PGS. TS. LƯƠNG ĐỨC PHẨM

GIÁO TRÌNH
CÔNG NGHỆ LÊN MEN

EBOOKBKMT.COM
Tài liệu kỹ thuật miễn phí

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

PGS. TS. LƯƠNG ĐỨC PHẨM

GIÁO TRÌNH

CÔNG NGHỆ LÊN MEN

EBOOKBKMT.COM
Tài liệu kỹ thuật miễn phí

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

Công ty Cổ phần Sách Đại học – Dạy nghề, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam giữ quyền công bố tác phẩm

575–2010/CXB/14–924/GD

Mã số: 7K851Y0–DAI

EBOOKBKMT.COM
Tài liệu kỹ thuật miễn phí

LỜI GIỚI THIỆU

Loài người biết sử dụng những sản phẩm lên men từ thời cổ xưa. Người La Mã thuở xưa gọi lên men là "sủi bọt" (fermentum). Louise Pasteur định nghĩa lên men là những quá trình nuôi cấy vi sinh vật kỵ khí để thu sản phẩm, điều này được thể hiện ở hiệu ứng Pasteur của nấm men: "Nấm men, trong điều kiện hiếu khí – tăng sinh khối; trong điều kiện kỵ khí – lên men rượu". Hiện nay người ta quan niệm lên men là một quá trình nuôi cấy vi sinh vật hoặc sử dụng enzyme tác dụng lên cơ chất nào đó để thu được sản phẩm mới. Rõ ràng, lên men không chỉ giới hạn trong điều kiện kỵ khí như thời của Pasteur.

Các sản phẩm lên men ngày một phong phú và gia tăng, chiếm tỷ trọng khá lớn trong các loại đồ uống và thực phẩm chế biến của con người. Các nhà khoa học Xô Viết trước đây xếp rượu pha chế (lique alcohol) và các dạng nước ngọt không cồn vào công nghệ vi sinh vật. Các chuyên môn này không được xếp vào quyển giáo trình này.

Giáo trình ***Công nghệ lên men*** gồm 10 chương. Ba chương đầu sơ qua về cơ sở hoá sinh và vi sinh của công nghệ lên men. Các chương sau là các quá trình công nghệ sản xuất một số sản phẩm lên men, trong đó có các sản phẩm truyền thống được nhân dân ta sản xuất và sử dụng từ rất lâu. Các sản phẩm này chưa được nghiên cứu đầy đủ và có hệ thống, vì vậy tác giả chưa đề cập đến cơ sở lý thuyết sâu của quá trình lên men cũng như công nghệ. Tác giả hy vọng giáo trình sẽ giúp cho các bạn đọc nắm được cơ sở và công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men hiện đại cũng như truyền thống.

Từ các bài giảng ở các trường đại học và các lớp cao học sinh học của viện Khoa học – Công nghệ Việt Nam, trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, tác giả biên soạn nên giáo trình này. Do thời gian có hạn, nên giáo trình có thể còn sai sót và có những thông tin mới chưa được cập nhật kịp thời, rất mong các bạn sinh viên và đồng nghiệp đóng góp ý kiến, tác giả sẽ tiếp tục hoàn thiện để lần xuất bản sau sách được hoàn chỉnh hơn.

Mọi ý kiến đóng góp xin gửi về Công ty cổ phần sách Đại học – Dạy nghề, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, 25 Hàn Thuyên, Hà Nội. Điện thoại (043) 8264974.

Xin trân trọng cảm ơn.

Tác giả

PGS.TS. LƯƠNG ĐỨC PHẨM

MỤC LỤC

Chương 1

VI SINH VẬT VÀ LÊN MEN

1.1. Các nhóm vi sinh vật trong công nghệ lên men 7
1.2. Dinh dưỡng vi sinh vật 12
1.3. Sự hô hấp ở vi sinh vật 17
1.4. Sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trong môi trường 18
1.5. Toán học hoá quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật 20
1.6. Các yếu tố ngoại cảnh ảnh hưởng đến đời sống vi sinh vật 26
Câu hỏi ôn tập chương 1 29

Chương 2

NƯỚC VÀ NGUYÊN LIỆU TRONG SẢN XUẤT LÊN MEN

2.1. Nước 30
2.2. Nguyên liệu trong sản xuất lên men 37
Câu hỏi ôn tập chương 2 49

Chương 3

ENZYME VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ LÊN MEN

3.1. Phân loại enzyme 50
3.2. Tính chất của enzyme 51
3.3. Những yếu tố ảnh hưởng tới hoạt lực của enzyme 52
3.4. Enzyme trong sản xuất lên men 53
3.5. Sản xuất chế phẩm enzyme 56
3.6. Khái niệm cơ bản về lên men 63
3.7. Cơ chế của quá trình lên men 64
Câu hỏi ôn tập chương 3 70

Chương 4

SẢN XUẤT RƯỢU – CỒN ETYLIC

4.1. Các nguồn nguyên liệu dùng trong công nghệ lên men rượu 71
4.2. Giống nấm men 72
4.3. Lên men rượu từ nguyên liệu tinh bột 77
4.4. Lên men rượu từ rỉ dường 85
4.5. Chống tạp nhiễm cho lên men 89
4.6. Chưng cất và tinh luyện 89
4.7. Tinh luyện để thu nhận cồn tuyệt đối 94
4.8. Sản xuất rượu thủ công truyền thống 95
Câu hỏi ôn tập chương 4 102

Chương 5

SẢN XUẤT BIA

5.1. Nguyên liệu 104
5.2. Quy trình công nghệ sản xuất bia 112
Câu hỏi ôn tập chương 5 125

Chương 6

SẢN XUẤT RƯỢU VANG

6.1. Đặc điểm nước quả và các yêu cầu nguyên liệu làm rượu vang 127
6.2. Hệ vi sinh vật trong dịch quả 129
6.3. Hệ vi sinh vật trong lên men rượu vang tự nhiên (lên men tự phát) 132
6.4. Dinh dưỡng nấm men và chất lượng của vang 133
6.5. Nấm men thường gặp trong sản xuất rượu vang 139
6.6. Sản xuất rượu vang 142
Câu hỏi ôn tập chương 6 144

Chương 7

SẢN XUẤT MEN BÁNH MỲ VÀ MEN THỨC ĂN CHĂN NUÔI

7.1. Sản xuất men bánh mỳ 145
7.2. Sản xuất men thức ăn chăn nuôi 153
Câu hỏi ôn tập chương 7 159

Chương 8

SẢN XUẤT CÁC AXIT HỮU CƠ

8.1. Sản xuất axit xitric 160
8.2. Sản xuất axit axetic 172
8.3. Lên men lactic 182
Câu hỏi ôn tập chương 8 204

Chương 9

SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TRUYỀN THỐNG

9.1. Sản xuất nước mắm 205
9.2. Sản xuất mắm nêm 211
9.3. Tôm và các sản phẩm lên men của tôm 212
9.4. Sản xuất tương 216
9.5. Sản xuất nước chấm 224
Câu hỏi ôn tập chương 9 227

Chương 10

NUÔI TRỒNG NẤM ĂN

10.1. Giá trị dinh dưỡng của nấm ăn 229
10.2. Công nghệ sản xuất nấm ăn 230
10.3. Giống nấm ăn 230
10.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của nấm 240
10.5. Nguyên liệu 241
10.6. Quá trình nuôi trồng 248
10.7. Những vấn đề cần chú ý khi gieo trồng nấm ăn 248
Câu hỏi ôn tập chương 10 250

Chương 1

VI SINH VẬT VÀ LÊN MEN

Loài người biết sử dụng các sản phẩm lên men từ thời cổ xưa. Rượu vang thấy xuất hiện ở xã hội Ai Cập từ 8 đến 10 ngàn năm trước Công nguyên. Bia thấy xuất hiện ở Babilon trước đây khoảng 7.000 năm, rượu xuất hiện ở Trung Quốc khoảng 2.000 năm trước Công nguyên. Ở Hy Lạp, có những đêm hội mừng được mùa rượu nho tế thần rượu này và uống tràn cung mây loại "nước tinh túy của trời" cho loài người từ thời xa xưa ấy.

Suốt thời gian dài, các quá trình lên men được thực hiện ở mức quy mô thủ công trong từng gia đình hoặc nhà thờ và người ta cũng không rõ tác nhân gây lên men. Đến giữa thế kỷ XIX, Louise Pasteur phát minh về vi sinh vật và cơ sở của quá trình lên men được sáng tỏ. Từ đó ngành công nghiệp lên men phát triển thành một ngành kinh tế độc lập và ngày càng hoàn thiện, chiếm tỷ trọng lớn trong nền kinh tế của nhiều quốc gia.

1.1. CÁC NHÓM VI SINH VẬT TRONG CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Lên men là sự chuyển hoá cacbonhydrat và một vài hợp chất hữu cơ khác thành những chất mới dưới tác dụng của enzyme do vi sinh vật gây ra. Như vậy, tác nhân chính của quá trình lên men là các tế bào vi sinh vật, hoặc có thể là enzyme của chúng đã được chế tạo thành các dạng chế phẩm. Có nhiều quá trình lên men khác nhau và thường được gọi bằng tên sản phẩm thu được. Ví dụ: lên men rượu, bia, rượu vang, lên men xitric, lactic,... Các sản phẩm này chính là do hoạt động sống của vi sinh vật tạo ra. Trong lên men bia, rượu,... tác nhân chính là nấm men rượu; lên men xitric là nấm mốc; lên men lactic, axetic, axeton – butanol do vi khuẩn.

Mục đích chính của quá trình lên men là chuyển hoá cơ chất trong môi trường dinh dưỡng thành các sản phẩm cần thiết nhờ vi sinh vật. Người ta thường xếp các dạng lên men thu sản phẩm có cồn, các loại đồ uống có rượu nhẹ, hoặc không có rượu cùng một chất sử dụng enzyme trong chế biến với những trang thiết bị gần gũi nuôi cấy vi sinh vật thành công nghiệp lên men.

1.1.1. Vi khuẩn *(Bacteria)*

– Vi sinh vật là một thế giới vi sinh vật bé nhỏ, mắt thường không nhìn thấy, sống đông đúc trong tự nhiên, chủ yếu là ở đất. Trong thế giới vi sinh nhỏ bé này, vi khuẩn là nhiều nhất. Chúng là những cơ thể nhỏ bé, đơn bào, nhân sơ, có hoạt động sống độc lập, kích thước từ 0,2 đến vài micromet (μm).

– Vi khuẩn có nhiều hình thái, kích thước và sắp xếp khác nhau. Hình dạng

chủ yếu của tế bào vi khuẩn là hình cầu, hình que, hình dấu phẩy, có dạng hình ống, hình sợi,... Trong điều kiện sống khắc nghiệt, một số giống vi khuẩn sinh bào tử, hay còn gọi là nha bào (spore). Bào tử vi khuẩn là thể thu gọn lại có vỏ bọc dày đặc và chống chịu được với những điều kiện môi trường không bình thường (pH, nhiệt độ, các chất độc,...). Trong công nghiệp lên men, các môi trường trước khi gieo giống nuôi cấy cần phải thanh trùng ở điều kiện hơi quá nhiệt (110 – 121°C hoặc cao hơn) để diệt các tạp khuẩn và những bào tử của chúng.

– Một số giống vi khuẩn có tiên mao hay chu mao (lông roi mọc ở đầu tế bào, đơn chiếc, hoặc mọc xung quanh tế bào thành từng chùm). Các lông roi này giúp vi khuẩn chuyển động trong môi trường lỏng. Các vi khuẩn Gram (–) thường có lông mao để bám vào các giá thể (màng nhày đường hô hấp cũng như đường tiêu hoá hoặc các giá mang nào khác). Nhiều vi khuẩn Gram (–) có tiên mao là các vi khuẩn gây bệnh.

– Vi khuẩn sinh sản thường theo lối phân cắt tế bào, chu kỳ nhân đôi tế bào xảy ra trong vòng 20 – 30 phút. Bào tử hay nha bào của vi khuẩn là thể bảo vệ nòi giống khi gặp điều kiện sống bất lợi.

– Vi khuẩn được dùng nhiều trong công nghiệp lên men với các thể dị dưỡng (phân huỷ chất hữu cơ có trong môi trường) để xây dựng tế bào mới, sản sinh ra năng lượng và tạo ra các sản phẩm lên men.

– Vi khuẩn có thể có một số giống bị virus sống ký sinh làm tan tế bào. Các loại virus này là các bacteriophage (thể ăn vi khuẩn hay thực khuẩn thể).

1.1.2. Xạ khuẩn

– Xạ khuẩn là nhóm vi sinh dạng sợi rất nhỏ, nhân sơ, khá phổ biến trong tự nhiên. Hầu hết xạ khuẩn là tế bào Gram (+), hiếu khí, dị dưỡng hoại sinh, có cấu tạo dạng sợi phân nhánh (khuẩn ty hay mixen).

– Hệ sợi của xạ khuẩn chia ra thành khuẩn ty cơ chất (ăn sâu vào cơ chất) và khuẩn ty khí sinh (mọc ra ngoài không khí). Đường kính khuẩn ty của xạ khuẩn trong khoảng 0,2 – 1μm đến 2 – 3μm. Đa số khuẩn ty xạ khuẩn không có vách ngăn và không tự đứt đoạn. Khuẩn ty của xạ khuẩn có nhiều màu sắc (có thể màu của khuẩn ty khí sinh và màu của bào tử): từ màu trắng, vàng, da cam, đỏ, lam, tím, nâu, đen,...

Khuẩn ty cơ chất có nhiệm vụ hút các chất dinh dưỡng trong môi trường rắn. Sau một thời gian phát triển, khuẩn ty cơ chất sẽ mọc dài ra trong không khí thành khuẩn ty khí sinh.

– Sau một thời gian phát triển, trên đỉnh khuẩn ty khí sinh sẽ xuất hiện các sợi, là cuống bào tử. Sợi này có các hình dạng khác nhau: thẳng, lượn sóng, xoắn, mọc đơn, mọc vòng,... Một số xạ khuẩn có sinh nang bào tử (túi chứa bào tử), bên trong có các bào tử.

– Xạ khuẩn sinh sản bằng bào tử. Trong môi trường lỏng có sục khí, xạ khuẩn

sinh trưởng bằng các mẩu sợi. Bào tử của xạ khuẩn là cơ quan sinh sản và thường chết ở nhiệt độ 60 – 70°C trong thời gian 15 phút hay dài hơn.

– Khuẩn lạc của xạ khuẩn rất đặc biệt, không trơn ướt như khuẩn lạc của vi khuẩn và nấm men mà thường thô ráp, dạng phấn, không trong suốt, có các nếp toả ra theo hình tia xạ. Vì vậy gọi chúng là xạ khuẩn.

– Sinh trưởng và phát triển của xạ khuẩn so với các vi khuẩn thường chậm hơn nhiều. Trên môi trường rắn hoặc bán xốp, xạ khuẩn phát triển sinh bào tử phải mất 1 tuần hoặc dài hơn.

– Trong công nghiệp vi sinh, xạ khuẩn chủ yếu dùng cho lên men các chất kháng sinh, thu một số enzyme, vitamin và axit hữu cơ. Trong 8.000 chất kháng sinh đã biết có đến 80% là do xạ khuẩn sinh ra. Trong lên men cổ truyền ít dùng xạ khuẩn.

1.1.3. Vi nấm

Vi nấm là các vi sinh vật nhân thật (eukaryote). Vi nấm được chia thành nấm men (yeast, levur) và nấm sợi (filamentaus fungi).

1.1.3.1. Nấm men

Nấm men khá phổ biến trong tự nhiên, nhất là ở các môi trường chứa đường với pH thấp (rau quả, mật, rỉ đường, mật ong, đất vườn mía, đất xung quanh nhà máy đường, bột, trong đất ô nhiễm dầu mỏ).

Nấm men có nhiều hình dạng khác nhau: tròn, oval, hình quả chanh, hình chuỳ, hình trứng, hình thoi, hình lưỡi liềm, hình tam giác, hình ống,... Có loại nấm men mọc khuẩn ty và có loại có khuẩn ty giả. Khuẩn ty giả là khuẩn ty chưa thành sợi rõ rệt mà do nhiều tế bào nối với nhau thành chuỗi dài. Có loài nấm men mọc thành váng trên môi trường lỏng.

Kích thước tế bào nấm men thay đổi tuỳ thuộc vào từng giống, từng loài và cả môi trường nuôi cấy. Nói chung, kích thước tế bào nấm men trung bình vào khoảng (3 – 5) × (5 –10)μm (gấp 10 lần vi khuẩn).

a) Cấu tạo tế bào nấm men

– Vách tế bào (vỏ): khi non mỏng sau đó dày dần lên. Vách tế bào chủ yếu là các glucan, mannan (chiếm 80%), còn lại là protein (10 – 20%), một ít lipit, đôi khi là các polyphotphat, enzyme, sắc tố. Đặc biệt vỏ của nấm men còn có kitin.

– Màng tế bào chất ở nấm men có chức năng giống như ở vi khuẩn. Màng này dày 7 – 8μm, cấu tạo chủ yếu là protein (50%) và lipit (20%), còn lại là một ít polysaccarit.

– Tế bào chất là một thể dịch có chứa:

+ Ty thể: chức năng là trạm lưu trữ năng lượng sinh học, thường ở dạng ATP.

+ Riboxom: các hạt có chức năng tổng hợp protein. Có hai loại 70S và 80S.

+ Các thể ẩn khác: không bào hoặc các khí khổng là loại túi có chứa dịch bào trong đó có enzyme, polyphotphat, lipoit, ion kim loại,... Tế bào già có không bào

lớn hơn ở tế bào non. Các loại hạt chất béo, hạt tinh bột,... với tư cách là các chất dinh dưỡng dự trữ.

+ Nhân ở tế bào nấm men là nhân thật, có sự phân hoá, kết cấu hoàn chỉnh và ổn định. Nhân thường có hình tròn, đôi khi kéo dài, kích thước đường kính khoảng 2 – 3μm.

b) Sinh sản của nấm men

– Nấm men sinh sản chủ yếu bằng cách nảy chồi. Tế bào trưởng thành mọc ra một chồi nhỏ, một phần nhân chuyển sang chồi cùng với sự lớn của chồi thành một nhân mới. Chồi lớn có vách ngăn với tế bào mẹ, rồi tách riêng thành tế bào mới.

– Một số ít nấm men sinh sản bằng cách phân đôi tế bào giống như vi khuẩn. Ngoài ra nấm men còn sinh sản bằng bào tử. Tế bào nấm men có thể tạo thành 2, 4, 6 hoặc 8 bào tử. Khi hai tế bào sát vách nhau, hợp ghép với nhau để phối nhân phối chất thành túi bào tử, rồi tách thành các tế bào mới.

Nấm men sinh trưởng khá nhanh, thời gian thế hệ khoảng 30 – 40 phút.

– Nấm men được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp lên men để sản xuất cồn, rượu, bia, rượu vang, men bánh mỳ, men thức ăn chăn nuôi và nhiều thứ đồ uống.

Nấm men dùng phối hợp với nhiều vi sinh khác để tạo hương cho sản phẩm là thực phẩm và dược phẩm.

Tuy nhiên, ngoài những nấm men có ích trong tự nhiên, còn gặp một số nấm men gây bệnh cho người và gia súc, làm hư hỏng lương thực, thực phẩm trong bảo quản cũng như trong chế biến.

1.1.3.2. Nấm mốc (moldo, mouldo)

– Nấm mốc hay còn gọi là nấm sợi (*Filamentous fungi*). Nấm mốc rất phổ biến trong tự nhiên. Có thể thấy chúng trên thực phẩm, quần áo, giày dép, trên dụng cụ, vật liệu và đặc biệt nhiều ở trong đất. Nấm mốc phát triển rất nhanh trên các hợp chất hữu cơ khi nóng và ẩm.

– Nấm mốc sinh trưởng và phát triển thành hệ sợi (micellium). Đó là một đám chằng chịt các sợi. Từng sợi được gọi là khuẩn ty hay sợi nấm (hypha). Khuẩn ty có hai loại: phần sợi cắm sâu vào cơ chất để hút các chất dinh dưỡng được gọi là khuẩn ty cơ chất; phần sợi mọc tự do ngoài không khí để hút không khí và sinh bào tử.

– Bào tử của nấm mốc là cơ quan sinh trưởng của tế bào. Bào tử già có nhiều màu khác nhau: đen, vàng, xám, xanh, hoa cau, nâu,... Màu của đám sợi mốc thường là màu của các bào tử.

– Sinh sản của nấm mốc bằng hai cách: vô tính và hữu tính. Sinh sản vô tính ở nấm mốc bằng bào tử (và có thể từ đoạn sợi nấm) là chủ yếu; sinh sản hữu tính đực cái bao gồm các hiện tượng chất giao, nhân giao và phân bào giảm nhiễm như ở các sinh vật bậc cao.

– Các bào tử sinh sản vô tính ở nấm mốc gồm có:

+ Bào tử đốt: sợi nấm ngắt thành từng đốt, rồi rơi vào môi trường nhanh chóng phát triển thành sợi nấm mới.

+ Bào tử màng nhày (*clamydospore*): trên các đoạn sợi nấm xuất hiện những tế bào tròn hoặc gần tròn, có màng dày bao bọc tạo thành bào tử.

+ Bào tử nang (*sporangiospore*): đầu sợi nấm phình to dần tạo thành nang (túi) – sporanium. Khi nang vỡ, bào tử tung ra ngoài.

+ Bào tử đính hay bào tử trần (*conidium*). Đa số nấm mốc sinh bào tử từ một tế bào thể bình rồi phân thành nhánh làm cuống mang bào tử (dạng ngoại sinh). Một số khác sinh bào tử trong tế bào (nội sinh).

Bào tử đính được sinh ra trên đầu sợi nấm đặc biệt gọi là cuống bào tử (conidiphore). Bào tử đính có hình dáng và màu sắc khác nhau tuỳ theo từng loài nấm mốc, có thể là hình cầu, hình trứng, hình bầu dục, hình kim; có thể không màu hoặc có màu (nâu, xanh, đen, xám, vàng). Bào tử đính có thể đơn bào hoặc đa bào, chúng có thể đứng riêng rẽ hoặc kết thành khối, thành chuỗi hay từng khối.

Bào tử nấm mốc khi già có thể theo gió phát tán khắp nơi và khi rơi vào môi trường mới, gặp điều kiện thuận lợi (nhất là nóng và ẩm) sẽ mọc thành nấm mốc mới.

– Nấm mốc có vai trò quan trọng trong tự nhiên, chúng có khả năng phân giải mạnh mẽ các hợp chất hữu cơ phức tạp làm khoáng hoá các chất này, khép kín vòng tuần hoàn vật chất.

Nấm mốc được dùng nhiều trong sản xuất enzyme, làm tương, nước chấm, chao, phomat, các chất kháng sinh,... Ngoài ra, nấm mốc còn được dùng để sản xuất axit hữu cơ (axit xitric), một số vitamin, các chất sinh trưởng và nhiều ancaloit để chữa bệnh.

Trong thực tế chúng ta cũng gặp những nấm gây hại cho bảo quản lương thực, thực phẩm, đồ dùng, vải vóc; gây bệnh ở người, gia súc và cây trồng.

1.1.4. Virus

– Virus là sinh vật phi tế bào, siêu hiển vi. Mỗi virus chỉ có chứa một loại axit nucleic (ADN – axit deoxyribonucleic hoặc ARN – axit ribonucleic).

– Chúng sống ký sinh bắt buộc trong tế bào sống dựa vào hệ thống trao đổi chất của vật chủ mà sao chép axit nucleic, tổng hợp các thành phần như protein,... sau đó lắp nối để tạo thành những virus con mới. Trong điều kiện ngoài, cơ thể virus có thể tồn tại lâu dài ở trạng thái phân tử hoá học không sống.

Virus chưa có cấu tạo tế bào. Mỗi virus được gọi là hạt virus. Thành phần chủ yếu là axit nucleic (ADN hoặc ARN) được bao quanh bởi một vỏ protein gọi là capsit.

Axit nucleic nằm ở giữa, tạo thành lõi hay gen của virus. Capsit mang các thành phần kháng nguyên và có tác dụng bảo vệ lõi nucleic.

- Các virus ký sinh ở tế bào người, động, thực vật và gây bệnh cho những sinh vật này. Chúng còn ký sinh ở tế bào vi sinh vật, chủ yếu là vi khuẩn, làm tan tế bào. Các virus này gọi là thực khuẩn thể (bacteriophage). Trong công nghệ lên men với vi khuẩn, cần quan tâm đến thực khuẩn thể, vì loại virus này có thể làm "mất giống" sản xuất, gây tác hại rất lớn.

– Hầu hết virus của vi khuẩn có đối xứng hình khối, nhưng đối với phage T (virus của *E. coli*) có các đặc điểm sau:

+ Đầu phage có đối xứng đa giác, có dạng hình 6 cạnh, vỏ đầu có cấu tạo bằng protein, bên trong có chứa ADN hình xoắn kép.

+ Phần cổ là bộ phận nối liền đầu và đuôi virus, có hình xoắn ốc xung quanh một lõi sợi rỗng, nhờ đó ADN của phage có thể gây nhiễm vào vi khuẩn.

+ Phần cuối là đuôi phage có hình đa giác và có những sợi mảnh với vai trò bám chặt trên bề mặt vi khuẩn để phage xuyên qua vỏ tế bào, rồi tuồn axit nucleic vào trong tế bào, tiến hành quá trình gây nhiễm.

1.2. DINH DƯỠNG VI SINH VẬT

– Các chất dinh dưỡng đối với vi sinh vật là bất kỳ chất nào được vi sinh vật hấp thu từ các môi trường xung quanh và được chúng sử dụng làm nguyên liệu để cung cấp cho quá trình sinh tổng hợp các thành phần của tế bào, hoặc để cung cấp cho quá trình trao đổi năng lượng.

– Quá trình hấp thụ các chất dinh dưỡng để thoả mãn mọi nhu cầu sinh trưởng và phát triển được gọi là quá trình dinh dưỡng. Chất dinh dưỡng phải là những chất có tham gia vào các quá trình trao đổi chất ở nội bào.

– Trong quá trình trao đổi chất, một phần vật chất trong thức ăn được đồng hoá để xây dựng tế bào, kết quả là tăng sinh khối; một phần khác của chất dinh dưỡng được oxy hoá, giải phóng năng lượng để phục vụ cho các hoạt động sống của tế bào và có thể tạo thành các sản phẩm cần thiết sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau.

1.2.1. Thành phần hoá học của vi sinh vật

Để hiểu rõ quá trình dinh dưỡng của vi sinh vật, trước hết cần nắm được thành phần hoá học tế bào của chúng.

Thành phần hoá học của vi sinh vật luôn luôn thay đổi trong quá trình sống và rất khác nhau ở những chủng loại. Tuy nhiên về cơ bản, thành phần hoá học của tế bào gồm có: protein, axit nucleic, gluxit, chất béo, chất khoáng, nước,... Tỷ lệ các chất hữu cơ, vô cơ trong tế bào vi sinh vật thay đổi rất nhiều theo điều kiện nuôi dưỡng, thời gian, giai đoạn sinh trưởng. Trong tế bào vi sinh vật, các hợp chất thành phần chia làm hai nhóm:

– *Nhóm 1:* gồm nước và muối khoáng;

– *Nhóm 2:* gồm các hợp chất hữu cơ.

1.2.1.1. Nước

Nước chiếm từ 75 – 80% khối lượng tế bào vi sinh vật và có ý nghĩa rất lớn đối với đời sống của chúng. Nước ở trong tế bào một phần ở dạng liên kết ở các dạng keo của tế bào và tham gia vào cấu trúc của tế bào; phần lớn còn lại ở dạng tự do thường dưới dạng dung dịch các hợp chất hữu cơ, vô cơ hình thành trong tế bào liên quan đến quá trình trao đổi chất. Lượng nước tự do trong tế bào tham gia vào sự sinh trưởng của chúng. Nước liên kết không có tính hoà tan và linh động.

Trong quá trình sống của vi sinh vật, nếu mất nước tự do với lượng đáng kể sẽ dẫn đến tình trạng khô héo tế bào và ảnh hưởng sâu sắc đến quá trình trao đổi chất. Mất nước liên kết dẫn đến phá vỡ cấu trúc của tế bào và tế bào bị chết. Trong tế bào, nước tham gia vào thành phần các thể keo như tế bào chất (nước liên kết). Nước giữ vai trò là dung môi (nước tự do) cho các chất hữu cơ và vô cơ hoà tan, nhờ đó mà chúng dễ dàng tham gia vào các phản ứng nội bào. Đặc biệt nước tham gia tích cực vào các phản ứng oxy hoá – khử, các phản ứng thuỷ phân dưới tác dụng của hệ enzyme. Ngoài ra, nước còn là nguồn cung cấp các ion H^+, OH^- cho quá trình trao đổi chất.

1.2.1.2. Chất khoáng

Trong tế bào vi sinh vật thấy có rất nhiều chất khoáng, chúng thường ở dạng muối sunphat, photphat, cacbonat, clorua,... và ở dạng các ion. Hàm lượng các chất khoáng chỉ chiếm dưới 15% chất khô của tế bào (đa số ở khoảng 2 – 5%). Các chất khoáng ở đây được chia thành 3 loại: đa lượng, vi lượng, trung lượng, hoặc chỉ là đa lượng và vi lượng. Dạng vi lượng chỉ có hàm lượng một vài phần triệu (ppm).

Chất khoáng có trong thành phần của các hợp chất hữu cơ phức tạp như protein, vitamin, enzyme,... Lượng chất vô cơ chứa trong tế bào vi sinh vật rất ít, tuy nhiên chúng giữ vai trò rất quan trọng cho hoạt động sống của tế bào, giữ cho áp suất thẩm thấu nội bào ở mức bình thường. Lượng chất khoáng thay đổi theo từng loại vi sinh vật, ngay trong cùng một loài, lượng các chất khoáng cũng rất khác nhau.

Trong các nguyên tố khoáng thì photpho chiếm số lượng lớn hơn cả. Nó tham gia vào thành phần cấu tạo của protein, enzyme, tham gia vào quá trình trao đổi chất, đặc biệt là cấu tạo nên axit nucleic. Lưu huỳnh (S) tham gia vào cấu tạo protein, các hệ enzyme và tham gia cấu tạo các axit amin chứa S như xistin và xistein. Kali (K) tham gia vào quá trình trao đổi chất, nhất là quá trình chuyển hoá các hợp chất gluxit. Magie (Mg) tham gia vào thành phần các hệ enzyme quan trọng trong tế bào. Các nguyên tố khác cũng giữ vai trò không kém quan trọng. Đặc biệt một số nguyên tố, tuy chiếm lượng cực ít trong tế bào vi sinh vật nhưng lại vô cùng cần thiết cho sự tồn tại và phát triển của vi sinh vật, gọi là nguyên tố vi lượng. Những nguyên tố vi lượng chủ yếu gồm: Fe, B, Mo, Co, Mn, Zn, Cu,... chúng tham gia trong thành phần các enzyme của vi sinh vật. Tất cả phản ứng tổng hợp sinh học, phân giải và trao đổi chất hữu cơ đều có sự tham gia của hệ enzyme.

1.2.1.3. Các chất hữu cơ

Chất khô trong tế bào chủ yếu là chất hữu cơ chiếm từ 25 – 85%, còn chất khoáng chỉ chứa không quá 15%. Chất hữu cơ chủ yếu là protein, hydratcacbon, chất béo, amino axit, enzyme, tỷ lệ giữa chúng thay đổi tuỳ theo loài vi sinh vật và điều kiện sống.

a) Protein

Protein chiếm tỷ lệ lớn hơn cả trong thành phần chất hữu cơ, thường chiếm từ 50 – 80% khối lượng chất khô của vi khuẩn, 40 – 60% ở nấm men và 15 – 40% ở nấm mốc. Protein đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong đời sống của vi sinh vật. Mỗi loại vi sinh vật chứa một số loại protein khác nhau, thường chúng chứa protein thuộc loại globulin, albumin, glutein. Ngoài protein đơn giản, trong vi sinh vật còn chứa cả protein phức nucleo – protein. Các protein này chứa nhiều trong nhân và tế bào chất dưới dạng những hợp chất như ADN, ARN. Những chất này thay đổi theo loài vi sinh vật, quá trình sinh trưởng, phát triển và ngay cả ở từng bộ phận của tế bào. Ví dụ: màng hoá nhày thì chứa glucoproteit, tế bào chất lại chứa nucleoproteit; nhân thì chứa axit deoxyribonucleic (ADN),...

Protein ngoài việc tham gia vào thành phần và cấu trúc của tế bào nó còn là thành phần cơ bản cấu tạo hệ enzyme, đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng sinh hoá tiến hành trong và ngoài cơ thể. Trong tế bào vi sinh vật có hàng ngàn enzyme khác nhau. Điều này cho thấy vì sao mà hàm lượng protein ở vi sinh vật lại cao như vậy.

b) Hydratcacbon (hay còn gọi là gluxit)

Trong tế bào vi sinh vật, hydratcacbon chiếm tỷ lệ tương đối cao. Hàm lượng gluxit thay đổi tuỳ loại vi sinh vật: vi khuẩn chứa từ 10 – 30% khối lượng chất khô; ở nấm men từ 27 – 63%; ở nấm mốc từ 40 – 60% khối lượng chất khô. Gluxit trong cơ thể vi sinh vật thường gặp dưới dạng polysaccarit, glycogen, granulozơ, dextran và các hợp chất cùng loại. Pentozơ và deoxyribozơ chứa trong nucleoproteit. Ở các bộ phận của tế bào vi sinh vật chứa những loại gluxit khác nhau: ở màng tế bào, màng nguyên sinh chất, gluxit thường tồn tại dưới dạng liên kết với protein như glucoproteit; dextran và các hợp chất tương tự thường thấy ở giáp mạc của vi khuẩn; còn glycogen, granulozơ thường tồn tại dưới dạng hạt trong nguyên sinh chất.

Gluxit giữ vai trò rất quan trọng trong cơ thể, chúng được sử dụng để tổng hợp protein và lipit, xây dựng các bộ phận cơ thể như màng tế bào, giáp mạc, đồng thời là nguyên liệu năng lượng cho quá trình hô hấp. Gluxit đóng vai trò là chất dự trữ trong tế bào vi sinh vật.

c) Lipit

Lượng lipit ở vi sinh vật thường chứa với số lượng không nhiều, từ 3 – 7%. Đặc biệt ở nấm men và nấm mốc, lipit có thể tới 40% hoặc hơn. Lipit thay đổi theo loài vi sinh vật: vi khuẩn chứa ít, thường từ 1 – 3%; nấm men 1,5 – 30%; còn ở nấm mốc,

bào tử chứa 10 – 14%; khuẩn ty chứa 3 – 40%. Cá biệt trong vi khuẩn như trực khuẩn lao *Mycobacter* chứa 40 – 50%. Ở các bộ phận cơ thể, lượng lipit cũng thay đổi rõ rệt, màng tế bào và phần ngoài của nguyên sinh chất chứa nhiều lipit nhất.

d) Sắc tố

Nhiều vi khuẩn như một số loài nấm men, nấm mốc, vi khuẩn, xạ khuẩn trong cơ thể có nhiều chất màu khác nhau gọi là sắc tố. Những sắc tố này khác nhau về màu sắc: đỏ, xanh, vàng, tím, da cam,... và khác nhau cả về tính chất lý học. Sắc tố chủ yếu chứa trong dịch tế bào làm cho vi sinh vật có những màu khác nhau. Một số vi khuẩn, sắc tố rải rác trong tế bào chất, dưới dạng hạt; ở loại khác, sắc tố ở trong màng tế bào. Một số sắc tố tiết ra môi trường bên ngoài.

e) Các chất hữu cơ khác

Ngoài các chất hữu cơ kể trên, trong tế bào vi sinh vật còn có một số chất hữu cơ như các loại axit hữu cơ (axit oxalic, xitric,...), muối của các axit hữu cơ, đặc biệt là các loại vitamin trong tế bào của một số loài vi sinh vật, như tiền vitamin A, vitamin B, vitamin C, K, PP,... Một số vitamin do vi sinh vật hấp thụ từ môi trường ngoài, một số do vi sinh vật tự tổng hợp từ các hợp chất hữu cơ khác.

1.2.2. Dinh dưỡng ở tế bào vi sinh vật

Vi sinh vật không có cơ quan dinh dưỡng riêng biệt. Các chất dinh dưỡng vào tế bào và các sản phẩm của quá trình sống từ tế bào tiết ra môi trường qua toàn thể bề mặt tế bào nhờ quá trình khuếch tán, thẩm thấu và hấp phụ.

– Vật chất được đi qua từ bộ phận này sang bộ phận khác được coi là sự khuếch tán. Trong tế bào có nhiều hướng đưa đến cân bằng nồng độ các chất trong tất cả thể tích dung dịch và do vậy xuất hiện dòng khuếch tán. Các chất được đồng hoá, nồng độ của chúng giảm dần và quá trình khuếch tán được tiếp tục không ngừng.

– Nếu trên đường khuếch tán có màng bán thấm thì quá trình khuếch tán được gọi là thẩm thấu. Quá trình này được thực hiện nhờ sự khác biệt áp suất thẩm thấu ở hai phía màng bán thấm. Vỏ tế bào và màng tế bào chất, đặc biệt là màng tế bào chất đóng vai trò là màng bán thấm. Nước, các ion mang điện tích trái dấu (tế bào vi khuẩn thường mang điện tích âm) và những phân tử không lớn (glucozơ, saccarozơ, maltozơ,...) đi qua được màng thấm, còn những chất cao phân tử như tinh bột, xenlulozơ, protein không đi qua được. Nước thấm từ phía có áp lực thẩm thấu nhỏ sang phía có áp lực lớn, còn các dung dịch vật chất thì ngược lại.

– Sự hấp phụ là hút vật chất trên bề mặt. Tế bào mang điện tuỳ thuộc vào độ pH của dung dịch, vì vậy nó hút các ion hoặc các phân tử mang điện trái dấu.

Nước đi vào tế bào trong trường hợp áp suất thẩm thấu trong tế bào cao hơn một chút so với bên ngoài. Nếu tế bào rơi vào môi trường có áp suất cao hơn áp suất nội bào thì nước từ tế bào tiết ra môi trường xung quanh, sinh ra hiện tượng tiêu nguyên tương và tế bào có thể bị chết.

1.2.3. Dinh dưỡng cacbon

Tuỳ thuộc vào khả năng đồng hoá các nguồn cacbon, có thể chia vi sinh vật thành hai nhóm: tự dưỡng (autotrophe) và dị dưỡng (heterotrophe).

– Những vi sinh vật tự dưỡng có khả năng tổng hợp các chất hữu cơ từ khí CO_2, nước, muối khoáng. Dựa vào nguồn năng lượng dùng cho tổng hợp, số này lại được chia thành các vi sinh vật quang hoá và hoá hợp (hoặc vi sinh vật tự dưỡng quang năng, hoặc hoá năng).

+ Các vi sinh vật quang hợp dùng nguồn năng lượng Mặt Trời. Chúng có các chất màu tương tự như chất diệp lục ở cây xanh. Những vi khuẩn có sắc tố màu đỏ thuộc nhóm này. Phương trình tổng quát của quá trình này như sau:

$$6CO_2 + 6H_2O + 2.824\ kcal = C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

+ Các vi sinh vật hoá hợp dùng nguồn năng lượng được giải phóng trong các phản ứng oxy hoá các chất vô cơ. Vi khuẩn nitơ sử dụng nguồn năng lượng trong phản ứng oxy hoá NH_3 để tổng hợp các chất hữu cơ.

Những vi khuẩn nitrat, vi khuẩn lưu huỳnh vô màu, vi khuẩn sắt,... thuộc nhóm này.

– Các vi khuẩn dị dưỡng chỉ đồng hoá được các chất hữu cơ. Chúng được chia làm hai nhóm: hoại sinh và ký sinh.

Những vi sinh vật hoại sinh dinh dưỡng bằng các thức ăn hữu cơ đã chết. Thuộc phân nhóm này là các vi khuẩn gây thối và lên men, các nấm mốc và nấm men.

Những vi sinh vật ký sinh thường là những vi sinh vật gây bệnh, những virus và thực khuẩn thể sống bám vào những cơ thể sống.

1.2.4. Dinh dưỡng nitơ

Nitơ có trong thành phần protein, axit nucleic và những chất khác có chứa N của tế bào. Những vi sinh vật ký sinh có khả năng tiêu hoá được protein của vật chủ. Chúng là những vi sinh vật hoại sinh trong đó có dạng vi sinh vật không cần tất cả các axit amin có trong thành phần cơ thể vật chủ, chúng có thể tổng hợp được những axit amin cần thiết từ N khoáng, chủ yếu là các muối amoni.

Nhiều vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn có thể sử dụng nguồn nitrat, nitrit. Các nguồn này được khử thành NH_3. Hầu hết các vi sinh vật dị dưỡng đồng hoá được NH_4^+.

Một số vi khuẩn có thể đồng hoá được nitơ phân tử của không khí. Những vi khuẩn này được gọi là vi khuẩn cố định nitơ. Đó là các vi khuẩn nốt rễ sống ở rễ cây họ Đậu và một số vi khuẩn sống tự do trong đất.

1.2.5. Đồng hoá chất khoáng

Như trên đã biết, các nguyên tố tro là lưu huỳnh, photpho, kali, canxi, magie, sắt,... Phần lớn các vi sinh vật dinh dưỡng các nguyên tố này ở dạng muối khoáng. Nguồn K, P có thể dùng là K_2HPO_4, KH_2PO_4, $(NH_4)_2HPO_4$, $NH_4H_2PO_4$ và K_2SO_4; nguồn Mg và S là $MgSO_4$, nguồn sắt – $FeCl_3$, $FeSO_4$. Các nguyên tố vi lượng (Zn,

Mn, Co, Ni, Cu) có sẵn trong thành phần cơ chất hoặc trong dạng muối khoáng có trong nước. Nhiều trường hợp nuôi cấy vi sinh vật phải bổ sung các nguyên tố vi lượng vào môi trường.

1.2.6. Nhu cầu về chất sinh trưởng

Vitamin là các chất sinh trưởng chính, đóng vai trò quan trọng trong thức ăn bổ sung cho vi sinh vật. Một số vi sinh vật cần vitamin trong môi trường dinh dưỡng, một số khác có thể tự tổng hợp được. Những vitamin ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật là vitamin PP (axit nicotinic), vitamin B_1 (tiamin), vitamin B_2 (riboflavin), biotin (vitamin H), axit pantotenic (vitamin B_5). Các vitamin tham gia chủ yếu vào cấu tạo các enzyme, tăng khả năng trao đổi chất, làm thay đổi cấu tạo màng,... Ngoài ra, các chất sinh trưởng còn có các gốc kiềm purin, pyrimidin và các dẫn xuất của chúng, một số axit béo và các thành phần của màng tế bào.

1.3. SỰ HÔ HẤP Ở VI SINH VẬT

Trong quá trình hô hấp, các chất hữu cơ phức tạp bị oxy hoá và kết quả là năng lượng được giải phóng để phục vụ cho nhu cầu hoạt động sống của tế bào.

– Một số vi sinh vật dùng oxy để hô hấp gọi là vi sinh vật hiếu khí (aerobic), số khác không cần oxy gọi là những vi sinh vật kỵ khí hay yếm khí (anaerobic). Mức độ kỵ khí ở những vi sinh vật khác nhau cũng khác nhau. Có một số vi sinh vật chỉ phát triển trong điều kiện không có oxy, gọi là vi sinh vật kỵ khí tuyệt đối hoặc bắt buộc; có một số vi sinh vật kỵ khí phát triển được cả trong điều kiện có oxy, gọi là vi sinh vật kỵ khí tuỳ tiện.

Số năng lượng được tách ra tuỳ thuộc vào nguyên liệu hô hấp và mức độ oxy hoá của nó. Các nguyên liệu hô hấp có thể là hydratcacbon, các loại rượu, axit hữu cơ,... Năng lượng sinh ra nhiều hơn cả là ở trong quá trình hô hấp hiếu khí.

Nếu nguyên liệu hô hấp là glucozơ và oxy hoá tới sản phẩm cuối cùng thì quá trình hô hấp có thể biểu diễn theo phương trình sau:

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 2824kcal$$

Năng lượng tách ra ít hơn trong quá trình hô hấp dùng rượu và oxy hoá không hoàn toàn theo phương trình sau:

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O + 486kcal$$

– Hô hấp kỵ khí không có oxy tham gia. Khả năng lợi dụng năng lượng trong hô hấp kỵ khí gọi là lên men. L. Pasteur đã gọi lên men là sự sống không cần oxy. Ngày nay khái niệm lên men có nghĩa rộng hơn: *lên men là quá trình nuôi cấy vi sinh vật kỵ khí hoặc hiếu khí để thu một hoặc một số sản phẩm trao đổi chất của chúng.*

Quá trình oxy hoá trong hô hấp kỵ khí tách H^+ và ion này sẽ kết hợp với một số sản phẩm hô hấp hoặc trở thành H_2 ở dạng tự do.

Nấm men là một điển hình của vi sinh vật kỵ khí tuỳ tiện. Trong quá trình lên

men rượu (kỵ khí), nấm men dùng glucozơ làm nguyên liệu đầu vào theo phương trình sau:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + CO_2 + 115kcal$$

Nhưng nấm men cũng có thể phát triển trong điều kiện có oxy, cho tăng sinh khối là chủ yếu, còn rượu etylic không tạo thành hoặc tạo thành rất ít.

Vi khuẩn butyric là vi sinh vật kỵ khí bắt buộc, khi lên men dùng glucozơ theo phương trình sau:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_3H_7OH + 2CO_2 + CH_2 + 63kcal$$

Năng lượng được giải phóng trong quá trình hô hấp chỉ có 10 – 25% được sử dụng cho vi sinh vật, số còn lại toả ra môi trường xung quanh ở dạng nhiệt, quang hoặc điện năng. Điều này được thấy rõ ở sự tự đốt nóng khối hạt, hoặc các vật liệu bảo quản, tăng nhiệt trong quá trình lên men, sử dụng phân bón hữu cơ trong các nhà kính làm nguồn nhiệt sinh học,...

1.4. SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG

Sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật là sự tăng số lượng tế bào (sinh sản) và tăng thể tích cũng như khối lượng tế bào (tăng sinh khối).

Trong môi trường dinh dưỡng, mỗi loài vi sinh vật đều phát triển theo các giai đoạn nhất định, có tính quy luật rõ rệt. Nghiên cứu quy luật này sẽ giúp ta có đầy đủ cơ sở khoa học để điều khiển quá trình này theo hướng mong muốn.

Có thể chia quá trình phát triển của vi sinh vật trong môi trường thành các giai đoạn, hay các pha sau:

1.4.1. Pha tiềm phát (pha lag)

Vi sinh vật mới được cấy vào môi trường chưa tăng về mặt số lượng. Nguyên nhân chủ yếu của hiện tượng này gồm hai loại:

– Nguyên nhân bên trong là bản thân loại vi sinh vật được cấy vào môi trường. Nếu giống ở dạng bào tử thì bào tử cần một thời gian thấm nước trương lên, các hệ enzyme chuyển từ trạng thái không hoạt động sang trạng thái hoạt động, bào tử nảy mầm và sinh trưởng. Nếu giống còn non thì sẽ tiếp tục sinh trưởng đến khi đạt kích thước tối đa và đến tuổi sinh lý trưởng thành. Còn tế bào đã trưởng thành cũng không thể sinh sản ngay được mà còn có thời gian làm quen với môi trường, đồng thời tiến hành tích luỹ năng lượng chuẩn bị cho giai đoạn sinh sản. Đặc điểm của từng loài vi sinh vật, khả năng thích nghi của chúng cũng là những yếu tố quan trọng.

– Nguyên nhân bên ngoài là điều kiện môi trường, gồm có chất dinh dưỡng, độ pH môi trường, độ ẩm, nhiệt độ, thế oxy hoá – khử,...

Những yếu tố của môi trường bên ngoài như nhiệt độ, độ ẩm, pH môi trường, đặc biệt là chất dinh dưỡng có ảnh hưởng rất lớn đến pha tiềm phát. Nếu môi trường

nuôi cấy phù hợp thì thời gian làm quen với môi trường được rút ngắn – pha tiềm phát ngắn.

Ngoài ra vấn đề chủng loài vi sinh vật cũng có liên quan nhiều đến thời gian của pha tiềm phát. Có loại vi khuẩn, trong điều kiện thuận lợi, pha này chỉ kéo dài trong vài phút đến vài chục phút, ở loại khác thì hàng giờ.

1.4.2. Pha logarit (pha chỉ số)

Trong pha này, số lượng vi sinh vật tăng với tốc độ rất nhanh, vì sau khi làm quen với môi trường, vi sinh vật bắt đầu tiến hành sinh sản với tốc độ khá cao. Thời gian sinh sản của một thế hệ phụ thuộc vào loài vi sinh vật. Vi sinh vật sinh sản theo cấp số nhân, nên số lượng tăng ngày càng nhanh. Thời gian tăng gấp đôi lượng tế bào gọi là thời gian thế hệ.

Số lượng ban đầu càng lớn thì tốc độ phát triển trong pha này càng nhanh và thời gian tăng đến số lượng cực đại càng ngắn. Một tế bào vi khuẩn chỉ sau 48 giờ đã sinh trưởng được 171 thế hệ. Trong pha này, vi sinh vật đã thích nghi với môi trường bên ngoài, quá trình trao đổi chất tiến hành rất nhanh. Đặc tính sinh hoá đặc trưng cho loài vi sinh vật thường biểu hiện rõ rệt trong pha này.

Sau một thời gian nuôi cấy, ở cuối pha logarit, điều kiện sinh trưởng trong môi trường thay đổi nhiều, chất dự trữ trong môi trường cạn dần, một số sản phẩm của sự trao đổi có tính độc tích tụ lại, pH môi trường thay đổi. Các chất khử hydro bị hao phí. Sự chuyển hoá năng lượng bị chậm lại. Những cá thể bắt đầu gây trở ngại cho nhau. Tốc độ sinh sản giảm dần. Số tế bào chết xuất hiện. Sự tăng tổng số tế bào sống chậm lại và dẫn tới các tế bào mới hình thành bằng số lượng tế bào chết đi. Sinh trưởng và phát triển bước vào pha cân bằng.

1.4.3. Pha cân bằng

Tiếp theo pha sinh trưởng logarit là pha cân bằng. Trong pha này, tổng số tế bào gần như không thay đổi. Hiện tượng này không có nghĩa là vi sinh vật ngừng sinh sản mà thực ra vi sinh vật vẫn sinh sản tiếp tục, nhưng trong một đơn vị thời gian, số tế bào sinh ra bằng số tế bào chết đi. Có thể nói đây là trạng thái cân bằng động. Chính trong pha này, số lượng tế bào chứa trong một đơn vị thể tích cũng đạt tới mức tối đa. Số lượng tối đa của vi sinh vật trong môi trường là đặc trưng quan trọng của mỗi loài vi sinh vật. Nó phụ thuộc nhiều vào môi trường ngoài. Trong pha này, chất dinh dưỡng môi trường giảm nhiều. Điều này dẫn đến kết quả là số tế bào sinh sản giảm, tế bào chết ngày càng tăng. Đặc biệt là các quá trình lên men, ở pha này, vi sinh vật tích tụ nhiều sản phẩm trong môi trường.

1.4.4. Pha suy vong

Trong pha này, tổng số tế bào giảm dần, số vi sinh vật chết nhiều hơn số vi sinh vật sinh ra. Điều này xảy ra là do điều kiện sống tạo nên, chủ yếu các chất dinh dưỡng đã cạn kiệt trong môi trường nuôi cấy.

1.5. TOÁN HỌC HOÁ QUÁ TRÌNH SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT

Mọi hoạt động của vi sinh vật đều liên quan chặt chẽ với môi trường. Các vi sinh vật không những chỉ có nhu cầu về thành phần và số lượng các chất dinh dưỡng mà còn chịu ảnh hưởng vào nhiều yếu tố khác như: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng,... của môi trường xung quanh. Các yếu tố này có thể làm kích thích hoặc ức chế sinh trưởng, thậm chí còn làm cho vi sinh vật bị tiêu diệt. Sự phát triển của vi sinh vật, cũng làm thay đổi môi trường sống của chúng.

Khi nói về sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn tức là đề cập đến sinh trưởng và phát triển của một số lượng lớn tế bào của cùng một loài. Do tế bào vi khuẩn quá nhỏ nên việc nghiên cứu chúng gặp nhiều khó khăn. Sự tăng về số lượng không phải bao giờ cũng diễn ra cùng với sự tăng sinh khối.

Vì vậy cần phải phân biệt các thông số và hằng số khác nhau khi xác định số lượng và khối lượng vi khuẩn.

Bảng 1.1. Các thông số và hằng số sử dụng khi xác định số lượng và khối lượng vi khuẩn

Các thông số cần xác định	Số lượng vi khuẩn	Khối lượng vi khuẩn
Đơn vị thể tích.	Nồng độ vi khuẩn (số tế bào/ml).	Mật độ vi khuẩn (sinh khối khô /ml).
Số lần tăng đôi sau một thời gian.	Hằng số tốc độ phân chia C (h^{-1}).	Hằng số tốc độ sinh trưởng μ (h^{-1}).
Thời gian cần thiết cho sự tăng đôi.	Thời gian thế hệ g (h).	Thời gian tăng đôi (h).

Tuỳ theo tính chất thay đổi của hệ vi khuẩn, có hai phương pháp nuôi cấy vi khuẩn cơ bản: nuôi cấy theo mẻ và nuôi cấy bán liên tục hoặc liên tục. Trong vi sinh vật học, khi nói đến sinh trưởng là nói đến sự sinh trưởng của cả quần thể. Dưới đây chúng ta khảo sát mẫu thí nghiệm lý tưởng để theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn.

Nếu số tế bào ban đầu là N_0 thì sau n lần phân chia, số tế bào tổng cộng là N:

$$N = N_0.2^n \tag{1.1}$$

Giá trị n (số thế hệ) có thể tính nhờ logarit thập phân:

$$\log N = \log N_0 + n\log 2$$

$$n = \frac{1}{\log 2}(\log N - \log N_0) \tag{1.2}$$

Thời gian thế hệ (g) được xác định theo công thức:

$$g = \frac{t}{n} = \log 2 \ \frac{t_2 - t_1}{\log N - \log N_0} \tag{1.3}$$

trong đó: t: thời gian vi khuẩn phân chia n lần;

$t_2 - t_1$: biểu thị sự sai khác giữa thời gian đầu t_1 và thời gian cuối t_2, h.

Hằng số tốc độ phân chia:

$$C = \frac{1}{g} = \frac{n}{t} = \frac{1}{\log 2} = \frac{\log N - \log N_0}{t_2 - t_1} \tag{1.4}$$

Rõ ràng, thời gian thế hệ càng ngắn, vi khuẩn sinh trưởng và sinh sản càng nhanh.

Vì $$C = \frac{n}{t} \text{ nên } n = Ct \quad (1.5)$$

Thay giá trị của n vào phương trình 1.1 ta có:

$$N = N_0.2^{Ct} \quad (1.6)$$

Hằng số tốc độ phân chia C phụ thuộc vào một số điều kiện: loài vi khuẩn, nhiệt độ nuôi cấy, môi trường nuôi cấy.

Nhưng không phải bao giờ sinh trưởng cũng diễn ra song song với sinh sản, vì vậy khi nghiên cứu động học trong quá trình nuôi cấy liên tục, theo dõi sinh trưởng và sinh sản của quần thể bằng một tiêu chuẩn khác.

Thay cho hằng số tốc độ phân chia (C), chúng ta dùng hằng số tốc độ sinh trưởng μ. Như vậy trong một thời gian dt đã có một sự tăng dX của sinh khối vi khuẩn tỷ lệ với X và μ. Nghĩa là:

$$\frac{dx}{dt} = \mu.X \qquad dt = \frac{1}{\mu.X}.dX \quad (1.7)$$

Tích phân phương trình trong giới hạn (X_0, X) và (0, t) ta có:

$$X = X_0.\ e^{\mu t} \quad (1.8)$$

Ở đây X_0 là lượng sinh khối ban đầu.

Vì $$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t}$$

Và chuyển sang logarit thập phân:

$$\mu = 2,302\frac{(\lg X - \lg X_0)}{(t_2 - t_1)} \quad (1.9)$$

Nếu lượng sinh khối (X_0, X) biểu thị bằng số tế bào (N_0, N) ta sẽ xác định được mối quan hệ qua lại giữa hằng số tốc độ phân chia (C), hằng số tốc độ sinh trưởng (μ) và thời gian thế hệ (g).

Kết hợp các phương trình (1.4) và (1.9) ta có:

$$\mu = 0,69C = \frac{0,69}{g} \quad (1.10)$$

1.5.1. Sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong điều kiện nuôi cấy theo mẻ

Phương pháp nuôi cấy mà trong suốt thời gian đó người ta không bổ sung thêm dinh dưỡng và cũng không loại bỏ đi sản phẩm cuối cùng của sự trao đổi chất gọi là nuôi cấy theo mẻ (quần thể tế bào bị giới hạn trong môt khoảng thời gian nhất định). Sự sinh trưởng trong một "hệ thống động" như vậy tuân theo những quy luật bắt buộc (theo các pha lag (pha tiềm phát), pha log, pha ổn định và pha suy vong).

1.5.1.1. Pha lag

Pha này được tính từ khi bắt đầu nuôi cấy đến khi vi khuẩn đạt được tốc độ sinh trưởng cực đại. Trong pha lag, vi khuẩn chưa phân chia nhưng thể tích và

khối lượng tế bào tăng lên rõ rệt do quá trình tổng hợp các chất, trước hết là các hợp chất cao phân tử (protein, enzyme, axit nucleic) diễn ra mạnh mẽ.

Độ dài pha lag phụ thuộc trước hết vào tuổi của giống và thành phần môi trường. Thường tế bào càng già thì pha lag càng dài.

Việc tìm hiểu độ dài của pha lag là cần thiết trong việc phán đoán đặc tính của vi khuẩn và tính chất của môi trường. Để thuận tiện cho việc tính toán, người ta chuyển các phương trình này thành các phương trình đường thẳng bằng cách sử dụng logarit:

$$\ln N = Ct\ln 2 + \ln N_0 = \mu t + \ln N_0$$

Và $$\log_2 N = \mu \log_2 e + \log_2 N_0 = Ct + \log_2 N_0$$

Pha lag được coi như là khoảng cách thời gian giữa đường thẳng thực nghiệm (r) và đường thẳng lý tưởng (i) song song với nó khi mà vi khuẩn, giả dụ không phải trải qua pha lag. Gọi thời gian của pha lag là TL, ta có:

$$TL = t_r - t_i = t_1 - t_0 \qquad (1.11)$$

Phương trình của đường thẳng lý tưởng là:

$$\log N_i = Ct_i + \log N_0$$

Vì: $$\log N_i = \log N_r$$

Có thể viết: $$\log N_r = Ct_i + \log N_0$$

$$\log N_r - \log N_0 = Ct_i$$

$$t_i = \frac{\log N_r - \log N_0}{C}$$

Trong đó: t_r: thời gian (giờ) thực nghiệm (thực tế).

t_i: thời gian lý tưởng (giờ).

N_o: số lượng tế bào ban đầu.

N_r: số lượng tế bào thực tế.

N_i: số lượng tế bào lý tưởng.

t_o: thời điểm ban đầu.

t_1: thời điểm cuối của pha lag

Như vậy trong vùng sinh trưởng logarit, chỉ cần chọn một giá trị t_r thích hợp và biết giá trị N_r tương ứng cùng với hằng số tốc độ phân chia C, ta có thể tính được độ dài pha lag TL.

Tuy nhiên, thời gian vật lý (h) không phải là giá trị đo thích hợp của pha lag. Vì vậy người ta thường đo pha lag bằng đơn vị thời gian sinh học như thời gian tăng gấp đôi, thời gian thế hệ, hằng số tốc độ sinh trưởng. Biết thời gian thế hệ (g) ta có thể xác định độ dài thời gian của pha lag (TL) gấp mấy lần thời gian thế hệ. Đại lượng này gọi là lag sinh trưởng.

Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến pha lag, nhưng 3 yếu tố đáng chú ý nhất gồm: tuổi giống, lượng cấy giống (trong công nghiệp lên men, tỷ lệ cấy giống thường là 1/10) và thành phần môi trường.

1.5.1.2. Pha chỉ số (pha logarit)

Trong pha này vi khuẩn sinh trưởng và phát triển theo luỹ thừa, nghĩa là sinh khối và số lượng tế bào tăng theo phương trình: $N = N_0.2^{Ct}$ hay $X = X_0.C^{\mu t}$. Trong pha này, kích thước của tế bào, thành phần hoá học, hoạt tính sinh lý,... không thay đổi theo thời gian.

Nếu lấy trục tung là logarit của số tế bào thì đường biểu diễn sinh trưởng theo luỹ thừa của vi khuẩn là đường thẳng. Vì pha sinh trưởng theo luỹ thừa của vi khuẩn được biểu diễn bằng sự phụ thuộc theo đường thẳng giữa thời gian và logarit của số tế bào nên pha này được gọi là pha logarit. Thường dùng logarit cơ số 2 là thích hợp hơn cả vì sự thay đổi đơn vị của $\log_2$ trên trục tung chính là sự tăng đôi số lượng vi khuẩn và thời gian cần để tăng một đơn vị của $\log_2$ lại là thời gian thế hệ.

Thời gian thế hệ (hoặc thời gian tăng đôi) g, hằng số tốc độ phân chia C và hằng số tốc độ sinh trưởng μ là 3 thông số quan trọng của pha log. Các hằng số C và μ có thể tính được từ phương trình:

$$\mu = \frac{\log_2 X_2 - \log_2 X_1}{\log_2 e(t_2 - t_1)}$$

Trong điều kiện thí nghiệm, có thể điều chỉnh sao cho tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn chỉ mẫn cảm, nghĩa là chỉ phụ thuộc một yếu tố. Trong trường hợp như vậy, yếu tố đã cho là yếu tố hạn chế tốc độ sinh trưởng. Chất dinh dưỡng hạn chế có thể là đường, axit amin, chất vô cơ.

Mối quan hệ giữa các hằng số C và μ với nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế được biểu diễn qua các phương trình sau:

$$C = \frac{[S]}{K_s + [S]}.C_{max}$$

Và

$$\mu = \mu_{max}\frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Trong đó: C_{max}, μ_{max} là hằng số tốc độ phân chia và hằng số tốc độ sinh trưởng cực đại;

Ks là hằng số bão hoà;

[S] là nồng độ chất dinh dưỡng hạn chế.

1.5.1.3. Pha ổn định

Trong pha này quần thể vi khuẩn ở trạng thái cân bằng động học. Số tế bào mới sinh ra bằng số tế bào cũ chết đi. Kết quả là số tế bào và cả sinh khối không tăng cũng không giảm.

Nguyên nhân tồn tại của pha ổn định là do sự tích luỹ các sản phẩm độc của trao đổi chất và việc cạn kiệt dinh dưỡng.

Sự tăng sinh khối tổng cộng tỷ lệ thuận với nồng độ ban đầu của chất dinh dưỡng hạn chế.

$$G = K.C$$

Trong đó: G là độ sinh khối tổng cộng;

C là nồng độ ban đầu của chất dinh dưỡng hạn chế;

K là hằng số hiệu suất: K = G/C.

Hằng số hiệu suất K thường được biểu thị bằng miligam (mg) chất khô đối với 1mg chất dinh dưỡng. Đối với các loại đường, K thường dao động trong khoảng từ 0,20 đến 0,30, nghĩa là từ 100mg đường được tạo thành 20 – 30mg khối lượng khô của tế bào. Lượng sinh khối đạt được trong pha ổn định gọi là hiệu suất hoặc sản lượng. Sản lượng phụ thuộc vào tính chất và số lượng các chất dinh dưỡng sử dụng vào điều kiện nuôi cấy. Đó là sự sai khác giữa số lượng vi khuẩn cực đại và khối lượng vi khuẩn ban đầu.

$$X_\varepsilon = X_{max} - X_0$$

Tỷ lệ sản lượng tế bào đối với lượng cơ chất tiêu dùng có ý nghĩa rất quan trọng. Nếu biểu thị cả hai đại lượng thành đơn vị khối lượng sẽ gọi tỷ lệ này (X/S) là hệ số kinh tế (Y). Nếu tính sản lượng ra gam và cơ chất tiêu dùng ra mol thì được gọi là hệ số kinh tế mol (Y_m). Nếu biết con đường phân huỷ cơ chất đã cho và hiệu suất ATP do kết quả của sự phân huỷ này, có thể tính được sinh khối vi khuẩn (gam) đối với 1 mol ATP. Ta gọi đó là hệ số năng lượng (Y_{ATP}).

1.5.1.4. Pha suy vong

Trong pha này, số lượng tế bào có khả năng sống giảm theo luỹ thừa. Chưa có một quy luật chung cho pha suy vong. Sự chết của tế bào có thể nhanh hay chậm, có liên quan đến sự tự phân hay không tự phân. Trong trường hợp môi trường tích luỹ các axit là nguyên nhân làm chết tế bào tương đối rõ thì nồng độ chất dinh dưỡng thấp dưới mức cần thiết và hậu quả là giảm hoạt tính trao đổi chất, phân huỷ dần dần các chất dự trữ và cuối cùng dẫn đến sự chết hàng loạt của tế bào. Ngoài đặc tính của bản thân chủng vi sinh vật, tính chất của các sản phẩm trao đổi chất tích luỹ lại cũng ảnh hưởng đến tiến trình của pha tử vong.

1.5.2. Sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong quá trình nuôi cấy liên tục và bán liên tục

Trong thực tiễn sản xuất, cần cung cấp cho vi sinh vật những điều kiện ổn định để trong một thời gian dài chúng vẫn có thể sinh trưởng trong pha log. Dĩ nhiên ở một mức độ nào đó có thể cấy chuyền tế bào nhiều lần vào môi trường dinh dưỡng mới. Đơn giản hơn nên đưa liên tục môi trường dinh dưỡng mới vào bình nuôi cấy vi khuẩn, đồng thời loại khỏi bình một lượng tương ứng dịch vi khuẩn. Đây chính là cơ sở của phương pháp nuôi cấy liên tục trong các thiết bị nuôi cấy liên tục.

Giả sử có một bình nuôi cấy trong đó vi khuẩn đang sinh trưởng và phát triển. Liên tục bổ sung vào bình môi trường mới có thành phần không thay đổi. Thể tích bình nuôi cấy không đổi, nghĩa là lượng môi trường được bổ sung cân bằng với lượng môi trường đi ra cùng tốc độ.

Gọi thể tích bình là V (lít), tốc độ dòng môi trường đi vào là f (lít/giờ) thì tốc độ pha loãng (hệ số pha loãng) D sẽ là f/V. Đại lượng D sẽ biểu thị sự thay đổi thể tích sau 1 giờ.

Nếu vi khuẩn không sinh trưởng và phát triển, chúng sẽ bị rút khỏi bình nuôi cấy với tốc độ:

$$V^- = \frac{dx}{dt} = DX$$

Trong đó: X– là sinh khối tế bào (g/l).

Tốc độ sinh trưởng của quần thể vi khuẩn trong bình được biểu diễn bởi phương trình:

$$V^+ = \frac{dx}{dt} = \mu X$$

Tốc độ thay đổi cuối cùng (tăng hoặc giảm) mật độ vi khuẩn trong nuôi cấy liên tục là sự sai khác giữa tốc độ tăng V^+ và tốc độ giảm V^-:

$$V = V^+ - V^- = \frac{dx}{dt} = (\mu - D)X$$

Nếu $\mu > D$ thì giá trị $V = dx/dt$ có giá trị dương, nghĩa là mật độ vi khuẩn trong bình tăng, ngược lại nếu $\mu < D$ sẽ có giá trị âm và mật độ vi khuẩn trong bình giảm. Trong trường hợp đặc biệt $\mu = D$ ta có $V = 0$, nghĩa là mật độ tế bào không tăng không giảm theo thời gian, quần thể vi khuẩn ở trạng thái cân bằng động học.

Nếu bình thí nghiệm có thiết bị duy trì sao cho μ luôn luôn bằng D, ta sẽ thu được quần thể vi khuẩn sinh trưởng và phát triển theo luỹ thừa thường xuyên ở mật độ tế bào không đổi và không phụ thuộc vào thời gian. Trong trường hợp như vậy, không những kích thước trung bình của tế bào mà cả môi trường nuôi cấy đều không đổi và không phụ thuộc vào thời gian. Điều này, một mặt tạo điều kiện cho việc nghiên cứu sinh trưởng và sinh lý của tế bào vi khuẩn, mặt khác cải thiện quá trình sản xuất sinh khối vi khuẩn ở quy mô công nghiệp.

Nuôi cấy theo mẻ được coi như hệ thống đóng, quần thể tế bào sinh trưởng trong đó và phải trải qua các pha tiềm phát, logarit, ổn định và suy vong. Mỗi pha sinh trưởng được đặc trưng bởi các điều kiện nhất định. Việc tự động hoá các pha là khó thực hiện. Nuôi cấy liên tục, trái lại, là hệ thống mở có khuynh hướng dẫn đến việc thiết lập một cân bằng động học. Yếu tố thời gian ở đây, trong phạm vi nhất định bị loại trừ. Tế bào được cung cấp những điều kiện không đổi, nhờ việc điều chỉnh tự động.

Có thể biểu thị bằng toán học quá trình nuôi cấy liên tục một cách đơn giản như sau:

$$V.\left(\frac{dx}{dt}\right) = QX_0 - QX + V\left(-\frac{dx}{dt}\right)_G$$

V: thể tích dịch nuôi (lít);

Q: hệ số dòng chảy l/giờ;

G: biểu thị tăng trưởng.

$$V.\left(\frac{dx}{dt}\right) = QS_0 - QS + V\left(-\frac{ds}{dt}\right)_C$$

C: biểu thị tiêu hao.

Bởi vì: $$-\left(\frac{ds}{dt}\right)_c = \left(\frac{-1}{\frac{dx}{dt}}\right).\left(\frac{1}{x}.\frac{dx}{dt}\right).X = \frac{-1}{Y_{x/s}}\mu X$$

Trong đó: $Y_{x/s} = g$ là sinh khối cơ chất.

Thay thế vào và coi $\frac{ds}{dt} = 0$, ta có:

$$Y_{x/s} = \frac{dx}{ds} = \frac{X}{S_0 - S}$$

Ở trạng thái ổn định, hiệu suất sinh trưởng có thể biểu đạt bằng lượng sinh khối X và nồng độ cơ chất S. Theo mô hình của Monod thì:

$$\mu = D = \mu.m.\frac{S}{K_s + S}$$

$$S = K_s\left(\frac{D}{\mu m - D}\right)$$

Thay thế vào công thức $Y_{x/s}$ ta có:

$$X = Y_{x/s}(S_0 - S) = Y_{x/s}\left[S_0 - K_s\left(\frac{D}{\mu m - D}\right)\right]$$

Suy ra đơn vị thời gian để thu sinh khối là:

$$D_X = DY_{x/s}\left[S_0 - K_s\left(\frac{D}{\mu m - D}\right)\right]$$

Đồng thời có thể biết được lúc:

$$D_m = \mu m\left(1 - \sqrt{\frac{k_s}{k_s + S_0}}\right)$$ thì D_X là sinh khối cực đại.

1.6. CÁC YẾU TỐ NGOẠI CẢNH ẢNH HƯỞNG ĐẾN ĐỜI SỐNG VI SINH VẬT

Vi sinh vật là những cơ thể sống. Chúng có nhu cầu về thành phần và số lượng dinh dưỡng các chất dinh dưỡng. Ngoài ra chúng còn chịu ảnh hưởng nhiều yếu tố môi trường sống như nhiệt độ, pH, không khí, độ ẩm, ánh sáng,... Các yếu tố này được chia thành ba nhóm: vật lý, hoá học và sinh học, có thể kích thích sinh trưởng và phát triển, hoạt lực hệ enzyme tăng cường, hiệu quả lên men,... nhưng cũng có thể ức chế hoặc tiêu diệt các tế bào vi sinh vật.

1.6.1. Các yếu tố vật lý

a) Nhiệt độ

Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến đời sống vi sinh vật. Mỗi loài vi sinh vật chỉ có khả năng hoạt động sống trong một giới hạn nhiệt độ nhất định. Giới hạn này được chia làm 3 điểm: nhiệt độ cực đại, cực tiểu và tối thích.

Quan hệ với nhiệt độ của vi sinh vật cũng chia thành ba nhóm: vi sinh vật ưa lạnh, vi sinh vật ưa ấm, vi sinh vật ưa nóng.

– Vi sinh vật ưa lạnh (Psychorophile) có nhiệt độ tối thích 10 – 18^0C và tối đa là 30^0C, nhưng ở nhiệt độ âm vẫn sống được. Có thể gặp vi sinh ưa lạnh ở các địa cực.

– Vi sinh vật ưa ấm (mesophile – ưa nhiệt độ trung bình) có khoảng nhiệt độ giới hạn là: tối thiểu 10^0C, tối đa 40 – 50^0C và tối thích là 25 – 37^0C.

– Vi sinh vật ưa nóng (thermophile): nhiệt độ tối thích là 50 – 65^0C, tối thiểu khoảng 30^0C, tối đa là 70 – 80^0C, thường gặp ở suối nước nóng, ở những đống rác ủ kín. Ngoài ra còn thấy những vi sinh vật sống ở nhiệt độ cao hơn – vi sinh vật chịu nhiệt.

Trong công nghiệp vi sinh vật, người ta sử dụng các giống ưa ấm là chủ yếu trong lên men.

Trong kỹ thuật hay dùng sấy hoặc hấp thanh trùng dụng cụ ở nhiệt độ cao để diệt vi khuẩn. Hấp Pasteur những môi trường lỏng ở 70^0C trong 30 phút có thể diệt được hầu hết các tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn, các bào tử của nấm mốc, nấm men, xạ khuẩn; hấp ở 121^0C khoảng 30 – 45 phút mới làm chết được bào tử của vi khuẩn. Một điều đáng chú ý là: nhiệt độ trên 70^0C đã diệt được phần lớn vi sinh vật, còn ở nhiệt độ thấp dưới 0^0C, vi sinh vật không chết, nếu có chết thì số lượng rất nhỏ, mà sống ở trạng thái tiềm sinh, khi nhiệt độ nâng cao thích hợp, chúng có thể trở lại hoạt động bình thường.

b) Độ ẩm

Độ ẩm ảnh hưởng nhiều tới tế bào vi sinh vật. Nước trong tế bào vi sinh vật chiếm tới 70 – 85%.

Mỗi loài vi sinh vật đều có một giới hạn với độ ẩm tối thiểu để phát triển cực điểm và khoảng tối thích. Ví dụ: vai trò của nấm mốc phát triển trên các vật rắn có độ ẩm tối thiểu là 15% (thực ra là 13,5%), với vi khuẩn là 20 – 30%. Nấm mốc phát triển trên môi trường rắn và xốp hoặc trên mặt môi trường lỏng có độ ẩm là 55 – 60%.

Đáng chú ý là tế bào sinh dưỡng có thể rất dễ dàng chuyển sang trạng thái khô trong điều kiện lạnh. Nếu làm khô tế bào ở điều kiện môi trường là chân không thì hoạt động sống của vi sinh vật bị ngừng lại, nhưng nhiều tế bào không chết.

c) Nồng độ của các chất hoà tan

Những chất hoà tan (đường, muối ăn, hoá chất) trong môi trường lỏng làm ảnh hưởng đến đời sống vi sinh vật. Chúng có tác dụng làm thay đổi áp suất thẩm thấu của môi trường với tế bào vi sinh vật.

Nếu môi trường giàu chất hoà tan với một lượng lớn sẽ làm cho tế bào chất bị héo khô và tế bào bị teo nguyên sinh vì nước tiết ra ngoài. Ngược lại, nước vào trong tế bào làm trương tế bào chất. Như vậy, trong bảo quản vi sinh vật thường hay dùng muối và đường với nồng độ cao để ức chế vi sinh vật phát triển.

d) Các tia năng lượng

– Ánh sáng Mặt Trời có tác dụng trực tiếp với đa số vi sinh vật (trừ các vi

khuẩn quang hợp). Ánh nắng trực tiếp có thể giết chết vi sinh vật sau vài phút hoặc vài giờ, ánh sáng bức xạ chỉ gây chết vi sinh vật khi tác dụng kéo dài.

– Tia tử ngoại (UV – ultraviolet) hay còn gọi là tia cực tím. Tất cả tia cực tím có bước sóng 2.000 – 3.000A^0 đều có tác dụng sát khuẩn. Nhưng hiệu quả nhất là các tia có bước sóng 2.650 – 2.660A^0.

– Tia tử ngoại có tác dụng phân huỷ một số chất hữu cơ trong tế bào, làm đông tụ protein, làm mất hoạt tính của enzyme, phá huỷ tế bào của vi sinh vật. Tuy nhiên với một lượng nào đó, các tia này có thể có tác dụng lên bộ gen làm ảnh hưởng đến tính di truyền và gây ảnh hưởng đột biến. Tia tử ngoại được dùng để sát khuẩn.

– Các tia X, tia phóng xạ α, β, γ đều có tác dụng đến tế bào vi sinh vật.

– Siêu âm: Nhiều loại vi sinh vật bị chết sau 1 phút dưới tác dụng của sóng siêu âm. Sóng siêu âm có thể làm vỡ vỏ tế bào. Siêu âm cũng có thể được dùng trong thanh trùng các môi trường lỏng.

1.6.2. Các yếu tố hoá học

– pH môi trường: pH môi trường ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của vi sinh vật, làm thay đổi điện tích của màng tế bào chất, dẫn đến thay đổi tính thẩm thấu của màng tế bào.

Mỗi loài vi sinh vật có pH tối thích, cực tiểu, cực đại riêng. Đại thể là vi khuẩn và xạ khuẩn thích hợp với pH ở vùng trung tính và kiềm (trừ các vi khuẩn sinh các axit hữu cơ). Vi khuẩn gây thối phát triển tốt ở môi trường kiềm, trong các môi trường axit, chúng bị ức chế hoặc có thể bị chết. Nấm men và nấm mốc thích hợp với pH 3 – 6.

– Thế oxy hoá khử: phản ánh mức độ hiếu khí, kỵ khí hoặc tuỳ tiện, cho biết vai trò của oxy trong các quá trình oxy hoá khử của tế bào vi sinh vật.

– Các chất độc với vi sinh vật:

Nhiều hợp chất hoá học có độc tính với vi sinh vật. Những chất này tác dụng trực tiếp đến tế bào chất, phá cấu trúc tế bào và ảnh hưởng xấu tới hoạt động sống bình thường của vi sinh vật hoặc vi sinh vật bị chết.

Muối kim loại nặng, cồn, phenol và một số hợp chất khác làm đông tụ protein và các enzyme, phá hoại cấu trúc tế bào, làm đình chỉ các phản ứng hoá sinh. Axit, kiềm, các chất oxy hoá mạnh như clo, clorua vôi, nước javel, có thể oxy hoá các hợp chất hữu cơ và phân giải chúng, đặc biệt là protein trong tế bào. Các chất kháng sinh tác động mạnh đến tế bào vi sinh vật, gây ức chế hoặc tiêu diệt chúng. Song, dùng thuốc kháng sinh trong trị liệu dẫn đến vi sinh vật bị nhờn thuốc, làm thuốc mất tác dụng.

Có một số hợp chất có tính sát khuẩn nhưng được sử dụng trong thực phẩm với nồng độ cho phép để phòng thối như các axit hữu cơ (axit lactic, axetat, xitric, benzoic, sorbat), khí SO_2.

1.6.3. Các yếu tố sinh học

Vi sinh vật có quan hệ tương tác với các giới vi sinh vật khá phong phú và phức tạp. Có thể chia các mối quan hệ này thành:

– Quan hệ *cộng sinh* là mối quan hệ hai bên đều có lợi, hai bên dựa vào nhau trong quá trình phát triển và chung sống. Cộng sinh có thể ở các cá thể cùng loài hoặc khác loài, khác giới (như vi sinh vật với cây họ Đậu).

– Quan hệ *hỗ sinh*: sản phẩm hoạt động sống của loài này tạo điều kiện cần thiết cho loài kia phát triển.

– Quan hệ *ký sinh* là quan hệ một chiều: loài sống ký sinh sống nhờ vào vật chủ, bòn rút các chất dinh dưỡng của vật chủ,... làm cho tế bào vật chủ ốm mòn rồi chết. Quan hệ này thể hiện ở các vi sinh vật gây bệnh.

– Quan hệ *đối kháng*: sự có mặt của loài này gây ức chế hoặc tiêu diệt loài khác.

Trong công nghệ lên men thường sử dụng các chủng vi sinh vật dị dưỡng (kể cả nuôi trồng nấm ăn) với các điều kiện nuôi cấy ban đầu thích hợp như pH, nhiệt độ, mức độ hiếu khí cùng thành phần môi trường nuôi cấy đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng và tạo thành sản phẩm.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 1

1. Các nhóm vi sinh vật (VSV) nào được dùng trong công nghệ lên men? Đặc điểm sinh học và sản phẩm chủ yếu của những nhóm này.
2. Thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy cần phải có những hợp chất nào để đảm bảo cho VSV đạt hiệu suất cao trong lên men?
3. Quá trình sinh trưởng và phát triển của VSV trong quá trình lên men.
4. Các yếu tố ngoại cảnh ảnh hưởng đến hoạt động sống của VSV.

Chương 2

NƯỚC VÀ NGUYÊN LIỆU TRONG SẢN XUẤT LÊN MEN

2.1. NƯỚC

Các xí nghiệp công nghiệp lên men thường sử dụng một lượng lớn nước. Ví dụ: một nhà máy rượu dùng để sản xuất 1.000 lít cồn từ rỉ đường dùng tới 70m^3 nước; từ các loại bột – khoảng 80 – 115m^3 nước; trong sản xuất bia, cứ 10 lít bia dùng tới 300 lít nước.

Nước tiêu tốn trong quá trình công nghệ, rửa thiết bị, rửa chai lọ và các đồ chứa đựng, làm lạnh, cấp hơi và vệ sinh nhà xưởng.

Các nhà máy rượu thường dùng các nguồn nước mặt (sông, hồ), giếng khoan nước ngầm. Công nghiệp bia, sinh khối nấm men, nước ngọt thường dùng nước sinh hoạt của thành phố hoặc giếng khoan.

Trong nước tự nhiên thường có các khí hoà tan (CO_2, O_2, N_2) và các muối khác nhau: các muối clorua ($NaCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$), sunphat (Na_2SO_4, $CuSO_4$, $MgSO_4$), cacbonat (Na_2CO_3, $CaCO_3$, $MgCO_3$, $FeCO_3$), bicacbonat ($NaHCO_3$, $Ca(HCO_3)_2$, $Mg(HCO_3)_2$), nitrat ($NaNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $Mg(NO_3)_2$),... Thỉnh thoảng còn chứa cả những vật mảnh nhỏ. Nước tự nhiên thường có một lượng vi sinh vật xác định. Nước sạch sinh học hơn cả là nước trong các hồ nước ngầm, trong các giếng phun.

Chất lượng nước dùng trong công nghiệp lên men ảnh hưởng lớn đến quá trình công nghệ cũng như chất lượng sản phẩm, đặc biệt là những dồ uống. Các chỉ số chất lượng quan trọng của nước là độ cứng, độ oxy hoá, số lượng vi sinh vật.

Độ cứng của nước lại phân thành: độ cứng chung, độ cứng tạm thời, độ cứng vĩnh cửu, cacbonat hoá và không cacbonat hoá. Độ cứng chung gây ra bởi hàm lượng ion Ca^{2+} và Mg^{2+} có ở trong nước. Độ cứng tạm thời là lượng các muối bicacbonat (hydrocacbonat) của hai ion canxi và magie, khi đun sôi, hai loại muối này chuyển thành cacbonat và lắng cặn. Độ cứng vĩnh cửu là hàm lượng các muối clorua, sunphat, nitrat của các ion này.

Độ cứng của nước được tính bằng số miligam – đương lượng trong 1 lít nước. 1mg – đương lượng tương ứng với 20,04mg ion canxi hoặc 12,16mg ion magie trong 1 lít nước. 1 độ cứng (theo độ Đức) tương ứng với 10mg CaO (hoặc số đương lượng, cũng như 7,14mg MgO) trong 1 lít nước. Như vậy, 1mg – đương lượng tương ứng với 2,8° (độ cứng); 1° tương ứng với 0,35663mg – đương lượng/l.

Độ cứng cacbonat hoá được tính không những bởi sự có mặt của hydrocacbonat của hai ion canxi và magie mà còn của cả các ion khác như natri, kali, sắt, nhôm cũng như cacbonat của các cation này. Độ cứng cacbonat được thể hiện mg đương lượng hydrocacbonat và cacbonat (HCO_3^- và CO_3^{2-}) trong 1 lít nước. Nếu số lượng mg đương

lượng HCO_3^- và CO_3^{2-} trong nước lớn hơn tổng mg đương lượng canxi và magie thì ta dùng độ cứng cacbonat của nước bằng độ cứng chung của nước.

Độ oxy hoá của nước là khả năng những chất có trong nước có thể phản ứng với các tác nhân oxy hoá. Độ oxy hoá được biểu hiện bằng số miligam oxy cần để oxy hoá các chất có trong 1 lít nước. Như vậy, độ oxy hoá là mức độ nhiễm bẩn của các chất hữu cơ của nước. Chỉ số vi khuẩn trong nước là tổng lượng vi sinh vật có trong 1ml nước và số nhóm trực khuẩn đường ruột. Chỉ số vi khuẩn của nước là chuẩn coli và chỉ số coli.

Chuẩn coli là số ml nước tìm thấy 1 tế bào trực khuẩn đường ruột (*E. coli* hoặc coliform), còn *chỉ số coli* là số lượng trực khuẩn đường ruột có trong 1.000ml nước.

$$\text{Chuẩn coli} = \frac{1.000}{\text{chỉ số coli}}$$

$$\text{Chỉ số coli} = \frac{1.000}{\text{chuẩn coli}}$$

2.1.1. Yêu cầu nước cho lên men

Nước dùng trong các xí nghiệp lên men phải đáp ứng được những yêu cầu về nước uống, không có mùi vị, không màu, trong suốt.

Các yêu cầu về nước uống như sau: (*)

Độ cứng chung, mg đương lượng, không quá 7

Hàm lượng các chất, mg/l, không quá:

Cặn khô	1.000
Clorit	350
Chì	0,1
Sunphat	500
Acsen	0,05
Fluor	1,5
Đồng	3,0
Kẽm	5,0

Tổng vi sinh vật có trong 1ml không quá 100

Số lượng trực khuẩn đường ruột trong 1 lít nước:

Chuẩn coli, ml, không nhỏ hơn	300
Chỉ số coli, không lớn hơn	3

Đối với nguồn nước giếng hoặc thuỷ vực cho phép chuẩn coli không nhỏ hơn 100ml (chỉ số coli là 10). Nói chung về nước uống không cho phép nước có mặt amoniac và các muối của axit nitrit, vết các muối của kim loại nặng (thuỷ ngân, bari,...). Độ oxy hoá của nước không được quá 3,0mg O_2/l. Trong một số trường hợp riêng biệt, được sự đồng ý của cơ quan giám sát vệ sinh cho phép độ cứng chung cũng không quá 14mg đương lượng.

Nước dùng trong sản xuất bia, ngoài yêu cầu chung về chất lượng nước còn có những yêu cầu cụ thể như sau: (*)

Cacbonat với giới hạn nồng độ, mg/l,	50
Sunphat	350
Clorit	150
Nitrat	40
SiO_2	20
Muối magie	100
Sắt	0,3
Amoniac	0,1
Mangan	vết
Độ oxy hoá	2mg O_2/l

(*): Những số liệu ở đây theo các tiêu chuẩn của Liên Xô trước đây.

Độ cứng tạm thời đối với bia sáng màu vào khoảng 0,71mg đương lượng và độ cứng vĩnh cửu là 0,36 – 0,72mg đương lượng; đối với bia thẫm màu, độ cứng tạm thời là 2,85 – 4,80mg đương lượng và độ cứng vĩnh cửu không xác định.

Nước dùng pha nước ngọt và rượu mùi có độ cứng chung không quá 1,6mg đương lượng và độ cứng tạm thời 0,36mg đương lượng. Nếu nước có chứa các chất rắn lơ lửng, hoặc độ cứng vượt quá tiêu chuẩn thì cần phải xử lý trước khi sử dụng.

2.1.2. Xử lý nước

Với mục đích là loại các chất rắn có trong nước và giảm độ cứng ta có thể sử dụng các phương pháp sau:

1. Lắng và lọc;

2. Đông tụ;

3. Loại các muối canxi và magie làm mềm bằng phương pháp lắng đọng hoặc trao đổi ion.

a) Lắng và lọc nước

Để tách nước khỏi các vật thể nhỏ, thường để lắng và lọc. Lắng là quá trình lắng đọng dưới tác dụng của trọng lực, lọc là quá trình tách vật rắn ra khỏi nước nhờ các lỗ hở hoặc khe hở của các vật liệu lọc giữ lại các vật thể rắn có kích thước lớn hơn các lỗ của màng vật liệu. Lắng cặn thường chậm, yêu cầu phải có các bể với diện tích mặt bằng lớn, do vậy ít được sử dụng. Phương pháp phổ biến cho việc tách các vật thể rắn nhỏ ra khỏi nước là lọc với vật liệu lọc là cát vàng, sỏi, than đá đập nhỏ.

b) Đông tụ hay keo tụ

Khi trong nước có những thể keo thì rất khó cho việc lọc bình thường. Trong trường hợp này, cần bổ sung chất keo tụ làm cho các thể keo kết lại với kích thước lớn hơn và sau đó để lắng cặn. Quá trình này được gọi là đông tụ. Những chất làm

đông tụ là sunphat nhôm, sunphat sắt. Sunphat nhôm thường gọi là phèn. Có hai dạng phèn đơn và phèn kép. Ngày nay người ta còn tạo ra các dạng polyme của các dạng phèn này có khả năng đông tụ cao. Sunphat nhôm được cho vào nước phản ứng với các muối bicacbonat canxi và magie:

$$Al_2(SO_4)_3 + 3Ca(HCO_3)_2 = 2Al(HCO_3)_3 + 3CaSO_4$$

$Al(HCO_3)_3$ không bền và phân huỷ thành hydroxyt nhôm và cacbonic:

$$Al(HCO_3)_3 = Al(OH)_3 + 3CO_2$$

Hydroxyt nhôm tạo thành các dạng dịch keo, các vật thể trong keo mang điện dương, xảy ra sự keo tụ các thể keo của nước và hydroxyt nhôm, tạo thành nhanh chóng các vẩn bông cặn lắng xuống đáy. Cặn lắng này kéo theo cả các vật thể rắn nhỏ ở dạng huyền phù, để lắng và lọc.

c) Làm mềm nước

Làm mềm nước được tiến hành bằng các phương pháp với vôi, xút vôi và trao đổi ion. Phương pháp dùng vôi làm mềm nước thường dùng với nước có độ cứng tạm thời cao và độ cứng vĩnh cửu thấp. Phản ứng xảy ra như sau:

$$Ca(HCO_3)_2 + Ca(OH)_2 = 2CaCO_3 + 2H_2O$$

$$Mg(HCO_3)_2 + Ca(OH)_2 = CaCO_3 + MgCO_3 + 2H_2O$$

$MgCO_3$ hoà tan khá tốt trong nước và lại phản ứng với hydroxyt canxi thành $Mg(OH)_2$ không tan:

$$MgCO_3 + Ca(OH)_2 = Mg(OH)_2 + CaCO_3$$

Sau đó đem lọc.

Để làm giảm độ cứng tạm thời và độ cứng vĩnh cửu của nước, người ta sử dụng phương pháp xút vôi (hydroxyt canxi và natri cacbonat): hydroxit canxi làm kết lắng các muối trong độ cứng tạm thời, còn natri cacbonat – các muối của độ cứng vĩnh cửu.

$$CaSO_4 + Na_2CO_3 = CaCO_3 + Na_2SO_4$$

$$MgSO_4 + Na_2CO_3 = MgCO_3 + Na_2SO_4$$

$$MgCO_3 + Ca(OH)_2 = Mg(OH)_2 + CaCO_3$$

Các cặn lắng được lọc bỏ.

d) Phương pháp trao đổi ion

Trao đổi ion là sự trao đổi các ion của nước với nhựa ionit. Nhựa ionit là các vật liệu rắn không tan trong nước, có khả năng trao đổi ion. Nếu nhựa có khả năng trao đổi với các cation thì được gọi là các cationit, ngược lại là anionit.

Ionit có thể là các chất hữu cơ hoặc vô cơ, có trong tự nhiên hoặc nhân tạo. Các cationit có nguồn gốc vô cơ tự nhiên là nhóm các silicat alumin (nhôm silicat), như xeolit, đất sét, glaucolit (kali sắt alumino silicat),... Những ionit tổng hợp nhân tạo là permunit (alumino silicat axit yếu). Ionit hữu cơ trong tự nhiên là axit humic có trong đất, có tác dụng điều chỉnh dinh dưỡng thực vật và axit humic của than đá, than nâu.

Để tăng khả năng trao đổi ion của than, người ta đập vỡ than thành các hạt nhỏ, rửa bằng axit sunphuric ở nhiệt độ cao, rồi rửa bằng kiềm và sấy. Than lưu huỳnh sau khi gia công thành Na–cationit, có khả năng trao đổi ion Na^+ với Ca^{2+} và Mg^{2+}.

Ionit hữu cơ tổng hợp là các nhựa cao phân tử. Có nhựa cation và nhựa anion. Nhựa trao đổi cation là sản phẩm ngưng tụ của polyphenol và formaldehyt (cationit phenolformaldehyt). Anionit là nhựa ngưng tụ polyme hoá các amit với formaldehyt hoặc epyclorhydrin, cũng là sản phẩm của sự kết hợp giữa các nhóm kiềm với sopolime stirol (anionit polysitirol).

Trong các xí nghiệp lên men hay dùng than lưu huỳnh để làm mềm nước. Khi lọc nước qua than lưu huỳnh (Na – cation) sẽ xảy ra các phản ứng sau:

$$Na_2R + CaSO_4 = CaR + CaSO_4$$
$$Na_2R + CaCl_2 = CaR + 2NaCl$$
$$Na_2R + MgSO_4 = MgR + Na_2SO_4$$
$$Na_2R + MgCl_2 = MgR + 2NaCl$$
$$Na_2R + Ca(HCO_3)_2 = CaR + 2NaHCO_3$$
$$Na_2R + Mg(HCO_3)_2 = MgR + 2NaHCO_3$$

Ghi chú: R là phức cationit.

Làm mềm nước bằng than lưu huỳnh hoặc các cationit khác có thể thực hiện trong các ống lọc đứng. Các ống này là ống kim loại hình trụ và kín. Dưới đáy ống lọc để một lớp lót bông những hạt mảnh than đá có kích thước xác định. Trên lớp lót, đổ đầy nhựa cationit. Sau đó cho nước chảy từ từ qua cột. Trong đó sẽ xảy ra sự trao đổi ion: tất cả các ion Na^+ sẽ trao đổi với Ca^{2+} và Mg^{2+}. Khả năng trao đổi ion của nhựa sẽ giảm dần theo thời gian. Để phục hồi khả năng này ta cho chảy vào cột lọc dung dịch NaCl và phản ứng sẽ là:

$$CaR + 2NaCl = Na_2R + CaCl_2$$
$$MgR + 2NaCl = Na_2R + MgCl_2$$

Dùng Na – cation làm cho nước giảm độ cứng đáng kể. Song phương pháp này không làm giảm được độ kiềm của nước. Nếu yêu cầu làm giảm độ kiềm, có thể axit hoá nước dã mềm bằng axit sunphuric hoặc axit clohydric.

Phản ứng trung hoà sẽ xảy ra như sau:

$$2NaHCO_3 + H_2SO_4 = Na_2SO_4 + 2H_2O + 2CO_2$$

Có thể làm mềm nước bằng cách kết hợp hai phương pháp với vôi và Na – cationit. Vôi sẽ khử độ cứng tạm thời, còn Na – cationit loại các muối vĩnh cửu. Cũng có thể dùng H – cationit làm mềm nước. Ion H^+ được trao đổi với các ion Ca^{2+} và Mg^{2+}. Nước chảy qua phin lọc chứa nhựa H – cationit và các phản ứng sẽ xảy ra:

$$H_2R + Ca(HCO_3)_2 = CaR + 2H_2O + 2CO_2$$
$$H_2R + Mg(HCO_3)_2 = MgR + 2H_2O + 2CO_2$$
$$H_2R + CaSO_4 = CaR + H_2SO_4$$

$$H_2R + CaCl_2 = CaR + 2HCl$$
$$H_2R + MgSO_4 = MgR + H_2SO_4$$
$$H_2R + MgCl_2 = MgR + 2HCl$$

Trong dung dịch có H – cationit, các axit vô cơ tự do sẽ tạo thành (axit sunphuric và clohydric). Các axit này sẽ ăn mòn kim loại. Do vậy, người ta thường dùng H – Na – cationit liên tiếp hoặc đồng thời. Khi sử dụng đồng thời thì một phần nước cho chảy qua phin lọc chứa Na – cationit, một phần nước khác chảy qua phin H – cationit. Nước qua Na – cationit sẽ kiềm hoá, còn qua H – cationit – axit hoá. Cho hai loại nước này chảy chung với nhau sẽ xảy ra phản ứng trung hoà. Cũng có thể cho nước chảy qua 2 phin lọc liên tiếp và cũng thu được nước đã trung hoà:

$$H_2SO_4 + Ca(HCO_3)_2 = CaSO_4 + 2H_2O + 2CO_2$$
$$2HCl + Ca(HCO_3)_2 = CaCl_2 + 2H_2O + 2CO_2$$

Để khử muối cho nước, người ta cho nước chảy liên tiếp vào lọc H – cationit và lọc anionit. Trong phin lọc thứ nhất có các ion trong nước như Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+ và những ion khác sẽ trao đổi với ion H^+ của cationit. CO_2 sẽ thoát ra từ lọc này. Để khử các anion trong nước, người ta cho nước qua lọc chứa các anion ở dạng OH^- và phản ứng sẽ xảy ra như sau:

$$2ROH + H_2SO_4 = R_2SO_4 + 2H_2O$$
$$ROH + HCl = RCl + H_2O$$

Vì vậy, nếu cho nước chảy qua cả hai phin lọc thì có thể loại bỏ được tất cả các cation cũng như anion có trong nước. Tái sinh phin lọc H – cationit bằng cách cho dung dịch H_2SO_4 hoặc HCl chảy qua, còn tái sinh lọc anionit dạng OH^- bằng dung dịch xút.

2.1.3. Khử khuẩn cho nước

Nước cấp trong lên men nếu nhiễm khuẩn vượt quá mức cho phép cần phải tiến hành diệt khuẩn. Diệt khuẩn có thể dùng phương pháp hoá học hoặc phương pháp vật lý, cũng có thể dùng cả hai phương pháp kết hợp.

Phương pháp hoá học diệt khuẩn thường dùng là clo, ozon và sử dụng ion bạc.

a) Khử khuẩn bằng clo

Phương pháp clorit diệt khuẩn dùng với khí clo hoặc clorua vôi (hypoclorit vôi – $Ca(ClO)_2$) và nước Javel (hypoclorit natri – NaClO).

Trong nước, Cl và OCl^- có tính sát khuẩn và được gọi là Clo hoạt tính.

$$Cl_2 + H_2O = HOCl + HCl$$
$$HOCl \rightleftharpoons H^+ + OCl^- \text{ (ion này không bền dễ phân huỷ thành H và Cl)}$$

H và Cl có tác dụng diệt khuẩn.

$$Cl_2 + 2NaOH = NaClO \text{ (nước Javel)} + NaCl + H_2O$$
$$NaClO \rightleftharpoons Na^+ + OCl^- \text{ (dễ phân ly thành Cl và O)}$$
$$Cl_2 + 2Ca(OH)_2 = Ca(ClO)_2 + CaCl_2 + H_2O$$

Sát khuẩn cho nước thường dùng hơn cả là khí clo (Cl_2) đóng trong bình thép và clo hoá nước chỉ cần với nồng độ 0,1 – 0,2 mg/l.

Nước Javel ở dạng lỏng là chất oxy hoá rất mạnh, có tính sát khuẩn cao. Clorua vôi ở dạng bột: hoà tan thành dịch 3 – 5% rồi cho vào nước. Hiện nay diệt khuẩn, người ta hay dùng hợp chất của clo là các viên cloramin B ($CH_3C_6H_4SO_2NaNCl$). Dung dịch cloramin B 0,02% có thể ức chế được tụ cầu vàng và diệt khuẩn đường ruột. Các viên này thường có 20 – 40% lượng clo hoạt động. Thời gian khử khuẩn khoảng 20 – 40 phút.

Dùng clo diệt khuẩn cho nước thường còn dư một chút hoá chất này trong nước và làm cho nước có mùi clo. Để khắc phục, người ta thường gia nhiệt hoặc thổi khí cho nước. Dùng clo còn có nhược điểm yếu nữa: nếu trong nước có mặt các hợp chất phenol thì clo dễ kết hợp với phenol và tạo thành clophenol. Hợp chất này với một nồng độ vô cùng nhỏ cũng làm cho nước có mùi khó chịu.

Một điều cần lưu ý: dùng clo diệt khuẩn cho nước chỉ với điều kiện nước chứa ít hoặc không có chất hữu cơ. Nếu nồng độ chất hữu cơ cao dễ tạo thành phức chứa clo ở dạng AOX. Dạng này gây độc và có thể là các tác nhân gây ung thư.

b) Khử khuẩn bằng ozon

Ozon có công thức là O_3 và dễ phân huỷ thành O_2 và O. O nguyên tử có tác dụng diệt khuẩn.

Dưới tác dụng của tia lửa điện giữa 2 điện cực, oxy trong không khí tạo thành ozon. Nồng độ ozon ra khỏi thiết bị tạo ozon là 1 – 2% hỗn hợp khí và đưa vào nước để sát khuẩn. Ozon dễ hoà tan vào trong nước, liều diệt khuẩn là 2 – 15mg/l. Khi mới hoà vào nước, tác dụng diệt khuẩn chưa rõ ràng, khi đủ lượng, ozon diệt khuẩn trong 3 – 8 giây.

Phương pháp này tiện lợi, nhưng cần phải được trang bị thiết bị sinh ozon với tần số khá cao.

Ngoài hai phương pháp trên, người ta còn sử dụng ion bạc sát khuẩn nước. Dịch chứa ion này với nồng độ cực kỳ thấp cũng đã có khả năng sát khuẩn.

c) Khử khuẩn bằng tia cực tím (tử ngoại – ultraviolet)

Trong ánh nắng Mặt Trời có tia cực tím. Đèn thuỷ ngân – thạch anh áp lực cao và đèn thuỷ ngân – argon áp lực thấp sẽ sinh ra tia cực tím. Tia cực tím được phát ra từ các đèn được chiếu qua nước. Yêu cầu là nước phải trong và ít, hoặc không có các chất hữu cơ. Nhược điểm của tia cực tím là không xuyên qua được các vật rắn.

Với nước, diệt khuẩn bằng ozon và clo có chi phí cao, phần nhiều chi phí là do thiết bị.

2.1.4. Nước thải

Trong xí nghiệp công nghiệp lên men có 3 loại nước thải:

1) Nước ngưng tụ ở các đường ống hơi và nước làm lạnh thiết bị. Loại nước này tương đối sạch, ít ô nhiễm, có thể sử dụng lại hoặc thải ra các thuỷ vực. Khi tái sử

dụng, nước có lẫn các tạp chất rắn thì sẽ cho qua lắng. Khi thải ra thuỷ vực có thể làm nguội và thổi khí bão hoà trước khi thải.

2) Nước dùng làm vệ sinh thiết bị và nhà xưởng thường có lẫn các tạp chất khoáng – vô cơ và hữu cơ, ít hoặc không hoà tan, nói chung là nước bị nhiễm bẩn nhẹ. Nước này cũng có thể tái sử dụng nhưng phải để lắng. Trước khi lắng cần cho thêm chất phản ứng để quá trình lắng được nhanh hơn, tốt hơn (các chất thường dùng là vôi, sunphat sắt, sunphat nhôm).

3) Nước bị ô nhiễm tương đối nặng các tạp chất khoáng và các chất hữu cơ hoà tan. Nước này cần phải đưa qua trạm xử lý của xí nghiệp để giảm các chất hữu cơ có trong nước đến mức có thể nuôi cá mới được phép thải ra thuỷ vực.

2.2. NGUYÊN LIỆU TRONG SẢN XUẤT LÊN MEN

Nguyên liệu dùng cho sản xuất lên men, trước hết là các chất hữu cơ nguồn cacbon. Sau khi được xử lý, nguyên liệu sẽ làm cơ chất trực tiếp cho lên men.

– Các nguồn nguyên liệu lên men có những yêu cầu như sau:

1) Những vật liệu này có thể tái sản xuất hàng năm, đảm bảo số lượng cũng như dễ quy tập một khối lượng lớn đảm bảo cho sản xuất.

2) Đáp ứng được hàm lượng lớn hydratcacbon.

3) Có thể bảo quản được trong thời gian dài.

Với những yêu cầu như trên ta thấy các loại hạt ngũ cốc, bột sắn, bột khoai tây, các loại đường (chủ yếu là saccarozơ) và rỉ đường,... là có thể làm nguyên liệu lên men.

– Nguồn nguyên liệu cacbon này lại được chia thành:

+ Hàm lượng tinh bột cao: gạo, ngô, đại mạch, lúa mỳ, cao lương, sắn, khoai lang, khoai tây,...

+ Hàm lượng đường cao: các loại đường và rỉ đường.

Các nguyên liệu nêu ra trên đây đều có thể dùng cho lên men rượu; nho và các loại quả nhiều đường – lên men rượu vang; đại mạch nảy mầm – thóc malt là nguyên liệu cho sản xuất bia.

Nguyên liệu có ý nghĩa rất lớn đến sản xuất lên men. Nguyên liệu càng tốt, hàm lượng hydratcacbon cao, chất chiết nhiều, hiệu suất lên men cao và chất lượng sản phẩm tốt. Trong sản xuất lên men, các nguồn nguyên liệu chủ yếu cung cấp hydratcacbon (gluxit), trong đó có các hợp chất quan trọng là đường – bột và enzyme cho lên men rượu, men bánh mỳ, men thức ăn chăn nuôi, các axit hữu cơ, các chế phẩm enzyme, các axit amin và nhiều sản phẩm khác. Ngoài ra, người ta còn chú trọng đến các nguồn nguyên liệu chứa protein, trong sản xuất bia, rượu, sản xuất nước mắm, nước chấm, phomat,...

2.2.1. Gluxit

Hydratcacbon hay gluxit trong tự nhiên chia thành 3 nhóm: đường đơn (monosaccarit), oligosaccarit (gồm có đường đôi – disaccarit đến đường 10) và

polysaccarit. Polysaccarit là hợp chất gluxit có phân tử lớn, trùng hợp từ hexozơ hoặc pentozơ. Các hợp chất polysaccarit tiêu biểu là tinh bột, xenlulozơ và hemixenlulozơ. Song, đối với công nghiệp lên men thì đường đơn (glucozơ, fructozơ), đường đôi (saccarozơ, maltozơ) và tinh bột là có ý nghĩa hơn cả.

a) Monosaccarit là các đường đơn gồm có 6 nguyên tử cacbon trong phân tử là hexozơ và 5 cacbon – pentozơ.

– Tính chất chung của các monosaccarit như sau:

+ Có tính hoạt động quang học: Trong phân tử của các monosaccarit có một cacbon bất đối. Vì vậy, trong dung dịch, khi ánh sáng đi qua, làm quay mặt phẳng phân cực. Đặc tính này được áp dụng cho một số thiết bị quang học xác định hàm lượng đường có trong dung dịch. Như vậy, đường đơn có 2 đồng phân quang học: dạng D – (quay phải) và dạng L – (quay trái).

+ Dễ phân huỷ ở nhiệt độ cao (ở môi trường axit bị phân huỷ ít hơn ở môi trường kiềm). Sản phẩm phân huỷ do nhiệt từ hexozơ cho oxymetyl – furfurol, từ pentozơ là furfurol. Oxymety–furfurol dễ tạo thành axit formic và axit lovulinovic, một phần được trùng hợp tạo thành màu vàng gạch.

+ Có khả năng trùng hợp thành disaccarit, oligosaccarit và polysaccarit nhờ các mối liên kết 1,4 – glycozit và 1,6 – glycozit.

+ Cũng giống như aldehyt và xeton, đường đơn dễ bị oxy hoá nhờ khử đồng từ Cu^{2+} thành Cu^{+} và Ag^{+} thành Ag.

Nếu oxy hoá nhẹ thì chỉ có nhóm aldehyt của đường bị oxy hoá và tính chất này được dùng để xác định đường theo phương pháp Pheling, trong đó Cu^{2+} được khử thành Cu^{+}. Nhờ oxyt đồng tạo thành, sẽ tính ra hàm lượng đường.

+ Nhóm cacbonyl tự do trong monosaccarit dễ phản ứng với axit amin tạo thành melanoidin. Phản ứng này sinh ra màu nâu và hương vị. Phản ứng xảy ra nhanh ở nhiệt độ cao và môi trường kiềm.

– Khả năng sinh melanoidin được sắp xếp theo thứ tự: hexozơ; mannozơ, galactozơ, fructozơ, glucozơ; pentozơ, xylozơ và arabinozơ.

Trong thiên nhiên đường đơn khá phổ biến, song lên men rượu nhờ *Saccharomyces* chỉ có hexozơ, còn một số giống men như *Candide*, *Torula* thì có thể đồng hoá được cả hexozơ và pentozơ (các men này không hoặc ít lên men rượu, được dùng chủ yếu trong sản xuất nấm men chăn nuôi).

– Một số đại biểu của các loại đường đơn:

Như trên ta đã biết, các đường đơn có 2 đồng phân quang học: dạng D– và dạng L–. Hầu như tất cả đồng phân của monosaccarit trong tự nhiên đều thuộc dạng D–, còn dạng L– ít gặp.

• **D – Glucozơ** (dextrozo, đường nho) – $C_6H_{12}O_6$ có nhiều trong quả nho, vì vậy còn được gọi là đường nho (đường bồ đào). Đường này rất phổ biến trong thực vật như trong tinh bột, xenlulozơ, hemixenlulozơ, glycogen, deoxtrin, saccarozơ, maltozơ, rafinozơ.

Trong dung dịch quá bão hoà và nhiệt độ 0,5 – 50°C, glucozơ sẽ kết tinh ở dạng tấm ngậm nước $C_6H_{12}O_6.H_2O$; ở nhiệt độ 50 – 90°C, kết tinh ở dạng khan (anhydrite) – $C_6H_{12}O_6$.

Glucozơ dễ hoà tan trong nước, khó hoà tan trong cồn và không hoà tan trong ete.

• **D – fructozơ** (Levulozơ, đường quả) – $C_6H_{12}O_6$, D – fructozơ có nhiều ở các phần non của thực vật, trong mật hoa, trong trái cây và trong mật ong. Fructozơ có trong thành phần của saccarozơ, rafinozơ, inulin. Khả năng kết tinh của fructozơ kém glucozơ. Trong dung dịch nước, fructozơ được kết tinh ở dạng hình kim, có thành phần là $C_6H_{12}O_6.H_2O$, trong cồn – dạng hình lăng trụ thoi.

Fructozơ dễ hoà tan trong nước, trong cồn, cũng như trong hỗn hợp cồn–ete. Nói chung hoà tan của fructozơ dễ hơn là glucozơ.

Fructozơ là một xetozơ khác với glucozơ và các aldozơ khác là bị oxy hoá khó hơn. Trong môi trường kiềm, fructozơ không bị oxy hoá bởi iot, khi đó cùng điều kiện glucozơ bị oxy hoá. Sự khác nhau giữa glucozơ và fructozơ còn ở chỗ: fructozơ có tính chống chịu nhiệt và tác dụng kiềm, axit kém hơn glucozơ, nhưng độ ngọt lại gấp khoảng 2 lần so với glucozơ.

• **D – Galactozơ** có ở trong thực vật ở thành phần melibiozơ, rafinozơ, polysaccarit (hemixenlulozơ, chất gôm,...). Trong nước, đường này kết tinh ở dạng monohydrate (ngậm một nước) – $C_6H_{12}O_6.H_2O$

• **D – Mannozơ** có trong thực vật ở thành phần của hemixenlulozơ và chất gôm. Hoà tan tốt trong nước.

• **D – Xylozơ** ($C_5H_{10}O_5$) có trong thành phần của hemixenlulozơ, chất gôm và một lượng nhỏ dạng tự do trong thực vật. Xylozơ hoà tan trong nước, nhưng không hoà tan trong ete và đa số các môi trường hữu cơ khác. Kết tinh từ dung dịch nước có hình lăng trụ.

• **D – Arabinozơ** ($C_5H_{10}O_5$) khá phổ biến trong thực vật ở trong thành phần của hemixenlulozơ, chất gôm và chất pectin. Dễ kết tinh trong cồn ở dạng hình lăng trụ. Dễ hoà tan trong nước cho vị ngọt.

Các oligosaccarit

• **Tính chất chung:**

Các oligosaccarit dễ hoà tan trong nước, không hoà tan trong ete, cồn và đa số các dung môi hữu cơ. Rất không bền với axit: với một lượng thấp axit trong môi trường bình thường, các oligosaccarit cũng có thể bị thuỷ phân thành các monosaccarit. Với kiềm, các oligosaccarit lại tương đối bền hơn: trong môi trường kiềm, có một lượng oligosaccarit không bị phân huỷ thành monosaccarit.

Disaccarit được tạo thành bởi kết hợp 2 phân tử monosaccarit với liên kết glycozit giữa nhóm hydroxyl glycozit của monosaccarit này với nhóm hydroxyl glycozit của monosaccarit kia. Kết quả là tách ra một phân tử nước và một phân tử disaccarit. Nếu như disaccarit được tạo thành từ 2 monosaccarit với 2 nhóm hydroxyl glycozit như nhau của 2 phân tử thì tạo thành disaccarozơ không có tính

khử và cũng không khử được đồng trong nước pheling. Disaccarozơ loại này thuộc về saccarozơ. Nếu khi tạo thành disaccarit mà một trong 2 monosaccarit có nhóm hydroxyl glycozit khác nhau thì disaccarit có tính khử. Đường maltozơ, melibiozơ thuộc loại này.

Sau đây là một số đại diện của disaccarit:

• **Saccarozơ** ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

Saccarozơ rất phổ biến trong tự nhiên, đặc biệt nhiều trong mía và củ cải đường và ở các loại trái cây với số lượng không nhiều.

Saccarozơ là một loại đường đôi, có cấu tạo từ hai gốc glucozơ và fructozơ, dễ hoà tan trong nước, khi gia nhiệt thì độ hoà tan cũng tăng theo khá nhanh. Nó không hoà tan trong cồn tuyệt đối, nhưng trong dung dịch cồn–nước, độ hoà tan của nó tăng lên cùng với hàm lượng nước có trong dung dịch. Trong dung dịch đường – nước bão hoà, saccarozơ dễ kết tinh với tinh thể lớn. Dưới tác dụng của axit và enzyme saccaraza (β – fructofuranozidaza) saccarozơ bị thuỷ phân:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

Saccarozơ Glucozơ Fructozơ

Phản ứng thuỷ phân của saccarozơ được gọi là sự nghịch đảo của đường. Sản phẩm nghịch đảo của saccarozơ tạo ra 2 đường là glucozơ và fructozơ trong hỗn hợp bằng nhau về khối lượng và các đường này được gọi là đường nghịch đảo.

Saccarozơ không có nhóm hydroxyl glycozit tự do nên không có hiện tượng khử đảo chiều quay cực.

Sấy saccarozơ ở 100 – 105^{0}C không gây ra những biến đổi rõ rệt, nhưng gia nhiệt tới 150^{0}C hoặc cao hơn, saccarozơ sẽ bị caramen hoá. Quá trình caramen hoá xảy ra khá phức tạp, đường bị phân huỷ và tạo thành vị đắng và màu nâu (từ nâu nhạt đến nâu thẫm – đen).

• **Maltozơ** ($C_{12}H_{22}O_{11}$) – đường đôi, cấu tạo từ hai gốc glucozơ. Maltozơ được tạo thành từ tinh bột khi thuỷ phân bằng enzyme amylaza có trong hạt nảy mầm, vì vậy nó được gọi là đường mạch nha.

Maltozơ dễ hoà tan trong nước và có hiện tượng khử, đảo chiều quay cực. Nó khử đồng trong dung dịch Pheling. Dưới tác dụng của axit và enzyme α–glucozidaza, maltozơ bị thuỷ phân thành 2 glucozơ:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2C_6H_{12}O_6$$

Maltozơ Glucozơ

• **Melibiozơ** – đường đôi, cấu tạo từ glucozơ và galactozơ, có trong thành phần của trisaccarit rafinozơ. Rafinozơ có ở trong các tế bào thực vật và ở dạng tự do.

Melibiozơ cũng kết tinh với 2 phân tử nước, trong dung dịch có tính khử và đảo chiều quay cực. Dưới tác dụng của axit và enzyme α–galactozidaza (melibiaza), melibiozơ phân huỷ thành glucozơ và galactozơ:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

Melibiozơ Glucozơ Galactozơ

c) Trisaccarit

• **Rafinozơ** ($C_{18}H_{32}O_{16}$) thấy có ở trong nhiều loài thực vật, trong đó có rễ củ cải đường. Khi kết tinh, rafinozơ ngậm 5 phân tử nước với dạng hình kim dài hoặc hình lăng trụ. Không có tính khử. Khi đun nóng với axit, rafinozơ sẽ phân huỷ thành glucozơ, fructozơ và galactozơ. Dưới tác dụng của enzyme β–fructofaranozidaza phân ly rafinozơ thành fructozơ và melibiozơ; enzyme α–galactozidaza thành galactozơ và saccarozơ.

• **Kestozơ** ($C_{18}H_{32}O_{16}$) cấu tạo từ 1 glucozơ và 2 gốc fructozơ. Trong khi chế biến củ cải đường, kestozơ được chuyển thành saccarozơ nhờ quá trình vi sinh vật, số còn lại sẽ chuyển vào rỉ đường. Kestozơ không có tính khử và hoạt tính quang học.

Dưới tác dụng của axit và enzyme β–fructofaranozidaza, kestozơ phân huỷ thành glucozơ và fructozơ.

d) Polysaccarit

– Polysaccarit là hydratcacbon cao phân tử, được cấu tạo từ các gốc monosaccarit, chủ yếu là dạng pyran, ít hơn là dạng furan, được liên kết theo kiểu glycozit. Những gốc monosaccarit trong phân tử polysaccarit được sắp xếp thành chuỗi dài hoặc chuỗi phân nhánh. Phân tử lượng của polysaccarit có thể là vài nghìn đến hàng triệu.

Polysaccarit không màu, thường là vô định hình. Chúng được chia thành loại tan và loại không tan. Loại tan tạo thành dịch keo, loại không tan – trương nở. Đa số các dung môi hữu cơ không hoà tan polysaccarit.

Dưới tác dụng của axit và ở nhiệt độ cao, polysaccarit bị thuỷ phân. Sản phẩm thuỷ phân là các polysaccarit đã bị ngắn mạch (sản phẩm trung gian), các oligosaccarit và sản phẩm cuối cùng là monosaccarit.

– Một số hợp chất polysaccarit:

• **Tinh bột:** Tinh bột là hydratcacbon dự trữ phổ biến nhất ở thực vật (ngũ cốc, khoai, sắn,...), được tạo thành từ quang hợp của cây xanh. Tinh bột có vẻ ngoài là bột màu trắng. Khi dịch tinh bột có mặt iot cho màu xanh. Phản ứng này dùng xác định sự có mặt tinh bột với số lượng rất thấp.

Tinh bột là hợp chất keo của nước điển hình. Tinh bột cấu tạo từ 2 polyme: amylozơ và amylopectin. Hai hợp chất này được trùng hợp từ các gốc D–glucozơ. Amylozơ là polysaccarit mạch dài với các mối liên kết giữa các gốc glucozơ là α–1,4–glycopyranozơ.

Amylopectin có cấu tạo phân nhánh: điểm phân nhánh là mối liên kết α–1,6–glycozit, còn phần mạch nhánh các gốc glucozơ nối với nhau bằng α–1,4–glycozit.

Ngoài polysaccarit, tinh bột còn chứa các chất khoáng, các axit béo cao phân tử, chất béo, các chất chứa nitơ,.... Các chất khoáng ở đây chủ yếu là photpho ở dạng photphat với hàm lượng là 0,2 – 0,7%. Các axit béo của tinh bột là axit plamitic, axit stearic,... tới khoảng 0,6%.

Tinh bột (*amylozơ* và *amylopectin*) không hoà tan trong nước lạnh, trong cồn và ete. Amylozơ dễ hoà tan trong nước nóng và tạo thành dung dịch có độ nhớt

thấp. Amylopectin hoà tan trong nước khi đun nóng dưới áp lực tạo thành dung dịch rất dính.

Dung dịch amylozơ rất không bền và dễ kết lắng ở dạng kết tinh. Còn amylopectin thì ngược lại, rất bền trong dung dịch. Amylozơ với iot cho màu xanh, còn amylopectin cho màu xanh tím.

Trong nước ấm, tinh bột trương nở và biến thành gel (hệ keo hai pha rắn lỏng). Mức độ trương nở của tinh bột phụ thuộc vào nhiệt độ. Tinh bột ngô ở 55^0C hầu như không trương nở, ở 80^0C các hạt tinh bột trương nở và tăng kích thước lên 25 lần hoặc hơn, ở 120^0C cấu trúc hạt tinh bột bị phá vỡ hoàn toàn.

Dịch tinh bột với nước được gia nhiệt từ từ sẽ nhận được một dịch keo dính và được gọi là hồ tinh bột. Độ nhớt tăng lên xảy ra nhờ amylopectin. Chất này trương nở rất mạnh, nhưng không hoà tan, còn amylozơ hoà tan. Nhiệt độ làm cho hồ tinh bột có độ nhớt dính nhất định gọi là nhiệt độ hồ hoá. Nhiệt độ hồ hoá của các nguồn tinh bột là không giống nhau, chúng thường nằm ở một khoảng xác định. Nhiệt độ hồ hoá của tinh bột đại mạch là 60 – 80^0C, của ngô là 65 – 75^0C, bột mỳ 54 – 62^0C, khoai tây là 59 – 64^0C,...

Bổ sung muối trung tính hoặc kiềm vào dịch hồ làm hạ thấp nhiệt độ hồ hoá. Nhưng khi có đường, nhiệt độ hồ hoá lại tăng lên.

Khi gia nhiệt tới 110^0C, hồ tinh bột sẽ bắt đầu loãng và tới 120 – 130^0C thì loãng hoàn toàn.

Dưới tác dụng của axit và enzyme, tinh bột bị thuỷ phân. Sản phẩm thuỷ phân là đường. Quá trình thuỷ phân gọi là sự đường hoá.

Khi đun nóng với axit, tinh bột biến thành glucozơ.

Dưới tác dụng của enzyme có trong hạt nảy mầm (có α– và β–amylaza), tinh bột biến thành các dextrin và sản phẩm cuối cùng là đường maltozơ.

Thuỷ phân tinh bột bằng nấm mốc (*Aspergillus usami, A. awamori, A. niger*,...) có α–amylaza, γ–amylaza (glucoamylaza), sản phẩm thu được là đường glucozơ.

Trong quá trình đường hoá, các sản phẩm trung gian được tạo thành. Đó là các polysaccarit có phân tử lượng khác nhau được gọi là các dextrin. Ở giai đoạn đầu là dextrin có phân tử lượng, kích thước, tính chất không khác với tinh bột là mấy, với iot cho màu xanh tím. Sau đó, là các dextrin có phân tử nhỏ dần và màu với iot cũng thay đổi.

Có 4 dextrin khác nhau: Amylodextrin, Eritrodextrin, Akhroodextrin và Maltodextrin với sự khác nhau về màu với iot và độ hoà tan trong cồn (bảng 2.1).

Bảng 2.1. Độ hoà tan trong cồn và màu với iot của dextrin

Tên	Màu với iot	Hoà tan trong cồn
Amylodextrin	Xanh – tím	Hoà tan trong rượu 25%, kết tuả ở 40%
Eritrodextrin	Nâu – đỏ	Hoà tan trong rượu 55%, kết tuả ở 65%
Akhroodextrin	Không màu	Hoà tan trong cồn 70%
Maltodextrin	Không màu	Hoà tan trong cồn cao độ

• **Glycogen** $(C_6H_{10}O_5)_n$ là polysaccarit dạng hạt có trong tế bào ở tất cả các loài động vật, ở trong một số nấm men và vi khuẩn. Nó là polysaccarit phân nhánh, được cấu tạo từ các gốc D – glucozơ. Nhìn bề ngoài đây là những hạt bột vô định hình, hoà tan trong nước tạo thành dung dịch màu trắng đục, bắt màu với iot cho màu nâu tối hoặc nâu đỏ. Khi đun với axit, glycogen chuyển thành glucozơ.

Glycogen có cấu tạo giống với tinh bột. Vì vậy, nó còn được gọi là tinh bột động vật. Trong tế bào, nó đóng vai trò nguyên liệu dự trữ; khi trong môi trường hết cơ chất dinh dưỡng, nó được sử dụng như nguồn dinh dưỡng cacbon.

• **Inlunin** $(C_6H_{10}O_5)_n$ có trong củ cây cúc vu (cây lê đất), trong dễ cây diếp xoăn và một số cây khác. Inlunin là một polysaccarit được cấu tạo từ các gốc D – fructozơ (35 gốc). Vẻ ngoài inlunin là những hạt tinh thể không màu hoặc bột màu trắng. Nó không hoà tan trong nước lạnh, nhưng hoà tan trong nước nóng. Khi đun với nước hoặc axit hữu cơ, nó dễ bị thuỷ phân thành fructozơ.

• **Xenlulozơ** $(C_6H_{10}O_5)_n$ là thành phần tế bào thực vật. Trong gỗ có khoảng 40 – 50% xenlulozơ vật chất khô.

Xenlulozơ là polysaccarit hình sợi dài, được trùng hợp từ các gốc D – glucozơ với số lượng vượt quá 100, tương ứng với phân tử lượng là 15.000. Trong nước lạnh, nó không hoà tan mà chỉ trương phồng lên. Khi đun sôi với axit sunphuric hoặc clohydric ta thu được glucozơ. Xenlulozơ cũng bị thuỷ phân bởi enzyme xenlulaza do vi sinh vật tiết ra và sản phẩm là xenbiozơ.

• **Hemixenlulozơ** là thành phần trong thành tế bào thực vật. Nó có nhiều trong rơm rạ, trong gỗ, lõi ngô, trong trấu, cám. Hemixenlulozơ có hàm lượng đáng kể trong các hạt ngũ cốc. Nó là tập hợp polysaccarit và có thể bị chiết tách bằng dung dịch kiềm. Nó không hoà tan trong nước. Trong thành phần của hợp chất này có đường 6 và 5 cacbon, dễ bị thuỷ phân hơn xenlulozơ. Sản phẩm thuỷ phân là pentozơ (arabiozơ và xylozơ) và hexozơ (mannozơ và galactozơ).

Trong thiên nhiên, các vi sinh vật nào có xenlulaza đồng thời có hemixenlulaza. Thuỷ phân các mẩu thực vật thường cho ta một hỗn hợp, được gọi là mùn (tập hợp các chất dinh dưỡng dự trữ cho cây trồng).

• **Những proteit** phụ thuộc vào thành phần hoá học của nhóm phụ phi protein được chia thành lipoproteit, glucoproteit, chromoproteit và nucleoproteit. Những proteit này trong sản xuất lên men ít được quan tâm.

Các protein, chủ yếu là protein đơn giản, dễ bị thuỷ phân bằng axit, bằng kiềm và enzyme. Quá trình thuỷ phân sơ giản là như sau:

Protein → polypeptit → oligopeptit → axit amin

Các enzyme phân giải protein được gọi là proteaza hay enzyme protelytic có trong hạt ngũ cốc nảy mầm và có nhiều trong các vi sinh vật. Các vi sinh vật dị dưỡng hoại sinh có khả năng sinh tổng hợp proteaza và tiết ra ngoài tế bào phân huỷ các chất cảm ứng có chứa protein để dùng làm nguồn thức ăn nitơ và làm nguồn chất sinh trưởng (những bazơ kiềm, những nucleotit, nucleozit khi thuỷ phân axit nucleic).

Sản phẩm thuỷ phân là các axit amin. Dùng axit sunphuric hoặc clohydric thuỷ phân ta được dịch hỗn hợp axit amin thường dùng làm nước chấm với tên gọi là magi. Trong quá trình này, các axit amin bị phá huỷ một phần, đặc biệt là tryptophan bị phá huỷ nhiều nhất, nếu tác nhân thuỷ phân là kiềm thì arginin bị phá huỷ.

Thuỷ phân protein bằng enzyme ta được hỗn hợp axit amin, song trong sản phẩm còn lẫn cả polypeptit và oligopeptit. Nếu sản phẩm có ít axit amin, nhiều sản phẩm trung gian (polypeptit, oligopeptit) ta được một chế phẩm được gọi là pepton.

Quá trình thuỷ phân này được áp dụng sản xuất nước chấm (xì dầu hoặc bây giờ có hãng gọi là "nước tương").

2.2.2. Các nguồn nguyên liệu tinh bột trong tự nhiên có nguồn N từ protein

Trong tự nhiên, các nguồn chứa tinh bột làm nguyên liệu cho sản xuất lên men chủ yếu là các hạt ngũ cốc (gạo tẻ, gạo nếp, cao lương, đại mạch, hạt mỳ, ngô,...) và các loại củ (khoai tây, sắn), chứa đường (rỉ đường mía và rỉ đường củ cải). Các nguồn nguyên liệu này ngoài tinh bột còn có protein, lipit, vitamin và các chất khoáng.

Thành phần hoá học của các nguồn nguyên liệu lên men được giới thiệu ở bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần hoá học của các nguồn nguyên liệu tinh bột

Tên nguyên liệu	Nước (%)	Gluxit (%)	Protein (%)	Lipit (%)	Chất khoáng		Vitamin	Xenlulozơ (%)	Năng lượng (kcal)
					(%)	Nguyên tố			
Gạo tẻ	13 – 14	70 – 80	7 – 8	1 – 2,5	0,3 – 0,8	P, Ca, Fe	B_1, B_2, D, E, PP	0,1 – 0,3	353
Bột mỳ	13 – 14	72,9	11	1,1	0,5 – 1,7	P, Ca, Fe	B_1, B_2, B_6, E, PP	0,1 – 0,7	354
Ngô	13 – 23	60 – 68	8 – 10	4 – 7	1,5 – 2,0	P, Ca, Fe	B_1, B_2, F, E, PP, Caroten	1,5 – 5,0	363
Khoai lang	68	28,5	0.8	0,2	1,2	P, Ca, Fe	B_1, B_2, C, PP, Caroten	1,3	122
Sắn	62	32,9	0.43	0,24	0,8	P, K, Ca, Fe	B_1	1,5	156
Khoai tây	67 – 83	16,5 – 28	0,7 – 2,0	0,1	0,8 – 0,9	P, Ca, K, Fe	B_1, B_2, C, PP, Caroten	0,7 – 1	92
Đại mạch (nguyên hạt)	15	65 – 70	9 – 12	2,0	2 – 3,5	P, Ca, K, Fe	B_1, B_2, B_6, E, PP	6,0	–

Lúa gạo là nguồn lương thực chính của nửa số dân trên thế giới. Lúa gạo cũng là nguồn nguyên liệu quan trọng trong sản xuất rượu – cồn. Trong gạo có 3 hợp chất đáng chú ý là tinh bột, protein và vitamin B_1. Tinh bột gạo dễ dàng đồng hoá trong cơ thể. Nó gồm hai cấu tử như các nguồn tinh bột khác: amylozơ và amylopectin. Hàm lượng hai cấu tử này quyết định tính dẻo của gạo. Amylozơ trong gạo nếp ít (2%), trong gạo tẻ nhiều hơn (9 – 11%). Gạo càng nhiều amylopectin càng dẻo. Gạo nếp nấu rượu cho chất lượng sản phẩm cao: hiệu suất lên men cao, ít tạp chất, vị ngọt, đặc biệt và hương thơm.

Protein của lúa gạo có giá trị dinh dưỡng cao nhất so với tất cả các loại protein của các loại ngũ cốc khác. Độ đồng hoá của protein của gạo đạt tới 98%. Hàm lượng protein của gạo không cao, vì vậy thích hợp cho lên men rượu.

Vitamin B_1 tập trung ở lớp vỏ gạo, chủ yếu ở lớp cám. Do vậy, nấu rượu nên dùng gạo lật, không nên dùng gạo sát quá kỹ. Với gạo lật, hoặc cám gạo, cám mỳ dùng nuôi nấm mốc hoặc lên men xạ khuẩn là rất thích hợp. Khi lên men, vitamin B_1 có ở lớp cám giúp cho nấm men sinh trưởng thuận lợi và hoạt tính hệ enzyme zimaza sẽ có thể được nâng cao.

• **Ngô** có khoảng 60% là tinh bột. Ở ngô già gluxit chủ yếu là tinh bột, ở ngô non thì gluxit lại là các loại đường. Có 2 loại: ngô tẻ và ngô nếp. Hiện nay giống ngô lai đang được trồng ở nhiều nơi. Ngô là thức ăn chủ yếu của đồng bào ở vùng cao núi đá và thức ăn chăn nuôi ở nhiều nước có ngành nuôi lợn, gia cầm phát triển.

Ngô cũng là nguồn nguyên liệu quan trọng cho công nghiệp lên men. Ngô được bảo quản ở dạng hạt. Hạt ngô có phôi khá lớn chứa nhiều chất béo, trong đó có vitamin E. Ngô trước khi chế biến để xay thành bột, người ta thường ngâm nước với một lượng SO_2 thích hợp để chống thối. Nước ngâm ngô được cô đặc thành dạng cao. Cao ngô có nhiều chất sinh trưởng, trong đó có protein, axit amin, vitamin và các chất khoáng. Cao ngô được dùng bổ sung vào các môi trường nuôi cấy vi sinh vật, cho hiệu quả khá tốt.

Protein trong ngô đa số ở khoảng 8,5 – 10% (có giống ngô lai tới 14%) và trong đó zein chiếm phần lớn trong protein của ngô. Protein của ngô hầu như không có lizin và tryptophan (hai axit amin không thể thay thế). Vì thế, giá trị sinh học của ngô kém hơn gạo.

Chất béo trong ngô tới 4 – 7% chất khô, phần lớn tập trung ở phôi. Ngô nghèo canxi, nhiều photpho (80% photpho ở dạng axit phytic) phân phối đều toàn hạt, còn ở lúa mỳ, axit này chỉ tập trung ở lớp ngoài.

Vitamin của ngô tập trung ở lớp vỏ ngoài và trong phôi. Ngô tương đối giàu vitamin B_1, chủ yếu tập trung ở phôi cùng với vitamin E. Ngô vàng giàu carotene (0,04mg%), còn vitamin PP thì rất ít.

Chế biến ngô nên sử dụng công nghệ tổng hợp: tách phôi chế dầu ngô giàu vitamin E, ngâm ngô thu dịch để làm cao ngô, rồi xay bột làm nguyên liệu lên men và thức ăn chăn nuôi.

• **Bột ngô**

Có khoảng 67 – 80% tinh bột và khoảng 10% là các gluxit khác, trong đó có xenlulozơ, pentozan, dextrin và các gluxit hoà tan. Protein trong bột ngô cũng chừng 12% gồm 30% là glutein và 50% là zein. Chất tro khoảng 0,92%, trong đó có 45% là anhydrit axit photphoric, 30% là kali oxyt, 15% là magie oxyt.

Bột ngô cần có độ ẩm nhỏ hơn 15%. Tuỳ từng yêu cầu công nghệ, ngô được xay nghiền có độ mịn khác nhau (bột mịn hay ngô mảnh).

• **Cao ngô** là loại dịch đặc có màu nâu thẫm. Thành phần hoá học chung của ngô đem ngâm trước khi đem xay nghiền (%):

Nước	30 – 60
Tổng N	2,7 – 4,5
Đường khử	0,1 – 11,0
Axit lactic	5,0 – 11,5
Axit bay hơi	0,1 – 0,5
N–amin	1,0 – 2,0
Chất tro	8,0 – 10,0
(trong đó có P, K, Cu, Fe, Mn, S, Zn, Ca)	

Trong thời gian ngâm xảy ra hiện tượng thuỷ phân một phần protein của ngô. Nước ngâm ngô có nhiều các axit amin được chiết ra từ ngô hoặc do thuỷ phân protein rồi hoà tan vào nước. Thông thường quá trình ngâm cũng xảy ra lên men lactic do các vi khuẩn lactic lẫn vào và axit lactic có thể tới 11,5%.

Số lượng chất tro của cao ngô không được vượt quá 24% so với chất khô. Trong tro có nhiều P, K và Mg.

Cao ngô được sử dụng như là nguồn N nguyên liệu hữu cơ và cũng là nguồn chất sinh trưởng, vì trong cao ngô rất giàu vitamin nhóm B, đặc biệt là biotin (150 – 200μg/100g) và những chất kích thích sinh học khác nữa.

Trong công nghệ lên men, người ta còn dùng các nguồn các chất kích thích sinh trưởng, như cao nấm men, dịch chiết mầm lúa hay hạt đậu (giá đỗ), dịch chiết khoai tây, nước chiết cám,...

• **Đại mạch và cao lương**

Hai loại hạt này có kích thước lớn hơn gạo và hạt mỳ, song vỏ trấu khá dày. Hàm lượng tinh bột cũng khá cao, nếu chế biến làm lương thực và thức ăn chăn nuôi sẽ mất nhiều công sức. Các hạt này đem cho gia cầm ăn trực tiếp cũng khó, vì vỏ trấu vừa dày và nhiều lông, gà ăn rất ngán. Do vậy, hạt đại mạch và cao lương dùng để sản xuất rượu đều tốt. Đại mạch nảy mầm rồi cho đường hoá, lên men rượu. Rượu đại mạch được ủ vào trong các thùng gỗ sồi cho ta các loại rượu uytki màu sắc đẹp và thơm ngon. Ngoài ra, đại mạch là nguyên liệu chính để sản xuất bia – một thứ đồ uống giải khát toàn cầu.

Đại mạch làm nguyên liệu bia có những yêu cầu riêng, đặc biệt là không cần loại đại mạch có hàm lượng protein cao, tuy rằng protein ảnh hưởng rất nhiều tới chất lượng bia. Sang chương "Sản xuất bia" chúng ta quay lại vấn đề này.

• **Khoai, sắn**

Các loại khoai (khoai tây, khoai lang) chứa nhiều nước, nghèo protein và chất khoáng. Ở nước ta không sản xuất rượu từ khoai tây, khoai lang. Ở các nước châu Âu và châu Mỹ, người ta dùng khoai tây làm nguyên liệu nấu rượu. Sản phẩm là rượu Vodka, đặc biệt là rượu Vodka Nga khá nổi tiếng.

Sắn chứa nhiều tinh bột, nhưng nghèo protein, trong đó lại ít lizin, tryptophan và đặc biệt là các axit amin không thể thay thế. Trong sắn củ còn có độc tính do hai glucozit rất độc, có vị đắng.

Bảo quản sắn củ tương đối khó, vì nó bị chảy nhựa sau thu hoạch.

Sắn được chế biến thành sắn lát phơi khô hoặc nghiền thành bột. Hai loại này đều có thể dùng làm nguyên liệu trong công nghệ vi sinh vật. Trước khi lên men sắn lát hoặc sắn bột được cho thuỷ phân bằng axit hoặc bằng enzyme, thu được dịch đường glucozơ, làm cơ chất lên men và nuôi cấy vi sinh vật.

Độc tố có trong sắn có tên chung phazeolunarin (cyanogen), gồm 2 glucozit là linamarin và lotausralin, trong phân tử của 2 chất này có nhóm – CN. Hàm lượng chung của phazeolunarin vào khoảng 0,001 – 0,04mg%, tập trung chủ yếu ở vỏ cùi. Bình thường chất này không độc, nhưng khi bị thuỷ phân, các glucozit giải phóng ra HCN.

Để tránh bị ngộ độc, trước khi luộc sắn cần ngâm và bóc vỏ cùi. Sắn tươi thái thành lát và phơi khô sẽ giảm đáng kể hàm lượng glucozit gây độc. Trong sản xuất rượu, nguyên liệu sắn được nấu ở nhiệt độ cao với lượng nước lớn làm loãng các chất độc vì khi lên men xong, chưng cất rượu, các muối xyanat không bay theo hơi nước và rượu.

Nấu rượu từ sắn được chưng cất ở các tháp cất công nghiệp cho chất lượng cao, nhưng cất theo phương pháp thủ công chất lượng rượu thua xa rượu gạo, đặc biệt là rượu nấu từ gạo nếp.

2.2.3. Các nguyên liệu chứa đường

Các nguyên liệu chứa đường chủ yếu là các loại rỉ đường – loại sản phẩm phụ của công nghiệp đường. Đó là loại dịch đường sau khi tách, kết tinh lần thứ hai. Có hai loại rỉ đường: rỉ đường mía và rỉ đường củ cải, có thể kể thêm là dịch hydrol – mật rỉ của công nghiệp đường glucozơ.

• **Rỉ đường** là loại dịch đường không thể kết tinh thêm nữa, có màu nâu thẫm, tỷ trọng 1,35 – 1,4. Rỉ đường có tới 61 – 86% là chất khô, trong đó có 40 – 55% là saccarozơ. Ngoài ra còn có 0,5 – 2% đường khử và 0,5 – 2,5 rafinozơ.

Trong rỉ đường mía rất ít photpho và các hợp chất chứa N kém rỉ đường củ cải, nhưng hàm lượng biotin ở rỉ đường mía cao hơn rất nhiều. Sau đây là hàm lượng các chất sinh trưởng ở trong 2 loại rỉ đường (mg/T) – bảng 2.3.

Bảng 3.3. Hàm lượng các chất sinh trưởng

Chất sinh trưởng	Trong rỉ đường củ cải	Trong rỉ đường mía
Biotin	40 – 130	2.700 – 32.000
Vitamin B_3 (axit pantotenic)	50.000 – 110.000	50.000 – 60.000
Inozit	5.700.000 – 8.000.000	6.000.000

Hàm lượng các hợp chất chứa N ở rỉ đường củ cải phong phú hơn ở rỉ đường mía. Trong rỉ đường củ cải có tới 1,1 – 1,5% N, trong đó có khoảng 1/3 là betain, có mặt nhiều axit amin, như axit aspartic, axit glutamic, loxin, izoloxin, tirozin và cũng như các vitamin nhóm B (B_1, biotin, B_2, B_3, B_5, inozit). Trong số này, biotin có một vai trò quan trọng đối với sinh trưởng của vi sinh vật.

Rỉ đường thường được bảo quản ở các bồn chứa tới hàng năm làm nguyên liệu cho sản xuất lên men. Trong thời gian bảo quản, nhiều loài vi sinh vật rơi vào rỉ đường, song chúng khó phát triển, vì nồng độ đường cao, nhưng rỉ đường bị nước mưa vào pha loãng thì vi sinh vật có thể phát triển làm tổn hao rỉ đường và làm ảnh hưởng tới chất lượng sản phẩm lên men.

Rỉ đường dùng cho lên men cần phải được xử lý bằng axit, làm giảm pH tới 1,5 – 2,5, gia nhiệt, rồi trung hoà, loại bỏ cặn bẩn.

• **Hydrol:** Loại mật rỉ của đường glucozơ. Đây cũng là một loại dịch đường màu nâu thẫm, có tới 50% đường. Trong số này đường khử là 70%. Hàm lượng tro của hydrol không quá 7% và pH bằng 4.

Trong trường hợp glucozơ được sản xuất từ tinh bột với phương pháp thuỷ phân bằng axit clohydric (HCl), hydrol thường chứa muối ăn (NaCl). Dùng hydrol này làm nguyên liệu pha môi trường nuôi cấy vi sinh vật cần chú ý đến nồng độ NaCl. Thông thường nồng độ NaCl > 5% có tính ức chế đến sinh trưởng của chủng nuôi cấy.

2.2.4. Nguồn nguyên liệu giàu protein trong tự nhiên

Trong sản xuất lên men, ngoài các hợp chất chủ yếu, hợp chất protein cũng đóng một vai trò khá quan trọng trong các quá trình nuôi cấy vi sinh vật.

Các hợp chất protein và các sản phẩm thuỷ phân của chúng là nguồn dinh dưỡng nitơ hữu cơ cho các vi sinh vật, làm cơ chất tạo thành các sản phẩm phụ, tạo ra các chất màu, chất thơm và nếu quá giới hạn, các sản phẩm phụ còn tạo ra chất độc cho sản phẩm chính. Trong lên men rượu, các axit amin tham gia tạo thành các loại rượu khác với etanol. Các rượu này tạo ra một hỗn hợp dầu có mùi khét và thường gọi là fusel. Trong chưng cất rượu, người ta phải loại bỏ rượu đầu, vì chứa nhiều dầu fusel, nhưng với nồng độ nhỏ, các loại rượu bậc cao sẽ kết hợp với các axit hữu cơ trong thời gian tàng trữ sẽ tạo ra các este có hương thơm, làm tăng chất lượng cho sản phẩm. Trong sản xuất bia, hợp chất protein đóng vai trò khá quan trọng như tạo màu, hương thơm, tạo và giữ bọt. Trong sản xuất các loại nước chấm (magi, xì dầu, tương, nước mắm,...) protein là nguồn nguyên liệu để tạo ra các axit amin trong sản phẩm.

Protein là hợp chất cao phân tử có phân tử lượng và kích thước rất lớn. Thành phần của protein có cacbon, hydro, oxy, nitơ và hầu như thường xuyên có lưu huỳnh, một số protein có photpho. Tất cả các protein chia ra làm hai nhóm:

– Protein đơn giản, được cấu tạo từ các gốc axit amin nối với nhau bằng mối liên kết peptit (–NH–CO–);

– Proteit là những protein phức tạp, gồm có protein đơn giản kết hợp với các chất phi protein tự nhiên.

Theo tính tan trong các dung môi có albumin, globulin, prolamin và glutamin. Albumin tan trong nước; globulin không tan trong nước, nhưng tan trong các dung dịch muối (đơn giản là dịch NaCl); prolamin không tan trong nước và trong các dung dịch muối, nhưng lại tan ở trong cồn 60 – 80^0. Nó có ở trong các hạt giống họ Hoà thảo. Các prolamin đã biết rõ như sau: glyadin có trong hạt giống lúa mỳ và

mỳ đen; gordein trong hạt giống đại mạch; zein trong hạt giống ngô; avein trong hạt giống yến mạch.

Glutelin là protein chỉ hoà tan trong dung dịch kiềm. Trong tự nhiên, protein này có trong hạt mỳ, ngô và gạo (trong lúa gạo nó được gọi là orizenin).

• **Bột đậu tương.** Được dùng với hai tư cách là nguồn tinh bột và nguồn protein. Có hai loại bột đậu tương: loại bột xay nghiền từ hạt đậu và loại xay nghiền từ khô đậu tương (loại đậu đã gia công nhiệt và ép dầu). Dầu đậu tương là loại chất béo có chất lượng cao dùng trong bữa ăn. Như vậy, sử dụng bột khô đậu tương kinh tế hơn. Điều đáng chú ý là đậu tương sống có chứa chất antitripxin làm vô hoạt các enzyme tiêu hoá. Vì vậy, nếu cho bột đậu tương sống vào khẩu phần thức ăn, vật nuôi không thể tiêu hoá được.

Độ ẩm của bột đậu tương ở 9 – 10%. Vật chất quý của hạt (hoặc bột) đậu tương là chất protein, trong đó chính là glyxinin. Protein đậu tương có nhiều axit glutamic (tới 20%). Hàm lượng gluxit trong đậu tương không quá 25%, tro là 4,5 – 6,5%. Trong bột đậu tương có nhiều lexitin, dùng để xác định tính chất tạo nhũ tương, cùng với nhiều vitamin nhóm B.

• **Bột lạc.** Tương tự như khô đậu tương, trên thị trường còn phổ biến là khô lạc. Trong lạc có thành phần protein, gluxit, chất béo gần giống với khô đậu tương, song hàm lượng dầu ăn có vẻ nhiều hơn ở lạc.

Bột lạc có thể xay nghiền hạt lạc nguyên hoặc từ khô lạc (sau khi đã ép dầu).

Bột khô dầu (đậu tương và lạc) là hai nguyên liệu chính dùng để sản xuất nước chấm.

Ngoài hai loại khô đậu tương, khô lạc người ta còn dùng các loại khô dầu hạt bông, khô hạt hướng dương làm nguyên liệu giàu protein để sản xuất các dịch thuỷ phân giàu axit amin. Protein của cá làm giàu protein cho nước mắm. Sừng, lông, móng gia súc thuỷ phân bằng axit cũng thu được nước chấm.

Các phương pháp sản xuất dịch thuỷ phân protein là phương pháp hoá giải thuỷ phân bằng axit sunphuric hoặc clohydric và phương pháp thuỷ phân bằng enzyme từ vi sinh vật. Phương pháp hoá giải sẽ phá huỷ vài axit amin cho sản phẩm là 3MCPD (3–monoclopropan–1,2–diol), chất này có thể gây ung thư.

Ngoài những hợp chất hữu cơ làm nguyên liệu cho công nghiệp lên men (các nguồn C và N hữu cơ) còn có các nguồn vô cơ như các muối amon, chủ yếu là muối sunphat, photphat, các muối khoáng đa dụng, vi lượng,... và ure với tư cách là nguồn nitơ, tác nhân trung hoà khi môi trường bị axit hoá cần đưa về trung tính hoặc kiềm nhẹ, cùng với các loại dầu làm chất phá bọt,...

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 2

1. Yêu cầu về nước trong công nghệ lên men và những phương pháp làm mềm nước cứng.
2. Hãy nêu những đặc điểm chủ yếu của các nguyên liệu trong công nghệ lên men.
3. Tại sao phải khử khuẩn nước, kể cả sản phẩm và môi trường nuôi cấy VSV? Các phương pháp khử khuẩn, biện pháp nào thường dùng trong công nghệ lên men.

Chương 3

ENZYME VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Enzyme hay ferment (còn gọi là men) là những chất xúc tác sinh học có bản chất là những protein tự nhiên do các tế bào sống sản sinh ra, nhưng hoạt động của enzyme lại không phụ thuộc vào tế bào.

Chữ "ferment" bắt nguồn từ chữ Latin fermentum – có nghĩa là "sủi bọt" – lên men, còn "enzyme" bắt nguồn từ chữ Hy Lạp cổ "En zyme" có nghĩa là trong con men (nấm men). Ý nghĩa của enzyme đối với cơ thể sống là vô cùng lớn. Nó tham gia vào những quá trình trao đổi chất giữa cơ thể và môi trường xung quanh. Các quá trình lên men quan trọng đều xảy ra dưới tác dụng của enzyme.

Ngày nay, người ta đã biết tới hàng ngàn các enzyme khác nhau và làm tinh sạch tới vài trăm enzyme. Các enzyme được chia thành enzyme một cấu tử và enzyme hai cấu tử. Enzyme một cấu tử là những protein đơn giản. Enzyme hai cấu tử gồm có một phần là protein và một phần không phải là protein (phần này được gọi là nhóm phụ). Phần protein của phân tử enzyme gọi là feron, nhóm ngoại – agon hoặc coenzyme (coferment). Đa số các enzyme là đơn cấu tử. Trong các enzyme này, nhóm hoạt động được xác định bởi các phân nhóm hoá học có trong phân tử protein. Những phân nhóm này đóng vai trò trung tâm hoạt động của enzyme. Trung tâm hoạt động của enzyme là phần phân tử protein kết nối với cơ chất và từ đó cơ chất sẽ phụ thuộc vào tác dụng xúc tác của enzyme. Nếu trung tâm hoạt động của enzyme bị phá vỡ thì các phần khác của enzyme cũng có thể bị phân huỷ và hoạt lực của enzyme bị giảm sút hoặc mất hoạt tính.

Các enzyme hai cấu tử, thường là các enzyme oxy hoá – khử, có thành phần nhóm ngoại là vitamin B_2; các enzyme chuyển hoá axit amin – vitamin B_6; trong thành phần nhóm ngoại của một enzyme oxy hoá có chứa phân nhóm nguyên tử oxy.

3.1. PHÂN LOẠI ENZYME

Dựa theo tính chất của enzyme người ta chia thành:

3.1.1. Enzyme oxy hoá – khử. Những enzyme này có tác dụng chuyển H^+ hoặc điện tử trong các phản ứng oxy hoá – khử, thường xảy ra trong quá trình hô hấp và lên men.

3.1.2. Tranferaza (enzyme chuyển nhóm). Enzyme có tác dụng chuyển cả nhóm axit amin, amin hoặc metyl cũng như các gốc monosaccarit từ hợp chất này chuyển sang hợp chất kia.

3.1.3. Hydrolaza (enzyme thuỷ phân). Enzyme có tác dụng phân cắt các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản và các phản ứng này có nước tham gia.

3.1.4. Lyaza (enzyme phân huỷ). Enzyme xúc tác các phản ứng phân huỷ các hợp chất phức tạp thành đơn giản, nhưng không có nước tham gia.

3.1.5. Izomenaza (enzyme đồng phân hoá). Enzyme có tác dụng biến một hợp chất hữu cơ thành đồng phân.

3.1.6. Ligaza (enzyme tổng hợp). Enzyme xúc tác liên kết giữa hai phân tử với nhau, kèm theo sự phá huỷ các mối liên kết trong chất hữu cơ phức tạp – nucleozittriphotphat, chất này có ý nghĩa lớn trong trao đổi chất của tế bào sống.

3.2. TÍNH CHẤT CỦA ENZYME

3.2.1. Tác dụng thuận nghịch của enzyme

Enzyme có thể làm gia tăng phản ứng theo chiều thuận cũng như chiều ngược lại. Điều này có nghĩa là, enzyme có tác dụng phân huỷ các hợp chất xác định nào đó, ở các điều kiện xác định khác nó lại có tác dụng tổng hợp. Một số phản ứng tổng hợp đã chứng minh được tác dụng thuận nghịch của enzyme, song trong những công trình nghiên cứu gần đây thấy rằng, ở đa số trường hợp, tổng hợp bằng enzyme các chất phức tạp và ngay cả những chất đơn giản trong tế bào không phải là enzyme phân huỷ trước đó. Ví dụ: nếu thuỷ phân mối glycozit của saccarozơ phải nhờ enzyme mantaza (α–glucozidaza) hoặc saccaraza (β–fructofuranozidaza) xúc tác, ngược lại, tổng hợp các hợp chất này lại xảy ra dưới tác dụng của enzyme glucozyltransferaza. Điều này không có nghĩa là, hàng loạt trường hợp tổng hợp chất này hoặc chất kia trong tế bào không phải là kết quả tác dụng thuận nghịch của enzyme.

3.2.2. Tính đặc hiệu của enzyme

Mỗi một enzyme có tính đặc hiệu riêng biệt: nó chỉ tác dụng đến một chất hoàn toàn xác định hoặc trên một mối liên kết hoá học nhất định trong phân tử. Ví dụ: enzyme saccaraza phân cắt saccarozơ và không tác dụng đến các disaccarit khác (maltozơ, lactozơ).

3.2.3. Hoạt lực xúc tác của enzyme

Ở đây, chúng ta cần thống nhất với nhau về vài thuật ngữ:

Tính xúc tác của enzyme được gọi là *hoạt tính enzyme*, khả năng xúc tác – hoạt lực của enzyme hay hoạt độ là số đo (theo một đơn vị nào đó) của hoạt lực enzyme.

Hoạt lực của enzyme vượt trội rất nhiều so với các chất xúc tác vô cơ. Peroxythydro (H_2O_2) bị phân huỷ dưới tác dụng xúc tác của ion sắt: 1ml ở điều kiện 0°C trong một giây phân ly được 10^{-5} mol H_2O_2 thành H_2O và 1/2 O_2. Cũng ở điều kiện này, 1 mol sắt trong thành phần enzyme catalaza phân huỷ được 10^5 mol H_2O_2. Như vậy, 1 mol sắt trong catalaza có hoạt lực gấp gần 1 tỷ lần so với 1 mol sắt vô cơ.

3.3. NHỮNG YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI HOẠT LỰC CỦA ENZYME

3.3.1. Nhiệt độ

Thông thường nhiệt độ tăng, tốc độ phản ứng hoá học cũng tăng theo. Các phản ứng hoá sinh dưới tác dụng xúc tác cũng vậy, song tốc độ phản ứng sẽ không tăng mãi theo nhiệt độ, nó chỉ tăng đến nhiệt độ nào đó thì dừng lại với điểm max (cực đại) và sau đó giảm tốc độ phản ứng, và cũng có nghĩa là enzyme giảm hoạt lực. Nhiệt độ mà ở đó hoạt lực enzyme cao nhất (max), được gọi là nhiệt độ tối thích. Đa số các enzyme từ nguồn thực vật có nhiệt độ tối thích ở khoảng 40 – 60°C. Nhiệt độ cao hơn nữa (70 – 80°C), các enzyme này sẽ giảm hoạt lực và hiện tượng này không thuận nghịch, được gọi là bất hoạt enzyme bằng nhiệt, hoặc sự ức chế nhiệt độ của enzyme. Sự ức chế này là do nhiệt độ cao làm biến tính protein. Song, có một số enzyme vẫn giữ được hoạt lực ở nhiệt độ cao tới 100°C và được gọi là các enzyme ưa nhiệt hoặc chịu nhiệt.

Nhiệt độ tối thích của enzyme không phải là hằng số cố định mà phụ thuộc vào nhiều điều kiện, trong đó có thời gian tác dụng của enzyme. Cần lưu ý rằng, các enzyme rất nhạy cảm khi dun nóng với điều kiện nhiều nước. Ngược lại, ở độ ẩm thấp hoặc trong trạng thái khô, enzyme ít nhạy cảm khi gia nhiệt, ngay ở gần 100°C có khi không bị ức chế hoặc bất hoạt do nhiệt. Điều này được cân nhắc kỹ trong các quá trình công nghệ sản xuất lên men.

Đường hoá tinh bột bằng hệ enzyme amylaza trong sản xuất rượu và bia thường ở 61 – 63°C với tinh bột (nhiều nước). Nếu nâng cao nhiệt độ nhiều nữa, enzyme sẽ bị bất hoạt bởi nhiệt độ. Khi sấy thóc malt (đại mạch nảy mầm) xuống ẩm độ tới 2 – 3% thì có thể với nhiệt độ cao enzyme tổn thất không lớn.

3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ ion H^+ (pH)

pH môi trường (hay nồng độ ion H^+) có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt lực enzyme. Mỗi một enzyme thể hiện sự tác dụng của mình ở một khoảng pH nhất định (có khi rất nhỏ). Vùng pH enzyme thể hiện hoạt lực cao nhất gọi là vùng pH tối thích. Những enzyme khác nhau có vùng pH tối thích khác nhau.

3.3.3. Chất hoạt hoá và chất ức chế enzyme

Hoạt lực của phần lớn các enzyme phụ thuộc vào hàm lượng những vật chất khác nhau có trong môi trường. Chất có tác dụng nâng cao tính xúc tác được gọi là chất hoạt hoá. Những ion Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, thường là những chất hoạt hoá enzyme. Để hoạt hoá (nâng cao hoạt lực) enzyme thường yêu cầu một hoặc một số ion. Ngoài ra, các chất khác cũng là những chất hoạt hoá enzyme. Hoạt lực của amylaza được tăng lên khi có mặt của ion I^-, Br^-, Cl^-; các proteaza trở nên hoạt động hơn khi môi trường có các chất HCN, H_2S và các chất có nhóm (SH) trong phân tử.

Các chất ức chế enzyme có tác dụng ức chế hoặc kìm hãm các hoạt động enzyme. Có thể chia các chất này thành hai nhóm: những chất ức chế chung và những chất ức chế riêng biệt. Đa số ion kim loại nặng là những chất ức chế enzyme, như chì, bạc, thuỷ ngân, vonfram và axit tricloaxetic, tanin. Những enzyme rút ngắn quá trình lên men rượu (phức hệ zimaza) có chứa nhóm sunphohydryl: etyliodaxetat, iodaxetamit, cloraxetophenol và các hợp chất có chứa nhóm halogen.

3.4. ENZYME TRONG SẢN XUẤT LÊN MEN

Các enzyme, trước hết là những enzyme thuỷ phân hydrolaza, sau là oxydoreductaza, transferaza, ligaza, izomeraza có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong lên men. Tất cả các enzyme này, trừ enzyme thuỷ phân, xúc tác các phản ứng lên men rượu và các dạng lên men khác. Phức hợp enzyme xúc tác lên men rượu gọi là zimaza (hay phức zima).

3.4.1. Enzyme thuỷ phân (hydrolaza)

Trong số các enzyme thuỷ phân có ý nghĩa quan trọng trong các quá trình lên men có α–glucozidaza, β–fuctofuranozidaza, α–galactozidaza, amylaza, hemixenlulaza, pectinaza và proteaza.

– α–glucozidaza hay maltaza là enzyme thuỷ phân đường maltozơ thành glucozơ. Enzyme này có trong nấm mốc, nấm men và vi khuẩn.

– β–fuctofuranozidaza (saccaraza, invertaza) thuỷ phân saccarozơ thành glucozơ và fructozơ, thuỷ phân rafinozơ thành fructozơ và melibiozơ. Saccaraza hay invertaza có trong nấm men và thực vật bậc cao.

– α–galactozidaza (melibiaza) thuỷ phân melibiozơ thành galactozơ và glucozơ, thuỷ phân rafinozơ thành saccarozơ và galactozơ. Melibiaza có trong men bia, nhưng những chế phẩm của enzyme này lại được sản xuất từ *Asp. oxyzara*.

Những enzyme thuỷ phân tinh bột được gọi là amylaza hay các enzyme amylolitic. Amylaza thuỷ phân tinh bột ở dạng nguyên, ở dạng hồ tinh bột và ở dạng hoà tan. Tác dụng của enzyme này lên tinh bột nguyên (chưa biến tính) hoặc tinh bột chưa có tác động cơ học thường là rất ít, nhưng tác dụng đến dạng hồ tinh bột và dạng tinh bột hoà tan thì nhanh hơn nhiều. Ngày nay amylaza được chia thành 3 enzyme: α–amylaza, β–amylaza, γ–amylaza (hay glucoamylaza). α–amylaza có trong nấm mốc, vi khuẩn, trong các hạt ngũ cốc nảy mầm. Glucoamylaza có trong nấm mốc, đặc biệt là *Aspergillus awamori* và giả nấm men *(endomycopsis)*. β–amylaza có trong các hạt ngũ cốc nảy mầm. α và β–amylaza bền ở môi trường axit và chịu nhiệt. α –amylaza nhạy cảm với pH phản ứng axit tăng. Vùng thích hợp của nó là pH 5,7, còn β–amylaza là 4,8. Hạ pH tới 3,3 và nhiệt độ là 0°C làm cho α–amylaza hoàn toàn mất hoạt tính. Với các điều kiện này β–amylaza vẫn thấy hoạt động. α–amylaza lại có khả năng thích hợp với nhiệt độ

nâng cao. Nhiệt độ tối thích của α–amylaza cao hơn β–amylaza. Nhiệt độ tối thích của α–amylaza trong đại mạch là 51 – 60°C, trong lúa mỳ đen là 54 – 63°C, β–amylaza của đại mạch là 48°C và của mỳ đen là 51°C. Khi gia nhiệt dung tích chứa tinh bột có α–amylaza đến 70°C trong 15 phút, hoạt lực của enzyme giảm rất ít, còn β–amylaza thì mất hoạt tính hoàn toàn. Sự khác nhau của α–amylaza về tính bền nhiệt phụ thuộc vào nguồn sản sinh ra chúng. α–amylaza của nấm mốc lại bị mất hoạt tính sớm nhất khi nâng cao nhiệt độ hơn nữa, sau đó là của các hạt nảy mầm (đại mạch dùng sản xuất bia) và bền nhiệt nhất là α–amylaza vi khuẩn. Có loài vi khuẩn *(Bacillus licheniformis)* sinh α–amylaza ở 95 – 100°C vẫn còn thấy hoạt tính.

β–amylaza tác dụng lên tinh bột, cắt tinh bột thành các phân tử đường đôi gồm có 2 glucozơ là đường maltozơ. α–amylaza tác dụng lên tinh bột bắt đầu bằng cách làm đứt mối liên kết trở thành những chuỗi gồm các đơn vị liên kết với nhau là các phân tử glucozơ, làm cho hồ tinh bột mất tính kết dính. Tác dụng này làm loãng hồ tinh bột hay còn gọi là dịch hoá hồ tinh bột. Các chuỗi glucozơ được tạo thành ở chiều dài khác nhau, theo thời gian ngày càng được cắt ngắn cho tới khi tạo thành maltozơ. Các chất trung gian trước khi tới maltozơ được gọi là dextrin. α và β–amylaza chỉ làm đứt các mối 1,4 – glycozit, còn mối 1,6 – glycozit chúng không đụng chạm đến.

α–amylaza tác động đến tinh bột chủ yếu cho các dextrin và một lượng nhỏ maltozơ.

β–amylaza cho chủ yếu là maltozơ và một lượng không lớn glucozơ.

γ–amylaza cho chủ yếu là glucozơ, một chút dextrin. γ–amylaza hoặc glucoamylaza rất bền với ion H^+.

Trong khi chỉ có α và β–amylaza tác động đến tinh bột sẽ thu được khoảng 80% maltozơ và 20% dextrin. Nếu lượng maltozơ tạo thành được nấm men lên men sử dụng ngay thì hiệu suất đường hoá sẽ đạt tới 92 – 95% là maltozơ. Phần còn lại là dextrin không phải đường, được gọi là các dextrin cuối. Những dextrin này bị phân huỷ bởi enzyme oligo–1,6–glucozidaza hay là dextrinaza.

Hemixenlulaza hay xitaza là enzyme xúc tác sự thuỷ phân hemixenlulozơ. Những enzyme này có trong hạt nảy mầm cũng như khi nuôi cấy nấm *Trichotherium roseum*.

Enzyme thuỷ phân các hợp chất pectin được gọi là pectinaza hay enzyme pectolytic: protopectinaza, pectiesteraza, polygalactuponaza là những pectinaza. Các enzyme này thường có trong nấm mốc. Protopectinaza phân huỷ protopectin thành các axit metoxyrovalic và polygalacturomic (còn gọi là các pectin hoà tan), araban và galactan. Enzyme pectinesteraza (pectaza) xúc tác phân huỷ pectin hoà tan thành rượu metylic và axit polygalacturomic. Enzyme polygalacturonaza (pectinaza) cắt mối liên kết giữa các gốc của polygalacturomic axit. Các nhóm này chứa nhóm metoxyl.

Proteaza hay các enzyme proteolytic xúc tác các phản ứng thuỷ phân protein và peptit. Proteaza có trong nấm mốc, nấm men, vi khuẩn và trong các hạt ngũ cốc nảy mầm. Proteaza có 2 loại: proteinaza và peptidaza. Proteinaza thuỷ phân protein thành các peptit và axit amin, peptidaza thuỷ phân các peptit thành axit amin. Sự phân proteaza thành hai enzyme ở đây là điều ước lệ vì proteinaza cũng thuỷ phân peptit.

Amidaza là nhóm enzyme xúc tác thuỷ phân amit thành amoniac (NH_3) và axit amin. Asparaginaza và glutaminaza thuộc nhóm enzyme này. Asparaginaza phân cắt asparagin thành axit aspartic và NH_3, glutaminaza phân cắt glutamin thành axit glutamic và NH_3. Hai enzyme này có trong nấm, nấm men, vi khuẩn và trong thực vật bậc cao.

Enzyme fitaza cũng là enzyme thuỷ phân. Nó xúc tác tách gốc axit photphoric của axit inozitphotphoric. Fitaza có trong nấm men và nhiều hạt thực vật.

3.4.2. Transferaza (enzyme vận chuyển)

Những enzyme có tác dụng xúc tác chuyển trọn vẹn phân nhóm các nguyên tử từ hợp chất này sang chất khác là các enzyme vận chuyển. Enzyme vận chuyển các gốc monosaccarit gọi là glycozyltransferaza (trước đây gọi là photphorylaza). Những enzyme này xúc tác phản ứng photpholiza cũng như phân cắt những hợp chất hữu cơ phức tạp dưới tác dụng của axit photphoric thành đơn giản hơn và cùng với sự tạo thành các este phức tạp của axit photphoric.

Photphorylaza có trong nấm men và thực vật bậc cao. Phản ứng photpholiza có tính thuận nghịch. Tổng hợp tinh bột trong thực vật và phân huỷ từng phần tinh bột trong khi bảo quản khoai tây và ngũ cốc xảy ra dưới tác dụng của enzyme photphorylaza.

3.4.3. Zimaza

Là phức hợp enzyme trong nấm men có tác dụng chuyển hoá cơ chất từ đường glucozơ thành rượu etylic.

Trong công nghệ lên men, thường lợi dụng hệ enzyme phức hợp có trong tế bào vi sinh vật để sản xuất ra một sản phẩm, là một trong những hợp chất mà hệ enzyme này tạo ra và tích tụ trong nội bào, hoặc tiết ra môi trường với một lượng đáng kể.

Do vậy, các quá trình lên men chủ yếu là nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường thích hợp để thu sản phẩm trao đổi chất là sản phẩm lên men có chọn lọc. Ngoài ra, người ta có thể dùng một lượng lớn sinh khối của vi sinh vật hoặc chế phẩm vi sinh vật có tác dụng vượt trội nào đó để chuyển hoá một tiền chất thành một sản phẩm và quá trình chỉ thực hiện trong một công đoạn hoặc một giai đoạn. Do vậy các chế phẩm enzyme cũng được sản xuất theo phương pháp lên men với các độ tinh sạch khác nhau (từ dạng thô có lẫn sinh khối vi sinh vật, dạng bán tinh và tinh sạch,...) dùng vào mục đích trên.

3.5. SẢN XUẤT CHẾ PHẨM ENZYME

Loài người đã biết sử dụng và sản xuất một số chế phẩm enzyme từ cổ xưa như lợi dụng enzyme trong nấm men để lên men rượu và làm bánh mỳ, các enzyme của nấm mốc làm tương, xì dầu, các enzyme của đu đủ, phủ tạng làm nước mắm,... Hồi xa xưa ấy thường dùng enzyme ở dạng thô, có nghĩa là chỉ dùng enzyme ban dầu chưa xử lý, chế biến. Ngày nay, việc sản xuất enzyme đã trở thành một ngành công nghiệp với các dạng sản phẩm có độ tinh khiết khác nhau, từ dạng thô bao gồm cả nguyên liệu ban đầu với nhiều phức hệ enzyme đến những chế phẩm có độ tinh khiết cao hơn, rồi những enzyme hoàn toàn tinh khiết.

Như chúng ta đã biết ở những phần trên, enzyme có mặt ở khắp các mô, tế bào trong mọi sinh vật, từ vi sinh vật cộng sinh đến động vật bậc cao. Enzyme gắn liền với mọi quá trình sống của tế bào và toàn cơ thể sinh vật. Khi cơ thể chết, các enzyme tiếp tục hoạt động trong một thời gian nữa, nếu kịp thời tách ra, enzyme đó vẫn bảo toàn được hoạt tính. Vì vậy, người ta có thể dùng mô, các bộ phận thực vật, động vật và các tế bào vi sinh vật làm nguồn nguyên liệu để sản xuất enzyme. Các nguồn enzyme thực vật thường là: hạt nảy mầm (amylaza), nhựa du đủ, lá vả, dứa cho enzyme proteaza (papain, bromelin, pancreatin,...).

Nhiều nước trên thế giới hàng năm đã sản xuất được một khối lượng lớn các enzyme từ động vật và thực vật (tới hàng chục vạn tấn). Nguồn nguyên liệu này rất bị hạn chế vì chính việc sản xuất enzyme từ động vật và thực vật khó khăn và để sản xuất enzyme là không phải dùng toàn bộ mà chỉ dùng một vài bộ phận nào đó của sinh vật mà thôi. Chính vì vậy, toàn bộ ngành công nghiệp sản xuất enzyme từ động vật và thực vật không thể phát triển rộng lớn được.

Ngày nay, ngành công nghiệp này chủ yếu được sản xuất từ vi sinh vật (nấm mốc, vi khuẩn, còn từ xạ khuẩn, nấm men đang được dùng ở mức độ nghiên cứu hoặc dùng sản xuất một số enzyme với lượng tương đối nhỏ). Takamine, nhà bác học Nhật Bản, đã nghiên cứu kỹ các quá trình nuôi cấy nấm mốc ở phương Đông và áp dụng trong sản xuất công nghiệp lớn ở Mỹ năm 1894. Từ đó đến nay, ngành công nghiệp sản xuất enzyme phát triển rất mạnh, đặc biệt là trong một vài thập kỷ trở lại đây. Vi sinh vật chiếm được ưu thế trong công nghiệp enzyme là vì:

– Trong tế bào vi sinh vật có hệ enzyme phong phú và tiết ra ngoài môi trường một lượng lớn các enzyme thuỷ phân. Vì vậy chúng có thể sống được ở các môi trường khác nhau, các chất vô cơ đơn giản (CO_2, N_2, S, Fe,...) đến các hợp chất phức tạp (tinh bột, đường, protein, pectin, xenlulozơ,...).

– Tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật là rất nhanh và hoạt tính enzyme của chúng rất mạnh. Trong vòng 24 giờ, chúng có thể chuyển hoá được một lượng lớn thức ăn gấp 30 – 40 lần so với lượng sinh khối của chúng.

Một thế hệ động vật thường là từ 2 – 3 năm, của thực vật ít nhất là 3 – 4 tháng nhưng ở vi sinh vật trong điều kiện thuận lợi chỉ 20 – 30 phút. Vi sinh vật có thể dùng 100% sinh khối làm nguồn enzyme. Trong trồng trọt và chăn nuôi, chúng ta cần diện tích lớn, còn nuôi vi sinh vật chỉ cần diện tích ít.

– Vi sinh vật tương đối dễ nuôi ở điều kiện công nghiệp và chúng rất dễ nhạy cảm với môi trường cũng như điều kiện nuôi cấy. Vì vậy chúng ta dễ điều khiển quá trình nuôi cấy theo định hướng phù hợp với yêu cầu mong muốn. Điều đó có thể giúp thu được các enzyme theo ý muốn với thành phần của hệ enzyme tương đối tinh khiết (có thể trong môi trường thu được một enzyme trội lên hẳn).

– Các nguồn dinh dưỡng nuôi vi sinh vật để thu enzyme thường là phế liệu, phế phẩm công nghiệp, nông nghiệp như cám, nước đường thuỷ phân từ tinh bột, nước bã rượu, lõi ngô, một số muối vô cơ,... Đó là nguồn nguyên liệu dễ kiếm và rẻ tiền.

Do vậy, ngành công nghiệp sản xuất enzyme từ vi sinh vật được nhiều nước trên thế giới chú ý phát triển. Tại Nhật và Mỹ, mỗi nước có trên 20 hãng sản xuất enzyme. Năm 1960, chỉ riêng Mỹ đã thu được 26,5 triệu đô la. Việc sản xuất enzyme cũng được chú trọng ở Liên Xô trước đây (từ năm 1951 đến năm 1964 đã tăng 50 lần). Tại Đan Mạch có hãng Novo với các sản phẩm enzyme nổi tiếng trên thế giới. Hiện nay nhiều nhà máy bia của Việt Nam, đang sử dụng sản phẩm enzyme của hãng này trong khâu đường hoá và lên men. Tại Việt Nam việc sản xuất các chế phẩm enzyme thô là mốc cám dùng làm tương, nước chấm và đường hoá trong nấu rượu.

3.5.1. Hai phương pháp nuôi cấy để thu nhận enzyme

Vi sinh vật là nguồn enzyme vô cùng phong phú và giúp cho ngành công nghiệp sản xuất những chế phẩm enzyme tiến khá nhanh, phục vụ cho các ngành sản xuất thực phẩm, hàng tiêu dùng, ăn uống, nông nghiệp, y dược đạt được hiệu quả kinh tế cao. Nhờ tính ưu việt đó, vi sinh vật đã chiếm ưu thế tuyệt đối trong sản xuất enzyme. Trong họ hàng vi sinh vật thì nấm mốc chiếm vị trí khá quan trọng. Từ nấm mốc đã thu được các chế phẩm enzyme thương mại là: amylaza, proteaza, xenlulaza,... Có tới 80 loại enzyme khác nhau được chiết từ nấm mốc và trong đó có hơn 10 enzyme đang được ứng dụng rộng rãi.

Quá trình sản xuất enzyme từ vi sinh vật gồm hai công đoạn: nuôi cấy vi sinh vật và chiết tách enzyme.

Nuôi cấy vi sinh vật phải cấy giống từ nhỏ đến lớn, nghĩa là giống thuần chủng từ ống nghiệm được gieo cấy nhân giống rồi nuôi cấy đại trà (lên men) trên các môi trường thích hợp để cho vi sinh vật cho nhiều enzyme với hoạt tính cao. Có thể nói, giai đoạn nuôi cấy vi sinh vật để có nhiều enzyme là vô cùng quan trọng, đó là khâu mấu chốt của quá trình sản xuất enzyme. Có thể liên tưởng quá trình này với trồng lúa: gieo cấy nhân giống như khi ta gieo mạ, nhưng mạ này được nhổ lên đem cấy đại trà ở các cánh đồng là các thùng lên men hoặc các khay lớn. Tuy thế nhưng nuôi cấy vi sinh vật phức tạp hơn nhiều so với cấy lúa. Việc tạo giống tốt, sau đó được giữ lại ở các môi trường dinh dưỡng thạch trong những ống nghiệm hoặc ở dạng bào tử khô. Khi nhân giống và lên men phải nghiên cứu các thành phần môi trường dinh dưỡng, các yếu tố nuôi cấy như nhiệt độ, pH môi trường, cung cấp không khí sao cho phù hợp với nhu cầu sinh lý của giống vi sinh vật.

Nuôi cấy vi sinh vật theo hai phương pháp: phương pháp lên men bề mặt và phương pháp lên men chìm.

3.5.1.1. Phương pháp lên men bề mặt (hình 3.1)

Phương pháp này còn gọi là phương pháp nổi dùng nuôi cấy nấm mốc sản xuất enzyme. Nước ta đã có truyền thống lâu đời gây mốc tương theo phương pháp này. Trong các nhà máy rượu sản xuất từ nguồn tinh bột thì việc gây hoá mốc đường hoá (myco – malt) cũng làm tương tự.

Phương pháp nuôi cấy bề mặt dựa trên cơ sở nuôi cấy mốc trên các lớp môi trường mỏng tiếp xúc tốt với không khí. Môi trường dinh dưỡng chủ yếu là cám (cám mỳ tốt hơn cả) loại to, có thêm ít bột, hoặc thêm những loại bã khác (bã bia, bã lõi ngô, bã khô lạc, khô đậu tương,...) tuỳ theo mục đích sản xuất. Cám làm ướt, trộn đều khi đạt độ ẩm 55 – 60%, đem hấp vô trùng ở 0,7atm trong 1 giờ, sau đó làm nguội đến 40 – 42^{0}C rồi gieo cấy bào tử mốc giống, hoặc giống từ ống nghiệm đã nhân giống qua cám trong các bình tam giác, hoặc bình cầu thuỷ tinh hay bằng nhôm (với điều kiện trong các bình này giống đã mọc tốt). Tãi cám dều (cám đã gieo cấy giống) ra các khay (50 × 70cm) với độ dày của lớp môi trường 2 – 4cm.

Đặt các khay vào phòng nuôi trên giá. Nhiệt độ phòng nuôi là 30 – 32^{0}C. Khi nào thấy mốc mọc rõ rệt, kết lớp cám thành bánh thì bẻ nhỏ trộn dều từ dưới lên. Độ ẩm của cám cần giữ là 55 – 60%, nhưng về cuối, cám khô dần. Thời gian nuôi cấy khoảng 30 – 48 giờ. Quá trình này xảy ra qua ba giai đoạn:

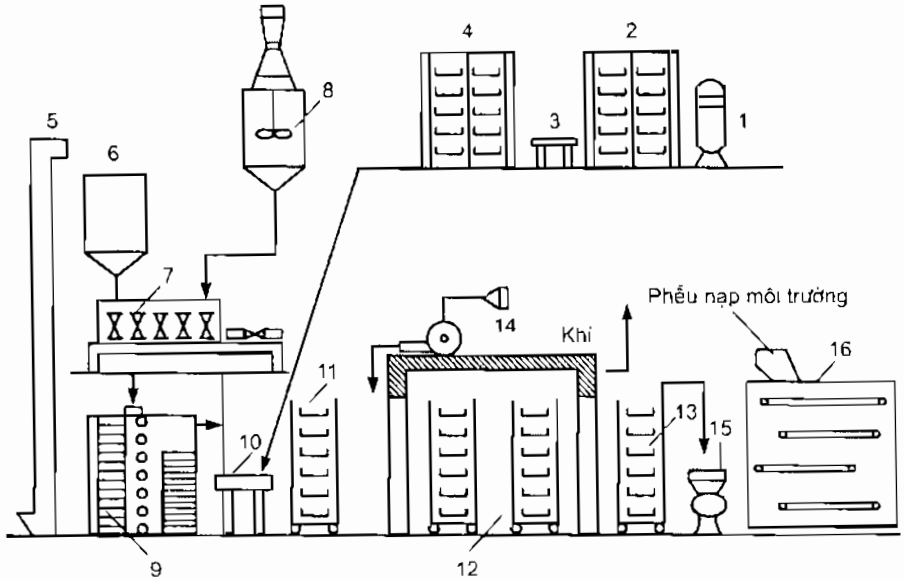
Giai đoạn 1: bắt đầu từ khi gieo cấy mốc giống đến giờ thứ 8 –10. Thông thường khối môi trường trong thời gian này được ủ dống, nhiệt độ tăng dần và bào tử mốc mọc mầm – cuống mầm. Để dảm bảo cho sự nảy mầm nhanh và tránh tạp nhiễm, cần phải giữ độ ẩm của môi trường ở 55 – 60%, độ ẩm không khí phòng nuôi 96 – 100% và nhiệt độ là 30 – 32^{0}C, tránh gió bụi ở ngoài thổi vào buồng. Nếu thấy nhiệt độ dống ủ lên cao quá, phải tãi mỏng khối môi trường ra khay và thổi khí (có trang bị quạt hút hoặc quạt thổi qua lọc không khí hạn chế bụi bẩn và tạp khuẩn).

Giai đoạn 2: kéo dài khoảng 10 –18 giờ. Ở giai đoạn này, mốc phát triển mạnh, lan khắp bề mặt và có xu hướng ăn sâu vào toàn bộ khối môi trường. Nếu thấy môi trường kết bánh và mọc không đều, nên lật mặt dưới lên trên và có thể bẻ vỡ nhỏ. Quá trình hô hấp của mốc xảy ra mạnh mẽ, chất dinh dưỡng được sử dụng phần lớn. Nhiệt độ khối mốc và phòng nuôi tăng, hàm lượng CO_2 trong phòng nuôi cấy tăng, cần có quạt thổi (hoặc hút) không khí sạch cùng nước sạch (đã vô trùng sơ bộ) phun mù, làm ẩm phòng.

Giai đoạn 3: kéo dài khoảng 10 – 20 giờ. Enzyme tạo thành giai đoạn này mạnh mẽ, cường độ trao đổi chất của mốc có thể giảm đi chút ít hơn trước và tốc độ bốc hơi của môi trường cũng giảm. Khi mốc bắt dầu tạo bào tử – nấm mốc đạt độ già sinh lý, quá trình nuôi cấy kết thúc.

Trong thời gian này, thổi khí sạch vào phòng nuôi thì càng tốt. Mốc cám khi lấy ra phải dập nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ thấp đến độ ẩm 10 – 12% đem đi đóng vào trong các túi polyetylen gắn kín, giữ ở nhiệt độ phòng và dùng dần. Mốc cám có thể hoà tan vào nước, lọc sạch rồi kết tuả enzyme bằng cồn, bằng muối amonisunphat, hoặc các hoá chất khác để nâng cao độ tinh khiết. Các chế phẩm enzyme thu được bằng phương pháp bề mặt ở Liên Xô trước đây được ký hiệu là P và tuỳ theo mức

độ tinh khiết, người ta lại thêm chữ x vào bên cạnh chữ P. Và khi đọc sách có thể gặp những chế phẩm enzyme có thêm ký hiệu P_x, P_{3x}, P_{10x},... Sơ đồ công nghệ nuôi cấy mốc cám theo phương pháp bề mặt được giới thiệu ở hình 3.1.



Hình 3.1. Sơ đồ dây chuyền công nghệ nuôi cấy vi sinh vật bằng phương pháp bề mặt

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

Những ưu điểm của phương pháp bề mặt:

– Cho nồng độ enzyme cao hơn nhiều so với phương pháp nuôi chìm.

– Có thể sấy khô nhanh chóng môi trường mà không giảm đáng kể hoạt tính enzyme.

– Tránh được nhiễm trùng toàn bộ khối môi trường.

– Tốn ít điện năng.

Tuy vậy phương pháp bề mặt khó được cơ giới hoá, tự động hoá do đó năng suất thấp, tốn nhiều lao động thủ công, cần diện tích nuôi lớn.

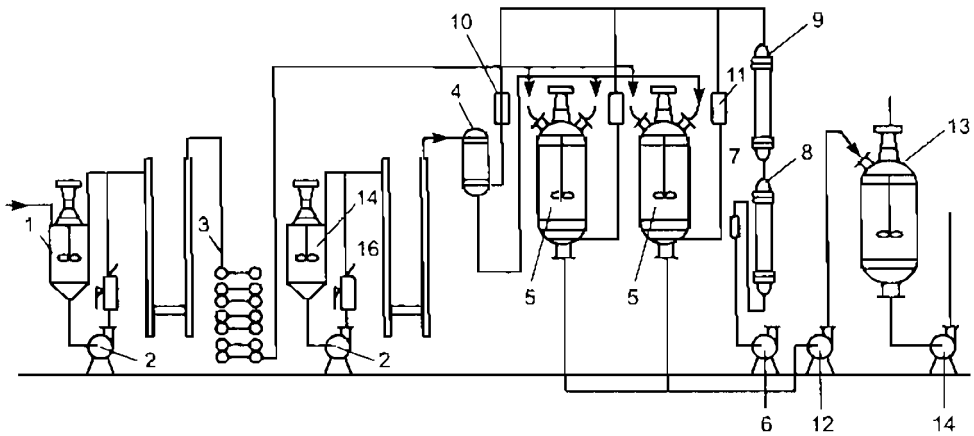
3.5.1.2. Phương pháp nuôi cấy chìm (nuôi cấy bề sâu)

Vi sinh vật được dùng trong nuôi cấy theo phương pháp này là vi khuẩn và nấm mốc. Chúng được cấy vào môi trường dinh dưỡng lỏng trong các nồi nhân giống và lên men. Trong thời gian nuôi cấy, người ta thổi khí nén vô trùng để cung cấp oxy cho vi sinh vật hô hấp. Phương pháp này đòi hỏi các trang thiết bị phức tạp hơn nhiều so với phương pháp bề mặt, nhưng dễ cơ khí hoá, năng suất cao và mặt bằng sản xuất nhỏ.

Nuôi cấy vi sinh vật theo phương pháp chìm trong các thiết bị kín với môi trường lỏng vô khuẩn và khuấy đảo cùng thổi khí sạch (vô trùng tuyệt đối) liên tục. Môi trường lỏng bao gồm các nguồn cacbon, nguồn nitơ vô cơ, hoặc nitơ hữu cơ (bột đậu tương, khô lạc, các loại khô dầu, cao men, cao ngô,...), các chất khoáng, các chất sinh trưởng. Trong thành phần môi trường lỏng nuôi cấy vi sinh vật để thu enzyme, cần chú ý đến cơ chất cảm ứng, ví dụ: đối với amylaza cần có tinh bột, proteaza cần có protein.

Phương pháp nuôi cấy chìm đòi hỏi vô trùng tuyệt đối, vì vậy yêu cầu công nghệ rất cao.

Sơ đồ công nghệ theo phương pháp nuôi cấy chìm được giới thiệu ở hình 3.2.



Hình 3.2. Sơ đồ dây chuyền công nghệ nuôi cấy vi sinh vật bằng phương pháp nuôi chìm

1. Thùng chuẩn bị và thanh trùng môi trường;
2. Bơm đẩy;
3. Thiết bị trao đổi nhiệt;
4. Thùng nhân giống;
5. Thùng lên men;
6. Máy nén khí;
7. Phân ly dầu nước;
8. Thùng chứa khí;
9. Tổng lọc;
10. Lọc riêng cho thùng nhân giống;
11. Lọc riêng cho thùng lên men;
12. Bơm đẩy;
13. Thùng chứa dịch môi trường;
14. Bơm đẩy.

Phương pháp nuôi chìm có những ưu, nhược điểm sau:

– Tiết kiệm diện tích sản xuất.

– Dễ cơ giới hoá, loại bỏ được lao động thủ công, tạo năng suất cao.

– Sử dụng hợp lý các chất dinh dưỡng của môi trường, tránh được sự lãng phí chất dinh dưỡng nằm lại trong khối môi trường rắn mà vi sinh vật không sử dụng được.

– Thu được enzyme chứa ít tạp chất hơn.

– Đảm bảo được điều kiện vệ sinh và vô trùng, do đó hiện tượng nhiễm vi sinh vật lạ ít xảy ra hơn.

– Tuy vậy, phương pháp chìm có nồng độ enzyme thấp cần phải đặc dịch môi trường trước khi tách enzyme, do đó giá thành cao.

– Tốn điện năng do cần sục khí liên tục.

– Nếu không đảm bảo được điều kiện vô trùng thì dễ xảy ra sự nhiễm trùng toàn bộ khối môi trường.

3.5.2. Thu hồi chế phẩm enzyme

Các chế phẩm enzyme được sử dụng trong thực tế dưới nhiều dạng khác nhau. Trong một số trường hợp, môi trường nuôi cấy vi sinh trong đó có chứa enzyme sử dụng trực tiếp dưới dạng thô không cần tách tạp chất, nếu các tạp chất đó không gây tác hại đáng kể đến sản phẩm và kỹ thuật sản xuất sau này (ví dụ: sản xuất rượu, da, dùng cho chăn nuôi, nước chấm, tương,...).

3.5.2.1. Thu dịch enzyme

Đối với trường hợp enzyme còn nằm trong tế bào thì cần phá vỡ tế bào bằng nhiều phương pháp như nghiền trong máy đồng hoá, nghiền với thuỷ tinh, cát, tự phân dùng tác dụng của siêu âm hoặc áp suất thẩm thấu cao,...

Sau đó có thể chiết xuất enzyme bằng các dung môi khác nhau như: nước, dung dịch đệm, dung dịch muối trung tính,... kết quả ta thu được dịch enzyme và loại bỏ bã sinh khối.

Đối với trường hợp enzyme tiết ra ngoài môi trường để thu dịch enzyme, người ta thường tách sinh khối và các chất cặn bã ra khỏi môi trường bằng ly tâm hoặc ép lọc với việc sử dụng thêm các chất trợ lọc (diatomit, than hoạt tính,...) hoặc các chất tạo kết tuả nếu cần thiết (như $CaCl_2 + (NH_4)_2SO_4 \rightarrow CaSO_4$, chất này dễ dàng bị lắng cặn kéo theo sinh khối nên giúp cho quá trình lọc sẽ dễ dàng hơn).

3.5.2.2. Thu chế phẩm kỹ thuật (chế phẩm thô)

Chế phẩm enzyme kỹ thuật là chế phẩm chưa được tinh chế, nó có thể chứa một hoặc một vài enzyme chủ yếu theo yêu cầu sử dụng, ngoài ra trong thành phần còn có thể có các protein không hoạt động, các chất ổn định và các tạp chất khác.

Để thu được chế phẩm enzyme kỹ thuật, bước đầu người ta cô đặc các dịch enzyme có nồng độ chất khô thấp từ 4 – 6g/l lên tới 15 – 20g/l ở nhiệt độ 35^{0}C trong các thiết bị có độ chân không cao. Sau đó:

– Hoặc là người ta cô đặc tiếp ở nhiệt độ 40 – 45^{0}C để đạt nồng độ chất khô 30 – 35g/l, bổ sung thêm các chất bảo quản NaCl, glyxerol, socbitol, benzoat và thu được chế phẩm kỹ thuật ở dạng lỏng, có thể bảo quản ở nhiệt độ thường từ 1 – 2 năm.

– Hoặc là người ta bổ sung thêm các chất ổn định để đạt nồng độ chất khô 30 – 40g/l rồi sấy khô với nhiệt độ ban đầu vào khoảng 120^{0}C và đầu ra ở 60^{0}C. Kết quả thu được chế phẩm kỹ thuật ở dạng bột.

– Hoặc là người ta có thể kết tuả enzyme bằng các loại muối trung tính như $(NH_4)_2SO_4$ hoặc cồn, ly tâm lấy cặn, trộn thêm các chất ổn định rồi sấy khô, nghiền mịn. Kết quả ta cũng thu được chế phẩm ở dạng bột.

Chế phẩm enzyme kỹ thuật thường được ứng dụng trong công nghiệp và nông nghiệp chủ yếu, đặc biệt là dung dịch trong chăn nuôi. Các chế phẩm thu được từ phương pháp nuôi bề mặt ký hiệu là P_x, P_{2x}, P_{3x},... (x là hoạt độ ban đầu) và từ phương pháp nuôi chìm được ký hiệu là G_x, G_{2x}, G_{3x},...

3.5.2.3. Thu chế phẩm enzyme tinh khiết

Việc tinh chế enzyme có thể tiến hành theo nhiều phương pháp và qua nhiều giai đoạn khác nhau.

Các protein không hoạt động có thể được loại khỏi dịch enzyme bằng phương pháp làm biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của pH, nhiệt. Các protein đã bị biến tính có thể tách khỏi dung dịch khi ly tâm hoặc lọc bỏ kết tuả. Có thể dùng phương pháp tách nhân đoạn khác nhau nhờ kết tuả bằng dung môi hữu cơ, kết tuả bằng muối, hấp phụ chọn lọc, trao đổi ion để thu những thành phần có hoạt lực enzyme cao nhất.

a) Tách enzyme nhờ kết tuả bằng dung môi hữu cơ

Tuỳ tính chất tuả của từng loại enzyme, dung môi và điều kiện kết tuả, mỗi enzyme sẽ được kết tuả tối đa ở một nồng độ dung môi nào đó. Các chất dung môi được dùng phổ biến để kết tuả là rượu etylic, izopropylic hoặc axeton. Vì các dung môi có thể gây nên sự vô hoạt enzyme do đó quá trình kết tuả này nhất thiết phải tiến hành nhanh chóng ở nhiệt độ thấp để tránh sự vô hoạt enzyme.

b) Tách enzyme nhờ kết tuả nhanh bằng muối trung tính

Muối được dùng phổ biến để kết tuả là $(NH_4)_2SO_4$. Ngoài ra, NaCl cũng được dùng khá phổ biến để kết tuả enzyme động vật. Tác dụng kết tuả của các ion muối tỷ lệ thuận với lực ion của chúng, do vậy mỗi loại enzyme sẽ được kết tuả tối đa ở một nồng độ xác định của muối. Thường để việc kết tuả đạt hiệu quả cao, người ta tiến hành kết tuả ở môi trường có pH gần điểm đẳng điện của enzyme. Các muối vô cơ sau khi phân đoạn có thể được loại đi bằng phương pháp thẩm tích, hoặc phương pháp lọc gel. So với kết tuả bằng dung môi, kết tuả bằng muối trung tính ít gây sự giảm hoạt lực enzyme hơn nhiều.

c) Tách enzyme bằng phương pháp hấp phụ không đặc hiệu (hấp phụ chọn lọc)

Để thực hiện phương pháp này, người ta cho dịch enzyme chảy từ từ qua cột chất hấp phụ (thường là hydrat axit nhôm, silicagel hydroxi apatit,...). Khi đó tuỳ theo khả năng tương tác của chất hấp phụ với từng loại enzyme, các enzyme khác nhau sẽ được hấp phụ trên chất hấp phụ với khả năng khác nhau. Sau đó dùng dung dịch đệm thích hợp để chiết rút enzyme ra khỏi cột. Phương pháp hấp phụ thường được dùng để làm đặc enzyme.

d) Tách enzyme bằng phương pháp trao đổi ion

Nguyên tắc của phương pháp này là dựa vào sự trao đổi ion giữa enzyme tích điện với các ion của chất nhựa khi cho dung dịch enzyme chảy từ từ vào cột chứa các chất nhựa trao đổi ion. Sau đó cho dung dịch rửa là dung dịch chất điện giải có nồng độ tăng dần chảy qua cột, các ion của dung dịch rửa sẽ đẩy ra khỏi nhựa các enzyme vừa liên kết với nhựa. Khi đó enzyme nào có ái lực với nhựa kém nhất sẽ dễ bị đẩy ra khỏi chất nhựa nhất. Cuối cùng các enzyme khác nhau sẽ được chiết ra khỏi cột theo từng phần chiết khác nhau, trong đó có phần chiết chứa enzyme cần thu với nồng độ cao nhất. Các chất nhựa trao đổi ion là các chất tổng hợp hữu cơ (các loại Dowex, Amberlit, Wolfarit, Permutit,...), các dẫn xuất của xenlulozơ (DEAE – Sephadex, CM – xenlulozơ,...), hoặc các chất có kết hợp cả tác dụng lọc gel (DEAE – Saphedex, CM – Saphedex,...).

Sau khi làm sạch, cần sấy khô các chế phẩm enzyme để có thể sử dụng lâu dài. Phương pháp sấy khô thường được áp dụng trong trường hợp này là sấy chân không ở nhiệt độ thấp hoặc sấy thăng hoa. Bằng các phương pháp làm sạch khác nhau có thể thu được chế phẩm enzyme có hoạt tính cao hơn nhiều so với phương pháp ban đầu. Việc thu chế phẩm enzyme tinh khiết và nhất là ở dạng tinh thể rất khó khăn và tốn kém, do đó các chế phẩm enzyme loại này chỉ được dùng trong y học và trong mục đích nghiên cứu như xác định khối lượng phân tử enzyme, nghiên cứu về cấu trúc enzyme,...

3.6. KHÁI NIỆM CƠ BẢN VỀ LÊN MEN

Từ cổ xưa khái niệm lên men là "sự sủi bọt". Theo định nghĩa của Pasteur, lên men thực chất là quá trình kỵ khí xảy ra đối với hoạt động của vi sinh vật để thu năng lượng, trong đó hydro được tách ra và chuyển đến cho chất nhận là hợp chất hữu cơ được tạo thành trong chuỗi biến đổi hoá sinh. Khái niệm lên men ở đây không đồng nghĩa với sự lên men (fermentation) được dùng rộng rãi hiện nay với nội dung là các quá trình sản xuất nhờ vi sinh vật hay là cơ sở của công nghệ vi sinh vật. Như vậy, các sản phẩm lên men ở đây được hiểu là các sản phẩm lên men cổ điển hay là các sản phẩm của các quá trình kỵ khí.

Đối với các chủng kỵ khí bắt buộc (sinh trưởng trong điều kiện không có oxy), trong tế bào không có hệ enzyme hô hấp. Thay vào vị trí của oxy là các chất nhận hydro hữu cơ. Các chất này được hình thành trong quá trình trao đổi chất dị hoá.

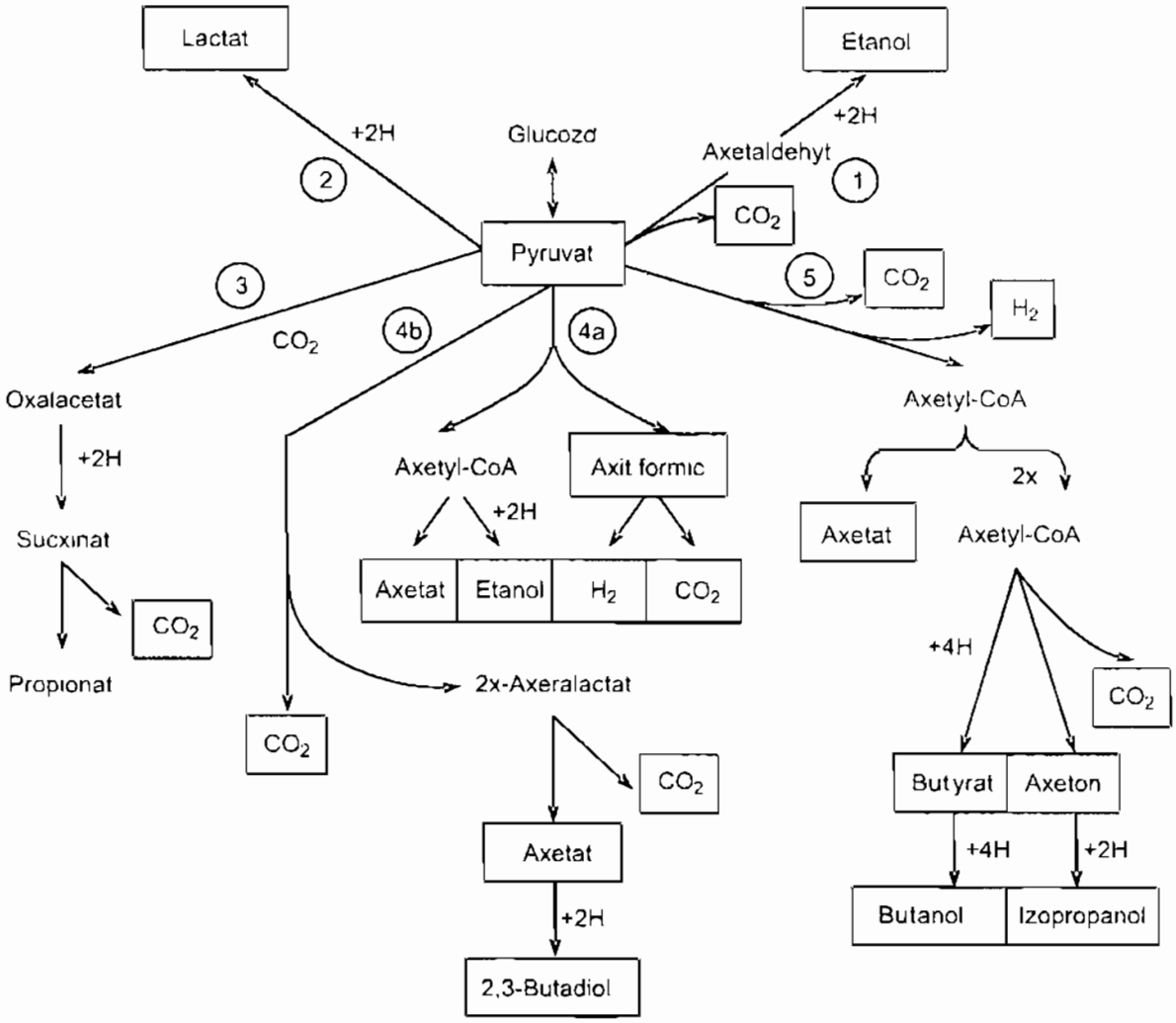
Trong lên men rượu, chất nhận hydro là axetaldehyt và chất này được khử thành etanol. Đối với tế bào, ý nghĩa của sự lên men là ở chỗ chúng thu được năng lượng ở dạng ATP. Các sản phẩm lên men không có ý nghĩa với các tế bào sinh trưởng kỵ khí, chúng được so sánh với H_2O và CO_2 sinh ra trong hô hấp. Sự tạo thành sản phẩm cuối cùng là nhằm để phục hồi NAD từ $NADH_2$ sinh ra khi thuỷ phân cơ chất (NAD và $NADH_2$ là Nicotinamit Adenin Nucleic và dạng khử của nó).

Các hợp chất hữu cơ nhận hydro được khử thành những sản phẩm cuối cùng được thải ra ngoài tế bào cũng như sản phẩm cuối cùng của sự hô hấp. Do vậy, vấn đề đặt ra trong sản xuất lên men là: chọn các điều kiện nuôi cấy sao cho càng nhiều cơ chất được chuyển thành sản phẩm càng tốt. Để đáp ứng được mục đích ấy người ta thường dùng môi trường dinh dưỡng có nồng độ đường cao và một lượng hạn chế các thành phần khác quan trọng với sinh trưởng.

Ở vi sinh vật, trong quá trình tiến hoá đã hình thành nhiều kiểu lên men. Một kiểu lên men quan trọng nhất được trình bày bằng sơ đồ hình 3.3.

Một số vi sinh vật kỵ khí không bắt buộc. Chúng thu nhận năng lượng trong điều kiện thoáng khí nhờ hô hấp, trong điều kiện yếm khí nhờ lên men. Thuộc các nhóm này có các nấm men sinh etanol và các vi khuẩn đường ruột (ví dụ *E. coli, Serratia marcescensi*). Trái lại, *Clostridium* lên men butyric thì có tính kỵ khí bắt buộc. Oxy là độc đa số với các loài *Clostridium* vì sự có mặt của các chất này dẫn đến tạo thành hydroperoxit (H_2O_2) và các peoxit. Enzyme catalaza và peroxidismutaza cần cho việc loại trừ những sản phẩm này thì vắng mặt ở vi khuẩn *Clostridium*. Những quá trình lên men quan trọng trong công nghiệp là lên men rượu (lên men

etanol), lên men lactic điển hình, lên men metan. Các quá trình lên men có ý nghĩa thực tiễn hơn là lên men 2,3–butadiol và lên men axeton – butanol, đó là những biến dạng của lên men butyric.



Hình 3.3. Một số kiểu lên men quan trọng

1. Lên men rượu của nấm men (*Saccharomyces*); 2. Lên men lactic của vi khuẩn lactic; 3. Lên men propionic của vi khuẩn propionic; 4a. Lên men formic của vi khuẩn đường ruột (ví dụ: *Escherichia coli*); 4b. Lên men 2,3–butadiol, một dạng đặc biệt của lên men formic (*Enterobacter aerogenes*); 5. Lên men butyric của *Clostridium*.

3.7. CƠ CHẾ CỦA QUÁ TRÌNH LÊN MEN

Những quá trình lên men quan trọng hơn cả là lên men rượu, lên men lactic, lên men butyric. Những quá trình lên men này có thể biểu diễn bằng các phương trình sau:

Lên men rượu: $C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + CO_2 + 118kJ$ (28,2kcal).

Lên men lactic: $C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHOHCH_2COOH + 94kJ$ (22,5kcal).

Lên men butyric: $C_6H_{12}O_6 = CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2O$.

Các phương trình này cho ta thấy, chất đầu tiên và sản phẩm cuối cùng của quá trình, nhưng không giải thích và cho biết các bước cũng như sản phẩm trung gian trong lên men, không thấy được tính liên tục và tương tác giữa các phản ứng riêng biệt đã xảy ra như thế nào trong suốt quá trình.

Lên men rượu, lên men lactic, lên men butyric là tip lên men cơ bản, chúng có liên quan chặt chẽ với quá trình hô hấp có mặt của O_2 (điều kiện hiếu khí).

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 = 6CO_2 + 6H_2O + 2.822kJ\ (674kcal)$$

Trong lên men, axit photphoric đóng vai trò rất quan trọng. Nó thường xuyên có mặt trong tế bào nấm men và các cơ thể sinh vật khác ở dạng Adenozinmonophotphat (AMP), Adenozindiphotphat (ADP), Adenozintriphotphat (ATP). Những hợp chất này chứa nhiều năng lượng và dễ dàng cho hoặc nhận thêm một gốc photphat, đồng thời cũng là nhận hoặc nhả ra năng lượng sinh học phục vụ cho hoạt động sống của cơ thể, hay các quá trình trao đổi chất, trong đó có lên men.

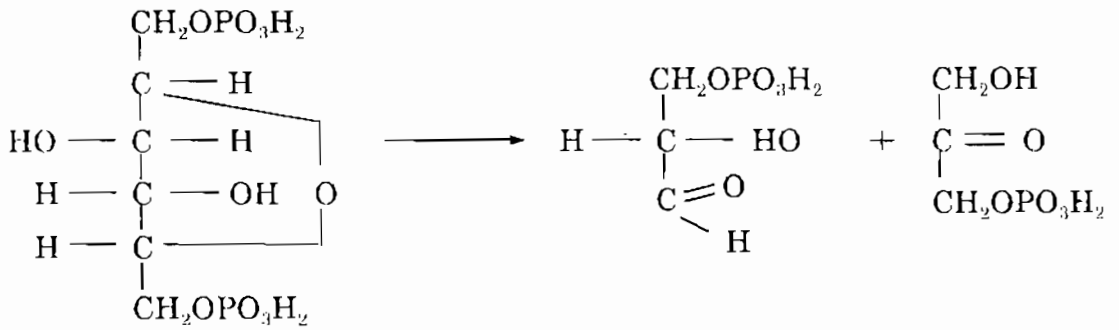
Toàn thể quá trình lên men có thể chia thành 5 giai đoạn (trong đó 4 giai đoạn đầu là như nhau và xảy ra ở điều kiện kỵ khí).

Giai đoạn 1 – photphoryliza đường: Phân tử glucozơ hoặc hexozơ khác, dưới tác dụng của enzyme hexokinaza kết hợp với một gốc photphat từ ATP. Kết quả của phản ứng là tạo ra ADP và glucopyranozơ – 6 – photphat. Chất này lại chịu tác dụng của enzyme glucozophotphatizomeraza được chuyển thành fructofuranoza – 6 – photphat. Chất mới được tạo thành này được enzyme photphofructokinaza kết hợp với một gốc photphat từ phân tử ATP mới hình thành. Cuối cùng của chuỗi phân tử này là một ADP và fructofuranozo – 1,6 – diphotphat được tạo thành. Giai đoạn 1 có thể được tóm tắt như sau:

Glucozơ → glucopyranozơ – 6 – photphat → fructofuranozơ – 6 – photphat → fructofuranozơ – 1,6 – diphotphat.

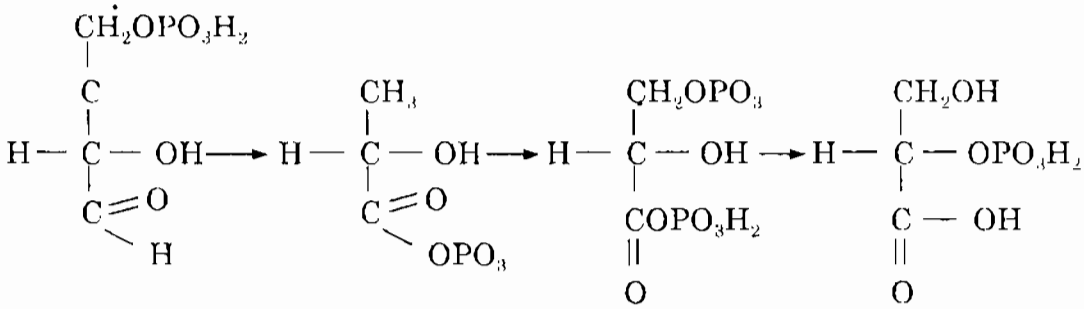
Giai đoạn 2: Trong giai đoạn này fructofuranozơ – 1,6 – diphotphat dưới tác dụng của aldonaza phân cắt thành 3 – photpho – glyxerinaldehyt và photphodiaxeton. Hai chất này có thể biến đổi tương tác với nhau với sự xúc tác của enzyme triozophotphat – tiomeraza.

Fructofuranozơ –1,6–diphotphat → 3–photphoglyxerin aldehyt + photphodioxyaxeton.

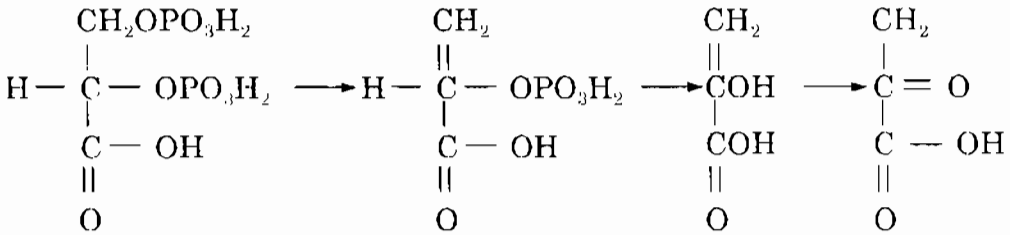


Trong quá trình lên men tiếp theo chuyển hoá thành 3– photphoglyxerinaldehyt. Photphodioxyaxeton sẽ chuyển dần thành trizophotphoglyxerin aldehyt dưới tác dụng của enzyme trizophotphatizomeraza.

Giai đoạn 3: Trong giai đoạn này photphoglyxerin aldehyt kết hợp với một gốc photphat còn lại từ photpho vô cơ và tạo thành 1,3–diphotphoglyxerin aldehyt. Chất này dưới tác dụng của enzyme trizophotphatdehydrogenaza được biến thành axit 1,3– diphotphoglyxerinic. Chất tạo thành được tách ra một gốc photphat nhờ enzyme photphotransferaza cho phân tử ADP tạo thành ATP cùng với axit 3– photphoglyxerinic. Cuối cùng, dưới tác dụng của enzyme photphoglyxero– mutaza, chất 2– photphoglyxerinic axit được tạo thành.



Giai đoạn 4: Chuyển hoá axit 2 – photphoglyxerinic thành axit pyruvic. Axit 2 - photphoglyxerinic dưới tác dụng của photphoglyxeripyruvat hydrotazer (enolaza) tạo thành photphoenolpyruvic axit và cho ADP một gốc photphat để tạo thành ATP. Sau đó phân tử axit enolpyruvic được phân ly và tạo thành axit pyruvic.



(Axit pyruvic)

3.7.1. Lên men rượu

Lên men rượu (etanol) được thực hiện nhờ nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Nấm men này có tính kỵ khí không bắt buộc, chúng có khả năng hô hấp và lên men. khả năng lên men của các chủng là rất khác nhau. Sinh trưởng kỵ khí nghiêm ngặt ở *S.cerevisiae* chỉ xảy ra qua một vài thế hệ, vì sự tổng hợp sterol cần cho việc cấu trúc màng tế bào đòi hỏi phải có oxy. Nếu sterol và các axit chưa no được cung cấp thì nấm men có thể sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt.

Sự lên men giúp nấm men có thể tồn tại trong những điều kiện kỵ khí. Về mặt sử dụng cơ chất cho sinh trưởng thì lên men là rất không kinh tế. Sự thu nhận được ít năng lượng trong lên men rượu khiến phần lớn cơ chất bị biến đổi vào việc sinh năng lượng. Từ 100g glucozơ sẽ tạo thành:

Trong điều kiện thoáng khí:

$100g\ C_6H_{12}O_6 + 5,1g\ NH_3 + 46,6g\ O_2 \rightarrow 43,2g\ C_6H_{10}O_3N$ (vật chất tế bào) $+ 41,1g\ H_2O + 67,4g\ CC_2$

Trong điều kiện kỵ khí:

$100g\ C_6H_{12}O_6 + 0,2g\ NH_3 \rightarrow 1,7g\ C_6H_{10}O_3N$ (vật chất tế bào) $+ 46,2g\ C_2H_6O$ (etanol) $+ 5,2g\ C_3H_8O_3$ (sucxinat) $+ 0,2g\ H_2O + 45,3g\ CO_2$

Nếu không cung cấp một nguồn nitơ có thể đồng hoá được thì không có khả năng sinh trưởng nhưng các sản phẩm lên men vẫn được tạo thành ở mức độ như cũ. *Sự lên men không gắn liền với sinh trưởng.* Các tế bào không sinh trưởng vẫn có hoạt động lên men trong nhiều ngày.

Trong điều kiện thoáng khí hay kỵ khí, tế bào vẫn cần một lượng ATP như nhau để duy trì sự trao đổi chất. Hậu quả là trong lên men thì glucozơ được tiêu dùng nhiều hơn khoảng 10 lần so với trong hô hấp. Để tiến hành trao đổi chất một cách kinh tế, trong quá trình tiến hoá đã hình thành một cơ chế điều hoà, ức chế sự lên men khi có mặt oxy. Đó là hiệu ứng Pasteur.

Trong sản xuất bia, người ta dùng các chủng *S.cerevisiae* khác nhau; những chủng này do tính chất tạo thành những đám tế bào nổi, nên được gọi là men bia lên men nổi. Các loại bia trắng, bia Ale và Porte được sản xuất bằng nấm men nổi. Có ý nghĩa to lớn trong việc sản xuất bia (ví dụ đối với bia Pilsner) là các nấm men lên men chìm được xếp thành các loài riêng *Saccharomyces carlsbergensis*. Trong sản xuất rượu vang thì các loài là *Kloeckera* và *Saccharomyces* (ví dụ *S.vini)* có một vai trò quan trọng, chúng tồn tại trên các quả nho. Ngày nay, chúng được dùng như những chủng thuần khiết để đưa vào dịch nho lên men. Đối với việc sản xuất đồ uống chứa rượu, thì các chất thơm tạo thành với lượng nhỏ nhờ những phản ứng phụ của sự lên men rất có ý nghĩa và cần sự quan tâm.

Lên men rượu, cần có những yêu cầu sau:

– Nguồn đường có thể lên men: lên men rượu nói chung cần có mặt các loại đường như glucozơ, fructozơ, đường đôi như saccarazơ, maltozơ,... và một số đường khác. Trong số này tốt nhất là đường glucozơ. Đối với lên men bia thì đường maltozơ là loại đường tốt nhất và thích hợp nhất.

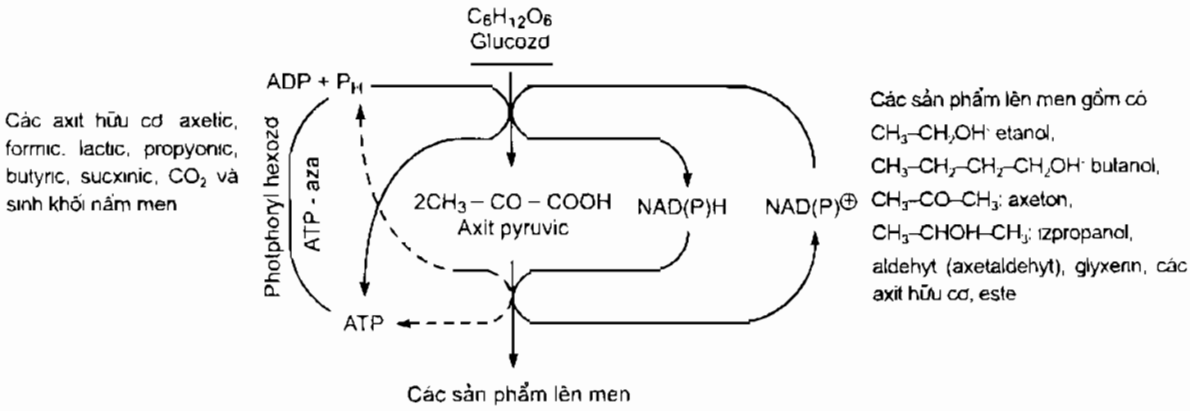
– pH môi trường là 4,5 – 5,5.

– Quá trình đòi hỏi kỵ khí, nhưng trong tất cả các quá trình thì giai đoạn đầu cần hiếu khí (có thể lượng oxy hoà tan trong môi trường đảm bảo điều kiện hiếu khí, nếu không đủ nhu cầu oxy, có thể thổi khí để cho giống nấm men sinh trưởng đủ lượng tế bào cần thiết cho lên men), sau đó ngừng điều kiện hiếu khí để chuyển sang giai đoạn lên men kỵ khí.

– Nhiệt độ lên men và sinh trưởng của nấm men tương đối thích hợp là 25 – 35^{0}C, tối thích là 28 – 32^{0}C (đối với lên men rượu nói chung), lên men bia có hai khoảng lên men (lên men chính 8 – 12^{0}C và lên men phụ 1 – 4^{0}C), lên men rượu vang cũng có hai khoảng lên men (lên men chính 20 – 25^{0}C, lên men phụ 10 – 15^{0}C), sau lên men phụ có thể giữ vang như nhiệt độ lên men phụ, hoặc ở dưới 10^{0}C càng lâu càng tốt.

– Tác nhân gây lên men rượu là các chủng loài thuộc giống *Saccharomyces cerevisiae*. Trong công nghiệp thu sinh khối nấm men làm bánh mỳ dùng giống *Saccharomyces*, bổ sung vào thức ăn chăn nuôi có thể dùng các giống *Saccharomyces, Candida* và một số giống khác.

Cơ chế lên men rượu được tóm tắt như hình 3.4.



Hình 3.4. Cơ chế lên men rượu sơ giản của *Saccharomyces*

3.7.2. Lên men glyxerin

Lên men glyxerin do *Saccharomyces* là sự biến dạng của quá trình lên men rượu. Trong lên rượu, glyxerin được tạo thành như một sản phẩm phụ với lượng rất ít. Từ lên men rượu có thể điều khiển thành lên men glyxerin. Môi trường được kiềm hoá bằng cách bổ sung dịch xút tới 5%.

Lên men rượu vang tạo thành glyxerin được thực hiện bằng cách giữ lại hoặc loại trừ chất nhận hydro bình thường là axetaldehyt. Người ta thêm Na_2SO_3 vào dịch quả để bảo quản, đồng thời chất này chuyển thành bisunphit và tạo thành glyxerin nhiều hơn.

$$Na_2SO_3 + CO_2 + H_2O \rightarrow NaHSO_3 + NaHCO_3$$

Sản phẩm glyxerin được tạo thành trong rượu vang sẽ gây vị đặc biệt cho đồ uống.

3.7.3. Lên men 2,3 – butadiol

Dạng lên men này là một biến thể của lên men formic điển hình đối với các vi khuẩn đường ruột kỵ khí không bắt buộc. Đó là sự lên men cho nhiều sản phẩm, trong đó có axit formic là một sản phẩm phụ điển hình, axetoin được tạo thành và biến đổi thành diaxetyl do tự oxy hoá và 2,3 – butadiol (butylenglycol; 2,3 – dihydroxybutan).

Quá trình lên men này không được áp dụng trong sản phẩm công nghiệp vì 2,3 – butylenglycol có thể dễ dàng nhận được theo con đường hoá học để biến thành 1,3 – butadien, là chất trùng hợp thành cao su tổng hợp (cao su Buna).

2,3 – butadiol được tạo thành bởi nấm men *Saccharomyces* như một sản phẩm phụ của quá trình lên men rượu. Đó là một trong những chất thơm của bia.

3.7.4. Lên men axeton – butanol

Lên men bình thường axeton– butanol là một biến dạng của lên men butyric đặc trưng của *Clostridium*: yêu cầu kỵ khí bắt buộc trên cơ chất là tinh bột nhờ vi khuẩn *Clostridium acetobutylium* (có thể nuôi trên môi trường chứa đường hoặc rỉ đường). pH lên men ở ngày đầu đạt tới 4,5; axeton và butanol sẽ dần được tích luỹ, nếu pH ở vùng trung tính thì sẽ tạo thành axit butyric. Các sản phẩm thu được nhờ cất phân đoạn.

3.7.5. Len men lactic

Có hai kiểu lên men lactic: điển hình và dị hình. Trong kiểu lên men lactic điển hình, thực tế chỉ sinh ra axit lactic; còn trong kiểu lên men dị hình thì các sản phẩm cuối cùng là axit lactic, etanol, axit axetic và CO_2. Sự lên men lactic điển hình có ý nghĩa công nghiệp

Lên men lactic điển hình: axit lactic được sản xuất nhờ vi sinh vật với khối lượng lớn. Axit lactic dược bổ sung vào sản xuất thực phẩm và đồ uống, dùng làm nguyên liệu trong công nghiệp hoá học. Trong bào chế thuốc, nó được sử dụng ở dạng muối canxi lactat làm tá dược. Ngày nay, axit lactic được chú ý nhiều trong chế biến thực phẩm, trong chăn nuôi và trong môi trường thuỷ sản, trong polyme hoá axit lactic làm đồ chứa đựng thực phẩm có thể bị phân huỷ, không gây ô nhiễm môi trường.

Các giống vi khuẩn lactic dược dùng nhiều nhất trong công nghiệp là *Lactobacillus delbrukii* và *L.bulgaricus*. Khi lên men trong những nồi kín, không thông khí, ở 50^0C, với môi trường là dịch thuỷ phân tinh bột và cặn sữa được bổ sung các axit amin, vì vi khuẩn lactic không tự tổng hợp được một số chất trong các hợp chất này. Môi trường có nồng độ chất khô 10 – 15%, sau 2 – 3 ngày lên men tới 90% sản phẩm tạo thành là axit lactic, cao hơn sẽ kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn, nên người ta thêm $CaCO_3$ vào môi trường và nhờ thế mà duy trì được pH 5,5 – 6, khi ấy axit lactic chuyển thành muối canxi.

Vi khuẩn lactic điển hình dược sử dụng trong sản xuất các sản phẩm từ sữa, như sữa chua (*Lactobacillus bulgaris, Streptococcus thermophillus*) và phomat (*Streptococcus lactic* và các loài khác), đóng vai trò quan trọng cùng với các loài vi khuẩn propionic trong việc tạo hương của các phomat rắn.

Lên men lactic dị hình không có ý nghĩa công nghiệp. Quá trình lên men tạo thành nhiều sản phẩm cuối cùng nên việc tách các sản phẩm khác nhau là rất tốn kém và phức tạp. Vi khuẩn lên men lactic dị hình (ví dụ *Lactocbacillus brevis, Leuconostoc mesenteroides*) cùng với các vi khuẩn lactic điển hình (ví dụ *Lactobacillus plantarum*) tham gia vào việc ủ cỏ, muối dưa chua. Kết quả ủ cỏ phụ thuộc vào việc tạo ra những điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn lactic: tạo điều kiện kỵ khí và bổ sung thêm đường đạt nồng độ cao mà vi khuẩn vẫn đồng hoá được, để *Lactobacillus* sinh trưởng, đồng thời ức chế sự phát triển của *Clostridium* sinh trưởng và ức chế sự phát triển của *Clostridium* gây thối thức ăn cỏ (vi khuẩn này sinh ra axit butyric).

Lên men lactic đồng hình: là quá trình phân huỷ các hợp chất hữu cơ trong điều kiện kỵ khí của quần thể vi sinh vật hoại sinh và tạo thành khí sinh học; trong đó chủ yếu là metan, sau đó là CO_2. Quá trình này là quá trình thối rữa kỵ khí. Lên men metan cũng xảy ra trong dạ cỏ của động vật nhai lại, nó có vai trò quan trọng trong tuần hoàn cacbon của tự nhiên. Trong các đầm lầy và thuỷ vực, chất hữu cơ được phân huỷ một phần thành metan "khí đầm lầy". Lên men metan được thực hiện trong các bể đậy kín. Trong quá trình thối rữa, chất hữu cơ được chuyển thành khí tới 50 – 80%, trong đó 55 – 70% là metan và 30 – 45% là CO_2. Metan sinh ra nhờ vi sinh vật là một nguồn năng lượng đã được sử dụng ở một số nơi để sản xuất khí đốt. Phương pháp này là một sự kết hợp giữa việc thu nhận các

chất có giá trị và việc loại trừ các chế phẩm. Metan sản xuất nhờ vi sinh vật có thể trở thành nguồn nguyên liệu có ý nghĩa to lớn. Theo cách này, không những các chế phẩm sinh hoạt được sử dụng mà cả sinh khối thực vật cũng được chuyển hoá thành sản phẩm giàu năng lượng.

Hoá sinh học của sự lên men metan còn chưa được giải thích đầy đủ. Khả năng khử CO_2 thành metan nhờ hydro phân tử là đặc tính riêng của tất cả các vi khuẩn sinh metan. Một số loài *(Methancoccus vanniellii, Methanobacterium ruminantium, Methanobacterium formicium)* còn khử cả focmiat. *Methanosarcina backeri* ngoài hydro còn sử dụng cả cacbonmonoxyt, metanol và axetat làm cơ chất để khử CO_2. Người ta còn biết đến vi khuẩn *Methanobacterium omelianskii* có thể tạo thành metan từ etanol. Ngoài ra còn thấy các giống ưa nhiệt như *Methanobacterium thermoautrophium*. Vì vậy nên tiến hành lên men ở 55°C. Quá trình lên men metan là sự nối tiếp của các nhóm vi khuẩn trong quần thể và nhiều sản phẩm trung gian được tạo thành, sản phẩm cuối cùng là CH_4, CO_2, H_2O.

Trên đây là phác hoạ toàn cảnh các quá trình lên men (theo nghĩa hẹp) nhờ vi sinh vật, chủ yếu là nấm men và vi khuẩn, có nghĩa là, các quá trình nuôi cấy các vi sinh vật này ở điều kiện kỵ khí để thu các sản phẩm chủ yếu của chúng sản ra. Ngoài ra, còn có các quá trình dùng sinh khối vi sinh vật cũng như chế phẩm enzyme để thực hiện quá trình chuyển hoá một công đoạn, hoặc giai đoạn trong quá trình lên men. Hơn nữa, trong lên men hiện đại, người ta còn thực hiện nuôi cấy vi sinh vật ở điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí để thu các sản phẩm trao đổi chất bậc 1 hoặc bậc 2.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 3

1. Có bao nhiêu loại enzyme?

Enzym thuỷ phân (hydrolaza) và enzym phân huỷ (liaza) khác nhau như thế nào? Hãy cho một ví dụ về enzyme thuỷ phân.

2. Những yếu tố ngoại cảnh ảnh hưởng đến hoạt lực của enzyme và ảnh hưởng đến đời sống VSV có những điểm giống nhau và khác nhau như thế nào?

3. Hãy cho biết thế nào là enzyme cảm ứng?

Nêu một ví dụ về nuôi cấy VSV để có một loại enzyme cảm ứng.

4. Có bao nhiêu phương pháp thu nhận enzyme từ VSV?

Hãy nêu một sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất các chế phẩm VSV.

5. Chiết tách và làm sạch các chế phẩm enzyme từ môi trường nuôi cấy VSV phải làm như thế nào?

6. Quan hệ giữa enzyme và lên men? Cơ chế các quá trình lên men đến axit pyruvic diễn ra như thế nào? Và từ axit pyruvic sẽ diễn tiếp theo các hướng nào?

Chương 4

SẢN XUẤT RƯỢU – CỒN ETYLIC

Rượu etylic là sản phẩm lên men được loài người biết sử dụng lâu đời nhất và hiện nay cũng là thứ đồ uống được phổ biến rộng rãi ở mọi nước trên toàn thế giới.

Rượu với tư cách là dồ uống rất đa dạng, nhiều mẫu mã khác nhau. Có loại rượu nặng (trên 40°), rượu thông thường (30 – 40°) và rượu nhẹ (dưới 30°). Độ cồn bằng % cồn tuyệt đối.

Sản lượng trung bình hàng năm trên thế giới có thể tới hàng ngàn triệu lít cồn và doanh thu rất đáng kể trong thu nhập quốc dân. Ngoài rượu ra, sản lượng bia và rượu vang cùng thu nhập của những ngành này cũng là những con số khổng lồ.

Trên thị trường hiện nay thấy nhiều loại rượu, như vodka – loại rượu trắng làm từ nguyên liệu tinh bột, rượu uytki làm từ đại mạch nảy mầm (sản phẩm được ủ trong các thùng gỗ sồi hàng năm), rượu Roon Scotland làm từ rỉ đường, rượu vang làm từ quả nho và các loại trái cây (không chưng cất), rượu cognac là rượu vang chưng cất, rượu sake làm từ gạo không chưng cất. Riêng loại "quốc lủi" ở nước ta cũng nhiều vẻ, có loại khá ngon nhưng chưa bằng vodka,...

Rượu – cồn etylic có thể được sản xuất bằng hai phương pháp chính là lên men (con đường sinh học) và tổng hợp (con đường hoá học).

Rượu sản xuất lên men được dùng làm đồ uống và cồn kỹ thuật được dùng cho một số ngành khác. Cồn tổng hợp là nguyên liệu kỹ thuật dùng trong công nghiệp, không được dùng làm đồ uống.

Cồn kỹ thuật có thể tổng hợp từ etylen, lên men từ dịch thuỷ phân gỗ bằng axit,... Các loại cồn kỹ thuật dùng làm nguyên liệu cho hàng loạt ngành công nghiệp khác nhau, như tổng hợp cao su nhân tạo, tơ, sợi, lông, len tổng hợp, da nhân tạo, chất dẻo, phim ảnh, thuỷ tinh hữu cơ, chất nổ, chất độn, sơn, chất màu, mỹ phẩm,... Có tới 150 ngành kinh tế quốc dân sử dụng cồn etylic. Đặc biệt trong những năm gần đây, người ta chú trọng đến cồn kỹ thuật tuyệt đối dùng làm nhiên liệu cho các động cơ, thay thế cho xăng từ dầu mỏ.

4.1. CÁC NGUỒN NGUYÊN LIỆU DÙNG TRONG CÔNG NGHỆ LÊN MEN RƯỢU

Nguyên liệu sản xuất lên men rượu chủ yếu là các nguồn tinh bột và rỉ đường:

– Các nguồn tinh bột gồm có: gạo, ngô, sắn, bột mỳ, cao lương, đại mạch, khoai tây.

– Các nguồn rỉ đường: rỉ đường mía, rỉ đường củ cải, rỉ đường (mật rỉ) của công nghiệp glucozơ (hydrol).

Các nguồn nguyên liệu trên đây có thể xem ở mục 2.2, chương 2.

4.2. GIỐNG NẤM MEN

4.2.1. Giống nấm men

Trong lên men rượu, giống nấm men được sử dụng là *Saccharomyces cereviseae*. Các chủng của loài này thường được gọi là các nòi men rượu. Giữa các nòi cũng có những đặc điểm riêng biệt khác nhau. Với nguồn nguyên liệu là tinh bột và rỉ đường, người ta cũng dùng những nòi riêng cho thích hợp. Nói chung, các nòi men rượu đều có những yêu cầu công nghệ như sau:

– Có sức phát triển mạnh trong dịch đường lên men.

– Có khả năng tiết ra hệ enzyme zimaza để lên men nhanh và hoàn toàn.

– Có khả năng lên men ở nhiệt độ tương đối cao mùa hè (35 – 38^{0}C).

– Có khả năng chịu được ở độ cồn tương đối (khoảng trên 10^0) trong quá trình lên men.

– Chịu được ở môi trường axit, có pH khoảng 4 – 4,5 hoặc thấp hơn.

Các nòi men rượu có hình oval, hoặc gần hình cầu hoặc elip. Sinh sản vô tính bằng nảy chồi. Thường có 1 – 4 bào tử trong tế bào. Hấp thụ và lên men đường tốt, nhưng nồng độ đường không quá 30% (chính đường này làm cho men rượu được mang tên là "nấm đường" – *Saccharomyces*) và có nòi tích tụ được tới 18^0 rượu trong môi trường.

Saccharomyces cerevisiae được dùng chính trong công nghiệp cồn – rượu etylic, sản xuất men bánh mỳ. Loài này có đặc điểm là lên men đường từ tinh bột được triệt để hơn các loài khác, vì chúng có khả năng lên men được các dextrin cuối (sản phẩm trung gian trong quá trình đường hoá tinh bột).

Nói chung nấm men *Saccharomyces* tuân thủ đúng hiệu ứng Pasteur. Khi có oxy, *Saccharomyces* tăng sinh khối khi chúng lên men rượu.

Phương trình tổng quát của quá trình lên men rượu là:

$$\text{Glucozơ} \xrightarrow[\text{tăng sinh khối}]{\textit{S. cerevisiae}} CO_2 + H_2O + E \text{ (năng lượng)}$$

Nhiệt độ thích hợp đối với sinh trưởng của men rượu là 25 – 30^{0}C, nhiệt độ tối thiểu khoảng 2 – 3^{0}C và tối đa 40^{0}C. Nhiệt độ cao hơn nữa, mức sinh trưởng và phát triển bị chậm lại hoặc dần bị chết. Trong môi trường có nồng độ đường cao (trên 30%), nấm men ngừng quá trình sống, hoặc bị chết do thay đổi áp suất thẩm thấu. Với các nòi khác nhau, nồng độ đường thích hợp cũng khác nhau.

Các nòi lên men rượu đều thuộc giống *Saccharomyces* (trong đó có men rượu, men bia, men rượu vang, men bánh mỳ). Các nòi của giống này được chia làm 2 loại: men nổi và men chìm. Men nổi là khi lên men, các tế bào men giống kết thành dám nổi lên trên bề mặt cùng với lớp bọt tương đối dày và duy trì trong suốt thời gian lên men. Sau khi kết thúc, chúng mới lắng dần xuống đáy và tạo thành

lớp xác men không chặt chẽ. Men chìm là trong lên men, các tế bào kết với nhau thành các bông lơ lửng trong dung dịch lên men và dần lắng xuống đáy thành lớp cặn men khá chặt chẽ.

Các nòi men nổi có khả năng lên men mạnh, lên men được đường đôi và đường đơn cũng như các dextrin thấp (chủ yếu là những dextrin cuối). Các nòi men chìm khi lắng làm cho dịch lên men trong, dễ lọc, sáng màu, thích hợp cho sản xuất bia.

Cơ chế lên men rượu xem ở phần 3.6 chương 3.

4.2.2. Bảo quản giống men

– Men rượu dùng trong sản xuất công nghiệp là các nòi thuần khiết được bảo quản trong các ống thạch nghiêng với môi trường Hansen, môi trường thạch – malt, môi trường nước đường hoá – thạch. Với các giống dùng sản xuất rượu từ rỉ đường, trong môi trường giữ giống cần có thêm 2 – 4% rỉ đường.

– Những ống giống men rượu được giữ ở 4 – 10^{0}C, hàng tháng được cấy chuyển. Người ta cũng có thể giữ các ống giống này với lớp dầu khoáng parafin vô khuẩn, để ở nhiệt độ như trên và có thể tới 6 tháng hoặc 1 năm mới cấy chuyển lại.

– Giống cần giữ lâu dài (khoảng 2 – 3 năm) thường được làm lạnh sâu và sấy thăng hoa trong máy đông khô.

Đa số các nòi nấm men bia và rượu vang đều thuộc men chìm, còn các nòi men rượu, men bánh mỳ và một ít nòi men bia đều thuộc men nổi.

Yêu cầu chung đối với men rượu dùng trong sản xuất là phải có lực lên men mạnh, biến đường thành rượu nhanh và càng triệt để càng tốt, có khả năng chịu được các chất kháng khuẩn và biến động các điều kiện nuôi cấy (t^0, pH, O_2,...).

Ở nước ta từ trước đến nay thường dùng một số nòi (chủng) phân lập từ men thuốc bắc, hoặc từ một số giống của các nhà máy thuộc Liên Xô (cũ), và từ ngày giải phóng, chúng ta có thêm các chủng cho bộ sưu tập nấm men dùng cho sản xuất rượu cồn từ tinh bột và từ rỉ đường mía.

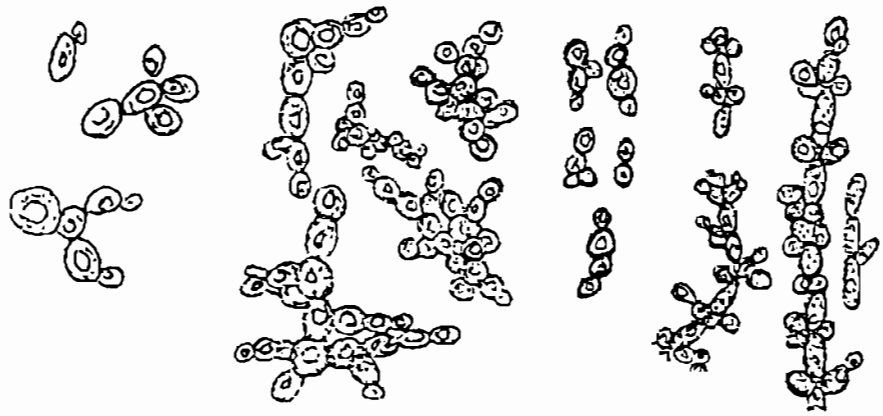
4.2.3. Một số nòi men rượu

Đối với tên men rượu từ tinh bột dùng các nòi II, XII, M, $R_2$11,..., lên men rỉ đường dùng nòi 396 và Я (Ia).

– Nòi II được phân lập do Lindner (1889) từ men của nhà máy rượu. Nòi này có giá trị lịch sử vì lần đầu tiên người ta dùng vi sinh vật thuần khiết trong sản xuất rượu. Nòi II dễ lên men trong môi trường đường, nhưng sinh sản yếu và tạo bọt mạnh, thường tụ lại thành đám sau một thời gian thì lắng xuống. Tế bào hình trứng có kích thước 5 – 7μm. Sinh sản bằng lối nảy chồi. Ngày nay, nòi này ít được dùng trong sản xuất rượu.

– Nòi XII được tách từ men bánh mỳ (1902) (hình 4.1). Tế bào hình tròn hoặc hình trứng, có kích thước (6 – 6,2) × (5 – 8) μm. Phát triển và sinh sản của nòi này

rất nhanh. Nó có thể lên men được glucozơ, galactozơ, maltozơ, mannozơ, 1/3 rafinozơ và có thể tạo thành 13% cồn trong môi trường lên men. Ngày nay, nòi này được dùng hầu hết ở các nhà máy rượu từ tinh bột, cũng như các nhà máy dùng dịch đường thuỷ phân từ gỗ hoặc dịch kiềm sunphit.



Hình 4.1. Men rượu, nòi XII

– Nòi M, thực ra đây không phải là một nòi chủng thuần khiết, mà là một hỗn hợp 4 nòi men nổi (chữ M viết tắt từ Mischung – có nghĩa là hỗn hợp và được ký hiệu thành nòi dùng phổ thông). M được Ginneberg đề nghị dùng từ năm 1905. Nó có thể lên men các loại đường khác nhau, trong đó có cả dextrin và rafinozơ. Những đường này được lên men không đồng thời bởi các nòi riêng biệt trong hỗn hợp. Giống hỗn hợp này rất bền vững với các điều kiện không bình thường trong thực tế sản xuất.

– Nòi $R_2$11 được phân lập từ men thuốc bắc ở nhà máy rượu Hà Nội. Tế bào hình oval, có kích thước (3 – 5) × (5 – 8)μm. Nó có thể lên men được glucozơ, saccarazơ, maltozơ, fructozơ, rafinozơ. Nó được dùng sản xuất rượu từ các nguyên liệu chứa tinh bột như gạo, ngô, khoai, sắn. Sinh sản của nòi này nhanh sau khi cấy từ 12 – 16 giờ, lên men tốt trong dịch đường có nồng độ 120 – 140g/l và ở 160 – 180g/l vẫn có thể lên men được, nhưng hiệu suất chuyển hoá thấp.

Nồng độ rượu tạo thành trong môi trường lên men là 10 – 12%. Nhiệt độ lên men thích hợp là 28 – 32^{0}C, nhưng tới 38^{0}C vẫn có thể lên men được, như vậy rất thuận tiện cho lên men mùa hè khi thiếu nước làm nguội các thùng lên men. $R_2$11 có khả năng chịu được chất sát trùng Na_2SiF_6 nồng độ 0,02% (ở nồng độ này vi khuẩn bị ức chế).

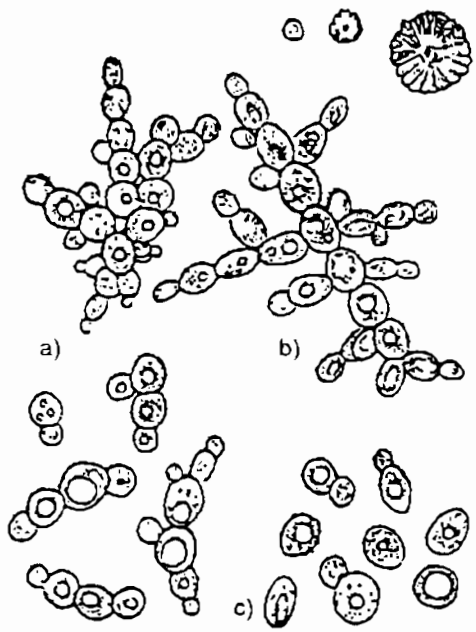
– Nòi 396 (gốc Trung Quốc) phân lập được từ dịch rỉ đường. Nó có thể lên men được fructozơ, maltozơ, saccarazơ, glucozơ, mannozơ, galactozơ, nhưng không lên men được arabinozơ và dextrin. Nhiệt độ thích hợp cho phát triển là 33^{0}C. Nồng độ rượu tạo thành trong môi trường lên men của nòi này tới 10%.

Nòi Я được tách từ rỉ đường do Yakubovxki phân lập (năm 1916), có khả năng lên men trong dịch đường có nồng độ cao và tạo thành cồn nhiều. Lên men được glucozơ, fructozơ, saccarazơ; maltozơ và galactozơ chỉ lên men được 1/3, hoàn toàn không lên

men được dextrin, lactozơ. Tế bào Я hình oval, có kích thước (5 – 6) × (6 – 7)μm, thuộc loại men nổi, chịu được pH = 2. Trong dịch đường phát triển mạnh và lên men trong môi trường có 20% chất khô. Ngày nay nòi này được dùng phổ biến ở các nhà máy sản xuất rượu từ rỉ đường của Liên Xô cũ.

4.2.4. Nuôi cấy giống nấm men trong quá trình lên men rượu

Trong lên men cần phải tiến hành nhân giống để men giống sinh sôi đủ lượng tế bào có khả năng lên men. Tuỳ thuộc vào quy mô sản xuất, quá trình nhân giống có thể qua nhiều cấp và thể tích của mỗi cấp tăng dần. Nhiều nhà máy rượu chỉ cần tiến hành nhân giống một lần và sau đó dùng sinh khối nấm men để lên men nhiều lần mới cần phải nhân giống lại. Trường hợp này cũng có thể gặp những dạng đột biến (hoặc bị tạp nhiễm) làm giảm năng lực lên men hoặc men bị thoái hoá.



Hình 4.2. Hình thái tế bào men rượu trong quá trình nuôi cấy. Hình tròn phía trên góc phải là dạng khuẩn lạc trên môi trường thạch – malt

a) Các tế bào trẻ (khoảng 12 – 16 giờ nuôi cấy). Tế bào men từ hình tròn đến hình hơi oval. Nảy chồi nhiều, có khi tới 70 – 80 số tế bào nảy chồi. Không có hoặc không thấy không bào;

b) Nấm men trưởng thành (khoảng 48 giờ). Trong tế bào chất xuất hiện dạng hạt và không bào lớn dần, đôi khi có 2 không bào trong 1 tế bào, số tế bào nảy chồi bị giảm (chỉ còn 10 – 15%). Quá trình sinh sản chậm lại. Những tế bào chết bắt màu xanh khi làm tiêu bản nhuộm với chất xanh metylen.

Nấm men trưởng thành thấy xuất hiện các hạt glycogen – một loại gần giống tinh bột làm chất dự trữ cho tế bào về già. Glycogen được nhìn thấy dưới kính hiển vi (khi nhuộm tế bào sống với dung dịch iot, glycogen bắt màu nâu – đỏ);

c) Hình thái các tế bào men rượu đã già: Trong tế bào thấy không bào lớn, có khi chiếm hầu hết nội bào

4.2.5. Nuôi cấy nhân giống nấm men

Muốn thực hiện lên men trong công nghiệp, đặc biệt là lên men rượu, cần phải đủ số lượng tế bào nấm men phải ở độ trẻ, khoẻ, sinh sản mạnh. Đối với lên men

rượu, số lượng tế bào *Saccharomyces* vào khoảng 120 – 160.10^6 tế bào/ml dịch men giống (sau khi nuôi cấy 20 giờ).

Giống từ môi trường thạch nghiêng cấy sang bình môi trường lỏng 100ml rồi cấy chuyển sang bình 500ml, tiếp theo 5 lít, 10 lít, 100 lít, 1.000 lít, 5.000 lít,... Nuôi men từ thùng 100 lít cần phải thổi khí và khoảng 1 – 2 giờ khuấy trộn môi trường một lần. Trong quá trình nuôi cấy cần phải duy trì nhiệt độ thích hợp đối với từng nồi men, nói chung cần phải giữ nhiệt độ ở khoảng 30 – 32^{0}C.

– Môi trường nhân giống từ 120ml đến 5 lít như sau:

Đối với tinh bột, thường dùng môi trường nước đường hoá có nồng độ 12 – 14^0 Bx hoặc 6 – 7^{0}Bx và pH = 4,5 – 4,8 (tương đương với 1,2 – 2g/l H_2SO_4). Đối với men rượu rỉ đường dùng môi trường rỉ đường đã được xử lý như sau: rỉ đường pha loãng tới 40^{0}Bx, điều chỉnh bằng H_2SO_4 tới pH 4,5, đun sôi 1 giờ, rồi để yên 1 – 2 ngày, lọc bỏ cặn. Rỉ đường sau khi xử lý pha loãng tới 12 – 14^{0}Bx (hoặc 6 – 7^{0}Bx), thêm $(NH_4)_2SO_4$: 0,2 – 0,5%, supephotphat: 0,2 – 0,5%, điều chỉnh pH tới 4,5 – 4,8 (tương đương với 1,5g/l H_2SO_4).

– Môi trường ở các nồi nuôi giống tiếp theo cũng giống như trên, nhưng được thêm chất sát trùng Na_2SiF_6 – 0,02%. Trong nồi lên men chính, dịch đường cần đạt tới nồng độ 90 – 120g/l (khoảng 12 – 14^{0}Bx), pH cần phải ở khoảng 4,5 – 4,8 để hạn chế các loại vi sinh vật tạp nhiễm. Môi trường sau khi thanh trùng thì được tiếp men giống và cho lên men tất cả, khoảng 65 giờ, trong đó 10 giờ đầu cần phải sục khí để men sinh sản đủ lượng tế bào, sau đó cho lên men tĩnh và kỵ khí.

Nấm men sau khi lên men có thể dùng lại cho đợt sau, nhưng phải làm sạch các vi sinh vật tạp nhiễm theo cách sau: axit hoá bằng H_2SO_4 tới pH ≐ 2,7 – 3, giữ ở pH này 3 – 4 giờ và kiểm tra bằng kính hiển vi, khi có tới 50% lượng tế bào men bị chết thì men được chuyển vào trong dịch đường mới để lên men.

4.2.6. Đánh giá chất lượng men trong sản xuất

– Những nòi men rượu được dùng trong sản xuất cần có những yêu cầu sau đây: hoạt lực lên men cao, chịu được độ rượu cao, có khả năng phát triển và hoạt động trong môi trường axit, có thể chịu đựng được một số sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật tạp nhiễm.

– Những giống men rượu tinh bột cần phải lên men được glucozơ, maltozơ và các mono hoặc disaccarit khác có chứa trong môi trường cũng như biến đổi được các dextrin.

– Nấm men dùng trong thùng lên men cần có những chỉ số sau:

Số lượng tế bào nảy chồi 10 – 15%, lượng tế bào chết không quá 2 – 4% (số này tăng có nghĩa là trong môi trường có mặt các tác nhân kìm hãm hoạt động sống của nấm men); số tế bào chứa glycogen không nhỏ hơn 70%; số lượng tế bào nấm men không nhỏ hơn 120 – 140 triệu/1ml. Khi soi kính có vi khuẩn chuyển động, còn vi khuẩn không chuyển động không quá 4 – 6 tế bào trong môi trường nhìn.

Các nòi men rượu rỉ đường cần lên men được saccarozơ, glucozơ và 1/3 rafinozơ (hoặc hoàn toàn).

4.3. LÊN MEN RƯỢU TỪ NGUYÊN LIỆU TINH BỘT

– Nấm men không lên men được tinh bột. Vì vậy, các nguồn nguyên liệu tinh bột như gạo, ngô (đã tách phôi), sắn, khoai tây, đại mạch, yến mạch, cao lương,... cần phải qua xử lý (nghiền nhỏ hoặc vỡ mảnh, nấu chín) rồi đưa vào khâu đường hoá. Khâu này rất quan trọng, vì chỉ biến bột thành đường, nấm men mới có thể đồng hoá để lên men biến đường thành rượu.

Người ta có thể đường hoá bột bằng axit sunphuric hoặc axit clohydric, bằng hệ enzyme amylaza trong hạt ngũ cốc nảy mầm và chế phẩm enzyme của nấm mốc.

Ngày nay, công nghiệp rượu thường dùng chế phẩm nấm mốc với hệ enzyme amylaza (α, β và γ–amylaza) để đường hoá tinh bột. Phương pháp này khá phổ biến ở nhiều nhà máy rượu. Ngoài ra, người ta còn dùng chế phẩm amylaza từ vi khuẩn (α–amylaza), chế phẩm γ–amylaza (glucoamylaza) từ giả nấm men *Endomycopsis*.

Quá trình sản xuất chế phẩm amylaza từ nấm mốc sẽ giới thiệu ở chương 8.

– Sản xuất rượu từ tinh bột gồm có các công đoạn sau:

1) Chuẩn bị nguyên liệu để nấu thành dịch hồ (cháo); 2) Nấu chín dịch hồ: 3) Đường hoá và chuẩn bị dịch đường cho lên men; 4) Nhân giống nấm men; 5) Lên men; 6) Chưng cất.

Các công đoạn 1, 2, 3 có thể để chung một phân xưởng nấu và đường hoá, công đoạn 4 và 5 xếp trong phân xưởng lên men và 6 – Chưng cất, thường để riêng trong khâu hoàn thành sản phẩm.

4.3.1. Nấu và đường hoá

a) Nấu

– Tinh bột tự nhiên và sống thường nằm trong tế bào của nguyên liệu, ngoài có lớp vỏ bọc. Lớp vỏ này làm cho tinh bột không hoà tan ở nước lạnh, không cho phép amylaza thấm qua để tác dụng với tinh bột. Vì vậy, cần phải nghiền nhỏ nguyên liệu trước khi đường hoá. Khi nghiền nhỏ cũng phá vỡ một số vỏ tế bào chứa tinh bột. Khi nấu dịch, nguyên liệu tinh bột chuyển thành dạng dịch hồ dính, sau đó chuyển sang trạng thái hoà tan.

– Đường hoá bằng enzyme hạt mầm hay enzyme của nấm mốc, tinh bột chuyển thành đường maltozơ và dextrin.

– Hệ enzyme đường hoá có 3 enzyme: α, β và γ–amylaza. Hạt nảy mầm thường có α và β–amylaza, trong chế phẩm của nấm mốc có loại β–amylaza vượt trội và ít α–amylaza; có chủng mốc sinh ra nhiều β–amylaza và γ–amylaza (glucoamylaza), riêng với một số chủng *Endomycopsis* sinh ra chủ yếu γ–amylaza. Như các chương trước và phần trước của chương này chúng ta đã biết 3 loại enzyme amylaza này

có 3 tác dụng dến tinh bột: β–amylaza có tác dụng lên tinh bột làm cắt mạch phân tử thành các đoạn dài, β–amylaza có tác dụng thành đường đôi là maltozơ và các dextrin cuối; γ–amylaza chuyển tinh bột thành glucozơ.

– Nấu nguyên liệu có thể thực hiện theo nấu giai đoạn, nấu bán liên tục và nấu liên tục.

+ *Nấu gián đoạn* là nấu từng mẻ trong các bình kim loại có cánh khuấy với những nguyên liệu nghiền không cần nhỏ hoặc có thể để nguyên hạt hoặc sắn lát. Khi nấu nguyên liệu với nước theo tỷ lệ 1kg nguyên liệu bột với 4 lít nước (1: 4) dưới áp suất hơi 30 – 3,5kg/cm^2, thời gian là 60 – 70 phút; đối với ngô hạt thời gian kéo dài tới 80 – 90 phút và áp suất hơi là 4 – 4,5kg/cm^2.

+ *Nấu bán liên tục trong 3 nồi:* nấu sơ bộ, nấu chín và nấu bổ sung. So với nấu gián đoạn, phương pháp này giảm được áp suất hơi, giảm được lượng hơi sử dụng (khoảng 15 – 30%), thời gian ngắn hơn, tăng hiệu suất thu hồi còn là 7 lít/1 tấn bột.

+ *Nấu liên tục* trong nhiều nồi với trang bị công nghệ cao để theo dõi quá trình nấu và có nhiều ưu điểm hơn hai phương pháp trên.

b) Đường hoá

Dịch hồ đã nấu chín được làm nguội tới nhiệt độ đường hoá, sau đó cho chế phẩm enzyme đường hoá và dịch hồ tiến hành đường hoá. Làm lạnh dịch đường để đưa vào lên men.

Đường hoá có thể thực hiện gián đoạn hoặc liên tục.

– Đường hoá gián đoạn ở các nhà máy rượu Việt Nam: cho toàn bộ dịch hồ vào thùng đường hoá, bật cánh khuấy và làm nguội bằng nước tới 70^{0}C, cho chất sát khuẩn natri fluosilicat theo tỷ lệ 2‰ và chế phẩm enzyme mốc đường hoá khoảng 5 – 10%, để nguội tới 60^{0}C, cho nốt 90 – 95% chế phẩm enzyme mốc đường hoá còn lại. Thời gian đường hoá 4 giờ.

Dịch đường hoá khi kết thúc có 14 – 18% đường (tương đương 8 – 9^{0}Bx), đường khử khoảng 3%, độ chua: pH = 4,5 – 5,2 hoặc 0,8 – 1,2g H_2SO_4/l.

– Đường hoá gián đoạn còn có hai cách khác nữa (khác như lượng chế phẩm amylaza vào từ đầu, rồi làm nguội tới 60^{0}C cho nốt chế phẩm, hoặc cho chế phẩm khi dịch hồ nguội tới 57 – 58^{0}C,...).

– Đường hoá hai lần liên tục: được tiến hành trong các thiết bị khác nhau, dịch hồ và dịch chế phẩm enzyme (30%) được liên tục đi vào hệ thống đường hoá (lần 1), rồi bổ sung chế phẩm (70%) khi dịch ra khỏi thiết bị lần 1 để vào lần 2 và liên tục dưa vào lên men. Thời gian đường hoá chỉ khoảng 30 phút. Dịch đường được làm nguội tới 28 – 30^{0}C, rồi vào lên men.

4.3.2. Lên men

a) Chuẩn bị dịch lên men

Dịch đường thuỷ phân sau khi được làm nguội xuống 28 – 30^{0}C, hoặc có thể thấp hơn, cần phải tính toán và chuẩn bị một số công việc hiệu chỉnh nồng độ

dường vào khoảng 13 – 15% (tương đương với 16 – 18^{0}Bx nồng độ chất khô hoà tan %), pH = 4,5 – 5,2 (có thể điều chỉnh bằng axit sunphuric hoặc clohydric). Có tài liệu cho hay, ở Nga từ xưa đến nay có những xí nghiệp rượu – tinh bột dùng vi khuẩn lên men lactic trước khi lên men rượu, khi đạt được pH = 4,5 thì dùng hơi diệt khuẩn, sau đó làm nguội và lên men rượu. Ở đây có câu hỏi được đặt ra: có phải khâu axit hoá bằng lên men lactic ở Nga đã tạo ra sản phẩm rượu Vodka với thương hiệu Smirnov nổi tiếng thế giới hay không?

Một công việc hết sức quan trọng trong khâu chuẩn bị dịch lên men cũng như dịch nhân giống trong sản xuất là bổ sung nguồn N và P vào dịch đường thuỷ phân. Đối với dịch đường thuỷ phân từ gạo, ngô, đại mạch, cao lương,... thì hai nguồn N và P trong dịch tương đối đủ, nếu thiếu cũng không đáng kể. Còn dịch rỉ đường thì gần như thiếu 2 nguồn này hoàn toàn. Do vậy cần phải bổ sung nguồn N: có thể dùng amoni sunphat, ure, diamoni photphat (được kể là 2 nguồn N và P); nguồn P thường dùng là nước chiết suất từ supephotphat hoặc axit orthophotphoric. Cách tính gần đúng cho dinh dưỡng nấm men theo tỷ lệ C: N: P = 100: 5: 1 hoặc 200: 5: 1.

Như vậy 1m^3 dịch đường hoá từ sắn ta có thể phải bổ sung 0,5kg ure hoặc 1kg $(NH_4)_2SO_4$ và 0,1kg supephotphat (qua nước chiết).

b) Nhân giống trong sản xuất

Để tiến hành lên men cần phải có lượng giống đủ cung cấp cho các nồi lên men (thường lượng giống dùng ở khâu này bằng 10% thể tích dịch lên men). Số lượng tế bào trong dịch nhân giống phải đạt 100 – 120.10^6/ml hoặc hơn nữa, với tuổi giống phải trẻ, khoẻ, đang ở pha phát triển: chỉ số từ 10 – 11% đang nảy chồi. Giống không được tạp nhiễm. Tế bào chết không quá 5%.

Muốn đạt được yêu cầu giống đưa vào sản xuất phải:

– Nhân giống trong phòng thí nghiệm (như đã giới thiệu ở phần 4.2.5) từ ống giống thạch nghiêng qua dịch ống nghiệm, bình tam giác và các bình tới 5 hoặc 10 lít thì chuyển vào nhân giống trong sản xuất.

Trong sản xuất rượu công nghiệp, khi nuôi cấy nấm men tiêu hao được 2/3 lượng chất khô hoà tan trong dịch ban đầu, ta được giống sản xuất.

Thông thường giống sản xuất được nuôi riêng trong các nồi nhân giống, sau đó tiếp vào các thùng lên men.

– Nhân giống trong sản xuất có thể thực hiện nuôi gián đoạn hoặc nuôi liên tục (hình 4.3). Nuôi gián đoạn được tiến hành trong một thiết bị gọi là nồi nhân giống. Đó là một nồi chế tạo bằng thép kín, bên trong có hai hệ xoắn ruột gà (cho hơi và nước) và có cánh khuấy. Thể tích của nồi nhân giống thường vào khoảng 6 – 8% thùng lên men, số lượng nồi nhân giống tương đương với số bình lên men.

Dịch đường dùng nhân giống là dịch thuỷ phân tinh bột đã cân bằng dinh dưỡng và điều chỉnh pH tới 3,8 – 4,0. Dịch nhân giống được thanh trùng theo phương pháp Pasteur (*chú ý:* toàn bộ quá trình phải được thực hiện trong điều kiện vô trùng).

Giống từ phòng thí nghiệm được chuyển vào nhân giống trong sản xuất khi dịch nhân giống có nhiệt độ dưới 26°C. Sau 18 – 24 giờ nuôi cấy, lượng dùng tiêu hao khoảng 2/3 (từ 16 – 18° còn 5 – 6°Bx) và rượu tích tụ được 5% và đưa vào nuôi cấy tiếp hoặc đưa vào lên men.

+ Đối với các nhà máy lớn, nhân giống 1 lần không đủ lượng giống (10%) cho lên men ta phải nhân giống lần 2 tiếp tục và được gọi là nhân giống hai cấp (cấp 1 và cấp 2). Trường hợp tìm thấy 2 trực khuẩn trong một trường kính hiển vi, phải hạ pH dịch giống xuống tới 2,5 – 2,8 bằng H_2SO_4, để yên 40 – 60 phút, số lượng tế bào men chết tới 50%. Men giống xử lý như vậy có thể dùng tiếp theo với lượng tăng lên đến 15 – 20% và điều chỉnh nhiệt độ lên cao hơn 3 – 4°C.

Giống thuần khiết từ ống nghiệm được nhân vào sản xuất có thể chỉ phải làm 1 lần trong 1 năm, nếu sản xuất ổn định. Như vậy, các nồi nhân giống cấp 1, cấp 2 hoặc cấp 3 sau khi nuôi giống đã đạt yêu cầu, người ta lấy ra 2/3 để đưa vào sản xuất và sau đó cho ngay một lượng dịch vừa đủ để nhân giống tiếp theo trong khoảng 6 – 8 giờ là đủ lượng tế bào nấm men dùng cho sản xuất.

– Nhân giống cũng như lên men cần giữ ở nhiệt độ 28 – 32°C, nếu nhiệt độ tăng cao phải hạ nhiệt độ bằng nước lạnh qua đường ruột gà, hoặc nếu không có thì phải tưới nước qua vỏ từ trên xuống. Nấm men ở nhiệt độ trên 32°C phát triển nhanh, nhưng tạo ra sản phẩm phụ làm giảm chất lượng và ở nhiệt độ cao (đặc biệt trên 35°C) các tạp khuẩn phát triển rất nhanh làm hỏng quá trình lên men.

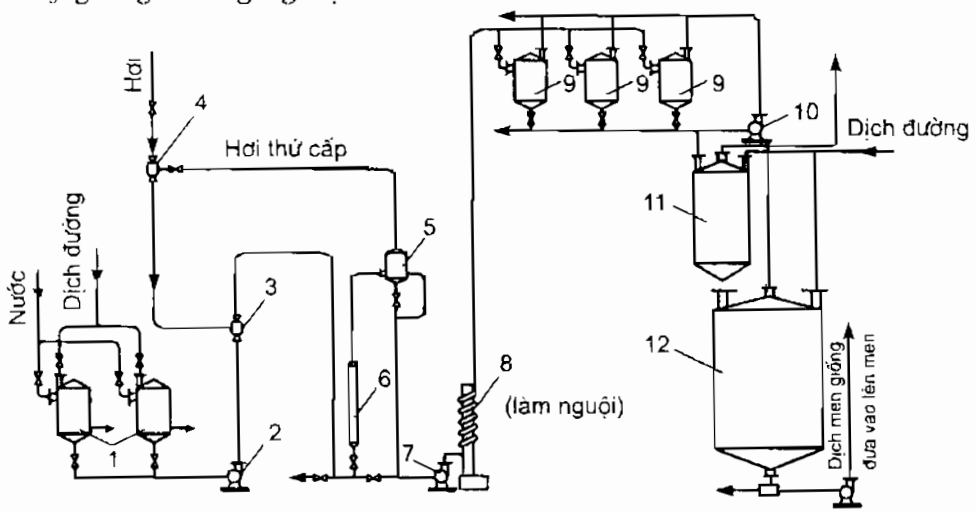
– Trước khi nuôi men, nồi hoặc thùng nuôi được rửa sạch, xì hơi nóng và thanh trùng bằng hơi, sau đó làm lạnh tới 55 – 58°C thì bổ sung nguồn dinh dưỡng nitơ cùng với dịch đường, sau đó đưa nhiệt độ đến 75°C, giữ 30 phút và làm lạnh tới 30°C.

– Khi tới 30°C, cần axit hoá bằng H_2SO_4 tới 0,7 – 0,9° và pH = 3,8 – 4,0 (ở đây cũng có thể axit hoá bằng vi khuẩn lên men lactic).

– Sau khi dịch đường đã chuẩn bị xong, cấy 6 – 8% dịch men đã nhân trước đó (có thể trong phòng thí nghiệm), khuấy và làm nguội (cho nước lạnh qua ống xoắn ruột gà) tới 22 – 24°C với mục đích ngăn ngừa tạp khuẩn phát triển khi nấm men còn chưa kịp sinh sản, mặt khác nấm men sinh trưởng ở nhiệt độ tương đối thấp này có thể thực hiện các quá trình lên men tốt hơn, ít sinh ra tạp chất là các sản phẩm phụ gây hại cho chất lượng sản phẩm và sức khoẻ người tiêu dùng. Thời gian nuôi men là 18 – 22 giờ và nhiệt độ lên tới 26 – 29°C. Quá trình nuôi cấy dịch đường giảm nồng độ chất khô hoà tan từ 17 – 18% xuống tới 5 – 8%, hàm lượng rượu trong dịch tích tụ tới 5%. Độ chua của dịch trong quá trình không đổi. Nếu độ chua tăng qua mức 0,05°, men có thể phải loại bỏ. Men nhân giống ở đây được coi là sản phẩm tế bào chứa nhiều glycogen, 3 – 4% số tế bào nảy chồi và không quá 1% tế bào chết trên một trường kính không có tạp khuẩn. Nếu có một mẫu nào đó phát hiện thấy trực khuẩn (1 – 2 trực khuẩn trên một trường kính) thì phải xử lý bằng axit hoá tới pH = 2,5 – 2,8, giữ 40 – 60 phút tới khi diệt được 50% số tế bào nấm men và lại dùng làm giống nuôi nhân giống tiếp theo hoặc đưa vào lên men.

Các giống loại này khi chuyển tiếp cần tăng lượng giống đến 15 – 20% và đưa nhiệt lên cao hơn 3 – 4°C so với nuôi bình thường.

– Giống sau khi nuôi nhân giống đạt yêu cầu, người ta chuyển tiếp vào nuôi tiếp theo với thể tích gấp 10 – 20 lần hoặc đưa vào lên men. Trước khi chuyển, lấy dịch giống ra các thùng (bình) nhỏ, kín và đã vô trùng để đưa vào làm giống nuôi mẻ sau. Nếu quá trình lưu giống đạt yêu cầu kỹ thuật thì hàng năm nhà máy mới phải thay giống từ ống nghiệm.



Hình 4.3. Sơ đồ trang bị trong dây chuyền công nghệ nuôi men rượu liên tục trong sản xuất

– Trình bày một dây chuyền công nghệ nuôi men liên tục trong nhà máy rượu nuôi nhân giống 3 cấp:

Cấp 1 ở bình số 9;

Cấp 2 ở bình số 11;

Cấp 3 ở bình số 12.

Các bình 1 được chứa dịch đường và cân bằng dinh dưỡng, nâng nhiệt bằng hơi tới 75 – 78°C, giữ ở 30 phút để thanh trùng Pasteur (trước đó đã giữ ở 55°C trong 45 – 60 phút) rồi đưa sang bình 6 nhờ bơm 2, chuyển qua separator (máy ly tâm tách) thu hơi thứ cấp đưa về 4. Nhờ bơm 7 đưa dịch qua trao đổi nhiệt 8, làm nguội tới 22 – 24°C, đưa vào nhân giống cấp 1 ở các bình 9.

Bình 11 nhận dịch từ đường ống chính và nhân giống từ các bình 9.

Bình 12 nhận dịch từ đường ống chính và nhân giống cấp 2 từ bình 11.

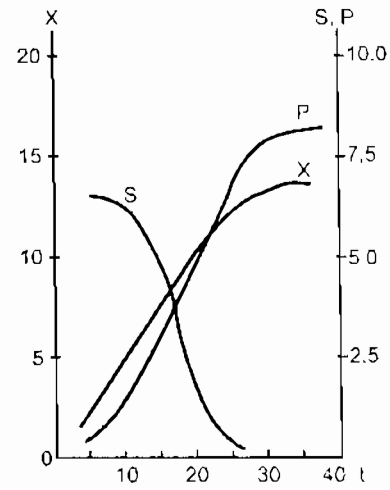
Thời gian nhân giống có thể là 16, 12, 8 giờ và lượng giống chuyển tiếp là 10, 20 và 30% lượng giống đã hoàn thành nuôi ở mỗi cấp. Sau một thời gian ngắn nuôi ban đầu sẽ hình thành dòng dịch và giống vào các bình nuôi 9, 11, 12 và lượng men nhân giống từ bình 12 ra đều đặn để đưa vào dãy các thùng lên men. Số lượng tế bào nấm men trong dòng chuyển men giữ ở mức 80 – 90 triệu/ml.

c) Lên men

Sau khi đã chuẩn bị xong dịch lên men có khoảng 16 – 18% chất khô hoà tan (tương đương với 13 – 18% đường) cùng với chất sát khuẩn cũng như bổ sung các

nguồn dinh dưỡng (đặc biệt đối với dịch đường thuỷ phân từ sắn cần phải bổ sung các nguồn N và P), tiếp giống nhân trong sản xuất với tỷ lệ 8 – 10% theo thể tích dịch. Trong trường hợp lượng giống không đủ cho lên men, cần phải sục khí để men giống tiếp tục phát triển. Nhiệt độ lên men: 28 – 32°C, pH 4,2 – 5,2. Tế bào nấm men tiếp tục sinh sản và sinh khối phát triển đến khi nồng độ rượu đạt tới 5% sẽ dừng lại hoặc phát triển chậm dần đến ngừng hẳn. Quá trình lên men tiến hành trong 2 – 3 ngày, động học của quá trình lên men rượu được trình bày ở hình 4.4.

Đối với những nòi nấm men chịu được nồng độ cao, khi lên men đường giảm xuống 6 – 8%, có thể bổ sung thêm đường (không cần cân đối dinh dưỡng N và P) và như vậy nấm men sẽ tiếp tục chuyển hoá đường thành rượu, năng suất lên men được tăng lên. Bình thường một quá trình lên men với nồng độ đường ban đầu 13 – 15% thì rượu tạo thành 7 – 8°, nếu bổ sung đường có kết quả: tổng đường trong lên men có thể tới trên 20% và rượu sinh ra cũng nhiều hơn (có khi đạt trên 10%).



Hình 4.4. Động học lên men rượu

X: số lượng tế bào nấm men (.10⁷/ml);
S: nồng độ đường (%);
P: nồng độ rượu; t: thời gian (giờ).

– Quá trình lên men rượu cần phải chú trọng:

+ Chống nhiễm tạp khuẩn, bảo vệ quá trình lên men.

+ Làm nguội cho quá trình lên men (ở nước ta khi lên men mùa hè, dịch đường thường nóng hơn 35°C, thường phun nước dội từ trên xuống quanh thùng). Trường hợp lên men ở nhiệt độ cao dẫn đến những hậu quả xấu: dễ tạp nhiễm, sinh nhiều sản phẩm phụ làm giảm chất lượng sản phẩm,...

– Lên men rượu trong công nghiệp có thể tiến hành lên men gián đoạn theo từng mẻ, lên men liên tục và lên men bán liên tục:

+ Lên men gián đoạn:

Lên men gián đoạn được thực hiện từng mẻ trong thùng lên men. Thùng lên men được chế tạo từ thép đen, bên trong được trang bị hai hệ ruột gà để dẫn hơi và nước, có thể chỉ có một hệ ống xoắn dẫn nước làm nguội dịch. Nếu trường hợp không có hệ làm nguội này thì dịch cần làm nguội ở hệ trao đổi nhiệt bên ngoài và khi lên men, nhiệt độ tăng cao, phải dội nước từ nắp thùng.

Nhiệt độ lên men ban đầu là 28°C, nếu có thể làm nguội tới 20 – 22°C cũng được. Khi lên men, nhiệt độ toả ra làm khối dịch nóng lên, có khi vượt 35°C. Trong mọi trường hợp lên men, trên 35°C là không tốt. Vì vậy, bằng mọi cách để đảm bảo cho lên men ở 28 – 32°C. Sau khi tiếp giống, nồng độ men giống trong 1ml dịch vào khoảng 12 triệu tế bào. Trong quá trình lên men cần theo dõi tình trạng giống, nồng độ đường, độ chua dịch. Dịch lên men trong sản xuất thường gọi là "giấm".

Lên men được coi là bình thường nếu sau 50 giờ, thấy đường là 0 (do độ khô hoà tan theo chiết quang kế), độ chua không quá 0,8g H_2SO_4/l.

Kết thúc lên men khi quãng thời gian lấy mẫu là 8 giờ, độ Bx không giảm, hoặc chỉ giảm 0,1 – 0,2%.

Lên men gián đoạn thường cho năng suất thấp, nhưng dễ thực hiện, dễ xử lý khi nhiễm và được áp dụng phổ biến ở các xí nghiệp rượu nước ta.

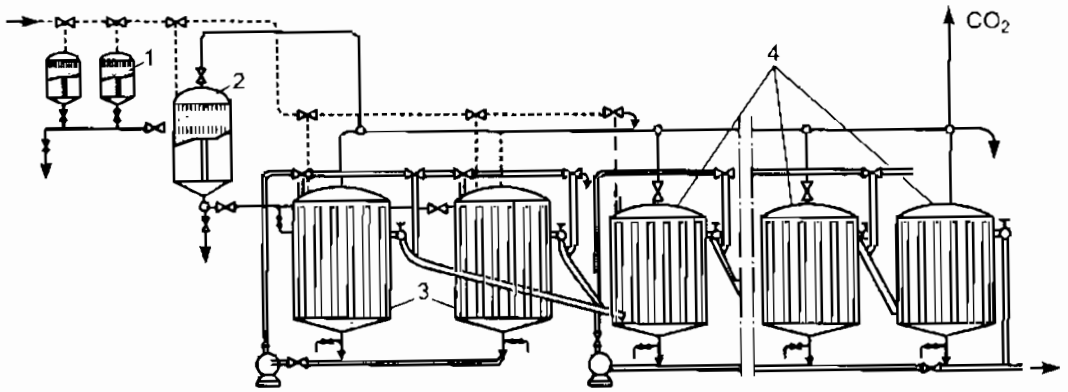
+ Lên men liên tục:

Lên men liên tục có đặc điểm là thùng lên men đầu tiên được tiếp một lượng lớn men giống và luôn có nồng độ men trong dịch cao (100 – 120 triệu tế bào/ml, cao gấp 8 – 10 lần so với lên men gián đoạn). Dịch đường và men giống chảy đầy vào thùng đầu tiên này sẽ chảy tràn sang thùng tiếp theo và cứ như vậy đến thùng cuối thì dịch lên men được kết thúc (giấm chín).

Giống men ở đây được nhân trong 2 cấp: cấp 1 có 2 bình (1) có thể tích bằng 25 – 30% bình nhân giống cấp 2. Bình (1) còn lại sau khi đã chuẩn bị dịch nhân giống (thanh trùng ở 75°C, điều chỉnh pH, cân bằng dinh dưỡng) được tiếp 25 – 30% men giống ở bình (3) nuôi men nước. Có như vậy sẽ đủ lượng men cấp 1 chuyển vào nhân giống cấp 2 và đủ giống cấp 2 đưa vào lên men.

Dây chuyền lên men liên tục được thể hiện ở hình 4.5.

Lên men chính chủ yếu xảy ra ở 2 thùng lên men đầu tiên (3), dịch lên men có đủ giống sẽ chảy tràn sang 3 thùng (4) và tiếp theo thùng,... và kết thúc. Vấn đề quan trọng ở đây là phải khống chế nồng độ men giống ở các thùng (3) luôn ở mức 100 – 120 triệu tế bào trong 1ml. Các thùng (3) phải thay nhau làm việc, chuẩn bị dịch lên men và thanh trùng.



Hình 4.5. Sơ đồ công nghệ lên men rượu liên tục

1. Hai thùng nhân giống cấp 1; 2. Thùng lên men giống cấp 2;
3. Thùng lên men đầu tiên; 4. Các thùng lên men tiếp theo

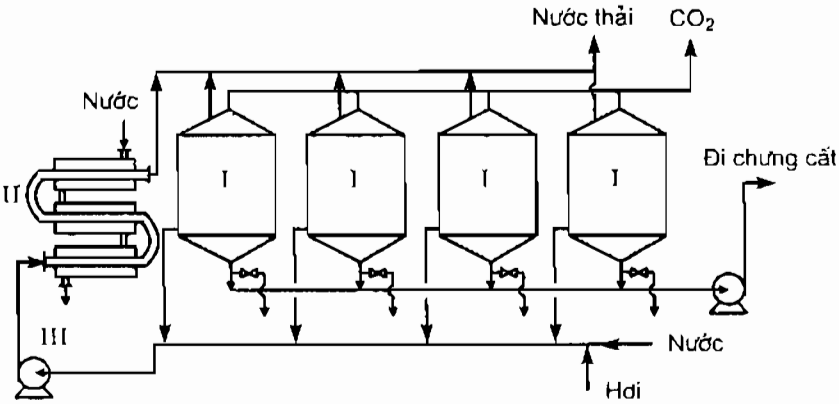
Ưu điểm của phương pháp công nghệ này là lên men xảy ra nhanh, hạn chế được tạp nhiễm.

+ Lên men bán liên tục:

Hệ thống thiết bị trong dây chuyền bán liên tục được cải tiến từ hệ lên men

gián đoạn: thêm một bộ phận trao đổi nhiệt ở bên ngoài kết nối với các thùng lên men bằng một hệ thống dẫn dịch. Khi lên men ở các thùng I, nhiệt độ lên quá cao sẽ được bơm đưa dịch qua làm nguội ở II và trở lại I lên men tiếp. Trong quá trình không cần thêm tế bào men giống, có thể dùng 1 thùng I đang thời kỳ men giống phát triển được axit hoá bằng H_2SO_4 đến pH 4,0 – 4,2 kết hợp với bơm tuần hoàn làm lạnh sau 1 – 2 giờ, san 1/2 dịch sang thùng khác, sau đó thêm dịch đường mới vào cả hai thùng, được 2 thùng lên men đồng thời.

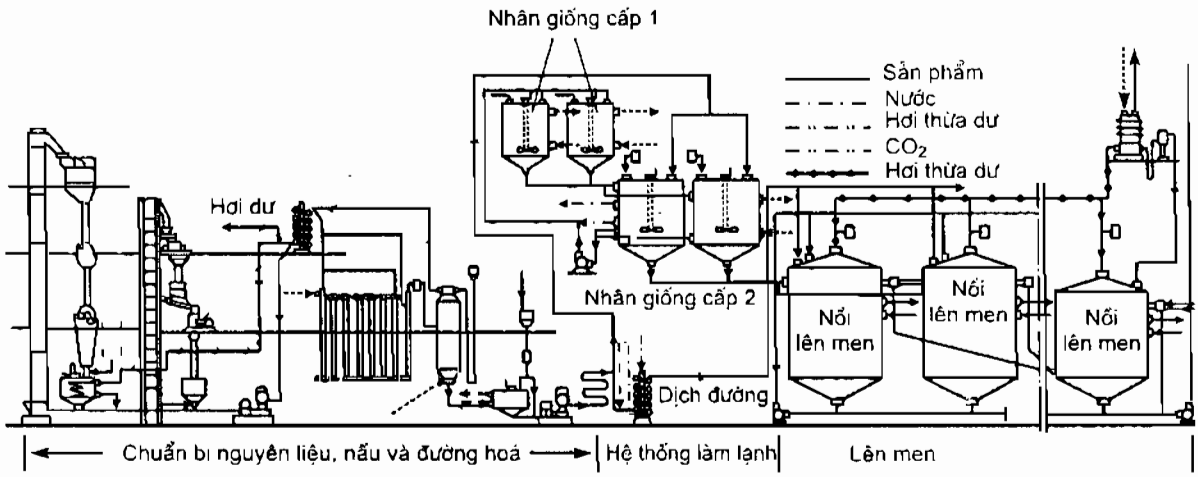
Sơ đồ công nghệ của quá trình lên men bán liên tục trình bày ở hình 4.6.



Hình 4.6. Sơ đồ công nghệ lên men bán liên tục
I. Các thùng lên men; II. Hệ làm lạnh; III. Bơm.

Công nghệ lên men bán liên tục dễ thực hiện, dễ khống chế được nhiệt độ lên men không tăng quá cao và có thể tăng cường tốc độ lên men nhờ CO_2 thoát ra khỏi dịch nhanh hơn.

Hình 4.7 sẽ trình bày một sơ đồ công nghệ lên men rượu liên tục từ nguyên liệu tinh bột.



Hình 4.7. Sơ đồ công nghệ lên men rượu từ nguyên liệu tinh bột

4.4. LÊN MEN RƯỢU TỪ RỈ ĐƯỜNG

4.4.1. Xử lý nguyên liệu

– Rỉ đường là sản phẩm phụ của ngành công nghiệp đường. Rỉ đường mía hoặc rỉ đường củ cải đều là nguồn nguyên liệu rất tốt cho công nghiệp vi sinh, trong công nghiệp rượu. Trong rỉ đường chứa tới 60 – 75% đường, trong đó phần lớn là saccarozơ, giàu chất khoáng, nhưng thiếu photpho (P) và có thể thiếu nguồn N dinh dưỡng cho nấm men. Rỉ đường mía khá giàu biotin (vitamin H). Đặc biệt là cả hai loại rỉ đường đều thấy có mặt các vi khuẩn không sinh bào tử và các loài sinh bào tử với số lượng tương đối lớn. Do vậy, muốn đưa rỉ đường vào lên men rượu cần phải xử lý.

– Xử lý rỉ đường gồm các bước sau:

+ Pha loãng thường theo tỷ lệ 1 : 1 (1 rỉ đường + 1 nước theo thể tích).

+ Axit hoá bằng H_2SO_4.

+ Bổ sung nguồn N và P cùng các chất kháng khuẩn, khuấy đều.

+ Gia nhiệt, có thể tới 120°C trong 10 phút, 110°C trong 30 phút, hoặc 80 – 95°C trong 45 – 60 phút. Khi gia nhiệt khuấy đều.

+ Để yên khoảng 4 giờ để lắng cặn. Lấy phần trong phía trên cặn để chuẩn bị dịch nuôi men nhân giống và dịch lên men.

4.4.2. Chuẩn bị dịch nuôi cấy nhân giống và lên men

Dịch rỉ đường đã xử lý, sau khi để lắng cặn được dùng để pha các môi trường làm dịch nuôi cấy nhân giống và lên men. Trong công nghiệp sản xuất rượu từ rỉ đường, có các nhà máy áp dụng công nghệ lên men một dòng (một nồng độ) và lên men hai dòng (hai nồng độ).

– Dịch lên men một dòng có nồng độ chất khô 20 – 22% (tương đương 15 – 16% đường), pH 4,5 – 5,0 (tương đương với độ chua 1,0 – 1,5g/ lít H_2SO_4); Ure cần bổ sung là 0,5g/l, supephotphat 0,1 – 0,2g/l (qua nước chiết); Chất kháng khuẩn natrifluosilicat 2‰.

– Dịch lên men hai dòng được pha như sau:

+ Dòng thứ nhất có nồng độ chất khô hoà tan 11 – 13% hoặc 12 – 14%, được nuôi men trong thùng nhân giống hoặc cho lên men sinh trưởng trong thời gian đầu ở thùng lên men đã đạt số lượng lớn men giống trong dịch, sau đó bổ sung đầy dịch thùng bằng dòng thứ hai nồng độ chất khô hoà tan 33 – 35%.

+ Dòng thứ hai có nồng độ chất khô hoà tan là 33 – 35%.

Các dòng này cần pH 4,5 – 5,0, có chất sát khuẩn và cân bằng dinh dưỡng N và P.

Nhân giống và lên men rượu rỉ đường về nguyên lý cũng tượng tự như lên men từ tinh bột nhưng từng công đoạn cũng có những sự khác biệt.

4.4.3. Nhân giống trong sản xuất rượu từ rỉ đường

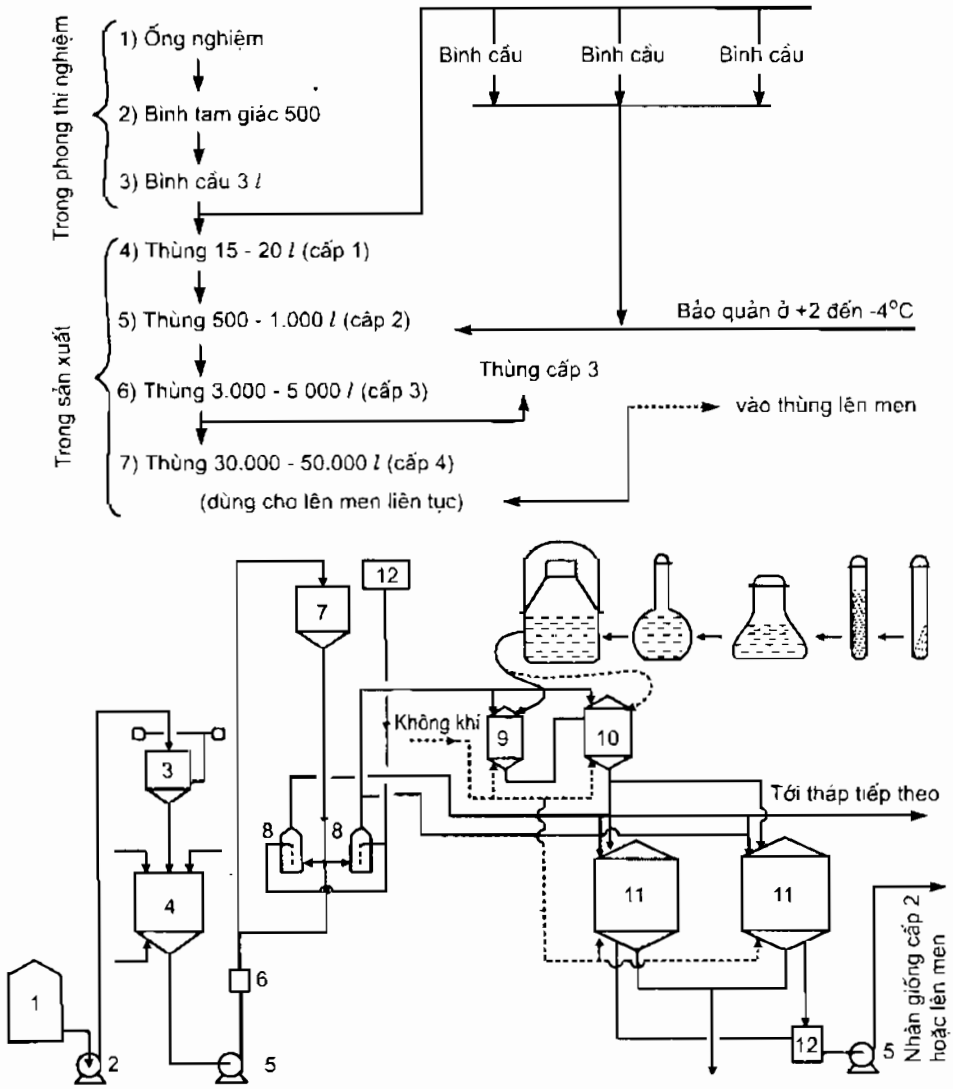
– Lên men rượu từ rỉ đường người ta thường chọn những nòi nấm men thích hợp với rỉ đường, chủ yếu là phát triển tốt và chuyển hoá đường thành rượu nhiều trong môi trường như dịch lên men đã chuẩn bị ở mục trên. Ngoài ra cần chọn lọc

các đặc tính như: khả năng lên men rafinozơ, khả năng di truyền, hoạt tính maltaza, tốc độ lên men và khả năng tạo thành các sản phẩm phụ.

– Ngày nay người ta có thể dùng một số nòi thuần chủng hoặc hai nòi hỗn hợp trong sản xuất rượu từ rỉ đường để nâng cao hiệu suất lên men cũng như nâng cao được chất lượng sản phẩm, đặc biệt là hương thơm do các sản phẩm phụ sinh ra.

– Nhân giống thực hiện ở hai công đoạn: phòng thí nghiệm và trong sản xuất. Giống gốc được giữ trong các ống thạch – malt, chuyển sang nuôi ở bình tam giác và bình cầu, rồi chuyển sang nuôi nhân giống cấp 1, cấp 2, cấp 3 (cấp 4 nếu lên men liên tục) trong sản xuất.

– Quá trình nhân giống theo sơ đồ hình 4.8.



Hình 4.8. Sơ đồ pha loãng, xử lý và nhân giống men rượu từ rỉ đường

1. Bể chứa rỉ đường; 2. Bơm; 3. Thùng cân; 4. Thùng pha loãng sơ bộ và xử lý; 5. Bơm ly tâm; 6. Bình lọc cặn; 7. Thùng chứa rỉ loãng; 8. Thiết bị pha loãng; 9, 10. Thiết bị gây men I và II (cấp 1), nhân giống cấp 2 hoặc lên men; 11, 12. Thùng đường định mức đưa vào nhân giống cấp 3 hoặc lên men.

Chế độ nuôi men và yêu cầu kỹ thuật ở mỗi cấp nhân giống được trình bày ở bảng 4.1. Quá trình xử lý rỉ đường và nhân giống nấm men từ phòng thí nghiệm đến lên men – hình 4.8 (quá trình này có 2 cấp gây men, nhân giống trong sản xuất và lên men gián đoạn – theo từng mẻ). Với các xí nghiệp nhỏ, khâu nhân giống sản xuất chỉ thực hiện một cấp ở thiết bị số 9 và 10, sau đó đưa vào lên men ở thiết bị số 11, còn các xí nghiệp lớn hơn cần nhân giống 2 hoặc 3 cấp: các thùng 11 dùng nhân giống cấp 2,... và khi lên men liên tục sẽ nhân giống cấp 4 rồi mới đưa vào lên men (bảng 4.1).

Bảng 4.1. Quá trình và chế độ nuôi cấy nhân giống lên men rượu từ rỉ đường

Số TT	Dụng cụ và thiết bị nhân giống	Thể tích V (l)		Dịch nuôi cấy		Sinh khối (% so với V dịch)	Điều kiện nuôi cấy		
		Chung	Sử dụng	Nồng độ chất khô (%)	Độ chua (H_2SO_4)		T°C	Thông khí	Thời gian (giờ)
1	Ống nghiệm	–	–	10 –12	0,2 – 0,3	–	30	Không lắc (thông khí)	4 – 6
2	Bình tam giác	0,5	0,4	13 –14	0,4 – 0,5	2 – 2,5	30	"	24
3	Bình cầu	3	2,4	14 – 15	0,4 – 0,5	15 – 17	30	"	24
3b	Bình cầu	3	2,4	14 – 15	0,4 – 0,5	25	30	"	24
4	Nồi nhân giống cấp 1	20	16	15 – 16	0,7 – 0,8	15	28 – 30	Liên tục, nhẹ	24
5	Nồi nhân giống cấp 2	1.000	800	16 – 17	0,9 – 1,1	2	28 – 30	Liên tục, mạnh	44 – 45
6	Nồi nhân giống cấp 3	5.000	4000	17 – 18	0,8 – 0,9	15 – 16	28 – 30	"	18
7	Nồi nhân giống cấp 4 (cho lên men liên tục)	30.000 – 50.000	24.000 – 40.000	20 – 22	0,4 – 0,5	10 – 17	28 – 30	"	5 – 6

4.4.4. Lên men

Trong các nhà máy rượu với các nguyên liệu là rỉ đường người ta cũng thực hiện các quy trình công nghệ lên men gián đoạn và lên men liên tục, bán liên tục như ở các nhà máy rượu từ tinh bột, song quá trình công nghệ có điểm khác là dùng biện pháp lên men một nồng độ (một dòng), hoặc hai nồng độ (hai dòng).

– Lên men gián đoạn:

+ Lên men rượu gián đoạn từ rỉ đường theo biện pháp công nghệ một dòng: dịch lên men có nồng độ chất khô hoà tan là 22 – 24%, được bổ sung 10% dịch nhân giống. Thời gian lên men 40 – 48 giờ ở nhiệt độ 30 – 32°C.

+ Lên men gián đoạn hai dòng: cho dịch đường và toàn bộ men giống 10% vào 50% V thùng lên men. Lúc này nồng độ dịch đường có nồng độ chất khô 12 – 14%, nuôi 3 – 4 giờ và được bổ sung dòng rỉ đường có nồng độ 30 – 32% đến đầy thùng.

Qua hai phương pháp lên men gián đoạn trên đây ta thấy rằng: phương pháp

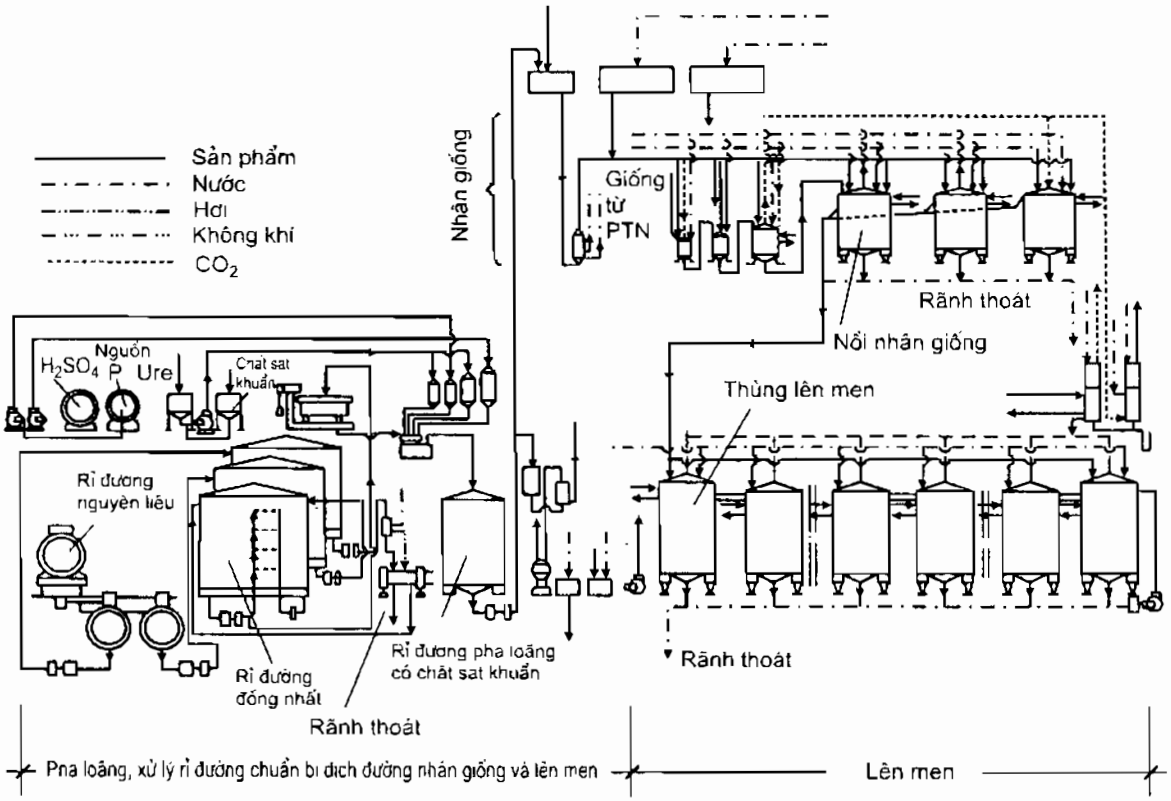
lên men một dòng đơn giản, dễ thực hiện, còn phương pháp hai dòng phức tạp hơn, nhưng thường có hiệu suất lên men cao hơn khoảng 0,5 – 1° cồn và thời gian lên men ngắn hơn.

– Lên men liên tục từ rỉ đường cũng tiến hành tương tự như từ tinh bột. Điều khác nhau ở đây là dịch đường có nồng độ 50%, sau khi xử lý, liên tục được pha loãng tới 12 – 14% và 30 – 32% ở hai thiết bị khác nhau và cùng vào nồi lên men đầu tiên. Nấm men ở nồi lên men này phát triển mạnh với lực lên men rất cao, được san sẻ liên tục cho các nồi nuôi tiếp theo. Thời gian lên men theo phương pháp này 32 – 40 giờ, ngắn hơn lên men gián đoạn khoảng 8 giờ.

Nồng độ cồn được tạo thành trong dịch lên men từ rỉ đường đạt khoảng 9 – 10% (cao hơn ở dịch lên men từ tinh bột). Đường sót còn khoảng 0,3 – 0,6g%. *Một điều cần lưu ý:* khi nhân giống trong sản xuất rượu từ rỉ đường nhất thiết phải sục khí với tỷ lệ không khí/ dịch là 2 – 3 V/V/giờ nhằm để tăng lượng lên men giống, rút ngắn thời gian lên men và tăng hiệu suất lên men.

Kinh nghiệm cho hay rằng, nấm men sau khi lên men gián đoạn một dòng có thể dùng làm men bánh mỳ rất tốt, còn nấm men thu được theo phương pháp hai dòng không được dùng vào mục đích này.

Sơ đồ công nghệ lên men rượu từ rỉ đường trong quy mô công nghiệp được giới thiệu ở hình 4.9.



Hình 4.9. Sơ đồ công nghệ lên men rượu từ rỉ đường một dòng – một nồng độ

4.5. CHỐNG TẠP NHIỄM CHO LÊN MEN

Trong quá trình lên men rất dễ bị tạp nhiễm do tạp khuẩn, phổ biến nhất là vi khuẩn lactic. Người ta hay dùng các chất kháng khuẩn vào mục đích bảo vệ lên men. Những chất kháng khuẩn hay diệt khuẩn dùng ở đây không ảnh hưởng đến hoạt động sống của nấm men, không có tác dụng xấu đến chất lượng sản phẩm và không gây độc đối với con người cũng như động vật, không làm hoen gỉ và ăn mòn thiết bị.

Những hợp chất clo hữu cơ có thể được dùng trong công nghiệp rượu, nhưng khi dùng cần phải cẩn thận, đặc biệt phải chú ý liều lượng cho phép được sử dụng, vì chúng có tác dụng làm gỉ thiết bị rất mạnh và ức chế nhiều enzyme ở hạt nảy mầm cũng như ở chế phẩm mốc cám. Trì hoặc pentaclophenolat còn giữ độc tính trong dịch lên men khi kết thúc. Formalin có thể được sử dụng tới 0,025%, cao hơn sẽ kiềm chế hoạt động của các enzyme đường hoá và trong tế bào nấm men. Axit fluosilic hay natri fluosilicat là phụ phẩm khi sản xuất supe photphat gây ăn mòn mạnh kim loại, nhưng ở nước thường dùng 2‰ cho cả dịch nhân giống cả dịch lên men. Chất kháng sinh cũng có thể dùng vào mục đích này với nồng độ là 0,75 – 2 đv/ml dịch. Gần đây một số chất kháng sinh mới không dùng trong trị liệu là lactoxit do xạ khuẩn *Actinomyces* sinh ra và dùng chống tạp nhiễm do lên men khá tốt: dùng cho nhân giống là 150 – 160 đv/ml và lên men chính là 50 – 60 đv/ml.

4.6. CHƯNG CẤT VÀ TINH LUYỆN

Dịch lên men rượu từ tinh bột hoặc từ rỉ đường sau khi kết thúc thường có nồng độ rượu etylic vào khoảng 5 – 10%, thường được gọi là giấm chín. Ngoài ra còn có những chất dễ bay hơi khác như các este, aldehyt, các loại rượu khác,...

Trong dịch này còn có tinh bột, cặn rỉ đường, dextrin, protein, các axit hữu cơ và chất khoáng. Trong nhiều hợp chất như vậy, nhưng dịch giấm chín chủ yếu gồm rượu và nước, vì vậy trong quá trình nghiên cứu và thực hiện công nghệ, ta xem dịch này là hỗn hợp gồm 2 cấu tử.

Dịch giấm chín cần phải chưng cất để loại nước đưa hàm lượng etanol 70 – 80 đến 90 – 96%. Sản phẩm này gọi là cồn. Song, chưng cất một lần ta chỉ được cồn thô, trong cồn thô còn chứa nhiều tạp chất (bảng 4.2 và 4.3), cần loại bỏ để được sản phẩm cồn tinh sạch dùng làm đồ uống 0 – cồn thực phẩm. Vì vậy, quá trình chưng cất thường kết hợp với tinh luyện.

4.6.1. Chưng cất và tinh luyện gián đoạn

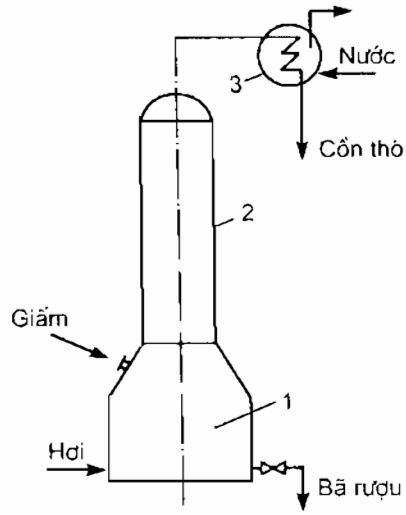
Tháp chưng cất và tinh luyện gián đoạn được trình bày ở hình 4.10.

Dịch giấm chín là hỗn hợp cồn – nước. Khi chưng cất ở áp suất khí quyển (p = 760mmHg) hỗn hợp này có điểm sôi là 78,15°C. Khi sôi, nồng độ của hỗn hợp là đẳng phí, có nghĩa là thành phần trong pha lỏng và pha hơi bằng nhau. Nồng độ rượu ở điểm sôi là 97,1% V. Như vậy, khi chưng cất và tinh chế, có thể nhận được cồn có nồng độ ≤ 97,2% V.

Cồn thô chứa tới 50 chất được coi là tạp chất của cồn. Tạp chất của còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là từ nguyên liệu khoai tây, hạt ngũ cốc, rỉ đường (hình 4.10).

Trong cồn thô từ rỉ đường, tạp chất dao động trong khoảng khá lớn: các axit hữu cơ từ 20 – 200mg/l, este từ 150 – 550mg/l, aldehyt từ 90 – 900mg/l, alcol bậc cao từ 0,2 – 5% khối lượng và hợp chất chứa nitơ tính theo amoniac từ 8 – 18mg/l.

Qua phân tích sắc ký khí ta thấy: thành phần của axit hữu cơ gồm axit axetic 75 – 85%, axit butyric 5 – 10%, còn lại là các axit khác; thành phần của aldehyt gồm có aldehyt axetic (axetaldehyt từ 75 – 90%, aldehyt propylic từ 5 – 10%, aldehyt butyric từ 2 – 8%; trong số các este thì 75 – 85% là este của axit axetic, 5 – 10% gồm este của axit propylic, valeric,...



Hình 4.10. Chưng cất gián đoạn
1. Thùng chứa dung dịch rượu lên men; 2. Thân tháp; 3. Bình ngưng tụ và làm lạnh cồn

Bảng 4.2. Tạp chất trong cồn thô từ một số nguyên liệu

Nguyên liệu	Este (mg/l cồn khan)	Aldehyt (% so với rượu)	Dầu fusel (% so với rượu)	Axit (mg/l cồn khan)
Khoai tây	416,6	0,0047	0,28	78,8
Khoai tây + hạt	306,7	0,011	0,21	32,1
Hạt	242,5	0,040	0,41	86,4
Rỉ đường	376,7	0,116	0,32	113,9

Các alcol bậc cao cũng khác nhau, chưng chủ yếu là alcol amylic và alcol izobutyric. Các alcol bậc cao thu được có mùi hôi khét, ta thường gọi là dầu hôi hay dầu fusel.

Một số tạp chất mang tính đặc thù của từng nguyên liệu. Cồn rượu nhận được từ rỉ đường chứa ít furfurol, gọi là tạp chất gây vị đắng. Đó là các tecpen. Các chất này có thể có trong cồn rượu với hàm lượng rất nhỏ, có thể phân tích định lượng qua các phương pháp hoá học, nhưng với vị giác lại dễ cảm nhận thấy rõ.

Tinh chế cồn:

Đối với cồn thô thu được sau khi chưng cất gián đoạn, cần phải xử lý bằng hoá chất: xút và thuốc tím ($KMnO_4$) dựa trên cơ sở xút tác dụng với các este, axit tự do, sau đó dùng thuốc tím làm chất oxy hoá các aldehyt (bảng 4.3).

Cách tiến hành: Pha cồn thô tới nồng độ 50% V, dùng dung tích xút 10% cho vào khuấy đều, điều chỉnh tới pH = 8,5 – 9; tiếp theo cho dung dịch $KMnO_4$ 2% vào, khuấy đều tới khi xuất hiện màu hồng đậm. Gia nhiệt trong nồi cất, giữ nguyên không cho bay hơi trong 1 – 2 giờ để các phản ứng xảy ra. Sau đó đun tiếp tới sôi và chưng cất phân đoạn qua tháp: khoảng 3 – 5% lượng cồn đầu (1) để riêng

vì chứa nhiều tạp chất; tiếp theo là sản phẩm (2) khoảng 6 – 12%, rồi đến sản phẩm (3) – sản phẩm chính có thể thu được 60 – 80% tổng số lượng cồn thu được; sau sản phẩm chính là sản phẩm cồn (2b) với số lượng là 6 – 12% và cồn cuối là dầu fusel từ 3 – 5%.

Bảng 4.3. Các tạp chất có trong cồn thô

Các tạp chất trong cồn thô	Công thức hoá học	Phân tử lượng	Nhiệt độ sôi, °C
Aldehyt			
– Axetic	C_2H_4O	44,05	20,2
– Acroleic	C_3H_4O	56,08	52,5
– Furfurol	$C_5H_4O_2$	96,08	161,7
Este			
– Formyat etyl	$C_3H_6O_2$	74,08	54,4
– Axetat etyl	$C_4H_8O_2$	88,10	77,1
– Axetat metyl	$C_3H_6O_2$	74,08	56,0
– Izobutyrat etyl	$C_6H_{12}O_2$	116,16	110,1
– Butyrar etyl	$C_6H_{12}O_2$	116,16	121,0
– Axetat izoamyl	$C_7H_{14}O_2$	130,18	142,0
– Izovalorat etyl	$C_7H_{14}O_2$	130,8	134,0
– Izovalovat izoamyl	$C_{10}H_{20}O_2$	172,26	194,0
– Axetal	$C_6H_{14}O_2$	118,17	102,4
Alcol			
– Izopropylic	C_3H_8O	60,09	82,4
– Propilic	C_3H_8O	60,09	97,2
– Izobutylic	$C_4H_{10}O$	74,12	108,1
– Butylic	$C_4H_{10}O$	74,12	117,9
– Izoamylic	$C_5H_{12}O$	88,15	132,1
– Amylic	$C_5H_{12}O$	88,15	137,8
– Metylic	CH_4O	32,04	64,7
– Hexilovic	$C_6H_{14}O$	102,17	155,7
Axit			
– Formic	CH_2O_2	46,03	100,8
– Axetic	$C_2H_4O_2$	66,05	118,1
– Butyric	$C_4H_8O_2$	88,10	163,6
Hợp chất khác			
– Tecpen	$C_{10}H_{16}$	136,23	167 – 170
– Hydrat tecpen	$C_{10}H_{18}O$	154,24	206 – 210

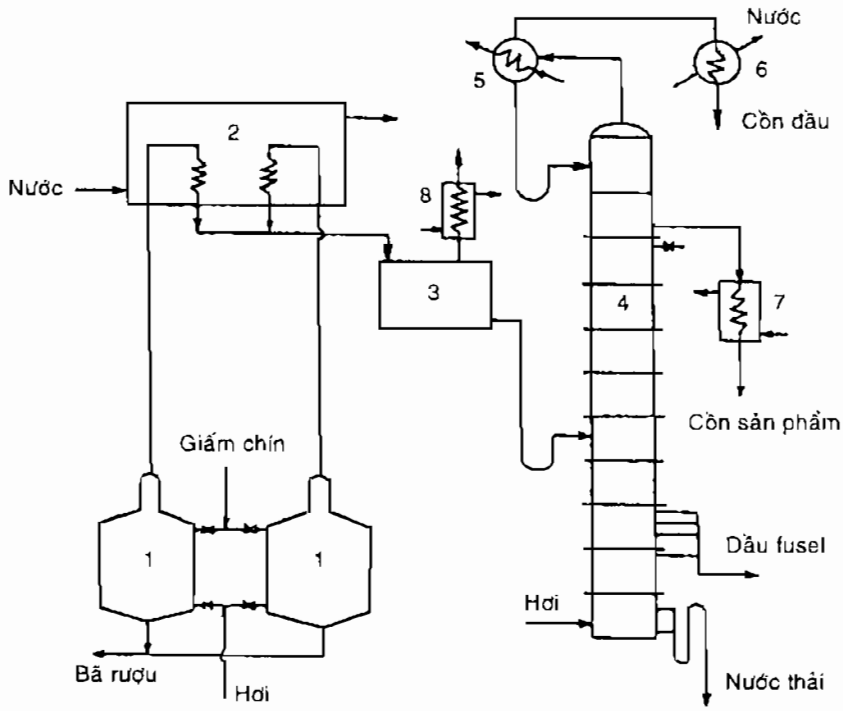
Có thể lấy dầu fusel theo từng mẻ tinh chế hoặc có thể sau 2 – 3 mẻ mới lấy ra.

Chưng cất gián đoạn với thiết bị đơn giản, trình độ công nghệ thấp, dễ thao tác, nhưng mất nhiều thời gian, thùng chứa lớn, năng suất thấp, tốn nhiều hơi nước nóng và nồng độ cồn ra khỏi tháp không cao (lúc đầu chỉ đạt 75 – 80%, sau đó giảm dần và cuối cùng là 6%. Nồng độ trung bình thu được là 20 – 30%). Do vậy, công nghiệp rượu hiện nay có xu hướng trang bị các tháp chưng cất liên tục theo hệ thống 1, 2, 3 tháp cất và thêm một tháp chưng luyện.

Chưng luyện gián đoạn có thể thu được cồn có chất lượng cao, nhưng tổn thất qua các khâu là rất lớn, do đó hiệu suất thu hồi thấp, tốn hơi và nhân công cho việc cất lại.

4.6.2. Chưng luyện bán liên tục (chưng cất gián đoạn, luyện liên tục)

Để khắc phục các nhược điểm của chưng cất và tinh luyện gián đoạn, chúng ta có thể thực hiện theo sơ đồ bán liên tục (chưng gián đoạn, luyện liên tục) (hình 4.11).



Hình 4.11. Sơ đồ chưng luyện bán liên tục

1. Thùng cất thô; 2. Thùng ngưng tụ cồn thô; 3. Thùng tạm chứa cồn thô; 4. Tháp tinh chế; 5, 6. Bình ngưng tụ; 7, 8. Bình làm lạnh.

Lên men xong, giấm chín được bơm vào thùng chứa 1. Vì làm việc gián đoạn lên phải bố trí hai thùng song song nhưng làm việc so le để ổn định phần nào nồng độ cồn thô trước khi vào tháp tinh. Thùng cất thô được đun trực tiếp bằng hơi có áp suất 0,8 – 1kg/cm^2. Hơi rượu bay lên được ngưng tụ ở 2 rồi vào thùng chứa 3, tiếp đó liên tục đi vào tháp tinh chế 4. Ở 4 cũng được đun bằng hơi nước trực tiếp, từ đĩa tiếp liệu (16 – 18 tính từ dưới lên) xuống đáy, nồng độ cồn giảm dần, đến đáy tháp còn 0,015 – 0,03% rồi ra ngoài. Nhiệt độ đáy tháp phải 103 –105°C. Hơi rượu bay lên được tăng dần nồng độ, phần lớn được ngưng tụ ở 5 rồi hồi lưu trở lại tháp. Một phần nhỏ chưa ngưng kịp còn chứa nhiều tạp chất dầu được đưa sang ngưng tụ tiếp ở 6 và lấy ra ở dạng cồn đầu. Cồn đầu chỉ dùng pha vecni, làm cồn đốt, sát trùng hoặc đem xử lý và cất lại.

Cồn sản phẩm lấy ra ở dạng lỏng cách đĩa hồi lưu (từ trên xuống) khoảng 3 – 6 đĩa,

được làm lạnh ở 7, rồi vào thùng chứa và vào kho. Cồn lấy ra ở đây tuy có nồng độ thấp hơn (0,3 – 0,5%V) so với đỉnh tháp nhưng chưa ít este và aldehyt.

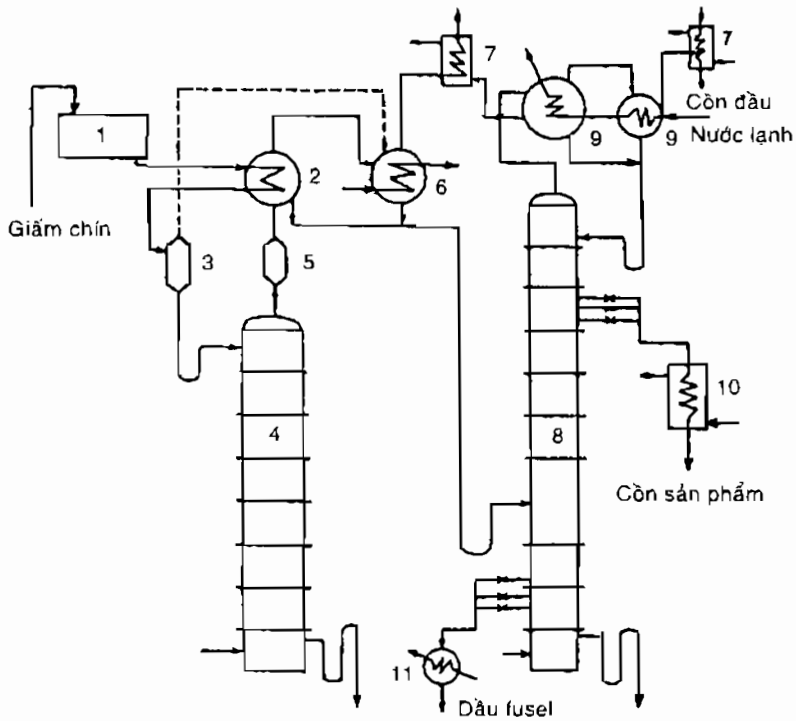
Chất lượng cồn thu được tuỳ thuộc vào chiều cao tháp và cách vận hành của từng xí nghiệp, nhưng về nguyên tắc hoàn toàn có thể thoả mãn tiêu chuẩn Việt Nam TCVN–1971.

4.6.3. Chưng luyện liên tục

Ngày nay nhiều nhà máy rượu lớn đã trang bị hệ thống chưng luyện liên tục hai tháp, ba tháp, bốn tháp (có một tháp tinh luyện),...

Với trang bị các thiết bị chưng cất và tinh luyện này cồn sản phẩm thu được có chất lượng cao, đạt các tiêu chuẩn của TCVN–71 dùng pha các loại rượu làm đồ uống và rượu thuốc. Sau đây giới thiệu sơ lược sơ đồ dây chuyền chưng cất – tinh luyện hai tháp.

Sơ đồ hai tháp chưng luyện gián tiếp một dòng (hình 4.12):



Hình 4.12. Sơ đồ liên tục hai tháp

1. Thùng cao vị chứa giấm chín; 2. Bình hâm giấm; 3. Bình tách CO_2 và khí không ngưng; 4. Tháp cất khô; 5. Bình chống phụt giấm; 6. Bình ngưng tụ cồn thô; 7. Bình làm lạnh ruột gà; 8. Tháp tinh chế; 9. Bình ngưng tụ hồi lưu; 10. Bình làm lạnh cồn sản phẩm; 11. Bình ngưng và làm lạnh dầu fusel.

Dịch giấm chín đưa lên thùng 1, qua bình 2 được gia nhiệt tới 70 – 80°C, qua 3 để tách CO_2 rồi đi vào 4. Hơi cồn bay lên ngưng tụ ở 2, phần chưa ngưng tiếp tục sang ngưng ở 6. Toàn bộ cồn thô ngưng ở 2, 6 và 7 đi vào tháp tinh chế 8 ở đĩa thứ 16 – 18 tính từ dưới lên. Tháp tinh cũng được cấp nhiệt bằng hơi nước có áp suất p = 0,8 – 1kg/cm^2. Hơi rượu bay lên được nâng cao dần nồng độ ra khỏi tháp

đi vào 9. Tại đây điều chỉnh lượng nước lạnh để lấy cồn đầu ra ở 7, khoảng 3 – 5% so với toàn bộ lượng cồn đưa vào hệ thống tháp. Số ngưng tụ ở 9 được hồi lưu trở lại tháp.

Cồn thành phẩm được lấy ra ở đĩa hồi lưu ba đến sáu đĩa và đoạn làm lạnh ở 10. Nhiệt độ đáy của 2 tháp luôn đảm bảo 103 – 105°C. Nhiệt độ đỉnh tháp 4 phụ thuộc nồng độ cồn trong giấm và thường vào khoảng 93 – 97°C. Nhiệt độ đỉnh tháp tinh 8 vào khoảng 78,3 – 78,5°C. Nhiệt độ thân tháp tinh ở vị trí các đĩa tiếp liệu về phía trên 3 – 4 đĩa khống chế ở 82 – 83°C. Dầu fusel lấy ra ở dạng hơi từ đĩa thứ 6 đến 11 (tính từ dưới lên) được ngưng và làm lạnh ở 11, sau đó đi vào thiết bị phân ly dầu, loại ra ở đáy tháp thô.

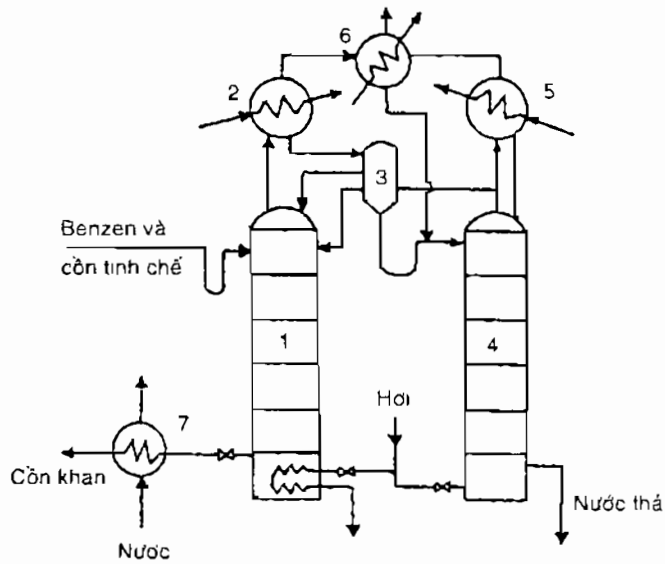
Hệ thống chưng luyện hai tháp tuy có tiên tiến hơn so với chưng luyện gián đoạn và bán liên tục nhưng chất lượng cồn vẫn chưa cao, hoặc muốn thu nhận được cồn tốt phải lấy tăng lượng cồn dầu.

Trong công nghiệp người ta trang bị tinh luyện 3 tháp và 1 tháp làm sạch (4 tháp), có thể thêm một tháp chưng cất dầu fusel để nâng cao chất lượng cồn.

4.7. TINH LUYỆN ĐỂ THU NHẬN CỒN TUYỆT ĐỐI

Phần trên chúng ta đã đề cập đến một cách sơ lược về công việc chưng cất và làm sạch cồn. Cồn sản phẩm thu được có thể là cồn khá tinh khiết (ít tạp chất), nhưng nồng độ cồn chỉ đạt được 96%. Đối với việc sử dụng cồn làm chất đốt hoặc làm nguyên liệu đặc biệt cho một số ngành kinh tế – kỹ thuật, người ta cần phải thu được cồn tuyệt đối, hoặc được gọi là cồn khan. Cồn tuyệt đối có nghĩa là cồn không có nước, hoặc nước còn lại với hàm lượng rất nhỏ (0,02%).

Hình 4.13. giới thiệu qua về công nghệ thu nhận cồn tuyệt đối.



Hình 4.13. Sơ đồ nhận cồn khan từ cồn tinh chế

1. Thuỷ tinh chế cồn khan; 2. Bơm ngưng tụ hỗn hợp đẳng phí; 3. Bình phân ly; 4. Tháp chưng 5; 6, 7. Bình ngưng tụ và làm sạch.

Tinh chế cồn khan được thực hiện như sau: cồn tinh chế có nồng độ 95 -- 96% cùng với benzen được tính trước, đi vào tháp 1 được đun bằng hơi gián tiếp ở đáy. Hỗn hợp 3 cấu tử bay lên kéo theo lượng nước chứa trong cồn và benzen đưa vào, sau khi ngưng tụ và làm lạnh ở 2, hỗn hợp đi vào bình phân ly 3. Ở đây benzen được phân lớp và quay trở lại tháp 1, còn alcol và nước đi và tháp tinh chế 4. Khác với tháp 1, ở tháp 4 được cấp hơi trực tiếp, hơi rượu bay lên sau khi ngưng tụ ở 5,

một phần đi vào tháp 1, phần còn lại hồi lưu vào 4 và chảy dần xuống đáy thành nước thải ra ngoài, tương tự các sơ đồ chưng luyện thông thường.

Cồn ở tháp 1 chảy xuống dưới đáy không còn nước và benzen được làm sạch ở 7, ta thu được cồn khan – không nước.

4.8. SẢN XUẤT RƯỢU THỦ CÔNG TRUYỀN THỐNG

Ở nước ta có nhiều địa phương sản xuất rượu thủ công từ xưa và có một số vùng cho rượu đặc sản nổi tiếng, như rượu Vân Hà – Đại Lâm, thường gọi là rượu làng Vân (Hà Bắc), rượu Bầu Đá (Bình Định), rượu ngô Bắc Hà (Lào Cai), rượu đế Nam Bộ, rượu cần Tây Nguyên, Tây Bắc, đặc biệt là rượu nếp cẩm (hay nếp than) có ở cả miền Nam và miền Bắc.

Các loại rượu cho chất lượng rượu khá cao, mùi vị thơm ngon, làm cho người tiêu dùng nhớ mãi.

Về cơ sở khoa học sản xuất rượu công nghiệp và rượu thủ công là không khác nhau, nhưng quá trình công nghệ, men giống và chất lượng thành phẩm là khác nhau.

– Sản xuất rượu công nghiệp có hai khâu (hay hai công đoạn) đường hoá và rượu hoá tách rời nhau, kế tiếp lẫn nhau, cũng có thể xen kẽ với nhau. Sản xuất rượu thủ công, hai khâu này không tách biệt mà chúng ta tưởng như là xảy ra đồng thời. Thực ra sản xuất rượu thủ công, khâu đường hoá cũng xảy ra trước, biến bột thành dường. Số đường tạo ra ban đầu được tích tụ rượu trong dịch lên men. Dịch lên men rượu thủ công xảy ra hai quá trình đường hoá và rượu hoá gần như đồng thời, nhưng cũng theo quy luật là sinh trưởng của nấm men đến mật độ nào đó thì dừng lại và các tế bào nấm men vẫn sản sinh ra rượu. Điểm max sinh trưởng bao giờ cũng trước điểm max sinh ra rượu của nấm men.

– Men giống lên men công nghiệp là các giống thuần chủng của *Saccharromyces serevisise*. Men giống sản xuất rượu thủ công được bảo quản trong bánh men khô cùng với các giống nấm mốc và giả nấm men. Vì vậy, khi rắc men vào cơm hoặc xôi từ các nguồn tinh bột (gạo, sắn, ngô) thì trước tiên nấm mốc phát triển sinh ra các enzyme đường hoá (amylaza) chuyển hoá tinh bột thành đường maltozơ, glucozơ, dextrin,... Nấm men đồng hoá các gluxit này để phát triển và lên men rượu.

Các loại bánh men này chủ yếu là bột gạo, được bổ sung các vị thuốc bắc, thuốc nam, hoặc các loại lá của thực vật (thường là thảo dược). Vì vậy bánh men được gọi là men thuốc bắc hoặc men lá.

– Sản phẩm rượu thủ công gồm hai dạng: dạng chưng cất thường gọi là rượu trắng (kiểu như vodka ở nước ngoài), loại không chưng cất như rượu nếp, rượu nếp cẩm, rượu cần (kiểu như rượu sake của Nhật Bản).

4.8.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu sản xuất rượu thủ công là gạo nếp, gạo tẻ, nếp cẩm, ngô, sắn. Ở nước ta ít khi dùng khoai tây, khoai lang vào sản xuất rượu.

Trong các nguyên liệu kể trên, gạo nếp (nếp cái hoa vàng, nàng hương, nếp cẩm) là loại rượu ngon nhất. Thành phần hoá học và hàm lượng các chất của nguyên liệu nếp cẩm được giới thiệu ở bảng 4.4.

Bảng 4.4. Thành phần hoá học của nếp cẩm

Thành phần	Hàm lượng (%)	Màu sắc của hạt nếp cẩm
Protein	8,2	Từ màu nâu – huyết dụ đến đen huyền và cho sản phẩm màu sắc tương tư
Lipit	1,5	
Gluxit	74,9	
Axit hữu cơ	0,6	
Tro	0,8	
Độ ẩm	14,0	

Tinh bột các loại gạo nếp có tỷ lệ amylaza và amylopectin khác với gạo tẻ và ngô, nên dễ đường hoá hơn. Đặc biệt là các loại gạo nếp nương, có mùi thơm dễ chịu. Mùi thơm này nhận thấy ở rượu thành phẩm.

4.8.2. Cách làm bánh men

4.8.2.1. Bánh men truyền thống

Gạo tẻ, dùng loại gạo xay hoặc xát dối (chưa kỹ), ngâm nước khoảng 1 – 2 giờ. Lấy gạo ra, để ráo, nước đem nghiền hoặc giã nhỏ rồi trộn với men giống theo tỷ lệ 2 – 5 bánh men giống giã nhỏ trộn với bột gạo ẩm. Sau đó nặn thành bánh tròn có đường kính khoảng 3 – 5cm. Bột gạo khi nặn bánh men có độ ẩm sao cho khi định hình bánh men không bị chảy nước hoặc bị tơi bột và khi thành bánh được xoắn phần trên thành dạng củ hành dược là vừa đủ. *Chú ý:* khi làm bánh men, dùng gạo xay có nhiều cám, trong đó chứa nhiều vitamin và chất khoáng. Những chất này rất cần cho sinh trưởng của nấm mốc và nấm men. Bột gạo nhào trộn với bột men giống cần có độ ẩm khoảng 50 – 55%. Nếu ẩm quá thì sự thoáng khí trong bánh men kém, nấm men và nấm mốc phát triển kém và vi khuẩn kỵ khí phát triển mạnh, trước hết là vi khuẩn lactic. Trường hợp không đủ độ ẩm, các hạt bột rời rạc không định hình được bánh men.

Đặt bánh men lên một lớp trấu mới (đã rửa sạch, phơi khô kỹ) trải trên nong, mành hoặc có thể trên nền nhà sạch. Đậy các bánh men bằng nong hoặc phủ trên mặt các bánh men bằng rơm sạch. Để như vậy khoảng 2 – 3 ngày, khi thấy bánh men phồng nở đều và xung quanh thấy các bào tử mốc có các chấm đen, vàng nhạt thì đem bánh men ra phơi chỗ thoáng, có thể dưới ánh Mặt Trời. Nhiệt độ khi ủ bánh men và phơi khô không nên để nóng quá (khoảng 30 – 35°C là tốt). Gói các bánh men đã tương đối khô vào gác bếp để hàng ngày được xông khói và làm khô thêm. Sau khoảng 1 tháng thì đem dùng dần cho sản xuất rượu.

Cách làm bánh men như trên nhận được bánh men bình thường, dễ bị nhiễm các khuẩn lạ không mong muốn khi sản xuất rượu, làm ảnh hưởng xấu đến hiệu suất và chất lượng sản phẩm, đặc biệt là mùi vị kém. Vì vậy, trong dân gian thường

làm bánh men có trộn thêm thuốc bắc hoặc các lá cây thu được các loại men thuốc bắc và men lá. Các loại men này đã được dùng lâu đời và đã tạo ra các loại rượu truyền thống nổi tiếng.

4.8.2.2. Men thuốc bắc

Men thuốc bắc được trộn các vị thuốc bắc hoặc thuốc nam với bột gạo. Bột gạo nghiền nhỏ, bột thuốc bắc nghiền nhỏ cùng bột bánh men, trộn đều. Tỷ lệ thuốc bắc với bột gạo có thể là 1:10 (nếu nồng độ rượu thành phẩm quá nồng độ ta sẽ rút tỷ lệ thuốc bắc; hoặc ngược lại, sẽ tăng thêm). Tỷ lệ bột men và nước như phần trên.

Vai trò thuốc bắc ở đây là: có tính kháng khuẩn, chống các tạp khuẩn, tạo cho rượu thành phẩm có mùi vị riêng biệt và có thể cung cấp thêm dinh dưỡng, cũng như làm chất kích thích sinh trưởng cho nấm men, nấm mốc.

Người ta có thể dùng các bài thuốc bắc với đầy đủ 24 vị, thường là 8 – 10 vị, có khi dùng ít hơn. Qua kinh nghiệm, càng nhiều vị thuốc bắc và nấu rượu bằng gạo nếp cho sản phẩm thơm ngon và hiệu suất thu được cao hơn.

Sau đây sẽ giới thiệu một vài bài thuốc dùng trong sản xuất bánh men (còn có nhiều bài thuốc khác nữa, nhưng 6 – 8 vị cơ bản đầu gần giống nhau).

– Bài 10 vị Bắc:

1. Nhục đậu khấu	3g	6. Bạc hà	2g
2. Bạch truật	2g	7. Tế tân	2g
3. Nhục quế	2g	8. Uất kim	2g
4. Thảo quả	2g	9. Tiểu hồi	2g
5. Cam thảo	2g	10. Khung cung	2g

– Bài 8 vị Bắc:

1. Nhục đậu khấu	3g	5. Cam thảo	2g
2. Bạch truật	2g	6. Bạc hà	2g
3. Nhục quế	2g	7. Tế tân	2g
4. Thảo quả	2g	8. Tiểu hồi	2g

– Bài 10 vị Nam;

1. Cam thảo nam	10g	6. Lá ổi	6g
2. Giềng củ	6g	7. Lá cúc tần	6g
3. Gừng củ	6g	8. Lá bưởi bung	6g
4. Ngải cứu	6g	9. Lá húng quế	6g
5. Hạt tiêu	6g	10. Nhân trần	6g

Các vị thuốc được phơi khô, tán nhỏ và trộn đều. Bột hỗn hợp có thể mua sẵn ở những cửa hàng thuốc bắc.

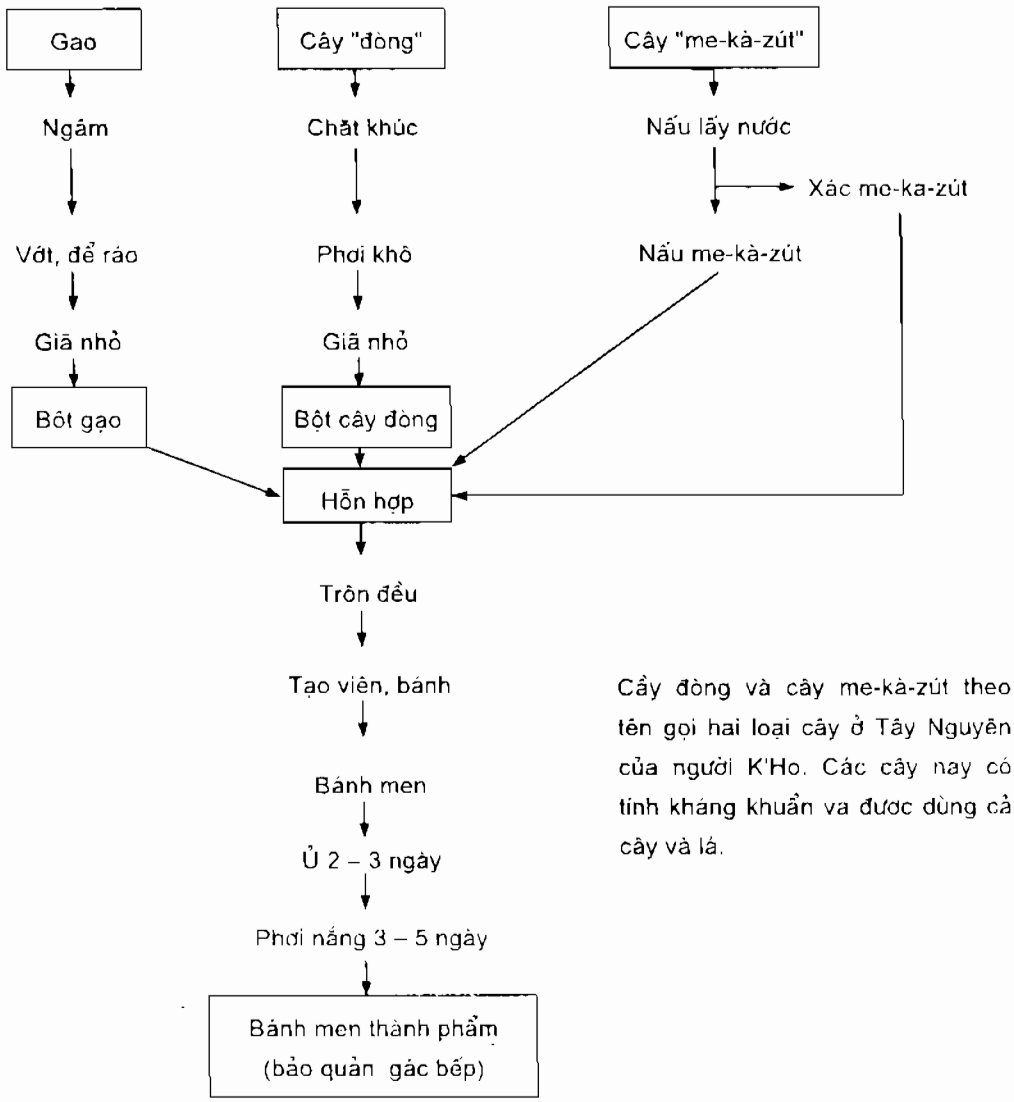
4.8.2.3. Men lá

Men lá là dùng các lá có sẵn ở miền núi thay cho các vị thuốc bắc. Các lá thường là lá rừng có nhiều tinh dầu có mùi thơm. Tuỳ mỗi địa phương có những

bài lá khác nhau. Mùi vị rượu thành phẩm phụ thuộc rất nhiều vào các loại lá, vào số lượng dùng trong bánh men.

Vùng phía Tây Nghệ An dùng các loại lá: lá mít (bơ mị), lá mía (bơ ồi), lá nhân trần (bơ há nan), lá quế (bơ quể), không có lá quế thì dùng vỏ quế (pước quể). Các loại lá đem giã nhỏ, rắc đều cùng bột gạo và làm bánh men cũng tương tự như trên.

Men lá và men rượu cần ở Tây Nguyên dùng men lá và quy trình làm men hai lá như sau:



Hình 4.14. Quy trình sản xuất men hai lá

4.8.3. Hệ vi sinh vật trong bánh men

Giống vi sinh vật dùng để làm bánh men là nấm men, nấm mốc có sẵn ở các bánh men cũ. Vì vậy, men bánh có tính địa phương và không thuần khiết, nhưng nói chung hệ vi sinh vật ở đây thường là:

– Nấm mốc gồm có *Aspergillus oryzae, A. flavus, A. awamorii, A. usami, A. niger* (giống *Aspergillus* chiếm phần lớn), *Mucor (M. sircinilloides), Rhizopus, Penicillium* và *Amylomyces rouxii*,... Nấm mốc sinh emzyme amylaza đường hoá tinh bột.

– Nấm men chủ yếu là *Saccharomyces cerevisiae*. Ngoài ra còn thấy *Hyphopichia butonii, Pichia anomada, Candida*,... những nấm men này coi như là men dại, men tạp có lẫn trong bánh men và không mong muốn. Nấm men rượu chuyển hoá đường thành rượu.

– Trong bánh men ta còn thấy có loài men giả là *Endomycopsis fibuliger*. Giống *Endomycopsis* tương tự như nấm men nhưng có thể mọc sợi, có khả năng sinh glucoamylaza và thuỷ phân tinh bột thành đường glucozơ. Vì vậy trong nghề làm rượu, người ta rất muốn giống này để cùng *Aspergillus, Mucor* và *Rhizopus* đường hoá tinh bột.

– Vi khuẩn: thường thấy có mặt vi khuẩn lactic, vi khuẩn axetic,... Nói chung, vi khuẩn có mặt ở đây đều là vi khuẩn tạp nhiễm, không mong muốn.

Các giống nấm mốc *Aspergillus, Mucor, Rhizopus* đóng vai trò sinh ra enzyme amylaza đường hoá tinh bột. Khi đường hoá, hệ enzyme trong nấm mốc thường ít α–amylaza và nhiều β–amylaza, vì vậy đường tạo thành chủ yếu là maltozơ và các dextrin cuối (cũng có thể lên men được).

Một số chủng mốc thuộc loài *Aspergillus awamorii, A. usami* sinh ra nhiều glucoamylaza, khi đường hoá cho sản phẩm là glucozơ. Hai loài này sinh bào tử có màu đen, nhìn thấy bằng mắt thường như các đầu kim nhỏ. Hình thức *A. usami* và *A. awamorii* khá giống nhau. Chúng thường có mặt trong bánh men.

Aspergillus oryzae và *A. flavus* cũng rất giống nhau, sinh bào tử khi già có màu vàng lục (vàng hoa cau), vì vậy chúng được gọi là mốc vàng hoa cau. Chúng có khả năng sinh enzyme amylaza và proteaza. Trong nghề làm tương, làm xì dầu và làm rượu rất hay gặp các mốc vàng.

Aspergillus niger, bào tử tương đối lớn và rất đen, được gọi là mốc đen, có khả năng sinh ra nhiều enzyme amylaza, nhưng đồng thời có thể tạo ra axit xitric từ dịch đường. Vì vậy, người ta cũng không mong muốn sự có mặt của mốc này trong bánh men, nhưng đây là một điều khó khăn, vì mốc này rất phổ biến trong tự nhiên. Trong sản xuất rượu cẩm, có tác giả khuyến nghị cần phải loại trừ sự có mặt *A. niger* trong bánh men, vì nó sinh ra axit, làm oxy hoá chất màu authoxyanin của nếp cẩm, ảnh hưởng xấu đến màu của rượu thành phẩm.

Việc sử dụng mốc vàng hoa cau trong nghề làm tương, nước chấm xì dầu và làm rượu cũng cần lưu ý: *A. flavus* có khả năng sinh amylaza và proteaza dùng để thuỷ phân tinh bột thành đường, thuỷ phân protein thành peptit và axit amin, nó còn sinh ra độc tố aflatoxin khi môi trường nuôi cấy có chất béo. Độc tố này ảnh hưởng nhiều tới gan. Vấn đề cần phải nghi vấn là trong sản xuất, sự có mặt mốc này có sinh ra aflatoxin không? Cần phải có những công trình nghiên cứu làm sáng tỏ.

Mucor và *Rhizopus* có hình dạng rất giống nhau, chỉ khác nhau phần hệ sợi cơ

chất. Trong nghề làm rượu rất hay gặp hai giống này, đặc biệt là *Mucor rouxii*, *M. mucedo*, *M. japancus*. Ở ta hay gặp *M. rouxii* (phát triển tốt trên môi trường Czapek và trên gạo).

Một số chủng *Mucor* có khả năng sinh tổng hợp hai hệ enzyme diastaza (amylaza) đường hoá tinh bột và zimaza lên men rượu từ đường. Vì vậy, chúng có thể lên men trực tiếp chuyển từ tinh bột thành rượu. *Mucor rouxii* sinh ra nhiều rượu hơn một số loài khác và được dùng nhiều trong men rượu.

Hơn nữa, khi có mặt *Rhizopus* và *Mucor* lên men, rượu có mùi thơm rất dễ chịu. Cơ chế sinh mùi thơm ở đây của hai mốc này như thế nào đến nay còn hoàn toàn chưa rõ.

Penicillium là mốc sinh bào tử có màu xanh, thường gọi là mốc xanh. Tuy nó có khả năng sinh ra hệ enzyme đường hoá mạnh, nhưng nó thường cho mùi vị mốc rất khó chịu như nhiều mốc khác. Những mốc sinh "mùi đặc trưng" của mốc thường không được hoan nghênh trong nghề chế biến thực phẩm.

Giống *Endomycopsis* được gọi là giả nấm men. Khi trưởng thành có hệ sợi giả cùng với bào tử đính nhiều chồi, bào tử phấn, hoặc tế bào phân đôi bằng vách ngăn, hoặc nảy chồi ở nhiều phía. *Endomycopsis* có khả năng sinh nhiều glucoamylaza và đặc biệt trong hệ enzyme do giống này sinh ra ưu việt hơn nấm mốc là có ít enzyme transglucosidaza. Có mặt enzyme này một phần glucozơ chuyển hoá thành axit gluconic. Hơn nữa, enzyme lấy từ chế phẩm nuôi *Endomycopsis* không có mùi mốc, làm cho hương vị của rượu thành phẩm thơm ngon.

Nấm men có trong bánh men chủ yếu là men rượu *Saccharomyces cereviciae*. Men rượu đã được giới thiệu kỹ ở đầu chương này. Ngoài men rượu ra, các giống men khác có trong bánh men đều coi là men hại.

Phần dưới bánh men thường lót trấu, tạo điều kiện thoáng khí.

4.8.4. Sản xuất rượu theo phương pháp thủ công truyền thống

a) Rượu chưng cất

Nguyên liệu tinh bột gồm các loại hạt gạo nếp, tẻ, ngô mảnh, sắn lát,... được ngâm nước, không vo, lấy ra để cho ráo nước, đem đồ (hoặc nấu) chín. Ở nước ta không dùng khoai tây, khoai lang để nấu rượu. Sắn dùng để nấu rượu là sắn lát (miếng, hoặc sắn đập thành mảnh hay cạo thành sợi, ít dùng sắn bột trong nấu rượu thủ công). Chú ý là gạo xát dối còn nhiều cám, hoặc các loại gạo cũ ít nhựa đem làm rượu thường thu được hiệu suất cao và dễ làm.

– Các loại xôi, cơm sau khi được dỡ tãi ra nong, mành sạch cho nguội tới 30°C thì rắc bột men. Tỷ lệ bột men so với lượng gạo vào khoảng 2,5 – 5%, trộn đều, ủ trong thúng, rá khoảng 5 – 7 giờ khi thấy khối cơm, xôi bốc nóng thì đem tãi mỏng ra nong, nia hoặc mành, để khoảng 5 – 10 giờ thấy mốc mọc, ta lật lớp cơm để mốc mọc đều ở khối cơm xôi, khoảng vài giờ nữa rồi đem vun thành đống (hay trong thúng), phủ kín bằng bao tải sạch, giữ ở chỗ thoáng mát (nhiệt độ khoảng 25 – 28°C

là tốt nhất). Sau 2 – 3 ngày, cơm ủ có mùi thơm dễ chịu, ăn thấy ngọt hơi, có vị cay rượu thì chuyển sang ủ trong chum, vại. Giai đoạn này mốc phát triển là chủ yếu và tiết ra enzyme đường hoá tinh bột, nấm men cũng bắt đầu sinh trưởng và chuyển hoá một ít đường thành rượu.

– Cơm rượu ủ trong chum vại sạch với tỷ lệ 1 phần gạo (đem nấu cơm, xôi) + 2 hoặc 3 phần nước lã sạch (tốt nhất là nước sôi để nguội). Đậy kín và ủ tiếp 2 – 4 ngày. Cơm rượu được ủ trong chum, vại nấm mốc ngưng phát triển, nhưng enzyme được tạo thành vẫn tiếp tục đường hoá, nấm men bước vào giai đoạn phát triển mạnh nhờ sử dụng oxy hoà tan trong nước và đường mới được tạo thành, rồi sau đó chuyển sang lên men rượu.

– Sau thời gian ủ lên men, người ta đem cơm rượu đã lên men hoàn thiện đem chưng cất, được loại rượu trắng truyền thống và nổi tiếng ở một số địa phương. Khi cất cần loại bỏ rượu đầu và rượu cuối.

Rượu trắng thu được thường có 35 – 40% rượu V (hay 35 – 40° cồn), uống khá ngon và êm dịu. 1kg gạo đem nấu thu được khoảng 500 – 600ml rượu 40 – 45°.

Chất lượng gạo trắng thủ công, tuy lượng tạp chất còn khá cao, nhưng chất lượng cảm quan nhiều loại rượu đạt khá cao về màu sắc, độ trong, mùi vị, hậu vị, uống xong cảm thấy dễ chịu, êm dịu và ít gây đau đầu.

b) Rượu cẩm

– Cách làm tương tự như rượu trắng, nhưng không chưng cất. Do vậy, một số người còn gọi là rượu nếp cẩm. Lên men rượu cẩm thường đạt 8 – 9° rượu, vì vậy cần bổ sung thêm rượu trắng (có độ rượu cao) hoặc cồn thực phẩm để rượu cẩm thành phẩm có độ rượu trên 16°, đem ủ kín. Có nơi còn hạ thổ (chôn xuống đất) giữ vài tháng, sau đó mới đem hoàn thành thành phẩm.

– Rượu cẩm có hai loại sản phẩm:

+ Loại trong, là loại rượu lọc bỏ bã. Rượu trong suốt có màu huyết dụ thẫm hoặc màu nâu đen bóng, mùi thơm dễ chịu, uống có vị ngọt cay chua và êm dịu.

+ Loại đục có cả bã đã làm nhuyễn.

Cả hai loại đều có hương vị thơm ngon, uống rất dễ chịu. Ngoài độ rượu thấp có tác dụng kích thích tiêu hoá và có tác động nhẹ đến hệ thần kinh làm cho người uống sảng khoái và phấn khởi, rượu cẩm còn chứa nhiều vitamin, đặc biệt là vitamin nhóm B, các axit amin, các khoáng chất,... Vì vậy, ta có thể coi rượu cẩm là thứ đồ uống nhẹ và bổ dưỡng.

c) Rượu cần

Có lẽ rượu cần là một loại đồ uống không thể thiếu được trong các lễ hội và tiệc tùng của người dân Tây Nguyên cũng như ở Tây Bắc nước ta. Rượu cần coi là một thứ văn hoá của đồng bào miền núi ở các cao nguyên, núi cao này.

Rượu cần cũng là một loại rượu không chưng cất, có vị ngọt, có độ rượu nhẹ và cũng giàu các chất dinh dưỡng. Quá trình làm rượu cần cũng tương tự như làm rượu cẩm hoặc rượu từ tinh bột khi ủ men đến khâu chưng cất, nhưng có khác đôi chút.

– Gạo ngâm nước, vớt, để ráo, trộn với trấu sạch, đem đồ chín hoặc xôi để nguội, tơi, trộn với trấu. Cơm xôi – trấu được trộn với men bánh: 3 bánh men (mỗi bánh nặng 40g) trộn với 5kg nguyên liệu. Chuyển hỗn hợp cơm – trấu, men vào gùi, dưới đáy gùi lót một lớp trấu sạch. Ủ qua đêm, lấy hỗn hợp này từ gùi ra đem tãi mỏng trên khay, mành sạch đến khi mốc mọc đều thì đem vào ủ ở các ché hoặc chum, vại. Trên đáy ché cũng lót một lớp trấu, cho cơm rượu tới đầy ché. Bịt kín và cho ủ tiếp trong thời gian khoảng 1 – 2 tháng ở nơi thoáng mát và khi cơm rượu ngót còn khoảng 1/2 ché là được.

– Làm rượu cần Tây Bắc có lẽ cầu kỳ hơn một chút. Bước đầu ta lấy trấu (trấu nếp càng tốt) đem đãi bỏ những trấu nào khi ngâm nước mà không chìm, sau đem hong khô rồi trộn với xôi. Không có gạo nếp thì dùng ngô xay hoặc sắn miếng đồ chín (không dùng bột sắn vì khó làm và dễ bị tắc cần). Xôi trộn trấu để nguội thì rắc bột men. Thường 1 chum cơm rượu cho vào khoảng 5 – 7 bánh men lá tán nhỏ, rắc đều. Người ta còn dùng xôi nếp để nặn thành bánh như bánh giầy, đem nướng cho cháy để có mùi thơm để dưới đáy chum, rồi cho các loại nguyên liệu đã chuẩn bị đầy vào chum, nén chặt, bịt thật kín, giữ ở nơi thoáng mát. Rượu cần ủ khoảng 3 tháng là dược. Nhớ là để càng lâu càng tốt, nhưng tốt nhất chỉ nên dùng trong một năm, vì để lâu quá, trấu bị mủn ra, uống không ngon nữa.

– Khi uống rượu cần Tây Nguyên cũng như Tây Bắc đều đổ thêm nước. Nên dùng nước đun sôi để nguội hoặc nước suối sạch. Sau đó cắm cần tới đáy ché hoặc chum. Khi uống không được thổi cần cho hơi vào chum, như vậy rượu mau hỏng.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 4

1. Có bao nhiêu phương pháp lên men rượu? Các phương pháp này có những điểm gì khác nhau và giống nhau? (chú ý: quá trình lên men và quá trình sản xuất rượu).
2. Các nguyên liệu sản xuất rượu? (cần đi sâu vào nguyên liệu tinh bột và rỉ đường).
3. Các tạp chất trong lên men rượu là những hợp chất gì? Chúng ảnh hưởng đến chất lượng rượu như thế nào? Tại sao rượu mới chưng cất uống ngay thường không ngon và cần phải tàng trữ một thời gian mới đem sử dụng?
4. Đặc điểm của men rượu? Thế nào là men nổi và men chìm?
   Tiêu chí tuyển chọn men rượu.

Chương 5

SẢN XUẤT BIA

Bia (Beer) là thứ đồ uống có rượu nhẹ được chế biến từ thóc malt (đại mạch nảy mầm) và hoa hublon. Có thể định nghĩa một cách đơn giản về cách làm bia (Beer) như sau:

$$\text{Dịch đường malt + hoa hublon} \xrightarrow[\text{lên men ở t° thấp}]{\text{Nấm men}} \text{Bia}$$

Vai trò của bia đã được khẳng định từ 5.000 năm trước Công nguyên và ngày nay không nước nào trên thế giới là không sản xuất hoặc tiêu thụ bia. Có nhiều nước, mức sản xuất và tiêu thụ bia là 140 – 160 lít/năm cho một đầu người. Ở nước ta, mức độ này khoảng 5 – 8 lít.

Thành phần của bia gồm có: 80 – 90% nước, 1,5 – 7% cồn, 3 – 10% chất hoà tan, 0,3 – 0,4% CO_2. Chất hoà tan yếu là hydratcacbon (dextrin, maltozơ, glucozơ và một ít pentozơ); các protein và sản phẩm thuỷ phân của nó (albumozơ, pepton, các axit amin), các chất khoáng (muối kali, natri, photpho, nhôm, canxi, mangan,...), một số axit hữu cơ, các vitamin (B_1, B_2, B_5, B_6, PP, biotin) và các chất đắng, chất thơm của hoa hublon.

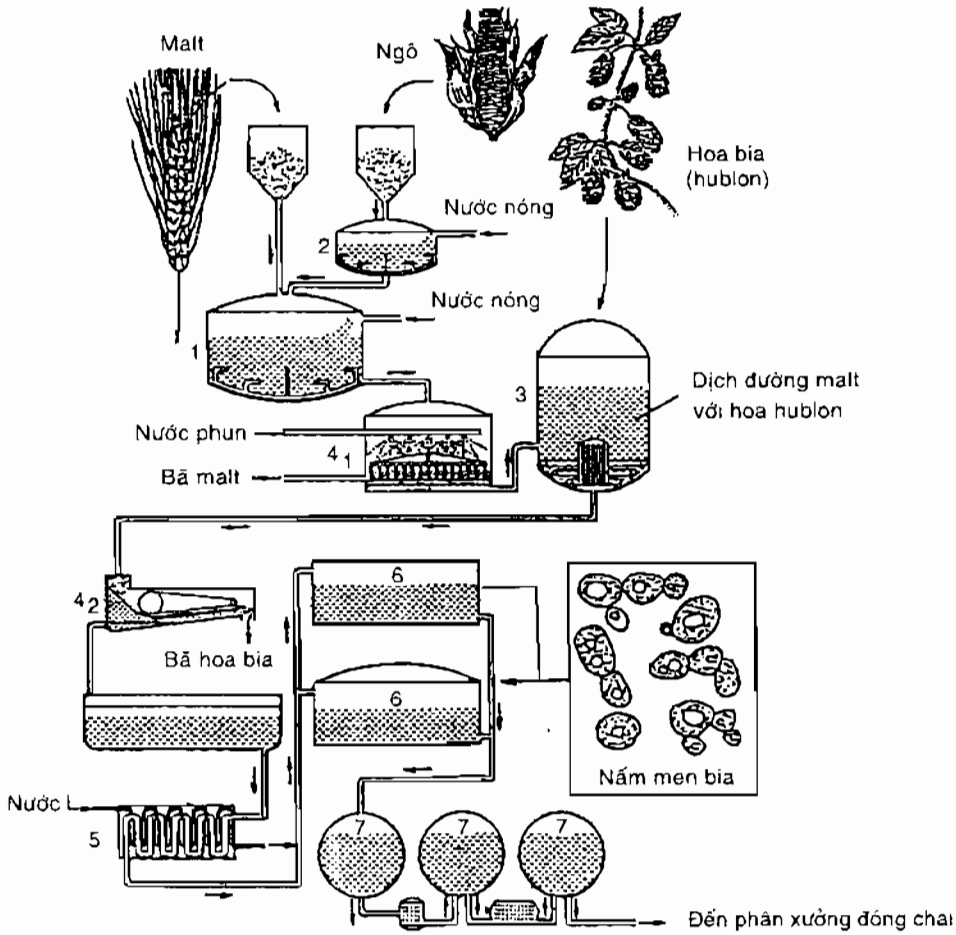
Độ bia tính bằng số % chất hoà tan hoặc đơn giản là hàm lượng đường của dịch đưa vào lên men.

Lên men được tiến hành ở nhiệt độ thấp trong thời gian dài. Vì vậy, CO_2 tạo thành hoà tan ở trong bia và phần lớn ở dạng liên kết. Khi ta uống, CO_2 hoá hơi thu nhiều nhiệt của cơ thể làm cho khoái cảm và có tính giải khát cao. Ngoài ra, bia là thứ đồ uống có độ dinh dưỡng và tiêu hoá cao. Nó có tác dụng thông tiểu tiện, kích thích tiết mật, tăng tiêu hoá (bản thân bia rất dễ dàng được hấp thụ qua màng ruột).

Từ thời xa xưa, người Babilon (vùng Irắc, Trung Đông ngày nay) đã sản xuất được thứ đồ uống giống như bia từ các hạt ngũ cốc. Cách làm này được truyền sang Ai Cập, Ba Tư, Hy Lạp và bia được làm từ đại mạch. Hiện nay ở Etiopia vẫn có nơi sản xuất bia theo người Babilon cổ xưa. Dần dần bia được sản xuất rộng rãi ra toàn châu Âu (nhưng chưa có hublon) mà chỉ dùng một số lá khác từ cây có mùi thơm. Đến thế kỷ IX, vùng Đông Nam Âu có một loại hoa hublon (dịch theo âm Hán – Việt là "hốt – bố") được đưa vào chế biến bia và từ đó đến ngày nay.

Như vậy, bia được chế biến chủ yếu từ đại mạch nảy mầm, hoa hublon, nguyên liệu phụ là gạo, ngô và nước. Ở nước ta, nghề làm bia phải nhập thóc malt, hoa hublon và chỉ có nguồn nước cùng nguyên liệu là gạo của nội địa. Đại mạch và hublon đã thử trồng ở một số nơi khí hậu mát mẻ như Sapa, Đà Lạt, Cao Bằng, Hà Giang, Sơn La,... từ vài chục năm gần đây, nhưng chưa có kết quả.

Quy trình sản xuất bia (hình 5.1).



Hình 5.1. Quy trình sản xuất bia

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

5.1. NGUYÊN LIỆU

5.1.1. Nước

Nước có thể được coi là nguyên liệu sản xuất bia. Nước có vai trò quan trọng, có ảnh hưởng lớn đến chất lượng của bia và đặc biệt là hương vị của bia thành phẩm.

Các chỉ số quan trọng của nước là: độ cứng, độ oxy hoá và vi sinh vật.

Nước dùng trong lên men nói chung phải đạt tiêu chuẩn nước uống, không có mùi, vị, không màu, trong suốt, đặc biệt không cho phép có mùi amoniac, vết của kim loại nặng (thuỷ ngân, bari,...).

Độ cứng của nước quyết định bởi hàm lượng 2 ion Ca^{2+} và Mg^{2+} có trong nước. Hàm lượng 2 ion này có nhiều trong nước thường gọi là nước cứng, khi đun sôi tạo cặn bám trên thành và lắng xuống đáy thiết bị làm giảm hiệu số trao đổi nhiệt, ảnh hưởng xấu đến mùi, vị, độ trong của sản phẩm và đặc biệt làm cho dịch bia thành phẩm khó ngậm CO_2. Nước cứng cần phải xử lý làm giảm Ca^{2+} và Mg^{2+} để nước trở thành mềm.

Hàm lượng các chất rắn có trong nước, tức phần cặn sau khi đã làm bay hơi vì sấy khô ở 105°C đến hàm lượng không đổi đối với nước nấu bia là nhỏ hơn 600mg/l.

Trong nước sản xuất bia không được có $NaHCO_3$, NH_3, HNO_2, cho phép có NO_3^- không quá 25mg/l. Đặc biệt là có sắt sẽ xảy ra phản ứng giữa sắt và tanin của hublon làm xấu màu và vị của bia. Nước dùng nấu bia cần có độ cứng tạm thời khoảng 0,72mg – đương lượng/lít, độ cứng vĩnh cửu: 0,26 – 0,72mg đương lượng/lít, độ oxy hoá 2mg/lít, số lượng tạp khuẩn/lít không quá 100, *E.coli* không quá 3/l. pH của nước thích hợp cho nấu bia là 6,8 – 7,2.

Như vậy, nước dùng trong sản xuất bia là nước mềm, nếu là nước cứng cần phải xử lý. Nước có sắt và mặn không dùng cho nấu bia. Nước trong một xí nghiệp sản xuất bia nên có 3 hệ thống: cung cấp nước mềm cho nồi hơi và nấu bia; cung cấp nước tẩy trùng dùng làm vệ sinh đường ống và thiết bị; nước sinh hoạt và làm nguội.

Có nhiều phương pháp xử lý nước cứng thành nước mềm, như đông tụ rồi kết tuả Ca^{2+} và Mg^{2+}, điện ly và chuyển các ion qua màng dưới tác dụng của điện trường và phương pháp trao đổi ion. Hiện nay phương pháp làm mềm nước bằng trao đổi ion là khá phổ biến.

5.1.2. Thóc Malt

– Thóc malt là nguyên liệu chính để nấu bia. Thóc malt là các loại ngũ cốc nảy mầm có hoạt tính enzyme amylaza và proteaza, có mùi thơm của hạt sấy khô. Nguyên liệu làm là đại mạch, lúa mỳ, mạch đen, kê, lúa tẻ,... và cả ngô nảy mầm. Trong đó đại mạch là nguyên liệu số một để sản xuất bia. Do vậy, khi nói thóc malt được hiểu là đại mạch nảy mầm.

– Trong đại mạch có loại bông 2 hàng hạt là nguyên liệu làm thóc malt tốt nhất. So với loại đại mạch 6 hàng hạt thì loại hạt trên to hơn; chứa nhiều tinh bột (61% – 64%), protein ít hơn (8% – 14%).

– Đại mạch nói chung là giàu protein. Trong quá trình nấu bia, các sản phẩm thuỷ phân của protein tạo cho bia những phức chất giữ bọt tốt hơn, có vị đậm đà. Song cũng vì giàu protein nên quá trình nấu bia phức tạp hơn và làm cho bia kém bền.

– Những hạt đại mạch để làm thóc malt được bảo quản sau thu hoạch ít nhất 1,5 – 2 tháng. Trước khi đem ngâm nước, hạt dược rửa sạch sơ bộ để loại bỏ các tạp chất, làm sạch bụi bẩn và vi sinh vật bám trên vỏ. Ngâm hạt trong bể hay các thùng chuyên dùng, có thể thêm chất sát khuẩn (thuốc tím) và các chất kích thích nảy mầm Gibberellin. Nhiệt độ ngâm hạt tốt nhất là 12 – 17°C, thời gian ngâm từ 30 – 48 giờ để hạt ngậm no nước có độ ẩm 42% – 45%. Trong thời gian ngâm cần phải thay nước một vài lần để rửa sạch nhớt và mùi khó chịu sinh ra. Hạt ngâm nước làm trương các chất keo, đặc biệt là protein. Các chất protein không tan giảm dần, đồng thời các chất hoà tan tăng dần, hô hấp mạnh. Có sự thay đổi sâu sắc hệ enzyme trong hạt, đặc biệt là amylaza và proteaza được hoạt hoá.

– Sau khi ngâm nước, hạt được đưa vào các thiết bị thúc mầm, hoặc được trải trên sàn xi măng có độ dốc cần thiết để thoát nước (lớp hạt trên sàn dày khoảng 20 – 30cm). Hạt sẽ nảy mầm trong các thiết bị hoặc trên sàn. Hàng ngày phun nước hoặc cho ngập nước để rửa các mùi khó chịu, cho thoát hết khí CO_2 và hạ nhiệt độ. Thời gian nảy mầm 6 – 8 ngày, nhiệt độ thích hợp là 15 – 18°C. Trong thời gian này, phức hệ enzyme của hạt được chuyển sang dạng hoạt động để thuỷ phân các chất trong nội nhũ vào dịch đường trong nấu bia sau này.

Đối với đại mạch, mầm được hình thành từ phôi mọc chạy theo phía trong vỏ đến 8 – 9 ngày mới nhú ra ngoài hạt. Rễ hình thành đâm ra ngoài vỏ. Sự nảy mầm kết thúc khi phần bên trong hạt trở nên tơi xốp, rễ dài 1,5 – 2 lần so với chiều dài của hạt và mầm mọc bên trong gần hết chiều dài của hạt.

– Khi hoàn thành nảy mầm, hạt được đem đi sấy. Mục đích sấy là làm cho hạt khô, dễ xát bỏ mầm rễ, bảo quản được tốt, đồng thời hạt sấy khô có màu và mùi thơm sẽ định hình màu cũng như hương bia sau này.

Sấy hạt trong các thiết bị sấy sao cho tổn thất enzyme là ít nhất mà vẫn đảm bảo độ khô, màu và mùi của hạt đúng với yêu cầu của sản xuất bia.

– Thóc malt được chia thành hai loại: malt vàng hoặc malt sáng màu và malt đen. Malt vàng dùng để sản xuất các loại bia vàng sáng màu, malt đen dùng để sản xuất các loại bia đen thẫm màu.

+ Malt vàng có vị ngọt thoảng nhẹ và hương thơm dịu. Từ malt vàng cho bia có vị đắng dịu, hương thơm ngát nhẹ nhàng. Hai chỉ tiêu cảm quan này của bia vàng do hoa hublon và hương thơm của malt sấy quyết định.

+ Malt có màu nâu đến đen thẫm, hương vị ngọt đậm. Bia đen có độ nhớt cao, hương vị mang từ thóc malt sấy cháy, trong đó là melanoit quyết định.

– Khi sản xuất malt vàng, điều cần thiết là làm sao cho hạt malt có hoạt lực enzyme cao, chủ yếu là amylaza, còn hàm lượng axit amin ở mức độ vừa phải và hàm lượng protein hoà tan chỉ cần ở mức độ vừa đủ. Như vậy, cần chọn đại mạch có hàm lượng protein thấp, nhưng có khả năng nảy mầm cao. Độ ẩm đại mạch sau khi ngâm không vượt quá 42 – 43%. Quá trình ủ nảy mầm ở nhiệt độ 13 – 18°C và cần thông gió tốt. Thời gian ủ là 6 – 8 ngày. Nếu dùng đại mạch có hàm lượng protein cao thì cần có độ ẩm của hạt sau khi ngâm là 44 – 46%, nhiệt độ của khối hạt có thể lên đến mức tối đa là 20 – 22°C.

Sấy malt vàng không quá 80°C và được chia thành các thang nhiệt cho phù hợp với độ ẩm của hạt.

Tuỳ từng ca sấy, cụ thể thời gian sấy có thể dao động 16 – 24 giờ. Độ ẩm cuối cùng của hạt là 3%.

Sau khi sấy, hạt được đem xát tách mầm rễ, vì mầm rễ sẽ làm cho bia có vị đắng và trong quá trình bảo quản dễ bị mọt ăn hại.

Thóc malt được bảo quản ở chỗ khô ráo, mát mẻ. Thóc malt sau khi sấy, xát bỏ mầm rễ, bảo quản từ 4 – 6 tuần để hoàn thiện mới đem dùng. Trong thời gian này, mức độ phân tán của các chất keo tăng dần, đồng thời số lượng các chất nitơ hoà tan và độ axit cũng tăng.

Thóc malt được làm như trên dùng để sản xuất bia có màu vàng sáng. Loại malt này có đặc điểm là bột trắng xốp, có mùi thơm dễ chịu dễ đường hoá.

Quá trình làm malt hạt bị tổn hao vật chất khoảng 20 – 30% chất khô và khâu sấy làm giảm hoạt lực enzyme so với hạt mới nảy mầm khoảng 30 – 40%.

– Với malt đen, khi ủ nảy mầm sao cho tích luỹ được nhiều N–amin và đường. Độ ẩm hạt khi ủ không được thấp hơn 45%, mục đích là làm tăng hoạt lực nhóm proteaza. Nhiệt độ khối hạt trong những ngày đầu ủ mầm cần khống chế 15 – 18°C, còn giai đoạn sau có thể tăng đến 22°C, thời gian ủ là 7 – 9 ngày.

Đặc điểm của hạt malt đen là màu nâu sẫm, có độ nhớt cao, khả năng tạo bọt và giữ bọt lớn. Các đặc điểm này trước hết là do hàm lượng melanoit có trong hạt quyết định. Những phẩm chất này được hình thành từ khi ủ nảy mầm đến khi sấy, đặc biệt là chế độ sấy để cho melanoit hoàn chỉnh.

+ Sấy malt đen cần:

* Hạ được độ ẩm hạt mầm từ 40 – 45% xuống còn 1,5%.

* Tạo được nhiều melanoit.

* Màu nâu sẫm.

* Tạo nhiều chất chiết bổ sung.

Do vậy, sấy malt phải kéo dài; sấy ở nhiệt độ cao, nhất là giai đoạn sấy kiệt. Khi sấy phải tuân thủ chế độ sấy với quan hệ giữa nhiệt độ với hàm ẩm hết sức nghiêm ngặt. Thời gian sấy malt đen là 48 giờ, nhiệt độ tối đa là 105°C ở máy sấy hai tầng. Ở giai đoạn đầu: 14 giờ đưa nhiệt độ tăng dần đến 40°C, độ ẩm hạt tới 20%; 3 – 4 giờ tiếp theo nâng nhiệt độ đến 60 – 65°C. Chế độ này giữ cho đến hết giai đoạn sấy ở tầng hai.

Ở tầng một, chế độ sấy bắt đầu ở nhiệt độ 50°C và độ ẩm hạt 20%. Giai đoạn thứ nhất ở tầng một sấy kéo dài 9 – 10 giờ, giữ nguyên 50°C và đến khi độ ẩm hạt còn 10%. Giai đoạn hai kéo dài hết thời gian sấy; nhiệt được tăng thêm, trong 4 – 5 giờ đầu nhiệt tăng lên 75°C, ẩm giảm xuống còn 5%. Trong 3 – 4 giờ tiếp theo được nâng đến 100 – 105°C cho đến hết thời gian sấy.

– Để tăng cường độ màu của bia về màu sắc, mùi vị hoặc để dễ dàng quá trình đường hoá, người ta còn chế ra các loại malt đặc biệt để cho vào các loại malt thường theo tỷ lệ 5 – 10% theo khối lượng. Các loại malt đặc biệt là malt caramen, malt cà phê và malt melanoit.

+ Malt caramen: Được sử dụng nhiều đối với bia đen. Bia sản phẩm có hương vị caramen, màu nâu cánh gián và có khả năng tạo bọt tốt.

Malt caramen được chế từ malt tươi hay malt khô và sấy ở nhiệt độ 110 – 170°C.

Malt tươi trước khi đem sấy được tưới nước với liều lượng 10 – 15 lít nước cho 100kg malt, trộn đều, để khoảng 12 giờ để enzyme tiếp tục hoạt động, đặc biệt là enzyme xitotaza có trong thóc malt, thuỷ phân những thành phần có cấu tạo phức tạp như làm phá vỡ vỏ tế bào tinh bột, thuỷ phân một phần tinh bột do

amylaza, một phần protein do proteaza, thuỷ phân lipit,... Sau đó malt được đưa vào lò sấy đặc biệt, nhiệt có thể nâng đến 170°C. Thời gian sấy 2 – 3 giờ.

Từ malt khô cũng có thể chế ra malt caramen.

Dung trọng malt caramen là 400 – 450g/l, độ ẩm 5 – 6%, chất khô hoà tan 40 – 60%, đường khử 30 – 50%.

Malt caramen phải có mùi caramen đặc trưng.

+ Malt cà phê: Malt này cũng được chế từ malt thường tươi hoặc khô. Nhiệt độ sấy đến 220 – 225°C. Để quá trình chế biến được kết quả tốt, người ta tạo điều kiện cho malt được đường hoá sơ bộ. Đem malt ngâm nước ở 70°C trong 12 giờ. Sau đó đem sấy ở lò sấy như malt caramen. Thời gian sấy có mùi vị cà phê. Hạt malt có màu và mùi thơm giống cà phê rang.

Hạt malt cà phê sau khi sấy có độ ẩm 2 – 3% và sau một thời gian bảo quản là 5 – 6%, chất hoà tan đạt 60 – 65%.

+ Malt melanoit: Malt melanoit còn gọi tắt là malt melan, chứa một lượng lớn melanoit. Malt này được chế từ đại mạch có hàm lượng protein cao. Khi ủ mầm ở giai đoạn cuối nâng nhiệt độ lên tới 20°C trong một ngày đêm, sau đó đem malt tươi dồn đống trong 1 – 2 ngày và nhiệt tăng tới 50 – 52°C (giữ ở nhiệt độ này khoảng 16 – 24 giờ). Sau đó đem sấy như malt đen.

+ Hoàn thiện làm thóc malt: Hạt thóc malt sau khi sấy vẫn có thể còn rễ và mầm. Rễ và mầm dễ hút nước, dễ bị côn trùng phá hại, hơn nữa khi làm bia mầm, rễ gây ra vị đắng rất khó chịu. Vì vậy, cần phải tách mầm, rễ ngay sau khi sấy, rồi đem đánh bóng (loại bỏ vỏ ngoài).

Malt thành phẩm khi mới sấy và tách mầm rễ rất khô, độ ẩm khoảng 2 – 3%, được đóng kín trong các bao PE bên trong và bao xác rắn bên ngoài. Tốt nhất bao ngoài là các thùng bằng sắt tây; mỗi thùng để cùng loại, cùng chất lượng. Bảo quản ở những nơi thoáng mát, tốt nhất là dưới 20°C. Trong thời gian bảo quản, độ ẩm có thể tăng đến 5 – 6%.

Khi vận chuyển và bảo quản, malt có thể bị nhiễm bụi bẩn. Trước khi đưa vào sản xuất bia, cần phải làm sạch malt và có thể loại được 0,5 – 1,2% bụi và các tạp chất nhẹ khác.

– Đánh giá chất lượng malt khô:

+ Các chỉ tiêu cảm quan:

* Màu sắc: vàng tươi hay đen tối sẫm (theo từng loại), vỏ phải óng ánh.

Kích thước, hình dáng tương tự như hạt đại mạch khô. Xác định độ màu theo dung dịch iot: 0,3 – 0,16mg iot/1 lít nước (malt vàng), 0,7 – 1,3mg iot/1 lít nước (malt đen).

* Mùi vị: có mùi vị đặc trưng cho từng loại malt, không có mùi vị lạ. Nếu có mùi chua, mốc là malt bị ẩm kém chất lượng.

Malt vàng có mùi thơm và ngọt nhẹ của thóc sấy, các loại malt thẫm màu ngọt dậm, mùi thơm của các loại hạt cháy.

* Độ sạch: không lẫn tạp chất, cho phép hạt bị sâu, bệnh ≤ 1%, hạt vỡ, mảnh vỡ tối đa là 0,5%, hạt không nảy mầm ≤ 5%.

+ Các chỉ tiêu cơ học:

* Dung trọng chia làm bốn loại: rất nhẹ (480 – 500g/l), nhẹ (500 – 530g/l), trung bình (530 – 560g/l), nặng (> 560g/l).

* Khối lượng khô của 1.000 hạt:

Trung bình là 28 – 38g/1.000 hạt (theo khối lượng có độ ẩm) và 25 – 37%g/1.000 hạt (theo chất khô tuyệt đối).

+ Các chỉ tiêu hoá học:

* Độ ẩm cho phép: malt mới sấy ≤ 4,5%, trong thời gian bảo quản ≤ 7%.

* Thời gian đường hoá: malt vàng: 10 – 20 phút/70°C;

malt đen: 20 – 30 phút/70°C.

* Chất hoà tan trung bình: 68 – 82% chất khô. Trên 78% là malt vàng chất lượng cao và trên 75% – malt đen chất lượng cao. Bình thường malt vàng có: 65 – 70% chất hoà tan, malt đen có 59 – 65% chất hoà tan.

* pH dịch đường malt: 5,5 – 6,5.

– Quá trình làm thóc malt gồm ủ hạt cho nảy mầm và sấy, đặc biệt là ủ mầm làm cho các enzyme có trong hạt được giải phóng khỏi các liên kết ở trong hạt và các enzyme được hoạt hoá xúc tác thuỷ phân ở giai đoạn nảy mầm, còn tích tụ trong hạt malt sau khi sấy và phát huy vai trò của chúng trong quá trình nấu – đường hoá sau này. Các enzyme này tham gia vào các phản ứng hoá sinh biến đổi toàn bộ các chất dinh dưỡng có phân tử lượng cao ở trong nội nhũ thành các chất có phân tử lượng thấp để dễ hoà tan vào dịch nước, tạo thành dịch đường. Quá trình này kết hợp với quá trình lên men của nấm men là cơ sở khoa học của nền công nghiệp sản xuất bia.

Trong thóc mầm có các nhóm enzyme quan trọng là xitaza, amylaza, proteaza, fitaza,... Đặc biệt là hai nhóm amylaza và proteaza là các enzyme vô cùng quan trọng trong nghề làm bia.

+ Xitaza: Nhóm này gồm hai enzyme là xitolactaza và xitolaza. Chúng xúc tác thuỷ phân hemixenlulozơ và các chất dạng keo thành các hợp chất trung gian, sau đó thành các loại đường đơn hexozơ, pentozơ và các sản phẩm khác.

Khi nảy mầm, xitaza tham gia và phân cắt hemixenlulozơ – quá trình này được gọi xitoliz, có ý nghĩa rất quan trọng với công nghệ sản xuất bia. Quá trình này làm phá vỡ thành tế bào chứa tinh bột, tạo điều kiện thuận lợi cho các enzyme khác xâm nhập vào bên trong tế bào để thuỷ phân các hợp chất khác của nội nhũ. Chính vì những lẽ này, hạt malt sau khi sấy có độ xốp cao. Như vậy, hoạt động của xitaza là "mở cửa" cho các phản ứng thuỷ phân tiếp theo, làm thay đổi cấu trúc tế bào và đặc điểm cơ lý của hạt. Phần lớn các sản phẩm do quá trình xitoliz tạo ra khi hạt nảy mầm dùng để nuôi mầm rễ và mầm lá. Phần còn lại giữ trong hạt malt và sau này không bị lên men tạo thành đường sót của bia (phần này chủ yếu là đường pentozơ), như là thành phần dinh dưỡng của bia.

Xitaza hoạt động chủ yếu trong thời gian ủ hạt nảy mầm.

+ Amylaza: Nguyên liệu chính dùng để sản xuất bia là đại mạch và một số hạt cốc khác. Hàm lượng tinh bột trong các loại hạt này là khá lớn. Để có dịch đường lên men bia chứa maltozơ, dextrin và glucozơ thì cần phải thuỷ phân tinh bột nhờ enzyme amylaza.

* Amylaza của thóc malt là một nhóm gồm ba enzyme: α – amylaza, β – amylaza và amylo – photphataza. Chúng có mặt ở 1/3 nội nhũ gần phía cuống hạt, ở gần phôi. α – amylaza phân cắt tinh bột thành các đoạn dài ngắn khác nhau, gồm một số cấu tử, thường gọi là dextrin và một ít đường maltozơ, có thể có glucozơ. Khi nấu, tinh bột sẽ trở thành hồ, có độ nhớt dính khá cao. Chỉ cần một lượng nhỏ α – amylaza là hồ tinh bột đã bị loãng là do các thành phần amylozơ và amylopectin của tinh bột bị α – amylaza phân cắt thành các dextrin khác nhau: dextrin đầu (bắt màu gần như tím với dịch iot nhưng đã hơi ngả nâu), dextrin trung gian (màu đỏ – xanh, màu đỏ – nâu,... với dịch iot) và dextrin cuối (không làm thay đổi màu của iot). Khả năng làm loãng hồ tinh bột được gọi là khả năng dịch hoá của enzyme này. Nhiệt độ tối ưu cho hoạt động cực đại của α – amylaza là 73°C và pH = 5,7.

β – amylaza có khả năng dịch hoá kém hơn α – amylaza, nhưng khả năng đường hoá (phân cắt tinh bột thành đường đôi là maltozơ và có thể một ít thành glucozơ) lại cao hơn. Tác dụng của β – amylaza vào các mạch amylozơ và amylopectin của tinh bột thường cho sản phẩm đường đôi là maltozơ.

Nhiệt độ tối thích của β – amylaza là 63°C, pH thích hợp là gần 4,8. Hai enzyme α – và β – amylaza có chung đối tượng phân cắt là tinh bột. Chúng tác động đồng thời cùng điều kiện có chung những sản phẩm tạo thành. Do vậy, người ta đã dùng khái niệm hoạt lực đường hoá thay cho cả hai enzyme bằng hoạt lực Diastaza.

* Amylophotphataza chỉ hoạt động trong thời gian nảy mầm. Trong hạt ngũ cốc nảy mầm nói chung không có γ – amylaza (glucoamylaza).

+ Proteaza: Enzyme proteaza xúc tác quá trình thuỷ phân protein. Trong hạt nảy mầm, enzyme này thực chất gồm hai enzyme là proteaza và peptidaza tác dụng kế tiếp nhau. Dưới tác dụng của chúng, protein sẽ bị biến đổi như sau:

Protein ⟶ Albumozơ... ⟶ Peptit ⟶ Axit amin

Albumozơ là polypeptit phức tạp nhưng không có tính đông tụ.

Cùng với nhóm xitaza, nhóm enzyme proteaza cũng tham gia vào quá trình phá vỡ thành tế bào của nội nhũ.

Sự thuỷ phân của protein bắt đầu bằng hoạt động của proteaza và protein đại phân tử bị phân cắt thành albumozơ và pepton, sau đó chuyển hoá thành polypeptit nhỏ hơn. Lúc này peptidaza hoạt động và phân cắt các polypeptit mạch ngắn thành peptit rồi tới axit amin.

Nhiệt độ tối thích của proteaza là 56 – 58°C và peptidaza 48 – 52°C. Chung cho proteaza là 48 – 52°C (ở 56 – 58°C, peptidaza giảm hoạt tính rất nhiều).

pH thích hợp cho protein là 4,5 – 5, cho peptidaza 7,8 – 8. Tổng hợp giá trị thích hợp cho cả hai enzyme là 4,8 – 5,2.

+ Phitaza: Enzyme này xuất hiện trong thời gian hạt nảy mầm và khi nấu mới hoạt động mạnh, xúc tác quá trình thuỷ phân hợp chất photpho hữu cơ, trước hết là hợp chất phitin có nhiều trong cám, thành axit photphoric. Axit vô cơ này giữ vai trò hình thành tính đệm của môi trường. Phitaza có hoạt lực tối đa ở pH 5,2 và nhiệt độ tối ưu là 48°C.

Trong thóc malt còn một số các enzyme khác nữa, nhưng vai trò không rõ rệt đối với nghề làm bia và không được giới thiệu trong giáo trình này.

5.1.3. Hoa hublon (hoa hốt–bố theo âm Hán – Việt hay hoa bia)

– Cây hoa hublon có tên khoa học là *Humulus lupulus* L. Đây là loại cây leo phân tính, thuộc họ Gai dầu, được trồng ở các nước vùng ôn đới. Hoa của nó được dùng sản xuất bia, tạo hương vị đặc biệt. Phía trên trong cánh hoa có một số lượng lớn các hạt màu sáng và dính. Đó là sản phẩm được tạo ra từ tuyến hoa mang mùi thơm, vị đắng.

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

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

Hoa hublon được nhiều nước trên thế giới như Cộng hoà Liên bang Đức, Ba Lan, Pháp,... trong đó Tiệp Khắc (nay là Cộng hoà Séc và Cộng hoà Slovakia) là nước trồng và hoa có chất lượng, năng suất đứng hàng đầu. Bia của Tiệp Khắc ngon nổi tiếng, có lẽ cũng là lý do đó (có thể còn vài nguyên nhân khác nữa).

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

Hoa tươi vừa hái về có độ ẩm 70 – 75%. Độ ẩm này khiến hoa không bảo quản được lâu, vì vậy phải tiến hành sấy, để hoa có độ ẩm 10 – 13%. Hoa sấy xong phải được bảo quản rất chu đáo ở phòng có độ ẩm không khí khoảng 85 – 90%, ở nhiệt độ 29 – 30% trong thời gian 10 – 15 ngày. Với điều kiện bảo quản như vậy, độ ẩm sẽ phân bố đều trong hoa, cánh hoa không bị giòn gãy. Để ức chế sự phát triển của vi sinh vật trên hoa, người ta xử lý bằng SO_2, sau đó hoa được đóng bánh, bao kín bằng giấy chống mốc, bảo quản ở kho lạnh, khô, tối, ở nhiệt độ 0,5 – 2°C.

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

Hoa hublon đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình sản xuất bia. Nó có tác dụng làm ngưng kết albumin (làm cho dịch bia trong), làm ức chế sự phát

triển của các vi sinh vật Gram dương, làm tăng khả năng tạo bọt và nhất là tạo nên mùi thơm, vị đắng đặc trưng của bia.

– Thành phần hoá học của hoa hublon khô như sau (% chất khô):

Độ ẩm:	8 –14%.
Xenlulozơ:	12 – 16%.
Hợp chất chứa N:	15 – 24%.
Tanin:	2 – 5%.
Pectin:	9 – 11%.
Nhựa và chất đắng (humulone và lupulone):	10 –20%.
Đường:	2 – 4%.
Este:	0,3 – 1%.
Các chất hữu cơ bền vững:	12 –20%.
Tro:	6 – 10%.

Chất tanin ở đây làm ngưng kết, đóng vón albumin trong giai đoạn nấu dịch đường, còn sản phẩm oxy hoá của nó thì tạo màu cho bia.

Nếu nhiều tanin bia sẽ có vị đắng chát. Bia thường bị đánh giá thấp do chất lượng của hublon xấu (vị đắng chát) hoặc thiếu hublon. Chúng tạo ra độ bền sinh học, tạo và giữ bọt tốt, định hình vị đắng và hương thơm cho bia.

Dầu este của hoa hublon có chứa chất thơm thuộc dãy cacbon tecpen. Dầu này dễ bay hơi khi đun sôi dịch đường malt, vì vậy khi nấu có thể cho hoa vào dịch đun sôi thành nhiều lần, lần cuối trước khi kết thúc vào khoảng 10 – 15 phút.

Trong công nghệ sản xuất bia, người ta thường dùng hoa hublon khô. Hoa này thường được bảo quản ở nơi khô ráo, mát mẻ (15 – 25^{0}C), tránh ánh nắng. gần đây người ta còn chế từ hoa tươi ra cao hoa dùng rất tiện lợi và kinh tế. Bảo quản cao ở nhiệt độ bình thường và rất ít bị hư hỏng. Trong sản xuất, người ta có thể dùng nửa cao, nửa hoa cho bia thành phẩm có chất lượng tốt.

5.1.4. Các nguyên liệu tinh bột (không phải thóc malt)

Đây là những nguyên liệu phụ dùng trong sản xuất bia nhằm cung cấp tinh bột cùng với thóc malt chuyển thành đường maltozơ trong quá trình đường hoá.

Các nguồn nguyên liệu này là gạo, ngô, mỳ, mạch đen, cao lương, sắn, khoai tây. Trong số này thường được dùng là gạo tẻ, ngô đã tách phôi và hạt mỳ. Khi dùng để đường hoá, chúng được nghiền nhỏ thành bột, cho vào nấu qua khâu hồ hoá, dịch hoá và đường hoá.

Các loại hạt này dùng cho bia phải chọn loại tốt: hạt mẩy đều, không có hạt lép, hạt mốc, mọt. Nên dùng gạo mới xát, không cần xát kỹ.

Ngoài ra, khi đường hoá thấy dịch chưa đủ nồng độ đường cần thiết thì có thể bổ sung thêm đường saccarazơ ở dạng đường kính, đường hoa mai hoặc đường nâu.

5.2. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT BIA

Trong phần trên chúng ta đã đề cập đến các nguyên liệu dùng để sản xuất bia. Các nguyên liệu này trước hết phải đường hoá các hàm lượng tinh bột có

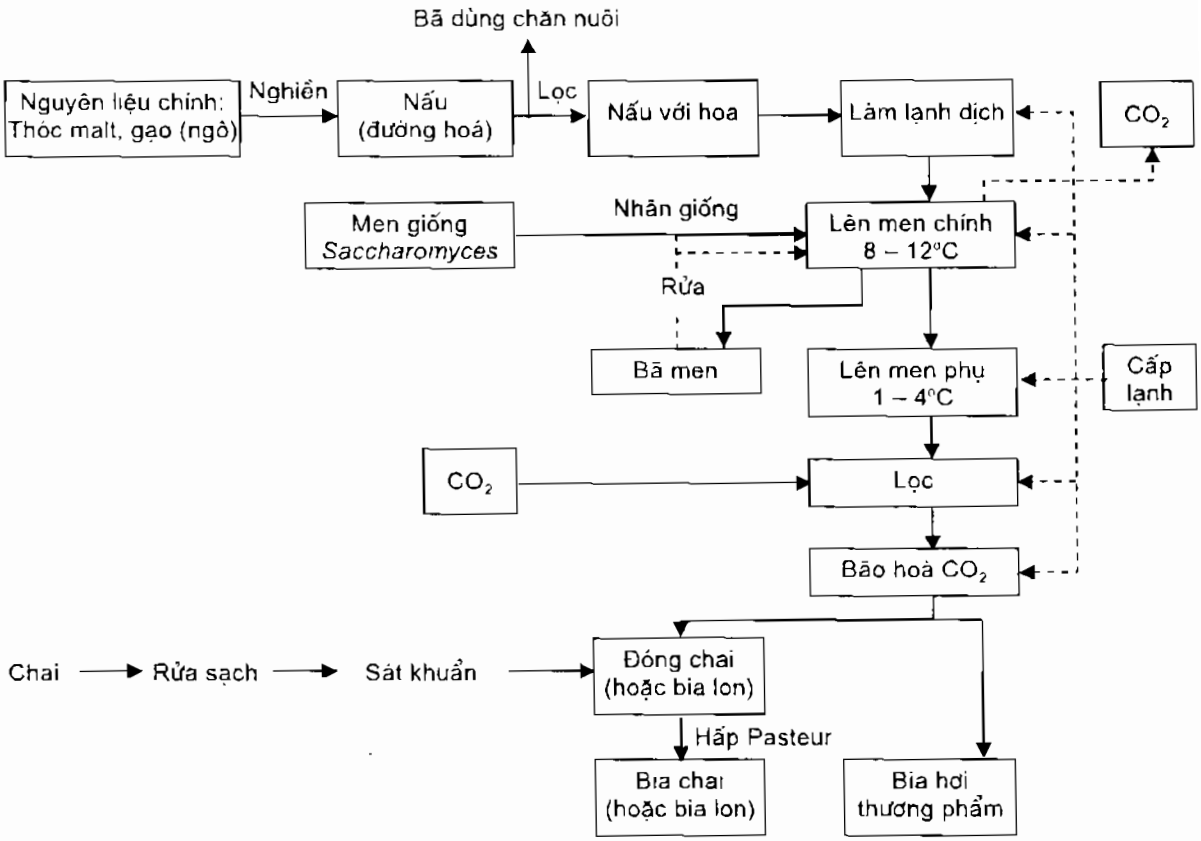
trong thóc malt, gạo hoặc ngô (là những nguyên liệu phụ). Quá trình đường hoá không có sự tham gia của vi sinh vật, trong đó tác nhân chuyển hoá tinh bột thành đường là các enzyme có trong thóc malt.

Khi đã có dịch đường, người ta nấu với hoa hublon rồi cho nấm men bia vào dịch để lên men. Bia là loại sản phẩm lên men không chưng cất.

Về cơ bản, cơ chế của quá trình lên men bia cũng tương tự như lên men rượu etylic, song cũng có đôi điều khác biệt. Đó là nấm men bia là những nòi lên men rượu và phát triển ở nhiệt độ thấp. Do vậy, sản xuất bia cần cung cấp lạnh rất nhiều. Các xí nghiệp bia, đặc biệt ở vùng nhiệt đới như nước ta phải trang bị hệ thống làm lạnh và cấp lạnh rất tốn kém.

5.2.1. Sơ đồ công nghệ sản xuất bia

Quy trình công nghệ sản xuất bia hiện nay được áp dụng ở tất cả các nước trên thế giới theo sơ đồ sau (hình 5.2).



Hình 5.2. Quy trình công nghệ sản xuất bia

5.2.2. Nấu – đường hoá hay là quá trình chuẩn bị dịch lên men

– Trước khi nấu malt và các nguyên liệu chứa tinh bột khác, phải nghiền nhỏ (thóc malt không cần nghiền nhỏ mà chỉ nghiền vỡ thành mảnh) rồi hoà với nước phần bột malt, phần bột gạo và một ít malt (khoảng 5% so với bột) hoà riêng trong hai thùng (thùng bột malt và thùng bột gạo cộng 5% bột malt) với tỷ lệ

nước đã được tính toán. Tổng lượng nước dùng phụ thuộc vào các công thức phối liệu, thường tỷ lệ nguyên liệu với nước là 1 : 4 – 1 : 8.

-- Mục đích của quá trình nấu là làm cho các chất có trong malt và các nguyên liệu khác hoà tan tối đa vào dịch. Phần lớn các chất hoà tan vào đây được tạo nên khi nấu.

Quá trình nấu được qua dần các thang nhiệt độ thích hợp khác nhau, nhằm bảo đảm cho các enzyme amylaza và proteaza hoạt động. Thực chất của quá trình này là quá trình thuỷ phân tinh bột và protein. Sản phẩm thu được là đường maltozơ và axit amin cùng với các sản phẩm trung gian của quá trình thuỷ phân:

Tinh bột → Dextrin → Maltozơ

Protein → Các sản phẩm trung gian → Axit amin

(abumozơ, peptit, peptone)

Cũng không kém phần quan trọng là quá trình thuỷ phân protein khi nấu. Những sản phẩm trung gian và cuối cùng của quá trình này làm định hình màu sắc, tạo vị, tạo bọt, giữ độ bền cho bia.

Trước hết phải chú trọng những mức nhiệt độ khác nhau để cho hệ enzyme trong bột malt hoạt động tốt nhất: 48 – 52^{0}C cho proteaza, 60 – 65^{0}C cho β - amylaza và 70 –75^{0}C cho α – amylaza.

– Khi nấu chín dịch bột dễ thành một khối hồ đặc, khó khuấy trộn và khó chín phần bên trong của những cục bột. Vì vậy, khi hoà bột (không phải malt) nên cho một ít bột malt (khoảng 5%) vào từ ban đầu, khuấy trộn đều và nâng dần nhiệt độ tới 48 – 52^{0}C, dừng lại khoảng 15 – 20 phút, rồi nâng tiếp tới 70^{0}C hoặc hơn một chút, bột sẽ hồ hoá và có mặt α – amylaza trong bột malt sẽ làm hồ loãng (hiện tượng này gọi là dịch hoá), sau đó tiếp tục đun tới 100^{0}C để bột chín hoàn toàn. Sau khi chín, khối dịch được hạ nhiệt độ tới 75^{0}C thì cho phần chủ yếu bột malt đã hoà với nước ấm ở nhiệt độ 48 – 52^{0}C (và giữ nhiệt độ này trong thời gian thích hợp) vào nồi để tiếp tục đường hoá rồi nâng dần tới 63 – 68^{0}C, giữ ở nhiệt độ này khoảng 30 – 40 phút, sau đó nâng nhiệt tới 72 – 75^{0}C, giữ khoảng 30 – 40 phút.

– Thử dịch đường hoá bằng dung dịch iot, nếu dịch iot không đổi màu là quá trình đường hoá đã kết thúc.

– Lọc qua thùng lọc chân không hoặc áp lực, cũng có thể lọc bằng máy lọc ép khung bản. Cần phải rửa bã bằng nước nóng 75^{0}C.

– Dịch đường thu được có màu vàng sáng hơi ánh nâu, trong suốt, có độ đường khoảng 8 – 12% (đo bằng khúc xạ kế hoặc thước đo độ đường ở nhiệt độ 20^{0}C). Đối với bia hơi thì độ đường ban đầu là 8 – 9%, với bia chai từ 10 – 20%. Còn sau khi lọc, nếu chưa đủ đường có thể thêm đường cát hoặc đường kính.

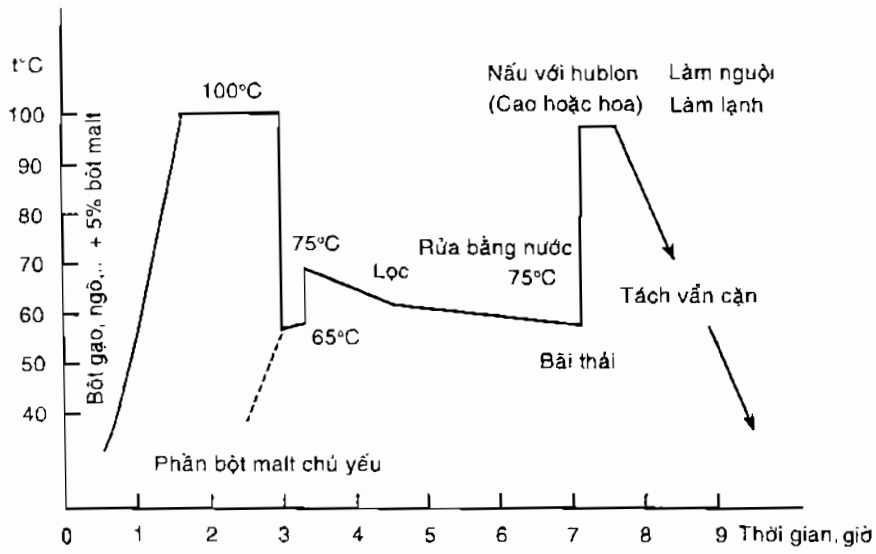
Trong sản xuất bia, nồng độ đường trong dịch đường malt – hublon và nồng độ chất khô hoà tan được dùng phổ biến, được hiểu như đồng nghĩa. Trên nhãn các loại bia, người ta ghi độ bia, có nghĩa là nồng độ chất hoà tan hay nồng độ đường ban đầu khi lên men.

Dịch đường đem nấu sôi với hublon. Khi nấu, hublon sẽ chiết ra các axit đắng, nhựa, tinh dầu, tanin vào dịch. Axit đắng và nhựa đắng sẽ làm cho bia có vị đặc trưng, ổn định các keo và tạo bọt bền vững, tanin kết hợp với phần protein chưa bị

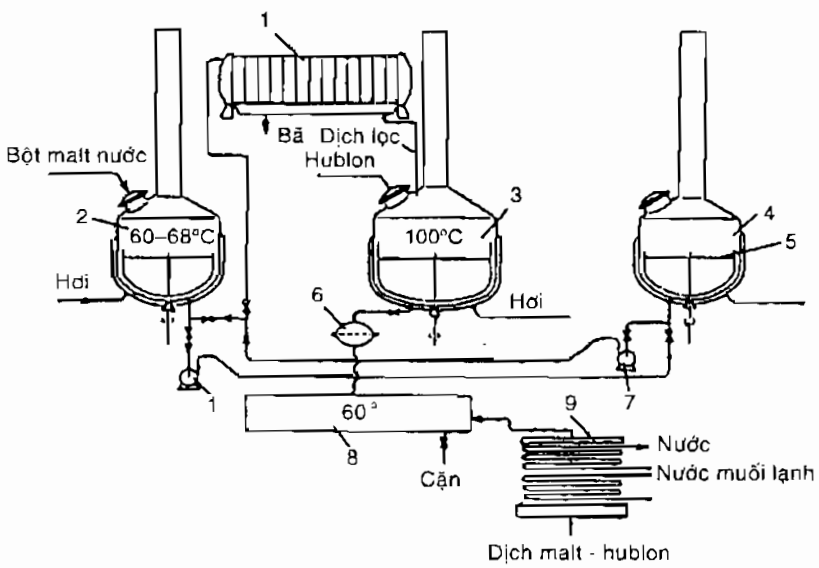
thuỷ phân có trong dịch sẽ kết vón làm cho dịch trong thêm và tăng độ bền của bia sau này. Các phản ứng melannoidin (giữa đường và các axit amin), sự caramen hoá khi nấu đường ở nhiệt độ cao, cùng với các chất tan của nguyên liệu malt ban đầu cũng như của hublon sẽ tạo cho bia hương thơm, vị đắng đặc biệt.

Sau khi nấu sôi với hoa, cần phải lọc bỏ bã hoa và dịch đường, làm nguội ở thùng chứa tới 60°C, giữ đến 1 – 2 giờ, các vẩn ngưng kết của protein sẽ lắng xuống và thải bỏ, còn phần dịch trong được đưa qua thiết bị làm lạnh nhanh tới 10 – 15°C và bơm vào thùng lên men.

Quá trình chuẩn bị dịch lên men được thể hiện trên hình 5.3 và 5.4.



Hình 5.3. Biểu đồ nấu đường hoá và chuẩn bị dịch đường malt – hublon



Hình 5.4. Sơ đồ chuẩn bị dịch đường malt – hublon (dịch lên men bia)

1. Lọc khung bản; 2. Nồi đường hoá; 3. Nồi nấu dịch đường với hoa hublon; 4. Nồi nấu hồ cháo và dịch hoá; 5. Cánh khuấy; 6. Lọc bã hoa hublon; 7. Bơm; 8. Bình lắng cặn; 9. Thiết bị trao đổi nhiệt làm lạnh nhanh.

Như trên ta đã biết, quá trình nấu đường hoá là quá trình thuỷ phân tinh bột nhờ hệ enzyme amylaza xúc tác. Đáng ra ở đây có hai quá trình thuỷ phân: Thuỷ phân tinh bột thành đường và thuỷ phân protein thành các sản phẩm khác nhau. Chính vì vậy, các thang nhiệt độ ở đây cần phải tuân thủ tương đối nghiêm ngặt để hoạt động xúc tác của các enzyme có hoạt lực tối đa.

Khi nâng nhiệt khối dịch malt tới 48 – 52°C và giữ trong khoảng thời gian thích hợp để tạo điều kiện cho phitaza và proteaza hoạt động. Proteaza phân cắt protein thành albumozơ, pepton, peptit và axit amin. Một phần (khoảng 30 – 40%) sản phẩm thuỷ phân này chuyển vào dịch đường ở dạng hoà tan làm chất dinh dưỡng cho nấm men. Albumozơ có tính hoạt động bề mặt cao, có vai trò rất lớn trong sự tạo bọt và giữ bọt của bia thành phẩm. Vai trò này cho thấy sự tác động tương tác giữa hợp chất này với các chất nhựa của hublon, giữa các axit amin với đường tạo ra melanoit cũng có khả năng tạo bọt.

Các hợp chất chứa N – các hợp chất thuỷ phân protein, chỉ chiếm có 3,1 – 5,6% trong dịch đường malt thu được sau khi nấu, nhưng chúng có vai trò rất lớn trong sự tạo bọt và độ bền của bia. Albumozơ, polypeptit và các axit amin hợp thành nhóm chất chứa N hoà tan bền vững trong dịch, không bị đông tụ (vẫn kết tuả) khi gia nhiệt, nhưng chúng lại có tính keo (colloid). Chúng có khả năng tạo nhiều bọt và hoàn thiện vị bia thành phẩm.

Các sản phẩm protein thuỷ phân phụ thuộc nhiều vào nhiệt độ. Khi giữ ở nhiệt độ 50°C và pH 5,6 – 5,9 là điều kiện thuận lợi cho sự tạo thành các hợp chất có phân tử lượng thấp. Quá trình này được gọi là *pepton hoá* (có một số tài liệu dùng thuật ngữ "đạm hoá" – theo chúng tôi là không chính xác – tác giả).

– Nhiệt độ có ảnh hưởng rất to lớn trong quá trình đường hoá: tốc độ, hiệu suất tạo thành đường cũng như tỷ lệ các thành phần của sản phẩm đường hoá.

Sau khi pepton hoá, khối dịch malt và khối dịch hồ đã làm loãng (dịch hoá) được giữ ở khoảng 63 – 65°C. Ở nhiệt độ này làm cho β–amylaza có hoạt lực tối đa và một lượng lớn maltozơ được tạo thành cùng với một lượng nhỏ dextrin. Sau đó đưa nhiệt độ tới 70 – 73°C là khoảng nhiệt độ tối ưu của α–amylaza: quá trình thuỷ phân nhanh hơn, nhưng sản phẩm phần lớn lại là dextrin. Đưa nhiệt độ lên cao tới 78°C, α–amylaza mất hoạt lực. Trong quá trình đường hoá cần giữ ở những thang nhiệt độ: 48 – 52, 63 – 65, 70 – 73°C, từ thấp lên cao, không được giữ các nấc thang nhiệt cao trước (vì như vậy sẽ làm mất hoạt tính các enzyme có nhiệt độ tối thích thấp).

– Dịch đường malt thu được sau khi nấu được đặc trưng bởi tỷ số giữa đường tổng (chủ yếu là maltozơ) và các chất không phải là đường (là hiệu số của các chất khô hoà tan với đường tổng). Các loại bia khác nhau có tỷ số này khác nhau. Yêu cầu trung bình là (1: 0,32) – (1: 0,43) và hàm lượng trung bình các gluxit có trong dịch đường malt (%) như sau:

Fructozơ 1 – 3; glucozơ 8 – 10; saccarazơ 2 – 6; maltozơ 38 – 40; maltotriozơ 11 – 19; maltotetraozơ 2 – 6; dextrin 14 – 22.

Trong sản xuất bia, người ta hay dùng chỉ tiêu hàm lượng (%) chất khô hoà tan và người ta gọi đó là độ bia (thường ghi ở ngoài nhãn). Hàm lượng này được dùng thay cho hàm lượng đường và thường được đo bằng khúc xạ kế. Các hàm lượng này không được chính xác nhưng được phép dùng trong sản xuất.

5.2.3. Men bia

– Nấm men bia thuộc giống men rượu *Saccharomyces*. Các nòi men bia được dùng trong sản xuất thường được gọi là "giống men bia". Đó là các nòi thuần chủng được tách hay phân lập từ một tế bào.

Sử dụng giống thuần chủng làm cải thiện chất lượng sản phẩm, làm giảm các tác nhân gây hư hỏng và xuất hiện các mùi vị lạ không mong muốn. Lên men ổn định và đồng hoá đều hơn, bia nhận được sự đồng nhất về chất lượng và thành phần.

Giống men bia thuần chủng được nhà bác học Đan Mạch là Hansen sử dụng vào sản xuất công nghiệp từ cuối thế kỷ XIX. Ông đã phân lập men vẫn dùng (dạng phức hợp) ở nhà máy bia Copenhagen ra những tế bào riêng biệt. Kết quả là Hansen đã chọn được hai giống thuần chủng và ký hiệu là men N°1 và N°2. Từ hai giống này được chọn theo các chủng (nòi) rất đa dạng của men bia được dùng tới ngày nay.

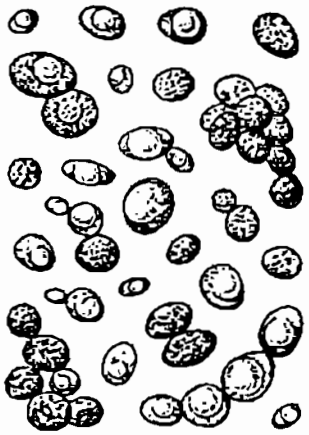
– Trong thực tế sản xuất, ta thấy có hai loại men bia được dùng trong công nghiệp: men nổi và men chìm.

+ Men nổi thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*. Loài này thường được dùng sản xuất các loại bia thẫm màu hoặc các loại bia đặc biệt. Men nổi chỉ phát triển và lên men, nhiệt độ tương đối cao (từ 12°C trở lên) cho nên nó thích hợp với nhiệt độ lên men ở 14 – 25°C. Men này khi lên men, tế bào của chúng lơ lửng và tập trung trên bề mặt dịch. Với đặc tính như vậy nên tốc độ lên men nhanh và mạnh mẽ. Song, với men nổi, trong công nghệ cần phải có thiết bị lọc cẩn thận mới cho sản phẩm trong suốt, vì các tế bào lơ lửng trong dịch lên men (kể cả lên men phụ).

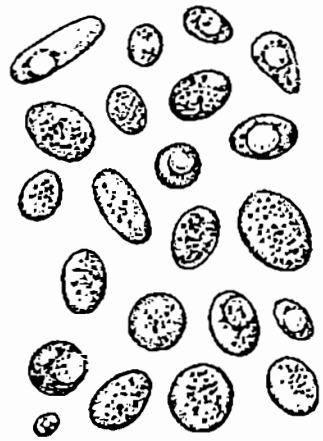
+ Men chìm thuộc loài *Saccharomyces carlsbergensis*, phát triển dược và gây lên men ngay ở nhiệt độ thấp (6 – 8°C). Loài men này được dùng phổ biến trên toàn thế giới để sản xuất các loại bia vàng sáng màu. Các tế bào nấm men khi lên men chúng thường kết dính vào nhau ở dạng bụi hoặc dạng bông và dễ kết lắng, tạo điều kiện thuận lợi cho công nghệ lọc cho sản phẩm trong suốt, màu vàng óng. Đây là ưu điểm để men chìm dễ dàng được dùng để sản xuất bia vàng trong suốt.

Song, về khía cạnh khác, men chìm dễ kết lắng nên bề mặt tiếp xúc của các tế bào nấm men với các thành phần dinh dưỡng có trong môi trường bị hạn chế. Vì vậy, thời gian lên men bị kéo dài, tính kinh tế kém hiệu quả hơn. Đó cũng là lý do làm cho men chìm ít được dùng trong sản xuất bia ngắn ngày.

Hình dáng của men bia được giới thiệu ở hình 5.5 và 5.6.



Hình 5.5. ***Saccharomyces carlsbergensis*** **(x 2.000)**



Hình 5.6. ***Saccharomyces cerevisisae*** **(x 2.000)**

– Men bia trong môi trường dinh dưỡng sẽ sinh sản và phát triển, đồng thời sinh ra rượu etylic và một số sản phẩm phụ hoặc thứ cấp (hay còn gọi là sản phẩm bậc hai). Trong quá trình sinh sản, men bia nảy chồi là chủ yếu, đôi khi cũng sinh sản bằng bào tử. Quá trình phát triển của nấm men cũng tuân thủ 4 – 5 giai đoạn (hay là các pha sinh trưởng). Đầu tiên (khoảng 1 vài giờ đầu) nấm men mới được gieo cấy vào môi trường chưa quen với môi trường và tuỳ độ thuần thục nên men không sinh trưởng và sau đó mới sinh trưởng theo logarit và cũng bắt đầu tạo rượu etylic. Các chất dinh dưỡng trong môi trường được men bia hấp thu để sinh ra tế bào mới, số đường trong dịch còn dư sẽ là phần đường cuối cùng làm cho hàm lượng etylic được tạo thành cùng các sản phẩm khác.

– Lên men là quá trình nuôi cấy nấm men với các chủng đặc hiệu trong dịch đường malt, sinh ra rượu và các sản phẩm phụ để cho dịch bia được hoàn thiện. Qua sự trao đổi chất của nấm men, dịch bia có hương vị và độ bền vững cần thiết. Hương thơm của bia chủ yếu là do các sản phẩm lên men phụ tạo thành. Thành phần của sản phẩm phụ này phụ thuộc vào loài nấm men, điều kiện lên men và thành phần môi trường.

Men chìm có thể phân huỷ trisaccarit thành fructozơ và melibozơ, sau đó dưới tác dụng của enzyme melibiaza, các đường glucozơ và galactozơ được tạo thành. Vì vậy, men chìm có thể lên men rafinozơ hoàn toàn. Còn men nổi chỉ lên men được 1/3 rafinozơ. Men bia lên men được các đường glucozơ, fructozơ và maltozơ, nhưng không lên men được tinh bột, dextrin (đối với nấm men chìm). Men nổi có enzyme pyruvatoxydaza, do vậy có thể sử dụng trực tiếp glucozơ vào hô hấp, cho nên nó có khả năng sinh trưởng và lên men nhanh hơn. Tế bào *Saccharomyces carlsbergensis* hình oval, có kích thước 6 – 12μm (hình 5.5). Sinh sản bằng cách nảy chồi. Rất khó tạo thành bào tử (men nổi dễ sinh bào tử hơn). Ở nhiệt độ 50 – 60°C, nấm men bị chết.

– Chọn men bia cần chú ý đến các chỉ tiêu sau: khả năng sinh trưởng, khả năng kết lắng và lực lên men cao.

– Quá trình sinh trưởng của nấm men gồm các pha: pha tiềm sinh, pha chỉ số, pha cân bằng và pha suy vong. Trong tiềm phát, nấm men hầu như không sinh sản. Trong pha thứ hai nấm men nảy chồi rất mạnh và bắt đầu lên men. Trong pha cân bằng, sinh trưởng của nấm men ổn định và lên men mạnh. Ở pha cuối cùng, sự sinh sản hầu như ngừng lại và bắt đầu kết lắng.

– Tốc độ sinh sản của nấm men phụ thuộc vào nhiệt độ, vào thành phần các chất dinh dưỡng, các chất độc, các hợp chất nitơ, cacbon có trong môi trường. Đối với men chìm, nhiệt độ thích hợp cho phát triển là 25 – 27°C, nhưng ở 2 – 3°C vẫn còn hoạt động. Trong môi trường giàu hợp chất nitơ và nghèo hợp chất hydratcacbon thì nấm men phát triển chậm và pha tiềm phát kéo dài ra.

Trong lên men bia, người ta không muốn chi phí nhiều đường cho việc tăng sinh khối của nấm men. Vì vậy, người ta có thể cho lên men chính trong các thùng kín bão hoà khí cacbonic, nhưng ở nồng độ cao sẽ bị ức chế (0,2% CO_2 men nảy chồi chậm, còn ở 15% CO_2 sẽ làm lên men ngừng lại).

– Có nhiều chất kìm hãm sinh trưởng và phát triển của nấm men: ở nồng độ rượu trên 15%, men sinh sản chậm; còn với 0,5% H_2SO_4 và 1% axit axetic, men có thể bị chết sau 1 – 2 giờ. Nhưng ở môi trường 1% axit lactic, men có thể chuyển hoá được dễ dàng.

– Khả năng kết lắng của nấm men có một ý nghĩa rất quan trọng trong nghề nấu bia. Men chìm kết lắng ở dạng bông dưới đáy các thùng lên men, còn men nổi được nổi lên bề mặt dịch lên men. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng kết lắng của men bia, như tính chất của vỏ tế bào, thành phần môi trường và những tác nhân bên ngoài. Ngày nay, người ta xác định tính kết lắng của nấm men phụ thuộc vào thành phần hoá học của vỏ tế bào. Trong vỏ tế bào, càng ít thành phần hydratcacbon, mangan và hàm lượng axit amin càng lớn thì nấm men càng kết lắng nhanh. Tốc độ kết lắng còn phụ thuộc vào trị số tích điện của tế bào, phụ thuộc vào pH của môi trường.

– Trong quá trình lên men, các giống men bia kết lại với nhau ở hai dạng: dạng bông và dạng bụi. Giữa hai dạng này có những đặc điểm khác nhau trong lên men chính và lên men phụ. Nấm men dạng bông lên men nhanh hơn nhưng không sâu xa, chúng tập trung lại với nhau khi lên men được khoảng 2/3 chất khô có trong môi trường. Quá trình lên men phụ của dạng này chậm và kéo dài hơn.

Nấm men dạng bụi lên men chậm hơn, nhưng sâu hơn và quá trình lên men phụ kết thúc sớm hơn. Thay đổi pH của môi trường cũng làm thay đổi dạng của sinh khối nấm men. Tính liên kết ở dạng bông của sinh khối nấm men thấy rõ nhất ở pH 4 – 4,4. Khi tăng độ axit của môi trường, nấm men sẽ chuyển sang dạng bụi. Khả năng kết lắng không phải là tính chất cố định của giống nấm men: giống thuần khiết ở dạng bông trong thời gian bảo quản có thể dần dần xuất hiện các thể dạng bụi và ngày càng tăng lên, làm giảm tính kết lắng.

Trong sản xuất bia người ta quan tâm nhiều đến các giống men ở dạng bông, vì chúng dễ kết lắng, làm sáng bia và sau khi chuyển dịch bia chưa chín sang lên men phụ có thể sử dụng cho các đợt lên men sau. Song, nếu chỉ có các nòi ở dạng bông thì lực lên men yếu và lên men không triệt để. Nhiều công trình nghiên cứu đã cho thấy rằng, các giống men bia là hỗn hợp dạng bụi và dạng bông. Những giống lên men tốt có thể gồm 90% dạng bụi và 5 – 10% dạng bông, còn lên men yếu gồm 40 – 50% dạng bông. Để có thể đảm bảo lên men được tốt và kết hợp với đặc điểm của quá trình công nghệ sản xuất, người ta có thể sử dụng hai hoặc nhiều nòi men bia cho lên men đồng thời.

– Sức lên men là điều quan tâm lớn nhất của thực tế sản xuất. Trong sản xuất bia thường dùng những nòi lên men mạnh và tạo cho bia có mùi vị thơm ngon.

– Tốc độ lên men phụ thuộc vào nhiều yếu tố: khả năng lên men của nấm men, hoạt tính sinh lý và số lượng tế bào của chúng trong môi trường, phụ thuộc vào nhiệt độ, pH, thành phần hoá học của dịch lên men, cũng như thế oxy hoá – khử,...

– Lực lên men hay khả năng lên men phụ thuộc vào hàm lượng các chất protein trong tế bào nấm men. Hàm lượng này thay đổi trong quá trình lên men. Khi mới tiếp vào dịch lên men, protein trong tế bào nấm men bia là 40 – 46% lượng chất khô. Ở giai đoạn đầu, số lượng nitơ protein tăng khoảng hai lần, sau đó giảm xuống tới mức ban đầu. Hàm lượng nitơ trong nấm men không những phụ thuộc vào số lượng nitơ amin và nitơ amoniac trong dịch lên men mà còn phụ thuộc vào hàm lượng hydratcacbon.

a) Các nòi nấm men dùng trong sản xuất bia

Nhà bác học Đức Hansen lần đầu tiên dùng các giống nấm men thuần khiết vào sản xuất bia. Việc sử dụng các giống thuần khiết có một số ưu điểm: làm tăng chất lượng của bia, quá trình lên men được tiến hành đồng đều hơn, sản phẩm thu được đồng nhất về thành phần cũng như hương vị. Ngoài ra còn giảm sự tạp nhiễm trong quá trình sản xuất cũng như trong thành phần.

Ngày nay, nhiều nước trên thế giới dùng các nòi nấm men chìm trong sản xuất. Các nòi này thuộc giống *Saccharomyces carlsbergensis*. Sau đây giới thiệu một số nòi men bia được dùng ở Liên Xô và Tiệp Khắc (cũ).

– Nòi 776 lên men trung bình. Khả năng kết lắng và làm sáng bia tốt. Giống này thích hợp cho sản xuất bia dùng những nguyên liệu thay thế. Trong dịch lên men có 11% chất khô, ở giai đoạn lên men chính, nòi 776 tách được 2,76% CO_2.

– Nòi 11 tìm được ở Liên Xô (cũ) năm 1939, lên men nhanh, mạnh, không yêu cầu cao về chất lượng nguyên liệu. Trong giai đoạn lên men chính của dịch có 11% chất khô, nó tách được 2,96% CO_2. So với 776, thời gian lên men chính rút ngắn được 20%. Tế bào hình oval có kích thước (6 – 8) × (8 – 10)μm. Khả năng kết lắng tốt và cho thành phẩm vị hoàn thiện.

– Nòi 41 tìm được năm 1933 ở Liên Xô (cũ), lên men trung bình. Trong giai đoạn lên men chính của dịch lên men có 11% chất khô, tách được 2,7% CO_2. Tế bào

hình oval (5 – 8) × (8 – 10)μm. Khả năng kết lắng tốt. Bia thành phẩm có vị dịu, thanh khiết.

– Nòi 44 tách được năm 1939 tại Liên Xô (cũ), lên men trung bình. Trong giai đoạn lên men chính, trên dịch có 11% chất khô, nó tách được 2,4% CO_2. Tế bào hình oval (6 – 8) × (8 – 10)μm, khả năng kết lắng tốt, cho bia vị hoàn thiện. Nòi này cho phép dùng nước có độ cứng cao trong sản xuất bia.

– Nòi P – gốc Tiệp Khắc, lên men trung bình, tách được 2,08% CO_2 trong giai đoạn lên men chính. Kết lắng tốt và bia thành phẩm có mùi vị thanh khiết.

– Nòi F – gốc Tiệp Khắc, lên men nhanh và mạnh. Tế bào to, chịu được các vi sinh vật tạp nhiễm, kết lắng tốt và cho bia vị dễ chịu.

Các nòi men nổi ít được sử dụng. Chúng được dùng để sản xuất một số bia sẫm màu và các sản phẩm đặc biệt, trong đó có bia của Anh và của Đức (Beclin). Một trong số những nòi men nổi là nòi 191 – K, nòi này lên men mạnh các monosaccarit và maltozơ, nhưng không lên men được lactozơ và rafinozơ.

b) Giữ giống men bia

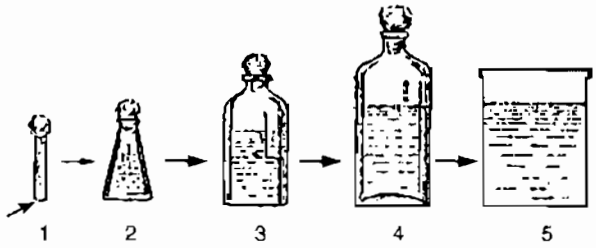
Những nòi men bia thuần khiết được tách ra từ một tế bào, nuôi cấy và bảo quản sao cho giữ được những tính chất quý ban đầu của chúng. Trong bảo quản, quá trình sống của men giống xảy ra rất chậm và hạn chế sự phát triển của chúng. Giữ được trạng thái tiềm sinh này có thể áp dụng các phương pháp bảo quản ở nhiệt độ thấp 2 – 4^{0}C (không quá 8^{0}C), đông khô, ở dạng bào tử hoặc kỵ khí. Cố giáo sư Vexelov (Nga) cho rằng, muốn giữ được những đặc tính quý của giống cần phải định kỳ cho những giống đang ở điều kiện tiềm sinh ra sản xuất rồi lại đưa vào bảo quản theo nguyên tắc "sống" và " làm việc".

Bảo quản giống thuần khiết ở 5 – 8^{0}C trong bão hoà CO_2 có thể giữ những tính chất ban đầu, nâng cao được khả năng lên men và cải thiện được mùi vị của bia.

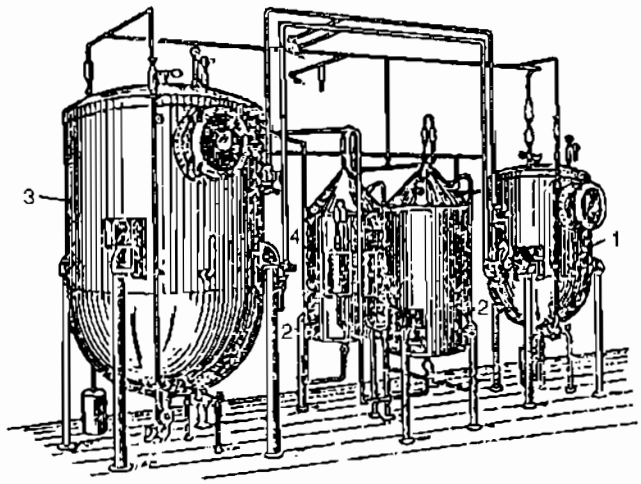
c) Nuôi cấy giống men bia

Nuôi cấy men bia trong sản xuất cũng theo nguyên tắc tăng dần thể tích và số lượng tế bào để đảm bảo khả năng lên men: giống từ ống nghiệm cấy qua các bình, các thùng rồi chuyển vào thùng lên men chính. Đầu tiên giống ống nghiệm được chuyển vào các bình 300ml dịch nước malt, giữ ở 18 – 25^{0}C tới khi phát triển mạnh. Từ đây chuyển tiếp qua các bình 3 – 5 lít có chứa 2 – 3 lít dịch đường malt, có hoa hublon và nuôi nhân giống ở 18 – 25^{0}C. Tiếp đó, nuôi giống ở các thùng 200 – 400 lít có chứa 100 – 200 lít môi trường, ở 12^{0}C. Tỷ lệ tiếp giống là 10%. Đến khi giống sinh trưởng mạnh ở các thùng này, sẽ tiếp giống vào các thùng lên men. Quá trình nhân giống men bia thuần chủng trong phòng thí nghiệm được giới thiệu ở hình 5.7 và trong phân xưởng ở hình 5.8.

Nếu nhà máy bia có thiết bị Greyner thì việc nhân giống sẽ từ ống nghiệm qua các bình Carlsberg, lên men ở 7 – 8^{0}C trong 5 – 6 ngày liên tục và tiếp tục tăng dần qua 200 – 300 lít rồi đưa vào các thiết bị này cho lên men ở 8^{0}C trong 3 ngày, sau đó đưa vào các thùng lên men.



Hình 5.7. Sơ đồ nhân giống men bia thuần chủng trong phòng thí nghiệm



Hình 5.8. Thiết bị Greyner – nhân giống trong phân xưởng

1. Bình thép để thanh trùng dịch nuôi cấy; 2. Bình nhân giống;
3. Bình nhân giống bổ sung; 4. Bình giữ lại dịch giống.

Dịch đường malt – hublon còn nóng cho vào bình 1 và được thanh trùng bằng hơi nóng, sau đó làm lạnh và được chuyển sang bình 2. Tiếp giống từ bình nhân giống trong phòng thí nghiệm vào dịch trong bình 2. Nuôi khoảng 3 ngày đến khi sủi bọt mạnh, tức là men phát triển tốt thì chuyển sang bình 3 đã có dầy dịch được thanh trùng tại đó. Trước khi chuyển giống từ bình 2 sang bình 3, người ta giữ lại 10 lít giống và chứa vào bình nhỏ 4 ở bên cạnh. Mẻ tiếp theo sẽ dùng giống từ bình 4 và không cần phải nhân giống ở phòng thí nghiệm. Nếu trường hợp giống trong phân xưởng không đạt yêu cầu thì phải nhân giống lại theo trình tự như hình 5.7.

Yêu cầu của giống về mặt vi sinh là thuần chủng, có nghĩa là giống đưa vào lên men không được tạp nhiễm. Vì vậy, quá trình nhân giống phải được làm thật sạch sẽ đảm bảo không bị tạp nhiễm. Các dụng cụ phải rửa sạch, tráng bằng nước sôi hoặc cồn. Nếu dùng nút bông phải sấy hoặc hấp thanh trùng. Nhiệm vụ này thường được giao cho cán bộ chuyên trách có tay nghề và trách nhiệm cao.

d) Sử dụng lại men sau khi lên men chính

Cặn men ở các thùng lên men chính sau khi đã chuyển dịch vào lên men phụ, chia làm ba lớp: lớp dưới cùng là những tế bào già, có lực lên men yếu; lớp giữa là những tế bào trẻ hơn có khả năng lên men mạnh; và lớp trên cùng là những tế bào

có kích thước nhỏ, khả năng kết lắng kém cùng với những vẩn cặn protein và hublon. Chỉ nên dùng lại lớp men giữa sau khi đã được xử lý. Có nhiều cách xử lý men này trong sản xuất. Đơn giản nhất là cho cặn men qua rây có kích thước nhỏ để loại bỏ những tạp chất lớn, sau đó rửa bằng nước. Cho cặn men vào các thùng hở hoặc kín rồi để yên cho men lắng xuống dưới (bỏ phần nước ở trên). Rửa 1 – 2 lần trong 24 giờ. Nước rửa là nước đun sôi để nguội, không có tạp khuẩn. Nên tiến hành rửa men ở trong nhà lạnh với nhiệt độ tốt nhất là 1^0C. Trước khi dưa vào lên men có thể hoạt hoá giống men đã rửa bằng cách cho dịch vào đường malt có độ đường khoảng 5 – 7%, để tĩnh ở phòng lên men chính đến khi phát triển mạnh thì tiếp vào lên men.

Nếu men bị tạp nhiễm thì cần phải xử lý bằng axit. Dung dịch axit dùng cho xử lý là H_2SO_4 0,4% hoặc H_3PO_4 0,6%. Cho men vào dung dịch axit, để yên một giờ rồi đổ cẩn thận vào bình sạch, bỏ cặn bẩn. Dịch men được trung hoà bằng NaOH hoặc KOH tới pH = 4,8 – 5,2. Men lắng xuống đáy được rửa bằng nước sôi để nguội rồi dem dùng cho lên men.

Cũng có thể làm sạch men như sau: dùng dịch chiết hublon bằng kiềm 2% có chứa 500 – 700mg/l izohumulon hoà với cặn men. Trong điều kiện này khoảng 24 giờ, hoạt lực men không giảm còn các vi sinh vật tạp nhiễm bị chết.

5.2.4. Lên men

– Quá trình lên men được thực hiện qua hai giai đoạn: lên men chính và lên men phụ:

+ Dịch đường malt – hublon đã được làm lạnh tới 10^0C và bơm vào các thùng lên men chính, rồi tiếp giống đã được nhân như ở trên. Tỷ lệ tiếp giống khi nhân tĩnh thường là 5 – 10%, còn nếu nhân giống có sục khí, hoặc bằng thiết bị Greyner thì tỷ lệ có thể là 0,5% (mật độ tế bào của dịch giống phải đạt khoảng 2.10^{10} tế bào/ml).

Lên men chính được tiến hành ở thùng kín hoặc hở, nhiệt độ thích hợp là 8^0C (có thể có nhiệt độ cao hơn), thời gian lên men chính khoảng 6 – 10 ngày. Ở giai đoạn này lên men mạnh, dịch sủi bọt nhiều, phần lớn các loại dường dều được chuyển thành rượu và CO_2, một số sản phẩm phụ cũng được tạo thành và chúng có ảnh hưởng đến sự hình thành hương vị của bia.

Cuối giai đoạn này sự lên men giảm xuống, phần lớn men đã lắng xuống đáy thùng. Sản phẩm cuối cùng là bia non, trong đó có rượu, một ít CO_2 và còn ít đường (khoảng 1,5 – 2,5%).

+ Bia non được bơm vào các thùng lên men phụ. Các thùng này kín, để đứng hoặc để nằm, có khả năng chịu áp lực lên men tới hơn 1atm, để có thể đảm bảo cho áp lực làm việc là 0,3 – 0,7atm. Khi chuyển bia non sang lên men phụ, *cần chú ý*: không để men còn lại trong dịch quá nhiều sẽ gây mùi men trong sản phẩm sau này, nhưng nếu quá ít sẽ làm cho quá trình "chín bia" kéo dài, lượng men còn lại thích hợp trong lên men phụ là 1,2 – 1,3g/l.

Nhiệt độ lên men phụ giữ ở 1 – 4 °C. Trong giai đoạn vẫn tiếp tục lên men, CO_2 sinh ra được giữ lại trong thùng và hoà tan dần vào dịch, pH của dịch bia tăng dần đến trên 5, axit giảm, các este phức tạp được tạo thành. Hương vị bia được hoàn thiện dần trong thời gian lên men phụ. Ta gọi quá trình này là sự "chín" của bia.

Ngoài ra, men bia dần kết lại với nhau ở dạng bông hoặc bụi, các cặn vẩn cùng với men lắng xuống đáy thùng làm cho bia trong và sáng màu. Thời gian lên men phụ tuỳ thuộc vào từng loại bia, có thể kéo dài 10 – 30 ngày. Đối với bia thông thường, bia hơi thường lên men phụ 11 – 14 ngày, bia chai 15 – 21 ngày hoặc dài hơn (có những loại bia lên men phụ tới 100 ngày).

Như vậy, lên men phụ là để hoàn thiện hương vị, độ trong của bia, làm cho "chín", bão hoà CO_2, tăng khả năng tạo bọt và ức chế sự phát triển của vi sinh vật ngoại lai có hại bị nhiễm vào dịch bia. Một trong những điều kiện vô cùng quan trọng trong giai đoạn này là đảm bảo nhiệt độ 1 – 4°C, nếu không đảm bảo yêu cầu này, cả quy trình có thể bị hỏng, sản phẩm thu được không đảm bảo chất lượng.

– Trong quá trình lên men, một số hợp chất C_4 được tạo thành, như axetoin, diaxetyl và 2, 3 – butylenglycol. Diaxetyl là chất không có lợi trong bia, vì gây ra mùi vị khó chịu. Nó được tạo ra một lượng tương đối lớn do nấm men ở giai đoạn đầu của quá trình lên men. Nếu hàm lượng axetoin có trong bia vượt quá 2,3mg/l cũng ảnh hưởng tới mùi vị của bia. Trong giai đoạn phát triển mạnh, nấm men cũng khử diaxetyl thành 2,3 – butylenglycol – chất này không ảnh hưởng xấu tới bia. Nhờ các biến đổi hoá sinh trong quá trình lên men bình thường không bị tạp nhiễm thì hàm lượng diaxetyl trong bia chỉ khoảng 0,4 – 0,6g/l (ngưỡng 0,2mg/l là lý tưởng) và axetoin khoảng 0,8 – 1,2g/l. Đây cũng là những chỉ tiêu hoá học biểu hiện mức độ chín của bia.

Lên men bia có thể tiến hành trong các thùng kín hoặc hở trong các hầm lạnh (thậm chí trong các bể bê tông được xử lý bề mặt bằng nhựa) với hai chế độ lạnh thích hợp cho lên men chính và phụ. Ngày nay, nhiều xí nghiệp bia mới xây dựng tiến hành lên men bia trong các thùng kín làm bằng thép không gỉ có hai vỏ và lên men chính phụ cùng với sự điều chỉnh nhiệt độ bằng cách bơm nước muối và glyxerin lạnh qua vỏ hoặc ống xoắn ruột gà chạy bên trong (lên men "gia tốc").

5.2.5. Hoàn thành sản phẩm

a) Lọc và bão hoà CO_2

Bia cần phải lọc bằng các máy lọc ống, lọc đệm khung bản (filter press) hoặc qua máy ly tâm cao tốc để làm sạch men và các vẩn cặn. Dịch sau khi lọc trong suốt có màu vàng sáng hoặc màu nâu, tăng giá trị cảm quan và tăng độ bền.

Dịch lọc này đem bão hoà CO_2 và đóng vào các thùng bock xuất thành bia hơi hoặc đem đóng chai. Cần phải chú ý rằng: nếu làm bia hơi thì độ đường ban đầu chỉ cần 8 đến 9° và thời gian lên men ngắn hơn.

Nhiệt độ khi lọc là 1 – 4°C (tốt nhất là 1°C) không nên lọc bia ở nhiệt độ cao hơn vì không giữ được CO_2 và dịch bia bị sục vẩn, khó lọc.

Dịch bia đã lọc, nếu không đủ hàm lượng CO_2 hoà tan thì phải làm bão hoà CO_2 trong các bình thép không gỉ chịu được áp lực tới 7atm và có bộ phận phân tán khí tốt. Điều kiện bão hoà CO_2 là nhiệt độ 1 – 5°C (có trường hợp bão hoà dịch ở – 5°C trong thiết bị khuấy bơm đảo liên tục), áp suất bão hoà CO_2 ở 4atm. Khí CO_2 ở đây là loại dùng cho thực phẩm, nếu là loại công nghiệp thì phải lọc khí qua than hoạt tính, qua dịch axit và dịch thuốc tím,...

Sau khi bão hoà CO_2, dịch bia được tàng trữ trong lạnh ít nhất 4 giờ mới đem đóng chai bằng máy tự động hoặc bán tự động, hoặc thủ công. Cần phải đóng chai khi bia còn lạnh để tránh tổn thất CO_2 với thiết bị đẳng áp.

b) Đóng chai

Chai dùng đóng bia thường là loại 0,5 lít. Đôi khi còn dùng loại 0,33 và 0,65 hoặc đóng trong hộp nhôm (được gọi là bia lon).

Chai để đóng bia là chai có màu thẫm xanh hoặc nâu tránh ánh sáng làm thay đổi màu sắc và mùi vị của bia. Trước hết, chai phải rửa thật sạch, không còn cáu bẩn, đem hấp hoặc luộc chín để khử khuẩn. Nút chai bằng sắt tây và đệm cao su là loại dùng cho thực phẩm cũng được khử khuẩn khi đóng chai.

c) Hấp bia

Bia chai không hấp chỉ để được 3 – 8 ngày, vì trong đó còn một ít men và các vi khuẩn làm hỏng bia. Vì vậy, cần phải hấp bia theo phương pháp Pasteur. Nhiệt độ hấp ở khoảng 60 –70°C, nếu nhiệt độ cao hơn, mùi vị của bia thay đổi, làm chất lượng giảm. Trong quá trình hấp, các tế bào nấm men, nấm mốc và bào tử của nấm, vi khuẩn sẽ bị chết, riêng bào tử của vi khuẩn nếu có sẽ không chết, nhưng ở trong bia không có điều kiện cho chúng nảy mầm, làm hư hỏng bia.

Có thể nâng cao độ bền của bia bằng cách bổ sung enzyme proteaza, axit ascorbic, polyamit,... là những chất ổn định vào bia.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 5

1. Hãy cho biết đặc điểm các loại nguyên liệu sản xuất bia (chủ yếu là thóc malt và hoa hublon).
2. Tiêu chí tuyển chọn giống men bia. Bia vàng thông thường dùng men bia nào trong sản xuất?
3. Tại sao cần phải lên men bia thành hai giai đoạn: lên men chính và lên men phụ?
4. Hãy cho biết sơ đồ công nghệ sản xuất bia. Giải thích các công đoạn.

Chương 6

SẢN XUẤT RƯỢU VANG

Khác với rượu trắng và các loại rượu pha chế, rượu vang là loại đồ uống lên men trực tiếp từ nước hoa quả. Khi quá trình lên men kết thúc, người ta không chưng cất mà để lắng trong tự nhiên, gạn lọc và hoàn thành sản phẩm. Rượu vang vốn có nguồn gốc từ quả nho, nên có tên gọi là "Vin" hoặc "Wine", ngày nay người ta mở rộng khái niệm của rượu vang là rượu không chưng cất từ các loại nước quả. Ở Việt Nam, có người còn gọi rượu lên men từ gạo không chưng cất, như rượu nếp hoặc nếp cẩm cũng là rượu vang.

Người ta hái nho chín đem nghiền nát và để cả khối đem ủ tự nhiên. Đường nho sẽ tạo thành rượu, các chất dinh dưỡng, chất thơm cũng được hoà vào dịch lên men. Đồng thời các chất chát, sắc tố từ xác quả cũng được chiết vào dịch và tạo thành màu sắc và hương vị của rượu vang. Chương "Sản xuất rượu vang" này của tác giả dùng thuật ngữ "ủ rượu vang" hàm nghĩa là quá trình lên men hoặc kỹ thuật sản xuất rượu vang.

Sản xuất rượu vang dựa trên cơ sở các quá trình hoá sinh xảy ra trong quá trình lên men các loại nước quả dưới tác dụng của enzyme của nấm men.

Trong nước quả (nho, mận, dâu, dứa, mơ,...) có chứa đường glucozơ, fructozơ, các chất pectin, các axit hữu cơ (axit tactaric, malic, sucxinic) và muối của những axit này, các chất màu, hợp chất chứa nitơ (protein, axit amin) vitamin cũng như các muối khoáng,...

Trong quá trình lên men, đường trong dịch quả được nấm men sử dụng để tăng sinh khối và tổng hợp một số sản phẩm (rượu, khí CO_2 và glyxerin, axit axetic, axit lactic, este etylaxetat). Các alcol bậc cao, aldehyt axetic được tạo thành từ các axit amin. Các chất pectic bị thuỷ phân kéo theo sự tạo thành một lượng nhỏ metanol.

Lên men rượu vang thường được chia thành các giai đoạn: Lên men chính ở nhiệt độ từ 20 – 30°C khoảng 10 ngày hoặc dài hơn. Ở cuối giai đoạn lên men chính, dịch lên men trong dần vì protein và pectin lắng xuống. Lên men phụ ở nhiệt độ từ 15 – 18°C. Khi lắng cặn hoàn toàn, dịch trong thì gạn. Lọc xong sẽ được vang có thể uống được, nhưng chưa ngon, cần phải tàng trữ ở nhiệt độ 4 – 10°C để vang hoàn thiện hương vị đặc trưng. Thời gian tàng trữ có thể là vài tháng, vài năm thậm chí tới hàng chục hoặc trăm năm.

Người ta chia rượu vang theo màu sắc, theo hàm lượng đường có trong rượu hoặc theo độ cồn.

Theo màu sắc: có vang trắng, vang đỏ; theo lượng đường còn lại trong rượu có: vang chát hay vang khô (hết đường) và vang ngọt (còn đường).

Ngoài ra còn có loại rượu vang nạp CO_2 hoặc giữ CO_2 trong lên men. Rượu sâm banh (champange) là loại rượu vang ngon có CO_2 nên khi uống có ga bọt. Vang khô thường uống giữa bữa ăn, vừa ăn, vừa uống. Vang ngọt dùng uống sau bữa ăn. Cũng có loại vang nửa khô: vang Vermouth dùng khai vị. Sâm banh thường dùng cho đại tiệc và phụ nữ thường thích loại vang này. Trước đây người ta vẫn truyền tụng về thần rượu Đionidot dạy loài người biết cách trồng nho và ủ rượu. Đến đầu thế kỷ XIX, nhà khoa học Pháp Canhia đơ Latua mới chỉ ra rằng, chính các cặn trắng đục được lắng xuống các thùng rượu là tác nhân gây hiện tượng lên men rượu. Lớp cặn trắng đục đó là các tế bào nấm men.

Sản xuất rượu vang dựa trên cơ sở biến đổi hoá sinh xảy ra trong quá trình lên men các loại nước quả dưới tác dụng của hệ enzyme của nấm men. Hiện nay, có hai phương pháp lên men rượu vang cơ bản: lên men tự nhiên và lên men nhờ các chủng nấm men thuần khiết.

Theo tài liệu của Tổ chức quốc tế về nghề Trồng nho và Làm rượu vang, năm 1974, nhiều nước trên thế giới không dùng giống men thuần chủng trong sản xuất rượu vang (Pháp, Italia, Mexico, Bồ Đào Nha, Hy Lạp, Tây Ban Nha,...). Các nước này dùng nấm men tự nhiên có sẵn trong nước quả để lên men.

Phương pháp sản xuất rượu vang từ chủng thuần khiết có rất nhiều triển vọng: thời gian lên men nhanh, quá trình lên men không bị dừng ở giữa chừng, hàm lượng đường trong dịch quả được lên men triệt để, nồng độ cồn thu được trong vang cao hơn lên men tự nhiên là 0,1 – 1°, vang sáng màu nhanh hơn, có thể cho hương vị thanh khiết hơn.

6.1. ĐẶC ĐIỂM NƯỚC QUẢ VÀ CÁC YÊU CẦU VỀ NGUYÊN LIỆU LÀM RƯỢU VANG

– Nguyên liệu làm rượu vang là các loại quả. Quả chín (có thể chưa thật chín) sau khi thu hoạch chọn loại quả tươi, chất lượng tốt, đem ép lấy nước hoặc ngâm với đường để thu được dịch nước quả dùng cho lên men.

Tất cả các loại quả đều có đường, nhiều vitamin, nhiều axit hữu cơ, trong đó có nhiều vitamin C, có đầy đủ chất khoáng và có một lượng protein đáng kể. Ngoài ra nước quả còn chứa tanin, pectin. Trong các loại quả dùng làm rượu vang trước hết phải kể đến nho.

+ Nho: Trong số các loại quả, nho là loại quả lý ý tưởng nhất để chế rượu vang. Thành phần hoá học của nho có (%): 10 – 30 đường (glucozơ, fructozơ, saccarozơ); 0,5 – 1,7 các axit hữu cơ (axit tactaric, axit malic); 0,1 – 0,9 các chất protein; 0,1 – 0,3 pectic; 0,1 – 0,5 chất khoáng; có các vitamin C, B_1, B_2, PP cùng các chất thơm.

Nho ưa đất ít chua và khí hậu khô, nhiều nắng. Vùng đất Khánh Hoà, Ninh Thuận, Bình Thuận của nước ta là một vùng nho mới và đang phát triển, nhưng năng suất chưa cao và chưa có rượu vang chiếm lĩnh thị trường. Hiện đang trồng thử nho ở vùng Ba Vì, Chí Linh,... cũng có nhiều triển vọng.

+ Dứa: Dứa cũng là nguyên liệu tốt để chế rượu vang. Trong nước dứa, lượng đường cũng khá cao, khi lên men thêm ít đường. Vang dứa không giữ được hương vị thơm ban đầu của nước quả.

+ Mơ: Mơ là loại quả sản xuất vang rất tốt. Vang mơ thơm ngon, có thể là một vị thuốc an thần và chữa bệnh đường ruột.

Ngoài các loại quả trên thì dâu, mận, táo (kể cả táo mèo) cũng là những loại quả có nhiều triển vọng làm nguyên liệu cho rượu vang.

Đặc điểm chung của các loại quả là có một lượng đường đáng kể dễ đồng hoá, nhiều vitamin và khoáng chất, cũng như các axit hữu cơ làm cho nước quả có vị chua (pH thường là thấp, từ 2,5 trở lên) và có tanin làm cho rượu sau này có vị chua chát.

– Trên đây ta đã biết, nguyên liệu để sản xuất rượu vang chủ yếu là quả nho. Ngoài ra có thể dùng dâu, dứa, mơ, mận, xoài,... lên men rượu vang. Nho có hai loại: tím đỏ dùng để sản xuất ra vang đỏ và nho màu xanh sản xuất ra vang trắng. Với vang, nho là nguyên liệu thích hợp nhất vì:

+ Từ nho cho vang chất lượng tốt nhất, hương vị êm dịu, chua chát hài hoà.

+ Thành phần dịch quả nho rất thích hợp cho lên men và thành phần rượu thành phẩm nhiều chất dinh dưỡng, gồm các chất kích thích sinh học. Chính vì vậy từ ngàn xưa, loài người đã được hưởng ân huệ từ "thần Rượu nho" ban thưởng như trong thần thoại Hy Lạp.

– Nguyên liệu là các loại quả thu hái về, tránh giập nát, chọn các loại quả tốt ép lấy dịch. Có nhiều trường hợp chỉ loại quả xấu, giập nát, dính bẩn, còn lại đem ép và không cần rửa, để lợi dụng hệ nấm men có sẵn trên vỏ quả. Đối với vang đỏ dùng cả xác quả và dịch đưa vào lên men.

Các loại quả khác ép lấy dịch, bỏ xác quả và vỏ.

– Dịch được ép với các thiết bị thép inox không bị axit ăn mòn, có vết sắt hoặc đồng. Các loại kim loại này làm giảm chất lượng của dịch quả, đặc biệt là làm biến màu. Dịch thu được sẽ đem sunphit hoá bằng cách bổ sung natri sunphurơ (Na_2SO_3) để chống bị oxy hoá làm sẫm màu hoặc biến màu. Lượng SO_2 được phép cho vào dịch quả là 30 – 120mg/l. Ngoài vai trò làm chất chống oxy hoá, SO_2 còn có tác dụng diệt tạp khuẩn, men dại, khi lên men tạo điều kiện cho nấm men sinh ra một ít glyxerin làm cải thiện hương vị cho vang.

Dịch quả thu được có thể phải bổ sung thêm đường, điều chỉnh độ chua sao cho dịch có pH ở khoảng 3,0 – 3,5, muối amoni hoặc nguồn axit amin, vitamin, trước hết là vitamin B_1. Với dịch giàu axit malic, cần lên men bổ sung malo–lactic để giảm độ chua gắt của axit malic.

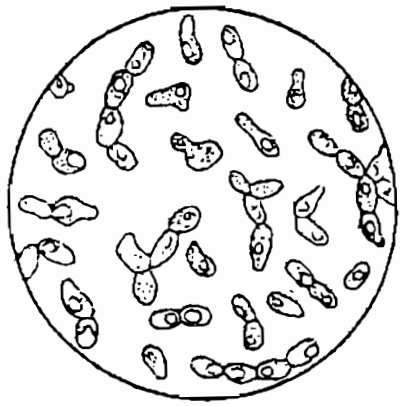
Với các loại quả có hạt cứng khó loại bỏ, dùng phương pháp ngâm đường. Quả tươi và tốt, rửa sạch, để ráo rồi ngâm đường theo tỷ lệ 1 quả/ 1 đường. Xiro thu được cũng cần sunphit hoá và khi lên men được pha loãng gấp 2 – 3 lần. Như vậy, vang sản xuất theo phương pháp xử lý quả ngâm đường này chất lượng không cao.

6.2. HỆ VI SINH VẬT TRONG DỊCH QUẢ

Trong dịch quả tự nhiên chưa xử lý thường rất phong phú về vi sinh vật. Chúng gồm có:

6.2.1. Nấm men

a) Nấm men rượu vang *Sacchoromyces vini* và *S. ovifomis.* Trước đây hai loài này được gộp thành một loài có tên là *S. ellipsoideus* (hình 6.1). Các loài này được dùng chủ yếu để lên men rượu vang.



Hình 6.1. Tế bào nấm men rượu vang
Saccharomyces ellipsoideus
(hỗn hợp hai loài *S. vini* và *S. oviformis*)

b) Nấm men nhọn dầu *(Hanseniaspora apiculata)* hay *Kloeckera apiculata,* là loài men dại làm giảm chất lượng của vang, rất phổ biến ở cỏ dại. Tế bào men này có đầu nhọn (hình 6.2) ở một đầu hoặc hai đầu, làm cho ta liên nghĩ đến quả chanh hoặc quả chuỳ, ở cuối lên men – hình oval hoặc elip. Giống men này khi trưởng thành có hình dáng oval, elip và dài giống cái giò. Kích thước tế bào không lớn: (3 – 4,5) × (5 – 11)μm. Kích thước và hình thái phụ thuộc vào mức độ phát triển, vào môi trường dinh dưỡng, vào nhiệt độ và những yếu tố khác nữa.

H. apiculata thường có trên vỏ quả những loại có đường, trong đó có nho và vai trò lớn trong thời kỳ đầu lên men tự phát. Đến khi trong môi trường tích tụ 4° cồn thì men này ngừng hoạt động, nhường chỗ cho nấm men rượu vang. Ở 35°C, *H. apiculata* ngừng sinh sản và ở 45°C bị chết. Nó có đặc điểm là sinh sản rất nhanh, so với men rượu vang nhanh gấp 2 lần. Điều này giải thích được là ở giai đoạn đầu lên men tự phát, nó đóng vai trò chủ yếu. Đến 90% trường hợp loài men này có mặt ở trên quả nho hoặc dịch quả ở các vùng trồng nho. Khi nó lên men, ngoài một lượng rượu không lớn lắm được tạo thành, còn có một số chất khác nữa, làm cho vang có vị đắng không mong muốn và kìm hãm men rượu vang phát triển.

Trong sản xuất, người ta tìm biện pháp để ngăn ngừa *H. apiculata* phát triển trong dịch quả: sơ bộ cho 50 – 75mg H_2SO_3 vào 1 lít dịch quả.

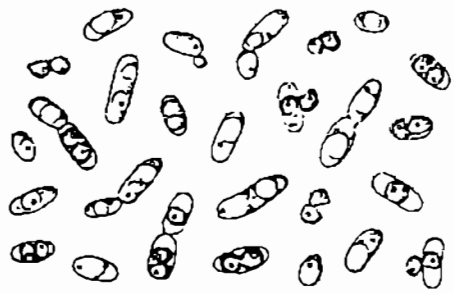
*c) **Pichia*** (hình 6.3)

Nấm men *Pichia* có tế bào hình oval hay clip, kích thước 3,6 – 7,2μm đường kính. Hình dáng của chúng có thể thay đổi thành trực khuẩn hoặc hình khúc giò. Trong trường hợp này chiều dài tế bào đạt tới 20 – 25μm. Nấm men *Pichia* phát triển rất tốt trên bề mặt các loại chất lỏng có đường, lên men khá tốt với cơ chất là bia và vang, nhanh chóng tạo thành màng trên bề mặt các sản phẩm này.

Lên men đường, những nấm men này không sinh ra sản phẩm mà chỉ đồng hoá chất hữu cơ bằng con đường oxy hoá cơ chất. *Pichia* oxy hoá rượu thành axit hữu cơ.

Trong vang non thường gặp loài này là phổ biến và gặp với số lượng rất lớn, tốc độ sinh sản vượt trội các men khác nhiều lần.

Hình 6.2. *Hanseniaspora apiculata* (*Kloeckera apiculata*)



Hình 6.3. *Pichia*

Pichia là một trong những tác nhân làm hỏng vang. Vang thành phẩm có *Pichia* phát triển tạo màng trên bề mặt và vang bị đục, các thành phần trong vang bị biến đổi sâu sắc. Vang bàn ăn khi chiết chai nếu còn đủ khí trong chai, *Pichia* có mặt sẽ sinh sản rất nhanh, làm tiêu hao lượng đường sót lại cùng với rượu, glyxerin và các chất hữu cơ có trong vang. Chỉ qua 3 ngày, ở 18 – 20°C, vang bị đục. *Pichia* phát triển trên bề mặt vang làm thay đổi thành phẩm và hương vị của vang. Sản phẩm trao đổi chất của loài nấm men này cho vang hương vị khó chịu và làm cho vang giảm chất lượng rõ rệt.

Cần phải tìm các biện pháp ngăn ngừa *Pichia* phát triển ở vang thành phẩm. Một trong những biện pháp có ý nghĩa thực tế và rất đơn giản khi chiết chai vang bàn ăn (vang dùng trong bữa ăn và không để lâu) là đổ thật đầy chai và đậy nút kín (nút phải sạch và vô khuẩn). Còn các loại vang thương phẩm sau khi đóng chai, cần khử khuẩn theo phương pháp hấp Pasteur.

d) Zygopichia (có tài liệu viết *Sigopichia)*

Tế bào nấm men *Zygopichia* có hình oval, có kích thước (3 – 5) × (3,5 – 13)μm (hình 6.4). Nấm men này không lên men rượu. Hay gặp nó trong vang bàn ăn, gây đục vang sau khi chiết chai.

Vang được chứa trong bom thùng, chai không đầy còn khoảng trống lớn dễ nhiễm *Zygopichia* và tạo màng (chúng dễ hoạt động ở vang có độ rượu dưới 12%).

Khi phát triển, *Zygopichia* sinh ra axit xitric và axit axetic cùng nhiều axit khác làm độ chua của vang tăng lên.

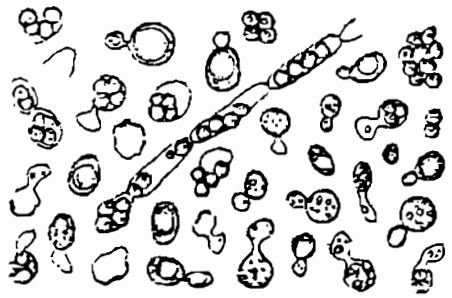
Biện pháp ngăn ngừa *Zygopichia* cũng giống như *H. apiculata* và *Pichia*.

e) Hansenula (hình 6.5). Tế bào *Hansenula* hình oval ngắn hoặc kéo dài, đôi khi có dạng tròn. Kích thước tế bào trung bình là (1,5 – 5) × (3 – 30)µm. Bào tử của men này có dạng cái mũ và kích thước là 2 – 3µm.

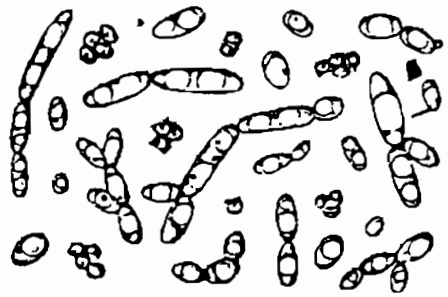
Hansenula có khả năng sinh trưởng rất nhanh trên bề mặt dịch quả, tạo thành màng ở ngày thứ hai và lắng cặn ở ngày thứ ba, đồng thời gây lên men được 2 – 3° rượu. *Hansenula* cũng có thể sinh trưởng được ở vang có 9 – 13° rượu. Nó là tác nhân mạnh mẽ tạo cho vang có các este bay hơi (etyl axetat làm cho vang có mùi thơm riêng biệt).

Hansenula cũng làm đục vang. Biện pháp chống *Hansenula* cũng giống như ở các nấm men tạo màng khác (*Pichia*).

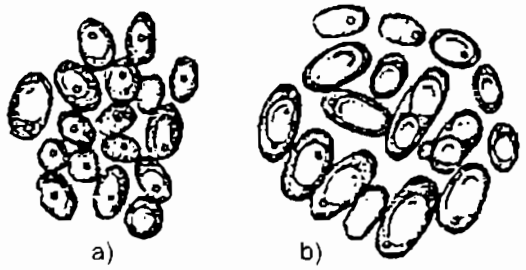
f) Mycoderma vini (hình 6.6). *Mycoderma* có tế bào hình oval và hình trụ (dạng một khúc gỗ) ở hai đầu lượn tròn. Kích thước trung bình của tế bào là (5,5 – 9) × (2 – 4)µm. Men này tạo màng rất mạnh ở vang có còn đường và độ rượu dưới 12%. Nó phát triển trên bề mặt thoáng của vang trong chai hay bom thùng và làm giảm hàm lượng rượu và các chất chiết trong vang, tạo thành các axit bay hơi làm cho vang có vị chua khé (gắt).



Hình 6.4. *Zygopichia*



Hình 6.5. *Hansenula*



Hình 6.6. *Mycoderma vini*

a) Tế bào ở màng trên dịch lên men; b) Tế bào ở cặn men.

Mycoderma cũng làm đục vang.

Ngoài các nấm men đã được đề cập ở trên, còn gặp nhiều giống loài nấm men khác nữa có trong dịch quả, đặc biệt là ở nước quả pha loãng. Trong các men khác hay gặp là *Torula*.

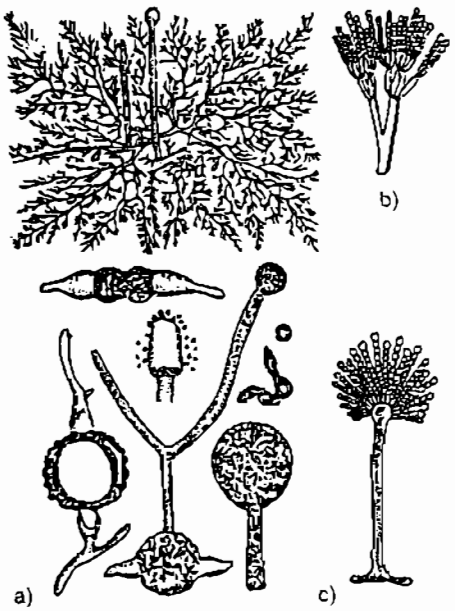
Tất cả các nấm men này đều gây lên men và làm giảm chất lượng của vang. Chúng được gọi bằng một tên chung là men dại.

6.2.2. Vi khuẩn và nấm mốc

Ngoài những nấm men còn thấy vi khuẩn và nấm mốc có trong nước quả, đặc biệt là khi pha loãng chuẩn bị môi trường lên men. Chúng ở không khí rơi vào nước quả và chỉ phát triển trong dịch lên men và vang. Vì ở hai loại môi trường có nhiều chất thích hợp cho cả vi khuẩn và nấm mốc phát triển. Vi khuẩn cũng phát triển được ở trong vang. Trong thời gian lên men, vi khuẩn sinh sản rất mạnh và tạo ra mùi mannit (hôi). Vi khuẩn gây phần lớn "các bệnh" của vang.

Cùng với các vi khuẩn là tác nhân chính gây "bệnh" vang, ta còn thấy có một số loài thuộc vi khuẩn lactic phát triển biến axit malic thành axit lactic (ta gọi quá trình này là lên men malo–lactic). Vi khuẩn này tham gia vào làm "chín" vang hay hoàn thiện cho vang, để cho vang có mùi hoàn thiện hơn. Đây là trường hợp duy nhất vi khuẩn làm lợi cho vang.

Trên vỏ quả thường có bào tử của các giống *Mucor*, nấm hình chổi xể hay bàn tay (*Penicillin*, còn gọi là mốc xanh) và *Aspergilus niger* (mốc đen) (xem hình 6.7).



Hình 6.7. **Hình thái nấm mốc**
a) *Mucor;* b) *Penicillum;* c) *Aspergillus.*

Các bào tử của vi sinh vật có ở vỏ quả (vỏ trái cây), đặc biệt là của nấm mốc, khi gặp điều kiện thuận lợi, chúng nảy mầm và phát triển trên bề mặt dịch lên men, ở bề mặt vang chứa trong bom thùng, trên bề mặt tường kho lạnh và được coi là kẻ thù nguy hiểm đối với nghề làm rượu vang. Để ngăn chặn nấm mốc phát triển, cần phải làm vệ sinh nhà xưởng, các hầm tàng trữ, kho tàng được xông lưu huỳnh để ngăn chặn, diệt trừ nấm mốc.

Cũng như vi khuẩn lactic, trong những nấm mốc có trong dịch nước quả, có một trường hợp với đại diện là *Botrytis cinera* làm tăng chất lượng cho vang.

6.3. HỆ VI SINH VẬT TRONG LÊN MEN RƯỢU VANG TỰ NHIÊN (LÊN MEN TỰ PHÁT)

Hệ vi sinh vật trong lên men rượu vang tự nhiên tương đối phức tạp và không đồng nhất trong các giai đoạn của quá trình lên men.

Trong nước nho tươi có những nhóm vi sinh vật khác nhau rơi từ môi trường xung quanh, chủ yếu ở vỏ quả, thân, cuống và thiết bị. Phần lớn trong phức hệ này là nấm mốc (76 – 90%), nấm men (9 – 22%), số còn lại chiếm tỷ lệ thấp là vi khuẩn không sinh bào tử hoặc có bào tử, xạ khuẩn và *Micobacter.*

Độ axit của nước nho khá cao (pH = 2,7 – 3,8) là điều kiện không thuận lợi cho các vi sinh vật phát triển.

Theo dõi quá trình lên men ở nhiều nơi một cách tự nhiên thấy rằng, một vài ngày đầu, các men dại hình thoi đầu nhỏ hoặc hình chuỳ (*Kloeckera)* chiếm ưu thế (70 – 80% trong tổng số nấm men), sau đó các nấm men hình elip hoặc oval (*Saccharomyces ellipsoideus)* nhanh chóng phát triển gây lên men mạnh, lượng đường tiêu hao nhanh và tích tụ cồn etylic. Khi độ cồn tương đối cao (8 – 12%) thì nấm men hình elip S. *ellipsoideus* hay là S. *vini* ngừng phát triển và hoạt động. Khi ấy nấm men chịu được cồn cao *Saccharomyces oviformis* tiếp tục lên men cho đến khi kết thúc.

Qua phân tích hệ vi sinh vật trong quá trình lên men tự nhiên cũng gợi mở cho chúng ta ý thức được: khi dùng nấm men thuần chủng để lên men nước quả không nên dùng một chủng đơn độc mà cần dùng phối hợp những chủng chịu được cồn cao để lên men tiếp theo. Có như vậy mới lên men triệt để đường có trong dịch lên men và cồn được hình thành trong rượu cao (có thể tới 17 – 19%).

Ở môi trường có độ chua lớn thường chỉ thích hợp với nấm mốc và nấm men. Nấm men trong nước quả tươi thường ít hơn nấm mốc, nhưng nấm men lại có khả năng phát triển và tăng sinh khối nhanh trong điều kiện thiếu oxy hoặc kỵ khí, đồng thời lên men tích tụ cồn. Điều kiện kỵ khí và trong dung dịch có cồn làm ức chế nấm mốc. Chính trong điều kiện này nấm men đã cạnh tranh và phát triển chiếm ưu thế trong quá trình lên men tự nhiên.

Trong các loài nấm men cũng cạnh tranh nhau, chỉ có các loài có khả năng đồng hoá đường nhanh tạo độ cồn cao mới dần dần chiếm ưu thế ở giai đoạn lên men chính và lên men phụ.

Nhiều tác giả đã nghiên cứu hệ vi sinh vật và hệ nấm men trong lên men nước quả đã nhận thấy rằng: số lượng và thành phần giống, loài là không đồng nhất. Các chi, giống, loài của nấm men khác nhau về tốc độ sinh trưởng, hoạt lực lên men, khả năng tạo cồn, chịu nóng, chịu lạnh, khả năng chịu cồn cao cũng như khả năng sinh ra các sản phẩm lên men thứ cấp, ảnh hưởng đến hương vị của rượu vang.

Các công trình nghiên cứu đều xác định rằng, hệ nấm men trong giai đoạn đầu lên men nước nho là *Kloeckera* – nấm men có dạng hình chuỳ hoạt động tích tụ được 2 – 4 độ cồn rồi ngừng hoạt động và chết dần, sau đó là nấm men rượu vang thực thụ (*Saccharomyces vini* và *Saccharomyces oviformis*) phát triển đóng vai trò chủ yếu trong lên men chính và lên men phụ. Trong các dịch quả khác như nước táo, thường thấy nấm men thuộc loài *Shzosaccharomyces acidodevoratus*. Loài này phân huỷ axit malic, làm giảm độ axit cho các loại dịch quả trong quá trình lên men.

6.4. DINH DƯỠNG NẤM MEN VÀ CHẤT LƯỢNG CỦA RƯỢU VANG

Các chương trên đã trình bày môi trường nuôi cấy nấm men cũng như với vi sinh vật nói chung, cần phải có các nguyên tố hoá học cần thiết và ở dạng dễ đồng hoá. Trong các nguồn dinh dưỡng thì nguồn cacbon và nitơ được quan tâm hàng đầu.

6.4.1. Nguồn dinh dưỡng cacbon

– Nguồn dinh dưỡng cacbon đối với nấm men gồm có: đường và dẫn xuất, các loại rượu, axit hữu cơ, axit amin, pectin, hydratcacbon,... Song mỗi loài nấm men có quan hệ riêng biệt với từng loại đường. Đặc điểm này là do đặc điểm chẩn đoán học (diangostic) của các chủng nấm men. Trong cơ chế trao đổi chất nói chung, phần lớn các loài của giống *Saccharomyces* khác nhau trước hết là quan hệ với đường. Còn những nguồn cacbon khác – các rượu và axit hữu cơ – thì quan hệ với chúng ở các loài là như nhau.

– Song, đa số các loài nấm men rượu vang lên men được glucozơ, fructozơ, saccarozơ và galactozơ. Rafinozơ được sử dụng một phần. Còn lactozơ, melibiozơ, pentozơ, dextrin và tinh bột hoàn toàn không được đồng hoá. Trong dịch nho, lượng đường glucozơ và fructozơ tương đối là bằng nhau, nhưng đường fructozơ ngọt hơn glucozơ nhiều.

– Theo cường độ sử dụng glucozơ và fructozơ (đến thời điểm mà nấm men dã lên men được 50% fructozơ) người ta chia nấm men làm 3 nhóm:

1) Nhóm thích glucozơ (glucosophyle) lên men glucozơ từ 80 – 85% (phần lớn là các loài thuộc giống *Saccharomyces*, cũng như giống *Saccharomycodes* và *Bretianomyces*.

2) Nhóm thích fructozơ (fructosophyle) trong giai đoạn này chỉ sử dụng có 5 – 10% glucozơ (*S. baili, S. rouxii, T. stella).*

3) Nấm men ưa thích cả hai loại đường và đến khi sử dụng được 50% glucozơ thì cũng thấy tiêu hoá được 40 – 60% fructozơ (*S. rosei, Pitria membranaefacien).*

– Các axit hữu cơ chiếm vị trí quan trọng trong trao đổi chất của nấm men: chúng có thể kích thích hoặc ức chế sinh trưởng, cũng có thể là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất trong hoạt động sống của nấm men.

Tất cả các sản phẩm trung gian của vòng Krebs (axit pyruvic, axit axetic, axit xitric, axit fumaric và axit malic) nấm men có thể dùng như nguồn cacbon duy nhất. Song, tốc độ sinh trưởng của chúng ở môi trường các axit này thấp hơn so với môi trường glucozơ.

Các axit béo không bão hoà, đặc biệt là axit oleic, axit linoleic, axit palmitoleic, axit arachidinic là những nhân tố sinh trưởng quan trọng của nấm men trong điều kiện kỵ khí. Men rượu vang có thể sinh sản tự do trong điều kiện kỵ khí, nếu như thêm vào môi trường 2 chất: một axit béo chưa bão hoà nào đó (axit oleic, axit linoleic) và sterin (argosterin hoặc cholesterin).

Trong môi trường với các axit hữu cơ khác nhau làm nguồn cacbon thì CO_2 là chất hoạt động sinh học liên kết với các hợp chất trung gian đối với men. Các hiện tượng này thấy rõ trong quá trình lên men Champange (sâm banh) bão hoà CO_2

6.4.2. Dinh dưỡng nitơ

Nitơ là cấu tử cần thiết để xây dựng nên tế bào và hoạt động sống của nấm men như axit amin, protein, các nucleotit purin và pirimidin và một số vitamin, những chất này cần phải có mặt trong môi trường ở dạng hữu cơ hoặc vô cơ. Phần

lớn nấm men không đồng hoá được nitrat. Song giống *Hansenula* và một số loài thuộc giống *Brettanomyces* lại "xài" được nitrat. Các nguồn nitơ vô cơ được nấm men đồng hoá tốt là amoni sunphat, axetat, lactat, malat, sucxinat và nước amoniac (amoni hydroxit).

- Trong trường hợp nguồn nitơ hữu cơ gần gũi với NH_3 là các axit amin, được nấm men sử dụng trước hết, đặc biệt là giống *Saccharomyces*. Nấm men cũng có thể đồng hoá được ure và pepton. Để có thể thu được một lượng lớn sinh khối *S. cerevisiae* trong điều kiện hiếu khí, cần phải có nguồn nitơ hữu cơ cũng như vô cơ. Một tỷ tế bào nấm men có thể đồng hoá được 4 – 7mg nitơ.

- Nitơ – amoniac ($N - NH_3$) có trong dịch nho (từ 25 – 100mg/l) được nấm men đồng hoá nhanh trong vài giờ đầu để phục vụ cho sinh sản. Với những lứa nho chín quá nhanh hoặc nhiễm nấm *Botrytis cinerea* thường không đủ lượng nitơ – amoniac có trong dịch quả, vì vậy cần phải bổ sung muối amoni để đẩy mạnh nấm men sinh trưởng. Chỉ nên làm việc này vào trước lúc bắt đầu lên men, vì rằng trong quá trình lên men, nấm men sử dụng không hoàn toàn các muối amoni. Cần phải chú ý là, bổ sung muối amoni làm cho độ axit trong vang tăng lên và làm giảm độ pH.

Với các axit amin, nấm men đồng hoá rất tốt, kém hơn là pepton và hoàn toàn không đồng hoá được protein tự nhiên. Song, khi trong môi trường có nguồn nitơ dễ tiêu hoá làm cho nấm men có thể tiết ra các enzyme proteolitic và nấm men có khả năng phân huỷ được protein.

+ Theo giá trị dinh dưỡng của axit amin, người ta chia chúng thành:

* Các axit amin được nấm men đồng hoá dễ dàng là izolơxin, triptophan, arginin, valin, histidin, axit asparatic.

* Các axit amin được đồng hoá kém – treonin, phenylalanin, tirozin, metionin, rerin, lizin, histidin, axit glutamic, lơxin.

* Prolin hoàn toàn không được nấm men đồng hoá.

+ Trong quá trình lên men dịch quả nho, một mặt yêu cầu cần có vật chất nitơ, mặt khác – nấm men lại tiết các chất này vào môi trường. Ở giai đoạn cuối lên men, thấy có một lượng khá lớn axit amin và các chất chứa nitơ khác nữa do các tế bào chết bị tự phân và ngay cả các tế bào nấm men sống cũng có khả năng tiết axit amin vào môi trường. Người ta nhận thấy rằng, trong thời gian đầu lên men, men rượu vang có thể sử dụng các axit amin, trừ prolin, nhưng khi cuối lên men chúng lại tiết vào vang các axit asparatic, glutamic, γ–aminobutyric, alanin, valin, glucocol, rerin, treonin.

+ Những nguồn nitơ rất cần thiết cho cấu tạo tế bào, sinh sản và sinh trưởng của nấm men. Song, còn những khung cacbon của các axit amin cũng có ảnh hưởng lớn tới những vấn đề này. Khung cacbon của axit amin sau khi khử amin là những nhân tố xác định giá trị dinh dưỡng, làm cho axit amin không những là các nguồn nitơ dinh dưỡng mà còn là các nguồn cacbon.

+ Trao đổi axit amin trong tế bào gồm 3 kiểu phản ứng: khử amin, chuyển amin và khử cacboxyl.

Trong quá trình phân huỷ và tái tạo axit amin "thứ cấp", enzyme chuyển nhóm amin (aminotransferaza) đóng vai trò quan trọng. Bổ sung axit amin cùng với muối amoni hoặc thay hoàn toàn bằng axit amin đều làm tăng hoạt tính enzyme.

Axit amin có ảnh hưởng không những đến các enzyme aminotransferaza tương ứng mà còn đối với những các khác. Alanin được bổ sung vào môi trường đều có tác dụng đến các enzyme nghiên cứu. Khi bổ sung tirozin chỉ làm tăng hoạt tính enzyme tirozin–aminotransferaza, khi thay hoàn toàn amoni sunphat bằng tirozin làm nâng cao được hoạt tính aminotransferaza.

+ Ở cuối lên men thường xuất hiện ở trong môi trường một lượng đáng kể amin do trao đổi chất của tế bào nấm men tạo ra cũng như một số nấm men bị tự phân. Các axit amin này cùng với amoni sunphat là tác nhân làm tăng hoạt tính các enzyme. Hoạt tính của asparatat–aminotransferaza tăng từ 3,1 đv/mg protein ở giữa giai đoạn lên men đến 47,7 đv/mg protein ở cuối lên men; hoạt tính của alanin–aminotransferaza tăng từ 0,35 đến 0,92 đv/mg protein; enzyme tirozin–aminotransferaza ở giữa lên men chỉ thấy vết và ở cuối lên men tìm thấy là 2,64 đv/mg protein.

– Thực chất đã cho thấy rằng, thừa oxy cũng như thừa CO_2 sẽ làm thay đổi lớn về trao đổi chất nitơ. Thừa oxy sẽ dẫn đến tăng một lượng lớn sinh khối và sẽ cần nhiều nguồn nitơ, trong đó có cả axit amin có trong môi trường.

Do vậy, trong môi trường, ở giữa thời gian lên men thường có một lượng axit amin là 25% và ở cuối thời gian lên men là 9% so với N tổng số. Ngược lại, nếu thừa CO_2 sẽ kìm hãm sinh sản của nấm men, nhưng chi phí axit amin với N tổng số cho một đơn vị sinh khối lại lớn hơn.

– Điều kiện lên men có ảnh hưởng đến hoạt tính proteaza. Hoạt lực tối đa của enzyme này trong điều kiện nấm men hiếu khí là 100% thì ở điều kiện trong CO_2 với áp lực 0,4 MPa là 66%. Peptidaza với những điều kiện như thế sẽ vài lần thấp hơn. Điều này cho thấy ở tế bào sống của nấm men, sự thuỷ phân protein chỉ tới polypeptit và tới các axit amin là không đáng kể.

Trong lên men rượu vang, cần lưu ý đến trao đổi chất cacbon và nitơ. Các cấu tử này đều có ảnh hưởng tới các chỉ tiêu cảm quan của vang. Thừa các chất chứa nitơ trong điều kiện lên men đủ oxy sẽ cho vang những tông mùi không thích hợp. Để khắc phục hiện tượng này, người ta có thể áp dụng lên men nhiều lần, nghĩa là lên men dở dang, đem lọc, loại bớt men sẽ cho vang có hương vị êm dịu hơn.

6.4.3. Dinh dưỡng các nguyên tố vô cơ

Cũng như các nấm men khác, nấm men rượu vang cũng rất cần các nguyên tố khoáng dinh dưỡng như photpho, lưu huỳnh, kali, canxi,...

a) Photpho có trong thành phần những hợp chất quan trọng nhất của tế bào: các nucleotit, axit nucleic, polyphotphat, photpholipit. Hợp chất photpho đóng một

vai trò xác định trong các chuyển hoá vật chất, đặc biệt là trong trao đổi chất cacbon và vận chuyển năng lượng. Nấm men sử dụng tốt nguồn photpho vô cơ là ortophotphat. Nguồn này có thể biến thành polyphotphat và sau khi hoạt hoá được sử dụng cho các quá trình sinh tổng hợp. Thiếu photpho trong môi trường dẫn đến sự thay đổi đáng kể trao đổi chất ở nấm men liên quan đến sự phá hỏng nhu cầu và hấp thu cacbon cũng như nitơ.

Để đảm bảo cho nhu cầu sinh lý bình thường của nấm men, lượng photpho dinh dưỡng vào khoảng 10 – 13mg cho 10 tỷ tế bào. Đối với men rượu vang là *Saccharomyces vini* và *S. oriformis*, để sinh trưởng tốt và nâng cao được tốc độ lên men, lượng photpho dinh dưỡng cần có trong môi trường là 100 – 500mg/l (với nguồn photpho bổ sung là Na_2HPO_4). Trong rượu vang sẽ giảm được lượng axit chung và axit bay hơi, nhưng lại nâng cao được hương vị đáng kể.

Trong tế bào nấm men, polyphotphat được thấy có ở 2 dạng: dạng hoà tan trong axit tricloaxetic, chiếm tỷ lệ ít; dạng không hoà tan trong axit chiếm phần nhiều hơn.

Trong các tế bào nấm men trẻ, nảy chồi mạnh chứa photpho nhiều hơn cả (0,12 – 0,07% sinh khối khô). Điều này được xác định bằng lượng polyphotphat ở giai đoạn đầu và tốc độ quá trình sinh trưởng của tế bào. Khi đó quá trình tổng hợp protein và axit nucleic xảy ra mạnh tương ứng với sự sinh sản và sinh trưởng mạnh mẽ, làm cho sự tiêu hao trước hết là các polyphotphat không tan trong axit (các polyphotphat này là phần hoạt hoá sinh lý), sau đó là các polyphotphat tan trong axit. Điều này có thể nhận thấy là khi sử dụng, hầu hết photpho chung trong tế bào ở cặn men bị giảm, còn trong vang lại tăng tương ứng. Điều đó có nghĩa là các hợp chất photpho hoà tan chuyển từ tế bào nấm men vào vang.

b) Lưu huỳnh có trong thành phần của protein và nhóm phụ (–SH) của một số enzyme, coenzyme A. Do vậy, nếu thiếu lưu huỳnh trong môi trường sẽ phá hỏng sự trao đổi chất và tổng hợp protein. Những hợp chất chứa S đóng vai trò quan trọng trong hoạt động sống của nấm men: các axit amin (xistein, xistin, metionin), các vitamin (tiamin và biotin) và những hợp chất khác. Trong dịch nho có nguồn S tự nhiên là các gốc sunphat. Trong điều kiện kỵ khí của quá trình lên men, S nguyên tố trong tế bào bị khử thành H_2S, còn trong điều kiện hiếu khí – được hoà tan trong chất béo và tích tụ trong tế bào.

Một lượng nhỏ S cũng làm tăng lực nảy chồi của nấm men, nhưng tới 1mg/l đã làm cho quá trình này bị ngừng trệ, do vậy S nguyên tố còn lại trong vang non là điều đặc biệt nguy hiểm, vì nó được dùng cho lên men thứ cấp.

Trong tế bào có mặt ion kim loại (Fe, Cu), lưu huỳnh sẽ tạo thành sunphua kim loại làm cho cặn men có màu nâu đỏ hoặc đen xám, gây cho vang những mùi khó chịu.

c) Canxi và kali cần thiết cho sự hoạt động của một số enzyme. K và Ca tham gia vào trung tâm hoạt động của các enzyme này và đồng thời có mặt ở các chất ức chế các enzyme.

d) Các nguyên tố vi lượng có ảnh hưởng đến sinh trưởng và lên men. Mn với nồng độ 1mg/l làm tăng lực hô hấp, ở 45 – 90mg/l – tăng lực lên men, tăng sinh tổng hợp enzyme esteaza của nấm men. Mo – tăng khả năng sinh sản, Bo – tăng khả năng lên men. Hỗn hợp nguyên tố vi lượng Li, Rb, Ni, Co làm tăng lượng sinh khối đáng kể.

6.4.4. Các nhân tố sinh trưởng

Đây là các chất kích thích sinh trưởng, gồm có vitamin, các axit amin, các bazơ purin và pyrimidin.

– Có 6 vitamin nhóm B là nhân tố cơ bản kích thích sinh trưởng các nấm men không màu (những nấm men không sinh ra sắc tố): inozit (vitamin B_8), biotin (vitamin B_7), axit pantotenic (vitamin B_5), tiamin (vitamin B_1), pyridoxin (vitamin B_6), axit nicotinic (vitamin B_3, PP).

Liều lượng tối thiểu các vitamin này có tác dụng dương tính đến phát triển của nấm men như sau: inozit – 5µg/ml; biotin – 0,0001µg/ml; axit pantotenic – 0,25µg/ml; tiamin – 1,0µg/ml; pyridoxin – 0,25µg/ml; axit nicotinic – 0,5µg/ml trong môi trường tổng hợp.

Đối với nấm men sinh sắc tố *Rhodotorula,* trong 6 vitamin trên thì tiamin được thay thế bằng axit paraaminobenzonic.

Các vitamin nhóm B thuộc nhóm chất xúc tác sinh học có hoạt tính sinh lý mạnh hơn cả. Trong nấm men có những loài có thể tổng hợp được một, hoặc một vài chất trong các vitamin này. Như vậy, thiếu một vitamin nào đó mà nấm men không sinh trưởng, thì chỉ cần bổ sung vitamin thiếu vắng vào môi trường, nấm men sẽ phát triển bình thường. Do vậy, có thể dùng các chủng nấm men làm chúng thử – test để định lượng vitamin nhóm B.

– Vitamin cùng với axit amin có trong môi trường có tác dụng rất lớn đến sinh trưởng và trao đổi chất của tế bào nấm men.

Hơn nữa trong nước quả có sẵn hệ vi sinh vật tự nhiên được nhiễm từ vỏ quả, trang thiết bị ép và dụng cụ cũng như từ môi trường xung quanh. Với đặc điểm của nước quả giàu dinh dưỡng thích hợp với nhiều loại vi sinh vật nên nước quả dễ bị lên men tự nhiên, khó điều khiển được. Nếu không có kinh nghiệm trong nghề làm rượu vang thì sản phẩm lên men khó có chất lượng cao. Nước quả cũng dễ bị oxy hoá làm cho sẫm màu. Muốn hạn chế các vi sinh vật tạp nhiễm và làm cho nước quả sáng màu, người ta thường cho thêm một lượng sunphurơ (SO_2) có tính toán. Với nước quả, sau khi ép thường dược bổ sung thêm đường để có khoảng 20% đường tổng số, điều chỉnh pH (2,8 – 3,5) bằng amoni kali tactarat (có khi dùng $CaCO_3$ bột hoặc amoni hydroxyt NH_4OH), bổ sung thêm nguồn nitơ – $(NH_4)_2SO_4$,... Dùng Na_2SO_3 cho vào nước quả, ngoài tác dụng bảo quản nó còn có tác dụng trong lên men, hướng cho việc tạo thành glyxerin nhiều hơn để tăng thêm hương vị đặc trưng cho vang.

6.5. NẤM MEN THƯỜNG GẶP TRONG SẢN XUẤT RƯỢU VANG

Nấm men trong sản xuất rượu vang thuộc giống *Saccharomyces* Meyer. Meyer, năm 1938, lần đầu tiên đã gộp các loài nấm men bia và nấm men rượu vang thành một giống.

Saccharomyces – có bào tử trong nang thường là 1 – 4 bào tử, có khi tới 8. Tế bào của chúng có hình dạng khác nhau: hình tròn, oval, hoặc elip. Sinh sản bằng lối nảy chồi, sử dụng được trong quá trình hô hấp và lên men, có trường hợp lên men ở dịch đường 30% và tạo được 18° cồn. Không đồng hoá được muối nitrat.

Giống *Saccharomyces* có tới 18 loài, nhưng chỉ có 7 loài thường gặp trong nước quả.

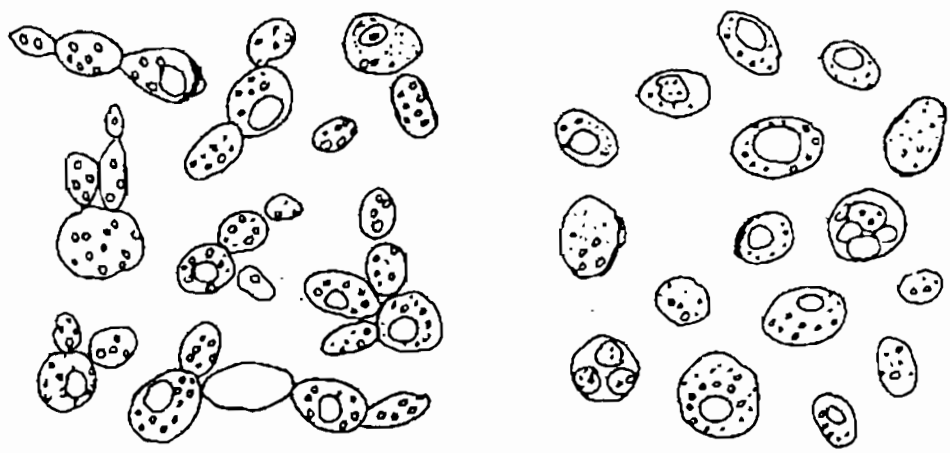
Các loài nấm men không sinh bào tử thường gặp trong nước quả và khả năng lên men hoặc tiêu hao đường trong đó, phổ biến là *Kloeckera, Torulopsis*. Người ta thường gọi chúng là men dại

Sau đây là một số loài nấm men thường gặp trong nước quả có vai trò quan trọng trong nghề làm rượu vang.

6.5.1. *Saccharomyces vini*

Đây là tên hiện nay dùng phổ biến, trước đây người ta gọi là *Saccharomyces vini* Meyer hay là *S. ellipsoideus,* theo Lodder là *Saccharomyces cerevisiae* Hansen.

Nấm men này phổ biến trong quá trình lên men nước quả, chiếm tới 80% trong tổng số *Saccharomyces* có trong nước quả khi lên men. Khả năng kết lắng của nó phụ thuộc vào từng nòi: các tế bào dạng bụi hoặc dạng bông. Nguồn dinh dưỡng cacbon của loài này là đường, cồn và axit hữu cơ, những tác nhân sinh trưởng là axit pantotenic, biotin, mezoinit, tiammin và pyridoxin.



Hình 6.8. Nấm men rượu vang
a) *Saccharomyces vini*; b) *Saccharomyces oviformis*

Đa số các tế bào của loài này hình oval, có kích thước (3 – 8) × (5 – 12)µm, sinh sản theo lối nảy chồi và tạo thành bào tử. *S. vini* sinh ra enzyme invectaza có khả

năng khử đường saccarozơ thành fructozơ và glucozơ, vì vậy trong lên men ta có thể bổ sung loại đường này vào dung dịch quả và hàm lượng rượu được tạo thành bình thường đối với nhiều nòi của men này chỉ đạt được 8 – 10% so với thể tích.

Ở giai đoạn cuối lên men, *Saccharomyces vini* kết lắng nhanh và làm trong dịch rượu.

Các nòi của giống này có đặc tính riêng rẽ về khả năng tạo cồn, chịu sunphit, tổng hợp các cấu tử bay hơi và các sản phẩm thứ cấp tạo ra cho vang có mùi vị đặc trưng riêng biệt.

Giai đoạn cuối cùng của quá trình lên men, các tế bào *Saccharomyces vini* thường bị già, không tiếp tục chuyển đường thành cồn và bị chết rất nhanh.

6.5.2. *Saccharomyces uvarum*

Men này được tách ra từ nước nho, rượu và nước quả phúc bồn tử lên men tự nhiên. Về hình thái nó không khác với các loài khác. Khả năng sinh bào tử khá mạnh trên môi trường thạch – malt. Các nòi của loài này có thể lên men 12 – 13° cồn trong dung dịch nước nho. Một vài nòi được dùng trong sản xuất rượu vang.

6.5.3. *Saccharomyces chevalieri,* theo Lodder là *Saccharomyces chevalieri Guilliermond*

Nấm men này được tách ra từ nước nho lên men tự nhiên; từ vang non được gây men nước dừa hoặc nước cọ.

Saccharomyces chevalieri thuần chủng lên men nước nho có thể tạo 16° cồn. Nó thường lẫn với *Saccharomyces vini.*

6.5.4. *Saccharomyces oviformis,* theo Lodder là *Sac. beuanes saccardo* (hình 6.8)

Được tách ra từ nước nho tự lên men, nhưng loại nấm men này ít hơn so với *S. vini*. Giống thuần chủng phát triển tốt trong nước nho và các loại nước quả khác, có khả năng chịu được đường cao, cồn cao, lên men kiệt đường và tạo thành tới 18° cồn. Các yếu tố sinh trưởng của loại này giống như *S. vini* và có khả năng chịu được độ cồn cao. Dùng các nòi thuần chủng của giống này lên men dịch quả có hàm lượng đường cao để chế vang khô cho kết quả tốt. Có hình dáng giống như *Saccharomyces vini* và có thể tạo thành 18% rượu trong quá trình lên men, giống này tạo thành màng trên dịch quả. *S. oviformis* lên men được glucozơ, fructozơ, saccarozơ, maltozơ, mannozơ và 1/3 rafinozơ, không lên men được lactozơ, pentozơ. Điều khác nhau cơ bản của *S. oviformis* với *S. vini* là: *S. oviformis* không lên men được galactozơ và men nổi lên bề mặt dịch lên men tạo thành màng.

Hai giống men rượu vang này (*S. vini* và *S. oviformis*) có nhiều nòi được dùng trong sản xuất. Nói chung, nhiều nòi men rượu quả có khoảng nhiệt độ thích hợp là 18 – 25°C; ở 35°C sinh sản của chúng bị ức chế; ở 40°C sinh sản của chúng bị ngừng hoàn toàn; ở nhiệt độ thấp hơn 16°C, sinh sản và lên men bị kéo dài. Các điều kiện hoá – lý, thành phần và chất lượng dịch quả, cũng như pH môi trường có ảnh hưởng rất lớn tới quá trình sống của nấm men.

6.5.5. *Hanseniaspora apiculate – Kloeckera apiculata*

Kloeckera apiculata: Kích thước tương đối nhỏ, có hình oval – elip hoặc hình quả chanh, tế bào có một đầu nhỏ, người ta thường gọi là men hình chuỳ. Sinh sản bằng nảy chồi rất phổ biến ở vỏ quả và nhiễm vào nước quả tới 90% tổng số men khi bắt đầu lên men. Nó có thể lên men tạo thành 6 – 7° cồn, nhưng tạo ra một loạt các axit bay hơi cũng giống như các este của chúng làm cho dịch có mùi tạp và nó còn kìm hãm các loài nấm men chính trong trong lên men, *K. apiculata* nhạy cảm với SO_2.

Trong nghề làm rượu vang, người ta không muốn loài men này phát triển. Để ngăn ngừa *H. apiculata* phát triển trong dịch quả, sơ bộ cho 50 – 75mg H_2SO_3 vào 1 lít dịch quả.

6.5.6. Yêu cầu đối với chọn nấm men thuần chủng

Nấm men rượu vang thuần khiết được Hansen lần đầu tiên (1883) tách được từ quả nho và được mang tên là *Saccharomyces ellipsoideus*. Ông phân lập ra từng khuẩn lạc với tế bào riêng biệt trên môi trường đặc và được cấy chuyển với sự kiểm tra bằng kính hiển vi. Từ đấy việc nghiên cứu giống men thuần chủng được chú ý nhưng cũng có nhiều ý kiến khác nhau về sử dụng chúng cho sản xuất rượu vang.

Sau khi có hãng rượu sản xuất được các loại vang ngon từ giống thuần chủng thì vấn đề này mới thực sự được quan tâm và phát triển trong nghiên cứu cũng như áp dụng trong công nghiệp.

Các nòi nấm men thuần khiết dùng nhiều trong sản xuất rượu vang thuộc giống *Saccharomyces vini* và *Saccharomyces oviformis* (hình 6.8).

Các chủng nấm men thuần khiết này, có sự khác nhau về tốc độ sinh trưởng, khoảng nhiệt độ thích hợp để lên men, khả năng tạo cồn và chịu cồn, khả năng chịu được pH thấp cũng như khả năng kết lắng (tạo thành dạng bông hoặc dạng bụi) như đã đề cập tới ở trên.

Những yêu cầu đối với nấm men rượu vang là:

Có lực lên men cao đối với nước quả, sử dụng đường cho lên men gần hoàn toàn, kết lắng tốt, làm trong dịch rượu nhanh, chịu được độ rượu cao và độ axit của môi trường, cũng như các chất sát trùng, tạo cho rượu hương vị thơm ngon thanh khiết.

Ngoài nguồn nitơ cũng cần chú ý đến nhu cầu chất sinh trưởng của nấm men. Nếu thấy men phát triển kém có thể thêm vào 1 lít nước quả 0,2ml hỗn hợp có thành phần như sau: Amoni sunphat – 100g/l; vitamin B_1 (thiamin) – 0,25g/l; canxi pantotenat – 0,25g/l; vitamin H (biotin) – 0,002g/l. Cũng có thể dùng cao nấm men thay cho hỗn hợp này.

Đối với dịch nhân giống hoặc hoạt hoá giống thì hỗn hợp các nguồn nitơ và các chất sinh trưởng này rất có ý nghĩa. Trong nước quả thường có đủ các chất khoáng đối với nhu cầu của nấm men. Vì vậy không cần phải bổ sung thêm chất khoáng.

Song, trong nghiên cứu cũng như nhân giống có thể thêm nguồn photpho kali ở dạng muối photphat và magie ở dạng muối sunphat. Ngoài ra để chống oxy hoá nước quả, người ta có thể thêm hoá chất vào nước quả sau khi ép và trước khi lên men. Chất dùng rộng rãi là SO_2 (anhydrit sunphurơ). SO_2 là hoá chất được cho phép dùng trong sản xuất rượu vang ở hầu hết trên thế giới và có tác dụng nhiều mặt: chống oxy hoá, làm giảm hoặc tiêu diệt nhiều loại vi khuẩn có hại trong đó có vi khuẩn lactic. Lượng SO_2 thường dùng là 30 – 120mg/l. SO_2 có tác dụng làm tê liệt các enzyme oxy hoá khử. Nếu dùng quá liều, lượng vang sẽ có mùi khó chịu và diệt một số vi khuẩn có ích. Nguồn SO_2 dùng phổ biến trong ủ rượu vang là hợp chất natri sunphit (Na_2SO_3).

6.6. SẢN XUẤT RƯỢU VANG

Hiện nay ở nhiều nước trên thế giới, sản xuất rượu vang vẫn gắn liền với kinh tế nông trại, có nghĩa là những gia đình trồng nho thường có một xưởng sản xuất rượu vang tại nông trại của mình với quy mô nhỏ, nhưng rượu được tàng trữ rất cẩn thận trong các đường hầm được hàng năm, có khi tới hàng chục năm, thậm chí tới trăm năm.

Thu hoạch nho rất nhộn nhịp vào mùa thu. Quả hái về được rửa sạch, ép lấy nước, hoặc nghiền nhỏ rồi cho vào thùng lên men sơ bộ ở các thùng hở. Nhiều xưởng vẫn dùng thùng gỗ để lên men. Dịch quả được tiếp 2% giống nấm men từ dịch lên men hoặc cặn ở những mẻ trước và cho lên men ở 20 – 22°C, không nên để quá 25 – 28°C. Thời gian lên men sơ bộ từ 1 – 2 ngày hoặc 3 – 4 ngày, sau đó ép qua máy thuỷ lực hoặc vít ép. Nếu lấy rượu vang có màu thì không qua lọc ép mà để cả khối dịch với vỏ nghiền cho vào lên men. Nếu là các loại quả hạt to khó ép to có thể ngâm đường. Trường hợp giữ dịch làm nguyên liệu để lên men dần sau này thì dịch quả ép không cho lên men sơ bộ mà bảo quản bằng sunphit với liều lượng là 30 – 120mg SO_2/l. Trước khi lên men, cần khử SO_2 thành H_2SO_4 rồi dùng $CaCO_3$ kết tuả $CaSO_4$.

Chuẩn bị dịch lên men: các loại nước quả thường có độ axit cao và đường thấp so với nước nho. Trước khi cho lên men, cần điều chỉnh pH về khoảng 3,2 – 3,5 hoặc 3,8 và bổ sung thêm đường vào dịch ép quả. 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. Nếu chọn được các loại quả có hàm lượng đường cao đáp ứng với yêu cầu lên men là tốt nhất, như vậy sản phẩm thu được giữ gần như nguyên vẹn các chất chiết từ quả hoặc những sản phẩm chuyển hoá của chúng.

6.6.1. Men giống trong sản xuất vang

Trong sản xuất rượu vang ở quy mô nông trại (chủ yếu ở Âu Mỹ) hoặc ở các xí nghiệp công nghiệp lớn, người ta thường dùng các nguồn giống như sau:

– Giống ban đầu hay giống khởi động dùng ở quy mô nông trại thường được lưu trữ từ các mẻ lên men truyền thống từ nhiều năm. Qua sàng lọc và tuyển chọn, nhiều nông trại đã có giống ban đầu tương đối thuần khiết của một hỗn hợp chủng *Saccharomyces vini* và *Saccharomyces oriformis*. Hỗn hợp giống này được giữ ở dạng sữa đặc hoặc bánh khô ở nhiệt độ lạnh khoảng 0 – 2°C. Trước khi sử dụng làm giống khởi động cần phải hoạt hoá. Loại giống này thường được dùng ở quy mô trang trại, nhưng những sản phẩm vang nổi tiếng thường là ở khu vực này làm ra.

Hoạt hoá đơn giản nhất là nuôi cấy trong môi trường nước nho có nồng độ đường 10% hoặc môi trường nước dịch quả với dịch dường – malt. Nếu thấy men phát triển kém nên thêm vào dịch nước quả một hỗn hợp sau: Amoni sunphat – 100g/l; vitamin B_1 – 0,25g/l; canxi pantotenat – 0,25g/l; biotin – 0,002g/l theo tỷ lệ 0,2ml hỗn hợp cho vào 1 lít dịch quả. Cũng có thể dùng cao nấm men thay cho hỗn hợp này.

– Nhân giống từ giống thuần chủng:

Giống thuần chủng được giữ ở các ống thạch nghiêng (có thể dưới lớp dầu parafin) hoặc các ống đông khô. Giống men được cấy chuyền vào môi trường lỏng là dịch quả như trên vài lần, rồi nhân tăng dần 1: 10,... để có đủ lượng giống đưa vào sản xuất.

– Cũng có thể dùng lại giống sau thời gian lên men chính. Các tế bào nấm men lắng xuống đáy thùng được lấy ra và xử lý (giống như dùng lại giống men bia).

Giống thuần chủng thường được dùng trong các nhà máy rượu vang lớn ở quy mô công nghiệp, đặc biệt là các nước Đông Âu. Có thể dùng giống thuần chủng hỗn hợp hai loài *S. vini* và *S. oviformis*.

- Dùng hệ nấm men tự nhiên bám vào vỏ quả khi thu hoạch để lên men. Quả thu hái về, giữ sạch sẽ, không rửa, ép lấy dịch và đặc biệt với nho tím đỏ giữ cả xác quả và dịch, đưa vào lên men. Trước khi lên men cần sunphit hoá dịch quả để diệt men dại, nấm mốc và các tạp chuẩn khác. Trong điều kiện thích hợp, giống men rượu sẽ phát triển vượt trội và cho các mẻ lên men tốt.

Ở các nước có nghề làm rượu vang truyền thống từ lâu đời, hệ vi sinh vật rượu vang rất phong phú, nhất là các men rượu vang có thể phát tán rất rộng, bám vào trên bề mặt vỏ quả, lưu trữ trong đất, cũng như trên bề mặt dụng cụ chứa đựng và thiết bị sản xuất.

Côn trùng (nhất là ruồi giấm) cùng với gió làm phát tán nấm men. Tuy vậy, dòng nấm men tự nhiên này chỉ ở các vùng có truyền thống sản xuất vang lâu đời mới có thể làm ra sản phẩm chất lượng cao. Thực tế cũng cho hay, các sản phẩm rượu vang tuyệt hảo trên thế giới lại chính ở khu vực này. Nhưng, với giống nấm men tự nhiên hay bị tạp chủng lên men cho độ rượu thấp và có thể chất lượng sản phẩm không đạt theo ý muốn.

6.6.2. Lên men

Lên men tự nhiên không cần phải nhân giống riêng, mà để cho khối dịch quả (đặc biệt là nho sau khi ép) lên men nhờ các nòi nấm men có sẵn ở vỏ quả từ ngoài đồng ruộng mang về, hoặc được bổ sung bằng các dịch đang lên men ở mẻ trước.

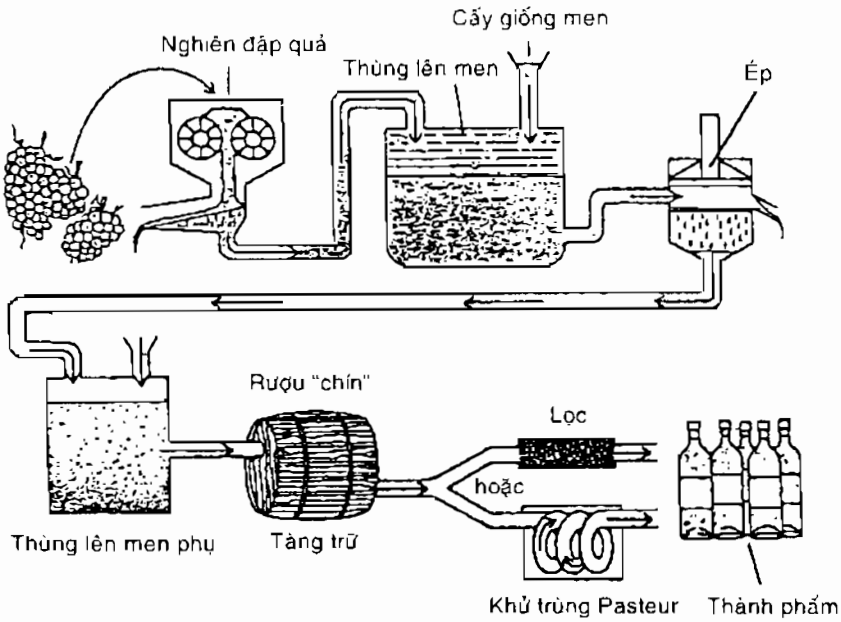
Trong lên men công nghiệp với các chủng thuần khiết thì cần phải nhân giống

ở các phòng thí nghiệm và phân xưởng. Quá trình nhân giống này phải nuôi cấy vô trùng: thiết bị và môi trường phải tiến hành thanh trùng, khi cấy chuyền giống cố gắng không để tạp nhiễm và giống sau khi nhân được đưa vào lên men đảm bảo giống khỏe không có tạp khuẩn.

Tiếp giống vào *lên men chính* theo tỷ lệ 2 – 3%. Nhiệt độ lên men tốt nhất là 20 – 22°C và thời gian khoảng 10 – 20 ngày. Lên men ở nhiệt độ 25 – 28°C với thời gian ngắn hơn. Trong khoảng 6 – 7 ngày, đường giảm mạnh, rượu tăng chậm rồi dừng lại. Vào cuối giai đoạn lên men chính nên bổ sung vào thùng lên men dịch nhân giống chủng *Saccharomyces oviformis* chịu được đường và cồn cao để lên men tiếp tục hoặc các dịch lên men còn lại ở những mẻ trước đang có giống nấm men này hoạt động. Dịch lên men chính thường đạt được 8 – 10% cồn.

Lên men phụ ở 15 – 18°C trong 15 – 20 ngày. Sau khi lên men phụ, độ cồn chưa đủ 14° thì phải thêm cồn cho tới nồng độ này hoặc cao hơn (chỉ được dùng loại cồn thực phẩm) rồi chuyển sang tàng trữ ở nhiệt độ thấp hơn 10°C. Tàng trữ ít nhất là 10 ngày, sau đó tách cặn và có thể cho tàng trữ tiếp tục. Thời gian tàng trữ ở nhiệt độ thấp càng lâu vang càng ngon. Thời gian có thể là hàng năm, tới vài chục năm.

Quy trình công nghệ sản xuất rượu vang đỏ được giới thiệu ở hình 6.9.



Hình 6.9. Quy trình sản xuất rượu vang đỏ
(dùng cả xác quả và vỏ quả nho tím đỏ đưa vào lên men)

CAU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 6

1. Các tiêu chí tuyển chọn men rượu vang.
2. Xử lý dịch nước quả bằng sunphit nhằm mục đích gì?
3. Hãy cho biết quá trình công nghệ sản xuất rượu vang từ dịch nước quả.
4. Tại sao phải lên men chính và lên men phụ? Các quá trình hoá vi sinh trong lên men xảy ra như thế nào?

Chương 7

SẢN XUẤT MEN BÁNH MỲ VÀ MEN THỨC ĂN CHĂN NUÔI

Men bánh mỳ và men thức ăn chăn nuôi (hay men gia súc) là sinh khối nấm men, nhưng có điều khác nhau cơ bản:

– Men bánh mỳ là sinh khối của men rượu *Saccharomyces cerevisiae* còn sống, có khả năng lên men rượu từ đường.

– Men gia súc là sinh khối của *S. cerivisiae* hoặc của các giống men khác như *Candida, Torulopsis* gồm các tế bào đã chết, không có khả năng sinh sản và phát triển. Men gia súc được sử dụng để đưa vào thức ăn chăn nuôi với tư cách là nguồn protein và vitamin (đặc biệt là – tiền vitamin D_2). Men gia súc là những tế bào nấm men qua nhiệt phân đã chết, khi gặp điều kiện thuận lợi không thể sinh trưởng được nữa.

7.1. SẢN XUẤT MEN BÁNH MỲ

Men bánh mỳ là sinh khối của một số nòi men rượu *Saccharomyces serevisiae* vẫn còn sống, khi trộn với bột nhào sẽ lên men rượu sinh CO_2, làm nở bánh.

– Sản xuất nấm men bánh mỳ dựa trên quá trình sinh sản và tăng sinh khối của một số nòi nấm men. Trong quá trình này, đường trong môi trường nuôi cấy được tiêu hao vào hai mục đích: lên men và hô hấp. Kết quả lên men là sự tạo thành rượu etylic và CO_2, còn hô hấp đưa đến tổng hợp các axit amin, axit nucleic và protein.

Trong điều kiện kỵ khí, nấm men gây lên men rượu. Nếu tăng dần lượng oxy trong môi trường tới 7mg/l thì có thể loại trừ được sự lên men rượu và thu được sinh khối ở mức tối đa.

Hàm lượng oxy trong môi trường tới 1mg/l làm ức chế hoàn toàn khả năng sinh sản của nấm men. Nhu cầu oxy phụ thuộc vào thời gian tuổi của tế bào: 1g nấm men trẻ cần 80 – 100mg/giờ, còn các tế bào già cần 40 – 60mg/giờ.

Trong các nhà máy sản xuất nấm men, không khí được nén và thổi vào các thùng nuôi men ở dạng các hạt hoặc dòng nhỏ phân tán. Lưu lượng không khí thổi qua các môi trường nuôi cấy là 30 – 100m^3/giờ.

– Nguyên liệu được dùng trong việc sản xuất nấm men bánh mỳ là rỉ đường – phế phẩm của công nghiệp đường, hoặc các dịch bã rượu.

Rỉ đường dùng trong sản xuất men bánh mỳ có những yêu cầu sau: hàm lượng chất khô không thấp hơn 75%, đường 40 – 50%, hàm lượng chất tro không thấp hơn 7,5%, tổng nitơ không thấp hơn 1,4%, số lượng các vi sinh vật không quá 15.000 tế bào trong 1g rỉ đường.

Rỉ đường trước khi pha môi trường nuôi nấm men cần được xử lý. Trước tiên pha rỉ đường theo tỷ lệ (1 : 1) – (1 : 4); axit hoá bằng axit sunphuric tới pH = 5 rồi làm sạch theo phương pháp hoá học hoặc phương pháp cơ học. Trong phương pháp hoá học, người ta cho thêm vào dịch rỉ đường các chất kết lắng để tuả các chất keo. Phương pháp cơ học dùng các máy ly tâm đĩa (seperator) để tách cặn của rỉ đường. Khi kết tuả các chất keo, người ta có thể đun nóng rỉ đường tới 80 – 100°C để giết các tạp khuẩn.

– Bã rượu sau khi chưng cất cồn là một loại nguyên liệu tốt dùng để nuôi cấy nấm men. Bã rượu nói chung có khoảng 90 – 95% nước, chất khô khoảng từ 5 – 10%. Trong số các chất hoà tan của bã rượu có đường (1 – 2,5%), các hợp chất nitơ, các vitamin nhóm B. Ngoài ra, trong bã rượu còn có các nguyên tố khoáng, các nguyên tố vi lượng,... Như vậy trong bã rượu có hơi ít dường, nhưng rất phong phú các chất kích thích sinh trưởng. Vì vậy khi dùng bã rượu để nuôi cấy nấm men, người ta lọc lấy phần dịch trong rồi bổ sung từ 1 – 2% rỉ đường, thêm supephotphat để tăng nguồn P và $(NH_4)_2SO_4$ hoặc ure làm nguồn nitơ.

– Quá trình nuôi men có thể chia làm ba giai đoạn: nhân giống thuần khiết trong phòng thí nghiệm (giai đoạn A), nhân giống thuần khiết tự nhiên trong sản xuất (giai đoạn B) và nuôi men lớn (giai đoạn C). Ở các nhà máy lớn, nhân giống ở phòng thí nghiệm và trong sản xuất phải tiến hành qua nhiều cấp để có đủ lượng tế bào men nuôi cấy ở giai đoạn C trong các thùng tới hàng trăm mét khối. Giống thuần khiết ở giai đoạn B có thể thu được ở dạng sữa men sau khi ly tâm tách, hoặc ép thành bánh dùng cho giai đoạn C ở cùng nhà máy, hay một số nhà máy khác.

Nhiệt độ nuôi cấy là 29 – 30°C. Trong suốt quá trình nuôi cấy ở giai đoạn B và C cần phải sục khí. Men C được tách bằng hệ ly tâm đĩa và lọc ép, hoặc lọc chân không. Men sữa dược qua sấy phun thành men bột có thể bảo quản được lâu dài. Men thương phẩm ở dạng bánh ép có 73 – 75% độ ẩm hoặc dạng các viên hay sợi khô có 7,5 – 9% độ ẩm, gọi là men khô. Ngoài ra ở các nhà máy bánh mỳ có thể tổ chức một phân xưởng sản xuất men nước để cung cấp cho nhu cầu của mình. Men nước dùng riêng để sản xuất bánh mỳ hoặc trộn lẫn với men khô, hoặc men ép để giảm lượng dùng các men này, đồng thời nâng cao được chất lượng bánh.

Quá trình sản xuất men bánh mỳ tương tự sản xuất sinh khối nấm men protein đơn bào, chỉ khác là các chủng nuôi cấy khác nhau và men bánh mỳ là những tế bào men còn sống.

7.1.1. Giống men bánh mỳ

Các nấm men được dùng trong sản xuất, thuộc họ *Saccharomycetacea*, giống *Sacchromyces*, loài *cerevisiae*. Trong công nghiệp dùng loài này với nhiều nòi (chủng) khác nhau thuộc men nổi. Mỗi nòi có một vài đặc tính riêng biệt. Nói chung nấm men dùng trong sản xuất men bánh mỳ cần có những tính chất sau: sinh sản nhanh, chịu được trong môi trường rỉ đường, có lực làm nở bột cao, ít bị

thay đổi trong bảo quản, có khả năng lên men được đường saccarozơ, glucozơ, maltozơ, có hoạt lực enzyme zimaza và maltaza cao. Ngoài ra, kích thước tế bào của nòi men dùng trong sản xuất cần phải tương đối lớn để có thể tách được nhờ những máy ly tâm đĩa bình thường và sinh khối ép được thành bánh có thể bẻ gãy được khi độ ẩm 75%.

Tế bào men bánh mỳ có hình oval, đôi khi hình tròn (phụ thuộc điều kiện nuôi cấy). Kích thước trung bình (8 – 10) × (4 – 6)μm. Không bào thay đổi rõ rệt trong quá trình nuôi cấy. Không bào là những hốc bên trong tế bào chứa đầy dịch, trong đó có những chất điện giải, protein, chất béo, hydratcacbon và enzyme. Trong không bào xảy ra các quá trình sinh học khác nhau, như quá trình phân ly hydratcacbon. Kích thước không bào có thể thay đổi tuỳ thuộc vào điều kiện nuôi cấy cũng như vào tuổi của tế bào. Trong tế bào trẻ, các không bào hầu như không thấy; ở các tế bào già, không bào đôi khi chiếm tới 80%. Trong môi trường giàu hydratcacbon, không bào tích luỹ glycogen, nhưng ở điều kiện thức ăn cạn và hiếu khí mạnh mẽ, trong tế bào đang phát triển nhanh thấy biến mất glycogen. Trong tế bào men bánh mỳ phát triển bình thường không tìm thấy các chất béo. Valutin cũng có trong không bào. Sự tạo thành valutin (metacromatin) phụ thuộc vào sự có mặt photphat trong môi trường. Ví dụ: tế bào nấm men bánh mỳ trong giai đoạn nhân giống không đủ photphat, nhưng hiếu khí mạnh hầu như không có valutin, còn trong môi trường giàu photphat không bào sẽ chứa nhiều valutin.

Trong môi trường cấy sục khí và khuấy mạnh sẽ làm cho các chồi mọc sớm tách khỏi tế bào mẹ, Các tế bào con lớn bằng tế bào mẹ mới bắt đầu nảy chồi và sinh sản. Nếu trong môi trường không đủ một vài chất dinh dưỡng hoặc có chất ức chế đối với nấm men thì quá trình sinh trưởng chậm lại và tế bào mọc hai, ba, hoặc bốn chồi ở những vị trí khác nhau trên bề mặt, tăng số lượng các tế bào nhỏ và khi điều kiện thích hợp, những tế bào này được phục hồi nhanh chóng quá trình sinh trưởng và nảy chồi bình thường.

7.1.2. Các phương pháp bảo quản men giống

Men giống cần bảo quản và giữ được khả năng sống, cũng như hoạt lực ở các tủ giống có những điều kiện thích hợp.

Các phương pháp bảo quản được áp dụng nhằm giữ các đặc tính nuôi cấy, hình thái và hoạt lực không biến đổi về cơ bản đã được giới thiệu ở chương 2, nhưng cũng có một vài đặc thù riêng. Có một số phương pháp giữ men giống như sau:

a) Phương pháp thứ nhất

Giữ giống thuần khiết trên môi trường thạch nghiêng, cấy chuyền sau 12 – 24 ngày sau khi đã hoạt hoá sơ bộ trên môi trường lỏng.

Môi trường thạch nghiêng: nước malt đường hoá (có 12% chất khô) – 48,5%; rỉ đường đã xử lý (có 6 – 8% chất khô) – 48,5%; dịch men tự phân (khoảng 9% chất khô) – 1% và thạch 2%.

Môi trường lỏng: để hoạt hoá nấm men, người ta dùng dịch malt không có hublon

có hàm lượng chất khô 12%. Nếu không cấy chuyền và hoạt hoá kịp thời thì hoạt lực maltaza và khả năng thích nghi với rỉ đường có thể bị giảm; hoặc trên bề mặt thạch, các tế bào nấm men sinh bào tử, rồi kết hợp với nhau làm thay đổi tính chất của giống.

b) Phương pháp thứ hai

Giữ tế bào men trong dịch saccarozơ 30% được chuẩn bị từ đường kính với nước máy. Dịch đường được cho vào bình và thanh trùng. Sau đó cấy giống từ ống thạch nghiêng đã nuôi hai ngày bằng que cấy và giữ ở nhiệt độ bình thường. Trong điều kiện này, nấm men hầu như không phát triển, không lên men. Đây là phương pháp giữ nấm men ở trạng thái tiềm sinh độc đáo và nếu dịch đường không bị khô cạn thì có thể giữ được 6 – 12 tháng mà không phải cấy chuyền. Khi sử dụng có thể dùng que cấy hoặc pipet vô trùng lấy dịch giống cấy chuyền vào môi trường lỏng để hoạt hoá (giới thiệu ở phương pháp thứ nhất). Sau 24 – 36 giờ, giữ ở nhiệt độ 30°C trong dịch đường lên men và khi đó ta lại cấy chuyền tiếp sang môi trường thạch, hoặc các môi trường nhân giống.

c) Phương pháp thứ ba

Bảo quản giống dưới lớp dầu vaselin hoặc parafin. Giống cấy trên môi trường thạch nghiêng 2 – 3 ngày được đổ phủ lên bề mặt một lớp vaselin vô trùng. Lớp dầu thoáng này giữ cho môi trường thạch khỏi bị khô và làm giảm các quá trình trao đổi chất, nhưng nấm men vẫn phát triển một cách chậm chạp. Phương pháp này có thể giữ men giống được 6 tháng tới 2 năm, những đặc tính hoá sinh và hình thái không bị thay đổi, tốc độ sinh sản của nấm men thậm chí còn tăng lên.

Người ta thường dùng dầu vaselin có tỷ trọng 0,8 – 0,9, đã được đun nóng ở 150°C để đuổi nước có trong dầu, rồi hấp thanh trùng. Lớp dầu trên bề mặt môi trường không quá 1cm. Ống giống có vaselin có thể để ở nhiệt độ trong phòng, nhưng tốt hơn cả là giữ ở 4 – 6°C.

d) Phương pháp thứ tư

Giữ giống ở điều kiện đông khô. Dịch huyền phù giống được đựng trong ống nghiệm – ampul ở trạng thái đông lạnh (–40°C), sấy khô dưới điều kiện lạnh và chân không cao tới độ ẩm còn 1,5 – 2,6%. Sau đó gắn miệng ampul dưới chân không và vô trùng.

7.1.3. Sản xuất men nước và men ép theo phương pháp thủ công

Men nước là men bánh mỳ ở dạng lỏng được tổ chức ở các nhà máy bánh mỳ và sử dụng theo nhu cầu sản xuất tại chỗ. Ưu điểm của men nước là quy trình sản xuất đơn giản và giá thành hạ, có thể cho chất lượng tốt so với men ép và men khô, nhưng cũng có những nhược điểm như không bảo quản được lâu và vận chuyển khó khăn.

Nguyên liệu dùng để sản xuất men nước là bột, thóc mầm hoặc chế phẩm mốc có hoạt lực amylaza, vi khuẩn lactic (*Lactobacterium delbruckii)* và nấm men *Saccharomyces serevisiae.*

a) Vi khuẩn Lactobacterium delbruckii (Thermobacterium cereale) dùng để axit hoá và cải thiện thành phần dinh dưỡng của môi trường cho nuôi cấy nấm men ở giai đoạn sau. Đây là giống vi khuẩn lactic lên men đồng hình cho sản phẩm axit lactic. Các tế bào vi khuẩn hình que có kích thước (0,4 – 0,7) × (2,7 – 7)μm, khi còn non thường đứng riêng lẻ, đôi khi kết hợp với nhau thành góc vuông hoặc kết thành chuỗi ngắn, không chuyển động, không sinh bào tử. Nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng là 45 – 47°C, cho tạo thành axit là 52 – 54°C. Giống này rất kén nguồn nitơ, đặc biệt là các axit amin. Lên men được glucozơ, fructozơ, maltozơ, saccarozơ, dextrin và cho sản phẩm là axit lactic.

Giống vi khuẩn lactic này được giữ trong môi trường lỏng là dịch mạch nha (nước malt) không lọc có nồng độ 12°Bx, thêm một ít $CaCO_3$ trong ống nghiệm, hoặc ampul (dạng ống tiêm vuốt 1 đầu). Cấy giống vào môi trường, để ở 50 – 52°C khoảng 1 – 2 ngày. Khi sử dụng, người ta tiến hành nhân giống từ ống gốc qua các bình tam giác ở 50 – 52°C khoảng 1 – 2 ngày, rồi chuyển sang bình cầu, các thùng nhân giống,...

Môi trường nhân giống ở các giai đoạn sau là dịch bột thuỷ phân bằng thóc mầm hoặc chế phẩm mốc. Làm dịch bột thuỷ phân như sau: trộn bột với nước theo tỷ lệ 1 : 3 (có thể thêm bột ngô hoặc bột đậu để tăng thành phần dinh dưỡng), nấu chín, để nguội tới 48 – 50°C, thêm 3% thóc mầm hoặc 0,8 – 1% chế phẩm mốc *A. awamori* hoặc *A. oryzae* và dịch giống vi khuẩn, giữ 8 – 14 giờ. Dịch bột được đường hoá và đồng thời tích tụ axit, đến khi môi trường đạt tới 11 – 12° axit (1° = 1ml NaOH 1 N/100ml – dịch chuẩn) thì có thể đưa vào cấy nấm men.

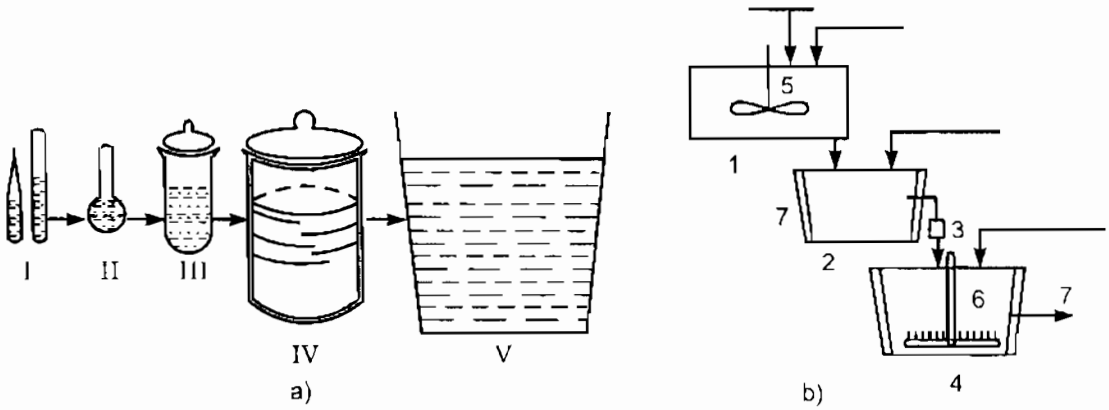
b) Giống men là các chủng thuộc Sacchromyces cerevisiae được cấy chuyền trên môi trường thạch – malt ở ống nghiệm, để ở 28 – 30°C khoảng 6 – 12 giờ, rồi tiến hành nhân giống. Từ ống nghiệm, men được cấy vào 3 bình tam giác có 100ml nước malt, ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ, sau đó chuyển sang các bình 5 – 6 lít.

Giống men sau khi nhân giống được chuyển vào dịch bột thuỷ phân đã axit hoá và làm nguội tới 28 – 30°C (tỷ lệ giống men vào đây là 5 – 10%), giữ ở nhiệt độ này khoảng 14 – 15 giờ, không sục khí hoặc có sục khí gián đoạn kết hợp với khuấy. Ở nhiệt độ này, vi khuẩn lactic ưa nhiệt ngừng phát triển và ngừng tích tụ axit. Nấm men tiêu hoá đường và axit lactic để tăng cường sinh khối, đồng thời có lên men rượu (trường hợp không sục khí, lượng sinh khối tích tụ không lớn lắm. 1ml có khoảng 150 – 200 triệu tế bào).

Trong môi trường nuôi men (dịch bột thuỷ phân đã axit hoá bằng vi khuẩn) có nồng độ axit cao, một mặt tạo điều kiện thuận lợi cho nấm men phát triển (axit lactic được sử dụng cho quá trình sống của nấm men) và mặt khác hạn chế sự phát triển các vi sinh vật tạp nhiễm. Như vậy, ta có thể sản xuất men bánh mỳ theo phương pháp không cần phải vô trùng, chỉ cần nhân giống vi khuẩn và nấm men 1 lần phục vụ cho quá trình công nghệ trong vài tháng (mỗi đợt để lại một số dịch nuôi cấy vi khuẩn và dịch men để dùng cho đợt sau). Phương pháp này được Oxtrovxki đề ra từ năm 1941 trong thời kỳ đầu của Thế chiến II ở Liên Xô trước đây.

Từ men nước, ta có thể đưa vào ly tâm để thu men ở dạng sữa hoặc dạng nhão và từ đó đem đóng thành bánh chuyên chở đi xa, giữ nhiệt độ dưới 10°C khoảng 5 – 7 ngày.

Sơ đồ công nghệ sản xuất men nước được giới thiệu ở hình 7.1.



Hình 7.1. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất men nước

a) Nhân giống vi khuẩn *Lactobaterium delbueckii*

I, II, III. Trong phòng thí nghiệm; IV, V. Trong sản xuất

b) Quá trình sản xuất men nước

1. Thùng nấu và đường hoá bột; 2. Thùng nuôi vi khuẩn để axit hoá môi trường; 3. Bộ phận làm lạnh, 4. Thùng nuôi men; 5. Cánh khuấy; 6. Ống sục khí; 7. Vỏ nước

7.1.4. Sản xuất men bánh mỳ từ rỉ đường

Sơ đồ công nghệ sản xuất men bánh mỳ (hình 7.2).

– Rỉ đường được xử lý như ở mục 7.1, sau đó đem dùng để pha môi trường nhân giống hoặc lên men (nuôi cấy thu sinh khối) có nồng độ đường khoảng 4%, ure 1%, supephotphat 0,5% (hoà nước lấy phần nước trong), thanh trùng.

– Giống men bánh mỳ được nhân nhiều cấp từ bình tam giác trên máy lắc đến bình lớn có thổi khí. Thể tích dịch nuôi cấy mỗi cấp lớn hơn nhau 10 lần và khi tiếp vào men là lên 10% theo thể tích dịch nuôi cấy. Thời gian nhân từng cấp khoảng 4 – 5 giờ, nhân giống trong phòng thí nghiệm – men A, trong sản xuất mức trung bình – men B và tiếp theo ở mức lớn hơn – men C.

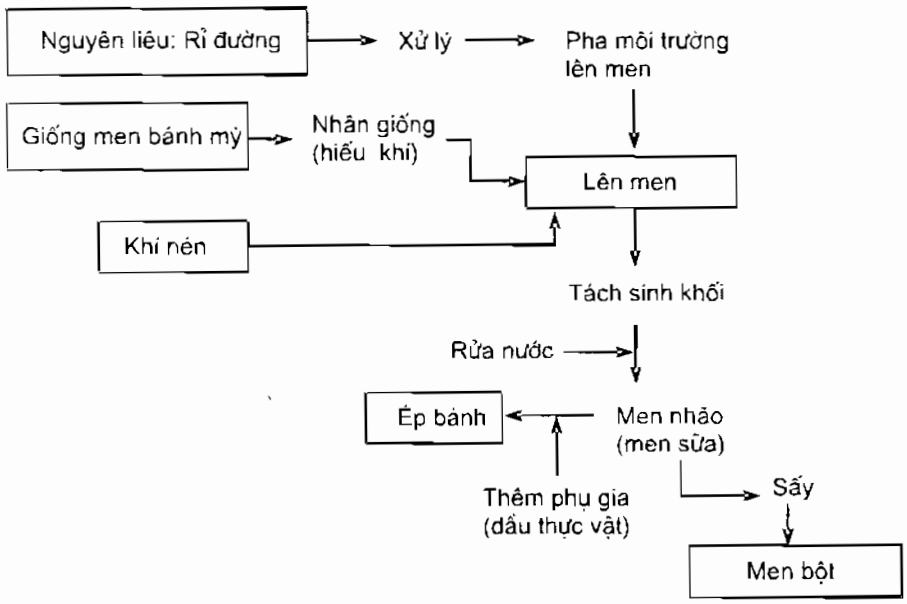
Men B và men C được dùng vào lên men trực tiếp từng quy mô sản xuất.

– Trong sản xuất công nghiệp, môi trường nuôi men được thanh trùng có pH = 5 – 5,5, được làm nguội tới 30°C, tiếp giống. Thổi khí với lưu lượng 50 – 60m^3 không khí/m^3/giờ. Nuôi ở 28 – 32°C trong khoảng thời gian 4 – 6 giờ, lấy 1 phần dịch nuôi cấy ra và bổ sung môi trường mới vào thùng lên men bằng lượng dịch lấy ra. Như vậy ta có dòng bán liên tục, hoặc thường xuyên lấy dịch ra và bổ sung môi trường mới, ta có dòng liên tục. Nuôi cấy bán liên tục hoặc liên tục ta chỉ cần tiếp giống vào thùng lên men (thùng nuôi cấy) một lần, nếu giống phát triển bình thường thì trong quy trình nuôi cấy không cần phải tiếp giống thêm nữa.

– Dịch nuôi cấy lấy ra được tách sinh khối bằng các máy ly tâm tách (Seperator) nhiều cấp, được rửa bằng nước và nước cũng được qua ly tâm tách, cuối cùng ta được men sữa đem sấy ở máy sấy hình tang trống cho men bột khô thương phẩm, hoặc thu được men đặc dạng sệt (past), thêm phụ gia là dầu thực vật, đem ép thành bánh – men thương phẩm đặc dạng bánh (men ép).

– Những năm 80 ở thế kỷ trước nước ta gặp nhiều khó khăn trong phát triển kinh tế, các nhà sản xuất men bánh ở thành phố Hồ Chí Minh đã khắc phục được khâu nuôi cấy và ly tâm thu sinh khối nấm men và thu được kết quả rất khả quan. Môi trường rỉ đường được hạ pH bằng axit tới pH 4, 5 và nuôi cấy, rồi được ly tâm bằng máy ly tâm liên tục hình tang trống kín, có điểm thoát dịch ổ rốn. Khi máy hoạt động, sinh khối nấm men bám vào thành tang trống và dịch trong thoát ra ở rốn trống.

Men đặc sệt được rửa rồi thêm phụ gia và đóng gói trong giấy thiếc. Hãng Xuân Phương với logo "xe bốn ngựa kéo" đã tung hoành một thời kỳ ở Huế, Đà Nẵng đến thành phố Hồ Chí Minh,... Nhưng quy trình cũng chỉ thích hợp với quy mô công nghiệp nhỏ.



Hình 7.2. Sơ đồ công nghệ sản xuất men bánh mỳ

Sấy men thành phẩm:

Men bánh mỳ thương phẩm còn có dạng khô (hoặc dạng bột hay dạng hạt). Men ép có độ ẩm khoảng 75% trong nhiệt độ bình thường tương đối dễ mất hoạt tính. Vì vậy, không nên vận chuyển ở khoảng cách xa, cũng như giữ ở nhiệt độ thường trong thời gian dài. Để khắc phục những nhược điểm này, men ép được cho qua sấy.

– Men sấy tới độ ẩm 8%, các tế bào ở trong trạng thái tiềm sinh. Men dậm đặc với hàm lượng ẩm trong tế bào là 12 – 17%, trong khi độ ẩm chung là 70 – 71%, là

điều kiện thuận lợi cho sấy khô men. Nước trong tế bào nấm men ở dạng liên kết hấp phụ và thẩm thấu. Dạng hấp thụ trong thể keo của tế bào chất và khó bị bay hơi. Nếu mất nước ở dạng này thường bị các tế bào chết (hoặc bị phá vỡ vỏ và màng), do vậy, không nên sấy men tới độ ẩm nhỏ hơn 8%. Độ ẩm liên kết thẩm thấu ở trong tế bào cũng như độ ẩm ngoài tế bào dễ được tách ra khỏi tế bào mà không bị phá vỡ cấu trúc của tế bào.

– Theo tốc độ khử nước của nấm men, quá trình sấy có thể chia làm 3 giai đoạn:

+ Loại nhanh độ ẩm ngoài tế bào đến độ ẩm 52 – 53%. Trong trường hợp này, nếu nhiệt độ khối men không quá 38°C thì hoạt lực làm nở bột nhào và số lượng tế bào chết không thay đổi.

+ Làm bay hơi chậm nước ở trong tế bào nấm men tới độ ẩm 16 – 20%.

+ Làm bay hơi rất chậm đến khi cân bằng độ ẩm.

Trong khi sấy, nếu tạo hạt men được nghiền càng nhỏ thì bề mặt tiếp xúc trong buồng sấy có thể là nhỏ và rút ngắn được thời gian sấy.

– Chế độ nhiệt trong khi sấy như sau:

Ở giai đoạn 1 là 80 – 70°C; giai đoạn 2 là 55 – 50°C; giai đoạn 3 là 45 – 40°C. Bất luận ở giai đoạn nào, nhiệt độ trong khối men không được vượt quá 38°C. Sấy men có thể thực hiện ở máy sấy băng chuyền, buồng sấy (hạt men được khuấy trộn định kỳ, lật mặt trên xuống dưới và ngược lại) và trong máy sấy hình trống trộn liên tục.

Trong quá trình sấy, hoạt tính nấm men có bị giảm một phần do bất hoạt một số enzyme và proteoliz (protein tự phân).

Sấy men bánh mỳ thường sấy ở máy 2 trục quay ngược chiều cùng với tang trống hình trụ thành men khô, rồi tạo hạt, đóng bao (*chú ý:* không sấy ở máy sấy phun như men gia súc).

7.1.5. Sản xuất men bánh mỳ ở các nhà máy rượu với nguyên liệu từ rỉ đường và các nhà máy bia

Trong công nghiệp sản xuất rượu cồn và các nhà máy bia đều dùng các chủng men thuộc giống *Saccharomyces*, đặc biệt là ở các nhà máy dùng rỉ đường làm nguồn nguyên liệu, sau khi lên men sinh khối, nấm men dễ được tách ra khỏi dịch lên men bằng hệ thống seperator. Sinh khối này qua xử lý là có thể làm men bánh mỳ.

Công nghệ sản xuất men bánh mỳ ở các nhà máy này là như sau: tách nấm men từ dịch rỉ đường, rửa bằng nước và thu nhận thể đậm đặc, ép, định hình, hoặc có thể sấy khô, đóng gói kín và bảo quản.

a) Tách nấm men từ dịch lên men

Dịch rỉ đường khi kết thúc lên men rượu có khá nhiều tế bào nấm men còn lơ lửng trong dịch và một phần lắng thành cặn xác men. Các xí nghiệp rượu liên hợp dùng nguyên liệu rỉ đường đều có xây dựng một xưởng sản xuất men bánh mỳ

trang bị các hệ thống thiết bị ly tâm tách bằng đĩa tầng 5 cấp, 7 cấp hoặc hệ ly tâm tách tuần hoàn. Ở dịch lên men bia dùng các chủng men chìm, xác men thường lắng xuống đáy và chỉ cần qua ly tâm tách là thu được xác men và qua rửa sạch sẽ được men dùng cho sản xuất bánh mỳ.

Qua các cấp thu dược xác men cần phải rửa bằng nước sạch và có nồng độ men đặc, dần được sáng màu dần, sản phẩm thu được là men đậm đặc. Để tách men từ dạng đậm đặc, ta qua thiết bị lọc ép, men nằm lại ở giữa các bản lọc.

Men ép có độ ẩm 71 – 74% và đưa vào định hình, đóng gói. Nếu men quá khô cần thêm 10% nước theo khối lượng rồi mới định hình. Khi định hình nên thêm 0,1% dầu thực vật và thực hiện ở nhiệt độ 10 – 15°C (ở nhiệt độ cao hơn, có thể thu nhận được hậu quả không tốt).

Men ép được cắt thành bánh với khối lượng khác nhau (50, 100, 500, 1.000g) và được gói trong giấy thiếc hoặc bằng giấy plastic, ngoài vỏ bao bằng giấy thường. Men thành phẩm dạng này là men bánh mỳ dạng bánh (hay dạng ướt), bảo quản ở 0 – 4°C và độ ẩm không khí giữ ở 82 – 96%. Thời gian bảo quản được trên 12 ngày.

b) Sấy

Từ men sữa đưa vào máy sấy ống trục quay với 2 ống hình trống để có độ ẩm ≤10%.

Men bánh mỳ thu được từ dịch lên men rỉ đường của các nhà máy rượu cồn có:

– Độ ẩm không quá 10%.

– Lực nở bột nhào không quá 90 phút.

– Thời gian bảo quản không nhỏ hơn 5 tháng.

7.2. SẢN XUẤT MEN THỨC ĂN CHĂN NUÔI

Men thức ăn chăn nuôi là những tế bào nấm men qua nhiệt phân đã chết, được dùng đưa vào thành phần thức ăn chăn nuôi làm nguồn protein.

Các chủng nấm men dùng vào mục đích này thuộc các giống *Saccharomyces* hay *Candida* hay *Torulopsis*. Với các chủng *Saccharomyces* ta dùng cơ chất dinh dưỡng chính là rỉ đường và quá trình nuôi cần thổi khí liên tục để men phát triển tăng sinh khối. Các chủng giống này chỉ đồng hoá được đường hexozơ (đường sáu) hoặc các đường đôi có cấu tử từ đường 6C. Với các chủng không phải là *Saccharomyces* có thể đồng hoá được hexozơ nhưng không lên men rượu (hoặc có nhưng rất ít) và đặc biệt là chúng đồng hoá được pentozơ (đường 5C). Khi nuôi cấy ở điều kiện hiếm khí, các chủng này phát triển khá mạnh và không hoặc ít tạo ra rượu. Vì vậy, các nước có ngành công nghệ vi sinh vật thường dùng các chủng thuộc các giống *Candida, Torulopsis* hoặc các giống khác nuôi trên môi trường có cơ chất nhiều pentozơ (thường là dịch thuỷ phân gỗ bằng axit).

Quá trình công nghệ men thức ăn chăn nuôi cũng tương tự như nuôi men bánh mỳ, song ở khâu hoàn thành sản phẩm, men thức ăn gia súc phải qua khâu nhiệt phân (thermolysis) và sấy ở máy sấy phun.

7.2.1. Giống nấm men dùng trong sản xuất men thức ăn chăn nuôi

Như trên đã biết, men rượu *Saccharomyces* (gồm men rượu, bia, bánh mỳ) có thể làm men thức ăn chăn nuôi rất tốt. Ngoài ra, người ta còn dùng các chủng loài thuộc giống men khác để thu sinh khối vào mục đích này.

Nấm men dùng ở đây có các yêu cầu như sau: có tốc độ sinh trưởng cao, đồng hoá được các chất dinh dưỡng có trong môi trường với hệ số kinh tế cao (kể cả cơ chất là đường pentozơ), dễ tách bằng seperator, có sức chống chịu với tạp khuẩn và chất kìm hãm sinh trưởng, với thành phần hoá học phải đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng và không chứa các chất có độc tính với động vật.

Ở nhiều nước có ngành công nghiệp vi sinh phát triển thường dùng các loài nấm men sau đây làm giống sản xuất men thức ăn chăn nuôi: *Candida utilis, C. tropicalis, C. arboreae, Torulopsis pinus, Trichosporum cutaneum* và hỗn hợp một vài chủng với nhau.

Candida utilis đồng hoá được glucozơ, xylozơ, nhưng không sử dụng được galactozơ và arabiozơ. *C. utilis* cần ít vitamin còn *C. tropicalis* nếu không đủ vitamin sẽ bị ảnh hưởng nhiều tới sinh trưởng.

Các chủng loài thuộc giống *Candida* thường được dùng làm giống sản xuất trên môi trường rỉ đường hoặc dịch bã rượu từ rỉ đường.

7.2.2. Nguyên liệu và môi trường dinh dưỡng

– Nguyên liệu chủ yếu dùng để sản xuất men thức ăn gia súc là rỉ đường. Ngoài rỉ đường người ta còn dùng dịch bã rượu sau khi chưng cất rượu. Trong dịch bã rượu (từ rỉ đường và từ tinh bột) có khoảng 7 – 10% chất khô hoà tan, đường khử khoảng 0,25 – 0,5%, có nhiều protein, axit amin, các axit hữu cơ nấm men có thể đồng hoá và chất khoáng. Đặc biệt trong dịch bã rượu giàu các chất sinh trưởng (chủ yếu là vitamin). Dùng dịch bã rượu, thêm khoảng 2 – 4% rỉ đường làm môi trường nuôi cấy nấm men rất tốt.

– Các giống *Candida*, *Torulopsis* còn có thể dùng dịch thuỷ phân gỗ, rượu, axit hữu cơ, parafin, dầu mỏ, khí đốt làm cơ chất dinh dưỡng trong công nghiệp thu sinh khối nấm men.

– Thành phần và nồng độ các cấu tử của môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng rất nhiều tới tốc độ sinh sản và phát triển tăng sinh khối nấm men. Trong rỉ đường, cũng như trong dịch bã rượu thường không cân đối tỷ lệ các cấu tử thành phần C: N: P (đặc biệt trong rỉ đường thường thiếu nguồn P). Vì vậy, ta thường dùng ure, cũng có thể dùng muối amon sunphat. Nguồn P dùng diamon photphat hoặc superphotphat. Khi thanh trùng chung trong môi trường, muối canxi photphat dễ tạo thành làm giảm nguồn dinh dưỡng và làm cáu bẩn thiết bị.

Dùng rỉ đường làm nguồn cơ chất dinh dưỡng, phải xử lý trước khi pha môi trường dinh dưỡng. Xử lý như sau: Pha loãng 1 : 1, axit hoá tới pH = 2,8 – 3,0; gia nhiệt tới 75°C, giữ ít nhất 45 phút, để lắng và loại bỏ cặn.

N trong ure chiếm 46%, trong amon sunphat 20,5%. P_2O_5 trong supephotphat, trong axit orthophotphoric 50,7% và trong diamon photphat 53,8%.

Ure và diamonphotphat (hoặc supephotphat) được hoà tan vào nước theo tỷ lệ (1 : 4) – (1 : 5), rồi lấy phần nước trong bổ sung vào môi trường dinh dưỡng. Bình thường 1m^3 môi trường dinh dưỡng bổ sung 1kg ure và 2kg axit orthophotphoric (hoặc 2,5 – 3,0kg supephotphat).

7.2.3. Nhân giống

Nuôi cấy nhân giống từ bình tam giác vài trăm ml đến các bình vài lít trong phòng thí nghiệm rồi chuyển sang các bình, hoặc nồi nhân giống trong sản xuất với thể tích vài trăm lít tới thể tích vài chục mét khối.

Môi trường nhân giống có thành phần dinh dưỡng gần giống với môi trường nuôi cấy mở rộng (lên men): rỉ đường khoảng 8 – 40%, có thêm nguồn N và P, với dịch bã rượu thì không cần thêm các nguồn chất sinh trưởng; nếu không, có thể thêm các nguồn chất sinh trưởng là cao ngô hoặc cao nấm men (1 – 2%) vào môi trường nhân giống trong phòng thí nghiệm.

Nhân giống ở nhiệt độ 28 – 30^{0}C, pH môi trường nhân giống là 4,8 – 5,0 với bình tam giác thường được nuôi ở trên máy lắc, với các bình và nồi, thùng nhân giống được thổi khí tích cực với 60m^3 không khí/m^3. giờ.

Quá trình nhân giống trong phòng thí nghiệm và nhân giống trong sản xuất là tạo điều kiện cho giống nuôi cấy sinh trưởng nhanh, không bị tạp nhiễm với các dụng cụ và thiết bị phục vụ cho nuôi cấy vi khuẩn (kể cả lọc khí và phục vụ cho sục khí).

7.2.4. Nuôi cấy mở rộng nấm men thương phẩm

– Trong sản xuất nấm men, người ta sử dụng phương pháp nuôi cấy theo dòng liên tục. Nhiệt độ nuôi cấy khoảng 28 – 32^{0}C, thành phần môi trường dinh dưỡng giống với môi trường nhân giống, pH 4 – 4,5 và nuôi cấy mở rộng trong các nồi lên men từ vài chục tới vài trăm m^3, môi trường cần thanh trùng. Hàm lượng oxy hoà tan là nhân tố giới hạn trong thành phần tối ưu của môi trường và điều kiện thuận lợi cho nuôi cấy. Cường độ hiếu khí được coi là thoả mãn là đường cong biểu diễn nồng độ oxy hoà tan tới hạn hoặc cao hơn không đáng kể. Tốc độ sử dụng oxy hoà tan của nấm men là biến đổi tới nồng độ tới hạn rồi ổn định.

Tốc độ sử dụng oxy của nấm men chỉ phụ thuộc vào hoạt tính của chúng và thành phần môi trường.

Cường độ hiếu khí của môi trường là Q (m^3/m^3.giờ) được xác định theo công thức:

$$Q = \frac{X.D.q}{0,03.K}$$

X: Hàm lượng men khô tuyệt đối trong môi trường, g/l.

D: Tốc độ pha loãng môi trường trong thiết bị, 1/giờ.

q: Tiêu tốn oxy để tổng hợp 1g men khô tuyệt đối, (qua thực nghiệm q = 1,5 – 1,75g O_2/g).

K: hệ số sử dụng oxy không khí, % (phụ thuộc vào cấu tạo phân tán khí, K thường thay đổi từ 10 – 40%).

Từ $1m^3$ không khí qua nén, hoà tan và sử dụng oxy cho sinh tổng hợp sinh khối K (kg) tính như sau:

$$G_0 = 0,21 \times 1,48K \approx 0,3K$$

0,21: nồng độ oxy trong một đơn vị không khí.

1,48: khối lượng riêng của $1m^3$ oxy ở điều kiện bình thường, kg.

Cường độ thổi khí ở các tế bào nuôi cấy men thương phẩm thường là 50 – 60 m^3/m^3.giờ

Nuôi cấy nấm men theo dòng bổ sung liên tục. Ở đây tốc độ dòng cần phải tương ứng với tốc độ sinh trưởng và đồng hoá các chất dinh dưỡng của nấm men.

– Hiệu suất của một thiết bị nuôi men (kg/m^3.giờ) được xác định theo công thức:

$$P = X\mu = XD$$

X: Nồng độ nấm men khô tuyệt đối, g/l.

μ: Tốc độ sinh trưởng riêng của nấm men trong 1 giờ, 1/giờ.

D: Tốc độ pha loãng môi trường trong thiết bị, 1/giờ.

Hiệu suất thiết bị phụ thuộc vào hệ số hấp thụ oxy, mức độ sử dụng không khí vào nhu cầu riêng về oxy cho tổng hợp 1 đơn vị sinh khối tuỳ từng loại nguyên liệu và hệ số tổng hợp.

– Để xác định chế độ làm việc tối ưu của thiết bị, người ta xác định mức độ sử dụng oxy và theo đó sẽ chọn được tốc độ pha loãng, thành phần tương ứng của môi trường và năng suất sinh khối cao.

Các tế bào càng giữ lâu trong thiết bị thì hoạt tính của giống càng giảm và năng suất sinh khối càng thấp.

Sử dụng giống nấm men có hoạt tính thấp sẽ làm giảm hiệu suất thu hồi sinh khối. Có thể xác định nồng độ sinh khối X trong môi trường (kg/m^3) theo phương trình:

$$X = S_0 . Y$$

S_0: Nồng độ các chất chứa cacbon đồng hoá trong môi trường, kg/m^3 (khoảng 30 – 40kg/m^3).

Y: Hệ số kinh tế cho tổng hợp (năng suất trung bình theo lượng men khô tuyệt đối từ nguồn cacbon được đồng hoá) bằng 45kg/100kg.

Bằng thực nghiệm ta thấy, từ $1m^3$ môi trường thường thu được 10 – 15kg men khô tuyệt đối và hệ số hấp thụ oxy của giai đoạn nấm men phát triển logarit là 1,82kg/m^3.giờ và giai đoạn ổn định là 0,8 – 0,9 kg/m^3.giờ.

Dịch men trong quá trình nuôi có thổi khí sẽ tạo thành bọt. Khi nuôi men đạt yêu cầu, dịch men tháo ra bình chứa là một thể tích dịch bọt với nồng độ 0,25g/cm^3, 2/3 thể tích là bọt. Trước khi tách men, cần phải phá bọt bằng biện pháp cơ học và hoá học. Các chất phá bọt là các hoạt chất bề mặt: Các chất keo ưa nước, mỡ cá voi, cá mập, hỗn hợp xà phòng, axit oleic, dầu silicon. Để tăng tác

dụng phá bọt, sử dụng chất phá bọt trong dạng nhũ hoá với nước 1: 6. Phá bọt bằng cơ học dựa vào kết cấu của thiết bị.

7.2.5. Tách và rửa nấm men

Sau khi phá bọt, dịch men được đưa vào tách men và rửa men, thực hiện trên nhóm gồm 3 nhóm seperator: ở nhóm thứ nhất thu được dịch men có hàm lượng sinh khối 120 – 160g/l vào thùng chứa pha loãng bằng nước tới dịch huyền phù 80 – 100g/l, rồi đưa vào nhóm thứ hai và thu được dịch men đặc hơn với nồng độ 250 – 300g/l. Pha loãng lần thứ hai tới 150 – 200g/l để đưa vào nhóm thứ ba, thu được dịch men 450 – 500g/l.

Sau mỗi nhóm seperator, dịch men được đưa vào thùng chứa riêng. Với dịch men được nuôi từ dịch bã rượu tinh bột thường tích men qua hai nhóm seperator liên tục để có dịch huyền phù men không thấp hơn 450g/l.

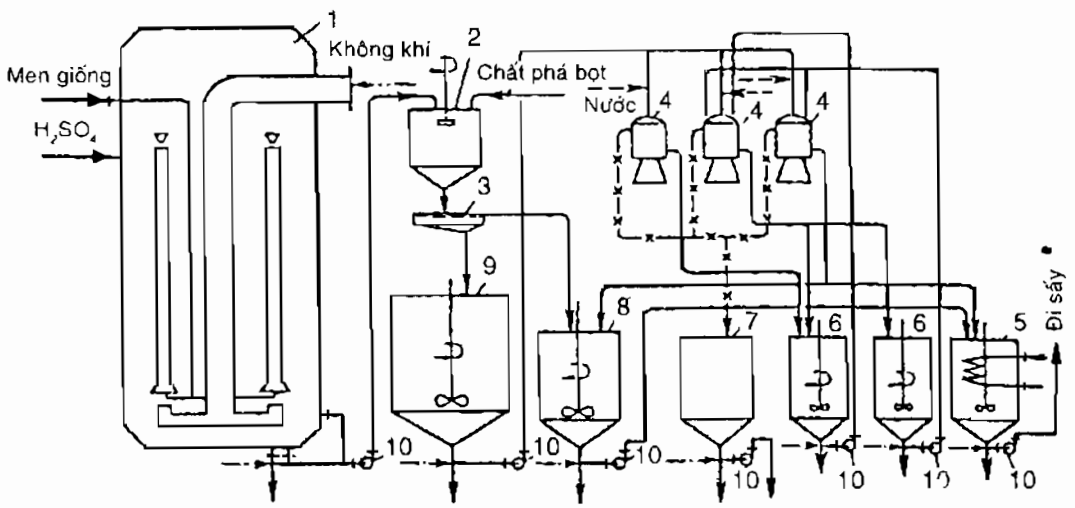
7.2.6. Nhiệt phân (thermolysis)

Huyền phù nấm men thu được sau khi tách bằng seperator đem gia nhiệt với mục đích giết men và tất cả vi sinh vật tạp nhiễm, đồng thời phá vỡ tế bào nấm men nhằm tăng hệ số hấp thu nấm men cho động vật và hạn chế các bệnh có thể nhiễm từ nấm men, làm giảm độ nhớt của huyền phù để đưa vào sấy đồng đều hơn, giảm tổn thất trong quá trình sấy và bảo quản.

Nhiệt phân bằng cách gia nhiệt và giữ ổn nhiệt trong thiết bị ở 75^0C trong 45 phút. Khi gia nhiệt có khuấy đảo cho đều nhiệt.

Sơ đồ công nghệ nuôi cấy nấm men thương phẩm gồm công đoạn nuôi cấy, tách men và gia nhiệt (hình 7.3).

Men nhiệt phân được đưa đi sấy ở máy sấy phun.



Hình 7.3. Sơ đồ công nghệ nuôi cấy mở rộng nấm men và nhiệt phân

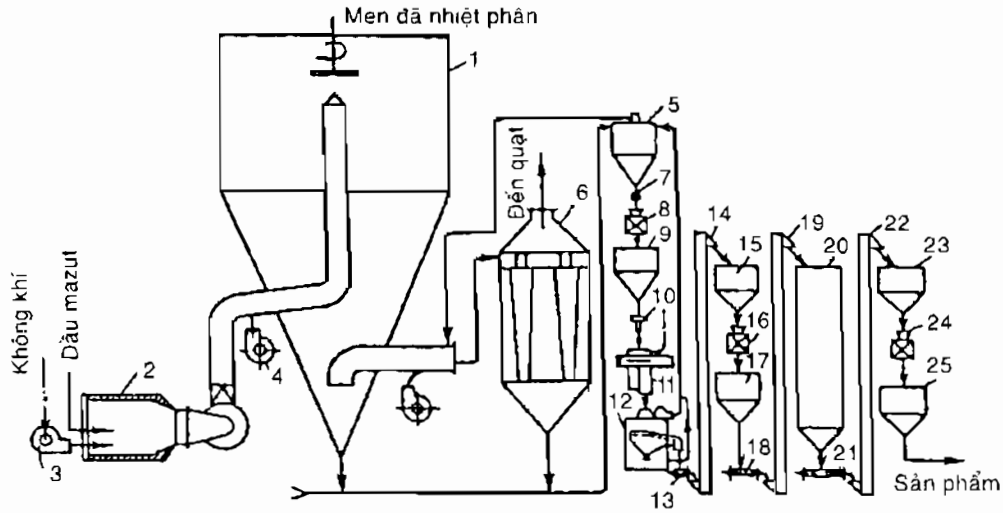
1. Thiết bị nuôi men; 2. Bình phá bọt; 3. Sàng; 4. Seperator; 5. Bình nhiệt phân; 6, 7, 8, 9. Bình chứa; 10. Bơm

7.2.7. Sấy men

Men thức ăn chăn nuôi thường được sấy theo hai phương pháp: sấy cán men thành màng mỏng và sấy phun. Sấy màng mỏng thường dùng trong các xí nghiệp nhỏ công suất không cao hơn 1 T/giờ. Sấy màng mỏng hay sấy trống gồm có hai dãy ống trụ hình trống, dưới mỗi dãy là các máng. Huyền phù men được đưa vào dãy máng bám vào trống thành màng mỏng khi hai trống xoay tròn ngược chiều nhau (6 – 8 vòng/phút). Hơi nóng được đưa vào bên trong trống và phần dưới trụ trống ngập vào huyền phù men (mỗi vòng ngập khoảng 8 – 10 giây), như vậy men được sấy đến độ ẩm không quá 10%. Phía trên trống lắp một lưỡi dao mỏng để gạt men khô. Men khô đưa đi đóng bao.

Sấy phun gồm một buồng sấy hình trụ, đầu dưới hình nón (đường kính 8 – 10m, phần trụ cao – 5,5 – 7m, phần nón – 6,6 – 8,7m). Phần bên trong trên đỉnh buồng sấy lắp hệ thống phun. Khí nóng hỗn hợp với không khí theo ống ở trung tâm buồng phía dưới đĩa phun làm nóng buồng sấy. Khí thừa sẽ qua xyclon lọc khí ra ngoài.

Nhiệt của khí nóng đưa vào buồng sấy tới 300°C, ở cửa ra tủ sấy là 85 – 95°C. Huyền phù men qua sấy chỉ khoảng vài giây. Nấm men được đưa nóng lên không quá 95°C làm cho chất lượng của các hợp phần của nấm men như protein, vitamin, màu sắc và cấu trúc được hoàn thiện, cũng như dễ tiêu hoá hơn.



Hình 7.4. Sơ đồ công nghệ sấy men, tạo viên và bảo quản

1. Buồng sấy; 2. Buồng đốt, 3, 4. Quạt; 5, 9, 15, 17, 25. Thùng tàng trữ; 6. Xyclon; 7. Cửa van, 8, 16, 24. Cân tự động; 10. Tách sắt bằng từ; 11. Tấm sàng hạt nhỏ; 12. Sàng phân loại; 13,18, 21. Băng chuyền; 14, 19, 22. Băng nâng; 20. Thùng giữ men.

7.2.8. Yêu cầu chất lượng của men thương phẩm

– Tiêu chuẩn của sinh khối nấm men thương phẩm dùng cho chăn nuôi như sau:

+ Chỉ tiêu cảm quan:

* Màu sắc: từ xám sáng hoặc trắng sữa cho đến nâu tối.

* Mùi vị: đặc trưng của nấm men, không có mùi vị lạ.

+ Chỉ tiêu hoá học (tính theo %):

* Độ ẩm: không quá 10.

* Protein: không nhỏ hơn 45 (tính theo chất khô).

* Tro: không quá 14.

* Các kim loại từ tính: không quá 0,003 (chì và asen không quá 5mg/kg mỗi chất).

* Các vitamin B_1, B_2, B_5 tương ứng không dưới 10, 30 và 300mg/kg.

* Vi khuẩn sống không quá 7.500/kg men khô (không được có vi khuẩn thương hàn).

* Nấm mốc không quá 50/g men khô.

* Lizin, metionin và triptophan tương ứng không dưới 0,5; 1,4; 1,1% của protein khô.

* Độ tiêu hoá của protein không dưới 75 – 80%.

* Giá trị sinh học của protein khô không dưới 55%.

– Men chăn nuôi chia làm 3 loại: khô, loại 1, 2, 3.

- Hình thức bề ngoài: bột, vẩy mỏng, hạt nhỏ.

Các chủng nấm men thuộc các giống *Saccharomyces, Candida, Torulopsis,...* là những chủng giống đã được sử dụng từ lâu vào trong chăn nuôi, không gây độc hại. Trong tế bào của chúng khá đầy đủ các axit amin, đặc biệt giàu lizin. Chính vì vậy, khi bổ sung vào thức ăn chăn nuôi làm cân bằng các axit amin trong khẩu phần dinh dưỡng. Nhưng trong đó ta thấy hàm lượng các axit amin chứa lưu huỳnh hơi bị thấp.

– Sinh khối nấm men dùng trong thức ăn chăn nuôi với hai dạng:

+ Dạng nước (loãng) hoặc nhão (đặc) được trộn với thức ăn, hoặc ủ chua thức ăn cùng với rau cho kết quả cũng tốt.

+ Dạng viên hoặc bột, sợi khô như trên đã giới thiệu (qua nhiệt phân, qua sấy). Tế bào nấm men khô là những tế bào đã chết. Chế phẩm này sử dụng rất thuận tiện: chỉ cần bổ sung vào thức ăn hàng ngày khoảng 5 – 10% để khẩu phần có thêm khoảng 90 – 110g protein tiêu hoá cho một đơn vị thức ăn.

Một kg nấm men khô dùng cho chăn nuôi thu thêm được 0,4kg thịt lợn; 1,5kg thịt gia cầm, 30 – 40 quả trứng, làm tăng sữa thu hoạch với hàm lượng chất béo nhiều hơn.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 7

1. Men bánh mỳ và men gia súc (men thức ăn chăn nuôi) có những đặc điểm gì khác nhau?
2. Vai trò của men bánh mỳ trong quá trình làm bánh như thế nào?
3. Hãy cho biết cách sản xuất men bánh mỳ từ rỉ đường. Ngoài phương pháp thông thường là nuôi nấm men thu sinh khối, còn có cách gì khác để thu được men làm bánh mỳ?
4. Tại sao lại dùng nấm men là nguồn gốc cân đối axit amin trong khẩu phần thức ăn chăn nuôi. Tại sao nấm men nói riêng và tế bào VSV nói chung lại giàu protein? Ngoài protein nấm men còn có những hợp chất nào có giá trị dinh dưỡng?

Chương 8

SẢN XUẤT CÁC AXIT HỮU CƠ

Các axit hữu cơ phổ biến rộng rãi ở giới thực vật và được sử dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm, đặc biệt trong chế biến đồ uống và một số ngành kinh tế khác, như trong công nghệ dược phẩm, sơn, phim ảnh,...

Nói chung, các axit hữu cơ có độ hoà tan trong nước cao, háo nước, có khả năng liên kết với các ion hoá trị cao, duy trì pH tốt.

Có ba phương pháp sản xuất các axit hữu cơ:

– Chiết tách từ trái cây, lá.

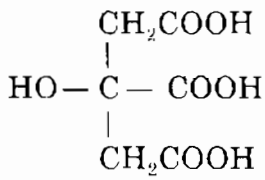
– Tổng hợp hoá học.

– Tổng hợp vi sinh học (lên men).

Trong các axit hữu cơ, axit xitric có tầm quan trọng hàng đầu, sau đó là (theo thứ tự, tầm quan trọng giảm dần): axit axetic, lactic, tartaric, malic, gluconic, propionic, axit fumaric.

8.1. SẢN XUẤT AXIT XITRIC

Axit xitric là một axit có 3 nhóm chức axit (axit tricacboxylic), có công thức phân tử là $C_6H_8O_7$, công thức cấu tạo là:



Axit thương phẩm ở dạng kết tinh ngậm một phân tử nước, có hình khối lăng trụ hình thoi trong suốt. Nhờ có vị chua dễ chịu nên axit xitric được dùng nhiều trong pha chế đồ uống, trong sản xuất bánh kẹo. Ngoài ra còn được dùng nhiều trong công nghiệp dệt, trong sản xuất phim ảnh và y tế.

Axit xitric có nhiều trong quả chanh, quả chấp, các quả trong họ *Cytrus*, trong lá thuốc lá hoa vàng, trong ly bông. Chính vì vậy, axit xitric lần đầu tiên được sản xuất từ dịch quả chanh ở đảo Bioil (Ý) năm 1784 bằng phương pháp kết tuả canxi xitrat. Ở đây hình thành công ty Arenella (Palermo) độc quyền tới năm 1920, đến khi có nhà máy sản xuất axit xitric nhờ phương pháp lên men ở Bỉ (1919) và ở Mỹ (1923).

Sản xuất axit xitric nhờ lên men bằng hai phương pháp: lên men bề mặt và lên men chìm. Mỗi một phương pháp đều có những ưu điểm và nhược điểm, đến nay vẫn song hành tồn tại trong công nghiệp, nhưng phương pháp lên men chìm có vẻ chiếm được ưu thế hơn trong điều kiện cơ khí hoá và tự động hoá quá trình công nghệ.

Sản lượng axit xitric hiện nay trên thế giới hàng năm đạt gần một triệu tấn/năm, chủ yếu bằng phương pháp lên men chìm cũng như phương pháp lên men bề mặt.

8.1.1. Các giống vi sinh vật sinh axit xitric

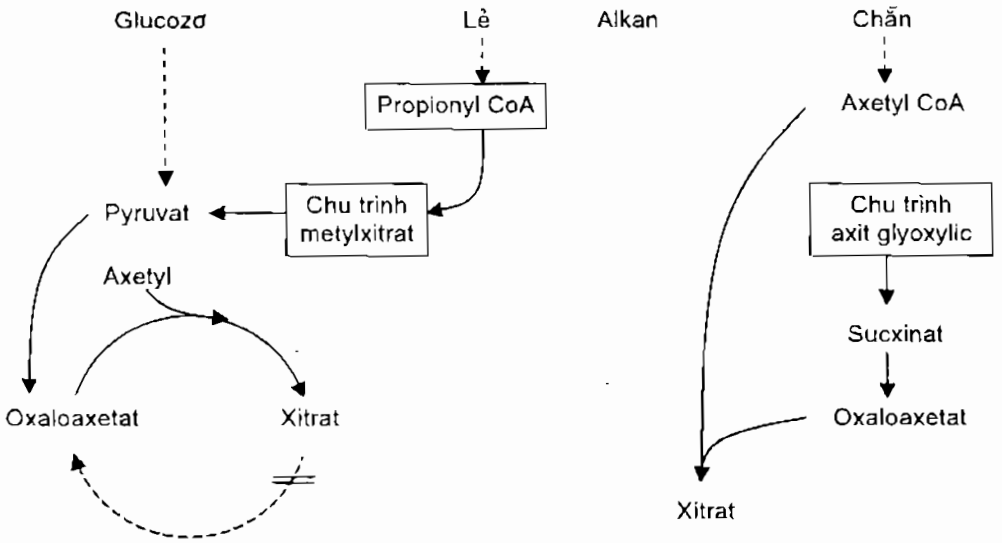
Vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp axit xitric thấy có các loài vi nấm (*Aspergillus, Penicillium,...*), nấm men (*Candida lipolytica, C. guillermondii,...*) và vi khuẩn (*Arthrobacter*) trên môi trường glucozơ, saccarozơ, n – alkan.

Các chủng vi nấm thấy ở đây là đông đảo nhất. Có thể kể ra đây những loài nấm mốc có khả năng này là *Citromyces glaber, Citromyces pfefferianus, Citromyces comidiophore, Penicillium luteum, P. glaucum, Asperigillus oryzae, A. niger, A. bactotae, A. awamori, A. awelchii,...* Trong số này có hoạt lực cao hơn cả là *Aspergillus niger* và được dùng rộng rãi trong công nghiệp xitric. Giống *Citromyces* ngày nay xếp vào giống *Penicillium*. Ở quy mô công nghiệp, axit xitric được sản xuất chủ yếu từ glucozơ và saccarozơ.

Các chủng nấm men đã được nghiên cứu và đưa vào sản xuất thử nghiệm với cơ chất n – alkan hoặc cơ chất là đường, có ưu điểm là hiệu suất lên men ít bị ảnh hưởng bởi các ion kim loại vi lượng và tốc độ lên men cao hơn. Song, ở quy mô công nghiệp mới có 1 nhà máy ở Southport (Mỹ) sử dụng công nghệ này hoạt động được 3 – 4 năm và đóng cửa năm 1982. Cũng tình trạng tương tự, nhà máy Liquichimica (ở Saline – Ý) được xây dựng nhưng chưa được hoạt động sản xuất.

Cơ chế sinh tổng hợp axit xitric ở vi sinh vật tương đối phức tạp và đến nay chưa được rõ các chi tiết, nhưng quá trình lên men này có thể biểu diễn một cách tổng quát theo quy trình sau: Đường glucozơ được phân ly thành axit pyruvic $CH_3COCOOH$, từ axit pyruvic chuyển hoá tiếp thành axit oxaloaxetic, rồi thành axit xitric.

Các con đường sinh tổng hợp axit xitric từ glucozơ và n – alkan được giới thiệu sơ giản ở sơ đồ (hình 8.1).



Hình 8.1. Các con đường tổng hợp thừa axit xitric từ glucozơ (*Aspergillus niger*) và alkan (*Candida lipolytica*) (theo W. Fritche, 1978)

Về mặt sinh học, có sự giống nhau giữa sự sản xuất thừa axit xitric và sự sản xuất thừa axit glutamic. Axit xitric được tạo thành qua các phản ứng của chu

trình tricacboxylic (hình 8.1). Để axit này tích luỹ, cần kìm hãm các phản ứng kế tiếp. Ở các chủng sản xuất, hoạt tính acotinaza – enzyme xúc tác sự chuyển hoá thành cis – acotinat và izoxitrat – bị giảm đi trong pha sản xuất. Acotinaza chứa sắt là cofacto. *Thiếu sắt (<1 mg/l) là một trong những nhân tố cơ bản gây nên sự sản xuất thừa.* Trong nguyên liệu dùng cho sản xuất như rỉ đường, sắt được kết tuả bằng feroxianit kali [$K_4\{Fe(CN)_6\}$]. Feroxianit đồng thời cũng ức chế izoxitratdehydrogenaza. Bằng cách bổ sung các ion đồng (150mg/l) cũng có thể là do tác dụng đối kháng của đồng đối với sắt. Ngoài ra việc bổ sung với nồng độ dưới tối ưu của kẽm (0,5mg/l) và mangan (< 3mg/l) cũng giữ vai trò quan trọng.

Việc tách rời axit xitric khỏi chu trình ATC đòi hỏi sự khép kín chu trình nhờ những phản ứng bổ sung. Quan trọng nhất là phản ứng *cacboxyl hoá pyruvat* thành oxaloaxetat. Để đạt được hiệu suất cao hơn cần chú ý đến các nhân tố khác nữa mà cơ sở hoá sinh học của chúng còn chưa được biết rõ. Một hệ sợi nấm đa bào gồm các tế bào có tuổi khác nhau và do đó có trạng thái sinh lý khác nhau là một hệ thống hoá sinh phức tạp. Một nhân tố khác là sự thông khí. Bên trong các cục sợi nấm (pellets) tạo thành khi nuôi chìm, việc cung cấp oxy khác với bên ngoài các cục này. Giữa kích thước và số lượng của cục sợi và sự thông khí có mối quan hệ nhất định. Hậu quả là, sự tạo thành sản phẩm không tỷ lệ thuận với số lượng hệ sợi nấm. Sự sản sinh axit xitric tối ưu hoá đạt được ở mật độ tế bào là 4g/l. Duy trì pH môi trường ở khoảng 2 – 3 là một nhân tố quan trọng. Trong điều kiện axit yếu, các axit oxalic và gluconic sẽ được tạo thành thay cho axit xitric. Sự tạo thành axit xitric bắt đầu sau khi kết thúc sinh trưởng. Để đạt được điều đó cần những nồng độ photphat dưới tối ưu.

Nhờ việc gây tạo các chủng năng suất cao, người ta đã đạt được một quy trình ổn định. Song, việc chọn lọc định hướng các thể đột biến là một tiền đề để hiểu rõ hơn hoá sinh học của sự tổng hợp thừa. Cũng có thể nghĩ rằng, sự tạo thành axit xitric là một phản ứng của tế bào đối với sự thiếu sắt, vì nhờ xitrat mà sắt được chuyển thành một phức chất dễ dàng được tế bào hấp thụ.

Các con đường mà từ đó các nấm men nuôi trên alkan có thể sản xuất thừa axit xitric, được giới thiệu trên hình 8.1. Bên cạnh axit xitric, axit izoxitric cũng được tiết ra mạnh. Người ta đang tìm kiếm các chủng đột biến sai hỏng về aconitaza. Ngoài axit xitric, nấm men sinh trưởng trên cacbuahydro cũng tạo thành cả các polyol (mezo – erytrol, arabitol).

Chọn các giống cho công nghiệp lên men axit xitric này cần chú ý đến các tiêu chuẩn sau:

– Hoạt lực sinh axit xitric cao và ổn định, không dễ bị biến đổi và thoái hoá.

– Chịu được nồng độ axit cao, hình thành axit xitric nhanh, do đó hạn chế được khả năng phát triển của tạp khuẩn, ít nhiễm tạp khuẩn trong sản xuất.

– Không hoặc ít hình thành các axit hữu cơ khác (oxalic, gluconic, fumaric,...)

Các chủng *A. niger* được dùng trong công nghiệp lên men xitric là nấm sợi màu

đen (màu của bào tử nấm), thích nghi ở pH thấp (2,5 – 3,5) và có nhu cầu oxy ở mức độ cao. Bào tử được dùng làm giống khởi động ở nhiều trường hợp nhân giống. Các chủng sản xuất đa số cho hiệu suất chuyển hoá trên 90% lượng đường thành axit (lượng đường thường có nồng độ khá cao trong môi trường: khoảng 20%).

Các nguồn cacbon tốt nhất đối với *A. niger* là saccarozơ, còn đối với *Cytromyces* là maltozơ. Nồng độ đường trong môi trường thích hợp là 10 – 20%, nhưng lên men bổ sung được nhiều lần có thể nâng nồng độ được tới 22,5% hoặc cao hơn.

Các nguồn nitơ vô cơ trong môi trường nuôi cấy tốt nhất là amon nitrat, còn nitơ hữu cơ là chiết đậu tương.

Trong môi trường nuôi cấy, cần chú trọng đến các nguyên tố khoáng P, Mg, K, Fe, Mn. Trong nguyên liệu như rỉ đường có lượng sắt cao hơn 3mg/l thì cần loại sắt bằng Kaliferoxyanit $K_4[Fe(CN)_6]$. Nồng độ rất thấp của Mn (<10mg/m^3) cũng đóng vai trò quan trọng, quyết định trong siêu tổng hợp axit xitric, bởi đây là nguyên nhân dẫn tới sự hạn chế hoạt động của con đường pentozơphotphat, gia tăng con đường dường phân (glycolyo), tăng nồng độ NH_4^+ nội bào, tăng sự quay vòng protein và axit nucleic, biến đổi thành phần lipit của màng và cấu trúc của màng tế bào. Do vậy hình thái tế bào cũng thay đổi.

Việc siêu tổng hợp (hay sản xuất thừa) axit xitric được coi là một sự rối loạn quá trình trao đổi chất bình thường do tác dụng kết hợp của nhiều nhân tố thiếu hụt gây ra đã trình bày ở trên. Ở chủng hoang dại, sự rối loạn này cũng được biểu hiện ở mức độ nhất định.

Từ các chủng hoang dại, qua chọn lọc và làm đột biến, có thể thu được các chủng công nghiệp có hoạt lực siêu tổng hợp axit xitric là cả một quá trình vất vả và phức tạp. Các chủng thuần khiết dùng trong sản xuất được bảo quản ở dạng tế bào tiềm sinh cùng bào tử ở môi trường thạch – malt trong ống nghiệm hoặc là bào tử khô trong các lọ kín có hút ẩm.

Mốc giống *A. niger* sinh axit xitric được giữ ở môi trường thạch – malt trong ống nghiệm, ở nhiệt độ 4 – 10°C, với thời gian 6 tháng phải cấy chuyền lại. Nếu thấy biến đổi về hình thái và giảm hoạt lực phải chọn lại: lấy các khuẩn lạc điển hình vượt trội, rồi cấy chuyền thử lại các đặc tính hoá sinh. Nếu giống dùng trong sản xuất môi trường tinh bột thì môi trường giữ giống nên thêm tinh bột tan. Phương pháp giữ giống bằng bào tử cũng được dùng nhiều trong sản xuất, cho kết quả khá tốt và ổn định.

8.1.2. Thu nhận bào tử nấm mốc

Mốc có thể sinh trưởng bằng mẩu sợi hoặc bằng bào tử. Trong sản xuất axit xitric, giống mốc cũng được nhân giống theo hai khả năng này.

Ống giống mốc trước khi đem sử dụng cần được cấy chuyền trên môi trường thạch – malt, giữ ở 32°C trong 4 – 7 ngày, sau đó cấy chuyền trong môi trường nuôi để thu bào tử.

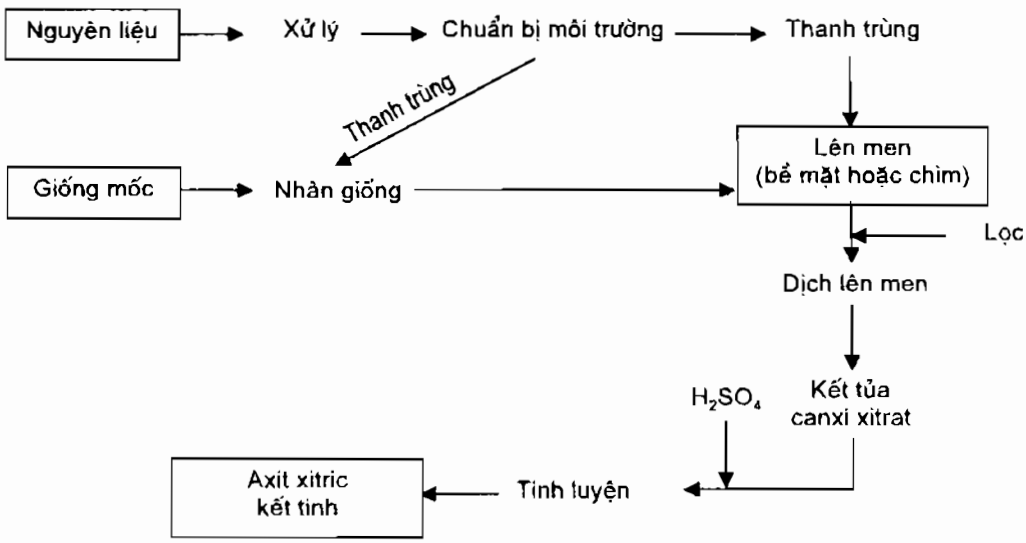
Môi trường nuôi thu bào tử có thành phần như sau: 1 lít nước malt có 3 – 3,5% đường; NH_4Cl 2g; KH_2PO_4 0,35g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,25g; $FeSO_4.7H_2O$ 0,0125g. Có thể thay nước malt bằng 2,2% glucozơ, cao ngô 0,1% và các thành phần khoáng thích hợp. Môi trường cho vào bình 1 – 3 lít với chiều dày lớp môi trường 1cm và thanh trùng ở 1atm trong 30 phút.

Mỗi ống giống cấy vào 2 bình 3 lít và để ở tủ ấm 32°C trong 4 ngày, rồi để nhiệt độ phòng 4 – 6 ngày, hoặc 6 – 11 ngày ở 5°C trong tủ lạnh. Sau khi nuôi được 7 – 15 ngày, trên mặt môi trường có một lớp màng mốc.

Lớp này được lấy ra để vào khay vô trùng, rồi đem sấy khô ở 40°C để thu bào tử. Từ 2 lớp màng này, có thể thu được 2g bào tử.

8.1.3. Quy trình công nghệ sản xuất axit xitric

8.1.3.1. Quy trình công nghệ (hình 8.2)



Hình 8.2. Quy trình công nghệ sản xuất axit xitric ở quy mô công nghiệp

Quy trình công nghệ sản xuất axit xitric ở quy mô công nghiệp cụ thể gồm các công đoạn sau:

1) Chuẩn bị môi trường nhân giống và lên men.

2) Giống gốc được chuyển vào nhân giống trong phòng thí nghiệm và trong sản xuất.

3) Lên men

– Theo phương pháp nuôi cấy bề mặt.

– Theo phương pháp nuôi cấy chìm.

4) Tách sinh khối lấy dịch nuôi cấy (lên men).

5) Kết tuả canxi xitrat từ dịch nuôi cấy.

6) Tinh luyện axit xitric từ canxi xitrat.

7) Sấy thành phẩm (tinh thể axit xitric).

8.1.3.2. Xử lý nguyên liệu và chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Như trên chúng ta đã biết, đối với *Aspergillus niger* – các chủng sản xuất trong lên men xitric – cơ chất thích hợp nhất là glucozơ và sucrozơ (saccarozơ). Trong thực tế có thể dùng rỉ đường mía hoặc rỉ đường củ cải thay cho các loại đường này. Rỉ đường là phế phẩm của công nghiệp đường, vừa rẻ tiền, vừa thích hợp cho lên men xitric.

Hàm lượng đường trong môi trường nuôi cấy nấm mốc sinh axit xitric thường khá cao và sợi nấm phát triển bị hạn chế bởi các yếu tố dinh dưỡng như photpho, mangan, sắt hay kẽm.

– Thành phần dinh dưỡng nuôi *A. niger* trong sản xuất axit xitric khái quát như trong bảng 8.1

Bảng 8.1. Thành phần môi trường nuôi *Aspergillus niger* sinh axit xitric

Thành phần	Đơn vị tính	Khoảng giá trị (*)	Giá trị thông thường
Saccarozơ	kg/m^3	125 – 225	180
NH_4NO_3 (hoặc muối amon khác)	kg/m^3	0,5 – 3,5	15
KH_2PO_4	kg/m^3	0,5 – 2	0,5
$MgSO_4.7H_2O$	kg/m^3	0,1 – 2	0,25
Fe^{2+}	mg/m^3	2 – 1.300	<200
Zn^{2+}	mg/m^3	0 – 2.900	200 – 1.500
Cu^{2+}	mg/m^3	1 – 10.200	200 – 1.500
Mn^{2+}	mg/m^3	0 – 46	<2

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

– Sau đây là một số môi trường nuôi *Aspergillus niger*:

+ Saccarozơ – 150g, NH_4NO_3 – 0,2g, $MgSO_4$ – 0,2g, KH_2PO_4 – 0,116g, nước cho đủ 1 lít.

+ Môi trường Curric (%): Saccarozơ: 12 – 15, $MgSO_4$: 0,025, NH_4NO_3: 0,2, KH_2PO_4: 0,1, pH = 3 – 3,6, nước cho đủ 100%.

+ Môi trường Deoger (%): Saccarozơ: 14, $MgSO_4$: 0,023, NH_4NO_3: 0,223, KH_2PO_4: 0,1, pH = 1,6 – 2,2, nước cho đủ 100%.

+ Saccarozơ – 10%, NH_4NO_3 – 0,25%, KH_2PO_4 – 0,01%, $MgSO_4$. 7 H_2O – 0,03%, $ZnSO_4.7H_2O$ – 0,0008%, pH = 5,5 – 6, nước cho đủ 100%.

+ Saccarozơ – 140g/l, NH_4NO_3 – 2,23, KH_2PO_4 – 1g, $MgSO_4.7H_2O$ – 0,23g. Nuôi nhân giống ở pH = 6, cho đủ nước tới 1 lít.

– Với môi trường lên men có thay đổi chút ít: Saccarozơ – 150g/l, thay NH_4NO_3 bằng NH_4Cl – 1,9g/l và bổ sung $ZnSO_4$ thích hợp làm tăng khả năng sinh axit xitric.

– Chuẩn bị môi trường cần chú ý:

+ Để nấm mốc phát triển tốt giữ pH = 6.

+ Để lên men tốt giữ pH = 3,4 – 3,5.

Điều chỉnh pH bằng HCl hoặc NH_4OH, pH quá thấp (<1,6) hạn chế khả năng sinh tổng hợp axit xitric của chủng sản. Trong xử lý môi trường và chuẩn bị môi trường phải rất quan tâm đến hàm lượng sắt có trong môi trường.

Rỉ đường rất hay được dùng làm nguyên liệu để sản xuất axit xitric. Dùng rỉ đường phải xử lý trước khi pha môi trường: thường trộn 1 rỉ đường với 2 nước, thêm 0,5% tanin (so với lượng rỉ đường). Tanin trước khi dùng cho vào một ít nước rồi đun nóng cho tan. Đổ dịch tanin tan và nóng vào rỉ đường.

8.1.3.3. Giống và nhân giống

Giống thuần chủng trong sản xuất axit xitric là các chủng *Aspergillus niger* đã được chọn lọc kỹ, có hoạt lực siêu tổng hợp axit xitric, được bảo quản trong các ống nghiệm, hoặc các bình có mặt nghiêng rộng để ở trạng thái giống già sinh bào tử có màu đen thẫm. Giống nấm cũng được bảo quản ở trạng thái là các bào tử khô trong các bình kín có chất hút ẩm (như đã giới thiệu ở mục 8.1.1). Trong công nghiệp lên men xitric, phương pháp giữ giống bào tử làm giống khởi động hoặc giống ban đầu là chủ yếu.

Trong lên men, nuôi cấy bề mặt bào tử được chuyển vào bề mặt môi trường lỏng, bào tử nảy mầm phát triển thành hệ sợi (mixen) và kết thành màng. Trong màng có những sợi ăn sâu xuống môi trường (mixen hay khuẩn ty cơ chất) và có sợi mọc trên bề mặt tiếp xúc với không khí (mixen hay khuẩn ty khí sinh).

Trong lên men chìm, giống khởi động (hay giống ban đầu) được tiếp vào các bình hoặc nồi nhân giống có khuấy đảo và sục khí (đã qua hệ lọc khí vô khuẩn).

Ở đây cần lưu ý:

– Để nấm mốc phát triển tốt, giữ pH = 6.

– Để lên men tốt giữ pH = 3,4 – 3,5.

– Điều chỉnh pH bằng HCl.

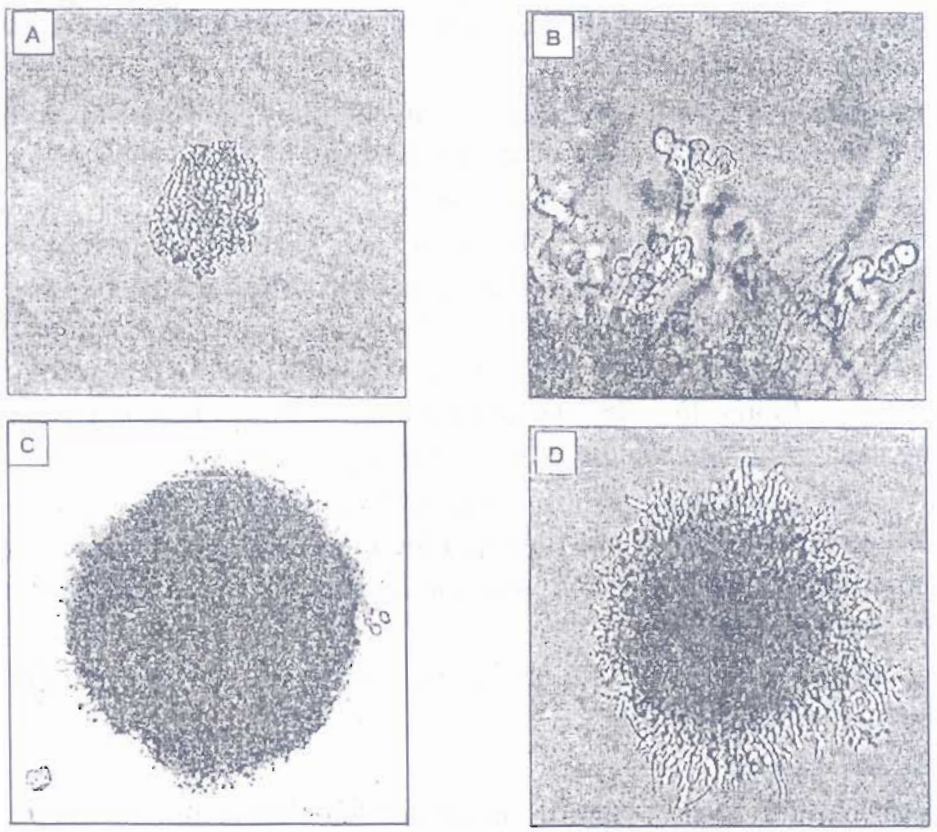
– Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là 31 – 37°C. Sinh khối nấm phát triển mạnh ở 34 – 37°C, nấm sinh tổng hợp axit xitric nhiều ở nhiệt độ 31 – 32°C. Ở nhiệt độ thấp hơn, nấm sinh ra nhiều axit gluconic; ở nhiệt độ cao hơn, việc tạo thành axit xitric bị kìm hãm.

Chuyển giống từ phòng thí nghiệm (thường là bào tử khô): 3g cho vào 2 – 3 lít môi trường 3 – 4% với muối khoáng, khuấy và sục khí, t^o = 34 – 35°C, thời gian là 28 – 36 giờ. Sục khí trong 24 giờ đầu là 9 – $10m^3/m^3$.giờ, thời kỳ cuối là 90 – $100m^3/m^3$.giờ.

Trong quá trình nuôi cấy chìm (nhân giống và lên men), giống nấm kết lại với nhau (hệ sợi nấm kết lại với nhau) thành các hạt (viên, cục – pellets) đường kính 1 – 2mm. Nhân giống trong công nghiệp có thể ở trong nồi với thể tích 10 – $20m^3$, đạt được (1 – 5) × 10^5 cục trong 1 lít môi trường. Tiếp giống dạng hạt vào lên men theo tỷ lệ 5 – 10% (V/V).

Quá trình nuôi cấy chìm, nấm có thể phát triển với những hình thái khác nhau (hình 8.3).

Sợi nấm phát triển rời rạc, dài, không phân nhánh sẽ làm tăng độ nhớt môi trường, giảm khả năng trao đổi oxy và sinh ra ít axit xitric, thậm chí không sinh ra. Dạng hình cầu nhỏ với những sợi mập và ngắn (hình 8.3B) là tốt nhất, có hoạt tính sinh axit xitric cao. Nấm phát triển theo dạng ở hình 8.3D là điều không mong muốn: dạng hạt phân rã, với những sợi nấm ít phân nhánh, dài và thò ra khỏi hạt sợi nấm. Trường hợp này cần bổ sung vào môi trường Kali feroxyamit (hexacyanoferrate kali), $ZnSO_4$, hoặc $CuSO_4$ để ức chế sự phát triển dạng sợi ít phân nhánh. Trong nồi nuôi cấy có cánh khuấy tốc độ cao có tác dụng tốt cho việc tạo thành các viên hạt nấm nhỏ.



Hình 8.3. Hình thái nấm *Aspergillus niger* (NRRL 2270) trong quy trình sản xuất axit xitric ở quy mô phòng thí nghiệm sử dụng thiết bị lên men cánh khuấy 2 lít

A. Hạt non (x100); B. Dạng sợi, ngắn, mập và phân nhánh nhiều thích hợp cho sinh tổng hợp axit xitric; C. Hạt chắc (x40); D. Dạng hạt phân rã với những sợi nấm ít phân nhánh, dài và thò ra khỏi hạt nấm (x100).

8.1.3.4. Lên men

Như chúng ta đã biết, lên men xitric có thể thực hiện theo phương pháp nuôi cấy bề mặt và phương pháp nuôi cấy chìm. Phương pháp nuôi cấy bề mặt chủ yếu nuôi nấm phát triển tạo màng nấm trên bề mặt môi trường lỏng với cơ chất là đường glucozơ hoặc rỉ đường chứa trong các khay (hình 8.6, nơi có ký hiệu A – nuôi cấy bề mặt và nơi có ký hiệu B – nuôi cấy chìm).

Lên men chìm có nhiều ưu việt, như có thể khống chế các yếu tố ảnh hưởng tới

quá trình lên men (nhiệt độ, pH, phá bọt) và tự động hoá quá trình công nghệ, hiệu suất lên men cao, tốn ít mặt bằng bố trí thiết bị và nhân công, nhưng dòi hỏi trang bị và các yêu cầu kỹ thuật là rất cao. Vì vậy, với ưu điểm là yêu cầu công nghệ không phức tạp và quá trình lại đơn giản, phương pháp lên men bề mặt vẫn tồn tại và phát triển song song với phương pháp lên men chìm, đặc biệt là nuôi cấy nấm mốc để sản xuất axit xitric và thu nhận chế phẩm enzyme.

a) Lên men bề mặt

Môi trường dược chuẩn bị xong, lọc kỹ và thanh trùng, phân vào các khay có chiều cao từ 2 – 8cm. Nuôi cấy nấm mốc theo phương pháp bề mặt có thể cho tiếp giống *Aspergillus niger* từ phòng thí nghiệm, có thể trực tiếp là bào tử, hoặc để nhân trong nồi nhân giống.

Môi trường dinh dưỡng chứa đựng trong các khay và được xếp trên giá trong các phòng lên men có thổi khí và quạt hút. Không khí đã lọc sạch thổi qua bề mặt khay. Nhiệt độ buồng lên men giữ ở 28 – 32°C.

Lên men có thể thực hiện qua hai bước: sau khi tiếp giống mốc 48 – 69 giờ, trên lớp môi trường ở khay dày 2 – 3cm và mốc tạo thành màng, ta sẽ bổ sung dịch đường. Chú ý là môi trường lúc đầu có 3 – 4% đường với muối khoáng, sau 50 – 70 giờ nuôi cấy, đường đã cạn (chủ yếu phục vụ cho sinh trưởng của mốc). Lúc này ta dùng dung dịch đường 25 – 28% (không có muối khoáng) bổ sung vào khay (phía dưới màng mốc, nâng dần lớp dịch tới 8cm mà không làm vỡ màng mốc).

Tiếp tục lên men 8 ngày. Trong lên men bổ sung thêm metanol hoặc etanol với tỷ lệ 1 – 3% có tác dụng nâng cao hiệu quả lên men. Kết thúc lên men, người ta rút dịch lên men ra và đưa môi trường mới vào khay, không làm vỡ màng mốc, sẽ rút ngắn được thời gian lên men.

Trong thực tế sản xuất, nuôi cấy bề mặt chỉ thu được 57% axit xitric so với hiệu suất chuyển hoá lý thuyết.

b) Lên men chìm

Lên men chìm được thực hiện trong các nồi lên men công nghiệp có thể tích tới 150 – 200m^3 có trang bị cánh khuấy và bộ phận thổi khí, hoặc trong các cột có dung tích 300 -- 500m^3 (thậm chí tới 1.000m^3) được thổi khí tích cực (hình 8.6 thiết bị B).

Giống nuôi ở các nồi có khuấy và sục khí. Tiếp giống vào lên men với tỷ lệ 5 – 10% theo thể tích. Trong quá trình lên men chìm, pH môi trường và oxy hoà tan đóng vai trò rất quan trọng. pH môi trường thời gian đầu liên quan đến hấp thu amon của giống nấm. pH ban đầu quá thấp (<1,6) cũng làm hạn chế sinh tổng hợp axit xitric. Trong bình lên men 2 lít, lượng NH_4^+ trong môi trường cạn kiệt vào khoảng 50 – 60 giờ. Khi sinh tổng hợp axit xitric, pH cần khống chế ở 2,2 - 2,6 bằng NH_4^+. Ở pH < 3, sự tạo thành axit oxalic và axit gluconic bị hạn chế.

Với tốc độ tạo axit xitric trong lên men công nghiệp khoảng 1 – 1,5kg/m^3.giờ, nấm mốc nuôi cấy có nhu cầu oxy là 0,3 – 0,5kg/m^3.giờ. Để có oxy hoà tan vào môi

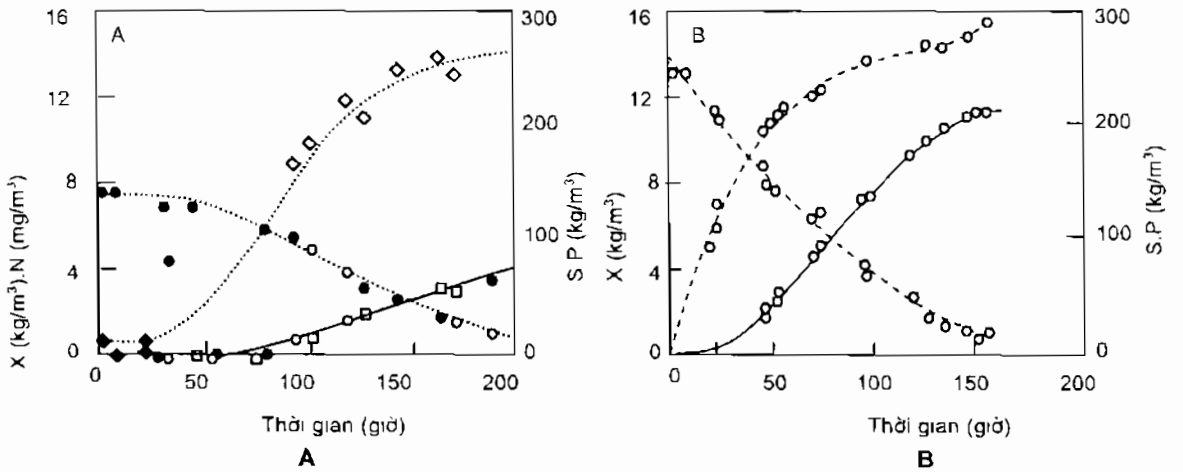
trường ta thường dùng máy nén thổi khí vào dịch nuôi cấy với bộ phận tán khí có lưu lượng 0,1 – 0,4m^3/m^3. phút với áp suất vào không nhỏ hơn 0,3 – 0,4 MPa và áp suất dư trong nồi lên men 0,25 – 0,35 hoặc 0,12 – 0,15 MPa (tuỳ thuộc vào kiểu cánh khuấy và cấu tạo hệ thổi khí của nồi lên men). Thông thường thời kỳ đầu cung cấp 100m^3 không khí/giờ (thể tích thiết bị là 50m^3), thời kỳ cuối là 800 – 1.000m^3/giờ.

Nuôi cấy chìm khoảng sau 8 giờ sẽ xuất hiện bọt và ngày càng nhiều. Để tránh bọt trào ra ngoài và lên men ít bọt, người ta thường dùng dầu thực vật để phá bọt (hoặc các chất polyme phá bọt).

Giống nấm mốc sau khi được tiếp vào môi trường lên men sẽ tiếp tục phát triển tăng sinh khối và kết thành các viên hạt sợi nấm. Quá trình sinh trưởng, giống nuôi cấy sinh nhiệt làm cho môi trường nóng dần. Trong công nghiệp người ta thường dùng hệ ống xoắn dẫn nước lạnh để hạ nhiệt và giữ ở khoảng 28 – 35°C: thời kỳ đầu giữ ở 33 – 34°C và khi tạo axit mạnh giữ ở 30 – 32°C.

Trong quá trình lên men, lượng đường giảm, để nâng cao được hệ số chuyển hoá đường thành axit, người ta thường bổ sung thêm dịch đường với thời gian lên men ở nhiều giai đoạn.

Động học của quá trình lên men xitric trên môi trường glucozơ nuôi cấy chủng *Aspergillus niger* NRRL 2270 ở bình lên men 2 lít và 400m^3 được giới thiệu ở hình 8.4.



Hình 8.4. (A) Động học của quá trình lên men sinh axit xitric bởi chủng *Aspergillus niger* NRRL 2270 ở nồi lên men bằng cánh khuấy 2 lít và (B) bởi chủng công nghiệp trong nồi lên men thổi khí dung tích 400m^3. Sinh khối nấm sợi (X: ♦, ◊); nồng độ glucozơ (S: ●, ○); axit xitric (P: ■, □).

Kết thúc lên men khi 2 lần phân tích cách nhau 4 giờ không thấy lượng axit tăng lên. Thời gian kết thúc lên men vào khoảng 150 – 200 giờ nuôi cấy. Trong dịch lên men có sinh khối nấm, axit xitric và có thể có một lượng nhỏ axit oxalic, axit gluconic do nấm sinh ra, cùng các loại cặn của môi trường.

Hiệu suất lên men chìm công nghiệp đạt được 77% của hiệu suất chuyển hoá lý thuyết.

Dịch lên men bề mặt hay lên men chìm có chứa chủ yếu sinh khối nấm và axit

xitric. Ngoài ra, còn đường sót, cặn các muối khoáng và của môi trường cùng một lượng nhỏ axit oxalic và axit gluconic cũng do nấm giống sinh ra (hình 8.4).

c) Chiết tách và làm sạch axit xitric từ dịch lên men

Chiết tách và làm sạch axit xitric từ dịch lên men qua các bước:

– Tách sinh khối nấm mốc: Trước hết gia nhiệt khối dịch lên men đến 60 – 65°C và đưa vào máy lọc chân không thu được dịch lọc và loại bỏ sinh khối.

– Tạo các muối canxi: Dịch lọc được cho ion Ca^{2+} trong nước vôi $Ca(OH)_2$ và canxi xitrat tạo thành kết tuả. Quá trình kết tuả được đun sôi và pH khi kết thúc là 6,8 – 7,5.

1) Quá trình kết tuả là quá trình trung hoà như sau:

Nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến quá trình tạo kết tuả muối canxi xitrat. Ở 70°C sản phẩm chủ yếu là tricanxi xitrat ngậm 4 nước vô định hình, ở 90°C – dicanxi hydroxitrat tinh thể.

Trong lên men chìm có thể khống chế pH < 3, có thể hạn chế hoặc loại bỏ được sự hình thành hai axit oxalic và gluconic. Khi cho nước vôi vào dịch lọc có axit và pH tăng tới 5,8, tuả dicanxi xitrat sẽ tạo thành. Tuả này dễ lọc và dễ rửa sạch hơn tricanxi xitrat.

Tách tuả canxi xitrat bằng lọc chân không và rửa kết tuả nhằm loại phần đường cũng như các tạp chất khác bám vào các tinh thể.

2) Tách kết tuả canxi xitrat

Các tinh thể sau khi rửa được đưa vào thiết bị tách có cánh khuấy, có ống phun hơi và thoát hơi, đồng thời cho H_2SO_4 98% vào thiết bị (0,25 – 0,5m^3 H_2SO_4 cho 1 T axit xitric có trong xitrat) và dịch khi này có 40% axit xitric với pH = 0,5 – 0,6. Để khử màu cho axit xitric thành phẩm, người ta dùng than hoạt tính với lượng 2% cho 1 T axit xitric có trong xitrat. Sau đó đun nóng tới 60°C và thêm H_2SO_4 có tỷ trọng 1,8 – 1,84 (0,425l/ 1kg axit xitric có trong xitrat). Khuấy đều và đun sôi: axit xitric sẽ được tách ra và thạch cao kết tuả.

Để tách canxi oxalat và canxi gluconat khi có mặt axit xitric, ta sử dụng một lượng dư axit sunphuric, khi đó canxi oxalat (hoặc gluconat) sẽ kết tuả cùng với thạch cao và khi đó dung dịch chỉ còn axit xitric.

$$C_6H_5O_7 + 3Ca(OH)_2 = Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \downarrow + H_2O$$

$$2C_6H_{12}O_7 \text{ (axit gluconic)} + Ca(OH)_2 = Ca(C_6H_{11}O_7)_2 \downarrow + H_2O$$

$$C_2H_2O_4 \text{ (axit oxalic)} + Ca(OH_2) = CaC_2O_4 + H_2O$$

Bước tiếp theo là cho dịch qua cột trao đổi ion mạnh và yếu để hấp phụ các ion kim loại, canxi sunphat còn sót, các hợp chất sunphua của kim loại nặng,...

Dịch thu được có nồng độ 250 – 280kg/m^3 axit xitric đưa vào cô và sấy.

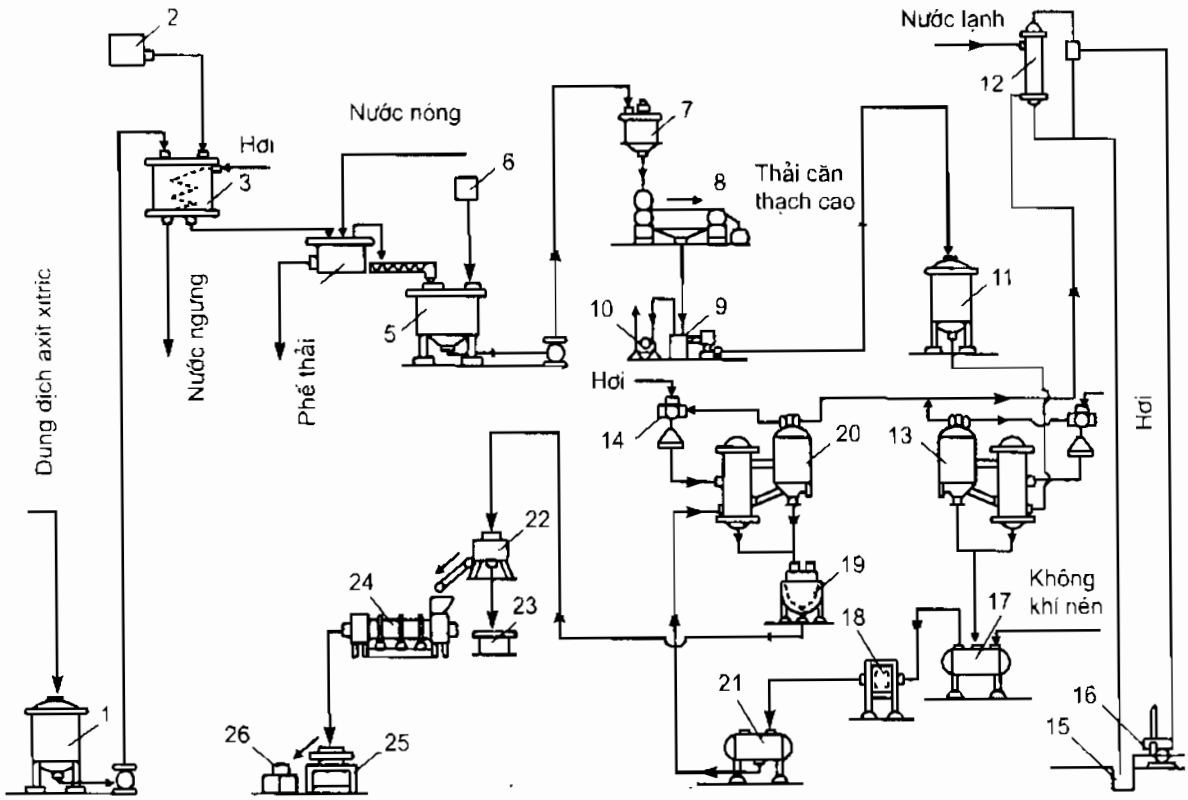
3) Cô và sấy sản phẩm

Dịch axit xitric đưa vào thiết bị có chân không:

+ Giai đoạn đầu cô đến tỷ trọng 1,24 – 1,26;

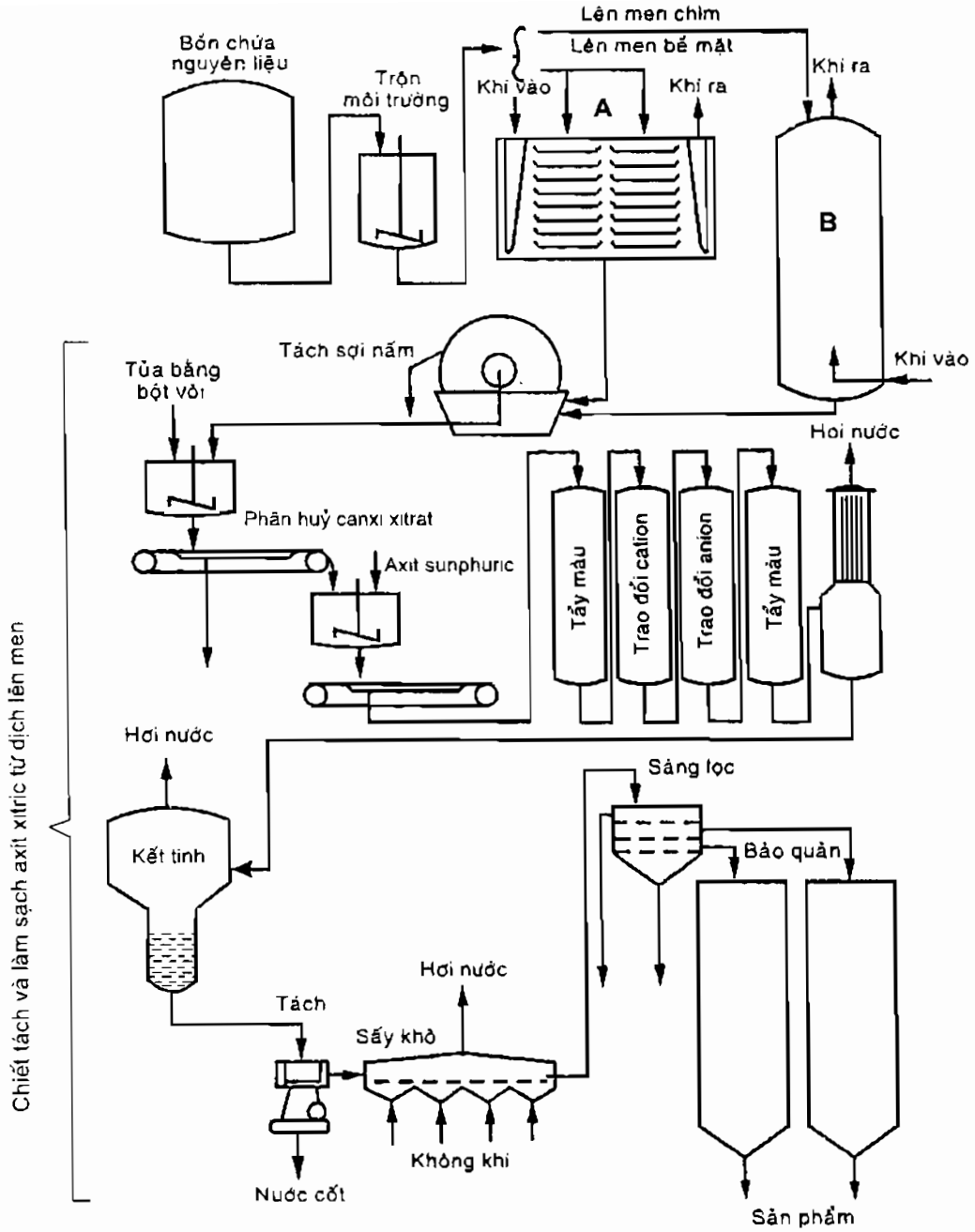
+ Giai đoạn sau cô đến tỷ trọng 1,32 – 1,36 tương ứng với nồng độ 80% rồi đưa vào thiết bị kết tinh. Khi dịch có nhiệt độ 35 – 37°C thì cho mầm kết tinh (tinh thể axit xitric) tới 10 – 25% vào thiết bị để kết tinh và tiếp tục giảm nhiệt độ 8 – 10°C nữa, cho khuấy liên tục trong 30 phút. *Ở đây chú ý:* khi cho kết tinh, cần giữ ở nhiệt độ trên hoặc dưới ở 36,6°C, điểm này chuyển hoá từ dạng khan sang dạng ngậm nước monohydrat của sản phẩm. Sau đó tách các tinh thể xitrit axit monohydrat bằng ly tâm và đưa đi sấy khô. Sấy bằng kiểu sấy băng tải, tác nhân sấy là không khí với nhiệt độ không quá 35°C. Cũng có thể sấy sản phẩm bằng sấy tầng sôi hai giai đoạn: giai đoạn đầu với khí nóng 90°C; giai đoạn sau với khí khô có độ ẩm 30 – 40% và nhiệt độ 20°C.

Công đoạn tách và làm sạch sản phẩm từ dịch lên men xitric ở quy mô công nghiệp được giới thiệu ở hình 8.5.



Hình 8.5. Sơ đồ tách axit xitric khỏi dung dịch lên men

1. Thùng đựng dung dịch axit xitric; 2. Thùng đựng sữa vôi; 3. Nồi trung hoà; 4. Bộ lọc tách cặn; 5. Nồi phản ứng để tách axit khỏi cặn; 6. Thùng chứa than hoạt tính; 7. Thùng trung gian; 8. Bộ lọc chân không dạng băng tải; 9. Thùng chân không; 10. Bơm chân không; 11. Thùng đựng dung dịch axit xitric; 12. Bộ ngưng tụ của thiết bị cô đặc; 13, 20. Nồi cô chân không lần 1 và lần 2; 14. Máy nén của thiết bị cô; 15. Giỏ áp kế; 16. Hút chân không; 17. Bơm; 18. Lọc ép tách dung dịch khỏi thạch cao; 19. Nồi tinh thể; 21. Thùng trung gian; 22. Máy ly tâm; 23. Thùng chứa dung dịch; 24. Sấy thùng quay; 25. Sàng rung; 26. Máy gói tự động.



Hình 8.6. Quy trình lên men axit xitric công nghiệp

8.2. SẢN XUẤT AXIT AXETIC

Axit axetic (CH_3COOH) được sản xuất bằng cách chưng khan gỗ, tổng hợp hoá học và lên men. Axit axetic được dùng nhiều trong công nghiệp thực phẩm, trong công nghiệp sơn, chất màu hữu cơ và dung môi, trong dược phẩm, trong sản xuất chất dẻo và sợi nhân tạo tổng hợp.

Trong công nghiệp thực phẩm, axit axetic được dùng làm chất tăng mùi vị, dùng trong đồ hộp, nước xốt mai–o–ne, nước chấm, tương hạt cải hoặc bổ sung trực

tiếp vào thực phẩm. Axit axetic dùng trong thực phẩm thường là sản phẩm lên men. Dấu ăn là dung dịch axit axetic có nồng độ là 3 – 6%.

Axit axetic dùng ăn trực tiếp trong các bữa ăn được gọi là giấm ăn, đó là sản phẩm lên men axetic. Quá trình lên men nhờ một nhóm vi khuẩn được gọi chung là vi khuẩn axetic, chúng oxy hoá rượu etylic thành axit axetic:

$$2CH_3 - CH_2OH \xrightarrow{2O_2} 2CH_3COOH + 2H_2O$$

Thực chất của quá trình này gồm 2 phản ứng với 2 enzyme của vi khuẩn axetic xúc tác:

$$CH_3 - CH_2OH \longrightarrow 2CH_3CHO + 2H$$

(Etanol) Alcohol–dehydrogenaza (Alxetaldehyt)

Sau sự hydrat hoá axetaldehyt diễn ra phản ứng loại hydro lần thứ hai:

$$CH_3 - C(OH)_2 \longrightarrow CH_3COOH + 2H$$

Aldehyt–dehydrogenaza (axit axetic)

Hydro được NADP nhận và qua các xitocrom của chuỗi hô hấp được chuyển cho O_2 (chất nhận).

Từ trước đến nay, chúng ta xếp quá trình này thuộc lên men hiếu khí, nhưng thực chất đây là một quá trình chuyển hoá: vi sinh vật sử dụng cơ chất etanol và chuyển hoá axit axetic. $NADPH_2$ xuất hiện trong quá trình này có lẽ được chuyển hoá qua chuỗi hô hấp để thu năng lượng. Quy trình này cũng là oxy hoá không hoàn toàn. Cơ chất bị phân giải không hoàn toàn, trong đó oxy là chất nhận hydro (điện tử).

Như vậy, nguyên liệu dùng để sản xuất axit axetic bằng phương pháp lên men là rượu etylic. Trong thực tế sản xuất, người ta hay dùng loại rượu nhạt hay các loại dịch có chứa rượu (bia, rượu vang kém chất lượng, nước quả bị lên men,...).

8.2.1. Vi khuẩn axetic

– Ngày nay người ta đã biết tới hơn 20 loài vi khuẩn có khả năng lên men axetic, chúng được gọi bằng một tên chung là vi khuẩn axetic. Những vi khuẩn này dễ tìm thấy trong không khí, đất và nước. Vì vậy, các dịch nước quả, bia, rượu thấp, dịch đường,... để hở tiếp xúc không khí dễ bị vẩn đục nhẹ, trên bề mặt tạo thành một lớp màng mỏng mịn màu trắng xám hoặc vàng xám. Đó là do các vi khuẩn axetic phát triển. Trước đây, L. Pasteur cho rằng, quá trình lên men giấm do một loại vi sinh vật gây ra và được gọi là *Mycoderma aceti*. Sau này, người ta biết đó là nhiều loài vi khuẩn thuộc nhóm *Acetobacter* hoặc *Bacterium*. Chúng là những trực khuẩn, Gram âm (–), không sinh bào tử, rất hiếu khí. Có một số chuyển động, một số khác không chuyển động.

– Những vi khuẩn axetic không những oxy hoá được rượu etylic thành axit axetic mà còn oxy hoá được rượu propionic, rượu butylic thành axit butyric nhưng chúng không oxy hoá được rượu metylic và những rượu bậc cao.

– Trong môi trường đủ rượu etylic (5 – 13%) thì sản phẩm chủ yếu là axit axetic, nếu nồng độ rượu thấp hơn các vi khuẩn axetic oxy hoá triệt để rượu thành CO_2 và nước.

– *Vi khuẩn axetic rất hiếu khí.* Tốc độ sinh trưởng của chúng rất nhanh, từ một tế bào, sau 12 giờ có thể phát triển thành 17 triệu tế bào. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, chúng tạo thành axit axetic và nồng độ axit thấp lại kích thích sự sinh trưởng của chúng. Vì vậy, trong sản xuất giấm có thể dùng rượu không cần thanh trùng được bổ sung một ít axetic để axit hoá môi trường.

Dưới dây giới thiệu một số loài vi khuẩn axetic có nhiều ý nghĩa thực tế:

1) Acetobacter aceti

Hình que ngắn, không sinh bào tử, thường kết với nhau thành chuỗi dài. Tế bào chất được nhuộm bằng iot cho màu vàng. Giống này có thể phát triển ở nồng độ rượu 11% và tích tụ trong môi trường tới 6% axit axetic. Nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng là 34°C.

2) Acetobacter pasteurianum

Hình que ngắn, tế bào chết nhuộm iot cho màu xanh.

3) Acetobacter orleameuse

Hình que nhỏ, hai dầu hơi nhọn, phát triển thành màng mỏng, nhưng chắc trên bề mặt dịch nuôi cấy. Tế bào chết nhuộm iot cho màu vàng. Giống này có thể phát triển ở dung dịch 10 – 12% rượu và tạo thành được 9,5% axit axetic.

4) Acetobacter xylium

Có khả năng tạo thành màng mạnh và đôi khi màng khá dày. Màng nhuộm bằng iot và axit sunphuric cho màu xanh. Giống này tích tụ được 4,5% axit axetic. Đôi khi loài này được dùng với nấm men để sản xuất đồ uống có độ rượu thấp.

5) Acetobacter schilitzenbachii

Hình que tương đối dài kết hợp thành chuỗi, không sinh bào tử, không chuyển động, Gram âm. Các tế bào già tạo thành màng chặt nhưng không chắc. Vì vậy, giống này có thể dùng để sản xuất giấm theo phương pháp chìm và có thể tạo thành 11,5 – 12% axit axetic trong dịch nuôi cấy.

6) Acetobacter curvum

Có đặc tính tương tự như *Acetobacter schilitzenbachii,* tạo thành axit cao, không tạo thành màng chắc, không làm bẩn vỏ bào và làm đục giấm.

Nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng của *Acetobacter schilitzenbachii* là 28°C, còn của *Acetobacter curvum* là 35 – 37°C. Nâng cao nhiệt độ qua giới hạn này, giống phát triển yếu và tạo thành axit kém. Trong thực tế lên men axetic, người ta thường giữ ở nhiệt độ 32 – 34°C đối với vi khuẩn *Ace. curvum.*

7) Acetobacter suboxydans

Vi khuẩn này được dùng nhiều trong công nghiệp vitamin để sản xuất axit ascobic (vitamin C). Trong lên men, nhờ các chủng vi khuẩn *suboxydans,* axit axetic

được tích tụ và giữ lại trong môi trường mà không bị oxy hoá tiếp. Các loài có khả năng oxy hoá cao tiếp tục chuyển hoá axit axetic được xếp vào nhóm *peroxydans*, như *Acetobacter suboxydans, Acetobacter pasteurianum.*

Các chủng chọn lọc của *Acetobacter suboxydans* được nuôi theo phương pháp chìm trong dịch dinh dưỡng 10 – 20% etanol với một ít glucozơ, có thể chuyển toàn bộ etanol thành axit axetic, nồng độ của sản phẩm có thể đạt tới 13%. Quá trình lên men xảy ra ở nhiệt độ thích hợp là 28 – 30°C trong khoảng 48 giờ, với nồng độ cồn 12 – 13% trong môi trường, khi lên men yêu cầu về thông khí là rất ngặt nghèo, chỉ cần ngừng 10 – 20 giây là số tế bào vi khuẩn đã có thể chết tới 1/3, ở nồng độ cơ chất thấp, thì sự hiếu khí không khắt khe như thế.

Trong sản xuất vitamin C, nguyên liệu đầu là L–socbozơ cần được chuyển hoá từ D–socbit – là một sản phẩm hoá học được biến đổi từ glucozơ. Sự chuyển hoá socbit thành socbozơ phải nhờ vi khuẩn *Acetobacter suboxydans* với enzyme xúc tác là socbit – dehydrogenaza

$$\text{D–socbit} \xrightarrow[\text{socbit–dehydrogenaza}]{} \text{L–socbozơ}$$

Trong phản ứng này, 2H được tách khỏi phân tử D – socbit thành =C=O của socbozơ. D–socbit có nồng độ ban đầu là 20% trong môi trường với sự có mặt cao nấm men và cao ngô. Quá trình chuyển hoá kéo dài 1 – 3 ngày và có thể bổ sung socbit một lần nữa để tổng nồng độ đạt tới 30%. Hiệu suất chuyển hoá socbit thành socbozơ có thể đạt tới 90%.

Nói chung các vi khuẩn axetic thuộc nhóm vi sinh vật ưa ấm và hiếu khí rất rõ. Vì vậy trong lên men axetic cần phải tiến hành ở điều kiện 25 – 32°C và thổi khí mạnh.

8.2.2. Lên men axetic – Sản xuất giấm ăn

– Trong lên men axetic, cơ chất dinh dưỡng chủ yếu là cồn etanol với nồng độ trên dưới 10% trong môi trường. Ngoài ra còn có thêm một ít đường, nguồn N vô cơ hoặc hữu cơ, cũng như các chất khoáng khác,...

– Có hai phương pháp lên men axetic: chậm và nhanh. *Phương pháp chậm* còn gọi là phương pháp Orican hoặc phương pháp Pháp. Phương pháp này dùng nước hoa quả làm nguyên liệu với giống *Acetobacter orleameuse.* Phương pháp này cho hiệu suất thấp, thời gian dài nhưng thích hợp cho công việc làm giấm ở gia đình hoặc sản xuất giấm ở quy mô nhỏ trong các xí nghiệp dùng "rượu lại", dịch đường, nước hoa quả hoặc bia hỏng, rượu vang kém phẩm chất,... cho lên men.

Phương pháp nhanh còn gọi là phương pháp Đức, hiện nay được áp dụng chủ yếu trong công nghiệp sản xuất giấm ăn trên thế giới với các thùng lên men bằng gỗ hình trụ (generator) tới 10m^3 hoặc lớn hơn, trong đó đặt các phoi bào gỗ giẻ. Giống dùng ở đây là *Acetobacter schilizenbachii* hoặc *Acetobacter curvum* được nhiễm vào phoi bào. Cho dịch lên men chảy qua các phoi bào nhiều lần, vi khuẩn axetic tiếp xúc với môi trường lên men và oxy hoá rượu thành axit. Như vậy nhờ

phoi bào, dòng môi trường chảy chậm, quanh co, diện tiếp xúc với vi khuẩn rất lớn. Hơn nữa, để tăng hiệu quả oxy hoá, người ta phun môi trường thành bụi và thổi không khí vào thùng lên men qua các lớp phoi bào từ dưới lên trên. Mỗi lần môi trường qua lớp phoi bào bị nóng lên vì phản ứng oxy hoá và vi khuẩn hô hấp toả nhiệt. Vì vậy, trước khi cho môi trường phun thành bụi lần sau cần phải làm lạnh. Môi trường có thể cho qua lớp phoi bào nhiều lần để cho vi khuẩn tiếp xúc và oxy hoá hầu hết rượu trong đó để biến thành giấm (rượu etylic dư khoảng 0,1 – 0,2%). Nhiệt độ lên men trong khoảng 24 – 37°C tuỳ theo giống vi khuẩn. Thời gian lên men khoảng 8 – 10 ngày.

Ngoài 2 phương pháp này người ta còn chú ý đến *phương pháp lên men chìm kiểu hiện đại*. Phương pháp này ngày càng có ý nghĩa lớn. Các nồi lên men đặc biệt được thông khí mạnh (reactor), có thể thay thế từng phần dịch dinh dưỡng cũng như được thông khí đầy đủ. Sau khi etanol được chuyển thành axit axetic thì cũng được rút bớt phần lớn và đưa dịch mới vào nồi lên men tiếp tục. Với phương pháp lên men như vậy gần như là lên men bán liên tục. Các chủng *Acetobacter suboxydans* tỏ ra thích hợp với phương pháp lên men này, chúng có thể chuyển hoá toàn bộ etanol thành axit axetic với điều kiện là nồng độ cồn 12% trong môi trường có thêm một ít glucozơ và sục khí rất mạnh. Lên men ở 28 – 32°C khoảng 2 ngày.

– Quy trình sản xuất giấm ăn hay lên men axetic gồm có những giai đoạn sau:

1) Chuẩn bị môi trường. 2) Lên men. 3) Hoàn thành sản phẩm.

+ Nguyên liệu dùng để sản xuất là các loại nước quả (chưa hoặc đã lên men rượu), rượu và bia kém phẩm chất, các loại dinh dưỡng, nhưng chủ yếu vẫn là các loại rượu. Trong đó, nước nho và rượu nho là nguyên liệu sản xuất giấm có chất lượng cao. Rượu etylic là nguồn nguyên liệu được dùng phổ biến trong công nghiệp lên men axetic. Các loại quả chín được ép lấy nước và các loại dịch đường có lẫn nấm men rượu sẽ xảy ra quá trình lên men rượu, biến các loại đường thành rượu etylic và thu được dịch rượu nhẹ. Cũng có trường hợp, người ta bổ sung nấm men *Saccharomyces* vào các loại dịch trên trước khi làm giấm. Quá trình lên men rượu tự nhiên (hoặc có thêm rượu nhẹ) kéo dài 2 – 3 tuần, xác men lắng xuống phía dưới và ta gạn lấy dịch trong có nồng độ rượu thấp để cho lên men axetic.

Nồng độ rượu thích hợp cho lên men axetic là 10 – 13%, trường hợp cao hơn sẽ ức chế giống vi khuẩn axetic phát triển và một phần rượu không bị oxy hoá thành giấm, còn trường hợp rượu quá thấp sẽ xảy ra hiện tượng oxy hoá triệt để biến giấm thành CO_2 và nước.

Trong môi trường dinh dưỡng, ngoài rượu etylic, cần phải có đủ các chất đảm bảo cho vi khuẩn sống và hoạt động, gồm có các nguồn cacbon, nitơ, các chất khoáng: K, Mg, Ca, Fe, P, S,...

Nguồn cacbon ở đây có thể là đường, nguồn nitơ là các axit amin, pepton hoặc muối amon. Các chất khoáng dùng ở dạng muối vô cơ hoặc hợp chất hữu cơ. Nước mạch nha, bia, nước quả, dịch nấm men,... là những nguồn dinh dưỡng rất tốt đối

với vi khuẩn axetic. Nhưng sử dụng các nguồn này phải cẩn thận, vì dùng với liều lượng cao sẽ làm cho vi khuẩn phát triển mạnh, kém khả năng lên men hoặc tạo điều kiện cho các vi sinh vật khác phát triển.

Trong sản xuất, người ta thường dùng môi trường có thành phần như sau: Cứ 100 lít cồn tuyệt đối thêm 25g supephotphat, 25g amon sunphat, 0,9g kali cacbonat, 500g glucozơ, hoặc dịch đường thuỷ phân từ tinh bột tính tương đương với lượng đường glucozơ. Có thể dùng saccrozơ thay cho glucozơ. Nước pha thành 800 – 1.000 lít môi trường.

Vi khuẩn axetic thường tiêu hoá rất ít các chất dinh dưỡng. Để có được giấm chất lượng cao và tránh hiện tượng nhạt ở phoi bào cần phải bổ sung các chất dinh dưỡng làm nhiều lần, nhưng mỗi lần với lượng thấp. Nếu trường hợp lên men bị yếu, thì có thể bổ sung vào môi trường dịch malt hoặc bia.

Môi trường nhân giống hoặc lên men cần được axit hoá bằng chính axit axetic nhằm kích thích giống phát triển và ức chế các vi khuẩn khác.

+ Trong quá trình lên men nhanh có thể dùng hệ vi khuẩn axetic thuần khiết tự nhiên, có nghĩa là, lúc dầu tạo điều kiện cho một số loài cùng một nhóm nhiễm từ không khí phát triển luôn luôn ở môi trường axit axetic. Nhưng trong sản xuất còn dùng các chủng thuần khiết và thu được hiệu quả cao. Các chủng thường dùng là *Acetobacter schiitzenbachii* hoặc *Acetobacter curvum* 86 và 96. Trước khi cho lên men ở thùng lớn, cần phải nhân giống ở bình tam giác và thùng nhỏ. Trong bình tam giác có dịch đường nồng độ 5 – 6°Bx và 3 – 5% rượu. Thùng nhân giống có cấu tạo giống thùng lên men nhưng nhỏ hơn. Các phoi bào đã vô trùng trong thùng nhân giống được axit hoá bằng axit axetic 6 – 9%. Cách làm như sau: trong thùng nhỏ xếp các phoi bào đã được nấu sơ bộ để diệt trùng, rồi tẩm ướt phoi bào bằng dung dịch axit axetic. Thanh trùng thùng có phoi bào ở nồi hấp 1atm trong 30 phút. Làm nguội tới 30°C, cấy giống từ bình tam giác sang. Sau khi cấy giống, người ta đổ vào thùng nhân giống hỗn hợp 6% axetic và 3% rượu etylic. Nuôi ở 30°C khoảng 5 – 7 ngày. Sau đó chuyển dịch giống này sang thùng lên men. Trước khi cấy chuyền giống, thùng lên men được rửa sạch, xếp phoi bào và cho hơi nóng đi qua, rồi thấm ướt phoi bào bằng dung dịch axetic 6%, hấp ở 70°C trong 15 phút. Phương pháp lên men nhanh với chủng thuần khiết có nhiều ưu điểm: Quá trình lên men ngắn ngày, dễ kiểm tra, giá thành hạ.

Trong quá trình sản xuất, nếu lên men liên tục không nghỉ thì có thể không phải nhân giống lại. Ở các thùng lên men chậm, khi đạt được độ chua của giấm cần thiết, người ta rút dịch ra khỏi thùng và lại cho thêm dịch mới. Trong khi thao tác không làm vỡ váng cái giấm. Các thùng lên men nhanh chứa các phoi bào đã tẩm axit axetic cho phun mù dịch rượu nhạt chảy từ trên xuống và thổi khí từ dưới lên liên tục, không phải nhân giống lại mà hiệu suất lên men vẫn đảm bảo. Ở đây cần chú ý, quá trình thổi khí phải liên tục, không được gián đoạn.

Phương pháp lên men chìm có nhiều ưu việt và đã chiếm được tỷ lệ đáng kể trong sản xuất axetic thực phẩm ở quy mô công nghiệp.

8.2.3. Những sinh vật gây hại giấm

– Giấm vẩn đục và giảm chua: Trong quá trình oxy hoá rượu thành giấm đôi khi gặp hiện tượng oxy hoá sâu sắc tới CO_2 và nước. Nguyên nhân là do nhiễm các nấm men tạo màng thuộc giống *Cadida mycoderma*. Ngoài ra, còn có thể do nhiễm các vi khuẩn axetic khác như *Acetobacter xylinum, Acetobacter aceti,...* Chúng dễ oxy hoá axit axetic. *Acetobacter xylinum* phát triển trong giấm tạo thành màng nhày trên bề mặt, làm cho giấm thành phẩm có cặn nhày, *Acetobacter aceti* làm vẩn đục giấm. Khi cho môi trường vào thùng lên men phân bố không đều, tạo cho khối phoi bào có những vùng có độ axit thấp và ở đây nơi có điều kiện cho các vi sinh vật tạp phát triển.

Thấy có hiện tượng trên cần lên men lại và rửa sạch thùng, thẩm ướt lại phoi bào bằng axit và sát trùng. Giấm thành phẩm cần hạn chế tiếp xúc với không khí hoặc đem hấp Pasteur tới 60 – 70°C. Có thể cho thêm vào giấm thành phẩm chất bảo quản kali pyrosunphat ($K_2S_2O_3$) với lượng 5 – 15g/100 lít kết hợp với hấp Pasteur để tăng độ bền của giấm.

– Lươn giấm: Trong thùng lên men và giấm thành phẩm hay gặp một loại giun tròn nhỏ, gọi là lươn giấm *Angiullula aceti*. Con đực trưởng thành dài tới 1mm, con cái 1 – 2mm.

Lươn giấm sinh trưởng và phát triển trong những điều kiện không nghiêm ngặt. Chúng phát triển rất mạnh trong nồng độ giấm thấp (6% axit axetic). Còn ở nồng độ cao (9 – 10%) chúng bị ức chế, nhưng không hoàn toàn ngừng sinh sản, ở nồng độ 12% chúng còn sống được 1,5 tháng, nồng độ cao hơn chúng bị chết.

Lươn giấm chủ yếu sống bằng các vi khuẩn lactic, nhưng chúng cũng có thể ăn một phần rượu, axit axetic, đường, các chất nitơ và các chất khoáng hoà tan. Chúng không làm ảnh hưởng đến hiệu suất lên men và không độc với người, nhưng với số lượng lớn, chúng làm vỡ màng giấm, làm vẩn đục giấm thành phẩm. Để phòng ngừa lươn giấm, người ta cho vào giấm thành phẩm 1 – 2% muối ăn. Khoảng 1 – 2 ngày sau đó người ta lọc để bỏ xác lươn giấm chết. Cũng có thể diệt lươn giấm bằng cách đun đến 40 – 50°C rồi lọc.

– Bọ giấm: Ở những lỗ thông khí hoặc xung quanh thùng lên men hoặc các thùng gỗ chứa đựng có độ ẩm cao và các chất dinh dưỡng, thường xuất hiện hai loại bọ giấm. Loại tế bào màu trắng, hình quả lê có kích thước 0,8 – 1,5mm và loại bé màu nâu, có kích thước 0,3 – 0,4mm. Chúng thường sống ở phía dưới nắp đậy thùng lên men. Khi xuất hiện bọ giấm thì lươn giấm biến mất. Sau khi hết lươn giấm thì bọ giấm cũng hết. Đôi khi xuất hiện một khối lượng lớn các bọ giấm.

Để chống bọ giấm người ta bôi dầu khoáng vào xung quanh những lỗ thông khí. Nếu chúng có trong thùng lên men thì dùng hơi nóng để tiêu diệt.

– Ruồi giấm: Nơi sản xuất hay thấy ruồi giấm. Những ruồi này có màu nâu đỏ và dài khoảng 2,5 – 3mm. Chúng thường phát triển ở phần trên và phần dưới thùng lên men, làm giảm độ axit, sinh ấu trùng ăn vi khuẩn axetic và dịch rượu giấm. Ruồi là vật truyền nhiễm các vi sinh vật gây hỏng giấm. Vì vậy, các lỗ hở, cửa và các phần hở của thùng lên men cần phải đậy kín bằng kính hoặc nút bông.

8.2.4. Chất lượng giấm thành phẩm

– Giấm thành phẩm có hai nồng độ axit axetic: 6 và 9%, dịch trong suốt, không bị mờ đục, có cặn, dịch nhày và lươn giấm.

– Màu sắc: không màu hoặc màu vàng nhẹ.

– Mùi vị: mùi đặc trưng của giấm làm từ rượu, không có mùi chua hắc hoặc mùi kim loại hay mùi vị lạ.

– Không có axit vô cơ hoặc axit axetic chưng cất từ gỗ, đặc biệt là không được phép có muối của kim loại nặng. Cho phép NaCl trong giấm với nồng độ < 2.

Hiện nay, giấm bán trên thị trường chỉ có 5% axit axetic và nhờ đục.

8.2.5. Vi khuẩn axetic oxy hoá các rượu và đường khác

– Vi khuẩn axetic không chỉ oxy hoá rượu etylic mà còn có thể oxy hoá được các rượu và các đường khác, ví dụ như rượu propiolic thành axit propionic, rượu butylic thành axit butyric. Rượu metylic và các rượu bậc cao những vi khuẩn này không oxy hoá.

– Một số vi khuẩn axetic oxy hoá các aldozơ (đường) đến các axit tương ứng, ví dụ từ glucozơ thành axit gluconic:

$$\underset{\text{(glucozơ)}}{2CH_2COH(CHOH)_4CHO} + O_2 \longrightarrow \underset{\text{(axit gluconic)}}{CH_2OH(CHOH)_4COOH}$$

Chuyển hoá đường glucozơ thành axit gluconic là phản ứng cơ bản trong quá trình lên men gluconic. Axit gluconic được sử dụng trong y tế và thú y. Tác nhân gây lên men này chịu được nồng độ glucozơ và axit gluconic cao. Các tác nhân, ngoài vi khuẩn axetic, ta còn thấy *Pseudomonas fluorensens*, một số nấm mốc thuộc giống *Aspergillus* và *Penicillium*. Các giống này được dùng trong công nghiệp.

– Có điều đặc biệt thú vị, một số vi khuẩn lactic có khả năng oxy hoá rượu đa nguyên tử thành xetoalcohol hoặc đường – xeton. Những quá trình này được gọi là quá trình xeton hoá và các tác nhân là các vi khuẩn, được gọi là các vi khuẩn sinh xeton.

– Trong công nghiệp sử dụng quy trình oxy hoá rượu 6 nguyên tử là sorbit thành sorbozơ. Sau đó dùng sorbozơ để tổng hợp nên axit ascobic (vitamin C).

$$\underset{\text{(Sorbit)}}{2CH_2OH(CHOH)} + O_2 \longrightarrow \underset{\text{(Sorbozơ)}}{CH_2OCO(CHOH_3)_3CH_2OH} + 2H_2O$$

Nguồn nguyên liệu ban đầu của quá trình này là glucozơ. Glucozơ được sơ bộ khử bằng con đường hoá học thành sorbit và sau đó được oxy hoá thành sorbozơ nhờ vi khuẩn axetic. Sự chuyển hoá này có thể đạt tới 80 – 90%.

– Oxy hoá glyxerin nhờ vi khuẩn axetic có một ý nghĩa quan trọng là glyxerin có thể chuyển thành dioxyaxeton – một nguyên liệu rất quý đối với công nghiệp hoá học.

$$2CH_2OHCHOHCH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_2OHCOCH_2OH + 2H_2O$$

(glyxerin) (dioxyaxeton)

– Polysaccarit từ vi khuẩn *Acetobacter xylium:*

+ Trong thực tế đời sống chúng ta gặp những trường hợp vi khuẩn tạo màng nhày. Bản chất của những màng vi khuẩn là các polysaccarit, trong đó có loại cấu tạo dạng sợi giống như xenlulozơ ở thực vật. Ta thường gọi các màng loại này là xenlulozơ vi khuẩn (BC). Trong số các vi khuẩn tạo màng xenlulozơ (BC) có các chủng thuộc loài *Acetobacter xylium* có hoạt tính tổng hợp cao và có thể tổng hợp được các sợi xenlulozơ giống như sợi bông.

Xenlulozơ vi khuẩn (Bactrial cellulose – BC*)* cấu tạo từ các chuỗi polyme 1,4 – glucopyranozơ mạch thẳng nhờ một số loài vi khuẩn, đặc biệt là *A. xylium.*

Trên môi trường dinh dưỡng lỏng nuôi tĩnh, *A. xylium* sẽ tạo thành một lớp màng. Lớp màng này có bản chất xenlulozơ liên kết với tế bào vi khuẩn. Nó giống xenlulozơ thực vật và có thêm những đặc tính như độ bền cơ học, đường kính sợi nhỏ, độ tinh khiết cao, tính đàn hồi lớn, khả năng thấm hút nước nhanh,...

BC có nhiều ứng dụng. BC của *A. xylium* với màng dày lớn được sản xuất ra "thạch dừa, vải, nhãn,..." (thạch ở đây là BC, không phải là agar – agar), thức ăn cho người ăn kiêng và một số kẹo bánh, dùng trong công nghiệp giấy với loại giấy cao cấp. Ngoài ra, nhờ khả năng bám chắc trên bề mặt ngay khi bốc hơi nước, không cho nước thấm qua, nhưng lại cho hơi nước di chuyển, có khả năng ngăn cản vi khuẩn, thay thế da tạm thời (da nhân tạo), màng mạch máu, làm mặt nạ dưỡng da cho phụ nữ và nhiều ứng dụng khác nữa.

+ Sản xuất màng vi khuẩn (BC) và thạch dừa:

Thạch dừa là màng vi khuẩn loại dày, màng BC loại mỏng dùng làm da nhân tạo trong chữa bỏng và mặt nạ dưỡng da cho phụ nữ.

* Giống vi khuẩn dùng trong sản xuất:

• Vi khuẩn *Acetobacter xylium* được phân lập từ màng giấm trên dịch môi trường làm giấm khi nuôi tĩnh.

Tế bào vi khuẩn có hình que (trực khuẩn), đứng riêng rẽ hay xếp thành chuỗi, không di động, Gram âm (–). Các tế bào được bao bởi màng nhày, màng nhẵn và khá dai, màng này bắt màu xanh với dịch iot. Khi nuôi trên môi trường dinh dưỡng, giống này tích tụ được khoảng 4% axit axetic trong môi trường.

• *Acetobarter xylium* với men rượu lên men tạo ra một loại nước giải khát có vị chua và rượu nhẹ được nhiều người ưa thích. Nước giải khát gọi là "thuỷ hải sâm", người Trung Hoa gọi là "Hải bảo" hay "Vị bảo", ở Nga – "nấm chè".

• *Acetobacter xylium* cũng như các vi khuẩn axetic khác có nhu cầu dinh dưỡng và sinh trưởng khá phong phú. Các nguồn cacbon dinh dưỡng có thể là các loại đường, rượu etylic và các axit hữu cơ. Các nguồn nitơ là các muối amon, các nguồn chất sinh trưởng là các axit amin (izolơxin, alanin, prolin, valin,...), axit nicotinic, axit pantotenic, axit folic, biotin, nicotiamit,...

* pH thích hợp cho nuôi cấy *A. xylium* là 4,5 – 6,3, nồng độ rượu cao nhất là 10%, nhiệt độ thích hợp là 25 – 30°C, ở 37°C không tạo màng.

* Phân lập, giữ giống, nhân giống và lên men có thể dùng các môi trường sau:

• Môi trường phân lập:

Glucozơ	20g.
KH_2PO_4	2g.
$(NH_4)_2PO_4$	3g.
$MgSO_4.7H_2O$	2g.
Nước máy cho đủ	1.000ml.
Thạch	20g.
$CaCO_3$	7g.

Môi trường giữ giống không có $CaCO_3$.

Axetic: 2%, rượu etylic: 2% (bổ sung sau khi thanh trùng môi trường).

• Môi trường nhân giống:

Môi trường 1:

Glucozơ	20g.
KH_2PO_4	2g.
$(NH_4)_2PO_4$	3g.
$MgSO_4.7H_2O$	2g.
Pepton	6g
Nước máy cho đủ	1.000ml.

Axetic: 2%, rượu etylic: 2% (bổ sung sau khi thanh trùng môi trường).

Môi trường 2:

Saccarozơ	20g.
$(NH_4)_2PO_4$	8g.
NH_4HPO_4	2g.
Nước dừa cho đủ	1.000ml.

Nhân giống trên máy lắc 220 vòng/phút ở 30°C trong 24 giờ. Cấy giống vào lên men khoảng 10% (V/V).

• Môi trường lên men (bảng 8.2)

Bảng 8.2. Các môi trường lên men thu BC

Môi trường / Thành phần	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5
Glucozơ	20g	20g	0	20g	0
Saccarozơ	0	0	0	0	20g
$(NH_4)_2SO_4$	3g	3g	5g	4g	8g
KH_2PO_4	2g	2g	2g	1g	0
$(NH_4)_2HPO_4$	0	0	0	0	8
$NH_4H_2PO_4$	0	0	0	0	2
$MgSO_4.7H_2O$	2g	2g	0	0	0
Axit axetic	2%	2%	5ml	2,5ml	0
Rượu etylic	2%	2%	0	0	0
Cao nấm men	0	5g	3g	0	20g
Pepton	0	6g	2g	0	0
Nước mía	0	0	200ml	0	0
Nước dừa	0	0	0	1.000ml	1.000ml
Nước máy	1.000ml	1.000ml	800ml	0	pH = 4

* Lên men:

Len men được thực hiện khi đã tiếp giống từ dịch nhân giống, để tĩnh ở nhiệt độ 30°C, pH ban đầu 4 – 5. Sau 4 ngày trên môi trường 1 – 4 có thể thu được các loại màng mỏng. Sau 10 – 12 ngày với môi trường 5 thu được màng dày dùng làm các loại thạch dừa.

* Thành phẩm:

Thành phẩm là sản phẩm lên men có hai loại:

• Loại mỏng là màng vi khuẩn BC dùng làm da nhân tạo trong chữa bỏng và làm mặt nạ.

Độ dày của màng là 0,5 – 1mm được xử lý: Rửa bằng nước 3 lần nhằm loại bớt axit axetic; Đun sôi với NaOH 0,5% trong 30 phút cho màng có màu vàng sẫm; Trung hoà bằng nước chanh loãng: màu chuyển từ vàng sẫm sang trắng trong; Ngâm với NaOH 0,5N ở nhiệt độ phòng trong 12 phút. Lặp lại 3 lần: loại bỏ mùi; Trung hoà lại bằng nước chanh loãng: làm sạch, trắng trong, không mùi.

• Thạch dừa: loại màng dày. Sau khi lên men màng được lấy ra, rửa sạch. Năng suất có thể thu được 600 – 650g/l sinh khối tươi. Lớp màng này có màu trắng, ăn giòn và cứng, được cắt ra thành miếng rồi ngâm vào nước đường có thêm vị hoa quả để làm thạch dừa, thạch nhãn, thạch vải,... đóng vào lọ thuỷ tinh nút kín, tạo hình làm kẹo thạch trong các bao chất dẻo cứng.

8.3. LÊN MEN LACTIC

Axit lactic ($C_3H_6O_3$) được loài người sử dụng từ lâu trong bảo quản và chế biến thực phẩm. Song, đến thế kỷ XIX chúng ta mới biết rõ về axit lactic và tác nhân gây lên men lactic.

Nhà bác học Sheele (Thụy Điển) lần đầu (1780) đã tách được axit lactic từ sữa bò lên men bị chua và được gọi là "axit sữa". Năm 1857, Louis Pasteur đã chứng minh được rằng, việc lên men sữa là kết quả hoạt động của nhóm vi sinh vật đặc biệt gọi là vi khuẩn lactic. Từ đó đến nay, vi khuẩn lactic được nghiên cứu khá nhiều và các dạng lên men của các chủng vi khuẩn này được ứng dụng trong thực tiễn đời sống.

– Axit lactic có hai dạng đồng phân quang học: Axit D– và L–lactic. Cơ thể người chỉ hấp thu được dạng L–. Dạng đồng phân này thường được chọn trong chế biến thực phẩm như trong sản xuất phomat, thịt,... trong muối chua rau quả, trong bảo quản thức ăn xanh cho gia súc. Ngoài ra, axit lactic và các muối của nó còn được dùng trong dược phẩm, làm các chất tạo nhũ, trong mỹ phẩm, trong công nghiệp dệt, thuộc da–lông, ấn loát,...

– Ngày nay, axit lactic được sản xuất bằng hai phương pháp:

+ Tổng hợp hoá học cho sản phẩm chủ yếu là hỗn hợp hai dạng D, L. Tỷ lệ sản phẩm hàng hoá đạt tới 50%.

+ Lên men nhờ các nguồn vi khuẩn đường, vi khuẩn lactic:

Sản phẩm của phương pháp này chủ yếu ở dạng L(+), song vẫn có thể lẫn dạng D(–). Vì vậy, muốn tách dạng đồng phân tinh khiết cần phải xử lý với một vài vấn đề kỹ thuật màng thẩm tích, hấp phụ qua nhựa trao đổi ion,...

Những dạng đơn đồng phân tinh khiết của axit lactic có thể polyme thành các vật liệu tổng hợp chế các bao bì, cốc chén tự phân huỷ trong thời gian ngắn. Với tính ưu việt này, axit lactic ngày nay được quan tâm nhiều, giúp cho lĩnh vực giải quyết được các bao gói bằng chất dẻo nhân tạo cho đến nay rất khó phân huỷ.

8.3.1. Tác nhân lên men lactic

a) Khái quát chung

– Tác nhân lên men lactic là vi khuẩn lactic. Tế bào của chúng hình cầu (hoặc hình hơi oval) và hình que. Đường kính của dạng cầu khuẩn là 0,5 – 1,5μm. Cầu khuẩn đứng riêng rẽ, cặp đôi hoặc chuỗi (*Streptococcus*) có chiều dài khác nhau. Kích thước dạng hình que từ 1 đến 8μm. Các tế bào trực khuẩn đứng riêng rẽ hoặc kết thành chuỗi.

Tất cả các vi khuẩn lactic đều không chuyển động, không tạo thành bào tử, Gram dương (+), kỵ khí tuỳ tiện (kỵ khí và vi hiếu khí). Trực khuẩn lactic nhạy cảm hơn các cầu khuẩn với oxy (độ hiếu khí của môi trường).

– Vi khuẩn lactic có thể lên men được mono – và disaccarit. Song, không phải disaccarit nào cũng được tất cả vi khuẩn lactic sử dụng. Một số chủng không lên men được saccarozơ, số khác là maltozơ, số khác nữa là lactozơ. Tinh bột và các polysaccarit khác, các vi khuẩn lactic không lên men được. Trong vi khuẩn lactic, có một số chủng mà chủ yếu là các chủng dị hình sử dụng được pentozơ và axit xitric.

– Các chủng vi khuẩn lactic khác nhau tạo thành lượng axit lactic trong môi trường là khác nhau. Bản thân các chủng này có tính nhạy cảm đối với sản phẩm tạo ra. Đa số các chủng trực khuẩn (*Lactobacillus)* lên men đồng hình có khả năng tạo axit vượt trội so với *Streptococcus* (ở *Lactobacillus* có thể tạo ra 2 – 3,5% axit lactic, ở *Streptococcus* khoảng 1%). Loài trực khuẩn có thể phát triển ở pH 3,8– 4, dạng hình cầu không thể phát triển ở pH này. pH tối thích cho trực khuẩn lên men là 5,5 – 6.

– Phần lớn vi khuẩn lactic, đặc biệt là những chủng trực khuẩn lên men đồng hình, có nhu cầu lớn về tập hợp các axit amin hoặc các hợp chất nitơ hữu cơ có cấu tạo phức tạp hơn có trong môi trường. Trên môi trường chỉ có nguồn nitơ vô cơ chúng phát triển rất kém. Hầu hết vi khuẩn lactic đều có nhu cầu các vitamin (trong đó có B_1, B_2, B_6, PP, axit pantotenic và folic). Như vậy, vi khuẩn lactic cần được nuôi trên những môi trường dinh dưỡng phức tạp.

– Vi khuẩn lactic có hoạt tính protelytic: chúng có thể phân huỷ protein của sữa thành peptit và các axit amin, nhưng khả năng này ở các chủng khác nhau là không giống nhau. Các chủng trực khuẩn thường có hoạt tính protelytic cao hơn ở các loài khác.

– Các tế bào vi khuẩn lactic dễ chuyển sang dạng khô héo, bền vững với CO_2 và rượu etylic. Nhiều loài có thể sống ở môi trường có 10 – 15% cồn hoặc cao hơn, một số trực khuẩn chịu được nồng độ muối cao (7 – 10%).

– Một số chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh màng nhày là các polysaccarit hay còn gọi là polyme sinh học, một số khác sinh bacterioxin – hợp chất có hoạt tính kháng sinh, chất đại diện và được dùng trong bảo quản thực phẩm là nizin. Người ta đã xác định tính năng ức chế các vi khuẩn gây thối và vi khuẩn gây bệnh của vi khuẩn lactic là khả năng tạo axit xuống pH dưới 4,5 kết hợp với khả năng sinh bacterioxin kháng khuẩn.

– Vi khuẩn lactic phổ biến rất rộng rãi trong tự nhiên: Thường thấy ở thực vật, trong đất, thực phẩm (rau quả, thịt, sữa,...). Trong đường ruột của người và động vật có một lượng lớn vi khuẩn này. Dạng hình cầu ở trong ruột được gọi là *Enterococcus* (*Streptococcus faecalis*).

– Đa số vi khuẩn lactic thuộc dạng ưa ấm – nhiệt độ tối thích là 25 – 35°C, một số khác ưa nhiệt – nhiệt độ tối thích khoảng 40 – 45°C. Song, cũng có chủng ưa lạnh (phát triển được ở 5°C hoặc thấp hơn) hoặc chịu nhiệt (tới 60 – 80°C mới bị chết).

Sau đây giới thiệu một số loài vi khuẩn lactic đại diện, có nhiều ý nghĩa trong kỹ thuật và đời sống.

b) Các chủng lên men đồng hình

1) Streptococcus lactis – hình cầu, kết đôi hoặc chuỗi ngắn, ưa ấm, nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng là 30 – 35°C, các điều kiện này làm sữa đông tụ sau 10 – 12 giờ. Trong môi trường tích tụ được 1% axit lactic. Nhiệt độ tối thiểu là 10°C, tối đa 40 – 45°C. Một vài chủng sinh tổng hợp nizin. *Str. lactis* được sử dụng rộng rãi

trong chế biến các sản phẩm sữa chua, bơ chua, phomat. Chúng làm đông tụ sữa thành các hạt đặc, nhẵn.

2) Str. cremosis – hình cầu, kết thành chuỗi dài, ưa ấm, tạo thành ít axit. Khoảng nhiệt độ sinh trưởng là 10°C tới 36 – 38°C, thích hợp là 25°C. Dùng trong giống khởi động với các *Streptococcus* khác. Một số chủng sinh bacterioxin: diplococxin.

3) Str. termophilus – Chuỗi hình cầu dài, phát triển mạnh ở 40 – 45°C. Tích tụ trong môi trưởng khoảng 1% axit, được sử dụng cùng với *Lactobacillus* trong chế biến sữa chua và phomat.

4) Lactobacillus bulgaricus – hình que lớn (đôi khi là dạng hạt), thường kết chuỗi dài. Không lên men saccarozơ. Vi khuẩn ưa nhiệt, nhiệt độ thích hợp cho phát triển là 40 – 45°C, tối thích 15 – 20°C. Tạo nhiều axit, tích tụ trong sữa tới 2,5 – 3,5% axit lactic, được dùng trong sản xuất sữa chua Địa Trung Hải, Cumic.

5) L. casei hay gặp ở dạng chuỗi dài ngắn khác nhau, tích tụ được 1,5% axit trong môi trường. Nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng là 30 – 35°C. Trực khuẩn này được dùng trong việc làm phomat.

6) L. acidophilus – Vi khuẩn ưa nhiệt, nhiệt độ tối thiểu 20°C, nhiệt độ thích hợp 30 – 40°C. Trong sữa, trực khuẩn này tích tụ tới 2,2% axit. Sinh bacterioxin, ức chế vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Một số chủng sinh màng nhày, *L.acidophilus* được dùng sản xuất các sản phẩm sữa acidophin.

7) L. delbrueckii – Trực khuẩn ưa nhiệt, đứng riêng rẽ hoặc kết thành chuỗi dài, ngắn. Không lên men lactozơ, vì vậy nó không thấy có mặt trong sữa. Nhiệt độ cho phát triển: tối thiểu 20°C, thích hợp 45 – 50°C. Trong cơ chất, nó tạo được 2,5% axit. Được sử dụng trong sản xuất bánh mỳ và sản xuất axit lactic.

8) L. plantarium – Trực khuẩn không lớn, kết đôi hoặc thành chuỗi. Nhiệt độ tối thích là 30°C, tích tụ được 1,3% axit. Dùng cho muối chua rau quả và ủ chua thức ăn xanh cho gia súc.

c) Vi khuẩn lactic lên men dị hình

1) Lactobacillus brevis (tên cũ là *L. brassica fermenti):* Thấy có mặt chủ yếu trong dưa chua bắp cải và dưa chuột. Lên men được saccarozơ và tích tụ được 1,2% axit lactic. Ngoài ra còn thấy axit axetic, rượu etylic, CO_2. Trực khuẩn này làm rau quả muối chua có mùi vị dễ chịu.

2) Streptococcus diacetilactis, Str. citrovorus,...: Sản phẩm tạo ra của các loài này ngoài axit lactic và CO_2 còn có các chất tạo mùi (este, diaxetyl,...). Nhiệt độ thích hợp cho phát triển của các vi khuẩn này là 25 – 30°C. Chúng có khả năng lên men được muối của axit xitric.

8.3.2. Cơ chế lên men lactic

Lên men lactic là sự chuyển hoá kỵ khí đường thành axit lactic nhờ nhóm vi khuẩn được gọi là vi khuẩn lactic (được giới thiệu ở phần trên).

– Có hai dạng lên men lactic: lên men đồng hình (homofermetation) và lên men dị hình (heterofermentation).

Lên men đồng hình (còn gọi là lên men điển hình) cho sản phẩm chủ yếu là axit lactic (80 – 90%) và rất nhỏ các sản phẩm phụ khác.

$$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHOHCOOH$$

(Glucozơ) (Axit lactic)

Lên men dị hình (còn gọi là lên men không điển hình) cho sản phẩm chính là axit lactic cùng số lượng khá lớn những sản phẩm phụ khác (trước hết là axit axetic, sau đó là rượu etylic, CO_2 và có thể có axetoin ($CH_3CHOHCOCH_3$), diaxetyl ($CH_3COCOCH_3$). Diaxetyl có mùi dễ chịu, vì vậy, với những liều lượng được tạo thành thích hợp sẽ làm cho sản phẩm có những mùi thơm đặc trưng.

– Tương ứng với hai dạng lên men ta có hai nhóm vi khuẩn lactic: *Nhóm vi khuẩn lên men đồng hình* và *nhóm vi khuẩn lên men dị hình*. Phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, pH, độ thông khí,...) đặc tính sinh ra sản phẩm của nhóm này có thể chuyển sang nhóm kia. Vì vậy, không nên phân định ranh giới chặt chẽ giữa 2 nhóm vi khuẩn lactic.

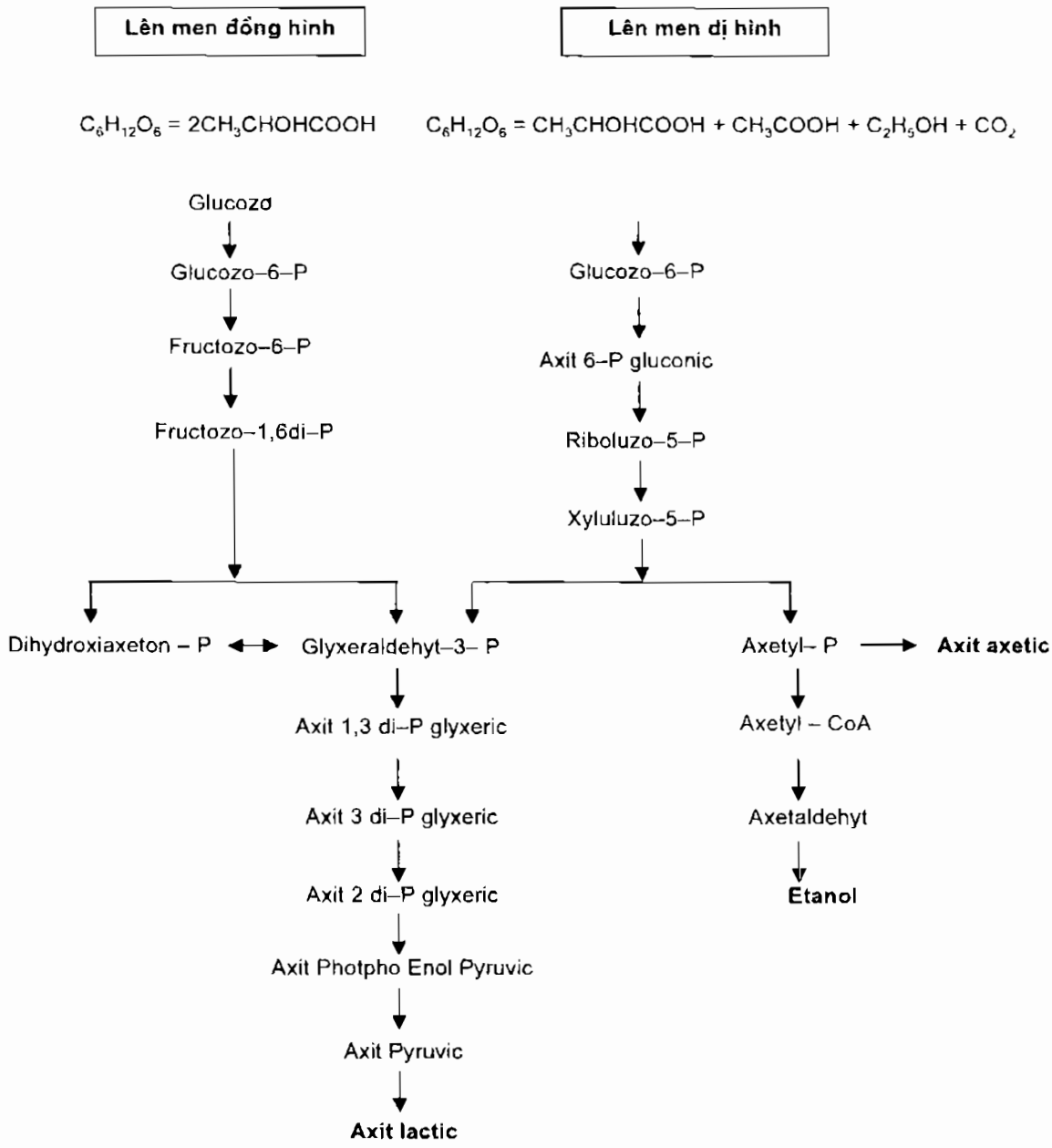
+ Quá trình chuyển hoá glucozơ đến axit pyruvic ($CH_3COCOOH$) ở vi khuẩn lactic đồng hình xảy ra như ở các vi khuẩn kỵ khí khác, cũng như ở nấm men rượu đều theo con đường đường phân (glycoliz). Tiếp theo, ở những vi khuẩn này không có enzyme pyruvatdecacboxylaza, axit pyruvic không bị phân giải mà lại là chất cuối cùng nhận điện tử (H^+). Axit pyruvic tác dụng tương tác với $NADH_2$ thành chất nhận điện tử tạm thời được tách ra trong oxy hoá photphoglyxerinaldehyt thành axit photphoglyxerinic.

Như vậy, axit pyruvic được khử thành axit lactic, $NADH_2$ bị oxy hoá về NAD. Phản ứng oxy hoá – khử này được xúc tác bởi enzyme lacticodehydrogenaza và có thể biểu thị ở phương trình:

$$CH_3COCOOH + NADH_2 = CH_3CHOHCOOH + NAD$$

+ Sự biến đổi glucozơ ở vi khuẩn lên men dị hình xảy ra khác với ở vi khuẩn lên men đồng hình. Ở vi khuẩn dị hình không có enzyme aldolaza làm thay đổi con đường chuyển hoá đầu tiên của glucozơ. Sau khi photphoryl, đường bị oxy hoá (lấy mất điện tử H^+) và bị khử CO_2 (decacboxyl) rồi đi vào con đường pentozophotphat. Cuối cùng, enzyme photphoxetalaza tham gia vào biến đổi thành aldehytphotphoglyxerin. Chất này cũng giống như ở vi khuẩn lên men đồng hình được chuyển hoá thành axit pyruvic. Sau đó lại được khử tiếp thành axit lactic. Axetylphotphat bị khử photphoryl (dephotphoryl) thành axit axetic hoặc khử thành rượu etylic (qua aldehyt axetic). Chất nhận điện tử cuối cùng theo con đường này là axit pyruvic và aldehyt axetic.

Sự chuyển hoá glucozơ trong tế bào vi khuẩn lactic được giới thiệu theo sơ đồ (hình 8.7).



Hình 8.7. Sơ đồ quá trình lên men đường glucozơ ở vi khuẩn lactic

8.3.3. Sản xuất axit lactic bằng phương pháp lên men

– Axit lactic $C_3H_8O_3$ tồn tại ở hai dạng: axit α – oxypropionic hay etylactic $CH_3CHOHCOOH$ và β – oxypropionic hay là etylenlactic CH_2OHCH_2COOH. Trong đó axit etylenlactic được tạo thành trong lên men có ý nghĩa công nghiệp.

– Axit lactic là hợp chất hoá học không bền vững. Phụ thuộc vào điều kiện sản xuất và bảo quản nó dễ bị lấy mất nước và tạo thành sản phẩm dehydrat hoá và được gọi tên là anhydrit của axit lactic. Axit lactic thương phẩm là dung dịch

nước của axit etylidenlactic hỗn hợp với anhydrit lactic (phần này không chuẩn độ trực tiếp được). Sản phẩm hàng hoá có hai nồng độ: 40 và 70% axit lactic. Loại 40% là chất lỏng trong suốt, không màu, màu vàng hoặc vàng nâu. Loại 70% là dạng sệt (past).

– Nguyên liệu sản xuất lên men lactic có thể là dịch đường tinh chế, rỉ đường mía, rỉ đường củ cải, dịch thuỷ phân từ tinh bột, đường saccarozơ, glucozơ và tinh bột.

– Sản xuất axit lactic gồm các công đoạn sau: Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng nuôi cấy vi khuẩn lactic; nhân giống và cấy giống vào môi trường lên men – lên men; tạo canxi lactat và thu nhận axit lactic.

+ Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng người ta thường dùng 75% dịch đường tinh chế và 25% rỉ đường. Pha loãng bằng nước sạch, khử màu bằng than hoạt tính, axit hoá bằng H_2SO_4, đun nóng tới 90 – 95°C và giữ ở nhiệt độ này trong 1 giờ để chuyển hoá saccarozơ thành đường khan. Để tăng thêm dinh dưỡng, người ta có thể bổ sung nước chiết mầm malt và trung hoà bằng $CaCO_3$ bột và sữa vôi tới pH = 6,3 – 6,5, sau đó còn bổ sung $CaCO_3$ để tạo thành canxi lactat (axit lactic sinh ra trong quá trình lên men). Môi trường dinh dưỡng trước khi cấy giống thuần chủng cần phải thanh trùng như sau: gia nhiệt môi trường tới 70°C, giữ ở nhiệt độ này trong 60 – 90 phút, làm nguội tới 50°C và cấy giống vi khuẩn lactic.

+ Giống sản xuất là *Lactobaccillus delbrueckii* (tên cũ là *Thermobacterium cereale*): Một loài ưa nhiệt, không lên men được lactozơ.

+ Lên men tiến hành trong các thùng lên men ở nhiệt độ 50°C khoảng 7 – 10 ngày. Axit lactic tạo thành trong quá trình lên men được trung hoà bằng $CaCO_3$ ở dạng bột mịn hoặc hoà với nước cho vào thùng lên men 3 – 4 lần trong một ngày đêm. Kết quả là canxi lactat được tạo thành:

$$2\ CH_3CHOHCOOH + CaCO_3 = Ca(CH_3CHOHCOO) + CO_2 + H_2O$$

(canxi lactat)

Người ta thực hiện lên men theo từng mẻ và cũng có thể lên men liên tục ở một dãy thùng lên men kế tiếp nhau. Dịch lên men có giống phát triển được chuyền liên tục từ thùng nọ sang thùng kia với chế độ công nghệ thích hợp cho thời gian rút ngắn được 1/2 so với lên men từng mẻ.

+ Sau khi kết thúc, dịch lên men được gia nhiệt tới 80 – 90°C, dùng vôi tôi để lắng cặn sắt và những tạp chất khác, rồi để yên khoảng 3 – 5 giờ. Trong cặn lắng có $CaCO_3$ dư và những phần tử khác lẫn vào. Sau khi lắng cặn, dịch được đem lọc. Dịch lọc thu được có chứa canxi lactat đưa vào thùng kết tinh. Ở đây dịch được làm lạnh và tinh thể lactat canxi hình thành. Để thu được axit lactic từ canxi lactat, người ta dùng axit sunphuric phá các tinh thể lactat, và giải phóng axit lactic ra khỏi $CaSO_4$.

$$(CH_3COCOOHCOO)_2Ca + H_2SO_4 = 2CH_3CHOHCOOH + CaSO_4$$

(axit lactic)

Dịch axit lactic sau khi lọc loại bỏ $CaSO_4$ còn lẫn sắt và các tạp chất, màu xấu. Ta có thể loại sắt bằng kali feroxyanua $K_4[Fe(CN)_6]$, khử màu bằng than hoạt tính giống như tinh thể axit xitric. Sau khi loại bỏ các tạp chất, dịch lọc có khoảng 18 – 20% axit lactic tiếp tục được đưa vào cô chân không tới 40% rồi xử lý tiếp đưa đến nồng độ 70%.

8.3.4. Ứng dụng lên men lactic và vi khuẩn lactic trong đời sống

8.3.4.1. Sản xuất sinh khối vi khuẩn lactic

– Từ lâu trong ngành công nghiệp sữa người ta đã dùng vi khuẩn lactic với các giống thuần chủng hoặc hỗn hợp trong chế biến phomat, sữa chua,... Người ta còn áp dụng cách này cho chế biến thịt, đặc biệt là xúc xích thô – chua, các sản phẩm thịt ướp muối,... Các vi khuẩn được cấy vào thực phẩm và sản phẩm thu được trong đó có quá trình lên men lactic.

– Vi khuẩn lactic được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp sữa, công nghiệp thực phẩm, trong nông nghiệp và thú y, y tế. Những loài vi khuẩn được sử dụng nhiều hơn cả được giới thiệu ở bảng 8.3.

Bảng 8.3. Các loài vi khuẩn lactic được sử dụng trong thực tế sản xuất

Sản phẩm	Giống hoặc hỗn hợp
Công nghiệp sữa	
Váng sữa	*Streptococcus lactic, S. cremosis, S. diacetilatis*
Sữa đông tụ	*S. lactis, S. diacetilatis, S. acetoinicus*
Sữa chua	*S. diacetilatis, S. acetoinicus, S. diacetilius*
Phomat	*Streptococcus lactic, S. cremosis, S acetoinicus, S. paracitrovosus, Lactobacillus, plantarum, L. casei*
Sữa acidophin và sữa dạng nhão	*Lactobacillus acidophitus, L. fermenti*
Công nghiệp bánh mỳ	
Bánh mỳ trắng và bánh mỳ đen	*Lactobacillus lactic, L.delbruekii, L. planterum, L. brevis*
Trong chăn nuôi	
Ủ silo thức ăn chăn nuôi	*Lactobacillius, Streptococcus lactic, diustaticus*

– Trong thực tế người ta sản xuất một số lượng lớn sinh khối vi khuẩn lactic từ một giống thuần chủng hoặc hỗn hợp vài chủng để làm giống sản xuất phục vụ cho các xí nghiệp công nghiệp cần đến các giống này. Ở Nga, loại giống vi khuẩn lactic như vậy được gọi là giống gây men sữa.

– Sinh khối vi khuẩn lactic được sản xuất ở các phòng thí nghiệm với 2 dạng sản phẩm: lỏng và khô.

– Giống thuần chủng được nuôi ở môi trường nhân giống (hay là môi trường sản xuất giống). Môi trường này giàu dinh dưỡng, tốt nhất là dùng sữa đã tách chất béo được bổ sung sữa bột để có chất khô là 16% và 0,2% natri xitrat. Như vậy, môi trường rất thích hợp cho vi khuẩn lactic sinh trưởng và thuận lợi cho việc sấy thành phẩm.

– Vi khuẩn lactic nói chung nhạy cảm với thực khuẩn thể (bacteriphage). Đã tìm thấy ở tất cả các giống thuộc liên cầu khuẩn (*Streptococcus*) và nhiều loài trực khuẩn (*Lactobacillus*) có thực khuẩn thể. Vì vậy, cần phải bổ sung natri xitrat vào môi trường nuôi cấy để ngăn ngừa thực khuẩn thể.

– Quá trình nuôi để tĩnh (không hiếu khí) ở 30°C khoảng 12 – 16 giờ đối với liên cầu khuẩn và ở 40°C trong 6 giờ đối với trực khuẩn lactic. Dịch nuôi cấy thường có khoảng $1,0 \times 10^9 - 2,0 \times 10^9$ tế bào/ml. Sau khi nuôi cấy, nếu không có yêu cầu dùng ở dạng đặc, hoặc khô và không cần giữ lâu thì có thể dùng cả dịch nuôi cấy, trong đó gồm sinh khối vi khuẩn và thành phần của môi trường còn lại. Trung hoà dịch nuôi cấy bằng xút 20% tới pH ban đầu của sữa thanh trùng.

Từ chế phẩm dạng lỏng này ta có thể tách sinh khối để thu được chế phẩm dạng nhão (past) hoặc đặc. Thời điểm thu sinh khối tốt nhất là ở đầu pha sinh trưởng ổn định. Ở thời điểm này, vi khuẩn có khả năng phát triển tốt và hoạt tính sinh lý cao.

Để có sản phẩm ở dạng nhão (past) có tới 127 – 500 tỷ tế bào/g đối với liên cầu khuẩn và 52 – 100 tỷ tế bào đối với trực khuẩn ta đem dịch qua ly tâm bằng máy siêu ly tâm 20.000 vòng/phút hoặc máy ly tâm đĩa (seperator) 15.000 vòng/phút.

Dạng chế phẩm nhão này có độ ẩm 70 – 72%, pH thích hợp cho sinh khối liên cầu khuẩn là 5 – 5,2, cho trực khuẩn axidophin là 4,5 – 4,7. Chế phẩm này được bảo quản ở 4 – 6°C. Có thể thêm 0,0003% kali bromua vào chế phẩm để bảo quản được tốt hơn. Dạng nhão này không giữ được lâu. Muốn giữ được lâu ta phải bảo quản ở điều kiện lạnh đông hoặc đem sấy.

Dịch giống sau khi trung hoà tới pH ban đầu của sữa thanh trùng đem sấy bằng máy sấy phun với nhiệt độ của không khí đầu vào là 130 – 140°C và ở vùng phun mù nhiệt độ không quá 48 – 50°C. Sản phẩm thu được là dạng bột có độ ẩm là 5 – 7%. Độ sống sót của liên cầu khuẩn trong khi sấy là 18 – 33%, còn trực khuẩn axidophin là 7 – 8%. Chế phẩm dạng bột được đựng trong các lọ nút kín (hoặc bao túi kín) tránh bị ẩm, giữ ở nơi thoáng mát.

Để ủ silo thức ăn chăn nuôi là các loại cỏ thân cây xanh, bã củ cải đường (có thể là bã mía),... ta dùng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum.* Giống vi khuẩn được nuôi giống trên môi trường rỉ đường, đem phun lên khối cây cỏ, rơm, thân cây,... rồi cho vào các hố sâu nén chặt theo từng lớp. Cuối cùng lấp kín bằng đất. Ủ chua thức ăn nhờ hoạt động của vi khuẩn lactic. Khi mùa đông giá lạnh hoặc mùa khô, các cây cỏ bị chết hoặc ít, lấy thức ăn ủ chua này cho gia súc ăn. Đây là cách để dành thức ăn chăn nuôi trong mùa khô.

8.3.4.2. Muối chua rau, quả

Rau cải và bắp cải, dưa chuột và cà thường được muối chua. Đây là những món ăn dân dã, nhưng được mọi người ưa thích. Đây cũng là một biện pháp công nghệ khá đơn giản, nhưng hiệu quả khá cao: bảo quản được nguồn thức ăn xanh và chế

biến ra một thứ sản phẩm giữ được gần như nguyên giá trị dinh dưỡng. Một trong những loại rau quả muối chua là Kim chi của xứ Hàn Quốc hầu như nổi tiếng khắp thế giới. Muối rau dưa còn là biện pháp hữu hiệu giữ thức ăn cho mùa đông băng giá ở những nước xứ lạnh và cất giữ thức ăn xanh cho đại gia súc trong mùa đông hanh khô.

Muối chua rau, quả dựa trên cơ sở hoạt động của vi khuẩn lactic biến đường trong rau, quả thành axit lactic. Ở đây có bổ sung muối và lên men liên quan rất chặt chẽ. Muối có tác dụng làm thay đổi áp suất thẩm thấu, chiết rút các chất tan trong dịch của tế bào rau, quả vào dịch muối để lên men. Trong quá trình muối dưa, vi khuẩn lactic có sẵn trên rau, quả hoặc rơi vào từ không khí, ngoài đồng ruộng, từ dụng cụ chứa đựng,... sẽ sinh trưởng và phát triển, đồng thời sinh ra axit lactic làm pH xuống thấp hơn 4,5 (nhiều khi nhỏ hơn 4). Đó là tác nhân giữ cho rau, quả có độ cứng vừa phải, không bị thối, thậm chí sản phẩm có vị chua, giòn, có mùi vị thơm chua đặc trưng. Sản phẩm lên men chính là axit lactic, ngoài ra còn có một lượng nhỏ axit bay hơi cùng rượu etylic và những chất khác. Chính các sản phẩm phụ này tạo ra các mùi riêng biệt cho sản phẩm.

Công nghệ muối chua rau, quả:

Muối chua rau, quả ở nhiều nơi thường thực hiện ở gia đình hoặc tập thể với quy mô nhỏ. Quá trình lên men lactic ở đây là quá trình tự phát, trong đó vi khuẩn lactic đồng hình cũng như dị hình có sẵn ở rau, quả chuyển hoá một lượng đường nhỏ có trong rau, quả thành axit lactic, có thể có những axit khác, rượu và CO_2. Sản phẩm là rau, quả có vị chua, mùi thơm đặc trưng, có lượng calo thấp, hàm lượng chất xơ cao, nhiều vitamin và chất khoáng và hầu như không có chất béo. Ngày nay ở nhiều nước, đặc biệt là xứ lạnh đã tiến hành muối dưa ở quy mô công nghiệp.

– Nguyên liệu: Rau cải bẹ, rau cải cây lớn, bắp cải loại bánh tẻ (đến tuổi trưởng thành không còn non và đừng quá già), rửa sạch, làm vệ sinh dụng cụ chứa đựng và đồng thời cũng chuẩn bị nước và muối ăn, có thể thêm đường kính. Bắp cải bỏ lá già bên ngoài và phần lõi. Rau, quả thái thành miếng, mảnh hoặc để nguyên đem muối.

Xếp rau thành từng lớp, rắc muối, lớp trên cùng và lớp cuối là muối. Tổng lượng muối vào khoảng 2 – 4,0% so với khối nguyên liệu. Hoặc có thể hoà muối, lọc sạch, rồi đổ nước muối vào ngập khối nguyên liệu. Để tăng độ axit hoá khối dưa, có thể thêm 1% đường kính hoặc đường cát vàng. Nước muối tạo điều kiện cho tế bào rau cứng và tiết dịch bào ra ngoài, cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn lactic phát triển.

Lên men đạt hiệu quả tốt ở điều kiện kỵ khí, vì vậy khối nguyên liệu cần được nén chặt. Không nên dùng những cục đá xanh (đá vôi) vào công việc này, vì đã có $CaCO_3$ sẽ tác dụng với axit lactic thành canxi xitrat có mùi vị khó chịu.

– Quá trình muối chua có thể chia thành 3 giai đoạn:

Giai đoạn đầu vi khuẩn lactic cùng với tạp khuẩn phát triển. Vi khuẩn lactic ở

giai đoạn này chủ yếu là các chủng thuộc loài *Leuconostoc mesentervides* (cầu khuẩn dị hình) bắt đầu lên men và sau vài giờ thì sinh axit. Lượng axit ở giai đoạn này chỉ đạt được 0,7 – 1,0% rồi các loài vi khuẩn, trong đó có *L. mesentervides* bị chết. Sau đó khối rau chuyển sang giai đoạn hai: lên men chính.

Ở giai đoạn hai chỉ có vi khuẩn lactic hoạt động mạnh mẽ nhất vì lượng axit được tích tụ nhiều nhất. Trong thời gian này ta thấy ở trong rau dưa có *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus brevis* (có tài liệu ghi là *Lactobacillus brassciaefermentati*) phát triển và nâng lượng axit trong nước dưa tới 1,5 – 2,0%. Cuối cùng là các loài *Lactobacillus sake* và *curvatus* kết thúc quá trình lên men và độ axit có thể tới 2 – 2,5%.

Giai đoạn thứ ba có thể xảy ra: các vi khuẩn lactic bị chính sản phẩm của mình sinh ra ức chế sinh trưởng và dần bị chết. Nếu trên bề mặt dưa thấy có váng, nghĩa là nấm mốc và nấm men phát triển, chúng tiêu hoá axit lactic làm dưa giảm chua, tạo điều kiện cho các vi khuẩn hoại sinh phát triển làm hư hỏng dưa.

– Thời gian muối dưa ở 20°C khoảng 10 – 12 ngày, ở 25°C khoảng 4 – 5 ngày. Ở 30°C – 2 ngày. Quá trình lên men bị chậm lại khi lượng axit lactic đạt 1,4 – 2,0% và ngừng lại ở 2,5%. Trong quá trình lên men thường có bọt khí CO_2 nổi lên bề mặt dưa. Ở bọt này có nhiều vi khuẩn gây hại, cho nên cần phải vớt bọt bằng vợt sạch.

– Đối với quả, công việc muối chua có những điểm khác với muối rau, đặc biệt ở khâu xử lý nguyên liệu. Đối với cà pháo để nguyên quả, sau khi rửa sạch có thể đem muối thẳng như rau hoặc đem xử lý qua nhiệt: nhúng quả cà vào nước nóng 80°C trong khoảng 45 giây. Xử lý qua nhiệt sẽ diệt được những enzyme oxy hoá ở vỏ quả, trong quá trình muối chua, vỏ quả cà pháo sẽ trắng đẹp và kết hợp với độ chua thích hợp, cà muối sẽ giòn, thơm ngon.

Đối với cà bát, sau khi bỏ cuống và hệ cuống, rửa sạch và cắt khía mặt trên của quả cà thành hình chữ thập, xếp cà vào chum vại, mỗi quả rắc ít muối vào vết cắt chữ thập.

Dùng dưa chuột để muối là những quả còn non. Sau khi thu hoạch nên sớm đưa dưa vào muối chua ngay. Dưa chuột được muối trong các lọ thuỷ tinh, chum vại sành hoặc thùng gỗ. Dưa sau khi rửa sạch ngâm vào dung dịch nước muối 6 – 10% và 1% đường. *Chú ý:* dưa phải giữ chìm trong dịch. Nồng độ muối ở dịch giảm dần và điều chỉnh tới 4% để ức chế vi khuẩn gây thối.

– Quá trình lên men lactic ở quả muối chua giống như trong rau dưa. Các vi khuẩn thấy có trong muối chua quả là *Luconostoc mesencovides, Pedicoccus cerevisiae, Lactobacillus brevis* và *L. plantarum.* Trong số này *Lactobacillus plantarum* – vi khuẩn lên men đồng hình, các loài khác – dị hình. Vai trò tạo axit chủ yếu là *L. plantarum,* các loài dị hình sinh ra sản phẩm phụ tạo mùi vị thích ứng cho sản phẩm.

– Trong lên men rau, quả, đặc biệt có sinh ra rượu etylic và các axit bay hơi. Este của các hợp chất này tạo ra các hương vị khác nhau.

– Người ta cũng đã nghiên cứu sử dụng giống vi khuẩn lactic thuần chủng trong muối rau dưa, song có thể rút ngắn được thời gian, nhưng mùi vị không bằng lên men tự nhiên. Vì vậy, nếu dùng giống thuần chủng làm "giống khởi động" cho muối rau dưa nên dùng một hỗn hợp giống gồm có giống chủ lực là vi khuẩn lên men đồng hình, các giống dị hình thích hợp và sinh trưởng tốt ở dịch chiết các loại rau quả nguyên liệu. Như vậy, vừa rút ngắn được thời gian lên men và cải thiện được hương vị sản phẩm.

Có công trình nghiên cứu xác định rằng, trong quá trình muối dưa có nấm men tham gia tích tụ tới 0,5 – 0,8% rượu etylic. Nhờ vậy, các este phức tạp được tạo thành, làm cho dưa có mùi thơm. Song, cũng cần hạn chế nấm men phát triển không được nhiều quá: tế bào nấm men so với vi khuẩn là 1 : 80 – 1 : 30.

Sau khi lên men kết thúc, dịch lên men có cặn trắng ngà. Đó chính là sinh khối vi khuẩn lactic. Sau mỗi mẻ lên men cho chất lượng sản phẩm cao, có thể dùng "cặn men lactic" này làm giống khởi động (start cultur) cho mẻ sau là rất tốt.

8.3.5. Sữa chua

Sữa chua là sản phẩm từ sữa bò, sữa cừu, sữa dê hoặc sữa ngựa được chế biến bằng phương pháp lên men lactic với các tên gọi khác nhau. Sữa chua đã được con người sử dụng từ hàng ngàn năm, có nguồn gốc từ vùng núi Capcaz. Ở đây sản phẩm sữa được lên men trong các túi làm từ da động vật. Đến nửa cuối thế kỷ XIX, sản phẩm này được du nhập từ Đông và Trung Âu, tới nay đã phổ biến ra toàn thế giới.

Quá trình lên men đã chuyển hoá lactozơ thành axit lactic, pH thấp có tác dụng khống chế sự phát triển của vi khuẩn gây thối rữa và các vi khuẩn khác, trong đó có vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Sữa chua có giá trị dinh dưỡng cao do các chất dinh dưỡng đã chuyển hoá tới dạng cơ thể dễ hấp thụ. Ngoài các chất dinh dưỡng như protein, lipit, gluxit, trong sữa chua còn đầy đủ các vitamin, có các chất kháng thể có ý nghĩa trong điều trị một số bệnh.

pH của sữa chua thấp, ngoài tác dụng ức chế các vi khuẩn gây hại còn có tác dụng làm phần lớn các cazein đông tụ, một phần nhỏ cazein sử dụng, các vitamin không những được bảo toàn mà còn được tăng thêm so với vi sinh vật sinh ra. Cazein trong sữa dưới dạng canxi cazeinat khi tác dụng với axit lactic sẽ tạo ra axit cazeinic và canxi lactat. Axit cazeinic tự do không hoà tan do đó dễ tạo thành các cục đông. Các hợp chất dễ tiêu hoá và còn cung cấp nguồn canxi rất tốt cho cơ thể.

Các giống vi khuẩn sản xuất sữa chua chủ yếu là các chủng thuộc loài *Streptococus lactis, S. cremoris, S. thermophilus, Lactobacillus acidophilus* – các chủng lên men đồng hình và thuộc các loài *S. diacetylactis, Leuconostoc citrovorum* – các chủng dị hình có khả năng tạo thành chất thơm.

Các chủng này phối hợp với nhau theo yêu cầu về thành phần và các chủng khác nhau và mỗi một giống hỗn hợp này dùng cho sản xuất một sản phẩm tương ứng và có những đặc điểm riêng biệt.

Sản phẩm sữa chua trên thị trường có các loại sữa yaourt, sữa Kefir, sữa axidophin, sữa chua từ sữa ngựa kumic,... Chủ yếu là hai loại yaourt và kefir.

a) Giống sữa chua

Giống sữa chua là hỗn hợp vài ba chủng vi khuẩn lactic được dùng trong sản xuất sữa chua, riêng sữa kefir là hỗn hợp nhiều chủng vi khuẩn và nấm men rượu trong một sản phẩm dạng hạt (gel).

Giống sữa chua (chủ yếu là sữa yaourt) gồm có các chủng sau (bảng 8.4).

Hỗn hợp chủng làm chủng khởi động có thể có một vài chủng lên men đồng hình (chủ yếu là axit lactic) và lên men dị hình (sinh axit lactic và các sản phẩm phụ tạo hương thơm). Giống sữa chua đã được phối trộn sẵn ở dạng khô hoặc dạng nhão (past). Dạng khô giữ ở nhiệt độ thường được vài tháng, dạng nhão giữ ở nhiệt độ 4^0C hoặc lâu hơn từ 10 ngày đến 15 ngày.

Bảng 8.4. Một số loài vi khuẩn dùng trong lên men sữa

Vi sinh vật	Nhiệt độ lên men (^{0}C)	Sản phẩm lên men		Lên men xitric đến	Sử dụng trong sản xuất
		Axit lactic	Chất khác		
S. thermophilus	40 – 45	0,7	–	–	Sữa lên men
S. lactic	25 – 30	0,7	–	–	Phomat
S. cremonis	25 – 30	0,7	–	–	Sữa lên men
S. diacetylactic	25 – 30	0,7	–	CO_2, diaxetyl	Sữa lên men
Leus. cremoris	25 – 30	0,4	CO_2	CO_2	Phomat, bơ
L. casei	30	1,5	–	–	Sữa lên men
L. lactis	40 – 45	1,5	–	–	Phomat
L. helveticus	40 – 45	2,0	–	–	Sữa lên men
Bofidobacterium	37	0,9	Axit axetic	–	Sữa lên men, phomat
L. bulgaricus	40 – 45	1,5	–	–	Sữa lên men

Ghi chú S: *Streptococcus; L: Lactobacillus; Leuc: Leuconostoc.*

– Giống vi khuẩn sản xuất yaourt (gọi tắt là giống yaourt) thường gồm các giống chủ lực là *Streptococus thermophilus* và *Lactobacilus balgaricus* hoặc *L. acidophilus*. Tỷ lệ giữa cầu khuẩn (cocus) và trực khuẩn (Bacilli) là 1 : 1, có thể thêm giống phụ lên men dị hình để tạo hương cho sản phẩm. Các loại giống yaourt bán trên thị trường có thể khác nhau về thành phần vi khuẩn, về tỷ lệ giữa chúng, về trạng thái (lỏng, sệt, bột,...). Tuỳ theo nhu cầu và điều kiện sản xuất, người ta lựa chọn giống thích hợp.

Sữa chua kefir có khác sữa chua yaourt về đôi chút chất lượng, đặc biệt là hương vị, vì trong sữa kefir có cả lên men lactic và lên men rượu. Nguyên liệu sản xuất kefir trước hết là sữa bò, sau đến sữa dê và sữa cừu. Kefir được sản xuất ở nhiều nước trên thế giới. Ở Nga, lượng Kefir sử dụng cho đầu người / năm là 5 lít.

Sữa chua Kefir có trạng thái đồng nhất, có vị chua (pH = 4,3 – 4,4) và mùi thơm đặc trưng.

Giống Kefir:

Giống vi sinh vật sản xuất sữa chua Kefir thường được gọi là "Nấm Kefir" hoặc "Men Kefir".

+ Nấm Kefir là một quần thể các vi khuẩn lactic và có cả nấm men rượu (bảng 8.5), chúng được liên kết với nhau bởi một loại chất dẻo polysaccarit sinh học ở dạng hạt gel có đường kính 2 – 15mm. Những hạt này có thể sấy khô ở nhiệt độ phòng trong khoảng 36 – 48 giờ, có thể giữ được hoạt lực 12 – 18 tháng. "Nấm" ở dạng ướt bảo quản ở 4°C khoảng 8 – 10 ngày.

Về hình thái nấm Kefir nhìn ở kính hiển vi như một rừng bạt ngàn những bông suplơ tý hon. Phần vỏ ngoài của nấm là các tế bào hình que, ở phần nhân là nấm men. Phần đệm là vi khuẩn hình cầu *Streptococcus* lên men đồng hình chủ yếu.

Nấm Kefir có cấu trúc cố định, có phân chia, phát triển và trưởng thành, tồn tại.... để làm giống cho những thế hệ sau. Nấm Kefir là hỗn hợp cộng sinh đặc biệt giữa nhiều loại vi khuẩn và nấm men. Khi ngâm vào sữa, "nấm" sẽ phát triển, một số tế bào vi sinh vật từ đây chuyển vào dịch sữa và cùng với các tế bào hạt nấm gây lên men cho sản phẩm là Kefir.

Sau khi kết thúc, "nấm" được vớt ra, rửa sạch, phơi khô đem bảo quản cho tới khi sử dụng.

Bảng 8.5. Một số nhóm vi sinh vật thường gặp trong "Nấm Kefir"

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

b) Công nghệ sản xuất sữa chua

– Nguyên liệu và chuẩn bị dịch sữa đưa vào lên men:

+ Để sản xuất sữa chua người ta chọn loại sữa có chất lượng cao, có thể là sữa tươi, sữa đã tách béo, sữa bột (cần phải hoàn nguyên). Sữa cần tiêu chuẩn hoá ở 40°C, ly tâm: Độ chua không quá 20°T, chất béo trong khoảng 0,5 – 3,0%, hàm lượng chất khô không béo lớn hơn 8,2%. Đối với sữa yaourt đặc không cần thêm chất ổn định. Sữa chua hoa quả có thể thêm chất ổn định, còn sữa chua lỏng để uống nhất thiết phải có liều lượng 0,1 – 0,5%. Chất ổn định thường là gelatin, pectic, thạch. Các chất ổn định có tác dụng ngăn chặn quá trình tách nước ở sữa chua thành phẩm, tăng độ nhớt.

+ Khả năng đông tụ sữa giảm khi lượng ion điện tích dương thiếu (chủ yếu là Ca^{2+}), vì vậy, có thể thêm $CaCl_2$ với liều lượng 0,002 – 0,04% trong một số thời điểm trong năm. Với sữa chua hoa quả cần thêm đường saccarozơ hoặc glucozơ, thường dùng là mứt hoa quả có 50% saccarozơ.

+ Nguyên liệu làm sữa chua cần phải làm đồng hoá, nhằm giảm kích thước cầu mỡ, phân phối đồng đều, tránh hiện tượng nổi lên của các cầu mỡ, làm cho sữa chua mịn và đồng nhất. Dịch sữa được đồng hoá ở 60 – 70°C.

Tiếp theo dịch sữa được thanh trùng ở 90 – 95°C trong 5 phút nhằm diệt các vi sinh vật, tăng khả năng hydrat hoá của casein (giữ nước tốt, hạn chế sự tách nước, quyện sữa mịn, chắc).

Cuối cùng làm nguội xuống 40 – 45°C để chuẩn bị lên men.

– Chuẩn bị giống sản xuất:

+ Sữa chuả Yaourt:

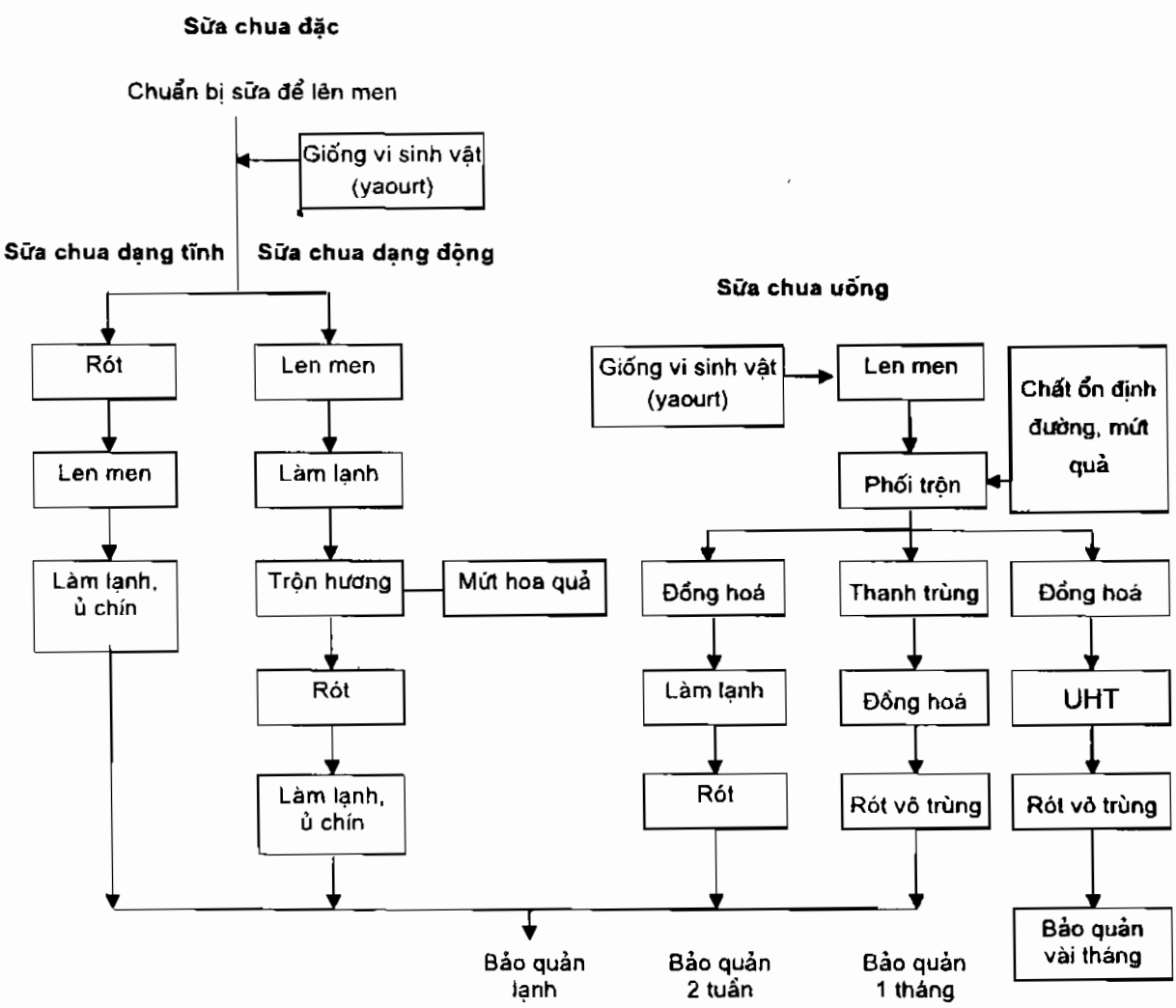
Giống sản xuất được chuẩn bị từ các giống gốc.

* Giống gốc của các loại sữa chua thường là giống hỗn hợp 2 – 3 chủng của vi khuẩn (có khi hơn) lactic lên men đồng hình và dị hình. Như các phần trên cho ta biết: Giống Yaourt có 2 loại chủng chủ lực là trực khuẩn và cầu khuẩn theo tỷ lệ 1 : 1 hoặc 2 : 1 (tuỳ theo yêu cầu công nghệ) cùng chủng liên cầu khuẩn lên men dị hình tạo hương. Giống Kefir là tập hợp các chủng vi khuẩn đồng hình, dị hình và nấm men trong một hỗn hợp là "Nấm Kefir". Giống *Acidophin* gồm *L. acidophinlus* và giống *Streptococcus* tạo hương,...

* Các giống gốc này được hoạt hoá làm giống khởi động và được nhân qua 2 – 3 cấp: cấp 1, cấp 2, cấp 3,... thành giống sản xuất đưa vào lên men. Lượng giống tiếp vào lên men là 3% hoặc cao hơn tuỳ theo nhiệt độ lên men.

* Sữa chua Yaourt có 2 dạng: dạng tĩnh, động. Sau khi tiếp giống, rót hộp và lên men ngay trong hộp và dạng động, sau khi tiếp giống lên men ở các thùng lớn, trộn hương, làm lạnh rồi mới rót hộp. Ngoài ra còn có dạng sữa chua để uống.

Quá trình công nghệ sản xuất các loại sản phẩm Yaourt được giới thiệu ở hình 8.8.



Hình 8.8. Sơ đồ công nghệ sản xuất các dạng sữa chua yaourt UHT (Ultra Higt Temperature – nhiệt độ siêu cao)

* Trong quá trình lên men đối với sữa dùng giống khởi động và sản xuất có *Lactobacillus bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* thường lên men ở 40 – 45°C, còn đối với giống có *Lactobacillus acidophilus* và *Streptococcus diacetylactis* (hoặc loài ưa ấm khác) nhiệt độ lên men là 30 – 35°C.

* Trong quá trình lên men, các chủng vi khuẩn lactic đồng hình sinh ra axit lactic và các chủng dị hình sinh axit lactic (ít) cùng các axit bay hơi khác (chủ yếu là axit axetic), rượu, CO_2, cùng các este và các chất sinh hương khác.

* Tỷ lệ giữa vi khuẩn lactic dạng cầu và dạng que thường là 1 : 1 hoặc 2 : 1. Tỷ lệ này ảnh hưởng lớn đến chất lượng sản phẩm: nếu trực khuẩn nhiều hơn sẽ làm cho sản phẩm có độ axit quá cao, vị quá chua.

* Thời gian lên men khoảng từ 3 đến 10 giờ. Thời gian lên men thường không cố định, vì phụ thuộc vào nhiều yếu tố như số lượng tế bào của chủng giống, tốc độ sinh axit, nhiệt độ lên men,...

* Kết thúc lên men sữa chua có pH = 4,5 thì cho làm lạnh tới 4 – 6°C và ủ ở nhiệt độ tối thiểu là 6 giờ. Trong thời gian này, mùi vị sản phẩm mới hoàn thiện. Chỉ sau thời gian này, sữa chua mới hoàn thành phẩm.

* Sữa chua thành phẩm có những yêu cầu sau:

• Trạng thái: Sữa đông đặc hoàn toàn, đồng nhất và bề mặt mịn.

• Màu sắc: Có màu tự nhiên của nguyên liệu, không được có màu lạ.

• Mùi vị: Thơm, đặc trưng của sữa, không có mùi hôi khét, khó chịu và mùi lạ, vị chua vừa phải, không chua gắt và vị đắng.

Bảo quản sữa chua ở 4 – 6°C, sữa chua dùng để uống được xử lý UHT (Ultra hight temperature) rồi rót vô trùng vào chai, hộp, có thể bảo quản ở nhiệt độ thường được vài tháng.

+ Sữa chua Kefir:

* Sữa nguyên liệu dùng sản xuất sữa chua Kefir là sữa có chất lượng cao, hàm lượng chất béo có thể thay đổi theo thị hiếu người tiêu dùng.

* Sữa nguyên liệu được thanh trùng ở 90 – 95°C trong 30 – 35 phút, sau đó làm nguội tới nhiệt độ 23 – 25°C, tiếp giống Kefir ("Nấm Kefir") theo tỷ lệ 2 – 10% khối lượng / thể tích. Quá trình lên men thực hiện ở khoảng nhiệt độ này trong 20 – 24 giờ. "Nấm Kefir" được vớt ra khỏi dịch sữa lên men. Phần dịch lúc này được giữ lạnh dưới 10°C, qua đêm và có chứa hỗn hợp các vi sinh vật khác nhau (chủ yếu là vi khuẩn lactic và nấm men).

* Quá trình lên men có thể được thực hiện theo quy trình công nghệ cải tiến như sau:

Giai đoạn đầu thực hiện như sau, với lượng "Nấm Kefir" tiếp vào lên men là 2 – 3% khối lượng / thể tích, giữ ở 20 – 25°C trong 24 giờ, vớt các hạt "nấm", dùng dịch lên men như dịch nhân giống để tiếp vào các mẻ lên men tiếp theo với tỷ lệ 1 – 3%. Thời gian lên men chính thức này là 12 – 18 giờ ở nhiệt độ 20 – 25°C.

Trong quá trình lên men, các vi khuẩn lactic đồng hình sinh ra axit lactic, các chủng dị hình ngoài axit lactic còn sinh ra các axit khác (axit axetic, axit propionic), rượu etylic, CO_2, các chủng men rượu sinh ra rượu etylic.

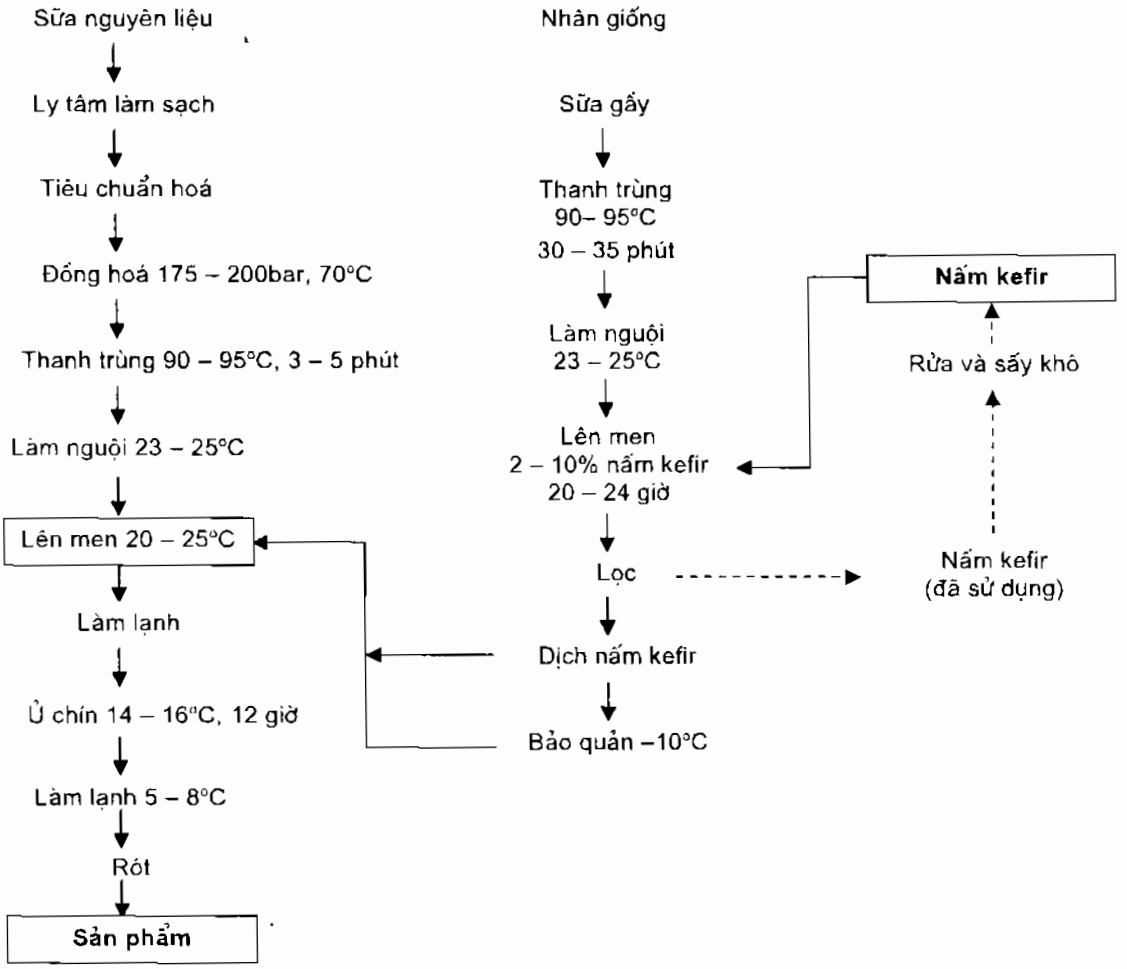
* Dịch sữa lên men khi đạt pH = 4,5 – 4,6 thì đưa vào làm lạnh xuống 14 – 16°C giữ khoảng 12 giờ để ủ chín, hoàn thiện hương vị. Kết thúc giai đoạn ủ chín, sản phẩm được bảo quản ở 5 – 8°C. Trong Kefir, lượng L – axit lactic gấp 10 lần D – axit lactic, rượu etylic khoảng 1 – 2%.

Rượu được sinh ra còn tiếp tục khi vi khuẩn dị hình và nấm men ngừng phát triển. Một số vitamin được tạo ra do nấm men và vi khuẩn trong thời gian nhân giống và lên men (chủ yếu là vitamin nhóm B và P). Đặc biệt là trong thời gian này, axit orotic của sữa (nguyên nhân tích mỡ trong gan) được vi sinh vật sử dụng hoàn toàn.

* Giá trị dinh dưỡng của sữa Kefir tương đương như sữa nguyên liệu, nhưng dễ tiêu hoá hơn, có mùi thơm và vị chua dễ chịu, có những chất kháng khuẩn, tăng

khả năng miễn dịch cho cơ thể. Sữa Kefir còn có tính chất giải khát tốt, tăng dịch vị, được sử dụng như thực phẩm ăn kiêng, điều trị bệnh.

Quy trình công nghệ sản xuất sữa chua Kefir được giới thiệu ở hình 8.9.



Hình 8.9. Sơ đồ công nghệ sản xuất sữa Kefir

8.3.4. Nem chua

Nem chua là sản phẩm lên men chua từ thịt lợn nạc, có giá trị dinh dưỡng cao, mùi vị thơm ngon, kích thích dịch vị tiêu hoá tốt, đồng thời làm lành mạnh hệ vi sinh vật đường ruột. Nem chua sử dụng thích hợp trong các bữa nhậu với rượu bia.

Một số nước Đông Nam Á cũng có những sản phẩm giống với men chua của Việt Nam: Nham – sản phẩm thịt lên men ở Thái Lan, Tocino – ở Philipin,...

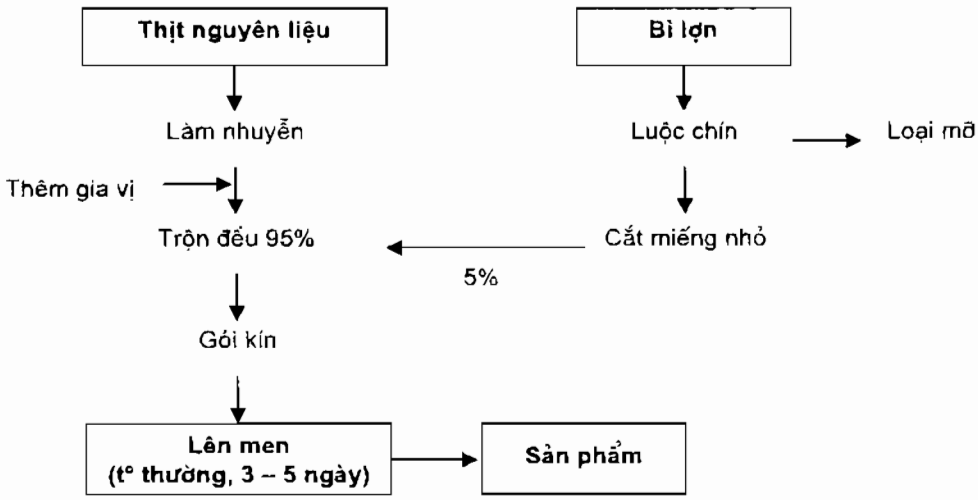
a) Nguyên liệu: Để sản xuất ra nem chua cần chọn thịt lợn nạc loại tốt, mới giết mổ xong, đặc biệt là thịt đùi mềm nhất và còn nóng. Thịt được xay nhỏ thật nhuyễn (nếu làm thủ công phải giã nhuyễn như làm giò nạc), trộn với gia vị (đường, mỳ chính, ớt, tỏi, hồ tiêu,... có thêm diêm tiêu).

Ngoài thịt nạc còn độn thêm bì lợn đã luộc chín, cắt thành miếng nhỏ dài, trộn với thịt đã xay nhuyễn.

b) Quy trình công nghệ sản xuất nem chua

– Hiện nay nhiều địa phương trong cả nước có sản phẩm nem chua, như nem chua Thanh Hoá, nem chua Hà Nội, Hải Phòng, nem chua Ninh Hoà (Khánh Hoà), nem chua Sài Gòn, nem chua miệt vườn miền Tây Nam Bộ,... sản phẩm mỗi nơi có đặc điểm riêng, song quy trình công nghệ nguyên lý là như nhau, chỉ khác nhau về liều lượng các chất phụ gia và gia vị, đặc biệt là thành phần giống vi sinh vật trong quá trình lên men:

– Sơ đồ công nghệ sản xuất được giới thiệu ở hình 8.10.



Hình 8.10. Sơ đồ công nghệ sản xuất nem chua

– Lên men nem chua là lên men lactic tự phát. Tác nhân gây lên men là các vi khuẩn lactic được nhiễm từ tự nhiên như dụng cụ, đồ chứa đựng, từ không khí, đặc biệt là từ lá gói bao phần thịt của nem. Ở những nơi sản xuất nem truyền thống thường chọn lá vông, lá chuối hoặc lá cây nào khác mềm và bản rộng để bao gói nem. Loại lá bao này không được rửa mà chỉ lau sạch. Việc bao gói này cần phải kín để đảm bảo độ kỵ khí cho vi khuẩn lactic phát triển.

– Nem để ở nhiệt độ thường (khoảng 25 – 30°C), các vi khuẩn sẽ phát triển và sinh axit lactic trong điều kiện kỵ khí. Vi khuẩn lactic ở đây thấy có các chủng thuộc giống *Lactobaccillus, Streptococcus* và *Pepdicoccus*, còn có thể có *Leuconostoc*. Dịch thịt tiết ra rất thích hợp cho vi khuẩn lactic sinh trưởng. Trong các chủng lactic có cả các chủng lên men đồng hình và các chủng dị hình. Vai trò sinh axit chủ yếu là các chủng *Lactobacillus* đồng hình, còn các chủng *Streptococcus, Pepdicoccus*, lên men dị hình góp phần tạo axit và đặc biệt sinh hương cho sản phẩm. Chưa có công trình khoa học nào nghiên cứu kỹ về hệ vi sinh vật trong nem chua, tỷ lệ giữa trực khuẩn và cầu khuẩn thế nào là thích hợp, các chất sinh hương,... Vì vậy, sản phẩm nem chua ở các địa phương có những đặc điểm khác nhau, song cơ bản vẫn có đặc điểm chung là ăn ngon, có vị chua, vị ngọt đạm cùng với mùi thơm đặc trưng.

– Trong quá trình lên men, axit lactic sinh ra và được tích luỹ làm tăng độ chua (pH giảm dần tới 4,5 là có thể ăn được, song quá trình này kéo dài tới 3 – 5 ngày tuỳ thuộc vào nhiệt độ phòng) và pH có khi giảm tới 4. Đồng thời với sự tích tụ axit, vi khuẩn lactic còn sinh ra chất bacterioxin. Chất này có hoạt tính kháng sinh cùng với pH < 4,5 làm ức chế các vi khuẩn gây thối rữa và các vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Nhiều công trình nghiên cứu đã chứng minh rằng, nem chua là sản phẩm khi đạt tiêu chuẩn (loại tốt) hoàn toàn không có vi khuẩn gây thối rữa và vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Quá trình lên men được bổ sung lên men phụ là các vi khuẩn lactic dị hình sinh ra một số sản phẩm phụ tạo hương vị thơm ngon. Các yếu tố ở đây góp phần làm nem chua "chín sinh học".

– Sản phẩm nem chua đạt chất lượng khi "chín sinh học" có các đặc điểm:

+ Khi bóc hết lá, nem phải chắc, tương đối khô, không nhớt, nhão.

+ Có màu hồng tươi.

+ Mùi thơm của thịt nạc lên men và các mùi gia vị.

+ Vị chua dễ chịu và ngọt đạm.

Nem chua có thể chấm tương ớt, ăn trực tiếp cùng với bia, rượu hoặc đem chao dầu nóng già hoặc đem nướng.

Sản phẩm "chín" tới ăn ngay rất ngon, song cũng có thể giữ ở 4 – 10°C trong thời gian 10 – 14 ngày. Nem chao dầu hoặc nước khi ăn lại có mùi vị riêng biệt và sản phẩm gia nhiệt này giữ trong các bao gói sạch và vô trùng sẽ bảo quản được lâu hơn. Với sản phẩm gia nhiệt, đóng gói tốt, bảo quản dài ngày,... có lẽ là một hướng cho sản xuất công nghiệp loại nem chua đặc sản của Việt Nam trong tương lai.

8.3.7. Mắm chua

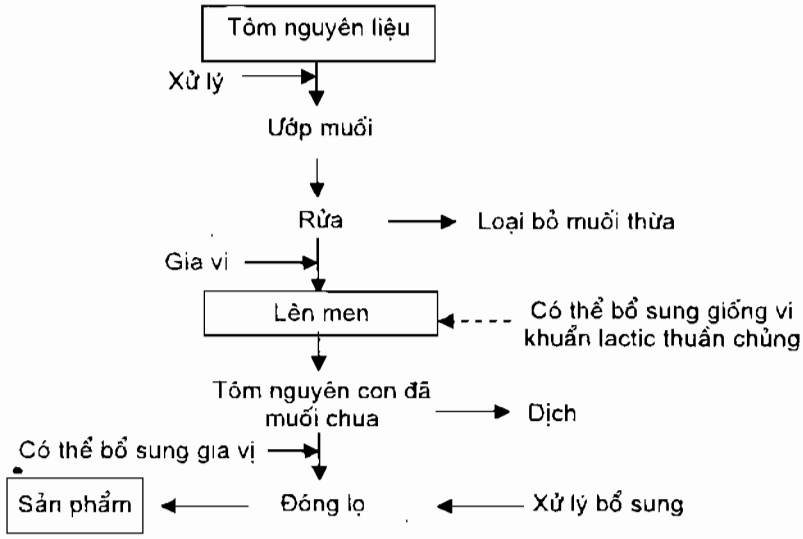
Mắm chua là sản phẩm lên men lactic từ cá và tôm, có đầy đủ các chất dinh dưỡng từ nguyên liệu (các axit amin, vitamin, chất khoáng), các chất kích thích tiêu hoá và có thể có cả những kháng thể tăng tính miễn dịch cho cơ thể. Đặc biệt các loại mắm chua (tôm, cá) đều nghèo chất béo.

Ở phần này chỉ đề cập đến quy trình công nghệ làm mắm tôm chua. Mắm cá chua quy trình chế biến cũng tương tự và cùng dựa trên cơ sở là protein nguyên liệu được thuỷ phân thành peptit, axit amin một phần nhỏ, còn lại biến tính thành dạng rắn chắc trong lên men lactic. Như vậy, sản phẩm có mùi thơm đặc biệt (chưa phải hương nước mắm), có vị chua, ngọt (đạm) dễ chịu.

– Nguyên liệu sản xuất mắm tôm chua là tôm nước ngọt, tôm biển,... còn tươi hoặc còn sống, không dùng tôm bị ươn, tôm gẫy đầu, tôm nát, tôm mùa lũ. Kích thước tôm nguyên liệu bằng ngón tay út là thích hợp.

– Trong tôm có khoảng 70 – 80% là nước, protein khoảng 13 – 25% (khác nhau ở giống tôm, điều kiện nuôi dưỡng), rất ít gluxit và lipit khoảng 0,01 – 3% (chủ yếu là photpholipit).

– Quy trình công nghệ chế biến mắm tôm chua là như sau (hình 8.11).



Hình 8.11. Sơ đồ công nghệ chế biến mắm tôm chua

Ở nước ta nhiều nơi sản xuất, mỗi nơi sản xuất, như ở Huế, Quảng Bình, Bắc Bộ, Nam Bộ,... đều có những quy trình riêng, nhưng nói chung đều có đặc trưng về nguyên lý như nhau và được giới thiệu ở quy trình trên.

+ Xử lý nguyên liệu: Tôm được rửa sạch, loại bỏ bùn cát, rong rêu,... cắt râu (từ mắt), rửa lại, để cho ráo nước.

Phun rượu (3 – 4% rượu 40°): phun đều lên tôm, rồi trộn với muối rang tán nhỏ (4 – 6%), cơm nếp giã nhuyễn (20% so với tôm), cùng với tỏi, ớt, riềng (giã nhỏ),... Có nơi không cho cơm nếp, thay bằng thính gạo tẻ, đường với liều lượng như sau: 10 bát tôm, 1 bát muối bột rang, 1 bát thính, 1 thìa đường và 1 bát gia vị (tỏi, riềng, gừng,...). Có địa phương sản xuất không thêm đường, nhưng khi cho tôm vào các bình, lu để muối chua được gài nén bằng những lóng mía chẻ đôi.

Như vậy, sản xuất mắm tôm chua thấy đều cho thêm gia vị với liều lượng đại thể như sau:

Tôm 90%; đường từ 1 – 2%; thính gạo 2%; muối 5 – 7%; cùng với tiêu, ớt, tỏi, riềng và rượu.

Nguyên liệu đã xử lý cho vào các hũ, lu, được gài chặt và phủ lá riềng hoặc lá ổi. Bịt kín và ủ cho lên men.

+ Quá trình lên men có thể thực hiện ở nhiệt độ thường (25 – 30°C) trong 7 – 10 ngày và tiếp theo ở 40 – 45°C cũng khoảng 7 – 10 ngày, hoặc ở 30 – 35°C trong suốt cả quá trình thời gian dài hơn.

Sau thời gian lên men, mắm chua "chín" có pH ≤ 4,5, axit lactic 0,87 – 2,99%, muối 4,5 – 6,5%, các hợp chất N protein 11 – 17,7%. Ăn có vị chua, ngọt đạm và mùi thơm đặc trưng.

Mắm tôm chua ăn với thịt ba chỉ luộc hoặc với nem cuốn (có thịt lợn luộc, lá mơ lông, khế, chuối tiêu non,...) rất thích hợp.

+ Các quá trình vi sinh và hoá sinh xảy ra trong lên men mắm tôm chua:

* Lên men mắm tôm (hoặc cá) chua xảy ra một loạt quá trình hoá sinh và vi sinh.

Sau khi tôm nguyên liệu được ướp muối (với tỷ lệ khoảng 4 – 6%), các vi sinh vật chưa phát triển được ngay, vì nồng độ muối này đã bắt đầu có thể ức chế một số loài vi sinh vật sinh trưởng. Muối làm thay đổi áp suất thẩm thấu của tế bào thịt tôm, làm cho nước của tế bào và mô thịt tôm tiết nước ra ngoài môi trường. Nước chiết từ tế bào thịt tôm trong dó có các enzyme protelytic nội tại của các mô cơ thịt tôm, các axit amin cùng các vitamin, chất khoáng hoà tan trong nước, tạo điều kiện cung cấp cho các vi khuẩn hoại sinh có trong hệ tiêu hoá của tôm và các vi khuẩn lactic bắt đầu sinh trưởng – phát triển.

Giai đoạn này lượng axit lactic sinh ra trong khối tôm rất nhỏ hoặc chưa có. Sự thuỷ phân một phần protein của dịch thịt tôm xảy ra thành các polypeptit, oligopeptit và có thể một số axit amin. Các sản phẩm thuỷ phân này sẽ là các chất dinh dưỡng cho vi khuẩn lactic. Sự thuỷ phân protein ở đây do proteaza có sẵn trong các mô thịt tôm, có trong hệ tiêu hoá của tôm và đồng thời là proteaza của một số loài vi khuẩn dị dưỡng hoại sinh có trong nước nhiễm ở đầu tôm. Các vi khuẩn này thường gặp là các loài thuộc các giống *Pseudomonas, Bacillus, Aeromonas*,... Ngoài proteaza ta còn thấy có amylaza do các vi khuẩn này sinh ra sẽ thuỷ phân tinh bột ở thính gạo hoặc xôi nếp đến các dextrin và đường. Đường cung cấp cho vi khuẩn lactic chuyển hoá ra axit lactic, còn các dextrin làm cho khối tôm muối có trạng thái sánh. Vi khuẩn lactic cũng có thể sinh proteaza nhưng hoạt tính này yếu, ở đây coi là không đáng kể.

* Giai đoạn tiếp theo là của vi khuẩn lactic. Các vi khuẩn lactic có ở tự nhiên được nhiễm vào khối tôm lên men, sau một thời gian làm quen (có thể là một hai chục giờ) ở giai đoạn đầu chúng bắt đầu sinh trưởng và phát triển, đồng thời sinh axit lactic. Khối tôm muối bắt đầu vào lên men. Lên men tôm chua là một quá trình tự phát, trong đó có tác nhân gây lên men là các chủng lactic lên men đồng hình và các chủng dị hình, như *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus*,...

Các chủng đồng hình chuyển hoá đường thành axit lactic, các chủng dị hình – sinh ra axit lactic (một phần) và các axit bay hơi khác (axit axetic, axit propionic) cùng với các este, các chất tạo hương vị cho sản phẩm mắm tôm chua.

* Giai đoạn tiếp theo: axit lactic sinh ra được tích tụ trong môi trường lên men và tới pH ≤ 4,5 có tác dụng ức chế các vi khuẩn dị dưỡng, hoại sinh, gây thối rữa cũng như các vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Khối tôm muối dần dần được axit hoá tới pH 4,0 – 4,5 hoặc thấp hơn với lượng axit lactic đạt tới 0,8 – 2,99% có trong sản phẩm. Sau khi lượng axit đạt mức tối đa, các vi khuẩn lactic cũng bị chính sản phẩm là axit lactic ức chế trở lại, làm cho chúng chết dần và các chất tạo hương (axit, rượu etylic, các este,...) kết hợp với vị mặn của muối, vị ngọt của đường, vị ngọt đạm của một số axit amin, cùng với mùi thơm của thính tạo cho sản phẩm có hương vị đặc biệt.

Giai đoạn này là giai đoạn "chín" (chín sinh học) của sản phẩm. Sử dụng vào thời điểm lượng axit tạo ra ở cực đại sau 5 – 7 ngày là thích hợp. Quá lâu sau, lượng axit giảm, nấm mốc sẽ phát triển và vi khuẩn gây thối rữa sẽ phát triển trở lại. Vì vậy, sản phẩm cần cho thêm chất bảo quản chống mốc, chống vi khuẩn gây thối.

Thời gian lên men khoảng 14 – 20 ngày.

– Sản phẩm của mắm tôm chua sau khi chín vẫn còn nguyên hình tôm, có màu đỏ gạch do màu của astaxantin. Trong vỏ tôm có chứa astaxantin màu xanh tím khi liên kết với protein. Khi xảy ra hiện tượng thuỷ phân protein thì astaxantin được giải phóng có màu đỏ gạch.

Sau khi lên men, cần tách tôm nguyên con đã muối chua và phần dịch. Phần dịch sau khi loại bỏ phần cặn thô được xử lý bổ sung đường, muối (hoặc nước mắm), mỳ chính, gia vị (ớt, gừng, tỏi, riềng và có thể thêm măng hoặc ngó sen,...), chất đồng hoá (tạo sệt – tinh bột biến tính hoặc pectin) thành dịch rót.

Phần tôm nguyên được xếp vào lọ thuỷ tinh và rót dịch. Đậy nút kín (có thể thêm chất bảo quản).

Tôm chua thành phẩm: có màu đỏ tươi tự nhiên, vị chua và ngọt đạm, mùi thơm đặc trưng của sản phẩm lên men chua. Tôm không được gẫy đầu, nguyên mình, giòn dai và mình không có vết đen. Gia vị phải sáng đẹp, không được có hạt ớt, vỏ tỏi. Phần dịch phải đặc sánh, có màu hồng nhạt, không còn hạt gạo, không lắng cặn.

Thời gian sử dụng tôm chua: 15 ngày. Nếu lọ kín được hấp Pasteur sẽ giữ được hàng tháng.

Hiện nay sản xuất tôm chua vẫn là sản xuất thủ công và nhỏ lẻ, chưa công nghiệp hoá. Đã có những công trình nghiên cứu sử dụng đu đủ xanh, dứa hoặc đưa chế phẩm pepsin hoặc tripxin hoặc bổ sung *Streptococcus cremosis, Str. lactis* vào ủ lên men cùng với tôm đã rút ngắn được thời gian lên men và chất lượng sản phẩm được nâng cao. Trong quy trình gia vị, có tỏi, riềng hay bị thâm đen. Để tránh hiện tượng này, gia vị không nên cho vào ngay từ đầu, mà nên cho vào lọ trước khi rót dịch vào tôm chua.

Hy vọng các công trình nghiên cứu về công nghệ sản xuất mắm tôm chua được đầy đủ để đưa sản phẩm này vào sản xuất công nghiệp và trở thành đặc sản Việt Nam.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 8

1. Hãy cho biết quá trình công nghệ sản xuất axit xitric từ rỉ đường nhờ nấm *Aspergillus*.
2. Các nguyên liệu và xử lý nguyên liệu sản xuất xitric.
3. Có bao nhiêu phương pháp sản xuất giấm ăn?
4. Màng xenlulozơ của vi khuẩn axetic là gì? Nó có những ứng dụng như thế nào?
5. Có hai dạng lên men lactic là những dạng gì? Hãy cho biết các dạng lên men này xảy ra như thế nào và ứng dụng vào trong chế biến thực phẩm?
6. Muối chua rau quả dựa trên cơ sở nào?
7. Tại sao nem chua là thịt sống không gia nhiệt mà lại ăn được?
8. Mắm tôm và mắm tôm chua khác nhau như thế nào?
9. Hãy cho biết giá trị dinh dưỡng của sữa chua và các tác dụng của sữa chua trong đường tiêu hoá.
10. Khái quát về sử dụng vi khuẩn lactic trong chế biến thực phẩm.

Chương 9

SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TRUYỀN THỐNG

Ở nước ta có nhiều sản phẩm lên men cổ truyền, phổ biến trong dân gian, được sử dụng như những món ăn truyền thống làm cơ sở cho nền văn hoá ẩm thực của nhân dân ta.

Bảng 9.1. Các sản phẩm lên men truyền thống ở Việt Nam

STT	Tên sản phẩm	Nguyên liệu	Cơ sở khoa học – công nghệ
1	Nước mắm	Lên men từ cá	Dựa trên cơ sở thuỷ phân protein của cá đến axit amin bằng enzyme.
2	Tương	Lên men từ đậu tương và gạo.	Dựa trên cơ sở thuỷ phân protein của đậu tương đến axit amin bằng enzyme và tinh bột đến đường maltozơ.
3	Nước chấm	Lên men từ khô đậu tương, khô lạc.	Dựa trên cơ sở thuỷ phân protein của khô dầu đến axit amin bằng enzyme.
4	Mắm tôm	Lên men từ tép moi.	Dựa trên cơ sở thuỷ phân protein của tôm moi đến axit amin bằng enzyme
5	Mắm tôm chua	Lên men từ tôm.	Dựa trên cơ sở lên men lactic để muối tôm chua nhờ vi khuẩn.
6	Mắm nêm (mắm cá chua)	Lên men từ cá.	Dựa trên cơ sở lên men lactic để muối tôm, cá nhờ vi khuẩn.
7	Muối dưa chua	Lên men rau, quả.	Dựa trên cơ sở lên men lactic để muối chua rau, quả nhờ vi khuẩn.
8	Chao	Lên men từ đậu phụ.	Dựa trên cơ sở thuỷ phân protein đến các sản phẩm trung gian nhờ vi sinh vật.
....			

Các sản phẩm như dưa chua, mắm tôm chua đã được giới thiệu ở phần ứng dụng lên men lactic ở chương trước, vì vậy trong chương này không đề cập đến.

9.1. SẢN XUẤT NƯỚC MẮM

Nước mắm là sản phẩm giàu dinh dưỡng, một đặc sản của Việt Nam. Với vài ngàn kilomet bờ biển và phong phú các loại cá là điều kiện thuận lợi cho ngành chế biến nước mắm ở nước ta phát triển. Sản phẩm nước mắm được sản xuất ở nhiều nơi với các thương hiệu nổi tiếng từ lâu như nước mắm Phú Quốc, Phan Thiết, Khánh Hoà, Cát Hải,... Ngày nay, nước mắm là loại nước chấm không thể thiếu vắng trong bữa ăn hàng ngày của nhân dân ta và đang dần dần có uy tín trên thị trường thế giới.

Một số nhà khoa học Pháp đã đặt nền móng nghiên cứu nước mắm Việt Nam từ những năm đầu thế kỷ XX. Song, công nghệ sản xuất nước mắm hiện nay vẫn

chủ yếu dựa trên công nghệ truyền thống làm nước mắm dài ngày; còn làm ngắn ngày, hương vị sản phẩm không hoàn thiện.

Dựa trên các kết quả nhiều nghiên cứu khoa học về nước mắm cho thấy: nước mắm là dịch hỗn hợp các axit amin được thuỷ phân từ thịt cá. Ngoài ra, nước mắm còn có nhiều vitamin và chất khoáng cùng muối. Nước mắm có nhiều mùi thơm đặc biệt, vị ngọt mặn.

a) Nguyên liệu sản xuất nước mắm

Nguyên liệu dùng để sản xuất nước mắm là các loại cá. Chất lượng nước mắm lại phụ thuộc rất nhiều vào từng loại cá. Thành phần hoá học của các loại cá được giới thiệu ở bảng 9.2 và 9.3. Nói chung, nguyên liệu dùng để sản xuất nước mắm là những loại cá giàu protein và ít mỡ. Cá biển và cá nước ngọt đều làm được nước mắm. Trong số cá biển làm nước mắm thì cá nổi tốt hơn cá đáy, cá bắt xa bờ tốt hơn cá bắt ven bờ. Một số cá nước ngọt làm nước mắm ngon như cá mương, cá rô phi,...

Bảng 9.2. Thành phần hoá học của cá nước ngọt

TT	Loại cá	Thành phần hoá học (% khối lượng)		
		Nước	Protein	Lipit
1	Diếc	85	13	1,1
2	Chép	79	18,1	1,5
3	Trắm đen	77	17,9	3,8
4	Mè hoa	82	14,5	0,6
5	Mè trắng	86	10,0	1,0
6	Lành canh	76	15,6	2,3

Bảng 9.3. Thành phần hoá học của cá biển

TT	Loài cá	Thành phần hoá học (% khối lượng)		
		Nước	Protein	Lipit
1	Nục sổ	76,8	21,75	0,85
2	Mối thường	77,5	19,26	1,8
3	Trích	75,9	21,76	3,15
4	Phèn hai sọc	76,2	20,35	2,20
5	Lươn ngắn	79,3	19,03	1,21
6	Cơm	75,14	11,25	2,10
7	Mòi	76,66	9,37	14,4
8	Lẹp	81,84	10,00	1,4
9	Chuồn	76,17	9,75	7,5

Như vậy nguyên liệu chính là nước mắm làm các loại cá. Ngoài ra còn có muối ăn loại tốt và sạch, thính gạo, dứa, mít,...

b) Công nghệ sản xuất nước mắm

– Hiện nay ở nước ta đang hiện hành một số phương pháp công nghệ sản xuất ở các địa phương, như Cát Hải (Hải Phòng), Nghệ An, Quảng Bình, Huế, Ninh Thuận, Bình Thuận (Phan Thiết), Khánh Hoà, Phú Quốc,...

Tựu trung lại có một số phương pháp chính:

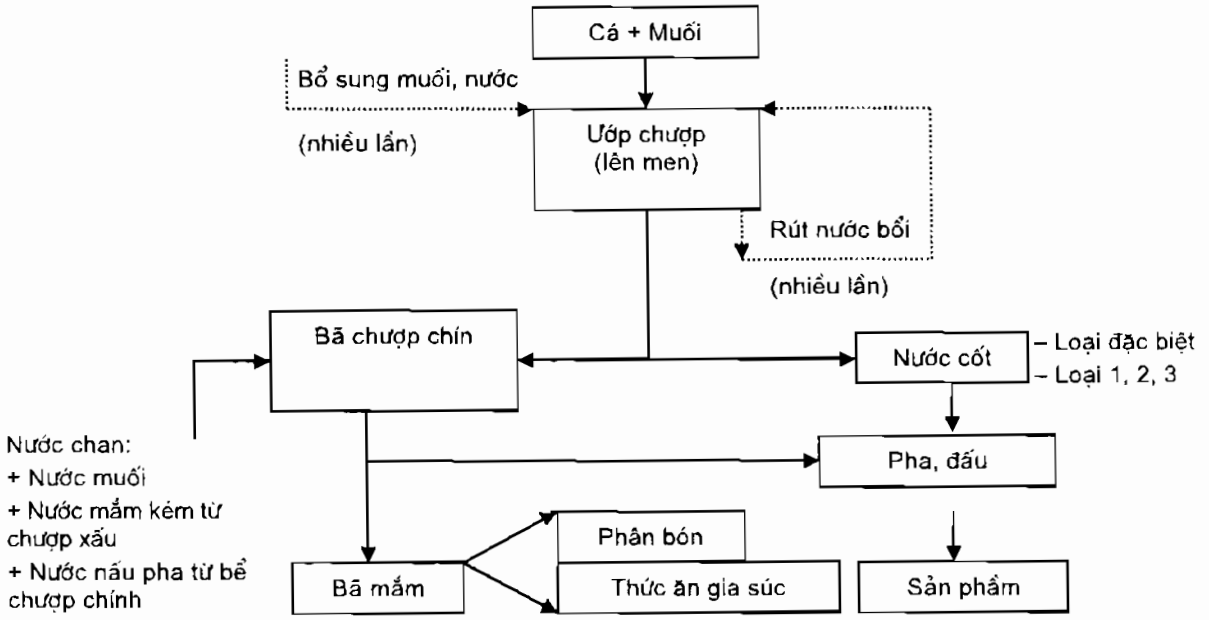
+ Phương pháp Cát Hải: ướp chượp với muối nhiều lần và thêm nước lã.

+ Phương pháp gài nén (Miền Trung): cho muối một lần và gài nén khối cá.

+ Phương pháp khuấy đảo.

+ Phương pháp Phú Quốc.

Nhìn chung, các phương pháp này có đôi điểm khác nhau về công nghệ, nhưng về nguyên lý là giống nhau. Sơ đồ công nghệ sản xuất nước mắm là như sau (hình 9.1).



Hình 9.1. Sơ đồ công nghệ sản xuất nước mắm

– Quá trình công nghệ sản xuất, nước mắm gồm hai giai đoạn. Hai giai đoạn cơ bản là thuỷ phân và tạo mùi. Có thể coi đây là hai giai đoạn lên men nước mắm: lên men chính và lên men phụ. Trong lên men chính, chủ yếu là thuỷ phân protein của thịt cá tới axit amin:

$$\text{Protein} \rightarrow \text{Polypeptit} \rightarrow \text{Oligopeptit} \rightarrow \text{Axit amin}$$

Tác nhân thuỷ phân protein ở đây là enzyme, protelytic gồm một phức hợp enzyme, proteinaza và peptidaza.

Lên men phụ là hoàn thiện quá trình thuỷ phân, hình thành hương vị đặc trưng của nước mắm từ các sản phẩm phụ của quá trình lên men.

• ***Ướp chượp:***

Là một khâu vô cùng quan trọng trong nghề sản xuất nước mắm. Cá được rửa sạch, không bỏ ruột cho vào ang, chum ướp với muối (cho muối một lần hoặc nhiều lần), đậy kín để cho cá ngấu, thỉnh thoảng khuấy đảo, protein thịt cá phân huỷ thành axit amin.

Nguyên liệu dùng để sản xuất nước mắm là nhiều loại cá. Chất lượng nước mắm phụ thuộc vào cá nguyên liệu. Cá cho nước mắm ngon thường là các loại cá có hàm

lượng protein cao và lipit thấp. Khi ướp chượp xảy ra thuỷ phân protein và lipit. Protein thuỷ phân thành các axit amin và có thể tạo thành một ít sản phẩm của sự thối rữa như NH_3, H_2S và một số khí thối rữa như indol, scatol, mercaptan,... có mùi khó chịu, nếu quá trình thuỷ phân này kéo dài, các sản phẩm này càng nhiều và làm cho quá trình làm nước mắm bị hư hỏng. Để ngăn chặn sự thối hỏng phát sinh, người ta phải cho đủ lượng muối vào chượp (25 – 30%) để ức chế các vi sinh vật và các enzyme proteaza biến đổi tiếp tới sản phẩm của sự thối rữa.

Chất béo của cá trong quá trình ướp chượp bị phân huỷ thành glyxerol và axit béo. Các axit béo không no dễ bị oxy hoá thành peroxyt và một vài chất khác như aldehyt, xeton, axit béo bậc thấp đều cho mùi khó chịu, đặc biệt là những nước mắm sản xuất theo quy trình công nghệ ngắn ngày.

Biến đổi hoá sinh trong cá khi ướp chượp là do hệ enzyme protelytic của thịt và nội tạng cá, cùng với của vi sinh vật có mặt khi ướp chượp tiết ra. Cá bắt đầu mềm, rồi chuyển sang rữa nát, cá vỡ bụng, protein phân huỷ thành pepton (hỗn hợp của các peptit ngắn dài) rồi đến các axit amin. Các enzyme hoạt động ở đây chủ yếu là các enzyme trong hệ enzyme có trong ruột cá và các vi sinh vật có sẵn trong cá, trong nước, trong muối, hoặc mới rơi vào phát triển trong chượp sinh ra.

Các vi sinh vật ở đây, chủ yếu là vi khuẩn, có thể quen dần với muối hoặc ưa chịu mặn phát triển. Có nhiều vi khuẩn bình thường không chịu được độ mặn cao (trên 10% NaCl) nhưng với điều kiện cho muối vào chượp nhiều lần nên có thể quen dần và chịu được môi trường có nồng độ muối cao. Đa số các vi khuẩn này là các tác nhân gây thối rữa có enzyme proteaza chịu kiềm với hoạt tính cao. Vì vậy, thời gian ướp chượp cho muối một lần tới 25 – 30% ngay từ đầu thường kéo dài tới 2 năm, còn cho muối làm nhiều lần kết hợp với đánh khuấy và phơi nắng có thể rút ngắn được vài tháng.

Trong ướp chượp thường chứa một lượng lớn các vi sinh vật. Có thể thấy hàng trăm hàng nghìn hoặc hàng triệu tế bào trong 1ml dịch chượp. Theo dẫn liệu của nhiều nhà nghiên cứu cho thấy trong dịch cá muối thường có 32 – 40 loài vi sinh vật khác nhau: thuộc giống *Micrococus* có *M. alvatus, M. aquatilis, M. candidus, M. flavus, M. flaviscens, M. citreus, M. acidilactis, M. luteus, M. pallidus, M. aerogenes, M. percitrium*,...

Thuộc nhóm trực khuẩn Gram âm có: giống *Achomolbacter (A. venosum, A. reticulare, A. geniculatrus, A. albus)*; các giống *Aerobacter paracolae, Citrobacter anidoliae; Pseudomonas (Ps. viscosa, Ps. liquefaciens); Flavobacterium; E. coli; Alcaligenes (Alc. Faecalis, Alc. recti)*. Thuộc nhóm vi khuẩn lactic có *Streptococcus faecalis, S. liquefciens, Lactobacillus plantarum, L. leichmani*. Ngoài ra còn thấy có những *Spirinllium, Proteus, Leuconostoc, Clostridium*,... Những vi khuẩn sinh bào tử tìm thấy trong nước chượp với số lượng không nhiều lắm là *Bacillus subtilis* và *Bacillus mesentericus*, cùng với nấm mốc *Penicillium, Aspergillus, Mucor*,...

Sự tạo hương nước mắm đến nay vẫn chưa được giải thích rõ ràng. Nhiều người cho rằng, các sản phẩm phân huỷ protein trong quá trình ướp chượp kết hợp

với nhau sinh hương, một số khác cho là hoạt động của vi khuẩn, có thể là do vi khuẩn lactic kỵ khí và hiếu khí, còn vi khuẩn *Clostridium* yêu cầu kỵ khí nghiêm ngặt. Chỉ biết rằng, trong giai đoạn thuỷ phân đạt tới thời điểm thành axit amin, nếu lấy dịch cốt ra thì nước mắm chỉ có vị ngọt đạm còn hương thì chưa rõ ràng. Nếu cứ ướp với bã mắm ở điều kiện kỵ khí thì hương vị nước mắm sẽ hoàn thiện và đặc trưng. Năm 1930, Botz và Ghilec đã tìm thấy vai trò sinh hương nước mắm của nhóm vi khuẩn *Clostridium*. Hai ông nuôi vi khuẩn này trên môi trường thạch pepton có 1,5% glucozơ và 0,1% KNO_3 hoặc trên bột cá đều thấy có mùi nước mắm được tạo thành.

Các vi sinh có trong chượp chủ yếu là các chủng sinh proteaza ngoại bào, phát triển mạnh ở nhiệt độ 30 – 40°C hoặc phơi nắng, nhất là một hai tháng đầu, sau đó có thể đưa nhiệt độ lên 48 – 52°C (ở nhiệt độ này hệ enzyme protelytic hoạt động mạnh nhất). Ở Ninh Thuận, Bình Thuận, người ta làm nước mắm còn đem ang, chum ướp chượp phủ dưới cát suốt trong những tháng khô hạn và nắng nóng.

Vi sinh vật phát triển làm nước chượp ban đầu đục, cá thay đổi màu sắc rồi rữa dần, sinh khí làm cho chượp sủi bọt. Cần khuấy đảo cho các khí thối hình thành bay đi và để cho phản ứng thuỷ phân xảy ra đồng đều, nhanh hơn. Muối bổ sung làm nhiều lần và đến giai đoạn cuối cùng cho đủ lượng muối (20 – 30% NaCl hoặc dịch chượp đạt 24 – 25° Baume) để ức chế sự phát triển và hoạt động của vi khuẩn gây thối. Sau đó đem ủ tĩnh dãi ngày để hình thành và hoàn thiện hương nước mắm.

Trong sản xuất nước mắm, nếu cho muối một lần, các sinh vật bình thường không chịu mặn sẽ bị ức chế hoặc bị chết, chỉ có những vi sinh vật ưa mặn sống sót phát triển và hoạt động. Quá trình thuỷ phân có thể kéo dài tới cả năm và sau đó cho lên men phụ tạo hương. Tổng thời gian theo quy trình này tới hai năm.

Hiện nay có nhiều quy trình công nghệ sản xuất nước mắm, như phương pháp Cát Hải (Hải Phòng), phương pháp của các tỉnh miền Trung (chủ yếu là các tỉnh khu 4 cũ), phương pháp Phú Quốc,... Các quy trình công nghệ (hay các phương pháp) đều dựa trên nguyên lý cho muối nhiều lần để ướp chượp, tận dụng sự phát triển của vi khuẩn sinh enzyme của nội tạng cá, các vi khuẩn ưa mặn và không ưa mặn (nhưng thích nghi dần). Do vậy, thời gian làm nước mắm so với phương pháp cho muối một lần rút ngắn được vài tháng.

Phương pháp ướp chượp ở miền Trung (khu 4 cũ) có gài nén và rút nước dịch cá nhiều lần và bổ sung muối khoảng 3 lần. Phương pháp sản xuất mắm Phú Quốc ngoài cá, nguyên liệu còn thêm thính gạo, dứa và mít: 100kg cá, 25kg muối (cho nhiều lần), 1kg thính gạo, 10 quả dứa và 1 – 2 quả mít, cho thêm dứa làm tăng lượng proteaza (enzyme proteaza của dứa được gọi là bromelin) để tăng khả năng thuỷ phân thịt cá; thêm mít tạo nguồn dinh dưỡng cacbon cho vi sinh vật phát triển và giúp cho hương thơm được cải thiện.

Dịch chượp được rút ra hàng ngày hoặc sau 7 ngày được cho quay trở lại khối

chượp. Thời gian rút và quay dịch chượp khoảng 2 tháng, sau đó lên men tĩnh (khi đã cho đủ muối) khoảng 6 – 8 tháng. Dịch chượp rút lần cuối là nước mắm cốt. Bã sau khi thêm nước muối lọc lấy phần dịch trong đem đấu với nước cốt thành nước mắm thương phẩm. Bã có thể làm phân bón, làm thức ăn chăn nuôi hoặc dùng ướp chượp mẻ tiếp theo.

Nước mắm là dịch chượp có độ muối cao rút ra (có thể là nhiều lần và cho quay lại ang chượp) rồi đem lọc, nấu và phối chế. Vì vậy số lượng vi sinh vật trong nước mắm ít hơn nhiều so với dịch chượp. Với nồng độ muối cao, các vi sinh vật và bào tử của chúng có trong nước mắm khó phát triển. Nước mắm loại thấp thường độ đạm thấp và tỷ lệ N – NH_3/N – toàn phần cao cho nên dễ bị thối.

c) Chỉ tiêu chất lượng của nước mắm

– Trạng thái: dịch trong suốt, không vẩn đục.

– Màu sắc: màu nâu nhạt đến nâu cánh gián hoặc thẫm.

– Mùi vị: mùi thơm đặc trưng, không có mùi khó chịu, mùi thối. Vị mặn dịu và ngọt đạm, không có vị chua, chát, đắng.

– Nồng độ muối ăn: 250 – 280g/l.

– pH = 5 – 5,5.

– Đảm bảo vệ sinh thực phẩm.

– Hợp chất vô cơ:

Ngoài NaCl, trong nước mắm còn có P, K, Ca, Mg, S. Trung bình 1 lít nước mắm có: P 0,66 – 0,566g; Ca 0,439 – 0,541g; Mg 2,208 – 2,310g; S 0,546 – 1,163g. Ngoài ra trong nước mắm còn có Br, I_2 ở dạng muối vô cơ hoặc dạng tự do. Mỗi lít nước mắm có I_2 5,08 – 7,62mg; Br 68,80 – 97,50mg.

d) Chỉ tiêu đánh giá về thành phần nitơ của nước mắm

– Nitơ toàn phần và nitơ hữu cơ cao: nước mắm ngon.

– Nitơ – formol so với nitơ toàn phần (N – tổng) chiếm 75%: nước mắm đã chín – sự thuỷ phân tương đối hoàn toàn.

– Nitơ – amoniac (N – NH_3) so với N – tổng có tỷ lệ 20,8% hoặc < 30% so với N – formol, nước mắm tốt không thối.

– Nitơ amin so với N – tổng có tỷ lệ ≥ 54,2%: nước mắm có nhiều axit amin – bổ ích cho cơ thể.

Ngoài axit amin, trong nước mắm còn có nhiều vitamin. Theo số liệu phân tích của J.A Drian: vitamin B_1 – 7mg; vitamin B_2 – 8,7mg; vitamin B_{12} – 3,3mg; vitamin PP – 4,4mg có trong 1 lít nước mắm.

Trong những năm gần đây có một số công trình nghiên cứu làm nước mắm ngắn ngày bằng cách bổ sung chế phẩm enzyme proteaza từ nấm mốc (*) (3% so với cá nguyên liệu) và nâng nhiệt độ lên từ từ không quá 55°C, khuấy đảo và giữ ở nhiệt độ 45°C. Cá được ướp chượp có enzyme bổ sung sau 2 tháng có thể rút hoặc

lọc lấy nước cốt. Về thành phần hoá học, nước mắm thí nghiệm so với nước mắm làm tự nhiên dài ngày không khác nhau nhiều, có thể còn cao hơn, nhưng hương vị thì còn xa mới đạt yêu cầu (bảng 9.4 và 9.5).

Bảng 9.4. Thành phần nitơ trong nước mắm

Các loài đạm	Nước mắm cá biển dài ngày (phương pháp cổ truyền)	Nước mắm cá biển xí nghiệp dài ngày	Nước mắm cá nước ngọt 7 ngày
Nitơ toàn phần (g/l)	30	26,6	29,26
Nitơ hữu cơ	23,76	19,0	23,21
Nitơ formol	22,50	18,3	18,48
Nitơ amoniac	6,24	7,6	6,05
Nitơ amin	16,26	10,7	12,43
Tỷ lệ nitơ hữu cơ/ Nitơ toàn phần (%)	79	71,4	79,3
Tỷ lệ nitơ amoniac/ nitơ toàn phần (%)	20,8	28,57	20,6
Tỷ lệ nitơ formol/ nitơ toàn phần (%)	75	68,7	63,6

Bảng 9.5. Thành phần hoá học của nước mắm được sản xuất theo phương pháp ngắn ngày và phương pháp cổ truyền

Phương pháp	Lượng nước cốt (ml)	Thành phần hoá học (g/l)		
		Nitơ toàn phần	Nitơ formol	Nitơ amin
Tự nhiên	520	23,8	14,0	9,06
	635	24,22	14,75	9,71
	375	23,24	14,0	9,72
Thêm 3% chế phẩm enzyme từ nấm mốc[*]	660	22,4	15,78	9,04
	605	24,78	16,47	10,04
	580	24,64	14,53	10,17

Về tạo hương cho nước mắm, nhiều nhà sản xuất đã dùng bã chượp của những mẻ nước mắm đã hoàn thiện cho ngâm với dịch của những mẻ mới chín tới trong một thời gian thích hợp (nhưng ngắn hơn những mẻ bình thường khác) và thu được những kết quả khả quan. Từ thực tế này, tác giả cuốn sách có ý tưởng như sau: sử dụng thiết bị UASB (thiết bị xử lý nước thải với nền bùn hoạt tính cho dòng chảy ngược trong điều kiện kỵ khí) *thay nền bùn hoạt tính bằng bã mắm được làm giàu vi khuẩn kỵ khí Clostridium* và cho dịch thuỷ phân protein cá (nước mắm ngắn ngày) chảy ngược qua trong điều kiện kỵ khí. Hy vọng việc tạo hương thơm cho nước mắm sẽ đạt kết quả mỹ mãn với thời gian rút ngắn được đáng kể!

9.2. SẢN XUẤT MẮM NÊM

Mắm nêm được sản xuất từ cá trên cơ sở lên men lactic, khác với quá trình lên men nước mắm, vì vậy mắm nêm còn được gọi là cá muối chua hoặc mắm cá chua.

---

[*] Về sử dụng chế phẩm enzyme ở đây, theo tác giả nên dùng chế phẩm proteaza kiềm từ vi khuẩn *Bacillus* và gia nhiệt lên tới ≤ 55°C và giữ ở 50°C ± 2 có thể có tác dụng tốt hơn.

a) Nguyên liệu

Cá cơm để cả con; cá nục, cá trích xay nhuyễn, hoặc cá nước ngọt, hoặc cá biển được rửa sạch, cắt đầu, moi ruột,... trộn với muối, đường, cơm (thính), tỏi.

b) Sản xuất mắm nêm (Việt Nam)

– Theo phương pháp một số gia đình sản xuất từ cá cơm (hoặc cá nục, cá trích): cá cơm còn tươi, lấy 1/3 nhúng vào nước muối bão hoà, khuấy nhẹ rồi để hong cho ráo nước và phơi nắng 4 – 5 giờ cho bay bớt nước. Trộn chung với 2/3 số cá còn lại + 20% muối sạch + 2% đường + 35% bột gạo nếp rang, trộn đều rồi cho vào hũ đậy kín. Lên men ở 28 – 30°C, rút nước và cho lên men tiếp 20 – 25 ngày.

– Theo phương pháp sản xuất PlaRa (Thái Lan): các loại cá nước ngọt khác nhau hoặc cá biển 38,5%, muối 11,5%, bột gạo rang 50%.

Cá sạch được phối trộn đều với muối theo tỷ lệ 10 : 3, cho vào chum, hũ sành đậy thật kín, hàng ngày phơi nắng, giữ 6 tháng. Khi hoàn thành, cho thêm bột gạo rang với tỷ lệ sản phẩm 1 : 1.

Sản phẩm có pH = 4,5 hoặc trên một chút, axit lactic 0,37 – 3,15%, muối 7,8 – 10%, dạng rắn, màu hồng thẫm hoặc nâu sẫm, vị chua, ngọt, mặn.

Nói chung, khi muối cá thường ở trong các hũ và đậy kín. Quá trình lên men khi muối cá ở điều kiện kỵ khí như vậy là lên men lactic nhờ vi khuẩn lactic chuyển hoá đường có sẵn trong nguyên liệu (với lượng nhỏ) hoặc đường thêm vào. Axit lactic được tích tụ trong khối cá làm pH chung hạ dần xuống dưới 4,5. Ở pH này, các vi khuẩn gây thối rữa và vi khuẩn gây bệnh đường ruột bị ức chế, không phát triển và dần bị chết.

Các vi khuẩn lactic thấy có mặt trong mắm nêm (mắm cá chua) là các chủng lên men đồng hình và dị hình thuộc các loài *Leuconostoc, Lactobacillus, Streptococcus, Pedicoccus*. Trong đó vi khuẩn đồng hình chủ yếu tạo ra axit lactic, còn các chủng dị hình tạo ra ngoài axit lactic (ít hơn so với đồng hình) còn có các axit khác, rượu và các este. Chính hương thơm của mắm nêm hình thành chủ yếu do các vi khuẩn lên men dị hình và từ các phụ gia như ớt, tỏi,...

Mắm nêm thường thêm ớt, tỏi, bột ngọt ăn với cá lóc hấp, thịt bò nhúng giấm hoặc ăn với nem cuốn.

Quá trình công nghệ sản xuất mắm nêm gần giống với công nghệ sản xuất mắm tôm chua (xem ở chương 8).

9.3. TÔM VÀ CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN CỦA TÔM

Các cuộc tranh luận về con tôm, cái tép hình như vẫn chưa có hồi kết thúc ở những ký túc xá sinh viên từ các miền nước ta. Song, họ tôm (tép) là những động vật giáp xác được phổ biến rộng rãi, là nguồn lợi thuỷ sản đứng thứ hai sau cá (có nơi còn đứng thứ nhất) thì mọi người đều nhất trí. Tôm (tép) có nhiều giống loài khác nhau và có một đặc điểm chung là toàn bộ cơ thể được bao bọc bởi một lớp

kitin (chitin). Lớp này bảo vệ cho cơ thể tôm khỏi bị vi sinh vật tấn công hơn ở cá. Hơn nữa, cấu tạo cơ thể của tôm có hệ tiêu hoá để ở trên đầu và cũng là nơi chứa nhiều chất protein hoà tan nhất.

Thành phần hoá học của tôm có 19 – 23% chất protein, 0,6 – 1,6% chất béo, các vitamin nhóm B (B_1, B_2, B_6, B_{12}), nước 73% và nhiều nguyên tố vi lượng. Trong protein của tôm có 18 axit amin và hầu như có đủ mặt các axit amin không thay thế, đặc biệt là hàm lượng axit amin chứa S khá cao. Chính vì vậy khi thối rữa, mắm tôm có mùi nặng hơn nước mắm.

Cấu tạo vỏ tôm không chặt, nhiều protein hoà tan. Với những đặc điểm trên, tôm có giá trị dinh dưỡng cao, nhưng cùng với các đặc điểm này sau khi đánh bắt, tôm hay bị chết và dễ bị ươn thối, nhất là do tôm có nội tạng để trên đầu.

Các loại tôm lớn thường được bảo quản hoặc bán cho sử dụng khi còn tươi sống.

9.3.1. Mắm tôm

Mắm tôm được chế biến từ moi biển (con tép) bằng cách cho tự phân và dùng muối hãm cho khỏi thối. Mặc dù làm từ tép nhưng sản phẩm lại được gọi là mắm tôm và giá trị dinh dưỡng rất cao, rất được ưa chuộng sử dụng hoặc chế biến các món đặc sản của Việt Nam, đặc biệt ở các quán "mộc tồn".

Tôm hoặc moi ở biển đều có hệ vi sinh vật gần giống với cá, vỏ moi mềm hơn vỏ tôm nên dễ bị vi sinh vật làm tan và đi sâu vào thịt moi. Nội tạng moi cũng ở trên đầu dễ tiết ra protein hoà tan do trong thịt moi và hệ tiêu hoá đều có proteaza nội tại. Với hệ enzyme này cùng với enzyme của vi sinh vật tiết ra làm cho cơ thể của moi tự phân. Hợp chất thuỷ phân chính ở đây là protein, cũng xảy ra như quá trình làm nước mắm. Do sản phẩm nước mắm ở dạng lỏng, mắm tôm thường ở dạng sệt (đặc), dạng bán lỏng, hoặc lỏng nên quá trình tự phân ở mắm tôm có thể xảy ra sâu sắc hơn nước mắm nên nặng mùi hơn.

a) Nguyên liệu

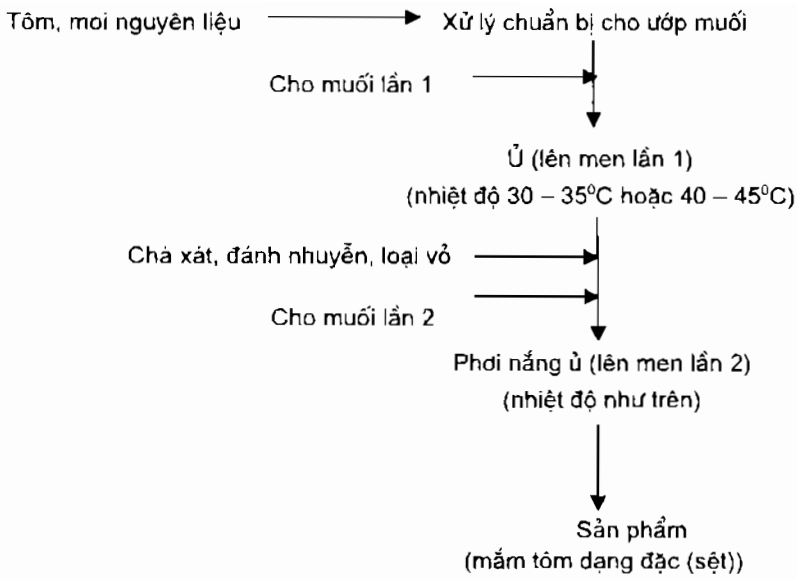
Nguyên liệu cho sản xuất mắm tôm chủ yếu là tép moi (moi biển cũng như moi đồng) hoặc các loại tôm nhỏ, tôm không đủ tiêu chuẩn thương phẩm. Tôm, moi được rửa sạch, loại đất cát và nước biển, đem trộn với muối sạch lần 1 (khoảng 1/3 lượng cần thiết) rồi cho vào chum, dậy kín, phơi nắng.

Ủ sau 1 – 3 tuần thấy khối ủ bắt đầu nát, đem chà xát hoặc đánh nhuyễn và cho muối lần 2 (cho đủ 25 – 30% so với khối lượng tôm nguyên liệu) để ngăn chặn quá trình thối rữa xảy ra đến sản phẩm cuối cùng là NH_3, H_2S, các khí thối khác (indol, mercaptol, scatol,...). Sau khi cho muối lần 2 lại tiếp tục ủ trong điều kiện giống như ủ lần 1 trong 3 – 6 tuần tiếp theo. Sản phẩm thu được là mắm tôm ở dạng đặc, bán lỏng hoặc lỏng.

Thời gian ủ (lên men) hai đợt là 3 – 7 tuần (tuỳ thuộc vào nhiệt độ ủ).

b) Quy trình công nghệ sản xuất mắm tôm

Quá trình công nghệ sản xuất mắm tôm theo sơ đồ sau (hình 9.2).



Hình 9.2. Sơ đồ công nghệ sản xuất mắm tôm

Ủ tôm với muối (nồng độ 6 – 8% lúc ban đầu) trong các cong, chum,... kín cũng là lúc quá trình lên men bắt đầu. Lên men ở đây là quá trình tự phát dưới tác dụng của enzyme proteaza thuỷ phân protein của thịt tôm.

Enzyme proteaza có mặt ở đây là do hệ enzyme tự có trong các tổ chức của tôm, của hệ vi sinh vật trong hệ tiêu hoá cũng như các vi sinh vật tạp nhiễm vào môi trường lên men. Thời kỳ đầu lên men, trong môi trường có nồng độ muối thấp, các vi sinh vật, đặc biệt là các chủng dị dưỡng hoặc hoại sinh như *Bacillus, Pseudomonas, Proteus, Clostridium*,... vẫn hoạt động bình thường và tiết ra enzyme proteaza,...

Các enzyme proteaza nội tại cũng như các enzyme bên ngoài do vi sinh vật sinh ra có tác dụng thuỷ phân protein thịt tôm thành peptit và axit amin. Enzyme này như chúng ta đã biết có nhiệt độ tối thích cho hoạt động là 48 – 52°C. Vì vậy, khi ủ cần phải gia nhiệt. Trong các cơ sở sản xuất mắm tôm, người ta thường đem hũ mắm tôm ra phơi nắng để nâng cao nhiệt độ lên men đến gần nhiệt độ tối thích. Như vậy trong quá trình lên men mắm tôm ở các cơ sở sản xuất thủ công có thời gian là không giống nhau, thường dao động từ 1 – 3 tuần, có khi cao hơn vì mỗi cơ sở sản xuất nằm ở những vùng địa lý, khí hậu khác nhau.

Sau giai đoạn 1 thấy thịt tôm đã nát, người ta đem chà xát cho thịt tôm, thịt mọi thật nhuyễn, có thể bổ sung muối và các loại phụ gia để bổ sung hương vị vào ngay hoặc muộn hơn, rồi lại tiếp tục ủ ở nhiệt độ thường hoặc phơi nắng.

Quá trình thuỷ phân protein của tôm xảy ra như sau:

Protein → polypeptit → oligopeptit → axit amin → amit → NH_3, H_2S và các khí thối.

Cả quá trình này là quá trình thối rữa, xảy ra cả ở điều kiện hiếu khí cũng như kỵ khí, ở 48 – 52°C nhanh hơn các điều kiện nhiệt độ thấp hơn. Vấn đề ở đây

đặt ra là: làm thế nào để quá trình dừng ở thời điểm tạo ra các axit amin và quá trình chuyển sang amit cùng NH_3 với các khí khác càng ít càng tốt. Để đáp ứng vấn đề này, người ta dùng muối với nồng độ cao tới 25 – 30% sẽ làm ngừng hầu hết các vi sinh vật hoạt động, thậm chí bị chết, nhưng enzyme peptidaza còn chuyển hoá tiếp các oligopeptit sang axit amin, đồng thời các phản ứng tạo ra chất thơm còn xảy ra trong thời gian kéo dài nữa.

Sản phẩm là khối nhão đặc, màu nâu đỏ, mùi mắm tôm thơm ngon đặc trưng. pH = 7,2 – 7,8, đường 0,5%, chất béo 1,4 – 2,6%, Ca 2 – 3,4%, Fe 0,02%, riboflavin 0,001%, niaxin 0,004%.

Mắm tôm thường được sử dụng trực tiếp, không cần qua giai đoạn gia nhiệt. Khi dùng chỉ cần vắt chanh hoặc cho thêm giấm, mắm tôm sẽ sủi bọt và làm thức chấm rất được ưa chuộng. Mắm tôm cũng là thứ ruồi nhặng rất thích. Nên khi sử dụng mắm tôm hoặc nấu nướng có mắm tôm cần phải lưu ý chuyện phòng tránh ruồi nhặng. Hơn nữa, ở mắm tôm có nồng độ muối cao tới 25 – 30% có thể làm chết vi sinh vật, trong đó có cả vi khuẩn *Vibrio, Salmonella* và các vi khuẩn đường ruột khác. Trong khi sử dụng, mắm tôm bị loãng ra và dùng thừa cho bữa sau là nguyên nhân cho vi sinh vật phát triển có thể gây ngộ độc và dịch bệnh cho người. Để phòng "dịch bệnh tiêu chảy có *Vibrio* dương tính" (theo thông báo của Bộ Y tế nước ta trong mùa hè vừa qua có bệnh tả ở một vài nơi và quy "thủ phạm" là mắm tôm – kể cũng hơi oan), mắm tôm trong sản xuất, bảo quản vận chuyển và sử dụng cần phải đảm bảo vệ sinh. Tuy là sản phẩm đặc biệt, nhưng với thành phần của mắm tôm, khi độ mặn giảm là môi trường rất thích hợp cho vi sinh vật phát triển gây ô nhiễm, ngộ độc thực phẩm và dịch bệnh. Khi sử dụng mắm tôm cần phải vắt chanh hoặc thêm giấm để làm giảm độ pH, có thể pha loãng cho đỡ mặn, ăn trực tiếp hoặc gia nhiệt. Mắm tôm pha loãng không được lưu giữ vì dễ bị nhiễm khuẩn, đặc biệt là phẩy tả *Vibrio* làm tiêu chảy cấp (bệnh tả) – lây truyền rất nhanh.

9.3.2. Mắm tôm chua hay tôm chua (xem thêm ở chương 8)

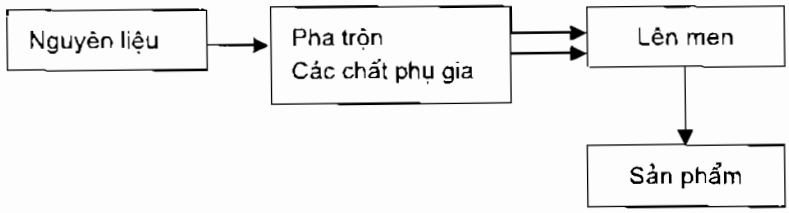
a) Nguyên liệu

Nguyên liệu làm mắm tôm chua là tôm nguyên con hoặc băm nhỏ, cho lên men và chất ức chế các vi sinh vật gây thối rữa.

Sản phẩm thu được là tôm chua dạng nguyên con hoặc dạng sệt có màu hồng hoặc vàng đỏ, vị mặn dịu, chua, ngọt, mùi thơm.

Nguyên liệu có các thành phần: tôm 90%, đường 2%, muối 5 – 7%, thính gạo 2%, tiêu, tỏi, giềng, ớt, rượu.

b) Sơ đồ công nghệ sản xuất



Quá trình lên men qua hai giai đoạn: giai đoạn 1 trong 7 – 10 ngày với nhiệt độ 20 – 30^{0}C, giai đoạn 2 trong 7 – 10 ngày với nhiệt độ 30 – 45^{0}C. Hoặc lên men ở khoảng nhiệt độ 30 – 35^{0}C và thời gian có thể dài hơn. Khi sản phẩm đạt tới độ thuần thục, cần đem sử dụng ngay không nên giữ lâu. Nếu giữ lâu phải thêm chất bảo quản.

Các vi khuẩn lên men lactic ở dây thường gặp là *Lactobacillus, Pedicoccus, Streptococcus,...*

Sản phẩm có pH ≤ 4,5, axit lactic 0,87 – 2,99%, muối 4,5 – 6,5%, protein 11 – 17,7%, vị chua, ngọt, mặn.

Sản phẩm mắm chua nhờ axit lactic tạo thành trong lên men và có thể cả các chất bacterioxin có tính kháng khuẩn. Khi axit lactic đạt tới mức độ cực đại, vi khuẩn lactic cũng bị ức chế, giảm hoạt tính axit hoá và nấm mốc sẽ phát triển gây hư hỏng sản phẩm. Vì vậy, sản phẩm mắm chua cần bổ sung chất bảo quản ức chế nấm mốc. Trong các chất bảo quản, có thể dùng axit benzoic và sorbic cùng các muối của chúng.

9.4. SẢN XUẤT TƯƠNG

Tương là một sản phẩm nước chấm làm từ đậu tương, một sản phẩm lên men cổ truyền của nhân dân Việt Nam. Trong nhân dân, nhiều gia đình biết làm tương. Nhiều địa phương có sản phẩm tương nổi tiếng như tương Bần Yên Nhân, tương Cự Đà (Hà Đông cũ), tương Nam Đàn (Nghệ An).

9.4.1. Nguyên liệu sản xuất

a) Đậu tương

Đậu tương là nguyên liệu chính để sản xuất tương.

Đậu tương hay còn gọi là đậu nành. Loại đậu tương vỏ vàng là loại thích hợp làm nguyên liệu tương (bảng 9.6).

Bảng 9.6. Thành phần hoá học của hạt đậu tương (%)

Thành phần	Tỷ lệ	Protein	Chất béo	Tro	Gluxit
Hạt nguyên,%	100	40,0	21,1	4,9	34,0
Nội nhũ, %	90 – 90,3	43,0	23,0	5,0	29,0
Vỏ, %	7,3 – 8,0	8,8	1,0	4,3	86,0
Phôi, %	2,0 – 2,4	41,1	11,0	4,4	43,0

Qua bảng 9.6 ta thấy, đậu tương có hàm lượng protein khá cao, ngoài ra còn có gluxit (trong đó chủ yếu là tinh bột ở nội nhũ), chất béo. Protein của đậu tương có đầy đủ các axit amin và tương đối cân đối tương đương với thịt. Có một điều cần lưu ý, trong đậu tương có một chất kháng tripxin (antitripxin). Chất này thường làm mất hoạt lực của những enzyme proteaza thuỷ phân protein. Vì vậy, khi sử dụng đậu tương để sản xuất tương, nước chấm hay đưa vào hợp phần thức ăn chăn nuôi, cần phải gia nhiệt làm chín hạt đậu (rang, luộc, hấp,...). Ở nhiệt độ cao, hạt đậu tương chín và chất kháng tripxin bị phá huỷ.

Đậu tương là loại hạt giàu chất dinh dưỡng như protein, chất béo, gluxit, muối khoáng và vitamin (trừ vitamin C và D). Đậu tương là cây thực phẩm quan trọng đối với người và gia súc, được trồng nhiều ở Mỹ, Trung Quốc, Nhật Bản, Brazin, Việt Nam và nhiều nước khác. Ngoài làm tương và nước chấm, đậu tương còn là nguyên liệu sản xuất đậu phụ, chao, dầu đậu nành, sữa đậu nành,... là những món ăn hàng ngày của nhân dân ta.

b) Các nguyên liệu phụ

Gạo nếp, gạo tẻ, bột ngô, bột mỳ.

Có thể sản xuất tương từ đậu tương với một trong những nguyên liệu phụ, hoặc từ tất cả. Trong các nguyên liệu phụ trên ta thấy hàm lượng gluxit, chủ yếu là từ tinh bột chiếm tới 73 – 75%, protein 7 – 8,5% (riêng bột mỳ tới 12,48%). Như vậy, các nguyên liệu này chứa chủ yếu là tinh bột. Trong tinh bột có hai cấu tử là amylozơ và amylopectin (tinh bột gạo nếp chủ yếu là amylopectin).

Chọn nguyên liệu cho sản xuất tương là những hạt nguyên hoặc đã xát vỏ, không bị mốc, mọt, chất lượng cao thì càng tốt.

Ngoài ra, cần có nguồn nước sạch, không cứng và ít vi sinh vật. Nước dùng sản xuất tương có thể là nước sạch bình thường cho sinh hoạt. Muối cần là muối sạch ít tạp chất.

9.4.2. Vi sinh vật dùng trong sản xuất tương

Giống vi sinh vật dùng trong sản xuất tương là mốc thuần chủng hoặc mốc hỗn hợp. Nấm mốc ở đây chủ yếu là các chủng thuộc giống *Aspergillus oryzae*. Mốc này thường khi sinh ra bào tử có màu vàng hoa cau. Mốc này sinh ra nhiều enzyme *amylaza, proteaza, invectaza, maltaza, catalaza*. Sinh trưởng của mốc ở khoảng nhiệt độ là 15 – 40°C, tối thích là 30 – 32°C.

Mốc vàng còn có một giống tương tự như *A. oryzae*. Đó là mốc *Aspergillus flavus*. Hai giống này rất khó phân biệt bằng mắt thường.

Mốc *A. flavus* có bào tử lúc đầu màu vàng sáng, sau chuyển sang màu nâu ôliu. Mốc này có hoạt tính enzyme proteaza khá cao, nhưng ở một số môi trường có chất béo, với điều kiện nhất định, mốc sinh ra độc tố gọi là aflatoxin (độc tố từ *A. flavus*). Độc tố này có thể làm sưng gan, sơ gan,... và dẫn tới ung thư.

Trong mốc tương của dân gian không thể loại trừ được mốc này. Hiện nay, có một số nhà nghiên cứu về mốc gộp chúng thành một nhóm mốc vàng *Aspergillus oryzae – flavus*.

9.4.3. Mốc tương

Gạo nếp, gạo tẻ, bột ngô mảnh nhỏ hấp (hoặc nấu chín), hạt phải tơi không dính bết, để nguội, tãi ra mẹt, nong, nia sạch, để tự nhiên trong điều kiện 28 – 35°C, độ ẩm không khí là 80 – 95%, trong thời gian 5 – 6 ngày. Mốc phát triển. Lúc đầu ta thấy hệ sợi trắng mọc lan truyền trên bề mặt rồi len lỏi vào các khe hở. Khối cơm, xôi dần khô, có thể phun nước sạch để độ ẩm giữ ở 50 – 60% và kết thành bánh, cần lật và bẻ nhỏ cho mốc mọc đều.

Mục đích chọn chỗ có màu vàng và nâu vàng lục, chỗ nào có mốc màu xanh, màu đen, màu hồng phát triển có thể loại bỏ. Khi khối xôi, cơm đã có bào tử mốc đồng đều, đem phơi khô hoặc sấy khô dưới 45°C. Khi phơi tránh ánh nắng trực tiếp. Khi khô, được mốc tương giống, được cho vào các lọ kín hoặc các bao gói PE, dán kín, cách ẩm. Cất giữ ở nơi khô ráo, mát mẻ. Ở nông thôn, mốc tương được gói kín, ngoài gói giấy báo hoặc lá chuối khô, gác trên gác bếp và để dùng dần. Các chợ vùng quê hiện nay cũng bán các loại mốc tương và kèm theo chỉ dẫn cách sử dụng mốc tương vào làm tương trong gia đình. Thời hạn sử dụng 6 tháng.

Trong mốc tương dân gian có nhiều giống mốc: *Mucor mucedo, M. plumbeus, M. racemosus, M. rouxii, Rhizopus nigricans, Syneephalasrum cinereum, S. racemosum, Aspergillus oryzae, A. flavus, A. niger, A. candidus, A. claucus, A. sydowi, A. versicolor, Penicillium commune, P. cycloplum, P. expasum, P. notalum, P. pubercclum, P. roquefoti, Alteraria tenuis, Cladosporium herbarum, Fusarium oxysporum, monilia sitophila, Torula conculuta, Tricoderma konigi, Tr. lignorum* (theo Lê Văn Phương, 1991) mới sinh trưởng, đến khi bắt đầu sinh bào tử thì môi trường nuôi cấy có nhiều enzyme và khi phơi, sấy nhẹ đến khô thì có thể coi đây là chế phẩm enzyme thô. Còn trường hợp nuôi mốc đến giai đoạn sinh trưởng với bào tử già thì chỉ là mốc giống trung gian (mốc được nhân giống cấp 2 hoặc cấp 3) trong sản xuất. Vì vậy, trong một số tài liệu thường viết "bổ sung 2 – 3% mốc" hoặc "canh trường mốc" vào,... là chưa rõ ràng về ý nghĩa thực vấn đề sử dụng enzyme.

– Cách sản xuất mốc tương thuần chủng và nhân giống trong sản xuất tương:

Giống mốc dùng trong sản xuất tương là *Aspergillus oryzae*, thường gọi là nấm mốc vàng hoa cau.

+ Giống gốc được lưu giữ trong phòng thí nghiệm với các điều kiện và các môi trường thạch trong ống nghiệm, hoặc giữ ở dạng bào tử như đã đề cập ở trên. Ở đây giới thiệu cách nhân giống từ ống nghiệm để có giống sản xuất.

+ Giống ống nghiệm được giữ trong tủ lạnh, đem cấy chuyền trên môi trường thạch – malt hoặc Kzapek Dox trong ống nghiệm, nuôi ở 30 – 32°C khoảng 5 – 6 ngày cho tới khi bào tử già. Bước cấy chuyền này được gọi là đánh thức giống trước khi đưa vào sản xuất.

+ Tiếp theo là nhân giống cấp 1 trong các bình tam giác với môi trường là gạo hấp chín hoặc ngô mảnh đã hấp chín. Giống ống nghiệm được hoà với nước vô trùng, lấy que gạt bông hệ sợi và lắc đều hệ sợi với bào tử trong nước rồi tiếp giống sang môi trường mới (gạo hấp chín, ngô mảnh hoặc có thêm bột đậu tương (mảnh hạt) đã rang chín rồi xay nhỏ) có trong bình tam giác 1 lít (mỗi bình có một lớp môi trường dày khoảng 2 – 3mm). Khi tiếp giống, lấy dịch giống ở ống nghiệm chuyển cho bình tam giác: Một ống giống cho 2 – 3 bình. Sau khi gieo cấy giống, lắc đều và giữ ở 30 – 32°C/ 5 – 6 ngày đến khi bào tử già.

Từ giống trong bình tam giác được cấy chuyền sang môi trường gạo + bột đậu tương hoặc ngô mảnh + bột đậu tương (có thể thêm 10% bột mỳ cho mỗi môi trường) để nhân giống cấp 2. Môi trường ở đây thường được làm ẩm ở 50 – 60% độ

ẩm, rồi đem hấp ở 121°C trong 3 – 4 giờ. Ngô mảnh, gạo trước khi hấp thường được ngâm nước 3 – 4 giờ, vớt ra để ráo nước mới đem chuẩn bị môi trường cấp 2.

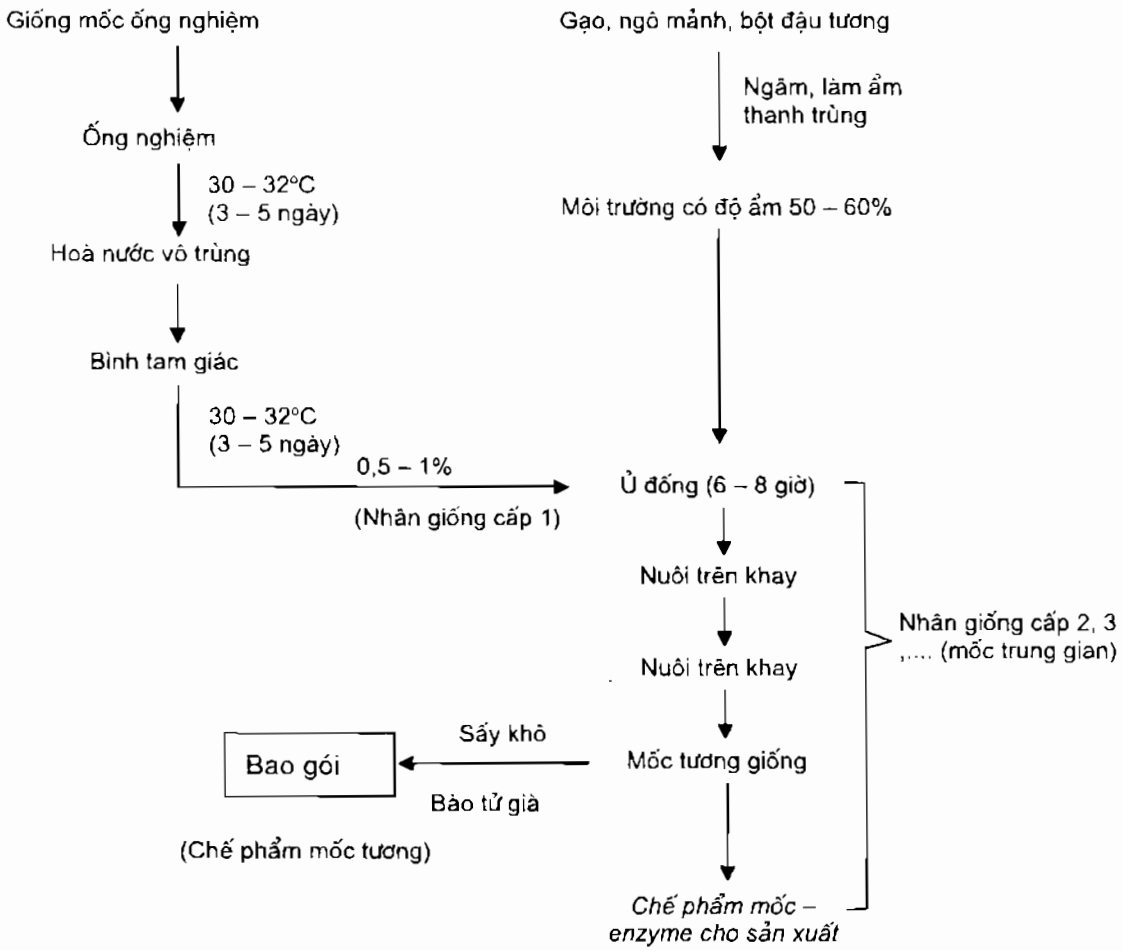
+ Nhân giống cấp 2: Sau khi tiếp giống vào môi trường cấp 2, đem ủ đống khoảng 6 – 8 giờ đến khi thấy đống môi trường nóng thì tãi ra các khay hay nong, nia sạch, đem nuôi ở 30 – 32°C trong phòng nuôi mốc theo phương pháp nuôi cấy bề mặt có điều khiển nhiệt độ, độ ẩm không khí ở 95%, có quạt hút và thổi khí. Quá trình nuôi thấy khối mốc khô dưới 45% thì phun thêm nước sạch, nếu thấy kết thành bánh thì bẻ nhỏ và lật dưới lên trên cho mốc đều. Có thể nhân giống cấp 3, cấp 4,...

+ Khi kết thúc nuôi, cần phân biệt 2 trường hợp:

* Nếu đem ngả tương cần khối mốc giàu enzyme và như vậy chỉ nuôi tới khi bắt đầu sinh bào tử. Đây là chế phẩm mốc – enzyme thô.

* Nếu để làm giống nhân giống tiếp hoặc giống đưa vào sản xuất với tư cách là giống khởi động thì phải nuôi cấy đến khi bào tử già. Trường hợp này giống như làm mốc tương và sản xuất giống bào tử.

Quá trình làm mốc tương và nhân giống sản xuất theo sơ đồ sau (hình 9.3).



Hình 9.3. Sơ đồ công nghệ nhân giống mốc tương cho sản xuất (hoặc mốc trung gian)

– Như vậy, theo sơ đồ này, chúng ta có thể thu nhận hai sản phẩm:

+ Chế phẩm mốc – enzyme (có nhiều enzyme có hoạt lực cao) dùng trực tiếp cho sản xuất: ngả tương.

+ Chế phẩm mốc giống, trong đó nguyên liệu môi trường nhân giống và hệ sợi cùng bào tử mốc có độ ẩm < 10%, giữ trong túi PE kín hoặc lọ kín, dùng dần làm giống khởi động cho các mẻ nhân giống hoặc lên men tiếp theo. Chế phẩm này cũng được dùng cấy vào cơ chất nguyên liệu là cơm xôi – ngô mảnh – đậu tương mảnh đã hấp chín, rồi nuôi trên khay (hoặc nong, nia) đến khi bắt đầu sinh bào tử thì đem ngả tương.

9.4.4. Quy trình công nghệ sản xuất tương

Kết hợp các quy trình công nghệ sản xuất tương ở các địa phương, một quy trình công nghệ có tính công nghiệp đã được đề xuất như sau:

a) Giống sản xuất

Mốc vàng hoa cau *Aspergillus* cất giữ trong ống nghiệm được nhân giống qua cấp 1 (trong bình tam giác), cấp 2 (3, 4,... nuôi trong khay) như ở hình 9.3. Chế phẩm thu được là: chế phẩm mốc – enzyme hoặc chế phẩm mốc sản xuất.

b) Nguyên liệu

Gồm có gạo tẻ (hoặc gạo nếp), ngô (xay thành mảnh, trước khi xay tách phôi để ép dầu thì tốt hơn) và đậu tương.

– Đậu tương cần phải xử lý như sau: chọn loại tốt đem vo, đãi sạch, hong khô và rang đến chín già, tách vỏ. Đậu rang chín có hai tác dụng: làm bất hoạt các antitripxin để nâng cao hiệu suất thuỷ phân của enzyme proteaza và dậu rang sẽ cho sản phẩm tương có mùi thơm cùng màu nâu khá đẹp.

Đậu rang đem xay thành bột hoặc xay vỡ đôi.

Từ những nguyên liệu này được chuẩn bị cho môi trường nhân giống hoặc lên men.

– Nhân giống: dùng chủ yếu là gạo và ngô (có thể thêm 10% bột đậu tương đã rang, trộn với nước có độ ẩm khoảng 50 – 60%, đem hấp ở 121°C/ 3 – 4 giờ, 1 hoặc 2 lần. Khi nguội, cấy mốc giống đến khi sinh bào tử ta có chế phẩm mốc – enzyme.

c) Ngả tương

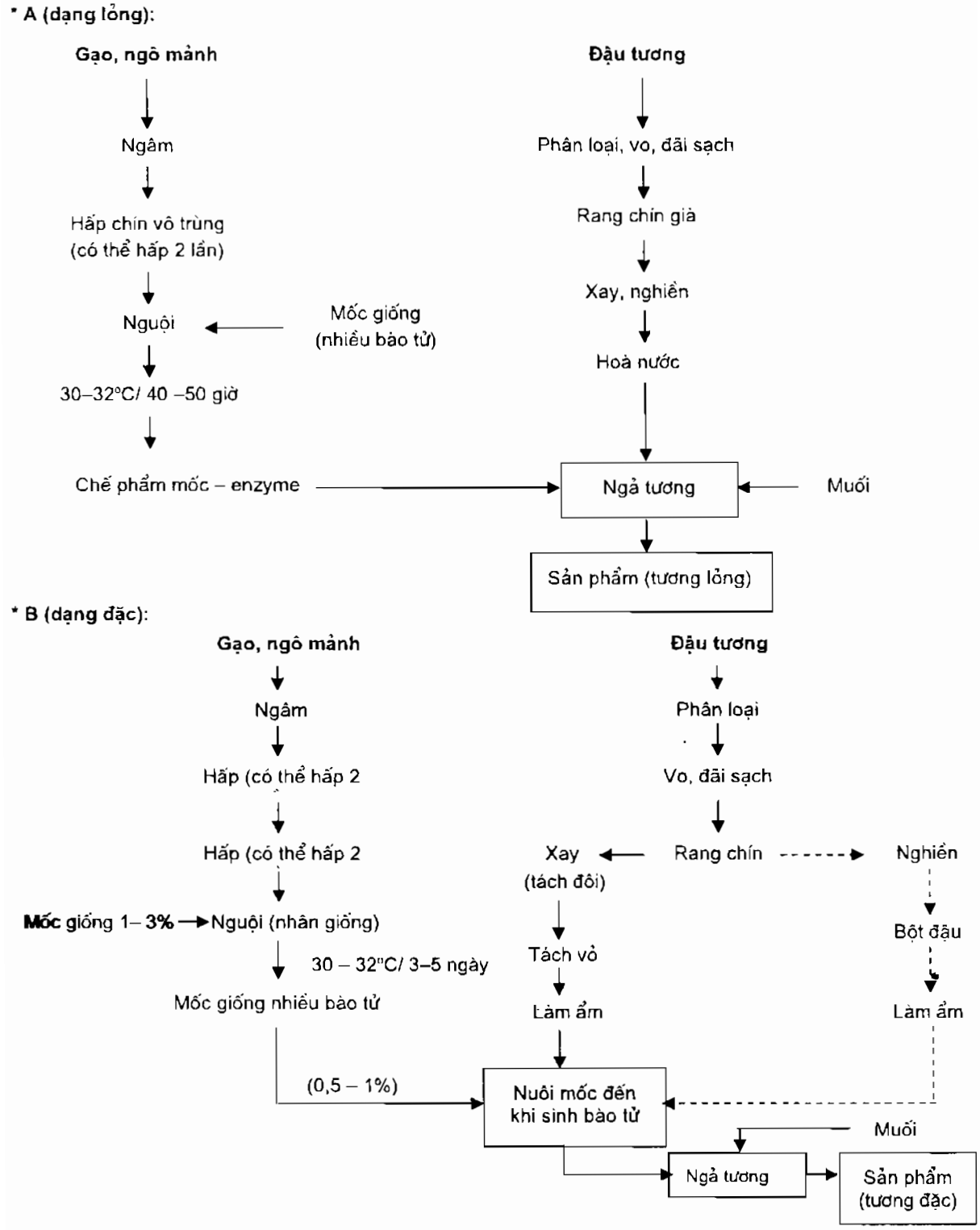
– Phân loại phương pháp:

+ *Thứ nhất:* chế phẩm mốc – enzyme được trộn với nước bột dậu và muối trong các chum, vại hoặc ang sành, khuấy đều, đậy kín.

+ *Thứ hai:* đậu tương vỡ đôi hoặc bột (đã rang) trộn nước có độ ẩm chung là 50 – 60%; hấp thanh trùng, tiếp mốc giống (chế phẩm có bào tử già), rồi nuôi trên khay đến khi mốc bắt đầu sinh bào tử, đem ngả tương trong chum, vại, ang sành sạch và thêm muối.

Quá trình thêm muối có thể thêm một lần hoặc 2, 3 lần để tương thành phẩm có khoảng 15% muối.

Như vậy, quá trình sản xuất tương theo sơ đồ công nghệ như sau (hình 9.4A và B).



Hình 9.4. Sơ đồ công nghệ sản xuất tương (A – lỏng, B – đặc)

– Một số công thức phối chế nguyên liệu:

+ Sản xuất tương dạng lỏng:

* Tương Bần – gạo nếp 33kg, đậu tương 12kg, muối sạch 16kg, nước 100 lít.

* Tương Cự Đà – gạo nếp 30kg, đậu tương 9kg, muối 13kg, nước 100 lít.

* Tương Nam – gạo nếp 20kg, đậu tương 10kg, muối 19kg, nước 124 lít.

(sản xuất hiện nay có thể thay ngô mảnh cho 1/2 lượng gạo nếp).

+ Sản xuất tương dạng đặc:

Đậu tương 5kg, gạo nếp 1kg, muối 0,12kg, nước 6 lít.

– Sau khi ngả tương, chum vại đựng tương được đậy kín và phơi nắng, hoặc trong sản xuất công nghiệp ngả tương trong các thùng thép, inox được gia nhiệt tới 52 – 55°C.

Ngả tương là quá trình lên men. Sau khi trộn lẫn chế phẩm mốc với đầy đủ nguyên liệu quá trình lên men bắt đầu. Trong quá trình này, vi sinh vật (mốc *A. oryzae*) không còn sinh trưởng và phát triển, nếu có, tác dụng của nó cũng không đáng kể, lúc này chỉ còn tác dụng của enzyme thuỷ phân do mốc giống đã sinh ra được tiết vào môi trường, hoặc tiếp tục được chiết rút từ hệ sợi và dịch ngả tương.

– Như chúng ta đã biết, trong quá trình nhân giống và nuôi cấy nấm mốc với môi trường có gạo nếp (hoặc gạo tẻ), ngô, đậu tương (như vậy chủ yếu là tinh bột và protein, chất béo) sẽ có các enzyme thuỷ phân được nấm mốc sinh ra là:

+ Hệ enzyme amylaza (α–, β–,γ–amylaza – hay glucoamylaza), trong số này α–amylaza hơi ít.

+ Proteaza gồm có proteaza và peptidaza.

+ Ngoài ra còn có lipaza, glucooxydaza và các enzyme khác với lượng nhỏ. Các enzyme amylaza và proteaza hoạt động chủ yếu trong thời gian ngả tương.

– Như chúng ta đã biết, nhiệt độ tối thích cho các enzyme hoạt động là: α–amylaza ở 70 – 73°C, β–amylaza ở 62 – 65°C, γ–amylaza ở 58 – 63°C, proteaza ở 48 – 52°C. Để dung hoà hoạt động của các enzyme này, chỉ cần gia nhiệt tối đa 52 – 55°C, vì cao quá proteaza sẽ dần mất hoạt tính.

Như vậy, trong tương chủ yếu là sản phẩm thuỷ phân từ tinh bột là đường maltozơ và glucozơ, các axit amin – sản phẩm thuỷ phân từ protein, các vitamin và muối khoáng có trong nguyên liệu.

Trong sản xuất tương thủ công thường đem chum tương đã ngả ra phơi nắng và giữa trưa hè cũng có thể nâng nhiệt độ tới 40°C. Việc phơi nắng tương ngả là điều hợp lý và như vậy cũng góp phần cho tương "chín ngấu" sớm hơn.

Ngả tương thủ công sau 10 ngày đã có mùi vị tương rõ rệt và có thể kéo dài tới 30 hoặc 100 ngày.

Với sản xuất tương công nghiệp khoảng 10 ngày, nếu nhiệt độ thấp, thời gian kéo dài hơn (bình thường từ 10 – 14 ngày). Nên nhớ rằng, tương ngả càng lâu càng có hương vị thơm ngon.

Trong sản xuất tương thủ công, người ta để xôi nguội cho nhiễm mốc tự nhiên, chọn loại mốc vàng rồi nuôi trực tiếp (hay nhân tiếp) để thu chế phẩm mốc – enzyme (khi mốc mới sinh bào tử rồi cho vào ngả tương).

Theo kinh nghiệm là tương của vùng Cự Đà, Khúc Thuỷ (Thanh Oai): sau khi rang đậu nghiền mảnh nhỏ trộn với mốc đã nuôi trên mẹt (nong, nia) 2 – 4 ngày, đến khi toàn khối đậu mọc mốc đều và mới chớm sinh bào tử, đem ngả tương. Theo ý tác giả, như vậy hoạt lực enzyme, trước hết là proteaza sẽ rất cao vì có đầy đủ cơ chất phản ứng. Trường hợp này không nên đưa nhiệt độ lên đến 55 – 60°C. Ở nhiệt độ này thường thích hợp cho các enzyme amylaza, nhưng proteaza bị biến tính và giảm hoạt lực.

9.4.5. Giá trị dinh dưỡng của tương

Như ta đã trình bày trong sản xuất tương, nguyên liệu chính là đậu tương và các hạt chứa gluxit. Do đó trong quá trình chuyển hoá trong tương, hàm lượng chất dinh dưỡng đáng chú ý nhất vẫn là protein, cụ thể là các axit amin và gluxit (đường glucozơ, maltozơ,...).

Ngoài ra, do quá trình chuyển hoá ấy mà tạo ra một số axit hữu cơ cung cấp cho tương mùi vị dễ chịu. Ngoài các thành phần cơ bản, tương còn cung cấp cho cơ thể chất béo, sinh tố và muối khoáng. Thành phần hoá học trong tương như bảng 9.7 và 9.8.

Bảng 9.7. Thành phần hoá học của tương

Thành phần	Hàm lượng (g/l)	
	Tương gạo	Tương ngô
Nước	58 – 68	560 – 650
Đạm toàn phần	6,6 – 9 2	6,4 – 9,4
Đạm amin	1,4 – 2,2	1,0 – 1,6
Đạm amoniac	0,35 – 0,45	0,36 – 0,48
Chất beo	7,0 – 9,1	12,0 – 15,5
Đường	140 – 172	65 – 120
Tinh bột	15 – 24	45 – 80
Xenlulozơ	0,5 – 1,5	0,8 – 2.0
Độ axit (axetic)	2,5 – 6,.5	3,5 – 7.4
Tro	110 – 160	115 – 160
NaCl	105 – 155	109 – 157
CaO	0,5 – 3,0	0,5 – 1,0
Fe_2O_3	0,0005 – 0,001	0,0005 – 0,001
P_2O_5	0,001 – 0,002	0,002 – 0.005
Vitamin B_1	310 – 500mg%	35 – 545mg%

Thường 1 lít cho 1.100 – 1.200 cal.

Bảng 9.8. Thành phần một số loại tương sản xuất ở Miền Bắc

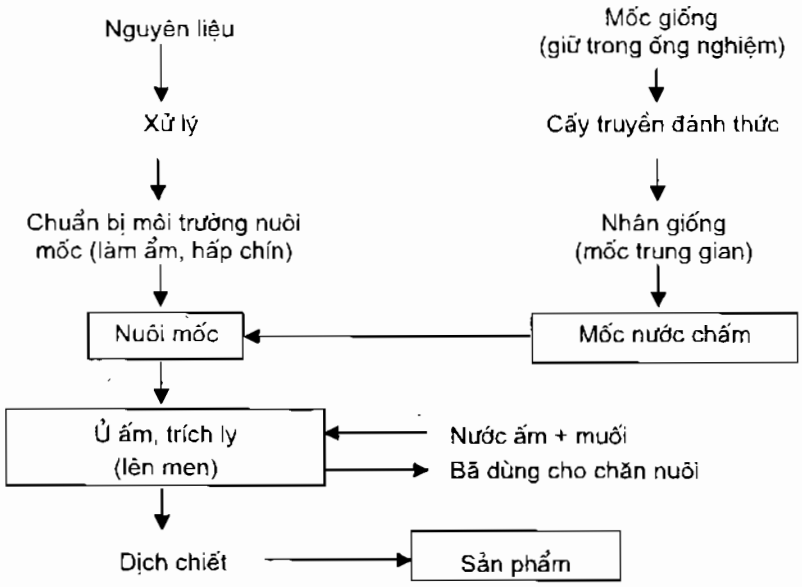
Loại tương	Đương khử (glucozơ) (g/l)	N formol (g/l)	Axit axetic (g/l)	NaCl (g/l)
Tương nếp	140	2,5	6	156
Tương tẻ	115 – 120	2,3 – 2,5	6	156
Tương ngô + mỳ	100	2,3	5 – 6	156
Tương Bần nếp	120 – 150	2,5 – 3,5	5 – 6	156
Tương Bần tẻ	100	2,5 – 3,5	5 – 6	156
Tương Bần ngô	80 – 90	2,5 – 3,5	6 – 9	156

9.5. SẢN XUẤT NƯỚC CHẤM

Nước chấm là một món ăn dạng lỏng, chủ yếu là axit amin với muối, có hương vị đặc trưng. Trong bữa ăn dùng để chấm hoặc trong nấu nướng dùng làm gia vị. Nước chấm còn được gọi là xì dầu hoặc xắng sáu. Hiện nay có một số cơ sở sản xuất nước chấm gọi loại này là "nước tương", như sản phẩm "nước tương" của hãng Chinsu.

Nước chấm được sản xuất bằng phương pháp lên men từ các nguồn nguyên liệu giàu protein như khô lạc, khô đậu tương, khô hạt hướng dương,... Nước chấm khá phổ biến trong dân ta, cũng như ở các nước châu Á và cả Âu Mỹ. Cơ sở khoa học của công nghệ sản xuất nước chấm là dựa trên cơ sở thuỷ phân protein thực vật bằng proteaza của nấm mốc thành hỗn hợp các axit amin (chủ yếu) và có thể còn các dạng peptit.

9.5.1. Quy trình công nghệ sản xuất nước chấm



Hình 9.5. Sơ đồ công nghệ sản xuất nước chấm

9.5.2. Nguyên liệu: Các loại khô dầu lạc, đậu tương, dầu bông hoặc hướng dương. Các loại hạt có dầu này đã được ép dầu, hàm lượng protein trong khô dầu có thể

tới 50 – 60%, tinh bột khoảng 30 – 40%. Nói chung là các khô dầu đã qua gia nhiệt, cần phải khô (độ ẩm < 10%), không mốc. Nếu khô dầu bị mốc thì rất có thể mốc đã tiết ra chất độc aflatoxin làm sưng gan, hoặc xơ gan và làm tiền đề cho bệnh ung thư gan.

Nguyên liệu khi đưa vào sản xuất cần được xử lý: xay nhỏ, trộn với 10% bột ngô hoặc bột mỳ, làm ẩm cho khối bột có độ ẩm chung là 50 – 60%. Sau đó hấp chín ở khoảng 1atm, khoảng 90 phút để thanh trùng. Đây là môi trường để nuôi cấy nhân giống hoặc nuôi cấy mở rộng để lên men. Khi nuôi cấy nhân giống trong sản xuất cũng như nuôi cấy mở rộng thường nuôi trên khay hoặc nong, nia, mành. Lớp môi trường dày khoảng 2 – 4cm.

9.5.3. Mốc nước chấm

– Về cơ bản sản xuất mốc nước chấm gần với sản xuất mốc tương. Sản xuất mốc nước chấm thủ công thường gây mốc từ cơm xôi trộn với bột khô dầu, chọn mốc vàng hoa cau, phơi khô, gói kín, bảo quản ở chỗ mát, khô ráo. Mốc nước chấm thủ công chủ yếu là mốc *Aspergillus oryzae* và *Aspergillus flavus*. Hai mốc này gần giống nhau, trong một số điều kiện *A. flavus* sinh ra aflatoxin.

– Trong sản xuất công nghiệp, mốc nước chấm là giống thuần chủng có khả năng sinh nhiều enzyme proteaza, amylaza và không sinh aflatoxin. Các chủng này thuộc các loài *Aspergillus oryzae, A. soyae, A. batatae, A. niger*,... (thông thường là các chủng của *A. oryzae* và *A. soyae*).

Mỗi giống được giữ trong ống nghiệm môi trường thạch – malt, thạch – đường – nước chiết đậu (đường 40g, nước chiết đậu 25g, thạch 25g/l, pH = 5,5 – 6).

– Cách sản xuất mốc nước chấm cũng giống như sản xuất mốc tương. Mốc nước chấm dạng khô nhiều bào tử có màu sắc khác nhau do màu bào tử của từng chủng loài khác nhau. Sau khi nhân giống, mốc được sấy ở ≤ 45°C, có quạt thổi đến khô, đóng bao PE kín hoặc trong lọ kín để dùng dần. Cũng có thể từ khi nuôi nhân giống đem sấy khô, rồi dùng chổi lông mềm thu bào tử, đóng giữ trong các lọ kín có chất chống ẩm và khi sử dụng dùng các bào tử này trực tiếp như là giống khởi động (giống ban đầu).

9.5.4. Nuôi mốc với cơ chất là nguyên liệu chính

– Nguyên liệu là các loại khô dầu sau khi đã được xử lý và chuẩn bị làm môi trường nuôi cấy mở rộng (xay nhỏ, làm ẩm, hấp thanh trùng và làm nguội tới 28 – 30°C) được gieo cấy mốc nước chấm theo tỷ lệ 0,5 – 1% mốc giống chứa bào tử (tính theo khối lượng nguyên liệu) hoặc 0,1% nếu chỉ là bào tử (bào tử có thể hoà với nước vô trùng trước khi tiếp giống). Trộn đều và ủ đống 6 – 8 giờ.

– Trong thời gian ủ đống, các bào tử ngậm nước sẽ nảy mầm hoặc các mẩu sợi cũng bắt đầu sinh trưởng. Khối môi trường dần nóng lên và được tãi mỏng trên khay (nong, nia hoặc mành sạch) với độ dày khoảng 3 – 4cm. Chú ý: khối môi trường cần đủ ẩm (50 – 55%), không bết, đảm bảo thoáng khí.

– Khoảng 20 giờ tiếp theo mốc phát triển hệ sợi và dính kết các mảnh bột khô dầu và thường phát triển trên bề mặt môi trường, tiếp tục toả nhiệt vào môi trường khô dầu.

– Trường hợp môi trường khô dưới 45% cần phải phun nước vô trùng để làm ẩm (không quá 60% độ ẩm) và lật lớp khô dầu, nếu kết bánh nên bẻ vỡ thành những cục nhỏ và tơi. Nấm sẽ phát triển tiếp tục, đến giờ 40 – 48 (hoặc có thể muộn hơn) sẽ bắt đầu sinh bào tử. Quan sát bằng mắt thường, khi đầu các sợi khí sinh đen lấm tấm như đầu kim, kết thúc nuôi mốc và chuyển sang ủ ấm trích ly. Khối môi trường khi này rất giàu enzyme proteaza và amylaza (do mốc sinh ra).

– Buồng nuôi mốc trong sản xuất nước chấm công nghiệp là các buồng kín, ra vào phòng tránh gió lùa, được trang bị hệ thống thổi khí sạch và hút khí có nhiều CO_2 ra khỏi buồng, hệ phun mù để đảm bảo độ ẩm không khí trong buồng là 95%. Không khí được đưa vào buồng qua hệ thống lọc sơ bộ để loại các hạt bụi lẫn vi sinh vật ở trong khí trời. Khi thổi khí có tác dụng tăng cường độ thoáng khí cho môi trường nuôi cấy cũng như có tác dụng hạ nhiệt. Buồng được trang bị hệ thống điều hoà là tốt nhất.

Các khay có môi trường đang nuôi cấy nấm mốc được đặt trên các giá thành hàng lối, đi lại dễ dàng để tiện việc chăm sóc mốc phát triển.

9.5.5. Ủ ấm trích ly

– Khi kết thúc nuôi cấy mở rộng trên môi trường là bột khô dầu (chủ yếu là khô đậu tương hoặc khô lạc) cho cả khối vào các thùng ủ ấm trích ly. Đây là quá trình lên men dựa trên cơ sở thuỷ phân protein và tinh bột có trong nguyên liệu nhờ enzyme cảm ứng của mốc sinh ra.

Các enzyme α–, β– và γ– amylaza thuỷ phân tinh bột đến các dextin và đường maltozơ, đường glucozơ. Nếu trong đó β– amylaza (glucoamylaza vượt trội) thì sản phẩm thuỷ phân sẽ chủ yếu là glucozơ.

Các enzyme protelytic (proteaza, peptidaza) sẽ thuỷ phân protein thành các peptit và axit amin (chủ yếu).

– Trong quá trình ủ ấm, dùng nước muối (nồng độ 5 – 10%), gia nhiệt và giữ thùng thuỷ phân ở nhiệt độ 50 – 55°C. Như vậy, quá trình này ưu tiên cho enzyme proteaza hoạt động cùng với amylaza. Các phản ứng thuỷ phân xảy ra cũng giống như trong công nghệ làm tương (khi ngả tương). Thời gian thuỷ phân hay lên men khoảng 64 –72 giờ và bắt đầu chiết rút dịch (làm đi làm lại nhiều lần). Quá trình chiết rút này gọi là quá trình trích ly. Dịch chiết lần thứ nhất thường có độ đạm (tổng N) cao, vị ngọt dạm, màu xấu và chiếm tới 60 – 80% lượng nguyên liệu đem thuỷ phân. Lần hai thu được sau khi ngâm bã 12 – 16 giờ với nước muối 15 – 18% và tiếp tục với các lần sau nếu thấy chưa trích ly hết.

– Dịch chiết (trích ly) được phối trộn với nhau được nước chấm thương phẩm sau khi đun sôi hoặc đun nóng ở 60 – 70°C trong 90 – 120 phút.

Thông thường 1kg khô dầu có thể sản xuất ra 3 – 4 lít nước chấm có độ đạm (tổng N) 13 – 17%, dịch nước màu nâu sẫm hoặc màu cánh gián, vị ngọt – mặn, pH khoảng 4,5 – 5,5, muối 18 – 25%.

Nước chấm lên men nhờ mốc *Aspergillus oryzae* không có 3 – MCPD (3 - monocloropropan – 1,2 – diol). Chất này là phức của clo với dẫn xuất của axit béo có trong nguyên liệu và tác hại của nó có thể gây ung thư. Khi thuỷ phân khô dầu bằng HCl, trong dịch axit amin thành phẩm dễ lẫn 3 – MCPD. Nước chấm lên men từ nấm mốc cần phải cảnh giác với aflatoxin.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 9

1. Cơ sở khoa học của sản xuất nước mắm.
2. Tại sao trong sản xuất nước mắm, người ta nên phơi ở ngoài nắng và khi thuỷ phân xong người ta cần ủ dài ngày?
3. Cơ sở khoa học của nghề làm tương.
4. Tại sao ủ tương, người ta cũng cần phơi nắng và ủ cũng tương đối dài ngày?
5. Làm nước chấm khác với làm tương ở những điểm nào?
6. Hãy cho biết quy trình làm nước chấm từ khô đậu tương bằng chế phẩm enzym – nấm mốc.

Chương 10

NUÔI TRỒNG NẤM ĂN

Loài người đã biết sử dụng nấm ăn làm nguồn dinh dưỡng quý giá từ ngàn năm về trước. Từ trước đến nay, nhiều người trong chúng ta cho nấm là loài thực vật hạ đẳng và nuôi trồng nấm ăn lại xếp vào công nghệ lên men có vẻ như hài hước. Song, sự thật không phải như vậy.

Tất cả các loài nấm đều không có chất liệu diệp lục, vì vậy nấm không thể quang hợp như cây xanh. Do đó, không thể xếp nấm vào giới thực vật.

Nấm thuộc về một giới riêng biệt, được gọi là giới nấm, như các giới khác (giới thực vật, giới động vật, giới vi khuẩn và vi khuẩn lam). Giới nấm bao gồm nấm men (đơn bào, sinh sản chủ yếu là nảy chồi), nấm sợi và nấm bậc cao (nấm quả thể – nấm mũ).

Khoá phân loại nấm hiện đại gồm các ngành và ngành phụ như sau:

1. Ngành nấm nhày (Myxomycota)

2. Ngành nấm thật (Eumycota)

2.1. Ngành phụ nấm tiên mao (Mastigomycotina)

2.2. Ngành phụ nấm tiếp hợp (Zygomycotina)

2.3. Ngành phụ nấm túi (Asconycotiana)

2.4. Ngành phụ nấm đảm (Basidimycotina)

2.5. Ngành phụ nấm bất toàn (Deuteromycotina)

Tất cả các loài nấm ăn được đều thuộc Nấm túi và Nấm đảm.

Sản lượng nấm ăn hiện nay trên thế giới có lẽ đã gần 2 triệu tấn/ năm, trong đó nấm đồng nội (champignon: nấm mỡ, nấm rơm, nấm sò) chiếm khoảng 75%.

Kỹ thuật trồng nấm dựa trên cơ sở công nghệ cổ truyền có cải tiến nuôi trồng theo luống, theo đống,... Kỹ thuật trồng nấm công nghiệp dựa trên cơ sở công nghệ lên men: tách giống thuần chủng, nuôi nhân giống và gieo trồng trên cơ chất đã xử lý với các quá trình như nuôi cấy vi sinh vật trong các gian, hòm, thùng, contenol,... với các điều kiện thích hợp với sinh lý của nấm để *thu hệ sợi nấm*.

Như vậy, nuôi trồng nấm ở điều kiện công nghiệp là quá trình lên men một pha: pha sinh trưởng dã thu sinh khối nấm. Do đó, chúng tôi xếp kỹ thuật nuôi trồng nấm ăn vào công nghệ lên men. Hơn nữa, quá trình xử lý nguyên liệu để nuôi nấm là quá trình ủ phân giải các hợp chất hữu cơ cao phân tử thành đường và các hợp chất có phân tử lượng thấp để nấm có thể đồng hoá được cũng là một quá trình lên men. Như vậy, công nghệ nuôi trồng nấm ăn có những hai quá trình lên men.

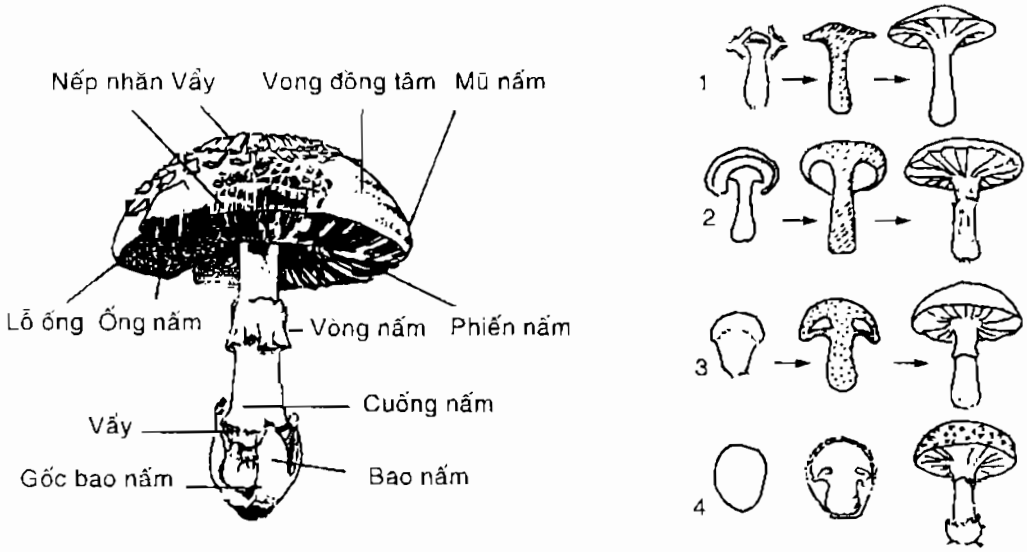
Nấm không có khả năng quang hợp, do đó chúng không thể tự dưỡng (autotroph) mà chỉ có đời sống dị dưỡng (heterotroph) như hầu hết các giống vi sinh vật dùng trong công nghệ lên men, nghĩa là nấm phải sống trong môi trường có thức ăn là các

chất hữu cơ. Các nấm sống trên chất hữu cơ đã chết (xác động, thực vật phân huỷ) thì được gọi là nấm hoại sinh (saprophyt). Các loài nấm ăn được đều là những loài dị dưỡng, hoại sinh.

Nói chung, nấm có thể phát triển từ bào tử hoặc từ mẩu sợi. Bào tử nảy mầm theo nhiều hướng khác nhau, sợi nấm phân nhánh nhiều lần, tạo nên một mạng lưới sợi dày chằng chịt và thường có màu trắng. Trên mạng sẽ sinh các nút và từ đây tạo thành quả.

Cấu tạo của nấm ăn gồm: hệ sợi và quả nấm. Hệ sợi nấm phát triển sinh ra quả nấm. Quả nấm ở nấm đảm gọi là quả đảm (basidicarp), ở nấm túi – quả túi (ascocarp).

Phần trên cùng của quả nấm là mũ nấm (pileus, cap) hình 10.1. Mũ nấm được mọc trên cùng nấm (stipe). Cũng có loài nấm chỉ có quả không có cuống. Mặt dưới mũ nấm có nhiều phiến. Khi cuống nấm và mũ nấm chưa nở ra thì quả nấm được gọi là nụ nấm. Nụ nấm là dạng thu hoạch thích hợp nhất của nấm rơm. Nói chung, các loại quả nấm là cơ quan sinh sản, cũng là cơ quan sinh bào tử của các loại nấm bậc cao. Đó chính là phần thu hái để ăn quả các loài nấm ăn. Nói chung, quả nấm (hay thể quả của nấm) khi chưa già (chưa nở xoè) là thức ăn giàu chất dinh dưỡng đối với con người. Sản phẩm thu được có thể sử dụng trực tiếp như các loại rau hoặc như gia vị thêm vào thức ăn. Trong trường hợp sau chấp nhận sử dụng sợi nấm khô dạng bột.



Cấu tạo của nấm (quả thể) Bốn kiểu hình quả nấm

Hình 10.1. Cấu tạo và các kiểu hình thành quả nấm

10.1. GIÁ TRỊ DINH DƯỠNG CỦA NẤM ĂN

Nấm có thể được coi là một loại rau cao cấp. Ngoài hương vị thơm ngon còn có giá trị dinh dưỡng cao, nấm khá giàu protein, vitamin và chất khoáng. Hàm lượng protein của nấm thấp hơn thịt, cá nhưng cao hơn bất kỳ một loại rau quả nào khác, đặc biệt trong protein nấm có đủ axit amin không thể thay thế, trong đó giàu lơxin và lizin (hoặc axit amin này có ít trong ngũ cốc).

Hàm lượng hydratcacbon đường – bột có ở trong nấm thường dao động trong một khoảng lớn (3 – 28%), có khi cao hơn, tuỳ thuộc vào từng loài.

Nấm chứa nhiều vitamin A, B, C, K, D, E, PP, nhiều nhất là các vitamin nhóm B (B_1, B_2, B_3). Một số loài nấm có cả vitamin B_{12}.

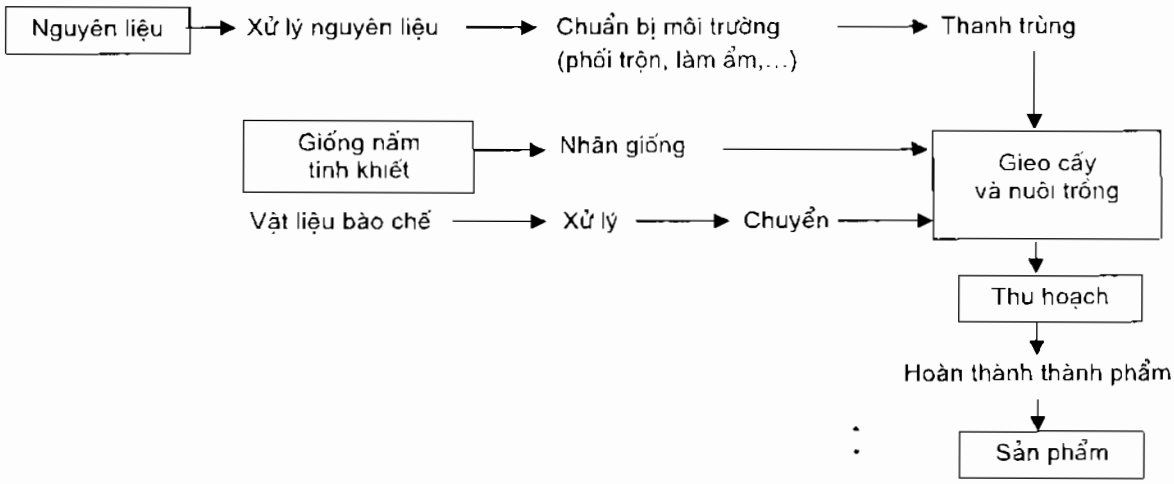
Trong sinh khối nấm khá giàu các chất khoáng, như K, Na, Ca, P, Mg,... có thể chiếm tới 60 – 70% lượng tổng cộng. Ăn nấm được bổ sung, cung cấp đầy đủ nhu cầu về chất khoáng mỗi ngày.

Riêng hàm lượng chất béo và bột ở nấm thấp, phù hợp cho những người ăn kiêng, đặc biệt là bệnh nhân tiểu đường và cao huyết áp. Lượng Na trong nấm cũng thấp thích hợp cho những người bị bệnh thận.

10.2. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT NẤM ĂN

Gieo giống và nuôi trồng nấm ăn về nguyên lý theo sơ đồ công nghệ như sau:

Sơ đồ công nghệ:



Hình 10.2. Sơ đồ quy trình công nghệ gieo giống và nuôi trồng nấm ăn

10.3. GIỐNG NẤM ĂN

Như chúng ta đã biết, các chủng nấm dùng để sản xuất nấm ăn thuộc hai ngành phụ là nấm Túi (có tỷ lệ 5,6% số chủng) và Nấm đảm (94,4%). Thuộc ngành phụ Nấm đảm (Basidimycotina) có khoảng 30 ngàn loài, đa số ăn được và có một số ít nấm độc. Chúng có khả năng tạo quả (thể quả). Cấu tạo quả nấm đã được giới thiệu ở hình 10.1.

Sản xuất nấm ăn là thu hoạch ở thể quả trưởng thành (chưa sinh bào) và cũng có thể là dạng sợi sạch phân nhánh như các cơ sở sản xuất nấm với quy mô công nghiệp tại Âu – Mỹ. Ở Tây Âu có khoảng 500 loài nấm ăn, trong đó có 50 loài dùng trong sản xuất, ở CHLB Nga có 300 loài và dùng trong sản xuất là 40 loài.

Chu kỳ phát triển của các loài nấm đảm khá phức tạp và có nhiều giai đoạn. Nấm đảm nói chung có tới 3 lớp sợi nấm: sợi sơ sinh, sợi thứ sinh và sợi tam sinh.

Sợi sơ sinh lúc đầu không có vách ngăn và có nhiều nhân, vách ngăn dần được tạo thành và phân thành các tế bào đơn nhân nằm trong sợi nấm. Sợi thứ cấp là sự phối hợp hai sợi sơ cấp, nhưng hai nhân vẫn đứng riêng rẽ làm cho tế bào có hai nhân (song nhân). Sợi tam sinh là sợi thứ cấp phát triển thành. Các sợi nấm liên kết chặt chẽ và sinh ra thể quả (quả nấm). Khi quả nấm trưởng thành và già sẽ sinh ra bào tử. Bào tử của nấm có nhiều màu sắc: trắng, đỏ, tím, đen, nâu. Giống nấm có thể phát triển bằng bào tử và mẩu sợi nấm. Do vậy, giống gốc nấm sản xuất được giữ trong môi trường thạch ở dạng bào tử hoặc dạng sợi.

10.3.1. Phân lập và tuyển chọn, giữ giống nấm ăn

Trong sản xuất nấm ăn cũng như trong lên men vi sinh vật nói chung, người ta phải phân lập để tuyển chọn các giống thuần chủng thích hợp với điều kiện sản xuất nhằm thu được hiệu quả kinh tế cao.

- Các môi trường dùng phân lập nấm ăn có thể là như sau:

+ Môi trường Hansen: Đường (glucozơ hoặc sacarozơ) – 50%, Pepton - 10%, KH_2PO_4 – 3g, $MgSO_4.7H_2O$ – 2,5g, cao nấm men – 1g, thạch – 20g, nước đủ 1 lít.

+ Môi trường Czapek – Dox. Đường kính – 30g, $NaNO_3$ – 3g, KH_2PO_4 - 1g, $MgO_4.7H_2O$ – 0,5g, KCl – 0,5g, $FeSO_4.7H_2O$ – 0,01g, thạch – 20g, nước đủ 1 lít.

+ Môi trường Sabouraud: Glucozơ – 40g, pepton – 20g, thạch – 20g, nước – 1 lít.

+ Môi trường thạch – glucozơ – pepton (DPA): Dextrozơ hoặc glucozơ – 20g, pepton – 20g, thạch – 20g, nước – 1 lít.

+ Môi trường thạch – khoai tây – muối khoáng: thành phần giống môi trường DPA với khoai tây làm cơ chất, nhưng được thêm KH_2PO_4 – 3g, $MgSO_4.7H_2O$ – 1,5g và 2 – 4 viên vitamin B_1 (10 – 20mg), nước cho đủ 1 lít.

+ Rơm, rạ: rửa sạch, cắt nhỏ – 200g, đường kính – 20g, $(NH_4)_2SO_4$ – 3g, thạch – 20g, nước – 1 lít.

+ Môi trường thạch – bột ngô – pepton: bột ngô – 20g, Glucozơ – 20g, KH_2PO_4 – 1g, $MgSO_4.7H_2O$ – 0,5g, pepton – 1g, thạch – 20g, nước – 1 lít.

Có thể dùng nước chiết giá đậu thay khoai tây trong môi trường khoai tây. Các môi trường trên cần điều chỉnh pH về 5,5 và cho thêm chất kháng sinh để hạn chế nhiễm khuẩn. Chất kháng sinh dùng ở đây là Streptomixin với liều lượng 30mg/l. các chất thuộc họ tetraxyclin – 20mg/l.

Cách chuẩn bị môi trường ở đây giống như trong các thí nghiệm về vi sinh vật.

– Cách phân lập:

Thường người ta dùng dao nhỏ, sạch cắt một miếng trên mũ nấm đã chín để vào ống nghiệm, dưới đáy ống nghiệm đã có một ít nước vô trùng hoặc để miếng mũ nấm vào các hộp petri đã có môi trường, khoảng 1 – 2 ngày, bào tử bắn từ mũ nấm vào nước trong ống nghiệm hoặc mặt thạch trong hộp petri. Dùng que gạt trên mặt thạch trong hộp petri hoặc dùng que cấy hoặc pipet vô trùng hút nước ở đáy ống nghiệm có bào tử nấm cấy vào môi trường thạch trong hộp petri.

Khi thấy sợi nấm mọc trên mặt thạch, lấy que cấy nhọn đầu mang sợi nấm

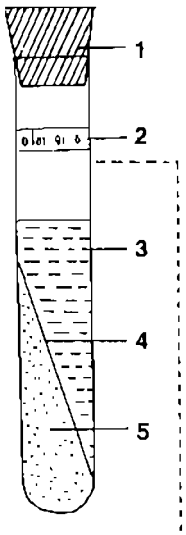
cấm sang ống thạch nghiêng, giữ ở nhiệt độ bình thường 5 – 7 ngày, cấy chuyền sang ống nghiệm khác.

– Giữ giống nấm ăn (hình 10.3):

+ Khi nấm ăn đã phát triển tốt trên ống thạch nghiêng, ta đổ một lớp dầu khoáng (parafin) lên trên bề mặt môi trường thạch và giữ ở trong lạnh 4 – 10°C.

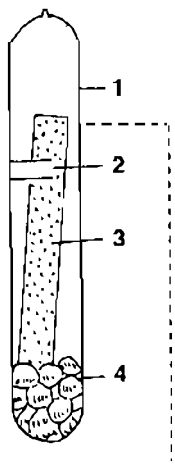
+ Nuôi nấm trong môi trường lỏng, đặt trên máy lắc, khi nấm phát triển thành các hạt sợi nấm, đem ly tâm loại dịch, lấy hạt nấm cho vào ống nghiệm, rồi thêm nước muối sinh lý phủ kín lớp hạt và ngập trên lớp hạt khoảng 1 – 2cm. Sau đó cũng đem bảo quản ở lạnh.

+ Cũng có thể băng giấy lọc thấm dịch bào tử nấm rồi để vào ống nghiệm.



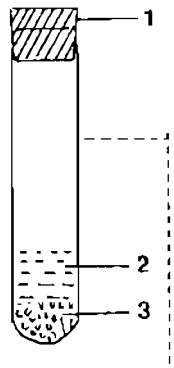
Cấy trên thạch nghiêng rồi phủ mặt thạch bằng dầu khoáng (dầu parafin)

1. Nút cao su, 2. Nhãn ghi số hiệu giống, 3 Dầu khoáng; 4. Vết cấy đã mọc tốt, 5 Môi trường thạch nghiêng



Cách dùng giấy lọc vô trùng thấm dịch bào tử rồi làm khô, cho vào ống chứa silica–gel (chất hút ẩm) rồi hàn ống lại

1. Ống thuỷ tinh; 2. Nhãn ghi số hiệu giống; 3. Giấy lọc đã thấm bào tử nấm; 4 Silica–gel (chất hut ẩm)



Cách nuôi cấy hạt, sợi nấm (nuôi cấy sợi nấm trên máy lắc bằng môi trường dịch thể để sợi nấm phát triển thành các hạt xốp hình cầu)

1 Nút cao su, 2 Nước muối sinh lý (NaCl 0,8%), 3 Các hạt sợi nấm

Hình 10.3. Một số hình thức giữ giống nấm ăn

10.3.2. Nhân giống

Trong sản xuất nấm ăn cũng như lên men vi sinh vật, giống cần phải được nhân giống nhằm tăng số lượng tế bào giống để có thể lên men hoặc hấp thu lượng cơ chất trong sản xuất lớn, tạo ra số lượng sản phẩm thích hợp, có chất lượng cao.

– Giống cấp 1 là giống trong ống nghiệm mới được cấy chuyền từ giống gốc. Qua xác định sơ bộ, đây là giống bình thường vẫn giữ được các đặc điểm cần có cho giống sản xuất.

– Giống cấp 2 là giống nuôi trong các bình thuỷ tinh hoặc bao nhựa plastic có nút bằng bông mỡ.

Giống cấp 2 được nuôi trên các môi trường khác nhau, nhưng đều là các cơ chất rắn trong môi trường xốp dễ thông thoáng khí. Các cơ chất trong môi trường

nhân giống cấp 2 là ngũ cốc, cám, mùn cưa. Có thể dẫn ra đây 4 trong số vài trăm môi trường nhân giống cấp 2 nấm ăn theo phương pháp bề mặt.

1)	Mùn cưa gỗ mềm (không chứa tinh dầu)	78%
	Cám gạo	20%
	Đường kính	1%
	Bột thạch cao	1%
	Nước	140 – 160%
2)	Thóc	98%
	$CaCO_3$	2%
	Nước	140 – 160%
	Thóc được ngâm	16 – 24 giờ
3)	Thóc	93%
	$CaCO_3$ (hoặc bột thạch cao)	2 – 3%
	Mùn cưa	3 – 4%
	Nước đủ ẩm (Thóc và mùn cưa đã ngâm như trên)	
4)	Rơm, rạ (cắt nhỏ)	63%
	Supephotphat	3%
	Phân lợn, phân ngựa hoặc phân trâu, bò khô	25%
	Bột đậu tương	3%
	Bột ngô	4%
	$MgSO_4.7H_2O$	2%

Rơm, rạ phải ngâm nước sao cho độ ẩm cuối cùng khoảng 60%, pH sau khi khử khuẩn là 6,2 – 6,8.

Môi trường nuôi giống cấp 2 cần có độ ẩm khoảng 40% được cho vào các bình, lọ thuỷ tinh hoặc nhựa có nút bằng bông mỡ (không chặt quá và cũng không lỏng quá). Khi cho môi trường vào bình, tránh dính vào miệng bình, không nên cho đầy quá (cần có một khoảng cách từ bề mặt môi trường đến nút) và cũng đừng lèn chặt (vì môi trường cần thông thoáng). Môi trường và đồ chứa đựng cần được hấp trùng trong các nồi hấp áp lực với 1 atm (khoảng 121°C từ 45 đến 120 phút). Nếu không có nồi hấp thì hấp cách thuỷ ở nhiệt độ 90 – 95°C khoảng 1 – 2 giờ, để nguội, rồi lại hấp (cần phải hấp đến 3 lần, thời gian để nguội 1 – 2 ngày). Hấp kiểu này gọi là hấp Tyndall hay hấp Pasteur ở nhiệt cao.

Yêu cầu giống cấp 2: nấm mọc tương đối nhanh, sớm mọc hệ sợi phủ trắng môi trường trong bình (hoặc bọc thành màng mỏng), không bị nhiễm tạp. Khi giống bị nhiễm tạp thường có mùi vị lạ và hệ sợi có chỗ loang lổ với các màu khác, không trắng như sợi nấm.

10.3.3. Một số đại diện nấm ăn dùng trong sản xuất

10.3.3.1. Nấm rơm (volvariella)

Hiện nay người ta mới sử dụng 5 loài nấm ăn vào sản xuất, đó là:

Volvariella volvacea (Bull.ex fr). Sing

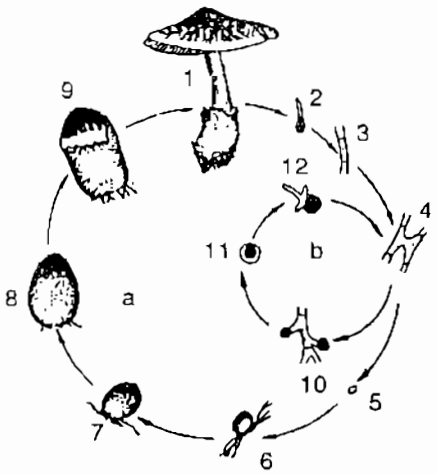
Volvariella volvacea (Bull. ex Fr). Sing var massei Sing

Volvariella volvaea (Bull. Ex Fr) Sing var hemii Sing

Volvariella esculenta (Mass) Sing còn gọi là Volvariella Bresdolac Sacc and Trott

Volvariella diplasia (Berk et curt) Sing

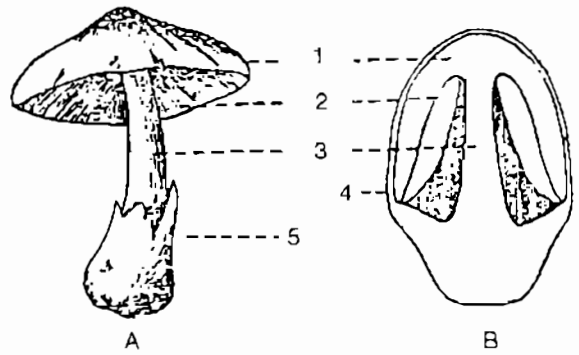
Nấm rơm (nấm rạ hay nấm Đông Cô) có tên khoa học là *Volvariella volvacea* ở châu Âu còn gọi là nấm chuối (hình 10.4). Nấm rơm có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới và á nhiệt đới. Nhiệt độ và độ ẩm thích hợp cho phát triển là khá cao; bào tử của nấm này nảy mầm thích hợp ở 40°C, không nảy mầm khi nhiệt độ thấp hơn 25°C, hoặc cao hơn 45°C. Độ ẩm không khí thích hợp cho nấm là 90% ± 5%, cao hơn 96% dễ bị thối nhũn. Sản phẩm thu hoạch khi quả ở dạng hình trứng, chưa nở xoè ra (hình 10.4). Nấm rơm có giá trị dinh dưỡng cao. Người châu Á biết ăn nấm rơm từ rất lâu, song 200 năm trở lại đây mới biết nuôi trồng ở nhiều nước châu Á, châu Phi và châu Âu. Sản lượng nấm rơm là trên 250.000 tấn (năm 1995), riêng Trung Quốc là 150.000 tấn.



Chu trình sống của nấm rơm *Volvariella*

a) Chu trình sinh sản vô tính, b) Chu trình sinh sản hữu tính.

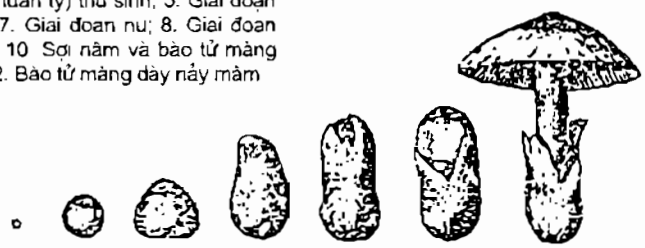
1. Thể quả chín (nở xoè); 2. Bào tử đảm nảy mầm, 3. Sợi nấm (khuẩn ty) sơ sinh, 4. Sợi nấm (khuẩn ty) thứ sinh, 5. Giai đoạn đầu ghim, 6. Giai đoạn nụ nhỏ, 7. Giai đoạn nụ; 8. Giai đoạn hình trứng, 9. Giai đoạn kéo dài, 10. Sợi nấm và bào tử màng dày, 11. Bào tử màng dày chín; 12. Bào tử màng dày nảy mầm



Hai giai đoạn ở thể quả của nấm rơm

A. Giai đoạn nở xoè: B. Giai đoạn trứng.

1. Mũ nấm; 2. Các phiến nấm; 3. Cuống nấm, 4. Bao ngoài, 5. Bao gốc.



Các giai đoạn phát triển của thể quả ở nấm rơm

Hình 10.3. Các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của nấm rơm

10.3.3.2. Nấm sò (nấm Pleurotus)

Nấm này còn có tên là Nấm bào ngư, *Oyster mushroom*. Tên khoa học *Pleurotus* (tên giống hoặc chi).

Nấm sò có tới 50 loài, trong này có 10 loài được dùng trong nuôi trồng.

Đó là:

– Nấm sò màu hồng đào: *Pleurotus salmoneostramineus* L. Vass (Pink Oyster Mushroom). Quả to vừa phải, đường kính mũ nấm là 3 – 14cm, cuống ngắn. Quả màu hồng đào, cuối cùng chuyển thành màu nâu đất hoặc vàng nhạt.

– Nấm sò hoàng bạch – *Pleurotus cornucopiae* (Paul.ex Pers.) Roll (Branched Oyster Fungus). Loại nấm sò nhỏ, mũ nấm khoảng 5 – 13cm, lúc đầu có hình bán cầu bẹp, về sau cuống dài ra khoảng 2 – 5cm. Nấm có màu trắng hay gần trắng, có lúc màu nâu nhạt, thịt khá dày.

– Nấm sò tím – *Pleurotus ostreatus* (Jacquin Fr.) Quél (Oyster mushroom).

Quả vừa hoặc lớn, mũ nấm khoảng 5 – 21cm, màu trắng, to, trắng xanh, nhưng khi mới nở màu tím. Cuống mọc xiên gần như không có và chỉ dài 1 – 3cm. Gốc cuống có lông nhung. Nấm này ăn khá ngon và có giá trị dược liệu.

Nuôi cấy nấm này theo công nghệ thông thường (nuôi cấy bề mặt) hoặc nuôi cấy chìm trong các bình lên men thu sinh khối.

Nấm còn có tên là nấm sò đông, nấm hương chân ngắn, hoặc nấm sò da hổ.

– Nấm này sò Đài Loan – *Pleurotus cystidiosus* O.K. Miller (Cystidi ate Pleurotus, Abalone Pleurotus).

Đây là nấm sò ưa nóng, quả khá to (7 – 12cm), màu nâu pha cam tro, trên bề mặt có vẩy nâu đen, giữa có vẩy nâu khói, nấm ăn ngon.

Ngoài các loài trên, ta còn thấy nấm sò viên bào, nấm sò phượng hoàng, nấm sò Ấn Độ, nấm sò cuống dài, nấm sò phiến hồng, nấm sò A nguy, nấm sò Kim Đỉnh.

Nhiều nước trên thế giới đã nuôi trồng nấm sò, đặc biệt ở châu Âu và châu Á. Ở châu Á có Nhật Bản và nhiều nước Nam Á, Đông Nam Á cũng trồng nhiều nấm sò.

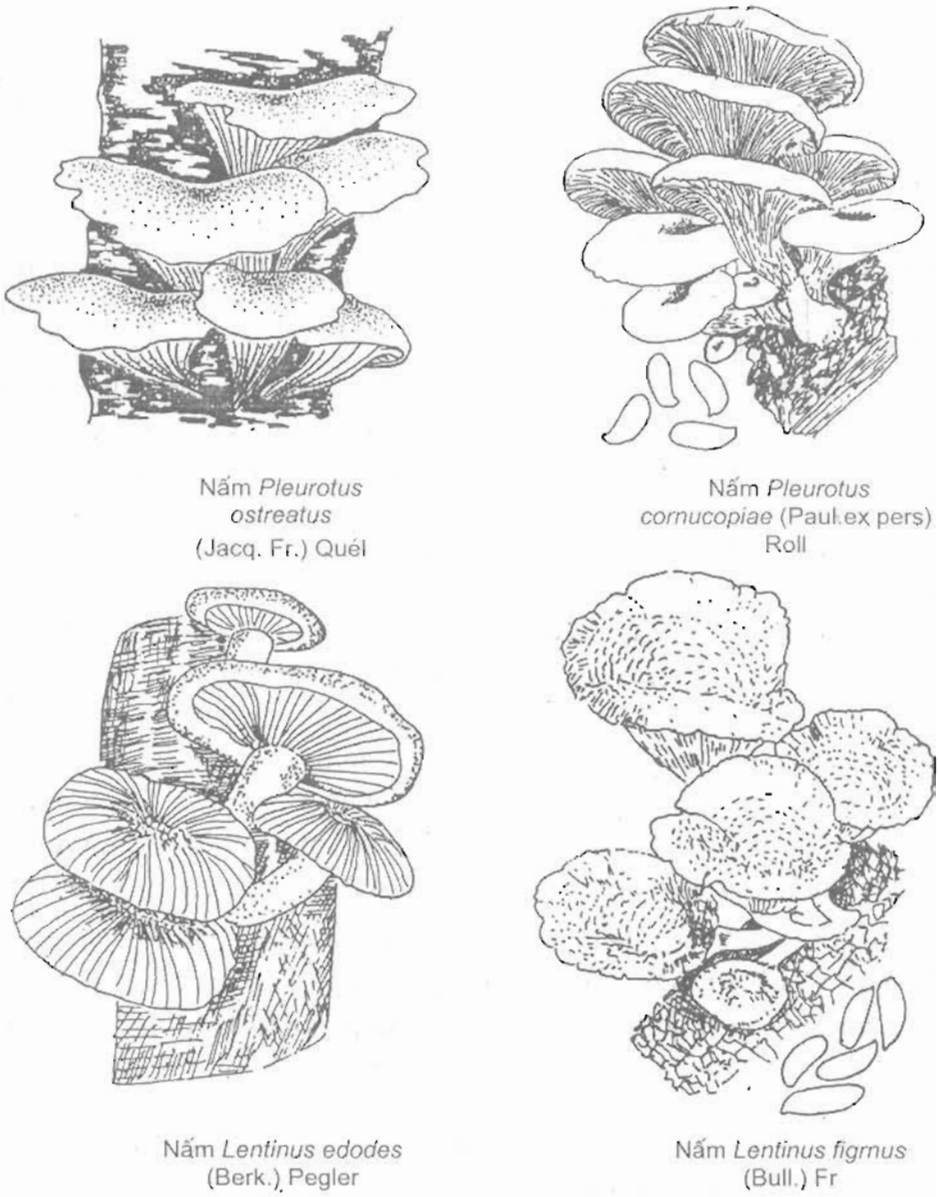
Nấm sò ăn ngon, có giá trị dinh dưỡng cao, protein tới 20% lượng chất khô của sinh khối. Trong protein nấm sò có đầy đủ các axit amin không thể thay thế. Nấm sò còn chứa nhiều vitamin, chất khoáng và các chất có hoạt tính sinh học. Do vậy, nấm sò là nguồn thực phẩm quý, giàu dinh dưỡng, mà còn là nguồn dược liệu.

Nhiệt độ thích hợp cho các loài nấm sò phát triển không giống nhau. Có loài ưa nóng, có loài ưa ấm, có loài ưa lạnh,...

Bảng dưới đây dẫn khoảng nhiệt thích hợp, cho phát triển của 3 loài nấm sò:

Loài nấm sò	Nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng hệ sợi, °C		Nhiệt độ thích hợp cho quả phát triển, °C	
	Phạm vi nhiệt độ	Nhiệt độ tối ưu	Tạo quả	Phát triển
Pleurotus ostrantis	10 – 35	24 – 27	17 – 22	13 – 17
P. Sajor caju	10 – 35	23 – 28	–	20 – 30
P. abaloras	20 – 35	25 – 28	–	26 – 28

Nuôi nấm sò khi cụm nấm phát triển khá to và thấy xuất hiện bào tử phát tán vào không khí như lớp khối trắng thì phải thu hoạch ngay, có thể thu hoạch thành nhiều lần (cách nhau khoảng 5 – 7 ngày).



Nấm *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Quél

Nấm *Pleurotus cornucopiae* (Paul.ex pers) Roll

Nấm *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler

Nấm *Lentinus figrnus* (Bull.) Fr

Hình 10.5. Một số loài nấm sò

10.3.3.3. Nấm mỡ – Agaricus, hình 10.5

– Nấm mỡ còn gọi là nấm trắng – white mushroom. Nấm mỡ ăn ngon và giá trị dinh dưỡng cao – Nhiều nước trên thế giới nuôi trồng loại nấm này. Nấm mỡ là loại nấm đồng nội. Trước đây, người ta trồng ở các vườn rau trên phân ngựa đã được ủ lên men dở dang. Sau dần, nấm mỡ được nuôi trên khay gỗ hay kim loại, hoặc túi mảng mỏng và đã cơ khí hoá được nghề nuôi nấm ở quy mô công nghiệp.

Các loài nấm mỡ được dùng rộng rãi trong sản xuất là:

+ Nấm mỡ song bào – *Agaricus bitorquis* (Lange) Sing, còn có tên *A.brunnescens* Peck.

+ Nấm mỡ xuân – *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc. (Spring Agaricus)

+ Nấm mỡ tứ bào – *Agaricus camapestris* L. ex Fr. (Meadow Mushroom).

+ Nấm mỡ ruộng (hoặc nấm mỡ ngựa – *Horse mushroom*) – *Agaricus arvensis* Schaeff ex Fr.

Thể quả của nấm mỡ giống cái đinh bu lông, màu trắng, màu sữa hay hồng nhạt hoặc nâu. Kích thước mũ nấm khoảng 5 – 12cm, hình cầu hay bán cầu.

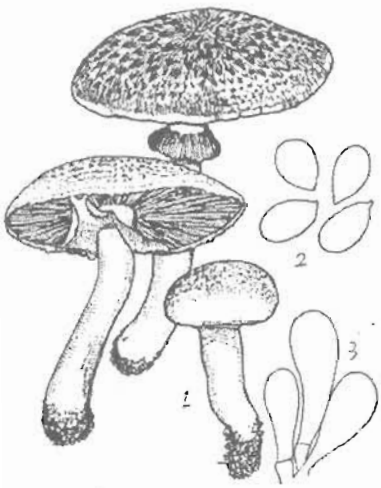
Bào tử đảm của nấm sò nảy mầm thường kéo dài 7 – 12 ngày. Sau đó, phát triển hệ sợi. Các sợi liên kết với nhau thành quả.

Nấm mỡ có những yêu cầu về sinh lý đặc biệt. Cần nắm rõ đặc điểm này để điều khiển các điều kiện công nghệ thích hợp cho nuôi trồng.

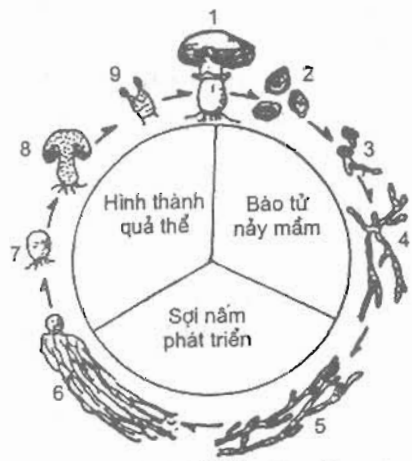
Nấm *Agaricus bitorquis* (Quél) Sacc.

Nấm *Agaricus arvensis* Schaeff. ex Fr.

Nấm *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.



Nấm *Agaricus rubellus* (Gill.) Sacc.



Chu trình phát triển của nấm mỡ

1. Quả thể; 2. Bào tử đảm; 3. Bào tử nảy mầm; 4. Sợi nấm sơ cấp; 5. Sợi nấm thứ cấp; 6. Hệ sợi nấm và sự hình thành mô sẹo; 7. Nụ nấm; 8. Hình thành các phiến nấm; 9. Đảm và bào tử đảm

Hình 10.6. Giới thiệu về nấm mỡ

10.3.3.4. Nấm hương – Lentinus

Nấm *Lentinus edodes*

Nấm *Lentinus lepideus* Fr.

Hình 10.7. Hai đại diện của nấm hương

Nấm hương có giá trị dinh dưỡng quý giá và ăn rất ngon. Vị ngon ngọt của nấm hương là do các nucleotit như 5' – GMP (Guanosin – 5' – Monophotphat), 5' – AMP, 5' – CMP, 5' – UMP và các chất đặc biệt khác như lentionin, 18 hợp chất chứa lưu huỳnh.

Ngoài giá trị dinh dưỡng, nấm hương còn có nhiều giá trị dược liệu. Nấm hương có sợi nấm lúc đầu nhỏ 0,5 – 1mm, về sau lớn dần đến 1 – 2mm. Quá trình tiếp hợp 2 sợi sơ cấp đơn nhân thành sợi thứ cấp song nhân. Khi sợi thứ cấp phát triển dày đặc trên cơ chất sẽ bắt đầu quá trình phân hoá tạo ra quả nấm. Quả nấm hương có mũ nấm hình bán cầu bẹp, về sau càng bẹp, kích thước khoảng 3 – 25cm. Nấm hương có thịt dày màu trắng, gần phía ngoài có màu nâu đỏ nhạt. Cuống nấm hình trụ có đường kính 0,5 – 1,2cm, dày khoảng 2,5 – 8cm.

Nấm hương được trồng cách đây 1.000 năm về trước ở Trung Quốc. Hiện nay nấm hương đang trồng theo phương pháp đơn giản ở quy mô lớn và phương pháp công nghiệp ở nhiều nước Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, đảo Đài Loan và một số nước châu Âu với năng suất hàng trăm ngàn tấn/năm.

Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của nấm hương:

– Độ ẩm:

Bào tử nảy mầm ở 20°C; thích hợp nhất ở độ ẩm không khí là 90%, ở 22 – 26°C; tỷ lệ nảy mầm của bào tử vào khoảng 80 – 100%.

Độ ẩm môi trường 60 – 70% và độ ẩm không khí thích hợp cho sợi nấm phát triển là 60 – 70%, còn cho quả nấm phát triển là 80 – 90%.

– Dinh dưỡng: các loại đường đơn, đường đôi (hexozơ và pentozơ), cùng tinh bột, xenlulozơ là nguồn dinh dưỡng cacbon của nấm hương.

Nguồn N dinh dưỡng của nấm hương là protein, peptit, axit amin, ure, các muối amon, nitrat và nitrit.

Tỷ lệ C/N khi phát triển hệ sợi là (25 – 40) : 1, khi ra quả và phát triển là 73 : 1. Trong môi trường cần có Fe, Zn, Mn (mỗi loại là 2mg/l), Cu, Mn, Sn, Ni ở dạng vi lượng (từ vài phần tỷ đến phần triệu). Cần có vitamin B_1 (100µg B_1), một ít giberelin hoặc chất kích thích sinh trưởng khác.

– Nhiệt độ: tối ưu là 24 – 27°C (hệ sợi), 20°C (quả).

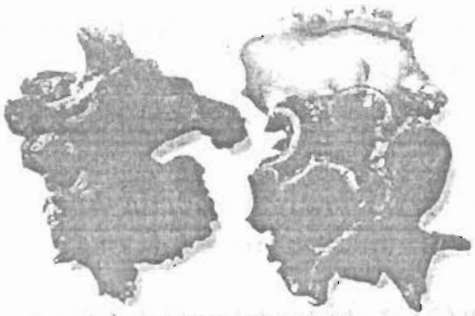
– pH môi trường: thích hợp cho hệ sợi là 5 – 6, khi ra quả là 3,5 – 4,5. Trong quá trình phát triển, axit hữu cơ tạo thành, nên có chất điều chỉnh pH trong môi trường.

– Ánh sáng: Không cần, nhưng khi ra quả cần đôi chút ánh sáng.

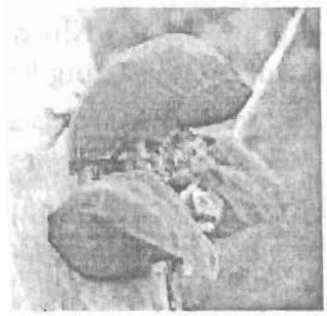
– Hàm lượng CO_2: không để CO_2 có tỷ lệ cao trong khí quyển nơi nuôi trồng.

10.3.3.5. Mộc nhĩ – Auricularia

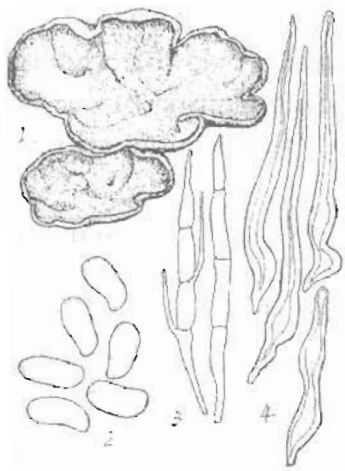
– Tất cả có 20 loài, nhưng chỉ có 6 loài thông dụng, trong đó có 2 loài được nuôi với số lượng lớn (mộc nhĩ đen và mộc nhĩ lông).



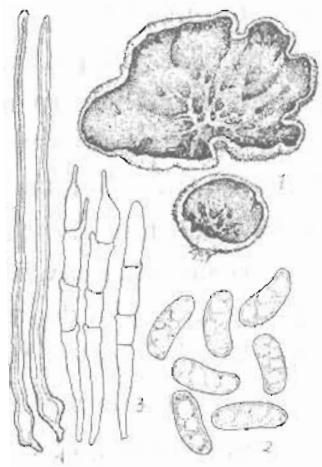
Nấm *Auricularia auricula*
(L. ex Hook.) Underw.



Nấm *Auricularia polytricha*
(Mont.) Sacc.



Nấm *Auricularia fuscosuccinea*
(Mont.) Farl.



Nấm *Auricularia cornea*
(Ehrenb ex Fr.) Speng.

Hình 10.8. Một vài loài mộc nhĩ *Aurieularia*

+ Mộc nhĩ đen: *Auricularia auricula* (L.ex Hook) Undrew.

+ Mộc nhĩ lông: *A. polytricha* (Mort) Sace.

Ngoài ra, còn có mộc nhĩ sừng *A. cornea*, mộc nhĩ nhăn *A. delicata*, mộc nhĩ hình khiên *A. peltalo*, mộc nhĩ vàng nâu *A. fuscosuccinea.*

– Mộc nhĩ là loại thực phẩm quý, giá trị dinh dưỡng cao, có giá trị dược liệu (có thể điều trị một số bệnh về máu, mạch).

– Mộc nhĩ có thể thu hái tự nhiên và nuôi với sản lượng buôn bán trên thế giới tới hàng triệu tấn/năm.

– Mộc nhĩ có thể nuôi trồng trên các cành gỗ tạp hoặc mùn cưa, các loại bột lõi ngô, thân sắn, bã mía, rơm, rạ cắt nhỏ,... cho vào các bịch chất dẻo màng mỏng.

– Bào tử mộc nhĩ nảy mầm tốt ở 30°C, sợi phát triển tốt ở khoảng 22 – 32°C. Thể quả hình thành thích hợp ở 20 – 28°C.

– Độ ẩm: Sợi nấm thích hợp với độ ẩm 60 – 70% nước, quả phát triển tốt ở độ ẩm không khí 90 – 95%. Khi thu hái, độ ẩm cơ chất tới 90%.

– Ánh sáng: Ở điều kiện tối hoặc trong ánh sáng tán xạ, sợi nấm mộc nhĩ vẫn phát triển bình thường. Khi ra quả nên có một ít ánh sáng nhẹ. Nếu không có ánh sáng, mộc nhĩ có màu trắng hoặc nâu nhạt và có thể năng suất thấp.

– Hàm lượng CO_2 trong không khí quá 1%, hệ sợi mộc nhĩ phát triển chậm; trên 5%, mộc nhĩ bị chết ngạt.

– pH thích hợp cho sợi nấm phát triển là 5 – 6,5. Khi chuẩn bị môi trường nên giữ pH = 5 – 6. Có thể dùng $CaCO_3$ làm chất giữ pH ổn định trong môi trường.

10.4. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA NẤM

Đó là: nhiệt độ, độ ẩm cơ chất và độ ẩm không khí xung quanh, hàm lượng CO_2 có trong không khí ở địa điểm nuôi cấy, chính là ở xung quanh môi trường.

– Nhiệt độ: Các giống nấm ăn đều có những khoảng nhiệt độ thích hợp để sinh trưởng phát triển hệ sợi, ra quả. Những giống nấm có nguồn gốc từ các nước xứ lạnh thường có nhiệt độ thích hợp khoảng 24 – 26°C, từ các nước nhiệt đới có khoảng nhiệt độ thích hợp cao hơn.

Nhiệt độ thích hợp cho hệ sợi thường cao hơn vài độ khi ở giai đoạn sinh thể quả. Do vậy, trong nuôi cấy ta cần chủ động điều khiển nhiệt độ thích ứng với nhu cầu sinh lý của từng giai đoạn nuôi cấy. Có thể dùng quạt thổi, phun mù,...

– Độ ẩm: Độ ẩm cơ chất là một trong những yếu tố quan trọng, quyết định đến năng suất và chất lượng một mẻ nuôi cấy.

Nấm chỉ mọc và hấp thu dinh dưỡng ở cơ chất có nước. Do vậy, nguyên liệu khi xử lý cần băm hoặc xay nhỏ để dễ ngấm nước.

Độ ẩm cơ chất nuôi trồng nấm tốt nhất là 45 – 50%. Nếu nuôi nấm trên các khay nhiều tầng trên giá với độ dày môi trường ở khay là 15 – 20cm thì độ ẩm cơ chất cần tới 64 – 65%. Trong trường hợp này, vật liệu che phủ cũng cần có độ ẩm tương ứng là 65 – 70%.

Để giữ nhiệt được độ ẩm cơ chất tương đối ổn định thì độ ẩm của không khí cũng cần phải : ở giai đoạn phát triển hệ sợi, độ ẩm không khí là 90 – 95%; còn giai đoạn sinh quả là 85 – 90%.

– Thành phần không khí và độ thông thoáng khí: Khi nuôi nấm, cường độ hô hấp của nấm tăng dần và thải CO_2 vào môi trường xung quanh. Vì vậy, cần phải làm

thông thoáng khí. Nếu nồng độ CO_2 lớn hơn 2% (theo V) sẽ làm giảm cường độ sinh trưởng và tạo quả của nấm. Giới hạn CO_2 thích hợp trong không khí là 0,01 – 0,1%. Nếu cao hơn sẽ dẫn đến nấm sinh trưởng ra quả chậm, cuống dài ra, quả chóng nở ra mũ, nấm có hình dáng gày gò, chất lượng kém. Ở đây, còn liên quan đến độ thông thoáng khí, vì tất cả các loài nấm nuôi trồng đều hiếu khí. Vì vậy, môi trường xốp cần đảm bảo thông thoáng khí.

– Ánh sáng: Ánh sáng không cần đối với đời sống của nấm. Sợi nấm phát triển được trong bóng tối cũng như trong ánh sáng. Ánh sáng trực tiếp ảnh hưởng xấu đến đời sống của nấm. Do đó không cần các vật liệu che phủ trong suốt và không cần chiếu sáng bằng điện.

10.5. NGUYÊN LIỆU

Nguyên liệu dùng nuôi trồng nấm nói chung (nấm ăn và nấm dược liệu) là các nguồn phế thải trong sản xuất nông nghiệp, như rơm, rạ, trấu, cám, mùn cưa, bông phế thải, vụn xơ dừa, lõi ngô,... Các loại nguyên liệu này được cấu tạo từ các đường đơn 6 cacbon (glucozơ – hexozơ) và đường đơn 5 cacbon (pentozơ – xylozơ) có trong thành phần chủ yếu của xenlulozơ và hemixenlulozơ. Ngoài ra còn có pectin, lignin trong các loại cây thân gỗ, cũng như mùn cưa, tính bột trong các loại hạt và các loài đường đơn, đường đôi và oligosacarit,...

Ngoài các hợp chất trên là nguồn C, trong nguyên liệu còn có một lượng nhỏ protein hoặc peptit, axit amin, cùng với một số vitamin và nhiều chất khoáng.

Các nguyên liệu trên đây cung cấp nguồn dinh dưỡng (thức ăn) cho nấm sống và phát triển, nhưng không phải tất cả các trường hợp nấm có thể tiêu hoá trực tiếp các nguyên liệu này. Do vậy, trong nuôi nấm, rất nhiều trường hợp phải xử lý nguyên liệu, tạo điều kiện cho nấm dễ đồng hoá các chất dinh dưỡng có trong nguyên liệu.

10.5.1. Xử lý nguyên liệu

Các loại nguyên liệu giàu xenlulozơ và hemixenlulozơ được băm nhỏ, làm ẩm, ủ (compost), có thể thêm nguồn nitơ như muối amon, ure, supephotphat,...

Tùy từng loại nấm, việc xử lý nguyên liệu để gieo trồng có khác nhau. Nấm sò, mộc nhĩ có hệ enzym thuỷ phân ngoại bào khá mạnh, nếu xử lý nguyên liệu không cần sâu xa; còn với các nấm khác, nguyên liệu cần ủ như trong ủ thu hoạch mùn.

Quá trình ủ là một quá trình lên men thuỷ phân hỗn hợp hiếu khí và kỵ khí. Trong đống ủ, nhiệt độ lúc đầu khoảng 25 – 30°C, dần tăng lên 50, 70°C, có khi cao hơn. Đầu tiên ta thấy có mặt vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn, nấm men đều thấy phát triển ở đống ủ. Chúng là các chủng vi khuẩn hiếu khí, sau đó trong khối ủ oxy ít dần sau đến hết, các vi sinh vật kỵ khí phát triển. Chúng có thể tích lũy các axit hữu cơ trong đống ủ, vì vậy cần thỉnh thoảng đảo lộn các nguyên liệu. Khi

nhiệt độ tăng lên, các vi sinh vật ưa ấm cũng chết dần và thay bằng các loài ưa nhiệt cùng chịu nhiệt.

Các vi sinh vật hiếu khí cũng như kỵ khí, ưa ấm cũng như ưa nhiệt chúng đều tiết ra các enzym ngoại bào thuỷ phân tinh bột, xenlulozơ, hemixenlulozơ,... và sản phẩm là hexozơ và pentozơ; đồng thời phân huỷ protein thành peptit và axit amin,...

Xử lý nguyên liệu bằng phương pháp ủ tạo nguyên liệu thành khối cơ chất trong môi trường nuôi trồng nấm. Quá trình ủ có tác dụng:

– Biến các hợp chất khó tiêu hoá thành dễ tiêu hoá đối với nấm.

– Quá trình tăng nhiệt trong đống ủ làm chết nhiều loại tạp khuẩn, làm ung thối trứng giun, sán và diệt được nhiều loại côn trùng.

Sản phẩm của khối ủ thu được một loại chất tiền mùn hoặc mùn làm cơ chất nuôi trồng nấm ăn bằng cách dùng để chuẩn bị môi trường nuôi cấy: chủ yếu là môi trường rắn, xốp (nuôi cấy bề mặt).

Nguyên liệu trước khi ủ thường được ngâm với nước vôi $Ca(OH)_2$ hoặc dung dịch xút loãng NaOH nhằm phá vỡ kết cấu xenlulozơ, hemixenlulozơ với lignin (hợp chất hữu cơ nguồn C dị hình khó phân huỷ). Trong quá trình ủ, các loại chất xơ được thuỷ phân thành các loại đường nấm dễ hấp thu, các hợp chất hữu cơ chứa N thành các peptit và các axit amin.

Khi chọn công thức phối trộn các thành phần nguyên liệu cần chú trọng tỷ lệ C/N trong môi trường. Để đáp ứng với dinh dưỡng của nấm, người ta thường bổ sung nguồn nitơ hữu cơ hoặc vô cơ thích hợp đối với từng giống nấm. Ví dụ: với nấm rơm C/N = 50, nấm mỡ C/N = 16. Nuôi nấm mỡ, môi trường cần hàm lượng N cao. Vì vậy, khi trồng nấm mỡ, cần chú ý đến việc bón phân, như phân ngựa, phân gà, phân trâu đã để khô. Ngoài bón phân, trong nuôi trồng nấm, người ta hay dùng ure và các dạng muối amon để điều chỉnh C/N. Song, sử dụng muối amon ở đây cần lưu ý: Các ion NH_4^+ được nấm sử dụng trước hết, còn lại là các gốc axit của muối làm chua môi trường; còn sử dụng ure có hai tác dụng là cung cấp nguồn N và trung hoà axit của môi trường.

Trong thành phần một số môi trường nuôi cấy nấm có thạch cao ($CaSO_4$) và bột đá ($CaCO_3$), nhằm cung cấp Ca^{2+} cho dinh dưỡng nấm, điều hoà độ ẩm môi trường và cũng có thể trung hoà bớt axit sinh ra.

Sau đây giới thiệu hai cách xử lý nguyên liệu (rơm rạ, bông thải, bã mía, mùn cưa khô) dùng trong nuôi trồng nấm.

– Xử lý rơm rạ:

Chọn rơm rạ đã phơi khô và không bị mốc, không bị nhũn nát. Ngâm rơm rạ vào bể nước vôi (1 T (tấn) rơm rạ dùng 20kg vôi nước). Rơm rạ được ngâm ngập nước vôi trong 3 – 5 phút và chuyển sang màu vàng nhạt, vớt ra để trên giá gỗ hoặc tre cho róc nước trong khoảng 3 – 5 phút.

Hoặc cho rơm rạ khô trải trên nền xi măng hay gạch thành từng lớp dày 10cm.

Rắc một lớp vôi bột lên trên. Tiếp tục rải rơm rạ thành lớp khác lên trên và lại rắc vôi bột. Lượng vôi bột dùng là 20kg cho 1T rơm rạ khô. Dùng bình vòi hoa sen tưới nước đẫm lên khối rơm rạ, đảo đều khoảng 60 phút, rồi xếp rơm rạ thành đống cao 1,5m; phủ màng PE, ủ trong 4 ngày. Sau đó rỡ ra, đảo trộn đều, rồi lại chất đống ủ tiếp 3 ngày nữa.

Có thể ủ đống rơm rạ ngay từ đầu, giữa đống có cột thông khí, dưới đống nên lót kệ để thông thoáng. Thời gian ủ khoảng 6 – 7 ngày, khoảng giữa thời gian này nên đảo đống ủ. Sau khi ủ, rút ra 1 nắm rơm để lên lòng bàn tay, nếu thấy hơi ứa nước là đủ ẩm, nếu nước chảy thành dòng là ướt quá, cần phải rũ tơi cho nước bay hơi bớt đi. Trường hợp khô quá phải bổ sung nước vôi (5kg vôi cho 1.000 lít). Cuối cùng rơm rạ được băm hoặc bó thành bó rồi đem thanh trùng.

Rơm rạ khi ủ được vi sinh vật (vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn) phát triển trong đống ủ phân huỷ các chất hữu cơ khó phân huỷ thành dễ phân huỷ, làm nguồn cơ chất dinh dưỡng cho nấm phát triển. Khi đống ủ đã ở nhiệt độ cao, khoảng 60 – 75°C, thì chỉ có vi sinh vật chịu nhiệt hoạt động, trong đó chủ yếu là xạ khuẩn. Do vậy, nhiều nơi sản xuất nấm, người ta dùng chế phẩm xạ khuẩn chịu nhiệt bổ sung vào đống ủ để làm tăng cường khả năng và vận tốc phân huỷ các hợp chất hữu cơ trong rơm rạ.

– Xử lý mùn cưa khô:

Chọn mùn cưa không có tinh dầu, phối trộn theo công thức sau:

Mùn cưa khô	100kg
Vôi ướt	2kg
Ure	0,25kg
Đường	0,5kg
Supephotphat	0,5kg
$CaCO_3$	0,5kg

Hoà tan vôi vào nước rồi trộn với mùn cưa để có độ ẩm 60 – 70%, rồi ủ vào cót quây tròn, dưới cùng lót bao dứa. Cho mùn cưa vào cót, cứ mỗi lớp dày 50cm thì rắc ure (phân phối ure cho đủ các lớp, lớp dưới ít hơn lớp trên). Mỗi cót quây có thể ủ được 300 -- 500kg mùn cưa khô. Trên phủ nilon. Sau 10 ngày mở cót, đem đảo trộn đều rồi lại cho vào cót như lần đầu, nhưng lần này rắc đường. Rồi lại đảo trộn như lần trước, ủ lại và rắc supephotphat. Lần thứ tư rắc $CaCO_3$, sau cùng cũng đảo trộn không rắc gì cả và ủ lại. Mỗi lần ủ khoảng 10 ngày. Tổng thời gian ủ là 45 – 60 ngày.

Mùn cưa sau khi ủ đem đóng bịch hoặc túi dài dùng nuôi mộc nhĩ. Thu hoạch xong mộc nhĩ có thể dùng làm nguyên liệu nuôi nấm rơm.

Cũng có nhiều cách khác nhau xử lý nguyên liệu, song đều dựa trên cơ sở là ngâm nước vôi cho các hợp chất xenlulozơ, hemixenlulozơ trương nở, biến tính tách khỏi lignin và sau đó đem ủ để các enzym thuỷ phân các hợp chất này thành đường đôi hoặc đường đơn, thuỷ phân protein thành peptit, oligopeptit, axit amin,

thậm chí một ít thành NH_3,... làm các nguồn dinh dưỡng dễ tiêu hoá đối với nấm nuôi trồng.

Mùn cưa đã xử lý đem phối trộn (mục 10.5.2), rồi thanh trùng để chuẩn bị gieo giống.

– Xử lý bông vụn, bông phế thải:

Ngâm qua trong nước vôi, vắt nhẹ, ủ thành đống, che đậy bằng nilon hoặc bao dứa. Thời gian ủ 12 – 24 giờ. Khi sử dụng phải dùng tay cào bông cho tơi vụn, rồi đem phối chế môi trường và khử trùng.

– Bã mía thích hợp cho nuôi nấm sò. Bản thân nấm sò rất thích hợp với cơ chất dinh dưỡng là các loại đường.

Bã mía được phơi khô, rồi được làm ẩm bằng nước vôi 0,5%, trộn với 0,3% ure, cho vào các túi, đem khử trùng, rồi cấy giống.

10.5.2. Một số công thức chuẩn bị môi trường nuôi trồng

– Nuôi trồng nấm rơm:

+ Rơm, rạ khô – 82kg, phân trâu, bò – 15kg, vôi – 3kg.

+ Rơm, rạ – 90%, cám gạo 7%, vôi 3%.

+ Bã mía – 1.000kg, cám gạo – 20kg, supephosphat – 1%

+ Lõi ngô nghiền – 98kg, ure – 1kg, supephotphat – 1kg

+ Bông phế liệu – 500kg, rơm rạ – 250kg, vôi – 7,5kg.

– Nuôi trồng nấm sò:

+ Rơm rạ cắt nhỏ – 90 – 95%, cám gạo hay bột ngô từ 5 – 10%

+ Mùn cưa tạp – 89%, cám gạo – 10%, $CaCO_3$ – 1%

+ Bã mía – từ 50 đến 69%, mùn cưa – từ 30 đến 49%, $CaCO_3$ – 1%.

+ Bông phế thải – 100kg, thạch cao – 2kg, supephotphat – 2kg, $CaCO_3$ – 2kg.

– Nuôi cấy nấm hương:

+ Mùn cưa – 77%, cám gạo – 20%, thạch cao – 2%, đường – 1%, nước làm ẩm.

+ Mùn cưa – 100kg, cám gạo – 20kg, thạch cao – 2kg, đường – 1kg, ure – 0,2kg, supephotphat – 0,6kg, nước đủ ẩm.

+ Mùn cưa – 75%, cám gạo – 20%, đường – 2%, thạch cao – 1,5%.

+ $MgSO_4$ – 0,1 đến 0,2%, vitamin B_1: 3 đến 5 viên, supephotphat – từ 0,8 đến 1%, ure – 0,3 – 0,5%, nước đủ ẩm.

+ Mùn cưa – 10%, lõi ngô nghiền – 70%, bột ngô – 3%, cám gạo – 16%, đường – 1%, nước đủ ẩm.

– Nuôi cấy nấm mỡ:

+ Phân ngựa – 1.000kg, phân gà – 100kg, thạch cao – 25kg, nước đủ ẩm.

+ Rơm rạ – 1.000kg, ure – 7,5kg, $(NH_4)SO_4$ – 25kg, ure – 10kg, $CaCO_3$ – 25kg, Supephosphat – 30kg, nước đủ ẩm.

+ Phân gia súc ẩm – 7.500kg, rơm rạ – 1.500kg, khô dầu 40kg, ure – 15kg, thạch cao – 75kg, supephotphat – 40kg, $CaCO_3$ – 50kg, nước đủ ẩm.

– Nuôi trồng mộc nhĩ:

+ Rơm rạ – 66%, cám gạo – 32%, supephotphat – 1%, nước đủ ẩm.

+ Bã mía – 87,5%, cám gạo – 10%, thạch cao – 1%, ure – 0,5%, nước đủ ẩm.

+ Mùn cưa – 100%, cám gạo – 15%, phân gà – 15%, ure – 1,5%, supephotphat – 3%, nước đủ ẩm.

10.5.3. Thanh trùng môi trường

Nguyên liệu khi xử lý và phối chế làm môi trường, rồi được đem thanh trùng. Với môi trường nhân giống cần thanh trùng ở nhiệt độ 121°C (ở áp suất hơi nước 1atm) trong các nồi hấp autoclave, còn môi trường nuôi cấy thu quả nấm thường thanh trùng theo phương pháp cách thuỷ 90 – 95°C (phương pháp Tyndall hay phương pháp Pasteur với nhiệt cao). Bình thường phải hấp 3 lần, cách nhau 1 ngày.

Môi trường sau khi thanh trùng được để nguội và tiếp giống để nuôi trồng. Nuôi trồng nấm có thể tãi môi trường thành luống, đánh thành mô, san trên khay rồi để khay trên giá làm nhiều tầng, đựng trong các bịch bằng túi PE mờ đục,...

Trường hợp nuôi trên các luống, phần đất dưới hoặc xung quanh trước khi xếp vun môi trường, có thể phải khử khuẩn đất bằng formol.

Nguyên liệu được cắt nhỏ, nghiền nhỏ dễ hút nước, dễ khử khuẩn, nhưng có thể thiếu thông thoáng. Do đó, khi làm môi trường với nguyên liệu có độ xốp cao như rơm rạ, bã mía, bông loại,... cần phải thêm chất liệu như trấu, lõi ngô,... để tăng độ thông thoáng cho môi trường, đảm bảo hiếu khí cho nấm phát triển.

10.5.4. Các vật liệu che phủ

Như chúng ta đã biết, nấm không phải là thực vật, vì vậy nấm không thể quang hợp. Như vậy, nấm không cần ánh sáng. Trong quá trình nuôi cấy nấm, cần phải có các vật liệu che phủ như đất bột, tro rơm rạ hoặc bản thân rơm rạ, tấm phủ bằng các loại vải hoặc màng PE đục, bao tải dứa,... Những vật liệu che phủ cần phải sạch, hạn chế nhiễm khuẩn.

10.5.5. Các hình thức gieo trồng

Hiện nay, nghề trồng nấm đang phát triển ở nhiều nước, trong đó có nước ta. Trồng nấm có thể ở tầng hầm các nhà cao tầng, các khu vườn rau, các khu lấy đất làm gạch bỏ lại, trong hầm mỏ hết thời gian khai thác,... hoặc trong vườn nhà, trên mái hiên trong các hộ gia đình. Như vậy, trồng nấm hiện nay vẫn dựa trên nguyên lý công nghệ truyền thống, bán công nghiệp và công nghiệp.

Ở nước ta, có một số cơ sở trồng nấm dựa trên cơ sở công nghệ bán công nghiệp: dùng giống nấm thuần chủng, nhân giống cấp 2, gieo cây giống vào môi trường dinh dưỡng đã được chuẩn bị theo yêu cầu của từng loại nấm.

Các dạng công nghệ chuẩn bị môi trường nuôi trồng nấm là như sau:

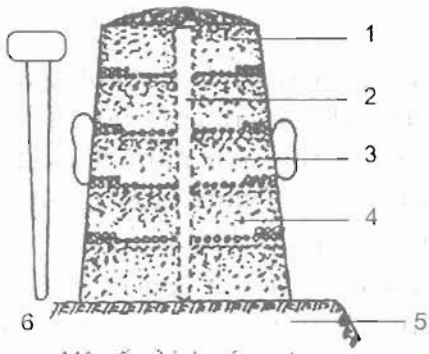
– Đánh luống, tạo thành mô đống.

– Bó rơm rạ thành các bó nhỏ đặt thành luống, cho nguyên liệu vào các bịch nilon.

– Môi trường tãi trên khay, đặt trên giá làm nhiều tầng.

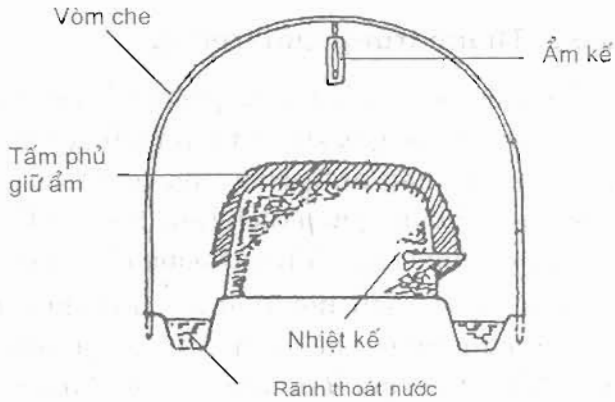
– Để môi trường trong hầm hoặc contenơ.

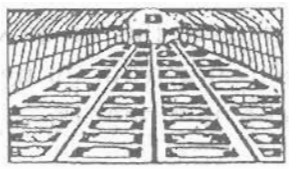
Các dạng thức công nghệ nuôi trồng được thể hiện ở các hình 10.9, 10.10, 10.11.



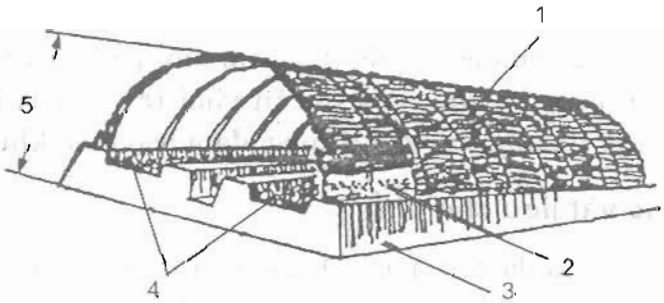
Mô nấm hình nón cụt

1. Khuôn; 2. Ống thông khí; 3. Rơm rạ; 4. Giống nấm rơm; 5. Luống và rãnh; 6. Coc gỗ tao ống thông khí





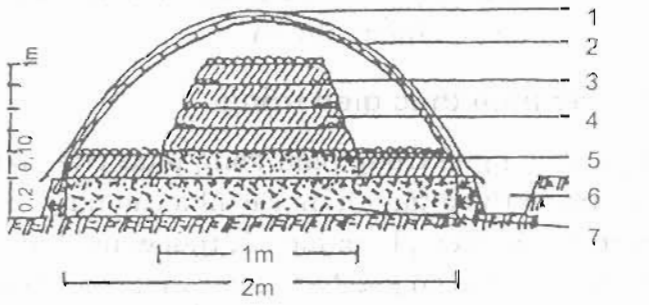
Luống nấm trong nhà



Làm vòm che nắng (luống ngoài trời)

1. Vòm che nắng che mưa; 2. Màng mỏng PE để lấy ánh sáng; 3. Tường thấp; 4. Chỗ xếp các bó rơm rạ; 5. Chiều cao 2,4cm

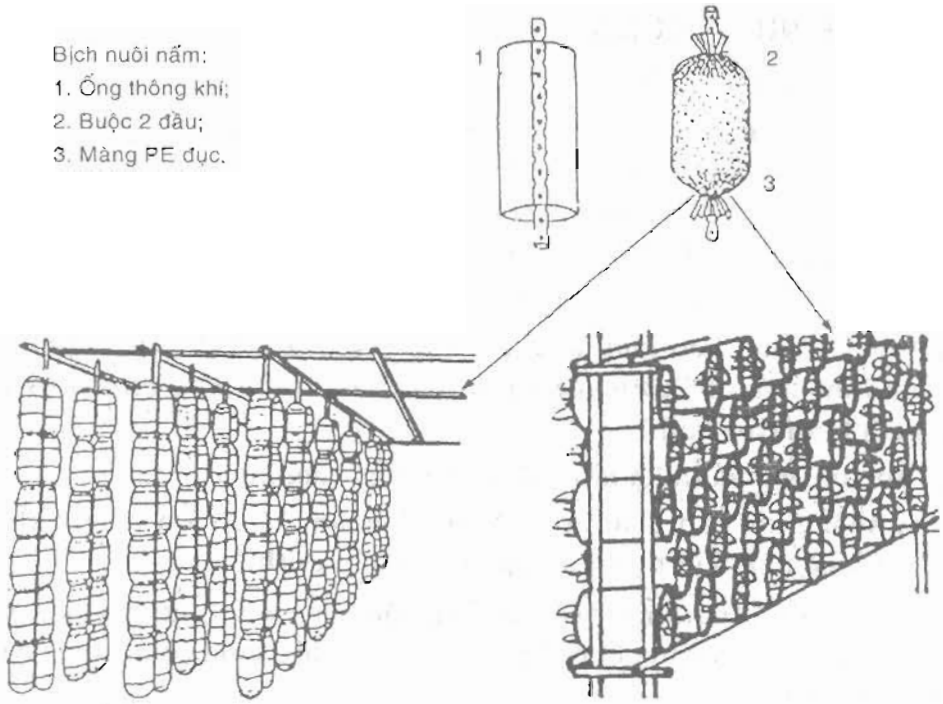
Xếp mô nấm lên giá



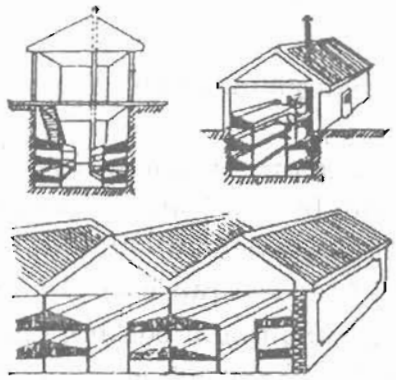
Làm vòm che bằng khung tre

1. Màng chất dẻo; 2. Khung tre; 3. Các bó rơm rạ; 4. Luống (ngoài trời); 6. Rãnh thoát nước; 7.Khu trồng nấm; 8. Các bó rơm rạ xếp cạnh luống.

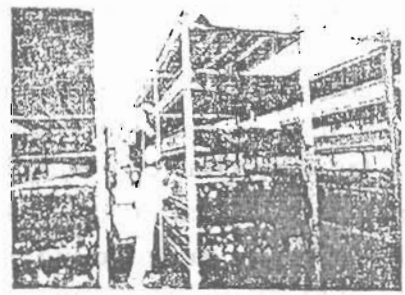
Hình 10.9. Nuôi nấm trên luống, trên khay giá và mô nguyên liệu



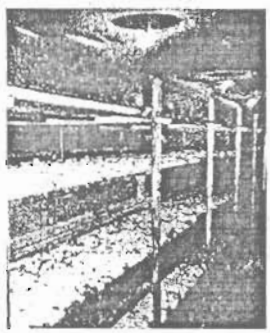
Hình 10.10. Bịch nuôi nấm



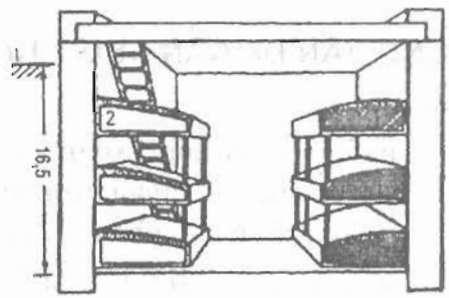
Một vài kiểu nhà nuôi nấm



Phòng nuôi trồng nấm mỡ trên mặt đất



Nuôi nấm mỡ trên giá



Phòng nuôi trồng nấm mỡ dưới lòng đất

Hình 10.11. Nuôi nấm trên giá, dưới đất, trên mặt đất và nhà nuôi nấm

10.6. QUÁ TRÌNH NUÔI TRỒNG

-- Theo dõi và chăm sóc nấm:

Tùy từng loại nấm nuôi trồng và nguyên liệu sử dụng, thời gian ủ tơ (phát triển hệ sợi) có thể là dài ngắn khác nhau. Đối với nấm rơm hay nấm sò chỉ mất 7 ngày, còn nấm mỡ – 2 đến 3 tháng trên mùn cưa hoặc 5 – 6 tháng trên gỗ. Giai đoạn này sợi nấm mọc lan kín khối cơ chất và chuẩn bị ra quả.

Khi chuẩn bị ra quả nấm có những nhu cầu sau:

+ Nhiệt độ hạ thấp hơn giai đoạn sợi là 3 – 5°C, cá biệt có loài phải hạ thấp hơn như nấm kim châm (*Flammulina velutipes*), nấm sò (*Pleurotus ostreatus*) cần phải kích thích lạnh (sốc lạnh).

Trong sản xuất người ta hạ nhiệt độ bằng cách tưới nước.

+ Độ ẩm không khí cần phải tăng. Nhiệt độ giảm và độ ẩm không khí tăng là hai yếu tố chính để nấm kết nụ và quả phát triển bình thường.

+ Ánh sáng nói chung không cần với đời sống của nấm, nhưng nếu mỗi ngày nấm rơm tiếp xúc với ánh sáng khoảng 10 – 15 phút lúc sáng sớm cũng có tác dụng kích thích ra nụ nấm.

– Quả nấm phát triển qua nhiều giai đoạn, ở từng giai đoạn đều có những thay đổi về chất lẫn lượng. Ở nấm rơm:

+ Ở giai đoạn hình trứng có hàm lượng protein và đường cao nhất, sau đó giảm dần ở các giai đoạn tiếp theo.

+ Ở giai đoạn trưởng thành, đường và protein giảm, nhưng chất béo và chất xơ tăng.

– Thu hái sản phẩm: Đối với nhiều loại nấm, giá trị là nấm quả trưởng thành, như mộc nhĩ, nấm sò, nấm mỡ, trước khi phát tán bào tử. Nấm rơm cần thu hoạch ở giai đoạn trước đó, chủ yếu ở dạng búp, ít khi đến dạng nở thành mũ.

Quả nấm sau khi hái được sử dụng tươi như các loại rau hoặc đem muối đóng hộp, sấy khô. Ở châu Âu còn dùng nấm khô, xay nhỏ thành bột dùng bổ sung vào món ăn làm chất gia vị. Trong sản xuất công nghiệp có giống nấm (nấm hương) được sản xuất theo phương pháp lên men chìm, sản phẩm thu được là hệ sợi đem sấy khô và nghiền thành bột làm gia vị. Sản phẩm dạng bột có rất nhiều triển vọng.

10.7. NHỮNG VẤN ĐỀ CẦN CHÚ Ý KHI GIEO TRỒNG NẤM ĂN

– Chọn nguyên liệu:

Những chất phế thải giàu xenlulozơ của sản xuất nông, lâm nghiệp là nguồn nguyên liệu làm cơ sở dinh dưỡng trong nuôi trồng nấm. Các nguyên liệu này không được nhiễm các loại phèn sắt, phèn nhôm hoặc các tạp chất khác.

+ Rơm rạ được phơi khô, không bị mốc, có mùi thơm đặc trưng, được đánh đống dùng dần. Nếu rơm rạ bị mốc, có màu đen, vụn nát do phơi không được nắng, bị thấm nước mưa nhiều,... không nên dùng để trồng nấm.

+ Bông phế thải từ các nhà máy dệt phải sấy khô và không mốc.

+ Mùn cưa: Các loại mùn cưa gỗ mầm, không có tinh dầu, được phơi khô.

+ Thân cây các loại gỗ mềm có nhựa màu trắng, khoảng 3 – 5 năm tuổi, đường kính thân gỗ khoảng 5 – 20cm.

+ Các loại phân hữu cơ (khô) và vô cơ,... dùng bổ sung để cân đối tỷ lệ C/N thích ứng cho môi trường.

– Giống nấm:

Dùng các lại nấm rơm, nấm sò, nấm mỡ, nấm hương, mộc nhĩ,... đã được tuyển chọn kỹ, không có độc tính đối với người và động vật.

Thường trong sản xuất, giống nấm được giữ trong các chai lọ thuỷ tinh hoặc nhựa, ở dạng sợi (đây là giống cấp 2).

+ Quan sát bên ngoài chai, giống có màu trắng đồng nhất, sợi nấm mọc đều từ trên xuống dưới, không có màu xanh, đen, vàng,... không có vùng loang lổ.

+ Khi ngửi chai giống có mùi thơm dễ chịu, không được có mùi chua, khó chịu (nếu có là giống bị tạp nhiễm).

+ Giống có độ tuổi vừa phải (không già, không non). Khi quan sát nếu thấy hệ sợi có nhiều mô sẹo, có thể có màu vàng, nâu đen là giống quá già. Khi hệ sợi chưa mọc kín hết đáy chai là giống còn non. Thời gian sử dụng tốt nhất là sau 3 – 4 ngày hệ sợi mọc kín đáy chai, hoặc túi đựng giống cấp 2.

+ Tỷ lệ tiếp giống tùy thuộc vào từng quy trình công nghệ. Thông thường là 10%.

+ Trước khi tiếp giống, môi trường phải thanh trùng: môi trường nhân giống phải thanh trùng ở 121°C, môi trường nuôi mở rộng phải thanh trùng ở 90 – 95°C (cách thuỷ).

Nhà xưởng cũng cần phải thanh trùng bằng cách xông SO_2 hoặc phun formol 0,5%. Đất để luống môi trường cũng cần thanh trùng bằng formol.

– Hiện nay nhiều nước trên thế giới đã phát triển nghề trồng nấm với những cơ sở sản xuất công nghiệp (các xí nghiệp hoặc các nông trại vừa trồng nấm vừa chế biến nấm) được cơ khí hoá và tự động hoá. Các cơ sở này đã có thể:

+ Điều khiển nhiệt độ không khí theo yêu cầu công nghệ.

+ Điều khiển thành phần khí quyển ở xung quanh nơi nuôi trồng nấm, đảm bảo tỷ lệ CO_2 trong không khí ổn định.

+ Độ ẩm không khí có hệ thống phun mù, đảm bảo ẩm độ 90%.

+ Nuôi nấm theo phương pháp bề mặt: môi trường được đánh luống nhiều tầng, nuôi trên khay đặt trên giá nhiều tầng, nuôi trong contenơ, đặc biệt là nuôi trong đường hầm (tunnel) hoặc trong các ống trong có 3 rãnh có vít xoáy để dễ chuyển đổi vị trí môi trường.

Có cơ sở tổ chức bố trí nuôi cấy ở "một gian". Trong gian này đảm nhận các công việc phối trộn nguyên liệu làm môi trường, thanh trùng (Tyndall hoá), gieo cấy giống và nuôi trồng. Song, có cơ sở tổ chức nhiều gian sản xuất, mỗi gian đảm

bảo một chức năng. Như vậy, môi trường được lưu chuyển qua các gian và kết quả là năng suất cao hơn, tổng thời gian ngắn hơn.

Với chương này, tác giả mới điểm qua các nét cơ bản của công nghệ trồng nấm. Sinh viên có thể tham khảo chi tiết ở các quyển sách chuyên khảo về nuôi trồng nấm được giới thiệu trong Tài liệu tham khảo chính.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 10

1. Các nguyên liệu trồng nấm ăn.
2. Các loại nấm nào thường được sử dụng để nuôi trồng làm thực phẩm.
3. Các tác nhân ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của nấm.
4. Hãy cho biết quy trình sản xuất nấm rơm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Nguyễn Lân Dũng, *Công nghệ nuôi trồng nấm*, tập I và II, NXB Nông nghiệp 2005.
2. Nguyễn Hữu Đống, *Nuôi trồng và sử dụng nấm ăn*, NXB Nghệ An, 2003.
3. Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Đức Lượng, Ngô Tiến Hiển, Giang Thế Bính, *Công nghệ sản xuất mỳ chính và các sản phẩm lên men cổ truyền*, NXB Khoa học Kỹ thuật, 2006.
4. Lê Văn Hoàng, *Các quá trình và thiết bị công nghệ sinh học trong công nghiệp*, NXB Khoa học Kỹ thuật, 2004.
5. Lương Đức Phẩm, *Công nghệ vi sinh vật*, NXB Nông nghiệp, 2004.
6. Lương Đức Phẩm, *Nấm men công nghiệp*, NXB Khoa học Kỹ thuật, 2009.
7. Lương Đức Phẩm, *Công nghệ sinh học trong bảo quản và chế biến thực phẩm*, NXB Khoa học Kỹ thuật, 2010.
8. Lê Xuân Phương, *Vi sinh vật công nghiệp*, NXB Xây dựng, 2001.
9. Phạm Văn Tỵ và Vũ Nguyên Thành, *Công nghệ sinh học*, Tập 5 – *Công nghệ vi sinh và môi trường*, NXB Giáo dục, 2006.
10. Hồ Sưởng, *Công nghệ sản xuất bia*, NXB Khoa học Kỹ thuật, 1992.
11. Đặng Thị Thu và những người khác, *Công nghệ enzym*, NXB Khoa học Kỹ thuật, 2004.
12. E.E. Bruchmann, Verlay Eugen Ulmer Stuttgart, 1976.
13. G. I. Fertman, M.T. Shoikhet, Biochim. i, technology. osnovi brodilnix proizvogstv "PP" Moskva, 1970, (tiếng Nga)
14. I. M. Gracheva i.., Technology. Mik..Belket. Prepatatov aminokirlot, 1992.

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

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung:
Phó Tổng biên tập PHAN DOÃN THOẠI
Giám đốc Công ty CP Sách ĐH–DN NGÔ THỊ THANH BÌNH

Biên tập nội dung và sửa bản in:
NGUYỄN HỒNG ÁNH
Trình bày bìa:
BÍCH LA
Thiết kế sách và chế bản:
TRỊNH THỤC KIM DUNG

GIÁO TRÌNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Mã số: 7K851Y0 – DAI

In 1.000 bản (QĐ : 31), khổ 19 x 27 cm. In tại Công ty CP In Thái Nguyên.
Địa chỉ : Phường Quang Trung, TP. Thái Nguyên.
Số ĐKKH xuất bản : 575 – 2010/CXB/14 – 924/GD.
In xong và nộp lưu chiểu tháng 7 năm 2010.

CÔNG TY CỔ PHẦN SÁCH ĐẠI HỌC - DẠY NGHỀ
HEVOBCO
25 HÀN THUYÊN - HÀ NỘI
Website : www.hevobco.com.vn ; Tel : 043.9724715

LONDON
QUALITY CROWN
QC 100
VƯƠNG MIỆN KIM CƯƠNG
CHẤT LƯỢNG QUỐC TẾ

TÌM ĐỌC
Giáo trình về sinh thái và môi trường của Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam

1.	Khoa học môi trường	GS. Lê Văn Khoa
2.	Đất ngập nước	GS. Lê Văn Khoa
3.	Môi trường và giáo dục bảo vệ môi trường	GS. Lê Văn Khoa
4.	Môi trường và phát triển bền vững	PGS. Nguyễn Đình Hoè
5.	Cẩm nang quản lý môi trường	PGS. Lưu Đức Hải
6.	Giáo trình Khoa học Trái Đất	PGS. Lưu Đức Hải - GS. Trần Nghi
7.	Giáo trình Cơ sở môi trường không khí	GS. Phạm Ngọc Hồ
8.	Giáo trình Động lực học lớp biên khí quyển	GS. Phạm Ngọc Hồ
9.	Giáo trình Cơ sở môi trường nước	TS. Đồng Kim Loan - PGS. Trịnh Thị Thanh
10.	Kinh tế môi trường	PGS. Hoàng Xuân Cơ
11.	Kinh tế chất thải	GS. Nguyễn Đình Hương
12.	Cơ sở sinh thái học	GS. Vũ Trung Tạng
13.	Sinh thái học các hệ sinh thái	GS. Vũ Trung Tạng
14.	Sinh thái học các hệ sinh thái nước	GS. Vũ Trung Tạng

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

- Tại TP. Hà Nội : 25 Hàn Thuyên ; 187 Giảng Võ ; 232 Tây Sơn ; 23 Tràng Tiền.
- Tại TP. Đà Nẵng : 15 Nguyễn Chí Thanh ; 62 Nguyễn Chí Thanh.
- Tại TP. Hồ Chí Minh : Cửa hàng 451B - 453, Hai Bà Trưng - Quận 3. Chi nhánh Công ty CP Sách Đại học - Dạy nghề, 240 Trần Bình Trọng, Quận 5.
- Tại TP. Cần Thơ : 5/5, đường 30/4.

Website : www.nxbgd.vn

8 934980 012277

Giá : 47.000 đ