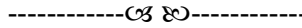


CHƯƠNG 1: MỞ ĐẦU



1.1. NGUỒN NGUYÊN LIỆU:

Công nghệ đồ uống chia làm hai phần: đồ uống lên men và đồ uống không lên men..

Đồ uống không lên men có các dạng như: nước khoáng, nước tinh khiết, nước giải khát có gas, nước giải khát pha chế, nước ép rau quả,...

Trong công nghiệp, nguồn môi trường sử dụng trong công nghệ sản xuất thức uống lên men phải đáp ứng các yếu tố sau:

- Đảm bảo đủ lượng dưỡng chất phục vụ cho sự phát triển của vi sinh vật.
- Sẵn có, giá thành thấp (thường là các phụ phẩm trong công nghiệp), dễ khai thác.
- Các phế thải sau khi lên men không gây ô nhiễm môi trường.

Chính vì vậy ta cùng xem xét đến một vài loại nguyên liệu thông dụng sau:

1.1.1. Rỉ đường:

Trong công nghiệp sản xuất đường mía hoặc đường củ cải, có một lượng đường không kết tinh được thường gọi là rỉ đường. Rỉ đường thường chiếm 3 – 3,5% trọng lượng của mía. Đây là nguồn cacbon rẻ tiền, giàu chất dinh dưỡng. Tuy nhiên có lẫn một số tạp chất như chất keo, tạp khuẩn gây bất lợi

.....
cho quá trình lên men. Chính vì vậy luôn cần xử lý trước khi đưa vào sử dụng.

Thành phần của ri đường phụ thuộc vào giống mía, vào điều kiện trồng trọt, vào phương pháp sản xuất đường, điều kiện bảo quản và điều kiện vận chuyển. Thành phần chính gồm: 15 – 20% nước và 80 – 85% chất khô hòa tan. Trong đó trên 50% là đường lên men được (gồm 30 – 35% saccharoza, 15 – 20% là đường khử), còn khoảng gần 50% các chất không phải là đường (gồm 30 – 32% là chất hữu cơ, 18 – 20% là chất vô cơ).

Tại Việt Nam ri đường đang là nguồn nguyên liệu cho công nghệ sản xuất nấm men, sản xuất natri glutamat, sản xuất cồn etylic,...

1.1.2. Malt trích ly

Malt là hạt lúa đại mạch nảy mầm (trên 95% số hạt), được sấy khô, sau đó tách mầm và rã ra. Trong malt chứa tinh bột, maltoza, dextrin, glucoza, protein (9 – 10%) và một lượng enzym amylaza.

Trong quá trình nấu malt, amylaza được hoạt hóa. Lúc này amylaza có khả năng phân giải lượng tinh bột có trong malt thành các loại đường khác nhau. Tùy vào loại amylaza mà tỷ lệ đường tạo thành có thể có tỷ lệ khác nhau giữa maltoza và glucoza. Đây là những loại đường mà nấm men có khả năng sử dụng phục vụ cho quá trình trao đổi chất của tế bào đồng thời cũng tạo ra sản phẩm phục vụ cho con người.

Người ta thường sử dụng malt trong công nghệ sản xuất bia.

1.1.3. Tinh bột:

Nhiều nguồn tinh bột khác nhau được sử dụng trong công nghệ vi sinh vật. Trong quá trình sử dụng tinh bột, trước tiên người ta phải thủy phân tinh bột thành đường, sau đó mới dùng nguồn đường này cho các vi sinh vật khác sử dụng. Có nhiều phương pháp thủy phân tinh bột: có thể sử dụng acid đặc ở nhiệt độ cao hoặc dùng enzym. Phương thức hay được dùng nhất là dùng enzym amylaza của nấm mốc (thường sử dụng amylaza của *Aspergillus niger* hoặc *Aspergillus oryzae*) để thủy phân tinh bột.

Tại Việt Nam chủ yếu là dùng sắn (*Manihot esculenta*). Củ sắn chứa khoảng 20 – 35% trọng lượng tinh bột và 1 – 2% trọng lượng protein. Sắn có giá thành thấp, nguồn nguyên liệu lại sẵn có. Chính vì vậy được ứng dụng nhiều trong sản xuất cồn, mì chính,...

Ngoài ra còn có thể dùng ngô, gạo, artisô, các loại củ khác (vd: khoai lang,...),...trong sản xuất. Thông dụng nhất là sử dụng một phần gạo trong công nghệ sản xuất bia để giảm giá thành nhập khẩu malt đại mạch. Ngoài ra còn có thể dùng gạo và ngô trong sản xuất rượu (nhiều nhất là tại Mỹ)...

1.1.4. Các loại quả:

Các loại quả thường chứa một lượng fructoza cao (6 – 12%) như đào, mơ, lê dứa hoặc một lượng glucoza như nho. Nguồn nguyên liệu này được sử dụng trong sản xuất rượu và các loại nước quả.

1.2. KỸ THUẬT LÊN MEN

Trong phần này quá trình lên men sẽ được trình bày một cách khái quát.

Trước hết các chủng vi sinh vật thu được nhờ chọn giống cần được bảo quản sao cho tránh khỏi mất hoạt tính. Sau đó một phần được cất đi bảo quản cho lần sử dụng sau. Một phần được *nhân giống* tăng số lượng trong phòng thí nghiệm nhằm phục vụ cho sản xuất. Định kỳ phải kiểm tra hoạt tính của giống. Việc nuôi cấy, nhân giống trong phòng thí nghiệm này nhằm mục đích cho việc tạo sinh khối tế bào để đảm bảo số lượng tế bào vi sinh vật cho quá trình sản xuất, chứ không phải cho việc tạo thành sản phẩm. Quá trình nhân giống này diễn theo nhiều cấp sao cho thể tích nuôi tăng lớn lên từ 5 – 10 lần.

Sau khi tăng sinh khối tế bào đến số lượng yêu cầu chúng sẽ được đưa vào nổi lên men trong sản xuất. Tùy theo kích thước nổi lên men trong sản xuất mà ta có thể sử dụng một hoặc hai nổi lên men trước (thùng cấy).

Quá trình lên men trong sản xuất cần chú ý:

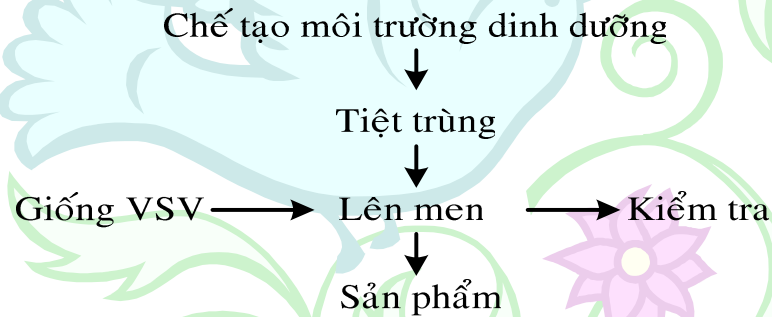
- Nguồn nguyên liệu phải rẻ tiền, sẵn có.
- Môi trường dinh dưỡng có khả năng tạo thành sản phẩm với hiệu suất cao.
- Sản phẩm tạo thành phải đảm bảo về độ tinh khiết.
- Quá trình lên men phải đảm bảo về độ vô trùng.
- Cần theo dõi liên tục quá trình lên men để có sự thu hoạch sản phẩm vào thời điểm tốt nhất.

Tùy theo quy mô sản xuất mà ta có thể sử dụng một hay nhiều nổi lên men. Nổi lên men được chứa môi trường nuôi cấy tới mức một nửa hoặc hai phần ba.

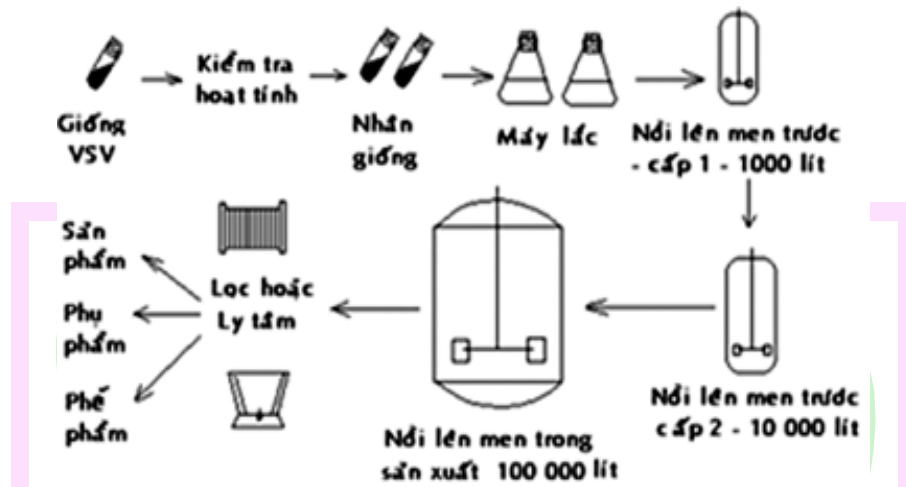
Việc *thu nhận sản phẩm* chính là quá trình tách tế bào ra khỏi môi trường dinh dưỡng. Nếu là các loại nấm mốc, xạ khuẩn,..theo hệ sợi thì người ta thường lọc. Còn đối với vi khuẩn và nấm men thì thường dùng phương pháp ly tâm.

Việc xử lý và làm tinh sản phẩm phụ thuộc vào bản chất hóa học của sản phẩm. Tùy thuộc vào sản phẩm của chúng ta là tế bào vi sinh vật hay là các chất mà vi sinh vật tạo thành. Các biện pháp được sử dụng có thể là chiết rút, hấp phụ, sàng phân rử hoặc kết tủa. Sau đó phải kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm cũng như quá trình làm tinh sản phẩm.

Một quá trình lên men cổ điển được chia thành các phần sau:



Dưới đây trình bày một quy trình lên men diễn ra trong sản xuất kháng sinh:



Để đảm bảo độ tinh khiết của sản phẩm cũng như hiệu suất tạo thành và tính kinh tế của quy trình ta phải tối ưu hóa từng công đoạn. Việc tách và cô lập sản phẩm cần phải được chú ý ngay từ công đoạn chọn giống vi sinh vật, chọn môi trường dinh dưỡng. Cần chú trọng tới các yếu tố kỹ thuật của từng bước.

Ngoài ra, việc loại bỏ và sử dụng các phế phẩm và phụ phẩm cũng phải được coi trọng. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng đến việc bảo vệ môi trường.

1.2.1. Nhu cầu oxy:

Trong quá trình lên men hiếu khí oxy là loại chất không thể thiếu được. Vi sinh vật thường sử dụng oxy hòa tan. Độ hòa tan của oxy trong nước rất thấp, khoảng 4 – 5 ml oxy/ lít trong điều kiện áp suất khí quyển, ở 30°C. Trong khi đó, đối với quá trình sản xuất, vi sinh vật lại đòi hỏi một lượng oxy là 500 – 5000 ml / lít/ giờ. Chính vì vậy lượng oxy trong dưỡng chất chỉ

.....
đủ dùng một vài giây đến một vài phút nếu không được cung cấp thường xuyên.

Để duy trì việc cung cấp oxy cho tế bào vi sinh vật trong nuôi cấy chìm, người ta thường dựa vào nguyên lý của quá trình chuyển dịch chất. Quá trình này xảy ra nhờ dòng chảy và sự khuếch tán, sao cho oxy chuyển dịch từ bóng không khí vào môi trường dinh dưỡng và từ đó vào tế bào.

Trong thiết bị lên men thường được lắp đặt các thiết bị sục khí và các hệ thống khuấy, nhằm đưa không khí vào dung dịch sau đó phá vỡ các bóng khí để oxy có thể hòa tan vào dịch dinh dưỡng phục vụ cho sự sinh trưởng và phát triển của tế bào.

1.2.2. Khử trùng:

Để đảm bảo cho quá trình lên men xảy ra có kết quả phải ngăn cản sự phát triển của các vi sinh vật có hại. Đối với nhiều quá trình lên men với mục đích tạo sản phẩm là các hợp chất hình thành trong quá trình trao đổi chất (vd: sản xuất kháng sinh, acid amin, enzym,..) thì cần phải khử trùng triệt để các thiết bị lên men, môi trường dinh dưỡng, không khí xung quanh. (*quá trình lên men vô trùng*). Ngược lại trong quá trình lên men tạo sinh khối (vd: sản xuất protein đơn bào của nấm men, tảo, vi khuẩn), thì người ta thường tiến hành *lên men không vô trùng*; trong quá trình này, sự phát triển của các vi sinh vật lạ đã bị ngăn cản bởi việc tạo ra điều kiện nuôi cấy thích hợp sao cho những chủng cần nuôi cấy phát triển mạnh mẽ nhất (vd: cơ chất hoặc pH của môi trường).

Trong trường hợp phải khử trùng thì người ta có thể sử dụng một hoặc kết hợp các phương pháp dưới đây:

- Khử trùng bằng hơi nước: khử trùng thiết bị bằng hơi nước, sau đó đưa hơi nước vào trong thiết bị có chứa môi trường dinh dưỡng, sau đó đun đến 121°C trong 20 – 40 phút. Cuối cùng cần làm nguội môi trường dinh dưỡng đến nhiệt độ nuôi cấy trước khi cho vi sinh vật vào.
- Khử trùng luân chuyển: Đun nóng liên tục trong thời gian ngắn ở 140°C trong vài phút. Môi trường dinh dưỡng được chảy thành dòng nhờ hệ thống khuấy.
- Khử trùng bằng hóa chất: có thể dùng etylenoxyt hoặc beta – propiolacton đối với những dung dịch nuôi cấy kém bền nhiệt. Tuy nhiên cần phải cẩn trọng trong khi sử dụng bởi chúng có khả năng gây nổ và di hại đến sức khỏe con người. Ngoài ra có thể khử trùng thiết bị bằng cloramin hoặc các chất diệt khuẩn khác, sau đó tráng nước vô trùng rồi mới cho môi trường dinh dưỡng vào, cuối cùng cần phải gia nhiệt để khử trùng môi trường dinh dưỡng.
- Lọc khử trùng: sử dụng bông đá hoặc bông thủy tinh hoặc các loại sợi polymer, màng, ... làm nguyên liệu lọc. Mục đích là lọc không khí để cung cấp oxy cho môi trường.

1.2.3. Phương pháp nuôi:

1.2.3.1. Nuôi gián đoạn:

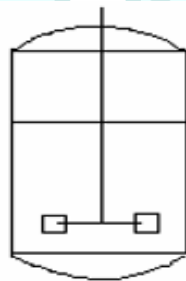
Nuôi gián đoạn – batch culture. Đây là phương pháp nuôi dễ dàng về mặt kỹ thuật. Thiết bị và môi trường dinh dưỡng được xử lý vô trùng. Vi sinh vật phát triển đến một chừng mực nào đó. Sự sinh trưởng của vi sinh vật gắn liền với sự thay đổi của điều kiện nuôi, sự giảm chất dinh dưỡng và sự tăng

sinh khối tế bào. Thông thường việc tạo thành sản phẩm mong muốn liên quan đến một trạng thái sinh lý nhất định trong pha sinh trưởng. Trạng thái này chỉ có thể duy trì trong một thời gian nhất định.

1.2.3.1.1. Nuôi cấy chìm:

Sử dụng nồi lên men. Trước hết nồi lên men được rửa sạch, rót môi trường mới vào và khử trùng để đảm bảo cho quá trình lên men không bị nhiễm. Các cơ thể vi sinh vật tồn tại trong môi trường. Trong nồi lên men có thiết bị sục khí và thiết bị khuấy giúp cho không khí, môi trường dinh dưỡng và các tế bào vi sinh vật được phân phối đều. Toàn bộ bề mặt tế bào được bao quanh bởi cơ chất đến nỗi không còn tồn tại tập đoàn tế bào.

1.2.3.1.2. Nuôi cấy bề mặt:



Lên men chìm



Lên men bề mặt

Trong phương pháp này, các tế bào vi sinh vật tồn tại ở bề mặt môi trường, hướng về không khí có chứa oxy. Các chất dinh dưỡng được hấp thụ nhờ các khuẩn ty dinh dưỡng đối với nuôi cấy nấm mốc.

Nuôi cấy bề mặt rất tốn kém, nhất là khi sử dụng trên quy mô lớn. Việc nuôi cấy được tiến hành trên những khay phẳng xếp chồng lên nhau. Sau đó

được ủ trong các buồng vô trùng đóng kín. Chính vì vậy thiết bị, cũng như mặt bằng sử dụng cho phương pháp này rất tốn kém.

1.2.3.2. Nuôi cấy liên tục

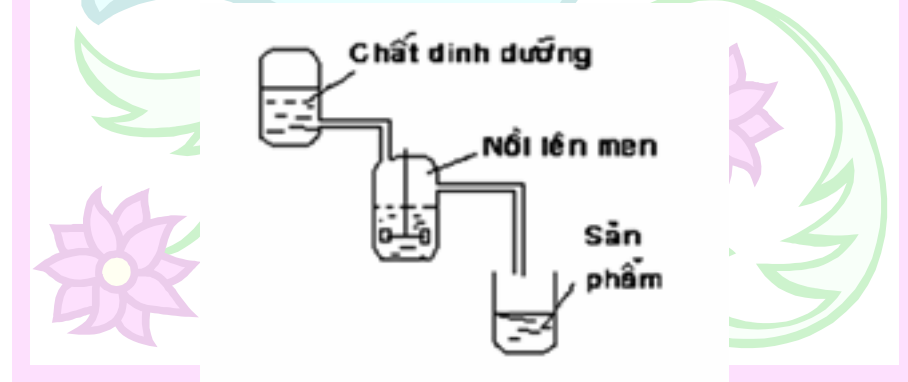
1.2.3.2.1. Các hệ thống hở:

Nồi lên men được thường xuyên cung cấp dịch dinh dưỡng mới và cũng tương đương như vậy một phần môi trường đã sử dụng cũng như một phần tế bào vi sinh vật được rút đi để đảm bảo sự cân bằng của quá trình trao đổi chất của tế bào vi sinh vật.

Người ta chia làm hai dạng hệ thống: hệ thống đồng nhất và hệ thống không đồng nhất.

- **Hệ thống đồng nhất:**

- *Hệ thống đồng nhất một giai đoạn:*



Hệ thống đồng nhất một giai đoạn

Sử dụng phương thức khuấy và thông khí nhằm trộn đều các chất lên men.. Các tế bào trong nồi lên men luôn sinh trưởng theo pha log. Tuy nhiên

.....
không có sự sinh sản đồng bộ. Các tế bào đang sinh trưởng mạnh mẽ và các tế bào già cùng tồn tại song song.

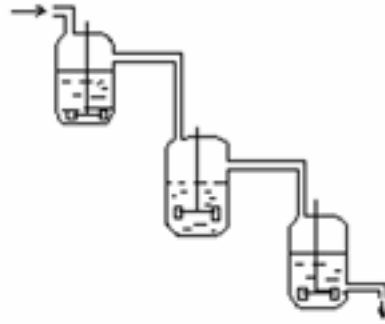
Việc bắt đầu quá trình nuôi cấy cũng tương tự như nuôi cấy gián đoạn theo phương thức chìm. Sau khi tế bào sinh trưởng đến mật độ mong muốn thì chuyển sang phương thức liên tục. *Tốc độ sinh trưởng* được điều chỉnh bởi *tốc độ dòng vào*. Còn *mật độ tế bào* lại phụ thuộc vào *nồng độ cơ chất trong dòng vào*. Khi chuyển từ trạng thái này sang trạng thái khác thì trạng thái cân bằng mới sẽ đạt được sau một thời gian. Nếu tăng tốc độ dòng vào đến một giá trị nhất định thì tốc độ sinh trưởng có thể đạt tới gần tốc độ cực đại. Tuy nhiên, nếu vượt quá giá trị này thì sẽ đến việc *rửa trôi* tế bào. Giá trị tiêu chuẩn của tốc độ dòng vào phụ thuộc vào thể tích nổi lên men.

Nếu chia tốc độ dòng vào cho thể tích hoạt động của nổi lên men ta được *tốc độ pha loãng*. Tốc độ pha loãng và tốc độ sinh trưởng là bằng nhau trong phạm vi của tốc độ pha loãng tiêu chuẩn. Giá trị mà tốc độ pha loãng đem lại hiệu suất cao nhất nằm ngay trước thời điểm rửa trôi tế bào.

Các hệ thống đồng nhất một giai đoạn được ứng dụng nhiều trong việc sản xuất sinh khối tế bào.

- *Hệ thống đồng nhất nhiều giai đoạn:*

Hệ thống liên tục được điều khiển các yếu tố hóa học thì được gọi là chemostat. Nếu các chemostat được đặt nối tiếp nhau ta sẽ có *hệ thống đồng nhất nhiều giai đoạn*. Hệ thống này được sử dụng khi quá trình trao đổi chất diễn ra ở các tốc độ sinh trưởng khác nhau



Hệ thống đồng nhất nhiều giai đoạn

Ví dụ: đầu tiên tạo sinh khối tế bào, sau tạo sản phẩm. Trong trường hợp này ở nồi lên men đầu tiên tốc độ sinh trưởng được duy trì ở tốc độ tối ưu nhất. Ở nồi lên men thứ hai, với mục đích tạo sản phẩm thì điều kiện nuôi khác, tốc độ sinh trưởng chậm hơn. Quá trình lên men tại đây đã xảy ra qua nhiều giai đoạn.

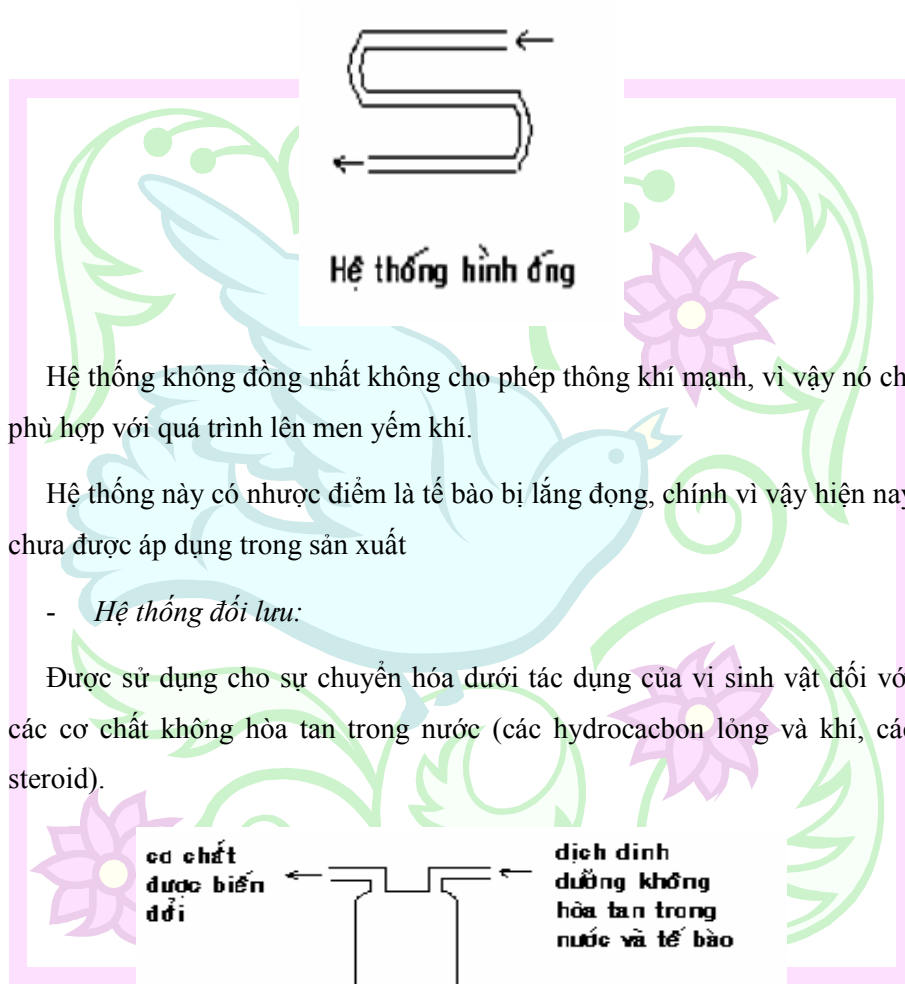
- **Hệ thống không đồng nhất:**

Trong hệ thống này không có sử dụng hệ thống khuấy trộn đều bằng cánh khuấy. Chính vì vậy, để đảm bảo sự trộn đều người ta có thể sử dụng các hệ thống hình ống hoặc hệ thống đối lưu. Sau đây là đặc điểm của từng hệ thống.

- *Các hệ thống hình ống:*

Tại đây sử dụng nồi lên men hình ống, nồi phản ứng hình ống. Trong thời gian chảy trong hệ thống các cơ thể trải qua những trạng thái sinh lý của sự lên men không liên tục. Nhờ vậy mà có thể đạt tới pha cân bằng (pha ổn

định) mà không bị rửa trôi sớm như ở hệ thống khuấy trộn (hệ thống đồng nhất).

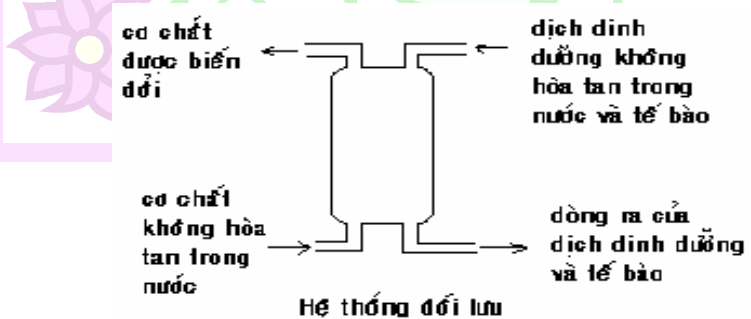


Hệ thống không đồng nhất không cho phép thông khí mạnh, vì vậy nó chỉ phù hợp với quá trình lên men yếm khí.

Hệ thống này có nhược điểm là tế bào bị lắng đọng, chính vì vậy hiện nay chưa được áp dụng trong sản xuất

- *Hệ thống đối lưu:*

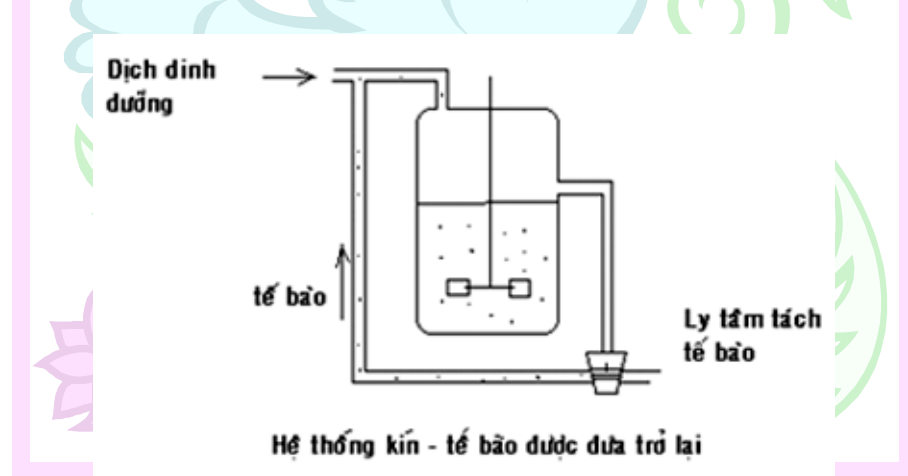
Được sử dụng cho sự chuyển hóa dưới tác dụng của vi sinh vật đối với các cơ chất không hòa tan trong nước (các hydrocarbon lỏng và khí, các steroid).



Tại hệ thống này, các tế bào trong dịch dinh dưỡng có chứa nước được đưa vào từ phía trên, còn cơ chất không tan trong nước thì được đưa vào từ phía dưới. Hai dòng chảy này đi ngang qua nhau và phản ứng với nhau. Các tế bào vi sinh vật phải được nuôi trước trong một chemostat, hoặc được tách ra sau phản ứng và được đưa trở lại.

1.2.3.2.1. Các hệ thống kín:

Trong quá trình hoạt động tại hệ thống kín tế bào vi sinh vật được lưu giữ lại hoặc được đưa trở lại, trong khi đó môi trường chảy đi không ngừng. Vì các tế bào chỉ hoạt động trong một thời gian nhất định nên sau một thời gian nào đó cần phải thay thế hoặc bổ sung chúng. Nói một cách khác là ta kéo dài pha cân bằng của sự nuôi không liên tục nhờ vào việc đưa cơ chất vào một cách liên tục.



Hệ thống kín mà trong đó tế bào vi sinh vật được đưa trở lại được ứng dụng trong sản xuất dấm theo phương pháp nhanh. Còn hệ thống kín mà trong đó tế bào vi sinh vật được giữ lại sau đó được tách ra và đưa trở lại

.....
trong sản xuất được ứng dụng trong sản xuất bia, rượu etylic cũng như trong việc làm sạch nước thải.

1.2.4. Nồi lên men:

Nồi lên men được ứng dụng trong phương thức nuôi chìm. Thể tích của nồi lên men dao động từ dưới 1 lít (trong phòng thí nghiệm) đến 500 000 lít (trong sản xuất công nghiệp). Chúng được thiết kế sao để đảm bảo yêu cầu tối ưu cho từng quá trình lên men

Về chi tiết, có sự khác nhau rất nhiều giữa các kiểu nồi lên men. Tuy nhiên vẫn có một số tính chất chung:

- Nồi lên men thường được tạo từ thép không gỉ, để tránh sự ăn mòn và tránh sự ảnh hưởng của kim loại đến quá trình lên men.
- Với quá trình lên men vô trùng thì nồi lên men kể cả các van phải chịu được áp suất, để có thể thực hiện khử trùng ở áp suất cao.
- Đối với quá trình lên men hiếu khí phải đạt được sự thông khí nhờ vào hệ thống thông khí (có thể dùng song song với hệ thống khuấy). Hệ thống thông khí này cũng phải đảm bảo sao cho không khí vào trong nồi là vô trùng.
- Trong quá trình lên men yếm khí cũng phải đảm bảo sự khuấy trộn, để ngăn cản sự lắng của tế bào.
- Nhiệt độ lên men tối ưu được duy trì nhờ hệ thống làm nóng và làm nguội bằng nước chảy quanh nồi, hoặc đưa vào trong nồi ở dạng các ống ruột gà.

- Với các quá trình lên men cần đảm bảo nhiệt độ xuống 3 – 4⁰C, thì lúc này nhiệt độ lên men tối ưu được duy trì nhờ hệ thống làm lạnh bằng dung dịch làm lạnh chảy quanh nồi, hoặc đưa vào trong nồi ở dạng các ống ruột gà. Dung dịch làm lạnh này có thể sử dụng glycol, hoặc freon. Trong trường hợp cùng cực ta cũng có thể sử dụng hỗn hợp muối và nước đá bào nhỏ theo tỷ lệ 1:3. Tuy nhiên hỗn hợp muối đá này có nhược điểm là dễ ăn mòn thiết bị.
- Để giảm nhiệt lượng tổn thất trong quá trình lên men, xung quanh nồi lên men cần có lớp bảo ôn. Lớp bảo ôn này có thể làm từ bọt biển hoặc là lớp bông thủy tinh.
- Kèm theo đó là các hệ thống kiểm tra nhiệt độ, áp suất, pH,...

Dưới đây là sơ đồ của một nồi lên men dùng trong sản xuất:

