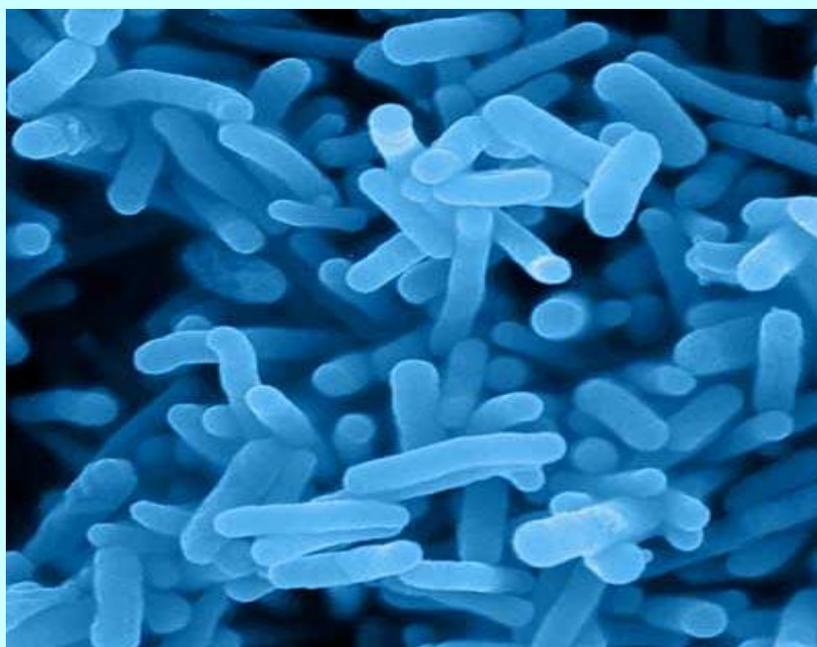


BIÊN VĂN MINH (CHỦ BIÊN)
KIỀU HỮU ẢNH, PHẠM NGỌC LAN, ĐỖ THỊ BÍCH THUY

Giáo trình điện tử
VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP



HUẾ, 2008

MỤC LỤC

Trang

Chương 1: MỞ ĐẦU

1. Đối tượng của vi sinh vật học công nghiệp.....	4
2. Nội dung	4
3. Lược sử phát triển của VSVHCN	5
4. Vị trí và yêu cầu môn học	7
5. Vai trò của VSV trong đời sống	7
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	8

Chương 2: CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP

1. Đặc điểm của vi sinh vật	10
2. Cơ sở hóa sinh của vi sinh vật học công nghiệp	13
3. Cơ sở di truyền vi sinh vật	18
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	36

Chương 3: SỰ PHÂN LOẠI SẢN PHẨM

1. Phân loại sản phẩm theo tính chất thương mại	38
2. Phân loại khác	40
3. Sinh trưởng và tạo thành sản phẩm trong các quá trình công nghiệp	45
4. Các loại vaccine	47
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	49

Chương 4: CÁC PHƯƠNG PHÁP VÀ KỸ THUẬT LÊN MEN

1. Quá trình lên men	53
2. Các nhóm VSV công nghiệp chủ yếu	56
3. Nguồn dinh dưỡng và nguyên liệu ban đầu	60
4. Khử trùng	62
6. Các phương pháp nuôi	62
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	66

Chương 5: SẢN XUẤT SINH KHỐI VI SINH VẬT

1. Giống ban đầu cho các quy trình lên men VSV	67
2. Sản xuất men bánh mì	67
3. VSV dùng cho các mục đích y học và kỹ thuật	71
4. Protein đơn bào (SCP)	76
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	80

Chương 6: CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN

1. Lên men ethanol	82
2. Lên men lactic	93
3. Lên men 2,3 butadiol	98
4. Lên men butanol -aceton	100
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	101

Chương 7: CÁC CHẤT TRAO ĐỔI BẬC MỘT

1. Nguyên lý của sự tổng hợp thừa	103
---	-----

2. Các phương pháp tạo ra thể đột biến tổng hợp thừa	103
3. Amino acid	105
4. Sản xuất các purine nucleotide	108
5. Vitamin	113
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	114
<u>Chương 8: CÁC CHẤT TRAO ĐỔI BẠC HAI</u>	
1. Các chất kháng sinh	117
2. Các độc tố nấm	122
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	128
<u>Chương 9: CÁC SẢN PHẨM CHUYỂN HÓA SINH HỌC</u>	
1. Sự chuyển hóa các steroid	130
2. Sự tạo thành phenyl-acetylcarbinol	132
3. Sản phẩm từ vi khuẩn acetic	133
4. Sản xuất vitamin C	134
5. Sản xuất dextran	138
6. Sản xuất arcrylamide	141
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	142
<u>Chương 10: XỬ LÝ NƯỚC THẢI BẰNG BIỆN PHÁP SINH HỌC</u>	
1. Vi sinh vật học của các nguồn nước uống	144
2. Xử lý nước thải	146
3. Lên men methane	150
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	155
<u>Chương 11 : SỰ TUYỂN KHOÁNG NHỜ VI SINH VẬT</u>	
1. Các vi khuẩn ngấm chiết	157
2. Cơ chế tác động của vi khuẩn	159
3. Một số quá trình thủy luyện kim sinh học	160
4. Sự tích lũy kim loại nhờ vi khuẩn và tảo	164
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	185
<u>Chương 12: CÔNG NGHỆ VI SINH VÀ BẢO VỆ MÔI TRƯỜNG</u>	
1. Nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường	167
2. Một số biện pháp vi sinh góp phần bảo vệ môi trường	169
3. Công nghệ vi sinh cố định đạm và phân vi sinh vật	170
4. Công nghệ xử lý rác thải hữu cơ	183
<i>Câu hỏi ôn tập</i>	186
<u>Chương 12: CÁC BÀI TẬP CƠ SỞ VÀ NÂNG CAO</u>	
1. Phần câu hỏi	188
2. Trả lời một số câu hỏi	196
Tài liệu tham khảo chính	199

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

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

Chương 1: MỞ ĐẦU

I. ĐỐI TƯỢNG CỦA VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP

1. Khái niệm chung

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

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

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

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

2. Đối tượng nghiên cứu

2.1. Các nhóm vi sinh vật sử dụng trong vi sinh vật công nghiệp

- 1). Virus
- 2). Vi khuẩn và cổ khuẩn (Eubacteria và Archaea)
- 3). Vi nấm (Microfungi)
- 4). Vi tảo (Microalgae)
- 5). Nguyên sinh động vật (Protozoa)

2.2. Quy trình công nghệ sản xuất một số sản phẩm bằng trên đối tượng vi sinh vật

3. Mục tiêu môn học

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

II. NỘI DUNG

1. Các giai đoạn phát triển của vi sinh vật học công nghiệp
2. Cơ sở khoa học của vi sinh vật học công nghiệp
3. Phân loại sản phẩm
4. Phương pháp và kỹ thuật lên men
5. Sự thu nhận sinh khối tế bào

6. Các sản phẩm lên men
7. Các chất trao đổi bậc 1
8. Các chất trao đổi bậc 2
9. Các sản phẩm chuyển hóa
10. Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học
11. Sự tuyển khoáng nhờ vi sinh vật

III. LƯỢC SỬ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP

Sự phát triển của VSVHCN được chia thành 4 giai đoạn chính:

Giai đoạn 1: Giai đoạn trước Pasteur (đến 1865)

Con người ứng dụng tiềm năng của VSV sản xuất các sản phẩm khi còn chưa nhận thức được sự tồn tại của chúng trong tự nhiên :

- + Sản xuất đồ uống chứa rượu như rượu, rượu vang, bia, ...
- + Sản xuất tương, nước mắm...
- + Sản xuất thực phẩm lên men như muối chua rau quả, ủ chua thức ăn cho gia súc...

Tuy một số quá trình được thực hiện ở quy mô rộng rãi, nhưng những sự thành công đó còn phụ thuộc vào sự ngẫu nhiên hay kinh nghiệm của những người thợ giỏi truyền cho các thế hệ sau. Vai trò của VSV trong sự chuyển hoá các chất hữu cơ được con người biết đến khoảng hơn 100 năm trước đây.

Giai đoạn 2: Giai đoạn phát triển của công nghiệp lên men tính đến 1940, bao gồm các công trình của Pasteur (1865) về lên men và học thuyết về mầm bệnh, Pasteur cũng đã đề ra phương pháp thanh trùng Pasteur để tiệt trùng rượu nho, bia mà không làm hỏng phẩm chất. Phương pháp này hiện nay có ứng dụng rất lớn. Bởi vậy Pasteur được coi là người sáng lập ra VSVHCN; Sự phát triển của hoá sinh học với các kiến thức về trao đổi chất trung gian, sự làm chủ ngày càng nhiều hơn đối với các enzyme.

Việc nghiên cứu và sử dụng các chủng nấm men thuần khiết *Saccharomyces carlsbergensis* trong sản xuất bia (Emil Christian Hansen, 1883) có thể xem là bước mở đầu cho công nghiệp lên men dựa trên cơ sở khoa học.



1



2



3

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

1. Louis Pasteur (1822-1895); 2. Emil Christian Hansen (1842 - 1909);

3. Eduard Buchner (1860- 1917)

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

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

Giai đoạn thứ ba: Giai đoạn công nghiệp kháng sinh, hóa chất và sinh tổng hợp điều khiển được tính 1941- 1970, bao gồm sự xuất hiện của các chất kháng sinh, những tiến bộ về di truyền học trong việc chọn lọc các thể đột biến vi khuẩn, sự nghiên cứu các điều kiện lên men tối ưu, kỹ thuật học lên men, việc tách và tinh chế sản phẩm...

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



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

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

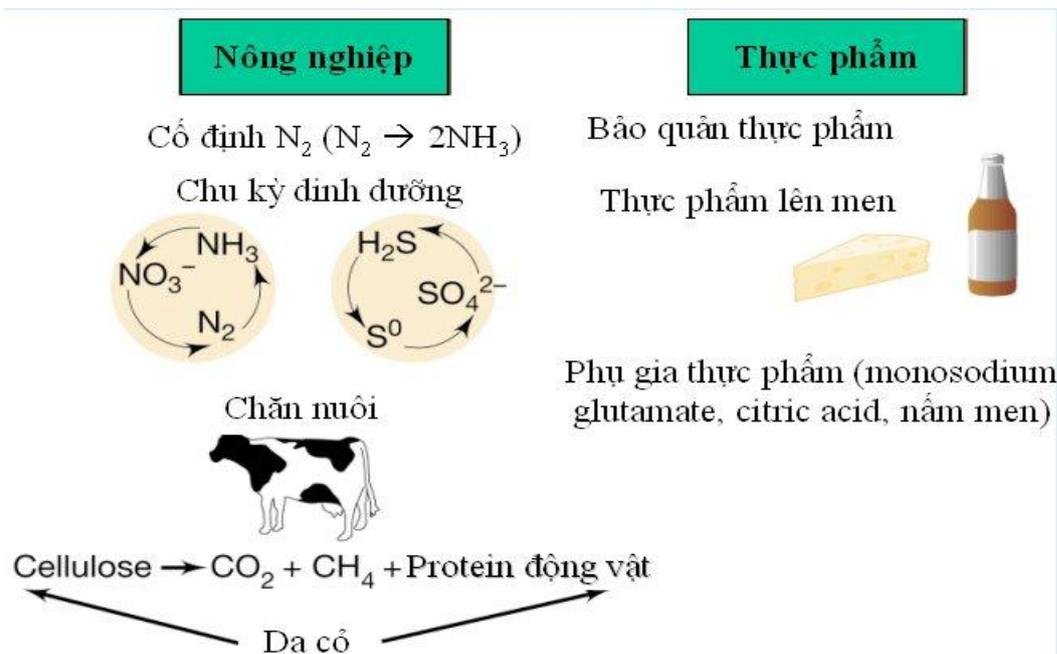


**Hình 1.3: 1.Daniel Nathans (1928-1999); 2.Werner Arber(1929-);
3.Hamilton Othanel Smith (1931-); 4.Herbert Boyer (1936-)**

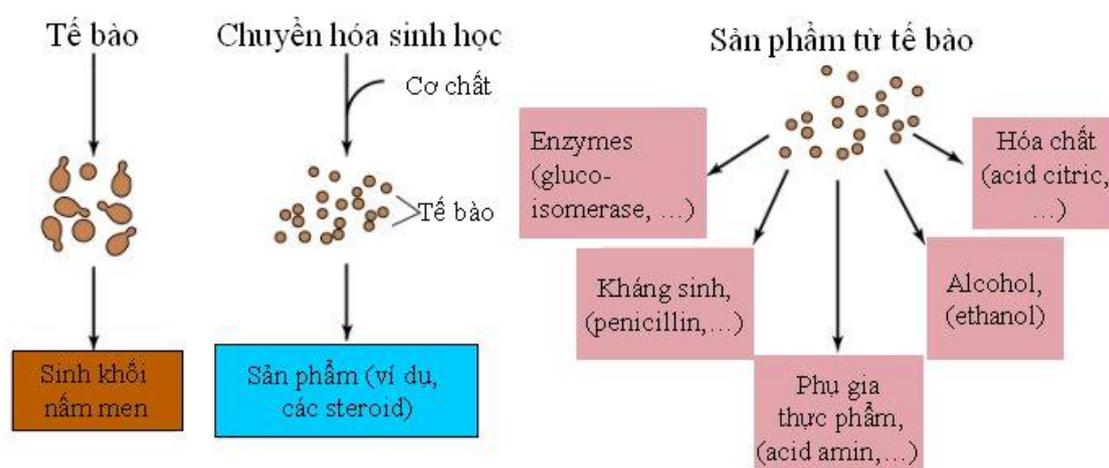
IV. VỊ TRÍ VÀ YÊU CẦU MÔN HỌC

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

V. Vai trò của vi sinh vật trong đời sống



Hình 1.4. Một số ích lợi của VSV trong nông nghiệp, thực phẩm



Hình 1.5. Ứng dụng của vi sinh vật trong công nghiệp

-Đại đa số vi sinh vật là “bạn”:

+ Về nông nghiệp: cố định đạm cho cây trồng; tuần hoàn các chất dinh dưỡng trong đất; giúp gia súc tiêu hóa cỏ, rơm thành thịt...

+ Về thực phẩm: tạo các thực phẩm lên men (bia, rượu, fomage, yaourt...); kéo dài thời gian bảo quản; tạo các phụ gia thực phẩm...

+ Về công nghiệp: tạo ra các dung môi hữu cơ, các chất dinh dưỡng, vitamin, sinh khối...

+ Về y tế: sản xuất kháng sinh, giúp ổn định hệ vi khuẩn đường ruột

+ Về môi trường: phân hủy các chất thải, cải thiện môi trường bị ô nhiễm thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ...

+ Về năng lượng: tạo khí methane dùng làm nhiên liệu; tạo H₂ từ năng lượng ánh sáng và các nguồn năng lượng vô cơ, hữu cơ dùng làm nguồn năng lượng tái sinh của tương lai.

+ Có vai trò không thể thiếu trong Công nghệ Sinh học hiện đại.

- Một số ít vi sinh vật là “thù”:

+ Gây bệnh trên người

+ Gây bệnh trên vật nuôi

+ Gây bệnh trên cây trồng.

+ Gây hư hỏng các dụng cụ thiết bị...

TÓM TẮT CHƯƠNG

Vi sinh vật học công nghiệp (VSVHCN) là một bộ phận của công nghệ sinh học, trong đó vi sinh vật được xem xét để sử dụng trong công nghiệp và những lĩnh vực khác nhau của kỹ thuật - công nghệ.

VSVHCN có ứng dụng rộng rãi trong y dược, lương thực thực phẩm, năng lượng, hóa chất, vật liệu mới, nông lâm ngư nghiệp và bảo vệ môi sinh...góp phần cải thiện đáng kể cuộc sống con người. Nhiều ứng dụng to lớn hơn đang ở phía trước.

* Câu hỏi ôn tập

1. Đối tượng nghiên cứu của vi sinh vật học công nghiệp là gì ?

2. Các giai đoạn phát triển của vi sinh vật học công nghiệp ?

3. Giai đoạn phát triển đầu tiên của vi sinh vật học công nghiệp được đánh dấu bằng công trình của Pasteur (1878) chứng minh vi sinh vật là tác nhân của sự lên men, và sau đó là các công trình của:.....(1883) dùng các chủng nấm men thuần khiết *Saccharomyces carlsbergensis* trong sản xuất bia, và(1898) phát hiện ra dịch chiết nấm men có khả năng gây ra quá trình lên men rượu (chứng minh lên men thực chất là một quá trình enzyme).

4. Tại sao có người nói vi sinh vật vừa là người bạn thân thiết, vừa là kẻ thù nguy hiểm của con người.

* Tài liệu đọc thêm

1.Kiều Hữu Ảnh, 1999.*Giáo trình Vi sinh vật học công nghiệp*. Nxb KH&KT Hà Nội.

2. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biên Văn Minh, 1998. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBGD.

3. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan, 2006. Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp, NXBGD.

4. Lương Đức Phẩm, 1999. *Công nghệ vi sinh vật*. Nxb NN.

* Tài liệu tham khảo

1. Kiều Hữu Ảnh, 2006. Giáo trình *Vi sinh vật học* Lý thuyết và bài tập giải sẵn song ngữ Việt- Anh, phần 1 & phần 2, NXB KH&KT, Hà Nội.

2. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 1997. Vi sinh vật học. NxbGD.

3. Phạm Văn Ty, 2006. Công nghệ sinh học tập 5 Công nghệ vi sinh và môi trường, NXBGD.

4. Prescott Harley Klein, 2002. *Microbiology*. W. C. Brown publisher, USA.

5. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

6. <http://wikipedia>

7. <http://wikibooks>

* Giải thích thuật ngữ

Gene là một đoạn DNA mang một chức năng nhất định trong quá trình truyền thông tin di truyền.

Plasmids (thường) là các phân tử DNA mạch đôi dạng vòng nằm ngoài DNA nhiễm sắc thể. Chúng thường hiện diện trong vi khuẩn, đôi khi cũng có ở sinh vật có nhân thật (eukaryote) (ví dụ như *vòng 2 micrometre* ở *Saccharomyces cerevisiae*). Chúng có kích thước khoảng từ 1 đến hơn 400 kilobase pairs (kbp). Chúng có thể hiện diện chỉ một bản sao, đối với plasmid lớn, cho tới vài trăm bản sao trong cùng một tế bào.

Sinh vật nhân sơ, còn gọi là **sinh vật tiền nhân (prokaryote)** là nhóm sinh vật mà tế bào không có màng nhân. Đây là đặc điểm chính để phân biệt với các tế bào eukaryote. Prokaryote cũng không có các bào quan và cấu trúc nội bào điển hình của tế bào eukaryote. Hầu hết các chức năng của các bào quan như ty thể, lục lạp, bộ máy Golgi được tiến hành trên màng sinh chất.

Sinh vật nhân chuẩn (eukaryote), còn gọi là **sinh vật nhân thực, sinh vật nhân điển hình** hoặc **sinh vật có nhân chính thức** là một sinh vật gồm các tế bào phức tạp, trong đó vật liệu di truyền được sắp đặt trong nhân có màng bao bọc.

Vi sinh vật : là những sinh vật đơn bào có kích thước nhỏ, không quan sát được bằng mắt thường mà phải sử dụng kính hiển vi. Thuật ngữ **vi sinh vật** không tương đương với bất kỳ taxon nào trong phân loại khoa học. Nó bao gồm cả virus, vi khuẩn, archaea, vi nấm, vi tảo, động vật nguyên sinh .v.v.

Chương 2

CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHỆ

I. CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA VI SINH VẬT

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

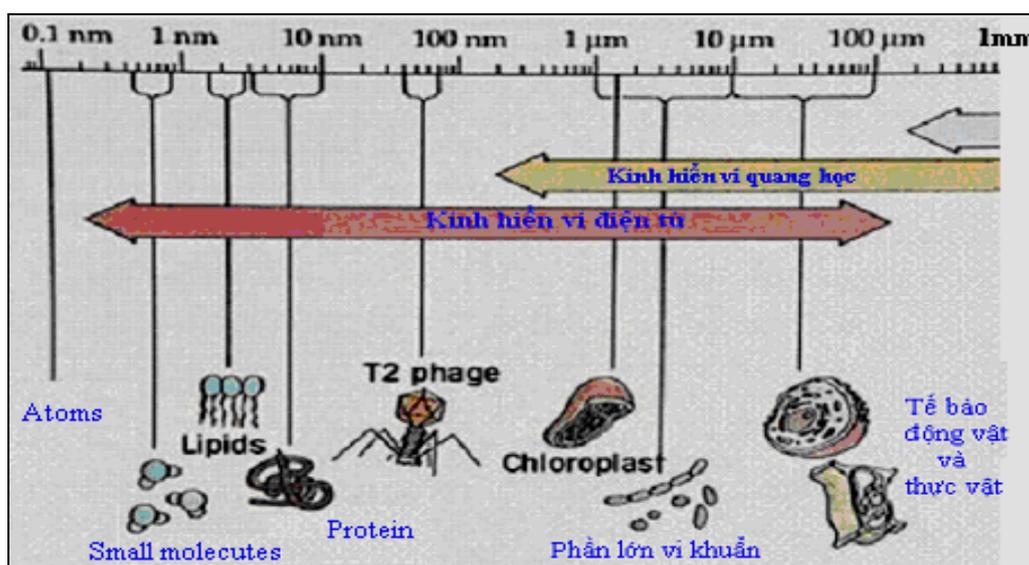
Vi sinh vật bao gồm nhiều nhóm khác nhau: Các virus (nhóm chưa có cấu tạo tế bào), các vi khuẩn và vi khuẩn lam (nhóm sinh vật nhân sơ), các vi nấm (nhóm sinh vật nhân chuẩn) và cả một số động vật nguyên sinh cũng như tảo đơn bào cũng thuộc nhóm này.

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

1. Đặc điểm chung của các vi sinh vật

1.1. Kích thước nhỏ bé

Vi sinh vật thường được đo kích thước bằng đơn vị micromet ($1\mu\text{m} = 1/1000\text{mm}$ hay $1/1\,000\,000\text{m}$). Virus được đo kích thước đơn vị bằng nanomet ($1\text{nm} = 1/1\,000\,000\text{mm}$ hay $1/1\,000\,000\,000\text{m}$).



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

1.2. Hấp thụ chất dinh dưỡng trực tiếp qua bề mặt tế bào, chuyển hóa nhanh

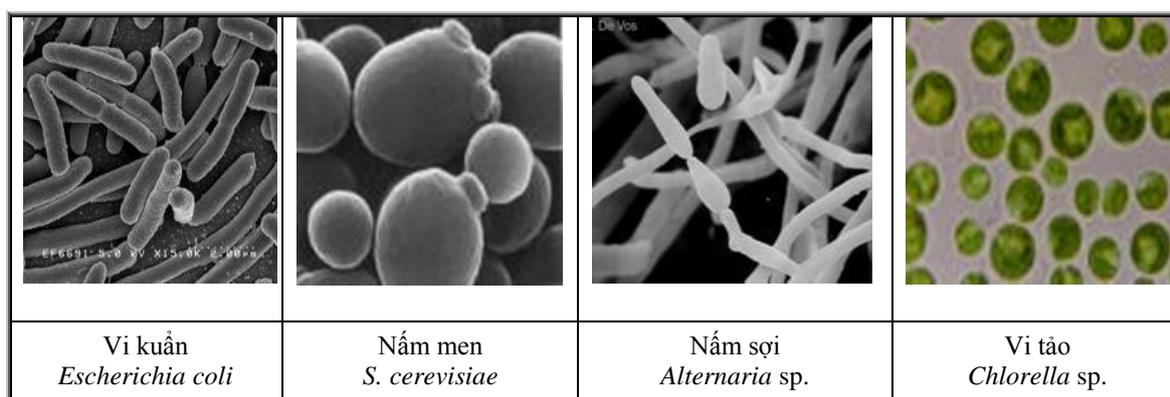
Đa số VSV là đơn bào nên chúng nhận các chất dinh dưỡng bằng *hấp thụ* (absorption) qua bề mặt tế bào, khác với thực vật là *tự dưỡng* (autotrophic) và động vật là *nhai tiêu hóa* (ingestion) qua ống tiêu hóa. Chính điều này mà việc nuôi các VSV được thực hiện dễ dàng và nhanh chóng.

Một vi khuẩn lactic (*Lactobacillus*) trong 1 giờ có thể phân giải được một lượng đường lactose lớn hơn 100-10 000 lần so với khối lượng của chúng. Tốc độ tổng hợp protein của nấm men cao gấp 1000 lần so với đậu tương và gấp 100 000 lần so với trâu bò.

1.3. Khả năng sinh sản nhanh

Thời gian thế hệ ngắn:

- 1 trực khuẩn *Escherichia coli* trong các điều kiện thích hợp chỉ sau 12-20 phút lại phân cắt một lần.
- Nấm men rượu (*Saccharomyces cerevisiae*) là 120 phút.
- Tảo Tiểu cầu (*Chlorella*) là 7 giờ, với vi khuẩn lam *Nostoc* là 23 giờ...



Hình 2.2. Một số vi sinh vật được sử dụng trong VSVHCN

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

Vi sinh vật đa số là đơn bào, đơn bội, sinh sản nhanh, số lượng nhiều, tiếp xúc trực tiếp với môi trường sống. Do đó, rất dễ dàng phát sinh biến dị. Tần số biến dị thường ở mức 10^{-5} - 10^{-10} .

Khi mới phát hiện ra penicillin hoạt tính chỉ đạt 20 đơn vị/ml dịch lên men (1943) thì nay đã có thể đạt trên 100 000 đơn vị/ml.

1.5. Phân bố rộng, chủng loại nhiều

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

Người ta ước tính trong số 1,5 triệu loài sinh vật có khoảng 200 000 loài vi sinh vật (100 000 loài động vật nguyên sinh và tảo, 90 000 loài nấm, 2500 loài vi khuẩn lam và 1500 loài vi khuẩn). Tuy nhiên hàng năm, có thêm hàng nghìn loài sinh vật mới được phát hiện, trong đó có không ít loài vi sinh vật.

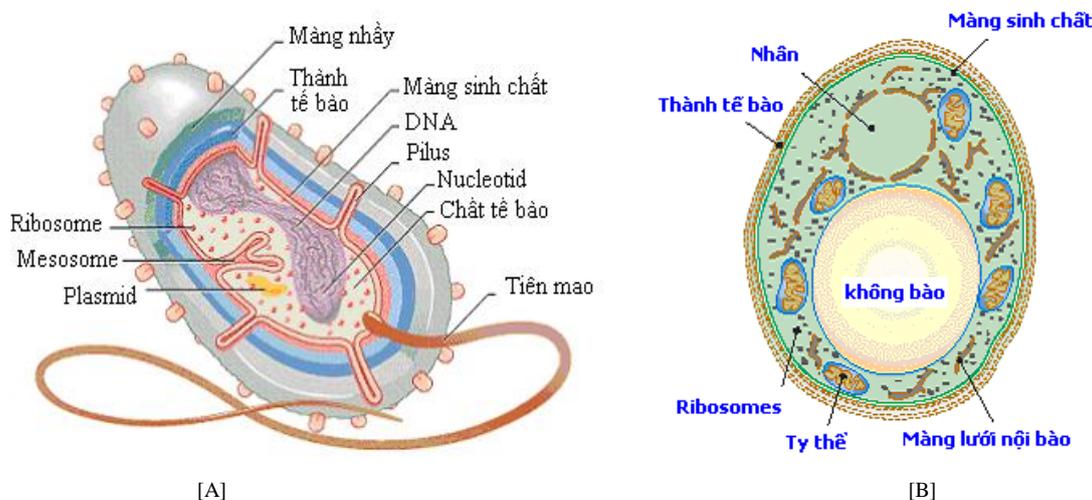
1.6. Sự đa dạng của các phản ứng hóa học

Các phản ứng sinh hóa trong cơ thể VSV thường đơn giản hơn nhiều so với trong cơ thể động, thực vật. Nhưng mỗi loài có một số phản ứng riêng nên các phản ứng sinh hóa của các loài VSV khác nhau rất đa dạng. Dù một hợp chất có phức tạp đến đâu, trong thiên nhiên đều có các VSV sử dụng hoặc phân hủy chúng. Sản phẩm do loài này tạo ra có thể được loài khác sử dụng.

Mỗi loài thường tạo ra một số chất trao đổi thứ cấp (secondary metabolites) đặc hiệu giúp cho chúng phát triển tốt hơn và kìm hãm một số loài khác. Ví dụ: các loài nấm men rượu thích nghi với nồng độ đường cao và tạo ra rượu là chất hạn chế sự phát triển nhiều loài khác. Do đặc điểm này, sản phẩm khi bị nhiễm sẽ kìm hãm sự tăng trưởng của các chủng sản xuất.

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

Đặc điểm	Tế bào prokaryote	Tế bào eukaryotes
Sinh vật điển hình	vi khuẩn, archaea	protista, nấm, thực vật, động vật
Kích thước điển hình	~ 1-10 μm	~ 10-100 μm
Cấu trúc nhân tế bào	vùng nhân; không có cấu trúc điển hình	cấu trúc nhân điển hình với màng nhân có các cấu trúc lỗ nhân
DNA genome / Nhiễm sắc thể	một phân tử (và thường dạng vòng)	một hoặc một vài phân tử DNA dạng thẳng được bao bọc bởi các protein histone trong cấu trúc NST
Vị trí xảy ra quá trình phiên mã và dịch mã	diễn ra đồng thời trong tế bào chất	tổng hợp RNA (phiên mã) ở nhân tế bào tổng hợp protein (dịch mã) tại tế bào chất
Cấu trúc ribosome	70S (50S+30S)	80S (60S+40S) ở nhân; 70S ở bào quan
Cấu trúc nội bào	rất ít cấu trúc	được tổ chức phức tạp và riêng biệt bởi hệ thống màng nội bào và bộ khung tế bào
Vận động tế bào	tiên mao được tạo thành từ các hạt flagellin	tiên mao và tiêm mao cấu tạo từ tubulin
Ty thể	không có	mỗi tế bào thường có hàng chục ty thể (phụ thuộc vào cường độ hô hấp nội bào (một số tế bào không có ty thể))
Lục lạp	không có	có ở các tế bào tảo và thực vật
Mức độ tổ chức cơ thể	thường là đơn bào	đơn bào, tập đoàn, và các cơ thể đa bào với các tế bào được biệt hóa rõ rệt
Phân bào	Phân cắt (một hình thức phân bào đơn giản)	Nguyên phân Giảm phân



Hình 2.3. Cấu trúc tế bào vi khuẩn [A] ; tế bào nấm men [B]

Từ những đặc điểm chung của các VSV vừa nêu, trong sản xuất cần lưu ý:

-Cách tốt nhất để tránh nhiễm là tạo môi trường chọn lọc thích hợp cho đối tượng sản xuất. Xu hướng chính hiện nay là sử dụng các VSV cực đoan nhằm hạn chế các vi sinh vật bình thường gây nhiễm.

-Sản xuất bằng các VSV có nhiều biến động và diễn biến nhanh, cần có các biện pháp thích hợp nhằm xử lý kịp thời.

II. CƠ SỞ HÓA SINH CỦA VI SINH VẬT HỌC CÔNG NGHIỆP

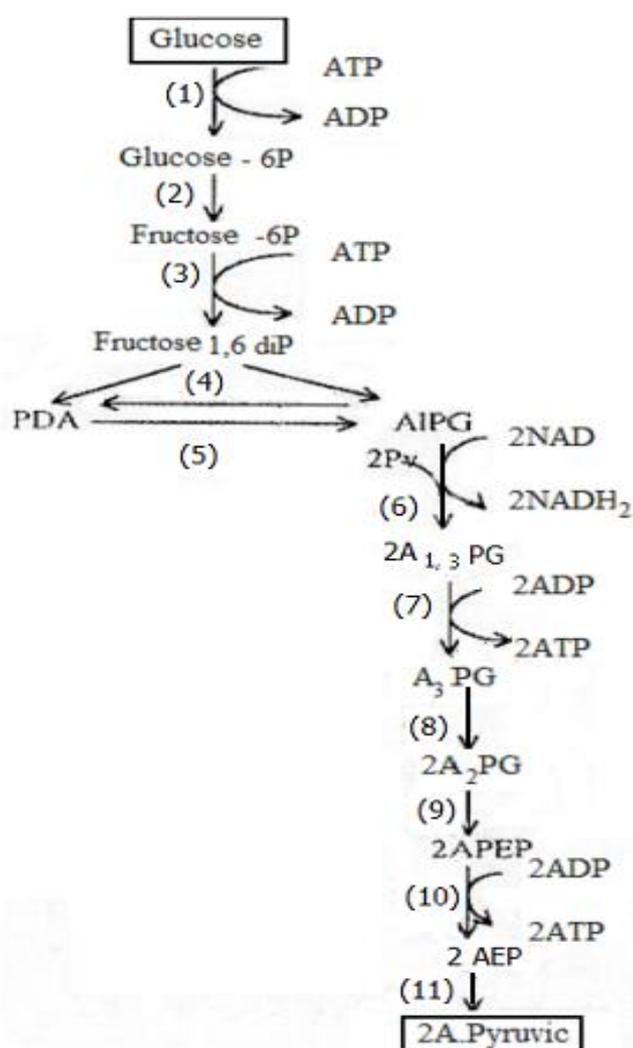
1. Đường phân.

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

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

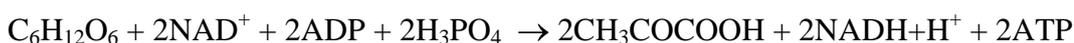
- Phân cắt phân tử glucose thành 2 phân tử triose là AIPG và PDA.
- Biến đổi 2 phân tử triose thành 2 phân tử acid pyruvic.

Quá trình đường phân có thể tóm tắt theo sơ đồ sau:

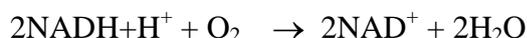


Hình 2.4. Sơ đồ đường phân

Kết quả của đường phân có thể tóm tắt là:



Trong hô hấp hiếu khí, acid pyruvic tiếp tục phân huỷ qua chu trình Krebs, còn $2\text{NADH} + \text{H}^+$ thực hiện chuỗi hô hấp để tạo H_2O .



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

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



Đồng thời tạo ra được 8 ATP

Trong hô hấp kỵ khí, $2\text{NADH} + \text{H}^+$ sẽ được dùng khử CH_3COCOOH (trong lên men lactic) hay khử CH_3CHO (trong lên men rượu) nên không thực hiện chuỗi hô hấp. Phản ứng lên men lactic như sau:



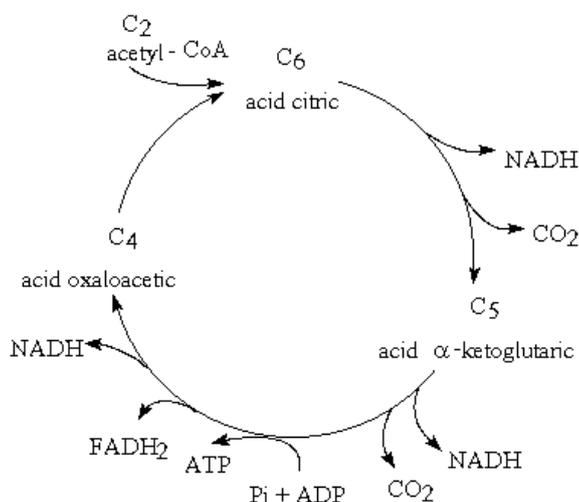
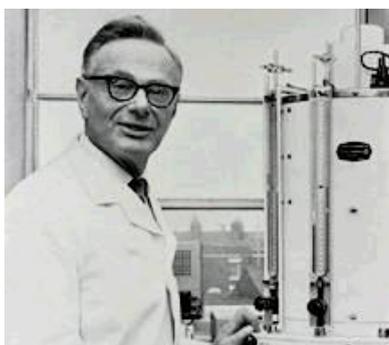
Vậy kết quả của đường phân trong hô hấp kỵ khí là



Quá trình này chỉ tạo ra được 2ATP

2. Chu trình Krebs.

Chu trình Krebs được tóm tắt qua sơ đồ sau:



[1]

[2]

Hình 2.5.: [1] Krebs, Sir Hans Adolf (1900-1981);

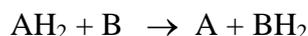
[1] Sơ đồ minh họa chu trình Krebs

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

3. Chuỗi hô hấp và phosphoryl hoá

3.1. Chuỗi hô hấp

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



Trong tế bào để phản ứng trên xảy ra thường cần hệ thống các chất truyền điện tử và H^+ trung gian, đó là hệ enzyme oxi hoá-khử. Các enzyme này cùng với cơ chất hoạt động trong một chuỗi phản ứng chặt chẽ để chuyển H_2 từ cơ chất đến O_2 tạo nên chuỗi hô hấp.

Khởi đầu của chuỗi là cơ chất dạng khử AH_2 . AH_2 làm nhiệm vụ là chất cho H_2 . H_2 tách ra từ cơ chất được hệ thống các coenzyme của hệ enzyme oxi hoá-khử vận chuyển đến khâu cuối cùng của chuỗi là O_2 để khử O_2 tạo phân tử H_2O .

Trong chuỗi hô hấp điện tử được chuyển từ cơ chất là chất có năng lượng cao nhất đến oxi có năng lượng thấp nhất, thế oxi hoá cao nhất (+0,81V). Giữa hai thành phần trên là các coenzyme có thể oxi hoá-khử trung gian, thế khử giảm dần từ cơ chất đến O_2 . Bởi vậy chuỗi hô hấp là quá trình giải phóng năng lượng.

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

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

Trong đó:

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

n: số điện tử trao đổi trong phản ứng.

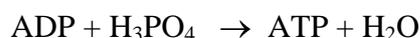
F: số Faraday (23,06) (hằng số Faraday).

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

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

3.2. Phosphoryl hoá

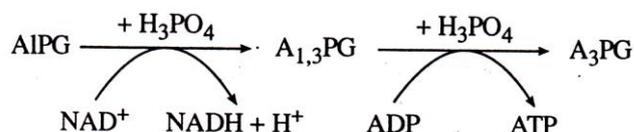
Quá trình tổng hợp ATP trong tế bào là quá trình phosphoryl hoá:



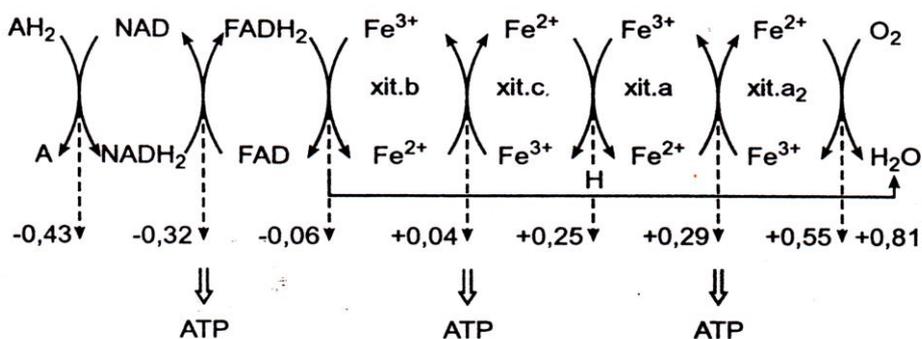
Phản ứng này đòi hỏi năng lượng tương đương năng lượng của liên kết cao năng thứ nhất (7,3 Kcalo/mol - trong điều kiện chuẩn). Tùy nguồn năng lượng cung cấp mà có các hình thức phosphoryl hoá quang hóa (xảy ra trong quang hợp) và phosphoryl hóa oxi hóa (xảy ra trong hô hấp).

Trong hô hấp có hai hình thức tổng hợp ATP

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



Phosphoryl hoá qua chuỗi hô hấp: là quá trình tổng hợp ATP nhờ năng lượng thải ra của các phản ứng trong chuỗi hô hấp. Chuỗi hô hấp xảy ra nhiều phản ứng, phản ứng nào thoả mãn các điều kiện của quá trình phosphoryl hoá thì quá trình tổng hợp ATP xảy ra ở đó. Trong chuỗi hô hấp có 3 vị trí đủ điều kiện để tổng hợp ATP. Như vậy, cứ vận chuyển được H_2 từ cơ chất đến O_2 sẽ tạo ra được 3 ATP cho tế bào.



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

4.1. Sự trao đổi protein

4.1.1. Sự tổng hợp protein

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

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

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

4.1.2. Phân huỷ protein

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

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

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

4.2. Trao đổi acid nucleic.

4.2.1. Tổng hợp acid nucleic

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

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

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

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

- Trên mạch có chiều 5'-3' của DNA gốc: do trên mạch này chiều tổng hợp mạch mới ngược chiều tháo xoắn nên diễn ra phức tạp hơn.

Quá trình tổng hợp mạch bổ sung xảy ra theo từng đoạn ngắn. Cứ mở xoắn một đoạn vài trăm nucleotide quá trình tổng hợp xảy ra ngược chiều tháo xoắn theo tuần tự tổng hợp đoạn RNA mồi rồi tổng hợp tiếp đoạn DNA. Tổng hợp xong đoạn này, tháo xoắn tiếp và lại tổng hợp như đoạn trước đó. Cứ như vậy trên mạch này DNA được tổng hợp theo từng đoạn ngắn-đoạn Okazaki. Sau đó các RNA mồi được cắt bỏ, thay vào các đoạn DNA tương ứng, nhờ ligase nối các đoạn Okazaki lại.

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

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

Quá trình tiếp diễn cho đến khi yếu tố rho (ρ) nhận biết điểm kết thúc trên DNA và kết thúc quá trình tổng hợp chuỗi RNA bổ sung. RNA tách khỏi DNA khuôn tạo ra pro-RNA.

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

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

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

4.2.2. Phân huỷ acid nucleic

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

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

- Thủy phân acid nucleic thành nucleotide nhờ các nuclease tương ứng xúc tác;
- Thủy phân nucleotide thành các đơn phân (base-nitrogene, đường pentose và H_3PO_4) nhờ enzyme thủy phân nucleotidase xúc tác;
- Biến đổi tiếp base-nitrogene, đường pentose thành các sản phẩm khác nhau.

4.3. Trao đổi lipid

4.3.1. Tổng hợp lipid

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

- Glycerin + ATP \rightarrow glycerol-P + ADP
- Glycerol-P + acid béo 1 \rightarrow monoglyceric.
- Monoglyceric + acid béo 2 \rightarrow diglyceric.
- Diglyceric + acid béo 3 \rightarrow Triglyceric + H_3PO_4 .

4.3.2. Phân huỷ lipid.

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

- Thủy phân acid béo thành glycerin và các acid béo.
- Phân huỷ tiếp glycerin và các acid béo.

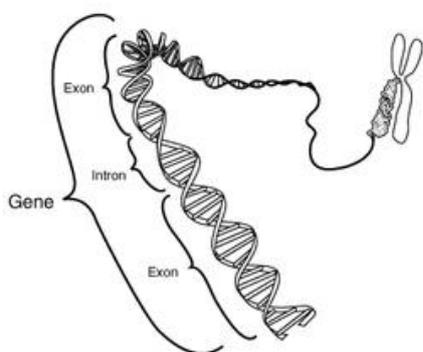
- + Glycerin + ATP \rightarrow glycerol-P + ADP
- + Glycerol-P \rightarrow AIGP \rightarrow đường phân.

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

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

III. CƠ SỞ DI TRUYỀN HỌC CỦA VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

*Khái niệm chung



Vật liệu di truyền (genetic material) để chỉ các đại phân tử đóng vai trò lưu giữ và truyền thông tin di truyền qua các thế hệ tế bào, hoặc thế hệ cơ thể. Ở cấp độ tế bào, vật liệu di truyền là các nhiễm sắc thể

(chromosome). Còn ở cấp độ phân tử thì đó là các phân tử DNA.

Bộ gene hay **hệ gene, genome** là tập hợp chứa đựng toàn bộ thông tin di truyền của một cơ thể sinh vật được mã hóa trong DNA (ở một số virus có thể là RNA). Bộ gen bao gồm những vùng chứa gene lẫn những đoạn không phiên mã. Thuật ngữ *genome* được Hans Winkler giới thiệu lần đầu tiên.

Intron là những đoạn DNA bên trong một gene nhưng không tham gia vào việc mã hoá protein. Những vùng còn lại của gene được gọi là **exon**. Các intron chủ yếu có mặt trong các tế bào eukaryote

1. Di truyền học virus

1.1. Đặc điểm và cấu tạo của virus

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

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

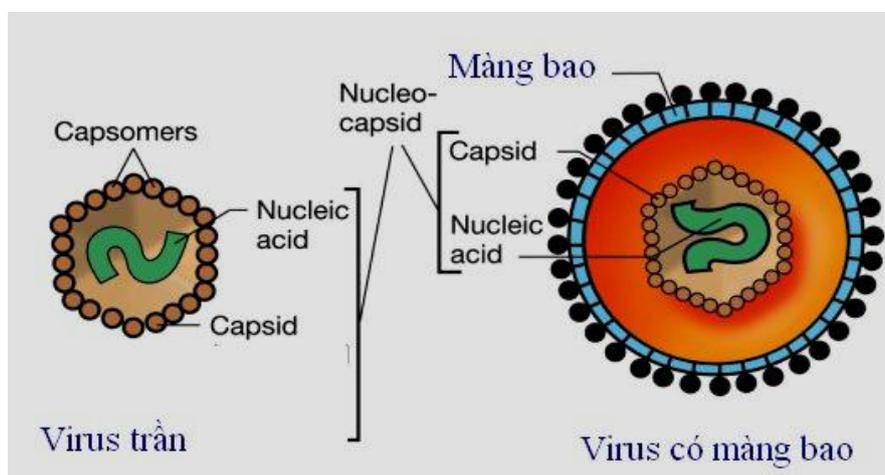
- Virus không tạo màng lipid riêng; Virus không có khung sườn tế bào;

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

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

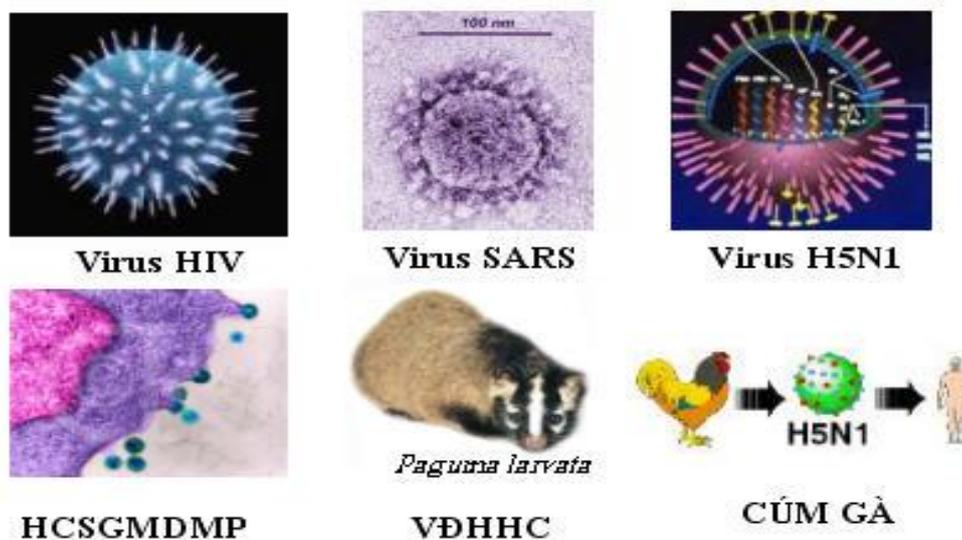
Hệ gene của virus rất đặc biệt (bảng 2.3), mỗi loại virus chỉ chứa một loại acid nucleic, hoặc là DNA hoặc là RNA, chuỗi đơn hay chuỗi kép, dạng sợi thẳng hay dạng vòng. Virus bé nhất khoảng 4 gene và lớn nhất khoảng vài trăm gene.

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



Hình 2.7. Virus trần và virus có màng bao**Bảng 2.2. Phân biệt quá trình truyền bệnh AIDS, SARS, CÚM GÀ**

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

**Hình 2.8. Virus và đường truyền bệnh AIDS, SARS, CÚM GÀ**

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

Bảng 2.3. Dạng acid nucleic và kích thước hệ gene một số virus

Virus	Vật chủ	Dạng acid nucleic	Kích thước hệ gene (số cặp base)
Phage MS2, f2, R17	<i>E. coli</i>	RNA sợi đơn-thẳng	3.569
Virus TMV	Thuốc lá	“	~ 6.000
Các Reovirus	Thú	RNA sợi kép-thẳng	~ 50.000
Phage ΦX174	<i>E. coli</i>	DNA sợi đơn-vòng	5.375
Virus SV40	Thú	DNA sợi kép-vòng	5.243
Baculovirus	Côn trùng	“	(100-150)x10 ³
Adenovirus Ad5	Người	DNA sợi kép-thẳng	~ 36.000
Phage λ (Lambda)	<i>E. coli</i>	“	48.502
Phage T ₂ , T ₄	<i>E. coli</i>	“	~ 200.000

Ghi chú: Các virus gây bệnh ở người và động vật có hệ gene chủ yếu là DNA sợi kép-thẳng, như: các virus thuộc họ *Adenoviridae* gây bệnh đường hô hấp, họ *Herpesviridae* gây mụn rộp herpes ở người, bệnh đậu gà, họ *Poxviridae* gây đậu mùa, đậu bò ... Hoặc là RNA sợi đơn-thẳng, như các virus thuộc họ *Retroviridae* gây ung thư, AIDS, bạch cầu ..., họ *Paramyxoviridae* gây sởi, quai bị, bệnh gà toi, họ *Rhabdoviridae* với bệnh dại, họ

Orthomyxoviridae với bệnh cúm, họ *Picornaviridae* với các bệnh viêm tủy xám, viêm gan A do virus, bệnh lở mồm long móng ở trâu bò...

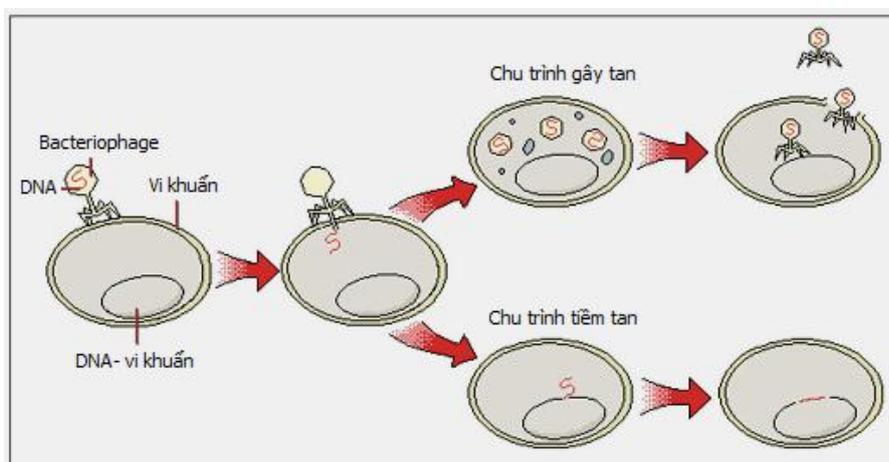
1.2. Phương thức sinh sản và vòng đời của virus

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

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

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

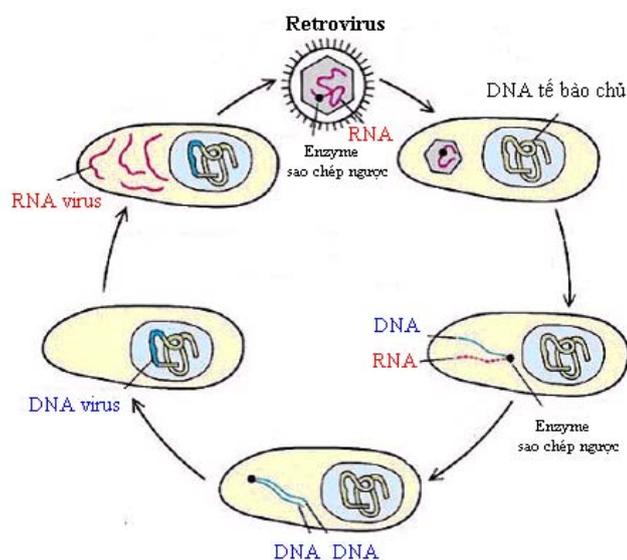
(3) Trong tế bào chủ, tùy loại DNA các phage khác nhau mà có thể diễn ra một trong hai trạng thái: gây tan hoặc tiềm tan.



Hình 2.9. Chu trình hoạt động gây tan (lytic cycle) và tiềm tan (lysogenic cycle) của phage λ ở *E. coli*.

+ Đối với các *phage độc* như T₂ và T₄, lúc này DNA của chúng sẽ sao chép nhiều lần và tổng hợp đủ các protein cần cho tạo vỏ và đuôi, để sau đó chúng lắp ráp với nhau tạo ra các phage thế hệ con. Sau đó, dưới tác dụng của lysozyme làm tan tế bào chủ và phóng thích chừng 100-200 phage con.

+ Đối với virus thuộc nhóm retrovirus (virus gây ung thư, gây bệnh AIDS, gây bệnh bạch cầu tế bào T...) có chu trình sống điển hình (hình 2.11).



Hình 2.10. Chu trình sống của virus nhóm retrovirus

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

+ *Tái tổ hợp*:

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

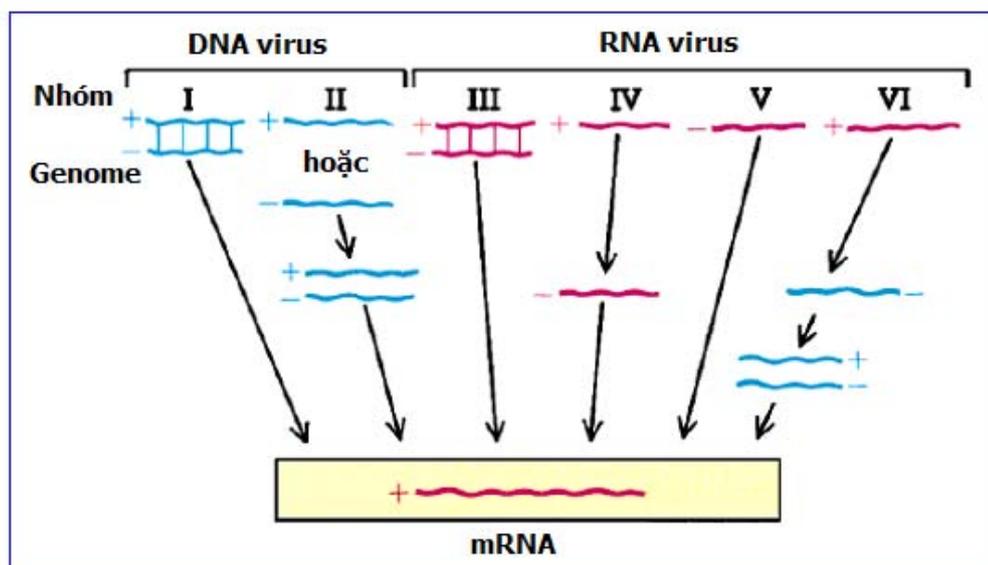
+ *Sao chép*:

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

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

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

+ *Phiên mã*:



Hình 2.11. Sơ đồ minh họa quá trình phiên mã ở một số virus

2. Di truyền học vi khuẩn

2.1. Vật liệu di truyền của vi khuẩn

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

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

- Các plasmid kháng thuốc, gọi là *plasmid R* (R-resistance), thường có mang nhiều gene mã hóa các enzyme có khả năng phân hủy chất kháng sinh tương ứng có mặt trong môi trường. Ví dụ, plasmid pBR322 (4362 cặp base) có 2 gene kháng ampicilline (Amp^R) và tetracycline (Tet^R).

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

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

- Gần đây người ta còn phát hiện các plasmid mới như: *Col-plasmid*, chứa gene mã hóa cho sự tổng hợp colchicine, một protein có thể giết chết các vi khuẩn khác; *Plasmid phân hủy*, giúp phân hủy các chất lạ như toluene hay salicylic acid; *Plasmid mang độc tính*, làm cho sinh vật trở thành sinh vật gây bệnh.

Một plasmid có thể thuộc một hoặc nhiều nhóm chức năng kể trên.

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

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

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

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

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

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

a) Tiếp hợp (*Conjugation*)

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

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

Về sau, người ta còn phát hiện một dạng vi khuẩn, trong đó plasmid F được xen cài vào trong nhiễm sắc thể vi khuẩn, dạng này có khả năng lai với tế bào F^- với tần số cao hơn khoảng 10^4 lần, gọi là *tế bào Hfr* (*High Frequency of recombination*). Khác với các tế bào F^+ , các tế bào Hfr còn có thể truyền đi một phần nhiễm sắc thể vi khuẩn qua ống tiếp hợp. Lợi dụng đặc tính này người ta đã lập bản đồ di truyền bằng tiếp hợp cho hơn 700 gene của nhiễm sắc thể *E. coli* và cho thấy nó có dạng vòng.

b) Biến nạp (*Transformation*)

Biến nạp là quá trình chuyển DNA trực tiếp tách ra từ tế bào thể cho sang tế bào thể nhận.

DNA này nằm tự do trong môi trường (dung dịch) do một vi khuẩn (thể cho) phóng ra. Tế bào thể cho và thể nhận có thể được bắt nguồn từ những sinh vật khác nhau như: thực vật, động vật và vi sinh vật.

Khác với tiếp hợp và tải nạp, biến nạp không cần sự tiếp xúc trực tiếp giữa 2 tế bào cũng như không cần vật trung gian như các phage.

Các tế bào ở trạng thái có thể được biến nạp được gọi là khả nạp (*competent*). Như vậy, qua biến nạp, một nòi vi khuẩn bị biến đổi về mặt di truyền do tiếp thu acid nucleic của một nòi khác.

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

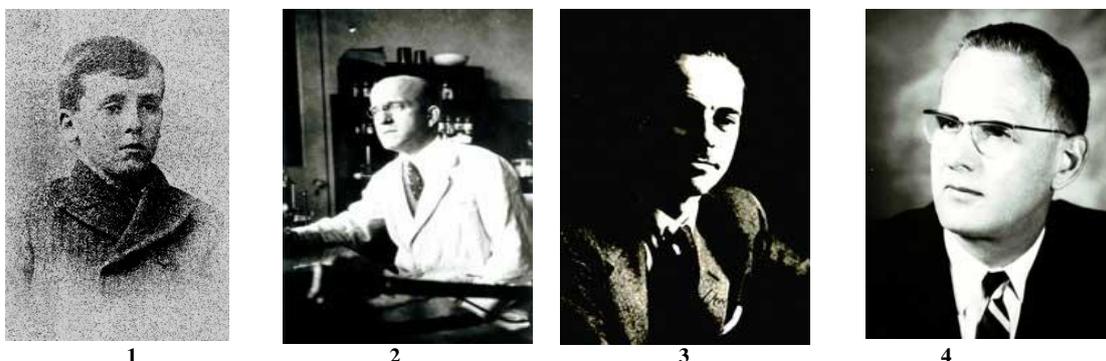
Đặc trưng của biến nạp là ở chỗ DNA thể cho phải ở dạng xoắn kép. Hiệu quả của nó phụ thuộc vào khả năng dung nạp của tế bào nhận, kích thước đoạn DNA và nồng độ DNA. Tế bào có khả năng tiếp nhận đoạn DNA ngoại lai đó gọi là tế bào khả biến, và có thể xảy ra lưỡng bội hóa ở một phần bộ gene (hợp tử từng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

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

Nói chung, tần số xuất hiện các tế bào khả biến là rất thấp (ngay cả ở các loài vi khuẩn có khả năng biến nạp) và tần số biến nạp (đối với các tế bào khả biến) cũng chỉ khoảng 10^{-3} . Vì vậy, biến nạp chỉ được dùng làm kỹ thuật lập bản đồ gene cho 1 số loài. Tuy nhiên, ngày nay biến nạp được ứng dụng rất rộng rãi như là một khâu cơ bản trong kỹ thuật di truyền: cấy-chuyển gene, tiêm lắp-ghép gene,... ở *E. coli*, nấm men bia, thực vật, động vật và cả ở người.

-Cơ chế biến nạp tự nhiên:

- + Tiếp xúc tế bào nhận
- + Xâm nhập vào bên trong
- + Liên kết với DNA của tế bào khả nạp (dạng plasmid hay dạng episom)
- + Tế bào khả nạp nhân lên → DNA biến nạp được nhân lên.



**Hình 2.12. 1. Frederick Griffith (1881-1941); 2. Oswald T. Avery (1877-1955);
3. Colin MacLeod (1909-1972); 4. Maclyn McCarty (1911-)**

-Biến nạp nhân tạo

Sau khi tạo DNA tái tổ hợp, việc tiếp theo là đưa nó vào lại tế bào chưa mang plasmid. Biến nạp nhân tạo được thực hiện với nhiều cách khác nhau

- + Dung hợp tế bào trần (protoplast fusion): Dung hợp 2 tế bào đã loại bỏ thành tế bào
- + Hóa biến nạp: Xử lý CaCl_2 lạnh, kèm sốc nhiệt (42°C trong 2 phút)
- + Điện biến nạp: có thể đến 10^9 - 10^{10} tế biến nạp/ $1\mu\text{gDNA}$. Đoạn biến nạp có kích thước 25-135kb (hình 2.14.a)
- + Vi tiêm: Tiêm thẳng DNA tái tổ hợp vào tế bào (hình 2.14.b)
- + Bắn DNA vào tế bào bằng súng bắn DNA (hình 2.14.c)

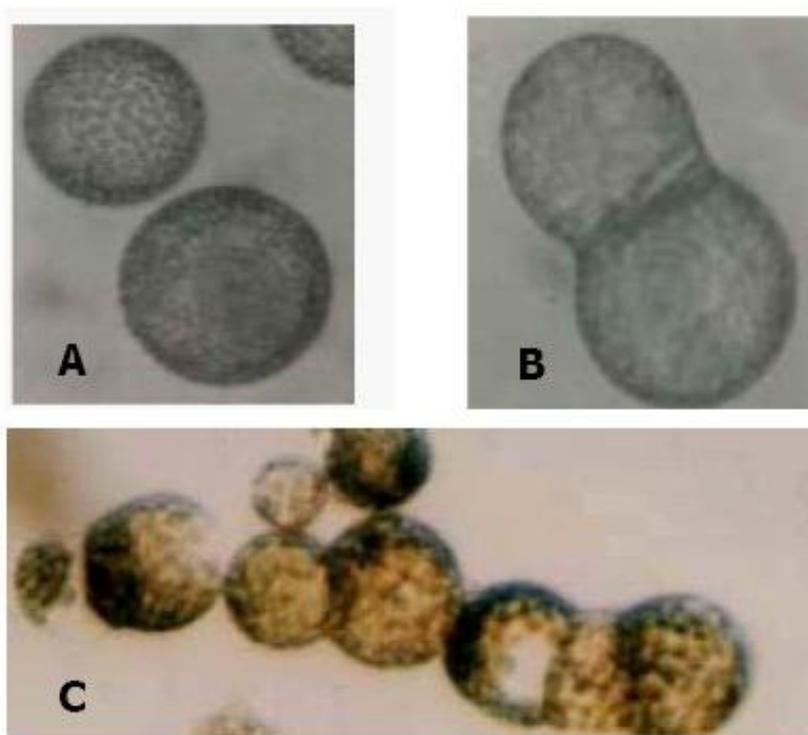
Ngoài ra còn nhiều phương pháp khác đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào như dùng màng lipid (liposome) bao DNA để đưa vào tế bào.



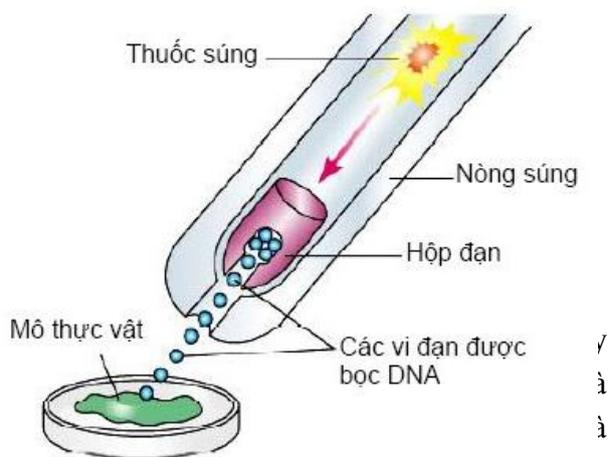
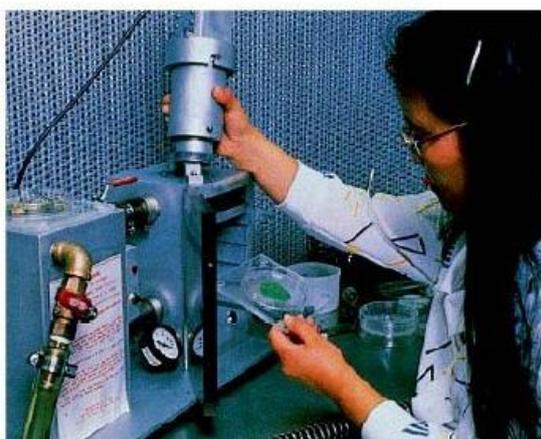
Hình 2.13. Một số thiết bị chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào

- a. Máy điện biến nạp(Electroporation);
- b. Vi tiêm(Microinjection); c. Súng bắn DNA (Biolistic apparatus)

Ngoài ra còn nhiều phương pháp khác đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào như dùng màng lipid (liposome) bao DNA để đưa vào tế bào hay phương thức “đội bom”.



Hình 2.14. Dung hợp protoplast. A. Các protoplast; B. Hai protoplast dung hợp trong một cặp; C. Các protoplast có thể dung hợp trong thể 3 (bên phải ảnh) hoặc nhiều hơn có khi tới 6 protoplast.



chính nó. Những bản sao DNA hay RNA của thực khuẩn thể này sau đó được "đóng gói" vào vỏ virus cũng mới được tổng hợp nhờ tế bào chủ.

Tuy nhiên, quá trình đóng gói DNA của thực khuẩn thể không phải lúc nào cũng hoàn hảo và ở một tần suất thấp, một số mảnh DNA của vi khuẩn chủ cũng bị đóng gói vào

vỏ thực khuẩn thể thay vì bộ gene của nó. Những RNA virus không có khả năng đóng gói DNA nên thường không tạo ra nhâm lẫn trên.

Khi ly giải tế bào, những virion bị đóng gói nhâm chứa DNA vi khuẩn có thể gắn vào một vi khuẩn khác và bơm phần DNA được đóng gói vào tế bào, và như vậy vô tình đã chuyển DNA vi khuẩn từ tế bào này sang tế bào khác. Phân tử DNA này có thể trở thành một phần của DNA nhiễm sắc thể trong tế bào mới, và từ đó được di truyền lại một cách ổn định.

Có 2 kiểu tải nạp: tải nạp chung và tải nạp đặc hiệu.

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

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

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

Những gene được chuyển nằm sát chỗ prophage xen vào;

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

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

3. Di truyền học vi nấm

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

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

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

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

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

4. Các sinh vật mang gene tái tổ hợp

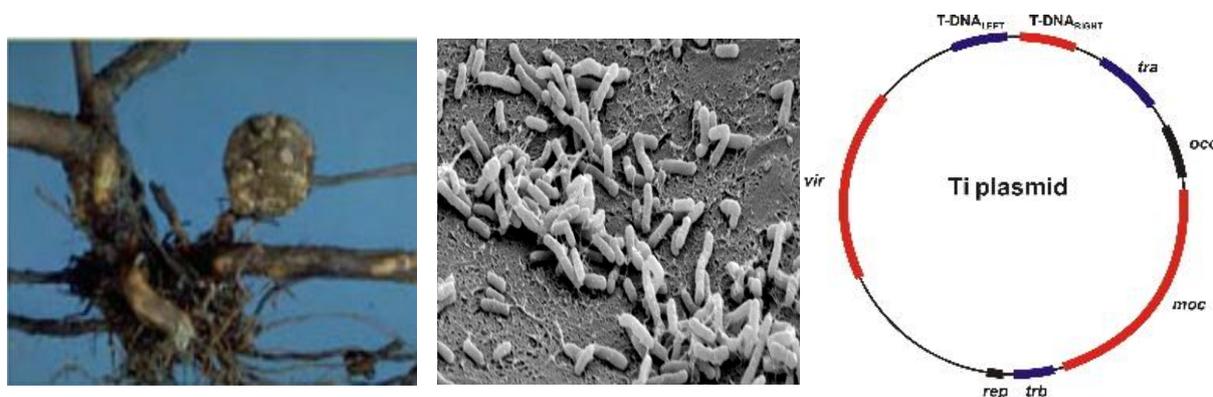
4.1. Các vi sinh vật tái tổ hợp

Hiện nay người ta dần thay thế vi khuẩn *E. coli* mang gene tái tổ hợp bằng các VSV khác như nấm men thuộc chi *Saccharomyces*, xạ khuẩn- *Streptomyces*....

4.2. Các thực vật tái tổ hợp

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

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



Hình 2.16. Khối u thực vật chứa vi khuẩn *A. tumefaciens* chứa Ti plasmid

4.3. Các động vật tái tổ hợp

Không chỉ virus, vi khuẩn, nấm và thực vật mà cả động vật cũng có thể được thiết kế về mặt di truyền. Trong một số điều kiện động vật cũng có thể biểu hiện các gene được gắn nhân tạo bởi *chuyển nhiễm*. Các động vật đầu tiên được chuyển gene là những con ruồi giấm mà những khuyết hụt về màu mắt của chúng đã được sửa chữa nhờ việc đưa các gene bình thường vào trứng khiếm khuyết.

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

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

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

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

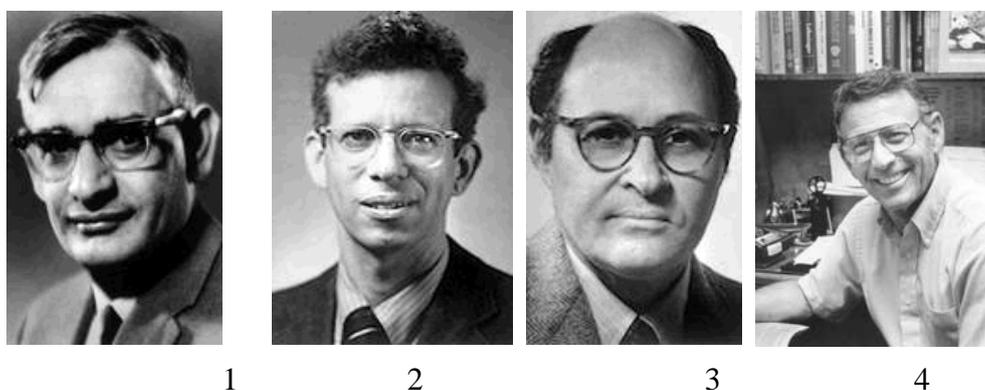
5. Công nghệ DNA tái tổ hợp

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

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

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

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



Hình 2.17. 1. Har Gobind Khorana (1922-); 2. Temin, Howard Martin (1934-1994);

3. Daniel Nathans (1928-1999); 4. Paul Berg (1926-)

5.1. Khái niệm công nghệ DNA tái tổ hợp

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

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

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

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

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

Năm 1970, Har Gobind Khorana tổng hợp được một gen nhân tạo đầu tiên, đến 1973 một gen nhân tạo khác có thể hoạt động bình thường trong tế bào sống, đó là gene mã hóa tRNA^{tyr} vận chuyển của tyrosin ở *E. coli* có chiều dài khoảng 200 cặp nucleotide.

Năm 1971, Temin, Howard Martin, phát hiện ra enzyme phiên mã ngược (*reversetranscriptase*) mở ra sự tổng hợp gene nhân tạo.

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

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

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

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

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

Năm 1981, Stanley B. Prusiner(1942-) phát hiện ra các đặc trưng của Prion

Năm 1982, phát triển vaccin tái tổ hợp chống viêm gan B.

Những năm 1982-1983, Thomas R. Cech và Sidney Altman phát minh ra RNA xúc tác.

Những năm 1983-1984, Robert Gallo và Luc Montagnier phân lập và định loại virus gây suy giảm miễn dịch ở người



Hình 2.20. Craig C. Mello (1960-)(Trái) và Andrew Z. Fire (1959-) và cơ chế vô hiệu hóa gen

5.2. Các enzyme thông dụng trong kỹ thuật di truyền

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

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

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

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

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

Bảng 2.4. Một số enzyme giới hạn và đoạn nhận biết của chúng (mũi tên chỉ vị trí cắt)

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



* Các enzyme thông dụng khác

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

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

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

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

5.3. DNA tái tổ hợp và các vector

5.3.1. Khái niệm DNA tái tổ hợp

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

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

Các ứng dụng chủ yếu của vector là:

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

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

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

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

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

5.3.3. Các đặc tính của một vector

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

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

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

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

5.3.4. Các loại vector chuyển gen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.4.1. Phương pháp sử dụng các đầu dính

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

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

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

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

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

5.5. Tạo dòng DNA tái tổ hợp

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

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

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

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

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

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

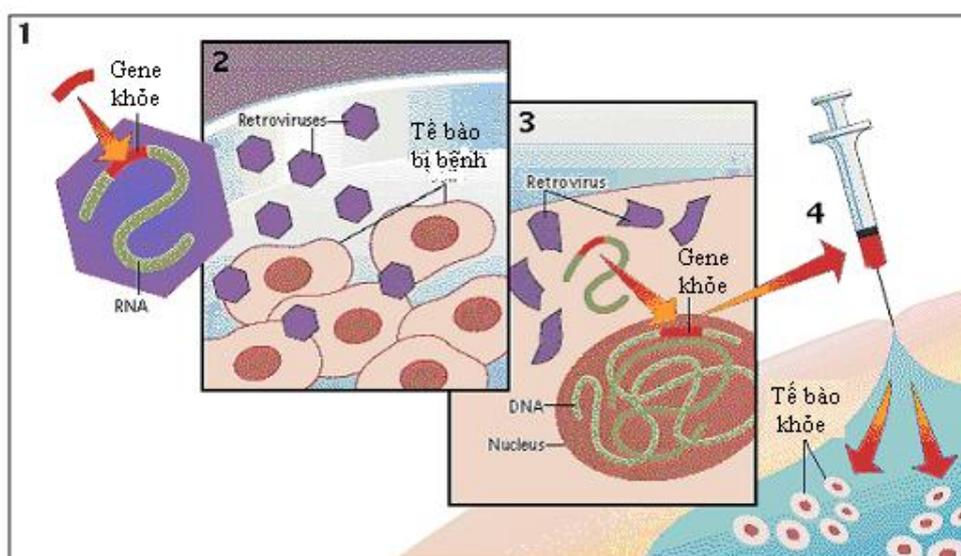
Bước 3: Đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ.

Có hai loại tế bào chủ thông dụng nhất là: (1) Tế bào vi khuẩn, thường là *E. coli*; (2) Tế bào sinh vật nhân chuẩn, ví dụ nấm men *S. cerevisiae* hoặc tế bào động-thực vật nuôi cấy. Tùy loại tế bào chủ mà sử dụng kỹ thuật biến nạp thích hợp.

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

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

5.6. Ứng dụng của công nghệ DNA tái tổ hợp



Hình 2.17. Phương pháp chữa bệnh bằng gen

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

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

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

- Tạo ra khả năng sửa chữa các khuyết tật di truyền ở động vật và người (liệu pháp gen hình 2.17)

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

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

- Tiêm vào bệnh nhân.

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

TÓM TẮT CHƯƠNG

Thực chất của VSVCN là ứng dụng các quá trình sống của VSV vào sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Nghiên cứu các đặc điểm và hoạt động sống cũng như cơ sở sinh hóa, cơ sở di truyền của VSV là nhằm làm nền tảng cho các quá trình tạo chủng giống, nuôi cấy, nhân giống lên men sản xuất đạt hiệu quả tốt hơn.

***Câu hỏi ôn tập**

1. Vi sinh vật có những đặc điểm chung nào ?
2. Hãy giải thích tại sao trong thiên nhiên vi sinh vật tăng lên không tương ứng với tốc độ sinh sản vô cùng nhanh chóng của nó.
3. Vật liệu di truyền của virus ? Mối quan hệ di truyền giữa virus và tế bào vật chủ ?
4. Vật liệu di truyền ở sinh vật nhân sơ khác với sinh vật nhân chuẩn ở những đặc điểm nào ?
5. Thế nào là tiếp hợp, biến nạp và tải nạp ? Tại sao nói các quá trình này tương đương với sinh sản hữu tính ở sinh vật bậc cao ? Ý nghĩa của việc phát hiện ra hiện tượng biến nạp ở vi khuẩn.
6. Thế nào là enzyme hạn chế ? Chúng có các vai trò và tính chất nào được coi là quan trọng đối với kỹ thuật DNA tái tổ hợp ?
7. Bằng hai ví dụ về enzyme cắt giới hạn, hãy chứng tỏ rằng ít nhất có hai phương pháp thành lập các phân tử DNA tái tổ hợp trong ống nghiệm (*in vitro*).
8. Thế nào là phân tử DNA tái tổ hợp, vector tách dòng ? Hãy nêu các bước của quy trình tạo dòng và cho sơ đồ minh họa.

*** Tài liệu đọc thêm**

1. Kiều Hữu Ảnh, 1999. *Vi sinh vật học công nghiệp*, NXBKHK, Hà Nội.
2. Phạm Thành Hồ, 2005. *Nhập môn công nghệ sinh học*, NXBGD.

*** Tài liệu tham khảo**

1. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biên Văn Minh, 1998. *Vi sinh vật học công nghiệp*, NXBGD.
2. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan, 2006. *Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp*, NXBGD.
3. Phạm Văn Ty, 2006. *Công nghệ sinh học tập 5 Công nghệ vi sinh và môi trường*, NXBGD.
4. Prescott Harley Klein, 2002. *Microbiology*. W. C. Brown publisher, USA.
5. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

*** Giải thích thuật ngữ**

DNA tái tổ hợp là phân tử DNA được tạo thành từ hai hay nhiều trình tự DNA của các loài sinh vật khác nhau. Trong kỹ thuật di truyền, DNA tái tổ hợp thường là được tạo thành từ việc gắn những đoạn DNA có nguồn gốc khác nhau vào trong *vector tách dòng*. Những vector tách dòng mang DNA tái tổ hợp này có thể biểu hiện thành các protein tái tổ hợp trong các sinh vật. Thí dụ một số dược phẩm là hormone peptide được tạo ra từ công nghệ DNA tái tổ hợp là insulin, hormone tăng trưởng, và oxytocin. Những vaccine cũng có thể được sản phẩm bằng phương thức này. Sinh vật chủ được sử dụng phổ biến nhất trong công nghệ DNA này là *Escherichia coli*.

Enzyme giới hạn (restriction enzyme, RE) là một enzyme endonuclease có vị trí nhận biết điểm cắt DNA đặc hiệu.

Episomes là những plasmid có khả năng gắn xen vào DNA nhiễm sắc thể của sinh vật chủ. Nhờ khả năng này, chúng có thể tồn tại trong một thời gian dài, được sao chép cùng lúc với DNA nhiễm sắc thể khi tế bào phân chia, và trở thành một phần trong bộ máy di truyền của tế bào. Thuật ngữ này không còn được dùng cho plasmid, vì giờ đây người ta đã biết trình tự tương đồng (homology) với nhiễm sắc thể trên plasmid, như transposon, biến plasmid thành episome (giúp plasmid gắn xen vào nhiễm sắc thể).

Genome là tập hợp chứa đựng toàn bộ thông tin di truyền của một cơ thể sinh vật được mã hóa trong DNA (ở một số virus có thể là RNA). Bộ gen bao gồm những vùng chứa gene lẫn những đoạn không phiên mã. Thuật ngữ *genome* được Hans Winkler giới thiệu lần đầu tiên.

Intron là những đoạn DNA bên trong một gene nhưng không tham gia vào việc mã hoá protein. Những vùng còn lại của gene được gọi là **exon**. Các intron chủ yếu có mặt trong các tế bào eukaryote

Plasmids (thường) là các phân tử DNA mạch đôi dạng vòng nằm ngoài DNA nhiễm sắc thể. Chúng thường hiện diện trong vi khuẩn, đôi khi cũng có ở sinh vật có nhân thật (eukaryote) (ví dụ như vòng 2 micrometre ở *Saccharomyces cerevisiae*). Chúng có kích thước khoảng từ 1 đến hơn 400 kilobase pairs (kbp). Chúng có thể hiện diện chỉ một bản sao, đối với plasmid lớn, cho tới vài trăm bản sao trong cùng một tế bào.

Vectơ tách dòng (vector cloning) là một phân tử DNA có kích thước nhỏ cho phép cài gắn một đoạn DNA ngoại lai vào nhằm mục đích nhân đoạn DNA ngoại lai lên với số lượng lớn.

Chương 3: SỰ PHÂN LOẠI SẢN PHẨM

I. PHÂN LOẠI SẢN PHẨM THEO TÍNH CHẤT THƯƠNG MẠI

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

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

1. Bản thân các tế bào vi sinh vật (sinh khối) là các sản phẩm mong muốn.

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

Thuật ngữ "protein đơn bào" (SCP) thường được dùng để chỉ các tế bào các vi sinh vật như là các sản phẩm công nghiệp với lý do là hàm lượng protein trong chúng cao và được quan tâm về mặt thương mại. Còn "giống khởi động" (starter culture) là các sản phẩm công nghiệp trong đó bản thân các tế bào vi sinh vật được dùng làm nguyên liệu cấy. Chẳng hạn, vi khuẩn thuộc chi *Rhizobium* và *Bradyrhizobium* được dùng để cấy lên các hạt đậu nhằm kích thích sự tạo thành các nốt sần cố định nitrogen, hoặc các giống vi khuẩn lactic được bán ra dưới dạng các nguyên liệu cấy (inoculants) để sản xuất các sản phẩm sữa lên men và xúc xích.

2. Các enzyme do vi sinh vật tạo nên

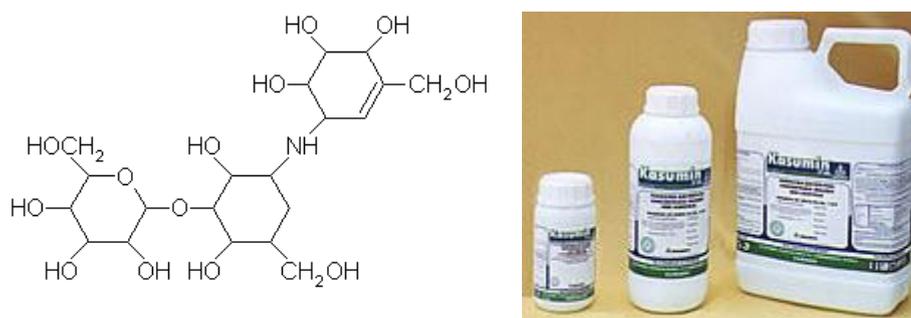
Nhiều enzyme quan trọng có ý nghĩa thương mại đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp nhờ vi sinh vật, bao gồm các enzyme phân giải tinh bột (các amylase), các enzyme phân giải protein- protease, các enzyme phân giải chất béo (các lipase)...

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

3. Các dược phẩm

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

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



Hình 3.1. Công thức hóa học validamycin (trái) và chế phẩm thuốc trừ nấm Kasumin (phải)

Bảng 3.1: Một số enzyme công nghiệp và ứng dụng

<i>Enzyme</i>	<i>Nguồn</i>	<i>Ứng dụng chính</i>
Amylase	<i>Aspergillus, Bacillus, Rhizopus</i>	Bổ sung vào bột, công nghệ dẹt, trợ giúp tiêu hóa
Catalase	<i>Micrococcus, Aspergillus</i>	Phòng oxy hóa thực phẩm, sản xuất phomat
Cellulase	<i>Aspergillus, Trichoderma</i>	Thủy phân gỗ, trợ giúp tiêu hóa
Citocrom c	<i>Candida</i>	Dùng trong chẩn đoán
Glucosylase	<i>Aspergillus</i>	Loại glucose hoặc oxy trong thực phẩm, xác định glucose lâm sàng
Hyaluronidase	<i>Nhiều loại vi khuẩn</i>	Làm sạch vết thương, chống dính trong phẫu thuật
Pectinase	<i>Aspergillus, Sclerotinia</i>	Làm trong vang, dấm, bia, dịch quả
Penicillinase	<i>Aspergillus</i>	Loại penicillin trong nghiên cứu
Protease	<i>Aspergillus, Streptomyces, Bacillus</i>	Làm trong sake, chế biến thịt, loại gelatin
Rennin	<i>Mucor</i>	Làm đông sữa trong sản xuất fromage
Streptokinase	<i>Streptococcus</i>	Làm lành các vết thương vết bỏng

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

Chất điều vị thực phẩm: bột ngọt nhân tạo aspartam là một dipeptide giữa aspartic acid và phenylalanin, cả hai amino acid này đều được sản xuất bằng con đường lên men vi sinh vật. các amino acids khác cũng được sản xuất bằng con đường này là: acid glutamic,

lysine và tryptophan. Một số vitamin cũng được sản xuất bằng con đường vi sinh vật, đó là riboflavin, vitamin B₁₂ và ascorbic acid (vitamin C).

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

II. PHÂN LOẠI KHÁC

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

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

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

1.2. Các sản phẩm trao đổi chất bao gồm:

- Các sản phẩm cuối cùng của trao đổi năng lượng (các sản phẩm lên men), ví dụ ethanol, acid lactic, methane, acetone-butanol...

- Các chất trao đổi bậc 1: Ví dụ amino acids, nucleotide, vitamins, đường,....

- Các chất trao đổi bậc 2: Ví dụ chất kháng sinh, alcaloid, gibberellin, IAA...

- Các loại enzyme: Ví dụ các enzyme ngoại bào như protease, amylase; các enzyme nội bào như asparaginase, penicillinase.

1.3. Các sản phẩm chuyển hoá

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

2. Các sản phẩm của công nghệ lên men

2.1. Các nhóm sản phẩm cơ bản

a. Sinh khối vi sinh vật: Gồm giống khởi đầu cho sản xuất, nấm men bánh mì và men vật nuôi, vaccine, protein đơn bào, phân vi sinh, chế phẩm diệt côn trùng, probiotic.

b. Enzyme vi sinh vật: Phổ biến hiện nay là α -amylase, β -glucanase, amyloglucosidase, glucose isomerase, glucose oxidase, cellulase, hemicellulase, pectinase, invertase, protease, lactase, lipase, streptokinase...

c. Các sản phẩm trao đổi chất: Gồm các sản phẩm sơ cấp (hay còn gọi là các sản phẩm bậc một) gồm rượu, bia, amino acid, acid hữu cơ, nucleotide, vitamin,.. và thứ cấp (hay sản phẩm bậc hai) gồm chất kháng sinh, lipid vi sinh vật, siderophore, các chất tăng trưởng và các chất có hoạt tính sinh học.

d. Các sản phẩm tái tổ hợp gen: Các r-protein và các sản phẩm khác được tạo ra nhờ các tế bào vi sinh vật chuyển gen.

e. Các sản phẩm của chuyển hoá sinh học: Gồm các steroid, vitamin C, acrylamide,... được sản xuất bằng tế bào vi sinh vật hoặc enzyme.

f. Các biopolymer và biosurfactant: các polysaccharide ngoại bào như xanthan, gellan, alginat vi sinh, cellulose vi khuẩn,... và các chất hoạt động bề mặt (biosurfactant) được sản xuất bằng công nghệ lên men.

2.2. Doanh số các sản phẩm chủ yếu của công nghệ sinh học (Dẫn theo Nguyễn lân Dũng) (bảng 3.2)

2.3. Các sản phẩm của công nghệ lên men:

Trên thực tế, nhiều sản phẩm được sản xuất với số lượng lớn bằng công nghệ lên men:

- Antibiotic : penicillin, tetracycline
- Amino acid : MSG (monodium glutamate)-Bột ngọt hay mì chính.
- Steroids : 11 α -hydroxylation của steroid, Vitamin C.
- Pesticides : bào tử của BT (*Bacillus thuringiensis*).
- Hoá chất số lượng lớn : ethanol nhiên liệu, citric acid,...
- Các enzyme : protease, glucose isomerase, amylase,...
- Các vitamin: riboflavin (B2), vitaminB12,...
- Các nucleotide : 5'IMP(5'-inosine), 5'GMP(5'-guanylate),...
- Polysaachrides : xanthan, cellulose vi khuẩn,..
- Vaccine các loại.

Trong xu hướng phát triển Hoá học xanh (Green chemistry) thì nhiều quy trình công nghệ hoá học sẽ được thay thế bằng CNSH.

Bảng 3.2: So sánh doanh số các sản phẩm chủ yếu của công nghệ sinh học

T	Sản phẩm	Doanh số (triệu USD)
1	Rượu, bia	23 000
2	Phomat (Fromage, Cheese)	14 000
3	Thuốc kháng sinh	4 500
4	Siro Fructose	800
6	Nấm men bánh mì	540
7	Enzyme	250
8	Các loại vaccine	150
9	Insulin	100
1	Kích tố HGH	75

0			
1	1	Thuốc trừ sâu sinh học	12

Bảng 3.3. Một số loại rượu, bia chủ yếu

Loại	Nguồn nguyên liệu
1. Không chưng cất:	
-Bia	Malt (mầm đại mạch)
-Cider (cidre)	Nước ép trái táo
-Vang (vin)	Nho
-Sakê (saké)	Gạo loại đặc biệt
-Rượu cần	Gạo, nếp, bắp, khoai mì,...
-Rượu nếp than	Nếp than
2. Chưng cất:	
-Rượu đế (Vodka)	Gạo, nếp, khoai tây, khoai mì, bắp
-Rượu Whisky	Bắp, lúa đại mạch
-Rượu Rum	Mật rỉ đường
-Cognac	Nho

3. Các biopolymer và biosurfactant

3.1. Các polymer sinh học (Biopolymer)

Polymer sinh học (biopolymer) là những đại phân tử thu nhận từ các sinh vật sống. Ở VSV nhiều biopolymer là các polysaccharide ngoại bào (exopolysaccharide) như là một sản phẩm phụ của quá trình chuyển hóa. Một số biopolymer có những giá trị đặc biệt được ứng dụng trong thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm và thậm chí trong công nghiệp dầu mỏ. Trong bối cảnh các polymer hóa học gây ô nhiễm do chậm phân hủy thì việc nghiên cứu và ứng dụng chúng ngày càng được quan tâm. Biến đổi di truyền *Xanthomonas campestris* nhằm sản xuất xanthan gum với giá rẻ.

3.2. Xanthan

Vẫn chưa có nhiều polysaccharide VSV có giá trị thương mại, nhưng số lượng biopolymer và ứng dụng của chúng ngày càng nhiều hơn. Một số polymer VSV đã là những sản phẩm công nghiệp và có thị trường ổn định. Xanthan là biopolymer từ *Xanthomonas campestris* là một sản phẩm có ứng dụng rộng rãi, doanh số đạt 100 triệu USD/năm.

X. campestris là một vi khuẩn hiếu khí bắt buộc, Gram âm, có khả năng sản sinh một biopolymer thương mại quan trọng là nhựa dẻo (gum) xanthan gum, một exopolysaccharide. Xanthan gum có độ dẻo cao, bền trong các môi trường lí hóa khắc nghiệt và có những tính chất lí hóa tương tự như plastic. Đặc biệt nó được sử dụng như các tác nhân làm ổn định, làm đặc, nhũ hóa hay tạo huyền phù.

Xanthan là chất tăng cường thu hồi dầu mỏ (oil recovery enhancer- ORE). Năm 1969, xanthan được phép dùng trong công nghiệp dệt, mỹ phẩm và thực phẩm.

3.3. Các biopolymer khác trong công nghiệp

Nhiều polysaccharide có ý nghĩa trong công nghiệp, đặc biệt như chất nhớt, chất thạch, hiện nay được sản xuất với quy mô lớn.

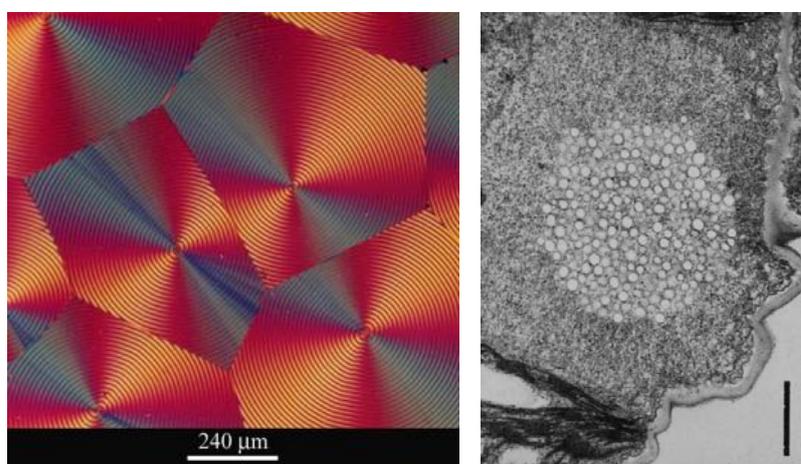
-Alginate vi sinh thu nhận từ vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Alginate thông dụng lấy từ rong nâu dùng in dấu răng để làm răng giả.

Gellan sản sinh từ *Pseudomonas elodea* ATCC 31461, là chất tạo gel (thạch) tương tự agar (độ trong cao hơn, đông đặc ở pH thấp, độ độc ít, không bị tác động enzyme).

-Zanflo thu nhận từ *Erwinia tahitica*, có tính chất tương tự xanthan, nhưng ở nhiệt độ cao hơn 60°C zanflo có những biến đổi thuận nghịch và hiện nay nó được sử dụng nhiều như sơn kẻ đường do tính chịu lạnh, chịu ma sát và khi quét nó sẽ trải lên bề mặt tương đối đều.

-Pullulan do VSV *Aureolebacidium pullulan* tạo ra, có tính chất tương tự cellophane (giấy bóng), đặc biệt là dễ bị phân hủy bởi enzyme pullulanase, không bị phân hủy bởi amylase. Trong tương lai, pullutan sẽ thay thế cho cellophane và các chất dẻo hóa học vì ít gây ô nhiễm môi trường.

-Polyhydroxybutyrate (PHB) là chất dự trữ của vi khuẩn, là một polyester chịu nhiệt có công thức: $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CO}-$



Hình 3.2. Tinh thể PHB (trái), Polyhydroxybutyrate (PHB) trong tế bào vi khuẩn (phải)

4. Các chất hoạt động bề mặt sinh học (Biosurfactans)

4.1. Giới thiệu khái quát:

Chất có hoạt tính bề mặt sinh học (Biosurfactans) của VSV là những sản phẩm rất quan trọng, hiện đang được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp. Những đặc tính có giá trị của chúng là làm thay đổi hoạt động bề mặt do làm giảm sức căng bề mặt và giữa hai bề mặt (interface), hoạt tính làm ẩm hoặc xuyên thấm (penetrating), tính lan tỏa

(spreading), ưa nước và kỵ nước, nhũ tương hóa và khử nhũ tương hóa... gia tăng phát triển vi khuẩn, thu hút kim loại và kháng VSV.

Hầu hết các chất hoạt động bề mặt đang được sử dụng hiện nay đều từ tổng hợp hóa học. Các biosurfactants vẫn chưa được ứng dụng rộng rãi.

Nếu so với chất hoạt động bề mặt hóa học thì các biosurfactants có nhiều ưu điểm hơn:

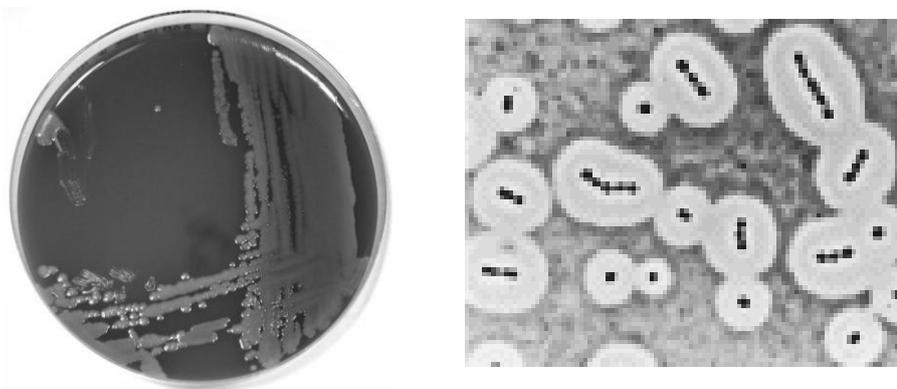
- Có khả năng phân hủy sinh học
- Nhìn chung các chất đều có độ độc thấp.
- Có tính dung hợp sinh học (biocompatibility) và tính tiêu hóa được (digestibility) nên thường dùng trong mỹ phẩm, dược phẩm, hay thậm chí làm phụ gia thực phẩm.
- Nguồn nguyên liệu ban đầu sẵn có (hydrocarbon, cacbohydrate hay lipid).
- Sản xuất có hiệu quả kinh tế (có thể được sản xuất từ phụ phế phẩm công, nông nghiệp)
- Sử dụng trong kiểm soát môi trường: dùng trong xử lý các vụ dầu tràn, trong phân hủy sinh học và giải độc..
- Tính đặc hiệu: Các biosurfactants ở dạng phức hợp chất hữu cơ với các nhóm chức đặc trưng nên thường có hoạt tính chuyên biệt.
- Tính hiệu quả ở các điều kiện cực đoan về nhiệt độ, pH và muối.

4.2. Các nhóm biosurfactants

- Biosurfactants của vi khuẩn: Nhiều loại vi khuẩn có khả năng tạo ra glycolipid. Đầu mang gốc đường của glycolipid có thể chứa nhiều loại đường khác nhau như rhamnose, trehalose (còn gọi là đường của nấm men), sucrose, và glucose.

-Rhamnolipid chứa một hoặc hai đơn vị rhamnose và phần còn lại thường là 2 acid β -hydroxydecanoic. Trehalose lipid có liên hệ với vách tế bào. Các acid béo β -hydroxy phân nhánh α thường bị ester hóa tại nhóm 6 và 6' hydroxyl của đơn vị trehalose.

-Biosurfactants của nấm men: Sophrose lipid dạng lacton và acid của *Torulopsis magnoliae*.



Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc (trái), tế bào (phải) *Acinetobacter calcoaceticus*

-Chất nhũ hóa sinh học ở dạng polysaccharide ngoại bào: polysaccharide ngoại bào của vi khuẩn là những polymer có khối lượng phân tử lớn mang nhiều tính chất vật lý và cơ học rất hữu ích như có tính nhớt cao, tính co giãn, khả năng chịu đựng sự biến dạng,... Trong công nghiệp, các chất này được sử dụng rộng rãi ở dạng gôm, chất biến đổi, tác nhân làm dày, chất ổn định có độ nhớt cao..

Một trong những chất nhũ hóa sinh học được nghiên cứu nhiều nhất là Emulsan, được tiết ra từ vi khuẩn phân hủy dầu *Acinetobacter calcoaceticus*.

Bảng 3.4: Các ứng dụng và hiệu quả của biosurfactants trong công nghiệp thực phẩm

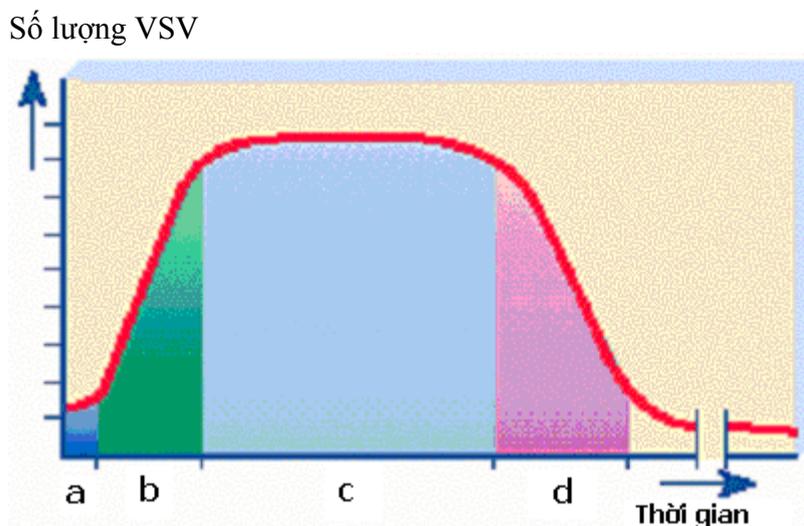
Đối tượng ứng dụng	Tác dụng của chất hoạt động bề mặt
Nông nghiệp -Phân phosphate	-Ngăn ngừa sự vón cục trong quá trình cất trữ
-Các loại thuốc xịt	-Làm ẩm, phân tán chất diệt côn trùng; tạo nhũ tương dung dịch thuốc trừ sâu; làm ẩm, làm lan rộng thuốc và giúp chất độc thấm vào trong
Thực phẩm: -Trái cây	-Rửa bụi, thuốc trừ sâu, phân sấp trên rau, vỏ trái cây
-Bánh nướng và kem	-Hòa tan dầu tạo hương, chống ôi thiu.
Kết tinh đường	-Cải thiện việc rửa, giảm thời gian.
-Mỡ và dầu ăn	-Chống dầu, mỡ bắn tung tóe khi chiên, xào.

III. SINH TRƯỞNG VÀ SỰ TẠO THÀNH SẢN PHẨM TRONG CÁC QUÁ TRÌNH CÔNG NGHIỆP

1. Quá trình sinh trưởng của VSV trong nuôi cấy tĩnh

Nuôi cấy tĩnh là phương pháp nuôi cấy mà trong suốt thời gian đó ta không thêm vào chất dinh dưỡng cũng không loại bỏ đi các sản phẩm cuối cùng của trao đổi chất (quần thể VSV giới hạn trong một khoảng không gian nhất định).

Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của logarit số lượng tế bào theo thời gian gọi là đường cong sinh trưởng (hình 3.4).



Hình 3.4. Đường cong sinh trưởng của vi sinh vật trong nuôi cấy tĩnh

a. Pha lag ; b. Pha log ; c. ổn định; d. suy vong

2. Động học của sự tăng trưởng

Khi nhu cầu oxygen và dinh dưỡng được đáp ứng đầy đủ, trong điều kiện nuôi cấy tĩnh, quá trình sinh trưởng của một quần thể VSV trải qua 4 giai đoạn (pha lag → pha log → ổn định → suy vong). Toàn bộ quá trình nuôi cấy gắn liền với sự thay đổi kéo dài của các điều kiện nuôi. Chất dinh dưỡng giảm đi, số lượng tế bào tăng lên rồi giảm dần, đồng thời hoạt tính trao đổi chất cũng thay đổi.

Trong lên men, các pha log và ổn định có vai trò quyết định để tạo sản phẩm. Sẽ có lợi hơn khi giảm thiểu pha lag, bằng bổ sung giống mạnh hay tăng lượng giống, để tăng năng suất. Thường tốc độ chết của tế bào có ý nghĩa trong công nghiệp thực phẩm và xử lý nước thải.

Sự tỏa nhiệt do tăng trưởng: Một phần năng lượng trao đổi chất của tế bào thoát ra ở dạng nhiệt. Lượng nhiệt tỏa ra đáng kể nhất là khi lên men trên 10 000 lít. Do đó, cần có thiết bị giải nhiệt để nhiệt độ môi trường lên men dao động trong khoảng $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, nhằm duy trì các điều kiện tối ưu cho sự tăng trưởng.

Ngoài ra sự tăng trưởng tế bào còn chịu sự tác động của hàng loạt các nhân tố:

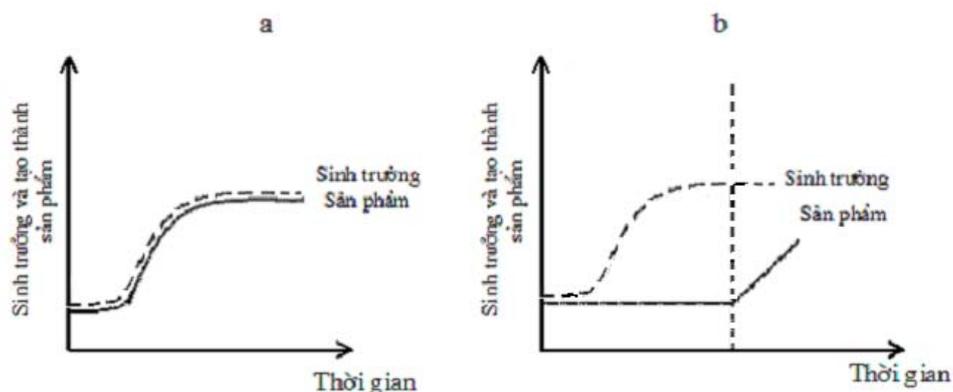
-Giới hạn cơ chất: Tốc độ tăng trưởng tối đa giảm 50% ở nồng độ 10^{-5} mol đối với glucose và các hợp chất N, 10^{-6} mol đối với vitamin và các nhân tố tăng trưởng.

-Ức chế cơ chất: Nồng độ cơ chất cao làm tốc độ tăng trưởng tối đa giảm ở nồng độ 1- 2 mol đối với glucose và ở nồng độ 0,1- 0,2 mol với nguồn N.

-Ức chế sản phẩm: Nồng độ sản phẩm cao làm độ tăng trưởng tối đa giảm 50% . Loại ức chế này thường gặp ở ethanol, các acid hữu cơ, amino acid, các antibiotic,... Điển hình là ethanol ở nồng độ 1mol sẽ ức chế nấm men và vi khuẩn.

Các yếu tố như nhiệt độ, pH, nồng độ CO_2 hòa tan cũng ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng.

3. Sản phẩm bậc một và sản phẩm bậc hai



Hình 3.5. Động học của sự sinh trưởng và tạo thành sản phẩm ở VSV

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

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

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

+ Một chất trao đổi bậc một là một chất được tạo thành trong pha sinh trưởng đầu tiên của VSV

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

*Đặc điểm của sản phẩm trao đổi bậc hai:

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

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

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

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

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

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

IV. CÁC LOẠI VACCINE

1. Định nghĩa:

Vaccine là chế phẩm có tính kháng nguyên dùng để tạo miễn dịch đặc hiệu chủ động, nhằm tăng sức đề kháng của cơ thể đối với một (số) tác nhân gây bệnh cụ thể.

Thuật ngữ vaccine xuất phát từ vaccinia, loại virus gây bệnh đậu bò nhưng khi đem chủng cho người lại giúp ngừa được bệnh đậu mùa (tiếng Latinh *vacca* nghĩa là "con bò cái"). Việc dùng vaccine để phòng bệnh gọi chung là **chủng ngừa** hay **tiêm phòng** hoặc **tiêm chủng**, mặc dù vaccine không những được cấy (chủng), tiêm mà còn có thể được đưa vào cơ thể qua đường miệng.

Vaccine có thể là các [virus](#) hoặc [vi khuẩn](#) sống, giảm độc lực, khi đưa vào cơ thể không gây bệnh hoặc gây bệnh rất nhẹ. Vaccine cũng có thể là các vi sinh vật bị bất hoạt, chết hoặc chỉ là những sản phẩm tinh chế từ vi sinh vật.

[Vaccine bất hoạt](#) là các vi sinh vật gây bệnh bị giết bằng [hóa chất](#) hoặc bằng [nhiệt](#). Thí dụ: các Vaccine chống [cúm](#), [tả](#), [dịch hạch](#) và [viêm gan siêu vi A](#). Hầu hết các Vaccine loại này chỉ gây đáp ứng miễn dịch không hoàn toàn và ngắn hạn, cần phải tiêm nhắc nhiều lần.

2. Các loại Vaccine kinh điển



Hình 3.6. Nuôi cấy virus cúm

(chủng gây [dại dịch](#) năm [1918](#)) phục vụ nghiên cứu và sản xuất vaccine

[Vaccine sống, giảm độc lực](#) là các vi sinh vật được nuôi cấy dưới những điều kiện đặc biệt nhằm làm giảm đặc tính độc hại của chúng. Vaccine điển hình loại này thường gây được đáp ứng miễn dịch dài hạn và là loại Vaccine được ưa chuộng dành cho người lớn khỏe mạnh. Các Vaccine ngừa bệnh [sốt vàng](#), [sởi](#), [bệnh ban đào](#) và [quai bị](#) đều thuộc loại này.

Vaccine sống ngừa [bệnh lao](#) không phải là dòng [vi khuẩn lao](#) gây bệnh, mà là một dòng lân cận được gọi là [BCG](#).

Vaccine [tái tổ hợp](#): với [công nghệ gen](#) hiện đại, người ta cắt đoạn gen tổng hợp nên protein đặc trưng cho vi sinh vật gây bệnh, ghép gen này vào vi khuẩn hay [tế bào nuôi cấy](#) để tạo ra protein đặc hiệu cho mầm bệnh, dùng protein này để tiêm chủng tạo miễn dịch đặc hiệu. Dạng vắc-xin này an toàn, ít tác dụng phụ, khả năng miễn dịch cao. Một điển hình của Vaccine dạng này là Vaccine phòng viêm gan virus B [thể hệ II](#) và III.

Các "[toxoid](#)" là các hợp chất độc bị bất hoạt trích từ các vi sinh vật (trong trường hợp chính các độc chất này là phương tiện gây bệnh của vi sinh vật). Chúng được tiêm cho vật chủ khác (như [ngựa](#)) để tạo kháng thể, rồi chiết lấy kháng thể này để chữa bệnh. Thí dụ: các [huyết thanh](#) ngừa [uốn ván](#) và [bach hầu](#).

3. Một số loại vaccine mới đang nghiên cứu

Các Vaccine này còn được xem là vaccine của tương lai, có 6 hướng phát triển chính hiện nay:

Sử dụng các [phụ gia](#) (*adjuvant*) mới, nhằm gây ra loại đáp ứng miễn dịch mong muốn. Thí dụ, chất nhôm phosphate và các oligonucleotide chứa CpG demethyl hóa đưa vào Vaccine khiến đáp ứng miễn dịch phát triển theo hướng [dịch thể](#) (tạo [kháng thể](#)) thay vì [tế bào](#).

[Vaccine khâm](#): sử dụng một sinh thể quen biết để hạn chế hiện tượng "phản tác dụng", thí dụ dùng virus vaccinia mang một số yếu tố của virus [viêm gan B](#) hay virus [dại](#).

[Vaccine polypeptidique](#): tăng cường tính sinh miễn dịch nhờ liên kết tốt hơn với các phân tử [MHC](#): peptide nhân tạo 1/2 giống virus, 1/2 kia gắn MHC; đoạn peptide mô phỏng 1 [quyết định kháng nguyên](#) (*epitope*).

[Anti-idiotypic](#): [idiotypic](#) là cấu trúc không gian của kháng thể tại vị trí gắn kháng nguyên, đặc hiệu với kháng nguyên tương ứng. Anti-idiotypic là các kháng thể đặc hiệu đối với idiotypic, do đó anti-idiotypic xét về mặt đặc hiệu lại tương tự với kháng nguyên. Vậy, thay vì dùng kháng nguyên X làm Vaccine, người ta dùng idiotypic anti-anti-X.

Vaccine [DNA](#): DNA của tác nhân gây bệnh sẽ được biểu hiện bởi tế bào người được chủng ngừa. Lợi thế của DNA là rẻ, bền, dễ sản xuất ra số lượng lớn nên thích hợp cho những chương trình tiêm chủng rộng rãi. Ngoài ra, Vaccine DNA còn giúp định hướng đáp ứng miễn dịch: tác nhân gây bệnh ngoại bào được trình diện qua [MHC](#) loại II, dẫn đến đáp ứng CD4 ([đáp ứng miễn dịch dịch thể](#)). Khi kháng nguyên của tác nhân đó được chính cơ thể người biểu hiện, nó sẽ được trình diện qua MHC loại I, lúc này [đáp ứng miễn dịch tế bào](#) qua CD8 được kích thích. Tuy nhiên phương pháp này là con dao hai lưỡi bởi lẽ tế bào mang DNA lại có nguy cơ bị nhận diện là "không ta", sinh ra bệnh tự miễn.

Sử dụng [vector](#) tái tổ hợp – dùng các vi khuẩn thuần tính hoặc các [tế bào trình diện kháng nguyên](#) như [tế bào tua](#) được chuyển gen để biểu hiện kháng nguyên mong muốn.

***TÓM TẮT CHƯƠNG**

Các quan điểm phân loại sản phẩm, nhóm sản phẩm được phân loại theo tính chất thương mại được ứng dụng rộng rãi. Các biopolymer và biosurfactant và các nguyên lý sinh học như sinh trưởng và sự tạo thành sản phẩm.

***Câu hỏi ôn tập**

1. Các kiểu phân loại sản phẩm hiện nay ? Theo anh (chị) kiểu phân loại nào hợp lý nhất ? Vì sao ?
2. Các sản phẩm của công nghệ lên men ?
3. Các nhóm biosurfactants ? Ứng dụng ?
4. Nêu các loại biopolymer chính và các ứng dụng ?
5. Phân tích các đặc điểm của sản phẩm bậc hai ?
6. Các loại vaccine, ứng dụng ?

Điền vào chỗ trống:

7. Theo các tiêu chuẩn sinh lí trao đổi chất, các sản phẩm công nghiệp do vi sinh vật tạo ra có thể được phân thành:

+ Vật chất tế bào gồm:

....., ví dụ.....

+ Các sản phẩm trao đổi chất, gồm:

....., ví dụ

+ Các sản phẩm chuyển hóa, ví dụ

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

+ Loại sản phẩm mà sự hình thành chúng gắn liền với sinh trưởng, ví dụ.....

Sự tổng hợp các sản phẩm này xảy ra trong thời gian.....

+ Loại sản phẩm mà sự hình thành chúng không cần thiết cho sinh trưởng, ví dụ

.....

Sự tổng hợp chúng xảy ra lúc sắp bắt đầu pha sinh trưởng

Giai đoạn trong đó sinh trưởng xảy ra được gọi là pha.....(trophophase).

Giai đoạn trong đó sản phẩm đặc trưng được tạo thành thường gọi là pha.....(idiophase).

9. Theo Brock (1995), các sản phẩm có ý nghĩa công nghiệp do vi sinh vật tạo thành có thể được phân thành 5 loại, đó là:.....

10. Năm đặc điểm đặc trưng đối với các sản phẩm bậc hai là:

- Mỗi sản phẩm bậc 2 chỉ được tạo thành bởi

- Các sản phẩm bậc hai dường như không cần thiết cho

- Sự tạo thành các sản phẩm bậc hai phụ thuộc rất nhiều vào các điều kiện sinh trưởng, đặc biệt là

- Chúng thường được tạo thành dưới dạng một nhóm các chất

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

* Tài liệu đọc thêm

1. Kiều Hữu Ảnh, 1999. *Vi sinh vật học công nghiệp*, NXB KH&KT, Hà Nội.

2. Phạm Thành Hồ, 2005. *Nhập môn công nghệ sinh học*, NXBGD.

3. Lương Đức Phẩm, 2006. *Nấm men công nghiệp*, NXB KH&KT, Hà Nội.

1. Kiều Hữu Ảnh, 1999. *Vi sinh vật học công nghiệp*,

* Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biền Văn Minh, 1998. *Vi sinh vật học công nghiệp*, NXBGD.

2. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan, 2006. Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp, NXBGD.

3. Phạm Văn Ty, 2006. Công nghệ sinh học tập 5 Công nghệ vi sinh và môi trường, NXBGD.

4. Prescott Harley Klein, 2002. *Microbiology*. W. C. Brown publisher, USA.

5. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

6. <http://wikipedia>

* Giải thích thuật ngữ

BCG: (Bacillus Calmette Guerin vaccine). Năm 1924, hai nhà vi khuẩn học Pháp Albert Calmette và Camille Guerin tìm ra vaccine BCG

Biosurfactans: chất hoạt động bề mặt

GMP : (5'-guanylate)

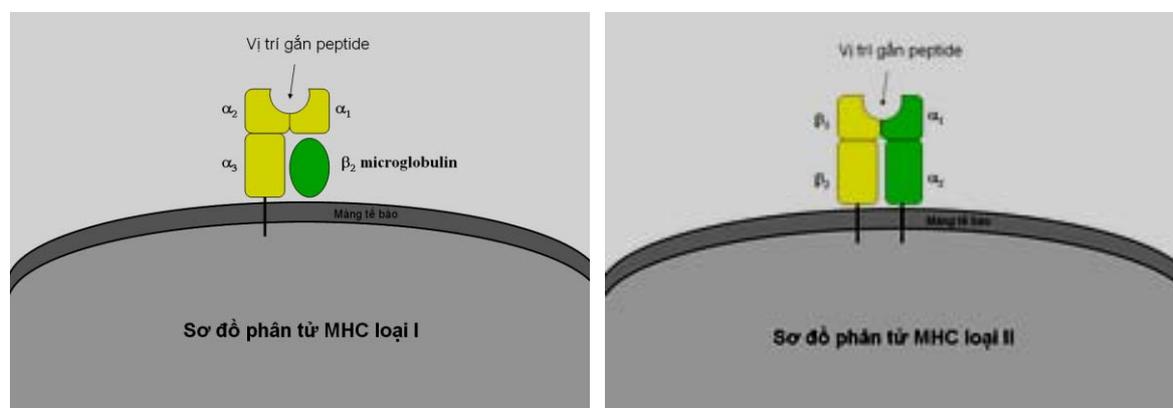
IMP : (5'-inosine),

MSG : (monodium glutamate)-Bột ngọt hay mì chính

MHC :(Phức hợp tương thích mô chính (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) hay ở người còn được gọi kháng nguyên bạch cầu người (*Human Leucocyte Antigen*, HLA) là một nhóm gene mã hoá cho các protein trình diện kháng nguyên trên bề mặt tế bào của đa số động vật có xương sống. Những protein này đóng vai trò quan trọng trong tổ chức miễn dịch của cơ thể cũng như những cơ chế giao tiếp giữa các tế bào.

Những thuật ngữ tiếng Việt để chỉ MHC đã được sử dụng bao gồm: Phức hợp tương thích mô chính, Phức hệ hoà hợp mô chính, Phức hệ phù hợp tổ chức chính, Hệ thống trình diện kháng nguyên.

MHC loại I: có trên bề mặt của hầu hết tất cả các tế bào có nhân của cơ thể, chúng gắn với các peptide được cắt ra từ các kháng nguyên tạo ra trong tế bào, các kháng nguyên này có thể là các protein của chính cơ thể hoặc các protein hoặc của các virus hay vi khuẩn nội bào.



Hình 3.7. Sơ đồ phức hệ MHC loại I và loại II

Phức hệ phân tử MHC loại I gồm một chuỗi nặng xuyên màng (chuỗi α), liên kết không đồng hóa trị với một chuỗi nhẹ ngoại màng β_2 -microglobulin. Phần ngoại bào của chuỗi nặng gồm 3 domain: α_1 , α_2 và α_3 , mỗi domain khoảng 90 axit amin. Phần xuyên màng gồm 25 axit amin và phần nội bào 30 axit amin.

Vị trí gắn mẫu peptide ở giữa hai domain α_1 và α_2 (là những domain ở xa màng tế bào nhất). Khác với chuỗi α , chuỗi β_2 -microglobulin là chuỗi duy nhất không có tính đa dạng kiểu hình và **không** được mã hóa bởi các gene thuộc phức hệ MHC.

Khối lượng của chuỗi α là 44 kDa, chuỗi β_2 -microglobulin là 12 kDa.

MHC loại II

Không như MHC loại I, các phân tử MHC loại II chỉ có trên một số loại tế bào của hệ miễn dịch, như các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp (đại thực bào, tế bào tua) hoặc các lympho B, lympho T đã hoạt hóa. Các tế bào này thực bào các kháng nguyên, "biên tập" chúng thành các đoạn peptide trước khi gắn với MHC loại II rồi phơi bày trên màng tế bào.

Phức hệ phân tử MHC loại II gồm hai chuỗi xuyên màng (α và β). Cả hai đều thuộc về họ các phân tử globulin miễn dịch và được mã hóa bởi các gene trong hệ MHC. Mỗi chuỗi góp một domain (α_1 và β_1) tạo nên vị trí gắn mẫu peptide.

Khối lượng chuỗi α khoảng 33-35 kDa, chuỗi β 26-28 kDa.

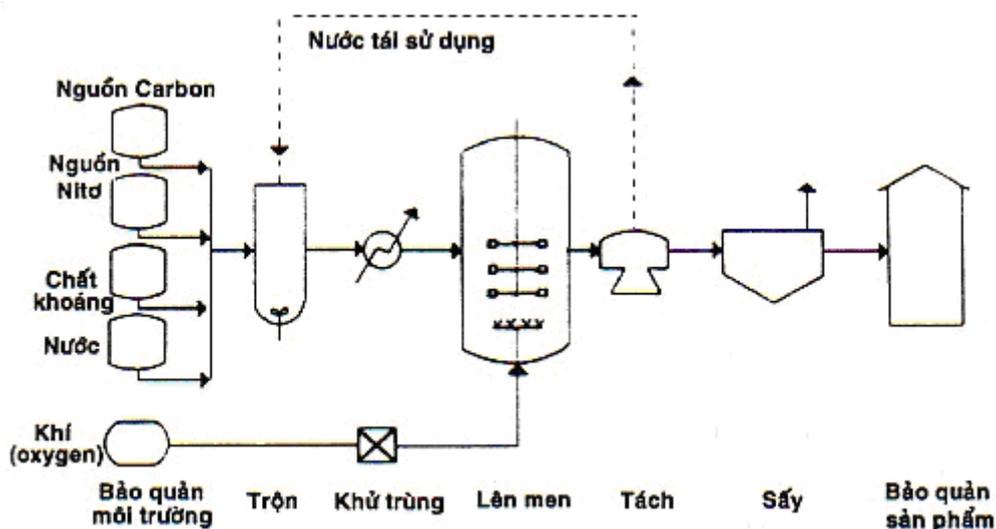
PHB : Polyhydroxybutyrate là chất dự trữ của vi khuẩn

SCP : Protein đơn bào.

Chương 4: CÁC PHƯƠNG PHÁP VÀ KỸ THUẬT LÊN MEN

I. QUÁ TRÌNH LÊN MEN

1. Sơ đồ tổng quát quá trình lên men công nghiệp và các công đoạn chính (hình 4.1)



Hình 4.1. Sơ đồ khái quát quá trình lên men công nghiệp với quy mô lớn

Một quá trình lên men, thường chia thành 3 công đoạn chính:

-*Trước lên men* (Upstream): Xử lý, chế biến, phối trộn và khử trùng nguyên liệu ban đầu.

-*Lên men* (Fermentation) trong nồi lên men được *thông khí* tốt (cần phá bọt), trong dịch lên men diễn ra quá trình truyền khối, truyền nhiệt, tăng sinh khối tế bào và điều chỉnh hoạt tính sinh học để tạo nhiều sản phẩm mục tiêu.

-*Sau lên men* (Downstream): Tách tế bào bằng li tâm hay lọc, phá vỡ tế bào để giải phóng các *chất nội bào*; tủa, *tinh sạch* các chất...; tạn dụng phụ phẩm

2. Hệ thống thiết bị

Theo sơ đồ khái quát hình 4.1), các thiết bị chủ yếu bao gồm: Các thiết bị trước lên men, lên men và sau lên men. Các Bioreactor (nồi lên men).

2.1. Các thiết bị trước lên men

Thường bao gồm:

- Bể hay bồn chứa cơ chất ban đầu để trữ nguyên liệu cho sản xuất.
- Thiết bị nghiền nguyên liệu thô
- Thiết bị trộn nguyên liệu và pha chế môi trường nuôi
- Thiết bị khử trùng

2.2. Nhu cầu oxygen và các kiểu lên men

Nhu cầu oxygen của hầu hết các tế bào VSV được thỏa mãn với nồng độ oxygen khoảng 1mg/l. Nếu mức oxygen thấp hơn thì sự lên men kỵ xảy ra và kết quả là tốc độ tăng trưởng giảm.

Cần duy trì cung cấp oxygen liên tục trong các quá trình lên men hiếu khí.

Phụ thuộc vào việc cung cấp oxygen, có các kiểu lên men sau đây:

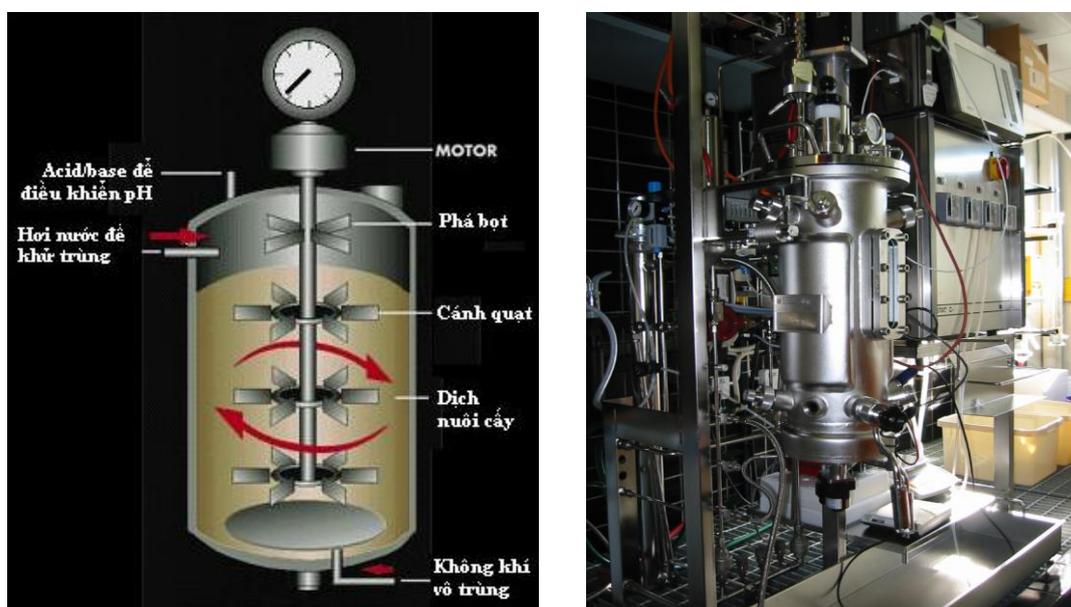
-Lên men bề mặt: Môi trường lỏng chứa trong các khay với chiều sâu không quá 5cm và tế bào mọc lớp bề mặt tiếp xúc trực tiếp với không khí. Kiểu này gọi là lên men tĩnh. Tế bào vi khuẩn *Acetobacter xylinum* tạo màng cellulose (bacterial cellulose -BC) dùng làm thạch dừa (nata de coco) cho năng suất cao nhất khi lên men tĩnh

-Nuôi cấy lắc: Thường dùng trong phòng thí nghiệm và oxygen cung cấp do môi trường bị khuấy trộn nhờ máy lắc.

-Lên men bán rắn: Cơ chất rắn ẩm để lớp mỏng trên khay

-Lên men chìm (submerged fermentation): Nhu cầu oxygen được thỏa mãn bằng thông khí mạnh nhờ bơm khí (compressor) thiết bị chủ yếu là (nồi lên men hay bioreactor)

2.3. Bioreactor



Hình 4.2. Hệ thống nhân giống (trái) và bioreactor (phải)

Mẫu bioreactor căn bản gồm một bồn kín được lắp khí cho luồng khí vào và khuấy. Ngoài ra bồn còn phải thỏa mãn các yêu cầu sau:

-Các vật cản: Việc gắn thêm các vật cản trên thành bioreactor có thể làm tăng hiệu quả chuyển oxygen.

-Kiểm soát phá bọt

-Kiểm soát pH

-Các cửa phụ: Một số cửa phụ được tạo ra để bổ sung tế bào nuôi và các chất thiết yếu của môi trường.

Đối với một số sản phẩm lên men kỵ khí như trong sản xuất rượu bia, có thể dùng bioreactor dạng bồn có đáy hình phễu (hình 4.3) khí thoát ra phía



Hình 4.3. Bioreactor hình phễu

trên, tế bào sẽ lắng ở đáy phiếu và lấy ra ngoài dễ dàng

2.4. Các thiết bị sau lên men

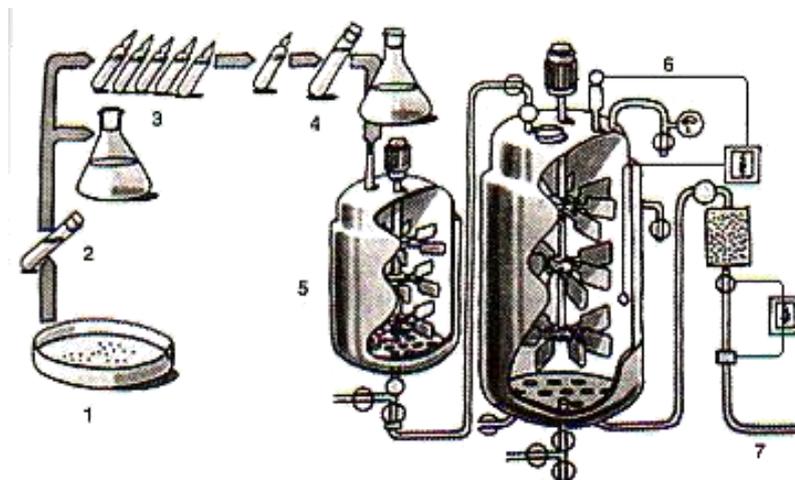
- Thiết bị tách tế bào
- Thiết bị phá vỡ tế bào: Dùng thu nhận các sản phẩm nội bào
- Thiết bị cô đặc: Làm bốc hơi, lọc màng, trao đổi ion, hấp thu
- Thiết bị dùng cho phản ứng tạo sản phẩm
- Thiết bị kết tinh dùng cho một số sản phẩm như bột ngọt, citric acid.
- Sắc kí dung cho tinh chế sản phẩm
- Thiết bị sấy
- Các thiết bị để chế biến và bảo quản sản phẩm như rửa, sấy...

3. Vận hành quy trình lên men

3.1. Chủng giống

*Tiêu chuẩn của chủng giống VSV trong sản xuất

- 1-Có năng suất sinh tổng hợp cao và ổn định; cấu trúc di truyền ổn định.
- 2-Có khả năng sử dụng các nguyên liệu rẻ tiền;
- 3-Không tạo thành các sản phẩm phụ không mong muốn;
- 4-Không mẫn cảm với sự tạp nhiễm của các VSV khác và Bacteriophage;
- 5-Có khả năng tách dễ dàng các tế bào hay sản phẩm khỏi môi trường lên men.



Hình 4.4. Sơ đồ hệ thống nhân giống trong lên men công nghiệp

1. Nuôi VSV trong hộp Petri; 2. Nhân giống trong ống nghiệm; 3. Một phần có thể đông lạnh giữ giống; 4. Có thể nhân giống từ ống đông lạnh; 5. Nhân giống đến quy mô 1m³; 6. nồi lên men sản xuất 10m³; 7 Hệ thống kiểm soát.

3.2. Hoạt hoá chủng giống

Giống sản xuất thường được bảo quản để tránh giảm hoạt tính. Do đó, việc cấy giống trên môi trường thạch nghiêng trước khi nhân giống là việc làm rất cần thiết. Có thể coi đây là việc “đánh thức” chủng giống đồng thời để kiểm tra hoạt tính của giống sau một thời gian bảo quản ở nhiệt độ thấp

3.3. Nhân giống

Kỹ thuật nhân giống: Khâu đầu tiên tẩy sạch dụng cụ bằng khử trùng và cho môi trường vô trùng vào. Tiếp theo là cho giống ban đầu (starter culture) vào để nuôi. Số lượng giống ban đầu chiếm khoảng 1-10% tổng khối lượng của môi trường nuôi. Tiến trình nhân giống thực hiện như sau: ồng giống được giữ ở nhiệt độ thấp → nuôi với 10ml môi trường → nuôi 200ml → nuôi 3 lit → nuôi 30 lit → 300lit. (hình 4.4)

3.4. Lên men

Có 2 vấn đề lớn liên quan đến lên men với quy mô lớn công nghiệp

-Thứ nhất là sự ổn định của các chủng sản xuất. Các chủng này thường phải trải qua một quá trình chọn lọc nhiều lần có sử dụng các tác nhân đột biến. Các biến chủng này thường xuất hiện các dạng hồi biến (revertant) có năng suất kém hơn và làm giảm sản lượng.

-Thứ hai là các biến đổi của những chỉ số vật lý và hoá học khi mở rộng quy mô sản xuất.

*Các thông số kỹ thuật khi nuôi cấy, lên men:

-Lượng oxygen hoà tan, pH tối ưu, nhiệt độ và sự khuấy trộn trong quá trình nuôi cấy. Sự thay đổi các thông số này có ảnh hưởng lớn đến quá trình tạo thành sản phẩm và ổn định hoạt tính sản phẩm.

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

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

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

II. CÁC NHÓM VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP CHỦ YẾU

1. Vi khuẩn lactic

- Đặc điểm sinh học:

+ *Lactobacillus* là vi khuẩn Gram dương, hình que, không bào tử, căn cứ vào sản phẩm lên men lactic, có thể phân biệt hai loại: vi khuẩn lên men lactic đồng hình và dị hình.

- Nhóm vi khuẩn lên men lactic đồng hình gồm các loài: *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L.debruckii ssp.bulgaricus*, *L. helveticus*, *Streptococcus thermophilus*,...

Chúng tạo sản phẩm chủ yếu là lactic acid . Các chủng sản xuất trong công nghiệp thuộc loại này.

- Nhóm vi khuẩn lên men lactic dị hình gồm các loài như: *L. brevis*, *L. kefir*, *Leuconostoc lactis*.

+ Vi khuẩn ưa ấm và chịu nhiệt: sinh trưởng tối ưu là 28- 45, chịu nhiệt 45-62⁰C.

+ Khá nhạy cảm với các acid : sự lên men bị ức chế mạnh mẽ ở pH 5 và ngừng ở pH dưới 4,5, mặc dù vi khuẩn sản sinh lactic acid như sản phẩm biến dưỡng chính.

- + Thuộc loại kị khí không bắt buộc
- + Có nhu cầu dinh dưỡng phức tạp: khi lên men cần các vitamin amino acid và các peptid ngắn.
- + Nguồn carbon là glucose, fructose, lactose, maltose, và sucrose. Một số chủng vi khuẩn lactic có thể sử dụng tinh bột như *L. amylophilus* và *L. amylovorus*.
- Các chủng sản xuất chủ yếu: *L. debrueckii* ssp. *bulgaricus*. *L. bulgaricus*.

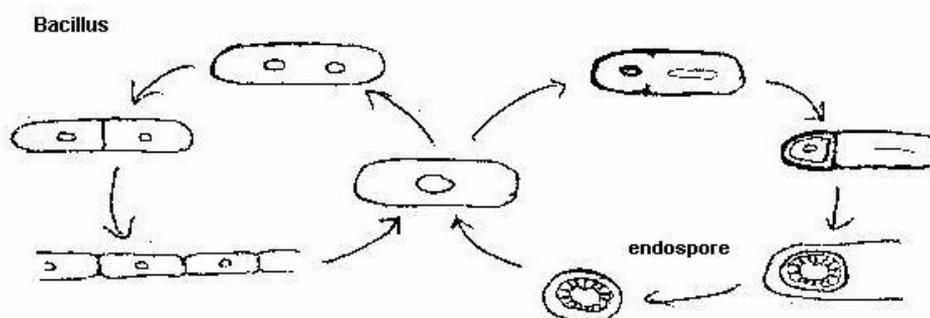
2. Pseudomonas

- Đặc điểm hình thái học chung cho *Pseudomonas* là Gram âm, tế bào hình que, di động nhờ roi ở đầu và không có bào tử.
- Các đặc điểm sinh lý là dị dưỡng, không lên men, linh hoạt về dinh dưỡng, không quang hợp, không cố định nitrogen.
- Các ứng dụng của *Pseudomonas*:
 - + Sự tích lũy polyester polyhydroxybutyrate (PHB) dự trữ là một đặc tính quan trọng của các *Pseudomonas* hiếu khí. PHA (polyhydroxyalkanoate) được tạo ra chủ yếu từ *Pseudomonas oleovorans* và *Alcaligenes eutropus*.
 - + Sản xuất protease chịu nhiệt và các lipase. Lipase P của *P. fluorescens* và lipase CC của *Candida cylindrica* được dùng nhiều nhất
 - + Một loại amylase dùng sản xuất các maltooligosaccharide từ tinh bột.
 - + Trifluoromethylbenzene bị hydroxyl hoá thành diol tương ứng nhờ *Pseudomonas putida*. Diol được tạo ra từ toluen được dùng để sản xuất các chất trung gian chiral prostaglandin.
 - + Một số chủng dùng sản xuất công nghiệp acrylamide.
 - + *Pseudomonas putida* tạo thành các alcôhl có hoạt tính quang học từ những cơ chất là achiral hoặc racemic, ..., trong sự biến đổi acid isobutyric thành acid (S)- β -hydroxybutyric.
 - + Ứng dụng tiềm ẩn nhờ khả năng phân giải nổi tiếng các hợp chất xenobiotic, đặc biệt là những chất hữu cơ bị halogen hoá, thuốc diệt cỏ, plastic, dung môi và những chất tẩy nhờn. Một số loài *Pseudomonas* phân giải thuốc diệt cỏ.
 - + *P. syringae* có một protein màng làm nhân đông đá (ice nucleation) để nước dễ đóng băng. Vi khuẩn này gây hại cho cây trồng, nhưng protein của nó được dùng làm tuyết nhân tạo.

3. Bacillus

- Các đặc điểm sinh học: Trục khuẩn Gram (+) hiếu khí, có bào tử. Mỗi vi khuẩn có 1 nội bào tử, bào tử không làm biến dạng tế bào.
- Khoảng 150 loài cực đoan: chịu nhiệt, chịu lạnh, ưa kiềm, ưa acid. Một số loài có thể thực hiện chuyển hoá sinh học.
- + Món ăn truyền thống của Nhật "itohiki -natto" đã có từ 400 năm, được chế biến từ đậu nành dưới tác động của *Bacillus natto* (*B. subtilis*). Sản lượng 10^8 kg/năm.
- + *Bacillus thuringiensis*: thuốc trừ sâu vi sinh và nguồn gen Bt.

- + *B. licheniformis* và *B. amynoliquefaciens* :alpha amylase chịu nhiệt.
- + *B. alcalophilus*: serine protease subtilin trong bột giặt.



Hình 4.5 : Chu trình sống của *Bacillus*

4. *Corynebacteria*

- *Corynebacteria glutamicum*, VSV đầu tiên được tìm thấy vào năm 1957 có khả năng sản sinh lượng lớn glutamic acid, mà muối monosodium glutamate (MSG) dùng làm chất điều vị (bột ngọt hay mì chính).

- Các chủng đột biến *Corynebacteria glutamicum* được dùng để sản xuất lysin với số lượng lớn.

+ Một số chủng dùng sản xuất công nghiệp:

Corynebacteria glutamicum trước đây gọi là *Micrococcus glutamicus*, *C. lilum*, *Brevibacterium flavum*.

5. Xạ khuẩn

Xạ khuẩn (actinomycetes) thuộc nhóm vi khuẩn thật (eubacteria) phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Phần lớn xạ khuẩn là hiếu khí, hoại sinh, có cấu tạo dạng sợi phân nhánh (khuẩn tì).

Phân rã lignocellulose, polyphenol, chitosan, keratin, pectin và nhiều chất khác nhờ tiết ra một lượng lớn hydrolase. Xạ khuẩn ưa nhiệt (tăng trưởng tối ưu ở 50-60⁰c)

- Các ứng dụng của xạ khuẩn

+ kháng sinh đầu tiên của nhóm này là streptomycin do selman abraham waksman (1888 - 1973) tìm ra năm 1944, đến nay trên 90% antibiotics được phát hiện là do xạ khuẩn sinh ra.

+ Nhiều chủng được lên men quy mô lớn để sản xuất kháng sinh từ thập niên 1940

+ Nhiều xạ khuẩn còn được dùng để sản xuất nhiều loại enzyme, vitamin, acid hữu cơ...

6. Vi khuẩn lam

Vi khuẩn lam (Cyanobacteria) có khả năng tự dưỡng quang năng nhờ có chứa sắc tố quang hợp. Vi khuẩn lam phân bố rộng rãi trong tự nhiên, nhiều loài có ý nghĩa trong sản xuất sinh khối giàu protein, cố định đạm hay sử dụng trong công nghiệp xử lý nước thải...

7. Vi nấm

-Đặc điểm sinh học:

+Các vi nấm như nấm mốc, nấm men là những Eukaryote đơn bào hay đa bào, hấp thụ dinh dưỡng qua vách tế bào và màng sinh chất nhờ phân giải các sinh vật chết hay phế thải của môi trường.

+Vi nấm có thể sinh sản vô tính hoặc hữu tính bằng bào tử tương ứng. Bào tử là những tế bào đơn bội hay lưỡng bội bay trong không khí và phát tán đến nhiều địa điểm xa hơn. Các bào tử có sức chống chịu cao đối với nhiệt độ cao hoặc thấp, cũng như với sự mất nước và có thể sống sót ở những điều kiện bất lợi khác.

-Các ứng dụng

+Ngoài nấm men truyền thống *S. cerevisiae* có nhiều ứng dụng trong VSCN, còn nhiều loài nấm men khác gọi là không truyền thống như *Candida*, *Torula* dùng trong sản xuất protein, sắc tố,...

+ Nhiều loài nấm mốc dùng trong sản xuất enzyme như: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*,...

+ Các nấm mốc *Mucor miehei* và *Mucor pusillus* có thể sản sinh enzyme thay thế rennin làm đông tụ sữa để chế fommege.

+ Nấm mốc *Aspergillus niger* là chủng sản xuất citric acid quy mô công nghiệp lớn từ đầu thập niên 1920. Citric acid là acid hữu cơ chính được sản xuất nhờ lên men và xếp thứ hai trong tất cả các sản phẩm lên men về sản lượng, sau ethanol công nghiệp. Hiện nay, sản lượng ước tính khoảng 700 000 tấn/ năm.

8. Vi Tảo (Micro algae)

-Đặc điểm sinh học:

Vi tảo (Microalgae) gồm các đại diện có khả năng quang hợp, có dạng đơn bào sống thành tập đoàn, phân bố chủ yếu ở môi trường nước ngọt, nước mặn và ở đất ẩm. Vi tảo có thể sinh sản theo hình thức dinh dưỡng, vô tính và hữu tính.

-Các loài vi tảo có ứng dụng

+ *Chlorella*, *Scenedesmus* dùng trong sản xuất protein đơn bào

+ *Chlamidomonas reinhardii* dùng trong chuyển gen qua lục lạp

+ *Dunaliella* là vi tảo chịu mặn dùng sản xuất glycerol và carotene.

+ *Skeletonema costatum* làm thức ăn cho ấu trùng tôm, tách acid béo không no. Sử dụng vi tảo cho xử lý môi trường hoặc làm sinh vật chỉ thị trong môi trường nghèo calcium (calcium) (tảo lục *Desmid*).

9. Nấm men

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

10. Nấm quả thể

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

III. NGUỒN DINH DƯỠNG VÀ NGUYÊN LIỆU BAN ĐẦU

Thuật ngữ *cơ chất* (substrate) được dùng để chỉ các thành phần của môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của VSV hoặc cho việc tạo ra các sản phẩm mục tiêu.

Môi trường nuôi có các cơ chất ở dạng dễ hấp thụ nhất cho các VSV thường ở dạng lỏng. Tuy nhiên, trong một số trường hợp có thể sử dụng một số môi trường rắn. Ngoài những thành phần chủ yếu, trong môi trường còn có các chất phụ gia.

1. Môi trường tự nhiên và tổng hợp

Môi trường tự nhiên phức tạp khác *môi trường tổng hợp* ở chỗ chúng được chế ra từ nguyên liệu tự nhiên có nguồn gốc động, thực vật; thành phần hoá học chính xác của các vật liệu này đến nay chưa biết hoặc xác định rất khó khăn. Một số môi trường phức tạp được pha chế bằng cách hoà tan các chất tự nhiên trong nước và tiếp theo được xử lý bằng thủy giải, làm trong hay bổ sung các chất dinh dưỡng, kích tố tăng trưởng hay các nguyên tố vi lượng. Môi trường tổng hợp (synthetic) có thành phần xác định.

Sự tăng trưởng của VSV trong nhiều trường hợp đòi hỏi môi trường chế biến rất nghiêm ngặt, sự thay đổi chút ít của môi trường sẽ ảnh hưởng đến sự thu hồi của sản phẩm. Trong nhiều trường hợp, cùng loại môi trường nhưng có mẽ có năng suất cao, có mẽ cho năng suất thấp mà nguyên nhân chủ yếu còn tùy thuộc vào kinh nghiệm của người sản xuất.

Một thực tế là nhiều loại thực phẩm lên men cổ truyền có hương vị ngon phụ thuộc vào nguyên liệu ban đầu như bia làm từ malt (hạt đại mạch mọc mầm) là ngon nhất, tuy về nguyên tắc vẫn là lên men rượu.

2. Nước

Nước là thành phần chính của tế bào và thể hiện nhiều vai trò khác nhau. Chất lượng nước rất quan trọng trong sản xuất các sản phẩm từ vi sinh.

Ví dụ: rượu Bàu đá ngon và nổi tiếng của Bình Định chỉ có thể được sản xuất từ nước suối Bàu đá (bàu có nghĩa là thủy vực).

Trong sản xuất vaccine, nguồn nước phải qua nhiều công đoạn làm tinh sạch, chưng cất hai lần rồi mới được sử dụng để nuôi các VSV.

Lên men trong môi trường nước có ưu điểm là độ đồng nhất cao, dễ dàng theo dõi pH và nhiệt độ; nhược điểm là khi chiết xuất các sản phẩm thì tỉ lệ nước cao gây tổn kém năng lượng và thời gian.

3. Nguồn carbon

Carbon là nguồn dinh dưỡng quan trọng, vừa cung cấp năng lượng, vừa là thành phần cấu trúc tế bào. Trong sản xuất từ VSV, nguồn carbon chủ yếu là đường đơn như glucose, oligosaccharide (lactose, saccharose); những đường này thường từ nguyên liệu ban đầu là mật rỉ đường và thường được xử lý để có glucose. Trong quá trình chuyển hóa thành bột ngọt, mật rỉ đường được xử lý thành đường đơn nhờ acid hoặc amylase. Ví dụ, trong sản xuất bột ngọt ở nước ta hiện nay thường dùng bột khoai mì (thủy phân bằng acid hoặc enzyme) và mật rỉ đường là nguồn C chủ yếu. Tỉ lệ C/N thường được chú ý.

4. Nguồn nitrogen

Thông dụng nhất là cung cấp nitrogen vô cơ dưới dạng muối ammonium (như ammonium phosphate), nitrogen hữu cơ thường được cung cấp như amino acid hoặc sản phẩm thủy phân từ protein.

- Nguồn nitrogen tổng hợp: SA (sulfat ammonium), DAP (Diammonium phosphate), urê.

Nguồn nitrogen tự nhiên:

- Bột đậu tương được dùng như là một nguồn nitơ kỹ thuật tương đối phổ biến trong nhiều môi trường dinh dưỡng.

- Nước chiết bắp (corn steep liquor), cao bắp có 15 loại amino acid, cao nấm men (yeast extract) giàu amino acid, các vi tamin,...

- Ngoài ra. Có thể sử dụng bột đậu nành hay bột đậu khác giàu đạm

5. Các nguyên tố khác và vitamin

Ngoài nguồn C và N, môi trường dinh dưỡng cần đủ các nguyên tố đa lượng và vi lượng khác như: P, S, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Co,... Ngoài các vitamin có sẵn trong cơ chất ban đầu, trong một số qui trình cần bổ sung vitamin như *biotin*.

6. Các chất phá bọt

Trong quá trình sục khí, bọt tạo ra nhiều lớp ngăn cách không khí. Các chất phá bọt thường dùng là các loại dầu: dầu dừa, dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu hạt cải, dầu cá không có mùi, dầu silicol 1%. Dầu phải đạt yêu cầu: hoạt tính phá bọt cao, mùi dễ chịu, màu sáng và không có tạp chất.

IV. KHỬ TRÙNG

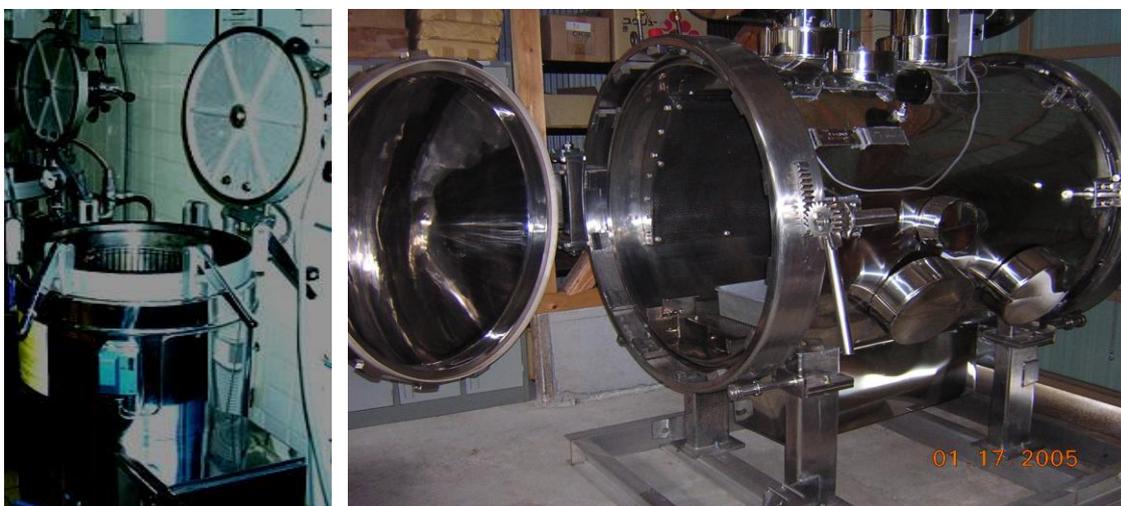
1. Lên men vô trùng

Trong nhiều quá trình lên men (sản xuất acid amin, enzyme, chất kháng sinh...) điều đó được thực hiện thông qua việc khử trùng môi trường dinh dưỡng, không khí và các thiết bị lên men (lên men vô trùng).

2. Lên men không vô trùng

Trong việc sản xuất sinh khối như sinh khối nấm men, sinh khối vi khuẩn, tảo thường tiến hành lên men không vô trùng. Sự phát triển của các cơ thể lạ bị ngăn cản mạnh mẽ bằng cách tạo ra những điều kiện nuôi sao cho chủng sản xuất có thể sinh trưởng trội hơn, ví dụ nhờ cơ chất đặc hiệu hay pH môi trường.

3. Khử trùng bằng nồi hấp Trong lên men từng mẻ các thiết bị sau khi làm vệ sinh được khử trùng bằng hơi nóng tới 120 – 130⁰C.



Hình 4.6. Nồi hấp áp lực hơi nước (trái), nồi hấp áp lực cho lên men xộp (phải)

4. Khử trùng bằng hoá chất

Một số hoá chất được dùng để khử trùng trong một số trường hợp ngoại lệ, như ethylenoxyl, propiolacton rất thích hợp cho việc khử trùng các chất kém bền nhiệt như enzyme chẳng hạn. Ethylenoxyl hỗn hợp với không khí theo tỉ lệ 3 - 8 % sẽ gây nổ, vì vậy khi dùng phải trộn lẫn với CO₂ hoặc N₂. β - propiolacton có tác dụng mạnh hơn nhưng có độc tính (có thể gây ung thư đối với người).

5. Lọc khử trùng

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

V. CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI

1. Nuôi không liên tục

Trong phương pháp nuôi không liên tục (batch - culture) hay còn gọi là nuôi gián đoạn, thông thường vi sinh vật sinh trưởng đến chừng nào một thành phần chủ yếu của môi trường dinh dưỡng bị giới hạn. Khi đó culture chuyển từ pha lũy thừa sang pha cân bằng. Sinh

trường gắn liền với sự thay đổi kéo dài của điều kiện nuôi, sự giảm chất dinh dưỡng và sự tăng khối lượng tế bào. Trong quá trình đó trạng thái sinh lí của tế bào cũng thay đổi. Thông thường việc tạo thành sản phẩm mong muốn liên quan với một trạng thái sinh lí nhất định trong pha sinh trưởng. Không thể duy trì được trạng thái này trong một thời gian dài.

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

1.1. Nuôi chìm

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

Phương pháp nuôi cấy chìm có một số ưu điểm:

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

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

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

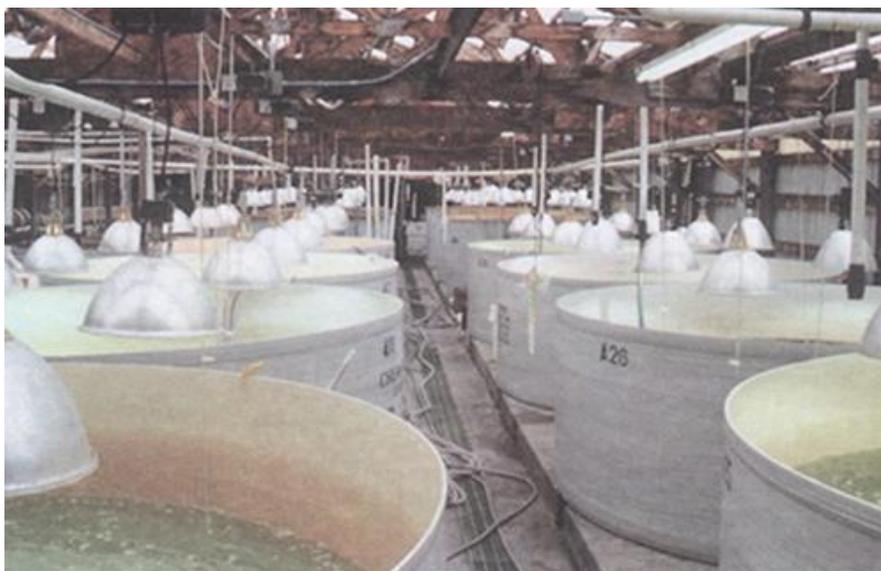
- Trong lên men chìm cần phải khuấy và sục khí liên tục vì vi sinh vật chỉ sử dụng được oxy hoà tan trong môi trường. Khí được nén qua một hệ thống lọc sạch tạp trùng, hệ thống này tương đối phức tạp và dễ gây nhiễm cho môi trường nuôi cấy .



Hình 4.7. Thiết bị nuôi cấy chìm

1.2. Nuôi bề mặt

Trong phương pháp nuôi bề mặt hay nuôi nổi các cơ thể tồn tại ở bề mặt môi trường, do đó mà các tế bào hướng về khoảng không khí được cung cấp đầy đủ ôxy. Ở các váng nấm, chất dinh dưỡng của môi trường chỉ được hấp thu nhờ các tế bào chìm và được chuyển vào sợi nấm khí sinh. Sự tạo váng trong phương pháp nuôi bề mặt dẫn tới một trạng thái sinh lí có ý nghĩa quan trọng đối với việc sản xuất các chất trao đổi nhất định của nấm, ví dụ như sản xuất acid citric hay các enzyme.



Hình 4.7. Nuôi cấy vi tảo theo phương pháp không liên tục

1.3. Nuôi cấy trên môi trường xốp

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

Nhược điểm của phương pháp:

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

2. Nuôi cấy liên tục

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

Ưu điểm của phương pháp nuôi cấy liên tục:

- Giảm bớt thời gian làm vệ sinh thiết bị, khử khuẩn và làm nguội.
- Giảm bớt thể tích của toàn bộ thiết bị.
- Lao động dễ dàng và có khả năng tự động hoá các thao tác.

- Tăng hiệu suất của toàn bộ quá trình công nghệ nhờ chọn lọc tốt nhất các điều kiện thao tác.

Nhược điểm:

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

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

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

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

***TÓM TẮT CHƯƠNG**

Quá trình lên men công nghiệp trong bioreactor gồm 3 công đoạn chủ yếu: *trước lên men, lên men và sau lên men*. Để triển khai sản xuất cần hệ thống thiết bị tương ứng với các công đoạn của quy trình công nghệ.

Bioreactor là thiết bị quan trọng nhất có cấu tạo thích hợp để đảm bảo tốt các điều kiện cho sự phát triển của giống sản xuất, bao gồm *cung cấp oxygen, giữ pH và nhiệt độ ổn định*

Một quá trình sản xuất bắt đầu từ *trước lên men*: xử lý, phối trộn nguyên liệu và khử trùng. Sự *lên men* bắt đầu từ khâu nhân giống, gia tăng số lượng tế bào cực đại và điều khiển phản ứng tế bào để tạo sản phẩm tối đa. Quá trình *sau lên men* bắt đầu từ tách tế bào, nếu là sản phẩm nội bào phải phá vỡ tế bào, thu sản phẩm, xử lý tạo sản phẩm và bảo quản.

Để thực hiện tốt sự lên men cần biết rõ về: nguồn *dinh dưỡng* để pha chế môi trường, kỹ thuật *vô trùng* và các *phương pháp nuôi*.

***Câu hỏi ôn tập chương 4**

1. Những điều kiện cần thiết cho một quá trình lên men trong sản xuất công nghiệp?
2. Yêu cầu chung của giống vi sinh vật dùng cho công nghệ lên men?
3. Các phương pháp hạn chế sự thoái hoá chủng giống ?
4. Các phương pháp khử trùng thường sử dụng trong sản xuất công nghiệp?
5. Những ưu và nhược điểm của phương pháp nuôi cấy gián đoạn và liên tục ?
6. Nêu các thiết bị chủ yếu trong công nghiệp lên men
7. Trong công nghiệp lên men, cung cấp oxygen có đặc điểm gì ?
8. Có các kiểu lên men rượu nào ?

9. Sự lên men công nghiệp là gì ?

10. Lên men công nghiệp gồm những công đoạn chủ yếu nào ?

*** Tài liệu đọc thêm**

*** Tài liệu đọc thêm**

1. Kiều Hữu Ảnh, 1999. *Vi sinh vật học công nghiệp*, NXBKHK, Hà Nội.

2. Phạm Thành Hồ, 2005. *Nhập môn công nghệ sinh học*, NXBGD.

*** Tài liệu tham khảo**

1. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biền Văn Minh, 1998. *Vi sinh vật học công nghiệp*, NXBGD.

2. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan, 2006. *Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp*, NXBGD.

3. Phạm Văn Ty, 2006. *Công nghệ sinh học tập 5 Công nghệ vi sinh và môi trường*, NXBGD.

4. Prescott Harley Klein, 2002. *Microbiology*. W. C. Brown publisher, USA.

5. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

6. <http://wikipedia>

*** Giải thích thuật ngữ**

BC (Bacterial cellulose): Cellulose vi khuẩn

Bioreactor (fermenter) là vật chứa (vessel) các tế bào, chiết xuất tế bào hay các enzyme thực hiện phản ứng sinh học.

DAP (Diammonium phosphate)

GMP (5'-guanylate)

Lên men (fermentation) được hiểu là tất cả các quá trình biến đổi do vi sinh vật thực hiện trong điều kiện kỵ khí (thiếu O₂) hay hiếu khí. Lên men là sự tích lũy các sản phẩm trao đổi chất hữu ích cho con người trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật.

MP (5'-inosine)

SA (sulfat ammonium)

Chương 5: SẢN XUẤT SINH KHỐI VI SINH VẬT

I GIỐNG BAN ĐẦU CHO CÁC QUY TRÌNH LÊN MEN VI SINH VẬT

Tất cả các quy trình lên men VSV đều cần giống ban đầu (starter culture), tức là phải có đủ số lượng tế bào cần thiết cho thực hiện phản ứng sinh học trong lên men. Khâu này phải đảm bảo các điều kiện:

- Đủ số lượng tế bào cần thiết
- Các tế bào có số lượng lớn nhưng hoạt tính không đổi và phải đạt một số tiêu chuẩn sau:
 - + Có khả năng sử dụng nguyên liệu rẻ tiền
 - + Không tạo thành các sản phẩm phụ không mong muốn
 - + Không mẫn cảm với sự nhiễm tạp với các VSV khác và bacteriophage.
 - + Có khả năng tách dễ dàng các tế bào hoặc sản phẩm ra khỏi môi trường lên men.

Trong đa số quy trình, các tế bào sinh sản tốt trong điều kiện thối khí đủ. Tuy nhiên, trong một số trường hợp tế bào lên men kỵ khí, nếu thối khí mạnh tế bào sinh sản nhanh có thể sản phẩm kém chất lượng. Ví dụ, trong làm bia nếu thối khí mạnh cho tế bào sinh sản nhanh ở giai đoạn đầu thì hương vị bia có thể giảm.

II. SẢN XUẤT MEN BÁNH MÌ

Nấm men làm nở bột gọi là men bánh mì. Từ cổ xưa con người đã biết sản xuất bánh mì, nhưng chỉ dựa vào quá trình lên men tự nhiên. Hiện nay nhiều nước trên thế giới đã chủ động sản xuất men ép để làm nở bột. Ở Việt Nam, chúng ta đã tuyển chọn được một số chủng nấm men bánh mì cho năng suất sinh khối khá cao, thích hợp để sản xuất trên môi trường ri đường mía.

Ngay từ năm 1858, Pasteur phát hiện sự tăng nhanh sinh khối tế bào nấm men khi sục khí mạnh, nhưng mãi đến năm 1919 quy trình sản xuất men bánh mì mới ra đời.

Men bánh mì thực chất là sinh khối tế bào nấm men được nuôi trong môi trường giàu đường (ri mật) có bổ sung phosphore và ammonium như DAP (diammonium phosphate), urea,...

1. Vi sinh vật

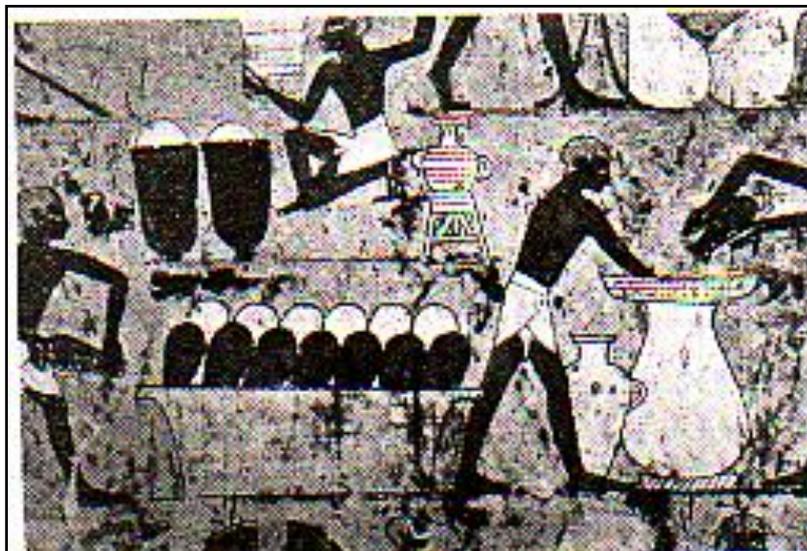
Tế bào nấm men có 3 vai trò trong sản xuất men bánh mì:

- Làm nở bột mì nhờ do lên men rượu sinh ra khí CO₂
- Bột khí làm xốp bánh và
- Góp phần tạo hương. Men bánh mì được bán ra ở dạng đông khô, hay dạng tươi được ép thành bánh.

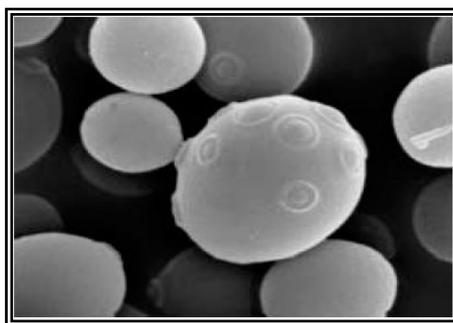
Nấm men sử dụng trong các xí nghiệp sản xuất men bánh mì thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*. Trong công nghiệp tuyển chọn chủng nấm men phải đảm bảo các đặc tính sau:

- Có khả năng nở bột tốt, làm khối bột nhào nhẹ và xốp.
- Dễ hoà với nước.
- Có đặc tính sinh hoá ổn định và độ bền vững tốt (khó bị tự phân).

- Bền nhiệt, có thể kéo dài hoạt tính enzyme ở nhiệt độ cao.
- Có khả năng lên men các nguồn đường glucose, fructose, maltose, saccharose.
- Khả năng sinh sản nhanh, cho năng suất cao trong quá trình lên men.
- Dễ tách sinh khối và dễ bẻ gãy sau khi ép.



Hình 5.1. Bức tranh mô tả cảnh làm bia và bánh mì
(từ ngôi mộ cổ Ai Cập có niên đại 4000 năm TCN)



Hình 5.2. Hình thái tế bào nấm men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae*

2. Sinh hóa và điều hoà

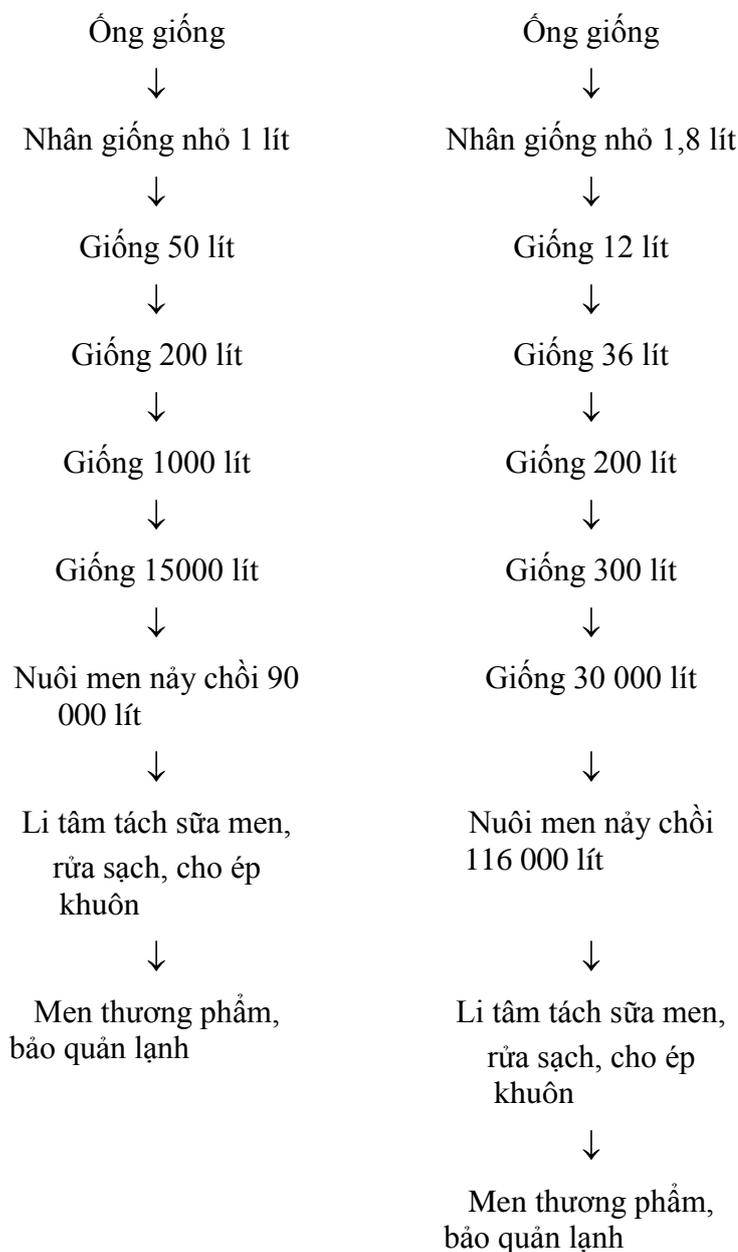
- Kiểm chế dị hoá bởi glucose
- Cạnh tranh về ADP và phosphate vô cơ
- Tác dụng của nồng độ CO₂ cao
- Ảnh hưởng của oxygen: Quan hệ của nấm men đối với oxygen rất phức tạp. Ngoài “hiệu ứng Pasteur” còn có hiệu ứng “Pasteur ngược” (sự kiểm chế dị hoá) và “hiệu ứng Pasteur âm”.

Có thể tránh hiện tượng kiểm chế dị hoá bằng cách nuôi cấy nấm men theo phương thức nồng độ đường được duy trì ở mức độ rất thấp như trong một hệ thống nuôi cấy liên tục. Nấm men chứa các enzyme hoạt động cho trao đổi chất oxygen hoá sẽ chuyển trao đổi chất của nó từ oxygen hoá sang lên men khi nồng độ đường vượt quá một giới hạn nhất định.

Ngoài khả năng ức chế sự tạo thành các enzyme oxygen hoá (kiềm chế dị hoá), glucose cũng có khả năng kiềm chế hoạt tính của các enzyme này.

3. Kỹ thuật sản xuất

3.1. Quy trình sản xuất men bánh mì:



3.2. Giám sát kỹ thuật:

Trong quá trình sản xuất cần tiến hành các bước kiểm tra sau:

- Kiểm tra pH- luôn duy trì ở mức pH: 4,2-4,5. Giờ cuối cùng của giai đoạn lên men thành phẩm cần tăng pH lên 4,8-5,2 để men có màu sáng, đẹp vì nấm men dễ hấp thụ màu của rỉ đường khi pH thấp

- Định lượng nitrogen trong dung dịch

- Xác định hàm lượng đường và rượu trong dịch lên men: Nếu đường quá cao thì tạo thành rượu; nếu < 5%, năng suất sinh khối thấp
- Xác định sự tăng trưởng của nấm men.
- Xác định hàm lượng chất dinh dưỡng của dịch lên men.

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

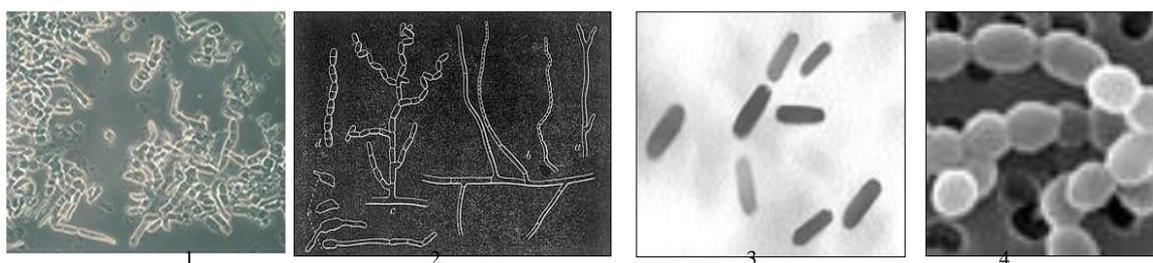
Để bảo quản, men ép chứa 67 - 71% độ ẩm được nén trong các thùng gỗ hoặc nhôm để tránh không khí xâm nhập và giữ trong các phòng lạnh. Nhiệt toả ra do hô hấp của nấm men trong quá trình bảo quản phải được loại bỏ ngay, nếu không độ bền của men ép sẽ bị giảm rõ rệt. Trong quá trình bảo quản, carbohydrate dự trữ sẽ bị phân giải, khả năng lên men sẽ bị giảm đi. Khi xuất xưởng, hàm lượng nước của nấm men được nâng lên 72 - 75% và nấm men sẽ được đóng gói. Bằng cách sấy khô nhờ không khí nóng người ta thu được men khô có trọng lượng khô 95 - 96% có hoạt tính lên men cao.

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

4. Vi sinh vật tạp nhiễm

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

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



Hình 5.3. Hình thái một số VSV gây hư hỏng men bánh mì

1. *Oidium lactis*; 2. *Dematium pullulans*;

3. *Serratia marcescens*; 4. *Leuconostoc mesenteroides*

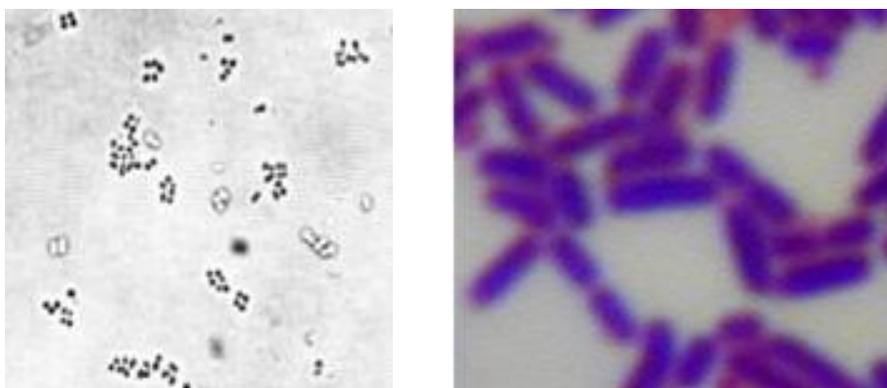
Hàng loạt vi sinh vật xâm nhập về sau vào men ép và gây nên các hiện tượng hư hỏng. Nguy hiểm nhất là *Oidium lactis* thường gây cho men ép mùi ùng. Các nấm khác như *Penicillium* tạo nên đám màu lục trên men ép, *Aspergillus* tạo nên các đám màu vàng nhạt tới màu xám, *Mucor* và *Fusarium* tạo các vết vàng và đỏ trên men ép. *Dematium pullulans* tạo

nên các vết màu nâu bẩn, các vi khuẩn acetic tạo nên những vùng ô trên bề mặt, *Serratia marcescens* tạo nên các vết đỏ trên men ép. *Leuconostoc mesenteroides* là bọ thường gây ra hiện tượng kéo sợi của bánh mì khi chúng có mặt với số lượng lớn trong nấm men. Có thể ngăn ngừa hiện tượng này bằng cách bổ sung acid propionic.

III. VSV DÙNG CHO CÁC MỤC ĐÍCH KỸ THUẬT VÀ Y HỌC

1. Giống khởi động trong công nghiệp thực phẩm

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



Hình 5.4. Hình thái một số VSV được dùng làm giống khởi động

Pediococcus cerevisiae(trái); *Lactobacillus plantarum* (phải)

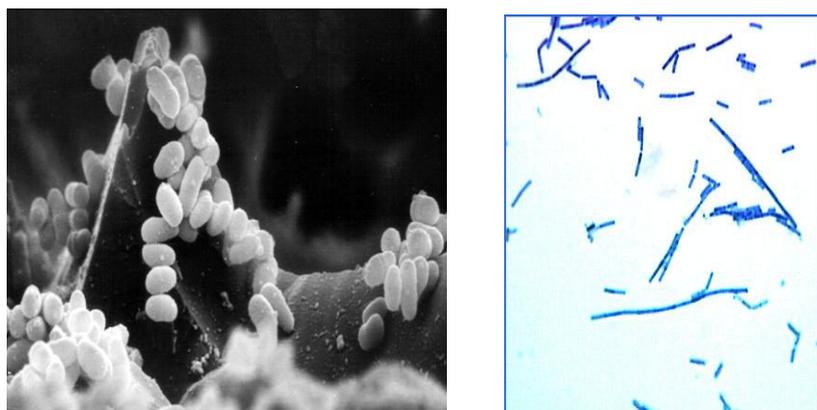
Thông thường, các vi khuẩn này được cấy dưới dạng hỗn hợp với các loài *Lactobacillus*, đặc biệt là *L. plantarum*. Các vi sinh vật này giữ vai trò tạo màu, làm giảm độ pH và tạo thành các chất thơm đặc thù. Ngoài ra, chúng còn ngăn cản sự phát triển của các vi sinh vật không mong muốn.

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

2. Nguồn bổ sung thức ăn gia súc

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

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



Hình 5.5. Hình thái các loài là nguồn bổ sung thức ăn gia súc

Corynebacterium glutamicum (trái); *Bacillus megatherium* (phải)

3. Vi sinh vật dùng trong điều trị

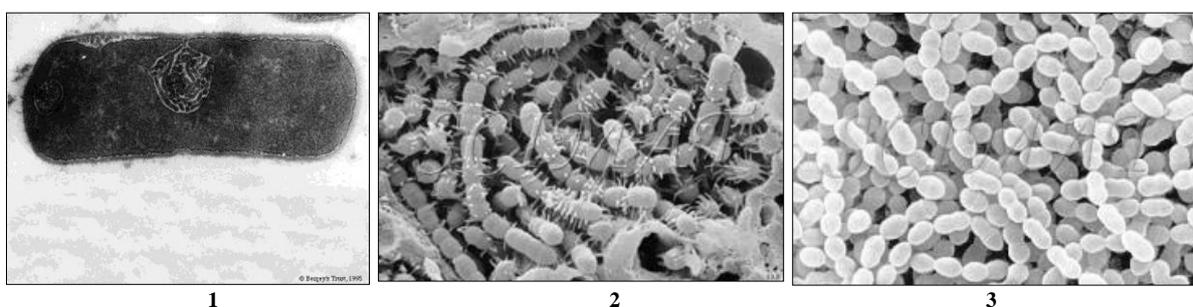
3.1. Chế phẩm trợ sinh (Probiotic)

Probiotic, hay còn gọi là chế phẩm trợ sinh, chứa các VSV sống vô hại hoặc có lợi có tác dụng làm cải thiện cân bằng VSV trên cơ thể vật chủ.

Probiotic tác dụng theo 4 cơ chế chủ yếu:

- Trung hòa độc tố
- Cạnh tranh với mầm bệnh
- Thay đổi chuyên hóa của VSV
- Kích thích tính miễn dịch của chủ thể.

Bacillus subtilis được dùng từ lâu như probiotic. *B. subtilis* được sử dụng qua đường uống để phòng và chữa các rối loạn tiêu hóa sau khi dùng kháng sinh, mà nhiều trường hợp dẫn đến tiêu chảy. *B. subtilis* có tác dụng hồi phục hệ VSV tự nhiên trong ống tiêu hóa của người sau khi dùng kháng sinh kéo dài hoặc bị bệnh. Các chế phẩm *B. subtilis* được bán ở hầu hết các nước châu Âu, mặc dù người ta còn biết ít về cơ chế tác dụng của chúng. Bào tử *B. subtilis* có thể qua được rào chắn đường tiêu hóa, một phần bào tử nảy mầm trong ruột non và sinh sôi trong đường ruột. Ngoài ra, một số tác dụng lâm sàng của *B. subtilis* đã được biết như làm tác nhân kích thích miễn dịch trong một số bệnh.



Hình 5.6. Hình thái một số vi khuẩn sử dụng trong điều trị dưới kính hiển vi điện tử

1. *Lactobacillus acidophilus*; 2. *Streptococcus lactis* ; 3. *Streptococcus thermophilus*

Nhiều chế phẩm Probiotic *B. subtilis* hiện có trên thị trường với nhiều tên gọi khác nhau được sản xuất ở trong nước như Biosubtyl DL (Công ty Sinh phẩm Y học Biopharco- Đà Lạt) và subtyl (XNDPTW 2). Biosubtyl DL có thành phần chủ yếu:

- + *Bacillus subtilis* $10^7 - 10^8$ CFU/g
- + *Lactobacillus acidophilus* ... $10^7 - 10^8$ CFU/g
- + Tinh bột
- + Lactose

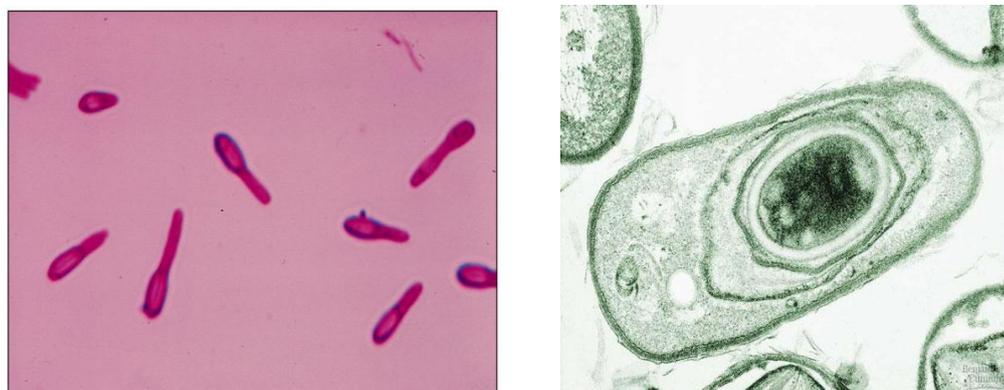
Nhiều loại chế phẩm Probiotic sản xuất trong và ngoài nước được sử dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản (tôm, cá) để hạn chế dịch bệnh. ví dụ: Chế phẩm sinh học Bacillus - BF2 của Viện vaccine và các chế phẩm sinh học dùng xử lý môi trường nuôi tôm, cá có thành phần:

- + *Bacillus subtilis* var HL ... 10^9 CFU/gr
- + *Bacillus licheniformis* 10^9 CFU/gr
- + *Bacillus megaterium* 10^9 CFU/gr
- + *Bacillus* sp 10^9 CFU/gr
- + Oligo - Alg

Nhiều hỗn hợp khác của các loại vi sinh vật kháng sinh cũng đã được sản xuất, chẳng hạn như hỗn hợp của các vi khuẩn lactic với *Streptococcus faecalis*, của các vi khuẩn lactic, acid lactic và tanin, của *Saccharomyces fragilis* và *Streptococcus lactis* với *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis* và *S. thermophilus*.

3.2. Điều chế vaccine

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



Hình 5.7. *Clostridium tetani* (trái) *C. botulinum* (phải)

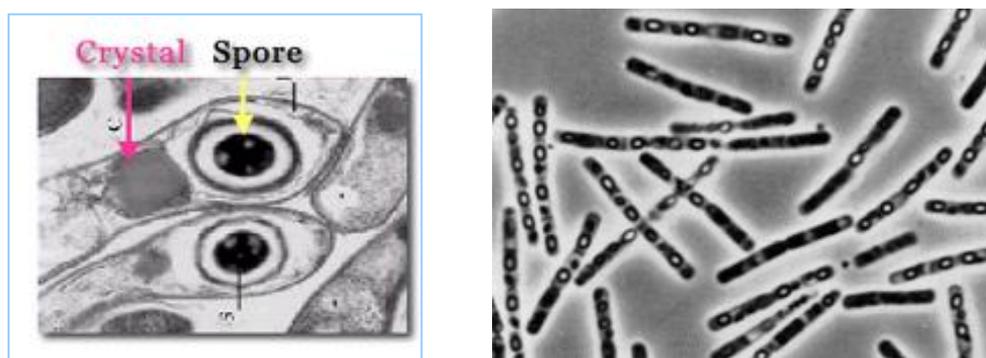
Để sản xuất các độc tố nhằm tạo ra các kháng độc tố thường là trong các cơ thể động vật, người ta cũng thường nuôi chìm các vi khuẩn chẳng hạn *Clostridium tetani* hay *C. botulinum*, sau đó tiêm vào các động vật thích hợp, chẳng hạn ngựa. Kháng độc tố lấy từ huyết thanh động vật sẽ được thuần khiết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

4. Dùng trong bảo vệ thực vật

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

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

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



Hình 5.8. Hình thái Tinh thể diệt côn trùng (trái) và bào tử ; vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (phải)

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



Hình 5.9. *Bacillus popilliae* (trái) gây bệnh cho bọ hung Nhật Bản (*Popilla japonica*) (phải)

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

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

Nhiều loại nấm khác cũng được phát hiện là có khả năng diệt côn trùng, chẳng hạn *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *Penicillium rugulosum*, *Mycrothecium verrucaria* có tác dụng kìm hãm sự phát triển của ruồi dấm (*Drosophila melanogaster*). *Spicaria rileyi* và *Cordyceps militaris* cũng là nấm gây bệnh cho côn trùng. *Entomophthora thaxteriana* là loài nấm gây bệnh cho ruồi nhà có thể tạo thành tới 50.000 bào tử/ ml khi được nuôi chìm trong môi trường chứa dung dịch peptone - cao nấm men - glucose sau 15 ngày ở nhiệt độ 28⁰C.

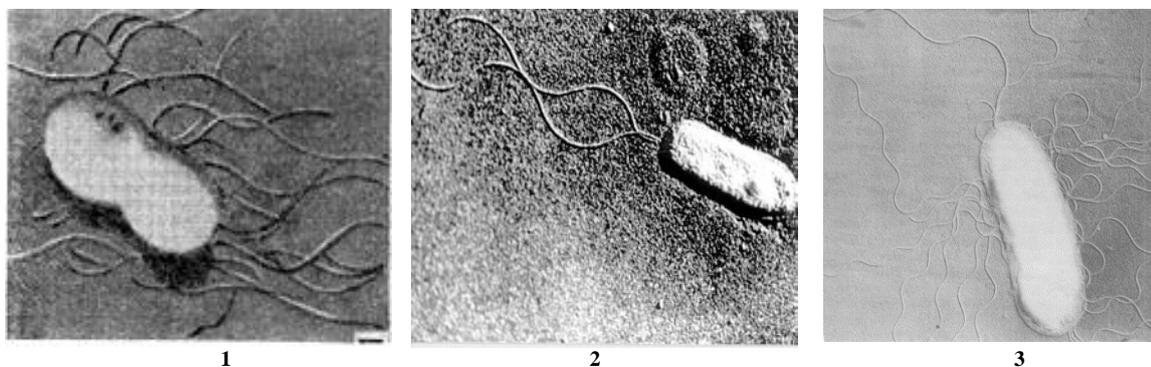
Nấm xanh, *Metarhizium anisopliae* có khả năng trừ các loài rầy, bọ xít, bọ xít hại dưa, mồi, cào cào và các loài sâu ăn lá khác.

5. Phân bón vi sinh vật

Để nuôi cấy đại trà các tế bào *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ dùng làm phân vi sinh vật cần phải sử dụng các cơ chất rất nghèo nitơ. Các tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 25 - 30⁰C, pH 6,5 - 7,0 và thông khí liên tục trong một môi trường chứa glucose. Sau 36 - 58 giờ sinh trưởng kết thúc. Tế bào được li tâm và đông khô trong chân không rồi trộn với đất vô trùng. Vi khuẩn cũng có thể được làm khô trong không khí ở 30 - 35⁰C sau đó được hấp phụ trên bột lignin.

Phân vi sinh vật đặc biệt là với *Rhizobium leguminosagum* hoặc *R. phaseoli* là một loại phân thông dụng ở nhiều nước từ cuối thế kỉ trước. Sản lượng của các cây họ đậu tăng lên rất nhiều ở những vùng đất mới khai phá, chẳng hạn ở vùng Poldern của Hà Lan. Để sản xuất

phân vi sinh vật, các chủng *Rhizobium* mới phân lập, cố định nitơ tốt được nuôi chìm trong các dịch dinh dưỡng hữu cơ rồi sau đó được trộn với các cơ chất như than bùn hoặc đá cuội. Trong quá trình này vi khuẩn phải sống được càng lâu càng tốt. Phân được sử dụng dưới dạng bột, dưới dạng dịch bùn hoặc dạng thuốc phun để phun trên các diện tích cần thiết.



Hình 5.10. Hình thái một số vi khuẩn được sử dụng làm phân bón vi sinh

1. *Azotobacter agilis* ; 2. *Rhizobium leguminosagum*; 3. *Azospirillum sp. brasilense*

IV. PROTEIN ĐƠN BÀO (SCP: *single cell protein*)

1. Tầm quan trọng

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

Tốc độ tăng dân số ở các nước đang phát triển lớn khoảng gấp đôi so với các nước phát triển. Chỉ dựa vào việc cải thiện các phương pháp nông nghiệp thì không đủ lượng protein để cung cấp cho nhu cầu thực phẩm. Rõ ràng, việc tìm ra các protein có giá trị sinh học cao là biện pháp mang lại những đóng góp có tính chất quyết định trong việc giải quyết vấn đề thực phẩm của nhân loại.

Trước đây người ta thường dùng bột các loại hạt chứa dầu như đậu tương hay bột cá để đáp ứng các nhu cầu này. Ý định dùng SCP để thay thế các loại bột nói trên sẽ giải quyết được hai vấn đề:

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

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

- Tốc độ sản xuất cao.
- Hàm lượng protein cao (30 - 80% tính theo trọng lượng khô).
- Có thể dùng các nguồn C khác nhau (một số có thể là các chất thải).
- Chủng sản xuất có năng suất cao và thành phần tốt, dễ kiểm, dễ chọn.

- Diện tích sản xuất không lớn, cho sản lượng cao (trừ táo).
- Không phụ thuộc vào mùa vụ, khí hậu.

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

- Chuẩn bị nguồn C, thường là phải qua một tổ hợp xử lý vật lý và hoá học các nguyên liệu thô.

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

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

2.1. Tuyển chọn vi sinh vật:

Một vi sinh vật sử dụng cho mục đích sản xuất SCP làm thức ăn protein cho người hoặc động vật cần có một số đặc điểm cơ bản:

- Không gây bệnh cho động vật, thực vật và người,
- Có giá trị dinh dưỡng cao
- Được chấp nhận như là một loại thực phẩm hoặc thức ăn gia súc
- Không chứa chất độc, giá thành sản xuất thấp.

2.2. Nuôi cấy

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

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

2.3. Thu hồi sinh khối

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

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

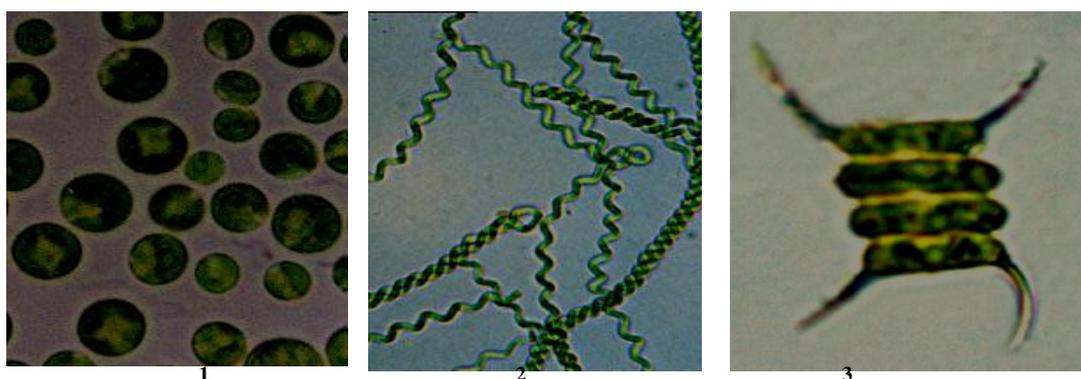
- Tùy thuộc vào loại cơ chất và loại sản phẩm, sinh khối cần được hậu xử lý để loại các thành phần cơ chất hay thường gặp hơn là làm giảm hàm lượng các chất không mong muốn (ví dụ nucleic acid) hoặc thậm chí để tách riêng phần protein.

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

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

3.1. Sử dụng tảo

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



Hình 5.11. Hình thái một số vi tảo dùng để sản xuất SPC

Chlorella sp. (trái); *Spirulina* sp. (giữa) và *Scenedesmus* sp. (phải)

3.2. Sử dụng vi khuẩn

Vi khuẩn có thể được dùng để sản xuất protein đơn bào, nhưng cần lưu ý đến những ưu điểm và nhược điểm của chúng:

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

3.3. Sử dụng nấm men

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

các amino acid chứa lưu huỳnh thấp hơn, để sử dụng cần bổ sung thêm methionin. Trong nấm men giàu các vitamin nhóm B.

3.4. Sử dụng nấm sợi

Nấm sợi có thể được nuôi trên nhiều loại cơ chất để thu nhận SPC, như rỉ đường củ cải, rỉ đường mía, sắn...

Các loại nấm sợi được sử dụng để thu nhận SPC: *Geotrichum candidum*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus nidulans*...



Hình 5.12. 1. *Geotrichum candidum* ; 2. *Fusarium graminearum*, 3. *Aspergillus nidulans*

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

Hàm lượng protein thô của nấm sợi nằm trong khoảng 50 - 55%, song khi sinh trưởng nhanh, hàm lượng nucleic acid sẽ cao (RNA tới 15%). Thành phần amino acid của nấm sợi cân đối, tuy nhiên các amino acid chứa S cũng có mặt ở nồng độ thấp. Nhiều loài nấm sợi có thể sinh độc tố nấm.

3.5. Sản xuất nấm ăn và nấm dược liệu

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

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

- Chất thải được loại bỏ một cách có lợi và được hoà nhập trở lại vào hệ sinh thái nhờ các quá trình chuyển hoá tự nhiên.
- Chất thải rắn và lỏng đều có thể tham gia trực tiếp vào sự chuẩn bị cơ chất.
- Lignin không tiêu hoá được và các thành phần của thành tế bào đã bị lignin hoá cao như cellulose và hemicellulose đều có thể được huy động và được khoáng hoá hoàn toàn.
- Các nguồn carbon thông thường hầu như không được sử dụng sẽ được chuyển hoá thành sinh khối giàu protein.

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

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



Hình 5.13. Một số loại nấm ăn và nấm dược liệu có thể trồng ở Việt Nam

1. Nấm sò (*Pleurotus ostreatus*); 2. Mộc nhĩ (*Auricularia auricula*)
3. Nấm rom (*Volvariella volvacea*); 4. Nấm mỡ (*Agaricus bisporus*),
- 5&6: Linh chi (*Ganoderma lucidum*)

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

***TÓM TẮT CHƯƠNG**

Sinh khối VSV là nguồn cung cấp năng lượng và hóa chất đáng kể cho con người. Để tạo nhiều sinh khối cần nấm được mối quan hệ chặt chẽ giữa yêu cầu chủng giống sinh trưởng và chất lượng sinh khối.

Giới thiệu nguyên lý sản xuất một số sản phẩm từ sinh khối VSV vào đời sống như men nở bột mì, protein đơn bào, thức ăn gia súc, thuốc trừ sâu BT, nấm ăn...

***Câu hỏi ôn tập chương 5**

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

4. Các ưu và nhược điểm của vi sinh vật sử dụng cho sản xuất SCP ?

5. Những ưu điểm khi dùng vi khuẩn để thu sinh khối là:

- Tốc độ sinh trưởng nhanh.....
- Về mặt cơ chất:
- Hàm lượng protein.....

6. Những nhược điểm khi dùng vi khuẩn để thu sinh khối là:

- Hàm lượng RNA.....(.....%)
- pH cần duy trì ở 5 -7 nếu không sẽ có nguy cơ
- Thu hồi bằng li tâm
- Các vi khuẩn Gram âm dễ tạo thành các.....

*** Tài liệu đọc thêm**

1. Kiều Hữu Ảnh, 1999. *Vi sinh vật học công nghiệp*, NXBKHK, Hà Nội.
2. Phạm Thành Hồ, 2005. Nhập môn công nghệ sinh học, NXBGD.

*** Tài liệu tham khảo**

1. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biền Văn Minh, 1998. *Vi sinh vật học công nghiệp*, NXBGD.
2. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan, 2006. Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp, NXBGD.
3. Phạm Văn Ty, 2006. Công nghệ sinh học tập 5 Công nghệ vi sinh và môi trường, NXBGD.
4. Prescott Harley Klein, 2002. *Microbiology*. W. C. Brown publisher, USA.
5. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>
6. <http://wikipedia>

*** Giải thích thuật ngữ**

SCP: (Single cell protein) protein đơn bào hiểu theo hai nghĩa khác thường:

- Gồm cả sinh khối của tế bào với nhiều chất chứa không chỉ protein.
- Không chỉ sinh vật đơn bào, mà có thể là nấm sợi đa bào.

DAP : diammonium phosphate

Chương 6: CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN

I. LÊN MEN ETHANOL

1. Lên men ethanol nhờ nấm men

1.1. Khái niệm chung

Lên men các loại đường thành rượu được thực hiện bởi nhiều loại nấm men, chủ yếu là các loài *Saccharomyces* và một số vi khuẩn.

Nguyên liệu làm rượu có thể chia thành 3 nhóm:

-Các cơ chất *giàu đường* như rỉ đường, nước mía, củ cải đường, nước trái cây chín,... Sự lên men rượu xảy ra trực tiếp từ loại nguyên liệu này.

-*Tinh bột* từ các loại ngũ cốc như lúa mì, gạo, ngô,.. và các loại củ như khoai tây, sắn,.. Ngũ cốc là nguồn nguyên liệu lớn từ trồng trọt, nhưng trước khi lên men phải được *thủy giải thành đường*, rồi mới lên men đường thành rượu.

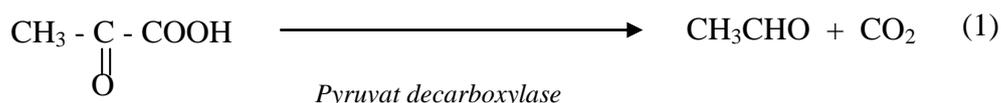
-Phức hợp Lignocellulose từ gỗ, phế thải nông, lâm nghiệp, giấy in báo,.. Đây là nguồn nguyên liệu dồi dào nhất trên Trái đất từ sinh khối thực vật, nhưng việc xử lý phân cắt cellulose thành glucose khó khăn và tốn kém hơn nhiều.

Sản phẩm rượu có thể dùng ở dạng *không chưng cất* hay *chưng cất*.

1.2. Cơ sở hoá sinh

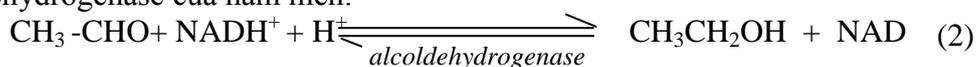
Lên men rượu là quá trình phân giải yếm khí đường dưới tác dụng của enzyme vi sinh vật đặc hiệu.

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



Pyruvic acid

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



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

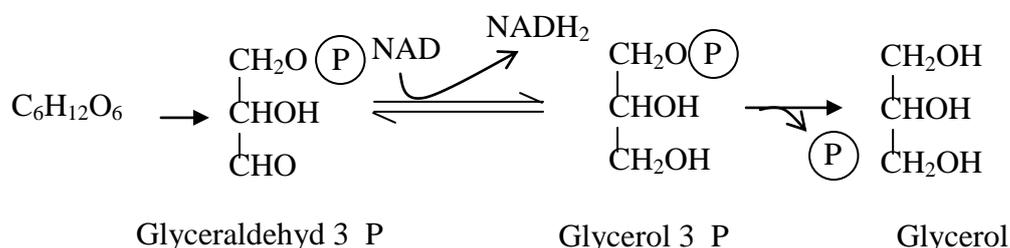
Tùy điều kiện của môi trường, sự lên men rượu có thể tiến hành theo các kiểu sau:

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

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

a. Thời kỳ cảm ứng:

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



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

b. Thời kỳ tĩnh:

Khi lượng acetaldehyd đã đạt tới mức nào đó thì chất này tiếp nhận hydro từ NADH₂ để chuyển rượu thành ethanol theo phản ứng (2):



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

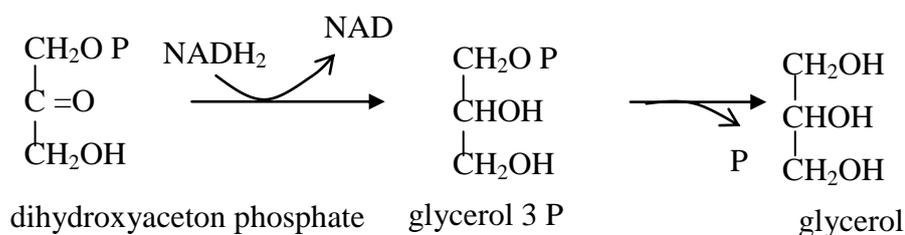
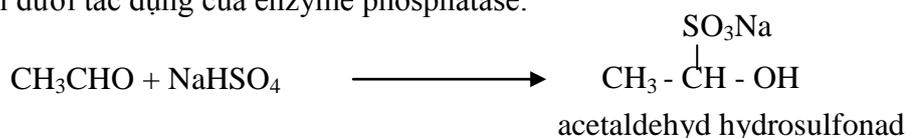


1.1.2. Lên men rượu và sự tạo thành glycerol

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

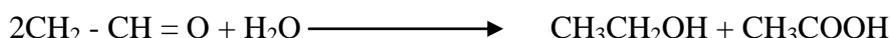
a. Sự lên men rượu trong môi trường có bisulfit:

Nguyên tắc của phương pháp này là chuyển acetaldehyd thành acetaldehyd hydrosulfonat khó tan bằng cách bổ sung NaHSO₃ vào môi trường. Khi đó, NADH₂ cho dihydroxyaceton phosphat tạo thành glycerol 3 P, chất này bị khử phosphat để tạo thành glycerol dưới tác dụng của enzyme phosphatase:

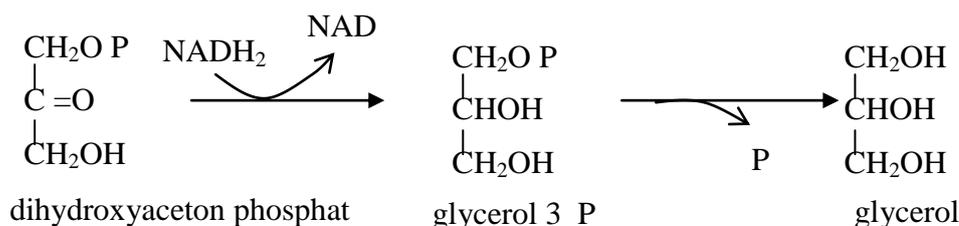


b. Sự lên men rượu trong môi trường kiềm:

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



Khi đó NADH₂ chuyển hydro cho dihydroxyaceton phosphat tạo thành glycerol 3 P, chất này bị khử phosphat để tạo thành glycerol nhờ enzyme phosphatase:



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

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

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

1.1.4. Sự tạo thành dầu khét (dầu fusel)

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

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

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

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

1.3. Sản xuất bia

*Sơ lược về bia

Bia, là một loại đồ uống chứa cồn được sản xuất bằng quá trình lên men của đường lơ lửng trong môi trường lỏng và nó không được chưng cất sau khi lên men.

Dung dịch đường không bị lên men gọi là hèm bia, thu được từ quá trình ngâm nước, hay "nước ủ bia", hạt ngũ cốc được ủ thành mạch nha, thông thường là lúa mạch.

Quá trình sản xuất bia được gọi là nấu bia. Do các thành phần sử dụng để sản xuất bia có khác biệt tùy theo từng khu vực, các đặc trưng của bia như hương vị và màu sắc cũng thay đổi rất khác nhau và do đó có khái niệm loại bia hay các sự phân loại khác.

*Lịch sử

Bia là một trong các đồ uống lâu đời nhất mà loài người đã tạo ra, có niên đại ít nhất là từ thiên niên kỷ 5 TCN và đã được ghi chép lại trong các thư tịch cổ của Ai Cập cổ đại và Lưỡng Hà (*Mesopotamia*).

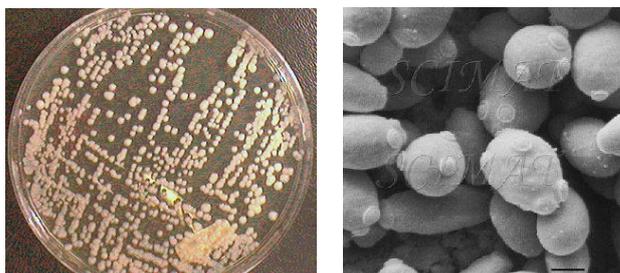
Việc kiểm định hóa học các bình gốm cổ phát hiện ra rằng bia đã được sản xuất khoảng 7.000 năm trước ở khu vực ngày nay là Iran và là một trong số các công nghệ sinh học đã biết, trong đó các quy trình sinh học của sự lên men được áp dụng.

Chứng cứ lâu đời nhất về bia được cho là bức vẽ 6.000 năm tuổi của người Sumeria miêu tả những người đang uống một thứ đồ uống bằng các cần hút bằng sậy từ thùng công cộng.

Bia cũng được đề cập tới trong *Thiên sử thi Gilgamesh*, một bản trường ca 3.900 năm tuổi của người Sumeria để tỏ lòng tôn kính nữ thần Ninkasi, vị thần bảo trợ cho bia, nó chứa công thức làm bia cổ nhất còn sót lại và miêu tả việc sản xuất bia từ lúa mạch.

Bia đã trở thành thiết yếu đối với tất cả các nền văn minh trồng ngũ cốc ở thế giới phương Tây cổ xưa, đặc biệt là ở Ai Cập và Lưỡng Hà.

Men bia



Hình 6.1. Nấm men bia *S. cerevisiae* khuẩn lạc (trái) tế bào (phải)

Men bia là các vi sinh vật có tác dụng lên men đường. Các giống men bia cụ thể được lựa chọn để sản xuất các loại bia khác nhau, nhưng có hai giống chính là men ale (*Saccharomyces cerevisiae*) và men lager (*Saccharomyces uvarum*), với nhiều giống khác nữa tùy theo loại bia nào được sản xuất. Men bia sẽ chuyển hóa đường thu được từ hạt ngũ cốc và tạo ra cồn và cacbon điôxít (CO₂). Trước khi các chức năng của men bia được hiểu rõ thì mọi

quá trình lên men đều sử dụng các loại men bia hoang dã. Mặc dù còn rất ít loại bia, chẳng hạn như bia lambic vẫn dựa trên phương pháp cổ này nhưng phần lớn các quá trình lên men ngày nay đều sử dụng các loại men bia được nuôi cấy và có độ tinh khiết cao. Trung bình, hàm lượng cồn trong bia là khoảng 4-6% rượu theo thể tích, mặc dù nó có thể thấp tới 2% và cao tới 14% trong một số trường hợp nào đó.

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

Độ đắng của bia thương phẩm được đo theo Thang đơn vị độ đắng quốc tế (IBUS). Trong khi cây hoa bia được trồng bởi nông dân trên khắp thế giới với nhiều giống khác nhau, nhưng nó chỉ được sử dụng trong sản xuất bia là chủ yếu.

Các loại bia

Bia hoa quả và bia rau cỏ là hỗn hợp với một số loại phụ gia từ hoa quả hay rau cỏ có thể lên men trong quá trình lên men, tạo ra chất lượng hài hòa một cách rõ nét. Bia thảo mộc và bia gia vị bổ sung các chất chiết ra từ [rễ](#), [hạt](#), [lá](#), [hoa](#) hay quả thảo mộc hoặc các loại cây gia vị thay vì (hoặc bổ sung cho) hoa bia. Bia hun khói là bất kỳ loại bia nào mà mạch nha của nó đã được hun khói. Thông thường các loại bia này có mùi và hương vị của khói. Các ví dụ điển hình của kiểu bia truyền thống này là bia Rauchbiers ở Bamberg, Đức. Tuy nhiên, nhiều nhà sản xuất bia ngoài nước Đức--chủ yếu là các nhà sản xuất bia thủ công ở Mỹ--cũng bổ sung mạch nha bia hun khói vào bia đen, ale Scotland và một loạt các kiểu bia khác.

Bia đặc biệt là cách gọi chung để chỉ các loại bia được sản xuất mà sử dụng các nguồn đường, hạt ngũ cốc và tinh bột có thể lên men không thông dụng.



Hình 6.2. Hoa houblon (*Humulus lupulus*)

Sơ đồ công nghệ sản xuất bia

Quy trình công nghệ sản xuất bia hiện nay được áp dụng trong nước cũng như trên thế giới đều theo các bước sau:

1. Ngâm ủ hạt và đường hoá: Giai đoạn đầu tiên của quá trình sản xuất bia, trong đó hạt ngũ cốc cần mạch nha hóa được ngâm trong nước ấm để kích thích nảy mầm nhằm

chiết ra mạch nha. Việc ngâm ủ cần phải đủ thời gian và nhiệt độ ổn định để các enzym có khả năng chuyển hóa tinh bột thành đường có khả năng lên men.

2. Lọc: Nước được lọc qua khối hạt ngâm ủ để hòa tan đường. Chất lỏng sẫm màu, chứa nhiều đường được gọi là hèm bia.

3. Nấu dịch đường với houblon: Hèm bia được luộc sôi cùng với các thành phần khác còn lại (ngoại trừ men bia), để loại bỏ bớt nước thừa và giết chết các loại vi khuẩn. Hoa bia (nguyên hay viên nhỏ) được thêm vào (hoặc sử dụng các chất chiết ra từ hoa bia).

4. Lên men: Men bia được thêm vào (hoặc rắc vào) và hỗn hợp được để cho lên men. Sau khi quá trình lên men sơ cấp, người ta có thể cho lên men thứ cấp, điều này cho phép men bia và các chất khác hoạt động lâu hơn. Một số nhà sản xuất bia có thể bỏ qua giai đoạn lên men thứ cấp và chỉ đơn giản là lọc bỏ bã men bia.

Ủ bia chín kéo dài ít nhất 4-5 tuần đủ để hình thành hương vị đặc trưng, và ổn định bia.

5. Đóng gói: Từ thời điểm này, bia chứa cồn, nhưng chưa có nhiều cacbon điôxít. Các nhà sản xuất bia có một số cách thức để tăng lượng cacbon điôxít. Cách phổ biến nhất được các nhà sản xuất lớn áp dụng là cacbonat hóa cưỡng bức, thông qua việc bổ sung trực tiếp khí CO₂ vào trong thùng bia hay chai bia.

Các nhà sản xuất nhỏ hoặc các nhà sản xuất có khuynh hướng cổ điển sẽ bổ sung "đường môi" hoặc một lượng nhỏ hèm bia vừa mới lên men vào đường ống dẫn cuối cùng, tạo ra sự lên men ngắn gọi là "bình ỏn thùng" hay "bình ỏn chai".

1.4. Sản xuất rượu vang

Rượu vang là một loại thức uống có cồn được lên men từ nho hoặc nước quả nhỏ, ngoài ra rượu vang còn có thể được làm từ một số loại nước quả khác. Rượu vang đã được uống từ thời Hy Lạp cổ điển trong các bữa ăn sáng và tiệc rượu ban đêm. Trong thế kỷ 1 TCN rượu vang cũng được người dân La Mã dùng trong các bữa ăn. Tuy nhiên người Hy Lạp và cả người La Mã đều pha loãng rượu vang với nước.



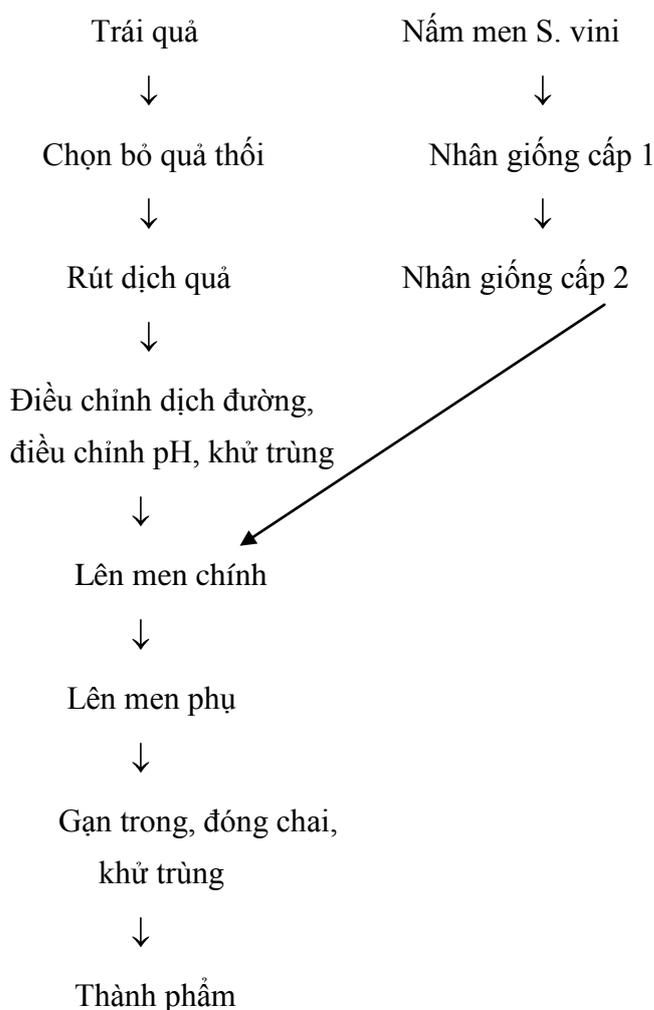
Hình 6.3. Nho (trái) và khung cảnh sản xuất rượu vang thời cổ (phải)

Trong khoảng từ thế kỷ 8 – 9 các nhà giả kim thuật đạo Hồi đã chưng cất rượu mạnh từ rượu vang.

Trước đây, Moldova là nước Cộng hòa có diện tích trồng nho và sản lượng rượu vang lớn nhất Liên Xô. Vang Moldova được bán trên khắp lãnh thổ Liên Xô (cũ). Moldova chỉ có 4,2 triệu dân nhưng là một trong số 10 quốc gia sản xuất rượu vang lớn nhất thế giới.

Hiện nay, trên thế giới có tới hàng trăm loại rượu vang khác nhau, mỗi loại được đặc trưng bởi một phương thức sản xuất riêng tùy vào đặc điểm của rượu và tính chất của công nghệ.

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



Hình 6.3. Sơ đồ công nghệ sản xuất rượu vang

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

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

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

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

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

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

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

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

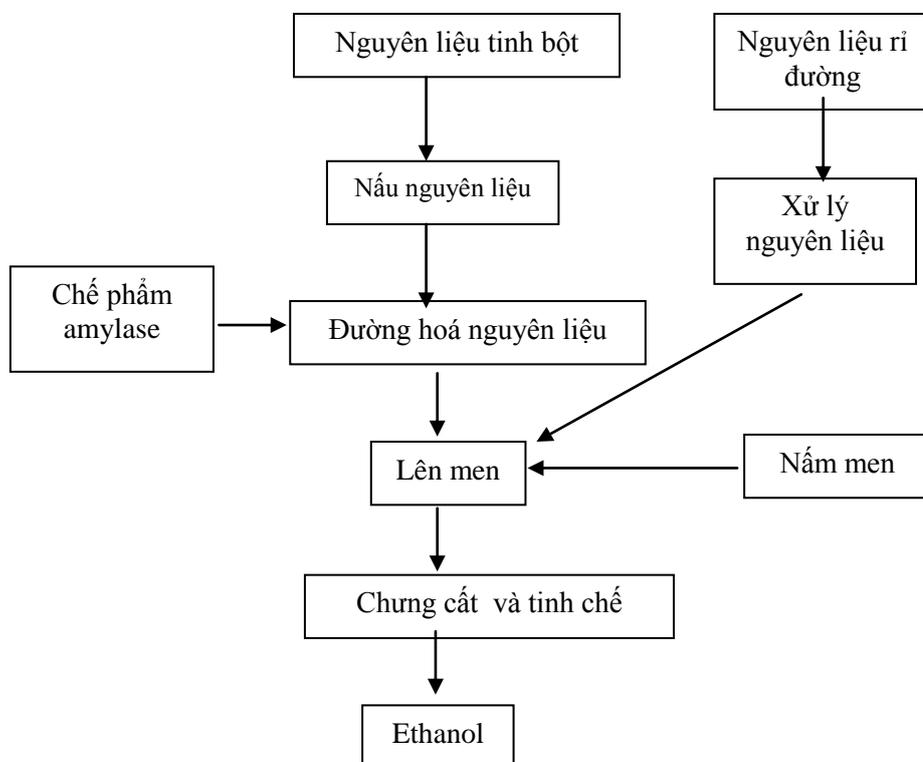
Rượu vang trắng được lên men từ quả đã được tách bã nên không có màu. Hương vị của rượu vang trắng chủ yếu do nước quả. Rượu vang trắng thường được lên men ở nhiệt độ thấp hơn rượu vang đỏ (khoảng 15 - 20⁰C) để giữ hương vị cho rượu. Thời gian lên men 6-7 ngày hoặc lâu hơn tùy theo nhiệt độ và yêu cầu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

1.4. Sản xuất rượu mạnh và cồn

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

Rượu ethanol (cồn) được con người xem là sản phẩm thực phẩm nhưng cũng lại là sản phẩm có nguy cơ độc hại đối với cơ thể. Tuy nhiên, sản lượng rượu ethanol được sản xuất

trên thế giới càng ngày càng tăng. Ở các nước có công nghiệp rượu vang phát triển như Italia, Pháp, Tây Ban Nha...Ethanol được dùng để tăng thêm nồng độ rượu. Một lượng khá lớn ethanol được dùng để pha chế các loại rượu mạnh như Whisky, Martin, Brandy, Napoleon, Rhum....Người ta có thể sản xuất rượu ethanol bằng phương pháp lên men vi sinh vật hoặc tổng hợp hoá học.



Hình 6.4. Sơ đồ công nghệ sản xuất rượu ethanol

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

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

+ Phương pháp acid: là phương pháp sử dụng acid (HCl, H₂SO₄) để chuyển hoá tinh bột thành đường. Phương pháp này thủy phân rất triệt để nên hiệu suất cao. Tuy nhiên, nó lại tạo ra nhiều sản phẩm đường không lên men khác do có quá trình thủy phân cellulose và hemicellulose, đồng thời nhiều acid amin bị phá hủy, thiết bị sử dụng đắt tiền do phải chịu được acid.

+ Phương pháp men thuốc bắc: là phương pháp sử dụng bánh men thuốc bắc để sản xuất rượu. Phương pháp này có đặc điểm là quá trình đường hoá và rượu hoá được tiến hành cùng một lúc do sự hoạt động đồng thời của nấm mốc và nấm men được gieo cấy từ bánh men

thuốc bắc; tinh bột không hồ hoá mà chỉ cần làm chín. Vì vậy, nó có nhược điểm là dễ bị nhiễm tạp, tinh bột sót nhiều, hiệu suất tổng thu hồi thấp.

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

Mục đích của *nấu nguyên liệu* là phá vỡ màng tế bào tinh bột và biến tinh bột thành trạng thái hoà tan trong nước. Hiện nay, trên thế giới có hai xu hướng về nhiệt độ nấu là 145-155⁰C trong thời gian dài hoặc 170-180⁰C trong thời gian ngắn. Trong quá trình nấu tinh bột sẽ được trương nở và hồ hoá.

Nguyên liệu tinh bột sau khi được hồ hoá được làm nguội về nhiệt độ 60 ± 2⁰C để thực hiện quá trình đường hoá. Chế phẩm amylase được sử dụng trong quá trình đường hoá được sản xuất từ các chủng nấm mốc khác nhau như: *Rhizopus*, *Mucor rouxii*, *Aspergillus* (*A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* ...)

Quá trình đường hoá được thực hiện trong trong 5 phút. Sau đó, dịch đường được làm nguội đến nhiệt độ lên men (36 ± 1⁰C).

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

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

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

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

Quá trình lên men dịch đường hoá có thể được thực hiện bằng phương pháp lên men gián đoạn, bán liên tục hoặc liên tục. Phương pháp lên men gián đoạn là cả quá trình lên men từ đầu đến cuối được thực hiện trong cùng một thiết bị; thời gian lên men khoảng 68-80 giờ ở nhiệt độ 36-37⁰C. Đặc điểm của phương pháp lên men bán liên tục là giai đoạn lên men chính thực hiện liên tục và xảy ra trong nhiều thùng lên men (thường là 6 thùng) và thời gian này kéo dài 60-62 giờ, giai đoạn cuối gián đoạn. Bản chất của phương pháp lên men liên tục là rải đều các giai đoạn lên men mà mỗi giai đoạn đó được thực hiện trong một hoặc nhiều thiết bị lên men có liên hệ với nhau. Hệ thống lên men liên tục thường có 11-12 thùng được nối với nhau bằng các ống chảy chuyên và van điều chỉnh. Kết thúc quá trình lên men ta thu được dấm chín với nồng độ rượu khoảng 7-9%.

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

2. Lên men ethanol nhờ vi khuẩn:

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

2.1. Cơ sở hoá sinh

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

2.2. Sản xuất ethanol nhờ *Zymomonas mobilis*

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

Từ dịch ép lên men của cây dứa dại (*Agave americana*) ở vùng Mexico người ta đã phân lập được một loài vi khuẩn hình que, di động, có lông roi ở hai cực, có khả năng tạo thành ethanol. Người ta để ý rằng trong ethanol mạnh chế từ dứa dại, các nguyên tử cacbon số 2 và số 3 cũng như số 5 và số 6 đã thay thế các nguyên tử cacbon số 1 và số 2 cũng như số 5 và số 6 trong ethanol chế từ nấm men.



Hình 6.5. Vi khuẩn *Zymomonas mobilis* và cây dứa dại *Agave americana*

II. LÊN MEN LACTIC

1. Sữa và các sản phẩm từ sữa

1.1. Các thành phần của sữa

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

Protein của sữa có chứa nhiều và hài hoà các acid amin và có hai kiểu protein khác nhau là protein hoà tan (albumin, immunoglobulin, lisozim, lactoferin, lactoperoxidase...) và protein ở trạng thái keo không bền bao gồm một phức hệ mixen của caseinat và canxiphosphat có bề mặt rất háo nước. Sữa tươi luôn có độ pH xấp xỉ 6,6-6,7, đồng thời do các mixen mang điện tích âm nên đẩy nhau nhằm đảm bảo độ bền keo của dung dịch. Khi giảm độ pH (do kết quả của quá trình lên men tạo acid lactic), các ion H^+ của acid sẽ liên kết với các mixen làm giảm điện tích. Đến một giới hạn nhất định, casein sẽ đông tụ. Casein đông tụ tốt nhất ở $pH = 4,5-4,7$.

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

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

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

1.2. Các sản phẩm lên men từ sữa

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

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

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

+ *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*): là vi khuẩn lên men điển hình, phát triển tốt ở nhiệt độ 45-50⁰C trong môi trường có độ acid cao. Loài này có thể tạo ra trong khối sữa đến 2,7% acid lactic từ đường lactose.

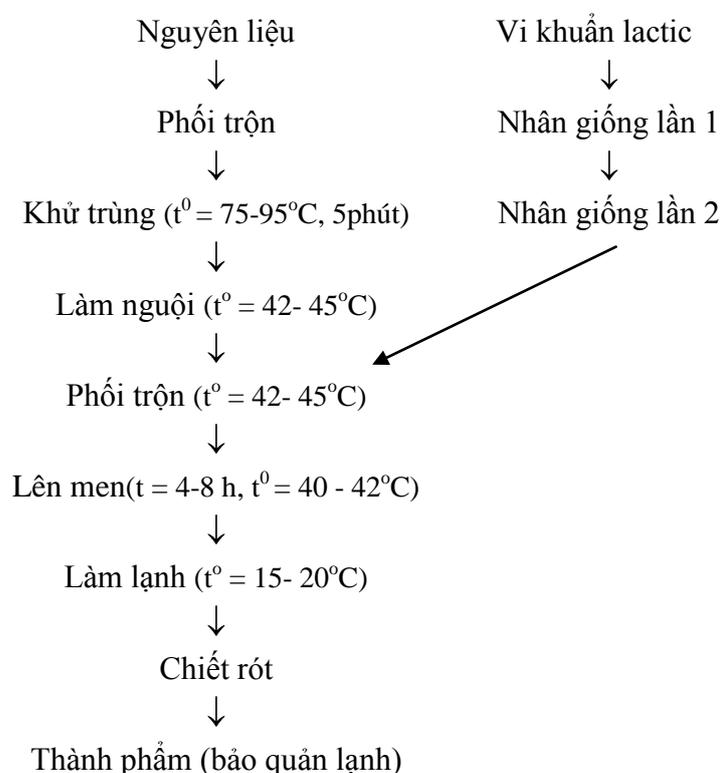
+ *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*): Phát triển tốt ở nhiệt độ 50⁰C và sinh sản tốt ở nhiệt độ 37-40⁰C. Đây cũng là vi khuẩn lactic chịu nhiệt lên men điển hình, có thể chịu được nhiệt độ đun nóng đến 65⁰C trong 30 phút nhưng chỉ phát triển được trong môi trường acid thấp hơn *L.bulgaricus*.

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

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

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

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



Hình 6.6. Sơ đồ công nghệ sản xuất sữa chua

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

Quy trình công nghệ sản xuất sữa chua theo sơ đồ hình 6.6.

1.2.2. Công nghệ sản xuất fromage

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

Sản xuất fromage gồm ba giai đoạn chính như sau:

Quy trình sản xuất fromage theo sơ đồ hình 6.7.



Hình 6.7. Sơ đồ công nghệ sản xuất fromage

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

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

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

Trong thực tế vi khuẩn lactic và nấm mốc được sử dụng trong công nghiệp sản xuất fromage nhiều hơn cả. Các loại vi khuẩn lactic thường được sử dụng trong sản xuất fromage

như: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus helveticus*. Các chế phẩm nấm mốc thường được sử dụng trong sản xuất fromage là: *Penicillium candidum* và *Penicillium glaucum*.

2. Acid lactic:

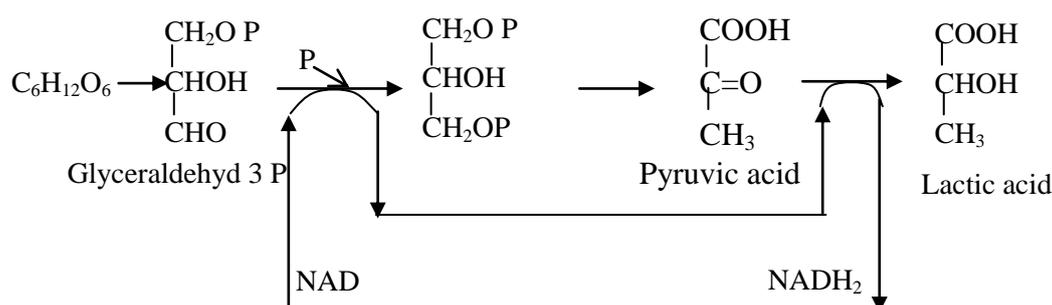
2.1. Sinh tổng hợp

Acid lactic tồn tại rộng rãi trong tự nhiên và đóng vai trò quan trọng trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau như: chế biến thực phẩm, y dược, thuốc da... Tùy theo chủng vi khuẩn lactic sử dụng trong sản xuất mà có hai kiểu lên men lactic là lên men đồng hình và lên men dị hình.

Trong kiểu lên men đồng hình thực tế chỉ sinh ra acid lactic. Để lên men công nghiệp, người ta thường dùng các giống *Lactobacillus delbrueckii* và *Lactobacillus bulgaricus*.

Trong sự lên men đồng hình, sự phân giải glucose giống như lên men rượu tới giai đoạn tạo thành pyruvat (theo con đường Embden - Mayerhoff - Parnas). Sau đó, nhờ Lactat dehydrogenase, pyruvat được khử bởi NADH_2 (coenzyme khử này được tạo thành do sự tách H_2 của glyceraldehyd 3 P trong quá trình đường phân) để tạo thành acid lactic.

Sự lên men lactic đồng hình được biểu diễn theo sơ đồ sau:



Sự lên men lactic dị hình xảy ra theo sơ đồ hình 6.8

Trong sự lên men lactic dị hình, nhiều sản phẩm khác nhau được tạo thành. Các tác nhân gây lên men lactic dị hình là *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*

Sự lên men lactic dị hình xảy ra khi vi khuẩn gây lên men thiếu enzyme cơ bản của sự đường phân là aldolase và trioso isomerase. Khi đó, glucose được chuyển hoá theo con đường pentosophosphat từ glucoso 6 phosphat đến xiluloso 5 phosphat. Sau đó, dưới tác dụng của enzyme pentosophosphat cetolase mà xiluloso 5 phosphat bị phân ly tạo thành glyceraldehyd 3 phosphat và acetyl phosphat. Acetyl phosphat có thể được chuyển hoá tiếp tục thành ethanol hoặc acid acetic tùy theo hệ enzyme của từng vi sinh vật. Còn glyceraldehyd 3 phosphat thì bị khử H_2 để chuyển thành acid lactic giống như trường hợp lên men lactic đồng hình.

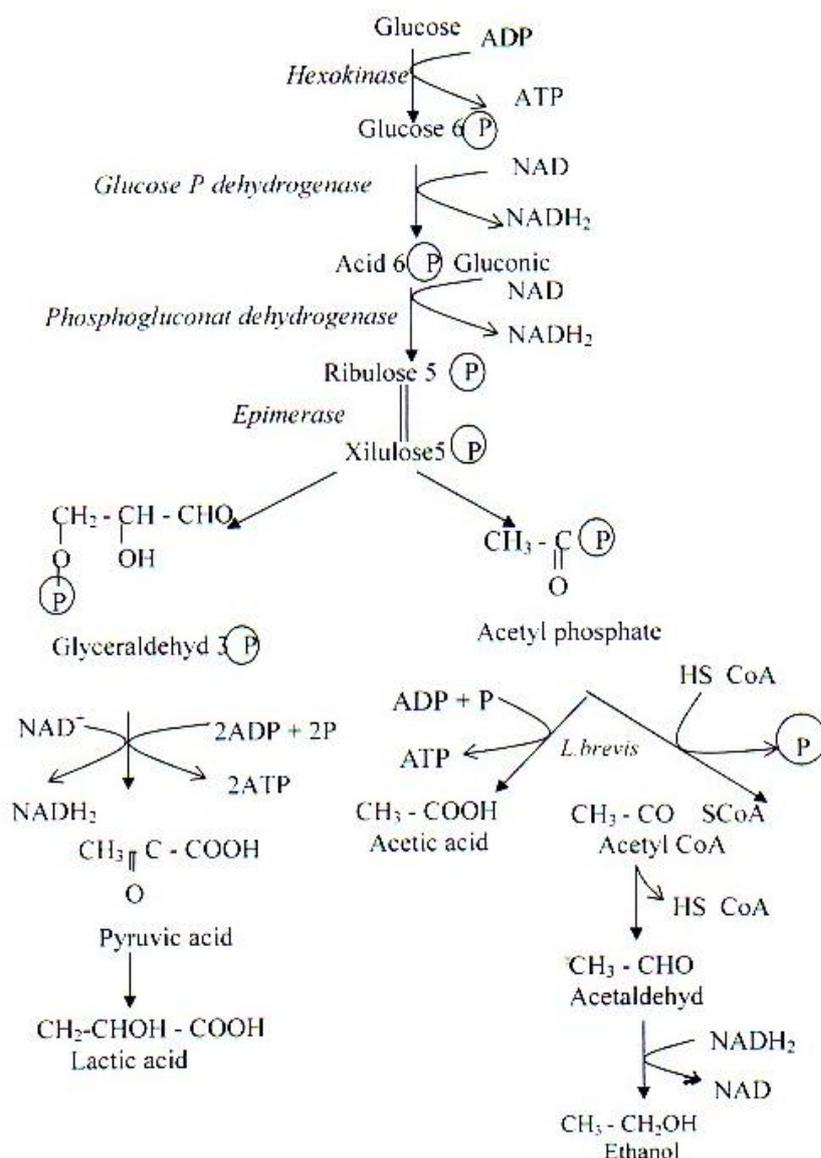
Sự lên men lactic dị hình được ứng dụng trong lên men thức ăn gia súc và muối chua rau quả. Các vi khuẩn có khả năng gây lên men các đường mono và disaccharid (sau khi đã thủy phân thành monosaccharid nhờ enzyme tương ứng của vi khuẩn).

2.2. Công nghệ sản xuất

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

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

Dịch lên men có chứa đường cần được bổ sung các chất dinh dưỡng là các nguồn nitơ như cao ngô, mầm đại mạch, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sau khi thanh trùng, dịch lên men được làm nguội xuống 50°C và bổ sung CaCO_3 .



Hình 6.8. Sơ đồ sự lên men lactic dị hình

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

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



Hình 6.9. Quy trình công nghệ sản xuất lactic acid

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

III. LÊN MEN 2,3 BUTADIOL

1. Vi sinh vật

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

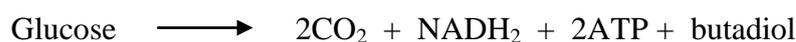
2. Cơ chế sinh hoá của quá trình lên men butadiol

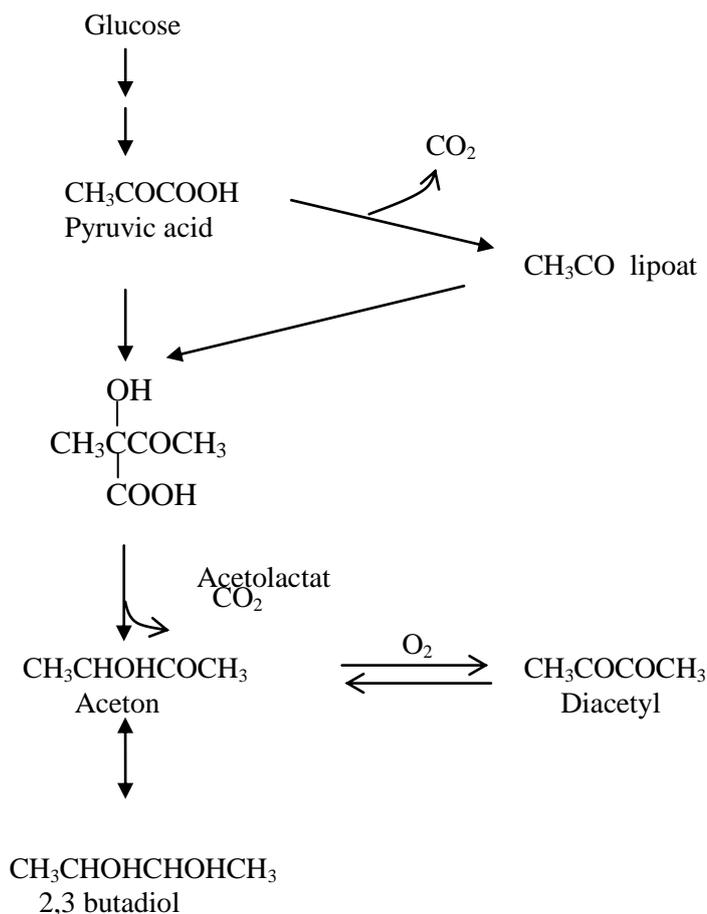
Cơ chế trao đổi chất tạo thành butadiol của vi sinh vật từ glucose xảy ra theo sơ đồ hình 6.10.

Đi từ glucose, pyruvic acid được tạo thành theo con đường phân. Nếu cơ chất ban đầu là đường pentose thì nó đi theo con đường pentosophosphat để đạt được glyceraldehyd 3 phosphate, sau đó chất này sẽ chuyển thành pyruvate theo con đường đường phân.

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

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





Hình 6.10. Cơ chế trao đổi chất tạo thành butadiol của vi sinh vật

3. Cơ chất và hiệu suất lên men

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

Ví dụ:

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

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

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

* *Nhiệt độ*:

Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng của vi khuẩn có khả năng sinh ra butadiol nằm trong khoảng 30-37⁰C. Nếu tăng nhiệt độ từ 33 lên 37⁰C thì khả năng lên men butadiol của

Klebsiella pneumoniae giảm 66% nhưn đối với chủng *Enterobater aerogenes* thì hiệu quả này không thể hiện rõ.

*** pH:**

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

***Oxy:**

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

Nồng độ đường ban đầu:

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

IV. LÊN MEN BUTANOL- ACETON

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

Tác nhân gây lên men butanol-aceton là chủng vi khuẩn *Clostridium acetobutlicum*. Đây là vi khuẩn yếm khí do đó sản phẩm lên men chỉ thu được trong điều kiện lên men không có oxy. Cơ chế hóa sinh quá trình lên men butanol-aceton theo Cleuberg theo sơ đồ hình 6.11

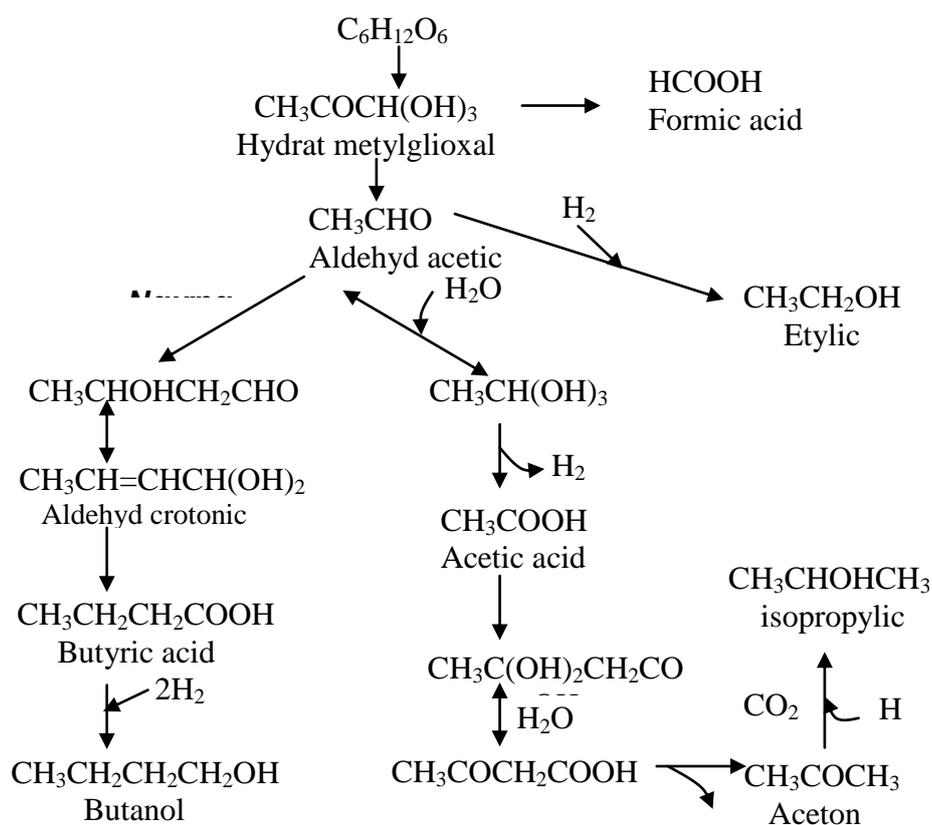
2. Quy trình sản xuất công nghiệp

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

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

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

Quá trình lên men aceton-butanol có thể chia làm hai thời kỳ: Ở thời kỳ đầu, trong môi trường lên men tích tụ acid (nên có tên gọi là lên men acid), song thời kỳ thứ hai thì trong môi trường tích tụ butanol, ethanol và aceton.



Hình 6.11. Cơ chế hóa sinh quá trình lên men butanol-aceton

*TÓM TẮT CHƯƠNG

Các loại thực phẩm cổ truyền có lịch sử lâu đời và được sử dụng hàng ngày chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp thủ công. Các quy trình công sản xuất các sản phẩm lên men phục vụ đời sống con người như: ethanol, rượu vang, bia, sữa và các sản phẩm từ sữa, butadiol, butanol- acetone dựa trên cơ sở khoa học đã khẳng định nhiều ưu thế và phát triển mạnh trong những năm gần đây.

*Câu hỏi ôn tập chương 6

1. Trình bày những điểm giống và khác nhau chủ yếu trong các quá trình sản xuất bia, rượu vang và rượu ethanol.
2. Phân tích vai trò của các nguyên liệu ảnh hưởng đến thành phẩm trong sản xuất bia.
3. So sánh hai phương pháp lên men cổ điển và lên men hiện đại trong sản xuất bia. Phân tích ưu nhược điểm của hai phương pháp đó.
4. Cơ chế và quy trình sản xuất sữa chua và fromage giống và khác nhau ở những điểm cơ bản nào? Hãy phân tích.
5. Cơ chế lên men lactic dị hình và đồng hình giống và khác nhau ở những điểm nào?

6. Trình bày quy trình sản xuất acid lactic công nghiệp.
7. Trình bày cơ chế hoá sinh và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men butadiol.
8. Cơ chế quá trình lên men aceton-butanol diễn ra như thế nào? Trong quá trình này ngoài hai sản phẩm chính là butanol và aceton còn có những sản phẩm phụ nào?

*** Tài liệu đọc thêm**

1. Biền Văn Minh (chủ biên). 2006. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBGD.
2. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biền Văn Minh. 1998. Vi sinh học, công nghiệp, NXBGD, Hà Nội.

*** Tài liệu tham khảo**

1. Kiều Hữu Ảnh. 1999. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBKHKKT.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty. Vi sinh vật học, 1997, NXBGD.
3. Phạm Thành Hồ. 2005. Nhập môn công nghệ sinh học, NXBGD.
4. Nguyễn Thị Hiền, 2006. Công nghệ sản xuất mì chính và các sản phẩm lên men cổ truyền, NXB KH&KT, Hà Nội.
5. Lương Đức Phẩm, 2006. Nấm men công nghiệp, NXB KH&KT, Hà Nội.

6. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

*** Giải thích thuật ngữ**

Các loại đồ uống chứa cồn: Thường các loại đồ uống có chứa cồn được chia theo nồng độ cồn có bên trong:

- ***Kefir*** (*kefir*): có nồng độ nhiều nhất là 3%
- ***Bia***: 1 – 12%, thường ở vào khoảng 5%
- ***Rượu vang*** (*vin*): 7 – 14% thường vào khoảng 12%
- ***Rượu mùi***: khoảng 15 – 75%, thông thường dưới 30%
- ***Rượu mạnh***: thường vào khoảng 30 – 55%

Các loại rượu vang: Dựa vào màu sắc

- Rượu vang đỏ* có được khi thực hiện lên men nước quả nho lẫn với xác
- Rượu vang trắng* được lên men từ quả đã được tách bã nên không có màu

IBUS (Integrated Biomass Utilisation System): Thang đơn vị độ đáng quốc tế.

Chương 7: CÁC CHẤT TRAO ĐỔI BẬC MỘT

I. NGUYÊN LÝ CỦA SỰ TỔNG HỢP THỪA

Vi sinh vật tồn tại trong tự nhiên sinh ra các sản phẩm trao đổi chất và các thành phần tế bào chỉ ở *mức độ cần thiết* cho sự sinh sản tối ưu và cho sự duy trì loài.

Trong điều kiện tự nhiên không có sự sản sinh dư thừa các chất trao đổi bậc một, bậc hai và các enzyme.

Chỉ khi những cơ thể thích hợp, thu được do xử lý bằng các tác nhân gây đột biến được chọn lọc trong phòng thí nghiệm thì người ta mới có thể nhận được các chủng tổng hợp thừa bị sai hỏng trong cơ chế điều hòa. Những chủng này được coi là những chủng có năng suất cao và được dùng trong sản xuất công nghiệp.

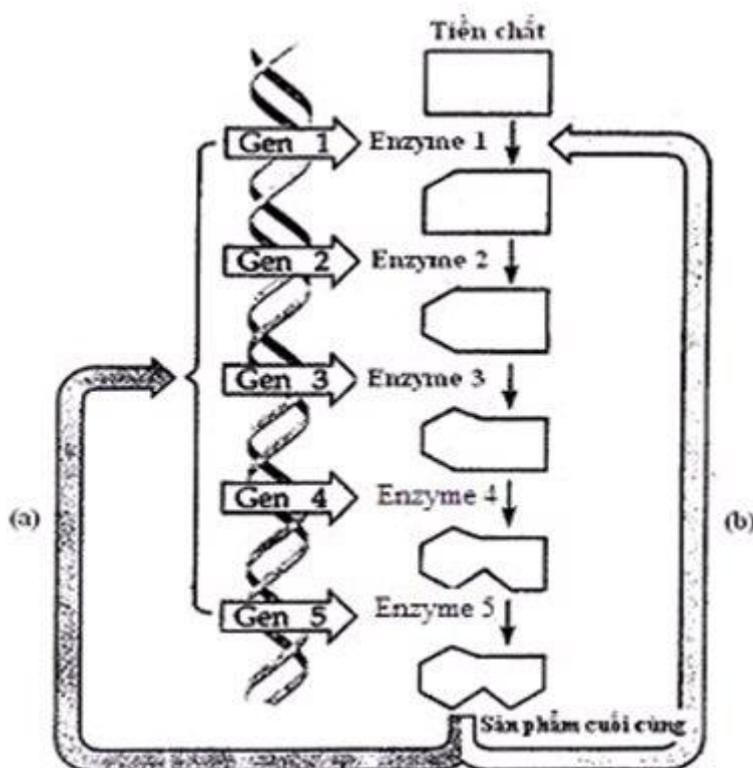
1. Những nguyên tắc điều hòa trao đổi chất

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

(a) Điều hòa *hoạt tính enzyme* nhờ sự ức chế (inhibition) bằng sản phẩm cuối cùng (còn được gọi là sự kìm hãm theo liên hệ ngược).

(b) Điều hòa *sự tổng hợp enzyme* nhờ sự kiểm chế (repression) bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiểm chế.

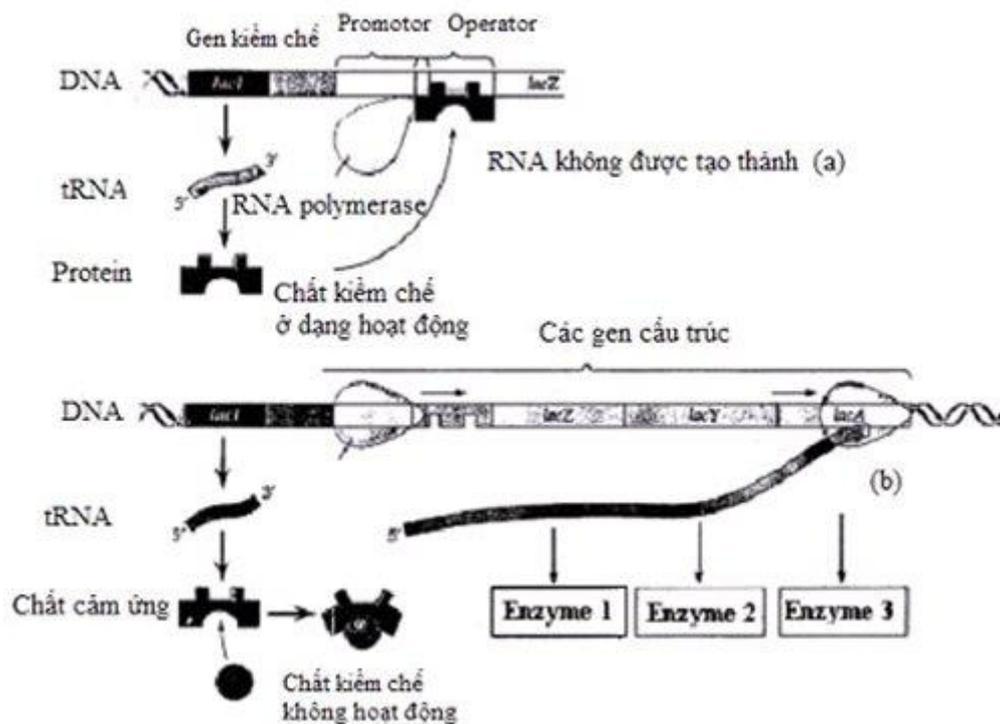
(c) Điều hòa *sự tổng hợp enzyme* nhờ sự kiểm chế dị hóa (catabolic repression).



Hình 7.1. Các cơ chế điều hoà trao đổi chất

a. Kiểm chế sự tổng hợp enzyme

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



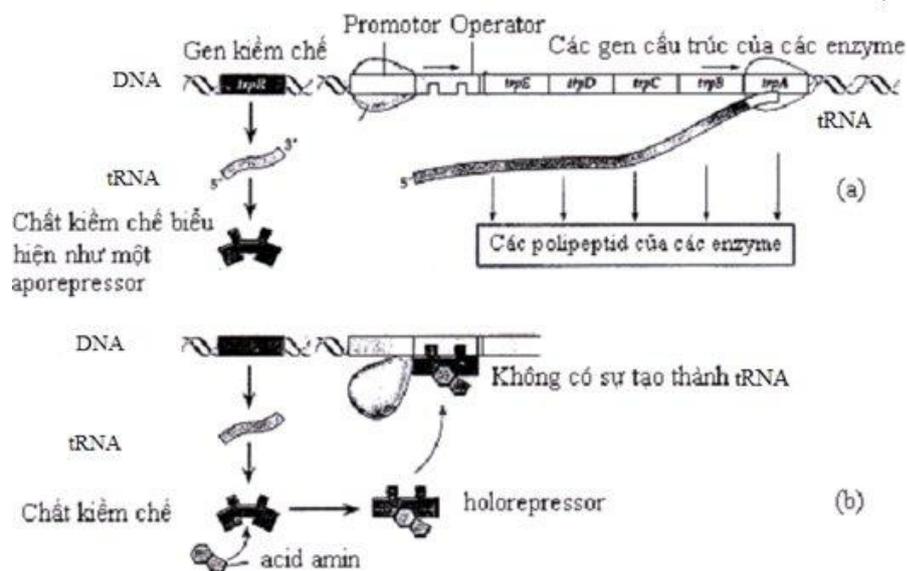
Hình 7.2. Điều hoà sự tổng hợp các enzyme cảm ứng

a) Khi không có mặt chất cảm ứng

b) Khi có mặt chất cảm ứng

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

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



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

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



Hình 7.4. Ví dụ về sự kiểm chế sự tổng hợp enzyme bởi sản phẩm cuối cùng (chẳng hạn một acid amin)

- a) Khi sản phẩm cuối cùng có mặt ở nồng độ thấp
- b) Khi sản phẩm cuối cùng có mặt ở nồng độ cao.

2.3. Đột biến tác động lên kiểm chế dị hóa

Toàn bộ những sai hỏng tương ứng cũng có thể biểu hiện ở sự cảm ứng enzyme. Nhờ những sai hỏng ấy mà các enzyme cảm ứng trở thành các enzyme cấu trúc, nghĩa là chúng tồn tại trong tế bào không phụ thuộc vào cơ chất. Sự kiểm chế dị hóa cũng có thể bị mất đi do đột biến.

II. CÁC PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỂ TỔNG HỢP THỪA

1. Các cơ chế điều hoà enzyme mở đầu

Nhiều chất trao đổi bậc một được tổng hợp nhờ các con đường trao đổi chất phân nhánh mà ở đó có nhiều sản phẩm được tạo thành. Sự ức chế bởi sản phẩm cuối cùng do một sản phẩm của một con đường phân nhánh dẫn đến hậu quả là cả những sản phẩm khác cũng không được tạo thành.

Các con đường trao đổi chất phân nhánh đòi hỏi một sự điều hoà phân hóa. Phù hợp với điều này là ba nguyên lý đã được chứng minh. Chúng liên quan tới cơ chế điều hoà enzyme mở đầu của một chuỗi phản ứng

- Sự có mặt của nhiều *izoenzyme*, mỗi enzyme bị ức chế bởi một sản phẩm cuối cùng.
- Sự *ức chế tích lũy* trong đó một enzyme bị ức chế từng phần bởi mỗi sản phẩm cuối cùng. Tác dụng của các sản phẩm cuối cùng cộng lại sẽ dẫn đến sự ức chế hoàn toàn.

- Sự ức chế đa trị (*phối hợp hay hợp tác*), trong đó một enzyme chỉ bị ức chế bởi tác dụng kết hợp của tất cả các sản phẩm cuối cùng. Một sản phẩm cuối cùng riêng sẽ không có tác dụng ức chế.

Trong các chủng tổng hợp thừa, sự phá vỡ ức chế do liên kết trở lại đạt được nhờ những kiểu sai hỏng về di truyền sau đây:

- Sai hỏng trong sự tạo thành sản phẩm cuối cùng nhờ khuyết một enzyme (*các thể đột biến trợ dưỡng*). Bằng cách bổ sung hạn chế sản phẩm cuối cùng, sinh trưởng sẽ xảy ra, song sự tích lũy nội bào của chất trao đổi gây ra sự ức chế trở lại bị ngăn cản.

- Sai hỏng về điều hòa. Các thể đột biến sai hỏng về điều hòa có thể bị sai hỏng trong trung tâm điều hòa của enzyme dị lập thể hoặc sai hỏng cơ chế kiểm chế do một đột biến của gen điều hòa hay gen operator. Kết quả là gây ra sự tổng hợp enzyme một cách cấu trúc.

Thường thì các chủng năng suất cao là những thể đột biến nhiều lần có cả hai loại sai hỏng. Có nhiều phương pháp chọn lọc có hiệu quả dùng để tạo ra và phân lập các thể đột biến thuộc cả hai kiểu.

2. Kỹ thuật penicillin

Để làm phong phú các thể *đột biến trợ dưỡng* ở vi khuẩn người ta sử dụng kỹ thuật penicillin. Trong phương pháp này các điều kiện được lựa chọn sao cho các tế bào kiểu hoang dại, ví dụ phát triển được khi không có mặt một amino acid nào đó, bị giết chết nhờ penicillin. Penicillin chỉ tác dụng lên các tế bào đang sinh trưởng. Các thể đột biến trợ dưỡng cần amino acid này sẽ không sinh trưởng được và do đó sống sót. Đối với các vi khuẩn không mẫn cảm với penicillin có thể dùng các chất kháng sinh khác, ví dụ kanamycin hay cycloserine. Với nấm men thì dùng nystatin là thích hợp.

Bằng việc dùng các tác nhân gây đột biến có thể nâng tần số đột biến tới mức thể đột biến cần tìm có thể xuất hiện trong số 10^5 - 10^8 tế bào. Để gây đột biến có thể dùng ánh sáng tử ngoại, các tia ion hóa hoặc các tác nhân hóa học như nitrite, hydroxylamine, nitrosomethylguanidine hay ethylmethansulfonate. Dùng hai loại cuối cùng có thể đạt được một tốc độ đột biến đặc biệt cao trong đó có cả các thể đột biến kép. Ví dụ khi xử lý bằng ethylmethansulfonate đã thu được 1-10% các thể đột biến trợ dưỡng trong số các tế bào sống sót.

Các tế bào của thể đột biến trợ dưỡng được làm giàu nhờ kỹ thuật penicillin sau khi loại penicillin nhờ penicillinase trước tiên được cấy lên môi trường thạch dinh dưỡng đủ để thu nhận những khuẩn lạc riêng biệt. Bằng cách cấy chuyển song song các khuẩn lạc lên môi trường tối thiểu và lên thạch chứa yếu tố sinh trưởng có thể dễ dàng nhận ra và phân lập các thể đột biến trợ dưỡng. Việc cấy chuyển diễn ra nhờ kỹ thuật đóng dấu tức là nhờ một con dấu nhưng đưa các khuẩn lạc từ một hộp petri này sang một hộp petri khác.

Để phân lập các thể đột biến sai hỏng về điều hòa có hai phương pháp thích hợp: phương pháp dùng chất chống chất trao đổi và phương pháp phân lập các thể hồi biến từ các thể đột biến trợ dưỡng.

3. Phương pháp dùng chất chống chất trao đổi

Chất chống chất trao đổi là những hợp chất tương tự về cấu trúc với một chất trao đổi nào đó, ví dụ methionine và ethionine. Do sự giống nhau của chúng, các chất chống trao đổi chất được tham gia vào quá trình trao đổi chất. Song vì không thể hoàn thành các chức năng của chất trao đổi nên chúng gây tác dụng ức chế trao đổi chất và thường giết chết tế bào. Sự ức chế có thể do nhiều nguyên nhân gây ra.

(a) Chất chống chất trao đổi, ví dụ một chất tương tự của amino acid, do được gắn vào một protein enzyme, sẽ làm cho enzyme này bất hoạt.

(b) Chất chống chất trao đổi cạnh tranh với chất trao đổi về trung tâm hoạt động của một enzyme và do vậy ngăn cản sự chuyển hóa của chất trao đổi. Trường hợp malonate ức chế sự loại hydro của succinate là một ví dụ.

(c) Các chất chống chất trao đổi xuất hiện ở vị trí của sản phẩm cuối cùng của một chuỗi tổng hợp, do kết hợp với enzyme dị lập thể mà làm giảm hoạt tính của nó hay do phản ứng với chất kiểm chế mà làm giảm sự tổng hợp các enzyme. Vì vậy sự tổng hợp của chất trao đổi thật sự bị ngăn cản và do đó sinh sản của tế bào bị ức chế.

Các chất chống trao đổi mà tác dụng ức chế do trường hợp thứ ba gây ra có ý nghĩa đối với việc chọn lọc các thể đột biến sai hỏng về điều hòa. Để chọn các thể đột biến kiểu này người ta cấy lên một đĩa petri chứa môi trường dinh dưỡng có bổ sung chất chống chất trao đổi một huyền dịch tế bào đậm đặc (khoảng 10^8 tế bào/đĩa) đã được xử lý trước bằng một tác nhân gây đột biến. Tuy có sự bổ sung chất chống chất trao đổi song trên đĩa thạch vẫn xuất hiện một số khuẩn lạc tế bào. Đây là các tế bào kháng các chất chống chất trao đổi. Nguyên nhân của sự kháng này có thể là, các tế bào, do một sự sai hỏng về điều hòa, đã tổng hợp nên một số lượng lớn các chất trao đổi thật sự, giống với các chất chống chất trao đổi. Điều này khiến cho chất chống chất trao đổi bị pha loãng tới mức trở nên vô tác dụng.

Khuẩn lạc của các thể đột biến kiểu này thường dễ nhận ra do được bao quanh bởi một vùng các khuẩn lạc vệ tinh. Các khuẩn lạc vệ tinh phát triển được là do các tế bào đề kháng đã tiết ra chất trao đổi bình thường làm giảm nồng độ chất chống chất trao đổi đối với các tế bào nằm xung quanh. Phương pháp dùng chất chống chất trao đổi giúp ta phân lập các thể đột biến bị hư hại trong sự ức chế bởi sản phẩm cuối cùng cũng như các thể đột biến bị rối loạn về cơ chế kiểm chế.

4. Phương pháp phân lập các thể hồi biến của các chủng trợ dưỡng

Trong phương pháp này người ta đi từ các thể đột biến là trợ dưỡng đối với sản phẩm cuối cùng, ví dụ một amino acid. Ở đây người ta quan tâm trước hết đến các thể đột biến mà tính trợ dưỡng của chúng do một sự hư hại trong enzyme dị lập thể gây ra. Từ đây có thể thu được những thể hồi biến với trung tâm xúc tác trở lại hoạt động bình thường, song trung tâm điều hòa, nơi sản phẩm cuối cùng tấn công vào, thì không.

Để phân lập những thể đột biến như vậy người ta cấy khoảng 10^{10} tế bào của thể đột biến trợ dưỡng lên một môi trường dinh dưỡng tối thiểu. Tuyệt đại đa số các tế bào sẽ không sinh trưởng. Song một số khuẩn lạc của các thể đột biến, do lấy lại được khả năng tổng hợp

sản phẩm cuối cùng, đã sinh trưởng được. Điều đó có nghĩa là enzyme bị hư hại đã thu lại hoạt tính xúc tác nhờ một đột biến thứ hai.

Trong một vài trường hợp, tuy đột biến thứ hai hồi phục được hoạt tính enzyme song không hồi phục được tính miễn cảm với chất hiệu ứng dị lập thể. Nhờ vậy sẽ xuất hiện một thể đột biến có hoạt tính enzyme đầy đủ nhưng lại khuyết về khả năng điều hòa dị lập thể. Thông thường các thể đột biến này tiết sản phẩm cuối cùng tương ứng ra môi trường và người ta có thể nhận biết được điều đó nhờ một vòng các khuẩn lạc vệ tinh.

Từ ví dụ về sự chọn lọc nhiều bước các thể đột biến chứa các enzyme đã mất tính miễn cảm dị lập thể có thể thấy rõ những biện pháp nào là cần thiết nhằm thu được các chủng có những tính chất mong muốn. Tiền đề của điều đó là phải hiểu biết chính xác các con đường trao đổi chất dẫn đến sự tạo thành các chất trao đổi, kể cả sự điều hòa chúng. Điều này quan trọng trước hết đối với các sản phẩm mà sự tạo thành chúng do nhiều sai hỏng về điều hòa gây ra. Trong những trường hợp này cần phải tìm cách gây đột biến nhiều lần đối với một chủng nào đó hoặc sử dụng các phương pháp truyền thông tin di truyền.

III. AMINO ACID

Các amino acid, cùng với các nucleotide và vitamin, là những nhân tố sinh trưởng thường được sử dụng như các loại dược phẩm hoặc chất bổ sung cho thực phẩm.

Các amino acid được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, làm các chất bổ sung trong y học, và làm nguyên liệu khởi đầu trong công nghiệp hóa học (bảng 7.1) .

Bảng 7.1. Các amino acid được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm

Amino acid	Sản lượng thế giới hàng năm (tấn)	Đề bổ sung vào	Mục đích
Glutamic acid	370.000	Nhiều loại thực phẩm	Tăng vị, làm mềm thịt
L-aspartic và alanine	5.000	Dịch quả, đồ ngọt	Làm dịu vị
Glycine	6.000	Đồ ngọt	Tăng vị
L-cysteine	700	Bánh mì Dịch quả	Tăng chất lượng Chống oxy hóa
L-Tryptophan + L-histidine	400	Nhiều loại thực phẩm, Sữa bột	Chống oxy hóa, chống ôi, tăng dinh dưỡng
Aspartame (phenylalanine +L-Aspartate)	7.000	Đồ uống nhẹ	Giảm calo
L-lysine	70.000	Bánh mì (Nhật), thực phẩm	Tăng dinh dưỡng
DL-methionine	70.000	Sản phẩm đậu tương, thực phẩm	Tăng dinh dưỡng

1. Sản xuất các amino acid nhờ vi sinh vật

Hàng loạt vi sinh vật tích lũy các amino acid trong dịch nuôi cấy. Tuy nhiên chỉ có vi khuẩn mới có năng suất đủ đảm bảo sản xuất các amino acid ở quy mô thương mại. Vì rằng các amino acid là các thành phần không thể thiếu của các tế bào vi sinh vật và sự sinh tổng

hợp chúng được điều khiển có mục đích để duy trì ở một mức độ tối ưu, thông thường chúng được tổng hợp ở một số lượng hạn chế và bị kiểm tra bởi cơ chế điều chỉnh theo kiểu *liên hệ ngược âm*. Vì vậy cần phải vượt qua sự điều chỉnh để đạt được sự sản xuất thừa các amino acid. Việc sản xuất thừa amino acid ở vi sinh vật có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp sau đây :

1. Kích thích tế bào thu nhận nguyên liệu ban đầu;
2. Cản trở các phản ứng phụ;
3. Kích thích sự tạo thành và nâng cao hoạt tính của các enzyme sinh tổng hợp;
4. Kim hãm hoặc hạn chế các enzyme tham gia vào sự phân giải các amino acid được tạo ra;
5. Kích thích sự tiết sản phẩm vào vùng không gian ngoại bào.

Những yêu cầu trên đã đạt được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đột biến.

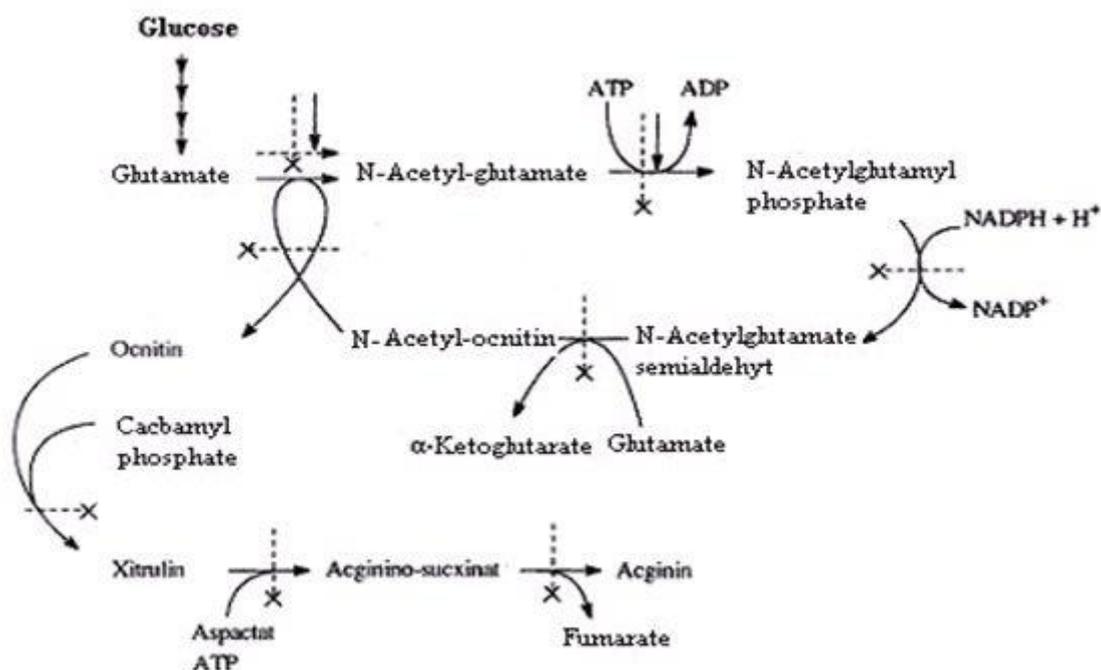
2. Sản xuất các amino acid nhờ các thể đột biến trợ dưỡng

Sự sản xuất các amino acid bằng các thể đột biến trợ dưỡng dựa trên nguyên tắc này. L- ornithine được sản xuất nhờ một sản phẩm trung gian trong quá hình sinh tổng hợp L- arginine. ở *Corynebacterium glutamicum* các enzyme đầu tiên và thứ hai trong con đường sinh tổng hợp bị kim hãm theo kiểu liên hệ ngược bởi L-arginine, như chỉ ra trên (hình 7.5).

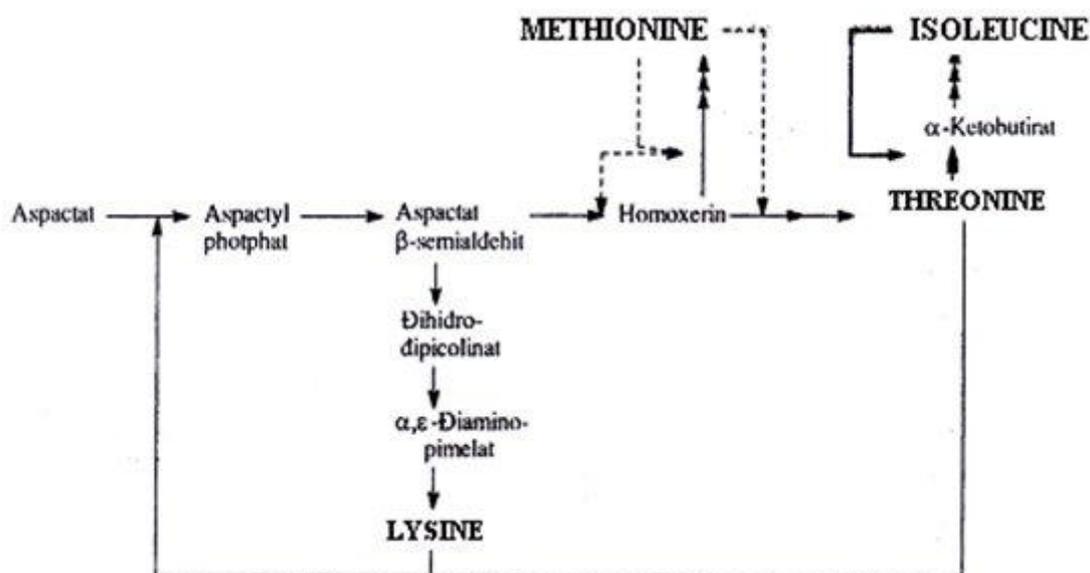
Sự tạo thành tất cả các enzyme tham gia vào sự sinh tổng hợp đều bị ức chế bởi L- arginine. Như vậy, một cơ thể trợ dưỡng cần xitruilin thuộc *Corynebacterium glutamicum* thiếu enzyme ornithine carbamoyl transferase xúc tác cho sự chuyển hoá ornithine thành citruline sẽ ngăn cản sự tạo thành arginine và sẽ tích lũy L-ornithine với số lượng lớn. Các điều kiện lên men giống với các điều kiện dành cho sự sản xuất L-glutamat trừ một điều là môi trường phải chứa một lượng thích hợp L-arginine và một lượng lớn biotin. Một thể đột biến trợ dưỡng cần citruline thuộc *Brevibacterium lactofermentum* cũng đã được phát hiện là có khả năng tích lũy một nồng độ cao L-ornithine từ đường (sản lượng trên 40% tính theo đương lượng phân tử).

L-citruline thì được sản xuất bởi các thể đột biến trợ dưỡng cần arginine của *Corynebacterium glutamicum* và *Bacillus subtilis* theo cách tương tự.

Các thể đột biến trợ dưỡng cũng được sử dụng trong quá trình sản xuất các sản phẩm cuối cùng của các con đường trao đổi chất phân nhánh. Lên men lysine là một ví dụ điển hình. ở các cơ thể nhân sơ L-lysine được tổng hợp từ L-aspartate với sự tạo thành một sản phẩm trung gian là α,ϵ -diaminopimelate. Ngoài L-lysine, L-threonine, L-methionine và L isoleucine cũng được sinh ra từ L-aspartate (hình 7.6).

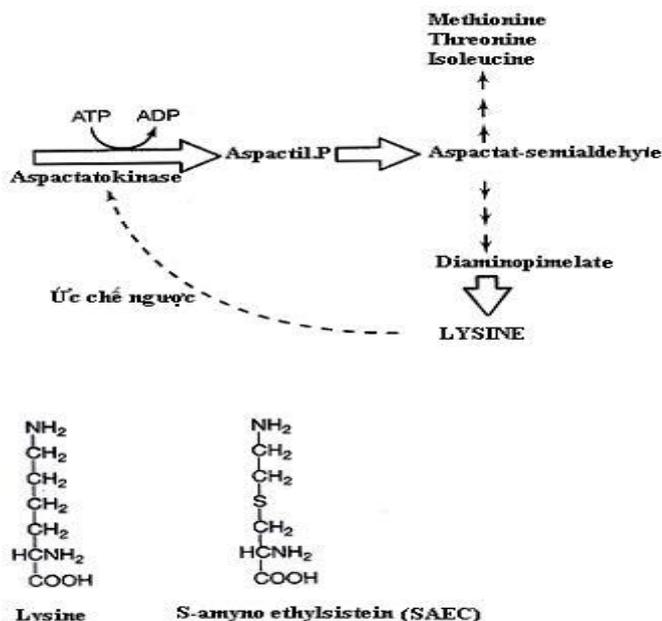


Hình 7.5. Điều hoà sinh tổng hợp arginine ở vi khuẩn *Corynebacterium* sinh glutamate



Hình 7.6. Điều hoà sinh tổng hợp amino acids thuộc họ aspartate ở *Brevibacterium flavum* và *Corynebacterium glutamicum*

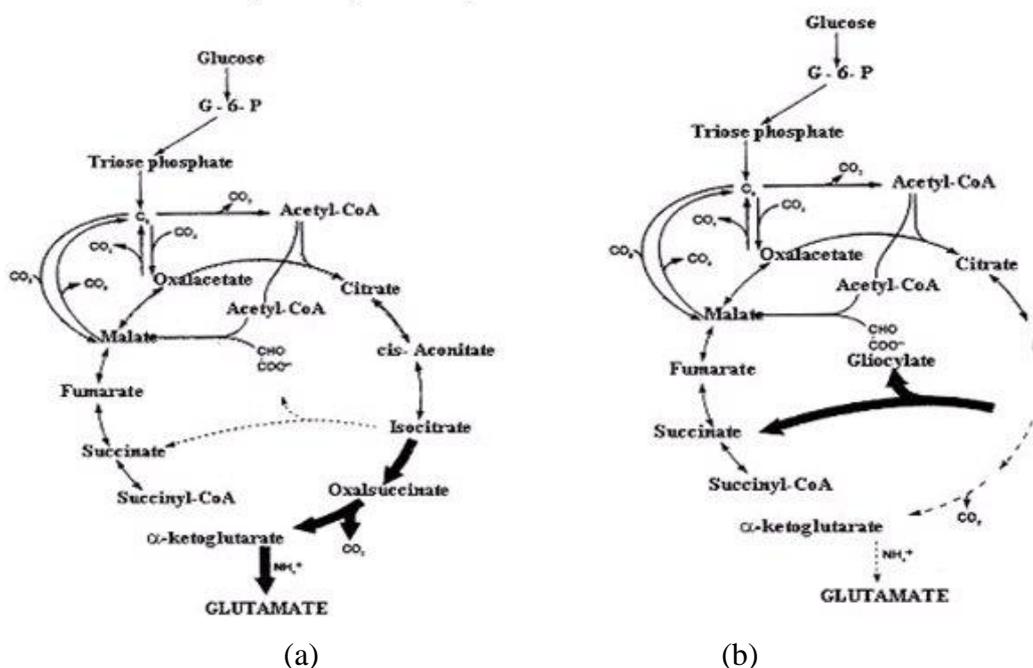
3. Sản xuất các amino acid nhờ các thể đột biến về điều hòa



Hình 7.7: Sản xuất công nghiệp lysine nhờ *Brevibacterium flavum*

Một ví dụ khác về việc ứng dụng sự sai hỏng về điều hoà kết hợp với tính trợ dưỡng trong một vi khuẩn sản sinh amino acid là sự sản xuất L-threonine. ở *Corynebacterium glutamicum* và *Brevibacterium flavum* sự tổng hợp thừa L-threonine bị ngăn cản bằng sự kìm hãm aspartokinase theo kiểu liên hệ ngược bởi L-threonine cộng L-lysine, cũng như bằng sự kìm hãm homoserine dehydrogenase theo kiểu liên hệ ngược bởi L-threonine.

Chủng *Corynebacterium glutamicum* dùng để sản xuất acid glutamic thiếu hẳn hoặc chỉ có khả năng hạn chế đối với việc chuyển α -ketoglutaric, một sản phẩm trung gian của chu trình TCA, thành succinyl-CoA (hình 7.8 a).



Hình 7.8. Sản xuất acid glutamic

a) Sử dụng con đường phụ glyoxylate để bù đắp các chất trung gian thiết yếu của chu trình Krebs.

3. Các nucleotide không thấm tốt qua màng tế bào. Do vậy vi sinh vật không dễ dàng tiết các nucleotide vào môi trường nuôi cấy qua hàng rào thẩm thấu.

Những vấn đề phức tạp trên đã được khắc phục và từ lâu IMP đã được sản xuất ở Nhật Bản không chỉ bằng phương pháp phân giải ARN nhờ enzyme mà còn bằng hai phương pháp lên men :

1. Sản xuất lên men trực tiếp IMP bằng con đường sinh tổng hợp *de novo*.
2. Sản xuất inosine bằng lên men sau đó chuyển hoá hóa học inosine thành IMP.

Để khắc phục các khó khăn trong lên men sản xuất trực tiếp IMP, hai phương hướng nghiên cứu sau đây đã được tiến hành :

1. Làm mất đoạn di truyền hoạt tính phân giải nucleotide của các thể đột biến *Bacillus subtilis* sản xuất inosine.
2. Cải thiện về di truyền và về môi trường nhằm tăng năng suất IMP ở *Brevibacterium ammoniagenes*.

Sản xuất công nghiệp IMP hiện nay được thực hiện nhờ các thể đột biến của *Brevibacterium ammoniagenes* theo phương pháp thứ hai.

V. VITAMIN

Một số vitamin quan trọng đã được sản xuất ở quy mô thương mại nhờ các quá trình xúc tác sinh học. Các vitamin thường được sử dụng làm các chất bổ sung cho thức ăn của người và động vật.

Tính về mặt doanh thu các loại dược phẩm, sản xuất các vitamin chỉ đứng thứ hai sau các chất kháng sinh - tức là vào khoảng gần một tỷ USD mỗi năm. Hầu hết các loại vitamin được sản xuất thương mại nhờ biện pháp tổng hợp hóa học. Tuy nhiên, một vài loại vitamin muốn được tổng hợp hóa học với giá thành rẻ phải trải qua những quá trình quá phức tạp trong khi đó lại có thể được sản xuất bằng biện pháp xúc tác sinh học. Trong số này, vitamin B₁₂ và riboflavin là những vitamin quan trọng nhất.

1. Vitamin B₁₂

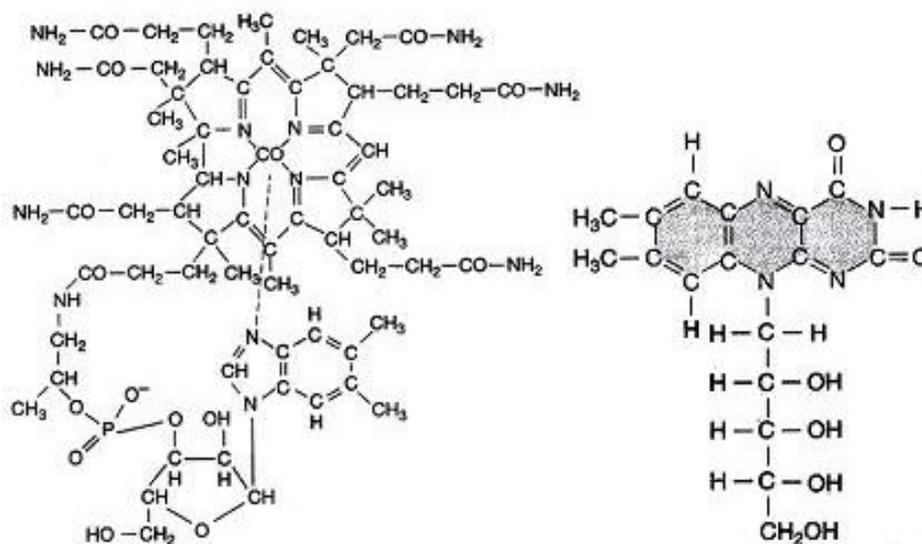
Trong tự nhiên, vitamin B₁₂ chỉ được tổng hợp nhờ vi sinh vật. Là một coenzyme, trong hóa sinh học động vật vitamin B₁₂ có vai trò quan trọng trong nhiều sự tái sắp xếp nội phân tử, ở đó một nguyên tử hydrogen gắn vào một nguyên tử cacbon được đổi chỗ cho một gốc thay thế gắn vào nguyên tử cacbon bên cạnh. Ở người, sự thiếu nhiều vitamin B₁₂ sẽ dẫn đến một bệnh nghiêm trọng có tên là bệnh *thiếu máu ác tính*, được đặc trưng bởi sự sản xuất ít các tế bào hồng cầu và bởi những sự rối loạn trong hệ thần kinh.

Nhu cầu về vitamin B₁₂ của động vật được đáp ứng nhờ thực phẩm ăn vào hay nhờ hấp thụ vitamin trong ruột của động vật do các vi sinh vật đường ruột sinh ra. Thực vật không sinh ra và cũng không sử dụng vitamin B₁₂.

Để sản xuất công nghiệp vitamin B₁₂ người ta sử dụng các chủng vi sinh vật đã được chọn lọc một cách đặc biệt, có sản lượng cao về vitamin B₁₂. các thành viên

của vi khuẩn thuộc chi *Propionibacterium* cho sản lượng giao động trong khoảng từ 19-23 mg/l trong một quá trình-hai giai đoạn, còn một vi khuẩn khác, *Pseudomonas denitrificans*, có thể sản xuất 60 mg/l trong một quá trình-một giai đoạn sử dụng rỉ đường củ cải làm nguồn cacbon.

Vitamin B₁₂ trong cấu trúc có chứa cobalt là phần cơ bản, vì vậy sản lượng của vitamin này sẽ tăng lên đáng kể khi cobalt được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (hình 7.10).



Hình 7.10. Trái -Cyanocobalamin (vitamin B12), Phải -Riboflavin (Vitamin B2)

2. Riboflavin

Riboflavin là hợp chất mẹ của flavin, FAD và FMN tức là của các coenzyme giữ vai trò quan trọng trong các enzyme tham gia vào các phản ứng oxi hóa-khử trong hầu hết mọi sinh vật (hình 7.10). Riboflavin được tổng hợp bởi nhiều vi sinh vật, gồm cả vi khuẩn, nấm men và nấm sợi. Nấm *Ashbya gossypii* sinh ra một lượng lớn vitamin này (tới 7g/l) và do vậy được sử dụng đối với hầu hết các quá trình sản xuất nhờ vi sinh vật. Tuy có sản lượng cao như vậy, song giữa quá trình sản xuất nhờ vi sinh vật và sự tổng hợp hóa học luôn luôn có sự cạnh tranh kinh tế lớn.

*TÓM TẮT CHƯƠNG

Các chất trao đổi bậc một là những chất được tạo thành trong pha sinh trưởng đầu tiên của VSV bao gồm các chất: amino acid, nucleotit và các acid amin...

Giới thiệu các nguyên lí của sự tổng hợp thừa, các phương pháp tạo ra thể tổng hợp thừa và phương pháp sản xuất các sản phẩm bậc một.

*Câu hỏi ôn tập chương 7

1.Trình bày:

a.Các cơ chế điều hòa hoạt tính và sự tổng hợp enzyme ở các chủng hoang dại

- b. Nguyên tắc của sự tổng hợp thừa.
- c. Tính chất và vai trò của các enzyme dị lập thể trong điều hòa hoạt tính enzyme.
- d. Các phương pháp tạo các thể đột biến tổng hợp thừa
- e. Nguyên tắc của kỹ thuật penicillin

2. Lysine có thể được tạo ra nhờ *E. coli* bằng cách loại CO₂ từ một acid amin chứa 7 cacbon, acid amin này có tên là:

- a. guanine
- b. proline
- c. diaminopimelic acid
- d. glutamic acid
- e. α -ketoglutaric acid

3. Sản xuất công nghiệp glutamic acid sử dụng các loài thuộc một trong các chi sau đây:

- a. *Corynebacterium*
- b. *Pseudomonas*
- c. *Escherichia*
- d. *Acetobacter*
- e. *Clostridium*

4. Enzyme DAP decarboxylase chuyển hóa acid diaminopimelic thành:

- a. ethanol; b. acid acetic
- c. glutamic acid; d. lactic acid ; e. lysine

5. Trong sự sinh tổng hợp thừa glutamic acid, hãy nêu vai trò của chu trình glyoxylate, biotin và các dẫn xuất của các acid béo. Ở chủng sản xuất, những enzyme nào hoạt động mạnh, enzyme nào thiếu hoặc hoạt động rất yếu ?

6. Trong sự điều hòa sinh tổng hợp các nucleotide purine ở *Corynebacterium glutamicum* (trả lời bằng đúng hoặc sai):

a. Các thể đột biến tiết IMP mạnh là các thể đột biến trợ dưỡng về adenine và xanthine

b. Việc tạo ra các thể đột biến thừa GMP dễ dàng hơn vì chỉ cần một bước tạo sự sai hỏng về điều hòa của IMP- dehydrogenase là đủ.

* Tài liệu đọc thêm

1. Biên Văn Minh (chủ biên). 2006. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBGD.
2. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biên Văn Minh. 1998. Vi sinh học, công nghiệp, NXBGD, Hà Nội.
3. Phạm Thành Hồ. 2005. Nhập môn công nghệ sinh học, NXBGD.

* Tài liệu tham khảo

1. Kiều Hữu Ảnh. 1999. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBKHKHT.
2. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>
3. <http://wikipedia>

* **Giải thích thuật ngữ**

Amino acid hay acid amin là một phân tử chứa cả nhóm amin và cacbonxylic acid.

IMP và GMP: 5'-inosine và 5'-guanylate

Vitamin, hay **sinh tố**, là phân tử hữu cơ cần thiết ở lượng rất nhỏ cho hoạt động chuyển hoá bình thường của cơ thể sinh vật. Có nhiều loại vitamin và chúng khác nhau về bản chất hoá học lẫn tác dụng sinh lý.

Các loại vitamin:

Vitamin A, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C, D1, D2, D3, D4, D5, E, K

Vitamin A, D, E, K hòa tan trong chất béo

Vitamin B, C hòa tan trong nước.

Chương 8

CÁC CHẤT TRAO ĐỔI BẠC HAI

I. CÁC CHẤT KHÁNG SINH

Hiện đã biết trên 8000 chất kháng sinh và mỗi năm có khoảng vài trăm *chất kháng sinh mới* được phát hiện. Trong tương lai chắc chắn còn có nhiều chất kháng sinh khác nữa cũng sẽ được tìm ra vì *đa số* các vi sinh vật có khả năng tạo thành chất kháng sinh đã được nghiên cứu cho tới nay đều chỉ thuộc về các chi *Streptomyces* và *Bacillus*

1. Các công đoạn sản xuất thương mại

Trong những năm gần đây, các kỹ thuật của công nghệ di truyền đã cải thiện đáng kể các quy trình tìm kiếm các chủng cho sản lượng cao. Kỹ thuật *khuếch đại gen* cho phép đưa các bản sao bổ sung của các gen mong muốn vào một tế bào nhờ một vectơ như plasmid. Việc cải thiện các quá trình điều khiển cũng cho phép làm tăng sản lượng. Tuy nhiên, khó khăn của việc sử dụng các quy trình di truyền để làm tăng sản lượng là ở chỗ các con đường sinh tổng hợp đa số các chất kháng sinh thường bao gồm rất nhiều bước với rất nhiều gen và không rõ gen nào cần được cải biến để nâng cao sản lượng. Do vậy, những nghiên cứu cơ bản có ý nghĩa rất quan trọng.

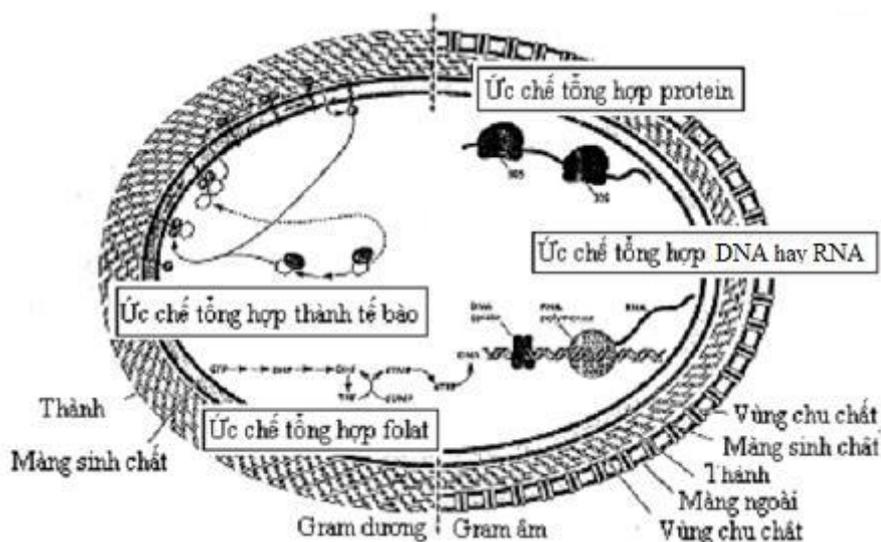
Trong nhiều trường hợp, để tăng sự tổng hợp một chất kháng sinh nào đó, việc ứng dụng các kết quả nghiên cứu trao đổi chất cơ bản mang lại nhiều lợi ích lớn hơn so với các chương trình gây đột biến và tuyển chọn mò mẫm.

2. Các nhóm chất kháng sinh chủ yếu dùng trong điều trị cho con người

Bảng 8.1: Phương pháp điều trị hiệu quả nhất bằng chất kháng sinh

Bệnh nhiễm trùng	Tác nhân gây bệnh	Phương pháp trị liệu hiệu quả nhất
Viêm phổi cộng đồng	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	cephalosporin phổ rộng thế hệ 4, macrolide hoặc fluoroquinolone
Viêm phổi bệnh viện	Vi khuẩn Gram âm hoặc tụ cầu	cephalosporin phổ rộng thế hệ 4, imipenem và aminoglycozide, vancomycin
Viêm màng não	<i>S. pneumoniae</i> hoặc <i>Neisseria meningitidis</i>	cephalosporin phổ rộng + vancomycin + rifampin
Hội chứng nhiễm trùng	Trực khuẩn Gram âm, song cả cầu khuẩn Gram dương	cephalosporin + aminoglycoside + vancomycin
Nhiễm trùng đường niệu	Vi khuẩn Gram âm như <i>E. coli</i>	sulfametoxazol + trimetroprim, fluoroquinolone, fosfomycin
Lao	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	isoniazid + rifampin + pirizinaid + etambutol

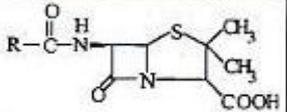
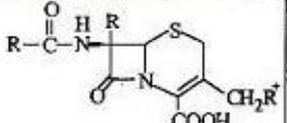
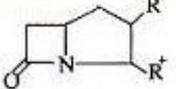
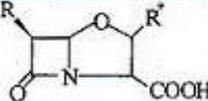
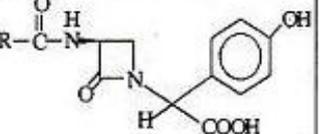
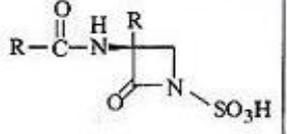
3. Đích tác dụng của các chất kháng sinh ở vi khuẩn



Hình 8.1.- Bốn đích tác dụng chủ yếu của các chất kháng sinh lên vi khuẩn

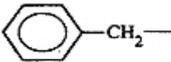
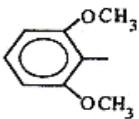
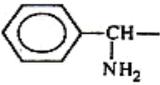
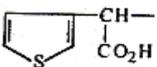
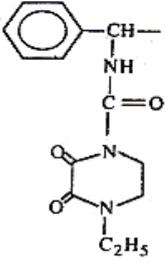
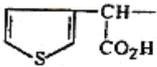
4. Các chất kháng sinh β -lactam : penicillin và cephalosporin

4.1. Các loại penicillin

Cấu trúc cơ sở	CKS	Loài sản sinh quan trọng
	Các penicillin	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Cephalosporin	<i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Nocardia lactamdurans</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Các acids clavulanic	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Tienamycin Acid olivanic Epthienamycin	<i>Streptomyces cattleya</i> <i>Streptomyces olivaceus</i> <i>Streptomyces flavogriseus</i>
	Nocardicin	<i>Nocardia uniformis</i> subsp. <i>tsuyamanensis</i>
	Các monolactam	<i>Gluconobacter</i> sp. <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas acidophila</i> <i>Flexibacter</i> sp. <i>Acetobacter</i> sp.

Hình 8.2. Cấu trúc cơ sở của một số loại chất kháng sinh β -lactam gặp trong tự nhiên

Hoạt tính sinh học Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của một penicillin nào đó có thể được coi như một đại lượng để đo khả năng thâm nhập vào màng ngoài tế bào, khả năng đề kháng với sự tấn công của các lactamase nếu chúng có mặt, và thứ ba, khả năng ức chế của nó đối với các enzym tham gia vào sự tổng hợp thành tế bào. Penicillin G chỉ ra khả năng chống lại mạnh các vi khuẩn Gram dương trừ các chủng sản sinh penicillinase. Kháng sinh này có hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính chống lại các vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae và các chủng *Pseudomonas*.

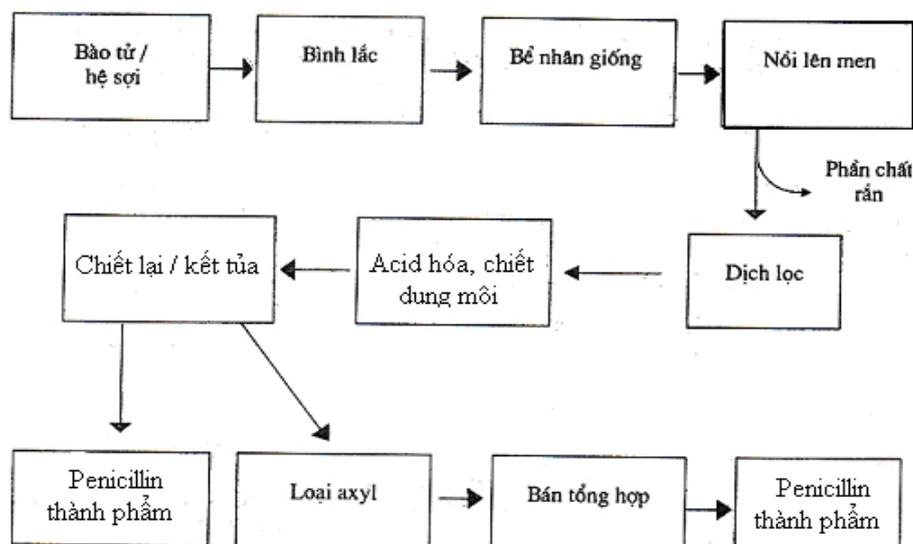
R	X	Tên
	— H	Benzylpenicillin
	— H	Methycilin
	— H	Ampicillin
	— H	Ticarcilin
	— H	Piperacilin
	— OCH ₃	Temocilin

Hình 8.3. Các penicillin bán tổng hợp

Sinh tổng hợp

Penicillin là các dẫn xuất của 3 acid amin, acid L-a-aminoadipic, L-cysteine và L-valine. Trước hết, một peptit (L)- α -aminoadipoyl-L-cisteinyl được tạo thành, chất này, sau khi được bổ sung L-valine và được epime hóa sẽ trở thành tripeptide L- α -aminođipyl-L-cysteine-D-valine, tức là cơ chất của penicillin synthase. Trong lên men kiểu 1, isopenicillin N được tạo thành bằng cách như vậy sẽ bị loại axyl để tạo thành nhân 6-APA nếu không có mặt một tiền chất chuỗi bên. Tuy nhiên, nếu có mặt phenylacetyl-CoA thì nhân 6-APA sẽ được acyl hóa để tạo thành penicillin G.

Trong kiểu lên men 2, chuỗi bên L-a-aminoadipyl của isopenicillin N được epime hóa để tạo thành chuỗi bên D- α -aminođipyl của penicillin N.



Hình 8.4. Quy trình sản xuất penicillin

4.2. Cephalosporin và các chất kháng sinh β -lactam khác

Cephalosporin là các chất kháng sinh β -lactam chứa một vòng dihydrothiazin thay vào hệ thống vòng thiazolidin. Cephalosporin lần đầu tiên được tìm thấy ở *Cephalosporium acremonium* song hàng loạt các nấm khác cũng sản sinh chất kháng sinh này. Hơn nữa nhiều cephalosporin bán tổng hợp đã được sản xuất. Giá trị của các cephalosporin không những nằm ở chỗ chúng có tính độc thấp mà còn vì chúng là những chất kháng sinh có phổ rộng.

Quá trình sàng lọc quy mô lớn nhằm tìm ra các chất kháng sinh β -lactam mới đã dẫn đến việc phát triển các hợp chất mới mà cấu trúc của nó khác với cả penicillin lẫn cephalosporin. Đó là các chất kháng sinh nocardicin, acid clavulanic, và thianemycin. Acid clavulanic là một chất kháng sinh được chú ý đặc biệt bởi vì, mặc dù nó không có hiệu quả như một chất kháng sinh song nó lại kìm hãm hoạt tính của các β -lactamase. Các enzyme này do một số vi khuẩn tạo thành, chúng phá hủy các chất kháng sinh β -lactam làm cho chúng trở nên vô hiệu khi được dùng để chữa một bệnh nào đó. Do vậy, khi được sử dụng tổ hợp cùng với các penicillin và cephalosporin miễn cảm với β -lactamase, acid clavulanic sẽ làm tăng rõ rệt hoạt tính của các chất kháng sinh này.

5. Các chất kháng sinh do các sinh vật nhân sơ sinh ra

Nhiều chất kháng sinh hoạt động mạnh chống lại các sinh vật nhân sơ cũng lại được sinh ra bởi chính các sinh vật nhân sơ. Thuộc về nhóm này có các aminoglycoside, các macrolide, các tetracyclin và nhiều loại khác. Trong số chúng, nhiều chất kháng sinh có công dụng y học chủ chốt và vì vậy việc sản xuất chúng giữ vai trò quan trọng trong công nghiệp dược.

5.1. Các chất kháng sinh aminoglycoside

Aminoglycoside là những chất kháng sinh chứa các đường amin nối với các đường amin khác bởi các liên kết glycoside. Nhiều chất kháng sinh có công dụng điều trị cao thuộc

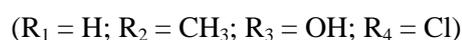
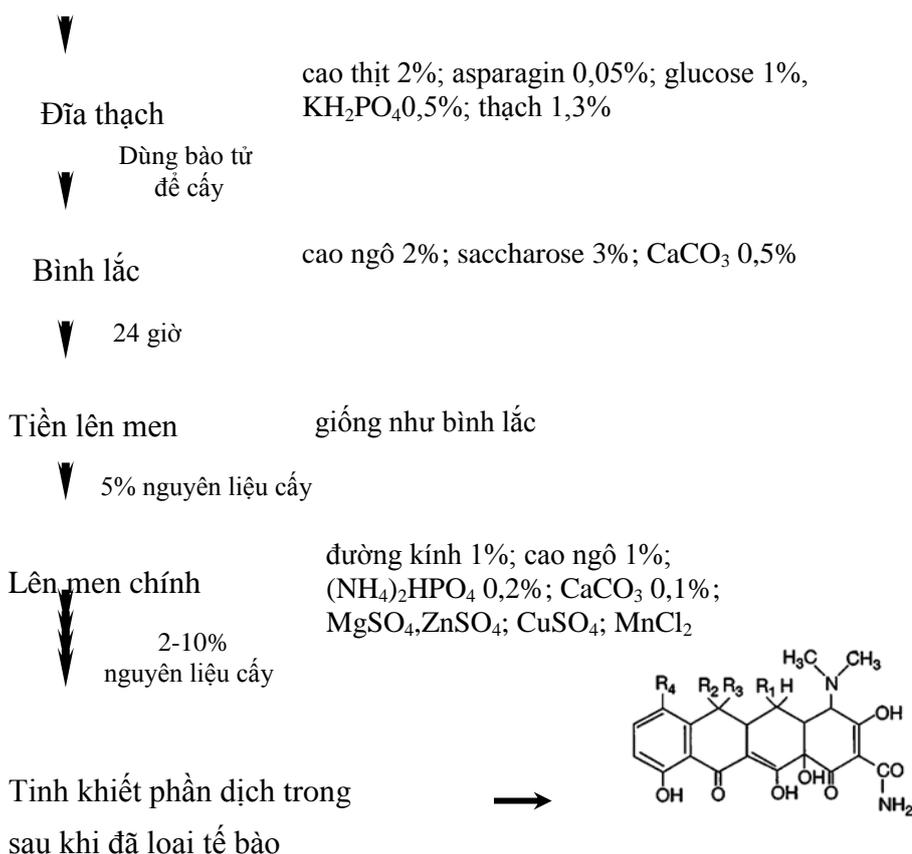
về các aminoglicozit, đó là streptomycin và các chất họ hàng, kanamycin, gentamycin và neomycin. Chúng được sử dụng trong thực tiễn y học trước hết để chống lại các vi khuẩn Gram âm. Streptomycin cũng được sử dụng rộng rãi để điều trị bệnh lao.

Đứng về mặt lịch sử, việc phát hiện ra giá trị của streptomycin đối với bệnh lao là một bước tiến quan trọng trong y học bởi vì đó là chất kháng sinh đầu tiên tìm thấy có khả năng khống chế bệnh nhiễm trùng đáng sợ này. Tuy nhiên, không có chất kháng sinh aminoglycoside nào được sử dụng rộng rãi như trước đây chúng từng được sử dụng. Streptomycin đã bị thay thế bởi một số hoá chất tổng hợp một mặt vì streptomycin gây nên một số hiệu ứng phụ nghiêm trọng, mặt khác ngày càng có nhiều vi khuẩn đề kháng với chất kháng sinh này. Việc sử dụng các chất kháng sinh aminoglicozit để chống lại các bệnh nhiễm khuẩn Gram âm đã trở nên ít có ý nghĩa hơn kể từ khi xuất hiện các penicillin bán tổng hợp và các tetracyclin. Ngày nay các chất kháng sinh aminoglicozit được coi là các chất kháng sinh dự trữ, chỉ được sử dụng khi các chất kháng sinh khác không mang lại hiệu quả.

5.2. Các chất kháng sinh macrolide

Quy trình sản xuất chlortetracyclin như sau:

Nguyên liệu cấy (bào tử trên thạch nghiêng hoặc trong đất vô trùng)



Hình 8.5. Quy trình sản xuất chlortetracyclin

Các chất kháng sinh macrolide chứa các vòng đại lacton nối với các thành phần đường. Những sự thay đổi trong cấu trúc của cả hai thành phần vòng lacton và đường đã làm xuất hiện nhiều loại kháng sinh macrolide. Chất kháng sinh macrolide biết rõ nhất là *erythromycin*, còn các macrolide khác là *oleandomixin*, *spiramixin* và *tyloxin*.

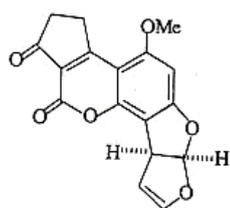
Cũng giống như trong sản xuất penicillin, cao ngô được sử dụng trong sản xuất chlortetracyclin ở quy mô lớn, song người ta tránh dùng glucose vì glucose gây nên hiện tượng kiềm chế dị hóa. Nguồn cacbon tốt nhất nên dùng ở đây là saccharose.

II. CÁC ĐỘC TỔ NẤM(mycotoxin)

Mycotoxin là một thuật ngữ chung dùng để miêu tả các độc tố được tạo thành trong quá trình sinh trưởng của nấm mốc. Độc tố nấm là một vấn đề không còn mới mẻ và việc ngộ độc bởi thực phẩm và thức ăn gia súc bị nhiễm nấm mốc đã được biết đến từ nhiều thế kỷ nay, song việc phát hiện ra aflatoxin B₁ (AFB₁) như là một trong những nhân tố gây ung thư có hiệu lực cao nhất gặp trong tự nhiên vào đầu những năm 60 đã thúc đẩy mạnh mẽ các nghiên cứu trên lĩnh vực này.

Mối nguy hiểm do các độc tố nấm và các bệnh do chúng gây ra trong một thời gian dài không được đánh giá đúng mức, đó là nguyên nhân tại sao chúng được mệnh danh là "các bệnh bị lãng quên". Tình trạng này đã thay đổi đột ngột kể từ khi người ta phát hiện ra hiện tượng nhiễm độc hàng loạt đối với gà tây ở các trang trại miền Nam và miền Đông nước Anh do lạc dùng làm thức ăn bị nhiễm mốc gây ra.

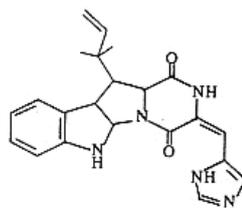
Thức ăn chứa lạc bị nhiễm *Aspergillus flavus*, nấm này sinh ra các aflatoxin rất độc (kể cả với người) và gây nên bệnh ung thư gan. Từ đó các nghiên cứu mạnh mẽ thuộc nhiều lĩnh vực có liên quan đã phát hiện ra các độc tố nấm khác nữa cũng gây nên những bệnh rất nguy hiểm.



Aflatoxin B₁ (*Aspergillus flavus*)

LD₅₀(đường miệng, chuột cống)

7,2mg/kg

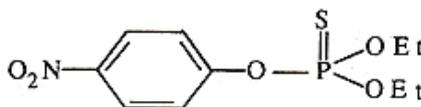


Roquefortin (*P. roqueforti*)

LD₅₀(trong màng bụng, chuột nhắt)

10-20 mg/kg

As₂O₃
Asen



LD₅₀(đường miệng, chuột cống) 15mg/kg ;

LD₅₀(đường miệng, chuột cống)

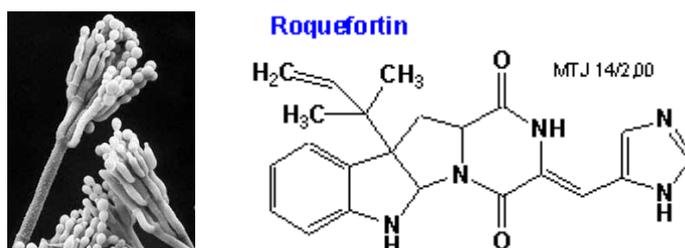
4-13mg/kg

Hình 8.6. Cấu trúc của hai loại độc tố nấm điển hình Aflatoxin B₁ và roquefortin

1. Tình hình nghiên cứu về độc tố nấm

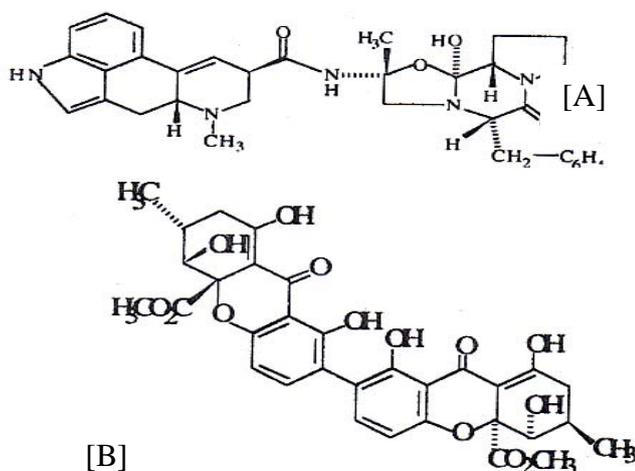
Cho đến giữa những năm 1980 người ta đã biết tới trên 300 độc tố nấm, chúng có thể xếp thành 25 kiểu cấu trúc và do khoảng 350 loại nấm khác nhau tạo thành. Hình 8.6. trình bày hai loại độc tố nấm điển hình, aflatoxin B₁ và roquefortin. Độ độc của hai loại chất độc nổi tiếng là asen và paration cũng được nêu ra để tiện so sánh.

Penicillium roqueforti, nấm sợi sản sinh roquefortin, thường được sử dụng để chuẩn bị nhiều loại phomage màu lam. Cũng may là hàm lượng roquefortin có trong phomat màu lam thông thường rất thấp (< 7ppm) cho nên liều lượng gây chết đối với người trưởng thành chỉ đạt được sau khi đã ăn 200 kg loại phomage này.



Hình 8.7. Nấm sợi *Penicillium roqueforti*, sản sinh độc tố roquefortin

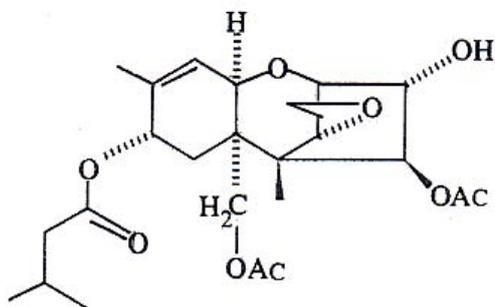
Có thể tìm thấy từ các loại nấm sợi gặp trong thực phẩm của người các độc tố nấm mang trên 20 loại hoạt tính khác nhau, chúng thường xuyên đe dọa tính mạng con người và nhiều trong số chúng gây nên bệnh ung thư. Theo tính toán của Tổ chức Quốc tế về Ung thư thì 80% các bệnh ung thư là do các yếu tố môi trường gây ra, trong số đó độc tố nấm có một vai trò quan trọng. Con người bị đe dọa bởi các độc tố nấm theo hai cách. Thứ nhất, con người tiêu thụ trực tiếp các nguyên liệu bị nhiễm nấm sinh độc tố. Thứ hai, thông qua thịt, sữa và trứng của các động vật ăn phải thức ăn bị nhiễm các khuẩn lạc nấm, con người hấp thu độc tố nấm có trong các thực phẩm này, đặc biệt là trong gan và thận động vật là những nơi độc tố nấm được tích lũy. Gây xuất huyết, nhiễm trùng, giảm hồng cầu, teo tủy sống, kìm hãm tổng hợp protein



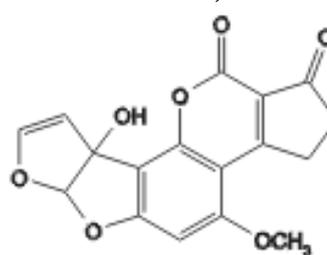
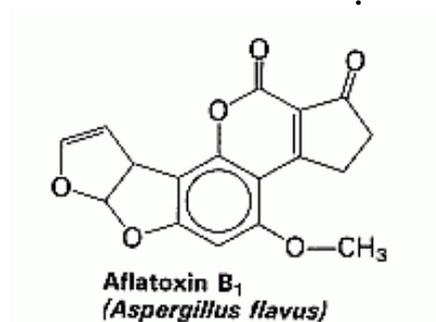
Hình 8.8. Bệnh nấm cựa: độc tố và phương thức tác dụng

[A] Ecgotamin LD₅₀(IV, chuột nhắt) 62mg/kg, co mạch ngoại vi,
hoại thư và hoại tử chân tay

[B] Acid secalonic A LD₅₀(IV, chuột nhắt) < 50mg/kg, hoại tử gan.



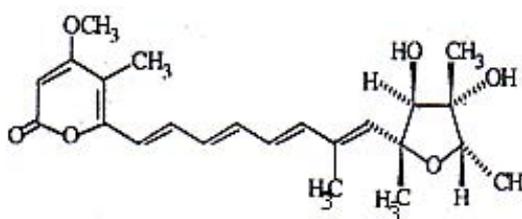
Hình 8.9. Độc tố T-2 (*Fuvarium culmorum*)



Aflatoxin M₁

(Sữa của các động vật mà
thức ăn của chúng có chứa Aflatoxin B₁)

Hình 8.10. Bệnh do aflatoxin ở người



Hình 8.11. Citreoviridin

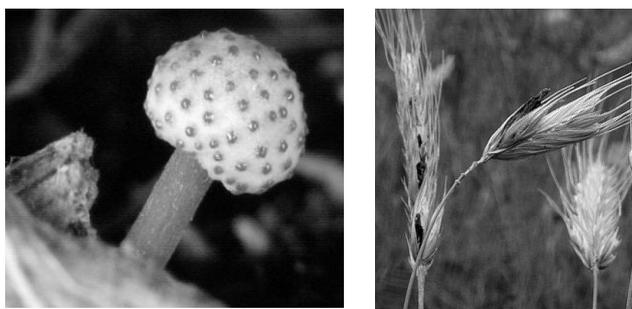
(*P. citreoviride*, *A. terreus*) gây khó thở, buồn nôn, nôn mửa ngừng thở,
kìm hãm tổng hợp ATP ở ti thể

2. Cấu trúc, hoạt tính sinh học và các bệnh do độc tố nấm gây ra

Là loại sản phẩm bậc hai điển hình gặp trong tự nhiên, các độc tố nấm tồn tại dưới rất nhiều dạng cấu trúc và có đặc tính hóa học đa dạng. Chẳng hạn moniliformin do *Fusarium moniliforme* sinh ra có cấu trúc đơn giản, rất dễ tan trong nước và có độc tính cao, còn penitrem A do *Penicillium crustosum* sinh ra gây nên bệnh run thì lại có cấu trúc rất phức tạp và kỵ nước.

Bệnh nấm cựa

Việc làm sáng tỏ cấu trúc của các độc tố nấm được bắt đầu với tác nhân gây bệnh nấm cựa, một bệnh do độc tố nấm gây ra đã được biết từ thời kỳ rất xa xưa. Bệnh này do một loài nấm sợi, *Claviceps purpurea* gặp trên các bông lúa gây ra, ở đó chúng tạo thành các phần xơ cứng thường được gọi là cựa gà. Bằng cách đó, chúng thâm nhập vào các ngũ cốc dùng làm bánh mì và gây nên các dịch ngộ độc gặp ở Châu Âu từ thời Trung cổ. Các nghiên cứu hóa học trong vòng trên 100 năm gần đây đã làm sáng tỏ được hai nhóm độc tố nấm - đó là các alcaloid của nấm cựa gà (ergotamin) và các ergocrom (acid secalonic)



Hình 8.12. Nấm sợi, *Claviceps purpurea* gặp trên các bông lúa

Bệnh mắt bạch cầu do nhiễm độc thức ăn (ATA)

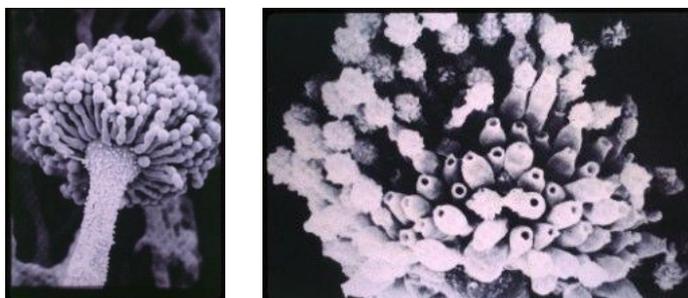
Đây là một bệnh nghiêm trọng khác do độc tố nấm gây ra, nguyên nhân là do một loài nấm sợi mọc trên ngũ cốc. Bệnh này được đặc trưng bởi sự phá hủy dần dần hệ thống tạo máu chịu trách nhiệm đối với sự tạo thành các tiểu thể hồng cầu và bạch cầu. ATA bắt đầu bằng sự phá hủy da, xuất huyết, viêm, và nhiễm trùng. Trong các giai đoạn cuối, tuỷ sống bị teo đi và lượng hồng cầu và bạch cầu bị giảm mạnh. Tỷ lệ tử vong do bệnh này gây ra có thể lên tới 60%. Bệnh này được xác định là một bệnh do độc tố nấm gây ra nhờ các nghiên cứu về vụ dịch nổ ra năm 1944 ở Uran thuộc miền Nam nước Nga trải rộng trong một vùng dài trên 500 km. Thực phẩm đã bị nhiễm các loài *Fusarium* sinh độc tố, bọn này tổng hợp loại độc tố nấm "kiểu T2"

Bệnh do các aflatoxin

Đây là bệnh dịch thứ ba có nguyên nhân từ độc tố nấm được nhận ra sau bệnh nấm cựa và ATA và là bệnh nguy hiểm nhất. Ngay sau khi các aflatoxin của loài nấm sợi *Aspergillus flavus* được xác định là nguyên nhân của "bệnh X ở gà tây", hàng loạt nghiên cứu đã được tiến hành nhằm xác định xem các loại độc tố nấm hoạt lực cao này có gây nên các bệnh nhiễm độc ở người hay không. Điều này đòi hỏi một chương trình sàng lọc toàn diện và phức tạp. Chẳng hạn, sự hấp thu aflatoxin đã được xác định bằng cách phân tích một số lượng lớn các mẫu thực phẩm thu thập từ thị trường và các gia đình. Từ đó đã thiết lập được một mối tương quan mang tính thống kê quan trọng về tỷ lệ mắc bệnh ung thư gan và việc hấp thu aflatoxin.

Nguy cơ tiềm tàng của các aflatoxin đối với sức khỏe con người đã dẫn đến việc hình thành nhiều chương trình có quy mô quốc tế nhằm giám sát sự có mặt của độc tố này trong

các loại lương thực ở hầu hết các nước trên thế giới. Liều lượng cho phép đối với aflatoxin tổng số nằm vào khoảng từ 0 đến 50 phần tỷ (ppb). Đa số các nước điều chỉnh ở mức 20 ppb. Riêng đối với AFM_1 , liều lượng cho phép nằm giữa 0 và 0,5 ppb và do vậy, thức ăn cho bò sữa cũng phải được điều chỉnh sao cho hàm lượng aflatoxin tổng số thấp hơn các loại thức ăn khác.



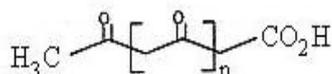
Hình 8.13. Nấm sợi *Aspergillus flavus* sinh độc tố aflatoxin

Bệnh "beriberi tim"

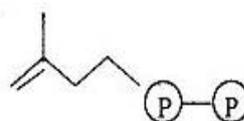
Loại bệnh độc tố nấm thứ tư là do độc tố của loài nấm *Penicillium citreoviride* mọc trên lúa thuộc vùng Đông á, polyen lacton citreoviridin gây ra. Bệnh này có tên là "beriberi tim" vì triệu chứng của nó giống như bệnh beriberi xuất hiện khi thiếu vitamin B_1 .

3. Sinh tổng hợp

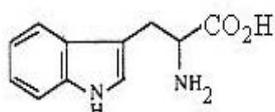
Các viên gạch cấu trúc cơ bản



Polyketid



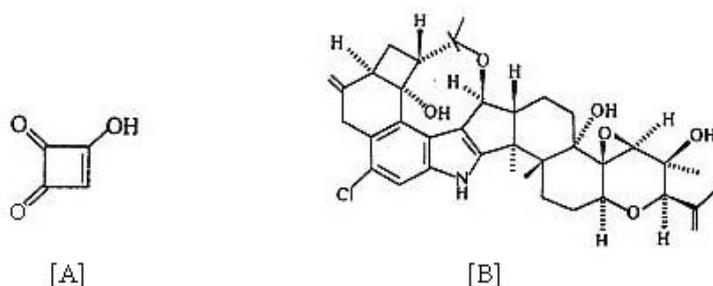
Isopentenyl pyrophosphate



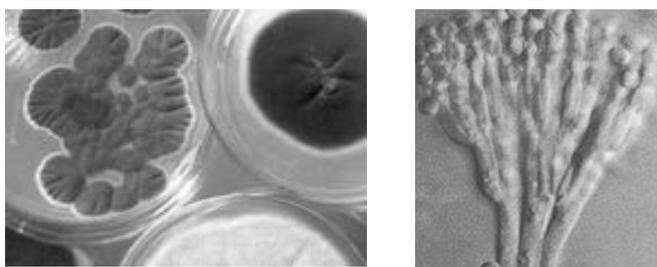
Tryptophan

không chứa đường !

Hình 8.14. Các viên gạch cấu trúc quan trọng nhất trong sinh tổng hợp độc tố nấm.



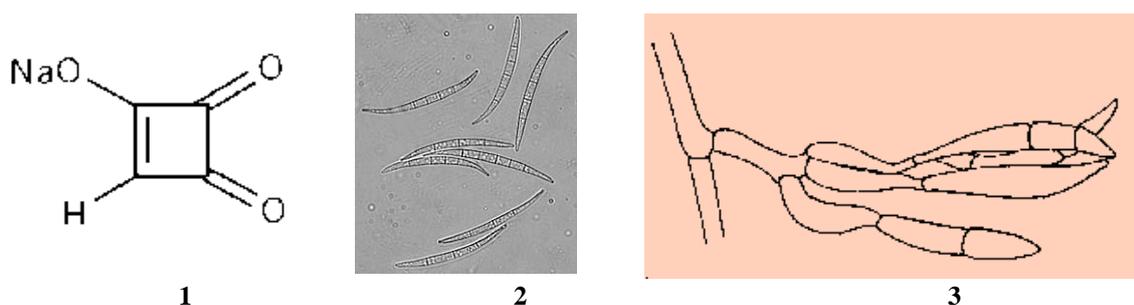
Hình 8.15. Cấu trúc của moniliformin (*Fusarium moniliforme*) [A] và penitrem (*Penicillium crustosum*) [B]



Hình 8.16. Khuẩn lạc *Fusarium moniliforme* trên hộp Petri (trái) và cơ quan sinh sản nấm *Penicillium crustosum* (phải)

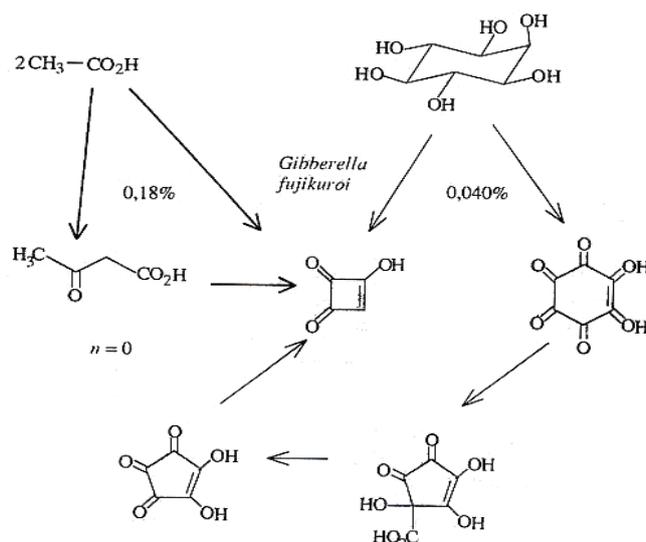
Sinh tổng hợp moniliformin

Moniliformin được tạo thành bởi các loài nấm thuộc chi *Fusarium* rất thường gặp trên các thức ăn chứa ngô như *F. avenaceum*, *F. subglutinans*, và *F. proliferatum*



Hình 8.17. 1. Công thức hóa học của Moniliformin;
2. *Fusarium avenaceum* các bào tử màng dày (*macroconidia*)
3. *Fusarium proliferatum* các bào tử và khuẩn ti

Cho đến gần đây người ta vẫn cho rằng tetraketit là thành viên đầu tiên của loạt sản phẩm tự nhiên được tạo thành từ sự vòng hóa các poliketid. Tuy nhiên, những thực nghiệm đánh dấu mới đây đã cho thấy một diketit cũng có thể tác dụng như một tiền chất trong sinh tổng hợp một độc tố nấm rất đơn giản về mặt cấu trúc là moniliformin (hình 8.18).



Hình 8.18. Các con đường sinh tổng hợp moniliformin

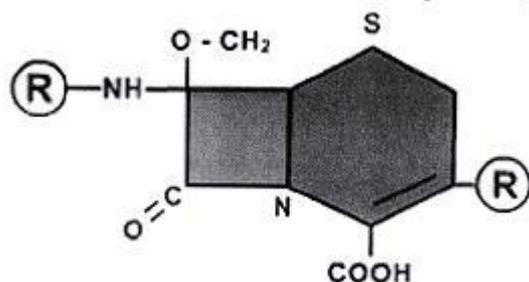
*TÓM TẮT CHƯƠNG

Các chất trao đổi bậc hai là một chất được tạo thành gần vào lúc kết thúc của pha sinh trưởng, thường là vào gần chính pha cân bằng. Một trong các đặc điểm đặc trưng của các chất trao đổi bậc hai là các enzyme tham gia vào sự tạo thành chúng được điều hoà một cách độc lập với các enzyme của trao đổi chất bậc một.

Các nguyên lí chung và phương pháp sản xuất một số sản phẩm bậc hai : chất kháng sinh, độc tố nấm.

Câu hỏi ôn tập chương 8

1. Hình sau trình bày cấu trúc của một chất kháng sinh thuộc họ β -lactam



a. Tên của chất kháng sinh này là gì, do vi sinh vật nào sinh ra ? Về mặt cấu trúc, nó giống và khác các penicillin ở chỗ nào ?

b. Đích tấn công của các chất kháng sinh thuộc họ β -lactam là gì ? Nó khác với đích tấn công của các aminoglycoside (như streptomycin), các macrolide (như rifamycin, erythromycin) hay các tetracyclin ở chỗ nào ?

c. Trình bày cơ chế tác dụng của các chất kháng sinh thuộc họ β -lactam; cơ chế này giống và khác với cơ chế tác dụng của vancomycin ở chỗ nào ?

d. Phân biệt chất kháng sinh với sulfa. Sulfa tấn công lên đâu ? Các quinolone là gì và tấn công lên đâu ?

e. Việc thay đổi các chuỗi bên (gốc R) của cephalosporin có thể tạo cho chất kháng sinh này những tính chất mới nào? Cephalosporin thế hệ 3 khác với Cephalosporin thế hệ 1 ở đặc điểm quan trọng nào?

2. Phân biệt penicillin bán tổng hợp với penicillin tự nhiên và penicillin sinh tổng hợp. Các

penicillin bán tổng hợp có những ưu thế gì nếu đem so sánh với các penicillin tự nhiên?

3. Bạn vừa tìm ra được một chất kháng sinh mới, nhưng chưa biết chắc chắn đó là một chất ức khuẩn, một chất diệt khuẩn và chất tiêu khuẩn.

a. Phân biệt chất ức khuẩn, chất diệt khuẩn và chất tiêu khuẩn.

b. Làm thế nào để xác định chất vừa tìm ra là chất ức khuẩn, diệt khuẩn hay tiêu khuẩn?

4. Mycotoxin là ngoại độc tố hay nội độc tố?

a. Cho ví dụ về ngoại độc tố và nội độc tố.

b. Nêu những điểm khác biệt chính giữa ngoại độc tố và nội độc tố ở vi khuẩn (quan hệ tế bào-độc tố, nguồn gốc, bản chất hóa học, tính bền nhiệt, tính độc, tính kháng nguyên, khả năng chuyển thành giải độc tố).

* Tài liệu đọc thêm

1. Biên Văn Minh (chủ biên). 2006. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBGD.
2. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biên Văn Minh. 1998. Vi sinh học, công nghiệp, NXBGD, Hà Nội.

* Tài liệu tham khảo

1. Kiều Hữu Ảnh. 1999. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBKHKHT.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty. Vi sinh vật học, 1997, NXBGD.

3. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

4. <http://wikipedia>

5. <http://wikibooks>

* Giải thích thuật ngữ

Chất kháng sinh: là những chất có nguồn gốc thiên nhiên và các sản phẩm cải biến chúng bằng con đường hóa học có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế chọn lọc sự phát triển của vi sinh vật hay tế bào của VSV ở ngay nồng độ thấp (10^{-3} - 10^{-2} microgam/ml).

MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Mycotoxin là một thuật ngữ chung dùng để miêu tả các độc tố được tạo thành trong quá trình sinh trưởng của nấm mốc.

Chương 9: CÁC SẢN PHẨM CHUYỂN HÓA SINH HỌC

Một trong những phát hiện có ý nghĩa quan trọng của vi sinh vật học công nghiệp là việc nhận thức được rằng vi sinh vật có thể được sử dụng để thực hiện các phản ứng hoá học đặc biệt vượt ra ngoài khả năng của hoá học hữu cơ.

Quá trình sử dụng vi sinh vật cho mục đích này có tên là sự *chuyển hoá sinh học*, nó bao gồm sự sinh trưởng của vi sinh vật trong những nổi lên men lớn theo sau là sự bổ sung hoá chất cần được chuyển hoá tại một thời điểm thích hợp. Tiếp tục lên men thêm một thời gian nữa để vi sinh vật tác động lên hoá chất rồi tách chiết dịch lên men, và cuối cùng sản phẩm mong muốn được tinh khiết.

Mặc dù về nguyên lý chuyển hoá sinh học có thể được sử dụng cho nhiều quá trình khác nhau song trong thực tế nó chỉ được ứng dụng để sản xuất một số hormone nhất định.

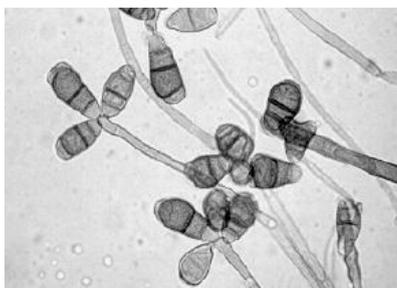
I. SỰ CHUYỂN HÓA CÁC STEROID

Việc sử dụng vi sinh vật để thực hiện những sự chuyển hoá steroid có ý nghĩa rất lớn trong công nghiệp dược phẩm. Steroid hormones điều chỉnh những trạng thái trao đổi chất khác nhau ở động vật kể cả ở người. Một trong những hormone đó, cortisone, có tác dụng làm giảm cơn đau có liên quan đến bệnh viêm khớp. Các dẫn xuất cortisone khác làm dịu các triệu chứng liên quan đến các bệnh dị ứng hoặc viêm.

Nhiều loại steroid hormones điều chỉnh hoạt động giới tính ở người trong đó một số đã được sản xuất thành dạng thuốc uống để tránh thụ thai. Các đặc tính sinh lý của một steroid phụ thuộc vào bản chất và vị trí chính xác của các thành phần hoá học nằm trên cấu trúc vòng của steroid gốc.

Một trong những điều phức tạp chủ yếu gặp trong hoá tổng hợp cortisone là việc phải đưa một nguyên tử oxygen vào một vị trí trong cấu trúc steroid 4 vòng được gọi là vị trí 11; đây là bước quyết định trong việc tạo nên hoạt tính sinh lý của phân tử.

Nhiều vi sinh vật có khả năng thực hiện các phản ứng chuyển hoá steroid. Tuy nhiên điều quan trọng là chúng có thể tiến hành phản ứng với tốc độ chuyển hoá cao, hiệu suất lớn và không tạo thành sản phẩm phụ hay không. Do yêu cầu này mà số chủng có thể sử dụng cho công nghiệp bị thu hẹp lại rất nhiều. Để hydroxyl hóa người ta sử dụng xạ khuẩn và nấm (đặc biệt là *Fusarium* và các loài *Curvularia*).

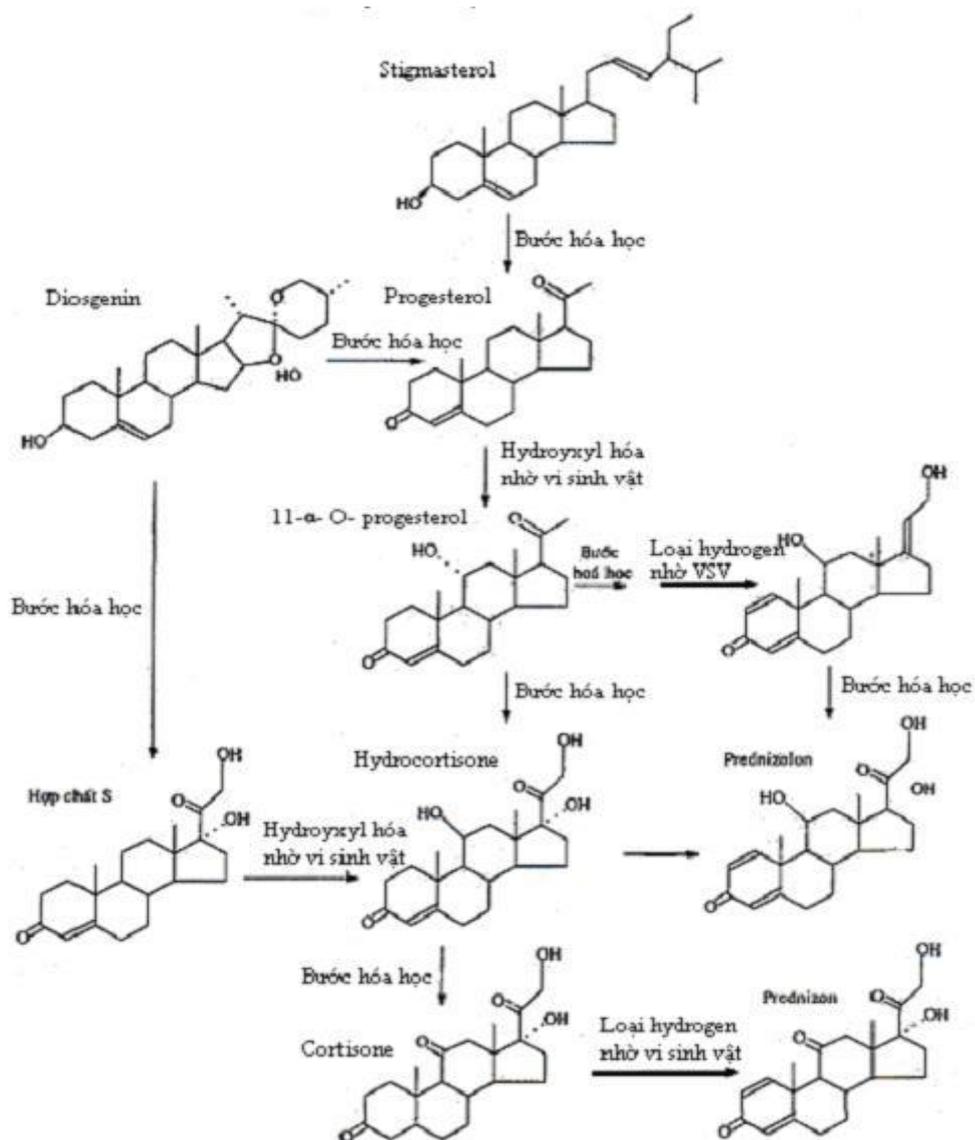


Curvularia lunata

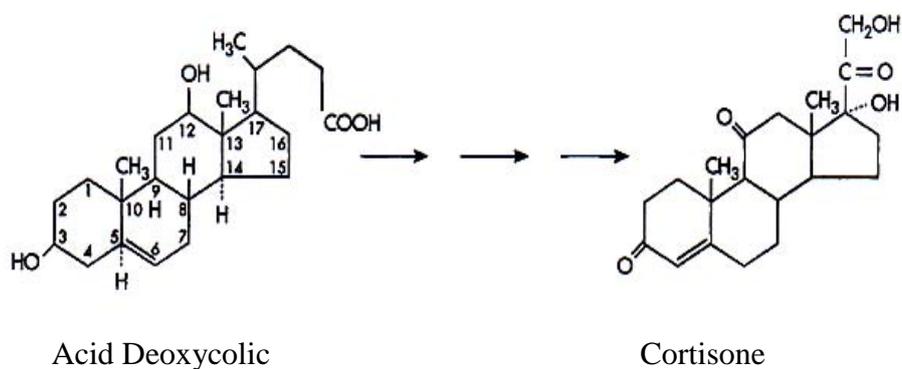


Penicillium chrysogenum

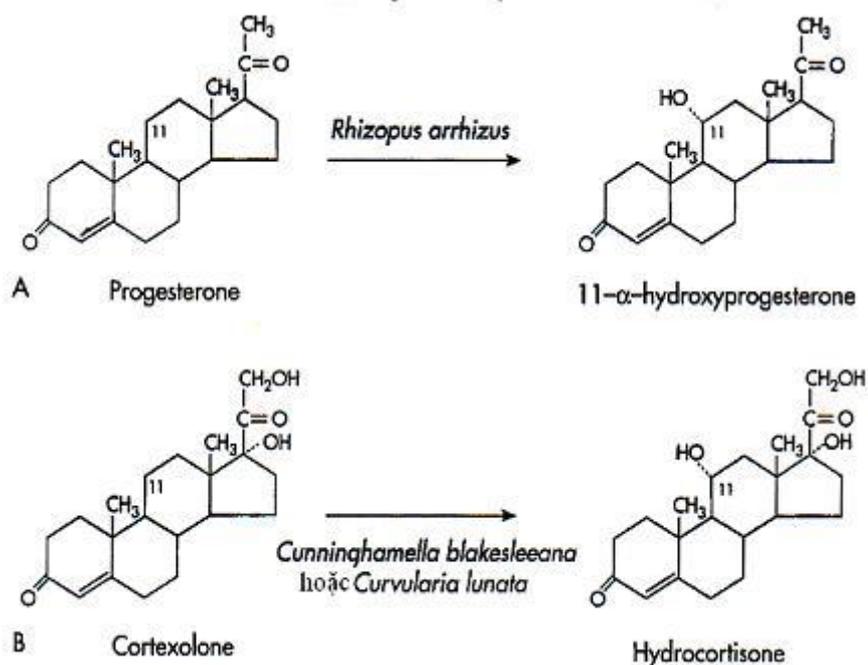
Hình 9.1. Một số loài vi nấm chuyển hóa steroid



Hình 9.2. Sản xuất steroid bằng các biện pháp hoá học kết hợp với sự chuyển hoá vi sinh vật



Hình 9.3. Cortisone được tổng hợp từ deoxycolic acid



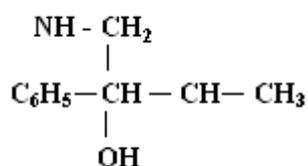
Hình 9.4. Sự sản xuất 11 α -hydroxyprogesterone và hydrocortisone

Để hydroxyl hoá vị trí 11- α của progesterone, thay cho hệ sợi nấm người ta dùng bào tử trần của *Aspergillus olivaceus*. Việc hydro hoá được tiến hành với các loài *Saccharomyces*, *Streptomyces* và *Rhizopus*.

Để loại hydro người ta dùng các vi khuẩn như *Corynebacterium* và nấm (*Fusarium*, *Calonectria*, *Cylindrocarpon*) còn để cắt vòng có thể dùng *Penicillium chrysogenum* hay *Pseudomonas testosteroni* chứa một steroidizomerase đặc hiệu.

II. SỰ TẠO THÀNH PHENYL-ACETYLCACBINOL, TIỀN CHẤT CỦA EPHEDRIN

Ephedrin là một alcaloit có trong cây *Ephedra vulgaris*. Giống như adrenalin, nó có tác dụng làm tăng huyết áp và được dùng làm thuốc để điều trị các bệnh suy nhược tuần hoàn, hen, viêm phế quản v.v. .. Cấu tạo hoá học của nó như sau :

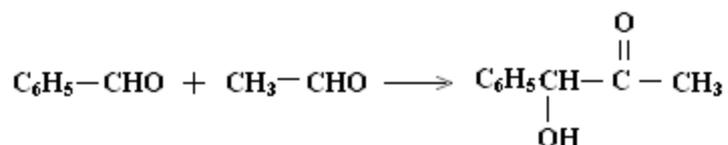


Tách chất này từ thực vật là một công việc tốn kém. Hoá tổng hợp nó cũng khó thực hiện bởi vì do hai nguyên tử C không đối xứng của phân tử mà xuất hiện bốn đồng phân lập thể trong đó chỉ có dạng L là có dược tính.

Nhờ *Saccharomyces cerevisiae* mà benzaldehyde có thể được chuyển hoá thành phenyl-axetylcacbinol, tiền chất của ephedrin, với hiệu suất 50-60% khi được bổ sung vào môi trường chứa một nồng độ tế bào là 0,8- 1% .

Trong sản phẩm chuyển hoá này, nhóm hydroxyl nằm ở cùng vị trí như trong L-ephedrin. Trong phản ứng này, các tế bào nấm men gắn "acetaldehyde hoạt động" được tạo

thành trong sự đường phân vào benzaldehyde vừa bổ sung vào môi trường (phản ứng cacboligase):



Benzaldehyde "Acetaldehyde hoạt động" L-phenyl-acetylacbinol

Sau đó phenyl-acetylacbinol được chuyển thành L-ephedrin bằng con đường hoá học nhờ một sự kết hợp hydro amin hoá.

III. SẢN PHẨM TỪ VI KHUẨN ACETIC

Trong sự oxygen hoá ethanol thành acid acetic, chuyển hoá thực chất là một sự sử dụng cơ chất. ở đây, NADPH₂ xuất hiện được chuyển qua chuỗi hô hấp để thu nhận năng lượng, song cơ chất không bị phân giải hoàn toàn do vậy quá trình cũng còn được gọi là sự oxygen hoá không hoàn toàn. Loại chuyển hoá này có thể trải qua nhiều bước.

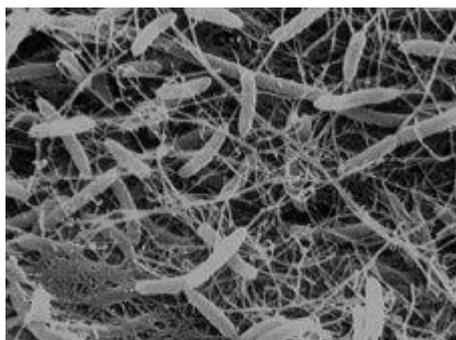
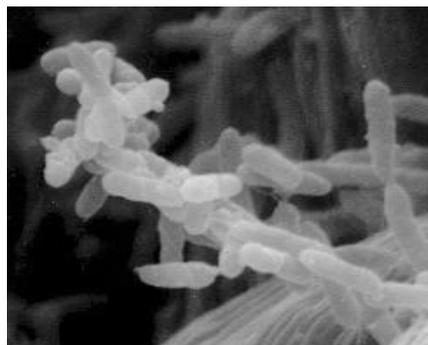
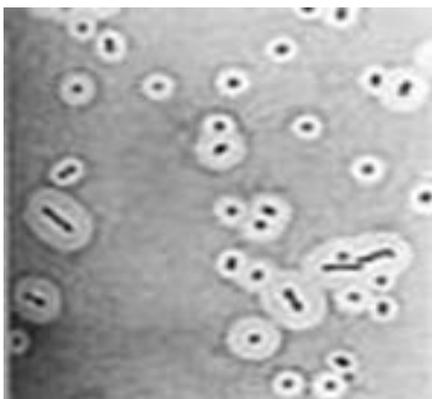
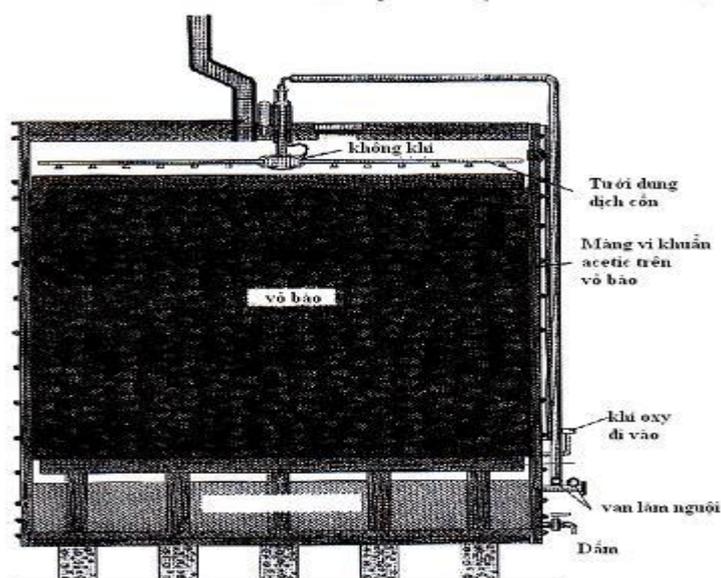
Các đại diện của vi khuẩn acetic (*Acetobacter*, *Gluconobacter*) oxygen hoá không chỉ ethanol mà cả một phổ rộng các rượu bậc một và rượu bậc hai cũng như các polyol.

Các loài vi khuẩn mà sản phẩm của chúng được giữ lại được gọi là các loại oxygen hoá thấp (*suboxygendant*). Thuộc về nhóm này có vi khuẩn acetic dùng trong công nghiệp là *Acetobacter suboxygendans*. Các loài chỉ tích lũy acid acetic tạm thời sau đó lại oxygen hoá tiếp được xếp vào nhóm oxygen hoá cao (*peroxygendant*), chẳng hạn *Acetobacter peroxygendans*, *Acetobacter pasteurianum*). Giữa hai nhóm này có các dạng chuyển tiếp.

* Sản xuất dấm ăn

Quá trình lên men được tiến hành nhờ các chủng chọn lọc của *Acetobacter suboxygendans* trong một dịch dinh dưỡng chứa glucose với 10-12% ethanol. Ethanol gần như được chuyển toàn bộ thành acid acetic. Nồng độ acid acetic cao nhất đã đạt được là 13%. Quá trình diễn ra ở 28-30°C và kéo dài khoảng 48 giờ. Trong phương pháp cổ điển Orléans, sự lên men kéo dài tới 5 tuần lễ. Trong các phương pháp hiện đại với nồng độ rượu hoặc acid acetic cao là 12%, thì một sự ngừng thông khí từ 10 đến 20 giây sẽ làm chết tới một phần ba số vi khuẩn. ở những nồng độ cơ chất thấp hơn, sự phụ thuộc vào oxygen không đến nỗi khắt khe tới như vậy.

Ngày nay các vi khuẩn acetic mới phân lập được xếp vào hai chi chính, *Acetobacter*, *Gluconobacter*. Các loài của *Acetobacter* (trên 60) chứa 5 đặc điểm: có mặt catalase, oxygen hóa ethanol qua acid acetic tới CO₂ và H₂O, oxygen hóa lactate thành cacbonate, oxygen hoá glycerol thành DHP và sự sản sinh acid gluconic từ glucose. Các vi khuẩn trong chi *Acetobacter* thường được chia thành bốn nhóm: oxygen hoá mạnh, oxygen hoá, oxygen hoá trung bình và oxygen hoá yếu.

*Acetobacter aceti**Acetobacter diazotrophicus**Acetobacter xylinum**Gluconobacter oxydans***Hình 9.5: Hình thái một số loài vi khuẩn acetic****Hình 9.6. Thiết bị sản xuất dấm theo phương pháp cổ điển**

IV. SẢN XUẤT VITAMIN C (acid L-ascobic)

Đa số động vật tổng hợp được toàn bộ lượng vitamin C cần thiết cho nhu cầu của mình và do vậy vitamin này được tìm thấy trong các mô của chúng (chủ yếu trong gan và thận với nồng độ 10-40 mg/100g). Tuy nhiên, người và một số động vật có xương sống cũng như

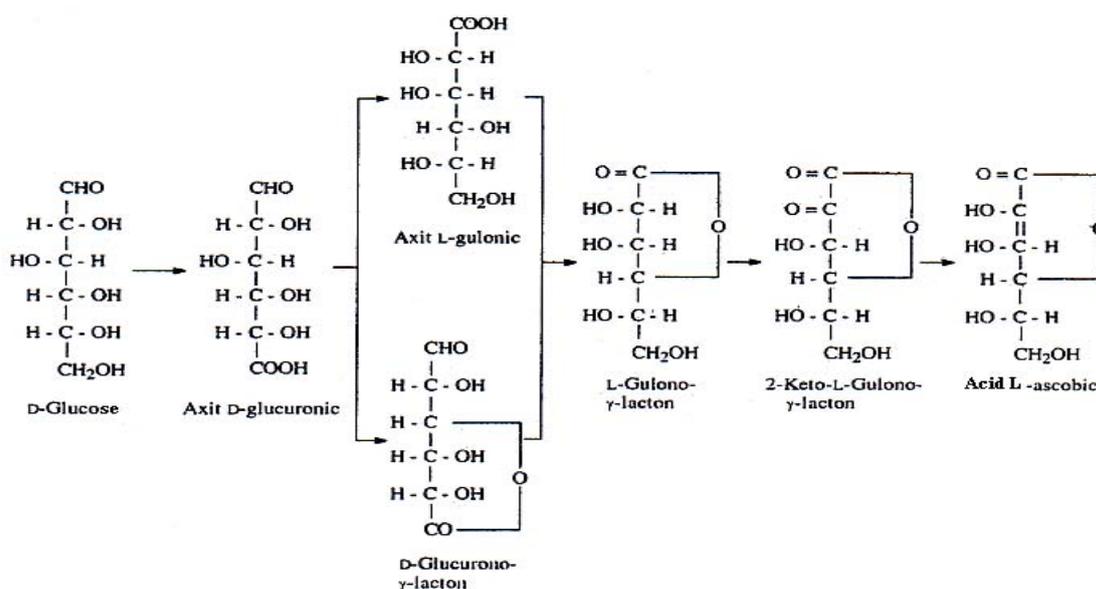
còn trùng lại phụ thuộc hoàn toàn vào nguồn vitamin C từ bên ngoài. Chủ yếu là rau (bắp cải, spinat, cà chua, 30-150 mg/100g) và quả (cam, chanh, 40-50mg/100g). đã cung cấp cho con người lượng vitamin C cần thiết (45-70 mg/ngày).

Một số vi sinh vật (nấm, nấm men, tảo) sản sinh một lượng rất nhỏ acid L-ascorbic cần cho các quá trình trao đổi chất của chúng. Cho đến nay chưa tìm thấy acid ascorbic ở vi khuẩn, hình như chúng không cần acid này.

Ở động vật có vú (trừ lợn linh trưởng và một số khác) acid L-ascorbic được tổng hợp từ D-glucose trong đó C¹ của glucose trở thành C⁶ của acid ascorbic và ngược lại. Sự tổng hợp diễn ra từ D-glucose tới acid D-glucuronic và sau đó thành lacton của acid L-gulononic.

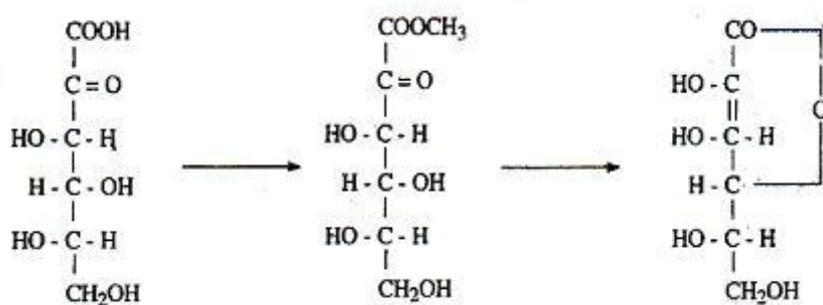
Sự oxy hoá sau đó của gulonolacton ở vị trí C², được xúc tác bằng L-gulonolacton dehydrogenase, một enzyme không tìm thấy ở người, theo sau là sự enol hóa sẽ cho acid L-ascorbic (hình 9.7). Ở thực vật, acid L-ascorbic được tạo thành từ D-glucose hay D-galactose qua một số con đường chuyển hóa.

Một trong những con đường này giữ không làm cho trật tự của chuỗi cacbon bị thay đổi, song các sản phẩm trung gian của con đường sinh tổng hợp thì còn chưa biết rõ. Có thể con đường này cũng giống con đường tổng hợp ở động vật.



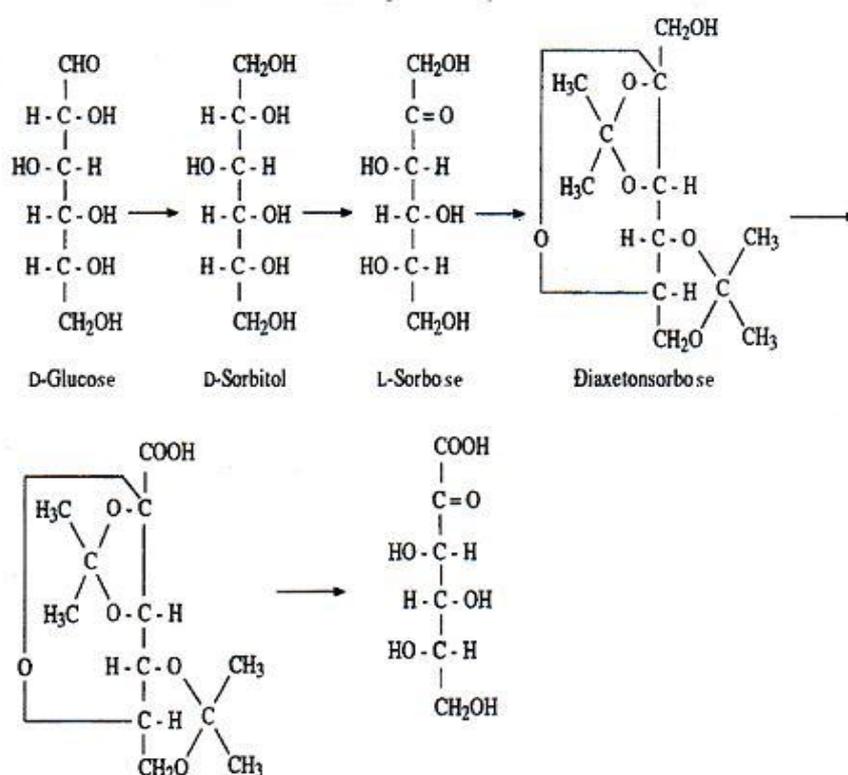
Hình 9.7: Con đường sinh tổng hợp acid L-ascorbic

Từ trên 50 năm nay, công nghiệp đã có thể đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về vitamin C của con người nhờ phương pháp bán tổng hợp từ glucose. Nhiều quá trình hoá học và sinh hóa kế tiếp nhau tham gia vào quá trình này và tất cả đều qua một sản phẩm trung gian là acid 2-keto-L-gulononic, từ đó sẽ thu được acid L-ascorbic nhờ con đường hoá học bằng cách lacton hoá và đồng phân hoá (hình 9.8).



Acid-keto-Lgulonic Methyl-2keto-Lgulonate Acid L-ascobic

Hình 9.8: Sự chuyển hoá hoá học acid 2-keto-L-gulonic thành acid L-ascobic



Hình 9. 9: Sự tổng hợp acid 2-keto-Lgulonic từ D-glucose qua D-sorbitol và L-socoza

1. Các quy trình bắt đầu bằng sự khử D-glucose

Quy trình công nghiệp này được Reinstein và Gruessner đề ra từ năm 1934 và đến nay vẫn còn sử dụng. Nó bao gồm 5 bước phản ứng kế tiếp nhau, tất cả đều đạt sản lượng tới 90-95%

1. Khử D-glucose thành D-sorbitol với sự có mặt của niken Raney, sau đó loại tới mức tối đa niken hòa tan bằng cách xử lý dung dịch sorbitol với nhựa cation.

2. Oxygen hóa D-sorbitol thành L-sorbose nhờ vi sinh vật : có nhiều chủng *Acetobacter* chịu được nồng độ niken tới 10-20 mg/l, thực hiện nhanh chóng phản ứng này trong các môi trường chứa nồng độ sorbitol cao. Quá trình lên men diễn ra ở 30°C trong một môi trường chứa 200 g/l sorbitol, 10 g/l cao ngô, và 0,5 g/l CaCO₃ với một chủng *Acetobacter suboxygendans* đã hoàn tất trong 24 giờ và cho khoảng 180g sorbose trong một lit. Sau khi lọc, loại ion và cô đặc dịch nuôi, sorbose được kết tinh (tới độ tinh khiết 99%)

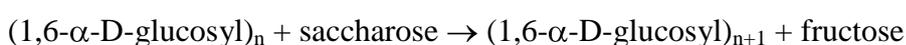
diketogluconic reductase tách ra từ *Corynebacterium* sp. ATCC 31090. Gen này đã biểu hiện tốt trong tế bào chủ song quy trình còn lâu mới có thể sử dụng cho sản xuất công nghiệp.

Nồng độ glucose cực đại được thể tái tổ hợp này chấp nhận còn ở mức tương đối thấp và năng suất còn rất nghèo nàn (0,6 g/l acid 2-keto-L- gluconic được tạo ra sau 57 giờ trong một môi trường chứa 20 g/l glucose). Vì rằng sự sinh tổng hợp acid L-ascorbic ở động vật đã được biết rõ, người ta hy vọng một ngày nào đó sẽ có thể đưa các gen mã cho các enzyme có liên quan vào một vi sinh vật thích hợp để cuối cùng có thể thu nhận vitamin C trực tiếp từ glucose.

V. SẢN XUẤT DEXTRAN

Đa số các polysaccharide ngoại bào từ vi sinh vật đều là sản phẩm của sự chuyển hóa nội bào cơ chất thành các sản phẩm trung gian, và cuối cùng thành polime. Dextran khác các polysaccharide này, cơ chất không thâm nhập vào tế bào vi sinh vật mà nó được chuyển hóa bên ngoài tế bào thành α -D-glucan phân nhánh, tức là dextran. Chỉ có saccharose được dùng làm cơ chất cho phản ứng này.

Như vậy, polysaccharide có thể được sản xuất bởi các tế bào nguyên vẹn trong môi trường nuôi hoặc có thể được tạo ra từ các chế phẩm phi tế bào chứa phức hệ enzyme destransaccharase (α -1,6-glucan : D-fructose 2-glucosyltransferase). Enzyme này giải phóng fructose và chuyển gốc glucose lên một phân tử chất nhận cũng đã được liên kết với enzyme :



Năng lượng tự do của liên kết glucoside trong phân tử disaccaride nằm vào khoảng 23 kJ trong khi năng lượng tự do của liên kết glucoside bên trong dextran thấp hơn một chút (12-17 kJ). Do vậy phản ứng diễn ra theo chiều từ trái sang phải đi kèm với một sự giảm năng lượng tự do.

Trong quá trình polime hóa chuỗi dextran đang dài ra vẫn liên kết chặt chẽ với enzyme, mức độ polime hoá tăng cho đến khi phân tử chất nhận (trong trường hợp đơn giản nhất là một phân tử cơ chất) giải phóng chuỗi polime khỏi enzyme.

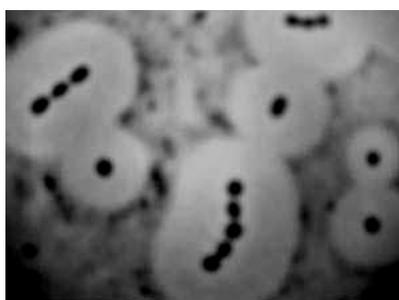
Các thành viên thấp nhất của các oligosaccharide không phải là các phân tử chất nhận có hiệu quả, ái lực đối với enzyme tăng dần theo độ dài chuỗi. Tuy nhiên, sự hạn chế về độ khuếch tán cũng tăng theo trọng lượng phân tử.

Bởi vậy, dưới các điều kiện thông thường, các dextran có trọng lượng phân tử rất cao sẽ được tạo thành, đặc biệt ở các nồng độ cơ chất thấp.

Để sản xuất các dextran có trọng lượng phân tử trung bình, cần phải tiến hành thủy phân các sản phẩm có trọng lượng phân tử cao (bằng acid hoặc bằng enzyme) và phải phân đoạn sản phẩm dưới những điều kiện kiểm soát rất cẩn thận. Trong khi đó, các polime trọng lượng phân tử thấp và đồng nhất có thể được lấy ra dùng làm nguyên liệu ban đầu cho một phản ứng khác để sản xuất các dextran có mức độ trùng hợp mong muốn.

Các nồng độ saccharose cao và có thể cả maltose khi được dùng làm nguyên liệu ban đầu sẽ tạo nên các điều kiện thuận lợi để tổng hợp các dextran mỗi trọng lượng phân tử thấp và đồng nhất kiểu đó.

Dextran được sản xuất bởi hàng loạt loài vi khuẩn, như *Streptobacterium dextranicum*, *Streptococcus mutans* và các loài khác. *Streptococcus mutans* giữ một vai trò quan trọng trong bệnh sâu răng. Sản phẩm phụ thuộc cả vào chủng lẫn vào các điều kiện sử dụng cho sinh trưởng và tổng hợp polime. Ở một số chủng, dextransaccharase nằm ở dạng hòa tan trong khi ở các chủng khác, nó liên kết một phần hay hầu như hoàn toàn với tế bào. Sản xuất dextran công nghiệp dùng *Leuconostoc mesenteroides* để tạo ra một polime chứa khoảng 95% liên kết α -1,6 (phần còn lại là liên kết α -1,3) và một trọng lượng phân tử là $4-5 \times 10^7$ dalton.



Hình 9.11: Vi khuẩn *Leuconostoc mesenteroides* có bao nhầy dày chứa hợp chất polyme là Dextran có tác dụng thay huyết tương khi cấp cứu mà thiếu huyết tương.

Các dextran được sử dụng trong ngành dược để làm chất dẫn máu (chất thay thế huyết tương). Tuy nhiên những dextran này phải có trọng lượng phân tử thấp nằm trong một phạm vi rất nhỏ (75000 ± 25000).

Các sản phẩm với trọng lượng phân tử thấp hơn được loại khỏi hệ tuần hoàn quá nhanh nên không có giá trị điều trị đầy đủ trong khi các sản phẩm có trọng lượng phân tử quá cao lại tham gia vào sự ngưng kết máu.

Các dung dịch chứa 6% loại dextran này có giá trị về độ nhớt và tập tính keo-thấm thấu rất giống với huyết tương của người. Vì các dextran không bị phân giải bởi các amylase trong cơ thể người nên khả năng phá hoại gan thấp hơn so với các chất thay thế huyết tương khác. Các dextran được mô cơ thể hấp thụ rất tốt, do vậy có thể được sử dụng cho nhiều loại dược phẩm, chẳng hạn sắt trong khi điều trị bệnh thiếu máu.

Gần đây, người ta cho rằng dextran có thể được sử dụng để tạo nên một lớp ưa nước ở trên bề mặt các vết bỏng rộng và hấp thụ các chất tiết từ các vết thương.

Trong việc sản xuất các dextran, việc duy trì cung cấp oxygen giữ một vai trò quan trọng đặc biệt vì trong quá trình lên men dung dịch trở nên rất nhớt.

Hiện nay người ta chưa có khả năng tính toán mối tương quan giữa năng lượng khuấy trộn đưa vào và tốc độ chuyển động của oxygen trong dung dịch với tập tính phi Newton của dịch lỏng nên trong đa số trường hợp người kỹ sư sinh học chỉ còn biết dựa vào kinh nghiệm của bản thân mình.

Môi trường lên men chứa các muối vô cơ, 2% cao ngô và saccharose. Sắt và mangan là những nguyên tố vết rất quan trọng. Dung dịch được khử trùng bằng sức nóng, được chuyển sang bể lên men và cấy giống sau khi đã làm lạnh.

Lên men được tiến hành ở 25°C, trong quá trình này, chủ yếu do sự tạo thành acid lactic, giá trị pH giảm từ 6,5-7,0 xuống còn 4,0. Dung dịch lên men được khuấy liên tục và thông khí.

Khi dextran được tạo thành, dung dịch trở nên đậm đặc cho đến khi quá trình kết thúc sau 3 hay 4 ngày, một khối dạng keo sẽ được tạo thành. Dịch lên men chứa chủ yếu là dextran, fructose tự do, acid lactic, etanol và các vi sinh vật. Dextran sau đó sẽ được kết tủa bằng methanol. Dịch trong được chất lại và methanol được thu hồi bằng phương pháp cất.

Nếu lên men dẫn đến việc tạo thành các dextran có trọng lượng phân tử cao thì chúng sẽ được thủy phân bằng acid chlohydric ở 100-105°C.

Sự hoàn tất thủy phân được xác định bởi độ nhớt. Sau một giai đoạn phản ứng nhất định, phản ứng lúc đầu được làm chậm lại bằng cách làm lạnh sau đó dừng lại hoàn toàn bằng cách bổ sung hydroxygenate natri.

Dung dịch được trộn với các yếu tố hấp phụ và lọc qua kizengua. Cuối cùng dextran được kết tủa phân đoạn với methanol, các phân đoạn mong muốn sẽ được tái hòa tan, lọc, cô đặc và sấy phun. Vì rằng việc thủy phân bằng acid khó kiểm soát và việc phân đoạn thường không thu được các phân có thành phần mong muốn, nên người ta đã tìm cách tổng hợp trực tiếp các dextran có trọng lượng phân tử thấp. Để làm điều này cần có kiến thức chắc chắn về động học của phản ứng.

Trọng lượng phân tử bị ảnh hưởng bởi :

- a) nồng độ của saccharose,
- b) chất nhận glucose,
- c) nhiệt độ phản ứng.

Chẳng hạn khi vắng mặt một chất nhận, một dung dịch saccharose 10%, sẽ thu được một sản phẩm với một trọng lượng phân tử lớn hơn 108 dalton. ở nồng độ 70% saccharose, các phân tử dextran chủ yếu có trọng lượng phân tử thấp sẽ được tạo thành. Nếu các dextran trọng lượng phân tử thấp được đưa vào làm môi thì enzyme sẽ có nhiều điểm khởi đầu và các polime tương đối đồng nhất sẽ được tạo thành. Điều quan trọng là các tế bào vi khuẩn không chứa các vết của các dextran có trọng lượng phân tử cao. Vì vậy nguyên liệu cấy phải được rửa vài lần bằng dung dịch muối để loại các dextran bám vào.

Như vậy một hỗn hợp 2% (w/v) một chất nhận có trọng lượng phân tử thấp (1000-25000) với một nồng độ đường là 10% ở 15°C và pH 5,0 sẽ cho một sản phẩm mà 50% có trọng lượng phân tử trong phạm vi mong muốn giữa 50000 và 100000 dalton. Các dextran này được sử dụng trong bệnh viện và không bị phân giải bằng thủy phân.

Theo tính toán sản lượng dextran vào năm 1980 ở Tây Âu là 1000 tấn, và trên thế giới là 200.000 tấn. Trong khi hầu hết các polysaccharide ngoại bào được sử dụng dưới dạng không bị biến đổi về mặt hóa học thì dextran dùng cho ngành dược và nhiều mục đích khác

lại được chuyển hóa thành các phân đoạn có trọng lượng phân tử tương đối thấp giữa 40000 và 70000 dalton nhờ các quy trình thủy phân thích hợp (thủy phân bằng acid loãng).

Thị trường chủ yếu của các dẫn xuất dextran dưới dạng các chế phẩm liên kết chéo chứa cấu trúc không gian ba chiều mà các nhóm chức năng được gắn vào đó nhờ các liên kết ete với các gốc glucose chính là các phòng thí nghiệm sinh hóa học.

Để sản xuất các loại gel cho mục đích sinh hóa, dextran có trọng lượng phân tử tương đối cao được dùng để tổng hợp các sản phẩm có tính thu hồi nước cao. Phản ứng với dextran trong dung dịch kiềm đã dùng epichlorohydrin để thu nhận gel, gel này sau đó được nghiền và trung hòa. Vì phản ứng giữa epichlorohydrin và polysaccharide là phản ứng tỏa nhiệt, cần chú ý để nhiệt tỏa ra được loại bỏ khỏi hệ thống.

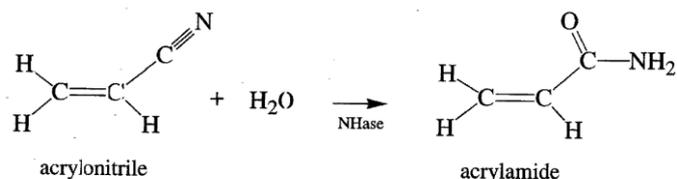
Điều này là đặc biệt quan trọng vì gel được tạo thành trong phản ứng có tính dẫn nhiệt thấp. Vì các gốc đường khử tận cùng của các phân tử dextran có tính phản ứng capo và dễ bị phân giải trong phản ứng polime nên chúng bị khử thành sorbitol và borohydride trong dung dịch kiềm trước khi bổ sung epichlorohydrin.

Mặc dầu các gel liên kết chéo thuộc loại sephadex bản thân chúng đã cực kỳ có ích trong việc phân đoạn các nguyên liệu hoạt động về mặt sinh học, song sự chuyển hóa chúng thành các dẫn xuất ete sẽ làm tăng giá trị tiềm tàng của chúng. Các ete carboxymethyl hay dimethylaminoethyl là những sản phẩm kiểu đó. Những hợp chất này khác biệt nhiều với các dextran liên kết chéo về tập tính trương của chúng trong dịch lỏng. Các sản phẩm có độ liên kết chéo khác nhau sẽ cho ra các chất hấp phụ có lỗ khác nhau và giới hạn phân đoạn khác nhau.

Việc đưa các nhóm hóa học khác vào các phân tử sẽ cho ra các chất hấp phụ mang đặc điểm ưa lipid. Chúng có thể được dùng để phân đoạn các lipid, v.v. và có thể dùng trong dung môi lỏng cũng như trong các dung môi hữu cơ phân cực. Một số dextran khác được dùng làm các chất mang trong các quy trình nuôi cấy tế bào. Dưới dạng này (có tên thương mại do hãng dược phẩm AB của Thụy Điển đặt ra là Sephadex), dextran được ứng dụng rất rộng rãi để tách và thuần khiết các phân tử sinh học khác nhau về điện tích, về kích thước phân tử v.v.. Protein không bị biến tính bởi mạng lưới polime ưa nước và sự hấp phụ không đặc hiệu là rất thấp.

VI. SẢN XUẤT ACRYLAMIDE

Vào thập niên 1980, quy trình lên men VSV chuyển hóa acrylonitrile thành acrylamide ra đời với sản lượng hàng tấn. Đây là quy trình lên men tạo thương phẩm có ý nghĩa quan trọng không chỉ bởi giá rẻ, ít gây ô nhiễm môi trường, mà còn chứng minh rằng nhiều hóa chất thông dụng có thể sản xuất công nghiệp nhờ chuyển hóa sinh học. Acrylamide được dùng trong thu hồi dầu mỏ và chất kết cục (flocculants) hay phụ gia trong nhiều sản phẩm khác. Mỗi năm 200 000 tấn được sản xuất bằng chất xúc tác hóa học là muối đồng (Cu) gây hậu quả nặng nề. Quy trình xúc tác sinh học mới do enzyme nitrile hydratase của vi khuẩn chuyển hóa acrylonitrile thành acrylamide không gây những bất lợi và có hiệu quả kinh tế.



Chủng vi khuẩn *Pseudomonas chlororaphis* B23 đã được phân lập từ đất là vi khuẩn sử dụng isobutyronitrile (isobutyronitrile-utilizing bacterium), thực hiện chuyển hóa sinh học có tính thương mại biến acrylonitrile thành acrylamide. Ở pha ổn định của tế bào *P.chlororaphis* B23, sự tích lũy acrylamide trong môi trường đạt tới 40% khối lượng khô. Sự tích lũy acrylamide do 3 nguyên nhân:

1. Phản ứng xúc tác chuyển hóa acrylonitrile thành acrylamide;
2. Nitrile hydratase không bị ức chế ngược bởi acrylamide;
3. Nitrile hydratase không nhạy cảm với acrylamide.

Việc chọn giống và cố định enzyme nâng cao hiệu quả quy trình này.

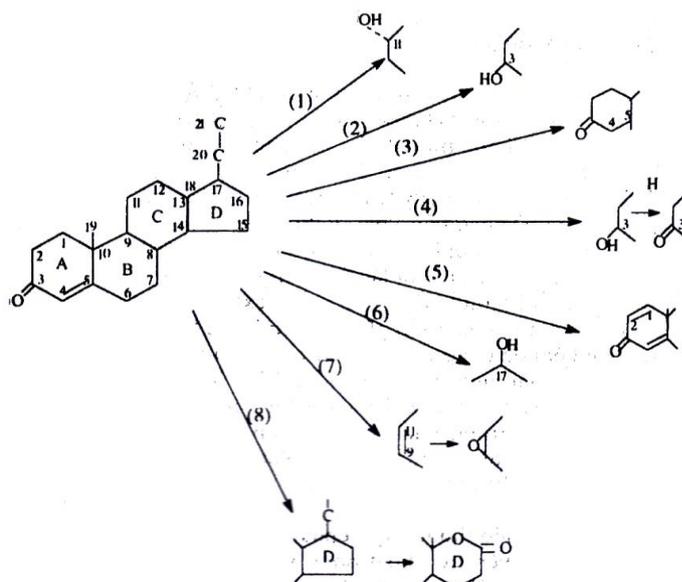
*TÓM TẮT CHƯƠNG

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

Các nguyên lí chung và phương pháp sản xuất một số sản phẩm chuyển hóa storoid, phenyl-acetylcabinol, acid acetic, acid gluconic, dextran và chuyển hóa acrylonitrile thành acrylamide.

*Câu hỏi ôn tập chương 9

1. Dựa vào sơ đồ sau đây, hãy nêu các nguyên tắc của sự chuyển hóa steroid:



2. Nêu các bước chính trong quá trình sản xuất một hormone steroid.
3. Phân biệt các vi khuẩn acetic peroxydant và suboxydant

4. Nêu sự khác biệt trong các phương pháp sản xuất dấm (Orleans, Spring, phương pháp chìm).

5. Nêu ứng dụng và nguyên tắc hóa học của sự tạo thành các dextran.

6. Một trong những điều phức tạp chủ yếu gặp trong hóa tổng hợp cortisone là.....

Đây là bước quyết định để tạo nên.....Trong vi sinh vật học công nghiệp, có thể dùng các vi sinh vật sau đây để thực hiện bước phản ứng này:

7. Dextran được sản xuất công nghiệp nhờ.....Trong môi trường chứa saccharose, vi khuẩn này tiết ra enzyme.....có chức năng

8. Vai trò của vi khuẩn trong quá trình chuyển hóa acrylonitrile thành acrylamide

* Tài liệu đọc thêm

1. Kiều Hữu Ảnh, 1999. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBK&KT.

2. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biền Văn Minh, 1998. Vi sinh học công nghiệp, NXBGD.

* Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan, 2006. Vi sinh học công nghiệp, NXBGD.

2. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

3. <http://wikipedia>

* Giải thích thuật ngữ

Chuyển hóa là tất cả mọi biến đổi về hóa sinh cùng với việc tạo ra năng lượng, xảy ra trong các tế bào của cơ thể sống, đồng thời cũng là nền tảng của tất cả mọi hiện tượng sinh học. Các phản ứng của “chuyển hóa” được phân loại thành katabolism (*phân hủy* có giải phóng năng lượng) và anabolism (*tổng hợp* dẫn tới sự phát triển của hệ tế bào).

Steroid hormones điều chỉnh những trạng thái trao đổi chất khác nhau ở động vật kể cả ở người.

Vitamine. Theo tiếng Latinh, “vita” có nghĩa là “sự sống” và “amine” là thành phần hóa học cần thiết cho sự sống.

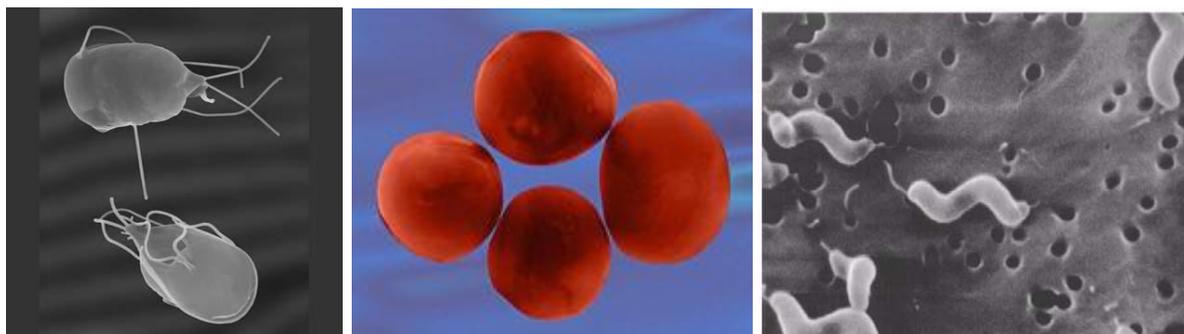
Chương 10

XỬ LÝ NƯỚC THẢI BẰNG BIỆN PHÁP SINH HỌC

I. VI SINH VẬT HỌC CỦA CÁC NGUỒN NƯỚC

Nước sạch (nước uống được) được định nghĩa là nước không chứa các tác nhân gây bệnh, các độc tố hoà tan, có độ đục, mùi, màu và vị khó chịu. Rõ ràng là, để có được nước sạch không phải là điều dễ dàng và ở đây, vi sinh vật vừa là nguyên nhân vừa là giải pháp của vấn đề.

Do thường xuyên tiếp xúc với không khí, đất cũng như các dòng chảy của các hệ thống thoát, nước bề mặt luôn luôn thu nhận các vi sinh vật hoại sinh có hại. Các vi sinh vật gây bệnh nổi bật nhất của nước thường gặp trong thời gian gần đây là : các động vật nguyên sinh *Giardia* và *Cryptosporidium*, các vi khuẩn *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, và *Mycobacterium*, các virus viêm gan A và Norwalk. Một số trong các tác nhân này (đặc biệt là các động vật nguyên sinh sinh bào nang) có thể tồn tại trong các thủy vực tự nhiên trong một thời gian dài ngoài cơ thể con người, trong khi một số khác chỉ tồn tại ở đó một cách tạm thời và nhanh chóng biến mất. Sự có mặt của vi sinh vật trong nước uống phải liên tục được giám sát để đảm bảo rằng nước không chứa các tác nhân lây nhiễm.



Giardia lamblia

Cryptosporidium parvum

Campylobacter jejuni.

Hình 10.1. Các vi sinh vật gây bệnh nổi bật nhất của nước thường gặp

Các tiêu chuẩn của Cơ quan Bảo vệ môi trường (EPA) về độ vệ sinh của nước dựa chủ yếu vào hàm lượng các coliform, đây là các vi khuẩn gram âm, lên men đường lactose, sinh khí như *Escherichia coli*, *Enterobacter* và *Citrobacter*.

Sự nhiễm phân của nước biển thường dễ dẫn đến các bệnh đường ruột dạ dày do các cầu khuẩn gram dương gây ra, mà trước hết là các *Enterococcus*. Đôi khi, các thể thực khuẩn của coliform và các reovirus (virus Norwalk) cũng được dùng làm các vi sinh vật chỉ thị về độ nhiễm bẩn bởi phân, song sự phát hiện chúng khó hơn và đòi hỏi nhiều vấn đề kỹ thuật hơn.

1. Đánh giá chung về chất lượng nước

Trong kỹ thuật xác định hàm lượng vi khuẩn tổng số, một mẫu nước nhỏ được cấy lên bề mặt một môi trường rắn. Con số khuẩn lạc chỉ nói lên quần thể vi khuẩn sống sót tổng số có mặt mà không cho phép phân biệt được các coliform với các loài khác. Thông tin này đặc biệt có ích trong việc đánh giá hiệu quả của các bước làm sạch nước khác nhau. Một yếu tố chỉ thị khác đối với chất lượng nước là nồng độ oxygen hòa tan. Nó chỉ ra rằng nước chứa

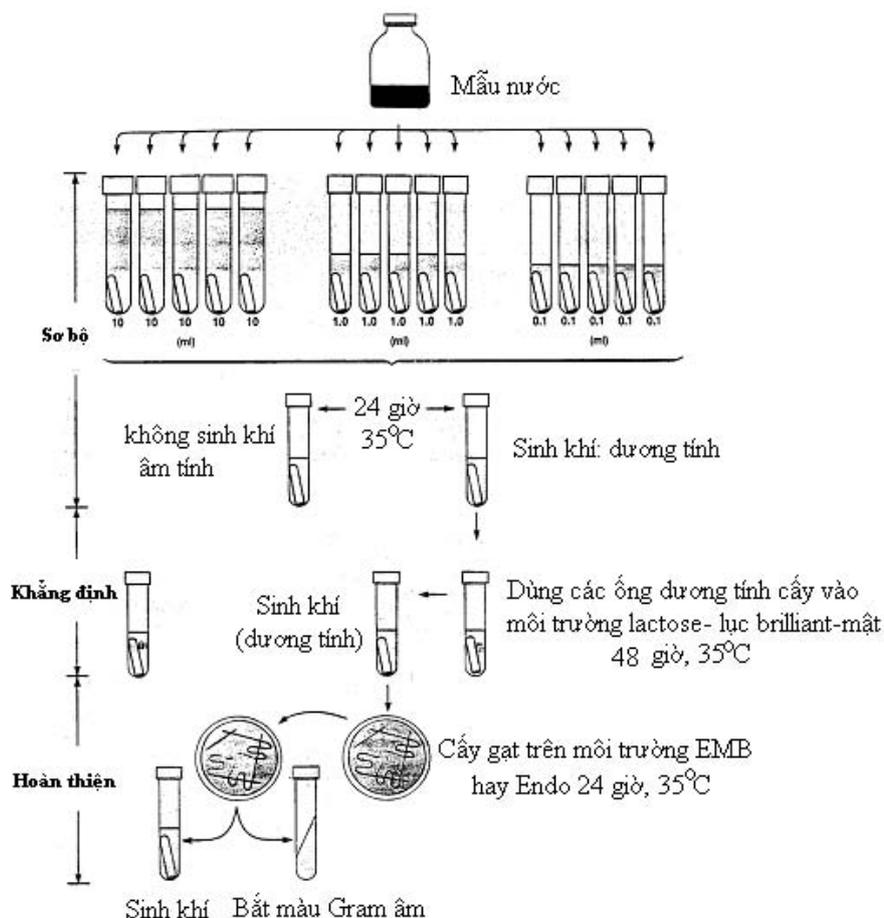
nồng độ chất hữu cơ và vi khuẩn cao sẽ có hàm lượng oxygen thấp vì oxygen đã bị tiêu thụ cho hô hấp hiếu khí.

Đếm số lượng các coliform

Có hai phương pháp tiêu chuẩn dùng để phát hiện và xác định số lượng các coliform : xác định hàm lượng thường gặp nhất (MPN = most probable number) và phương pháp xác định qua màng lọc.

Trong kỹ thuật MPN, coliform được xác định bằng một loạt các phép thử : phép thử sơ bộ, phép thử khẳng định và phép thử hoàn thiện (hình 10.2).

Phép thử sơ bộ sử dụng 3 dãy ống nghiệm, mỗi dãy chứa những nồng độ canh thang lactose và lauryl khác nhau. Một dãy gồm 5 ống nghiệm trong chứa các ống Durham đặt ngược để thu khí sinh ra trong quá trình lên men. Ba dãy nói trên lần lượt được cấy 10, 1 và 0,1 ml mẫu nước. Sau khi giữ 24 giờ, các ống được đánh giá theo sự sinh khí. Kết quả dương tính về sinh khí sẽ là bằng chứng sơ bộ về sự có mặt của các coliform. Số ống dương tính sẽ được đếm và được dùng để tính số lượng thường gặp của coliform dựa theo một bảng thống kê. Phép thử khẳng định được tiến hành bằng cách cấy mẫu dương tính vào một ống nghiệm khác. Phép thử sẽ được hoàn thiện nhờ phân lập các loài coliform trên các môi trường chọn lọc và phân hóa, nhuộm Gram và khẳng định lại việc sinh khí.



Hình 10.2. Quy trình xác định hàm lượng coliform tổng số (MPN) trong một mẫu nước.

Xử lý nguồn nước

Quá trình xử lý nước gồm nhiều bước. Trước hết nước được giữ trong các bể lớn vừa là nơi dự trữ vừa là bể sa lắng. Việc đưa nước vào các bể này phải được kiểm tra nghiêm ngặt để tránh bị nhiễm bẩn bởi xác động vật, chất thải và nước thải. Ngoài ra, sự sinh trưởng quá mức của vi khuẩn lam và tảo sẽ làm chất lượng nước xấu đi, cần được phòng ngừa bằng sulfate đồng (0,3 ppm). Quá trình sa lắng để loại bỏ các hạt lớn cũng được thúc đẩy trong giai đoạn dự trữ.

Tiếp theo, nước được bơm vào các hồ hoặc bể, ở đó sẽ tiếp tục xảy ra sự sa lắng, sự thông khí và sự lọc. Nước trước hết được lọc qua đệm cát hoặc đất bột chứa nhiều tảo cát để loại vi khuẩn, virus và các động vật nguyên sinh, rồi qua than hoạt tính để loại các chất hữu cơ không mong muốn. Nước thu thập từ các hệ thống lọc này được đưa về các bể dự trữ qua các ống dẫn. Bước cuối cùng trong xử lý nước là tẩy trùng hóa học bằng cách bơm bóng khí clo qua các bể cho đến khi đạt được nồng độ 1-2 ppm, song một số cơ sở xử lý nước ở các thành phố cũng sử dụng cloramin cho mục đích này. ở Mỹ, người ta cũng sử dụng cả ozon hoặc peoxygende cho giai đoạn tẩy trùng, song phương pháp này đòi hỏi giá thành cao và không giữ được hiệu quả kháng khuẩn cho một thời gian dài. Chất lượng cuối cùng của nước có thể khác nhau, song hầu hết nước máy đều hơi có mùi và vị do ảnh hưởng của giai đoạn tẩy trùng.

II. XỬ LÝ NƯỚC THẢI

1. Đặc tính của nước thải

Nước thải, hay nước cống, là nguồn nước đã sử dụng của một cộng đồng và bao gồm :

1. Các chất thải sinh hoạt hòa trong nước, bao gồm phân người và các loại nước rửa đi từ các cống rãnh của các căn hộ và của cả thành phố đổ vào hệ thống cống.

2. Các chất thải công nghiệp hòa trong nước như acid, dầu, mỡ, chất hữu cơ có nguồn gốc động thực vật do các nhà máy thải ra.

3. Nước ngầm, nước bề mặt và nước khí quyển thâm nhập vào hệ thống nước thải.

2. Các quá trình xử lý nước thải

Việc đưa nước thải không được xử lý đầy đủ vào sông hồ có thể dẫn đến một hoặc nhiều hậu quả không mong muốn sau đây:

1. Tăng khả năng lan truyền của các vi sinh vật gây bệnh.

2. Tăng mối hiểm họa khi sử dụng các thủy vực tự nhiên làm nguồn cung cấp nước uống.

3. Làm cho các loại trai sò bị nhiễm bẩn gây hậu quả không an toàn khi dùng làm thức ăn cho người.

4. Gây tổn thất lớn trong quần thể chim nước do nguồn thức ăn của chúng bị ô nhiễm.

5. Gây nguy hiểm cho người bơi và làm giảm giá trị của những thủy vực dành cho các mục đích giải trí.

6. Làm cạn kiệt nguồn oxygen của nước do sự có mặt của các chất hữu cơ không bền ở trong nước thải, do vậy hủy hoại sự sống trong nước.

7. Tạo ra các tình trạng không mong muốn như có mùi khó chịu hoặc tích lũy các chất cặn bã do vậy làm giảm giá trị tài sản và tính năng giải trí.

Có nhiều phương pháp xử lý nước thải, chúng được chia thành hai loại, một loại áp dụng cho từng hộ gia đình hoặc các đơn vị riêng lẻ và một loại cho cả cộng đồng hoặc thành phố.

Thiết bị xử lý cho các đơn vị nằm độc lập

Việc xử lý nước thải đi ra từ các hộ gia đình hoặc các đơn vị nằm độc lập như khách sạn hoặc trung tâm thương mại có thể được thực hiện nhờ các loại bể phân giải kỵ khí hay hiếu khí. Bể tự hoại là loại bể phân giải kỵ khí thường gặp nhất dùng để xử lý một lượng nước thải hạn chế. Bể tự hoại giải quyết hai mục tiêu : sa lắng các nguyên liệu rắn và phân giải sinh học các chất rắn này. Nguyên liệu sẽ được tích lũy ở phần đáy của bể được gọi là bùn. Khi nước thải đi vào bể, sự sa lắng xảy ra ở phần bên dưới, cho phép loại đi một dịch lỏng chứa ít chất rắn lơ lửng (suspended solid - S.S.) hơn. Phần chất rắn sa lắng sẽ được tiếp tục phân giải bởi các vi khuẩn kỵ khí, các sản phẩm cuối cùng sẽ là các hợp chất hữu cơ, có BOD cao và có mùi. Dịch đi ra từ bể tự hoại sẽ được dẫn vào lòng đất phía dưới lớp bề mặt, ở đó sẽ diễn ra sự phân giải tiếp tục nhờ vi sinh vật mà chủ yếu là sự oxygen hóa hiếu khí các chất hữu cơ có trong dịch lỏng. Kiểu xử lý này không đảm bảo có thể loại trừ toàn bộ các tác nhân gây bệnh. Bởi thế, dịch thải đi ra từ các bể tự hoại không được phép dẫn thẳng vào các nguồn nước dành cho việc cung cấp nước uống.

Cũng đã có các hệ thống xử lý hiếu khí nước thải dành cho các đơn vị dân cư nhỏ. Các hệ thống này bao gồm các bể và thiết bị nhằm làm giảm kích thước các chất rắn nạp vào thành các hạt cỡ nhỏ, một bể thông khí và một bể sa lắng. Oxygen được bơm vào bể thông khí cho phép xảy ra sự oxygen hóa liên tục và sự phân giải hiếu khí các chất rắn có trong nước thải. Các hệ thống này đặc biệt cần thiết cho những địa phương nằm trên các vùng đất có tính thấm không cao (như đất sét) hoặc các loại đất chứa nhiều đá.

Thiết bị xử lý nước thải đô thị

Các thiết bị xử lý nước thải đô thị thực hiện hàng loạt quá trình xử lý. Các yêu cầu cho từng công đoạn xử lý được trình bày trên bảng .

1. Xử lý sơ cấp

Việc loại bằng biện pháp vật lý các chất rắn dạng thô được thực hiện qua ba bước :

a) loại các vật rắn lớn như hộp, lốp xe, chai lọ, can;

b) sàng lọc các vật rắn nhỏ như đá, sỏi;

c) sa lắng (sơ cấp) để loại các nguyên liệu dạng hạt nhỏ hơn như phân và giấy. Các nguyên liệu dạng hạt này (bùn hay chất rắn sinh học) thường được xử lý bằng con đường sinh học nhờ sự phân giải kỵ khí trong một bể phân giải bùn (sludge digester)

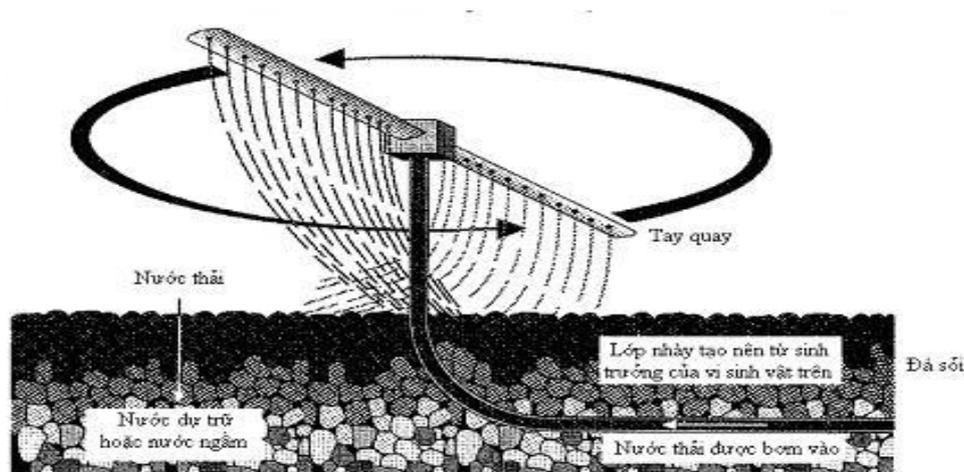
Bảng 10.1: Các mức độ và yêu cầu của quá trình xử lý nước thải

Mức độ xử lý	Yêu cầu xử lý
Sơ cấp	Loại khoảng 30% BOD và 60% chất rắn lơ lửng tổng số (TSS).
Thứ cấp	Loại cả BOD lẫn chất rắn lơ lửng tổng số tới chỉ còn 25-30 mg/l, song phần được loại không nằm dưới 85%, pH nằm giữa 6,0 và 9,0.
Tam cấp	Loại cả BOD lẫn chất rắn lơ lửng tổng số tới chỉ còn ít hơn 9 mg/l, hoặc loại trên 95% BOD và TSS; trong những trường hợp l đặc biệt cần loại bỏ cả các chất dinh dưỡng (như photphat và nitrat).

Xử lý thứ cấp (bằng con đường sinh học)

Đó là sự phân giải các chất hữu cơ và quá trình làm giảm BOD. Một hoặc nhiều trong số các phương pháp sau đây sẽ được sử dụng:

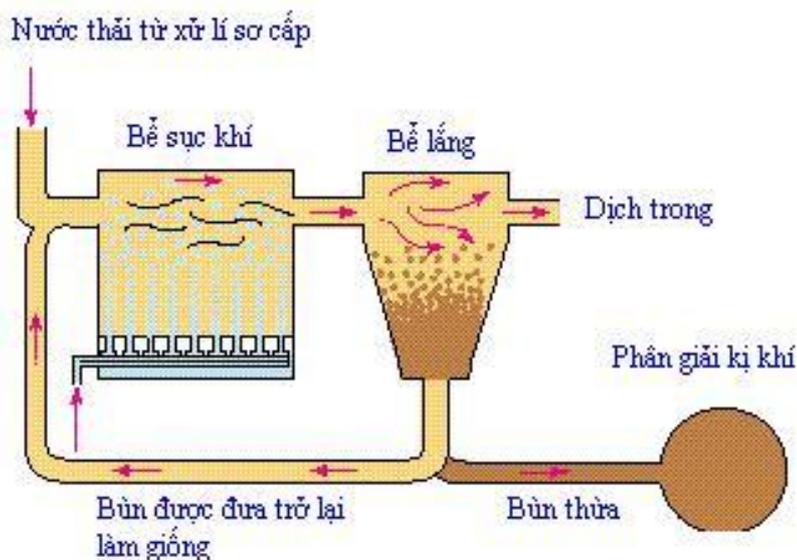
a) Lọc trích (trickling filters) : Nước thải được phun (và qua đó được thông khí) lên một lớp đệm đá. Mỗi viên đá sẽ được phủ bởi một lớp sinh khối nhày chứa vi khuẩn được gọi là *zoogloea*. Chính *zoogloea* sẽ phân giải các thành phần của nước thải khi nước thải chảy thành các dòng nhỏ trên các viên đá (hình 10.3)



Hình 10.3. Xử lý nước thải theo phương pháp lọc trích

b) Bùn hoạt tính (activated-sludge) :

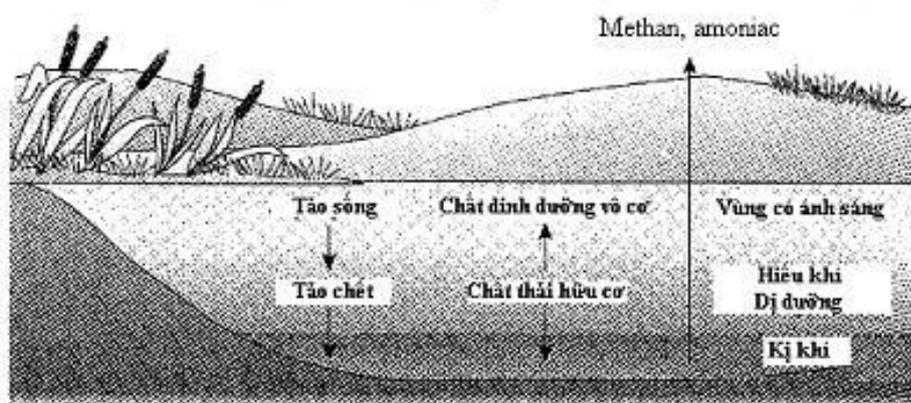
Nước thải được thông khí mạnh dẫn đến việc tạo thành các hạt chứa đầy vi sinh vật phân giải hiếu khí. Quá trình này diễn ra trong các bể thông khí, sau đó nước thải được đưa sang một bể sa lắng để loại bỏ các chất rắn sinh học (hình 10.4).



Hình 10.4. Xử lý nước thải theo phương pháp bùn hoạt tính

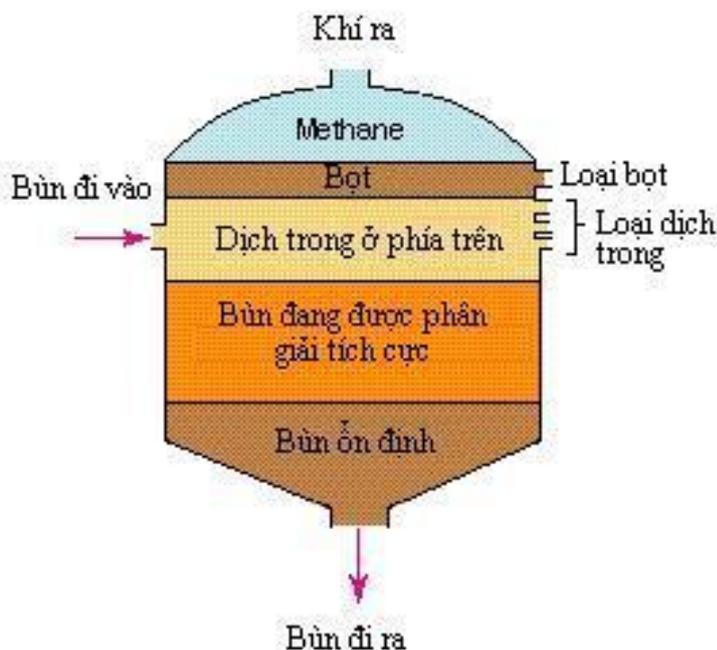
c) Hồ oxygen hoá (oxygenation ponds hay lagoons) :

Trong các hồ nông (chỉ sâu từ 1 đến 2 m), tảo, như các loài thuộc chi *Chlorella* sẽ tiêu thụ các chất dinh dưỡng của nước thải và sản sinh oxygen cần thiết cho sự phân giải hiếu khí (hình 10.5).



Hình 10.5. Hồ oxygen hoá

d) Bể phân giải bùn (sludge digester) : Tại đây xảy ra sự phân giải các chất rắn đã được tích lũy trong xử lý sơ cấp và đôi khi sau sự xử lý thứ cấp. Các vi sinh vật kỵ khí sẽ phân giải bùn trong các bể kín, tạo ra methane (có thể được dùng làm nhiên liệu đốt nóng), CO_2 và một lượng nhỏ các khí nitơ và hydro. Sự phân giải kỵ khí nước thải là một quá trình diễn ra chậm (hình 10.6).



Hình 10.6. Xử lý bùn trong bể phân giải kỵ khí

Xử lý tam cấp

Quá trình này loại bỏ các chất ô nhiễm còn lại sau xử lý thứ cấp. Nhờ quá trình này, một loại nước thải có chất lượng cao thích hợp, với nhiều mục đích tái sử dụng sẽ được tạo ra. Xử lý tam cấp có thể bao gồm một hoặc nhiều công đoạn sau đây :

- Keo tụ hoá học (chemical flocculation) để loại các chất dạng hạt còn lưu lại .
- Bước lọc cuối cùng (final filtration) để loại các chất rắn, các chất này sau đó sẽ được làm khô hoặc đốt, hoặc được dùng làm phân.
- Loại bỏ hoặc làm giảm hàm lượng photphat và nitrate.
- Chlor hóa dịch thải để giết chết các nhóm vi sinh vật mà một số có thể là các vi khuẩn gây bệnh. Dịch thải cuối cùng sẽ phải được loại clo trước khi đưa vào các thủy vực bởi vì clo có hại cho các sinh vật thủy sinh.

III. LÊN MEN METHANE

1. Quá vi sinh vật học tổng thể

Sự tạo thành methane là một quá trình vi sinh vật học tổng thể trong đó chất hữu cơ được chuyển hóa thành methane. Sohlenen khi khẳng định các nghiên cứu trước đây của Omelianski, đã chứng minh rằng sự lên men các chất hữu cơ một mặt sẽ tạo thành các sản phẩm cuối cùng như H_2 , CO_2 và acid acetic, và mặt khác sẽ sinh ra methane nhờ sự khử CO_2 bởi H_2 . Việc hai quá trình này có quan hệ với nhau trong quá trình tạo thành methane tổng thể đã bị bỏ qua trong nhiều năm vì những khó khăn về mặt phương pháp trong các thực nghiệm vi sinh vật học.

Tương tự, ý nghĩ cho rằng H_2 dưới dạng phân tử hoạt động như một sản phẩm trung gian giữa hai giai đoạn đã không được thừa nhận cho đến năm 1979. Thêm vào đó, Bryant còn giả thiết về sự tồn tại của một giai đoạn thứ ba trong quá trình vi sinh vật học tổng thể của

sự tạo thành methane, bằng cách đó cung cấp những mối liên quan còn thiếu giữa một phía là các acid béo bay hơi chứa 3 nguyên tử cacbon hoặc hơn và một phía khác là acetate, H_2 và CO_2 . Dần dần, ý nghĩ về một mối liên quan giữa các vi khuẩn lên men chịu trách nhiệm đối với pha thứ nhất của quá trình tạo thành methane tổng thể và các vi khuẩn sinh methane chịu trách nhiệm đối với pha thứ hai đã được chứng minh rõ ràng tới mức diễn biến của quá trình này có thể được biểu diễn dưới dạng một mô hình sinh học.

Bước một

Các loài vi sinh vật chủ yếu của tiêu quần xã lên men methane có khả năng tấn công các polime ngay cả khi các chất này nằm ở thể rắn. Các loài vi sinh vật này chứa các enzyme ngoại bào, tức là các enzyme được tế bào xuất ra phía bên ngoài khoang chu chất và thậm chí có thể được tiết vào trong môi trường. Các enzyme này sẽ thủy phân các nguyên liệu polime thành các nguyên liệu có trọng lượng phân tử thấp, thậm chí các monome: protein thành các acid amine, polisaccharide thành các oligo- và các monosaccharide. Các phân tử nhỏ hòa tan sau đó sẽ được các vi khuẩn cùng loại hấp thu và sử dụng cho trao đổi chất của mình. Các loài vi khuẩn sống bằng protein có thể khác với các loài vi khuẩn sống bằng polisaccharide.

Khác với các vi khuẩn lên men nói trên, một nhóm vi khuẩn lên men khác không có khả năng thủy phân nguyên liệu polime, song cũng có khả năng hấp thu các phân tử hòa tan nhỏ hơn và dùng các phân tử này cho trao đổi chất của mình. Thường gặp bọn này trong trường hợp của đường hơn là trong trường hợp của các acid amine.

Do kết quả hoạt động trao đổi chất của nhóm vi khuẩn lên men thứ nhất trong hỗn dịch sẽ xuất hiện các loại sản phẩm cuối cùng ở dạng khử, đó là các acid béo bay hơi chứa từ 2 đến 5 nguyên tử cacbon hoặc hơn, ethanol (và các rượu hoặc keton khác), và/hoặc các acid hữu cơ như acid lactic. Do nhiều acid hữu cơ được sinh ra trong quá trình lên men này, bước một của quá trình vi sinh vật học tổng thể trong sự tạo thành methane thường được gọi là bước sinh acid.

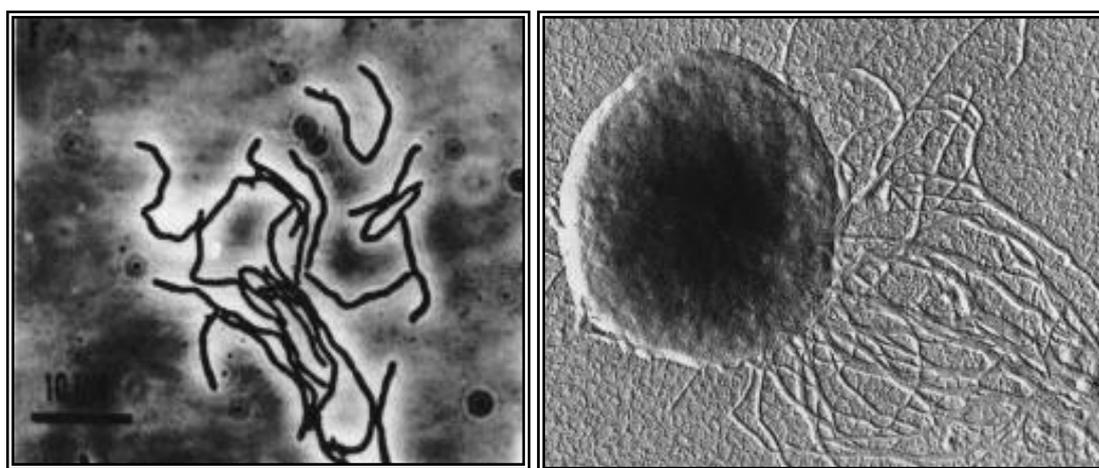
Các acid hữu cơ sẽ xuất hiện trong hỗn dịch dưới dạng các anion và thường bắt nguồn từ các phân tử cơ chất trung tính. Do vậy một cation cặp đôi sẽ phải có mặt trong hỗn dịch để đảm bảo tính trung hòa về điện. Có một số cation cặp đôi ứng cử viên. Khi các hợp chất chứa nitơ, cụ thể là protein, được phân giải, cation cặp đôi NH_4^+ sẽ được tạo thành. Khi vắng mặt các hợp chất chứa nitơ, cation cặp đôi duy nhất có thể được tạo ra từ các chất hữu cơ là ion hydro, được ký hiệu là H_3O^+ .

Như vậy trong bước lên men, cation cặp đôi H_3O^+ thường được sản sinh nhiều. Bởi vậy, bước sinh acid thường là một bước acid hóa, song cần tránh hiểu sai về mặt thuật ngữ học. Sự sinh acid thực chất là sự sinh các anion acid hữu cơ. Còn sự acid hoá là sự sản sinh các ion hydro và do vậy liên quan đến pH của hỗn dịch.

Bước sinh methane

Các vi sinh vật sinh methane không phải là các vi khuẩn thật (eubacteria) mà là các vi khuẩn cổ (archeobacteria) hay còn gọi là cổ khuẩn. Chỉ có H_2 cộng với CO_2 hoặc acetate là có thể được dùng làm cơ chất cho các vi khuẩn cổ tạo thành methane. Song cũng có một vài ngoại lệ. Đó là trường hợp của các hợp chất gần gũi như methanol, formiat, CO_2 và các methylamine. Các loài vi sinh vật đầu tiên được gọi là bọn dinh dưỡng hydro, là các vi khuẩn cổ hóa dưỡng vô cơ vì chúng dùng H_2 để khử CO_2 bằng nhằm thu năng lượng và là các vi khuẩn cổ tự dưỡng vì chúng sử dụng CO_2 làm nguồn cacbon.

Các loài vi sinh vật thứ hai, được gọi là bọn sinh acetate, là các vi khuẩn cổ hoá dưỡng hữu cơ vì chúng cắt acetate thành methane và CO_2 , thu nhận năng lượng của mình từ acetate mặc dù không nhất thiết phải cắt acetate, và là bọn dị dưỡng vì chúng sử dụng acetate làm nguồn cacbon.



Methanobacterium thermoautophicum

Methanococcus jannischii

Hình 10.7. Hình thái tế bào của một số loài cổ khuẩn (archeobacteria) sinh methane

Acetate là một anion. Khi bị cắt thành methane và CO_2 , cần có một cation cặp đôi tham gia vào quá trình. Khi ion cặp đôi đó là ion amon, NH_4^+ , được sinh ra trong bước lên men đầu, thì amonium bicarbonate, NH_4HCO_3 , sẽ được tạo thành trong hỗn dịch. Khi cation cặp đôi là H_3O^+ , được sinh ra trong bước lên men đầu, thì acid cacbonic, H_2CO_3 , sẽ được tạo thành và CO_2 sẽ được giải phóng trong thể tích khí sinh học thoát ra. Kết quả của cả hai trường hợp là môi trường trở nên kiềm hoặc khả năng trung hòa của nó sẽ được tăng cường. Do vậy sự tạo thành methane xuất hiện như một bước kiềm hóa.

Bước trung gian

Một vài nhóm vi khuẩn được dùng làm cầu nối giữa bước lên men và bước tạo thành methane. Không những thế, một số trong chúng còn cạnh tranh với các vi khuẩn lên men về các cơ chất monome. Một số khác cạnh tranh với các vi khuẩn cổ sinh methane về acetate hoặc về H_2 cộng với CO_2 .

Bảng 10. 2: Các nhóm phân loại chính của cổ khuẩn sinh methane

Lớp	Họ	Chi
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae (T)	<i>Methanobacterium</i> (T)
-nt-	-nt-	<i>Methanobrevibacter</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanosphaera</i>
-nt-	Methanothermaceae	<i>Methanothermus</i> (T)
Methanococcales	Methanococcaeae (T)	<i>Methanococcus</i> (T)
Methanomicrobiales	Methanosarcinaceae	<i>Halomethanococcus</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanococcoides</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanohalobium</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanohalophilus</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanolobus</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanosarcina</i> (T)
-nt-	-nt-	<i>Methanosaeta</i> (<i>Methanothrix</i>)
-nt-	Methanomicrobiaceae (T)	<i>Methanoculleus</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanogenium</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanolacinia</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanomicrobium</i> (T)
-nt-	-nt-	<i>Methanoplanus</i>
-nt-	-nt-	<i>Methanospirillum</i>
-nt-	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i> (T)

T = họ/ chi chuẩn; -nt- như trên

Các acid béo bay hơi được chuyển hóa thành acetate, H₂ và CO₂ nhờ các loài vi khuẩn đặc biệt thuộc về nhóm sản sinh acetate và tạo thành hydro bắt buộc, đã có thời được gọi là các vi khuẩn khử proton bắt buộc. Các vi khuẩn này, do các nguyên nhân về mặt nhiệt động học, chỉ có thể sống cộng dưỡng mà không phải là cộng sinh với các vi khuẩn dinh dưỡng hydro.

Kết quả là áp lực riêng phần của hydro, sản phẩm trung gian của chúng, p_{H_2} , trong suốt quá trình đều giữ ở mức rất thấp (khoảng 10^{-6} bar). Vì vậy, H₂ thuộc loại phân tử chỉ phát

hiện được trong các hỗn dịch sinh methane một cách có hệ thống và định lượng được trong thời gian rất gần đây. Etanol và lactate đều được chuyển hoá thành acetate, H_2 và CO_2 nhờ một nhóm vi khuẩn sinh acetate và tạo thành hydro bắt buộc khác.

Các loài vi khuẩn khác có thể cạnh tranh với chúng. Thực chất, lực nhiệt động học dùng để duy trì áp lực riêng phần của hydro ở các giá trị từ thấp đến rất thấp trong suốt thời gian đã tạo điều kiện thuận lợi cho các loài vi khuẩn này vì chúng có cơ chế dinh dưỡng hydro của bản thân chúng.

Khi các anion sulfat, SO_4^{2-} , có mặt trong môi trường, các vi khuẩn khử sulfate có thể trở nên quan trọng. Một số trong chúng có thể cạnh tranh với các vi khuẩn sinh acetate tạo thành hydro bắt buộc về các acid béo bay hơi dùng làm cơ chất. Nhóm vi khuẩn có khả năng sử dụng ethanol và lactate có thể bao gồm chủ yếu là các vi khuẩn khử sulfate. Bọn này thậm chí có thể là bọn khử sulfate tùy tiện. Khi các anion sulfate có mặt, được sinh ra từ cơ chất hữu cơ sẽ được sử dụng để khử SO_4^{2-} thành sunfua, HS^- .

Khi các vi khuẩn dinh dưỡng hydro có mặt, H_2 sinh ra từ cơ chất hữu cơ sẽ được chúng sử dụng. Khi các anion sulfate và các vi khuẩn dinh dưỡng hydro đồng thời có mặt, sự cạnh tranh về hydro có thể xảy ra, và kết quả sẽ phụ thuộc vào các điều kiện môi trường.

Việc các vi khuẩn khử sulfate có thể bị lôi kéo vào quá trình tạo thành methane dẫn đến hai kết luận quan trọng. Thứ nhất, chúng có thể hỗ trợ hoặc cạnh tranh với các vi khuẩn sinh methane. Thứ hai, chúng chịu trách nhiệm đối với sự có mặt của H_2S trong thể tích khí sinh học thoát ra. Đây là hai sự kiện có tầm quan trọng kỹ thuật cơ bản.

Ngoài các vi khuẩn khử sulfate, một nhóm vi khuẩn dinh dưỡng hydro khác cũng giữ vai trò quan trọng trong quần thể vi sinh vật sinh methane tổng thể. Các vi khuẩn này được gọi là các vi khuẩn sinh acetate đồng hình, chúng thuộc bọn hóa dưỡng vô cơ và thu năng lượng của mình từ phản ứng khử CO_2 bằng H_2 để tạo ra một mình acetate, tên của chúng bắt nguồn từ đó.

Một số trong các vi khuẩn này là bọn tự dưỡng và có khả năng đồng hóa CO_2 . Các vi khuẩn sinh acetate đồng hình khác cũng cạnh tranh với các vi khuẩn lên men vì chúng có khả năng tạo ra một mình acetate từ glucose. Trong trường hợp này, chúng là bọn hóa dưỡng hữu-vô cơ hỗn hợp, và là bọn hỗn dưỡng, tức là vừa tự dưỡng vừa dị dưỡng.

Cần lưu ý rằng, các vi khuẩn sinh acetate đồng hình không cạnh tranh với các vi khuẩn sinh methane về cơ chất (vì chúng sinh ra acetate) mà về năng lượng vì chúng sử dụng một phần năng lượng tiềm tàng của hỗn hợp, H_2 cộng với CO_2 .

Khi quá trình vi sinh vật học tổng thể của sự tạo thành methane bị cắt thành hai bước tách biệt, bước lên men sinh acid acid hoá đầu tiên và bước sinh methane kiềm hóa thứ hai, thì các vi khuẩn sinh acetate đồng hình có thể giữ một vai trò hỗ trợ và quan trọng vì chúng có thể bắt giữ H_2 sinh ra trong bước thứ nhất, trước khi nó thoát ra, để tạo thành acetate. Vì thế, acetate sẽ được dự trữ trong hỗn dịch như là một cơ chất sinh methane tiềm tàng cho bước hai. Hiện tại chưa có bằng chứng thực nghiệm cho giả thuyết này. Các acid béo không thể được chuyển hóa một mình thành các sản phẩm cuối cùng thông thường có tính khử do những lý do về nhiệt động học. Chúng cũng được chuyển hóa thành acetate, H_2 và CO_2 bởi một nhóm vi khuẩn sinh acetate sản sinh hydro bắt buộc khác, bọn này phải sống cộng dưỡng bắt

buộc với các vi khuẩn dinh dưỡng hydro để duy trì áp lực riêng phần của hydro. pH-thấp hoặc rất thấp trong suốt thời gian diễn ra sự phân giải .



Hình 10.8. Bể lên men methane sinh gas

***TÓM TẮT CHƯƠNG**

Giới thiệu một cách khái quát về các đặc tính của nước thải, vai trò của VSV trong các nguồn nước, các quy trình xử lý nước thải.

VSVCN góp phần bảo vệ môi trường bằng các quy trình xử lý nước thải.

***Câu hỏi ôn tập chương 10**

1. Việc đưa nước thải chứa một hợp chất *không độc nhưng dễ phân giải*, chẳng hạn tinh bột, vào sông hoặc ao hồ sẽ gây nên một hiệu quả xấu đến chất lượng của nước. Những hậu quả đó được biểu hiện như thế nào ? Tại sao ?

2. Tại sao người ta nói rằng, sự có mặt của khu hệ vi khuẩn nitrate hóa trong nước thải có thể làm cho các kết quả đo BOD trở nên thiếu chính xác ? Tại sao việc đo BOD₅ chưa bị ảnh hưởng của khu hệ vi khuẩn này ?

3. Sau 5 ngày ủ một loại nước thải công nghiệp, lượng oxygen hòa tan còn lại trong mẫu đối chứng là 7,8 mg/l, trong một dịch nước thải pha loãng 0,1% là 2,8 mg/l

a. Tính BOD₅ của loại nước thải đã cho

b. Trong 1000m³ nước thải nói trên có chứa bao nhiêu kg BOD₅ ?

4. Sau khi ủ một mẫu nước thải có k (tốc độ oxygen hóa sinh học) bằng 0,15/ ngày 7 ngày ở 20⁰C và người ta đo được BOD bằng 208 mg/l. Tính BOD₅, BOD₁₀ và BOD tổng số của loại nước thải này.

5. Cách xác định COD khác cách xác định BOD ở chỗ nào ? Tại sao giá trị COD thường lớn hơn giá trị BOD ?

6. Hạn chế của phương pháp xác định COD so với phương pháp BOD nằm ở đâu ? Tại sao trong một số tình huống, người ta vẫn phải dùng phương pháp COD để thay thế cho phương pháp BOD ?

7. Quá trình phân giải các chất hữu cơ thành methane trải qua nhiều bước, trong đó có hai bước lên men.

a. Đó là những bước nào ?

b. Tuy vậy, người ta không thể gọi sự tạo thành methane là một quá trình lên men, vì sao ? Vậy đó là quá trình gì?

c. Nêu ý nghĩa của hiện tượng cộng dưỡng trong sự tạo thành methane sinh học.

*** Tài liệu đọc thêm**

1. Biên Văn Minh (chủ biên), 2006. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBĐHHuế.

2. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biên Văn Minh. 1998. Vi sinh học công nghiệp, NXBGD.

*** Tài liệu tham khảo**

1. Kiều Hữu Ảnh. 1999. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBKHKHKT.

2. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan, 2006. Vi sinh học công nghiệp, NXBGD.

3. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

4. <http://wikipedia>

*** Giải thích thuật ngữ**

BOD: Nhu cầu oxygen sinh hóa- là lượng oxygen hòa tan mà VSV đòi hỏi cho quá trình phân giải hiếu khí các chất hữu cơ trong nước thải. Mức độ BOD nói lên lượng các chất hữu cơ dễ bị oxygen hóa có trong nước thải. Mật độ BOD cao nghĩa là lượng acid hữu cơ cao.

TSS: chất rắn lơ lửng tổng số (SS -).

S.S: (suspended solid): chất rắn lơ lửng

MPN = most probable number) : Phương pháp phát hiện và xác định số lượng các coliform thường gặp nhất

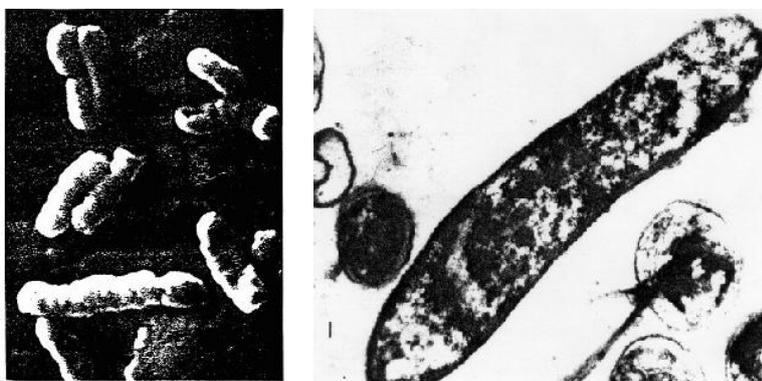
Chương 11

SỰ TUYỂN KHOÁNG NHỜ VI SINH VẬT

Sự tham gia của vi sinh vật vào việc ngâm chiết quặng đã được nhiều tác giả chứng minh. Đây là những vi sinh vật hóa dưỡng vô cơ bắt buộc hay tùy tiện, hoặc vi sinh vật dị dưỡng, chúng có thể thuộc về nhóm trung hay ưa nhiệt có khả năng oxy hóa sắt hai thành sắt ba cũng như các loại lưu huỳnh dạng khử thành acid sunfuric hoặc sunfat kim loại. Ngoài ra, hàng loạt các vi sinh vật khác như nấm, tảo, và động vật nguyên sinh cũng có mặt trong sự sinh trưởng cộng sinh trong các dung dịch ngâm chiết tồn tại trong tự nhiên.

I. CÁC VI KHUẨN NGÂM CHIẾT

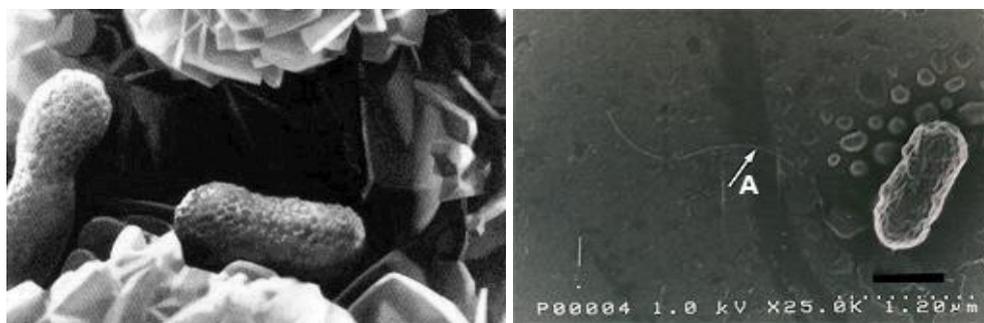
Thiobacillus ferrooxidans là vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất trong mối quan hệ với các biện pháp xử lý thủy luyện kim sinh học (biohydromatallurgical treatment) các loại quặng và tinh quặng chứa sunfua. Đó là một vi khuẩn hình que, Gram âm, di động bằng tiên mao, không hình thành bào tử, đứng một mình hay đôi khi thành từng cặp. Vi khuẩn hóa dưỡng vô cơ này thu nhận năng lượng cần thiết cho sinh trưởng và đồng hóa CO_2 từ sự oxy hóa sắt hai và các hợp chất lưu huỳnh vô cơ có tính khử. Về mặt sinh lý, *T. ferrooxidans* giống với *Thiobacillus thiooxidans*, loại vi khuẩn thường thường có mặt trong các loại nước khai mỏ có tính acid. Sự khác biệt cơ bản được nhiều người thừa nhận giữa hai loài này là việc *T. thiooxidans* không có khả năng oxy hóa sắt hai và các sunfua kim loại không tan. Hệ thống oxy hóa sắt hai của *T. ferrooxidans* được liên kết với lớp màng ngoài chứa lipopolysaccarit của thành tế bào. Các enzyme oxy hóa sắt là Fe^{2+} -citocrom c oxydoreductase, citocrom a, và coenzyme Q...



Hình 11.1. *Thiobacillus ferrooxidans* đồng hóa CO_2 từ sự oxy hóa sắt hai và các hợp chất lưu huỳnh vô cơ có tính khử

Sơ đồ chung của sự oxy hóa sinh học bao gồm các loại sau: S^{2-} , S^0 , SO_4^{2-} , $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, SO_3^{2-} , và SO_4^{2-} . Trong dãy oxy hóa của sự trao đổi chất S^{2-} , lưu huỳnh nguyên tố nằm ở trạng thái phân tử được polime hóa (cấu trúc vòng S_8) và sunfit là một sản phẩm trung gian chia khóa được chuyển hóa thành sunfat. Các phản ứng enzyme tham gia vào dãy oxy hóa sunfua này có thể được trình bày như sau:

Các vi khuẩn ngấm chiết khác bao gồm *Leptospirillum ferrooxidans* lần đầu tiên được phân lập từ quặng sunfua vàng. Nó có thể ngấm chiết pirit, có khả năng sinh trưởng tự dưỡng trên ion sắt hai, có nhiều sự tương đồng về mặt sinh lý với *Thiobacillus thiooxidans* và mẫn cảm với sự kìm hãm bởi ion sắt ba.



Hình 11.2. Vi khuẩn *Thiobacillus thiooxidans* (*Acidithiobacillus thiooxidans*)

Thiobacillus acidophilus có khả năng đối với cả sinh trưởng hóa tự dưỡng lẫn sinh trưởng dị dưỡng. Nó được phân lập từ một môi trường nuôi *T. ferrooxidans*. Vi khuẩn này oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố, đường, acid amin và các acid cacboxylic ở pH 3,0-3,5. *Thiobacillus kabobis* và *Thiobacillus organoporus* oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố và sinh trưởng ở pH 1,5-5,0. *Thiobacillus thioporus* oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố, thiosunfat và nhiều loại sunfua kể cả sunfua kẽm.

Sunfobacillus acidocaldarius được phân lập từ các suối nước nóng có tính acid. Nó sinh trưởng hóa tự dưỡng với các cơ chất là lưu huỳnh, các hợp chất khử của lưu huỳnh và sắt hai.



Hình 11.3. *Sunfobacillus acidocaldarius* Sinh trưởng ở pH=2, nhiệt độ 80°C

II. CƠ CHẾ TÁC ĐỘNG CỦA VI KHUẨN

Sự chiết kim loại ra khỏi các quặng chứa sunfua có thể đạt được nhờ các phương thức trao đổi chất trực tiếp hay gián tiếp của vi sinh vật. Cơ chế trực tiếp có thể biểu diễn bằng phương trình:



Trong đó M là kim loại nặng hóa trị hai.

Cơ chế gián tiếp, ví dụ đối với quá trình ngâm chiết quặng uranium, có thể được biểu diễn như sau:



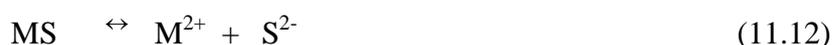
Sắt hai được sinh ra trong phương trình trên sẽ được tái oxy hóa bởi các vi khuẩn thành sắt ba theo phương trình sau:



Vi vậy, trong phương thức tác dụng gián tiếp của vi khuẩn, vi khuẩn đóng vai trò cung cấp một cách liên tục chất oxy hóa, $Fe_2(SO_4)_3$. Sắt hai sẽ thu được từ sự oxy hóa sinh học pirit là chất luôn luôn kết hợp với các sun fua và quặng uranium:



Bước một trong sự oxy hóa trực tiếp các sunfua kim loại. MS, là sự hòa tan cơ chất trước khi xảy ra phản ứng trao đổi chất. Điều này có thể đạt được nhờ sự phân ly của MS:



Anion sunfua được giải phóng ra sau đó sẽ lập tức được liên kết với hệ thống enzyme của vi khuẩn và bị oxy hóa thành sunfat:



Vi vậy, anion sunfua bị loại khỏi phương trình (11.12) và cân bằng sẽ chuyển về phía bên phải gây ra một sự hòa tan mạnh hơn. Về mặt lý thuyết quá trình này có thể tiếp tục đến khi toàn bộ cơ chất (MS) được chuyển hóa thành sản phẩm (MSO_4). Tuy nhiên, trong các hệ thống không liên tục sự tích lũy các sản phẩm có thể đạt tới một nồng độ trở nên độc đối với vi sinh vật hoặc Jarosit sẽ kết tủa trên bề mặt của cơ chất làm cản trở hoạt động của vi khuẩn. Sơ đồ này giải thích tại sao vi sinh vật lại ưa ở ngay sát bề mặt khoáng vật. Hơn nữa người ta đã phát hiện thấy một mối quan hệ trực tiếp giữa tốc độ chiết kim loại (dM^{2+}/dt) độ hòa tan sản phẩm của các khoáng vật sunfua (K_{sp}):

$$dM^{2+}/dt K_{sp} = \alpha K_{sp} = \alpha [M^{2+}][S^{2-}] \quad (11.14)$$

Trong đó α là hệ số tỷ lệ thuận. Theo phương trình (11.14), tốc độ chiết kim loại là cao nhất khi độ hòa tan sản phẩm của khoáng vật sunfua của nó là cao nhất.

III. MỘT SỐ QUÁ TRÌNH THỦY LUYỆN KIM SINH HỌC

1. Ngâm chiết sinh học quặng đồng

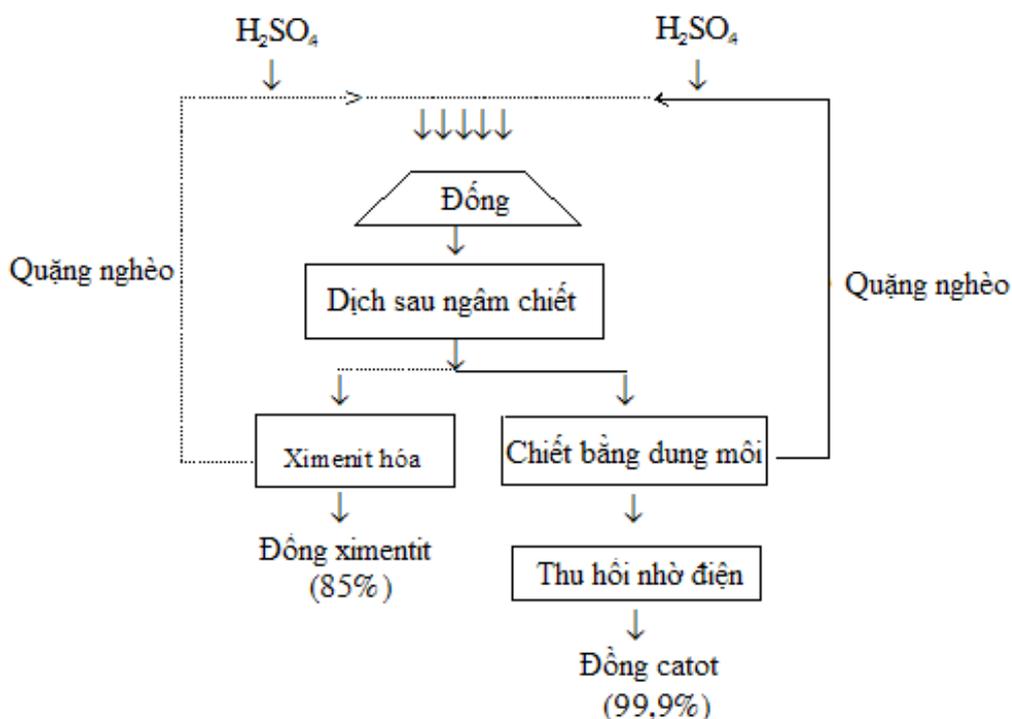
Các yếu tố ảnh hưởng đến sự thu hồi đồng và đến hoạt tính của vi khuẩn là:

a) Đặc tính vật lý của thể quặng (kích thước hạt quặng, độ thấm đối với dung dịch ngâm chiết, tính dẫn nhiệt và kích thước đồng).

b) Thành phần hóa học của quặng và nguyên liệu nghèo là đá chủ chứa khoáng vật đồng (sự có mặt và phân bố của pirit và hạt quặng riêng biệt bên trong thể quặng);

c) Thành phần của dung dịch ngâm chiết đi vào (O_2 và CO_2 hòa tan và các chất dinh dưỡng khác, độ acid, tỷ lệ Fe^{2+}/Fe^{3+} , quần thể vi sinh vật).

Việc ngâm chiết tại chỗ (in-situ) quặng đồng cũng giống như ngâm chiết chất đồng ở nhiều điểm. Khi độ quặng quá thấp không thể dùng phương pháp khai thác thông thường, người ta sẽ phá vỡ khối quặng trong lòng đất bằng thuốc nổ và ngâm chiết tại chỗ.



Hình 11.4. Sơ đồ ngâm chiết quặng đồng

2. Ngâm chiết sinh học quặng uranium

Uranium đã được chiết từ quặng nhờ quá trình ngâm chiết vi khuẩn học ở quy mô công nghiệp. Hóa học của sự chiết này có thể được biểu diễn bằng một sự thay đổi từ uranium không tan hóa trị bốn sang dạng hóa trị sáu hòa tan trong môi trường ngâm chiết có tính acid:



Phương trình này là phương trình đảo ngược của phương trình (11.9). Sunfat sắt hai được tái oxy hóa thành sunfua sắt ba theo phương trình (11.10). Sự biến đổi năng lượng tự do chuẩn (86,1 kJ/mol) và thế oxy hóa khử đối với hệ thống U^{4+}/U^{6+} (446mV) cũng giống như sự biến đổi năng lượng tự do và thế oxy hóa khử của hệ thống Fe^{2+}/Fe^{3+} (77,4 kJ/mol và

747mV). Các quá trình sinh hóa học và thủy luyện kim sinh học đối với việc chiết uranium đã được biết rất rõ.

3. Ngâm chiết sinh học quặng bạc

Sự phân bố của bạc và các nguyên tố khác trong đất bị ảnh hưởng mạnh bởi các chu trình sinh địa hóa. Các kim loại nặng và kim loại quý thường tạo thành các phức chất và được duy trì nhờ các lớp mùn của đất. Các vi sinh vật tham gia vào việc sử dụng các nguyên tố này bao gồm cả vi khuẩn, nấm, tảo và địa y.

Về khả năng của *Thiobacillus ferrooxidans* sử dụng sunfua bạc làm nguồn năng lượng hiện đang còn tranh cãi. Một số tác giả cho rằng (Ag₂S) tổng hợp và tự nhiên đều không được vi khuẩn ngâm chiết phân giải vì bạc độc với *T. ferrooxidans*. Tính độc này có liên quan đến sự tích lũy đặc hiệu đối với bạc của tế bào. Song việc nuôi *T. ferrooxidans* trong môi trường có nồng độ AgNO₃ tăng dần lại tạo ra các chủng đề kháng với bạc.

Vào năm 1986 một nghiên cứu khác đã phát hiện ra rằng *T. ferrooxidans* đã thúc đẩy sự chiết chọn lọc bạc từ một loại quặng sunfua hỗn hợp. Trong 49 ngày ngâm chiết, khoảng 75% bạc đã được hòa tan từ quặng hỗn hợp khi có mặt vi khuẩn và chỉ có 50% khi vắng mặt vi khuẩn.

4. Thủy luyện kim sinh học vàng

Ngay từ những năm 1960 người ta đã phát hiện được các vi khuẩn dị dưỡng có khả năng hòa tan vàng từ các khoáng vật laterit. Trong các nghiên cứu này, hàm lượng vàng cực đại không vượt quá 1,5mg/dm³. Tuy nhiên sau 283 ngày ngâm chiết đã tách được tới 82% vàng chứa trong quặng. Một số loài nấm đã được chứng minh không những có thể chiết vàng từ quặng mà còn có thể loại vàng hòa tan khỏi dung dịch ngâm chiết nhờ hấp phụ sinh học lên bề mặt cơ thể. Những tế bào nấm này sau đó sẽ được lọc, làm khô và nung. Người ta đã phân lập được hàng loạt chủng nấm hoạt động có thể loại tới 98% vàng từ dung dịch ngâm chiết sau 15- 20 giờ tiếp xúc.

4.1. Hòa Tan vàng từ quặng pirit nhờ hoạt động của vi sinh vật

Các thí nghiệm ngâm chiết đã được tiến hành với pirit chứa vàng (150g vàng/tấn quặng) trong các bình nón chứa 5g pirit và 200cm³ môi trường dinh dưỡng chứa 200mg (NH₄)₂SO₄, 50mg KCl, 50mg K₂HPO₄, 500mg MgSO₄ và 10mg Ca(NO₃)₂ trong một lít nước cất, và được ủ với 10 cm³ một chủng *Thiobacillus ferrooxidans* thuần khiết. Kết quả chỉ ra trong bảng (11.1)

Bảng 11.1. Sự hòa tan vàng từ cơ chất pirit nhờ *Thiobacillus ferrooxidans*

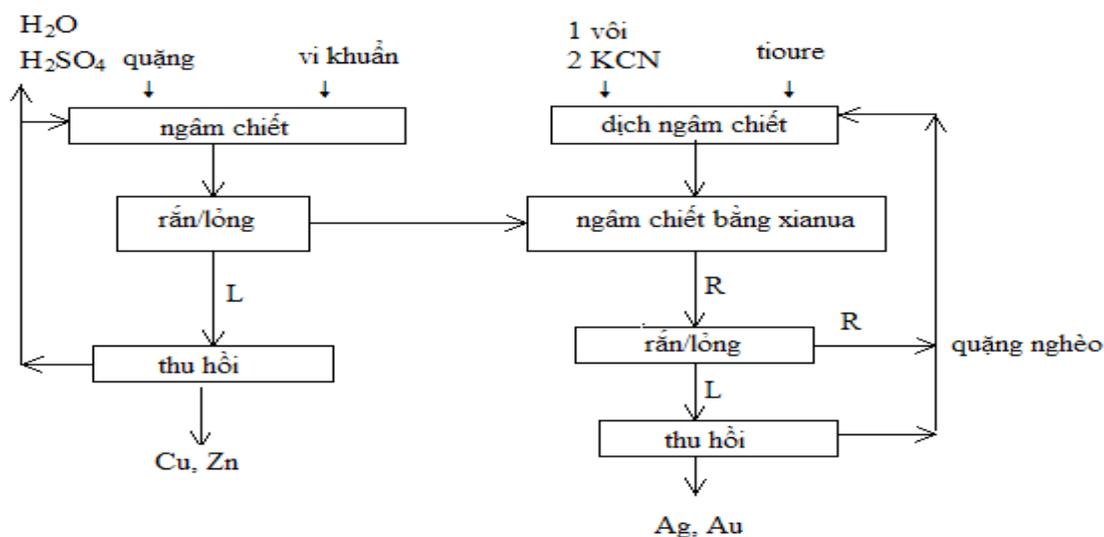
Thí nghiệm nuôi tĩnh số	Sự tách chiết vàng g/dm ³	Thí nghiệm nuôi lắc số	Sự tách chiết vàng g/dm ³
1	Không	1	60
2	150	2	480
3	270	3	490
4	390	4	520

4.2. Thu hồi vàng từ các tài nguyên chứa asenopirit

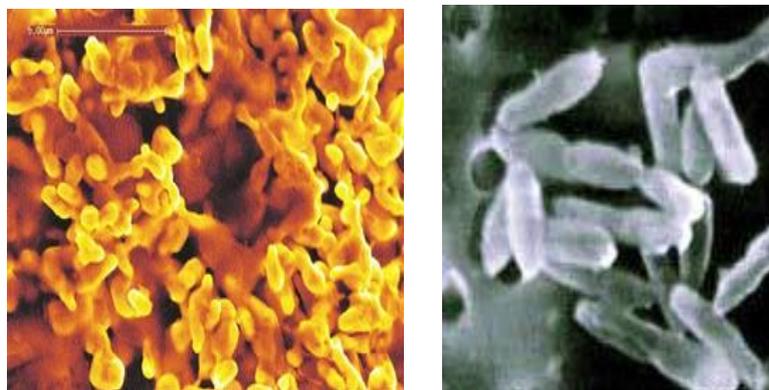
Sự tuyển khoáng asenopirit đã được tiến hành từ những năm 1960. Vi khuẩn *Thiobacillus ferrooxidans* có khả năng giải phóng vàng từ quặng chứa cacbon trong đó asen chiếm khoảng 6%.

Các điều kiện tối ưu cho sự ngâm chiết đã xác định được là: tỷ trọng bùn khoáng là 20%, pH 1,5-2,0 và kích thước hạt là 0,05mm.

Các đặc điểm cơ bản của quá trình ngâm chiết kim loại quý với sự tham gia của vi khuẩn được minh họa trong hình 11.2 dưới đây.



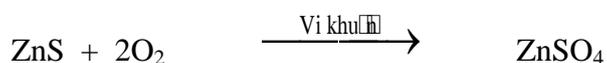
Hình 11.5. Quá trình ngâm chiết kim loại quý nhờ vi khuẩn (R= rắn; L=lỏng)



Hình 11.6. Vi khuẩn *Ralstonia metallidurans* có công dụng như các máy lọc đất siêu nhỏ, hấp thu kim loại nặng (Au) ở trạng thái hòa tan và chuyển chúng sang dạng cứng

5. Ngâm chiết sinh học sunfua kẽm

Sự tách chiết kẽm từ các quặng sunfua nhờ *Thiobacillus ferrooxidans* được thực hiện theo phản ứng sau đây:



Các bể ngâm chiết quặng sunfua kẽm bán công nghiệp nhờ *Thiobacillus ferrooxidans* đã tạo được những nồng độ kẽm trong dịch mang (pregnant solution) tới $120\text{g}/\text{dm}^3$ và tốc độ giải phóng kẽm vào dung dịch tới $1300\text{mg}/\text{dm}^3/\text{giờ}$. Dùng phép tách chiết kim loại bằng điện phân từ dung dịch ngâm chiết nhờ vi khuẩn (do Cominco, Trail, B.C., Canada thiết kế) đã đạt được một hiệu quả tới khoảng 80% với chất lượng kẽm thành phẩm loại cao. Các nghiên cứu động học chỉ ra rằng tốc độ tách chiết, $V(\text{mg}/\text{dm}^3/\text{giờ})$ là một hàm số của kích thước hạt quặng sunfua, d và được biểu diễn bằng phương trình sau:

$$V = V_m \exp(-kd) = 569,2 \exp(-5,24 \cdot 10^{-2} d)$$

Trong đó V_m là tốc độ lý thuyết cực đại có thể đạt được và k là một hằng số tỷ lệ thuận.

Trong một nghiên cứu khác được tiến hành vào năm 1986, B. Zurita đã tìm thấy rằng tốc độ đối với các hạt quặng nhỏ hơn $12\mu\text{m}$ được tính theo phương trình:

$$V = \exp(-0,136k + 5,452)$$

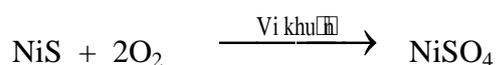
và đối với các hạt có kích thước lớn hơn $12\mu\text{m}$:

$$V = \exp(-0,03d + 5,88)$$

Khi sử dụng phương trình thứ hai để tính tốc độ, sự tách chiết kẽm được đặc trưng bởi các biến ngâm chiết. Bằng cách cực đại hóa phương trình hồi quy, các giá trị biến tối ưu đã được xác định là: nhiệt độ = 35°C ; pH = 2,3; tỷ trọng bùn khoáng = 22%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,75\text{g}/\text{dm}^3$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,66\text{g}/\text{dm}^3$, CO_2 trong không khí = 7,9% và diện tích riêng phần của tinh quặng sunfua kẽm-chì không thể xử lý có hiệu quả kinh tế bằng quy trình làm nóng chảy thông thường. Song các kỹ thuật thủy luyện kim sinh học đã được sử dụng thành công để thu hồi kẽm và các kim loại khác từ các sunfua kém phẩm chất. Trong các kỹ thuật này, kẽm, đồng, và cadmium sẽ được hòa tan, trong khi chì vẫn còn nằm lại trong quặng. Vì sunfua kẽm không hòa tan trong môi trường ngâm chiết sinh học chứa acid sunfuric cho nên có thể thực hiện được dễ dàng việc tách chiết chọn lọc.

6. Tách chiết coban và niken từ quặng sunfua nhờ biện pháp vi sinh vật.

Sự trao đổi niken và độc tính của niken đối với vi sinh vật đã được Kaltwasser và Frings nghiên cứu vào năm 1980. Nồng độ vết của niken có thể kích thích sinh trưởng của vi sinh vật trong khi các nồng độ lớn hơn lại tác động như chất kim hãm. Người ta đã tìm thấy các vi khuẩn dị dưỡng tiết ra các acid hữu cơ có thể dùng để ngâm chiết các quặng laterit chứa niken (Bosecker, 1986). Chẳng hạn, *Penicillium simplicissimum* đã tách chiết được tới khoảng 70% niken từ quặng laterit nhờ các vi sinh vật dị dưỡng có một tương lai đầy hứa hẹn. Sự khai thác các mỏ niken nghèo trong tương lai sẽ phụ thuộc nhiều vào các kỹ thuật rẻ tiền như kỹ thuật ngâm chiết acid –vi khuẩn. Các muối sunfua tổng hợp hoặc tồn tại trong tự nhiên (NiS) có thể được oxy hóa nhờ *Thiobacillus ferrooxidans* theo phương trình sau:



Pentlandit là loại quặng sunfua niken chủ yếu gặp trong hầu hết các mỏ có từ tính. Trong quặng này, niken được thay thế bằng coban với tỷ lệ Ni/C = 50/2. Việc ngâm chiết sinh học pentlandit có thể biểu diễn bằng phương trình sau:



Trong các thực nghiệm với các bình ngâm chiết, trên 80% niken đã được tách khỏi pentlandit trong 12 tuần, còn trong các thực nghiệm ở bể ngâm chiết trên 97% niken đã được tách chiết trong 3 ngày. Các thực nghiệm khác đã cho thấy rằng sự tách chiết niken được cải thiện về cơ bản khi có mặt vi khuẩn cố định nitơ *Beijerinckia lacticoenes*.

Người ta cho rằng sinh trưởng của *Thiobacillus ferrooxidans* được kích thích bởi sự giải phóng ion amoniac nhờ *Beijerinckia* là vi khuẩn nhận được nguồn cacbon dành cho sinh trưởng từ *T. ferrooxidans*. Theo các kết quả đã công bố, quá trình ngâm chiết sunfua coban nhờ *T. ferrooxidans* trong các thí nghiệm có cấy giống đã diễn ra với tốc độ 75 lần nhanh hơn so với các mẫu đối chứng vô trùng (Karavaiko, 1985) và nồng độ đạt được đã lên tới 30g/dm³ (Torma, 1978).

IV. SỰ TÍCH LŨY KIM LOẠI NHỜ VI KHUẨN VÀ TẢO

Vi sinh vật bao gồm xạ khuẩn, vi khuẩn lam, các vi khuẩn khác cũng như nấm sợi và nấm men có khả năng tích lũy các kim loại nặng và các nuclid phóng xạ từ môi trường ngoài. Số lượng tích lũy được có thể rất lớn, và các cơ thể tham gia vào quá trình tích lũy này có thể dao động từ những mối tương quan lý-hóa như hấp phụ và kết tủa tới các quá trình phụ thuộc vào trao đổi chất tế bào như quá trình vận chuyển. Cả tế bào sống lẫn tế bào chết đều có khả năng đối với việc hấp thụ và tích lũy và do vậy các sản phẩm được tạo ra sẽ là bản thân các tế bào vi sinh vật hoặc các chất bắt nguồn từ các tế bào như các sản phẩm tiết của trao đổi chất, các polisaccarit, các cấu tử của thành tế bào.

1. Cơ chế của sự tích lũy kim loại nhờ vi sinh vật

1.1. Sự hấp phụ sinh học không phụ thuộc vào trao đổi chất

Hấp phụ là sự tích lũy hay sự tập trung các chất, chất bị hấp phụ, lên một bề mặt hoặc mặt phân pha, chất hấp phụ. Ngược lại, hấp thụ xảy ra khi các nguyên tử hay các phân tử của một pha xâm nhập gần như đồng đều vào trong các nguyên tử hoặc phân tử của một pha khác. Có ba kiểu hấp phụ chính.

Kiểu thứ nhất do lực hấp dẫn điện gây ra và thường được gọi là sự hấp phụ “trao đổi” - là sự hấp dẫn của các ion tích điện dương đối với các phối tử tích điện âm trong nguyên liệu tế bào

Loại hấp phụ thứ 2, trong đó các phân tử được hấp phụ có thể có sự chuyển dịch bên trong bao gồm các lực van der Waal.

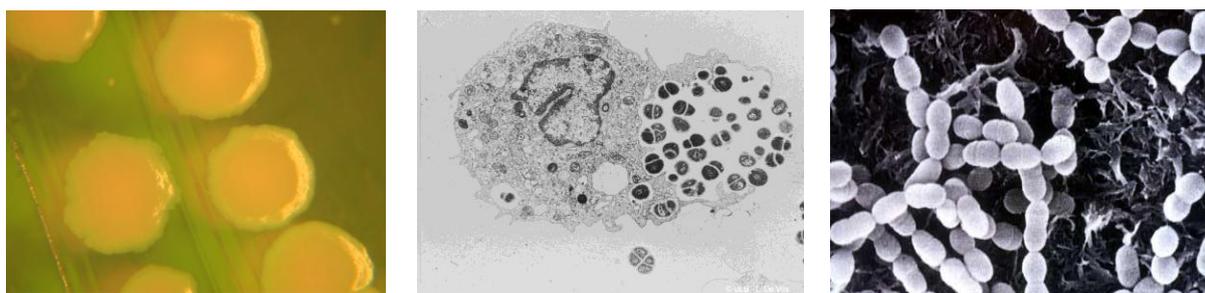
Loại thứ 3 là lực hấp dẫn hóa học giữa chất bị hấp phụ và chất hấp phụ. Nói chung khó có thể tách biệt giữa sự hấp phụ vật lý và sự hấp phụ hóa học và đa số các loại hấp phụ đều bao gồm cả ba dạng đã mô tả ở trên.

Thuật ngữ “hấp thụ” (sorption) có thể bao gồm cả hấp phụ và hấp thụ và dùng để chỉ một quá trình trong đó một thành phần chuyển dịch từ một pha sang một pha khác, thường là một pha rắn. Do vậy thuật ngữ “hấp thụ sinh học” được dùng để mô tả những mối tương

quan lý- hóa không định hướng có thể tồn tại giữa các loại kim loại/ nuclid phóng xạ và các thành phần của tế bào.

***Vi khuẩn và vi khuẩn lam**

Thành tế bào của các vi khuẩn Gram dương hấp thu kim loại có hiệu quả tuy rằng phổ hấp thu của chúng có thể khá rộng. Đối với *B.megaterium*, *Micrococcus lysodeikticus*, và *Streptococcus mutans* sự liên kết kim loại được xếp theo thứ tự sau đây: $La^{3+} > Cd^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > K^{+} > Na^{+}$. Thành tế bào của *Bacillus subtilis* có ái lực chọn lọc đối với một số cation và dường như rằng nhóm $-COO$ của acid glutamic trong peptidoglycan là vị trí chủ yếu đối với sự kết tủa kim loại.



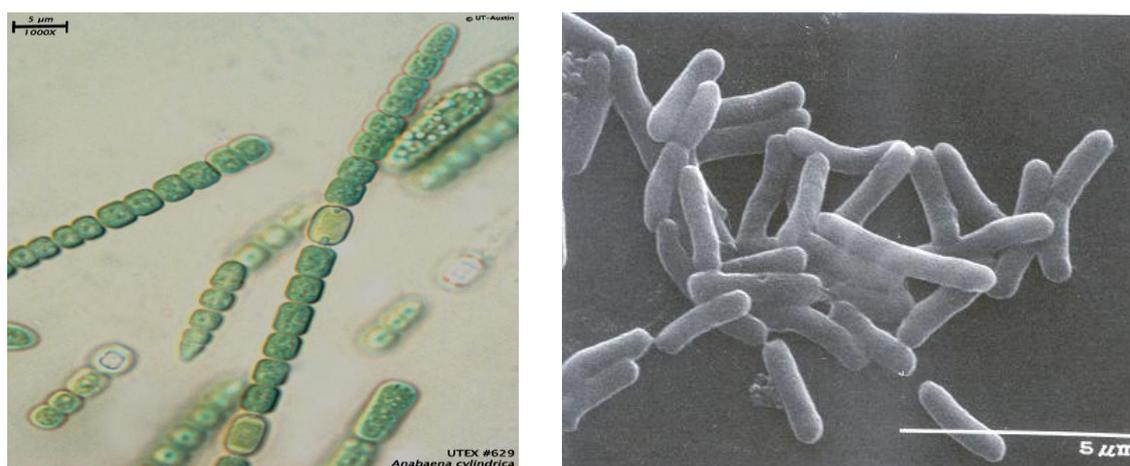
Hình 11.7. Một số vi khuẩn có khả năng tích lũy kim loại

1. *B.megaterium*; 2. *Micrococcus lysodeikticus* 3. *Streptococcus mutans*

1.2. Sự tích lũy nội bào phụ thuộc vào trao đổi chất

***Vi khuẩn và vi khuẩn lam**

Người ta đã phát hiện được các hệ thống vận chuyển đặc hiệu đối với Mn^{2+} ở một số vi khuẩn như *E. coli*, *B. subtilis* và *Lactobacillus plantarum*. Ngoài ra, Mn^{2+} cũng như (Ni^{2+} và Co^{2+}) có thể được hấp thu như là một cơ chất có ái lực thấp của hệ thống vận chuyển Mg^{2+} . Ở *L.plantarum*, sự vận chuyển Mn^{2+} phụ thuộc vào gradien H^{+} xuyên màng và người ta đã phát hiện được các nồng độ nội bào của kim loại này cao tới 30mmol/l.



Hình 11.8. Vi khuẩn lam *Anabaena cylindrica* (trái); *Anacystis nidulans* (phải)

Ở vi khuẩn lam *Anabaena cylindrica* người ta đã ghi nhận được hệ thống vận chuyển Ni^{2+} có tính đặc hiệu cao. Niken được tập trung nhiều hơn khoảng 2.700 lần ở bên trong tế bào và sự hấp thu phụ thuộc vào hiệu thế của màng và bị kìm hãm trong bóng tối hoặc bởi các

chất kìm hãm trao đổi chất. Sự hấp thu tích cực Cd^{2+} cũng được phát hiện ở *Anacystis nidulans* và quá trình này bị kìm hãm cạnh tranh bởi Ca^{++} và Zn^{2+} .

Câu hỏi ôn tập chương 11

1. Các *Thiobacillus* là những vi khuẩn chịu acid:

- Xác định tip dinh dưỡng của các vi khuẩn nhóm này.
- Xét nhu cầu oxy, phải xếp chúng vào nhóm nào ?
- Cho biết một môi trường nuôi cấy thích hợp cho nhóm vi khuẩn này ?

2. Bản chất của hiện tượng ăn mòn các ống dẫn bằng sắt là:

- Sự oxi hóa H_2S thành acid sulfuric.
- Sự khử acid sulfuric thành H_2S .
- Sự oxi hóa H_2S thành lưu huỳnh
- Sự khoáng hóa chất hữu cơ thành H_2S

3. Trong sự ăn mòn ống dẫn nước, sự oxy hóa dưới điều kiện kỵ khí đã diễn ra với sự tham gia của các quá trình..... khi có mặt giống vi khuẩn có tên là.....và.....trong môi trường.

4. Sự oxy hóa lưu huỳnh nguyên tố được thực hiện bởi các vi khuẩn như *Thiobacillus thiooxidans* diễn ra theo phương trình sau đây:



* Tài liệu đọc thêm

1. Nguyễn Quang Hào, Vương Trọng Hào, Biền Văn Minh, 1998. Vi sinh học công nghiệp, NXBGD.

2. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Bá Hiên, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoan, 2006. Vi sinh học công nghiệp, NXBGD.

* Tài liệu tham khảo

- Kiều Hữu Ảnh. 1999. Vi sinh vật học công nghiệp, NXBKHKHT.
- Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 1997. Vi sinh vật học, NXBGD.

3. Phạm Thành Hồ, 2005. Nhập môn công nghệ sinh học, NXBGD.

4. <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr>

5. <http://images.google.com.vn/images>

6. <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>

* Giải thích thuật ngữ

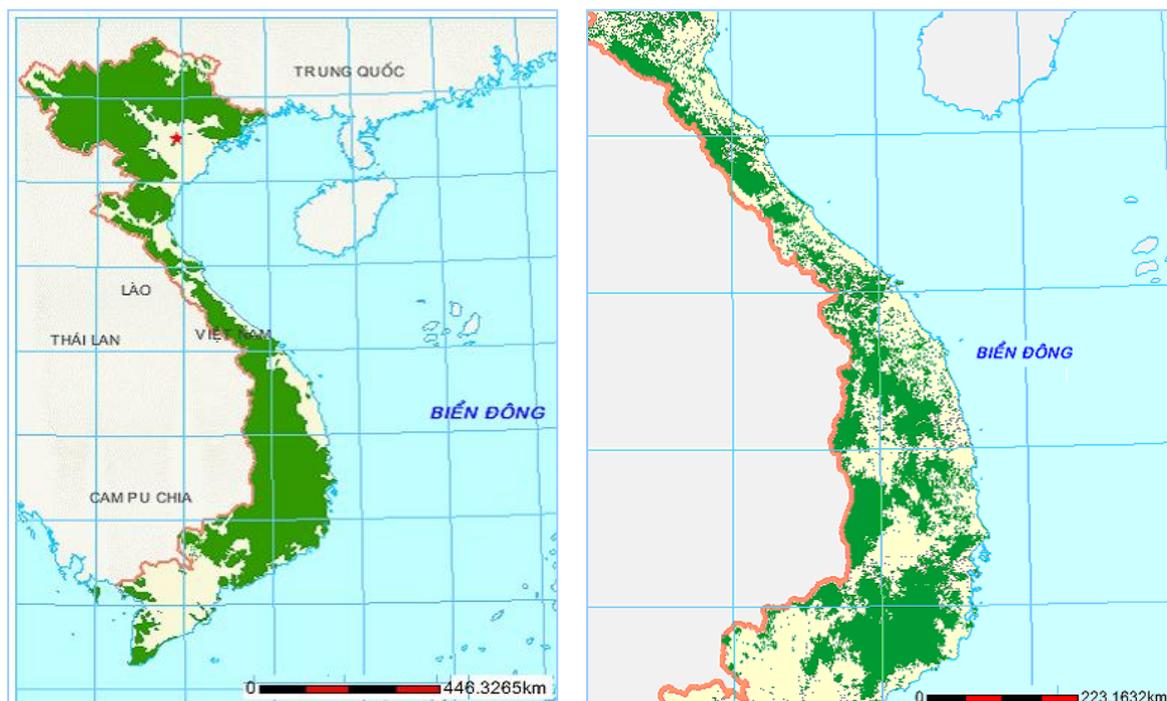
in-situ: tại chỗ

Chương 12

CÔNG NGHỆ VI SINH VÀ BẢO VỆ MÔI TRƯỜNG

I. NGUYÊN NHÂN GÂY Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG

1. **Phá rừng:** Có thể xem phá rừng là nguyên nhân cơ bản, là nguồn gốc của nhiều nguyên nhân khác làm mất cân bằng hệ sinh thái và gây ô nhiễm môi trường.



Hình 12.1. Hiện trạng rừng Việt Nam năm 1943 (trái) và năm 1999 (phải)

Bảng 12.1. Diễn biến diện tích rừng từ năm 1943 đến năm 1999

Đơn vị tính: 1000ha

Năm	1943	1976	1980	1985	1990	1995	1999
1- Rừng tự nhiên	14.000	11.070	10.486	9.308	8.430	8.252	9.444
2- Rừng trồng	0	92	422	584	745	1.050	1.471
Cộng (1 + 2)	14.000	11.162	10.908	9.892	9.175	9.302	10.915
Độ che phủ của rừng	43%	33,8%	32,1%	30%	27,2%	28,1%	33,2%

2. **Sự phát triển các ngành công nghiệp:** Là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường do các nhà máy thải ra các chất thải dạng khí, dạng lỏng hay dạng rắn, đều là những chất gây ô nhiễm môi trường.



Hình 12.2. Ô nhiễm không khí do hoạt động công nghiệp
a. Nhà máy Smokestacks (Mỹ), b. ở Paraha Tiệp Khắc

3. **Thuốc trừ sâu, phân hóa học:** Cũng là nguyên nhân quan trọng gây ô nhiễm môi trường khi sử dụng quá nhiều, sử dụng bừa bãi thiếu cân đối.



Hình 12.3. Paul Hermann (1899-1965), khám phá ra dichloro - diphenyl - trichloroethane (DDT), có tác dụng diệt sâu hại, đã sử dụng khá phổ biến từ những năm 1940-1970. Đã cấm sử dụng từ 1973.

4. **Hoạt động của con người:** Góp phần làm ô nhiễm môi trường bởi chất thải sinh hoạt, bởi các hoạt động sản xuất và đời sống của con người.

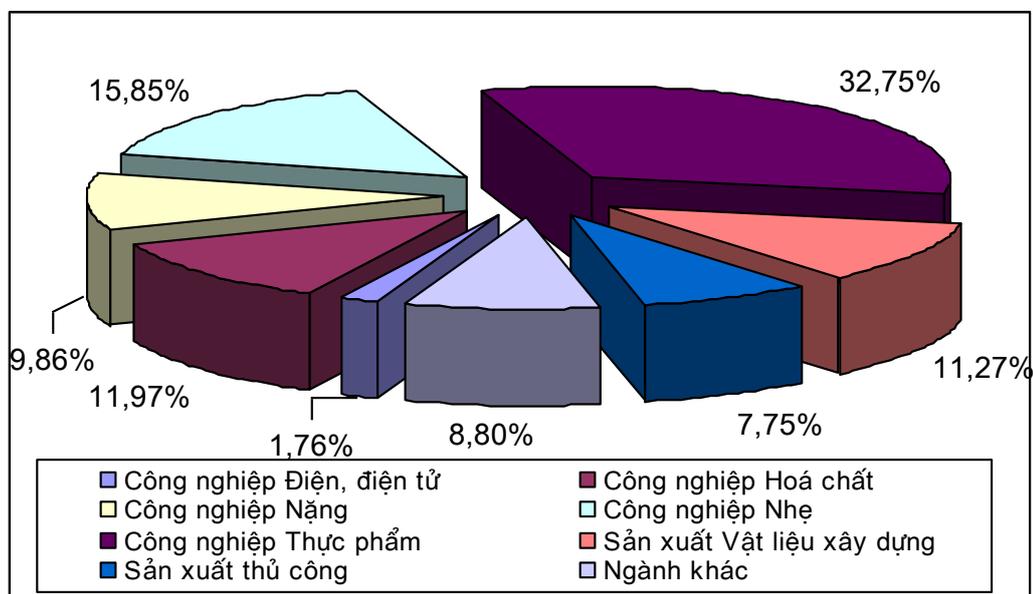
- Xã hội càng văn minh, dân số càng tăng thì ngày càng xuất hiện nhiều yếu tố gây ô nhiễm môi trường.

- Sự bùng nổ dân số kéo theo quá trình đô thị hóa ngày càng diễn ra mạnh mẽ mà môi trường đô thị là môi trường bị ô nhiễm nặng.

- Sinh hoạt của con người tạo nên lượng rác thải, nước thải lớn gây ô nhiễm môi trường. Dân số càng tăng thì nguy cơ ngày càng lớn.

- Xã hội càng văn minh, con người càng có nhu cầu sử dụng nhiều loại phương tiện gây ô nhiễm môi trường như xe có động cơ, tủ lạnh... Ô nhiễm do xe cộ thải ra trong môi trường không khí ngoài CO₂ ra còn có cả Pb.

Ngoài ra còn nhiều nguyên nhân khác cũng gây ô nhiễm môi trường, có nguyên nhân thường xuyên, có nguyên nhân xảy ra đột xuất. Ví dụ: cháy rừng, đắm tàu chở dầu, tai nạn nhà máy hạt nhân, thử vũ khí hạt nhân, vũ khí hóa học, chiến tranh. . .



Hình 12.4. Xung đột giữa phát triển kinh tế và ô nhiễm môi trường

II. MỘT SỐ BIỆN PHÁP VI SINH GÓP PHẦN BẢO VỆ MÔI TRƯỜNG

Việc bảo vệ môi trường có thể thực hiện theo các phương pháp cơ bản là:

- Triệt tiêu nguyên nhân hay hạn chế nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường.
- Xử lý hậu quả mà các nguyên nhân đã gây ra sự ô nhiễm.

Với những phương hướng đó, CNVS có thể góp phần bảo vệ môi trường theo các biện pháp sau:

1. Trồng cây xanh: Trồng cây xanh để phủ xanh đất trống đồi trọc, cải tạo đất, cải tạo môi sinh, cải tạo hệ sinh thái. . . là biện pháp hữu hiệu hạn chế sự ô nhiễm môi trường do rừng bị tàn phá gây ra.

2. Dùng phân sinh học thay phân hóa học:

Hạn chế sử dụng phân hóa học nhờ CNSH tạo ra các dạng phân sinh học như Nitragin, azotobacterin, phân lân vi sinh. . . Nhờ đó giảm thiểu sự ô nhiễm do phân học học gây ra.

3. Dùng phương pháp sinh học để bảo vệ thực vật thay cho thuốc trừ sâu

- Dùng VSV diệt côn trùng gây hại
- Dùng động vật diệt côn trùng gây hại
- Công nghệ gen tạo giống cây chịu sâu bệnh

4. Xử lý chất thải bằng CNVS



[1]

[2]

[3]

Hình 12.5. [1]. Ngày 6/1/1960, Bác Hồ đã ra lời kêu gọi toàn dân hưởng ứng một tháng trồng cây và đặt tên là Tết trồng cây.[2,3] Trồng rừng

III. CÔNG NGHỆ VI SINH CÓ ĐỊNH ĐẠM VÀ PHÂN VI SINH VẬT

1. Công nghệ gen tạo giống cây có khả năng cố định đạm

Có 2 hướng giải quyết vấn đề này đang được thực hiện:

- Sử dụng công nghệ gen: Chuyển gen sản xuất nitrogenaza (gen nif) từ vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* có khả năng cố định nitơ sang *E.coli* tạo ra cho *E.coli* có khả năng cố định đạm rồi sử dụng chúng như là nguồn cung cấp đạm.

- Chuyển gen nif vào các cây không có khả năng cố định đạm làm cho các cây này trở thành cây có khả năng cố định đạm nên tự cung cấp được đạm cho cây. Hy vọng rằng trong thời gian đến, bằng kỹ thuật gen người ta chuyển các plasmid chứa gen nif vào các cây trồng và sẽ chấm dứt nạn đói đạm triền miên của cây trồng, lúc bấy giờ chắc chắn sẽ tạo ra một bước ngoặt vĩ đại đối với sự phát triển nông nghiệp trên toàn thế giới.

2. Công nghệ sinh học với sản xuất phân vi sinh vật

Hiện nay người ta tạo ra những giống cây trồng có năng suất cao thường nhu cầu đòi hỏi về phân bón cũng cao. Vì vậy mà đất không đáp ứng được nhu cầu cho cây nên phải sử dụng nhiều dạng phân bón: Phân vô cơ, phân hữu cơ, phân vi sinh...

Phân vô cơ hay còn gọi là phân hóa học có ưu điểm như cho kết quả nhanh, hiệu quả cao, nhưng nếu dùng nhiều sẽ làm ô nhiễm môi trường, làm thay đổi tính chất lý hóa của đất theo hướng làm cho đất xấu đi, tích lũy nhiều ion độc trong đất và ngay cả trong các sản phẩm thu hoạch. . .

Phân hữu cơ có nhiều loại như phân xanh, phân bùn, phân rác, phân chuồng. . . nhưng hiệu quả chậm, hiệu suất kinh tế không cao do phải sử dụng lượng lớn, tốn kém công vận chuyển. . .

Phân vi sinh có nhiều dạng và có hiệu quả khác nhau phù hợp với loại cây trồng cũng như loại đất trồng. Phổ biến hiện nay là phân vi khuẩn nốt sần (Nitragin), Azotobacterin, phân lân vi sinh.

2.1. Phân vi khuẩn nốt sần (Nitragin):

Nitragin là loại phân được chế tạo bởi vi khuẩn *Rhizobium* do Beijerinck phân lập năm 1888 và được Fred đặt tên vào năm 1889 dùng để bón cho các loại cây thích hợp của họ đậu.

Phân bón vi sinh do Noble Hiltner sản xuất đầu tiên tại Đức năm 1896 và được đặt tên là nitragin: Sau đó phát triển sản xuất tại một số nước khác như ở Mỹ (1896), Canada (1905), Nga (1907), Anh (1910) và Thụy Điển (1914). Tùy từng nước mà nitragin sản xuất ra dưới những hình thức khác nhau: trên thạch, trong dịch thể, hấp thụ vào than bùn, đất vườn. . .



Hình 12.6. Một số dạng chế phẩm Nitragin

Quá trình sản xuất nitragin được tiến hành theo các bước sau:

- Phân lập vi khuẩn nốt sần từ nốt rễ các cây họ đậu
- Tuyển chọn các chủng có hoạt tính cố định đạm cao, có khả năng chịu đựng được các điều kiện bất lợi của môi trường và có khả năng cạnh tranh được với các VSV khác sống xung quanh rễ cây; có khả năng sống sót trên hạt khi tẩm nhiễm.
- Nhân giống rồi cho hấp thụ vào chất mang.

Theo GS.Nguyễn Lâm Dũng trong hoàn cảnh nước ta hiện nay trước mùa gieo một loại đậu đỗ nào đó, các phòng thí nghiệm nhỏ tổ chức ở các tỉnh sẽ sản xuất các ống nghiệm thạch nghiêng cấy vi khuẩn nốt sần và chuyển trực tiếp xuống các hợp tác xã, các nông trường, ở đây giống được nhân lên trong các môi trường đơn giản (chứa nước chiết đậu 5%, với 1% đường kính). Sau 72 giờ nuôi cấy trong mỗi ml môi trường này có thể đạt tới 3800.10^{16} vi khuẩn nốt sần điển thanh hoặc 2800.10^{16} tế bào vi khuẩn nốt sần lạc. Dem tẩm vào hạt hoặc bón vào đất. . . Cần chú ý tránh sử dụng đồng thời các loại thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển của vi khuẩn nốt sần.



Hình 12.7. Hiệu quả của việc sử dụng Nitragin

2.2. Phân Azotobacterin

Trong nhiều năm ở nhiều nước khác nhau, người ta đã sản xuất ở quy mô công nghiệp hay thủ công những chế phẩm từ vi khuẩn *Azotobacter* và gọi là Azotobacterin. Đó là những dịch nuôi cấy *Azotobacter* được hấp thụ vào than bùn hoặc các loại đất giàu chất hữu cơ đã trung hòa và bổ sung thêm một ít phân photpho kali. . .

Azotobacter là loại vi khuẩn sống tự do hiếu khí, tế bào từ hình cầu đến hình que. Khi còn non tế bào hình que kích thước khoảng $2,0-0,7 \times 1,0-2,5\mu\text{m}$ di động nhờ chu mao, khi tiêu thụ hết 1g các hợp chất carbon có khả năng cố định được 10mg N_2 . pH thích hợp 7,2-8,2, ngoài khả năng cố định đạm *Azotobacter* còn có khả năng tạo ra lượng lớn các chất điều hòa sinh trưởng như auxin, gibberellin. . .

*Gần đây, Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch (Bộ NN&PTNT) sản xuất loại phân vi sinh Azotobacterin dùng cho cây khoai tây.

Phân bón vi sinh Azotobacterin chứa 10^9CFU/g vi khuẩn azotobacterin và chất mang, giúp tăng khả năng cố định N_2 trong đất, tăng độ xốp của đất, tăng năng suất và kích thích sinh trưởng của cây trồng. Phân bón vi sinh Azotobacterin dùng thích hợp cho các cây rau màu, các cây có củ, tạo ra sản phẩm rau, quả sạch.

Cách dùng:

- Liều lượng: Bón kết hợp cho 1 sào Bắc bộ với: (500-800kg) phân chuồng + (20-25kg) phân lân + 5kg phân đạm + (10-12kg) kali + (1-1,5kg) phân vi sinh.
- Cách bón: Bón lót toàn bộ phân chuồng, phân lân và 3kg phân kali. Bón thúc: lần 1 sau khi cây cao từ 15-20cm: 2kg đạm + 3kg lân + 1/2 lượng phân vi sinh, hoà với 60 lít nước sạch tưới vào gốc cây; lần 2 bón sau lần 1 khoảng 15-20 ngày: 1/2 lượng phân vi sinh + 4kg kali + 3kg đạm, hoà với 60 lít nước sạch tưới gốc cây.

2.3. Phân lân sinh học

Trong nhiều năm gần đây, tiếp theo việc nghiên cứu và sử dụng phân đạm sinh học để thay cho phân đạm hóa học người ta cũng đã đi sâu nghiên cứu việc chế tạo phân lân sinh học.

Để phân hủy dạng lân hữu cơ khó tan, người ta đã sử dụng nhóm VSV có khả năng phân hủy lân hữu cơ như: *Bacillus mycoides*, *B.subtilis*, *Proteus vulgaris* . . .

Để phân hủy lân vô cơ, cần sử dụng VSV nhóm: *Bacillus megatherium*, *B.mycoides*, *B.butyricus*, *Pseudomonas gracilis*, *P.herbicola*, *P.radiobacter*. . . Nấm mốc *Aspergillus niger*. Quá trình sản xuất phân lân sinh học tiến hành qua các bước chủ yếu sau:

- Phân lập và thuần khiết các VSV có khả năng phân giải lân
- Tuyển chọn chủng có hoạt tính phân giải lân cao, có khả năng thích hợp với các điều kiện sống khác nhau trong môi trường đất, có khả năng tồn tại trong chất mang khi sản xuất chế phẩm.
- Nhân giống VSV để gia tăng số lượng VSV phân giải lân
- Chế tạo chế phẩm bằng cách trộn VSV phân giải lân với chất mang với tỷ lệ thích hợp. Chất mang thường dùng là than bùn, đất bột apatit, có thể bổ sung thêm 1% đường làm chất dinh dưỡng cho vi khuẩn phát triển tốt, chế phẩm có thể ở dạng bột hay dạng viên.

3.Thuốc sinh học bảo vệ thực vật

Việc sử dụng quá nhiều thuốc hoá học trừ sâu và diệt cỏ dại trong nông nghiệp ngày càng dẫn đến hậu quả ô nhiễm môi trường và phá hoại hệ sinh thái tự nhiên. Thuốc sinh học bảo vệ thực vật dựa trên quan hệ đối kháng giữa các nhóm vi sinh vật với nhau, giữa côn trùng với nhau, cũng như giữa VSV với côn trùng. Các quan hệ đối kháng này vốn đã có trong tự nhiên, nó chính là một trong các yếu tố tự điều chỉnh của hệ sinh thái. Khi một loài nào đó trong hệ sinh thái phát triển quá nhiều về số lượng thì có một loài khác dùng nó làm thức ăn cũng phát triển mạnh và tiêu diệt nó. Nhờ các quan hệ đối kháng như vậy, các loài trong tự nhiên luôn luôn được giữ ở thể cân bằng. Hệ sinh thái tự nhiên được bảo tồn nhờ những quy luật tự điều chỉnh như vậy. Khi sử dụng quá nhiều thuốc trừ sâu và diệt cỏ, các loài đối kháng vốn đã ít lại bị tiêu diệt đi cùng với côn trùng gây hại, và vì thế yếu tố điều chỉnh tự nhiên ngày càng mất đi.

Phương pháp sinh học bảo vệ thực vật nhằm mục đích phục hồi những loài đối kháng với côn trùng gây hại, dựa trên nguyên tắc nuôi nhân tạo các loài đối kháng, thả ra thiên nhiên ở những nơi có nhiều loài gây hại. Có thể sử dụng biện pháp côn trùng diệt côn trùng như nuôi nhân tạo ong mắt đỏ *Tricoderma* để diệt trừ sâu xám và một số loại sâu khác. Có thể sử dụng biện pháp diệt côn trùng như nuôi cấy *Bacillus thuringiensis* để gây bệnh cho các loài sâu hại cây trồng.

Trong tế bào của loại vi khuẩn *B. thuringiensis* có những hạt tinh thể hình quả trám có độc tính đối với côn trùng. Những vi khuẩn diệt côn trùng đầu tiên được phân lập ra đầu tiên từ côn trùng bị bệnh. Sau đó được nuôi cấy, nhân giống và cuối cùng được đưa trở lại thiên nhiên, gây dịch bệnh hàng loạt cho côn trùng hại cây. Hiện nay có hai nhóm biện pháp có thể sử dụng VSV để phòng trừ bệnh cây: dùng VSV diệt côn trùng và dùng VSV diệt VSV bằng khả năng sinh chất kháng sinh.

3.1.Chế phẩm thuốc trừ sâu BT

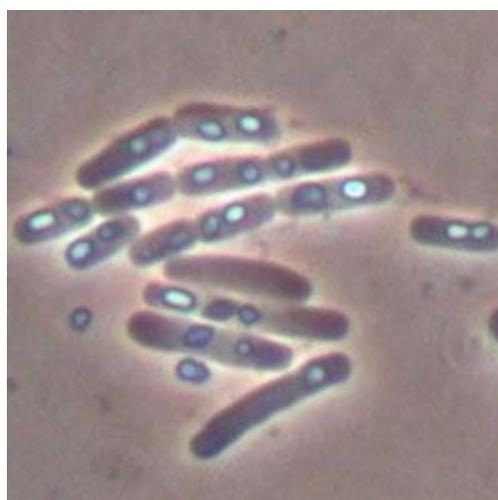
Năm 1901, Ishwatori. S, lần đầu tiên phân lập được chủng vi khuẩn gây bệnh cho tằm. Ông đặt tên là *Bacillus sotto*. Đến năm 1911, loài vi khuẩn này được Ernst Berliner phát hiện và đặt tên lại là *Bacillus thuringiensis* khi ông nghiên cứu ra tác nhân gây bệnh trên loài sâu xám ở tỉnh Thuringia, Đức. Đến năm 1938, lần đầu tiên *Bacillus thuringiensis* được sử dụng làm thuốc trừ sâu tại Pháp và đến những thập niên 1950, BT đã được dùng rộng rãi tại Mỹ. Năm 1956, người ta tìm ra hoạt tính trừ sâu của vi khuẩn có liên quan đến tinh thể được tạo ra trong quá trình sinh bào tử. Năm 1961, BT được đăng ký như một loại thuốc trừ sâu an toàn với tổ chức EPA (Environmental Protection Agency). Ngày nay hàng chục ngàn biến loài của chủng vi khuẩn này được sử dụng để tạo ra thuốc trừ sâu sinh học đối với nhiều côn trùng gây bệnh khác nhau.

3.1.1. Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

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

a. Thể sinh dưỡng

Thể sinh dưỡng dạng que, hai đầu tù, kích thước 1,2-1,8 μm x 3-5 μm , bắt màu Gram dương. Lông mọc xung quanh. Chúng thường tồn tại từng cá thể hay 2 cá thể liền nhau. Thể sinh dưỡng sinh sản theo kiểu phân chia ngang. Trong thời kỳ sinh sản thường có 2,4,8... thể sinh dưỡng liền nhau thành chuỗi, lúc này vi khuẩn sinh trưởng mạnh, trao đổi chất nhiều, để nuôi cấy trên môi trường.



Hình 12.8. Hình thái vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

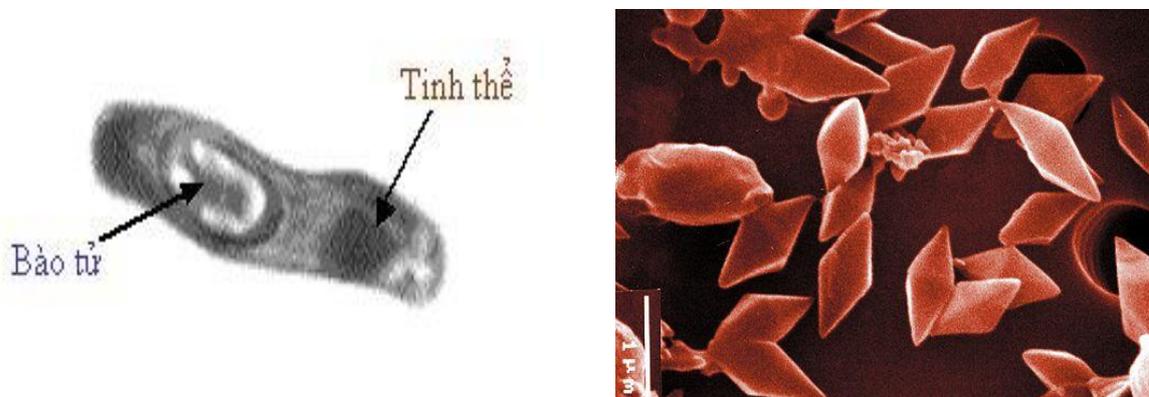
b. Nang bào tử

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

c. Bào tử và tinh thể

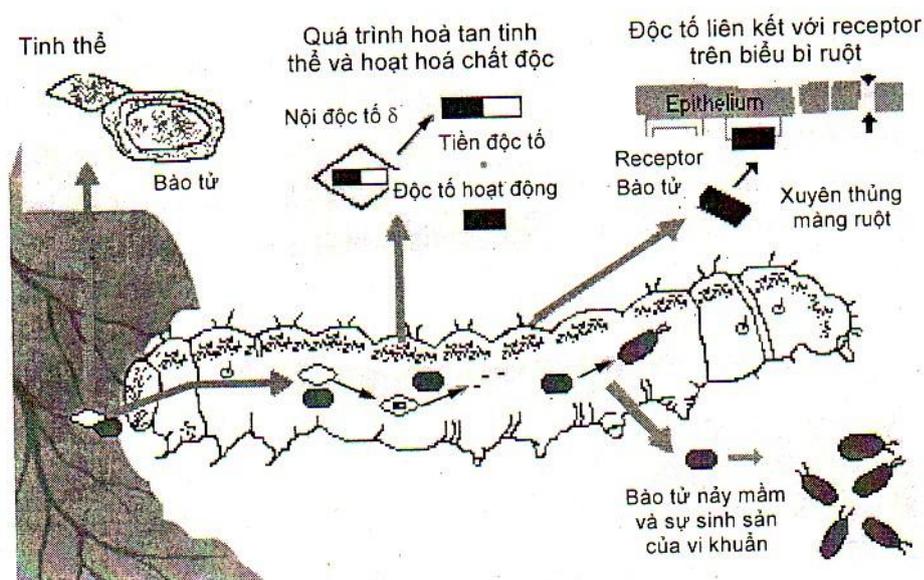
Khi nang bào tử phát triển đến một giai đoạn nào đó, chúng sẽ nứt ra, giải phóng bào tử và tinh thể. Kích thước bào tử 0,8-0,9 μm x 2 μm . Bào tử dạng ngù có thể đề kháng với các

điều kiện môi trường bất lợi. Chế phẩm vi khuẩn thường được bảo quản ở dạng bào tử. Tinh thể thường có kích thước thay đổi, nhưng thường vào khoảng $0,6\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$; hình thoi, hình bầu dục tùy theo loài và loại môi trường.



Hình 12.9. Nang bào tử vỡ giải phóng bào tử và tinh thể độc của BT

3.1.2. Cơ chế gây độc của tinh thể độc BT



Hình 12.10. Cơ chế hoạt động của tinh thể độc diệt côn trùng

Tinh thể độc cùng với bào tử xâm nhập vào cơ thể sâu bằng con đường tiêu hóa khi sâu ăn phải lá có vi khuẩn. Trong điều kiện bình thường, tinh thể độc không hòa tan. Khi đi vào ruột giữa của sâu, nơi có pH kiềm cao ($>9,5$) làm cho tinh thể độc tan ra. Tuy nhiên, dạng hòa tan này chưa phải là dạng hoạt động. Dạng tiên độc tố này được protease trong ruột giữa của sâu hoạt hóa thành dạng hoạt tính độc tố δ . Độc tố này liên kết với tế bào biểu mô thành ruột, đâm qua màng tạo thành lỗ xuyên màng, làm mất cân bằng ion nội bào của tế bào biểu mô và làm cho chúng bị phân giải, sâu ngừng ăn và bị chết đói. pH của trong ruột bị giảm

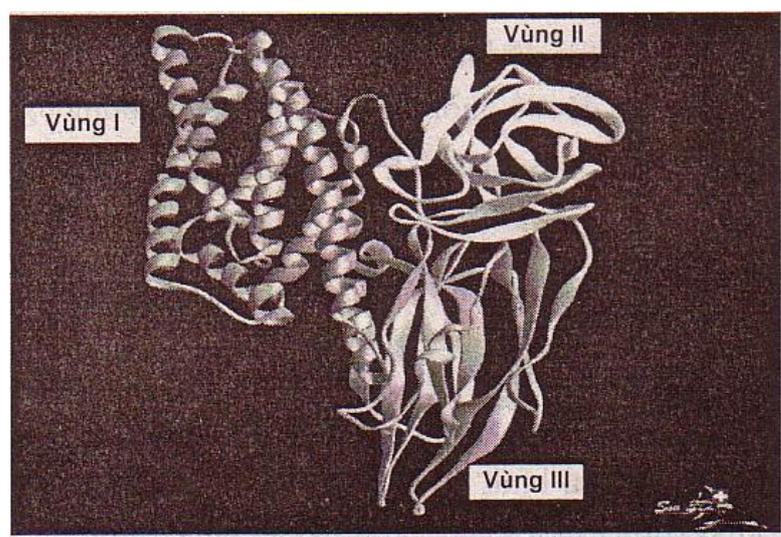
xuống bằng với pH nội môi trong huyết tương. Độ pH thấp này cho phép các bào tử nảy mầm, xâm chiếm vật chủ và cuối cùng là gây chết.

Những nghiên cứu gần đây cho thấy nội độc tố δ có ba vùng chức năng:

-Vùng I là một bó gồm 7 chuỗi xoắn α . Một vài chuỗi hoặc tất cả các chuỗi có thể cài vào màng tế bào ruột, tạo ra các lỗ, từ đó các ion có thể qua lại tự do.

-Vùng II chứa 3 dải β không song song tương tự như vùng gắn kháng nguyên của globulin miễn dịch. Vùng này có vai trò gắn với thụ thể trên bề mặt tế bào biểu mô ruột.

-Vùng III có nhiệm vụ bảo vệ độc tố đã được hoạt hóa không bị phân hủy bởi protease ở ruột.



Hình 12.11. Nội độc tố δ của *B. thuringiensis*

3.1.3. Sản xuất thuốc trừ sâu BT

Việc sản xuất thuốc trừ sâu sinh học BT ở Việt Nam trong những năm gần đây mới chỉ ở quy mô phòng thí nghiệm. Cho đến nay vẫn chưa có nhà máy sản xuất với công suất cao để có thể đáp ứng được cho phòng trừ sâu hại rau ở các vùng chuyên canh.

Các chủng dùng cho sản xuất thử chủ yếu là từ nước ngoài, vì vậy chưa đáp ứng được nhu cầu sản xuất trong nước, công nghệ sản xuất chủ yếu theo phương pháp lên men chìm. Phương pháp lên men xộp đã có một số cơ sở thực hiện nhưng không thu được kết quả như mong muốn.

Để sản xuất chế phẩm diệt côn trùng hại rau BT phải qua các bước sau:

a. Phân lập vi khuẩn *B. thuringiensis* (BT) :

-Để phân lập vi khuẩn BT người ta thu mẫu là những côn trùng bị bệnh đang còn sống.

- Sử dụng một trong các môi trường có thành phần như sau

Bảng 12.2 Môi trường dùng để phân lập vi khuẩn *B. thuringiensis*

Nguyên liệu (g/l)	Môi trường 1	Môi trường 2	Môi trường 3	Môi trường 4
Glucose	15	5	3	
Saccarose				10
Cao ngô	4.5			
Tinh bột ngô	6.0	5		
Cao nấm men	3.5	2		
K ₂ HPO ₄		1		
KH ₂ PO ₄		1	1	
NaOH	0.43			
CaCl ₂	0.1			
Pepton		10	30	10
NaCl			2	5
MgSO ₄ .7H ₂ O			0.1	
Na ₂ HPO ₄			5	
Cao thịt				3

(Dẫn theo Trần Cẩm Vân, 1995).

b. Tuyển chọn chủng thích hợp: Cần tuyển chọn chủng vi khuẩn BT mang các đặc điểm:

- Có hiệu lực diệt sâu cao
- Có tỉ lệ sống sót cao khi phun một số lượng lớn ra ngoài đồng ruộng
- Có khả năng sinh trưởng, phát triển, giữ hoạt tính trong điều kiện nuôi cấy nhân giống ở phòng thí nghiệm.
- Có tỉ lệ sống sót cao trong chế phẩm.

c. Lên men tạo chế phẩm: Để sản xuất chế phẩm BT có 3 phương pháp chính: Lên men trên môi trường lỏng (lên men chìm), lên men trên môi trường đặc và lên men trên môi trường bán lỏng (còn gọi là lên men xộp).

Sau đây chúng tôi xin giới thiệu phương pháp lên men chìm:

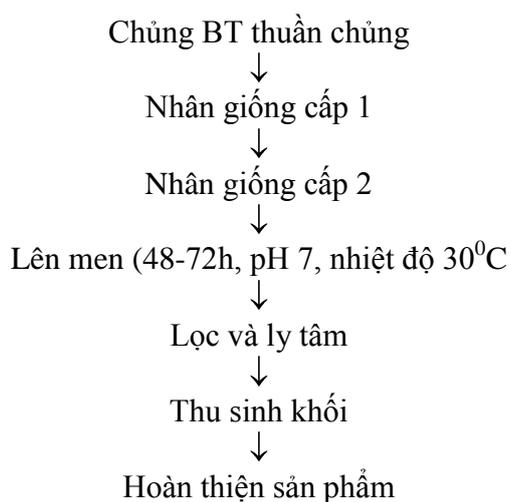
- Nhân giống cấp 1; Môi trường có thành phần như MT 1 **Bảng IV.1**
- Nhân giống cấp 2: Môi trường có thành phần (g/l):
- Glucose -3; Khô lạp - 5; Bột cá- 5; Cao ngô-5; Dầu đậu tương- 2.5ml; nước 1lit.
- Lên men : Môi trường lên men chìm có thành phần g/l):

Khô lạp - 20; Bột cá- 5; Cao ngô-18; CaCO₃- 5; MgSO₄.7H₂O-0.07; Dextrin- 5; K₂HPO₄- 0.4; Dầu đậu tương- 3ml; nước 1lit.



Hình 12.12 Chế phẩm Thuốc trừ sâu BT có độc tính đối với côn trùng.

Quy trình sản xuất BT (Dẫn theo GS.TS. Phạm Văn Ty)



Hình 12.13. Quy trình sản xuất BT

Thành phẩm: Chế phẩm sau khi lên men phải đánh giá chất lượng dựa vào 2 chỉ tiêu: số lượng vi khuẩn sống trong chế phẩm đạt trên 2.10^9 tế bào/g và độc tính của chế phẩm phải mạnh.

Tiêu chuẩn BT cần phải đạt:

- Số lượng bào tử: : 3-10 tỉ bào tử/ 1g chế phẩm
- Hàm lượng chất khô đảm bảo từ 7-10%
- Độ pH trung tính: 7- 7,5
- Hiệu lực diệt sâu đạt từ 70-90% sau 7 ngày
- Thời gian bảo quản 12 tháng.

3.2. Nấm xanh *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium thuộc họ Moniliaceae. Bào tử trần, hình trụ, đầu tròn hoặc elip tùy chủng, có màu lục nhạt hay oliu, kích thước 4,5-5,5 μm . Nhiệt độ sinh trưởng là 28-30 $^{\circ}\text{C}$. Trên 35 $^{\circ}\text{C}$ thường không sinh trưởng. Bào tử nảy mầm sau 24 giờ khi gặp độ ẩm thích hợp ở 28-30 $^{\circ}\text{C}$. *Metarhizium flavoviridae* Grams có cấu tạo giống *Metarhizium anisopliae*, nhưng bào tử có dạng hình trụ. *Metarhizium* có khả năng tiêu diệt nhiều loài côn trùng phá hoại mùa màng như bọ rầy, bọ xít, bọ rùa, châu chấu, kiến vương hại dừa, bọ đất hại mía, lạc, mồi, muỗi... Chúng có khả năng sinh độc tố destrucin A ($\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_5\text{N}_5$) và destrucin B ($\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_7\text{N}_5$) rất độc đối với côn trùng. Khi bào tử nấm rơi trên cơ thể côn trùng, gặp độ ẩm cao và kéo dài sẽ nảy mầm, đâm xuyên vào cơ thể. Khi côn trùng chết, nấm lại đâm xuyên ra ngoài, lúc đầu là lớp phấn trắng ở khớp nối giữa các đốt, sau phát triển khắp bề mặt cơ thể côn trùng và hình thành bào tử. Bào tử *M. anisopliae* thường có màu lục đậm còn *M. flavoviridae* thường có màu lục nhạt. Bào tử phát tán theo gió hoặc nước để lây sang cá thể khác.



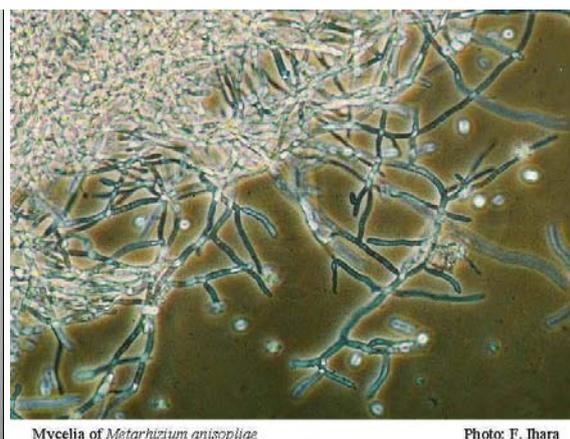
[1]



[2]



[3]



[4]

Hình 12.13a. Nấm xanh *Metarhizium anisopliae*
 [1] kí sinh trên bọ que, [2] Bộ cánh cứng ,[3]Khuẩn lạc, [4] Hệ sợi.



[1]

[2]

Hình 12.13b. Nấm xanh *Metarhizium anisopliae*

[1] Khuẩn lạc trên môi trường thạch nghiêng, [2] bào tử nhìn qua kính hiển vi

Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long đã thu thập, phân lập con bọ xít hôi hại lúa bị bệnh tại Ô Môn, tạo thuần và nghiên cứu đặc tính sinh học của nấm xanh, *Metarhizium anisopliae* và đã chế tạo thành công chế phẩm M.a(OM2 – B)

Chế phẩm M.a (OM2– B) có hiệu lực rất cao đối với các loài bọ cánh cứng, rầy, bọ xít hại cây trồng và có hiệu lực tương đối khá đối với cào cào, mối và một số sâu ăn lá khác

Sau khi phun 7 ngày, hiệu lực diệt trừ bọ cánh cứng hại dứa của M.a (OM2 – B) đạt từ 68 tới 89%, hiệu lực diệt trừ các loài rầy đạt từ 73,5 tới 91,5% và hiệu lực trừ bọ xít hại cây trồng là từ 73-88% (tùy theo điều kiện nhiệt, ẩm độ của từng vụ, từng vùng và trên từng cây trồng khác nhau).

Chế phẩm nấm xanh có hiệu lực bền lâu và kéo dài tới hàng tháng sau khi phun, nên trong một vụ lúa, nếu bị rầy nâu, bọ xít phá hại thì chỉ cần phun chế phẩm này một lần là đủ. Chế phẩm nấm xanh không gây ảnh hưởng xấu tới thiên địch của sâu hại, con người, gia súc và môi trường.

Chế phẩm nấm xanh, M.a (OM2 – B) đã được ứng dụng trên 650 ha cây trồng (lúa, ngô, cây ăn trái, nho, trà) và 7000 cây dứa. Theo kết quả ghi nhận được từ các địa phương thì chế phẩm này đã đạt hiệu quả cao trong việc quản lý các loài sâu, rầy hại lúa; sâu, rầy hại trà; mối và các loài sâu hại cây ăn trái, khi ứng dụng vào các mô hình sản xuất lúa sạch, trà sạch, nho sạch và trái cây an toàn tại ĐBSCL và một số tỉnh khác.

Đặc biệt, chế phẩm nấm xanh còn có hiệu quả cao khi ứng dụng để trừ bọ cánh cứng hại dứa, một loài côn trùng nguy hại nhất đối với cây dứa hiện nay.

Chế phẩm trừ sâu sinh học nấm xanh, M.a (OM2 – B) đã được đưa vào danh mục thuốc bảo vệ thực vật, với tên thương mại là Ometar, được phép sử dụng ở Việt Nam theo quyết định số 63/2003/QĐ-BNN ngày 27 tháng 05 năm 2003 của Bộ Trưởng Bộ Nông nghiệp và PTNT.

Chế phẩm nấm xanh M.a(OM2 – B) ở dạng bột thấm nước, với chất lượng tốt, có số lượng bào tử cao (1,2 -1,5 x 10⁹ bào tử/gram)

Liều dùng : từ 4 tới 5 kg chế phẩm cho 1 ha cây trồng.

Chế phẩm M.a(OM2 – B) có hiệu lực ổn định đối với sâu hại sau 8 tháng bảo quản ở nhiệt, ẩm độ bình thường.

Cách dùng: Pha một gói chế phẩm 150 gam trong 1 bình ..12..lít nước, lọc qua hai lớp vải màn. Nên trộn thêm chất bám dính nông dược hoặc dầu ăn (4 -5^{CC}/bình) để tăng hiệu quả sử dụng.

Nên phun chế phẩm vào lúc chiều mát.

3. 3. Biện pháp VSV diệt VSV gây bệnh cây bằng khả năng sinh kháng sinh.

Cây trồng không những bị phá hoại bởi côn trùng mà còn bị thiệt hại do các nhóm VSV gây bệnh cây. Nước ta nằm trong vùng nhiệt đới nóng ẩm, rất thích hợp cho các loại VSV gây bệnh cây, đặc biệt là nhóm vi nấm. Ví dụ như bệnh đạo ôn do nấm mốc *Piricularia oryzae* gây ra, bệnh tiêm lửa do *Heminthosporum oryzae*, bệnh lúa von do *Fusarium moniliformae* gây ra. Các bệnh này gây thiệt hại đáng kể cho sản lượng mùa màng. Thuốc hoá học dùng để tiêu diệt các loại nấm bệnh rất nhiều, nhưng dùng càng nhiều liều lượng ngày càng phải cao lên do hiện tượng nhờn thuốc. Liều lượng cao của các chất hoá học tiêu diệt cả khu hệ VSV có ích trong đất như VSV cố định nitơ , VSV phân huỷ chất hữu cơ.....

Biện pháp sử dụng VSV diệt VSV gây bệnh cây bằng khả năng sinh chất kháng sinh dựa trên hai mối quan hệ cơ bản giữa VSV với nhau: Quan hệ ký sinh và quan hệ đối kháng.

Quan hệ ký sinh: VSV gây bệnh cây sống ký sinh trên thực vật, nhưng chính nó lại bị một loại VSV khác sống ký sinh- gọi là ký sinh bậc hai. Ký sinh bậc hai thường là vi khuẩn hay virus có khả năng sống ký trên vi nấm gây bệnh thực vật.

Nguyên tắc của biện pháp này là tách các ký sinh bậc 2 từ nấm bệnh thực vật, nuôi cấy, nhân giống trong điều kiện thí nghiệm rồi thả trả lại tại vùng có ký chủ của nó đang phát triển. Ký sinh bậc hai sẽ gây thành dịch bệnh làm chết hàng loạt các VSV gây bệnh cho cây trồng. Khó khăn của biện pháp này là việc phân lập cũng như nuôi cấy ký sinh bậc hai. Vì nó là loại sinh vật sống ký sinh trên cơ thể sống nên việc phân lập và nuôi cấy bằng môi trường nhân tạo rất khó khăn.

Quan hệ đối kháng: VSV trong quá trình sống tiết ra các chất đối kháng ức chế hoặc tiêu diệt lẫn nhau. Điển hình là các VSV sinh chất kháng sinh.

Việc nghiên cứu và ứng dụng biện pháp này được tiến hành theo các bước:

- Phân lập chủng VSV sinh kháng sinh
- Chọn chủng, nâng cao hoạt tính.

- Thử hoạt tính kháng sinh đối với VSV gây bệnh cây
- Sản xuất và thử tác dụng các chế phẩm.

Bên cạnh việc nhập giống VSV sinh chất kháng sinh có hoạt tính mạnh từ nước ngoài, việc phân lập các chủng VSV có khả năng sinh chất kháng sinh là rất quan trọng vì chất kháng sinh thuộc loại hợp chất dễ bị phân huỷ trong môi trường đất, nhất là điều kiện nóng ẩm.

Các VSV có nguồn gốc nước ngoài thường không thích hợp với điều kiện tự nhiên của nước ta, khi đưa vào đất dễ bị mất hoạt tính. Trong khi đó khu hệ VSV đất của Việt Nam rất nhiều về số lượng và phong phú về chủng loại.

***Tạo chủng VSV sinh chất kháng sinh:** Trong số các VSV sinh chất kháng sinh đáng chú ý là xạ khuẩn.

Để phân lập xạ khuẩn sinh kháng sinh thuộc chi *Streptomyces* cần sử dụng một trong các môi trường có thành phần như (Bảng 12.3):

Bảng 12.3. Thành phần môi trường để phân lập xạ khuẩn chi Streptomyces.

1. MT ISP- 4(g/l)				2. MT Gauze- 1(g/l)	
Tinh bột tan	10	thành phần dung dịch vi lượng :		Tinh bột tan	20
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	ZnCl ₂	0,1	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
NaCl	1	SnSO ₄	0,1	NaCl	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	H ₂ O	100ml	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
CaCO ₃	2			KNO ₃	1
Dung dịch vi lượng 1ml				Thạch	20
Thạch	20			Nước cất	1lit
Nước cất	1litt			pH	7,2- 7,4
pH	7,0				

Để ức chế các loại tạp khuẩn, nên bổ sung vào môi trường phân lập xạ khuẩn K₂Cr₂O₇ với tỉ lệ 0,4g/l.

Để thử hoạt tính kháng sinh người ta thường dùng phương pháp khuếch tán trên thạch.

Các chủng xạ khuẩn dùng trong bảo vệ thực vật cần được chọn theo những tiêu chuẩn sau:

- Hoạt lực kháng sinh cao
- Hoạt phổ kháng sinh rộng
- Giữ được hoạt tính khi đưa vào đồng ruộng
- Không độc đối với cây trồng, người, động vật và các VSV khác.

Không tuộc loại kháng sinh dùng trong y học.

***Tạo chế phẩm kháng sinh thô:**

Hiện nay, các chế phẩm kháng sinh dùng trong nông nghiệp được sản xuất ở dạng thô. Có hai dạng chế phẩm: dạng dịch thể và dạng bột.

Chế phẩm dạng bột tiện lợi cho quá trình bảo quản và vận chuyển hơn chế phẩm dạng nước. Khi sử dụng, tùy theo đối tượng bệnh cây

Dạng dịch thể: Giống xạ khuẩn được cấy truyền sang môi trường thạch nghiêng (MT-Gauze1). Tiến hành nhân giống cấp 1 trên môi trường có thành phần (g/l):

Bột ngô-20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -5; $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ -2; K_2HPO_4 -2; NaCl - 2; nước 1lit.

Phân phối môi trường vào các bình tam giác dung tích 500ml, mỗi bình đựng 100ml. Mỗi bình cấy một ống giống xạ khuẩn thạch nghiêng (hút 1-2ml môi trường lỏng cho vào ống giống, dùng que cấy gạt cho bào tử hoà vào dung dịch. Đổ dung dịch trở lại bình tam giác. Nuôi cấy trên máy lắc tốc độ 200- 220vòng/phút ở nhiệt độ 28- 30⁰C, trong thời gian từ 24- 48 giờ.

Nhân giống cấp 2 với môi trường có thành phần (g/l):

Bột ngô- 30; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4; CaCO_3 - 4; NaCl - 2; nước 1lit; pH= 6.5- 7.5.

Môi trường lên men: có thể sử dụng một trong các môi trường sau đây (g/l):

1).MT1: Cao ngô- 0.5; Glucose- 1; CaCO_3 - 0.5; NaCl - 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.35; Bột khoai tây - 1.5.

2).MT2: Cao ngô- 0.3; Bột đậu tương- 2; Glucose- 3; CaCO_3 - 0.6; NaCl - 0.2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.3; KH_2PO_4 - 0.02.

3).MT3: Bột ngô- 2; Nấm men khô- 0.5; Glucose- 3; CaCO_3 - 0.6; NaCl - 0.2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.3; KH_2PO_4 - 0.02.

Dịch nuôi cấy xạ khuẩn sau khi kết thúc giai đoạn nuôi trong nồi lên men có sục khí có thể coi như chế phẩm kháng sinh thô. Chế phẩm này có thể đem ly tâm loại bỏ sinh khối xạ khuẩn rồi đem đóng chai bảo quản ở nhiệt độ thấp (nếu phun lên lá). Cũng có thể để cả khối xạ khuẩn nếu muốn đưa xạ khuẩn vào đất.

***Ứng dụng chế phẩm kháng sinh thô:**

-Bón trực tiếp vào đất, vào gốc cây

-Phun dịch kháng sinh thô lên lá, lên thân nên loại bỏ sinh khối xạ khuẩn thay vào đó là các chất giúp cho thuốc bám dính trên thân lá.

IV. CÔNG NGHỆ XỬ LÝ RÁC THẢI HỮU CƠ

Rác thải là một nguyên nhân quan trọng gây ô nhiễm môi trường. Mức sống của nhân loại ngày càng cao, dân số càng tăng thì mức độ ô nhiễm môi trường do rác tạo ra càng lớn.

Thành phần rác thải rất đa dạng, các rác thải hàng ngày được thu gom lại và xử lý bằng nhiều phương pháp khác nhau. Trước đây, phần lớn rác thải ở thành phố, các khu đông dân cư được tập trung lại đem chôn lấp hay đốt đi, cả hai biện pháp này đều gây ô nhiễm môi trường.

- Rác chôn xuống đất sẽ làm ô nhiễm nguồn nước, ô nhiễm vùng đất xung quanh bãi rác thải, các khí thải độc hại do quá trình phân hủy tự nhiên bay ra làm ô nhiễm bầu không khí.

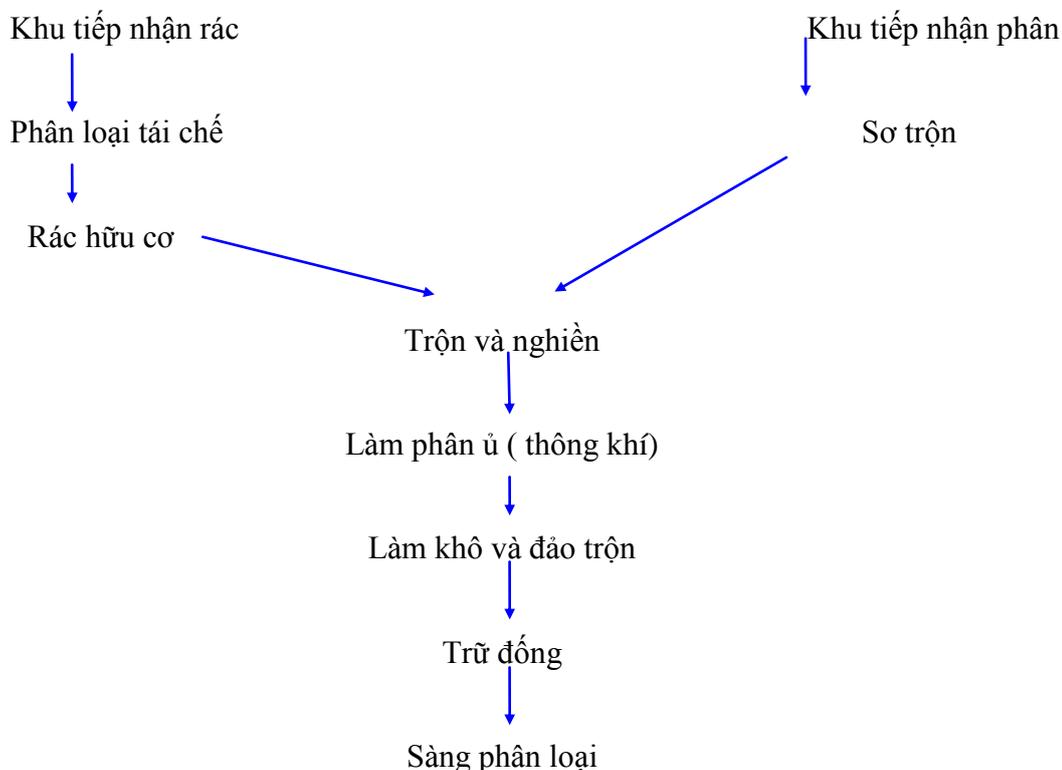
- Rác đem đốt sẽ thải vào bầu khí quyển một lượng lớn các khí độc.

Để khắc phục các nhược điểm trên, người ta dùng biện pháp sinh học để xử lý rác có hiệu quả nhất: vừa không gây ô nhiễm môi trường, lại vừa có hiệu quả kinh tế cao.

1. Xử lý rác thải bảo vệ môi trường và tận thu làm phân bón

GS.TS. Phạm Văn Ty cùng một số nhà khoa học khác kết hợp với công ty môi trường và đô thị Hà Nội đã nghiên cứu đưa VSV có khả năng phân giải cellulose vào xử lý rác thải. Theo phương pháp này, rác được đánh thành đồng hình thang, 2m x 3m x 1,5m, dưới đáy đồng có đường ống dẫn khí vào. Bào tử nấm mốc có hoạt tính phân giải cellulose cao được bổ sung vào theo tỷ lệ 40-50g/tấn rác. Dùng máy thổi khí vào trong suốt tuần đầu mỗi lần 10 phút, mỗi lần cách nhau 10 phút. Trong tuần 2 và 3 mỗi lần cách nhau 10 phút và mỗi lần kéo dài 5 phút. Tuần 4 ngưng thổi khí, sau 40 ngày kiểm tra, nếu rác đã phân hủy tốt đem sàng còn nếu chưa có thể đợi thêm vài ngày. Phương pháp này có thể phân hủy khoảng 30% rác hữu cơ sau 40-50 ngày.

Theo đề án VIE/86/023 nhà máy thí điểm xử lý rác ở Cầu Diễn đã được cải tạo và xây dựng theo công nghệ xử lý rác thải bằng phương pháp lên men, sử dụng hệ thống quạt cung cấp khí cưỡng bức tạo điều kiện để rác phân hủy thuận lợi. Nhiệt độ khối ủ khoảng 50°C và trong trường hợp cần thiết kết hợp đảo trộn để ổn định nhiệt độ, thời gian xử lý thông thường khoảng 60 ngày. Để tăng thêm thành phần nitơ trong phân ủ trộn thêm (cặn thải bơm hút ở các nhà vệ sinh tự hoại) trong quá trình lên men, đây chuyên công nghệ như sau (12.14)



Hình 12.14. Sơ đồ công nghệ xử lý rác thải tại xí nghiệp xử lý rác thải Cầu Diễn

Ở Ấn Độ quy trình công nghệ dùng VSV phân giải hiếu khí rác thải đô thị và rác thải nông nghiệp như sau: Rác được chất thành đống để lên men, cứ sau 10 ngày đống rác lại được đảo trộn một lần. Trong thời gian 33 ngày, đống rác được phân hủy hoàn toàn và thu được phân hữu cơ có tên gọi là CELRICH. CELRICH có một số ưu điểm như: hạn chế cỏ dại mọc, có chứa VSV phân giải lân và VSV cố định đạm, nâng cao năng suất mùa màng 15-40%; cải thiện màu sắc, mùi vị kích thích hoa quả và rau trong điều kiện tốn ít phân bón hóa học.

2. Xử lý nước thải bằng công nghệ sinh học

Nước được dùng nhiều trong sinh hoạt, trong sản xuất nông, công nghiệp. Nước sau khi sử dụng được thải ra môi trường. Nước thải chứa nhiều chất vô cơ, hữu cơ, nhiều khí độc, đặc biệt nước thải ở các bệnh viện chứa nhiều loại VSV gây bệnh. Do đó việc xử lý nước thải, biến nước nhiễm bẩn thành nước sạch trả lại cho môi trường, hay để sử dụng lại cho sản xuất và đời sống là việc làm cấp thiết.

Hiện nay trên thế giới đang sử dụng các phương pháp vật lý, hóa học và sinh học để xử lý nước thải. Trong các phương pháp trên, phương pháp sinh học ngày càng được sử dụng rộng rãi vì những ưu điểm:

- Phân hủy hoạt chất hữu cơ trong nước thải nhanh, triệt để mà không gây ô nhiễm môi trường.
- Tạo ra được một số sản phẩm có ích để sử dụng trong công nghiệp và sinh hoạt như: bioga, etanol..., trong nông nghiệp như phân bón.
- Thiết bị đơn giản, phương pháp dễ làm, chi phí ít tốn kém, hiệu quả cao hơn các phương pháp khác.

Phương pháp sinh học để xử lý nước thải thường có thể bao gồm các giải pháp chính là:

- **Phương pháp xử lý hiếu khí** (xử lý bằng bùn hoạt tính): Đây là phương pháp phổ biến nhất cho xử lý nước thải hữu cơ, trong phương pháp này, các chất hữu cơ ở nồng độ cao có trong nước thải được VSV sử dụng trong điều kiện hiếu khí. Sinh khối VSV được nuôi trong thiết bị sục khí, có thể bằng kim loại hoặc bê tông và được để lắng trong thiết bị lắng tiếp sau, nước thải sau khi xử lý được tách khỏi cặn bùn nhờ thiết bị lắng này. Để tăng cường hiệu quả của bể hiếu khí và của VSV, sau khi tách khỏi nước ở trong bể lắng, lượng bùn nước được hồi lưu một phần về bể hiếu khí. Phương pháp này sử dụng cho các nước thải có hàm lượng BOD trung bình từ 150-10.000mg/l.

Hệ vi sinh vật: thường gặp là: *Actinomycetes, Bacillus, bacterrium, Pseudomonas...*

- **Phương pháp màng sinh học**: Trong phương pháp này, VSV được cố định trên bề mặt của chất màng, nước thải được đưa vào trên lớp vật liệu màng. Tại đây, chất hữu cơ được hấp thụ và phân giải.

Quá trình phân giải các HCHC chủ yếu nhờ sự có mặt của các VSV hiếu khí trên bề mặt màng và vì vậy, chúng được phân giải tới CO_2 và H_2O . Ngoài ra trong các lớp sâu của màng có chứa các vi khuẩn yếm khí, đóng vai trò phân giải các HCHC thành H_2S , NH_4^+ , axit

hữu cơ... các hợp chất này lại tiếp tục được vi khuẩn hiếu khí phân hủy tới H_2SO_4 , HNO_3 , CO_2 và H_2O . Ngoài vi khuẩn, sự phân hủy các HCHC còn có sự đóng góp của các loài vi tảo và các động vật nguyên sinh khác. Phương pháp màng sinh học nhìn chung thường được áp dụng để xử lý các nước thải có độ nhiễm bẩn thấp, BOD từ 100-200mg/l với hiệu suất xử lý 75-90%BOD.

•**Phương pháp hồ sinh học:** Phương pháp xử lý kết hợp tác dụng của vi khuẩn với các sinh vật khác, chủ yếu là tảo và các ĐVNS khác, đồng thời kết hợp hoạt động của vi khuẩn hiếu khí, yếm khí nhờ tạo ra mức độ thoáng khí khác nhau trong hồ có chiều sâu không quá lớn, kết hợp với hiệu quả chiếu sáng của diện tích bề mặt hồ. Khả năng phân giải khoảng 35-95% các hợp chất hữu cơ.

•**Phương pháp xử lý yếm khí:** Phương pháp này thích hợp cho xử lý các nước thải có nồng độ nhiễm bẩn cao, BOD từ 500mg/l hoặc lớn hơn và có khả năng thu hồi năng lượng, tạo ra ít bùn khả năng phân hủy tới 80-90% BOD. Trong cách xử lý yếm khí, vi khuẩn yếm khí được nuôi trong các thiết bị yếm khí có khuấy trộn. Chất hữu cơ được phân giải tới metan, CO_2 , các axit hữu cơ, H_2S ... Một lượng lớn năng lượng thu được dưới dạng khí metan. Quá trình phân hủy yếm khí các HCHC có thể xảy ra ở nhiệt độ cao 53-55 $^{\circ}\text{C}$ nhờ hệ vi khuẩn *Thermophilus* (tốc độ phân hủy trong điều kiện trên cao hơn 2-3 lần so với tốc độ phân hủy nhờ hệ mesophilus ở 34-36 $^{\circ}\text{C}$).

•**Phương pháp tự nhiên xử lý rác thải:** Với những loại rác thải có nồng độ chất nhiễm bẩn không cao, không chứa nhiều chất độc hại cho người thì thường dùng phương pháp xử lý tự nhiên.

Nước thải từ nhà máy, khu dân cư... cho chảy thấm qua lớp đất dày khoảng 2m, hay cho chảy qua lớp đất xốp, cát, sỏi... nước thải đi qua các lớp đất đó nhờ hệ VSV có sẵn ở đây các chất bẩn sẽ được phân hủy làm cho nước trở nên sạch hơn. Đây là quá trình tự làm sạch dễ làm, ít tốn kém, có thể xử lý nước thải trên quy mô lớn. Nước sau khi xử lý có thể dùng trong nông nghiệp, dẫn ra ao hồ sông... để hòa vào nguồn nước chung của tự nhiên.

Câu hỏi ôn tập chương 12

1. Nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường ? những biện pháp nào của công nghệ vi sinh góp phần chống ô nhiễm môi trường ?
2. Các loại phân bón vi sinh vật ? Trình bày quy trình sản xuất một loại phân bón vi sinh thông dụng hiện nay. Cho ví dụ minh họa.
3. Trình bày cơ sở khoa học của mối quan hệ đối kháng giữa các sinh vật. Qua đó hãy cho biết quy trình sản xuất và ứng dụng của một loại thuốc trừ sâu sinh học.
4. Cơ sở khoa học của các biện pháp xử lý rác thải hữu cơ ? Trình bày một quy trình cụ thể.
5. Trình bày những nguyên tắc chung của công nghệ sản xuất enzyme từ VSV và một số ứng dụng cụ thể.

* **Giải thích thuật ngữ**

Định nghĩa môi trường: Theo UNESCO (1981) thì môi trường của con người bao gồm toàn bộ các hệ thống tự nhiên và các hệ thống do con người tạo ra, những cái hữu hình (đô thị, hồ chứa...) và những cái vô hình (tập quán, nghệ thuật...), trong đó con người sống bằng lao động của mình, họ khai thác các tài nguyên thiên nhiên và nhân tạo nhằm thỏa mãn những nhu cầu của mình.

Định nghĩa ô nhiễm môi trường: Ô nhiễm môi trường là sự nhiễm bẩn của môi trường làm cho môi trường không còn trong lành, sạch sẽ. Sự nhiễm bẩn có thể xảy ra ở môi trường đất, môi trường nước, môi trường không khí do các tác nhân gây ô nhiễm tương ứng với từng loại môi trường trên.

Định nghĩa chất thải: Chất thải bao gồm chất thải rắn, lỏng, khí được thải ra sau quá trình sử dụng của con người và đã bị thay đổi tính chất ban đầu của chúng.

Các loại chất thải (theo nguồn gốc phát sinh) :

+ Chất thải sinh hoạt: Chất thải từ các khu dân cư, khu vực hoạt động thương mại, công sở, trường học...

+ Chất thải công nghiệp: Chất thải từ các nhà máy đang hoạt động, có cả chất thải sinh hoạt nhưng trong đó chất thải công nghiệp là chủ yếu.

+ Chất thải đô thị: là những chất thải trong các hệ thống cống thoát của một thành phố.

Chương 13

BÀI TẬP CƠ SỞ VÀ NÂNG CAO

I. PHẦN CÂU HỎI

1. Điền vào chỗ trống

Câu 1:

a. Thế giới vi sinh vật vô cùng đa dạng. Để nghiên cứu chúng các nhà khoa học phải dựa vào các tiêu chí về để sắp xếp chúng vào bậc thang phân loại và đặt tên.

b. Các vi sinh vật được sắp xếp vào bậc thang phân loại từ thấp đến cao:.....Loài là bậc thang phân loại thấp nhất.....là bậc thang phân loại cao nhất. Loài được đặt tên theo hệ thống.....theo tiếng.....viết nghiêng. Ví dụ vi khuẩn gây bệnh than có tên là *Bacillus anthracis*.

Câu 2:

Virus là những thực thể gây nhiễm..... mà gen nom của chúng chỉ chứa hoặc là..... hoặc làChúng chỉ nhân lên trong bằng cách sử dụng bộ máy.....vàcủa tế bào để tổng hợp nên các bản sao của bản thân mình nhằm truyền của bản thân chúng sang các tế bào khác.

Câu 3:

Cấu trúc điển hình của một virus đơn giản nhất bao gồm một..... (.....hoặc.....) và mộtđược gọi là Các virus phức tạp hơn, đặc biệt là các virus động vật còn chứa một lớp vỏ bọc được tạo nên bởi một tổ hợp.....và.....

Câu 4:

a. DNA sợi đơn của virus vừa được transcriptase ngược tổng hợp nên trước hết được chuyển thành.....và sau đó được.....của tế bào chủ.

b. Ở một số virus, lớp vỏ bọc được phủ bởi các..... có bản chất là.....hoặc.....mà vai trò của chúng là để nhận biết (về mặt hoá học) các và gắn vào tế bào mà chúng gây nhiễm.

Câu 5:

a. Lứa tuổi bị nhiễm HIV cao nhất là lứa tuổi

b. Bệnh viêm gan B được truyền chủ yếu qua đường.....

c. Bacteriophage nhân lên nhờ.....và phá huỷ nó. Đó là quá trình....., còn các vi khuẩn chứa một prophage và lưu giữ nó vĩnh viễn trong.....của mình được gọi là các vi khuẩn.....

Câu 6:

a. Prophage, nằm trêncủa vi khuẩn, chính là nguyên liệu di truyền của.....

b. Các hạt tương tự virus song chỉ chứa ARN thuần khiết được gọi làlà bọn gây bệnh ở thực vật có nghĩa kinh tế như.....

c. Các hạt protein thuần khiết gây bệnh thần kinh ở động vật có tên là.....

Câu 7:

a. Hiện tượng một loại virus chỉ nhiễm bệnh trên một vật chủ hay nhóm vật chủ nhất định được gọi làcủa virus. Tính này do các.....tạo nên.

b. Bệnh dại là một bệnhcấp tính thường dẫn đến

Câu 8:

Trong các cấu trúc sau đây, hai cấu trúc nào không gặp trong một hạt HIV: a) ARN sợi đơn; b) các glicoprotein bề mặt; c) DNA sợi kép; transcriptase ngược; e) protein vỏ; f) DNA sợi đơn.

Câu 9:

a. Nhiễm sắc thể vi khuẩn khi nằm dưới dạng..... sẽ khác với dạngbởi một cấu trúc đậm đặc hơn và ít cồng kềnh hơn.

b. Khi có mặt của lisozim và saccarose, một trực khuẩn Gram âm sẽ bị biến đổi thành một tế bào.....có tên là.....và mất đi dạng hình que của nó.

Câu 10:

Nấm là sinh vật thuộc dạng tế bàoCơ thể có thể đơn hay đa bào dạng sợi, có thành.....(một số ít có thành.....), không có.....sống dị dưỡng theo kiểu..... Sinh sản bằngkhông có.....và

Câu 11:

Sự khác biệt cơ bản của các tế bào Prokaryote so với tế bào Eukaryote là ở chỗ:

a. Nguyên liệu di truyền của chúng không được bao bọc bởi.....

b. Thiếu các bào quan như:.....được bao bọc bởi màng..

c. Thành tế bào luôn luôn chứa phức hệ.....hay còn gọi là.....

d. Ribosome của các tế bào prokaryote thuộc loại

Câu 12:

a. Nội bào tử là thể của các tế bào vi khuẩn, không phải là phương tiện sinh sản, khi gặp điều kiện thuận lợi, bào tử sẽ nảy mầm và mỗi bào tử chỉ chotế bào dinh dưỡng.

b. Nội bào tử có tínhcao, do vậy thường gây khó khăn trong công tác bảo quản thực phẩm và trong việc khử trùng ở các bệnh viện.

Câu 13:

a. Nhân tố di truyền ngoài nhân của vi khuẩn có tên là các, chúng không quyết định sự sống còn của tế bào vi khuẩn song mang một số gen quan trọng như các gen.....,

b. Các vi khuẩn lưu huỳnh màu tía và màu lục sử dụng.....làm chất cho điện tử trong quang hợp, kết quả là tạo thành.....tích lũy bên trong tế bào hoặc được tiết ra bên ngoài tế bào.

Câu 14:

a. Cố định nitrogen là quá trình chuyển hoá nitrogen của khí quyển (N_2) thành..... một chất cần thiết cho sự sinh tổng hợp các amino acid.

b. Trong thế giới vi sinh vật, chỉ có một số loài..... là có khả năng cố định nitrogen phân tử.

c. Enzyme chịu trách nhiệm đối với sự cố định nitrogen phân tử có tên là

d. Có.....nhóm vi khuẩn cố định nitrogen chủ yếu, đó là.....

Câu 15:

a. Nitrogenase dễ bị làm bất hoạt bởi....., vì vậy các tế bào vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen hoặc là phải hô hấp mạnh ở vùng bề mặt tế bào để giữ cho phần bên trong tế bào vắng mặt oxy (chẳng hạn ở).

b. Protein được chuyển hoá thành các peptid bởi các enzyme có tên là....., còn các peptid được phân giải thành các aminoacid có tên là.....

Câu 16:

a. Quá trình phản nitrat hoá là một quá trình có hại đối với nông nghiệp, bởi vì.....

b. Sự khử nitrogen dạng khí thành amoniac có tên là.....

c. Phức hệ enzyme chịu trách nhiệm đối với sự cố định nitrogen cộng sinh có tên là....

Câu 17:

a. Sự phản nitrat hoá xảy ra mạnh ở những nơi oxy.....

b. Chi vi khuẩn oxy hoá amoniac thành nitrit có tiếp đầu ngữ....., trong khi Chi vi khuẩn oxy hoá nitrit thành nitrat có tiếp đầu ngữ.....

c. Một vi khuẩn đất sinh bào tử sống kỵ khí được nghiên cứu nhiều do khả năng cố định nitrogen mạnh của nó có tên là.....

Câu 18:

a. Vi khuẩn cố định nitrogen sống cộng sinh trong bèo hoa dâu thuộc bộ(1).... sinh oxy và có tip dinh dưỡng là.....

b. Vi khuẩn không lưu huỳnh màu tía hay gặp trong các nguồn nước tự nhiên thuộc bộ..... sinh oxy và có tip dinh dưỡng là.....

c. Chi nào trong các chi sau đây chứa các loài cố định nitrogen sống cộng sinh:

Rhizobium/ Anabaena/ Clostridium/ Frankia/ Azotobacter.

Câu 19:

Bất cứ lúc nào cũng có thể tìm thấy trên cơ thể của một người trưởng thành ít nhất..... tế bào vi sinh vật, đa số trong chúng là.....và chúng được gọi là.....của cơ thể con người.

Câu 20:

Một số vi sinh vật sống trên da, song đa số sống trên các bề mặt.....của cơ thể, đó là.....bao phủ bên trong mũi, miệng, đường hô hấp trên, đường ruột, và đường niệu sinh dục.

Câu 21:

.....không được coi là một bộ phận của khu hệ bình thường.

Câu 22:

Nhiều cơ quan và vị trí ở bên trong của cơ thể khỏe mạnh như.....không chứa vi sinh vật.

Câu 23:

Nếu hiện tượngcần sự có mặt của mầm bệnh sau đó sẽ giải phóng độc tố của mình vào các tổ chức thì hiện tượng.....chỉ là hậu quả của sự tiếp xúc giữa độc tố với tổ chức mà không nhất thiết cần sự có mặt của mầm bệnh.

Câu 24:

Trường hợp ngộ độc thức ăn có tên là botulism (liệt do ngoại độc tố tác động lên hệ thần kinh) không phải là một sự nhiễm trùng mà là một sự.....

Câu 25:

Một bệnh nhiễm khuẩn có thể được truyền bằng, tức là sự tiếp xúc có hiệu quả giữa một cơ thể đã bị nhiễm và một cơ thể khỏe mạnh. Không được nhầm lẫn phương thức truyền bệnh này vớihoặc là các phương thức truyền qua một động vật trung gian có tên là, giữa một cơ thể bị nhiễm khuẩn với một cơ thể khỏe mạnh.

Câu 26:

Nếu sự.....gây nên một sự tham gia có hiệu quả của cơ thể trong việc hình thành kháng thể, được gọi là.....thì sự.....là một phương pháp đưa vào cơ thể các kháng thể đã được tổng hợp từ trước; đó là một sự miễn dịch.....Trường hợp đầu là trường hợp tiêm chủng để....., còn trường hợp sau là trường hợp tiêm chủng để

Câu 27:

Chất kháng sinh là các chất hóa học do VSV tiết ra có khả năng..... hoặccủa các VSV khác.

Câu 28:

Penicillin G chủ yếu hoạt động chống lại vi khuẩn Gram....., vì rằngNhược điểm chủ yếu của penicillin G là:.....

Câu 29:

- a. Dùng vaccine là đưa vào cơ thể một loại.....lấy từ vi sinh vật gây bệnh.
- b. Vaccin là vi sinh vật sống được lấy từ vi sinh vật sống đã mất.....
- c. Giải độc tố được sản xuất từ..... của vi sinh vật.

d. Muốn phòng dịch có kết quả, vaccin phải được dùng cho% đối tượng cảm thụ.

h. Vaccine được dùng cho những người.....

Câu 30:

Trẻ nhỏ và người cao tuổi dễ mắc cảm với các bệnh nhiễm trùng vì ở họ hoặc là hệ thống miễn dịch.....hoặc là.....

Câu 31:

Giai đoạn phát triển đầu tiên của vi sinh vật công nghiệp được đánh dấu bằng công trình của Louis Pasteur (1878) chứng minh vi sinh vật là tác nhân của sự lên men, và sau đó các công trình của:

- a. -.....(1886) dùng các chủng nấm men thuần khiết trong sản xuất bia.
- b. -(1898) phát hiện ra dịch chiết nấm men có khả năng gây ra quá trình lên men rượu (chứng minh lên men thực chất là một quá trình enzyme).
- c. Giai đoạn thứ 2 của CNVS được đánh dấu bằng.....
- d. Giai đoạn hiện tại của CNVS được đánh dấu bằng sự phát triển của công nghệ di truyền với:
 - Sự phát hiện các enzym.....(các con giao cắt)
 - Sự phát hiện ra các(các vector)
 - Sự gắn các gen lạ mang các thông tin tổng hợp các..... vào một cơ thể.
 - Sự kiểm tra ngày càng tốt hơn sự.....của các gen này.

Câu 32:

Theo Thomas D.Brock (1995), Các sản phẩm có ý nghĩa công nghiệp mang tính thương mại do vi sinh vật tạo thành có thể được phân thành 5 loại đó là:

- a.
- b.....
- c.....
- d.....
- e.....

Câu 33:

Trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật để thu nhận sinh khối tế bào, cần lưu ý:

- a. Các biện pháp tránh nhiễm tạp thường dùng là.....hoặc.....
- b.Trừ tảo, sự thu nhận sinh khối các vi sinh vật khác cần một sự.....
- c. Nhiệt tạo ra phải được loại đi bằng một hệ thống.....

Câu 34:

a. Mục đích của khử trùng Tyndal là tiêu diệt các vi khuẩn mang.....ở nhiệt độ.....Nguyên lý của phương pháp là để cho cácnày.....thành.....rồi sau đó đun sôi để giết chết các thểđó.

b. Trong kỹ thuật xác định số lượng tế bào bằng phương pháp nuôi trên môi trường rắn, người ta gọi khuẩn lạc là.....(là chữ viết tắt của.....) vì rằng không phải bao giờ nó cũng được mọc lên từ một tế bào.....

Câu 35:

Để sản xuất bia người ta sử dụng đại mạch đã nảy mầm (nha), hublon, nấm men và.....(a)..... Các nguồn tinh bột khác hoặc các(b)..... chứa đường có thể được để bổ sung vào nha đại mạch là : nha lúa mì (Triticum), các loại ngũ cốc chưa nảy mầm (đại mạch, lúa mì, ngô, lúa), các sản phẩm phân huỷ tinh bột và các đường có thể lên men. Việc sử dụng các nguyên liệu bổ sung này đòi hỏi phải có sự bổ sung (một phần) các chế phẩm.....(c)..... có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Câu 36:

Cảm giác hăng hái (invigorating) và say (intoxicating) của bia là do.....(a).....gây ra, mùi thơm, hương vị và vị đắng của bia là do.....(b)....., Giá trị dinh dưỡng là do hàm lượng các chất keo hoà tan không lên men (bao gồm.....(c)... và cuối cùng, tác dụng giải khát là do.....(d).....gây ra.

Câu 37:

Tác dụng của hublon là một chất làm trong vì nó kết tủa.....(a).....trong dịch hèm, là chất làm thay đổi đặc tính của dịch hèm do tạo nên.....(b)....., và cùng với ethanol và CO₂ tạo nên các đặc tính.....(c)..... mạnh tạo tính ổn định cho bia. Hàm lượng.....(d).....chứa trong hublon làm tăng khả năng tạo(e).....của bia

Câu 38:

Dịch đường hoá sau khi nấu, được gọi là.....(a)....., dịch này sau khi lọc để loại trấu và bã, được bổ sung hublon và đun nóng nhiều giờ nhằm chiết các thành phần mong muốn từ hublon và nhằm kết tủa và loại các ...(b).....có mặt trong hublon để tăng tính ổn định của bia

Câu 39 :

Brandy là rượu mạnh cất từ, *whisky* là rượu mạnh cất từ....., *rum* cất từ.....lên men, còn *vodka* là rượu mạnh cất từ.....hoặc.....lên men.

2. Hãy trả lời bằng đúng (Đ) hoặc sai (S)

Câu 40:

Trong những sự khẳng định sau đây, đâu là sự khẳng định đúng:

a. Năng lượng giải phóng trong dị hoá được sử dụng trực tiếp cho sự tổng hợp các thành phần tế bào.

b. Đồng hoá cung cấp các viên gạch xây dựng để tổng hợp các thành phần tế bào.

c. Sự tổng hợp các thành phần tế bào là một quá trình giải phóng năng lượng.

Câu 41:

Một chất kháng sinh có hoạt phổ hẹp là chất kháng sinh:

a. Chỉ có tác dụng lên các vi khuẩn Gram âm

b. Chỉ có tác dụng lên các vi khuẩn Gram dương

- c. Chỉ có tác dụng lên các vi khuẩn Gram dương lẫn vi khuẩn Gram âm
- d. Chỉ tác động lên một nhóm riêng biệt, thậm chí lên một hoặc vài loài vi khuẩn.
- e. Được sử dụng rộng rãi hơn trong thực tiễn y học so với các chất kháng sinh có hoạt phổ rộng.

Câu 42:

- a. Vi khuẩn là những tế bào
- b. Tất cả cầu khuẩn đều di động
- c. Mọi vi khuẩn gây bệnh đều có thể đổi hình
- d. Sau khi bị thoái hình, vi khuẩn có thể trở về hình thể bình thường nếu điều kiện thích hợp.

Câu 43:

Những nhận định nào dưới đây là đúng với tế bào vi khuẩn

- a. Nhân được phân cách với phần còn lại bởi màng nhân
- b. Vật chất di truyền là DNA kết hợp với protein histon
- c. Không có màng nhân
- d. Vật chất di truyền là DNA không kết hợp với protein histon

Câu 44:

- a. Acid teichoic là thành phần đặc trưng của tế bào vi khuẩn Gram dương.
- b. Sở dĩ có tên gọi "sao chép bán bảo thủ" vì phương thức này cho phép bảo toàn nguyên vẹn 50% lượng DNA có mặt trong tế bào mẹ.
- c. Tác nhân gây bệnh giang mai *Treponema pallidum* chuyển động rất nhanh nhờ hệ thống tiên mao bao quanh cơ thể gọi là chu mao.
- d. Đặc điểm đặc trưng của một nội độc tố là nó liên kết với tế bào vi khuẩn và sẽ không khi nào được tế bào tiết ra.

Câu 45:

Sản xuất công nghiệp acid glutamic sử dụng các loài thuộc một trong các Chi sau đây:

- a) *Corynebacterium*;
- b) *Pseudomonas*;
- c) *Escherichia* ;
- d) *Acetobacter*;
- e) *Clostridium*.

Câu 46:

Hãy gọi tên các vi sinh vật có khả năng tạo thành các hỗn hợp sau đây nhờ lên men đường:

- a. CO₂ + ethanol
- b. CO₂ + ethanol + acid lactic

- c. CO₂ + ethanol + acid lactic + hydro + acid axetic
 d. CO₂ + ethanol + acid lactic + hydro + acid axetic + butadion
 e. CO₂ + hydro + acid butiric + acid axetic.
 f. CO₂ + hydro + aceton + butanol + ethanol + 2-propanol.

Câu 47:

- a. Hô hấp kị khí là quá trình oxy hóa thu nhận năng lượng trong đó chất nhận điện tử cuối cùng là oxy liên kết.
 b. Chất nhận điện tử cuối cùng trong lên men ethanol là acetaldehyde.
 c. Ở các vi khuẩn sinh methan thành tế bào chứa peptodoglycan.

Câu 48:

Tìm sự khẳng định sai



là phương trình biểu diễn tổng quát quá trình lên men rượu ở:

- a. *Saccharomyces cerevisiae*
 b. *Sarcina ventriculi*
 c. *Zimomonas mobylis*
 d. *Escherichia coli*

3 Sắp xếp sự mô tả ở bên phải sao cho phù hợp với các thuật ngữ ở bên trái

Câu 49:

Biến nạp	a. Kiểu chuyển gen trong đó một tế bào thể nhận nhận các gen từ các phân tử DNA tự do trong môi trường xung quanh.
Tải nạp	b. Kiểu chuyển gen phụ thuộc vào sự tiếp xúc tế bào - tế bào.
Tiếp hợp	c. Các gen tồn tại ở cùng một vị trí tương ứng trên nhiễm sắc thể tương đồng nhưng khác về mặt trạng thái đột biến.
Hfr	d. Kiểu chuyển gen trong đó một phage được dùng làm phương tiện để mang DNA từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác.
Alen	e. Một tế bào F(trong đó plasmid F được gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ.

Câu 50:

Độc tính (Virulence)	a. Khả năng của một VSV gây nên một bệnh
Bệnh (Disease)	b. VSV, có thể bắt đầu một bệnh ở một cơ thể khỏe mạnh
Khả năng gây bệnh (Patogenicity)	c. Mức độ về khả năng gây ra một bệnh ở một tác nhân gây bệnh
Tác nhân gây bệnh (Causative agent)	d. Sự phá hỏng các chức năng của cơ thể do nhiễm trùng

II. TRẢ LỜI MỘT SỐ CÂU HỎI

1. a. cấu tạo, dinh dưỡng, sinh sản.
b. Loài(species)– Chi (genus)- Họ (family) -Bộ (order) -Lớp (class)- Ngành (phylum)- Giới (kingdom)-Siêu giới (superkingdom); tên kép, tiếng Latinh.
2. không có cấu trúc tế bào; DNA; RNA; các tế bào vật chủ; sinh năng lượng; sinh tổng hợp; genom.
3. lõi acid nucleic; DNA; RNA; vỏ protein; capsid; lipid, hydratcarbon; protein.
4. a. DNA sợi kép; gắn vào genom của tế bào chủ
b. gai; hydratcarbon; protein; thụ thể (receptor).
5. a. từ 13 đến 19;
b. máu
c. vi khuẩn; gây tan; con cái; tiềm tan.
6. a. Nhiễm sắc thể, Bacteriophage;
b. viroid, dưa, khoai tây, cà chua.. c.prion.
7. a. chuyên hóa; gai để nhận biết các thụ thể của tế bào mà chúng gây nhiễm.
b. viêm não cấp tính; tử vong
8. c; f.
9. a. siêu xoắn; giãn xoắn;
b. trần; spheroplas.
10. nhân chuẩn; kitin; cellulose; lục lạp; hoại sinh, kí sinh, cộng sinh; bằng bào tử; lông; roi.
11. a. Chất nhân; màng nhân;
b. ti thể, lưới nội chất, bộ máy Golgi
c. PG; peptidoglycan;
d. 70S.
12. a. nghỉ; một;
b. kháng nhiệt.
13. a. plasmid,
b. đề kháng với các chất kháng sinh; sản xuất các chất có khả năng gây bệnh; sản xuất các chất bacteriocin; tạo nên một đặc tính trao đổi chất ở vi khuẩn.
14. a. amoniac;
b. vi sinh vật;
c. nitrogenase;
d. hai; nhóm cộng sinh và nhóm không cộng sinh.
15. a. oxy; *Azotobacter*;

- b. protease; peptidase.
16. a. làm mất nitrogen của đất và do vậy, làm giảm chất dinh dưỡng cho sinh trưởng của thực vật;
b. sự cố định nitơ phân tử;
c. nitrogenase.
17. a. vắng mặt; b. nitroso; nitro; c. *Clostridium pasteurianum*.
18. a. (có); quang dưỡng vô cơ; b. không; quang dưỡng hữu cơ; c. *Rhizobium*, *Anabaena*, *Frankia*.
19. 100 nghìn tỉ; vi khuẩn; khu hệ bình thường.
20. trong; màng nhầy.
21. các virus kí sinh nội bào.
22. dịch não tủy, máu, bàng quang, tử cung, vòi Falop, tai giữa, thận...
23. Nhiễm độc; ngộ độc.
24. nhiễm độc.
25. tiếp xúc trực tiếp; cắn, đốt; vector truyền bệnh.
26. tiêm chủng; miễn dịch chủ động nhân tạo; trị liệu huyết thanh học; thụ động nhân tạo; phòng bệnh; chữa bệnh.
27. ức chế, tiêu diệt chọn lọc; kim hãm sự nhân lên.
28. dương; Không có tác dụng với vi khuẩn Gram âm.
29. a. kháng nguyên; b. độc tính; c. ngoại độc tố; d. 80; h. khoẻ mạnh.
30. chưa hoàn chỉnh; không còn hiệu quả nữa.
31. a. Emil Christian Hansen (1842-1909);
b. Eduard Buchner (1860-1917);
c. sự xuất hiện các chất kháng sinh; chọn lọc di truyền các thể đột biến; sự phát triển của phương pháp nuôi cấy liên tục;
d. restrictase; plasmid; protein đặc biệt; biểu hiện.
32. a. Bản thân tế bào VSV là các sản phẩm mong muốn
b. Các enzym do VSV tạo nên: amylase, protease, lipase.
c. Các dược phẩm: các chất kháng sinh, độc tố, alkaloid.
d. Các hóa chất đặc biệt và các chất điều vị thực phẩm.
e. Các hóa chất thông dụng được sản xuất bằng con đường VSV bao gồm ethanol, axid acetic, axid lactic....
33. a. vô trùng hoặc sạch; b. thông khí mạnh; c. làm lạnh.
34. a. nội bào tử; 100⁰C; bào tử; nảy mầm; tế bào mới; dinh dưỡng.
b. đơn vị hình thành khuẩn lạc; CFU (colony forming unit); đơn độc.

35. a. nước; b. nguyên liệu chứa đường; enzyme.
36. a. ethanol; b. hublon; c. hydratcarbon, protein; d. CO₂.
37. a. protein; b. hương thơm và vị đắng; c. kháng sinh; d. pectin; bột.
38. a. dịch hèm; b. protein.
39. a. vang; nha lên men; ri đường; ngũ cốc, khoai tây.
40. b.
41. d.
42. d.
43. c,d.
44. a; d.
45. a.
46. a. *Saccharomyces cerevisiae*, *Sarcina ventriculi*
b. *Leuconostoc meseteroides*
c. *Escherichia coli*
d. *Enterobacter aerogenes*
e. *Clostridium butyricum*
f. *Clostridium acetobutylicum*
47. a. (Đ); b. (Đ); c (S).
48. c.
49. a. biến nạp; b. tiếp hợp; c. alen; d. tải nạp; e. Hfr.
50. a. khả năng gây bệnh; b. tác nhân gây bệnh; c. độc tính; d. bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

- [1] Kiều Hữu Ảnh, 1999. Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp, NXB KHKT, Hà Nội.
- [2] Phạm Thành Hồ, 2005. Nhập môn công nghệ sinh học, NXBGD.
- [3] Lê Thi Liên Thanh & Lê Văn Hoàng, 2002. Công nghệ chế biến sữa và các sản phẩm từ sữa. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [4] Nguyễn Đình Thương & Nguyễn Thanh Hằng, 2000. Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- [5] Lương Đức Phẩm, 1998. Công nghệ vi sinh. NXB Nông nghiệp. Hà Nội
- [6] Lê Xuân Phương, 2001. Vi sinh vật công nghiệp. NXB Xây dựng. Hà Nội.
- [7] Lê Ngọc Tú - Hóa sinh Công nghiệp, 2006. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- [8] Wolfgang Fritche, 1997. Cơ sở hoá sinh của vi sinh vật học công nghiệp (Kiều Hữu Ảnh và Ngô Tự Thành dịch). NXB KHKT.

II. TÀI LIỆU TIẾNG NƯỚC NGOÀI

- [1] Aiba S., Hemphrey A. E. and Millis F. F.. 1973, Biochemical Engineering. Second Edition. Academic Press.
- [2] Reh, H-J. Deiana, 1994, Annales, et exercices de microbiologie ge'ne'rale, Doin Editeur, Paris
- [3] Schlegel, H,G., 1992, Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart New York.

III. CÁC THÔNG TIN TỪ MẠNG

- [1] <http://www.google.com.vn/>; <http://vietsciences.free.fr/design/home.htm>
- [2] <http://vietsciences.free.fr> và <http://vietsciences.net> Nguyễn Lâm Dũng
- [3] <http://vietsciences.net> và <http://vietsciences.free.fr> Võ Thị Diệu Hằng
- [4] <http://vietsciences.free.fr> Phạm Văn Tuấn

