




CÔNG NGHỆ ENZYME ENZYME TECHNOLOGY





29/09/2011 11:21 SA 1



CÔNG NGHỆ ENZYME




29/09/2011 11:21 SA 2 Nguyễn Hữu Trí




CÔNG NGHỆ ENZYME

- “Without enzymes there can be no life”.
- Enzyme: là các phức hợp protein hình cầu, trong tế bào sống, thực hiện các xúc tác sinh hóa chuyển đổi cơ chất một cách nhanh chóng.
- Công nghệ Enzyme : sự sản xuất enzyme cho các mục đích công nghiệp chế biến thực phẩm, y học, mục đích sinh học (bioremediation),...




29/09/2011 11:21 SA 3 Nguyễn Hữu Trí



CÔNG NGHỆ ENZYME

- Do có cấu hình gấp cuộn rất phức tạp nên mỗi enzyme chỉ xúc tác được phổ hẹp cơ chất, trong một giới hạn cơ chất và nhiệt độ.
- Trong ứng dụng công nghiệp, tạo sản phẩm có chất lượng cao, ít sản phẩm phụ, dễ tinh sạch,...
- Enzyme không độc và có khả năng bị phân giải (thân thiện môi trường).
- Có thể được tạo ra một lượng lớn nhờ vi sinh vật.
- Tham gia giải quyết các vấn đề xã hội hiện đại: sản xuất lương thực, thiếu hụt và bảo tồn năng lượng, cải thiện môi trường, cùng với các ứng dụng y học.

29/09/2011 11:21 SA 4 Nguyễn Hữu Trí




CÔNG NGHỆ ENZYME

- Sản xuất và sử dụng enzyme là lĩnh vực thành công nhất của CNSH và gia tăng 12% hàng năm trong suốt 10 năm qua.
- Có hơn 400 công ty khắp thế giới sản xuất enzyme, châu Âu chiếm đa số (60%)

Table 5.1 Distribution of bulk-produced enzymes by value		Table 5.2 Approximate annual world production of some industrial enzymes	
Specific area	Percentage	Enzyme	Tonnes pure enzyme
Food	41	Bacillus protease	550
De-arginis	34	Amylin glucosidase	350
Textiles	11	Bacillus amylase	350
Leather	3	Glucose isomerase	60
Pulp/paper	1	Microbial rennin	25
Other applications	6	Fungal amylase	20
		Feculanase	20
		Fungal protease	15

29/09/2011 11:21 SA 5



Vai trò xúc tác của enzyme

- Năng lượng hoạt hóa tức là mức năng lượng các chất tham gia phản ứng phải đạt được.
- Chất có tác dụng thúc đẩy tốc độ phản ứng hóa học được gọi là chất xúc tác.
- Enzyme không làm lệch vị trí cân bằng mà nó chỉ làm phản ứng chóng đạt trạng thái cân bằng.

29/09/2011 11:21 SA 6 Nguyễn Hữu Trí

Vai trò xúc tác của enzyme

Phản ứng	Saccharose + H ₂ O → glucose + fructose (calo/mol)	H ₂ O ₂ → H ₂ O + 1/2O ₂ (calo/mol)
Không xúc tác	32.000	18.000
Xúc tác vô cơ (H ⁺)	25.000	11.700
Enzyme	(saccharase) 9.400	(catalase) 5.500

29/09/2011 11:21 SA
7
Nguyễn Hữu Trí

Vai trò xúc tác của enzyme

Đặc điểm	Chất xúc tác vô cơ	Chất xúc tác hữu cơ
Bản chất hóa học	Phân tử nhỏ gồm vài nguyên tố (Pt, HCl...)	Đại phân tử protein
Tăng tốc độ phản ứng	10 ² – 10 ⁶ lần	10 ⁶ – 10 ¹¹ lần
Các điều kiện:	Cao (≥ 100°C) Acid hoặc kiềm mạnh Cao (vài atm)	Thấp (36 – 45°C) pH sinh lý Áp suất khí quyển (1 atm)
Nhiệt độ thích hợp	Cao (100°C)	Thấp (36 – 45°C)
pH thích hợp nhất	Acid hoặc kiềm mạnh	pH sinh lý

29/09/2011 11:21 SA
8
Nguyễn Hữu Trí

Phân loại enzyme theo cấu tạo

Apoenzym hay apoprotein: chỉ có protein trong thành phần cấu tạo của nó.

Coenzym: enzym có protein kết hợp với phân tử kim loại tạo thành phức hữu cơ – kim loại.

Các đồng yếu tố được gọi là nhóm ngoại prosthetic. Còn phức chất chứa cả hai yếu tố được gọi là enzym hoàn chỉnh – holoenzym.

29/09/2011 11:21 SA
9
Nguyễn Hữu Trí

Danh pháp quốc tế và phân loại enzyme

- Danh pháp:
- Tên thông thường: trypsin, pepsin, renin.....
- Tên hệ thống: tên cơ chất - tên kiểu phản ứng

Pyruvate – decarboxylase là enzyme khử CO₂ của acid pyruvic.

Glucophosphate – isomerase là enzyme giúp chuyển gốc phosphate trong glucose.

29/09/2011 11:21 SA
10
Nguyễn Hữu Trí

Danh pháp quốc tế và phân loại enzyme

Phân loại:

- Oxidoreductase: xúc tác phản ứng oxi hóa khử, chuyển electron, H, O.
- Transferase: xúc tác phản ứng chuyển nhóm chức năng từ chất cho sang chất nhận.
- Hydrolase: xúc tác phản ứng thủy phân (Hydrolysis reaction).

29/09/2011 11:21 SA
11
Nguyễn Hữu Trí

Danh pháp quốc tế và phân loại enzyme

- Lyase: xúc tác phản ứng cắt liên kết hóa học (chemical bonds)
- Isomerase: xúc tác phản ứng chuyển hóa một cơ chất thành một dạng đồng phân của nó (isomer)
- Ligase: xúc tác phản ứng liên kết 2 nguyên tử (C-O, C-S, C-N, C-C, phosphoric ester, C-kim loại)

29/09/2011 11:21 SA
12
Nguyễn Hữu Trí

STT	Nhóm enzyme	Phản ứng xúc tác
1	Oxidoreductase	Chuyển e ⁻ , H ⁺ hoặc nguyên tử H) $A + B \leftrightarrow A + B$
2	Transferase	Phản ứng chuyển nhóm chức $A-B + C \leftrightarrow A + B - C$
3	Hydrolase	Phản ứng phân ly nhờ nước (thủy giải) (chuyển nhóm chức cho phân tử nước): $A-B + H_2O \leftrightarrow A-H + B-OH$
4	Lyase	Phản ứng chuyển hóa nhờ bổ sung nhóm chức vào liên kết đôi hoặc tạo liên kết đôi nhờ lấy đi nhóm chức (phân giải không có nước tham gia)
5	Isomerase	Chuyển nhóm chức trong phân tử tạo các dạng đồng phân $\begin{array}{c} XY \\ \\ A-B \end{array} \leftrightarrow \begin{array}{c} YX \\ \\ A-B \end{array} + X-Y$
6	Ligase	Tổng hợp liên kết C-C, C-S, C-O và C-N nhờ phản ứng trùng ngưng liên hợp với sự thủy giải ATP.

Danh pháp quốc tế và phân loại enzyme

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	$A_{red} + B_{ox} \leftrightarrow A_{ox} + B_{red}$ e ⁻ - Reduction equivalent	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	$A-B + C \leftrightarrow A + B-C$	C-Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	$A-B + H_2O \leftrightarrow A-H + B-OH$	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases

29/09/2011 11:21 SA 14 Nguyễn Hữu Trí

Danh pháp quốc tế và phân loại enzyme

Class	Reaction type	Important subclasses
4 Lyases ("synthases")	$A + B \leftrightarrow A-B$	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	$A \leftrightarrow Iso-A$	Epimerases cis trans isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	$A + B + X-P \leftrightarrow A-B + XDP$ X = A, C, U, C	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

29/09/2011 11:21 SA 15 Nguyễn Hữu Trí

Cường lực xúc tác lớn

1 gam Rennine có thể gây đông tụ 7,2 tấn sữa.

Catalase **1 giây**

$$10^5 H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 10^5 H_2O + 5 \cdot 10^4 O_2$$

29/09/2011 11:21 SA 16 Nguyễn Hữu Trí

Tính đặc hiệu của enzyme

- Đặc hiệu phản ứng
- Đặc hiệu cơ chất
 - Đặc hiệu tuyệt đối
 - Đặc hiệu tương đối
 - Đặc hiệu nhóm
 - Đặc hiệu đồng phân quang học

29/09/2011 11:21 SA 17 Nguyễn Hữu Trí

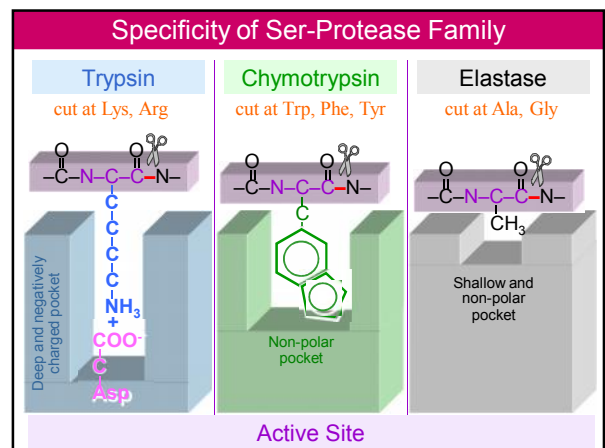
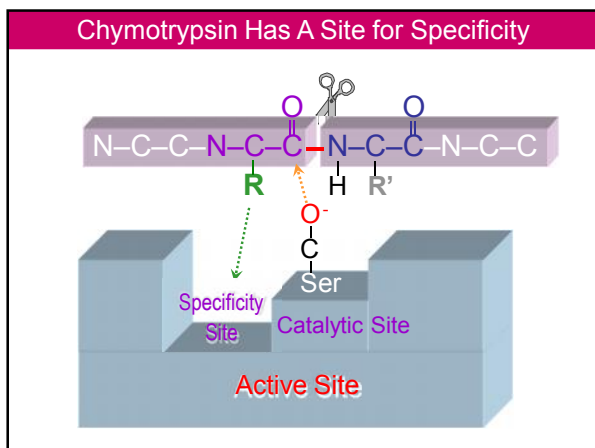
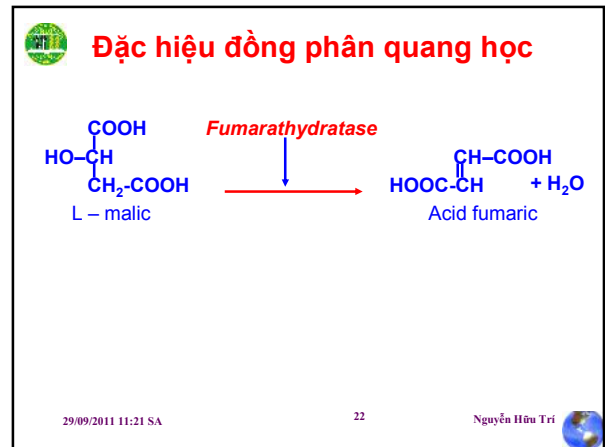
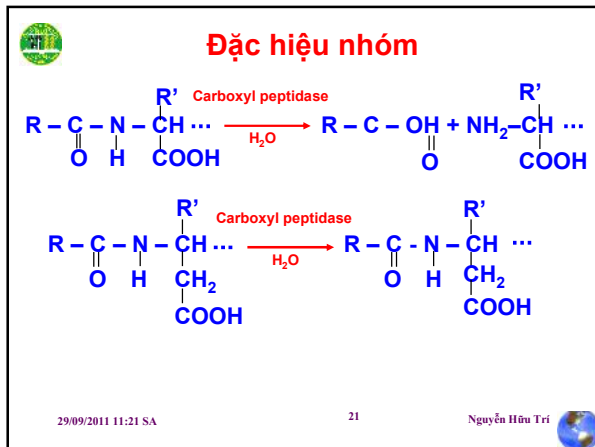
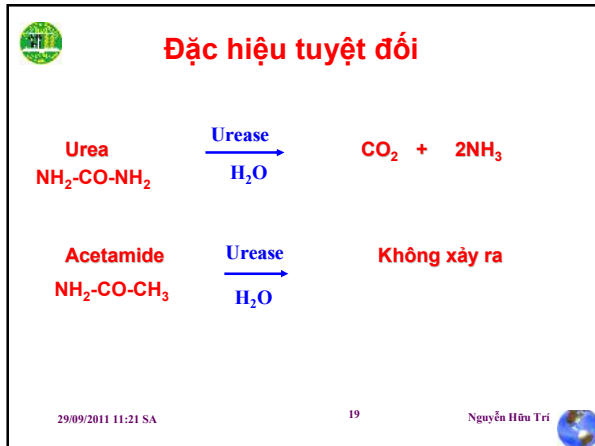
Đặc hiệu phản ứng

- Oxy hoá nhờ oxydase:

$$RCHCOOH + 1/2O_2 \xrightarrow{\text{Oxydase}} RCOCOOH + NH_3$$
- Khử carboxyl nhờ decarboxylase:

$$RCHCOOH \xrightarrow{\text{Decarboxylase}} RCH_2NH_2 + CO_2$$

29/09/2011 11:21 SA 18 Nguyễn Hữu Trí





Enzyme

- Công nghiệp tổng hợp enzyme cần thiết cho ngành công nghệ thực phẩm và nước giải khát. Enzymes cũng được sử dụng trong phân tích y học và công nghiệp và ngày nay chúng được thêm vào bột giặt (cellulase, protease, lipase).
- Enzyme có thể được tổng hợp bởi thực vật, động vật, vi sinh vật hoặc nuôi cấy mô động, thực vật.
- Các enzyme động thực vật có thể được tổng hợp nhờ quá trình lên men vi sinh vật. Hầu hết các enzyme được tổng hợp trong tropophase thì amylases (bởi *Bacillus stearotherophilus*) được tổng hợp trong idiophase, vì vậy nó là chất biến dưỡng thứ cấp.

29/09/2011 11:21 SA

25

Nguyễn Hữu Trí



Lịch sử phát triển enzyme

- Cuối thế kỷ 18 đầu thế kỷ 19, sự phân giải các chất nhờ enzyme đã được ghi nhận nhưng cơ chế vẫn chưa biết.
- Thế kỷ 19, Louis Pasteur phát hiện một chất có khả năng xúc tác trong quá trình lên men chuyển hóa đường thành rượu gọi là ferment có trong tế bào nấm men.
- 1877, Wilhelm Kuhne, sinh lý học người Đức đầu tiên dùng thuật ngữ enzyme.
- Thế chiến thứ 1, Weitzman sản xuất aceton ở Anh.

29/09/2011 11:21 SA

26

Nguyễn Hữu Trí



Lịch sử phát triển enzyme

- 1897, Eduard Buchner phát hiện khả năng lên men của dịch chiết nấm men. 1907, ông nhận nobel prize cho phát minh "cell free fermentation"
- 1926, James B. Sumner kết tinh enzyme urease và 1937 cho enzyme catalase.
- 1930, Northrop và Staley kết tinh enzym pepsin.
- Thế chiến thứ 2, sản xuất kháng sinh theo qui mô công nghiệp.

29/09/2011 11:21 SA

27

Nguyễn Hữu Trí



Lịch sử phát triển enzyme

- Lysozyme là enzyme được xác định cấu trúc đầu tiên và năm 1965.
- 1969, xây dựng qui trình công nghiệp sản xuất amino acid sử dụng enzyme.
- 1972, Boyer et al. áp dụng kỹ thuật di truyền trong công nghệ enzyme.
- 1973, sản xuất aspartic acid bằng lên men cố định tế bào.
- 1984 đến nay, phát hiện hàng trăm loại enzyme khác nhau và ứng dụng rộng rãi.

29/09/2011 11:21 SA

28

Nguyễn Hữu Trí



Cấu trúc lysozyme



29/09/2011 11:21 SA

29

Nguyễn Hữu Trí



Công nghệ sản xuất enzyme từ vi sinh vật

29/09/2011 11:21 SA

30

Nguyễn Hữu Trí





Sinh vật như một hệ thống mở chế tạo enzyme

- Sinh vật được xem như hệ thống mở liên quan mật thiết đến quá trình trao đổi chất giữa tế bào và môi trường bên ngoài.
- Quá trình trên là con đường chuyển hoá chính đóng vai trò quan trọng chu trình chuyển hoá các chất trong tự nhiên.
- Các phản ứng trong và ngoài tế bào trong chu trình chuyển hoá trên được xúc tác bởi một chất xúc tác sinh học có bản chất protein, được gọi là enzyme.
- Tùy theo nơi xúc tác trong hoặc ngoài tế bào: enzyme nội bào và enzyme ngoại bào.

29/09/2011 11:21 SA

31

Nguyễn Hữu Trí



Ưu thế

- Enzyme thu nhận từ vi sinh vật có hoạt tính cao
- Chủ động về nguyên liệu nuôi cấy và giống vi sinh vật
- Chu kỳ sinh trưởng của vi sinh vật ngắn nên có thể thu hoạch nhiều lần quanh năm
- Có thể điều khiển sinh tổng hợp enzyme để dàng theo hướng có lợi vì vi sinh vật có khả năng cảm ứng với môi trường rất nhanh
- Giá thành tương đối thấp vì môi trường nuôi cấy tương đối rẻ, đơn giản, dễ tổ chức sản xuất.
- Vi sinh vật có thể tổng hợp cùng lúc nhiều loại enzyme khác nhau.

29/09/2011 11:21 SA

32

Nguyễn Hữu Trí



Nguồn enzyme chủ yếu từ vi sinh vật

- 1960, 70% enzyme từ thực vật và động vật
- Ngày nay, enzyme từ nguồn vi sinh vật chiếm 90% thị trường
- Vi sinh vật là nguồn enzyme duy nhất trên qui mô công nghiệp.
- Chuyên hóa khối lượng lớn cơ chất.
- Nguyên liệu sản xuất rẻ tiền, dễ kiếm, không bị biến động theo mùa.

29/09/2011 11:21 SA

33

Nguyễn Hữu Trí



Nguồn enzyme chủ yếu từ vi sinh vật

- Hoạt tính enzyme cao nhất
- Tốc độ sinh sản nhanh
- Sản xuất chủ yếu nhờ vào quá trình lên men chìm.
- Vi sinh vật sản xuất enzyme nhờ thông tin di truyền của chính nó và nguồn gene được chuyển vào.
- Tốc độ sinh tổng hợp enzyme có thể điều khiển được.

29/09/2011 11:21 SA

34

Nguyễn Hữu Trí



Tuyển chọn giống vi sinh vật cho enzyme có hoạt tính cao

- Các nhà di truyền học khi chọn lựa cho công nghiệp sản xuất enzyme phải tìm những đặc tính mong muốn tối ưu:
 - sản phẩm enzyme cao
 - không phụ thuộc chất cảm ứng
 - dễ dàng thu nhận...
- Cố gắng loại bỏ hoặc ức chế những đặc tính không mong muốn
 - những chất đồng biến dưỡng có hại
 - mùi, màu...

29/09/2011 11:21 SA

35

Nguyễn Hữu Trí



Chọn lọc chủng sản xuất enzyme.

Table 5.5 | Production organisms for selected enzyme products

Enzyme activity	Application/industry	Host organism	Donor organism
Amylase (fungal)	Baking, brewing, starch	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus</i> spp.
Amylase (bacterial)	Starch	<i>A. niger</i>	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
Cellulase	Baking, brewing, detergents, textiles	<i>B. subtilis</i>	<i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i>
		<i>Pirouderma rosei</i>	
Pectate lyase	Fruits and vegetables, textiles	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
Protease (alkaline)	Detergents	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
		<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i>	Calf stomach, <i>Mucor</i> , <i>Rhizomucor</i>
Xylanase (hemicellulase)	Pulp and paper, textiles	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Actinomyces</i> , <i>Trichoderma</i> spp.

Source adapted from Beika and Charzy (2006)



Bản chất sinh học của enzyme

- Enzyme được tạo ra trong tế bào sinh vật
- Enzyme tham gia phản ứng cả trong tế bào sống và khi được tách khỏi tế bào sống.
- Enzyme tham gia phản ứng trong điều kiện nhiệt độ ôn hoà.
- Enzyme tham gia xúc tác từ giai đoạn đầu đến giai đoạn giải phóng hoàn toàn năng lượng dự trữ.
- Enzyme có thể thực hiện một phản ứng đơn lẻ.
- Phản ứng có enzyme giúp tiết kiệm năng lượng.
- Enzyme chịu sự điều khiển của gene và điều kiện phản ứng

29/09/2011 11:21 SA

37

Nguyễn Hữu Trí



Cấu trúc enzyme Trung tâm hoạt động (active site)

- Trung tâm hoạt động: nhóm hóa học tiếp xúc trực tiếp cơ chất; nhóm hóa học không tiếp xúc cơ chất nhưng tác dụng trực tiếp đến quá trình xúc tác.
- Gồm các amino acid có nhóm hoá học hoạt động mạnh; ion kim loại; nhóm chức của coenzyme.
- Enzyme thể có một, hai, thậm chí 4 trung tâm hoạt động.

29/09/2011 11:21 SA

38

Nguyễn Hữu Trí



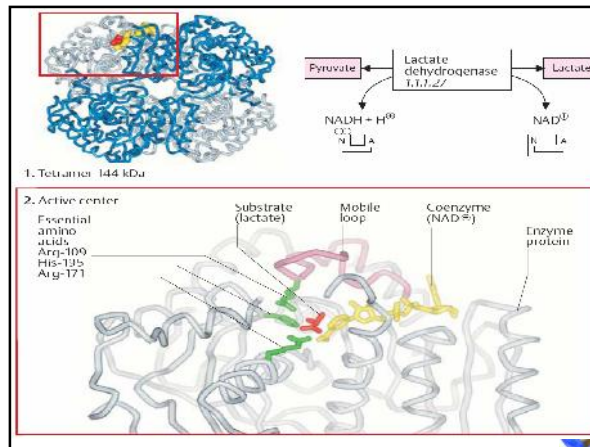
Cấu trúc enzyme Trung tâm hoạt động (active site)

- Cơ chất có cấu trúc phân tử thích hợp với trung tâm hoạt động của enzyme mới có thể kết hợp với trung tâm hoạt động tạo phức enzyme – cơ chất.
- Các loại enzyme thường tạo ra trung tâm hoạt động có cấu trúc không gian nhất định.
- Thuyết trung tâm hoạt động linh hoạt của Koshland: cơ chất làm thay đổi cấu trúc không gian của trung tâm hoạt động, giúp trung tâm hoạt động tham gia xúc tác.

29/09/2011 11:21 SA

39

Nguyễn Hữu Trí



Các tiền chất enzyme

- Tiền enzyme (proenzyme; zymogen): một số enzyme không có khả năng xúc tác ngay sau khi được tổng hợp mà phải trải qua một giai đoạn biến đổi nhất định (giai đoạn hoạt hoá).
- Tiền enzyme trải qua giai đoạn hoạt hoá nhằm loại bỏ đoạn peptide che lấp trung tâm hoạt động enzyme.
 - Pepsinogen → pepsin
 - Trypsinogen → trypsin
 - Chymotrypsinogen → chymotrypsin

29/09/2011 11:21 SA

41

Nguyễn Hữu Trí



Ý nghĩa quá trình xúc tác trong tế bào sinh vật

- Giảm năng lượng hoạt hoá → gắn liền quá trình tiến hóa sinh vật.
- Tăng tốc độ phản ứng sinh hóa trong cơ thể, giúp tế bào tăng nhanh về số lượng và khối lượng.

29/09/2011 11:21 SA

42

Nguyễn Hữu Trí



Cơ chế tác dụng của enzyme

- Trong phản ứng có enzyme, cơ chất được hoạt hóa mạnh, thay đổi tính chất hóa học → sản phẩm của phản ứng.
- Quá trình xúc tác của enzyme gồm 3 giai đoạn:
- Giai đoạn 1:** enzyme kết hợp cơ chất bằng liên kết yếu tạo phức hợp tạm thời.
- Giai đoạn 2:** Cơ chất bị thay đổi cấu hình không gian.
- Giai đoạn 3:** sản phẩm được tạo ra và tách khỏi enzyme.

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$$

29/09/2011 11:21 SA 43 Nguyễn Hữu Trí

Cơ chế tác dụng của enzyme lên cơ chất

29/09/2011 11:21 SA 44 Nguyễn Hữu Trí

Mô hình “chìa và khóa” của Fisher (1894)

29/09/2011 11:21 SA 45 Nguyễn Hữu Trí

Mô hình “khớp cảm ứng” của Koshland (1958)

29/09/2011 11:21 SA 46 Nguyễn Hữu Trí

Phương trình động học Michaelis - Menten

- 1913, Michaelis và Menten xây dựng phương trình động học giải thích phản ứng xúc tác có enzyme.
- Phương trình thể hiện mối quan hệ giữa vận tốc phản ứng với nồng độ cơ chất và enzyme.
- Enzyme kết hợp cơ chất tạo phức ES.
- Phức hợp chuyển hóa tạo sản phẩm P, enzyme được giải phóng và tiếp tục xúc tác phản ứng mới.

29/09/2011 11:21 SA 47 Nguyễn Hữu Trí

Phương trình động học Michaelis - Menten

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

- V_0 : vận tốc ban đầu của phản ứng
- V_{max} : vận tốc tối đa của phản ứng
- $[S]$: nồng độ cơ chất.

29/09/2011 11:21 SA 48 Nguyễn Hữu Trí

Các yếu tố ảnh hưởng hoạt tính enzyme

- Nhiệt độ
- pH
- Chất kiềm hãm
- Chất hoạt hóa

29/09/2011 11:21 SA 49 Nguyễn Hữu Trí

Nhiệt độ

- Tốc độ phản ứng tỉ lệ thuận với nhiệt độ trong một giới hạn nhất định.
- Nhiệt độ tương ứng với tốc độ phản ứng enzyme cao nhất được gọi là nhiệt độ tối ưu.
- Mỗi enzyme có nhiệt độ tối ưu khác nhau
- Nhiệt độ cao hơn nhiệt độ tối ưu, hoạt tính enzyme giảm → enzyme bị biến tính.
- Ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối ưu, hoạt tính enzyme yếu nhưng có thể tăng trở lại khi tăng dần nhiệt độ.

29/09/2011 11:21 SA 50 Nguyễn Hữu Trí

Ảnh hưởng của nhiệt độ

29/09/2011 11:21 SA 51 Nguyễn Hữu Trí

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Enzyme	Stability optimum (°C)	Activity optimum (°C)
Microbial rennet	~40	~40
<i>L. oryzae</i> α-amylase	~60	~60
<i>B. subtilis</i> α-amylase	~70	~70
<i>B. licheniformis</i> α-amylase	~80	~80
<i>A. oryzae</i> β-galactosidase	~40	~40

29/09/2011 11:21 SA 52 Nguyễn Hữu Trí

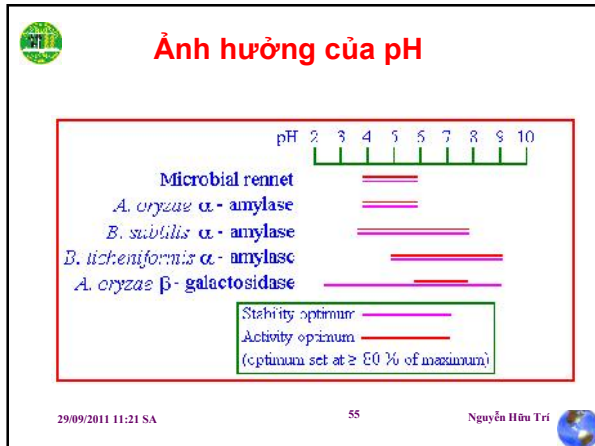
pH

- pH ảnh hưởng đến mức độ ion hóa của enzyme và cơ chất.
- Tùy enzyme sẽ có pH tối ưu khác nhau.
- Để đạt hiệu quả xúc tác, nghiên cứu và xác định nhiệt độ và pH tối ưu của enzyme là rất quan trọng.

29/09/2011 11:21 SA 53 Nguyễn Hữu Trí

Ảnh hưởng nhiệt độ, pH

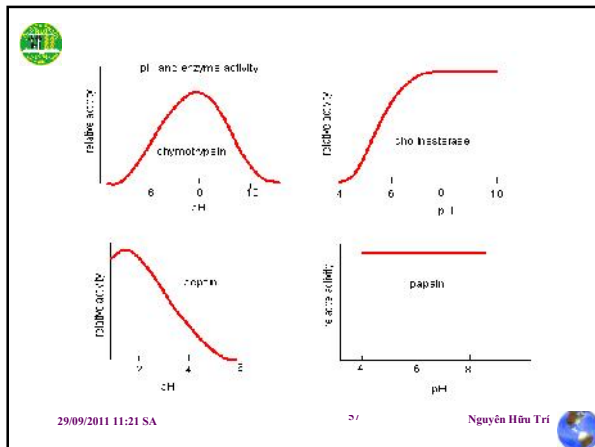
29/09/2011 11:21 SA 54 Nguyễn Hữu Trí



Ảnh hưởng của pH

Enzyme	Nguồn gốc	pH _{opt}
Pepsin	Dịch vị	1,8
Trypsin	Dịch tụy	8
Chymotrypsin	Dịch tụy	8,1- 8,6
Amylase	Nước bọt, dịch tụy	7,0
Lipase	Dịch tụy	7,0 – 7,5
Phosphatase acid	Tuyến tiền liệt	5,0 – 5,6
Phosphatase kiềm	Xương, gan	8,6 – 9,1

29/09/2011 11:21 SA 56 Nguyễn Hữu Trí



Chất kìm hãm và hoạt hóa enzyme

Chất hoạt hóa: là chất làm tăng hoạt tính của enzyme, chúng có bản chất hoá học khác nhau.

Chất kìm hãm: Là chất làm giảm hoạt tính của enzyme do làm giảm ái lực của enzyme với cơ chất hoặc làm enzyme mất khả năng kết hợp với cơ chất.

29/09/2011 11:21 SA 58 Nguyễn Hữu Trí

- ### Các yếu tố ảnh hưởng hoạt tính enzyme- Chất hoạt hóa
- Giúp tăng hoạt tính enzyme ở nồng độ nhất định.
 - Tác dụng ức chế khi vượt quá nồng độ này.
 - Giúp phá vỡ một số liên kết trong phân tử tiền enzyme hoặc phục hồi các nhóm chức năng trong trung tâm hoạt động của enzyme.
- 29/09/2011 11:21 SA 59 Nguyễn Hữu Trí

- ### Các yếu tố ảnh hưởng hoạt tính enzyme – chất kìm hãm
- Chất kìm hãm làm giảm hoạt tính enzyme nhưng không bị thay đổi bởi enzyme. Cơ chế kìm hãm có thể thuận nghịch hoặc không thuận nghịch.
 - Chất kìm hãm cạnh tranh
 - Chất kìm hãm không cạnh tranh
 - Kìm hãm bởi sản phẩm phản ứng
- 29/09/2011 11:21 SA 60 Nguyễn Hữu Trí

Kim hãm cạnh tranh

Có cấu trúc gần giống cơ chất, nó kết hợp với trung tâm hoạt động của Enzyme do đó chiếm chỗ của cơ chất và làm giảm hoạt tính Enzyme (H):

$$E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$$

$$E + I \rightarrow EI + S \rightarrow EI + S \text{ (I là chất ức chế cạnh tranh).}$$

29/09/2011 11:21 SA Nguyễn Hữu Trí

Kim hãm không cạnh tranh

Có cấu tạo hoá học khác cơ chất, gắn với enzyme ở vị trí không nhất định, có thể ở ngoài trung tâm hoạt động

29/09/2011 11:21 SA 62 Nguyễn Hữu Trí

Chất kim hãm không cạnh tranh

- Kết hợp với enzyme ở vị trí ngoài trung tâm hoạt động
- làm thay đổi cấu trúc không gian phân tử enzyme, dẫn đến giảm hoạt tính enzyme.
- Trong trường hợp này, enzyme vẫn kết hợp cơ chất.
- Mức độ kim hãm không phụ thuộc vào sự tương quan giữa nồng độ cơ chất và chất kim hãm.

29/09/2011 11:21 SA 63 Nguyễn Hữu Trí

Kim hãm bởi sản phẩm phản ứng

Sản phẩm P sau phản ứng đóng vai trò giống chất kim hãm không cạnh tranh.

29/09/2011 11:21 SA 64 Nguyễn Hữu Trí

Phương pháp xác định hoạt tính enzyme

- Xác định lượng cơ chất mất đi hay lượng sản phẩm tạo thành sau một thời gian nhất định và lượng enzyme xác định (phương pháp phổ biến)
- Xác định thời gian cần thiết để enzyme khảo sát biến đổi một lượng cơ chất mất đi hay thu được lượng sản phẩm nhất định.
- Xác định nồng độ enzyme cần thiết trong một thời gian nhất định có thể tạo thành sản phẩm hoặc biến đổi một lượng cơ chất nhất định.
- Lưu ý: Đảm bảo điều kiện pH, nhiệt độ, thời gian, chất hoạt hóa hoặc chất làm bền enzyme.

29/09/2011 11:21 SA 65 Nguyễn Hữu Trí

Phương pháp xác định hoạt tính enzyme

- Đơn vị hoạt độ quốc tế (UI): lượng enzyme xúc tác được 1μmol cơ chất sau một phút ở điều kiện tiêu chuẩn
- Katal: Lượng enzyme có khả năng xúc tác làm chuyển hóa được một mol cơ chất sau một giây ở điều kiện tiêu chuẩn.
- Hoạt độ riêng: Số đơn vị UI (katal) ứng với một ml dung dịch hoặc gram chế phẩm khô.
- Hoạt độ riêng của phân tử: Số phân tử cơ chất được chuyển hóa bởi một phân tử enzyme trong một đơn vị thời gian.

29/09/2011 11:21 SA 66 Nguyễn Hữu Trí



Quy trình sản xuất enzyme

- Sinh tổng hợp enzyme
- Thu nhận enzyme: phá vỡ tế bào, tách enzyme, cô đặc enzyme
- Tinh sạch enzyme
- Hình thành công thức chế phẩm enzyme (enzyme product formulation)

29/09/2011 11:21 SA

67

Nguyễn Hữu Trí



Thu nhận enzyme – Phá vỡ tế bào

- Phá vỡ tế bào bằng phương pháp vật lý:
 - Phương pháp đồng hóa bằng máy xay sinh tố
 - Phương pháp đồng hóa bằng máy đồng hóa.
 - Phá vỡ tế bào bằng máy French press
 - Phương pháp nghiền với alumina hay cát
 - Phương pháp nghiền với bi thủy tinh
 - Phương pháp siêu âm

29/09/2011 11:21 SA

68

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp đồng hóa bằng máy xay sinh tố

- Thích hợp phá các mô mềm như gan, tim, cơ,...
- Thực hiện nhanh trong 5 – 10 phút ở nhiệt độ 4°C.
- Sau khi đồng hóa, dịch đồng hóa được li tâm ở 23 000 g trong 1 giờ ở 4 °C, thu dịch nổi.



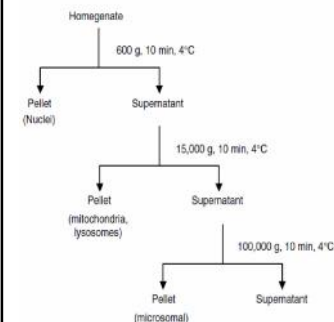
29/09/2011 11:21 SA

69

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp đồng hóa bằng máy đồng hóa (tế bào động vật)



Phá vỡ tế bào bằng máy French press

- Hòa trộn tế bào vào dung dịch buffer thích hợp và nạp vào máy.
- Tế bào bên trong máy French press đang ở áp suất rất cao, nhạch chóng bị đẩy ra áp suất khí quyển.
- Sự thay đổi áp suất đột ngột làm tế bào bị vỡ.
- Li tâm ở 23 000 g trong 1 h ở 4 °C, thu dịch nổi.



29/09/2011 11:21 SA

71

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp nghiền với alumina hay cát

- Dùng chày nghiền tế bào với cát thạch anh, hoặc cát nhôm (2 lần khối lượng tế bào).
- Hòa hỗn hợp nghiền trên vào dung dịch buffer thích hợp. (3 – 4 lần thể tích tế bào)
- Dịch trên được li tâm ở 23 000 g trong 1 giờ ở 4 °C, thu dịch nổi.

29/09/2011 11:21 SA

72

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp nghiền với bi thủy tinh

- Thường dùng cho tế bào nấm men
- Cho 0.1 – 3 g tế bào vào các ống polysterene.
- Thêm vào 1 thể tích buffer phù hợp.
- Thêm vào 1- 3 g bi thủy tinh lạnh/ 1 gam tế bào.
- Vortex 5 lần trong 1 phút.
- Li tâm ở 23 000 g trong 1 giờ ở 4 °C, thu dịch nổi.

29/09/2011 11:21 SA

73

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp phá vỡ tế bào bằng máy siêu âm

- Sóng siêu âm tạo rung động mạnh phá vách tế bào.
- Mô được cho vào 2 lần thể tích buffer.
- Tiến hành siêu âm ở mức cao nhất trong 2 phút.
- Li tâm 23 000 g trong 1 giờ ở 4 °C → thu dịch nổi.



29/09/2011 11:21 SA

74

Nguyễn Hữu Trí



Thu nhận enzyme – Phá vỡ tế bào

- 2. Phương pháp hóa học: dựa trên khả năng tạo áp suất thẩm thấu hoặc khả năng oxy hóa mạnh của chất hóa học → Không cần áp suất cao, ít chi phí nhưng thường bị lẫn hóa chất vào hỗn hợp.
- 3. Phương pháp sinh học (phương pháp enzyme)
- Phương pháp tự phân: tạo điều kiện enzyme tối ưu cho một số enzyme phân giải thành phần thành tế bào. Thủy phân cả những chất khác và enzyme
- Phương pháp sử dụng enzyme từ ngoài tế bào: sử dụng enzyme hệ cellulase xử lý thành tế bào nấm men và tế bào thực vật.
- Lưu ý: Huyền phù tế bào vi sinh vật phải được ly tâm, lọc để thu enzyme ngoại bào.

29/09/2011 11:21 SA

75

Nguyễn Hữu Trí



Thu nhận enzyme – Tách enzyme

- Phương pháp ly tâm: tách vật rắn ra khỏi dung dịch, thực hiện trong điều kiện nhiệt độ thấp, trong công nghiệp người ta thường dùng máy ly tâm liên tục
- Phương pháp lọc: tách phần rắn ra khỏi dung dịch.
- Lọc ép: dung dịch cần lọc có khối lượng nhỏ
- Lọc chân không: sử dụng nhiều trong sản xuất và nghiên cứu
- Lọc theo dòng chảy cắt ngang: nguyên liệu chảy song song vật liệu lọc.
- Lọc thông thường

29/09/2011 11:21 SA

76

Nguyễn Hữu Trí



Thu nhận enzyme - Phương pháp cô đặc

- Phương pháp nhiệt
- Phương pháp kết tủa
- Phương pháp thẩm tích (dialysis)
- Phương pháp siêu lọc (ultrafiltration)

29/09/2011 11:21 SA

77

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp nhiệt

- Làm bốc hơi nước, cô đặc dung dịch enzyme, giúp tăng hoạt tính enzyme.
- Trong công nghiệp:
 - Bốc hơi lớp mỏng
 - Bốc hơi ly tâm lớp mỏng
 - Bốc hơi ống dài

29/09/2011 11:21 SA

78

Nguyễn Hữu Trí





Phương pháp kết tủa

- **Kết tủa bằng muối (amoniun sulphate; NaCl) → thẩm tích**
- **Dung môi hữu cơ (ethanol; acetone)**
- **Dùng polymer**
- **Kết tủa ở điểm đẳng điện**

29/09/2011 11:21 SA

79

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp thẩm tích

- Thẩm tách dựa trên nguyên tắc sự khuếch tán các phân tử từ nơi có nồng độ cao sang thấp.
- Dung dịch enzyme được chứa trong màng bán thấm và ngâm trong beaker có chứa dung dịch buffer thích hợp.
- Màng bán thấm cho phép các phân tử có kích thước nhỏ hơn phân tử enzyme đi qua màng thông qua sự khuếch tán qua các lỗ nhỏ trên màng.
- Quá trình thẩm tách thực hiện ở 4° C kết hợp khuấy nhẹ.
- Thay dung dịch buffer sau 1 – 2 giờ.
- Sau khi thẩm tích, dùng pipetteman hút dung dịch ra khỏi túi thẩm tích.

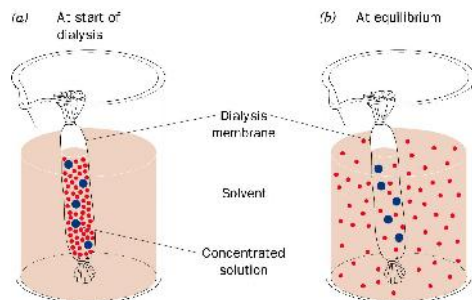
29/09/2011 11:21 SA

80

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp thẩm tích



29/09/2011 11:21 SA

81

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp siêu lọc

- Sử dụng màng lọc với kích thước lỗ lọc siêu nhỏ, áp suất cao (nitrogen pressure) được sử dụng 100 – 500 Kpa, không dùng không khí nhằm tránh sự oxy hóa enzyme.
- Áp dụng dòng chảy ngang cross – flow giúp tránh tắc nghẽn lỗ lọc.
- Các phân tử enzyme quan tâm được giữ lại trong màng trong khi các phân tử kích thước nhỏ đi qua các lỗ trên màng.
- Loại bỏ dung môi và phân tử kích thước nhỏ hơn kích thước enzyme.

29/09/2011 11:21 SA

82

Nguyễn Hữu Trí



Một số màng siêu lọc thông dụng

Common Ultrafiltration Devices

Supplier	Trade Name	Molecular Weight Cut-Off (kDa)	Maximum Sample Volume (ml)	Type of Membrane
Pressure device:	Amicon	10, 30	50, 200, 500	Polycethersulfone
	YM	1, 3, 10, 30, 100	50, 200, 500	Regenerated cellulose
	YC	500	50, 200, 500	Cellulose acetate
Centrifugal device:	Amicon	Microcon, Centricon	0.5, 2	Regenerated cellulose
	Gelman Science	Nanosep, Microsep, Macrosep, Jumbosep, Delta spin	0.5, 3.5, 15, 60	Modified polyethersulfone
	Nalgen	4, 10, 30, 100	0.5, 4, 15	Polycethersulfone
	Schleicher & Schuell	Centrex UT	0.5, 2	Regenerated cellulose



Tinh sạch enzyme

- Phương pháp kết tinh: dùng dung dịch amoniun sulfate, khó thực hiện để có enzyme có độ tinh sạch cao.
- Phương pháp sắc ký
- Phương pháp điện di: chưa áp dụng trên qui mô công nghiệp

29/09/2011 11:21 SA

84

Nguyễn Hữu Trí



Hình thành công thức chế phẩm enzyme

- Công việc mang tính bảo mật, thông tin công thức chế phẩm được giữ kín bởi nhà sản xuất.
- Bí mật có thể được tiết lộ kèm theo nhiều điều kiện ràng buộc trên hợp đồng.
- Là bước chính trong qui trình sản xuất enzyme.
- Công thức chế phẩm bao gồm thành phần trong enzyme thành phẩm giúp bảo quản, duy trì hoạt tính enzyme, những chỉ dẫn và những qui định chặt chẽ về việc sử dụng chúng.
- Qui định trên tùy thuộc vào mục đích sử dụng của enzyme.

29/09/2011 11:21 SA 85 Nguyễn Hữu Trí

Vi sinh vật	Ứng dụng
<i>Aspergillus oryzae</i>	Amylases
<i>Aspergillus niger</i>	Glucamylase
<i>Trichoderma reesii</i>	Cellulase
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertase
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactase
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Lipase
<i>Aspergillus species</i>	Pectinases và proteases
<i>Bacillus species</i>	Proteases
<i>Mucor pusillus</i>	Rennet vi sinh
<i>Mucor meihei</i>	Rennet vi sinh

Các enzyme và quá trình chế biến thực phẩm

Các enzyme không thể thiếu được trong kỹ thuật chế biến thực phẩm hiện đại.

Các enzyme là một phần cần thiết của hầu hết quá trình lên men thức ăn và thức uống, và trong khi hầu hết các enzyme sẽ có nguồn gốc từ các vi sinh vật thì càng có nhiều các quá trình đang được cải thiện bởi sự thêm vào các enzyme ngoại sinh

Industry	Enzymes	Export Value (million US\$)
Brewing	α -amylase, β -amylase, protease, pappain, amyloglucosidase, xylanase	30
Dairy	Animal/microbial chymosins, lactase, lipase, lysozyme	20
Baking	α -amylase, xylanase, protease, phospholipase A and D, lipoygenase	20
Fruit and vegetable processing	Pectinase, polygalacturonase, pectin lyase, hemicellulases	10
Starch and sugar	α -amylase, β -amylase, glucamylase, xylanase, pullulanase, isomerase, oligoamylase	120

29/09/2011 11:21 SA 88 Nguyễn Hữu Trí

Ngày càng có nhiều sự sản xuất enzyme thực phẩm sử dụng công nghệ sinh học tái tổ hợp DNA- rDNA

Việc sử dụng được chấp nhận của các enzyme bởi công nghệ rDNA thì dựa vào các điều kiện sau:

- Enzyme được tạo ra bởi công nghệ sinh học rDNA thì giống với những enzyme trong tự nhiên
- Sự chuẩn bị enzyme không bị nhiễm bất kỳ các chất độc nào mà có thể được đưa vào trong suốt quá trình chế biến hay tinh sạch (Ví dụ các nội độc tố từ *Escherichia coli*)
- Các vi sinh vật sống sót bắt nguồn từ công nghệ rDNA không hiện diện ở bước chuẩn bị cuối cùng

Chymosin-men đông tụ sữa là ví dụ đầu tiên cho công nghệ mới này và bây giờ nó được sử dụng vượt quá 80% thị trường ở Mỹ và Canada.

29/09/2011 11:21 SA 88 Nguyễn Hữu Trí

Sử dụng công nghệ rDNA → Sự cải thiện được tăng cường rõ ràng ở giá trị, sự tinh sạch và giá cả của enzyme → sẽ đem lại lợi ích và cải thiện chất lượng thực phẩm cho người tiêu dùng

Enzyme	Application	Source/producing organisms	Status
Chymosin	Cheddar cheese manufacture	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fabryella zimmermannii</i>	Commercial, ~85% of market
Lactase	Ice cream hyperlactation	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Commercial
α -Amylase	High-fructose corn syrup (HFCS)	<i>Aspergillus niger</i>	Commercial
Proteolysin (PL)	Cheddar cheese	<i>Aspergillus niger</i>	Commercial
Aspartic protease	Beer aging and flavoring	<i>Aspergillus niger</i>	Commercial, 10% approval pending
Chitinase	Anti-staling in bread	<i>Aspergillus niger</i>	Commercial
Cellulase	Food processing (texturizing, thickening, and clarification)	<i>Aspergillus niger</i>	In review
Protease	Food processing (texturizing, thickening, and clarification)	<i>Aspergillus niger</i>	Approved
Glucose oxidase	Meat tenderization and poultry processing	<i>Aspergillus niger</i>	Under development
Chitinase	Chitinase for flour and bread	<i>Aspergillus niger</i>	Under development

29/09/2011 11:21 SA 89 Nguyễn Hữu Trí

Cổ định enzyme

29/09/2011 11:21 SA 90 Nguyễn Hữu Trí



Enzyme tự do

- Nhược điểm:
- Lẫn vào sản phẩm
- Hoạt tính giảm dần sau mỗi phản ứng xúc tác
- Không bền nhiệt, acid, kiềm, dung môi hữu cơ.

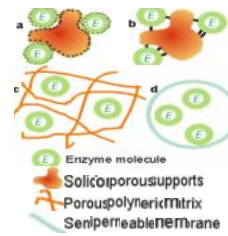
29/09/2011 11:21 SA

91

Nguyễn Hữu Trí



Enzyme cố định



Enzyme hòa tan được gắn vào chất mang.

29/09/2011 11:21 SA

92

Nguyễn Hữu Trí



Lợi ích của việc sử dụng enzyme cố định

- Giảm giá thành do enzyme được sử dụng lặp đi lặp lại, chế phẩm bền hơn trong các điều kiện pH, t, áp suất thẩm thấu tối ưu, bền nhiệt,... có thể hoạt động trong điều kiện nghiêm ngặt hơn.
- Enzyme cố định thường ổn định hơn so với dạng hòa tan của nó và có thể tái sử dụng ở dạng tinh khiết, bán tinh khiết hoặc dạng toàn tế bào.
 - Vd: glucose isomerase cố định có thể được sử dụng liên tục hơn 1000 giờ trong khoảng nhiệt độ 60 đến 65°C.
- Sản phẩm phản ứng không bị lẫn lộn với enzyme
- Dễ dàng tổ chức sản xuất các sản phẩm lên men bằng enzyme ngoại bào

29/09/2011 11:21 SA

93

Nguyễn Hữu Trí



Thuận lợi của xúc tác sinh học cố định

1. Cho phép sử dụng lại của các enzyme thành phần.
2. Lý tưởng cho tiến hành liên tục.
3. Sản phẩm không chứa enzyme.
4. Cho phép sự kiểm soát chính xác hơn của các quá trình xúc tác.
5. Cải thiện sự ổn định của enzyme.
6. Cho phép phát triển của hệ thống phản ứng đa enzyme.
7. Có thể xem xét đề nghị khả năng ứng dụng trong công nghiệp và y học.
8. Giảm các vấn đề thất thoát

29/09/2011 11:21 SA

94

Nguyễn Hữu Trí



Đặc điểm enzyme cố định

- Hoạt tính yếu hơn hoạt tính enzyme hòa tan cùng loại.
- Tuân theo định luật Michaelis – Menten:
 - Có sự cạnh tranh cơ chất với enzyme và chất mang.
 - Cản trở sự khuếch tán cơ chất và sản phẩm phản ứng → giảm tốc độ phản ứng
- Có tính bền nhiệt cao hơn enzyme hòa tan.
- pH tối ưu dịch chuyển sang kiềm hoặc acid so với pH tối ưu của enzyme hòa tan cùng loại.
- Có thể bảo quản tốt hơn
- Tái sử dụng nhiều lần

29/09/2011 11:21 SA

95

Nguyễn Hữu Trí



Các yếu tố ảnh hưởng hoạt tính enzyme không hòa tan

- Phụ thuộc vào bản chất và tính chất hóa học enzyme không hòa tan, tùy chất mang là polyanion; polycation, enzyme sẽ bị ảnh hưởng khác nhau.
- → bổ sung dung dịch có lực ion cao hoặc dung dịch đậm nồng độ cao.
- Phụ thuộc vào sự khuếch tán cơ chất, sản phẩm và các phân tử khác: tốc độ khuếch tán trên phụ thuộc vào các yếu tố kích thước lỗ gel, trong lượng phân tử cơ chất, chênh lệch nồng độ giữa môi trường vi mô xung quanh enzyme và enzyme tự do. Giới hạn khuếch tán: rào khuếch tán bên ngoài và bên trong
- Điện tích chất mang ảnh hưởng pH tối ưu enzyme

29/09/2011 11:21 SA

96

Nguyễn Hữu Trí





Các phương pháp cố định enzyme

- Chọn chất mang phù hợp để cố định enzyme
- Hoạt hóa chất mang
- Các phương pháp cố định enzyme

29/09/2011 11:21 SA

97

Nguyễn Hữu Trí



Chất mang dùng cố định enzyme

- Kinh tế
- Tính chất cơ lý bền vững, ổn định
- Có tính bền về mặt hóa học, không bị tan trong môi trường phản ứng
- Có tính kháng khuẩn cao
- Có độ trương tốt, diện tích bề mặt tiếp xúc lớn.
- Cấu trúc lỗ xốp, siêu lỗ, dạng hạt, màng hoặc dạng phim mỏng.

29/09/2011 11:21 SA

98

Nguyễn Hữu Trí



Các loại chất mang trong cố định enzyme

- Chất mang hữu cơ: Polymer tổng hợp và polymer tự nhiên
- Chất mang vô cơ: sợi bông thủy tinh, silicium oxide, Aluminium oxide, mangesium oxide

29/09/2011 11:21 SA

99

Nguyễn Hữu Trí



Polymer tự nhiên

- Chất mang polysaccharide: cellulose, agarose, dextran, sephadex, tinh bột, chitin, chitosan...
- Chất mang có bản chất protein: gelatin, keratin, albumin

29/09/2011 11:21 SA

100

Nguyễn Hữu Trí



Polymer tổng hợp

- Polyacrylamide; polyester, polyacrylic; polyvinylalcohol
- Ưu điểm: bền, tính chất cơ lý tốt, hoàn toàn trơ trước sự tấn công của vi khuẩn, độ trương tốt, kích thước siêu lỗ có thể điều chỉnh được
- Nhược điểm: Giá thành cao, không tương thích sinh học, gây ô nhiễm môi trường.

29/09/2011 11:21 SA

101

Nguyễn Hữu Trí



Chất mang vô cơ

- Là những dạng oxide có cấu trúc lỗ và khả năng hấp thu tốt
- Nhược điểm: giá thành cao, tan trong dung dịch kiềm pH > 7.5 → cố định những enzyme đặc biệt

29/09/2011 11:21 SA

102

Nguyễn Hữu Trí





Phương pháp hoạt hóa chất mang

- Hoạt hóa bằng cyanogen halogenur
- Hoạt hóa bằng ethyl chloroformate
- Hoạt hóa bằng phương pháp azide
- Hoạt hóa bằng glutaraldehyde
- Hoạt hóa bằng phương pháp diazo
- Hoạt hóa bằng carbodiimide
- Hoạt hóa bằng 3 – aminopropyltriethoxysilane

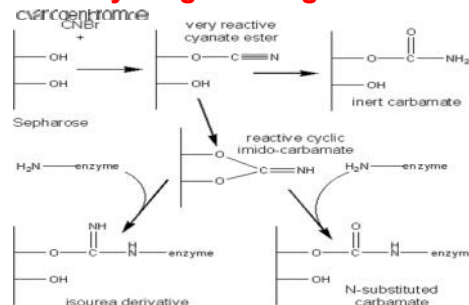
29/09/2011 11:21 SA

103

Nguyễn Hữu Trí



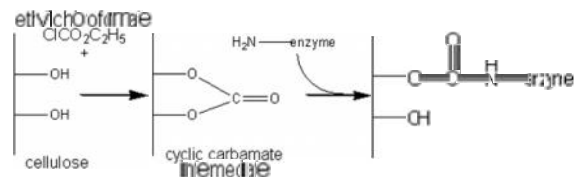
Phương pháp hoạt hóa bằng cyanogen halogenur



- Tạo sản phẩm trung gian rất độc



Phương pháp hoạt hóa enzyme



- Quy trình vẫn tạo ra sản phẩm trung gian, nhưng không có độc tính

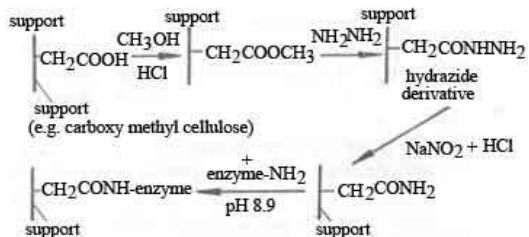
29/09/2011 11:21 SA

105

Nguyễn Hữu Trí



Hoạt hóa bằng phương pháp azide



- Sử dụng phương pháp azide cho các chất có nhóm chức -COOH của CM – cellulose polyacrylamide và nylon

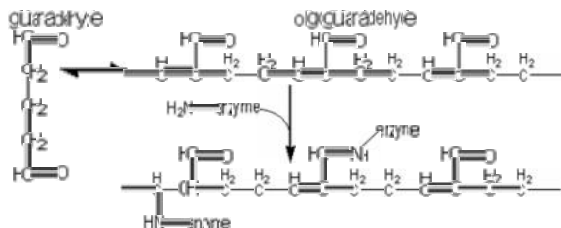
29/09/2011 11:21 SA

106

Nguyễn Hữu Trí



Hoạt hóa bằng glutaraldehyde



- Dùng cho các chất mang nhóm -NH₂. Glutaraldehyde có 2 nhóm aldehyde hoạt hóa.

29/09/2011 11:21 SA

107

Nguyễn Hữu Trí



Hoạt hóa bằng phương pháp diazo

- Áp dụng cho các chất mang chứa nhóm amine.

29/09/2011 11:21 SA

108

Nguyễn Hữu Trí



Hoạt hóa bằng carbodiimide

• Hoạt hóa các chất mang nhóm carboxyl

29/09/2011 11:21 SA 109 Nguyễn Hữu Trí

Hoạt hóa bằng 3-Aminopropyltriethoxysilane

Hoạt hóa vật liệu trở như thủy tinh

29/09/2011 11:21 SA 110 Nguyễn Hữu Trí

Các phương pháp cố định enzyme

29/09/2011 11:21 SA 111 Nguyễn Hữu Trí

Phương pháp hóa học – carrier bound

• Phương pháp hóa học trong cố định enzyme là phương pháp tạo liên kết enzyme với chất mang. Gồm 2 kiểu:

- 1. Covalent immobilization (Cố định enzyme với chất mang bằng liên kết cộng hóa trị)
- 2. Non-covalent immobilization (Cố định enzyme với chất mang bằng liên kết không cộng hóa trị – phương pháp hấp phụ):

29/09/2011 11:21 SA 112 Nguyễn Hữu Trí

Covalent immobilization

- Liên kết cộng hóa trị giữa nhóm chức năng (functional group) của chất mang đã hoạt hóa và nhóm chức năng trên acid amin của enzyme: -OH; -SH; -NH₂; -COOH
- Khó thu hồi lại chất mang
- Hiệu suất cố định enzyme thấp
- Động học enzyme thường bị thay đổi
- Tính linh động và độ ổn định cao.

29/09/2011 11:21 SA 113 Nguyễn Hữu Trí

Covalent immobilization Multi point covalent attachment

- Enzyme được cố định vào chất mang thông qua sự liên kết của nhiều cấu tử acid amin lên chất mang.
- Chất nền: thủy tinh xốp, polyacrylamide, cellulose, hạt từ tính...
- VD: glyoxyl – agarose: enzyme gắn vào chất mang thông qua liên kết của vùng giàu lysine.

Scheme for enzyme immobilization to glyoxyl-agarose

29/09/2011 11:21 SA 114 Nguyễn Hữu Trí

Non - covalent

- Non – covalent (Phương pháp hấp phụ -Không cộng hóa trị): Phương pháp liên kết ion (ionic exchange; van der Waals; tương tác kỵ nước (strong hydrophobic interaction))
- VD: Ionic exchange: liên kết giữa chất mang truyền thông và enzyme để bị phá vỡ khi thay đổi nồng độ muối và pH.
- Porous glass, agarose gel, hạt từ (magnetic particle) được phủ lớp ionic polymers: polyethylenimine (PEI); dextran sulfate chứa nhiều nhóm có khả năng tạo liên kết ion (ionic group) và có cấu trúc linh động dễ dàng tương thích enzyme.

29/09/2011 11:21 SA 115 Nguyễn Hữu Trí

Covalent

- Covalent (cộng hóa trị): liên kết cộng hóa trị giữa nhóm chức năng (functional group) của chất mang và nhóm chức năng trên acid amin của enzyme: -OH; -SH; -NH₂; -COOH
- Multi – point covalent attachment: đa vị trí có khả năng tạo liên kết cộng hóa trị giữa enzyme và chất mang.
- Support: Porous glass, agarose gel, hạt từ (magnetic particle).
- Spacer arm: ngắn

29/09/2011 11:21 SA 116 Nguyễn Hữu Trí

Liên kết cộng hóa trị

- Các chất mang thường sử dụng: polypeptide, polysaccharide, agarose...
- Các liên kết đồng hóa trị giữa chất mang và E có thể phân loại như sau:
 - Diazo hóa: chất mang- N=N- E.
 - Tạo cầu amit: chất mang-CO-NH- E.
 - Alkyl và Aryl hóa: chất mang-CH₂-NH₂-E.
 - Tạo bazơ Schiff: chất mang-CH=N-E.
 - Trao đổi tiol disulfua: chất mang-S-S- E.
- Ưu điểm:
 - Bền, không bị ly giải theo sản phẩm
 - Có nhiều lựa chọn chất mang phù hợp
- Khuyết điểm
 - Đắt tiền và quy trình phức tạp
 - Có thể làm thay đổi vị trí hoạt động của enzyme

29/09/2011 11:21 SA 117 Nguyễn Hữu Trí

Covalent

Fig. 4.2 Scheme for enzyme immobilization on glyoxy-agarose

29/09/2011 11:21 SA 118 Nguyễn Hữu Trí

Carrier free

- Enzyme tự động cố định trong khối protein của nó mà không có sự hỗ trợ của chất mang với sự hiện diện của bifunctional reagents như glutaraldehyde
- Cross - linked enzyme (CLEs)
- Cross - linked enzyme crystal (CLECs)
- Cross - linked enzyme aggregate (CLEAs)

29/09/2011 11:21 SA 119 Nguyễn Hữu Trí

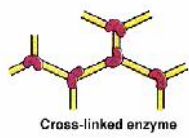
Carrier free

- Cross - linked enzyme (CLEs): Được tạo ra từ sự liên kết chéo của các enzyme hòa tan
- Cross - linked enzyme crystal (CLECs): được tạo ra từ sự liên kết chéo của các tinh thể enzyme → tính ổn định cao trong các điều kiện khắc nghiệt
- Cross - linked enzyme aggregate (CLEAs): được tạo ra từ sự liên kết chéo của các protein ở trạng thái tủa.
- Tủa (muối, dung môi...) → khuấy mạnh → tạo liên kết dưới sự hiện diện của glutaraldehyde.

29/09/2011 11:21 SA 120 Nguyễn Hữu Trí

Liên kết chéo

Dựa trên liên kết cộng hóa trị giữa các enzyme tạo thành khối không gian ba chiều.



Cross-linked enzyme

- **Ưu điểm:**
 - Liên kết enzyme chặt
 - Kết hợp với các phương pháp khác tạo ra liên kết bền vững
- **Khuyết điểm:**
 - Có thể làm thay đổi đáng kể vị trí hoạt động
 - Mất hoạt tính enzyme trong quá trình cố định

29/09/2011 11:21 SA
121
Nguyễn Hữu Trí

Carrier free

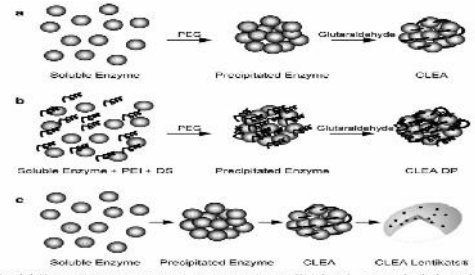


Fig. 4.4 Schematic representation of the preparation of CLEA (a) as polyethylene glycol (PEG) as precipitating agent and glutaraldehyde as cross-linking agent; (b) as polyethylenimine (PEI) as precipitating agent and glutaraldehyde as cross-linking agent; (c) using polyethylene glycol (PEG) as precipitating agent and glutaraldehyde as cross-linking agent and encapsulation into poly(vinyl alcohol), hydroxyethyl acrylate and poly(ethylene glycol).

29/09/2011 11:21 SA
122
Nguyễn Hữu Trí

Phương pháp containment

- Phương pháp nhốt enzyme (entrapment)
- Phương pháp giữ trong màng: microcapsule; ultrafiltration

29/09/2011 11:21 SA
123
Nguyễn Hữu Trí


Phương pháp nhốt enzyme (entrapment)

- Enzyme được giữ lại trong một khoảng nhỏ được tạo ra trong quá trình polymer hóa. Enzyme hòa tan vào dung dịch monomer trước khi được polymer hóa bằng các tác nhân vật lý, hóa học.
- Chất nền (matrix): Alginate Polyacrylamide; polyvinyl alcohol...

29/09/2011 11:21 SA
124
Nguyễn Hữu Trí

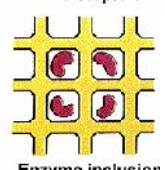
Phương pháp bẫy (nhốt)

1.1 Microencapsulation (gói enzyme trong các bao cực nhỏ). Màng polymer thấm thấu dày 200Å^o(cellulose, polysaccharit, phi tinh bột) gói enzyme bên trong. Màng này cho cơ chất và sản phẩm enzyme đi qua nhưng không cho các đại phân tử đi qua



Microcapsule

1.2 Bẫy trong gel: Việc bẫy enzyme trong thể nền của gel đạt được bằng cách thực hiện phản ứng polymer hóa, tủa / làm đông với sự hiện diện của enzyme.



Enzyme inclusion

29/09/2011 11:21 SA
125
Nguyễn Hữu Trí

Phương pháp giữ trong màng

- Enzyme microcapsule: quá trình polymer hóa được tiến hành trên bề mặt của giọt enzyme phân tán trong dung môi với sự hỗ trợ của chất hoạt tính bề mặt (surfactant)
- vỏ bọc bên ngoài.
- Màng siêu lọc (Ultrafiltration membrane): enzyme được nhốt trong màng siêu lọc, cho phép cơ chất và sản phẩm ra vào màng → enzyme hoạt động cần coenzyme.
- Nhược điểm: dễ bị tắc lỗ màng do bọt khí; sự tụ tập các chất không mong muốn.

29/09/2011 11:21 SA
126
Nguyễn Hữu Trí

Hấp phụ enzyme lên chất không tan

Một số chất mang được sử dụng

- + Hữu cơ: than hoạt tính, tinh bột, cellulose agarose...
- + Vô cơ: Silic, thủy tinh xốp, oxyt của kim loại...
- + Polymer tổng hợp: polyamit, nilon, polyacrylamide...
- + Chất trao đổi ion: amberit, diethyl-amino-etyl sephadex (DEAE – sephadex), DEAE – cellulose, carboxyl methyl cellulose (CM cellulose).



Carrier-bound enzyme

29/09/2011 11:21 SA

Nguyễn Hữu Trí

Hấp phụ enzyme lên chất không tan

- **Ưu điểm:**
 - Không thay đổi cấu trúc enzyme hay trung tâm tâm hoạt động.
 - Không hoặc ít đòi hỏi hóa chất đi kèm
 - Đơn giản, rẻ tiền
- **Khuyết điểm:**
 - Dễ ly giải khi thay đổi một số đặc điểm như pH, t...
 - Không đặc hiệu

29/09/2011 11:21 SA

128

Nguyễn Hữu Trí

Ứng dụng trong sản xuất công nghiệp

- Sản xuất fructose nhờ enzyme glucose isomerase
- Ứng dụng của enzyme raffinase cố định
- Ứng dụng của enzyme invertase cố định
- Sản xuất L – amino acid nhờ enzyme aminoacylase cố định
- Ứng dụng của lactase cố định
- Sản xuất kháng sinh

29/09/2011 11:21 SA

129

Nguyễn Hữu Trí

Sản xuất fructose nhờ enzyme glucose isomerase

- Glucose isomerase tạo ra từ *Arthrobacter* và *Streptomyces sp.*, nhạy với tác nhân kim loại → cố định enzyme trên collagen, bông...
- D- glucose → D- fructose

29/09/2011 11:21 SA

130

Nguyễn Hữu Trí

Ứng dụng của enzyme raffinase cố định

- Sản xuất: Nuôi nấm mốc *Mortierella vinacea var. raffinoseutilizer* trong các hạt → sấy khô → sử dụng như enzyme cố định
- Ứng dụng: Raffinase (α -galactosidase) cố định giúp loại bỏ raffinose và stachyose từ sữa đậu nành, tránh nguy cơ bị đầy hơi khi dùng thức uống này.

29/09/2011 11:21 SA

131

Nguyễn Hữu Trí

Ứng dụng của enzyme invertase cố định

- Enzyme invertase nấm men được cố định trong than (tên thương hiệu Brimac TM) → sản xuất siro nghịch đảo chất lượng tương đương, tránh sự đậm màu, giảm nồng độ muối và tro trong sản phẩm, hiệu suất chuyển đổi cao.
- Thời gian phản ứng giảm đáng kể: Enzyme invertase tự do (24 giờ), enzyme invertase cố định (15 phút)

29/09/2011 11:21 SA

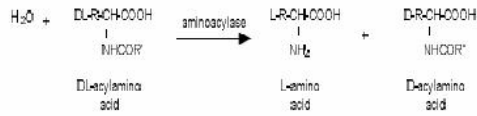
132

Nguyễn Hữu Trí



Sản xuất L – amino acid nhờ enzyme aminoacylase cố định

- Sản xuất theo phương pháp hóa học chỉ thu được amino acid ở dạng đồng phân D – không có giá trị dinh dưỡng.
- L – amino acid tách khỏi hỗn hợp dựa vào sự khác biệt về độ hòa tan. DL – acylamino acid quay trở lại là phản ứng.



29/09/2011 11:21 SA

133

Nguyễn Hữu Trí



Ứng dụng của lactase cố định

- Giá thành cao → enzyme lactase từ tế bào nấm men được nhà khoa học Ý cố định với các sợi cellulose triacetate .
- Lactase dễ bị ức chế bởi sản phẩm tạo thành, chất béo, protein như tương khi dùng xử lý huyết thanh sữa → nhiễm vi sinh vật.

29/09/2011 11:21 SA

134

Nguyễn Hữu Trí



Sản xuất kháng sinh

- Penicillin amidase từ *E. coli* cố định trên sephadex G200 hoạt hóa bởi cyanogen bromide → thủy phân benzylpenicillin và phenoxymethylpenicillin sinh ra từ quá trình lên men giải phóng ampicillin.

29/09/2011 11:21 SA

135

Nguyễn Hữu Trí



Ứng dụng trong y học và phân tích

- Một số bệnh di truyền về rối loạn chuyển hóa ở người do thiếu một loại enzyme đặc biệt → thay thế bằng cách sử dụng enzyme cố định trong các vi hạt, sợi hay gel nhằm tránh gây ra đáp ứng miễn nhiễm cơ thể.
- VD: Tạo thận nhân tạo, enzyme urease cố định trong hạt resin hấp phụ hoặc than chì tạo thành các vi nang là nơi hấp phụ sản phẩm quá trình phân hủy urea ở thận

29/09/2011 11:21 SA

136

Nguyễn Hữu Trí

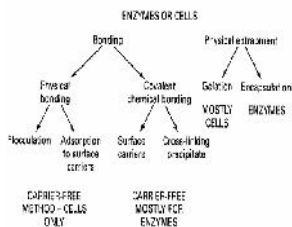


Fig. 24 Polyphase of immobilization.

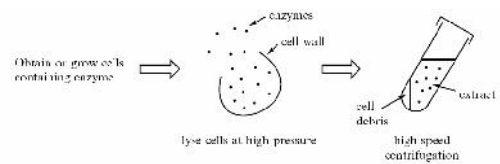
29/09/2011 11:21 SA

137

Nguyễn Hữu Trí



Kỹ thuật tách chiết enzyme



29/09/2011 11:21 SA

138

Nguyễn Hữu Trí





Phá vỡ mô và tế bào (Disruption of tissues and cells)

Lựa chọn mô

- Dựa vào giá thành, tính sẵn có và sự phong phú của enzyme
- Recombinant DNA technology – xây dựng host cell (expression system)
- Tránh hoặc hạn chế sử dụng các mô giàu proteinase. Vd: gan, lách, thận... Ở vi sinh vật tạo mutant strain (dòng đột biến) thiếu một số proteinase (*E. Coli*, *Bacillus subtilis*)

29/09/2011 11:21 SA

139

Nguyễn Hữu Trí



Phá vỡ mô và tế bào (Disruption of tissues and cells)

- Vi sinh vật thường được chọn làm host organism
- Ưu điểm: tốc độ sinh trưởng nhanh
- Nhược điểm: thiếu cơ chế cải biên sau dịch mã và enzyme thường ở dạng inclusion body.
- Cải biên gene biểu hiện giúp sản phẩm enzyme tiết ra môi trường ngoài tế bào.

29/09/2011 11:21 SA

140

Nguyễn Hữu Trí



Phá vỡ mô – tách tế bào (disruption of tissue and separation of cells)

- Nhiều loại tế bào có trong cùng một mô.
- Huyền phù tế bào được chuẩn bị bằng phương pháp cơ học hoặc phương pháp enzyme.
- Phương pháp cơ học: ảnh hưởng tới sự nguyên vẹn tế bào.
- Phương pháp enzyme: collagenase từ *Clostridium histolyticum*, trypsin, esterase... → tách dựa vào điện tích, antigenicity, kích thước, tỷ trọng.

29/09/2011 11:21 SA

141

Nguyễn Hữu Trí



Phá vỡ tế bào động vật

- Mô được cắt nhỏ (loại bỏ mỡ và mô liên kết)
- Mô mềm đồng hóa trong thiết bị đồng hóa
- Mô cứng cần được xay nhỏ trong máy xay trước khi cho vào thiết bị đồng hóa.
- Ly tâm.

29/09/2011 11:21 SA

142

Nguyễn Hữu Trí



Phá vỡ tế bào thực vật

- Thu nhận enzyme từ tế bào thực vật tương đối khó khăn do sự hiện diện vách tế bào, không bào (vacuole) và hợp chất phenolic.
- Việc phá vỡ không bào → giải phóng proteinases, pH dịch chiết thấp.
- Khi có oxygen, phenol oxidases xúc tác chuyển hợp chất phenolic thành dạng polymeric pigment có thể bất hoạt (inactivate) enzyme trong dịch chiết
- Bổ sung chất khử 2 – mercaptoethanol
- Bổ sung polyvinylpyrrolidone giúp hấp thu hợp chất phenolic.

29/09/2011 11:21 SA

143

Nguyễn Hữu Trí



Phá vỡ tế bào nấm men

- Vách tế bào
- Nhiều proteinase
- Tạo đột biến gây ra sự thiếu hụt một vài proteinase
- Ngăn chặn sự tạo proteinase bằng cách nuôi trên môi trường không chứa cơ chất protein.
- Phương pháp 1: ủ bánh men trong toluene (6% (v/w)) và 2 – mercaptoethanol (0.2 % (v/w)) ở 370 C trong 1 h → tách thành phần vách tế bào → EDTA (15 mM) pH 7.0 chứa 5 mM 2 – mercaptoethanol, ủ qua đêm → phá vỡ vách tế bào → ly tâm 15 000 rpm trong 30 phút

29/09/2011 11:21 SA

144

Nguyễn Hữu Trí





Phá vỡ tế bào nấm men

- Phương pháp 2: lắc với hạt thủy tinh (đường kính 1 mm) → 1ml dịch được ly tâm 2500 rpm ở 10° C.
- Nấm men *Pichia pastoris* được dùng như tế bào chủ, recombinant protein được tiết vào môi trường nuôi cấy.

29/09/2011 11:21 SA

145

Nguyễn Hữu Trí



Phá vỡ tế bào vi khuẩn

- Vách tế bào
- Phương pháp cơ học thường ảnh hưởng đến các thành phần của tế bào.
- → Vi khuẩn gram dương (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*) : dùng enzyme lysozyme phá hủy vách tế bào, ủ với lysozyme từ trứng gà (0.2 mg/ml) ở 37° C trong 15 phút.
- → Vi khuẩn gram âm (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*) : rửa tế bào với detergent (0.1% (v/v) N-lauroyl-sarcosine) → xử lý với sucrose (0.7 M), Tris (0.2 M), EDTA (0.04 M)

29/09/2011 11:21 SA

146

Nguyễn Hữu Trí



Phá vỡ tế bào vi khuẩn

- Dna trong dịch chiết có độ nhớt cao gây khó khăn trong việc tinh sạch enzyme
- Hoặc xử lý với deoxyribonuclease 1 (10 µg/ml)
- Hoặc xử lý với protamine (protein giàu arginine trong cấu tạo)
- Hoặc xử lý polymer tích điện dương (polyethyleneimine)

29/09/2011 11:21 SA

147

Nguyễn Hữu Trí



Enzyme gắn trên màng tế bào

- Màng tế bào cần được xử lý với non – ionic detergent như Triton hay Tween. Các detergent này ít gây ảnh hưởng lên cấu trúc protein nói chung và enzyme nói riêng.
- Quy luật sử dụng detergent: 2 mg detergent dùng cho 1 mg màng tế bào.
- CD – circular dichroism được dùng để kiểm tra cấu trúc bậc 2 của enzyme tách chiết.

29/09/2011 11:21 SA

148

Nguyễn Hữu Trí



Ứng dụng của enzyme



29/09/2011 11:21 SA

149

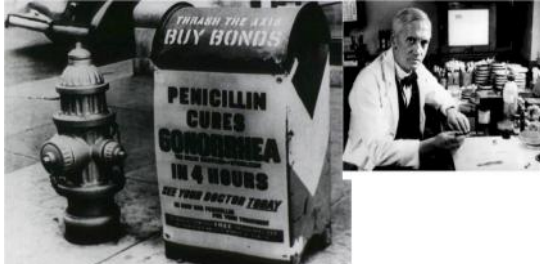
Nguyễn Hữu Trí



Các ứng dụng công nghiệp của enzymes			
Ứng dụng	Enzyme sử dụng	Sử dụng	Vấn đề
Chất tẩy rửa sinh học	- Đầu tiên là các protease, được sản xuất ở dạng ngoại bào từ vi khuẩn. - Amylase	- sử dụng cho các điều kiện trước khi ngâm và các ứng dụng lỏng trực tiếp. - chất tẩy rửa cho máy rửa chén để loại không cần tinh bột	- phân ứng dị ứng của công nhân chế biến, ngày nay đã vượt qua được bằng các công nghệ chế biến.
Công nghiệp bánh kẹo	- Alpha-amylase: làm bánh thường bị bắt hoạt ở 50°C, bị phá hủy trong quá trình nướng nướng. - Proteinase	- xúc tác cắt tinh bột từ bột thành đường, có thể được sử dụng bởi nấm men. Sử dụng trong sản xuất bánh mì trắng, bánh bao, bánh mì nhỏ. - sản xuất bánh quy để hạ thấp mức protein trong bột.	
Công nghiệp rượu bia	-enzyme được tạo ra từ lúa mạch suốt giai đoạn ngâm trong sản xuất bia. - các enzyme được sản xuất công nghiệp: amylases, glucanases, proteinase, beta glucanase, amyloglucosidase.	- phân hủy tinh bột và protein để tạo đường đơn, axit amin và peptide được sử dụng bởi nấm men để thúc đẩy tạo cồn. - ngày nay được sử dụng rộng rãi trong sản xuất rượu bia: cắt polysaccharide và protein trong làm malt; cải thiện các đặc tính lọc; bia thấp calo, loại vận động trong trở bia.	
Công nghiệp chế biến bơ sữa	- Rennin, từ dạ dày từ động vật nhai lại non (bò, cừu, dê con). - các enzyme được tạo từ vi sinh vật. - Lipase. - Lactase.	- sản xuất phô mai, sử dụng để phân cắt protein. Ngày nay tìm thấy sự gia tăng sử dụng trong công nghiệp bơ sữa. - kích thích làm chín phô mai mềm xanh (phô mai vân xanh, Roquefort) - hệ gly lactose thành glucose và galactose.	- các động vật già không thể được sử dụng vì khi gia tăng tuổi tác thì sản xuất rennin giảm và được thay thế bởi protease, pepsin, không thích hợp cho sản xuất phô mai. Những năm gần đây sự gia tăng to lớn tiêu thụ phô mai cũng với gia tăng sản xuất thì bộ phận tiêu hóa thiếu hụt rennin và gia tăng giá cả

Ứng dụng	Enzyme sử dụng	Sử dụng	Vấn đề
Công nghiệp tinh bột	- Amylase, amyloglucosidases và glucoamylases. - Glucose isomerase - các enzyme cố định.	- chuyển tinh bột thành glucose và các chất ngọt (siro) khác. - chuyển glucose thành fructose (các siro cao fructose bắt nguồn từ các chất liệu tinh bột đã kích thích tinh làm ngọt và thấp năng lượng). - sản xuất các siro cao fructose.	Được sử dụng rộng rãi ở Mỹ và Nhật nhưng ở Châu Âu giới hạn để bảo vệ nông dân trồng củ cải đường.
Công nghiệp dệt	Enzyme Amylase - Các enzyme vi khuẩn.	- ngày nay được sử dụng rộng rãi để loại tinh bột, được sử dụng như một chất dính hoặc hồ vải trên các sợi vải của bề mặt vải nhất định để ngăn chặn các hư hại trong dệt (theo cổ truyền, sự loại hồ dán sử dụng các hòa chất mạnh là phổ biến). - thông thường dành cho loại hồ vải bởi vì chúng có khả năng chịu nhiệt lên tới 100-110°C.	
Công nghiệp thuốc da	- Các enzyme tìm ở phần chó và bò cạp. - các enzyme Trypsin từ lò mổ và từ vi sinh vật.	- theo cổ truyền, được sử dụng để xử lý da thuộc để làm mềm lại bởi loại bỏ các thành phần protein nhất định. (quá trình gọi là ngâm mềm, ngâm mềm mạnh được đòi hỏi để làm cho miếng da mềm, mịn, ngâm mềm nhẹ cho dễ giầy). - hiện nay thay thế một lượng lớn các enzyme để cấp ở trên trong ngâm mềm, cũng được sử dụng cho loại lông từ da sống.	- việc chuẩn bị có mùi rất khó chịu.
Sử dụng trong y học và được học	- Trypsin - trypsin tuyến tụy.	- giải phẫu loại các mô hư, làm tan các cục máu nghẽn. - hỗ trợ kiểm soát phân cắt, xử lý sưng tấy... - nhiều enzyme được sử dụng trong hóa học làm sáng như các công cụ chuẩn đoán.	

Ứng dụng của enzyme



Công nghệ enzyme bắt đầu phát triển vào những năm 1950, khi thế chiến II cần lượng lớn penicilline.

29/09/2011 11:21 SA 152 Nguyễn Hữu Trí

Ứng dụng của enzyme

- Phần lớn enzyme có thể được sản xuất bởi vi sinh vật (nấm sợi, vi khuẩn và nấm men phần còn lại từ động vật và thực vật).
- Khi sử dụng tế bào vi vật trong lên men có thể xúc tác lại có một số nhược điểm:
 - Tiêu thụ cơ chất.
 - Hình thành các sản phẩm không mong muốn.
 - Thu nhận và tinh sạch sản phẩm có thể khó khăn.

➔ **Hướng khắc phục: dùng enzyme cố định.**

29/09/2011 11:21 SA 153 Nguyễn Hữu Trí

Ứng dụng của enzyme

- Phần lớn enzyme sử dụng trong công nghiệp là enzyme ngoại bào (protease, amylase và (mức độ ít hơn) cellulose, lipase...), thường không cần cofactor để hoạt động.
- Một số enzyme nội bào được sản xuất công nghiệp bao gồm glucose oxidase cho bảo quản thực phẩm, asparaginase cho trị liệu ung thư và penicillin acylase cho sự biến đổi kháng sinh

29/09/2011 11:21 SA 154 Nguyễn Hữu Trí

Ứng dụng của enzyme

- Nhờ công nghệ di truyền, có thể chuyển gene mong muốn từ sinh vật này sang sinh vật chủ thích hợp ➔ sản xuất các enzyme công nghiệp chất lượng và độ tinh sạch cao.
- Vi sinh vật tái tổ hợp ngày càng được sử dụng rộng rãi và là xu hướng chủ yếu trong tương lai.

29/09/2011 11:21 SA 155 Nguyễn Hữu Trí

Ứng dụng trong thực phẩm



29/09/2011 11:21 SA 156 Nguyễn Hữu Trí

Các enzyme được sử dụng ở quy mô công nghiệp trong công nghệ thực phẩm

Enzyme	Source	Action	Application
α -Amylase	<i>A. niger</i> <i>A. terreus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Hydrolysis of starch with α -glucosidic linkage	Starch processing
Mucoylase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus terreus</i>	Hydrolysis of starch manufacturing and starch additives. It is inactive at branch points, but more active in the linkage in amylopectin	Starch processing, breads and dairy products
Pullulanase	<i>Glomus fragrans</i>	Hydrolysis of starch with α -glucosidic linkage This enzyme is inactive in maltose formation	Production of high-maltose syrups
β -Glucanase	<i>A. niger</i> <i>A. niger</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Hydrolysis of starch with β -glucosidic linkage	Brewing
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>A. niger</i>	Hydrolysis of sucrose into glucose and fructose	Confectionery industry, food of infants
Lactase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>A. niger</i>	Hydrolysis of lactose into glucose and galactose	Food industry, production of ice cream, yogurt
Pectinase	<i>A. niger</i> <i>A. niger</i> <i>A. niger</i>	Degrades pectin in cellulose, hemicellulose, and other polysaccharides associated with the cell wall of plants	Clarification of fruit juices and wines
Neutral protease	<i>A. niger</i> <i>A. niger</i> <i>A. niger</i>	Hydrolysis of protein into peptides and amino acids	Food processing, meat tenderizing, cheese making
Bovine chymotrypsin	<i>Bos taurus</i>	Hydrolysis of protein into peptides and amino acids	Food processing, meat tenderizing, cheese making
Hemolysin	<i>A. niger</i> <i>A. niger</i>	Hydrolysis of protein into peptides and amino acids	Food processing, meat tenderizing, cheese making

29/09/2011 11:21 SA 157 Nguyễn Hữu Trí

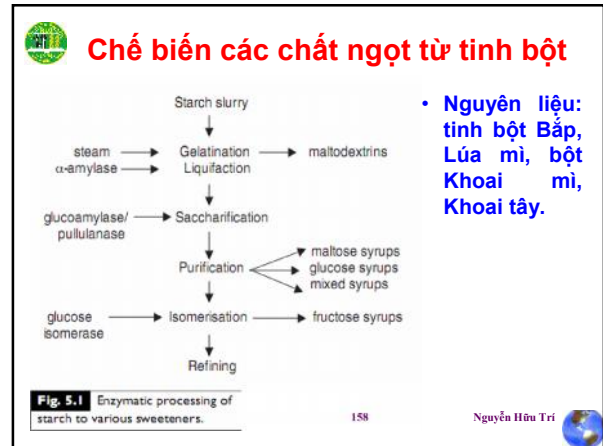


Table 5.4 Production of industrial enzymes by tonnage in the Western world

Nation	Tonnes	%
USA	6300	12
Japan	4240	8
Denmark	24910	47
France	1390	3
Germany (former West)	3180	6
Netherlands	10070	19
UK	1000	2
Switzerland	1060	2
Others	530	1
Total	53000	100

Giá cả: giá enzyme đã giảm đáng kể, mức chấp nhận được trong thập kỷ qua.

Gia tăng sử dụng enzyme tinh sạch cao và đặc hiệu cao.

→ gia tăng lợi nhuận từ mua bán enzyme rất nhiều.

29/09/2011 11:21 SA 159 Nguyễn Hữu Trí



Protease thực vật – Bromelin (E.C.3.4.4.24)

- Bromelin là nhóm protease chứa nhóm sulfhydryl, thu nhận từ thực vật thuộc họ Bromeliaceae.
- Bromelin chiếm 50% protein trong quả dứa.
- pH hoạt động: pH 6 – 8; Mw: 33 000 Da.
- Bromelin là một glycoprotein
- Thịt dứa có hoạt tính enzyme bromelin kể từ 3 tháng trước khi chín và hoạt độ cao nhất trong khoảng 20 ngày trước khi chín.

29/09/2011 11:21 SA 161 Nguyễn Hữu Trí





Bromelin – Quy trình thu nhận và tinh sạch bromelin

Quả/thân/chòì → xay nhuyễn/lọc → dịch lọc → ly tâm → dịch ly tâm → kết tủa → thu tủa (chế phẩm enzyme thô) → sấy khô → tinh sạch → sản phẩm enzyme tinh khiết.

29/09/2011 11:21 SA

163

Nguyễn Hữu Trí



Thu nhận bromelin

- Thu dịch bromelin thô
- Phương pháp tách bromelin
- Phương pháp kết tủa
- Phương pháp hấp phụ
- Phương pháp siêu lọc

29/09/2011 11:21 SA

164

Nguyễn Hữu Trí



Thu dịch thô bromelin

- Xay nhuyễn thân, quả dừa bằng máy xay
- Vắt kỹ
- Lọc → thu dịch lọc
- Ly tâm 6000 rpm trong 10 phút → thu dịch nổi

29/09/2011 11:21 SA

165

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp tách bromelin

- Phương pháp kết tủa protein: kết tủa phải được thực hiện trong điều kiện lạnh
- Sử dụng acetone: dịch ép được làm lạnh từ 0 – 4° C, acetone được giữ ở 20° C.
- Ethanol: dịch chiết và ethanol phải được giữ lạnh. Kết tủa thu được phải được rửa bằng acetone và làm khô nhanh.
- Amonium sulphate: amonium sulphate nồng độ bão hòa (70%) giúp kết tủa bromelin. Quá trình thực hiện ở nhiệt độ thấp.

29/09/2011 11:21 SA

166

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp tách bromelin

- Phương pháp hấp phụ: Kaolin khô được trộn dung dịch nước dừa sau ly tâm theo tỷ lệ 25 mg kaolin/1ml dịch → khuấy từ → ly tâm thu tủa bromelin – kaolin.
- Phương pháp siêu lọc: loại bỏ các chất có kích thước nhỏ hơn phân tử bromelin → giúp cô đặc bromelin
- Điều chỉnh nhiệt độ thích hợp nhằm tránh tắt nghẽn lỗ lọc.
- Điều chỉnh áp suất giúp tăng tốc độ dòng chảy giúp tăng hiệu suất lọc.

29/09/2011 11:21 SA

167

Nguyễn Hữu Trí



Phương pháp tinh sạch bromelin

- Tinh sạch bằng phương pháp thẩm tích
- Hòa 1 g bromelin thô trong 10 ml đệm sodium phosphate 0.03 M pH 7.2 → túi cellophane đựng trong cốc chứa sẵn 1 lít đệm sodium phosphate 0.03 M pH 7.2 → khuấy từ trong 6 giờ → thay dung dịch đệm ngoài túi mỗi 2 giờ.
- Điều chỉnh nhiệt độ phù hợp
- Tinh sạch bằng phương pháp lọc qua sephadex G – 50, G – 100.
- Tinh sạch bằng phương pháp sắc ký

29/09/2011 11:21 SA

168

Nguyễn Hữu Trí





Protease thực vật – Papain (E.C.3.4.4.10)

- Papain là một sulfhydryl protease tách được từ nhựa đu đủ xanh.
- Quả xanh 10 tuần tuổi chứa nhiều nhựa nhất. Trong nhựa, ngoài thành phần chính là papain (95%) còn chứa một số protein khác.
- Papain là endoprotease gồm 185 amino acid. Mw: 20. 900 Da.
- Papain có cấu trúc không gian dạng hình cầu, gồm 2 nhân kỵ nước.
- Vùng trung tâm hoạt động papain: Lys – Asp – Glu – Gly – Ser – Cys – Gly – Ser - Cys

29/09/2011 11:21 SA

169

Nguyễn Hữu Trí



Hoạt tính enzyme và cơ chế xúc tác

- Papain cần nhóm sulfhydryl tự do để thể hiện hoạt tính.
- Papain thủy phân protein thành các polypeptide và các amino acid.
- Papain có khả năng thủy phân sâu hơn.
- Papain có tính đặc hiệu rộng: thủy phân hầu hết liên kết peptide trừ liên kết với proline và với các glutamic có carboxyl tự do.
- Khả năng thủy phân tùy thuộc vào trạng thái cơ chất
- Papain còn có hoạt tính esterase, thiol esterase và transferase.

29/09/2011 11:21 SA

170

Nguyễn Hữu Trí



Protease động vật – pepsin (E.C.3.4.4.1)

- Pepsin là enzyme quan trọng có trong tuyến tiêu hóa động vật, thuộc nhóm enzyme thủy phân
- Cấu trúc: pepsin có dạng hình cầu, cấu trúc bậc 4 gồm bốn tiểu đơn vị.
- Một trong 3 liên kết S – S trong phân tử cần thiết cho trung tâm hoạt động.
- Papain gồm 329 amino acid pI : pH 1.0
- Trung tâm hoạt động pepsin gồm một hoặc 2 nhóm carboxyl của acid glutamic, một nhân thơm của tyrosine.
- Pepsin có tính acid mạnh. Mw: 34. 500 Da
- Tiền enzyme của pepsin là pepsinogen.

29/09/2011 11:21 SA

171

Nguyễn Hữu Trí



Hoạt động xúc tác của pepsin

- Protease chỉ có khả năng cắt 15% liên kết peptide trong protein → **đoạn peptide**
- Pepsin chỉ đặc hiệu cắt liên kết peptide giữa acid amine nhân thơm với amino acid khác.
- Pepsin còn có khả năng cắt các nối peptide giữa Leu –Val, Val – Cys, Glu – Asn, Leu – Glu ở mức độ thấp hơn.
- Pepsin phân cắt dễ dàng protein tan trong nước.
- Pepsin bị ức chế bởi cơ chất dạng epoxide

29/09/2011 11:21 SA

172

Nguyễn Hữu Trí



Protease động vật – trypsin (E.C.3.4.21.4)

- Trypsin có trong dịch tụy người và động vật.
- Trypsin là một protease kiềm tính hoạt động ở ruột.
- Tiền enzyme của trypsin là trypsinogen: hoạt hóa nhờ enzyme đường ruột enterokinase.
- Mw: 22.680 – 23.400 Da gồm 249 amino acid.
- pH tối ưu: pH 8; pH thích hợp: 7.8 – 9.5, vẫn ổn định pH thấp 3 – 5.
- Nhiệt độ hoạt động: nhiệt độ cơ thể và vẫn hoạt động tốt trong khoảng 30 – 400 C.
- Trypsin được hoạt hóa bởi: Ca, Co, Mn và bị ức chế bởi: Cu, Ag, Hg.

29/09/2011 11:21 SA

173

Nguyễn Hữu Trí



Hoạt động và tính đặc hiệu của trypsin

- Trung tâm hoạt động: -Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-
- Trypsin cắt liên kết peptide giữa carboxyl của lysine, arginine với nhóm amine của các amino acid khác.
- Trypsin tác dụng tốt hơn với protein bị biến tính
- Trypsin chỉ phân cắt được 1/3 liên kết peptide trong phân tử protein, tạo các peptide nhỏ và các amino acid.
- Trypsin còn khả năng thủy phân ester.

29/09/2011 11:21 SA

174

Nguyễn Hữu Trí



Amylase

- Amylase là một enzyme đóng vai trò chủ yếu trong hoạt động thủy phân tinh bột trong quá trình nảy mầm của hạt ngũ cốc.
- Có 6 loại amyase, các enzyme này khác nhau ở đặc tính, pH hoạt động và tính ổn định với nhiệt:
 - α - amylase, β - amylase, γ - amylase (glycoamylase): thủy phân α -1,4 - glycoside của tinh bột.
 - Dextrin-6-glucanhydrolase, amylopectin-6-glucanhydrolase và oligodextrin - 6 - glucanhydrolase (dextrinase): thủy phân α -1,6 - glycoside của tinh bột.

29/09/2011 11:21 SA 175 Nguyễn Hữu Trí

Amylase

- 6 loại amylase được chia thành 2 nhóm:
 - Endoamylase: α - amylase và nhóm enzyme khử nhánh Dextrin - 6- glucanhydrolase, amylopectin - 6 - glucanhydrolase và oligodextrin - 6 - glucanhydrolase (dextrinase).
 - Exoamylase: β - amylase, γ - amylase.
- Amylase từ các nguồn khác nhau có thành phần, tính chất, nhiệt độ hoạt động, pH tối ưu, các đặc điểm thủy phân khác nhau.

29/09/2011 11:21 SA 176 Nguyễn Hữu Trí

Amylase

The diagram illustrates the structure of amylose, a linear polysaccharide of glucose units. It shows two glucose units in their cyclic Haworth projection. The top unit is linked to the bottom unit via an α -1,4 glycosidic bond. A side chain is attached to the top unit via an α -1,6 glycosidic bond. Labels indicate: " α -1,4 linkage between two glucose units" and " α -1,6 linkage between two glucose units".

29/09/2011 11:21 SA 177 Nguyễn Hữu Trí

Thu nhận amylase từ vi sinh vật

- Phân lập, chọn giống vi sinh vật
- Chọn cơ chất cảm ứng, thành phần môi trường nuôi cấy thích hợp.
- Tiêu chuẩn hóa các điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ nuôi, pH, độ ẩm ban đầu, độ thoáng khí...

29/09/2011 11:21 SA 178 Nguyễn Hữu Trí

Nuôi vi sinh vật tạo amylase bằng phương pháp bề mặt

- Nguyên liệu: cám mì, cám gạo, chất lượng nguyên liệu ảnh hưởng lớn hoạt lực amylase sinh ra.
- Độ ẩm tối thích: (nấm mốc: *Asp. niger*, *Asp. awamort...*) từ 58 - 60%
- Nhiệt độ nuôi:
- Giai đoạn nảy mầm của đỉnh bào tử (3-4 giờ): 23 - 30° C đối với nấm mốc, 32 - 38° C đối với vi khuẩn
- Giai đoạn sinh trưởng nhanh của hệ sợi, hô hấp xảy ra mạnh, sinh nhiệt lớn (4-18 giờ) → thổi khí vô trùng nhiệt độ 28 -29° C và độ ẩm cao
- Giai đoạn tạo amylase mạnh (10 -20 giờ)
- Thời gian nuôi để thu amylase cực lớn tùy vào loại vi sinh vật

29/09/2011 11:21 SA 179 Nguyễn Hữu Trí

Nuôi vi sinh vật tạo amylase bằng phương pháp bề sâu

- Môi trường dinh dưỡng: nguồn nguyên liệu giàu tinh bột, chất cảm ứng cho sinh trưởng vi sinh vật tạo amylase. Tùy loại vi sinh vật, người ta có thể bổ sung thêm 1 số loại muối vô cơ, trong đó các muối nitrate được vi sinh vật sử dụng như nguồn nitơ.
- Nhiệt độ nuôi: 30 -32° C đối với nấm sợi; 37° C đối với *Bacillus subtilis*. Nhiệt độ nuôi ảnh hưởng tới độ bền nhiệt của amylase tạo thành.
- Sục khí và khuấy trộn: phần lớn vi sinh vật tạo amylase là vi sinh vật hiếu khí, cần oxy hòa tan trong môi trường để tăng trưởng.

29/09/2011 11:21 SA 180 Nguyễn Hữu Trí



Pectinase

- Enzyme xúc tác sự phân hủy của các polymer pectin.
- Trong tự nhiên, hiện tượng này thường xảy ra khi trái cây chín.
- Ứng dụng trong thực phẩm, giúp làm trong nước rau quả.
- Kiểm soát hoạt động pectinase giúp điều chỉnh độ nhớt sản phẩm
- Pectinase được phân loại dựa trên cơ chế tác dụng của chúng

29/09/2011 11:21 SA 182 Nguyễn Hữu Trí

Cellulase

- Trong thiên nhiên cellulose bị phân hủy bởi vi sinh vật cả trong điều kiện hiếu khí và yếm khí.
- Quá trình phân hủy này được xúc tác bởi enzyme cellulase.
- Vi sinh vật trong tự nhiên có khả năng sinh tổng hợp cellulase: nấm sợi, xạ khuẩn, vi khuẩn.
- Đóng vai trò quan trọng trong chuyển hóa vật chất trong tự nhiên và cả trong công nghiệp thực phẩm, môi trường.

29/09/2011 11:21 SA 183 Nguyễn Hữu Trí


Lipase

- Lipase là enzyme tham gia thủy phân glyceride tạo monoglyceride và các acid béo.
- Phân loại:
 - Pancreatic lipase thu từ tuyến tụy của heo. Enzyme này tham gia thủy phân triglyceride, dầu, chất béo, acid béo đơn giản...
 - Pregastric lipase: enzyme được sản xuất từ động vật. Enzyme tham gia thủy phân acid béo chuỗi ngắn trong chất béo của sữa
 - Lipase từ vi sinh vật: sử dụng nấm sợi và vi khuẩn sản xuất lipase theo qui mô công nghiệp

29/09/2011 11:21 SA 184 Nguyễn Hữu Trí

Lactose

- Một số người không thể hấp thu được lactose ở trong sữa tuy nhiên lactose vẫn ở trong hệ tiêu hóa và được lên men bởi vi khuẩn. Hậu quả là làm cho cơ thể buồn nôn, có rú, sinh hơi, và tiêu chảy sau khoảng 4 giờ sau khi sử dụng sản phẩm sữa.
- Lactase tiêu hóa được lactose trong thực phẩm
- Vì vậy các sản phẩm sữa không chứa lactose rất cần thiết





29/09/2011 11:21 SA 185 Nguyễn Hữu Trí

© 2008 Paul Billet [CDWS](http://www.cdw.com)

Lactase

Enzyme lactase (β -galactosidase) thu được từ nấm mốc *Aspergillus oryzae*

29/09/2011 11:21 SA 186 Nguyễn Hữu Trí

© 2008 Paul Billet [CDWS](http://www.cdw.com)

Amylase

Female urinary system Male urinary system

Urine is tested for amylase levels

Urine sample taken

ADAM

29/09/2011 11:21 SA 187 Nguyễn Hữu Trí

Amylase

Dệt: rũ bỏ hồ vải (tầng lớp hồ để mặt vải trở nên mịn, dễ bắt màu)

29/09/2011 11:21 SA 188 Nguyễn Hữu Trí

Pectinase

Thành phần Prozyme: Protease, Amylase, Cellulase, Lipase, Pectinase, Vitamin A, Vitamin D3, Vitamin E, Vitamin K3, Stay C...rất cần thiết cho sự tiêu hóa và tăng trọng của tôm.

29/09/2011 11:21 SA 189 Nguyễn Hữu Trí

Pectinase

Pectinase có khả năng thủy phân pectin. Sản xuất nước quả từ nguyên liệu quả nhờ cơ chế phá vỡ protopectin (chất làm liên kết tế bào), thủy phân protein, phá vỡ nguyên sinh chất của tế bào → vỡ tế bào ⇒ nước chảy ra, hiệu suất tăng. Làm trong nước quả ép (bia, rượu)

29/09/2011 11:21 SA 190 Nguyễn Hữu Trí

Pectinase

Bảo quản thực phẩm : Phối hợp với catalase → kéo dài thời gian bảo quản của bột trứng, sữa khô, làm ổn định bia. Chống rỉ các bao bì đựng nước giải khát CO₂ (do đuổi O₂ ra khỏi sản phẩm khi thêm nước vào).

29/09/2011 11:21 SA 191 Nguyễn Hữu Trí

Chiến lược sản xuất enzyme tẩy rửa của Novo Nordisk A/S

-Gene enzyme lipolase *Humicola lanuginosa* được chuyển vào *Aspergillus oryzae* thích hợp cho mục đích thương mại hơn.

- Enzyme làm tăng hiệu quả ở các điều kiện giặt tẩy.

- Ổn định với nhiệt và pH liên quan tới giặt tẩy.

Fig. 5.2. Cloning strategy for enzymes.

29/09/2011 11:21 SA 192 Nguyễn Hữu Trí

