

**ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA
KHOA HOÁ KỸ THUẬT
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

**GIÁO TRÌNH
CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC PHẨM II
THỜI LƯỢNG 45 TIẾT**

ĐÀ NẴNG 2007

MỞ ĐẦU

Công nghệ sinh học là một ngành khoa học đang được thế giới quan tâm. Giá trị của công nghệ sinh học là ở chỗ đó là một công cụ có thể áp dụng cho nhiều ngành kinh tế như sản xuất lương thực thực phẩm, chăn nuôi thú y, công nghiệp dược và công nghiệp hoá học, chuyên hoá sinh khối thành năng lượng, xử lý phế liệu và phụ liệu công nông nghiệp, phòng chống ô nhiễm và vệ sinh môi trường...

- Công nghệ sinh học đã giúp cho các chương trình cải thiện nông nghiệp, nghề vườn và nghề rừng tăng năng suất cây trồng, tăng chất lượng dinh dưỡng của nông phẩm, chọn giống chống chịu với sâu bệnh và với thời tiết đất đai không thuận lợi và tạo ra các giống thích nghi với các điều kiện thổ nhưỡng và khí hậu nhất định. Đồng thời nó cũng tạo điều kiện để duy trì một sự đa dạng di truyền đủ rộng giữa các giống cây trồng và giữ gìn các nguồn gen đã được tạo nên từ các họ hàng hoang dại của chúng. Tính đa dạng di truyền được thể hiện thông qua một số lượng cực lớn các kiểu kết hợp gen có trong một số cá thể của một loài và thông qua sự khác nhau về các tính trạng của các giống trong cùng một loài: kiểu sinh trưởng, tính kháng sâu bệnh, tính kháng với ngoại cảnh (sương muối, hạn, nóng...) và năng suất. Sau khi nghiên cứu kết quả của nhiều tổ hợp lai một cách cẩn thận và nghiêm túc, các nhà chọn giống dựa vào tính đa dạng di truyền để chọn ra các dòng có tính trạng mong muốn. Để thành công, nhà chọn giống phải có được trong tay vốn di truyền càng lớn càng tốt. Vốn di truyền này bao gồm các giống cây trồng, các giống chống chịu, các giống địa phương (các giống này thường bị bỏ quên vì do năng suất thấp nhưng nó rất quý vì có tính chống sâu bệnh và các điều kiện ngoại cảnh không thuận lợi). Trong vốn di truyền còn phải kể đến các cây hoang dại có tác dụng tăng sức sống cho các cây giống trồng.

Tính đa dạng di truyền là nhân tố bảo đảm cây trồng không bị các tai biến khí hậu hoặc sâu bệnh tiêu diệt hoàn toàn. Cây trồng càng thuần nhất thì càng dễ bị hại khi có tai họa.

- Công nghệ sinh học cũng được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm và dinh dưỡng. Ngành công nghệ lên men là một bộ phận của công nghệ sinh học đã sản xuất ra nhiều sản phẩm rất thú vị cho ngành thực phẩm. Hoặc việc sản xuất nấm men cũng có một ý nghĩa rất quan trọng. Người ta có thể sử dụng một lượng nhỏ nấm men để bổ sung protein, vitamin và các chất khoáng cho thực phẩm. Ngoài ra, sinh khối nấm men là nguồn thức ăn bổ sung trong chăn nuôi rất có hiệu quả.

- Công nghệ sinh học giúp cho chăn nuôi và thú y tạo ra được những giống nuôi mong muốn và sản xuất ra các loại vacxin để phòng chống bệnh tật cho các vật nuôi. Ví dụ: việc cấy chuyển hợp tử bò đã tạo ra được giống bò tốt, có sức chịu đựng cao. Kỹ thuật cấy chuyển được thực hiện như sau: gây sự rụng trứng ở một con bò cái có các đặc điểm mà ngành chăn nuôi cần đến và đem thụ tinh nhân tạo bằng tinh trùng của một con bò đực có những đặc điểm như người ta mong muốn. Các hợp tử hay phôi được thu nhận bằng cách rửa dạ con. Làm đông lạnh phôi trong nitơ lỏng ở

-179°C và có thể vận chuyển ở trạng thái này: 1000 phôi đông lạnh không nặng quá 50kg. Phôi được cấy vào bò cái chữa đẻ hộ. Bê con phát triển lên từ các phôi này sẽ ra đời trong môi trường sống sau này của chúng và không phải đương đầu với những sự bất lợi của môi trường mà các súc vật nhập hay gặp phải. Sự bảo vệ bằng các kháng thể của bò mẹ và nhờ bú sữa của bò mẹ mà sau khi ra đời bê sơ sinh có thể chịu đựng tốt hơn đối với các loại bệnh tật thông thường.

- Công nghệ sinh học còn tích cực giúp đỡ ngành y tế để bảo vệ sức khỏe của cộng đồng. Người ta nói rằng y học dự phòng (và lâu dài hơn là y học dự báo dựa trên hiểu biết về đặc điểm di truyền mỗi cá thể) sẽ mang lại lợi ích nhiều hơn các phương pháp điều trị. Một lĩnh vực của công nghệ sinh học có thể góp phần quan trọng trong giải quyết các vấn đề y tế, trong khuôn khổ một chính sách ưu tiên cho y học dự phòng, đó là cải tiến các vacxin hiện có và chế tạo ra các vacxin mới. Đồng thời nó còn giúp ích trong việc sản xuất các loại kháng sinh, vitamin và các thuốc chữa bệnh khác. Những năm gần đây, nhờ vào kỹ thuật di truyền người ta đã tìm cách tách chiết các hoạt chất của thực vật bậc cao để làm vật liệu xuất phát cho hàng loạt loại thuốc.

- Công nghệ sinh học còn góp phần trong việc sản xuất ra năng lượng như: sản xuất cồn bằng con đường lên men, chương trình biogas...và chính các nguồn năng lượng này lại đi phục vụ cho các quá trình sản xuất khác.

- Công nghệ sinh học còn tham gia vào việc chuyển hoá các chất và ngăn chặn sự ô nhiễm môi trường. Sản phẩm phụ và các chất thải chứa hydratcacbon có thể được chuyển hoá bằng cách lên men nhờ các vi sinh vật thông thường hay bằng các qui trình công nghệ sinh học. Hoặc các kỹ thuật tái tổ hợp AND cũng sẽ góp phần tích cực để tách được các giống vi khuẩn thích hợp nhất cho việc tối ưu hoá những sự chuyển hoá đó. Ví dụ: chuyển gen mã hoá các enzym xenluloza và hemixenluloza của *Clostridium thermocellum* thành những loài *Clostridium* khác có thể điều khiển được sự chuyển hoá xenluloza và hemixenluloza thành etanol, axeton, butanol, axit axetic và axit lactic. Dùng một vài giống ưa nhiệt *Clostridium* ($t_{op}^{\circ} = 65-75^{\circ}C$) có lợi là cắt giảm được chi phí trong việc chưng cất và sẽ hạ được giá thành sản phẩm.

Để ngăn chặn sự ô nhiễm môi trường người ta có thể dùng các loại vi sinh vật khác nhau. Các kỹ thuật tái tổ hợp AND đã tạo ra những chủng vi khuẩn có thể phân huỷ và hấp thụ một số lớn các chất do công nghiệp hoá chất thải ra.

Như vậy công nghệ sinh học có liên quan đến nhiều lĩnh vực và bao gồm các ngành như:

- Công nghệ di truyền
- Công nghệ nuôi cấy mô và tế bào
- Công nghệ enzyme
- Công nghệ vi sinh vật...

Trong học phần này sẽ nghiên cứu về một số phần của công nghệ vi sinh vật. Các quá trình vi sinh được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau của nền kinh tế. Những thành tựu khoa học kỹ thuật và sinh hoá cho phép tạo ra những quá trình sản xuất có năng suất cao dựa trên các phương pháp công nghệ đã được điều chỉnh để có một số sản phẩm thực phẩm, chăn nuôi, thuốc chữa bệnh và các chất hữu cơ.

CHƯƠNG I: NHỮNG NGUYÊN TẮC HOÁ SINH TRONG CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

Để tạo ra bất kỳ một sản phẩm lên men nào đều phải qua các bước sau:

- Chuẩn bị môi trường
- Chuẩn bị giống
- Lên men
- Thu hồi và tinh chế sản phẩm

Để tạo ra sản phẩm có chất lượng tốt và năng suất cao thì cần hiểu rõ các vấn đề sau.

1.1 Phân loại sản phẩm của công nghệ vi sinh vật

Các sản phẩm lên men công nghiệp được phân loại theo các tiêu chuẩn sinh lí trao đổi chất. Sự phân loại này dựa vào sản phẩm chính của quá trình lên men vì các quá trình sản xuất nhờ vi sinh vật luôn luôn tạo thành nhiều sản phẩm.

1.1.1 Vật chế tế bào (sinh khối)

Cơ chất → tế bào

Ví dụ: + protein đơn bào (trạng thái chết)

+ vi khuẩn cố định đạm (sống): *Rhizobium*, *Azotobacter*, VK trừ sâu *Bacillus thuringiensis*...

Việc tổng hợp sinh khối hay vật chất tế bào đồng nhất với sinh trưởng của vi sinh vật. Sinh trưởng và sinh sản gắn liền với nhau. Sinh trưởng là tăng khối lượng, còn sinh sản là tăng số lượng.

1.1.2 Các sản phẩm trao đổi chất

Cơ chất → sản phẩm + tế bào

1. Các sản phẩm cuối cùng của sự trao đổi năng lượng (các sản phẩm lên men)

Ví dụ: etanol, axit lactic, axeton-butanol...

Lên men là quá trình yếm khí của sự thu nhận năng lượng, trong đó hydro tách ra được chuyển đến các chất nhận hữu cơ (nó không đồng nghĩa với sự lên men trong ngôn ngữ quốc tế - nó được hiểu là các quá trình sản xuất công nghiệp nhờ vi sinh vật)

Một số cơ thể tiến hành lên men khi không có oxy làm chất nhận hydro cuối cùng (ky khí tùy tiện), những nhóm cơ thể lên men bắt buộc thì không chứa các enzym hô hấp. Các hợp chất hữu cơ nhận hydro là những hợp chất được hình thành trong quá trình trao đổi chất dị hoá. Sau khi nhận hydro, các hợp chất này thải ra ngoài tế bào giống như các sản phẩm cuối cùng của sự hô hấp. Từ đó nảy ra vấn đề là trong sản xuất cần chọn các điều kiện nuôi sao cho càng nhiều cơ chất được chuyển thành các sản phẩm lên men càng tốt.

Ví dụ: trong sản xuất rượu để tăng hàm lượng rượu thì cần tăng hàm lượng đường và giảm các yếu tố quan trọng cho sinh trưởng.

2. Các chất trao đổi bậc 1

Ví dụ: axit amin, nucleotit, vitamin, axit xitric.

Các chất trao đổi bậc một là những viên gạch cấu trúc có trọng lượng phân tử thấp của các cao phân tử sinh học của tế bào chất: axit amin, nucleotit, nucleozit, đường, axit béo, vitamin... Ngoài ra các sản phẩm trung gian của quá trình trao đổi chất (các axit hữu cơ trong chu trình ATC) cũng là các chất trao đổi bậc 1. Các cơ chế điều hoà phát triển trong quá trình tiến hoá bảo đảm sao cho các chất trao đổi bậc 1 chỉ được tổng hợp đến mức độ cần thiết.

3. Các chất trao đổi bậc 2

Ví dụ: kháng sinh, alcaloit

Các chất trao đổi bậc 2 là những chất trao đổi có trọng lượng phân tử thấp, không gặp ở mọi cơ thể, sự phân bố của chúng chỉ giới hạn ở những đơn vị phân loại nhất định. Chúng không có chức năng chung trong trao đổi chất của tế bào và tế bào cũng có thể tồn tại mà không cần đến chúng. Tuy nhiên, các chất trao đổi bậc 2 có thể có ý nghĩa với sự sinh trưởng và các cơ thể sản sinh ra chúng. Chẳng hạn một số chất trao đổi bậc 2 có vai trò trong sự hấp thụ sắt khi thiếu nguyên tố này. Thường các chất bậc 2 được tạo thành khi sự sinh trưởng đã kết thúc. Các chủng tồn tại trong tự nhiên thường chỉ tạo thành rất ít chất trao đổi bậc 2, những chất này được tích lũy trong tế bào hoặc thải ra ngoài.

4. Các enzym

Ví dụ: enzym ngoại bào: proteaza, amylaza

enzym nội bào : asparaginaza, penixilinaza.

Tế bào vi sinh vật chứa khoảng 1000 enzym khác nhau. Một số enzyme chỉ có mặt với số lượng vài phân tử nhưng nhiều enzym có mặt với số lượng lớn. Chỉ những enzym chịu trách nhiệm phân huỷ các cơ chất không hoà tan như tinh bột, xenlulo, protein... mới được tiết từ tế bào vào môi trường. Vi sinh vật có khả năng sử dụng các cơ chất khác nhau cho sinh trưởng và thích ứng với các điều kiện sinh trưởng rất khác nhau. Trong sự giới hạn của thể tích tế bào chỉ tổng hợp những enzym mà nó cần. Trong công nghệ sản xuất enzym cần phải điều khiển trao đổi chất sao cho enzym mà ta mong muốn được tổng hợp càng nhiều càng tốt.

1.1.3 Các sản phẩm của sự chuyển hoá chất

Ví dụ: sự oxy hoá không hoàn toàn để tạo thành axit axetic soboza.

Trong quá trình chuyển hoá các tế bào hoạt động như những hệ thống xúc tác cho một hoặc nhiều bước chuyển hoá chất. Về mặt lí thuyết những phản ứng này cũng xảy ra nhờ các enzym cô lập, tuy nhiên con đường này không thể thực hiện được hoặc không kinh tế (ví dụ với các phản ứng enzym phụ thuộc năng lượng). Các enzym chuyển hoá các chất theo cách rất đặc hiệu. Ví dụ: sự

chuyển hoá hoặc tách hydro xảy ra nhờ phân tử steroid không có ý nghĩa đối với tế bào (cũng có thể đó là những phản ứng khử độc).

Trong sự chuyển hoá để tạo axit axetic gắn liền với sinh trưởng, nó gắn liền với sự thu nhận năng lượng.

1.2 Động học của sinh trưởng và của sự tạo thành sản phẩm

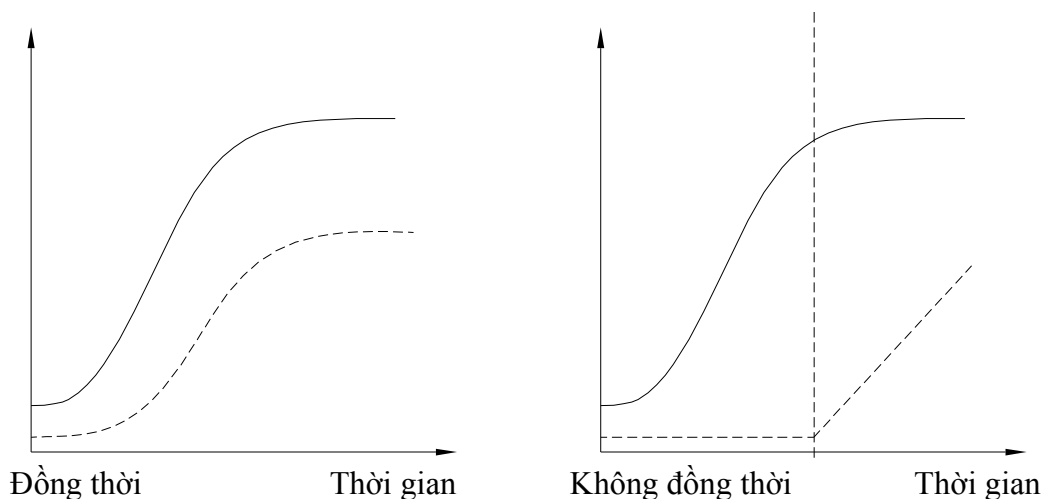
Sinh trưởng của một quần thể vi sinh vật diễn ra qua các giai đoạn khác nhau. Sự sinh sản của tế bào bắt đầu sau một giai đoạn tiềm phát. Trong giai đoạn log tiếp theo xảy ra sự sinh sản theo hàm số mũ. Sau một thời gian sinh trưởng ngừng lại vì thiếu chất dinh dưỡng cơ bản và vì tích lũy các chất ức chế. Các tế bào chuyển vào giai đoạn cân bằng. Trong giai đoạn này không diễn ra sinh trưởng nữa nhưng tế bào vẫn còn hoạt động trao đổi chất.

Toàn bộ quá trình nuôi gắn liền với sự thay đổi kéo dài của các điều kiện nuôi. Chất dinh dưỡng giảm đi, số lượng tế bào tăng lên. Đồng thời hoạt tính trao đổi chất cũng thay đổi.

Về phương diện chức năng của các sản phẩm trao đổi chất đối với tế bào có thể phân biệt 2 nhóm:

- Các sản phẩm mà sự hình thành của chúng gắn liền với sự sinh trưởng. Ví dụ: các sản phẩm lên men, các chất trao đổi bậc 1, các enzym. Sự tổng hợp những sản phẩm này xảy ra trong thời gian sinh trưởng và còn có thể tiếp diễn sau khi sinh trưởng đã kết thúc.

- Các sản phẩm mà sự hình thành của chúng xảy ra sau khi sinh trưởng đã kết thúc; ví dụ các sản phẩm trao đổi chất bậc 2.



Hình 1: Động học của quá trình sinh trưởng và tạo thành sản phẩm

Nhiều sản phẩm chiếm một vị trí trung gian. Ví dụ sự tổng hợp axit amin mặc dù diễn ra trong thời gian sinh trưởng nhưng vẫn tiếp diễn sau khi sinh trưởng đã kết thúc, vì quá trình tổng hợp tiếp diễn trên cơ sở của một sai hỏng

di truyền. Sự tổng hợp của nhiều enzym xảy ra không song song với sinh trưởng mà gắn liền với một trạng thái sinh lí nhất định của tế bào cho nên trong lên men công nghiệp cần phải tìm ra trạng thái sinh lí của năng suất cao nhất và duy trì nó trong thời gian dài.

1.3 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 như vậy được bảo đảm nhờ các cơ chế điều hoà.

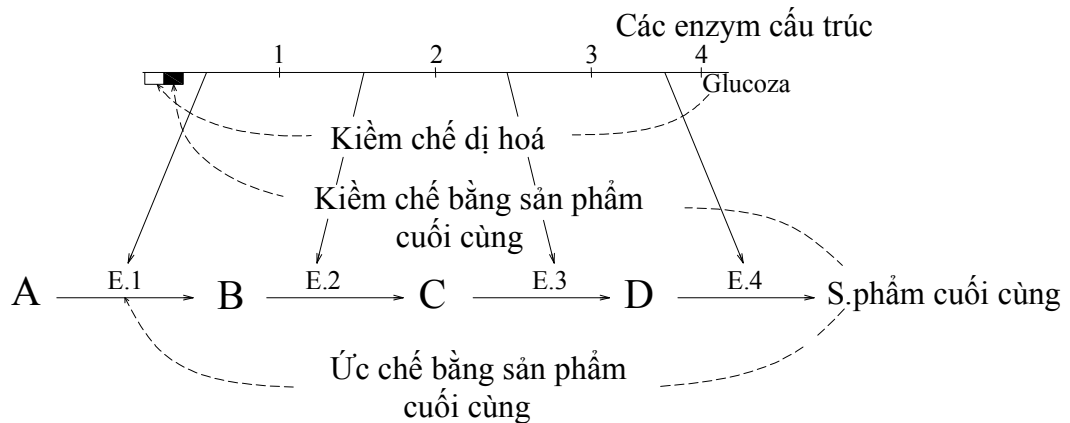
Ví dụ: các cơ chế này cần hoạt động sao cho các axit amin không được tổng hợp quá nhu cầu của sự tổng hợp protein.

Như vậy, trong điều kiện tự nhiên không có sự sản sinh dư thừa các sản phẩm trao đổi chất bậc 1, bậc 2 và các enzym. Nếu trong tự nhiên cơ chế điều hoà này bị rối loạn, ví dụ do kết quả đột biến thì các thể đột biến sai hỏng trao đổi chất thường có hại đột với chúng ban đầu.

1.3.1 Những nguyên tắc điều hoà trao đổi chất

Có 3 cơ chế chịu trách nhiệm điều hoà trao đổi chất:

1. Điều hoà hoạt tính enzym nhờ sự ức chế bằng sản phẩm cuối cùng hay còn gọi là sự kim hãm theo liên kết ngược.
2. Điều hoà tổng hợp enzym nhờ sự kiểm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kim chế.
3. Điều hoà tổng hợp enzym nhờ sự kiểm chế dị hoá.

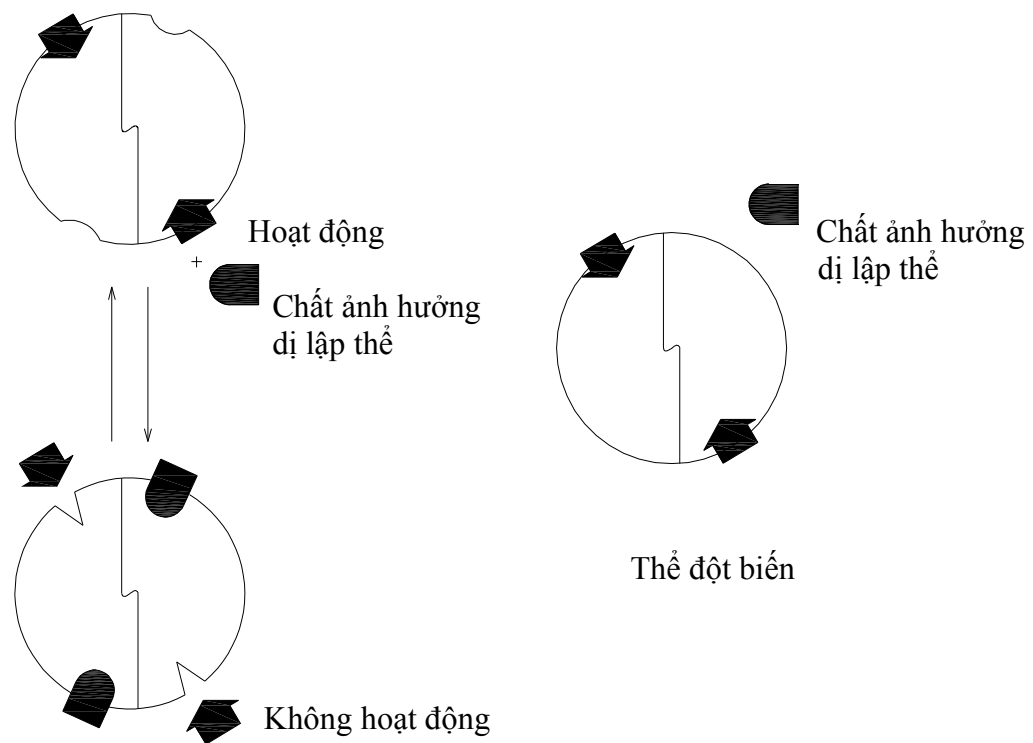


Sơ đồ 1: Các nguyên tắc của sự điều hoà enzyme

* Trong cơ chế 1 sản phẩm cuối cùng của 1 quá trình sinh tổng hợp gây ra sự ức chế quá trình tổng hợp của chính nó. Ở đây, sản phẩm cuối cùng dù được hình thành trong tế bào hay được thu nhận từ môi trường dinh dưỡng, điều đó cũng có ý nghĩa. Trong cơ chế này, sản phẩm cuối cùng nói chung ảnh hưởng đến enzyme đầu tiên của chuỗi sinh tổng hợp. Enzym có tính quyết định này là 1 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 2, sản phẩm cuối cùng ức chế sự tổng hợp enzym cần cho sự tạo thành sản phẩm ấy, trong đó việc đọc thông tin di truyền cần cho sự tổng hợp enzym (sự phiên âm) bị phong tỏa. Ở nồng độ cao của sản phẩm cuối cùng sự tổng hợp của các enzym tham gia vào chuỗi phản ứng bị ngừng hoặc bị kéo dài một cách đáng kể. Nếu nồng độ của sản phẩm cuối cùng giảm xuống dưới 1 mức nào đó thì xảy ra sự giải kiềm chế, nghĩa là các enzym được tạo thành với tốc độ cao hơn. Sự điều hoà theo kiểu này xảy ra từ từ vì nó gắn liền với sự tổng hợp enzym.

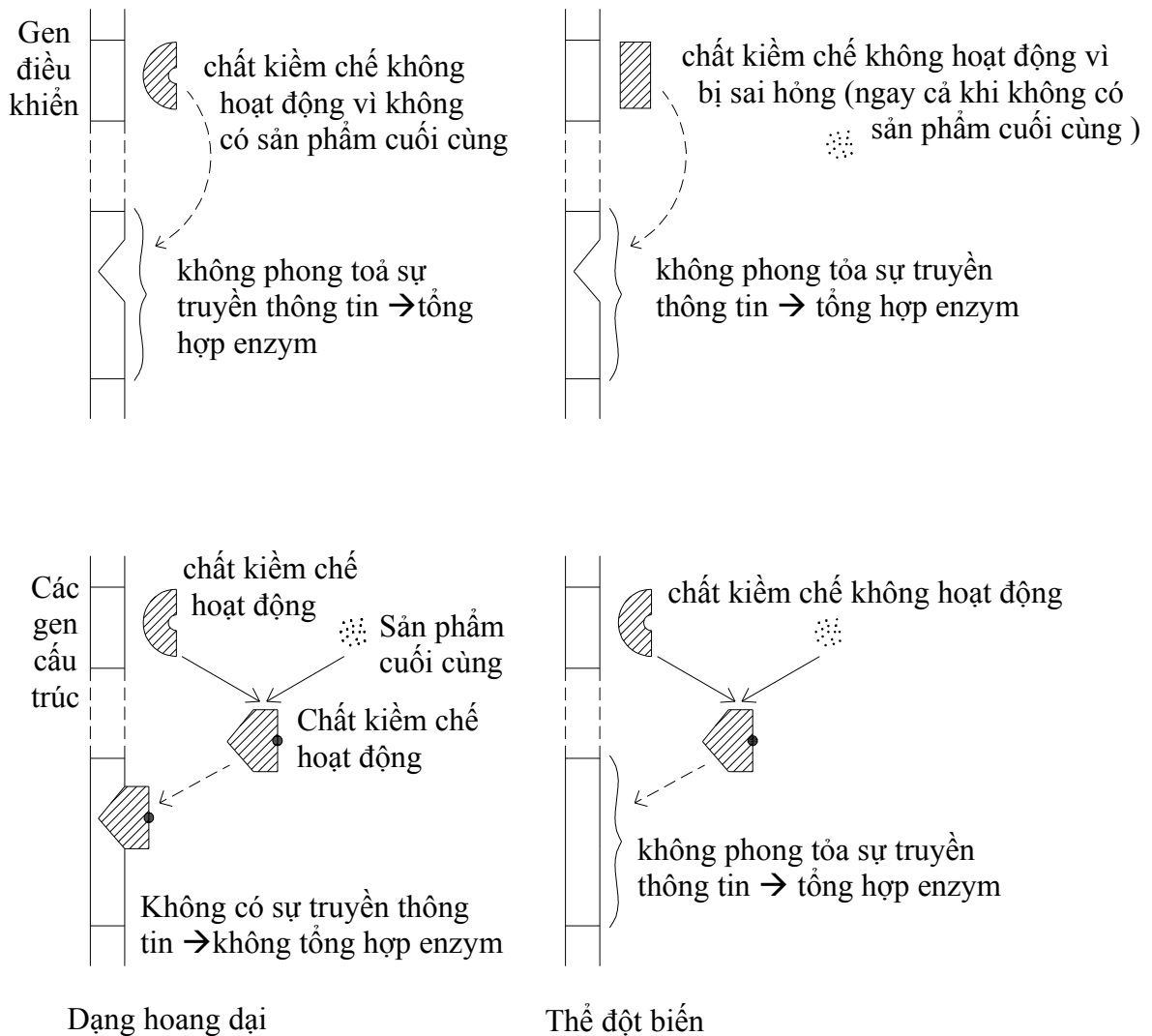


Dạng hoang dại

Hình 2: Mô hình của sự ức chế bằng sản phẩm cuối cùng

* Sự kiềm chế dị hoá điều hoà quá trình tổng hợp các enzym dị hoá xúc tác sự phân huỷ cơ chất. Các enzym này được tổng hợp nhờ sự cảm ứng enzym. Cơ chế này tương tự cơ chế kiềm chế tức là cũng xảy ra ở mức độ phiên âm. Trong sự cảm ứng enzym, một chất dinh dưỡng đóng vai trò chất cảm ứng kích thích sự tổng hợp enzym xúc tác cho sự phân huỷ chính nó, nghĩa là chất này cảm ứng sự tổng hợp. Do đó, việc tổng hợp các enzym cảm ứng chỉ xảy ra khi có mặt cơ chất tương ứng trong môi trường.

* Sự kiểm chế dị hoá điều hoà quá trình tổng hợp các enzym dị hoá xúc tác sự phân huỷ cơ chất. Các enzym này được tổng hợp nhờ sự cảm ứng enzym. Cơ chế này tương tự cơ chế kiểm chế tức là cũng xảy ra ở mức độ phiên âm. Trong sự cảm ứng enzym, một chất dinh dưỡng đóng vai trò chất cảm ứng kích thích sự tổng hợp enzym xúc tác cho sự phân huỷ chính nó, nghĩa là chất này cảm ứng sự tổng hợp. Do đó, việc tổng hợp các enzym cảm ứng chỉ xảy ra khi có mặt cơ chất tương ứng trong môi trường.



Hình 3: Mô hình kiểm chế bằng sản phẩm cuối cùng

Nếu trong môi trường có mặt nhiều cơ chất thì trước hết xảy ra sự tổng hợp của enzym nào xúc tác phân huỷ cơ chất dễ sử dụng nhất. Sự tổng hợp của các enzym khác bị ức chế bởi sự kiểm chế dị hoá. Thông thường thì glucoza là cơ chất thích hợp nhất.

1.3.2 Những sai hỏng di truyền của điều hoà trao đổi chất

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

Những enzyme dị lập thể ngoài vị trí phản ứng với cơ chất, chúng còn một vị trí khác đối với sản phẩm cuối cùng (hình 2). Vị trí thứ 2 này gọi là trung tâm dị lập thể. Hai vị trí này tách biệt nhau về không gian và khác nhau về cấu trúc.

Một đột biến có thể dẫn đến kết quả làm 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 của sản phẩm cuối cùng tương ứng (hình 2 phía bên phải).

Trong sự kiểm chế tổng hợp enzym xảy ra những phản ứng quyết liệt trong phạm vi thông tin di truyền, ở sự phiên âm (hình 3).

Sự điều hoà tổng hợp enzym có thể bị rối loạn do những đột biến khác nhau. 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 đụng chạm đến gen điều khiển và làm cho gen này mất khả năng tác dụng với chất kiểm chế (bên phải hình 3).

Toàn bộ những sai hỏng tương ứng cũng có thể biểu hiện ở sự cảm ứng enzyme. Nhờ những sự 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 hoá bị mất đi.

CHƯƠNG II: NHỮNG VẤN ĐỀ KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP CHUNG TRONG CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

Sản xuất sinh khối và các sản phẩm trao đổi chất trong quá trình lên men có nhiều điểm giống nhau về phương pháp và kỹ thuật. Việc áp dụng kỹ thuật và phương pháp tùy từng đối tượng vi sinh vật và mục tiêu sản phẩm cuối cùng. Trên cơ sở đó có thể áp dụng những mục tiêu và phương pháp riêng. Chính vì thế không thể có một phương pháp chung cho tất cả các sản phẩm. Việc áp dụng kỹ thuật và phương pháp chỉ có thể trên cơ sở những nguyên tắc chung của các kỹ thuật và phương pháp đã trình bày. Vì thế, trong chương này sẽ giới thiệu những nguyên tắc chung của kỹ thuật và phương pháp được áp dụng rộng rãi trong các ngành vi sinh công nghiệp. Các nguyên tắc chung đó bao gồm việc tuyển chọn giống vi sinh vật, giữ giống vi sinh vật, các quá trình và thiết bị

lên men cơ bản, một số kỹ thuật và phương pháp chính để thu nhận sản phẩm lên men.

2.1 Giống vi sinh vật

2.1.1 Yêu cầu về giống vi sinh vật công nghiệp

Các chủng vi sinh vật muốn đem vào sản xuất lớn phải bảo đảm các tiêu chuẩn sau đây:

- Phải cho sản phẩm mong muốn với năng suất cao, chất lượng tốt, có ý nghĩa kinh tế trong sản xuất và ít sản phẩm phụ không mong muốn.
- Sử dụng nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền
- Thời gian lên men ngắn.
- Dễ tách sinh khối hay sản phẩm sau lên men.
- Vi sinh vật phải thuần chủng, không chứa vi sinh vật lạ, đặc biệt không chứa bacteriophage ký sinh.
- Chủng vi sinh vật phải khoẻ, phát triển dễ dàng và nhanh chóng, cho nhiều tế bào dinh dưỡng hoặc các bào tử hoặc các hình thức tái sinh khác.
- Có khả năng chống, chịu các điều kiện bất lợi của môi trường.
- Dễ bảo quản, tồn tại và ổn định các đặc tính sinh lí, sinh hóa suốt trong thời gian sử dụng.
- Có khả năng thay đổi các đặc tính bằng các kỹ thuật đột biến, kỹ thuật gen để không ngừng nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm.

2.1.2 Nguồn giống vi sinh vật

2.1.2.1 Phân lập trong tự nhiên

Thiên nhiên là nguồn cung cấp giống vô tận cho công nghiệp vi sinh vật. Các vi sinh vật sử dụng trong công nghiệp thực phẩm có thể dễ dàng phân lập chúng từ các loại thức ăn, nước uống sản xuất theo phương pháp cổ truyền: từ bánh men thuốc bắc, mứt tương, sữa chua... Vi sinh vật sử dụng trong công nghiệp sản xuất kháng sinh thường được phân lập trong đất, nước ở những vùng khác nhau.

Để phân lập được một chủng vi sinh vật mong muốn từ một quần thể hỗn hợp vi sinh vật trong tự nhiên chúng ta phải thực hiện các bước sau: thu mẫu, hoà loãng, cấy lên môi trường, nuôi, thuần khiết, kiểm tra...

Các công việc này đều giống nhau khi nghiên cứu trên các đối tượng vi rút, vi khuẩn, nấm, tảo, nguyên sinh động vật, các động vật không xương sống loại nhỏ.

Để hoà loãng mẫu người ta thường sử dụng nước muối sinh lí (0,85% dung dịch NaCl) hoặc nước cất. Đối với một số loài dễ chết trong nước cất hoặc nước muối sinh lí như *Pseudomonas* thì dùng dung dịch peptone 0,1% để làm loãng. Sau khi pha loãng thì đem cấy rửa trên môi trường thạch rồi đem nuôi trong tủ ấm 1-3 ngày. Tiếp theo tách các khuẩn lạc điển hình và làm tinh khiết một số lần trên môi trường thạch để tách riêng từng khuẩn lạc.

Đối với nhóm vi sinh vật yếm khí nếu cấy trên môi trường thạch trong hộp Petri người ta phải cho thêm các chất khử hay gắn kín bằng parafin hoặc nuôi trong môi trường không có oxy.

Để phân lập các chủng sản xuất kháng sinh hoặc kháng sinh người ta thường dùng phương pháp nhanh: hoà loãng mẫu 10 hoặc 100 lần, sau đó lấy 1ml dung dịch hoà loãng cấy lên môi trường thạch đã có sẵn vi sinh vật cần tiêu diệt hoặc cơ chất cần phân giải. Sau khi nuôi 1-3 ngày trong tủ ấm thì đem xem xét những khuẩn lạc nào có đặc tính mà chúng ta mong muốn thì tiến hành phân lập và thuần khiết những chủng có hoạt lực cao.

Để phân lập được chủng vi sinh vật mong muốn thì phải tiến hành làm giàu số lượng vi sinh vật đó, tức là phải sử dụng những môi trường và điều kiện nuôi cấy để chọn lọc các chủng mong muốn và ức chế các chủng không mong muốn.

2.1.2.2 Thu nhận từ các trung tâm giữ giống

Ngày nay có nhiều trung tâm giữ giống giống trên thế giới có thể cung cấp cho chúng ta các giống vi sinh vật phục vụ cho công tác nghiên cứu, giảng dạy, sản xuất. Một số trung tâm giữ giống như:

- Mỹ: ABBOTT, ATCC, NRRL
- Canada: CANAD-212
- Nhật: FERM, HIR
- Úc: CC
- Trung quốc: IMASP

2.1.3 Cải tạo giống vi sinh vật

Trừ một số ngành của công nghệ thực phẩm người ta có thể có sử dụng vi sinh vật kiểu dại còn hầu hết các ngành công nghiệp khác như sản xuất kháng sinh, vitamin, enzyme v.v. người ta đều dùng các biến chủng.

2.1.3.1 Ưu nhược điểm khi sử dụng biến chủng

*** Ưu điểm:**

- Cho năng suất cao
- Thời gian lên men ngắn và ít tạo bọt trong khi lên men
- Ít tạo sản phẩm phụ trong quá trình lên men
- Tạo được nhiều sản phẩm quý mà chủng kiểu dại không có được, ví dụ như: insulin, kháng nguyên Hbs (chống vim gan B) v.v.
- Khả năng chống, chịu các điều kiện bất lợi của môi trường cao.

*** Nhược:**

- Đòi hỏi công nghệ cao
- Trong quá trình sản xuất có thể xuất hiện hiện tượng hồi biến

2.1.3.2 Phương pháp tạo giống mới

Để tạo ra giống vi sinh vật mới người ta có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau:

- Đột biến nhân tạo và chọn lựa: đây là công việc của các phòng thí nghiệm hoặc các trung tâm nghiên cứu nhằm tìm ra các chủng vi sinh vật có năng suất cao hoặc sản xuất được những sản phẩm mà mình mong muốn.

- Tái tổ hợp gen: sử dụng các khả năng biến nạp, tiếp hợp, tải nạp, lai tế bào chất ở vi sinh vật và các kỹ thuật gen để thực hiện việc tạo ra các cá thể mới với những bộ gen theo ý muốn.

- Lựa chọn thường xuyên: công việc này thường thực hiện ở các phòng thí nghiệm của các nhà máy nhằm giữ được các cá thể tốt trong quần thể vi sinh vật. Khi kiểm tra loại bỏ các đột biến ngẫu nhiên không cho năng suất cao hoặc có những biểu hiện bất lợi và giữ những cá thể thích nghi tốt trong điều kiện sản xuất.

2.1.4 Giữ giống vi sinh vật

2.1.4.1 Ý nghĩa và nhiệm vụ của công tác giữ giống

Giữ giống vi sinh vật là một công việc có ý nghĩa vô cùng lớn. Nó giúp cho chúng ta giữ được các đặc tính quý (không bị thoái hoá) của vi sinh vật và bảo đảm cung cấp giống cho các quá trình sản xuất.

Nhiệm vụ của công tác giữ giống là sử dụng các kỹ thuật cần thiết để giữ cho vi sinh vật có tỷ lệ sống cao, các đặc tính di truyền không bị biến đổi và không bị tạp nhiễm bởi vi sinh vật lạ.

2.1.4.2 Các phương pháp giữ giống

Có rất nhiều phương pháp giữ giống vi sinh vật. Tùy theo trạng thiết bị và loại vi sinh vật cần giữ mà chúng ta có thể sử dụng một trong các phương pháp sau:

- Giữ giống trên môi trường thạch nghiêng
- Giữ giống dưới lớp dầu khoáng
- Giữ giống trong cát
- Giữ giống trong đất
- Giữ giống trên silicagen
- Giữ giống trên các loại hạt ngũ cốc (lúa, ngô, kê..)
- Giữ giống trên giấy lọc
- Giữ giống trên các miếng gelatin
- Giữ giống bằng phương pháp lạnh đông
- Giữ giống bằng phương pháp đông khô

2.2 Dinh dưỡng và môi trường nuôi cấy vi sinh vật

2.2.1 Quá trình và nhu cầu dinh dưỡng ở tế bào vi sinh vật

Trong quá trình sống tế bào vi sinh vật không ngừng trao đổi chất với môi trường xung quanh. Tế bào vi sinh vật tuy rất nhỏ nhưng vì hấp thu các chất dinh dưỡng và thải các sản phẩm trao đổi chất qua toàn bộ bề mặt tế bào cho nên cường độ trao đổi chất của chúng là rất lớn. Các chất dinh dưỡng qua màng vào tế bào và được chuyển hoá để tạo thành những chất riêng biệt cần

thiết cho việc xây dựng tế bào. Nhờ quá trình đồng hoá các tế bào mới có thể sinh trưởng, phát triển tăng sinh khối, đồng thời sinh ra các sản phẩm trao đổi chất.

Sự biến đổi các chất dinh dưỡng bao gồm nhiều phản ứng hoá sinh khác nhau nhờ hệ enzym theo con đường trao đổi chất để:

1. Tạo ra những chất có trong thành phần của tế bào
2. Sản ra năng lượng sinh học cần thiết cho hoạt động sống

Những chất dinh dưỡng khi đã là những hợp chất có phân tử nhỏ có thể đi qua màng tế bào vi sinh vật và tham gia vào 2 loại phản ứng:

- Biến đổi dị hoá làm xuất hiện những sản phẩm có cấu trúc đơn giản hơn. Những biến đổi dị hoá này cung cấp cho vi sinh vật năng lượng chuyên hoá ở dạng ATP hoặc những hợp chất giàu năng lượng khác. Một số những sản phẩm dị hoá thải đi, một số khác làm vật liệu hoặc làm tiền chất cho các phản ứng đồng hoá.

- Biến đổi đồng hoá, đảm bảo sự tổng hợp của thành phần mới có cấu trúc phức tạp hơn và phân tử lượng cao hơn - gọi là quá trình sinh tổng hợp.

Các chất dinh dưỡng của vi sinh vật chủ yếu lấy ở môi trường xung quanh. Cho nên thành phần của môi trường dinh dưỡng bảo đảm cung cấp các nguyên tố C, H, O, N, P, S, Ca, Fe và các nguyên tố vi lượng.

2.2.2 Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

2.2.2.1 Phân loại môi trường

1. Phân loại theo thành phần có trong môi trường:

+ Môi trường tự nhiên: có thành phần không xác định, được chế tạo từ động hay thực vật.

+ Môi trường tổng hợp: gồm những chất hoá học tinh khiết và được lấy với nồng độ cho trước.

+ Môi trường bán tổng hợp.

2. Phân loại theo trạng thái vật lý:

+ Môi trường lỏng: dùng để tăng sinh, tích lũy các sản phẩm trao đổi chất, phát hiện các đặc tính sinh lí, sinh hoá, để giữ giống và bảo quản nhiều loại vi sinh vật không phát triển được trên môi trường đặc.

+ Môi trường đặc: dùng để phân lập thu khuẩn lạc rời, nghiên cứu định danh, giữ giống, đếm số lượng vi sinh vật.

+ Môi trường xộp: dùng trong công nghệ vi sinh vật.

2.2.2.2 Nguyên liệu dùng chuẩn bị môi trường trong công nghệ vi sinh vật

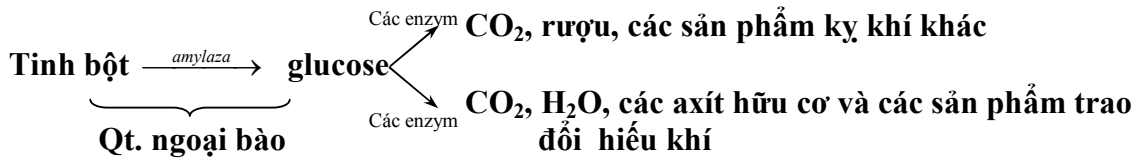
1. Nguyên liệu cung cấp nguồn cacbon

Cacbon chiếm một phần rất lớn trong tế bào vi sinh vật, chính vì vậy những hợp chất chứa cacbon có ý nghĩa hàng đầu trong sự sống của vi sinh vật.

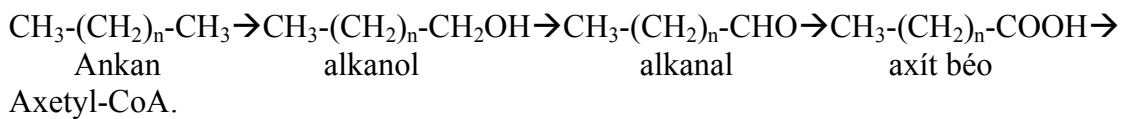
Nguồn thức ăn cacbon chủ yếu của vi sinh vật là hydratcacbon. Các hợp chất có phân tử thấp như một số đường thì vi sinh vật có thể đồng hoá trực tiếp.

Còn các hợp chất cao phân tử (tinh bột, xenlulo...) sẽ được phân huỷ nhờ các enzyme do vi sinh vật tiết ra.

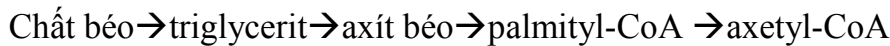
Trong các hydratecarbon thì glucose là một nguồn cacbon vạn năng đối với vi sinh vật. Quá trình biến đổi glucose trong tế bào vi sinh vật có thể diễn ra bằng 3 con đường: chu trình Embden-Meyerhof-Parnas (EMP); pentozơ; Entner-Dondoroff. Tất cả đều dẫn tới tạo thành axit pyruvic rồi từ đó đi vào các quá trình khác nhau.



Ngoài ra vi sinh vật có thể đồng hoá một số các cacbuahydro:



Đối với chất béo:



2. Nguyên liệu cung cấp nguồn nitơ

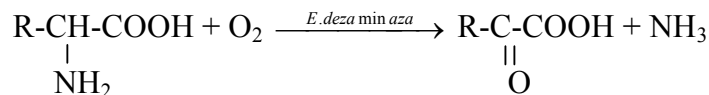
Vi sinh vật cần nitơ để xây dựng tế bào vì tất cả các thành phần quan trọng của tế bào đều có chứa nitơ (protein, axit nucleic, enzym...).

Axit amin tạo ra protein. Các axit amin trong tế bào vi sinh vật được tạo thành do quá trình trao đổi cacbon và nitơ.

Nitơ trong không khí rất phong phú nhưng nó bền vững về mặt hoá học và chỉ có các vi sinh vật cố định nitơ mới có khả năng đồng hoá chúng. Còn các nguồn nitơ dùng trong lên men của công nghệ vi sinh vật là các hợp chất nitơ vô cơ và hữu cơ.

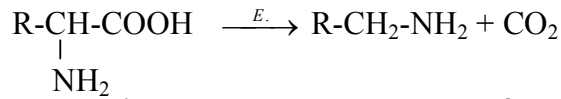
Các axit amin thường không được vi sinh vật sử dụng trực tiếp ngay mà phải qua 2 loại phản ứng: hoặc khử amin hoặc khử cacboxil.

Khử amin:



Như vậy, chỉ có những vi sinh vật nào có khả năng khử amin mới có khả năng sử dụng axit amin. Quá trình này thường xảy ra ở những vùng pH=6,5 ÷ 7,5.

Khi pH ở vùng axit thì xảy ra phản ứng khử cacboxyl:



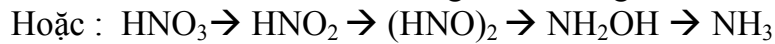
(Sản phẩm decarboxyl của một số các axit amin có độc tố, ví dụ: từ lizin → cadaverin).

Nguồn nitơ hữu cơ thường là các hợp chất phức tạp nên đầu tiên vi sinh vật phải tiết vào môi trường enzym proteaza để thủy phân.

Các nguồn nitơ vô cơ



AH₂ - chất khử có trong môi trường.



Quá trình này nhờ hệ enzym nitratoreductaza

Tất cả các loại vi sinh vật đều đồng hoá được muối amôn.

Nhưng để sử dụng được nitơ vi sinh vật đều phải tách NH₃.

3. Nguyên liệu cung cấp các chất khoáng

* Các hợp chất photpho:

Ảnh hưởng lớn quá trình trao đổi chất của tế bào vi sinh vật. Trong tế bào vi sinh vật thường gặp các hợp chất polyphotphat, chúng có chức năng tham gia vận chuyển glucose qua màng tế bào → dẫn đến quá trình photphoril hoá glucose.

Nguồn photpho có thể là vô cơ hoặc có trong các loại nguyên liệu hữu cơ. Vi sinh vật sử dụng nhanh nhất là các hợp chất photpho vô cơ hoà tan, còn photpho hữu cơ sử dụng ít và chậm. Tuy nhiên nhu cầu về photpho phụ thuộc vào chủng vi sinh vật, dư cũng ảnh hưởng xấu.

* Các chất khoáng khác:

Mg, Na, Fe, K, Al, Li, Rb, Mn... lấy từ môi trường dinh dưỡng.

Các chất này có ý nghĩa khác nhau đối với vi sinh vật: có một số kim loại tham gia vào cấu tạo phân tử hoặc làm thay đổi hoạt lực enzym.

Tuy nhiên nồng độ các chất này cũng nằm trong một giới hạn.

4. Các chất kích thích sinh trưởng:

- Cao ngô
- Cao nấm men
- Dịch ép trái cây

5. Chất béo trong công nghệ vi sinh vật

- Dầu béo (lạc, đậu tương, ngô, lanh...): thường dùng làm cát phá bọt.
- Mật khác nếu vi sinh vật có khả năng tiết ra enzym lipaza sẽ phân huỷ chất béo đến axetyl-CoA và đồng hoá tiếp.

Chú ý: không dùng quá nhiều dầu phá bọt → có thể ảnh hưởng xấu đến quá trình lên men: độ nhớt lớn, tạo nhũ tương của các hạt xà phòng.

6. Nước

Trong công nghệ vi sinh vật nước được sử dụng nhiều và với nhiều mục đích khác nhau. Chất lượng của nước có ảnh hưởng đến tiến trình công nghệ và chất lượng của sản phẩm. Do đó, tùy vào mục đích sử dụng mà phải bảo đảm yêu cầu về các chỉ tiêu chất lượng của nước như: độ cứng, độ oxy hoá, vi sinh...

2.3 Các phương pháp lên men

Có nhiều cách để phân loại các phương pháp lên men. Dựa vào cách nạp liệu và thu hồi bán thành phẩm sau lên men người ta chia ra lên men gián đoạn, liên tục và bán liên tục.

Lên men gián đoạn thực hiện theo từng mẻ nên thường có năng suất thấp và chu kì sản xuất bị kéo dài. Lên men liên tục thì ngược lại, nguyên liệu liên tục vào và sản phẩm sau lên men liên tục đi ra. Lên men bán liên tục là hình thức kết hợp giữa hai phương pháp trên.

Dựa vào thành phần đồng nhất hay không đồng nhất của canh trường người ta chia ra lên men bề mặt (nổi), lên men bề sâu (chìm) và bán rắn.

Trong lên men bề mặt, vi sinh vật phát triển trên bề mặt của môi trường nuôi cấy và lấy không khí từ mặt thoáng của môi trường. Phương pháp này thường sử dụng để sản xuất axit citric và một số enzyme. Nhược điểm lớn nhất của phương pháp này là tốn kém bề mặt. Tuy nhiên, do đầu tư ít nên chừng mực nào đó vẫn được sử dụng.

Lên men bán rắn là phương pháp trung gian giữa lên men bề mặt và bề sâu. Hàm lượng nước trong môi trường chiếm khoảng 70% chất khô. Một số enzyme hiện nay được sản xuất theo phương pháp này. Người ta cải tiến phương pháp này bằng thiết bị thùng quay nhằm cung cấp đủ oxy cho quá trình lên men và thực hiện luôn khâu sấy khô sau lên men. Điều khó khăn là do sự truyền nhiệt kém của các chất độn nên khó thực hiện tốt khâu thanh trùng.

Lên men chìm là phương pháp được sử dụng nhiều nhất. Nó có thể cho phép kiểm soát được toàn bộ quá trình lên men một cách thuận lợi, ít tốn kém mặt bằng. Do hệ thống khuấy trộn tốt nên toàn bộ môi trường nuôi cấy là một hệ thống nhất.

2.4 Thu hồi sản phẩm

Để thu hồi sản phẩm phải qua nhiều bước. Số lượng các bước phụ thuộc vào nguyên liệu ban đầu, nồng độ ban đầu, sự ổn định về mặt sinh học của sản phẩm và mức độ yêu cầu về độ tinh khiết của sản phẩm.

Bước đầu của việc thu hồi sản phẩm là tách tế bào và các sản phẩm không hoà tan ra khỏi dịch lên men bằng cách lọc hoặc lắng. Để trích li các sản phẩm bên trong tế bào thì phải phá vỡ tế bào bằng các phương pháp vật lí (siêu âm, ép, lạnh đông rồi tan giá...) hoặc các phương pháp hoá học (xử lí bằng axit, trích li bằng axeton...) hoặc bằng phương pháp sinh học (dùng enzyme). Nếu sử dụng axit thì sản phẩm phải bền vững trong môi trường axit.

Các sản phẩm lên men có trong môi trường ít thì phải làm đậm đặc. Các phương pháp thường dùng để tách sản phẩm như: lọc, ly tâm, lắng, trích li, sắc kí, cô đặc, kết tủa, kết tinh, tuyển nổi, sấy khô, nghiền....

CHƯƠNG III: SẢN XUẤT SINH KHỐI VI SINH VẬT

3.1 Sản xuất protein đơn bào

3.1.1 Ưu, nhược điểm của sản xuất protein đơn bào

1. Ưu:

- Ít tốn diện tích
- Tốc độ sinh trưởng cao: gấp 100 ÷ 1000 lần so với đại gia súc

Ví dụ: để sản xuất 1t protein cần:

- + Trồng 4ha đậu trong 3 tháng
- + Nuôi 4 con bò trong 15 ÷ 18 tháng
- + Nuôi 300m³ vi sinh vật trong 24h
- Không phụ thuộc vào khí hậu
- Thành phần và giá trị dinh dưỡng của sinh khối có thể điều chỉnh bằng cách thay đổi thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy hoặc tạo giống mới.
- Sử dụng nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền.

2. Nhược:

- Trong sinh khối của vi sinh vật chứa nhiều axit nucleic (10 ÷ 20%) không có lợi cho sức khỏe của con người.
- Protein vi sinh vật có hương vị chưa cao.

3.1.2 Các yêu cầu cơ bản của việc sản xuất protein đơn bào

Để đạt được hiệu quả kinh tế cao trong việc sản xuất sinh khối vi sinh vật cần phải bảo đảm các yêu cầu sau:

1. Sử dụng nguyên liệu rẻ tiền với thu hoạch cao. Để đạt được năng suất cao cần lưu ý đến hiệu suất chuyển hoá nguyên liệu của vi sinh vật. Các dạng nguyên liệu được quan tâm nhiều:

- Cacbohydrat: vi sinh vật có khả năng chuyển hoá 100% để tạo thành sinh khối.

- Hydratcacbon (ri đường, dịch kiềm sunfit, xenluloza, tinh bột, cặn sữa...): vi sinh vật có khả năng chuyển hoá 50% vật chất khô này sang sinh khối.

2. Tốc độ sinh trưởng cao: nói chung tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật rất lớn, thời gian nhân đôi của chúng ngắn.

Vi khuẩn 0,3-2 giờ

Nấm men và tảo 2-6 giờ

Nấm sợi khoảng 10 giờ

Gà mái 500 giờ

Heo 1000 giờ

Trâu bò 2000 giờ

Như vậy trong cùng một thời gian nếu nuôi cấy vi sinh vật để thu nhận sinh khối sẽ thu được một khối lượng cao hơn rất nhiều so với các sinh vật khác.

3. Hàm lượng protein cao:

Hàm lượng protein phụ thuộc vào chủng và chịu ảnh hưởng nhiều ở điều kiện nuôi cấy. Nói chung hàm lượng protein ở vi sinh vật đạt 50-60%.

4. Chất lượng protein cao:

Đánh giá chất lượng protein người ta hay quan tâm đến hàm lượng axit amin không thay thế. Tiêu chuẩn này cũng mang tính chất loại. Thành phần axit amin của protein vi sinh vật giống như trong thịt và sữa. Protein vi sinh vật giàu lizin nhưng các axit amin chứa lưu huỳnh lại thấp.

5. Khả năng tiêu hoá của protein:

Khả năng tiêu hoá protein vi sinh vật bị hạn chế bởi các thành phần nitơ phi protein (như axit nucleic, peptit của thành tế bào). Tuy nhiên nếu protein được tách khỏi tế bào thì khỏi quan tâm. Do đó bản chất thành tế bào là tiêu chuẩn để lựa chọn vi sinh vật dùng trong sản xuất protein vi sinh vật.

6. Sự an toàn về độc tố:

Các vi sinh vật gây bệnh hoặc có chứa các thành phần gây độc nghi ngờ thì không được dùng để sản xuất protein. Yêu cầu hàm lượng axit nucleic phải thấp, hàm lượng của nó càng cao thì càng làm giảm giá trị của protein. Khi tiêu hoá các axit nucleic sẽ phân huỷ tiếp thành các nucleotit, sau đó lại được phân huỷ tiếp thành ademin hoặc guanin và cuối cùng thành axit uric. Trong cơ thể người không có enzym urinaza do đó uric không chuyển hoá tiếp. Sự tích tụ axit uric sẽ gây nên bệnh thấp khớp, tạo ra sỏi thận, sỏi bàng quang do độ hoà tan thấp của axit này. Lượng axit nucleic hấp thụ qua dinh dưỡng không được qua 2g/ngày.

Ở động vật vấn đề này không quan trọng vì chúng có khả năng đồng hoá axit uric. Ta có thể làm giảm lượng nucleic bằng những biện pháp sau:

- Giảm mạnh tốc độ sinh trưởng.

- Chiết rút ARN=dùng dịch NaCl 10% nóng.

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

- Phân huỷ ARN bởi enzym nucleaza đưa vào hoặc của bản thân tế bào.

Dùng phương pháp gây choáng nhiệt theo 3 bước: đầu tiên các tế bào được đun nóng lên 68°C trong 5 giây. Sau đó ủ ở 52,5°C trong 2 giờ và cuối cùng ở 55-56°C trong 1h. Việc xử lý này làm biến tính riboxom và hoạt hoá các ribonucleaza. Các sản phẩm thủy phân được tách khỏi tế bào, hàm lượng

protein không bị ảnh hưởng, hàm lượng axit nucleic giảm từ 1-2% lượng vật chất khô của tế bào.

7. Những vấn đề kỹ thuật:

Vi sinh vật phải dễ tách và dễ xử lí. Các tế bào lớn như nấm men được tách ra bằng li tâm tốt hơn tế bào vi khuẩn. Chọn các chủng có khả năng chịu nhiệt sẽ làm giảm chi phí cho việc làm nguội. Tính không mẫn cảm với sự tạp nhiễm là tiền đề cho việc làm nguội sản xuất protein không vô trùng. Ngoài ra người ta còn chú ý đến khả năng đồng hoá đồng thời nhiều nguồn cacbon khác nhau.

3.1.3 Vi sinh vật dùng trong sản xuất protein đơn bào

3.1.3.1 Nấm men

Trong các đối tượng vi sinh vật được sử dụng để thu nhận protein thì nấm men là loại được nghiên cứu sớm nhất và đến nay đã được áp dụng rộng rãi trên nhiều nước. Nấm men giàu protein, vitamin (nhất là nhóm B). Hàm lượng protein dao động 40-60% khối lượng chất khô. Protein của nấm men gần giống protein nguồn gốc động vật, chứa khoảng 20 loại aminoacid, trong đó đầy đủ các axit amin không thay thế. Thành phần các aminoacid của nấm men cân đối hơn lúa mì, kém chút ít so với sữa, bột cá và sản phẩm động vật nói chung.

Sử dụng rộng rãi: *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* vì các loại này khả năng chuyển hoá các chất cao, đa dạng và qui trình công nghệ đơn giản.

3.1.3.2 Nấm sợi

Khi dùng nguyên liệu là tinh bột và xenlulo thì không thể sử dụng nấm men được vì bản thân nấm men không chứa enzyme amylaza và xenlulaza, do đó phải dùng nấm sợi. Nấm sợi có nhược điểm là thời gian nhân đôi dài và hàm lượng protein thấp (khoảng 30%). Nhưng nấm sợi lại có ưu điểm là rất dễ tách sinh khối và tạo hương vị đặc biệt.

Để dùng trong thực phẩm người ta sử dụng các loài *Morchella*. Loài này có vị ngon, phù hợp cho chế biến thực phẩm. Tuy nhiên, khó khăn nhất là nuôi cấy *Morchella* rất tốn kém và dễ bị nhiễm.

Hiện nay nhiều nơi sử dụng hỗn hợp giống *Trichoderma virid* và nấm men *Sacch. Cerevisiae* để sản xuất protein. Ngoài ra, người ta còn sử dụng hỗn hợp *Trichoderma virid* với *Candida utilis* hoặc *Endomycopsis fibuliger* với *Candida utilis*.

3.1.3.3 Vi khuẩn

Vi khuẩn dùng để sản xuất protein đơn bào thường được nuôi trên cacbua hydro. Người ta thường sử dụng các giống *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*. Các giống vi khuẩn này có khả năng đồng hoá các ankal, cacbua hydro béo và thơm.

Đối với nguyên liệu là metan người ta sử dụng các giống *Methylomonas methanica*, *Methylococens capsulatus*.

3.1.3.4 Vi khuẩn lam và vi tảo

Tất cả mọi loài tảo có kích thước nhỏ bé và có thể thích hợp với việc sử dụng các phương pháp nuôi cấy đối với vi sinh vật đều gọi là vi tảo. Còn vi khuẩn lam trước đây gọi là tảo lam. Về qui trình công nghệ sản xuất thu sinh khối của 2 loại này về cơ bản là giống nhau.

Hàm lượng protein chiếm 40-60% lượng chất khô, thậm chí đối với *Spirulina* còn lên đến 60-70%. Hàm lượng các aminoacid của 2 loại này khá cân đối, gần với protein tiêu chuẩn.

Ngoài ra trong sinh khối của các loài tảo còn chứa nhiều loại vitamin: A, B, K, pantothenic và dạng tươi còn chứa vitamin C. Ở *Spirulina* chứa nhiều B₁₂ nên dùng làm thực phẩm, mỹ phẩm, TAGS (gà cho trứng đỏ, da vàng). Trong sinh khối vi khuẩn lam còn chứa kháng sinh nên bảo quản tốt.

3.1.4 Qui trình công nghệ sản xuất protein đơn bào

3.1.4.1 Sản xuất protein đơn bào từ vi sinh vật

1. Qui trình công nghệ:

Nguyên liệu → xử lí → chuẩn bị môi trường dinh dưỡng

Vi sinh vật thuần khiết → nuôi → cấy vi sinh vật

Sản phẩm ← hoàn thiện ← xử lí ← tách sinh khối ← lên men

2. Nguyên liệu: Thường sử dụng các loại nguyên liệu như: rỉ đường, nước thải của nhà máy sữa, dịch kiềm sunfit, dịch thủy phân gỗ, tinh bột, dextrin, cacbuahydro...

3. Xử lí: bao gồm nhiều công đoạn khác nhau phụ thuộc vào loại nguyên liệu và chủng vi sinh vật sử dụng:

+ Làm sạch: (tách tạp chất, loại bỏ các phần không cần thiết, làm sạch vi sinh vật).

+ Làm nhỏ nguyên liệu

+ Thủy phân nguyên liệu (tinh bột, xenlulo...)

4. Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng: Ngoài cơ chất chính là cacbon thì trong môi trường cần phải bổ sung thêm các chất dinh dưỡng nguồn nitơ, photpho, kali, magie, các nguyên tố vi lượng và các chất sinh trưởng như cao ngô, cao nấm men... Sử dụng các hoá chất để điều chỉnh pH của môi trường đến giá trị thích hợp.

5. Chuẩn bị giống: Nuôi cấy nhân giống đầu tiên được thực hiện trong phòng thí nghiệm, sau đó được nuôi cấy tiếp ở phân xưởng sản xuất. Tỷ lệ tiếp giống chuyên cấp là 1:10. Thời gian nuôi ở mỗi cấp khoảng 15h. Trong quá trình

nhân giống dùng nước amoniac để giữ pH và phải sục khí vô trùng liên tục. Trong giai đoạn này chú ý bảo đảm việc khử trùng môi trường nuôi cấy.

6. Lên men: Thường sử dụng phương pháp lên men chìm và có thể tiến hành lên men gián đoạn, liên tục hoặc bán liên tục. Khi lên men chú ý điều chỉnh các yếu tố: t° , pH, môi trường dinh dưỡng, O_2 , phá bọt.

7. Tách sinh khối: Tùy vào điều kiện cụ thể mà có thể sử dụng các phương pháp khác nhau để tách sinh khối như lọc, lắng, li tâm...

8. Xử lý sinh khối: Tùy vào mục đích sử dụng mà quá trình xử lý sinh khối gồm các công đoạn sau:

- + Rửa
- + Chiết rút protein (loại bớt ARN bằng các phương pháp khác nhau)
- + Sấy: tốt nhất là dùng phương pháp sấy phun

3.1.4.2 Sản xuất sinh khối tảo:

Đặc điểm tế bào của các loại tảo là có diệp lục tố nên chúng có khả năng quang hợp. Phản ứng quang hợp của tảo: $CO_2 + 4H_2O \rightarrow CH_2O + 3H_2O + O_2$. Sự cố định và khử CO_2 thành hydratcacbon của tảo theo chu trình Kalvin.

Nuôi tảo ngoài việc cung cấp protein còn có tác dụng tránh được sự làm giàu dinh dưỡng đối với các thủy vực do nước thải được làm sạch bằng vi khuẩn gây nên (tránh tích tụ các chất khoáng như NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} ...)

1. Yêu cầu về tảo giống:

- Tốc độ sinh trưởng nhanh
- Năng suất quang hợp cao
- Có sức chống chịu với điều kiện ngoại cảnh
- Sinh khối có thành phần hoá học thích hợp
- Tế bào luôn ở trạng thái huyền phù, không dính kết vào thành bể hoặc lắng xuống đáy.

- Dễ tách sinh khối (nhờ vớt, lọc)

2. Các loại tảo thường dùng:

- Vítảo: Chlorella, Scenedesmus, Dunaliella
- Vi khuẩn lam: Spirulina

3. Công nghệ nuôi :

* Quy trình công nghệ:

Chuẩn bị môi trường \rightarrow cấy tảo giống \rightarrow nuôi tảo \rightarrow thu hoạch

* Môi trường: để chuẩn bị môi trường nuôi tảo người ta có thể sử dụng nước máy, nước biển, nước thải đã qua xử lý. Cần bổ sung thêm các chất khoáng cần thiết vào môi trường cho tảo phát triển.

* Điều kiện nuôi: tảo thích hợp với môi trường có pH = 8,5÷10 và nhiệt độ 20÷40 $^{\circ}$ C. Trong quá trình nuôi bảo đảm cung cấp đủ ánh sáng và CO_2 .

* Thu hoạch: có thể thu hoạch tảo bằng cách lọc, vớt hoặc cào. Để tận dụng hết các chất khoáng người ta có thể sử dụng lại môi trường sau khi đã tách tảo.

3.2 Sản xuất nấm men bánh mì:

Nấm men bánh mì là sinh khối của chủng *Sacch.cerevisiae* vẫn còn sống.

3.2.1 Yêu cầu đối với giống nấm men bánh mì

- Sinh sản nhanh
- Chịu được môi trường ri đường
- Có lực làm nở bột cao: có khả năng lên men đường sacarose, glucose, maltose, có hoạt lực zimaza và maltaza cao.
- Ít bị thay đổi khi bảo quản.
- Tế bào lớn để dễ tách sinh khối.

Hoạt lực zimaza và maltaza là thời gian (phút) để sinh ra 10ml khí CO₂ khi lên men dung dịch 5% đường glucoza hoặc maltoza bằng men ép với tỉ lệ là 2,5% so với lượng dịch đường.

3.2.2 Công nghệ sản xuất:

1. Qui trình công nghệ:

Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng → cấy giống → nuôi → tách nấm men → xử lí → thành phẩm.

2. Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng:

Người ta thường sử dụng ri đường để làm môi trường nuôi cấy nấm men bánh mì. Trước khi pha môi trường thì cần phải xử lí ri đường. Ri đường nghèo chất dinh dưỡng, đặc biệt là các chất cung cấp nguồn nitơ và photpho cho nên phải bổ sung. Ngoài ra, để tăng sinh khối nhanh trong môi trường cần phải có một số vitamin như: biotin, inositol, axit pentotenic.v.v.

3. Cấy giống:

Giống phải bảo đảm đúng yêu cầu và được nuôi cấy trước cho đủ số lượng tế bào. Quá trình nuôi cấy giống cần thực hiện nghiêm ngặt về chế độ vô trùng và nhu cầu dinh dưỡng của nấm men.

4. Nuôi nấm men:

Mục đích của giai đoạn này là tạo được lượng sinh khối lớn và có hoạt lực cao. Để nấm men sinh trưởng và phát triển tốt thì trong quá trình lên men cần chú đến các yếu tố như: nhiệt độ giữ trong khoảng 27÷30⁰C; pH của môi trường 4÷5,5; cung cấp đầy đủ oxy; bảo đảm nồng độ và thành phần các chất dinh dưỡng theo yêu cầu; nồng độ tế bào nấm men tích lũy được phải đạt mức thích hợp.

5. Thu nhận sinh khối:

Sau khi lên men xong thì tiến hành tách sinh khối. Có thể tách sinh khối bằng cách lọc hoặc li tâm.

6. Xử lý nấm men:

Tùy theo yêu cầu của sản phẩm (ướt hoặc khô) mà quá trình xử lý khác nhau. Để thu nhận nấm men ướt thì tiến hành rửa sinh khối đã thu được rồi đem ép. Nấm men ướt khó bảo quản và thời gian bảo quản không lâu.

Để bảo quản lâu thì cần phải sấy khô nấm men. Khi sấy nấm men chú ý không để nhiệt độ sấy vượt quá 30°C.

3.2.3 Sản xuất men nước:

1. Nguyên liệu: bột, malt hoặc chế phẩm amylaza của nấm mốc.

2. Môi trường nhân giống: bột → trộn nước (tỉ lệ 1:3) → nấu chín → làm nguội 48-50°C → bổ sung chế phẩm amylaza (3% malt hoặc 0,8 ÷ 1% chế phẩm enzym nấm mốc như *Asp.awamori* hoặc *Asp.oryzae* và dịch giống vi khuẩn. Giữ 8-14 giờ, cho đến khi môi trường đạt tới 11 ÷ 12° axit (1° = 1ml NaOH 1N/100ml) thì đưa vào cấy nấm men.

3. Dịch giống vi khuẩn: lấy nước malt có nồng độ 12°Bx thêm 1 ít CaCO₃. Cấy vi khuẩn *Lactobacterium Delbruckii* và giữ ở nhiệt độ 50 ÷ 52°C trong 1 ÷ 2 ngày. Trước khi đưa vào sử dụng phải nhân giống tiếp.

4. Cấy nấm men: môi trường sau khi đã axit hoá được làm nguội đến 28-30°C rồi tiếp giống nấm men đã nuôi cấy trước vào (tỉ lệ 5 ÷ 10%), giữ ở nhiệt độ này 14 ÷ 15 giờ không sục khí hoặc sục khí gián đoạn. Ở nhiệt độ này vi khuẩn lactic ngừng tích tụ axit. Nấm men sử dụng đường và axit để tăng trưởng sinh khối.

Trong môi trường có axit nấm men sẽ phát triển tốt và hạn chế các vi sinh vật lạ.

CHƯƠNG IV: SẢN XUẤT AXIT AMIN

Axit amin thường bổ sung vào thức ăn cho người và gia súc. Với mục đích này người ta cần đến các axit amin không thay thế. Trong đó, quan trọng nhất là các axit amin L-lyzin, L-tryptophan, L-methionin, L-treonin. Phần lớn các loại protein được khai thác từ thực vật do đó hoặc thiếu axit amin này hoặc axit amin khác. Vì thế, việc bổ sung axit amin vào thực phẩm sẽ làm tăng giá trị của protein. Ngoài ra, các axit amin còn có tính chất làm tăng mùi vị của các sản phẩm thực phẩm.

4.1 Các phương pháp sản xuất axit amin:

4.1.1 Phương pháp tổng hợp hoá học:

Phương pháp này dùng để sản xuất một số axit amin như: glyxin, alanin, metyonin, tryptophan. Phương pháp tổng hợp hoá học thường cho một hỗn hợp các dạng đồng phân L- và D-axit amin. Trong 2 dạng này chỉ có dạng L-là thích hợp cho dinh dưỡng. Do đó việc tách 2 dạng này rất khó khăn và trở nên tốn kém.

4.1.2 Phương pháp trích ly từ dịch thủy phân:

Phương pháp này thường dùng để thu nhận L-cystein, L-cystin, L-leuxyn, L-asparagin, L-tyrozin. Để sản xuất axit amin theo phương pháp này, đầu tiên phải tiến hành thủy phân nguyên liệu giàu protein và sau đó dùng các phương pháp khác nhau để trích ly axit amin cần sản xuất ra khỏi dung dịch thủy phân.

4.1.3 Phương pháp tổng hợp nhờ vi sinh vật:

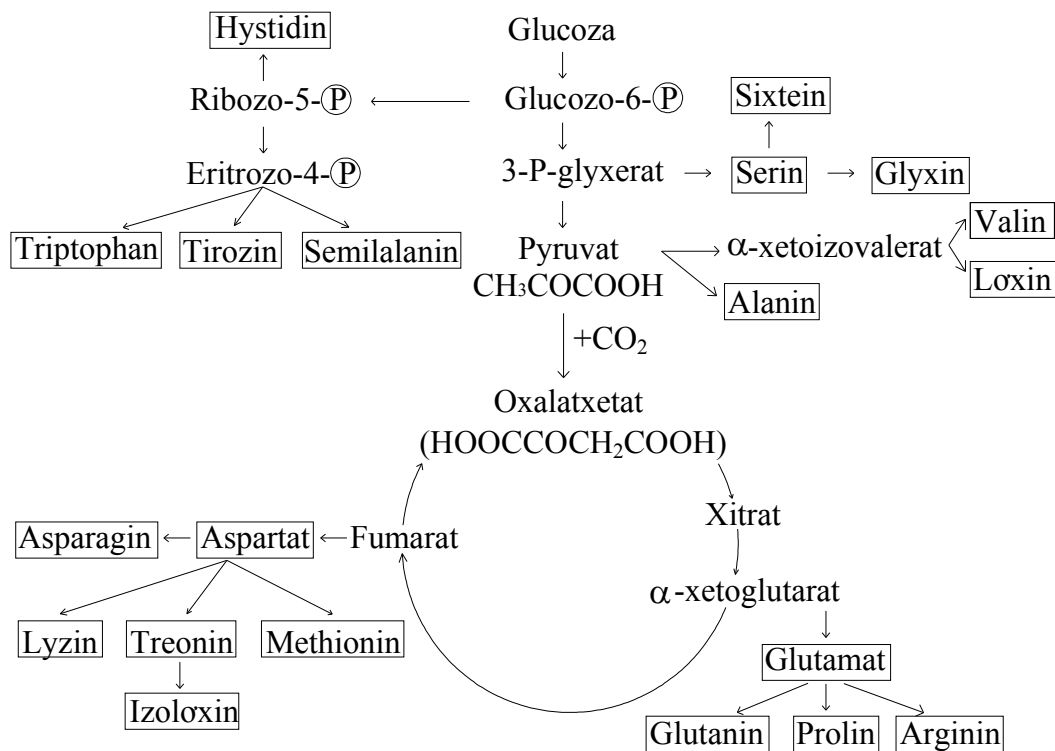
Phương pháp này có 2 phương án:

1. Lên men trực tiếp: các axit amin được tạo thành từ các nguyên liệu rẻ tiền nhờ vi sinh vật.
2. Chuyển hoá các tiền chất của axit amin nhờ vi sinh vật.

Sự lên men trực tiếp có ý nghĩa lớn hơn và hiện nay đã hoàn chỉnh công nghệ để sản xuất hàng loạt các axit amin.

4.2 Sản xuất axit amin nhờ vi sinh vật:

4.2.1 Sự tổng hợp axit amin ở tế bào vi sinh vật:

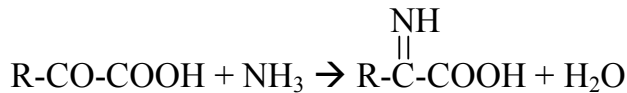


Sơ đồ 2: Sơ đồ tổng hợp axit amin ở tế bào vi sinh vật

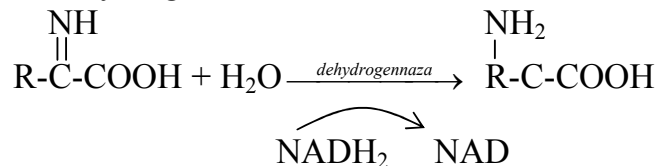
Các axit amin trong tế bào vi sinh vật được tạo thành do quá trình trao đổi cacbon và nitơ. Việc tổng hợp các axit amin trải qua hàng loạt những phản ứng phức tạp với sự xúc tác của nhiều loại enzyme khác nhau, nhưng có thể quy về 2 loại phản ứng là amin hoá và chuyển amin:

1. Phản ứng amin hoá: gồm 2 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: tạo iminoaxit. Giai đoạn này không có sự tham gia của enzym.

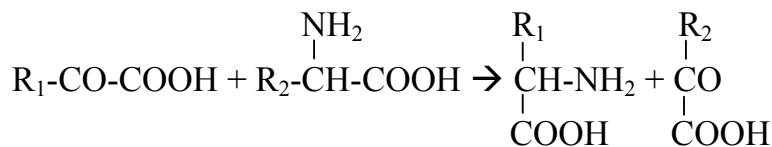


- Giai đoạn 2: chuyển iminoaxit thành aminoaxit nhờ enzym dehydrogenaza



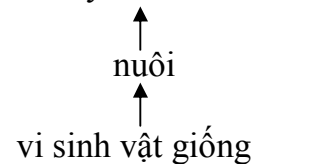
NADH₂: nicotinamitadenin dinucleotit dạng khử

2. Phản ứng chuyển amin: phản ứng này xảy ra nhờ sự xúc tác của enzym aminotransferaza



4.2.2 Quy trình công nghệ:

Nguyên liệu → xử lí → chuẩn bị môi trường dung dịch → cấy vi sinh vật



sản phẩm ← xử lí sản phẩm ← lên men ←

1. Nguyên liệu: bảo đảm cung cấp nguồn cacbon, nitơ và các nguyên tố khác để vi sinh vật phát triển và tổng hợp được nhiều sản phẩm.

- Cung cấp nguồn cacbon: dùng rỉ đường, nguyên liệu giàu tinh bột hoặc một số loại nguyên liệu khác.
- Nguồn nitơ: thường dùng là urê, cũng có thể dùng các loại muối amoni.
- Các hợp chất khoáng: KH₂PO₄, MgSO₄, MnSO₄...
- Các chất kích thích sinh trưởng: vitamin, axit amin.

2. Xử lí:

- Làm sạch
- Thủy phân

3. Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng:

- Có nồng độ và thành phần thích hợp phụ thuộc vào chủng vi sinh vật và giống sản xuất.
- Điều chỉnh pH cho môi trường và thanh trùng môi trường.

4. Chuẩn bị giống

a. Chủng vi sinh vật:

Để sản xuất axit amin người ta có thể sử dụng nhiều chủng vi sinh vật khác nhau, tuy nhiên để sản xuất người ta phải tạo các biến chủng hoặc loại bỏ sự ức chế bằng sản phẩm cuối cùng của vi sinh vật.

b. Nuôi giống:

Để đủ lượng giống cho sản xuất người ta phải tiến hành nuôi cấy qua nhiều bước. Các chủng vi sinh vật dùng trong sản xuất axit amin phần lớn là các đột biến cho nên nếu cấy chuyển nhiều lần sẽ gặp thể hồi biến và ảnh hưởng đến sức sản xuất. Trong sản xuất axit amin không bao giờ được dùng sinh khối của mẻ trước làm giống cho mẻ sau.

5. Lên men:

Thường sử dụng phương pháp lên men chìm. Trong quá trình lên men cần chú ý điều chỉnh các thông số kỹ thuật: nhiệt độ lên men, pH môi trường, sự thông khí, bổ sung các chất dinh dưỡng, phá bọt và một số các yếu tố khác.

6. Thu nhận sản phẩm:

Tùy thuộc vào loại sản phẩm và mục đích sử dụng mà quá trình thu nhận sản phẩm không giống nhau:

- Dùng để chế biến thức ăn gia súc:
 - Thu nhận dưới dạng canh trường:
Hỗn hợp sau khi lên men → cô đặc → bột khô
 - Tách sinh khối → cô đặc → sản phẩm

- Dùng trong chế biến thực phẩm hoặc y học:

Phải tinh chế qua nhiều công đoạn để thu nhận các chế phẩm kỹ thuật hoặc tinh khiết.

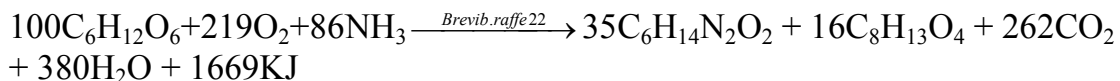
4.3 Kỹ thuật sản xuất một số axit amin:

4.3.1 Sản xuất L-lyzin:

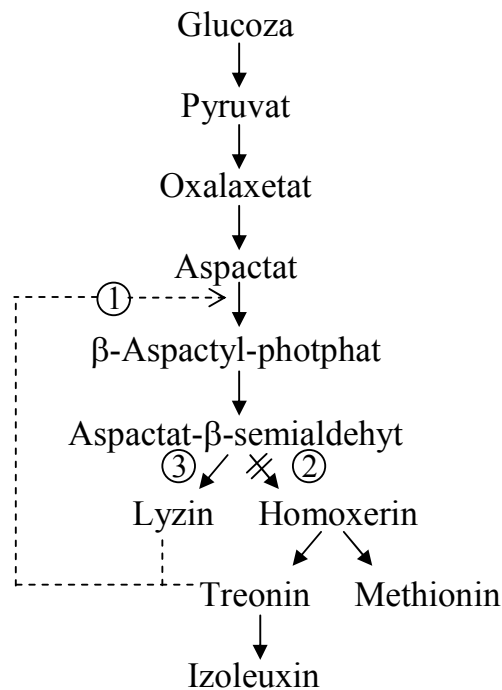
1. Chủng vi sinh vật:

Chủng sản xuất là một thể đột biến cần homoxerin của *Corynebacterium glutamicum* (còn gọi là *Micrococcus glutamicus*). Dưới điều kiện lên men thích hợp chủng này có thể sản xuất tới 50g lyzin/lit môi trường. Nguyên liệu thường dùng là glucoza hay mật rỉ với nồng độ 150g/lit.

2. Phương trình lên men tổng quát:



3. Cơ chế:



Sơ đồ 3: Cơ chế tổng hợp lyzin của *Corynebacterium glutamicum*

①-Enzym aspactokinaza, ②-Enzym homoxerindehydrogenaza, ③-Enzym dihydropicolinat-syntetaza.

Lyzin là một axit amin thuộc họ aspactat và được tổng hợp qua một con đường trao đổi chất phân nhánh mà qua đó homoxerin, metionin, treonin, izoloxin cũng được tạo thành.

Những đường chấm chấm biểu diễn sự ức chế bởi sản phẩm cuối cùng. Ở chủng hoang dại lyzin và treonin cùng gây ra một sự ức chế phối hợp (E) đối với aspactokinaza(1). Do khuyết homoxerindehydrogenaza(2) mà không có sự tạo thành treonin. Dihydropicolinat-Syntetaza(3) không miễn cảm dị lập thể nên sự ức chế bởi sản phẩm cuối cùng bị triệt tiêu và có sự tổng hợp thừa lyzin (50g/l).

4. Lên men :

Nguồn hydratcacbon thích hợp cho tổng hợp lyzin là glucose, fructose, maltose và saccarosse. Các đường như lactose, rafinose, pentose các chủng sinh lyzin không đồng hoá được. Cho nên người ta thường sử dụng các loại nguyên liệu như ri đường, dịch thủy phân từ tinh bột (ngô, sắn) để làm môi trường sản xuất lyzin.

Nồng độ đường trong môi trường lên men khoảng 10-12%. Trong quá trình lên men, nhằm để tăng hiệu suất thu hồi lyzin có thể bổ sung thêm đường để nâng cao nồng độ đường lên tới 25% (nhưng cũng thận trọng vì có khi hiệu

suất sinh lyzin không tăng mà còn ảnh hưởng xấu đến vi sinh vật do làm tăng áp suất thẩm thấu của môi trường).

Nguồn nitơ hay dùng là urê, NH_3 hoặc các muối amon. Tỷ lệ giữa C:N đóng vai trò quan trọng, nó ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp lyzin. Thường bổ sung các muối amon với hàm lượng khoảng 2%.

Ngoài ra còn phải bổ sung vào môi trường các chất cung cấp nguồn photpho như KH_2PO_4 và K_2HPO_4 (bảo đảm lượng photpho đạt 0,008-0,02mg/lít; nếu nồng độ này lên đến 1,6-2mg/lít thì sự tạo thành lyzin bị ngừng). Do đó không nên dùng photphat amon để làm nguồn cung cấp nitơ và photpho.

Phải bổ sung các muối có chứa các nguyên tố Mg, Fe, Cu, Mn (thường bổ sung MgSO_4 -0,03%; còn Fe, Cu, Mn có trong rỉ đường và cao ngô).

Các chất kích thích sinh trưởng:

+ Biotin: cần khoảng 8-15mg/lít, nếu quá ít (1-2mg/l) thì sản phẩm chủ yếu sẽ là axit glutamic, (biotin và B_1 có trong cao ngô, đặc biệt trong rỉ đường mía có nhiều biotin)

+ Thiamin(B_1): nếu không có sẽ tạo thành alanin

+ Treonin: không có, hoặc ít sẽ kìm hãm sự phát triển của vi sinh vật nhưng dư sẽ dẫn tới sự ức chế bằng sản phẩm cuối cùng. Hàm lượng thích hợp trong khoảng 200-800mg/l.

+ Methionin: nó ảnh hưởng tới sinh trưởng của vi sinh vật, hàm lượng thích hợp: 150-250mg/l.

Có thể dùng homoxerin để thay cho treonin và methionin.

Bảo đảm môi trường có pH=7-7,6 và phải thanh trùng. Lượng giống cho vào để lên men là 5-10%. Nhiệt độ lên men là 30-32°C, cung cấp O_2 2-4g/11.h; trong quá trình lên men dùng urê hoặc nước NH_3 để điều chỉnh pH. Tổng thời gian lên men 50-72h.

5.Thu nhận sản phẩm:

Tùy vào dạng chế phẩm (dịch nuôi cấy, dịch cô đặc, bột hoặc tinh thể) mà quá trình thu nhận sản phẩm có khác nhau.

- Dịch nuôi cấy là chế phẩm thu được sau lên men và có thể dùng trực tiếp pha vào thức ăn gia súc.

- Dung dịch cô đặc: để chống hư hỏng thì dịch sau lên men được axit hoá bằng HCl đến pH=5 và bổ sung dung dịch NaHSO_3 25% (tỷ lệ 0,4% so với dịch lên men) rồi đem cô chân không cho đến khi đạt nồng độ chất khô 35-40%. Chế phẩm này dùng trong chăn nuôi.

- Bột: từ dịch cô đặc có thể bổ sung thêm các chất độn (bột xương, cám...) rồi sấy khô và nghiền nhỏ. Hoặc dịch cô đặc đem sấy phun để thu chế phẩm dạng bột.

- Để thu nhận các tinh thể lyzin thì phải sử dụng nhiều phương pháp và tiến hành qua nhiều bước:

Hỗn hợp sau lên men → lọc (li tâm) → sinh khối

↓
dung dịch

↓
nhả hấp phụ ← trao đổi ion

Dùng dung dịch NH_4OH 2-3,5% để nhả hấp phụ. Dùng HCl axit hoá đến pH=5 rồi cô đặc đến khi đạt nồng độ 30-50% → làm lạnh 10-12°C để trợ tinh. Để có chế phẩm tinh khiết thì đem tinh thể kết tinh lần 1 kết tinh lại nhiều lần (hoà tan vào cồn).

4.3.2 Sản xuất L-treonin:

Cho đến nay treonin chưa được sản xuất ở qui mô lớn bằng con đường vi sinh vật vì việc gây tạo các thể đột biến tổng hợp thừa L-treonin gặp nhiều khó khăn so với lyzin.

Có thể đạt được một sự sản xuất thừa treonin nhờ 3 bước đột biến sau:

- Mất tính miễn cảm dị lập thể của homoxerindehydrogenaza miễn cảm với treonin.
- Trợ dưỡng izoloxin.
- Trợ dưỡng metionin.

4.3.3 Sản xuất L-triptophan:

Nhờ vào sự tổng hợp của vi sinh vật, L-triptophan có thể thu nhận bằng hai con đường: chuyển tiền chất của triptophan thành triptophan nhờ sự giúp đỡ của các hệ enzym vi sinh vật; hoặc thu nhận triptophan nhờ sự đột biến do thiếu tirozin và fenilalanin của các chủng vi sinh vật.

4.3.3.1 Phương pháp chuyển tiền chất:

1. Tiền chất:

Nhờ vi sinh vật có thể thu nhận được triptophan từ các tiền chất khác nhau. Hiệu suất thu hồi sản phẩm từ các tiền chất khác nhau là không giống nhau. Một số tiền chất hay sử dụng:

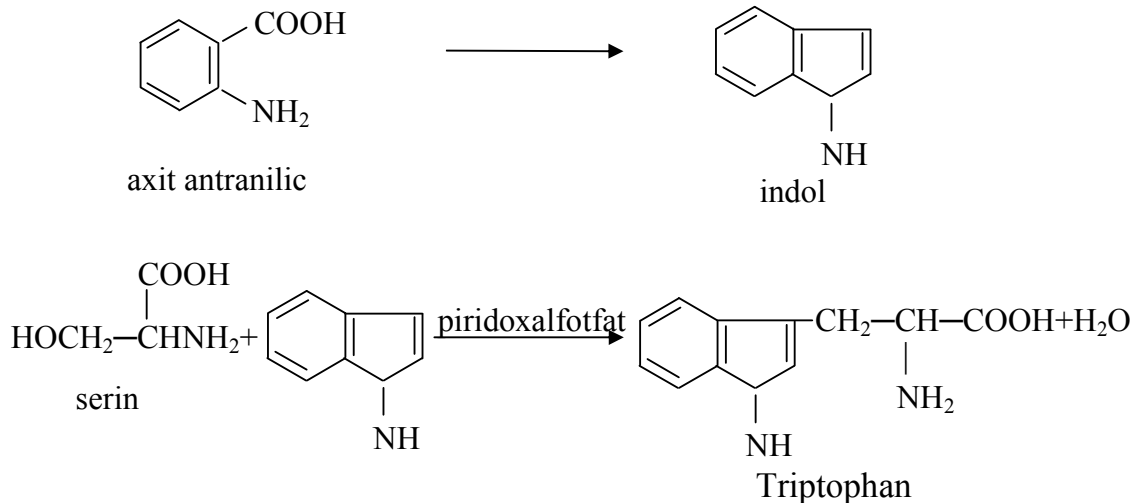
Axit antranilic	hiệu suất thu hồi 98,8%
Indol	87,2%
Indol + Cerin (1:2)	92,5%
Indol + Cistein (1:2)	89,5%
Indol + Alanin (1:4)	87,0%

2. Chủng vi sinh vật:

Để chuyển các tiền chất người ta có thể sử dụng nhiều chủng vi sinh vật khác nhau. Riêng đối với axit antranilic người ta hay dùng nhất là nấm men *Candida utilis* hoặc *Hansunella*.

3. Cơ chế:

Khi sử dụng axit antranilic làm tiền chất thì cơ chế của quá trình như sau:



Sơ đồ 4: Cơ chế chuyển axit antranilic thành triptophan

4. Kỹ thuật lên men:

Quá trình sản xuất chia làm hai giai đoạn: thu nhận sinh khối và chuyển hoá tiền chất nhờ sự giúp đỡ của sinh khối đã thu nhận được.

Giai đoạn đầu không khác mấy so với quá trình nuôi cấy các loại vi sinh vật giống khác. Tức là quá trình cũng đi từ ống giống gốc → ống nghiệm → bình tam giác... lượng sinh khối thu được phụ thuộc vào phương pháp nuôi cấy giống. Họ thấy rằng nếu lượng giống đưa vào lên men càng lớn thì mức độ chuyển hoá của axit antranilic càng lớn.

Nguồn cung cấp cacbon cho giống phát triển là sacaroza hoặc mật rỉ (với hàm lượng từ 6,3-20%), nguồn cung cấp nitơ là urê với lượng từ 0,5-1%. Ngoài ra còn bổ sung thêm (%): K₂HPO₄-0,01, MgSO₄-0,005, CaCl₂-0,01. Bảo đảm môi trường có pH=7,5÷8 và vô trùng. Tiến hành nuôi giống ở nhiệt độ 28÷30⁰C, thời gian nuôi của mỗi cấp không quá 24 giờ. Yêu cầu giống đạt 3÷5 gam sinh khối khô/1lít môi trường.

Giai đoạn hai được thực hiện trong thiết bị lên men. Đầu tiên chuẩn bị môi trường nuôi giống trong thiết bị lên men và chuyển men giống đã nuôi ở giai đoạn 1 vào. Tiếp tục nuôi giống trong 24 giờ ở nhiệt độ 28÷30⁰C và thông khí không ít hơn 7g O₂/l.h. Nếu trong quá trình nuôi giống có xuất hiện bọt thì phải dùng dầu phá bọt.

Sau 24 giờ nuôi giống cho vào thiết bị lên men dung dịch axit antranilic 5% trong rượu và dung dịch amoniac 50% để lên men. Lúc này thông khí bảo đảm cung cấp 3÷4 gam O₂/l.h.

Sau khi cho dung dịch axit vào được 3-4 giờ thì bổ sung thêm dung dịch ri đường 25%. Tiếp theo, cứ sau 12 giờ thì bổ sung dung dịch ri đường, sau 6 giờ thì bổ sung dung dịch ammoniac và axit antranilic một lần. Tổng thời gian của giai đoạn 2 là 120÷140 giờ.

Quá trình lên men (giai đoạn 2) thực hiện ở pH của môi trường $\approx 8,0$ và nhiệt độ lên men khoảng 30°C .

3. Thu nhận sản phẩm:

Dung dịch sau lên men có chứa 7,8÷12,5% chất khô, trong đó có 0,3÷0,5% triptophan. Phần lớn triptophan (85÷88%) nằm trong pha lỏng. Do đó để thu nhận chế phẩm tinh khiết thì phải tinh chế dịch lọc. Còn nếu dùng cho chăn nuôi thì sử dụng dạng cô đặc có cả sinh khối nấm men.

Để làm thức ăn gia súc thì dịch sau lên men đem cô đặc còn lại 1/3 thể tích, sau đó đem sấy trong thiết bị sấy phun ($t^{\circ}=110\div 120^{\circ}\text{C}$) để thu nhận bột dùng bổ sung cho thức ăn gia súc. Trong thành phần của bột này gồm có:

- Chất khô 90%
- Protein 48÷54%
- Triptophan 1÷3%
- Vitamin (mg/kg):
 - + B₁ : 15÷18,5
 - + B₂ : 24,5÷32,5
 - + PP : 620÷680

- Axit amin khác 6%. Trong đó có chứa nhiều các axit amin như: lizin, histidin, treonin, xerin, glutamate, prolin, glyxin, valin, tirozin, phenilalanin, acparagin, acginin...

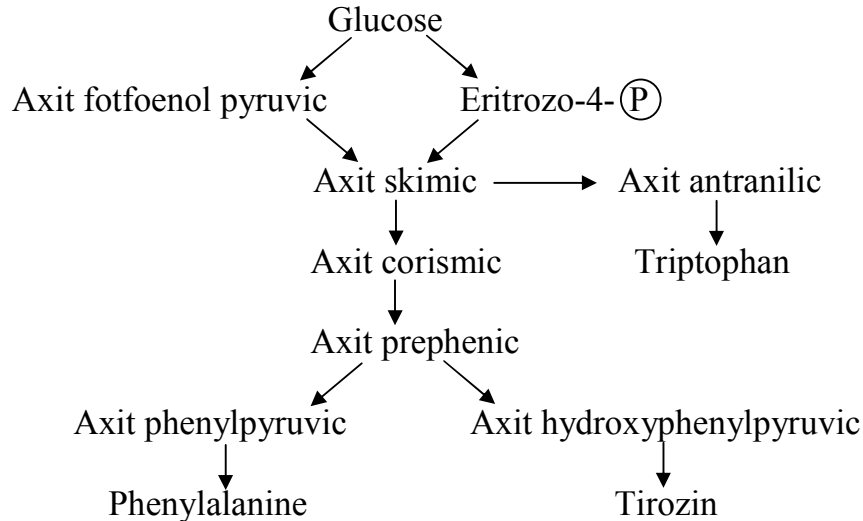
Để thu nhận chế phẩm triptophan tinh khiết thì phải qua các bước sau:

- Tách sinh khối bằng li tâm
- Dùng HCl axit hoá đến pH = 1 và tách các kết tủa
- Tiến hành trao đổi ion
- Nhả hấp phụ nhờ dung dịch ammoniac 5%
- Cô đặc dung dịch ở nhiệt độ $60\div 70^{\circ}\text{C}$
- Làm lạnh đến $4\div 6^{\circ}\text{C}$ để trợ tinh
- Tách tinh thể triptophan
- Rửa các tinh thể bằng rượu etylic
- Sấy các tinh thể ở nhiệt độ 60°C

Các phế liệu của quá trình tinh chế này có thể dùng cho chăn nuôi.

4.3.3.2 Thu nhận nhờ các chủng đột biến:

Sự thu nhận triptophan cũng như tirozin và phenilalanin có thể thực hiện trên các chủng đột biến của *E. coli* hoặc *Bacillus subtilis*. Quá trình tổng hợp tirozin, triptophan và phenilalanin đi theo sơ đồ sau:



Sơ đồ 5: Cơ chế tổng hợp triptophan, phenilalanin, tirozin trong tế bào vi sinh vật

Để tổng hợp thừa triptophan người ta dùng chủng *e. coli* trợ dưỡng tirozin và phenylalanine.

CHƯƠNG V: SẢN XUẤT CHẾ PHẨM ENZYM

5.1 Những tính chất ưu việt của enzyme

Enzym là một chất xúc tác sinh học. Nó có đầy đủ các tính chất của chất xúc tác hoá học, ngoài ra còn có những ưu việt sau:

1. Có tính chuyên hoá cao (tính đặc hiệu): mỗi enzyme chỉ tác dụng lên một cơ chất nhất định nào đó theo ý muốn mà không gây nên một biến đổi nào khác. Ví dụ: amylaza chỉ thủy phân tinh bột, proteaza chỉ thủy phân protein.v.v.

2. Cường lực xúc tác lớn: với một lượng nhỏ enzyme có thể làm xúc tác để chuyển hoá một lượng cơ chất lớn. Ví dụ: 1g pepxin có khả năng thủy phân 50kg trứng, 1g rennin có thể làm đông tụ 72 tấn sữa, 1mol catalaza có thể làm chuyển hoá 5×10^6 mol H_2O_2 trong 1 giây.

3. Tác dụng trong một điều kiện êm dịu: phần lớn các enzyme hoạt động ở nhiệt độ không cao, pH thường là trung tính và ở áp suất thường.

4. Enzym không độc hại: tất cả các loại enzyme đều có nguồn gốc từ sinh vật nên không độc hại đối với sức khỏe con người.

Chính vì những ưu việt đó mà trong những năm gần đây chế phẩm enzyme được sử dụng rộng rãi và ngành công nghiệp enzyme cũng được phát triển không ngừng.

5.2 Nguồn nguyên liệu để thu nhận enzyme:

Enzyme có thể thu nhận từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau như: động vật, thực vật và vi sinh vật.

5.2.1 Động vật:

Enzyme nằm trong các cơ quan nội tạng của động vật:

- Tụy tạng: chứa nhiều enzyme amylaza, maltaza, proteaza, esteraza, lipaza.v.v.

- Dạ dày chứa nhiều enzyme pepxin, các enzyme tiêu hoá (trong ngăn thứ tư của dạ dày bò có 1 loại vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp xenlulaza), trong dạ dày của bê và nghé có chứa enzyme rennin làm đông tụ sữa.

- Ruột: chứa chủ yếu là enzyme enterokinaza có khả năng phá vỡ các liên kết peptit.

- Gan: là cơ quan chứa rất nhiều enzyme.

Không thể thu enzyme từ động vật trên qui mô công nghiệp được vì thời gian nuôi động vật quá dài nên không kinh tế.

5.2.2 Thực vật:

Người ta có thể thu được một số enzyme trong thực vật thương phẩm như thu papain từ đu đủ, bromelain từ dứa, amylaza từ malt, plazmin (cả papain) từ họ ficus (sung, vả).

Trong các họ đậu có enzyme ureaza. Trong thuốc lá có chứa enzyme amylaza, esteraza, pectinaza, proteaza. Trong chè có chứa nhiều enzyme oxy hoá khử như polyphenoloxydaza. Trong rau quả cũng chứa nhiều loại enzyme khác nhau.

Thu enzyme từ thực vật cũng không kinh tế vì muốn có nhiều thực vật thì phải trồng nên phải có đất và chi phí tốn kém trong việc chăm bón.

5.2.3 Vi sinh vật:

So với động vật và thực vật thì việc thu nhận enzyme từ vi sinh vật có nhiều lợi thế hơn.

- Từ vi sinh vật có thể thu nhận được nhiều enzyme khác nhau, trong đó có những loại không thể thu nhận được từ động vật hoặc thực vật.

- Bằng cách thay đổi điều kiện nuôi cấy hoặc dùng tác nhân điều chỉnh người ta có thể điều khiển quá trình sinh tổng hợp enzyme của vi sinh vật theo ý muốn.

- Vi sinh vật có khả năng sinh sản và phát triển nhanh, tổng hợp enzyme với tốc độ cực kỳ lớn trong một thời gian ngắn. Chính vì thế việc sản xuất enzyme từ vi sinh vật ít tốn thời gian.

- Enzyme thu nhận từ vi sinh vật có hoạt tính rất mạnh, vượt xa các enzyme từ các nguồn sinh vật khác.

- Vi sinh vật có khả năng sinh sản, phát triển và tổng hợp enzyme trên các môi trường dinh dưỡng đơn giản, dễ kiếm và rẻ tiền (có thể là phế liệu của các ngành sản xuất khác nhau). Cho nên việc sản xuất enzyme từ vi sinh vật cũng rất kinh tế.

Chính vì các lợi thế trên nên nguồn enzyme từ vi sinh vật có thể đưa vào ngành sản xuất chế phẩm enzyme công nghiệp.

Bảng 1: Khả năng sử dụng các loại enzyme từ vi sinh vật

Loại enzyme	Vi sinh vật	Sử dụng
Amylaza	Bacillus Subtilis, Bacillus Stearotherophilus.	Bia và rượu (phân huỷ tinh bột thành đường lên men, sản xuất nha)
α -amylaza	Asp.niger Asp.oryzac	Sản xuất bánh mì, bánh ngọt (thuỷ phân một phần tinh bột)
Glucoamylaza	Asp.niger Asp.oryzac Endomycopsis bispora	Sản xuất glucoza, bia (làm giảm hàm lượng dextrin)
Pectnaza	Asp.niger Asp.oryzac Sclerotinia libertina	Sản xuất và làm trong dịch quả, các chế phẩm rau cho dinh dưỡng trẻ sơ sinh.
Các xenluloza	Trichoderma viride	CN thực phẩm (làm tan thành tế bào thực vật ở rau), rượu (thu nhận đường từ xenluloza).
Dextranaza	Penicillium funiculorum	Sản xuất dexran với kích thước phân tử nhất định. Chất bổ sung cho thuốc đánh răng.
Invectaza	Sacch.Cerevisiac	Dịch hoá đường để làm keo, sản xuất mật ong nhân tạo.
Các proteaza	Bacil.Subtilis, Bacil.Cereus Bacil.Stearotheroopilus, Streptomyces griseus, Asp.oryzac	Bổ sung vào bột giặt để loại protein, làm mềm thịt, chất trợ tiêu hoá, dùng trong công nghệ làm phim
Enzym làm đông sữa	Mucor pusillus	Sản xuất fommat
Keratinaza	Streptomyces fradiac	Ngành da (khử lông)
β -galactozidaza	Asp.niger, Pen.notatum	Bảo quản thực phẩm (loại O ₂) Xác định glucoza (chẩn đoán bệnh đái đường).
Streptokinaza	Streptococcus, Spec.chotridium histolyticum	Điều trị (tiêu cục nghẽn) Điều trị các vết thương, vết bỏng
L-asparaginaza	Eschericha coli, Erivinia aroidac	Điều trị bệnh bạch cầu
Penixilinazylaza	Escherichia coli	SX các penixilin bán tổng hợp

5.3 Sản xuất enzym từ vi sinh vật:

Quá trình sản xuất gồm 3 giai đoạn:

- Tuyển chọn vi sinh vật và cải tạo giống
- Nuôi cấy vi sinh vật
- Tách và tinh chế enzym

5.3.1 Tuyển chọn vi sinh vật và cải tạo giống:

1. Tuyển chọn:

Khả năng tạo enzym của vi sinh vật rất đa dạng và phong phú. Mỗi loại enzym có thể thu nhận được từ nhiều chủng vi sinh vật khác nhau và ngược lại một chủng vi sinh vật cũng có khả năng sinh nhiều loại enzym.

Ví dụ:	
Amylaza có thể thu nhận nhờ	{ <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus Subtilis</i> <i>Bac.Stearothermophilus</i>
α -Amylaza	{ <i>Asp.niger</i> <i>Asp.oryzae</i>
Glucoamylaza	{ <i>Asp.awamori</i> <i>Asp.oryzae, niger</i> <i>Endomycopsis, awamori</i>
Pectinaza	{ <i>Asp.niger</i> <i>Asp. oryzae</i> <i>Asp.awamori</i>
Proteaza	{ <i>Asp.oryzae</i> <i>Bac.Subtilis</i> <i>Streptomyces griseus</i>
Proteinaza	{ <i>Asp.awamori, flavus, Candidus</i> <i>Bac.mesentericus, Bac.Subtilis</i>
Xenlulaza	{ <i>Trichoderma viride</i> <i>Asp.terreus</i>

Khả năng sinh enzym của các chủng vi sinh vật không giống nhau và khác nhau ngay cả trong cùng một chủng. Vì vậy, khi tuyển chọn vi sinh vật phải tiến hành tìm kiếm, phân lập, lựa chọn hàng chục, hàng trăm thậm chí đến hàng nghìn giống vi sinh vật khác nhau mới có được những chủng vi sinh vật có hoạt lực cao trong việc tạo những enzym cần thiết.

2. Cải tạo giống:

Để nâng cao sức sản xuất enzym của vi sinh vật cũng như làm tăng cường hoạt tính của enzym người ta phải sử dụng các phương pháp khác nhau để cải tạo giống, đặc biệt là phương pháp gây đột biến. Bằng phương pháp đột biến nhiều nước đã thu được những chủng vi sinh vật có những đặc tính tốt, chỉ tổng

hợp một hoặc vài ba enzym nhưng đều có hoạt tính cao so với chủng nguyên thủy ban đầu.

5.3.2 Nuôi vi sinh vật:

5.3.2.1 Các yếu tố ảnh hưởng tới sự tổng hợp enzym:

1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường dinh dưỡng:

Là yếu tố quan trọng có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển và tổng hợp enzym của vi sinh vật. Cùng một loại vi sinh vật nhưng nếu nuôi cấy trên các môi trường có thành phần dinh dưỡng khác nhau thì mức độ tạo thành enzym và thành phần enzym được tạo thành cũng khác nhau.

Ví dụ: nuôi *Asp.oryzae* bằng phương pháp bề mặt trên môi trường cám đại mạch thì có thể tạo được nhiều enzym, trong đó có các loại enzym có hoạt tính cao như amylaza, proteaza, maltaza, pectinaza, invertaza, ribonucleaza. Nhưng nếu nuôi trên môi trường Kzapek cải tiến với nitrat và tinh bột thì chỉ tạo thành chủ yếu là α -amylaza, còn các enzym khác tạo thành với lượng không đáng kể.

Hiện tượng này được giải thích bằng lý thuyết sinh tổng hợp cảm ứng enzym. Hiện tượng cảm ứng này chỉ thấy ở vi sinh vật chứ không thấy ở động vật và thực vật. Khi trong môi trường có những chất khó đồng hoá vi sinh vật phải tiết vào môi trường một hoặc những enzym tương ứng để phân huỷ nó thành những chất có thể đồng hoá được. Cho nên khi thêm các chất cảm ứng vào môi trường dinh dưỡng thì khả năng sinh tổng hợp enzym của vi sinh vật có thể tăng lên gấp nhiều lần so với trường hợp bình thường.

Dinh nghĩa: Một quá trình sinh tổng hợp được gọi là cảm ứng nếu như nó chỉ xảy ra ở mức độ đáng kể khi trong môi trường có cơ chất đặc hiệu của enzym này hoặc các chất trao đổi có cấu trúc tương tự cơ chất. Các enzym thuộc loại này gọi là enzym cảm ứng, các cơ chất kích thích quá trình tổng hợp này gọi là chất cảm ứng.

Muốn tổng hợp được enzym cảm ứng cần có 4 điều kiện:

- Thứ nhất: Có gen tương ứng trong nhiễm sắc thể
- Thứ hai: Có nguyên liệu đầy đủ để xây dựng các phân tử enzyme đó (các axit amin, các hợp phần coenzyme).
- Thứ ba: Có năng lượng cần thiết cho việc tổng hợp enzyme.
- Thứ tư: Có chất cảm ứng.

Nếu có đủ 3 điều kiện trên nhưng thiếu chất cảm ứng thì enzyme cũng không được tạo thành.

Trong công nghệ sản xuất enzyme cần phải lựa chọn chất cảm ứng thích hợp và xác định nồng độ tối ưu của nó trong môi trường để có hiệu suất sinh tổng hợp cao nhất.

2. Ảnh hưởng của độ ẩm:

Trong phương pháp nuôi cấy bề mặt, độ ẩm của môi trường có vị trí đặc biệt quan trọng. Khi độ ẩm thấp vi sinh vật bị rơi vào tình trạng bất lợi cho hoạt

động sống nên có khuynh hướng tạo bào tử và hạn chế sự tổng hợp enzyme. Khi độ ẩm quá cao thì độ tối xốp và thoáng khí của canh trường bị giảm, do đó sự tổng hợp enzyme khó khăn.

Độ ẩm cho phép vi sinh vật tổng hợp enzyme tốt thường từ 53÷65%, phụ thuộc vào đặc điểm sinh lí của vi sinh vật, vào cấu trúc cơ học của môi trường và điều kiện thoát ẩm của môi trường nuôi cấy.

3. pH của môi trường:

So với phương pháp nuôi chìm thì phương pháp bề mặt ít chịu ảnh hưởng của pH môi trường đến quá trình sinh tổng hợp enzyme vì trong quá trình nuôi pH của môi trường khá ổn định. Với phương pháp nuôi cấy chìm pH môi trường biến đổi khá rõ rệt trong quá trình nuôi và gây ảnh hưởng lớn tới sự tổng hợp enzyme. Do đó, người ta thường điều chỉnh pH để thu được enzyme với hiệu suất cao.

Mỗi loại enzyme thường được tổng hợp mạnh trong một vùng pH xác định đối với từng loại vi sinh vật. Ví dụ: amylaza và pectinaza của nấm mốc được tổng hợp mạnh trong môi trường có pH=4,5÷5, còn proteaza trong môi trường có pH=6÷6,5.

4. Nhiệt độ:

Phần lớn các vi sinh vật có khả năng tổng hợp mạnh các enzyme đều thuộc loại ưa nhiệt trung bình, có nhiệt độ tối thích 22÷32⁰C. Với vi khuẩn có loại thích ở nhiệt độ cao hơn (35÷55⁰C) và chúng có khả năng tổng hợp các enzyme có độ bền nhiệt cao. Khi nâng nhiệt độ môi trường tới quá mức thích hợp thì khả năng sinh tổng hợp enzyme bị giảm rõ rệt.

5. Oxy:

Để vi sinh vật sinh trưởng và phát triển được thì phải có oxy. Do đó, trong thời kỳ tích lũy sinh khối phải cung cấp đầy đủ oxy cho môi trường.

6. Thời gian nuôi:

Thời gian nuôi cấy thích hợp của mỗi loại vi sinh vật được xác định bằng thời gian cho phép tích tụ enzyme tối đa. Thời gian đó phụ thuộc vào chủng vi sinh vật và ít phụ thuộc vào enzyme chúng tổng hợp.

5.3.2.2 Lựa chọn môi trường nuôi cấy:

Thành phần môi trường dinh dưỡng là một trong những yếu tố có ảnh hưởng quyết định đến hoạt động sống của vi sinh vật cũng như khả năng sinh tổng hợp enzyme của chúng.

Để bảo đảm những yêu cầu tối thiểu cho vi sinh vật phát triển và tổng hợp enzyme thì trong môi trường cần có các chất chứa cacbon, nitơ, hydro, oxy và các chất khoáng như Mg, Ca, P, S, Fe, K .v.v.

- Nguồn cung cấp cacbon thường dùng là glucit. Khi sử dụng đường cần nhớ rằng một số đường có tác dụng kìm hãm sự sinh tổng hợp một số enzyme

thủy phân. Ví dụ: đường glucose có thể kìm hãm sinh tổng hợp một số enzyme hệ amylaza.

Ngoài glucit cũng có thể sử dụng nguồn cacbon khác như mỡ, dầu, axit hữu cơ, rượu. Trong số các axit hữu cơ thì axit lactic được vi sinh vật hấp thụ dễ dàng hơn cả. Axit này có nhiều trong nước chiết ngô. Cho nên cao ngô được dùng vừa là nguồn bổ sung đạm vừa là nguồn cung cấp cacbon cho vi sinh vật phát triển.

- Nguồn cung cấp nitơ có thể là các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ. Các hợp chất hữu cơ là những hợp chất giàu đạm như cao ngô, bột đậu tương, khô đậu, khô lạc... Nguồn nitơ vô cơ như urê, NH_3 , các muối amôn.

Ngoài ra, một số axit amin, bazơ purin (adenine, guanine...), pyrimidin cũng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Các axit amin có tác dụng khác nhau đối với vi sinh vật cũng như việc sinh tổng hợp enzyme. Nhiều axit amin có khả năng tăng cường sinh tổng hợp enzyme, một số khác lại kìm hãm hoặc không có ảnh hưởng rõ rệt.

- Các nguyên tố khoáng cũng có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình sinh tổng hợp enzyme. Các nguyên tố này bao gồm cả nguyên tố đa lượng và vi lượng. Vi lượng là sắt, kẽm, đồng, coban. Các nguyên tố này thường có trong nước hoặc trong các thành phần hữu cơ khác của môi trường (bột, cao ngô) do đó không cần bổ sung hoặc chỉ bổ sung ở dạng vết. Nồng độ của các nguyên tố này tăng sẽ kìm hãm mạnh sự phát triển của vi sinh vật.

Các nguyên tố đa lượng được đưa vào dưới dạng muối vô cơ nhưng cần tính cả hàm lượng của chúng đã có sẵn trong các thành phần của môi trường. Trong các nguyên tố này cần lưu ý đến P và S vì 2 nguyên tố này là thành phần cấu tạo của nhiều chất quan trọng, nhất là nucleotit, lipit, vitamin...

- Các yếu tố sinh trưởng: các vitamin chủ yếu dùng để kích thích sinh trưởng của vi sinh vật. Tuy nhiên cần nhớ rằng, trong nhiều trường hợp môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của vi sinh vật chưa hẳn đã là thích hợp để sinh tổng hợp enzyme. Có khi môi trường kìm hãm sự tích lũy sinh khối tế bào nhưng vẫn tăng cường sinh tổng hợp enzyme.

Để xác định thành phần môi trường dinh dưỡng thích hợp cho mỗi vi sinh vật có thể tiến hành lựa chọn trên cơ sở kinh nghiệm hoặc dùng các phương pháp toán học qui hoạch thực nghiệm.

Khi lựa chọn nguyên liệu để chuẩn bị môi trường cần chú ý rằng, trong các nguyên liệu tự nhiên có chứa nhiều chất khác nhau, kể cả các nguyên tố khoáng đa lượng cũng như vi lượng và có cả các yếu tố sinh trưởng. Do vậy, trong nhiều trường hợp không cần bổ sung thêm các loại muối vô cơ. Mặt khác, các nguyên liệu này rẻ tiền do vậy nó thường dùng trong công nghiệp để sản xuất chế phẩm enzyme từ vi sinh vật.

Các nguyên liệu tự nhiên thường dùng để chuẩn bị môi trường là cám gạo, bột ngô, bột đậu tương, khô lạc hoặc các phế liệu như men bia, ri đường... Trong các nguyên liệu này thì cám gạo và bột ngô là nguồn cacbon tốt nhất. Còn nấm men bia tự phân, khô lạc là nguồn nitơ tốt nhất.

Khi chuẩn bị môi trường còn cần phải chú ý đến các chất có tác dụng điều hoà sinh tổng hợp enzyme, đặc biệt là các chất cảm ứng. Đối với mỗi loại enzyme có thể có nhiều chất cảm ứng cho nên phải lựa chọn chất cảm ứng có hiệu quả nhất. Ví dụ như chất cảm ứng của sinh tổng hợp amylaza là tinh bột, dextrin; của proteaza là các protein có trọng lượng phân tử nhỏ.

Sử dụng các chất cảm ứng thường làm tăng đáng kể lượng enzyme được tổng hợp. Tuy nhiên, khi lựa chọn chất cảm ứng cần tính toán cẩn thận về giá thành của nó.

5.3.2.3 Các phương pháp nuôi cấy vi sinh vật:

Có nhiều phương pháp khác nhau để nuôi vi sinh vật tổng hợp enzyme.

1. Phương pháp bề mặt:

Phương pháp này thích hợp để nuôi các loại nấm mốc vì khả năng phát triển của nó nhanh, mạnh nên ít tạp nhiễm.

- Quy trình công nghệ:

Môi trường → phối trộn → làm ẩm → hấp → đánh tơi và làm nguội → gieo mốc giống → vào thiết bị nuôi → vào phòng nuôi → nuôi mốc → canh trường.

Các chất dinh dưỡng thường là các nguyên liệu tự nhiên như các chất thải của công nghệ thực phẩm hoặc hỗn hợp của nhiều chất. Trong môi trường cần thêm chất cảm ứng cần thiết cho sự tổng hợp enzym hoặc bổ sung thêm chất dinh dưỡng nguồn nitơ, photpho như nước chiết ngô, khoai tây, dịch tự phân nấm men... Để bảo đảm độ xốp của môi trường cần có chất làm xốp như trấu (10÷20%). Trước khi gieo cấy cần thanh trùng môi trường để đảm bảo không bị nhiễm vi sinh vật lạ.

Quá trình nuôi cấy kéo dài từ 33÷48h. Có các hiện tượng:

- Thái nhiệt, cần giữ $t^0=28\div32^0C$
- Giảm ẩm, giữ $\varphi_{\text{phòng}}=96\div100\%$
- Cung cấp O_2 : trong quá trình mốc phát triển lấy O_2 và thải CO_2
→ cần cung cấp không khí vô trùng.

- Ưu nhược điểm của phương pháp:

Ưu:

- Cho nồng độ enzym cao hơn so với phương pháp bề mặt
- Có thể sấy khô nhanh chóng môi trường (dạng thô) mà không ảnh hưởng đến hoạt lực enzym.
- Tránh sự nhiễm trùng toàn bộ khối canh trường
- Tốn ít điện năng.

Nhược:

- Khó cơ giới hoá, tự động hoá.
- Năng suất thấp.
- Tốn nhiều lao động.
- Tốn nhiều mặt bằng.

2. Phương pháp nuôi cấy chìm:

• Với phương pháp này vi sinh vật phát triển trong môi trường lỏng có sục khí và khuấy đảo liên tục. Nguồn cacbon sử dụng trong phương pháp này là tinh bột, các chất thải có đường như rỉ đường và các nguyên liệu khác. Nguồn nitơ hay dùng là chất hữu cơ như cao ngô, dịch men bia, dịch thủy phân, khô lạc... Ngoài ra trong thành phần môi trường cũng cần bổ sung thêm các chất khoáng. Môi trường cần được thanh trùng bằng cách sục hơi trực tiếp ở $t^{\circ}=121\div 125^{\circ}\text{C}$ trong thời gian $60\div 90$ phút đối với môi trường chứa nguyên liệu bột, đậm thô và $20\div 30$ phút với các loại môi trường có chứa đường.

Trong quá trình nuôi cấy chìm cần phải sục khí vô trùng và khuấy đảo liên tục. Nếu có bọt phải dùng dầu phá bọt. Thời gian từ 1-4 ngày tùy chủng. Phải chú ý điều chỉnh pH.

• Ưu, nhược:

+ Ưu:

- Tiết kiệm diện tích
- Dễ cơ giới hoá, tự động hoá.
- Sử dụng hợp lý chất dinh dưỡng, tránh lãng phí.
- Thu enzyme ít tạp chất
- Đảm bảo vệ sinh, vô trùng nên ít nhiễm vi sinh vật lạ.

+ Nhược:

- Nồng độ enzyme thấp, cần làm đặc canh trường trước khi tách nên giá thành cao.
- Tốn điện do sục khí.
- Nếu không đảm bảo vô trùng sẽ nhiễm hàng loạt.

3. Phương pháp nuôi cấy 2 bước:

- Bước 1: vi sinh vật nuôi trong thiết bị để phát triển tối đa.
- Bước 2: chuyển sinh khối sang thiết bị khác để sinh tổng hợp enzyme.

5.3.3 Tách và tinh chế enzyme:

Trong thực tế enzyme được sử dụng ở nhiều dạng khác nhau. Một số lĩnh vực có thể sử dụng dưới dạng canh trường khô mà chất lượng sản phẩm không thay đổi (như sản xuất rượu, công nghệ thuộc da). Đa số các ngành công nghiệp (chủ yếu là thực phẩm và công nghiệp nhẹ) đòi hỏi phải sử dụng các chế phẩm enzyme sạch (gọi là chế phẩm kỹ thuật). Còn trong y học phải sử dụng các chế phẩm enzyme tinh khiết. Tuy nhiên, cho đến nay chưa tìm được một phương

pháp chung để tách một enzym nào đó mà phải phối hợp nhiều phương pháp khác nhau.

Quá trình làm sạch enzym gồm 2 giai đoạn là chiết enzym và tách enzym.

5.3.3.1 Chiết enzym:

Mục đích của công đoạn này là tách các enzym ra khỏi canh trường sau lên men. Quá trình này phụ thuộc vào loại enzym (ngoại bào hay nội bào) và môi trường lên men (lỏng hoặc rắn) mà tiến hành khác nhau.

Đối với enzym ngoại bào nằm trong canh trường lỏng thì tiến hành tách sinh khối để thu dung dịch có chứa enzyme. Nếu enzym ngoại bào nằm trong canh trường rắn (xốp) thì dùng nước vô trùng hoặc các dung dịch đệm thích hợp để chiết enzym.

Để thu các enzym nội bào thì phải tiến hành phá vỡ tế bào bằng một trong các phương pháp sau:

- Phương pháp đồng hoá (nghiền trong máy đồng hoá)
- Nghiền với bột thủy tinh, cát...
- Tụ phân
- Làm lạnh đông và tan giá lặp đi lặp lại nhiều lần
- Nhờ tác động của siêu âm
- Dùng áp suất thẩm thấu cao
- Phương pháp khuyếch tán

Sau khi phá vỡ tế bào thì dùng nước cất hoặc dung dịch muối loãng hoặc các dung dịch đệm thích hợp để chiết enzym.

5.3.3.2 Tách enzym:

Mục đích của giai đoạn này là làm sạch và tách các enzym ra khỏi hỗn hợp phụ thuộc vào mức độ tinh sạch của các chế phẩm enzym mà quá trình tách cũng rất khác nhau.

1. Thu nhận chế phẩm kỹ thuật:

Chế phẩm enzym kỹ thuật là chế phẩm enzym được tinh chế sơ bộ có thể chứa một hoặc vài enzym chủ yếu.

Để thu chế phẩm enzym kỹ thuật thì đầu tiên phải cô đặc dung dịch enzym ở nhiệt độ 30°C cho đến khi đạt nồng độ 20g/lit. Sau đó tiếp tục cô ở nhiệt độ 40°C cho đạt nồng độ 30÷50g/lit. Khi cô có thể cho thêm chất bảo quản hoặc chất ổn định. Tiếp theo đem sấy phun với nhiệt độ không vượt quá 70°C.

Ngoài ra để thu chế phẩm enzym kỹ thuật người ta cũng có thể kết tủa bằng dung môi hữu cơ hoặc muối trung tính và sau đó cho chất ổn định vào sấy khô rồi nghiền.

Dung môi hữu cơ thường dùng là rượu etylic, izopropylic, axeton...kết tủa bằng dung môi hữu cơ dựa trên nguyên tắc khi thêm dung môi vào dung dịch enzym thì lực hút giữa các phân tử protein-enzym tích điện và các phân tử

nước bao quanh chúng bị giảm. Khi nồng độ dung môi thêm vào đạt đến mức làm cho năng lượng hydrat hoá giữa các phân tử nước và protein nhỏ hơn năng lượng liên hợp giữa các phân tử protein-enzym thì lúc đó các phân tử protein-enzym liên hợp lại tạo kết tủa.

Tùy theo tính chất của enzym và dung môi hữu cơ mà mỗi một loại enzym được kết tủa ở một nồng độ dung môi khác nhau. Ví dụ proteaza kết tủa trong etanol 76÷78%, α -amylaza kết tủa trong etanol 70%, glucoamylaza kết tủa trong etanol 45% và trong axeton 70%.

Dùng dung môi hữu cơ có ưu điểm là cất và thu hồi được. Nhưng dung môi dễ làm cho enzym bị vô hoạt. Để khắc phục nhược điểm đó phải tiến hành kết tủa enzym ở nhiệt độ thấp (5°C) và thời gian ngắn.

Các muối trung tính thường dùng để kết tủa enzym là: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl...tùy theo tính chất từng loại enzym mà người ta dùng nồng độ muối khác nhau. Ví dụ amylaza thường kết tủa trong $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở nồng độ 0,75% độ bão hoà; glucoamylaza ở nồng độ 0,8÷0,9% độ bão hoà.

Phương pháp dùng muối trung tính kết tủa còn gọi là diêm tích. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc các ion muối có tác dụng phá vỡ các lớp hydrat bao quanh phân tử protein do sự hút các phân tử trái dấu về phía nó. Kết quả làm phân tử protein bị mất nước và đông tụ.

Sau khi kết tủa phải loại các muối trung tính ra khỏi enzym bằng phương pháp thẩm tích. Để thực hiện người ta cho enzym vào các màng bán thấm (xenlofan) rồi cho vào các dung dịch đệm thích hợp ngâm trong 24 giờ và sau đó thử lại nếu đã loại hết muối thì đưa đi xử lý tiếp.

2. Thu nhận chế phẩm tinh khiết:

Để thu nhận chế phẩm tinh khiết phải kết hợp nhiều phương pháp và qua nhiều giai đoạn. Đầu tiên phải tiến hành loại bỏ các protein không hoạt động bằng phương pháp biến tính chọn lọc. Các protein biến tính có thể tách ra bằng cách lọc hoặc ly tâm. Sau đó enzym được kết tủa bằng dung môi hữu cơ hoặc muối trung tính. Tiếp theo dùng sắc kí (sắc kí trao đổi ion, hấp phụ, phân bố, gel phân tử v.v...) để thu phân đoạn enzym có hoạt lực cao nhất.

Sau khi tinh chế xong phải dùng phương pháp điện di để kiểm tra mức độ đồng nhất của enzym.

5.4 Đánh giá chất lượng của enzym:

5.4.1 Phương pháp đánh giá:

Chất lượng của enzym được đánh giá bằng mức độ hoạt động của nó tức là hoạt độ của enzyme. Thực tế người ta đo hoạt độ của enzym thông qua việc xác định lượng cơ chất mất đi hay lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng. Về nguyên tắc có thể chia ra làm 3 nhóm phương pháp xác định hoạt độ enzym:

1. Đo lượng cơ chất bị mất đi hay lượng sản phẩm được tạo thành trong một thời gian nhất định với một nồng độ enzym xác định.
2. Đo thời gian cần thiết để thu được một lượng biến thiên nhất định của cơ chất hay sản phẩm ứng với một nồng độ enzym nhất định.
3. Đo nồng độ enzym cần thiết để làm biến đổi một lượng cơ chất hay thu nhận một lượng sản phẩm nhất định trong một thời gian nhất định.

5.4.2 Đơn vị:

Để đo hoạt độ của enzym người ta dùng đơn vị hoạt độ.

- Đơn vị enzym quốc tế (kí hiệu UI): là lượng enzym có khả năng xúc tác làm chuyển hóa một micromol cơ chất sau một phút ở điều kiện tiêu chuẩn (ở pH_{opt} , t_{opt} đối với enzym cần xác định)

- Đơn vị Katal (Kat): là lượng enzym có khả năng xúc tác làm chuyển hoá một mol cơ chất trong một giây ở điều kiện tiêu chuẩn

$$1 \text{ UI} = \frac{1}{60} \times 10^{-6} \text{ Kat} = 16,67 \text{ nKat (nanoKat)}$$

- Hoạt độ riêng của chế phẩm enzym: là số đơn vị UI hoặc số đơn vị Kat ứng với 1ml chế phẩm (nếu là dung dịch) hoặc 1mg chế phẩm (nếu là bột).

Nếu enzym đã tinh sạch thì hoạt độ được biểu thị bằng số UI hoặc số Kat trên 1mg enzym.

- Hoạt độ phân tử: số phân tử cơ chất được chuyển hoá bởi một phân tử enzym trong một đơn vị thời gian.

5.4.3 Những chú ý khi đánh giá chất lượng enzym:

Để đánh giá chính xác độ hoạt động của enzym thì khi xác định hoạt độ của nó cần chú ý:

- Nồng độ cơ chất trong phản ứng phải ở trong một giới hạn thích hợp đủ thừa để bão hoà enzym nhưng không quá cao đến mức kìm hãm enzym.

- Với những enzym cần có chất hoạt hoá hoặc chất làm bền thì phải cho chất này vào enzym trước khi cho cơ chất vào phản ứng.

- Xác định hoạt độ cần tiến hành ở pH_{opt} và cố định. pH thường thay đổi phụ thuộc vào cơ chất và thành phần dung dịch đệm.

- Nhiệt độ dùng xác định hoạt độ phải nhỏ hơn nhiệt độ tối ưu của enzym để đề phòng sự kìm hãm của enzym ở nhiệt độ cao.

- Thời gian xác định hoạt độ thường 5÷30 phút. Nhưng cũng có trường hợp kéo dài đến 24 giờ nếu hoạt độ của enzym quá thấp. Trong thời gian dài phải cho thêm những chất diệt khuẩn để tránh hiện tượng tạp nhiễm.

5.5 Enzym không tan:

Enzym không tan hay còn gọi là enzym cố định là enzym nằm trong một không gian bị giới hạn. Sự giới hạn linh hoạt của enzym đạt được bằng cách đưa nó vào một pha cách li, tách rời khỏi pha dung dịch tự do và ở đó nó vẫn

có khả năng tiếp xúc được với phân tử cơ chất. Pha chứa enzym thường không tan trong nước nhưng cũng có thể là polymer cao phân tử ưa nước.

5.5.1 Ưu nhược điểm của enzym không tan:

1. Ưu điểm:

- Giảm giá thành vì có thể sử dụng lặp lại nhiều lần một lượng enzym xác định.
- Enzym không lẫn trong các sản phẩm do đó tránh được ảnh hưởng không tốt của nó đối với sản phẩm.
- Có thể làm ngừng nhanh chóng các phản ứng khi cần thiết.
- Enzym không tan bền hơn enzym tan do đó kết hợp tận dụng các yếu tố nhiệt độ, pH...
- Dùng enzym cố định có thể dễ dàng thay thế các quá trình lên men bằng các phản ứng enzym ngoài tế bào.

2. Nhược điểm:

Enzym không tan có hoạt độ riêng nhỏ hơn enzym tan

5.5.2 Phương pháp sản xuất enzym không tan:

Gồm có 3 phương pháp:

5.5.2.1 Gắn liên kết đồng hoá trị:

Đa số các enzym không tan được sản xuất bằng phương pháp này. Nó chia ra làm hai phương pháp là gắn enzym vào chất không hoà tan hoặc gắn các phân tử enzym với nhau để tạo thành đại phân tử không hoà tan.

1. Gắn phân tử enzym vào chất mang không hoà tan:

• Yêu cầu về chất mang:

- Có độ hoà tan thấp và bền vững với các tác động cơ, nhiệt và hoá học.
- Các chất mang không gây tác động kìm hãm enzym.
- Không hấp phụ phi chọn lọc đối với protein.
- Nên hao nước vì chất mang kỵ nước có thể gây ức chế với enzym được mang.
- Việc gắn sẽ có hiệu quả hơn nếu chất mang và enzym có điện tích trái dấu.

• Những chất mang thường dùng:

+ Chất mang hữu cơ: như là polypeptit, polysaccarit, các dẫn xuất của xenlulo (DEAE-xenlulo: diethyl animoetyl xenlulo, CM-xenlulo: cacboxyl metyl xenlulo), dẫn xuất của dextran (DEAE-sephadex, CM-sephadex) hoặc agaroza (aga khác với agaroza, trong thành phần của agaroza có gốc sunfat).

Chất mang thông dụng hơn cả là các detran có liên kết ngang gọi là sephadex và agaroza ở dạng hạt gọi là sepharoza. Nói chung cả 2 loại này đều có cấu trúc lỗ xốp làm cho các phân tử lớn có thể xâm nhập vào gel một cách dễ dàng.

Ngoài ra còn có các polymer tổng hợp khác như polyacrylamit, polysterol, polyamit.

+ Chất mang vô cơ: so với chất mang hữu cơ thì chất mang vô cơ bền hơn về nhiệt, cơ học, hoá học, vi sinh vật và nhất là không thay đổi cấu hình của khuôn khi thay đổi tính chất của môi trường xung quanh. Các chất mang vô cơ như: silicagen, pentonit, nhôm hydroxyt ...

2. Gắn các enzyme với nhau

Người ta có thể gắn những enzyme lại với nhau nhờ những tác nhân đa hay lưỡng chức để tạo thành những đại phân tử enzyme không hoà tan. Với phương pháp này thu được nhiều dẫn xuất enzyme không tan, ví dụ thu dẫn xuất tripxin không tan bằng cách dùng andehyt glutaric ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$) 1% để liên kết các phân tử enzyme.

Phương pháp này có ưu điểm:

- Ít tổn thất enzyme do giải phóng ra môi trường
- Tăng khả năng chống chịu của enzyme đối với các yếu tố biến tính nên đưa vào sản xuất được.

Nhược điểm của phương pháp này là số enzyme cố định ít.

5.5.2.2 “Gói” enzyme trong khuôn gel

Phải tiến hành trùng hợp hoá các gel đồng thời với sự có mặt của enzyme. Sau đó enzyme được giữ lại trong gel và gel đã có enzyme có thể làm nhỏ bằng cách nghiền trong máy đồng hoá hoặc ép qua các lỗ rây rồi đem sấy khô ở nhiệt độ không quá 40°C .

Có thể “gói” enzyme bằng các phương pháp sau:

- Các gel được hình thành trong sự polymer hoá tổng hợp
- Các enzyme bị nhốt trong các lỗ nhỏ của các sợi tổng hợp
- Gói trong bao vi thể
- Phương pháp tiền polymer

5.5.2.3 Phương pháp hấp phụ vật lí

Phương pháp hấp phụ vật lí không thông qua liên kết hoá trị gắn các enzyme trên chất mang. Quá trình thực hiện hấp phụ khá đơn giản: chất hấp phụ và enzyme được trộn lẫn với nhau trong một khoảng thời gian cho phép sự hấp phụ xảy ra nhờ tương tác của các liên kết ion, kỵ nước, hydrogen và lực Van der Wals.

Phương pháp này có nhược điểm là quá trình giải hấp phụ enzyme dễ dàng xảy ra bởi sự thay đổi pH, nhiệt độ và thành phần ion.

5.5.3 Một số tính chất của enzyme không tan:

- Enzyme không tan có hoạt độ riêng nhỏ hơn enzyme tan
- Enzyme không tan cũng tuân theo định luật Michaelis Menten (sự ảnh hưởng của nồng độ cơ chất đến hoạt tính enzyme). Tuy nhiên do có hiện tượng cạnh tranh giữa cơ chất và chất mang, do hiện tượng khuếch tán nên cũng có

những sai khác đáng kể về tốc độ phản ứng của enzyme: khi chất mang và cơ chất tích điện cùng dấu thì K_m không tan $>$ K_m tan, nếu tích điện trái dấu thì ngược lại (K_m - Hằng số Michaelis)

- Enzyme không tan có tính bền nhiệt cao hơn enzyme tan
- Enzyme không tan có sự dịch chuyển pH tối ưu sang miền kiềm hoặc axit hơn so với enzyme tan.
- Enzyme không tan có thời gian bảo quản lâu hơn và bền với các chất kìm hãm cũng như các tác nhân gây biến tính.

CHƯƠNG VI: SẢN XUẤT AXIT HỮU CƠ

Axit hữu cơ được sử dụng rộng rãi trong chế biến và bảo quản thực phẩm cũng như trong công nghệ vi sinh vật. Chính vì thế mà hiện nay axit hữu cơ được nghiên cứu và sản xuất rộng rãi.

6.1 Các phương pháp sản xuất axit hữu cơ:

Để sản xuất axit hữu cơ người ta có thể dùng nhiều phương pháp khác nhau như:

- Phương pháp tổng hợp hoá học
- Phương pháp chiết tách từ nguyên liệu thực vật
- Phương pháp sinh tổng hợp nhờ vi sinh vật

Trong các phương pháp này thì phương pháp sinh tổng hợp nhờ vi sinh vật rất có ý nghĩa vì quá trình sản xuất nhanh, sử dụng nguyên liệu sẵn có rẻ tiền và có thể tạo được nhiều loại axit hữu cơ khác nhau.

6.2 Kỹ thuật sản xuất một số axit hữu cơ nhờ vi sinh vật:

6.2.1 Sản xuất axit axetic:

Axit axetic có thể thu nhận bằng cách lên men đường hoặc oxy hoá rượu etylic. Sau đây xét quá trình sản xuất axit axetic từ rượu etylic.

1. Chủng vi sinh vật:

Để oxy hoá rượu etylic thành axit axetic người ta có thể sử dụng nhiều loại vi khuẩn khác nhau. Nhưng sử dụng nhiều hơn cả là các chủng vi khuẩn: *Bacterium schuzenbachi*, *Bacterium curvum*. Các loại vi khuẩn này có khả năng oxy hóa rất lớn.

2. Phương trình lên men:



3. Kỹ thuật lên men:

Có thể sử dụng phương pháp lên men liên tục hoặc gián đoạn. Để quá trình lên men tiến triển được tốt thì cần chú ý các điểm sau:

- Nguyên liệu và hỗn hợp dinh dưỡng: có thể sử dụng cồn thô hoặc cồn tinh chế để làm môi trường. Theo kinh nghiệm cho thấy sản xuất từ cồn thô thì

axit có mùi mạnh hơn, tuy nhiên trong cón thỏ có chứa nhiều dầu fuzen nên ảnh hưởng xấu đến quá trình lên men.

Để cho vi khuẩn hoạt động tốt thì trong môi trường ngoài nước, rượu, axit axetic còn phải có muối khoáng, hydrat cacbon và các hợp chất chứa nitơ để hấp thụ.

- Nồng độ rượu và axit axetic: nồng độ rượu thích hợp phụ thuộc vào dạng vi khuẩn sử dụng. Nói chung giới hạn cao nhất của nồng độ rượu là 15%. Khi trong môi trường lên men hết rượu thì vi khuẩn sẽ sử dụng axit. Do đó, để tránh hiện tượng này trong thiết bị lên men luôn để lại một ít rượu (0,3÷0,5%).

Môi trường có phản ứng axit rất thích hợp cho hoạt động của vi khuẩn axetic. Tuy nhiên khi axit tích lũy nhiều sẽ ảnh hưởng đến hoạt động của vi khuẩn. Để bảo toàn tính thuần khiết của vi khuẩn và chống sự phát triển của vi sinh vật lạ, đồng thời bảo đảm cho quá trình lên men tiến triển bình thường thì nên tiến hành lên men ở nồng độ axit axetic khoảng 10%.

- Sự thông khí: sự oxy hoá rượu chỉ xảy ra khi vi khuẩn tiếp xúc trực tiếp với oxy của không khí. Do đó, sự có mặt nhiều oxy sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình lên men. Theo lí thuyết thì để lên men 1 kg rượu khan thì cần 2,3 m³ không khí.

- Nhiệt độ: nhiệt độ có ý nghĩa lớn đối với quá trình lên men axetic. Nhiệt độ 6÷10⁰C là mức tối thiểu đối với vi khuẩn axetic, nếu nhiệt độ thấp hơn nữa thì các hoạt động sống của vi khuẩn sẽ bị ngừng. Ở nhiệt độ nhỏ hơn 12÷15⁰C các vi khuẩn sinh sản chậm, còn trong khoảng 15÷34⁰C chúng sẽ phát triển bình thường và sinh sản nhanh chóng. Khi nhiệt độ thấp thì quá trình lên men sẽ diễn ra chậm chạp, ngược lại, khi nhiệt độ quá cao thì rượu và axit axetic sẽ bốc hơi nhiều và do đó sẽ gây tổn thất lớn trong sản xuất.

Nhiệt độ thích hợp của các loài vi khuẩn khác nhau thì không giống nhau. Đối với *Bacterium schuzenbachi* thì thích hợp nhất ở nhiệt độ 28⁰C. Còn *Bacterium curvum* 35÷37⁰C. Ở nhiệt độ cao hơn thì cường độ sinh sản và sự tạo axit bắt đầu giảm.

4. Thu nhận sản phẩm:

Sau khi lên men xong dung dịch axit phải được làm trong và lọc. Để làm trong thường sử dụng một số chất như gelatin, than hoạt tính. Sau khi xử lí bằng các chất trên thì để yên vài ba ngày cho lắng cặn và tiếp theo đưa hỗn hợp đi lọc trong.

Sau khi lọc dung dịch axit rất nồng nên phải tang trữ ít nhất 2 tháng mới đem sử dụng. Muốn làm dấm thì pha loãng đến nồng độ yêu cầu rồi đem lọc trong lần nữa. Để giữ được chất lượng của dấm thì có thể thanh trùng hoặc sử dụng chất bảo quản.

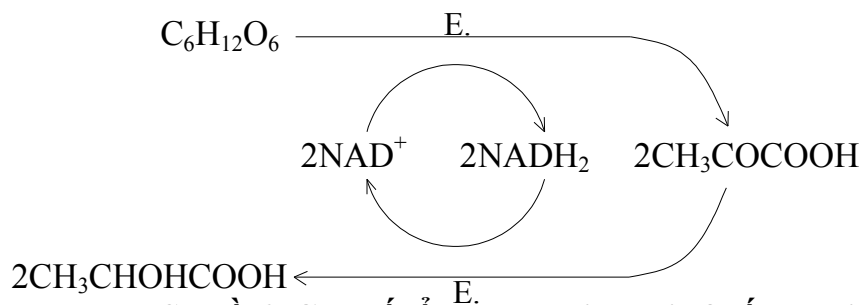
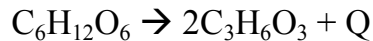
Ngoài ra, trong một số trường hợp để nâng cao nồng độ của axit người ta có thể tiến hành chưng cất hỗn hợp sau lên men để thu hồi axit axetic.

6.2.2 Sản xuất axit lactic:

1. Chủng vi sinh vật:

Sử dụng vi khuẩn lactic lên men điển hình và thích nghi ở nhiệt độ cao. Thường hay sử dụng chủng *Lactobacillus Delbruckii*.

2. Phương trình lên men:



3. Kỹ thuật lên men:

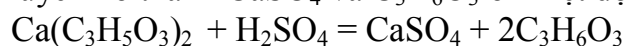
Để chuẩn bị môi trường lên men có thể sử dụng rỉ đường hoặc các loại nguyên liệu khác. Để vi khuẩn phát triển được thì cần bổ sung thêm vào môi trường một số các chất dinh dưỡng khác.

Có thể tiến hành lên men bằng phương pháp liên tục hoặc gián đoạn. Lên men ở nhiệt độ $50^{\circ}C$ và phải ổn định một cách nghiêm ngặt. Giảm nhiệt độ lên men sẽ làm cho hoạt lực lên men yếu và làm phát triển các vi sinh vật lạ. Ngược lại, tăng nhiệt độ sẽ làm vô hoạt enzyme và làm chậm quá trình lên men.

Quá trình sinh tổng hợp axit lactic thích nghi ở pH axit yếu ($6,3 \div 6,5$). Tuy nhiên, khi lên men do tích lũy axit nên làm cho nồng độ axit của môi trường tăng lên. Nếu độ pH quá thấp sẽ kìm hãm sự tạo thành axit lactic và quá trình lên men sẽ ngừng trước khi tất cả đường chuyển thành axit lactic. Do đó trong quá trình lên men phải luôn luôn giữ pH ở mức thích hợp. Người ta thường dùng các muối canxi ($CaCO_3$) để trung hòa và tạo ra canxilactat ($Ca(C_3H_5O_3)_2$).

4. Thu nhận sản phẩm:

Sau khi lên men người ta tiến hành xử lý để thu hồi dung dịch canxilactat và đem kết tinh. Tiếp theo làm nóng chảy các tinh thể canxilactat và dùng H_2SO_4 để chuyển nó thành $CaSO_4$ và $C_3H_6O_3$ ở nhiệt độ $60 \div 70^{\circ}C$:



Tiếp theo tiến hành tách dung dịch axit ra khỏi hỗn hợp. Sau đó phải tách sắt và làm trong dung dịch bằng than hoạt tính rồi li tâm tách tạp chất.

Quá trình tích lũy axit citric thích nghi ở môi trường có pH axit. Tuy nhiên khi tích lũy nhiều axit thì pH của môi trường sẽ giảm nhiều. Do vậy cần có biện pháp để giữ pH ở mức thích hợp.

Sự thông khí cho môi trường cũng rất quan trọng vì tất cả mixen của nấm mốc là loại hiếu khí điển hình. Trong quá trình phát triển của mình nấm mốc đòi hỏi một lượng oxy rất lớn.

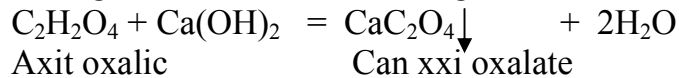
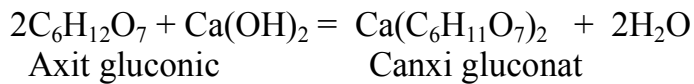
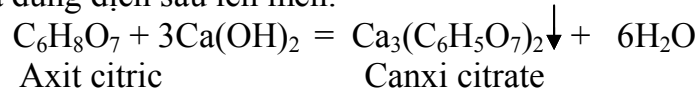
Nhiệt độ thích hợp cho nấm mốc *Aspergillus niger* 31÷37⁰C. Ở nhiệt độ 34÷37⁰C thì sinh khối nấm mốc phát triển mạnh, còn ở 31÷32⁰C thì axit tạo nhiều. Nếu nhiệt độ thấp hơn thì phát triển sinh khối bị chậm và sự tạo thành axit citric cũng bị giảm mà sự tích lũy axit gluconic lại tăng. Còn ở nhiệt độ cao hơn thì sinh khối phát triển nhanh nhưng quá trình tạo axit bị kìm hãm.

4. Thu nhận sản phẩm:

Dung dịch sau lên men là một hỗn hợp gồm nhiều axit, trong đó chủ yếu là các axit citric, gluconic và oxalic.

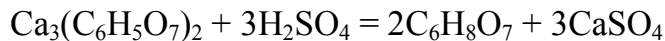
Quá trình tách axit citric gồm các bước:

- Trung hoà dung dịch sau lên men:



- Tách và rửa kết tủa trên thiết bị lọc chân không

- Chuyển canxi citrate thành axit citric:



Chú ý: phải sử dụng dư axit sunfuric

- Tách dung dịch axit trên thiết bị lọc chân không.

- Sấy dung dịch axit trên thiết bị sấy chân không.

- Kết tinh để thu nhận các tinh thể axit

- Li tâm để tách tinh thể. Sau khi li tâm sẽ thu nhận được các tinh thể axit citric có độ ẩm 2÷3% sẽ đem đi sấy khô và nước cái trong đó có chứa ít axit thì được sử dụng vào mục đích khác.

- Sấy tinh thể: có thể dùng các thiết bị sấy thùng quay hoặc sấy băng tải. Sấy ở nhiệt độ không vượt quá 35⁰C. Nếu sấy ở nhiệt độ cao hơn thì các tinh thể của axit bị phá huỷ. Trước khi đưa đi đóng gói cần phải cho axit qua sàn để loại bỏ những tạp chất tinh cở rơi vào.