng đất mới khai phá, chẳng hạn ở vùng Poldern của Hà Lan. Để sản xuất phân vi sinh vật, các chủng *Rhizobium* mới phân lập, cố định nitơ tốt được nuôi chìm trong các dịch dinh dưỡng hữu cơ rồi sau đó được trộn với các cơ chất như than bùn hoặc đá cuội. Trong quá trình này vi khuẩn phải sống được càng lâu càng tốt. Phân được sử dụng dưới dạng bột, dưới dạng dịch bùn hoặc dạng thuốc phun để phun trên các diện tích cần thiết.

V. Protein đơn bào (SCP: *single cell protein*)

1. Tầm quan trọng

Tuy sản xuất protein động vật của thế giới hoàn toàn có thể đáp ứng được nhu cầu của dân số thế giới hiện tại nhưng 2/3 protein sản xuất ra chỉ được tiêu thụ bởi 1/3 dân số thế giới. Ở các nước đang phát triển tiêu thụ protein chỉ nằm ở mức 12g protein động vật/đầu người/ ngày.

Tốc độ tăng dân số ở các nước đang phát triển lớn khoảng gấp đôi so với các nước phát triển. Chỉ dựa vào việc cải thiện các phương pháp nông nghiệp thì không đủ lượng protein để cung cấp cho nhu cầu thực phẩm. Rõ ràng, việc tìm ra các ngũ cốc có năng suất cao hoặc các protein có giá trị sinh học cao là những biện pháp mang lại những đóng góp có tính chất quyết định trong việc giải quyết vấn đề thực phẩm của nhân loại. Ở đây, sản xuất protein nhờ vi sinh vật trên quy mô công nghiệp chắc chắn sẽ giữ một vai trò quan trọng.

Ở các nước có mức sống cao, các thức ăn hỗn hợp dành cho động vật đòi hỏi phải chứa các nguồn protein có chất lượng cao để sản xuất ra trứng, thịt đủ tiêu chuẩn. Các thức ăn này phải thoả mãn hoàn toàn các nhu cầu dinh dưỡng của động vật thường chứa 10 - 30% protein tính theo trọng lượng. Trước đây người ta thường dùng bột các loại hạt chứa dầu như đậu tương hay bột cá để đáp ứng các nhu cầu này. Ý định dùng SCP để thay thế các loại bột nói trên sẽ giải quyết được hai vấn đề:

- Tăng nguồn đậu tương, cá (và cả ngũ cốc) cho dinh dưỡng người.
- Các nước châu Âu, Nga, Nhật và một số vùng khác vốn không trồng được đậu tương do vậy sản xuất được SCP sẽ làm cho chăn nuôi ở đó không phụ thuộc vào việc nhập khẩu protein.

So với sản xuất các nguồn protein truyền thống, sản xuất SCP có những ưu thế sau:

- Tốc độ sản xuất cao.
- Hàm lượng protein cao (30 - 80% tính theo trọng lượng khô).
- Có thể dùng các nguồn C khác nhau (một số có thể là các chất thải).
- Chúng sản xuất có năng suất cao và thành phần tốt, dễ kiểm, dễ chọn.
- Diện tích sản xuất không lớn, cho sản lượng cao (trừ tảo).
- Không phụ thuộc vào mùa vụ, khí hậu.

2. Các bước chính của một quá trình sản xuất SCP

- Chuẩn bị nguồn C, thường là phải qua xử lý vật lý và hoá học các nguyên liệu thô.
- Chuẩn bị môi trường thích hợp chứa nguồn C, N, P và các chất dinh dưỡng khác.
- Ngăn ngừa sự nhiễm tạp môi trường hoặc thiết bị sản xuất.
- Cấy vi sinh vật mong muốn.
- Tách sinh khối tế bào vi sinh vật khỏi môi trường đã tiêu dùng.
- Hậu xử lý sinh khối tinh khiết hoặc không.

Trong đó, trước hết cần lưu ý những vấn đề sau:

* Tuyển chọn vi sinh vật: một vi sinh vật sử dụng cho mục đích sản xuất SCP làm thức ăn protein cho người hoặc động vật cần có một số đặc điểm cơ bản như không gây bệnh cho động vật, thực vật và người, có giá trị dinh dưỡng cao được chấp nhận như là một loại thực phẩm hoặc thức ăn gia súc, không chứa chất độc, giá thành sản xuất thấp.

* Nuôi cấy: dù là sự lên men diễn ra dưới điều kiện vô trùng hoặc điều kiện sạch đều cần phải có các biện pháp để tránh nhiễm tạp như:

- Đun nóng hoặc lọc các thành phần môi trường và khử trùng thiết bị lên men.
 - Khác với tảo, các quá trình sản xuất SCP khác đều cần thông khí mạnh.
 - Nhiệt tạo ra được loại bỏ nhờ hệ thống làm lạnh.
- * Thu hồi sinh khối

- Nấm men và vi khuẩn thường được thu hồi bằng li tâm, các vi sinh vật dạng sợi có thể thu hồi bằng li tâm vắt (lọc vắt).

- Phải loại bớt càng nhiều nước trước khi làm khô để tránh tổn kém trừ ở những nơi có thể phơi nắng và sử dụng lao động giá rẻ, tuy nhiên sản phẩm sẽ có chất lượng thấp hơn.

- Tùy thuộc vào loại cơ chất và loại sản phẩm, sinh khối cần được hậu xử lý để loại các thành phần cơ chất hay thường gặp hơn là làm giảm hàm lượng các chất không mong muốn (ví dụ nucleic acid) hoặc thậm chí để tách riêng phần protein. Một nhược điểm lớn của SCP là thường chứa hàm lượng nucleic acid cao. Nếu các loại SCP này được sử dụng cho người thì sẽ là một vấn đề vì con người thiếu uricase xúc tác cho sự oxy hoá acid uric thành allantoin. Khi ăn nhiều các dẫn xuất của purine sẽ làm tăng hàm lượng acid uric trong máu. Acid này sẽ kết tủa tạo thành tinh thể trong các khớp và đóng góp vào việc gây sỏi đường niệu đạo. Đã có nhiều phương pháp đề ra nhằm làm giảm hàm lượng acid uric trong SCP như thuỷ phân bằng kiềm, chiết bằng hoá chất, điều khiển về sinh trưởng và sinh lý tế bào, hoạt hoá RNA-ase (bằng xử lý nhiệt ngắn). Nhưng thường thì các phương pháp ấy sẽ dẫn đến giảm giá trị sinh học của protein đơn bào.

- Đề phòng để không loại ra môi trường ngoài lượng lớn vi sinh vật kể cả dạng chết lẫn dạng sống. Khi dịch thải có hàm lượng BOD cao thì cần phải xử lý để tránh ô nhiễm môi trường. Sau khi xử lý, môi trường có thể được tái sử dụng nhằm đồng thời hai mục đích là giảm lượng nước mới cần thiết và giảm giá thành sản phẩm.

3. Ưu nhược điểm của các vi sinh vật dùng cho SCP

3.1. Sử dụng tảo

Để sản xuất SCP thường dùng ba chi tảo là *Chlorella*, *Spirulina* và *Scenedesmus*. Chúng có thể có phương thức sinh dưỡng là quang hợp, hoá tổng hợp hoặc là dị dưỡng. Phương thức hay sử dụng nhất là quang hợp. Trong trường hợp này nhân tố giới hạn sẽ là ánh sáng vì vậy kinh tế nhất là dùng các hồ hở dưới ánh sáng mặt trời. Tuy nhiên, khi tiến hành nuôi tảo ở các hệ thống có qui mô lớn thì khó có thể giữ được các điều kiện vô trùng với giá thành thấp và trong những trường hợp này nguy cơ nhiễm tạp là nghiêm trọng.

3.2. Sử dụng vi khuẩn

Vi khuẩn có thể được dùng để sản xuất protein đơn bào, nhưng cần

lưu ý đến những ưu điểm và nhược điểm của chúng:

- Tốc độ sinh trưởng nhanh.
- Sử dụng được nhiều loại cơ chất.
- pH cần duy trì ở 5 -7 nếu không sẽ có nguy cơ nhiễm các vi khuẩn gây bệnh.
- Thu hồi bằng li tâm khó khăn.
- Hàm lượng protein thô có thể rất cao (80%) nhưng hàm lượng của các nucleic acid đặc biệt là RNA cũng cao (20%) và cần phải được loại bỏ.
- Thành phần amino acid cân đối nhưng hàm lượng các amino acid chứa S hơi thấp.
- Khi dùng các vi khuẩn Gram âm để sản xuất SCP cần lưu ý tới khả năng độc tố của chúng.

3.3. Sử dụng nấm men

Sản xuất nấm men ở qui mô công nghiệp đã được phát triển từ hơn một thế kỷ nay đặc biệt là việc sử dụng các loài của chi *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida*. Thường thì tốc độ sinh trưởng nấm men là tương đối cao tuy nhiên không bằng các chủng vi khuẩn sinh trưởng nhanh nhất. Hàm lượng protein của nấm men chiếm khoảng 55 - 60%, tuy nhiên hàm lượng nucleic acid có thể lên tới 15%, vì vậy tiến hành các biện pháp làm giảm nucleic acid là cần thiết. Thành phần amino acid của nấm men cân đối nhưng so với vi khuẩn thì hàm lượng các amino acid chứa lưu huỳnh thấp hơn, để sử dụng cần bổ sung thêm methionin. Trong nấm men giàu các vitamin nhóm B.

3.4. Sử dụng nấm sợi

Nói chung tốc độ sinh trưởng của nấm sợi thường thấp hơn vi khuẩn và nấm men nhưng gần đây đã có thể phân lập được các chủng có tốc độ gần với nấm men. Giới hạn pH thích hợp cho sinh trưởng khá rộng (3 - 8), tuy nhiên trong sản xuất cần giữ pH < 5 để tránh nhiễm vi khuẩn. Việc nhiễm nấm men rất hay xảy ra trừ khi môi trường được khử trùng tốt. Khi nuôi cấy chìm, nấm sợi thường tạo thành các đám sợi nấm, điều này có ưu điểm là việc thu hoạch được dễ dàng, song lại có nhược điểm là hạn chế sự phân bố đồng đều của không khí trong toàn bộ hệ sợi. Hàm lượng protein thô của nấm sợi nằm trong khoảng 50 - 55%, song khi sinh trưởng nhanh, hàm lượng nucleic acid sẽ cao (RNA tới 15%). Thành phần amino

acid của nấm sợi cân đối, tuy nhiên các amino acid chứa S cũng có mặt ở nồng độ thấp. Nhiều loài nấm sợi có thể sinh độc tố nấm.

3.5. Sản xuất nấm ăn

Các phế phụ phẩm nông, lâm nghiệp như rơm rạ, bã mía, lõi ngô, mùn cưa, trấu... vẫn chưa được sử dụng triệt để. Bằng các biện pháp xử lý thích hợp chúng có thể được chuyển thành cơ chất để nuôi nấm ăn. Quả thể nấm được dùng làm thực phẩm, bã thực vật ủ hoại sau khi trồng nấm được dùng làm phân hữu cơ, các cơ chất đã có nấm mọc có giá trị như một loại thức ăn nâng cấp cho động vật.

Việc chuyển hoá bã thải hữu cơ nhờ nấm ăn có nhiều ưu điểm:

- Chất thải được loại bỏ một cách có lợi và được hoà nhập trở lại vào hệ sinh thái nhờ các quá trình chuyển hoá tự nhiên.

- Chất thải rắn và lỏng đều có thể tham gia trực tiếp vào sự chuẩn bị cơ chất.

- Lignin không tiêu hoá được và các thành phần của thành tế bào đã bị lignin hoá cao như cellulose và hemicellulose đều có thể được huy động và được khoáng hoá hoàn toàn.

- Các nguồn carbon thông thường hầu như không được sử dụng sẽ được chuyển hoá thành sinh khối giàu protein.

- Việc thu hoạch thịt quả thể từ bề mặt cơ chất là cách tốt nhất để tách sinh khối vi sinh vật thuần khiết khỏi cơ chất của chúng bằng tay hoặc bằng máy.

- Nấm ăn là một loại sinh khối vi sinh vật đã được xác định kỹ càng và được người tiêu dùng chấp nhận rộng rãi.

Để trồng nấm, chỉ có các nấm đảm hoại sinh là thích hợp về mặt sinh thái học. Trong tự nhiên, chúng giữ vai trò quan trọng trong sự phân giải cellulo-lignin. Một số nấm có vị ngon thích hợp với việc dùng làm thực phẩm. Nấm ăn được trồng khắp thế giới dưới với các điều kiện khí hậu khác nhau và có thể sử dụng các chất thải nông nghiệp và lâm nghiệp là những cơ chất thích hợp có thể nhận được với những số lượng lớn.

Một số loại Nấm ăn và Nấm dược liệu có thể trồng ở Việt Nam



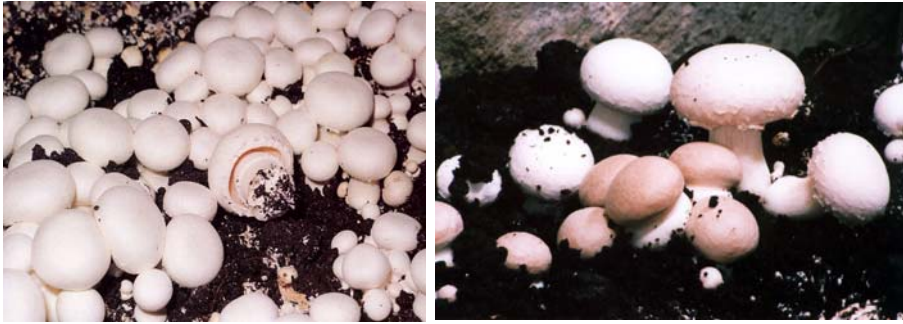
Hình 5.1: Nấm sò (*Pleurotus ostreatus*)



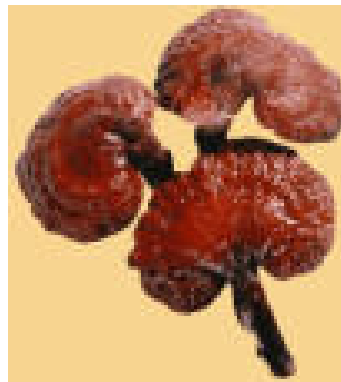
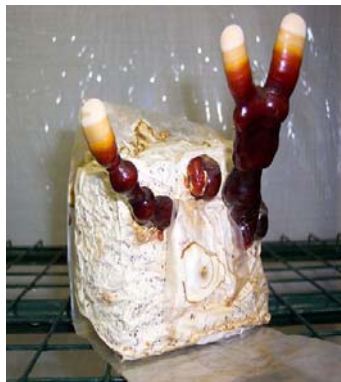
Hình 5.2: Mộc nhĩ (*Auricularia auricula*)



Hình 5.3: Nấm rom (*Volvariella volvacea*)



Hình 5.4: Nấm mỡ (*Agaricus bisporus*)



Hình 5.5: Linh chi (*Ganoderma lucidum*)

Câu hỏi ôn tập chương 5

1. Tiêu chuẩn của chủng vi sinh vật cho sản xuất sinh khối ?
2. Yêu cầu về giống và kỹ thuật sản xuất men bánh mì ?
3. Ý nghĩa và các bước chính của sản xuất SCP ?
4. Các ưu và nhược điểm của vi sinh vật sử dụng cho sản xuất SCP ?

Chương 6

Các sản phẩm lên men

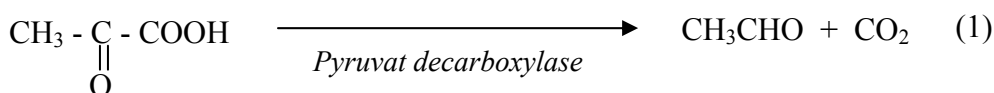
I. Lên men ethanol

1. Lên men ethanol nhờ nấm men

1.1. Cơ sở hoá sinh:

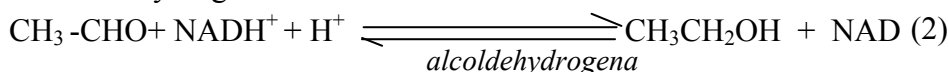
Lên men rượu là quá trình phân giải yếm khí đường dưới tác dụng của enzyme vi sinh vật đặc hiệu.

Trong sự lên men rượu, đầu tiên pyruvic acid được tạo thành qua sơ đồ Embden-Mayerhoff-Parnas, bị decarboxyl hoá tạo thành acetaldehyt và CO₂ nhờ xúc tác của pyruvat decarboxylase.



Pyruvic acid

Sau đó, acetaldehyt bị khử thành rượu etylic dưới tác dụng xúc tác của ancoldehydrogenase của nấm men:



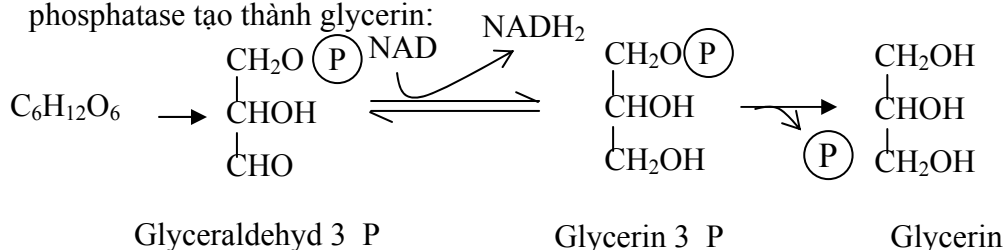
Ở đây NADH₂ tạo thành trong phản ứng oxy hoá glyceralddehyd 3 P của quá trình đường phân đóng vai trò chất cho hydro, còn acetaldehyd là chất nhận.

Tuỳ điều kiện của môi trường, sự lên men rượu có thể tiến hành theo các kiểu sau:

1.1.1. Sự lên men rượu trong điều kiện bình thường:

Xảy ra khi pH = 4-5, và có thể chia làm hai thời kỳ:

a. Thời kỳ cảm ứng: Trong thời kỳ này, lượng acetaldehyd tạo thành theo phản ứng (1) còn ít, khi đó hydro 3 P tạo thành được chuyển từ NADH₂ tới acetaldehyd glycerin 3 P. Chất này bị khử gốc P nhờ enzyme phosphatase tạo thành glycerin:



Vậy, glycerin là sản phẩm phụ của quá trình lên men rượu trong môi trường acid.

b. Thời kỳ tĩnh:

Khi lượng acetaldehyd đã đạt tới mức nào đó thì chất này tiếp nhận hydro từ NADH_2 để chuyển rượu thành etylic theo phản ứng (2):



Phương trình tổng quát của sự lên men rượu bình thường như sau:

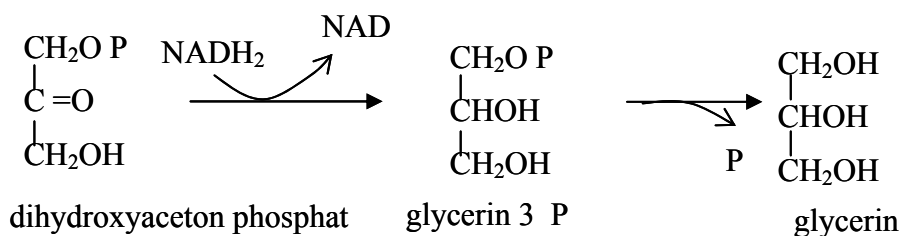
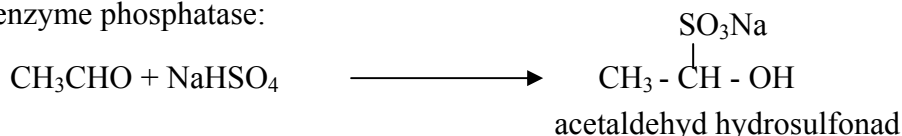


1.1.2. Lên men rượu và sự tạo thành glycerin

Để tăng cường sự tạo thành glycerin (để sản xuất glycerin hoặc tạo vị cho đồ uống có rượu), người ta đưa ra hai dạng lên men khác với lên men rượu ở dạng trên:

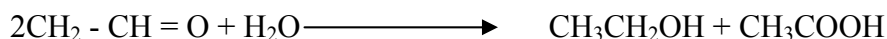
a. Sự lên men rượu trong môi trường có bisulfit:

Nguyên tắc của phương pháp này là chuyển acetaldehyd thành acetaldehyd hydrosulfonad khó tan bằng cách bổ sung NaHSO_3 vào môi trường. Khi đó, NADH_2 cho dihydroxyaceton phosphat tạo thành glycerin 3 P, chất này bị khử phosphat để tạo thành glycerin dưới tác dụng của enzyme phosphatase:

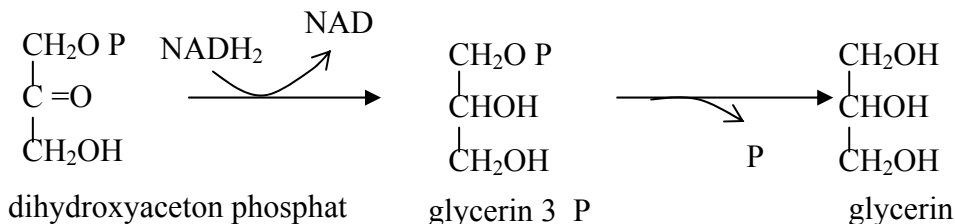


b. Sự lên men rượu trong môi trường kiềm:

Trong quá trình lên men kiểu này, acetaldehyd được loại bỏ nhờ phản ứng hoá hai thành ethanol và acid acetic trong điều kiện môi trường kiềm:



Khi đó NADH_2 chuyển hydro cho dihydroxyaceton phosphat tạo thành glycerin 3 P, chất này bị khử phosphat để tạo thành glycerin nhờ enzyme phosphatase:



1.1.3. Sự ức chế lên men rượu khi có mặt oxy

Sự lên men xảy ra mạnh mẽ trong điều kiện yếm khí. Khi có oxy, quá trình lên men bị ức chế và chuyển sang cơ chế hô hấp. Sự ức chế lên men khi có mặt oxy gọi là hiệu ứng Pasteur. Trong quá trình này, ATP được tổng hợp mạnh mẽ nhờ phosphoryl hoá oxy hoá liên hợp với quá trình vận chuyển proton và electron qua dây hô hấp tới oxy. Kết quả là trạng thái tích lũy năng lượng của tế bào tăng lên, vì sinh vật chỉ cần một lượng glucose không nhiều cũng đủ duy trì sự sống và phát triển của chúng.

Hiệu ứng Pasteur là một cơ chế điều hoà quan trọng đối với quá trình lên men. Trong thực tế khi sản xuất sinh khối thì người ta cho nấm men phát triển trong điều kiện thoáng khí, còn khi cần thúc đẩy sự lên men thì cần giữ môi trường trong điều kiện yếm khí.

1.1.4. Sự tạo thành dầu khét (dầu fusel)

Dầu khét là sản phẩm phụ của quá trình lên men. Thành phần chủ yếu là các rượu cao như rượu propylic, amylic, isoamylic, butylic, isobutylic, tyrosol... Chúng là những cấu tử tạo nên mùi thơm đặc trưng cho các sản phẩm lên men. Ngoài rượu cao, các sản phẩm khác của quá trình như acid amin, acid béo... là chất dinh dưỡng và nguyên liệu cho các quá trình tổng hợp của tế bào vi sinh vật.

Sự tạo thành rượu bậc cao trong quá trình lên men là kết quả của một dãy phản ứng hoá sinh hết sức phức tạp. Cơ chế tạo thành rượu bậc cao cho đến nay đã có rất nhiều nhà nghiên cứu quan tâm nhưng chưa giải quyết hoàn toàn thoả đáng. Chung quy lại về các lý thuyết giải thích về cơ chế tạo thành rượu bậc cao theo hai đường hướng:

- Do phản ứng chuyển amin, chuyển carboxyl giữa các acid amin của môi trường và của tế bào với acid pyruvic được sinh ra khi lên men rượu:

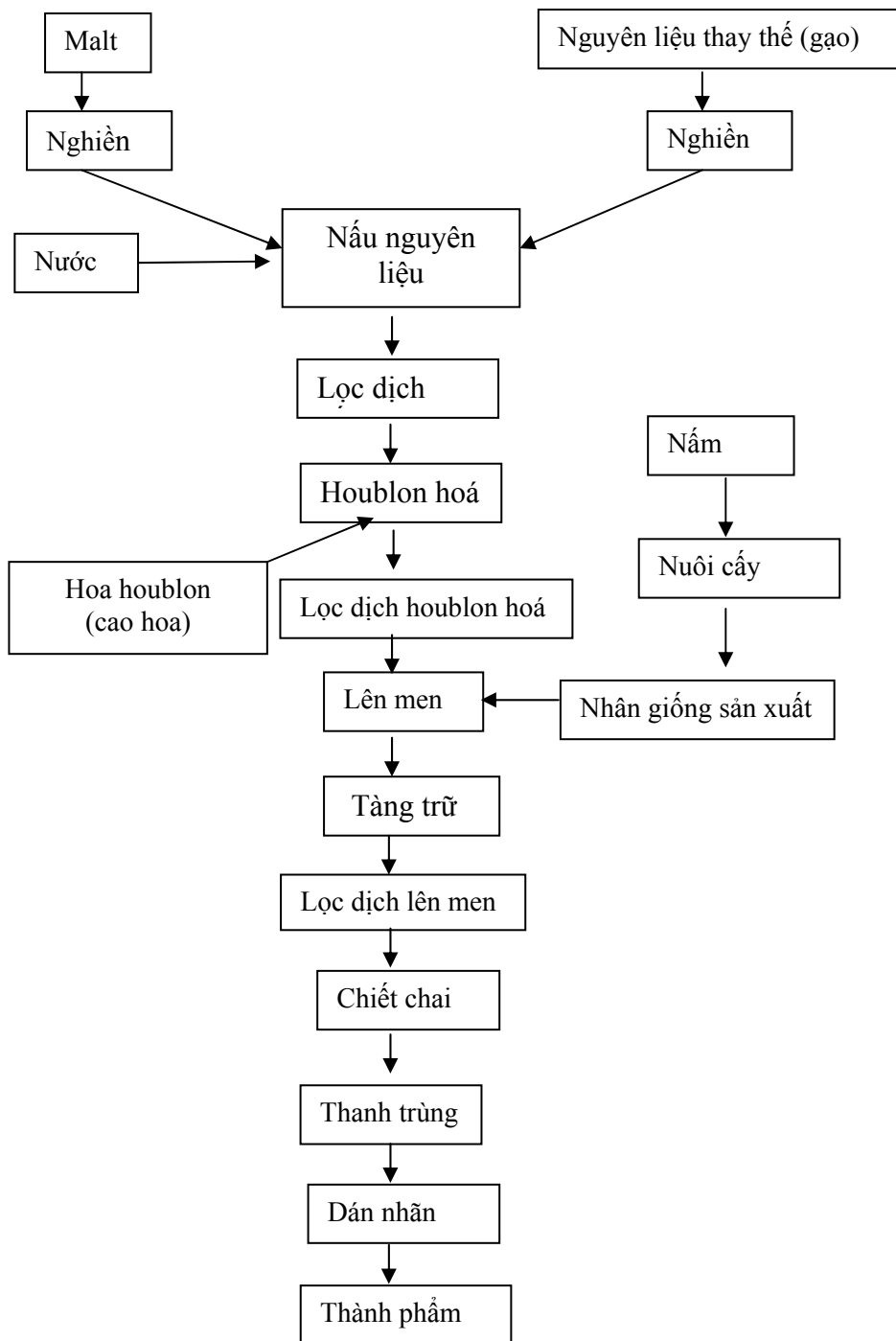
- Do sự trao đổi chất bình thường của vi sinh vật bị thay đổi khi môi trường thay đổi (thừa acid amin), kết quả dẫn tới sự tích tụ một số chất trao đổi trong đó có các rượu bậc cao. Ví dụ: khi đưa vào môi trường alanin, acid aminobutyric, glycin, valin, leucin, isoleucin...thì sẽ tổng hợp các rượu cao tương ứng.

1.2. Sản xuất bia

Bia là loại đồ uống có độ rượu nhẹ và có tính giải khát cao. Thành phần của bia gồm có: 80-90% nước, 1.5-7% cồn, 3-10% chất hoà tan, 0.3-0.4% CO₂. Chất hoà tan chủ yếu là hydratcarbon (dextrin, maltose, glucose và một ít pentose), các protein và sản phẩm thuỷ phân của nó (albumose, pepton, các acid amin), các chất khoáng (muối kali, natri, phospho, nhôm, canxi, mangan...), một số acid hữu cơ, các vitamin (B₁, B₂, B₅, B₆, PP, biotin) và các chất đắng, chất thơm của hoa houblon.

1/Sơ đồ công nghệ sản xuất bia:

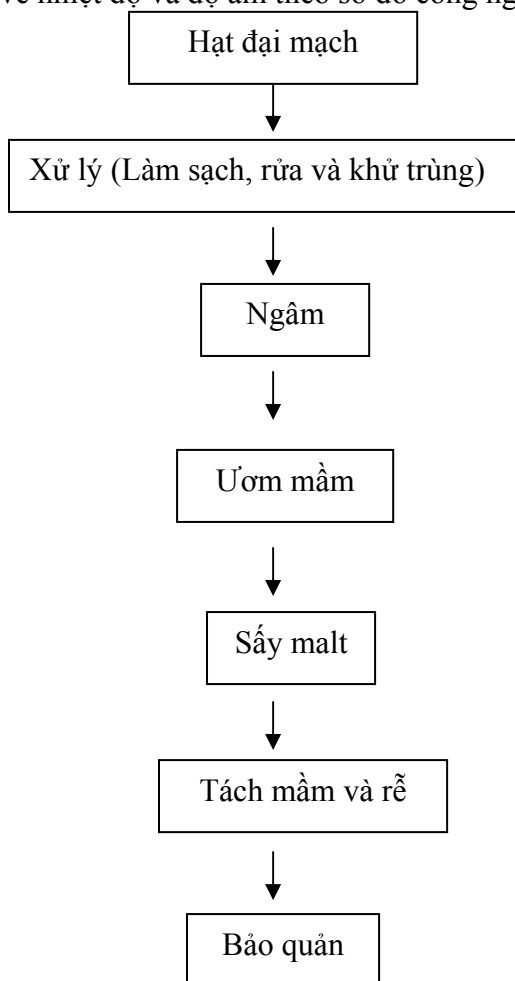
Quy trình công nghệ sản xuất bia hiện nay được áp dụng trong nước cũng như trên thế giới đều theo sơ đồ 6.1.



Hình 6.1: Sơ đồ công nghệ sản xuất bia

* *Malt đại mạch:*

Malt đại mạch là hạt thóc đại mạch được nảy mầm trong những điều kiện nhân tạo về nhiệt độ và độ ẩm theo sơ đồ công nghệ trên hình 6.2:



Hình 6.2: Sơ đồ sản xuất malt đại mạch

* *Hoa houblon* là nguyên liệu không thể thiếu được trong sản xuất bia. Mùi thơm có được của bia một phần là do tinh dầu có trong hoa houblon.. Các chất đắng có trong hoa houblon truyền cho bia vị đắng dễ chịu, đồng thời pectin trong houblon có vai trò giữ bọt, tăng độ bền sinh học cho bia và ức chế sự phát triển của vi khuẩn.

* *Nước* là một nguyên liệu quan trọng trong công nghiệp sản xuất bia. Trong nhà máy bia, nước được dùng với nhiều mục đích khác nhau từ

giai đoạn xử lý nguyên liệu cho đến các giai đoạn thành phẩm. Chính vì vậy, nước nấu bia không chỉ đòi hỏi đầy đủ các tiêu chuẩn của nước uống mà còn phải có yêu cầu riêng đáp ứng với công nghệ sản xuất bia về độ cứng, pH và hàm lượng các ion kim loại.

b. Nghiền malt: Nghiền malt với mục đích phá vỡ cấu trúc của tế bào, tạo điều kiện thuận lợi thúc đẩy quá trình sinh hoá xảy ra trong nguyên liệu khi nấu nhằm thu được dịch đường có nồng độ các chất cao nhất từ nguyên liệu ban đầu. Yêu cầu khi nghiền malt là giữ vỏ malt càng nguyên càng tốt và cần có một tỷ lệ thích hợp giữa tấm thô, tấm mịn và bột, tỷ lệ này phụ thuộc vào thiết bị lọc dịch đường hoá.

c. Nấu nguyên liệu (Đường hoá nguyên liệu):

Mục đích của quá trình nấu bia là chuyển các chất của malt và nguyên liệu thay thế từ trạng thái không hoà tan sang trạng thái hoà tan nhờ tác động của hệ enzyme thuỷ phân.

Để tăng hiệu suất nấu người ta đã áp dụng nhiều phương pháp đường hoá khác nhau. Tuy nhiên, tất cả các phương pháp đó đều theo một nguyên tắc chung về điều khiển nhiệt độ thích hợp cho các enzyme thuỷ phân, chủ yếu là hệ amylase và protease, hoạt động. α -amylase hoạt động thích hợp trong khoảng 70-75⁰C, β -amylase: 63-65⁰C, protease: 50-60⁰C.

d. Đun sôi dịch đường với hoa houblon (quá trình houblon hoá):

Mục đích của quá trình houblon hoá là để ổn định thành phần dịch đường, truyền cho bia mùi và vị của hoa houblon, là keo tụ các protein, vô hoạt enzyme và thanh trùng dịch đường.

Trong quá trình này phải đảm bảo không để nhiệt độ của dịch đường hạ xuống dưới 70⁰C để tránh oxy không khí tiếp xúc với dịch đường xảy ra các phản ứng oxy hoá làm giảm chất lượng của bia.

Hoa houblon dùng để nấu bia có thể dùng loại hoa nguyên, hoa ép hoặc cao hoa và phải cho hoa chia làm nhiều đợt nhằm tăng mùi thơm cho bia. Lượng hoa sử dụng để nấu bia phụ thuộc vào dạng và loại bia, vào lượng acid đắng có trong hoa mà dao động 1-4g/l bia.

e. Lên men bia:

Trong quá trình lên men bia, một lượng lớn cơ chất, chủ yếu là đường và dextrin bậc thấp bị nấm men hấp thụ để tạo thành rượu etylic, khí carbonic và các sản phẩm phụ.

*** Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men:**

Quá trình lên men chịu ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố như: chất lượng của nấm men, lượng nấm men gieo cấy ban đầu, nồng độ chất hoà

tan của dịch đường houblon hoá, nhiệt độ của dịch lên men, áp suất bề mặt, hàm lượng oxy, cường độ khuấy đảo dịch lên men và nồng độ các sản phẩm lên men.

- Chất lượng nấm men:

Trong sản xuất bia thường dùng các nòi men chìm thuộc giống *Saccharomyces carlbergensis* có khi cũng dùng loại men nổi thuộc giống *Saccharomyces cerevisiae*. Men chìm thường lên men ở nhiệt độ 6-10⁰C, còn men nổi ở 14-25⁰C.

Khi chọn men bia cần dựa vào các chỉ tiêu như: Tốc độ và mức độ lên men; Hàm lượng sản phẩm bậc hai tạo thành; Tốc độ và khả năng kết lắng; Mức độ thoái hoá; Khả năng chống chịu điều kiện ngoại cảnh;

Một số chủng nấm men phù hợp có chất lượng tốt có thể tái sử dụng đến đời thứ bảy, thử tám.

- Lượng nấm men gieo cấy ban đầu liên quan mật thiết đến quá trình lên men. Nói chung, lượng nấm men gieo cấy ban đầu quá ít thì thời gian lên men kéo dài. Mật độ nấm men gieo cấy ban đầu lớn thì chất lượng bia được nâng cao do lượng các sản phẩm bậc hai giảm. Tuy nhiên, mật độ tối đa của lượng nấm men gieo cấy ban đầu nếu vượt qua ngưỡng 70.10⁶ tế bào/cm³ thì hiệu quả mang lại không rõ nét.

- Nồng độ chất hoà tan của dịch đường houblon hoá 11-12% làm cho quá trình lên men tốt hơn so với các loại dịch đường có nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn.

- Nhiệt độ của dịch lên men và môi trường xung quanh có ảnh hưởng khá mạnh đến tiến quá trình lên men. Nếu nhiệt độ cao thì thời gian lên men nhanh, mật độ tối đa đạt được cao hơn so với nhiệt độ thấp, lên men triệt để hơn; tuy nhiên các sản phẩm bậc hai (đặc biệt là diacetyl) tạo ra nhiều hơn, lượng tế bào chết nhiều hơn và tốc độ suy thoái nhanh hơn nên chất lượng bia giảm.

- Áp suất bề mặt của dịch lên men xác định mức độ bão hoà CO₂, là hợp chất gây ức chế quá trình lên men, ảnh hưởng đến lượng sinh khối tạo thành, trạng thái sinh lý của nấm men, vì vậy nó ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình lên men. Trong thực tế sản xuất, người ta thường khống chế để áp suất không tăng quá 1 kg/cm².

- Lượng oxy trong dịch lên men rất cần thiết cho quá trình phát triển sinh khối ở giai đoạn đầu của quá trình lên men đồng thời cũng là yếu tố tác động mạnh đến tốc độ suy thoái của nấm men. Chính vì vậy, lượng oxy hoà tan trong dịch đường houblon hoá chỉ nên khống chế ở nồng độ 6,7-7mg/l.

- Cường độ khuấy đảo dịch lên men là một trong những yếu tố thúc đẩy quá trình lên men; tuy nhiên nó làm cho bia chứa quá nhiều sản phẩm bậc hai vì vậy cần phải chọn một phương án và chế độ khuấy dịch lên men thích hợp. Hiện nay, trên các thùng lên men người ta trang bị nhiều áo lạnh có thể có nhiệt độ khác nhau và sự đối lưu của dịch lên men thực hiện được nhờ vào sự chênh lệch nhiệt độ giữa các vùng.

- Nồng độ các sản phẩm lên men:

Sản phẩm chính của quá trình lên men là rượu etylic và khí carbonic. Khi những hợp chất này tích tụ đến một nồng độ nhất định trong dịch lên men thì các hoạt động sống của nấm men bị ức chế. Nếu nồng độ cồn lên đến 12% thì quá trình lên men bị đình chỉ hoàn toàn.

*** Nuôi cấy nhân giống men bia:**

Nấm men bia từ ống giống gốc (môi trường thạch nghiêng) trước khi đưa vào sản xuất được nhân giống theo thể tích tăng dần nhằm làm cho chủng gốc quen dần với môi trường sản xuất. Trước hết, giống gốc trong ống nghiệm được chuyển vào các bình 300ml dịch nước malt, giữ ở 18-25⁰C. Sau đó cấy chuyển tiếp qua các bình 3-5 lít có 2-3 lít dịch đường malt có hoa houblon và nuôi nhân giống ở 18-25⁰C. Tiếp đó nuôi giống ở các thùng 200-400 lít có 100-200 lít môi trường ở 12⁰C. Tỷ lệ tiếp giống là 10%. Đến khi giống sinh trưởng mạnh ở các thùng này sẽ tiếp giống vào các thùng lên men.

*** Sử dụng lại nấm men sau khi lên men chính:**

Cặn men sau khi lên men chính chia làm ba lớp: Lớp dưới cùng là lớp tế bào già có năng lực lên men yếu, lớp giữa là những tế bào trẻ hơn có khả năng lên men mạnh và lớp trên cùng là những tế bào có kích thước nhỏ khả năng kết lắng kém cùng với những vẩn cặn protein và houblon. Vì vậy trước khi tái sử dụng nấm men sản xuất cần phải qua xử lý để thu lớp giữa đưa vào sản xuất.

*** Lên men:**

Lên men bia được thực hiện theo hai giai đoạn: giai đoạn lên men chính và giai đoạn lên men phụ - tàng trữ. Hiện nay, có hai phương pháp lên men được sử dụng phổ biến ở các nhà máy là lên men theo phương pháp cổ điển và lên men theo phương pháp hiện đại.

Đối với lên men theo phương pháp cổ điển quá trình lên men chính và quá trình lên men phụ-tàng trữ là hai giai đoạn tách biệt nhau, diễn ra trong hai loại thiết bị khác nhau, sắp xếp ở các mặt bằng khác nhau và được gọi là công nghệ lên men hai pha. Theo phương pháp này, quá trình lên men chính được tiến hành trong các thùng lên men kín hoặc hở ở nhiệt

độ 8⁰C hoặc lớn hơn, thời gian kéo dài 6-10 ngày. Ở giai đoạn này, nấm men lên men mạnh, dịch sủi bọt nhiều. Cuối giai đoạn này, sự lên men giảm xuống, phần lớn nấm men lắng xuống đáy thùng. Ta có được sản phẩm bia non bao gồm rượu etylic, CO₂, các sản phẩm phụ và còn một ít đường (khoảng 1.5-2.5%). Bia non tiếp tục được bơm vào các thùng lên men phụ và tàng trữ. Nhiệt độ lên men phụ giữ ở 1-4⁰C. Giai đoạn này, nấm men lên men phần đường còn lại để bổ sung CO₂ cho bia, đồng thời hoàn thiện chất lượng của bia do quá trình lắng cặn nấm men cũng như các kết tủa mới tạo thành làm cho bia trong hơn đồng thời xảy ra phản ứng oxy hoá khử giữa các chất có trong bia làm tăng hàm lượng este, rượu bậc cao và giảm hàm lượng diacetyl. Sự tự phân của nấm men sinh ra peptit, acid amin, vitamin trong giai đoạn này cũng góp phần tăng chất lượng của bia.

Sản xuất bia theo công nghệ cổ điển có ưu điểm là sản phẩm có chất lượng cao, nhưng nhược điểm lớn nhất của nó là chu kỳ lên men quá dài. Sản xuất bia theo công nghệ hiện đại có thể rút ngắn 50-70% chu kỳ lên men mà chất lượng của bia có thể tiệm cận được với phương pháp cổ điển. Ở công nghệ lên men hiện đại, hai giai đoạn lên men chính và lên men phụ được thực hiện trong cùng một thiết bị nên còn gọi là lên men một pha. Thiết bị lên men theo công nghệ này là tank thân trụ-đáy côn có kích thước lớn. Thể tích của chúng dao động từ 100-1500m³; được chế tạo bằng thép không gỉ với góc côn ở đáy là 70⁰. Trên thân thiết bị được trang bị 3-5 áo lạnh có chất làm lạnh với nhiệt độ -6⁰C, thường chất làm lạnh là glycol. Các áo lạnh này vừa có tác dụng điều hoà nhiệt độ trong quá trình lên men đồng thời còn có tác dụng giúp cho dịch lên men trong thiết bị đối lưu do chênh lệch nhiệt độ ở các vùng khác nhau được tạo ra khi thay đổi nhiệt độ của các áo lạnh.

f. Hoàn thiện sản phẩm:

Bia thành phẩm thu được sau quá trình lên men trong các tank lên men được lọc, chiết chai, thanh trùng, dán nhãn để hoàn thiện sản phẩm.

Lọc bia thường được thực hiện trên các thiết bị lọc khung bản có diatomit là chất trợ lọc.

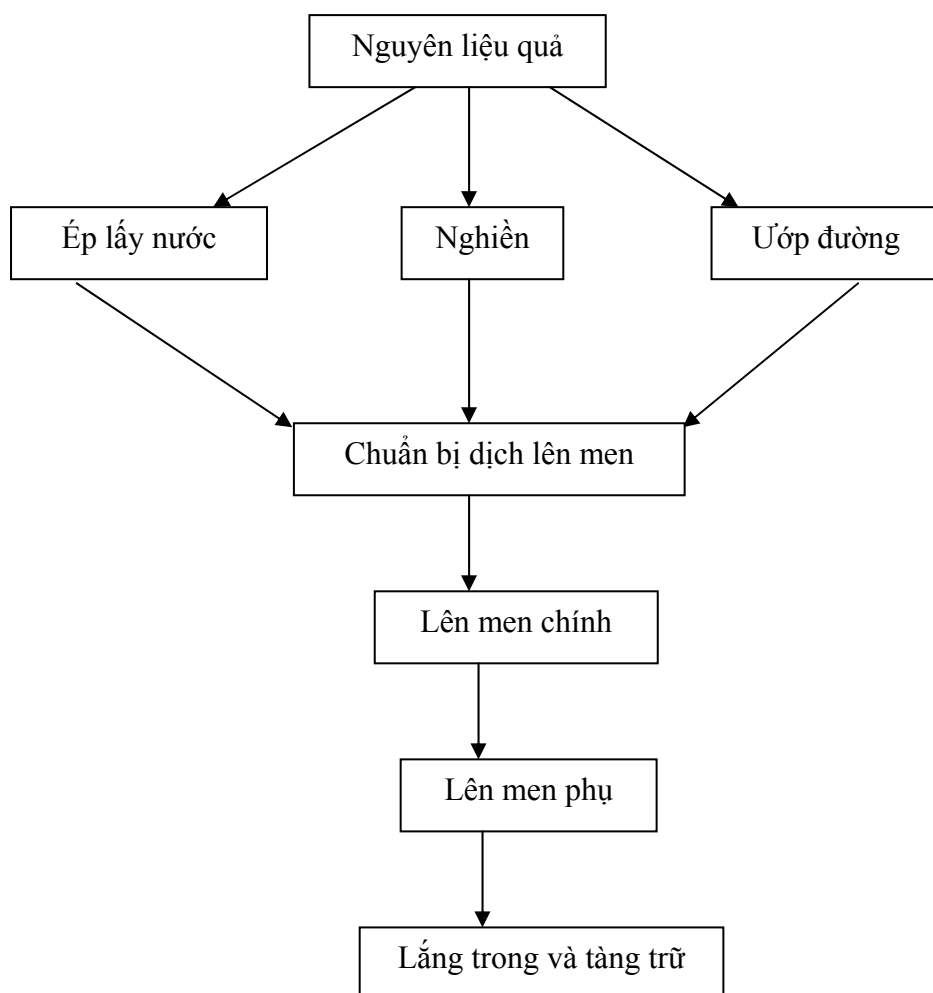
Quá trình chiết chai thường được thực hiện qua hệ thống máy chiết trong đó thực hiện nhiều giai đoạn như hút chân không, thổi CO₂, cân bằng áp suất, chiết bia, phun nước nóng để đuổi O₂ còn lại và đóng nắp.

Bia chai từ máy chiết ra được thanh trùng trên hệ thống tunen có vòi phun nước ở phía trên theo các khoảng nhiệt độ tăng dần sau đó giảm dần nhằm hạn chế sự phát triển của vi khuẩn trong quá trình bảo quản bia.

1.3. Sản xuất rượu vang

Rượu vang là một loại đồ uống có cồn thu được nhờ quá trình lên men dịch quả không qua chưng cất. Trong rượu vang chứa đầy đủ các chất dinh dưỡng có sẵn từ quả và một lượng cồn vừa phải cùng các chất thơm, acid hữu cơ, chất khoáng và vitamin... Trước đây, rượu vang thường được chế biến từ quả nho, vì vậy, rượu vang còn được gọi là rượu nho. Hiện nay, trên thế giới có tới hàng trăm loại rượu vang khác nhau, mỗi loại được đặc trưng bởi một phương thức sản xuất riêng tùy vào đặc điểm của rượu và tính chất của công nghệ.

Quy trình chế biến rượu vang theo sơ đồ chung trên hình 6.3:



Hình 6.3: Sơ đồ công nghệ sản xuất rượu vang

Quả hái về được rửa sạch ép lấy nước hoặc nghiền nhỏ rồi cho vào thùng để chuẩn bị dịch lên men. Cũng có trường hợp người ta không ép hoặc nghiền mà cho quả vào ngâm với đường theo tỷ lệ khối lượng 1:1 để trích ly thành dạng xiro và bảo quản để lên men dần sau này.

Chuẩn bị dịch lên men: các loại quả thường có độ acid cao và độ đường thấp so với nước nho. Trước khi cho lên men cần điều chỉnh pH về khoảng 3.2 - 3.8 và bổ sung thêm đường. Trường hợp là dịch xiro (dịch quả ngâm đường) thì pha gấp 2 hoặc 3 lần để dịch lên men có khoảng 16-18% đường.. Có thể trong quá trình lên men còn bổ sung thêm đường.

Lên men: Trường hợp lên men tự nhiên, người ta để cho khối dịch quả tự lên men với các nòi nấm men có sẵn trong vỏ quả từ ngoài đồng ruộng mang về hoặc bổ sung các dịch đang lên men ở các mẻ trước.

Trong lên men công nghiệp, trước khi cấy chuyên nấm men vào dịch để lên men, người ta tiến hành *nhân giống các chủng thuần khiết* trong phòng thí nghiệm và nhân giống trung gian trong phân xưởng.

Nấm men sau khi nhân giống được cấy vào dịch lên men với tỷ lệ 6-10% thể tích để thực hiện *lên men chính*. Nhiệt độ lên men vào khoảng 22-28⁰C (tùy thuộc vào loại rượu vang), thời gian lên men dài hay ngắn phụ thuộc vào nhiệt độ lên men và thường kéo dài 7-20 ngày. dịch lên men chính đạt được 8-10% cồn.

Lên men phụ ở 15 - 18⁰C trong 15-20 ngày. Sau khi lên men phụ, độ cồn 14⁰ thì phải thêm cồn cho tới nồng độ này hoặc cao hơn rồi chuyển sang *tàng trữ* ở nhiệt độ thấp hơn 10⁰C. Tàng trữ ít nhất 10 ngày, sau đó tách cặn và có thể hoàn thành sản phẩm hoặc tàng trữ tiếp tục.

Trong thực tế có hai cách chế biến rượu vang phổ biến nhất là cách chế biến rượu vang trắng và cách chế biến rượu vang đỏ.

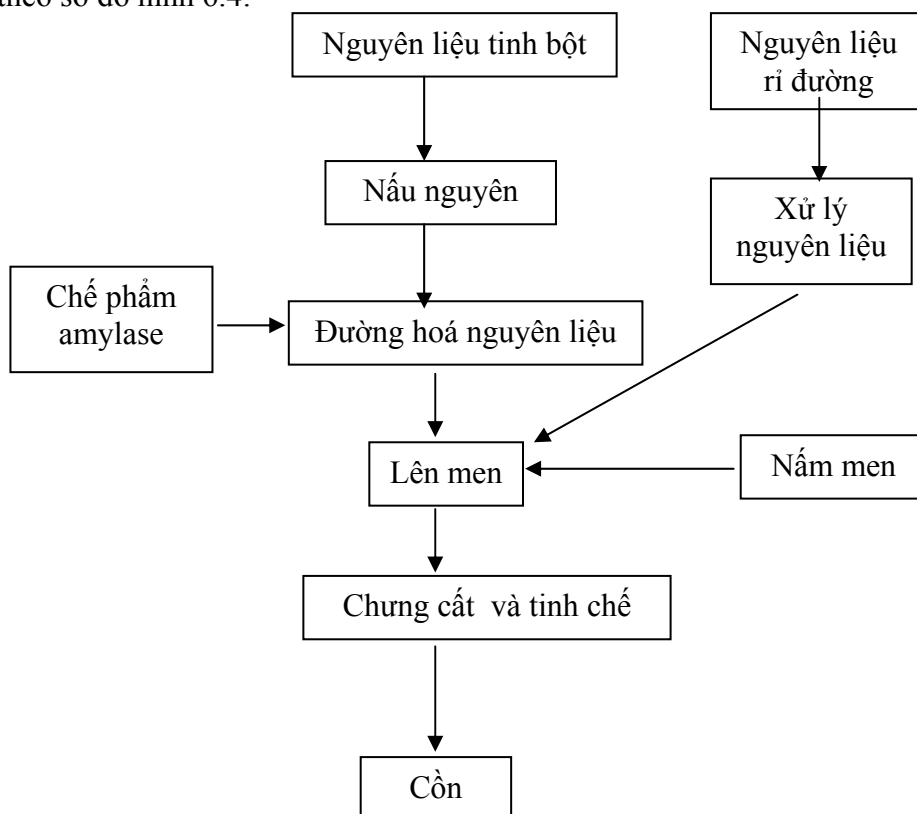
Rượu vang đỏ có được khi thực hiện lên men nước quả nho lẫn với xác. Trong vỏ quả có chứa nhiều chất màu, tanin, chất thơm. Những chất này phân huỷ trong quá trình lên men làm tăng lượng chất hoà tan và tạo hương thơm, màu sắc đẹp cho rượu. Lên men cả xác quả thường tiến hành ở nhiệt độ cao hơn nhằm trích ly triệt để các chất màu, chất thơm và tanin. Khi kết thúc lên men cần tách xác quả ra khỏi rượu. Trong sản xuất lớn, trước hết người ta cho rượu chảy qua một tấm lưới để giữ xác quả lại. Rượu thu được lúc này có chất lượng cao nhất gọi là rượu vang giọt, vang chảy. Khi rượu ngừng chảy, xác quả trên lưới được ép trên máy ép để thu rượu vang ép. Rượu vang ép chiếm tỷ lệ khoảng 15% tổng số rượu chế được và có thể đem trộn với rượu vang chảy. Rượu vang đỏ có hàm lượng tanin nhiều hơn rượu vang trắng nên có vị chát. Do đó, sau khi lên men

rượu cần tiến hành lên men malolactic nhằm chuyển hoá acid malic thành acid lactic tạo cho rượu có vị chua dịu cân đối với vị chát của tanin. Có thể sử dụng vi khuẩn lactic hoặc một lượng nhỏ nấm men Schizosaccharomyces để có khả năng lên men malolactic triệt để.

Rượu vang trắng được lên men từ quả đã được tách bã nên không có màu. Hương vị của rượu vang trắng chủ yếu do nước quả. Rượu vang trắng thường được lên men ở nhiệt độ thấp hơn rượu vang đỏ (khoảng 15 - 20⁰C) để giữ hương vị cho rượu. Thời gian lên men 6-7 ngày hoặc lâu hơn tùy theo nhiệt độ và yêu cầu công nghệ. Kết thúc quá trình lên men khi nhận thấy rượu không còn sủi bọt lên nữa, cặn và xác men lắng xuống đáy thùng. Khi đó tiến hành gạn cặn, rượu trẻ được chuyển sang thùng mới, tiếp tục lắng trong rồi đưa đi tàng trữ.

1.4. Sản xuất rượu mạnh và cồn

Quy trình sản xuất rượu etylic bằng phương pháp lên men vi sinh vật theo sơ đồ hình 6.4:



Hình 6.4: Sơ đồ công nghệ sản xuất rượu etylic

Rượu etylic (cồn) được con người xem là sản phẩm thực phẩm nhưng cũng lại là sản phẩm có nguy cơ độc hại đối với cơ thể. Tuy nhiên, sản lượng rượu etylic được sản xuất trên thế giới càng ngày càng tăng. Ở các nước có công nghiệp rượu vang phát triển như Italia, Pháp, Tây Ban Nha... Etylic được dùng để tăng thêm nồng độ rượu. Một lượng khá lớn etylic được dùng để pha chế các loại rượu mạnh như Whisky, Martin, Brandy, Napoleon, Rhum.... Người ta có thể sản xuất rượu etylic bằng phương pháp lên men vi sinh vật hoặc tổng hợp hoá học.

Đối với *nguyên liệu tinh bột*, trước khi lên men cần qua giai đoạn chuyển hoá tinh bột thành đường được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau, còn giai đoạn lên men và chưng cất tinh chế thì có nguyên lý giống nhau. Vì vậy, tên gọi khác nhau của phương pháp lên men bằng vi sinh vật chính là tên của phương pháp chuyển hoá tinh bột.

+ Phương pháp maltase: là phương pháp sử dụng enzyme của malt để chuyển hoá tinh bột thành đường. Phương pháp này làm cho chất lượng của rượu có hương vị đặc trưng dễ chịu nhưng hiệu suất không cao do quá trình thủy phân tinh bột không triệt để.

+ Phương pháp acid: là phương pháp sử dụng acid (HCl , H_2SO_4) để chuyển hoá tinh bột thành đường. Phương pháp này thủy phân rất triệt để nên hiệu suất cao. Tuy nhiên, nó lại tạo ra nhiều sản phẩm đường không lên men khác do có quá trình thủy phân cellulose và hemicellulose, đồng thời nhiều acid amin bị phá huỷ, thiết bị sử dụng đắt tiền do phải chịu được acid.

+ Phương pháp men thuốc bắc: là phương pháp sử dụng bánh men thuốc bắc để sản xuất rượu. Phương pháp này có đặc điểm là quá trình đường hoá và rượu hoá được tiến hành cùng một lúc do sự hoạt động đồng thời của nấm mốc và nấm men được gieo cấy từ bánh men thuốc bắc; tinh bột không hồ hoá mà chỉ cần làm chín. Vì vậy, nó có nhược điểm là dễ bị nhiễm tạp, tinh bột sót nhiều, hiệu suất tổng thu hồi thấp.

+ Phương pháp amylose: Đặc điểm của phương pháp này là sử dụng nấm mốc và nấm men đã được nuôi cấy thuần khiết để thực hiện hai quá trình đường hoá và rượu hoá riêng biệt. Phương pháp này có ưu điểm là dễ cơ khí hoá và tự động hoá, cho hiệu suất thu hồi cao. Tuy nhiên nó đòi hỏi nguyên liệu phải đồng đều và yêu cầu vô trùng tuyệt đối.

Mục đích của *nấu nguyên liệu* là phá vỡ màng tế bào tinh bột và biến tinh bột thành trạng thái hoà tan trong nước. Hiện nay, trên thế giới có hai xu hướng về nhiệt độ nấu là $145\text{-}155^\circ\text{C}$ trong thời gian dài hoặc $170\text{-}180^\circ\text{C}$ trong thời gian ngắn. Trong quá trình nấu tinh bột sẽ được trương nở và hồ hoá.

Nguyên liệu tinh bột sau khi được hồ hoá được làm nguội về nhiệt độ $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$ để thực hiện quá trình đường hoá. Chế phẩm amylase được sử dụng trong quá trình đường hoá được sản xuất từ các chủng nấm mốc khác nhau như: *Rhizopus*, *Mucor rouxii*, *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. oryzae* ...)

Quá trình đường hoá được thực hiện trong trong 5 phút. Sau đó, dịch đường được làm nguội đến nhiệt độ lên men ($36 \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Nguyên liệu ri đường có nồng độ chất khô và hàm lượng đường rất cao (80-90Bx). Trước khi lên men, người ta phải xử lý nhằm tạo pH thích hợp, sát trùng, đồng thời bổ sung chất dinh dưỡng và pha loãng đến nồng độ yêu cầu phù hợp cho quá trình lên men.

Nấm men dùng trong sản xuất rượu là chủng *Saccharomyces cerevisiae*. Các loài nấm men này cần có các tính chất cơ bản như : Tốc độ phát triển nhanh; Lên men được nhiều loại đường khác nhau và đạt được tốc độ lên men nhanh; Chịu được nồng độ lên men cao, đồng thời ít bị ức chế bởi những sản phẩm của sự lên men; Thích nghi với những điều kiện không thuận lợi của môi trường, đặc biệt đối với chất sát trùng, độ acid, nhiệt độ cao.

Các chủng nấm men thường dùng để lên men dịch đường hoá tinh bột là: *S. cerevisiae* Rasse II (chủng II), *S. cerevisiae* Rasse XII (chủng XII), chủng M, chủng MTB Việt nam (được phân lập từ men thuốc bắc). Các chủng nấm men dùng để lên men dịch ri đường là: chủng 396 Trung Quốc, chủng I-A Liên Xô cũ, chủng “T” Việt Nam.

Chủng nấm men gốc trước khi đưa vào sản xuất lên men được nuôi cấy nhân giống theo thể tích tăng dần cho đến khi đạt được 10-15% thể tích thùng lên men trong sản xuất

Quá trình lên men dịch đường hoá có thể được thực hiện bằng phương pháp lên men gián đoạn, bán liên tục hoặc liên tục. Phương pháp lên men gián đoạn là cả quá trình lên men từ đầu đến cuối được thực hiện trong cùng một thiết bị; thời gian lên men khoảng 68-80 giờ ở nhiệt độ $36-37^{\circ}\text{C}$. Đặc điểm của phương pháp lên men bán liên tục là giai đoạn lên men chính thực hiện liên tục và xảy ra trong nhiều thùng lên men (thường là 6 thùng) và thời gian này kéo dài 60-62 giờ, giai đoạn cuối gián đoạn. Bản chất của phương pháp lên men liên tục là rải đều các giai đoạn lên men mà mỗi giai đoạn đó được thực hiện trong một hoặc nhiều thiết bị lên men có liên hệ với nhau. Hệ thống lên men liên tục thường có 11-12 thùng được nối với nhau bằng các ống chảy chuyển và van điều chỉnh. Kết thúc quá trình lên men ta thu được dấm chín với nồng độ rượu khoảng 7-9%.

Để thu được cồn tinh chế từ dấm chín, người ta thực hiện hai quá trình là chưng cất và tinh chế. Hai quá trình này được thực hiện trên các tháp chưng cất và tháp tinh chế. Quá trình chưng cất là quá trình tách cồn cùng với các tạp chất dễ bay hơi ra khỏi dấm chín; kết thúc quá trình chưng cất ta được cồn thô. Quá trình tinh chế là quá trình tách tạp chất ra khỏi cồn thô và cuối cùng ta nhận được cồn tinh chế. Quá trình chưng cất và tinh chế cồn được gọi là quá trình chưng luyện.

1.2. Lên men ethanol nhờ vi khuẩn:

Nhiều loài vi khuẩn có khả năng lên men tạo ethanol. Tuy nhiên, bên cạnh ethanol chúng còn tạo ra nhiều sản phẩm phụ trong quá trình lên men như các rượu bậc cao, các acid hữu cơ, các polyol, keton và các chất khí khác.

1.2.1. Cơ sở hoá sinh

Khác với cơ chế lên men ethanol của nấm men, nhiều vi khuẩn chuyển hoá glucose thành pyruvat theo con đường Entner-Doudoroff (ED). Theo con đường này, glucoso-6-phosphat bị oxy hoá thành 6-phosphogluconat rồi sau đó chuyển hoá thành 2-ceto-3-deoxy-6-phosphogluconat. Chất này, sau đó được phân cắt trực tiếp thành glyceraldehyd-3-phosphat và pyruvat.

1.2.2. Sản xuất ethanol nhờ *Zymomonas mobilis*

Theo kết quả nghiên cứu người ta thấy rằng *Zymomonas mobilis* chỉ có khả năng chuyển hoá các loại đường theo con đường ED. Tốc độ hấp thụ đường và sinh ethanol nhiều nhất khi chủng này được lên men trong môi trường có glucose, đồng thời nó có khả năng lên men ở nồng độ đường trong môi trường cao (40%). Vi khuẩn này cũng đòi hỏi có đầy đủ thành phần dinh dưỡng trong môi trường như C, N, P.

II. Lên men lactic:

1. Sữa và các sản phẩm từ sữa:

1.1. Các thành phần của sữa

Sữa là một trong những sản phẩm thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao. Trong sữa có đầy đủ tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết và dễ hấp thụ như protein, glucid, lipid, vitamin, muối khoáng và các enzyme.

Protein của sữa có chứa nhiều và hài hoà các acid amin và có hai kiểu protein khác nhau là protein hoà tan (albumin, imunoglobulin, lisozim, lactoferin, lactoperoxydase...) và protein ở trạng thái keo không bền bao gồm một phức hệ mixen của caseinat và canxiphosphat có bề mặt rất háo nước. Sữa tươi luôn có độ pH xấp xỉ 6,6-6,7, đồng thời do các mixen mang điện tích âm nên đẩy nhau nhằm đảm bảo độ bền keo của

dung dịch. Khi giảm độ pH (do kết quả của quá trình lên men tạo acid lactic), các ion H^+ của acid sẽ liên kết với các mixen làm giảm điện tích. Đến một giới hạn nhất định, casein sẽ đông tụ. Casein đông tụ tốt nhất ở pH = 4,5-4,7.

Lactose chiếm vị trí hàng đầu trong glucid của sữa. Lactose tồn tại ở hai dạng tự do và liên kết với protein và các glucid khác. Khi sữa bị nhiễm vi sinh vật, nhiều loại vi khuẩn có khả năng lên men lactose tạo thành acid và làm thay đổi tính chất, cấu trúc của sữa. Người ta đã lợi dụng tính chất này để chế biến lên men sữa thành nhiều sản phẩm khác nhau.

Trong sữa có mặt nhiều cation như K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} và các anion của acid phosphoric, limonic, clohydric nên trong sữa có nhiều loại muối khác nhau. Trong đó, muối canxi có ý nghĩa lớn đối với người. Muối canxi còn có ý nghĩa quan trọng trong chế biến các sản phẩm sữa. Khi sữa có hàm lượng canxi thấp, sữa sẽ không bị đông tụ hoặc đông tụ rất chậm.

Chất béo trong sữa tồn tại dưới dạng huyền phù của các hạt nhỏ hình cầu hoặc hình ovan với đường kính 2-10 μ m. Các hạt nhỏ hình cầu này được vây quanh bởi một màng protein, gồm hai phần: phần có thể hoà tan được và phần không thể hoà tan được trong nước. Bề mặt bên trong của màng có liên quan mật thiết với một lớp phụ có bản chất phospholipit với thành phần chủ yếu là lexitin và xephalin. Trong lòng các hạt nhỏ hình cầu có chứa glycerit với điểm nóng chảy thấp, giàu acid oleic, luôn ở trạng thái lỏng trong điều kiện nhiệt độ môi trường. Phần tiếp xúc với màng là các glycerit có điểm nóng chảy cao hơn, có thể đông đặc ở nhiệt độ môi trường. Chính nhờ có cấu trúc như vậy mà chất béo ổn định trong sữa.

1.2. Các sản phẩm lên men từ sữa

1.2.1. Công nghệ sản xuất sản phẩm sữa lên men (sữa chua):

Sữa lên men là kết quả của quá trình hoạt động của vi sinh vật làm thay đổi các thành phần có trong sữa mà đặc trưng là quá trình lên men tạo thành acid lactic từ đường lactose. Trong một số sản phẩm đặc biệt còn có cả sự tạo thành ethanol.

Vi sinh vật được sử dụng trong sản xuất sữa chua là vi khuẩn lactic với hai loài đặc trưng:

+ *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*): là vi khuẩn lên men điển hình, phát triển tốt ở nhiệt độ 45-50 $^{\circ}$ C trong môi trường có độ acid cao. Loài này có thể tạo ra trong khối sữa đến 2,7% acid lactic từ đường lactose.

+ *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*): Phát triển tốt ở nhiệt độ 50 $^{\circ}$ C và sinh sản tốt ở nhiệt độ 37-40 $^{\circ}$ C. Đây cũng là vi khuẩn

lactic chịu nhiệt lên men điển hình, có thể chịu được nhiệt độ đun nóng đến 65⁰C trong 30 phút nhưng chỉ phát triển được trong môi trường acid thấp hơn *L.bulgaricus*.

Hai loài vi khuẩn nêu trên thuộc loại vi khuẩn hiếu khí và chịu được môi trường có độ acid thấp (pH = 4-4,5).

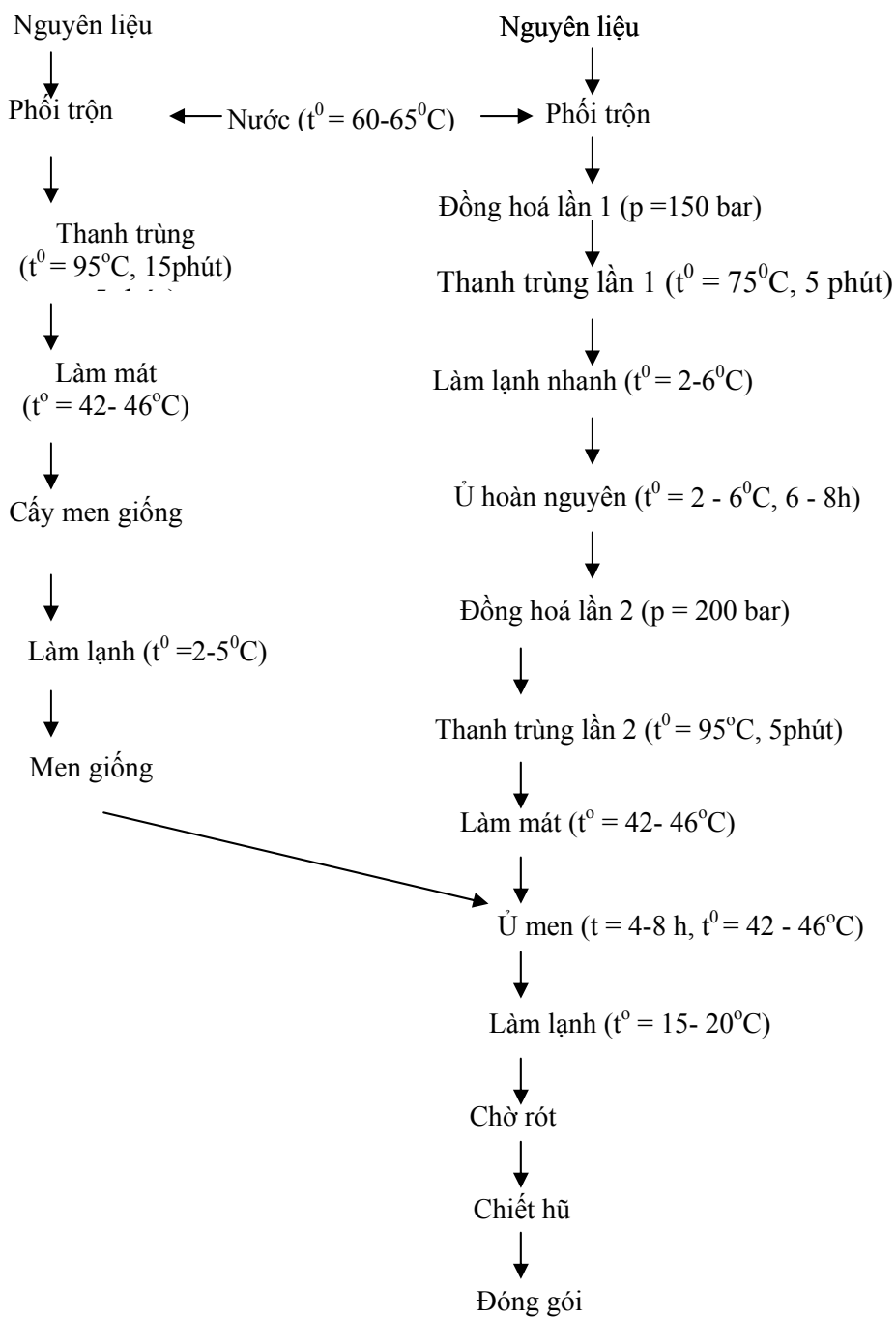
Trong sản xuất sữa chua, việc cấy hỗn hợp hai loài vi khuẩn này cho kết quả sinh ra acid lactic tốt hơn là chỉ sử dụng riêng từng loài. *L. bulgaricus* có khả năng thủy phân casein thành một số acid amin do đó tạo điều kiện cho *S. thermophilus* phát triển.

Trong sản xuất sữa chua bằng nuôi cấy hỗn hợp hai loài trên cho thấy: ở giai đoạn đầu của quá trình sản xuất, pH của sữa thích hợp cho loài *Streptococcus* hoạt động chiếm ưu thế và đảm bảo cho quá trình lên men lactic được bắt đầu. Hoạt độ của các enzyme phân huỷ casein của *Lactobacillus* kích thích sự phát triển của *Streptococcus*, độ acid tăng lên. pH của sữa thay đổi làm cho *Streptococcus* khó phát triển. Lúc này *Lactobacillus* sẽ thay thế chỗ và sự vón cục của sữa bắt đầu.

Sữa chua có thể được sản xuất từ sữa tươi tự nhiên hoặc sữa bột hoà tan với sữa tươi. Sau khi thanh trùng ở nhiệt độ 95⁰C, sữa được làm lạnh đến nhiệt độ 42-46⁰C và cấy hai loại vi khuẩn trên để thực hiện quá trình lên men ở nhiệt độ 40-50⁰C trong thời gian 2-3h.

Để sản phẩm có độ chua nhẹ và thơm, người ta có thể sử dụng tế bào của vi khuẩn *Streptococcus* ở giai đoạn trẻ và khi môi trường lên men có độ acid thấp. Ngược lại, muốn sữa chua có độ acid cao thì cần sử dụng tế bào *Streptococcus* già hơn hoặc sử dụng *Lactobacillus*.

Quy trình công nghệ sản xuất sữa chua theo sơ đồ hình 6.5.



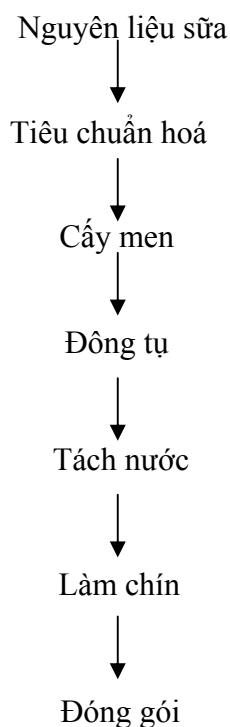
Hình 6.5: Sơ đồ công nghệ sản xuất sữa chua

1.2.2. Công nghệ sản xuất phomat

Phomat là sản phẩm được lên men hay không được lên men (tức là loại sản phẩm chịu tác động ít nhất của quá trình lên men lactic) chủ yếu từ thành phần casein của sữa tạo thành dạng gel mất nước. Phomat giữ lại hoàn toàn lượng chất béo ban đầu. Ngoài ra trong sản phẩm còn chứa một ít lactose dưới dạng acid lactic và một tỷ lệ khác nhau về chất khoáng.

Sản xuất phomat gồm ba giai đoạn chính như sau:

Quy trình sản xuất phomat theo sơ đồ hình 6.6.



Hình 6.6: Sơ đồ công nghệ sản xuất phomat

- Tạo gel casein hay còn gọi là quá trình đông tụ sữa: Quá trình này xảy ra có thể là do tác dụng đồng thời của men dịch vị dạ dày bê và acid lactic sinh ra từ trình lên men lactose bởi vi khuẩn. Đôi khi một trong hai dạng đông tụ chiếm ưu thế.

- Quá trình tách nước từng phần của gel được thực hiện theo nhiều phương pháp khác nhau tùy thuộc vào bản chất của quá trình đông tụ.

- Quá trình làm chín phomat nhờ hệ enzyme vi sinh vật.

pentosophosphat cetolase mà xiluloso 5 phosphat bị phân ly tạo thành glyceraldehyd 3 phosphat và acetyl phosphat. Acetyl phosphat có thể được chuyển hoá tiếp tục thành ethanol hoặc acid acetic tùy theo hệ enzyme của từng vi sinh vật. Còn glyceraldehyd 3 phosphat thì bị khử H_2 để chuyển thành acid lactic giống như trường hợp lên men lactic đồng hình.

Sự lên men lactic dị hình được ứng dụng trong lên men thức ăn gia súc và muối chua rau quả. Các vi khuẩn có khả năng gây lên men các đường mono và disaccharid (sau khi đã thuỷ phân thành monosaccharid nhờ enzyme tương ứng của vi khuẩn).

Sơ đồ sự lên men lactic dị hình xảy ra theo sơ đồ hình 6.7

2.2. Công nghệ sản xuất

Quy trình công nghệ sản xuất acid lactic được tiến hành theo sơ đồ hình 6.8.

Nguyên liệu được sử dụng để sản xuất acid lactic có thể là nguồn tinh bột hoặc đường. Nếu nguyên liệu là tinh bột thì trước hết phải được thuỷ phân bằng enzyme hoặc acid.

Dịch lên men có chứa đường cần được bổ sung các chất dinh dưỡng là các nguồn nitơ như cao ngô, mầm đại mạch, $(NH_4)_2SO_4$. Sau khi thanh trùng, dịch lên men được làm nguội xuống $50^{\circ}C$ và bổ sung $CaCO_3$.

Quá trình lên men được thực hiện ở liên tục ở nhiệt độ $48-50^{\circ}C$ và kéo dài 2-4 ngày.

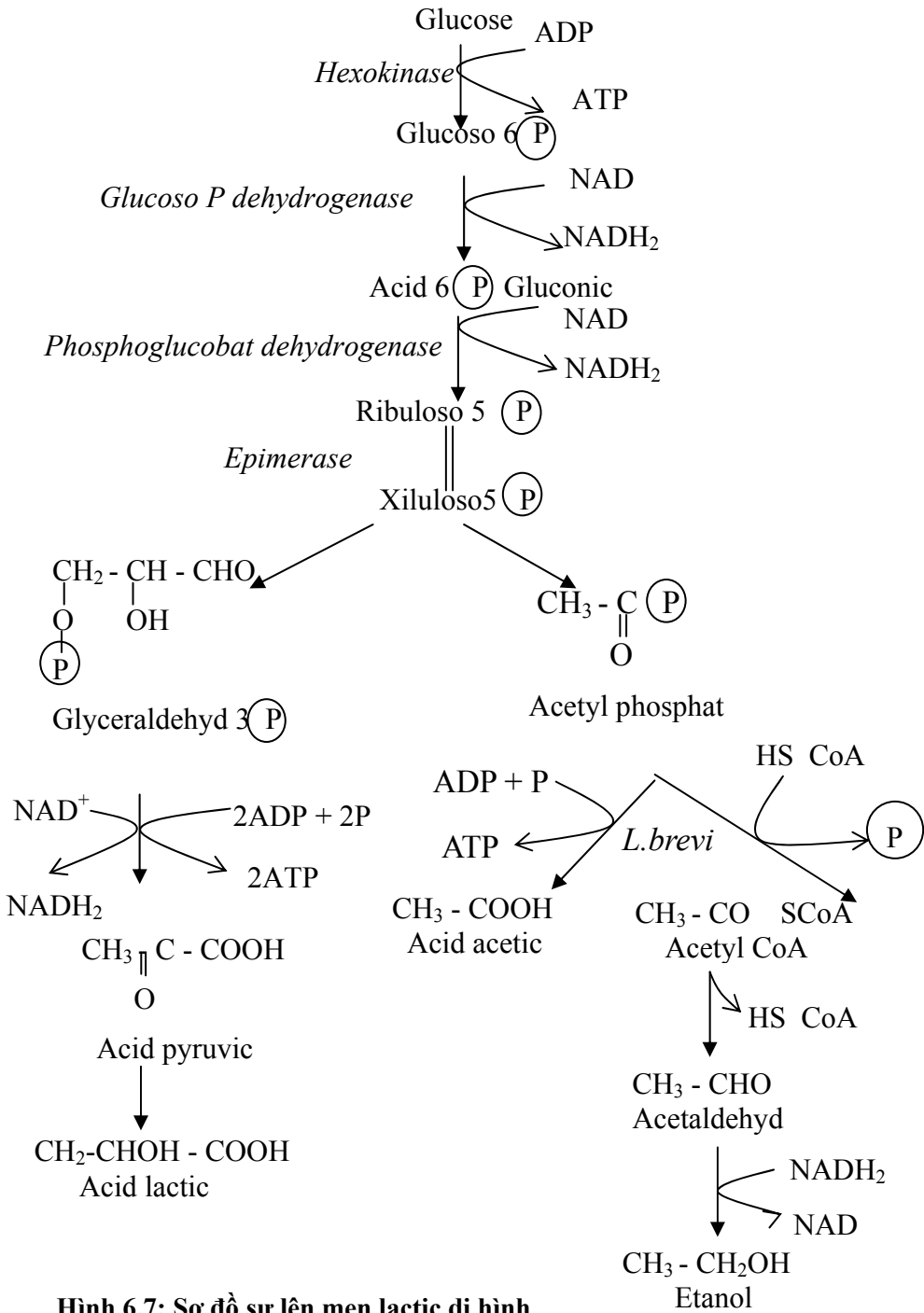
Acid lactic được tạo thành dưới dạng muối canxi. Do muối lactat canxi có tính tan thấp, nên trước khi tách sinh khối và một số chất không tan khác bằng phương pháp lọc, người ta cần đun nóng để hoà tan toàn bộ muối này. Dịch lọc được xử lý với H_2SO_4 để giải phóng acid lactic.

Tùy thuộc vào mục đích sử dụng mà có thể tinh chế acid lactic bằng nhiều phương pháp khác nhau như sử dụng than hoạt tính, trao đổi ion, thẩm tích, chiết bằng dung môi...

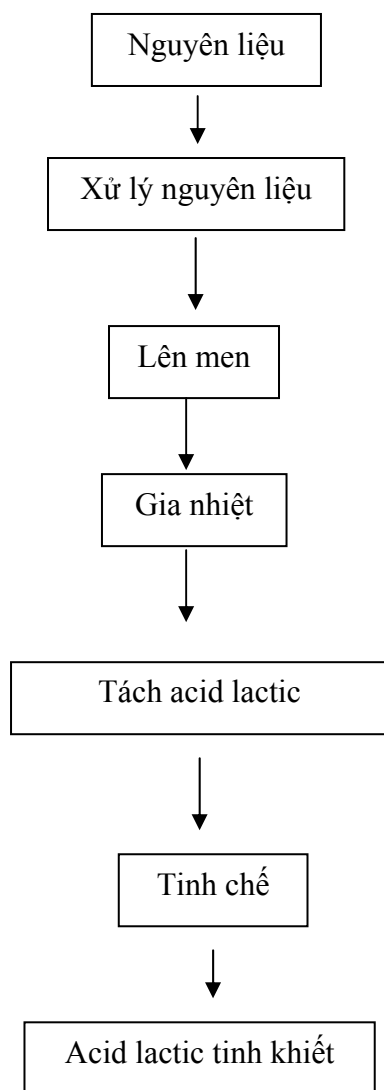
III. Lên men 2,3 butadiol

1. Vi sinh vật

Có rất nhiều chủng vi sinh vật có khả năng lên men butadiol với hiệu quả cao như *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas hydrophila*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*. Trong đó *Klebsiella pneumoniae* và *Bacillus polymyxa* được sử dụng một cách phổ biến trong sản xuất thương mại butadiol.



Hình 6.7: Sơ đồ sự lên men lactic dị hình



Hình 6.8: Quy trình công nghệ sản xuất acid lactic

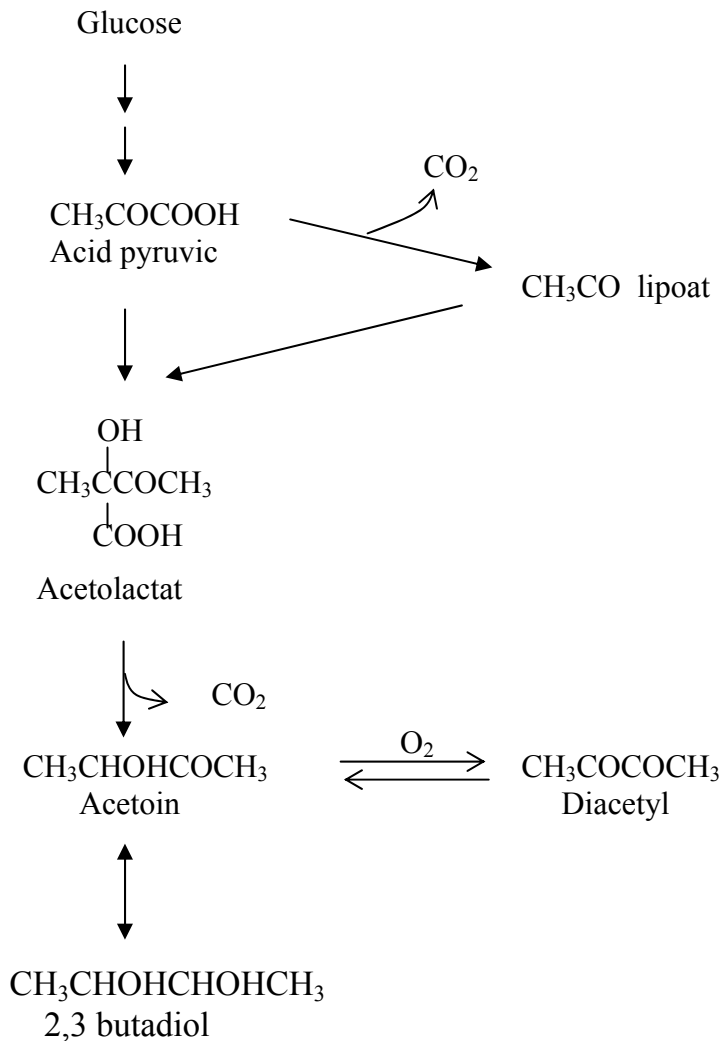
2. Cơ chế sinh hoá của quá trình lên men butadiol

Cơ chế trao đổi chất tạo thành butadiol của vi sinh vật từ glucose xảy ra theo sơ đồ hình 6.9.

Đi từ glucose, acid pyruvic được tạo thành theo con đường phân. Nếu cơ chất ban đầu là đường pentose thì nó đi theo con đường

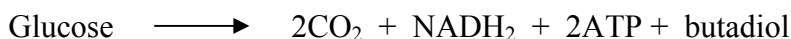
pentosophosphat để đạt được glyceraldehyd 3 phosphat, sau đó chất này sẽ chuyển thành pyruvat theo con đường đường phân.

Tiếp theo đó, hai phân tử pyruvat được ngưng tụ đồng thời loại bỏ CO_2 để tạo thành acetolactat. Dưới tác dụng của enzyme acetolactat decarboxylase, acetolactat tạo thành acetoin, chất này tiếp tục bị oxy hoá không có mặt enzyme thành diacetyl hoặc bị khử dưới sự xúc tác của butadioldehydrogenase thành butadiol.



Hình 6.9: Cơ chế trao đổi chất tạo thành butadiol của vi sinh vật

Phương trình tóm tắt của quá trình lên men butadiol như sau:



3. Cơ chất và hiệu suất lên men

Cơ chất và hiệu suất lên men phụ thuộc vào từng chủng vi sinh vật gây lên men.

Ví dụ:

Klebsiella pneumoniae có khả năng lên men hàng loạt đường như glucose, manose, galactose, xilose, arabinose, xenlobiose và lactose nhưng không có khả năng lên men cellulose và hemicellulose. Để khắc phục vấn đề này, người ta đã đưa ra quy trình đường hoá và lên men đồng thời bằng cách sử dụng thêm chủng nấm mốc *Tricodema harzianum* để thủy phân cellulose và hemicellulose. Bằng quy trình này, hiệu suất lên men đạt 50-60%, tăng lên 30-40% so với quá trình lên men và đường hoá riêng biệt.

Bacillus polymyxa, ngoài lên men các loại đường trên, còn có khả năng lên men các hợp chất cao phân tử như xilan, inulin, tinh bột.

4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men

* Nhiệt độ:

Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng của vi khuẩn có khả năng sinh ra butadiol nằm trong khoảng 30-37⁰C. Nếu tăng nhiệt độ từ 33 lên 37⁰C thì khả năng lên men butadiol của *Klebsiella pneumoniae* giảm 66% như đối với chủng *Enterobater aerogenes* thì hiệu quả này không thể hiện rõ.

* pH:

Mỗi chủng vi khuẩn thích hợp với các giá trị pH khác nhau để sinh tổng hợp butadiol là cao nhất. *Klebsiella oxitoca* sinh tổng hợp butadiol cực đại ở pH=5,2-5,6; *Klebsiella aerogenes* thích hợp ở pH =6,2 trong khi đó *Enterobater cloacae* thích hợp ở pH=5,0-5,5.

* Oxy:

Đây là thông số môi trường quan trọng nhất ảnh hưởng đến quá trình lên men. Nếu cung cấp oxy quá lớn thì sự tạo thành sinh khối sẽ chiếm ưu thế. Ngược lại nếu oxy được cung cấp ít thì khả năng sinh butadiol cao cùng với sự tiêu thụ một lượng đường lớn. Tuy nhiên để quá trình lên men tốt thì trong môi trường lên men cần có một mật độ tế bào vi sinh vật ban đầu nhất định.

Nồng độ đường ban đầu:

Ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu đến sự lên men phụ thuộc vào thành phần môi trường. Chẳng hạn như khi đối với môi trường sản xuất, sự tăng nồng độ đường kéo theo sự tăng hàm lượng một số thành phần khác mà trong đó có thể có các chất kim hãm, do đó, nồng độ đường ban đầu cần được giới hạn. Tuy nhiên đối với môi trường tổng hợp thì nồng độ đường ban đầu khoảng 200g/l quá trình lên men vẫn xảy ra.

5. Tiềm năng ứng dụng

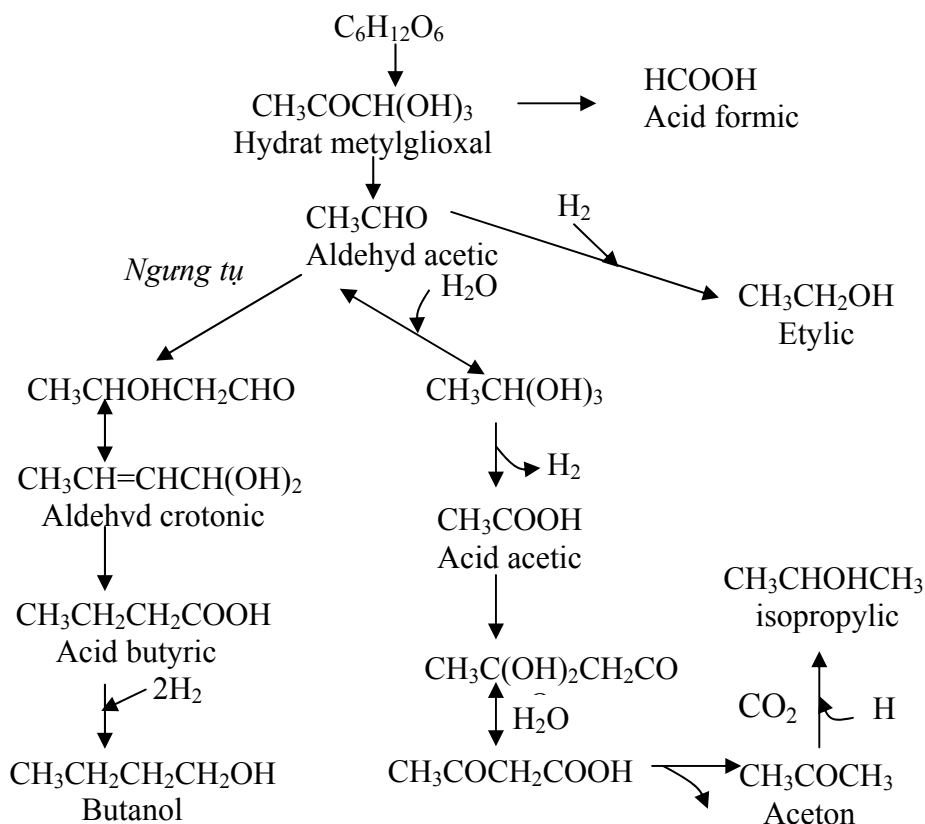
Butadiol được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Nó có thể dùng làm nhiên liệu hoặc có thể được dùng để điều chế các hợp chất hữu cơ khác nhau như etyl keton và 1,3 butadien. Etyl keton là một dung môi công nghiệp, còn 1,3-butadien dùng để sản xuất cao su.. Butadiol cho phản ứng với aceton tạo nên hợp chất “tetrametyl” có thể phối trộn với xăng. Các este của butadiol được dùng để sản xuất các chất dẻo polime chịu nhiệt.

IV.Lên men butanol-aceton

1. Cơ sở hoá sinh của quá trình lên men butanol-aceton

Tác nhân gây lên men butanol-aceton là chủng vi khuẩn *Clostridium acetobutylicum*. Đây là vi khuẩn yếm khí do đó sản phẩm lên men chỉ thu được trong điều kiện lên men không có oxy. Cơ chế hóa sinh quá trình lên men butanol-aceton theo Cleuberg theo sơ đồ hình 6.10

Như vậy, thông qua sự trao đổi chất của vi khuẩn mà trong môi trường tích tụ được sản phẩm aceton, butanol, ethanol, CO₂ và H₂. Ngoài ra còn có các sản phẩm trung gian như acid buttyric, acid acetic, acid formic...



Hình 6.10: Cơ chế hóa sinh quá trình lên men butanol-aceton

2. Quy trình sản xuất công nghiệp

Nhìn chung, quy trình sản xuất aceton-butanol có thể chia làm ba giai đoạn: Chuẩn bị dịch hồ để lên men; Lên men; Chung cất để tách các sản phẩm;

Nguyên liệu để sản xuất aceton-butanol bằng phương pháp lên men là tinh bột (các nguyên liệu có tinh bột), không cần đường hoá trước vì vi khuẩn có amylase khá hoạt động. Yêu cầu của nguyên liệu là có glucid, nitơ và phospho. Do đó, bột các ngũ cốc là nguyên liệu hoàn hảo có chứa tất cả các thành phần cần thiết cho sự lên men. Rỉ đường và các dịch thủy phân gỗ, rơm, bẹ ngô... là nguyên liệu không đầy đủ bắt buộc phải trộn với ngũ cốc.

Nồng độ dịch hồ để lên men khoảng 8-10% tính theo chất khô hoặc 4-6% tính theo tinh bột. Nếu nồng độ cao hơn sẽ thừa và không được lên men. Khi nồng độ butanol đạt xấp xỉ 1,5% (tương ứng với nồng độ ban đầu của glucid là 6%) thì quá trình lên men bị ngừng. Nhiệt độ lên men của vi khuẩn aceton-butanolla là 36-37⁰C.

Quá trình lên men aceton-butanol có thể chia làm hai thời kỳ: Ở thời kỳ đầu, trong môi trường lên men tích tụ acid (nên có tên gọi là lên men acid), song thời kỳ thứ hai thì trong môi trường tích tụ butanol, ethanol và aceton (nên có tên gọi là lên men rượu). Trong thời kỳ thứ hai này, độ acid chuẩn ở trong môi trường lên men bị giảm nhanh: giảm đi gần một nửa so với giá trị cực đại ở cuối thời kỳ đầu. Đồng thời cũng xảy ra chuyển hoá một cách nhanh chóng các acid thành những hợp chất trung tính tương ứng: acid butyric bị khử thành rượu butylic, còn acid acetic bị chuyển hoá thành aceton. Tiếp đó, độ acid chuẩn có tăng lên một ít, còn vận tốc tạo ra dung môi dần dần bị chậm lại và đến cuối thời kỳ lên men thì ngừng hoàn toàn. Trong quá trình lên men còn kèm theo sự thoát khí CO₂ và H₂. Qua 5-6h đầu, sự thoát khí còn chậm chạp, sau đó thì tăng nhanh rồi đạt đến cực đại, tiếp đến lại giảm nhanh chóng và quá trình ngừng. Các khí này được dẫn từ các thùng lên men vào các thiết bị gom khí rồi sau đó thải ra không khí. Sau khi lên men xong thì dấm chín được bơm vào thiết bị chưng cất để tách mỗi thứ ra khỏi hỗn hợp.

Câu hỏi ôn tập chương 6

1. Hãy trình bày sự biến đổi của phân tử glucose đến etylic xảy ra trong tế bào nấm men.
2. Trình bày những điểm giống và khác nhau chủ yếu trong các quá trình sản xuất bia, rượu vang và rượu etylic.
3. Phân tích vai trò của các nguyên liệu ảnh hưởng đến thành phẩm trong sản xuất bia.
4. Phân tích các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men bia.
5. So sánh hai phương pháp lên men cổ điển và lên men hiện đại trong sản xuất bia. Phân tích ưu nhược điểm của hai phương pháp đó.
6. So sánh phương pháp sản xuất vang đỏ và sản xuất vang trắng.
7. Chủng nấm men dùng trong sản xuất rượu cần có những yêu cầu gì?
8. Phân tích thành phần và tính chất của sữa được ứng dụng để sản xuất các sản phẩm từ sữa. Cho ví dụ minh hoạ.

9. Cơ chế và quy trình sản xuất sữa chua và phomat giống và khác nhau ở những điểm cơ bản nào? Hãy phân tích.

10. Cơ chế lên men lactic dị hình và đồng hình giống và khác nhau ở những điểm nào?

11. Trình bày quy trình sản xuất acid lactic công nghiệp.

12. Trình bày cơ chế hoá sinh và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men butadiol.

13. Cơ chế quá trình lên men aceton-butanol diễn ra như thế nào? Trong quá trình này ngoài hai sản phẩm chính là butanol và aceton còn có những sản phẩm phụ nào?

14. Phân tích quy trình sản xuất aceton-butanol ở quy mô công nghiệp.

Chương 7

Các chất trao đổi bậc một

I. Nguyên lý của sự tổng hợp thừa

Vi sinh vật tồn tại trong tự nhiên sinh ra các sản phẩm trao đổi chất và các thành phần tế bào chỉ ở *mức độ cần thiết* cho sự sinh sản tối ưu và cho sự duy trì loài. Sự trao đổi chất tế bào có *tính kinh tế* như vậy được đảm bảo nhờ các cơ chế điều hòa phát triển cao. Chẳng hạn những cơ chế này hoạt động sao cho các aminoacid không được tổng hợp quá nhu cầu của sự tổng hợp protein. Kết quả là, trong điều kiện tự nhiên không có sự sản sinh dư thừa các chất trao đổi bậc một, bậc hai và các enzyme. Nếu trong tự nhiên cơ chế *điều hòa* này bị rối loạn, ví dụ do kết quả của một *đột biến* thì các thể đột biến *sai hỏng trao đổi chất* thường sinh trưởng kém hơn và bị các chủng hoang dại lấn át. Chỉ trong điều kiện phòng thí nghiệm và trong ống giống thuần khiết mới có thể duy trì được các thể đột biến như vậy. Trong tự nhiên những chủng như vậy thường ít xuất hiện trong các ổ sinh thái. Bởi vậy những thí nghiệm nhằm phân lập các chủng có khả năng tổng hợp thừa từ nơi sống tự nhiên thường không đem lại kết quả mong muốn. Chỉ khi những cơ thể thích hợp, thu được do xử lý bằng các tác nhân gây đột biến được chọn lọc trong phòng thí nghiệm thì người ta mới có thể nhận được các chủng tổng hợp thừa bị sai hỏng trong cơ chế điều hòa. Những chủng này được coi là những chủng có năng suất cao và được dùng trong sản xuất công nghiệp.

1. Những nguyên tắc điều hòa trao đổi chất

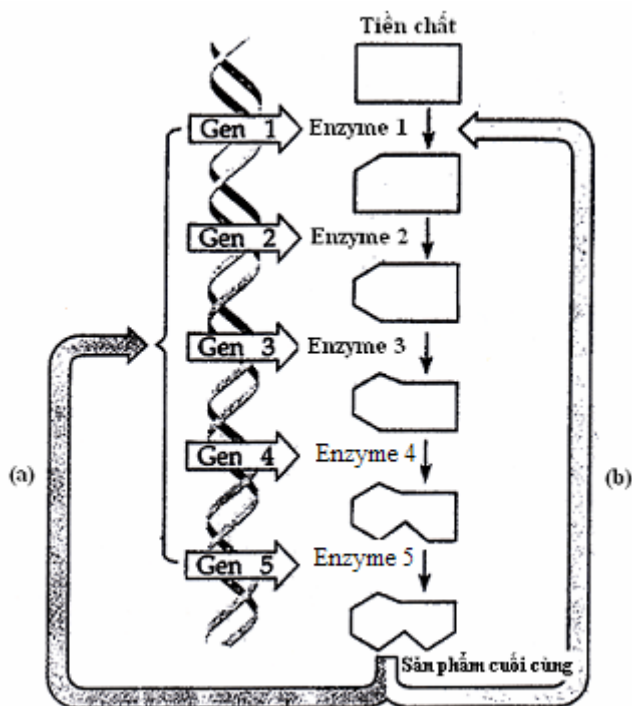
Có ba cơ chế chịu trách nhiệm trước hết về điều hòa trao đổi chất (hình 7.1):

- (a) Điều hòa *hoạt tính enzyme* nhờ sự ức chế (inhibition) bằng sản phẩm cuối cùng (còn được gọi là sự kìm hãm theo liên hệ ngược).
- (b) Điều hòa *sự tổng hợp enzyme* nhờ sự kìm chế (repression) bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kìm chế.
- (c) Điều hòa *sự tổng hợp enzyme* nhờ sự kìm chế dị hóa (catabolic repression).

Trong cơ chế ức chế bằng sản phẩm cuối cùng (a), sản phẩm cuối cùng của một quá trình sinh tổng hợp gây ra sự ức chế quá trình tổng hợp chính sản phẩm cuối cùng đó. Ở đây, sản phẩm cuối cùng dù được hình thành trong tế bào hay được thu nhận từ môi trường dinh dưỡng, đều có cùng ý nghĩa. Trong cơ chế này, sản phẩm cuối cùng nói chung ảnh hưởng đến enzyme đầu

tiên của chuỗi sinh tổng hợp. Enzyme có tính chất quyết định này là một *protein dị lập thể*. Nó có đặc điểm là thay đổi cấu hình không gian khi có mặt sản phẩm cuối cùng nhằm giảm bớt hoạt tính xúc tác. Sự ức chế này xảy ra nhanh và rất có hiệu quả.

Trong cơ chế kiểm chế (b), sản phẩm cuối cùng ức chế sự tổng hợp của enzyme cần cho sự tạo thành sản phẩm ấy, trong đó việc đọc thông tin di truyền cần cho quá trình tổng hợp enzyme (sự phiên mã) bị phong tỏa. ở nồng độ cao của các sản phẩm cuối cùng, sự tổng hợp các enzyme tham gia vào chuỗi phản ứng bị ngừng hoặc bị kéo dài một cách đáng kể. Nếu nồng độ sản phẩm cuối cùng giảm xuống dưới một mức nào đó thì sẽ xảy ra sự giải kiểm chế, nghĩa là các enzyme được tạo thành với tốc độ cao hơn. Sự điều hòa theo kiểu này xảy ra từ từ, vì nó gắn liền với sự tổng hợp enzyme.

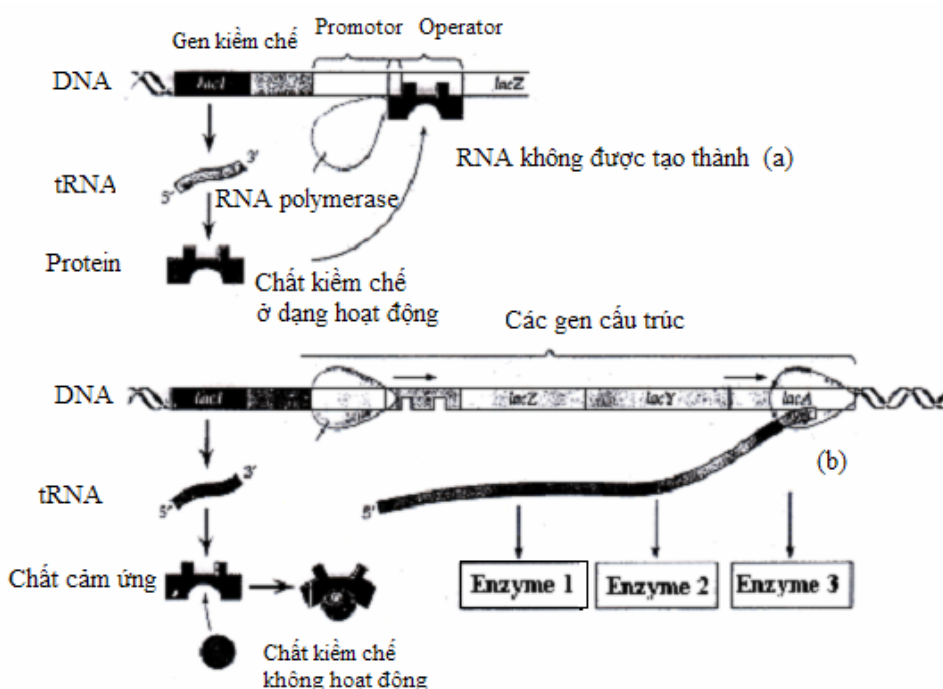


Hình 7.1: Các cơ chế điều hoà trao đổi chất

- a. Kiểm chế sự tổng hợp enzyme
- b. Ức chế hoạt tính enzyme đầu tiên trong con đường trao đổi chất (sự ức chế ngược)

Do sự khác nhau về tốc độ phản ứng và sự mẫn cảm, sự *ức chế* ngược nhạy cảm hơn sự *kiềm chế* tuy rằng chức năng của cả hai cơ chế đều cần thiết cho sự điều hòa một cách kinh tế quá trình sinh tổng hợp các viên gạch cấu trúc trong tế bào.

Trong khi *sự kiềm chế enzyme* điều hòa quá trình tổng hợp các enzyme đồng hóa, nghĩa là các enzyme chịu trách nhiệm về tổng hợp thì sự tổng hợp các enzyme dị hóa (xúc tác sự phân hủy cơ chất) lại được điều hòa bởi *sự cảm ứng enzyme*. Đó là cơ chế tương tự như kiềm chế, cũng xảy ra ở mức độ phiên mã. Trong sự cảm ứng enzyme, một chất dinh dưỡng đóng vai trò *chất cảm ứng* kích thích sự tổng hợp enzyme xúc tác cho sự phân hủy chính nó, nghĩa là chất này cảm ứng sự tổng hợp. Do đó việc tổng hợp các enzyme cảm ứng chỉ xảy ra khi có mặt cơ chất tương ứng trong môi trường dinh dưỡng (hình 7.2).



Hình 7.2: Điều hoà sự tổng hợp các enzyme cảm ứng

a) Khi không có mặt chất cảm ứng

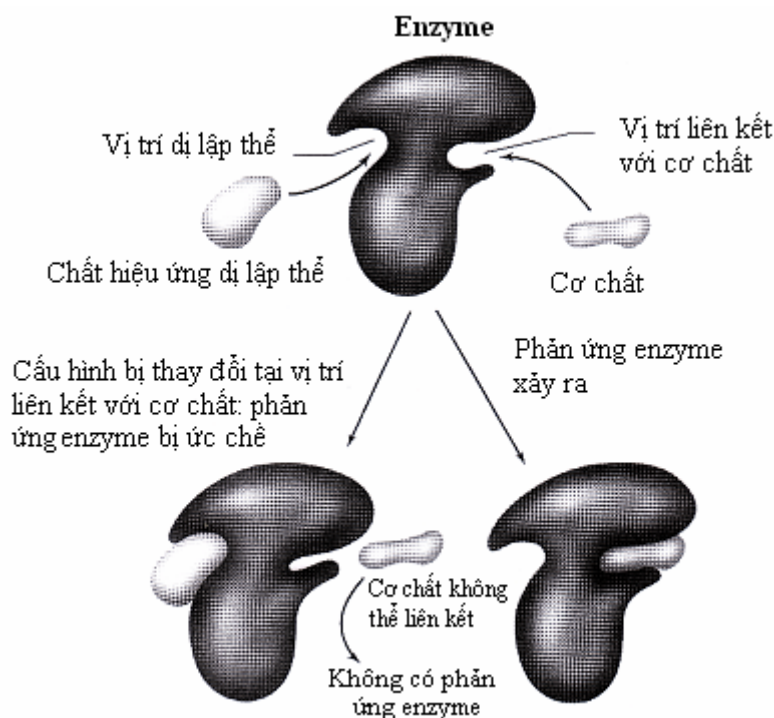
b) Khi có mặt chất cảm ứng

Nếu trong môi trường dinh dưỡng có mặt nhiều cơ chất thì trước hết xảy ra sự tổng hợp của enzyme nào xúc tác sự phân hủy cơ chất dễ sử dụng nhất. Sự tổng hợp của các enzyme khác bị ức chế bởi sự *kiềm chế dị hóa* (c). Thông thường thì glucose là cơ chất thích hợp nhất. Bởi vậy hiệu ứng trong đó khi có mặt glucose, nhiều enzyme khác của quá trình dị hóa cũng như của quá trình trao đổi chất trung gian và trao đổi chất bậc hai không được tổng hợp cũng còn được gọi là *hiệu ứng glucose*. Không phải bản thân glucose mà là một chất trao đổi hình thành trong quá trình dị hóa glucose hay dị hóa một cơ chất khác để sử dụng, có trách nhiệm đối với sự ức chế này. Nhiều kết quả thực nghiệm cho biết AMP vòng có tác động đến giai đoạn phiên mã.

2. Những sai hỏng di truyền của điều hòa trao đổi chất

Các cơ chế điều hòa trao đổi chất có thể bị thay đổi do những đột biến dẫn đến sự tổng hợp thừa các chất trao đổi.

2.1. Đột biến dẫn đến những thay đổi trên enzyme dị lập thể



Hình 7.3: Cơ chế của sự ức chế enzyme nhờ chất hiệu ứng dị lập thể

Các enzyme dị lập thể chịu trách nhiệm về sự ức chế bằng sản phẩm cuối cùng, hay ức chế ngược, hoạt tính của chúng bị giảm do sản phẩm cuối cùng. Ngoài vị trí phản ứng với cơ chất, chúng còn có một vị trí khác đối với sản phẩm cuối cùng, vị trí thứ hai này được gọi là trung tâm dị lập thể. Hai vị trí phản ứng tách biệt nhau về không gian và khác nhau về cấu trúc; cũng như vậy, cơ chất của enzyme và sản phẩm cuối cùng của chuỗi sinh tổng hợp có cấu trúc khác nhau. Ngoài ra, cần lưu ý rằng các enzyme dị lập thể bao gồm nhiều dưới đơn vị giống nhau. Trạng thái hoạt động của enzyme được đặc trưng ở chỗ nó có thể phản ứng với cơ chất. Nếu bên cạnh cơ chất còn xuất hiện sản phẩm cuối cùng như một chất hiệu ứng dị lập thể thì sẽ xảy ra sự bao vây dị lập thể. Trong trường hợp này trung tâm xúc tác bị biến đổi về mặt không gian đến mức nó không thể phản ứng với cơ chất được nữa.

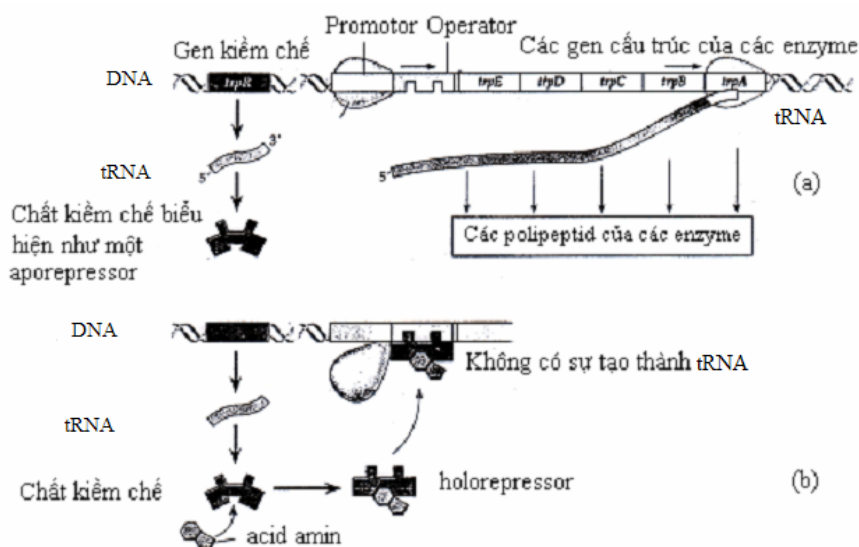
Một đột biến có thể dẫn đến kết quả là protein enzyme dị lập thể bị thay đổi bằng cách mất đi khả năng phản ứng với chất hiệu ứng nhưng vẫn còn hoạt tính xúc tác. Một protein bị biến đổi như vậy vẫn còn hoạt động ngay cả khi có mặt sản phẩm cuối cùng; nó dẫn đến sự tổng hợp thừa sản phẩm cuối cùng tương ứng.

2.2. Đột biến dẫn đến sự tổng hợp thừa các enzyme sinh tổng hợp

Trong sự kiểm soát tổng hợp enzyme sẽ xảy ra những phản ứng quyết định trong phạm vi thông tin di truyền, ở sự phiên mã. Nếu trong tế bào tồn tại một sản phẩm cuối cùng giả định nào đó, một aminoacid chẳng hạn, chỉ ở nồng độ rất thấp, thì các enzyme cần thiết cho sự tổng hợp aminoacid này sẽ được tạo thành. Muốn vậy, đoạn DNA chứa thông tin di truyền về cấu trúc của enzyme được điều hòa phải được đọc. Đó là do chất kiểm chế (repressor) với cấu hình không gian hiện có, biểu hiện như một chất aporepressor, không thể phản ứng với gen điều khiển (gen operator) của operon aminoacid. Chất kiểm chế này được sinh ra do tác dụng của gen kiểm chế (gen repressor) nằm trong một đoạn DNA bên cạnh. Từ operator diễn ra việc đọc thông tin di truyền; thông tin này được chuyển đến vị trí tổng hợp protein dưới dạng tRNA, và tạo khả năng cho sự tổng hợp enzyme tương ứng.

Trái lại, nếu aminoacid trong tế bào có nồng độ cao hơn, ví dụ do được đưa vào từ dung dịch dinh dưỡng thì sẽ xảy ra sự kìm hãm quá trình tổng hợp các enzyme tương ứng. Do phản ứng với các aminoacid hay với dạng hoạt động của chúng (aminoacyl-ARN_v) mà chất aporepressor bị thay đổi cấu trúc không gian tới mức có thể chiếm gen operator như một chất holorepressor. Kết quả là sự tổng hợp tRNA tương ứng và do vậy cả sự tổng hợp protein enzyme, cũng bị phong tỏa (hình 7.4).

Sự điều hòa tổng hợp enzyme có thể bị rối loạn do những đột biến khác nhau. Những sự sai hỏng dẫn đến hậu quả là, ngay cả khi có mặt aminoacid, các enzyme cần thiết cho sự tổng hợp chúng vẫn tiếp tục được tạo thành. Sự tổng hợp enzyme không thể kiểm chế này được gọi là sự tổng hợp *một cách cấu trúc*. Một mặt, những đột biến có thể đụng chạm đến gen kiểm chế dẫn tới một sai hỏng của chất kiểm chế hoặc làm biến mất nó, hay mặt khác đụng chạm đến gen điều khiển và làm cho gen này mất khả năng tác dụng với chất kiểm chế. Trong cả hai trường hợp hiệu quả là như nhau. Thường thường ở những thể đột biến như vậy, sẽ xảy ra sự tổng hợp thừa các enzyme sinh tổng hợp và do vậy có sự tổng hợp thừa các aminoacid.



Hình 7.4: Ví dụ về sự kiểm chế sự tổng hợp enzyme bởi sản phẩm cuối cùng (chẳng hạn một acid amin)

- Khi sản phẩm cuối cùng có mặt ở nồng độ thấp
- Khi sản phẩm cuối cùng có mặt ở nồng độ cao.

2.3. Đột biến tác động lên kiểm chế dị hóa

Toàn bộ những sai hỏng tương ứng cũng có thể biểu hiện ở sự cảm ứng enzyme. Nhờ những sai hỏng ấy mà các enzyme cảm ứng trở thành các enzyme cấu trúc, nghĩa là chúng tồn tại trong tế bào không phụ thuộc vào cơ chất. Sự kiểm chế dị hóa cũng có thể bị mất đi do đột biến.

II. Các phương pháp tạo ra thể đột biến tổng hợp thừa

1. Các cơ chế điều hoà enzyme mở đầu

Nhiều chất trao đổi bậc một được tổng hợp nhờ các con đường trao đổi chất phân nhánh mà ở đó có nhiều sản phẩm được tạo thành. Sự ức chế bởi sản phẩm cuối cùng do một sản phẩm của một con đường phân nhánh dẫn đến hậu quả là cả những sản phẩm khác cũng không được tạo thành. Các con đường trao đổi chất phân nhánh đòi hỏi một sự điều hòa phân hóa. Phù hợp với điều này là ba nguyên lý đã được chứng minh. Chúng liên quan tới cơ chế điều hòa enzyme mở đầu của một chuỗi phản ứng :

- Sự có mặt của nhiều *izoenzyme*, mỗi enzyme bị ức chế bởi một sản phẩm cuối cùng.
- Sự *ức chế tích lũy* trong đó một enzyme bị ức chế từng phần bởi mỗi sản phẩm cuối cùng. Tác dụng của các sản phẩm cuối cùng cộng lại sẽ dẫn đến sự ức chế hoàn toàn.
- Sự *ức chế đa trị (phối hợp hay hợp tác)*, trong đó một enzyme chỉ bị ức chế bởi tác dụng kết hợp của tất cả các sản phẩm cuối cùng. Một sản phẩm cuối cùng riêng sẽ không có tác dụng ức chế.

Các enzyme dị lập thể đứng ở đầu các chuỗi sinh tổng hợp phân nhánh rõ ràng có nhiều trung tâm điều hòa hoặc có các trung tâm điều hòa rất phức tạp.

Sự ức chế bởi sản phẩm cuối cùng không chỉ giới hạn đối với enzyme đứng ở đầu các chuỗi sinh tổng hợp phân nhánh. Thường thì sau sự phân nhánh còn có một sự ức chế do liên kết trở lại nữa. Cũng tồn tại những sự liên kết trở lại kế tiếp nhau, trong đó một sản phẩm trung gian do một sự ức chế mà tích lũy lại, bẫy giờ lại ức chế một phản ứng nằm trước đó. Các nguyên lý về sự ức chế do liên kết trở lại đúng với cả sự điều hòa hoạt tính enzyme cũng như sự kiểm chế.

Trong các chủng tổng hợp thừa, sự phá vỡ ức chế do liên kết trở lại đạt được nhờ những kiểu sai hỏng về di truyền sau đây:

- Sai hỏng trong sự tạo thành sản phẩm cuối cùng nhờ khuyết một enzyme (*các thể đột biến trợ dưỡng*). Bằng cách bổ sung hạn chế sản phẩm cuối cùng, sinh trưởng sẽ xảy ra, song sự tích lũy nội bào của chất trao đổi gây ra sự ức chế trở lại bị ngăn cản.

- Sai hỏng về điều hòa. Các thể đột biến sai hỏng về điều hòa có thể bị sai hỏng trong trung tâm điều hòa của enzyme dị lập thể hoặc sai hỏng cơ chế kiểm chế do một đột biến của gen điều hòa hay gen operator. Kết quả là gây ra sự tổng hợp enzyme một cách cấu trúc.

Thường thì các chủng năng suất cao là những thể đột biến nhiều lần có cả hai loại sai hỏng. Có nhiều phương pháp chọn lọc có hiệu quả dùng để tạo ra và phân lập các thể đột biến thuộc cả hai kiểu.

2. Kỹ thuật penicillin

Để làm phong phú các thể đột biến trợ dưỡng ở vi khuẩn người ta sử dụng kỹ thuật penicillin. Trong phương pháp này các điều kiện được lựa chọn sao cho các tế bào kiểu hoang dại, ví dụ phát triển được khi không có mặt một aminoacid nào đó, bị giết chết nhờ penicillin. Penicillin chỉ tác dụng lên các tế bào đang sinh trưởng. Các thể đột biến trợ dưỡng cần aminoacid này sẽ không sinh trưởng được và do đó sống sót. Đối với các vi khuẩn không mẫn cảm với penicillin có thể dùng các chất kháng sinh khác, ví dụ kanamycin hay cycloserine. Với nấm men thì dùng nystatin là thích hợp.

Bằng việc dùng các tác nhân gây đột biến có thể nâng tần số đột biến tới mức thể đột biến cần tìm có thể xuất hiện trong số 10^5 - 10^8 tế bào. Để gây đột biến có thể dùng ánh sáng tử ngoại, các tia ion hóa hoặc các tác nhân hóa học như nitrite, hydroxylamine, nitrosomethylguanidine hay ethylmethansulfonate. Dùng hai loại cuối cùng có thể đạt được một tốc độ đột biến đặc biệt cao trong đó có cả các thể đột biến kép. Ví dụ khi xử lý bằng ethylmethansulfonate đã thu được 1-10% các thể đột biến trợ dưỡng trong số các tế bào sống sót.

Các tế bào của thể đột biến trợ dưỡng được làm giàu nhờ kỹ thuật penicillin sau khi loại penicillin nhờ penicillinase trước tiên được cấy lên môi trường thạch dinh dưỡng đủ để thu nhận những khuẩn lạc riêng biệt. Bằng cách cấy chuyên song song các khuẩn lạc lên môi trường tối thiểu và lên thạch chứa yếu tố sinh trưởng có thể dễ dàng nhận ra và phân lập các thể đột biến trợ dưỡng. Việc cấy chuyên diễn ra nhờ kỹ thuật đóng dấu tức là nhờ một con dấu nhưng đưa các khuẩn lạc từ một hộp petri này sang một hộp petri khác.

Để phân lập các thể đột biến sai hỏng về điều hòa có hai phương pháp thích hợp: phương pháp dùng chất chống chất trao đổi và phương pháp phân lập các thể hồi biến từ các thể đột biến trợ dưỡng.

3. Phương pháp dùng chất chống chất trao đổi

Chất chống chất trao đổi là những hợp chất tương tự về cấu trúc với một chất trao đổi nào đó, ví dụ methionine và ethionine. Do sự giống nhau của chúng, các chất chống trao đổi chất được tham gia vào quá trình trao đổi chất. Song vì không thể hoàn thành các chức năng của chất trao đổi nên chúng gây tác dụng ức chế trao đổi chất và thường giết chết tế bào. Sự ức chế có thể do nhiều nguyên nhân gây ra.

- (a) Chất chống chất trao đổi, ví dụ một chất tương tự của aminoacid, do được gắn vào một protein enzyme, sẽ làm cho enzyme này bất hoạt.

- (b) Chất chống chất trao đổi cạnh tranh với chất trao đổi về trung tâm hoạt động của một enzyme và do vậy ngăn cản sự chuyển hóa của chất trao đổi. Trường hợp malonate ức chế sự loại hydro của succinate là một ví dụ.
- (c) Các chất chống chất trao đổi xuất hiện ở vị trí của sản phẩm cuối cùng của một chuỗi tổng hợp, do kết hợp với enzyme dị lập thể mà làm giảm hoạt tính của nó hay do phản ứng với chất kiềm chế mà làm giảm sự tổng hợp các enzyme. Vì vậy sự tổng hợp của chất trao đổi thật sự bị ngăn cản và do đó sinh sản của tế bào bị ức chế.

Các chất chống trao đổi mà tác dụng ức chế do trường hợp thứ ba gây ra có ý nghĩa đối với việc chọn lọc các thể đột biến sai hỏng về điều hòa. Để chọn các thể đột biến kiểu này người ta cấy lên một đĩa petri chứa môi trường dinh dưỡng có bổ sung chất chống chất trao đổi một huyền dịch tế bào đậm đặc (khoảng 10^8 tế bào/đĩa) đã được xử lý trước bằng một tác nhân gây đột biến. Tuy có sự bổ sung chất chống chất trao đổi song trên đĩa thạch vẫn xuất hiện một số khuẩn lạc tế bào. Đây là các tế bào kháng các chất chống chất trao đổi. Nguyên nhân của sự kháng này có thể là, các tế bào, do một sự sai hỏng về điều hòa, đã tổng hợp nên một số lượng lớn các chất trao đổi thật sự, giống với các chất chống chất trao đổi. Điều này khiến cho chất chống chất trao đổi bị pha loãng tới mức trở nên vô tác dụng. Khuẩn lạc của các thể đột biến kiểu này thường dễ nhận ra do được bao quanh bởi một vùng các khuẩn lạc vệ tinh. Các khuẩn lạc vệ tinh phát triển được là do các tế bào đề kháng đã tiết ra chất trao đổi bình thường làm giảm nồng độ chất chống chất trao đổi đối với các tế bào nằm xung quanh. Phương pháp dùng chất chống chất trao đổi giúp ta phân lập các thể đột biến bị hư hại trong sự ức chế bởi sản phẩm cuối cùng cũng như các thể đột biến bị rối loạn về cơ chế kiềm chế.

4. Phương pháp phân lập các thể hồi biến của các chủng trợ dưỡng

Trong phương pháp này người ta đi từ các thể đột biến là trợ dưỡng đối với sản phẩm cuối cùng, ví dụ một aminoacid. Ở đây người ta quan tâm trước hết đến các thể đột biến mà tính trợ dưỡng của chúng do một sự hư hại trong enzyme dị lập thể gây ra. Từ đây có thể thu được những thể hồi biến với trung tâm xúc tác trở lại hoạt động bình thường, song trung tâm điều hòa, nơi sản phẩm cuối cùng tấn công vào, thì không.

Để phân lập những thể đột biến như vậy người ta cấy khoảng 10^{10} tế bào của thể đột biến trợ dưỡng lên một môi trường dinh dưỡng tối thiểu. Tuyệt đại đa số các tế bào sẽ không sinh trưởng. Song một số khuẩn lạc của các thể đột biến, do lấy lại được khả năng tổng hợp sản phẩm cuối cùng, đã sinh trưởng được. Điều đó có nghĩa là enzyme bị hư hại đã thu lại hoạt tính

xúc tác nhờ một đột biến thứ hai. Trong một vài trường hợp, tuy đột biến thứ hai hồi phục được hoạt tính enzyme song không hồi phục được tính miễn cảm với chất hiệu ứng dị lập thể. Nhờ vậy sẽ xuất hiện một thể đột biến có hoạt tính enzyme đầy đủ nhưng lại khuyết về khả năng điều hòa dị lập thể. Thông thường các thể đột biến này tiết sản phẩm cuối cùng tương ứng ra môi trường và người ta có thể nhận biết được điều đó nhờ một vòng các khuẩn lạc vệ tinh.

Từ ví dụ về sự chọn lọc nhiều bước các thể đột biến chứa các enzyme đã mất tính miễn cảm dị lập thể có thể thấy rõ những biện pháp nào là cần thiết nhằm thu được các chủng có những tính chất mong muốn. Tiền đề của điều đó là phải hiểu biết chính xác các con đường trao đổi chất dẫn đến sự tạo thành các chất trao đổi, kể cả sự điều hòa chúng. Điều này quan trọng trước hết đối với các sản phẩm mà sự tạo thành chúng do nhiều sai hỏng về điều hòa gây ra. Trong những trường hợp này cần phải tìm cách gây đột biến nhiều lần đối với một chủng nào đó hoặc sử dụng các phương pháp truyền thông tin di truyền.

III. Aminoacid

Các aminoacid, cùng với các nucleotide và vitamin, là những nhân tố sinh trưởng thường được sử dụng như các loại dược phẩm hoặc chất bổ sung cho thực phẩm.

Các aminoacid được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, làm các chất bổ sung trong y học, và làm nguyên liệu khởi đầu trong công nghiệp hóa học (bảng 7.1).

Bảng 7.1. Các aminoacid được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm

Aminoacid	Sản lượng thế giới hàng năm (tấn)	Để bổ sung vào	Mục đích
Glutamic acid	370.000	Nhiều loại thực phẩm	Tăng vị, làm mềm thịt
L-aspartic và alanine	5.000	Dịch quả, đồ ngọt	Làm dịu vị
Glycine	6.000	Đồ ngọt	Tăng vị
L-cysteine	700	Bánh mì Dịch quả	Tăng chất lượng Chống oxy hóa
L-Tryptophan + L-histidine	400	Nhiều loại thực phẩm, Sữa bột	Chống oxy hóa, chống ôi, tăng dinh dưỡng
Aspartame (phenylalanine +L-Aspartate)	7.000	Đồ uống nhẹ	Giảm calo

L-lysine	70.000	Bánh mì (Nhật), thực phẩm	Tăng dinh dưỡng
DL-methionine	70.000	Sản phẩm đậu tương, Thực phẩm	Tăng dinh dưỡng

Aminoacid thương mại quan trọng nhất là *glutamic acid* được sử dụng làm chất tăng vị (bột ngọt). Hai aminoacid quan trọng khác, aspartic acid và phenilalanine tạo ra đường nhân tạo *aspartame*, một thành phần quan trọng của các loại đồ uống nhẹ dùng trong ăn kiêng và các thực phẩm không chứa đường khác. Lysine, một aminoacid không thay thế cho người và một số động vật nuôi đã được sản xuất thương mại nhờ vi khuẩn *Brevibacterium flavum* dùng làm thức ăn bổ sung vào bột ngũ cốc hoặc vào bánh mì. Mặc dù hầu hết các aminoacid đều có thể tổng hợp được bằng con đường hóa học, song sự tổng hợp hóa học thường tạo ra các hỗn hợp D,L không hoạt động về mặt quang học. Để thu được dạng L là dạng quan trọng về mặt hóa sinh, cần phải dùng phương pháp xúc tác sinh học.

1. Sản xuất các aminoacid nhờ vi sinh vật

Hàng loạt vi sinh vật tích lũy các aminoacid trong dịch nuôi cấy. Tuy nhiên chỉ có vi khuẩn mới có năng suất đủ đảm bảo sản xuất các aminoacid ở quy mô thương mại. Vì rằng các aminoacid là các thành phần không thể thiếu của các tế bào vi sinh vật và sự sinh tổng hợp chúng được điều khiển có mục đích để duy trì ở một mức độ tối ưu, thông thường chúng được tổng hợp ở một số lượng hạn chế và bị kiểm tra bởi cơ chế điều chỉnh theo kiểu *liên hệ ngược âm*. Vì vậy cần phải vượt qua sự điều chỉnh để đạt được sự sản xuất thừa các aminoacid. Việc sản xuất thừa aminoacid ở vi sinh vật có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp sau đây :

1. Kích thích tế bào thu nhận nguyên liệu ban đầu;
2. Cản trở các phản ứng phụ;
3. Kích thích sự tạo thành và nâng cao hoạt tính của các enzyme sinh tổng hợp;
4. Kim hãm hoặc hạn chế các enzyme tham gia vào sự phân giải các aminoacid được tạo ra;
5. Kích thích sự tiết sản phẩm vào vùng không gian ngoại bào.

Những yêu cầu trên đã đạt được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đột biến.

2. Sản xuất các aminoacid nhờ các thể đột biến trợ dưỡng

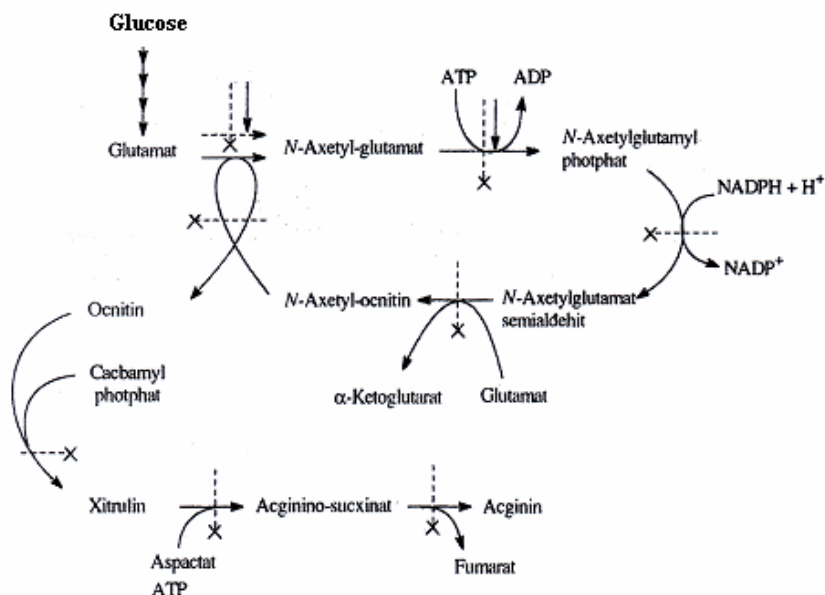
Các thể đột biến trợ dưỡng, vốn không có khả năng sinh ra chất hiệu ứng theo kiểu liên hệ ngược âm, sẽ có thể sản xuất thừa tiền chất hoặc các

chất trao đổi gần gũi của phản ứng bị phong tỏa khi các tế bào của thể đột biến sinh trưởng trên một môi trường chứa hạn chế một chất dinh dưỡng cần thiết. Sự sản xuất các aminoacid bằng các thể đột biến trợ dưỡng dựa trên nguyên tắc này. L- ornithine được sản xuất nhờ một sản phẩm trung gian trong quá hình sinh tổng hợp L-arginine. ở *Corynebacterium glutamicum* các enzyme đầu tiên và thứ hai trong con đường sinh tổng hợp bị kim hãm theo kiểu liên hệ ngược bởi L-arginine, như chỉ ra trên (hình 7.5).

Sự tạo thành tất cả các enzyme tham gia vào sự sinh tổng hợp đều bị ức chế bởi L-arginine. Như vậy, một cơ thể trợ dưỡng cần xitruclin thuộc *Corynebacterium glutamicum* thiếu enzyme ornithine carbamoyl transferase xúc tác cho sự chuyển hoá ornithine thành citruline sẽ ngăn cản sự tạo thành arginine và sẽ tích lũy L-ornithine với số lượng lớn. Các điều kiện lên men giống với các điều kiện dành cho sự sản xuất L-glutamat trừ một điều là môi trường phải chứa một lượng thích hợp L-arginine và một lượng lớn biotin. Một thể đột biến trợ dưỡng cần citruline thuộc *Brevibacterium lactofermentum* cũng đã được phát hiện là có khả năng tích lũy một nồng độ cao L-ornithine từ đường (sản lượng trên 40% tính theo đương lượng phân tử).

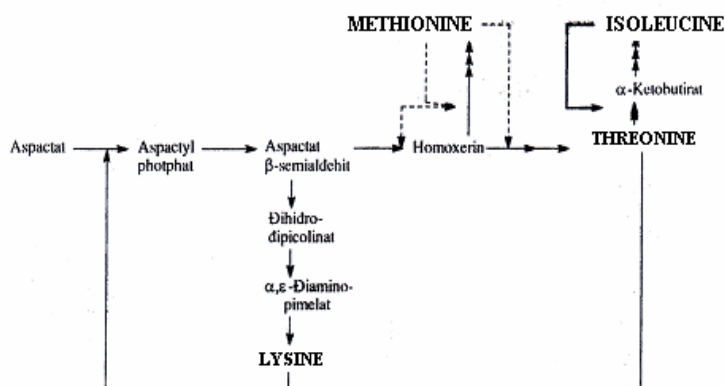
L-citruline thì được sản xuất bởi các thể đột biến trợ dưỡng cần arginine của *Corynebacterium glutamicum* và *Bacillus subtilis* theo cách tương tự.

Các thể đột biến trợ dưỡng cũng được sử dụng trong quá trình sản xuất các sản phẩm cuối cùng của các con đường trao đổi chất phân nhánh. Lên men lysine là một ví dụ điển hình. ở các cơ thể nhân sơ L-lysine được tổng hợp từ L-aspartate với sự tạo thành một sản phẩm trung gian là α,ϵ -diaminopimelate. Ngoài L-lysine, L-threonine, L-methionine và L isoleucine cũng được sinh ra từ L-aspartate (hình 7.6).



Hình 7.5: Điều hoà sinh tổng hợp arginine ở vi khuẩn *Corynebacterium* sinh glutamate

Một điểm kiểm soát quan trọng trong con đường diaminopimelate là aspartokinase, nó xúc tác cho bước đầu tiên trong sự tổng hợp tất cả các aminoacid thuộc họ này. Ở các chi *Corynebacterium* và *Brevibacterium*, enzyme này bị kim hãm theo kiểu liên hệ ngược bởi L-lysine cộng với L-threonine. Do vậy một thể trợ dưỡng cần homoserine và một thể trợ dưỡng kép cần threonine-metionin đã được phân lập từ *Corynebacterium glutamicum* và *Brevibacterium flavum*, theo thứ tự, để giảm dự trữ nội bào của L-threonine, một chất kim hãm rõ rệt đối với aspartokinase. Cả hai thể đột biến đều có khả năng tích lũy một nồng độ L-lysine cao; một lượng biotin đầy đủ được đưa vào môi trường để ngăn cản tế bào tạo thành L-glutamate.



Hình 7.6: Điều hoà sinh tổng hợp aminoacids thuộc họ aspartate ở *Brevibacterium flavum* và *Corynebacterium glutamicum*

3. Sản xuất các aminoacid nhờ các thể đột biến về điều hòa

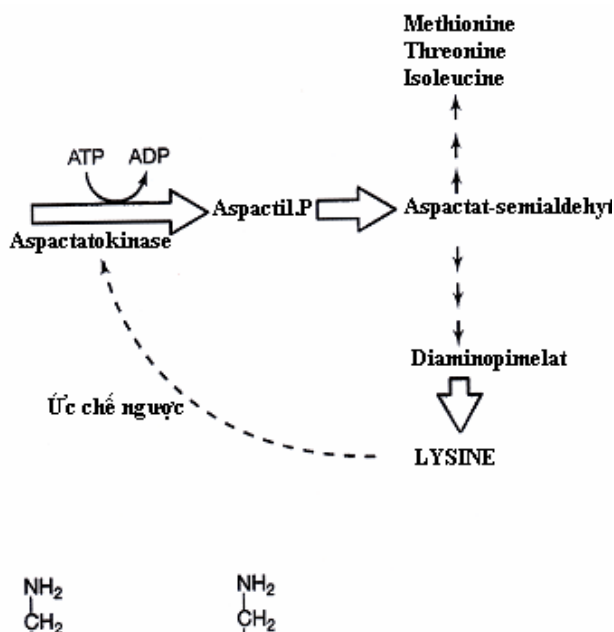
Phương pháp dùng các thể đột biến trợ dưỡng nêu trên không thích hợp đối với việc sản xuất các aminoacid là sản phẩm cuối cùng của các con đường trao đổi chất phân nhánh, như arginine và histidine. Chúng có thể được sản xuất nhờ các thể đột biến về điều hoà đã bị mất đi một khả năng điều hoà sinh tổng hợp nào đó. Các thể đột biến như vậy đã được tạo ra dưới dạng các thể đột biến đề kháng với các chất tương tự aminoacid hoặc dưới dạng một thể hồi biến từ thể đột biến trợ dưỡng song bị khuyết một enzyme điều hoà.

Các hợp chất giống các amino acid tự nhiên về mặt cấu trúc thường gây tác động lên sinh trưởng của một số vi sinh vật. Trước đây người ta gọi chúng là các "izoster" để nhấn mạnh tính giống nhau về hoá học không gian của chúng. Ngày nay, chúng được gọi là các chất tương tự aminoacid. Tác dụng hìm hãm của chúng sẽ bị loại bỏ khi đưa vào các aminoacid tự nhiên tương ứng. Một số chất tương tự aminoacid hoạt động như một corepressor giả hoặc một chất kim hãm theo mối liên hệ ngược giả của một enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp aminoacid tự nhiên tương ứng, đồng thời cũng kim hãm sự gắn aminoacid đó vào protein. Do vậy ở các chủng đột biến đề kháng với các chất tương tự aminoacid tự nhiên, enzyme điều hoà sẽ trở nên mất tính miễn cảm.

Vào năm 1970 người ta đã phân lập được một thể đột biến đề kháng với chất tương tự chứa lưu huỳnh của lysine, S-(2-aminoethyl)-L-cysteine, (SAEC - công thức $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ từ *Brevibacterium flavum*. Không giống như sự điều hoà sinh tổng hợp lysine ở *Escherichia coli* được kiểm soát bởi ba izoenzyme của aspartokinase và ba sản phẩm cuối cùng L-lysine, L-threonine và L-metionin, sự điều hoà ở *Brevibacterium flavum* diễn ra đơn giản hơn : chỉ có một aspartokinase bị kim hãm theo kiểu liên hệ ngược bởi L-lysine và L-threonine. Sinh trưởng của *Brevibacterium flavum* bị kim hãm bởi SAEC. Sự kim hãm được tăng cường rõ rệt bởi L-threonine, và bị loại bỏ nhờ lysine. Điều đó chỉ ra rằng SAEC hoạt động như một chất kim hãm giả của aspartokinase theo kiểu liên hệ ngược. Vì thế một số thể đột biến đề kháng với SAEC sẽ trở thành các chủng chứa một aspartokinase mất miễn cảm đối với cơ chế điều hoà theo kiểu liên hệ ngược.

Trong thực tế, một số chủng có khả năng tổng hợp tiềm tàng L-lysine đã được tìm thấy trong các thể đột biến đề kháng với SAEC, chúng có khả năng sinh trưởng khi có mặt cả SAEC lẫn L-threonine. Chủng tốt nhất sinh ra tới 31-33 g/l L-lysine. Aspartokinase trong thể đột biến này có tính miễn cảm với sự điều hoà bởi L-lysine cộng với L-threonine theo kiểu liên hệ ngược thấp hơn khoảng 150 lần so với enzyme trong các chủng bố mẹ.

Biện pháp kết hợp tính trợ dưỡng và sự sai hỏng về điều hòa hiện đang được ứng dụng rộng rãi để cải thiện các vi sinh vật tổng hợp các aminoacid. ở *Brevibacterium lactofermentum*, aspartokinase bị kìm hãm khi bổ sung đồng thời hoặc riêng rẽ L-lysine và L-threonine. Ngoài ra, dihydrodipicolinate synthase, enzyme tham gia vào sự sinh tổng hợp lysine cũng bị ức chế bởi L-lysine; những mối tương quan về điều hòa như vậy được gọi là "sự khóa liên động trao đổi chất" (metabolic interlock). Một thể đột biến đề kháng với SAEC phân lập được trên một môi trường chứa SAEC cộng với L-threonine đã tích lũy một lượng lớn L-lysine (18g/l). Một thể đột biến trợ dưỡng cần leucine bắt nguồn từ thể đột biến đề kháng với SAEC tạo ra tới 41g/l L-lysine nhờ sự mất mẫn cảm di truyền của aspartokinase với sự kìm hãm của L-threonine và L-lysine theo cơ chế liên hệ ngược cũng như nhờ sự giải kìm hãm của dihydrodipicolinate synthase trong trường hợp thiếu L-leucine. Một phát hiện tương tự cũng gặp ở chủng *Corynebacterium glutamicum* cần L-homoserine và L-leucine và đề kháng với SAEC. ở *Brevibacterium lactofermentum* dự trữ của DL-alanine nội bào cao hơn dự trữ của các aminoacid khác. Trong tế bào của chủng này, alanine được tạo thành bởi pyruvate-L-aminoacid transaminase từ pyruvate và bởi aspartate β -decarboxylase từ aspartate. Cả hai acid đều là những tiền chất thông thường trong sự sinh tổng hợp L-lysine và L-alanine. Như vậy các thể đột biến trợ dưỡng cần alanine sẽ có một năng suất L-lysine cao hơn chủng bố mẹ. Trong thực tế, đã phân lập được một thể đột biến trợ dưỡng cần L-alanine có nguồn gốc từ thể đột biến đề kháng với SAEC đã sản xuất được 39 g/l L-lysine. Một chủng hoang dại của *Brevibacterium lactofermentum* mẫn cảm cao đối với các chất tương tự lysine, α -chlorocaprolactame hoặc γ -methyl-L-lysine đứng riêng rẽ. Một thể đột biến đề kháng với cả hai chất tương tự lysine có nguồn gốc từ một thể đột biến cần alanin đề kháng SAEC đã sản xuất tới 60 g/l L-lysine.



Hình 7.7: Sản xuất công nghiệp lysine nhờ *Brevibacterium flavum*

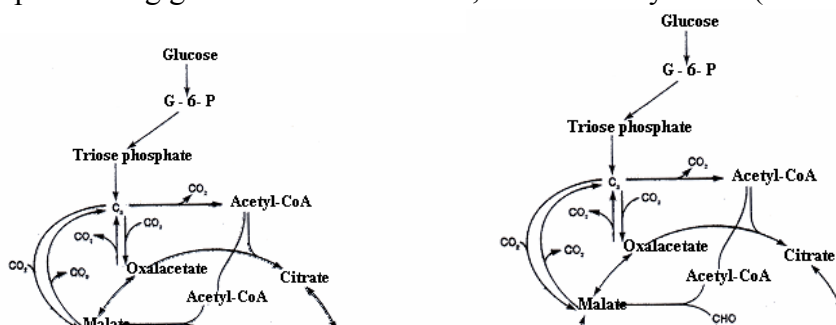
Một ví dụ khác về việc ứng dụng sự sai hỏng về điều hoà kết hợp với tính trợ dưỡng trong một vi khuẩn sản sinh aminoacid là sự sản xuất L-threonine. ở *Corynebacterium glutamicum* và *Brevibacterium flavum* sự tổng hợp thừa L-threonine bị ngăn cản bằng sự kìm hãm aspartokinase theo kiểu liên hệ ngược bởi L-threonine cộng L-lysine, cũng như bằng sự kìm hãm homoserine dehydrogenase theo kiểu liên hệ ngược bởi L-threonine (hình 7.6), ngay cả khi sử dụng các thể đột biến cần isoleucine đề kháng với SAEC. Sự sản xuất thừa L-threonine nhờ một thể đột biến đề kháng với một chất tương tự threonine, α -amino- β -hydroxyvalerate, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ (AHV), đã được tạo ra từ sự mất hẳn cảm di truyền đối với sự kìm hãm theo kiểu liên hệ ngược bởi L-threonine. Cả homoserine dehydrogenase lẫn homoserine kinase tham gia vào sự tổng hợp L-threonine đều bị kiểm chế bởi L-methionine ở cả hai chủng và do vậy, đã có thể thu được một thể trợ dưỡng cần metionin có năng suất tạo L-threonine cao hơn chủng bố mẹ. Các vi khuẩn sản xuất có hiệu quả L-arginine đã được chọn lọc theo cách sau: một chủng hoang dại của *Corynebacterium glutamicum* thì đề kháng cao với các chất tương tự của arginine là canavanin và L-arginine hydroxamate. Một thể đột biến mất cảm với D-serine có nguồn gốc từ một thể đột biến trợ dưỡng cần isoleucine thì lại mất cảm với cả hai chất tương tự của arginine. Điều này có thể xảy ra nhờ tính thấm qua màng tế bào của các chất tương tự của arginine được tăng cường và nhờ tính mất cảm của các enzyme điều hoà tham gia vào sự sinh tổng hợp L-arginine đối với các chất tương tự. Thể đột biến đã sản xuất 1,5 g/l arginine và năng suất của

thể đột biến này có thể được cải thiện từng bước nhờ các bước đột biến và chọn lọc xa hơn. Thể đột biến cuối cùng chọn được có tính đề kháng với L-arginine hydroxamate, D-arginine và 2-thiazolalanine, song lại mẫn cảm với D-serine, và nó đã sản xuất được 20-25 g/l L-arginine trong một môi trường chứa 15% đường. L-arginine cũng được sản xuất công nghiệp nhờ các thể đột biến về điều hoà của *Bacillus subtilis* và của *Brevibacterium flavum*.

Gần đây, việc tạo ra các thể đột biến về điều hoà nhờ sử dụng các phương pháp tải nạp đã được phát triển trên *Serratia marcescens* thuộc họ Enterobacteriaceae. Phương pháp tải nạp bao gồm hai phần : chọn các đột biến cá lẻ gây nên sự sai hỏng hoàn toàn các cơ chế điều hoà khác nhau, và tổ hợp các thể đột biến đã được chọn lọc bằng biện pháp đồng tải nạp. Chẳng hạn, một chủng *Serratia marcescens* sản sinh threonine được tạo ra như sau: Một thể tải nạp đã được cấu tạo từ 1) một chủng cần threonine mà chủng gốc chứa các enzyme *cấu trúc* aspartokinase mẫn cảm với threonine và homoserine dehydrogenase và 2) một phage đã được nhân lên trên một chủng khuyết cơ chế điều hoà theo kiểu liên hệ ngược đối với aspartokinase mẫn cảm với threonine và homoserine dehydrogenase. Thể tải nạp này thiếu cả hai cơ chế kìm hãm theo kiểu liên hệ ngược và kiểm chế đối với cả hai enzyme, và đã sản xuất được 8,3 g/l L-threonine. Sau đó, vùng threonine của thể tải nạp này được chuyển vào trong một chủng cần threonine có nguồn gốc từ một chủng bị khuyết về cơ chế liên hệ ngược cũng như cơ chế kiểm chế đối với aspartokinase mẫn cảm với lysine. một trong các thể tải nạp đã tạo nên một hàm lượng cao cả hai enzyme aspartokinase và homoserine dehydrogenase không mẫn cảm với cơ chế liên hệ ngược và tiết ra khoảng 25 g/l L-threonine vào một môi trường chứa 16% saccharose.

Một yếu tố quan trọng khác trong sản xuất thương mại các aminoacid là yếu tố *tiết*. Nói chung, sinh vật không tiết các sản phẩm trao đổi chất mà chúng đã phải bỏ công sức nhiều mới tạo được. Tuy nhiên, sự tiết các aminoacid có thể được thực hiện theo nhiều cách, đặc biệt bằng cách làm thay đổi tính thấm của tế bào. Chẳng hạn, ở *Corynebacterium glutamicum*, một vi khuẩn sản sinh acid glutamic, tính thấm của tế bào có thể được tăng cường bằng một sự thiết hụt một chất dinh dưỡng đặc biệt dẫn đến việc cơ thể tạo ra một màng tế bào yếu, nhờ đó cho phép nó tiết ra acid glutamic thừa.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* dùng để sản xuất acid glutamic thiếu hẳn hoặc chỉ có khả năng hạn chế đối với việc chuyển α -ketoglutaric, một sản phẩm trung gian của chu trình TCA, thành succinyl-CoA (hình 7.8 a).



(a)

(b)

8. Sản xuất acid glutamic

- a) Sử dụng con đường phụ glyoxylate để bù đắp các chất trung gian thiết yếu của chu trình Krebs.
- b) Sau khi kết thúc sinh trưởng, hầu như toàn bộ cacbon cơ chất được chuyển thành glutamate.

Bằng việc khống chế nồng độ biotin thấp và việc bổ sung các dẫn xuất của các axit béo có thể làm tăng tính thấm của màng và tăng sự tiết những nồng độ glutamic acid cao. Các vi khuẩn đã bị hư hại như vậy sẽ sử dụng chu trình glyoxylate để thoả mãn nhu cầu của chúng về các chất trao đổi trung gian thiết yếu, đặc biệt là trong pha sinh trưởng. Sau khi sinh trưởng đã bị giới hạn do nguồn dinh dưỡng bị thay đổi, một sự chuyển hóa isocitrate (gần như hoàn toàn nếu tính theo mol hoặc 81,7% nếu tính theo trọng lượng) sẽ xảy ra (hình 7.8 b).

IV. Sản xuất các purine nucleotide

1. IMP

Sau khi sản xuất thành công ở quy mô công nghiệp các aminoacid nhờ lên men, người ta đã tiến hành các nghiên cứu rộng rãi nhằm xây dựng quy trình sản xuất lên men các nucleotide tăng vị, IMG và GMP. Tuy nhiên, lên men nucleotit khác lên men các aminoacid ở một số điểm sau :

1. Sự sinh tổng hợp các purin nucleotide diễn ra tương đối phức tạp . Ngoài con đường trao đổi chất *de novo* , các con đường ứng cứu và

chuyển hóa lẫn nhau cũng tham gia vào sự sinh tổng hợp nucleotide purine (hình 7.9).

2. Các enzyme có khả năng phân giải các nucleotide phân bố rộng trong các vi sinh vật.

3. Các nucleotide không thấm tốt qua màng tế bào. Do vậy vi sinh vật không dễ dàng tiết các nucleotide vào môi trường nuôi cấy qua hàng rào thẩm thấu.

Những vấn đề phức tạp trên đã được khắc phục và từ lâu IMP đã được sản xuất ở Nhật Bản không chỉ bằng phương pháp phân giải ARN nhờ enzyme mà còn bằng hai phương pháp lên men :

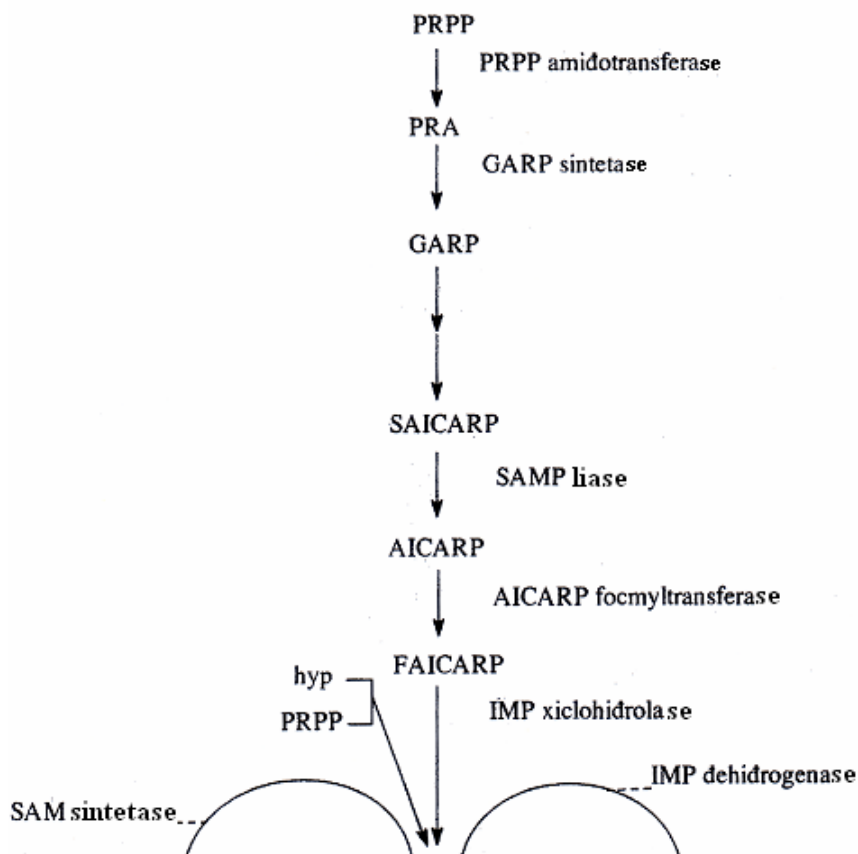
1. Sản xuất lên men trực tiếp IMP bằng con đường sinh tổng hợp *de novo*.
2. Sản xuất inosine bằng lên men sau đó chuyển hoá hóa học inosine thành IMP.

Ở đây sẽ nói kỹ hơn về quá trình lên men trực tiếp.

Để khắc phục các khó khăn trong lên men sản xuất trực tiếp IMP, hai phương hướng nghiên cứu sau đây đã được tiến hành :

1. Làm mất đoạn di truyền hoạt tính phân giải nucleotide của các thể đột biến *Bacillus subtilis* sản xuất inosine.
2. Cải thiện về di truyền và về môi trường nhằm tăng năng suất IMP ở *Brevibacterium ammoniagenes*.

Sản xuất công nghiệp IMP hiện nay được thực hiện nhờ các thể đột biến của *Brevibacterium ammoniagenes* theo phương pháp thứ hai.



Hình 7.9: Con đường sinh tổng hợp các purine nucleotide

Chủng *Brevibacterium ammoniagenes* KY3454 (ATCC 6872) đã được coi như cây đèn thần của Aladdin vì chủng này và các thể đột biến sinh ra từ nó sản xuất nhiều loại nucleotid và các dẫn xuất của chúng theo cả con đường *de novo* lẫn con đường ứng cứu.

Để xây dựng quy trình sản xuất lên men IMP ở quy mô công nghiệp, hàng loạt chủng *Brevibacterium ammoniagenes* đã được lựa chọn theo từng bước nhằm tăng năng suất IMP sau khi đã xử lý đột biến nhiều lần bằng tia tử ngoại hoặc NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine). Một thể đột biến trợ dưỡng hồng đối với adenine, KY13102, lần đầu tiên đã được phân lập vào năm 1968.

Khi bổ sung Mn^{+2} ở nồng độ dưới tối ưu cho sinh trưởng, chủng này đã sản xuất được trên 12 g/l IMP. Tuy nhiên, hàm lượng cao của Mn^{+2} (trên 20 g/l) sẽ kích thích sinh trưởng, song lại làm giảm mạnh sự tích lũy IMP và làm tăng sự tích lũy hypoxanthine.

Chủng KY13102, do tính miễn cảm cao với Mn^{+2} như vậy, đã không thích hợp cho sự sản xuất công nghiệp IMP. Sau đó, từ chủng KY13102, một chủng khác tích lũy IMP song không miễn cảm với Mn^{+2} , chủng KY13171, đã được tạo ra. Sinh trưởng tế bào và sự tích lũy IMP đều tăng khi nồng độ Mn^{+2}

tăng. Tuy nhiên năng suất IMP của chủng KY13171 không đủ thoả mãn cho một quy trình sản xuất thực tế và có hiệu quả kinh tế.

Sự tổng hợp các purin nucleotide ở *Brevibacterium ammoniagenes* được điều hòa bởi adenin và các dẫn xuất của guanine. Đặc biệt, enzyme chìa khóa PRPP amidotransferase bị kìm hãm mạnh bởi GMP cũng như bởi ATP, ADP và AMP. Để cải thiện năng suất IMP người ta đã tìm cách loại bỏ sự kiểm soát của GMP theo kiểu liên hệ ngược trong sự sinh tổng hợp *de novo* purine. Kết quả là vào năm 1982, chủng KY13184 thiếu hụt IMP dehydrogenase và cần guanine cho sinh trưởng đã được tạo ra từ chủng KY13171. Trước đó đã có nhiều công trình nghiên cứu chứng minh rằng nhu cầu về guanin có liên quan tới sự tăng năng suất IMP và inosine ở *Brevibacterium ammoniagenes*.

Bằng các chu kỳ đột biến và chọn lọc xa hơn, nhiều chủng tốt hơn đã được tạo ra từ KY13184. Cuối cùng người ta đã thu được một chủng sản xuất IMP có hiệu quả, chủng KY13369, tích lũy tới 20-27 g/l IMP, nhưng không tích lũy hypoxanthine. Sự tăng năng suất IMP và sự giảm năng suất hypoxanthine không do sự biến đổi về tốc độ sinh tổng hợp purine nucleotide *de novo* hay về hoạt tính phân giải IMP gây ra mà có thể là do tính thấm đối với sự tiết IMP đã được cải thiện.

XMP

Vào năm 1964, lần đầu tiên người ta cho biết chủng KY9978, một thể đột biến cần guanine của *Corynebacterium glutamicum* tạo ra được 2,57 g/l XMP. Sau đó, đã tích lũy được một lượng XMP lớn hơn so với *Corynebacterium glutamicum* KY9987. Khi bổ sung thừa các dẫn xuất của guanine, sự tích lũy XMP bị ức chế. Sự tích lũy XMP của chủng này hình như là do hậu quả của sự tiết trực tiếp nucleotide được tổng hợp *de novo* ra khỏi tế bào, bởi vì XMP pyrophosphorylase chỉ có mặt ở hàm lượng rất thấp hoặc hầu như không có, và xanthine được cung cấp từ bên ngoài đã không được chuyển hoá thành XMP bởi các tế bào đang sinh trưởng.

Trong quá trình lên men này, nồng độ Mn^{2+} trong môi trường kích thích rõ rệt sự tích lũy XMP. Khi có mặt 1000 $\mu\text{g/l}$ Mn^{2+} , 6,46 g/l XMP đã được tổng hợp, trong khi có mặt 10 $\mu\text{g/l}$ Mn^{2+} , chỉ có 3,18 g/l được, tạo thành. Điều này trái ngược hẳn với quá trình lên men IMP nhờ các thể đột biến trợ dưỡng cần adenin cùng loài. Sự tiết trực tiếp IMP ra khỏi các tế bào *Brevibacterium ammoniagenes* thường gặp khó khăn, cho nên đột biến về tính thấm là biện pháp chủ yếu để tạo ra các chủng sản sinh IMP.

So với các thể đột biến sản sinh IMP, các thể đột biến sản sinh XMP có thể tạo ra dễ hơn vì sự tiết trực tiếp XMP xảy ra dễ dàng. Theo Fujio và Furuya (1984) một thể đột biến cần guanine, hỏng về adenine của

Brevibacterium ammoniagenes có hoạt tính nucleotidase yếu, chủng KY13215, đã tích lũy được vài chục gam XMP trong một lít môi trường.

GMP

Việc sản xuất GMP bằng con đường lên men trực tiếp còn chưa thực hiện được. Hiện nay GMP có thể được sản xuất công nghiệp qua XMP bằng cách sử dụng một chủng tích lũy XMP và một chủng chuyển hóa XMP. Chủng KY13510 đã được Fujio và ctv tạo ra năm 1984 từ chủng *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 qua một số bước đột biến. Chủng này đề kháng với decoyinin, thiếu thực sự hoạt tính phân giải 5'-nucleotide và giàu GMP synthetase (XMP aminase). Các tế bào KY 13510 chuyển hoá có hiệu quả XMP thành GMP.

Thành phần hỗn hợp cơ bản dùng để chuyển hóa gồm KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$, L-cysteine-HCl, axit nicotinic, và biotin. Ngoài ra để chuyển hoá còn cần một chất hoạt động bề mặt, polyoxyethylene stearilamine (POESA) là chất tạo điều kiện cho XMP và GMP thấm qua màng tế bào. Những lượng lớn GDP, GTP cũng như GMP đã được tạo thành từ XMP khi việc nuôi cấy được tiến hành ở 32°C . Trong khi đó, chỉ có một mình GMP được tạo thành khi nuôi ở 42°C .

Tốc độ chuyển hóa đã cao hơn tới 88%. Thông khí là nhân tố không thể thiếu. pH tối ưu là 7,4. Sau 22 giờ ủ 50 g/l $\text{XMP} \cdot \text{Na}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ với 120 gam tế bào KY13510 /l trong một nồi lên men 5 lít, 43,5 g/l $\text{GMP} \cdot \text{Na}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ đã được tạo thành.

GMP synthetase (XMP aminase) cần ATP để chuyển hoá XMP thành GMP và sinh ra AMP. Có lẽ ATP của tế bào đã được sử dụng vào giai đoạn đầu của sự chuyển hóa và gần như toàn bộ ATP được tiêu dùng trong phản ứng chuyển hóa đều được tái sinh từ AMP và glucose.

V. Vitamin

Một số vitamin quan trọng đã được sản xuất ở quy mô thương mại nhờ các quá trình xúc tác sinh học. Các vitamin thường được sử dụng làm các chất bổ sung cho thức ăn của người và động vật.

Tính về mặt doanh thu các loại dược phẩm, sản xuất các vitamin chỉ đứng thứ hai sau các chất kháng sinh - tức là vào khoảng gần một tỷ USD mỗi năm. Hầu hết các loại vitamin được sản xuất thương mại nhờ biện pháp tổng hợp hóa học. Tuy nhiên, một vài loại vitamin muốn được tổng hợp hóa học với giá thành rẻ phải trải qua những quá trình quá phức tạp trong khi đó lại có thể được sản xuất bằng biện pháp xúc tác sinh học. Trong số này, vitamin B_{12} và riboflavin là những vitamin quan trọng nhất.

1. Vitamin B₁₂

Trong tự nhiên, vitamin B₁₂ chỉ được tổng hợp nhờ vi sinh vật. Là một coenzyme, trong hóa sinh học động vật vitamin B₁₂ có vai trò quan trọng trong nhiều sự tái sắp xếp nội phân tử, ở đó một nguyên tử hydro gắn vào một nguyên tử cacbon được đổi chỗ cho một gốc thay thế gắn vào nguyên tử cacbon bên cạnh. ở người, sự thiếu nhiều vitamin B₁₂ sẽ dẫn đến một bệnh nghiêm trọng có tên là bệnh *thiếu máu ác tính*, được đặc trưng bởi sự sản xuất ít các tế bào hồng cầu và bởi những sự rối loạn trong hệ thần kinh.

Nhu cầu về vitamin B₁₂ của động vật được đáp ứng nhờ thực phẩm ăn vào hay nhờ hấp thụ vitamin trong ruột của động vật do các vi sinh vật đường ruột sinh ra. Thực vật không sinh ra và cũng không sử dụng vitamin B₁₂.

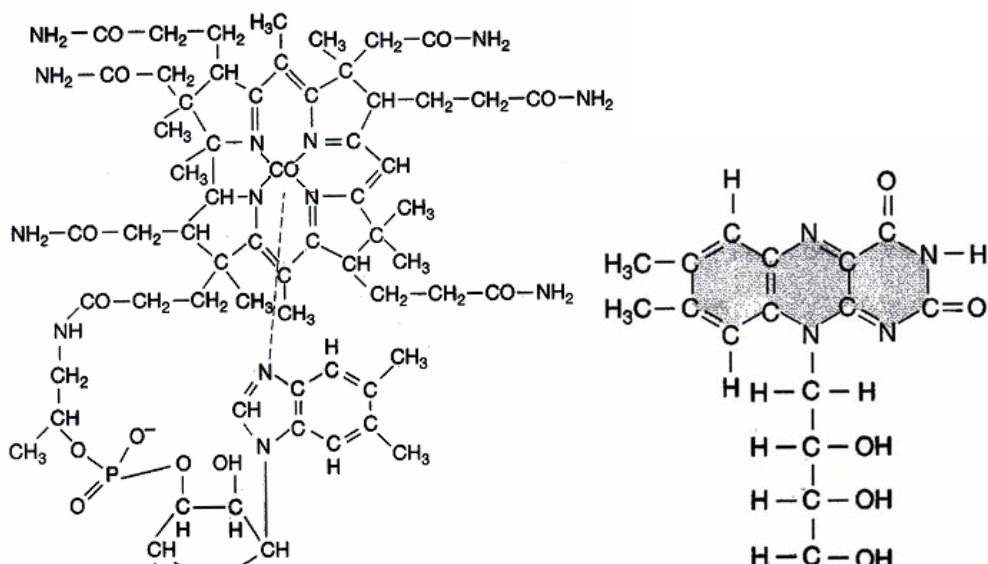
Để sản xuất công nghiệp vitamin B₁₂ người ta sử dụng các chủng vi sinh vật đã được chọn lọc một cách đặc biệt, có sản lượng cao về vitamin B₁₂. các thành viên

của vi khuẩn thuộc chi *Propionibacterium* cho sản lượng giao động trong khoảng từ 19-23 mg/l trong một quá trình-hai giai đoạn, còn một vi khuẩn khác, *Pseudomonas denitrificans*, có thể sản xuất 60 mg/l trong một quá trình-một giai đoạn sử dụng ri đường củ cải làm nguồn cacbon.

Vitamin B₁₂ trong cấu trúc có chứa cobalt là phần cơ bản, vì vậy sản lượng của vitamin này sẽ tăng lên đáng kể khi cobalt được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (hình 7.10).

2. Riboflavin

Riboflavin là hợp chất mẹ của flavin, FAD và FMN tức là của các coenzyme giữ vai trò quan trọng trong các enzyme tham gia vào các phản ứng oxi hóa-khử trong hầu hết mọi sinh vật (hình 7.10). Riboflavin được tổng hợp bởi nhiều vi sinh vật, gồm cả vi khuẩn, nấm men và nấm sợi. Nấm *Ashbya gossypii* sinh ra một lượng lớn vitamin này (tới 7g/l) và do vậy được sử dụng đối với hầu hết các quá trình sản xuất nhờ vi sinh vật. Tuy có sản lượng cao như vậy, song giữa quá trình sản xuất nhờ vi sinh vật và sự tổng hợp hóa học luôn luôn có sự cạnh tranh kinh tế lớn.



Hình 7.10: Trái -Cyanocobalamin (vitamin B12), Phải -Riboflavin (Vitamin B2)**Câu hỏi ôn tập chương 7**

1. Trình bày:

a. Các cơ chế điều hòa hoạt tính và sự tổng hợp enzyme ở các chủng hoang dại

b. Nguyên tắc của sự tổng hợp thừa.

c. Tính chất và vai trò của các enzyme dị lập thể trong điều hòa hoạt tính enzyme.

d. Các phương pháp tạo các thể đột biến tổng hợp thừa

e. Nguyên tắc của kỹ thuật penicillin

2. Lysine có thể được tạo ra nhờ *E. coli* bằng cách loại CO₂ từ một acid amin chứa 7 cacbon, acid amin này có tên là:

a. guanine

b. proline

c. acid diaminopimelic

d. acid glutamic

e. acid α -ketoglutaric

3. Sản xuất công nghiệp acid glutamic sử dụng các loài thuộc một trong các chi sau đây:

a. *Corynebacterium*

b. *Pseudomonas*

c. *Escherichia*

d. *Acetobacter*

e. *Clostridium*

4. Enzyme DAP decarboxylase chuyển hóa acid diaminopimelic thành:

a. ethanol

b. acid acetic

- c. acid glutamic
- d. acid lactic
- e. lysine

5. Trong sự sinh tổng hợp thừa acid glutamic, hãy nêu vai trò của chu trình glyoxylate, biotin và các dẫn xuất của các acid béo. Ở chủng sản xuất, những enzyme nào hoạt động mạnh, enzyme nào thiếu hoặc hoạt động rất yếu ?

6. Trong sự điều hòa sinh tổng hợp các nucleotide purine ở *Corynebacterium glutamicum* (trả lời bằng đúng hoặc sai):

- a. Các thể đột biến tiết IMP mạnh là các thể đột biến trợ dưỡng về adenine và xanthine
- b. Việc tạo ra các thể đột biến thừa GMP dễ dàng hơn vì chỉ cần một bước tạo sự sai hỏng về điều hòa của IMP- dehydrogenase là đủ.

Chương 8

Các chất trao đổi bậc hai

I. Các chất kháng sinh

Hiện đã biết trên 8000 chất kháng sinh và mỗi năm có khoảng vài trăm *chất kháng sinh mới* được phát hiện. Trong tương lai chắc chắn còn có nhiều chất kháng sinh khác nữa cũng sẽ được tìm ra vì *đa số* các vi sinh vật có khả năng tạo thành chất kháng sinh đã được nghiên cứu cho tới nay đều chỉ thuộc về các chi *Streptomyces* và *Bacillus*. Nhiều nhà nghiên cứu về các chất kháng sinh tin rằng sẽ có nhiều chất kháng sinh mới được phát hiện nếu tìm thêm ở các nhóm vi sinh vật khác. Mặt khác các kỹ thuật của công nghệ di truyền sẽ cho phép thiết kế một cách nhân tạo các chất kháng sinh mới khi mà các chi tiết về bản đồ gen của các vi sinh vật sản sinh chất kháng sinh đã được biết rõ.

Tuy nhiên, phương thức chủ yếu được sử dụng cho đến nay để phát hiện các chất kháng sinh mới vẫn là phương pháp *sàng lọc*. Trong phương pháp sàng lọc, một số lượng lớn chủng vi sinh vật có tiềm năng tạo thành chất kháng sinh sẽ được thu thập từ tự nhiên dưới dạng giống thuần khiết, sau đó các chủng này sẽ được kiểm nghiệm khả năng sinh kháng sinh qua việc xem xét chúng có tạo ra bất cứ chất khuếch tán nào có năng lực ức chế sự sinh trưởng của các vi khuẩn kiểm định hay không. Vi khuẩn kiểm định được lựa chọn từ nhiều loại vi khuẩn nhưng đó phải là các chủng đại diện hoặc gần gũi với các loài vi khuẩn gây bệnh. Quy trình cổ điển để kiểm nghiệm các chủng vi sinh vật mới có khả năng sinh kháng sinh là phương pháp cấy vạch do Fleming sử dụng lần đầu trong các nghiên cứu tiên phong của ông về penicillin. Những chủng nào được chứng minh là có khả năng sinh kháng sinh sẽ được nghiên cứu tiếp để xác định xem chất kháng sinh mà chúng sinh ra có phải là mới hay không.

Khi một cơ thể sản sinh một chất kháng sinh mới được phát hiện, chất kháng sinh đó sẽ được sản xuất ở số lượng lớn, tinh khiết, kiểm nghiệm về độc tính và hoạt tính điều trị ở các động vật đã bị gây nhiễm. Đa số kháng sinh mới sẽ *không* cho kết quả dương tính ở các phép thử trên động vật mà chỉ một số mới đạt kết quả này. Cuối cùng, chỉ một số rất ít các chất kháng sinh mới này có công dụng trong y học và được sản xuất ở quy mô thương mại.

1. Các công đoạn sản xuất thương mại

Một chất kháng sinh muốn sản xuất được ở quy mô thương mại trước hết phải được sản xuất thành công ở các nồi lên men công nghiệp

dung tích lớn. ở đây, việc hoàn thiện các phương pháp tinh khiết có hiệu quả giữ vai trò quan trọng nhất. Sở dĩ cần tạo ra các phương pháp tách chiết và tinh khiết vì lượng kháng sinh có mặt trong dịch lên men thường rất nhỏ. Nếu chất kháng sinh hoà tan trong một loại dung môi hữu cơ không trộn lẫn trong nước thì có thể dễ dàng tinh khiết nó bằng cách chiết chất kháng sinh với một thể tích nhỏ dung môi và qua đó cô đặc chất kháng sinh. Nếu chất kháng sinh không tan trong dung môi thì phải loại nó khỏi dịch lên men bằng cách hấp phụ, trao đổi ion hoặc kết tủa bằng con đường hoá học.

Trong mọi trường hợp, mục đích đều là thu được một sản phẩm kết tinh với độ tinh khiết cao dù rằng một số chất kháng sinh không kết tinh dễ dàng và khó tinh khiết. Một điều có quan hệ khác là vi sinh vật thường sản sinh ra không phải chỉ một loại sản phẩm cuối cùng mà trong đó có lẫn cả các chất kháng sinh khác. Để đạt được mục tiêu cuối cùng là chỉ có một chất kháng sinh duy nhất, các nhà hóa học đã phát triển các phương pháp loại bỏ sản phẩm phụ trong khi đó các nhà vi sinh vật lại tìm kiếm các chủng sản xuất không sinh ra các sản phẩm phụ không mong muốn. Hiếm khi có thể phân lập được từ tự nhiên một chủng vi sinh vật tạo thành chất kháng sinh mong muốn với hàm lượng cao đạt yêu cầu của sản xuất thương mại. Do vậy, một trong những nhiệm vụ chủ yếu của các nhà vi sinh vật học công nghiệp là phân lập các chủng mới có *sản lượng cao*. Ngày nay, sản lượng penicillin đã tăng lên hơn 50.000 lần so với chủng ban đầu nhờ việc chọn chủng và tạo ra môi trường thích hợp. Việc lựa chọn chủng bao gồm gây đột biến giống ban đầu, nuôi các thể đột biến và thử nghiệm các thể đột biến về khả năng sinh chất kháng sinh. Trong đa số trường hợp, các thể đột biến thường tạo ra ít chất kháng sinh hơn bố mẹ, do vậy việc nhận được các chủng có sản lượng cao là rất hiếm hoi.

Trong những năm gần đây, các kỹ thuật của công nghệ di truyền đã cải thiện đáng kể các quy trình tìm kiếm các chủng cho sản lượng cao. Kỹ thuật *khuếch đại gen* cho phép đưa các bản sao bổ sung của các gen mong muốn vào một tế bào nhờ một vectơ như plasmid. Việc cải thiện các quá trình điều khiển cũng cho phép làm tăng sản lượng. Tuy nhiên, khó khăn của việc sử dụng các quy trình di truyền để làm tăng sản lượng là ở chỗ các con đường sinh tổng hợp đa số các chất kháng sinh thường bao gồm rất nhiều bước với rất nhiều gen và không rõ gen nào cần được cải biến để nâng cao sản lượng. Do vậy, những nghiên cứu cơ bản có ý nghĩa rất quan trọng. Trong nhiều trường hợp, để tăng sự tổng hợp một chất kháng sinh nào đó, việc ứng dụng các kết quả nghiên cứu trao đổi chất cơ bản mang lại nhiều lợi ích lớn hơn so với các chương trình gây đột biến và tuyển chọn mò mẫm.

2. Các nhóm chất kháng sinh chủ yếu dùng trong điều trị cho con người

Có hai cách phân loại nhóm các chất kháng sinh dùng để điều trị cho người. Cách thứ nhất dựa vào ý nghĩa kinh tế của chúng. Theo đó thì vào năm 1997, cephalosporine có doanh thu cao nhất, còn trong số các penicillin thì chỉ có amoxicilin (amoxil) là bán chạy nhất. Tổ hợp các chất kiềm chế β -lactamase với các chất kháng sinh β -lactam như augmentin (amoxicilin + clavulanate K), primacin (imipenem + xilastatin) và unasyn (ampicillin + sulbactam) cộng với nhóm các chất kháng sinh β -lactam tạo được doanh thu khoảng 6 tỉ USD vào năm đó.

Hai chất kháng sinh macrolide phổ rộng thuộc nhóm erythromycin (biacin và zithromax) đạt doanh số gần 2 tỉ. Nhóm thứ ba là các quinolone do ciprofloxacin làm đại diện đạt 1 tỉ. Ba nhóm được phẩm này, theo thứ tự, tấn công vào sự tổng hợp thành tế bào, sự sinh tổng hợp protein và *gyrase*, enzyme sao chép ADN. Trong khi đó vào năm 1995, thị trường chất kháng sinh lại được thống trị bởi ba nhóm thuốc kháng khuẩn khác hẳn, đó là các tetracyclin, các aminoglycozide và các glycopeptide với doanh thu trên 400 triệu USD. Kháng sinh chống lao rifampin và dẫn xuất mới của cacbapenem là imipenem cũng nằm trong danh sách. Doanh số toàn cầu của các chất kháng sinh vào năm 2000 đạt khoảng 24 tỉ.

Phương pháp phân loại thứ hai dựa vào các loại bệnh nhiễm khuẩn mà chất kháng sinh được sử dụng để điều trị. Các bệnh này được xếp thành hai nhóm do vi khuẩn Gram dương hoặc Gram âm gây ra. Do các vi khuẩn Gram âm có tính thấm màng ngoài nguyên vẹn, còn vi khuẩn Gram dương thì không, nên nói chung các chất kháng sinh như vancomycin chỉ ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn Gram dương mà không ức chế các vi khuẩn Gram âm.

Các liên cầu khuẩn Gram dương là những tác nhân gây bệnh quan trọng trong các bệnh viêm phổi, viêm màng não và viêm tai giữa, trong khi các tụ cầu và cầu khuẩn đường ruột (*Enterococcus*) lại là tác nhân của các ca nhiễm trùng sau mổ. Trục khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* vẫn gây nên hàng triệu ca tử vong mỗi năm. Các đại dịch tả và dịch hạch trong lịch sử đã từng do hai loài vi khuẩn Gram âm, *Yersinia pestis* và *Vibrio cholera* gây ra, trong khi các chủng *E. coli*, *Salmonella* và *Shigella* thường xuyên là nguyên nhân của các bệnh tiêu chảy. Trục khuẩn Gram âm *Pseudomonas aeruginosa* thường được mô tả như một tác nhân cơ hội gây bệnh ở những người bị tổn thương về miễn dịch hoặc bị bệnh u xơ nang.

Giống như các bệnh dịch hạch, tả, tiêu chảy, một số bệnh nhiễm khuẩn như viêm phổi thường dễ bị mắc nhất trong môi trường cộng đồng,

trong khi các bệnh khác lại bị nhiễm trong môi trường bệnh viện, thường được gọi là các bệnh nhiễm trùng bệnh viện. Các bệnh sau mổ do tụ cầu và cầu khuẩn đường ruột thuộc nhóm thứ hai, và vì chúng tồn tại trong môi trường thường xuyên sử dụng các chất kháng sinh nên nhiều chủng tụ cầu và cầu khuẩn đường ruột có tính đề kháng với các chất kháng sinh và trở thành các vi khuẩn đặc biệt phiền hà.

Các tụ cầu kháng các penicillin và đặc biệt là kháng methicilin có thể có mặt với tỷ lệ rất cao (40% tỉ lệ nhiễm trùng gặp ở *Staphylococcus aureus* kháng methicilin và 50% gặp ở *S. epidermidis* kháng chất kháng sinh này) ở một số bệnh viện. Chúng gây tử vong cao (25-63%) trong các trường hợp nhiễm trùng máu.

Vào cuối những năm 1990 các cầu khuẩn đường ruột chiếm tới 12% tổng số ca nhiễm trùng bệnh viện ở một số thành phố của Mỹ trong đó trên 15% trường hợp vi khuẩn đề kháng với vancomycin. Nhiễm trùng do cầu khuẩn đường ruột đề kháng với vancomycin đã gây nên tỉ lệ tử vong từ 42 đến 81%.

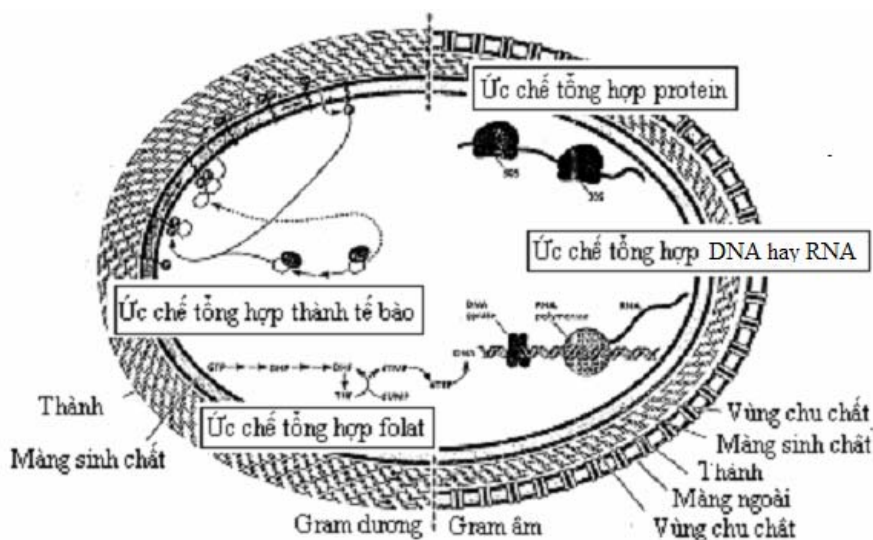
Bảng 8.1: Phương pháp điều trị hiệu quả nhất bằng chất kháng sinh

Bệnh nhiễm trùng	Tác nhân gây bệnh	Phương pháp trị liệu hiệu quả nhất
Viêm phổi cộng đồng	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	cephalosporin phổ rộng thế hệ 4, macrolide hoặc fluoroquinolone
Viêm phổi bệnh viện	Vi khuẩn Gram âm hoặc tụ cầu	cephalosporin phổ rộng thế hệ 4, imipenem và aminoglycozide, vancomycin
Viêm màng não	<i>S. pneumoniae</i> hoặc <i>Neisseria meningitidis</i>	cephalosporin phổ rộng + vancomycin + rifampin
Hội chứng nhiễm trùng	Trực khuẩn Gram âm, song cả cầu khuẩn Gram dương	cephalosporin + aminoglycoside + vancomycin
Nhiễm trùng đường niệu	Vi khuẩn Gram âm như <i>E. coli</i>	sulfametoxazol + trimetoprim, fluoroquinolone, fosfomycin
Lao	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	isoniazid + rifampin + pirizinaid + etambutol

Nhiều chất kháng sinh khác cũng đã được sử dụng trong những trường hợp đặc biệt và chống lại những vi khuẩn đặc biệt, chẳng hạn bacitracin được sử dụng tại chỗ để chống lại các bệnh nhiễm khuẩn ở da còn các tetracyclin được dùng để điều trị các bệnh do *Helicobacter*, *Vibrio cholerae* và các bệnh nhiễm khuẩn do *Brucella*.

3. Đích tác dụng của các chất kháng sinh ở vi khuẩn

Các cơ chế tác dụng của hầu hết các chất kháng sinh kháng khuẩn đều đã được làm sáng tỏ sau khi người ta phát hiện ra rằng các phân tử này gây hiệu quả lên sinh trưởng của vi khuẩn, hoặc bằng cách làm chậm đột ngột sinh trưởng (ức khuẩn) hoặc giết chết vi khuẩn (diệt khuẩn). Hình 8.1 trình bày bốn đích chủ yếu ở các vi khuẩn gây bệnh được tìm ra sau nhiều thập kỷ nghiên cứu về cơ chế tác dụng của các chất kháng sinh : sự sinh tổng hợp thành tế bào, sự sinh tổng hợp protein, sự sao chép và sửa chữa ADN và sự sinh tổng hợp coenzyme folate.



Hình 8.1.- Bốn đích tác dụng chủ yếu của các chất kháng sinh lên vi khuẩn

4. Các chất kháng sinh β -lactam : penicillin và cephalosporin

Một trong những nhóm kháng sinh quan trọng nhất cả về mặt lịch sử lẫn mặt y học là nhóm β -lactam. Nhóm này gồm các penicillin, cephalosporin và các cephamycin, được gọi là β -lactam vì chúng chứa hệ thống vòng β -lactam (hình 8.2) là một hệ thống dị vòng phức tạp.

Các chất kháng sinh β -lactam phản ứng với hai loại enzyme chủ yếu ở vi khuẩn. Khi biểu hiện hoạt động kháng khuẩn của mình, các chất kháng sinh β -lactam phản ứng với các enzyme tổng hợp thành tế bào làm gián đoạn sự tổng hợp thành tế bào của vi khuẩn. Trước đây người ta cho rằng một chất kháng sinh β -lactam kim hãm hoạt tính của transpeptidase vì nó giống về mặt cấu trúc với phần D-alanyl-D-alanin của peptidoglycan mới sinh ra. Song trong những năm gần đây, người ta đã mô tả về những vị trí đa thụ thể trên màng tế bào chất vi khuẩn có thể liên kết cộng hóa trị với penicillin. Một số protein liên kết với penicillin (penicillin binding proteins = PBP) hoạt động như các enzyme và biểu hiện hoạt tính của carboxypeptidase, transpeptidase, endopeptidase và transglycosilase. Vai trò chính xác của các PBP, bất kể thuộc hoạt tính enzyme nào, trong sự sinh trưởng và phân chia tế bào, vẫn chưa được biết rõ, và vì vậy cơ chế phân tử của hoạt động gây chết của các chất kháng sinh β -lactam vẫn chưa thể giải thích được.

Nhóm enzyme thứ hai phản ứng với các chất kháng sinh β -lactam có vai trò sinh lý đối lập với các enzym tổng hợp thành tế bào, tức là, chúng thủy phân vòng β -lactam và hoạt động bảo vệ tế bào khỏi sự tấn công của các β -lactam. Việc làm bất hoạt các chất kháng sinh β -lactam bởi các β -lactamase đã được biết tới từ cách đây hơn 50 năm, và điều này đã là một yếu tố quan trọng đóng góp vào việc phát triển không ngừng nhóm chất kháng sinh này. β -Lactamase là các enzyme có hiệu quả cao xúc tác cho sự thủy phân hàng loạt các β -lactam. Cơ chất cho các enzyme này bao gồm các penicillin và các cephalosporin nhị vòng cũng như các β -lactam một vòng và các β -lacton.

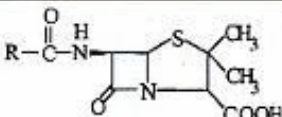
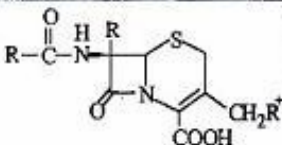
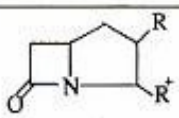
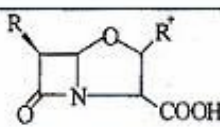
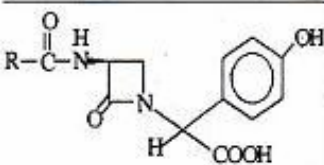
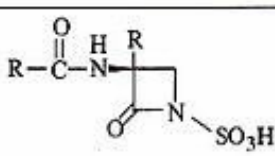
4.1. Các loại penicillin

Phân nhóm

Chất kháng sinh β -lactam được phát hiện đầu tiên, *penicillin G*, chủ yếu hoạt động chống lại các vi khuẩn Gram dương. Sở dĩ như vậy là vì các vi khuẩn Gram âm không cho chất kháng sinh này đi qua. Về sau người ta đã phát hiện ra nhiều penicillin mới trong đó một số chống lại rất có hiệu quả các vi khuẩn Gram âm. Đó là những phát hiện có ý nghĩa nhất trên lĩnh vực chất kháng sinh trong vài thập kỷ qua. Penicillin là các dẫn xuất acyl của *acid 6-aminopenicillanic* (nhân 6-APA - hình 8.3). Chúng được sản xuất nhờ hai kiểu lên men : kiểu 1 tạo ra các penicillin với chuỗi bên không phân cực tức là chỉ có các β -lactam, và kiểu 2 sinh ra penicillin N cùng với các β -lactam khác (hình 8.4). Kiểu 1 chỉ gặp ở nấm và bản chất của chuỗi bên không phân cực có thể xác định được bằng cách bổ sung

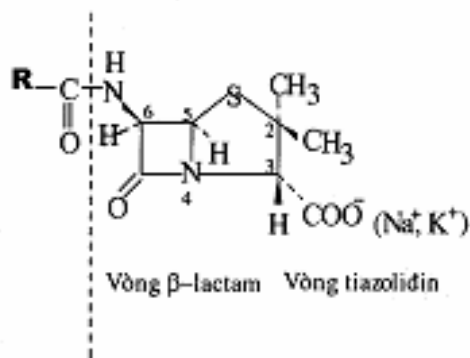
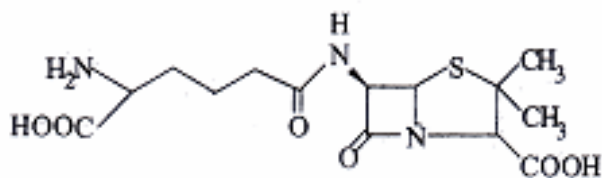
các tiền chất chuỗi bên thích hợp vào môi trường lên men. Chẳng hạn, nếu acid phenylacetic được bổ sung vào môi trường lên men kiểu 1 thì benzylpenicillin sẽ được tạo thành. Có nhiều ví dụ về các penicillin sinh tổng hợp được tạo thành theo cách như vậy và một số được trình bày trong hình 8.2.

Penicillin N là một penicillin chứa chuỗi bên D- α -aminoadipyl liên kết kiểu γ , đã được tạo ra bởi 8 loài nấm khác nhau trong đó *Cephalosporium acremonium* (tên khác *Acremonium chrysogenum*) là loài biết rõ nhất. Các vi sinh vật này cũng sản sinh cephalosporin. Nhiều loài *Streptomyces* cũng sản sinh penicillin N cùng với các cephalosporin, cephamycin, clavam, hay cacbapenam. Các vi sinh vật của cả hai nhóm lên men đều sản sinh izopenicillin N trong đó acid α -aminoadipic có cấu hình L song chất này thường không được tiết ra môi trường lên men mà ngược lại nằm dưới dạng một sản phẩm trung gian nội bào của sinh tổng hợp. Ngoài các penicillin sinh tổng hợp, các penicillin bán tổng hợp đã được sản xuất bằng cách acyl hóa nhân 6-APA. Nhờ cách này đã sản xuất được các penicillin như methicillin, nafxilin, và các penicillin isoxazolyl, các penicillin phổ rộng ampicillin, amoxycilin, epicilin và cyclacilin; các penicillin kháng *Pseudomonas* như cacbenicilin và ticarcilin, các penicillin ureido, pipeacilin, azocilin, và mezlocilin.

Cấu trúc cơ sở	CKS	Loài sản sinh quan trọng
	Các penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Cephalosporin	<i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Nocardia lactamdurans</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Các acids clavulanic	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Tienamycin Acid olivanic Epithienamycin	<i>Streptomyces cattleya</i> <i>Streptomyces olivaceus</i> <i>Streptomyces flavogriseus</i>
	Nocardicin	<i>Nocardia uniformis</i> subsp. <i>tsuyamanesis</i>
	Các monolactam	<i>Gluconobacter</i> sp. <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas acidophila</i> <i>Flexibacter</i> sp. <i>Acetobacter</i> sp.

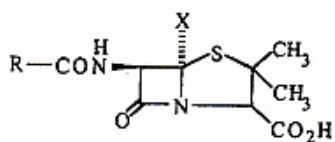
Hình 8.2: Cấu trúc cơ sở của một số loại chất kháng sinh β -lactam gặp trong tự nhiên

Penicillium chrysogenum là một ví dụ biết rõ nhất về lên men kiểu 1, song một số loài *Penicillium* khác cũng như hàng chục chi nấm khác cũng sản sinh các penicillin mang chuỗi bên không phân cực.

Hình 8.3: Nh[©]n 6-APA**Penicillin N**

Hoạt tính sinh học Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của một penicillin nào đó có thể được coi như một đại lượng để đo khả năng thâm nhập vào màng ngoài tế bào, khả năng đề kháng với sự tấn công của các lactamase nếu chúng có mặt, và thứ ba, khả năng ức chế của nó đối với các enzym tham gia vào sự tổng hợp thành tế bào. Penicillin G chỉ ra khả năng chống lại mạnh các vi khuẩn Gram dương trừ các chủng sản sinh penicillinase. Kháng sinh này có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính chống lại các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae và các chủng *Pseudomonas*.

Hình 8.5, Các penicillin bán tổng hợp methycilin, kháng sinh bền với penicillinase có hoạt tính chống lại vi khuẩn sinh penicillinase song có hoạt tính yếu chống lại *Streptococcus faecalis* và không có hoạt tính đối với các vi khuẩn Gram âm. Tất cả các penicillin có phổ rộng, ampicillin, ticarcilin, và piperacilin đều miễn cảm với penicillinase song lại có hoạt tính chống lại các vi khuẩn Gram âm mạnh hơn. Temocilin chỉ hoạt động chống lại các vi khuẩn Gram âm. Sự liên kết của của penicillin với các protein PBP là tiêu chuẩn tốt nhất để hiểu về hoạt tính kháng khuẩn ở mức độ phân tử. Các PBP 1a, 1b, 2 và 3 là những PBP chủ chốt ở *Escherichia coli* và việc liên kết với một hoặc nhiều trong các protein này sẽ dẫn đến sự biến đổi hình dạng của tế bào và cuối cùng dẫn đến tử vong.



R	X	Tên
	— H	Benzylpenicillin
	— H	Methycilin
	— H	Ampicillin
	— H	Ticarcilin
	— H	Piperacilin
	— OCH ₃	Temocilin

Hình 8.5: Các penicillin bán tổng hợp

Penicillin G và ampicillin có ái lực cao đối với PBP 2 và 3 và hậu quả là làm xuất hiện một số lượng thấp các tế bào bị phồng lên và kéo dài.

Amoxycilin có ái lực với các PBP 1a, 1b và 2 và cho tế bào ít có hình sợi hơn so với ampicillin. Rõ ràng rằng tính liên kết của các penicillin khác nhau với các PBP thay đổi rất nhiều và bản thân các PBP ở các vi sinh vật khác nhau cũng có sự khác biệt về kiểu và số lượng. *Lên men và tách sản phẩm*

Penicillium chrysogenum là cơ thể vẫn được sử dụng để sản xuất công nghiệp penicillin. Các chủng cho sản lượng cao đã thu được nhờ gây đột biến và chọn lọc bằng nhiều cách qua hơn bốn chục năm nay. Năng suất 60 mg/l ở chủng đầu tiên nay đã lên tới 85000 mg/l ở những chủng hiện đang được dùng trong sản xuất.

Quá trình sản xuất penicillin được trình bày theo sơ đồ ở hình 8.6. Giống thường được giữ dưới dạng bào tử đông khô hoặc giữ trong nitơ lỏng. Giống trong các bình nuôi lắc (4 ngày) được cấy vào các bể nhân giống thể tích có thể lên tới trên 300.000 lit.

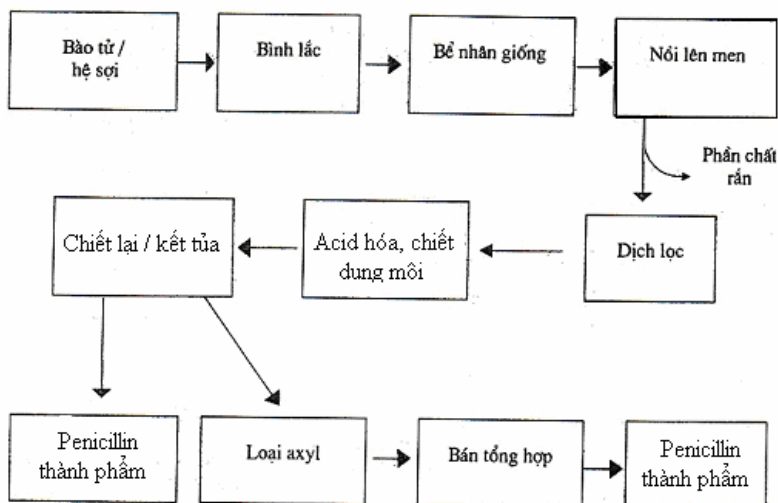
Phần chính của quá trình sản xuất là các nồi lên men. Môi trường thông dụng nhất bao gồm glucose, phenylacetate natri, cao ngô, sunfat amon và phosphate kali acid. pH của môi trường lên men được giữ ở 6,8-7,4 bằng cách bổ sung NaOH hay acid sulfuric và nhiệt độ thông thường là 25°C và độ thông khí là nhân tố giữ vai trò rất quan trọng trong sản xuất penicillin.

Thời gian cần thiết để sản sinh một lượng penicillin tối đa thông thường là 8 - 10 ngày. Quá trình lên men ít khi diễn ra trong điều kiện tĩnh thuần túy. Vào ngày thứ 5 đến ngày thứ 6, môi trường lên men được loại khỏi nồi lên men và môi trường mới được bổ sung. Trong một phương pháp khác, phương pháp tĩnh có bổ sung, tiền chất chuỗi bên, glucose, v.v.. được đưa vào một cách liên tục hay định kỳ.

Theo tính toán, khoảng 70% lượng glucose tiêu thụ được dùng trực tiếp cho sinh trưởng, 26% dành cho sự duy trì cơ thể và 6% cho sự tổng hợp penicillin. Trong sản xuất penicillin, cần xem xét các thông số sau đây : tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật, nhu cầu duy trì cơ thể (g glucose/ g tế bào/ h), tốc độ sản sinh penicillin riêng phần (q pen) đối với một cơ thể (mg penicillin /g tế bào/ h) và năng suất penicillin trên g glucose. Ngoài ra, thời gian lưu trong nồi lên men, dung tích bể, thời gian chế biến, môi trường và chi phí nhân công là những nhân tố bổ sung có tầm quan trọng công nghiệp.

Khi lên men kết thúc, toàn bộ môi trường lên men được lọc và sợi nấm cũng như mọi chất rắn khác đều được loại bỏ. Dịch lọc được acid hóa đến khoảng pH 4 rồi penicillin được chiết trong một loại dung môi như butyl acetate. Sau đó penicillin được kết tủa khỏi dung môi nhờ bổ sung

acetate kali và được thú hồi nhờ biện pháp lọc. Ở bước tiếp theo, nó có thể được kết tinh lại từ isopropanol.



Hình 8.6: Quy trình sản xuất penicillin

Muối kali của penicillin G có thể sử dụng được sau khi tiến hành các quy trình kiểm tra chất lượng, hoặc thông thường hơn, được chuyển hóa thành nhân 6-APA cho các quá trình chế biến tiếp theo.

Nhân 6-APA được sản xuất từ penicillin G bằng cách cho penicillin G đi qua một cột chứa penicillin acylase bất động. Acylase sẽ cắt penicillin G thành acid phenylacetic và 6-APA : pH của cột được giữ trung tính bằng cách bổ sung NaOH. Nhân 6-APA rời khỏi cột được thu hồi bằng cách kết tủa ở pH 4.

Các penicillin acylase được nhiều loài vi khuẩn, nấm sợi, nấm men và xạ khuẩn sinh ra. Hai loại penicillinase được chú ý trong quá trình sản xuất penicillin là các penicillin G acylase, chủ yếu do vi khuẩn sinh ra, có pH tối ưu ở khoảng 7,5 và các penicillin V acylase thường do nấm sinh ra.

Sinh tổng hợp

Penicillin là các dẫn xuất của 3 acid amin, acid L- α -aminoadipic, L-cysteine và L-valine. Trước hết, một peptit (L)- α -aminoadipoyl-L-cysteinyl được tạo thành, chất này, sau khi được bổ sung L-valine và được epime hóa sẽ trở thành tripeptide L- α -aminođipyl-L-cysteine-D-valine, tức là cơ chất của penicillin synthase. Trong lên men kiểu 1, isopenicillin N được tạo thành bằng cách như vậy sẽ bị loại axyl để tạo thành nhân 6-APA nếu không có mặt một tiền chất chuỗi bên. Tuy nhiên, nếu có mặt

phenylacetyl-CoA thì nhân 6-APA sẽ được acyl hóa để tạo thành penicillin G.

Trong kiểu lên men 2, chuỗi bên L-a-aminoadipyl của isopenicillin N được epime hóa để tạo thành chuỗi bên D- α -aminoadipyl của penicillin N.

4.2. Cephalosporin và các chất kháng sinh β -lactam khác

Cephalosporin là các chất kháng sinh β -lactam chứa một vòng dihydrothiazin thay vào hệ thống vòng thiazolidin. Cephalosporin lần đầu tiên được tìm thấy ở *Cephalosporium acremonium* song hàng loạt các nấm khác cũng sản sinh chất kháng sinh này. Hơn nữa nhiều cephalosporin bán tổng hợp đã được sản xuất. Giá trị của các cephalosporin không những nằm ở chỗ chúng có tính độc thấp mà còn vì chúng là những chất kháng sinh có phổ rộng.

Quá trình sàng lọc quy mô lớn nhằm tìm ra các chất kháng sinh β -lactam mới đã dẫn đến việc phát triển các hợp chất mới mà cấu trúc của nó khác với cả penicillin lẫn cephalosporin. Đó là các chất kháng sinh nocardicin, acid clavulanic, và thianemycin. Acid clavulanic là một chất kháng sinh được chú ý đặc biệt bởi vì, mặc dù nó không có hiệu quả như một chất kháng sinh song nó lại kìm hãm hoạt tính của các β -lactamase. Các enzyme này do một số vi khuẩn tạo thành, chúng phá huỷ các chất kháng sinh β -lactam làm cho chúng trở nên vô hiệu khi được dùng để chữa một bệnh nào đó. Do vậy, khi được sử dụng tổ hợp cùng với các penicillin và cephalosporin miễn cảm với β -lactamase, acid clavulanic sẽ làm tăng rõ rệt hoạt tính của các chất kháng sinh này.

5. Các chất kháng sinh do các sinh vật nhân sơ sinh ra

Nhiều chất kháng sinh hoạt động mạnh chống lại các sinh vật nhân sơ cũng lại được sinh ra bởi chính các sinh vật nhân sơ. Thuộc về nhóm này có các aminoglycoside, các macrolide, các tetracyclin và nhiều loại khác. Trong số chúng, nhiều chất kháng sinh có công dụng y học chủ chốt và vì vậy việc sản xuất chúng giữ vai trò quan trọng trong công nghiệp dược.

5.1. Các chất kháng sinh aminoglycoside

Aminoglycoside là những chất kháng sinh chứa các đường amin nối với các đường amin khác bởi các liên kết glycoside. Nhiều chất kháng sinh có công dụng điều trị cao thuộc về các aminoglycosit, đó là streptomycin và các chất họ hàng, kanamycin, gentamycin và neomycin. Chúng được sử dụng trong thực tiễn y học trước hết để chống lại các vi

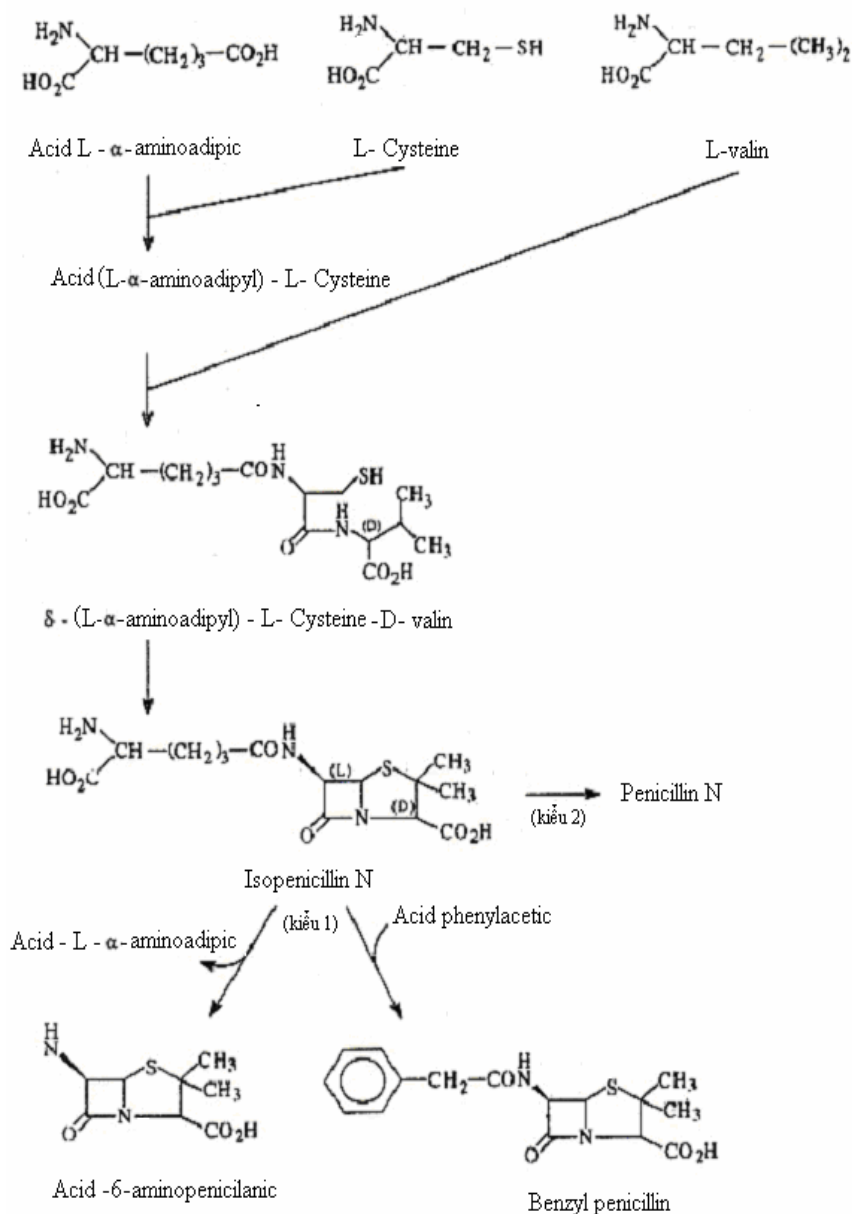
khuẩn Gram âm. Streptomycin cũng được sử dụng rộng rãi để điều trị bệnh lao.

Đứng về mặt lịch sử, việc phát hiện ra giá trị của streptomycin đối với bệnh lao là một bước tiến quan trọng trong y học bởi vì đó là chất kháng sinh đầu tiên tìm thấy có khả năng khống chế bệnh nhiễm trùng đáng sợ này. Tuy nhiên, không có chất kháng sinh aminoglycoside nào được sử dụng rộng rãi như trước đây chúng từng được sử dụng. Streptomycin đã bị thay thế bởi một số hoá chất tổng hợp một mặt vì streptomycin gây nên một số hiệu ứng phụ nghiêm trọng, mặt khác ngày càng có nhiều vi khuẩn đề kháng với chất kháng sinh này. Việc sử dụng các chất kháng sinh aminoglycosit để chống lại các bệnh nhiễm khuẩn Gram âm đã trở nên ít có ý nghĩa hơn kể từ khi xuất hiện các penicillin bán tổng hợp và các tetracyclin. Ngày nay các chất kháng sinh aminoglycosit được coi là các chất kháng sinh dự trữ, chỉ được sử dụng khi các chất kháng sinh khác không mang lại hiệu quả.

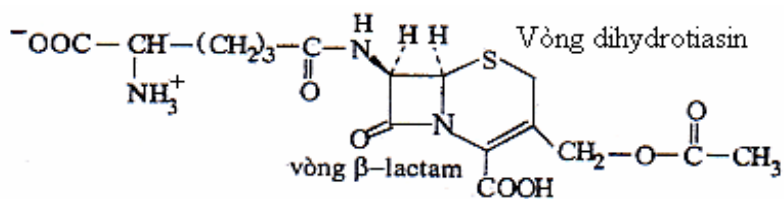
Một trong những đặc điểm đáng chú ý của các chất kháng sinh aminoglycoside là sự điều khiển sinh tổng hợp chúng. Như có thể thấy trên hình 8.9, ba thành phần của phân tử streptomycin được tổng hợp từ 3 con đường tách biệt nhau rồi cuối cùng các dưới đơn vị được hợp nhất với nhau. Sản phẩm trung gian cuối cùng, streptomycin-P, không có hoạt tính sinh học nhưng được hoạt hoá khi loại bỏ một phân tử phosphate. Streptomycin được tổng hợp như một sản phẩm bậc hai điển hình. Một số enzyme tham gia vào quá trình này chỉ được tổng hợp vào cuối pha sinh trưởng.

Một phương thức trong sự điều khiển là sự sản sinh một chất cảm ứng có tên là *nhân tố A*. Nhân tố A không giống về mặt hoá học với streptomycin, song bằng cách nào đó nó tham gia vào sự trao đổi hydrat cacbon. Các enzyme chủ chốt của sự sinh tổng hợp chỉ được tổng hợp khi một nồng độ nhân tố A nhất định đã được tích lũy, điều này giải thích vai trò của nhân tố này trong trao đổi chất bậc hai. Trong pha sinh trưởng, nhân tố A đã được tổng hợp sẽ được tiết ra và tích lũy dần dần trong môi trường. Chỉ khi nồng độ đạt tới một mức độ tới hạn nhân tố A mới bắt đầu hoạt động và cảm ứng sự tổng hợp các enzym chủ chốt cần cho sự sinh tổng hợp streptomycin. Ý nghĩa của nhân tố A đối với sự tổng hợp streptomycin thể hiện ở chỗ là các thể đột biến nhân tố A(-) đã mất đi khả năng sinh tổng hợp streptomycin, song nếu nhân tố A được đưa vào các thể đột biến trên thì sự sinh tổng hợp streptomycin lại được phục hồi. Tuy vậy, bản thân nhân tố A không phải là một tiền chất của streptomycin, điều này được chỉ ra qua hiện tượng là chỉ cần bổ sung một lượng rất nhỏ

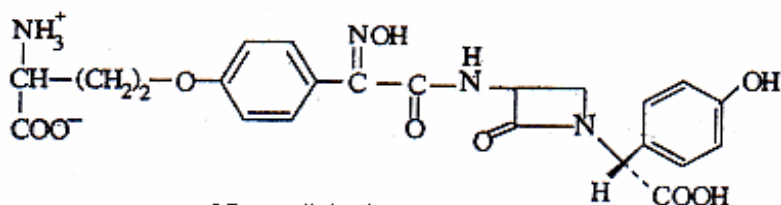
nhân tố A, 1 μ g, đã có thể dẫn đến việc tạo thành 1 gam streptomycin. Song cũng cần lưu ý rằng, sự sinh tổng hợp streptomycin không chỉ được điều khiển bởi một mình nhân tố A vì các quá trình điều khiển khác cũng tác động lên sự sinh tổng hợp streptomycin.



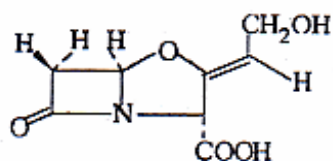
Hình 8.7.- Sinh tổng hợp các penicillin



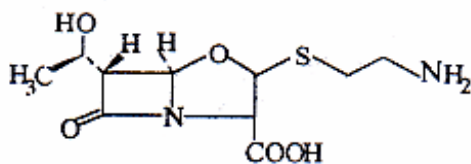
Cephalosporin C



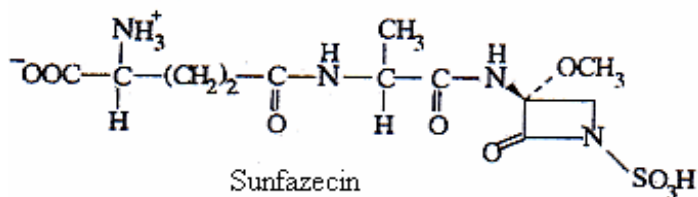
Nocardicin A



Acid clavulanic

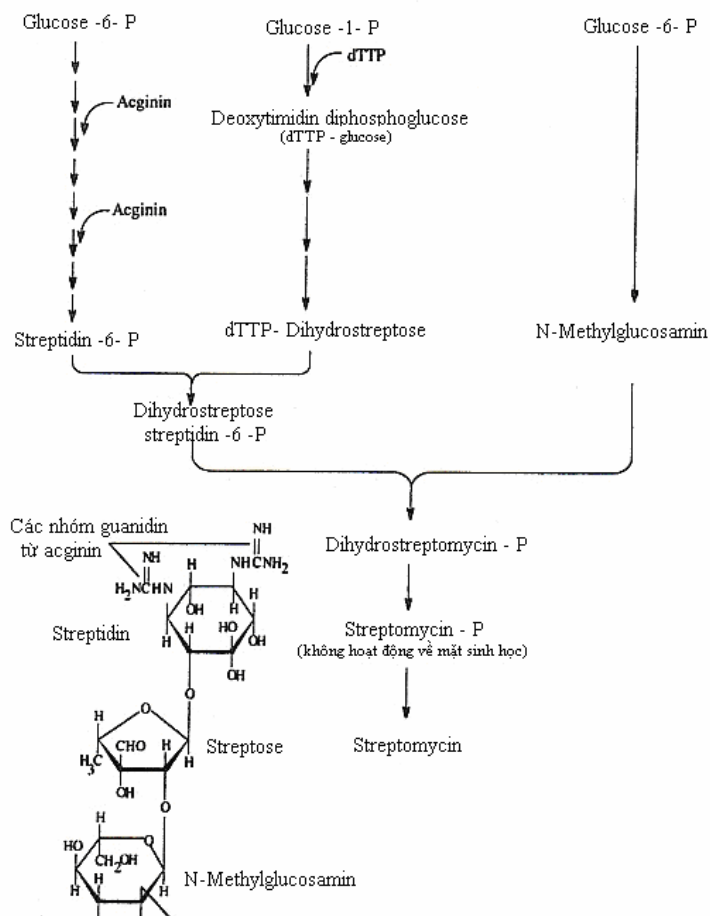


Tienamycin



Sunfazecin

Hình 8.8: Các chất kháng sinh β -lactam mới



Hình 8.9: Sinh tổng hợp streptomycin ở *Streptomyces griseus*

5.2. Các chất kháng sinh macrolide

Các chất kháng sinh macrolide chứa các vòng đại lacton nối với các thành phần đường. Những sự thay đổi trong cấu trúc của cả hai thành phần vòng lacton và đường đã làm xuất hiện nhiều loại kháng sinh macrolide. Chất kháng sinh macrolide biết rõ nhất là *erythromycin*, còn các macrolide khác là *oleandomixin*, *spiramixin* và *tyloxin*.

Erythromycin thường được sử dụng trong điều trị để thay thế penicillin đối với các bệnh nhân bị dị ứng với penicillin hoặc với các chất kháng sinh β -lactam khác. Erythromycin có giá trị đặc biệt trong điều trị các bệnh do *Legionella* gây ra vì tính miễn cảm cao của vi khuẩn gây bệnh, *Legionella pneumophila*, đối với chất kháng sinh này.

Tính phức tạp của các chất kháng sinh macrolide thể hiện trong cấu trúc của chúng. Người ta đã biết tới trên 25 bước phản ứng do enzyme xúc tác tham gia vào sự sinh tổng hợp erythromycin.

Việc điều khiển sinh tổng hợp xảy ra theo nhiều cách. Glucose và phosphate kim hãm sinh tổng hợp và erythronolit B, một trong những sản phẩm trung gian trong sinh tổng hợp erythromycin cũng ức chế sự tổng hợp chất kháng sinh này. Bản thân erythromycin cũng gây nên sự ức chế bởi sản phẩm cuối cùng đối với một số enzyme chủ chốt.

5.3. Các tetracyclin

Các tetracyclin là một nhóm chất kháng sinh quan trọng được ứng dụng rộng rãi trong y học thực hành. Đó là những chất kháng sinh phổ rộng đầu tiên ức chế hầu hết các vi khuẩn Gram dương và Gram âm.

Cấu trúc cơ sở của các tetracyclin bao gồm hệ thống vòng naphhtacen. Bổ sung vào vòng này là các thành phần khác nhau tùy từng loại. Chẳng hạn, clotetracyclin chứa một nguyên tử clo trong khi oxytetracyclin chứa một nhóm hydroxyl và không có clo).

Cả ba chất kháng sinh này đều được sản xuất từ con đường vi sinh vật học, song trên thị trường cũng có bán các tetracyclin bán tổng hợp trong đó các thành phần khác được gắn vào hệ thống vòng naphhtacen nhờ phương pháp hoá học.

Các tetracyclin và các chất kháng sinh β -lactam là hai nhóm chất kháng sinh quan trọng nhất trong lĩnh vực y học. Tetracyclin cũng được sử dụng trong ngành thú y và ở một số nước được dùng làm thức ăn bổ sung cho gia cầm và lợn. Đã có một thời, chlotetracyclin được sử dụng để bảo quản cá bằng cách đưa nó vào đá dùng để ướp cá biển vừa đánh bắt được, song việc sử dụng các chất kháng sinh có công dụng y học hiện nay không được khuyến khích vì nó chứa đựng nguy cơ tạo nên hiện tượng kháng kháng sinh.

Sự sinh tổng hợp một tetracyclin bao gồm nhiều bước phản ứng do enzyme xúc tác. Trong trường hợp của chlotetracyclin có tới 72 sản phẩm trung gian tham gia vào sự tổng hợp mà đa số trong chúng chỉ được biết một cách rất đại cương.

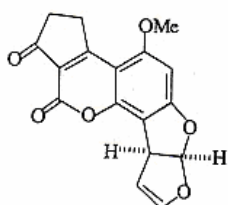
Các nghiên cứu về di truyền học ở vi khuẩn sản sinh chlotetracyclin *Streptomyces aureofaciens* cho biết rằng có trên 300 gen đã tham gia vào ! Với một số lượng gen lớn đến như vậy, sự điều khiển sinh tổng hợp chất kháng sinh rõ ràng là rất phức tạp. Tuy nhiên một số tín hiệu điều hòa đã được làm rõ và các quy trình sản xuất đang được cải thiện.

II. Các độc tố nấm (mycotoxin)

Mycotoxin là một thuật ngữ chung dùng để miêu tả các độc tố được tạo thành trong quá trình sinh trưởng của nấm mốc. Độc tố nấm là một vấn đề không còn mới mẻ và việc ngộ độc bởi thực phẩm và thức ăn gia súc bị nhiễm nấm mốc đã được biết đến từ nhiều thế kỷ nay, song việc phát hiện ra aflatoxin B₁ (AFB₁) như là một trong những nhân tố gây ung thư có hiệu lực cao nhất gặp trong tự nhiên vào đầu những năm 60 đã thúc đẩy mạnh mẽ các nghiên cứu trên lĩnh vực này.

Mỗi nguy hiểm do các độc tố nấm và các bệnh do chúng gây ra trong một thời gian dài không được đánh giá đúng mức, đó là nguyên nhân tại sao chúng được mệnh danh là "các bệnh bị lãng quên". Tình trạng này đã thay đổi đột ngột kể từ khi người ta phát hiện ra hiện tượng nhiễm độc hàng loạt đối với gà tây ở các trang trại miền Nam và miền Đông nước Anh do lạc dùng làm thức ăn bị nhiễm mốc gây ra.

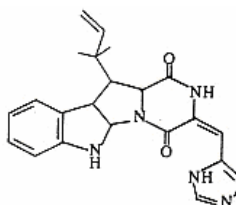
Thức ăn chứa lạc bị nhiễm *Aspergillus flavus*, nấm này sinh ra các aflatoxin rất độc (kể cả với người) và gây nên bệnh ung thư gan. Từ đó các nghiên cứu mạnh mẽ thuộc nhiều lĩnh vực có liên quan đã phát hiện ra các độc tố nấm khác nữa cũng gây nên những bệnh rất nguy hiểm.



AflatoxinB₁ (*Aspergillus flavus*)

LD₅₀(đường miệng, chuột cống)

7,2mg/kg

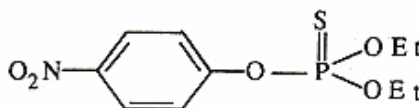


Roquefortin (*P. roqueforti*)

LD₅₀(trong màng bụng, chuột nhắt)

10-20 mg/kg

As₂O₃
Asen



LD₅₀(đường miệng, chuột cống) 15mg/kg ;

LD₅₀(đường miệng, chuột cống)

4-13mg/kg

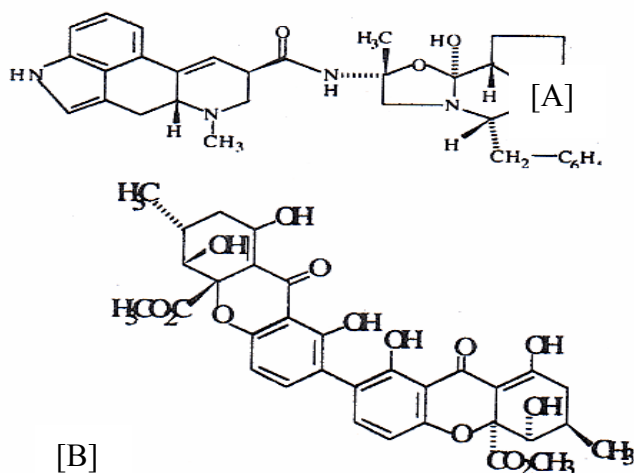
Hình 8.11: Cấu trúc của hai loại độc tố nấm điển hình Aflatoxin B₁ và roquefortin

1. Tình hình nghiên cứu về độc tố nấm

Cho đến giữa những năm 1980 người ta đã biết tới trên 300 độc tố nấm, chúng có thể xếp thành 25 kiểu cấu trúc và do khoảng 350 loại nấm khác nhau tạo thành. Hình 8.10 trình bày hai loại độc tố nấm điển hình, aflatoxin B₁ và roquefortin. Độ độc của hai loại chất độc nổi tiếng là asen và paration cũng được nêu ra để tiện so sánh.

Penicillium roqueforti, nấm sợi sản sinh roquefortin, thường được sử dụng để chuẩn bị nhiều loại phomat màu lam. Cũng may là hàm lượng roquefortin có trong phomat màu lam thông thường rất thấp (< 7ppm) cho nên liều lượng gây chết đối với người trưởng thành chỉ đạt được sau khi đã ăn 200 kg loại phomat này.

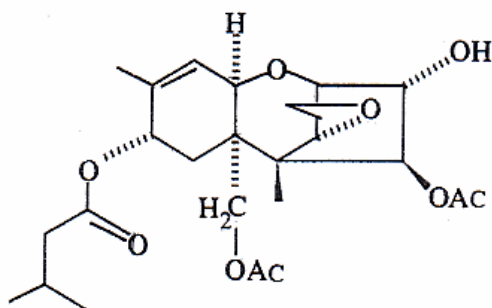
Có thể tìm thấy từ các loại nấm sợi gặp trong thực phẩm của người các độc tố nấm mang trên 20 loại hoạt tính khác nhau, chúng thường xuyên đe dọa tính mạng con người và nhiều trong số chúng gây nên bệnh ung thư. Theo tính toán của Tổ chức Quốc tế về Ung thư thì 80% các bệnh ung thư là do các yếu tố môi trường gây ra, trong số đó độc tố nấm có một vai trò quan trọng. Con người bị đe dọa bởi các độc tố nấm theo hai cách. Thứ nhất, con người tiêu thụ trực tiếp các nguyên liệu bị nhiễm nấm sinh độc tố. Thứ hai, thông qua thịt, sữa và trứng của các động vật ăn phải thức ăn bị nhiễm các khuẩn lạc nấm, con người hấp thu độc tố nấm có trong các thực phẩm này, đặc biệt là trong gan và thận động vật là những nơi độc tố nấm được tích lũy. Gây xuất huyết, nhiễm trùng, giảm hồng cầu, teo tủy sống, kìm hãm tổng hợp protein



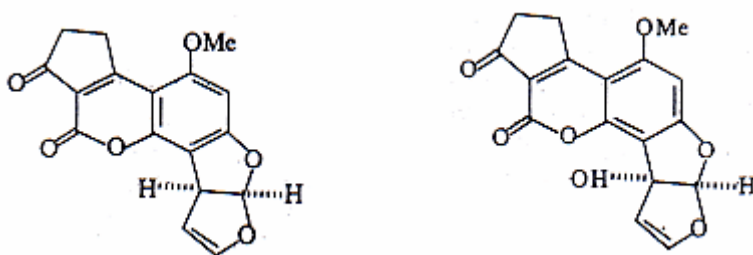
Hình 8.12: Bệnh nấm cựa: độc tố và phương thức tác dụng

[A]Ecgotamin LD₅₀(IV, chuột nhắt) 62mg/kg, co mạch ngoại vi, hoại thư và hoại tử chân tay

[B] Acid secalonic A LD₅₀(IV, chuột nhắt) < 50mg/kg, hoại tử gan.



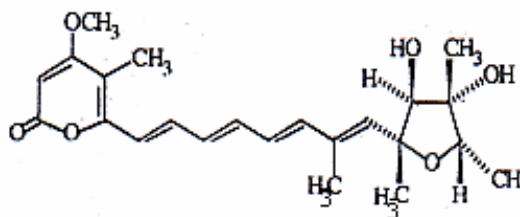
Hình 8.13: Độc tố T-2 (*Fuarium culmorum*)



Aflatoxin B₁(*A. flavus*)

Aflatoxin M₁ (Sữa của các động vật mà thức ăn của chúng có chứa Aflatoxin B₁)

Hình 8.14: Bệnh do aflatoxin ở người: độc tố, nguồn gốc và phương thức tác dụng



Hình 8.15: Citreoviridin

(*P. citreoviride*, *A. terreus*) gây khó thở, buồn nôn, nôn mửa ngừng thở, kim hãm tổng hợp ATP ở ti thể

2. Cấu trúc, hoạt tính sinh học và các bệnh do độc tố nấm gây ra

Là loại sản phẩm bậc hai điển hình gặp trong tự nhiên, các độc tố nấm tồn tại dưới rất nhiều dạng cấu trúc và có đặc tính hóa học đa dạng. Chẳng hạn

monoliformin do *Fusarium moniliforme* sinh ra có cấu trúc đơn giản, rất dễ tan trong nước và có độc tính cao, còn penitrem A do *Penicillium crustosum* sinh ra gây nên bệnh run lại có cấu trúc rất phức tạp và kỵ nước.

Bệnh nấm cựa

Việc làm sáng tỏ cấu trúc của các độc tố nấm được bắt đầu với tác nhân gây bệnh nấm cựa, một bệnh do độc tố nấm gây ra đã được biết từ thời kỳ rất xa xưa. Bệnh này do một loài nấm sợi, *Claviceps purpurea* gặp trên các bông lúa gây ra, ở đó chúng tạo thành các phần xơ cứng thường được gọi là cựa gà. Bằng cách đó, chúng thâm nhập vào các ngũ cốc dùng làm bánh mì và gây nên các dịch ngộ độc gặp ở Châu Âu từ thời Trung cổ. Các nghiên cứu hóa học trong vòng trên 100 năm gần đây đã làm sáng tỏ được hai nhóm độc tố nấm - đó là các alcaloid của nấm cựa gà (ergotamin) và các ergocrom (acid secalonic)

Bệnh mắt bạch cầu do nhiễm độc thức ăn (ATA)

Đây là một bệnh nghiêm trọng khác do độc tố nấm gây ra, nguyên nhân là do một loài nấm sợi mọc trên ngũ cốc. Bệnh này được đặc trưng bởi sự phá hủy dần dần hệ thống tạo máu chịu trách nhiệm đối với sự tạo thành các tiểu thể hồng cầu và bạch cầu. ATA bắt đầu bằng sự phá hủy da, xuất huyết, viêm, và nhiễm trùng. Trong các giai đoạn cuối, tuỷ sống bị teo đi và lượng hồng cầu và bạch cầu bị giảm mạnh. Tỷ lệ tử vong do bệnh này gây ra có thể lên tới 60%. Bệnh này được xác định là một bệnh do độc tố nấm gây ra nhờ các nghiên cứu về vụ dịch nổ ra năm 1944 ở Uran thuộc miền Nam nước Nga trải rộng trong một vùng dài trên 500 km. Thực phẩm đã bị nhiễm các loài *Fusarium* sinh độc tố, bọn này tổng hợp loại độc tố nấm "kiểu T2" (hình 8.12). Độc tố T2 kìm hãm sự tổng hợp protein theo một cơ chế giống như cơ chế của khí mù tạt chứa nitơ. Vì rằng đại diện đầu tiên của nhóm độc tố nấm này được phân lập từ *Trichothecium roseum* nên chúng cũng được gọi là "tricothecen". Cho đến nay trên 50 tricothecen đã biết làm thành một trong những nhóm độc tố nấm quan trọng nhất. Đặc biệt, ở các vùng khí hậu nhiệt đới tricothecen là một mối nguy hiểm đối với dân cư trong vùng, rõ rệt nhất là trường hợp đã xảy ra ở Campuchia vào những năm 1980.

Bệnh do các aflatoxin

Đây là bệnh dịch thứ ba có nguyên nhân từ độc tố nấm được nhận ra sau bệnh nấm cựa và ATA và là bệnh nguy hiểm nhất. Ngay sau khi các aflatoxin của loài nấm sợi *Aspergillus flavus* được xác định là nguyên nhân của "bệnh X ở gà tây", hàng loạt nghiên cứu đã được tiến hành nhằm xác định xem các loại độc tố nấm hoạt lực cao này có gây nên các bệnh nhiễm độc ở người hay không. Điều này đòi hỏi một chương trình sàng lọc

toàn diện và phức tạp. Chẳng hạn, sự hấp thu aflatoxin đã được xác định bằng cách phân tích một số lượng lớn các mẫu thực phẩm thu thập từ thị trường và các gia đình. Từ đó đã thiết lập được một mối tương quan mang tính thống kê quan trọng về tỷ lệ mắc bệnh ung thư gan và việc hấp thu aflatoxin.

Tỷ lệ mắc bệnh ung thư gan bình thường là hai trường hợp trên 100.000 dân trong một năm. Tỷ lệ này quan sát được ở những vùng cao nguyên khí hậu khô, nơi có thể tương đối dễ dàng giữ thực phẩm không bị nhiễm mốc và do vậy hàm lượng aflatoxin của chúng nằm ở mức độ thấp. Sự hấp thu aflatoxin hàng ngày ở các vùng này nằm dưới 5 mg/kg thể trọng. Nếu sự hấp thu hàng ngày đối với aflatoxin tăng gấp đôi tới 10 mg/kg, như trong trường hợp ở các vùng thấp có độ ẩm cao hơn của Kenya thì tỷ lệ mắc bệnh ung thư gan trung bình sẽ tăng 100%. Mặc dù ở các mức độ hấp thu aflatoxin cao hơn, tỷ lệ mắc bệnh ung thư không tăng theo tỷ lệ thuận, song hiệu quả của các độc tố này vẫn biểu hiện rõ rệt.

Giống như trường hợp ung thư gan người ta cũng quan sát được một mối tương quan tương tự giữa việc hấp thu aflatoxin và tỷ lệ mắc bệnh "xơ gan thiếu niên" gặp ở Ấn Độ. Mặc dù người ta đã tìm thấy nhiều loại mycotoxin trên các loại nông sản khác nhau, song chỉ có một số hạn chế, chẳng hạn các aflatoxin và ochratoxin, là có khả năng gây ung thư. Một số khác, chẳng hạn các mycotoxin do các loài *Fusarium* và *Alternaria* sinh ra thì có thể gây đột biến trên một số cơ thể, song hiệu quả gây ung thư của chúng thì chưa được xác định. Do hiệu quả gây ung thư mạnh và hay gặp trên thực phẩm và thức ăn gia súc, AFB₁ là một trong những mycotoxin được nghiên cứu nhiều nhất.

Aflatoxin gồm một loạt chất trao đổi có tác dụng độc và gây ung thư do *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* sinh ra trên đồng ruộng và trong quá trình bảo quản một số nông sản quan trọng như lạc, hạt bông ngô, lúa, hạt bầu bí, hạt hướng dương và hạt của các loại quả hạch. Trong số gần 20 aflatoxin đã biết, người ta quan tâm nhiều nhất đến aflatoxin B₁ và aflatoxin M₁, chất này cũng là một tác nhân gây ung thư.

Aflatoxin M₁ là một sản phẩm hiđroxyl hóa được tạo thành trong trao đổi chất của các động vật có vú mà trong thức ăn của chúng có chứa aflatoxin B₁. Aflatoxin trong sữa bò có thể là nguyên nhân của bệnh xơ gan trầm trọng gặp ở các trẻ em ở Ấn Độ và châu Phi. Cơ chế tác dụng của các aflatoxin với sự tham gia của một 15, 16-epoxit và cytochrom P-450 hiện đang được nghiên cứu mạnh mẽ.

Mặc dầu AFB₁ gây nên cả hiệu quả cấp tính (ngộ độc gan) lẫn mạn tính (ung thư gan) song hiệu quả gây ung thư mới là điều đáng lo ngại

nhất. Khi thí nghiệm trên chuột đực Fischer người ta đã phát hiện ra rằng 10% số chuột thí nghiệm đã bị ung thư gan khi chúng được cho ăn thức ăn chỉ chứa $1\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁ trong một khoảng thời gian là 2 năm.

Nguy cơ tiềm tàng của các aflatoxin đối với sức khỏe con người đã dẫn đến việc hình thành nhiều chương trình có quy mô quốc tế nhằm giám sát sự có mặt của độc tố này trong các loại lương thực ở hầu hết các nước trên thế giới. Liều lượng cho phép đối với aflatoxin tổng số nằm vào khoảng từ 0 đến 50 phần tỷ (ppb). Đa số các nước điều chỉnh ở mức 20 ppb. Riêng đối với AFM₁, liều lượng cho phép nằm giữa 0 và 0,5 ppb và do vậy, thức ăn cho bò sữa cũng phải được điều chỉnh sao cho hàm lượng aflatoxin tổng số thấp hơn các loại thức ăn khác.

Bệnh "beriberi tim"

Loại bệnh độc tố nấm thứ tư là do độc tố của loài nấm *Penicillium citreoviride* mọc trên lúa thuộc vùng Đông Á, polyen lacton citreoviridin gây ra. Bệnh này có tên là "beriberi tim" vì triệu chứng của nó giống như bệnh beriberi xuất hiện khi thiếu vitamin B₁. Bệnh này mở đầu bằng những sự rối loạn chức năng của tim rồi tiến triển dần thành khó thở, buồn nôn và nôn. Beriberi tim đã từng gây những vụ dịch trong dân cư vùng Đông Nam Á cho đến lúc mà nguyên nhân của nó được phát hiện và được loại trừ về cơ bản nhờ việc ngăn ngừa lúa khỏi bị nhiễm nấm. Trước đó, chẳng hạn vào năm 1908, chỉ riêng ở Nhật đã có trên 10000 người chết vì bệnh "beriberi tim". Dưới những điều kiện nhất định có thể khắc phục được hiệu quả của citreoviridin, mà tác dụng của nó rõ ràng là có liên quan tới sự kìm hãm quá trình tổng hợp ATP ở ti thể, bằng cách tiêm vitamin B₁.

Cho đến gần đây người ta cho rằng citreoviridin chỉ gặp ở nấm lúa Đông Nam Á, tuy nhiên, vào năm 1980, độc tố nguy hiểm này và hai độc tố nấm khác có cấu trúc tương tự cũng đã được phát hiện ở loài nấm sợi *Aspergillus terreus* sống trong đất, trên ngũ cốc, và trên các nguyên liệu chứa đường. Citreoviridin của *A. terreus* có thể được sinh ra với một nồng độ rất cao, tới 2% trọng lượng khô của sợi nấm.

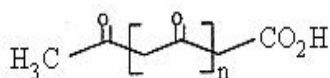
Việc phát hiện ra *Aspergillus terreus* sản sinh các độc tố nấm cũng mang một ý nghĩa quan trọng vì nấm này thường được dùng trong sản xuất các sản phẩm công nghiệp, chẳng hạn acid itaconic. Một trường hợp nấm có ích khác cũng đồng thời sản sinh độc tố nấm là trường hợp của *Aspergillus niger* vẫn được sử dụng để sản xuất acid citric. Nấm này tổng hợp một nhóm các độc tố có cấu trúc cyclopeptide, chẳng hạn malformin A có cấu trúc lập thể. Trong những trường hợp này, sản phẩm lên men có ích phải được thuần khiết đặc biệt khỏi các độc tố nấm.

3. Sinh tổng hợp

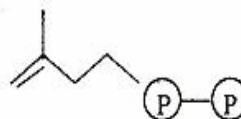
Các viên gạch cấu trúc cơ bản

Hiện nay người ta biết rằng sự sinh tổng hợp trên 300 độc tố nấm đã biết đều dựa vào một số rất ít các viên gạch cấu trúc cơ bản được trình bày trên hình 8.16. Các decaketid chứa từ hai đến mười đơn vị acid acetic là những hợp chất có tầm quan trọng đặc biệt và các độc tố nấm có hoạt tính sinh học rộng đều có thể được xây dựng từ các polyketid này theo các phương thức cực kỳ linh động. Ngoài ra, nhiều độc tố nấm cũng được tạo thành từ một mình isopentenyl pyrophosphate hoặc từ những tổ hợp của hợp chất này với tryptophan và các acid amin khác.

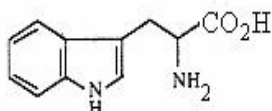
Một trong những đặc điểm đặc trưng của sự sinh tổng hợp các độc tố nấm là, không giống các sản phẩm có nguồn gốc vi sinh vật khác như các chất kháng sinh, *đường* không được sử dụng như các tiền chất hoặc viên gạch cấu trúc cho sinh tổng hợp.



Polyketid



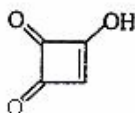
Isopentenyl pyrophosphate



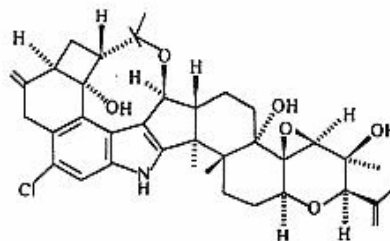
Tryptophan

không chứa đường !

Hình 8.16: Các viên gạch cấu trúc quan trọng nhất trong sinh tổng hợp độc tố nấm.



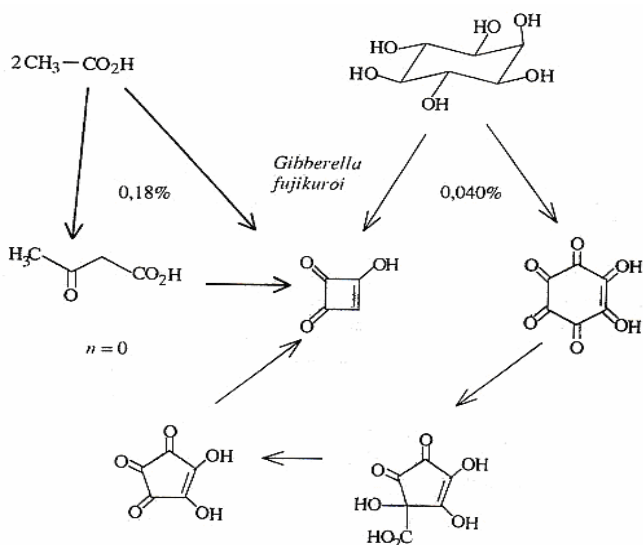
[A]



[B]

Hình 8.17: Cấu trúc của moniliformin (*Fusarium moniliforme*) [A] và penitrem (*Penicillium crustosum*) [B]

Sinh tổng hợp moniliformin Cho đến gần đây người ta vẫn cho rằng tetraketit là thành viên đầu tiên của loạt sản phẩm tự nhiên được tạo thành từ sự vòng hóa các poliketid. Tuy nhiên, những thực nghiệm đánh dấu mới đây đã cho thấy một diketit cũng có thể tác dụng như một tiền chất trong sinh tổng hợp một độc tố nấm rất đơn giản về mặt cấu trúc là moniliformin (hình 8.18).

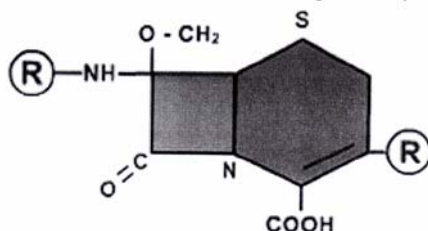


Hình 8.18: Các con đường sinh tổng hợp moniliformin

Moniliformin lần đầu tiên được Cole và ctv tách ra (1973) và Springer và ctv làm sáng tỏ về mặt cấu trúc (1974), được tạo thành ở nồng độ cao (tới 33g/kg) bởi loài nấm *Fusarium moniliforme* rất thường gặp trên các thức ăn chứa ngô. Lượng độc tố này đủ giết chết 200000 con gà trống non. *Fusarium moniliforme* và *Gibberella fujikuroi* chỉ sản sinh moniliformin trên môi trường rắn chứa ngô. Trên môi trường này nấm sinh trrởng rất mạnh và chuyên hóa toàn bộ và nhanh chóng cơ chất thành hệ sợi nấm màu trắng. Sự sinh tổng hợp moniliformin từ acetate có thể diễn ra qua malonyl CoA và 1,3-butandion (hình 8.18). Sự oxi hóa nhóm methylene phản ứng của 1,3-butandion có thể dẫn đến một hợp chất trung gian được viết dưới các dạng hồ biến, chất này sau đó sẽ bị mất nước để tạo thành moniliformin.

Câu hỏi ôn tập chương 8

1. Hình sau trình bày cấu trúc của một chất kháng sinh thuộc họ β -lactam



a. Tên của chất kháng sinh này là gì, do vi sinh vật nào sinh ra ? Về mặt cấu trúc, nó giống và khác các penicillin ở chỗ nào ?

b. Đích tấn công của các chất kháng sinh thuộc họ β -lactam là gì ? Nó khác với đích tấn công của các aminoglycoside (như streptomycin), các macrolide (như rifamycin, erythromycin) hay các tetracyclin ở chỗ nào ?

c. Trình bày cơ chế tác dụng của các chất kháng sinh thuộc họ β -lactam; cơ chế này giống và khác với cơ chế tác dụng của vancomycin ở chỗ nào ?

d. Phân biệt chất kháng sinh với sulfa. Sulfa tấn công lên đâu ? Các quinolone là gì và tấn công lên đâu ?

e. Việc thay đổi các chuỗi bên (gốc R) của cephalosporin có thể tạo cho chất kháng sinh này những tính chất mới nào ? Cephalosporin thế hệ 3 khác với Cephalosporin thế hệ 1 ở đặc điểm quan trọng nào ?

2. Phân biệt penicillin bán tổng hợp với penicillin tự nhiên và penicillin sinh tổng hợp. Các

penicillin bán tổng hợp có những ưu thế gì nếu đem so sánh với các penicillin tự nhiên ?

3. Bạn vừa tìm ra được một chất kháng sinh mới, nhưng chưa biết chắc chắn đó là một chất ức khuẩn, một chất diệt khuẩn và chất tiêu khuẩn.

a. Phân biệt chất ức khuẩn, chất diệt khuẩn và chất tiêu khuẩn.

b. Làm thế nào để xác định chất vừa tìm ra là chất ức khuẩn, diệt khuẩn hay tiêu khuẩn ?

4. Mycotoxin là ngoại độc tố hay nội độc tố ?

a. Cho ví dụ về ngoại độc tố và nội độc tố.

b. Nêu những điểm khác biệt chính giữa ngoại độc tố và nội độc tố ở vi khuẩn (quan hệ tế bào-độc tố, nguồn gốc, bản chất hóa học, tính bền nhiệt, tính độc, tính kháng nguyên, khả năng chuyển thành giải độc tố).

Chương 9

Các sản phẩm chuyển hóa

Một trong những phát hiện có ý nghĩa quan trọng của vi sinh vật học công nghiệp là việc nhận thức được rằng vi sinh vật có thể được sử dụng để thực hiện các phản ứng hoá học đặc biệt vượt ra ngoài khả năng của hoá học hữu cơ. Quá trình sử dụng vi sinh vật cho mục đích này có tên là sự *chuyển hoá sinh học*, nó bao gồm sự sinh trưởng của vi sinh vật trong những nồi lên men lớn theo sau là sự bổ sung hoá chất cần được chuyển hoá tại một thời điểm thích hợp. Tiếp tục lên men thêm một thời gian nữa để vi sinh vật tác động lên hoá chất rồi tách chiết dịch lên men, và cuối cùng sản phẩm mong muốn được tinh khiết. Mặc dù về nguyên lý chuyển hoá sinh học có thể được sử dụng cho nhiều quá trình khác nhau song trong thực tế nó chỉ được ứng dụng để sản xuất một số hormone nhất định.

I. Sự chuyển hóa các steroid

Việc sử dụng vi sinh vật để thực hiện những sự chuyển hoá steroid có ý nghĩa rất lớn trong công nghiệp dược phẩm. Steroid hormones điều chỉnh những trạng thái trao đổi chất khác nhau ở động vật kể cả ở người. Một trong những hormone đó, cortisone, có tác dụng làm giảm cơn đau có liên quan đến bệnh viêm khớp. Các dẫn xuất cortisone khác làm dịu các triệu chứng liên quan đến các bệnh dị ứng hoặc viêm.

Nhiều loại steroid hormones điều chỉnh hoạt động giới tính ở người trong đó một số đã được sản xuất thành dạng thuốc uống để tránh thụ thai. Các đặc tính sinh lý của một steroid phụ thuộc vào bản chất và vị trí chính xác của các thành phần hoá học nằm trên cấu trúc vòng của steroid gốc.

Vào đầu những năm 1930, Kendall ở Trường Đại học Tổng hợp Basel đã tách được cortisone, một steroid do tuyến thượng thận tiết ra. Khoảng một thập kỷ sau Hench chỉ ra rằng việc uống cortisone có thể làm dịu cơn đau ở các bệnh nhân bị bệnh viêm khớp.

Nhu cầu thực tế của hormone trở nên cấp bách và các phương pháp hoá tổng hợp steroid được phát triển vì thị trường tiềm tàng là rất lớn. Tuy nhiên, hoá tổng hợp khá phức tạp yêu cầu tới 37 bước trong đó nhiều bước xảy ra dưới các điều kiện cực trị. Cortisone tổng hợp được theo con đường này trị giá 200 đôla một gam.

Một trong những điều phức tạp chủ yếu gặp trong hoá tổng hợp cortisone là việc phải đưa một nguyên tử oxygen vào một vị trí trong cấu trúc steroid 4 vòng được gọi là vị trí 11; đây là bước quyết định trong việc tạo nên hoạt tính sinh lý của phân tử.

Vào năm 1952, Peterson và Murray thuộc hãng Upjohn đã phát hiện ra rằng nấm mốc mọc trên bánh mì *Rhizopus arrhizus* có khả năng hydroxyl hoá progesterone, một steroid khác, bằng cách đó đưa một nguyên tử oxygen vào vị trí 11. Progesterone là một tiền chất trong hoá tổng hợp cortisone, và bằng phương pháp hydroxyl hoá nhờ vi sinh vật (trong công nghiệp thường dùng các chủng họ hàng với *R. arrhizus*) việc tổng hợp đã được rút ngắn từ 37 xuống 11 bước. Nhờ vậy giá thành giảm xuống còn 6 đôla một gam.

Sự hydroxyl hoá progesterone mang lại hiệu quả kinh tế do đã rút ngắn được sự tổng hợp hoá học. Sự lên men có thể thực hiện ở 30°C với nước là dung môi và ở áp suất của khí quyển. Các phản ứng dưới các điều kiện này rẻ hơn nhiều so với các phản ứng diễn ra dưới các điều kiện cực trị về nhiệt độ và áp suất và dung môi không phải là nước như trong hoá tổng hợp cortisone. Đến nay đã có một số quá trình khác ứng dụng vi sinh vật để tổng hợp công nghiệp các steroid. Nấm *Cunninghamella blakesleana* cũng có khả năng hydroxyl hoá steroid cortesolon để tạo thành hydrocortisone nhờ việc gắn oxygen vào vị trí số 11. Những sự chuyển hoá nhân steroid khác do vi sinh vật thực hiện bao gồm sự hydro hoá, sự loại hydro, sự epoxygent hoá, và sự loại hoặc thêm các chuỗi bên (hình 9.1).

Các steroid ít có ý nghĩa thương mại là các corticosteroid như cortisone, hydrocortisone (hình 9.2, hình 9.3), prednison và dexametazon, kích tố tính đực testosterone và hormone động dục estradiol (hai loại sau dùng cho các loại thuốc tránh thụ thai) và spironolacton (thuốc lợi tiểu).

Nguyên liệu dùng cho tất cả các quá trình trên là các loại rượu phức tạp có tên là các sterol. Có hai nguồn sterol thông thường : Sản xuất dầu đậu tương để lại một chất thải giàu stigmasterol và sitosterol; rễ của cây barbasco ở Mêhicô chứa diosgenin. Ngoài ra, có thể sử dụng ergosterin lấy từ nấm men hoặc các steroid sản xuất thuần túy bằng con đường tổng hợp.

Nhiều vi sinh vật có khả năng thực hiện các phản ứng chuyển hoá steroid. Tuy nhiên điều quan trọng là chúng có thể tiến hành phản ứng với tốc độ chuyển hoá cao, hiệu suất lớn và không tạo thành sản phẩm phụ hay không. Do yêu cầu này mà số chủng có thể sử dụng cho công nghiệp bị

thu hẹp lại rất nhiều. Để hydroxyl hóa người ta sử dụng xạ khuẩn và nấm (đặc biệt là *Fusarium* và các loài *Curvularia*).

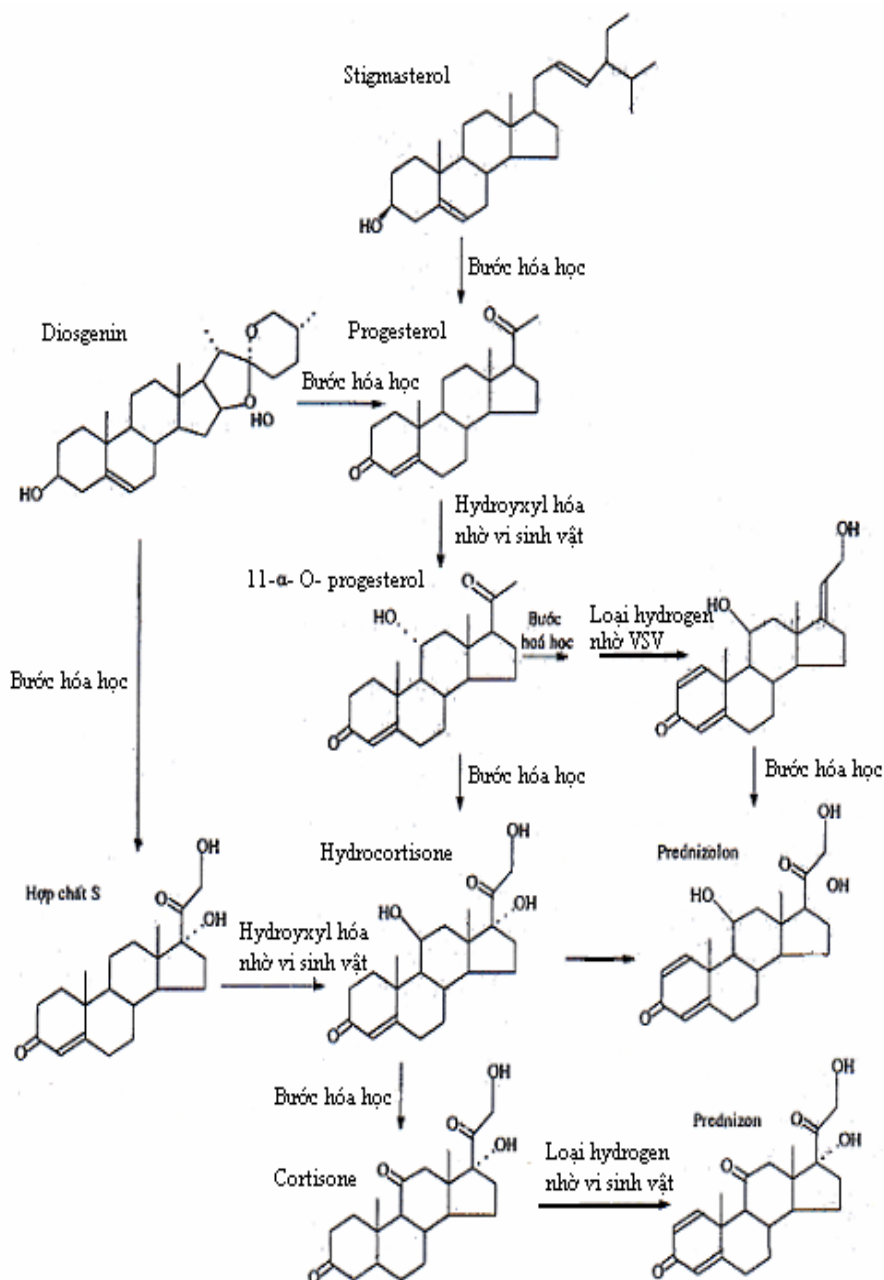
Để hydroxyl hoá vị trí 11- α của progesterone, thay cho hệ sợi nấm người ta dùng bào tử trần của *Aspergillus olivaceus*. Việc hydro hoá được tiến hành với các loài *Saccharomyces*, *Streptomyces* và *Rhizopus*. Để loại hydro người ta dùng các vi khuẩn như *Corynebacterium* và nấm (*Fusarium*, *Calonectria*, *Cylindrocarpon*) còn để cắt vòng có thể dùng *Penicillium chrysogenum* hay *Pseudomonas testosteroni* chứa một steroidizomerase đặc hiệu.

Trong một quá trình chuyển hoá steroid điển hình, vi sinh vật trước hết được đưa vào một môi trường thích hợp không chứa steroid. Người ta thường sử dụng các nồi lên men nhỏ (10-50m³). Thường vào cuối pha sinh trưởng logarit thì steroid mới được đưa vào với nồng độ 0,05-0,1%. Vì các steroid tan yếu trong nước nên người ta dùng các dung môi hữu cơ hoà tan được trong nước (như methanol, propylenglycol, dimetylsulfoxygent) làm chất hoà tan trung gian.

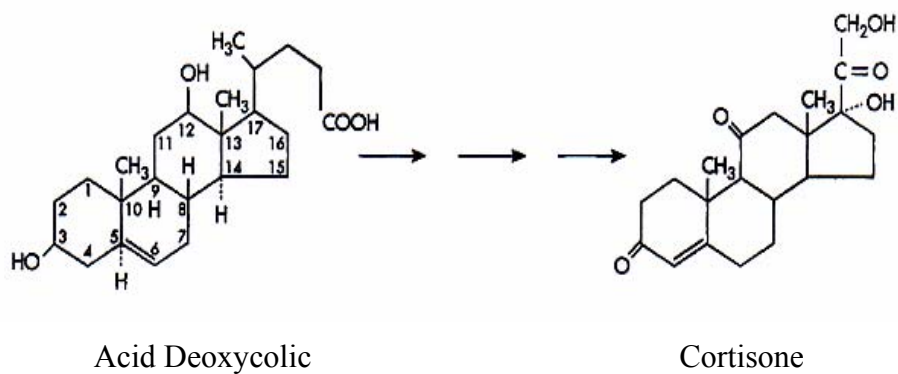
Thời gian chuyển hoá kéo dài từ 6 đến 48 giờ, thông thường thì quá trình được kết thúc sau 20 giờ bằng cách tách tế bào và chiết sản phẩm. Hiệu suất đạt được là 60-95%. Các sản phẩm của phản ứng nằm bên ngoài tế bào.

Việc theo dõi phân tích sự chuyển hoá để xác định thời gian lên men cực thích giữ vai trò rất quan trọng, vì nếu vượt ra ngoài thời gian đó sẽ xảy ra các phản ứng kế tiếp không mong muốn. Nếu không chế tốt thì có thể tiến hành hai phản ứng chuyển hoá mong muốn kế tiếp nhau trong cùng một nồi lên men. Chẳng hạn 6 α -fluo-21-acetoxigen-16 α -methyl-4-pregnen-3,20-dion trước hết được hydroxyl hoá ở vị trí 11 α nhờ *Aspergillus ochraceus* và sau đó cũng trong môi trường ấy nhờ bổ sung *Bacillus lentus* mà lại được loại hydro ở vị trí 1,2.

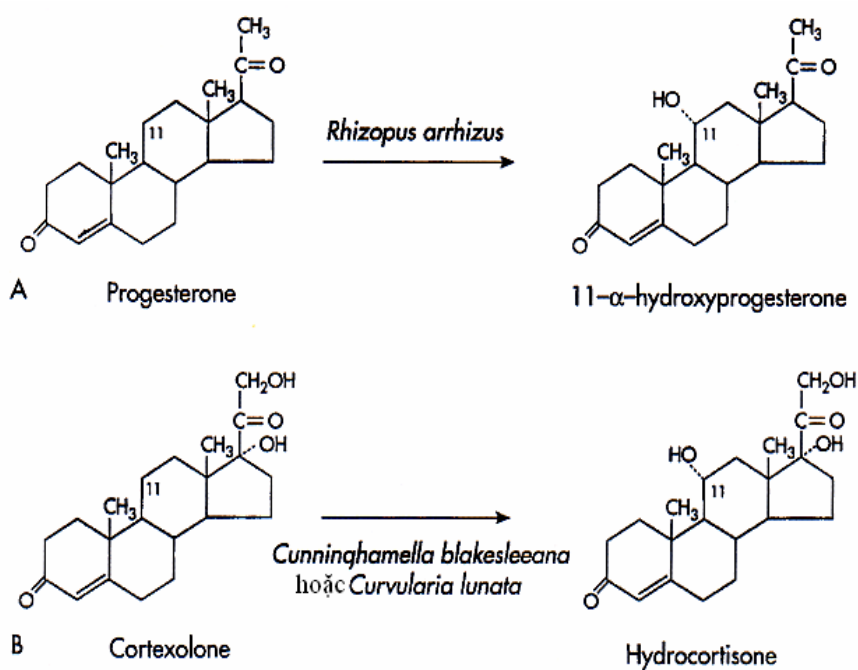
Vào năm 1980 giá cortisone ở Mỹ đã chỉ còn 46 cent một gam, rẻ hơn 400 lần so với giá ban đầu. Việc tìm được các ứng dụng khác của các steroid (dùng cho tránh thụ thai, bệnh thiếu hormone, các bệnh về da, viêm và dị ứng) cùng với tính hiệu quả cao của phương pháp sản xuất đã tạo ra một nhu cầu cấp thiết đối với các loại dược phẩm này. Doanh thu 4 loại steroid chính (cortisone, aldosteron, prednison và prednisolon) trên thị trường thế giới vào năm 1987 là 300 triệu đô la.



Hình 9.1: Sản xuất steroid bằng các biện pháp hoá học kết hợp với sự chuyển hoá vi sinh vật



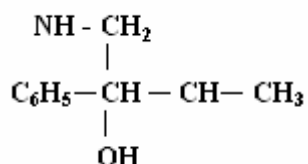
Hình 9.2: Cortisone được tổng hợp từ deoxycolic acid



Hình 9.3: Sự sản xuất 11 α -hydroxyprogesterone và hydrocortisone

II. Sự tạo thành phenyl-acetylcacbinol, tiền chất của ephedrin

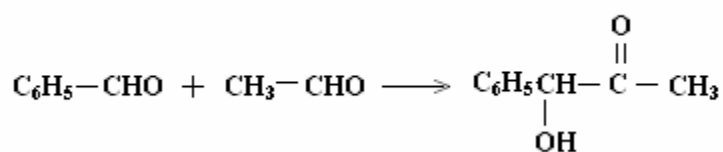
Ephedrin là một alcaloit có trong cây *Ephedra vulgaris*. Giống như adrenalin, nó có tác dụng làm tăng huyết áp và được dùng làm thuốc để điều trị các bệnh suy nhược tuần hoàn, hen, viêm phế quản v.v. .. Cấu tạo hoá học của nó như sau :



Tách chất này từ thực vật là một công việc tốn kém. Hoá tổng hợp nó cũng khó thực hiện bởi vì do hai nguyên tử C không đối xứng của phân tử mà xuất hiện bốn đồng phân lập thể trong đó chỉ có dạng L là có dược tính.

Nhờ *Saccharomyces cerevisiae* mà benzaldehyde có thể được chuyển hoá thành phenyl-acetylcacbinol, tiền chất của ephedrin, với hiệu suất 50-60% khi được bổ sung vào môi trường chứa một nồng độ tế bào là 0,8- 1% .

Trong sản phẩm chuyển hoá này, nhóm hydroxyl nằm ở cùng vị trí như trong L-ephedrin. Trong phản ứng này, các tế bào nấm men gắn "acetaldehyde hoạt động" được tạo thành trong sự đường phân vào benzaldehyde vừa bổ sung vào môi trường (phản ứng cacboligase):



Benzaldehyde

"Acetaldehyde hoạt động"
acetylcacbinol

L-phenyl-

Sau đó phenyl-acetylcacbinol được chuyển thành L-ephedrin bằng con đường hoá học nhờ một sự kết hợp hydro amin hoá.

III. Sản phẩm từ vi khuẩn acetic

Trong sự oxygen hoá ethanol thành acid acetic, chuyển hoá thực chất là một sự sử dụng cơ chất. ở đây, NADPH₂ xuất hiện được chuyển qua chuỗi hô hấp để thu nhận năng lượng, song cơ chất không bị phân giải

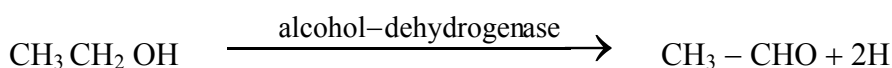
hoàn toàn do vậy quá trình cũng còn được gọi là sự oxygen hoá không hoàn toàn. Loại chuyển hoá này có thể trải qua nhiều bước.

Các đại diện của vi khuẩn acetic (*Acetobacter*, *Gluconobacter*) oxygen hoá không chỉ ethanol mà cả một phổ rộng các rượu bậc một và rượu bậc hai cũng như các polyol.

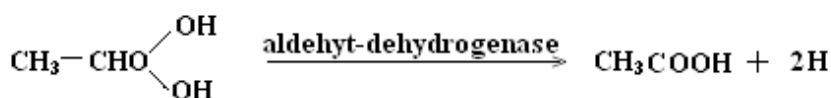
Các loài vi khuẩn mà sản phẩm của chúng được giữ lại được gọi là các loại oxygen hoá thấp (*suboxygendant*). Thuộc về nhóm này có vi khuẩn acetic dùng trong công nghiệp là *Acetobacter suboxygendans*. Các loài chỉ tích lũy acid acetic tạm thời sau đó lại oxygen hoá tiếp được xếp vào nhóm oxygen hoá cao (*peroxygendant*), chẳng hạn *Acetobacter peroxygendans*, *Acetobacter pasteurianum*). Giữa hai nhóm này có các dạng chuyển tiếp.

1. Sản xuất dấm ăn

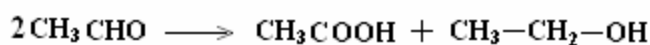
Các phản ứng được dùng để sản xuất dấm ăn nhờ *Acetobacter suboxygendans* là :



Sau sự hydrat hoá axetaldehyde sẽ diễn ra một sự loại hydro lần thứ hai :



Hydro được NADP nhận và qua các xitocrom được chuyển đến O_2 là chất nhận điện tử cuối cùng. Sự tạo thành acid acetic đòi hỏi cung cấp oxygen mạnh. Khi thông khí không đầy đủ có thể xảy ra sự hoá hai của axetaldehyde thành acid acetic và ethanol theo phương trình sau đây (phản ứng Canizzaro) :



Ethanol lại đi vào phản ứng thứ nhất và cuối cùng cũng được oxygen hoá thành acid acetic.

Ethanol hoặc acid acetic không thể được dùng làm nguồn cacbon duy nhất vì người ta không tìm thấy các enzyme cần thiết của chu trình glyoxylate ở *Acetobacter xylinum*. Vì vậy để sinh trưởng vi khuẩn cần được bổ sung các nguồn C khác như glucose.

Sự cung cấp oxygen có tính chất quyết định đến kỹ thuật sản xuất dấm. Trước kia quá trình được tiến hành bằng phương pháp nuôi bề mặt nhờ một lớp váng của *Acetobacter xylinum* (phương pháp Orléans), trong đó vi khuẩn được cố định trên các vỏ bào gỗ giẻ. Vỏ bào đựng trong một thùng gỗ hình trụ (generator) được thông khí từ phía dưới và tưới các dung dịch chứa rượu (ví dụ các loại rượu vang kém phẩm chất) từ phía trên (hình 9.4).

Ngày nay các phương pháp chìm ngày càng có ý nghĩa hơn. Hiện tại người ta dùng các nồi lên men đặc biệt (acetator) được thông khí rất mạnh trong đó dịch dinh dưỡng được thay thế từng phần bằng dịch dinh dưỡng bổ sung cũng đã được thông khí đầy đủ.

Sau khi ethanol đã được chuyển hoá thành acid acetic, phần lớn dịch dinh dưỡng trong nồi được lấy đi và thay thế vào đó là dịch dinh dưỡng mới. Nhờ đó có thể đạt được một phương thức giống như nuôi cấy liên tục.

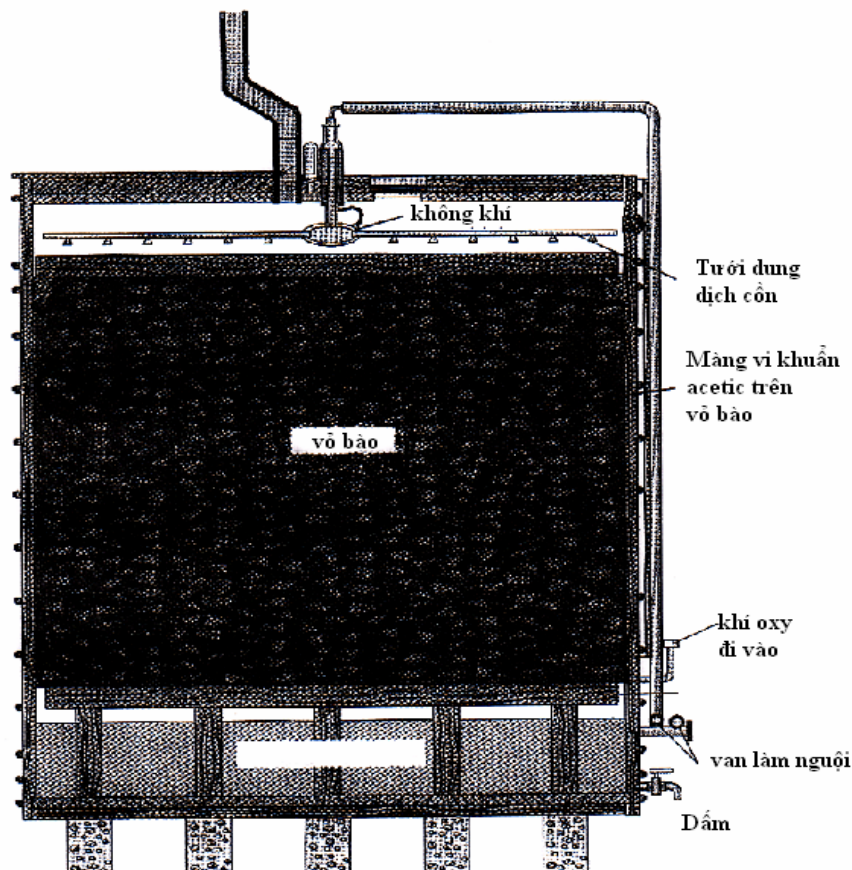
Quá trình lên men được tiến hành nhờ các chủng chọn lọc của *Acetobacter suboxygendans* trong một dịch dinh dưỡng chứa glucose với 10-12% ethanol. Ethanol gần như được chuyển toàn bộ thành acid acetic. Nồng độ acid acetic cao nhất đã đạt được là 13%. Quá trình diễn ra ở 28-30°C và kéo dài khoảng 48 giờ. Trong phương pháp cổ điển Orléans, sự lên men kéo dài tới 5 tuần lễ. Trong các phương pháp hiện đại với nồng độ rượu hoặc acid acetic cao là 12%, thì một sự ngừng thông khí từ 10 đến 20 giây sẽ làm chết tới một phần ba số vi khuẩn. ở những nồng độ cơ chất thấp hơn, sự phụ thuộc vào oxygen không đến nỗi khắt khe tới như vậy.

Vi sinh vật oxygen hóa ethanol thành acid acetic thường được gọi là các vi khuẩn acetic, các vi khuẩn này thực hiện trao đổi chất ở pH môi trường thấp, điều này phân biệt chúng với các vi khuẩn khác.

Các vi khuẩn acid acetic là bọ đa hình, tế bào từ hình elip tới hình que thẳng hoặc hơi cong $0,5-0,8 \times 0,9-4,2 \mu\text{m}$, đứng một mình, thành cặp hoặc thành chuỗi có dạng không chuyển động và dạng chuyển động với tiên mao ở cực hoặc vòng quanh cơ thể. Chúng là bọ hiếu khí bắt buộc, một số tạo thành sắc tố, một số tạo thành cellulose. Người đầu tiên tìm cách phân loại các vi khuẩn acid acetic là Hansen (1894).

Ngày nay các vi khuẩn acid acetic mới phân lập được xếp vào hai chi chính, *Acetobacter*, *Gluconobacter*. Các loài của *Acetobacter* (trên 60) chứa 5 đặc điểm: có mặt catalase, oxygen hóa ethanol qua acid acetic tới CO_2 và H_2O , oxygen hóa lactate thành cacbonate, oxygen hoá glycerol

thành DHP và sự sản sinh acid gluconic từ glucose. Các vi khuẩn trong chi *Acetobacter* thường được chia thành bốn nhóm : oxygen hoá mạnh, oxygen hoá, oxygen hoá trung bình và oxygen hoá yếu.



Hình 9.4: Thiết bị sản xuất dấm theo phương pháp cổ điển

IV. Sản xuất vitamin C (acid L-ascobic)

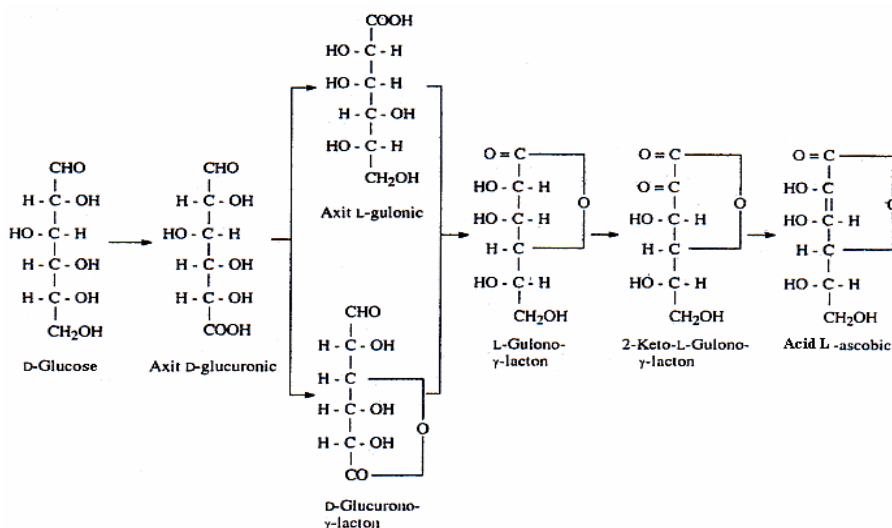
Đa số động vật tổng hợp được toàn bộ lượng vitamin C cần thiết cho nhu cầu của mình và do vậy vitamin này được tìm thấy trong các mô của chúng (chủ yếu trong gan và thận với nồng độ 10-40 mg/100g). Tuy nhiên, người và một số động vật có xương sống cũng như côn trùng lại phụ thuộc hoàn toàn vào nguồn vitamin C từ bên ngoài. Chủ yếu là rau (bắp cải, spinat, cà chua, 30-150 mg/100g) và quả (cam, chanh, 40-50mg/100g). đã cung cấp cho con người lượng vitamin C cần thiết (45-70 mg/ngày).

Một số vi sinh vật (nấm, nấm men, tảo) sản sinh một lượng rất nhỏ acid L-ascorbic cần cho các quá trình trao đổi chất của chúng. Cho đến nay chưa tìm thấy acid ascorbic ở vi khuẩn, hình như chúng không cần acid này.

Ở động vật có vú (trừ lợn linh trưởng và một số khác) acid L-ascorbic được tổng hợp từ D-glucose trong đó C¹ của glucose trở thành C⁶ của acid ascorbic và ngược lại. Sự tổng hợp diễn ra từ D-glucose tới acid D-glucuronic và sau đó thành lacton của acid L-gulononic.

Sự oxy hoá sau đó của gulonolacton ở vị trí C², được xúc tác bằng L-gulonolacton dehydrogenase, một enzyme không tìm thấy ở người, theo sau là sự enol hóa sẽ cho acid L-ascorbic (hình 9.5). ở thực vật, acid L-ascorbic được tạo thành từ D-glucose hay D-galactose qua một số con đường chuyển hóa.

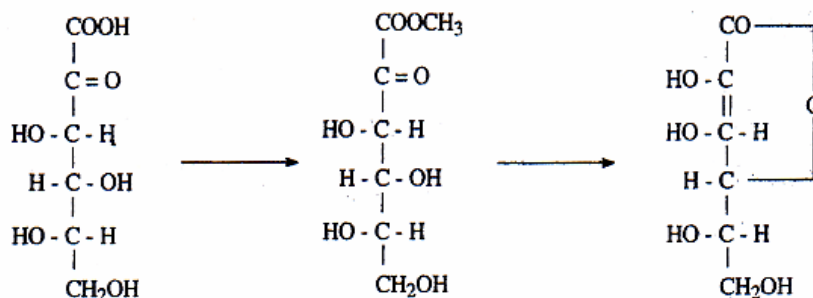
Một trong những con đường này giữ không làm cho trật tự của chuỗi carbon bị thay đổi, song các sản phẩm trung gian của con đường sinh tổng hợp thì còn chưa biết rõ. Có thể con đường này cũng giống con đường tổng hợp ở động vật.



Hình 9.5: Con đường sinh tổng hợp acid L-ascorbic

Từ trên 50 năm nay, công nghiệp đã có thể đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về vitamin C của con người nhờ phương pháp bán tổng hợp từ glucose. Nhiều quá trình hoá học và sinh hóa kế tiếp nhau tham gia vào quá trình này và tất cả đều qua một sản phẩm trung gian là acid 2-keto-L-

gulonic, từ đó sẽ thu được acid L-ascorbic nhờ con đờng hoá học bằng cách lacton hoá và đồng phân hoá (hình 9.6).



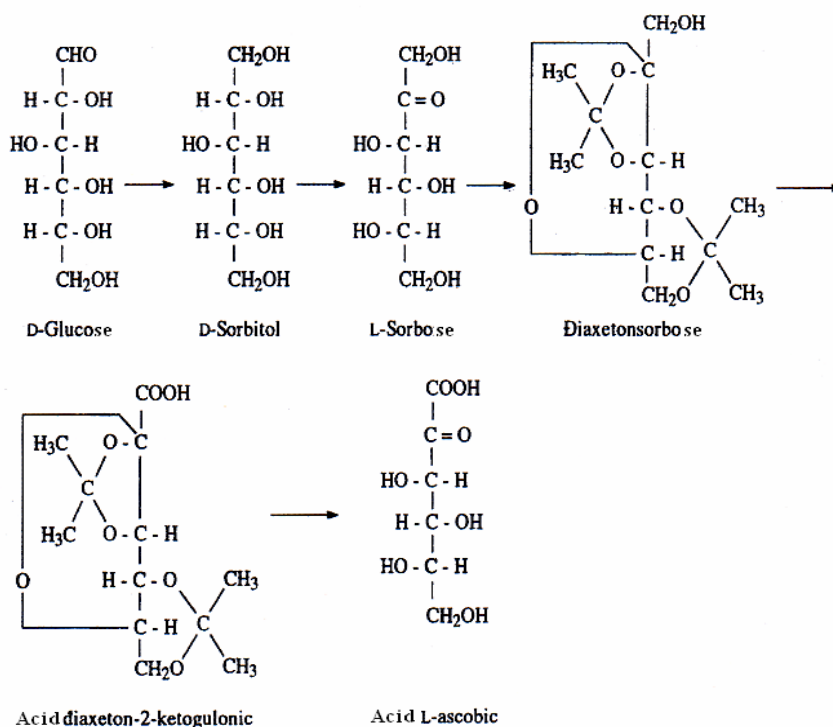
Acid-keto-Lgulonic Methyl-2keto-Lgulonate Acid L-ascobic

Hình 9.6: Sự chuyển hoá hoá học acid 2-keto-L-gulonic thành acid L-ascobic

Các quy trình chuẩn bị acid 2-keto-L-gulonic có thể được xếp thành hai nhóm: (1) nhóm bắt đầu bằng sự khử D-glucose và làm đảo ngược trật tự cacbon, và (2) nhóm bắt đầu bằng sự oxygen hóa D-glucose trong đó không có sự đảo ngược chuỗi cacbon.

1. Các quy trình bắt đầu bằng sự khử D-glucose

Quy trình công nghiệp này được Reinstein và Gruessner đề ra từ năm 1934 và đến nay vẫn còn sử dụng. Nó bao gồm 5 bước phản ứng kế tiếp nhau, tất cả đều đạt sản lượng tới 90-95% (hình 9.7)



Hình 9.7: Sự tổng hợp acid 2-keto-L-gulonic từ D-glucose qua D-sorbitol và L-sorbose

1. Khử D-glucose thành D-sorbitol với sự có mặt của niken Raney, sau đó loại tới mức tối đa niken hòa tan bằng cách xử lý dung dịch sorbitol với nhựa cation.

2. Oxygen hóa D-sorbitol thành L-sorbose nhờ vi sinh vật : có nhiều chủng *Acetobacter* chịu được nồng độ niken tới 10-20 mg/l, thực hiện nhanh chóng phản ứng này trong các môi trường chứa nồng độ sorbitol cao. Quá trình lên men diễn ra ở 30°C trong một môi trường chứa 200 g/l sorbitol, 10 g/l cao ngô, và 0,5 g/l CaCO₃ với một chủng *Acetobacter suboxygendans* đã hoàn tất trong 24 giờ và cho khoảng 180g sorbose trong một lít. Sau khi lọc, loại ion và cô đặc dịch nuôi, sorbose được kết tinh (tới độ tinh khiết 99%)

3. Tạo thành diacetone-sorbose để bảo vệ các nhóm không tham gia vào giai đoạn sau.

4. Oxygen hóa hóa học diacetone-sorbose thành acid diacetone-2-keto-L-gulonic.

5. Giải phóng acid diacetone-2-keto-L-gulonic nhờ thủy phân.

Giữa những năm 1960 và 1975 nhiều cơ sở nghiên cứu của Mỹ và Nhật đã tìm cách giảm số bước trong quy trình Reinstein bằng cách oxygen hóa trực tiếp D-sorbitol hay L-sorbose nhờ một kỹ thuật vi sinh vật thành acid 2-keto-L-gulonic khi sử dụng các chủng *Acetobacter* và *Pseudomonas*. Tất cả những nghiên cứu này đều không cho kết quả khả quan, năng suất ít khi vượt quá 5 g/l trong các điều kiện tốt nhất với một sản lượng vào khoảng 10% so với sản phẩm ban đầu. Vào năm 1981, các nhà nghiên cứu Trung Quốc cho biết đã sản xuất được 37 g/l acid 2-keto-L-gulonic từ 100 g sorbose khi sử dụng một chủng *Gluconobacter oxygendans*. Đây là một sự cải thiện đáng kể so với các kết quả trước đó.

2. Các quy trình bắt đầu bằng sự oxygen hóa D-glucose

Hai con đường đã được nghiên cứu : (1) cái gọi là con đường acid L-idonic bắt đầu bằng sự oxygen hóa glucose ở vị trí cacbon số 5 ; (2) con đường acid 2,5-diketo-D-gluconic.

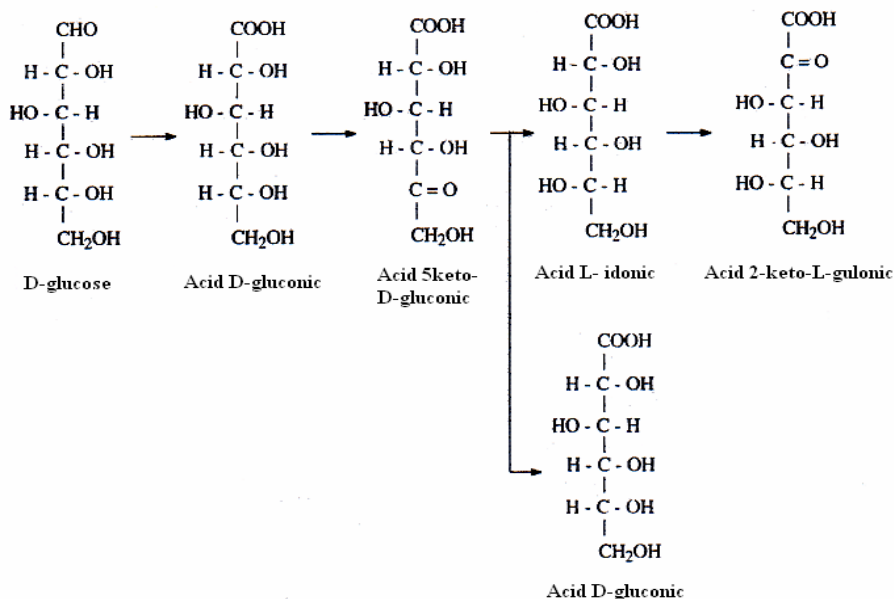
a) Con đường acid L-idonic

Con đường này gồm ba bước kế tiếp nhau : (1) oxygen hoá sinh hóa học D-glucose thành acid 5-keto-D-gluconic qua acid D-gluconic ; (2) khử hóa học (hoặc sinh hóa học) acid 5-keto-D-gluconic thành acid L-idonic ; (3) oxygen hóa sinh hóa học acid L-idonic thành acid 2-keto-L-gulonic (hình 9.8).

Phản ứng đầu tiên dễ dàng được thực hiện bởi *Acetobacter suboxygendans*. Chủng

ATCC 621 đã chuyển hóa 100 g/l glucose trong 33 giờ với một sản lượng là 90%. Một số phương pháp đã được đề ra nhằm khử acid 5-keto-D-gluconic. Trong thực tế, chỉ có phương pháp hoá học do Grey đề xuất (1947) là có giá trị. Trong phương pháp này, sự khử đạt được nhờ sự hydro hoá có xúc tác dưới áp lực và không may là dẫn đến việc tạo thành hai đồng phân, acid L-idonic và acid D-gluconic theo những tỷ lệ tương đối mà trong các điều kiện tốt nhất thì là 70 và 30%. Hai phương pháp loại acid D-gluconic vừa tạo thành đã được chú ý : (1) nhờ lên men với *Acetobacter suboxygendans*, nó có thể bị oxygen hóa trở lại thành acid 5-keto-D-gluconic, chất này sau đó sẽ được quay vòng, hay (2) hỗn hợp có thể được lên men với một vi sinh vật (*Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Acetobacter melanogenus*), bọn này sử dụng acid D-gluconic để sinh trưởng và phân giải nó hoàn toàn cùng một lúc với việc chuyển hoá acid L-idonic thành acid 2-keto-L-gulonic. Bằng phương pháp này người ta

đã thu được những kết quả tốt : 67 g/l acid 2-keto-L-gulonic đã được tạo ra từ 100 g/l hỗn hợp chứa 70% acid L-idonic, song còn có những vấn đề kỹ thuật chưa được chấp nhận trên quy mô công nghiệp.

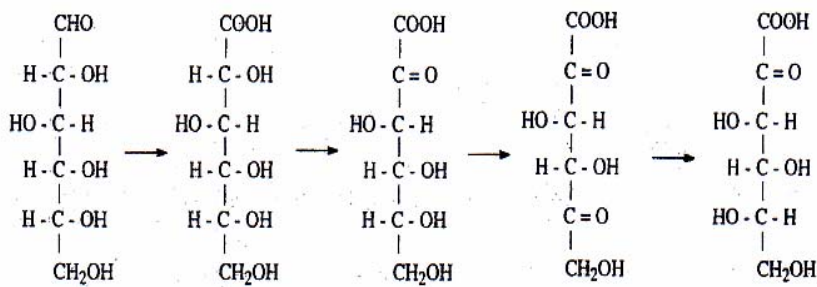


Hình 9.8. Sự chuyển hoá D-glucose thành acid 2-keto-L-gulonic qua acid L-inonic

b) Con đường acid 2,5-diketo-D-gluconic

Con đường này , chủ yếu được nghiên cứu từ năm 1970, gồm hai bước sinh hoá học : (1) oxygen hóa D-glucose thành acid 2,5-diketo-D-gluconic qua acid D-gluconic và acid 2-keto-D-gluconic ; (2) khử acid 2,5-diketo-D-gluconic thành acid 2-keto-L-gulonic (hình 9.9).

Bước một không gặp trở ngại gì nghiêm trọng. Ngay từ năm 1974 các nhà nghiên cứu Nhật Bản đã cho biết về một năng suất 220 g/l 2,5-diketo-D-gluconat canxi đạt được từ 200 g/l glucose sau 3 ngày lên men nhờ *Acetobacter fragi*. Vào năm 1982 các nhà nghiên cứu ở Shionogi đã sử dụng : (1) cho bước một, một thể đột biến của *Erwinia* có khả năng sản xuất 328 g/l 2,5-diketo-D-gluconat canxi trong 26 giờ; (2) trong bước hai, họ đã sử dụng một chủng đột biến của *Corynebacterium* tạo ra 106 g/l 2-keto-L-gluconat canxi trong 66 giờ.

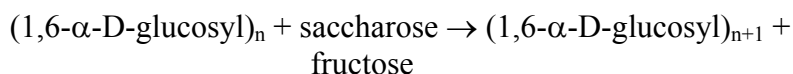


gluconic được tạo ra sau 57 giờ trong một môi trường chứa 20 g/l glucose). Vì rằng sự sinh tổng hợp acid L-ascorbic ở động vật đã được biết rõ, người ta hy vọng một ngày nào đó sẽ có thể đưa các gen mã cho các enzyme có liên quan vào một vi sinh vật thích hợp để cuối cùng có thể thu nhận vitamin C trực tiếp từ glucose.

V. Sản xuất destran

Đa số các polysaccharide ngoại bào từ vi sinh vật đều là sản phẩm của sự chuyển hóa nội bào cơ chất thành các sản phẩm trung gian, và cuối cùng thành polime. Destran khác các polysaccharide này, cơ chất không thâm nhập vào tế bào vi sinh vật mà nó được chuyển hóa bên ngoài tế bào thành α -D-glucan phân nhánh, tức là destran. Chỉ có saccharose được dùng làm cơ chất cho phản ứng này.

Như vậy, polysaccharide có thể được sản xuất bởi các tế bào nguyên vẹn trong môi trường nuôi hoặc có thể được tạo ra từ các chế phẩm phi tế bào chứa phức hệ enzyme destransaccharase (α -1,6-glucan : D-fructose 2-glucosyltransferase). Enzyme này giải phóng fructose và chuyển gốc glucose lên một phân tử chất nhận cũng đã được liên kết với enzyme :



Năng lượng tự do của liên kết glucoside trong phân tử disaccaride nằm vào khoảng 23 kJ trong khi năng lượng tự do của liên kết glucoside bên trong destran thấp hơn một chút (12-17 kJ). Do vậy phản ứng diễn ra theo chiều từ trái sang phải đi kèm với một sự giảm năng lượng tự do.

Trong quá trình polime hóa chuỗi destran đang dài ra vẫn liên kết chặt chẽ với enzyme, mức độ polime hoá tăng cho đến khi phân tử chất nhận (trong trường hợp đơn giản nhất là một phân tử cơ chất) giải phóng chuỗi polime khỏi enzyme.

Các thành viên thấp nhất của các oligosaccharide không phải là các phân tử chất nhận có hiệu quả, ái lực đối với enzyme tăng dần theo độ dài chuỗi. Tuy nhiên, sự hạn chế về độ khuếch tán cũng tăng theo trọng lượng phân tử.

Bởi vậy, dưới các điều kiện thông thường, các destran có trọng lượng phân tử rất cao sẽ được tạo thành, đặc biệt ở các nồng độ cơ chất thấp.

Để sản xuất các destran có trọng lượng phân tử trung bình, cần phải tiến hành thủy phân các sản phẩm có trọng lượng phân tử cao (bằng acid

hoặc bằng enzyme) và phải phân đoạn sản phẩm dưới những điều kiện kiểm soát rất cẩn thận. Trong khi đó, các polime trọng lượng phân tử thấp và đồng nhất có thể được lấy ra dùng làm nguyên liệu ban đầu cho một phản ứng khác để sản xuất các destran có mức độ trùng hợp mong muốn.

Các nồng độ saccharose cao và có thể cả maltose khi được dùng làm nguyên liệu ban đầu sẽ tạo nên các điều kiện thuận lợi để tổng hợp các destran môi trọng lượng phân tử thấp và đồng nhất kiểu đó.

Destran được sản xuất bởi hàng loạt loài vi khuẩn, như *Streptobacterium destranicum*, *Streptococcus mutans* và các loài khác. *Streptococcus mutans* giữ một vai trò quan trọng trong bệnh sâu răng. Sản phẩm phụ thuộc cả vào chủng lẫn vào các điều kiện sử dụng cho sinh trưởng và tổng hợp polime. ở một số chủng, destransaccharase nằm ở dạng hòa tan trong khi ở các chủng khác, nó liên kết một phần hay hầu như hoàn toàn với tế bào. Sản xuất destran công nghiệp dùng *Leuconostoc mesenteroides* để tạo ra một polime chứa khoảng 95% liên kết α -1,6 (phần còn lại là liên kết α -1,3) và một trọng lượng phân tử là $4-5 \times 10^7$ dalton.

Các destran được sử dụng trong ngành dược để làm chất dẫn máu (chất thay thế huyết tương). Tuy nhiên những destran này phải có trọng lượng phân tử thấp nằm trong một phạm vi rất nhỏ (75000 ± 25000).

Các sản phẩm với trọng lượng phân tử thấp hơn được loại khỏi hệ tuần hoàn quá nhanh nên không có giá trị điều trị đầy đủ trong khi các sản phẩm có trọng lượng phân tử quá cao lại tham gia vào sự ngưng kết máu.

Các dung dịch chứa 6% loại destran này có giá trị về độ nhớt và tập tính keo-thấm thấu rất giống với huyết tương của người. Vì các destran không bị phân giải bởi các amylase trong cơ thể người nên khả năng phá hoại gan thấp hơn so với các chất thay thế huyết tương khác. Các destran được mô cơ thể hấp thụ rất tốt, do vậy có thể được sử dụng cho nhiều loại dược phẩm, chẳng hạn sắt trong khi điều trị bệnh thiếu máu.

Gần đây, người ta cho rằng destran có thể được sử dụng để tạo nên một lớp ưa nước ở trên bề mặt các vết bỏng rộng và hấp thụ các chất tiết từ các vết thương.

Trong việc sản xuất các destran, việc duy trì cung cấp oxygen giữ một vai trò quan trọng đặc biệt vì trong quá trình lên men dung dịch trở nên rất nhớt.

Hiện nay người ta chưa có khả năng tính toán mối tương quan giữa năng lượng khuấy trộn đưa vào và tốc độ chuyển động của oxygen trong

dung dịch với tập tính phi Newton của dịch lỏng nên trong đa số trường hợp người kỹ sư sinh học chỉ còn biết dựa vào kinh nghiệm của bản thân mình.

Môi trường lên men chứa các muối vô cơ, 2% cao ngô và saccharose. Sắt và mangan là những nguyên tố vết rất quan trọng. Dung dịch được khử trùng bằng sức nóng, được chuyển sang bề lên men và cấy giống sau khi đã làm lạnh.

Lên men được tiến hành ở 25°C, trong quá trình này, chủ yếu do sự tạo thành acid lactic, giá trị pH giảm từ 6,5-7,0 xuống còn 4,0. Dung dịch lên men được khuấy liên tục và thông khí.

Khi destran được tạo thành, dung dịch trở nên đậm đặc cho đến khi quá trình kết thúc sau 3 hay 4 ngày, một khối dạng keo sẽ được tạo thành. Dịch lên men chứa chủ yếu là destran, fructose tự do, acid lactic, etanol và các vi sinh vật. Destran sau đó sẽ được kết tủa bằng methanol. Dịch trong được chất lại và methanol được thu hồi bằng phương pháp cất.

Nếu lên men dẫn đến việc tạo thành các destran có trọng lượng phân tử cao thì chúng sẽ được thủy phân bằng acid chlohydric ở 100-105°C.

Sự hoàn tất thủy phân được xác định bởi độ nhớt. Sau một giai đoạn phản ứng nhất định, phản ứng lúc đầu được làm chậm lại bằng cách làm lạnh sau đó dừng lại hoàn toàn bằng cách bổ sung hydroxygenate natri.

Dung dịch được trộn với các yếu tố hấp phụ và lọc qua kizengua. Cuối cùng destran được kết tủa phân đoạn với methanol, các phân đoạn mong muốn sẽ được tái hòa tan, lọc, cô đặc và sấy phun. Vì rằng việc thủy phân bằng acid khó kiểm soát và việc phân đoạn thường không thu được các phần có thành phần mong muốn, nên người ta đã tìm cách tổng hợp trực tiếp các destran có trọng lượng phân tử thấp. Để làm điều này cần có kiến thức chắc chắn về động học của phản ứng.

Trọng lượng phân tử bị ảnh hưởng bởi : a) nồng độ của saccharose, b) chất nhận glucose, c) nhiệt độ phản ứng. Chẳng hạn khi vắng mặt một chất nhận, một dung dịch saccharose 10%, sẽ thu được một sản phẩm với một trọng lượng phân tử lớn hơn 108 dalton. ở nồng độ 70% saccharose, các phân tử destran chủ yếu có trọng lượng phân tử thấp sẽ được tạo thành. Nếu các destran trọng lượng phân tử thấp được đưa vào làm môi thì enzyme sẽ có nhiều điểm khởi đầu và các polime tương đối đồng nhất sẽ được tạo thành. Điều quan trọng là các tế bào vi khuẩn không chứa các vết của các destran có trọng lượng phân tử cao. Vì vậy nguyên liệu cấy phải được rửa vài lần bằng dung dịch muối để loại các destran bám vào.

Như vậy một hỗn hợp 2% (w/v) một chất nhận có trọng lượng phân tử thấp (1000-25000) với một nồng độ đường là 10% ở 15°C và pH 5,0 sẽ cho một sản phẩm mà 50% có trọng lượng phân tử trong phạm vi mong muốn giữa 50000 và 100000 dalton. Các dextran này được sử dụng trong bệnh viện và không bị phân giải bằng thủy phân.

Theo tính toán sản lượng dextran vào năm 1980 ở Tây Âu là 1000 tấn, và trên thế giới là 200.000 tấn. Trong khi hầu hết các polysaccharide ngoại bào được sử dụng dưới dạng không bị biến đổi về mặt hóa học thì dextran dùng cho ngành dược và nhiều mục đích khác lại được chuyển hóa thành các phân đoạn có trọng lượng phân tử tương đối thấp giữa 40000 và 70000 dalton nhờ các quy trình thủy phân thích hợp (thủy phân bằng acid loãng).

Thị trường chủ yếu của các dẫn xuất dextran dưới dạng các chế phẩm liên kết chéo chứa cấu trúc không gian ba chiều mà các nhóm chức năng được gắn vào đó nhờ các liên kết ete với các gốc glucose chính là các phòng thí nghiệm sinh hóa học.

Để sản xuất các loại gel cho mục đích sinh hóa, dextran có trọng lượng phân tử tương đối cao được dùng để tổng hợp các sản phẩm có tính thu hồi nước cao. Phản ứng với dextran trong dung dịch kiềm đã dùng epichlorohydrin để thu nhận gel, gel này sau đó được nghiền và trung hòa. Vì phản ứng giữa epichlorohydrin và polysaccharide là phản ứng tỏa nhiệt, cần chú ý để nhiệt tỏa ra được loại bỏ khỏi hệ thống.

Điều này là đặc biệt quan trọng vì gel được tạo thành trong phản ứng có tính dẫn nhiệt thấp. Vì các gốc đường khử tận cùng của các phân tử dextran có tính phản ứng capo và dễ bị phân giải trong phản ứng polime nên chúng bị khử thành sorbitol và borohydrin trong dung dịch kiềm trước khi bổ sung epichlorohydrin.

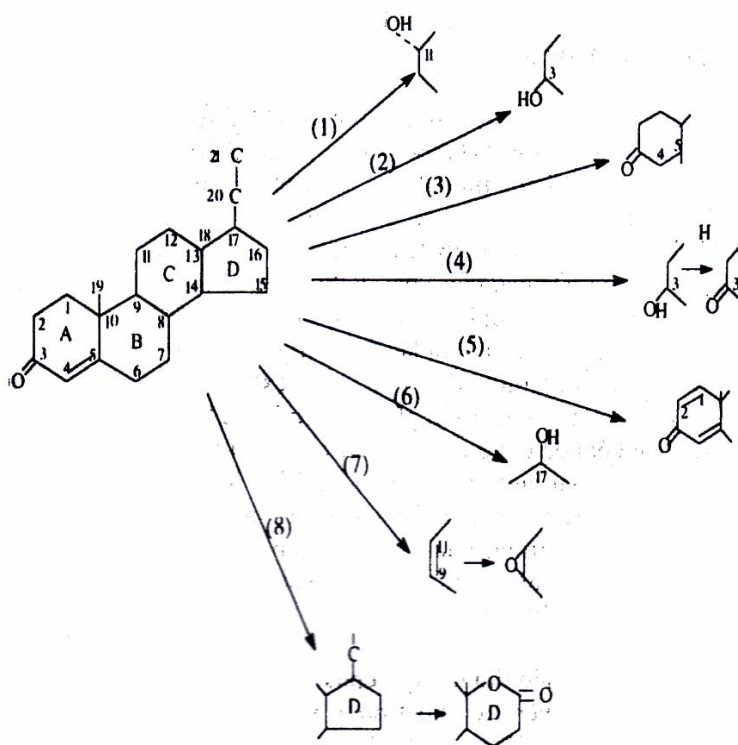
Mặc dầu các gel liên kết chéo thuộc loại sephadex bản thân chúng đã cực kỳ có ích trong việc phân đoạn các nguyên liệu hoạt động về mặt sinh học, song sự chuyển hóa chúng thành các dẫn xuất ete sẽ làm tăng giá trị tiềm tàng của chúng. Các ete carboxymethyl hay dimethylaminoethyl là những sản phẩm kiểu đó. Những hợp chất này khác biệt nhiều với các dextran liên kết chéo về tập tính trương của chúng trong dịch lỏng. Các sản phẩm có độ liên kết chéo khác nhau sẽ cho ra các chất hấp phụ có lỗ khác nhau và giới hạn phân đoạn khác nhau.

Việc đưa các nhóm hóa học khác vào các phân tử sẽ cho ra các chất hấp phụ mang đặc điểm ưa lipid. Chúng có thể được dùng để phân đoạn

các lipid, v.v. và có thể dùng trong dung môi lỏng cũng như trong các dung môi hữu cơ phân cực. Một số dextran khác được dùng làm các chất mang trong các quy trình nuôi cấy tế bào. Dưới dạng này (có tên thương mại do hãng dược phẩm AB của Thụy Điển đặt ra là Sephadex), dextran được ứng dụng rất rộng rãi để tách và thuần khiết các phân tử sinh học khác nhau về điện tích, về kích thước phân tử v.v.. Protein không bị biến tính bởi mạng lưới polime ưa nước và sự hấp phụ không đặc hiệu là rất thấp.

Câu hỏi ôn tập chương 9

1. Dựa vào sơ đồ sau đây, hãy nêu các nguyên tắc của sự chuyển hóa steroid:



2. Nêu các bước chính trong quá trình sản xuất một hormone steroid.

3. Phân biệt các vi khuẩn acetic peroxydant và suboxydant

4. Nêu sự khác biệt trong các phương pháp sản xuất nấm (Orleans, Spring, phương pháp chìm).

5. Nêu ứng dụng và nguyên tắc hóa học của sự tạo thành các dextran.

6. Một trong những điều phức tạp chủ yếu gặp trong hóa tổng hợp cortisone là.....

Đây là bước quyết định để tạo nên.....Trong vi sinh vật học công nghiệp, có thể dùng các vi sinh vật sau đây để thực hiện bước phản ứng này:

7. Destran được sản xuất công nghiệp nhờ.....Trong môi trường chứa saccharose, vi khuẩn này tiết ra enzyme.....có chức năng

Chương 10

Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học

I. Vi sinh vật học của các nguồn nước uống

Những vụ dịch tả mới đây ở Nam Mỹ đã làm chết hàng ngàn người, và một vụ dịch mới bùng nổ ở Wisconsin do *Cryptosporidium* gây ra ảnh hưởng tới 370.000 người đều có nguyên nhân từ các nguồn nước uống bị nhiễm bẩn. Trong nhiều khu dân cư trên thế giới, sự thiếu nước sạch đã dẫn đến hàng tỉ ca tiêu chảy và cướp đi khoảng hai triệu trẻ em mỗi năm. Chỉ tính riêng ở Mỹ hàng năm cũng đã có gần một triệu người mắc các bệnh có nguyên do từ nước bẩn.

Nước sạch (nước uống được) được định nghĩa là nước không chứa các tác nhân gây bệnh, các độc tố hoà tan, có độ đục, mùi, màu và vị khó chịu. Rõ ràng là, để có được nước sạch không phải là điều dễ dàng và ở đây, vi sinh vật vừa là nguyên nhân vừa là giải pháp của vấn đề.

Do thường xuyên tiếp xúc với không khí, đất cũng như các dòng chảy của các hệ thống thoát, nước bề mặt luôn luôn thu nhận các vi sinh vật hoại sinh có hại. Thêm vào đó, nó cũng tiếp nhận cả các vi sinh vật gây bệnh. Các vi sinh vật gây bệnh nổi bật nhất của nước thường gặp trong thời gian gần đây là : các động vật nguyên sinh *Giardia* và *Cryptosporidium*, các vi khuẩn *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, và *Mycobacterium*, các virut viêm gan A và Norwalk. Một số trong các tác nhân này (đặc biệt là các động vật nguyên sinh sinh bào nang) có thể tồn tại trong các thủy vực tự nhiên trong một thời gian dài ngoài cơ thể con người, trong khi một số khác chỉ tồn tại ở đó một cách tạm thời và nhanh chóng biến mất. Sự có mặt của vi sinh vật trong nước uống phải liên tục được giám sát để đảm bảo rằng nước không chứa các tác nhân lây nhiễm.

Vì rằng việc xác định một số tác nhân gây bệnh trong nước thường khá khó khăn và tốn thời gian, cho nên cách hay dùng nhất để xác định độ sạch của nước là phát hiện sự nhiễm bẩn bởi phân. Mức độ nhiễm phân cao có nghĩa là nước chứa nhiều tác nhân gây bệnh và do vậy không an toàn. Do vậy, các giếng, bể chứa nước, và các nguồn nước khác phải được theo dõi về sự có mặt của các *vi khuẩn chỉ thị*. Các vi sinh vật vốn không gây bệnh này là những kẻ ngụ cư trong đường ruột của chim và động vật có vú, chúng dễ dàng phát hiện được nhờ các phương pháp thông dụng vẫn dùng trong phòng thí nghiệm thông thường.

Các vi khuẩn đường ruột có ích nhất trong các biện pháp giám sát sự ô nhiễm của nước bởi vi sinh vật là các coliform và các liên cầu khuẩn đường ruột, chúng tồn tại trong nước nhưng không sinh sản được ở đó. Phát hiện được chúng với số lượng cao cũng có nghĩa là nước mới bị nhiễm phân hoặc bị nhiễm phân ở mức độ cao.

Các tiêu chuẩn của Cơ quan Bảo vệ môi trường (EPA) về độ vệ sinh của nước dựa chủ yếu vào hàm lượng các coliform, đây là các vi khuẩn gram âm, lên men đường lactose, sinh khí như *Escherichia coli*, *Enterobacter* và *Citrobacter*.

Sự nhiễm phân của nước biển thường dễ dẫn đến các bệnh đường ruột dạ dày do các cầu khuẩn gram dương gây ra, mà trước hết là các *Enterococcus*. Đôi khi, các thể thực khuẩn của coliform và các reovirut (virut Norwalk) cũng được dùng làm các vi sinh vật chỉ thị về độ nhiễm bẩn bởi phân, song sự phát hiện chúng khó hơn và đòi hỏi nhiều vấn đề kỹ thuật hơn.

1. Đánh giá chung về chất lượng nước

Trong kỹ thuật xác định hàm lượng vi khuẩn tổng số, một mẫu nước nhỏ được cấy lên bề mặt một môi trường rắn. Con số khuẩn lạc chỉ nói lên quần thể vi khuẩn sống sót tổng số có mặt mà không cho phép phân biệt được các coliform với các loài khác. Thông tin này đặc biệt có ích trong việc đánh giá hiệu quả của các bước làm sạch nước khác nhau. Một yếu tố chỉ thị khác đối với chất lượng nước là nồng độ oxy hòa tan. Nó chỉ ra rằng nước chứa nồng độ chất hữu cơ và vi khuẩn cao sẽ có hàm lượng oxy thấp vì oxy đã bị tiêu thụ cho hô hấp hiếu khí.

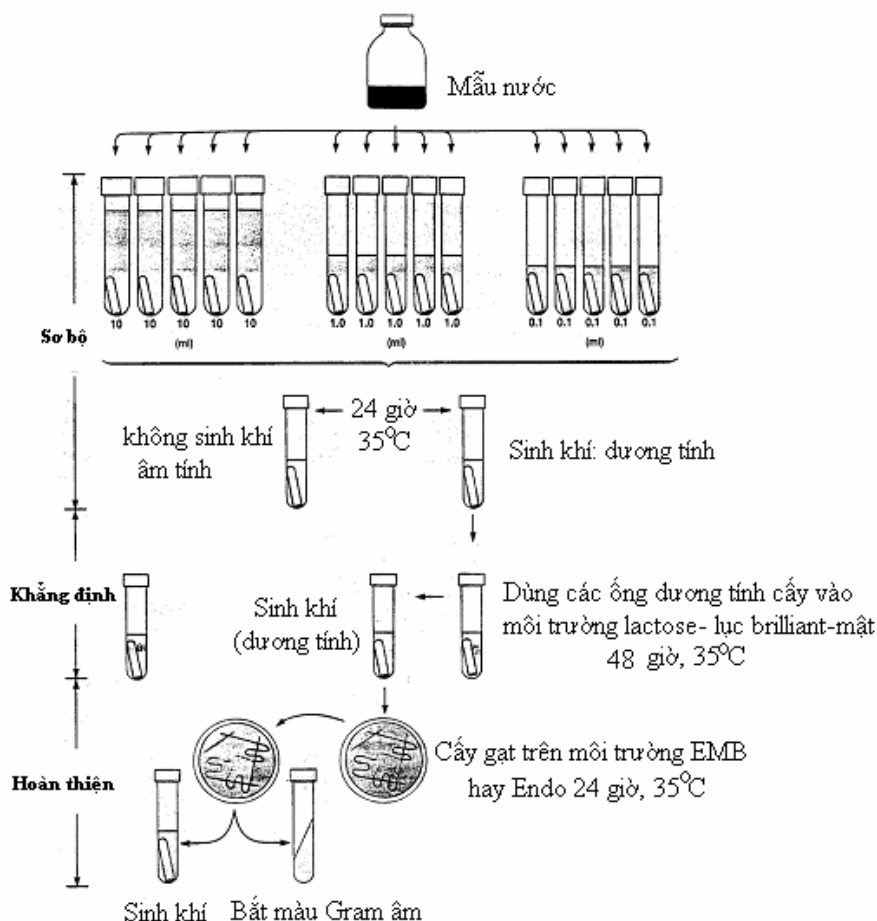
Đếm số lượng các coliform

Có hai phương pháp tiêu chuẩn dùng để phát hiện và xác định số lượng các coliform : xác định hàm lượng thường gặp nhất (MPN = most probable number) và phương pháp xác định qua màng lọc.

Trong kỹ thuật MPN, coliform được xác định bằng một loạt các phép thử : phép thử sơ bộ, phép thử khẳng định và phép thử hoàn thiện (hình 10.1).

Phép thử sơ bộ sử dụng 3 dãy ống nghiệm, mỗi dãy chứa những nồng độ canh thang lactose và lauryl khác nhau. Một dãy gồm 5 ống nghiệm trong chứa các ống Durham đặt ngược để thu khí sinh ra trong quá trình lên men. Ba dãy nói trên lần lượt được cấy 10, 1 và 0,1 ml mẫu nước. Sau khi giữ 24 giờ, các ống được đánh giá theo sự sinh khí. Kết quả dương tính về sinh khí sẽ là bằng chứng sơ bộ về sự có mặt của các coliform. Số ống dương tính sẽ được đếm và được dùng để tính số lượng thường gặp của coliform dựa theo

một bảng thống kê. Phép thử khẳng định được tiến hành bằng cách cấy mẫu dương tính vào một ống nghiệm khác. Phép thử sẽ được hoàn thiện nhờ phân lập các loài coliform trên các môi trường chọn lọc và phân hóa, nhuộm Gram và khẳng định lại việc sinh khí.



Hình 10.1: Quy trình xác định hàm lượng coliform tổng số (MPN) trong một mẫu nước.

Kỹ thuật MPN có một số nhược điểm. Trước hết nó cần vài ngày để thực hiện. Thứ hai, nó không phân biệt được các coliform thường gặp trong đất và nước (*Enterobacter*) với các coliform thuộc phân thật sự chủ yếu sống trong đường ruột của các động vật (*Escherichia*). Để xác định coliform thuộc phân đòi hỏi một phép thử đặc hiệu hơn chẳng hạn phép lọc qua màng.

Phương pháp lọc qua màng đòi hỏi ít bước và ít môi trường hơn, rẻ hơn, gọn nhẹ hơn, và có thể được tiến hành với một lượng nước lớn hơn.

Phương pháp này thích hợp để xác định các dịch lỏng loãng, như nước uống, chứa ít chất hạt, và không thích hợp lắm đối với nước chứa vi sinh vật sinh trưởng mạnh hoặc chứa các chất ức chế kim loại có thể liên kết với màng lọc. Sau khi lọc, màng lọc được đặt vào một đĩa Petri nhỏ chứa môi trường chọn lọc. Sau khi ủ, các coliform thuộc phân có thể được đếm và thông thường được xác định các đặc điểm khác biệt trên các môi trường này. Thường thì đối với các kỹ thuật xác định nhanh có tính đặc hiệu cao người ta dùng các cơ chất, mà khi có mặt các enzyme phân giải lactose chứa trong các coliform, sẽ giải phóng các chất màu vào môi trường.

Khi một phép thử cho kết quả âm tính về coliform thì nước được coi là thích hợp đối với người tiêu dùng. Tuy nhiên, ngay cả những nồng độ coliform thấp cũng có thể được chấp nhận trong một số hoàn cảnh. Chẳng hạn, nước thành phố có thể chứa tối đa 4 coliform trong 100 ml, các giếng tư nhân được phép chứa nhiều hơn. Đối với nước uống thì không cho phép chứa bất kỳ một nồng độ coliform, cầu khuẩn đường ruột, virus hay động vật nguyên sinh nào. Các thủy vực dùng để nuôi cá hay làm bể bơi được cho phép chứa từ 70 đến 200 coliform trong 100 ml. Nếu số coliform ở các bể nước dùng cho giải trí đạt tới 1000 con trên 1 ml thì các cơ quan y tế thường cấm sử dụng.

Xử lý nguồn nước

Hầu hết các nguồn nước uống đều được lấy về từ sông, hồ chứa nước, giếng. Chỉ ở những vùng núi cao hay vùng xa, kém phát triển thì các nguồn nước này mới được sử dụng trực tiếp. Tại đa số các thành phố, nước phải được xử lý trước khi cung cấp cho người tiêu dùng. Các nguồn nước như giếng sâu, thường tương đối sạch và không chứa các chất nhiễm bẩn, đòi hỏi xử lý ít hơn các nguồn nước bề mặt bị nhiễm nhiều chất thải.

Quá trình xử lý nước gồm nhiều bước. Trước hết nước được giữ trong các bể lớn vừa là nơi dự trữ vừa là bể sa lắng. Việc đưa nước vào các bể này phải được kiểm tra nghiêm ngặt để tránh bị nhiễm bẩn bởi xác động vật, chất thải và nước thải. Ngoài ra, sự sinh trưởng quá mức của vi khuẩn lam và tảo sẽ làm chất lượng nước xấu đi, cần được phòng ngừa bằng sulfate đồng (0,3 ppm). Quá trình sa lắng để loại bớt các hạt lớn cũng được thúc đẩy trong giai đoạn dự trữ.

Tiếp theo, nước được bơm vào các hồ hoặc bể, ở đó sẽ tiếp tục xảy ra sự sa lắng, sự thông khí và sự lọc. Nước trước hết được lọc qua đệm cát hoặc đất bột chứa nhiều tảo cát để loại vi khuẩn, virus và các động vật nguyên sinh, rồi qua than hoạt tính để loại các chất bẩn hữu cơ không mong muốn. Nước thu thập từ các hệ thống lọc này được đưa về các bể dự trữ qua các ống

dẫn. Bước cuối cùng trong xử lý nước là tẩy trùng hóa học bằng cách bơm bóng khí clo qua các bể cho đến khi đạt được nồng độ 1-2 ppm, song một số cơ sở xử lý nước ở các thành phố cũng sử dụng cloramin cho mục đích này. ở Mỹ, người ta cũng sử dụng cả ozon hoặc peoxyde cho giai đoạn tẩy trùng, song phương pháp này đòi hỏi giá thành cao và không giữ được hiệu quả kháng khuẩn cho một thời gian dài. Chất lượng cuối cùng của nước có thể khác nhau, song hầu hết nước máy đều hơi có mùi và vị do ảnh hưởng của giai đoạn tẩy trùng.

II. Xử lý nước thải

1. Đặc tính của nước thải

Nước thải, hay nước cống, là nguồn nước đã sử dụng của một cộng đồng và bao gồm :

1. Các chất thải sinh hoạt hòa trong nước, bao gồm phân người và các loại nước rửa đi từ các cống rãnh của các căn hộ và của cả thành phố đổ vào hệ thống cống.

2. Các chất thải công nghiệp hòa trong nước như acid, dầu, mỡ, chất hữu cơ có nguồn gốc động thực vật do các nhà máy thải ra.

3. Nước ngầm, nước bề mặt và nước khí quyển thâm nhập vào hệ thống nước thải.

Đặc tính lý, hóa học của nước thải

Nước thải chứa khoảng 99,9% nước. Lượng chất rắn lơ lửng trong nước thải nhỏ đến mức chỉ được tính bằng phần triệu (ppm); hàm lượng chất rắn của nước thải dao động từ vài ppm đến 100 ppm. Các thành phần hóa học, mặc dù có mặt ở nồng độ thấp song có ý nghĩa cực kỳ quan trọng và thay đổi về kiểu loại và số lượng tùy theo cộng đồng dân cư cũng như theo thời gian trong ngày. Các chất vô cơ có trong nước máy thường xuất hiện trong nước thải. Các hợp chất hữu cơ thường được bổ sung vào nước thải qua phân người và các chất thải sinh hoạt khác. Các chất thải công nghiệp bổ sung cho nước thải cả các hợp chất vô cơ lẫn hữu cơ. Chẳng hạn, các lò giết mổ, các nhà máy đường, xưởng bột giấy, xưởng sản xuất các sản phẩm sữa bổ sung các chất hữu cơ, công nghiệp hóa học và chế biến kim loại bổ sung các acid, muối kim loại và các chất thải kim loại vô cơ khác.

Kỹ nghệ hiện đại đang làm thay đổi đặc tính của nước thải. Bao gói dành cho rác thải sinh hoạt đã làm tăng hàm lượng hữu cơ tổng số trong nước thải. Việc các chất tẩy rửa thay thế phần lớn các loại xà phòng đã gây những

ảnh hưởng có hại cho quần thể vi sinh vật cần thiết cho việc xử lý hiệu quả nước thải .

Đặc tính vi sinh vật học

Nấm, động vật nguyên sinh, tảo, vi khuẩn và virut đều có mặt trong nước thải. Nước thải không xử lý có thể chứa tới hàng triệu vi khuẩn trong một mililit, bao gồm các coliform, các *Streptococcus*, các trực khuẩn kỵ khí sinh bào tử, nhóm *Proteus* và các loại khác bắt nguồn từ đường ruột của người . Các nguồn bổ sung vi sinh vật khác là nước ngầm, nước bề mặt và nước khí quyển cũng như các chất thải công nghiệp. Ngoài ra, tính hiệu quả của một quá trình xử lý nước thải còn phụ thuộc vào những sự biến đổi sinh hóa học do vi sinh vật tiến hành. Typ sinh lý của các vi sinh vật chiếm ưu thế tham gia vào các quá trình chuyển hóa này có thể thay đổi tùy theo từng giai đoạn của quá trình xử lý nước thải. Các điều kiện có thể dao động từ hiệu suất cao độ đến kỵ khí nghiêm ngặt.

Nhu cầu oxy sinh hóa

Nhu cầu oxy sinh hóa (biochemical oxygen demand - BOD) là lượng oxy hòa tan mà vi sinh vật đòi hỏi cho quá trình phân giải hiếu khí các chất hữu cơ có mặt trong nước thải. Một trong những nguyên nhân đầu tiên vì sao phải xử lý nước thải trước khi đưa nó trở lại các thủy vực tự nhiên là làm giảm yêu cầu về cung cấp oxy hòa tan cho phần nước nhận được. Mức độ BOD là một chỉ số nói lên lượng chất hữu cơ có trong nước thải; càng nhiều chất hữu cơ dễ oxy hóa có mặt, BOD càng cao. "Nồng độ" của nước thải được biểu hiện bằng mức độ BOD. Giá trị BOD cao có nghĩa là chất hữu cơ có mặt ở hàm lượng cao trong khi BOD thấp có nghĩa là chất hữu cơ dễ bị oxy hóa có mặt với hàm lượng thấp. Sự sống của bất kỳ một thủy vực nào cũng phụ thuộc rất nhiều vào khả năng của nó đối với việc duy trì một lượng oxy hòa tan nhất định cần thiết để duy trì sự sống của các thủy sinh vật trong thủy vực đó. Chẳng hạn, thiếu oxy cá sẽ bị ngạt thở và các sinh vật nước thông thường sẽ bị hủy hoại.

Các quá trình xử lý nước thải

Việc đưa nước thải không được xử lý đầy đủ vào sông hồ có thể dẫn đến một hoặc nhiều hậu quả không mong muốn sau đây:

1. Tăng khả năng lan truyền của các vi sinh vật gây bệnh.
2. Tăng mối hiểm họa khi sử dụng các thủy vực tự nhiên làm nguồn cung cấp nước uống.

3. Làm cho các loại trai sò bị nhiễm bẩn gây hậu quả không an toàn khi dùng làm thức ăn cho người.

4. Gây tổn thất lớn trong quần thể chim nước do nguồn thức ăn của chúng bị ô nhiễm.

5. Gây nguy hiểm cho người bơi và làm giảm giá trị của những thủy vực dành cho các mục đích giải trí.

6. Làm cạn kiệt nguồn oxy của nước do sự có mặt của các chất hữu cơ không bền ở

trong nước thải, do vậy hủy hoại sự sống trong nước.

7. Tạo ra các tình trạng không mong muốn như có mùi khó chịu hoặc tích lũy các chất cặn bã do vậy làm giảm giá trị tài sản và tính năng giải trí.

Có nhiều phương pháp xử lý nước thải, chúng được chia thành hai loại, một loại áp dụng cho từng hộ gia đình hoặc các đơn vị riêng lẻ và một loại cho cả cộng đồng hoặc thành phố.

Thiết bị xử lý cho các đơn vị nằm độc lập

Việc xử lý nước thải đi ra từ các hộ gia đình hoặc các đơn vị nằm độc lập như khách sạn hoặc trung tâm thương mại có thể được thực hiện nhờ các loại bể phân giải kỵ khí hay hiếu khí. Bể tự hoại là loại bể phân giải kỵ khí thường gặp nhất dùng để xử lý một lượng nước thải hạn chế. Bể tự hoại giải quyết hai mục tiêu : sa lắng các nguyên liệu rắn và phân giải sinh học các chất rắn này. Nguyên liệu sẽ được tích lũy ở phần đáy của bể được gọi là bùn. Khi nước thải đi vào bể, sự sa lắng xảy ra ở phần bên dưới, cho phép loại đi một dịch lỏng chứa ít chất rắn lơ lửng (suspended solid - S.S.) hơn. Phần chất rắn sa lắng sẽ được tiếp tục phân giải bởi các vi khuẩn kỵ khí, các sản phẩm cuối cùng sẽ là các hợp chất hữu cơ, có BOD cao và có mùi. Dịch đi ra từ bể tự hoại sẽ được dẫn vào lòng đất phía dưới lớp bề mặt, ở đó sẽ diễn ra sự phân giải tiếp tục nhờ vi sinh vật mà chủ yếu là sự oxy hóa hiếu khí các chất hữu cơ có trong dịch lỏng. Kiểu xử lý này không đảm bảo có thể loại trừ toàn bộ các tác nhân gây bệnh. Bởi thế, dịch thải đi ra từ các bể tự hoại không được phép dẫn thẳng vào các nguồn nước dành cho việc cung cấp nước uống.

Cũng đã có các hệ thống xử lý hiếu khí nước thải dành cho các đơn vị dân cư nhỏ. Các hệ thống này bao gồm các bể và thiết bị nhằm làm giảm kích thước các chất rắn nạp vào thành các hạt cỡ nhỏ, một bể thông khí và một bể sa lắng. Oxy được bơm vào bể thông khí cho phép xảy ra sự oxy hóa liên tục và sự phân giải hiếu khí các chất rắn có trong nước thải. Các hệ thống này

đặc biệt cần thiết cho những địa phương nằm trên các vùng đất có tính thấm không cao (như đất ướt) hoặc các loại đất chứa nhiều đá.

Thiết bị xử lý nước thải đô thị

Các thiết bị xử lý nước thải đô thị thực hiện hàng loạt quá trình xử lý. Các yêu cầu cho từng công đoạn xử lý được trình bày trên bảng .

1. Xử lý sơ cấp

Việc loại bằng biện pháp vật lý các chất rắn dạng thô được thực hiện qua ba bước : a) loại các vật rắn lớn như hộp, lốp xe, chai lọ, can; b) sàng lọc các vật rắn nhỏ như đá, sỏi; c) sa lắng (sơ cấp) để loại các nguyên liệu dạng hạt nhỏ hơn như phân và giấy. Các nguyên liệu dạng hạt này (bùn hay chất rắn sinh học) thường được xử lý bằng con đường sinh học nhờ sự phân giải kỵ khí trong một bể phân giải bùn (sludge digester)

Bảng 10.1: Các mức độ và yêu cầu của quá trình xử lý nước thải

Mức độ xử lý	Yêu cầu xử lý
Sơ cấp	Loại khoảng 30% BOD và 60% chất rắn lơ lửng tổng số (TSS).
Thứ cấp	Loại cả BOD lẫn chất rắn lơ lửng tổng số tới chỉ còn 25-30 mg/l, song phân được loại không nằm dưới 85%, pH nằm giữa 6,0 và 9,0.
Tam cấp	Loại cả BOD lẫn chất rắn lơ lửng tổng số tới chỉ còn ít hơn 9 mg/l, hoặc loại trên 95% BOD và TSS; trong những trường hợp 1 đặc biệt cần loại bỏ cả các chất dinh dưỡng (như photphat và nitrat).

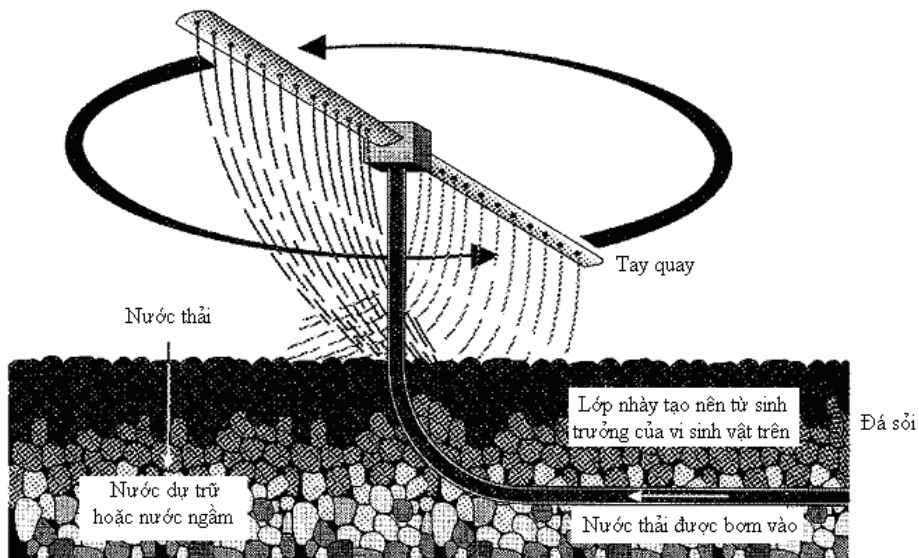
Xử lý thứ cấp (bằng con đường sinh học)

Đó là sự phân giải các chất hữu cơ và quá trình làm giảm BOD. Một hoặc nhiều trong số các phương pháp sau đây sẽ được sử dụng:

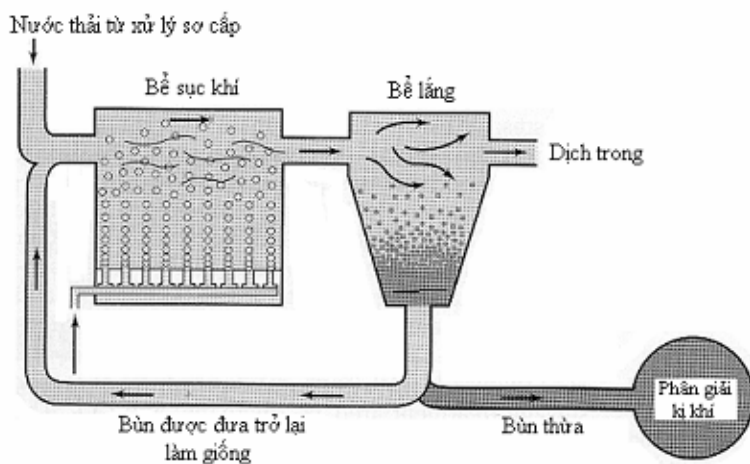
a) Lọc trích (trickling filters) : Nước thải được phun (và qua đó được thông khí) lên một lớp đệm đá. Mỗi viên đá sẽ được phủ bởi một lớp sinh khối nhày chứa vi khuẩn được gọi là *zoogloea*. Chính *zoogloea* sẽ phân giải các thành phần của nước thải khi nước thải chảy thành các dòng nhỏ trên các viên đá (hình 10.2)

b) Bùn hoạt tính (activated-sludge) : Nước thải được thông khí mạnh dẫn đến việc tạo thành các hạt chứa đầy vi sinh vật phân giải hiếu khí. Quá

trình này diễn ra trong các bể thông khí, sau đó nước thải được đưa sang một bể sa lắng để loại bỏ các chất rắn sinh học (hình 10.3).

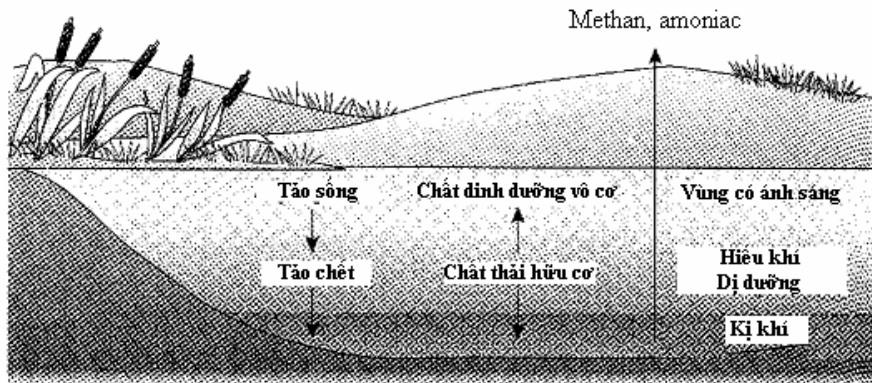


Hình 10.2: Xử lý nước thải theo phương pháp lọc trích



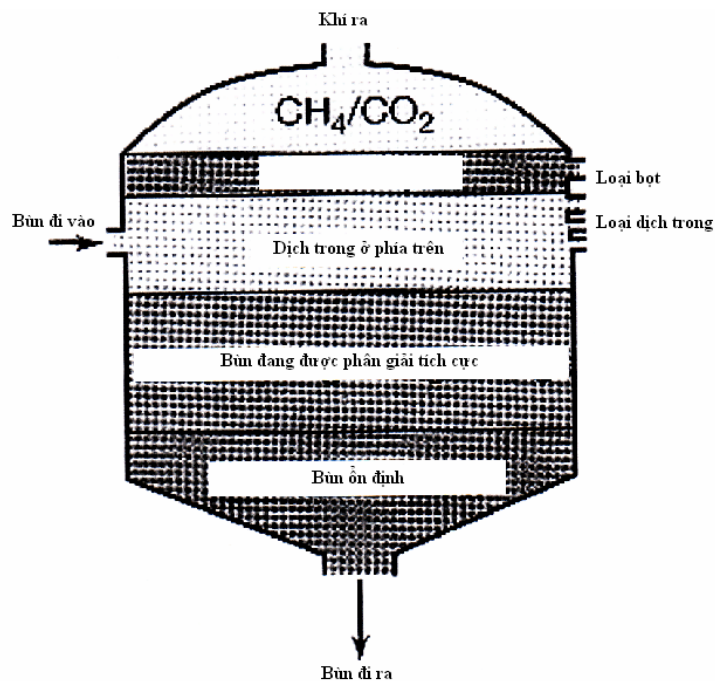
Hình 10.3: Xử lý nước thải theo phương pháp bùn hoạt tính

c) Hồ oxy hoá (oxydation ponds hay lagoons) : Trong các hồ nông (chỉ sâu từ 1 đến 2 m), tảo, như các loài thuộc chi *Chlorella* sẽ tiêu thụ các chất dinh dưỡng của nước thải và sản sinh oxy cần thiết cho sự phân giải hiếu khí (hình 10.4).



Hình 10.4: Hồ oxy hoá

d) Bể phân giải bùn (sludge digester) : Tại đây xảy ra sự phân giải các chất rắn đã được tích lũy trong xử lý sơ cấp và đôi khi sau xử lý thứ cấp. Các vi sinh vật kị khí sẽ phân giải bùn trong các bể kín, tạo ra methane (có thể được dùng làm nhiên liệu đốt nóng), CO_2 và một lượng nhỏ các khí nitơ và hydro. Sự phân giải kị khí nước thải là một quá trình diễn ra chậm (hình 10.5).



Hình 10.5: Xử lý bùn trong bể phân giải kị khí

Xử lý tam cấp

Quá trình này loại bỏ các chất ô nhiễm còn lại sau xử lý thứ cấp. Nhờ quá trình này, một loại nước thải có chất lượng cao thích hợp, với nhiều mục đích tái sử dụng sẽ được tạo ra. Xử lý tam cấp có thể bao gồm một hoặc nhiều công đoạn sau đây :

a. Keo tụ hoá học (chemical flocculation) để loại các chất dạng hạt còn lưu lại .

b. Bước lọc cuối cùng (final filtration) để loại các chất rắn, các chất này sau đó sẽ được làm khô hoặc đốt, hoặc được dùng làm phân.

c. Loại bỏ hoặc làm giảm hàm lượng photphat và nitrate.

d. Clo hóa dịch thải để giết chết các nhóm vi sinh vật mà một số có thể là các vi khuẩn gây bệnh. Dịch thải cuối cùng sẽ phải được loại clo trước khi đưa vào các thủy vực bởi vì clo có hại cho các sinh vật thủy sinh.

III. Lên men methane

1. Quá vi sinh vật học tổng thể

Sự tạo thành methane là một quá trình vi sinh vật học tổng thể trong đó chất hữu cơ được chuyển hóa thành methane. Sohngen khi khẳng định các nghiên cứu trước đây của Omelianski, đã chứng minh rằng sự lên men các chất hữu cơ một mặt sẽ tạo thành các sản phẩm cuối cùng như H_2 , CO_2 và acid acetic, và mặt khác sẽ sinh ra methane nhờ sự khử CO_2 bởi H_2 . Việc hai quá trình này có quan hệ với nhau trong quá trình tạo thành methane tổng thể đã bị bỏ qua trong nhiều năm vì những khó khăn về mặt phương pháp trong các thực nghiệm vi sinh vật học.

Tương tự, ý nghĩ cho rằng H_2 dưới dạng phân tử hoạt động như một sản phẩm trung gian giữa hai giai đoạn đã không được thừa nhận cho đến năm 1979. Thêm vào đó, Bryant còn giả thiết về sự tồn tại của một giai đoạn thứ ba trong quá trình vi sinh vật học tổng thể của sự tạo thành methane, bằng cách đó cung cấp những mối liên quan còn thiếu giữa một phía là các acid béo bay hơi chứa 3 nguyên tử cacbon hoặc hơn và một phía khác là acetate, H_2 và CO_2 . Dần dần, ý nghĩ về một mối liên quan giữa các vi khuẩn lên men chịu trách nhiệm đối với pha thứ nhất của quá trình tạo thành methane tổng thể và các vi khuẩn sinh methane chịu trách nhiệm đối với pha thứ hai đã được chứng minh rõ ràng tới mức diễn biến của quá trình này có thể được biểu diễn dưới dạng một mô hình sinh học.

Bước một

Các loài vi sinh vật chủ yếu của tiểu quần xã lên men có khả năng tấn công các polime ngay cả khi các chất này nằm ở thể rắn. Các loài vi sinh vật này chứa các enzyme ngoại bào, tức là các enzyme được tế bào xuất ra phía bên ngoài khoang chu chất và thậm chí có thể được tiết vào trong môi trường. Các enzyme này sẽ thủy phân các nguyên liệu polime thành các nguyên liệu có trọng lượng phân tử thấp, thậm chí các monome: protein thành các acid amine, polisaccharide thành các oligo- và các monosaccharide. Các phân tử nhỏ hòa tan sau đó sẽ được các vi khuẩn cùng loại hấp thu và sử dụng cho trao đổi chất của mình. Các loài vi khuẩn sống bằng protein có thể khác với các loài vi khuẩn sống bằng polisaccharide.

Khác với các vi khuẩn lên men nói trên, một nhóm vi khuẩn lên men khác không có khả năng thủy phân nguyên liệu polime, song cũng có khả năng hấp thu các phân tử hòa tan nhỏ hơn và dùng các phân tử này cho trao đổi chất của mình. Thường gặp bọn này trong trường hợp của đường hơn là trong trường hợp của các acid amine.

Do kết quả hoạt động trao đổi chất của nhóm vi khuẩn lên men thứ nhất trong hỗn dịch sẽ xuất hiện các loại sản phẩm cuối cùng ở dạng khử, đó là các acid béo bay hơi chứa từ 2 đến 5 nguyên tử cacbon hoặc hơn, ethanol (và các rượu hoặc keton khác), và/hoặc các acid hữu cơ như acid lactic. Do nhiều acid hữu cơ được sinh ra trong quá trình lên men này, bước một của quá trình vi sinh vật học tổng thể trong sự tạo thành methane thường được gọi là bước sinh acid.

Các acid hữu cơ sẽ xuất hiện trong hỗn dịch dưới dạng các anion và thường bắt nguồn từ các phân tử cơ chất trung tính. Do vậy một cation cặp đôi sẽ phải có mặt trong hỗn dịch để đảm bảo tính trung hòa về điện. Có một số cation cặp đôi ứng cử viên. Khi các hợp chất chứa nitơ, cụ thể là protein, được phân giải, cation cặp đôi NH_4^+ sẽ được tạo thành. Khi vắng mặt các hợp chất chứa nitơ, cation cặp đôi duy nhất có thể được tạo ra từ các chất hữu cơ là ion hydro, được ký hiệu là H_3O^+ .

Như vậy trong bước lên men, cation cặp đôi H_3O^+ thường được sản sinh nhiều. Bởi vậy, bước sinh acid thường là một bước acid hóa, song cần tránh hiểu sai về mặt thuật ngữ học. Sự sinh acid thực chất là sự sinh các anion acid hữu cơ. Còn sự acid hoá là sự sản sinh các ion hydro và do vậy liên quan đến pH của hỗn dịch.

Bước sinh methane

Các vi sinh vật sinh methane không phải là các vi khuẩn thật (eubacteria) mà là các vi khuẩn cổ (archeobacteria). Các vi khuẩn cổ khác về

cơ bản với các vi khuẩn thật và thực chất nằm trong số các sinh vật cổ nhất trên trái đất.

Chỉ có H_2 cộng với CO_2 hoặc acetate là có thể được dùng làm cơ chất cho các vi khuẩn cổ tạo thành methane. Song cũng có một vài ngoại lệ. Đó là trường hợp của các hợp chất gần gũi như methanol, formiat, CO_2 và các methylamine.

Các loài vi sinh vật đầu tiên được gọi là bọn dinh dưỡng hydro, là các vi khuẩn cổ hóa dưỡng vô cơ vì chúng dùng H_2 để khử CO_2 bằng nhằm thu năng lượng và là các vi khuẩn cổ tự dưỡng vì chúng sử dụng CO_2 làm nguồn cacbon.

Các loài vi sinh vật thứ hai, được gọi là bọn sinh acetate, là các vi khuẩn cổ hoá dưỡng hữu cơ vì chúng cắt acetate thành methane và CO_2 , thu nhận năng lượng của mình từ acetate mặc dù không nhất thiết phải cắt acetate, và là bọn dị dưỡng vì chúng sử dụng acetate làm nguồn cacbon.

Acetate là một anion. Khi bị cắt thành methane và CO_2 , cần có một cation cặp đôi tham gia vào quá trình. Khi ion cặp đôi đó là ion amon, NH_4^+ , được sinh ra trong bước lên men đầu, thì amonium bicarbonate, NH_4HCO_3 , sẽ được tạo thành trong hỗn dịch. Khi cation cặp đôi là H_3O^+ được sinh ra trong bước lên men đầu, thì acid cacbonic, H_2CO_3 , sẽ được tạo thành và CO_2 sẽ được giải phóng trong thể tích khí sinh học thoát ra. Kết quả của cả hai trường hợp là môi trường trở nên kiềm hoặc khả năng trung hòa của nó sẽ được tăng cường. Do vậy sự tạo thành methane xuất hiện như một bước kiềm hóa.

Bước trung gian

Một vài nhóm vi khuẩn được dùng làm cầu nối giữa bước lên men và bước tạo thành methane. Không những thế, một số trong chúng còn cạnh tranh với các vi khuẩn lên men về các cơ chất monome. Một số khác cạnh tranh với các vi khuẩn cổ sinh methane về acetate hoặc về H_2 cộng với CO_2 .

Các acid béo bay hơi được chuyển hóa thành acetate, H_2 và CO_2 nhờ các loài vi khuẩn đặc biệt thuộc về nhóm sản sinh acetate và tạo thành hydro bắt buộc, đã có thời được gọi là các vi khuẩn khử proton bắt buộc. Các vi khuẩn này, do các nguyên nhân về mặt nhiệt động học, chỉ có thể sống cộng dưỡng mà không phải là cộng sinh với các vi khuẩn dinh dưỡng hydro.

Kết quả là áp lực riêng phần của hydro, sản phẩm trung gian của chúng, p_{H_2} , trong suốt quá trình đều giữ ở mức rất thấp (khoảng 10^{-6} bar). Vì vậy, H_2 thuộc loại phân tử chỉ phát hiện được trong các hỗn dịch sinh methane

một cách có hệ thống và định lượng được trong thời gian rất gần đây. Etanol và lactate đều được chuyển hoá thành acetate, H_2 và CO_2 nhờ một nhóm vi khuẩn sinh acetate và tạo thành hydro bắt buộc khác.

Các loài vi khuẩn khác có thể cạnh tranh với chúng. Thực chất, lực nhiệt động học dùng để duy trì áp lực riêng phần của hydro ở các giá trị từ thấp đến rất thấp trong suốt thời gian đã tạo điều kiện thuận lợi cho các loài vi khuẩn này vì chúng có cơ chế dinh dưỡng hydro của bản thân chúng.

Khi các anion sulfate, SO_4^- , có mặt trong môi trường, các vi khuẩn khử sulfate có thể trở nên quan trọng. Một số trong chúng có thể cạnh tranh với các vi khuẩn sinh acetate tạo thành hydro bắt buộc về các acid béo bay hơi dùng làm cơ chất. Nhóm vi khuẩn có khả năng sử dụng ethanol và lactate có thể bao gồm chủ yếu là các vi khuẩn khử sulfate. Bọn này thậm chí có thể là bọn khử sulfate tùy tiện. Khi các anion sulfate có mặt, được sinh ra từ cơ chất hữu cơ sẽ được sử dụng để khử SO_4^- thành sunfua, HS^- .

Khi các vi khuẩn dinh dưỡng hydro có mặt, H_2 sinh ra từ cơ chất hữu cơ sẽ được chúng sử dụng. Khi các anion sulfate và các vi khuẩn dinh dưỡng hydro đồng thời có mặt, sự cạnh tranh về hydro có thể xảy ra, và kết quả sẽ phụ thuộc vào các điều kiện môi trường.

Việc các vi khuẩn khử sulfate có thể bị lôi kéo vào quá trình tạo thành methane dẫn đến hai kết luận quan trọng. Thứ nhất, chúng có thể hỗ trợ hoặc cạnh tranh với các vi khuẩn sinh methane. Thứ hai, chúng chịu trách nhiệm đối với sự có mặt của H_2S trong thể tích khí sinh học thoát ra. Đây là hai sự kiện có tầm quan trọng kỹ thuật cơ bản.

Ngoài các vi khuẩn khử sulfate, một nhóm vi khuẩn dinh dưỡng hydro khác cũng giữ vai trò quan trọng trong quần thể vi sinh vật sinh methane tổng thể. Các vi khuẩn này được gọi là các vi khuẩn sinh acetate đồng hình, chúng thuộc bọn hóa dưỡng vô cơ và thu năng lượng của mình từ phản ứng khử CO_2 bằng H_2 để tạo ra một mình acetate, tên của chúng bắt nguồn từ đó.

Một số trong các vi khuẩn này là bọn tự dưỡng và có khả năng đồng hóa CO_2 . Các vi khuẩn sinh acetate đồng hình khác cũng cạnh tranh với các vi khuẩn lên men vì chúng có khả năng tạo ra một mình acetate từ glucose. Trong trường hợp này, chúng là bọn hóa dưỡng hữu-vô cơ hỗn hợp, và là bọn hỗn dưỡng, tức là vừa tự dưỡng vừa dị dưỡng.

Cần lưu ý rằng, các vi khuẩn sinh acetate đồng hình không cạnh tranh với các vi khuẩn sinh methane về cơ chất (vì chúng sinh ra acetate) mà về năng lượng vì chúng sử dụng một phần năng lượng tiềm tàng của hỗn hợp, H_2 cộng với CO_2 .

Khi quá trình vi sinh vật học tổng thể của sự tạo thành methane bị cắt thành hai bước tách biệt, bước lên men sinh acid hoá đầu tiên và bước sinh methane kiềm hóa thứ hai, thì các vi khuẩn sinh acetate đồng hình có thể giữ một vai trò hỗ trợ và quan trọng vì chúng có thể bắt giữ H_2 sinh ra trong bước thứ nhất, trước khi nó thoát ra, để tạo thành acetate. Vì thế, acetate sẽ được dự trữ trong hỗn dịch như là một cơ chất sinh methane tiềm tàng cho bước hai. Hiện tại chưa có bằng chứng thực nghiệm cho giả thuyết này. Các acid béo không thể được chuyển hóa một mình thành các sản phẩm cuối cùng thông thường có tính khử do những lý do về nhiệt động học. Chúng cũng được chuyển hóa thành acetate, H_2 và CO_2 bởi một nhóm vi khuẩn sinh acetate sản sinh hydro bắt buộc khác, bọn này phải sống cộng dưỡng bắt buộc với các vi khuẩn dinh dưỡng hydro để duy trì áp lực riêng phần của hydro. pH-thấp hoặc rất thấp trong suốt thời gian diễn ra sự phân giải.

Câu hỏi ôn tập chương 10

1. Việc đưa nước thải chứa một hợp chất *không độc nhưng dễ phân giải*, chẳng hạn tinh bột, vào sông hoặc ao hồ sẽ gây nên một hiệu quả xấu đến chất lượng của nước. Những hậu quả đó được biểu hiện như thế nào? Tại sao?

2. Trong thực tế, ở $20^{\circ}C$, sau bao nhiêu ngày thì sự oxy hóa sinh học các chất hữu cơ có trong nước thải có thể được coi như kết thúc? Tại sao người ta thường chỉ xác định BOD_5 ? Làm thế nào để xác định BOD_5 ? Đối với nước thải sinh hoạt và nhiều loại nước thải công nghiệp, BOD_5 tương đương với khoảng bao nhiêu % BOD tổng số?

3. Tại sao người ta nói rằng, sự có mặt của khu hệ vi khuẩn nitrate hóa trong nước thải có thể làm cho các kết quả đo BOD trở nên thiếu chính xác? Tại sao việc đo BOD_5 chưa bị ảnh hưởng của khu hệ vi khuẩn này?

4. Sau 5 ngày ủ một loại nước thải công nghiệp, lượng oxy hòa tan còn lại trong mẫu đối chứng là 7,8 mg/l, trong một dịch nước thải pha loãng 0,1% là 2,8 mg/l

a. Tính BOD_5 của loại nước thải đã cho

b. Trong $1000m^3$ nước thải nói trên có chứa bao nhiêu kg BOD_5 ?

5. Sau khi ủ một mẫu nước thải có k (tốc độ oxy hóa sinh học) bằng 0,15/ ngày 7 ngày ở $20^{\circ}C$ và người ta đo được BOD bằng 208 mg/l. Tính BOD_5 , BOD_{10} và BOD tổng số của loại nước thải này.

6. Cách xác định COD khác cách xác định BOD ở chỗ nào? Tại sao giá trị COD thường lớn hơn giá trị BOD?

7. Hạn chế của phương pháp xác định COD so với phương pháp BOD nằm ở đâu ? Tại sao trong một số tình huống, người ta vẫn phải dùng phương pháp COD để thay thế cho phương pháp BOD ?

8. Quá trình phân giải các chất hữu cơ thành methane trải qua nhiều bước, trong đó có hai bước lên men.

a. Đó là những bước nào ?

b. Tuy vậy, người ta không thể gọi sự tạo thành methane là một quá trình lên men, vì sao ? Vậy đó là quá trình gì?

c. Nêu ý nghĩa của hiện tượng cộng dưỡng trong sự tạo thành methane sinh học.

Chương 11

Sự tuyển khoáng nhờ vi sinh vật

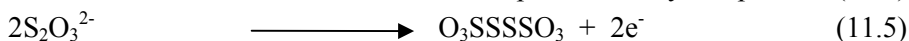
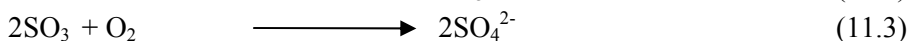
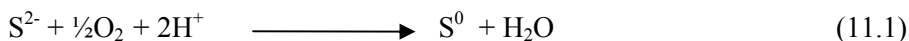
Việc tách kim loại từ quặng nhờ quá trình ngâm chiết (leaching) không phải là một công nghệ mới. Trong thực tế, ngâm chiết quặng đồng đã được thực hiện từ năm 1947 tại miền Bắc Hungari, từ thế kỷ 16 tại vùng núi Harz của Đức, từ khoảng năm 1670 tại Rio Tinto ở Tây Ban Nha và từ thế kỷ 18 ở miền Wicklow nước Anh. Việc ngâm chiết quặng được đưa vào Mỹ từ đầu những năm 1920. Ở Nga, việc chiết đồng từ các dòng chảy qua mỏ pirit đồng đã được thực hiện ở vùng Uran từ giữa những năm 1940. Tuy nhiên, trong tất cả những quy trình đã tiến hành trước đây, vai trò của vi khuẩn chưa được đánh giá đúng mức vì vi sinh vật chủ yếu chịu trách nhiệm đối với sự oxy hóa các sunfua kim loại, *Thiobacillus ferrooxidans* mới được xác định đầu tiên vào năm 1947.

Sự tham gia của vi sinh vật vào việc ngâm chiết quặng đã được nhiều tác giả chứng minh. Đây là những vi sinh vật hóa dưỡng vô cơ bắt buộc hay tùy tiện, hoặc vi sinh vật dị dưỡng, chúng có thể thuộc về nhóm trung hay ưa nhiệt có khả năng oxy hóa sắt hai thành sắt ba cũng như các loại lưu huỳnh dạng khử thành acid sunfuric hoặc sunfat kim loại. Ngoài ra, hàng loạt các vi sinh vật khác như nấm, tảo, và động vật nguyên sinh cũng có mặt trong sự sinh trưởng cộng sinh trong các dung dịch ngâm chiết tồn tại trong tự nhiên.

I. Các vi khuẩn ngâm chiết

Thiobacillus ferrooxidans là vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất trong mối quan hệ với các biện pháp xử lý thủy luyện kim sinh học (biohydromatallurgical treatment) các loại quặng và tinh quặng chứa sunfua. Đó là một vi khuẩn hình que, Gram âm, di động bằng tiên mao, không hình thành bào tử, đứng một mình hay đôi khi thành từng cặp. Vi khuẩn hóa dưỡng vô cơ này thu nhận năng lượng cần thiết cho sinh trưởng và đồng hóa CO₂ từ sự oxy hóa sắt hai và các hợp chất lưu huỳnh vô cơ có tính khử. Về mặt sinh lý, *T. ferrooxidans* giống với *Thiobacillus thiooxidans*, loại vi khuẩn thường thường có mặt trong các loại nước khai mỏ có tính acid. Sự khác biệt cơ bản được nhiều người thừa nhận giữa hai loài này là việc *T. thiooxidans* không có khả năng oxy hóa sắt hai và các sunfua kim loại không tan. Hệ thống oxy hóa sắt hai của *T. ferrooxidans* được liên kết với lớp màng ngoài chứa lipopolysaccarit của thành tế bào. Các enzyme oxy hóa sắt là Fe²⁺-citocrom c oxydoreductase, citocrom a, và coenzyme Q...

Sơ đồ chung của sự oxy hóa sinh học bao gồm các loại sau: S^{2-} , S^0 , SO_4^{2-} , $S_4O_6^{2-}$, SO_3^{2-} , và SO_4^{2-} . Trong dãy oxy hóa của sự trao đổi chất S^{2-} , lưu huỳnh nguyên tố nằm ở trạng thái phân tử được polime hóa (cấu trúc vòng S_8) và sunfit là một sản phẩm trung gian chìa khóa được chuyển hóa thành sunfat. Các phản ứng enzyme tham gia vào dãy oxy hóa sunfua này có thể được trình bày như sau:



Các vi khuẩn ngậm chiết khác bao gồm *Leptospirillum ferrooxidans* lần đầu tiên được phân lập từ quặng sunfua vàng. Nó có thể ngậm chiết pirit, có khả năng sinh trưởng tự dưỡng trên ion sắt hai, có nhiều sự tương đồng về mặt sinh lý với *Thiobacillus thiooxidans* và mẫn cảm với sự kìm hãm bởi ion sắt ba.

Thiobacillus acidophilus có khả năng đối với cả sinh trưởng hóa tự dưỡng lẫn sinh trưởng dị dưỡng. Nó được phân lập từ một môi trường nuôi *T. ferrooxidans*. Vi khuẩn này oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố, đường, acid amin và các acid cacboxylic ở pH 3,0-3,5. *Thiobacillus kabobis* và *Thiobacillus organoporus* oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố và sinh trưởng ở pH 1,5-5,0. *Thiobacillus thioporus* oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố, thiosunfat và nhiều loại sunfua kể cả sunfua kẽm.

Sunfobacillus acidocaldarius được phân lập từ các suối nước nóng có tính acid. Nó sinh trưởng hóa tự dưỡng với các cơ chất là lưu huỳnh, các hợp chất khử của lưu huỳnh và sắt hai.

II. Cơ chế tác động của vi khuẩn

Sự chiết kim loại ra khỏi các quặng chứa sunfua có thể đạt được nhờ các phương thức trao đổi chất trực tiếp hay gián tiếp của vi sinh vật. Cơ chế trực tiếp có thể biểu diễn bằng phương trình:

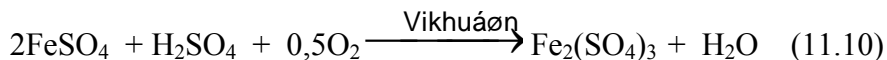


Trong đó M là kim loại nặng hóa trị hai.

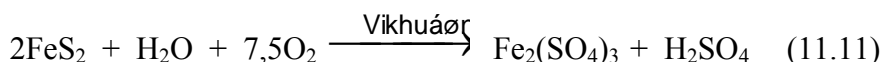
Cơ chế gián tiếp, ví dụ đối với quá trình ngậm chiết quặng uranium, có thể được biểu diễn như sau:



Sắt hai được sinh ra trong phương trình trên sẽ được tái oxy hóa bởi các vi khuẩn thành sắt ba theo phương trình sau:



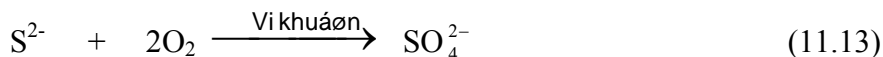
Vì vậy, trong phương thức tác dụng gián tiếp của vi khuẩn, vi khuẩn đóng vai trò cung cấp một cách liên tục chất oxy hóa, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Sắt hai sẽ thu được từ sự oxy hóa sinh học pirit là chất luôn luôn kết hợp với các sunfua và quặng uranium:



Bước một trong sự oxy hóa trực tiếp các sunfua kim loại. MS, là sự hòa tan cơ chất trước khi xảy ra phản ứng trao đổi chất. Điều này có thể đạt được nhờ sự phân ly của MS:



Anion sunfua được giải phóng ra sau đó sẽ lập tức được liên kết với hệ thống enzyme của vi khuẩn và bị oxy hóa thành sunfat:



Vì vậy, anion sunfua bị loại khỏi phương trình (11.12) và cân bằng sẽ chuyển về phía bên phải gây ra một sự hòa tan mạnh hơn. Về mặt lý thuyết quá trình này có thể tiếp tục đến khi toàn bộ cơ chất (MS) được chuyển hóa thành sản phẩm (MSO_4). Tuy nhiên, trong các hệ thống không liên tục sự tích lũy các sản phẩm có thể đạt tới một nồng độ trở nên độc đối với vi sinh vật hoặc Jarosit sẽ kết tủa trên bề mặt của cơ chất làm cản trở hoạt động của vi khuẩn. Sơ đồ này giải thích tại sao vi sinh vật lại ưa ở ngay sát bề mặt khoáng vật. Hơn nữa người ta đã phát hiện thấy một mối quan hệ trực tiếp giữa tốc độ chiết kim loại ($d\text{M}^{2+}/dt$) độ hòa tan sản phẩm của các khoáng vật sunfua (K_{sp}):

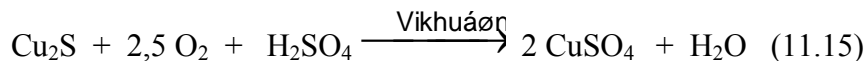
$$d\text{M}^{2+}/dt K_{sp} = \alpha K_{sp} = \alpha [\text{M}^{2+}][\text{S}^{2-}] \quad (11.14)$$

Trong đó α là hệ số tỷ lệ thuận. Theo phương trình (11.14), tốc độ chiết kim loại là cao nhất khi độ hòa tan sản phẩm của khoáng vật sunfua của nó là cao nhất.

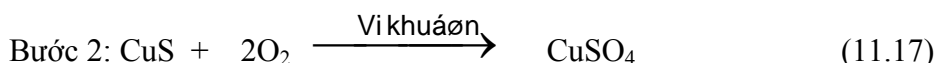
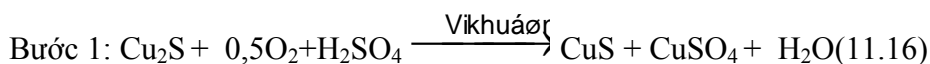
III. Một số quá trình thủy luyện kim sinh học

1. Ngâm chiết sinh học quặng đồng

Hiện tại khoảng 25% toàn bộ sản lượng đồng ở miền Tây nước Mỹ được sản xuất nhờ ngâm chiết sinh học các loại quặng nghèo. Phản ứng tổng thể của sự ngâm chiết chancopirit nhờ vi khuẩn diễn ra như sau:



Phản ứng này diễn ra qua 2 bước:



CuS có thành phần giống như thành phần của covenlit, một loại khoáng vật tự nhiên. Các loại khoáng vật sunfua đồng khác là bocnit (Cu_5FeS_4), cubamit (CuFe_2S_3) và enacgit (Cu_3AsS_4). Tất cả các khoáng vật này đều được oxy hóa nhờ vi khuẩn.

Việc ngâm chiết chất đồng thường được tiến hành ở gần các điểm khai thác để giảm tối đa giá thành vận chuyển. Quặng nghèo được vận chuyển bằng xe tải hoặc băng chuyền tới một vị trí không thấm rồi đổ thành các đống có dạng hình nón cụt. Đa số các đống quặng được tạo dựng dựa vào các địa hình tự nhiên.

Các đống quặng lớn có thể cao tới 200m, rộng 80m ở phía đỉnh và 250m về phía đáy và chứa tới 50.000-300.000 tấn quặng. Dung dịch ngâm chiết được phun lên phần đỉnh của của các đống. Nó thấm qua phần thân đống và tích lại ở chân đống.

Đồng được thu hồi từ dịch nhờ xementit hóa với sắt (trong quá trình này, đồng được kết tủa dưới dạng kim loại trong khi sắt được hòa tan: $\text{Cu}^{2+} + \text{Fe}^0 \rightarrow \text{Cu} + \text{Fe}^{2+}$) hoặc bằng cách chiết chọn lọc thành một dung môi hữu cơ và sau khi tách pha lỏng khỏi pha hữu cơ, đồng được rửa sạch khỏi dung môi hữu cơ bằng acid sunfuric loãng để tạo ra một dung dịch sunfat đồng đậm đặc và tinh khiết, từ đó nó được kết tủa nhờ điện phân.

Sơ đồ của quá trình ngâm chiết kiểu chất đồng được trình bày trên hình 11.1. Các đường chấm chấm được áp dụng trong trường hợp đồng được thu hồi từ dung dịch sau ngâm chiết (pregnant solution) nhờ xementit hóa với sắt phế liệu.

Trong các xí nghiệp hiện đại, đồng được thu hồi bằng phương pháp chiết nhờ dung môi và tách nhờ điện phân. Nói chung đồng xementit chứa

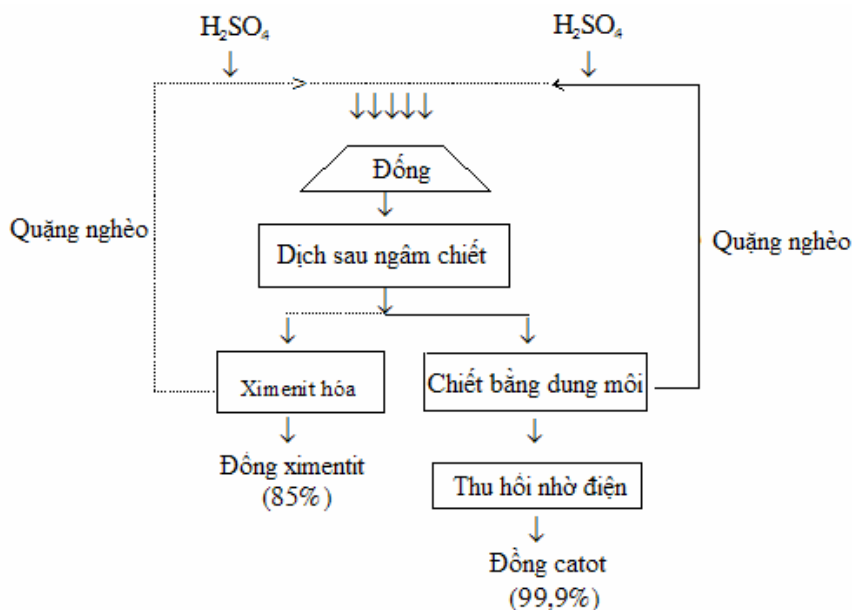
khoảng 85% đồng. Nó được trộn với tinh quặng tuyển nổi và được đưa vào nồi nấu kim loại trong bước thu hồi cuối cùng. Đồng thu được nhờ phương pháp tách chiết bằng dung môi -điện phân tinh khiết tới 99% và đầy đủ tiêu chuẩn để đưa ra thị trường.

Việc chiết đồng trong các quá trình công nghiệp này đạt được nhờ cả hai cơ chế ngấm chiết vi sinh vật trực tiếp và gián tiếp. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự thu hồi đồng và đến hoạt tính của vi khuẩn là:

a) Đặc tính vật lý của thể quặng (kích thước hạt quặng, độ thấm đối với dung dịch ngấm chiết, tính dẫn nhiệt và kích thước đồng).

b) Thành phần hóa học của quặng và nguyên liệu nghèo là đá chủ chứa khoáng vật đồng (sự có mặt và phân bố của pirit và hạt quặng riêng biệt bên trong thể quặng);

c) Thành phần của dung dịch ngấm chiết đi vào (O_2 và CO_2 hòa tan và các chất dinh dưỡng khác, độ acid, tỷ lệ Fe^{2+}/Fe^{3+} , quần thể vi sinh vật).



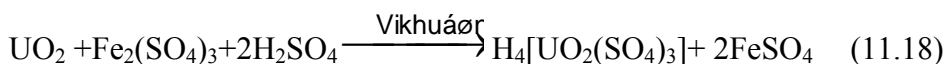
Hình 11.1. Sơ đồ ngấm chiết quặng đồng

Hãng sản xuất đồng lớn nhất của Mỹ, hãng Phelps Dodge Company, vào năm 1986 đã tuyên bố rằng họ có thể sản xuất một pao đồng từ quặng thải của họ với giá 30 xu bằng phương pháp chất ngấm chiết đồng tách chiết bằng dung môi - điện phân. Giá bán nằm vào khoảng 75-80 xu. Hãng này có kế hoạch đầu tư trên 50 triệu USD để mở rộng xí nghiệp ngấm chiết của mình.

Việc ngâm chiết tại chỗ (in-situ) quặng đồng cũng giống như ngâm chiết chất đồng ở nhiều điểm. Khi độ quặng quá thấp không thể dùng phương pháp khai thác thông thường, người ta sẽ pha vỡ khối quặng trong lòng đất bằng thuốc nổ và ngâm chiết tại chỗ.

2. Ngâm chiết sinh học quặng uranium

Uranium đã được chiết từ quặng nhờ quá trình ngâm chiết vi khuẩn học ở quy mô công nghiệp. Hóa học của sự chiết này có thể được biểu diễn bằng một sự thay đổi từ uranium không tan hóa trị bốn sang dạng hóa trị sáu hòa tan trong môi trường ngâm chiết có tính acid:



Phương trình này là phương trình đảo ngược của phương trình (11.9). Sunfat sắt hai được tái oxy hóa thành sunfua sắt ba theo phương trình (11.10). Sự biến đổi năng lượng tự do chuẩn (86,1 kJ/mol) và thế oxy hóa khử đối với hệ thống $\text{U}^{4+}/\text{U}^{6+}$ (446mV) cũng giống như sự biến đổi năng lượng tự do và thế oxy hóa khử của hệ thống $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (77,4 kJ/mol và 747mV). Các quá trình sinh hóa học và thủy luyện kim sinh học đối với việc chiết uranium đã được biết rất rõ.

3. Ngâm chiết sinh học quặng bạc

Sự phân bố của bạc và các nguyên tố khác trong đất bị ảnh hưởng mạnh bởi các chu trình sinh địa hóa. Các kim loại nặng và kim loại quý thường tạo thành các phức chất và được duy trì nhờ các lớp mùn của đất. Các vi sinh vật tham gia vào việc sử dụng các nguyên tố này bao gồm cả vi khuẩn, nấm, tảo và địa y.

Về khả năng của *Thiobacillus ferrooxidans* sử dụng sunfua bạc làm nguồn năng lượng hiện đang còn tranh cãi. Một số tác giả cho rằng (Ag_2S) tổng hợp và tự nhiên đều không được vi khuẩn ngâm chiết phân giải vì bạc độc với *T. ferrooxidans*. Tính độc này có liên quan đến sự tích lũy đặc hiệu đối với bạc của tế bào. Song việc nuôi *T. ferrooxidans* trong môi trường có nồng độ AgNO_3 tăng dần lại tạo ra các chủng đề kháng với bạc.

Vào năm 1986 một nghiên cứu khác đã phát hiện ra rằng *T. ferrooxidans* đã thúc đẩy sự chiết chọn lọc bạc từ một loại quặng sunfua hỗn hợp. Trong 49 ngày ngâm chiết, khoảng 75% bạc đã được hòa tan từ quặng hỗn hợp khi có mặt vi khuẩn và chỉ có 50% khi vắng mặt vi khuẩn.

4. Thủy luyện kim sinh học vàng

Công nghệ vàng thông dụng từ các tài nguyên khác nhau rất được phát triển. Vàng được thu hồi bằng phương pháp clo hóa, xianit hóa, ngâm

chiết tiosunfat và tioure, tạo hỗn hợp (amalgamation), tuyển nổi, tuyển bằng trọng lực và nấu chảy hoặc bằng tổ hợp các quy trình trên. Nếu vàng phân tán tinh vi bên trong các loại quặng mẹ sunfua như trong pirit, acxenopirit, pirotit, galen (quặng chì sunfua), và sphalerit thì nhiều trong số các phương pháp tuyển vàng kể trên sẽ không mang lại hiệu quả kinh tế mong muốn.

Chất ngậm chiết không xâm nhập được vào bên trong khối quặng rắn để tiếp xúc với các hạt vàng có kích thước nhỏ hơn một μm . Muốn giải phóng được vàng thì các loại quặng chứa sunfua này thường phải được tiền oxy hóa. Tuy nhiên nung là một quy trình tốn năng lượng và liên quan đến các vấn đề về môi trường như phát sinh acxenic bay hơi, chì, lưu huỳnh, và các chất độc khác. Một biện pháp có thể thay thế tiền oxy hóa là áp dụng các phản ứng sinh học để giải phóng các hạt vàng từ quặng.

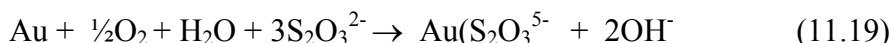
Ngay từ những năm 1960 người ta đã phát hiện được các vi khuẩn dị dưỡng có khả năng hòa tan vàng từ các khoáng vật laterit. Trong các nghiên cứu này, hàm lượng vàng cực đại không vượt quá $1,5\text{mg}/\text{dm}^3$. Tuy nhiên sau 283 ngày ngậm chiết đã tách được tới 82% vàng chứa trong quặng. Một số loài nấm đã được chứng minh không những có thể chiết vàng từ quặng mà còn có thể loại vàng hòa tan khỏi dung dịch ngậm chiết nhờ hấp phụ sinh học lên bề mặt cơ thể. Những tế bào nấm này sau đó sẽ được lọc, làm khô và nung. Người ta đã phân lập được hàng loạt chủng nấm hoạt động có thể loại tới 98% vàng từ dung dịch ngậm chiết sau 15-20 giờ tiếp xúc.

4.1. Hòa Tan vàng từ quặng pirit nhờ hoạt động của vi sinh vật

Các thí nghiệm ngậm chiết đã được tiến hành với pirit chứa vàng (150g vàng/tấn quặng) trong các bình nón chứa 5g pirit và 200cm^3 môi trường dinh dưỡng chứa 200mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50mg KCl, 50mg K_2HPO_4 , 500mg MgSO_4 và 10mg $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ trong một lít nước cất, và được ủ với 10cm^3 một chủng *Thiobacillus ferrooxidans* thuần khiết. Kết quả chỉ ra trong bảng (11.1)

Thí nghiệm số 1 được tiến hành mà không cấy vi khuẩn vào dung dịch ngậm chiết (mẫu đối chứng vô trùng). Các số liệu trong bảng 11.1 đã nhận được sau 3 tuần ngậm chiết ở nhiệt độ thường. Hiệu quả của vi khuẩn trong việc hòa tan vàng từ pirit là rõ rệt vì trong thí nghiệm nuôi tĩnh, vãng đã không được tìm thấy trong mẫu đối chứng vô trùng. Trong các thí nghiệm với bình lắc, lượng vàng được hòa tan vào các mẫu có cấy giống đã tăng lên 6 lần. Các tác giả đã chỉ ra rằng trong quá trình oxy hóa các sunfua kim loại nhờ vi khuẩn (pirit, galen và các sphalerit), các loại

hợp chất oxy hóa của lưu huỳnh đã được tạo thành phức chất với các ion này và được hòa tan, chẳng hạn theo phản ứng sau đây:



Bảng 11.1. Sự hòa tan vàng từ cơ chất pirit nhờ *Thiobacillus ferrooxidans*

Thí nghiệm nuôi tính số	Sự tách chiết vàng g/dm ³	Thí nghiệm nuôi lắc số	Sự tách chiết vàng g/dm ³
1	Không	1	60
2	150	2	480
3	270	3	490
4	390	4	520

Sự oxy hóa pirit dẫn đến sự tạo thành acid sunfuric như đã chỉ ra trong phương trình 11.11. Các ion hydroxyl trong phương trình 11.19 được trung hòa bằng acid sunfuric thu được từ phương trình 11.11:



Bằng cách sử dụng pirit, chancopirit, asenopirit, galen và macasit chứa vàng đã được nghiền nhỏ (được cấy bằng *T.ferrooxidans*) và trong các mẫu đối chứng vô trùng với từng loại hoặc hỗn hợp sunfua, một số tác giả khác đã phát hiện ra rằng việc thu hồi vàng từ các mẫu có cấy giống đã không cho hiệu quả cao hơn so với các mẫu đối chứng vô trùng. Phát hiện này trái ngược với các kết quả vừa nêu ở trên và các tác giả của công trình này đã đi đến kết luận rằng *T.ferrooxidans* trong dung dịch loãng đã không có tác dụng đáng kể lên sự tích lũy và sự thoát vàng vào đất.

Trong khi đó các thí nghiệm ngâm chiết với phế liệu ở Colorado Mineral Belt đã chỉ ra rằng khi có mặt vi khuẩn và chất dinh dưỡng, sự thu hồi các kim loại thường đã được nâng cao đáng kể so với các mẫu đối chứng vô trùng. Các tác giả này đã đề xuất một quy trình ngâm chiết hai bước để đạt một hiệu quả kinh tế cao hơn.

Trong bước thứ nhất, một quá trình ngâm chiết bằng vi khuẩn (hoặc acid) sẽ được thực hiện để loại các kim loại thường ra khỏi phế liệu và để giải phóng vàng và bạc. Sau đó phần còn lại sẽ được trung hòa bằng vôi và trong bước thứ hai có thể sử dụng kỹ thuật xianua hóa thông thường để thu hồi vàng và bạc. Bằng cách sử dụng nguyên lý ngâm chiết hai bước kể trên, Klusman và Nelson (1976) cũng như Lawrence và Bruynesteyn

(1983) đã chứng minh khả năng áp dụng của phương pháp này đối với sự thu hồi vàng và bạc từ các tinh quặng perit chịu lửa.

Việc thu hồi vàng tăng theo tỷ lệ thuận với hiệu suất tiền oxy hóa pirit nhờ vi khuẩn. Chẳng hạn, nếu không áp dụng quá trình tiền oxy hóa nhờ vi khuẩn cho các mẫu pirit thì qua kỹ thuật xianua hóa vàng thu hồi chỉ đạt khoảng 25%. Còn nếu pirit được tiền oxy hóa tới 80% thì vàng thu hồi nhờ biện pháp xianua hóa sẽ vượt quá 90%. pH tương đối thấp (dưới 1) tạo điều kiện thuận lợi cho việc giữ các ion sắt ba trong dung dịch. Vi khuẩn *T.ferrooxidans* hoạt động tốt nhất ở pH 2,3. Các giá trị pH dưới 1,5 thường kìm hãm hoạt tính của vi khuẩn. Tuy nhiên Lawrence và Bruynesteyn đã phát hiện thấy rằng vi khuẩn này có khả năng thích ứng tốt với các giá trị pH thấp tới khoảng 0,6.

Trong một thí nghiệm khác tiến hành vào năm 1985, việc thu hồi vàng đã được tiến hành từ một loại phế thải tuyển nổi kẽm và chì (chứa 1,75g vàng/ tấn) nhờ phương pháp ngâm chiết kép. Trong bước một, các mẫu tuyển nổi đã trải qua công đoạn tiền khai thác và nghiền mịn đã được ngâm chiết trong một bể có thông khí và khuấy trộn nhờ sử dụng *T.ferrooxidans*, ở đó kẽm, sắt và đồng được hòa tan. Sau khi đã tách biệt hai pha rắn - lỏng, phần còn lại (có tính acid) được ngâm chiết theo kỹ thuật tioure để thu hồi vàng.

Người ta cho rằng trong quá trình ngâm chiết chất thải tuyển nổi chứa sunfua nhờ sử dụng vi khuẩn, vàng sẽ được giữ lại dưới dạng tự nhiên trong phần chất thải rắn, song một phần sẽ được giải phóng ra dưới dạng tự nhiên trong phần chất thải rắn, song một phần sẽ được giải phóng ra dưới dạng các hạt có kích thước dưới 1mm từ quặng pirit nghèo. Sự thu hồi vàng theo phương pháp tioure diễn ra theo phương trình sau:



Ion sắt ba được cung cấp từ phản ứng oxy hóa pirit. Ưu điểm của việc sử dụng tioure để thu hồi các kim loại quý từ chất thải có tính acid sinh ra từ quá trình ngâm chiết nhờ vi khuẩn là ở chỗ nó không đòi hỏi phải trung hòa chất thải vốn là một công đoạn tiên quyết của quy trình xianua hóa. Ngoài ra, tioure và các sản phẩm phân giải của nó không gây nên những rủi ro cho môi trường so với chất ngâm chiết xianua. Những sự lo lắng mới đây về hiệu quả đối với môi trường và giá thành của các phương pháp vẫn sử dụng cộng với những thành công đạt được nhờ hoạt động thúc đẩy của vi khuẩn đã cho phép giả thuyết rằng công nghệ sinh học phải được ứng dụng cho việc chế biến quặng vàng. Giá thành chi phí cho sự tuyển khoáng sinh học các loại quặng vàng sunfua chịu lửa sẽ giảm do quy mô của nhà máy sẽ được nâng cao.

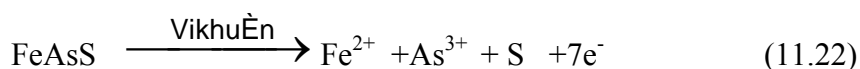
4.2. Thu hồi vàng từ các tài nguyên chứa asenopirit

Sự tuyển khoáng asenopirit đã được tiến hành từ những năm 1960. Vi khuẩn *Thiobacillus ferrooxidans* có khả năng giải phóng vàng từ quặng chứa cacbon trong đó asen chiếm khoảng 6%.

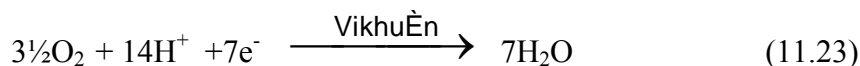
Các điều kiện tối ưu cho sự ngâm chiết đã xác định được là: tỷ trọng bùn khoáng là 20%, pH 1,5-2,0 và kích thước hạt là 0,05mm.

Dưới các điều kiện này, 90% acid asen và 60% sắt đã được tách ra từ quặng sau 10 ngày ngâm chiết. Về mặt sinh hóa học, sự oxi hóa asenopirit có thể được biểu diễn bằng các phản ứng điện hóa sau đây:

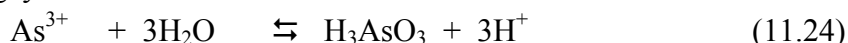
-Ôxy hóa anot:



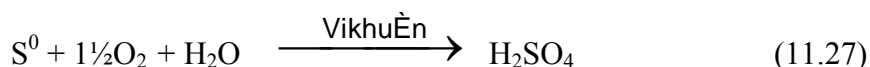
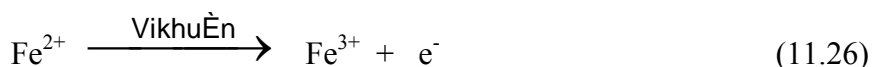
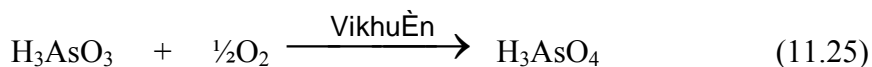
-Khử catot:



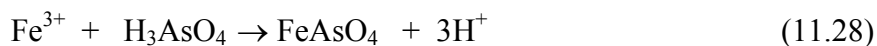
Ion As^{3+} được giải phóng trong phương trình (11.22) sẽ bị thủy phân ngay thành acid asenic



Acid asenơ (phương trình 11.24) cũng như Fe^{2+} và S (phương trình 11.22) sẽ được oxy hóa tiếp tục



Ion sắt ba có ái lực cao với acid asenic và một kết tủa asenat sắt ba sẽ được tạo thành:



Tổng các phương trình từ 11.22 đến 11.28 sẽ là:



Dựa trên các phản ứng oxy hóa asenopirit kể trên, một nhà máy sản xuất thử đã được xây dựng từ năm 1975 để thu hồi vàng từ asenopirit. Theo quy trình này, một loại tinh quặng asenopirit chứa 10% asen đã được ngâm chiết theo phương pháp kép nhờ sử dụng vi khuẩn.

Khoảng 90% hàm lượng asen đã được chiết ra trong khoảng 100 giờ. Các điều kiện ngâm chiết là: tỷ trọng bùn khoáng là 20%, 75% có kích thước hạt nhỏ hơn 0,074mm, nhiệt độ 25-28⁰C và pH 1,75-2,1. Sau quá trình ngâm chiết nhờ vi khuẩn và công đoạn tách biệt pha lỏng rắn, phần còn lại được trung hòa bằng vôi tới pH 3,5.

Phần asenat chứa kết tủa được loại bỏ và dung dịch sau khi được điều chỉnh pH cũng như nồng độ chất dinh dưỡng sẽ được đưa trở lại bước ngâm chiết.

Một nghiên cứu khác (Polkin và ctv, 1985) cũng chỉ ra rằng các phương pháp ngâm chiết nhờ vi khuẩn là các phương pháp có hiệu quả nhất trong việc giải phóng vàng nằm dưới dạng phân tán mịn từ các tinh quặng asenopirit, chẳng hạn loại tinh quặng chứa 8,4% asen, 24,1% sắt, 26% lưu huỳnh và 290g vàng/ tấn.

Hạt của các tinh quặng này có kích thước dưới 0,074mm. Việc ngâm chiết được tiến hành theo một hệ thống nối tiếp gồm ba bể phản ứng, mỗi bể có dung tích hoạt động 1,5 dm³ chứa 25% chất rắn.

Bùn khoáng được cấy bằng giống *Thiobacillus ferrooxidans*, được khuấy bằng biện pháp cơ học và thông khí (với tốc độ 3 dm³ không khí/dm³ bùn khoáng/phút).

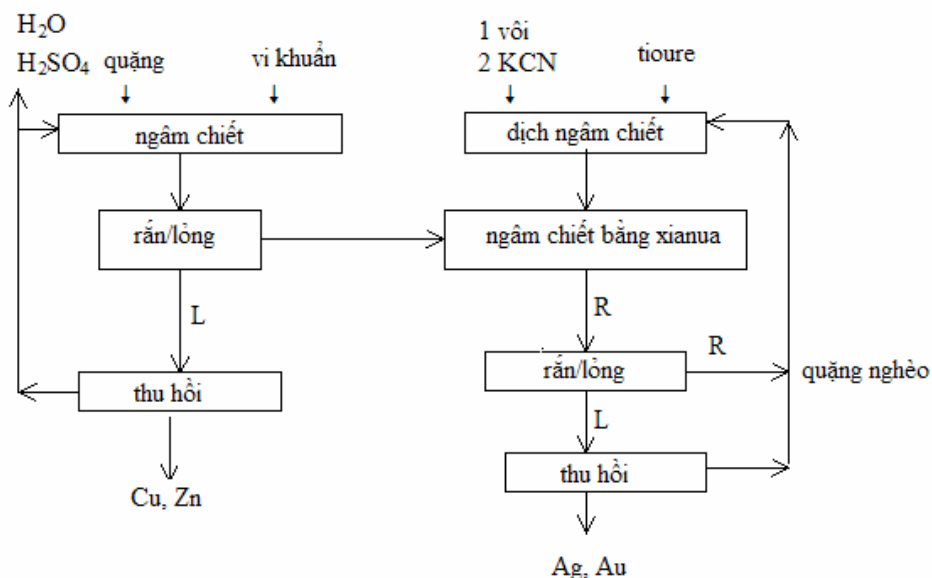
Việc ngâm chiết được hoàn thành sau 30 giờ với một sự thu hồi asen tới 90%. Phần còn lại sau khi ngâm chiết được trung hòa bằng vôi và được xử lý bằng phương pháp xianua hóa trong các dịch huyền có tỷ trọng bùn khoáng là 20% chứa 1% KCN.

Hiệu suất thu hồi vàng nằm trong khoảng 88-92%. Nếu tinh quặng asenopirit chứa vàng được ngâm chiết trực tiếp bằng dung dịch KCN thì hiệu suất thu hồi cuối cùng chỉ nằm vào khoảng 7-10%. Nếu asenopirit chứa vàng trước hết được nung ròi sau đó mới ngâm chiết bằng các dung dịch KCN thì vàng thu hồi cũng không vượt quá 77%. Những sự so sánh này chỉ ra ưu thế và hiệu quả của phương pháp thủy luyện kim sinh học.

Sau công đoạn ngâm chiết nhờ vi khuẩn, chất rắn chứa vàng và bạc được chuyển sang tuyển thu hồi kim loại quý. Ở đó vàng và bạc được hòa tan nhờ biện pháp (trung hòa với vôi) và xianua hóa học nhờ xử lý trực tiếp bằng tiore mà không cần trung hòa.

Từ tuyển ngâm chiết nhờ vi khuẩn, bất cứ lượng Cu và Zn nào giải phóng ra từ quặng đều có thể được thu hồi nhằm tăng hiệu quả kinh tế của quá trình.

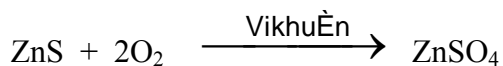
Các đặc điểm cơ bản của quá trình ngâm chiết kim loại quý với sự tham gia của vi khuẩn được minh họa trong hình 11.2 dưới đây.



Hình 11.2. Quá trình ngâm chiết kim loại quý nhờ vi khuẩn (R= rắn; L=lỏng)

5. Ngâm chiết sinh học sunfua kẽm

Sự tách chiết kẽm từ các quặng sunfua nhờ *Thiobacillus ferrooxidans* được thực hiện theo phản ứng sau đây:



Các bể ngâm chiết quặng sunfua kẽm bán công nghiệp nhờ *Thiobacillus ferrooxidans* đã tạo được những nồng độ kẽm trong dịch mang (pregnant solution) tới $120\text{g}/\text{dm}^3$ và tốc độ giải phóng kẽm vào dung dịch tới $1300\text{mg}/\text{dm}^3/\text{giờ}$. Dùng phép tách chiết kim loại bằng điện phân từ dung dịch ngâm chiết nhờ vi khuẩn (do Cominco, Trail, B.C., Canada thiết kế) đã đạt được một hiệu quả tới khoảng 80% với chất lượng kẽm thành phẩm loại cao. Các nghiên cứu động học chỉ ra rằng tốc độ tách chiết, $V(\text{mg}/\text{dm}^3/\text{giờ})$ là một hàm số của kích thước hạt quặng sunfua, d và được biểu diễn bằng phương trình sau:

$$V = V_m \exp(-kd) = 569,2 \exp(-5,24 \cdot 10^{-2} d)$$

Trong đó V_m là tốc độ lý thuyết cực đại có thể đạt được và k là một hằng số tỷ lệ thuận.

Trong một nghiên cứu khác được tiến hành vào năm 1986, B.Zurita đã tìm thấy rằng tốc độ đối với các hạt quặng nhỏ hơn $12\mu\text{m}$ được tính theo phương trình:

$$V = \exp(-0,136k + 5,452)$$

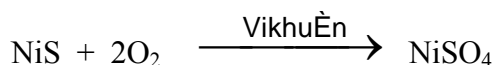
và đối với các hạt có kích thước lớn hơn $12\mu\text{m}$:

$$V = \exp(-0,03d + 5,88)$$

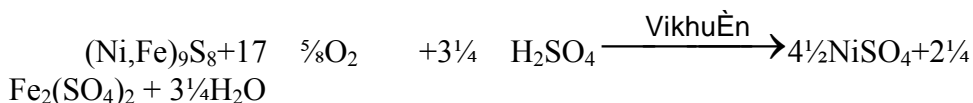
Khi sử dụng phương trình thứ hai để tính tốc độ, sự tách chiết kẽm được đặc trưng bởi các biến ngậm chiết. Bằng cách cực đại hóa phương trình hồi quy, các giá trị biến tối ưu đã được xác định là: nhiệt độ = 35°C ; pH = 2,3; tỷ trọng bùn khoáng = 22%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,75\text{g/dm}^3$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,66\text{g/dm}^3$, CO_2 trong không khí = 7,9% và diện tích riêng phần của tinh quặng sunfua kẽm-chì không thể xử lý có hiệu quả kinh tế bằng quy trình làm nóng chảy thông thường. Song các kỹ thuật thủy luyện kim sinh học đã được sử dụng thành công để thu hồi kẽm và các kim loại khác từ các sunfua kém phẩm chất. Trong các kỹ thuật này, kẽm, đồng, và cadmium sẽ được hòa tan, trong khi chì vẫn còn nằm lại trong quặng. Vì sunfua kẽm không hòa tan trong môi trường ngậm chiết sinh học chứa acid sunfuric cho nên có thể thực hiện được dễ dàng việc tách chiết chọn lọc.

6. Tách chiết coban và niken từ quặng sunfua nhờ biện pháp vi sinh vật.

Sự trao đổi niken và độc tính của niken đối với vi sinh vật đã được Kaltwasser và Frings nghiên cứu vào năm 1980. Nồng độ vết của niken có thể kích thích sinh trưởng của vi sinh vật trong khi các nồng độ lớn hơn lại tác động như chất kim hãm. Người ta đã tìm thấy các vi khuẩn dị dưỡng tiết ra các acid hữu cơ có thể dùng để ngậm chiết các quặng laterit chứa niken (Bosecker, 1986). Chẳng hạn, *Penicillium simplicissimum* đã tách chiết được tới khoảng 70% niken từ quặng laterit nhờ các vi sinh vật dị dưỡng có một tương lai đầy hứa hẹn. Sự khai thác các mỏ niken nghèo trong tương lai sẽ phụ thuộc nhiều vào các kỹ thuật rẻ tiền như kỹ thuật ngậm chiết acid -vi khuẩn. Các muối sunfua tổng hợp hoặc tồn tại trong tự nhiên (NiS) có thể được oxy hóa nhờ *Thiobacillus ferrooxidans* theo phương trình sau:



Pentlandit là loại quặng sunfua niken chủ yếu gặp trong hầu hết các mỏ có từ tính. Trong quặng này, niken được thay thế bằng coban với tỷ lệ Ni/C = 50/2. Việc ngậm chiết sinh học pentlandit có thể biểu diễn bằng phương trình sau:



Trong các thực nghiệm với các bình ngâm chiết, trên 80% niken đã được tách khỏi pentlandit trong 12 tuần, còn trong các thực nghiệm ở bể ngâm chiết trên 97% niken đã được tách chiết trong 3 ngày. Các thực nghiệm khác đã cho thấy rằng sự tách chiết niken được cải thiện về cơ bản khi có mặt vi khuẩn cố định nitơ *Beijerinckia lacticogenes*.

Người ta cho rằng sinh trưởng của *Thiobacillus ferrooxidans* được kích thích bởi sự giải phóng ion amon nhờ *Beijerinckia* là vi khuẩn nhận được nguồn cacbon dành cho sinh trưởng từ *T. ferrooxidans*. Theo các kết quả đã công bố, quá trình ngâm chiết sunfua coban nhờ *T. ferrooxidans* trong các thí nghiệm có cấy giống đã diễn ra với tốc độ 75 lần nhanh hơn so với các mẫu đối chứng vô trùng (Karavaiko, 1985) và nồng độ đạt được đã lên tới 30g/dm³ (Torma, 1978).

IV. Sự tích lũy kim loại nhờ vi khuẩn và tảo

Vi sinh vật bao gồm xạ khuẩn, vi khuẩn lam, các vi khuẩn khác cũng như nấm sợi và nấm men có khả năng tích lũy các kim loại nặng và các nuclit phóng xạ từ môi trường ngoài. Số lượng tích lũy được có thể rất lớn, và các cơ thể tham gia vào quá trình tích lũy này có thể dao động từ những mối tương quan lý-hóa như hấp phụ và kết tủa tới các quá trình phụ thuộc vào trao đổi chất tế bào như quá trình vận chuyển. Cả tế bào sống lẫn tế bào chết đều có khả năng đối với việc hấp thụ và tích lũy và do vậy các sản phẩm được tạo ra sẽ là bản thân các tế bào vi sinh vật hoặc các chất bắt nguồn từ các tế bào như các sản phẩm tiết của trao đổi chất, các polisaccarit, các cấu tử của thành tế bào.

1. Cơ chế của sự tích lũy kim loại nhờ vi sinh vật

1.1. Sự hấp phụ sinh học không phụ thuộc vào trao đổi chất

Hấp phụ là sự tích lũy hay sự tập trung các chất, chất bị hấp phụ, lên một bề mặt hoặc mặt phân pha, chất hấp phụ. Ngược lại, hấp thụ xảy ra khi các nguyên tử hay các phân tử của một pha xâm nhập gần như đồng đều vào trong các nguyên tử hoặc phân tử của một pha khác. Có ba kiểu hấp phụ chính.

Kiểu thứ nhất do lực hấp dẫn điện gây ra và thường được gọi là sự hấp phụ “trao đổi” - là sự hấp dẫn của các ion tích điện dương đối với các phối tử tích điện âm trong nguyên liệu tế bào

Loại hấp phụ thứ 2, trong đó các phân tử được hấp phụ có thể có sự chuyển dịch bên trong bao gồm các lực van der Waal.

Loại thứ 3 là lực hấp dẫn hóa học giữa chất bị hấp phụ và chất hấp phụ. Nói chung khó có thể tách biệt giữa sự hấp phụ vật lý và sự hấp phụ hóa học và đa số các loại hấp phụ đều bao gồm cả ba dạng đã mô tả ở trên.

Thuật ngữ “hấp thu” (sorption) có thể bao gồm cả hấp phụ và hấp thụ và dùng để chỉ một quá trình trong đó một thành phần chuyển dịch từ một pha sang một pha khác, thường là một pha rắn. Do vậy thuật ngữ “hấp thu sinh học” được dùng để mô tả những mối tương quan lý- hóa không định hướng có thể tồn tại giữa các loại kim loại/ nuclid phóng xạ và các thành phần của tế bào.

*Vi khuẩn và vi khuẩn lam

Thành tế bào của các vi khuẩn Gram dương hấp thu kim loại có hiệu quả tuy rằng phổ hấp thu của chúng có thể khá rộng. Đối với *B. megaterium*, *Micrococcus lysodeikticus*, và *Streptococcus mutans* sự liên kết kim loại được xếp theo thứ tự sau đây: $La^{3+} > Cd^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > K^+ > Na^+$. Thành tế bào của *Bacillus subtilis* có ái lực chọn lọc đối với một số cation và đường như rằng nhóm $-COO$ của acid glutamic trong peptidoglycan là vị trí chủ yếu đối với sự kết tủa kim loại.

1.2. Sự tích lũy nội bào phụ thuộc vào trao đổi chất

*Vi khuẩn và vi khuẩn lam

Người ta đã phát hiện được các hệ thống vận chuyển đặc hiệu đối với Mn^{2+} ở một số vi khuẩn như *E. coli*, *B. subtilis* và *Lactobacillus plantarum*. Ngoài ra, Mn^{2+} cũng như (Ni^{2+} và Co^{2+}) có thể được hấp thu như là một cơ chất có ái lực thấp của hệ thống vận chuyển Mg^{2+} . Ở *L. plantarum*, sự vận chuyển Mn^{2+} phụ thuộc vào gradien H^+ xuyên màng và người ta đã phát hiện được các nồng độ nội bào của kim loại này cao tới 30mmol/l.

Ở vi khuẩn lam *Anabaena cylindrica* người ta đã ghi nhận được hệ thống vận chuyển Ni^{2+} có tính đặc hiệu cao. Niken được tập trung nhiều hơn khoảng 2.700 lần ở bên trong tế bào và sự hấp thu phụ thuộc vào hiệu thế của màng và bị kìm hãm trong bóng tối hoặc bởi các chất kìm hãm trao đổi chất. Sự hấp thu tích cực Cd^{2+} cũng được phát hiện ở *Anacystis nidulans* và quá trình này bị kìm hãm cạnh tranh bởi Ca^{++} và Zn^{2+} .

Câu hỏi ôn tập

1. Các *Thiobacillus* là những vi khuẩn chịu acid:

- Xác định tip dinh dưỡng của các vi khuẩn nhóm này.
- Xét nhu cầu oxy, phải xếp chúng vào nhóm nào ?

c. Cho biết một môi trường nuôi cấy thích hợp cho nhóm vi khuẩn này ?

2. Bản chất của hiện tượng ăn mòn các ống dẫn bằng sắt là:

a. Sự oxy hóa H_2S thành acid sulfuric.

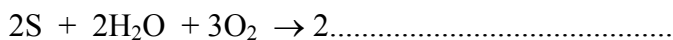
b. Sự khử acid sulfuric thành H_2S .

c. Sự oxy hóa H_2S thành lưu huỳnh

d. Sự khoáng hóa chất hữu cơ thành H_2S

3. Trong sự ăn mòn ống dẫn nước, sự oxy hóa dưới điều kiện kỵ khí đã diễn ra với sự tham gia của các quá trình..... khi có mặt giống vi khuẩn có tên là..... và..... trong môi trường.

4. Sự oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố được thực hiện bởi các vi khuẩn như *Thiobacillus thiooxidans* diễn ra theo phương trình sau đây:



Chương 12

Bài tập cơ sở và nâng cao

I. Phần câu hỏi

1. Điền vào chỗ trống

Câu 1:

a. Thế giới vi sinh vật vô cùng đa dạng. Để nghiên cứu chúng các nhà khoa học phải dựa vào các tiêu chí về để sắp xếp chúng vào bậc thang phân loại và đặt tên.

b. Các vi sinh vật được sắp xếp vào bậc thang phân loại từ thấp đến cao:.....Loài là bậc thang phân loại thấp nhất.....là bậc thang phân loại cao nhất. Loài được đặt tên theo hệ thống.....theo tiếng.....viết nghiêng. Ví dụ vi khuẩn gây bệnh than có tên là *Bacillus anthracis*.

Câu 2:

Virus là những thực thể gây nhiễm..... mà gen nom của chúng chỉ chứa hoặc là..... hoặc là Chúng chỉ nhân lên trong bằng cách sử dụng bộ máy.....và của tế bào để tổng hợp nên các bản sao của bản thân mình nhằm truyền của bản thân chúng sang các tế bào khác.

Câu 3:

Cấu trúc điển hình của một virus đơn giản nhất bao gồm một..... (.....hoặc.....) và mộtđược gọi là Các virus phức tạp hơn, đặc biệt là các virus động vật còn chứa một lớp vỏ bọc được tạo nên bởi một tổ hợp.....và.....

Câu 4:

a. DNA sợi đơn của virus vừa được transcriptase ngược tổng hợp nên trước hết được chuyển thành..... và sau đó được..... của tế bào chủ.

b. Ở một số virus, lớp vỏ bọc được phủ bởi các..... có bản chất là.....hoặc.....mà vai trò của chúng là để nhận biết (về mặt hoá học) các và gắn vào tế bào mà chúng gây nhiễm.

Câu 5:

a. Lứa tuổi bị nhiễm HIV cao nhất là lứa tuổi

b. Bệnh viêm gan B được truyền chủ yếu qua đường.....

c. Bacteriophage nhân lên nhờ.....và phá huỷ nó. Đó là quá trình....., còn các vi khuẩn chứa một prophage và lưu giữ nó vĩnh viễn trong.....của mình được gọi là các vi khuẩn.....

Câu 6:

a. Prophage, nằm trêncủa vi khuẩn, chính là nguyên liệu di truyền của.....

b. Các hạt tương tự virus song chỉ chứa ARN thuần khiết được gọi làlà bọn gây bệnh ở thực vật có nghĩa kinh tế như.....

c. Các hạt protein thuần khiết gây bệnh thần kinh ở động vật có tên là.....

Câu 7:

a. Hiện tượng một loại virus chỉ nhiễm bệnh trên một vật chủ hay nhóm vật chủ nhất định được gọi làcủa virus. Tính này do các.....tạo nên.

b. Bệnh dại là một bệnhcấp tính thường dẫn đến

Câu 8:

Trong các cấu trúc sau đây, hai cấu trúc nào không gặp trong một hạt HIV: a) ARN sợi đơn; b) các glicoprotein bề mặt; c) DNA sợi kép; transcriptase ngược; e) protein vỏ; f) DNA sợi đơn.

Câu 9:

a. Nhiễm sắc thể vi khuẩn khi nằm dưới dạng..... sẽ khác với dạngbởi một cấu trúc đậm đặc hơn và ít cồng kềnh hơn.

b. Khi có mặt của lisozim và saccarose, một trực khuẩn Gram âm sẽ bị biến đổi thành một tế bào.....có tên là.....và mất đi dạng hình que của nó.

Câu 10:

Nấm là sinh vật thuộc dạng tế bàoCơ thể có thể đơn hay đa bào dạng sợi, có thành.....(một số ít có thành.....), không có.....sống dị dưỡng theo kiểu..... Sinh sản bằngkhông có.....và

Câu 11:

Sự khác biệt cơ bản của các tế bào Prokaryote so với tế bào Eukaryote là ở chỗ:

a. Nguyên liệu di truyền của chúng không được bao bọc bởi.....

b. Thiếu các bào quan như:.....được bao bọc bởi màng..

c. Thành tế bào luôn luôn chứa phức hệ.....hay còn gọi là.....

d. Ribosome của các tế bào prokaryote thuộc loại

Câu 12:

a. Nội bào tử là thể của các tế bào vi khuẩn, không phải là phương tiện sinh sản, khi gặp điều kiện thuận lợi, bào tử sẽ nảy mầm và mỗi bào tử chi cho tế bào dinh dưỡng.

b. Nội bào tử có tính cao, do vậy thường gây khó khăn trong công tác bảo quản thực phẩm và trong việc khử trùng ở các bệnh viện.

Câu 13:

a. Nhân tố di truyền ngoài nhân của vi khuẩn có tên là các, chúng không quyết định sự sống còn của tế bào vi khuẩn song mang một số gen quan trọng như các gen.....,

b. Các vi khuẩn lưu huỳnh màu tía và màu lục sử dụng..... làm chất cho điện tử trong quang hợp, kết quả là tạo thành..... tích lũy bên trong tế bào hoặc được tiết ra bên ngoài tế bào.

Câu 14:

a. Cố định nitrogen là quá trình chuyển hoá nitrogen của khí quyển (N_2) thành..... một chất cần thiết cho sự sinh tổng hợp các amino acid.

b. Trong thế giới vi sinh vật, chỉ có một số loài..... là có khả năng cố định nitrogen phân tử.

c. Enzyme chịu trách nhiệm đối với sự cố định nitrogen phân tử có tên là

d. Có.....nhóm vi khuẩn cố định nitrogen chủ yếu, đó là.....

Câu 15:

a. Nitrogenase dễ bị làm bất hoạt bởi....., vì vậy các tế bào vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen hoặc là phải hô hấp mạnh ở vùng bề mặt tế bào để giữ cho phần bên trong tế bào vắng mặt oxy (chẳng hạn ở).

b. Protein được chuyển hoá thành các peptid bởi các enzyme có tên là....., còn các peptid được phân giải thành các aminoacid có tên là.....

Câu 16:

a. Quá trình phản nitrat hoá là một quá trình có hại đối với nông nghiệp, bởi vì.....

b. Sự khử nitrogen dạng khí thành amoniac có tên là.....

c. Phức hệ enzyme chịu trách nhiệm đối với sự cố định nitrogen cộng sinh có tên là....

Câu 17:

a. Sự phản nitrat hoá xảy ra mạnh ở những nơi oxy.....

b. Chi vi khuẩn oxy hoá amoniac thành nitrit có tiếp đầu ngữ....., trong khi Chi vi khuẩn oxy hoá nitrit thành nitrat có tiếp đầu ngữ.....

c. Một vi khuẩn đất sinh bào tử sống kỵ khí được nghiên cứu nhiều do khả năng cố định nitrogen mạnh của nó có tên là.....

Câu 18:

a. Vi khuẩn cố định nitrogen sống cộng sinh trong bèo hoa dâu thuộc bộ(1).... sinh oxy và có tip dinh dưỡng là.....

b. Vi khuẩn không lưu huỳnh màu tím hay gặp trong các nguồn nước tự nhiên thuộc bộ..... sinh oxy và có tip dinh dưỡng là.....

c. Chi nào trong các chi sau đây chứa các loài cố định nitrogen sống cộng sinh:

Rhizobium/ Anabaena/ Clostridium/ Frankia/ Azotobacter.

Câu 19:

Bất cứ lúc nào cũng có thể tìm thấy trên cơ thể của một người trưởng thành ít nhất..... tế bào vi sinh vật, đa số trong chúng là..... và chúng được gọi là..... của cơ thể con người.

Câu 20:

Một số vi sinh vật sống trên da, song đa số sống trên các bề mặt..... của cơ thể, đó là..... bao phủ bên trong mũi, miệng, đường hô hấp trên, đường ruột, và đường niệu sinh dục.

Câu 21:

.....không được coi là một bộ phận của khu hệ bình thường.

Câu 22:

Nhiều cơ quan và vị trí ở bên trong của cơ thể khỏe mạnh như..... không chứa vi sinh vật.

Câu 23:

Nếu hiện tượng cần sự có mặt của mầm bệnh sau đó sẽ giải phóng độc tố của mình vào các tổ chức thì hiện tượng..... chỉ là hậu quả của sự tiếp xúc giữa độc tố với tổ chức mà không nhất thiết cần sự có mặt của mầm bệnh.

Câu 24:

Trường hợp ngộ độc thức ăn có tên là botulism (liệt do ngoại độc tố tác động lên hệ thần kinh) không phải là một sự nhiễm trùng mà là một sự.....

Câu 25:

Một bệnh nhiễm khuẩn có thể được truyền bằng, tức là sự tiếp xúc có hiệu quả giữa một cơ thể đã bị nhiễm và một cơ thể khỏe mạnh. Không được nhầm lẫn phương thức truyền bệnh này vớihoặc là các phương thức truyền qua một động vật trung gian có tên là, giữa một cơ thể bị nhiễm khuẩn với một cơ thể khỏe mạnh.

Câu 26:

Nếu sự.....gây nên một sự tham gia có hiệu quả của cơ thể trong việc hình thành kháng thể, được gọi là.....thì sự.....là một phương pháp đưa vào cơ thể các kháng thể đã được tổng hợp từ trước; đó là một sự miễn dịch.....Trường hợp đầu là trường hợp tiêm chủng để....., còn trường hợp sau là trường hợp tiêm chủng để

Câu 27:

Chất kháng sinh là các chất hóa học do VSV tiết ra có khả năng..... hoặccủa các VSV khác.

Câu 28:

Penicillin G chủ yếu hoạt động chống lại vi khuẩn Gram....., vi răngNhược điểm chủ yếu của penicillin G là:.....

Câu 29:

- a. Dùng vaccine là đưa vào cơ thể một loại.....lấy từ vi sinh vật gây bệnh.
- b. Vaccin là vi sinh vật sống được lấy từ vi sinh vật sống đã mất.....
- c. Giải độc tố được sản xuất từ..... của vi sinh vật.
- d. Muốn phòng dịch có kết quả, vaccin phải được dùng cho% đối tượng cảm thụ.
- h. Vaccine được dùng cho những người.....

Câu 30:

Trẻ nhỏ và người cao tuổi dễ mắc cảm với các bệnh nhiễm trùng vì ở họ hoặc là hệ thống miễn dịch.....hoặc là.....

Câu 31:

Giai đoạn phát triển đầu tiên của vi sinh vật công nghiệp được đánh dấu bằng công trình của Louis Pasteur (1878) chứng minh vi sinh vật là tác nhân của sự lên men, và sau đó các công trình của:

- a. -.....(1886) dùng các chủng nấm men thuần khiết trong sản xuất bia.

b. -(1898) phát hiện ra dịch chiết nấm men có khả năng gây ra quá trình lên men rượu (chứng minh lên men thực chất là một quá trình enzyme).

c. Giai đoạn thứ 2 của CNVS được đánh dấu bằng.....

d. Giai đoạn hiện tại của CNVS được đánh dấu bằng sự phát triển của công nghệ di truyền với:

- Sự phát hiện các enzym.....(các con giao cắt)
- Sự phát hiện ra các(các vector)
- Sự gắn các gen lạ mang các thông tin tổng hợp các..... vào một cơ thể.
- Sự kiểm tra ngày càng tốt hơn sự.....của các gen này.

Câu 32:

Theo Thomas D.Brock (1995), Các sản phẩm có ý nghĩa công nghiệp mang tính thương mại do vi sinh vật tạo thành có thể được phân thành 5 loại đó là:

- a.
- b.....
- c.....
- d.....
- e.....

Câu 33:

Trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật để thu nhận sinh khối tế bào, cần lưu ý:

- a. Các biện pháp tránh nhiễm tạp thường dùng là.....hoặc.....
- b.Trừ tảo, sự thu nhận sinh khối các vi sinh vật khác cần một sự.....
- c. Nhiệt tạo ra phải được loại đi bằng một hệ thống.....

Câu 34:

- a. Mục đích của khử trùng Tyndal là tiêu diệt các vi khuẩn mang.....ở nhiệt độ.....Nguyên lý của phương pháp là để cho cácnày.....thành.....rồi sau đó đun sôi để giết chết các thểđó.

b. Trong kỹ thuật xác định số lượng tế bào bằng phương pháp nuôi trên môi trường rắn, người ta gọi khuẩn lạc là.....(là chữ viết tắt của.....) vì rằng không phải bao giờ nó cũng được mọc lên từ một tế bào.....

Câu 35:

Để sản xuất bia người ta sử dụng đại mạch đã nảy mầm (nha), hublon, nấm men và....(a)..... Các nguồn tinh bột khác hoặc các(b).....chứa đường có thể được để bổ sung vào nha đại mạch là : nha lúa mì (Triticum), các loại ngũ cốc chưa nảy mầm (đại mạch, lúa mì, ngô, lúa), các sản phẩm phân huỷ tinh bột và các đường có thể lên men. Việc sử dụng các nguyên liệu bổ sung này đòi hỏi phải có sự bổ sung (một phần) các chế phẩm.....(c).....có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Câu 36:

Cảm giác hăng hái (invigorating) và say (intoxicating) của bia là do....(a).....gây ra, mùi thơm, hương vị và vị đắng của bia là do.....(b)....., Giá trị dinh dưỡng là do hàm lượng các chất keo hoà tan không lên men (bao gồm.....(c)... và cuối cùng, tác dụng giải khát là do.....(d).....gây ra.

Câu 37:

Tác dụng của hublon là một chất làm trong vì nó kết tủa.....(a).....trong dịch hèm, là chất làm thay đổi đặc tính của dịch hèm do tạo nên.....(b)....., và cùng với ethanol và CO₂ tạo nên các đặc tính.....(c)..... mạnh tạo tính ổn định cho bia. Hàm lượng.....(d).....chứa trong hublon làm tăng khả năng tạo(e).....của bia

Câu 38:

Dịch đường hoá sau khi nấu, được gọi là....(a)....., dịch này sau khi lọc để loại trừ và bã, được bổ sung hublon và đun nóng nhiều giờ nhằm chiết các thành phần mong muốn từ hublon và nhằm kết tủa và loại các ... (b)..... có mặt trong hublon để tăng tính ổn định của bia

Câu 39 :

Brandy là rượu mạnh cất từ, *whisky* là rượu mạnh cất từ....., *rum* cất từ.....lên men, còn *vodka* là rượu mạnh cất từ.....hoặc.....lên men.

2. Hãy trả lời bằng đúng (Đ) hoặc sai (S)

Câu 40:

Trong những sự khẳng định sau đây, đâu là sự khẳng định đúng:

a. Năng lượng giải phóng trong dị hoá được sử dụng trực tiếp cho sự tổng hợp các thành phần tế bào.

b. Đồng hoá cung cấp các viên gạch xây dựng để tổng hợp các thành phần tế bào.

c. Sự tổng hợp các thành phần tế bào là một quá trình giải phóng năng lượng.

Câu 41:

Một chất kháng sinh có hoạt phổ hẹp là chất kháng sinh:

a. Chỉ có tác dụng lên các vi khuẩn Gram âm

b. Chỉ có tác dụng lên các vi khuẩn Gram dương

c. Chỉ có tác dụng lên các vi khuẩn Gram dương lẫn vi khuẩn Gram âm

d. Chỉ tác động lên một nhóm riêng biệt, thậm chí lên một hoặc vài loài vi khuẩn.

e. Được sử dụng rộng rãi hơn trong thực tiễn y học so với các chất kháng sinh có hoạt phổ rộng.

Câu 42:

a. Vi khuẩn là những tế bào

b. Tất cả cầu khuẩn đều di động

c. Mọi vi khuẩn gây bệnh đều có thể đổi hình

d. Sau khi bị thoái hình, vi khuẩn có thể trở về hình thể bình thường nếu điều kiện thích hợp.

Câu 43:

Những nhận định nào dưới đây là đúng với tế bào vi khuẩn

a. Nhân được phân cách với phần còn lại bởi màng nhân

b. Vật chất di truyền là DNA kết hợp với protein histon

c. Không có màng nhân

d. Vật chất di truyền là DNA không kết hợp với protein histon

Câu 44:

a. Acid teichoic là thành phần đặc trưng của tế bào vi khuẩn Gram dương.

b. Sở dĩ có tên gọi "sao chép bán bảo thủ" vì phương thức này cho phép bảo toàn nguyên vẹn 50% lượng DNA có mặt trong tế bào mẹ.

c. Tác nhân gây bệnh giang mai *Treponema pallidum* chuyển động rất nhanh nhờ hệ thống tiên mao bao quanh cơ thể gọi là chu mao.

d. Đặc điểm đặc trưng của một nội độc tố là nó liên kết với tế bào vi khuẩn và sẽ không khi nào được tế bào tiết ra.

Câu 45:

Sản xuất công nghiệp acid glutamic sử dụng các loài thuộc một trong các Chi sau đây:

- a) *Corynebacterium*;
- b) *Pseudomonas*;
- c) *Escherichia* ;
- d) *Acetobacter*;
- e) *Clostridium*.

Câu 46:

Hãy gọi tên các vi sinh vật có khả năng tạo thành các hỗn hợp sau đây nhờ lên men đường:

- a. CO₂ + ethanol
- b. CO₂ + ethanol + acid lactic
- c. CO₂ + ethanol + acid lactic + hydro + acid axetic
- d. CO₂ + ethanol + acid lactic + hydro + acid axetic + butadion
- e. CO₂ + hydro + acid butiric + acid axetic.
- f. CO₂ + hydro + aceton + butanol + ethanol + 2-propanol.

Câu 47:

a. Hồ hấp kị khí là quá trình oxy hóa thu nhận năng lượng trong đó chất nhận điện tử cuối cùng là oxy liên kết.

b. Chất nhận điện tử cuối cùng trong lên men ethanol là acetaldehyde.

c. Ở các vi khuẩn sinh methane thành tế bào chứa peptidoglycan.

Câu 48:

Tìm sự khẳng định sai

Phương trình: $\text{Glucose} + \text{ADP} + \text{P}_{\text{vc}} \rightarrow 2 \text{Ethanol} + 2\text{CO}_2 + \text{ATP}$
là phương trình biểu diễn tổng quát quá trình lên men rượu ở:

- a. *Saccharomyces cerevisiae*
- b. *Sarcina ventriculi*
- c. *Zimomonas mobylis*
- d. *Escherichia coli*

3 Sắp xếp sự mô tả ở bên phải sao cho phù hợp với các thuật ngữ ở bên trái

Câu 49:

Biến nạp	a. Kiểu chuyển gen trong đó một tế bào thể nhận nhận các gen từ các phân tử DNA tự do trong môi trường xung quanh.
Tải nạp	b. Kiểu chuyển gen phụ thuộc vào sự tiếp xúc tế bào - tế bào.
Tiếp hợp	c. Các gen tồn tại ở cùng một vị trí tương ứng trên nhiễm sắc thể tương đồng nhưng khác về mặt trạng thái đột biến.
Hfr	d. Kiểu chuyển gen trong đó một phage được dùng làm phương tiện để mang DNA từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác.
Alen	e. Một tế bào F(trong đó plasmid F được gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ.

Câu 50:

Độc tính (Virulence)	a. Khả năng của một VSV gây nên một bệnh
Bệnh (Disease)	b. VSV, có thể bắt đầu một bệnh ở một cơ thể khỏe mạnh
Khả năng gây bệnh (Pathogenicity)	c. Mức độ về khả năng gây ra một bệnh ở một tác nhân gây bệnh
Tác nhân gây bệnh (Causative agent)	d. Sự phá hỏng các chức năng của cơ thể do nhiễm trùng

II. Trả lời một số câu hỏi

- cấu tạo, dinh dưỡng, sinh sản.
 - Loài(species)- Chi (genus)- Họ (family) -Bộ (order) -Lớp (class)-Ngành (phylum)- Giới (kingdom)-Siêu giới (superkingdom); tên kép, tiếng Latinh.
- không có cấu trúc tế bào; DNA; RNA; các tế bào vật chủ; sinh năng lượng; sinh tổng hợp; genom.
- lõi acid nucleic; DNA; RNA; vỏ protein; capsid; lipid, hydratcarbon; protein.
- DNA sợi kép; gắn vào genom của tế bào chủ
 - gai; hydratcarbon; protein; thụ thể (receptor).
- từ 13 đến 19;
 - máu
 - vi khuẩn; gây tan; con cái; tiềm tan.
- Nhiễm sắc thể; Bacteriophage

7. chuyên hóa; gai để nhận biết các thụ thể của tế bào mà chúng gây nhiễm.
8. c; f.
9. a. siêu xoắn; giản xoắn; b. spheroplas.
10. nhân chuẩn; kitin; cellulose; lục lạp; hoại sinh, kí sinh, cộng sinh; bằng bào tử; lông; roi.
11. DNA; màng nhân; bào quan; peptidoglycan; histon, 70S.
12. a. nghỉ; một; b. kháng nhiệt.
13. a. plasmid, b. đề kháng với các chất kháng sinh; sản xuất các chất có khả năng gây bệnh; sản xuất các chất bacteriocin; tạo nên một đặc tính trao đổi chất ở vi khuẩn.
14. a. amoniac; b. vi sinh vật; c. nitrogenase; d. hai; nhóm cộng sinh và nhóm không cộng sinh.
15. a. oxy; *Azotobacter*; b. protease; peptidase.
16. làm mất nitrogen của đất và do vậy, làm giảm chất dinh dưỡng cho sinh trưởng của thực vật.
17. a. vắng mặt; b. nitroso; nitro; c. *Clostridium pasteurianum*.
18. a. (có); quang dưỡng vô cơ; không; quang dưỡng hữu cơ; c. *Rhizobium*, *Anabaena*, *Frankia*.
19. 100 nghìn tỉ; vi khuẩn; khu hệ bình thường.
20. trong; màng nhầy.
21. các virus kí sinh nội bào.
22. dịch não tủy, máu, bàng quang, tử cung, vòi Falop, tai giữa, thận...
23. Nhiễm độc; ngộ độc.
24. nhiễm độc.
25. tiếp xúc trực tiếp; cắn hoặc đốt; vector truyền bệnh.
26. tiêm chủng; miễn dịch chủ động nhân tạo; trị liệu huyết thanh học; thụ động nhân tạo; phòng bệnh; chữa bệnh.
27. ức chế, tiêu diệt chọn lọc; kìm hãm sự nhân lên.
28. dương; các vi khuẩn Gr(+) có thành tế bào được cấu tạo chủ yếu từ peptidoglycan.
29. a.kháng nguyên; b. độc tính; c. ngoại độc tố; d. 80; h. khoẻ mạnh.
30. chưa hoàn chỉnh; không còn hiệu quả nữa.
31. a.Gerhard Henrik Armauer Hansen ; b. Eduard Buchner ; c. sự xuất hiện các chất kháng sinh; chọn lọc di truyền các thể đột biến; sự phát

triển của phương pháp nuôi cấy liên tục; d. restrictase; plasmid; protein đặc biệt; biểu hiện.

32. a. Bản thân tế bào VSV là các sản phẩm mong muốn
b. Các enzym do VSV tạo nên: amylase, protease, lipase.
c. Các dược phẩm: các chất kháng sinh, độc tố, alkaloit.
d. Các hóa chất đặc biệt và các chất điều vị thực phẩm.
e. Các hóa chất thông dụng được sản xuất bằng con đường VSV bao gồm ethanol, axid acetic, axid lactic....
33. a. vô trùng hoặc sạch; b. thông khí mạnh; c. làm lạnh.
34. a. nội bào tử; 100⁰C; bào tử; nảy mầm; tế bào mới; dinh dưỡng.
b. đơn vị hình thành khuẩn lạc; CFU (colony forming unit); đơn độc.
35. a. nước; b. nguyên liệu chứa đường; enzyme.
36. a. ethanol; b. hublon; c. hydratcarbon, protein; d. CO₂.
37. a. protein; b. hương thơm và vị đắng; c. kháng sinh; d. pectin; bột.
38. a. dịch hèm; b. protein.
39. a. vang; nha lên men; rỉ đường; ngũ cốc, khoai tây.
40. b.
41. d.
42. d.
43. c,d.
44. a; d.
45. a.
46. a. *Saccharomyces cerevisiae*, *Sarcina ventriculi*
b. *Leuconostoc meseteroides*
c. *Escherichia coli*
d. *Enterobacter aerogenes*
e. *Clostridium butyricum*
f. *Clostridium acetobutylicum*
47. a. (Đ); b. (Đ); c (S).
48. c.
49. a. biến nạp; b. tiếp hợp; c. alen; d. tải nạp; e. Hfr.
50. a. khả năng gây bệnh; b. tác nhân gây bệnh; d. độc tính; e. bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Kiều Hữu Ảnh. 1999. Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp. NXB KHKT. Hà Nội.
2. Hoàng Đình Hòa, Công nghệ sản xuất malt và bia. NXB KHKT Hà Nội, 1998.
3. Lê Thi Liên Thanh & Lê Văn Hoàng, Công nghệ chế biến sữa và các sản phẩm từ sữa. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 2002.
4. Nguyễn Đình Thương & Nguyễn Thanh Hằng, Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 2000.
5. Lương Đức Phẩm. 1998. Công nghệ vi sinh. NXB Nông nghiệp. Hà Nội
6. Lê Xuân Phương. 2001. Vi sinh vật công nghiệp. NXB Xây dựng. Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú - Hóa sinh Công nghiệp. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 1998.
8. Wolfgang Fritche. 1997. Cơ sở hoá sinh của vi sinh vật học công nghiệp (Kiều Hữu Ảnh và Ngô Tự Thành dịch). NXB KHKT.

II. TÀI LIỆU TIẾNG NƯỚC NGOÀI

1. Aiba S., Hemphrey A. E. and Millis F. F.. 1973. Biochemical Engineering. Second Edition. Academic Press.
2. Reh, H-J. Deiana, 1994.
Annales, et exercices de microbiologie ge'ne'rale, Doin Editeur, Paris
3. Schlegel, H.G., 1992.
Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart New York.

III. CÁC THÔNG TIN TỪ MẠNG

<http://www.google.com.vn/>; <http://vietsciences.free.fr/design/home.htm>
<http://vietsciences.free.fr> và <http://vietsciences.net> Nguyễn Lâm Dũng
<http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr> Võ Thị Diệu Hằng
<http://vietsciences.free.fr> Phạm Văn Tuấn