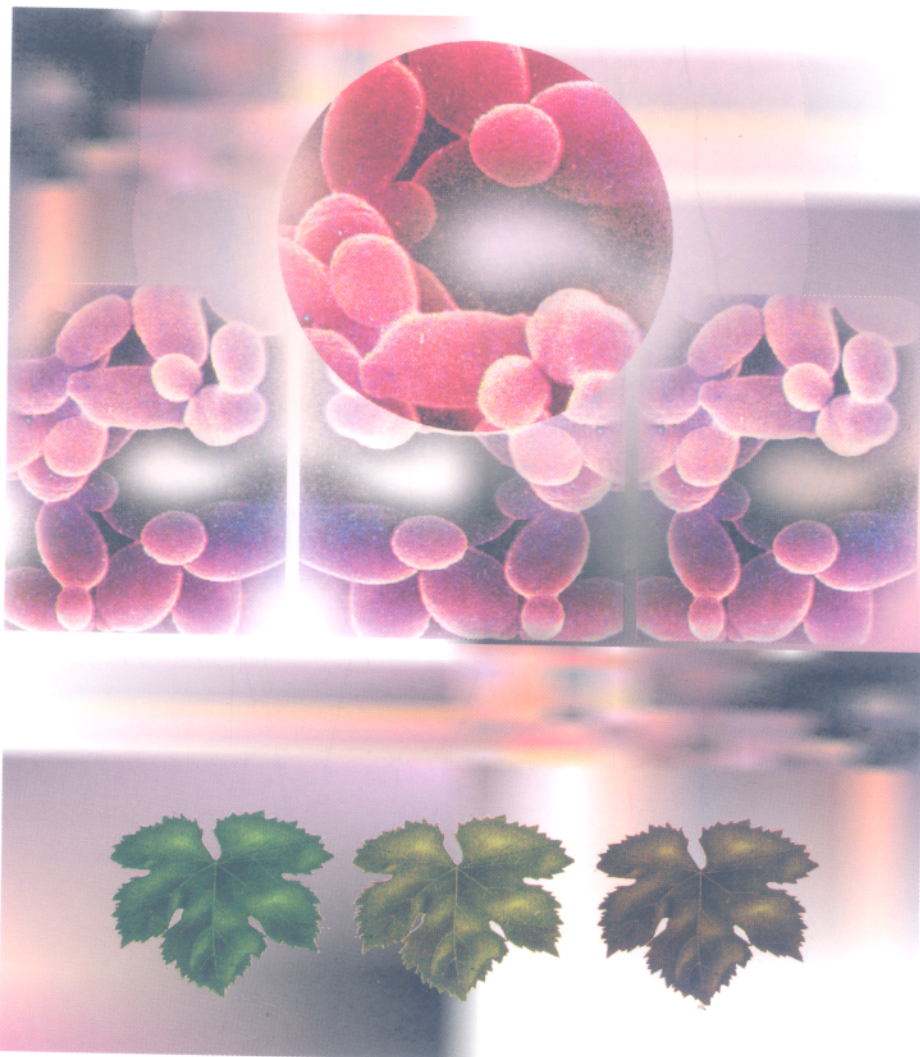


LƯƠNG ĐỨC PHẨM

NẤM MEN CÔNG NGHIỆP



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

LƯƠNG ĐỨC PHẨM

NĂM MEN CÔNG NGHIỆP

(In lần thứ hai, có sửa chữa và bổ sung)



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI – 2009

LỜI NÓI ĐẦU

Nấm men là nhóm vi sinh vật gần gũi với loài người từ xưa đến nay. Các sản phẩm của chúng, như rượu, bia, rượu vang và nhiều dạng đồ uống khác ngày càng nhiều và dường như chưa bao giờ đáp ứng đủ nhu cầu của con người.

Ngoài ra, tế bào nấm men rất giàu protein - được coi là nguồn protein đơn bào (SCP) rất quý giá. Hiện nay nguồn này đang là nguồn dinh dưỡng gián tiếp qua chăn nuôi tới con người. Hy vọng rằng trong thời gian không xa nguồn protein tinh sạch tách từ nấm men sẽ cho chúng ta những món ăn nhân tạo giống như các sản phẩm thịt, cá, trứng... và như vậy, tương lai của ngành sản xuất này sẽ vô cùng rộng lớn.

Cuốn sách được biên soạn nhằm cung cấp kiến thức cơ bản về sinh học của nấm men và cơ sở công nghệ để đưa nấm men vào sản xuất công nghiệp. Đối tượng của cuốn sách là các sinh viên năm cuối của các trường cao đẳng và đại học có liên quan đến vi sinh vật và công nghệ vi sinh vật, học viên các lớp cao học sinh học và những ai quan tâm đến vấn đề này.

Biên soạn cuốn sách này chắc chắn là còn những sai sót, tác giả chân thành cảm ơn những ý kiến đóng góp quý báu của bạn đọc.

Hà Nội tháng 6 năm 2005

Tác giả

PGS. TS. Lương Đức Phẩm

PHẦN THỨ NHẤT

ĐẠI CƯƠNG VỀ NẤM MEN

Chương 1

PHÂN LOẠI VÀ HÌNH THÁI NẤM MEN

1.1. PHÂN LOẠI NẤM MEN

Từ cổ xưa loài người đã biết nấu rượu. Tác nhân chuyển hóa đường thành rượu là một loại nấm men thường gọi là men rượu. Theo hệ thống phân loại nấm men thuộc vào giới nấm (*Kingdom Fungi* theo Whitaker, 1969; Takhtakjan, 1970). *Fungi* bắt nguồn từ chữ la tinh *Fungus* có nghĩa là nấm, đôi khi dùng *Mycetes* bắt nguồn từ chữ Hy Lạp *Mukes*.

Nấm men là nhóm nấm cơ thể đơn bào hoặc tập hợp đơn bào, nhân chuẩn, hiển vi. Nấm men có thể thuộc về hai lớp nấm: nấm túi (*Ascomycetes*) và nấm bất toàn (*Deuteromycetes* hoặc *Fungi imperfect*). Xem sơ đồ phân loại nấm ở trang sau.

1.1.1. Tiêu chí phân loại nấm men

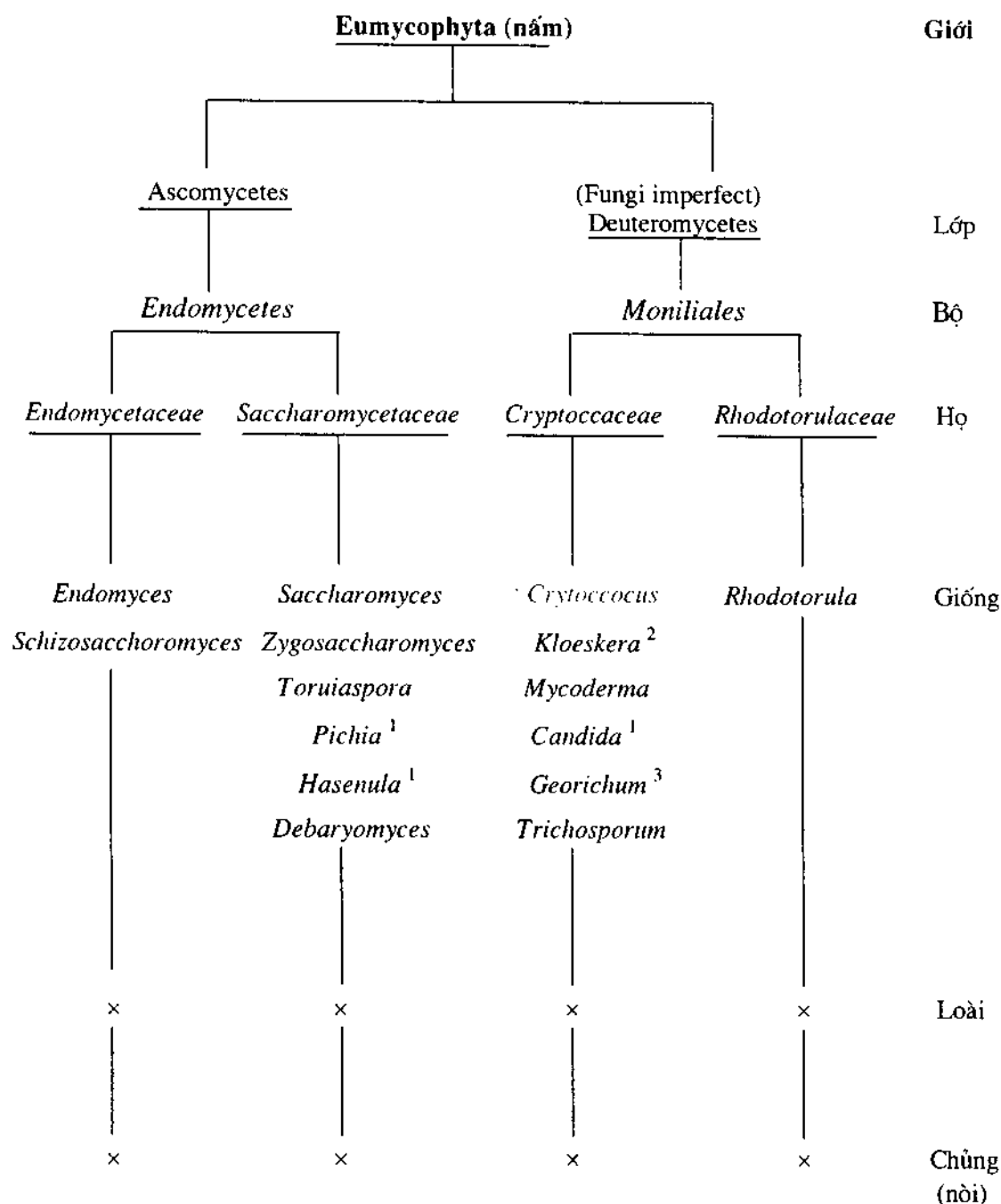
Đơn vị cơ bản phân loại nấm men trong sản xuất lên men là nòi hoặc chủng. Đây là các tế bào thuần chủng của một loài xác định. Các nòi (chủng) được hợp nhất thành loài (*Species*), các loài hợp thành giống (*genus, genera*), các giống hợp thành họ... (xem sơ đồ).

Để xác định được giống vi sinh vật nói chung một cách chính xác ta phải thực hiện hàng loạt thí nghiệm phức tạp và mất nhiều thời gian để có được những hiểu biết sâu sắc về các đặc điểm sinh học, giúp ta có được những chẩn đoán đúng đắn.

Có hai dấu hiệu hay đặc điểm chẩn đoán học là: hình thái và nuôi cấy. Trong các tài liệu thường mô tả hình thái của từng loài hoặc chủng, các tài liệu về công nghệ sản xuất cụ thể thường mô tả chi tiết từng nòi (hay chủng) được dùng trong sản xuất và thường được gọi là chủng sản.

Nấm men và các loài giống nấm men thuộc về hai nhóm nấm: nhóm nấm túi tạo thành bào tử được gộp chung vào lớp nấm túi (*Ascospore*) và nhóm nấm không tạo thành bào tử – lớp nấm không hoàn thiện (*Fungi imperfect*) hay còn gọi là lớp nấm bất toàn.

Các nhà khoa học Xô Viết trước đây thường phân loại giống và loài nấm sinh bào tử theo hệ thống Kudryavzeva (1954) và với nấm men nói chung theo hệ thống phân loại của J. Lodder (1970).



Sơ đồ phân loại nấm men (theo W. Carol Frazier)

1. Nấm men tạo thành màng;
2. Nấm men hình chùy;
3. Nấm men tạo thành khuẩn ti thật hoặc khuẩn ti giả.

Qua sơ đồ phân loại nấm của W. Carol Frazier ta thấy:

- **Lớp nấm túi** là những nấm sinh bào tử nang hay còn gọi là nấm thật. Dưới lớp là bộ gồm các nấm đơn bào (*unicellomyceteles*). Đây là những nấm men. Dưới bộ là họ *Schizosaccharomycetaceae* gồm các giống *Saccharomyces*, *Sackira*, *Hanseniaspora*, *Nasodia*...

Phần lớn nấm men được sử dụng trong công nghiệp thuộc giống *Saccharomyces* trong lớp nấm túi và vài giống thuộc lớp nấm bất toàn. Giống *Endomyces vernalis* là một loài nấm men dùng trong thế chiến thứ nhất để tổng hợp chất béo.

- Giống *Saccharomyces*, quan trọng nhất là loài *Saccharomyces cerevisiae*, được dùng nhiều trong công nghiệp thực phẩm. Một số chủng của nấm men này dùng làm men nở bánh mì, một số khác dùng trong công nghiệp rượu, bia, rượu vang, sản xuất glyxerol hoặc enzym invertaza. *Saccharomyces fragilis* lên men đường lactoza đóng vai trò quan trọng trong sản xuất sữa và các sản phẩm của sữa. Có lẽ trong tương lai loài người trông cậy vào giống nấm men này để thu nhận cồn tuyệt đối từ những nguyên liệu tái tạo được để thay thế xăng khi dầu mỏ ở trái đất bị cạn kiệt.

- Giống *Zygosaccharomyces*. Một vài tác giả coi giống này là giống phụ của giống *Saccharomyces*. Các loài của giống này có thể phát triển ở dịch đường nồng độ cao và làm hỏng mật sirô. *Z. nusbarumeri* được tìm thấy trong mật. Các loài này tham gia vào lên men rượu vang và đặc biệt lên men đậu tương làm thành một thứ đồ uống đặc biệt.

- Các giống *Pichia*, *Hasenula*, *Debaryomyces*... cũng như các giống *Mycoderma*, *Candida*... là những nấm men hình thành màng trên mặt dịch nuôi cấy, phát triển trên bề mặt các dịch ướp chua dưa chuột và các loại rau quả. Chúng oxy hóa các chất hữu cơ làm giảm độ chua và làm tăng pH của dịch ướp. *Hasenula* và *Pechia* có thể chịu đựng độ cồn cao và oxy hóa rượu etylic. *Debaryomyces* có thể chịu được muối cao, đặc biệt ở phomat có muối tới 24% vẫn thấy men này phát triển. Nấm men tạo màng không hoặc sản sinh ra ít rượu etylic từ đường. Giống *Saccharomycodes* và *Hansenula spora* có hình quả chanh, cũng như các men già *Kloeckera* không sinh bào tử có tế bào hình chùy. Những giống men này làm hỏng rượu, đặc biệt là mất mùi rượu vang.

- Lớp men giả còn gọi là lớp men không hoàn toàn thuộc lớp nấm bất toàn (*Fungi imperfect* hay *Deuteromycetes*). Nấm trong lớp này không tạo thành bào tử. Thuộc lớp này có *Moniales* gồm 2 họ là *Cryptococcaceae* và *Rhodotorulaceae*.

- Họ *Cryptococcaceae* hay *Cryptococcoides* gồm các giống *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Pityrosporum*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Trigonopsis*, *Rhodotorulua*.

1.1.2. Phân loại nấm men trên cơ sở di truyền

Phương pháp phân loại vi sinh vật nói chung và phân loại nấm men dựa trên cơ sở nghiên cứu hình thái tế bào và khuẩn lạc, các đặc tính sinh học khác bị hạn chế vì phải làm thí nghiệm

và đặc biệt là khó xác định chính xác các chủng loại gần nhau. Do vậy, việc phân loại các chủng giống nấm men hay vi sinh vật nói chung dựa trên cơ sở cấu trúc phân tử là phương pháp tỏ ra hữu hiệu và đang được áp dụng trong các phòng thí nghiệm phân loại vi sinh vật. Có 3 phương pháp phân loại theo cơ sở cấu trúc phân tử của tế bào:

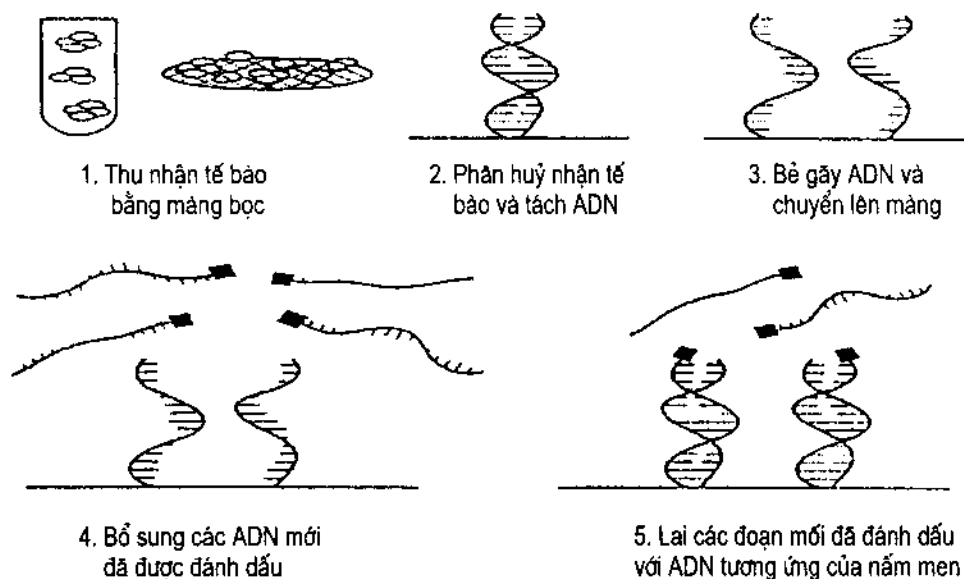
- Phương pháp đánh dấu ADN (ADN finger printing)

Phương pháp này sử dụng các mẫu dò phóng xạ để nhận các băng ADN đặc trưng và duy nhất cho mỗi cá thể riêng biệt bằng kỹ thuật thẩm tích Southern Blotting. Công việc được tiến hành trước khi lai với mẫu dò. Mẫu ADN cần lai đã được cắt bởi enzym giới hạn cần được chuyển từ agarosa sang lớp màng nitro xenluloza hoặc nylon do chúng có kích thước lớn hơn và có khả năng liên kết với ADN tốt hơn. Quá trình chuyển ADN lên bề mặt một lớp màng thích hợp làm cho nó có thể liên kết với ADN sợi đơn và tạo ra một giá đỡ bền vững hơn.

Mẫu dò trước khi lai với ADN cần được đánh dấu để phát hiện chúng trên màng. Trước khi sử dụng sợi kép ADN được biến tính bằng nhiệt để tạo ra sợi đơn. Các sợi đơn có thể dễ dàng bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung với các sợi đơn khác trong lớp màng để tạo thành một sợi kép ổn định. Quá trình lai ghép này thường được tiến hành qua đêm, sau đó lớp màng được rửa sạch để loại bỏ các sợi thừa hoặc liên kết yếu.

Chất để đánh dấu có thể dùng chất đồng vị phóng xạ, như đồng vị phospho-32. Gần đây người ta hay dùng chất đánh dấu là steroid digoxigenin thực vật (DIG). Sợi ADN được đánh dấu bằng DIG sẽ xác định bằng phản ứng so màu.

Quá trình lai ghép sợi ADN qua 5 bước như sau (xem hình 1.1):



Hình 1.1. Lai ADN của chủng nấm men theo phương pháp đánh dấu

- Phương pháp phân tích nhiễm sắc thể

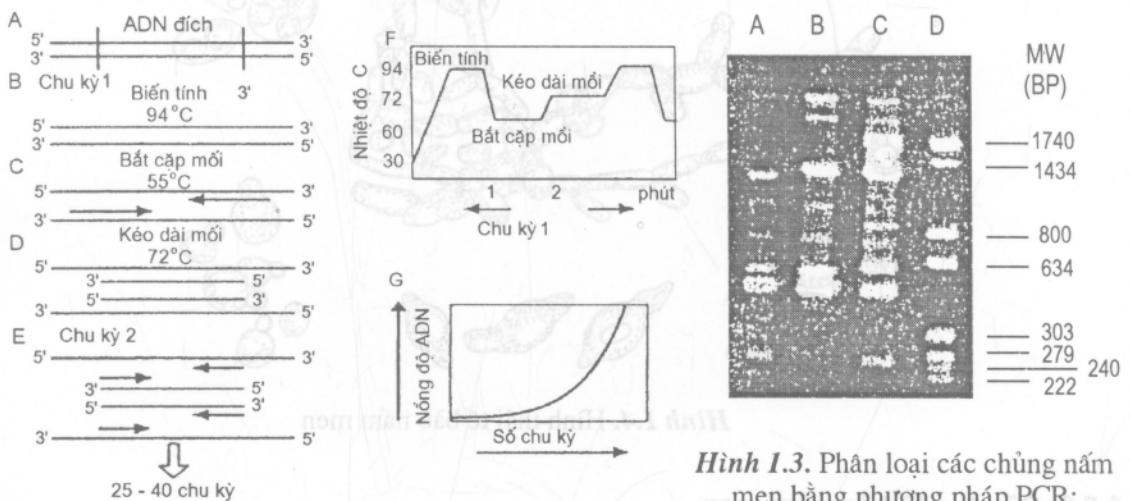
Phương pháp này dựa trên cơ sở điện di để phân cắt toàn bộ thể nhiễm sắc về kích cỡ của chúng.

Các bộ gen đơn bội của *Saccharomyces* chứa 16 thể nhiễm sắc có kích thước khác nhau. Chúng được tách ra thành những băng riêng và được hiện rõ trong dung dịch ethidiumbromide – $C_{21}H_{20}BrN_3$ dưới ánh sáng tử ngoại. Một số giống nấm men đơn bội có thể có ít hơn 16 băng, các giống nấm men lưỡng bội thường có số băng nhiều hơn. Với cách này ta có thể dễ dàng nhận biết sự khác nhau giữa giống nghiên cứu với giống chuẩn đã có trong phòng thí nghiệm hoặc đang dùng trong sản xuất.

- Phương pháp PCR

Kỹ thuật PCR là phương pháp nhân đoạn ADN đặc hiệu hay còn gọi là phản ứng chuỗi trùng hợp. Cơ sở của phương pháp này dựa vào đặc tính hoạt động của enzym ADN – polymeraza có khả năng tổng hợp một mạch mới từ khuôn kể từ một *mồi* đã cặp sẵn với khuôn. *Mồi* là những trình tự bổ sung chuyên biệt cho những đoạn ADN cần tổng hợp.

Quá trình gồm 3 bước: biến tính phân tử, bắt cặp mồi với khuôn và tổng hợp mạch mới. Mỗi quá trình được coi như một chu kỳ và các chu kỳ được lặp lại nhiều lần (hình 1.2 và 1.3).



Hình 1.2. Phương pháp PCR

Hình 1.3. Phân loại các chủng nấm men bằng phương pháp PCR:

- A. Chủng nấm men mới;
- B. Chủng nấm men đại;
- C. Chủng nấm men chìm;
- D. ADN đối chứng

1.2. HÌNH THÁI VÀ CẤU TẠO TẾ BÀO NẤM MEN

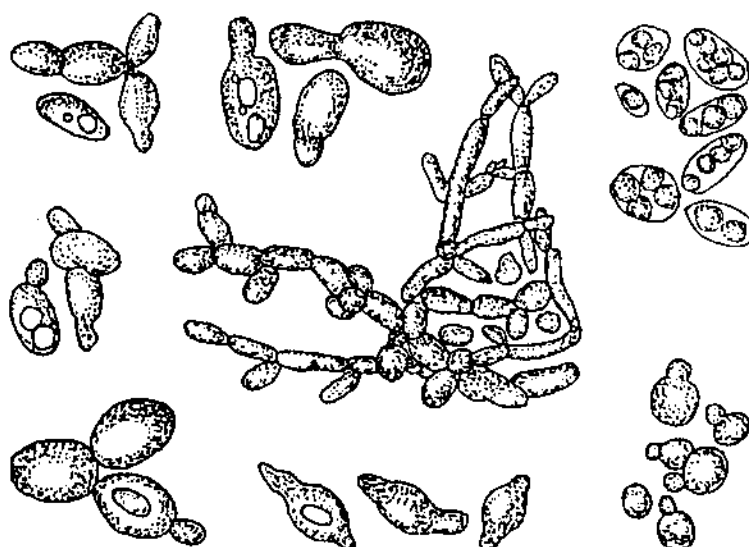
1.2.1. Hình thái

Tế bào nấm men có hình dáng: hình cầu, hình ovan hoặc elíp, hình quả chanh, hình trụ, hình chùy hoặc đôi khi còn kéo dài ra thành sợi. Nấm men có thể thay đổi hình dáng và kích

thước trong các giai đoạn phát triển và điều kiện môi trường xung quanh. Hình thái của chúng không thay đổi chỉ ở các giống nuôi cấy khi còn trẻ trong các môi trường dinh dưỡng tiêu chuẩn.

So với các vi sinh khác (đối với vi khuẩn chẳng hạn) tế bào nấm men có kích thước tương đối lớn: đường kính khoảng $7\mu\text{m}$; chiều dài $8 - 12\mu\text{m}$ ($1\mu\text{m} - \text{micron mét} = 10^{-6}\text{ m}$). Với kích thước này ta có thể ước tính bề mặt của tế bào nấm men trong một lít dịch lên men vào khoảng 10 m^2 và do vậy cường độ trao đổi chất của tế bào nấm men với môi trường xung quanh là vô cùng to lớn. Khối lượng nấm men là 500 kg so với trâu bò cùng khối lượng thì một ngày đêm nấm men tổng hợp được 50 tấn protein, còn trâu bò chỉ tổng hợp được 0,5 kg (như vậy gấp 5' ngàn lần)

Trọng lượng riêng của tế bào nấm men không khác mấy so với tế bào vi khuẩn (ở nấm men chỉ số này là 1,055 – 1,060, ở vi khuẩn: 1,050 – 1,112). Hình dáng tế bào nấm men được giới thiệu ở hình 1.4.



Hình 1.4. Hình thái tế bào nấm men

1.2.2. Cấu tạo tế bào nấm men

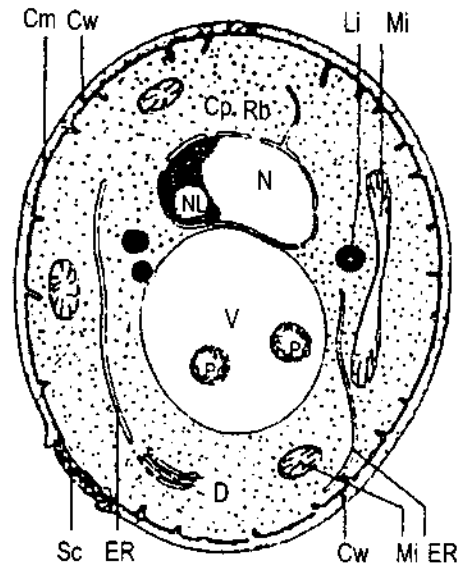
Nấm men là sinh vật đơn bào hiển vi, tế bào cơ bản giống như ở động, thực vật. So sánh cấu tạo tế bào nấm men với vi khuẩn ta thấy có sự tiến hóa nhảy vọt từ nhân sơ đến nhân chuẩn. Cùng với sự tiến hóa về nhân và cơ chế phân chia nhân (nhân có màng, có các thể nhiễm sắc, phân bào có tơ...) ở cơ thể nhân chuẩn xuất hiện nhiều thể không thấy ở thể nhân sơ, như ti thể, lục lạp v.v...

Tế bào nấm men có thành phần và cấu tạo phức tạp. Trong tế bào có các cấu tử – tiểu thể và có thể chia thành: các cơ quan nội bào hay cơ quan tử của tế bào và các chất chứa trong tế bào hay các thể vùi của tế bào (inclusion).

Cấu tạo tế bào nấm men được giới thiệu ở hình 1.5.

Hình 1.5. Sơ đồ cấu tạo tế bào nấm men:

Sc- sợi chồi;	Mi- ti thể chứa ADN và ARN riêng;
Cm- màng tế bào;	N- nhân;
Cp- tế bào chất;	NL- chất nhân;
D- thể Golgi;	Po- polyphosphat;
ER- lưới nội chất;	Rb- Riboxom (80s);
Li- lipid;	V. không bào;
	Cw- vỏ tế bào



• **Vỏ tế bào:** Bao quanh tế bào nấm men là một lớp màng mỏng dày đặc, mềm mại có thể đàn hồi để định hình cũng như bảo vệ tế bào chống lại các tác động bên ngoài và chất độc. Vỏ tế bào nấm men mang điện. Nó còn có tác dụng giữ áp suất thẩm thấu nội bào, điều chỉnh các chất dinh dưỡng là các hợp chất có phân tử lượng thấp và các muối khoáng đi qua các lỗ nhỏ vào trong tế bào.

Thành phần hoá học của vỏ tế bào gồm có các phức chất protein – polysaccharit, phosphat và lipid. Vỏ tế bào dày khoảng 25 nm và chiếm khoảng 25% khối lượng tế bào. Trong thành phần polysaccharit thấy có glucan (chủ yếu) và mannan. Tổng hai hợp chất này chiếm tới 90% chất khô của vỏ tế bào. Glucan là một polyme phức tạp từ các tiểu phần là glucoza. Mặc dù có cấu trúc không gian, nhưng phần lớn glucan nằm tại lớp phía trong của vỏ và tiếp giáp với màng tế bào chất. Glucan là thành phần chính cấu tạo nên vỏ tế bào. Nếu thành phần này bị phá hỏng thì tế bào bị phá vỡ hoàn toàn. Mannan là polyme của đường mannanoza, chủ yếu nằm ở phần ngoài vỏ, nhưng không phải là thành phần quyết định của vỏ tế bào. Nếu bỏ phần mannan hình dáng tế bào không bị biến đổi. Đại thể ta thấy lượng mannan trong vỏ tế bào nấm men là rất nhỏ, như ở *Saccharomyces guttulata* và *Endomycopsis caponlaris* hoặc hoàn toàn vắng mặt ở *Nadsonia fulvescens*, *Schizosaccharomyces*. Vỏ tế bào nấm men còn có kitin (chitin). Kitin là loại hydratcacbon, là polyme của N-axetyl-glucozamin. Thành phần thường nằm sát ở vùng nấm men nảy chồi.

Tế bào chất: Ở vùng giữa vỏ thành tế bào với màng tế bào chất ta thấy hàng loạt enzym, chủ yếu là những enzym thuỷ phân, như β -fructofuranosidaza (invertaza) và phosphataza axit.

Thành phần protein có trong vỏ tế bào chiếm khoảng 10% chất khô. Trong số này có một phần là các enzym liên kết với vỏ thành tế bào. Trong các enzym kể trên invertaza có bản chất

mannoprotein. Mannan ở enzym chiếm tới 50% và đóng một vai trò quan trọng làm bền vững cho phân tử enzym.

Phần nhiều các protein còn lại ở đây kết hợp với mannan. Như vậy, mannan đóng vai trò cấu trúc enzym trong vỏ tế bào. Ngoài ra, tính kết chùm và lắng của các tế bào nấm men cũng chịu ảnh hưởng bởi cấu trúc mannoprotein của thành tế bào. Thông thường thành phần này của vỏ tế bào có liên quan đến hiện tượng tạo thành dạng sợi bông (kết tủa lắng xộp – flocculus) của nấm men. Đối với nấm men cũng như vi khuẩn người ta đã khẳng định rằng khuẩn lạc của chúng chuyển từ dạng S (dạng nhẵn – smooth) sang dạng R (xù xì, sần sùi – rough) và tạo thành sợi bông trong môi trường là do biến đổi các nhóm ưa nước (hydrophile) ở trong vỏ tế bào thành các nhóm kỵ nước (hydrophobe). Song, qua phân tích vỏ tế bào nấm men *S. cerevisiae* và *S. carlsbergensis* (một chủng không tạo thành dạng bông và một chủng tạo thành dạng bông) được nuôi trên môi trường tổng hợp không thấy sự khác biệt về hàm lượng các chất cơ bản theo thời gian sinh trưởng, còn hàm lượng mannan giảm từ từ và glucan - được tăng lên. Mối liên kết hoạt động giữa phosphomannan với ion canxi (Ca^{2+}) của 2 tế bào dạng bông có thể tạo thành kết tủa xộp.

Hàm lượng protein ở vỏ tế bào với các phức hợp protein-polysacarit, phosphat và lipid. Trong đó một số phức protein-polysacarit là thành phần của hai enzym gluconaza và mannanaza. Hai enzym này thường tập trung ở chỗ nảy chồi của nấm men. Chúng làm mềm vỏ tạo điều kiện cho chồi sọ nảy thành chồi. Enzym investaza ở đây có bản chất là mannoprotein. Phần protein còn lại không phải là enzym kết hợp thành phức với mannan và polysacarit khác đóng vai trò cấu trúc của vỏ. Tính tạo bông của tế bào cũng chịu ảnh hưởng của cấu trúc mannoprotein của vỏ tế bào.

• *Màng tế bào chất*

Xung quanh tế bào chất được bao quanh một lớp màng rất mỏng, chiều dày không quá 0,1 nm (1 nanomet = 10^{-9} m) dính chặt với tế bào chất. Có thể quan sát thấy lớp màng này dưới kính hiển vi trường tối: thấy màng là lớp viền sáng rất mỏng quanh tế bào chất.

Màng tế bào chất có 4 chức năng cơ bản: tác dụng như rào chắn thẩm thấu, điều chỉnh chất dinh dưỡng từ môi trường vào trong tế bào và ngược lại cho các sản phẩm trao đổi chất ra ngoài tế bào; thực hiện sinh tổng hợp một số hợp phần của tế bào (các cấu tử của vỏ tế bào); nơi khu trú một số enzym và cơ quan tử của tế bào (như riboxom).

Vận chuyển chất qua màng liên quan đến tính thấm của màng. Đặc tính này trước hết phụ thuộc vào các enzym phospholipaza và lipaza.

• *Tế bào chất*

Tế bào chất còn gọi là nguyên sinh chất. Nó có cấu trúc không đồng nhất (heterogen) và ở thể keo, chứa tất cả các cấu trúc cơ bản của tế bào: ti thể, riboxom, mạng lưới nội chất, các chất dự trữ và các thể vùi của hợp chất lipoit và hydratcacbon tự nhiên trong nội bào.

Nhờ kính hiển vi điện tử chúng ta biết được tế bào chất là hệ keo được cấu tạo từ protein (đặc tính keo dính là đặc tính của protein), hydratcacbon, lipit, chất khoáng, nước và các hợp chất khác nữa. Nước trong tế bào chất chiếm tới 90% ở dạng tự do để hòa tan các chất trước khi tham gia vào các phản ứng trao đổi chất và dạng liên kết. Tế bào chất có độ nhớt cao tương ứng với glycerin hoặc xiro đặc. (Như vậy gấp 800 – 8000 lần so với nước). Khi tế bào già độ nhớt này giảm.

Trong tế bào chất chứa đầy đủ các cơ quan tử của tế bào, như ti thể, nhân, các khoang không bào, các hạt chất dự trữ dạng tinh bột, dạng chất béo, cũng như mạng lưới nội chất và các thể vùi khác (trong đó có các hạt riboxom) v.v...

Cấu trúc của tế bào chất thay đổi phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy và tuổi sinh trưởng của tế bào. Sự thay đổi này có thể là thuận nghịch và không thuận nghịch là do mức độ tác động của các yếu tố bên ngoài. Các tế bào trẻ có chất nguyên sinh đồng nhất, khi già chất này xuất hiện không bào, các giọt chất béo, các hạt polyphosphat và lipoit. Như vậy, tế bào trở nên dị nguyên (không đồng nhất).

Ngoài các cơ quan tử của tế bào có trong tế bào chất ở dạng ti thể hay thể vùi (ti thể, microxom, không bào...), còn có những chất xúc tác sinh học rất quan trọng là enzym tham gia vào tất cả các phản ứng hoá sinh.

- *Microxom hay lipoxom*

Đây là thể vùi có dạng hạt siêu hiển vi, được cấu tạo từ lipoit, protit và axit ribonucleic (ARN).

Các thành phần này ta thấy hàm lượng protit và ARN hầu như bằng nhau còn lipit là rất nhỏ. Ở đây sẽ xảy ra các qui trình sinh tổng hợp protein cho tế bào từ các axit amin đã được hoạt hoá ở hệ thống ti thể. Các axit amin này được nối với nhau theo lệnh của nhân được chuyển qua ARN đi vào các phản ứng sinh tổng hợp protein.

- *Ti thể (Mitochondria hay Chondrixom)*

Ti thể có dạng hạt nhỏ, dạng que hoặc dạng sợi mảnh phân bố trong tế bào chất ở khoảng giữa vỏ tế bào và không bào. Có thể thấy chúng ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng của tế bào nấm men: thời kỳ yên tĩnh, nảy chồi, sinh bào tử v.v... chiều dài của sợi ti thể là 0,2 – 7,5 μm . Hình dáng của nó có thể thay đổi trong quá trình nuôi cấy, có thể là từ các hạt hoặc que hay sợi đơn đến kết thành chuỗi.

Bình thường số lượng ti thể trong tế bào nấm men dao động rất lớn: từ 1 đến 50. Nếu trong tế bào chỉ có 1 ti thể thì thể tích của nó chiếm không nhỏ hơn 20% thể tích tế bào, ở *S. cerevisiae* có 1 ti thể chiếm tới 88% thể tích tế bào. Trong môi trường có nồng độ glucoza thấp tế bào nấm men có tới 100 – 200 ti thể, nhưng ở nồng độ cao chỉ thấy 30 – 40.

Những chất dinh dưỡng thấm vào nội bào được hấp thụ và tích lũy bởi ti thể sẽ nhanh

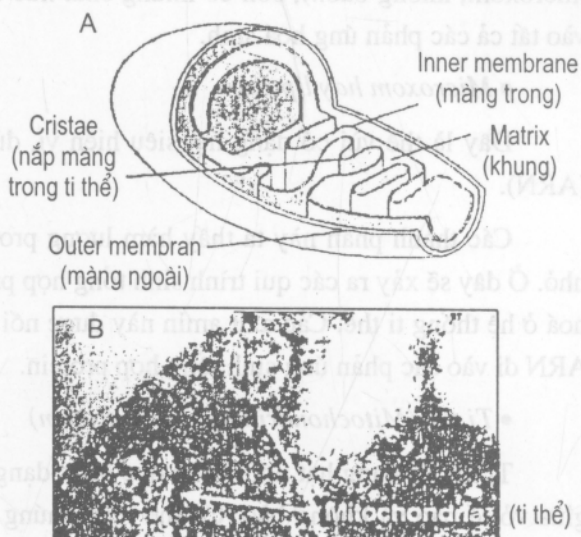
chống thành dạng đậm đặc nhờ các enzym tương ứng tham gia. Các phản ứng năng lượng quan trọng – quá trình phosphoryl hóa có oxy tham gia và các phản ứng của chu trình Krebs (chu trình axit tricarboxylic – ATC) xảy ra hoàn toàn trong ti thể. Có thể xem ti thể là “các trạm năng lượng của tế bào”. Ở đây xảy ra hàng loạt các phản ứng hoạt hoá các axit amin đi vào Riboxom để tham gia quá trình sinh tổng hợp protein, hoạt hoá các chất béo và nhiều các hợp chất khác nữa để sẵn sàng thực hiện các phản ứng hóa sinh trong trao đổi chất của tế bào. Thực tế là trong các quá trình đặc biệt quan trọng của sự trao đổi chất của tế bào, các ti thể đều có mặt ở các vị trí khu trú nhất định của mình.

Ti thể của nấm men có cấu tạo chủ yếu từ khoảng 30% chất béo và 60 – 70% protein. Trong số protein này có khoảng 25 – 75% ở dạng protein cấu trúc. Trong ti thể có chứa các enzym thực hiện các phản ứng oxy hoá trong vòng ATC, chuyển điện tử qua chuỗi hô hấp và quá trình phosphoryl hóa để thực hiện chức năng cung cấp năng lượng sinh học và vật liệu tham gia vào các cơ chế phức tạp tái tạo ADN, phiên mã và dịch mã các thông tin di truyền vào sinh tổng hợp phospholipid của sterin, vào hoạt hóa các axit béo... Các axit nucleic (ADN và ARN) là các cấu tử nhưng có số lượng không lớn trong ti thể. Một trong các phát minh quan trọng là tìm thấy ADN trong ti thể và được ký hiệu là MADN – loại ADN này khác đáng kể với ADN trong nhân tế bào.

Rất dễ nhận ra ti thể của nấm men được giới thiệu ở hình 1.6 khi soi bằng kính hiển vi điện tử (hình 1.6A và B).

Ti thể có thể là hình cầu, hình que hay dạng sợi, nhưng đều được bao quanh bởi một màng mỏng gồm có hai lớp. Hình dáng vỏ ngoài ti thể có các nếp gấp.

Kết quả nghiên cứu cho ta thấy, phần lớn các enzym tham gia vào vòng ATC đều được xuất hiện trong khung của ti thể, trái lại các enzym tham gia vào vận chuyển điện tử và quá trình quang hợp có oxy lại liên quan đến lớp màng có các nếp gấp phía trong (xem hình 1.6). Cấu trúc của ti thể bị biến đổi khi điều kiện sống của nấm men chuyển từ kỵ khí sang hiếu khí. Khi nấm men phát triển ở điều kiện kỵ khí với môi trường không có lipid thì ti thể ở dạng rất đơn giản gồm có hai lớp màng, nhưng không có nếp gấp. Nếu thêm hợp chất lipid như axit oleic và ergosterol sẽ kích thích tạo thành nếp gấp. Sự phát triển của ti thể còn chịu ảnh hưởng khi thiếu oxy và sự có mặt của lipid cùng glucoza trong môi trường. Nghiên cứu cấu trúc và sự phân bố của enzym trong ti thể ở các lớp màng và khung đang được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới tiến hành.



Hình 1.6. Cấu tạo ti thể nấm men

Kết quả cho thấy phần lớn các enzym tham gia vào quá trình vận chuyển điện tử và quá trình quang hợp có oxy lại liên quan đến lớp màng có nếp gấp bên trong của ti thể.

Không bào (vacuole). Không bào là một cơ quan nội bào có dạng hang (hốc) chứa đầy dịch bào và được tách ra từ tế bào chất thành màng không bào. hình dạng không bào thay đổi liên tục, chuyển dịch và tiếp xúc với tế bào chất. Trong dịch bào ngoài các chất điện ly hoà tan trong nước còn có các hợp chất dạng keo như protein, chất béo, hydratcacbon và enzym chứa trong bào quan này. Trong dịch bào còn thấy có mặt Na, K, Ca, Mg, Cl, SO_4 và PO_4 ở dạng các nguyên tử riêng biệt hoặc muối không làm cho nồng độ của chúng ở đây cao hơn nhiều lần hàm lượng muối ở môi trường xung quanh.

Kích thước và hình dáng không bào thay đổi rất nhiều. Một tế bào nấm men có thể có một vài hoặc một không bào ở trung tâm. Không bào chứa các ti thể vùi rất đa dạng, có thể là các chất ở dạng hoà tan, ở dạng tinh thể hay ở dạng hạt hoặc giọt. pH trong dịch bào là 5,9 – 6,0, áp suất thẩm thấu của dịch bào gần với của dung dịch muối NaCl 2,5 – 3,5%. Thông thường các chất chứa trong dịch bào không phản quang, các thể kết tinh và lipid chuyển động mới bất sáng. Các quá trình oxy hóa – khử xảy ra trong dịch bào.

Không bào của nấm men trưởng thành thường lớn hơn khi ở tế bào trẻ. Tuy nhiên, ở một thời điểm của vòng đời khi nảy chồi mới bắt đầu thì hình như không bào được chia thành nhiều không bào nhỏ và một số trong đó được chuyển sang tế bào con. Sau đó các không bào còn lại có xu hướng tái hợp thành một không bào duy nhất.

Sự tạo thành không bào ở tế bào nấm men đến nay vẫn chưa biết được đầy đủ. Song, chắc chắn là không bào có chứa các enzym thuỷ phân, enzym oxy hóa – khử, các polyphosphat, lipid, các hợp chất trung gian của tế bào có phân tử lượng thấp và các ion kim loại.

- **Mạng lưới nội chất (dictyosome)**

Trong tế bào chất của nấm men còn chứa một hệ thống màng hai lớp, được gọi là mạng lưới nội chất bao gồm hàng dãy màng kép có gai cong dày. Một số màng có kết hợp với riboxom. Đôi khi đầu màng chuốt thành các bong tròn và rồi có thể từ đây tạo thành không bào. Mạng lưới này còn được gọi là thể golgi hay bộ máy golgi.

Mặc dù mạng lưới nội chất của nấm men, cũng như ở các vi sinh vật khác, có tham gia vào các hoạt động của tế bào. Song, mối quan hệ mạng lưới này với các cơ quan nội bào khác vẫn chưa được biết rõ ràng. Có tác giả cho rằng, mạng lưới kép này điều hành chung quá trình sinh lý của tế bào.

- **Nhân tế bào**

Nhân là cấu tử bất biến của tế bào nấm men. Ta thấy rõ nhân tế bào nấm men trong trường hợp giữ tế bào trong nước vô trùng vài ngày. Lúc này tế bào chất trở thành đồng nhất và trong suốt do bị đối. Với kính hiển vi thông thường ta có thể quan sát rất rõ ràng nhân tế bào hoặc dưới

kính hiển vi huỳnh quang hay kính hiển vi đối pha sau khi xử lý bằng dung dịch fluorocrom.

Nhân của tế bào nấm men có màng vỏ, hạch nhân (thể nhiễm sắc – karyokon) và chất nhân (karyoplasma). Vỏ nhân tham gia vào điều hoà các qui trình trong nhân bằng cách thay đổi tính thấm và thông báo trực tiếp giữa nhân với môi trường bên ngoài tế bào, cũng như giữa nhân và tế bào chất.

Đường kính của nhân tế bào nấm men vào khoảng 2 μm . Phần lớn nhân có dạng hình cầu hoặc elip. Sự phân bố của chúng trong nội bào có thể thay đổi trong suốt quá trình sống của tế bào. Kích thước nhân của tế bào nấm men không đồng nhất không những ở các tế bào khác giống, mà ở tế bào cùng một giống trong các trạng thái sinh lý khác nhau. Nhân to ở các giống *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes* và dễ dàng nhìn thấy dưới kính hiển vi. Còn ở các giống lên men hoặc không lên men như *Torulopsis pulcherrima*, *T. utilis*... thường có nhân nhỏ. Ở tế bào nấm men đang sinh trưởng nhân rất giàu axit nucleic và vùng sinh sản được hoạt hoá (nơi sẽ mọc chồi hoặc phân cắt tế bào).

Thành phần hoá học cơ bản của nhân là axit dezoxinucleic (ADN). Với nó và chỉ với nó (ADN) có liên quan đến sự truyền thông tin di truyền từ thế hệ này tới thế hệ tiếp sau. Nhân còn có protein nhưng không liên kết với các axit nucleic. Quá trình sinh tổng hợp protein và đặc điểm các protein này được tiến hành theo lệnh của ADN nhờ các axit ribonucleic truyền đạt và vận chuyển (mARN và tARN). Dòng thông tin này có thể sơ giản hoá như sau: từ ADN chuyển qua ARN tới protein (ADN $\rightarrow$ ARN $\rightarrow$ Protein).

Hàm lượng ADN trong tế bào bất kỳ là ổn định nghiêm ngặt và không phụ thuộc vào các điều kiện của môi trường bên ngoài, vào dinh dưỡng cũng như vào tác động từ các yếu tố khác, mặc dù các yếu tố này đang ảnh hưởng đến trao đổi chất của tế bào. Một chủng men rượu ở các giai đoạn phát triển khác nhau đều có hàm lượng ADN là 0,17 – 0,18% sinh khối khô. Còn ở men rượu vang sau khi gia nhiệt hàm lượng này cũng không thay đổi.

Thành phần nucleotit trong ADN rất phụ thuộc vào từng loài. Song, số gốc adenin (A) luôn bằng số gốc timin (T): A = T, còn số gốc guanin (G) bằng số gốc xitozin (X): G = X, cũng như số gốc pyrimidin bằng số gốc purin: A + G = T + X. Những loài nấm men gần nhau có thành phần nucleotit như nhau. Trong quá trình tiến hóa các vi sinh vật tách ra xa nhau cho thấy chỉ số này khác biệt rõ rệt. Do vậy, thành phần nucleotit thường được sử dụng làm dấu hiệu phân loại.

Trong khi sinh sản ở nhân tế bào nấm men các cấu trúc ADN - thể nhiễm sắc. Thể này có thể quan sát dưới kính hiển vi với tiêu bản cố định và nhuộm màu. Trong thể nhiễm sắc ADN liên kết với protein – histon tạo thành những sợi nucleoprotein dày khoảng 10 nm. Đối với từng loài nấm men cụ thể số lượng thể nhiễm sắc, chiều dài và hình dáng của chúng là ổn định. Song, những số liệu về số lượng thể nhiễm sắc của nấm men là rất không thống nhất kể cả khi nghiên cứu dưới kính hiển vi điện tử cũng như những số liệu về di truyền học.

Với các điều kiện xác định trong tự nhiên và trong thực nghiệm dưới tác dụng của các yếu tố vật lý và hóa học khác nhau số lượng thể nhiễm sắc trong tế bào có thể thay đổi. Ở các tế bào đơn bội thể nhiễm sắc là một n , còn ở lưỡng bội là $2n$. Tăng số lượng bộ thể nhiễm sắc cũng sẽ làm tăng lượng ADN, có nghĩa là kích thước tế bào, nhân và chất nhân cũng sẽ phải tăng lên. Những tế bào đơn bội chứa số lượng ADN chỉ bằng nửa trong tế bào lưỡng bội.

Các thể nhiễm sắc riêng biệt rất nhỏ nên rất khó hoặc không thể quan sát được cấu trúc phức tạp của chúng bằng kính hiển vi thường hoặc kính hiển vi điện tử. Tuy nhiên, bằng phương pháp đánh dấu ADN đã được sử dụng trong kỹ thuật điện di dùng để tách từng nhiễm sắc thể riêng biệt. Kỹ thuật này còn được sử dụng trong phân loại nấm men. Lớp màng bao quanh nhân tế bào không biến đổi trong suốt chu kỳ sống của tế bào và có thể quan sát thấy trên ảnh chụp từ kính hiển vi điện tử siêu nhỏ. Liên kết với màng nhân là một bộ phận gọi là tấm chắn. Cấu trúc đặc trưng của tấm chắn là một đĩa nhiều lớp mà từ đây các mao quản nhỏ mở rộng vào trong nhân và tế bào chất. Các tấm chắn này đóng một vai trò quan trọng trong quá trình phân chia nhân của tế bào nấm men.

Đến nay ta đã biết nhân tế bào là một cấu trúc chứa một lượng lớn ADN được sắp xếp trong 16 thể nhiễm sắc chứa trên 6000 gen khác nhau và mã hóa cho tất cả các phân tử protein được tổng hợp trong tế bào. Trong mấy năm cuối thế kỷ XX đã công bố kết quả về khám phá ra trình tự bộ gen của nấm men *Saccharomyces*, cho phép xác định trình tự các gen riêng biệt và từ đó biết được trình tự các axit amin trong các protein được tổng hợp do các gen này điều khiển (mã hóa). Với kết quả này người ta đã biết được khoảng 30% được xác định là đã mã hóa cho protein. Song, tới nay vẫn còn chưa xác định được chức năng cụ thể của một số gen. Do vậy, chúng được gọi là gen lặn. Việc nghiên cứu khoảng trên 1000 gen lặn đang được 114 phòng thí nghiệm ở Châu Âu và Mỹ tiến hành nghiên cứu và hy vọng sẽ bổ sung cho hiểu biết về bộ gen của tế bào nấm men sớm được hoàn thiện.

• Các thể vùi và các chất dự trữ trong tế bào nấm men

Các thể vùi nằm trong tế bào chất và dịch không bào. Chúng có thể thay đổi trong quá trình sống của tế bào. Các thể vùi và các chất dự trữ của nấm men là những hạt glycogen (gần giống với tinh bột), metacromatin (volutin), các chất giống chất béo và các hạt chất béo, lưu huỳnh tích tụ, hạt axit và đường tinh thể. Các loại chất này trong tế bào ở dạng không hoạt động và thường không tan trong nước.

- Tregaloza (đường đôi hoàn nguyên) và glycogen (polysacarit giống tinh bột) có trong tế bào với số lượng là: tregaloza từ 20 – 150 mg, glycogen – 30 – 100 mg trong 1g chất khô của tế bào. Nấm men nuôi trong điều kiện hiếu khí ta thấy lượng tregaloza vượt trội, còn kỵ khí glycogen vượt trội. Nâng cao nhiệt độ nuôi cấy thì hàm lượng tregaloza tăng lên. Các hạt glycogen thấy xuất hiện ở thời kỳ đầu lên men, nhưng về cuối thì biến mất. Theo quan điểm hiện

đại, glycogen ở ngoài màng tế bào chất và liên kết với những cấu tử không tan của vỏ tế bào. Glycogen đóng vai trò là nguồn C dinh dưỡng dự trữ.

- *Lipit* (chất béo và những chất tương tự chất béo) là những cấu tử quan trọng của màng tế bào chất và các nội quan bào. Lipit dạng giọt giữ vai trò làm vật liệu dinh dưỡng dự trữ.

Chất béo của nấm men là hỗn hợp các loại chất béo thực (glyxerit của các axit béo) với phospholipit (lexitin, kefallin) và sterol (ecgosterol). Các giọt chất béo nhìn khá rõ dưới kính hiển vi. Chúng khúc xạ ánh sáng rất mạnh. Đặc biệt là các nấm men tạo màng trên bề mặt dịch nuôi cấy ta nhìn thấy các giọt này rất rõ.

Phospholipit kết hợp với sterin, carotenoid và skvaletin làm thúc đẩy sinh trưởng nấm men và thực hiện các phản ứng sinh tổng hợp ở điều kiện kỵ khí. Tùy từng loài và phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy, nấm men có khả năng tổng hợp được 1 – 74% lipit trong chất khô của tế bào. Loài *Rhodotorula gracile* có thể tổng hợp lipit tới 74%. Nhiều chủng nấm men đã được dùng sản xuất chất béo trong thế chiến thứ nhất.

- *Metacromatin (volutin)*. Các hạt volutin là thể keo nằm trong dịch không bào. thành phần của nó gồm chủ yếu là các polyphosphat. Đôi khi vì sai lệch nào đó trong trao đổi chất của tế bào ta nhìn thấy các hạt này hình cầu khúc xạ ánh sáng rất rõ.

Volutin được sử dụng để xây dựng chất nguyên sinh (protoplast) – tế bào chất và làm nguồn cung cấp năng lượng. Vì vậy, số lượng metacromatin giảm trong quá trình sinh tổng hợp protein mạnh mẽ và trái lại có nghĩa là sinh sản bị ngừng trệ.

- *Lưu huỳnh*. Đôi khi ta thấy lưu huỳnh (S) trong tế bào chất nấm men. Lưu huỳnh trong tế bào nấm men khúc xạ ánh sáng rất mạnh. Khi lưu huỳnh có trong tế bào có thể là xuất hiện các dạng thoái triển của tế bào nấm men.

Như trên chúng ta đã biết, cấu tạo và các cơ quan nội bào của tế bào nấm men. Trong cấu trúc của chúng có chứa nhiều vật chất khác nhau. Các hợp chất này biến đổi sẽ đưa đến biến đổi kết quả các quá trình hóa sinh của tế bào. Những quá trình rất đồng bộ và liên quan chặt chẽ với nhau.

1.3. MỘT SỐ GIỐNG NẤM MEN THƯỜNG GẶP TRONG TỰ NHIÊN VÀ ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG CÔNG NGHIỆP

Phần này chúng ta sẽ đề cập đến một số giống và loài nấm men gặp trong tự nhiên. Chúng là các tác nhân sinh ra các sản phẩm có lợi cho đời sống kinh tế của xã hội loài người, như rượu, bia, nước giải khát, men bánh mì, men thức ăn chăn nuôi v.v... Song, cũng có một số trong những giống – loài nấm men này lại có thể gây phá hỏng các quá trình lên men hoặc sản phẩm lên men.

1.3.1. Giống *Saccharomyces Meyen* ^(*)

Giống này gồm các nấm men có thể lên men đường sinh ra rượu etylic. Các loài của giống này phổ biến rất rộng rãi trong tự nhiên, đặc biệt một số nòi đã được chúng ta nghiên cứu và biết khá rõ. Các men này có vai trò rất to lớn trong sản xuất các sản phẩm lên men có chứa cồn.

Giống *Saccharomyces* có hình dáng tế bào là hình cầu, hình ôvan hay elip. Sinh sản vô tính bằng nảy chồi. Thường có 1 – 4 bào tử trong nang, ít khi có 8 bào tử. Hệ sinh dưỡng của các giống này trong điều kiện bình thường là các thể lưỡng bội. Khi già chúng thường kết thành vòng và mọc trên dịch lên men sợi giả, có thể kết thành màng nổi. Lên men đường tốt, nhưng nồng độ đường không quá 30% (chính vì điều này những nấm men này được gọi là giống “nấm đường”) và tạo thành tới 18% cồn etylic. Chúng không đồng hóa được muối nitrat.

Theo Kudrêyxeva, giống này có 18 loài. Chúng không khác nhau về hình thái, nhưng lại khác nhau nhiều về quan hệ với các loại đường (xem bảng 1.1).

Bảng 1.1. Khả năng đồng hóa các nguồn hydratcacbon của nấm men

Giống Saccharomyces	Quan hệ với các nguồn cacbon dinh dưỡng																				
	Các loại đường										Các loại rượu					Các axit hữu cơ					
	Glucoza	Galactoza	Sacaroza	Rafinoza	Lactoza	Maltoza	Dextrin	Inulin	Xyloza	Arabioza	Etanol	Glycerin	Mannit	Dulxit	Sorbit	Axetic	Lactic	Xucsinic	Malic	Tartaric	Xitric
S. vini	+	+	+	1/3	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
S. cerevisiae	+	+	+	1/3	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
S. uvarum	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
S. carlsbergensis	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
S. chevalieri	+	-	+	1/3	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
S. oviformis	+	-	+	1/3	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
S. chodati	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Ghi chú: + đồng hóa; - không đồng hóa

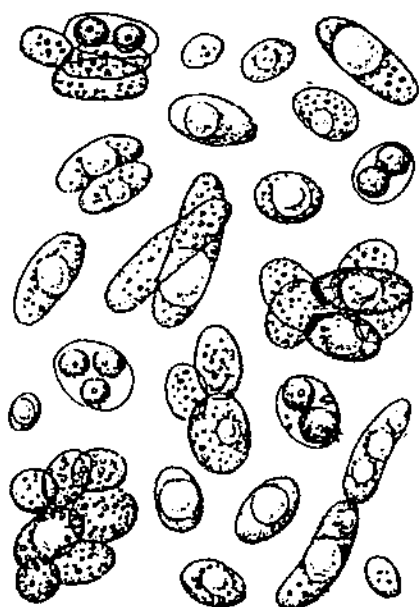
Rafinoza khi bị phân huỷ thành fructoza (1) và melbioza (2). Nấm men khi chỉ đồng hoá được fructoza còn melbioza không đồng hóa được, nên chỉ ghi là 1/3.

Dưới đây sẽ giới thiệu bảy loài chính thuộc giống *Sccharomyces*. Các loài này có nhiều ý nghĩa và đóng vai trò to lớn trong sản xuất lên men.

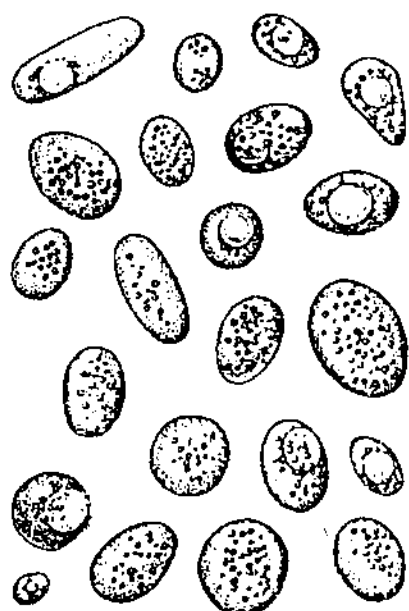
1) *Saccharomyces vini* Meyen (Theo Lodder – *S. cerevisiae* Hansen)

^(*) Năm 1838, Meyen lần đầu tiên hợp nhất 3 loài men rượu, bia và rượu vang thành giống *Saccharomyces* và như vậy cách gọi tên nấm men thường là tên giống, loài kèm theo tên tác giả. Song, các tài liệu khoa học hiện nay thường không viết tên tác giả ở tên nấm men.

Đây là loài nấm men rất phát triển ở các loại quả ngọt, ở dịch rau quả. Chúng lên men dịch quả, đặc biệt là dịch quả nho tạo thành những loại rượu nho và thường được gọi là rượu vang. Tên của loài này trước đây được gọi là *Saccharomyces ellipsoideus*, bắt nguồn từ hình dáng tế bào của chúng là hình *ellip* (hình 1.7).



Hình 1.7. *Saccharomyces vini* ($\times 2000$)



Hình 1.8. *Saccharomyces cerevisiae* nòi XII ($\times 2000$)

Trong dịch quả lên men ta thấy giống *Saccharomyces* chiếm tới 80% số tế bào vi sinh vật có mặt. Dịch lên men được phủ một lớp bọt trên bề mặt. Men này có hai dạng: dạng bụi dễ làm đục và dạng bông dễ kết tủa, dễ lắng làm trong dịch lên men.

Nói chung các nòi thuộc loại này cần các nguồn dinh dưỡng là đường, rượu và axit hữu cơ (xem bảng 1.1). Các nguồn chất sinh trưởng của chúng là axit pantotenic (Vitamin B₃), biotin (Vitamin H hay B₇), mezoizoinit, tiamin (vitamin B₁) và pyridoxin (vitamin B₆).

2. *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (Theo Lodder – *S. cerevisiae* Hansen)

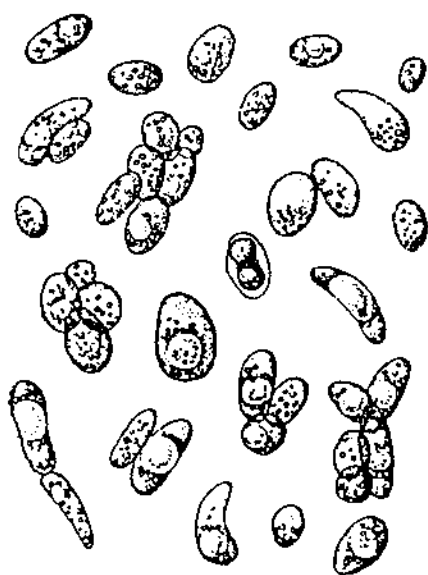
Loài nấm men này được dùng trong công nghiệp cồn etylic, men bánh mì và bia. Hình dáng các chủng của nó không khác nhiều lắm so với các chủng cùng giống (hình 1.8). Khả năng tạo thành bào tử túi của *S. cerevisiae* kém hơn *S. vini*, *S. uvarum*. Loài này có đặc điểm lên men đường từ tinh bột sâu xa hơn so với các loài khác, vì rằng nó có thể lên men được những dextrin đơn giản.

3) *Saccharomyces uvarum* Beijerinck (Theo Lodder – *S. uvarum* Beijerinck).

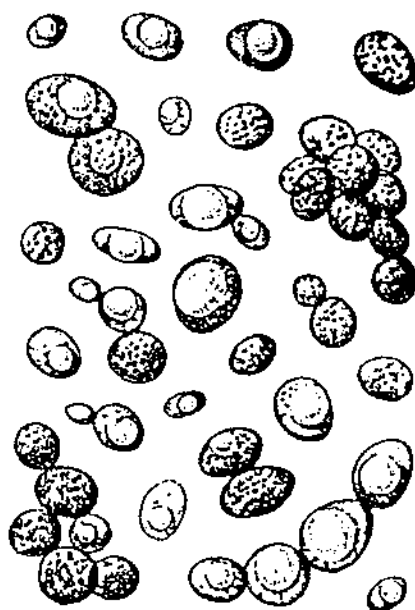
Các chủng của loài này được phân lập từ dịch quả phức bốn tử, dịch nho lên men và dịch bia. Một số chủng được dùng làm men bánh mì, chúng có độ lắng tốt (loại men chìm) được dùng

trong sản xuất bia.

Hình thái loài này có dáng chung của các loài thuộc giống *Saccharomyces* (hình 1.10). Sự tạo thành bào tử của loài này xảy ra mạnh mẽ khi nuôi trên môi trường thạch – malt trong khoảng thời gian đầu sau khi tách được chúng từ điều kiện tự nhiên. Có một số chủng loài này dễ tạo thành dạng bông trong lên men. Vì vậy, chúng có thể dùng trong sản xuất rượu vang và có thể tích tụ trong dịch lên men được 12 – 13° cồn.



Hình 1.9. *Saccharomyces uvarum* (× 2000)



Hình 1.10. *Saccharomyces carlsbergensis*
(× 2000)

4) *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen (Theo Lodder – *S. uvarum* Beijerinck)

Các chủng của loài này được dùng nhiều trong sản xuất bia. Chúng là loại men chìm, hình thái tế bào cũng tương tự các loài men khác cùng giống (hình 1.10). Khả năng sinh bào tử yếu và ít gặp.

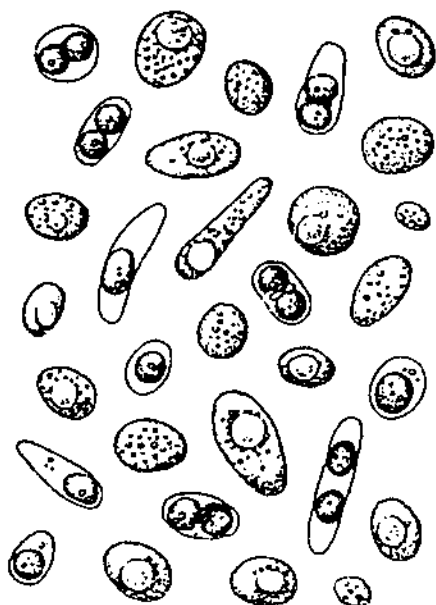
Khả năng lên men đường không kém các loài *Saccharomyces* khác, nhưng loài men này có thể phát triển và lên men ở nhiệt độ thấp (5 – 10°C). Vì lẽ này Kudreyxeva xếp chúng thành một loài riêng.

Trong dịch nho ít gặp loài này. Vì vậy, trong sản xuất rượu nho các chủng thuộc loài này không có vai trò gì đặc biệt, nhưng chúng là giống chủ lực trong lên men bia.

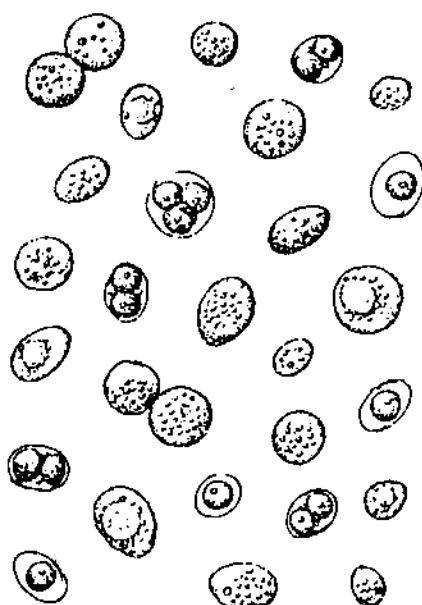
5) *Saccharomyces chevalieri* Guillermond

Các chủng loài này thường được phân lập từ dịch quả nho tự lên men và từ vang non của dịch quả cọ dừa. Hình thái men này xem hình 1.11.

Loài men này phát triển tốt trên dịch nho và có thể tích tụ tới 16° cồn, song không vượt được *Saccharomyces vini* trong lên men rượu vang.



Hình 1.11. *Saccharomyces chevalieri* ($\times 2000$)



Hình 1.12. *Saccharomyces oviformis* ($\times 2000$)

6) *Saccharomyces oviformis* Osterwalder (Theo Lodder – *Saccharomyces bayanus* Saccardo)

Các chủng thuộc loài men này được phân lập từ dịch quả nho lên men tự nhiên thường dùng trong sản xuất rượu sâmpanh (champagne).

Những giống *oviformis* thuần chủng có tế bào tương tự như các loài khác (hình 1.12), phát triển tốt ở dịch nho, lên men gần như toàn bộ đường trong dịch quả và có thể tích tụ tới 18° cồn (nếu dịch quả có hàm lượng cao hoặc quá trình lên men được bổ sung đường). Nhu cầu về chất sinh trưởng của loài men này cũng giống như *S. vini*. Trong giai đoạn đầu *S. oviformis* thường phát triển chậm so với *S. vini*, nhưng sức chịu đựng cồn lại cao hơn và như vậy ở giai đoạn cuối lại phát triển tốt hơn. Do vậy, nó thường được dùng kết hợp với *S. vini* trong lên men rượu vang có hàm lượng đường cao và để sản xuất vang “khô” (lên men hết đường).

Các chủng *S. oviformis* khi kết thúc lên men thường tạo thành một lớp màng trên bề mặt dịch. Chúng thường được dùng trong sản xuất rượu vang từ dịch quả có hàm lượng đường cao, đặc biệt trong sản xuất sâmpanh để có sản phẩm lên men để có nồng độ cồn cao tự nhiên.

* *Saccharomyces oviformis cheresiensis* (hình 1.13).

Loài này lên men đường mạnh, có thể tạo thành tới $16,5^{\circ}$ cồn trong dịch lên men. Khi kết thúc lên men cũng tạo thành lớp màng trên mặt dịch. Trong quá trình rượu bị oxy hoá và kết quả

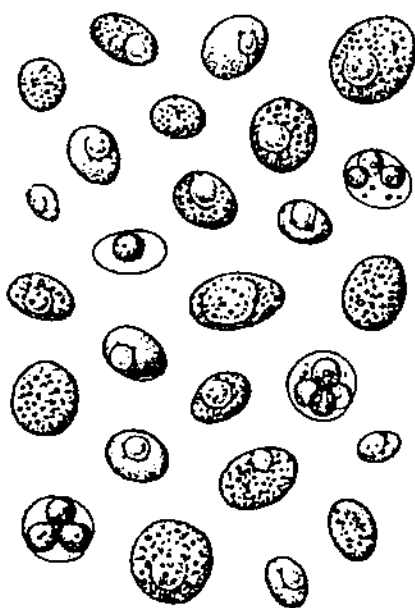
sẽ tạo thành chất axetaldehyt (tới 700 mg/l) cùng với các este bay hơi làm cho vang có hương thơm quả anh đào.

Điều kiện thích hợp cho men Cheres phát triển tốt là nhiệt độ 18 – 20°C và phải đủ không khí. Có thể dùng men này để chữa các loại vang có tích tụ axit axetic và axit lactic (vang có hai loại axit này thường có mùi chuột).

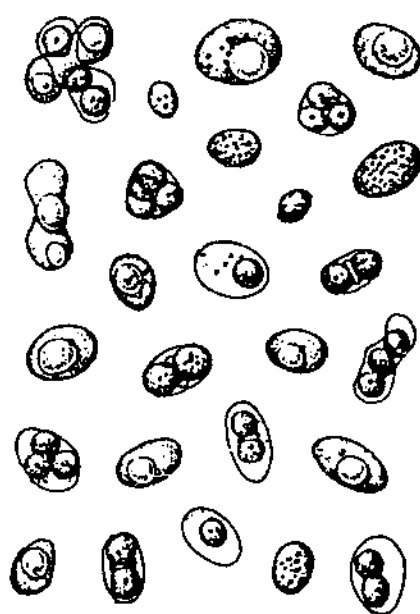
7) *Saccharomyces chodati* Steiner (theo Lodder – *S. italicus* Casteli)

Men này được phân lập từ nước nho lên men tự nhiên ở Thụy Sĩ, không lên men được sacaroza, nhưng lên men tốt glucoza và fructoza.

Hình dáng tế bào và bào tử nang của *S. chodati* xem hình 1.14.



Hình 1.13. *Saccharomyces oviformis* var. *cheresiensis* (× 2000)



Hình 1.14. *Saccharomyces chodati*

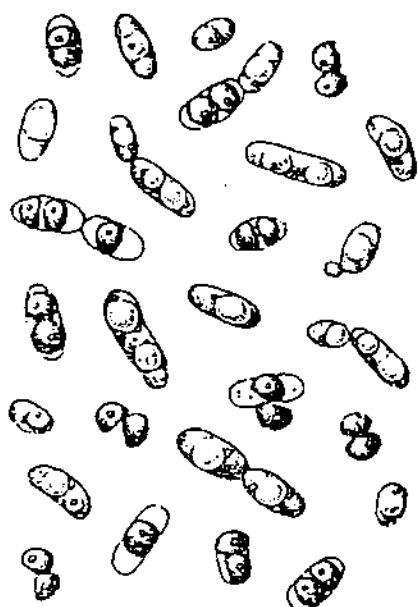
1.3.2. Giống *Pichia Hansen*

Giống men này tạo thành bào tử ở dạng bán cầu hoặc dạng có nhiều góc cạnh, mỗi nang có 1 – 2, hiếm khi có tới 4 bào tử (hình 1.15).

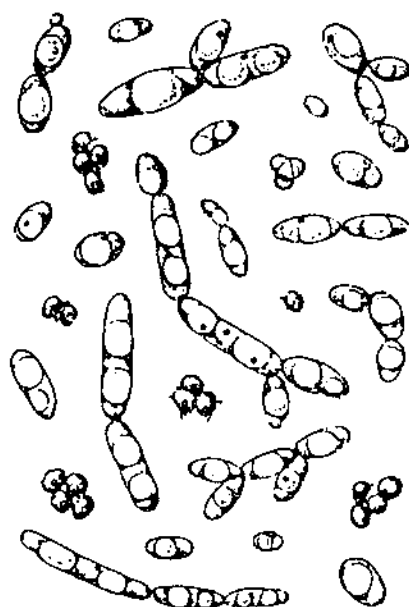
Các chủng của nấm men này đồng hoá đường theo con đường oxy hóa. Ngoài ra, chúng có thể oxy hóa rượu, axit hữu cơ. Do vậy, chúng phát triển rất tốt trên mật rượu vang, bia và các loại dịch có chứa rượu dưới 12%. Ở vang non, nấm men này có thể gặp với số lượng lớn hơn nhiều lần so với các giống nấm men khác. Trên mặt vang *Pichia* tạo thành màng có những hạt bột màu trắng, làm thay đổi thành phần và hương vị của vang. Nó tạo cho vang những axit hữu cơ bay hơi và este của những axit này.

Các nấm men *Pichia* còn kìm hãm sinh trưởng giống men sâmpanh và men cheres, cũng như men bia.

Những nấm men tạo màng, trong đó có *Pichia*, thường chịu được sulfit (nồng độ H_2SO_3 tới 500 mg trong 1 lít vang mới có thể ức chế được chúng). Chúng có thể khử sulfat và sulfit khá mạnh tới S (lưu huỳnh) nguyên tử và một phần chuyển sang H_2S . Ở rượu thường gặp loài *Pichia alcoholphila* (đồng nghĩa với *P. membranefaciens*). Loài này đồng hoá glucoza, fructoza, mannoza, etanol, glycerin, các axit axetic, lactic, malic, xucxinic thành axit tartaric bằng con đường oxy hóa.



Hình 1.15. *Pichia* ($\times 1500$)



Hình 1.16. *Hansenula* ($\times 2000$)

1.3.3. Giống *Hansenula* Sydow

Cũng giống như *Pichia* các nấm men thuộc giống *Hansenula* cũng tạo thành màng trên các dịch chứa đường. Lớp màng này khô và nhẵn, màu trắng xám, lan dần từ mặt dịch xuống thành các đồ chứa đựng. Vòng đời của men này được tính từ khi sinh bào tử. Mỗi bào tử nang có từ 1 - 14 bào tử. Bào tử có dạng hình chóp (hình 1.16).

Trên môi trường đặc *Hansenula* cũng tạo thành màng, lúc đầu có màu trắng, mờ đục không bóng và dày đặc, sau đó trở thành nhẵn nhéo. Trên bề mặt nước nhỏ chúng phát triển khá nhanh, tạo màng sau 2 - 3 ngày và lắng cặn, đồng thời lên men rượu, tích tụ được 2 - 3% cồn. Tế bào ở màng dài hơn tế bào ở cặn. Không bào to và chứa nhiều hạt chất béo, chiết quang mạnh. Hình dáng tế bào ở cặn có hình ôvan hoặc tròn.

Trong dịch đường *Hansenula* phát triển và lên men nhẹ, nhưng nó đồng thời oxy hóa đường và rượu (khi môi trường có nồng độ rượu dưới 13%) và đủ oxy. Nó còn oxy hóa đường sót, rượu, axit hữu cơ làm cho pH môi trường chuyển từ axit sang kiềm.

Trong quá trình phát triển *Hansenula* có thể chuyển hóa đường thành rượu etylic, butyric, amylic, thành các axit axetic, xucxinic, butyric, các este bay hơi (đặc biệt là etyl axetat) làm cho dịch lên men có hương thơm gắt.

Trong công nghiệp lên men *Hansenula* được coi là *men đại rất nguy hại*, đặc biệt là loài *H. anomala*. Loài này làm đục rượu vang. Nếu đóng chai còn đủ không khí nó phát triển rất nhanh ở 18 - 20°C, lắng cặn có tinh bột ở đáy chai và oxy hóa axit tartaric (axit này các loài khác thường không đồng hóa được).

1.3.4. Giống *Candida Berkhout*

Các chủng thuộc giống men này tạo màng, không sinh bào tử. Tế bào hình ôvan hoặc hình trụ dài có chứa 1 ÷ 2 giọt chất béo nằm ở 2 đầu và đôi khi khúc xạ ánh sáng rất mạnh (hình 1.17).

Trên mặt môi trường chứa đường và rượu etylic men này nhanh chóng tạo màng mờ đục, lúc đầu phẳng nhẵn, sau nhăn nheo và có màu trắng xám, thường rơi xuống đáy.

Giống *Candida* gồm 81 loài. Trong rượu vang thường gặp *Candida valida*, lên men được glucoza và *Candida vini*. Hai giống này không lên men được Saccaroza và người ta xếp chúng vào loài *Candida mycoderma*. Những chủng thuộc loài này có thể phát triển trong rượu vang, trong bia, khi những sản phẩm này còn một lượng nhỏ đường sót, rượu và axit hữu cơ (chỉ vài phần trăm). Ở rượu vang chúng tạo ra các mùi vị lạ, làm giảm chất lượng sản phẩm.

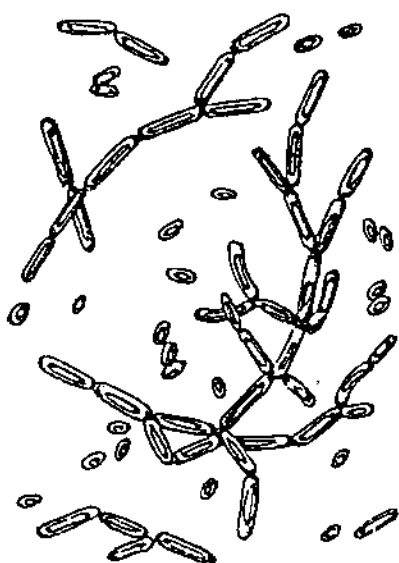
1.3.5. Giống *Schizosaccharomyces Lindner* (hình 1.18)

Giống nấm men này ít gặp ở dịch quả nho, nhưng hay gặp ở các loại dịch quả khác, đặc biệt là ở nước táo chúng phát triển rất mạnh và gây nguy hiểm cho sản xuất, vì chúng có thể lên men đường đồng thời với lên men axit malic và tạo thành rượu, CO₂.

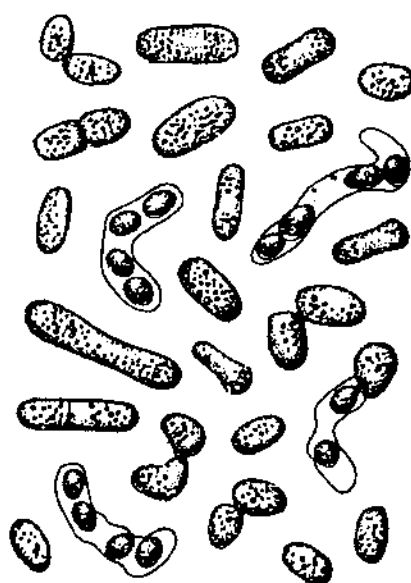
Tế bào *Schizosaccharomyces* có hình trụ hai đầu lượn tròn. Trong điều kiện không thuận lợi tế bào phân đôi, sau đó tạo thành túi có 4 - 8 bào tử.

Nấm men này có thể đồng hóa được glucoza, saccaroza, maltoza, dextrin từ tinh bột. Khả năng oxy hóa của giống men này là rất yếu. Chúng có thể đồng hóa được các nguồn cacbon dinh dưỡng trong quá trình lên men.

Theo Kudreyxeva giống này có 2 loài: *Schizosaccharomyces pombe* và *Schizosaccharomyces acidevoratus* Chulenko. Theo Lodder thì hai loài này được xếp chung thành loài *Schizosaccharomyces pombe*.



Hình 1.17. *Candida mycoderma* ($\times 800$)



Hình 1.18. *Schizosaccharomyces pombe*

1.3.6. Giống *Saccharomyces Hansen*

Nấm men thuộc giống này có hình quả chanh lớn, sinh sản vô tính hỗn hợp theo kiểu nảy chồi và phân cắt tế bào (hình 1.19). trong điều kiện sinh sản không thuận lợi các tế bào hình thành túi có 4 bào tử hình cầu.

Với dịch quả lên men bình thường không có SO_2 thường ít gặp men này, nhưng trong dịch có 80 - 120 mg/l H_2SO_3 tự do thì lại rất hay gặp. Có ý kiến cho rằng, nên sử dụng chúng vào dịch quả có hàm lượng sulfite (cao để khử chất này) và trong lên men phụ rượu vang.

Các chủng men thuộc giống này có thể lên men tạo thành 10^9 cồn.

Chúng có đặc điểm khá đồng nhất là sản phẩm tạo ra ngoài rượu etylic còn có các axit bay hơi và các sản phẩm thứ cấp khác. Trong lên men nếu thiếu khí không đủ sẽ tạo ra etyl axetat tới 200 mg/l và ở điều kiện thiếu khí - 80 mg/l. Các hàm lượng của etyl axetat làm cho dịch lên men có mùi vị chua thiu và được phép sang hoàn thành phẩm rượu vang.

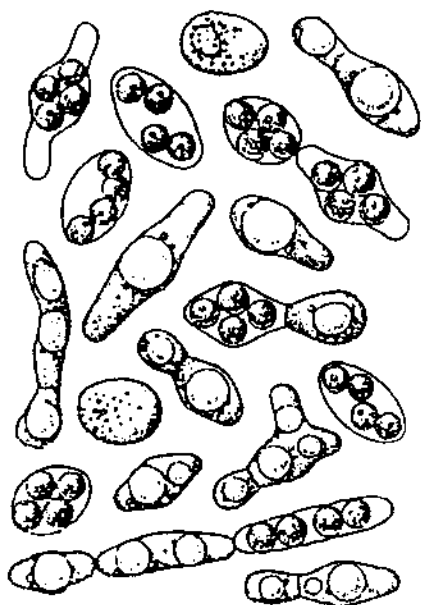
Trong thực tế sản xuất chúng ta coi men này làm phá hỏng quá trình lên men. Theo Lodder xếp giống này là một loài của giống *Saccharomyces*: *S. ludwigi*.

1.3.7. Giống *Hanseniaspora (Zikes) Klöcker*

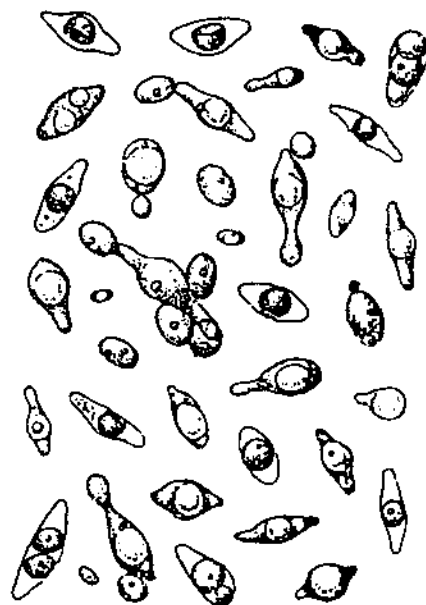
Tế bào của giống men này khá nhỏ, hình ellip hoặc hình quả chanh. Sinh sản bằng nảy chồi ở một hoặc hai đầu. Hiếm khi sinh bào tử, nếu có thì mỗi túi mang 1 - 2 hoặc 3 - 4 bào tử (hình 1.20).

Nấm men *Hanseniaspora* phát triển rất nhanh trên các loại quả, cũng như trong các dịch quả làm hư hỏng các đối tượng này. Tốc độ phát triển của chúng rất nhanh gấp 2 lần so với *Saccharomyces vini*.

Hanseniaspora apiculata là loại men đại trong sản xuất rượu vang, làm hỏng dịch và có thể là cả quá trình lên men.



Hình 1.19. *Saccharomyces ludwigi* ($\times 2000$)



Hình 1.20. *Hanseniaspora apiculata* ($\times 2000$)

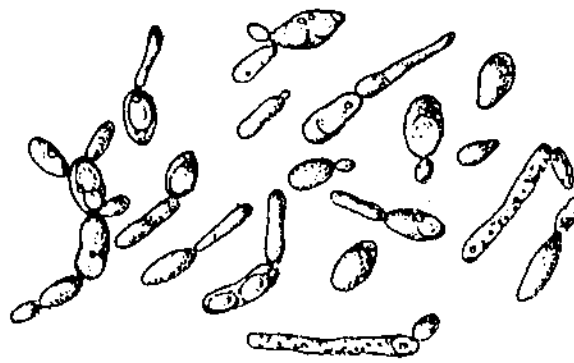
1.3.8 Giống *Brettanomyces Kufferath*

Tế bào của giống men này có hình dạng khá khác nhau: hình ôvan, đôi khi thót nhọn ở đầu và kéo dài ra; hoặc hình que thường nối 2 tế bào hoặc nhiều hơn (hình 1.21). Chúng nảy chồi ở hai đầu hoặc ở nhiều nơi. Chúng phát triển chậm, bắt đầu sinh trưởng ở dịch quả sau 5 ngày), tạo thành trên bề mặt dịch một lớp màng mỏng, nhẵn và có màu trắng xám.

Trong sản xuất rượu vang thường gặp 2 loài của giống này là *Brettanomyces intermedius* và *Br. custersii*.

Loài *Br. custersii* có thể lên men ở dịch có 18% đường và tạo thành 11 - 12° cồn, trên 12° cồn sẽ ngừng phát triển.

Giống này có thể phát triển ở nhiệt cao (ưu nhiệt – thermophyle), nhưng nhiệt độ tối thích là 31 - 32°C, dưới 12°C ngừng phát triển. Chúng rất nhạy cảm với SO_2 : ở dịch có 100 mg SO_2/l là bị ức chế hoàn toàn.



Hình 1.21. *Brettanomyces*

1.3.9. Giống *Torulopsis Berlese*

Tế bào của giống men này hình tròn, ít trường hợp là hình ovan. Trong tế bào chứa các hạt chất béo lớn, đôi khi chứa đầy các hạt này ở nội bào, đặc điểm của giống này là nảy chồi ở bất kỳ mọi chỗ trên bề mặt tế bào, tạo thành một số chồi đồng thời.

Giống này có tính lọc thẩm thấu, nên có thể phát triển ở dịch có tới 50% đường. Vì vậy, có thể gặp các men này ở rỉ đường, ở các loại dịch quả. Trong dịch quả dễ dàng thấy hai loài: *Torulopsis bacillaris* và *T. candida*.

So với các giống khác các loài men này lên men fructoza nhanh hơn và nhiều hơn so với glucoza (50% fructoza và 5% glucoza). Chúng đồng hóa pepton tốt hơn các nguồn nitơ khác so với *Saccharomyces*. Ở nhiệt độ thấp các men này bị ức chế, nhưng phát triển tốt khi nâng cao nhiệt độ.

1.3.10. Giống *Rhodotorula Harrison*

Các men thuộc giống này có màu đỏ. Trên môi trường đường và dextrin có thể thấy có những chủng tạo nhớt màu đỏ.

Đây là giống men đa hình thái: hình tròn; hình ovan, tế bào có thể bị kéo dài ra và bị uốn cong. Tế bào sinh ra chất màu Carotinoid làm cho tế bào có sắc tố từ vàng tới đỏ. Trên bề mặt dịch chúng tạo thành các vòng màu vàng tới đỏ.

Trong dịch quả dễ gặp 2 loài của giống này là *Rhodotorula glutinis* và *Rh. rubra*.

Chương 2

SINH LÝ NẤM MEN

Tế bào nấm men có thể sống độc lập. Quá trình sống của chúng gồm có các quá trình dinh dưỡng, quá trình sinh trưởng với những đặc điểm di truyền để bảo tồn nòi và những quá trình hoá sinh trao đổi chất trong tế bào để phục vụ cho sinh trưởng cũng như tạo thành các sản phẩm. Trong chương này chúng ta nghiên cứu các quá trình dinh dưỡng, sinh trưởng và đặc điểm di truyền của nấm men.

2.1. THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA TẾ BÀO NẤM MEN

Cũng như các cơ thể sống khác, thành phần cơ bản và chủ yếu của tế bào nấm men là nước - khoảng 75% khối lượng chung. Thành phần sinh khối khô của nấm men đại thể là như sau (%):

Chất vô cơ	5 ÷ 10
Cacbon	25 ÷ 50
Nitơ	4,8 ÷ 12
Protein ($N \times 6,25$)	30 ÷ 75
Lipit	2 ÷ 5

Thành phần hoá học của tế bào nấm men nếu tính theo các nguyên tố cấu thành sẽ là (% theo trị số trung bình): C - 47, H - 65, O - 31, N - 5 ÷ 10, P - 1,6 ÷ 3,5. Hàm lượng các nguyên tố không phải đa lượng: Ca - 0,3 ÷ 0,8, K - 9,5 ÷ 2,5, Mg - 0,1 ÷ 0,4, Na - 0,06 ÷ 0,2, S - 0,2. Các nguyên tố vi lượng (mg/kg): Fe - 90 ÷ 350, Cu - 20 ÷ 135, Zn - 100 ÷ 160, Mo - 15 ÷ 65. Nước trong tế bào ở 2 dạng: nước liên kết (chủ yếu) và nước tự do. Trong phần nước liên kết thì nước ở thể keo của tế bào chất chiếm tới 46 ÷ 53% và phần giữa của tế bào - 22 ÷ 27%. Thay đổi độ ẩm của nấm men sẽ kéo theo sự thay đổi các tỷ lệ nước trong nội bào và phần giữa của tế bào. Khi loại bỏ 85% lượng nước từ nấm men ở nhiệt độ dưới 50°C hầu như không ảnh hưởng đến hoạt động của chúng.

Chất khô của tế bào nấm men gồm có 23 ÷ 28% là chất hữu cơ và 5 ÷ 7% chất tro.

Chất hữu cơ ở đây gồm có (%): protein - 13 ÷ 14%, glucogen - 6 ÷ 8, xenluloza - 1,8 ÷ 2, chất béo - 0,5 ÷ 2.

• **Protein:** Nấm men có hàm lượng protein nguyên liệu trung bình khoảng 50% (tính theo chất khô) và khoảng 45% protein hoàn chỉnh. Các dẫn xuất của axit nucleic như bazơ purin và pyrimidin, các axit amin tự do đều được coi là protein nguyên liệu.

• **Glycogen:** Là những chất dự trữ nguồn cacbon (hydratcacbon của nấm men). Khi trong môi trường thiếu nguồn cacbon dinh dưỡng glycogen sẽ được huy động tham gia vào quá trình tiêu hoá của nấm men và giải phóng ra nước, khí cacbonic.

• **Tregaloz:** Hợp chất thường kết hợp với hàng loạt hạt glycogen làm nguồn dự trữ cacbon rất cơ động. Ở cùng một pH hàm lượng tregaloz tăng thì nitơ giảm.

• **Chất béo:** Chất béo trong tế bào nấm men có các axit oleic, linoelic, palmitic. Trong chất béo có tới 30 ÷ 40% phosphatit.

• **Tro:** Trong tro nấm men thấy có các oxyt sau đây (%): P_2O_5 khoảng 25 ÷ 60; CaO - 1 ÷ 8; MgO - 4 ÷ 6; Na_2O - 0,5 ÷ 2; SO_3^{2-} - 0,5 ÷ 6; SiO_2 - 1 ÷ 2; Fe_2O_3 - 0,05 ÷ 0,7.

• **Phospho:** Trong tế bào nấm men thấy ortho-, pyro- và metaphosphat ở dạng hữu cơ và vô cơ. Chúng là thành phần của axit nucleic, phospholipit và coenzym của adenosinphosphat (AMP, ADP, ATP) và tiamin (vitamin B_1). Trong chất nhân (nucleoprotein) có chứa phospho ở dạng orthophosphat. Dạng này còn thấy ở thành phần các enzym flavin, dạng pyrophosphat thấy trong nhiều coenzym (Codehydrataz KoI, KoII, cacboxylaza). Phospho còn thấy các dạng khác nhau tham gia và các quá trình quan trọng trao đổi năng lượng của tế bào.

– **Lưu huỳnh (S):** Lưu huỳnh là thành phần của nhiều hợp chất rất quan trọng như các axit amin (sixtin, stein, metionin và glutation), các vitamin (biotin, anevarin). Trong thành phần enzym lưu huỳnh ở dạng gốc sulfit và tiolovic.

– **Sắt:** Sắt chứa trong các xitocrom, xitocrom - oxydaza, perdoxydaza, catalaza và nhiều enzym của quá trình hô hấp hoặc các enzym khác nữa, như zimogenaza, pyrophosphataza.

– **Magie:** Magie có tác dụng hoạt hoá nhiều phosphataza và enolaza. Ion magie (Mg^{2+}) có ảnh hưởng gìn giữ hoạt tính enzym khi đun nóng. Magie và mangan (Mg, Mn) làm tăng nhanh nhu cầu về glucoza của nấm men. Ảnh hưởng của Mg mạnh hơn khi nồng độ glucoza thấp trong môi trường. Các môi trường dinh dưỡng thường có 0,02 ÷ 0,05% Mg ở dạng sulfat.

– **Kali:** Kali vừa là chất dinh dưỡng vừa là chất kích thích sinh trưởng của nấm men. Tác dụng kích thích được giải thích bằng vai trò của ion này trong quá trình phosphoryl - oxy hoá và quá trình đường phân (glycolysis). Nó còn kích thích quá trình vận chuyển phospho vô cơ vào trong tế bào. Kali hoạt hoá hàng loạt enzym của nấm men, như aldolaza, enzym pyruvat cacboxylaza và còn ảnh hưởng đến trao đổi chất nitơ, lưu huỳnh và chất béo của tế bào nấm men.

– **Canxi:** Canxi đóng vai trò hoạt hoá trong tế bào vi sinh vật nói chung, cũng như tế bào nấm men. Canxi được tìm thấy trong tế bào của vi sinh vật ở dạng tự do, nhưng chủ yếu ở dạng liên kết với protein, hydratcacbon và lipit. Ion canxi (Ca^{2+}) liên kết với protein - enzym làm trung tâm hoạt động của amylaza. Ion này có thể liên kết với ATP cùng với cả

Mg^{2+} và Mn^{2+} . Canxi là cofacto của transketolaza trong men bánh mì và ức chế một số enzym khác, như pyrophosphatasa, enolaza và adenosintriphosphatasa. Nâng cao hàm lượng muối canxi trong môi trường sẽ làm ức chế sinh sản và làm giảm tích lũy glycogen, làm tăng hàm lượng sterin của nấm men. Đối với nấm men hàm lượng Ca^{2+} đạt tới 40 mg/l có tác dụng kích thích sinh trưởng, cao hơn - kìm hãm.

• **Các nguyên tố vi lượng:** Các nguyên tố vi lượng có vai trò quan trọng đối với sinh sản và hoạt động sống của nấm men. Chúng tham gia vào thành phần của nhiều enzym, vitamin và nhiều hợp chất khác nữa trong các quá trình sinh tổng hợp các sản phẩm của tế bào. Thí dụ: coban (Co) có tác dụng kích thích sinh trưởng nấm men, nâng cao hàm lượng các chất chứa nitơ (N) phi protit trong tế bào, trước hết là ADN và ARN, các axit amin tự do. Nó còn kích thích tổng hợp vitamin, như riboflavin (vitamin B_2) và axit ascorbic (vitamin C).

Tác dụng kích thích sinh trưởng đối với vi sinh vật được giải thích như sau: Các ion kim loại vi lượng ở trong thành phần enzym tạo thành phức hữu cơ - kim loại (metalorganic) và các hợp chất phức khác trong tế bào. Hiệu quả thu được phụ thuộc vào độ bền liên kết của phức hữu cơ - kim loại của enzym với phân tử cơ chất hoặc phức được hoạt hoá làm tăng tính hoạt động của các sản phẩm trung gian. Kết quả là các phức này sẽ tạo điều kiện phản ứng cho enzym kết hợp với cơ chất tốt hơn làm tăng hoạt tính của enzym và cơ chất sẽ được chuyển hoá được nhiều hơn.

• **Vitamin và nhân tố sinh trưởng:** Để cho nấm men được phát triển bình thường và lên men được bình thường cần phải có các vitamin làm cofacto trong nhiều enzym của tế bào nấm men. Nấm men có thể tổng hợp được tất cả các vitamin trong chừng mực nào đó (nhiều hoặc ít), ngoại trừ biotin (vitamin H). Vì vậy, trong môi trường dinh dưỡng nhất định phải có vitamin này trong môi trường.

Trong tế bào nấm men rất giàu protein - enzym, vì vậy sự có mặt các vitamin làm các cofacto của các enzym này là điều dễ hiểu. Thực tế cho ta thấy tế bào nấm men rất giàu vitamin, nhất là vitamin nhóm B và tiền vitamin D_2 là ergosterol. Nhiều nước đã tổ chức một ngành công nghiệp nuôi cấy nấm men để thu sinh khối làm thức ăn chăn nuôi. Sinh khối nấm men ở đây được coi là nguồn protein - vitamin đậm đặc, thường được gọi là protein đơn bào (SCP), có thể thay bột cá, bột đậu tương... trong khẩu phần thức ăn.

Các axit béo có 18 nguyên tử C, đặc biệt là axit oleic, là tác nhân sinh trưởng rất quan trọng. Tác dụng kích thích sinh trưởng của axit oleic chỉ thấy ở nồng độ thấp và quá 0,5 mg/ml sẽ không thấy tác dụng và làm nấm men sinh trưởng chậm hơn nhiều.

Như chúng ta đã biết, hàm lượng protein trong tế bào rất cao. Các dạng protein hoàn chỉnh tham gia vào thành phần các enzym để chuyển hoá vật chất xây dựng tế bào cũng như tạo thành các sản phẩm lên men. Trong thành phần các protein có đủ các axit amin và đặc biệt là 8 hoặc 9 axit amin cần thiết không thể thay thế. Hàm lượng các axit amin trong tế

bào nấm men ở giai đoạn cuối lên men là như sau (mg/g men khô): lizin - 7,5; arginin - 1,3; histidin - 11,0; axit asparaginic - 2,9; serin - 2,7; glyxin - 1,5; axit glutamic - 3,9; alanin - 8,7; prolin - 2,0; tirozin - 2,8; metionin - 2,9; lōxin - 5,4; sistein - vết v.v...

Hàm lượng vitamin trong tế bào nấm men như sau ($\mu\text{g/g}$ men khô):

Inozit: $6000 \div 15000$; biotin (vitamin H): $0,6 \div 0,7$; riboflavin (vitamin B₂): $30 \div 60$; axit pantotenic (vitamin B₃): $2,0 \div 19,0$; tiamin (vitamin B₁): $24 \div 50$; pyridoxin (vitamin B₆): $14 \div 39$; nicotinamit (vitamin B₅): $370 \div 750$.

Thành phần hoá học của tế bào nấm men có thể thay đổi phụ thuộc vào thành phần môi trường dinh dưỡng, mức độ tăng trưởng của giống nấm men và điều kiện nuôi cấy. Quan hệ của nấm men với các chất có trong môi trường chính là mối tương tác vào nhu cầu dinh dưỡng và các enzym do chính các nòi (hay chủng) của giống nấm men, sinh ra trong quá trình nuôi cấy. Để có thể thu được sinh khối nấm men hay các sản phẩm lên men, người ta phải nghiên cứu rất kỹ các yêu cầu sinh lý của nấm men, trước hết là nhu cầu dinh dưỡng và các điều kiện cho sinh trưởng và điều kiện lên men cho hiệu suất cao.

2.2. DINH DƯỠNG NẤM MEN

Người ta thường chia làm hai nguồn dinh dưỡng đối với nấm men. Đó là dinh dưỡng ngoại bào và dinh dưỡng nội bào. Chất dinh dưỡng ngoại bào được thấm qua màng vào tế bào từ các chất của môi trường nuôi cấy bên ngoài. Khi tế bào ở trạng thái đối với môi trường bên ngoài nghèo hoặc cạn các chất dinh dưỡng thì những chất dự trữ nội bào, như glycogen, tregaloza, lipit, các hợp chất chứa N sẽ được sử dụng - dinh dưỡng nội bào.

Các chất dinh dưỡng khi được sử dụng sẽ hoặc là đi vào thành phần tế bào để phục vụ cho sinh trưởng hoặc là cung cấp năng lượng cần thiết cho đời sống của tế bào.

Các chất dinh dưỡng ngoại bào được thấm qua màng tế bào chất để vào nội bào. Màng này có khả năng điều chỉnh tính thấm của tế bào đối với vật chất hoặc vào hoặc ra khỏi tế bào. Chuyển vật chất qua màng thường có hai cách; khuếch tán và vận chuyển theo các đặc hiệu hoá lập thể.

2.2.1. Vận chuyển vật chất qua màng tế bào

Như trên chúng ta đã biết, có hai cách vận chuyển vật chất qua màng tế bào chất: khuếch tán và đặc hiệu hoá lập thể. Mỗi cách đều có hai dạng: vận chuyển chủ động và vận chuyển thụ động. Theo cách thụ động không tiêu hao năng lượng. Ở dạng khuếch tán thụ động vật chất qua màng không cần đến năng lượng, vật chất được qua màng ở dạng chất hoà tan và đi qua màng nhờ tính bán thấm của màng. Ở dạng khuếch tán chủ động tiêu tốn quá trình năng lượng của quá trình hô hấp (thường là ATP). Để thấm chất R-O vào tế bào năng lượng cần thiết cho khử hydro của chất này để thành R-OH. R-OH được hoà tan vào màng và sau đó chất này lại bị oxy hoá thành R-O trong tế bào và giải phóng H⁺ để khử phân tử R-O khác tiếp theo.

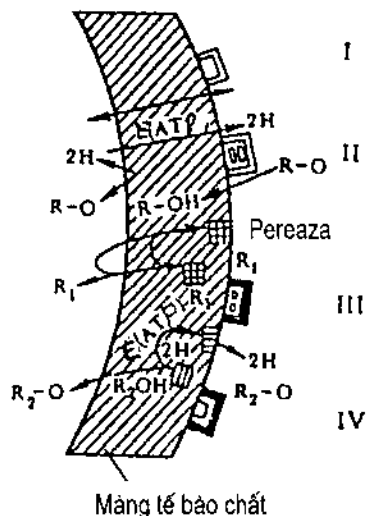
Đa số vật chất được chuyển qua màng vào nội bào lại trở lại dạng không hoà tan trong tế bào chất.

Khi các chất qua màng thường được một kiểu protein đặc biệt khu trú ở đây giúp đỡ. Protein đặc biệt này là enzym permeaza tham gia vào thành phần của màng tạo điều kiện cho vật chất thấm qua. Khi vật chất hoà tan đi qua màng sinh học permeaza cũng được hoà tan cùng với vật chất và cùng khuếch tán vào tế bào, sau đó permeaza được giải phóng để tiếp tục vận chuyển chất mới. Như vậy, vật chất muốn qua được màng phải có khả năng kết hợp với chất mang - protein. Chất mang này là enzym permeaza đặc biệt và vận chuyển theo kiểu này được gọi là vận chuyển hoá lập thể. Vận chuyển vật chất theo kiểu hoá lập thể cần năng lượng để cho vật chất kết hợp với protein thành phức vật chất - enzym theo cấu trúc hoá học lập thể. Vận chuyển chất (R_1) chủ động theo hoá lập thể thụ động R_1OH thường cần năng lượng để tạo phức, song theo kiểu chủ động thường tiêu tốn nhiều năng lượng. Chất R_2-O cần được biến thành R_2-OH . Chất này kết hợp với permeaza đặc biệt. Sau khi vào nội bào R_2OH bị khử để trở về R_2O . Như vậy, cấu trúc hoá học lập thể của permeaza làm cho vận chuyển chất hoà tan qua màng rất có hiệu quả. Cũng cần lưu ý rằng, vận chuyển một hydratecarbon nhất định chỉ có một permeaza tham gia. Ta gọi enzym là một permeaza đặc hiệu (xem hình 2.1).

Người ta cũng xác định được tính phụ thuộc chất đưa vào nấm men với sức thấm thấu của màng tế bào. Những chất thấm qua màng trước hết là các loại đường được quan tâm; sức thấm qua màng của các loại đường phụ thuộc vào cấu tạo mạch vòng của các phân tử. Mật cấu tạo mạch vòng ở sorbit, mannit và ở các rượu 6 nguyên tử C dẫn đến thay đổi sức thấm rõ rệt.

Hình 2.1. Sơ đồ cơ chế chuyển vật chất qua màng tế bào chất:

- I. Vận chuyển thụ động theo cách khuếch tán;
- II. Vận chuyển chủ động theo cách khuếch tán;
- III. Vận chuyển thụ động theo cách hoá lập thể;
- IV. Vận chuyển chủ động theo cách hoá lập thể.



Mỗi một loại đường có đặc tính thấm rõ rệt và mỗi loại nấm men cũng có nhu cầu hoặc khả năng tiêu hoá riêng đối với các loại đường. Thí dụ: *Saccharomyces cerevisiac* sử

dùng được *tregaloza*, nhưng *S. fragilis* thì không. Sức thẩm thấu của tế bào nấm men với hỗn hợp đường theo kiểu cạnh tranh, thí dụ: giữa glucoza với galactoza, giữa galactoza với maltoza. Thật vậy, các chủng loài vi sinh vật khác nhau về đặc tính sinh lý được xác định không những có hệ enzym phức hợp khác nhau mà còn khác nhau ở đặc điểm thẩm thấu và cơ chế vận chuyển qua màng. Các yếu tố của môi trường ảnh hưởng lớn đến độ thẩm thấu của màng và quá trình vận chuyển các chất hoà tan qua màng. Hoạt tính permeaza thường bị ức chế bởi các ion kim loại nặng, phụ thuộc vào pH, vào nhiệt độ... Tính thẩm thấu của màng tế bào nấm men còn phụ thuộc nhiều vào thành phần môi trường nuôi cấy, đặc biệt là sự có mặt của biotin. Biotin là chất kích thích sinh trưởng, nhưng nhu cầu chỉ cần một lượng nhỏ, khi thiếu biotin thì lực thẩm lại được tăng lên.

2.2.2. Dinh dưỡng cacbon

Các hợp chất hữu cơ khác nhau như các loại đường và dẫn xuất, các rượu, axit hữu cơ, axit amin... có thể là nguồn dinh dưỡng cacbon của nấm men. Ở đây cũng cần phải lưu ý rằng, hầu hết các loài nấm men đều không có enzym polyhydrolaza trong đó có amylaza và xenlulaza. Vì vậy, nấm men không sử dụng trực tiếp được tinh bột cũng như xenluloza và hemixenluloza. Gần đây có một số công trình nghiên cứu cho biết một số chủng thuộc giống *Candida* có hoạt tính amylaza ngoại bào, song vẫn chưa đưa được các chủng này vào sản xuất công nghiệp cũng như trong thực tế.

Các nguồn C dinh dưỡng trước hết phải kể đến các loại đường. Đường glucoza thuộc loại đường 6 (hexoza) được tất cả các loài nấm men sử dụng. Glucoza được coi như nguồn C vạn năng đối với vi sinh vật. Nhiều loài nấm men, trong đó có giống *Saccharomyces* lên men rượu, không sử dụng được pentoza (pentoza thuộc loại đường 5). Các loài nấm men dùng sản xuất men gia súc thuộc giống *Candida*, *Torulopsis* có thể đồng hoá được pentoza. Vì vậy, các men này có thể nuôi cấy ở dịch thủy phân từ gỗ hoặc từ các nguồn giàu hemixenluloza.

Tỷ số các đường được nấm men sử dụng là đặc điểm riêng của từng loài. Qua đây ta có thể xây dựng phương pháp chẩn đoán các loài nấm men. Phần lớn các loài thuộc giống *Saccharomyces* khác nhau giữa chúng trước hết là quan hệ với các loại đường trong quá trình trao đổi chất hydratcacbon. Đối với các nguồn cacbon khác như các loại rượu và axit hữu cơ thì mối quan hệ này là giống nhau ở tất cả các loài của giống này. Các loài *Saccharomyces* lên men rượu vang sử dụng glucoza, fructoza, maltoza, saccaroza và galactoza, với rafinoza chỉ sử dụng được một phần, còn lactoza, melibioza, dextrin, pentoza và tinh bột lại hoàn toàn không được sử dụng. Với các men rượu khác thì có thể lên men được các dextrin cuối, nhưng không lên men được tinh bột.

Có thể coi tính sử dụng kế tiếp các nguồn cacbon là tính đa dưỡng của nấm men. Trong nuôi cấy theo giai đoạn glucoza và fructoza được sử dụng trước hết, kế tiếp là axit béo

phụ thuộc vào chủng loài và thành phần của axit này. Thí dụ: axit axetic ngăn trở việc sử dụng axit lactic - một sản phẩm sinh ra của quá trình đường phân chuyển từ axit pyruvic.

Axit axetic và glucoza được sử dụng đồng thời. Như là một qui luật, trong môi trường có một hỗn hợp các nguồn cacbon dinh dưỡng thì nguồn nào cung cấp cho nấm men sinh trưởng tốt sẽ được sử dụng trước.

Trong nuôi cấy liên tục nấm men có tốc độ sinh trưởng cùng với tốc độ pha loãng của môi trường thì những hợp chất có nhiều C trong phân tử sẽ được sử dụng sau cùng.

Những loài nấm men cùng một giống không phải bao giờ cũng đồng hoá vật chất như nhau. Có thể nói, các loài khác nhau (dù là một giống) đồng hoá các nguồn dinh dưỡng là khác nhau. Thí dụ: các loài *Candida natalensis* và *C. parapsilosis* đồng hoá rất tốt galactosa, nhưng *C. clauseni* lại không đồng hoá được đường này. *Saccharomyces cerevisiae* chỉ bắt đầu sử dụng được galactosa từ ngày thứ hai sau khi nuôi cấy.

Những disacarit (maltoza và saccaroza) trước khi được nấm men sử dụng phải qua thủy phân sơ bộ thành đường đơn nhờ enzym tương ứng của nấm men. Nấm men chuyển từ sống kỵ khí sang hiếu khí sẽ bị yếu khả năng sử dụng glucoza và maltoza, nhưng với saccaroza hoạt tính sử dụng lại được tăng gấp 2,5 lần. Nấm men sử dụng maltoza chỉ khi trong môi trường không có mặt glucoza và fructoza. Maltoza được lên men hoàn toàn trong pha sinh trưởng ổn định của nấm men.

Các axit hữu cơ chiếm một vị trí quan trọng trong trao đổi chất của nấm men. Chúng có thể kích thích hoặc ức chế sinh trưởng nấm men. Chúng cũng có thể là nguồn dinh dưỡng cacbon và năng lượng duy nhất.

Tất cả các sản phẩm trung gian trong trao đổi của vòng Krebs đều là nguồn cacbon dinh dưỡng cho nấm men. Song, tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật này trong môi trường chỉ có axit axetic, xitric, succinic, fumaric, malic hay oxalic đều thấp hơn so với ở môi trường glucoza.

Các axit béo được làm nguồn cacbon dinh dưỡng phụ thuộc vào từng chủng loài nấm men, vào nồng độ axit, vào chiều dài của mạch cacbon trong phân tử axit và mức độ điện ly. Những axit có mạch C từ 2 đến 4 làm nguồn cơ chất khá tốt ở nồng độ tương đối thấp. Muối kali của các axit với mạch cacbon từ 2 đến 5 kích thích sinh trưởng nấm men tăng $1,4 \div 3,3$ lần so với axit tương ứng.

Các axit béo có mạch cacbon tương đối dài (từ 6 đến 10) nấm men chỉ sử dụng ở nồng độ trong môi trường rất thấp ($0,02 \div 0,05\%$). Ở nồng độ cao sẽ ức chế nấm men phát triển. Axit béo có cacbon từ $C_{12} + C_{17}$ trong phân tử được sử dụng tùy thuộc vào chủng loài nấm men.

Các axit béo chưa bão hoà, đặc biệt là axit oleic, linoleic, palmitic, arachidinic là tác

nhân sinh trưởng quan trọng của nấm men trong điều kiện kỵ khí. Người ta xác định rằng, men rượu vang có thể sinh sản tự do trong điều kiện kỵ khí nếu như trong môi trường có mặt hai chất là axit béo (oleic, linoleic, linolevic) và sterin (ergosterin hoặc cholesterin).

Sử dụng hydrocacbon từ dầu mỏ và khí đốt làm nguồn cacbon nuôi cấy nấm men rất được quan tâm trong vài thập kỷ gần đây. Đặc biệt là thu sinh khối nấm men từ hydrocacbon làm nguồn protein - vitamin dùng bổ sung vào thức ăn chăn nuôi rất có nhiều triển vọng. Cũng còn có ý kiến e ngại các chế phẩm này còn dư lượng những chất nào đó còn chưa rõ hoặc rất ít không thể xác định được ảnh hưởng tới đời sống sức khoẻ của người và động vật. Trong số các hydrocacbua thì parafin có thể là nguồn cacbon dinh dưỡng dễ dàng đối với một số chủng của giống *Candida* cũng như giống *Torulopsis*. Các chủng này oxy hoá parafin và đồng hoá tăng sinh khối. Ngoài làm nguồn bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, sinh khối nấm men ở đây có thể là nguồn chế biến ra protein tinh khiết và sản xuất ra các chế phẩm nấm men còn sống có hoạt tính khử các thành phần trong hydrocacbua trong những sự cố ô nhiễm dầu mỏ trên biển.

Ngày nay người ta đang hoàn thiện thực nghiệm về vai trò của CO_2 trong trao đổi chất của nấm men. Thật vậy, giữa tất cả các nguồn cacbon hữu cơ thì khí CO_2 là chất hoạt động sinh học. Những dạng liên kết với CO_2 đều là các sản phẩm cần thiết cho nấm men. Người ta đã chứng minh khả năng nấm men tổng hợp protein từ axit pyruvic và axit cacbonic của hàng loạt axit hữu cơ sản ra (các axit của vòng Krebs như citric, malic, succinic... và cả axit lactic).

2.2.3. Dinh dưỡng nitơ

Nguồn nitơ cần thiết cho tổng hợp các cấu tử chứa nitơ của tế bào là các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ có sẵn trong môi trường.

Các hợp chất hữu cơ chứa N của tế bào là các axit amin, các nucleotit purin và pyrimidin, protein và một số vitamin. Nấm men có khả năng tổng hợp được tất cả các axit amin... thành phần protein trực tiếp từ các hợp chất vô cơ trong khi sử dụng nguồn cacbon là các chất hữu cơ - sản phẩm trung gian của quá trình dị hoá hydratcacbon trong hô hấp và lên men.

Đa số nấm men không đồng hoá được nitrat. Song, giống *Hasenula* và giống *Pichia* lại đồng hoá được chất này (giống *Hasenula* có khả năng vượt trội hơn). Một số loài thuộc giống *Brettanomyces* cũng đồng hoá được nitrat.

Nguồn nitơ vô cơ được nấm men sử dụng tốt là các muối amoni của axit vô cơ cũng như hữu cơ. Đó là amoni sulfat, phosphat rồi đến các muối axetat, lactat, malat và succinat.

Trong môi trường có muối amoni, đặc biệt là sulfat, thì nấm men sẽ sử dụng gốc amoni trước, gốc axit còn lại sẽ sử dụng sau hoặc ít sử dụng sẽ làm cho môi trường axit hoá, giảm pH.

Trong môi trường lỏng amoniac (NH_3) ở dạng NH_4^+ gần với tiền chất của nitơ hữu cơ và là nguồn nitơ rất dễ cho nấm men sử dụng, chỉ xếp sau các axit amin. Nấm men còn sử dụng được urê và pepton. Trong môi trường lỏng urê sẽ bị ureaza của nấm men phân ly thành NH_4^+ và CO_2 . Để thu sinh khối *Saccharomyes* được tốt trong môi trường nên có mặt cả nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ.

Các nguồn nitơ hữu cơ thường là hỗn hợp các axit amin, các peptit, các nucleotit... Trong thực tế người ta hay dùng cao ngô, cao nấm men, dịch thủy phân protein tự nhiên (đậu tương, khô lạc...) làm nguồn nitơ hữu cơ.

Nấm men tiêu hoá rất tốt các axit amin, còn pepton kém hơn và hoàn toàn không sử dụng được protein. Song, có trường hợp trong môi trường có hợp chất nitơ dễ đồng hoá nấm men có khả năng phân hủy protein do tiết ra các enzym proteolytic (*). Các muối amon được nấm men sử dụng tốt hơn các axit amin. Trong quá trình nuôi cấy nấm men các axit amin vừa là nguồn nitơ vừa là nguồn cacbon dinh dưỡng. Chúng đồng thời tham gia vào phản ứng xetoaxit để tạo thành các axit amin mới như là chất cho nhóm amin (NH_2 -). Trường hợp xảy ra đồng hoá trực tiếp các axit amin có trong môi trường dinh dưỡng có thể làm giảm tiêu hao nguồn đường và tăng hiệu suất lên men.

Cần phải lưu ý rằng, nấm men chỉ sử dụng được axit amin ở dạng tự nhiên (L-axit amin). Với các hợp chất chứa N hữu cơ nấm men đồng hoá rất tốt các L-axit amin, còn các hợp chất amit - kém hơn. Muốn tiêu hoá được các hợp chất này (axit amin và amit) nấm men cần có các vitamin như biotin, axit pantotenic, tiamin, pyridoxin. Những hợp chất chứa N khác như protein, betain, cholin, purin và amin ở dạng etylamin, propin- và butylamin nấm men không đồng hoá. Các peptit nằm trung gian giữa protein và axit amin nấm men đồng hoá cũng tương đối khó khăn. Trong môi trường có mặt các chất này với các dạng nitơ khác sẽ làm tăng khả năng sử dụng các axit amin của nấm men.

Người ta chia các axit amin thành hai nhóm:

- Nhóm dễ tiêu hoá là izoloxin, triptophan, arginin, valin, histidin, axit aspartic.
- Nhóm tiêu hoá kém hơn là treonin, phenylalanin, tiozin, metionin, serin, glyxin, axit glutamic, lợxin; và hoàn toàn không sử dụng prolin.

Tạo thành 10 tỷ tế bào nấm men chi phí nitơ trong điều kiện kỵ khí là $66 \div 67$ mg, trong điều kiện hiếu khí là $37 \div 53$ mg. Hàm lượng nitơ trong nấm men phụ thuộc vào thành phần môi trường, điều kiện hiếu khí và số lượng các chất dinh dưỡng bổ sung vào môi trường đối với từng chủng loài nấm men.

Nitơ của tế bào nấm men thường vào khoảng $7 \div 10\%$, đôi khi lên tới 12% vật chất khô.

(*) Nói chung, nhiều trường hợp nấm men không tiết enzym này ra ngoài tế bào, vì vậy nấm men không thể đồng hoá trực tiếp được protein tự nhiên.

2.2.4. Dinh dưỡng các nguyên tố vô cơ

Trong phần trước đã đề cập đến sự có mặt và vai trò các nguyên tố vi lượng trong tế bào nấm men. Ở phần này sẽ bổ sung thêm về nhu cầu và sự cần thiết của các nguyên tố này trong môi trường dinh dưỡng.

Các nguyên tố vô cơ trong nuôi cấy vi sinh vật nói chung, trong đó có nấm men, phospho được quan tâm trước hết, sau đó là kali và magiê, lưu huỳnh...

Như chúng ta đã biết phospho tham gia vào các thành phần quan trọng của tế bào, như các nucleoprotein, axit nucleic, polyphosphat, phospholipid... Các hợp chất phospho đóng vai trò xác định trong các biến đổi hoá sinh khác nhau, đặc biệt là trong trao đổi chất hydrocarbon và trong vận chuyển năng lượng. Nấm men sử dụng rất tốt nguồn phospho vô cơ là orthophosphat. Hợp chất này sẽ chuyển thành polyphosphat và sau khi được hoạt hoá sẽ dùng vào các quá trình tổng hợp.

Khi không đủ P trong môi trường sự trao đổi chất ở nấm men bị thay đổi đáng kể liên quan tới sự phá vỡ nhu cầu và sử dụng hydratecarbon và nitơ. Nhu cầu sinh lý về phospho đối với 10 tỷ tế bào nấm men vào khoảng $10 \div 13$ mg P.

Trong phòng thí nghiệm vi sinh người ta thường dùng muối KH_2PO_4 và K_2HPO_4 làm nguồn P và K, còn trong sản xuất thường dùng dịch chiết từ supephosphat làm nguồn P. Trong điều kiện kỵ khí nấm men tiêu hoá P chủ yếu 3 giai đoạn đầu, có thể dùng tới $80 \div 90\%$ tổng nhu cầu nguyên tố này. Các tế bào trẻ khoẻ, đang sung sức sinh sản giàu P hơn tế bào già ngừng sinh sản. Thí dụ: sau 6 giờ lên men trong tế bào có 2,15% P so với chất khô, giai đoạn cuối chỉ có 1%.

Trong dịch đường hoá từ tinh bột thường đủ P đáp ứng cho nhu cầu của nấm men, ri đường củ cải cũng như ri đường mía thường thiếu P, vì vậy cần phải bổ sung vào môi trường axit orthophosphoric hoặc supephosphat.

Lưu huỳnh là thành phần của một số axit amin trong phân tử protein và là nhóm phụ ($-\text{SH}$) của một số enzym CoA. Bởi vậy, khi không có mặt lưu huỳnh trong môi trường sự trao đổi chất của tế bào bị vi phạm và có thể không tổng hợp được protein. Những chất chứa lưu huỳnh như axit amin (sixin, sixtein, metionin), vitamin (tiamin, biotin) và một số hợp chất khác đóng vai trò quan trọng trong hoạt động sống của nấm men. Trong môi trường nuôi cấy nấm men thường có $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ làm nguồn amon và nguồn lưu huỳnh. Ở điều kiện kỵ khí lưu huỳnh nguyên tố (S) bị khử thành H_2S , còn ở điều kiện hiếu khí - hoà tan trong các hợp chất tương tự chất béo và tích tụ ở trong đó.

Trong môi trường với hàm lượng lưu huỳnh nhỏ làm tăng sự nảy chồi của nấm men. Nhưng ở nồng độ 1 mg/l S đã kìm hãm quá trình này. Do vậy, khi sử dụng các nguồn lưu huỳnh dinh dưỡng cho vi sinh vật nói chung, trong đó có nấm men, cần phải thận trọng, đặc biệt là lên men rượu vang thứ cấp.

Khi có mặt ion kim loại (sắt, đồng) lưu huỳnh trong tế bào nấm men để tạo thành kim loại - sulfua, làm cho cặn men có màu đỏ nâu hoặc đen xám. Trầm tích S trong tế bào nấm men dẫn đến các dạng thoái triển (regression).

Các ion kali, canxi, magiê cũng cần có trong môi trường nuôi cấy hoặc lên men. Thông thường ion kali được bổ sung cùng với các muối phosphat hoặc sulfat, còn ion Ca^{++} và Mg^{++} thường có đủ trong nước sinh hoạt. Song, có trường hợp nước giàu hai ion sau thường gọi là nước cứng. Cần phải loại bớt hai ion này và quá trình này gọi là làm mềm nước. Nếu để nguyên nước cứng nuôi cấy vi sinh vật sẽ có những ảnh hưởng và hiệu quả không tốt đến cả quá trình, đặc biệt là trong sản xuất bia nước cứng sẽ làm cho dịch bia khó bão hoà CO_2 và giữ khí này không được lâu, làm cho vị bia kém thanh thoát.

Các nguyên tố vi lượng cũng rất cần để quá trình sinh lý trong tế bào nấm men được xảy ra bình thường. Các nguyên tố vi lượng là mangan, đồng, sắt, kẽm, molipden, bo, liti, rubidi, niken, coban... các nguyên tố này chỉ cần một lượng rất nhỏ (vi lượng). Trong nước sinh hoạt thường có mặt các ion này. Khi pha chế môi trường ta có thể không cần bổ sung các muối của chúng, nhưng có trường hợp đặc biệt nào đó sẽ bổ sung nguyên tố cần thiết ở dạng muối của chất nào đó vào môi trường.

2.2.5. Dinh dưỡng các chất sinh trưởng

Những chất kích thích sinh trưởng là các vitamin, các bazơ purin và pyrimidin. Những nhân tố sinh trưởng cơ bản đối với nấm men không có sắc tố là 6 vitamin nhóm B: inozit (vitamin B_8), biotin (vitamin B_7 hay H), axit pantotenic (B_3), tiamin (B_1), pyridoxin (B_6), axit nicotinic (B_5 hay PP). Đối với nấm men có sắc tố đỏ cần các chất sinh trưởng là tiamin, ngoài ra còn có axit paraaminobenzoic.

Hàm lượng tối thiểu của vitamin cần cho sự phát triển bình thường của nấm men trong môi trường tổng hợp là như sau ($\mu\text{g/ml}$):

Inozit - 5; biotin - 0,0001; axit pantotenic - 0,25; tiamin - 1,0; pyridoxin - 0,25; axit nicotinic - 0,5.

Nhiều chủng nấm men không tự tổng hợp được một hoặc hai hoặc một số vitamin trên. Chính vì vậy người ta đã xác định được một chủng nào đó không thể tổng hợp được một vitamin cụ thể và khi bổ sung vitamin này nấm men sẽ phát triển bình thường. Từ kết quả này người ta đã xây dựng được phương pháp xác định vitamin đó qua sự sinh trưởng của nấm men làm test thí nghiệm.

Trong công nghiệp thường dùng các nguồn vitamin là cao ngô, cao nấm men (có thể dùng dịch men tự phân hay nước chiết nấm men), nước chiết cám (cám gạo hoặc cám mì), dịch thủy phân đậu tương bằng enzym và đặc biệt là rỉ đường (cung cấp biotin). Trong các thí nghiệm nuôi cấy ở phòng thí nghiệm vi sinh vật hoặc ở qui mô nhỏ có thể dùng các dịch

chiết từ giá đậu, từ rau cải, bắp cải, cà chua, cà rốt, khoai tây... làm nguồn vitamin bổ sung vào môi trường.

Axit amin ngoài vai trò là nguồn nitơ hữu cơ và cả nguồn cacbon hữu cơ được vi sinh vật sử dụng trực tiếp làm vật liệu xây dựng tế bào còn là các chất kích thích sinh trưởng cho một số chủng nấm men. Nhu cầu riêng biệt này là rất nhỏ. Một vài axit amin được bổ sung vào môi trường tổng hợp cùng với các vitamin cần thiết sẽ kích thích sinh sản cho một số chủng thấy kết quả rõ ràng.

Với nguồn cao ngô được sử dụng thường đáp ứng được cả nhu cầu về vitamin cùng với axit amin.

2.3. SINH TRƯỞNG CỦA NẤM MEN

Thuật ngữ sinh trưởng đối với vi sinh vật bao hàm 2 ý nghĩa: sinh sản và phát triển. Như vậy trong phần này chúng ta sẽ đề cập đến sinh sản của từng tế bào (cá thể) và phát triển của cả quần thể các tế bào nấm men trong trường hợp nuôi cấy thuần chủng. Sự thay đổi hình thái sinh lý của tế bào dẫn đến tạo thành một tế bào hoặc nhiều tế bào mới là sinh sản và tăng số lượng tế bào cùng với khối lượng quần thể (tăng sinh khối) là sự phát triển.

Đa số các cơ thể đơn bào sinh sản là hậu quả của sự tăng số lượng cá thể trong quần thể nói chung. Quá trình sinh sản của vi sinh vật có “chế ước qua lại” với môi trường dinh dưỡng. Môi trường có những tác động vật lý và hoá học đến hệ enzym của vi sinh vật. Trong giai đoạn đầu nấm men thường chưa sinh sản tế bào sẽ tiết vào môi trường các enzym khử để tác động đến mối disulfit ($-S-S-$) của hợp chất protit ở vỏ tế bào làm thay đổi sức thẩm thấu nhằm đưa chất dinh dưỡng từ môi trường vào trong tế bào, thúc đẩy các enzym cảm ứng và enzym cấu trúc.

2.3.1. Sinh sản

Nấm men có hai hình thức sinh sản: hữu tính (bằng bào tử) và vô tính (bằng nảy chồi hoặc phân cắt tế bào). Tùy thuộc vào điều kiện nuôi cấy tế bào nấm men sẽ sinh sản theo cách sinh sản vô tính hay cách sinh sản hữu tính.

2.3.1.1. Sinh sản vô tính

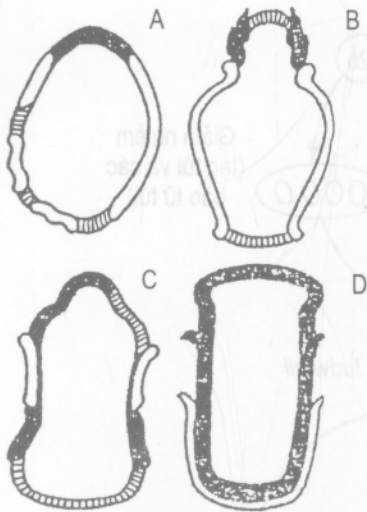
Nghiên cứu tế bào nấm men dưới kính hiển vi điện tử ta thấy tế bào nấm men có 4 típ sinh sản vô tính (xem hình 2.2).

- Típ thứ nhất: ở nấm men nảy chồi, thí dụ giống *Saccharomyces* thuộc họ *Saccharomycetaceae*, các tế bào mẹ không chuyển trực tiếp các vật liệu vỏ sang tế bào con, mà ở chỗ các mấu chồi sẽ tổng hợp các vật liệu vỏ tế bào và tích tụ ở đây để chuyển sang cho tế bào con. Chỗ mấu chồi là các sẹo thường ở đầu cong nhất của tế bào (ở đó có thể là tròn hoặc xoắn).

- Típ thứ hai: ở họ *Saccharomycodaceae* giống *Saccharomyces* và *Hanseniaspora*. Đặc điểm của các giống này là chồi mọc ở vùng cực của tế bào tạo thành nhiều sẹo. Chồi được tạo thành từ sẹo mọc lên, phần còn lại của vỏ cạnh chồi được kéo căng ra.

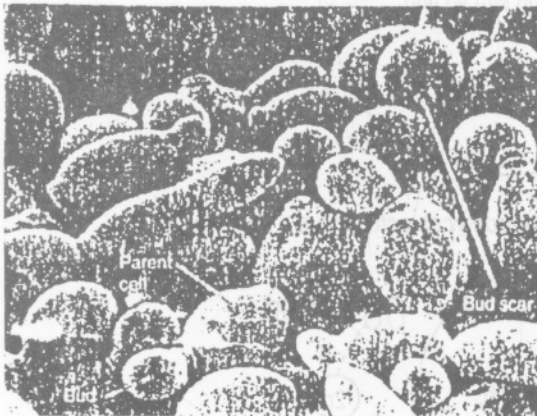
- Típ thứ ba: tế bào phân cắt thuộc họ *Schizosaccharomycetaceae*, giống *Schizosaccharomyces*, có đặc tính sinh sản lưỡng cực ở vỏ tế bào. Vật liệu mới ở vỏ tế bào chuyển sang rìa từ giữa đến đầu tế bào có dạng vòng tròn ngày càng lớn rồi tế bào bị phân cắt.

- Típ thứ tư: xảy ra ở tế bào nấm men hình trụ *Endomyces magnusii*. Sự thay đổi cấu trúc trong phân cắt tế bào là có thể xảy ra ở trên toàn vỏ. Nếu phân cắt thành nhiều tế bào thì vỏ sẽ tạo thành một số bản mỏng song song nằm ở 2 bên thành vỏ với các vết sẹo - vị trí chia cắt tế bào.

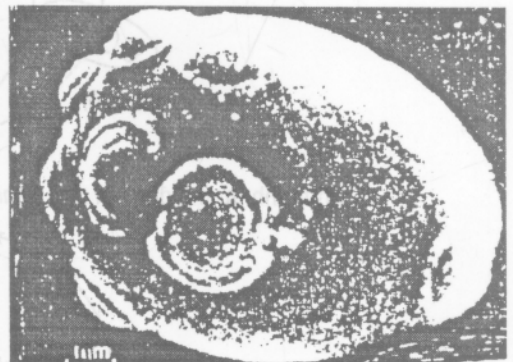


Hình 2.2. Cấu trúc vỏ tế bào nấm men với các típ sinh sản vô tính:

- A. *Sacchromyces cerevisiae*;
- B. *Sacchromyces ludwigii*;
- C. *Schizosaccharomyces pombe*;
- D. *Endomyces magnusii*.



Hình 2.3a. Hình ảnh nấm men đâm chồi nhìn dưới kính hiển vi điện tử



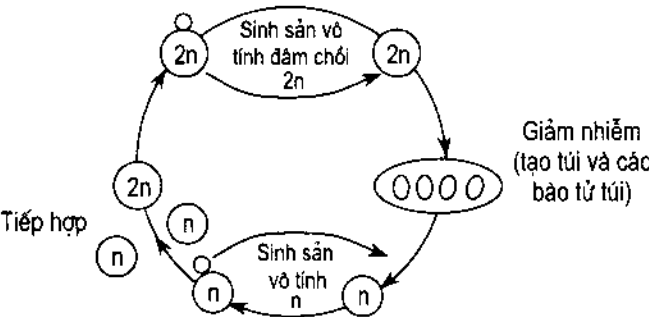
Hình 2.3b. Ảnh tế bào nảy chồi

Trong quá trình sinh sản vô tính nhân và tế bào chất từ tế bào mẹ chuyển sang tế bào con. Trước khi phân cắt nhiễm sắc thể trong nhân cũng chia làm 2 phần bằng nhau cho tế bào mẹ và tế bào con. Phân tử ADN điều khiển sự biến đổi và tái tạo nhiễm sắc thể. Sự phân chia này được gọi là mitosis (phân bào có tơ, gián phân hay phân bào nguyên nhiễm). Trong các thể hệ tế bào được bảo tồn nghiêm ngặt số lượng ổn định nhiễm sắc thể.

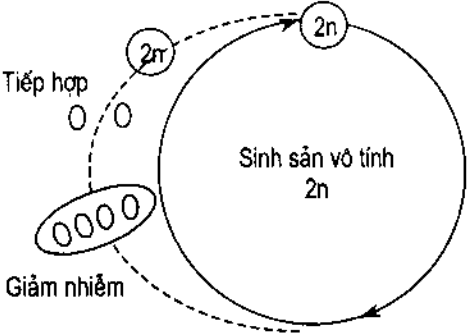
Nấm men sinh sản vô tính bằng nảy chồi hoặc phân đôi tế bào, nhưng giữa quá trình này có thể sinh sản hữu tính xen kẽ hoặc ngược lại nấm men đang sinh sản hữu tính có thể trở lại sinh sản vô tính. Nấm men có 3 dạng chu trình sinh học của sinh sản vô tính (hình 2.4a, b, c).

Nấm men có 3 dạng chu trình sinh học:

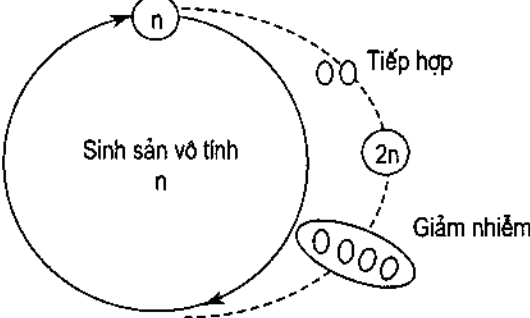
1. Chu trình đơn bội - lưỡng bội như loài *Sac. cerevisiae*



2. Chu trình ưu thế lưỡng bội như *Sacchromycoides ludwigii*



3. Chu trình ưu thế đơn bội như *Schizosaccharomyces octosporus*



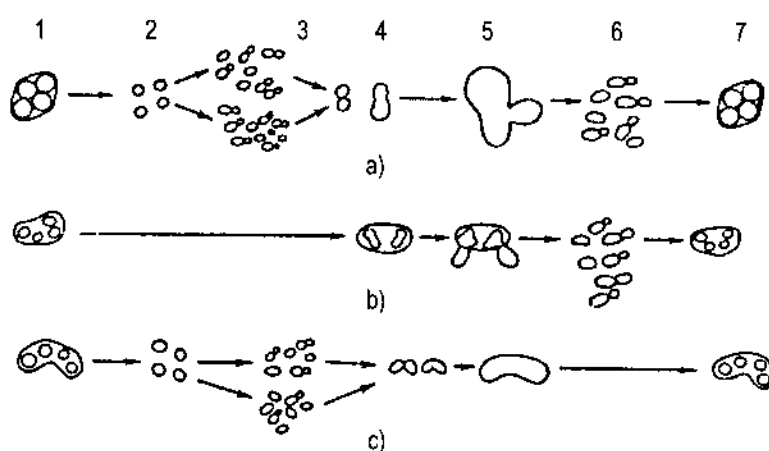
Hình 2.4. Sơ đồ 3 dạng chu trình sinh học ở nấm men

2.3.1.2. Sinh sản hữu tính

Sinh sản của nấm men liên quan tới sự tạo thành bào tử nang (túi) của tế bào sinh dưỡng (vegetation) kèm theo quá trình giảm phân của sự phân cắt của nhân.

Trong quá trình nuôi cấy nấm men chuyển đột ngột từ môi trường giàu sang môi trường nghèo dinh dưỡng, trong khi đó vẫn giữ nguyên độ ẩm, tích tụ các hợp chất trung gian, đủ oxy của không khí thì tế bào sẽ sinh bào tử nang nằm trong các túi được gọi là bào tử nang. Bào tử nang bền với tác nhân bên ngoài như nhiệt độ cao, khô hạn, nhưng kém bền nhiệt hơn so với bào tử vi khuẩn. Chúng thường chết ở nhiệt độ 60°C, còn bào tử vi khuẩn chết ở nhiệt độ 120°C.

Quá trình sinh sản hữu tính ở nấm men thường qua một số bước (hình 2.5):



Hình 2.5. Sơ đồ chu kỳ sống (vòng đời) của một số giống nấm men:

a) *Saccharomyces*; b) *Saccharomycoides*; c) *Zygosaccharomyces*

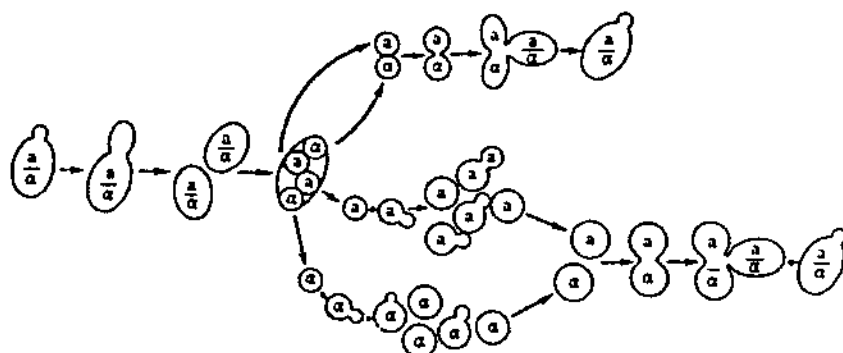
1- bào tử nang; 2- nảy mầm; 3- pha đơn bội; 4- tiếp hợp; 5- hợp tử; 6- pha nhị bội; 7- bào tử nang

Bào tử nang được tạo thành do kết quả giao hợp hai tế bào có tính đực cái và phân chia nhân đã thụ thành hợp tử. Trong một nang có từ 1 + 4, đôi khi tới 8 bào tử. Một chu kỳ từ bào tử nang ban đầu tới bào tử nang mới qua 4, 5, 6 bước tùy theo giống nấm men (hình 2.5). Khi gặp điều kiện thuận lợi cho sinh sản vô tính ở môi trường mới các bào tử nảy mầm thành tế bào mới và nảy chồi tiếp theo trở về sinh sản vô tính.

Trong vòng đời của nấm men có sự luân phiên sinh sản vô tính và hữu tính với các giai đoạn đơn bội, nhị bội khác nhau.

Giống *Saccharomyces* với các pha đơn bội, nhị bội thay nhau được chia làm chia nhóm: dị tản (heterothallic) và đồng tản (homothallic). Những chủng dị tản có pha nhị bội và đơn bội bền vững. Tế bào nhị bội có thể sinh sản vô tính lâu dài không hạn chế, khi gặp điều kiện không thuận lợi sẽ chuyển sang sinh bào tử nang chứa các bào tử đơn bội. Mỗi bào

tử thuộc về một trong hai típ tiếp hợp (α và a). Sự tiếp hợp được thực hiện do gặp gỡ 2 bào tử hoặc 2 tế bào của hai chủng đơn bội khác nhau rồi tạo thành hợp tử và trở lại pha nhị bội.



Hình 2.6. Chu kỳ sống (vòng đời) của nấm men dị tản:

Saccharomyces cerevisiae α và a - các típ tiếp hợp

Sự khác biệt giữa tế bào α và a làm cho chúng có khả năng hình thành hợp chất hormon giới tính. Người ta cho rằng, hormon giới tính làm cho tăng hoạt tính enzym phân huỷ thành tế bào tạo điều kiện cho sự tiếp hợp được thuận lợi.

Các chủng nấm men đồng tản khác với dị tản là chúng chỉ có pha nhị bội bền vững. Bào tử được tách khỏi nang sẽ tạo thành giống nhị bội. Trong các thế hệ của bào tử riêng biệt xảy ra sự giao phối các tế bào đơn bội - sự tự nhị bội hoá. Ta thấy hiện tượng này xảy ra giữa các bào tử của hai tế bào chị em hoặc tế bào mẹ với tế bào con. Kiểu giao hợp ở nấm men đồng tản đã giúp cho các nhà nghiên cứu có một tập hợp các nòi *Saccharomyces vini* dùng trong nghề làm rượu vang. Do vậy, các nòi đồng tản dùng trong mục đích này có nhiều ưu việt.

Song, ở một vài giống nấm men như *Zygosaccharomyces* và *Schyzosaccharomyces* có thời gian dài sinh sản vô tính ở dạng đơn bội. Trước khi tạo thành bào tử các tế bào đơn bội nhập vào với nhau và tạo thành hợp tử lưỡng bội. Các hợp tử này được chia ra theo cách giảm phân cho 4 hoặc 8 bào tử đơn bội. Các bào tử này nảy mầm và lại sinh sản vô tính ở dạng đơn bội.

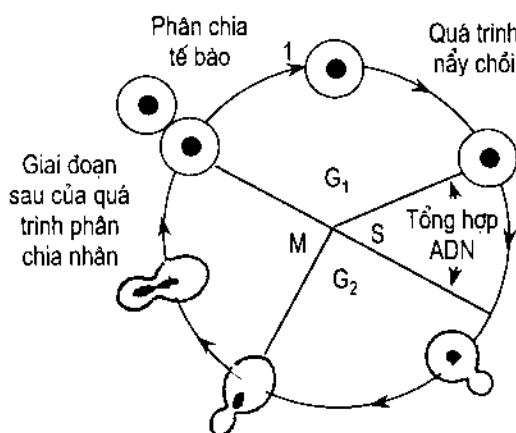
Khi tế bào nấm men tạo thành bào tử thì hoạt động sống và trao đổi chất xảy ra trong tế bào chậm. Trạng thái này không thích hợp cho sinh sản vô tính. Bởi vậy, sự tạo thành bào tử là một cách sinh sản nhằm bảo tồn loài xem như giai đoạn phát triển cá biệt của nấm men.

2.3.2. Đặc tính di truyền của nấm men

Hoạt động sống sinh lý của nấm men, đặc biệt là sinh sản, chịu ảnh hưởng nhiều tác động của các yếu tố ngoại cảnh của môi trường nuôi cấy. Song, yếu tố quyết định và quan

trọng nhất là các đặc tính di truyền của tế bào qua sinh sản truyền cho các thế hệ con cháu của tế bào. Đặc tính này được thể hiện rõ nét đối với từng chủng loài riêng biệt.

Nghiên cứu đặc tính di truyền của nấm men được tiến hành tại Đan Mạch năm 1935 trong phòng thí nghiệm của nhà bác học Carlsberg. Ông đã xác định được chu kỳ sống đơn bội - đa bội của nấm men. Các loài thuộc giống *Saccharomyces* có thể biến đổi giữa 2 dạng đơn bội (có bộ đơn thể nhiễm sắc trong nhân) và lưỡng bội (nhị bội - hai thể nhiễm sắc trong nhân). Tế bào nấm men có 2 giới tính là α và a . Các tế bào đơn bội sinh ra α và a được hình thành qua nguyên phân bằng cách nảy chồi. Chúng kết hợp với nhau thành bào tử lưỡng bội a/α . Khi gặp điều kiện dinh dưỡng kém tế bào giảm phân tạo nang chứa 4 bào tử trong đó hai bào tử mang giới tính α và hai mang giới tính a (hình 2.6). Sau đó tế bào sinh sản theo phương pháp vô tính hoặc hữu tính, cũng có thể xen kẽ như chúng ta đã đề cập tới ở phần trên.



Hình 2.7. Chu kỳ sống của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Quá trình sinh sản của nấm men liên quan chặt chẽ tới sự phát triển của chồi. Các chồi được tách khỏi tế bào mẹ khi có kích thước bằng tế bào trưởng thành và sau đó bước vào thời kỳ sinh sản. Thời gian thế hệ là chu kỳ sinh sản được tính là khoảng thời gian giữa hai lần phân chia liên tiếp của một tế bào.

Đối với các tế bào phát triển trong điều kiện không bị ức chế thì số lượng sẽ tăng gấp đôi trong một chu kỳ. Chu kỳ sinh sản của tế bào được chia làm 4 giai đoạn: G_1 , S, G_2 và M (hình 2.7)

S là giai đoạn tổng hợp ADN

M là giai đoạn nguyên phân

G_1 và G_2 là những giai đoạn phân chia nguyên phân và tổng hợp ADN.

Quá trình nảy chồi xảy ra đồng thời với sự bắt đầu của giai đoạn tổng hợp ADN. Quá trình này có liên quan với hiện tượng mềm hoá vỏ tế bào dưới tác dụng của các enzym lytic. Các enzym này tác dụng lên polysaccarit của thành vỏ tế bào. Từ đó chồi được hình thành từ

các vật liệu mới của tế bào và lớn dần lên. Khi chồi đạt kích thước đủ lớn sẽ hình thành vách ngăn phức tạp có thành phần vỏ tế bào là chitin, mannan và glucan. Sau đó chồi được tách khỏi tế bào mẹ, chồi tách ra để lại cho tế bào mẹ một vết sẹo chồi và ở tế bào con một vết sẹo - sẹo sinh.

Sự phát triển và tạo thành vỏ tế bào con được xảy ra đồng thời với quá trình hình thành chồi. Kết quả của sự lớn dần về kích thước của cấu trúc không gian bền vững của chồi thành tế bào hoàn chỉnh. Thành phần và cấu trúc cũng như quá trình sinh tổng hợp các chất hợp phần của vỏ tế bào rất phức tạp và còn nhiều điều chúng ta còn chưa biết rõ.

Trong giai đoạn S và G của chu kỳ tế bào, nhân được chuyển dịch về phía khu vực chồi đang hình thành. Như vậy, ở thời điểm đầu của quá trình phân chia, nhân nằm cạnh phần cổ chồi và một phần nhân được chuyển sang chồi, còn lại vẫn nằm trong tế bào mẹ.

Tế bào men *Saccharomyces* tuy đơn giản nhưng mang đầy đủ tính chất của một cơ thể nhân chuẩn. Lauer đã xác định được enzym (bộ gen) của thể đơn bội *Saccharomyces* gồm $1,4 \cdot 10^7$ cặp bazơ. Cùng với Whitney và Hall, ông đã nghiên cứu thành phần ADN của bộ gen này và cho thấy khoảng 95% các chuỗi là thành phần nhân bản đơn (single copy), trong đó A + T chiếm 60% trong số các bazơ. Lauer đã xác định được 16 cặp nhiễm sắc của *Saccharomyces cerevisiae*. Phân tử ADN có khoảng $1,5 \cdot 10^5 \div 2,5 \cdot 10^6$ cặp bazơ. Các thể nhiễm sắc đều chứa một phân tử sợi xoắn kép ADN. Đa số các gen quy định tính trạng khác nhau của tế bào đều nằm trong thể nhiễm sắc. Tuy vậy cũng có một số lượng lớn ADN (5 + 35%) nằm ở tế bào chất và các bào quan. ADN trong ti thể là những phân tử mạch vòng có kích thước khoảng 25 μm , số lượng bản sao trong tế bào khoảng 20 ÷ 70. Chúng mang các gen tạo ra và điều khiển các enzym hô hấp và tạo ra thành phần của hệ tổng hợp protein của chính ti thể.

Nghiên cứu sâu các đặc tính di truyền giúp ta nắm bắt được các quá trình sinh tổng hợp các vật chất tế bào, cấu trúc xây dựng tế bào, các quá trình trao đổi chất và đặc biệt giúp chúng ta có thể nghiên cứu chọn giống, lai tạo giống vi sinh vật nói chung và nấm men nói riêng có những đặc tính quý sinh ra các sản phẩm rất cần thiết cho con người. Các phương pháp đột biến gen, lai ghép tế bào trần, lai hiếm và tái tổ hợp ADN đang ngày càng hấp dẫn và chúng đang cho kết quả chọn giống vi sinh vật công nghiệp đầy hứa hẹn.

2.3.3. Sinh trưởng nấm men

Khi cấy nấm men hay vi sinh vật nói chung vào môi trường dinh dưỡng, chúng sẽ sinh sản cho đến cơ chất dinh dưỡng cần thiết ở trong môi trường giảm tới mức thấp nhất. Khi đó sinh trưởng phát triển của chúng chậm dần và ngừng hẳn, cũng có thể tế bào còn vài lần phân chia tiếp, nhưng sự tăng sinh khối không đáng kể. Nếu trong cả quá trình nuôi cấy này ta không bổ sung chất dinh dưỡng và loại bỏ các sản phẩm trao đổi chất thì ta có quần thể tế bào trong không gian sống có giới hạn. Hệ sinh trưởng như vậy được coi là “hệ kín”, có

nghĩa là trong môi trường không được đổi mới. Hệ kín thường được thực hiện nghiên cứu sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường lỏng.

Khi tiếp giống vào môi trường lỏng với nồng độ tế bào giống ban đầu là X_0 , đồ thị biểu diễn sự sinh trưởng của vi sinh vật sẽ thuộc vào logarit số tế bào với thời gian. Đồ thị này được chia làm 6 pha (hay 6 giai đoạn):

a- Pha tiềm phát: ở pha này vi sinh vật chưa sinh sản còn làm quen với môi trường. Số lượng tế bào X không tăng và được gọi là $X_0 \rightarrow \frac{dX}{dt} = x$.

μ_x là vận tốc sinh trưởng

b- Pha tăng dần: bắt đầu sinh sản và tăng dần (μ_x và số lượng tế bào X tăng dần).

c- Pha chỉ số: ở pha này X tăng theo thời gian theo cấp số và $\ln X$ tỷ lệ thuận với thời gian t , μ_x không đổi và là cực đại:

$$\mu_x = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

d- Pha giảm dần: trong pha này, sự tăng số lượng vi sinh vật trong quần thể X chậm dần $\rightarrow \mu_x$ giảm dần.

e- Pha ổn định: pha này được coi như pha cân bằng động, số lượng vi sinh vật đạt đến cực đại và không thay đổi theo thời gian, $\mu_x = 0 \rightarrow \frac{dX}{dt} = x$.

f- Pha suy vong: ở pha này số lượng vi sinh vật X giảm, do già bị chết và tự phân.

Đồ thị sinh trưởng của vi sinh vật trong "hệ kín" được biểu diễn ở hình 2.8.

Hình 2.8. Đồ thị sinh trưởng của vi sinh vật trong "hệ kín"

A. $x = f(t)$

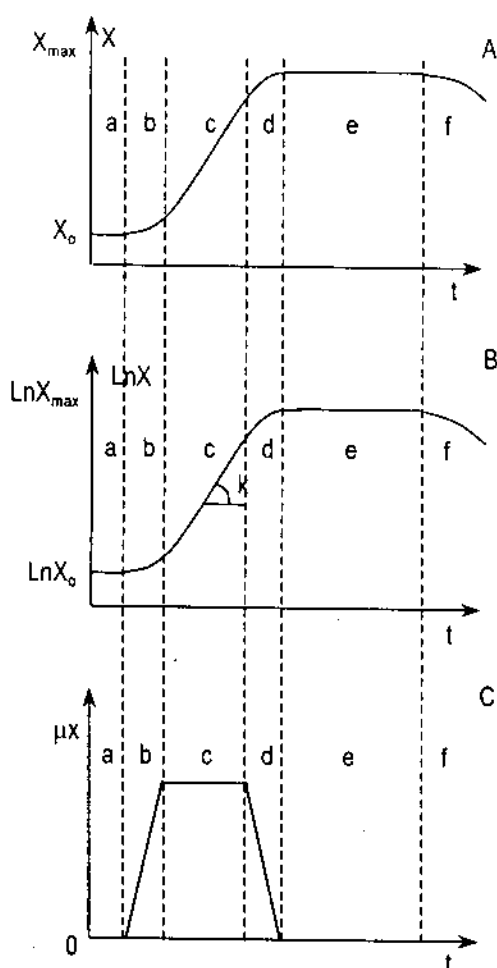
B. $\ln x = f(t)$ khi lấy logarit cả hai vế, tương ứng bán logarit.

C. $\mu_x = f(t)$

μ_x : hằng số tốc độ sinh trưởng riêng của vi sinh vật;

x : sinh khối;

t : thời gian.



Quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật nói chung, trong đó có nấm men, được nhiều tác giả chia làm 4 pha: pha tiềm phát, pha phát triển chỉ số, pha ổn định và pha suy thoái (hình 2.8).

- Lag-pha (pha tiềm phát hay pha làm quen): Đây là giai đoạn nấm men mới được cấy vào môi trường còn chưa sinh sản. Vận tốc sinh trưởng coi như bằng không. Đây là pha tiềm phát, nấm men còn thích nghi với môi trường mới, trong đó một số tế bào bị ức chế, thậm chí có thể bị chết. Số lượng tế bào nấm men ở giai đoạn này là không tăng hoặc tăng không đáng kể, nhưng sự trao đổi chất của chúng lại xảy ra mạnh mẽ. Tế bào có kích thước tăng lên đáng kể, hàm lượng các chất protein, axit nucleic đều tăng lên, các enzym thích ứng đều được tổng hợp mạnh mẽ. Trong môi trường càng đầy đủ dinh dưỡng giống nấm men cấy vào càng trẻ khỏe và lag-pha càng ngắn. Người ta có thể cấy một lượng giống lớn với các tế bào trẻ khỏe làm cho lag-pha càng rút ngắn và giống có thể phát triển ngay sau khi tiếp giống.

- Pha logarit (pha phát triển chỉ số hay pha phát triển theo cấp số nhân)

Trong pha này hầu hết thời gian nấm men hay giống vi sinh vật nào khác đã qua pha tiềm phát sẽ phát triển số lượng tế bào theo cấp số nhân với tốc độ sinh trưởng là cực đại:

$$2^0 (1) \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 (4) \rightarrow 2^3 (8) \dots \rightarrow 2^n$$

Nếu trong một thể tích môi trường lúc đầu có X_0 tế bào thì sau lần phân chia số tế bào sẽ là:

$$X = X_0 \cdot 2^n \quad (1)$$

logarit phương trình sẽ có:

$$\lg = \lg X_0 + n \lg 2 \quad (2)$$

từ đó tính được số lần phân chia (thế hệ) như sau:

$$n = \frac{\lg X - \lg X_0}{\lg 2} \quad (3)$$

Số lần chia trong một giờ hay là hằng số tốc độ phân chia là:

$$V = \frac{n}{t} = \frac{\lg X - \lg X_0}{\lg 2(t - t_0)} \quad (4)$$

Thời gian cần cho một chu kỳ phân chia của một lứa (hay còn gọi là thời gian thế hệ):

$$g = \frac{1}{n} = \frac{1}{V} \quad (5)$$

Thí dụ: sau 10 giờ nuôi cấy, số tế bào trong môi trường từ 10^2 đến 10^9 thì hằng số tốc độ phân chia là:

$$V = \frac{\lg 10^9 - \lg 10^2}{0,310 \cdot 10} = \frac{6}{3} = 2 \quad (6)$$

Thời gian thế hệ (thời gian một lứa) là: $\frac{1}{2}$ giờ.

t: thời điểm xác định;

t_0 : thời điểm ban đầu;

X: nồng độ nấm men ở thời điểm xác định;

X_0 : nồng độ nấm men ở thời điểm ban đầu;

V: số lần phân chia trong 1 giờ;

g: thời gian thế hệ, cần cho 1 lứa (chu kỳ phân chia).

Nếu biết hằng số tốc độ phân chia (μ) và thời gian ta có thể tính được con số lý thuyết số tế bào X theo μ như sau:

$$V = \frac{n}{t} \rightarrow n = V.t$$

thay $n = V.t$ vào phương trình (1) ta có:

$$X = X_0 \cdot 2^{V.t} \quad (7)$$

Kích thước trung bình của tế bào giống nấm men ở pha này nói chung là nhỏ nhất, vì chúng còn phải sinh sản (nảy chồi, phân chia tế bào) từ nguồn tế bào chất và vỏ tế bào. Đối với các tế bào trong pha này chúng có hoạt tính sinh lý - sinh hoá rất đặc trưng và chúng rất nhạy cảm với các nhân tố không thuận lợi hơn các tế bào đã trưởng thành và ở trạng thái ổn định.

Trong pha chỉ số tế bào phát triển ào ạt, khi đó các chất dinh dưỡng trong môi trường không phải là vô tận, mà ngược lại ngày một giảm đi, hơn nữa trong môi trường xuất hiện và tích tụ những sản phẩm trao đổi chất không cần thiết đối với giống nuôi cấy. Như vậy, trong quá trình chất dinh dưỡng cạn dần, các sản phẩm sinh ra làm cho các điều kiện mất đi sự thuận lợi cho sinh trưởng và quá trình chuyển sang pha ổn định.

- Pha ổn định: Trong pha này tế bào sống là ổn định và mật độ quần thể là tối đa. Cũng có nghĩa là số lượng tế bào sinh ra bằng số lượng tế bào chết (hình 2.8).

- Pha suy vong: Trong pha này các tế bào sống giảm dần và tế bào chết tăng dần, một số tế bào chết bị tự phân do các enzym proteaza nội bào. Các tế bào sống trở nên già đi, kích thước nhỏ lại, biến dạng và tế bào chết xuất hiện dạng hạt. Tế bào chết bị tự phân trở nên trống rỗng và bên trong còn các hạt chất béo nhỏ.

Như vậy, từ 6 pha sinh trưởng người ta ghép lại còn 4 pha (pha sinh trưởng tăng dần và pha chậm dần được ghép vào pha chỉ số) - hình 2.9. Mỗi pha sinh trưởng tương ứng với tốc độ sinh trưởng xác định. Để biểu thị được tốc độ này người ta phải sử dụng các thông số

tuyệt đối và tương đối. Các trạng thái sinh lý của tế bào nấm men trong vòng đời thể hiện ở hình 2.10.

• Tốc độ sinh trưởng tuyệt đối của giống nuôi cấy là V trong khoảng thời gian xác định được tính theo công thức:

$$v = \frac{dx}{dt} \quad (9)$$

v : tốc độ sinh trưởng tuyệt đối;

dx : tăng số lượng tế bào (biểu thị bằng số lượng, sinh khối hay chỉ số đo độ đục);

dt : trong khoảng thời gian xác định.

• Tốc độ sinh trưởng riêng là μ được tính theo đơn vị số lượng tế bào hoặc đơn vị sinh khối tăng trong:

$$\mu = \frac{v}{x} = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x} \rightarrow v = \mu x \quad (10)$$

Song, trong thực tế người ta thường tính tốc độ sinh trưởng riêng trung bình (μ_{tb}) trong khoảng thời gian xác định theo dạng công thức (4):

$$\mu_{tb} = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0} = \frac{2,3(\lg X - \lg X_0)}{t - t_0} \quad (11)$$

Tốc độ sinh trưởng còn tính trong khoảng thời gian thế hệ - thời gian tăng đôi số tế bào (được gọi là g) và được tính:

$$\mu = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0,693}{g} \quad (12)$$

Qua các pha ta thấy:

- Số lượng tế bào X trong pha tiềm phát không tăng: $X = X_0 \rightarrow \frac{dX}{dt} = 0 \rightarrow \mu x = 0$.

- Ở pha chỉ số được tính theo μ_{tb} (công thức 11).

- Pha ổn định X cũng không đổi và $\mu x = 0 \rightarrow \frac{dX}{dt} = 0$.

Trong nuôi cấy nấm men còn sử dụng thông số y là chỉ số kinh tế và được tính theo:

$$y = \frac{\text{lượng sinh khối tạo thành (X)}}{\text{lượng cơ chất được sử dụng}}$$

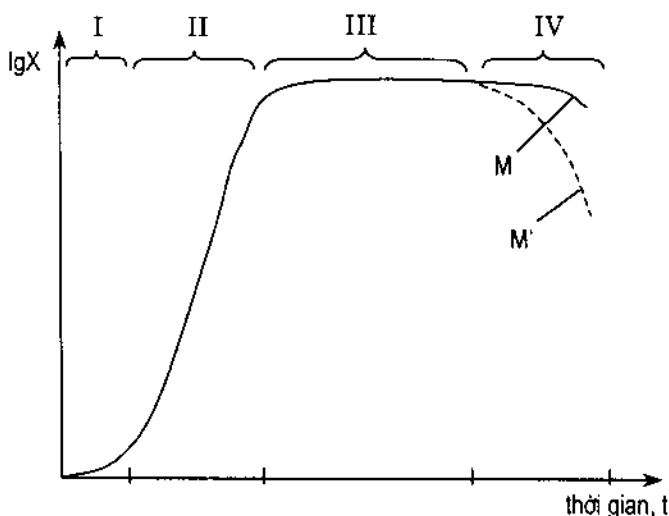
Chỉ số y phụ thuộc vào quá trình sinh năng lượng. Nếu quá trình hô hấp thì chỉ số này cao, còn trong lên men sẽ thấp và thay đổi phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy nấm men.

Trong quá trình lên men tốc độ sinh trưởng của giống nấm men được xác định chủ yếu

bằng bốn nhân tố: nồng độ sản phẩm (etanol), nhiệt độ, nồng độ oxy hoà tan và mật độ tế bào nấm men (sinh khối). Đối với lên men rượu vang nhiệt độ thường ổn định, ở điều kiện kỵ khí coi như nồng độ oxy bằng không. Do vậy, nồng độ etanol tạo thành có ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của nấm men và được tính theo công thức:

$$\mu = 0,19 + 0,019P$$

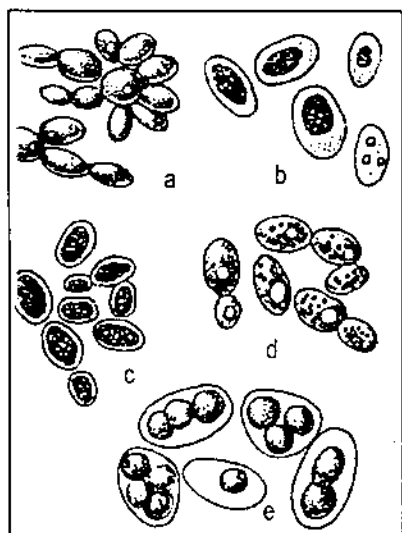
P là nồng độ % của etanol tạo thành.



Hình 2.9. Đường cong sinh trưởng của quần thể vi sinh vật trong môi trường

I- lag-pha; II- pha chỉ số; III- pha ổn định; IV- pha suy vong;

M- tổng số tế bào; M'- số tế bào chết



Hình 2.10. Trạng thái sinh lý của tế bào

nấm men:

a- tế bào nảy chồi; b- tế bào tự phân; c- tế bào chết;

d- tế bào ở trạng thái tĩnh; e- tế bào nang của nấm men

Chương 3

CÁC QUÁ TRÌNH TRAO ĐỔI CHẤT VÀ SẢN PHẨM CỦA TẾ BÀO NẤM MEN

Như chúng ta đã biết, nấm men thuộc nhóm vi sinh vật kỵ khí tùy tiện. Có nghĩa là chúng có thể sống ở điều kiện có không khí (hiếu khí) và ở điều kiện không có không khí (kỵ khí). Ở mỗi điều kiện nấm men có các quá trình trao đổi chất thích hợp, nhưng giữa các quá trình này cũng có những giai đoạn chung và như vậy không phải hoàn toàn riêng biệt hoặc tách biệt ở điều kiện hiếu khí và kỵ khí.

Trong quá trình hoạt động sống của tế bào nấm men, cũng như các vi sinh vật, cần tiêu hoá các chất dinh dưỡng từ môi trường để xây dựng tế bào mới phục vụ cho sinh trưởng, đồng thời sản ra môi trường một số sản phẩm. Tất cả các quá trình này được gọi là trao đổi chất ở tế bào.

Sự trao đổi chất nói chung gồm 3 giai đoạn:

- Phân cắt các đại phân tử ở ngoài tế bào để có thể qua màng vào nội bào.
- Phân giải các phân tử bé để tạo ra các chất trao đổi chất trung gian (pyruvat, axetyl-CoA) và năng lượng hữu ích (ATP).
- Sự phân giải triệt để các chất trao đổi chất trung gian thành CO_2 và H_2O với sự giải phóng ra nhiều năng lượng ở dạng ATP với hàng loạt các phản ứng oxy hoá khử các hợp chất hữu cơ và vô cơ.

3.1. DỊ HOÁ VÀ ĐỒNG HOÁ Ở TẾ BÀO NẤM MEN

Trao đổi chất ở tế bào nấm men cũng tương tự như ở hầu hết giới vi sinh vật. Chức năng cơ bản của trao đổi chất là tạo ra các vật liệu tế bào và nguồn năng lượng phục vụ cho hoạt động sống của tế bào.

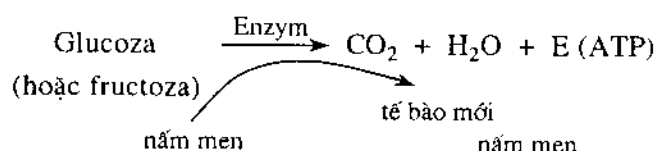
Trao đổi chất ở trong tế bào gồm 2 quá trình ngược chiều nhau (có khi xen kẽ với nhau): dị hoá và đồng hoá.

3.1.1. Sự dị hoá (catabolism hay Dissilation)

Sự dị hoá là quá trình phân giải các hợp chất dinh dưỡng có phân tử lớn để có thể qua màng vào nội bào, sau đó tiếp tục phân giải các chất có phân tử nhỏ thành các hợp chất trung gian, và thu nhận năng lượng. Tiếp tục phân giải triệt để các hợp chất hữu cơ (kể cả

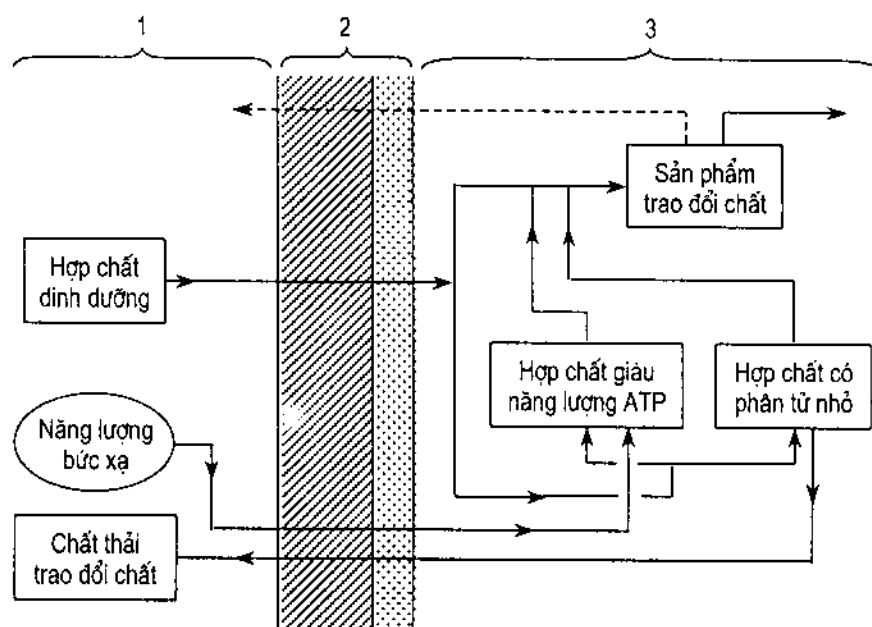
các sản phẩm trung gian) thành sản phẩm cuối cùng CO_2 và H_2O và phần lớn năng lượng ở dạng ATP.

Phương trình đại thể của quá trình dị hoá như sau:



Ở chương II đã cho thấy, hầu hết nấm men không sản ra được các enzym amylaza, proteaza và xenlulaza, do vậy nấm men không sử dụng trực tiếp tinh bột, protein và xenluloza, hemixenluloza. Nấm men đa số các trường hợp chỉ sử dụng được một số đường, như glucoza, fructoza, maltoza, saccaroza, lactoza, rafioroza... (xem bảng 1.1).

Dị hoá các chất hữu cơ ở tế bào nấm men trong quá trình sống hiếu khí (hô hấp) hay lên men (kỵ khí) ngoài năng lượng thu được còn tạo ra các sản phẩm. Phần lớn sản phẩm là vật liệu tế bào dùng cho sinh tổng hợp các hợp chất cấu trúc tế bào mới, còn một số sản phẩm tế bào không sử dụng và được thải ra ngoài môi trường, như rượu etylic, CO_2 , glycerin v.v... Sơ đồ sau giới thiệu sơ giản về trao đổi ở tế bào vi sinh vật (hình 3.1).



Hình 3.1. Sơ đồ trao đổi ở vi sinh vật:

1- môi trường xung quanh; 2- vỏ và màng tế bào; 3- tế bào chất

Các cơ chất dinh dưỡng của nấm men thường là các loại đường, như:

- Monosacarit gồm có glucoza, fructoza, galactoza, aloza, sorboza - là các hexoza có công thức $C_6H_{12}O_6$ và các đường 5 (pentoza) gồm có arabioza, xiloza, xiluloza, riboza, ribuloza - có công thức $C_5H_{10}O_5$; các đường khác như ramnozơ ($C_6H_{12}O_5$), sorbitol ($C_6H_{14}H_6$) v.v...

- Các disaccarit như:

Lactoza hay lactobioza $C_{12}H_{22}O_{12}$ gồm có 2 phân tử đường galactoza và glucoza;

Maltoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) - đường mạch nha, gồm có 2 glucoza.

Saccaroza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) - đường mía hay đường củ cải, gồm có glucoza và fructoza (glucoza dễ dàng chuyển thành fructoza và ngược lại).

- Trisaccarit, như xenlobioza ($C_{18}H_{32}O_{16}$) được phân giải nhờ enzym xenlobiaza.

Các loại đường này không phải bất cứ chủng loài nấm men nào cũng có thể đồng hoá được, mà còn tùy thuộc nấm men có enzym thuỷ phân cảm ứng hoặc enzym đồng phân để chuyển chúng về dạng đường đơn dễ tiêu hoá được hay không - các đường đơn này thường là glucoza và fructoza hoặc pentoza đơn giản.

Các đường đơn dễ tiêu hoá và được coi là vạn năng là glucoza, sau đó là fructoza. Các đường này được tế bào sử dụng như là nguồn nguyên liệu ban đầu được đưa vào quá trình đường phân (glycolism). Quá trình đường phân xảy ra ở điều kiện kỵ khí. Năng lượng được tách ra trong quá trình sẽ dự trữ ở các mối phosphat là adenozintriphosphat (ATP) hoặc ở một vài chất giàu năng lượng khác. Những hợp chất giàu năng lượng này được sử dụng cho nhiều phản ứng hoá sinh trong trao đổi chất, trong sinh trưởng và phát triển. Do vậy quá trình dị hoá (phân giải các hợp chất hữu cơ) còn được gọi là quá trình trao đổi năng lượng.

3.1.2. Đồng hoá (Anabolism hay Assimilation)

Đồng hoá là sử dụng các hợp chất trao đổi trung gian do quá trình dị hoá tạo thành hoặc có sẵn trong môi trường để thực hiện các quá trình sinh tổng hợp ra các chất cấu trúc tế bào, như các hợp chất cao phân tử polysaccarit, protein, axit nucleic, lipid... tạo ra tế bào mới từ các tiền chất đơn giản (axit amin, các bazơ purin và pyrimidin, axit hữu cơ, phosphat - đường). Sự tổng hợp gắn liền với nhu cầu về năng lượng tự do được giải phóng do khử phospho của ATP. Quá trình sinh tổng hợp như vậy được gọi là trao đổi chất kiến tạo hay là cấu trúc xây dựng.

Các quá trình đồng hoá và dị hoá thường xảy ra ở các vùng khác nhau trong tế bào, song chúng lại xảy ra gần như đồng thời do các enzym đặc hiệu. Tốc độ dị hoá trong tế bào được điều hoà không phải là thành phần môi trường xung quanh mà là do nhu cầu năng lượng của tế bào ở những thời điểm xác định. Năng lượng được sử dụng ở dạng ATP. Để thu nhận đủ số năng lượng này tế bào xử lý nguồn vật liệu có thể làm thoả mãn nhu cầu năng lượng cần thiết cho hoạt động sống. Thật vậy, kết quả trao đổi chất từ môi trường dinh

đường mang lại tất cả các yếu tố cho sự tích lũy năng lượng, cho sinh tổng hợp các thành phần cấu trúc của tế bào, cho sự tạo thành rất nhiều enzym và hoàn thiện cho các sản phẩm trung gian.

Các quá trình lên men và hô hấp hoặc là phản ứng kỵ khí hay hiếu khí đóng vai trò cơ bản trong trao đổi chất của tế bào nấm men.

Nấm men thuộc các thể vi sinh vật kỵ khí tùy tiện. Ở điều kiện không có oxy chúng nhận năng lượng trong các phản ứng oxy hoá khử. Khi mới rơi vào điều kiện hiếu khí nấm men vẫn sử dụng “nguồn năng lượng của mình” bằng phương pháp kỵ khí, sau đó đến các sản phẩm trao đổi chất mới bị oxy hoá bằng oxy phân tử (O_2). Cường độ hô hấp (hay sử dụng oxy) phụ thuộc trực tiếp vào điều kiện nuôi cấy.

Các quá trình dị hoá và đồng hoá xảy ra hình như ngược chiều với nhau. Đầu tiên là các phản ứng dị hoá, sau đó là các phản ứng đồng hoá và gần như đồng thời. Nhiều người coi hai quá trình là một và gọi chung là quá trình đồng hoá. Đây cũng là nội dung của các quá trình trao đổi năng lượng, hô hấp, lên men ở tế bào nấm men.

Các phản ứng trao đổi chất trong tế bào nhờ chất xúc tác sinh học là các enzym. Trong tế bào vi sinh vật có hàng ngàn enzym được chuyển hoá xúc tác những phản ứng đặc trưng. Việc tổng hợp enzym thực chất là tổng hợp các protein được điều khiển bởi bộ gen nằm ở nhân tế bào. Vấn đề enzym ta có thể tham khảo ở những tài liệu khác.

Những enzym và hệ enzym khác nhau được khu trú trong các cơ quan tử của tế bào hoặc đơn giản là chúng được hoà tan trong tế bào chất. Các cấu tử của tế bào có mặt enzym. Các enzym đường phân được hoà trộn trong tế bào chất. Các enzym invertaza và permeaza đảm nhận việc đồng hoá các loại đường và vận chuyển chất dinh dưỡng qua màng, cũng như hexokinaza - hệ enzym quan trọng trong quá trình phosphoryl hoá có mặt ở ngay vỏ tế bào. Các enzym tham gia vào quá trình oxy hoá axit pyruvic, axit béo và một số axit amin lại nằm ở các tiểu thể. Các enzym tổng hợp protein khu trú ở ribosom, các enzym tham gia vào chuỗi hô hấp có mặt mitochondri (ti thể). Sự biến đổi cấu trúc ở ti thể, đặc biệt là tạo thành nếp gấp của ti thể và sự có mặt của oxy phân tử trong điều kiện nuôi cấy sẽ đưa nấm men chuyển chế độ hô hấp từ hiếu khí (có oxy) sang chế độ kỵ khí (không có oxy). Dĩ nhiên là biến đổi này cần phải có hệ enzym thích ứng trong tế bào. Những nấm men nào có sẵn hai hệ enzym hô hấp này sẽ thích ứng với hai kiểu hô hấp. Giống nấm men *Saccharomyces* tỏ ra rất thích hợp với cả hai chế độ hô hấp. Khi đủ oxy chúng sinh trưởng tăng sinh khối và tạo ra rất ít rượu etylic, khi không đủ oxy chúng sẽ chuyển sang lên men để tạo thành rượu etylic và CO_2 , còn tăng sinh khối thấp hơn nhiều so với hiếu khí. Một số giống nấm men khác khi chuyển sang hô hấp kỵ khí tạo ra ít hoặc rất ít, thậm chí là không tạo ra rượu etylic.

3.2. TRAO ĐỔI NĂNG LƯỢNG

Nấm men cũng như hầu hết các cơ thể sinh vật trong quá trình sống cần phải có năng lượng. Nấm men cần nguồn năng lượng trong quá trình phân giải (hay oxy hoá hoặc đốt

cháy) các hợp chất dinh dưỡng từ ngoài môi trường vào tế bào. Chúng là thể sinh vật không có chất diệp lục, nên không sử dụng được năng lượng mặt trời như giới thực vật. Nấm men chỉ lấy được năng lượng hữu ích cho quá trình sinh tổng hợp của chúng nhờ giải phóng năng lượng ở các phản ứng hoá sinh trong nội bào.

Các phản ứng phân giải ở tế bào nấm men tương tự như ở vi khuẩn.

– Nguồn cung cấp năng lượng chủ yếu ở nấm men là glucxit, thực chất là một số loại đường đơn và đường đôi (xem chương II, và phần 3.1.1).

Các loại đường trước hết được biến thành glucoza hoặc fructoza. Hai loại đường bị biến đổi qua một số phản ứng tới axit pyruvic ($\text{CH}_3\text{--CO--COOH}$) và giải phóng ra hợp chất giàu năng lượng là ATP. Giai đoạn này không cần sự có mặt oxy phân tử của không khí (kỵ khí).

– Tiếp theo giai đoạn đường phân là sự phân giải triệt để các hợp chất trung gian thành sản phẩm cuối cùng là CO_2 và H_2O với sự có mặt oxy phân tử (O_2) của không khí là quá trình hô hấp hiếu khí hoặc không cần oxy phân tử (O_2) là quá trình hô hấp kỵ khí hay quá trình lên men. Quá trình phân giải triệt để này tạo ra nhiều ATP và bao giờ cũng là phản ứng oxy hoá các chất hữu cơ và vô cơ.

Quá trình oxy hoá chất A có thể xem là một chuỗi các phản ứng mà A mất đi điện tử của mình. Chất A gọi là chất cho điện tử $\rightarrow$ sản phẩm bị oxy hoá. Khi đó chất B được thêm điện tử $\rightarrow$ chất nhận điện tử $\rightarrow$ sản phẩm khử. Trong tế bào vi sinh vật chất bị oxy hoá thường là hợp chất hữu cơ mất H^+ hay là chất được oxy hoá. Như vậy, quá trình oxy hoá thực chất là quá trình khử hydro, trong khi đó quá trình khử là quá trình hydro hoá. Tổ hợp hai quá trình thành một - quá trình oxy hoá - khử.

Nếu chất nhận điện tử (H^+) cuối cùng là oxy phân tử (O_2) là quá trình hô hấp hiếu khí. Khi chất nhận điện tử (H^+) cuối cùng là các hợp chất khác không phải là oxy phân tử thì quá trình được gọi là hô hấp kỵ khí (nếu chất nhận H^+ là hợp chất hữu cơ - được gọi là quá trình lên men, còn chất nhận là vô cơ - được gọi chung là hô hấp kỵ khí). Quá trình tạo năng lượng ở tế bào vi sinh vật trong điều kiện hiếu khí được giới thiệu ở hình 3.2 và hình 3.3.

Ở đây cũng cần nhấn mạnh rằng, sản phẩm đường phân là pyruvat. Quá trình từ glucoza đến pyruvat vi sinh vật mới thu được rất ít năng lượng (khoảng 2%). Phần năng lượng chủ yếu vẫn còn được tích lũy trong các NADH và nhất là trong pyruvat. Trong quá trình glycoliz (đường phân) mới chỉ cắt được một mối C-C.

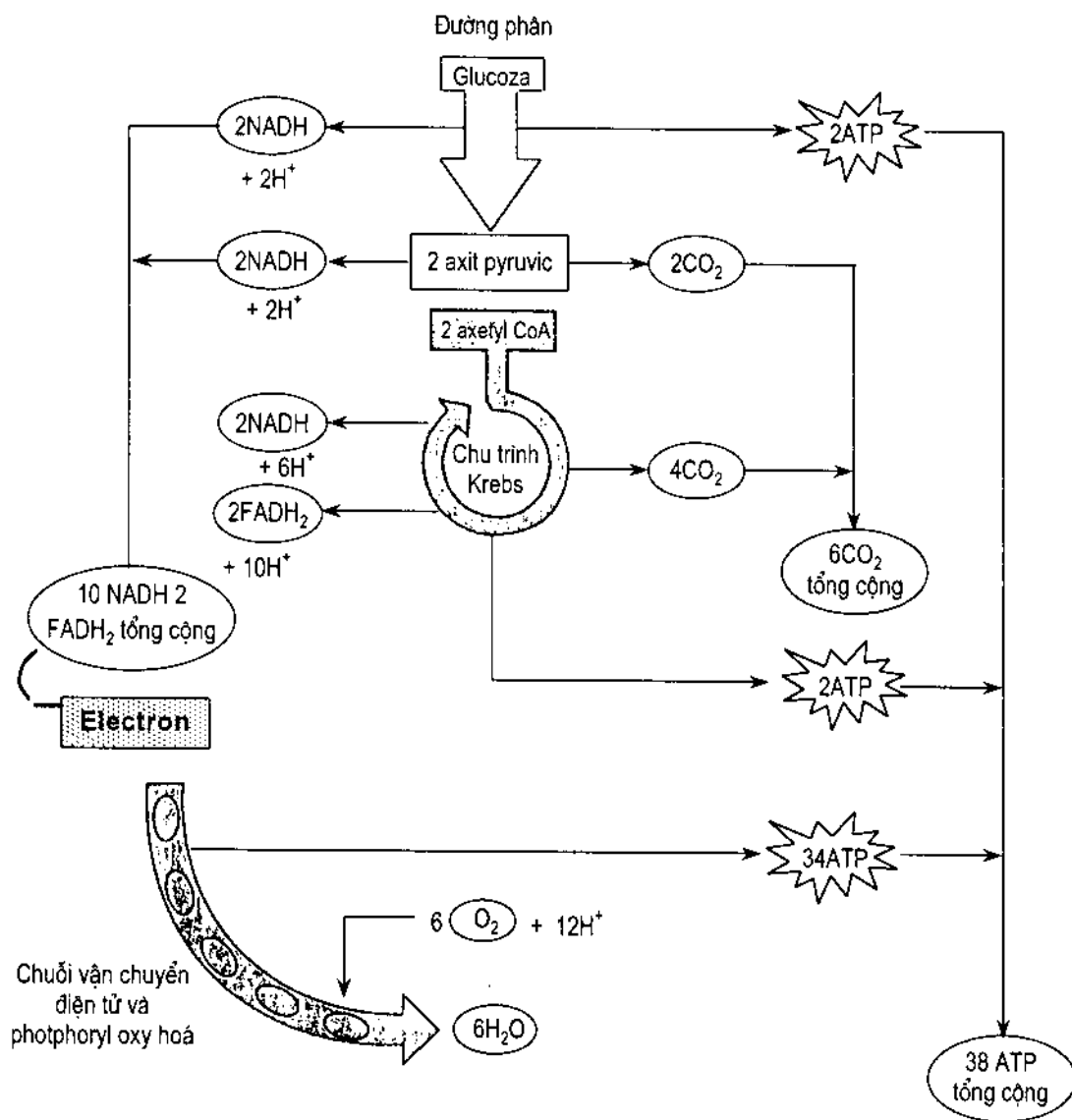
Số phận pyruvat sẽ được tiếp tục và chu trình Krebs theo kiểu hô hấp hiếu khí hay hô hấp kỵ khí theo kiểu lên men là còn tùy thuộc vào hệ enzym của tế bào vi sinh vật hoặc điều kiện có oxy hay không có oxy - đối với tế bào nấm men.

3.3. HÔ HẤP

Như đã biết, nấm men là cơ thể sống kỵ khí tùy tiện. Chúng có thể sống ở điều kiện

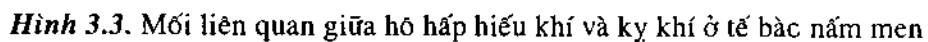
hiếu khí cũng như kỵ khí. Chính vì vậy chúng có hai kiểu hô hấp khác nhau, tùy thuộc vào điều kiện có đủ oxy cung cấp cho quá trình trao đổi chất của chúng hay không. Ở môi trường lỏng bao giờ cũng có sẵn một lượng oxy hoà tan. Vì vậy, khi nuôi cấy nấm men ở điều kiện tĩnh, có nghĩa là không sục khí, thì thời gian đầu nấm men sinh trưởng ở điều kiện hiếu khí và lượng oxy hoà tan cạn dần nấm men chuyển sang hô hấp kỵ khí.

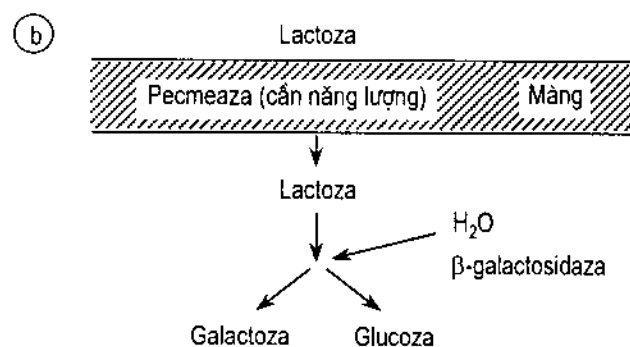
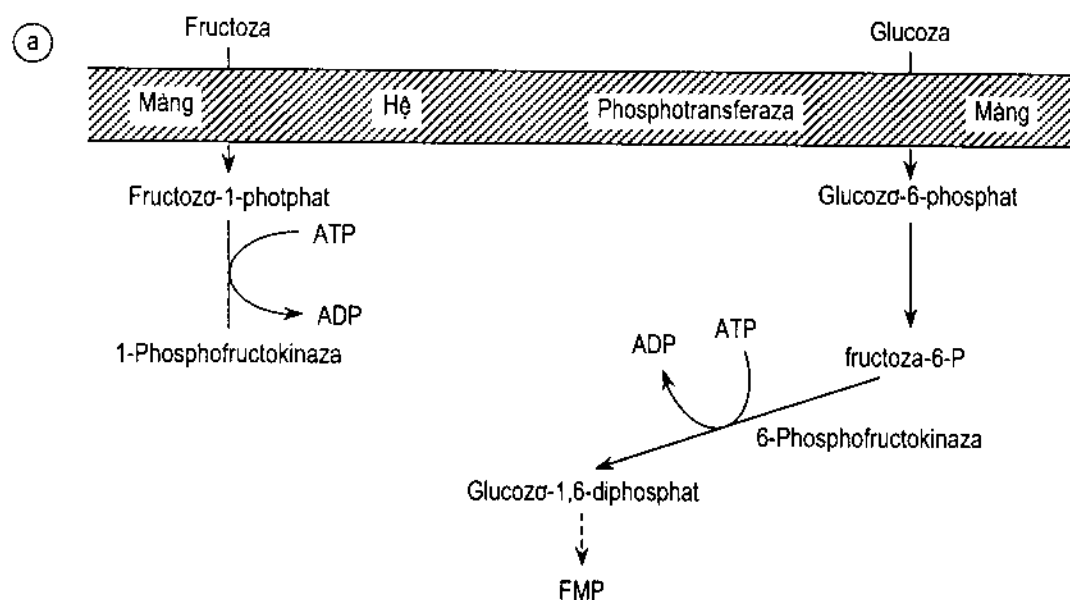
Hô hấp kỵ khí và hiếu khí thực chất là phụ thuộc vào hệ enzym nội bào đảm bảo chuyển hoá các vật chất dung dịch hữu cơ (nguồn cacbon) cũng như vô cơ... tham gia vào các quá trình trao đổi năng lượng, hô hấp tùy nghi để sinh trưởng và tạo ra các sản phẩm trao đổi chất.



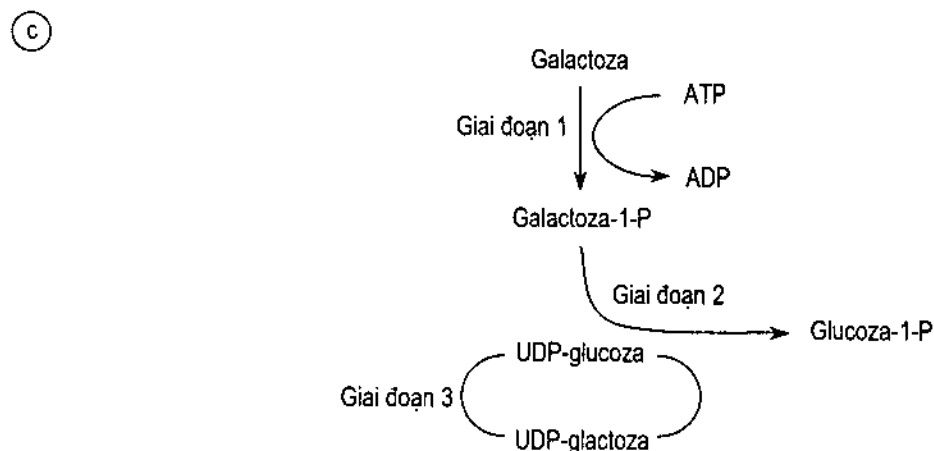
Hình 3.2. Tóm tắt quá trình hô hấp hiếu khí và tạo ATP ở tế bào vi sinh vật

Hấp thu và đường phân một số loại đường qua màng tế bào nấm men được giới thiệu ở các hình 3.4a, b, c.



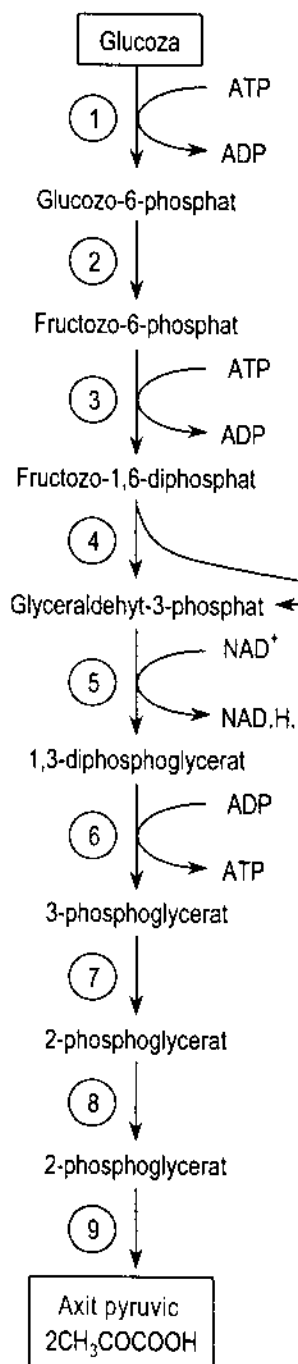


Sự biến đổi của galactoza theo sơ đồ sau:



Hình 3.4. Hấp thu fructoza, glucoza, lactoza, galactoza và bước đầu đường phân ở tế bào nấm men

3.3.1. Hô hấp kỵ khí



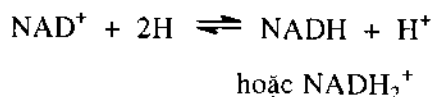
Hình 3.5. Quá trình đường phân theo con đường Embden - Mayerhof - Parnas (EMP)

Đường phân (glycolysis) là quá trình chuyển hoá glucoza nội bào thành axit pyruvic. Nấm men *Saccharomyces* đường phân chủ yếu theo con đường EMP (Embden-Mayerhof-Parnas), còn ở *Candida* theo EMP là 70 ÷ 80%, theo con đường pentozophosphat là 20 ÷ 30%.

Đường phân theo EMP như sau (hình 3.5):

Ý nghĩa cơ bản của quá trình đường phân là ở chỗ đã biến đổi cấu trúc của glucoza thành axit pyruvic - một chất có hoạt tính sinh học cao và yếu về mối quan hệ hoá học, làm giảm nhẹ cho biến đổi cơ chất khởi đầu ở các giai đoạn tiếp theo của quá trình oxy hoá - khử.

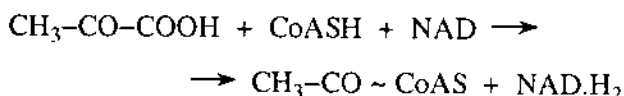
Trong quá trình đường phân ban đầu cần ATP để khởi động quá trình. Ở những giai đoạn sau ATP được tái sinh. NAD^+ là coenzym của các enzym dehydrogenaza xúc tác các quá trình oxy hoá - khử:



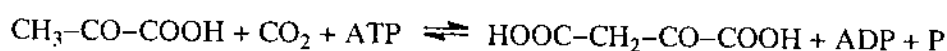
Glucoza được enzym xúc tác sẽ tạo thành 2 phân tử axit pyruvic ($CH_3COCOOH$).

3.3.2. Hô hấp hiếu khí

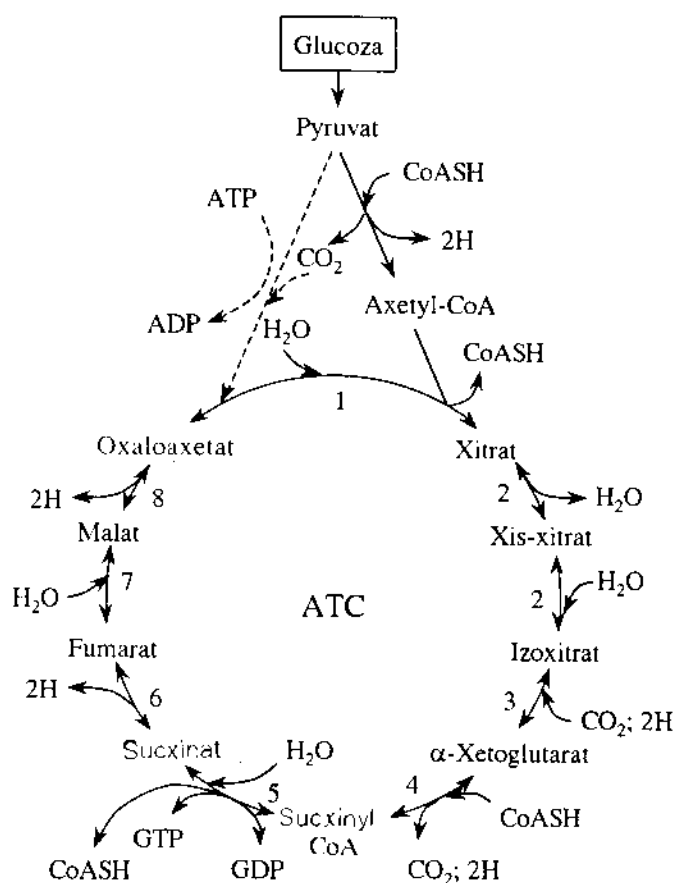
Trước tiên, một phân tử axit pyruvic tham gia vào phản ứng decarboxyl oxy hoá và kết quả là CoA-axetyl (axit axetic được hoạt hoá) tạo thành.



Phân tử axit pyruvic thứ hai dưới tác dụng của enzym pyruvat cacboxylaza được ngưng kết với CO_2 để tạo thành axit oxaloaxetic:



Chu trình được xác lập với axit oxaloaxetic cũng có thể tạo thành từ axit malic. Đặc biệt là chu trình được bắt đầu với sự ngưng kết giữa CoA-axetyl và phân tử oxaloaxetic axit nhờ enzym xitratsintetaza xúc tác. Chu trình này được gọi là chu trình hay vòng Krebs hoặc chu trình ATC (axit tricacboxylic) (hình 3.6).



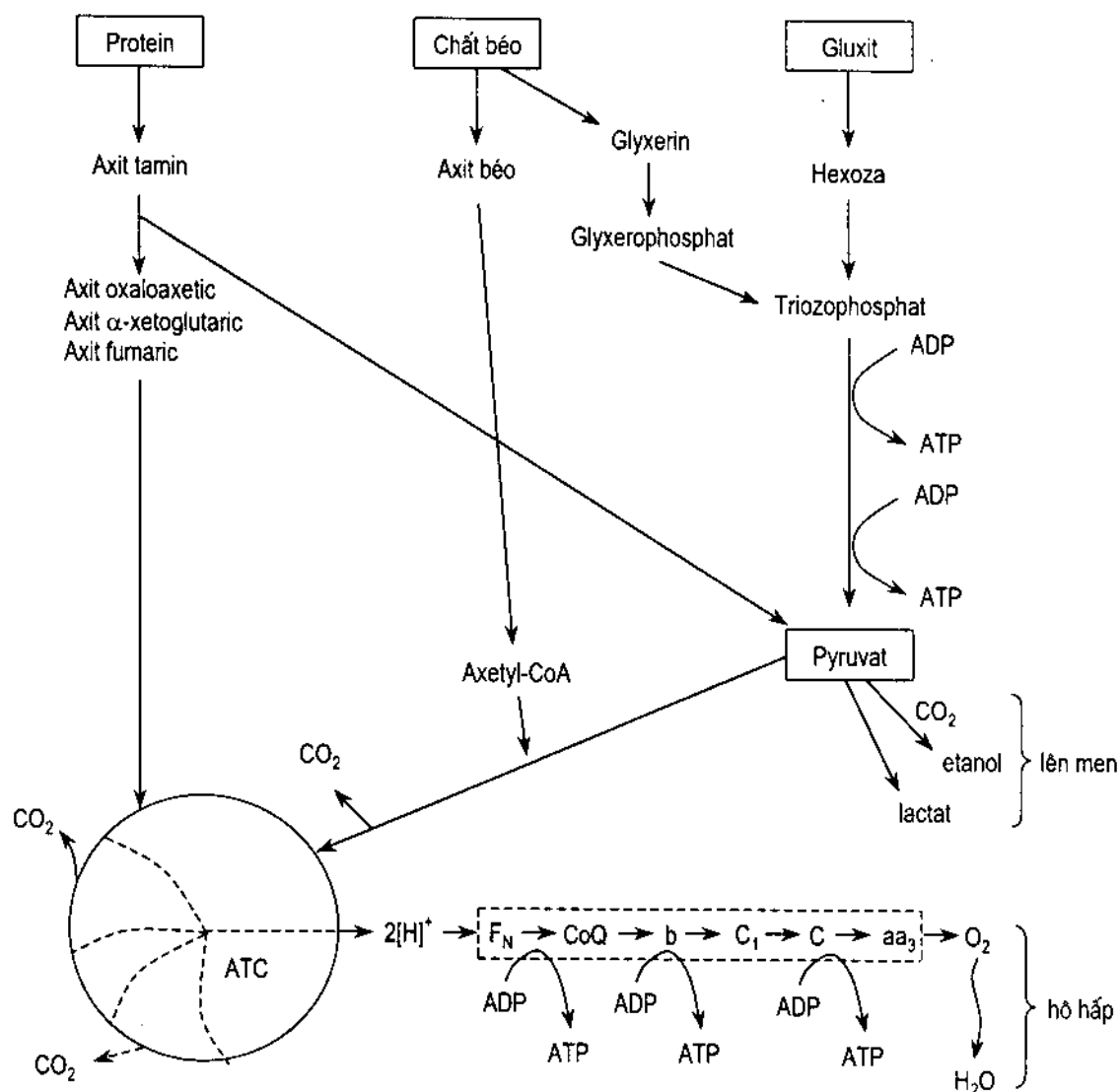
Hình 3.6. Chu trình ATC
(chu trình Krebs)

1. Enzym ngưng tụ xitrat: xitratsintetaza, xitrat-oxaloaxetatliaza (axetyl-CoA), xitrogenaza;
2. Aconitaza (aconitathydrataza);
3. Izoxitrat dehydrogenaza (D₃-izoxitrat, ADN-oxydoreductaza);
4. α-xetoglutarat dehydrogenaza;
5. Succinatilokinaza [Succinat-CoA-sintetaza, Succinat-CoA-ligaza (GDP)];
6. Succinat dehydrogenaza (chất nhận), oxydoreductaza;
7. Fumaraza;
8. Malatdehydrogenaza (L-malat; NAD-oxydoreductaza).

Chu trình Krebs là quá trình oxy hoá phosphoryl diễn ra ở tế bào nấm men hô hấp hiếu khí. Hệ thống vận chuyển điện tử tạo ra một lượng lớn năng lượng tích tụ ở dạng ATP. Các hợp chất trung gian như xitrat, izoxitrat, α-xetoglutarat v.v... là các vật liệu cho sinh tổng hợp các axit amin, axit nucleic. Các hợp chất mới sinh từ chu trình này có thể được sử dụng lại nhằm cung cấp vật liệu cho các hoạt động sinh tổng hợp cho các thành phần của tế bào.

Trong điều kiện hô hấp hiếu khí: tế bào nấm men sử dụng oxy phân tử (O₂) làm chất nhận điện tử (H⁺) cuối cùng qua chuỗi hô hấp và như vậy glucoza bị oxy hoá hoàn toàn thành CO₂ và nước. Trở lại vấn đề trao đổi năng lượng chúng ta thấy ở giai đoạn đường phân từ một phân tử glucoza giải phóng được 2 ATP, từ chu trình Krebs - 2 ATP và quá trình qua chuỗi hô hấp - 34 ATP. Như vậy, sau quá trình hô hấp hiếu khí một phân tử glucoza tạo ra

38 ATP. Trong quá trình hô hấp của nấm men NAD^+ tái sinh được sử dụng lại để oxy hoá phosphoryl trong chu trình Krebs tiếp theo. Qua đây chúng ta thấy rõ ràng, khi có mặt oxy của không khí nấm men thu nhận năng lượng nhờ hô hấp. Quá trình đường phân chỉ cung ứng một lượng nhỏ các hợp chất khử để chuyển vào chuỗi hô hấp. Để đảm bảo cung cấp đầy đủ cho chuỗi hô hấp cần phải đi tìm từ các nguồn khác. Đã chứng minh được rằng, vòng Krebs là dòng cơ bản thực hiện oxy hoá cuối cùng không những là sản phẩm trao đổi glucit mà còn cả các hợp chất khác như protein, chất béo và có thể là một số hydrocacbon của dầu mỏ hoặc khí đốt (hình 3.7).



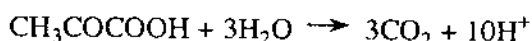
Hình 3.7. Mối tương quan của các đường chuyển hoá các cơ chất trong chuỗi hô hấp và lên men

Các phân tử chất béo ở đây đã được biến đổi sơ bộ.

Các hợp chất này được biến đổi nhờ hàng loạt các phản ứng enzym liên tiếp tới axit pyruvic, sau đó được chuyển vào vòng Krebs. Khâu đầu tiên của chuỗi phản ứng là oxy hoá decarboxyl axit pyruvic để tạo ra chất tạo nguồn là axetyl-CoA. Đối với vòng Krebs axetyl-CoA có tác dụng tương tác với axit oxalic để tạo thành axit xitric, sau đó axit này lại biến đổi thành izoxitric axit và tiếp theo là axit α -xetoglutaric, axit xucxinic... Cuối cùng các hợp chất của chu trình chuyển hoá nhanh chóng thành axit oxaloaxetic và axit này một lần nữa lại tham gia vào chu trình. Axit oxaloaxetic ở đây không phải là hợp chất ban đầu, vì chất ban đầu tham gia vào chu trình đã nhường hai nguyên tử cacbon ở dạng CO_2 , sau đó được bổ sung nguồn cacbon từ axetyl-CoA.

Trong 1 vòng chu trình Krebs khi oxy hoá hoàn toàn gốc axetyl tạo ra hai phân tử CO_2 , 1 NAD.P. H_2 , 2 NAD. H_2 và 1 FAD. H_2 . Ở axit α -xetoglutaric trong chu trình Krebs được mở ra cho 1 nhánh trao đổi chất để tổng hợp các axit amin là axit glutamic, arginin và prolin.

Phản ứng tổng quát của chu trình Krebs có thể viết gọn như sau:



Ở phản ứng này ta không thấy một phân tử oxy, một gốc phosphat vô cơ cũng như một ATP nào tham gia vào chu trình này. Sự oxy hoá xảy ra nhờ oxy của nước được tách ra khỏi hydro và hydro được chuyển thành điện tử (H^+) chảy vào chuỗi hô hấp.

Ở chuỗi hô hấp oxy phân tử của không khí mới tham gia. Ở đây thấy có mặt các enzym dehydrogenaza liên quan tới NAD.P (pyruvat-, izoxitrat-, α -xetoglutarat-, lactat-, và malat dehydrogenaza), flavoproteit, coferment Q (Ubikinon) và các xitocrom b, c_1 , c, a, a_3 . Đặc điểm của chuỗi hô hấp là sự có mặt enzym alcoholdehydrogenaza có trong ti thể xúc tác oxy hoá etanol. Ngoài ra alcoholdehydrogenaza I và II còn có thấy trong tế bào chất. Phức hệ enzym pyruvatdehydrogenaza được trình bày ở hình 3.12.

Cơ chế tách năng lượng ở điều kiện hiếu khí cơ bản là dựa trên phản ứng oxy hoá phosphoryl ADP. Sự hô hấp bao gồm hàng loạt các phản ứng oxy hoá - khử giữa hydro được tách ra từ vòng Krebs với phân tử oxy ở chuỗi hô hấp. Cần nhấn mạnh rằng, các enzym xúc tác các phản ứng này đều khu trú trong ti thể của nấm men. Để chu trình được liên tục nhất thiết phải có chất nhận H^+ và ở đây chất nhận hữu hiệu nhất là oxy. Tốc độ tối đa của chu trình quan sát chỉ thấy ở điều kiện đủ oxy.

3.3.3. Hô hấp trong điều kiện kỵ khí và lên men

- *Hiệu ứng Pasteur*: Pasteur quan sát quá trình sống của men rượu *Saccharomyces* và đã phát triển hiệu ứng mang tên ông mà trải qua gần hai trăm năm đến nay vẫn hoàn toàn đúng.

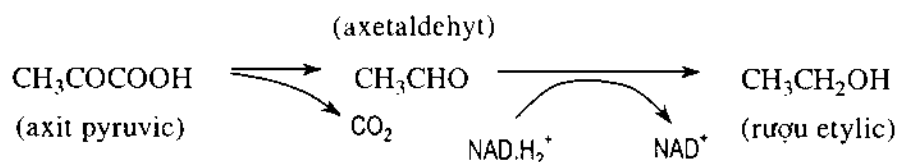
Nấm men rượu sống trong môi trường đường nếu đủ oxy chúng sinh trưởng, tăng sinh khối và sống ở trạng thái hô hấp, nếu thiếu oxy hoặc không có oxy chúng chuyển sang lên men (hô hấp kỵ khí).

Nếu cung cấp oxy liên tục vào môi trường thì tế bào nấm men sẽ chuyển từ trạng thái lên men sang hô hấp. Louis Pasteur đã quan sát thấy một hiện tượng đặc biệt là quá trình hấp thu glucoza trong tế bào đang hô hấp (hiếu khí) xảy ra lại chậm hơn so với các tế bào đang lên men. Ông giải thích điều này như sau: trong trạng thái lên men 1 phân tử glucoza (hay nguồn cacbon nào khác sinh ra ít năng lượng hơn so với trạng thái hô hấp. Vì vậy, trong điều kiện lên men (hay hô hấp kỵ khí) cần phải phân giải nhiều glucoza hơn.

Trong điều kiện kỵ khí chức năng tạo năng lượng ở ti thể bị giảm đi hầu hết. Để bù đắp sự thiếu hụt này do hô hấp, giai đoạn đường phân được tăng cường và trở thành nguồn cung cấp năng lượng cho tế bào. Chức năng của chu trình Krebs sẽ bị biến dạng với sự tạo thành etanol từ axit pyruvic và axit axetic được hình thành trong tế bào. Chính vì vậy, trong điều kiện kỵ khí nấm men, chủ yếu là *Saccharomyces*, chuyển hướng trao đổi chất cho sản phẩm là etanol. Trong điều kiện hô hấp kỵ khí thường được coi là quá trình lên men (theo nghĩa hẹp) vì quá trình tạo ra ít năng lượng hơn so với hiếu khí.

Thật vậy, với điều kiện nuôi cấy nấm men ta có thể thay đổi kiểu trao đổi chất của chúng từ hiếu khí sang kỵ khí và ngược lại, nhưng phải nhớ rằng, ở điều kiện kỵ khí tế bào nấm men sử dụng cơ chất tiêu tốn hơn nhiều so với hiếu khí để đảm bảo nguồn cung cấp năng lượng.

Nấm men trong điều kiện kỵ khí hoặc vi hiếu khí có khả năng đưa chu trình Krebs hoạt động được một phần nhỏ. Tuy vậy, khả năng hoạt động này cũng được xác định. Khi đó NAD^+ tái sinh được sử dụng như là chất nhận H^+ . Nấm men không có khả năng chịu được ở môi trường có độ axit cao, cho nên pyruvic mới sinh ra nhờ đường phân tức thì được chuyển thành CO_2 và axetaldehyt, cuối cùng là thành rượu etylic.



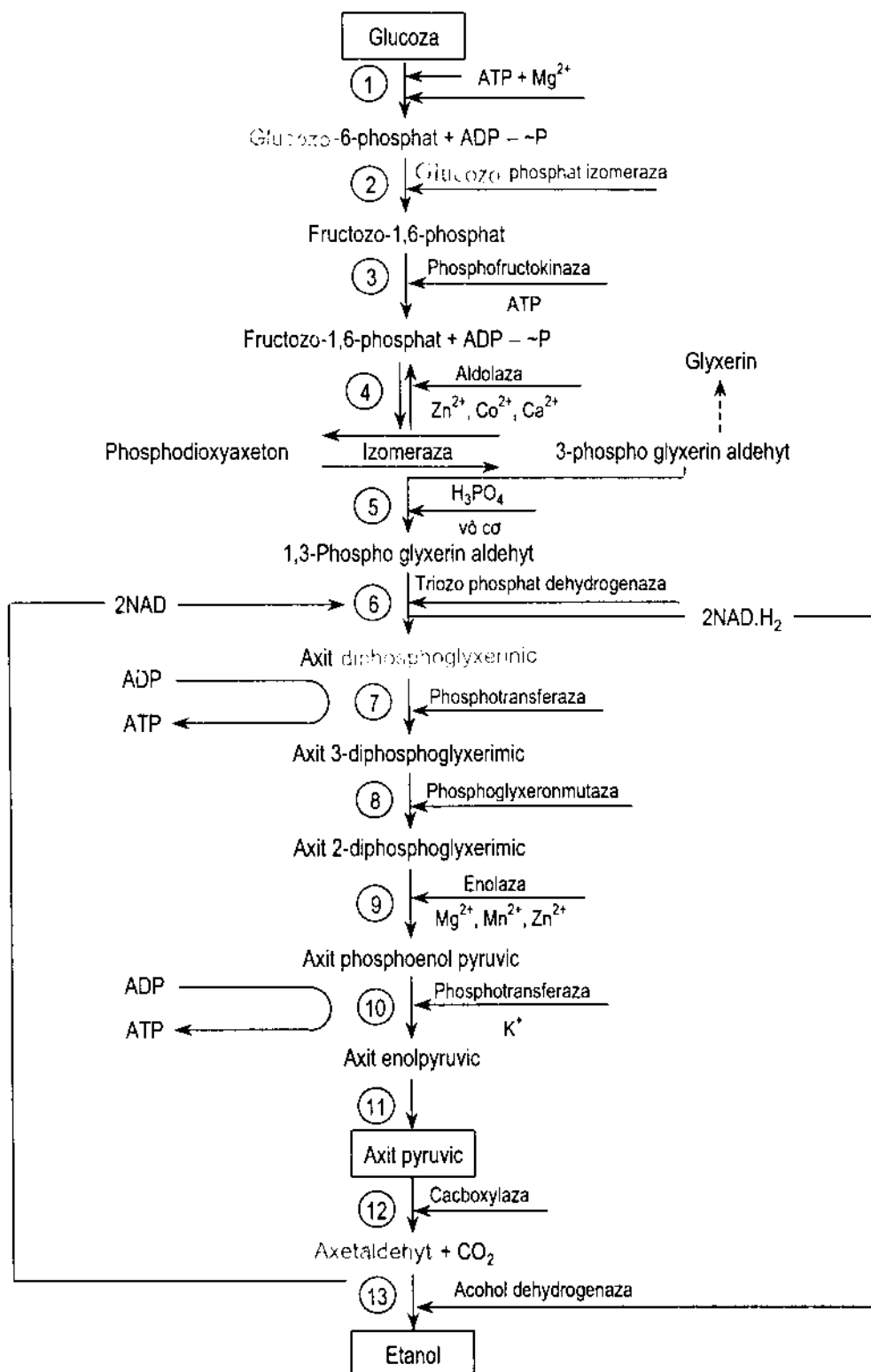
Như vậy, phản ứng này xảy ra để tái sinh NAD^+ - một coenzym được sử dụng trong quá trình đường phân và giải toả sự nhiễm độc cho nấm men khỏi axit pyruvic.

Ngày nay người ta định nghĩa cho quá trình lên men rượu như sau: Đồng hoá các hydratecarbon trong điều kiện kỵ khí xảy ra với sự tách ra năng lượng và dẫn đến tạo thành sản phẩm oxy hoá không hoàn toàn được gọi là lên men.

- *Quá trình lên men rượu* từ glucoza phải tiến hành qua 13 bước (giai đoạn) gồm cả quá trình đường phân và quá trình chuyển pyruvat thành etanol (xem hình 3.8).

Trong quá trình lên men rượu các hợp chất hữu cơ được sinh ra nhờ các phản ứng oxy hoá (Thí dụ: axetaldehyt) là chất nhận H^+ . Trong các phản ứng này oxy không tham gia.

Sơ đồ này cho ta thấy quá trình chuyển hoá các hợp chất trong lên men rượu từ glucoza.



Hình 3.8. Quá trình lên men rượu etylic

Quá trình lên men rượu khá phức tạp, gồm 13 giai đoạn, mỗi giai đoạn được đặc trưng bằng một phản ứng hoá sinh với 1 enzym xúc tác. Hệ enzym của quá trình này trước đây và hiện nay người ta vẫn sử dụng thuật ngữ Zima để chỉ hệ enzym lên men rượu của nấm men.

Quá trình gồm có:

1) Các este phosphoryl của đường được tạo thành. Dưới tác dụng của hexokinaza và axit adenilic tạo ra chất nhận và chất cho axit phosphoric, glucoza biến thành glucoranozo-6-phosphat. Các axit adenilic có trong nấm men ở dạng adenosinmonophosphat AMP, adenosindiphosphat ADP và adenosintriphosphat ATP. Hexokinaza xúc tác chuyển một nhóm phosphat từ ATP đến glucoza, khi đó ATP thành ADP còn gốc phosphat thì kết hợp với cacbon thứ 6 của glucoza. Enzym này được hoạt hoá bằng ion Mg^{2+} . Đối với D-fructoza và D-mannoza cũng xảy ra tương tự như vậy.

Phản ứng enzym glucokinaza xác định tốc độ lên men.

2) Glucozo-6-phosphat sẽ chuyển đồng phân thành fructozo-6-phosphat dưới tác dụng của enzym glucosophosphat izomeraza. Phản ứng thuận nghịch nhưng dịch chuyển về hướng fructozo-6-phosphat.

3) Fructozo-6-phosphat dưới tác dụng của phosphofructokinaza được kết hợp với nguyên tử cacbon thứ nhất nhờ gốc phosphat của ATP và thành fructozo-1,6-diphosphat. Phản ứng này thực tế không phải là thuận nghịch. Phân tử đường chuyển sang dạng oxo (trong phân tử có nhóm $C=O$) và trở thành kém bền, dễ dàng biến đổi tiếp theo, đặc biệt rất yếu ở mỗi liên kết giữa C_3 và C_4 .

4) Dưới tác dụng của enzym aldolaza (được hoạt hoá bằng Zn^{2+} , Co^{2+} và Ca^{2+}) fructozo-1,6-diphosphat chia thành 2 phosphotrioza là 3-phosphoglyxerin aldehyt và phospho dioxyaxeton. Phản ứng này là thuận nghịch.

5) Giữa hai phosphotrioza được đồng phân hoá nhờ xúc tác của trioza phosphat-izomeraza. Phản ứng được cân bằng ở 95% 3-phosphoglyxerin aldehyt và 5% phospho dioxyaxeton.

6) Giai đoạn cảm ứng: hợp chất trung gian được tạo thành là aldehyt axetic. Giữa 2 phân tử 3-phosphoglyxerin aldehyt dưới tác dụng của aldehytmutaza có sự tham gia của phân tử nước sẽ xảy ra phản ứng phân đôi do oxy hoá - khử nhờ dismutaza. Khi đó một phân tử phosphoglyxerin sẽ được oxy hoá thành axit 3-phosphoglyxerinic. Phosphoglyxerin không tham gia vào phản ứng tiếp theo và sau đó tách một axit phosphoric để trở thành các sản phẩm phụ của quá trình lên men (glyxerin).

Quá trình oxy hoá 3-phosphoglyxerin aldehyt thành axit 3-phosphoglyxerinic xảy ra rất phức tạp. Đầu tiên nó chuyển hoá thành 1,3-diphosphoglyxerin aldehyt, rồi kết hợp với

gốc axit phosphoric vô cơ, sau đó dưới tác dụng của triphosphatdehydrogenaza với sự có mặt của NAD (nicotinamit adenin dicleotit) được oxy hoá thành axit 1,3-diphosphoglyxerinic. NAD tham gia vào hợp chất protein đặc biệt tạo thành enzyme kỵ khí dehydrogenaza có khả năng lấy H^+ trực tiếp từ phosphoglyxerin aldehyt và các hợp chất hữu cơ khác.

7) Với sự tham gia của phosphattransferaza gốc axit phosphoric được chứa trong mối liên kết giàu năng lượng được chuyển từ 1,3-diphosphoglyxerinic axit cho ADP để tạo thành ATP. Năng lượng được giải phóng khi oxy hoá phosphoglyxerin aldehyt sẽ được lưu giữ trong ATP.

8) Dưới tác dụng của phosphoglyxeromutaza, axit 3-phosphoglyxerinic được đồng phân hoá thành axit 2-phosphoglyxerinic.

9) Kết quả là nước được tái tạo và gây ra hiện tượng phân phối lại năng lượng bên trong nội phân tử. Axit 2-phosphoglyxerinic chuyển thành axit phosphoenolpyruvic được chứa trong mối liên kết năng lượng cao. Phản ứng được xúc tác do enolaza được hoạt hoá nhờ các ion Mg^{2+} , Mn^{2+} và Zn^{2+} .

Tác dụng cực đại của enolaza ở khoảng pH = 5,2 ÷ 5,5, ở pH = 4,2 phân tử enolaza bị đông vón, ở pH = 3 ÷ 4 bị biến tính không thuận nghịch.

10) Dưới tác dụng của phosphotransferaza với sự có mặt K^+ gốc axit phosphoric được chuyển từ axit phosphoenolpyruvic cho ADP và năng lượng được lưu giữ ở ATP.

11) Axit enolpyruvic tạo thành được biến dạng sang dạng xeto ổn định hơn axit pyruvic ($CH_3COCOOH$).

12) Dưới tác dụng của cacboxylaza, CO_2 được tách từ axit pyruvic và tạo thành aldehyt axetic.

13) Enzym alcoholdehydrogenaza chuyển H^+ từ $NAD.H_2$ cho aldehyt axetic. Kết quả là rượu etylic được tạo thành và NAP và NAD được tái tạo.

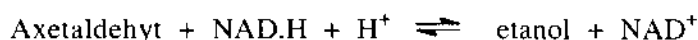
Như chúng ta đã biết, nấm men là cơ thể kỵ khí tùy tiện. Chúng hô hấp như những cơ thể hiếu khí bậc cao. Khi nấm men được gieo cấy vào môi trường có oxy hoà tan chúng hô hấp và sinh trưởng, tăng sinh khối. Lượng oxy hoà tan trong môi trường dần cạn kiệt nấm men chuyển sang hô hấp kỵ khí hay lên men. Trong lên men rượu, các đường đơn như glucoza và fructoza sẽ được phân giải theo con đường EMP và chu trình ATC trong giai đoạn đầu, tiếp theo là chuỗi hô hấp hoạt động giải phóng ra nhiều năng lượng tích tụ trong ATP, sinh khối men giống tăng và khi môi trường chuyển sang kỵ khí (hết oxy hoà tan hoặc không cấp không khí) nấm men chuyển sang lên men, tích tụ rượu etylic và CO_2 (những sản phẩm chính) cùng một số sản phẩm phụ, trong đó có glyxerin.

Theo sơ đồ của quá trình lên men, axetaldehyt phải nhận được H^+ từ $NAD.H_2$ dưới xúc tác của alcoholdehydrogenaza. Khi môi trường hiếu khí phần lớn nucleotit khử phải đi vào hô hấp hiếu khí (hình 3.2 và 3.3). Do vậy quá trình sẽ làm giảm lượng $NAD.H_2$ trong tế

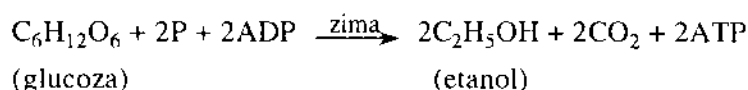
bào nấm men dẫn đến sinh khối tăng, lượng glyxerin tăng, lượng rượu giảm. Như vậy, thực chất của hiệu ứng Pasteur là sự cạnh tranh của NAD.H₂ trong quá trình hô hấp đối với quá trình lên men ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Chính L. Pasteur người đầu tiên phát hiện ra sự cảm ứng của oxy tự do đối với hoạt động sống của nấm men và đã đề ra hiệu ứng Pasteur.

Custeur sau này đã bổ sung những điều kiện của quá trình lên men rượu như sau: kỵ khí, có mặt các đường có thể lên men rượu, pH = 4,5 ÷ 5,5, nhiệt độ 25 ÷ 33°C, khối lượng nấm men trong dịch lên men = 0,26% cơ chất. Khi pH = 7,5 ÷ 8 thì nấm men sinh ra glyxerin là sản phẩm chủ yếu.

Trong các bước của quá trình lên men rượu ta thấy 11 bước là quá trình đường phân. Quá trình này chung cho tất cả giới sinh vật. Hai bước tiếp theo có sự tham gia của hai enzym là pyruvatcacboxylaza và alcoholdehydrogenaza để biến pyruvat thành rượu etylic:



Phương trình tổng quát lên men rượu có thể viết như sau:



Nếu bổ sung vào môi trường những chất ức chế quá trình sẽ biến thành:

- Dạng lên men thứ hai của Neiberg: Cho vào môi trường chất bisulfit. Chất này sẽ liên kết với axetaldehyt và ngăn chặn không cho chuyển thành etanol. Hydro dạng khử NAD.H₂ trong trường hợp này được sử dụng cho khử phosphoglyxerin aldehyt thành glyxerin (phản ứng 4 và 5). Thật vậy, trong môi trường lên men axit pyruvic được sulffit hoá sẽ tích tụ glyxerin và axetaldehyt ở dạng dẫn xuất với bisulfit. Dạng lên men này được sử dụng cho thu nhận glyxerin.

- Dạng lên men thứ ba của Neiberg: Khi môi trường lên men có phản ứng kiềm sẽ biến đổi một nửa axetaldehyt được oxy hoá thành axit axetic, nửa kia được khử tới etanol. Dạng lên men này làm chua môi trường và hiệu suất lên men chỉ còn một nửa.

3.4. SINH TỔNG HỢP MỘT SỐ HỢP CHẤT QUAN TRỌNG VÀ SẢN PHẨM CỦA TẾ BÀO NẤM MEN

3.4.1. Sinh tổng hợp các chất vật liệu xây dựng tế bào

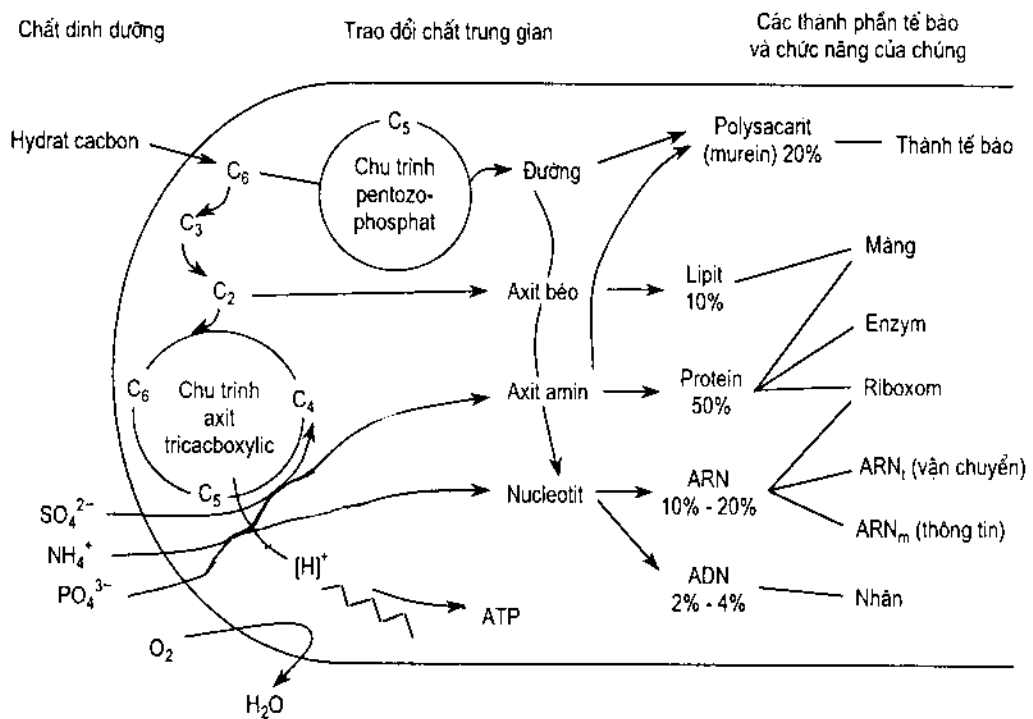
Tế bào nấm men cũng như tế bào vi khuẩn hoặc các cơ thể sinh vật khác, gồm có vỏ, màng, tế bào chất, nhân hoặc chất nhân, cùng các cơ quan khác. Trong hoạt động sống nấm men đã thực hiện hàng loạt các quá trình trao đổi chất và trao đổi năng lượng để đảm bảo

cho đời sống của chúng được tồn tại và phát triển. Các quá trình này trải qua rất nhiều các phản ứng hoá sinh để tạo ra các vật liệu tế bào rồi từ đây tiến hành tổng hợp ra hàng loạt các hợp chất quan trọng để xây dựng tế bào mới, như các protein từ các axit amin, các enzym từ protein và vitamin hoặc muối khoáng, các axit nucleic để hình thành chất nhân v.v... (hình 3.9). Từ kết quả sinh trưởng và phát triển khối lượng nấm men được gia tăng trong quá trình nuôi cấy. Chúng ta thường có khái niệm tăng sinh khối để chỉ sự tăng trưởng số lượng tế bào hoặc khối lượng nấm men hoặc vi sinh vật nói chung trong một đơn vị thể tích lỏng hoặc khối lượng rắn.

Bởi vậy, trong công nghiệp nấm men sản phẩm đầu tiên có thể là *sinh khối*. Sinh khối được thu nhận bằng hai cách: nuôi cấy kỵ khí và nuôi cấy hiếu khí. Nuôi cấy hiếu khí nấm men sản phẩm chủ yếu là sinh khối, CO_2 và một số sản phẩm thứ cấp. Nuôi cấy kỵ khí thu được sinh khối ít hơn (chỉ khoảng 1/4 so với hiếu khí), CO_2 và một số sản phẩm trao đổi chất của tế bào nấm men, trong đó có một chất khí quan trọng là rượu etylic.

Các con đường sinh tổng hợp axit amin và lên men cùng một số sản phẩm của nấm men được giới thiệu ở các hình 3.9, 3.10, 3.11.

Những quá trình sinh tổng hợp và kiến tạo tế bào phụ thuộc rất nhiều vào hệ enzym oxy hoá - khử (dehydrogenaza) của tế bào. Hình 3.12 giới thiệu hoạt động của phức hệ pyruvatdehydrogenaza và hình 3.13 giới thiệu hệ thống oxy hoá nội bào.

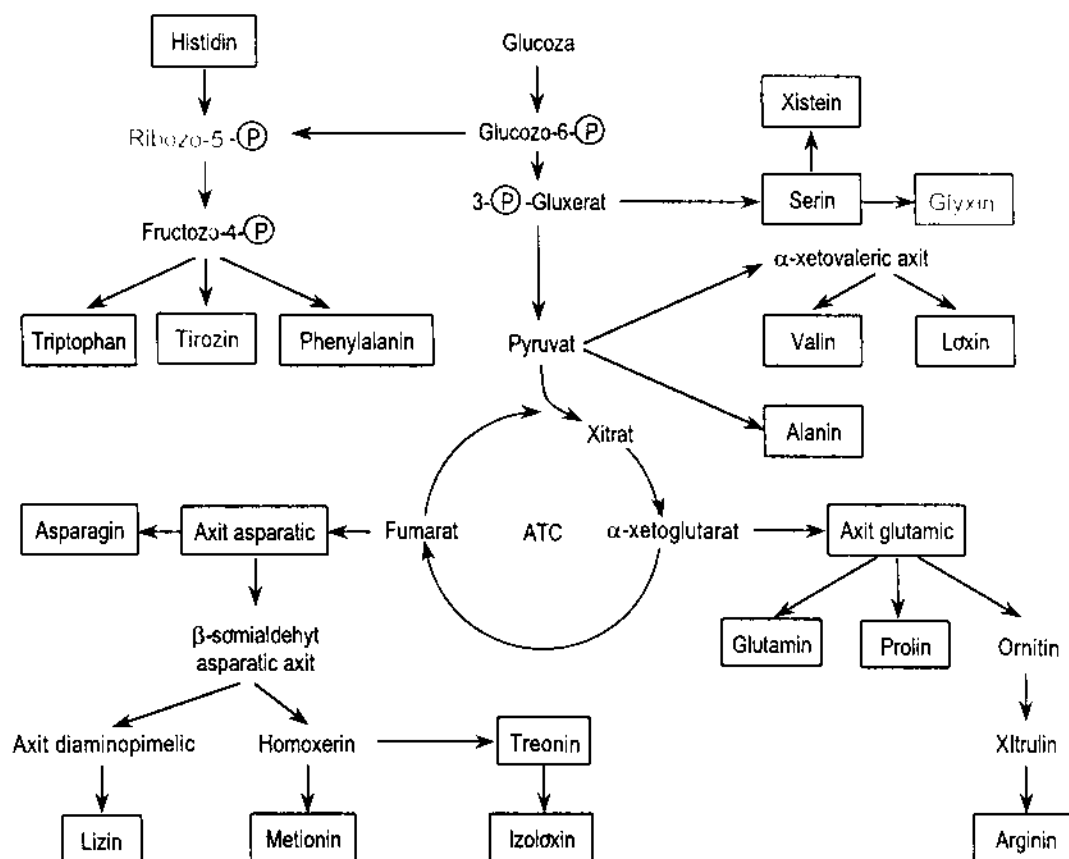


Hình 3.9. Sơ đồ của các quá trình trao đổi chất tham gia vào sinh trưởng

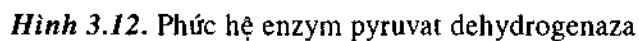
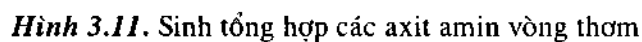
Các quá trình sinh tổng hợp các vật liệu tế bào và kiểm tra tế bào là rất phức tạp. Trong quyển sách này chỉ nêu một cách sơ lược một số vật liệu cơ bản như axit amin được ARN_m truyền thông tin gắn với ARN_i vận chuyển vào riboxom để tổng hợp protein, axit nucleic được tổng hợp từ các nucleotit và nucleozit v.v... Từ các axit amin được tạo thành trong quá trình đường phân và qua chu trình Krebs được tương tác với nhau bằng con đường khử amin hoặc chuyển amin sẽ tạo thành đầy đủ 20 axit amin thành phần của protein. Các axit amin này được mã hoá nhờ ARN thông tin rồi được ARN vận chuyển vào riboxom và được tổng hợp thành các phân tử protein làm thành phần cho các cấu tử cũng như enzym của tế bào.

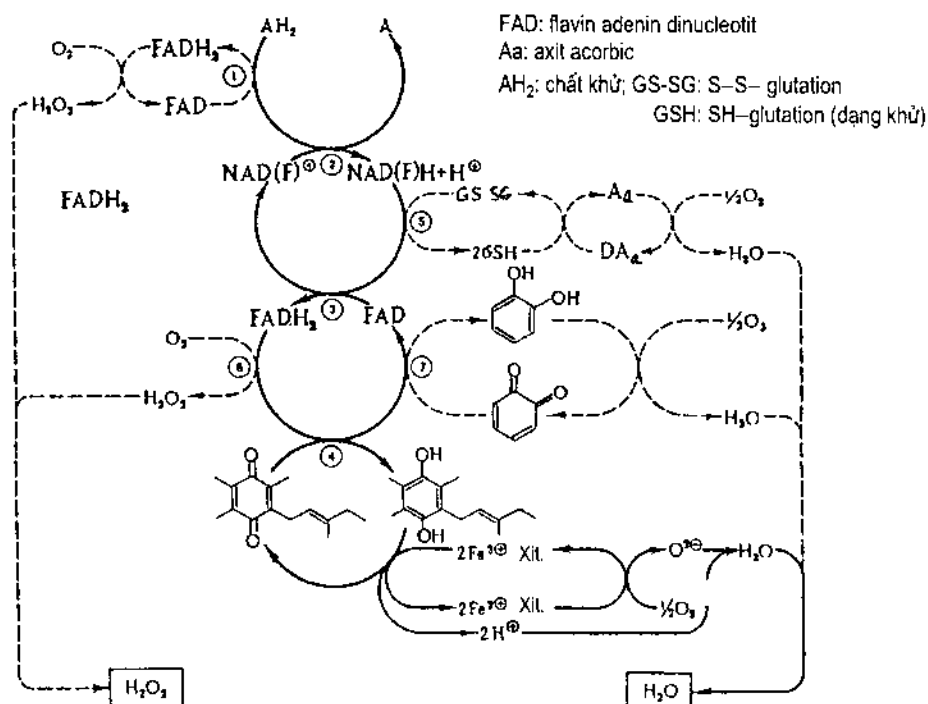
Sinh khối là đặc điểm đặc trưng cho lên men hiếu khí, song ở điều kiện kỵ khí cũng có thể thu được sinh khối, nhưng lượng ít hơn và thời gian nuôi cấy lâu hơn, đặc biệt là cơ chất tiêu tốn nhiều hơn.

Kết quả như trên còn được gọi là kết quả của sự trao đổi chất sơ cấp. Quá trình trao đổi chất sơ cấp gồm nhiều giai đoạn, trải qua nhiều phản ứng trung gian đã xây dựng nên các thành phần kiến tạo nên các đại phân tử cần thiết cho tế bào nấm men.



Hình 3.10. Sinh tổng hợp các axit amin

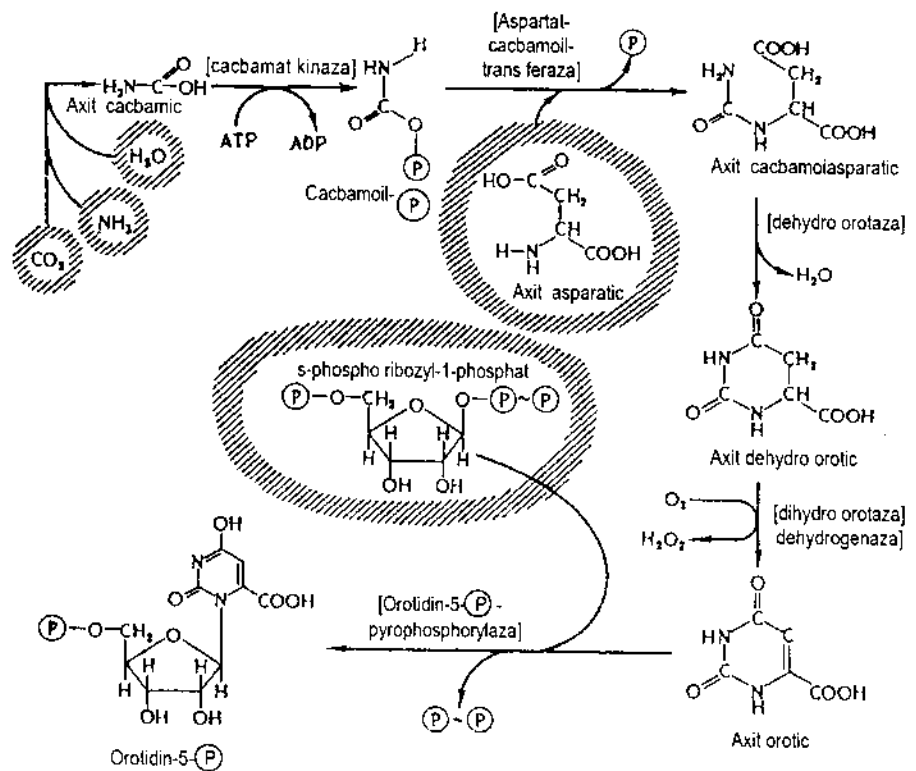




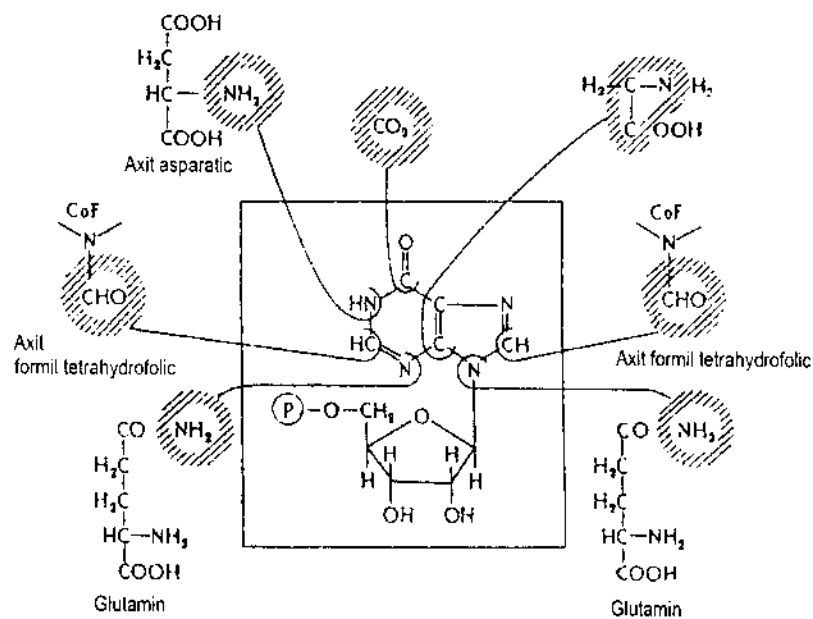
Hình 3.13. Hệ thống oxy hoá nội bào:

- chuyển điện tử ở chuỗi hô hấp với tích trữ năng lượng;
- biến đổi hoá sinh trong điều kiện hiếu khí.

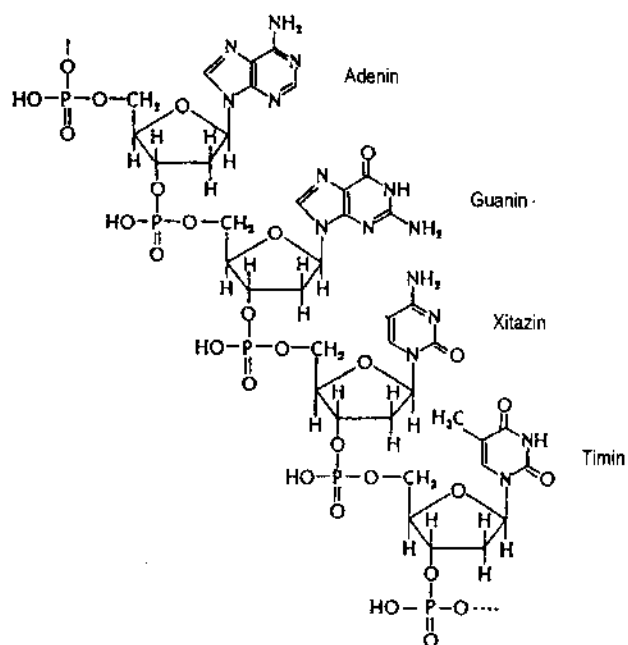
Ngoài trao đổi chất sơ cấp còn có trao đổi chất thứ cấp. Đối với nấm men ta có thể thấy sản phẩm trao đổi chất thứ cấp khác ngoài rượu etylic. Các chất đó là các loại cồn bậc cao, các este và nhiều sản phẩm trung gian. Các hình 3.9, 3.10 đến 3.13 giới thiệu qua về sinh tổng hợp axit amin, nucleotit và phức hệ enzym oxy hoá trong tế bào nấm men, các hình 3.14, 3.15 giới thiệu qua về công thức ADN và sự tái tạo của nó trong quá trình sinh trưởng và 3.16 giới thiệu sơ lược về sự kết hợp axit amin với ARN_t vận chuyển.



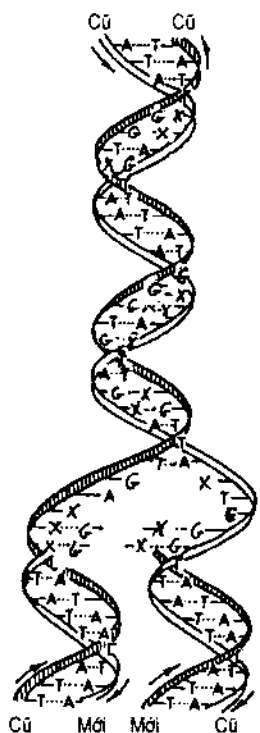
Hình 3.14. Sinh tổng hợp các nucleotit pyrimidin.



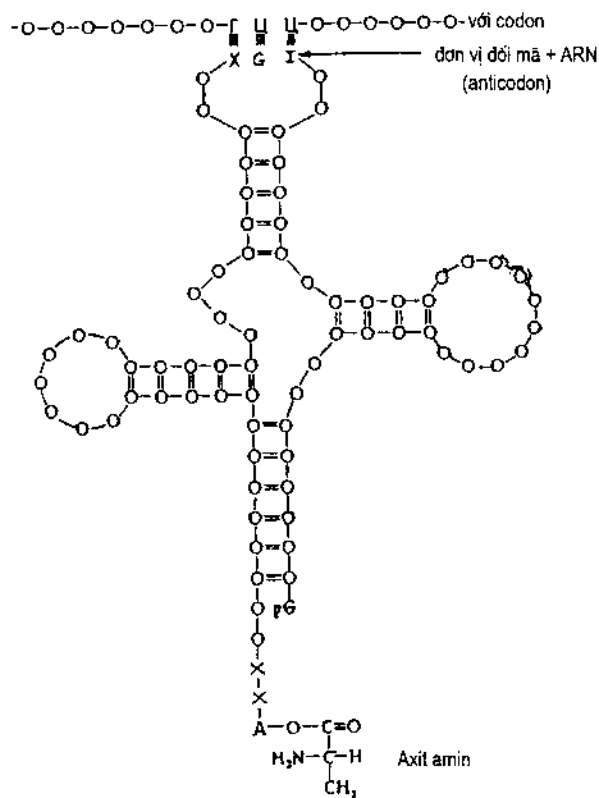
Hình 3.15. Sinh tổng hợp các nucleotit purin



Hình 3.16. Một đoạn công thức của ADN (axit dezoxynucleic)



Hình 3.17. Sơ đồ biểu hiện sợi xoắn kép ADN và kết hợp thành 2 sợi mới từ 2 nửa cũ tách ra trong quá trình sinh sản

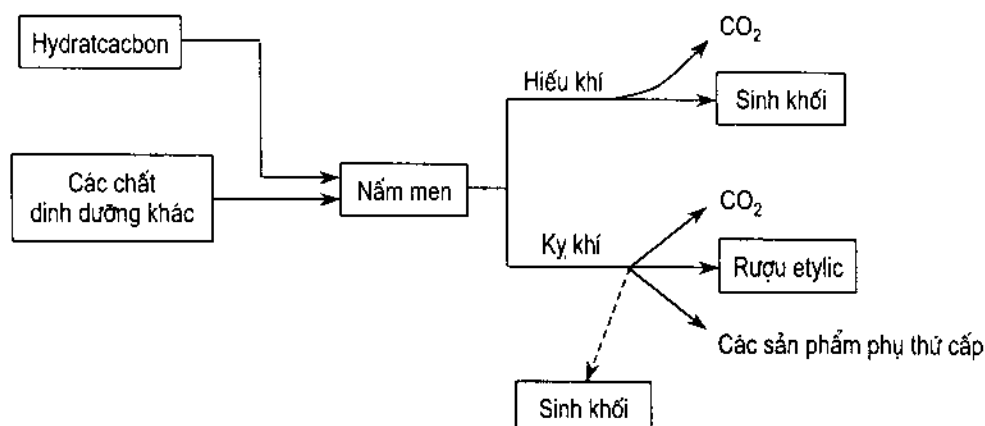


Hình 3.18. Sơ đồ mô hình kết hợp giữa axit amin (alanin) với ARN_t (ARN vận chuyển).

3.4.2. Các sản phẩm từ nấm men

Các sản phẩm từ nấm men khi nuôi cấy hiếu khí ta thu được một lượng lớn sinh khối và sản phẩm chủ yếu là *sinh khối nấm men* được dùng làm men bánh mì, bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để cân đối protein và vitamin trong khẩu phần dinh dưỡng; khi nuôi cấy kỵ khí ta thu được rượu etylic là sản phẩm chủ yếu, ngoài ra còn một loạt các sản phẩm phụ, trong đó có CO_2 là sản phẩm kinh tế, còn lại là các hợp chất có mùi vị hương thơm hoặc là làm cải thiện hoặc là làm giảm chất lượng cho rượu thành phẩm.

Ở các phần trên, kể cả các chương trước, chúng ta có khái niệm lên men là quá trình chuyển hoá vật chất của nấm men ở điều kiện kỵ khí hay là quá trình nuôi cấy nấm men kỵ khí (nghĩa hẹp). Ngày nay người ta mở rộng khái niệm lên men là nuôi cấy nấm men (hay vi sinh vật nói chung) kỵ khí hoặc hiếu khí để nhận một sản phẩm nào đó đều coi là quá trình lên men. Vì vậy, các sản phẩm lên men từ nấm men có thể tóm tắt như sau:



3.4.2.1. Sinh khối nấm men

Sinh khối nấm men làm nở bột mì là sinh khối men *Sacchrromyces cerevisiae* còn sống, còn hoạt tính lên men rượu, khi trộn với bột mì sẽ lên men rượu, giải phóng ra CO_2 làm phồng gluten (protein trong bột mì), bột nhào nở làm cho bánh mì xốp.

Sinh khối nấm men bổ sung vào thức ăn chăn nuôi là sinh khối của các giống *Sacchrromyces*, *Candida*... đã sấy khô, đã chết không có hoạt tính lên men rượu. Loại sinh khối nấm men này được coi là thể đậm đặc protein - vitamin.

Cũng có loại nấm men *Sacchrromyces* còn sống, có khả năng lên men rượu được dùng thêm vào thức ăn tươi cho lợn (rau, cám, rượu gạo) để ủ thức ăn với mục đích tạo hương thơm và có thể làm cho thức ăn dễ tiêu hoá hơn.

3.4.2.2. Các sản phẩm lên men ngoài rượu etylic

- CO_2 (khí cacbonic)

Trong quá trình sống của nấm men sinh ra một lượng khí CO₂ khá lớn. Sản phẩm này được tạo thành từ các quá trình hô hấp hiếu khí và kỵ khí.

Trong công nghiệp lên men, đặc biệt là công nghiệp rượu - bia, CO₂ được thu gom lại và nén nhiều bậc với áp lực cao có thể hoá rắn thành tuyết CO₂ hoặc lỏng. Loại tuyết CO₂ dùng bảo quản thực phẩm là khá tốt. Nếu trước khi nén khí CO₂ được làm sạch hấp phụ qua than hoạt tính thì tuyết CO₂ dùng làm bảo hoà các đồ uống tạo cho đồ uống có độ khoái cảm cao khi người sử dụng.

• Các sản phẩm thứ cấp

Trong quá trình lên men, ngoài rượu etylic và khí CO₂, ta còn thấy nhiều sản phẩm phụ khác. Đó là các sản phẩm thứ cấp. Chúng được tạo thành từ protein, nhưng chủ yếu là từ các axit amin. Phân định rạch ròi nguồn gốc các sản phẩm này là điều có lẽ không cần thiết. Vì vậy, khái niệm các sản phẩm phụ với hàm lượng thấp được coi là các sản phẩm thứ cấp. Các sản phẩm thứ cấp là glycerin, axit malic, axetaldehyt, axit axetic, axit pyruvic, axit lactic, axetic, diaxetyl, este, rượu bậc cao.

Cơ chế tạo thành các sản phẩm thứ cấp trong lên men chúng ta chưa thật hiểu biết được hoàn toàn. Song, người ta đã xác định được rằng, hai chất glycerin và axetaldehyt được sinh ra đầu tiên, các chất còn lại là các sản phẩm biến đổi tiếp theo.

Tỷ số các sản phẩm thứ cấp được thể hiện như sau:

$$G \geq 5m + 2a + a_{xa} + b + p + 2ax + 9l + 3x + 3y$$

G: glycerin

p: axit pyruvic

m: axit malic

a_x: axetoin

a_{xa}: axetaldehyt

l: axit limonic (xitric)

a: axit axetic

x: izoproanol (rượu)

b: 2,3-butylenglycol

y: izoamylic (rượu)

• Glycerin

Glycerin được tạo thành trong quá trình lên men khi axetaldehyt kết hợp với natri bisulfit (theo dạng lên men thứ hai của Neiberg) cũng như trường hợp lên men ở môi trường kiềm.

Trong quá trình đường phân theo EMP ở phản ứng thứ tư tạo ra phosphodioaxeton và chất này sẽ chuyển thành α-glyxerophosphat nhờ NAD⁺ xúc tác. Sau đó với sự có mặt của phosphataza glycerin và phosphoric axit được tạo thành. Lượng glycerin, theo Pasteur, tạo thành trong lên men rượu bình thường có thể đạt tới 9 g/l.

Trong sản xuất bia và rượu vang rất cần có một lượng glycerin tích tụ trong dịch lên men. Glycerin có vị ngọt và sánh bóng như dầu béo, nhưng rất dễ tan trong nước, trong

rượu. Vì vậy, lên men rượu vang có một lượng nhỏ glycerin được tạo thành sẽ làm cho hương vị sản phẩm được hài hoà và được cải thiện đáng kể. Khi pha chế rượu mùi người ta cũng thường cho thêm một lượng glycerin cùng với đường và chất thơm vào sản phẩm.

• Các axit hữu cơ

Các axit hữu cơ là sản phẩm lên men thứ cấp của nấm men, luôn gặp trong quá trình lên men rượu. Các axit này gồm có hai loại:

- các axit bay hơi gồm có axetic, izobutyric, butyric, izovalerianic, valerianic...
- các axit không bay hơi - axit lactic, citric, succinic, malic...

Axit axetic tạo thành ở giai đoạn đầu lên men và về cuối bị giảm đi. Một số chủng nấm men có thể đồng hoá được axit axetic như là nguồn cacbon. Axit axetic được tạo thành trong lên men rượu bình thường vào khoảng $0,3 \div 0,8$ g/l.

• Các rượu bậc cao

Các rượu bậc cao được tạo thành trong lên men rượu thường được gọi là fuzel (fusel) làm cho rượu có mùi hôi.

Các rượu bậc cao gồm có: n-propanol, izobutanol, 2-metyl-1-butanol, 3-metyl-1-butanol.

Có nhiều giả thuyết về sự hình thành rượu bậc cao và cho đến nay chúng ta vẫn nghiêng về thuyết nguồn gốc chúng tạo ra từ các axit amin: các axit amin được dezamin hoặc chuyển nhóm amin giữa các axit amin, tiếp theo là decarboxyl hoá các xetoaxit và khử aldehyt. Như vậy, rượu bậc cao có thể được tạo thành nhờ sự trao đổi chất hydratecacbon cùng với trao đổi chất chứa nitơ của nấm men.

Khối lượng và thành phần các loại rượu bậc cao phụ thuộc vào nguồn cơ chất, loài và chủng nấm men và cuối cùng là nhiệt độ lên men. Trong số rượu bậc cao thì hàm lượng rượu izoamylic là cao hơn cả.

Rượu bậc cao được hình thành chủ yếu trong pha sinh trưởng chỉ số (pha logarit). Quá trình này là kết quả của sự trao đổi chất kiến tạo được gắn liền với sinh sản và phát triển. Ở các pha sau các chất này được tạo thành ít hơn.

Nói chung, hương vị của các rượu bậc cao làm cho khẩu giác cảm thấy khó chịu, nhưng với hàm lượng thấp chúng kết hợp với axit hữu cơ tạo thành các este lại làm cho rượu thành phẩm có hương vị dễ chịu. Điều này giải thích cho các sản phẩm của rượu như vodka, rượu vang, bia, conhắc v.v... để tăng trữ càng lâu càng ngon.

• Aldehyt

Aldehyt là sản phẩm thứ cấp trong lên men rượu. Nó có mặt thường trực trong quá trình trao đổi chất của nấm men và nó cũng có thể tạo thành qua con đường oxy hoá các loại

ruợu. Aldehyt, mà chủ yếu là axetaldehyt, có trong sản phẩm ở điều kiện kỵ khí ít hơn so với hiếu khí. Hợp chất này với hàm lượng nhỏ hơn giới hạn cho phép sẽ làm cho đồ uống có cồn được tăng hương vị, nhưng quá sẽ gây ngộ độc, làm đau đầu cho người sử dụng, trước hết là ảnh hưởng xấu đến hương vị sản phẩm.

Sản phẩm tàng trữ lâu hoặc trong thời gian lên men phụ hàm lượng aldehyt sẽ giảm.

Trong số aldehyt có trong sản phẩm lên men còn có diacetyl - một sản phẩm thứ cấp rất được quan tâm đến trong sản xuất bia. Những sản phẩm thứ cấp loại này và một số nữa chúng ta sẽ trở lại ở phần hai của cuốn sách này.

• Lipit

Các dạng chất béo nói chung (lipit) được tạo thành trong hoạt động sống của nấm men, một số tham gia vào kiến tạo tế bào, một số được tích tụ thành chất béo tự do trong tế bào của một số loài nấm men.

Lipit là hỗn hợp các loại chất béo thực (este của các axit béo với glycerin - rượu đa chức), các chất sáp (este của axit béo với các rượu bậc cao), các phospholipit (chứa axit béo, glycerin, phospho vô cơ và amin hoặc axit amin), sterin.

Tổng hợp lipit ở tế bào nấm men gắn liền với trao đổi hydratecacbon.

Một số nòi của các giống nấm men có khả năng tổng hợp chất béo như sau:

Saccharomyces cerevisiae có thể tổng hợp được $12,6 + 42,8\%$ chất béo so với sinh khối khô

<i>Endomycopsis vernalis</i> (già nấm men)	45,0%
<i>Candida reukaufii</i> (nấm men mật hoa)	35,0%
<i>Rhodotorula gracillis</i> (nấm men màu đỏ)	70,0%

Các nòi này có thể dùng trong công nghiệp để sản xuất chất béo. Song, hiện nay vấn đề này không được chú trọng, ngoại trừ trong những năm chiến tranh thế giới lần thứ nhất ở thế kỷ trước.

Đặc biệt là trong tế bào nấm men rất giàu sterin, chủ yếu là ergosterin. Đây là một loại chất béo rất đặc biệt, đại thể nó được tổng hợp tới 3% chất khô. Ergosterin là tiền chất của vitamin D₂. Nếu phơi sinh khối nấm men dưới ánh nắng hoặc chiếu tia tử ngoại ta sẽ thu được vitamin D₂ - chất rất cần cho việc khắc phục bệnh còi xương ở người cũng như ở gia súc.

3.4.2.3. Rượu etylic

Rượu etylic là sản phẩm lên men chủ yếu của nấm men. Sản phẩm này sẽ được dành trọn trong phần hai - "Sản phẩm lên men và công nghiệp nấm men" của quyển sách này.

PHẦN THỨ HAI

CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN VÀ CÔNG NGHIỆP NẤM MEN

Chương 4

CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN

4.1. 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.

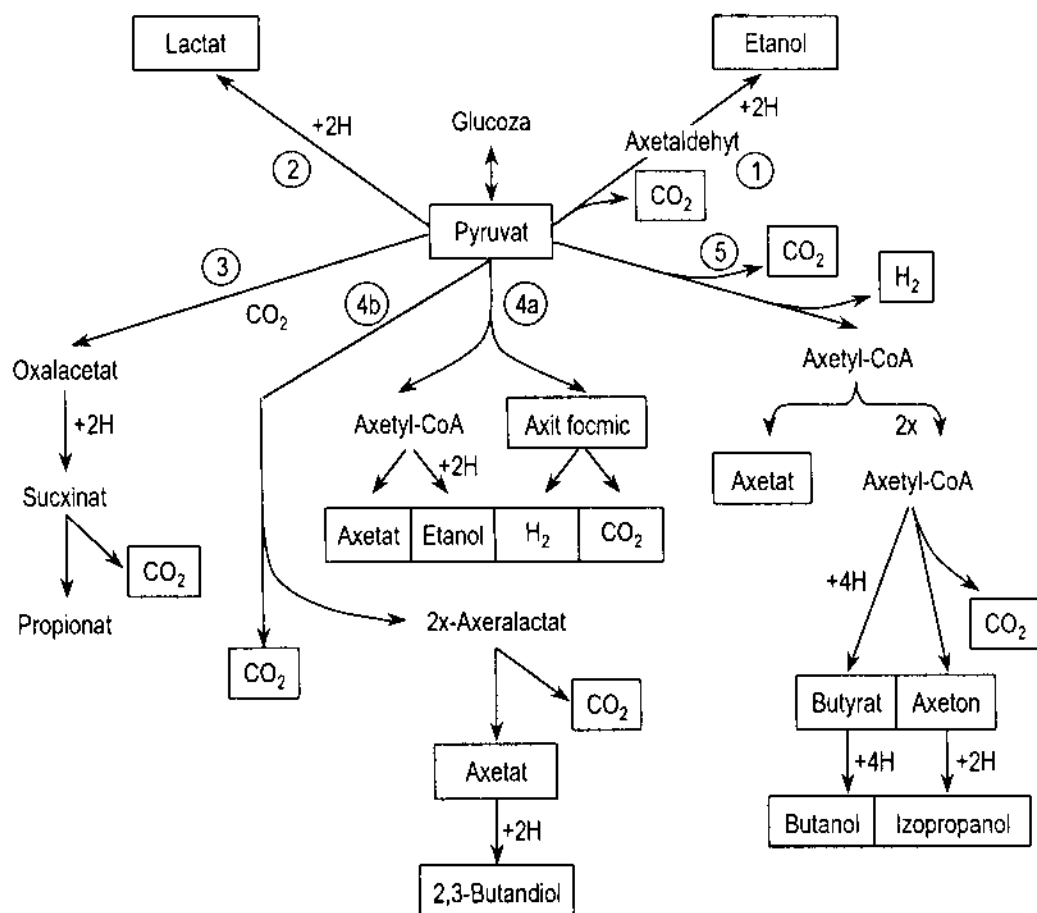
Đối với các chủng kỵ khí bắt buộc (sinh trưởng trong điều kiện không có oxy), trong tế bào không có hệ enzym hô hấp. Thay vào vị trí của oxy là các chất nhận hydro hữu cơ. Các chất này được hình thành trong quá trình trao đổi chất dị hoá.

Trong lên men rượu chất nhận hydro là axetaldehyt và chất này được khử thành etanol. Đối với tế bào thì 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 đối 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 Nucleotit 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. Nói chung, sản phẩm lên men thường không có một chức năng nào đối với tế bào. 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. Những kiểu lên men quan trọng nhất được trình bày bằng sơ đồ trên hình 4.1.

Một số vi sinh vật có tính 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 marcescens*). Trái lại, *Clostridium* lên men butyric thì có tính kỵ khí bắt buộc. Oxy là độc với đa số các loài *Clostridium* vì sự có mặt của các chất này sẽ dẫn đến tạo thành hydroperoxyt (H_2O_2) và các peroxit. Enzym catalaza và peroxitdismutaza 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.



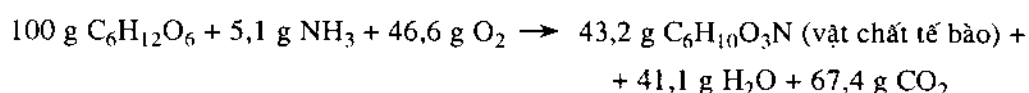
Hình 4.1. Khái niệm về quá trình lên men:

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*

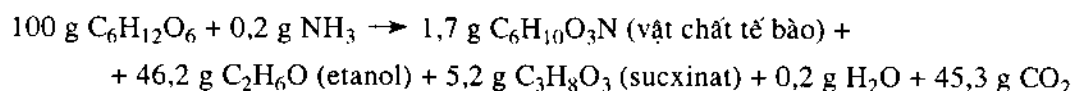
- **Lên men rượu:** lên men rượu (etanol) được thực hiện nhờ nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Nấm men này có tính kỵ khí không bắt buộc, chúng có khả năng hô hấp và lên men, khả năng lên men của các chủng là rất khác nhau. Sinh trưởng kỵ khí nghiêm ngặt ở *S. cerevisiae* chỉ xảy ra qua một vài thế 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 100 g glucoza sẽ tạo thành:

Thoáng khí:



Kỵ khí:



Nếu không cung cấp một nguồn nitơ có thể đồng hoá được thì không có 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.

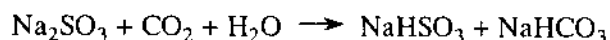
Trong điều kiện thoáng khí hay kỵ khí, tế bào vẫn cần một lượng ATP như nhau để duy trì sự trao đổi chất. Hậu quả là trong lên men thì glucoza được tiêu dùng nhiều hơn khoảng 10 lần so với trong hô hấp. Để tiến hành trao đổi chất một cách kinh tế, trong quá trình tiến hoá đã hình thành một cơ chế điều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

Trong sản xuất bia, người ta cũng 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 Pilsner 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 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 quan tâm.

- **Lên men glycerin** do *Saccharomyces* là sự biến dạng của quá trình lên men rượu. Trong lên men rượu, glycerin được tạo thành như một sản phẩm phụ với số lượng rất ít. Từ

lên men rượu có thể điều khiển thành lên men glyxerin. Môi trường được kiểm 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 bisunfit và tạo thành glyxerin nhiều hơn.



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

- **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 diacetyl do tự oxy hoá và 2,3-butadiol (2,3-butylenglycol; 2,3-dihydroxybutan).

Quá trình lên men này không được áp dụng trong sản xuất 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.

- **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* và *Cl. saccharobutylium* (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 lũy, nếu pH ở vùng trung tính thì sẽ tạo thành axit butyric. Các sản phẩm thu được nhờ cất phân đoạn.

- **Lên 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 hoặc không điển 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 được dùng bổ sung vào sản xuất thực phẩm và đồ uống, dùng làm nguyên liệu trong công nghiệp hóa 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 môi trường thủy sản, trong polyme hóa axit lactic làm đồ chứa đựng thực phẩm có thể bị phân hủy không gây ô nhiễm môi trường.

Các giống vi khuẩn lactic được dùng nhiều nhất trong công nghiệp là *Lactobacillus delbruckii* và *L. bulgaricus*. Khi lên men trong những nồi kín, không thông khí ở 50°C với môi trường là dịch thủy phân tinh bột và cặn sữa được bổ sung các axit amin, vì vi khuẩn có 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 ở $5,5 \div 6$, khi ấy axit lactic chuyển thành muối canxi.

Vi khuẩn lactic điển hình được sử dụng trong sản xuất các sản phẩm từ sữa, như sữa chua (*Lactobacillus bulgarius*, *Streptococcus thermophilus*) và phomat Harzer (*Streptococcus lactic* và các loài khác), đóng vai trò quan trọng cùng với 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 *Lactobacillus 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 đồng thời ức chế sự phát triển của *Clostridium* gây thối thức ăn cỏ (vi khuẩn này sinh ra axit butyric).

- **Lên men metan:** 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 là CO_2 . Quá trình này là quá trình thối rửa kỵ khí. Lên men metan cũng xảy ra trong dạ cỏ của động vật nhai lại, nó có vai trò quan trọng trong vòng tuần hoàn cacbon của tự nhiên. Trong các đầm lầy và thủy vực, chất hữu cơ được phân huỷ một phần thành metan – “khí đầm lầy”. Lên men metan được thực hiện trong các bể đáy kín. Trong quá trình thối rửa chất hữu cơ được chuyển thành khí tới $50 \div 80\%$, trong đó $55 \div 70\%$ là metan và $30 \div 45\%$ 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 phế phẩm. Metan sản xuất nhờ vi sinh vật có thể trở thành nguồn nguyên liệu có ý nghĩa to lớn. Theo cách này thì không những các phế 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 (*Methanococcus vanniellii*, *Methanobacterium ruminantium*, *Methanobacterium formicum*) còn khử cả formiat. *Methanosarcina backeri* ngoài H_2 còn sử dụng cả cacbonmonoxit, metanol và axetat làm cơ chất để khử CO_2 . Người ta còn biết vi khuẩn *Methanobacterium omelianskii* có thể tạo thành metan từ etanol. Ngoài ra, còn thấy các giống ưa nhiệt, như *Methanobacterium thermoautotrophium*. 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. Trong quyển sách này tác giả đề cập các quá trình lên men nhờ nấm men, chủ yếu là quá trình lên men rượu và các sản phẩm từ quá trình lên men.

Lên men rượu, như chúng ta đã biết, cần có những yêu cầu như sau:

- Nguồn đường có thể lên men: lên men rượu nói chung cần có mặt các loại đường đơn như glucoza, fructoza; đường đôi như saccaroza, maltoza... và một số đường khác. Trong số này tốt nhất là đường glucoza. Đối với lên men bia thì đường maltoza là loại đường tốt nhất và thích hợp nhất.

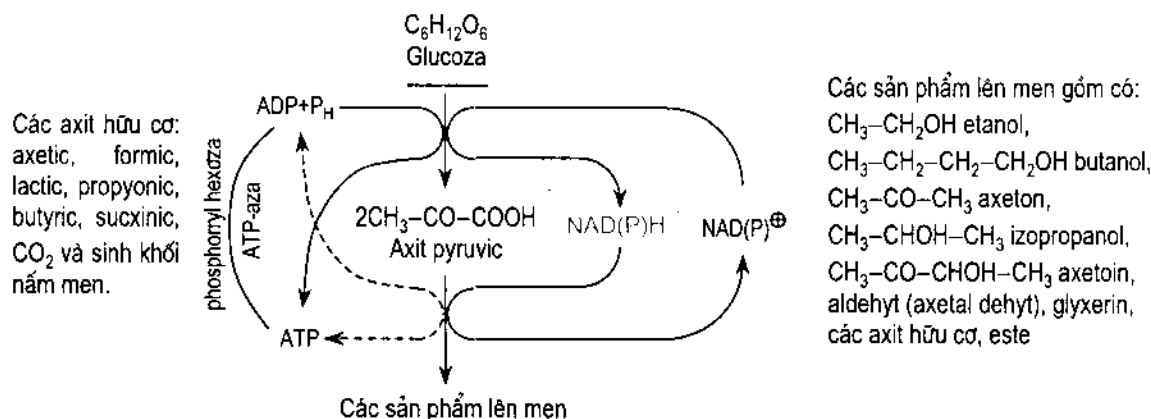
- pH môi trường là $4,5 \div 5,5$.

- Quá trình tạo cồn đòi hỏi kỵ khí, nhưng trong tất cả 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 ta 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 $25 \div 35^{\circ}\text{C}$, tối thích là $28 \div 32^{\circ}\text{C}$ (đối với lên men rượu nói chung), lên men bia có hai khoảng lên men (lên men chính $8 \div 12^{\circ}\text{C}$ và lên men phụ $1 \div 4^{\circ}\text{C}$), lên men rượu vang cũng có hai khoảng lên men (lên men chính $20 \div 25^{\circ}\text{C}$ và lên men phụ $10 \div 15^{\circ}\text{C}$ sau lên men phụ có thể giữ vang (tàng trữ) như nhiệt độ lên men phụ hoặc ở dưới 10°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 men bánh mì dùng giống *Saccharomyces*, bổ sung vào thức ăn chăn nuôi có thể dùng giống *Saccharomyces*, *Candida* và một số giống khác.

Cơ chế lên men rượu ở *Saccharomyces* được tóm tắt như sau (hình 4.2):



Hình 4.2. Cơ chế lên men rượu (sơ giản) ở *Saccharomyces*

4.2. CÁC SẢN PHẨM TỪ NẤM MEN

Xem mục 3.4.2 chương 3.

4.3. NHỮNG NHÂN TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HOẠT TÍNH CỦA NẤM MEN

Trong những chương trên chúng ta đã đề cập đến những nhân tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của nấm men. Trong phần này chúng ta cũng đề cập đến những nhân tố này ảnh hưởng đến hoạt tính của nấm men. Hoạt tính ở đây chúng ta nên hiểu là hoạt động sống và khả năng tạo ra các sản phẩm trao đổi chất hay là sản phẩm lên men của tế bào nấm men. Các yếu tố ảnh hưởng ở đây là nhiệt độ, oxy hoà tan hay độ hiếu khí, pH môi trường, hàm lượng sản phẩm chính tạo ra, thành phần môi trường và các điều kiện khác của môi trường nuôi cấy.

Từ nhu cầu về sinh lý và dinh dưỡng làm chúng ta thoát đầu thường nhầm tưởng ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng và các điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng và hoạt tính của nấm men là như nhau. Thực chất hai vấn đề này là khác nhau, thậm chí là rất khác nhau.

Trong quá trình nuôi cấy hay lên men thường được chia làm 2 pha: pha sinh trưởng và pha sản xuất. Trong pha sinh trưởng các chất dinh dưỡng tiêu hao phục vụ cho sinh sản và phát triển tăng sinh khối, sản phẩm chính của lên men do *Sacchrromyces* được tạo ra trong pha này một lượng nhỏ và bắt đầu từ sau khi giống nấm men bước vào giai đoạn sinh trưởng theo cấp số nhân (trong giai đoạn phát triển theo logarit). Trong pha sản xuất sản phẩm chính (rượu etylic) được tích tụ ngày một nhiều và điểm cực đại thường sau điểm cực đại của sinh trưởng và phát triển của nấm men.

Trong pha sinh trưởng các chất dinh dưỡng tiêu hao phục vụ cho sinh trưởng của nấm men, còn trong pha sản xuất nguồn cacbon dùng phục vụ cho tổng hợp các sản phẩm lên men, chủ yếu là rượu etylic. Vì vậy, trong môi trường chúng ta cần phải tính toán sao cho sau pha sinh trưởng nguồn phospho và nitơ cần cho nấm men được sử dụng hết hoặc gần hết, các nguồn chất sinh trưởng cũng tương tự như vậy, trong pha sản xuất còn chủ yếu là nguồn đường phục vụ cho việc tạo thành và tích tụ sản phẩm.

Quá trình lên men hai pha này chỉ là tương đối, không có sự tách biệt rõ ràng. Vì sản phẩm được tích tụ từ trong pha sinh trưởng. Ngày nay người ta quan niệm rằng, sự phát triển của nấm men, việc sử dụng nguồn đường và tạo rượu etylic là những quá trình xảy ra đồng thời và có quan hệ qua lại mật thiết với nhau. Tốc độ lên men ở giai đoạn phát triển logarit nhỏ gấp 33 lần so với các tế bào giống men nổi ở giai đoạn phát triển ổn định. Song, lượng sản phẩm tạo thành tối đa trong môi trường bao giờ cũng chậm hơn mức phát triển cực đại. Quá trình lên men hai pha vẫn đúng với các quá trình theo từng mẻ, còn lên men liên tục và bán liên tục các pha này xen kẽ vào nhau rất khó phân biệt. Đối với lên men thu sinh khối nấm men làm men bánh mì hoặc men thức ăn chăn nuôi thì lên men chỉ còn một pha: pha

sinh trưởng trùng với pha sản xuất. Khi sinh trưởng đạt cực đại thì kết thúc lên men hoặc nuôi cấy bán liên tục ta có thể liên tục cho thêm môi trường mới vào bằng số lượng dịch lên men đã có hàm lượng nấm men đạt cực đại ra khỏi nồi lên men.

4.3.1. Nhiệt độ

Một trong những nhân tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hoạt tính của nấm men là nhiệt độ.

Đối với sinh trưởng của đa số nấm men nhiệt độ tối thích vào khoảng $28 \div 32^{\circ}\text{C}$, nhưng với lên men thì lại không hoàn toàn trùng với khoảng nhiệt độ này. Đối với lên men rượu etylic để sản xuất rượu trắng (cồn thực phẩm, rượu Vodka, các loại rượu trắng truyền thống) nhiệt độ thích hợp là $30 \div 35^{\circ}\text{C}$, với lên men rượu vang là $20 \div 25^{\circ}\text{C}$, lên men bia là $6 \div 10^{\circ}\text{C}$ hoặc $8 \div 12^{\circ}\text{C}$ v.v...

Nói chung, nhiệt độ lên men cao ở khoảng $30 \div 35^{\circ}\text{C}$ sự bắt đầu tích tụ rượu etylic càng sớm, tốc độ lên men nhanh và kết thúc sớm, nhưng không lên men được hết đường (đường sót còn lại với một lượng khá lớn). Điều này có thể là nguy hiểm, vì đường sót sẽ được vi khuẩn lactic sử dụng để tạo thành axit lactic, làm chua dịch lên men, làm ảnh hưởng đến mùi vị sản phẩm, kể cả rượu trắng, bia và rượu vang. Lên men ở nhiệt độ cao cũng làm cho các vi khuẩn tạp nhiễm phát triển nhanh, gây cho sản phẩm nhiều biến đổi xấu về chất lượng.

Nhiệt độ không những chỉ ảnh hưởng đến cường độ lên men và sinh trưởng của nấm men mà còn ảnh hưởng tới sinh tổng hợp các sản phẩm phụ và thứ cấp. Nhiệt độ càng cao càng dễ sinh và tích tụ các sản phẩm loại này. Điều này không có lợi cho chất lượng của sản phẩm chính.

Nhiệt độ lên men cao dẫn đến tích tụ nhiều loại rượu bậc cao cũng như axetaldehyt. Nhiệt độ lên men tăng từ 10 đến 25°C kéo theo tăng hàm lượng axetaldehyt từ $1,25$ lên $21,5$ mg/l.

Giữa nhiệt độ và độ hiếu khí có quan hệ chặt chẽ với nhau. Nấm men thường sinh trưởng mạnh mẽ ở khoảng thời gian đầu của quá trình lên men (sau pha tiềm phát). Trong thời gian này dịch lên men có một lượng oxy hoà tan và nhiệt độ $25 \div 30^{\circ}\text{C}$ rất thích hợp cho nấm men sinh trưởng và lên men. Khi ở nhiệt độ thấp hiệu ứng này là rất thấp (sinh trưởng yếu và lên men kém, trừ lên men bia).

Hoạt tính hô hấp của nấm men bị giảm khi nhiệt độ xuống thấp. Cường độ hô hấp của nấm men ở 5°C có thể chỉ bằng $1/5$ so với ở nhiệt độ 30°C .

Nấm men cũng có loài chịu nhiệt và chịu lạnh. Những loài chịu nhiệt ở $40 \div 42^{\circ}\text{C}$ có lực lên men cao, nhưng năng lượng hô hấp giảm đáng kể. Lẽ dĩ nhiên là đặc điểm sinh lý của các loài này có những sự biến đổi trong quá trình trao đổi chất để phù hợp cho lên men và hô hấp.

Trong công nghiệp rượu cồn người ta thường chọn các chủng loài nấm men thích hợp cho lên men ở $30 \div 35^{\circ}\text{C}$, cho sản xuất rượu vang – $20 \div 25^{\circ}\text{C}$ và sản xuất bia – $8 \div 12^{\circ}\text{C}$. Đặc biệt là các chủng lên men rượu ở vùng khí hậu nhiệt đới như ở nước ta nếu chọn được các chủng lên men ở nhiệt độ cao $36 \div 38^{\circ}\text{C}$ mà vẫn không làm giảm chất lượng là rất tốt, vì lên men trong mùa hè nhiệt độ dịch có thể lên tới $38 \div 40^{\circ}\text{C}$. Nếu nhiệt độ này vẫn lên men bình thường, hiệu suất chuyển hoá không thấp hơn và chất lượng vẫn tốt thì đỡ tốn nước làm nguội, đỡ tốn điện năng bơm nước làm mát.

4.3.2. Oxy hoà tan - độ hiếu khí

Độ hiếu khí được thể hiện bằng lượng oxy (O_2) hoà tan trong môi trường, đơn vị tính là $\text{mg O}_2 / \text{l}$ môi trường. Cần chú ý một điều là ở nhiệt độ càng cao lượng oxy hoà tan trong dịch càng thấp.

Oxy hoà tan vào môi trường lỏng ở dạng bọt khí nhỏ làm kích thích sinh sản của nấm men và tạo điều kiện cho tế bào nấm men hô hấp. Trong trường môi trường có khuấy trộn và thổi khí làm cho bọt khí càng phân tán nhỏ và đều hơn. Do đó, tế bào nấm men càng được tiếp xúc với chất dinh dưỡng và oxy tốt hơn. Bình thường oxy hoà tan tối đa trong nước đến 9 mg/l . Nồng độ giảm xuống còn 1 mg/l nấm men sẽ ngừng sinh sản.

Thời gian đầu nấm men sinh trưởng mạnh nhờ có lượng oxy của không khí hoà tan vào dịch lên men. Nếu lượng giống tiếp vào lên men ít (còn xa mới tới lượng cần để cho lên men) người ta phải thổi khí (với điều kiện khí đã được lọc sạch bụi, tạp khuẩn) để cho giống nấm men sinh trưởng. Thời gian sinh trưởng ở giai đoạn đầu lên men có cường độ hô hấp khá mạnh, sau một thời gian (từ khi sinh trưởng đạt cực đại chuyển vào pha cân bằng) thì cường độ hô hấp giảm và quá trình chuyển sang lên men, tích tụ sản phẩm chính là rượu etylic. Trong điều kiện lên men cần phải kỵ khí và men giống ngừng sinh sản. Song, trong điều kiện này ta còn thấy nấm men còn sinh sản được $4 \div 5$ thế hệ tiếp theo và tận dụng các chất dự trữ trong tế bào và các enzym trong chuỗi hô hấp.

Do vậy, trong lên men với điều kiện kỵ khí ta có thể tính tổng số tế bào nấm men bằng cách tính gần đúng: với n là số lượng tế bào nấm men khi tiếp vào môi trường lên men thì tổng số tế bào sẽ là $X = n.2^4 \div n.2^5$.

Quá trình lên men rượu thường được thực hiện trong điều kiện kỵ khí, nhưng khi nấm men mới được nhân giống thì nhất thiết phải có một lượng oxy nào đó để nấm men sử dụng. Trong thực tế sản xuất đây là thời điểm duy nhất trong quá trình lên men rượu oxy có ích cho nấm men. Sau đó oxy phải loại bỏ hoàn toàn trong tất cả các công đoạn tiếp theo, bởi vì oxy sẽ ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng bia thành phẩm, đặc biệt là nó có thể làm mất tính ổn định của hương sản phẩm, đặc biệt là bia.

Oxy cũng gây ảnh hưởng mạnh tới hoạt tính của nấm men và đặc biệt là đến sự phát triển của giống vi sinh vật này. Một số enzym của nấm men chỉ phản ứng với oxy mà không

gây phản ứng với bất kỳ một chất nhận hydro nào khác, chúng ta nhận thấy hiện tượng này ở enzym oxygenaza - các enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các axit béo không no và các sterol. Các hợp chất này cấu thành màng tế bào chất và chúng có vai trò quan trọng về mặt chức năng cũng như tính đồng nhất của màng. Cả hai loại chất này đều cần oxy trong quá trình sinh tổng hợp của chúng.

Ở đây chúng ta cũng cần phải nhấn mạnh là theo Louis Pasteur thì nấm men cần có oxy để sinh sản và phát triển. Tuy nhiên, nếu sự có mặt oxy trong môi trường quá lượng cho phép trong lên men sẽ kéo dài pha sinh trưởng, giảm tốc độ lên men của tế bào nấm men và làm tăng hàm lượng đường sót trong bia thành phẩm. Do vậy, lượng oxy có mặt trong dịch nước malt không vượt quá mức yêu cầu. Nếu hàm lượng oxy vượt quá mức cho phép sẽ ảnh hưởng xấu tới hương vị của bia thành phẩm.

4.3.3. pH của môi trường

pH của môi trường lên men hay môi trường nuôi vi sinh vật nói chung có ảnh hưởng tới đời sống vi sinh vật rất lớn. Mỗi chủng vi sinh vật hay mỗi nhóm vi sinh vật có khoảng pH thích ứng hay tối thích cho sinh trưởng và phát triển.

Ở nhóm nấm men, với các giống men rượu *Saccharomyces* cũng có những pH tối thích khác nhau. Đối với men rượu và men bia thuộc giống *Saccharomyces* pH ban đầu thích hợp cho lên men là khoảng 5,5. Trong quá trình lên men pH giảm xuống $4,4 \div 4,5$ rồi lại tăng dần lên. Nguyên nhân giảm pH hay là tăng độ chua của môi trường được giải thích bằng sự tạo thành CO_2 và các axit hữu cơ trong quá trình.

Đối với men rượu vang có thể lên men ở pH là $2,8 \div 3,8$, so với men rượu thì men rượu vang chịu được độ axit cao hơn. Nâng cao độ axit của môi trường làm cho nấm men thay đổi hình dáng: tế bào trở thành nhỏ hơn với dạng hình tròn nhiều hơn, trong tế bào chất tích tụ các chất béo.

4.3.4. Khí CO_2

Dưới áp lực khí quyển CO_2 hoàn toàn không ảnh hưởng ức chế đến sinh trưởng của nấm men và lên men. Nếu loại bỏ CO_2 từ môi trường bằng nitor hoặc không khí quá trình lên men không tăng nhanh hơn. Nếu CO_2 tạo thành dần dần được hút ra bằng bơm chân không tốc độ lên men sẽ tăng nhanh hơn, nhưng không nhiều lắm. Khi khí quyển trên bề mặt dịch lên men được thay bằng CO_2 thì lực lên men của giống men bia có thể nâng cao gấp $3 \div 4$ lần. Khi bơm CO_2 vào môi trường với các chủng nấm men có lực lên men mạnh kích thước tế bào sẽ tăng lên, ngược lại với các chủng có lực lên men yếu sẽ nhỏ hơn.

Nói chung là dưới áp suất dư của CO_2 tế bào nấm men tăng lên đáng kể và có hình tròn nhiều hơn.

Khí CO₂ cũng như là chất trao đổi tự nhiên, trong nồng độ xác định cũng sẽ kìm hãm hoặc thậm chí đình chỉ sinh sản nấm men. Tính chất CO₂ làm quá trình hô hấp ở nhiều vi sinh vật chậm lại được áp dụng vào hàng loạt các quá trình công nghệ như bảo quản dịch nước quả, trái cây, trong hoàn thành phẩm bia, rượu vang, đồ uống có gaz.

4.3.5. Rượu etylic

Nấm men được gieo cấy vào môi trường lên men khoảng 1 ÷ 2 giờ đầu còn làm quen chưa phát triển, sau đó sẽ phát triển theo cấp số nhân và bắt đầu tích tụ rượu etylic.

Rượu etylic được nấm men tạo ra và được tích tụ trong môi trường ngày càng nhiều. Hàm lượng rượu cao dần sẽ làm cho nấm men sinh trưởng chậm dần và đến nồng độ nào đó sẽ làm cho nấm men, giảm hoạt tính, thậm chí có thể làm ngừng hẳn sự phát triển của nấm.

Các loại rượu khác cũng có tác dụng sát khuẩn và ức chế nấm men. Khả năng chịu được một nồng độ rượu nào đó của các chủng nấm men là không giống nhau. Nó phụ thuộc vào khả năng thích ứng và trao đổi chất của tế bào của từng chủng nấm men. Một chủng nấm men có khả năng tạo thành và tích tụ nhiều rượu etylic trong môi trường có nghĩa là chủng ấy có khả năng chịu đựng được độ rượu cao.

4.3.6. Thành phần môi trường

Thành phần môi trường nuôi cấy và lên men có ảnh hưởng lớn sinh trưởng của nấm men và trao đổi chất trong tế bào, đặc biệt là có thể quyết định cả hiệu suất lên men hoặc chuyển hướng lên men từ sản phẩm này sang sản phẩm khác. Thí dụ: trong môi trường có mặt chất natri bisulfit hoặc pH môi trường ban đầu là 7,5 ÷ 8,5 nấm men chuyển từ lên men rượu sang lên men glyxerin.

Trong môi trường có thể chia thành 4 nhóm thành phần là:

- Nguồn cacbon dinh dưỡng, chủ yếu là các loại đường có thể lên men.
- Nguồn nitơ dinh dưỡng.

- Các nguồn chất khoáng đa lượng, trung lượng và vi lượng. Trong số này P, K, Mg được coi là đa lượng và quan trọng nhất là phospho. Hàm lượng P cần đủ cho sinh trưởng nếu quá sinh trưởng sẽ kéo dài ảnh hưởng đến hiệu suất lên men. Cần chú ý là, chất này chỉ tham gia vào sinh trưởng và trao đổi chất là chủ yếu. Các nguyên tố K, Mg cũng cần xác định để bổ sung vào môi trường. Các nguyên tố khác cũng đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành các enzym hoặc hoạt hoá các enzym của tế bào nấm men. Thông thường các chất khoáng cần thiết cho nấm men và lên men đều có mặt trong nước sử dụng cùng với các nguyên liệu. Song, nước dùng cho lên men cũng cần phải quan tâm đúng mức trong công nghiệp vi sinh vật.

- Nguồn các chất sinh trưởng gồm các vitamin, các axit amin, peptit, nucleozit, nucleotit v.v...

Trong thực tế sản xuất người ta có thể dùng nguồn chất sinh trưởng là cao ngô, cao nấm men, dịch chiết từ rau quả, giá đỗ, dịch thủy phân từ protein (nước chấm, nước mắm) có mặt các axit amin, nucleozit, nucleotit, peptit, các vitamin, có mặt rất nhiều các chất khoáng. Như vậy, ta coi các loại này là nguồn nitơ hữu cơ, vitamin, khoáng: nguồn dinh dưỡng nitơ, nguồn các chất sinh trưởng và khoáng. Những nguồn này có ảnh hưởng ở các dạng lên men khác nhau cũng khác nhau. Trong các chương sau chúng ta sẽ đề cập tới vấn đề này. Với nguồn nitơ dinh dưỡng ta có thể bổ sung vào môi trường những muối amoni trước hết là amoni sulfat, amoni phosphat sau đó đến urê.

Trở lại các nguồn dinh dưỡng cacbon. Trong môi trường lên men nguồn cacbon phục vụ cho sinh trưởng và cho lên men tạo ra sản phẩm. Trong họ hàng men rượu *Saccharomyces* với các chủng khác nhau cần có các nguồn cacbon, là các đường khác nhau để lên men cũng khác nhau. Lên men rượu etylic cần hoặc là vật liệu lý tưởng cho lên men là đường glucoza, lên men bia - đường maltoza, lên men rượu vang - đường fructoza sau là glucoza.

Hiệu ứng Captree cho thấy sự ức chế của glucoza với hô hấp và ức chế quá trình đồng hoá maltoza. Khi quá trình hô hấp bị ức chế thì quá trình lên men xảy ra, thậm chí ngay cả khi có mặt oxy và nồng độ glucoza trong môi trường quá cao thì quá trình lên men vẫn xảy ra mạnh hơn so với hô hấp qua vòng Krebs. Các chủng nấm men nhạy cảm với glucoza thì quá trình hô hấp bị ức chế ngay cả khi có mặt glucoza với một lượng thấp (khoảng 0,4%) trong môi trường. Trong lên men bia nếu dịch malt chứa 1% glucoza cũng đã ức chế hô hấp của nấm men. Trong trường hợp nồng độ glucoza chưa đủ mức để ức chế hô hấp thì khi có mặt oxy glucoza sẽ bị “đốt cháy” hoàn toàn thành CO_2 và H_2O theo con đường glycoliz và qua vòng Krebs. Maltoza và maltotrioza được chứng minh là không gây ức chế đối với quá trình hô hấp.

4.4. NƯỚC TRONG CÔNG NGHỆ LÊN MEN

4.4.1. Yêu cầu về nước dùng cho pha chế môi trường dinh dưỡng

Trong công nghệ vi sinh vật nước có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất lên men và đến chất lượng sản phẩm vì các môi trường lên men (hoặc nuôi cấy) cần một lượng nước rất lớn. Nước dùng cho sản xuất lên men là nước sạch và mềm. Các chỉ số quan trọng của nước là: độ cứng, độ oxy hoá, vi sinh vật.

Độ cứng thể hiện ở sự có mặt của các ion Ca^{2+} và Mg^{2+} có trong nước. Các muối bicacbonat của hai ion này là độ cứng tạm thời (khi đun sôi chúng chuyển sang cacbonat và lắng cặn), còn các muối của các ion như: Cl^- , SO_4^{2-} và NO_3^- là độ cứng vĩnh cửu.

Độ cứng của nước tính bằng mg - đương lượng trong một lít nước:

$$1 \text{ mg - đương lượng} \approx 20,04 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ hoặc } 12,16 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{l}$$

Trước đây người ta tính độ cứng bằng độ Đức:

$$1^\circ \text{ Đức} = 10 \text{ mg CaO hoặc } 7,14 \text{ mg MgO/l.}$$

Như vậy: $1 \text{ mg - đương lượng/l} \approx 2,8^\circ$

$$1^\circ \approx 0,35663 \text{ mg - đương lượng.}$$

Độ oxy hoá của nước cho biết mức độ nhiễm bẩn của nước bởi các chất hữu cơ. Nó thể hiện bằng số $\text{mg O}_2/\text{l}$.

Chỉ số vi sinh vật cho biết mức độ nhiễm bẩn của nước bằng tổng số vi sinh vật và lượng vi khuẩn đường ruột (đại biểu là *E.coli*) có trong 1 lít nước. Nước dùng trong lên men nói chung phải đạt tiêu chuẩn dùng làm nước uống, không có mùi vị, không màu, trong suốt, đặc biệt là không có sắt và có mùi amoniac, không có các kim loại nặng (thủy ngân, bari, chì v.v...), có các chỉ tiêu sau:

Độ cứng chung (mg - đương lượng)	không quá	7
Cặn khô (mg/l)		1000
Cặn sunfat		500
Cặn clorua		350

Tổng lượng vi khuẩn trong nước:

Trực khuẩn *E.coli*:

Chuẩn coli, ml	không nhỏ quá	300
Chỉ số coli	không quá	3

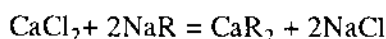
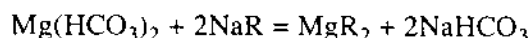
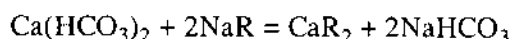
Nước không đạt yêu cầu trước khi đưa vào lên men cần phải lọc qua cát sỏi, phun mù để khử sắt và làm mềm nước bằng cách hấp phụ qua hạt nhựa trao đổi ion.

4.4.2. Xử lý nước bằng phương pháp trao đổi ion

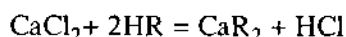
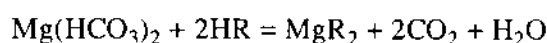
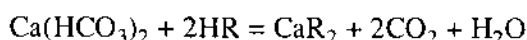
Phương pháp xử lý nước bằng cột trao đổi ion có nhiều ưu điểm và khả năng sử dụng rộng rãi. Hiện nay vấn đề thiết kế và lựa chọn tế bào còn nhiều khó khăn, đòi hỏi kinh phí lớn. Phương pháp này có tác dụng cao được sử dụng để xử lý nước cho lò hơi trong các dây chuyền sản xuất. Nhờ phương pháp trao đổi ion về phương diện lý thuyết có thể làm sạch tất cả các muối bao gồm các bicacbonat kiềm, lọc sạch muối một cách đơn giản. Đầu tiên muối được lọc qua lớp cation, khi đó nước chứa các axit tự do tương ứng với các anion có trong nước ban đầu. Tiếp theo qua lọc có anionit, khi đó nước có độ kiềm nhẹ. Quá trình làm mềm nước bằng trao đổi cation là quá trình trao đổi giữa các cation của các vật chất hoà tan trong

nước có khả năng sinh cấu trong lò hơi với cation của các vật chất không tạo thành cấu trong lò, những chất này gọi là cationit. Trong kỹ thuật chủ yếu sử dụng 3 loại cationit sau: natri, hydro và amoni ký hiệu là: NaR, HR và NH₄R trong đó R là gốc của cationit, không tan trong nước.

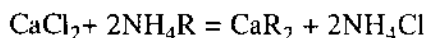
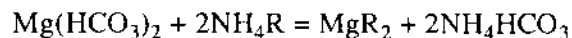
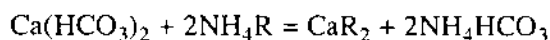
a) Khi dùng natri-cationit phản ứng xảy ra như sau:



b) Khi dùng hydro-cationit phản ứng xảy ra như sau:



c) Khi dùng amoni-cationit phản ứng xảy ra như sau:



Khi dùng natri-cationit toàn bộ độ cứng đều được khử, song độ kiềm có trong nước không thay đổi. Khi dùng hydro-cationit độ cứng và độ kiềm đều được khử, nhưng lại tạo thành các axit, không thuận lợi cho việc cung cấp cho lò hơi. Vì vậy người ta thường phối hợp 2 phương pháp trên.

Nếu dùng amoni-cationit, độ cứng giảm đi còn rất nhỏ nhưng các muối amoni tạo ra khi đưa vào trong lò sẽ phân huỷ nhiệt để tạo thành khí amoniac (NH₃) và axit theo phản ứng:

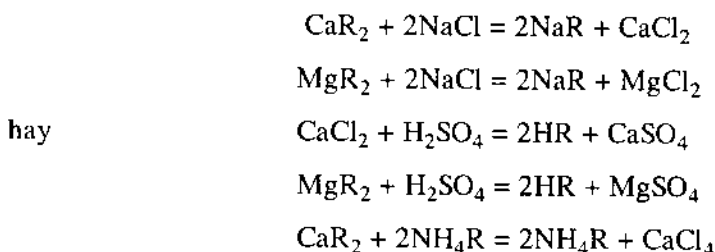


Việc sinh khí NH₃ cùng với sự có mặt của oxy trong nước gây nên ăn mòn kim loại đồng. Vì vậy amoni-cationit này cũng dùng để phối hợp với natri-cationit hoặc hydro-cationit.

Trong quá trình làm việc, các cationit dần dần bị kiệt hết các cation. Để phục hồi khả năng làm việc của các cationit người ta cho chúng trao đổi với các chất có khả năng cung cấp cation. Quá trình này gọi là hoàn nguyên cationit.

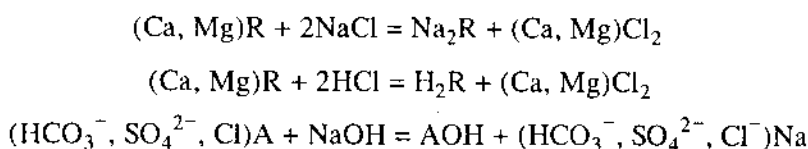
Để hoàn nguyên natri-cationit, người ta dùng dung dịch NaCl. Để hoàn nguyên hydro-cationit, người ta dùng dung dịch H₂SO₄ hay HCl. Để hoàn nguyên amoni-cationit, người ta dùng dung dịch muối amoni.

Các phản ứng hoàn nguyên xảy ra như sau:



Các liên kết tách ra sau khi hoàn nguyên là những liên kết tan trong nước và được thải ra khỏi lớp cationit bằng cách rửa.

Hạt nhựa trao đổi ion (cationit hoặc anionit) là những chất polyme hữu cơ bậc cao, chúng không hoà tan mà chỉ trương lên trong nước. Loại hạt nhựa để làm mềm nước thường được chế tạo ở dạng hạt nhỏ (hoặc khi dùng thì nghiền nhỏ) với kích thước cỡ $0,5 \div 1,5$ mm. Để làm mềm nước, thường người ta dùng các ion natri (hoặc hydro). Để loại bỏ các anion, người ta dùng các anionit có khả năng hấp phụ các anion: HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- ... và trao lại cho nước ion OH^- . Sau khi đã làm mềm nước, hạt nhựa được hoàn nguyên (còn gọi là tái sinh) bằng cách cho dung dịch nước muối (đối với natri-cationit) hoặc axit (đối với hydro-cationit) và dung dịch NaOH (đối với anionit) chảy qua lớp hạt nhựa, kết quả là khả năng trao đổi ion được phục hồi. Quá trình hoàn nguyên (tái sinh) cationit và anionit được thể hiện bằng các công thức sau:



Trong đó A là gốc của anionit, không tan trong nước.

Cột lọc cationit và anionit thường là những ống hình trụ, thẳng đứng, lớp nhựa trao đổi ion dày $1,5 \div 2,0$ m. Phần dung tích bỏ không ở trên cũng là để cho nước và để phòng khối hạt nhựa tăng thể tích khi làm tơi xộp chúng. Thao tác ở cột nhựa trao đổi ion như sau: đổ nước vào để xử lý, sau đó làm tơi xộp khối nhựa bằng một luồng dung dịch rửa chảy ngược từ dưới lên trên, tiếp đến là hoàn nguyên nhựa và lượng các chất hoàn nguyên còn dư thừa. Phương pháp xử lý nhựa kiểu này tạo điều kiện sử dụng nhựa rất nhiều lần, thậm chí sau vài năm sử dụng hoạt lực của nhựa thay đổi không đáng kể.

Chương 5

SẢN XUẤT CỒN – RƯỢU ETYLIC (ETANOL)

Từ xa xưa loài người đã biết sản xuất ra rượu etylic làm đồ uống. Ngày nay nghề làm rượu - cồn vẫn còn đang phát triển và chiếm tỷ lệ khá lớn trong các ngành kinh tế quốc dân.

Rượu với tư cách là đồ uống rất đa dạng và có nhiều mẫu mã khác nhau. Nói chung, người ta có thể chia ra thành rượu mạnh (khoảng trên 40° cồn), rượu thông thường (khoảng 30 ÷ 40°) và rượu nhẹ (dưới 30°). Ở các nước Phương Tây người ta sản xuất ra rượu trắng được gọi là Vodka, như ở Nga và một số nước khác, rồi chứa trong các thùng gỗ sồi thường có màu nâu vàng nhạt đến màu nâu sẫm với các hương vị khác nhau và có tên gọi khác nhau. Tình hình tiêu thụ các loại rượu trên thế giới có thể tới 4 ÷ 6 l/người/năm (tính ra cồn 100°), không tính bia và rượu vang.

Ngoài công dụng làm đồ uống, rượu - cồn etylic còn có khả năng làm nguyên liệu cho một số ngành kinh tế quan trọng: làm dung môi hữu cơ, nhiên liệu, dùng trong y tế, trong mỹ phẩm pha nước hoa, trong dược để trích ly các hoạt chất sinh học, sản xuất axit axetic và giấm ăn, sản xuất các loại este có mùi thơm, trong cao su tổng hợp và nhiều hợp chất khác v.v... Đặc biệt với khả năng dùng làm nhiên liệu (chất đốt) của cồn tuyệt đối hứa hẹn cho một ngành sản xuất nhiên liệu với nguyên liệu tái sinh - một viễn cảnh sáng sủa và rộng lớn. Mai đây các mỏ dầu và khí đốt trong lòng đất cạn kiệt thì cồn tuyệt đối có lẽ là một loại nhiên liệu thích hợp và nguyên liệu để sản xuất ra cồn có lẽ không bao giờ hết. Hiện nay nhiều hãng ô tô đã thử nghiệm thành công các mẫu động cơ chạy bằng cồn hoặc bằng hỗn hợp cồn - xăng. Trong tương lai không xa sẽ có những ô tô với động cơ loại này chạy trên đường. Chúng ta hy vọng chờ xem! Cồn đối với ngành công nghệ sinh học nói chung cũng như ngành công nghệ lên men sẽ cố gắng sản xuất ra các loại cồn thích hợp và giá rẻ có thể cạnh tranh được với xăng dầu, khí đốt.

Cồn etylic hay etanol: C_2H_5OH là một chất lỏng không màu, trong suốt, có vị nóng gắt và mùi đặc trưng.

Những hằng số vật lý của cồn etylic:

Tỷ trọng tương đối:

d_4^{20}	0,78927
d_{20}^{20}	0,79067

Nhiệt độ (°C):

nóng chảy	-114,3
sôi ở 760 mmHg	78,35
bốc cháy	12

Nhiệt lượng:

cháy, kJ/kg	26665
bay hơi ở 20°C	910
nóng chảy, kJ/mol	4,94

Độ nhớt, cP:

ở 0°C	1,78
ở 20°C	1,19

Etanol có tính co dẫn ở dạng hơi khá lớn, so với hơi nước gấp 2 ÷ 2,5 lần. Nó rất hút nước từ độ ẩm không khí cũng như từ các tổ chức (mô) động vật và thực vật, đặc biệt từ tế bào vi sinh vật. Do vậy, nó có tính sát khuẩn, vì khi cồn hút một lượng lớn nước từ tế bào sẽ có thể làm vỡ hoặc biến dạng tế bào vi khuẩn. Khi trộn 50% thể tích cồn với 50% thể tích nước ta thu được 96,4% thể tích hỗn hợp. Như vậy, cồn trộn với nước bị co thể tích.

Cồn etylic tinh khiết có phản ứng trung tính, nhưng cồn thu được theo phương pháp lên men có lẫn một lượng nhỏ axit hữu cơ, vì vậy nó có phản ứng axit nhẹ. Cồn và dung dịch cồn (nặng) - nước dễ bắt lửa bùng cháy với ngọn lửa xanh nhẹ và không có muội.

Hơi cồn trong không khí gây độc cho người, động vật và vi sinh vật. Giới hạn cho phép nồng độ ở không khí là ≤ 1 mg/l. Hỗn hợp không khí với hơi cồn ở nồng độ nào đó có thể là nguy hiểm, vì dễ phát nổ khi gặp tia lửa. Giới hạn nồng độ gây nổ của hơi cồn trong hỗn hợp là 2,8 ÷ 13,7% thể tích không khí.

Cồn etylic có thể được sản xuất bằng hai phương pháp chính là lên men và tổng hợp theo con đường hoá học.

Cồn sản xuất theo phương pháp lên men được dùng làm thực phẩm (đồ uống) và cồn kỹ thuật dùng cho các ngành khác. Cồn tổng hợp chỉ là nguyên liệu kỹ thuật không được dùng làm đồ uống.

Cồn kỹ thuật có thể sản xuất từ khí chứa etylen, dịch thuỷ phân từ gỗ (lên men), dịch kiểm sulfit trong công nghiệp giấy (lên men). Loại cồn này dùng làm nguyên liệu cho hàng loạt ngành công nghiệp khác nhau, như dung môi trong sản xuất cao su tổng hợp, sợi tổng hợp, lông - len tổng hợp, da nhân tạo, chất dẻo, phim ảnh, thuỷ tinh hữu cơ, chất nổ, chất độn, sơn, chất màu v.v... Có tới 150 ngành kinh tế quốc dân sử dụng cồn etylic.

Trong quyển sách này chúng tôi chỉ đề cập đến việc sản xuất rượu - cồn etylic theo phương pháp lên men.

5.1. NGUYÊN LIỆU SẢN XUẤT RƯỢU - CỒN ETYLIC

Nguyên liệu dùng để sản xuất rượu - cồn etylic gồm có:

- Các loại hạt, củ chứa nhiều tinh bột như các hạt ngũ cốc (gạo, ngô, đại mạch, hạt mì, cao lương v.v...) và các loại củ (sắn, khoai tây...);
- Các loại rỉ đường (từ mía hoặc từ củ cải đường);
- Dịch thủy phân từ gỗ (chủ yếu từ xenluloza và hemixenluloza).

Chúng ta chỉ làm quen với hai loại nguyên liệu trên, còn loại nguyên liệu thứ 3 ở nước ta chưa có cơ sở nào sử dụng nguồn nguyên liệu này để sản xuất lên men rượu.

5.1.1. Các nguồn nguyên liệu chứa tinh bột

Ở nước ta nguồn nguyên liệu để sản xuất rượu chủ yếu là gạo tẻ và gạo nếp, ở công nghiệp dùng ngô và sắn (chủ yếu) cùng với rỉ đường mía. Các loại rượu thủ công nấu từ các loại gạo nếp đã có truyền thống lâu đời và có loại sản phẩm đặc biệt của một số địa phương khá nổi tiếng. Rượu làm từ ngô cũng vậy. Cồn rượu từ sắn trong vòng 20 ÷ 30 năm gần đây cũng đã chiếm lĩnh được thị trường.

• **Sắn:** Sắn là loại củ chứa nhiều tinh bột. Củ sắn gồm 3 phần chính: vỏ, thịt củ và lõi. Ngoài ra còn cuống và rễ củ.

Vỏ gồm 2 phần: vỏ gỗ ở bên ngoài, cấu tạo chủ yếu là xenluloza, thường chiếm khoảng 1,5 ÷ 2% khối lượng củ; vỏ cùi cũng cấu tạo từ xenluloza nhưng trong vỏ cùi còn có mù sắn là các polyphenol, tới 85 ÷ 90% polyphenol của củ sắn nằm ở đây.

Thịt củ chứa nhiều tinh bột, ít protein và 1 lượng dầu, lượng polyphenol ở đây chỉ chiếm 10 ÷ 15%, nhưng các polyphenol gây trở ngại khi chế biến, đặc biệt là để sắn chày mù (nhựa) sẽ làm cho bột sắn biến màu, thay đổi mùi vị khó ăn trực tiếp khi luộc, khó thoát nước khi sấy hoặc phơi khô sắn lát hoặc sắn bột.

Thành phần hoá học của củ sắn tươi có thể là như sau (%): tinh bột: 20 ÷ 34; protein: 0,8 ÷ 1,2; chất béo: 0,3 ÷ 0,4; xenluloza: 1 ÷ 3,1; chất tro: 0,54; polyphenol: 0,1 ÷ 0,3; nước: 60 ÷ 74,2.

Trong củ sắn có một hợp chất có độc là phazeolumatin gồm hai glucosit: linamarin và lotaustalin. Hàm lượng chất này vào khoảng 0,001 ÷ 0,04 mg% và chứa chủ yếu trong vỏ cùi. Bình thường phazeolumatin không độc, nhưng khi bị thủy phân giải phóng ra HCN - gây độc. Khi hàm lượng HCN tới khoảng 50 ÷ 100 mg người ăn sẽ bị ngộ độc, cao hơn có thể dẫn đến tử vong (tùy mức ăn nhiều ít). Để tránh ngộ độc trước khi luộc ăn cần phải ngâm và bóc vỏ cùi. Sắn dùng trong sản xuất rượu là sắn lát khô hoặc sắn nạo thành sợi và bột sắn. Đối với sản xuất rượu thủ công người ta thường dùng sắn lát, sắn sợi đem đồ chín. Còn trong công nghiệp dùng bột sắn hoặc sắn lát nghiền nhỏ đem nấu thành cháo trước khi cho vào đường hoá.

• Các loại gạo tẻ, gạo nếp, tấm, ngô: đều là những nguồn nguyên liệu tinh bột rất tốt dùng để sản xuất rượu. Riêng đối với ngô, trước khi đem nấu rượu cần tách phôi để chế dầu cám và vitamin E, nếu còn phôi sẽ làm cho rượu có mùi vị khó chịu của chất béo trong phôi.

• Khoai tây: Khoai tây là loại củ có chứa nhiều tinh bột, một lượng nhỏ protein và nhiều vitamin. Khoai tây ở nhiều nước trên thế giới sử dụng làm nguồn thực phẩm loại rau quả, nhưng cũng có nước dùng như là nguồn lương thực cung cấp tinh bột và đặc biệt dùng khoai tây làm nguồn nguyên liệu sản xuất rượu Vodka hoặc rượu cần.

Thành phần hoá học trung bình của khoai tây như sau (%):

Nước	75,0	Xenluloza	1,0
Chất khô	25,0	Chất chứa nitơ	2,0
trong đó có tinh bột	18,0	Axit hữu cơ	0,6
đường	0,8	Chất béo	0,1
Pentozan và pectin	1,5	Chất khoáng	1,0

Hàm lượng tinh bột trong khoai tây dao động khá lớn: từ 12 đến 27%. Đường ở đây gồm có glucoza, saccaroza, fructoza, nhưng vượt trội là glucoza.

Vật chất chứa N của khoai tây gồm có protein, axit amin, amit, kiềm nitơ. Trong đó các chất protein là 44 ÷ 66% và các chất phi protein là 56 ÷ 34%. Có thấy 18 axit amin trong dịch khoai tây. Ngoài ra, trong khoai tây còn có những chất có độc tính là glycoalkaloid (colanin và chaconin), đặc biệt là khi khoai tây mọc mầm các chất này được giải phóng gây độc cho người và động vật ăn phải (với hàm lượng trên 20 mg%).

Dịch chiết của khoai tây có phản ứng axit nhẹ (pH 5,6 ÷ 6,2). Chất khoáng trong khoai tây chủ yếu là các muối của kali và phosphat. Trong dịch khoai tây có vitamin C tới 10 ÷ 25 mg% và một lượng nhỏ vitamin nhóm B, axit pantotenin, vitamin PP, biotin (vitamin H) và carotin (provitamin A). Thành phần hoá học của một số nguyên liệu tinh bột (%) được giới thiệu ở bảng 5.1 và 5.2.

Bảng 5.1. Thành phần hoá học của một số nguyên liệu tinh bột ở Việt Nam dùng sản xuất rượu

Thành phần	Sắn khô	Gạo tẻ	Tấm	Ngô	
				Vàng	Đá
Nước %	14	11	11,5	12,5	13,0
Gluxit lên men	67,6	69,2	41,0	68,4	72,6
Protit	1,75	7,3	5,3	8,3	7,2
Chất tro	179	0,9	17,7	1,6	1,1
Chất béo	0,87	1,2	2,0	5,1	4,1
Xeluloza	3,38	0,5	22,5	4,1	2,0

Bảng 5.2. Thành phần hoá học của một số hạt ngũ cốc

Giống hạt	Protein	Tinh bột	Chất béo	Xenluloza	Đường	Pentoza và hydratcacbon khác	Chất khoáng
Hạt mì	16	60	1,9	2,8	4,3	8,0	2,2
Ngô	10	70	4,6	2,1	3,0	7,0	1,3
Yến mạch	12	45	5,5	14,0	2,0	13,0	3,8
Đại mạch	12	55	2,0	6,0	4,0	11,0	3,5
Gạo tẻ	7	63	2,3	12,0	3,6	1,5	6,0

5.1.2. Rỉ đường

Rỉ đường hay còn gọi là mật rỉ, là một loại thứ phẩm của công nghiệp đường thu được ở công đoạn kết tinh đường. Có hai loại rỉ đường: rỉ đường mía và rỉ đường củ cải. Ở nước ta chỉ có rỉ đường mía. Năm 2000 nước ta đã trồng được khoảng $10 \div 12$ triệu tấn mía và được đưa vào sản xuất đường. Như vậy, ta có khoảng 350 đến 420 ngàn tấn rỉ đường (tính theo tỷ lệ chế biến đường thường thu được 3,5% là rỉ đường so với nguyên liệu).

Thành phần của rỉ đường phụ thuộc vào giống mía, thổ nhưỡng, điều kiện canh tác và công nghệ sản xuất đường. Lượng chất khô trong rỉ đường là $70 \div 75\%$ hoặc $80 \div 85\%$, phần còn lại là nước. Trong chất khô đường chiếm tới 60%, trong đó $35 \div 40\%$ là saccaroza và $20 \div 25\%$ là đường khử. Số còn lại là các hợp chất vô cơ và hữu cơ. Trong các hợp chất vô cơ thấy có mặt một số ion K^{2+} , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_3^{2-} ..., các hợp chất hữu cơ thấy có mặt pectin, furfural, một số axit hữu cơ, caramen và các chất màu khác, chất keo, một số axit amin, vitamin.

Trong sản xuất đường người ta hay dùng sulfit để tẩy trắng đường. Do vậy, trong rỉ đường có mặt axit formic do phân huỷ đường và các chất khác tạo thành, đồng thời có dư sulfit. Hai chất này có tác dụng kìm hãm phát triển của nấm men.

Thành phần hoá học của rỉ đường mía có 80% chất khô được dẫn ra với con số trung bình (theo số liệu của G. Olibrikh) trong bảng 5.3.

So với rỉ đường củ cải thì trong rỉ đường mía hàm lượng saccaroza thấp hơn, như đường hoàn nguyên (đường khử) lại tăng cao, hàm lượng các chất chứa N thấp. Rỉ đường mía thường có màu nâu thẫm, không có đường rafinoza, phản ứng ngả sang axit nhẹ ($pH\ 4,5 \div 6$ khi pha loãng 1 : 1), mùi thơm ngọt hơi chua giống như mùi trái cây. Trong số hợp chất hữu cơ phi đường không chứa N ta thấy có axit aconitic - $3 \div 7\%$ lượng chất khô, axit bay hơi - $0,6 \div 0,9\%$. Độ axit khoảng 4 ml $H_2SO_4\ 1\ N/100\ g$ rỉ đường.

Thấy có đủ mặt các axit amin có trong rỉ đường, nhưng vượt trội hơn cả là axit asparatic. Không thấy có betain (một hợp chất chứa N dạng protein) có trong rỉ đường mía.

Bảng 5.3. Thành phần hoá học của rỉ đường mía

Các chất thành phần	Hàm lượng % trong rỉ đường	Các chất thành phần	Hàm lượng % trong rỉ đường
Saccaroza	32	SiO ₂	0,5
Đường hoàn nguyên	30	SO ₃	1,6
Chất hữu cơ phi đường	10	Cl ₂	0,4
Chất tro	8	Na ₂ O + Fe ₂ O ₃ + Al ₂ O ₃	0,2
trong đó: K ₂ O	3,5	P ₂ O ₅	0,2
CaO	1,5	Tổng - N	5 ÷ 2,2
MgO	0,1	N-amin (không thuỷ phân)	0,2 ÷ 0,5
		Các colloid	0,2 ÷ 1,0

Các vitamin trong rỉ đường mía có những chất như sau (tính ra mg%):

Tiamin	0,5 (0,3) (*)	Nicotinamit	1,5 (5,1)	Biotin	0,15 (0,01)
Riboflavin	0,12 (0,04)	Axit pantotenic	7,0 (8,0)	Inozit	500,0 (700,0)
Pyridoxin	0,9 (0,54)	Axit folic	0,02 (0,02)		

Các số liệu trên đây ta thấy hàm lượng biotin trong rỉ đường củ cải không đủ cho nhu cầu sinh trưởng của nấm men khi ta pha loãng 4 ÷ 5 lần. Biotin trong rỉ đường mía cao hơn nhiều. Năm 1971 tác giả đã phân tích lượng biotin trong rỉ đường mía Việt Trì vụ 1970 - 1971 tại Viện Hoá sinh mang tên Bakh thuộc Viện Hàn lâm khoa học Liên Xô thấy có tới 75 mg% và tác giả đã dùng rỉ đường vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật với tư cách là nguồn biotin.

Đối với rỉ đường củ cải dùng để nuôi cấy nấm men người ta thường phải bổ sung biotin từ 100 ÷ 200 mg/1 tấn nguyên liệu.

Rỉ đường trong thời gian bảo quản thấy có mặt nhiều chủng loại và số lượng vi sinh vật (các loại tạp khuẩn), gồm có: *Leuconostoc mesenteroides*, vi khuẩn axetic, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Saccharomyces*, *Torula*, *Candida* v.v... Nếu rỉ đường có hàm lượng đường cao và trong thời gian bảo quản không bị pha loãng bằng nước mưa thì vi sinh vật vào khối rỉ đường không sinh sản được và không hoạt động. Chúng ở trạng thái nằm yên. 1 g rỉ đường có thể có 1.000 ÷ 10.000 vi sinh vật, có trường hợp chúng gây lên men rỉ đường và số lượng tế bào của chúng sẽ tăng lên khá lớn.

Yêu cầu rỉ đường làm nguyên liệu cho công nghiệp vi sinh vật là như sau: chất khô không ít hơn 75%, hàm lượng saccaroza từ 35 đến 50%, pH 6,5 ÷ 8,5, hàm lượng N-chung không ít hơn 1,4%, số lượng vi sinh vật không quá 15.000CFU/g nguyên liệu.

(*) Số liệu trong ngoặc đơn (...) là hàm lượng vitamin trong rỉ đường củ cải.

Khi sử dụng rỉ đường ta có thể dùng con số sau đây để tính toán pha môi trường (%):

Saccaroza	50	Chất tro	%
Đường khử	$6 \div 9$	Có thể dùng làm nguồn biotin	

Cần bổ sung thêm:

Nguồn N là urê hoặc amoni sulfat.

Nguồn P là supephosphat (khoảng 1% so với rỉ đường).

Rỉ đường trước khi đem sử dụng cần phải được xử lý: pha loãng 1 : 1, axit hoá bằng H_2SO_4 hoặc HCl tới pH = 2,8 ÷ 3,0 và gia nhiệt trong vài giờ. Nhiệt độ thấp nhất là 75°C, nếu kết hợp khuấy thì càng tốt (đẩy SO_2 ra khỏi rỉ đường).

5.2. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT RƯỢU

Sản xuất rượu bằng phương pháp lên men được áp dụng phổ biến từ thời cổ xưa. Theo phương pháp này, rượu được lên men từ các dịch đường nhờ các nòi nấm men trong điều kiện kỵ khí. Nguyên liệu dùng trong sản xuất rượu là các loại ngũ cốc, sắn, khoai tây, rỉ đường, các loại nước quả và gỗ. Ngoài sản phẩm chính là cồn etylic trong quá trình lên men còn tạo thành khí CO_2 , glyxerin, một vài loại cồn bậc cao, aldehyt, các axit hữu cơ và sinh khối nấm men tích tụ đồng thời với sự hình thành các sản phẩm.

Sản xuất rượu bằng phương pháp lên men bao gồm ba giai đoạn:

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

Các nguyên liệu lên men trừ các hợp chất đường, các nguyên liệu khác (các loại chứa tinh bột và xenluloza) cần phải qua quá trình đường hoá. Những chất chứa xenluloza như gỗ, mùn cưa, rơm rạ... thường dùng axit clohydric hoặc sunfuric để đường hoá. Các chất có bột thường đường hoá bằng hệ enzym amylaza của thóc mầm hoặc của nấm mốc. Đường hoá các chất bột cũng có thể dùng axit, nhưng cần phải có thiết bị chịu axit và tốn kém về kinh tế. Nấm mốc dùng để đường hoá thường dùng các giống *Aspergillus* hoặc gần đây có chiều hướng dùng các giống giả nấm men *Endomycopsis*. Các giống này có khả năng sinh ra nhiều enzym glucoamylaza - có tác dụng chuyển tinh bột thành glucoza. Trong quá trình lên men thường dùng các nòi nấm men thuộc giống *Saccharomyces cerevisiae*.

Hiện nay sản xuất rượu chủ yếu dùng hai nguồn nguyên liệu là nguồn tinh bột gạo, ngô, khoai, sắn và rỉ đường.

Lên men rượu từ các loại nguyên liệu chứa tinh bột về nguyên lý không khác với nguồn nguyên liệu khác, còn về phần chế biến nguyên liệu cần phải qua đường hoá để biến tinh bột thành đường. Các nòi men rượu không có enzym đường hoá được tinh bột, vì vậy

nhất thiết phải qua khâu đường hoá. Hiện nay trên thế giới dùng nhiều phương pháp đường hoá khác nhau và do đó sản xuất rượu từ các nguồn nguyên liệu tinh bột được mang tên các phương pháp đường hoá.

Nguyên liệu chứa tinh bột cần phải nấu chín để các màng tế bào tinh bột bị phá vỡ, tinh bột chuyển thành dạng dễ tan. Có như vậy hệ enzym amylaza mới tác dụng phân giải tinh bột được dễ dàng. Nguyên liệu thường được nấu chín ở $130 \div 140^{\circ}\text{C}$ dưới áp lực, sau đó mới đường hoá.

5.2.1. Phương pháp đường hoá bằng axit

Theo phương pháp này, giai đoạn nấu và giai đoạn đường hoá xảy ra đồng thời. Các axit dùng trong mục đích này là axit clohydric với tỷ lệ 8 ÷ 10% hoặc axit sunfuric với tỷ lệ 2 ÷ 5%. Kết quả thu được là một dạng dịch đường glucoza.

5.2.2. Phương pháp men thuốc bắc

Men thuốc bắc có từ lâu đời ở nước ta cũng như ở Trung Quốc. Ở miền núi nhân dân còn dùng men lá để nấu rượu. Đặc điểm của phương pháp này là trong men thuốc bắc có các loại nấm mốc và nấm men; nấm mốc phân giải tinh bột thành đường và nấm men chuyển hoá đường thành rượu. Hai quá trình xảy ra liên tục và người ta tưởng rằng chúng xảy ra đồng thời. Thuốc bắc gồm 20 vị, trong đó có 6 vị chính, được nghiền nhỏ trộn lẫn với bột và cho nhiễm nấm mốc, nấm men từ không khí rơi vào, sau đó nặn thành từng bánh giữ ở chỗ khô ráo hoặc gói kín để gác bếp dùng dần. Phương pháp nấu rượu thủ công hoặc rượu nếp vẫn dùng men thuốc bắc đã tán nhỏ. Để một vài giờ mốc phát triển và sinh ra hệ enzym thuỷ phân tinh bột, sau đó ủ và cho lên men. Rượu nấu bằng men thuốc bắc từ gạo nếp cho chất lượng cao, hương vị đậm đà.

Phương pháp lên men rượu bằng men thuốc bắc cho hiệu suất thấp, nhiều khi chỉ đạt khoảng 50% so với lý thuyết.

5.2.3. Phương pháp maltaza

Tác nhân đường hoá trong phương pháp này là thóc malt (thóc đại mạch nảy mầm) hoặc các loại thóc nảy mầm. Trong các hạt nảy mầm có hệ enzym amylaza (α -amylaza và β -amylaza) thuỷ phân tinh bột thành các dextrin và maltoza. Sản phẩm thu được chủ yếu là dịch đường maltoza.

Phương pháp này trước đây chủ yếu được dùng ở các nước giàu đại mạch như châu Âu và Mỹ, nhưng ngày nay được thay thế dần bằng phương pháp myco-malt.

Phương pháp amyloza (amylose): Khoảng năm 1895, một số nhà bác học người Pháp là Calmette, Colette, Boidin đã nghiên cứu dùng nấm men để lên men rượu tại Lille và Viện Pasteur Sài Gòn áp dụng cho Việt Nam. Kết quả đã tìm ra được một loài mốc là *Amylomyces rouxii* có khả năng đường hoá tinh bột và phương pháp này được mang tên là Amyloza.

Phương pháp này dễ cơ khí hoá toàn bộ dây chuyền sản xuất, kỹ thuật nuôi cấy mốc và lên men tương đối gọn. Nhưng đồng thời cũng có nhược điểm là yêu cầu vô trùng tuyệt đối, thời gian lên men dài (khoảng 6 + 8 ngày, có khi tới 9 + 10 ngày).

5.2.4. Phương pháp myco-malt (có nghĩa là mầm mốc)

Nấm mốc được nuôi cấy theo phương pháp bề mặt hoặc phương pháp chìm sinh ra nhiều enzym amylaza dùng để đường hoá tinh bột. Amylaza của nấm mốc là α -amylaza, glucoamylaza và dextrinaza. Sản phẩm đường hoá là hỗn hợp các dextrin cuối, maltoza và glucoza (trong dịch đường chủ yếu là glucoza).

Dùng phương pháp này cho phép rút ngắn được chu trình sản xuất (chỉ bằng $1/3 \div 1/2$ thời gian của phương pháp amyloza), thời gian đường hoá từ 1 + 3 giờ. Nhờ khả năng đường hoá của mốc cao, nên có thể dùng nhiều nguồn nguyên liệu tinh bột khác nhau để sản xuất rượu. Trong khi lên men rượu không đòi hỏi vô trùng tuyệt đối mà vẫn có thể đạt được hiệu suất lên men cao. Trong giai đoạn sản xuất mốc đường hoá dùng phương pháp bề mặt nên khó cơ khí hoá, cần diện tích mặt bằng rộng và đòi hỏi nhiều nhân công.

Phương pháp myco-malt tương đối thích hợp với nhiều quy mô sản xuất rượu từ trung ương đến địa phương. Nhiều nước trên thế giới, kể cả những nước tiên tiến hiện nay áp dụng phổ biến phương pháp này. Ở nước ta áp dụng nấm mốc trong sản xuất rượu từ năm 1959 tại nhà máy rượu Hà Nội.

Sản xuất rượu từ rỉ đường không cần phải qua khâu đường hoá, nhưng cần phải xử lý để loại bỏ tạp chất và những vi sinh vật có sẵn trong rỉ đường. Để tăng cường dinh dưỡng cho nấm men cần phải bổ sung vào môi trường rỉ đường các muối phosphat và muối amoni sulfat hoặc dịch men tự phân. Trong lên men người ta dùng bổ sung dịch chiết từ superphosphat hoặc axit phosphoric làm nguồn phospho.

5.3. VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT RƯỢU

Trong sản xuất rượu, người ta thường dùng những nhóm vi sinh vật sau:

- Nấm men, để lên men dịch đường thành rượu.
- Nấm mốc, để thủy phân dịch hồ tinh bột thành đường.
- Vi khuẩn lactic, dùng để axit hoá dịch đường trước khi lên men.

Trường hợp dùng vi khuẩn lactic không phải là phổ biến, nhưng thực tế sản xuất đã cho thấy dùng nhóm vi khuẩn này đảm bảo quá trình lên men thuận lợi hơn, nâng cao được dinh dưỡng cho nấm men (vi khuẩn lactic tích tụ các hợp chất nitơ để được nấm men đồng hoá) và tăng được hiệu suất tạo thành rượu.

5.3.1. Nấm men

Trong sản xuất rượu, người ta thường dùng những nòi nấm men thuộc giống

Saccharomyces cerevisiae (hình 5.1a). Giữa các nòi này có các đặc điểm khác nhau. Đối với lên men dịch đường từ tinh bột thường dùng một số nòi khác với khi lên men rỉ đường. Các nòi lên men rượu cần phải có những tính chất sau:

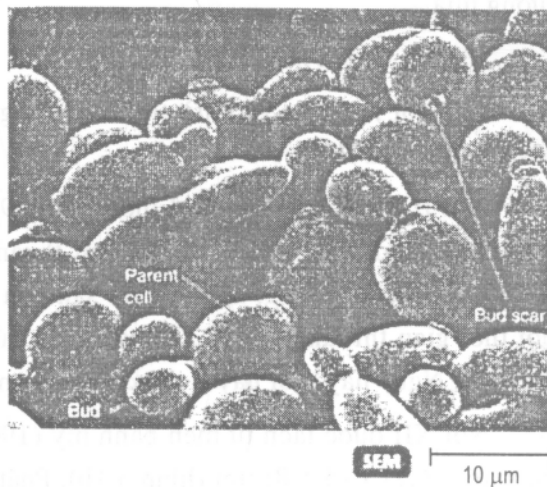
- Có sức phát triển mạnh trong dịch đường lên men.
- Có khả năng tiết ra hệ enzym zyma để lên men nhanh chóng và hoàn toàn.
- Có thể lên men được ở nhiệt độ tương đối cao của mùa hè.
- Có khả năng chịu được độ cồn cao trong quá trình lên men.
- Chịu được môi trường có độ axit cao.

Nhiệt độ tối thích hợp đối với sinh trưởng của nấm men trong khoảng $25 \div 30^{\circ}\text{C}$, còn nhiệt độ tối thiểu khoảng $2 \div 3^{\circ}\text{C}$. Ở 40°C , sinh trưởng ngừng lại và men bị chết. Trong môi trường có nồng độ đường cao nấm men ngừng các quá trình sống. Đối với các nòi nấm men khác nhau, nồng độ đường thích hợp cũng không giống nhau. Các giống men rượu là loại nấm men nổi có khả năng lên men mạnh, có thể lên men được mono và disaccarit, cũng như một phần dextrin (chủ yếu là dextrin cuối).

Các nòi lên men rượu đều thuộc giống nấm men *Saccharomyces* (kể cả lên men bia, rượu vang và men bánh mì). Các nòi men này được chia làm hai loại: men nổi và men chìm. Nên nhớ rằng ở đây là men nổi và men chìm, không phải là lên men nổi hoặc lên men chìm như ở nhiều tài liệu và sách vở của các tác giả khác thường dùng nhầm các thuật ngữ này.

- Men nổi là các chủng nấm men khi lên men hay phát triển trong dịch nuôi cấy, chúng tạo thành từng đám với lớp bọt tương đối dày và duy trì trong suốt thời gian lên men. Sau khi kết thúc chúng (những tế bào nấm men) mới lắng dần xuống đáy và tạo thành một lớp xác men không chặt chẽ.

- Men chìm khi phát triển trong dịch nuôi cấy và lên men không tạo thành lớp bọt dày trên bề mặt dịch và các tế bào lắng dần xuống đáy thùng tạo thành lớp cặn men khá chặt chẽ. Đặc biệt nổi bật của men chìm là lắng nhanh tạo cho dịch lên men trong suốt có độ trong sáng và các nòi men có enzym α -galactozidaza nên có thể dùng hoàn toàn đường rafinoza cho lên men, còn các nòi men nổi chỉ có một số là đồng hoá được 1/3 rafinoza thành rượu và CO_2 .



Hình 5.1a. Tế bào *Saccharomyces cerevisiae*
(chụp dưới kính hiển vi điện tử)

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

a) Một số nòi men rượu

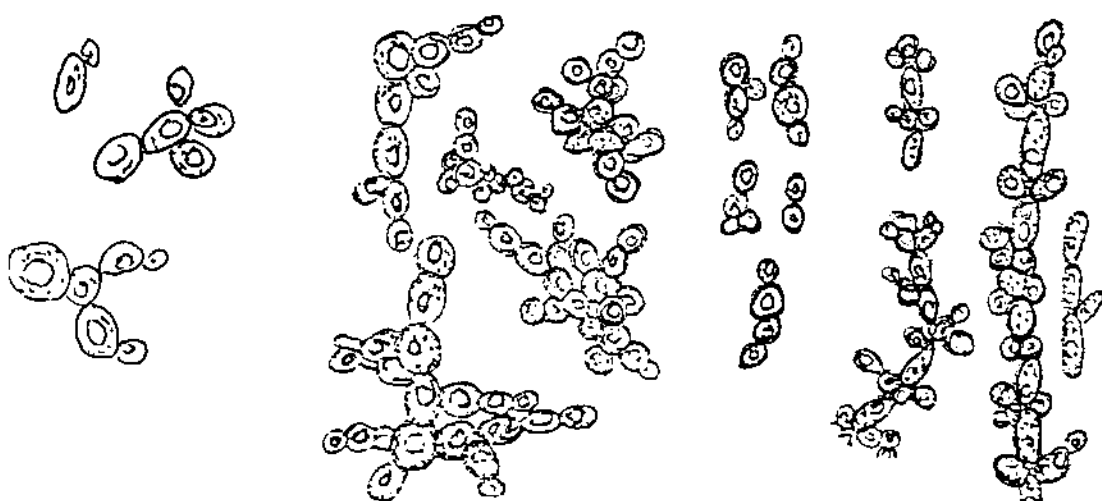
Đối với lên men rượu từ tinh bột dùng các nòi II, XII, M, R₂₁₁..., lên men rỉ đường dùng nòi 396 và Я (Ia).

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 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 $5 \div 7 \mu m$. Sinh sản bằng lối nảy chồi. Ngày nay, nòi này ít được dùng trong sản xuất rượu.

Nòi XII được tách từ men bánh mì (1902). Tế bào hình tròn hoặc hình trứng, có kích thước $(6 \div 6,2) \times (5 \div 8) \mu m$ (hình 5.1b). Phát triển và sinh sản của nòi này rất nhanh. Nó có thể lên men được glucoza, galactoza, maltoza, manozo, 1/3 rafinoza 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 thủy phân từ gỗ hoặc dịch kiềm sunfit.

Nòi M, thực ra đây không phải là một nòi 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 rafinoza. 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 R₂₁₁ được phân lập từ men thuốc bắc ở nhà máy rượu Hà Nội. Tế bào hình ô van, có kích thước $(3 \div 5) \times (5 \div 8) \mu m$. Nó có thể lên men được glucoza, saccaroza, maltoza, fructoza, rafinoza. 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 ÷ 140 g/l và ở 160 ÷ 180 g/l vẫn có thể lên men được, nhưng hiệu suất chuyển hoá thấp.



Hình 5.1b. Men rượu, nòi XII

Nồng độ rượu tạo thành trong môi trường lên men là $10 \div 12\%$. Nhiệt độ lên men thích hợp là $28 \div 32^\circ\text{C}$, nhưng tới 38°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. R₂11 có khả năng chịu được chất sát trùng Na_2SiF_6 trong 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 fructoza, maltoza, saccaroza, glucoza, mannoza, galactoza, nhưng không lên men được arabinoza và dextrin. Nhiệt độ thích hợp cho phát triển là 33°C . Nồng độ rượu tạo thành trong môi trường lên men của nòi này tới 10%.

Nòi Я được tách từ rỉ đường do Yakubovskii (năm 1916), có khả năng lên men trong dịch đường có nồng độ cao và tạo thành cồn nhiều. Lên men được glucoza, fructoza, saccaroza, galactoza, maltoza chỉ lên men được 1/3 và hoàn toàn không lên men được dextrin, lactoza. Tế bào Я hình ô van có kích thước $(5 \div 6) \times (6 \div 7) \mu\text{m}$, 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 rượu từ rỉ đường của Liên Xô cũ.

b) Bảo quản giống lên men

Giống nấm men thuần khiết được bảo quản để giữ được các đặc tính ban đầu. Có nhiều phương pháp bảo quản nấm men. Ở các nhà máy thường giữ giống nấm men trên môi trường thạch - malt hoặc môi trường nước đường hoá - thạch đối với những giống lên men từ tinh bột, còn đối với những giống lên men từ rỉ đường thường dùng môi trường hỗn hợp thạch - malt - rỉ đường. Các ống nghiệm giống thạch nghiêng được giữ ở nhiệt độ $4 \div 10^\circ\text{C}$ và định kỳ cấy chuyển lại hai lần trong một tháng (mỗi kỳ cấy chuyển nên sơ bộ làm trẻ hoá

bằng cách nuôi chuyển qua dịch đường hoá hoặc rí đường có thêm các nguồn muối khoáng). Có thể bảo quản giống dưới lớp dầu parafin hoặc vazolin vô trùng. Phương pháp này có thể hàng năm mới cấy chuyển lại.

c) Nuôi cấy nấm men trong quá trình lên men rượu

Trong nổi lên men cần phải tiến hành nhân giống để men giống sinh sôi đủ lượng tế bào có khả năng lên men tùy 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.

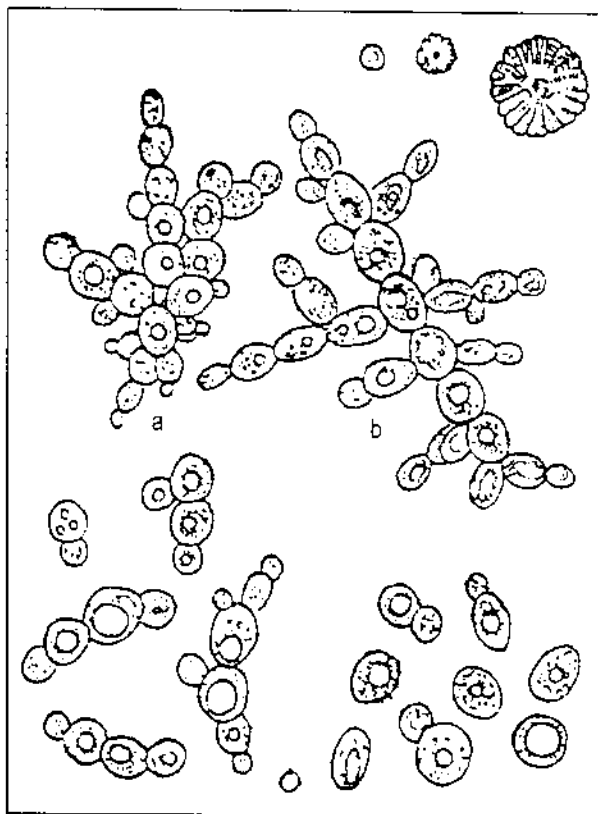
a- Các tế bào trẻ (khoảng $12 \div 16$ giờ nuôi cấy). Tế bào men từ hình tròn đến hơi ô van. Nảy chồi nhiều, có khi tới $70 \div 80$ số tế bào nảy chồi. Không có hoặc không thấy không bào.

b- Nấm men trưởng thành (khoảng 48 h). 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 $10 \div 15\%$). 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.

• Nuôi cấy nhân giống nấm men



Hình 5.2. 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

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 $120 \div 160 \cdot 10^6$ tế bào/ml dịch men giống (sau khi nuôi cấy 20 giờ).

Giống từ môi trường thạch nghiêng cấy sang bình môi trường lỏng 100 ml rồi cấy chuyển sang bình 500 ml, tiếp theo 5 l, 10 l, 100 l, 1000 l, 5000 l... Nuôi men từ thùng 100 l cần phải thổi khí và khoảng 1 ÷ 2 giờ khuấy trộn môi trường một lần. Trong quá trình nuôi cấy cần duy trì nhiệt độ thích hợp đối với từng nổi men, nói chung cần giữ nhiệt độ ở khoảng $30 \div 32^\circ\text{C}$.

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

Đối với tinh bột thường dùng môi trường nước đường hoá có nồng độ $12 \div 14^\circ \text{Bx}$ hoặc $6 \div 7^\circ \text{Bé}$ và $\text{pH} = 4,5 \div 4,8$ (tương đương với $1,2 \div 2 \text{ g/l H}_2\text{SO}_4$). Đối với men rượu ri đường dùng môi trường ri đường đã được xử lý như sau: ri đường pha loãng tới 40°Bx điều chỉnh bằng H_2SO_4 tới $\text{pH} 4,5$, đun sôi 1 giờ, rồi để yên 1 ÷ 2 ngày, lọc bỏ cặn. Ri đường sau khi xử lý pha loãng tới $12 \div 14^\circ \text{Bx}$ ($6 \div 7^\circ \text{Bé}$), thêm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: $0,2 \div 0,5\%$, supephosphat: $0,2 \div 0,5\%$, điều chỉnh pH tới $4,5 \div 4,8$ (tương đương với $1,5 \text{ g/l H}_2\text{SO}_4$).

Môi trường ở các nổi nuôi giống tiếp theo cũng giống như trên, nhưng được thêm chất sát trùng Na_2SiF_6 - $0,02\%$. Trong nổi lên men chính dịch đường cần đạt tới nồng độ $90 \div 120 \text{ g/l}$ (khoảng $12 \div 14^\circ \text{Bx}$), pH cần phải ở khoảng $4,5 \div 4,8$ 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 $\text{pH} = 2,7 \div 3$ 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 cấy trong dịch đường mới để lên men.

d) Đánh giá chất lượng nấm men trong sản xuất

Những nổi 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 glucoza, maltoza 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 $10 \div 15\%$, lượng tế bào chết không quá $2 \div 4\%$ (số này tăng

lên 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 trong 1 ml môi trường không thấp hơn $120 \div 149$ triệu. Khi soi kính không được thấy các vi khuẩn chuyển động, còn vi khuẩn không chuyển động không quá $4 \div 6$ tế bào trong một trường nhìn của kính hiển vi.

Các nòi men rượu rỉ đường cần lên men được saccharoza, glucoza, rafinoza (1/3 hoặc hoàn toàn).

5.3.2. Nấm mốc và thu nhận chế phẩm enzym để đường hoá tinh bột

5.3.2.1. Nấm mốc dùng trong sản xuất theo phương pháp myco - malt

Nấm mốc dùng để đường hoá các nguồn nguyên liệu tinh bột trong sản xuất rượu là *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. usami*, *A. awamori*, *A. batatae*...

Mốc *Aspergillus* đã được dùng phổ biến trong sản xuất tương, nước chấm ở các nước phương Đông từ lâu đời. Giống mốc này có hệ khuẩn ty (hệ sợi) không màu hoặc vàng nhạt. Có hai loại khuẩn ty: khuẩn ty khí sinh phát triển trên bề mặt môi trường và khuẩn ty dinh dưỡng ăn sâu vào môi trường đặc (còn gọi là khuẩn ty cơ chất). Khuẩn ty phân nhánh có nhiều vách ngăn tế bào. Tế bào có hạch nhân. Cuống đính bào tử không phân nhánh dài và thẳng đầu có nhiều cuống nhỏ. Tùy loại có cuống nhỏ 1 tầng hoặc 2 tầng. Tất cả cuống nhỏ có hình chai và gọi là tế bào hình chai, khi trưởng thành sinh ra các đính bào tử ở đầu cuống. Các đính bào tử xếp thành chuỗi dài và càng tận cùng càng lớn dần. Những chuỗi đính bào tử xếp đối xứng từng toả tròn trên chóp nang trông như đoá hoa cúc. Đính bào tử điển hình thường hình cầu, đơn bào, đa hạch bề mặt xù xì. Do cuống sinh bào tử và đính bào tử có màu sắc nên màu của chúng trở thành màu của khuẩn lạc mốc. Các khuẩn lạc của mốc *Aspergillus* thường là: vàng, vàng lục, đen, tro, nâu v.v...

a) Một số mốc đường hoá

Aspergillus oryzae còn gọi là mốc vàng. Đầu tiên có màu vàng lục sau có màu nâu thẫm. Chiều cao của cuống sinh bào tử $1 \div 2$ mm. Mốc này sinh ra các enzym amylaza, invertaza, maltaza, proteaza và catalaza. Mốc phát triển trong khoảng nhiệt độ $15 \div 40^{\circ}\text{C}$, tối thích $30 \div 32^{\circ}\text{C}$. Trong giống này có nhiều chủng được dùng trong sản xuất rượu, sản xuất nước chấm.

Aspergillus flavus cũng gọi là mốc vàng rất giống *A. oryzae*, chỉ khác là kích thước nhỏ hơn, các tầng cuống hình chùy mang đính bào tử và khuẩn lạc có màu trội về xanh lục hơn. Lúc đầu khuẩn lạc mốc có màu vàng sáng, sau chuyển thành màu nâu ôliu. Chiều cao của cuống sinh bào tử là $0,4 \div 1$ mm. Mốc này sinh ra các hệ enzym giống *A. oryzae*, đặc biệt là proteaza rất hoạt động và chế phẩm tinh khiết của enzym này được dùng làm tác nhân ổn định bia. Ở một số môi trường có chất béo (trên lạc) mốc này có thể sinh ra độc tố aflatoxin.

Có một số tác giả xếp hai giống mốc vàng này thuộc nhóm *A. oryzae-flavus*.

Aspergillus niger thường gọi là mốc đen. Sợi mốc màu trắng nhưng đính bào tử màu đen. Từ cuống đầu tiên mọc tiếp 2 ÷ 4 nhánh cuống nhỏ rồi mới tiếp đến các bào tử. Mốc sinh ra enzym amylaza, invertaza, maltaza, proteaza, pectinaza, glucooxydaza. Mốc này được dùng trong sản xuất rượu, sản xuất axit xitric, axit fumaric. Proteaza do mốc này hoạt động ở pH 2,5 ÷ 3,5, còn ở proteaza của *A. oryzae* không hoạt động ở vùng pH này.

Aspergillus niger có hoạt tính amylaza đường hoá khác nhau ở những chủng khác nhau. Một số chủng được sử dụng để đường hoá tinh bột trong sản xuất rượu hoặc mật - bột (xiro glucoza). Mốc này có thể chịu được pH thấp, nhiệt độ thích hợp là 30 ÷ 33°C và dễ phát triển trên môi trường tinh bột.

Aspergillus awamori và *Aspergillus usami* gần với *A. niger* có khả năng sinh ra nhiều dextrinaza và glucoamylaza sinh ra ít hoặc trung bình. Mốc này được dùng nhiều trong công nghiệp rượu để đường hoá tinh bột.

b) Nuôi cấy mốc đường hoá: Các chế phẩm enzym đường hoá

Nuôi cấy mốc để sản xuất tương hoặc xì dầu ở các nước phương Đông có từ thời cổ xưa. Năm 1884 J. Takamine (Nhật Bản) đã nuôi cấy *A. oryzae* trên gạo, sau đó thay gạo bằng cám mì và thu được chế phẩm enzym bằng cách chiết qua nước rồi kết tủa bằng cồn. Năm 1915 mốc này được dùng rộng rãi trong sản xuất rượu ở Mỹ theo quy trình công nghệ của Takamine và được dùng phổ biến trên thế giới để dung dịch các nguồn nguyên liệu tinh bột trước khi lên men rượu cho đến nay.

Hiện nay trong công nghiệp rượu thường dùng các chủng khác nhau của mốc nhóm *A. oryzae-flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. usami*, *A. batatae* theo hai phương pháp nuôi cấy bề mặt và nuôi cấy chìm...

Phương pháp nuôi cấy bề mặt nấm mốc đường hoá thường dùng cám mì làm cơ chất. Cám mì cần phải lớn và có hơn 20 % tinh bột. Cám được thêm một ít formalin và axit clohydric để tăng hiệu quả thành trùng dưới áp lực hơi nước nóng 1 atm trong khoảng 1 ÷ 2 giờ.

Nói chung nuôi cấy đường hoá theo phương pháp bề mặt gồm 4 giai đoạn:

- Chuẩn bị giống và nhân giống để thu được mốc trung gian;
- Chuẩn bị và thanh trùng môi trường nuôi cấy;
- Nuôi cấy mốc trên khay, mảnh, nong, nia... trên các giá trong các buồng nuôi mốc có những điều kiện thích hợp để mốc sinh ra enzym tối đa.

Đập nhỏ, sấy và đóng gói mốc cám khô.

Mốc giống *A. awamori* được giữ trong phòng thí nghiệm trên môi trường thạch - malt ở chỗ tối 18°C. Cứ 3 tháng một lần cấy chuyển trên môi trường nước malt có 7% chất khô

với 3% thạch và 0,09% axit nitric.

Mốc trước khi đưa vào sản xuất được cấy trên môi trường thạch - malt 7 ÷ 8 ngày rồi chuyển vào bình tam giác 500 ml có 10 g cám mì được làm ẩm bằng 6 ml nước đã axit hoá và thành trùng 1 giờ. Nuôi ở buồng ẩm 30°C trong 3 ngày, sau đó chuyển sang nuôi ở khay nhôm hoặc màng với điều kiện tương tự đến khi mốc sinh bào tử nhiều. Mốc cám thu được này gọi là mốc trung gian dùng để cấy trộn vào môi trường sản xuất tiếp theo.

Môi trường sản xuất cũng được chuẩn bị tương tự và san đều trên các khay hoặc màng, nong... chiều dày lớp môi trường 2,5 ÷ 3 cm. Tỷ lệ mốc cấy chuyển tiếp khoảng 0,2 ÷ 0,4%.

Nuôi mốc trên khay trong các buồng từ 24 ÷ 26 đến 30 ÷ 36 giờ và kết thúc khi mốc sắp đến giai đoạn tạo thành bào tử. Trong quá trình nuôi cần lật và bẻ nhỏ cám vì hệ sợi mốc phát triển làm cơ chất kết thành bánh.

Mốc cám sau khi nuôi cấy có độ ẩm 40 ÷ 50% cần phải sấy khô không quá 45°C đến khi độ ẩm còn 10 ÷ 12%, nghiền nhỏ. Mốc cám khô đựng trong các bao hoặc thùng kín, bảo quản ở chỗ mát (dưới 20°C) và để dùng dần. Cũng có thể dùng mốc cám có độ ẩm 45 ÷ 50% (chưa sấy) vào đường hoá trực tiếp.

Qua nghiên cứu và thực tế thấy dùng cám mì làm cơ chất rắn nuôi cấy mốc đường hoá thu được kết quả cao nhất. Trường hợp không có cám mì có thể thay bằng các môi trường có những thành phần sau:

- Môi trường bột ngô: bột ngô nhỏ mịn, vàng - 75%; trấu nhỏ có 1/8 ÷ 1/10 vỏ lúa - 25%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,5%.
- Môi trường tấm gạo: tấm gạo tẻ - 80%; trấu nhỏ - 20%.
- Môi trường cám bổi: cám gạo có 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Quá trình nuôi cấy mốc trên những môi trường này tương tự như trên môi trường cám mì.

Phương pháp nuôi cấy chìm thường dùng các mốc *A. niger*, *A. usami*, *A. batatae-61*.

Quá trình nuôi cấy gồm các giai đoạn:

Chuẩn bị giống và nhân giống.

Pha chế môi trường dinh dưỡng.

Nuôi cấy mốc trong thùng lên men, thu dịch men có hoạt lực cao.

Mốc giống dùng từ ống nghiệm hoặc từ mốc cám trong các bình tam giác nhân giống như trong phương pháp bề mặt. Nhân giống có thể qua cấp 1 ở trong bình tam giác và cấp hai trong các thùng nhân giống có sục khí. Môi trường nhân giống gồm dịch lọc bã rượu từ các nguyên liệu tinh bột được bổ sung 1,5% bột mì hoặc bột ngô (có khi dùng 2 ÷ 3% cám); 0,5% cao ngô; 0,5% KNO_3 ; 0,1 ÷ 0,2% MgO hoặc 0,2% CaCO_3 ; pH = 5,6 ÷ 5,8. Môi trường được thanh trùng 1 ÷ 1,5 atm/giờ. Trong mỗi bình tam giác 750 có 130 ÷ 150 ml môi trường.

Nhân giống trong bình tam giác trên máy lắc 200 ÷ 220 v/phút ở 30 ÷ 32°C khoảng 72 giờ, sau đó nhân giống tiếp trong các nồi 2 vỏ có khuấy và sục khí (40 ÷ 60 m³/h) ở 30 ÷ 32°C khoảng 24 ÷ 30 giờ.

Môi trường dinh dưỡng nuôi mốc để sinh enzym như sau:

Dịch lọc bã rượu	97,8%
Bột	1,5 ÷ 2%
Cao ngô	0,5%
MgO hoặc CaCO ₃	0,2%
pH	5,6 ÷ 5,8

Trong môi trường cần có 1,2 ÷ 1,7 g% chất khử (không tính pentoza) và N tổng: 220 ÷ 280 mg% (đối với *A. batatae* chỉ cần 1%).

Quá trình nuôi mốc cần phải sục khí (15 ÷ 20 m³/giờ) và khuấy, có thể trong 18 giờ đầu không cần khuấy vì mốc mới phát triển, độ nhớt thấp, vì vậy chỉ cần sục khí cũng đủ trộn môi trường. Thời gian nuôi cấy khoảng 60 ÷ 72 giờ ở 30 ÷ 32°C.

Dịch men sau khi nuôi cấy được thêm 0,2% formalin làm chất bảo vệ và dùng để đường hoá dịch cháo ở nhiệt độ 56 ÷ 57°C với tỷ lệ 75 ÷ 100% (tùy thuộc vào hoạt lực enzym). Đối với nấm men lên men các dịch đường từ tinh bột môi trường cần phải có các hợp chất nitơ để đồng hoá. Trong trường hợp dùng mốc đường hoá là *A. awamori* chỉ có các enzym amylaza (còn proteaza hoàn toàn không có). Vì vậy, trong dịch đường hoá không có các hợp chất nitơ để đồng hoá đối với nấm men. Các hợp chất nitơ này là hỗn hợp các axit amin được thuỷ phân từ protein dưới tác dụng của enzym proteaza. Để giải quyết vấn đề này có thể dùng hỗn hợp chế phẩm enzym *A. oryzae* nuôi cấy theo phương pháp bề mặt giàu proteaza và của *A. awamori* nuôi cấy theo phương pháp chìm. Sử dụng hỗn hợp này cho phép giảm lượng chế phẩm cần thiết xuống 2 lần và nâng cao được hiệu suất lên men nói chung. Người ta còn dùng hỗn hợp *A. oryzae* nuôi cấy bề mặt và *A. usami-45* hoặc *A. batatae* nuôi cấy chìm cũng cho kết quả tốt.

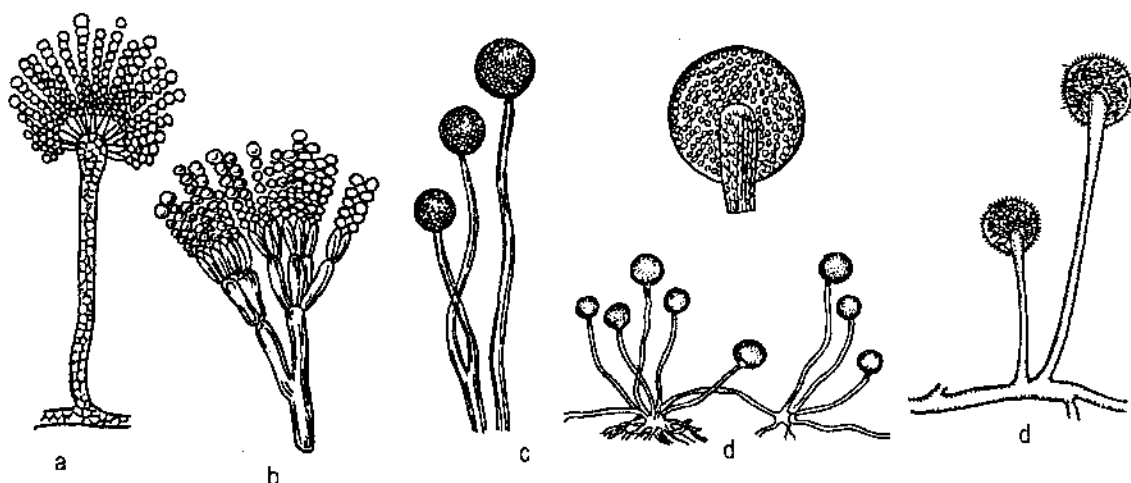
Đánh giá chất lượng mốc đường hoá theo hoạt lực amylaza, dextrinaza, glucoamylaza và proteaza.

Các hình 5.3, 5.4 và 5.5 giới thiệu hình thái một số nấm mốc và sơ đồ công nghệ nuôi cấy nấm mốc để thu nhận chế phẩm enzym dùng trong sản xuất rượu.

5.3.2.2. Công nghệ nuôi cấy nấm mốc để thu chế phẩm amylaza đường hoá tinh bột

Quá trình công nghệ thu nhận chế phẩm enzym amylaza được thực hiện theo hai phương pháp: nuôi cấy bề mặt được áp dụng ở nhiều nhà máy rượu trên thế giới (ở nước ta

hầu như chỉ với phương pháp này) và được giới thiệu tóm tắt ở hình 5.4; nuôi cấy chìm với nấm mốc và đặc biệt với *Endomycopsis* (một giống giả nấm men sinh nhiều glucoamylaza) - phương pháp này tóm tắt ở hình 5.5.



Hình 5.3. Hình thái một số nấm mốc hay gặp trong sản xuất rượu
a- *Aspergillus*; b- *Penicillium*; c- *Mucor*; d- *Rhizopus*

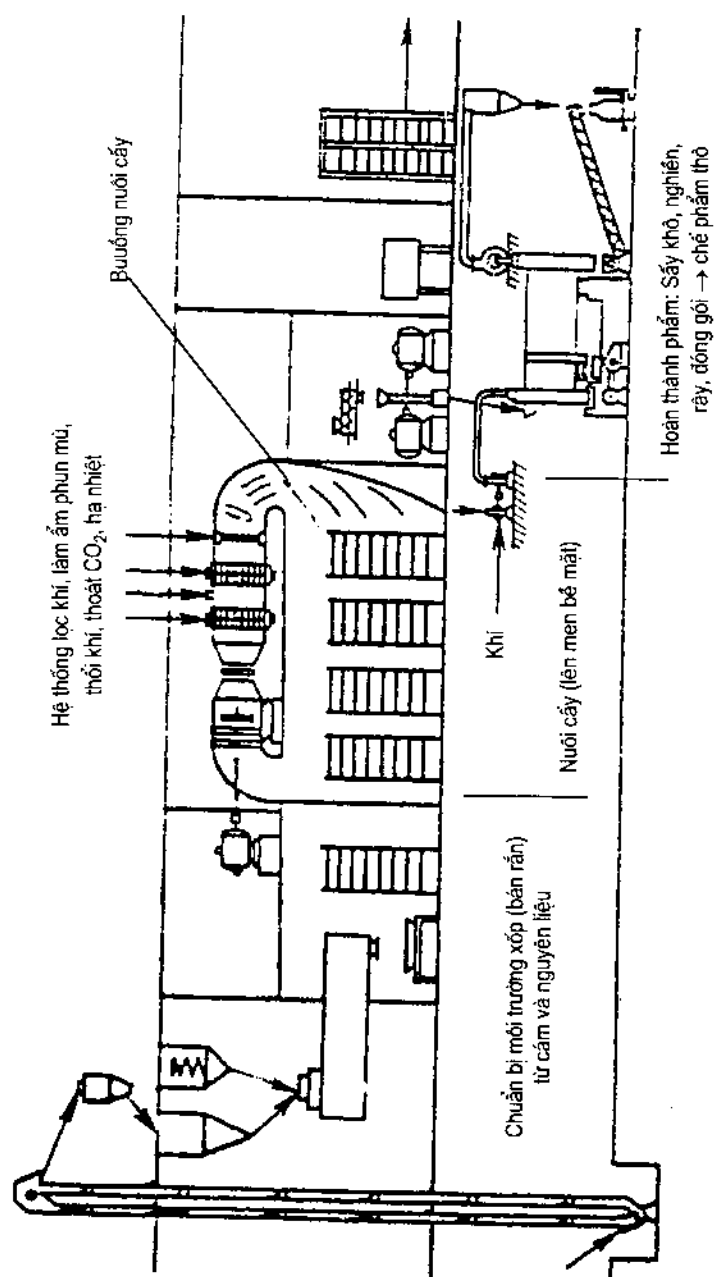
Chế phẩm thu được ở dạng thô theo phương pháp bề mặt được ký hiệu là BmX, có tới 90% là chất khô và nuôi cấy chìm - Cx và có thể được sử dụng vào việc đường hoá hồ tinh bột.

Các chế phẩm này được đánh giá hoạt lực enzym qua các thông số: A - amylaza, D - dextrin và GluA (Glucoamylaza). Các chế phẩm thu được thường có hoạt lực enzym: BmX có A = $35 \div 70$ đv/mg; D = $500 \div 2500$; GluA = $100 \div 800$; Cx có A = $10 \div 300$ đv/mg; D = không xác định; GluA = $700 \div 1000$ đv/ml.

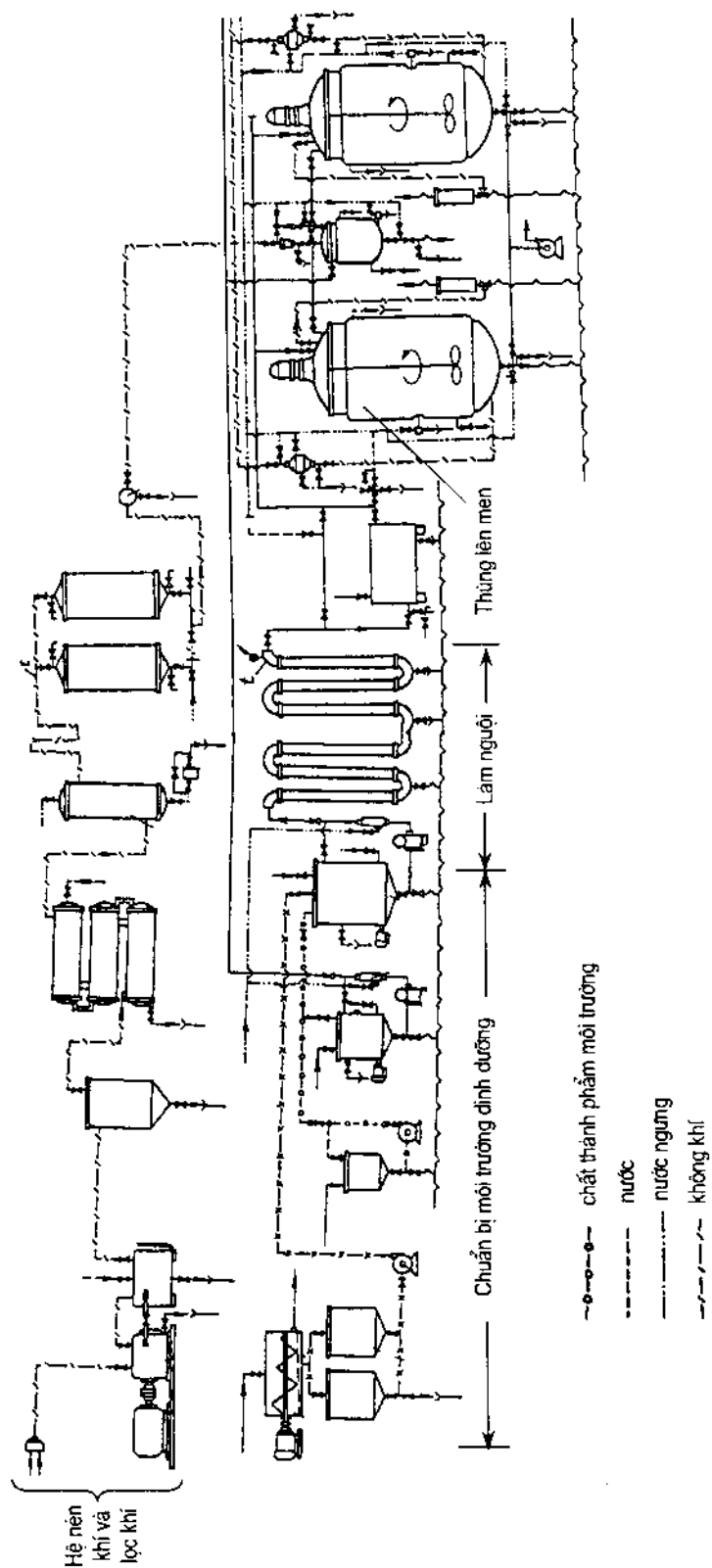
5.4. LÊN MEN RƯỢU THEO PHƯƠNG PHÁP MYCO-MALT (TỪ NGUYÊN LIỆU TINH BỘT)

Phương pháp myco-malt được áp dụng cho lên men rượu từ nguồn nguyên liệu tinh bột.

Nấm men không lên men trực tiếp từ tinh bột. Vì vậy, các nguồn nguyên liệu, như gạo, ngô (đã tách phôi), sắn, khoai tây, đại mạch, yến mạch, cao lương... cần phải qua khâu xử lý (nghiền nhỏ, hoà nước và nấu chín) rồi đưa vào khâu đường hoá. Khâu này rất quan trọng vì chỉ biến tinh 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, hệ enzym amylaza trong hạt nảy mầm là dùng enzym đường hoá của nấm mốc để biến đường thành rượu.



Hình 5.4. Sơ đồ công nghệ nuôi cấy nấm mốc cám trên khay thu chế phẩm enzym theo phương pháp bề mặt



Hình 5.5. Sơ đồ công nghệ nuôi cấy nấm mốc theo phương pháp chìm để thu chế phẩm enzym

Sản xuất rượu theo phương pháp myco-malt 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.

5.4.1. Nấu và đường hoá

*** 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 enzym hạt mầm hay enzym của nấm mốc tinh bột chuyển thành đường maltoza và dextrin.

Hệ enzym đường hoá có 3 enzym: α , β và γ -amylaza. Hạt này mầm thường có α và β -amylaza, trong chế phẩm của mốc có β - 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 chủ yếu γ -amylaza. Như các chương trước và phần trước của chương này chúng ta đã biết 3 loại enzym amylaza này có 3 tác dụng đến tinh bột: α -amylaza tác dụng lên tinh bột cắt mạch phân tử thành các đoạn dài, β -amylaza có tác dụng thành đường đôi là maltoza và các dextrin cuối; γ -amylaza chuyển tinh bột thành glucoza.

Nấu nguyên liệu có thể thực hiện theo nấu gián 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 1 kg nguyên liệu bột với 4 lít nước (1 : 4) dưới áp suất hơi 3 + 3,5 kg/cm² thời gian là 60 + 70 phút, đối với ngô hạt thời gian kéo dài tới 80 + 90 phút và áp suất hơi là 4 + 4,5 kg/cm².

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 cồn là 7 l/l 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.

*** Đường hoá**

Dịch hồ đã nấu chín được làm nguội tới nhiệt độ đường hoá, sau đó cho chế phẩm

enzym 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.

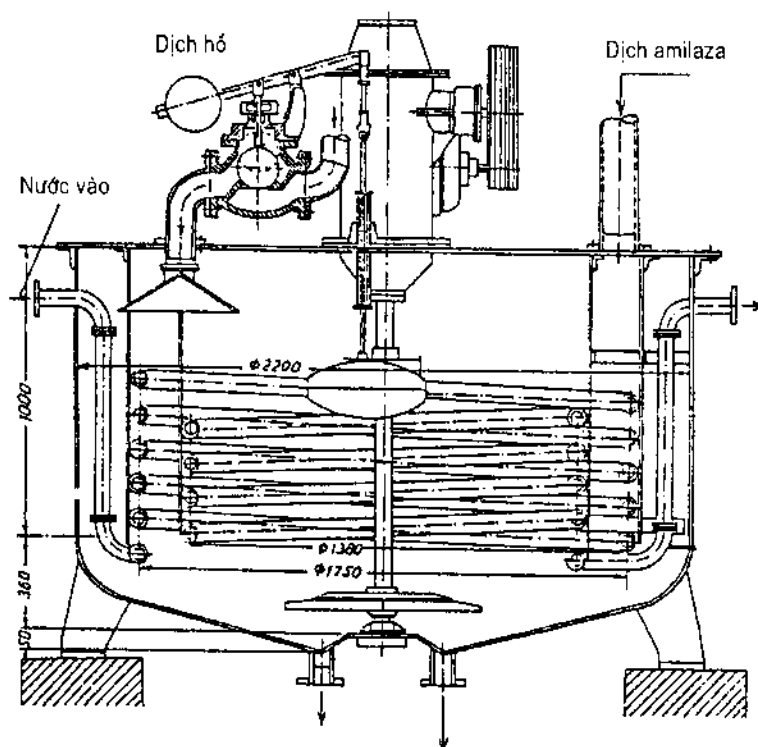
- Đường hoá gián đoạn ở các nhà máy rượu Việt Nam: cho toàn bộ dịch hồ vào thùng đường hoá, bật cánh khuấy và làm nguội bằng nước tới 70°C , cho chất sát khuẩn natri fluosilicat theo tỷ lệ 2‰, và chế phẩm enzym mốc đường hoá - 5 ÷ 10% để nguội tới 60°C cho nốt 90 ÷ 95% chế phẩm còn lại. Thời gian đường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

Dịch đường hoá khi kết thúc có 14 ÷ 18% đường (tương đương 8 ÷ 9°Be), đường khử khoảng 3%, độ chua: pH = 4,5 ÷ 5,2 hoặc 0,8 ÷ 1,2 g $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{l}$.

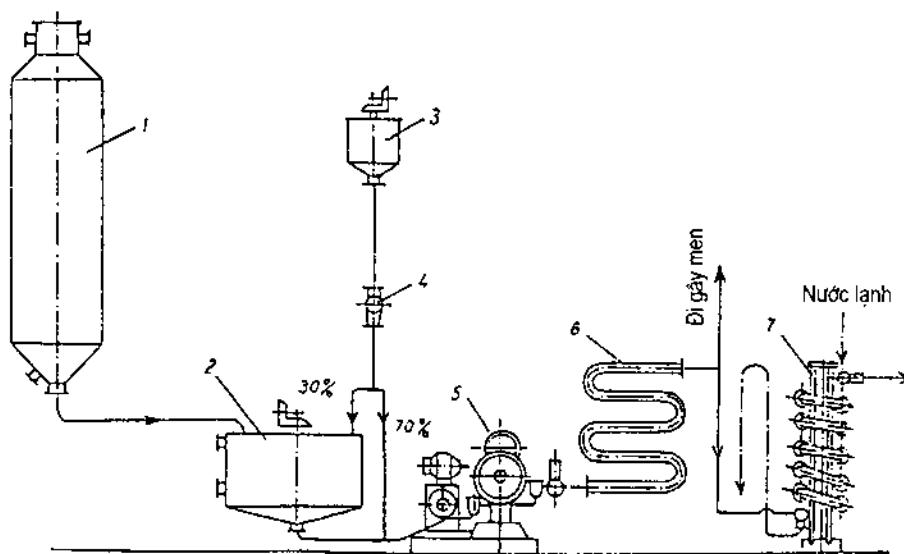
Đường hoá gián đoạn còn có hai cách khác nữa (khác như lượng chế phẩm amylaza vào từ đầu, rồi làm nguội tới 60°C cho nốt chế phẩm, hoặc cho chế phẩm khi dịch hồ nguội tới $57 \div 58^{\circ}\text{C}$ v.v...).

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

Sơ đồ đường hoá liên tục được thể hiện ở hình 5.7. Nồi đường hoá lần 1 có thể dùng cho đường hoá gián đoạn (hình 5.6).



Hình 5.6. Thùng đường hoá gián đoạn hoặc thùng đường hoá lần 1 trong quá trình liên tục 2 lần



Hình 5.7. Sơ đồ đường hoá liên tục 2 lần:

1- nồi nấu hồ (hồ hoá); 2- nồi đường hoá lần 1; 3- bình ngưng chế phẩm; 4- bình lượng chế phẩm;
5- bơm; 6- đường hoá lần 2; 7- trao đổi nhiệt làm nguội dịch đường bằng nước trong thiết bị ống lồng ống

5.4.2. Lên men

* Chuẩn bị dịch lên men

Dịch đường thủy phân sau khi được làm nguội xuống $28 \div 30^\circ\text{C}$ hoặc có thể thấp hơn ta cần phải tính toán và chuẩn bị một số công việc hiệu chỉnh nồng độ đường vào khoảng $13 \div 15\%$ (tương đương với $16 \div 18^\circ\text{Bx}$ nồng độ chất khô hoà tan %), $\text{pH} = 4,5 \div 5,2$ (có thể điều chỉnh bằng axit sulfuric 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 $\text{pH} = 4,5$ 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 thủy phân. Đối với dịch đường thủy 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 sulfat, ure, diamoni phosphat (được kể là 2 nguồn N và P); nguồn P thường dùng là nước chiết từ supephosphat hoặc axit orthophosphoric. Cách tính gần đúng cho dinh dưỡng nấm men theo tỷ lệ $\text{C} : \text{N} : \text{P} = 100 : 5 : 1$ hoặc $200 : 5 : 1$.

Như vậy 1 m^3 dịch đường hoá từ sản ta có thể phải bổ sung 0,5 kg ure hoặc 1 kg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 0,1 kg supephosphat (qua nước chiết).

*** 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 $100 \div 120.10^6/\text{ml}$ hoặc hơn nữa, với tuổi giống phải trẻ, khoẻ đang ở pha phát triển chỉ số và 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 5.3.1) từ ống giống thạch nghiêng qua dịch ống nghiệm, bình tam giác và các bình tới 5 hoặc 10 l 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 5.8 và 5.9). 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 (hình 5.8).

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 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 theo 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 dùng 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 $6 \div 8$ h là đủ lượng tế bào nấm men dùng cho sản xuất (hình 5.9 - Sơ đồ nuôi liên tục).

Nhân giống cũng như lên men cần giữ ở nhiệt độ $28 \div 32^{\circ}\text{C}$, nếu nhiệt độ tăng cao phải hạ nhiệt 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.

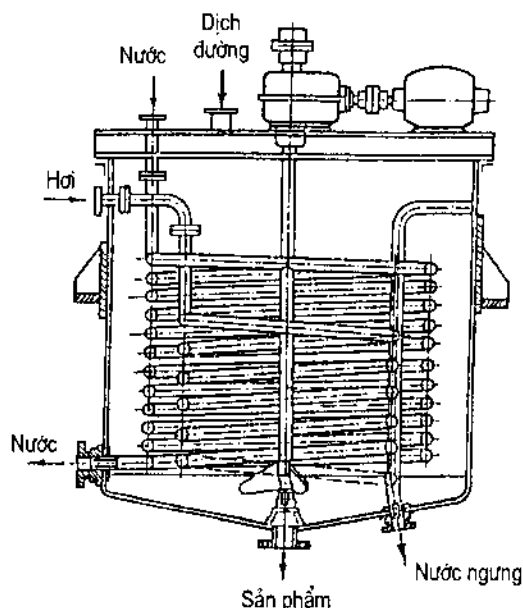
Nồi nuôi men được giới thiệu ở hình 5.8.

Nồi này có thể thực hiện được nhiệm vụ thanh trùng Pasteur cho dịch đường và nuôi men.

Trước khi nuôi men thường được rửa sạch, xì hơi nóng và thanh trùng bằng hơi, sau đó làm lạnh tới $55 \div 58^{\circ}\text{C}$ thì bổ sung nguồn dinh dưỡng nitor cùng với dịch đường, sau đó đưa nhiệt đến 75°C giữ 30 phút và làm lạnh tới 30°C .

Khi tới 30°C cần axit hoá dịch bằng H_2SO_4 tới $0,7 \div 0,9^{\circ}$ và $\text{pH} = 3,8 \div 4,0$ (ở đây cũng có thể axit hoá bằng vi khuẩn lên men lactic).

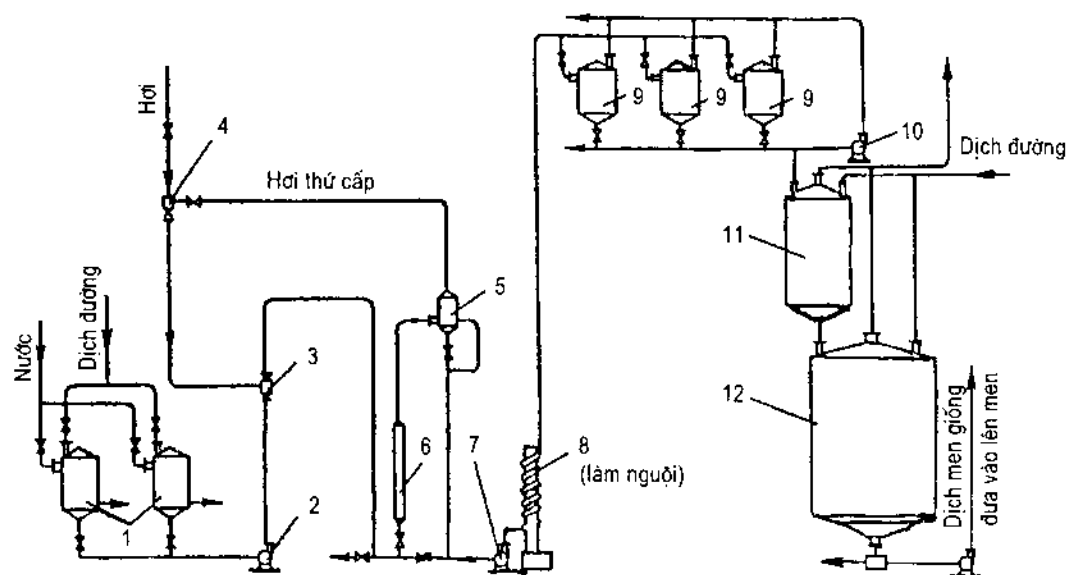
Sau khi dịch đường đã chuẩn bị xong ta cấy $6 \div 8\%$ dịch men đã nhân trước đó (có thể là trong phòng thí nghiệm), khuấy và làm nguội (cho nước lạnh qua ống xoắn ruột gà) tới $22 \div 24^{\circ}\text{C}$ với mục đích ngăn ngừa tạp khuẩn phát triển khi nấm men còn chưa kịp sinh sản, mặt khác nấm men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



Hình 5.8. Nồi nuôi men nhân giống trong sản xuất

lượng giống đến $15 \div 20\%$ và đưa nhiệt độ lên cao hơn $3 \div 4^{\circ}\text{C}$ 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 $10 \div 20$ lần hoặc đưa vào lên men. Trước khi chuyển men ta 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 5.9. Sơ đồ trang bị trong dây chuyền công nghệ nuôi men rượu liên tục trong sản xuất

Hình 5.9 trình bày một dây chuyền công nghệ nuôi men liên tục trong các nhà máy rượu nuôi nhân giống 3 cấp: cấp 1 ở các 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 $75 \div 78^{\circ}\text{C}$ giữ ở 30 phút để thanh trùng Pasteur (trước đó đã giữ ở 55°C trong $45 \div 60$ 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 $22 \div 24^{\circ}\text{C}$ đưa vào nhân giống cấp 1 ở các bình 9.

Bình 11 nhận dịch từ đường ống chính và nhận 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 và 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 dây các thùng lên men. Số lượng tế bào nấm men trong dòng chuyển men giữ ở mức $80 \div 90$ triệu/ml.

* Lên men

Sau khi đã chuẩn bị xong dịch lên men có khoảng $16 \div 18\%$ chất khô hoà tan (tương đương với $13 \div 15\%$ đường) cùng với chất sát khuẩn cũng như bổ sung các nguồn dinh dưỡng (đặc biệt đối với dịch đường thủy phân từ sắn cần phải bổ sung nhuần các nguồn N và P) ta tiếp giống nhân trong sản xuất với tỷ lệ $8 \div 10\%$ 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: $28 \div 32^\circ\text{C}$, pH $4,2 \div 5,2$. Tế bào nấm men tiếp tục sinh sản và sinh khối phát triển đến khi nồng độ rượu đạt 5% sẽ dừng lại hoặc phát triển chậm dần đến ngừng hẳn. Quá trình lên men tiến hành trong $2 \div 3$ ngày, động học của quá trình lên men rượu được trình bày ở hình 5.10.

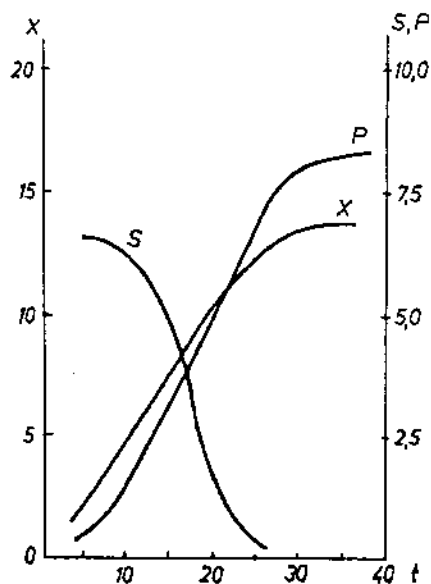
Đối với những nòi nấm men chịu được nồng độ cao khi lên men đường giảm xuống $6 \div 8\%$ t_0 , có thể bổ sung thêm đường (không cần cân đối dinh dưỡng N và P) và như vậy, giống men sẽ tiếp tục chuyển hoá đường thành rượu, năng suất lên men được tăng lên. Bình thường một quá trình lên men với nồng độ đường ban đầu $13 \div 15\%$ thì rượu tạo thành là $7 \div 8\%$, 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%).

Quá trình lên men rượu cần phải chú trọng:

- Chống nhiễm tạp khuẩn, bảo vệ quá trình lên men;

- Làm nguội cho các thùng lên men (ở nước ta khi lên men mùa hè dịch trong thùng 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 v.v...

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.



Hình 5.10. Động học lên men rượu:

X- số lượng tế bào nấm men ($\cdot 10^7/\text{ml}$);
S- nồng độ đường (%);
P- nồng độ rượu;
t- thời gian (giờ).

*** 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 ở bên ngoài và khi lên men nhiệt độ tăng cao phải dội nước từ nắp thùng. Kết cấu thùng lên men tương tự như nồi nấu men nhân giống (hình 5.8).

Nhiệt độ lên men ban đầu là 28°C , nếu có thể làm nguội tới $20 \div 22^{\circ}\text{C}$ cũng được. Khi lên men nhiệt độ toả ra sẽ 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 $28 \div 32^{\circ}\text{C}$. Sau khi tiếp giống nồng độ men giống trong 1 ml dịch vào khoảng 12 triệu tế bào. Trong quá trình lên men cần theo dõi tình trạng giống, nồng độ đường, độ chua của dịch. Dịch lên men trong sản xuất thường gọi là “giấm”.

Lên men được xem là bình thường nếu sau 50 giờ thấy đường là 0 (đo độ khô hoà tan theo chiết quang kế), độ chua không quá 0,8 g $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{l}$.

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

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**

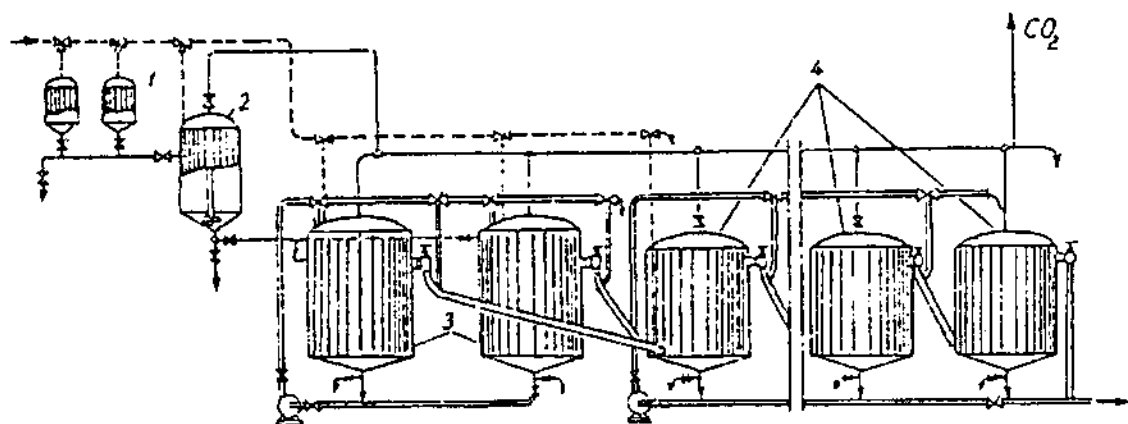
Lên men liên tục có đặc điểm là thùng lên men đầu tiên được tiếp 1 lượng lớn men giống và luôn có nồng độ men trong dịch cao ($100 \div 120$ triệu tế bào/ml: cao gấp $8 \div 10$ lần so với lên men gián đoạn). Dịch đường và men giống chảy đầy vào thùng đầu tiên này sẽ chảy tràn sang thùng tiếp sau và cứ như vậy đến thùng cuối cùng 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 $25 \div 30\%$ bình nhân giống cấp 2 (2). Các thùng lên men nối tiếp có $8 \div 10$ thùng.

Nhân giống ở 2 bình cấp 1 lệch nhau khoảng $3 \div 4$ h. Khi cấp 1 đạt yêu cầu ta chuyển giống xuống bình 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 $25 \div 30\%$ men giống ở bình (3) nuôi men trước. Có như vậy sẽ đủ lượng men cấp 1 chuyển vào nhân cấp 2 và đủ giống cấp 2 đưa vào lên men.

Dãy chuyển lên men liên tục được thể hiện ở hình 5.11.

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 $100 \div 120$ triệu tế bào trong 1 ml. Các thùng (3) phải thay nhau làm việc, chuẩn bị dịch lên men và thanh trùng.



Hình 5.11. Sơ đồ công nghệ lên men rượu liên tục:

1- hai thùng nhân giống cấp 1; 2- thùng nhân giống cấp 2;

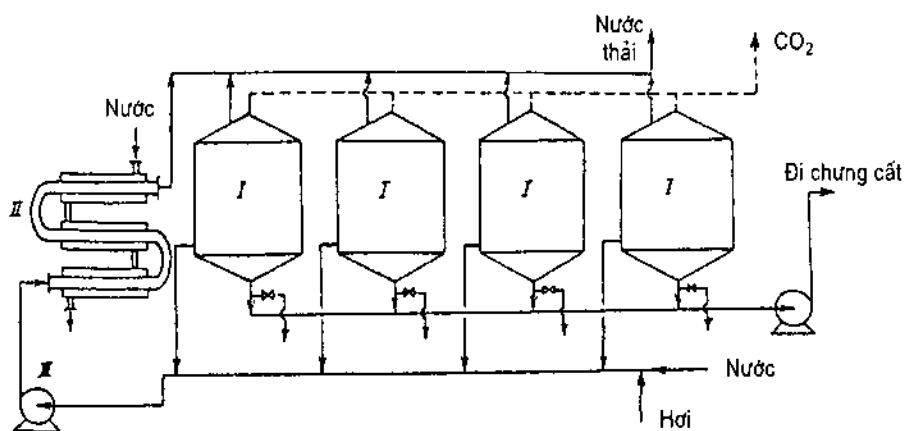
3- các thùng lên men đầu tiên; 4- các thùng lên men tiếp theo

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 nhân giống ta có thể dùng 1 thùng I đang thời kỳ men giống phát triển được axit hoá bằng H_2SO_4 đến pH $4,0 \div 4,2$ kết hợp với bơm tuần hoàn làm lạnh và sau $1 + 2$ h ta san 1/2 dịch sang thùng khác, sau đó thêm dịch đường mới vào cả hai thùng, ta được 2 thùng lên men đồng thời.

Sơ đồ công nghệ của quá trình lên men bán liên tục trình bày ở hình 5.12.

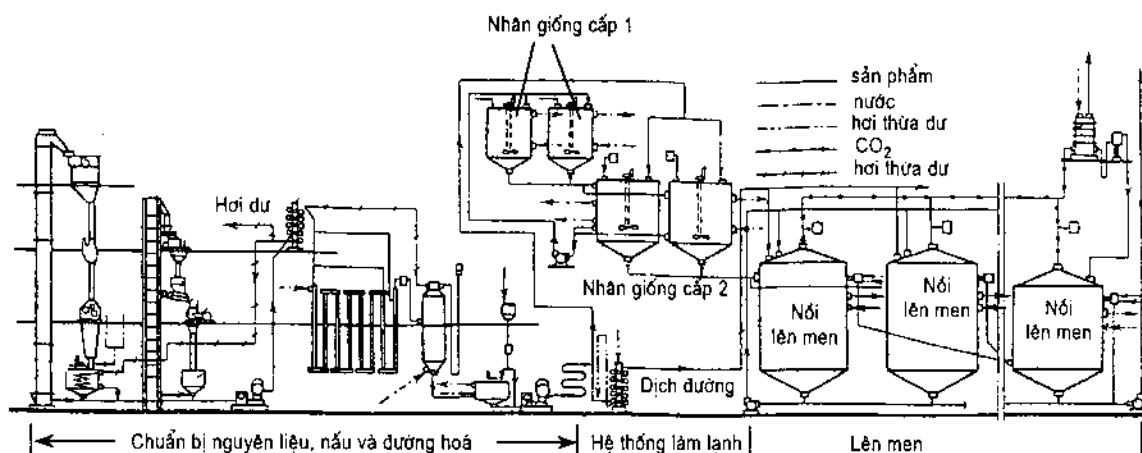


Hình 5.12. Sơ đồ công nghệ trang bị lên men bán liên tục:

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.

* Dưới đây sẽ trình bày một sơ đồ công nghệ lên men rượu liên tục từ nguyên liệu tinh bột (hình 5.13).



Hình 5.13. Sơ đồ công nghệ quá trình lên men rượu từ nguyên liệu tinh bột

5.5. LÊN MEN RƯỢU TỪ RỈ ĐƯỜNG

5.5.1. 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 đó có công nghiệp rượu. Trong rỉ đường chứa tới $60 + 75\%$ đường, trong đó phần lớn là saccarozơ, giàu chất khoáng, nhưng thiếu phospho (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 khá 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 (một 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 $80 + 95^\circ\text{C}$ trong vòng $45 + 60$ 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.

5.5.2. Chuẩn bị dịch nuôi cấy nhân giống và lên men

Dịch rỉ đường đã xử lý sau khi để lắng cần 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 (2 nồng độ).

- Dịch lên men một dòng có nồng độ chất khô $20 \div 22\%$ (tương đương $15 \div 16\%$ đường), pH $4,5 \div 5,0$ (tương đương với độ chua $1,0 \div 1,5$ g/l H_2SO_4).

Ure cần bổ sung là $0,5$ g/l, supephosphat - $0,1 \div 0,2$ g/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 $11 \div 13\%$ hoặc $12 \div 14\%$ dùng nuôi men trong thùng nhân giống hoặc cho 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 thùng bằng dòng thứ hai có nồng độ chất khô $33 \div 35\%$.

Dòng thứ hai có nồng độ chất khô hoà tan là $33 \div 35\%$.

Các dòng này cần pH $4,5 \div 5,0$, có chất sát khuẩn và cân bằng dinh dưỡng N và P.

Nhân giống và lên men rượu rỉ đường về nguyên lý cũng tương tự như lên men từ tinh bột nhưng từng công đoạn cũng có đôi điều khác biệt.

5.5.3. 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 còn cần chọn các đặc tính như: khả năng lên men rafinoza, khả năng di truyền, hoạt tính maltaza, tốc độ lên men và khả năng tạo thành các sản phẩm phụ.

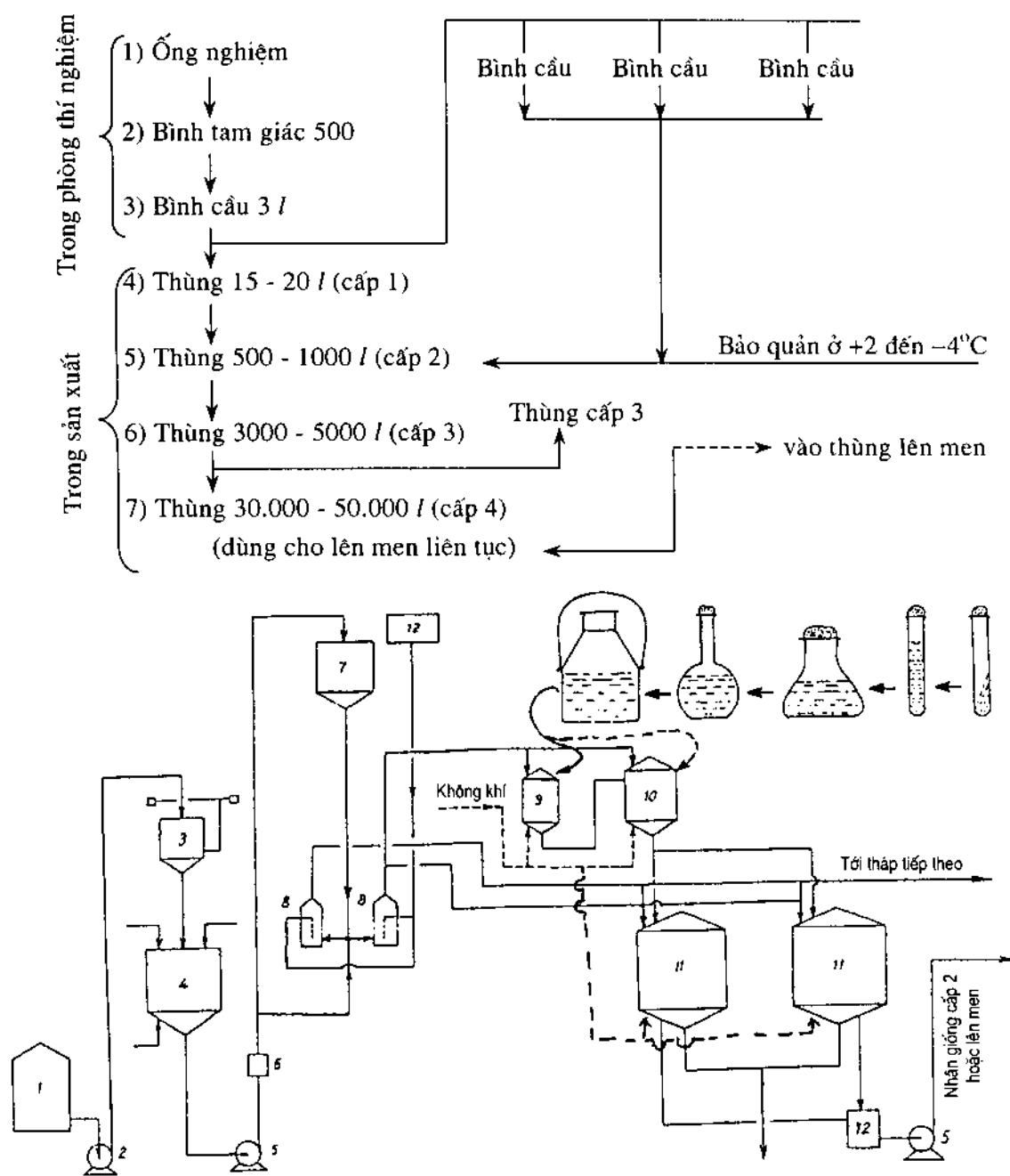
Ngày nay người ta có thể dùng một nòi thuần chủng hoặc hai nòi hỗn hợp vào trong sản xuất rượu từ rỉ đường để nâng cao hiệu suất lên men cũng như nâng cao được chất lượng sản phẩm, đặc biệt là hương thơm do các sản phẩm phụ sinh ra.

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) ở trong sản xuất.

Quá trình nhân giống theo sơ đồ ở trang sau:

Chế độ nuôi men và yêu cầu kỹ thuật ở mỗi cấp nhân giống được trình bày ở bảng 5.4. Quá trình xử lý rỉ đường và nhân giống nấm men từ phòng thí nghiệm đến lên men - hình 5.14 (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 1 cấp ở thiết bị số 9 và 10, sau đó đưa vào lên men ở thiết bị 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.



Hình 5.14. 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 lượng định mức đưa vào nhân giống cấp 3 hoặc lên men

Bảng 5.4. 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 I	20	16	15 ÷ 16	0,7 ÷ 0,8	15	28 ÷ 30	liên tục, nhẹ	24
5	Nồi nhân giống cấp II	1.000	800	16 ÷ 17	0,9 ÷ 1,1	2	28 ÷ 30	liên tục, mạnh	44 ÷ 45
6	Nồi nhân giống cấp III	5.000	4.000	17 ÷ 18	0,8 ÷ 0,9	15 ÷ 16	28 ÷ 30	"	18
7	Nồi nhân giống cấp IV (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

5.5.4. Lên men

Trong các nhà máy rượu với nguyên liệu là rỉ đường người ta cũng thực hiện các qui trình công nghệ lên men gián đoạn và lên men liên tục cũng như 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 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 h 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 cho hiệu suất lên men cao hơn khoảng 0,5 ÷ 1° cồn và thời gian lên men ngắn hơn.

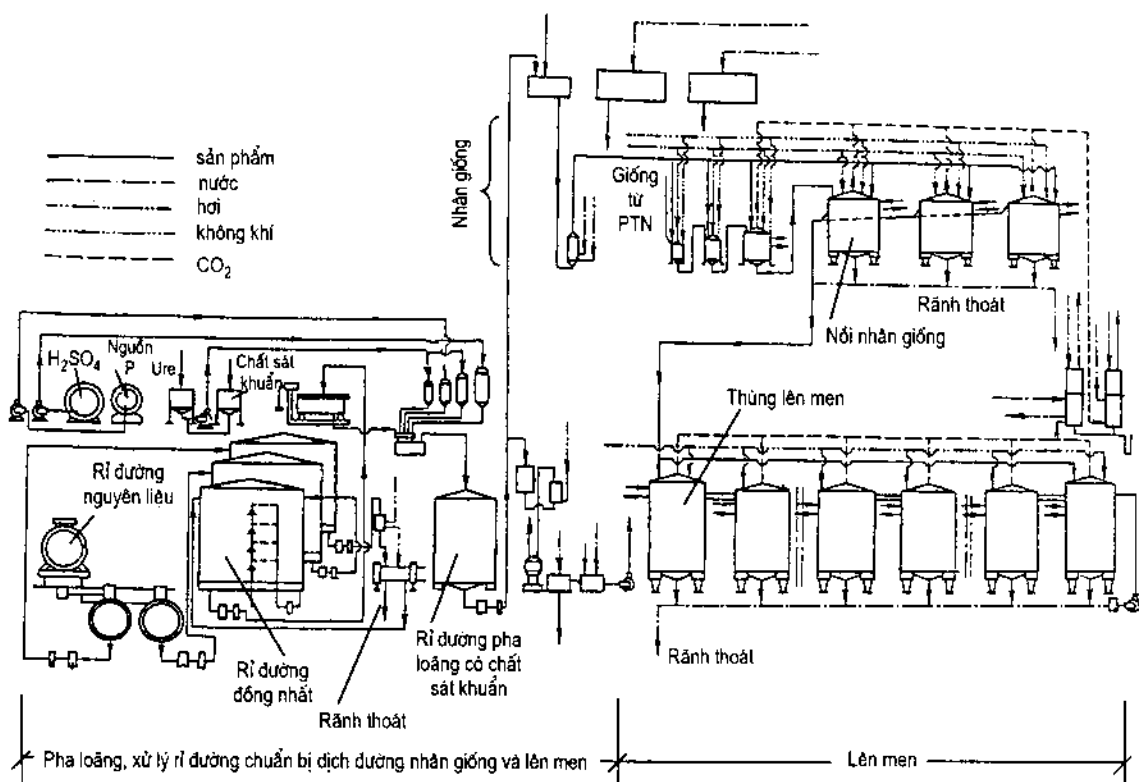
- Lên men liên tục từ rỉ đường cũng tiến hành tương tự như từ tinh bột. Điều khác ở đây là dịch đường có nồng độ 50% sau khi xử lý, liên tục được pha loãng tới 12 ÷ 14% và 30 ÷ 32% ở hai thiết bị khác nhau và cùng vào nồi lên men đầu tiên. Nấm men ở nồi lên men này phát triển mạnh với lực lên men rất cao được san sẻ liên tục cho các nồi tiếp theo. Thời gian lên men theo phương pháp này là 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 ÷ 0,6 g%. 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 $2 \div 3$ V/V/h nhằm để tăng lượng 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 mì rất tốt, còn nấm men thụ 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 5.15 - Quá trình lên men rỉ đường một dòng - một nồng độ.



Hình 5.15. Sơ đồ công nghệ quá trình lên men rượu từ một dòng rỉ đường

5.6. 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 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 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 enzym ở hạt nảy mầm cũng như ở chế phẩm mốc cám. Tri 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 enzym đường hoá và trong tế bào nấm men. *Axit fluosilic* hay *natri fluosilicat* là phụ phẩm khi sản xuất supephosphat gây ăn mòn mạnh kim loại, nhưng ở nước thường dùng 2‰ cho cả dịch nhân giống và dịch lên men. Chất kháng sinh cũng có thể dùng vào mục đích này với nồng độ là $0,75 \div 2$ đv/ml dịch. Gần đây một chất kháng sinh mới không dùng trong trị liệu là *lactoxit* do xạ khuẩn *Actinomyces* 105/1 sinh ra và dùng chống tạp nhiễm cho lên men khá tốt: dùng cho nhân giống là $150 \div 160$ đv/ml và lên men chính là $50 \div 60$ đv/ml.

5.7. CHUNG 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 $8 \div 10\%$, thường được gọi là giấm chín. Ngoài ra, còn có những chất dễ bay hơi khác như các este, aldehyt, các loại rượu khác v.v...

Trong dịch này còn có tinh bột, cặn rỉ đường, dextrin, protit, 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 hai cấu tử.

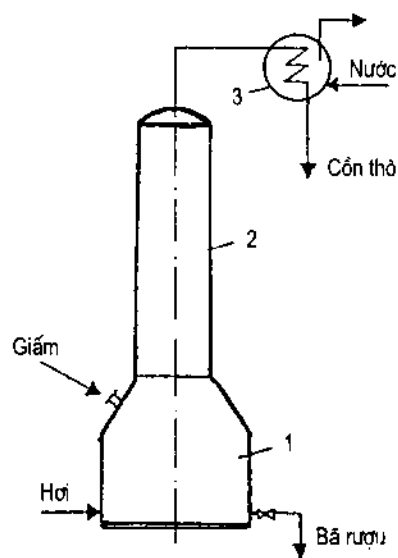
Dịch giấm chín cần phải chưng cất để loại nước đưa hàm lượng etanol tới $70 \div 80$ đến $90 \div 96\%$. Sản phẩm này gọi là cồn. Song, chưng cất một lần ta chỉ được cồn thô. Trong cồn thô còn chứa nhiều tạp chất (bảng 5.5 và 5.6) cần phải loại bỏ để có được sản phẩm là cồn tinh sạch dùng làm đồ uống - cồn thực phẩm. Vì vậy, quá trình chưng cất thường kết hợp với tinh luyện.

5.7.1. Chưng cất gián đoạn

Tháp chưng cất gián đoạn trình bày ở hình 5.16.

Dịch giấm chín là hỗn hợp cồn - nước. Khi chưng cất ở áp suất khí quyển ($p = 760$ mmHg) hỗn hợp này có điểm sôi là $78,15^\circ\text{C}$. 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 ta chỉ có thể nhận được cồn có nồng độ $\leq 97,2$ V.

Cồn thô thu được chứa tới 50 chất được coi là tạp chất của cồn. Tạp chất của cồn phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là từ nguyên liệu khoai tây, hạt ngũ cốc, rỉ đường (xem bảng 5.5).



Hình 5.16. Chưng cất gián đoạn:
1- thùng chứa dịch rượu lên men; 2- thân tháp; 3- bình ngưng tụ và làm lạnh cồn

Trong cồn thô từ rỉ đường tạp chất giao động trong khoảng khá lớn: các axit hữu cơ từ 20 ÷ 200 mg/l, este từ 150 ÷ 550 mg/l, aldehyt - 90 ÷ 900 mg/l, alcol bậc cao - 0,2 ÷ 5% khối lượng và hợp chất chứa nitơ tính theo amoniac từ 8 ÷ 18 mg/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 - 75 ÷ 90%, aldehyt propylic - 5 ÷ 10%, aldehyt butyric - 2 ÷ 8% trong số các este thì 75 ÷ 85% là este của axit axetic, 5 ÷ 10% gồm este của axit propylic, valeric v.v...

Bảng 5.5. Tạp chất trong cồn thô từ một số nguyên liệu

Nguyên liệu	Este mg/l cồn khan	Aldehyt	Dầu fusel	Axit mg/l cồn khan
		% so với rượu		
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, nhưng 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 furfural, nhưng lại chứa các tạp chất có mùi mật mía. Cồn rượu từ tinh bột thường chứa nhiều furfural là tạp chất gây vị đắng. Đó là các tecpen. Các chất này có thể có trong cồn rượu với hàm lượng rất nhỏ khó 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.

Cách tiến hành: pha cồn thô tới nồng độ 50% V, dùng dung dịch xút 10% cho vào khuấy đều, điều chỉnh tới pH = 8,5 ÷ 9,0; tiếp theo là dung dịch KMnO_4 2% được thêm vào, khuấy đều tới khi xuất hiện màu hồng đậm. Gia nhiệt trong nồi cất, giữ nguyên không cho bay hơi bằng van chặn trong 1 ÷ 2 h 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 - 3 ÷ 5%.

Bảng 5.6. 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
- furfural	$C_5H_4O_2$	96,08	161,7
Este			
- formiat 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
- butyrat etyl	$C_6H_{12}O_2$	116,16	121,0
- axetat izoamyl	$C_7H_{14}O_2$	130,18	142,0
- izovalerat etyl	$C_7H_{14}O_2$	130,8	134,8
- izovalerat 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	60,0*9	82,4
- propylic	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

Ta có thể lấy dầu fusel theo từng mẻ tinh chế hoặc có thể sau 2 ÷ 3 mẻ mới lấy ra.

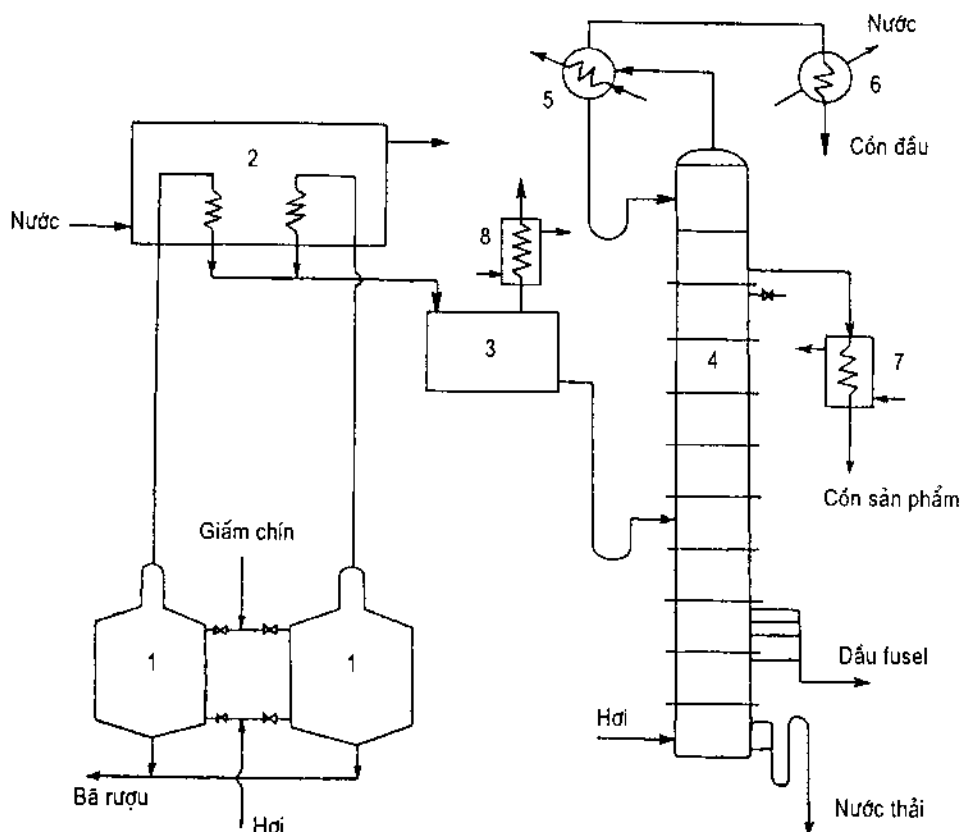
Chưng cất gián đoạn với thiết bị đơn giản, trình độ công nghệ thấp, dễ thao tác, nhưng mất nhiều thời gian, thùng chứa lớn, năng suất thấp, tốn nhiều hơi nước nóng và nồng độ cồn ra khỏi tháp không cao (lúc đầu chỉ đạt 75 ÷ 80%, sau đó giảm dần và cuối cùng là 6%. Nồng

độ trung bình thu được là $20 \div 30\%$). 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 ở các khâu là rất lớn, do đó hiệu suất thu hồi thấp, tổn hơi và nhân công cho việc cất lại.

5.7.2. 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) sau đây (xem hình 5.17).



Hình 5.17. 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- bình ngưng tụ; 6- bình ngưng tụ; 7- bình làm lạnh; 8- bình làm lạnh

Lên men xong giảm chín được bơm vào thùng chứa 1. Vì làm việc gián đoạn nên 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 $0,8 \div 1 \text{ kg/cm}^2$. 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 đến 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 hơi ở đỉnh tháp nhưng chứa ít este và aldehyt.

Chất lượng cồn thu được tùy thuộc vào chiều cao tháp và cách vận hành của từng xí nghiệp, nhưng về nguyên tắc hoàn toàn có thể thỏa mãn tiêu chuẩn Việt Nam TCVN-1971.

5.7.3. Chung 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) v.v...

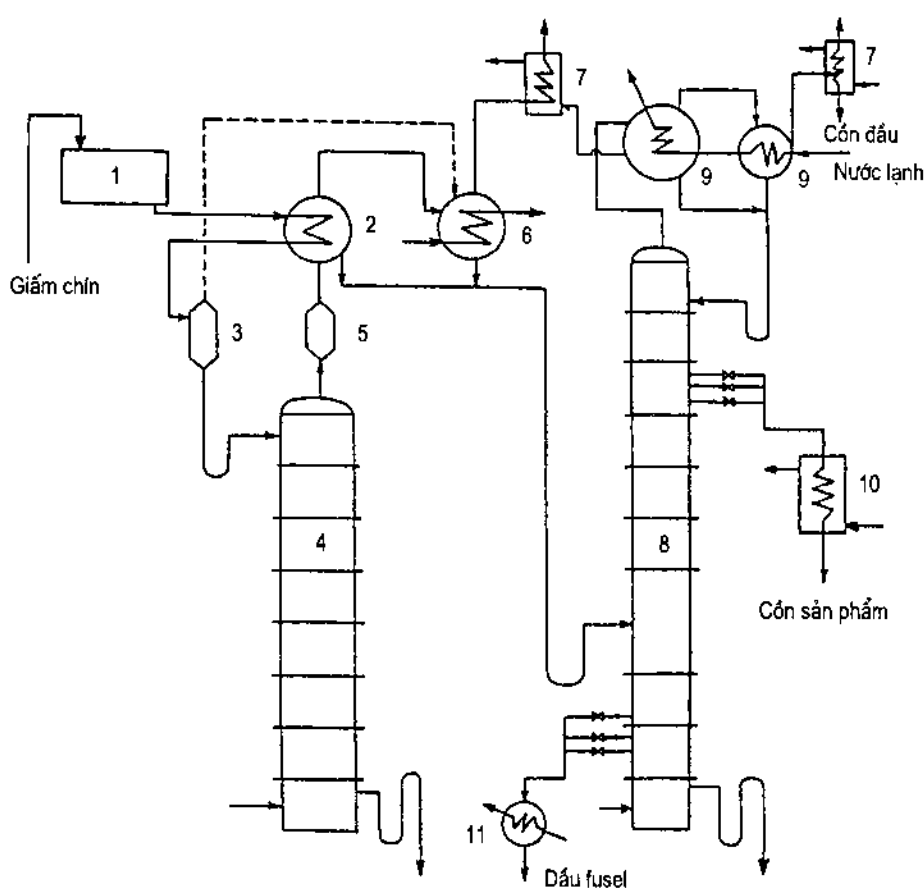
Với trang bị các thiết bị chưng cất và tinh luyện này cồn sản phẩm thu được có chất lượng cao, đạt các tiêu chuẩn của TCVN-71 dùng pha các loại rượu làm đồ uống và rượu thuốc. Sau đây giới thiệu sơ lược bằng sơ đồ vài dây chuyền chưng cất - tinh luyện hai tháp.

*** Sơ đồ hai tháp chưng luyện gián tiếp một dòng:**

Dịch giấm chín đưa lên thùng 1, qua bình 2 được gia nhiệt tới 70 ÷ 80°C qua 3 để tách CO₂ 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 $p = 0,8 + 1 \text{ kg/cm}^2$. Hơi rượu bay lên được nâng cao dần nồng độ ra khỏi tháp đi vào 9. Tại đây ta 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. Sô ngưng 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 hai 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 không 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 hoặc cho giấm chín cất lại, 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 đầu.



Hình 5.18. 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

Trong công nghiệp người ta trang bị hệ chưng luyện 3 tháp và 1 tháp làm sạch (4 tháp), có thể thêm 1 tháp chưng cất dầu fusel để nâng cao chất lượng cồn.

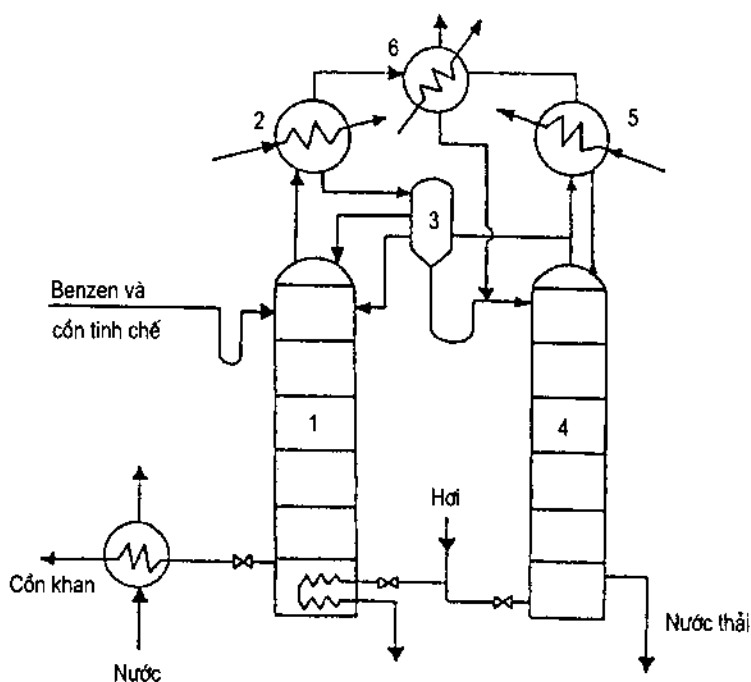
5.8. TÍNH LUYỆN ĐỂ THU NHẬN CỒN TUYỆT ĐỐI

Phần trên chúng ta đã đề cập 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 còn gọi là cồn khan. Cồn tuyệt đối có nghĩa là cồn không còn nước hoặc nước còn lại với hàm lượng rất nhỏ (0,02%).

Hình 5.19 giới thiệu qua về công nghệ thu nhận cồn tuyệt đối.

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 vào tháp tinh chế 4. Khác với ở 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 tới đáy không còn nước và benzen được làm lạnh ở 7, ta thu được cồn khan - không nước.



Hình 5.19. Sơ đồ nhận cồn khan từ cồn tinh chế

1- thủy tinh chế cồn khan; 2- bình ngưng tụ hỗn hợp đẳng phí;
3- bình phân ly; 4- tháp chưng; 5, 6, 7- bình ngưng tụ và làm sạch

5.9. SẢN XUẤT RƯỢU THỦ CÔNG TRUYỀN THỐNG

Ở nước ta có nhiều địa phương sản xuất rượu thủ công từ xa 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 cả ở miền Nam và miền Bắc.

Các loại rượu trên 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 về 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 và 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 đường. Số đường tạo ra ban đầu được nấm men sử dụng trước tiên phục vụ cho sinh trưởng tăng sinh khối và sau đó mới bắt đầu tích tụ rượu trong dịch lên men. Dịch lên men rượu thủ công xảy ra 2 quá trình đường hoá và rượu hoá gần như đồng thời, nhưng vẫn theo qui 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 *Saccharomyces cerevisiae*. Men giống sản xuất rượu thủ công được bảo quản trong một 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 enzym đường hoá (amylaza) chuyển hoá tinh bột thành đường maltoza, glucoza, dextrin... Nấm men đồng hoá các glucit 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 Xakê của Nhật).

5.9.1. 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 của một số nguyên liệu xem bảng 5.1 và nếp cẩm được giới thiệu ở bảng 5.7.

Bảng 5.7. 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 tự
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 amyloza và amylopectin khác với gạo tẻ và ngô, nên dễ đường hoá hơn. Đặc biệt là các loại gạo nếp, kể cả nếp nương, có mùi thơm dễ chịu. Mùi thơm này còn nhận thấy ở rượu thành phẩm.

5.9.2. Cách làm bánh men

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 + 5 cm. Bột gạo khi nặn bánh men có độ ẩm sao cho khi định hình bánh men không bị chảy nước hoặc không bị tơi bột và khi thành bánh được xoắn phần trên đỉnh thành dạng củ hành được là vừa đủ. Chú ý: khi làm bánh men dùng gạo xay có nhiều cám, trong đó có 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 sự thoát 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, mảnh 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 và gác bếp để hàng ngày được xông khói và làm khô thêm. Sau khoảng 1 tháng thì đem dùng dần cho sản xuất rượu.

Các làm bánh men như trên ta nhận được bánh men bình thường, dễ bị nhiễm các khuẩn lạ mà ta không mong muốn khi ta sản xuất rượu làm ảnh hưởng xấu tới 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.

* *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 lượng rượu thành phẩm quá nồng 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 là 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 đầy đủ tới 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 phẩm 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	3 g	6- Bạc hà	2 g
2- Bạch truật	2 g	7- Tế tân	3 g
3- Nhục quế	2 g	8- Uất kim	2 g
4- Thảo quả	2 g	9- Tiểu hồi	2 g
5- Cam thảo	2 g	10- Khung cù	2 g

- Bài 8 vị Bắc:

1- Nhục đậu khấu	3 g	5- Cam thảo	3 g
2- Bạch truật	2 g	6- Bạc hà	2 g
3- Nhục quế	2 g	7- Tế tân	2 g
4- Thảo quả	3 g	8- Tiểu hồi	3 g

- Bài 10 vị Nam:

1- Cam thảo nam	10 g	6- Lá ổi	6 g
2- Giềng củ	6 g	7- Lá cúc tần	6 g
3- Gừng củ	6 g	8- Lá bưởi bung	6 g
4- Ngải cứu	6 g	9- Lá húng quế	6 g
5- Hạt tiêu	6 g	10- Nhân trần	6 g

Các vị thuốc được phơi khô tán nhỏ và trộn đều. Bột hỗn hợp có thể mua sẵn ở các cửa hàng thuốc bắc.

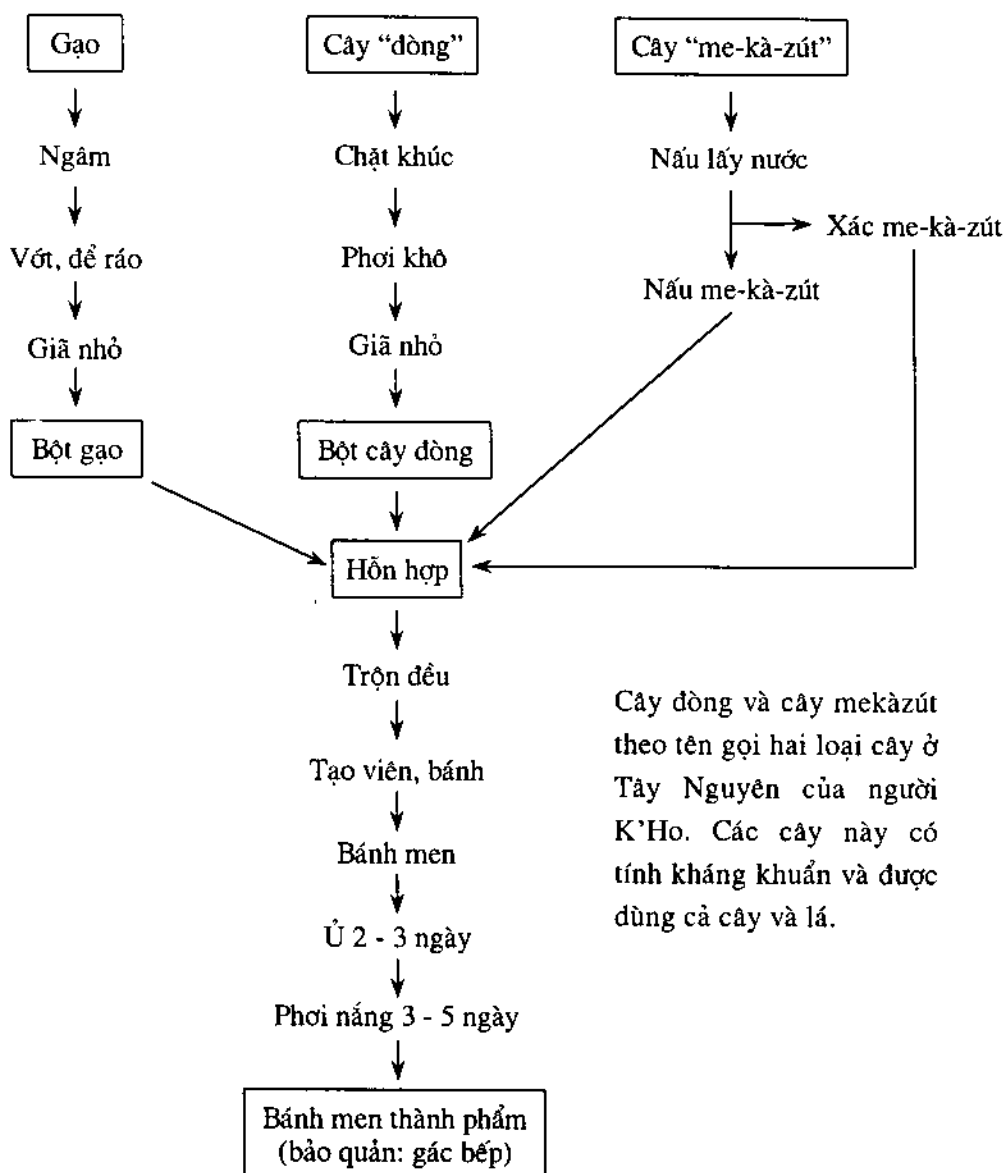
* *Men lá*: Men lá là dùng các lá có sẵn ở miền núi thay cho các vị thuốc bắc. Các lá thường là lá rừng có nhiều tinh dầu có mùi thơm. Tùy mỗi địa phương có những bài lá khác

nhau. Mùi vị rượu thành phẩm phụ thuộc rất nhiều vào các loại lá, vào số lượng dùng trong bánh men.

Tây Nghệ An dùng các loại lá: lá mít (bơ mị), lá mía (bơ òi), lá nhãn trần (bơ há nan), lá quế (bơ quế), không có lá quế thì dùng vỏ quế (pước quế). Các loại lá đem giã nhỏ rắc đều với bột gạo và làm bánh men cũng tương tự như trên.

Men lá và men rượu cần ở Tây Nguyên có đôi chút khác biệt. Men lá ở Tây Nguyên có loại chỉ dùng một thứ lá, có loại hai thứ lá và có loại ba thứ lá.

Men rượu cần của người K'Ho Tây Nguyên dùng men lá và qui trình làm men hai lá như sau:



5.9.3. 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. circinilloides*), *Rhizopus*, *Penicillium* và *Amylomyces rouxii*... Nấm mốc sinh enzyme amylaza đường hoá tinh bột.

- Nấm men chủ yếu là *Saccharomyces cerevisiae*. Ngoài ra còn thấy có *Hyphopichia burtonii*, *Pichia anomala*, *Candida*... những nấm men này coi như là men dại, men tạp có lẫn trong bánh men và chúng ta 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 glucoza. 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 mật vi khuẩn lactic, vi khuẩn axetic... Nói chung, vi khuẩn có mặt ở đây đều là vi khuẩn tạp nhiễm, ta không mong muốn.

Các giống nấm mốc *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* được giới thiệu ở hình 5.3, chúng 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 maltoza 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 glucoza. Hai loài này sinh bào tử có màu đen nhìn thấy bằng mắt thường như các đầu kim nhỏ. Về 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 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 cần, 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 anthoxyanin của nếp cần 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 protein dùng để thuỷ phân tinh bột

thành đường, thủy 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 nghĩ vẫn là trong sản xuất có mặt mốc này có sinh ra aflatoxin không? Cần phải có những công trình nghiên cứu để giải đáp 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. japonicus*. 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 enzym diastaza (amylaza) đường hoá tinh bột và zymaza lên men rượu từ đường. Vì vậy, chúng có thể lên men trực tiếp 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 của 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 enzym 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 phân 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 enzym do giống này sinh ra ưu việt hơn nấm mốc là có ít enzym transglucosidaza. Có mặt enzym này một phần glucoza chuyển thành axit gluconic. Hơn nữa, enzym 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 cerevisiae*. Men rượu đã được giới thiệu kỹ ở phần thứ nhất cũng như ở đầu chương này. Ngoài men rượu ra các giống men khác có trong bánh men đều coi là men đại.

Phần dưới bánh men thường lót trấu, tạo điều kiện thoáng khí.

5.9.4. Sản xuất rượu theo phương pháp thủ công truyền thống

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 cho 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, mảnh 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 h khi thấy khối cơm, xôi bốc nóng thì đem tãi mỏng ra nong nia hoặc mảnh để

khoảng 5 - 10 h thấy mốc mọc, ta lật ióp cơm để mốc mọc đều ở khối cơm xôi khoảng vài giờ nữa, rồi đem vun thành đồng (hay trong thúng), phủ kín bằng bao tải sạch, giữ ở chỗ thoáng mát (nhiệt độ khoảng $25 + 28^{\circ}\text{C}$ 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 ở trong chum vại. Giai đoạn này mốc phát triển là chủ yếu và tiết ra enzym 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 gạo (đem nấu cơm, xôi) + 2 hoặc 3 nước lã sạch (tốt nhất là nước sôi để nguội). Đậy kín và ủ tiếp tục 2 ÷ 4 ngày. Cơm rượu được ủ trong chum vại nấm mốc ngừng phát triển, nhưng enzym 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 ta 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. 1 kg gạo đem nấu rượu thu được khoảng 500 ÷ 600 ml rượu 40 ÷ 45°.

Chất lượng rượu 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.

Vấn đề chất lượng rượu thủ công và rượu công nghiệp (thường gọi là rượu quốc doanh) còn nhiều điều chưa được hiểu biết thấu đáo. Vì việc này cần có những công trình nghiên cứu sâu và lý giải được những điều cần biết, đặc biệt là vấn đề tạo hương vị.

* *Rượu cấm:* Các làm tương tự rượu trắng, nhưng không chưng cất. Do vậy, một số người còn gọi là rượu nếp cấm (nếp than theo tiếng gọi ở Nam Bộ) là rượu vang cấm. Lên men rượu cấm thường đạt 8 ÷ 9° rượu, vì vậy cần bổ sung thêm rượu trắng (có độ rượu cao) hoặc cồn thực phẩm để rượu cấm 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 cấm có hai loại sản phẩm:

- Loại trong là rượu đã lọc bỏ bã. Rượu trong suốt có màu huyết dụ thắm hoặc nâu đen bóng, mùi thơm dễ chịu, uống có vị ngọt cay hơi 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 tác động nhẹ đến thần kinh làm cho người uống sáng khoái và phấn khởi, rượu cấm còn chứa nhiều vitamin, đặc biệt là các vitamin nhóm B, các axit amin, các chất khoáng... Vì vậy, ta có thể coi rượu cấm là thứ đồ uống có độ rượu nhẹ và bổ dưỡng.

* *Rượu cần:* Có lẽ rượu cần là một thứ 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 còn là một

thứ văn hoá của đồng bào miền núi ở các vùng cao nguyên, núi cao này.

Rượu cần cũng là một loại rượu không chưng cất, có vị ngọt, độ rượu nhẹ và cũng giàu các chất dinh dưỡng. Quá trình làm rượu cần cũng tương tự như làm rượu cần hoặc rượu từ tinh bột khi ủ men đến khâu chưng cất, nhưng có khác đôi chút.

Gạo ngâm nước 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 40 g) trộn với 5 kg 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, màn sạch đến khi mốc mốc 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 theo trong thời gian khoảng 1 ÷ 2 tháng ở nơi thoáng mát và khi cơm rượu ngọt 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 trải ra 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 5 ÷ 7 bánh men lá tán nhỏ, rắc đều. Người ta còn dùng xôi nếp nặn thành bánh như bánh dày đem nướng cho cháy để có mùi thơm để dưới đáy chum, rồi cho các loại nguyên liệu đã chuẩn bị vào đầy chum, nén chặt, bịt thật kín, giữ ở nơi thoáng mát. Rượu cần ủ khoảng 3 tháng là được. 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 rượu, như vậy rượu mau hỏng.

Rượu cần làm cho tiếng hát lăm, điệu xoè ngắt ngảy, say tình say nghĩa... Inh noọng ời!

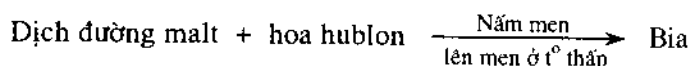


Du khách uống rượu cần dân tộc Thái tại Ngày hội văn hoá các dân tộc Tây Bắc

Chương 6

BIA

Bia (Beer) là thứ đồ uống có độ rượu nhẹ được chế từ thóc malt (đại mạch nảy mầm) và hoa hublon. Có thể định nghĩa một cách sơ giản và cách làm bia (Brew) như sau:



Vai trò của bia đã được khẳng định từ 5000 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% CO₂. Chất hoà tan chủ yếu là hydratcacbon (dextrin, maltoza, glucoza và một ít pentoza), các protein và sản phẩm thủy phân của nó (albumoza, pepton, các axit amin), các chất khoáng (muối kali, natri, phospho, nhôm, canxi, mangan...), một số axit hữu cơ, các vitamin (B₁, B₂, B₅, B₆, PP, biotin) và các chất đắng, chất thơm của hoa hublon.

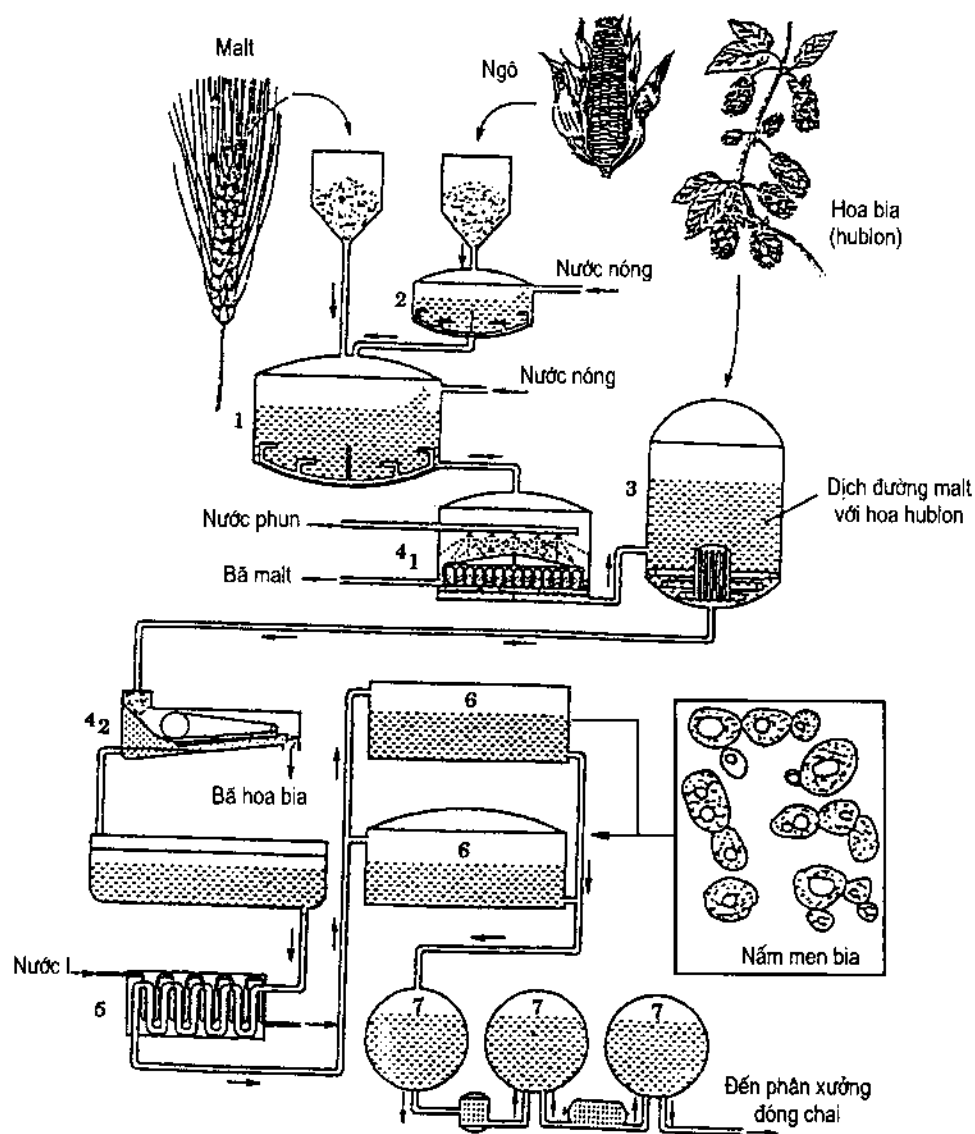
Độ bia người ta tính bằng số % chất hoà tan hoặc đơn giản là hàm lượng đường của dịch đưa vào lên men.

Lên men được tiến hành ở nhiệt độ thấp trong thời gian dài. Vì vậy, CO₂ tạo thành được hoà tan ở trong bia và phần lớn ở dạng liên kết. Khi ta uống, CO₂ 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 I Rắc, 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 được làm bia từ đại mạch. Hiện nay ở Etiopi 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 cỏ mùi thơm. Đến thế kỷ IX vùng Đông Nam Âu có một loại hoa là hublon (dịch theo âm Hán - Việt là "hốt bố") được đưa vào chế biến bia và từ đó định hình như 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 là 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 v.v... từ vài chục năm gần đây, nhưng chưa có kết quả.

Quá trình sản xuất bia theo hình 6.1.



Hình 6.1. Quy trình sản xuất bia:

1- thùng nấu malt; 2- thùng nấu nguyên liệu phụ; 3- thùng nấu hoa hublon; 4_{1,2} - hệ thống lọc ép hoa loại bã; 5- hệ thống làm lạnh; 6- nồi lên men chính; 7- hệ thống lên men phụ

6.1. NGUYÊN LIỆU

6.1.1. 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 phần.

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 dùng cho nước uống, không có mùi vị, không màu, trong suốt, đặc biệt không cho phép có mùi amoniac, vết của kim loại nặng (thủy ngân, bari v.v...).

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 ta 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 để 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 600 mg/l.

Trong nước sản xuất bia không được có NaHCO_3 , NH_3 , HNO_2 , cho phép có NO_3^- không quá 25 mg/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 0,72 mg - đương lượng/lít, độ cứng vĩnh cửu: $0,26 + 0,72$ mg đương lượng/lít, độ oxy hoá 2 mg O_2 /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 mangan không dùng cho nấu bia. Nước trong một xí nghiệp sản xuất bia nên có ba 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 tủa Ca^{2+} và Mg^{2+} , điện ly là 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 (xem thêm mục 4.4).

6.1.2. Thóc malt

Thóc malt là nguyên liệu chính để nấu bia. Thóc malt là các loại ngũ cốc nảy mầm có hoạt tính enzym amylaza và proteaza, có mùi thơm của hạt sấy khô. Nguyên liệu làm là đại mạch, lúa mì, 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 hai hàng hạt là nguyên liệu làm thóc malt tốt nhất. So với loại đại mạch 6 hàng 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 thủy 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 ngâm nước, hạt được 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 hoặc 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 $12 \div 17^{\circ}\text{C}$, thời gian ngâm từ $30 \div 48$ giờ để hạt ngâm no nước có độ ẩm $42 \div 45\%$. 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, hồ hấp mạnh. Có sự thay đổi sâu sắc hệ enzym 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 rải trên sàn xi măng có độ dốc cần thiết để thoát nước (lớp hạt trên sàn dày khoảng $20 \div 30$ cm). Hạt sẽ nảy mầm trong các thiết bị hoặc trên sàn. Hàng ngày phun nước hoặc cho ngập nước để rửa sạch các mùi khó chịu, cho thoát hết khí CO_2 và hạ nhiệt độ. Thời gian nảy mầm $6 \div 8$ ngày, nhiệt độ thích hợp là $15 \div 18^{\circ}\text{C}$. Trong thời gian này phức hệ enzym của hạt được chuyển sang dạng hoạt động để thủy 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 $1,5 \div 2$ 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 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 enzym ít nhất mà vẫn đảm bảo độ khô, màu và mùi của hạt đúng 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 sản xuất các loại bia đen thâm 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 đen có màu nâu đến đen thâm, 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 enzym 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 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 $42 \div 43\%$. Quá trình ủ nảy mầm ở nhiệt độ $13 \div 18^{\circ}\text{C}$ 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 $44 \div 46\%$,

nhệt độ khối hạt có thể đến mức tối đa là $20 \div 22^{\circ}\text{C}$.

Sấy malt vàng không quá 80°C và được chia thành các thang nhiệt cho phù hợp với độ ẩm của hạt.

Sấy ở nhiệt độ 45°C khoảng 12 giờ để độ ẩm của hạt từ 45% xuống còn 10%, sau đó nâng nhiệt độ tới 55°C khoảng 4 giờ, 60°C - 2 giờ, 80°C - 2 giờ, xuống 75°C - 2 giờ.

Tùy từng ca sấy cụ thể thời gian sấy có thể dao động $16 \div 24$ giờ. Độ ẩm cuối cùng của hạt là 3%.

Sau khi sấy hạt được đem xát tách mầm rể, vì mầm rể 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 rể, bảo quản từ $4 \div 6$ tuần để hoàn thiện mới đem dùng. Trong thời gian này mức độ phân tán của các chất keo tăng lên, 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 $20 \div 30\%$ chất khô và khâu sấy làm giảm hoạt lực enzym so với hạt mới nảy mầm khoảng $30 \div 40\%$.

Với malt đen, khi ủ nảy mầm sao cho tích lũy 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 $15 \div 18^{\circ}\text{C}$, còn giai đoạn sau có thể tăng đến 22°C . thời gian ủ là $7 \div 9$ ngày.

Đặc điểm của malt đen là mầm 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 khâu sấy, đặc biệt là chế độ sấy để cho melanoit hoàn chỉnh.

Sấy malt đen cần:

- hạ được độ ẩm hạt mầm từ $40 \div 45\%$ 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 và hàm ẩm hết sức nghiêm ngặt.

Thời gian sấy malt đen là 48 giờ, nhiệt độ tối đa là 105°C ở máy sấy 2 tầng. Ở giai đoạn đầu: 14 h đưa nhiệt độ tăng dần đến 40°C độ ẩm hạt tới 20%; $3 \div 4$ n tiếp theo nâng nhiệt độ đến $60 \div 65^{\circ}\text{C}$. 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 h 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 h đầu nhiệt tăng lên 75°C độ ẩm giảm xuống còn 5%. Trong 3 - 4 h tiếp theo được nâng đến $100 \div 105^{\circ}\text{C}$ 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 lẫn vào malt thường theo tỷ lệ $5 \div 10\%$ 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 $110 \div 170^{\circ}\text{C}$.

Malt tươi trước khi đem sấy được tưới nước với liều lượng $10 \div 15$ lít nước cho 100 kg malt, trộn đều, để khoảng 12 h để enzym tiếp tục hoạt động, đặc biệt là enzym xitotaza có trong thóc malt, thuỷ phân những thành phần 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 lipid v.v... Sau đó malt được đưa vào lò sấy đặc biệt, nhiệt có thể nâng đến 170°C . Thời gian sấy $2 \div 3$ h.

Từ malt khô cũng có thể chế ra malt caramen.

Dung trọng malt caramen là $400 \div 450$ g/l, độ ẩm $5 \div 6\%$, chất khô hoà tan $40 \div 60\%$, đường khử $30 \div 50\%$.

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 $220 \div 225^{\circ}\text{C}$. 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 h. 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 $2 \div 3\%$ và sau một thời gian bảo quản là $5 \div 6\%$, chất hoà tan đạt $60 \div 65\%$.

* *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 lên tới 20°C trong một ngày đêm, sau đó đem malt tươi dồn đông trong $1 \div 2$ ngày và nhiệt tăng tới $50 \div 52^{\circ}\text{C}$ (giữ ở nhiệt độ này khoảng $16 \div 24$ h). 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, rẽ ngay sau khi sấy, rồi đem đánh bóng (loại bỏ vỏ ngoài).

Malt thành phẩm khi mới sấy và tách mầm rẽ 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: $0,3 + 0,16$ mg iot/l lít nước (malt vàng), $0,7 + 1,3$ mg iot/l 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 thâm màu ngọt đậm, mùi thơm của các loại hạt chấy.

+ *Độ sạch:* không lẫn tạp chất, cho phép hạt bị sâu bệnh $\leq 1\%$, hạt vỡ, mảnh vỡ tối đa là $0,5\%$, hạt không nảy mầm $\leq 5\%$.

- *Các chỉ tiêu cơ học:*

+ *Dung trọng* chia làm 4 loại: rất nhẹ ($480 + 500$ g/l), nhẹ ($500 + 530$ g/l), trung bình ($530 + 560$ g/l), nặng (> 560 g/l).

+ *Trọng lượng khô của 1000 hạt:*

Trung bình là $28 + 38$ g/1000 hạt (theo trọng lượng có độ ẩm) và $25 + 37$ g/1000 hạt (theo chất khô tuyệt đối).

- *Các chỉ tiêu hoá học:*

+ *Độ ẩm cho phép:* malt mới sấy $\leq 4,5\%$, trong thời gian bảo quản $\leq 7\%$.

+ *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 enzym có trong hạt được giải phóng khỏi các liên kết ở trong hạt và các enzym được

hoạt hoá xúc tác thủy 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 enzym này tham gia vào các phản ứng hoá sinh biến 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 để 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 enzym quan trọng là xitaza, amylaza, proteaza, fitaza... Đặc biệt là hai nhóm amylaza và proteaza là các enzym vô cùng quan trọng trong nghề làm bia.

* *Xitaza*: Nhóm này gồm hai enzym là xitolactaza và xitolaza. Chúng xúc tác thủy phân hemixenluloza và các chất dạng keo thành các hợp chất trung gian, sau đó thành các loại đường đơn hexoza, pentoza và các sản phẩm khác.

Khi nảy mầm xitaza tham gia và phân cắt hemixenluloza - 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 enzym khác xâm nhập vào bên trong tế bào để thủy 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 thủy 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 pentoza), 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 maltoza, dextrin và glucoza thì cần phải thủy phân tinh bột nhờ enzym amylaza.

Amylaza của thóc malt là một nhóm gồm 3 enzym: α -amylaza, β -amylaza và amylophosphataza. Chúng có mặt ở 1/3 nội nhũ gần phía cuống hạt, ở gần phôi.

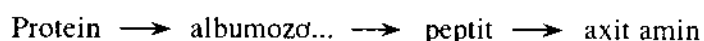
α -Amylaza phân cắt tinh bột thành các đoạn dài ngắn khác nhau gồm một số cấu tử là glucoza (monomer) ta thường gọi là dextrin và một ít đường maltoza, có thể có glucoza. Khi nấu tinh bột sẽ trở thành hồ có độ nhớt dính khá cao. Chỉ cần một lượng nhỏ α -amylaza là hồ tinh bột đã bị loãng tức thì do các thành phần amyloza 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 enzym 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 maltoza và có thể một ít thành glucôza) lại cao hơn. Tác dụng của β -amylaza và các mạch amyloza và amylopectin của tinh bột thường vào các nối cho sản phẩm đường đôi là maltoza.

Nhiệt độ tối thích của β -amylaza là 63°C , pH thích hợp là gần 4,8. Hai enzym 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 enzym bằng hoạt lực Diastaza,

Amylophosphatase chỉ hoạt động trong thời gian nảy mầm. Trong hạt ngũ cốc nảy mầm nói chung không có γ -amylaza (glucoamylaza).

* **Protease:** Enzym proteaza xúc tác quá trình thủy phân protein. Trong hạt nảy mầm enzym này thực chất gồm hai enzym là proteinaza và peptidaza tác dụng kế tiếp nhau. Dưới tác dụng của chúng protein sẽ bị biến đổi như sau:



Albumozơ là polypeptit phức tạp nhưng không có tính động tự.

Cùng với nhóm xitaza nhóm enzym proteaza cũng tham gia vào quá trình phá vỡ thành tế bào của nội nhũ.

Sự thủy phân của protein bắt đầu bằng hoạt động của proteinaza 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 proteinaza là $56 \div 58^{\circ}\text{C}$ và peptidaza - $48 \div 52^{\circ}\text{C}$. Chung cho proteaza chúng ta chấp nhận là $48 \div 52^{\circ}\text{C}$ (nếu lấy $56 \div 58^{\circ}\text{C}$ thì peptidaza giảm hoạt tính rất nhiều).

pH thích hợp cho protein là $4,5 \div 5$, cho peptidaza - $7,8 \div 8$. Tổng hợp giá trị thích hợp cho cả hai enzym là $4,8 \div 5,2$.

* **Phitaza:** Enzym này xuất hiện trong thời gian hạt nảy mầm và khi nấu mới hoạt động mạnh, xúc tác quá trình thủy phân hợp chất phospho hữu cơ, trước hết là hợp chất phitin có nhiều trong cám, thành axit phosphoric. 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 enzym khác nữa, nhưng vai trò không rõ rệt lắm trong nghề làm bia và không được giới thiệu trong tài liệu này.

6.1.3. Hoa hublon (hoa hốt bố theo âm Hán - Việt hay hoa bia)

Cây 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 của 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 nhều 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 trồng như Cộng hoà Liên bang Đức, Ba Lan, Pháp..., trong đó Tiệp Khắc (nay là Cộng hoà Sec và Cộng hoà Slovakia) là nước trồng hoa có chất lượng và 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: nhều 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 giá trị nhất.

Hoa tươi vừa hái về có độ ẩm $70 \div 75\%$. Độ ẩm này khiến hoa không bảo quản được lâu, vì vậy phải tiến hành sấy, để hoa có độ ẩm $10 \div 13\%$. Hoa sấy xong được bảo quản rất chu đáo ở phòng có độ ẩm không khí khoảng $85 \div 90\%$, ở nhiệt độ $29 \div 30^{\circ}\text{C}$ trong thời gian $10 \div 15$ ngày. Với thời gian bảo quản như vậy, độ ẩm sẽ phân bố đều trong hoa, cánh hoa không bị giòn gãy. Để ức chế sự phát triển của vi sinh vật trên hoa người ta xử 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 $0,5 \div 2^{\circ}\text{C}$.

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 abumin (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	$8 \div 14$
Xenluloza	$12 \div 16$
Hợp chất N	$15 \div 24$

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 abumin 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°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.

6.1.4. 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 maltoza trong quá trình đường hoá.

Các nguồn nguyên liệu này là gạo, ngô, mì, mạch đen, cao lương, sắn và khoai tây. Trong số này thường được dùng là gạo tẻ, ngô đã tách phôi và hạt mì. 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 saccaroza ở dạng đường kính, đường hoa mai hoặc đường nâu.

6.2. 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

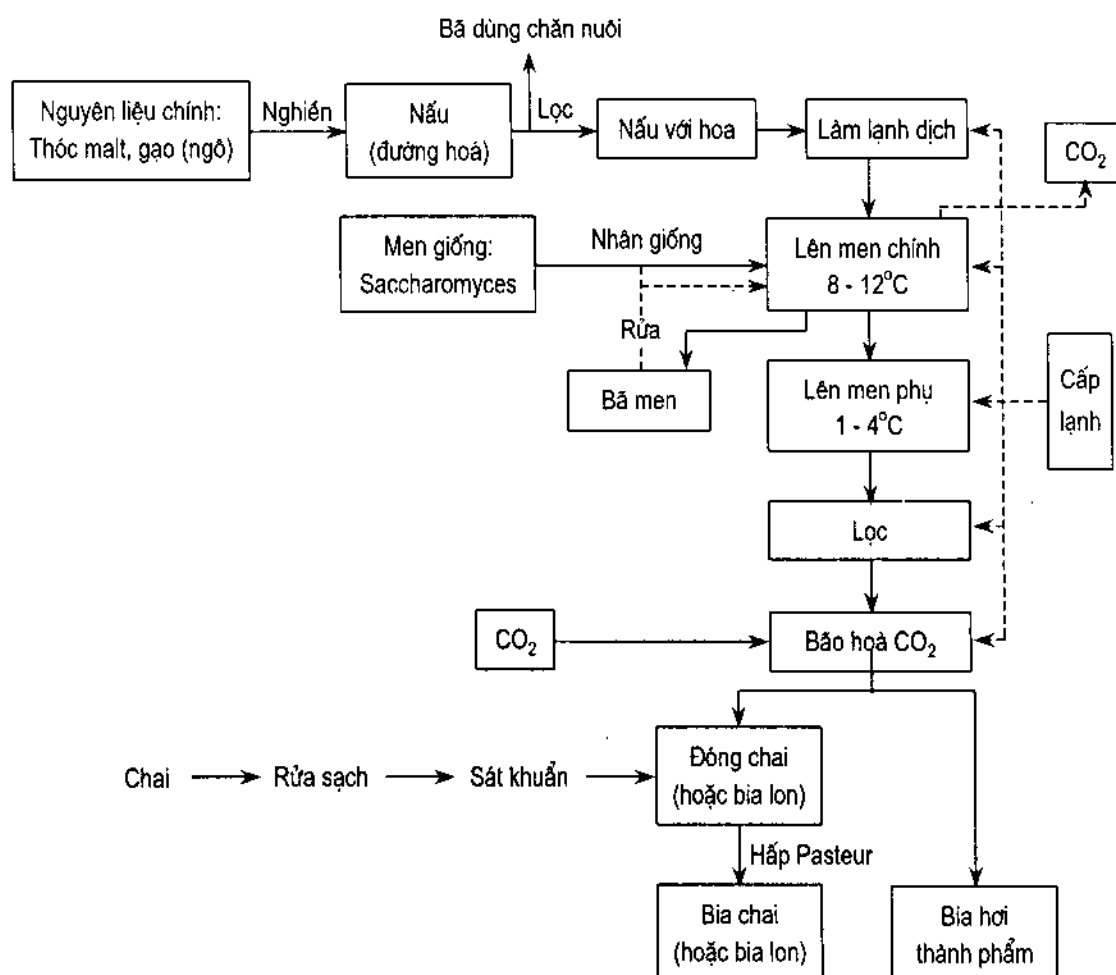
vật trong đó tác nhân chuyển hoá tinh bột thành đường là các enzym có trong thóc malt.

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.

Lên men bia về cơ bản cơ chế của quá trình 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.

6.2.1. 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 đều theo sơ đồ sau:

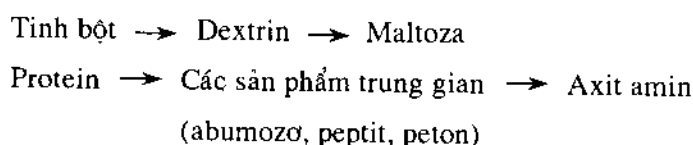


6.2.2. Nấu - đường hoá hay là quá trình chuẩn bị dịch lên men

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 + 5% bột malt) với tỷ lệ nước đã được tính toán. Tổng lượng nước dùng tùy thuộc vào các công thức phối liệu, thường tỷ lệ nguyên liệu với nước là $1 : 4 \div 1 : 8$.

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 enzym amylaza và proteaza hoạt động. Thực chất của quá trình này là quá trình thủy phân tinh bột và protein. Sản phẩm thu được là đường maltoza và axit amin cùng với các sản phẩm trung gian của quá trình thủy phân:



Cũng không kém phần quan trọng là quá trình thủy phân protein khi nấu. Những sản phẩm trung gian và cuối cùng của quá trình này là 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 enzym trong bột malt hoạt động tốt nhất: 48 - 52°C cho proteinaza, 60 - 65°C cho β -amylaza và 70 - 75°C - α -amylaza.

Khi nấu chín dịch bột để 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°C dừng lại khoảng 15 - 20 phút, rồi nâng tiếp tới 70°C hoặc hơn một chút, bột sẽ hồ hoá và có mặt α -amylaza trong bột malt sẽ làm hồ loãng (hiện tượng này được gọi là dịch hoá), sau đó tiếp tục đun tới 100°C để bột chín hoàn toàn. Sau khi chín khối dịch được hạ nhiệt độ tới 75°C thì cho phần chủ yếu bột malt đã hoà với nước ấm ở nhiệt độ 48 - 52°C (và giữ nhiệt độ này trong thời gian thích hợp) vào nổi để tiếp tục đường hoá rồi nâng dần tới 63 - 68°C giữ ở nhiệt độ này khoảng 30 - 40 phút, sau đó nâng nhiệt tới 72 - 75°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°C.

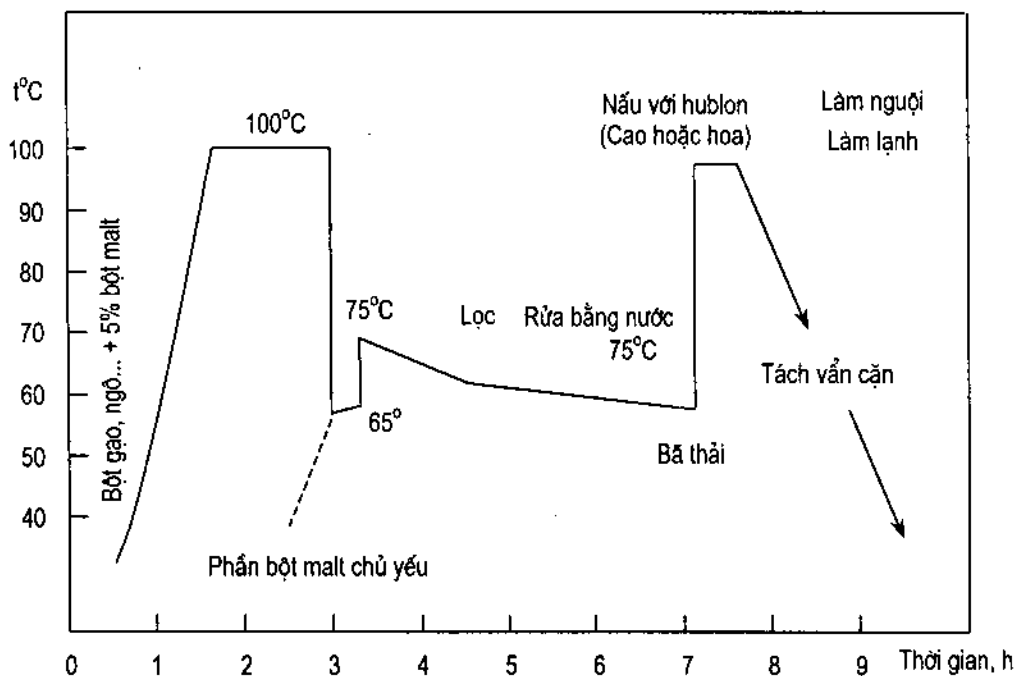
Dịch đường thu được có màu vàng sáng hơi ánh nâu, trong suốt, có độ đường khoảng 8 - 12% (đo bằng khúc xạ kế hoặc thước đo độ đường ở nhiệt độ 20°C). Đối với bia hơi thì độ đường ban đầu là 8 - 9%, với bia chai từ 10 - 12%. Còn sau khi lọc nếu chưa đủ đường có thể thêm đường cát hoặc đường kính.

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.

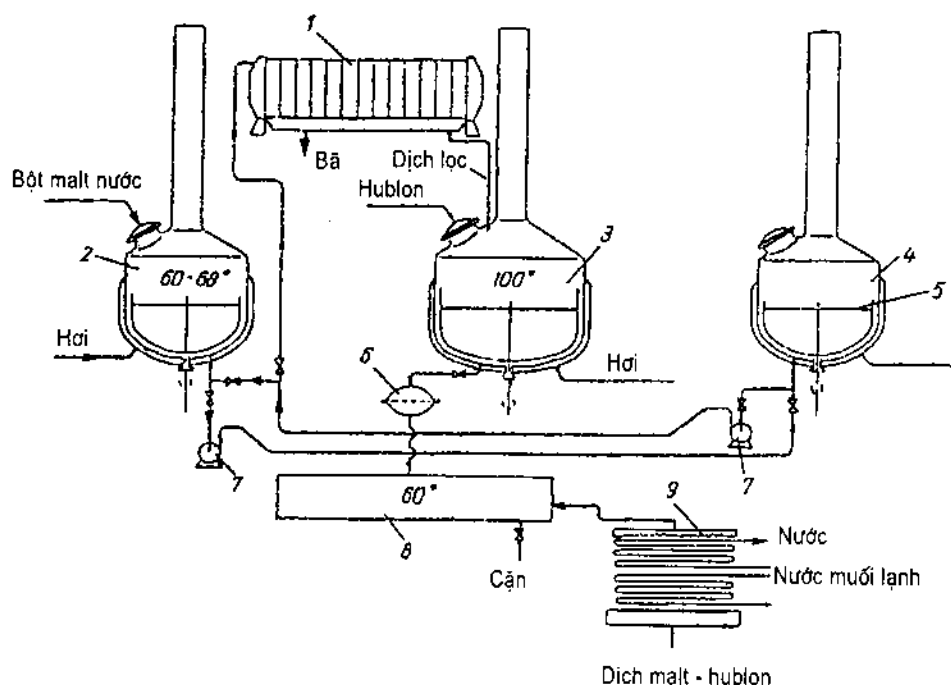
Dịch đường đem nấu sôi với houblon. Khi nấu houblon sẽ chiết ra các axit đắng, nhựa, tinh dầu, tanin vào dịch. Axit đắng và nhựa đắng sẽ làm cho bia có vị đặc trưng, ổn định các keo và tạo bọt bền vững, tanin kết hợp với phần protein chưa bị thủy phân có trong dịch sẽ kết vón làm cho dịch trong thêm 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 houblon sẽ tạo cho bia hương thơm, vị đắng đặc biệt.

Sau khi nấu sôi với hoa cần phải lọc bỏ bã hoa và dịch được 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 6.2 và 6.3.



Hình 6.2. Biểu đồ nấu đường hoá và chuẩn bị dịch đường malt - hublon



Hình 6.3. Sơ đồ chuẩn bị dịch đường malt - houblon (dịch lên men bia):

1. lọc khung bản; 2. nồi đường hoá; 3. nồi nấu dịch đường với hoa houblon; 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 enzym 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 enzym có hoạt lực tối đa.

Khi nâng nhiệt khối dịch malt tới $48 - 52^{\circ}\text{C}$ và giữ trong khoảng thời gian thích hợp để tạo điều kiện cho phytaza 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 còn 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 (vẩn kết tủa) 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 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 maltoza 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 phân lớn lại là dextrin. Dưa 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 enzym 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 maltoza) và các chất không phải là đường (là hiệu số 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 glucit có trong dịch đường malt (%) như sau:

Fructoza 1 - 3; glucoza 8 - 10; sacaroza 2 - 6; maltoza 38 - 40; maltotrioza 11 - 19; maltotetraoza 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 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 này không được chính xác nhưng được phép dùng trong kiểm tra sản xuất.

6.2.3. 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 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 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^o1 và men N^o2. Từ hai giống này được chọn theo cho các chủng (nòi) rất đa dạng của men bia dùng tới ngày nay.

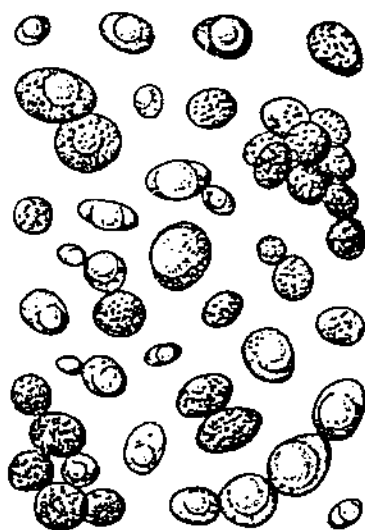
Trong thực tế sản xuất ta thấy có hai loại men bia được dùng trong công nghiệp: men nổi và men chìm.

Men nổi thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*. Loài này thường được dùng sản xuất các loại bia thâm màu hoặc các loại bia đặc biệt. Men nổi chỉ phát triển và lên men ở 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).

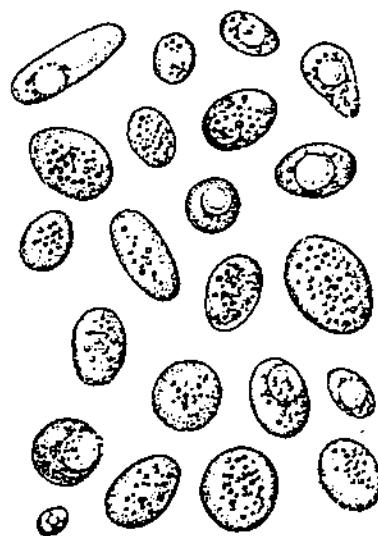
Men chìm thuộc loài *Saccharomyces carlsbergensis*, phát triển được và gây lên men ngay ở nhiệt độ thấp (6 - 8°C). Loài men này được dùng phổ biến trên toàn thế giới để sản xuất các loại bia vàng sáng màu. Các tế bào nấm men khi lên men chúng thường kết dính vào nhau ở dạng bụi hoặc dạng bông và dễ kết 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 ngấn ngày.

Hình dáng của men bia được giới thiệu ở hình 6.4 và 6.5.



Hình 6.4. *Saccharomyces carlsbergensis*
(× 2000)



Hình 6.5. *Saccharomyces cerevisiae*
(× 2000)

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 thuần thực 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 trisaccharit thành fructoza và meliboza, sau đó dưới tác dụng của enzym melibiaza các đường glucoza và galactoza được tạo thành. Vì vậy, men chìm có thể lên men rafinoza hoàn toàn. Còn men nổi chỉ lên men được 1/3 rafinoza. Men bia lên men được các đường glucoza, fructoza và maltoza, nhưng không lên men được tinh bột, dextrin (đối với nấm men chìm). Men nổi có enzym pyruvatoxydaza, do vậy có thể sử dụng trực tiếp glucoza vào hô hấp, cho nên nó có khả năng sinh trưởng và lên men nhanh hơn. Tế bào *Saccharomyces carlbergensis* hình ovan, có kích thước 6 - 12 μm (hình 6.4 và 6.6). 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.



Hình 6.6. Tế bào men bia

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 phát, 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% CO₂ men nảy chồi chậm, còn ở 15% CO₂ 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% H₂SO₄ 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 v.v...

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 men bia là 40 - 46% lượng chất khô. Ở giai đoạn sinh trưởng 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.

*** Các nòi nấm men dùng trong sản xuất bia**

Nhà bác học Đức Hansen lần đầu tiên dùng các giống 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 về hương vị. Ngoài ra còn giảm sự tạp nhiễm trong quá trình sản xuất cũng như trong thành phẩm.

Ngày nay, nhiều nước trên thế giới dùng các nòi men chìm trong sản xuất. Các nòi này thuộc giống *Sacchromyces carlbergellsis*. 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 776 tách được 2,76% CO₂.

Nòi 11 tìm được ở Liên Xô (cũ) năm 1939, lên men nhanh và mạnh, không yêu cầu cao về chất lượng nguyên liệu. Trong giai đoạn lên men chính lên dịch có 11% chất khô, nó tách được 2,96% CO₂. So với 776 thời gian lên men chính rút ngắn được 20%. Tế bào hình ovan 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% CO₂. Tế bào hình ovan (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 và sinh ra 2,4% CO₂

trong giai đoạn lên men chính, trên dịch có 11% chất khô. Tế bào hình ovan $(6 - 8) \times (8 - 10)$ μm , khả năng kết lắng tốt cho bia vị hoàn thiện. Nồi này cho phép dùng nước có độ cứng cao trong sản xuất bia.

Nồi 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.

Nồi 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 nồi 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 nồi men nổi là nồi 191-K, nồi này lên men mạnh các monosaccarit và maltoza, nhưng không lên men được lactoza và rafinoza.

**** Giữ giống men bia***

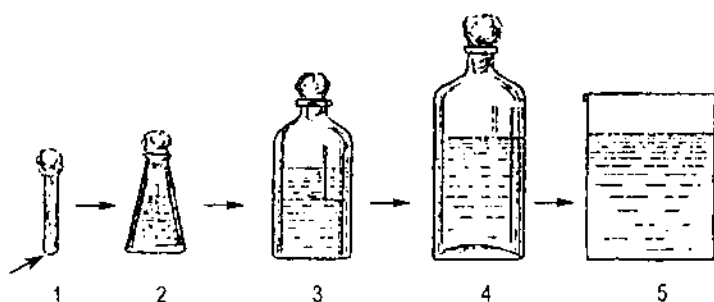
Những nồi men bia thuần khiết được tách ra từ một tế bào, nuôi cấy và bảo quản sao cho giữ được những tính chất quý ban đầu của chúng. Trong bảo quản quá trình sống của men giống xảy ra rất chậm và hạn chế sự phát triển của chúng. Giữ được trạng thái tiềm sinh này có thể áp dụng các phương pháp bảo quản ở nhiệt độ thấp 2 - 4°C (không quá 8°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°C trong bão hoà CO_2 có thể giữ được những tính chất ban đầu, nâng cao được khả năng lên men và cải thiện được mùi vị của bia.

**** Nuôi cấy giống men bia***

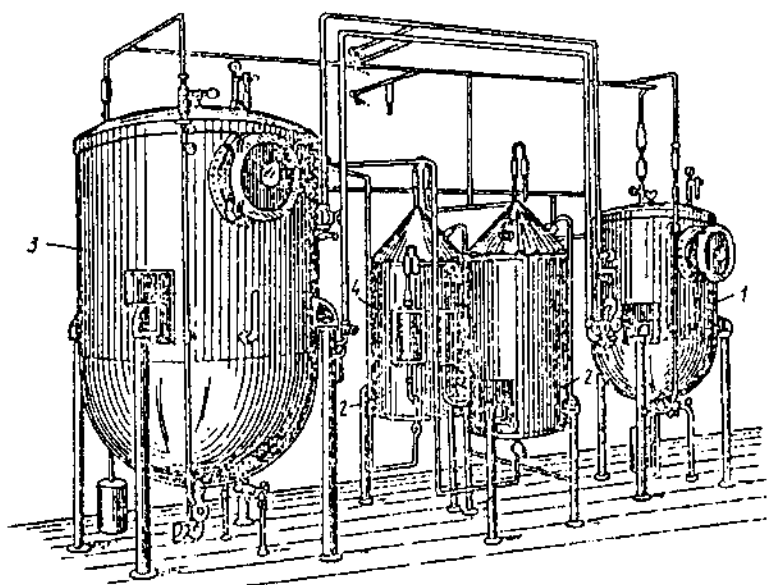
Nuôi cấy men bia trong sản xuất cũng theo nguyên tắc tăng dần thể tích và số lượng tế bào để đảm bảo khả năng lên men: giống từ ống nghiệm cấy qua các bình, các thùng rồi chuyển vào thùng lên men chính. Đầu tiên giống ống nghiệm được chuyển vào các bình 300 ml dịch nước malt, giữ ở 18 - 25°C tới khi phát triển mạnh. Từ đây chuyển tiếp qua các bình 3 - 5 lít có 2 - 3 lít dịch đường malt có hoa houblon và nuôi nhân giống ở 18 - 25°C. Tiếp đó nuôi giống ở các thùng 200 - 400 lít có 100 - 200 lít môi trường ở 12°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 6.7 và trong phân xưởng 6.8.

Nếu nhà máy có thiết bị Greyner thì việc nhân giống sẽ từ ống nghiệm qua các bình Carlsberg, lên men ở 7 - 8°C trong 5 - 6 ngày và tiếp tục tăng dần qua 200 - 300 lít rồi đưa vào thiết bị này cho lên men ở 8°C trong 3 ngày, sau đó đưa vào các thùng lên men.



Hình 6.7. Sơ đồ nhân giống men bia thuần chủng trong phòng thí nghiệm

1



Hình 6.8. Thiết bị Greyer - 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 - houblon 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 có nghĩa là men phát triển tốt thì chuyển sang bình 3 đã có đầy dịch được thanh trùng tại đó. Trước khi chuyển giống từ bình 2 sang 3, người ta giữ lại 10 lít giống và chứa vào bình nhỏ 4 ở bên cạnh. Mẻ tiếp theo sẽ dùng giống gốc 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 4.7a và 4.7b.

Yêu cầu của giống về mặt vi sinh là thuần chủng, có nghĩa là giống đưa vào lên men không được nhiễm tạp khuẩn. Vì vậy, quá trình nhân giống phải làm thật sạch sẽ đảm bảo không bị tạp nhiễm. Các dụng cụ phải rửa sạch, tráng bằng nước sôi hoặc bằng 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.

*** 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 houblon. 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 hờ 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°C. Trước khi đưa vào lên men có thể hoạt hoá giống men đã rửa bằng cách cho vào dịch 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 nhiễm tạp nhiều 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 đem dùng cho lên men.

Cũng có thể làm sạch men như sau: dùng dịch chiết houblon bằng kiềm 2% có chứa 500 - 700 mg/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.

6.2.4. Lên men

Quá trình lên men được thực hiện qua hai giai đoạn: Lên men chính và lên men phụ.

Dịch đường malt - houblon đã được làm lạnh tới 10°C 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/l ml).

Lên men chính được tiến hành ở thùng kín hoặc hờ, nhiệt độ thích hợp là 8°C (có thể ở 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 đường đều 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 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 tới hơn 1 atm, để có thể đảm bảo cho áp lực làm việc là 0,3 - 0,7 atm. 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 còn quá ít sẽ làm cho quá trình “chín bia” kéo dài, lượng men còn lại thích hợp trong lên men phụ là 1,2 - 1,3 g/l.

Nhiệt độ lên men phụ giữ ở 1 - 4°C. Trong giai đoạn này vẫn tiếp tục lên men, CO_2 sinh ra được giữ lại trong thùng và hoà tan dần vào dịch, pH 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 vẫn cùng với men lắng xuống đáy thùng làm cho bia trong và sáng màu. Thời gian lên men phụ tùy 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 bia “chín”, bảo 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 nó 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. Sau đó vào lên men phụ, tăng trữ, lượng diaxetyl giảm rõ rệt và chuyển thành axetoin. Nếu hàm lượng axetoin có trong bia vượt quá 2,3 mg/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 - 0,6 g/l (ngưỡng 0,2 mg/l là lý tưởng) và axetoin khoảng 0,8 - 1,2 mg/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 rỉ có hai vỏ và lên men chính phụ cùng một thùng với sự điều chỉnh nhiệt độ bằng cách bơm nước muối hoặc glycerin lạnh qua vỏ hoặc ống xoắn ruột gà chạy bên trong (lên men “gia tốc”).

6.2.5. Hoàn thành sản phẩm

Lọc và bão hoà CO₂:

Bia cần phải lọc bằng các máy lọc ống, lọc đệm khung bản (filter press) hoặc qua máy li 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 CO₂ 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 CO₂ và dịch bia bị sục vẩn khó lọc.

Dịch bia đã lọc, nếu không đủ hàm lượng CO₂ hoà tan thì phải làm bão hoà CO₂ trong các bình thép không rỉ chịu được áp lực tới 7 atm và có bộ phận phân tán khí tốt. Điều kiện bão hoà CO₂ là nhiệt độ ở từ 1 - 5°C (có trường hợp bão hoà dịch ở -5°C trong thiết bị khuấy bơm đảo liên tục), áp suất bão hoà CO₂ ở 4 atm. Khí CO₂ 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 v.v...

Sau khi bão hoà CO₂ dịch bia được tàng trữ trong lạnh ít nhất là 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 CO₂ với thiết bị đẳng áp.

Đóng chai:

Chai dùng đóng bia thường là loại 0,5 l. 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 cặn bẩn đem hấp hoặc luộc chín để khử khuẩn. Nút làm bằng sắt tây và đệm cao su là loại dùng cho thực phẩm cũng được khử khuẩn trước khi đóng chai.

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 Paster (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 enzym proteaza, axit ascorbic, polyamit v.v... là những chất ổn định vào bia.

6.3. SỬ DỤNG CÁC CHẾ PHẨM ENZYM TRONG SẢN XUẤT BIA

Việc nghiên cứu sử dụng các chế phẩm enzym vào sản xuất bia được các nhà làm bia trên thế giới quan tâm từ những năm 50 của thế kỷ XX, nhằm thay thế một phần thóc malt bằng nguyên liệu chứa tinh bột không phải là malt. Nhiều công trình đã có kết quả áp dụng vào sản xuất và có hiệu quả kinh tế cao.

Những chế phẩm enzym từ vi sinh vật được dùng trong công nghiệp bia là:

- α -amylaza từ vi khuẩn, từ nấm mốc dùng trong quá trình làm loãng bột nấu và đường hoá.
- Proteaza để phân huỷ protein trong nguyên liệu thành các hợp chất trung gian và axit amin.
- Xitaza để thuỷ phân các chất gồm và xenluloza trong nguyên liệu để cho dịch lên men sau này dễ lọc, tạo điều kiện hình thành vị bia đầy đủ và tăng độ bền của bột. Sử dụng các chế phẩm của enzym này cho phép dùng tới 50% thóc đại mạch chưa nảy mầm và có thể dùng thóc malt có chất lượng trung bình cũng có thể cho bia chất lượng cao.
- Các chế phẩm enzym chuyển dextrin trung gian thành dextrin cuối có thể lên men để tăng hiệu suất lên men và bia thành phẩm dễ lọc, có độ bền cao hơn.
- Các chế phẩm enzym giúp chuyển hoá diacetyl thành axetoin làm rút ngắn thời gian “chín” bia trong lên men phụ và tàng trữ.

Sau đây là một số chế phẩm enzym của hãng Novo Industry (Đan Mạch) trong công nghiệp bia ở nhiều nước trên thế giới cũng như ở nước ta.

6.3.1. Termamyl 120L

Chế phẩm enzym α -amylaza chịu nhiệt, pH trung tính ở dạng lỏng, hoạt tính 120 kilonovo, được sản xuất từ dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus licheniformis* trong phân tử có ion Ca^{2+} . Enzym này thuỷ phân tinh bột ở mối α -1,4glucozit trong phân tử amyloza và amylopectin. Nhờ vậy, tinh bột sẽ chóng bị phân giải thành dextrin tan trong nước.

Dùng trong nấu bia ở khâu dịch hoá các loại bột không phải là malt ở 95 - 105°C với liều lượng enzym là 0,05 - 0,1% so với lượng bột. Chế phẩm enzym này hoạt động ổn định ở nhiệt độ trên nếu trong dịch chế phẩm có một lượng 50 - 70 ppm Ca^{2+} .

Dùng enzym này có thể thay phần bột malt lứt (khoảng 5% so với bột) khi dịch hoá và có thể tăng tỉ lệ bột không phải malt trong công thức nấu, thời gian nấu có vẻ như ngắn hơn.

6.3.2. Celluclast 1,5L

Chế phẩm enzym xenlulaza dạng lỏng, được sản xuất từ dịch nuôi cấy của *Trichoderma reesei* theo phương pháp chìm, hoạt động tối ưu ở 50 - 60°C và pH = 4,5 - 6. Enzym này phân huỷ xenluloza ở mối liên kết β -1,4 glucan thành oligosacarit cũng như disacarit và glucan thành glucoza, xenbioza.

Nó được dùng khi cần phá vỡ xenluloza để tạo thành đường có khả năng lên men, làm giảm độ nhớt của dịch hoặc tăng hiệu suất chiết của nguyên liệu có nguồn gốc thực vật. Trong nấu bia nó được thêm vào malt với liều lượng 0.2 - 1 kg/T nguyên liệu thay thế.

6.3.3. Cereflo

Chế phẩm enzym β -glucanaza được thu nhận từ dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* theo phương pháp chìm. Enzym này là Endo-glucan có tác dụng cắt mối liên kết β -1,3 và β -1,4-glucan trong bột đại mạch từ oligosacarit thành những mạch 3 - 5 gốc glucoza.

Nó dùng trong công đoạn nấu malt với bột để giảm độ nhớt của dịch, do vậy lọc dễ hơn. Khoảng nhiệt độ hoạt động tối ưu của enzym này là 50 - 70°C với pH = 6,5 - 7,5.

6.3.4. Fungamyl 800L

Chế phẩm enzym amylaza từ nấm mốc *Aspergillus oryzae*, dạng lỏng, hoạt lực 800 Kilonovo, chế phẩm này cắt liên kết α -1,4-glucozit trong phân tử amyloza và amylopectin của tinh bột hoặc của dextrin, oligosacarit của dịch. Kết quả là một lượng lớn maltoza được tạo thành.

Trong sản xuất bia, fungamyl được thêm vào trong quá trình nấu ở nhiệt độ 55 - 60°C, pH = 4 - 5 để tăng khả năng đường hoá của malt và bổ sung vào dịch trong giai đoạn lên men để chuyển hoá thêm một phần dextrin thành đường. Nhờ vậy hiệu suất lên men có thể tăng được 2 - 5%.

Liều lượng dùng:

- 0,02 - 0,05% so với tổng nguyên liệu khi nấu;
- 10 ml vào 1 lít dịch trong lên men.

6.3.5. Neutraza

Chế phẩm proteaza được thu nhận từ dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis*. Trong phân tử enzym này có ion kim loại Zn^{2+} và trung tính. Neutraza cũng được ổn định hoạt tính bằng ion Ca^{2+} , khoảng nhiệt độ tối ưu là 45 - 55°C và pH = 5,5 - 7,5.

Trong sản xuất bia, neutraza được dùng để hỗ trợ proteaza của malt thuỷ phân protein có trong nguyên liệu hạt chưa nảy mầm.

Liều lượng sử dụng là 0,06 - 0,1% so với lượng bột không phải malt.

6.3.6. Finizym 200L

Chế phẩm enzym β -glucan được sản xuất bằng chủng mốc *Asp. niger* theo phương pháp lên men chìm. Enzym này thuỷ phân ở mối β -1,3 và β -1,4-glucan thành oligosacarit và những phần nhỏ của disacarit. Khoảng tối ưu nhiệt độ là 60°C, pH = 4 - 5,5.

Finizym dùng trong quá trình lên men là ủ chín bia để hạn chế hiện tượng khó lọc do β -glucan. Liều lượng dùng: 0,5 - 1 kg/100 hl dịch lên men.

6.3.7. Maturex L

Chế phẩm enzyme chuyển hoá α -acetolactat (Decarboxylaza α -acetolactat viết tắt là ALDC). Đầu tiên người ta thu nhận enzyme này nhờ vi khuẩn *Enterobacter aerogenes*, sau đó nhờ đến *Bacillus licheniformis*, *B. brevis* và đến nay chế phẩm enzyme này đã được sử dụng vào quá trình lên men để rút ngắn thời gian ủ chín bia. Người ta đã kết luận rằng, dùng enzyme này vào dịch mới lên men có tác dụng khử bỏ các α -acetolactate và hydroxylbutyrat - axeto trong vòng 24 giờ ở 100°C tới giới hạn cho phép hương vị của các dioxeton bay hơi tương ứng (diacetyle và 2,3-pentanedion) mà không ảnh hưởng gì đến phẩm chất quan trọng của bia.

Liều dùng: 0,02 ppm enzyme tinh khiết là đủ để giảm diacetyle có trong bia xuống tới mức dưới 0,15 ppm - giới hạn trên của ngưỡng hương vị.

Dùng trộn với dịch ngay sau khi làm lạnh chuẩn bị tiếp giống bắt đầu lên men, thời gian lên men phụ có thể rút ngắn được 5 - 7 ngày vẫn đạt chất lượng bia thành phẩm.

Hiện nay nhiều nước trên thế giới đã sản xuất được các chế phẩm enzyme dùng vào trong công nghiệp bia, như hãng "Rapidara" của Pháp, các hãng "Sankio", "Daiva Kesey" của Nhật, "Naalden" của Hà Lan, và các hãng của Mỹ, của CHLB Đức, CH Séc, Nga v.v...

Việc dùng enzyme trong sản xuất bia có những hiệu quả:

- Tăng nguyên liệu tinh bột không phải malt trong thành phần công thức nấu bia.
- Tăng hàm lượng chất hoà tan có thể lên men và như vậy tăng hiệu suất lên men.
- Có thể dùng malt chất lượng thấp và rút tỷ lệ malt trong khâu nấu đường hoá.
- Dịch lên men giảm độ nhớt dễ lọc.
- Rút ngắn được thời gian nấu và thời gian lên men phụ mà chất lượng bia có vẻ được cải thiện hơn.

Nói chung, việc sử dụng enzyme vào nấu bia là một việc làm rất có ích và cần khuyến khích.

6.4. SINH VẬT GÂY HẠI TRONG SẢN XUẤT BIA

Vi sinh vật nhiễm vào dịch lên men và bia thành phẩm gây ra những mùi vị lạ, làm bia chóng hỏng và làm giảm chất lượng của bia.

Những vi sinh vật tạp nhiễm của bia thuộc ba nhóm: nấm men, vi khuẩn và nấm mốc.

6.4.1. Nấm men

Trong sản xuất bia thường gặp những men dại, chúng khác với men bia ở hình thái, tạo thành bào tử dễ dàng. Chúng làm cho bia có mùi vị khó chịu và làm đục bia.

Các men đại của bia gồm có:

Saccharomyces pasteurianus dễ lẫn với men nhân giống, có hình tròn, hình ovan dài, dễ tạo thành bào tử sau 24 - 48 giờ. Bị nhiễm giống này từ không khí, bia có mùi lạ và vị đắng, bia bị vẩn đục và khó sáng màu.

Saccharomyces turbidans có hình ovan ($2,5 \times 6 \mu\text{m}$), tạo thành bào tử sau 24 - 48 giờ. Bị nhiễm giống này từ không khí, làm thay đổi vị bia và bia bị đục mạnh. *Saccharomyces cerevisiae* var. *cratericus*, *Saccharomyces willianus* và *Hanseniaspora apiculata* làm hỏng bia nhanh. Chúng tạo thành cặn và gây cho bia có vị khó chịu. Tế bào của các giống này hình quả chanh, thường gặp ở các loại quả.

Các men đại nguy hại cho bia hơn cả là *Candida mycoderma*. Chúng phát triển trên bề mặt dịch lên men và bia khi đủ không khí và tạo thành màng. Các men này không lên men rượu, mà lại oxy hoá rượu và axit hữu cơ thành khí cacbonic và nước. Trong thời gian nảy chồi các tế bào liên kết với nhau tạo thành các cành nhánh. Không tạo thành bào tử. Ngoài *Candida mycoderma* còn gặp *C. guillemondii* và *C. crusei*. Chúng làm đục bia và có mùi khó chịu.

Torulopsis thường gọi là torula bia có tế bào tròn, không tạo thành bào tử, lên men rượu nhẹ, làm đục bia, làm hỏng vị của bia. Các giống thuộc *Torulopsis* chết sớm và tự phân trước men bia, tạo điều kiện cho vi khuẩn *Pedococcus* và *Sarcina* phát triển. *Torulopsis* thường gặp trong không khí và các loại hạt xanh.

Pichia dễ liên kết hai tế bào hoặc một số tế bào thành chuỗi ngắn, không tạo thành bào tử, sinh sản trên bề mặt dịch đường. Trong bia chúng tạo thành các axit bay hơi và những chất khác nữa, làm cho bia có vị quả chín và vị thuốc. Chúng dễ phát triển khi bề mặt dịch lên men đủ không khí, dễ làm vẩn đục bia.

6.4.2. Vi khuẩn

Các vi khuẩn có thể phát triển trên dịch men và bia với nhiều chủng loại thuộc các nhóm có đặc tính sinh lý khác nhau. Trong số các tạp khuẩn của bia có các vi khuẩn gram dương (*Clostridium*, *Lactobacterium*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pedococcus*), và các vi khuẩn gram âm (*Aerobacter*, *Acetomonas*, trực khuẩn đường ruột, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acetomonas*, *Zimmonas*). Các trực khuẩn của nhóm vi khuẩn gam dương sinh catalaza ít gặp ở trong bia. Tạp khuẩn ở trong bia thường gặp là những nhóm sau:

- *Vi khuẩn lactic (Lactobacterium)*: rất nguy hại cho bia. Chúng dễ làm chua và làm đục bia. Các vi khuẩn lactic có hai nhóm trực khuẩn và cầu khuẩn, dễ lên men đường và tạo thành axit lactic. Chúng có các đặc tính sau đây: gram dương, không tạo thành bào tử, chuyển động, phân hủy gelatin, không tạo thành catalaza, không khử nitrat thành nitrit, chịu được độ rượu cao, kỵ khí và phát triển khi bão hoà CO_2 trên mặt dịch men, chịu được độ axit

cao và tác dụng sát trùng của hoa hublon. Để gặp các vi khuẩn lactic trong các sản phẩm của sữa, trên hạt trong nước, trong nước quả, trong dịch vị của người và động vật. Những vi khuẩn này rơi vào dịch men và bia cũng như các thiết bị, đường ống từ không khí hoặc từ nước. Chúng cũng dễ nhiễm vào men giống.

Những vi khuẩn lactic gây tác hại cho bia nhiều hơn cả là:

Lactobacterium lindnerii - Trục khuẩn dài và cong, sinh sản ở nhiệt độ thấp, làm đục bia và làm thay đổi mùi vị của bia.

Lactobacterium pasteurianum - trục khuẩn dài rất mảnh, rơi vào từ không khí gây nhiễm cho thiết bị và men giống, dễ làm đục và chua bia. Nguyên nhân làm chua bia có thể còn do các vi khuẩn lactic khác.

Pedicoccus hay là *Sarcina* của bia - rất nguy hiểm trong sản xuất bia, cấu khuẩn liên kết 2,4 hoặc thành chuỗi, không tạo thành bào tử, gram dương, kỵ khí. Kích thước của tế bào trong khoảng 0,6 - 1,5 μm .

Nhiệt độ thích hợp đối với vi khuẩn này là 21 - 25°C, nhưng có thể phát triển được ở 7 - 45°C và môi trường có nồng độ rượu tới 8%. *Pedicoccus* nhiễm vào men giống và làm đục bia, tạo cho bia mùi mật ong khó chịu, vì nó tạo ra chất diacetyl, chính mùi chất này phối hợp với mùi bình thường của bia tạo thành mùi mật ong. Proteaza trong thóc malt bị giảm hoạt lực thì các protein chỉ bị phân hủy tới albumoz và pepton. Những chất này dễ bị *Pedicoccus* đồng hoá và vi khuẩn phát triển nhanh chóng. Trong môi trường còn đường maltoza, pentoza không lên men và không khí có tác dụng kích thích sinh trưởng của vi khuẩn này và tạo thành diacetyl. Diacetyl có ảnh hưởng xấu tới sự sinh sản, tốc độ lắng và có thể làm chết men bia. *Pedicoccus* đặc biệt phát triển nhanh trong những môi trường có mật nấm men, vì nó không thể tự tổng hợp được một số chất cần cho sinh trưởng của nó - vitamin B₁ (tiamin) và vitamin B₂ (riboflavin).

Những *Pedicoccus* dễ gặp trong bia là *P. damnosus* - tạo thành cặn trong bia, *P. pemiciosus* làm đục bia. Một số khác làm nhờn bia.

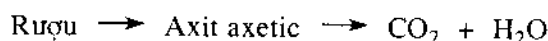
Biện pháp chống nhiễm *Pedicoccus* cho bia tốt nhất là phải tuân theo các quy định trong quy trình công nghệ của quá trình đường hoá, lên men và đặc biệt phải giữ môi trường trong vùng pH cần thiết.

Bacterium termo có nhiệt độ phát triển tối đa là 45 - 50°C, nhưng cũng có thể phát triển ở nhiệt độ thấp. Vi khuẩn này có dạng hình que kết thành đôi, không tạo thành bào tử, lên men lactic điển hình trên dịch đường saccharoza, maltoza, galactoza, lactoza, manosa. Khi phát triển làm đục dịch lên men, thỉnh thoảng làm nhớt và có mùi cần tây. Trong thùng lên men vi khuẩn này dễ bị chết.

- Vi khuẩn axetic: trục khuẩn nhỏ không chuyển động, hiếu khí gram âm, không tạo

thành bào tử, phản ứng trên catalaza dương tính. Vi khuẩn này thường phát triển trên mặt thoáng tạo thành màng trắng hoặc xám. Nhiệt độ có thể sinh trưởng được là 5 - 40°C. Chịu được tác dụng sát trùng của hoa hublon, rất bền vững với axit, trong khoảng pH từ 4,5 đến 3,2 các vi khuẩn lactic phát triển được bình thường. Trong quá trình phát triển các vi khuẩn lactic sử dụng đường và rượu tạo thành axit axetic hoặc CO₂ và nước.

Giống *Acetobacter* có khả năng biến rượu thành axit axetic rồi thành CO₂ và H₂O:



Giống *Acetomonas* lên men axetic từ rượu:



Acetobacterium sinh trưởng ở trong bia ngay cả trong trường hợp rất ít không khí. Trong số này thường gặp là các loài *A. capsulatum* và *A. vicosum*. Chúng làm cho bia bị nhớt dính và tạo thành các chất polysaccharit kiểu dextran. Hai loài này rất giống nhau, chỉ phân biệt được bằng nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng (với loài thứ nhất là 30°C, loài thứ hai là 25°C).

- *Escherichia coli* (trực khuẩn đường ruột) dễ phát triển trong dịch lên men và có thể tồn tại rất lâu trong bia. Từ nước có *E. coli* nhiễm vào men giống, và dịch men.

Số lượng vi khuẩn này là chỉ số vệ sinh trong sản xuất.

6.4.3. Nấm mốc

Nấm mốc có khả năng mọc ở tường, nóc hầm lên men, trong các thiết bị, đường ống, ở tất cả các nơi có vết dịch đường và bia. Các nấm mốc thường gặp là *Aspergillus*, *Penicillium*, *Oidium*, *Rhizopus*. *Aspergillus* dễ thấy ở hạt bị vỡ và hoa hublon. *Penicillium* và *Rhizopus* ký sinh ở thóc malt, làm thóc malt bị thâm màu và làm giảm hoạt lực của enzym, gây khó khăn cho quá trình đường hoá, dịch đường có độ axit cao. *Oidium* - mốc lactic dễ thấy ở thóc malt, thành các thùng lên men và ở hoa hublon.

6.5. KIỂM TRA VI SINH VẬT

6.5.1. Kiểm tra men giống (xem thêm ở chương 10)

Đối với men giống cần phải xác định mức lên men cuối, lực lên men, khả năng sinh trưởng, khả năng kết lắng v.v...

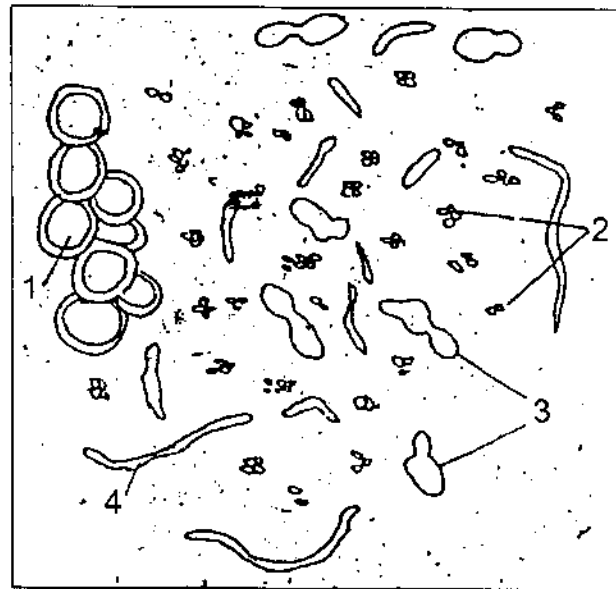
Kiểm tra độ thuần của men bằng cách phát hiện các vi sinh tạp dưới kính hiển vi.

Thêm vào tiêu bản men sống một giọt dung dịch kiểm 10% để hoà tan protein. Soi 20 trường nhìn. Trong mỗi một trường nhìn cần có khoảng 50 tế bào men. Trong men giống không được quá 1% vi khuẩn và 0,5% men dại. Hình thái men giống và một số vi sinh vật tạp nhiễm ở trong hình 6.9.

Chất lượng men được đánh giá theo thang sau: (bảng 6.1)

Bảng 6.1.

Số lượng vi sinh vật tập trong 20 trường nhìn	Đánh giá chất lượng
0 - 2	Rất tốt
2 - 4	Tốt
4 - 10	Đạt yêu cầu
Trên 10	Kém
Trong men giống không được có vi khuẩn lactic, pedicoccus men tạp	



Hình 6.9. Cận bìa:

1- men nuôi cấy; 2- *Pedicoccus*; 3- men dại; 4- vi khuẩn lactic

6.5.2. Xác định *Pedicoccus*

Ngoài phương pháp soi kính, người ta còn dùng phương pháp sinh học để xác định *Pedicoccus*. *Pedicoccus* phát triển rất kém trong môi trường bình thường. Nó phát triển rất nhanh trên môi trường nước amoniac - nấm men (cứ mỗi ống nghiệm hoặc bình nón có 10 ml nước nấm men 5% cho vào 1 giọt nước amoniac). Cho các dịch nghiên cứu vào nước amoniac - nấm men và giữ ở tủ ấm 25°C. Sau vài ngày đem cặn ra soi kính xem *Pedicoccus*. Song, phương pháp này cũng có thể bị lẫn giữa *Pedicoccus* với các vi sinh vật khác, ví dụ *Termobacterie*.

Người ta còn dùng phương pháp chính xác hơn - Phương pháp Betgece - Geller. Môi trường là bia không có hoa hublon với tinh bột chưa đường hoá và có hàm lượng rượu là 6%. Cho vào môi trường này một lượng lớn các mẫu nghiên cứu. Giữ ở 25°C trong 5 ngày, sau đó lấy cặn soi kính hiển vi và xác định sự có mặt của *Pedicoccus* đang phát triển.

6.5.3. Xác định men đại

Men giống dễ phát triển trên môi trường là dịch malt không có hoa hublon đã thanh trùng có 2% axit tataric. Nếu sau 24 ÷ 48 h thấy bắt đầu lên men là có thể có men đại. Phương pháp này chưa tin cậy lắm. Người ta còn cấy dịch men cần thử lên khối thạch cao và men đại sẽ sinh bào tử sau 40 h, còn giống men bia không sinh bào tử.

Hàm lượng tế bào men chết được xác định bằng cách nhuộm màu xanh metylen theo Fink. Tính số lượng trong 10 trường nhìn và suy ra phần trăm. Hàm lượng tế bào chết không quá 10%. Nếu trường hợp số lượng tế bào chết cao hơn mức quy định thì cần phải rửa lại bằng nước lạnh.

Xác định tế bào trẻ theo phản ứng glycogen. Tiêu bản được nhuộm bằng dung dịch lugol. Tế bào có glycogen bắt màu phải rửa lại nâu. Men tốt các tế bào có glycogen là 70 - 75%.

6.5.4. Kiểm tra bia chưa chín

Soi kính hiển vi để tìm vi sinh vật gây hại. Nếu số lượng vi khuẩn cao sẽ tạo cho bia thành phẩm có nhiều axit.

6.5.5. Kiểm tra bia thành phẩm

Kiểm tra độ bền của bia phải tiến hành hàng ngày ở 20°C, kiểm tra *E. coli* 1 lần trong một tháng, và một số chỉ tiêu khác.

a) Kiểm tra độ bền của bia như sau: giữ bia ở 20°C, hàng ngày nhận xét sự lắng cặn, vẩn đục hoặc màng. Nếu độ bền của bia kém thì cần xác định hàm lượng vi sinh vật nói chung. Trong 1 ml bia thành phẩm không được quá 100 tạp khuẩn.

Kiểm tra vi sinh vật của bia thành phẩm gồm: tổng số vi khuẩn hiếu khí, trực khuẩn đại tràng (*E. coli*), *Clostridium welchii*, tế bào men bia còn sót trong bia, vi khuẩn gây bệnh và các vi khuẩn làm vẩn đục bia.

b) Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí

- Bia chai đã được hấp thanh trùng theo phương pháp Paster ta cần pha loãng 1: 10, 1: 100, 1: 1000.

- Bia tươi đựng trong thùng pha loãng 1: 100, 1: 1000, 1: 10000.

- Cho mỗi một mẫu thử vào 3 hộp petri đã sấy vô trùng, mỗi hộp 1 ml và 15 ml thạch glucoza đã đun chảy để nguội 45°C. San đó đem để ở tủ ấm 37°C và đọc kết quả sau 24 - 48 h.

Cách tính kết quả xem phần kiểm nghiệm vi sinh vật chung.

c) Xác định trực khuẩn đại tràng (*E. coli*)

Trên 5 ống Vành-xăng đặc cho thêm vào mỗi ống 0,34 ml axit phenic 5% và 10 ml bia.

Trên 3 ống Vành-xăng loãng, cho thêm 0,17 ml axit phenic 5% và 10 ml bia (bia nguyên chất, bia pha loãng 1/10, bia pha loãng 1/100).

Lắc đều và để ở tủ ấm 24 - 48 h ở 42°C.

Nếu ống nào bị đục thì cấy chuyển tiếp sang môi trường nước thịt - pepton - lactoza có ống Dunham và sang dung dịch pepton. Để ở tủ ấm 42°C trong 24 - 48 h rồi tìm phản ứng indol bằng paradiametynaminobenzaldehyt hay axit nitric và cồn izoamyllic.

Nếu có phản ứng indol và trên môi trường lactoza bị đục, sinh hơi thì coi như có *E. coli*. Mỗi ống Vành-xăng đục dương tính tính ra 20 tế bào *E. coli*, còn các ống pha loãng sẽ suy ra bằng tỷ lệ pha loãng. Dịch cấy không pha loãng cho dương tính coi như có 1000 *E. coli*, pha loãng 1/10 - 10000 *E. coli* và pha loãng 1/100 - 100.000 *E. coli*.

d) Xác định Clostridium welchii

Cho thêm 2 ml dung dịch natri sunphát 25% và 5 giọt sắt sunfat vào môi trường Uyxonble đã đun chảy. Cấy vào đó 10 ml bia nguyên và đun cách thủy ở 75°C trong 5 phút. Sau đó làm đông ngay bằng cách để vào tủ lạnh hoặc ngâm trong nước lạnh. Để vào tủ ấm 37°C trong 24 - 48 h và đọc kết quả. Nếu có *Clostridium welchii* thì trên môi trường Uyxonble có những khuẩn lạc tròn đều và màu đen.

Tính kết quả ra số tế bào *Cl. welchii* có trong một lít bia bằng cách lấy số khuẩn lạc màu đen đếm được chia cho 10 và nhân với 1000.

e) Xác định số lượng tế bào nấm men còn sống trong bia

- Phương pháp soi kính hiển vi. Ly tâm 100 ml bia với tốc độ 3000 v/ph, lấy cặn phết trên kính, nhuộm đơn và soi kính: xác định các tế bào nấm men chết và còn sống theo sự bắt màu của tế bào.

- Phương pháp nuôi cấy trên môi trường Sabouraud: cho vào 3 hộp petri (mỗi hộp 1 ml bia), rồi đổ môi trường Sabouraud đã điều chỉnh pH 4,5 - 5,5, để ở nhiệt trong phòng, sau 24 - 48 h đếm số khuẩn lạc nấm men.

Cách tính số trung bình giống như tính tổng số vi khuẩn hiếu khí.

g) Xác định vi khuẩn gây bệnh (chủ yếu là tụ cầu mủ vàng)

Cấy 1 ml bia vào môi trường nước thịt - pepton - glucoza 1%, để ở tủ ấm 37°C trong 24 h, rồi cấy chuyển sang môi trường Clapman.

Nếu có tụ cầu gây bệnh thì môi trường có màu vàng và sẽ tiến hành cấy trên môi trường thạch máu để tìm tính chất làm tan máu hoặc làm đông huyết tương. Nếu qua cách thử này cho dương tính thì kết luận trong bia có tụ cầu gây bệnh mủ vàng.

Tiêu chuẩn về chỉ tiêu vi sinh vật cho bia thành phẩm như sau:

- Tổng số vi khuẩn hiếu khí không quá 100 / lít đối với bia chai, 1000 / lít đối với bia hơi.
- Không được có vi khuẩn gây bệnh - *Cl. welchii*, *E. coli*.
- Không có nấm men đối với bia chai và không quá 20 đối với bia hơi.

h) Xác định vi khuẩn làm đục bia

Bia bị vẩn đục thường do các vi khuẩn *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Leuconostoc*.

Cho 5 ml bia cấy vào nước thịt - pepton, đun cách thủy ở 85°C trong 15 phút, làm nguội và để ở tủ ấm 37°C. Sau 48 - 72 h cấy bia sang đĩa thạch máu và đĩa thạch thường, để ở tủ ấm 37°C trong 24 - 48 h.

Quan sát khuẩn lạc và đặc tính sinh học để xác định loại vi khuẩn có bào tử.

6.6. MEN BIA VÀ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM

Trong công nghệ sản xuất rượu, bia, rượu vang chỉ có một quá trình vi sinh vật là quá trình lên men. Tác nhân gây lên men là nấm men. Lên men bia, như ta đã biết, người ta sử dụng một trong hai loại men nổi hoặc men chìm. Việc chọn các nòi men bia dùng làm giống sản xuất là một công việc khó khăn và quan trọng bậc nhất, là tiền đề của sự thành công cho sản xuất ra bia có chất lượng cao. Dĩ nhiên, có một giống sản xuất tốt vẫn chưa đủ và với giống này cần phải có các biện pháp công nghệ thích hợp mới đảm bảo cho kết quả mong muốn.

6.6.1. Các yêu cầu công nghệ với giống men bia

Một nòi nấm men được dùng làm giống sản xuất cần phải đáp ứng các chỉ tiêu sau đây:

- Khả năng và tốc độ lên men trong điều kiện nhiệt độ thấp với dịch đường malt.
- Khả năng kết lắng (đối với các nòi men chìm).
- Hàm lượng các sản phẩm bậc hai tạo thành trong lên men.
- Tính ổn định trong sản xuất (cần xem xét mức độ thoái hóa, suy giảm các đặc tính kỹ thuật).
- Tạo ra hương vị và chất lượng sản phẩm đặc trưng.

Khả năng và tốc độ lên men ở môi trường nước malt-houblon có 11 - 12% chất khô hòa tan là môi trường cho lên men bia. Với nhiệt độ 8 - 10°C quá trình lên men thường diễn ra khoảng 7 - 10 ngày. Qua thực tế ta thấy, nồng độ dịch đường từ 2,5 - 12% tốc độ sinh trưởng và lên men của nấm men không bị ảnh hưởng, ở nồng độ 15 - 20% thì tốc độ lên men giảm đáng kể.

Khả năng kết lắng của giống men bia là một chỉ tiêu vô cùng quan trọng đối với men chìm dùng sản xuất những loại bia vàng sáng màu. Trong quá trình lên men chúng thường kết lại với nhau ở dạng bông hoặc dạng bụi. Loại dạng bông để kết lắng làm cho dịch lên men sớm có độ trong cao và sang giai đoạn lọc được dễ dàng, sản phẩm thu được là loại bia vàng óng ánh.

Các chỉ tiêu khác cũng không được xem nhẹ trong việc tuyển chọn. Tính ổn định và khả năng tạo hương vị đặc trưng phụ thuộc rất nhiều vào các đặc điểm sinh học, mà nguyên nhân sâu xa là do đặc tính di truyền của từng nòi (chủng).

6.6.2. Hấp thu cacbon dinh dưỡng của men bia

Dịch đường malt thu được sau khi thủy phân (đường hóa) có mặt các đường sacaroza, glucoza, maltoza, fructoza, maltotrioza và các dextrin. Sử dụng đường ở các loài nấm men khác nhau thường theo thứ tự ưu tiên là sacaroza, glucoza, fructoza, maltoza và maltotrioza. Hầu hết nấm men đều không sử dụng được đường maltotetroza và các loại dextrin, ngoại trừ loài *Saccharomyces diaticus*.

Các loại đường được nấm men sử dụng đều có khả năng thẩm qua màng vào bên trong tế bào nhờ các enzym permeaza hoặc trước khi thẩm thấu đường được phân cắt thành đường đơn, như sacaroza cần thủy phân thành glucoza và fructoza nhờ enzym ngoại bào là invertaza. Maltoza và maltotrioza chiếm đa số tới 50 - 60% trong dịch đường malt. Do vậy các nòi men bia cần phải có khả năng hấp thu và lên men hai loại đường này. Điều đó hoàn toàn phụ thuộc vào đặc tính di truyền của từng nòi được sử dụng. Hai loại đường này vào bên trong tế bào sẽ được chuyển hóa thành glucoza nhờ α -glucosidaza (hay maltaza). Enzym này được kích thích khởi động bởi maltaza, nhưng lại bị glucoza ức chế. Nồng độ glucoza lớn hơn 1% theo thể tích dịch đường thì gen này đã bị ức chế. Do vậy khi 40 - 50% lượng đường glucoza trong dịch đã được sử dụng thì quá trình chuyển hóa maltoza và maltotrioza mới bắt đầu xảy ra. Vì vậy, sự có mặt của glucoza trong dịch đường là nguyên nhân chính gây ức chế làm giảm tốc độ lên men của men bia.

Các đường được tế bào nấm men hấp thu vào trong tế bào và được chuyển hóa theo con đường đường phân (glucoliz) hay EMP (Embden – Mayerhof – Parnas) dẫn đến sự tạo thành axit pyruvic. Từ đây các biến đổi hóa sinh theo hai điều kiện:

- + Kỵ khí – lên men cho sản phẩm chính là rượu etylic và CO_2 cùng các sản phẩm phụ là các sản phẩm bậc hai hay sản phẩm thứ cấp;

- + Hiếu khí – hô hấp, qua vòng Krebs và cho sản phẩm cuối cùng là CO_2 , H_2O , đồng thời cung cấp vật liệu tế bào phục vụ cho sinh trưởng.

Hoạt động sống của nấm men trong các điều kiện này hoàn toàn tuân thủ hiệu ứng Pasteur (có đủ oxy nấm men sinh trưởng, tăng sinh khối) và hiệu ứng Captree (sự ức chế của glucoza và ức chế quá trình chuyển hóa maltoza).

Cơ chế của quá trình lên men rượu xem thêm ở chương 4 và chương 5.

6.6.3. Hấp thu các hợp chất chứa nitơ

Nấm men nói chung có thể hấp thu các hợp chất N - vô cơ ở dạng amoni và N - hữu cơ

có phân tử lượng thấp, chủ yếu là các axit amin. Các axit amin cần có sẵn trong môi trường hoặc có thể tổng hợp được trong nội bào nấm men. Chúng được sử dụng như là vật liệu xây dựng tế bào phục vụ cho phát triển tăng sinh khối và với lượng thừa dư ở môi trường chuyển hóa thành các hợp chất tạo hương vị cho bia thành phẩm. Trong giai đoạn cuối của quá trình lên men sự sinh sản của nấm men đã dừng thì sự hấp thu các nguồn nitơ bị chậm lại và đi đến kết thúc hoàn toàn.

Trong dịch đường malt - hublon thu được ta thấy có mặt các loại sản phẩm thủy phân từ các nguồn N là albumoz, polypeptit, peptit, các nucleozit, nucleotit. Đây là các nguồn vật liệu, chủ yếu là axit amin và nucleotit, nucleozit, để xây dựng các phân tử protein, axit nucleic cho tế bào nấm men. Trong đó có 19 axit amin và được nấm men sử dụng theo thứ tự: nhóm A (hấp thu nhanh), nhóm B - trung bình, nhóm C - chậm, nhóm D - ít hoặc không hấp thu.

Nhóm A gồm có: axit glutamic, axit aspartic, glutamin, asparagin, serin, treonin, lizin, arginin. Nhóm B: valin, metinin, izoloxin, histidin. Nhóm C: glyxin, phenylalanin, tirozin, triptophan, alanin. Nhóm D: prolin.

Prolin có hàm lượng lớn nhất trong dịch đường malt, nhưng lại bị chuyển hóa kém hoặc không chuyển hóa. Nó là thành viên duy nhất của nhóm D. Các gốc amoni (NH_4^+) có trong dịch cũng được liệt vào nhóm C - nhóm các axit amin được sử dụng chậm. Prolin thường có trong bia với hàm lượng 200 - 300 mg/l.

Các axit amin được nấm men sử dụng để tổng hợp protein, nucleic axit... chúng còn có ảnh hưởng tới hương thơm cũng như chất lượng của bia. Nấm men đồng hoá các axit amin nhờ hệ enzym chuyển amin ($-\text{NH}_2$) transaminaza và khung cacbon còn lại là các oxo-axit (hay xeto-axit). Các oxo - axit là tiền chất của các aldehyt và rượu bậc cao. Các sản phẩm này góp phần tạo ra hương thơm cho bia thành phẩm. Phần lớn nitơ amin được sử dụng để tổng hợp protein, do vậy nó đóng vai trò quan trọng và quyết định đối với phát triển của nấm men. Các axit amin thông thường không trực tiếp liên kết thành protein. Chúng có liên quan đến các phản ứng chuyển amin với bộ khung axit amin của protein nấm men có được từ quá trình dị hoá các loại đường. Điều này giải thích tại sao hàm lượng tổng số axit amin trong dung dịch đường malt đóng vai trò quan trọng với sinh trưởng của nấm men, còn phổ axit amin đóng vai trò thứ yếu.

Phổ axit amin có ảnh hưởng tới hương thơm của bia. Các axit amin có trong dịch malt được sắp xếp thành 3 nhóm theo vai trò quan trọng của chúng đối với chất lượng của bia. Thực chất của vấn đề này là dựa vào tầm quan trọng của các xeto axit do các axit amin tương ứng khi khử amin.

Nhóm 1 gồm có: axit amin glutamic, asparagin, glutamin, treonin, serin, metionin, prolin. Hàm lượng ban đầu của nhóm này được xem là không quan trọng do chúng có thể

được hấp thụ trực tiếp từ các phân tử của chúng có sẵn trong dịch đường malt hoặc được sinh tổng hợp từ quá trình dị hóa các loại đường với chuyển amin trong giai đoạn lên men.

Nhóm 2 gồm có: valin, phenylalanin, glyxin, izoloxin, alanin và tyrozin.

Nhóm 3: lizin, loxin, histidin, arginin.

Thiếu các axit amin thuộc 2 nhóm sau ảnh hưởng lớn đến chất lượng của bia thành phẩm, nhất là hương vị. Ở giai đoạn cuối lên men khi hàm lượng các axit amin bị cạn kiệt thì một nửa số Xeto axit của các axit amin thuộc nhóm 2 phải được tổng hợp từ các loại đường. Nguồn nitơ có trong nước malt được sử dụng để tổng hợp các axit amin trên nên những oxo- và xeto-axit. Nấm men hấp thụ axit amin nhờ hệ enzym chuyển amin - transaminaza và tạo ra các oxo-axit và Xeto-axit nội bào. Các oxo-axit nội bào được tạo ra nhờ các phản ứng chuyển amin và phản ứng đồng hoá là tiền chất của các aldehyt và rượu bậc cao góp phần tạo ra hương thơm cho bia thành phẩm.

Khi hàm lượng nitơ cần thiết không đủ đáp ứng cho tổng hợp các axit amin thiếu hụt trong giai đoạn cuối lên men sẽ dẫn đến tích tụ keto-axit trong tế bào. Xeto-axit bị khử sẽ thành rượu bậc cao. Do vậy, rượu bậc cao trong bia có cấu trúc tương tự axit amin.

Diacetyl là hợp chất cacbonyl - một sản phẩm bậc 2 của lên men rượu, được hình thành trong quá trình tổng hợp các keto-axit, có mùi bơ. Do vậy, nó làm cho bia giảm hương thơm. Trong nghề làm bia người ta luôn chú ý tới hàm lượng của chất này sao cho không vượt quá mức độ cho phép làm ảnh hưởng xấu tới chất lượng bia. Điều này có thể thực hiện được dễ dàng bằng cách sao cho trong dịch nước malt có mặt các axit amin nhóm 2.

Còn các axit amin nhóm 3, nếu không đủ sẽ gây rối loạn đến quá trình chuyển hóa nitơ, cũng như sự phát triển của nấm men và ảnh hưởng tới hương vị của bia.

Trong thực tế sản xuất, nếu dùng nguyên liệu toàn bộ là thóc malt thì những vấn đề thiếu hụt N-amin, thành phần và số lượng axit amin của nước malt không làm chúng ta phải lo lắng. Song, khi dùng các nguyên liệu không phải là thóc malt (gạo, ngô, cao lương...) thì chúng ta cần phải chú ý cân bằng hàm lượng nitơ protein hoặc sự có mặt các axit amin cần thiết.

6.6.4. Một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình lên men và chất lượng bia

6.6.4.1. Giống khởi động (hay giống ban đầu - start culture)

Giống khởi động là giống sau khi nhân giống hoặc giống được xử lý sau các mẻ lên men chính trước đó, được đưa vào lên men. Giống khởi động có thể là men nước hoặc men sữa (hoặc ở dạng nhão). Nồng độ men giống sau tiếp giống (hay là bắt đầu lên men) cần phải là $10 - 12 \cdot 10^6$ tế bào /ml.

Nếu nồng độ men bia trong thời gian đầu quá thấp hoặc giống yếu hay bị già men có

khả năng nảy chồi tiếp và thời gian đạt được định mức là rất dài. Những điều này sẽ ảnh hưởng đến hoạt động của men giống và trao đổi chất của chúng. Trong lên men dễ dẫn đến hiện tượng men bị “ỳ” (tiêu thụ đường chậm hoặc dở dang không đồng hóa đường nữa). Những mẻ lên men này thường cho hiệu quả kém và chất lượng thành phẩm xấu.

Qua thực tế sản xuất ta thấy, mật độ giống khởi động càng lớn thì tỷ lệ tế bào nảy chồi thấp, tốc độ sinh sản tương đối thấp, nhưng tốc độ lên men lớn. Khi lượng tế bào nảy chồi thấp sẽ dẫn đến cường độ trao đổi chất ở những tế bào trẻ cũng thấp và các chất bậc hai do tế bào sinh ra cũng suy giảm. Qua nghiên cứu thấy rằng, lượng diacetyl phụ thuộc vào giống khởi động: trường hợp giống ban đầu là 10.10^6 tế bào/ml thì lượng diacetyl tạo thành trong lên men là 0,45 mg/l và khi giống ban đầu là 20.10^6 tế bào/ml thì tạo thành trong lên men là 0,32 mg/ml diacetyl.

Các sản phẩm bậc hai khác như aldehyt, rượu bậc cao... cũng có hiện tượng phụ thuộc vào giống ban đầu như diacetyl.

Như vậy, trong sản xuất ta cố gắng đưa một lượng giống khởi động càng nhiều càng tốt vào lên men, nhưng chỉ có thể đưa đến mật độ tối đa là 70.10^6 tế bào/ml. Quá nồng độ này hiệu quả thu được không rõ ràng.

6.6.4.2. Nhiệt độ

Nhiệt độ nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và lên men của men bia.

Lên men bia được chia thành hai giai đoạn là:

- Lên men chính ở nhiệt độ 6 - 8°C hoặc tới 12°C đối với *S. carlsbergensis* (men chìm). Thời gian lên men là 7 - 12 ngày với nồng độ dịch đường là 11 - 12% chất khô hoà tan.
- Lên men phụ ở nhiệt độ 1 - 4°C, tốt nhất là ở 1 - 2°C, thời gian lên men kéo dài tới 3 tuần trở lên, với nồng độ đường có thể lên men trong dịch sau lên men chính khoảng 1 - 2%.

Trường hợp lên men ở nhiệt độ cao sẽ thu được:

- + Thời gian lên men ngắn;
- + Mật độ tế bào nấm men đạt được cao hơn so với ở nhiệt độ thấp;
- + Lên men triệt để hơn, nhưng sản phẩm bậc hai, đặc biệt là diacetyl, tạo ra nhiều hơn;
- + Lượng sinh khối cao, nhưng lượng tế bào già và chết lại nhiều hơn, các đặc tính công nghệ bị suy giảm nhanh, nhất là đặc tính kết lắng;
- + Cuối cùng là tỷ số giữa các cấu tử trong bia thành phẩm mất cân đối, chất lượng sản phẩm bị giảm.

Mỗi một chủng giống được đưa vào sản xuất đều có nhiệt độ thích hợp riêng cho phát triển và lên men. Sai lệch nhiệt độ này men giống cho kết quả không được như mong muốn.

6.6.4.3. Oxy và thể oxy hoá khử

Thời kỳ đầu lên men tính từ khi tiếp giống, oxy rất cần thiết cho men giống sinh trưởng để đạt tới nồng độ xác định ($8 - 10 \cdot 10^6$ tế bào/ml). Dịch đường malt-hublon sau khi làm lạnh nhanh thường có một lượng oxy hoà tan. Để tăng lượng oxy này người ta thường cho dịch tiếp xúc với không khí trong thời gian làm lạnh và lắng trong hoặc sục khí vô khuẩn vào dịch đường khi đã tiếp giống.

Lên men bia là quá trình kỵ khí, nhưng trong quá trình nhân giống và tiếp giống vào lên men thì nhất thiết dịch lên men phải có một lượng oxy hoà tan để nấm men sử dụng. Đây là giai đoạn duy nhất trong tất cả quá trình sản xuất bia là oxy có ích cho nấm men để tạo ra bia có chất lượng cao. Ở những giai đoạn sau, khi sinh trưởng đã ổn định và các sản phẩm lên men đang được tạo thành cần phải không có oxy hay là cần phải loại bỏ hoàn toàn, vì sự có mặt của oxy sẽ gây ra những hậu quả xấu đến chất lượng bia thành phẩm. Một biện pháp công nghệ sản xuất bia có nồng độ cao là việc nghiên cứu sâu và ứng dụng vai trò của oxy ở các giai đoạn trong suốt quá trình lên men.

Oxy có ảnh hưởng rất mạnh đến hoạt tính của nấm men, đặc biệt là hoạt tính của các enzym oxygenaza – các enzym tham gia vào tổng hợp các axit béo và các sterol. Những chất này là thành phần quan trọng của màng tế bào chất.

Chỉ cần một lượng rất nhỏ oxy còn sót lại ở các giai đoạn sau sinh trưởng cũng có ảnh hưởng xấu tới chất lượng bia thành phẩm. Song, nhu cầu tiêu thụ oxy của tế bào nấm men cần có một ngưỡng giới hạn, nếu quá sẽ kéo dài pha sinh trưởng, giảm tốc độ lên men và làm tăng lượng đường sót lại trong bia thành phẩm.

Giống sản xuất thường là được nhân từ phòng thí nghiệm đến phân xưởng hoặc là men sữa từ quá trình lên men trước đó. Cả hai loại giống này đều thiếu hụt các chất béo và sterol. Để khắc phục tình trạng này cho giống được phát triển và lên men bình thường hoặc là người ta bổ sung tiền chất các loại chất béo này hoặc là người ta sục khí vào dịch nuôi cấy trong thời gian đầu lên men.

Hàm lượng oxy hoà tan vào dịch đường malt-hublon sau khi làm lạnh thường có 6,7 – 7 mg/ml là thích hợp. Nếu quá ít thì tốc độ sinh trưởng của nấm men bị hạn chế, tốc độ lên men chậm lại và hương vị của bia thành phẩm không đạt được mức cần thiết. Trường hợp này cần phải sục khí.

Trong vài giờ đầu phần lớn oxy hoà tan trong dịch đã được nấm men sử dụng. Như vậy, trong quá trình lên men thể oxy hóa – khử rH_2 bị giảm và giảm nhanh hơn pH. Trong

thời gian lên men, số lượng các sản phẩm oxy hóa giảm đi trong khi quá trình khử oxy thì được tích tụ ngày càng nhiều. Kết quả là rH_2 giảm đi rõ rệt. Ở dịch đường malt-hublon sau khi làm lạnh $rH = 20 - 24$, khi bắt đầu lên men mạnh rH_2 đã giảm xuống còn $10 - 11$. Khi lên men mạnh tất cả oxy hoà tan thường ở mức nhỏ nhất vào khoảng 10 . Khi rH_2 thấp giảm tới 15 khả năng sinh sản của nấm men đã bị hạn chế rất mạnh. Nếu lên men chính trong các thùng hồ rH_2 thường cao hơn, vì oxy của không khí khuếch tán qua lớp bọt vào dịch. Giá trị rH_2 càng thấp thì chất lượng bia càng cao. Ở rH_2 cao bia non sẽ thâm màu hơn, bia thành phẩm có vị không bình thường và có thể bị đục.

6.6.4.4. pH của dịch lên men

pH của dịch đường trước khi lên men là $5,5 - 5,6$ và trong quá trình lên men chính sẽ giảm dần tới $4,4 - 4,5$. Như vậy, độ chua của dịch đường trong lên men tăng. Điều này được giải thích bằng sự tạo thành CO_2 và một số các axit hữu cơ trong hoạt động sống của nấm men. Ngoài ra, trong quá trình này là do dịch đường hình thành hai hệ thống đệm của muối phosphat ở pH $5,67 - 7,07$ và hệ thống đệm axit hữu cơ - muối của axit hữu cơ ở pH $4,27 - 5,67$.

Như vậy, kết thúc quá trình lên men chính pH dịch vào khoảng $4,5$ (sau $6 - 9$ ngày lên men) và nồng độ chất hoà tan còn lại là $4,0 - 4,5^\circ Bx$ (trong đó có $1 - 1,5\%$ đường có thể lên men được) sẽ chuyển lên men phụ. Trong thời gian lên men phụ các axit hữu cơ có mặt trong dịch sẽ phản ứng với các loại rượu và tạo thành các este có ảnh hưởng tới việc tạo mùi của bia. Do vậy, pH dịch bia sẽ tăng dần trở lại.

Aldehyt là sản phẩm luôn có mặt trong các dịch lên men và trao đổi chất của tế bào nấm men. Chúng có thể tạo thành bằng con đường oxy hóa các rượu. Trong số aldehyt của bia thấy nhiều nhất là axetaldehyt. Tổng lượng aldehyt trong bia sau lên men chính có khoảng $9 - 10$ mg/l (axetaldehyt khoảng $5 - 7$ mg/l). Trong lên men phụ aldehyt giảm đi nhiều.

Ở mức độ $10 - 15$ mg/l aldehyt làm tăng hương thơm cho bia. Quá ngưỡng này bia có mùi thơm “bơ” và mùi “táo xanh”. Các mùi này ta không mong muốn.

Axetaldehyt được tích tụ trong suốt quá trình phát triển của nấm men. Nồng độ của nó có giảm xuống trong pha tĩnh và cuối lên men. Cũng giống như các rượu bậc cao và este, mức độ tích tụ axetaldehyt phụ thuộc vào chủng nấm men và các điều kiện lên men. Mặc dù chủng (nòi) nấm men được lựa chọn là yếu tố hàng đầu, nhưng sự có mặt của oxy trong lên men và tỷ lệ men giống tiếp bào lên men và nhiệt độ cũng là những yếu tố kích thích sự tạo thành axetal. Giống tiếp với tỷ lệ khá lớn làm giảm được lượng aldehyt tích tụ trong dịch lên men, ngược lại sự có mặt của oxy sau pha sinh trưởng và nhiệt độ lên men cao càng tích tụ hợp chất này nhiều hơn. Hơn nữa, nấm men kết lắng quá sớm không tái sử dụng axetaldehyt sau khi được tạo thành cũng dẫn đến làm tăng lượng aldehyt này trong bia.

Trong quá trình lên men phụ và tăng trưỡng ta thấy rượu bậc cao thay đổi thành phần và tỷ lệ, tạo nên một sự hợp lý về mặt tạo hương và điều vị, đồng thời nhờ enzym esteaza sẽ xuất hiện trong bia các este phức tạp giữa rượu, axit hữu cơ và aldehyt. Các sản phẩm này đóng góp cho sự tạo thành hương vị của bia.

6.6.5. Diacetyl, acetoin và 2,3-butandiol

Các hợp chất này thường có mặt trong dịch lên men bia. Chúng là sản phẩm bậc 2 được tạo ra trong giai đoạn lên men chính. Diacetyl cho bia “mùi bơ”.

Diacetyl gây mùi xấu nhất cho bia, vì ngưỡng cảm nhận của nó rất thấp (0,1 mg/l), thấp hơn 10 lần so với 2,3-pentandiol. Diacetyl là chất lỏng không màu đến vàng nhạt, có mùi hôi cực mạnh và vị đắng gắt rất khó chịu, tác động mạnh đến hệ thần kinh con người. EU quy định hàm lượng diacetyl trong bia không vượt quá 0,2 mg/l.

Như vậy, diacetyl là hợp chất không có lợi cho bia, nó thường gây nên mùi và vị khó chịu cho bia. Khi nấm men phát triển mạnh nó được tạo thành một lượng đáng kể khoảng 0,35 - 0,55 mg/l, nhưng thời gian lên men phụ và tăng trưỡng lượng diacetyl giảm đi rõ rệt, nhờ nấm men khử nó thành acetoin. Thời gian cần thiết cho quá trình khử này là 3 tuần trong các qui trình công nghệ tiêu chuẩn.

Trong quá trình lên men đệm phosphat dễ bị phá vỡ do một phần gốc phosphat bị nấm men đồng hóa và thay vào đó là hệ đệm axit hữu cơ - muối của chúng để đảm bảo pH được biến đổi bình thường.

Nếu pH diễn biến không bình thường, như pH giảm mạnh và nhanh có thể là do nhiễm vi khuẩn sinh axit, như vi khuẩn lactic, vi khuẩn butyric...

Trong lên men bình thường ta thấy có mặt các axit lactic, axit axetic, axit succinic. Axit lactic do axit pyruvic khử và tạo thành trong bia, hàm lượng trung bình là 150 - 200 mg/l. Nếu bị nhiễm khuẩn nồng độ này tăng vọt lên gấp nhiều lần. Các axit citric, succinic là sản phẩm tạo thành qua vòng Krebs. Axit succinic tạo thành trong bia tới 60 - 70 mg/l. Axit axetic được hình thành qua đường oxy hóa và phân huỷ acetaldehyt. Hàm lượng trung bình của axit axetic trong bia là 80 - 100 mg/l.

Trong trường hợp pH dịch lên men chuyển sang kiềm hướng lên men sẽ là thu nhận glycerin là sản phẩm chính (xem thêm ở những phần tiếp theo).

6.7. SINH TỔNG HỢP CÁC SẢN PHẨM THỨ CẤP (BẬC 2)

Những sản phẩm phụ là những sản phẩm thứ cấp (hay còn gọi là sản phẩm bậc 2) cũng được tạo thành ở thời kỳ cuối lên men chính. Chúng có vai trò quan trọng trong việc hình thành hương vị của bia, cũng có nghĩa là chúng có ảnh hưởng lớn tới chất lượng của bia.

Một số trong đó là các sản phẩm trung gian của quá trình biến đổi đường thành rượu, một số khác là sản phẩm của sự phản ứng tương tác giữa các sản phẩm trung gian với nhau hoặc với các cấu tử thành phần môi trường và với hoạt động của nấm men.

Trong dịch lên men ta thấy các sản phẩm chính là sinh khối nấm men (sản phẩm này được tách ra khỏi bia dùng vào mục đích khác), rượu etylic và CO_2 (hoà vào dịch lên men hoặc bay ra ngoài) còn có các sản phẩm phụ.

6.7.1. Glyxerin

Nếu lên men rượu ở vùng pH 4,5 - 6 thì glyxerin là sản phẩm phụ và có thể tích tụ tới 3 g/l. Chất này có trong bia với 1 lượng vừa phải sẽ làm cho bia dịu ngọt hơn, làm tăng độ đậm đà và hậu vị dễ chịu cho người uống.

6.7.2. Rượu bậc cao

Là nhóm rượu có số lượng cacbon nhiều hơn hơn 2 và chúng tập trung lại gọi là dầu fuczel. Ở trong dầu fuczel còn có thêm axit bay hơi, este, aldehyt. Thành phần và số lượng các rượu bậc cao phụ thuộc vào nòi nấm men dùng trong sản xuất, vào thành phần nguyên liệu và nhiệt độ lên men. Thường lên men với dịch đường có nhiều axit amin và nhiệt độ lên men cao thường cho nhiều rượu bậc cao.

Các rượu bậc cao là propylic, izopropylic, butyric, izobutyric, amylic, izoamylic và Chúng có thể tạo thành trong lên men bia từ 20 đến 95 mg/l, bình thường là 50 - 60 mg/l. Với men nổi khối lượng các rượu bậc cao được tạo thành nhiều hơn so với men chìm.

Trong các rượu bậc cao có trong bia ta thấy izoamylic nhiều hơn cả (44 mg/l, có khi tới 58 mg/l). Hàm lượng các rượu bậc cao khác có ở trong bia chỉ vài mg/l hặc vết. Từng loại rượu này đều cho bia các hương vị riêng biệt, nhưng những hương vị này không phải đặc trưng cho bia và còn làm cho khẩu giác khó chịu. Nói chung là các rượu bậc cao tạo thành với số lượng cao sẽ làm cho bia có chất lượng cảm quan xấu đi.

Rượu bậc cao được tạo thành chủ yếu trong giai đoạn lên men chính, ở pha nấm men phát triển logarit. Nhiều người cho rằng nguồn gốc tạo rượu bậc cao là từ các axit amin. Các axit amin được khử amin (deamin hóa) và tiếp theo là khử cacboxyl và rượu bậc cao được tạo thành. Thực ra sự hình thành rượu bậc cao xảy ra với các quá trình hóa sinh xảy ra khá phức tạp. Ngoài cách khử amin và cacboxyl của các axit amin người ta còn thấy rượu bậc cao là quá trình trao đổi chất cacbon với quá trình chuyển amin liên quan đến axit pyruvic và liên quan đến sự sinh trưởng của nấm men. Ở các pha sinh trưởng sau pha logarit nấm men tạo ra rượu bậc cao ít hơn. Trong giai đoạn lên men phụ khối lượng rượu bậc cao có thể bị giảm đi do chúng phản ứng với các axit hữu cơ được tạo thành trong dịch lên men và sinh ra este.

6.7.3. Este và aldehyt

Este là sản phẩm được tạo thành từ các loại rượu với axit hữu cơ có trong dịch lên men. Trong đó nhiều nhất là etyl axetat (15 - 20 mg/l) và ít nhất là izoetyl formiat (0,8 - 1 mg/l, còn izoamyl axetat chỉ có vết).

Tổng este có trong bia là 30 - 80 mg/l. Chúng có ý nghĩa quan trọng trong sự hình thành mùi thơm của bia.

Với men nổi lượng este sinh ra nhiều hơn so với men chìm.

Axetoin nếu vượt quá 2,3 mg/l cũng tạo cho hương vị bia không tốt. Nếu lượng men giống đưa vào lên men lớn và nấm men sớm phát triển mạnh sẽ thúc đẩy quá trình khử diaxetyl thành 2,3-butandiol - chất không gây mùi vị lạ cho bia và trong trường hợp này diaxetyl có trong bia khoảng 0,2 mg/l. Đây là hàm lượng lý tưởng. Trong thực tế sản xuất, hàm lượng diaxetyl vào khoảng 0,4 - 0,6 mg và axetoin: 0,8 - 1,2 mg trong 1 lít bia thành phẩm.

Số liệu ta thu được từ các quá trình khử diaxetyl cho ta đánh giá quá trình lên men phụ và tàng trữ đã “đạt” hay “chưa đạt” hoặc bia “chín” hay “chưa chín”.

Diaxetyl tạo thành trong bia là sản phẩm trung gian của quá trình sinh tổng hợp valin và izoloxin. Trong dịch lên men hàm lượng diaxetyl có tác dụng điều chỉnh sự tạo thành tiền chất của mình - α -axetolactat được khử cacboxyl thành diaxetyl và diaxetyl bị khử thành axetoin.

Có nhiều biện pháp hạn chế lượng diaxetyl tạo thành trong dịch lên men, trong đó có biện pháp bổ sung enzym α -axetolactat decarboxylaza vào dịch đường khi làm nguội trước khi bổ sung men giống. Enzym này giúp cho chuyển hóa trực tiếp α -axetolactat thành axetoin và không qua diaxetyl. Kỹ thuật sử dụng các chế phẩm enzym đã giới thiệu ở phần 6.4.

Những sản phẩm bậc hai trong lên men bia, được giới thiệu còn chưa đầy đủ. Sự tạo thành và biến đổi chúng trong thời gian lên men, tàng trữ bia là rất phức tạp và đa dạng. Yếu tố quan trọng bậc nhất ảnh hưởng tới sự hình thành các sản phẩm phụ này là nòi (chủng) nấm men, nhưng các biện pháp công nghệ phù hợp với sinh lý của nấm men và các điều kiện khác cũng vô cùng quan trọng.

Muốn có một loại bia sản phẩm có chất lượng cao ta cần phải chú ý tới một cách toàn diện là vấn đề chọn giống, chọn các điều kiện tối ưu và một qui trình công nghệ thích hợp. Hy vọng rằng, ngành công nghiệp bia ở nước ta sẽ phát triển hơn nữa, đóng góp tích cực cho sự nghiệp công nghiệp hóa và hiện đại hóa đất nước.

Chương 7

RƯỢU VANG

Khác với rượu trắng và các loại rượu pha chế, rượu vang là loại đồ uống lên men trực tiếp từ nước 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 ý nghĩa 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 hòa 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 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 hóa sinh xảy ra trong quá trình lên men các loại nước quả dưới tác dụng của enzym của nấm men.

Trong nước quả (nho, mận, dâu, dứa, mơ v.v...) có chứa đường glucoza, fructoza, các chất pectin, các axit hữu cơ (axit tartaric, malic, xucsinic) và muối của những axit này, các chất màu, hợp chất chứa nitơ (protein, axit amin) vitamin cũng như các muối khoáng v.v...

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 CO₂ và glyxerin, axit axetic, axit lactic, este etylaxetat). Các alcol bậc cao, aldehyt axetic được tạo thành từ các axit amin. Các chất pectin bị thủy 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 (màu đỏ bordaux), 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 (champagne) 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 Dionidot 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 hóa sinh xảy ra trong quá trình lên men các loại nước quả dưới tác dụng của hệ enzym 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, México, 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 $0,1 \div 1^0$, vang sáng màu nhanh hơn, có thể cho hương vị thanh khiết hơn.

7.1. 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 tưởng nhất để chế rượu vang. Thành phần hóa học của nho có (%): $10 \div 30$ đường (glucoza, fructoza, sacaroza); $0,5 \div 1,7$ các axit hữu cơ (axit tataric, axit malic); $0,1 \div 0,9$ các chất protein; $0,1 \div 0,3$ pectin; $0,1 \div 0,5$ chất khoáng, có các vitamin C, B₁, B₂, PP cùng các chất thơm.

Nho ưa đất ít chua và khí hậu khô, nhiều nắng. Vùng đất Khánh Hòa, 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 nước quả là có một lượng đường đáng kể dễ đồng hóa, 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 hòa.
- 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 dập nát, chọn các loại quả tốt ép lấy dịch. Có nhiều trường hợp chỉ loại quả xấu, dập 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 dịch quả, đặc biệt là làm biến màu. Dịch thu được sẽ đem sulfite hóa bằng cách bổ sung natri sulfuro (Na_2SO_3) để chống bị oxy hóa làm sẫm màu hoặc biến màu. Lượng SO_2 được phép cho vào dịch quả là $30 \div 120 \text{ mg/l}$. Ngoài vai trò làm chất chống oxy hóa, SO_2 còn có tác dụng diệt tạp khuẩn, men dại, khi lên men tạo điều kiện cho nấm men sinh ra một ít glycerin 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 B₁. 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. Xirô thu được cũng cần sulfite

hóa và khi lên men được pha loãng gấp 2 ÷ 3 lần. Như vậy, vang sản xuất theo phương pháp xử lý này chất lượng không cao.

7.2. 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:

7.2.1. Nấm men

• **Nấm men rượu vang** *Saccharomyces vini* và *S. oviformis*. Trước đây hai loài này được gộp thành một loài có tên là *S. ellipsoideus* (hình 7.1) Các loài này được dùng chủ yếu để lên men rượu vang (xem thêm ở chương I).

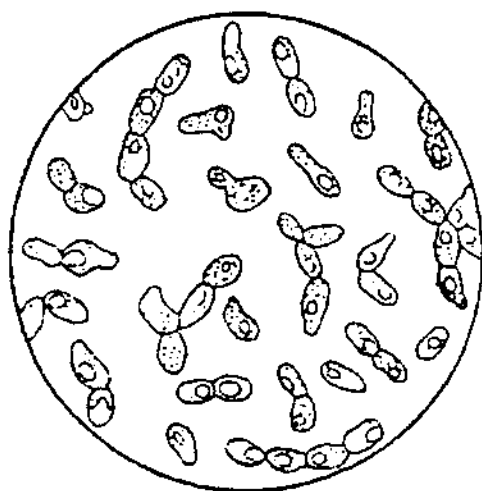
• **Nấm men nhọn đầu** (*Hanseniaspora apiculata*) hay *Kloeckera apiculata* là loài men đại làm giảm chất lượng của vang, rất phổ biến ở cổ đại. Tế bào men này có đầu nhọn (hình 7.2) ở một đầu hoặc hai đầu, làm cho ta liên nghĩ đến quả chanh hoặc quả chùy, ở cuối lên men – hình ovan hoặc elip. Giống men này khi trưởng thành có các hình dáng ovan, elíp và dài giống cái giò. Kích thước tế bào không lớn: $3 \div 4,5 \times 5 \div 11 \mu\text{m}$. 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 (xem thêm ở phần 7.5.5).

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 ÷ 75 mg H_2SO_3 vào 1 lít.

* ***Pichia*** (hình 7.3)

Nấm men *Pichia* có tế bào hình ovan hay elip, kích thước $3,6 \div 7,2 \mu\text{m}$ chiều dài và $3 \div 5 \mu\text{m}$ đường kính. Hình dáng của chúng có thể thay đổi thành trục khuẩn hoặc hình khúc

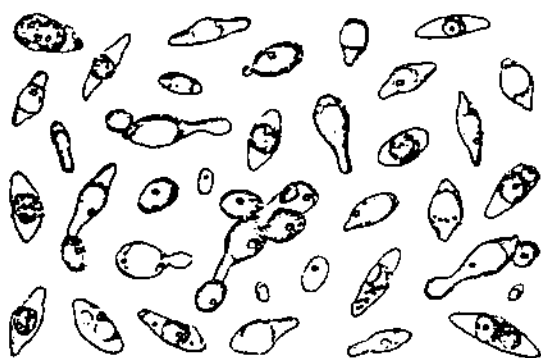


Hình 7.1. Tế bào nấm men rượu vang
Saccharomyces ellipsoideus
(hỗn hợp hai loài *S. vini* và *S. oviformis*)

giò. Trong trường hợp này chiều dài tế bào đạt tới $20 \div 25 \mu\text{m}$. 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 hóa chất hữu cơ bằng con đường oxy hóa cơ chất. *Pichia* oxy hóa rượu thành axit hữu cơ.

Trong vang non ta thường gặp loài này là phổ biến và gặp với số lượng rất lớn và tốc độ sinh sản vượt trội các men khác nhiều lần.



Hình 7.2. *Hanseniaspora apiculata*
(*Kloeckera apiculata*)



Hình 7.3. *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 còn đủ khí trong chai *Pichia* có mặt sẽ sinh sản rất nhanh, làm tiêu hao lượng đường sót lại cùng với rượu, glycerin và các chất hữu cơ có trong vang. Chỉ qua 3 ngày ở $18 \div 20^\circ\text{C}$ vang bị đục. *Pichia* phát triển trên bề mặt vang làm thay đổi thành phần 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.

* *Zygopichia* (có tài liệu viết *Sigopichia*)

Tế bào nấm men *Zygopichia* có hình ovan hoặc hình kéo dài, có kích thước $3 \div 5 \times 3,5 \div 13 \mu\text{m}$ (hình 7.4). 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 để 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 axetic cùng nhiều axit khác làm độ chua của vang tăng lên.

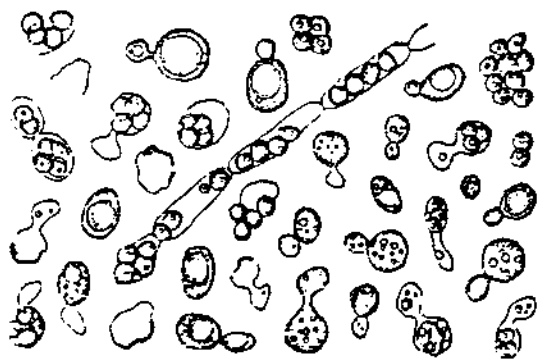
Biện pháp ngăn ngừa *Zygopichia* cũng giống như với *H. apiculata* và *Pichia*.

Hansenula (hình 7.5). Tế bào *Hansenula* hình ovan ngắn hoặc kéo dài, đôi khi có dạng tròn. Kích thước tế bào trung bình là $1,5 \div 5 \times 3 \div 30 \mu\text{m}$. Bào tử của men này có dạng cái mũ và kích thước là $2 \div 3 \mu\text{m}$.

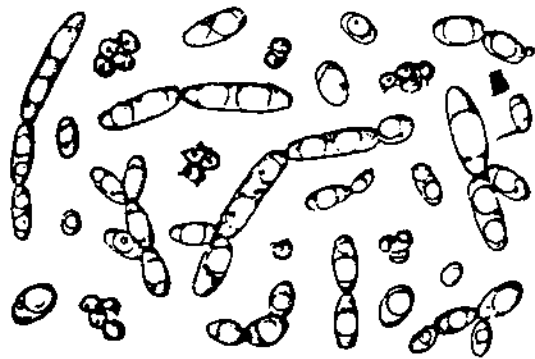
Hansenula có khả năng sinh trưởng rất nhanh trên bề mặt dịch quả, tạo thành màng ở ngày thứ hai và lắng cặn ở ngày thứ ba, đồng thời gây lên men được $2 \div 3^\circ$ rượu. *Hansenula* cũng có thể sinh trưởng được ở vang có $9 \div 13^\circ$ rượu. Nó là tác nhân mạnh mẽ tạo cho vang có các este bay hơi (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*).

Mycoderma vini (hình 7.6). *Mycoderma* có tế bào hình ovan và hình trụ (dạng một khúc gỗ) ở hai đầu lượn tròn. Kích thước trung bình của tế bào là $5,5 \div 9 \mu\text{m} \times 2 \div 4 \mu\text{m}$. 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 7.4. *Zygopichia*



Hình 7.5. *Hansenula*

Mycoderma cũng làm đục vang.

Ngoài các men đã được đề cập ở trên ta còn gặp nhiều giống loài men khác nữa có trong dịch quả, đặc biệt là ở nước quả pha loãng. Trong các men khác ta hay gặp là *Torula*.

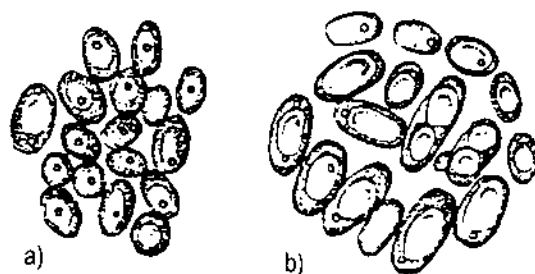
Tất cả các men này đều gây lên men và làm giảm chất lượng của vang. Chúng được gọi bằng một tên chung là men dại.

7.2.2. 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 vi khuẩn và nấm mốc. Vi khuẩn cũng phát triển được ở trong vang. Trong thời gian lên men vi khuẩn sinh sản rất mạnh tạo ra mùi mannit (hôi). Vi khuẩn gây phần lớn “các bệnh” của vang.

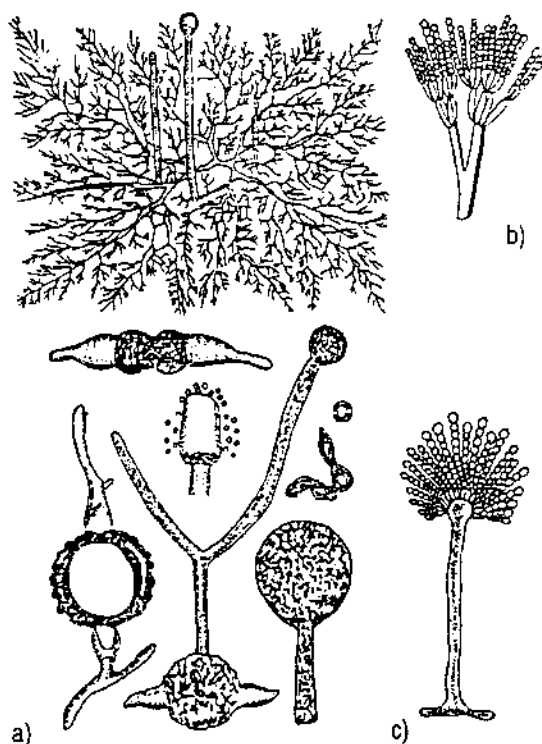
Cùng với các vi khuẩn là tác nhân chính gây “bệnh” vang, ta còn thấy có một số loài thuộc vi khuẩn lactic phát triển biến axit malic thành axit lactic (ta gọi quá trình này là lên men malo-lactic). Vi khuẩn này tham gia vào làm “chín” vang hay hoàn thiện cho vang, để cho vang có mùi hoàn thiện hơn. Đây 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 (*Penicillium*, còn gọi là mốc xanh) và *Aspergillus niger* (mốc đen) (xem hình 7.7).



Hình 7.6. *Mycoderma vini*

a- tế bào ở màng trên mặt dịch lên men;
b- tế bào ở cặn men



Hình 7.7. Hình thái nấm mốc:

a- *Mucor*; b- *Penicillium*; 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 cinerea* làm tăng chất lượng cho vang.

7.3. 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 ($\text{pH} = 2,7 + 3,8$) 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 đại hình thoi đầu nhỏ hoặc hình chùy (*Kloeckera*) chiếm ưu thế (70 – 80% trong tổng số nấm men) sau đó các nấm men hình elip hoặc ovan (*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 chùy *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 hóa 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 chùy chim phần lớn và 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 biệt là nước táo thường thấy nấm men thuộc loài *Shzosaccharomyces acidodevoratus*. Loài này phân hủy axit malic, làm giảm độ axit cho các loại dịch quả trong quá trình lên men.

7.4. DINH DƯỠNG NẤM MEN VÀ CHẤT LƯỢNG CỦA VANG

Các chương trên đã cho chúng ta thấy, 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 hóa. Trong các nguồn dinh dưỡng thì nguồn cacbon và nitơ được quan tâm hàng đầu.

7.4.1. 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, hydrate cacbon và v.v... Song mỗi loài nấm men có quan hệ riêng biệt với từng loại đường. Đặc điểm này là do đặc điểm chẩn đoán học (diagnostic) 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 men rượu vang lên men được glucoza, fructoza, sacaroza và galactoza. Rafinoza được sử dụng một phần. Còn lactoza, melibioza, pentoza, dextrin và tinh bột hoàn toàn không được đồng hóa. Trong dịch nho lượng đường glucoza và fructoza tương đối là bằng nhau, nhưng đường fructoza ngọt hơn nhiều glucoza.

Theo cường độ sử dụng glucoza và fructoza (đến thời điểm mà nấm men đã lên men được 50% fructoza) người ta chia nấm men làm 3 nhóm:

1) Nhóm thích glucoza (glucosophyle) lên men glucoza từ 80 ÷ 85% (phần lớn là các loài thuộc giống *Saccharomyces*, cũng như giống *Saccharomycodes* và *Brettanomyces*;

2) Nhóm thích fructoza (fructosophyle) trong giai đoạn này chỉ sử dụng có $5 \div 10\%$ glucoza (*S. bailii*, *S. rouxii*, *T. stella*);

3) Nấm men ưa thích cả hai loại đường và đến khi sử dụng được 50% thì glucoza cũng thấy tiêu hoá được là $40 + 60\%$ fructoza (*S. rosei*, *Pitria membranaefaciens*).

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, axetic, citric, fumaric và malic) nấm men có thể sử dụng như là nguồn cacbon duy nhất. Song, tốc độ sinh trưởng ở môi trường các axit này thấp hơn so với môi trường glucoza.

Các axit béo không bão hoà, đặc biệt là axit oleic, linoleic, palmitoleic, 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, linoleic) và sterin (ergosterin hoặc cholesterolin).

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 Champagne (xâm bánh) bão hoà CO_2 .

7.4.2. Dinh dưỡng nitơ

Nguồn dinh dưỡng nitơ cần thiết các cấu tử của tế bào chứa nitơ, như axit amin, protein, các nucleotit purin và pyrimidin và một số vitamin, cần phải có mặt trong môi trường ở dạng hữu cơ hoặc vô cơ. Phần lớn nấm men không đồng hóa 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 sulfat, phosphat, axetat, lactat, malat, succinat và nước amoniac (amoni hydroxit).

Trong trường hợp nguồn nitơ hữu cơ gắn 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 hóa 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 $4 \div 7$ mg nitơ.

Nitơ - amoniac ($\text{N} - \text{NH}_3$) có trong dịch nho (từ $25 \div 100$ mg/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 hóa được protein tự nhiên. Song, khi trong môi trường có nguồn nitơ dễ tiêu hoá làm cho nấm men có thể tiết ra các enzym proteolytic 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 hóa dễ dàng là izoleuxin, triptophan, arginin, valin, histidin, axit aspartic;

- Các axit amin được đồng hóa kém – treonin, phenylalanin, tirozin, metionin, rerin, lizin, histidin, axit glutamic, lœxin;

và prolin hoàn toàn không được nấm men đồng hóa.

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 ta thấy có một lượng khá lớn axit amin và các chất chứa nitơ khác nữa do các tế bào chất 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 aspartic, glutamic, γ -aminobutyric, alanin, valin, glycocol, 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” enzym 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 enzym.

Axit amin có ảnh hưởng không những đến các enzym aminotransferaza tương ứng mà còn đối với những cái khác, những cái này không có ảnh hưởng tới cơ chất. Alanin được bổ sung vào môi trường đều tác dụng đến các enzym nghiền cừu. Khi bổ sung tirozin chỉ làm tăng hoạt tính enzym tirozin-aminotranferaza, khi thay hoàn toàn amoni sulfat bằng tirozin làm nâng cao được hoạt tính aminotranferaza.

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 sulfat là tác nhân làm tăng hoạt tính các enzym. Hoạt tính của asparat-aminotransferaza tăng từ 3,1 đ.v/mg protein ở giữa giai đoạn lên men đến 47,7 đ.v/mg protein ở cuối lên men; hoạt tính của alanin – aminotransferaza tăng từ 0,35 đến 0,92 đ.v/mg protein; enzim tirozin – aminotransferaza ở giữa lên men chỉ thấy vết và ở cuối lên men tìm thấy là 2,64 đ.v/mg protein.

Thực nghiệm đã cho thấy rằng, thừa oxy cùng 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 – 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 và nitơ tổng cho một đơn vị sinh khối lại lớn hơn.

Điều kiện lên men có ảnh hưởng đến hoạt tính của proteaza. Hoạt lực tối đa của enzym này trong điều kiện nấm men hiếu khí là 100% thì ở điều kiện trong CO_2 với áp lực là 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 thủy 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.

7.4.3. Dinh dưỡng các nguyên tố vô cơ

Cũng như các nấm men khác, men rượu vang cũng rất cần các nguyên tố khoáng dinh dưỡng như phospho, lưu huỳnh, kali, canxi v.v...

- **Phospho** có trong thành phần những hợp chất quan trọng nhất của tế bào: các nucleotit, axit nucleic, polyphosphat, phospholipit. Hợp chất phospho đóng một vai trò xác định trong các chuyển hóa vật chất đặc biệt là trong trao đổi chất cacbon và vận chuyển năng lượng. Nấm men sử dụng tốt nguồn phospho vô cơ là ortophosphat. Nguồn này có thể biến thành polyphosphat và sau khi hoạt hóa được sử dụng cho các quá trình sinh tổng hợp. Thiếu phospho 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 phospho dinh dưỡng vào khoảng $10 \div 13$ mg cho 10^9 tế bào. Đối với men rượu vang là *Saccharomyces vini* và *S. oriformis* sinh trưởng tốt và nâng cao được tốc độ lên men, lượng phospho dinh dưỡng cần có trong môi trường là 100 – 500 mg/l (với nguồn phospho 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 polyphosphat được thấy có ở 2 dạng: dạng hoà tan trong axit tricloaxetic – ít, dạng không hoà tan trong axit chiếm phần nhiều hơn.

Trong các tế bào nấm men trẻ, nảy chồi mạnh chứa phospho nhiều hơn cả ($0,12 \div 0,07\%$ sinh khối khô). Điều này được xác định lượng polyphosphat 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 polyphosphat không tan trong axit (các polyphosphat này là phần hoạt hóa sinh lý) sau đó là các polyphosphat tan trong axit. Điều đó có thể nhận thấy là khi sử dụng hầu hết nguồn phosphat nấm men ngừng nảy chồi. Trong khi tàng trữ vang ta thấy hàm lượng phospho chung trong tế bào ở cặn men bị giảm, còn trong vang lại tăng tương ứng. Điều đó có nghĩa là các hợp chất phospho hoà tan chuyển từ tế bào nấm men vào vang.

- **Lưu huỳnh** có trong thành phần của protein và nhóm phụ (-SH) của một số enzym, coenzym 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 (sixtein, sixtin, metionin), các vitamin (tiamin và biotin) và những hợp chất khác. Trong dịch nho có nguồn S tự nhiên là các gốc sulfat. 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 1 mg/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 sulfua kim loại làm cho cặn men có màu nâu đỏ hoặc đen xám, gây cho vang những mùi khó chịu.

- **Canxi và kali** cần thiết cho sự hoạt động của một số enzym. K và Ca tham gia vào trung tâm hoạt động của các enzym này và đồng thời có mặt ở các chất ức chế các enzym.

- **Các nguyên tố vi lượng** có ảnh hưởng đến sinh trưởng và lên men. Mn với nồng độ 1 mg/l làm tăng lực hô hấp, ở $45 \div 90$ mg/l – tăng lực lên men, tăng sinh tổng hợp enzym 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.

7.4.5. 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 B₈), biotin (vitamin B₇) axit pantotenic (vitamin B₃), tiamin (vitamin B₁), pyridoxin (vitamin B₆), axit nicotinic (vitamin B₅, PP).

Liều lượng tối thiểu các vitamin này có tác dụng dương tính đến phát triển của nấm men là như sau: inozit – 5; biotin – 0,0001; axit pantotenic – 0,25; tiamin – 1,0; pyridoxin – 0,25; axit nicotinic – 0,5 µg/ml môi trường tổng hợp.

Đối với nấm men sinh sắc tố *Rhodotorula* trong 6 vitamin trên thì tiamin được thay thế bằng axit paraaminobenzoic.

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, hai, ba... hoặc một vài chất trong các vitamin này. Như vậy, thiếu một vitamin nào đó mà nấm men không sinh trưởng, ta chỉ cần bổ sung vitamin thiếu vắng vào môi trường nấm men sẽ phát triển bình thường. Do vậy, ta có thể dùng các chủng nấm men làm chủng - 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 hóa làm cho sẫm màu. Muốn hạn chế các vi sinh vật tạo nhiễm và làm cho nước quả sáng màu người ta thường cho thêm một lượng sulfuro (SO₂) có tính toán. Với nước quả sau khi ép thường được bổ sung thêm đường để có khoảng 20% đường tổng số, điều chỉnh pH (2,8 – 3,5) bằng amoni kali tatarat (có khi dùng CaCO₃ bột hoặc amoni hydroxyt NH₄OH), bổ sung thêm nguồn nitơ - (NH₄)₂SO₄... Dùng Na₂SO₃ 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 của vang.

7.5. 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 dáng khác nhau: hình tròn, ovan, hoặc elip. Sinh sản bằng lối nảy chồi, sử dụng đường trong quá trình hô hấp và lên men, có trường hợp lên men ở dịch đường 30% và tạo được 18° cồn. Không đồng hóa được muối nitrat.

Giống *Saccharomyces* có tới 18 loài, nhưng chỉ có 7 loài thường gặp trong nước quả.

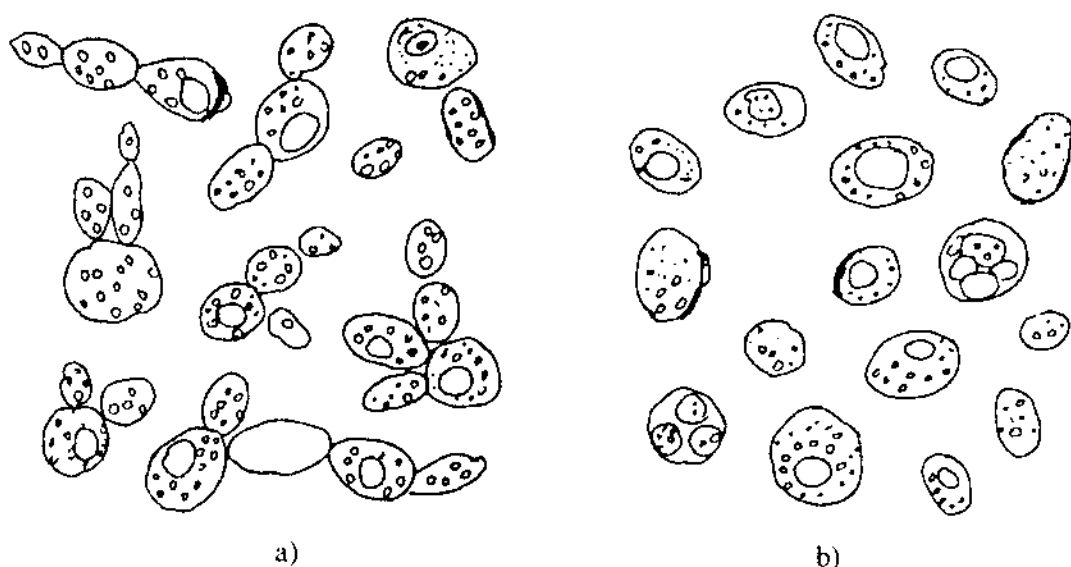
Các loài nấm men không sinh bào tử thường gặp trong nước quả và khả năng lên men hoặc tiêu hao đường trong đó, phổ biến là *kloeckera*, *Torulopsis*. Người ta thường gọi chúng là men dại.

Sau đây là một số loài nấm men thường gặp trong nước quả là có vai trò quan trọng trong nghề làm rượu vang.

7.5.1. *Saccharomyces vini* (hình 7.8)

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, mezôinit, tiammin và piridoxin.



Hình 7.8. Nấm men rượu vang:

a- *Saccharomyces vini*; b- *Saccharomyces oviformis*

Đa số các tế bào của loài này hình ovan có kích thước $(3 + 8) \times (5 + 12) \mu\text{m}$, sinh sản theo lối nảy chồi và tạo thành bào tử. *S. vini* sinh ra enzym invertaza có khả năng khử đường sacaroza thành fructoza và glucoza, 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 về khả năng tạo cồn, chịu sulfit, 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.

7.5.2. *Saccharomyces uvarum* (hình 1.9)

Men này được tách từ nước nho, rượu và nước quả phúc bốn từ 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 $12 \div 13^\circ$ cồn trong dung dịch nước nho. Một vài nòi được dùng trong sản xuất rượu vang.

7.5.3. *Saccharomyces chevalieri* theo Lodder là *Saccharomyces chevalieri* Guilliermond (hình 1.11)

Nấm men này được tách 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*.

7.5.4. *Saccharomyces oviformis* theo Lodder là *Sac. Beuanes saccardo* (hình 7.8)

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 glucoza, fructoza, mannoza, sacaroza, maltoza và 1/3 rafinoza, không lên men được lactoza, pentoza. Điều khác nhau cơ bản của *S. oviformis* với *S. vini* là: *S. oviformis* không lên men được galactoza 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 $18 - 25^\circ\text{C}$, ở 35°C sinh sản của chúng bị ức chế, ở 40°C sinh sản 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.

7.5.5. *Hanseniaspora apiculata* – *Kloeckera apiculata* (hình 7.2)

Kloeckera apiculata: kích thước tương đối nhỏ, có hình ovan - elip hoặc hình quả chanh, tế bào có một đầu nhỏ người ta thường gọi là men hình chùy. Sinh sản bằng nảy chồi,

rất phổ biến ở vỏ quả và nhiễm vào nước quả chiếm 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 lên men, *K. apiculata* nhạy cảm với SO_2 .

Trong nghề làm rượu vang người ta không mong muốn loài men này phát triển, nếu có thì chỉ cần có trong giai đoạn đầu tạo được 3 – 4° cồn.

7.5.6. 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 đây 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 1.6, 1.12 và 7.8).

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 0,2 ml hỗn hợp có thành phần như sau: Amoni sulfat – 100 g/l; vitamin B₁ (thiamin) – 0,25 g/l; canxi pantotenat – 0,25 g/l; vitamin H (biotin) – 0,002 g/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 phospho kali ở dạng muối phosphat và magie ở dạng muối sulfat. Ngoài ra để chống oxy hóa nước quả, người ta có thể thêm hóa chất vào nước quả sau khi ép và trước khi lên men. Chất dùng rộng rãi là SO_2 (anhydrit sulfuro). 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 hóa, làm giảm hoặc tiêu diệt nhiều loại vi khuẩn có hại trong đó có vi khuẩn lactic. Lượng SO_2 thường dùng là $30 \div 120 \text{ mg/l}$. SO_2 có tác dụng làm tê liệt các enzym 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 sulfit Na_2SO_3 .

7.6. 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 qui 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 gỗ. Nhiều xưởng vẫn dùng thùng gỗ để lên men. Dịch quả được tiếp 2% giống nấm men từ dịch lên men hoặc cặn men ở những mẻ trước và cho lên men ở $20 \div 22^\circ\text{C}$, không nên để quá $25 \div 28^\circ\text{C}$. Thời gian lên men sơ bộ từ 1 ÷ 2 ngày hoặc 3 ÷ 4 ngày, sau đó ép qua máy thủy 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 ta 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 sulfit với liều lượng là $30 \div 120 \text{ mg SO}_2/\text{l}$. Trước khi lên men cần khử SO_2 thành H_2SO_4 rồi dùng CaCO_3 kết tủa 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 hóa của chúng.

7.6.1. Men giống trong sản xuất vang

Trong sản xuất rượu vang ở qui 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 qui 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 oviformis*. Hỗn hợp giống này được giữ ở dạng sữa đặc hoặc bánh khô ở nhiệt độ lạnh khoảng $0 \div 2^\circ\text{C}$. Trước khi sử dụng làm giống khởi động cần phải hoạt hoá. Loại giống này thường được dùng ở qui 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 đường – malt. Nếu thấy men phát triển kém nên thêm vào dịch nước quả một hỗn hợp sau: Amoni sulfat – 100 g/l; vitamin B₁ – 0,25 g/l; canxi pantotenat – 0,25 g/l; biotin – 0,002 g/l theo tỷ lệ 0,2 ml 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 chuyển 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 qui mô công nghiệp, đặc biệt là các nước Đông Âu. Có thể dùng giống thuần chủng hỗn hợp hai loài *S. vini* và *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 sulfat hóa dịch quả để diệt men dại, nấm mốc và các tạp khuẩn khác. Trong điều kiện thích hợp giống men rượu vang 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.

Còn trùng (nhất là ruồi dấm) 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.

7.6.2. 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) của dịch lên men sơ bộ cho lên men với 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.

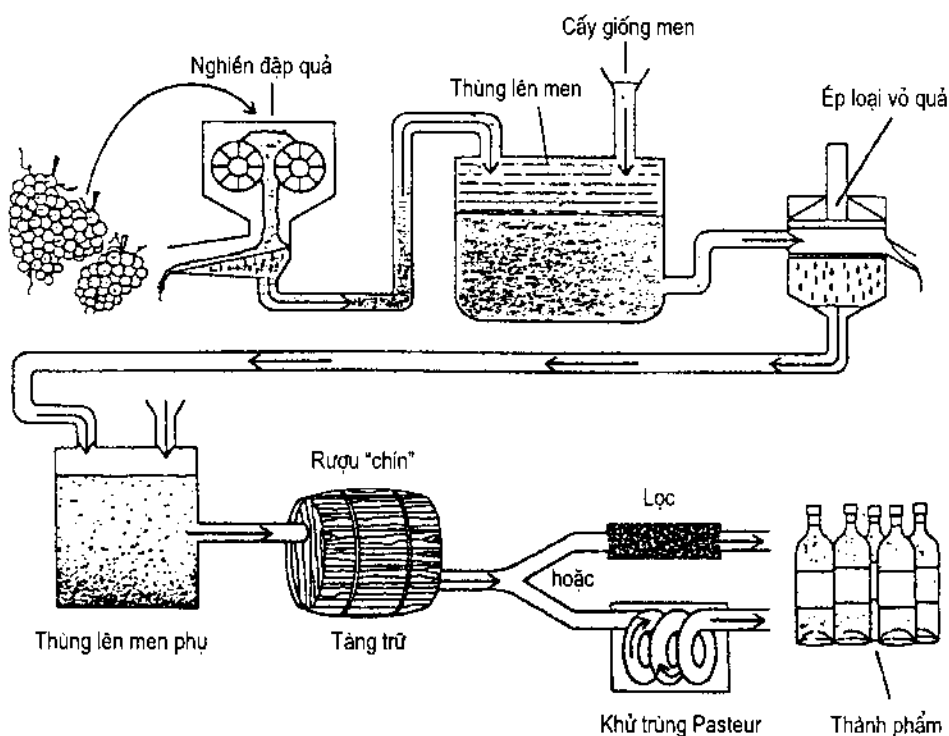
Trong lên men công nghiệp với các chủng thuần khiết thì cần phải nhân giống ở các phòng thí nghiệm và phân xưởng. Quá trình nhân giống này phải nuôi cấy vô trùng: thiết bị và môi trường phải tiến hành thanh trùng, khi cấy chuyển giống cố gắng không để tạp nhiễm

và giống sau khi nhân được đưa vào lên men đảm bảo giống khoẻ 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.

Quy trình công nghệ sản xuất rượu vang đỏ được giới thiệu ở hình 7.9.



Hình 7.9. Quy trình sản xuất rượu vang đỏ

7.7. SẢN PHẨM LÊN MEN

7.7.1. Những sản phẩm được tạo ra trong quá trình hoạt động sống của nấm men

Đây là những chất do nấm men tạo ra trong quá trình sống và được giải phóng (hay

tách ra khỏi tế bào) vào môi trường. Một số chất này là sản phẩm trao đổi chất của nấm men rất đáng được quan tâm đối với rượu vang, đặc biệt chúng tạo ra phức hệ hương thơm (bouquet) và vị dịu êm của vang.

Trong lên men có hai sản phẩm chính là rượu etylic và CO_2 . Ngoài ra còn là các sản phẩm phụ là các chất thứ cấp hay là các sản phẩm bậc hai. Các sản phẩm được tạo thành từ protein cũng như từ các axit amin với các chất phân giải trung gian của đường tạo thành là các loại rượu bậc cao. Ngoài ra còn có glycerin, axit succinic, axetaldehyt, axit axetic, axit propionic, axit lactic, axit xitric, 2,3-butylenglycol, axetoin, diaxetyl, este.

- **Glycerin** được tạo thành trong lên men khi axetaldehyt liên kết với bisulfit natri hoặc lên men ở môi trường kiềm. Glycerin được tạo thành mạnh mẽ từ khi bắt đầu lên men. Nhờ có vị ngọt và sánh như dầu glycerin đóng vai trò nhất định trong sự làm hài hoà vị của vang. Bình thường hàm lượng của nó có trong vang từ $7 \div 14$ g/l, còn đối với vang làm từ nho nhiễm nấm mốc *Botrytis cinerea* thì cần tới 20 g/l glycerin. Sự khác nhau về hàm lượng chất này có trong vang phụ thuộc vào công nghệ, vào nhiệt độ lên men, vào mức độ sulfit hóa và đặc biệt là vào từng chủng (nòi) nấm men dùng trong sản xuất.

- **Axeton và diaxetyl** đều có ảnh hưởng đến chất lượng của vang, mặc dù số lượng của chúng được tạo ra trong vang không lớn lắm: axetoin từ $2,0 \div 84$ mg/l và diaxetyl – $0,1 \div 1,8$ mg/l. Sự có mặt của chúng ở trong vang có hai khả năng: ảnh hưởng rất lớn đến hương vị vang và biến đổi hoá sinh. Diaxetyl ở nồng độ thấp cho vang mùi xác định, nhưng lớn hơn 1 mg/l sẽ cho vang tông mùi vị chua oxy hóa, thỉnh thoảng chuyển sang mùi chuột. Vang khô và champagne (Xâm panh) loại tốt chỉ có vết diaxetyl, loại chất lượng thấp – cao hơn 1 mg/l. Sự tạo thành diaxetyl và axetoin trong lên men có quan hệ tương tác với sulfit hoá dịch quả. Hàm lượng tối đa axetoin trong dịch quả không sulfit hóa vượt trội gấp 2 lần so với dịch quả được sulfit hóa.

Trong quá trình lên men, đặc biệt ở điều kiện hiếu khí, số lượng diaxetyl tăng lên, song sự tích tụ của nó không tương đồng với sự tạo thành axetoin.

Số lượng tối đa của axetoin (100 mg/l) đạt được ở giữa thời gian lên men, về cuối lên men nó được khử thành 2,3-butylenglycol. Thật vậy, 3 chất này đều được tạo thành trong hệ thống oxy hóa - khử của môi trường: diaxetyl dễ bị khử thành axetoin, cuối cùng thành 2,3-butylenglycol.

Số lượng diaxetyl, axetoin và 2,3-butylenglycol, được tạo thành trong lên men, phụ thuộc vào nồng độ đường ban đầu: nồng độ càng cao (2,5 và 10 g/100 ml) càng tích tụ nhiều diaxetyl. Những chủng nấm men rượu vang có khả năng sinh tổng hợp chất này là khác nhau: có chủng tạo ra diaxetyl là 0,5 mg/l và axetoin 9,7 mg/l, chủng khác lại tạo ra được 9,6 và 64,7 mg/l.

• **Aldehyt** hay gặp ở trong vang là aldehyt axetic, propionic, butyric, valeric, enantic v.v... Các aldehyt này có mùi rất gắt (trong trường hợp đặc không pha loãng). Khi pha loãng, trừ aldehyt axetic, các aldehyt khác có mùi dễ chịu của tông mùi quả tự nhiên. Đặc biệt là trường hợp khi lên men sinh ra nhiều axetaldehyt với dịch quả sulfít hóa. Khi SO_2 tạo thành trong dịch lên men sẽ bị giảm dần do bị phân huỷ và tích tụ axetaldehyt trong vang.

Men rượu vang trong điều kiện có oxy của không khí sẽ oxy hóa etanol thành aldehyt axetic (axetaldehyt). Số lượng aldehyt này tạo thành trong vang tới 10 mg/l khi lên men vang từ đường glucoza. Aldehyt loại này (axetal) thường tích tụ trong vang một lượng nhỏ, trừ vang Cheres. Nấm men tạo màng sản xuất loại vang này có thể sinh ra aldehyt axetic một lượng lớn và tiêu hao etanol (do oxy hóa) tới 4% tổng lượng rượu.

• **Các axit.** Các axit bay hơi gặp ở vang là: axit axetic, propionic, izobutyric, butyric, izovaleric, capronic, caprilic, valeric. Trong điều kiện lên men hiếu khí chỉ thấy có vết axit enantic hay enantyllic ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{COOH}$). Các axit bay hơi được tích tụ chủ yếu ở giai đoạn đầu lên men. Axetaldehyt tạo thành nhanh chóng trong đầu lên men, nhưng gần cuối thấy giảm đáng kể. Một số nấm men có thể dùng axit axetic làm cơ chất dinh dưỡng và như vậy trong quá trình lên men lượng axit bay hơi tạo thành trong giai đoạn đầu và giảm dần trong giai đoạn cuối (do nấm men sử dụng).

Axit succinic hoàn toàn vắng mặt trong nho và ở vang thấy có 0,1 ÷ 0,4%.

Axit lactic thường xuyên có mặt trong quá trình lên men rượu vang – khoảng 5% đường tiêu hao dùng để cho sinh tổng hợp loại axit này. Trong các sản phẩm vang trắng lên men tốt có axit lactic là 2,5 g/l, vang đỏ – 4,5 g/l. Axit lactic có hai đồng phân quang học: D(-) và L(+) lactic. Dạng D(-) là sản phẩm do nấm men sinh ra trong điều kiện kỵ khí, còn L(+) là axit lactic do vi khuẩn sinh ra trong lên men malo-lactic từ axit malic. Từ những hexoza và pentoza vi khuẩn lactic tổng hợp một lượng không lớn D-lactic axit.

Limonic axit (axit xitric) trong điều kiện lên men vang bình thường được tạo ra một lượng không lớn (chỉ giới hạn ở 0,3 ÷ 0,8 g/l).

Axit malic trong dịch quả có tới 3 ÷ 4,5 g/l. Trong lên men nấm men sử dụng axit này và có thể giảm hàm lượng tới 25%. Nếu trong vang có hàm lượng axit malic sẽ làm cho vang có vị chua gắt.

Các xetoaxit trong vang là đại diện cho axit pyruvic, axaloaxetic, α -xetoglutaric v.v...

Hàm lượng axit pyruvic có trong vang ở khoảng 11 ÷ 460 mg/l, α -axit xetoglutaric – 2 ÷ 341 mg/l. Lên men ở điều kiện dư áp suất CO_2 thì hàm lượng pyruvic giảm, nhưng α -axit xetoglutaric lại tăng lên.

Người ta cho rằng, sự tạo thành axit pyruvic và α -xetoglutaric phụ thuộc vào từng chủng nấm men. Các chủng này có hoạt tính enzym cacboxylaza khác nhau: nếu pyruvat

carboxylaza càng hoạt động thì axit pyruvic được tạo thành càng ít. Điều này rất có ý nghĩa trong nghề làm rượu vang, vì axit pyruvic tích tụ trong dịch lên men sẽ liên kết với SO_2 làm giảm hoạt tính kháng khuẩn của chất này.

- **Các este** được tạo thành trong quá trình lên men vang một lượng đáng kể và chúng là những hợp chất quan trọng hình thành hương vị của vang. Trong số này có etylaxetat là vượt trội hơn cả về số lượng. Nó có mùi của quả tự nhiên. Este etylbutyrat cũng như este của các rượu bậc cao có mùi hoa quả. Sự tạo thành những este phức tạp do các giống và loài nấm men khác nhau là không đồng nhất như nhau. Ví dụ: *S. oviformis* tổng hợp được nhiều etylaxetat trong điều kiện kỵ khí – 80 mg/l, trong hiếu khí – 40 mg/l và izoamylaxetat trong kỵ khí – 1,21 mg/l và trong hiếu khí – 0,14 mg/l. *S. vini* trong điều kiện kỵ khí tương ứng – 64 và 0,62 mg/l, trong hiếu khí – 36 và 0,13 mg/l. Ngưỡng cảm nhận được của etylaxetat có trong vang là 180 – 200 mg/l. Nếu thấp hơn hoặc cao hơn khoảng này đều ảnh hưởng trực tiếp tới vị của vang. Trường hợp cao hơn sẽ cho vang vị đắng gắt khó chịu.

Trong lên men vang tích tụ cả các este có độ sôi thấp và độ sôi cao (este etyl của các axit caproic, caprilic, capric, izoamylcapronic và của các axit béo linoleic, linolenic và v.v...). Điều kiện lên men chỉ ảnh hưởng đến số lượng các este. Lên men ở điều kiện kỵ khí mức độ este tạo thành lớn gấp 6 lần so với lên men hiếu khí và gấp 4 lần so với lên men dư thừa CO_2 . Giữ vang non được lên men ở điều kiện hiếu khí và kỵ khí sẽ dẫn đến thay đổi nồng độ phần trăm của các este có độ sôi cao và làm tăng este có độ sôi thấp, ngược lại, vang non được lên men ở dư áp suất CO_2 sẽ làm cho hàm lượng phần trăm các este có độ sôi cao nhiều hơn.

Một lượng lớn các este etylic của các axit béo bậc cao, như axit enantyl (hay enantic), được thấy có trong vang. Các chất béo cùng với các cấu tử khác của vang tham gia vào quá trình oxy hóa của vang bản ăn, làm vai trò chất chống oxy hóa. Trong nồng độ nhất định chúng làm cho mùi vị của vang mềm mại hơn, dịu êm và hài hòa hơn. Đối với nấm men *S. cerevisiae* khi sinh trưởng kỵ khí yêu cầu axit oleic, linoleic, linolenic. Ergosterin và một số các sterol khác cần thiết cho sinh trưởng kỵ khí của nấm men. Nhu cầu về các axit béo không bão hòa là điều chế ước cần quan tâm, vì trong điều kiện kỵ khí nếu không tổng hợp được chúng.

- **Lipit** là hỗn hợp các chất béo thực (este của axit béo với glycerin), sáp (este của axit béo với rượu bậc cao), phospholipit (chứa axit béo, glycerin, phosphat vô cơ và amin hoặc axit amin).

Tế bào *S. cerevisiae* có khả năng tích tụ chất béo trong tế bào từ 12,6 đến 42,8% so với chất khô. Đặc biệt chất này giàu sterin, hàm lượng ergosterin kiểm chứa trong tế bào đạt tới 3% so với chất khô.

Tạo thành chất béo trong tế bào nấm men liên quan chặt chẽ với sản phẩm trao đổi chất cacbon.

Lipit có trong vang do hai con đường: từ quả và từ chủng loài nấm men. Giống quả có chất béo thì trong lên men chất béo sẽ được chuyển sang vang non. Trên bề mặt quả nhỏ thường phủ một lớp sáp và chất sáp này sẽ rơi vào dịch quả. Thành phần chính của chất sáp này là axit oleanlevic và các rượu. Trong vang hàm lượng chất béo cao hơn ở dịch quả, do quá trình lên men các chủng nấm men sinh tổng hợp ra chất béo. Thật vậy, trong nước nho chưa lên men có 50 mg/l tổng chất béo, nhưng ở vang có tới $73 \div 113$ mg/l (ở một số loại vang). Tùy thuộc vào giống nho và men sử dụng trong sản xuất hàm lượng có trong vang là khác nhau, và đặc biệt là điều kiện lên men cũng như quá trình tàng trữ vang trên cặn men. Khi tàng trữ vang có hai quá trình về chất béo đối nghịch nhau: tổng hợp chất béo trong tế bào sống từ chất đường có trong nội bào và tách chiết chất béo từ tế bào chết. Hàm lượng chất béo trong tế bào lên men ở điều kiện kỵ khí và dưới áp suất CO_2 cao hơn khi lên men ở điều kiện hiếu khí.

Trong lên men nấm men sử dụng các axit béo không bão hòa từ dịch nho như axit oleic, linolevic, linolenovic. Nhu cầu này được tăng lên nhiều khi lên men dưới áp suất CO_2 . Trong điều kiện thiếu oxy các axit này rất cần thiết cho hoạt động sống của nấm men. Tàng trữ vang trên cặn men dẫn đến làm giàu thêm các axit oleic và linolevic. Trong các axit bão hòa ở trong dịch quả cũng như ở trong vang và trong nấm men ta thấy nhiều hơn cả là axit palmitic và axit stearic.

Cần lưu ý rằng, thay đổi điều kiện lên men có thể ảnh hưởng đến thành phần chất béo trong vang non, do đó ảnh hưởng đến lên men phụ. Các axit chưa bão hòa là những tác nhân sinh trưởng của nấm men trong điều kiện kỵ khí.

• **Các rượu bậc cao** được tạo thành bằng khử amin hoặc chuyển amin của các axit amin, tiếp nữa là khử cacboxyl của các xetoaxit và khử các aldehyt trong quá trình lên men rượu. Cũng chứng minh được rằng, rượu bậc cao được tạo thành do kết quả chuyển hóa hydratcacbon trong lên men. Các nhà bác học Xô Viết cho hay, rượu bậc cao được tạo thành trong pha sinh trưởng của nấm men. Quá trình này là kết quả của sự trao đổi kiến tạo liên quan đến sinh sản và sinh trưởng của nấm men.

Rượu bậc cao là sản phẩm được tổng hợp ở giai đoạn trao đổi chất cacbon và nitơ của nấm men.

Bổ sung các muối amoni vào môi trường nghèo nitơ sẽ tạo thành các rượu bậc cao bị giảm đi $1,4 \div 1,7$ lần. Khi thêm dư các axit amin α -alanin, axit α -amylbutiric, loxin, izoloxin và valin vào môi trường này sẽ thúc đẩy không những chỉ tạo rượu tương ứng với cấu trúc của các axit amin mà còn tạo ra hàng loạt các rượu bậc cao khác.

Trong vang ta thấy có các rượu sau: metanol, *n*-propanol, izopropanol, *n*-butanol, izobutanol, *n*-pentanol (rượu amylic), 2-metylbutanol (rượu amylic hoạt động quang học), 3-metylbutanol (rượu izoamylic), *n*-hexanol, rượu β -phenyletylic, triptofol. Hàm lượng các

rượu này có trong vang phụ thuộc vào điều kiện lên men dịch nho.

Trong điều kiện dư oxy của không khí sẽ tạo ra hàm lượng chung các rượu bậc cao lớn hơn ở điều kiện kỵ khí và dưới áp lực CO_2 .

Lên men dưới áp suất CO_2 sẽ giảm được hàm lượng rượu bậc cao, đặc biệt là izobutyric và amylic, nâng cao được thành phần phần trăm của rượu β -phenyletylic. Điều này có tác dụng nâng cao chất lượng cho vang, vì rượu izobutyric và amylic có ảnh hưởng xấu tới mùi vị của vang. Hai rượu này chiếm tới 90% tất cả rượu bậc cao có trong vang.

Các rượu bậc cao mạch vòng, như β -phenyletylic, tiozol, triptophol có tác dụng làm cho hương vị vang dịu êm dễ chịu. Người ta đã xác định được rằng, nấm men có thể tạo ra rượu phenyletylic từ phenylalanin. Vì vậy, người ta có thể thêm axit amin này vào vang non rồi đem đi tàng trữ, chất lượng vang được cải thiện rõ rệt. Song, hàm lượng của nó không được quá $20 \div 25 \text{ mg/l}$.

• **Sulfuahydryl** – hợp chất – SH có thể được nấm men tiết vào môi trường trong quá trình lên men. Điều này là đặc tính sinh lý của từng chủng nấm men được dùng trong lên men liên quan tới trao đổi chất của tế bào.

Các hợp chất sulfuahydryl như glutation và sixtein được nấm men tiết vào trong môi trường làm giảm thế oxy hoá - khử (Eh) – một chỉ số công nghệ quan trọng trong suốt quá trình lên men và tàng trữ vang cho đến “chín” sinh học của sản phẩm.

Thay đổi Eh trong quá trình lên men phụ thuộc vào tốc độ sinh sản của nấm men và tăng sinh khối. Eh bắt đầu giảm ở thời điểm nấm men sinh sản, khi mà nhu cầu oxy là tối đa. Trong lên men dịch được sulfit hóa thế oxy hóa – khử bị giảm khá mạnh.

Hợp chất – SH thuộc loại chất khử có hoạt tính khử cao. Những chất khử của vang là các sản phẩm phản ứng hóa sinh xảy ra trong quá trình chế biến vang. Sự có mặt các chất khử tạo cho vang có khả năng bảo vệ, trước hết là các cấu tử thơm khỏi bị tác dụng bởi các chất oxy hóa.

Hàm lượng các chất khử này không giống nhau ở các loại quả nguyên liệu. Trong quá trình lên men ta thấy: số lượng các rượu được nâng cao đáng kể trong thời gian lên men mạnh, nhưng đến cuối lên men lại giảm xuống. Lên men dưới áp suất CO_2 0,4 MPa tích tụ được hàm lượng các chất khử tới 56 mg/l, còn lên men bình thường – 17 g/l.

Vang non thu nhận bằng cách lên men dưới áp suất CO_2 có hợp chất sulfuahydryl dự trữ cao, trong đó hàm lượng glutation khử là 98 mg/l và hợp chất – SH là 245 mg/l. Trong lên men bình thường các hàm lượng này là 6 và 113.

• **Sulfuahydro (H_2S)** có mùi khó chịu và có ở trong vang với hàm lượng vượt quá 0,005 mg/l làm giảm chất lượng cảm quan. Tạo ra H_2S trong lên men thuộc vào từng chủng nấm men sử dụng, vào nhiệt độ và môi trường.

Nấm men có thể chuyển hóa S và SO_2 thành H_2S . Sixtín, axit asparatic, glutamic, glycerin, histidin, ornitin, serin, treonin kích thích sự tạo thành H_2S . Các chất metionin, axit pantotenic, vitamin B_6 lại kìm hãm sự tích tụ H_2S . Tạo thành H_2S của mỗi chủng nấm men phụ thuộc vào đặc tính di truyền. Có thể dùng hỗn hợp các chủng nấm men có khả năng và không có khả năng khử sulfat trong lên men sẽ làm giảm được nồng độ H_2S được tạo thành trong môi trường.

7.7.2. Các sản phẩm tạo thành trong quá trình tự phân của nấm men

Tự phân là phân huỷ các cấu tử tế bào dưới tác dụng của enzym thủy phân (hydrolytic hay hydrolaza) của chính bản thân tế bào. Trong quá trình tự phân ta thấy sự phân huỷ protein, hydratcacbon, nucleotit, lipid và các vật chất tế bào khác. Sản phẩm tự phân được hoà tan vào môi trường. Điều kiện để tế bào tự phân là tế bào đã chết và còn giữ được hoạt tính những enzym nội bào.

Trong nghề làm rượu vang từ lâu người ta đã giữ quan điểm cho rằng, tăng trữ vang trên cặn men hoặc bổ sung những sản phẩm tự phân của nấm men sẽ làm tăng được chất lượng vang thành phẩm. Như vậy, trong dịch vang khi tăng trữ được tăng cường các hợp chất chứa nitơ, cặn bản là các axit amin. Nhưng có một số nhà nghiên cứu lại cho rằng, không phải hoàn toàn như vậy: hợp chất chứa N không cải thiện chất lượng vang, mà chỉ có các sản phẩm tự phân khi giữ vang non trên cặn men ở 8°C mới có hiệu quả. Vitamin nhóm B là các hợp chất có hoạt tính sinh học, với một lượng rất nhỏ cũng có ảnh hưởng tới các quá trình hóa sinh làm cho vang “chín” và định hình buket hương vị cho vang. Trong dịch men tự phân phong phú các vitamin nhóm B và chúng có thể là tác nhân gây tác dụng dương tính cho các hoạt động enzym và chất lượng sản phẩm. Trong cao nấm men *Saccharomyces vini* hàm lượng axit pantotenic (vitamin B_3) là $1000 \div 1400 \mu\text{g/l}$, axit nicotinic (vitamin B_5) – $20.000 \div 25.000 \mu\text{g/l}$, so với *S. oviformis* thì những con số này gấp 2 lần.

Những mẫu vang được bổ sung cao men đều nâng cao được chất lượng sản phẩm, nhất là hương vị đậm đà và mềm mại hơn.

7.8. CÁC TÁC NHÂN ẢNH HƯỞNG ĐẾN LÊN MEN VANG

* **Nhiệt độ.** Nhiệt độ là yếu tố quan trọng bậc nhất đối với nấm men nói chung và lên men vang nói riêng. Nó có tác dụng rõ rệt đến khả năng lên men của chủng nấm men và chất lượng của rượu vang (độ rượu, đường sót, chất thơm...). Lên men rượu vang thường thực hiện ở khoảng nhiệt độ $10 - 30^\circ\text{C}$. Chúng ta cũng đã xác định được rằng, ở nhiệt độ cao lên men bắt đầu sớm, xảy ra mạnh mẽ, nhưng dễ bị dừng lại ngang chừng và kết thúc lên men khi đường sót còn lại ở dịch lên men là khá lớn. Với đường này dễ được vi khuẩn lactic sử dụng. Do vậy, trong vang có nhiều axit lactic và axit axetic. Ngoài ra, trong dịch quả có sẵn fructoza tạo điều kiện cho vi khuẩn lactic sử dụng và tạo thành rượu C_6 – mannit và axit

axetic. Những chất này với đường sót làm cho vang có vị chua – ngọt khó chịu. Nhiệt độ càng cao càng tạo điều kiện kỵ khí cho lên men, nhưng lại gây khó khăn cho lên men thứ cấp (lên men phụ) từ các đường sót, đặc biệt là lên men được tiến hành không có oxy của không khí, với hàm lượng ban đầu lên men tương đối cao. Nhiệt độ có ảnh hưởng không những đến cường độ lên men, tốc độ sinh sản của men giống mà còn đến sinh tổng hợp các sản phẩm thứ cấp. Cho nên mỗi loại vang cần phải có một qui trình công nghệ riêng thích hợp, nhất là nhiệt độ lên men.

Người ta cho rằng, lên men ở nhiệt độ ổn định là hợp lý hơn cả: nấm men hoạt động tốt hơn ở nhiệt độ 35°C từ đầu cho đến cuối lên men so với nuôi cấy ở 25°C rồi chuyển sang 35°C.

Giữa nhiệt độ và độ hiếu khí có mối liên quan. Sinh trưởng nấm men xảy ra mạnh ở những ngày đầu tiên với điều kiện hiếu khí và nhiệt độ 25 – 30°C. Hiếu khí cho hiệu ứng thấp khi nhiệt độ nuôi cấy thấp.

Lực hô hấp của nấm men dùng cho lên men Xâm panh ở vang non và môi trường tổng hợp với nhiệt độ 5°C chỉ bằng 1/5 so với nhiệt độ 30°C. Qua thực tế đã chọn lọc được những chủng nấm men chịu nhiệt. Khi nuôi cấy ở nhiệt độ cao chúng có lực lên men mạnh, nhưng lực hô hấp có thể bị giảm. Các chủng này có thể sử dụng vào sản xuất làm giống chịu nhiệt có hoạt tính sinh học cao và tạo ra các sản phẩm của hoạt động sống làm ta có thể nhận biết được. Vang non do lên men bằng các chủng chịu nhiệt khác với các mẫu kiểm chứng (với các chủng bình thường) ở chỗ: ít các rượu bậc cao để hoàn thiện mùi vị, nhưng hàm lượng chất khử cao, còn diacetyl và axetoin giảm.

Nấm men chịu lạnh rất tốt. Nếu cấy chuyển với nhiệt độ thấp dần chúng có thể sống ở – 200°C. Ở 0°C một số loài còn sinh sản chậm và gây lên men. Bình thường vẫn thấy lên men ở 2°C.

Trong các loài nấm men thì giống *Schizosaccharomyces* là bền nhiệt hơn cả. Chúng bị chết ở nhiệt độ 73 + 75°C. Trong vang có rượu etylic, các chất hoà tan từ dịch quả như axit, tanin, đường... Những chất này có đồng tác dụng để diệt khuẩn trong vang làm cho tính bền nhiệt hay chịu nhiệt của vi sinh vật nói chung bị giảm xuống và hiệu quả thanh trùng cao.

Có thể tính nhiệt độ tối thích T_0 cho hấp Pasteur rượu vang theo công thức:

$$T_0 = 75 - 1,5Q$$

75 - nhiệt độ hấp dịch quả;

1,5 - hệ số thực nghiệm;

Q - hàm lượng rượu etylic (%V).

Như vậy, hấp Pasteur rượu vang có 17 – 20° rượu ở 45 – 50°C.

hấp Pasteur rượu vang có 13 – 16° rượu ở 50 – 55°C.

hấp Pasteur rượu vang có 9 – 14° rượu ở 55 – 65°C.

Để cho tiện lợi có thể hấp vang đóng chai với biểu:

Nhiệt độ, °C	40	43	47
Hàm lượng rượu (%V)	10	9	8

Và hấp Xâmpanh: Đun 38 – 40°C trong 8 – 10 giờ và giữ ở nhiệt độ này 2 giờ, rồi sau đó làm lạnh dần dần trong 7 – 8 giờ tới 20°C.

*** Oxy của không khí.** Oxy được đưa vào môi trường khi bắt đầu lên men bằng những bọt không khí nhỏ có tác dụng kích thích sinh sản cho tế bào nấm men. Như vậy, không khí có tác dụng khuấy đảo môi trường làm cho tế bào tiếp xúc được với chất dinh dưỡng của môi trường và giải phóng được các sản phẩm trao đổi chất được tốt hơn. Oxy cần cho tế bào nấm men sinh sản. Nếu trong môi trường chỉ có 1 mg O₂ trong 1 l thì sự sinh sản bị ngừng lại.

Oxy là một trong những nhân tố cơ bản xác định sự sinh sản của nấm men. Trong môi trường càng nhiều tế bào nấm men càng lên men mạnh. Sinh trưởng và phát triển của nấm men trong thời gian lên men rượu vang (đặc biệt là lên men dịch quả có nồng độ đường cao) phụ thuộc vào số lượng oxy của không khí. Thí nghiệm sau cho thấy: lên men dịch quả có 21% đường ở 25°C và tiếp giống với lượng nhỏ ở 2 bình (bình N^o1 đầy bằng nút mài và bình N^o2 đầy nút bông). Sau 10 ngày lên men bình N^o1 còn đường sót là 2,5%, bình N^o2 hết đường.

Oxy rất cần cho lên men vang ở một vài giai đoạn, đặc biệt ở giai đoạn sinh trưởng logarit được đưa không khí vào môi trường sẽ nâng cao được nồng độ tế bào và phần trăm đường đầu lên men, thậm chí chỉ cần thêm một lượng nhỏ (0,15 m³ không khí cho 1l môi trường hoặc khoảng 0,2 mg O₂) cũng đã ảnh hưởng rõ rệt đến tốc độ lên men và tăng sinh khối đáng kể. Trong lên men khi đã sinh ra một lượng lớn rượu thì hiệu quả không khí đưa vào không làm tăng sinh sản, mặc dù nấm men vẫn sử dụng không khí như giai đoạn đầu lên men. Vai trò của oxy đặc biệt quan trọng và cần thiết trong giai đoạn nhân giống và giai đoạn đầu lên men. Ở đây cần biết rằng, nấm men nuôi ở nhiệt độ thấp và được sục khí sẽ được cung cấp một lượng oxy lớn vì ở nhiệt độ thấp oxy hoà tan cao hơn, làm cho sinh khối nhiều hơn, mặc dù ở nhiệt độ cao tốc độ sinh trưởng là cao hơn.

Trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt nấm men không sinh sản. Nhưng qua thực nghiệm thấy rằng, nấm men sinh sản trong điều kiện hiếu khí rồi đưa vào sử dụng ở điều kiện kỵ khí qua 4 ÷ 5 thế hệ chúng huy động được hệ enzym hô hấp kỵ khí dự trữ và sinh trưởng bình thường.

Trong điều kiện áp suất dư (0,4 MPa) – kỵ khí – sinh sản của nấm men chậm rõ rệt. Khi sục khí vào dịch quả với lượng O₂ là 2,6 ÷ 5,2 mg/l kích thích nấm men sinh sản và tăng nồng độ tế bào từ 30 đến 90 triệu/ml và quá trình lên men được rút ngắn. Khi tăng lượng không khí vào môi trường với lượng lớn (17 mg/l.h) sẽ tăng nồng độ tế bào tới 174 triệu/ml

và thời gian lên men cũng được rút ngắn tương ứng. Trong vang lượng axetaldehyt, rượu bậc cao, axit bay hơi, axetoin, axetyl... trong trường hợp này được tăng lên và làm giảm chất lượng của vang thành phẩm.

Do vậy, việc sục khí trong lên men vang cần phải cân trọng và tính toán sao cho lên men với thời gian thích hợp và tạo ra các sản phẩm thứ cấp ở giới hạn cho phép không ảnh hưởng xấu đến chất lượng rượu vang.

* **Đường.** Trong dịch quả hàm lượng đường không lên men tới 20% tổng lượng đường. Như vậy, nồng độ đường còn sót lại là khá cao trong lên men và làm chất ức chế cho việc tạo thành rượu. Ảnh hưởng của nồng độ đường trong môi trường đến việc tạo thành cồn là như sau:

Nồng độ đường, %	37	42	47	55	75
Lượng rượu tạo thành, %V	8,6	6,3	5,9	3,4	0

Ngừng trệ lên men trong nồng độ đường cao liên quan đến giống men có khả năng vượt qua được áp suất thẩm thấu của hàm lượng dịch đường.

Để hoạt động được bình thường tế bào nấm men cần ở trong dung dịch có áp suất thẩm thấu thấp hơn áp suất có trong không bào. Ở dung dịch 25% đường sacaroza nấm men gây lên men và vượt trội áp suất đối kháng là 2,5 MPa, nhưng ở dung dịch 25% glucoza – 5,8 MPa.

Nấm men giống *Zygosaccharomyces* có thể phát triển được ở môi trường chứa 50 – 60% đường và vượt qua áp suất thẩm thấu là 12 – 25 MPa và đại thể lực lên men của giống này yếu.

Giới hạn áp suất thẩm thấu đối với sinh trưởng và lên men đường của các loài nấm men khác nhau của giống *Saccharomyces* là không như nhau. Trong dung dịch fructoza áp suất thẩm thấu cho lên men của các loài chịu được áp suất thẩm thấu cao có thể từ 62 (*S. mellis* và *S. geterogenicus*) tới 23 MPa (*S. rosei*), các loài không chịu được áp suất thẩm thấu cao – từ 16 (*S. cerevisiae*) đến 12 MPa (*S. carlsbergensis*).

* **Độ axit của môi trường.** Độ pH của dịch quả nằm trong khoảng pH 2,8 ÷ 3,8. Loài *S. vini* phát triển bình thường ở pH 3,5. So với *S. cerevisiae* và *S. carlsbergensis* thì *S. vini* chịu được độ chua cao hơn.

Nếu nâng cao độ chua môi trường lên nửa nấm men sẽ thay đổi hình thái; tế bào nhỏ hơn, dạng cầu vượt trội, trong tế bào chất tích tụ chất béo.

* **Các chất phenol.** Ảnh hưởng của polyphenol đến sinh trưởng của nấm men đã được nghiên cứu từ rất lâu. Người ta đã thấy rằng, các loài thuộc giống *Saccharomyces* tương đối chịu được polyphenol hơn các giống *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*. Những nấm men

tạo màng mọc trên bề mặt vang đỏ. Hàm lượng tanin trong vang đỏ tới 0,3%. Những tế bào nấm men trong lên men vang đỏ hấp phụ antoxian và phụ thuộc vào các loài nấm men. Antoxian ảnh hưởng đến phát triển của men rượu vang và vi khuẩn lactic phát triển ở trong vang. Trong dịch có hàm lượng cồn cao (11% V) tất cả các axit phenolcacbonic kìm hãm quá trình lên men và gây thoái hóa tế bào nấm men. Petunidin gây tác dụng ức chế mạnh hơn đến tế bào nấm men so với malvidin, delphinin và petunidin. Axit galic và tanin chỉ ức chế phát triển của giống khi nồng độ của chúng trong dịch cao (800 mg/l hoặc cao hơn).

* **Khí CO₂.** Dưới áp suất của khí CO₂ sinh trưởng của nấm men và lên men hầu như không bị ảnh hưởng. Loại CO₂ từ môi trường lên men bằng nitor hoặc bằng không khí quá trình lên men không rút ngắn được thời gian. Nếu rút dẫn CO₂ bằng bơm chân không thì lên men mạnh lên nhưng không nhiều.

Dưới áp lực dư của CO₂ những tế bào nấm men rượu vang tăng kích thước là đáng kể và ngả sang hình tròn.

CO₂ như là một chất trao đổi, trong nồng độ xác định nó có tác dụng kìm hãm hoặc làm ngừng sinh sản của nấm men. Tính chất của khí CO₂ làm ức chế lên men được ứng dụng trong hàng loạt các quá trình công nghệ: bảo quản dịch quả, lên men vang trắng dưới áp suất CO₂, vang đỏ khi tàng trữ với CO₂, lên men vang bán ngọt dưới áp suất dư CO₂ trong các thiết bị đặc biệt.

Lượng CO₂ hoà tan vào môi trường có ảnh hưởng đến phát triển của nấm men. Trên cơ sở này người ta đã dự trữ dịch quả ở trong các thùng kín dưới áp suất CO₂. Một lít dịch quả cần có 15 g CO₂ hoà tan. Để đảm bảo chất lượng CO₂ hoà tan này cần phải dùng bơm nén ở áp suất 0,72 MPa trong nhiệt độ 15°C. Bảo quản dịch quả để sao cho lượng vi sinh vật trong đó là nhỏ nhất và không phát triển. Nhiệt độ thích hợp là 0 ÷ 2°C.

7.9. CÁC CHẤT SÁT KHUẨN (ANTICEPTIC) DÙNG TRONG SẢN XUẤT RƯỢU VANG

Trong sản xuất rượu vang các chất sát khuẩn sau được dùng để giữ dịch quả và vang thành phẩm.

* **SO₂ - anhydrit sulfuro.** Thế oxy hoá - khử của vang bị giảm dưới tác dụng của SO₂, vì SO₂ có tính khử và là chất có hoạt tính antioxiant (chất chống oxy hóa) làm tê liệt oxydaza, trong đó có polyphenoloxydaza. SO₂ được coi là chất sát khuẩn tốt nhất cho vang. Trong dịch quả hoặc vang nó ở dạng không phân ly H₂SO₃ hoặc ở dạng ion (HSO₃⁻ và SO₃²⁻), ta có thể gọi là các dạng axit sulfuro tự do, và trong hợp chất với một vài cấu tử quan trọng (andehyt, đường, chất màu, protein, các axit amin có lưu huỳnh, xeto axit) – liên kết axit sulfuro.

Tốc độ liên kết vật chất của vang với axit sulfuro phụ thuộc vào nhiệt độ pH môi trường và các chủng loài nấm men. Chỉ ở dạng tự do của axit này (dạng không phân ly H_2SO_3) là có hoạt tính sinh học, có tác dụng sát khuẩn. Số lượng axit sulfuro từ 1% (trong pH 3,8) tới 10% (trong pH 2,8) có tác dụng sát khuẩn như sau: ở môi trường có độ axit cao (chua) sẽ có lực sát khuẩn cao gấp 10 lần so với môi trường có tính axit yếu (chua ít hơn). Vì thế trong khi lắng dịch quả cần phải cho số lượng anhydrit sulfuro để đến khi tiếp giống vào dịch không quá 30 mg/l axit sulfuro và tổng axit tự do H_2SO_3 không vượt quá 200 mg/l. Lên men với bã nho đỏ bằng phương pháp hơ cần phải cho lượng SO_2 nhiều hơn, vào khoảng 250 ÷ 300 mg/l. Cần xác định chế độ bổ sung sulfit sao cho khi kết thúc lên men hàm lượng H_2SO_3 chỉ còn 40 ÷ 60% tổng lượng ban đầu, vì rằng nấm men sẽ khử axit sulfuro và muối sulfat thành lưu huỳnh nguyên tử. Trong tế bào lưu huỳnh hoà tan trong lipoit và trầm lắng trong tế bào chất hoặc bị khử thành H_2S . Phần lớn H_2S được tách ra cùng với CO_2 .

Để ngăn ngừa phát triển của nấm men trong vang, hàm lượng axit sulfuro tự do trong đó cần phải cao (200 ÷ 300 mg/l). Nấm men tạo màng rất chịu được axit sulfuro. Khả năng chịu được SO_2 nhiều hơn cả ở giai đoạn sinh trưởng và lên men, còn kém hơn cả khi môi trường cạn dinh dưỡng và men ở trạng thái tĩnh. Dịch quả được sulfit hoá với hàm lượng 200 ÷ 250 mg/l SO_2 sẽ lên men chậm, nhưng vẫn có thể lên men hoàn toàn. Ở cuối quá trình lượng sulfit chỉ còn 40 ÷ 60% so với lượng ban đầu.

Trong quá trình lên men nấm men khử sulfat thành một lượng nhỏ sulfit. Một số nấm men tạo thành SO_2 từ α -sixtein hoặc khử glutation. Các chủng nấm men khi lên men dịch quả tươi có thể tạo thành SO_2 tới 50 mg/l. Các chủng *S. bayanus* tạo ra SO_2 nhiều hơn các chủng *S. cerevisiae*. Số lượng sulfat ban đầu ở dịch quả cao sẽ thấy ảnh hưởng rõ rệt trong quá trình. Chỉ có 2% số chủng nấm men có khả năng làm tăng số lượng SO_2 (> 50 mg/l) trong quá trình lên men. Phần lớn nấm men (tới 78% số chủng) làm tăng số lượng SO_2 trong dịch tăng không lớn: SO_2 tới 1 ÷ 10 mg/l, thậm chí SO_2 được sử dụng.

* **Izodioxianat allil** là cấu tử chính của dầu alligor với hàm lượng 94 ÷ 99%. Đây là một loại chất kháng sinh thực vật (phytonxit) của cây bạch giới có tính kháng khuẩn cao. Nó không ảnh hưởng đến chức năng lên men của tế bào mà chỉ làm yếu lực hô hấp. Liều dùng của dầu bạch giới để đảm bảo cho rượu vang là: đối với vang bàn ăn là 0,9 mg/l với hàm lượng SO_2 trong vang dạng tự do không quá 20 mg/l và tổng không quá 200 mg/l; đối với vang bán ngọt – 1,2 mg/l với hàm lượng SO_2 ở dạng tự do trong vang 30 mg/l và tổng không quá 300 mg/l. Dầu alligor tổng hợp cũng có tính kháng khuẩn, nhưng nếu bảo quản không tốt hoặc dùng quá liều sẽ làm cho vang xuất hiện mùi tỏi.

Izodioxianat tự nhiên hoặc tổng hợp đều có phổ tác dụng sinh học, đặc biệt với nấm.

* **Axit sorbic** kết hợp với SO_2 (40 và 60 mg/l) sẽ cho vang ổn định sinh học. Song, ở liều lượng cho phép (200 mg/l) không ảnh hưởng đến hương vị của vang, nhưng cũng không

tác dụng đến vi khuẩn. Rượu vang khi đóng chai thường hay bị mờ đục do vi khuẩn lactic phát triển, làm cho vang thoảng có tông mùi của phong lữ thảo (geranium) khó chịu. Vi khuẩn axetic có thể sử dụng sorbic làm nguồn cacbon.

* **Dietyl este** của axit pyrocacbonic trước đây được khuyến cáo dùng trong bảo quản rượu vang đóng chai. Chất này không bền và dễ phân huỷ thành rượu và axit cacbonic. Ngày nay chất này bị cấm, vì nó gây ra sự tạo thành uretan trong vang trắng và bia.

* **5-Nitrofurylacrinlic axit (5-NFA)** có tác dụng kháng khuẩn. Nhóm NO_2 tương tác với enzym của vi sinh vật làm xuất hiện những enzym oxy hóa không thuận nghịch, làm ức chế sinh sản và phát triển của vi sinh vật. 5-NFA được dùng trong vang bàn ăn và vang chứa đường với liều dùng là $5 + 10 \text{ mg/l}$ để phòng ngừa vi khuẩn và nấm men sinh sản.

* **Bạc** (dạng ion hoặc dạng keo) đều kìm hãm lên men, có tính diệt nấm. Nó thuộc nhóm chất độc.

Dịch bạc có tác dụng diệt khuẩn, nhất là đối với trực khuẩn gây bệnh đường ruột. Với tác dụng diệt khuẩn của một liều dùng rất nhỏ trong nước cũng làm nâng cao được hiệu lực sóng siêu âm.

* **Ozon** nhận được bằng cách cho dòng oxy đi qua bộ tạo sóng mà ở đấy oxy chịu tác động của các điện cực. Có thể dùng ozon thanh trùng các thùng chứa khi không đựng rượu vang. Ozon có thể dùng làm tác nhân khử khuẩn có hiệu quả.

7.10. QUÁ TRÌNH LÊN MEN MALO-LACTIC Ở RƯỢU VANG

7.10.1. Tác nhân gây lên men malo-lactic

Quá trình lên men malo-lactic là quá trình có duy nhất đối với những loại vang có độ chua cao. Tác nhân gây ra quá trình này là vi khuẩn lactic. Phân huỷ các chất hợp phần khác cũng như axit malic ở trong vang có độ chua bình thường hoặc độ chua thấp là điều ta không mong muốn. Hoàn toàn không nguy hiểm đối với chất lượng vang vì trong quá trình lên men malo-lactic vi khuẩn chỉ động chạm đến axit malic mà không có tác động gì đến các cấu tử thành phần khác của vang.

E. Peymand đã xếp mức độ gây nguy hiểm cho chất lượng của vang do tác động của vi khuẩn lactic theo chiều tăng lên là như sau: lên men đường arabioza, axit xitric và đường xiloza tạo thành một lượng không lớn lắm các axit bay hơi và làm giảm chất lượng vang không đáng kể; lên men axit tataric, glyxerin, glucoza và fructoza làm thay đổi khá rõ các hợp phần có trong vang và làm giảm đáng kể chất lượng của vang.

Mức độ gây xấu hay làm giảm chất lượng vang phụ thuộc vào đặc tính của chủng vi khuẩn lactic và đặc điểm của vang. Ít ảnh hưởng đến chất lượng vang là các chủng vi khuẩn

lactic chỉ lên men axit malic mà không tiêu hao đường hoặc có lên men đường nhưng không tạo ra axit bay hơi.

Các vi khuẩn lactic hình cầu lên men dị hình, đặc biệt là những chủng không lên men axit xitric và đường arabioza là tác nhân gây lên men malo-lactic đáp ứng được mong muốn nhất. Chúng có lên men glucoza và không sinh ra axit bay hơi. Trong lên men malo-lactic vi khuẩn sử dụng axit malic là chính và một phần đường.

Vi khuẩn lactic lên men đồng hình đồng thời phân huỷ axit malic cũng có thể lên men glucoza còn lại không đáng kể ở trong vang khô và tạo thành axit lactic mà không sinh ra các sản phẩm phụ.

Các trực khuẩn lactic lên men dị hình có trong dịch lên men hay ở trong vang khô đều tạo thành một lượng khá lớn axit bay hơi so với các trực khuẩn lên men đồng hình.

E. Peymand còn chỉ cho thấy, cầu khuẩn lên men dị hình còn là tác nhân lên men malo-lactic nhiều hơn cả, từ 398 chủng nghiên cứu của giống *Leuconostoc* ở pH 3 đã thu được 36% số chủng lên men axit malic và có 7% số chủng lên men đường; ở pH 3,2 có 31% lên men axit malic và đường – 12% số chủng. Ở pH cao hơn số chủng lên men đường nhiều hơn và số chủng lên men axit lactic ít hơn. Do vậy, trong vang khô cần các chủng vi khuẩn hình cầu lên men dị hình sử dụng axit malic vượt trội, nhưng không làm tiêu hao đường.

7.10.2. Lên men malo-lactic tự phát ở trong vang

Trong nghề làm rượu vang người ta thường gặp quá trình lên men malo-lactic tự phát và điều đó làm cho sự quan tâm tới tác nhân của quá trình này nhiều hơn. Trong các loại vang có độ chua cao là điều kiện thuận lợi cho các loài cầu khuẩn lactic lên men dị hình hoặc trực khuẩn lactic lên men đồng hình phát triển. Những vang này không sulfít hóa tiếp theo sẽ kích thích các khuẩn lactic phát triển. Nhưng cần phải kim hãm vi khuẩn ngay sau khi chúng sử dụng axit malic. Đến khi vang đạt được độ êm dịu thì lên men malo-lactic không cần tiến hành đến cùng và phần axit malic còn lại không lên men nữa. Như vậy, các vi khuẩn lactic có trong vang với độ chua thấp hoặc các loài lên men dị hình trong vang còn đường cần phải dừng hoạt động.

Có thể kích thích hoặc ức chế sự giảm độ chua sinh học bằng chế độ điều chỉnh sulfít hoá dịch quả khi tàng trữ hoặc dịch vang sau khi lên men. Dịch vang sau khi lên men malo-lactic có thể bổ sung lượng sulfít tới 50 – 75 mg/l. Sau khi lên men rượu vang có độ axit thấp thì không nên thêm sulfít, vì rằng vang này được sulfít hóa sẽ ức chế làm lên men malo-lactic chậm hoặc hoàn toàn không phát triển.

Lên men malo-lactic tự phát có thể xảy ra khi tàng trữ vang trên cặn men. Điều kiện này có thể làm cho vang giàu các hợp chất chứa nitơ. Các vang có độ chua thấp không nên cho phép lên men này xảy ra, vì quá trình sẽ làm giảm hương và vị của vang.

Thế oxy hóa – khử cũng ảnh hưởng đến quá trình làm giảm độ chua. Thế này càng thấp càng làm cho vi khuẩn hoạt động mạnh hơn, phát triển mạnh hơn và quá trình kết thúc sớm hơn. Quá trình lên men malo-lactic xảy ra ở trong các thùng lớn kín mạnh hơn ở các thùng nhỏ.

Hàm lượng axit tối thích trong vang bàn ăn hết đường (vang khô) là 6 ± 2 g/l (tính theo độ chuẩn ra axit tataric). Thực tế không hiếm vang có hàm lượng axit tới $9,5 \div 10,5$ mg/l. Ngoài các điều kiện đã nêu ra ở trên, chế độ sulfite hóa cũng làm hạ được độ chua của vang, đặc biệt là hàm lượng axit malic và axit tataric có trong vang.

Hàm lượng hai axit hữu cơ này có trong nho còn phụ thuộc vào địa phương, vào thời tiết diễn ra từng năm (mưa, gió, nắng...), vào loại nho. Trị số pH của vang phụ thuộc vào hàm lượng axit tataric có trong tổng lượng chung axit chuẩn độ. Thí dụ: Vang có hàm lượng axit tataric từ 3 đến 1,8 g/l và chỉ số đo được là $3,1 \div 3,2$ tương ứng.

Từ mối quan hệ axit malic và axit tataric ở một số loại vang cho phép ta chọn phương pháp làm giảm độ chua cho vang: phương pháp sinh học dùng vi khuẩn sử dụng axit malic làm nguồn dinh dưỡng và phương pháp hóa học làm chất kết lắng axit tataric. Những loại vang tốt cần phải có lượng axit malic rất ít và axit tataric có trong vang phần lớn, dẫn đến pH thấp không kích thích, thậm chí còn ngăn trở vi khuẩn lactic phát triển.

Trong vang đỏ hàm lượng axit tataric thấp hơn nhiều so với malic, trị số pH cao. Hàm lượng axit chuẩn độ là $8 \div 10$ g/l tương ứng với pH của vang là 3,2 và 3,4. Đây là một trong những nguyên nhân làm giảm độ chua trong vang đỏ xảy ra và tiến trình nhanh hơn trong vang trắng.

Độ chua hoạt động (pH) là một chỉ số rất quan trọng và có thể điều khiển được bằng vi khuẩn lactic. Đa số các trường hợp vang có pH ở khoảng $2,8 \div 3,8$, vang vùng Nam Âu và Địa Trung Hải có trị số pH là $3,8 \div 4,6$. Độ chua hoạt động cao làm chậm quá trình phân giải axit malic. Tác nhân gây lên men malo-lactic là trực khuẩn lactic *Lactobacillus plantarum*, đặc biệt là các chủng có khuẩn lạc dạng R có khả năng sống ở $45 \div 50^{\circ}\text{C}$.

7.10.3. Lên men malo-lactic bằng giống vi khuẩn thuần chủng

Việc đưa giống vi khuẩn thuần chủng vào vang để lên men malo-lactic là tương đối khó khăn. Trong vang có thành phần hóa học để làm chất dinh dưỡng cho vi khuẩn là hạn chế, làm khó khăn cho vi khuẩn phát triển. Ở vang độ chua hoạt tính cao và có hàm lượng cồn nhất định. Hai tác nhân này kìm hãm vi khuẩn phát triển là chủ yếu.

Ở Pháp dùng giống vi khuẩn dạng bột đông khô đưa vào vang đỏ trong các lò tàng trữ khác nhau đều cho kết quả dương tính. Ở miền Đông Hoa Kỳ người ta dùng chất kích thích sinh trưởng *Lactobacillus citrivorum* trong vang cũng làm hạ giảm được độ chua sinh học

của vang bản ăn. Những lô đối chứng không cho chất kích thích không xảy ra quá trình lên men malo-lactic.

Ngày nay người ta đã dùng vi khuẩn lactic thích hợp được nhân giống và bổ sung vào dịch quả hoặc vang. Những chủng vi khuẩn này đã được nghiên cứu kỹ về các đặc tính sinh hoá và sinh lý. Những chủng được tuyển chọn phải có:

- Chịu được ở pH thấp (độ chua cao) và phát triển được ở độ chua hoạt tính của vang ($\text{pH } 2,7 + 3,2$);

- Từ hỗn hợp các chất dinh dưỡng chủng giống sử dụng axit malic làm nguồn dinh dưỡng cacbon trước tiên và không sinh ra sản phẩm phụ làm giảm chất lượng của rượu vang.

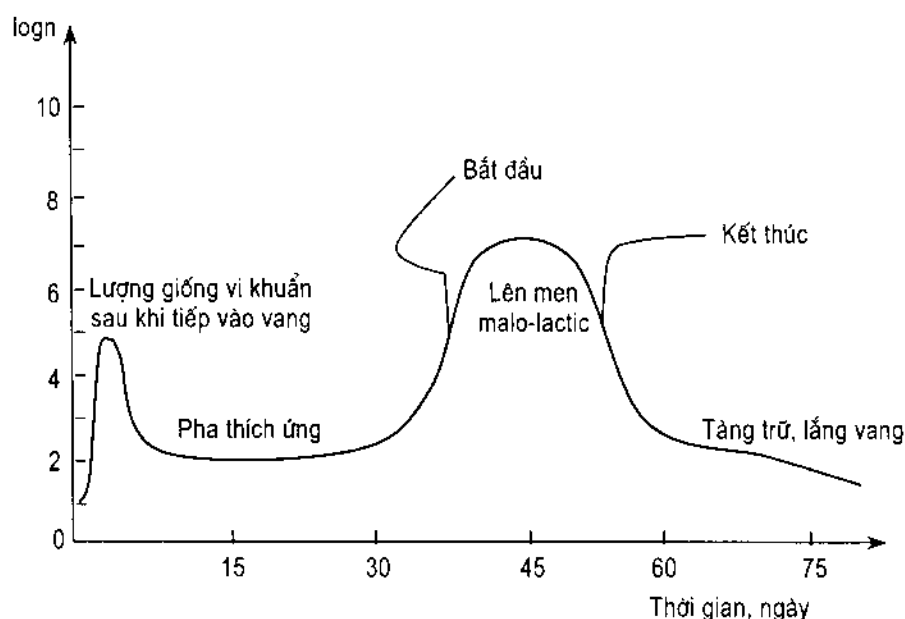
Một số chủng cầu khuẩn lactic lên men dị hình và trực khuẩn chịu axit cao lên men đồng hình đạt được các yêu cầu này. Chúng phân giải axit malic thành axit lactic, nhưng không lên men axit xitric và đường pentoza.

Để tuyển chọn được những chủng vi khuẩn chịu được axit cao và tồn cố trong vang người ta chuẩn bị dịch nuôi cấy hỗn hợp với nấm men như sau:

Dịch quả pha loãng 2 lần (1 dịch + 2 nước), 5 g/l cao nấm men, 10% cồn etylic, $\text{pH} = 4,8$. Cấy giống (hỗn hợp nấm men và vi khuẩn), nuôi ở 25°C cho lên men rượu đến khi kết thúc. Sau đó đem ly tâm ở 3000 vòng/phút tách được phần lớn nấm men, sau đó ly tâm ở 9000 vòng/giây tách sinh khối vi khuẩn và rửa bằng dung dịch NaCl (7 g/l). Ở tất cả các mẫu thử nghiệm đều thấy rằng, số lượng tế bào giống vi khuẩn được đưa vào vang đều giảm ở những giờ đầu. Khoảng 48 giờ sau khi tiếp giống vào vang có tới 25 – 90% số tế bào mất khả năng sinh sản. 15 – 30 ngày sau đó chúng ổn định và có thể bị chết một số. Những tế bào sống thích ứng với môi trường và bắt đầu sinh trưởng (hình 7.10). Như vậy, thời gian để cho giống vi khuẩn thuần chủng thích ứng được với môi trường của vang kéo dài từ 8 – 30 ngày. Đường cong phát triển của giống vi khuẩn lactic gây lên men malo-lactic ở vang đỏ được giới thiệu ở hình 7.10.

Nhân tố đầu tiên làm hạn chế sinh trưởng của giống vi khuẩn là pH của vang. Trị số pH càng cao thì số lượng tế bào vi khuẩn ở trạng thái hoạt động sống càng lớn. Sinh trưởng của giống vi khuẩn chỉ bắt đầu sau 14 ngày hoặc hơn để còn thích ứng với môi trường. Các nhân tố khác ảnh hưởng đến quá trình lên men malo-lactic là: độ rượu trong vang, không đủ lượng muối khoáng, các vitamin và axit amin.

Trong quá trình nghiên cứu và thử nghiệm trong sản xuất người ta nhận thấy rằng, các chủng cầu khuẩn lên men dị hình thuộc giống *Leuconostoc* có hoạt tính mạnh làm giảm độ chua của vang khá tốt. Chúng có thể lên men được ở vang có độ chuẩn axit là 11 g/l, axit tataric 5 g/l, $\text{pH} = 3,0$.



Hình 7.10. Đường cong sinh trưởng của vi khuẩn gây lên men malo-lactic ở vang đỏ

Các chủng trực khuẩn lactic lên men đồng hình và dị hình cũng phát triển được ở trong vang và gây ra lên men malo-lactic và làm giảm độ chua hoạt tính cho vang. Kết quả đã đưa đến kết luận, dùng các chủng vi khuẩn lactic làm tác nhân gây lên men malo-lactic bằng cách nhân giống thuần chủng cho thích nghi với môi trường vang, rồi tiếp vào với lượng lớn vi khuẩn cùng với giống nấm men vào giai đoạn lên men chính cũng như giai đoạn lên men bổ sung (lên men phụ và tàng trữ).

Trong quá trình nhân giống cần thêm xác quả để kích thích giống vi khuẩn phát triển. Điều này cần thiết cho cả vang trắng và vang đỏ. Người ta cũng đưa ra kiến nghị dùng các chất chiết từ vỏ quả thay cho xác quả trong mục đích này.

Chương 8

SINH KHỐI NẤM MEN

Công nghệ sản xuất sinh khối nấm men là kỹ thuật thực hiện nuôi các giống nấm men thuần chủng hoặc hỗn hợp vài chủng để thu nhận được khối lượng tế bào sau khi sinh trưởng với các mục đích:

- Sinh khối nấm men là những tế bào sống có khả năng lên men rượu dùng trong sản xuất bánh mì, thường gọi là *Men bánh mì*, bột nở làm bánh gato v.v...

- Sinh khối nấm men làm nguồn protein - vitamin bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Đây là những tế bào nấm men sau khi sấy khô đã chứa protein tới $50 \div 60\%$ (theo chất khô), rất giàu vitamin nhóm B và với tiền vitamin D_2 , đầy đủ các khoáng. Sản phẩm này thường được gọi là *Men gia súc* hay *Men thức ăn chăn nuôi*, hoặc còn gọi là *nguồn protein đơn bào (SCP)*.

Trong tế bào vi sinh vật có hàm lượng protein rất cao: ở vi khuẩn $60 \div 70\%$ tính theo chất khô, có loài tới 87% , ở nấm men khoảng $40 \div 60\%$, còn ở nấm mốc và xạ khuẩn có hàm lượng protein trung bình là thấp hơn 30% . Chất lượng protein của vi khuẩn là cao nhất, vì các thành phần axit amin cân đối hơn ở nấm men. Vì kích thước tế bào vi khuẩn nhỏ và các điều kiện nuôi cấy phức tạp hơn, nên việc sản xuất sinh khối vi sinh vật làm nguồn protein trong công nghiệp vi sinh vật chủ yếu là từ nấm men. Sản phẩm này được mang tên là protein trong dinh dưỡng động vật, chủ yếu là trong chăn nuôi.

Sản xuất protein nấm men được tiến hành từ đầu thế kỷ XX ở Đức (Del Bruck, 1916), với phương pháp nuôi *Candida utilis* trên rỉ đường, sau đó năm 1936 được tiến hành sản xuất lớn trên cơ sở nuôi trong dịch kiềm sulfit - dịch thải của công nghiệp xenluloza, ở Mỹ năm 1946 mới tổ chức sản xuất sinh khối nấm men và đến nay nhiều nước trên thế giới đã tổ chức sản xuất loại sản phẩm này dùng chủ yếu cho chăn nuôi và có thể tách làm tinh sạch protein dùng trong dinh dưỡng cho người - làm thức ăn nhân tạo hoặc bổ sung vào các nguồn chế biến thực phẩm. Trong khoảng vài chục năm gần đây công nghiệp sản xuất SCP đã có bước phát triển nhảy vọt do việc người ta sử dụng hydrocacbon của dầu mỏ, khí đốt làm nguồn cacbon và năng lượng rất có hiệu quả trong nuôi cấy nhiều loài vi sinh vật.

Trong tế bào vi sinh vật, ngoài hàm lượng protein rất lớn ra còn có các chất béo, vitamin và các chất khoáng, năng suất của vi sinh vật vượt trội xa năng suất cây trồng vật nuôi trong nông nghiệp nhiều lần.

Dưới đây là số liệu về thời gian tăng gấp hai lần khối lượng của một số sinh vật:

Vi khuẩn	20 phút
Nấm men	2 giờ
Nấm và tảo	6 giờ
Cây lá bản, cỏ	2 tuần
Gia cầm	4 tuần
Lợn	6 tuần
Bò	2 tháng

Qua đây ta thấy, vi sinh vật phát triển nhanh hơn các loại cây trồng khoảng 500 lần và 1.000 ÷ 5.000 lần vật nuôi.

Sản xuất sinh khối vi sinh vật có những đặc điểm sau:

- Chi phí lao động ít hơn nhiều so với sản xuất nông nghiệp.
- Có thể sản xuất ở những địa điểm bất kỳ trên trái đất, không chịu ảnh hưởng của khí hậu, thời tiết, quá trình công nghệ dễ cơ khí hoá và tự động hoá.
- Năng suất cao.

- *Sử dụng các nguồn nguyên liệu rẻ tiền và hiệu suất chuyển hoá cao.* Các nguyên liệu thường là phế phẩm, phụ phẩm của những ngành khác, như rỉ đường, dịch kiềm sulfit, parafin dầu mỏ... Hiệu suất chuyển hoá cao: hydratcacbon được chuyển hoá tới 50%, cacbua hydro - tới 100% thành chất khô của tế bào.

- *Hàm lượng protein trong tế bào rất cao:* ở vi khuẩn là 60 ÷ 70%, ở nấm men là 40 ÷ 50% chất khô. Hàm lượng này còn phụ thuộc vào loài và chịu nhiều ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy. Cần chú ý rằng, hàm lượng protein ở đây chỉ bao hàm protein chứ không gồm cả thành phần nitơ protein khi xác định theo phương pháp nitơ tổng số của Kjeldal, như axit nucleic, các chất peptit của thành tế bào.

- *Chất lượng protein cao:* Nhiều axit amin có trong vi sinh vật với hàm lượng cao, giống như trong sản phẩm của thịt, sữa. Protein vi sinh vật đặc biệt giàu lizin, chính vì vậy là một lợi thế khi bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, vì trong thức ăn thường thiếu axit amin này. Trái lại, hàm lượng các axit amin chứa lưu huỳnh lại thấp.

- *Khả năng tiêu hoá của protein:* có phần bị hạn chế bởi thành phần phi protein, như axit nucleic, peptit của thành phần tế bào, hơn nữa bởi chính thành và vỏ tế bào vi sinh vật khó cho các enzym tiêu hoá đi qua.

- *An toàn về độc tố:* Trong sản xuất protein đơn bào không dùng vi sinh vật gây bệnh, cũng như loài chứa thành phần độc hoặc nghi ngờ về sinh lý dinh dưỡng ở dạng khó tách riêng. Chính vì sự an toàn cho sức khoẻ của con người, cho đến nay SCP vẫn hầu như chỉ được dùng trong dinh dưỡng động vật.

- Những vấn đề kỹ thuật: sinh khối vi sinh vật phải dễ tách và xử lý. Vấn đề này phụ thuộc chủ yếu vào kích thước tế bào. Sinh khối nấm men dễ tách bằng ly tâm hơn vi khuẩn. Ngoài ra, những vi sinh vật nào có khả năng sinh trưởng ở mật độ cao sẽ cho năng suất cao, sinh trưởng tốt ở nhiệt độ cao (có tính ưa nhiệt hoặc chịu nhiệt) sẽ giảm chi phí về làm nguội trong sản xuất, ít mắc cảm với sự tạp nhiễm v.v... sử dụng được các nguồn cacbon rẻ tiền, chuyển hoá càng nhiều càng tốt... thì sẽ được dùng trong sản xuất.

Vấn đề giải quyết sự thiếu hụt protein trong khẩu phần thức ăn chăn nuôi gia súc và gia cầm là một nhiệm vụ rất quan trọng đối với ngành kinh tế quốc dân. Cân đối được dinh dưỡng chăn nuôi sẽ có hiệu quả kinh tế to lớn. Một trong các biện pháp hữu hiệu giải quyết sự thiếu hụt protein này là tăng cường sản xuất sinh khối nấm men.

Nấm men tổng hợp được protein, vitamin - các hợp chất dinh dưỡng quý giá nhanh gấp hàng trăm lần thực vật và hàng nghìn lần động vật. Protein vi sinh vật theo hàm lượng axit amin, vitamin và mức độ hấp thụ còn vượt trội hơn nguồn protein động vật.

Trong khẩu phần động vật nông nghiệp cần từ 90 ÷ 110 g protein tiêu hoá cho 1 đơn vị thức ăn. Trong thức ăn thô hàm lượng này không quá 50 ÷ 75 g, do vậy thức ăn chứa hydratcacbon không cân bằng cả về số lượng cũng như chất lượng (thành phần) protein. Như vậy là sử dụng không hợp lý về dinh dưỡng. Nấm men dùng cho chăn nuôi là nguồn protein được bổ sung vào khẩu phần cho gia súc làm nâng cao giá trị sinh học cho các nguồn protein khác (thường là từ thực vật). Trong protein của nấm men chứa không ít hơn 20 axit amin và có tất cả các axit amin không thể thay thế (valin, lizin, lơxin, izolơxin, treonin, metionin, phenylalanin và triptophan).

Tỷ số P và K trong nấm men làm cho bộ khung xương của động vật non phát triển bình thường. Các vitamin và nguyên tố vi lượng trong tế bào nấm men có ảnh hưởng rất lớn đến phát triển của động vật. Vitamin nhóm B trong nấm men là nhiều hơn cả so với các vitamin khác. Các vitamin có cả tocoferol, ergosterin, cholin là những tác nhân điều chỉnh trao đổi chất béo. Hệ thống enzym của nấm men xúc tác các quá trình đồng hoá axit amin và tổng hợp protein.

Bổ sung nấm men vào thức ăn bò sữa làm tăng hàm lượng sữa và chất béo có trong sữa, với gia cầm, thủy cầm cho lượng trứng nhiều hơn. 1 kg men khô dùng cho chăn nuôi thu thêm 0,4 kg thịt lợn; 1,5 kg thịt gia cầm; 30 ÷ 40 quả trứng.

8.1. NẤM MEN DÙNG TRONG CÔNG NGHIỆP THU SINH KHỐI

Protein của vi sinh vật, chủ yếu được tổng hợp để hình thành các enzym. Vì vậy phần lớn là nằm trong tế bào, một số rất ít được tách ra ngoài môi trường.

Những chủng dùng trong sản xuất cần phải có một số yêu cầu: thời gian nhân đôi ngắn, có khả năng tạo thành 40 ÷ 70% protein, tiêu hoá tối đa các chất dinh dưỡng của môi

trường, không được gây bệnh và tách vào môi trường những độc tố, có sức bền cao và chịu được ở điều kiện nuôi cấy không vô trùng, dễ dàng tách khỏi dịch nuôi cấy trong điều kiện tuyển nổi (flotation) và ly tâm tách.

Các chủng vi sinh vật được sử dụng vào sản xuất protein đơn bào, tùy thuộc vào nguồn cacbon trong môi trường sẽ được giới thiệu sau đây:

Để thu nhận protein trên các dịch thủy phân từ nguyên liệu thực vật người ta hay dùng các chủng nấm men thuộc giống *Candida*: *C. utilis*; *C. tropicalis*; *C. maltosa*; *C. scotti*; *C. humicola*; *C. diddensii* hoặc dùng ở mức độ ít hơn các giống nấm men *Trichosporon cunetaneum* và *Cryptococcus diffluens*. Có hiệu quả (theo sinh khối và số lượng protein) hơn là các chủng của *S. scotti*, *C. tropicalis*, *C. utilis* và một vài chủng khác.

Nuôi cấy trên các dịch kiềm sulfite và bã rượu sulfite dùng giống *Candida*, nhiều nhất là *C. utilis* hoặc *C. tropicalis*. Có thể dùng đơn lẻ hoặc dùng hỗn hợp cả hai để chúng hỗ trợ lẫn nhau và kết quả thu được tốt hơn. Ngoài ra, người ta còn dùng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus diffluens*.

Nuôi trên môi trường dịch thủy phân than bùn với nấm men *C. tropicalis* là tốt nhất.

Đối với men bánh mì người ta chỉ dùng các chủng thuộc giống *Saccharomyces* loài *cerevisiae*. Các chủng này chính là các nòi lên men rượu. Song, với men bánh mì cũng có một số yêu cầu khác với khi tuyển chọn giống nấm men cho lên men rượu.

- *Candida tropicalis* (hoặc *Candida tropicalis* Berkhour) (hình 8.1):

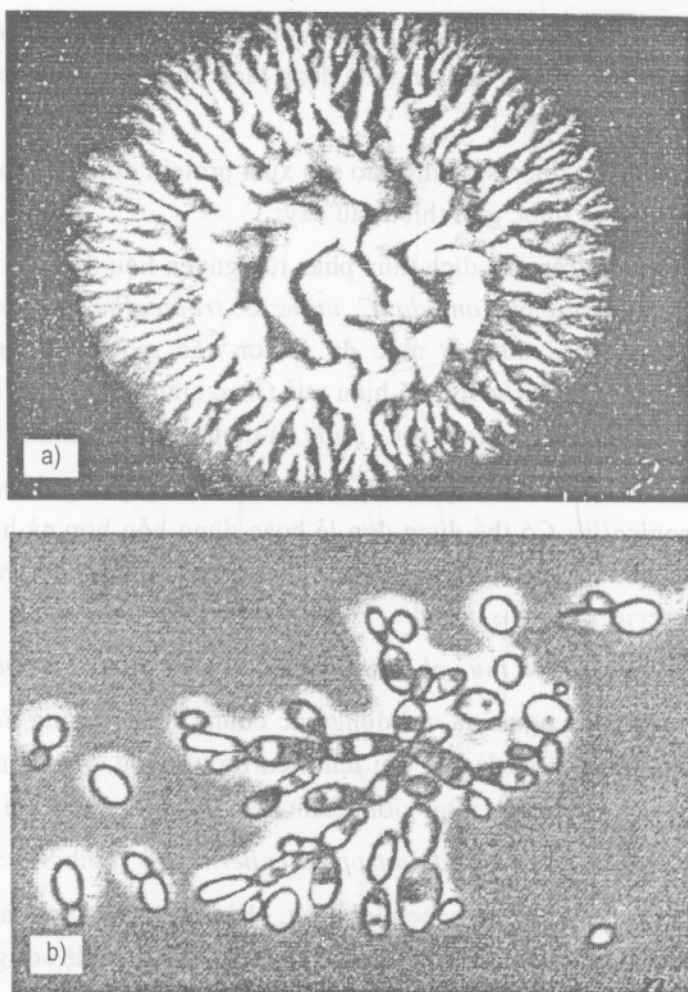
- Hình thái: Tế bào hình ovan hoặc hình tròn, khá lớn, kích thước là $(4 \div 8) \times (5 \div 11)$ μm , phần lớn các tế bào kết thành nhánh, hiếm khi đứng riêng rẽ. Hệ sợi giả phát triển tốt từ những sợi giả kéo dài phân nhánh thành chuỗi. Không tạo bào tử túi. Trong tế bào già tích tụ nhiều hạt chất béo.

- Tính chất nuôi cấy: qua ngày đêm ở 36°C trong nước malt (4°Be) tạo thành cặn không nhiều và qua một tháng tạo thành màng dày nhẵn nhéo.

Khuẩn lạc mọc trên mặt thạch - malt hình tròn, màu kem trắng. Trên mặt khuẩn lạc có những nếp nhăn với nhánh phát tia. Rìa khuẩn lạc bị chia cắt theo hình răng cưa hoặc có tua (hiếm khi phẳng nhẵn). Men này là loại dị hình thái: một chủng có khi mọc thành khuẩn lạc dạng R (nhăn nhéo) hoặc dạng S (nhẵn).

- Tính chất hoá sinh: *Candida tropicalis* lên men rất tốt ở các dịch đường glucoza, galactoza, sacaroza, maltoza.

Men này có thể đồng hoá được các nguồn cacbon: glucoza, galactoza, sacaroza, maltoza, trehaloza, rafinoza, melixitoza, inulin, d-xyloza, l-arabinoza, l-ramnoza, etanol, glyxerin, d-mannit, d-sorbit, α -metyl-d-glucozit, axit dl-lactic, succinic, xitric, tinh bột tan.



Hình 8.1. *Candida tropicalis*:

a- khuẩn lạc; b- tế bào

Nấm men này không hấp thu được sorbioza, xenlobioza, lactoza, melibioza, dulxit, inozit và axit xalysalic.

Những chủng thuộc giống loài này không phân huỷ (hoặc rất yếu) arbutin, không tạo thành các chất tương tự tinh bột, thủy phân ure. Không đồng hoá (hoặc rất yếu) nitrat.

Các chủng men này cần một số vitamin làm chất sinh trưởng: axit pantotenic, paraaminobenzoic, tiamin, inozit v.v...

• **Đặc tính công nghệ:**

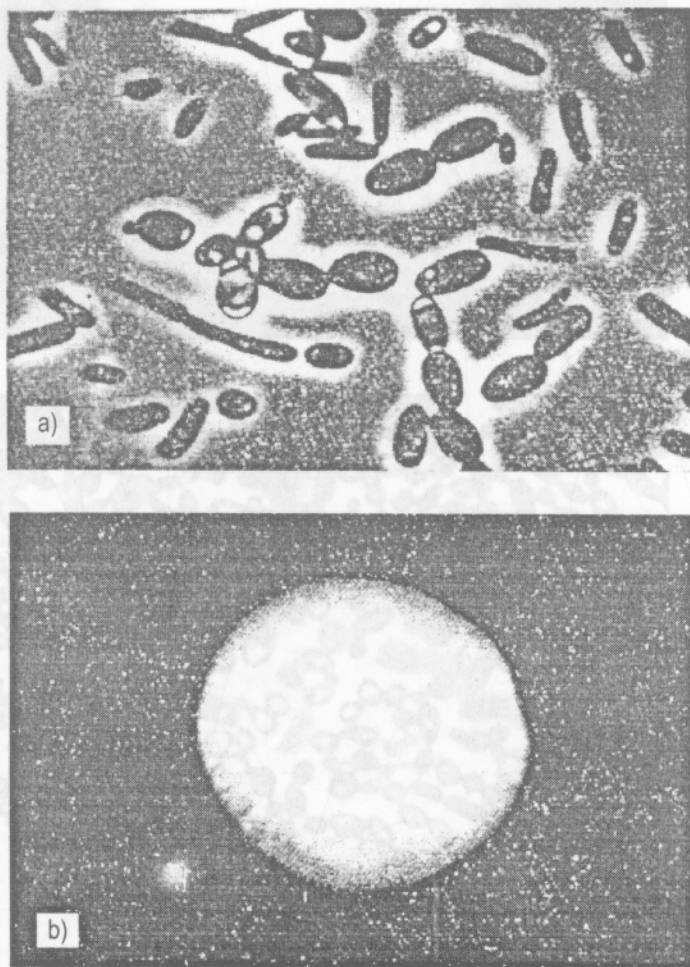
Hiệu suất thu sinh khối của *C. tropicalis* đạt khoảng $38 \div 46\%$ trong môi trường nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng riêng là $0,15 \div 0,2/h$. Nếu trong môi trường cho thêm cao men (0,5%), destibiotin ($5 \div 10 \gamma$) năng suất sẽ tăng đến $48 \div 50\%$ và tốc độ sinh trưởng là $0,25 \div 0,28/h$.

Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là $36 \div 37^{\circ}\text{C}$, pH môi trường $4,2 \div 4,5$.

• *Candida utilis* (hay *Candida utilis* (Henneberg) nov. Comb)

- Hình thái: tế bào dài có kích thước $4 \times 8,3 \mu\text{m}$, đứng riêng rẽ hoặc đôi khi kết thành chuỗi ngắn, phân nhánh. Không thấy sinh hệ sợi hoặc giả sợi. Không sinh ra bào tử túi.

- Đặc điểm nuôi cấy: trong môi trường lỏng tạo thành vòng và cặn lắng đặc. Khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch - malt có màu vàng úa, óng ánh nhẹ, phẳng, nhẵn, rìa hơi bị chia cắt (hình 8.2), thỉnh thoảng ở giữa không lắng bóng hơi gợn nhăn nheo.



Hình 8.2. *Candida utilis*:

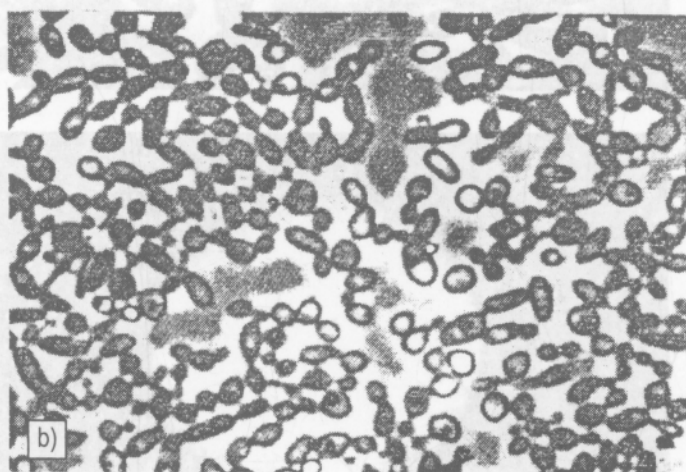
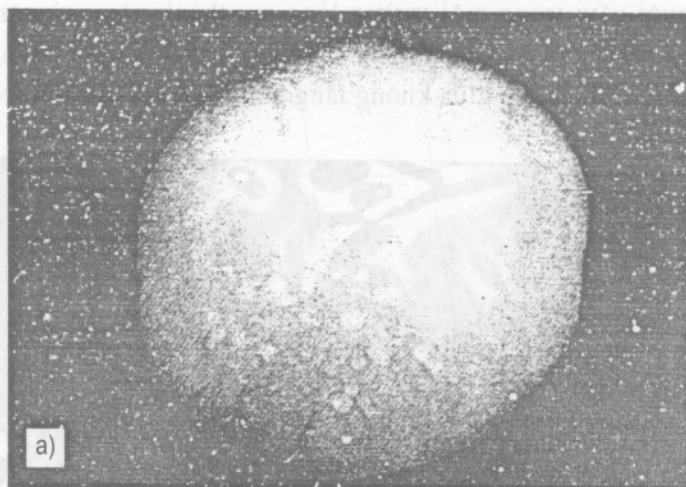
a- tế bào; b- khuẩn lạc

- Đặc tính hoá sinh: Loài men này lên men được glucoza, sacafoza, 1/3 rafinoza. Đồng hoá bằng cách oxy hoá glucoza, sacaroza, maltoza, rafinoza, xyloza, yếu với galactozo và arabinoza.

Có thể hấp thu được các nguồn nitơ như KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ure, pepton.

- Đặc điểm công nghệ: Nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng là $34 - 36^\circ\text{C}$.

Năng suất thu sinh khối là khoảng 40% so với chất khô trong môi trường, tốc độ sinh trưởng là 0,3/h.



Hình 8.3. *Torulopsis candida*:

a- khuẩn lạc; b- tế bào

• *Torulopsis cadida* (hay *Torulopsis candida* (Saito) Lodder)

- Hình thái: Tế bào hình ovan kéo dài, kích thước trong môi trường nuôi cấy 1 ngày đêm trên môi trường lỏng là $(3,3 \times 6,4) \times 4,5 \mu\text{m}$. Chúng đứng riêng rẽ là chủ yếu, nhưng có thể tạo thành nhánh nhỏ. Tế bào nảy chồi, thường là 1 : 1, những cũng có khi nảy 2 - 3 chồi ở đầu (hình 8.3).

- Đặc điểm nuôi cấy: Khuẩn lạc mọc trên thạch - malt có màu vàng nhạt sáng, nhẵn, lồi cao, óng ánh nhẹ, rìa nhẵn hoặc răng cưa chút ít.

- Đặc tính hoá sinh: không lên men đường. Đồng hoá được glucoza, saccaroza, maltoza, xyloza. Không tiêu hoá được nitrat. Năng suất nuôi cấy thu được sinh khối khoảng $25 \div 30\%$ chất khô tiêu hao trong môi trường.

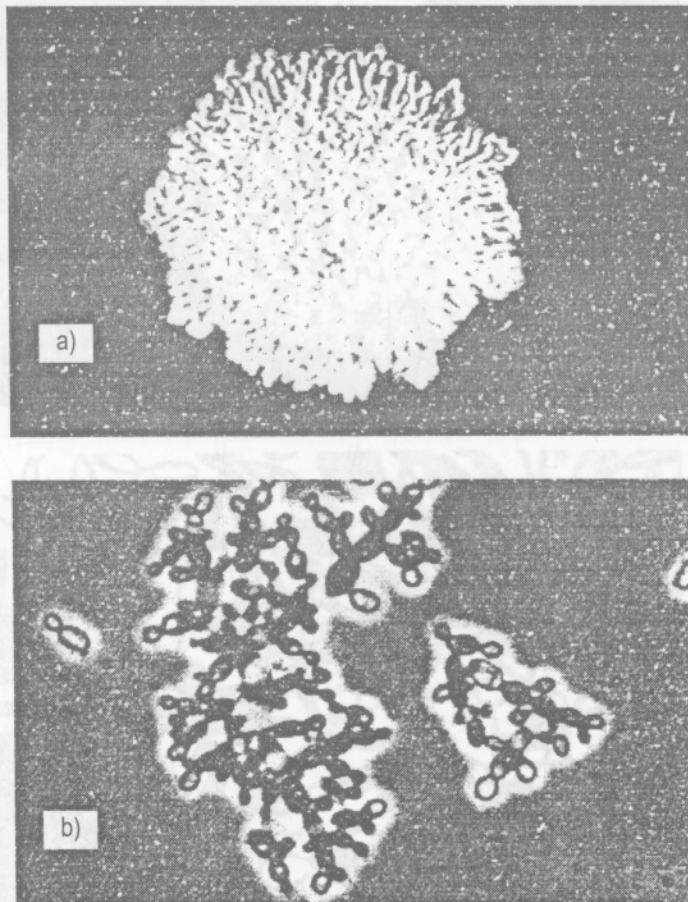
- *Candida tenuis* (hay *Candida tenuis* Diddens et Lodder) (hình 8.4)

Tế bào tương đối nhỏ: $(1,4 \div 1,8) \times (2,1 \div 2,5)$ μm hình ovan hơi kéo dài, tụ tập thành nhánh dày.

Mọc chồi ở nhiều phía tế bào, ở các đầu tạo thành đồng thời từ $2 \div 4$ chồi.

Các giả sợi được tạo thành dạng hình chỉ:

- Đặc điểm nuôi cấy: trong môi trường lỏng sau ngày đêm tạo thành vòng xộp trắng và cặn bông lớn.



Hình 8.4. *Candida tenuis*:

a- khuẩn lạc; b- tế bào

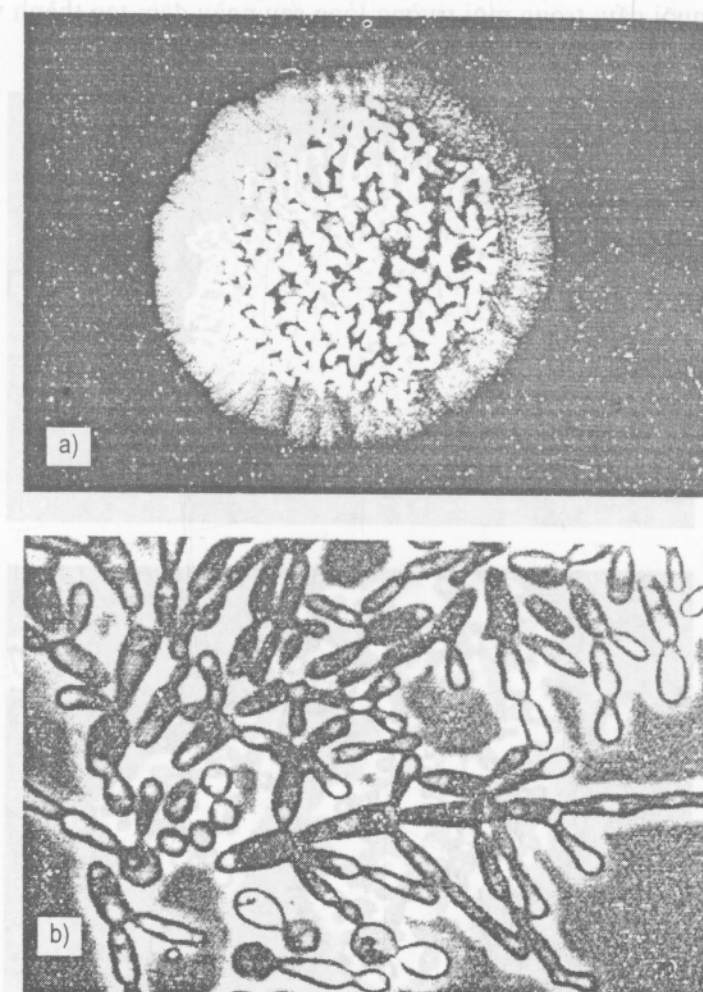
Khuẩn lạc trên môi trường thạch - malt nhô cao, nhăn nheo nhẹ và có màu trắng nhạt. Vùng trung tâm nhăn nheo lộn xộn, ngoài rìa tạo hình tia.

- Tính chất hoá sinh: Loài này lên men được glucoza và galactoza, hấp thu được glucoza, galactoza, maltoza, sacaroza, rafinoza, xyloza, arabinoza, lactoza (nhưng yếu).

• *Candida guilliermondii* (hay *Candida guilliermondii* Castellami Langeron et Guer)

- Hình thái (hình 8.5): Tế bào ô van hoặc tròn, đôi khi kéo dài ra. Kích thước trung bình: $(3,6 \div 4,5) \times 4,0 \div 5,5$ μm , đứng riêng rẽ hay kết thành nhánh, có hạt chất béo bên trong tế bào. Giả sợi phát triển khá mạnh. Không tạo thành bào tử túi.

- Đặc điểm nuôi cấy: Qua ngày đêm ở $36 \div 37^{\circ}\text{C}$ trong môi trường nước malt tạo thành cặn xộp có vòng bông dính vào.



Hình 8.5. *Candida guilliermondii*:

a- khuẩn lạc; b- tế bào

Khuẩn lạc trên môi trường thạch - malt có màu kem trắng nhạt đến vàng nhạt, trên mặt khuẩn lạc ở trung tâm dồn lại dày đặc, ở ngoài rìa hình thành các tia dày, nhìn nghiêng khuẩn lạc nhô cao, ngoài rìa phân cắt thành dạng răng cưa với vòng sợi rậm đầy. Cấu trúc khuẩn lạc là thuần nhất, có lông mượt mềm mại.

- Đặc tính hoá sinh: lên men được glucoza và sacaroza.

Đồng hoá được các nguồn C như sau: glucoza, galactoza, l-sorloza, sacaroza, maltoza, xenlobioza, trehaloza, rafinoza, melixitoza, d-xyloza, l-arabinoza, etanol, glyxerin, dulxit, d-mannit, d-sorbit, α -metyl-d-glucozit, axit succinic, xitric, inozit.

Men này không sử dụng được lactoza, melibioza, inulin, tinh bột tan, axit xalisalic, lactic. Nó không phân huỷ được arbutin, không tạo thành các chất giống tinh bột, phân cắt được ure, nhưng không đồng hoá được nitrat. Trong môi trường không có vi tamin sinh trưởng rất yếu. Nó cần axit foleic, riboflavin, axit folic, pyridoxyl, riboflavin, tiamin.

• *Trichosporon cutaneum*: (hay *Trichosporon cutaneum* (De Beum Gouderote et Vaucher) OIA) (hình 8.6)

- Hình thái: Tế bào hình ovan và dài với đầu tù, đứng riêng rẽ hoặc kết thành chuỗi, sợi có vách ngăn. Kích thước tế bào tương đối lớn: $(2 \div 15) \times (10 \div 15) \mu\text{m}$ hoặc lớn hơn. Sợi và giả sợi phát triển khá tốt, không tạo thành bào tử túi, thường gặp bào tử đốt hình trụ, phân nhánh. Sợi có kích thước khác nhau. Nhiều tế bào mọc nấm dạng sừng. Trong tế bào có các hạt chất béo.

- Đặc điểm nuôi cấy: Qua ngày đêm ở $36 \div 37^\circ\text{C}$ trong môi trường nước malt (4°Be) tạo thành màng nhăn nheo, ngập trong dịch và muộn hơn tạo thành màng dày đặc.

Khuẩn lạc trên môi trường thạch - malt có dạng hình tròn, màu vàng nhạt, lõi nhô cao và sợi mọc vào thạch. Trên mặt khuẩn lạc phủ lớp gấp nhăn nheo khá lớn, mượt mà với các lớp lông mịn, đôi khi tạo thành lớp màng bột trắng. Sợi men mọc vào thạch dày đặc khó lấy được khuẩn lạc ra khỏi khối thạch. Rìa khuẩn lạc khía nát dạng tia cân đối, ngoài cùng là vùng sợi (mixen).

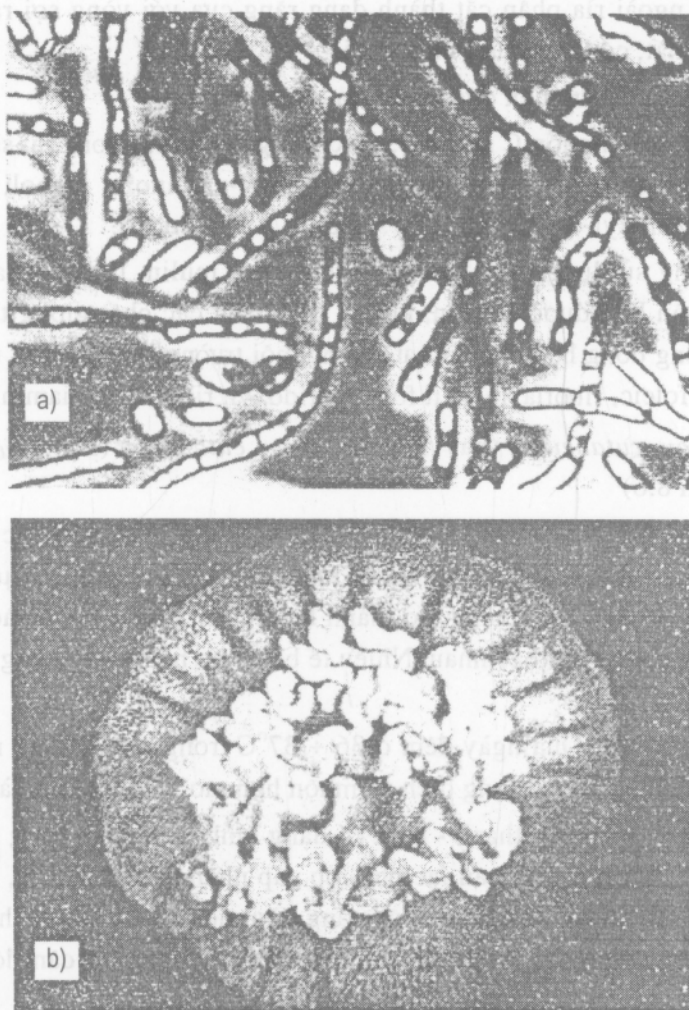
- Đặc tính hoá sinh: Loài men này không lên men đường hoặc lên men glucoza yếu. Giống đồng hoá được các nguồn cacbon: glucoza, galactoza, l-sorboza, sacaroza, maltoza, xenlobioza, trehaloza, lactoza, rafinoza, melixitoza, inulin, d-xiloza, l-arabinoza, tinh bột tan, l-ramoza, etanol, glyxerin, d-mannit, d-sorbit, α -metyl-d-glucozit, dl-lactic, succinic và xitric axit, cũng như inozit và dulxit. Không hấp thu được menlibioza axit salyxalic.

Các đại diện của loài men này có thể phân huỷ được arbutin, không tạo thành hoặc tạo thành yếu các chất tương tự tinh bột. Phân giải nhẹ ure. Không đồng hoá hoặc yếu nguồn nitrat. Cần một vài vitamin, như tiamin, pyridoxin, axit para-aminobenzoic và nicotinic.

- Đặc điểm công nghệ: Rất thích hợp trên môi trường nước dịch bã rượu và rỉ đường. Năng suất thu được $50 \div 60\%$ và tốc độ phát triển $0,21 \div 0,24/\text{h}$.

Bổ sung vào môi trường cao nấm men thường thu được sinh khối cao.

Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là $38 \div 39^{\circ}\text{C}$ và pH $4,2 \div 4,6$. Tế bào có hàm lượng protein là $53 \div 55\%$.



Hình 8.6. Tế bào *Trichosporon cutaneum*:

a- tế bào; b- khuẩn lạc

8.2. SẢN XUẤT SINH KHỐI NẤM MEN TỪ NGUYÊN LIỆU THÔNG THƯỜNG

Nguyên liệu dùng sản xuất sinh khối nấm men hiện nay chủ yếu là từ rỉ đường. 90% lượng sinh khối nấm men dùng bổ sung vào thức ăn chăn nuôi (khoảng $5 \div 10\%$) trên thế giới được sản xuất từ rỉ đường mía và củ cải đường. Thành phần chính của loại nguyên liệu này là đường sacaroza ($35 \div 40\%$). Trong rỉ đường mía lượng đường khử thường rất cao, chiếm tới 30%, còn trong rỉ đường củ cải hàm lượng đường khử chỉ có khoảng 1%. Một đặc điểm nữa của rỉ đường mía là các chất sinh trưởng có trong nó với hàm lượng lớn: 100 g rỉ đường mía có tới $70 \div 320\gamma$ biotin (theo số liệu của tác giả phân tích tại phòng nghiên cứu

vitamin của Viện hoá sinh mang tên Bach thuộc Viện hàn lâm khoa học Liên Xô cũ thì trong rỉ đường Việt Nam có $700 \div 800 \gamma$ biotin/ 1 kg); 5,4 mg axit pantotenic; 600 mg inozit. Còn nhu cầu về các chất sinh trưởng của nấm men khi phát triển trên rỉ đường là 29γ % biotin; 5% axit pantotenic; 12 mg% inozit. Mặt khác rỉ đường mía nghèo chất khoáng và các axit amin. Vì vậy, khi dùng đường mía làm nguồn cacbon trong nuôi cấy nấm men cần phải loại bỏ một phần các chất sinh trưởng, đồng thời bổ sung các muối khoáng cần thiết và có thể phải thêm hỗn hợp các axit amin dạng protein thủy phân (dịch nấm men tự phân, dịch thải trong sản xuất nước chấm, dịch bã rượu...) ở giai đoạn nhân giống.

Dùng ngũ cốc làm nguồn nguyên liệu sản xuất sinh khối nấm men rất tốt. Bột hoặc tinh bột các loại dùng vào mục đích này trước tiên phải tiến hành thủy phân bằng axit hay enzym của mầm mại hoặc enzym vi sinh vật để biến các polysacarit thành các dạng đường mà nấm men đồng hoá được.

Nước thải các nhà máy giấy xenluloza theo phương pháp sulfit cũng là nguồn nguyên liệu tốt để sản xuất nấm men. Nước thải này thường gọi là dịch kiềm - sulfit. Thành phần hydratcacbon của nó chủ yếu là đường pentoza - một loại đường chỉ có nấm men mới có thể chuyển hoá tốt. Người ta tính được rằng, khoảng 5 tấn bột xenluloza dùng sản xuất giấy sẽ thải một lượng dịch kiềm sulfit chứa khoảng tới khoảng 180 kg đường. Dịch này hấp thụ nhiều O_2 cho nên khi nuôi cấy nấm men có thể giảm mức cung cấp oxy tới 60% so với bình thường.

Các nguồn xenluloza thực vật (gỗ, rơm, rạ, bã mía, lõi ngô...) được chú ý nhiều trong sản xuất nấm men. Trước hết cần phải thủy phân xenluloza bằng axit hoặc enzym. Nếu dùng gỗ thì thường phải thủy phân bằng axit sulfuric (H_2SO_4).

Trong trường hợp dùng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* thì có thể kết hợp chung cất thu cồn sau khi tách sinh khối từ dịch thải. Như vậy, trong dây chuyền sản xuất cần phải trang bị thêm bộ phận chung cất. Dịch ly tâm được đưa vào hệ ly tâm tách (separator) và dịch thải tách ra được chuyển đến khâu chung cất.

• Xử lý nguyên liệu và chuẩn bị môi trường

Đối với các nguyên liệu ban đầu dùng để sản xuất protein đơn bào từ nấm men đều cần phải xử lý sơ bộ và sau đó sẽ tiến hành pha chế môi trường. Tùy từng loại nguyên liệu chủ yếu và chủng vi sinh vật nuôi cấy chúng ta sẽ có các thành phần môi trường thích hợp, nhưng nói chung ngoài nguồn cơ chất cơ bản là nguồn cacbon ra, chúng ta cần đưa vào môi trường nguồn nitơ, phospho, kali, magie, các nguyên tố khoáng khác nữa. Thường dùng nguồn nitơ là các muối sulfat, nguồn phospho là supephosphat (*), K - trong KCl, Mg -

(*) Có thể dùng ure làm nguồn N, axit orthophosphoric với diamophosphat làm nguồn P thay cho amoni sulfat và supephosphat. Hai chất này sẽ tạo cặn $CaSO_4$ bám vào mặt trong thiết bị và ống dẫn gây cản trở cho thanh trùng và truyền nhiệt.

MgSO₄. Có thể dùng amoniac để giữ ở pH xác định. Trong quá trình còn cần nguồn các chất sinh trưởng, như cao ngô, cao nấm men, hoặc các dịch thủy phân khác... Các thành phần môi trường được hoà tan, lọc bỏ cặn, điều chỉnh pH tới $4,8 \div 5,2$ bằng axit sulfuric hoặc axit clohydric (đối với môi trường rỉ đường pH là $4,2 \div 4,5$).

Dịch bã rượu là nguồn dinh dưỡng nuôi cấy nấm men rất tốt. Trong dịch này có khoảng $1 \div 2\%$ chất khô tan rất giàu vitamin B và các axit amin. Nuôi nấm men dùng dịch này pha thêm rỉ đường để môi trường luôn luôn có khoảng 2% đường, ta có thể thu được từ $10 \div 15$ kg men khô từ 1 m^3 dịch bã rượu.

Rỉ đường mía và rỉ đường củ cải là nguyên liệu phổ biến dùng nuôi cấy nấm men, như men bánh mì, men thức ăn chăn nuôi (xem mục 5.1.2 chương 5). Trong thời gian bảo quản rỉ đường bị nhiễm vi sinh vật, nhưng vì có nồng độ đường cao chúng không phát triển. Trước khi pha môi trường cần phải xử lý rỉ đường: pha loãng 1 : 1, axit hoá tới pH $2,8 \div 3,0$, gia nhiệt tới 75°C giữ ít nhất 45 phút, để lắng, bỏ cặn.

Nuôi cấy nấm men trong sản xuất SCP thường phân thành hai giai đoạn:

+ Giai đoạn nhân giống để có đủ lượng giống (số lượng tế bào) đưa vào lên men - giai đoạn chuẩn bị vật liệu nuôi cấy, cần phải vô trùng. Môi trường nhân giống và khi tiến hành nhân giống cũng phải đảm bảo vô trùng.

Trường hợp không cần vô trùng thì không cần phải thanh trùng ở áp suất dư của hơi nước, chỉ cần đun nóng hoặc ozon hoá, lọc khử khuẩn, clo hoá, xử lý qua với formalin v.v...

• Nuôi cấy nhân giống

Nuôi cấy nhân giống đầu tiên được thực hiện trong phòng thí nghiệm: giống ống nghiệm được nuôi cấy chuyển vào bình tam giác có môi trường vô trùng, sau đó các bình đã có giống được nuôi trên máy lắc với nhiệt độ bình thường từ $25 \div 30^\circ\text{C}$ đến độ tuổi sinh lý thích hợp sẽ cấy vào môi trường nhân giống ở phân xưởng - nhân giống cấp 2 trong các bình thép kín có sục khí đến khi đạt được $3,5 \div 4$ g sinh khối trong 1 lít dịch nuôi. Quá trình kết thúc sau $12 \div 15$ giờ. Có thể phải nhân giống cấp 3 ở các nồi có thể tích tới $4 \div 5 \text{ m}^3$. Tỷ lệ tiếp giống chuyển cấp là 1 : 10. Trong quá trình nhân giống dùng nước amoniac để giữ pH, thổi khí liên tục. Từ nồi $4 \div 5 \text{ m}^3$ sẽ được chuyển sang thùng $12 \div 15 \text{ m}^3$ và tới vài chục mét khối hoặc to hơn.

• Nuôi men công nghiệp

Là nuôi mở rộng ở phân xưởng không cần phải vô trùng. Có nhiều nhà máy lắp đặt các nồi lên men kín hoặc hở, thông thường thể tích các nồi lên men là vài chục mét khối, có thể tới 500 m^3 .

Tiến hành nuôi lên men theo phương pháp bán liên tục cho hiệu quả kinh tế cao: khi đạt lượng sinh khối có trong dịch nuôi cấy sẽ lấy dần ra và cho thêm môi trường mới vào nồi

lên men có hàm lượng đường khoảng $1 \div 2\%$.

- Các tế bào của chủng nuôi được tách trước tiên theo phương pháp tạo thành bọt cùng với sinh khối trào ra ngoài rồi đưa vào ly tâm tách.

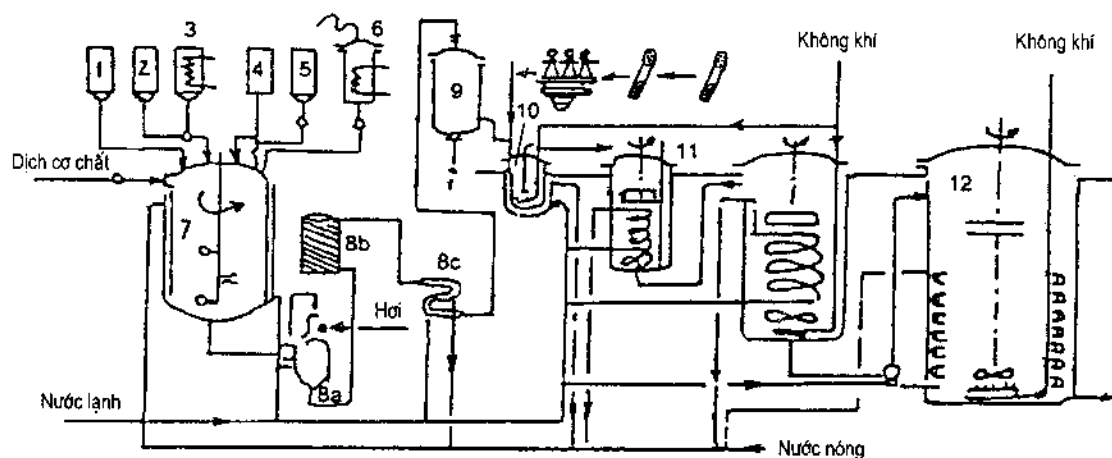
Bọt và sinh khối trào ra ngoài được thu gom lại đưa đi xử lý bằng phương pháp “tuyển nổi” (floatation) rồi đưa đi ly tâm qua các máy separator (ly tâm tách), cô đặc ở chân không.

Sinh khối nấm men thu được ở dạng sệt có $75 \div 80\%$ nước, $20 \div 25\%$ chất khô trong đó cacbon chiếm $40 \div 50\%$, nitơ $7 \div 10\%$ tương ứng với $40 \div 60\%$ protein, hydro $5 \div 7\%$, oxy $25 \div 30\%$; các nguyên tố vô cơ $5 \div 10\%$ (phospho và kali chiếm $95 \div 97\%$ tổng lượng tro, số còn lại là canxi, magie, nhôm, lưu huỳnh, clo, sắt, ngoài ra còn một lượng rất nhỏ các nguyên tố mangan, kẽm, molipden, bo, coban...). Sinh khối được đưa vào sấy ở máy sấy hai trục hoặc sấy phun.

Như ta đã biết, trong tế bào nấm men (và kể cả vi khuẩn), có nhiều vitamin nhóm B (trừ vitamin B_{12}): tiamin, riboflavin, axit nicotinic, axit folic, đặc biệt là rất giàu tiền vitamin D_2 (ergosterin). Dưới ánh sáng tử ngoại (cực tím) ergosterin sẽ chuyển thành vitamin D_2 . Trước khi đóng gói sản phẩm sinh khối nấm men được chiếu tia tử ngoại để vitamin hoá sản phẩm.

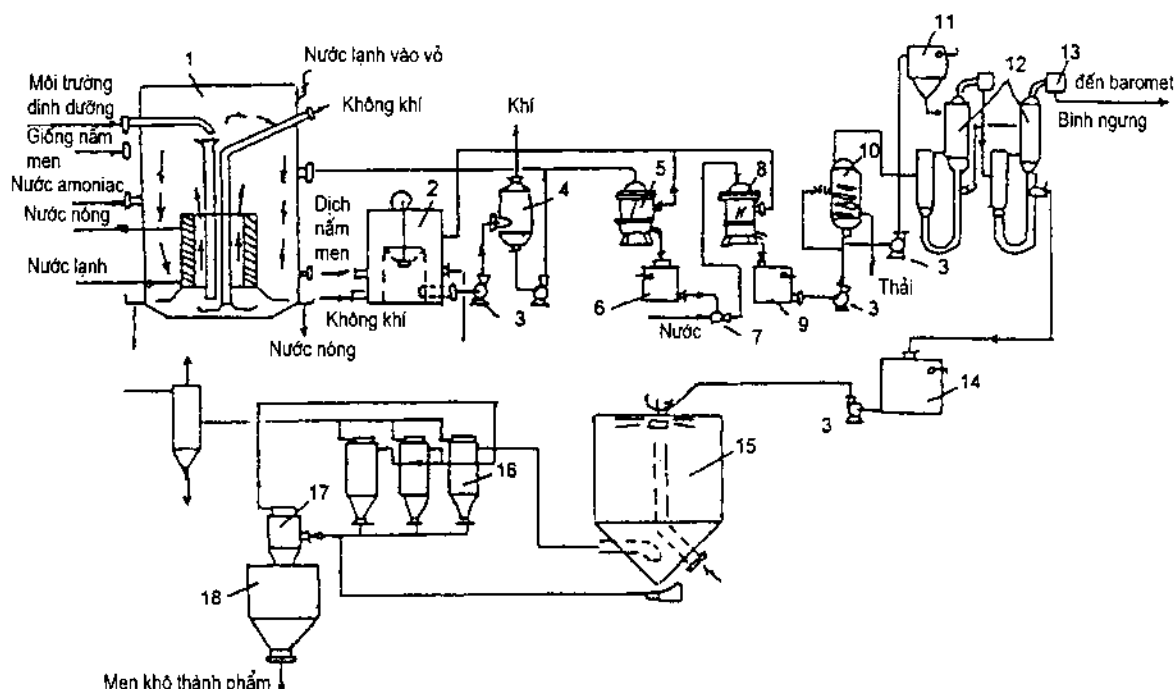
8.3. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT SINH KHỐI NẤM MEN

Quá trình công nghệ sản xuất sinh khối nấm men có thể giới thiệu sơ giản trên hai hình 8.7. Hình 8.7 giới thiệu quá trình nhân giống trong phòng thí nghiệm và nhân giống trong sản xuất. Hình 8.8 giới thiệu quá trình nuôi men mở rộng, tách men và sấy men.



Hình 8.7. Quá trình chuẩn bị môi trường và nuôi cấy giống ở điều kiện vô trùng:

- 1- bình đựng dịch amonisulfat; 2- supephosphat; 3- nước nóng; 4- sữa vôi; 5- KCl;
- 6- bình tự phân nấm men; 7- bình pha môi trường; 8a, 8b, 8c- thanh trùng;
- 9- bình lắng; 10- nồi giống cấp hai; 11- nồi giống cấp ba; 12- nuôi mở rộng



Hình 8.8. Sơ đồ nuôi và thu sinh khối nấm men:

1- nổi lên men; 2- thùng truyền nổi; 3- bơm; 4- bình tách khí; 5 và 8- separator tách I và II; 6- thùng chứa men; 7- bơm nước; 9- thùng chứa men đặc; 10- bình điều chỉnh nhiệt liên tục; 11- thùng tập trung men trước khi sấy; 12- nổi cơ chân không hai buồng; 13- buồng tạo chân không; 14- thùng chứa men trước khi sấy; 15- sấy phun; 16, 17- các xyclon; 18- thùng tăng trữ

8.4. SẢN XUẤT NẤM MEN CHĂN NUÔI TỪ BÃ RƯỢU

Như các phần trên chúng ta đã đề cập đến dịch bã rượu rất giàu chất sinh trưởng, nếu dùng nuôi cấy vi sinh vật, trước hết là nấm men, để cho chúng ta một lượng đáng kể sinh khối bổ sung vào thức ăn chăn nuôi cho hiệu quả kinh tế lớn.

Có hai loại bã rượu: loại dịch bã của các nhà máy rượu với nguồn nguyên liệu từ ngũ cốc, sắn (các loại chứa tinh bột) và của các nhà máy rượu rỉ đường.

Trong dịch bã rượu tinh bột sau khi lọc loại bã thô dùng cho thức ăn chăn nuôi có 7 + 8% chất khô và dịch bã rượu rỉ đường thường có 7,5 ÷ 10% chất khô, nhiều các hợp chất chứa N, có nhiều vitamin và khoáng chất.

Thành phần hoá học của hai loại bã rượu được giới thiệu ở 2 bảng (8.1 và 8.2).

Trong quá trình hoạt động sên nấm men đã chuyển 50 ÷ 55% chất khô của rỉ đường vào dịch bã. Do vậy, dịch là môi trường rất giàu các chất sinh trưởng.

Bảng 8.1. Thành phần hoá học của bã rượu rỉ đường

Vật chất	Hàm lượng, % chất khô	Vật chất	Hàm lượng, % chất khô
Hợp chất hữu cơ	70 ÷ 83	Các axit hữu cơ	5 ÷ 27
Protein	17 ÷ 27	trung đó có axit bay hơi	3 ÷ 12
Nitơ		Glycerin	6 ÷ 13
tổng	3 ÷ 5	Vật chất khử	3 ÷ 7
protein	0,4 ÷ 1,0	Tro tính ra K ₂ O	17 ÷ 24
amin	0,3 ÷ 0,6	Na ₂ O	7 ÷ 8
NH ₃	0,1 ÷ 0,3	CaO	0,5 ÷ 3
Axit amin	6 ÷ 10	Vi lượng	1,5 ÷ 2

Dịch bã rỉ đường chứa 7,5 ÷ 10% chất khô, trong đó có tới 3% là các hợp chất vô cơ. Đường khử (0,2 ÷ 0,5%), glycerin (0,6 ÷ 0,9%), các axit hữu cơ (1,5 ÷ 2,5%), các axit amin, các loại rượu, glucosid, các hợp chất nitơ vô cơ và hữu cơ, các muối của P, K, Fe, vitamin và các nguyên tố vi lượng. Các hợp chất này men có thể hấp thu được.

Trong dịch bã rượu từ tinh bột có 7,0 ÷ 8,0% chất khô (gồm có 0,25 ÷ 0,5% từ các đường; glycerin - 0,4 ÷ 0,6%; tinh bột - 0,1 ÷ 0,2%; hemixenluloza - 1,4 ÷ 2,3%; xenluloza - 0,3 ÷ 0,9%; protein, axit amin, axit hữu cơ và các hợp chất khoáng. Các axit amin có trong dịchbã rượu như asparagin, valin, glyxin, lōxin, izolōxin, các axit glutamic và asparatic v.v... rất dễ được nấm men hấp thu và sử dụng vào cấu tạo tế bào.

Bảng 8.2. Thành phần hoá học của dịch bã rượu từ ngũ cốc

	Hàm lượng (%) trong bã			
	Ngô	Gạo	Sắn	Đại mạch
Nước	93,2	92,6	92,0	93,0
Chất khô	6,8	7,4	8,0	7,0
Chất khô hoà tan	2,5	2,9	2,5	2,7
Hydratcacbon				
- chất khử tính theo maltoza	0,5	0,4	0,5	0,45
- tinh bột	0,5	0,4	0,35	-
- pentozan	0,45	0,45	0,5	0,4
- hemixenluloza	1,8	1,7	2,3	1,7
- xenluloza	0,3	0,3	0,5	0,24
Nitơ				
trong dịch lọc	0,04	0,06	0,02	0,07
Tro				
trong dịch lọc	0,29	0,25	0,15	0,32
Chất béo	-	0,67	-	0,46

8.4.1. Nấm men dùng trong sản xuất men chăn nuôi trên môi trường bã rượu

Nấm men chăn nuôi được nuôi cấy ở môi trường rỉ đường hoặc trên môi trường dịch bã rượu từ ngũ cốc hoặc từ rỉ đường (sau khi đã thu CO_2 và chưng cất rượu). 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, dễ tách bằng separator, có sức chống chịu với tạp khuẩn và những chất kìm hãm sinh trưởng. Với thành phần hoá học phải đáp ứng được nhu cầu về dinh dưỡng và không chứa các chất có độc tính đối với động vật.

Trong sản xuất men chăn nuôi các loài nấm men sau đây hay được sử dụng là *Candida utilis*, *C. tropicalis*, *C. arboreae*, *Trichosporon cutaneum*, *Torulopsis pinus* và hỗn hợp một vài chủng của chúng.

Nấm men *C. utilis* sử dụng được glucoza, xyloza, nhưng không sử dụng được galactoza và không đồng hoá được arabioza; *C. tropicalis* ngoài glucoza, xyloza còn sử dụng được galactoza và một phần arabioza. *C. utilis* cần ít các vitamin, còn *C. tropicalis* khi không đủ vitamin sẽ bị ảnh hưởng nhiều về sinh trưởng. Phần lớn men thuộc giống *Candida* có khả năng lên men đường. Điều này không mong muốn cho sản xuất men chăn nuôi.

Tốc độ hấp thu glyxein và các axit hữu cơ của các loài nấm men là khác nhau. Hiện nay các chủng loài *C. utilis*, *Tor. pinus*, *C. tropicalis*, *C. arboreae*... thường được dùng làm giống sản xuất trên môi trường rỉ đường hoặc dịch bã rượu rỉ đường.

8.4.2. Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng

- Nguyên liệu: Hai loại dịch bã rượu từ rỉ đường và từ ngũ cốc, sản sau khi chưng cất. Thành phần hoá học của hai loại dịch bã này được giới thiệu ở 2 bảng 8.1 và 8.2.

Trong sản xuất rượu có một lượng dịch bã rất lớn: cứ 100 l cồn thải ra tới gần 12 m³. Với bã rượu từ các loại có chứa tinh bột có thể dùng làm thức ăn chăn nuôi trực tiếp (hoặc lọc lấy phần bã khô), phần dịch thường thải nhưng trong đó rất giàu các chất dinh dưỡng về hàm lượng nitơ, vitamin và khoáng.

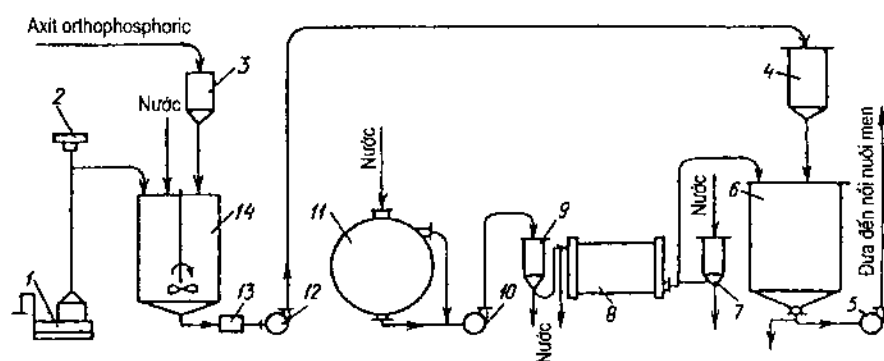
Dịch bã rượu rỉ đường sau khi chưng cất và tách xác men cũng là một loại dịch rất giàu dinh dưỡng, đại thể cũng giống như dịch bã rượu từ tinh bột.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy nấm men ta trộn lẫn dịch bã rượu đã làm nguội với muối phosphat và amoni. Nếu dịch bã có nồng độ chất khô trên 8% thì pha loãng tới nồng độ $6,8 \div 7,2\%$.

Dịch hỗn hợp trước khi nuôi cấy phải thanh trùng ở $95 \div 98^\circ\text{C}$ khoảng $30 \div 45$ phút.

Sơ đồ công nghệ chuẩn bị môi trường nuôi cấy được trình bày ở hình 8.9.

Các chất dinh dưỡng (ure, diamoni phosphat) được cân ở 1 và nhờ 2 đưa vào thùng hoà tan 14. Axit orthophosphoric đi qua ống đóng 3 vào thùng hoà tan 14 với nước. Hỗn hợp được khuấy trộn qua bể 13 vào bơm ly tâm 12 đưa qua bình đóng 4, rồi đưa vào bình chứa 6.



Hình 8.9. Sơ đồ công nghệ chuẩn bị môi trường dinh dưỡng từ dịch bã rượu ri đường

Bã rượu sau khi chưng cất được đưa vào bình thanh trùng 11, rồi từ đây nhờ bơm 10 đưa vào lọc 9 và trao đổi nhiệt 8 đi vào bình chứa 6. Từ 6 môi trường dinh dưỡng nhờ bơm 5 đưa vào thiết bị nuôi men. Nước làm nguội trao đổi nhiệt tấm bản 8 được đưa ra ngoài qua phin lọc 7.

Sơ đồ công nghệ chuẩn bị môi trường dinh dưỡng từ dịch bã rượu ngũ cốc (tinh bột) được giới thiệu ở hình 8.10.

Dịch bã từ bình thanh trùng qua rotamet 1 nhờ bơm 2 đi vào trao đổi nhiệt (làm nguội) 3, từ 3 qua sàng 4. Bã thô từ sàng 4 cho vào thùng chứa 5 rồi nhờ bơm 2 đưa ra ngoài làm thức ăn chăn nuôi; dịch lọc thô đưa vào thùng chứa hỗn hợp 6 với dung dịch muối khoáng dinh dưỡng qua bộ phận đo lường 7. Môi trường dinh dưỡng đưa qua bể 10 và 11 rồi nhờ bơm 2 cho vào hoặc là thùng nuôi nhân giống men thuần chủng hoặc là qua trao đổi nhiệt 3 và rotamet 1 rồi vào thùng nuôi men lớn.

Nhiệt độ của môi trường dinh dưỡng và của khí nén đưa vào dịch nuôi cấy sao cho trong quá trình nuôi men ở thiết bị nhân giống hoặc thiết bị nuôi cấy lớn không quá $33 \pm 35^{\circ}\text{C}$.

Làm nguội dịch bã rượu ri đường thường cho qua trao đổi nhiệt tấm bản và với bã rượu tinh bột - ống lồng ống.

Thành phần và nồng độ các cấu tử của môi trường dinh dưỡng nuôi cấy nấm men ảnh hưởng rất nhiều đến tốc độ sinh sản, thành phần tế bào và hiệu suất thu hồi sinh khối của nấm men. Các nguồn đường đơn và kép, axit cacbonic, axit amin, glyxerin là nguồn cacbon dinh dưỡng của nấm men.

Trong bã thường thiếu cân đối về tỷ lệ C : N : P. Vì vậy, muốn nấm men sử dụng hết nguồn cacbon ta phải thêm nguồn N và P (thường dùng là ure và axit orthophosphoric hoặc diamoni phosphat). Supephosphat và amoni sulfat được sử dụng nhưng không như mong muốn vì chúng tạo ra canxi sulfat làm cho cấu kiện thiết bị.

Chi phí nguồn P hoặc nguồn N dinh dưỡng G (kg/m³) theo công thức sau:

$$G_{P,N} = \frac{F_m \cdot K}{m_1} - m_2$$

F - năng suất nấm men khô tuyệt đối từ 1 m³ dịch bã rượu (kg);

m - hàm lượng P₂O₅ hoặc N trong men khô tuyệt đối (% ứng với P₂O₅ là 7,5 ÷ 8 và với N là 4 ÷ 4,5);

K - hệ số nguồn P và N dinh dưỡng thừa dư (ứng với 1,3 và 1,07);

m₁ - hàm lượng P₂O₅ hoặc N trong nguồn dinh dưỡng, % (P₂O₅ có trong axit ortho-phosphoric là 50,7%, trong diamoni phosphat là 53,8%; N trong ure là 46%, trong amoni sulfat là 20,5%);

m₂ - hàm lượng P₂O₅ hoặc N tiêu hoá có trong dịch bã, kg/m³.

Năng suất nấm men:

$$F = z \cdot f \cdot (100 - B) \cdot 10^{-4}$$

z - hàm lượng nguồn cacbon có trong 1 m³ bã rượu (kg);

f - năng suất nấm men từ nguồn C của bã (thừa nhận là 45%);

B - tổn hao nấm men, % (qua ly tâm tách - seperator là 7% và sấy là 2%).

Ure và diamoni phosphat hoà tan vào nước nóng theo tỷ lệ 1 : 5 ÷ 6 (nước). Dung dịch được trộn lẫn với lượng axit phosphoric đã được tính toán, pha loãng bằng nước theo tỷ lệ 1 : 5 rồi cho qua bộ phận đo lường. Với 1 m³ bã rượu thường bổ sung 0,9 kg axit ortho-phosphoric và 1 ÷ 1,1 kg ure hoặc 1,3 kg diamoni phosphat và 0,5 kg cacbamat (ure).

Trong quá trình nuôi men pH được giữ ở 4 ÷ 4,2. Trong bã rượu rỉ đường pH là 4,5 ÷ 4,7, còn ở bã rượu ngũ cốc pH là 4,8 ÷ 5,2. Vì vậy cần dùng axit clohydric hoặc axit sulfuric để đưa pH dịch nuôi cấy về 4 và 4,2. Để khắc phục tạo thành CaSO₄ làm cấu bẩn thiết bị khi dùng axit sulfuric, còn khi dùng HCl dễ làm rỉ thiết bị người ta thường dùng hỗn hợp của hai axit này. Trong bã thường có hàm lượng canxi là lớn hơn 0,25% (CaO).

Để tránh các chất ức chế sinh trưởng nấm men, như các axit bay hơi, SO₂, N₂O (hoặc NO), formalin... cần phải được loại bỏ nhờ làm chua môi trường tới pH = 3,5 ÷ 4 và thổi khí.

8.4.3. Nhân giống - Sinh sản của giống thuần chủng

Giống thuần chủng qua nhân giống rồi cấy tiếp vào môi trường trong các thiết bị nuôi mở rộng. Giống khi nhân giống cần đảm bảo không bị nhiễm tạp khuẩn, gồm nhiều tế bào trẻ, khoẻ, có khả năng sinh sản nhanh.

Giống có thể qua nhiều cấp nhân giống: ở trong bình tam giác đặt trên máy lắc khi được cấy chuyển từ ống thạch nghiêng, rồi tiếp vào các bình nhân giống cấp 1 để sục khí với V = 3 ÷ 5 l, tiếp theo là các thiết bị nhân giống cấp 2, cấp 3 V = 0,63 ÷ 6,3 m³... để đưa vào các thiết bị nuôi men 20 ÷ 25 m³ hoặc có thể tới 100 m³.

Môi trường ở bình tam giác và các bình, thiết bị nhân giống là như sau: dịch rỉ đường có nồng độ chất khô $4 \div 5\%$, chỉnh pH tới $4,8 \div 5,0$ và bổ sung $0,3\%$ diamoni phosphat hoặc $0,2\%$ orthophosphat và $0,1\%$ ure.

Môi trường trong các thiết bị nhân giống cấp 2, cấp 3... là dịch bã rượu có nồng độ $4,5 \div 6,0\%$ chất khô, chỉnh pH tới $4,5 \div 5,0$ và môi trường trong các thiết bị nuôi mở rộng là dịch bã rượu có nồng độ chất khô $6 \div 7\%$, pH = $3,5 \div 3,8$. Nhiệt độ nuôi nhân giống là $30 \div 32^\circ\text{C}$, thời gian nuôi (h) như sau: ở bình tam giác là $16 \div 20$, ở thiết bị nhân giống $8 \div 10$, trong phản xướng $4 \div 5$, ở thiết bị nhân mở rộng là $3 \div 4$. Với độ ẩm sinh khối là 75% thì lượng sinh khối ở các cấp nhân giống ở các thiết bị nhân giống có sục khí là như sau: ở cấp 1 sản xuất - $15 \div 20 \text{ g/l}$; ở cấp 2 sản xuất - $30 \div 33 \text{ g/l}$.

Dịch bã rượu tinh bột trong phản xướng nhân giống thường dùng giống nhân từ bình tam giác 100 ml môi trường là rỉ đường 6% chất khô trong 2 ngày không cần khuấy đảo và sục khí, sau đó tiếp vào $6 \div 10$ bình tam giác tiếp theo với môi trường như trước (mỗi bình có $150 \div 200 \text{ ml}$ môi trường), nuôi trên máy lắc 200 vg/phút trong 24 h. Sau đó chuyển tiếp nuôi ở các bình có sục khí ($20 \div 25 \text{ l}$), rồi chuyển sang nhân giống sản xuất cấp 1 ($V = 0,6 \text{ m}^3$ với dịch lọc bã rượu tinh bột) trong 12 h, nhân giống sản xuất cấp 2 ($V = 5 \div 6 \text{ m}^3$) thổi khí tích cực $60 \text{ m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{h}$.

Quá trình nhân giống trong phòng thí nghiệm và nhân giống trong sản xuất là tạo điều kiện cho giống thuần chủng sinh sản nhanh, không bị tạp nhiễm với các dụng cụ và thiết bị phục vụ cho nuôi cấy vô khuẩn (kể cả lọc khí phục vụ cho sục khí).

8.4.4. Nuôi cấy nấm men thương phẩm - Nuôi cấy mở rộng

Trong sản xuất công nghiệp người ta thường dùng phương pháp nuôi cấy theo dòng liên tục. 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 v 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 của môi trường.

Cường độ hiếu khí của môi trường là $Q (\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{h})$ được xác định theo công thức:

$$Q = \frac{X \cdot D_q}{0,03 \cdot K}$$

X - hàm lượng men khô tuyệt đối trong môi trường, g/l;

D - tốc độ pha loãng môi trường trong thiết bị, h^{-1} ;

q - tiêu tốn oxy để tổng hợp 1 g men khô tuyệt đối, g (nuôi ở dịch bã rượu rỉ đường và dịch bã rượu tinh bột, q thừa nhận là $1,5 \div 1,75 \text{ g O}_2/\text{g}$);

K - hệ số sử dụng oxy không khí, % (phụ thuộc vào cấu tạo phân tán khí, K thường thay đổi từ $10 \div 40\%$).

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:

$$X = S_0 \cdot Y$$

S_0 - nồng độ các chất chứa cacbon đồng hoá trong môi trường, kg/m^3 (khoảng $30 \div 40 \text{ kg/m}^3$);

Y - hệ số kinh tế cho tổng hợp (năng suất trung bình lượng men khô tuyệt đối từ nguồn cacbon được đồng hoá) bằng 45 kg/100 kg .

Bằng thực nghiệm ta thấy từ 1 m^3 môi trường thường thu được $10 \div 15 \text{ kg}$ men khô tuyệt đối và hệ số hấp phụ oxy của giai đoạn nấm men phát triển logarit là $1,8 \div 2 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{h}$ và giai đoạn ổn định là $0,8 \div 0,9 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{h}$.

Dịch men trong quá trình nuôi có thể khí sẽ tạo thành bọt. Khi nuôi men đạt yêu cầu dịch men tháo ra bình chứa là một thể dịch bọt với nồng độ $0,25 \text{ g/cm}^3$, $2/3$ 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 hoá, axit oleic, dầu silicon. Để tăng tác dụng phá bọt chất sử dụng trong dạng nhũ hoá với nước 1 : 6. Phá bọt bằng cơ học dựa vào kết cấu của thiết bị.

8.4.5. 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 separator: ở nhóm thứ nhất thu được dịch men có hàm lượng sinh khối $120 \div 160 \text{ g/l}$ vào thùng chứa pha loãng bằng nước tới dịch huyền phù $80 \div 100 \text{ g/l}$, rồi đưa vào nhóm thứ hai và thu được dịch men đặc hơn với nồng độ $250 \div 300 \text{ g/l}$. Pha loãng lần thứ hai tới $150 \div 200 \text{ g/l}$ để đưa vào nhóm thứ ba thu được dịch men $450 \div 500 \text{ g/l}$.

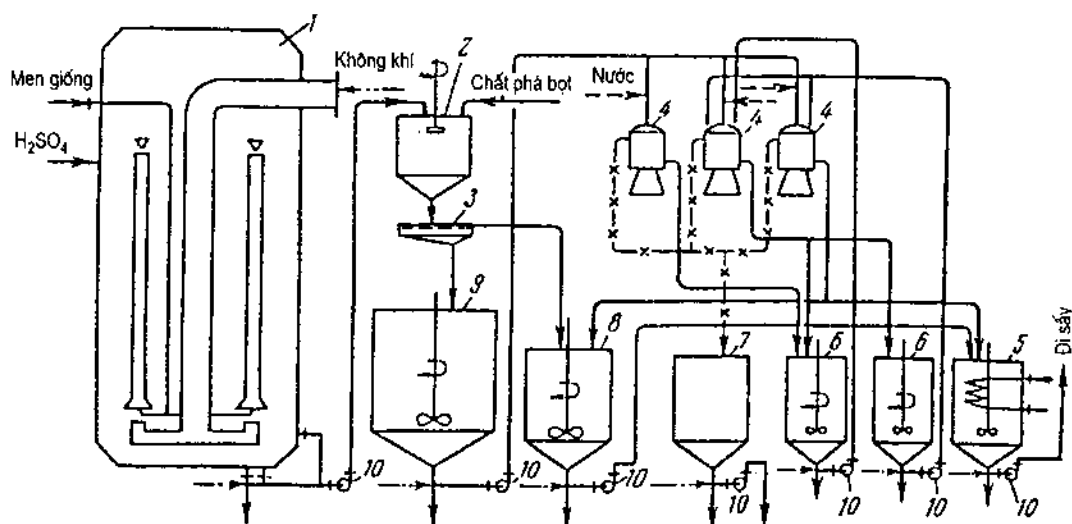
Sau mỗi nhóm separator dịch men đưa vào thùng chứa riêng. Với dịch men được nuôi từ dịch bã rượu tinh bột thường tách men qua hai nhóm separator liên tục để có dịch huyền phù men không thấp hơn 450 g/l .

8.4.6. Nhiệt phân (thermolysis)

Huyền phù nấm men thu được sau khi tách bằng separator 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 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°C 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 8.11).



Hình 8.11. Sơ đồ công nghệ nuôi cấy mở rộng nấm men, tách và nhiệt phân:

1- thiết bị nuôi men; 2- bình phá bọt; 3 - sàng; 4- separator;

5- bình nhiệt phân; 6, 7, 8, 9- bình chứa; 10- bơm

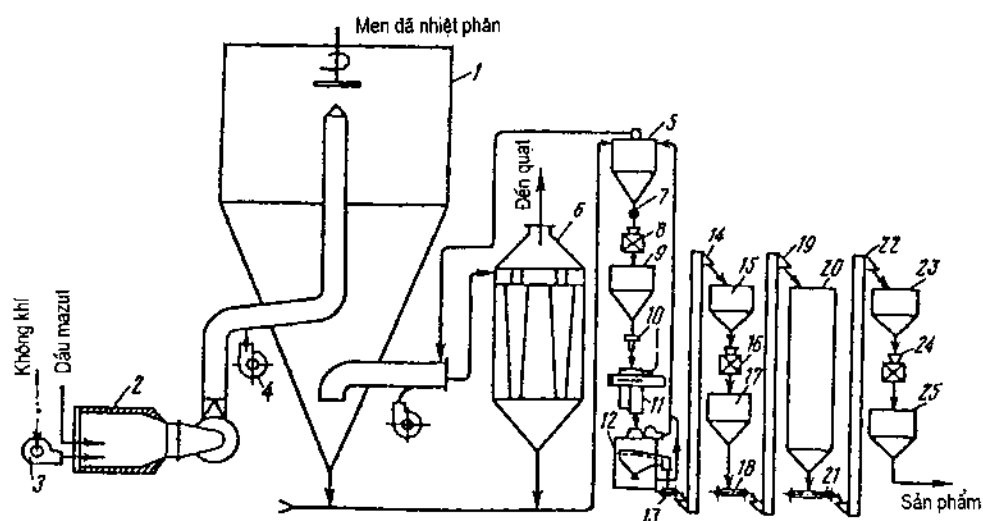
Men nhiệt phân được đưa đi sấy (hình 8.12).

8.4.7. Sấy men

Men thức ăn chăn nuôi thường được sấy theo hai phương pháp: sấy cùn men thành màng mỏng và sấy phun. Sấy màng mỏng thường dùng trong các xí nghiệp nhỏ công suất không cao hơn 1 T/h. 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 1 lưới 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 ÷ 10, phần trụ cao - 5,5 ÷ 7 m, phần nón - 6,6 ÷ 8,7 m). 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 280 ÷ 300°C, ở cửa ra của 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 chất hợp phần của nấm men như protein, vitamin, màu sắc và cấu trúc được hoàn thiện, cũng như dễ tiêu hoá hơn.



Hình 8.12. 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 chuyển; 14, 19, 22- băng nâng; 20- thùng giữ men

8.4.8. 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 5 mg/kg mỗi chất).
- Các vitamin B₁, B₂, B₅ tương ứng không dưới 10, 30 và 300 mg/kg.
- Vi khuẩn sống không quá 7500/kg men khô (không được có vi khuẩn thương hàn).
- Nấm mốc không quá 50/g men khô.
- Lizin, metionin và tryptophan 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 sợi nhỏ;

- Màu sắc: từ vàng sáng đến nâu, không được có mùi vị lạ;
- Độ ẩm: không quá 10%.

Hàm lượng tro của men rượu rỉ đường tới 14% men khô tuyệt đối, với men từ bã rượu ngũ cốc là tới 10%. Sợi men có đường kính $5 \div 9$ mm, chiều dài không quá 28 mm qua sàng có lỗ 3 mm trên 95%.

Hàm lượng protein trong men (%) ở loại khô - 56,0; ở loại I - 51,0; II - 46,0; loại III - 43,0.

Tạp chất kim loại sau khi tách sắt có thể còn có trong chế phẩm men là các mẫu vảy nhỏ là kim loại bất từ hoặc không bất từ. Những tạp chất kim loại là thể mảnh kim loại không bất từ có kích thước mảnh, miếng kim loại không quá 2 mm không được vượt quá 20 mg/1 kg men khô đối với loại I, còn với loại II và III con số này là không được quá 30 mg/kg.

8.5. SẢN XUẤT PROTEIN VI SINH VẬT TỪ DẦU MỎ VÀ KHÍ ĐỐT

Khoảng 40 năm trở lại đây, thế giới chú ý rất nhiều đến việc sử dụng các sản phẩm dầu mỏ để nuôi cấy vi sinh vật nhằm mục đích thu protein. Đây là một nguồn nguyên liệu hết sức dồi dào và rẻ tiền, vi sinh vật, nhất là nấm men và vi khuẩn lại sử dụng tốt làm nguồn cơ chất để tổng hợp protein.

Từ lâu, người ta biết có nhiều vi sinh vật sống ở các dầu mỏ, khí đốt, ở đáy các bể chứa dầu, trên mặt đất và trên đường nhựa. Năm 1925, Tauxon đã phát hiện thấy khả năng oxy hoá hydrocacbon của vi sinh vật. Năm 1940, nhiều công trình nghiên cứu sử dụng vi sinh vật vào việc tìm kiếm dầu mỏ và khí thiên nhiên gần mặt đất đã được tiến hành. Tới năm 1962, phương pháp sản xuất protein từ dầu mỏ và triển vọng của nó đã được trình bày tại hội nghị quốc tế lần thứ VI.

Việc dùng vi sinh vật nuôi cấy trên dầu mỏ và khí thiên nhiên đang là vấn đề hấp dẫn và lôi cuốn các nhà nghiên cứu khoa học, vi sinh vật, dinh dưỡng học và chăn nuôi trên toàn thế giới.

Trữ lượng dầu mỏ trên thế giới cuối năm 1969 là 78 tỷ tấn (62,3% số này nằm ở vùng Trung cận Đông) và tới năm 1975 có thể tới 200 tỷ tấn (phát hiện thêm ở các vùng mới và thăm dò ở thêm lục địa) và bây giờ con số này còn cao hơn nữa. Hàm lượng trung bình của parafin trong dầu mỏ là 20%. Nhiều công trình nghiên cứu cho biết n-parafin là loại nguyên liệu tương đối thích hợp hơn cả để nuôi cấy vi sinh vật. Như vậy, nguồn nguyên liệu này vô cùng phong phú và rẻ tiền.

Các vi sinh vật sống trong dầu mỏ và khí đốt đều lấy hydrocacbon làm nguồn cacbon để trao đổi chất và năng lượng. Trong quá trình chuyển hoá, chúng cần oxy hoá hydrocacbon thuộc nhóm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc và xạ khuẩn. Theo số liệu của Fush

(1961) đã thống kê có khoảng 26 giống, trong đó có chừng 75 loài phân huỷ hydrocacbon mạch thẳng, 25 loài phân huỷ hydrocacbon mạch vòng. Những giống đó thuộc các nhóm sau:

- Vi khuẩn:

Achromobacter, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*.

- Vi khuẩn có khuẩn ty và xạ khuẩn:

Micromonospora, *Mycobacterium*, *Mycococcus*, *Nocardia*, *Streptomyces* hoặc *Actinomyces*.

Nấm men và nấm mốc: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cytomyces*, *Debaryomyces*, *Endomyces*, *Monilia*, *Penicillium*, *Scopuluriopsis*, *Torulopsis*.

Đồng hoá tốt các hydrocacbon lỏng là các chủng thuộc giống *Candida*: *C. tropicallis*, *C. maltosa*, *C. lipolytica*, *C. rubusta*, *C. pelliculosa*, *C. scotti*, *C. rugosa*, *C. oleophila*. Ngoài ra còn các giống khác cũng đồng hoá được hydrocacbon dầu mỡ như: *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *T. colliculosa*, *T. dattila*, *T. sake*, *T. famata*, *Rh. glutinis*, *Rh. gracilis*. Mọc tốt trên môi trường này còn có nấm men *Lodderomyces elongisporus*, vi khuẩn *Pseudomonas ovalis*.

Nhiều vi sinh vật phát triển khá tốt trên môi trường chứa các hợp chất axit hữu cơ cũng như etanol và metanol. Nuôi trên môi trường có metanol để thu SCP dùng cho chăn nuôi người ta dùng nấm men thuộc giống *Candida* và *Hansenula*, vi khuẩn *Pseudomonas* và *Methylomonas*. Các chủng nấm men có hiệu quả ở đây là *C. silvicola*, *C. boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Torulaglabrata*, *Ternobii* và v.v...

Hydrocacbon dạng khí thường được vi khuẩn *Mycobacterium* và *Pseudomonas* đồng hóa. Khả năng này còn thấy ở một số vi khuẩn khác và xạ khuẩn *Streptomyces*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Acremonium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Methylococcus*.

Trên môi trường etanol người ta nuôi nấm men *Candida*, *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, cũng như vi khuẩn thuộc giống *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Zygomonas*.

Trên bã rượu nấu từ rỉ đường và bột ngũ cốc thường được nuôi nấm men *C. tropicallis*, *C. utilis*, *C. stellatoidea*, *Torulopsis pinus*, *Trichosporon pullulans* cũng như nấm *Chaetomium pululiferum*.

Komagata, Nakases và Kasuio khi nghiên cứu 498 chủng nấm men phân lập từ các nguồn khác nhau đã thấy rằng, hầu như tất cả các chủng nấm men oxy hóa được hydrocacbon đều thuộc giống *Candida*, nhưng chỉ có một số ít là có hoạt lực cao. Một số

chúng có khả năng sử dụng tốt hydrocacbon là: *Candida lipolytica*, *C. intermedia*, *C. tropicalis*, *C. parasilopsis*, *C. guilliermondii*.

Vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trên nhiều loại hydrocacbon hơn nấm men và nấm mốc. Nấm men chỉ phát triển trên n-alkan và alkan. Nấm mốc phát triển trên n-alkan, còn trên alkan mạch nhánh sinh trưởng kém hơn. Vi khuẩn phát triển tốt trên các dãy alkan mạch thẳng, mạch nhánh, trên các hydrocacbon thơm và khí thiên nhiên. Ngày nay, người ta đã biết rất rõ là metan propan đều dễ dàng bị oxy hóa bởi các vi khuẩn *Pseudomonas*, *Methanomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium*. Trên 60 loài vi sinh vật đã được mô tả có khả năng sử dụng khí thiên nhiên, trong số này có nhiều loài vi khuẩn thuộc các giống *Mycobacterium* (*Myc. methanicum*, *Myc. falvum* v. *methanicum*, *Myc. perrugosum* v. *ethanicum*, *Myc. mucosum*, *Myc. rubrum* v. *propanicum*, *Myc. rhodochous*, *Myc. fotuitum*, *Myc. farafinium*, *Myc. lacticolum*, *Myc. smegmatis*, *Myc. carotenum*, *Myc. hyalium*, *Myc. equi*, *Myc. flavum*, *Myc. brevicola*, *Myc. vadosum*, *Myc. phlei*), giống *Methanomonas* (*Met. methanica*, *Met. methnooxidans*, *Met. carbonatophila*), giống *Pseudomonas*, (*Ps. propanica*, *Ps. fluorescens*), một số loài thuộc các giống *Bacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudobacterium*, *Cryonerbacterium*, *Mycrococcus*, *Vibrio*, một số xạ khuẩn (*Proactinomyces albus*, *Nocardia* sp., *Actinomyces*, một số nấm thuộc các giống *Fusarium*, *Arenonium* và *Candida*.

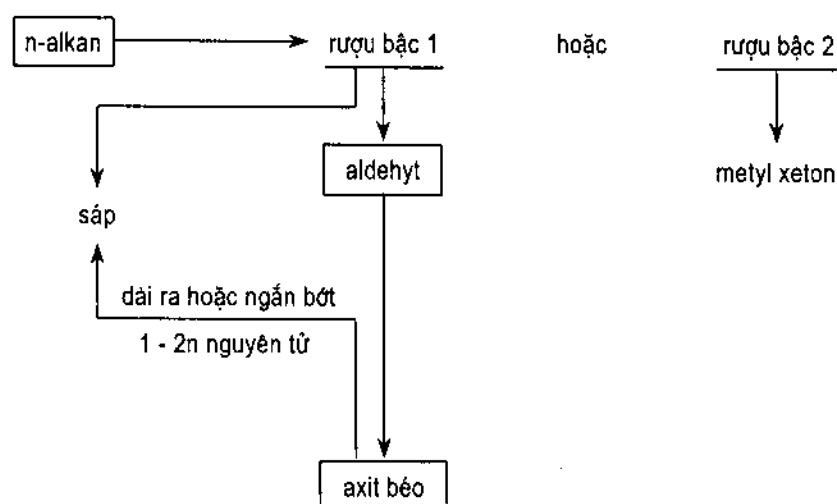
Khả năng sử dụng hydrocacbon của vi sinh vật có phụ thuộc vào điều kiện sống của chúng trong tự nhiên hay không đến nay vẫn chưa được rõ, vì một số lớn nấm men đồng hóa được hydrocacbon tìm thấy ở những địa điểm hoàn toàn không có nguồn cacbon này. Sự đồng hóa của các vi sinh vật có khả năng oxy hóa hydrocacbon là một quá trình rất phức tạp và phụ thuộc vào những điều kiện sau:

- Khả năng thâm nhập vào tế bào của hydrocacbon.
- Sự tồn tại các hệ thống enzym cần thiết để chuyển hóa nguồn cacbon này, đặc biệt đối với hai giai đoạn đầu của sự oxy hóa.
- Vi sinh vật phải bền vững với độc tính của hydrocacbon khi nồng độ cao.

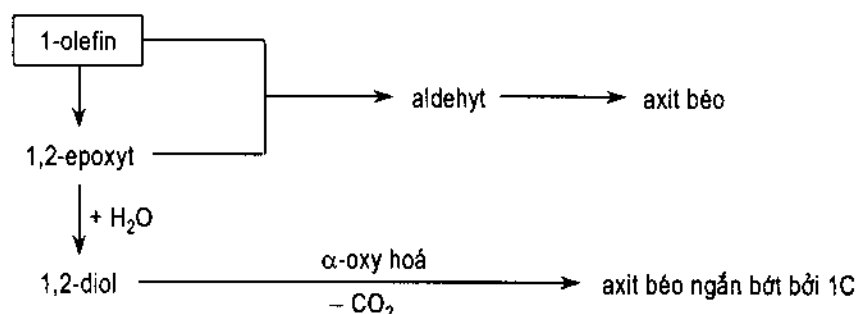
Quá trình thâm nhập của hydrocacbon vào tế bào cho tới nay cũng chưa được làm sáng tỏ đầy đủ. Có giả thuyết cho rằng, quá trình đó thực hiện nhờ có sự tham gia của lipit ở màng tế bào. Cơ chế phân giải hydrocacbon tuy có nhiều giả thuyết và được nghiên cứu nhiều nhưng cũng chưa hoàn toàn rõ ràng ở các đối tượng khác nhau.

Quá trình đồng hóa cacbon từ dầu mỏ và khí đốt có thể đề ra ở dạng tổng quát như sau:

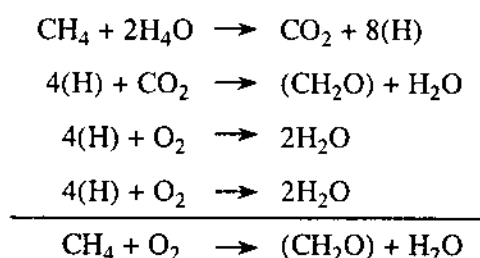
- (1) hydrocacbon → rượu bậc 1 hoặc rượu bậc 2 → aldehyt → axit béo.
- (2) Đối với n-alkan có thể là:



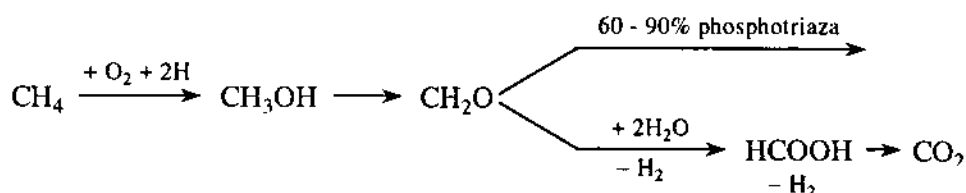
(3) Đối với các hợp chất không no (thí dụ: loại 1-olefin), người ta cho rằng quá trình oxy hoá nhờ vi sinh vật có thể đi theo con đường sau:



(4) Các vi sinh vật có khả năng phân giải khí metan thành CO_2 và H^+ hoạt động. Sau đó chúng sử dụng H^+ này để khử CO_2 và tạo thành các hợp chất hữu cơ:



Các quá trình hoá sinh trong tế bào vi khuẩn với metan đại thể như sau:



Các axit béo sẽ được lôi cuốn vào quá trình đồng hóa tiếp theo bằng các kiểu α , β hoặc ω -oxy hóa đến acetyl-CoA rồi đi vào vòng Krebs. Một phần các axit amin hữu cơ được tạo thành sẽ kết hợp với NH_3 cho các aminoaxit. Nhờ các phản ứng chuyển amin mà số loại axit amin được tạo thành ngày càng phong phú và cuối cùng, dưới sự điều khiển của ADN trong tế bào vi sinh vật, các axit amin này sẽ được tổ hợp lại với nhau để hình thành các phân tử protein.

Cơ sở sản xuất protein từ khí đốt là: nuôi vi khuẩn trên dịch muối amoni và muối khoáng được thường xuyên thổi khí metan và không khí. Ưu điểm của phương pháp này là:

- Khí thiên nhiên rẻ hơn dầu mỏ nhiều lần.

- Phần khí không được vi sinh vật đồng hóa hết rất dễ dàng thoát ra ngoài, vì vậy sản phẩm rất tinh khiết và không mất công tách những phân tử nguyên liệu dư thừa như dùng dầu mỏ. Sản phẩm thu được khi nuôi vi sinh vật trên dầu mỏ không phải tất cả các hydrocacbon lỏng và rắn đều được đồng hóa. Điều này sẽ gây những khó khăn đáng kể về mặt kỹ thuật. Đối với việc dùng khí metan không phải như thế. Khí thiên nhiên không được đồng hóa đều được loại bỏ một cách dễ dàng.

Tuy nhiên, trong sản xuất protein từ khí thiên nhiên bằng con đường vi sinh vật, các nhà khoa học và kỹ thuật đã vấp phải hai vấn đề khó khăn, mà sự thực hiện phương pháp này trong công nghiệp phụ thuộc rất nhiều vào việc giải quyết hai vấn đề đó.

Vấn đề thứ nhất - các vi sinh vật đồng hóa khí thiên nhiên đều là các vi sinh vật hiếu khí. Chúng cần oxy để hô hấp. Môi trường dinh dưỡng phải thường xuyên thổi hỗn hợp khí metan và oxy hoặc không khí. Hỗn hợp khí này dễ gây nổ, nguy hiểm. Trong trường hợp hỗn hợp khí cao rất dễ bắt lửa và nổ, còn nồng độ khí thấp thì vi sinh vật không đủ hô hấp. Cả hai trường hợp này (không đủ dinh dưỡng và ngạt thở) vi sinh vật đều phát triển kém và hiệu suất nuôi cấy thấp.

Vấn đề thứ hai - để tiến hành một cách có kết quả quá trình sinh tổng hợp điều rất quan trọng là oxy và metan phải được chuyển từ trạng thái khí sang trạng thái lỏng để cho các bọt khí mang nhiên liệu và chất oxy hóa đến vi sinh vật nhanh chóng, đi đến các tế bào đang sinh trưởng và quá trình đồng hóa xảy ra tại đây. Khó khăn ở chỗ này là độ hòa tan của metan và oxy trong nước thấp. Lẽ tất nhiên độ hòa tan của metan có thể tăng cao bằng cách tăng áp suất dư trong thiết bị, nhưng như vậy thiết bị cần chịu áp cao và việc chế tạo sẽ phức tạp; việc sản xuất protein bằng phương pháp này mất tính hấp dẫn về kinh tế. Có thể giải quyết bằng cách đưa một dung môi hữu cơ nào đó vào môi trường dinh dưỡng để tăng độ hòa tan của metan, nhưng lúc đó vi sinh vật có thể thích dung môi hơn metan và việc dùng khí thiên nhiên mất hết ý nghĩa.

Sản phẩm thu được khi nuôi vi sinh vật (chủ yếu là nấm men) trên dầu mỏ rất giàu

dinh dưỡng, có thể coi nó là một loại protein - vitamin đậm đặc. Sản phẩm của Pháp có tên là "Toprina" chứa tới 70% protein, của Liên Xô cũ là ББК có 52% protein hoặc cao hơn, của Anh - có khoảng 45% protein v.v... và rất giàu các vitamin nhóm B, cũng như ergosterin (tiền vitamin D₂). Những sản phẩm này không mang mùi vị gì của nguyên liệu, không có độc tố gây ung thư, phá bạch cầu, gây quái thai v.v... Chính vì vậy chúng được dùng rộng rãi vào chăn nuôi và trong tương lai sẽ được dùng để tách protein tinh sạch làm các thức ăn nhân tạo hoặc các mục đích dinh dưỡng khác.

Vấn đề lựa chọn các chủng vi sinh vật có hoạt lực sinh tổng hợp cao để dùng trong sản xuất có ý nghĩa rất quan trọng. Trong công nghiệp sản xuất protein từ dầu mỏ và khí đốt phải chọn các chủng sao cho đáp ứng được các yêu cầu sau:

- Có khả năng sử dụng tốt nguồn hydrocarbon dùng làm nguyên liệu sản xuất.
- Sinh trưởng nhanh chóng, cho sản lượng cao trong thời gian ngắn, không đòi hỏi các yếu tố sinh trưởng bổ sung trong sản xuất lớn.
- Có đặc điểm hóa học và nuôi cấy ổn định, có hàm lượng protein cao, chứa đầy đủ các axit amin cần thiết, không có độc tố và phải được động vật đồng hóa tốt.

Phần lớn các chủng nấm men có sản lượng cao trên cơ chất hydrocarbon được phân lập từ những mẫu đất và bùn ở những nơi có mỏ dầu hoặc quanh các nhà máy chế biến dầu mỏ. Viện sinh tổng hợp các chất protein ở Liên Xô cũ, năm 1967 đã chọn được hơn 500 chủng nấm men phân lập từ các mẫu trên có khả năng đồng hóa được hydrocarbon, trong đó các chủng nấm men thuộc giống *Candida* có sản lượng cao. Các chủng này được nuôi thử trong thiết bị có sục khí ở điều kiện phòng thí nghiệm trên môi trường *n*-parafin cho hiệu suất sinh khối tới 80 ÷ 100% (trọng lượng men khô so với lượng parafin được dùng). Hàm lượng protein trong sinh khối khoảng 50%.

Chất lượng parafin ảnh hưởng rất lớn đến sản lượng nuôi cấy nấm men. Trong *n*-parafin thường có 93 ÷ 98% hydrocarbon được tạo thành phức chất với cacbamat, đó là các *n*-alkan có số nguyên tử cacbon từ 12 ÷ 24; 2 ÷ 7% izoparafin naphten và không quá 0,5% hydrocarbon một hoặc hai vòng thơm.

Qua các số liệu công bố trong việc nghiên cứu lựa chọn các nguồn nguyên liệu khác nhau, ta thấy:

- Sản phẩm nấm men phụ thuộc vào nguồn hydrocarbon có trong nguyên liệu và các phương pháp làm sạch. Nếu trong nguyên liệu có chứa một số cacbua khác, hàm lượng của chúng quá một giới hạn nhất định nào đó có thể làm ức chế sinh trưởng của vi sinh vật.
- Sản phẩm oxy hóa của một số hydrocarbon khác trong nguyên liệu có thể có tác hại đến tăng sinh khối của giống nuôi cấy.
- Đặc tính lý học của cơ chất (độ nóng chảy, độ nhớt, màu sắc...) có thể làm cho quá

trình sản xuất gặp khó khăn. Thí dụ: parafin không khuếch tán vào môi trường nước, khi khuấy đảo trong nhiệt độ sinh trưởng bình thường của nấm men. Chính điểm này có thể khắc phục được một phần nào đó làm cho tăng được độ hòa tan của parafin vào nước bằng cách chọn các chủng có nhiệt độ sinh trưởng tối thích cao, tốt nhất là các chủng ưa nhiệt (trên 40°C).

Sơ đồ công nghệ sản xuất sinh khối nấm men từ các sản phẩm dầu mỏ là từ các nguồn hydrocacbon tương tự nhau.

Quy trình sản xuất gồm các giai đoạn sau: chuẩn bị môi trường dinh dưỡng, nhân giống và lên men, tách và rửa sinh khối nấm men, sấy khô.

Khi chuẩn bị môi trường dinh dưỡng người ta bổ sung axit octophosphoric hoặc superphosphat, kali clorua, magie sulfat vào hỗn hợp hydrocacbon - nước. Nguồn nitơ thường dùng trong sản xuất nấm men là nước amoniac có 20 ÷ 25% NH_3 và một lượng nhỏ amoni sulfat để oxy hóa môi trường ban đầu. Nước amoniac dùng làm nguồn nitơ và làm chất điều chỉnh pH trong thời gian nuôi cấy.

Nguyên liệu dầu - các hydrocacbon không có các nguyên tố vi lượng, vì vậy cần phải tăng thêm vào môi trường dinh dưỡng các muối sau: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; KI; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

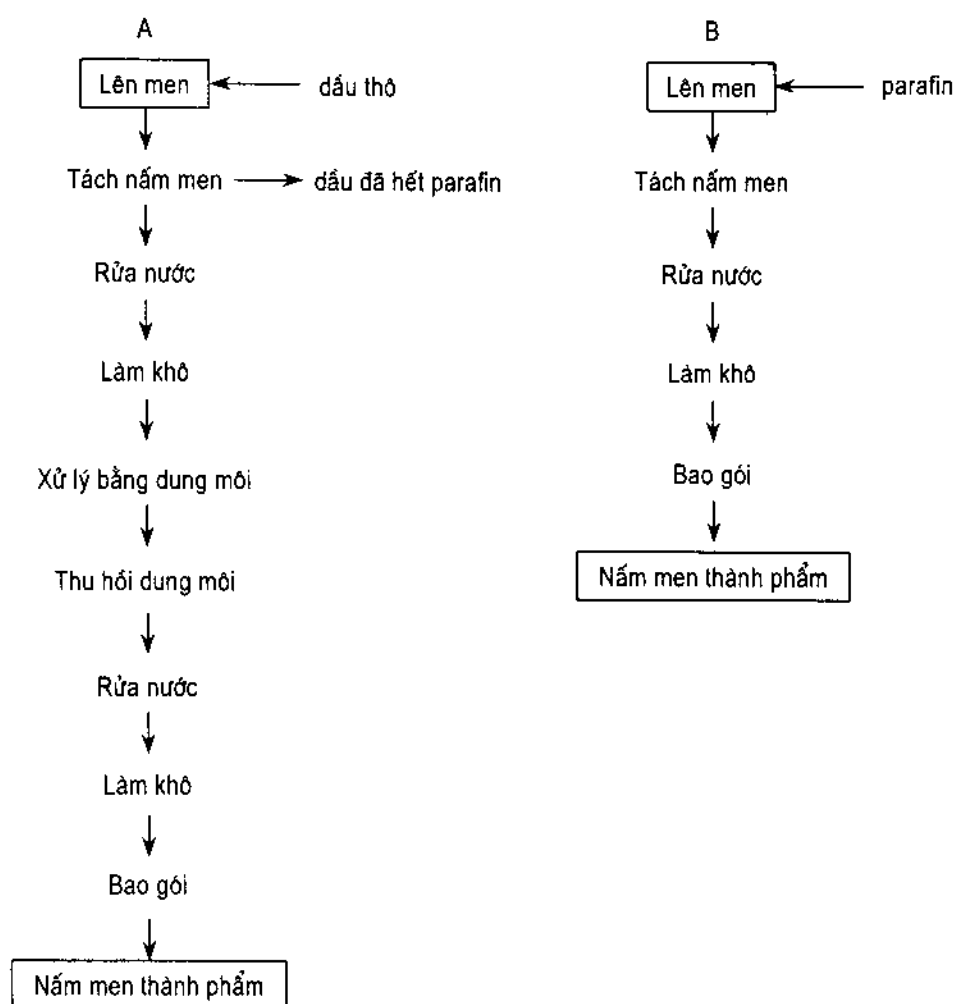
Cùng với *n*-parafin, dầu mỏ thô cũng được dùng làm nguyên liệu sản xuất protein từ nấm men. Phương pháp dùng dầu mỏ thô chưa tách parafin tương đối rẻ nhưng đòi hỏi quy trình công nghệ phức tạp hơn. Dùng parafin thì trong khâu tách nấm men có thể bỏ bớt khâu tẩy rửa bằng dung môi hữu cơ vì thực tế parafin được nấm men sử dụng hoàn toàn.

Để nâng cao hiệu suất sử dụng cơ chất và tận dụng triệt để các thiết bị nuôi cấy, ở nhiều nước người ta đã bắt đầu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy liên tục trong công nghiệp sản xuất sinh khối nấm men. Parafin nóng (50 ÷ 60°) được liên tục cho vào thùng lên men. Nồng độ parafin trong môi trường ban đầu là 1,5 ÷ 2% thể tích. Sự tích tụ sinh khối nấm men trong thời gian nuôi cấy có thể thực hiện trong hai nổi lên men: trong nổi thứ nhất (lên men chính) được thổi khí mạnh, sau đó chuyển sang nổi thứ hai (lên men phụ) được thổi khí yếu hơn.

Nuôi cấy nấm men trên môi trường chứa parafin thường phải thổi khí mạnh gấp 2,6 ÷ 2,8 lần so với khi nuôi cấy nấm men trên môi trường hydratcacbon.

Sự sinh trưởng của vi sinh vật trên hydrocacbon phụ thuộc vào pH cũng giống như khi nuôi trên đường sacaroza (pH = 5 ÷ 6). Tuy nhiên người ta có thể giữ ở trị số thấp hơn để tránh tạp nhiễm. Khi sinh trưởng trên hydrocacbon nấm men tỏa nhiệt nhiều hơn và yêu cầu về thanh trùng không đòi hỏi chặt chẽ như khi nuôi trên môi trường sacaroza.

Dưới đây giới thiệu sơ đồ sản xuất nấm men từ dầu mỏ thô và parafin tinh khiết.



Sơ đồ sản xuất nấm men từ dầu thô (A) và từ parafin (B)

Sau đây giới thiệu một vài môi trường nuôi cấy vi sinh vật trên hydrocacbon (theo Nadirov và Popov, 1974).

1) Môi trường nuôi cấy nấm men (kg)

<i>n</i> -Parafin	12,5
Supephosphat	2,7
Amoni sulfat	0,45
Nước amoniac (25%)	4,0
KCl	0,56
MgSO ₄	0,28
Nước cho tới	1.000

Có thể thay superphosphat bằng axit octophosphat, amoni sulfat bằng amoni clorua hoặc cho đồng thời axit sulfuric với nước amoniac.

Hiệu suất có thể thu được trên 100 kg men khô/m³ môi trường.

2) *Môi trường nuôi cấy vi khuẩn (kg)*

<i>n</i> -Parafin	10
K ₂ HPO ₄	1
KNO ₃	1
MgSO ₄	0,5
NaCl	0,1
FeCl ₃	0,01
Nước cho tới	1.000 l

2) *Môi trường nuôi cấy nấm mốc (kg)*

Dầu diezen	30
NaNO ₃	3
KH ₂ PO ₄	1
KCl	0,5
FeSO ₄	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Nước cho tới	1.000 l

Các nguyên tố vi lượng cần cho *Aspergillus* (mg/l môi trường):

Fe - 0,2; Zn - 0,18; Cu - 0,04; Mn - 0,02 và Ca - 0,02.

Việc tuyển chọn các chủng nấm men và vi khuẩn có khả năng phân huỷ dầu mỡ và parafin ngày nay có ý nghĩa rất lớn trong việc bảo vệ môi trường khi bị ô nhiễm dầu mỡ, đặc biệt là vùng đất quanh kho chứa hoặc đất ven biển sau các sự cố nhiễm dầu do các tàu chở dầu bị nạn.

8.6. SẢN XUẤT NẤM MEN BÁNH MÌ

Men bánh mì là sinh khối của một số nòi men rượu *Sacharomyces serevisiae* vẫn còn sống khi trộn với bột nhào sẽ lên men rượu sinh CO₂ làm nở bánh.

Sản xuất nấm men bánh mì 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 CO₂, còn hô hấp đưa đến tổng hợp các axit min, axit nucleic và protein.

Trong điều kiện kỵ khí nấm men gây lên men rượu. Nếu tăng dần lượng oxy trong môi trường tới 7 mg/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 1 mg/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: 1 g men trẻ cần $80 \div 100$ mg/h còn các tế bào già cần $40 \div 60$ mg/h.

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 $30 \div 100 \text{ m}^3/\text{h}$.

Nguyên liệu được dùng trong việc sản xuất nấm men bánh mì là rỉ đường - phế phẩm của công nghiệp đường hoặc các dịch bã rượu.

Rỉ đường dùng trong sản xuất men bánh mì có những yêu cầu sau: hàm lượng chất khô không thấp hơn 75%, đường $40 \div 50\%$, 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 1 g rỉ đường.

Rỉ đường trước khi pha môi trường nuôi nấm men cần được xử lý. Trước tiên pha loãng rỉ đường theo tỉ lệ 1 : 1 ÷ 1 : 4; axit hóa bằng axit sulfuric tới pH = 5 rồi làm sạch theo phương pháp hóa học hoặc phương pháp cơ học. Trong phương pháp hóa học người ta cho thêm vào dịch rỉ đường các chất kết lắng để tủa các chất keo. Phương pháp cơ học dùng các máy ly tâm đĩa (separator) để tách cặn của rỉ đường. Khi kết tủa các chất keo người ta có thể đun nóng rỉ đường tới $80 \div 100^\circ\text{C}$ để giết các tạp khuẩn.

Bã rượu sau khi chưng cất còn 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 hòa 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 đường, 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 supephosphat để tăng nguồn P và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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. Men nuôi cấy sau thay cho men A.

Nhiệt độ nuôi cấy là $29 \div 30^\circ\text{C}$. 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 được qua sấy phun thành men bột có thể bảo quản được lâu dài. Men thương phẩm ở dạng bánh ép có $73 \div 75\%$ độ ẩm hoặc dạng các viên hay sợi khô có $7,5 \div 9\%$ độ ẩm gọi là men khô. Ngoài ra ở các nhà máy bánh mì 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 mì 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 mì tương tự sản xuất sinh khối nấm men protein đơn bào, chỉ khác là các chủng nuôi cấy khác nhau và men bánh mì là những tế bào men còn sống (xem các hình 8.10, 8.11 và 8.12, nhưng không có thiết bị nhiệt phân - thermolysis và không dùng sấy phun).

8.6.1. Giống men bánh mì

Các nấm men được dùng trong sản xuất thuộc họ *Sccharomycetacea*, 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 mì 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 sacaroza, glucoza, maltoza, có hoạt lực enzym zimaza và maltaza cao. Ngoài ra, kích thước của 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 mì có hình ovan, đôi khi hình tròn (phụ thuộc điều kiện nuôi cấy). Kích thước trung bình $(8 \div 10) \times (4 \div 6) \mu\text{m}$. 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 enzym. Trong không bào xảy ra các quá trình sinh học khác nhau, như quá trình phân ly xau xa hydratcacbon. Kích thước không bào có thể thay đổi tùy 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 lũy 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 mì 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 phosphat trong môi trường. Thí dụ: tế bào nấm men bánh mì trong giai đoạn nhân giống không đủ phosphat, nhưng hiếu khí mạnh hầu như không có valutin, còn trong môi trường giàu phosphat 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.

Như chúng ta đã biết, nấm men nổi dễ tạo thành bào tử ($2 + 4$ trong 1 tế bào) sau $24 + 48$ h ở điều kiện đói thức ăn. Đôi khi các tế bào được nảy mầm từ bào tử. Nhưng đa số trường hợp sau khi già các bào tử thoát ra khỏi tế bào và hợp với nhau thành từng đôi rồi nảy mầm theo sinh: sản hữu tính để tạo thành tế bào mới. Các thế hệ sau lại sinh sản bằng cách nảy chồi bình thường.

8.6.2. 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 II nhưng cũng có một vài đặc thù riêng. Có một số phương pháp giữ men giống như sau:

- Phương pháp thứ nhất:

Giữ giống thuần khiết trên môi trường thạch nghiêng, cấy chuyển sau $12 + 24$ ngày sau khi đã hoạt hóa sơ bộ trên môi trường lỏng.

Môi trường thạch nghiêng: nước malt đường hóa (có 12% chất khô) - 49,5%; rỉ đường đã xử lý (có $6 + 8\%$ chất khô) - 49,5%; dịch men tự phân (khoảng 9% chất khô) - 1% và thạch 2%.

Môi trường lỏng: để hoạt hóa nấm men người ta dùng dịch malt không có hublon có hàm lượng chất khô 12%. Nếu không cấy chuyển và hoạt hóa 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.

- Phương pháp thứ hai:

Giữ tế bào men trong dịch saccaroza 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 chuyển. Khi sử dụng có thể dùng que cấy hoặc pipet vô trùng lấy dịch giống cấy chuyển vào môi trường lỏng để hoạt hóa (giới thiệu ở phương pháp thứ nhất). Sau 24 + 36 h giữ ở nhiệt độ 30°C dịch đường lên men và khi đó ta lại cấy chuyển tiếp sang môi trường thạch hoặc các môi trường nhân giống.

- 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 khoáng 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 hóa 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 tỉ 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 1 cm. Ống giống có vaselin có thể để ở nhiệt độ trong phòng, nhưng tốt hơn cả là giữ ở 4 + 6°C.

- 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. Bảo quản các ampul giống ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở lạnh. Thời gian bảo quản tới 3 năm không phải cấy chuyển. Một vài chủng men được bảo quản đông khô có tỉ lệ tế bào sống thấp.

8.6.3. Sản xuất men nước và men ép theo phương pháp thủ công

Men nước là men bánh mì ở dạng lỏng được tổ chức ở các nhà máy bánh mì và sử dụng theo nhu cầu sản xuất tại chỗ. Ưu điểm của men nước là qui 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 delbrückii*) và nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Vi khuẩn *Lactobacterium delbrückii* (*Thermobacterium cereale*) dùng để axit hóa 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 là 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 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 $45 \div 47^{\circ}\text{C}$, cho tạo thành axit là $52 \div 54^{\circ}\text{C}$. Giống này rất kén nguồn nitơ, đặc biệt là các axit amin. Lên men được glucoza, fructoza, maltoza, sacaroza, 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 $50 \div 52^{\circ}\text{C}$ khoảng $1 \div 2$ ngày. Khi sử dụng người ta tiến hành nhân giống từ ống gốc qua các bình tam giác ở $50 \div 52^{\circ}\text{C}$ khoảng $1 \div 2$ ngày, rồi chuyển sang bình cầu, các thùng nhân giống...

Môi trường nhân giống ở các giai đoạn sau là dịch bột thủy phân bằng thóc mầm hoặc chế phẩm mốc. Làm dịch bột thủy phân như sau: trộn bột với nước theo tỉ lệ $1 : 3$ (có thể thêm bột ngô hoặc bột đậu để tăng thành phần dinh dưỡng), nấu chín, để nguội tới $48 \div 50^{\circ}\text{C}$ thêm 3% thóc mầm hoặc $0,8 \div 1\%$ chế phẩm mốc *A. awamori* hoặc *A. oryzae* và dịch giống vi khuẩn giữ $8 \div 14$ giờ. Dịch bột được đường hoá và đồng thời tích tụ axit, đến khi môi trường đạt tới $11 \div 12^{\circ}$ axit ($1^{\circ} = 1 \text{ ml NaOH } 1 \text{ N}/100 \text{ ml}$ - dịch chuẩn) thì có thể đưa vào cấy nấm men.

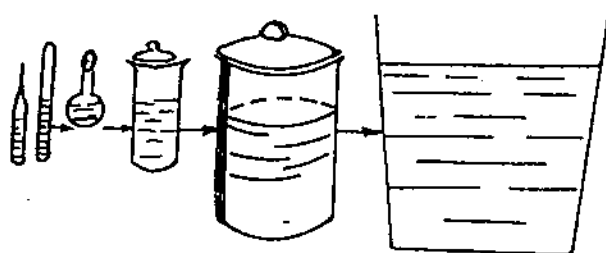
2. Giống men là các chủng thuộc *Sacchromyces cerevisiae* được cấy chuyển trên môi trường thạch - malt ở ống nghiệm, để ở $28 \div 30^{\circ}\text{C}$ khoảng $6 \div 12$ giờ, rồi tiến hành nhân giống. Từ ống nghiệm men được cấy vào ba bình tam giác có 100 ml nước malt ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ, sau đó chuyển sang các bình 5 ÷ 6 lít.

Giống men sau khi nhân giống được chuyển vào dịch bột thủy phân đã axit hoá và làm nguội tới $28 \div 30^{\circ}\text{C}$ (tỉ lệ giống men tiếp vào đây là $5 \div 10\%$), giữ ở nhiệt độ này khoảng $14 \div 15$ 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. 1 ml có khoảng $150 \div 200$ triệu tế bào).

Trong môi trường nuôi men (dịch bột thủy 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 mì theo phương pháp này không cần phải vô trùng, chỉ cần nhân giống vi khuẩn và nấm men một 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 Oxtrovski 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 $5 \div 7$ ngày.

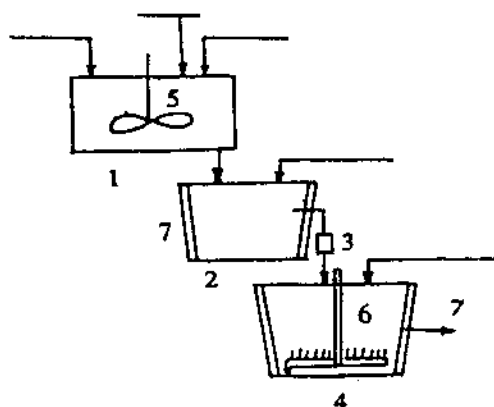
Sơ đồ công nghệ sản xuất men nước được giới thiệu ở hình 8.13.



Hình 8.13. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất men nước:

A- nhân giống vi khuẩn *Lactobacterium delbruckii*:

I, II, III- trong phòng thí nghiệm; IV- 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

8.6.4. Quá trình tách men từ dịch rỉ đường lên men ở nhà máy rượu

Dịch bã là một hệ thống gồm các cấu tử phức tạp, gồm có nước ($82 \div 90\%$ theo khối lượng), chất khô ($4 \div 10\%$) và rượu etylic với các chất bay hơi ($5 \div 8\%$ theo khối lượng (W) hoặc $6 \div 10\%$ theo thể tích (V)). Dịch này luôn luôn có một lượng CO_2 hoà tan nhất định ($1 \div 1,5 \text{ g/l}$), độ chua khoảng 0,50, pH $4,9 \div 5,2$.

Chất khô trong dịch men gồm có tế bào nấm men, cặn bã của môi trường rỉ đường cùng với những chất hoà tan trong hỗn hợp rượu - nước (đường không lên men, protein, chất khoáng...) (xem mục 8.4 và bảng 8.1).

Để tách được sinh khối nấm men giữ được hoạt tính để làm nở bột nhào khỏi khối dịch người ta thực hiện bằng cách qua các hệ ly tâm tách (separator) 5 cấp, 7 cấp, ly tâm tách tuần hoàn, rửa sạch men để làm trắng màu, rồi đưa qua sấy khô không làm cho men chết.

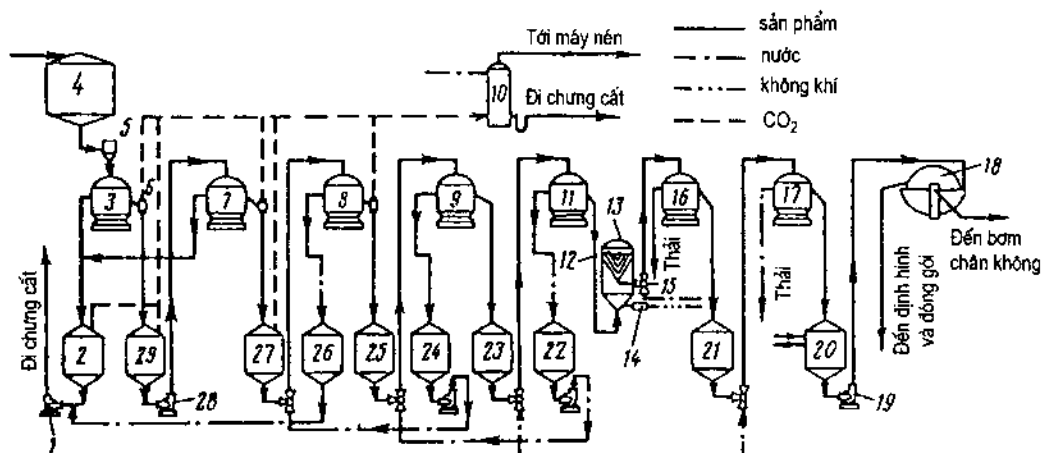
• **Quy trình công nghệ tách men bằng hệ ly tâm tách 7 cấp**

Sơ đồ công nghệ tách men bằng hệ ly tâm tách 7 cấp được trình bày ở hình 8.14.

Dịch men từ thiết bị sau khi kết thúc lên men được đưa vào thùng chứa 4, sau đó cho tự chảy vào phin lọc - bã 5, từ đây dịch được đưa vào separator thứ nhất 3. Thể tích dịch sữa men sau khi tách cấp 1 này là 20% thể tích dịch thô ban đầu. Dịch đã tách men được đưa vào thùng chứa 2, từ đây nhờ bơm 1 đưa vào tháp cất đã chưng cất rượu cồn; còn sữa men đưa vào 29 rồi nhờ bơm 28 chuyển vào separator cấp hai 7, sau đây được đưa vào thùng chứa 27.

Sữa men thu được đậm đặc dần: sau separator bậc một còn 20% dịch thô ban đầu, sau bậc hai - 5% (hay 25% V sau bậc một). Men đặc được bắt đầu được rửa bằng nước giếng khoan.

Nước rửa ở các separator phía sau được đưa về các separator phía trước để tách men bổ sung. Ở separator thứ ba (8) bắt đầu rửa men, nước rửa vào thùng chứa 26 rồi cho quay trở lại separator thứ nhất 3. Cũng như vậy, nước rửa men ở separator thứ tư 9 cho trở lại separator thứ ba 8 và từ 11 trở lại 9. Điều chú ý là ở cột 13 giữ men trong 2 giờ với điều kiện hiếu khí để nâng cao hoạt tính và độ bền của men, ở thùng chứa 20 đựng men đậm đặc (sệt) và được làm lạnh bằng nước muối tới $0 \div 4^{\circ}\text{C}$.



Hình 8.14. Sơ đồ công nghệ tách men bằng separator 7 cấp:

3, 7, 8, 9, 11, 16, 17- separator; 2, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29- thùng chứa; 1, 19 - bơm;
13- cột ống; 18- lọc chân không; 12- đèn khử khuẩn; 15- tia nước rửa; 14- lọc sinh học

Hàm lượng sinh khối trong men đặc sau separator thứ bảy 17 là $400 \div 550$ g/l. Nước rửa men vào khoảng $70 \div 80\%$ tổng dịch bã thô vào separator thứ nhất. Sau khi lọc men bằng lọc chân không, độ ẩm của men đặc là $72 \div 74\%$ cho đi ép định hình, đóng gói và đưa vào kho lạnh bảo quản ở nhiệt độ $0 \div 4^{\circ}\text{C}$.

Trong dịch lên men còn có CO_2 , rượu. Vì vậy cần kết hợp thu hồi CO_2 và chưng cất rượu (xem sơ đồ hình 8.14).

8.6.5. Sấy men thành phần

Men bánh mì 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 đậm đặc với hàm lượng ẩm trong tế bào là $12 \div 17\%$ trong khi đó độ ẩm chung là $70 \div 71\%$ 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 phụ ở trong thể keo của tế bào chất và khó bị bay hơi. Nếu mất nước ở dạng này thường ở 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 $52 \div 53\%$. 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 $16 \div 20\%$.

- 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 là như sau:

Ở giai đoạn 1 là $80 \div 70^{\circ}\text{C}$; giai đoạn 2 - $55 \div 50^{\circ}\text{C}$; giai đoạn 3 - $45 \div 40^{\circ}\text{C}$. Bất luận ở giai đoạn nào nhiệt độ trong khối men không được quá 38°C . Sấy men có thể được thực hiện ở máy sấy băng chuyển, 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 enzym và proteoliz (protein tự phân).

Sấy men bánh mì 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).

8.6.6. Sản xuất men bánh mì ở các nhà máy rượu với nguyên liệu từ rỉ đường

Trong công nghiệp sản xuất rượu cần đều dùng các chủng men rượu thuộc *Saccharomyces cerevisiae*, 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 separator. Sinh khối này qua xử lý là có thể làm men bánh mì rất thích hợp.

Công nghệ sản xuất men bánh mì ở các nhà máy rượu rỉ đường là như sau: tách xác men từ dịch men rỉ đường, rửa bằng nước và thu nhận điều kiện thể đậm đặc, ép, định hình, đóng gói và bảo quản.

♦ 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 được 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 mì trang bị các hệ thống thiết bị ly tâm tách bằng đĩa tầng 5 cấp, 7 cấp hoặc hệ ly tâm tách tuần hoàn.

Qua các cấp thu được xác men cần phải rửa bằng nước sạch và 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 $71 \div 74\%$ 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 $10 \div 15^{\circ}\text{C}$ (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, 1000 và được gói trong giấy thiếc hoặc bằng giấy plastic ngoài vỏ bao bằng giấy thường. Men thành phần dạng này là men bánh mì dạng bánh (hay dạng ướt), bảo quản ở $0 \div 4^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm không khí giữ ở $82 \div 96\%$. Thời gian bảo quản được trên 12 ngày trong điều kiện này không nhỏ hơn 12 ngày.

• **Sấy:** từ men sữa đưa vào máy sấy ống trục quay với 2 ống hình trống để có độ ẩm $\leq 10\%$.

Men bánh mì thu được từ dịch lên men rỉ đường của các nhà máy rượu cần có:

- độ ẩm không quá 10%;
- lực nở bột nhào không quá 90 phút;
- thời gian bảo quản không nhỏ hơn 5 tháng.

8.6.7. Sản xuất nấm men từ rỉ đường

Nuôi nấm men trong môi trường rỉ đường giống như lên men rượu, song có sự khác nhau cơ bản là quá trình nuôi cấy được thổi khí liên tục và các chất dinh dưỡng phong phú hơn để đáp ứng nhu cầu sinh trưởng. Sản phẩm chính của quá trình này là sinh khối nấm men, sản phẩm phụ là rượu etylic.

Rỉ đường được xử lý như trong lên men rượu, như hạ pH, gia nhiệt để diệt khuẩn, kết lắng keo tụ để dịch đường sạch hơn v.v... Các chất dinh dưỡng hữu cơ và muối khoáng được bổ sung vào dịch đường sau khi xử lý và pha loãng với lượng cao hơn định mức lên men rượu bình thường. Định lượng các chất dinh dưỡng nitơ và phospho ở đây rất quan trọng đối với sinh trưởng của nấm men. Nguồn dinh dưỡng nitơ có thể dùng ure (cacbamit). Nấm men có thể hấp thu ure sau khi bị phân huỷ thành NH_4^+ và CO_2 mà không tạo thành gốc axit làm thay đổi pH của môi trường. Liều lượng sử dụng cacbon và axit orthophosphoric thứ tự như sau: $1,5 \div 2$ kg và $1,8 \div 2$ kg, phosphoric 70% (xem thêm ở các hình 8.10, 8.11, 8.14).

Các chỉ tiêu của quá trình lên men:

- Giống là men rượu *Sacchromyces* để thu sinh khối làm men bánh mì.
- Môi trường lên men được pha loãng từ rỉ đường đã xử lý với các chất khoáng dinh dưỡng, có nồng độ chất khô - 22%; pH $5,1 \div 5,2$; axit chuẩn độ $0,5 \div 0,6^\circ$. Hàm lượng rượu etylic sau khi nuôi cấy - $2,5 \div 3,5\%$ V. Lên men ở $28 \div 30^\circ\text{C}$, thổi khí - $4,5 \div 5 \text{ m}^3/(\text{m}^3.\text{h})$. Sinh khối trong dịch lên men là $15 \div 20$ g/l, trong cặn men và bã tới $30 \div 35$ g/l.

PHẦN THỨ BA

VI SINH VẬT TẠP NHIỄM VÀ TUYỂN CHỌN NẤM MEN

Chương 9

VI SINH VẬT TẠP NHIỄM TRONG SẢN XUẤT NẤM MEN

Trong sản xuất nấm men (làm men rượu, bia, rượu vang, sinh khối nấm men) thường bị nhiễm vi khuẩn, nấm men (men dại) và nấm mốc.

Trong quá trình lên men (nuôi cấy nấm men) chúng ta rất hay gặp các giống vi khuẩn: vi khuẩn lactic, vi khuẩn axetic, vi khuẩn butyric (ít gặp hơn); các loài men dại (không phải là giống nuôi cấy được liệt vào men dại) và nhiều loài nấm mốc.

Các nguồn tạp nhiễm chính là: từ men giống ban đầu trong quá trình nhân giống (trong phòng thí nghiệm hoặc trong sản xuất) bị nhiễm - Loại tạp nhiễm này khá là nguy hiểm vì giống sản xuất bị nhiễm làm cho toàn bộ quá trình lên men bị nhiễm, với mức độ nhiễm nặng có thể làm hỏng cả quá trình; - nhiễm từ nước sản xuất không đạt yêu cầu, nước này đem rửa nguyên liệu, dụng cụ thiết bị sẽ bị nhiễm ở diện rộng; - nhiễm từ không khí; - nhiễm từ nguyên liệu và từ quá trình chuẩn bị không đảm bảo vệ sinh, vô trùng, nhiễm vào khi làm nguội các loại môi trường nuôi cấy. Cũng có thể nhiễm từ quần áo, giày dép, quần áo, đồ dùng của người trực tiếp sản xuất không tuân thủ các qui định về vệ sinh.

Vi sinh vật tạp nhiễm có thể là vô hại, nhưng thông thường là gây hại. Trong số này, vi khuẩn là các vi sinh vật gây tác hại cho sản xuất nấm men là nhiều nhất. Chúng làm thay đổi mùi vị của dịch lên men, làm giảm độ bền và làm xấu màu, hương vị của sản phẩm. Nhiễm nhẹ các vi sinh vật tạp này cũng làm cho hiệu suất lên men giảm, vì chúng cạnh tranh dinh dưỡng cacbon (đường) với men giống.

Thành phần hệ vi sinh vật tạp nhiễm thay đổi trong quá trình sản xuất. Đầu tiên khi trong dịch lên men có nhiều chất dinh dưỡng, độ axit chưa cao (trừ trường hợp làm rượu vang) và có 1 ít oxy hoà tan tạo thuận lợi cho sự phát triển của các vi khuẩn gây hại. Ở lên men bia thường gặp là vi khuẩn lactic và vi khuẩn *Flavobacterium*. Ở lên men rượu cũng rất hay gặp các loài của vi khuẩn lactic từ khi chuẩn bị môi trường lên men, ngoài ra còn gặp vi khuẩn butyric và vi khuẩn axetic. Đặc biệt là khi môi trường lên men rượu đã tích tụ được một lượng rượu mà không đảm bảo kỵ khí để cho môi trường hiếu khí vi khuẩn axetic phát triển mạnh và oxy hoá rượu thành axit axetic - một loại axit bay hơi có vị chua khé và bốc mùi khó chịu. Trong lên men rượu vang ta cũng hay bắt gặp những loài vi khuẩn này. Nói chung, công nghiệp nấm men còn gặp nhiều loài vi khuẩn tạp nhiễm khác nữa.

9.1. VI KHUẨN LACTIC

9.1.1. Giới thiệu sơ giản về vi khuẩn lactic

Vi khuẩn lactic có tế bào dạng hình que và hình cầu, kích thước của chúng phụ thuộc vào môi trường và điều kiện nuôi cấy.

Dạng hình que có thể là ngắn gần như hình cầu, chiều dài khoảng $0,5 \div 0,7 \mu\text{m}$ và mọc thành sợi dài, đôi khi tới $8 \mu\text{m}$. Chúng đứng riêng rẽ, kết đôi hoặc kết thành chuỗi.

Dạng hình cầu còn có dạng ovan, đường kính $0,5 \div 0,6$ tới $1 \mu\text{m}$, đứng riêng lẻ hoặc kết đôi hay chuỗi. Chuỗi có chiều dài khác nhau.

Thành phần môi trường có ảnh hưởng đến hình dáng tế bào. Trong môi trường có hàm lượng rượu cao sẽ làm cho tế bào dài ra. Rượu etylic còn có tác dụng kìm hãm sự phân chia tế bào mạnh hơn so với sinh trưởng của vi khuẩn.

Các tế bào vi khuẩn lactic không chuyển động, không tạo thành bào tử, gram (+), không tạo thành sắc tố, không khử nitrat thành nitrit, không có hoạt tính catalaza.

Vi khuẩn lactic là thể kỵ khí, vi hiếu khí. Trong điều kiện kỵ khí chúng sinh trưởng và hoạt động mạnh, nhưng ở điều kiện hiếu khí chúng vẫn sống và hoạt động kém.

Vi khuẩn lactic sinh sản bằng cách phân cắt tế bào. Với điều kiện thuận lợi thời gian thế hệ của chúng chỉ là 15 phút, không thuận lợi - kéo dài tới 24 giờ.

9.1.2. Sinh lý vi khuẩn lactic

Vi khuẩn lactic hoạt động sống ở điều kiện kỵ khí, vì vậy đặc điểm cơ bản của vi này là không có catalaza. Song, những năm gần đây có một số thông báo tìm thấy hoạt tính enzym này ở một số chủng vi khuẩn lactic ở dạng *Pseudocatalaza*. *Pseudocatalaza* thấy ở một số loài thuộc các giống *Leuconostoc* và *Lactobacillus*.

Hoạt tính proteaza thấy ở cầu khuẩn, trực khuẩn và liên trực khuẩn (*Streptobacterium*), nhưng ở trực khuẩn thường có hoạt lực cao hơn, nhất là các chủng phân lập được từ ruột non bê nghé. Proteaza của vi khuẩn lactic gồm cả proteinaza, peptinaza.

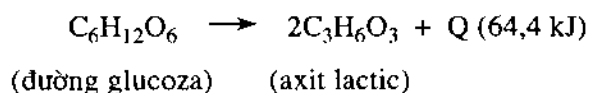
Hoạt tính lipaza của vi khuẩn lactic có ở nhiều chủng thuộc cầu khuẩn, trực khuẩn. Chế phẩm lipaza thu nhận được từ dịch chiết không có tế bào vi khuẩn dễ dàng phân huỷ những triglycerit đơn giản.

Hoạt tính hoá sinh của vi khuẩn lactic phụ thuộc vào đặc điểm sản phẩm lên men các loại đường C6 - đường đơn - hexoza (glucoza, fructoza, mannoza, galactoza), đường kép - disacarit (lactoza, maltoza, sacaroza) và polysacarit (dextrin, tinh bột). Dựa vào sản phẩm lên men chia thành lên men lactic đồng hình (homofermentation) và lên men dị hình (heterofermentation).

Sản phẩm lên men lactic đồng hình chủ yếu là (hoặc duy nhất) axit lactic (có thể có

một ít sản phẩm phụ); lên men lactic dị hình phần lớn là axit lactic, nhưng các sản phẩm phụ cũng khá lớn (tổng các sản phẩm phụ: axit lactic, axit propionic, succinic, cồn, CO₂... còn cao hơn axit lactic).

Phương trình biểu hiện lên men lactic đồng hình là như sau:

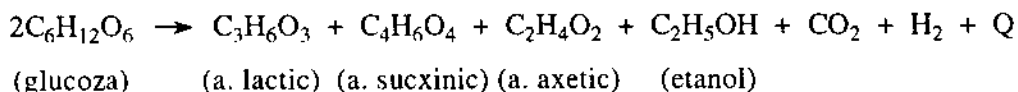


Như vậy, 100% đường glucoza được biến đổi thành axit lactic. Vi khuẩn lactic không chuyển hoá glucoza thành các vật liệu tế bào. Vi khuẩn sử dụng các axit amin có sẵn trong tế bào với tư cách vật liệu xây dựng tế bào để sinh sản và phát triển.

Quá trình lên men lactic diễn hình theo con đường Embden - Meyerhof - Parnas, giống như lên men rượu, đến axit pyruvic (CH₃COCOOH). Vì vi khuẩn lactic không có enzym cacboxylaza nên không chuyển axit pyruvic thành aldehyt axetic và CO₂ (và tiếp theo thành rượu etylic), nên chúng khử axit pyruvic thành axit lactic.

Như vậy, lên men đồng hình chỉ là trao đổi năng lượng, vi khuẩn không sử dụng glucoza để xây dựng tế bào, mà lại sử dụng các axit amin của cơ chất có sẵn trong môi trường.

Lên men lactic dị hình ngoài sản phẩm chính là axit lactic còn có các sản phẩm khác như axit axetic, succinic, etanol, CO₂ và H₂. Lên men dạng này khác với lên men dị hình là ở chỗ quá trình theo con đường pentozophosphat và có thể biểu diễn theo phương trình tổng quát như sau:



Axit pyruvic biến một phần thành aldehyt axetic và CO₂. Kết quả quá trình chuyển hoá aldehyt axetic và axit pyruvic là axit succinic, axetic và etanol được tạo thành.

Trong lên men dị hình axit lactic có thể tạo được từ 40% đường dùng cho lên men, axit succinic khoảng 20%, etanol - 20%, axit axetic - 10%, CO₂ - 20%.

9.1.3. Các sản phẩm trao đổi chất của vi khuẩn lactic

Các sản phẩm của vi khuẩn lactic là axit lactic (sản phẩm chính, ngoài ra còn có các axit bay hơi, etanol, diaxetyl và axetoin cùng một số chất khác nữa.

- Axit lactic: vi khuẩn lactic có thể tạo ra 2 dạng đồng phân quang học D(-) và L(+) từ đường. Các dạng đồng phân này được tạo ra phụ thuộc vào chủng giống vi khuẩn dùng trong lên men.

Lactobacillus casei chỉ tạo thành L(+) axit lactic. Tất cả các cầu khuẩn lên men dị hình và một vài chủng cầu khuẩn dị hình lại tạo thành D(-) lactic. Nhiều loài vi khuẩn lactic tạo thành hỗn hợp D(-) và L(+) axit lactic.

- Các polyol (rượu bậc cao): trong lên men glucoza và pentoza vi khuẩn lactic có thể tạo ra glycerin và 2,3-butadiol; fructoza - mannitol. Thành phần và chất lượng các rượu đa nguyên tử này tạo ra trong lên men trước hết là phụ thuộc vào chủng giống dùng trong lên men.

- Các axit bay hơi: các chủng vi khuẩn lên men dị hình thường tạo thành các axit bay hơi trong lên men dịch đường fructoza, arabinoza, xyloza mạnh hơn khi lên men từ axit xitric (yếu hơn). Hầu như các chủng đồng hình không tạo thành axit bay hơi khi lên men từ fructoza. Khi nuôi cấy với glycerin chỉ có chủng đồng hình mới tạo ra axit bay hơi. Trong lên men glucoza và axit malic tất cả các loài vi khuẩn lactic đều tạo thành một lượng nhỏ axit bay hơi. Các axit bay hơi ở đây chủ yếu là axit axetic, ngoài ra có thể có một lượng nhỏ axit propionic và các axit khác.

- Diacetyl và acetoin: trong sản xuất bia và rượu vang người ta rất quan tâm tới hai chất này. Chúng được tạo ra do các chủng nấm men và các chủng vi khuẩn lactic. Nói chung, trong lên men nhờ nấm men người ta không muốn sự có mặt của vi khuẩn lactic trong quá trình lên men và tăng trổ sản phẩm. Trong lên men rượu vang lại xảy ra quá trình malo-lactic. Đây là trường hợp duy nhất có lợi trong sản xuất vang nhờ vi khuẩn lactic (xem thêm phần lên men malo-lactic ở rượu vang). Trong rượu vang có quá trình lên men malo-lactic thì tổng lượng axit sẽ giảm và hàm lượng diacetyl acetoin sẽ cao tới 9 mg/l (còn ở vang không có lên men dạng này chỉ có 4,3 mg/l).

Diacetyl được xem như chất mùi, với nồng độ thích hợp nó sẽ làm tăng hương thơm, nhưng nếu cao quá sẽ có mùi bơ cho sản phẩm mà chúng ta không mong muốn. Giữa diacetyl và acetoin có mối quan hệ tương tác chặt chẽ và có ảnh hưởng lớn đến hương thơm của sản phẩm kể cả bia và rượu vang. Chúng ta có thể tham khảo về vấn đề này ở các chương trước.

9.1.4. Những yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn lactic

- Dinh dưỡng cacbon: Vi khuẩn lactic sử dụng nguồn năng lượng chính từ các nguồn đường mono- và disacarit như glucoza, lactoza, sacaroza, maltoza và các axit hữu cơ như axit xitric, malic, pyruvic, fumaric... làm nguồn năng lượng và trao đổi cấu trúc. Khi không có mặt cơ chất nguồn cacbon vi khuẩn sẽ sử dụng nguồn năng lượng và vật liệu tế bào là các axit amin (axit glutamic, arginin, tirozin...). Khi axit amin được sử dụng, CO₂ sẽ tách ra ngoài. Như là một qui luật, các vi khuẩn không sử dụng được nguồn cacbon là polysacarit (ngoại trừ một loài *Lactobacillus delbrueckii*). *L. delbrueckii* có thể đồng hoá được tinh bột. Loài này có thể phát triển ở nhiệt độ cao (50°C) và gần đây nó còn có tên *L. thermophilus*).

- Dinh dưỡng nitơ: Theo nhu cầu nguồn dinh dưỡng nitơ vi khuẩn lactic có thể chia làm 3 nhóm:

- + Các phức hợp axit amin (nhóm vi khuẩn lactic chịu nhiệt *Thermobacterium*);
- + Phát triển trên môi trường có sixtein và muối amoni (nhóm *Streptobacterium*);

+ Phát triển trên môi trường có nguồn nitơ duy nhất là muối amoni (nhóm *Streptococcus*).

Do phần lớn vi khuẩn lactic không có khả năng tổng hợp được các dạng nitơ hữu cơ phức tạp, vì vậy chúng cần hỗn hợp các axit amin, dịch thủy phân protein từ casein, bột đậu tương, khô lạc... làm nguồn pepton, peptit và những hợp chất axit amin khác nhau có trong môi trường.

- Nguồn vitamin: Vi khuẩn lactic nói chung, đặc biệt là trực khuẩn rất cần vitamin làm nguồn chất sinh trưởng.

Người ta xác định được rằng, yêu cầu về vitamin riêng biệt của vi khuẩn lactic có thể thay đổi khi trong môi trường có các axit amin hoặc axit béo và deoxyribozit khác nhau. Kiềm purin cũng ảnh hưởng tới nhu cầu của vi khuẩn về axit n-aminobenzoic, nhu cầu về axit folic giảm nhiều nếu như môi trường có chứa tất cả các axit amin đã biết; timin hoặc timidin, kiềm purin được tổng hợp nhờ vi khuẩn trong sự tham gia của axit folic.

- Các chất nitơ: Để phát triển và hoạt động sống các vi khuẩn lactic cũng cần các hợp chất vô cơ như đồng, sắt, natri, phospho, iot, lưu huỳnh, mangan, đặc biệt là mangan có tác dụng phòng ngừa tế bào bị tự phân.

Vi khuẩn làm giảm độ axit có trong môi trường cần có phức hợp các chất khoáng. Cầu khuẩn lên men lactic dị hình không phát triển được ở môi trường đã làm sạch các chất khoáng nhờ trao đổi ion. Khi vi khuẩn đã kém hoạt lực có thể cho chúng hoạt hoá ở môi trường đã được bổ sung những ion K^+ cùng Mg^{2+} hoặc Mn^{2+} .

Các dịch cà chua, dịch quả v.v... làm nguồn vitamin rất tốt.

- Oxy: Vi khuẩn lactic không có hệ enzym xitochrom tham gia vào hô hấp, nhưng chúng lại thực hiện được hô hấp nhờ hoạt tính của một số hợp chất có mặt của hệ flavoprotein.

Quan hệ giữa các loài vi khuẩn với oxy ở mức độ hiếu khí của môi trường khác nhau là rất khác nhau, thậm chí còn đối nghịch nhau nữa. Trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt chỉ làm cho trực khuẩn lên men dị hình chậm phát triển khi ban đầu, còn đối với trực khuẩn lên men đồng hình sinh trưởng bị giảm 10%, lên men giảm 23%.

Các loài lên men dị hình sinh trưởng tốt nhất ở điều kiện kỵ khí, các loài không sử dụng pentoza thì phát triển rất kém trong điều kiện này.

- Nhiệt độ: Nhiệt độ tối thích cho vi khuẩn lactic phát triển là $25^{\circ}C$, đại bộ phận vi khuẩn lactic bị chết từ $45^{\circ}C$ trở lên, riêng loài *Lactobacillus delbrueckii* là loài chịu nhiệt ở nhiệt độ $50^{\circ}C$ phát triển và hoạt động mạnh mẽ. Các chủng men rượu vang ở nhiệt độ $10 - 15^{\circ}C$ còn tiến hành lên men và ở nhiệt độ dưới $10^{\circ}C$ trong khi tàng trữ còn có thể giúp cho vang hoàn thiện.

- pH môi trường: Các chủng vi khuẩn lactic chịu được pH thấp khác nhau, đối với vi khuẩn tách từ rượu vang có thể chịu được pH 3 ÷ 3,5 hoặc thấp hơn, các chủng tách từ dưa, mấm chua chịu được pH 3,7 trở lên v.v...

Chịu được axit nhiều hơn cả là các cầu khuẩn lên men dị hình, ít hơn là các trực khuẩn lên men dị hình. Các trực khuẩn lên men đồng hình chiếm vị trí trung gian.

9.1.5. Các vi khuẩn lên men lactic gây hại trong công nghiệp nấm men

- *Lactobacillus*: Trực khuẩn lactic là tác nhân gây hại bậc nhất cho sản xuất nấm men, chúng làm chua dịch đường, chiếm đoạt hàm lượng đường trước khi được men sử dụng. Chúng rất phổ biến trong tự nhiên và rất dễ nhiễm vào dịch lên men cũng như sản phẩm.

Lactobacillus có tế bào hình que (hoặc que ngắn gần như hình cầu), kích thước khác nhau, gram (+), không tạo thành Catalaza. Chúng sống kỵ khí, không tạo thành bào tử. Dạng chuỗi thường gặp là do 2 ÷ 3 tế bào nối tiếp với nhau. Chúng có nhu cầu dinh dưỡng là hỗn hợp các chất phân huỷ từ protein, đường, các nhân tố sinh trưởng và muối khoáng. Chúng thường có mặt trong không khí, trong ống dẫn dịch đường, trong các thùng chứa đựng. Chúng có thể nhiễm vào men giống khi nhân giống trong phòng thí nghiệm.

- *Thermobacterium cercale* (tên cũ là *Lactobacillus delbrueckii*):

Trực khuẩn chịu nhiệt, dài từ 2,8 đến 7,0 μm . Các tế bào đứng riêng rẽ hoặc kết đôi (thường kết đôi) theo một góc hoặc thẳng, đôi khi kết thành chuỗi (hình 9.1), chúng không chuyển động, không tạo thành bào tử, rất yêu cầu về dinh dưỡng. Chúng có hoạt tính amylaza, vì vậy có thể phát triển ở dịch tinh bột. Chịu nhiệt: các tế bào của loài này có thể sinh trưởng ở dịch đường 50 ÷ 54°C, gây ra mùi chua thiu. Chúng rất nhạy cảm với hoa hublon. Trong dịch đường malt-hublon hoặc bia chúng không phát triển.



Hình 9.1. *Lactobacillus delbrueckii*
(*Thermobacterium cercale*)

- *Lactobacillus pasteurianus* (hình 9.2a):

Tế bào hình que, trong dịch đường và sản phẩm chúng có chiều dài khác nhau, làm đục dịch nhẹ. Vi khuẩn này lên men lactic đồng hình, pH thích hợp là 4,0 ÷ 5,0 và hoạt động bình thường ở khoảng nhiệt độ 11 ÷ 37°C, ở nhiệt độ thấp hơn bị ức chế nhẹ. Loài này có hoạt tính proteaza và sẽ tăng lên khi trong môi trường thiếu nitơ tiêu hoá và tăng nồng độ các hợp chất N hoà tan trong dịch. Như vậy là làm tăng điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn này phát triển. Chúng khá bền trong môi trường axit. Khi nhiễm vào men giống sẽ phát triển và tích tụ cùng men giống và có thể làm chết một phần men giống. Hình 9.2b giới thiệu *L. plantarum*, hình 9.2c- *L. brevis*.



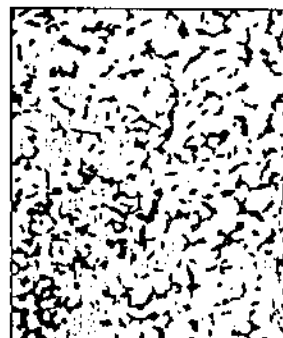
Hình 9.2a

Lactobacillus pasteurianus



Hình 9.2b

Lactobacillus plantarum

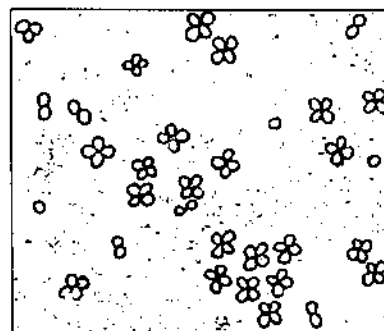


Hình 9.2c

Lactobacillus brevis

- *Pediococcus* (hình 9.3): Thuộc giống này là những vi khuẩn hình cầu, gram (+), không sinh bào tử, không chuyển động, đứng riêng lẻ hay kết đôi, kết ba, kết bốn hoặc kết thành chùm, đôi khi thành chuỗi. Chúng là các thể kỵ khí và vi hiếu khí, thường yêu cầu CO_2 cho phát triển, tạo thành D(-) hoặc cả D(-) và L(+) axit lactic, không khử nitrat thành nitrit, không phân huỷ được gelatin, chủ yếu là không tạo thành catalaza, lên men đồng hình.

Một số chủng tạo thành màng nhầy từ sacaroza. Trong rượu vang gặp loài *Pediococcus cerevisiae* lên men đồng hình, không sử dụng được pentoza, thường xuyên lên men được từ glucoza, fructoza, mannoza, xenbioloza, trehaloza.



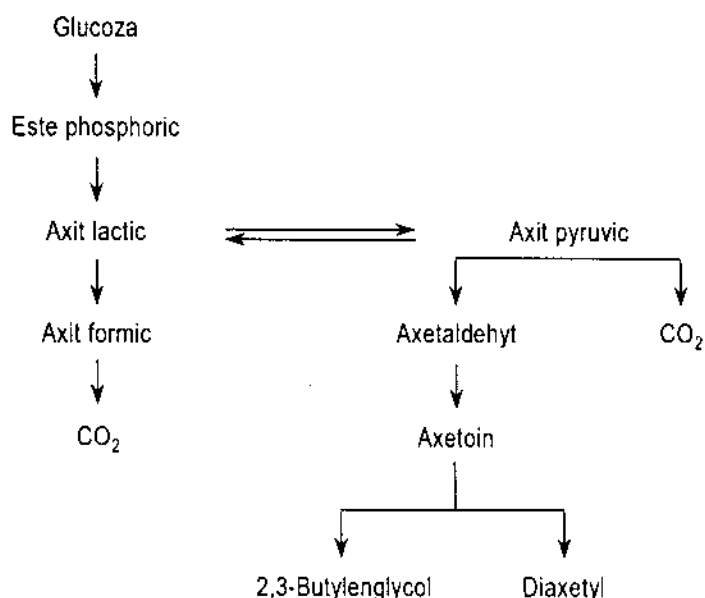
Hình 9.3. *Pediococcus*

Cấu khuẩn lên men lactic đồng hình từ pentoza thuộc loài *Pediococcus pentosaceus*. Nhiệt độ tối thích cho *Pediococcus* phát triển là $25 \pm 32^\circ\text{C}$ và khoảng nhiệt độ phát triển của giống này là $7 \pm 45^\circ\text{C}$. Ở môi trường có 8% rượu etylic chúng vẫn có thể phát triển được, nhưng cao hơn sẽ bị ức chế. Vì vậy, giống này gây hại cho dịch lên men rượu, bia nói chung và vang non lên men khi chưa tích tụ được độ cồn trên 8°. Trong dịch đường, dịch lên men và bia thành phẩm nhiễm các chủng của giống này thường bị đục, vẩn cặn, axit lactic được tạo thành làm chua dịch và sinh ra diacetyl.

Cặn dịch lên men do vi khuẩn tạo thành ở dạng hạt nhỏ, đôi khi làm nhớt dịch, làm sai lệch mùi vị của sản phẩm (có vị khó chịu và có mùi mật ong do diacetyl gây ra).

Ngoài gây ra mùi lạ diacetyl còn có ảnh hưởng tới nấm men, làm cho nấm men bị lắng cặn quá sớm và bị chết.

Sơ đồ tạo thành diacetyl do *Pediococcus* có thể là như sau:



Trị số pH của dịch lên men rượu, bia và sự có mặt của các sản phẩm phân huỷ protein có ảnh hưởng nhiều đến sự phát triển của *Pediococcus*. Trong thóc malt có hoạt tính proteaza yếu protein sẽ chỉ phân giải tới albumoz và peptit. Những chất này sẽ là dinh dưỡng rất tốt cho *Pediococcus*. Phần maltoza không được lên men, pentoza, cũng như oxy của không khí kích thích phát triển những chủng loài thuộc giống này và tạo ra diaxetyl.

Pediococcus phát triển thường có mặt ở nấm men, vì chúng không tổng hợp được một số chất cần thiết cho đời sống của mình như các vitamin B₁, B₂, B₃... mà phải nhờ nấm men.

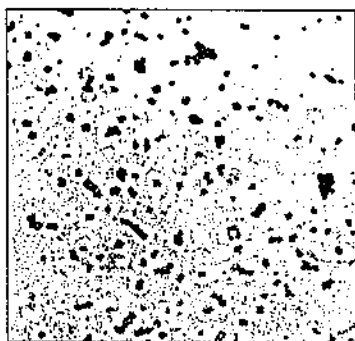
Có hai loài *Pediococcus* gây hỏng bia: *Pediococcus demnosus* (tạo thành cặn trong bia) và *P. pernixinosus* (gây đục bia hoặc nước quả). Một vài loài *Pediococcus* tạo nhớt, thậm chí còn làm cho dịch đường, dịch lên men, bia và vang non thành một khối nhầy mà không phụ thuộc vào sự có mặt O₂ của không khí và độ bão hoà CO₂ có trong dịch.

- *Leuconostoc* (hình 9.4a): Các tế bào thuộc giống này hình cầu, lên men dị hình, hình trứng dài, đứng riêng rẽ, kết đôi hoặc thành chuỗi ngắn, có khả năng tạo NH₃ từ asparagin và không có catalaza.

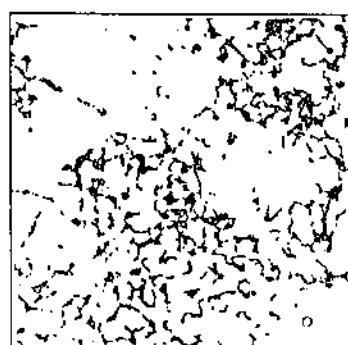
Sản phẩm lên men của các chủng thuộc giống này đều sinh ra axit lactic cùng với CO₂, etanol, các axit hữu cơ bay hơi. Một số chủng còn tạo thành mannit từ fructoza. Chúng có thể phát triển được ở 10°C, nhưng ở trên 45°C bị ức chế. *Leuconostoc venos* và *Leuconostoc gracile* được giới thiệu ở hình 9.4b và 9.4c.



Hình 9.4a
Leuconostoc



Hình 9.4b
Leuconostoc venos (x+) (x1000)



Hình 9.4c
Leuconostoc gracile (x1000)

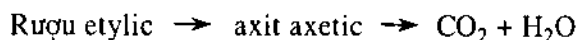
9.2. VI KHUẨN AXETIC VÀ NHỮNG VI KHUẨN TẠP NHIỄM KHÁC

Vi khuẩn axetic (*Acetobacterium*) gram (+), hiếu khí, không tạo thành bào tử. Một số là trực khuẩn, một số khác là que ngắn gần giống hình cầu (hình 9.5). Chúng dễ nhiễm vào dịch đường, dịch quả. Nhiệt độ cho sự phát triển của chúng là $5 \div 40^{\circ}\text{C}$, chịu được axit, do vậy có thể phát triển ở pH $3,2 \div 3,45$. Chúng không nhạy cảm với hublon. Trên bề mặt dịch vi khuẩn này tạo thành màng màu trắng ngà hoặc xám. Người ta thường gọi màng này là “cái giấm”.

Vi khuẩn axetic không yêu cầu nhiều về dinh dưỡng. Chúng có thể phát triển ở môi trường có mặt nitơ ở dạng một axit amin (glutamin, axit asparatic hoặc prolin). Một vài loài trong giống này cần có các chất sinh trưởng trong môi trường. Nguồn cacbon đối với giống này là rượu etylic và đường. Vì vậy, các dịch lên men rượu, dịch đường malt, dịch quả, bia và rượu vang rất thích hợp đối với chúng, đặc biệt ở điều kiện hiếu khí chúng phát triển mạnh để làm chua môi trường.

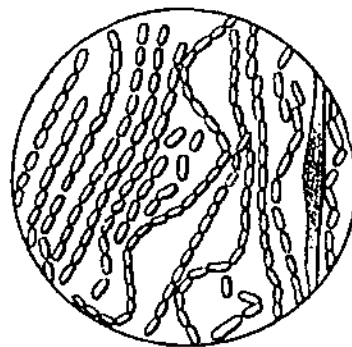
Vi khuẩn axetic có loài chuyển động có loài không. Người ta thường chia giống này thành hai phân giống:

- *Acetobacter* có khả năng mọc tiên mao đều khắp, oxy hoá rượu etylic thành axit axetic rồi thành CO_2 và nước:



Lên men axit axetic (hay là quá trình làm giấm) nhờ giống vi khuẩn này là quá trình oxy hoá rượu etylic không hoàn toàn.

- *Acetomonas*: tiên mao mọc ở đầu tế bào, chỉ oxy hoá rượu etylic đến axit axetic rồi thôi:



Hình 9.5. *Acetobacterium*

Tính chất chung của vi khuẩn axetic là dễ thay đổi hình dáng. Chúng có thể sinh trưởng ở dịch đường, dịch quả, bia và rượu vang, kể cả khi trong dịch có ít oxy hoà tan. Chúng phát triển ở trong dịch, bám vào thành dụng cụ, chai lọ chứa đựng và sống cùng với men giống đưa vào sản xuất. Trong thiên nhiên dễ gặp các vi khuẩn này ở không khí, ở vỏ quả và rất dễ phát triển ở các loại dịch quả chứa nhiều đường.

Có hai loài vi khuẩn axetic khá nguy hiểm đối với công nghệ nấm men là *Acetobacterium capsulatum* và *A. viscorum*. Chúng làm cho dịch đường và bia thành thể nhầy, thậm chí ngay cả trong chai thành phẩm bị hạn chế oxy. Trong khi sinh trưởng chúng tạo thành polysacarit - polyme sinh học dạng giêlatin thường gọi là dextran hoặc tạo thành màng nhầy trên mặt dịch. Hai loài này có nhiệt độ sinh trưởng thích hợp là 30°C và 25°C.

Nếu dịch có độ cồn trên 6% thì các vi khuẩn này không thể phát triển được.

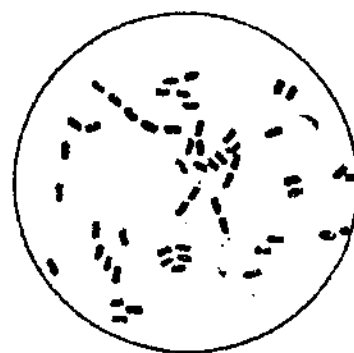
Vi khuẩn axetic sẽ phát triển rất mạnh, nếu trong dịch lên men chưa đạt 6% rượu etylic hoặc bia thành phẩm đóng chai, vào bom (bock) không đầy, trên mặt nhiều oxy hoặc khi chai, thùng đã dùng xong nhưng chưa rửa ngay mà trong đó còn sót lại một ít dịch đường hoặc bia, hoặc rửa không sạch. Ở nhiệt độ 25 + 40°C sẽ thúc đẩy chúng sinh sản khá nhanh.

• **Nhóm vi khuẩn đường ruột:** Trong các dịch đường và dịch lên men rất có thể nhiễm các vi khuẩn đường ruột. Các vi khuẩn này thường có mặt ở trong nước, nhưng nguyên nhân sâu xa là từ phân người và phân gia súc nhiễm vào nước hoặc qua một khâu trung gian là từ đất vào nước. Khi chúng phát triển làm cho các loại dịch bị đục mạnh, làm giảm hoạt tính của men giống trong quá trình lên men.

Nhóm trực khuẩn đường ruột, đại diện là *Escherichia coli* (*E. coli*).

* *E. coli* (hình 9.6) là trực khuẩn ngắn, kích thước: $(1,1 \div 1,5) \times (2 \div 6) \mu\text{m}$, không sinh bào tử, gram (-), hiếu khí hoặc kỵ khí tùy tiện. Trong sản xuất *E. coli* thường nhiễm vào dịch đường và dịch lên men từ nước không đạt yêu cầu vệ sinh, từ men giống, từ quần áo, giày dép, từ tay (không rửa sạch khi đại tiện) của công nhân, từ thùng đựng, từ thiết bị, từ hệ thống đường ống bị nhiễm bẩn v.v...

Trong quá trình lên men ở giai đoạn lên men chính nhóm này không phát triển, thậm chí có thể bị giảm về số lượng vì pH dịch lên men không thích hợp với chúng, nhưng ở pH cao hơn ở giai đoạn lên men phụ và tàng trữ sẽ phát triển gây đục sản phẩm, có khi còn làm chua sản phẩm vì chúng có thể tạo thành axit lactic từ đường. Số lượng của chúng phụ thuộc nhiều vào pH môi trường, nhiệt độ lên men, vào thời gian, vào mức độ nhiễm ban đầu. Các *E. coli* đều chịu được môi trường axit và chịu được nhiệt độ lạnh hơn hẳn



Hình 9.6. Trực khuẩn đường ruột

nhiều vi khuẩn khác, ở $5 \div 12^{\circ}\text{C}$ chúng vẫn sinh sản. Chúng rất nhạy cảm khi thanh trùng.

Nhóm vi khuẩn đường ruột gồm 4 phân nhóm: *Escherichia coli commue*; *Escherichia coli citrovorum*; *Escherichia coli aerogenes* và *Escherichia paracoli*.

Trong số này phân nhóm *E. coli aerogenes* có tính chất sinh lý quan trọng được dẫn ở bảng 9.1.

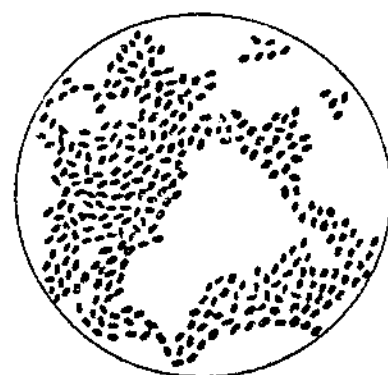
Bảng 9.1. Đặc tính của *E. coli* phân lập từ các nguồn khác nhau

Vi khuẩn <i>E. coli</i> được phân lập từ nguồn	Nhuộm gram	Lên men lactoza	Tạo thành indol	Phản ứng với metyl đỏ	Sử dụng natri xitrat	Phân huỷ giêlatin	Tạo thành H_2S
Dịch đường	—	+	+	+	—	—	—
Men sản xuất	—	+	—	+	+	—	+
	—	+	+	+	—	—	+
	—	+	+	+	—	—	+
	—	+	+	+	—	—	+
	—	+	+	+	—	—	—
Bia thành phẩm	—	+	+	+	—	—	+
	—	+	+	+	—	—	+

Qua bảng ta thấy *E. coli* có hầu hết tính chất là như nhau, không phụ thuộc vào nơi chúng được phân lập ra, như dịch đường, dịch lên men từ bia thành phẩm, từ men giống sản xuất. Chúng đều không bắt màu khi nhuộm gram, có khả năng lên men lactoza, tạo thành indol, cho phản ứng dương tính với metyl đỏ, không đồng hoá được natri xitrat, không phân huỷ được giêlatin và tạo thành H_2S (trừ hai chủng).

• **Flavobacterium**: là trực khuẩn lớn, nhưng ngắn, có chiều dài tới $4\ \mu\text{m}$ (hình 9.7), gram (+), không tạo thành bào tử, phản ứng catalaza âm tính, kỵ khí tùy tiện, không nhạy cảm với hublon, phát triển tốt nhất ở pH 5 và ở nhiệt độ $30 \div 35^{\circ}\text{C}$. Vi khuẩn này rất dễ sử dụng đường glucoza, fructoza có trong dịch quả hoặc dịch đường malt, nhưng không sử dụng được maltoza. Trong những ngày đầu chúng nhiễm vào môi trường nuôi cấy sẽ phát triển làm cho pH giảm nhanh tới $4,4 \div 4,5$ rồi phát triển chậm lại. Ở pH 2 hoặc thấp hơn vi khuẩn này không phát triển và kết lắng.

Dịch đường hoặc dịch lên men, bia và vang thành phẩm bị nhiễm *Flavobacterium* sẽ bị đục, có mùi H_2S nhẹ và có mùi táo. Chúng có thể sử dụng đường glucoza và fructoza tạo thành rượu và CO_2 . Khi gia nhiệt tới 60°C và giữ 5 phút vi khuẩn này sẽ chết.



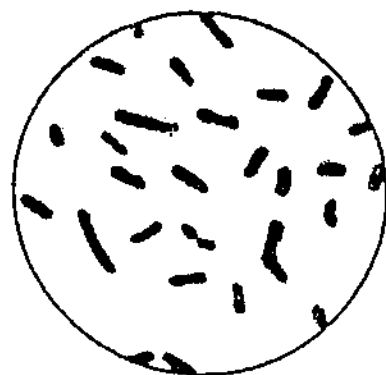
Hình 9.7. *Flavobacterium*

Flavobacterium thường nhiễm vào men sản xuất, thậm chí khi dùng men thuần chủng, rửa kỹ và thanh trùng các đồ chứa đựng cũng như thiết bị vẫn còn tìm thấy trong men giống. Thông thường tỷ lệ nhiễm vào khoảng 0,05% (tìm thấy 5 tế bào vi khuẩn trong 10 ngàn tế bào nấm men). Người ta qui định: cho phép nhiễm vi khuẩn này không quá 5%.

Phát triển của khuẩn này còn phụ thuộc vào hoạt tính của nấm men, vào số lượng ban đầu của vi khuẩn và tốc độ giảm pH trong lên men.

• ***Zimomonas*** (còn gọi là *Achromobacter*) (hình 9.8)

Năm 1952 Endrus và Gillilend đã hợp nhất các vi khuẩn có một tính chất chung là khả năng lên men rượu từ glucoza vào một giống gọi là *Zimomonas*. Đó là các trực khuẩn, gram (-), không sinh bào tử, phản ứng catalaza âm tính. Sống kỵ khí điển hình, nhưng vẫn chịu được khi môi trường có một lượng không lớn không khí. Vi khuẩn này phát triển ở khoảng pH rộng ($3,4 \div 7,5$) và sau $2 \div 3$ ngày làm bia kém phẩm chất. Chúng chịu được hublon và nhiệt độ thấp, tạo thành rượu etylic, axetaldehyt và CO_2 từ glucoza. Khi vi khuẩn này phát triển sẽ làm cho dịch hoặc thành phẩm (bia) bị đục và có mùi khó chịu.



Hình 9.8. *Zimomonas*

Đại diện của giống này là *Zimomonas anaerobia* - trực khuẩn có chiều dài $2 \div 10 \mu\text{m}$ và dày là $1 \div 1,5 \mu\text{m}$.

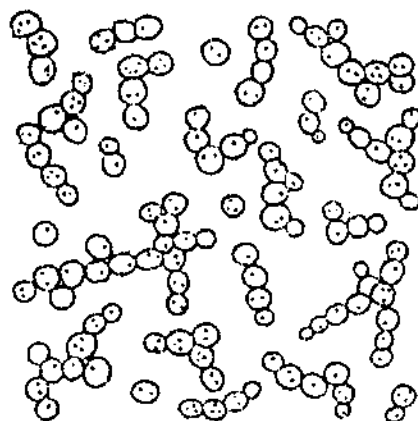
Các vi khuẩn tạp nhiễm trong sản xuất nấm men, đặc biệt là ở bia, được giới thiệu ở bảng 9.2.

9.3. TẠP NHIỄM NẤM MEN

Trong sản xuất nấm men người ta thường dùng một chủng thuần khiết hoặc hỗn hợp $2 \div 3$ chủng làm men giống. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy có thể bị nhiễm những men khác với men giống, thậm chí cả những loài gần gũi với men giống, đều là những nấm men tạp nhiễm và được gọi là “men dại”.

9.3.1. *Torulopsis* (hình 9.9)

Ở các nhà máy bia gặp đại diện của giống này là *Torula bia*. Nó gồm một số loài. Kích thước, màu sắc và hình dáng của chúng rất đa dạng. Chúng có màu vàng, đỏ, hồng. Tính chất cơ bản khác với giống *Saccharomyces* là không có khả năng tạo thành bào tử



Hình 9.9. *Torula bia*

Bảng 9.2. Một số vi khuẩn tạp nhiễm trong sản xuất nấm men

Tên vi khuẩn	Hình dạng và kích thước, μm	Đặc điểm						Sản phẩm trao đổi chất	Dấu hiệu làm hỏng sản phẩm		
		Dấu hiệu		Với các tác nhân bên ngoài							
		Gram	Catalaza	Bào tử	Huỷlon	Rượu	Độ axit của môi trường			Nhiệt độ $^{\circ}\text{C}$	Với oxy
<i>Lactobacillus pasteurinus</i>	Trục khuẩn (0,5 - 1) $\times$ (7 - 35)	+	-	-	bén (chịu đựng được)	bén (chịu đựng được)	bén	11 - 37	hiếu khí	axit lactic, axetic, formic, rượu, CO_2	chua thiu, làm đục nhẹ
<i>Delbrueckii</i>	Trục khuẩn, 2,8 $\times$ 7	+	-	-	không chịu đựng được	»	»	50 - 54 (chịu nhiệt)	kỵ khí	axit lactic	làm chua thiu
<i>Pediococcus secerisiae</i>	Cầu khuẩn, xếp đôi, xếp tư, kết chuỗi hoặc chùm	+	-	-	không bén, nhưng dần có thể bén	chịu đựng được ở nồng độ 8%	»	tối thích 21 - 25	»	axit lactic, diacetyl và ...	làm chua thiu, vẫn cân
<i>damnosus</i>	»	+	-	-	»	»	có thể làm giảm pH tới 3,8 - 4,0	»	»	»	lúa
<i>pernicius</i>	»	+	-	-	»	»	phát triển ở pH 3,5	»	»	»	đục
Vi khuẩn axetic <i>Axetobacter aceti</i>	Trục khuẩn, 1 $\times$ 2	-	+	-	bén	không phát triển ở nồng độ cồn $\geq 6\%$	bén	8 - 36	hiếu khí	axit axetic	chua thiu
<i>mobile</i>	»	-	+	-	»	»	»	7 - 42	»	»	»
<i>pasteurianas</i>	Trục khuẩn, (0,4 - 0,8) $\times$ 1	-	+	-	»	»	»	5 - 40	»	»	»
<i>xylium</i>	Trục khuẩn ngắn	-	+	-	»	»	»	»	»	»	chua, đục, nhớt
<i>capsulatum</i>	Gắn như cầu khuẩn (0,6 - 1)	-	+	-	»	»	»	»	»	»	»
<i>vicosum</i>	»	-	+	-	»	»	»	»	»	»	»
<i>turbilas</i>	»	-	+	-	»	»	phát triển ở 13 $^{\circ}\text{C}$	»	»	»	»
<i>Zimmonas anatrobina</i>	Trục khuẩn, (1 - 1,5) $\times$ (2 - 10)	-	-	-	»	»	bén, phát triển pH 3,4 - 7,5	ở 60 $^{\circ}\text{C}$ chết sau 5 phút	kỵ khí	etanol, aldehyt, axetic, CO_2	đục và những mùi vị lạ
<i>Proteus</i>	Trục khuẩn, (0,8 - 1,0) $\times$ (1,5 - 4)	-	-	-	»	»	tối ưu ở pH5, < pH4 không phát triển	bén ở 1 $^{\circ}$ thấp, ở 54 $^{\circ}\text{C}$ chết sau 5 phút	kỵ khí tùy tiện		nhễm từ men giống

và lên men yếu. Hình dáng tế bào thường có dạng tròn, trong tế bào chất thường chứa các hạt chất béo làm khúc xạ ánh sáng. Tế bào *Torula* có kích thước nhỏ: $(2,5 \div 5) \times (5 \div 8) \mu\text{m}$. Chúng có thể phát triển trong dịch đường, bia làm đục môi trường và làm giảm hương vị sản phẩm.

Trong các dụng cụ chứa đựng như thùng bock đựng bia *Torula* bị chết rất sớm so với giống nuôi cấy. Điều nguy hiểm là những men này chết sẽ làm nguồn dinh dưỡng cho vi khuẩn *Pediococcus* và vi khuẩn này sẽ phát triển rất mạnh.

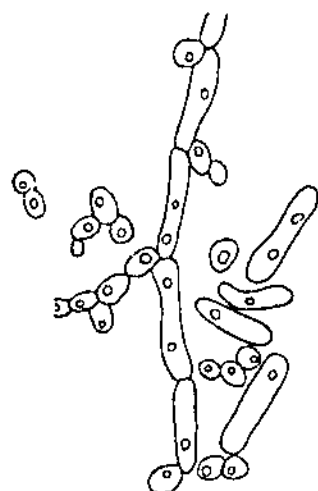
Torula thường gặp trong không khí, trên vỏ quả, trên hạt mạch xanh.

9.3.2. *Candida* (trước đây gọi là *Micoderma*)

Nấm men tạo màng, phát triển chủ yếu trên mặt dịch đường hoặc bia, tạo thành màng màu trắng. Tế bào hình ovan hoặc hình trụ, đôi khi rất dài (hình 9.10): $(2 \div 5) \times (4 \div 16) \mu\text{m}$, thường gặp ở dạng khúc giò chiều dài tới $20 \div 25 \mu\text{m}$.

Trên môi trường đặc *Candida* tạo thành khuẩn lạc phân nhánh mạnh có màu kem trắng mịn, không bóng láng. Men này phát triển ở dịch đường và bia tạo màng và tạo cặn. Không sinh bào tử, không lên men đường. Nguồn cacbon dinh dưỡng là glucoza, fructoza, sacaroza, maltoza, rượu và các axit hữu cơ.

Candida thường gặp trong sữa, trong không khí, trong bột nhào bị chua. *Candida* hiếu khí, không thể phát triển trong điều kiện thiếu oxy (trong các thùng lên men đang bão hoà CO_2 , trong các loại chai chứa thành phẩm đóng đầy, nút kín). Khi men này phát triển trong bia làm bia có mùi vị khó chịu.



Hình 9.10. *Candida*

9.3.3. *Pichia*

Tế bào có hình ovan hay elip, đứng đơn hoặc kết đôi hay thành chuỗi ngắn (hình 9.11), kích thước $(3 \div 6) \times (4 \div 7,5) \mu\text{m}$. Trên môi trường đặc *Pichia* tạo thành khuẩn lạc vàng bóng, nhẵn, đôi khi nhẵn nheo. Trong môi trường lỏng tạo thành cặn vẩn. Không sinh bào tử. Có khả năng lên men và đồng hoá glucoza, galactoza, sacaroza và maltoza, cũng sử dụng được rafinoza. Trong dịch đường nấm men này sinh sản và phát

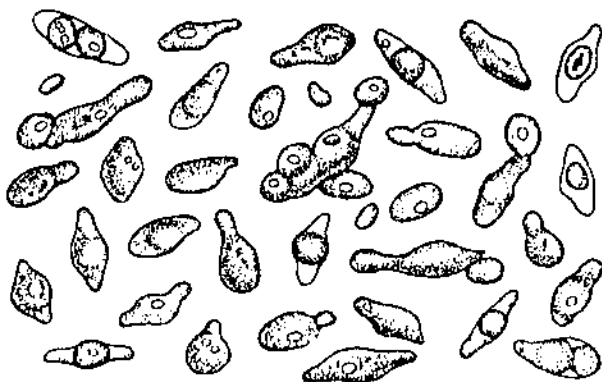


Hình 9.11. *Pichia*

triển trên bề mặt và tạo màng. Trong bia chúng sinh ra các axit bay hơi và các chất khác cho mùi vị este hoa quả và thảo dược. Khi có mặt thoáng trong chai, thùng chứa chúng phát triển làm cho bia bị đục và giảm chất lượng.

9.3.4. *Apiculatus* (hay *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, men đầu nhọn)

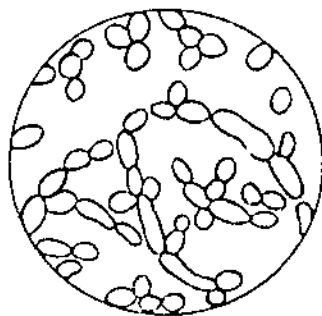
Tế bào hình quả chanh (*) hay hình chùy, một đầu hoặc hai đầu nhọn, đứng đơn hoặc kết đôi hoặc thành chuỗi (hình 9.12). Kích thước $(2 \div 4) \times (5 \div 8) \mu\text{m}$. Khuẩn lạc mọc trên môi trường đặc có màu kem xám, nhẵn bóng. Phát triển ở dịch quả, dịch đường malt tạo cặn và có vòng bên thành đồ chứa đựng. Men này sinh sản nhanh hơn với men giống và ức chế men giống. Khá phổ biến trong tự nhiên, thường gặp ở các loại quả có chứa đường glucoza và fructoza, không sinh bào tử, không lên men hoặc lên men yếu. Sản phẩm trao đổi chất của chúng ức chế men giống. Men này nhạy cảm với sulfit.



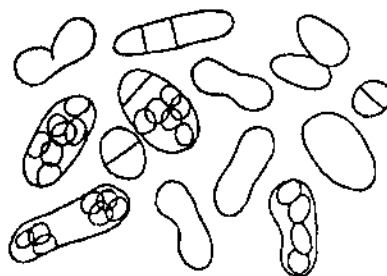
Hình 9.12. *Apiculatus* (*Hanseniaspora*, *Kloeckera*)

9.3.5. *Monilia* (hình 9.13)

Tế bào men này hình tròn kéo dài thành khuẩn ti và thành những tế bào tương tự nấm men. Kích thước: $(2 \div 3) \times (5 \div 8) \mu\text{m}$. tế bào sinh sản bằng nảy chồi, không tạo thành bằng bào tử, có khả năng lên men dịch đường. *Monilia* thường gặp ở hạt malt vỡ, ở dịch lên men và bia. Men này rất bền với các chất sát khuẩn. Khi phát triển trong dịch tạo màng và cặn, làm giảm chất lượng bia thành phẩm. Nhiễm vào dịch quả từ vỏ quả hoặc thùng chứa đựng. Phát triển trong vang gây ra mùi chuột.



Hình 9.13. *Monilia*



Hình 9.14. *Schizosaccharomyces*

(*) Hình quả chanh ở quyển sách này là hình quả chanh ở vùng Địa Trung Hải.

9.3.6 *Schizosaccharomyces*

Schizosaccharomyces sinh sản bằng cách phân cắt tế bào. Tế bào khá to, hình trụ hoặc hình ovan, kích thước $(3,2 \div 4,6) \times (12 \div 26) \mu\text{m}$ (hình 9.14). Trong dịch đường lên men mạnh, tạo ra được tới 12° cồn. Trong dịch quả men này phát triển và phân huỷ hoàn toàn axit malic thành CO_2 và nước, ngoài ra còn làm giảm khá mạnh độ chua của dịch. Nguồn nhiễm từ vỏ quả hoặc từ dụng cụ chứa đựng.

Các nấm men đại trong sản xuất nấm men được giới thiệu ở bảng 9.3.

9.4. NẤM MỐC

Trong công nghiệp nấm men thường bị nhiễm nấm mốc, đặc biệt là khâu nguyên liệu có chứa tinh bột (gạo, ngô, sắn, thóc malt...) và trong kho tàng lưu giữ sản phẩm cũng như đồ chứa đựng. Các sản phẩm nấu từ nguyên liệu bị mốc hoặc sản phẩm nhiễm mốc thường có mùi vị của mốc rất khó chịu, làm giảm chất lượng cảm quan và giá trị của sản phẩm.

Nấm mốc là các thể vi nấm. Chúng ít đòi hỏi về độ ẩm. Chúng có thể mọc ở khắp mọi nơi, ở thành dụng cụ, tường kho, các thùng, bình chứa đựng, đường ống v.v... Ở mọi nơi mà ở đó còn đọng ít nguyên liệu, một ít dịch đường, một ít vang, một ít bia. Chúng có thể mọc trên bề mặt bia, rượu vang trong kho chứa, trong bình - thùng chứa, trong chai (nếu còn một ít không khí).

Nấm mốc hiếu khí. Tế bào nấm mốc có vỏ, trong tế bào chất có nhân và nhân con, có các tiểu thể. Khi phát triển tế bào nấm mốc thành hệ sợi (mixen - khuẩn ti): có khuẩn ti ăn sâu vào cơ chất - gọi là khuẩn ti cơ chất, có khuẩn ti mọc ra ngoài cơ chất - khuẩn ti khí sinh. Khuẩn ti khí sinh, mọc thành các nhánh rồi sinh ra tế bào đặc biệt hình chai hoặc nhánh đặc biệt rồi sinh ra bào tử. Bào tử nằm trong túi gọi là bào tử nang hoặc bào tử đính với nhau rồi đính vào đầu nhánh mang bào tử - đính bào tử hoặc bào tử đốt v.v...

Nấm mốc gây tạp nhiễm trong công nghiệp nấm men thường gặp là:

9.4.1. *Aspergillus*

Nấm mốc thuộc giống này rất phổ biến trong tự nhiên. Thường thấy chúng ở các loại hạt ngũ cốc bị tổn thương, ở hoa hublon, ở nước cống rãnh... Giống này thuộc lớp nấm túi *Ascomycetes*. *Aspergillus* có chùm bào tử đính xoè ra như bông cúc (hình 9.15). Khuẩn ti phân nhánh có vách ngăn. Bào tử đính có màu xanh xám, sau đó sẫm thành xanh - xám hoặc nâu - xám hoặc thành đen, cũng có những loài bào tử có màu vàng hoa cau (xem thêm ở mục 5.3.2).

Cuống đính thẳng bào tử, phần cuối phình ra có dạng hình cầu và từ đây hình thành tế bào hình chai vào đầu cuống đính bào tử (hình 9.15). Các bào tử đính được tạo thành từ đầu tế bào hình chai.

Bảng 9.3. Đặc điểm của một số nấm men

Dấu hiệu, đặc điểm	Saccharomyces			Pichia	Apiculatus	Candida	Rodotorula
	pasteurianus	villia	ellipsoideus				
Hình thái tế bào	ôvan, dài đơn, đôi hoặc chuỗi ngắn; nảy chồi	ôvan, dài, đôi khi gần như tròn, xếp đơn, đôi; nảy chồi	ôvan, dài, xếp đơn, đôi; nảy chồi	tròn, ôvan, đứng đơn, kết đôi; nảy chồi	hình quả chanh, đơn, đôi; nảy chồi	ôvan, hình trụ, đôi khi rất dài; nảy chồi	tròn, ôvan, đơn, đôi; nảy chồi
Kích thước tế bào, µm	2,7-5 × 6,5-18	2,7-6 × 7-16	2,5-6 × 3-12	3-6 × 4-7,5	2-4 × 5-8	2-5 × 4-10-16	2,5-5 × 5-8
Trên môi trường thạch - malt	khối lạc màu kem trắng, nhẵn bóng, đôi khi ướt nhẹ mặt	màu kem - xám, nhẵn, ít bóng láng	màu kem, nhẵn, bóng láng	vàng, bóng láng, đôi khi ướt mặt	màu kem - xám, nhẵn bóng	kem - xám, không bóng, đôi khi ướt mặt	màu hồng, nhẵn bóng láng
Trên dịch malt	tạo cặn, sau một tháng tạo vòng quanh thùng			tạo cặn	cặn, sau 1 tháng tạo vòng	cặn, màng, đôi khi tạo vòng	cặn, vòng, đôi khi tạo màng bám vào thành
Lên men đường glucoza	+	+	+	+	+	-	-
galactoza	-	yếu	+	+	-	-	-
sacaroza	+	+	+	+	-	-	-
maltoza	+	+	+	+	-	-	-
lactoza	-	-	-	-	-	-	-
rafinosa	2/3	2/3	1/3	1/3	-	-	-
Đông hoá đường glucoza	+	+	+	+	+	+	+
galactoza	-	+	+	+	-	-	+
sacaroza	+	+	+	+	-	+	+
maltoza	+	+	+	+	-	+	+
lactoza	-	-	-	-	-	-	-
Đông hoá N-pepton	+	+	+	+	+	+	+

Đặc điểm của giống *Aspergillus* giàu các enzym thủy phân ngoại bào (amylaza, proteaza, pectinaza, lipaza v.v...). Ta rất hay gặp chúng ở các kho nguyên liệu trong các thùng chứa đựng bột, gạo... đã hết nhưng không được rửa sạch, ở cận bã bia, bã rượu, ở lõi ngô, bã sắn v.v... Chúng mọc và phát triển có khi thành lớp mốc có màu sắc đỏ, đen, vàng... Màu do các bào tử già có màu sắc. Các bào tử này dễ bị gió cuốn bay xa và rơi vào đâu gặp điều kiện thuận lợi sẽ mọc thành mốc mới.

9.4.2. *Penicillium* (hình 9.16)

Nấm này cũng thuộc lớp nấm túi. Sợi có vách ngăn, khi phát triển sinh bào tử trông mốc như cái chổi xể và bào tử có màu xanh. Tất cả các loài của giống này lúc đầu phát triển sợi có màu trắng, sau là xanh - xám và cuối cùng là nâu - xám. Cuống đính bào tử có vách ngăn và có hình cái chổi, phần cuối là tế bào hình chai cùng với các đính bào tử. Khi rụng các bào tử bính có màu xanh lục.

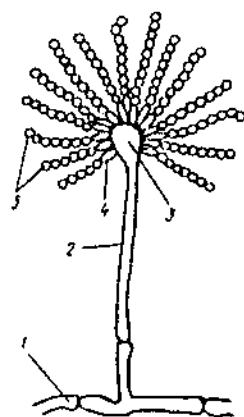
Mốc này thấy ở mọi chỗ, thấy cả trên thực phẩm. Bào tử của chúng có nhiều trong không khí, rau quả, ở các loại hạt và thóc malt, đặc biệt là ở các loại hạt bị vỡ. Để phát triển mốc này yêu cầu dinh dưỡng ở mức tối thiểu nhưng điều trước tiên là độ ẩm và khoảng nhiệt độ rất rộng, ở các kho lạnh nhiệt độ trên dưới 0°C ta vẫn thấy mốc này phát triển.

Penicillium thường sống ký sinh ở phôi các loại hạt, phá hỏng phôi và đi sâu vào trong phá hỏng hạt. ở thóc malt mốc này làm hỏng hạt thóc, thay đổi màu sắc, mùi vị, làm giảm hoạt lực diastaza và nặng sẽ làm hỏng hạt, các enzym của thóc malt và không thể dùng để nấu bia được.

Penicillium dễ sinh ra enzym thủy phân ngoại bào (amylaza, proteaza, pectinaza...) và có một số loài có khả năng sinh chất kháng sinh Penixilin.

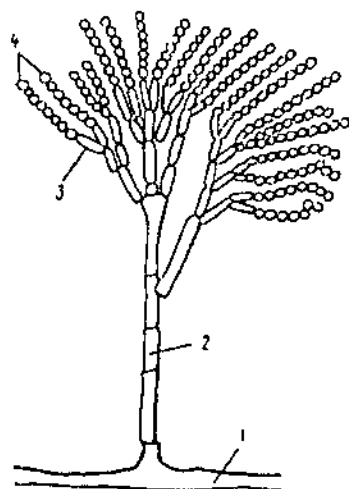
9.4.3. *Oidium*

Mốc này được gọi là mốc sữa, vì nó rất dễ phát triển ở sữa làm cho sữa chua thiu. Ngoài ra, còn gặp mốc này ở nhiều nơi, đặc biệt ở thóc malt tươi (chưa sấy), malt đã nghiền



Hình 15. *Aspergillus*

1- sợi nấm; 2- cuống sinh bào tử;
3- tế bào hình chai; 4- đính bào tử;
5- bào tử.

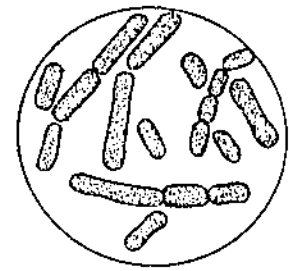


Hình 9.16. *Penicillium*

1- sợi nấm; 2- cuống sinh bào tử;
3- đính bào tử; 4- bào tử.

đập, ở thành các đồ chứa đựng bia hoặc vang, các thùng lên men, nhân giống có dính dịch đường hoặc dịch lên men hay thành phẩm.

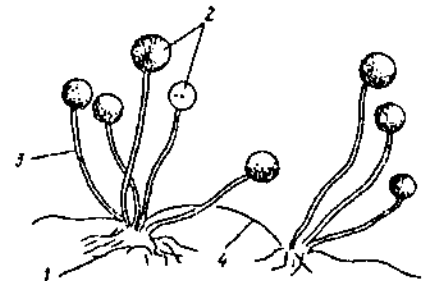
Oidium sinh bào tử đốt (oidia) hay còn gọi là bào tử phấn, bào tử vách mỏng các bào tử nối với nhau ở các góc 1/4 với các viên lượng tròn (hình 9.17), thường là dạng chuỗi hoặc sợi. Khả năng lên men của mốc này là rất nhỏ.



Hình 9.17. *Oidium*

9.4.4. *Rhizopus*

Mốc có màu đen, là một trong những mốc phổ biến nhất. Bắt đầu sinh trưởng rất nhanh, mọc thành nhiều nhánh như nhau ra mọi phía từ đế chồi (hình 9.18). Các nhánh này bám chặt vào cơ chất do một mẫu riêng biệt - được gọi là đế chồi (rizoid), vì vậy mốc có thể mọc cao lên khỏi cơ chất cũng như các thành của dụng cụ chứa đựng. Từ sợi mọc cuống mang bào tử, từ cuối màng sinh ra túi chứa bào tử (bào tử nang).



Hình 9.18. *Rhizopus*:
1- rizoid; 2- bào tử nang; 3- cuống sinh bào tử; 4- mặt cơ chất

Các loại nguyên liệu, sản phẩm thực phẩm nhiễm mốc này sẽ bị hệ sợi tạo thành màu trắng che phủ.

Rhizopus thuộc loại mốc nguy hiểm cho quá trình làm thóc malt từ đại mạch. Nó nguy hiểm cũng tương đương như *Penicillium*.

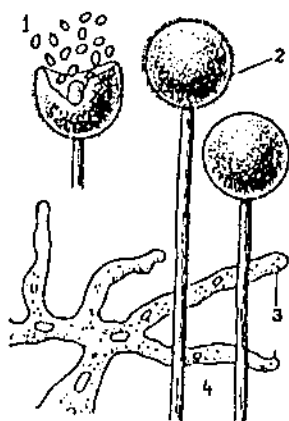
Trong nghề làm rượu vang hay gặp nhất là các giống nấm mốc *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Sphacreulina*. Các giống *Aspergillus*, *Penicillium* đã được giới thiệu ở trên.

9.4.5. *Mucor*

Là giống nấm bậc thấp thuộc lớp *Phycomycetes*. Mixen của chúng phân nhánh khá phong phú, nhưng không có vách ngăn. Đỉnh đầu của sợi nấm là cuống bào tử nang; nang (túi) bào tử hình cầu có thể nhìn bằng mắt thường chứa các bào tử bên trong (hình 9.19). Thành của nang bào tử nứt ra sẽ giải phóng các bào tử và các bào tử sẽ theo gió bay khắp nơi rơi vào đâu đủ điều kiện thuận lợi sẽ nảy mầm mọc thành hệ sợi mới (mixin).

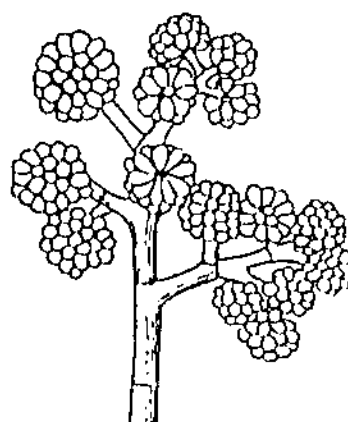
Sợi của nấm *Mucor* thường khi bắt đầu có màu trắng, sau đó sẫm hơn rồi ngả sang màu đen. Sợi nấm có thể đứt thành những đoạn nhỏ và những đoạn này rơi vào nơi nào đó gặp thuận lợi cũng phát triển thành hệ sợi mới.

Mucor có khả năng lên men yếu và tranh giành cơ chất với nấm men nuôi cấy. Trong trường hợp đủ oxy chúng phát triển khá mạnh.



Hình 9.19. *Mucor*

1- bào tử; 2- bào tử nang; 3- sợi nấm

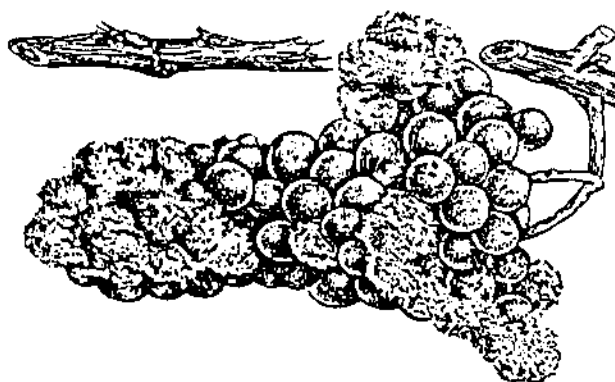


Hình 9.20. *Botrytis*

9.4.6. *Botrytis*

Lần đầu tiên, năm 1801 X. G. Peterson mô tả tác nhân gây bệnh xám nho, và ông đặt tên cho loài nấm này là *Botrytis cinerea* (theo chữ Hy Lạp cổ botrytis có nghĩa là chùm, cinere - xám như tro). Lúc đầu nấm này được xếp vào nấm bất toàn, nhưng sau đó qua kết quả nghiên cứu thấy sinh sản hữu tính của nó và được Anton De Bari xếp vào giống *Sclerotinia* loài *fuckelina*. Song, cho đến nay trong khoa học người ta vẫn dùng tên *Botrytis cinerea* (hình 9.20).

Hệ sợi của *Botrytis* có vách ngăn thành nhiều tế bào, cuống đính bào tử có dạng sợi phân nhánh giống như cành cây (hình 9.18). Ở đầu cành phồng nhẹ rồi mọc từ đầu các sợi phân nhánh mang các bào tử hình cầu màu xám trông như các chùm hoa. *Botrytis* có kích thước bào tử lớn hơn tế bào nấm men một chút. Kích thước bào tử của nấm này là $(10 + 14) \times (7 + 9) \mu\text{m}$. *Botrytis* chủ yếu làm hại nho, làm cho nho hạ phẩm cấp nguyên liệu cho vang (hình 9.21).



Hình 9.21. Cành với chùm nho (đặt nằm ngang) bị *Botrytis* ký sinh

9.4.7. *Sphaerulina*

Thuộc nấm bậc cao được xếp vào lớp *Ascomycetes*. Trên thân, lá, quả nhỏ cũng như các thùng, dụng cụ chứa đựng, trên nền kho thỉnh thoảng thấy một lớp màu đen.

Nấm này trước đây có tên là *Dematium pullulans* và *Pullularia pullulans*. Lớp màu đen ta gặp ở trên là tập hợp các bào tử bình của *Sphaerulina intermixta*. Trong điều kiện thuận lợi nấm phát triển và sinh bào tử với số lượng khổng lồ làm thành một lớp màu đen như ta nhìn thấy. Từ bào tử trong điều kiện thích hợp sẽ mọc thành một sợi trắng sau thành hệ sợi, trong tế bào chất có những hạt không bào. Từ mẫu sợi nấm cũng có thể phát triển thành hệ sợi mới, sinh trưởng giống như nấm men.

Vì sinh vật tạp nhiễm trong công nghiệp lên men nấm mốc thường ít nguy hiểm hơn hai nhóm vi khuẩn và men dại, song các sản phẩm được sản xuất từ các nguyên liệu bị nhiễm mốc hoặc mốc nhiễm vào dịch lên men để lại dư vị cùng mùi vị mốc rất khó chịu, khó khắc phục, làm giảm các chỉ tiêu cảm quan của sản phẩm.

9.5. CÁC BIỆN PHÁP PHÒNG VÀ CHỐNG VI SINH VẬT TẠP NHIỄM

Như chúng ta đã biết, vi sinh vật tạp nhiễm trong quá trình nuôi cấy nấm men, trước hết chúng tranh cướp chất dinh dưỡng với giống nuôi cấy làm giảm năng suất lên men, chúng cũng có thể ức chế giống sản xuất làm thay đổi các hướng trao đổi chất, nặng có thể làm hỏng cả quá trình, nhẹ cũng làm thay đổi mùi vị, làm đục vẩn và làm giảm chất lượng sản phẩm.

Để có thể đảm bảo cho quá trình lên men ta cần tuân thủ các nguyên tắc như sau:

- Không sử dụng các nguyên liệu bị nhiễm mốc nặng, hoặc không đảm bảo yêu cầu (hạt non, hạt lép, hạt vỡ, quả dập nát, ri đường bị chua và bị nhiễm quá nặng). Muốn vậy khâu chọn lọc và bảo quản nguyên liệu cần được chú trọng, kho tàng phải cao ráo sạch sẽ, công tác phòng chống mốc và côn trùng phải làm tốt, giữ độ ẩm thấp, thông thoáng tốt. Ri đường bảo quản lâu ngày rất cần phải xử lý bằng H_2SO_4 và gia nhiệt trước khi được đưa vào sản xuất.

- Cần phải tôn trọng các qui định về vệ sinh sản xuất: nhà xưởng phải làm vệ sinh hàng ngày, các dụng cụ chứa đựng, đường ống chuyển dịch đường sau khi hết cần phải rửa sạch bằng nước hoặc các dịch sát khuẩn.

Công nhân sản xuất trực tiếp cũng cần tắm rửa sạch sẽ, mặc quần áo bảo hộ lao động sạch đầy đủ, đặc biệt là những người làm công tác về giống sản xuất cần phải nắm vững các qui trình vệ sinh về công tác vi sinh vật.

- Giống nhân ở phòng thí nghiệm cần được vô trùng và thuần chủng. Giống trong sản xuất có thể bị nhiễm nhẹ, như fluosilicat natri (NaSiF_6) - với liều lượng 0,02% (đây là biện pháp phổ biến dùng ở nước ta), penixilin với nồng độ $0,75 \div 2$ đv/ml dịch hoặc chất kháng sinh diệt vi khuẩn lactic - lactoxit với nồng độ $150 \div 160$ đv/ml dịch nhân giống và $50 \div 60$ đv/ml dịch lên men (xem thêm ở mục 5.6).

- Trong sản xuất rượu vang, dịch quả được sulfit hoá ($50 \div 150$ mg/l SO_2) nhằm diệt hoặc ức chế tạp khuẩn, giúp men giống sinh một ít glyxerin cải thiện vị của vang, chống oxy hoá làm thay đổi màu dịch quả.

- Một biện pháp ức chế vi sinh vật tạp nhiễm người ta thường hạ pH dịch men tới $\leq 4,5$.

Chương 10

TUYỂN CHỌN NẤM MEN

10.1. NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN NẤM MEN GIỐNG THUẦN CHỦNG

Để nghiên cứu những tính chất sinh học của một loài vi sinh vật nào đó, trong đó có nấm men, trước hết ta phải phân lập được nó ở dạng giống thuần khiết, có nghĩa là chỉ là từ một tế bào gốc phát triển qua các thế hệ mà thành.

Phân lập (hoặc tách) men giống sạch (thuần khiết) có thể sử dụng hai phương pháp:

- Từ một khuẩn lạc riêng biệt mọc trên bề mặt môi trường đặc;
- Từ một tế bào rời được tách ra theo phương pháp Lindner hoặc nhờ các vi thao tác.

10.1.1. Tách giống thuần chủng từ khuẩn lạc riêng biệt

Đây là phương pháp rất phổ biến và thường dùng ở các phòng thí nghiệm vi sinh vật.

Phương pháp dựa trên cơ sở là tách giống sạch từ khuẩn lạc nấm men mọc riêng rẽ trên môi trường đặc. Muốn vậy, phải gieo cấy nguồn giống (từ đất, từ hoa quả...) sau khi đã pha loãng tới 10^{-6} hoặc 10^{-8} trên môi trường đặc (thạch - malt hoặc thạch - dịch quả, thạch - nước đường hoá từ tinh bột...) trong hộp Petri, giàn đều, để 2 ÷ 3 ngày cho giống mọc tốt trên bề mặt môi trường đã được thanh trùng.

Từ một tế bào riêng biệt sẽ sinh sản và phát triển thành một khuẩn lạc trên bề mặt môi trường. Mỗi loại tế bào có khuynh hướng mọc sát lại với nhau. Đó là tính giống nòi của tế bào được di truyền qua các thế hệ.

Các nguồn giống nấm men: đất ở xung quanh nhà máy đường, nhà máy rượu, các cơ sở chế biến tinh bột, từ các nguồn dịch quả ép cả vỏ (chọn quả sạch, không rửa), từ men bánh mì hoặc bột nhào cho nở tự nhiên, từ các dịch nhân giống và lên men (các mẻ có hiệu suất cao và không bị nhiễm). Từ đất ta lấy một ít khoảng 1 gam hoà nước thành dạng huyền phù, từ dịch quả, từ dịch nhân giống và lên men... - ta coi là nguồn giống ban đầu. Từ đó ta có thể tiến hành pha loãng theo tỷ lệ 1 : 10 (1 ml dịch giống ban đầu + 9 ml nước vô trùng) và làm vài lần tiếp theo, ta được các đậm độ dịch pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} v.v... rồi lấy 0,1 ml dịch pha loãng cấy giàn đều trên bề mặt môi trường đặc đã thanh trùng trong hộp Petri.

- Phân lập nấm men từ mẫu đất:

- + Lấy khoảng 1 gam mẫu thử cho vào ống nghiệm. Đổ thêm vào ống nghiệm 9 ml nước muối sinh lý (nước có 0,85% NaCl) hoặc nước máy;

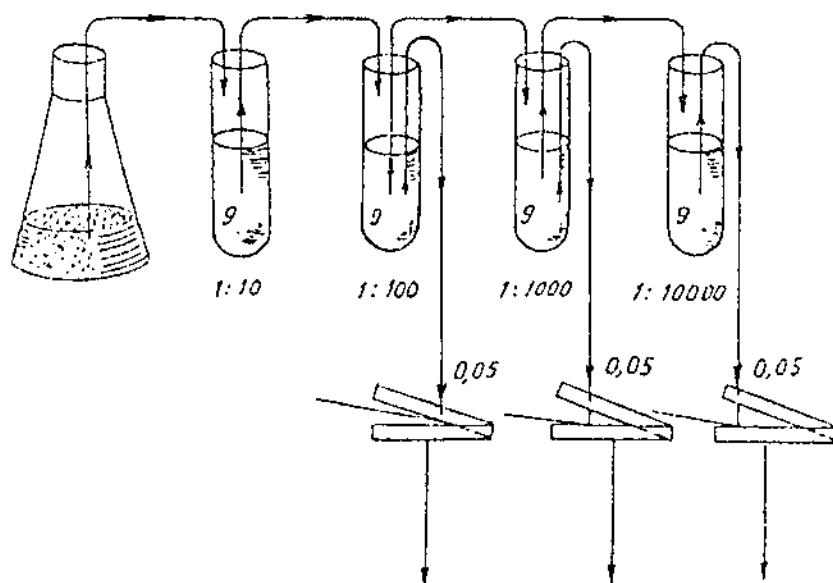
+ Đậy kín, lắc đều, để lắng 15 phút;

+ Lấy 4 ml dịch bên trên cho vào ống nghiệm khác, bổ sung 1 ml chất kháng sinh (2 mg streptomixin và 5 mg penixilin trong 1 ml). Lắc đều và để yên 15 phút.

Dịch ở đây được coi là vật liệu nuôi cấy ban đầu. Từ đây ta có thể tiến hành theo hai cách:

a- Lấy 1 ml vật liệu nuôi cấy ban đầu cho vào ống nghiệm đã có 9 ml nước vô khuẩn, ta có đậm độ pha loãng 10^{-1} và tiếp tục pha loãng như vậy ta có 10^{-2} , 10^{-3} v.v...

Từ mỗi đậm độ pha loãng ta lấy ra một giọt bằng pipet Pasteur gieo vào các hộp Petri đã có môi trường thạch - malt hoặc các môi trường khác như Saburo; Hansen, dịch quả với thạch. Lấy que gạt gạt đều, nuôi ở $25 \div 28^{\circ}\text{C}$ trong 1 ÷ 2 ngày. Quan sát khuẩn lạc.



Hình 10.1. Sơ đồ pha loãng dung dịch huyền phù nấm men và cấy lên môi trường thạch ở hộp Petri

b- Trường hợp vật liệu nuôi cấy ban đầu có quá ít không đủ để pha loãng và cấy từ dịch nguyên ban đầu cũng khó thấy mức phát triển rõ rệt thì cần phải nuôi cấy “tăng sinh” (phát triển tăng sinh khối): Lấy 1 ml dịch nuôi cấy ban đầu cho vào các bình tam giác đã có một trong các môi trường đã thanh trùng là nước malt, nước quả, Saburo, Hansen... Nuôi $25 \div 28^{\circ}\text{C}$ trong 2 ngày (có thể để trên máy lắc 1 ngày). Sau đó cấy trực tiếp ra môi trường đặc trong đĩa Petri hoặc pha loãng như trên.

Trường hợp phân lập nấm men từ dịch quả hoặc dịch đang lên men làm như sau:

Đốt que cấy để vô khuẩn và cắm sâu vào dịch khoảng 1 cm rồi lấy ra tức thì một vòng que cấy có dính dịch rồi nhúng vào 0,5 ml nước cất vô trùng có sẵn trong ống nghiệm, lắc

đều và dịch trong ống nghiệm thu được coi là vật liệu nghiên cứu. Từ đây lấy ra một vòng que cấy và gieo vào hộp Petri đã có sẵn môi trường vô khuẩn. Lấy que gạt thủy tinh đốt (hoặc nhúng cồn rồi đốt qua ngọn lửa đèn cồn) vô khuẩn giàn đều giọt vật liệu nuôi cấy được que cấy đưa vào trên mặt môi trường trên đĩa thạch.

Nếu trường hợp số lượng tế bào nấm men trong dịch vật liệu nghiên cứu quá ít, ta phải làm qua một giai đoạn "tăng sinh" (nấm men phát triển tăng sinh khối) trên hai dịch cấy:

dịch N^o1: dịch nguyên không pha loãng;

dịch N^o2: lấy 1 ÷ 2 giọt từ dịch dịch N^o1 pha vào 5 ml nước cất vô trùng trong ống nghiệm, lắc đều.

Lấy từ dịch dịch N^o1 và dịch N^o2 bằng pipet 1 ml rồi giọt 1 ÷ 2 giọt vào mặt môi trường đặc vô khuẩn trong hộp Petri, dùng que gạt giàn đều hoặc lắc lúng đều dịch trên mặt thạch không cần que gạt. Cũng có thể dùng que cấy lấy từ dịch mẫu cấy rích rắc trên bề mặt thạch trong hộp Petri. Sau đó lật ngược hộp nuôi ở 25 ÷ 28°C trong 4 ÷ 5 ngày. Sau khi giống mọc tốt, chọn khuẩn lạc mọc riêng rẽ, mọc tốt đều và đẹp hoặc những điểm giống mọc tốt trên đường rích rắc chuyển vào môi trường lỏng (dịch malt, dịch quả) đã vô khuẩn trong ống nghiệm hoặc trong bình tam giác. Nuôi 2 ÷ 3 ngày ở 28°C để giống phát triển. Từ đây ta tiến hành phân lập (có thể phải qua quá trình pha loãng) để chọn các chủng sạch từ các khuẩn lạc riêng rẽ mọc tốt trên bề mặt môi trường đặc trong đĩa Petri.

Phương pháp này không phải bao giờ cũng nhận được giống thuần chủng, vì khuẩn lạc tạo thành không phải bao giờ cũng từ một tế bào, mà có thể mọc từ một số tế bào gần gũi nhau. Vì vậy cần phải tiến hành phân lập lặp lại như đã làm ở trên: vật liệu nghiên cứu là giống mới chọn rồi tiến hành chọn lại qua pha loãng, chọn khuẩn lạc riêng biệt, kiểm tra bằng kính hiển vi tính đồng nhất của tế bào, kiểm tra hình thái, màu sắc và tính đồng nhất của khuẩn lạc đã phát triển.

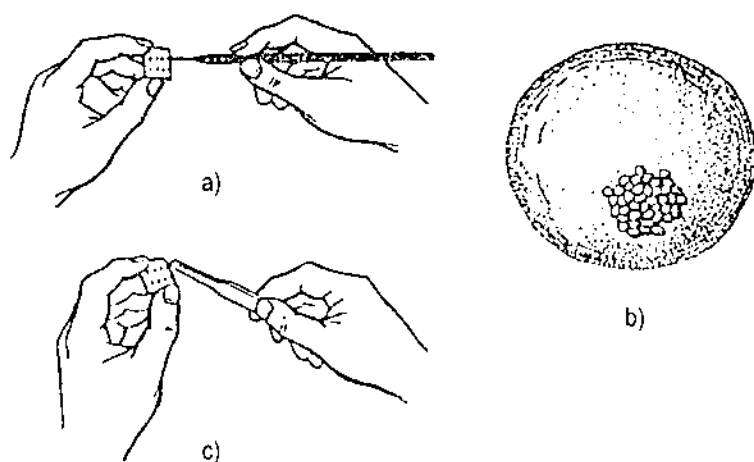
– Quan sát khuẩn lạc:

Sau khi có được các khuẩn lạc riêng biệt trong đĩa Petri cần quan sát và ghi chép đầy đủ các đặc điểm: hình thái, kích thước, chiều dày, xem có vòng tròn đồng tâm hay không, có tia xạ không, mặt khuẩn lạc nhẵn bóng hay ướt hoặc nhám xù xì, khô; màu sắc khuẩn lạc có cấu tạo mềm mại như nhung hay xơ cứng như gai, có nếp nhăn, mép nhăn hay răng cưa...

Từ khuẩn lạc riêng rẽ ta cấy chuyển vào ống nghiệm để làm chủng nghiên cứu và từ khuẩn lạc hoặc từ ống thạch nghiêng ta nghiên cứu hình thái tế bào và các đặc điểm tiếp theo.

10.1.2. Tách nấm men từ một tế bào theo phương pháp Lindner

Dùng bút vẽ kỹ thuật vô khuẩn lấy giống nấm men được nuôi ở môi trường lỏng đưa chấm lên lam kính một loạt các hạt nhỏ từ dịch giống (hình 10.2).



Hình 10.2. Tách giống nấm men thuần khiết từ một tế bào:

a- chấm giọt lên lam kính; b- gạt chấm có khuẩn lạc phát triển; c- lấy giọt chấm có khuẩn lạc

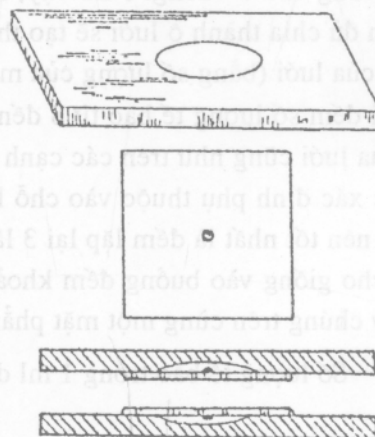
Lật ngược lam kính đặt vào chỗ lõm của phiếu kính, rồi bịt rìa lam kính bằng parafin nóng chảy hoặc vazolin để không bị khô các hạt dịch ở bên trong. Soi kính chọn những hạt chỉ có một loại tế bào. Tiêu bản được để vào tủ ấm $25 \div 28^{\circ}\text{C}$. Sau $12 \div 24$ h lại đem soi kính. Nếu thấy những hạt lựa chọn mọc lên một khuẩn lạc dùng miếng giấy lọc vô khuẩn thấm cẩn thận lên giọt đã mọc khuẩn lạc. Dùng panh (kẹp) inox vô trùng kẹp miếng giấy lọc. Miếng giấy lọc đó thấm giống nấm men được đưa vào môi trường lỏng trong ống nghiệm ở $25 \div 28^{\circ}\text{C}$ trong 24 h. Môi trường nuôi cấy ở đây là nước malt, môi trường Hansen hoặc dịch quả có hàm lượng đường khoảng $7 \div 10\%$. Sau thời gian nuôi cấy nấm men phát triển tăng sinh khối và được coi là vật liệu nghiên cứu. Từ đây ta dùng vật liệu này để nghiên cứu tiếp theo: hình thái tế bào, chồi, túi không bào, hạt glycogen v.v..., cấy vào thạch nghiêng giữ giống và cấy chuyển trong bảo quản.

10.2. NGHIÊN CỨU TẾ BÀO NẤM MEN DƯỚI KÍNH HIỂN VI

10.2.1. Hình thái, sinh sản

– Nghiên cứu hình thái, kích thước tế bào nấm men... người ta hay dùng tiêu bản giọt ép hoặc giọt treo. Cách làm như sau: Để làm *tiêu bản giọt ép* ta giở một giọt nước cất lên phiến kính khô, dùng que cấy lấy một ít tế bào nấm men ở khuẩn lạc hoặc từ ống thạch nghiêng cho vào giọt nước, rồi di nhiều lần cho tế bào men rải đều trong giọt nước, đặt một lam kính lên giọt nước. Chú ý khi đặt lam kính sao cho phần ép giữa lam kính và vật kính không có một bong bóng khí nào, chỉ là nước với tế bào nấm men. Đem soi kính hiển vi với độ phóng đại 600 lần (vật kính 40 và thị kính 15×).

Với tiêu bản giọt treo ngoài hình thái tế bào còn có thể quan sát sự nảy chồi của nấm men. Lấy một giọt dịch có chứa nấm men bằng vòng que cấy vô khuẩn rồi chấm lên lam kính đã vô khuẩn, quay ngược lam kính xuống phía dưới rồi úp lam kính lên một phiến kính chuyên dùng đã vô khuẩn có một vết lõm hình tròn ở giữa. Giọt giống huyền phù chấm trên lam kính phải đúng vào giữa vết lõm (hình 10.3). Mép của lam kính được bôi bằng parafin nóng chảy hoặc vazolin để không khí không ra vào được vết lõm. Như vậy, ta có thể quan sát sự sinh sản của tế bào nấm men hàng ngày.



Hình 10.3. Cách làm tiêu bản giọt treo

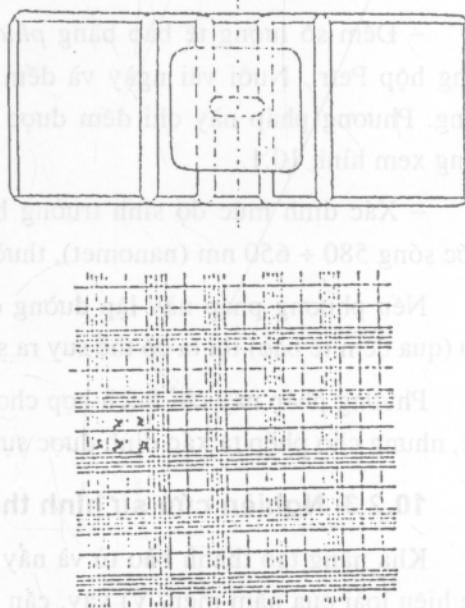
Mỗi tiêu bản giọt treo ta có thể theo dõi quan sát hình thái và sinh sản của nấm men hàng ngày. Thời gian lưu giữ có thể tới 8 ÷ 10 ngày.

– Nhuộm tế bào để đánh giá chất lượng nấm men:

Trong nghiên cứu, cũng như trong sản xuất không chỉ theo dõi quan sát hình thái tế bào mà còn phải thường xuyên đánh giá tình trạng sinh lý của tế bào nhờ các tiêu bản nhuộm tế bào. Giống nấm men được coi là trẻ khỏe có hình thái tế bào đặc trưng, số tế bào trẻ và nảy chồi nhiều, số tế bào chết ít ($\leq 5\%$). tốc độ sinh sản nhanh, số tế bào chứa chất dinh dưỡng dự trữ (hạt glycogen) nhiều.

10.2.2. Đếm số lượng tế bào trong dịch nuôi cấy để xác định tốc độ sinh sản và sinh trưởng của nấm men

Đếm số lượng tế bào thường áp dụng phương pháp dùng buồng đếm Goriaev - Thom. Buồng đếm (hình 10.4) là phiến kính dày được chia thành phần đều nhau bằng các vạch thẳng. Phần giữa của phiến kính lõm xuống mỗi cạnh thấp 1/10 mm, trên đó có vạch một mạng lưới. Diện tích của ô vuông lớn của lưới là $1/25 \text{ mm}^2$, diện tích của ô vuông nhỏ là $1/400 \text{ mm}^2$. Cho dịch huyền phù (một giọt) lên lưới và phủ bằng một lam kính. Miết vài lần sao cho lam kính với hệ trạng lưới phiến kính không còn bọt khí, không còn khoảng trống không chứa dịch,



Hình 10.4. Buồng đếm Goriaev - Thom

trừ vùng các ô vuông. Như vậy, khoảng không gian giữa lam kính và phần giữa của phiến kính đủ chia thành ô lưới sẽ tạo thành buồng đếm. Các tế bào nấm men được đếm trên các ô lớn của lưới (bằng số lượng của mỗi ô nhỏ cộng lại). Thể tích của mỗi ô này là $1/250 \text{ m}^3$. Ta phải đếm số lượng tế bào từ 8 đến 10 ô vuông lớn. Cần đếm tất cả các tế bào nằm trong các ô của lưới cũng như trên các cạnh phía trên và phía bên phải của mỗi ô. Vì độ chính xác của việc xác định phụ thuộc vào chỗ lam kính có áp sát vào bề mặt của buồng đếm hay không, cho nên tốt nhất là đếm lặp lại 3 lần, mỗi lần đếm 150 ÷ 200 tế bào. Nếu bắt đầu đếm sau khi đã cho giống vào buồng đếm khoảng 3 ÷ 5 phút, để cho tế bào lắng xuống, khi soi kính ta thấy chúng trên cùng một mặt phẳng.

Số lượng tế bào trong 1 ml dịch huyền phù được tính theo công thức:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S}$$

ở đây: M - số lượng tế bào (triệu)/ml;

a - số lượng tế bào trung bình;

h - chiều sâu của buồng đếm, 1/10 mm;

S - diện tích ô vuông lớn, $1/25 \text{ mm}^2$.

– Đếm số lượng tế bào bằng *phương pháp pha loãng* rồi cấy trên hộp Petri có môi trường thạch, nuôi vài ngày và đếm khuẩn lạc rồi suy ra lượng tế bào theo hệ số pha loãng. Phương pháp này chỉ đếm được tế bào sống và mất nhiều thời gian. Sơ đồ pha loãng xem hình 10.1.

Phương pháp không cần sử dụng kính hiển vi.

– Đếm số lượng tế bào bằng *phương pháp pha loãng* rồi cấy trên môi trường thạch trong hộp Petri. Nuôi vài ngày và đếm khuẩn lạc rồi suy ra lượng tế bào theo hệ số pha loãng. Phương pháp này chỉ đếm được số tế bào sống và mất nhiều thời gian. Sơ đồ pha loãng xem hình 10.1.

– Xác định mức độ sinh trưởng bằng *phương pháp đo độ đục* trên máy so màu với bước sóng 580 ÷ 650 nm (nanomet), thường dùng lọc màu đỏ 620 nm.

Nếu phương pháp này lập đường cong chuẩn với mối tương quan OD và số lượng tế bào (qua đếm tế bào) thì ta có thể suy ra số lượng tế bào nấm men trong 1 ml dịch huyền phù.

Phương pháp này chỉ thích hợp cho các môi trường lỏng đồng nhất, có thể không chính xác, nhưng cho phép ta xác định được sự sinh trưởng và phát triển của giống nghiên cứu.

10.2.3. Nghiên cứu sự hình thành bào tử ở nấm men

Khả năng tạo thành bào tử và nảy mầm của bào tử cũng như hình dáng của bào tử là dấu hiệu loài của nấm men. Vì vậy, cần xác định một cách có hệ thống vị trí, trạng thái của chủng nấm men được phân lập khi cấy chúng vào môi trường đặc biệt để tạo thành bào tử.

Để nấm men sinh bào tử người ta có thể cấy chúng trên nhiều môi trường khác nhau. Hiện nay người ta hay cấy chuyển giống nấm men 1 ÷ 2 ngày trên môi trường đặc vào môi trường axetat.

Thành phần môi trường đặc như sau (g/l):

Pepton	10	Nước cho đủ 1 lít
Nước chiết men	5	Hấp thành trùng ở 0,8 atm trong 30 phút
Glucosa	20	
Thạch	20	

Thành phần môi trường axetat như sau (g/l):

Natri axetat	10	Nước cho đủ 1 lít
Kali clorua	5	Môi trường được hấp thanh trùng ở 1 atm trong 30 phút
Thạch	20	

hoặc cấy trên môi trường Gorotkova được Kregovan - Rip cải tiến có thành phần (g/l):

Glucosa	1	Nước đủ 1000 ml
Pepton	10	Hấp thành trùng ở 120°C trong 15 phút
NaCl	5	
Thạch	30	

Chú ý: những bào tử nấm men được hình thành trong nang. Nang bào tử hình tròn, hình trứng hoặc hình nón. Bào tử nang thường sinh ra ở môi trường nghèo.

Nhuộm bào tử theo phương pháp của Vieczơ (Wirtz) được Sap-fe và Fulton (Schaeffer - Fulton) cải tiến. Cách làm như sau:

- làm tiêu bản trên phiến kính và cố định bằng nhiệt;
- giở lên tiêu bản dung dịch malasit xanh lục đã pha loãng, để 30 ÷ 60 giây, hơ nóng 3 lần đến khi bốc hơi;
- rửa bằng nước thường 30 giây;
- giở lên tiêu bản dung dịch saframin 0,5%, để yên 30 giây;
- rửa, sấy khô và soi vật kính dầu.

Sau khi nhuộm bào tử bắt màu xanh lục, tế bào còn lại bắt màu đỏ.

Soi tìm bào tử cũng có cách làm hơi khác, như sau:

Nấm men bình thường khó sinh bào tử, muốn chúng sinh bào tử phải nuôi chúng ở môi trường nghèo. Một trong cách nuôi đó là phương pháp dùng khối thạch cao: Trộn 2 phần thạch cao (CaSO_4) khan với 1 phần nước. Từ thạch cao nhão này ta nặn thành khối có đường kính $d = 2 \div 3$ cm và chiều cao $h = 1 \div 1,5$ cm. Bề mặt của khối thạch cao được làm sạch. Khối này được đặt vào hộp đĩa Petri và thanh trùng khô (trong tủ sấy ở 160°C/1 h). Đáy hộp và bề mặt khối thạch cao được làm ẩm bằng nước máy vô trùng. Cặn men đã nuôi 2 ngày ở môi trường Gorotkova được dùng que cấy vô trùng bôi lên mặt khối thạch cao và để ở tủ ẩm 25 ÷ 30°C trong 1 ÷ 2 ngày. Sau 30 giờ các tế bào nấm men đã có thể sinh bào tử.

Môi trường Gorotkova có thành phần (g/l) như sau:

Pepton	10	Nước cho đủ 1 lít
Cao thịt	10	Hấp 0,8 atm trong 20 + 30 phút
NaCl	5,0	
Glucosa	2,5	

Lấy nấm men từ bề mặt khối thạch cao, làm tiêu bản, nhuộm bào tử rồi soi kính.

Bào tử thường khó bắt màu hơn tế bào chất, vì vậy cần phải dùng thuốc nhuộm mạnh và gia nhiệt. Tất cả các phương pháp nhuộm đều dựa trên nguyên tắc: đầu tiên là nhuộm tiêu bản chung, sau tẩy phần màu của tế bào chất rồi nhuộm bổ sung cho tế bào chất bắt màu riêng.

Nhuộm bào tử người ta thường dùng Fuxin carbolic (Fuxin có thêm phenol) cho ngập vết bôi, hơ qua ngọn lửa cùng với thuốc nhuộm trong vài phút tới khi bốc hơi (nhưng không được sôi dịch trên vết bôi). Chất màu bay hơi dần ta lại thêm thuốc nhuộm lên tiêu bản để tránh vết bôi bị khô. Để tẩy màu người ta dùng dung dịch H_2SO_4 , HCl hoặc axit axetic 1 ÷ 5%, dung dịch cồn 33%... Thời gian tẩy màu phụ thuộc vào đặc tính của từng tiêu bản, có thể là từ vài giây đến vài phút. Sau tẩy màu là rửa bằng nước.

Sau khi rửa bằng nước tiêu bản được nhuộm bổ sung bằng xanh metylen trong 1 ÷ 2 phút. Soi kính thấy tế bào chất bắt màu xanh và bào tử màu đỏ.

10.2.4. Xác định hàm lượng hạt glycogen trong tế bào men

Hàm lượng các chất dự trữ trong tế bào nấm men là glycogen. Những hạt này có đặc điểm là làm tăng khả năng lên men của nấm men và là chỉ tiêu quan trọng.

Bình thường nấm men có khoảng 70 ÷ 75% lượng tế bào có glycogen. Nếu trong sản xuất thấy tỷ lệ này giảm có nghĩa là men đã bị già hoặc trong môi trường không đủ chất dinh dưỡng. Đưa men này vào lên men sẽ kéo dài thời gian lên men chính.

Tế bào men già ít hạt glycogen, tế bào chất dạng hạt, không bào lớn, tế bào không nảy chồi.

Đặc điểm của glycogen là dễ bắt màu với iod cho màu nâu đỏ. Để dễ phát hiện glycogen người ta hay dùng iod đậm đặc trong dung dịch lugol (7 g iod + 20 g KI + 100 ml nước cất). Tiêu bản có thể cố định trên phiến kính đã rửa sạch chất béo bằng hỗn hợp cồn - ete (1 : 2).

Trường hợp nhuộm tiêu bản với tế bào men sống người ta hay dùng dung dịch lugol loãng hơn (0,33 g iod tinh thể + 0,66 g KI + 100 ml nước cất). Đầu tiên hoà KI vào 100 ml nước rồi hoà tiếp iod, tiếp theo là thêm nước cho đủ 100 ml.

Hàm lượng glycogen được xác định bằng cách soi kính tiêu bản sống với hỗn hợp 1 giọt dịch men và một giọt dung dịch lugol. Tiêu bản để 5 ÷ 6 phút rồi đem soi kính. Những tế bào không có glycogen sẽ bắt màu vàng - chanh, tế bào có glycogen bắt màu nâu đỏ hoặc nâu màu da lươn.

10.2.5. Nhuộm và quan sát các hạt Volutin, chất béo trong tế bào

– Volutin: Khi tế bào sống volutin được nhuộm thấy xuất hiện dạng hạt trong không bào. Nhuộm tế bào sống bằng đồ trung tính và manh metylen (1 : 5000). Các hạt volutin trong không bào là các hạt hình cầu bắt màu đỏ hoặc xanh.

Nhuộm tế bào đã cố định trên tiêu bản bằng xanh metylen thì các hạt volutin bắt màu tím hoặc tím - đỏ, còn tế bào chất có màu xanh da trời.

Quan sát tế bào sống người ta làm dung dịch màu 0,01% và 0,001% trong nước. Hoà 10 mg bột màu khô vào 1 lít nước cất.

Nhuộm tiêu bản cố định dùng dung dịch có tỷ lệ 1 : 40 (1 ml dung dịch cồn bão hoà chất màu trộn đều với 40 ml nước).

– Chất béo: Chất béo trong tế bào vi sinh vật thường ở dạng lipopropeptit. Người ta dùng dung dịch xudan - 0,1 g xudan III trong 20 ml cồn 95° - hoặc trong axit lactic đặc để nhuộm chất béo.

Giỏ 1 giọt huyền phù giống vi sinh vật lên phiến kính, rồi thêm 1 giọt formalin 40%, trộn đều, để yên 5 phút để cố định tiêu bản. Sau đó giỏ 1 giọt xanh metylen (1 : 40) để yên 10 phút, rồi bỏ sung hỗn hợp vừa mới pha theo tỷ lệ xudan và nước là 1 : 1.

Tế bào chất bắt màu xanh, giọt mỡ bắt màu hồng, còn không bào không bắt màu.

10.2.6. Tìm tế bào men chết

Giống men tốt đưa vào lên men tỷ lệ tế bào chết không quá 10%. Nếu chỉ số này cao sẽ làm cho quá trình lên men chậm , “uế oải”, làm cho các vi sinh vật tạp nhiễm có dịp phát triển và sản phẩm (bia hoặc rượu vang) có mùi vị của men tự phân.

Xác định các tế bào men chết bằng cách soi kính chế phẩm sống được nhuộm bằng dung dịch xanh metylen với pH 4,6.

Làm tiêu bản nhuộm tế bào chết như sau:

Mang 1 giọt men lên phiến kính rồi giỏ 1 giọt thuốc nhuộm lên trên, dẩy bằng lam kính, sau 2 ÷ 3 phút rồi đem soi kính. Các tế bào chết sẽ bắt màu xanh. Lập tỷ số tế bào chết với tổng tế bào men rồi suy ra số % tế bào chết.

Để chính xác ta đếm số lượng men chết và tổng số ở buồng đếm.

10.3. XÁC ĐỊNH SỰ ĐỒNG HOÁ VÀ LÊN MEN CÁC LOẠI ĐƯỜNG CỦA NẤM MEN

Ở đây có 2 thuật ngữ “đồng hoá” và “lên men”. Đối với men rượu hai thuật ngữ là đồng nghĩa, còn đối với các loài không lên men rượu thì hai thuật ngữ này không đồng nghĩa, có nghĩa là loài hoặc chủng nấm men này chỉ đồng hoá được nguồn đường (nguồn

carbon dinh dưỡng) để phục vụ cho sinh trưởng và tăng sinh khối, chứ không phục vụ cho lên men biến đường thành rượu.

Dựa vào nguyên lý của Kluyver và Dekker:

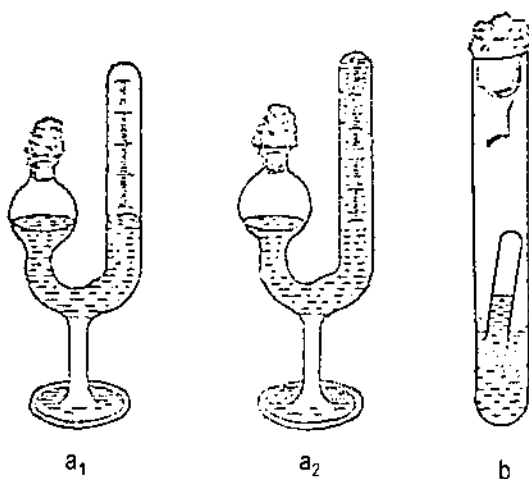
- Những loài nấm men không lên men được glucoza thì không lên men được các loại đường khác.
- Những nấm men lên men được glucoza sẽ lên men được đường glucoza và mannoza. Vì vậy, không cần thử với 2 loại đường này.
- Không có nấm men nào đồng thời lên men được maltoza và lactoza.

Thông thường người ta chỉ cần thử với các loại đường như sau: glucoza, sacaroza, maltoza, galactoza, rafinoza. Những loại đường này phải tinh khiết và không bị phân huỷ khi đun nóng.

Cách tiến hành như sau:

Pha dịch đường 20%, khử khuẩn (nếu qua lọc vô khuẩn Xaizơ là tốt nhất). Lấy 0,5 ml dịch đường này cho vào ống nghiệm có sẵn môi trường (pepton - 0,5%, cao men 0,5% trong nước cất đã khử khuẩn). Trong ống nghiệm có để sẵn 1 ống Durham. Cấy 1 vòng que cấy giống, lắc đều và giữ ở nhiệt độ $25 \div 30^{\circ}\text{C}$. Nếu nấm men lên men được đường trong môi trường sẽ sinh ra CO_2 và CO_2 vào ống Durham sẽ đẩy ống nổi lên (hình 10.5).

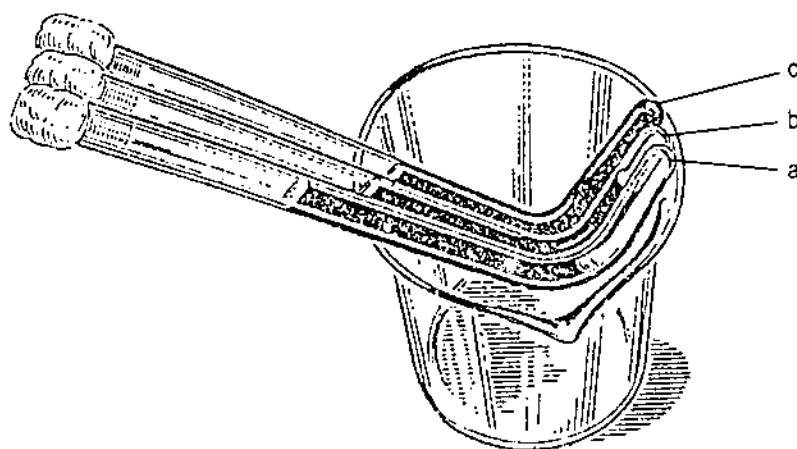
Ta cũng có thể làm tương tự như vậy, nhưng môi trường cho vào ống Einhorn (hình con vịt) hoặc ống Dunba. Nếu CO_2 sinh ra sẽ đẩy dịch môi trường khỏi khỏi đuôi ống (hình 10.6).



Hình 10.5

a₁- bình Einhorn chứa dịch đường; a₂- bình Einhorn khi dịch đường lên men;
b- ống Durham trong dịch đường lên men.

Cũng có thể có nhiều cách khác, chủ yếu là xác định xem quá trình nuôi cấy nấm men có sinh ra CO_2 hay không? Nếu sinh ra CO_2 thì ta kết luận được chủng nấm men đồng hoá được loại đường nghiên cứu và qua cảm quan hoặc phân tích có tích tụ rượu etylic hay không ta kết luận được nấm men có lên men được đường đó không.



Hình 10.6. Ống Dunba:

a- đường lên men hoàn toàn; b- đường lên men không hoàn toàn; c- đường không lên men

10.4. CÁC ĐẶC ĐIỂM LÊN MEN

Khả năng lên men của nấm men rượu biến đường thành etanol là đặc điểm được chú ý trước tiên.

Trong lên men thời kỳ đầu cần quan tâm đến sinh trưởng của nấm men, nhưng đến mức độ nào đó không cần nấm men sinh trưởng tiếp và giữ ổn định ở nồng độ tế bào nấm men đó và nấm men ở giai đoạn sau chỉ dùng cơ chất chuyển hoá thành rượu.

Hoạt tính của nấm men rượu được xác định qua một số đặc điểm với một số phương pháp.

10.4.1. Lực lên men

Xác định lực lên men của một chủng loài nấm men có thể bằng phương pháp trọng lượng, phương pháp thể tích... dựa trên khả năng làm thoát khí CO_2 .

10.4.1.1. Phương pháp trọng lượng

Xác định lượng CO_2 sinh ra tới khi kết thúc lên men.

Chuẩn bị dịch lên men với 10 ÷ 15% đường cho vào các bình có nút mài và nút có ống thông ra ngoài nối với bầu chứa H_2SO_4 để chặn không khí từ ngoài vào bình. Gieo cấy men giống vào dịch lên men trong bình, nuôi ở 25 ÷ 28°C đối với men rượu và men bánh mì, ở 15 ÷ 25°C với men rượu vang, ở 7 ÷ 9°C với men bia. Cân bình sau khi tiếp giống và trong quá

trình lên men đến khi trọng lượng bình và dịch lên men không đổi: kết thúc lên men. Hiệu số trọng lượng của bình trước và sau lên men cho ta số trọng lượng CO_2 sinh ra và từ đó ta tính ra số g CO_2 sinh ra của 100 ml dịch lên men.

10.4.1.2. Phương pháp thể tích

Những năm gần đây người ta dùng phương pháp thể tích xác định lực lên men của men giống trên máy Vac-bua trong khoảng 3 h. Cơ sở của phương pháp này dựa trên mối quan hệ giữa hàm lượng nitơ protein trong tế bào với lực lên men của nấm men. Lượng khí CO_2 tách ra theo đơn vị thời gian được đo trên máy Vac-bua. Sau đó phân tích hàm lượng nitơ protein và hiệu suất lên men tính theo công thức:

$$K = \frac{\varphi}{N}$$

φ - tốc độ lên men, tính bằng ml CO_2 ;

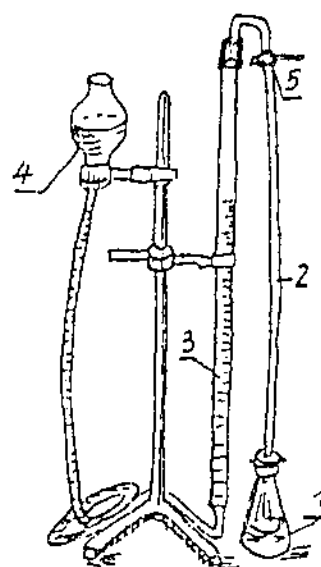
N - hàm lượng nitơ protein trong tế bào nấm men.

Hiệu suất lên men đối với của men bia *Saccharomyces carlsbergensis* chủng N²11 bằng 11 ÷ 12.

Phương pháp này có một số ưu điểm: nhanh và chính xác, song cũng có nhược điểm: phức tạp, cần có máy Vac-bua, vì vậy khó thực hiện phổ biến trong công nghiệp.

Gần đây người ta dùng phương pháp đơn giản hơn của Ca-lơ (Kaler). Phương pháp này dựa vào thể tích khí CO_2 đo được trong dịch maltoza 10%. Bộ đo này rất đơn giản và có thể thực hiện được ở tất cả các nhà máy và các phòng thí nghiệm. Nó gồm một bình lên men hình nón có thể tích 50 ml, được nối liền với một ống có gắn buret (hình 10.7).

Buret đã đổ đầy dung dịch NaCl 20% được axit hoá bằng axit octophosphoric tới pH = 1. Cho 0,7 g men và 30 ml maltoza, được pha trong dung dịch KH_2PO_4 0,2% vào bình. Điều chỉnh mức dịch trong buret bằng không nhờ một bình cân bằng. Cho lên men 3 h ở 20°C, mỗi giờ ghi vạch dịch ở buret. Men tốt sau 3 h tách được 25 ÷ 28 ml CO_2 .



Hình 10.7. Dụng cụ đo lực lên men của nấm:

1- bình lên men; 2- ống cao su; 3- buret;
4- bình cân bằng; 5- van ba ngã

10.4.2. Mức lên men cuối

Mức lên men cuối phụ thuộc vào từng nòi (chủng), trạng thái nấm men cũng như thành phần và chất lượng dịch malt. Đồ dịch malt đã được xác định sơ bộ hàm lượng chất

khô vào bình thuỷ tinh và cho 10% men giống và lắc mạnh. Cho lên men ở $20 \div 25^{\circ}\text{C}$ khoảng 2 ngày, thỉnh thoảng lắc, sau đó xác định lượng chất khô còn lại.

Mức lên men cuối được tính theo công thức:

$$V = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

V - mức lên men cuối, %;

P_1 - hàm lượng chất khô ban đầu, g;

P_2 - hàm lượng chất khô còn lại trong dịch lên men, g.

Nếu hàm lượng chất khô đã tính là % thì công thức trên không nhân với 100.

10.4.3. Khả năng sinh trưởng: xác định bằng tốc độ sinh sản và hệ số sinh trưởng

Số lượng tế bào sau khi nuôi trên môi trường có 11% chất khô hoà tan ở $6 \div 8^{\circ}\text{C}$ trong 3 ngày (đối với men bia), các men khác ở nhiệt độ $20 \div 25$ và $25 \div 28^{\circ}\text{C}$.

Tốc độ sinh sản được tính bằng lượng tăng tế bào trong 1 đơn vị thời gian. Còn hệ số sinh sản là tỷ số nồng độ men sau 7 ngày với nồng độ ban đầu. Đôi khi người ta xác định theo khoảng thời gian lượng men gấp đôi.

Số lượng tế bào nảy chồi được tính bằng số % tế bào nảy chồi soi thấy ở 10 trường kính. Những tế bào trẻ, khoẻ thường nảy chồi với tỷ lệ $40 \div 70\%$. Nếu số lượng nảy chồi thấp ta đánh giá là men đã bị già hoặc trong môi trường thiếu chất dinh dưỡng nào đó hoặc chất sinh trưởng cần thiết cho men. Cấy men này vào môi trường mới thấy tốc độ sinh sản tăng thì men này vẫn có lợi cho lên men và men thì trẻ lại.

10.4.4. Khả năng kết lắng

Chỉ tiêu này đặc biệt quan trọng đối với men bia và men rượu vang. Nấm men trong quá trình phát triển có thể ở dạng bông và có thể ở dạng bụi. Dạng bông lên men nhanh hơn dạng bụi, dạng bụi lên men chậm hơn, nhưng lên men hoàn toàn hơn. Điều quan trọng ở đây là men dạng bông khi lên men còn 1/3 chất khô sẽ kết lại với nhau và lắng xuống làm cho dịch lên men trong, lọc sản phẩm dễ hơn. Đặc tính này của dạng bụi kém hơn dạng bông nhiều.

Khả năng kết lắng phụ thuộc trước hết vào vỏ tế bào nấm men, các chất có mặt trong môi trường, đặc biệt là 2 ion Ca^{2+} và Mg^{2+} , chất keo và pH của môi trường, pH men kết lắng nhiều nhất là $4 \div 4,4$.

Khả năng kết lắng của nấm men trong sản xuất thường được xác định bằng phương pháp cảm quan. Gần đây người ta áp dụng phương pháp định lượng của Cộng hoà Séc như sau:

Lượng men giống tính ra khoảng 3 g chất khô được rửa bằng dung dịch muối sinh lý (0,85%) vào một ống định mức 500 ml (đường kính 5 cm) tới mức 400 ml. Sau khi lắc 1 phút,

ống định mức để yên sau 12 phút và xác định thể tích men lắng. Men dạng bông tốt xác định theo phương pháp này lớp cặn men không thấp hơn 28 mm.

10.4.5. Khả năng chịu cồn

Nhiều trường hợp ta thấy những chủng nấm men tạo ra nhiều cồn thì trước hết phải chịu được cồn ở nồng độ cao.

Để xác định khả năng chịu cồn ta chuẩn bị dịch lên men có nồng độ đường 2% và $10 \div 12^\circ$ cồn, cấy giống, để vào tủ ấm 25°C trong 5 ngày. Sơ bộ nhận xét xem chủng giống nào lên men sớm và lên men mạnh, thời gian sủi bọt... Sau 5 ngày cho thêm vào 1% hỗn hợp gồm 2% glucoza và 15° cồn, lại để ở 25°C . Hàng ngày quan sát sự sủi bọt (lên men) của các ống thí nghiệm. Nên tiến hành thí nghiệm ở trong lọ penixilin có nút cao su kín.

Chủng nào lên men được ở 15° cồn là chủng chịu được cồn cao và có khả năng sinh ra nhiều cồn.

10.4.6. Khả năng chịu nhiệt và chịu lạnh

Bình thường đối với nhiều chủng men rượu lên men ở dưới 10°C và trên 30°C là không thích hợp. ở những khoảng nhiệt độ này thường chúng lên men không hết đường và dễ tạp nhiễm.

Để khắc phục tình trạng này ta phải chọn các chủng nấm men thích hợp với nhiệt độ trên 30°C và dưới 10°C .

Chọn chủng nấm men chịu lạnh ta thường cho lên men ở 7°C với môi trường $10 \div 12^\circ\text{Bx}$ (chọn men bia), dịch quả có 18 + 20% đường (chọn men rượu vang). Những chủng nào lên men sớm ở điều kiện này là chủng chịu lạnh tốt.

Chọn những chủng lên men ở nhiệt độ cao ta thử ở 35°C . Chủng nào lên men sớm ở điều kiện này là những chủng lên men được ở nhiệt độ cao trên 30°C .

10.4.7. Tính chịu axit

Không phải tất cả các chủng nấm men đều chịu được môi trường có pH thấp. Có những loại dịch quả pH tới $2,5 \div 2,9$. Chọn chủng giống chịu được axit cao rất có ý nghĩa với nghề sản xuất rượu vang.

Muốn chọn được chủng nấm men có thể lên men ở các loại dịch quả có độ chua khác nhau ta thử chúng ở dịch quả có pH 2,6 với hàm lượng đường 18% và để ở $25 \div 27^\circ\text{C}$. Dùng axit tataric để điều chỉnh pH. Quan sát xem chủng nào phát triển và lên men sớm.

Kết thúc lên men cần xác định lượng đường sót, nếu cần phải định lượng rượu tạo thành.

10.4.8. Khả năng chịu sulfite (SO_2)

Là đặc điểm rất cần cho các chủng men rượu vang. Cần phải thử ở môi trường có lượng SO_2 tự do khác nhau. Nồng độ SO_2 tự do thường chọn là 100 mg/l.

Đầu tiên là sulfite mẫu thử với lượng SO_2 khác nhau, sau mỗi giờ lại thêm SO_2 và cho đến khi có 100 mg SO_2 tự do trong 1 lít. Lượng SO_2 ban đầu sẽ giảm dần do SO_2 tham gia vào các hợp chất trong dịch lên men (đường, aldehyt...), sau 1 ÷ 2 h lượng SO_2 được cấy men giống và cách tiến hành như sau:

Sau khi chuẩn SO_2 dịch được chứa trong bình 2 lít có nút thuỷ tinh, lắc đều và để yên 1 h (bình này có ống dẫn và có van chặn phía dưới). Chia dịch theo ống dẫn có van khoá vào các bình nhỏ. Mỗi bình 20 ml dịch. Chú ý làm cẩn thận, tránh rơi vãi, tung toé dịch. Để tránh SO_2 bay hơi các bình nhỏ được nút bằng nút cao su đã ngâm cồn, rồi tiếp giống (0,2 ml giống đã nhân 2 ngày cho mỗi bình nhỏ).

Đặt các bình nhỏ đã có giống vào tủ ấm 27°C trong 10 ngày. Hàng ngày quan sát sự sinh trưởng và lên men ở các bình thử. Mỗi chủng cần thử ở 3 bình nhỏ chứa 20 ml dịch.

Cũng có thể dùng *phương pháp xác định nhanh khả năng chịu SO_2* như sau: Chuẩn bị môi trường thạch - nước quả (nước quả đã sulfite hoá có 100 mg SO_2 tự do trong 1 l và 3% thạch). Nước quả cũng làm sulfite hoá và bổ sung như trên, nhưng tính toán cần phải tính thêm 3% thạch. Như vậy lượng sulfite trong môi trường sẽ cao hơn khi trong môi trường dịch sulfite hoá bình thường.

Xác định sulfite tự do bằng phương pháp iod.

Sau khi dịch quả đủ lượng SO_2 tự do (100 mg/l) cho vào các hộp Petri và cấy giống bằng cách chấm điểm (lấy đầu que cấy chấm sâu vào dịch nhân giống 1 cm rồi chấm lên bề mặt môi trường thạch theo từng điểm). Mỗi hộp Petri cấy khoảng 25 điểm. Rồi đặt hộp Petri vào tủ ấm 27°C . Quan sát xem chủng nào phát triển sớm và tốt là những chủng chịu sulfite.

Trên đây ta chọn những chủng chịu 100 mg SO_2 tự do trong 1 l dịch, nếu cần ta thử và chọn giống ở nồng độ SO_2 150 mg/l.

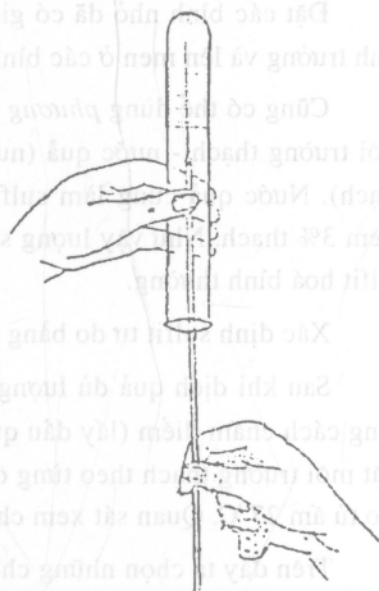
10.4.9. Xác định phenotip (phenotype) K, N và S của nấm men

Trong quá trình sống giữa các chủng nấm men người ta nhận thấy rằng, tất cả những chủng nấm đường *Saccharomyces* đều thuộc về một trong 3 típ sống ngoại cảnh phenotip: típ đối kháng ức chế với các chủng khác do sinh ra độc tố nấm men, được gọi là típ Killer (K); típ trung tính (N) và típ nhạy cảm (S) (xem thêm ở phần mục 10.7.3.2).

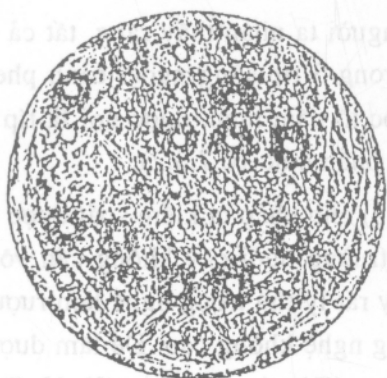
Sử dụng chủng đã xác định phenotip (K, N hoặc S) cho phép ta kiểm soát được ở mức độ nào đó về độ thuần khiết của chủng đưa vào môi trường nuôi cấy không cần vô trùng tuyệt đối mà vẫn hoạt động được bình thường. Điều này rất lý thú trong nghề làm rượu vang và có thể là trong sản xuất bia ở điều kiện trang bị công nghệ không cao. Để làm được điều này việc cần thiết là phải xác định hàm lượng phần trăm (%) các phenotip (K, N, S) trong dịch lên men tự nhiên (làm đối chứng) và trong dịch đã khử khuẩn được cấy giống thuần khiết đã được xác định phenotip.

Kỹ thuật xác định phenotip được thực hiện như sau (đối với men rượu vang): Đổ vào hộp Petri môi trường thạch - nước nho 1,5%, để 2 ÷ 3 ngày tới khi môi trường khô nhẹ ta gieo cấy giống huyền phù nấm men. Để ngăn chặn sự thủy phân thạch ta thanh trùng riêng phần thạch 3% rồi trộn với nước nho ở 60 ÷ 70°C. Muốn kiểm tra vùng ức chế sinh trưởng của giống nhạy cảm (S) được rõ, người ta có thể cho thêm vào môi trường nóng chảy dung dịch xanh metylen 0,5% trước khi đổ môi trường vào hộp Petri (theo tỷ lệ 1 ml cho 200 ml môi trường).

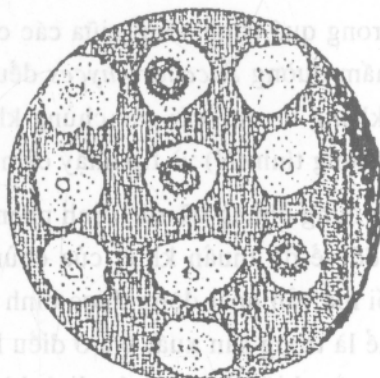
Những khuẩn lạc mọc riêng biệt cần phải xác định Phenotip. Lấy que kim tách khuẩn lạc cả phần môi trường đặc đem chuyển đặt vào bên trong thành ống nghiệm đã có 0,5 ml nước máy vô khuẩn và châm vào hộp Petri với thảm phenotip S đã mọc tốt. Mỗi hộp Petri có thể châm liên tiếp 30 điểm từ chủng nghiên cứu (hình 10.9). Khuẩn lạc đưa vào ống nghiệm được làm dịch huyền phù giống. Đồng thời ở hộp Petri khác có sẵn môi trường thạch - dịch nho (nhưng không có thảm mọc phenotip S) lấy que làm các vòng thảm cho những chủng nấm men nghiên cứu đường kính khoảng 1,5 cm. Ở trung tâm các vòng được cấy trích chủng phenotip K đã được sơ bộ nuôi trên môi trường thạch - dịch nho. Có thể đưa vào hộp Petri hàng chục vòng thảm chủng nghiên cứu trên thảm chủng phenotip S (hình 10.10). Sau 2 ngày đem nuôi ở 25 - 28°C và xác định phenotip chủng nghiên cứu. Nếu xung quanh khuẩn lạc tạo thành vùng trong vòng thảm chủng S thì chủng đó là chủng K. Những chủng mà mọc ở giữa vòng thảm của chúng chủng K mọc được là chủng S, còn lại là chủng N.



Hình 10.8. Cây trích
(đối với chủng kích thích khí)



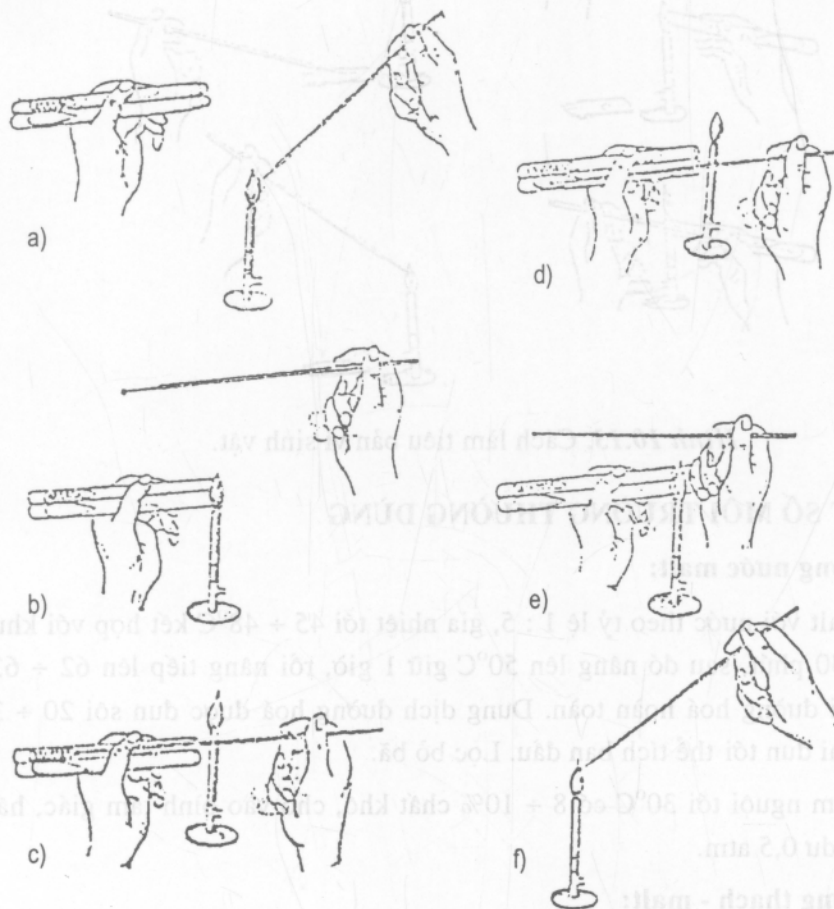
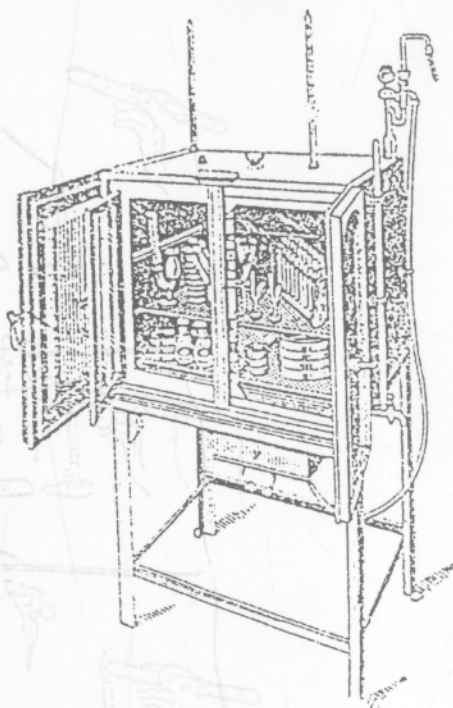
Hình 10.9. Khuẩn lạc của chủng nghiên cứu
trên thảm của chủng S (nhạy cảm)



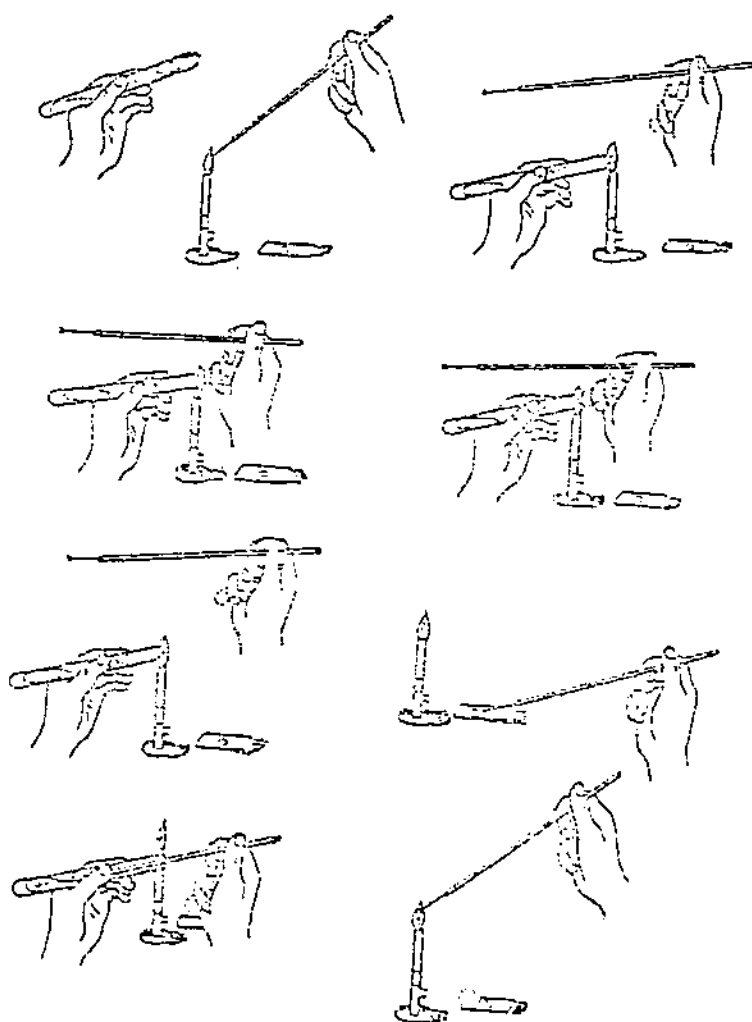
Hình 10.10. Khuẩn lạc của chủng K
trên thảm chủng nghiên cứu

Sau đây giới thiệu một số dụng cụ và động tác thường dùng trong công tác nghiên cứu vi sinh vật (hình 10.11, 10.12 và 10.13).

Hình 10.11. Tủ ẩm



Hình 10.12. Thao tác cấy chuyển sang ống thạch nghiêng.



Hình 10.13. Cách làm tiêu bản vi sinh vật.

10.5. MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG THƯỜNG DÙNG

– Môi trường nước malt:

Hoà bột malt với nước theo tỷ lệ 1 : 5, gia nhiệt tới $45 \div 48^{\circ}\text{C}$ kết hợp với khuấy đảo. Giữ nhiệt trong 30 phút, sau đó nâng lên 50°C giữ 1 giờ, rồi nâng tiếp lên $62 \div 63^{\circ}\text{C}$, giữ nhiệt cho đến khi đường hoá hoàn toàn. Dung dịch đường hoá được đun sôi $20 \div 30$ phút. Cần thêm nước khi đun tới thể tích ban đầu. Lọc bỏ bã.

Dịch lọc làm nguội tới 30°C có $8 \div 10\%$ chất khô, cho vào bình tam giác, hấp thanh trùng với áp suất dư 0,5 atm.

– Môi trường thạch - malt:

Dịch đường malt mới lọc hoặc đã thanh trùng ở trong các bình tam giác có 8% chất

khô và bổ sung thạch (20 g cho 1 lít). Thạch sơ bộ hoà nước, nấu nóng chảy có thể phải lọc qua 2 lớp vải màn xen vào giữa là lớp bông rồi cho vào dịch malt. Đun dịch thạch - malt cho nóng chảy đều và chia vào các ống nghiệm hoặc các bình tam giác. Thanh trùng ở $0,5 \div 0,8$ atm.

– Môi trường nước thịt - pepton (MP) ^(*):

Lấy 500 g thịt bò miếng không lẫn mỡ, gân, loại bỏ các sợi nhỏ, chỉ còn thịt nạc, đem xay nhỏ rồi cho vào 1 lít nước cất để ở nhiệt độ thường 12 giờ, rồi gia nhiệt lên đến $50 \div 60^\circ\text{C}$ trong một giờ trên bếp cách thuỷ (nâng nhiệt từ $25 \div 30^\circ\text{C}$ đến 60°C trong 1 h). Sau đó lọc qua vải màn, thêm 10 g pepton và 5 g muối ăn, đun nóng tới khi tan hết pepton, thêm nước cho đủ 1 lít. Chính pH tới $7,0 \div 7,2$ bằng Na_2CO_3 rồi chia vào các bình tam giác hoặc ống nghiệm. Thanh trùng ở áp suất dư $0,75$ atm trong 30 phút. Có thể sau 3 ngày thanh trùng lặp lại.

Nước thịt sau khi lọc có thể đem cô đặc ở nhiệt độ $60 \div 70^\circ\text{C}$ tới khi thành khối sệt, ta được một dạng cao thịt, bảo quản lạnh và để dùng dần.

– Nước chiết men:

Có thể dùng men bia dạng sữa, men bánh mì dạng ép, dạng khô để chế ra nước chiết men.

80 g men dạng ép hay 50 g dạng khô cho vào 1 lít nước, điều chỉnh pH tới 6,8, sau đó đun sôi 30 phút, chiết lấy nước trong, bỏ cặn, kiểm tra lại pH, lọc và thanh trùng.

Từ nước chiết men ta pha thành môi trường thạch - nước chiết men.

Men tự phân và cao men: Nguyên liệu là men bánh mì dạng ép hoặc khô, men bia rửa sạch ở dạng men sữa.

Men cũng được hoà với nước (men ép tỷ lệ 1 : 4; men khô tỷ lệ 1 : 6; men sữa - 1 : 1) giữ ở 50°C trong 24 h. Chiết lấy phần nước trong, bỏ cặn, trung hoà và đun sôi. Từ dịch men tự phân ta có thể pha thành môi trường thạch - nước men - đường (nước men được thêm 0,5% muối ăn, $1 \div 2\%$ glucoza và 2% thạch). pH 6,8. Thanh trùng ở $0,5$ at trong 30 phút. Có thể thay glucoza bằng 5% sacaroza, pH = $6 \div 6,5$.

Dịch men tự phân có thể cô đặc thành cao men, đem dùng dần để pha môi trường với tư cách là nguồn nitơ hữu cơ (pepton, peptit, axit amin, nucleotit...) và các nguồn vitamin, đặc biệt là vitamin nhóm B.

^(*) Nước thịt cũng có thể làm như sau: Thịt bò nạc tươi đem nghiền (xay) hoặc thái nhỏ cho vào bình hoặc cốc, thêm nước theo tỉ lệ 1 thịt với 2 nước, khuấy đều, giữ ở $4 \div 6^\circ\text{C}$ trong tủ lạnh khoảng $18 \div 20$ h, hoặc để ở tủ ấm 37°C trong 2 h, lấy ra đun sôi $5 \div 7$ phút, lọc qua vải màn hoặc giấy lọc, thêm nước cho tới thể tích lúc đầu. Nước thịt chia vào các bình nón, thanh trùng ở 120°C trong $30 \div 40$ phút. Nước thịt sau khi thanh trùng có pH = 6,2, hầu như không có protein mà chỉ có axit amin, vitamin, muối khoáng hoà tan.

Môi trường Hansen

Glucoza 20 g
(có thể thay bằng sacaroza 50 g)

Trong thực tế người ta hay dùng môi trường Hansen cải tiến với thành phần như môi trường này được thêm 10 g cao men.

Pepton 10 g
 KH_2PO_4 3 g
 MgSO_4 2,5
Nước cho đủ 1 lit

Môi trường Genneberg

Sacaroza 150 g
Asparagin hoặc pepton 3 g
 KH_2PO_4 5 g
 MgSO_4 2 g
 CaCO_3 5 g
Nước cất cho đủ 1 lít

Môi trường Genneberg + amoni

Sacaroza 150 g
 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2 g
 KH_2PO_4 1 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g
 CaCO_3 5 g
Nước cất cho đủ 1 lít

Môi trường Rider: Thành phần môi trường có các loại muối sau, g/l:

Amoni sulfat	3	Natri clorua	0,5
Magie sulfat	0,7	KH_2PO_4	1,0
Canxi nitrat	0,4	K_2HPO_4	0,1

Dùng môi trường nuôi nấm men cần loại bỏ canxi nitrat, vì nấm men không đồng hoá được chất này. pH đầu của môi trường là 6,6.

Để thử sinh trưởng của nấm men người ta thêm 2% đường vào môi trường.

Để thử lên men của nấm men người ta thêm 5% đường vào môi trường.

Để môi trường tổng hợp đầy đủ các chất dinh dưỡng và sinh trưởng ta cần phải bổ sung các hợp phần vitamin như sau, $\mu\text{g/ml}$:

Inozit	5,0	Pyridoxin	0,25
Biotin	0,0001	Axit nicotinic	0,5
Axit pantotenic	0,25	Pha trong nước cất	
Tiamin	1,0		

Chú ý: Khi dùng môi trường chọn lại đối với nấm men, để cho nấm men chiếm ưu thế và ức chế vi khuẩn, ta cho vào môi trường chất kháng sinh neomixin với hàm lượng 20 đv/1 ml môi trường, hoặc hỗn hợp penixilin với streptomixin cho đồng thời (50 ÷ 100 đv trong 1 ml môi trường).

Để ngăn chặn nấm mốc mọc ở các loại môi trường lỏng hoặc môi trường thạch người ta cho thêm vào môi trường cồn để có 4% cồn hoặc 0,2% natri propionat.

Khi phân lập từ giống men tạo màng người ta cho vào môi trường axit iodua axetic với số lượng 0,1 ÷ 0,2%.

Môi trường Saburo (Sabouraud)

Pepton	10 g
Glucose	40 g
Thạch	15 g
Nước cho đủ	1000 ml
pH	5,6

10.6. NHỮNG DUNG DỊCH THUỐC NHUỘM TIÊU BẢN VI SINH VẬT VÀ CÁCH LÀM TIÊU BẢN

10.6.1. Tiêu bản vi sinh vật

Để nghiên cứu vi sinh vật trên kính hiển vi ta dùng 2 loại tiêu bản: tiêu bản vi sinh vật sống và tiêu bản vi sinh vật chết.

*** Tiêu bản vi sinh vật sống có hai dạng:**

– Tiêu bản “giọt treo”: được chuẩn bị trên phiến kính có vết lõm tròn, được mài sẵn, rửa vết lõm được bôi bằng vazolin, trên mặt đáy bằng lam kính ở giữa mang một giọt treo có vi sinh vật. Dùng tiêu bản này quan sát hình thái, sự chuyển động, sinh sản của tế bào vi sinh vật trong một thời gian tương đối dài dưới kính hiển vi.

– Tiêu bản “giọt giàn đều” trên phiến kính: Lấy 1 giọt môi trường nuôi cấy vi sinh vật bằng vòng que cấy đưa lên phiến kính đã rửa sạch, rồi giàn đều, đặt bằng lam kính. Khi đặt tránh còn bọt khí bên trong, lấy giấy lọc thấm khô dịch tràn ở bên ngoài lam kính.

Dùng tiêu bản này để xác định hình dáng, cấu trúc tế bào, sự chuyển động và đặc tính sinh sản của vi sinh vật.

*** Tiêu bản vi sinh vật chết là tiêu bản “tế bào cố định” trên phiến kính**

Lấy 1 giọt môi trường có vi sinh vật (giọt không lớn lắm) bằng vòng que cấy rồi bôi lên phiến kính sạch, giàn đều. Để khô vết bôi ở nhiệt độ phòng hoặc đưa nhẹ qua ngọn lửa.

Để cố định vết bôi người ta thường đưa qua ngọn lửa 3 ÷ 4 lần. Có thể giở cồn ngập vết bôi trong vài phút (hoặc nhúng vết bôi vào cồn hoặc ete hay dung môi khác). Tiêu bản được cố định, sau đó rửa trôi vết bôi bằng dịch thuốc nhuộm với thời gian xác định, rồi rửa nhẹ bằng nước nhờ bình có quả bóp. Khi rửa nước sẽ kéo theo thuốc nhuộm thừa, còn tế bào

chết đã gắn trên tiêu bản và bắt màu. Tiêu bản được thấm khô bằng giấy lọc, rồi đem soi kính. Với tiêu bản vi khuẩn nên soi bằng vật kính dầu.

Soi nấm men thường dùng các độ phóng đại 15×10 và 15×40 . Có thể lúc đầu dùng vật kính 10 sau chuyển sang vật kính 15.

10.6.2. Cách pha những dung dịch thuốc nhuộm và chỉ thị

Những thuốc nhuộm kiềm thường là xanh metylen, fuxin kiềm hoặc trung tính, gentian violet (tím), tím metyl, xanh lục metylen, tionin.

Những thuốc nhuộm axit thường là eozin, fuxin axit, congo, axit pyric, fluoresxin v.v...

– **Xanh metylen** (trong dung dịch cồn bão hoà):

Cho 10 g xanh metylen vào 100 ml cồn 96° để vài ngày, thỉnh thoảng lắc, rồi đem lọc.

– **Xanh metylen** (trong dung dịch kiềm) - theo Leffer:

Cho 30 ml dung dịch xanh metylen (cồn bão hoà) và 1 ml dung dịch KOH 10% vào 100 ml nước.

– **Xanh metylen theo Finku:**

Pha thành 3 dung dịch riêng biệt: dung dịch 1 - 0,9 g Na_2HPO_4 trong 500 ml nước cất; dung dịch 2 - 13,6 g KH_2PO_4 trong 500 ml nước cất; dung dịch 3 - 0,1 g metylen xanh hoà vào 500 ml nước cất.

Hỗn hợp gồm có: 0,25 ml dd 1 + 99,75 ml dd 2 + 100 ml dd 3.

– **Fuxin** (dung dịch bão hoà cồn):

1 g fuxin kiềm hoà vào 10 ml cồn 96°. Lắc, để yên trong vài ngày.

– **Fuxin với axit carbollic** (phenol) dùng để nhuộm bào tử:

1 g fuxin kiềm, nghiền trong cối sứ với 10 ml cồn 96°, bổ sung thêm 10 g axit carbollic tinh thể, không ngừng nghiền và tiếp dần thêm 100 ml nước.

– **Tím gentian** (gentian violet) - dùng nhuộm gram:

1 g gentian violet khô hoà vào 10 ml cồn 96° rồi trộn lẫn với 100 ml dung dịch carbollic 5%.

– **Dung dịch lugol:**

2 g KI hoà vào 5 ml nước cất thêm 1 g I_2 tinh thể. Sau đó thêm dần nước cất tới 300 ml. Dung dịch được bảo quản trong lọ sẫm màu và để ở chỗ tối.

– **Đỏ trung tính:**

Để nhuộm các tiêu bản cố định thường dùng dung dịch đỏ trung tính có nồng độ $1 \div 1,5\%$. Cũng từ những dung dịch này pha thành dung dịch có nồng độ 0,1% hoặc 0,15%

để dùng ngay, vì những dung dịch này không bền.

– **Dung dịch Sudan III** - dùng để nhuộm các giọt mỡ trong tế bào:

1 g sudan III cho vào 200 ml cồn 90° hoặc axit lactic đặc.

– **Xanh bromtymon:**

0,4 g xanh bromtymon (bromtymonblau) hoà vào 40 ml nước cất, đun nóng tới sôi và thêm 6,4 ml dung dịch NaOH 0,1 N. Nếu chất màu không hoà tan và dịch không có màu lục thì thêm vài giọt NaOH. Sau đó bổ sung nước cho đủ 1000 ml.

10.7. CHỌN LỌC NẤM MEN CÓ HOẠT TÍNH CAO

Trong quá trình chọn lọc các chủng nấm men có hoạt tính cao được dùng trong công nghiệp người ta cần phải thực hiện các phương pháp khác nhau: chọn lọc tự nhiên (như phần đầu của chương này đã giới thiệu), chọn lọc thích ứng, làm đột biến, lai ghép tế bào (kỹ thuật tế bào trần) và tái tổ hợp ADN.

10.7.1. Chọn lọc thích ứng

Hướng cho vi sinh vật quen dần với điều kiện nuôi cấy ở môi trường mới, như nhiệt độ, pH, môi trường có chất kháng sinh hoặc môi trường có chất cảm ứng nào đó. Dần dần tạo ra các chủng mới có các đặc điểm tốt hơn so với các chủng gốc bố mẹ, ông bà...

Đối với chọn giống nấm men cho rượu vang, cho bia hay lên men rượu người ta cũng luyện dần cho giống men chịu dần pH thấp, chịu nhiệt độ thấp, chịu nồng độ đường cao, nồng độ rượu cao hoặc chịu nồng độ SO₂ cao.

Với phương pháp chọn lọc thích ứng người ta có thể chọn được các chủng lên men rượu vang ở nhiệt độ tương đối thấp, chịu được SO₂ cao, chịu được nồng độ đường cao và tạo ra trong dung dịch lên men tới 14 ÷ 17° rượu. Nhiều chủng rượu vang bền với cồn được tạo ra theo phương pháp này.

10.7.2. Đột biến

Chọn lọc với sử dụng chất đột biến khác nhau là phương pháp tạo giống tích cực nhất để có thể chọn ra các chủng giống có năng suất cao của các dạng hữu ích của vi sinh vật. Dưới sự biến đổi của vi sinh vật làm biến đổi tính di truyền, cấu trúc và chức năng di truyền của chúng bị biến đổi bền vững có thể truyền đời này qua đời khác qua các thế hệ.

Đột biến có hai dạng:

- Đột biến thuộc tế bào chất - những biến đổi có thể di truyền được, nảy sinh ở tế bào chất và di truyền từ tế bào chất sang tế bào chất.
- Đột biến thuộc về nhân - những biến đổi có thể di truyền được, nảy sinh ở nhân và di truyền từ nhân sang nhân.

Như chúng ta đã biết, tính thích nghi, năng lực lên men, chất lượng sản phẩm của nấm men chịu ảnh hưởng của các yếu tố xác định được gọi chung là các tác động tự nhiên. Chúng thuộc tất cả các yếu tố thuộc về môi trường nuôi cấy nấm men và sự biến đổi của nấm men thuộc loại này là các biến đổi *phenotype* (kiểu ngoại cảnh, kiểu hiện tượng). Trái lại, những ảnh hưởng tự nhiên lại được quyết định bởi đặc tính di truyền của từng giống nấm men và những biến đổi sâu xa ở bộ gen (genom) thuộc loại này là biến đổi sinh học ở mức độ gen - *genotype* (kiểu gen, kiểu di truyền, kiểu sinh học).

Có nhiều phương pháp nghiên cứu làm biến đổi và phát triển đặc tính di truyền của nấm men, như nâng cao hoạt tính, các tính trạng về sinh lý, đồng hoá các loại đường, khả năng tạo cồn... Các phương pháp đó là: sàng lọc, chọn lọc đột biến, lai ghép... Trong đó làm biến đổi gen là phương pháp hiện đại nhất làm biến đổi cấu trúc phân tử ADN và do đó làm biến đổi vật liệu di truyền và thể hiện bằng các tính trạng trong đời sống nấm men được di truyền từ thế hệ này qua thế hệ khác. Như vậy, các chủng nấm men thu được đã bị biến đổi về mặt sinh học thường không còn bộc lộ những tính chất của ông bà, bố mẹ, cũng có thể tốt hơn một số thuộc tính, nhưng có thể lại kém đi như phát triển chậm lại, tạo ra một số hương vị mới không mong muốn chẳng hạn. Trong trường hợp này rất hay gặp khi tuyển chọn nấm men bia. Phương pháp này làm đột biến sinh học - *genotype*, ít khi được sử dụng đối với men bia do bản chất đa bội (polyploid) và dạng nhị bội không hoàn chỉnh (aneuploid) của chúng.

Trước đây, người ta cho rằng các giống nấm men bia có tính di truyền rất ổn định. Tuy nhiên, hiện nay với sự trợ giúp của phương pháp đánh dấu ADN, các nhà khoa học đã nhận thấy sự bất ổn định về di truyền xảy ra ở nhiều chủng giống nấm men bia. Ảnh hưởng gây ra bởi sự đột biến nấm men thường được biểu hiện thông qua 3 trạng thái chính và chúng rất có hại đối với quá trình lên men, đó là:

- Nấm men bia chuyển từ trạng thái kết lắng sang dạng không kết lắng;
- Mất khả năng lên men đường maltoza;
- Xuất hiện các biến thể có khả năng tạo hương kém;

- Sự suy giảm khả năng hô hấp hay còn gọi là đột biến gen "petite" là kiểu đột biến xảy ra nhiều nhất trong các giống men bia. Sự đột biến này xảy ra ngẫu nhiên khi một đoạn ADN trong ty thể trở thành khiếm khuyết và làm sai lệch bộ gen ở ty thể. Các ty thể này sau đó không thể tổng hợp được một số protein xác định. Kiểu đột biến gen này được gọi là kiểu "petite" (làm nhỏ đi) do các khuẩn lạc của thể đột biến thường nhỏ hơn rất nhiều so với khi giống men này được hô hấp đầy đủ (cũng gọi là kiểu "grande" - làm lớn lên). Quá trình đột biến gen làm suy giảm khả năng hô hấp thường xảy ra với tần số nằm trong khoảng $0,5 \div 5\%$ so với tổng số tế bào nấm men. Tần số này có thể lên đến 50%. Sự thiếu hụt các chức năng của ty thể làm mất đi khả năng hô hấp hiếu khí và kết quả là các chủng nấm men này

không có khả năng chuyển hoá các loại carbon có khả năng lên men như lactoza, glycerol và ethanol. Sự đột biến này có thể được biểu hiện ra bằng khả năng thực hiện một số các phản ứng hoá học đặc của tế bào nấm men, tạo ra những biến đổi về sự hấp thụ đường, sự tiêu thụ các sản phẩm cuối và khả năng thích ứng với các yếu tố gây sốc như rượu etylic và nhiệt độ. Khả năng kết lắng, thành tế bào, cấu trúc lớp tế bào chất và đặc biệt là hình thái tế bào đều chịu ảnh hưởng của sự đột biến.

Các chủng nấm men bia thiếu năng hô hấp hoặc tạo nhiều thể đột biến thiếu năng hô hấp thường có năng lực lên men và khả năng tạo hương kém. Ví dụ như ở các loại bia được sản xuất bởi các thể đột biến này thường có nồng độ diacetyl và rượu cao hơn, tốc độ lên men dịch đường thấp hơn, tế bào chết nhiều hơn, đồng thời sinh khối thu được và khả năng kết lắng của nấm men cũng giảm mạnh.

Sàng lọc quần thể nấm men để thu nhận các đột biến thể tự nhiên được xem là một kỹ thuật có giá trị hơn cả do tránh được hiện tượng sử dụng lẫn lộn các thể đột biến tiêu cực. Để tuyển chọn các chủng nấm men bia đột biến có tốc độ chuyển hoá maltoza cao, người ta sử dụng 2-deoxy-glucosa, một chất tương tự glucosa. Kết quả thu được một chủng nấm men đột biến tự nhiên có khả năng kháng lại 2-deoxy-glucosa. Qua nghiên cứu, nhiều chủng nấm men khác nhau có khả năng hấp thụ maltoza mà không bị ức chế bởi glucosa đã được phân lập. Chính điều này đã làm cho tốc độ lên men của nấm men tăng lên và không gây ra bất kỳ sự biến đổi nào về hương cũng như vị của bia.

Cơ thể nấm men *Saccharomyces* tuy đơn giản nhưng mang đầy đủ tính chất của một cơ thể nhân chuẩn. Sau khi nghiên cứu động học của quá trình phục hồi ADN sợi kép và hàm lượng ADN của tế bào nấm men *Saccharomyces* tại pha dừng Laner đã xác định được genom của thể đơn bội bao gồm $1,4.10^7$ cặp bazơ. Cùng với Whitney và Hall, ông đã nghiên cứu về thành phần ADN genom và cho thấy khoảng 95% các chuỗi là thành phần nhân bản đơn (single copy), trong đó A+T chiếm 60% trong số các bazơ. Bằng kỹ thuật phân tích trên kính hiển vi điện tử kết hợp với một số phương pháp khác, Laner đã xác định được 16 cặp nhiễm sắc thể của *Saccharomyces cerevisiae*. Phân tử ADN dài khoảng $1,5.10^5 + 2,5.10^6$ cặp bazơ. Các nhiễm sắc thể đều chứa một phân tử ADN xoắn kép. Đa số các gen qui định các tính trạng khác nhau đều nằm trong nhiễm sắc thể. Tuy vậy cũng có một lượng lớn ADN của tế bào (5 + 35%) nằm ở tế bào chất và các bào quan. ADN ty thể là những phân tử mạch vòng có kích thước khoảng 25 μ m, số lượng bản sao trong tế bào khoảng 20 + 70. Chúng mang gen tạo các enzym hô hấp và tạo thành phần của hệ tổng hợp protein của chính ty thể.

Nghiên cứu các đặc tính di truyền học của nấm men được triển khai lần đầu tiên tại phòng thí nghiệm của Carlsberg tại Đan Mạch, năm 1935. Tại đây, các nhà khoa học đã thiết lập được chu kỳ sống đơn bội - đa bội của nấm men. Các loài *Saccharomyces* có thể biến đổi giữa hai trạng thái đơn bội (có một bộ đơn nhiễm sắc thể trong nhân) và trạng thái

lượng bội (có hai nhiễm sắc thể). Nấm men có hai giới tính a và α . Các tế bào đơn bội sinh sản a và α được hình thành qua nguyên phân bằng cách nảy chồi. Chúng kết hợp với nhau tạo nên bào tử lưỡng bội a/α . Nhưng khi nòi lưỡng bội này gặp điều kiện môi trường dinh dưỡng kém, thì các tế bào của nó diễn ra hiện tượng giảm phân bằng cách phân bào giảm nhiễm và biến đổi thành dạng nang bào tử ở nhân. Có chứa 4 bào tử sinh dưỡng trong đó có hai bào tử giới tính a và hai bào tử giới tính α .

Các thành của bào tử nang có thể bị phân huỷ bằng cách sử dụng chế phẩm enzym glucanaza. Bốn bào tử nhỏ trong bào tử nang có thể phân tích được bằng cách sử dụng các thiết bị vi thao tác, các bào tử này sau đó được kích thích nảy chồi, kiểm tra khả năng lên men và tiếp tục sử dụng cho các thí nghiệm lai tạo sau này. Cả hai giống đơn bội và lưỡng bội đều có thể cùng nhau tồn tại một cách ổn định và có thể sinh sản bằng phương thức phân bào giảm nhiễm hoặc nảy chồi. Các giống nấm men bia không có khả năng biến đổi ngay lập tức đối với các kỹ thuật lai tạo do chúng thường không phải dạng đơn bội hay lưỡng bội mà chúng thuộc dạng không nguyên bội (aneuploid) và dạng đa bội. Kết quả là các giống này ít hoặc không có khả năng ghép đôi, hình thành bào tử kém và các bào tử được tạo thành có tỷ lệ sống sót thấp. Những năm gần đây, các nhà khoa học nhận thấy rằng có thể làm tăng khả năng tạo bào tử của nấm men bia bằng cách điều chỉnh thành phần môi trường và ổn định nhiệt độ.

Qua đột biến và sàng lọc chọn các chủng giống để thu các thể đột biến gần đây được chứng minh là một kỹ thuật thành công hơn do tránh được sử dụng lần các thể đột biến tiêu cực. Để tuyển chọn các chủng men bia đột biến có tốc độ chuyển hoá maltoza, người ta đã sử dụng 2-deoxy-glucosa, một chất tương tự glucoza. Qua đây người ta đã nhận được thể đột biến có thể đồng hoá maltoza mà không bị glucoza ức chế. Điều này làm cho tốc độ lên men dịch đường malt tăng lên và không gây ra bất kỳ sự biến đổi về hương vị của bia. Các đột biến gen của nấm men thường xảy ra khi sử dụng các thể đột biến tự phát tuyển chọn được các chủng nấm men bia kháng lại chất diệt cỏ sulfometuron vào lên men bia và đã thu được loại sản phẩm có lượng diacetyl được tạo ra bằng 50% so với chủng bố mẹ. Các thể đột biến đã bị vô hoạt một phần hoạt tính của enzym tạo thành tiền chất của diacetyl là α -acetolactat (α -acetylactat synthetaza).

Làm đột biến nhân tạo người ta hay dùng phương pháp chiếu xạ chất đột biến và các chất hoá học, như chiếu tia tử ngoại UV, tia rentgen (X), tia neutron, những hợp chất nitơ dạng iprit, etylenimin và dietylsulfata.

Chọn giống men rượu vang với sự sử dụng chiếu tia tử ngoại và hơi dietylsulfata dưới sự lãnh đạo khoa học của S. I. Alikhanhian và G. M. Nalbandian. Nhóm này đã chọn được chủng thuộc loài *Saccharomyces oviformis* sớm tạo màng trên dịch lên men và tích tụ cồn tới 17,5% cồn.

10.7.3. Sự tạo giống lai (Hybridization)

Trong lai tạo giống lai dựa trên cơ sở lai ghép hai tế bào bố mẹ có tính trạng có lợi giao phối với nhau để tạo ra con lai có tính trạng lai vượt trội (như sinh trưởng và phát triển mạnh hơn so với bố mẹ) theo một hoặc một số tính trạng. Với phương pháp lai tạo giống người ta đã chọn được những chủng giống vi sinh vật có khả năng cho năng suất cao hơn các chủng nguyên thủy.

Tạo giống lai của nấm men dựa trên cơ sở cho các bào tử hoặc các tế bào đơn bội giao hợp giữa chúng với nhau.

Những nấm men dị tân do lai giống nhân tạo ở mức độ nang bào tử lần đầu tiên được thực hiện là O. Vinge và O. Laust, năm 1938. Họ đưa bào tử nang của một loài hoặc khác loài từng đôi một cho vào những giọt dinh dưỡng khác nhau với sự trợ giúp của thiết bị vi thao tác.

Năm 1943, K. Lindegren và G. Lindegren đã trộn 2 giống men đơn bội bền vững để nhận một loại bào tử và tách được hợp tử nhờ kỹ thuật vi thao tác. Các hợp tử nảy mầm và phát triển thành tế bào mới.

Phương pháp thứ ba là chọn lai ghép các chủng đồng tân, trong trường hợp các bào tử đơn bội được tách từ túi nang sẽ tạo thành lưỡng bội, cũng như trong các thế hệ sau những bào tử riêng rẽ xảy ra sự giao hợp các tế bào đơn bội.

Nhờ kỹ thuật vi thao tác K. V. Kosikov và O. Raevskaia đã cho chủng Ia (Я) của *Saccharomyces* giao hợp với *S. carlsbergensis* và nhận được chủng men rượu lai có thể lên men được hoàn toàn rafinoza.

Đem các giống họ hàng xa như *Saccharomyces cerevisiae* giao hợp với *Schiz. pombe* là những thí nghiệm rất lý thú.

Giống lai nhận được có hình thái và sinh lý riêng biệt.

Cũng nhờ kỹ thuật vi thao tác nhiều giống men rượu vang lai tạo đã được hình thành và có hàng loạt các đặc tính có lợi cho nghề làm rượu vang: lai giống *S. vini*, *S. chodat* hoặc *S. uvarum* với *S. paradoxus* ta được một giống lai có hoạt tính pectinaza khá cao và lực lên men khá mạnh. Rõ ràng những chủng con lai đưa vào sản xuất rất kinh tế.

Lựa chọn men rượu vang bằng cách lai ghép chọn giống dẫn đầu là các nhà khoa học Pháp, Ý, Mỹ và CHLB Đức.

Các chủng nấm men đơn bội và nhị bội có khả năng sinh khối là như nhau, nhưng khả năng tạo cồn là khác nhau: thể nhị bội cho khả năng tạo cồn là lớn hơn. Lai ghép có thể sử dụng cho các hiệu quả đa bội. Ở nấm men sự giao hợp tế bào đơn bội với tế bào có mức bội thể cao hơn cho phép đưa vào hệ genom đơn bội của tế bào, dần dần sẽ nâng mức bội thể.

Có thể nhận được các mức đa bội thể giữa đơn bội tới lục bội thể. Các thể này có khả năng cố định trong quan hệ mức bội thể của chúng và sinh sản vô tính.

10.7.3.1. Lai chéo dòng (Cross-breeding)

Mặc dù kỹ thuật lai chéo dòng bị rơi vào quên lãng trong nhiều năm do sự xuất hiện những phương pháp công nghệ sinh học tiến bộ như tái tổ hợp ADN là phương pháp được xem là hoàn hảo đối với quá trình cải tiến các giống men bia mới, nhưng gần đây kỹ thuật lai chéo lại được sử dụng một cách rộng rãi và tỏ ra rất có giá trị. Ví dụ, như sử dụng các kỹ thuật di truyền cổ điển các nhà khoa học đã tạo ra giống men bia mới với lượng diacetyl chỉ bằng 10% so với giống nấm men cùng loài tại thời điểm kết thúc quá trình lên men. Cũng giống như việc lai tạo giữa giống nấm men nổi và giống nấm men chìm đã tạo ra một giống lai có thời gian lên men ngắn hơn, bia tạo ra có hương vị tốt hơn. Một trong những ưu điểm quan trọng của phương pháp lai chéo dòng là khi tiến hành chúng ta không phải chịu áp lực gây ra bởi các câu hỏi thuộc phạm trù đạo đức và những lo sợ gặp phải như tái tổ hợp ADN.

10.7.3.2. Lai hiếm (Rare mating)

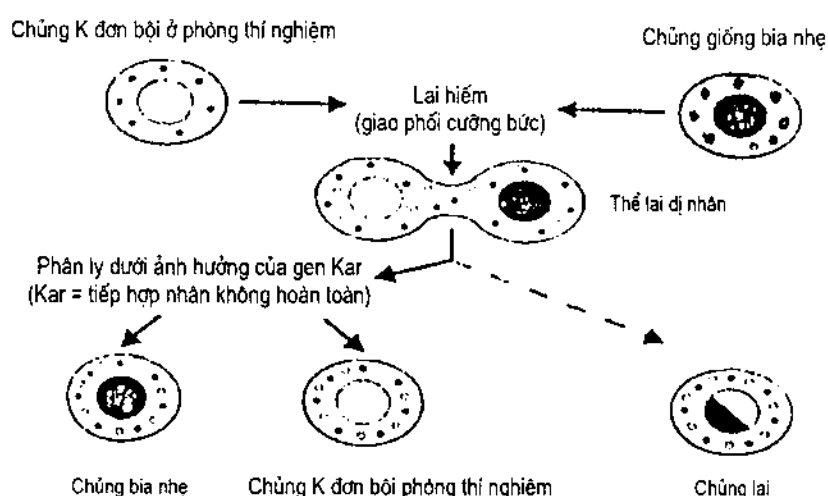
Lai hiếm là một kỹ thuật lai không phụ thuộc vào kiểu ghép đôi và số bội của nấm men, do đó đây là kỹ thuật lý tưởng khi tiến hành lai tạo giữa các giống đa bội và không nguyên bội mà các phương pháp lai tạo thông thường không thể sử dụng được. Khi các giống không ghép đôi được trộn lẫn vào nhau với tỷ lệ cao, một số giống lai hiếm được tạo thành và các giống này được phân lập bằng cách sử dụng các kháng nguyên đặc hiệu. Phương pháp này có một nhược điểm là trong khi hợp nhất các gen của các chủng nấm men thì sản phẩm ghép đôi này có thể thừa hưởng những tính chất không mong muốn. Một ví dụ điển hình, các nhà khoa học đã lai tạo thành công một giống nấm men bia lên men được dextrin, nhưng có một sai sót xảy ra là giống này có chứa một gen tạo hương khó chịu phenolic-off-flavour. Chính gen này tạo ra khả năng decarboxylaza axit pterulic trong dịch malt thành hợp chất 4-vinyl guaiacol gây cho bia có mùi phenol.

Những nghiên cứu cho thấy phương pháp lai hiếm được sử dụng để chuyển các gen sinh chất diệt nấm men (killer toxin) từ các giống đơn bội có trong phòng thí nghiệm vào các giống men bia mà không làm biến đổi các tính chất lên men ban đầu của nấm men bia.

Một số loài nấm men thuộc chi *Saccharomyces* có khả năng tiết ra độc tố có bản chất protein được gọi là chất diệt nấm men (killer toxin), chất độc này có thể làm chết một số loài *Saccharomyces* khác. Các loài nấm men tiết độc tố được gọi là nấm men gây độc (killer yeasts) (chủng K), còn các loài bị chết bởi chất độc này gọi là nấm men nhạy cảm (sensitive yeasts) (chủng S), nhưng cũng có những loài mà bản thân có không tiết độc tố mà cũng không bị ảnh hưởng bởi độc tố thì được gọi là nấm men bền vững (resistant yeasts) hay nấm men trung tính (chủng N). Xem thêm mục 10.4.9.

Tính độc của *Saccharomyces* được xác định bởi sự hiện diện của hai plasmid dsARN trong tế bào chất (chúng được ký hiệu là M và L). Plasmid loại M đặc trưng cho các loài nấm men độc (killer strain) và mã hoá cho killer toxin là một protein ngoại bào và tất nhiên cũng mã hoá cho một hoặc nhiều protein giúp cho vật kháng lại chất độc do nó sinh ra. Plasmid loại L mã hoá cho việc tạo một protein có tác dụng bao phủ cả hai loại dsARN để tạo ra các hạt có hình dạng giống như một virus. Các virus giả này không tự lây lan từ tế bào này sang tế bào khác bằng bất kỳ quá trình truyền nhiễm nào.

Các chủng nấm men bia có thể biến đổi để không bị chết bởi các nấm men sinh độc tố và do đó tự bản thân chúng cũng có hoạt tính diệt nấm men, bằng cách đó chúng có thể loại bỏ được sự cạnh tranh của các nấm men tạp nhiễm (là những tế bào nhạy cảm). Phương pháp lai hiếm đã được ứng dụng thành công trong việc tạo ra các giống men bia có khả năng sinh độc tố bằng cách cho lai nấm men thuần chủng với một giống nấm men độc mang gen Kar (hình 10.14). Giống lai này đã được lên men thử nghiệm, chất lượng bia thành phẩm sản xuất từ chủng killer được chấp nhận, nhưng trong thành phần của nó có chứa hàm lượng este cao hơn đôi chút. Tuy nhiên, độc tố không hoạt động trong bia thành phẩm cũng như ở vang bởi vì loại độc tố này rất nhạy cảm với nhiệt nên bị vô hoạt hoàn toàn khi thanh trùng. Phương pháp lai chéo này cũng đã chọn được những chủng men rượu vang có hoạt tính cao và ứng dụng vào trong lên men thực tế rất có hiệu quả.



Hình 10.14. Lai hiếm để tạo ra chủng nấm men có hoạt tính killer.

10.7.3.3. Lai tế bào chất (cytoduction)

Lai tế bào chất là một dạng đặc biệt của lai hiếm mà trong đó chỉ có thành phần tế bào chất của thể cho được chuyển vào trong tế bào của thể nhận. Để thực hiện việc lai tế bào chất cần phải có quá trình gây đột biến gen Kar là một gen đặc biệt của nhân. Chính đột

biến này làm hỏng quá trình kết hợp nhân. Lai tế bào chất có thể được sử dụng theo ba cách: thay thế bộ gen ty thể, thêm vào các ADN dạng plasmid (cấu trúc tự sao chép ADN) hay chuyển giao các sợi đôi ARN phân tử. Khi sử dụng phương pháp thay thế bộ gen ty thể, chúng ta có thể nghiên cứu ảnh hưởng của các vật liệu di truyền đến các chức năng của tế bào như: hoạt động hô hấp, hoạt tính bề mặt tế bào và những đặc điểm khác của nấm men.

Những tiến bộ mới của công nghệ sinh học đã tạo tiền đề cho việc phát triển các phương pháp di truyền mới. Ví dụ dung hợp tế bào trần và phương pháp ADN tái tổ hợp.

10.7.3.4. Dung hợp tế bào trần (Protoplast fusion)

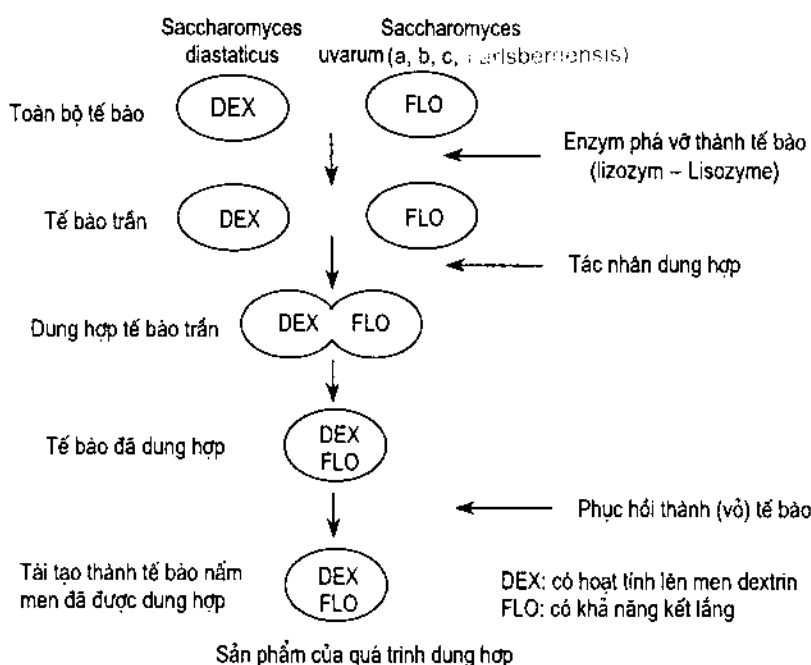
Dung hợp tế bào trần là một kỹ thuật được áp dụng trong nghiên cứu di truyền nhằm tạo ra các chủng giống nấm men mới. Phương pháp này không phụ thuộc vào tính đơn bội và kiểu ghép đôi và do đó được áp dụng rộng rãi đối với các giống men có bản chất đa bội. Thành tế bào của nấm men được loại bỏ bằng cách sử dụng các lizozym (enzym dung giải thành (vỏ) tế bào) chiết từ dạ dày ốc sên, hoặc từ các nguồn vi sinh vật khác nhau. Việc loại bỏ lớp thành tế bào làm cho tính thấm thấu của các tế bào trần yếu đi. Cho nên, chúng cần được duy trì trong một môi trường ổn định tính thấm thấu, ví dụ như dung dịch sorbitol 1M. Enzym có trong tế bào trần được loại bỏ bằng cách rửa kỹ, sau đó các tế bào trần được trộn và huyền phù hoá trong một tác nhân dung hợp có chứa polyethylen glycol (PEG) và các ion Ca^{2+} trong dung dịch đệm. Tiếp đó các tế bào trần đã dung hợp cần phải được kích hoạt để tái tạo lại lớp thành tế bào để bắt đầu lại quá trình phân chia. Quá trình này được tiến hành trong môi trường rắn có chứa 3% agar và sorbitol. Hoạt động của polyethylene glycol như một tác nhân dung hợp cho đến nay vẫn chưa được hiểu một cách cặn kẽ. Tuy nhiên, các nhà khoa học tin rằng nó hoạt động như một polycation tạo ra các mối liên kết yếu giữa các tế bào trần (hình 10.15).

Phương pháp dung hợp tế bào trần đã tạo ra được nhiều chủng nấm men có đặc tính ưu việt như:

- Chủng giống nấm men bia có hoạt tính amylaza được kiến tạo bởi phương pháp dung hợp tế bào trần giữa 2 loài *S. cerevisiae* và *S. diastaticus*.
- Nấm men đa bội thể có khả năng tạo hàm lượng cồn cao được tạo thành từ chủng có khả năng kết lắng tốt và chủng nấm men rượu Sakê.
- Giống nấm men có khả năng chịu áp suất thẩm thấu cao đã được lai tạo từ loài *Saccharomyces diastaticus* và *Saccharomyces rouxii*

Dung hợp tế bào trần là một kỹ thuật rất có hiệu quả, nhưng chủng giống lai bằng phương pháp này thường có những tính chất rất khác so với bố mẹ do bộ gen của nó là sự kết hợp giữa hai chủng giống. Vì vậy, sử dụng kỹ thuật này để đưa vào tế bào nấm men một đặc tính có lợi như khả năng kết lắng là rất khó thực hiện, nhưng cho tới nay kỹ thuật này vẫn

được xem là có hiệu quả do chúng có thể tạo ra sản phẩm cuối có hương vị không thay đổi nhiều, đồng thời giống tạo được bằng phương pháp này có thể chịu đựng áp suất thẩm thấu lớn, nhiệt độ lên men cao (gần 40°C) và tăng khả năng chịu cồn. Các chủng giống nấm men loại này đã được sử dụng thành công trong ngành công nghiệp sản xuất rượu.



Hình 10.15. Dung hợp tế bào trần của 2 chủng nấm men

Mặc dù các kỹ thuật lai tạo như lai hiếm, dung hợp tế bào trần đã có những thành công nhất định, nhưng chúng cũng có những hạn chế. Một nhược điểm lớn nhất của chúng là thiếu tính đặc hiệu khi trao đổi đặc tính di truyền. Chỉ đến năm 1978, khi mà người ta xây dựng được hệ thống trao đổi ADN của nấm men thì kỹ thuật lai tạo mới có những bước tiến lớn. Ngày nay, chúng ta có thể làm biến đổi thành phần di truyền của một chủng giống nấm men mà không làm mất bất kỳ đặc tính không mong muốn nào của nó đồng thời chúng ta có thể đưa vào nấm men các gen từ các nguồn khác. Kỹ thuật này sử dụng một loạt các phương pháp được gọi là kỹ thuật ADN tái tổ hợp, xuất phát từ hai lĩnh vực có liên quan. Đó là lĩnh vực di truyền học vi sinh vật, chuyên nghiên cứu các cơ chế, thông qua đó các vi sinh vật kế thừa những nét đặc trưng của cha mẹ chúng và lĩnh vực sinh học phân tử nghiên cứu về thông tin di truyền, được mang trong các phân tử ADN và làm thế nào để ADN điều khiển được quá trình tổng hợp protein.

10.7.4. Tái tổ hợp ADN

Trong những năm từ 1970 đến 1980, nhờ có sự phát triển của các kỹ thuật ADN tái tổ

hợp, việc áp dụng các vi sinh vật trong thực tế đã được tiến hành rất rộng rãi ngoài sức tưởng tượng của con người. Cho dù quá trình tái tổ hợp tự nhiên chỉ cho phép trao đổi gen giữa các vi sinh vật có quan hệ gần gũi với nhau, tuy nhiên kỹ thuật lai tái tổ hợp nhân tạo lại có thể thực hiện được giữa các loài không có quan hệ gì với nhau. Các kỹ thuật này mạnh đến nỗi ngày nay thuật ngữ tái tổ hợp ADN thường được hiểu là bất kỳ thao tác gen nhân tạo, cho dù đó là giữa các chủng cùng loài hay giữa các loài khác biệt.

Với những kỹ thuật này một gen của một động vật có xương sống, kể cả con người, có thể chuyển vào phân tử ADN của một vi khuẩn hoặc một gen của virus có thể cấy vào phân tử ADN của nấm men. Trong nhiều trường hợp, đối tượng nhận sau đó được tạo ra để biểu hiện gen mã hoá cho một sản phẩm có giá trị thương mại. Do vậy, nấm men có chứa gen mã hoá cho insulin của người đã được dùng để sản xuất insulin sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường cho người hoặc sản xuất vacxin chống viêm gan B từ một gen lấy từ vỏ của virus viêm gan B (nấm men tạo ra một protein của virus).

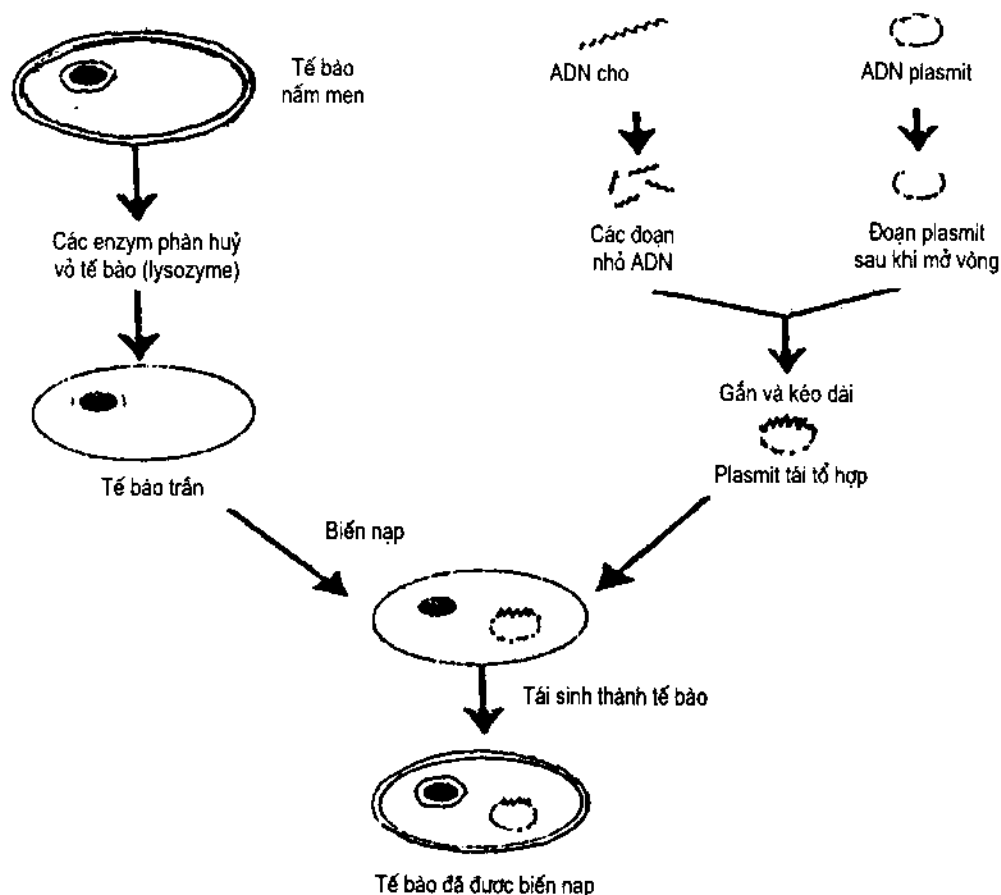
Nhờ có kỹ thuật tái tổ hợp ADN mà con người có thể tạo ra hàng nghìn phiên bản của cùng một phân tử ADN, từ đó sản sinh đủ số lượng ADN cho nhu cầu của các thí nghiệm và phân tích khác nhau. Chúng ta thường nghĩ rằng thao tác gen nhân tạo là các thao tác di truyền. Kỹ thuật di truyền hiện nay đã có thể thực hiện được nhờ vào việc khám phá và phát triển một số kỹ thuật quan trọng như việc phát hiện ra các enzym cắt đặc hiệu, các enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn có khả năng cắt phân tử ADN từ những nguồn khác nhau thành những đoạn nhỏ dễ dàng cho việc tái tổ hợp trong điều kiện *invitro*. Kỹ thuật di truyền chỉ có thể thực hiện trên sự phát triển của các phương pháp chuyển những phân tử ADN đã được tái tổ hợp vào bên trong tế bào. Quá trình này được thực hiện bởi các vectơ. Nếu như muỗi mang virus gây bệnh sốt vàng da đốt và truyền bệnh sang người thì muỗi được xem là vectơ truyền bệnh. Thuật ngữ vectơ hay vectơ clonning đã được sử dụng rộng rãi để mô tả một phân tử ADN có thể tự sao chép được sử dụng như một chất mang để chuyển một gen từ một sinh vật này sang một sinh vật khác. Công nghệ tái tổ hợp ADN đã được sử dụng để cải tạo các chủng giống nấm men, một số giống nấm men đã được tái tổ hợp thành công:

- Có hoạt tính của enzym glucoamylaza của nấm mốc *Aspergillus niger*.
- Có hoạt tính của enzym glucanaza từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* và nấm mốc *Tricoderma reishi*.
- Có hoạt tính của enzym axetolactat decarboxylaza của vi khuẩn *Enterobacter aerogenes* và *Acetobacter* spp.
- Có hoạt tính của enzym proteaza ngoại bào dành cho nấm men bia chịu lạnh.
- Biến đổi đặc tính kết lắng của nấm men.

Quá trình tái tổ hợp ADN của một chủng men bia được đưa thêm ADN của

S. diastaticus có khả năng tiết ra enzym glucoamylaza được dùng để sản xuất bia nghèo năng lượng (hình 10.15).

Có lẽ sử dụng phối hợp các giải pháp truyền thống rẽ tiền sẵn có cho nhiều vấn đề mà các giống tái tổ hợp được hy vọng là có thể giải quyết như các nguồn enzym glucanaza, glucoamylaza và α -amylaza rẽ tiền, đã làm hạn chế việc triển khai sử dụng các chủng giống nấm men tái tổ hợp này. Tương tự như vậy, trong một số trường hợp tái tổ hợp ADN đã vượt quá tầm hiểu biết về tính chất sinh hoá của nấm men. Ngoài ra nó còn phụ thuộc vào sự chấp nhận của người tiêu dùng. Mặc dù đây là một rào cản đầy khó khăn, nhưng có thể tin rằng trong tương lai khi con người dần dần trở nên quen thuộc với các loại được phẩm sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN và nhiều loài cây trồng được cải tạo nhằm có được những sản phẩm tốt hơn được trồng tại các nông trang để lấy thực phẩm chiếm được lòng tin của người tiêu dùng thì lúc đó sự lưỡng lự hiện nay đối với việc sử dụng các sản phẩm của công nghệ này trong công nghiệp sản xuất sẽ dần dần mất đi.



Hình 10.16. Giống men bia mới bằng phương pháp tái tổ hợp ADN.

10.7.5. Những thành tựu nghiên cứu về nấm men

Thế kỷ 20 đã chứng kiến một cuộc cách mạng lớn trong lĩnh vực cải tiến công nghệ, đặc biệt trong công nghệ sinh học. Kỹ nghệ di truyền mau chóng trở thành mũi nhọn trong lĩnh vực nghiên cứu nấm men, tạo ra nhiều chủng, giống mới mang đặc tính ưu việt. Một số thành công đã được ứng dụng trong công nghệ sản xuất bia như:

- Bằng phương pháp đột biến, Malzahn, 1977 đã tuyển chọn được các chủng nấm men bia có khả năng kết lắng cao.

- Hockney và Frieman, 1980 cũng đã thu nhận được chủng nấm men bia có khả năng tạo cồn cao từ quá trình phân lập các thể đột biến bởi EMS.

- Sử dụng kỹ nghệ lai ghép gen cho phát triển các chủng giống nấm men công nghiệp. Lewis và cộng sự, 1976, Russell, 1980 đã xác định được các gen điều khiển quá trình kết lắng của nấm men. Tương tự như vậy, các gen (DEX, STA) mã hoá cho sản xuất glucoamylaza ngoại bào đã được xác định và gần đây nhất người ta đã tạo được các chủng nấm men đa bào mang các gen điều khiển quá trình đồng hoá maltoza (MALT-6). Người ta cũng tạo nên một chủng nấm men mới có khả năng bền vững với cycloheximid bằng phương pháp đưa vectơ trội này vào tế bào nấm men.

Quá trình lai ghép nấm men đã kích thích gen trội đơn P1, làm tăng khả năng bền vững đối với axit decarboxylat cinamic và điều này rất có ý nghĩa trong quá trình tạo hương trong công nghệ sản xuất bia.

Bằng việc đưa một đoạn gen endoglucanaza của *Trichoderma reesei* vào gen của nấm men đã kiến tạo được một chủng nấm men mới có hoạt tính phân giải β -glucan cao, giúp cho quá trình lọc thô trở nên dễ dàng hơn và chóng lại sự hình thành kết tủa trong bia. Đồng thời, một chủng nấm men với hoạt tính xenlulaza cao cũng đã được thu nhận từ việc chuyển một gen xenlulaza từ *Trichoderma reesei* và *Saccharomyces*.

Những nhà khoa học ở Nhật Bản cũng đã thành công trong việc nghiên cứu chuyển gen α -axetolactat decarboxylaza từ chủng *Enterobacteria aerogenes* vào nấm men để giảm sự tạo thành diacetyl trong lên men bia và phân lập gen đồng hoá đường maltoza với tần số copy cao, chuyển vào chủng nấm men bia đã được ứng dụng thành công trong lên men bia nồng độ đường 24 P và hiệu suất lên men tăng 30%.

Những chủng nấm men mới với đặc tính ưu việt được tạo ra bằng các phương pháp di truyền đã có nhiều ứng dụng hiệu quả vào ngành công nghệ đồ uống nói chung và bia nói riêng và chắc chắn sẽ trở thành mũi nhọn trong lĩnh vực công nghệ sinh học ở thế kỷ 21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thành Đạt, Mai Thị Hằng; 2001,
Sinh học vi sinh vật, tái bản lần thứ nhất, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.
2. Hoàng Đình Hoà; 2000,
Công nghệ sản xuất malt và bia, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Lương Đức Phẩm; 2004,
Công nghệ vi sinh vật, tái bản lần thứ nhất, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Hồ Sưởng; 1992,
Công nghệ sản xuất bia, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
5. Nguyễn Đình Thương, Nguyễn Thị Hằng; 2000,
Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
6. Nguyễn Văn Việt, Nguyễn Thị Hiền và những người khác; 2001,
Nấm men bia và ứng dụng, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Beery D. R.; 1982,
Biology of yeast, Edward Arnold (Publishes) LTd. London.
8. Hans G. Schlegel; 1993,
General Microbiology (Trans. by M. Kogut), 7th edi.
Cambridge University Press.
9. Reed G., Nagodawithana T. W.; 1991.
Yeast Technology, 2nd Ed., Van Nostrand Reinhold, New York.
10. Wallker G. M.; 1998,
Yeast Physiology and Biotechnology, John Weiley and Sons, Chicester, U. K.
11. Бурян Н. И., Тюрина; 1979,
Микробиология виноделения; “Пищевая Пр” изд., Москва.
12. Грачева И. М., Иванов Л. А., Кантере В. М.; 1972,
Технология Микробных претратов, Аминокислот и биоэнергия, 2^{oc} изд. “Колос”,
Москва.
13. Жвирблянская А. Ю.; 1970,
Микробиологический контроль производства пива и безалкогольных напитков,
“Пищевая Пр.” изд., Москва.

MỤC LỤC

<i>Phần thứ nhất</i> ĐẠI CƯƠNG VỀ NẤM MEN	5
---	---

Chương 1 PHÂN LOẠI VÀ HÌNH THÁI NẤM MEN	5
--	---

1.1. Phân loại nấm men	5
1.1.1. Tiêu chí phân loại nấm men.....	5
1.1.2. Phân loại nấm men trên cơ sở di truyền.....	7
1.2. Hình thái và cấu tạo tế bào nấm men	9
1.2.1. Hình thái	9
1.2.2. Cấu tạo tế bào nấm men.....	10
1.3. Một số giống nấm men thường gặp trong tự nhiên và được sử dụng trong công nghiệp...	18
1.3.1. Giống <i>Saccharomyces Meyen</i>	19
1.3.2. Giống <i>Pichia Hansen</i>	23
1.3.3. Giống <i>Hansenula Sydow</i>	24
1.3.4. Giống <i>Candida Berkhout</i>	25
1.3.5. Giống <i>Schizosaccharomyces Lindner</i>	25
1.3.6. Giống <i>Sac charomyces Hansen</i>	26
1.3.7. Giống <i>Hanseniaspora (Zikes) Klöcker</i>	26
1.3.8. Giống <i>Brettanomyces Kufferath</i>	27
1.3.9. Giống <i>Torulopsis Berlese</i>	28
1.3.10. Giống <i>Rhodotorula Harrison</i>	28

Chương 2 SINH LÝ NẤM MEN	29
---	----

2.1. Thành phần hoá học của tế bào nấm men	29
2.2. Dinh dưỡng nấm men	32
2.2.1. Vận chuyển vật chất qua màng tế bào	32
2.2.2. Dinh dưỡng cacbon.....	34

2.2.3. Dinh dưỡng nitơ	36
2.2.4. Dinh dưỡng các nguyên tố vô cơ.....	38
2.2.5. Dinh dưỡng các chất sinh trưởng.....	39
2.3. Sinh trưởng của nấm men	40
2.3.1. Sinh sản	40
2.3.2. Đặc tính di truyền của nấm men	44
2.3.3. Sinh trưởng nấm men.....	46

Chương 3

CÁC QUÁ TRÌNH TRAO ĐỔI CHẤT VÀ SẢN PHẨM CỦA TẾ BÀO NẤM MEN..... 52

3.1. Dị hoá và đồng hoá ở tế bào nấm men	52
3.1.1. Sự dị hoá (catabolism hay Dissilation)	52
3.1.2. Đồng hoá (Anabolism hay Assimilation)	54
3.2. Trao đổi năng lượng	55
3.3. Hô hấp	56
3.3.1. Hô hấp kỵ khí.....	60
3.3.2. Hô hấp hiếu khí.....	60
3.3.3. Hô hấp trong điều kiện kỵ khí và lên men.....	63
3.4. Sinh tổng hợp một số hợp chất quan trọng và sản phẩm của tế bào nấm men	68
3.4.1. Sinh tổng hợp các chất vật liệu xây dựng tế bào	68
3.4.2. Các sản phẩm từ nấm men	75

Phần thứ hai

CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN VÀ CÔNG NGHIỆP NẤM MEN 79

Chương 4

CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN 79

4.1. Khái niệm cơ bản về lên men.....	79
4.2. Các sản phẩm từ nấm men	85
4.3. Những nhân tố ảnh hưởng đến hoạt tính của nấm men	85
4.3.1. Nhiệt độ	86
4.3.2. Oxy hoà tan - độ hiếu khí	87

4.3.3. pH của môi trường.....	88
4.3.4. Khí CO ₂	88
4.3.5. Rượu etylic	89
4.3.6. Thành phần môi trường.....	89
4.4. Nước trong công nghệ lên men	90
4.4.1. Yêu cầu về nước dùng cho pha chế môi trường dinh dưỡng	90
4.4.2. Xử lý nước bằng phương pháp trao đổi ion	91

Chương 5

SẢN XUẤT CỒN – RƯỢU ETYLIC.....	94
5.1. Nguyên liệu sản xuất rượu - cồn etylic.....	96
5.1.1. Các nguồn nguyên liệu chứa tinh bột	96
5.1.2. Rỉ đường	98
5.2. Một số phương pháp sản xuất rượu	100
5.2.1. Phương pháp đường hoá bằng axit	101
5.2.2. Phương pháp men thuốc bắc	101
5.2.3. Phương pháp maltaza.....	101
5.2.4. Phương pháp myco-malt (có nghĩa là mầm mốc).....	102
5.3. Vi sinh vật trong sản xuất rượu.....	102
5.3.1. Nấm men	102
5.3.2. Nấm mốc và thu nhận chế phẩm enzym để đường hoá tinh bột.....	108
5.4. Lên men rượu theo phương pháp myco-malt (từ nguyên liệu tinh bột).....	112
5.4.1. Nấu và đường hoá	115
5.4.2. Lên men.....	117
5.5. Lên men rượu từ rỉ đường	124
5.5.1. Xử lý nguyên liệu.....	124
5.5.2. Chuẩn bị dịch nuôi cấy nhân giống và lên men	125
5.5.3. Nhân giống trong sản xuất rượu từ rỉ đường	125
5.5.4. Lên men.....	127
5.6. Chống tạp nhiễm cho lên men.....	128
5.7. Chung cất và tinh luyện	129
5.7.1. Chung cất gián đoạn.....	129
5.7.2. Chung luyện bán liên tục (chung cất gián đoạn, luyện liên tục).....	132
5.7.3. Chung luyện liên tục	133

5.8. Tinh luyện để thu nhận cồn tuyệt đối	134
5.9. Sản xuất rượu thủ công truyền thống.....	135
5.9.1. Nguyên liệu.....	136
5.9.2. Cách làm bánh men	137
5.9.3. Hệ vi sinh vật trong bánh men	140
5.9.4. Sản xuất rượu theo phương pháp thủ công truyền thống.....	141

Chương 6

BIA

144

6.1. Nguyên liệu.....	145
6.1.1. Nước	145
6.1.2. Thóc malt.....	146
6.1.3. Hoa hublon (hoa hốt bố theo âm Hán - Việt hay hoa bia).....	152
6.1.4. Các nguyên liệu tinh bột (không phải thóc malt).....	154
6.2. Quy trình công nghệ sản xuất bia	154
6.2.1. Sơ đồ công nghệ sản xuất bia.....	155
6.2.2. Nấu - đường hoá hay là quá trình chuẩn bị dịch lên men	156
6.2.3. Men bia.....	159
6.2.4. Lên men.....	166
6.2.5. Hoàn thành sản phẩm	168
6.3. Sử dụng chế phẩm enzym trong sản xuất bia	169
6.3.1. Termamyl 120L.....	169
6.3.2. Celluclast 1,5L	169
6.3.3. Cereflo.....	170
6.3.4. Fungamyl 800L.....	170
6.3.5. Neutraza.....	170
6.3.6. Finizym.....	170
6.3.7. Maturex L	171
6.4. Sinh vật gây hại trong sản xuất bia.....	171
6.4.1. Nấm men	171
6.4.2. Vi khuẩn	172
6.4.3. Nấm mốc	174
6.5. Kiểm tra vi sinh vật	174

6.5.1. Kiểm tra men giống.....	174
6.5.2. Xác định <i>Pedococcus</i>	175
6.5.3. Xác định men đại	176
6.5.4. Kiểm tra bia chưa chín	176
6.5.5. Kiểm tra bia thành phẩm	176
6.6. Men bia và chất lượng sản phẩm.....	178
6.6.1. Các yêu cầu công nghệ với giống men bia	178
6.6.2. Hấp thu cacbon dinh dưỡng của men bia.....	179
6.6.3. Hấp thu các hợp chất chứa nitơ.....	179
6.6.4. Một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình lên men và chất lượng bia	181
6.6.5. Diacetyl, axetoin và 2,3-butandiol	185
6.7. Sinh tổng hợp các sản phẩm thứ cấp (bậc 2).....	185
6.7.1. Glycerin	186
6.7.2. Rượu bậc cao	186
6.7.3. Este và aldehyt	187

Chương 7

RƯỢU VANG

188

7.1. Đặc điểm nước quả và các yêu cầu về nguyên liệu làm rượu vang	189
7.2. Hệ vi sinh vật trong dịch quả	191
7.2.1. Nấm men	191
7.2.2. Vi khuẩn và nấm mốc.....	194
7.3. Hệ vi sinh vật trong lên men rượu vang tự nhiên (lên men tự phát)	195
7.4. Dinh dưỡng nấm men và chất lượng của vang	196
7.4.1. Nguồn dinh dưỡng cacbon.....	196
7.4.2. Dinh dưỡng nitơ	197
7.4.3. Dinh dưỡng các nguyên tố vô cơ.....	199
7.4.5. Các nhân tố sinh trưởng.....	200
7.5. Nấm men thường gặp trong sản xuất rượu vang.....	200
7.5.1. <i>Saccharomyces vini</i>	202
7.5.2. <i>Saccharomyces uvarum</i>	203
7.5.3. <i>Saccharomyces chevalieri</i>	203
7.5.4. <i>Saccharomyces oviformis</i>	203

7.5.5. <i>Hanseniaspora apiculata</i> – <i>Kloeckera apiculata</i>	203
7.5.6. Yêu cầu đối với chọn nấm men thuần chủng	204
7.6. Sản xuất rượu vang	205
7.6.1. Men giống trong sản xuất vang	205
7.6.2. Lên men	206
7.7. Sản phẩm lên men	207
7.7.1. Những sản phẩm được tạo ra trong quá trình hoạt động sống của nấm men	207
7.7.2. Các sản phẩm tạo thành trong quá trình tự phân của nấm men.....	213
7.8. Các tác nhân ảnh hưởng đến lên men vang.....	213
7.9. Các chất sát khuẩn (Anticeptic) dùng trong sản xuất rượu vang.....	217
7.10. Quá trình lên men malo-lactic ở rượu vang	219
7.10.1. Tác nhân gây lên men malo-lactic.....	219
7.10.2. Lên men malo-lactic tự phát ở trong vang	220
7.10.3. Lên men malo-lactic bằng giống vi khuẩn thuần chủng	221

Chương 8

SINH KHỐI NẤM MEN 224

8.1. Nấm men dùng trong công nghiệp thu sinh khối	226
8.2. Sản xuất sinh khối nấm men từ nguyên liệu thông thường	233
8.3. Quy trình công nghệ sản xuất sinh khối nấm men	237
8.4. Sản xuất nấm men chần nuôi từ bã rượu.....	238
8.4.1. Nấm men dùng trong sản xuất men chần nuôi trên môi trường bã rượu	240
8.4.2. Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng	240
8.4.3. Nhân giống - Sinh sản của giống thuần chủng.....	242
8.4.4. Nuôi cấy nấm men thương phẩm - Nuôi cấy mở rộng.....	243
8.4.5. Tách và rửa nấm men	245
8.4.6. Nhiệt phân (thermolysis)	245
8.4.7. Sấy men	247
8.4.8. Yêu cầu chất lượng của men thương phẩm	247
8.5. Sản xuất protein vi sinh vật từ dầu mỏ và khí đốt	248
8.6. Sản xuất nấm men bánh mì.....	256
8.6.1. Giống men bánh mì.....	258
8.6.2. Các phương pháp bảo quản men giống	259
8.6.3. Sản xuất men nước và men ép theo phương pháp thủ công.....	260

8.6.4. Quá trình tách men từ dịch rỉ đường lên men ở nhà máy rượu	262
8.6.5. Sấy men thành phẩm	264
8.6.6. Sản xuất men bánh mì ở các nhà máy rượu với nguyên liệu từ rỉ đường.....	265
8.6.7. Sản xuất nấm men từ rỉ đường	266

Phần thứ ba

VI SINH VẬT TẠP NHIỄM VÀ TUYỂN CHỌN NẤM MEN	267
--	------------

Chương 9

VI SINH VẬT TẠP NHIỄM TRONG SẢN XUẤT NẤM MEN	267
---	------------

9.1. Vi khuẩn lactic	268
9.1.1. Giới thiệu sơ giản về vi khuẩn lactic	268
9.1.2. Sinh lý vi khuẩn lactic	268
9.1.3. Các sản phẩm trao đổi chất của vi khuẩn lactic	269
9.1.4. Những yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn lactic	270
9.1.5. Các vi khuẩn lên men lactic gây hại trong công nghiệp nấm men	272
9.2. Vi khuẩn axetic và những vi khuẩn tạp nhiễm khác	275
9.3. Tạp nhiễm nấm men	278
9.3.1. <i>Torulopsis</i>	278
9.3.2. <i>Candida</i> (trước đây gọi là <i>Micoderma</i>)	280
9.3.3. <i>Pichia</i>	280
9.3.4. <i>Apiculatus</i> (hay <i>Hanseniaspora</i> , <i>Kloeckera</i> , men đầu nhọn)	281
9.3.5. <i>Monilia</i>	281
9.3.6. <i>Schizosaccharomyces</i>	282
9.4. Nấm mốc	282
9.4.1. <i>Aspergillus</i>	282
9.4.2. <i>Penicillium</i>	284
9.4.3. <i>Oidium</i>	284
9.4.4. <i>Rhizopus</i>	285
9.4.5. <i>Mucor</i>	285
9.4.6. <i>Botrytis</i>	286
9.4.7. <i>Sphaerulina</i>	287
9.5. Các biện pháp phòng và chống vi sinh vật tạp nhiễm.....	287

Chương 10

TUYỂN CHỌN NẤM MEN

289

10.1. Nghiên cứu tuyển chọn nấm men giống thuần chủng.....	289
10.1.1. Tách giống thuần chủng từ khuẩn lạc riêng biệt.....	289
10.1.2. Tách nấm men từ một tế bào theo phương pháp Lindner.....	291
10.2. Nghiên cứu tế bào nấm men dưới kính hiển vi.....	292
10.2.1. Hình thái, sinh sản	292
10.2.2. Đếm số lượng tế bào trong dịch nuôi cấy để xác định tốc độ sinh sản và sinh trưởng của nấm men	293
10.2.3. Nghiên cứu sự hình thành bào tử ở nấm men.....	294
10.2.4. Xác định hàm lượng hạt glycogen trong tế bào men	296
10.2.5. Nhuộm và quan sát các hạt Volutin, chất béo trong tế bào.....	297
10.2.6. Tìm tế bào men chết	297
10.3. Xác định sự đồng hoá và lên men các loại đường của nấm men	297
10.4. Các đặc điểm lên men.....	299
10.4.1. Lực lên men	299
10.4.2. Mức lên men cuối.....	300
10.4.3. Khả năng sinh trưởng: xác định bằng tốc độ sinh sản và hệ số sinh trưởng ...	301
10.4.4. Khả năng kết lắng	301
10.4.5. Khả năng chịu cồn.....	302
10.4.6. Khả năng chịu nhiệt và chịu lạnh	302
10.4.7. Tính chịu axit	302
10.4.8. Khả năng chịu sulfit (SO_2).....	302
10.4.9. Xác định phenotip (phenotype) K, N và S của nấm men	303
10.5. Một số môi trường thường dùng.....	306
10.6. Những dung dịch thuốc nhuộm tiêu bản vi sinh vật và cách làm tiêu bản.....	309
10.6.1. Tiêu bản vi sinh vật	309
10.6.2. Cách pha những dung dịch thuốc nhuộm và chỉ thị.....	310
10.7. Chọn lọc nấm men có hoạt tính cao	311
10.7.1. Chọn lọc thích ứng	311
10.7.2. Đột biến	311
10.7.3. Sự tạo giống lai (Hybridization).....	315
10.7.4. Tái tổ hợp ADN.....	319
10.7.5. Những thành tựu nghiên cứu về nấm men.....	322

TÀI LIỆU THAM KHẢO

323

NẤM MEN CÔNG NGHIỆP

Tác giả: PGS. TS. LƯƠNG ĐỨC PHẨM

Chịu trách nhiệm xuất bản: **TS. PHẠM VĂN DIỄN**

Biên tập và sửa bài: **ThS. NGUYỄN HUY TIẾN**

NGỌC LINH, ĐỨC LƯƠNG

Trình bày bìa: **PHƯƠNG HỒNG THẨM**

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội

In 700 cuốn khổ 19 x 27cm, tại Xưởng in NXB Văn hóa Dân tộc.

Số đăng ký kế hoạch XB: 209 – 2009/CXB/227 – 10/KHKT, ngày 18/3/2009.

Quyết định XB số: 244/QĐXB – NXBKHKT, ký ngày 13/8/2009.

In xong và nộp lưu chiểu Quý III năm 2009.

4760 101

209220 IVU1



Glá: 86.000d