

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA ĐÀ NẴNG



TIẾN SĨ:
BÙI XUÂN ĐÔNG

GIÁO TRÌNH
CÔNG NGHỆ ENZYME

CHƯƠNG 4: CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME**4.1. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME TỪ VI SINH VẬT**

Hoạt động của enzyme trong tế bào thường được giữ ở mức độ xác định bảo đảm cho mọi chức năng của tế bào hoạt động một cách tiết kiệm và kinh tế nhất. Điều này được thực hiện thông qua việc điều hòa hoạt độ của chính phân tử enzyme và điều hòa số lượng enzyme trong tế bào (tế bào vi sinh vật chỉ tổng hợp enzyme khi cần thiết với số lượng thích hợp mong muốn).

Với mục đích nuôi cấy thu hồi enzyme với hiệu suất cao, cần phải nhận rõ quá trình điều hòa sinh tổng hợp enzyme để có các định hướng tác động thích hợp trong công nghệ.

4.1.1. Nguyên lý điều hoà quá trình sinh tổng hợp enzyme trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Enzyme là loại protein xúc tác cho mọi phản ứng sinh học trong mọi tế bào của sinh vật.

Ngoài cơ thể và tế bào, enzyme không được tạo thành mà chúng chỉ được tổng hợp trong tế bào. Tế bào được cấu tạo và hoạt động như nhà máy tự động hóa hoàn toàn, sản xuất ra enzyme.

Quá trình tổng hợp enzyme được điều khiển và xác định chính xác trình tự aminoacid trong cấu trúc enzyme tạo thành. Vật chất quyết định là DNA, có trong nhân tế bào. DNA như bộ phận điều khiển tất cả quá trình xảy ra trong khi tổng hợp enzyme (hoạt hóa aa, chuyển aa vào vị trí trong một trình tự xác định, sửa chữa sai sót trong quá trình tổng hợp). Nơi tạo ra tiền enzyme trong tế bào là ribosom. Đây được coi là phân xưởng sản xuất chính các loại enzyme.

Tế bào có thể tạo ra hàng ngàn loại enzyme, trong đó mỗi loại có tính chất, cấu tạo và chức năng riêng biệt.

Mỗi một enzyme được tổng hợp ra bị điều khiển bởi một gen. Sau khi tổng hợp nên, mỗi một enzyme lại tham gia một phản ứng sinh học, để cuối cùng tạo ra sản phẩm.

Như vậy, gen đóng vai trò quan trọng và quyết định đến cấu trúc của enzyme, chiều hướng phản ứng của enzyme. Nếu gen bị thay đổi, enzyme sẽ bị thay đổi theo và kết quả là phản ứng sẽ bị thay đổi hoàn toàn.

Nếu aminoacid nằm ngoài trung tâm hoạt động và bị ảnh hưởng bởi tác động của sự thay đổi gen thì chiều hướng và tốc độ của phản ứng enzyme không bị ảnh hưởng.

Trong trường hợp aminoacid nằm trong trung tâm hoạt động của enzyme, hoạt động của enzyme sẽ bị ảnh hưởng mạnh bởi sự biến đổi gen.

4.1.1.1.Điều hoà theo hướng đóng mở bởi operator - hiện tượng trấn áp và cảm ứng sinh tổng hợp enzyme:

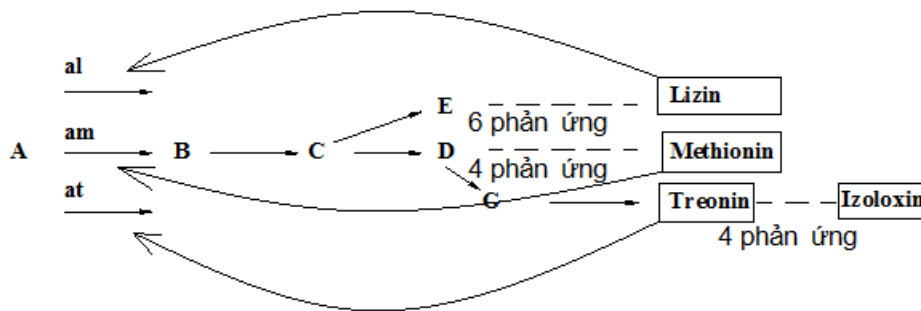
a) *Hiện tượng trấn áp và cảm ứng sinh tổng hợp enzyme:*

Hiện tượng trấn áp (ức chế) - repression: là hiện tượng làm giảm quá trình sinh tổng hợp do sản phẩm cuối cùng của quá trình nuôi cấy.

Hiện tượng này thường gặp đối với các enzyme xúc tác quá trình sinh tổng hợp một chiều như: quá trình sinh tổng hợp axit amin, nucleotit.

Khi thêm một axit amin nào đó vào môi trường nuôi cấy thì tế bào sẽ không cần tổng hợp axit amin này nữa. Do đó cũng sẽ đình chỉ quá trình sinh tổng hợp enzyme, xúc tác cho quá trình tổng hợp nên chính axit amin đó. Enzyme này chỉ được tổng hợp trở lại khi có nhu cầu nghĩa là khi làm giảm nồng độ axit amin tương ứng.

Đối với hệ thống phân nhánh nghĩa là quá trình từ một cơ chất chung ban đầu tạo thành nhiều sản phẩm cuối cùng khác thì cơ chế trấn áp có thể được thực hiện theo các cách khác nhau.



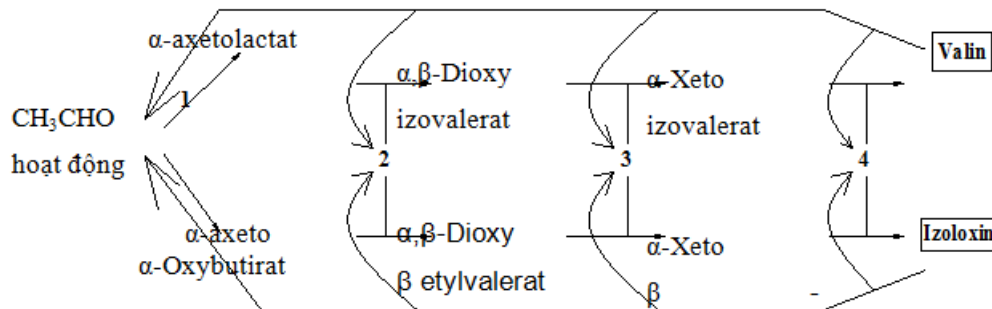
Hình 4.1: Sơ đồ minh họa cơ chế trấn áp.

A – Cơ chất Aspartic ban đầu; B, C, D, G - các sản phẩm trung gian có tác dụng trấn áp.

Ví dụ: Phản ứng đầu tiên của quá trình sinh tổng hợp các axit amin lizin, methionin, treonin đều do enzyme aspactokinase xúc tác. Enzyme này có 3 dạng izoenzyme. Ký hiệu: al, am, at. Quá trình sinh tổng hợp al sẽ bị trấn áp bởi nồng độ lizin, am sẽ bị trấn áp bởi

nồng độ của methionin, at sẽ bị trấn áp bởi nồng độ treonin. Có thể minh họa cơ chế trấn áp này theo sơ đồ hình 4.1.

Điều đáng lưu ý thêm trong sơ đồ này là nhánh do izoenzyme at xúc tác. Trong nhánh này, treonin vừa là sản phẩm cuối cùng của cả quá trình vừa là cơ chất ban đầu để sinh tổng hợp izolexin. Do đó quá trình sinh tổng hợp at chỉ bị trấn áp khi cả treonin và izolexin đạt nồng độ cao vượt quá nhu cầu của tế bào. Như vậy ở đây sự trấn áp chỉ xảy ra khi có sự hợp đồng tác dụng của cả 2 sản phẩm.



Hình 4.2: Sơ đồ biểu diễn quá trình sinh tổng hợp valin và izolexin do 4 enzyme giống nhau xúc tác.

1: α -axeto. α -oxyaxitintetase, 2: reductoizomerase (axetolactat mutase), 3: hydrooxyaxit dehydratase, 4: amino transpherase.

Quá trình trấn áp hợp đồng này cũng xảy ra đối với quá trình sinh tổng hợp enzyme giống nhau - xúc tác cho các phản ứng song song tạo thành 2 sản phẩm cuối cùng khác nhau. Ví dụ: quá trình sinh tổng hợp valin và izolexin do 4 enzyme giống nhau xúc tác hình 4.2.

Hiện nay người ta cho rằng RNA mới là yếu tố trấn áp thực sự cho quá trình sinh tổng hợp các enzyme xúc tác để tổng hợp các axit amin tương ứng.

Hiện tượng cảm ứng (induction): là hiện tượng ngược lại với hiện tượng trấn áp làm tăng lượng enzyme của tế bào. Nghĩa là khi trong môi trường nuôi cấy có chất cảm ứng sẽ kích thích cho vi sinh vật sinh tổng hợp nên nhiều enzyme hơn so với bình thường.

Chất cảm ứng được xem như là một chất nền (chất cơ sở, bộ khung cacbon) để sinh tổng hợp enzyme. Hiện nay, người ta chỉ ra rằng có thể các sản phẩm trung gian của quá trình biến đổi đóng vai trò là chất cảm ứng, thậm chí nhiều cơ chất của enzyme cũng có thể là chất cảm ứng. Điển hình là các glucit (monosaccarit và polysaccarit).

Trong số các enzyme do vi sinh vật tổng hợp, có những enzyme bình thường chỉ được tổng hợp rất ít ỏi nhưng khi thêm một số chất nhất định vào môi trường nuôi cấy thì hàm lượng của chúng có thể tăng lên rất nhiều lần. Monod và Cohn (1925) gọi các enzyme này là enzyme cảm ứng, chất gây nên hiệu quả này là gọi là chất cảm ứng.

Các enzyme cảm ứng thường là những enzyme xúc tác cho quá trình phân giải như: protease, amylase, pectinase, penicillinase, β -galactosidase ở tế bào *E. coli*.

Khi nuôi cấy *E. coli* trong môi trường glucose và glyxerin, vi khuẩn chỉ tổng hợp một ít (khoảng 10 phần tử) β - galactosidase/tế bào.

Nếu nuôi cấy trên môi trường lactose là nguồn các bon duy nhất thì hàm lượng enzyme là 6÷7% tổng hợp lượng protein của tế bào.

Trích ra từ tế bào chứa đến 6000 phần tử enzyme, nghĩa là tăng lên gần 1000 lần so với khi nuôi cấy trong môi trường cũ.

Sự cảm ứng thường có tính chất dây chuyền. Trong hệ thống gồm nhiều phản ứng, cơ chất đầu tiên của hệ thống có thể cảm ứng quá trình sinh tổng hợp tất cả các enzyme xúc tác cho quá trình chuyển hoá của nó.

Cơ chế: trước hết chất cảm ứng làm tăng quá trình sinh tổng hợp enzyme tương ứng, sau đó sản phẩm này lại cảm ứng tổng hợp enzyme để phá huỷ nó, tiếp theo sản phẩm thứ 2 này lại cảm ứng tổng hợp nên enzyme thứ 3...

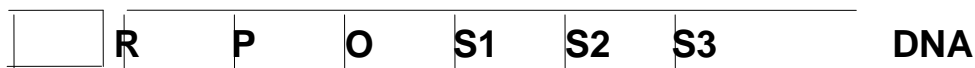
Ví dụ: Histidin có tác dụng cảm ứng hàng loạt các enzyme xúc tác cho quá trình chuyển hoá nó thành axit glutamic (Chasin và Magasamil (1968)).

4.1.1.2. Cơ chế điều hoà theo kiểu trấn áp và cảm ứng:

Zacob và Monod đã đề ra mô hình giải thích cơ chế của 2 hiện tượng trấn áp và cảm ứng trên cơ sở di truyền.

Theo mô hình này, sự trấn áp và cảm ứng sinh tổng hợp enzyme được thực hiện theo cùng một cơ chế chung dựa trên cơ sở điều hoà hoạt động của các gene dưới tác dụng của các chất phân tử thấp. Những căn cứ chính của thuyết này như sau:

a) Có sự phân hoá chức năng của các giai đoạn khác nhau trong phân tử DNA trong nhiễm sắc thể, dựa vào chức phận của chúng trong qui trình sinh tổng hợp protein có thể chia thành các loại gene sau:



Hình 4.3: Sự phân hóa chức năng của các thành phần trong phân tử DNA.

- **Gene cấu trúc (ký hiệu: S₁, S₂, S₃)** : mã hoá phân tử protein, tức là thứ tự các axit amin trong phân tử protein được tổng hợp là tùy thuộc vào thứ tự các nucleotit của đoạn gene này.

Các gene mã hóa các enzyme được sắp xếp liền nhau thành một nhóm trên nhiễm sắc thể. Chúng là khuôn để tổng hợp phân tử RNA_{tt}.

- **Operator (ký hiệu: O)**: ở cạnh nhóm gene cấu trúc, không mã hoá protein nhưng đảm bảo cho quá trình sao chép mã ở gene cấu trúc theo cơ chế “Đóng mở” tựa như công tắc của một dây đèn.

Quá trình sao chép chỉ có thể tiến hành khi operator ở trạng thái “mở” (không kết hợp với chất nào cả) và ngừng lại khi nó bị “đóng” (kết hợp với một chất đặc biệt gọi là chất trấn áp repressor).

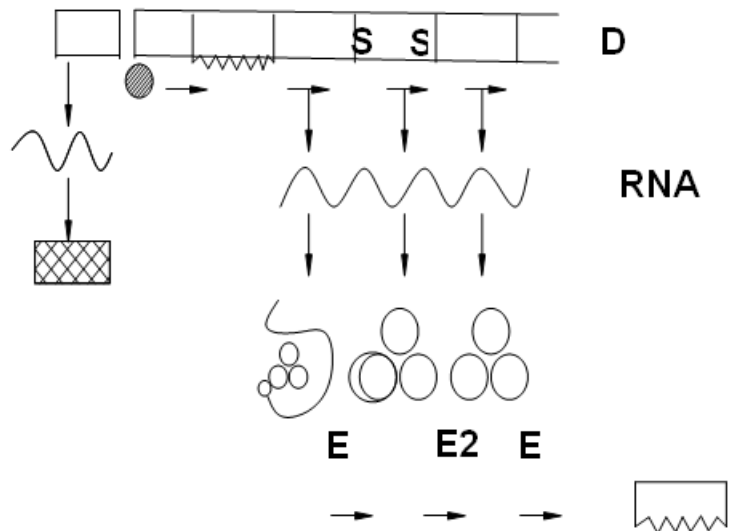
Một operator có thể “phụ trách” một nhóm gene cấu trúc. Các gene cấu trúc này cùng với operator của chúng hợp thành một đơn vị sao chép sơ cấp gọi là một operon. Sự tổng hợp RNA_{tt} được bắt đầu ở một đầu của operon và chuyển qua các gene cấu trúc để đến đầu kia của operon.

- **Promotor (ký hiệu P)**: Đứng trước trình tự operator là đoạn DNA mà RNA-polimerase sẽ kết hợp và bắt đầu quá trình sao chép các gene cấu trúc.

- **Gene điều hoà regulator (ký hiệu R)**: Gene này mã hoá cho một protein đặc biệt gọi là chất trấn áp (repressor). Chất trấn áp có vai trò “đóng-mở” operator. Do đó gene điều hoà có thể kiểm tra quá trình sao chép gene cấu trúc thông qua chất trấn áp này.

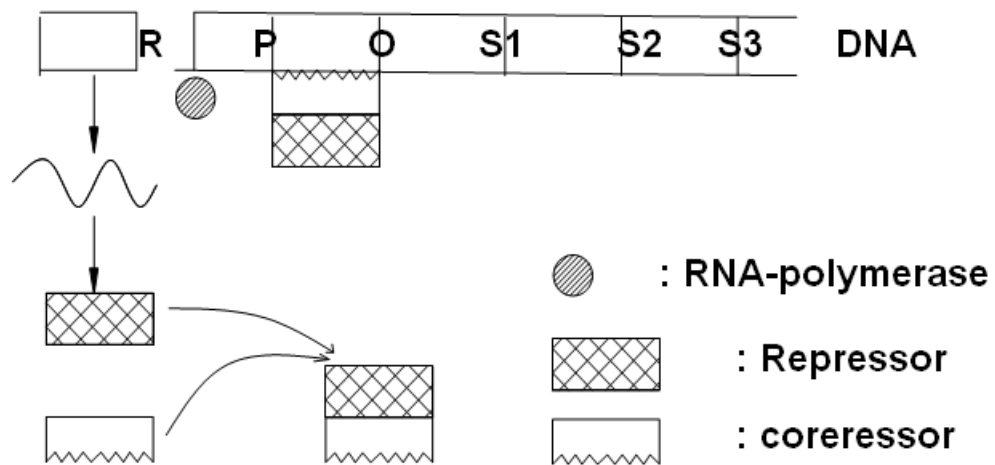
b) Trong trường hợp điều hoà sinh tổng hợp enzyme theo cơ chế trấn áp, repressor do gene điều hoà tổng hợp còn ở dạng không hoạt động (aporepressor) chưa có khả năng kết hợp với operator nên quá trình sao chép các gene cấu trúc tiến hành bình thường (hình 4.4).

Các enzyme được tổng hợp xúc tác cho các phản ứng để tạo thành các sản phẩm cuối cùng, sản phẩm cuối cùng này lại có khả năng kết hợp với aporepressor và hoạt hoá nó.



Hình 4.4: Sơ đồ biểu diễn cơ chế điều hoà sinh tổng hợp enzyme theo cơ chế trấn áp trong trường hợp không có sản phẩm cuối cùng.

Aporepressor đã được hoạt hoá sẽ kết hợp với operator ngăn cản quá trình sao chép các gene cấu trúc, làm ngừng việc tổng hợp RNA_t tương ứng do đó đình chỉ quá trình sinh tổng hợp các enzyme tương ứng. Trong trường hợp này các sản phẩm mới được coi như là chất trấn áp (repressor) (hình 4.5).



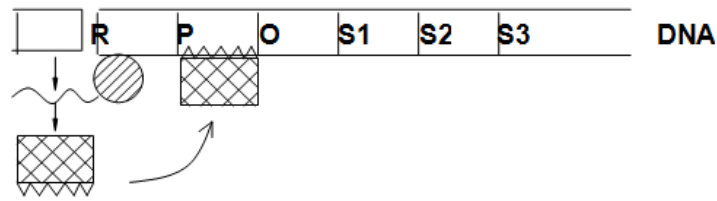
Hình 4.5: Sơ đồ biểu diễn cơ chế điều hoà sinh tổng hợp enzyme theo cơ chế trấn áp trong trường hợp có sản phẩm cuối cùng.

R: Gene điều hoà, P: Gene promotor, O: Gene Operator, S1, S2, S3: Các gene cấu trúc.

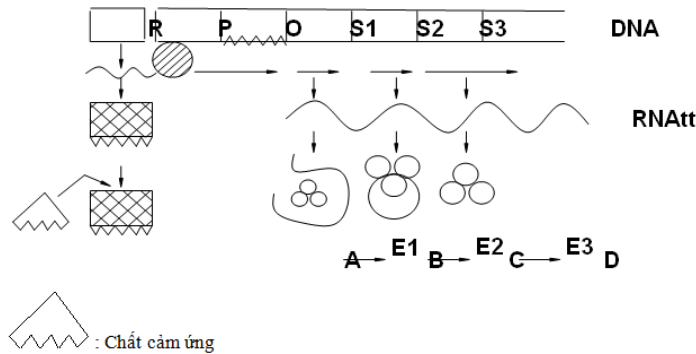
c) Đối với trường hợp cảm ứng:

Khi không có mặt chất cảm ứng, chất trấn áp (repressor) được tổng hợp đã ở trạng thái hoạt động, nó kết hợp với operator, quá trình sao chép mã của gene cấu trúc bị bao vây

nên các enzyme tương ứng không được tổng hợp (hình 4.6).



Hình 4.6: Sơ đồ biểu diễn cơ chế điều hoà sinh tổng hợp enzyme theo cơ chế cảm ứng trong trường hợp không có chất cảm ứng.



Hình 4.7: Sơ đồ biểu diễn cơ chế điều hoà sinh tổng hợp enzyme theo cơ chế cảm ứng trong trường hợp có chất cảm ứng.

Khi có mặt chất cảm ứng thì chất trấn áp repressor bị mất hoạt động, tách khỏi gene điều khiển operator và quá trình sao chép mã bắt đầu, kết quả làm tăng lượng enzyme được tổng hợp (hình 4.7).

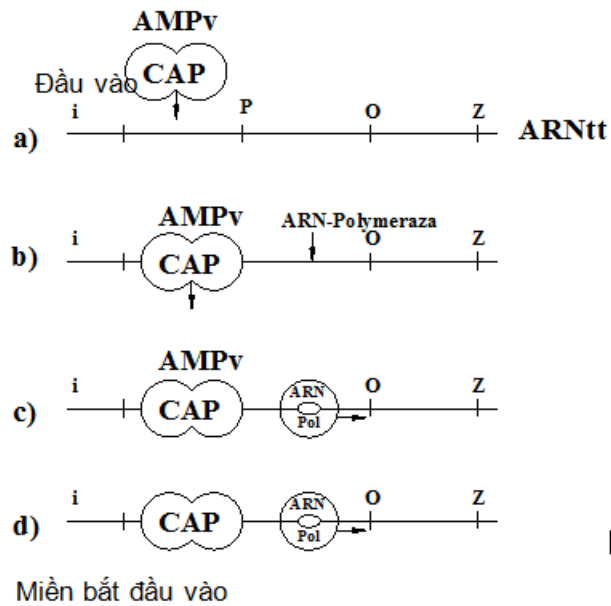
Như vậy ta thấy hiện tượng trấn áp và cảm ứng sinh tổng hợp enzyme là hai mặt đối lập của một quá trình hoá sinh thống nhất được thực hiện thông qua hoạt động “đóng-mở” gene dưới tác dụng của các chất phân tử thấp.

4.1.1.3. Điều hoà tương tác giữa RNA - polymerase với promotor:

Nhiều dấu hiệu thực nghiệm cho thấy các gene bảo đảm sinh tổng hợp một số enzyme cảm ứng xúc tác cho quá trình phân giải không chỉ chịu sự kiểm tra theo cơ chế cảm ứng như đã trình bày ở trên mà còn chịu sự kiểm tra theo một cơ chế khác nhờ tác dụng của AMP vòng (AMP_v) gọi là “trấn áp phân giải” (catabolic repressor). AMP_v có tác dụng kích thích đối với quá trình sao chép mã của các operon phân giải. Hiện tượng này đã được nghiên cứu nhiều đối với operon lactose.

Theo nhiều tác giả, tác dụng kích thích của AMP_v đối với quá trình sao chép mã được thực hiện nhờ một protein đặc biệt làm trung gian gọi là protein nhận AMP_v , hay còn

gọi là protein hoạt hoá gen phân giải CAP (catabolite gene activator protein).



Hình 4.8: Mô hình bắt đầu sao chép mã của operon lactose

a) – Phức hợp CAP-AMP_v chuẩn bị kết hợp vào miền đặc biệt của DNA, b) – Sau khi phức hợp CAP-AMP_v kết hợp vào, nó làm yếu đoạn DNA, c) - RNA-polymerase kết hợp vào miền đặc biệt của nó, d) - RNA-polymerase “trước” dọc theo đoạn DNA đến miền bắt đầu thực hiện quá trình sao chép.

Khi AMP_v kết hợp với CAP tạo thành phức hợp có tác dụng hoạt hoá gene promotor làm cho RNA - polymerase dễ dàng kết hợp với nó để bắt đầu quá trình sao chép mã (hình 4.8).

Vậy AMP_v có tác dụng làm tăng cường quá trình sao chép. Cũng có ý kiến cho rằng phức hợp AMP_v – CAP – RNA - polymerase cho phép bắt đầu quá trình sao chép mã.

Người ta cũng nhận thấy glucose và một số loại đường khác khi thêm vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn thường làm giảm lượng AMP_v trong tế bào, do đó làm giảm quá trình sinh tổng hợp nhiều enzyme cảm ứng, ngay cả khi nó có chất cảm ứng trong môi trường. Hiện tượng này còn gọi là “hiệu ứng glucose” được quan sát thấy ở *E. coli* và một số vi khuẩn. Tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa biết rõ cơ chế làm giảm AMP_v do glucose và các đường khác.

4.1.1.4. Nguyên lý trao đổi chất của VSV trong sinh tổng hợp enzyme:

Khác với cơ thể thực vật và động vật, VSV là cơ thể đơn bào nên có những tính chất chuyên biệt. Ví dụ, sự trao đổi chất giữa tế bào VSV và môi trường là trực tiếp. Do đó,

VSV có khả năng thích ứng nhanh với sự thay đổi của môi trường.

Trong quá trình thực hiện trao đổi chất với môi trường bên ngoài, VSV biểu hiện quá trình đồng hóa và dị hóa bên trong và bên ngoài cơ thể rõ hơn ở động vật và thực vật.

Như vậy trong quá trình trao đổi chất ở VSV có hai quá trình dị hóa (dị hóa trong tế bào, dị hóa ngoài tế bào) và quá trình đồng hóa chỉ xảy ra trong tế bào.

Để thực hiện quá trình đồng hóa và dị hóa đó, VSV phải tổng hợp các enzyme tương ứng.

Các enzyme đồng hóa được tổng hợp trong tế bào và chỉ thực hiện các hoạt động đồng hóa xảy ra trong tế bào.

Các enzyme dị hóa được tổng hợp trong tế bào nhưng có thể hoạt động trong tế bào (enzyme ngoại bào – exoenzyme) hoặc ngoài tế bào (enzyme dị bào – endoenzyme).

Theo nghĩa rộng, enzyme nội bào còn bao gồm cả các loại enzyme tham gia tổng hợp, enzyme tham gia phản ứng oxy hóa và các enzyme tham gia chuyển hóa vật chất trong tế bào.

Phần lớn những enzyme ngoại bào thuộc enzyme cảm ứng. Do đó, việc điều khiển sinh tổng hợp enzyme này ta áp dụng quy luật cảm ứng sẽ thu được những kết quả như mong muốn.

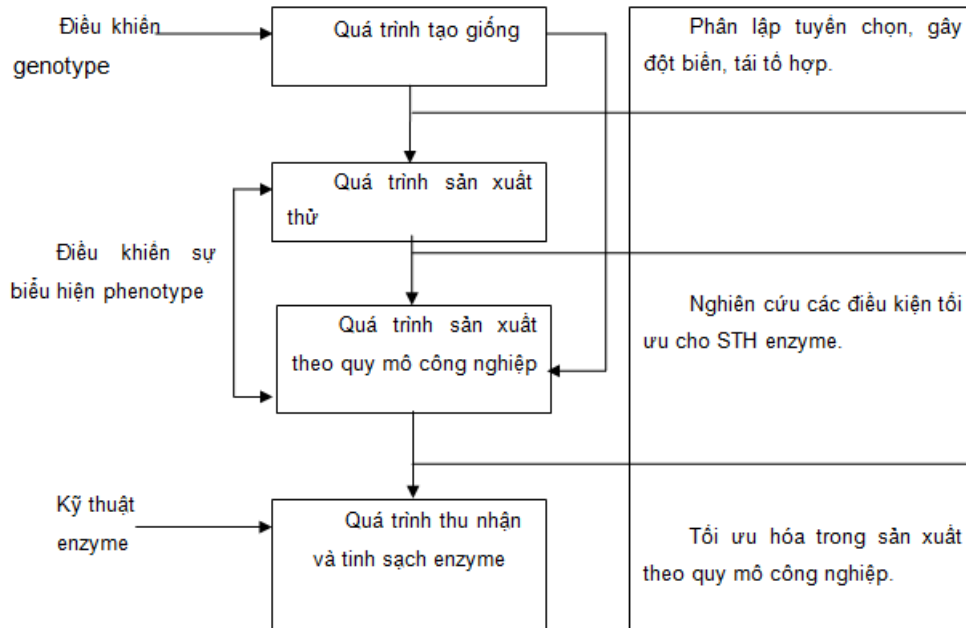
4.1.1.5. Nguyên lý điều khiển quá trình kỹ thuật sản xuất enzyme trong quy mô công nghiệp:

Ngày nay khi nói đến công nghệ sản xuất enzyme là người ta hiểu rằng, công nghệ sản xuất enzyme dựa trên hoạt động sống của VSV. Như vậy, quá trình sản xuất enzyme từ VSV phải được điều khiển theo ý muốn của con người.

Điều khiển genotype:

- Là quá trình tạo giống có khả năng sinh tổng hợp enzyme cao.
- Thay đổi những base của gen trong cấu trúc của DNA sẽ thay đổi hoạt động của gen. Từ đó thu được giống VSV mới có khả năng sinh tổng hợp enzyme cao hơn giống ban đầu nhiều lần.
- Phương pháp di truyền cổ điển dễ thực hiện nhưng đột biến tạo ra không định hướng, tốn nhiều công sức và thời gian.

- Phương pháp tái tổ hợp nhanh và thu được kết quả như mong muốn.



Hình 4.9: Nguyên lý điều khiển sản xuất enzyme theo quy mô công nghiệp.

Điều khiển biểu hiện phenotype:

- Là phương pháp sử dụng các yếu tố bên ngoài, tác động vào tế bào theo hướng tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp enzyme.

- Điều khiển hoạt động của gen là điều khiển hoạt động bên trong. Điều khiển các yếu tố môi trường bên ngoài (pH, nhiệt độ, lượng oxy, nồng độ chất dinh dưỡng, cơ chất, chất kích thích...) là điều khiển bên ngoài tế bào.

- Điều khiển các yếu tố bên ngoài tế bào thường dựa vào thành tựu khoa học và kỹ thuật của ngành chế tạo máy (chế tạo thiết bị lên men), ngành tự động hóa. Ví dụ: thiết bị lên men có thể ổn định các yếu tố ảnh hưởng ở giá trị tối ưu, giúp cho VSV phát triển và tổng hợp enzyme rất ổn định về số lượng và hoạt tính của enzyme cũng rất cao.

4.1.2. Phân lập, tuyển chọn và cải tạo giống vi sinh vật cho enzyme có hoạt lực cao:

4.1.2.1. Phân lập giống:

a) Phân lập giống trong điều kiện tự nhiên:

VSV có khả năng thích nghi trong mọi hoàn cảnh môi trường, nên VSV có thể tồn tại trong những điều kiện khắc nghiệt nhất. Trong quá trình đấu tranh sinh tồn đó, có các

thể sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzyme có hoạt tính rất cao.

Đặc điểm chung của VSV được phân lập từ môi trường tự nhiên:

- Không có khả năng sinh tổng hợp một loại enzyme thật sự mạnh và chưa có khả năng đáp ứng với quy mô sản xuất công nghiệp do VSV phải tổng hợp nhiều loại enzyme khác nhau để đảm bảo sự phát triển.

- Chúng VSV hoang dại phải có thời gian thích nghi với điều kiện sản xuất công nghiệp.

- Chúng VSV hoang dại có khả năng STH một loại enzyme nào đó thường tập trung ở vùng môi trường có chứa nhiều cơ chất tương ứng.

- Trong quá trình sinh sản và phát triển, VSV tự nhiên luôn xảy ra thường biến và đột biến. Những đột biến có lợi thường tồn tại bền vững nên việc tìm kiếm các đột biến kiểu này rất có ý nghĩa.

b) Phân lập giống trong điều kiện sản xuất:

Giống được phân lập trong điều kiện sản xuất có những ưu điểm sau:

- Các giống đã thích nghi với điều kiện sản xuất nên sau khi phân lập, các giống này không cần phải qua giai đoạn sản xuất thử, thí nghiệm.

- Có đặc điểm sinh hóa cao hơn các chủng hoang dại.

- Mật độ tế bào VSV có trong điều kiện sản xuất thường rất cao. Do đó khả năng thu nhận được các chủng có khả năng sinh tổng hợp enzyme cao thường rất cao.

c) Phân lập giống trong mẫu đã hư hỏng:

Các ống giống có thể bị nhiễm trong quá trình bảo quản. Do bị nhiễm, có thể rất nhiều tế bào VSV giống bị thoái hóa, nhưng cũng còn nhiều tế bào không bị thoái hóa. Việc phân lập lại từ nguồn giống này nhiều khi lại thu được kết quả tốt.

4.1.2.2. Kỹ thuật nâng cao chất lượng giống:

Việc nâng cao chất lượng giống cần phải được thực hiện thường xuyên vì trong công nghiệp đòi hỏi tính cạnh tranh cao. Trong phòng thí nghiệm thường sử dụng các phương pháp cơ bản sau:

- Phương pháp tạo khả năng thích nghi:

Nguyên tắc của phương pháp là huấn luyện VSV thích nghi với những điều kiện tối

ưu trong sản xuất. Ưu điểm: dễ thực hiện. Nhược điểm là đòi hỏi phải có tính kiên trì cao và quá trình huấn luyện phải lâu dài vì tính thích nghi tạo ra không thể di truyền cho thế hệ sau.

- Phương pháp thay đổi hệ thống di truyền:

Di truyền học là môn khoa học đóng vai trò rất quan trọng trong việc khám phá bí mật sự sống và tạo ra những giống mới dùng trong sản xuất công nghiệp. Kỹ thuật di truyền được chia làm hai nhóm: Kỹ thuật di truyền cổ điển (lai, gây đột biến) và kỹ thuật di truyền hiện đại (tái tổ hợp gen).

a) Phương pháp gây đột biến:

Đây là phương pháp hay được dùng nhất nhằm để:

- Tạo những đột biến bị giảm khả năng sinh tổng hợp repressor hoặc tổng hợp repressor có ái lực thấp với operator.

- Tạo những đột biến tổng hợp enzyme có cấu trúc bậc 1 thay đổi, do đó có thể giảm độ thay đổi với kiểu kim hãm theo cơ chế liên hệ ngược.

Nếu sự thay đổi cấu trúc bậc 1 xảy ra ở vùng trung tâm hoạt động hoặc ở gần đó thì có thể làm thay đổi rõ rệt hoạt tính của enzyme.

- Gây đột biến ở đoạn gene hoạt hoá promotor để làm tăng áp lực của nó đối với RNA - polymerase do đó làm tăng tốc độ sao chép mã. Dùng biện pháp này có thể làm tăng lượng glucose – 6 - phosphatdehydrogenase lên 6 lần.

Hiện tượng đột biến thường liên hệ với sự thay đổi một gene, chẳng hạn bị “lỗi” một bazơ khi tái tạo phân tử DNA. Ví dụ ở một vị trí nào đó trên gene có thứ tự nucleotit là G-C, nếu nó bị thay thế bằng A-T, T-A hoặc C-G thì phân tử RNA_{tt} được tổng hợp trên đoạn gene bị lỗi này cũng sẽ khác với RNA_{tt} bình thường ở vị trí tương ứng với chỗ “lỗi” trên gene. Do đó sẽ tổng hợp nên phân tử enzyme khác với bình thường ở một số gốc axit amin.

Để tạo một đột biến gene có thể dùng tác nhân vật lý (tia tử ngoại, tia phóng xạ) hay hoá học (các hoá chất) tác dụng lên tế bào sinh vật.

Phương pháp biến nạp:

Là sự biến đổi tính trạng di truyền của một nòi vi sinh vật dưới ảnh hưởng của DNA trong dịch chiết nhận được từ tế bào của vi sinh vật khác. Ở đây yếu tố biến nạp là DNA.

Sự chuyển vật liệu di truyền (DNA) từ tế bào cho đến tế bào nhận có thể xảy ra trong ống nghiệm (invitro) khi cho tế bào nhận tiếp xúc với dịch chiết từ tế bào cho mà không có sự tiếp xúc giữa các tế bào.

Các tế bào có thể nhận bất kỳ loại DNA nào chứ không đòi hỏi phải là DNA từ các giống họ hàng. Tuy nhiên tế bào chỉ có thể nhận một số đoạn DNA nhất định, thường không quá 10 đoạn.

Các đoạn DNA được di truyền trong biến nạp có $M=10^6-10^7$ và phải có cấu trúc xoắn kép. Tế bào không tiếp nhận các đoạn DNA có kích thước nhỏ hơn hoặc các đoạn không có cấu trúc xoắn kép.

Hiện tượng biến nạp phổ biến ở nhiều loài vi sinh vật như: *Diplococcus*, *Staphylococcus*, *Hemophilus*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Xantomonas*.

Phương pháp tiếp hợp gene:

Khác với biến nạp, ở đây vật liệu di truyền chỉ được truyền từ tế bào cho đến tế bào nhận khi hai tế bào tiếp xúc với nhau. Do vậy các vi sinh vật có khả năng biến nạp thì sẽ không có khả năng tham gia tiếp hợp gene nữa.

Hiện nay quá trình tiếp hợp gene đã được nghiên cứu ở một số loài vi khuẩn như *E. coli*, *salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Phương pháp tải nạp:

Vật liệu di truyền (DNA) được chuyển từ tế bào cho sang tế bào nhận nhờ vai trò trung gian của thực khuẩn thể (phage). Trong quá trình tải nạp, các đoạn DNA được chuyển từ tế bào cho đến tế bào tiếp hợp với DNA của tế bào nhận. Do đó làm biến đổi tính chất di truyền của tế bào nhận.

4.1.2.3. Phương pháp bảo quản giống vi sinh vật :

Khi sử dụng vi sinh vật để sản xuất enzyme cần chọn giống thuần chủng, đã được kiểm tra đầy đủ về các đặc tính hoá sinh, vi sinh, nuôi cấy và cần đặc biệt lưu ý đến điều kiện bảo quản giống.

Thực tế khi bảo quản giống gốc trong một thời gian dài có thể tạo ra các biến dị ngẫu nhiên không mong muốn do đó định kỳ phải cấy chuyển và kiểm tra lại các đặc tính ban đầu.

- Phương pháp cấy chuyền và bảo quản lạnh:

Nguyên tắc: Dựa vào khả năng của VSV có thể hạn chế quá trình trao đổi chất trong điều kiện lạnh trong một thời gian nhất định. Trong khoảng thời gian này, VSV có thể bảo tồn được khả năng sinh tổng hợp enzyme.

Đây là phương pháp phổ biến nhất để thực hiện bằng cách giữ giống trên môi trường thạch (thạch nghiêng, hộp petri...) với thành phần môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho giống vi sinh vật đó.

Sau khi giống đã mọc tốt cần bảo quản ở nhiệt độ lạnh 3 - 4⁰C và sau mỗi tuần phải cấy chuyền lại.

Khi cấy chuyền chỉ lấy bào tử hoặc khuẩn lạc mà không nên lấy cả môi trường dinh dưỡng để bảo đảm không chuyền các sản phẩm trao đổi chất vào môi trường mới (có thể gây nên những biến đổi bất lợi không thể lường hết được).

Nếu là xạ khuẩn thì không nên bảo quản giống trên môi trường thạch mà nên giữ trong đất đã khử trùng.

Để kéo dài thời gian bảo quản giống từ hàng tháng đến 1 năm, người ta phủ một lớp paraffin lỏng đã tiệt trùng trên bề mặt giống để hạn chế sự phát triển của nó. Cần lưu ý chỉ phủ lớp dầu sau khi cấy vi sinh vật đạt đến độ chín sinh lý.

Phương pháp cấy chuyền rất có hiệu quả để bảo quản các giống nấm men, vi khuẩn và rất hữu hiệu, dễ dàng triển khai giống ra sản xuất lớn, hạn chế các tai biến có thể dẫn đến hư hỏng giống gốc.

- Phương pháp làm khô:

Nguyên tắc: Trong môi trường tối thiểu có độ ẩm thấp, VSV có bào tử có thể bảo tồn khả năng sinh tổng hợp enzyme trong một thời gian dài. Phương pháp này chỉ có hiệu quả đối với VSV có khả năng sinh bào tử.

Trước khi sử dụng, cát, đất, silicagen phải được làm sạch và sấy đến độ ẩm <5% (tất cả đều được khử trùng cẩn thận). Giống VSV sẽ được nuôi cho đến khi tạo bào tử. Người ta trộn bào tử với đất hoặc cát đã được làm lạnh và sấy khô. Sau đó hỗn hợp cho vào bao, hàn kín và bảo quản ở nhiệt độ thường.

Phương pháp này rất hay được sử dụng để bảo quản nấm mốc, xạ khuẩn, một vài

loài nấm men, vi khuẩn thời gian giữ giống có thể được 1 năm.

Phương pháp làm khô cũng thực hiện đơn giản, không cần dụng cụ đắt tiền. Tuy nhiên giống như phương pháp cấy chuyen thời gian bảo quản tương đối ngắn.

- *Phương pháp đông khô:*

Nguyên tắc: Khi môi trường nuôi cấy giảm đến giới hạn ngưng phát triển của VSV, VSV có khả năng bảo tồn khả năng sinh tổng hợp enzyme và hoạt tính enzyme.

Phương pháp làm khô bằng sấy chân không thăng hoa còn gọi là sấy lạnh để tạo nên sản phẩm đông khô (thực phẩm đông khô, các vật phẩm sinh học, y học đông khô...) được thực hiện như sau: sau khi nuôi cấy VSV trong môi trường lỏng, người ta phân phối giống trong những ống dùng cho phương pháp này và đưa vào máy tạo đông khô.

Đây là phương pháp bảo quản lâu dài đến 10 năm mà không làm cho giống bị biến đổi đặc tính nhưng đòi hỏi công nghệ cao, thiết bị đắt tiền, chi phí bảo quản lớn. Hơn nữa một số loài vi sinh vật như nấm mốc không có bào tử và một số loại vi rút tỏ ra không thích hợp khi bảo quản đông khô.

- *Phương pháp làm lạnh đông trong nitơ lỏng:*

Khí nitơ hoá lỏng ở nhiệt độ rất thấp -165°C đến -196°C nên nếu bảo quản vi sinh vật ở môi trường này sẽ rất tốt vì giống được giữ bất biến trên 10 năm. Tuy nhiên đây là lĩnh vực công nghệ cao (cần nitơ nguyên chất và lạnh thâm độ) nên chi phí bảo quản rất cao.

4.1.3. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme:

Đây là yếu tố đầu tiên ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động sống cũng như khả năng sinh tổng hợp enzyme của vi sinh vật. Môi trường cần chứa đầy đủ các chất C, N, H, O; các chất vô cơ: Mn, Ca, P, S, Fe, K và các chất vi lượng khác.

4.1.3.1. Nguồn cacbon:

Chủ yếu lấy từ các loại đường dễ đồng hóa như: glucose, maltose, ri đường hoặc tinh bột đã thủy phân sơ bộ. Ngoài ra, còn một số nguồn phi glucit như: glyxerol, các axit béo... Tùy thuộc vào đặc tính của enzyme và nòi vi sinh vật mà người ta lựa chọn nguồn cacbon thích hợp.

- *Đối với các hệ vi sinh vật sinh enzyme amylase:* đây là enzyme cảm ứng điển hình

vì vậy môi trường nuôi cấy phải có các chất cảm ứng: tinh bột, dextrin, mantoza. Qua nghiên cứu người ta nhận thấy ba loại glucit này là nguồn cacbon tốt nhất để sinh tổng hợp amylase đạt hiệu quả cao. Chẳng hạn hiệu suất sinh tổng hợp trên môi trường glucit khác nhau với một số loại enzyme amylase như sau:

+ Đối với α -amylase: Tinh bột > dextrin > mantoza > glucose > saccaroza > galactose > manit > avabinoza.

+ Đối với Oligo-1,6-glucoridase (dextrinase): Tinh bột > dextrin > mantoza > saccaroza > glucose > lactose > galactose > orabinoza > manit.

+ Đối với α -1,4-amyloglucoridase : Tinh bột > dextrin > mantoza > saccaroza, glucose, lactose, orabinoza > rabinoza > lactose > manit.

Khi nuôi cấy theo phương pháp bề mặt nếu dùng cám thì không cần bổ sung tinh bột, nguồn tinh bột rất phổ biến, ngoài cám có thể dùng bột ngô, bột mì, bo bo.

Cần chú ý trong đa số trường hợp, một số loại đường, điển hình nhất là đường glucose lại kìm hãm sinh tổng hợp các enzyme thủy phân nói chung (chẳng hạn theo cơ chế trấn áp phân giải do làm giảm lượng AMP_v trong tế bào).

-Đối với các hệ vi sinh vật sinh enzyme protease: Có một số nguồn glucit khi dùng nuôi cấy nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzyme protease có hoạt lực cao, chẳng hạn theo thứ tự sau:

+ Đối với *Asp. flavus* 74: fructoza > glucose > saccaroza > ramnoza > mantoza > galactose > orabinoza > lactose.

+ Đối với *Asp. awamori* 200: fructoza > manit > saccaroza > orabinoza > galactose > lactose.

+ Đối với *Asp. oryae* 79: fructoza > saccaroza > mantoza > glucose > manit > orabinoza > galactose > lactose.

Tinh bột là nguồn cacbon của nhiều chủng vi khuẩn sinh tổng hợp enzyme protease. Ví dụ: Vi khuẩn *Bac. subtilis* có khả năng sinh tổng hợp protease ở môi trường tinh bột > 8%, giống xạ khuẩn ưa nhiệt *Micromonospora vulgaricus* sinh tổng hợp protease trong môi trường 0,15 - 0,25% tinh bột.

Ngoài ra một số loại hydrocacbon cũng là nguồn cacbon cho 125 chủng vi sinh vật.

Chẳng hạn, một số giống vi khuẩn *Pseudomonas semginosa* có khả năng sinh tổng hợp protease hoạt lực cao trên môi trường n - paraffin với 12, 14, 16 nguyên tử C hoặc propylenglycol, hydrocacbon thơm.

- Đối với các hệ vi sinh vật sinh enzyme pectinase:

Quá trình sinh tổng hợp enzyme pectinase có liên quan đến chất cảm ứng. Đó chính là pectin, đương nhiên đó là nguồn cacbon. Nếu sử dụng hỗn hợp glucit trong đó có pectin, để nuôi cấy vi sinh vật thì hoạt lực của pectinase ngoại bào có thể tăng 4 - 6 lần so với khi nuôi cấy không có pectin.

Giống *Asp. niger* được nuôi cấy trên môi trường có nhiều nguồn cacbon như: pectin, tinh bột, isulin, lactose, saccaroza, mantoza, galactose nồng độ 2, 4, 6% sẽ cho pectinase có hiệu suất cao. Tuy nhiên nếu nuôi cấy trên môi trường chỉ có monosacarit và glycerin thì hoàn toàn không thể sinh tổng hợp enzyme này. Đường glucose có tác dụng kìm hãm (chất trấn áp) sinh tổng hợp enzyme pectinase trên môi trường nuôi cấy là pectin và lactose đôi với loài *Asp. niger*, *Asp. awamori*.

- Đối với các hệ vi sinh vật sinh enzyme xenlulase:

Enzyme xenlulase là enzyme cảm ứng vì vậy trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật sinh enzyme này nhất thiết phải có xenluloza là chất cảm ứng và là nguồn cacbon.

Nguồn xenluloza rất phong phú: giấy lọc, bông, bột xenluloza, lõi ngô, cám, mùn cưa, rơm rạ, than bùn. Ngoài ra có thể kể thêm chiết xuất xenlobiozo-octa axetat, cám mì, lactose, balixyl cũng có nguồn cacbon tốt. Đối với giống *Stachybotris atra*, nguồn glucit tốt nhất để sinh tổng hợp enzyme xenluloza là tinh bột 1%.

Các nguồn cacbon khác nói chung (glucose, xenlobioza, axetat, xitrat, oxalat...) lại kìm hãm sinh tổng hợp xenluloza, glycerin không phải là chất cảm ứng cho enzyme này.

- Ngoài nguồn glucit là chủ yếu còn phải kể đến các nguồn cacbon khác như:

+ Các axit béo phân tử lượng lớn (oleic, stearic, miniotic). Ví dụ: axit oleic có tác dụng kích thích tổng hợp glucoamylase lên $2,5 \div 3,5$ lần so với nồng độ thích hợp $2 \div 3\%$.

+ Etanol và glycerin trong nhiều trường hợp nuôi cấy được dùng làm cacbon bổ sung.

+ Trong số các axit hữu cơ thì axit lactic hay được vi sinh vật hấp thụ để tổng hợp

enzyme. Tuy nhiên người ta thường không bổ sung trực tiếp axit này vào môi trường nuôi cấy mà chỉ bổ sung loại nguyên liệu hay chế phẩm có chứa nó hoặc sẽ gây sinh ra nó trong quá trình nuôi cấy.

4.1.3.2. Nguồn nitơ: Có thể ở dạng vô cơ hay hữu cơ.

- Nitơ hữu cơ: Thường là nước chiết malt, nước chiết ngô, hoặc cao ngô, cao nấm men, pepton, bột khô, khô dầu.

- Nitơ vô cơ: NaNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , ure...:

Ngoài ý nghĩa cung cấp nitơ ra, thành phần và tính chất của muối vô cơ còn quyết định giá trị pH của môi trường. Nếu nitơ dưới dạng muối amoni, thì khi ion NH_4^+ được cơ thể VSV sử dụng, còn lại gốc anion sẽ gây axit hóa môi trường. Ngược lại, nếu nguồn muối vô cơ là nitrat thì khi VSV sử dụng (NO_3^-) còn lại ion kim loại tự do sẽ gây kiềm hóa môi trường. Do vậy việc chọn nguồn nitơ vô cơ thích hợp cho VSV sinh tổng hợp được một enzyme nào đó là rất đáng quan tâm.

- Đối với hệ vi sinh vật sinh enzyme amylase:

Ở nhiều loài nấm mốc, nguồn nitơ tốt nhất là NaNO_3 và NH_4NO_3 , nồng độ nitơ dưới mức 0,05% nấm mốc vẫn phát triển được nhưng sinh tổng hợp amylase rất kém.

Tỷ lệ tối ưu giữa tinh bột và NaNO_3 trong môi trường Zapec nuôi cấy nấm mốc sinh tổng hợp amylase đạt hiệu quả cao nhất là 18:1.

Các muối amoni vô cơ ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl), một số nguồn nitơ hữu cơ (gelatin, casein, cao ngô) cho hiệu quả sinh tổng hợp amylase thấp.

Trong thực tế, người ta thường dùng nguồn nitơ là các axit amin có nguồn gốc từ dịch thủy phân protein (dịch tự phân nấm men, nước chấ, cao ngô, dịch chiết malt) đây vừa là nguồn nitơ vừa là nguồn cacbon và chất cảm ứng sinh enzyme.

Các axit amin có tác dụng tốt nhất trong những trường hợp này là asparagin, axit glutamic; D,L serin, histamin, alanin. Trong khi casein thậm chí là ức chế thì dịch thủy phân casein lại cảm ứng sinh tổng hợp amylase lên gấp 2 lần so với ban đầu.

- Đối với hệ VSV sinh enzyme protease: Nguồn nitơ sử dụng rất phong phú, bao gồm 2 nhóm: vô cơ và hữu cơ.

+ Đối với một số loài nấm mốc thuộc họ *Asp. (oryzae, awamori, niger, flavas)* nếu

môi trường có nguồn nitơ hữu cơ thì sẽ sinh tổng hợp protease có tính axit cao. Trên môi trường Czapek nếu thay NaNO_3 bằng casein thì hoạt lực protease có thể tăng lên 3,5 lần. Sinh tổng hợp enzyme protease được nâng cao khi môi trường nuôi cấy có cả hai nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ. Nếu môi trường chỉ có nguồn nitơ vô cơ sẽ dẫn đến ngừng sinh tổng hợp enzyme này.

+ Trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn, trong số các nguồn nitơ vô cơ thì $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ là tốt hơn cả. Các muối amon và nitrat khác đều làm giảm hoạt lực enzyme.

+ Đối với xạ khuẩn ưa nhiệt *Actynomyces Vulgaris U2* thì pepton là chất cảm ứng để sinh tổng hợp enzyme protease là tốt nhất.

+ Các axit amin có ảnh hưởng rõ rệt nhất đến quá trình sinh tổng hợp enzyme VSV nói chung. Chẳng hạn glyxin, alanin, metionin, loxin làm tăng hoạt lực protease của chủng đột biến *Asp. oryzae* 251 - 90 lên 16% và chủng nguyên thủy *Asp. oryzae* 132 - 63 lên 7 - 14%.

Nhiều axit amin lại có tác dụng ức chế sinh tổng hợp enzyme như: valin, axit glutamic, izoloxin, treonin. Nói chung có khoảng 10 axit amin như vậy.

Axit amin có tác dụng kích thích sinh tổng hợp enzyme khi trong tế bào VSV không tự tổng lượng đủ lượng axit amin tự do so với môi trường nuôi cấy.

+ Ngoài ra, các bazơ purin như A (adenin), G (guanin) và các dẫn xuất của chúng, RNA và các sản phẩm thủy phân cũng làm tăng đáng kể sinh tổng hợp protease VSV.

- Đối với hệ VSV sinh tổng hợp enzyme pectinase:

Cũng giống như đối với hệ VSV sinh tổng hợp enzyme protease, nếu dùng kết hợp nitơ hữu cơ và vô cơ sẽ có tác dụng tốt đến quá trình sinh tổng hợp pectinase. Tuy nhiên, muối nitrat kim loại kiềm lại kiềm hãm enzyme này.

Đối với *Asp. niger*, nguồn nitơ tốt nhất để sinh tổng hợp pectinase là $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Đối với *Asp. awamori* thì lại là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Trong khi đó thì Nitơ từ pepton, casein thủy phân là hoàn toàn ức chế sự tạo thành enzyme.

Đối với nấm mốc *Asp. foetidus* thì $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nước chiết cám, nước chiết nấm men có tác dụng nâng cao hoạt lực polygalacturonaza. Nói chung, tỉ lệ thích hợp nhất đối với

C/N khi tổng hợp pectinase trong khoảng 7/1 - 13/1.

- Đối với hệ VSV sinh enzyme xenlulase:

Nguồn nitơ thích hợp nhất đối với nhóm VSV này là nguồn muối nitrat. Trong đó NaNO_3 làm cho môi trường kiềm hoá tạo điều kiện thuận lợi cho sự tạo thành xenlulase.

Cao ngô và cao nấm men (kể cả nước chiết nấm men) cũng có tác động khác nhau đến khả năng sinh tổng hợp xenlulase tùy thuộc giống VSV.

Các muối amoni đã có tác dụng thậm chí ức chế quá trình sinh tổng hợp vì chúng làm cho môi trường bị axit hoá gây ức chế quá trình sinh tổng hợp thậm chí làm mất hoạt tính enzyme ngay sau khi tạo thành trong môi trường.

4.1.3.3. Nguồn các nguyên tố khoáng và các yếu tố (chất) kích thích sinh trưởng:

Muối khoáng rất cần thiết cho hoạt động của VSV, đặc biệt là đối với các quá trình sinh tổng hợp các enzyme kim loại.

Để sinh tổng hợp α -amylase và glucoamylase, nồng độ MnSO_4 thích hợp nhất là 0,05%. Nếu thiếu muối này và muối photphat kali thì VSV không thể sinh tổng hợp được dextrinase. Hoạt lực α -amylase và dextrinase được nâng cao ở nồng độ KH_2PO_4 1% và hoạt lực glucoamylase ở nồng độ KCl 0,05%, dextrinase ở nồng độ thích hợp nhất là 0,15%.

Ion Mg^{2+} có tác dụng sinh tổng hợp và ổn định các enzyme có hoạt tính ở nhiệt độ cao. Đặc biệt Ca^{2+} có trong thành phần của α -amylase (trong 1 phân tử gam α -amylase của *Asp. oryzae* có 20g Ca, của *Bac. subtilis* có 4g Ca). Trong môi trường nuôi cấy Ca^{2+} nâng cao khả năng tổng hợp α -amylase, bảo vệ enzyme này khỏi sự ảnh hưởng của protease.

Lưu huỳnh với nguồn chủ yếu là các axit amin chứa S như metionin, cystein, sistin, và các muối sunphat (CuSO_4). Các muối khoáng có Fe, Mn, Zn, B, Mo, Cu cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp xenlulase. Trong đa số trường hợp biotin (VTM H) và một số VTM cũng rất cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp enzyme .

Khi lựa chọn môi trường cần chú ý đến cả thành phần định tính và định lượng sao cho quá trình sinh tổng hợp enzyme mong muốn là cao nhất. Muốn vậy người ta có thể sử dụng một số phương pháp sau:

1) Phương pháp tối ưu hoá thực nghiệm: để tìm điều kiện công nghệ tối ưu.

2) Phương pháp toán học mô hình hoá thực nghiệm: cho phép xác định nhanh chóng và đúng đắn tỉ lệ các thành phần môi trường nuôi cấy và các yếu tố công nghệ bảo đảm cho hoạt động sống và sinh tổng hợp enzyme cao nhất.

4.1.3.4. Các loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme

Có thể chia làm 2 loại: môi trường tổng hợp và môi trường tự nhiên (phức hợp).

- Môi trường tổng hợp: là môi trường bao gồm các chất với liều lượng xác định (qua tìm hiểu, nghiên cứu), chẳng hạn nguồn cacbon có thể là tinh bột, xenlulose, đường, axit, rượu, nguồn nitơ vô cơ hoặc hữu cơ (axit amin, peptin...). Loại môi trường này được sử dụng cho mục đích nghiên cứu (có khi nó mang tên nhà nghiên cứu ra nó: Czêpk-Dobrovonxki, Hasen...).

- Môi trường tự nhiên: thường dùng các loại phế liệu, nguyên liệu (đa số trong đó là thực phẩm) có chứa các nguồn cacbon, nitơ, khoáng (đa lượng, vi lượng), các yếu tố sinh trưởng. Mặt khác, các nguyên liệu này lại có sẵn, rẻ tiền nên được sử dụng rất nhiều trong công nghiệp sản xuất các chế phẩm enzyme vi sinh vật.

Các nguyên liệu để chuẩn bị làm môi trường tự nhiên bao gồm: cám và bột hạt cốc, nước chiết ngô, dịch ép hoa quả, rau, khô dầu, bã rượu, ri đường, sản phẩm phân huỷ nấm men bia, trấu, lõi ngô (để làm chất độn, tạo xốp).

Khi lựa chọn sử dụng môi trường cần chú ý đến các chất có tác dụng điều hoà sinh tổng hợp enzyme, đặc biệt các chất cảm ứng. Bằng thực nghiệm, người ta thấy rằng chất cảm ứng (tăng cường sinh tổng hợp enzyme) thường là cơ chất chủ yếu, các sản phẩm thủy phân của nó hoặc chất tương tự cơ chất.

Chất cảm ứng thường kết hợp với chất trấn áp repressor làm cho nó không hoạt động (mất khả năng kết hợp với gene điều khiển operator). Như vậy, chất cảm ứng phải đi vào bên trong tế bào do đó không thể là những chất đại phân tử như protein, tinh bột, xenluloza, pectin. Theo một số tác giả thì các cơ chất này là các cơ chất 'tiền cảm ứng', dưới tác dụng của enzyme gốc chúng bị thủy phân một phần tạo thành chất có phân tử lượng bé hơn để đóng vai trò là chất cảm ứng thực sự.

Ví dụ: từ năm 1972 Iurikievits cho rằng chất cảm ứng thực sự của α -amylase không phải là tinh bột mà là sản phẩm thủy phân một phần của nó: erytrodextrin. Tương tự như

vậy, chất cảm ứng của enzyme protease là các polypeptin, protein có phân tử lượng nhỏ.

Khi lựa chọn môi trường nuôi cấy và đặc biệt là chất cảm ứng cần xem xét cẩn thận các yếu tố chi phí, giá thành sản xuất ra sản phẩm.

4.1.4. Các phương pháp nuôi cấy vi sinh vật:

Để thu được nguồn enzyme dồi dào từ vi sinh vật, cần phải nuôi cấy chúng. Về nguyên tắc có 2 phương pháp nuôi cấy VSV thu enzyme là: phương pháp nuôi cấy bề mặt (còn gọi là phương pháp nổi) và phương pháp bề sâu (còn gọi là phương pháp nuôi cấy chìm), trong đó ở phương pháp bề sâu còn có thể chia ra 2 phương pháp cụ thể hơn là nuôi cấy chìm 1 bước (1pha) và nuôi cấy chìm 2 bước (2 pha).

4.14.1. Phương pháp nuôi cấy bề mặt:

- *Giới thiệu chung về phương pháp nuôi cấy bề mặt:*

Là phương pháp tạo môi trường để vi sinh vật phát triển trên bề mặt môi trường .

Về cơ bản, các nguyên liệu của môi trường dinh dưỡng phải cung cấp đủ chất dinh dưỡng như: nitơ, cacbon, vitamin, muối khoáng cho vi sinh vật phát triển. Tuy nhiên, muốn có môi trường dinh dưỡng tốt hơn có thể bổ sung thêm nitơ vô cơ hoặc nitơ hữu cơ và các chất cảm ứng khác tùy từng loại enzyme.

Trong nuôi cấy bề mặt, người ta sử dụng môi trường lỏng và môi trường đặc.

Môi trường lỏng:

- VSV phát triển trên bề mặt môi trường, tạo khuẩn lạc ngăn cách pha lỏng và pha khí.

- VSV sử dụng chất dinh dưỡng từ dung dịch môi trường, oxy từ không khí, tiến hành tổng hợp enzyme. Enzyme ngoại bào tách ra từ sinh khối và hòa tan vào dung dịch môi trường, enzym nội bào nằm trong sinh khối VSV.

- Chiều cao của môi trường lỏng phải được tính toán kỹ và khoảng 12-15cm. Nếu quá lớn thì VSV sẽ không có khả năng đồng hóa hết các chất dinh dưỡng ở phía đáy khay nuôi cấy. Nếu chiều cao quá nhỏ, sẽ thiếu thành phần dinh dưỡng, hiệu suất thu hồi enzyme sẽ không cao. Trong nhiều nhà máy, người ta thường tạo môi trường trong khay nuôi cấy có chiều cao môi trường từ 5-7cm là hợp lý.

Môi trường đặc:

Đây là môi trường được sử dụng ở phần lớn các nhà máy sản xuất enzyme.

- VSV không chỉ phát triển trên bề mặt môi trường, mà còn phát triển trên bề mặt các hạt môi trường (nằm hẳn trong lòng môi trường).

- VSV nhận chất dinh dưỡng từ hạt môi trường và sinh tổng hợp ra enzyme ngoại bào và nội bào. Các enzyme ngoại bào sẽ thấm vào trong các hạt môi trường, còn các enzyme nội bào thì nằm trong sinh khối VSV.

- Môi trường nuôi cấy vừa phải có độ ẩm thích hợp, vừa phải có độ xốp cao. Nếu ẩm quá thì sẽ làm bết môi trường lại, không khí không thể thâm nhập vào môi trường được, nếu độ ẩm quá thấp thì không thuận lợi cho VSV phát triển. Thông thường người ta tạo độ ẩm khoảng 55-65% là hợp lí. Nếu sử dụng cám là nguyên liệu chính thì phải cho thêm 20-25% trấu để làm xốp môi trường, tạo điều kiện thuận lợi cho không khí dễ dàng xâm nhập vào lòng môi trường.

- Quy trình công nghệ tổng quát sản xuất enzyme bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt (hình 4.10)

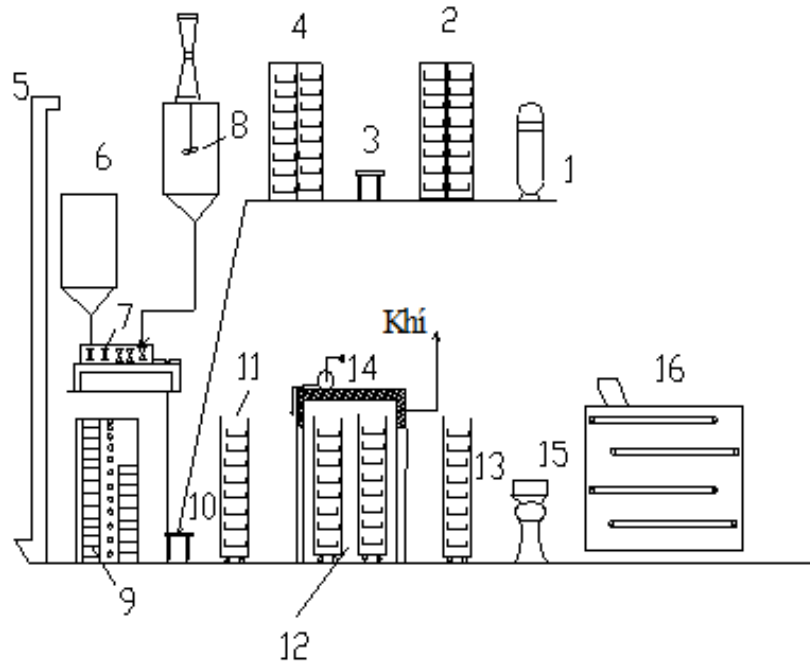
4.1.4.2. Quy trình công nghệ tổng quát (đối với môi trường đặc):

Quy trình này rất thích hợp để nuôi cấy các loại nấm mốc (sinh tổng hợp các hệ enzyme amylase, xenlulase, pectinase, protease) do khả năng phát triển nhanh, mạnh, nên ít bị tạp nhiễm.

+ Nguyên liệu: Môi trường thường dùng nguyên liệu là cám mì hay cám gạo, ngoài ra còn dùng bột ngô, bột mì, bo bo. Đối với một số mục đích đặc biệt, người ta nuôi VSV trực tiếp trên bề mặt hạt gạo (sản xuất tương), hạt đậu tương (đậu tương lên men - misô) đã được nấu chín trộn hạt cốc còn sống (làm men thuốc bắc, men dân tộc, làm tương).

+ Phối trộn nguyên liệu: Tỷ lệ các chất phụ gia (chất độn) phải bảo đảm sao cho hàm lượng tinh bột trong khối nguyên liệu không được thấp hơn 20%, có thể bổ sung thêm nguồn nitơ vô cơ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), photpho (P_2O_5 , H_3PO_4 kỹ thuật), nitơ hữu cơ và các chất kích thích sinh trưởng như malt, nước chiết ngô, nước lọc bã rượu.

+ Làm ẩm môi trường : Có ý nghĩa quan trọng, trong điều kiện sản xuất lớn, hàm ẩm tối ưu của môi trường cám là 58-60%. Khi được nuôi cấy trong điều kiện tiệt trùng nghiêm ngặt thì sẽ đạt hoạt độ enzyme cao nhất khi hàm ẩm 65 - 68%.



Hình 4.10: Sơ đồ dây chuyền công nghệ nuôi cấy vi sinh vật bằng phương pháp bề mặt.

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

Để làm ẩm có thể dùng nước trộn với nguyên liệu (nhào) rồi thanh trùng hoặc làm ẩm sơ bộ rồi thanh trùng sau đó dùng nước vô trùng (nước ngưng tụ, nước đun sôi để nguội) để điều chỉnh lại độ ẩm của khối nguyên liệu. Cách sau có thể rút ngắn thời gian làm nguội, không chế được độ ẩm chính xác hơn nhưng đòi hỏi phải thanh trùng ở nhiệt độ và áp suất cao hơn.

+ Thanh trùng:

Làm cho môi trường được tinh khiết hơn về phương diện VSV và làm cho chín (biến hình) môi trường (tinh bột, protein). Thông thường người ta thanh trùng bằng hơi nước trực tiếp ở nhiệt độ 120 - 130⁰C trong 2 - 3h.

+ Làm nguội và làm tơi môi trường để gieo giống:

Khối môi trường vừa hấp xong còn nóng và dính bết. Vì vậy phải làm nguội và làm

toi để thuận tiện cho việc gieo giống và phân phối vào các dụng cụ nuôi. Yêu cầu thời gian này phải ngắn để hạn chế nhiễm khuẩn từ bên ngoài. Nhiệt độ yêu cầu đạt được để gieo giống là 35 - 39⁰C.



Hình 4.11: Quy trình sản xuất enzyme từ vsv nuôi cấy trên môi trường đặc

+ Nuôi cấy nấm mốc giống:

Với mục đích là tạo đủ lượng bào tử giống cho toàn bộ môi trường nuôi cấy, quy trình công nghệ thực hiện tương tự như trong sản xuất lớn nhưng phải thực hiện các điều kiện kỹ thuật đặc biệt và khắc khe hơn như: nguyên liệu phải tốt, giàu chất dinh dưỡng hơn, điều kiện nuôi cấy không chế nghiêm ngặt hơn, thời gian nuôi cấy dài hơn (gần gấp đôi) để nấm mốc hình thành nhiều bào tử và đều.

Tiến hành quá trình nuôi cấy : Sau khi gieo giống và phân phối vào các dụng cụ nuôi (mảnh hay khay đục lỗ) rồi chuyển vào phòng nuôi có điều chỉnh nhiệt độ và độ ẩm tương đối của không khí (ϕ) cũng như mức độ thông khí. Quá trình nuôi cấy nấm mốc kéo dài 33 – 48 h/mẻ được trải qua 3 giai đoạn:

*Giai đoạn 1: Từ khi nuôi cấy mốc giống đến giờ nuôi thứ 10 -12. Xảy ra sự trương nở bào tử và xuất hiện cuống nấm. Để bảo đảm sự nảy mầm nhanh và hạn chế nhiễm tạp, cần giữ độ ẩm nguyên liệu $W = 55 - 60\%$, $\varphi = 96 - 100\%$, $T = 30 - 32^{\circ}\text{C}$.

*Giai đoạn 2 là giai đoạn sinh trưởng nhanh của hệ sợi (kéo dài trong 10-18h): Nấm mốc phát triển mạnh, lan khắp bề mặt và trong toàn khối môi trường (khuẩn ty ăn sâu vào cơ chất) dẫn đến hiện tượng kết bánh. Quá trình hô hấp và tỏa nhiệt mạnh làm môi trường bị khô xốp, tăng hàm lượng CO_2 , nhiệt độ phòng nuôi tăng lên đến $38 - 40^{\circ}\text{C}$. Để không chế nhiệt độ thích hợp $28 - 30^{\circ}\text{C}$ cần thông gió (quạt) và bảo hoà ẩm không khí phòng nuôi.

*Giai đoạn 3: kéo dài trong 10 - 20h và đặc trưng nhất vì tạo ra enzyme nhiều nhất. Cường độ trao đổi chất dần dần yếu đi, sự tỏa nhiệt giảm mạnh nên tốc độ bốc hơi nước của môi trường nuôi cấy cũng giảm theo. Quá trình nuôi cấy được chấm dứt khi nấm mốc đạt độ già chín sinh lý.

4.1.4.3. Giới thiệu chung về phương pháp nuôi cấy chìm:

Trong nuôi cấy theo phương pháp chìm, người ta thường sử dụng môi trường lỏng và được thực hiện trong những thùng lên men. Trong các thiết bị lên men, thường lắp đặt các hệ thống điều khiển cánh khuấy, hệ thống cung cấp oxy, hệ thống điều chỉnh pH và nồng độ các chất dinh dưỡng.

a) Tác dụng của hệ thống thổi khí:

Người ta thường cung cấp không khí vào bể lên men bằng máy nén khí (compressor). Không khí sau khi ra khỏi máy nén khí được làm nguội, làm sạch và khử trùng. Không khí được phân phối vào thiết bị lên men bằng các ống dẫn khí có nhiều lỗ nhỏ.

- Làm xáo trộn môi trường: nhờ trạng thái động này, khả năng tiếp xúc giữa cơ chất và tế bào VSV sẽ rất cao. Khả năng tiếp xúc này càng cao bao nhiêu thì khả năng sinh tổng hợp enzyme càng cao bấy nhiêu.

- Nhờ có máy nén khí hoạt động, không khí được cung cấp thường xuyên, oxy sẽ tan vào trong môi trường tốt hơn và VSV sẽ phát triển mạnh hơn (đối với VSV hiếu khí). Như vậy, đây là quá trình thúc đẩy VSV sinh sản và phát triển.

- Dòng khí được cung cấp và thải ra liên tục sẽ kéo theo những chất khí được tạo ra

trong quá trình phát triển của VSV. Những chất khí được tạo ra trong quá trình trao đổi chất này thường gây ức chế quá trình trao đổi chất, sinh sản và phát triển của VSV. Nhờ có dòng khí thổi vào môi trường sẽ hạn chế những ảnh hưởng xấu của các chất khí được tạo ra trong quá trình trao đổi chất.

b) Tác dụng của hệ thống khuấy trộn:

- Cánh khuấy làm xáo trộn môi trường nuôi cấy, làm các thành phần môi trường và tế bào VSV không bị lắng xuống, từ đó làm tăng khả năng tổng hợp enzyme.

- Trong lên men hiếu khí có thổi không khí, cánh khuấy hoạt động sẽ làm tăng khả năng hòa tan của oxy có trong không khí khi được thổi vào môi trường. Khi đó, các bọt khí bị vỡ nhỏ ra, tăng diện tích tiếp xúc với dung dịch. Thời gian tồn tại lâu của bọt khí sẽ làm tăng khả năng tan của oxy. VSV chỉ có thể đồng hóa oxy hòa tan chứ không có khả năng đồng hóa oxy ở dạng tự do.

- Cánh khuấy làm tăng nhanh quá trình sinh sản vô tính do tác động cơ học.

c) Quy trình công nghệ sản xuất enzyme bằng phương pháp nuôi cấy bề sâu (hình 4.12):

Phương pháp nuôi cấy bề sâu đòi hỏi phải được vô trùng tuyệt đối ở các khâu vệ sinh tổng hợp, thanh trùng thiết bị, thanh trùng môi trường dinh dưỡng, thao tác nuôi cấy, không khí cung cấp cho quá trình nuôi cấy .

Các giai đoạn của quá trình nuôi cấy chìm 1 bước (1pha) gồm: chuẩn bị môi trường nuôi cấy, nuôi cấy nấm mốc giống, nuôi cấy nấm mốc sản xuất.

+ Chuẩn bị môi trường nuôi cấy :

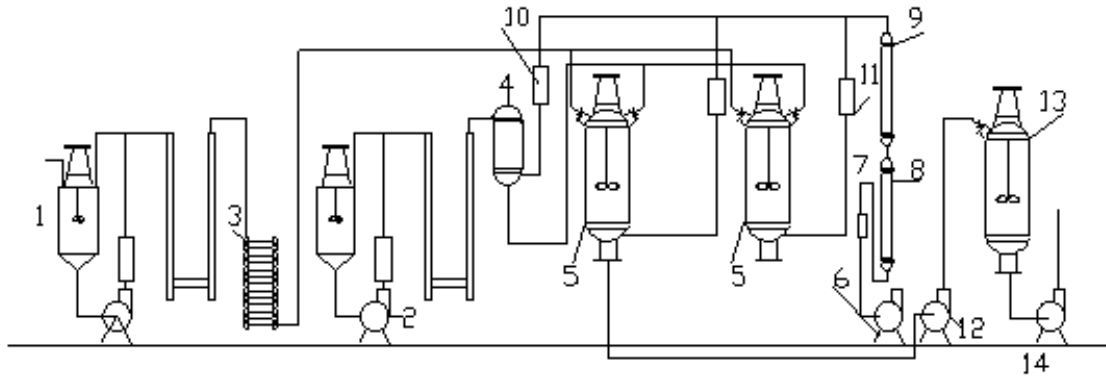
Sau khi đã phối trộn đúng tỉ lệ các thành phần sẽ được khuấy trộn kỹ rồi thanh trùng bằng hơi nhiệt (trực tiếp hay gián tiếp bằng nồi 2 vỏ), nhiệt độ 118-125°C, thời gian 15 - 60 phút, sau đó được làm nguội đến nhiệt độ 30°C thì tiến hành gieo cấy nấm mốc giống vào.

+ Nuôi cấy nấm mốc giống:

Được tiến hành qua 2 cấp độ (bước), phòng thí nghiệm và men giống trung gian.

- Ở cấp PTN được thực hiện trong các bình cầu, tiệt trùng môi trường làm nguội, cấy giống rồi nuôi trên máy lắc (150 – 200 lần/phút). Nấm mốc sử dụng O₂ không khí qua nút bông và quá trình lắc, thời gian nuôi 46 - 50h. Ở cấp phát triển giống trung gian người ta

chuyển nước giống PTN vào thiết bị nuôi đã chứa sẵn môi trường tiệt trùng và làm nguội. Nuôi cấy có sục khí vô trùng với lưu lượng $15 - 20\text{m}^3/\text{m}^3\text{h}$, thời gian 36 - 40h. Thử tích dịch men giống bằng 10% so với dịch men sản xuất về sau.



Hình 4.12: Sơ đồ sản xuất chế phẩm enzyme trên môi trường rắn theo phương pháp nuôi cấy bề mặt

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

+ Nuôi cấy nấm mốc sản xuất:

Trong quá trình nuôi cấy cần phải sục khí vô trùng và khuấy trộn, tiếp dầu phá bọt nếu có hiện tượng tạo bọt trào ra khỏi nồi lên men.

Thời gian nuôi 1 - 4 ngày tùy theo giống vi sinh vật.

Việc khống chế pH, chế độ sục khí và bảo đảm vô trùng là những yếu tố quan trọng quyết định hiệu quả quá trình. Trị số pH ban đầu của môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng nhất định đến sự tạo thành enzyme. Ví dụ: đối với enzyme α -amylase thì pH_{opt} của các loại vi khuẩn là 7, của các loại nấm mốc là 5, 6–5,7.

Nếu môi trường được bổ sung muối amoni của NH_4NO_3 thì khi NH_4^+ được vi sinh vật sử dụng sẽ chuyển môi trường về axit. Nếu sự axit hoá thụ động này có ảnh hưởng xấu đến sinh tổng hợp enzyme thì cần phải bổ sung CaCO_3 để trung hoà hoặc duy trì tự động pH_{opt} cho sinh tổng hợp.

Nếu sử dụng nguồn NaNO_3 thì khi vi sinh vật sử dụng NO_3^- , còn lại Na^+ sẽ kiềm hoá môi trường, lúc đó lại phải dùng axit để trung hoà.

d) Phương pháp nuôi cấy chìm 2 bước: (lên men 2 pha)

Vi sinh vật được nuôi trong thiết bị đầu tiên (giai đoạn đầu, bước đầu tiên, pha thứ nhất) để phát triển đến mức độ cần thiết, sau đó được chuyển sang thiết bị lên men tiếp theo (giai đoạn sau, bước thứ hai, pha thứ hai) có thành phần khác với thiết bị đầu để sinh tổng hợp enzyme.

Pha thứ nhất được gọi là pha sinh trưởng (trophophase), pha thứ hai được gọi là pha chế tạo enzyme (idiophase).

Điển hình cho phương pháp này xuất phát từ việc phát minh quá trình lên men chất kháng sinh streptomycin bởi xạ khuẩn *streptomyces griseus* vào năm 1944 bởi Schatz, Bugie và Waksman.

Nguồn glucit mà giống xạ khuẩn này đồng hoá được để sinh tổng hợp streptomycin là: glucose, tinh bột, dextrin, mantozơ, galactose, mannoza. Nguồn nitơ được sử dụng là protein của bột đậu nành, bột cá, men khô, bột hạt bông, gluten bột mì (nhóm xạ khuẩn sinh tổng hợp kháng sinh streptomycin nói chung đều có hoạt lực protease rất mạnh để thủy phân các protein nói trên thành các axit amin cần thiết). Nguồn nitơ vô cơ bao gồm các muối amoni, photpho hoà tan.

Bản thân quá trình lên men streptomycin là các quá trình lên men 2 pha điển hình. Pha sinh trưởng mạnh, bào tử nảy chồi và mọc thành sợi sau 6 - 8^h. Pha thứ 2, khuẩn ty phát triển và bắt đầu sinh tổng hợp kháng sinh. Trong quá trình này (ở pha thứ 2) đồng thời tạo thành một phức của mannoza với streptomycin gọi là manozilostreptomycin có hoạt tính kháng sinh kém hơn 6 lần so với streptomycin và có thể coi đây là tạp chất không mong muốn trong quá trình sinh tổng hợp. Tuy nhiên phức này dưới tác dụng của enzyme α -manozilostreptomycinase có tính D-manoza sẽ giải phóng streptomycin. Vào năm 1969, Inamine và các cộng sự đã nghiên cứu sản xuất enzyme α - manozilostreptomycinase theo phương pháp nuôi cấy chìm 2 bước như sau:

Pha thứ nhất: Tế bào *streptomyces griseus* được nuôi trong môi trường dinh dưỡng có khuấy trộn và sục khí trong 17^h ở nhiệt độ 28^oC để tạo nhiều bào tử. Sau đó bào tử được rửa sạch và chuyển sang thiết bị tiếp theo.

Pha thứ hai: Tiếp tục nuôi cấy để sinh tổng hợp enzyme α -

manozilostreptomixinaza trong 18 - 24^h. Lúc này tốc độ phát triển của vi khuẩn chậm lại, nhưng sự chuyển hoá phức chất manozidosteptomixin nhanh chóng diễn ra dưới tác dụng của enzyme thành kháng sinh streptomixin.

4.1.4.4. So sánh phương pháp nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme :

a) Phương pháp nuôi cấy bề mặt có những ưu nhược điểm sau:

+ Nồng độ enzyme tạo thành cao hơn nhiều lần so với dịch nuôi cấy chìm sau khi đã tách tế bào vi sinh vật. Trong công nghiệp rượu muốn đường hoá 100kg tinh bột chỉ cần 5kg chế phẩm nấm mốc bề mặt nhưng phải cần đến 100lít nấm mốc chìm đã lọc bã và tế bào vi sinh vật.

+ Chế phẩm dễ dàng sấy khô mà không làm giảm đáng kể hoạt tính enzyme, dễ bảo quản, vận chuyển, nghiền nhỏ hoặc sử dụng trực tiếp nếu không cần khâu tách và làm sạch enzyme.

+ Tốn ít năng lượng (điện, hơi nước, công nhân) thiết bị, dụng cụ nuôi cấy đơn giản, có thể thực hiện ở qui mô gia đình, trang trại cũng như ở qui mô lớn đến 20T/ngày.

+ Nuôi cấy trong điều kiện không cần vô trùng tuyệt đối và trong quá trình nuôi cấy nếu có nhiễm trùng phần nào, khu vực nào thì chỉ cần loại bỏ canh trường phần đó.

+ Tuy nhiên phương pháp bề mặt có năng suất thấp, khó cơ khí hoá, tự động hoá, cần diện tích nuôi lớn, chất lượng chế phẩm ở các mẻ không đồng đều.

b) Phương pháp nuôi cấy bề sâu có những ưu nhược điểm sau:

+ Phương pháp nuôi cấy hiện đại (công nghệ cao) dễ cơ khí hoá, tự động hoá, năng suất cao, dễ tổ chức sản xuất tiết kiệm diện tích sản xuất.

+ Có thể nuôi cấy dễ dàng các chủng vi sinh vật đột biến có khả năng sinh tổng hợp enzyme cao và lựa chọn tối ưu thành phần môi trường, các điều kiện nuôi cấy, enzyme thu được tinh khiết hơn, đảm bảo điều kiện vệ sinh, vô trùng.

+ Tuy nhiên do thu được canh trường có nồng độ enzyme thấp nên khi tách thu hồi enzyme sẽ có giá thành cao (có đặt trước). Tốn điện năng cho khuấy trộn, nếu không bảo đảm vô trùng sẽ bị nhiễm hàng loạt, toàn bộ gây tổn thất lớn.

c) Các thông số:

Các thông số vật lý:

- **Nhiệt độ:** Lượng nhiệt giải phóng ra bởi một thùng lên men có thể đạt đến 2.10^6 kcal/h. Do vậy phải làm nguội nhờ nước chảy thành dòng trong ống ruột gà của thùng lên men.

- **pH:** điều chỉnh liên tục bằng các điện cực nhạy và vô trùng, pH thường được duy trì bằng kiềm (NaOH, KOH, amoniac) hoặc bằng các axit vô cơ (H_2PO_4 , H_2SO_4).

- **Bọt:** Trong môi trường thường giàu protein nên khi khuấy và sục khí sẽ tạo ra nhiều bọt, có thể thêm hợp chất dẫn xuất của dầu thực vật và dẫn xuất silicon để phá bọt. Tuy nhiên các sản phẩm này thường có ảnh hưởng xấu đến sự vận chuyển O_2 , có thể gây độc đối với VSV. Do đó phải chọn chất đáp ứng được các tiêu chuẩn thực phẩm hiện hành.

- **Oxy:** là thông số khó làm chủ ở quy mô công nghiệp. Khó khăn là do các quá trình của hệ lên men tuân theo những quy luật có bản chất khác nhau (quá trình vật lý – chuyển khối, quá trình sinh lý, quá trình hỗn hợp).

Các thông số sinh lý:

- **Cân bằng năng lượng:** Một phần lớn năng lượng phát tán ra dưới dạng nhiệt được loại bỏ nhờ các thiết bị làm lạnh ở bên ngoài thùng lên men có dung tích lớn.

- **Áp suất CO_2 :** CO_2 có vai trò quan trọng trong phản ứng cacboxyl hóa và có vai trò dương tính đối với một số quá trình sinh tổng hợp enzyme (amylase của *B. subtilis*) nên nếu sục khí (hiếu khí) quá mạnh sẽ không có lợi.

- **Áp suất O_2 :** Tác dụng của O_2 khác nhau tùy theo ở giai đoạn sinh trưởng hay giai đoạn tổng hợp enzyme. Ví dụ: Giai đoạn sinh trưởng của *E. coli* và tổng hợp penicillinacylaza thì tỷ lệ oxy hòa tan cao sẽ thuận lợi cho sự sinh trưởng, nhưng lại bất lợi cho sự tổng hợp enzyme.

- **Cảm ứng và ức chế:** Trong một số quá trình sinh tổng hợp enzyme, người ta cần một chất cảm ứng, còn trong trường hợp khác người ta tránh sự có mặt của các chất ức chế (glucose hoặc axit amin) lúc đầu hoặc tránh sự xuất hiện của chúng trong quá trình lên men.

- **Khả năng trích ly:** Sự dư thừa các nucleotit sẽ làm tăng độ nhớt, giảm khả năng trích ly. Có thể làm giảm hàm lượng của nó trong tế bào bằng cách làm giảm tỷ lệ sinh trưởng.

4.1.5. Phương pháp thu nhận một số enzyme quan trọng từ VSV:

Trong công nghiệp sản xuất enzyme, tùy theo mục đích sử dụng người ta thường sản xuất các dạng chế phẩm khác nhau:

- Chế phẩm enzyme thô.
- Chế phẩm enzyme bán tinh khiết.
- Chế phẩm enzyme tinh khiết.
- Chế phẩm VSV có khả năng sinh tổng hợp enzyme mạnh.

Ba dạng chế phẩm đầu thường sử dụng vào những phản ứng các chế phẩm enzyme người ta quan tâm đến hoạt tính xúc tác và độ tinh sạch của enzyme. Dạng sản phẩm sau cùng, nhà sản xuất quan tâm đến hoạt tính sinh học và khả năng sinh sản, phát triển của VSV tạo ra enzyme đó.

4.1.5.1. Thu nhận enzyme protease từ VSV:

a) Đặc điểm nguồn thu nhận và tính chất của protease VSV:

Nhiều VSV có khả năng thu nhận protease như vi khuẩn (*Bac. Subtilispha, brevis, Cl. Sporogen...*), xạ khuẩn (*Str. Griseus, rimosus, fradiae*), nấm mốc (*Asperillus, Pennicillin, Mucor...*).

Bảng 4.2. Một số tính chất của protease.

Nhóm	Nguồn enzyme	Chất kim hãm	Đặc điểm trung tâm hoạt động	pH tối thích
Protease – serin	Bac. Subtilis, Str.griseus, Asp. Oryzae, E.coli	DFP+	Serin	Kiềm
Protease – thiol	Streptococcus	Iodoacetamid Ps.cloromer- curbenzoat	-SH	7,5 7,0
Protease kim loại	Bac. Subtilis Bac. megaterium Asp. Oryzae Clotridiumhistol yticum	EDTA++ 1,1octa- fenantrolin	Kim loại hóa trị 2	Trung tính
Protease acid	Asp. Niger Asp. Awamori Rhizopus chinensis Mucor pusillus	Diazoaxetil Di norlox- inmetil ester	-COOH	acid

Dựa vào cơ chế phản ứng và pH hoạt động thích hợp có thể chia thành 4 nhóm protease VSV: Protease – serin, protease – thiol, protease- kim loại, protease- acid. Các protease – serin và protease thiol có khả năng phân giải liên kết ester và amid của các dẫn xuất acid của aminoacid. Ngược lại, các protease kim loại và protease acid thì không có hoạt tính này. Có thể tóm tắt đặc tính của các nhóm protease này theo bảng 4.2.

Năm 1975, Morihara đã thử phân loại các protease VSV được chia thành bốn nhóm lớn, dựa vào tính đặc hiệu của nó đối với cơ chất tổng hợp hoặc đối với chuỗi β -insulin đã bị oxy hóa. Nhóm 1 có tính đặc hiệu với các gốc aminoacid ở về phía nhóm $-\text{CO}_2$ của liên kết peptit nên còn gọi cacboxylendopeptidase. Nhóm 3 có tính đặc hiệu với các gốc aminoacid ở về phía nhóm $-\text{NH}$ của liên kết peptit nên còn gọi aminoendopeptidase. Nhóm 4 có tính đặc hiệu với các gốc aminoacid ở cả hai phía của liên kết peptit. Mỗi nhóm này được phân thành các nhóm nhỏ cũng dựa vào tính đặc hiệu của chúng và một số tính chất khác.

b) Trung tâm hoạt động:

Trong trung tâm hoạt động của protease ngoài gốc aminoacid đặc trưng cho từng nhóm còn có một số gốc aminoacid khác. Các kết quả nghiên cứu về cấu trúc không gian trung tâm hoạt động của một số protease VSV cho phép rút ra một số nhận xét chung:

- Trung tâm hoạt động của các protease VSV đủ lớn và bao gồm một số gốc aminoacid và trong một số trường hợp còn có cả cofacto kim loại.

Ví dụ: trung tâm hoạt động của thermolysin được tạo thành nhờ các gốc aminoacid ở giữa chuỗi polypeptit, tạo thành một rãnh sâu ở giữa phân tử và nguyên tử Zn nằm ở đáy của rãnh này.

- Đối với các protease không chứa cystein, trung tâm hoạt động của nó có tính mềm dẻo hơn vì cấu trúc không gian của chúng không được giữ vững bởi các cầu disulphide.

Mặc dù, trung tâm hoạt động của các enzyme có khác nhau nhưng các enzyme này đều xúc tác thủy phân liên kết peptit theo cùng một cơ chế chung.

c) Các phương pháp thu nhận enzyme protease:

- Nuôi cấy bằng phương pháp bề mặt:

Môi trường thường dùng là cám, có pH từ 5,6-6,2 (đối với nấm sợi) hoặc từ 6,2-7,2

(đối với vi khuẩn) cho vào các khay lớn để nuôi cấy. Thời gian nuôi cấy thay đổi tùy vào VSV do đó mỗi loại VSV cần lựa chọn thời gian thích hợp nhất (thời gian mà lượng enzyme trong môi trường là lớn nhất). Sau đó, dùng nước hoặc dung dịch để chiết rút enzyme ra khỏi môi trường, loại bỏ những phần không hòa tan, kết tủa enzyme bằng muối vô cơ hay dung môi hữu cơ.

- *Nuôi cấy bằng phương pháp bề sâu:*

Chuẩn bị môi trường thích hợp ngay trong thùng lên men và khử trùng. Sau khi làm lạnh, cấy VSV vào tỷ lệ 1-10%. Sau thời gian nuôi cấy, tiến hành kiểm tra hoạt độ enzyme của môi trường nuôi cấy. Khi hoạt độ đã đạt đến hoạt độ cực đại cần nhanh chóng tách enzyme ra khỏi tế bào VSV bằng cách ly tâm hoặc lọc.

Khi dùng phương pháp bề sâu, muốn có kết quả tốt cần xác định cho được lượng oxy cần thiết trong thời gian sinh trưởng của mỗi loài VSV. Thể tích thùng lên men càng lớn càng khó không chế yếu tố này. Đặc biệt là cấy trực tiếp vi khuẩn vào thùng lên men (không thông qua giai đoạn nuôi cấy trung gian) sẽ đảm bảo môi trường không bị nhiễm.

- *Thu nhận enzyme protease:*

Để tách enzyme từ môi trường nuôi cấy VSV theo phương pháp bề mặt, cho canh trường sau khi nuôi cấy vào dung dịch đệm, dung dịch muối loãng hoặc nước theo tỷ lệ thích hợp, khuấy đều và lắc trên máy lắc trong một thời gian nhất định, lọc hay ly tâm thu lấy dịch trong. Trong sản xuất thường dùng nước máy để chiết rút với thể tích gấp hai lần thể tích môi trường, tiến hành chiết rút trong 1h.

Theo phương pháp bề sâu, cần làm lắng tế bào VSV hoặc ly tâm để tách sinh khối khỏi dung dịch enzyme (nên lọc hơn vì ly tâm thường làm giảm đáng kể hoạt tính enzyme).

4.1.5.2. Thu nhận enzyme amylase từ VSV:

Các enzyme amylase có trong nước bọt, dịch tiêu hóa của người và động vật, trong hạt nảy mầm, nấm sợi, xạ khuẩn, nấm men và vi khuẩn. Ngày nay, người ta thu chúng chủ yếu từ canh trường vi khuẩn, nấm sợi và một số loại nấm men.

Theo tính chất và cơ chế tác dụng lên tinh bột của amylase, người ta phân biệt amylase ra các loại sau: α - amylase, β – amylase, β – gluco – amylase, oligo-1,6-glucozidase...

a) Nguồn enzyme amylase từ VSV:

Thực vật và VSV là đối tượng chủ yếu dùng làm nguồn thu các chế phẩm enzyme chủ đạo để thu các chế phẩm enzyme amylase, do chúng có khả năng tích lũy một lượng lớn enzyme này trong điều kiện xác định. Ngày nay do ưu thế về nhiều mặt, VSV trở thành nguồn thu enzyme chủ yếu.

Để thu amylase, người ta thường dùng các giống nấm sợi như *Aspergillus*, *Rhizopus*... hoặc nấm men và giả nấm men thuộc các giống *Candida*, *Saccaromyces*, *Endomycopsis*, *Endomyces*...

Nhiều loại vi khuẩn có khả năng tạo lượng lớn amylase như *Baccillus Polymysa*, *Bacterium cassavanum*, *Clotridium acetobutylicum*, *Pseudomonas saccharophia*... Các vi khuẩn ưa nhiệt có khả năng sinh trưởng nhanh và phát triển tốt ở nhiệt độ tương đối cao, nên khi nuôi chúng ở nhiệt độ cao ít bị tạp nhiễm. Những vi khuẩn ưa nhiệt đáng chú ý là *Bac. Diastaticus*, *Bac. stearothermophilus*, *Bac. Coagulans*, *Bac. circulans*, trong đó *Bac. circulans* được phân lập từ đất sinh trưởng tốt ở 65-70⁰C và tạo amylase tốt nhất ở 50⁰C. Trong số vi khuẩn ưa ấm, *Bac. subtilis* với nhiệt độ sinh trưởng tối thích là 37⁰C được nghiên cứu nhiều nhất.

Trong nhóm xạ khuẩn rất hiếm gặp loài tạo amylase mạnh mẽ, tuy nhiên cũng có một số như là loại xạ khuẩn ưa nhiệt *Micromonospora vulgaris* 42 có khả năng tạo một lượng nhỏ α - amylase hoạt động ở 65⁰C cùng với protease và các loại enzyme khác.

Trong công nghiệp các biến chủng được sử dụng rộng rãi để thu chế phẩm amylase. Đáng chú ý hơn cả là *Asp. Niger S*, *Asp. Niger S-4*, *Asp. Niger S-4-10*...

Phức hệ enzyme có nguồn gốc khác nhau đều có những đặc điểm riêng. Canh trường của nấm sợi *Aspergillus* thường có hệ enzyme sau: α - amylase, glucoamylase, glucoziltransferase. Trong canh trường của vi khuẩn thường không tạo thành một phức hệ enzyme amylase như là ở hệ nấm sợi mà chỉ có một α - amylase.

b) Thu nhận enzyme amylase từ VSV:

Sinh trưởng và sinh tổng hợp của enzyme amylase từ VSV:

Khi nuôi VSV tạo amylase có hai quá trình liên quan mật thiết với nhau. Quá trình tổng hợp sinh khối VSV và quá trình tích tụ enzyme trong tế bào hay ngoài môi trường.

Ở một số VSV, quá trình tổng hợp amylase tiến hành song song với quá trình sinh trưởng. Tuy nhiên theo ý kiến của nhiều tác giả, sự tạo thành amylase cực đại thường xảy ra sau khi quần thể tế bào đạt điểm sinh trưởng. Trong trường hợp này sinh trưởng của VSV hầu như không kèm theo sự tích lũy enzyme amylase trong canh trường, chỉ sau khi kết thúc pha sinh trưởng mới xảy ra sự tổng hợp enzyme cực lớn.

Theo lý thuyết hiện đại giữa vận tốc sinh trưởng riêng của VSV và vận tốc sinh trưởng tổng hợp enzyme có mối tương quan phụ thuộc:

- Kiểu phụ thuộc thứ nhất: Vận tốc sinh trưởng của VSV hoàn toàn phù hợp chính xác với vận tốc sinh tổng hợp enzyme.

- Kiểu phụ thuộc thứ hai: Ngoài sự tổng hợp enzyme trong giai đoạn sinh trưởng, còn có “sự tổng hợp enzyme với thêm” không liên quan tỷ lệ thuận với sinh trưởng của VSV. Sự tạo thêm enzyme này được thực hiện bằng các tế bào đang chuyển sang quá trình tự phân và phụ thuộc vào độ bền vững của RNA_t. Như vậy khả năng không trùng khớp của các giai đoạn sinh trưởng với giai đoạn sinh tổng hợp enzyme được xác định bằng sự bền của RNA_t.

Các yếu tố ảnh hưởng của môi trường đến sinh tổng hợp enzyme amylase:

- *Ảnh hưởng của nguồn Nito dinh dưỡng*: cho nguồn nito nhất định (nito vô cơ hoặc hữu cơ) vào môi trường có thể kích thích tổng hợp amylase này và ức chế tổng hợp amylase khác.

+ Sự tạo glucoamylase cũng như α -amylase cực đại thường thấy ở các nồng độ nito cao (0,25 – 0,4%). Nhiều nguồn nito hữu cơ (gelatin, casein, nước chiết ngô) đảm bảo cho *Asp. Awamori* sinh trưởng tốt nhưng không tăng cường tổng hợp amylase.

+ Tỷ lượng giữa cacbon và nito trong môi trường ảnh hưởng rất mạnh tới quá trình tích lũy enzyme. Tỷ lượng tối ưu của cacbon và nito cho sinh tổng hợp enzyme amylase là 10: 1 – 40:1. Ví dụ trong môi trường zapeck, tỷ lượng giữa tinh bột và NaNO₃ tối ưu cho sinh tổng hợp enzyme amylase là 18: 1.

- *Ảnh hưởng của aminoacid*: Aminoacid là những cấu tử hợp thành phân tử enzyme. Mặt khác các aminoacid lại không đồng nhất về giá trị dinh dưỡng nên sử dụng hỗn hợp aminoacid sẽ có giá trị lớn hơn và những chất lượng mới. Aminoacid có ảnh hưởng tốt tới

sinh lý của VSV cũng như sinh tổng hợp enzyme amylase do những nguyên nhân sau:

+ Aminoacid vừa là nguồn cacbon, nguồn nitơ và là nguồn năng lượng. Nhiều VSV có thể đồng hóa trực tiếp aminoacid.

+ Một số aminoacid riêng lẻ (gutamic acid, aspartic acid...) đóng vai trò vô cùng quan trọng trong trao đổi aminoacid, cụ thể là sinh tổng hợp nhiều aminoacid khác và trong quá trình chuyển amine.

- *Ảnh hưởng của nguồn khoáng dinh dưỡng:* các nguyên tố đa lượng và vi lượng có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và tổng hợp của enzyme.

+ Mg^{2+} có ảnh hưởng đến độ bền nhiệt của enzyme. Thiếu $MgSO_4$ sẽ có ảnh hưởng xấu đến sự tổng hợp mọi amylase bởi nấm sợi. Khi đó, sự tổng hợp amylase bị ức chế hoàn toàn, còn lượng gluco amylase giảm xuống hàng chục lần. Nồng độ tối ưu của nó trong quá trình sinh tổng hợp amylase là 0,05%.

+ Phospho cần để tổng hợp các hợp phân quan trọng của sinh chất (nucleic phospholipide acid) và nhiều coenzyme (adenosine-phosphat, thiamine), đồng thời để phosphoryl hóa glucide trong quá trình oxy hóa sinh học. Phospho ảnh hưởng trực tiếp tới sinh sản của nấm sợi và các VSV khác, do vậy tăng cường tổng hợp các enzyme amylase.

+ Ca^{2+} cần cho tổng hợp và ổn định α - amylase hoạt động vì nó là cấu tử không thể thiếu của enzyme này, ngoài ra còn có tác dụng bảo vệ amylase tránh khỏi tác động của protease.

- *Ảnh hưởng của pH nguyên liệu:*

Đối với nuôi cấy bằng phương pháp bề mặt, pH ảnh hưởng ít do môi trường có dung lượng đệm cao và hàm ẩm thấp. Tuy nhiên, pH ban đầu của môi trường có ảnh hưởng không nhỏ tới sự phát triển của nấm mốc và sự tạo enzyme.

Nếu dùng nước máy để làm ẩm cám thì pH môi trường là 5-6. Nếu dùng HCl, H_2SO_4 và acid lactic thì pH môi trường là 4,5-5 tạo điều kiện chọn lọc cho nấm mốc phát triển vì nấm mốc phát triển tốt trong môi trường acid yếu còn vi khuẩn hầu như không phát triển trong điều kiện này.

c) *Các phương pháp thu nhận enzyme amylase:*

Muốn thu được các enzyme amylase với hiệu suất cao cần phải tiến hành, phân lập

và chọn giống VSV để tuyển lấy những chủng hoạt động mạnh, đồng thời phải tiến hành lựa chọn cơ chất cảm ứng và thành phần môi trường thích hợp cũng như tiêu chuẩn hóa các điều kiện nuôi. Như vậy, sự tổng hợp enzyme amylase không chỉ phụ thuộc vào các tính chất di truyền của VSV mà còn phụ thuộc vào việc tuyển chọn các điều kiện nuôi đặc hiệu.

Trong số những yếu tố có ảnh hưởng lớn đến sinh tổng hợp các enzyme amylase trong quá trình nuôi cấy, thành phần môi trường, tính chất cơ lý của môi trường, độ tiết trùng, độ ẩm ban đầu, độ thoáng khí, nhiệt độ nuôi, pH môi trường là những yếu tố cơ bản rất quan trọng.

Thành phần chính của môi trường VSV tạo amylase bằng phương pháp bề mặt là cám mì, cám gạo. Đây là nguyên liệu hoàn hảo và có thể là thành phần duy nhất của môi trường để nuôi cấy VSV mà không cần bổ sung thêm các chất khác.

Chất lượng của cám gạo, cám mì có ảnh hưởng lớn đến hoạt lực của enzyme amylase. Cám không được chứa tinh bột dưới 20-30%. Nên dùng cám mới, cám tốt không có dư vị chua hay đắng, không hôi mùi mốc.

Các thành phần bổ sung là chất làm xốp, chất sinh trưởng như trấu, mùn cưa, mầm mạch... Cám và các chất phụ gia chứa nhiều bào tử VSV nên cần phải thanh trùng (120°C trong 90 phút) để đảm bảo chủng nuôi phát triển bình thường và canh trường sản xuất không chứa VSV ngoại lai.

Độ ẩm tối thích của môi trường là 58-60% và phải giữ cho môi trường có độ ẩm đó trong suốt quá trình nuôi. Độ ẩm cao quá (55-70%) sẽ làm giảm độ thoáng khí, còn thấp hơn (50-55%) sẽ kìm hãm sự sinh trưởng và phát triển của VSV. Trong điều kiện tiết trùng tốt (môi trường bình tam giác, trong tủ ẩm phòng thí nghiệm) hoạt lực enzyme cao nhất thu được ở độ ẩm 65-68%. Cần nhớ rằng khi nuôi trong điều kiện không được vô trùng tuyệt đối, thì độ ẩm của môi trường sau khi cấy giống không được vượt quá 60%, vì cao hơn nữa sẽ bị nhiễm khuẩn. Tuy vậy, việc giữ độ ẩm cao trong suốt quá trình sinh trưởng của nấm sợi có ý nghĩa to lớn hơn đối với sự tạo thành enzyme.

Nhiệt độ nuôi: toàn bộ chu kỳ sinh trưởng của nấm mốc có thể chia thành 3 thời kỳ:

- Thời kỳ trương và nảy mầm của bào tử: giữ nhiệt độ phòng nuôi từ 23-30°C đối với nấm mốc và 32-38°C đối với vi khuẩn.

- Thời kỳ sinh trưởng nhanh cuat hệ sợi: nấm mốc sinh trưởng mạnh, tạo ra lượng nhiệt sinh lý lớn nên cần phải hạ nhiệt độ phòng nuôi để sợi nấm mọc đều và đẹp.

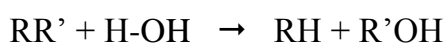
- Thời kỳ tạo amylase mạnh mẽ: quá trình trao đổi chất yếu dần đi, sự tỏa nhiệt giảm mạnh, các enzyme amylase được tổng hợp mạnh mẽ. Nhiệt độ hạ xuống 3-4⁰C so với giai đoạn đầu. Nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng của đa số nấm mốc trên môi trường rắn là 28-30⁰C, cho *Bac. subtilis* là 35-37⁰C.

Thời gian nuôi để có lượng enzyme tối ưu thường được xác định bằng thực nghiệm. Ví dụ, trong điều kiện sản xuất thoáng khí tốt thì thời gian để có thể tích lũy enzyme cực đại đối với nấm sợi và vi khuẩn như sau: *Aspergillus oryzae* 476 (24-25h), *Asp. Oryzae* – KC (30-36h), *Bac. subtilis* (68-72h)

4.2. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME AMYLASE

4.2.1. Giới thiệu về enzyme amylase

Amylase là một hệ enzyme rất phổ biến trong thế giới sinh vật. Các enzyme này thuộc nhóm enzyme thủy phân, xúc tác phân giải liên kết nội phân tử trong nhóm polysaccharide với sự tham gia của nước:



Có 6 loại enzyme được xếp vào 2 nhóm: Endoamylase (enzyme nội bào) và exoamylase (enzyme ngoại bào).

Endoamylase gồm có α -amylase và nhóm enzyme khử nhánh. Nhóm enzyme khử nhánh này được chia thành 2 loại: Khử trực tiếp là Pullulanase (hay α -dextrin 6 – glucosidase), khử gián tiếp là Transglucosylase (hay oligo-1,6-glucosidase) và maylo-1,6-glucosidase. Các enzyme này thủy phân các liên kết bên trong của chuỗi polysaccharide.

Exoamylase gồm có β -amylase và γ -amylase. Đây là những enzyme thủy phân tinh bột từ đầu không khử của chuỗi polysaccharide.

Amylase rất thông dụng, được dùng nhiều trong công nghiệp thực phẩm. Chế phẩm amylase kỹ thuật và tinh khiết có thể sản xuất từ những hạt ngũ cốc nảy mầm (thóc, ngô, đại mạch, tiểu mạch, lúa mì...) và từ quá trình nuôi cấy vi sinh vật.

Chế phẩm amylase thu được từ phương pháp nuôi cấy vi sinh vật hầu hết được tổng hợp bởi nấm mốc, vi khuẩn và một số ít từ nấm men.

+ *Ứng dụng amylase trong sản xuất bia:*

Người ta sử dụng enzyme amylase tổng hợp để thay thế cho enzyme amylase có trong malt đại mạch.

+ *Ứng dụng amylase trong sản xuất cồn :*

Giai đoạn đường hóa trong sản xuất cồn, người ta bắt buộc phải sử dụng enzym amylase để thủy phân tinh bột (không thể sử dụng phương pháp thủy phân tinh bột bằng acid).

+ *Ứng dụng amylase trong chế biến thực phẩm gia súc:*

Trong chế biến thức ăn gia súc, thành phần ngũ cốc chiếm một khối lượng rất lớn. Trong khối lượng này, thành phần tinh bột rất cao. Để tăng hiệu suất sử dụng năng lượng từ nguồn tinh bột, người ta thường cho thêm enzym amylase vào. Enzym amylase sẽ tham gia phân giải tinh bột tạo thành đường, giúp cho quá trình chuyển hóa tinh bột tốt hơn.

+ *Ứng dụng enzym amylase trong công nghiệp dệt:*

Trong công nghiệp dệt, người ta thường sử dụng enzym amylase của vi khuẩn để tẩy tinh bột và làm cho vải mềm. Trong vải thô thường chứa khoảng 5% tinh bột và các tạp chất khác. Do đó, khi sử dụng chế phẩm enzym amylase của vi khuẩn vải sẽ tốt hơn. Người ta thường sử dụng lượng chế phẩm amylase khoảng 0,3-0,6 g/l dung dịch và thời gian xử lý 5-15 phút ở nhiệt độ 90⁰C. Các nước sử dụng lượng enzym amylase nhiều nhất trong lĩnh vực này là Mỹ, Nhật, Pháp, Đan Mạch.

+ *Ngoài ra*, enzyme amylase cũng được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi trong sản xuất đường bột, sản xuất dextrin, maltodextrin, nha glucose, siro, glucose – fructose, sản xuất tương và nước chấm ... ở quy mô công nghiệp.

4.2.2. Công nghệ sản xuất enzyme amylase trên môi trường rắn xốp

4.2.2.1. Nguyên liệu tạo môi trường nuôi cấy.

+ Nguyên liệu sử dụng trong nuôi cấy bề mặt thường là những nguyên liệu có nguồn gốc tự nhiên như cám mì, cám gạo, gạo, ngô mảnh, đậu nành và các loại hạt ngũ cốc khác. Trong các loại nguyên liệu trên, cám gạo, cám mì được sử dụng nhiều hơn cả. Hai loại này có đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho VSV phát triển. Mặt khác khi tạo môi trường, chúng thường có tính chất vật lý rất thích hợp để vừa đảm bảo khối kết dính cần

thiết, vừa đảm bảo lượng không khí lưu chuyển trong khối nguyên liệu.

+ Nguyên liệu sử dụng trong nuôi cấy bề sâu (Sử dụng môi trường hoàn toàn lỏng): Nguyên liệu nuôi cấy phổ biến là dịch đường như gluco, fructo, saccaro, nước chiết bắp, pepton,... nồng độ thích hợp khoảng 10 - 15%.

4.2.2.2. Giống vi sinh vật dùng trong sản xuất amylase.

+ Chủng nấm mốc *Asp. Oryzae*, *Asp. Niger*...

+ Các loại vi khuẩn là *Bacillus Subtilis*, *Bac. Mensentericus*...

4.2.2.3. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: trong quá trình chuẩn bị môi trường, điều quan trọng nhất là tạo được độ ẩm thích hợp. độ ẩm thích hợp cho nhiều vi sinh vật nuôi cấy trong môi trường cám là 60% W. Độ ẩm vượt quá 60% thường tạo điều kiện cho nhiều vi khuẩn phát triển, khi đó dễ xảy ra nhiễm vi sinh vật lạ. Nếu độ ẩm bé hơn 60 % W (thường 45-50% W) thường gây hiện tượng tạo nhiều bào tử ở nấm sợi, và như vậy hoạt tính enzyme sẽ giảm rất mạnh.

Trường hợp cần tạo giống trung gian, ta nên tạo độ ẩm môi trường khoảng 45-50% W. Trong suốt quá trình nuôi cấy để thu nhận enzyme, ta cần duy trì độ ẩm thích hợp khoảng 50 – 60% W và độ ẩm trong không khí là 95 – 100% W.

Sau khi chuẩn bị xong môi trường, ta tiến hành thanh trùng môi trường để tiêu diệt những vi sinh vật nhiễm vào môi trường mà có thể ức chế sự phát triển của giống vi sinh vật mà ta quan tâm. Người ta thường thanh trùng bằng hơi nước nóng ở 1 – 1,5 at trong thời gian 45 – 60 phút. Để thuận lợi cho việc thanh trùng có hiệu quả cũng như tạo điều kiện thích hợp cho sợi nấm phát triển, trước khi thanh trùng, người ta thường dùng acid clohydric hay acid sunfuric để điều chỉnh pH của môi trường.

Sau khi thanh trùng môi trường xong người ta bắt đầu nuôi cấy để thu nhận enzyme.

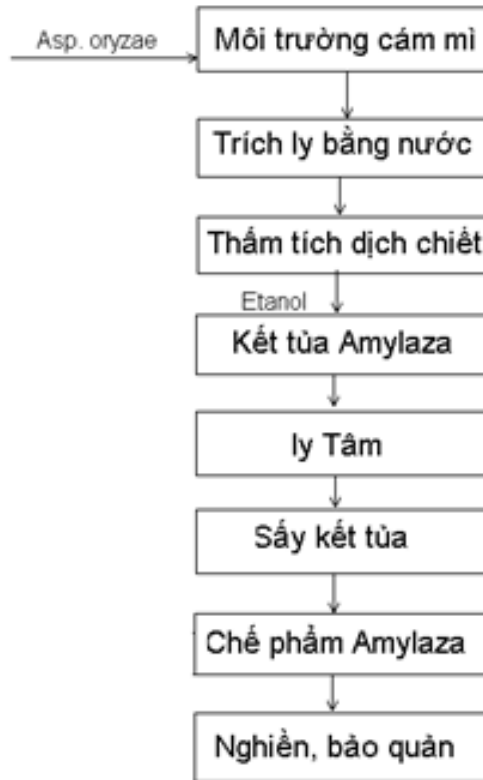
4.2.2.4. Sơ đồ qui trình công nghệ

4.2.2.5. Thuyết minh qui trình:

Từ môi trường nuôi cấy bề mặt, chủng nấm mốc *Asp. Oryzae* được nuôi cấy trên cám mì, sau đó enzyme được trích ly bằng nước và thẩm tích dịch chiết, dùng etanol để kết tủa amylaza, tiếp tục ly tâm và sấy kết tủa sẽ thu được chế phẩm và có thể nghiền nhỏ đem

sử dụng dần. Etanol dùng để kết tủa có nồng độ 65 – 70% hoặc có thể dùng aceton 60% và giữ pH ở 5,5 – 5,6 bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (600g/lít).

Quá trình phát triển của nấm mốc trong môi trường bán rắn khi nuôi bằng phương pháp bề mặt này trải qua các giai đoạn sau:



Hình 4.13: Sơ đồ quy trình sản xuất amylase bằng phương pháp nuôi cấy VSV trên môi trường rắn xốp

a) Giai đoạn 1:

Giai đoạn này kéo dài 10-14 giờ kể từ thời gian bắt đầu nuôi cấy. Ở giai đoạn này có những thay đổi sau:

- Nhiệt độ tăng rất chậm.
- Sợi nấm bắt đầu hình thành và có màu trắng hoặc màu sữa.
- Thành phần dinh dưỡng bắt đầu có sự thay đổi.
- Khôi môi trường còn rời rạc.
- Enzyme mới bắt đầu được hình thành.

Trong giai đoạn này phải đặc biệt quan tâm đến chế độ nhiệt độ. Tuyệt đối không

được đưa nhiệt độ cao quá 30 °C vì thời kỳ đầu này giống rất mẫn cảm với nhiệt độ.

b) Giai đoạn 2:

Giai đoạn này kéo dài 14-18 giờ. Trong giai đoạn này có những thay đổi cơ bản sau:

- Toàn bộ bào tử đã phát triển thành sợi nấm và sợi nấm bắt đầu phát triển rất mạnh các sợi nấm này tạo ra những mạng sợi chằng chịt khắp trong các hạt môi trường, trong lòng môi trường.

- Trong giai đoạn này ta có thể hoàn toàn nhìn rõ các sợi nấm có màu trắng xám bằng mắt thường.

- Môi trường được kết lại khá chặt.

- Độ ẩm môi trường giảm dần

- Nhiệt độ môi trường sẽ tăng nhanh có thể lên tới 40-45 °C.

- Các chất dinh dưỡng bắt đầu giảm nhanh do sự đồng hoá mạnh của nấm sợi.

- Enzyme amylase được tổng hợp mạnh.

- Lượng O₂ trong không khí giảm và CO₂ sẽ tăng dần, do đó trong giai đoạn này cần phải được thông khí mạnh và nhiệt độ cố gắng duy trì trong khoảng 29-30°C là tốt nhất.

c) Giai đoạn 3:

Giai đoạn này kéo dài 10-20 giờ. Ở giai đoạn này có một số thay đổi cơ bản như sau:

- Quá trình trao đổi chất yếu dần, do đó mức độ giảm chất dinh dưỡng sẽ chậm lại.

- Nhiệt độ của khối môi trường giảm, do đó làm giảm lượng không khí môi trường xuống 20-25 thể tích không khí /thể tích phòng nuôi cấy/ 1giờ. Nhiệt độ nuôi duy trì ở 30°C, trong giai đoạn này, bào tử được hình thành nhiều do đó lượng enzym amylase tạo ra sẽ giảm xuống. Chính vì thế việc xác định thời điểm cần thiết để thu nhận enzym rất cần thiết.

d) Thu nhận sản phẩm:

Kết thúc quá trình nuôi cấy ta thu nhận được chế phẩm enzym amylase, chế phẩm này được gọi là chế phẩm enzym thô (vì ngoài thành phần enzym ra, chúng còn chứa sinh khối VSV, thành phần môi trường và nước trong môi trường).

Để đảm bảo cho chế phẩm enzym thô α -amylase không bị mất hoạt tính nhanh người ta thường sấy khô chế phẩm enzym đến một độ ẩm thấp (thiết bị sấy thường dùng ở

đây là máy sấy chân không). Độ ẩm cần đạt được sau khi quá trình sấy kết thúc là nhỏ hơn 10% độ ẩm. Để đảm bảo hoạt tính enzym không thay đổi người ta thường sấy ở nhiệt độ 38-40°C. Enzym α -amylase ở nấm mốc *Asp.oryzae* sẽ bị bất hoạt nếu nhiệt độ lên đến 60-70°C.

Tùy theo mục đích sử dụng ta có thể dùng chế phẩm thô này ngay không cần phải quá trình tinh sạch. Trong những trường hợp cần thiết khác, ta phải tiến hành làm sạch enzyme.

Để sản xuất enzym tinh khiết người ta phải tiến hành như sau:

- Toàn bộ khối lượng enzym thô amylase được đem đi nghiền nhỏ. Mục đích của quá trình nghiền là vừa phá vỡ thành tế bào vừa làm nhỏ các thành phần của chế phẩm thô. Khi thành tế bào được phá vỡ, các enzym nội bào chưa thoát ra khỏi tế bào sẽ dễ dàng thoát khỏi tế bào. Phần lớn enzym amylase ngoại bào khi được tổng hợp và thoát khỏi tế bào ngay lập tức thấm vào thành phần môi trường. Khi ta nghiền nhỏ, enzym thoát ra khỏi các thành phần này dễ dàng hơn.

- Trong khi nghiền người ta thường sử dụng những chất trợ nghiền trong trường hợp này được dùng là cát thạch anh và bột thủy tinh. Các chất này là những chất vô cơ không tham gia vào phản ứng và khả năng tăng mức độ ma sát, trước khi sử dụng cát thạch anh và bột thủy tinh phải được rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ lớn hơn 100°C để loại bỏ nước và tiêu diệt VSV.

- Trích ly: Sau khi nghiền mịn, người ta cho nước vào để trích ly enzym α -amylase. Các loại enzyme thủy phân có khả năng tan trong nước nên người ta thường dùng nước như một dung môi hòa tan. Cứ một phần chế phẩm enzym thô, người ta cho 4-5 phần nước, khuấy nhẹ và sau đó lọc lấy dịch, phần bã thu riêng dùng làm thực phẩm gia súc (chú ý cần loại bỏ cát thạch anh và bột thủy tinh ra khỏi hỗn hợp bã rồi mới cho gia súc ăn). Dịch thu nhận được vẫn ở dạng chế phẩm enzym thô vì trong đó có chứa nước, các chất hòa tan khác từ khối môi trường nuôi cấy. Việc tiếp theo là làm sao tách enzym ra khỏi vật chất này.

- Quá trình kết tủa enzym α -amylase: Để làm việc trên người ta tiến hành kết tủa enzym nhờ những tác nhân gây tủa. Trong công nghệ tinh chế enzym, người ta thường dùng

cồn và sunfat amon. Hai tác nhân kết tủa này dễ tìm kiếm và giá rẻ so với những tác nhân gây tủa khác.

Trong khi tiến hành kết tủa, người ta phải làm lạnh cả dung dịch enzym thô và cả những tác nhân kết tủa để tránh làm mất hoạt tính enzym. Khi đổ chất làm kết tủa enzym vào dung dịch enzym thô phải hết sức từ từ để tránh hiện tượng biến tính. Trong quá trình kết tủa người ta dùng cồn hoặc sunfat amon với liều lượng như sau: Cứ một phần dung dịch enzym thô người ta cho 2 đến 2,5 lần cồn hoặc sunfat amon.

- Khi cho chất kết tủa vào dung dịch enzym thô, người ta tiến hành khuấy nhẹ, sau đó để yên trong điều kiện nhiệt độ lạnh (thường từ 4-7⁰C) theo thời gian, các enzym sẽ được tạo kết tủa và lắng xuống đáy, người ta tiến hành gạn và lọc thu nhận kết tủa ở dạng paste (độ ẩm lớn hơn 70%W).

- Ở trạng thái này enzym rất dễ bị biến tính vì còn nhiều nước để dễ bảo quản người ta sấy kết tủa enzym α -amylase ở 40⁰C cho đến khi độ ẩm cuối cùng đạt 5-8% W (thiết bị sấy thường dùng là máy sấy phun sương).

- Trong nhiều trường hợp chế phẩm enzym α -amylase ở dạng kết tủa vẫn hoàn toàn chưa sạch về mặt hóa học vì trong đó còn chứa 1 số enzym ngoài enzym amylase ta quan tâm, chẳng hạn enzyme α - amylase này còn chứa hoạt tính protease có tính acid và cellulose do đó muốn thu nhận được enzym có độ tinh khiết cao hơn ta phải tinh chế enzym α -amylase kết tủa bằng các quá trình lọc Gel hay sử dụng phương pháp cố định enzyme ,...

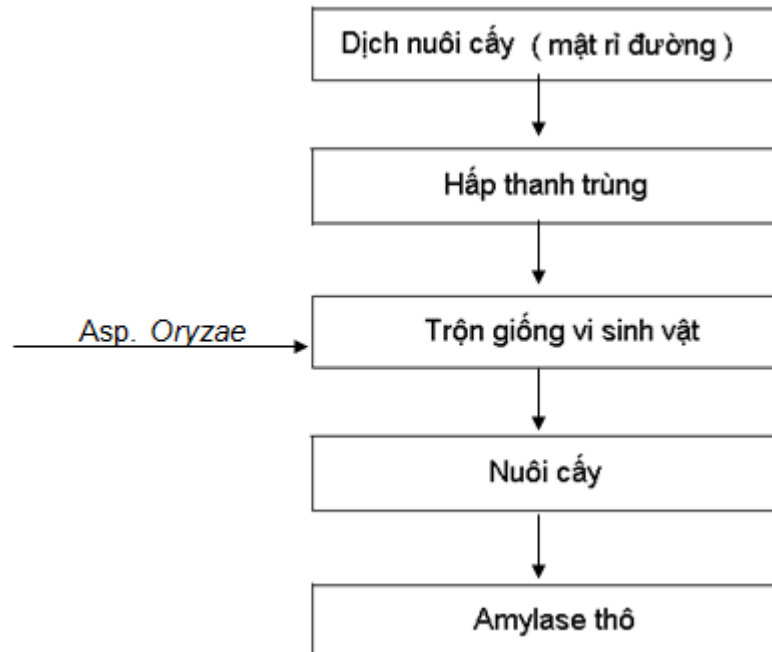
4.2.3. Công nghệ sản xuất enzyme amylase theo phương pháp nuôi cấy bề sâu

4.2.3.1. Chuẩn bị môi trường:

Từ môi trường sử dụng trong nuôi cấy bề sâu: để tạo khả năng thoáng khí tốt hơn, người ta thường cho thêm trấu với tỷ lệ thích hợp cho từng loại enzym được tạo ra từ VSV. Thực chất cho trấu vào là làm tăng độ xốp của môi trường, tạo nên những khoảng trống để không khí có thể lưu thông trong lòng môi trường. Chính vì thế ta thấy rằng nấm mốc *Asp. oryzae* không chỉ phát triển trên bề mặt môi trường mà còn phát triển rất mạnh trên bề mặt hạt môi trường. Hay nói cách khác, chủng nấm mốc *Asp.oryzae* có khả năng phát triển ở giữa hai pha rắn và pha khí của môi trường. Trong trường hợp này, nó có khả năng phát triển hẳn trong lòng môi trường nhưng nó vẫn hoàn toàn mang ý nghĩa của quá trình lên

men bề mặt.

4.2.3.2. Sơ đồ qui trình công nghệ



Hình 4.14: Sơ đồ qui trình công nghệ sản xuất enzyme amylase bằng phương pháp nuôi cấy bề sâu

4.2.3.3. Thuyết minh qui trình:

Sau khi đã bổ xung các chất dinh dưỡng cho môi trường thì ta tiến hành hấp khử trùng môi trường ở nhiệt độ 118 – 125 °C, thời gian 40 – 60 phút, sau đó để nguội đến nhiệt độ bình thường (28 – 30°C) và tiếp giống vi sinh vật (*Asp. oryzae*) vào môi trường, tỷ lệ giống đưa vào là 2 – 2,5 %.

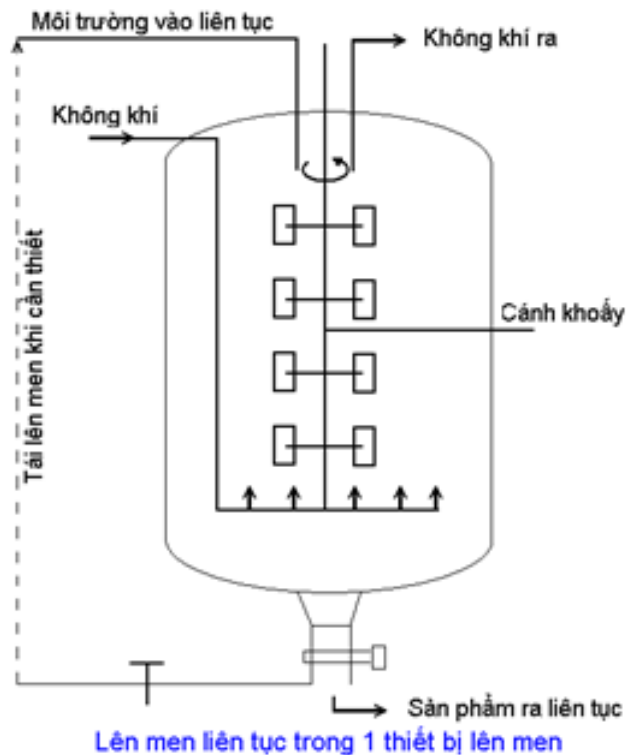
Sau đó quá trình nuôi cấy được thực hiện theo 2 phương pháp: nuôi cấy theo chu kỳ hay nuôi cấy liên tục.

+ Nuôi cấy theo chu kỳ, là phương pháp nuôi cấy trong 1 thiết bị lên men. Sau 1 chu kỳ nuôi từ 2 – 4 ngày ở 28 – 32 °C người ta thu nhận toàn bộ dịch nuôi cấy như là 1 loại chế phẩm enzyme thô. Sau khi kết thúc quá trình nuôi cấy, người ta vệ sinh thiết bị, chuẩn bị môi trường mới để tiếp tục nuôi cấy một mẻ mới. phương pháp này không đòi hỏi kỹ thuật cao. Tuy nhiên quá trình nuôi cấy này cũng có những nhược điểm riêng. Vd, thời gian ngừng giữa hai lần nuôi cấy để vệ sinh thiết bị thường làm gián đoạn việc sản xuất, do đó

năng suất thấp. Năng suất giữa các mẻ không giống nhau.

Nuôi cấy liên tục, là để khắc phục tình trạng trên. Quá trình nuôi cấy liên tục có thể nuôi cấy trong 1 thiết bị, cũng có thể thực hiện trong nhiều thiết bị.

Như vậy dòng môi trường vào bằng với tốc độ dòng sản phẩm ra. Phương pháp này có lợi là nếu chất lượng sản phẩm ra cuối cùng ra ta thu nhận được chưa đạt yêu cầu đặt ra ta có thể khắc phục bằng hai cách.



Hình 4.15: Thiết bị lên men liên tục

Cách thứ nhất: ta cho tốc độ môi trường vào và sản phẩm ra chậm lại, có nghĩa là làm sao cho thời gian lưu của dung dịch và tế bào vi sinh vật trong thiết bị lâu hơn.

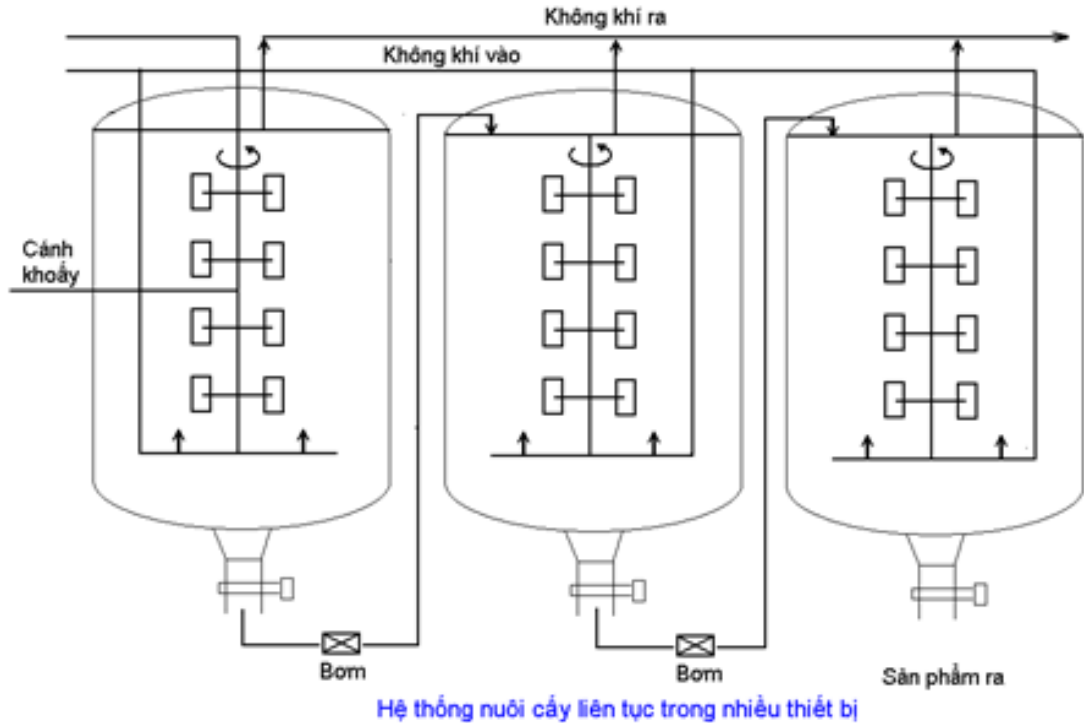
Cách thứ hai là: ta tiến hành hoàn lưu dịch lên men hòa chung với dòng môi trường để tái lên men. Như vậy, các thành phần dòng môi trường có cơ hội tham gia triệt để vào quá trình trao đổi chất, các loại enzyme sẽ được tạo ra nhiều hơn.

4.2.3.4. Thu nhận và tinh chế enzyme

Dung dịch sau khi nuôi cấy theo phương pháp bề sâu được tách khỏi sinh khối và các thành phần không hòa tan bằng phương pháp ly tâm. Dịch thu thường chứa 2 – 3% chất khô hòa tan. Hàm lượng chất này rất nhỏ, do đó ta cần phải cô đặc chúng cho đến khi khối

lượng dịch giảm đi 5 – 10 lần ở điều kiện chân không.

Ngoài phương pháp cô chân không, ta có thể dùng nhựa trao đổi ion để hấp thụ enzyme. Sau đó ta tiến hành phân hấp thụ và sẽ thu được enzyme.



Hình 4.16: Hệ thống nuôi cấy liên tục trong nhiều thiết bị

4.3. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME PROTEASE

4.3.1. Tổng quan về enzyme protease

Nhóm enzyme Protease (peptit – hidrolase): xúc tác quá trình thủy phân liên kết liên kết peptit (-CO-NH-)n trong phân tử protein, polypeptide đến sản phẩm cuối cùng là các acid amin. Ngoài ra, nhiều protease cũng có khả năng thủy phân liên kết este và vận chuyển axit amin.

Theo hệ thống phân loại quốc tế thì nhóm enzyme này được chia làm 4 phân nhóm:

- Aminopeptidase: thủy phân liên kết peptit ở đầu nitơ amin ($-NH_2$) của mạch polypeptit.
- Cacboxypeptidase: xúc tác thủy phân liên kết peptit ở đầu cacbon của mạch polypeptit. Hai phân nhóm này thuộc loại exo-peptidase (enzyme ngoại phân).
- Dipeptit hidrolase: thủy phân các liên kết peptit.

- Protease: xúc tác sự thủy phân liên kết peptit nội mạch (endo-peptidase)

Các protease khá phổ biến ở động, thực vật và vi sinh vật, trong đó đáng chú ý hơn cả là có nhiều vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp mạnh mẽ protease. Các enzyme này có thể ở trong tế bào (protease nội bào) hay được tiết vào môi trường nuôi cấy (protease ngoại bào).

Giống như amylase, một số loại protease đã được dân tộc các nước châu Á, trong đó có Việt Nam sử dụng trong một số ngành sản xuất các sản phẩm thực phẩm truyền thống như: sản xuất nước mắm và các loại mắm, sản xuất tương và chao, một số loại nem, tré. Một số nòi vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, xạ khuẩn thuộc giống *Streptomyces*, nấm mốc thuộc giống *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* là có khả năng sinh tổng hợp enzyme protease mạnh nhất.

Căn cứ vào cơ chế phản ứng, độ pH tối ưu, Hartley (1960) đã phân loại các protease vi sinh vật thành 4 nhóm: protease-serin, P.tiol, P.kim loại và P.axit. Trọng lượng phân tử của 4 nhóm này tương đối bé: chẳng hạn MP-serin=20000 – 27000, tuy nhiên nhóm này có một số có M lớn hơn như enzyme của penicillium M = 44000. Asp. Oryzae 5038 và M = 52000, MP.kim loại = 33800 – 48400, MP.tiol và axit = 30000 – 40000.

Về độ bền thì P. serin bền trong giới hạn pH rộng, từ 5 – 10 ở điều kiện nhiệt độ thấp. P. serin của *Bacillus pumilus* khá bền trong môi trường kiềm, ở pH = 11 vẫn giữ được 80% hoạt độ ban đầu.

Ở nhiệt độ 36°C nhóm này bị mất hoạt tính nhanh chóng. Tuy nhiên các P.serin của *Streptomyces fradiae* và *Stre.reatus* lại bền nhiệt ở 70°C trong 30 phút chỉ bị mất 10 -15% hoạt tính.

Các protease kim loại kém bền nhất trong số 4 nhóm này, bền trong phạm vi pH = 6 – 9, nhanh chóng bị mất hoạt tính ngoài khoảng pH này. Canxi làm tăng độ bền của nhóm enzyme này. Các protease - axit bền trong phạm vi pHaxit = 2 – 6, trong môi trường axit chúng khá bền nhiệt.

Protease cần thiết cho các sinh vật sống, rất đa dạng về chức năng từ mức độ tế bào, cơ quan đến cơ thể nên được phân bố rất rộng rãi trên nhiều đối tượng từ vi sinh vật (vi khuẩn, nấm và virus) đến thực vật (đu đủ, dứa...) và động vật

(gan, dạ dày bê...). So với protease động vật và thực vật, protease vi sinh vật có những đặc điểm khác biệt. Trước hết protease vi sinh vật là một hệ thống rất phức tạp bao gồm nhiều enzyme rất giống nhau về cấu trúc, khối lượng và hình dạng phân tử nên rất khó tách ra dưới dạng tinh thể đồng nhất.

Cũng do là phức hệ gồm nhiều enzyme khác nhau nên protease vi sinh vật thường có tính đặc hiệu rộng rãi cho sản phẩm thủy phân triệt để và đa dạng.

Protease trong vi sinh vật có đủ 3 loại, mỗi loại có khoảng hoạt động ở độ pH khác nhau và gọi là protease acid, protease trung tính và protease kiềm. Điều đó có nghĩa là khoảng hoạt động của nó có độ pH rất rộng.

Protease kiềm thường ở nấm men.

Protease trung tính có ở rất nhiều loài nấm mốc khác nhau, chủ yếu là các loài nấm mốc có màu vàng hoa cau (*Aspegillus oryzae*, *Asp. Flavus*, *Asp. Fumigatus*...). Ngoài ra còn thấy ở vi khuẩn *Bac. Mensentericus*.

Protease acid thường được thu ở các loài nấm mốc màu đen như *Asp. niger*, *Asp. awamori*... Tuy nhiên tùy theo điều kiện môi trường và thành phần cơ chất trong môi trường dinh dưỡng mà protease hình thành là acid, kiềm, trung tính.

Ứng dụng

Protease là enzyme được sử dụng nhiều nhất hiện nay trong một số ngành sản xuất như:

+ Trong công nghiệp sữa:

Protease được dùng trong sản xuất phomat nhờ hoạt tính làm đông tụ sữa của chúng. Protease từ một số vi sinh vật như *A. candidus*, *P. roquerti*, *B. mesentericus*,... được dùng trong sản xuất phô mát.

+ Trong công nghiệp sản xuất bánh mì, bánh quy...

Protease làm giảm thời gian trộn, tăng độ dẻo và làm nhuyễn bột, tạo độ xốp và nở tốt hơn.

+ Trong công nghiệp chế biến thịt:

Protease được dùng làm mềm thịt nhờ sự thủy phân một phần protein trong thịt, kết quả làm cho thịt có một độ mềm thích hợp và có vị tốt hơn. Protease được sử dụng để làm

mềm thịt và tăng hương vị thịt. (ngâm thịt vào dinh dưỡng protease ở pH và nhiệt độ xác định - phương pháp này phổ biến và thuận lợi nhất).

+ *Trong chế biến thủy sản:*

Khi sản xuất nước mắm (và một số loại mắm) thường thời gian chế biến thường là dài nhất, hiệu suất thủy phân (độ đậm) lại phụ thuộc rất nhiều địa phương, phương pháp gài nén, nguyên liệu cá. Nên hiện nay quy trình sản xuất nước mắm gần đây đã được hoàn thiện trong đó sử dụng chế phẩm enzyme thực vật (bromelain và papain) và vi sinh vật để rút ngắn thời gian làm và cải thiện hương vị của nước mắm.

+ *Trong sản xuất bia:*

Chế phẩm protease có ý nghĩa quan trọng trong việc làm tăng độ bền của bia và rút ngắn thời gian lọc. Protease của *A. oryzae* được dùng để thủy phân protein trong hạt ngũ cốc, tạo điều kiện xử lý bia tốt hơn.

+ *Trong công nghiệp thuộc da:*

Protease được sử dụng làm mềm da nhờ sự thủy phân một phần protein của da, chủ yếu là collagen, thành phần chính làm cho da bị cứng. Kết quả đã loại bỏ khỏi da các chất nhớt và làm cho da có độ mềm dẻo nhất định, tính chất đó được hoàn thiện hơn sau khi thuộc da. Trước đây, để làm mềm da người ta dùng protease được phân lập từ cơ quan tiêu hóa của động vật. Hiện nay, việc đưa các protease tách từ vi khuẩn (*B. mesentericus*, *B. subtilis*), nấm mốc (*A. oryzae*, *A. flavus*) và xạ khuẩn (*S. fradiae*, *S. griseus*, *S. rimosus*...) vào công nghiệp thuộc da đã đem lại nhiều kết quả và dần dần chiếm một vị trí quan trọng.

+ *Ngoài ra, protease còn được ứng dụng rộng rãi trong rất nhiều ngành khác như:*

- Điều chế dịch đậm thủy phân dùng làm chất dinh dưỡng, chất tăng vị trong thực phẩm và sản xuất một số thức ăn kiêng.

- Protease của nấm mốc và vi khuẩn phối hợp với amylase tạo thành hỗn hợp enzyme dùng làm thức ăn gia súc có độ tiêu hóa cao, có ý nghĩa lớn trong chăn nuôi gia súc và gia cầm.

- Điều chế môi trường dinh dưỡng của vi sinh vật để sản xuất vaccine, kháng sinh,...

- Sản xuất keo động vật, chất giặt tổng hợp để giặt tẩy các chất bản protein, sản xuất

mỹ phẩm,...

4.3.2. Nguyên liệu dùng trong sản xuất protease.

4.3.2.1. Nguyên Liệu dùng làm môi trường sản xuất:

+ Đối với nuôi cấy bề mặt thì môi trường sản xuất chính là: cám gạo, bột mì, bột bắp, đậu tương nghiền, rang...

+ Đối với nuôi cấy bề sâu thì môi trường sản xuất chính là: Chủ yếu là mật rỉ đường có bổ xung thêm dinh dưỡng.

4.3.2.2. Giống vi sinh vật:

+ Từ nấm mốc gồm có: *Aspergillus oryzae*, *Asp.niger*, *Asp.flavus*, *Asp.awamori*, *Asp.fumigatus*, *Asp.soizae*, *A. terricola*, *A. saitoi*, *Penicillium chysogenum* ...là thông dụng nhất.

+ Từ vi khuẩn có *Bacillus subtilis*, *Bac.mensentericus*, *Bac.thermophilus*, *B. thermorpoteliticus*...

+ Từ xạ khuẩn có *Actinomyces griceus*, *Act.fradiae*, *Act.Rimosus*.

4.3.3. Công nghệ sản xuất chế phẩm protease từ vsv theo phương pháp nuôi cấy bề mặt

4.3.3.1. Sơ đồ qui trình công nghệ

4.3.3.2. Thuyết minh qui trình:

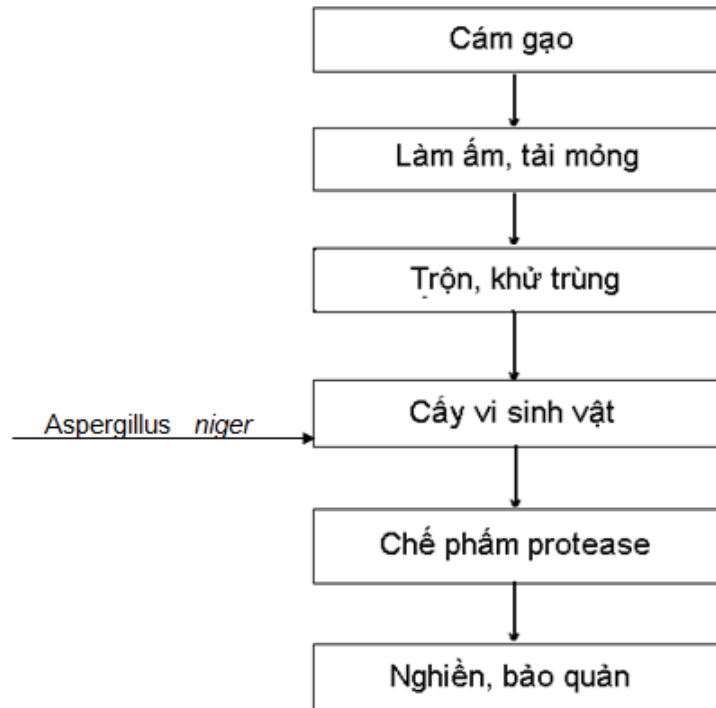
Từ những nguyên liệu kể trên, trước hết chúng được làm ẩm tải mỏng ra khay, nong hoặc nia, sau đó cấy giống nấm *Aspergillus niger* mốc vào; trộn đều nguyên liệu với vi sinh vật và đặt vải màn lên nuôi trường phòng sạch vô trùng, giữ ẩm 70 – 85% để ở nhiệt độ 30⁰C sau khoảng 30-32 giờ thì thấy các tế bào phát triển mạnh, mọc phủ kín bề mặt, loại bỏ những tế bào tạp, chỉ giữ những tế bào, khuẩn lạc thuần rồi trộn đều chế phẩm, sấy khô nhẹ ở nhiệt độ 45-50⁰c, nghiền bóp, cho vào túi polyetylen bảo quản dùng dần. Khi tế bào phát triển trên môi trường là lúc enzym proteaza được hình thành và phát triển theo. chế phẩm thu được là proteaza thô ở dạng rắn.

4.3.3.3. Thu nhận sản phẩm:

Kết thúc quá trình nuôi cấy ta cũng thu nhận được chế phẩm enzym protease, chế phẩm này được gọi là chế phẩm enzym thô (vì ngoài thành phần enzym ra, chúng còn chứa

sinh khối VSV, thành phần môi trường và nước trong môi trường). Tùy mục đích sử dụng mà ta có thể dùng chế phẩm enzyme thô này, mà không cần tinh sạch enzyme.

Quá trình tinh sạch protease cũng tương tự quá trình tinh sạch amylase.



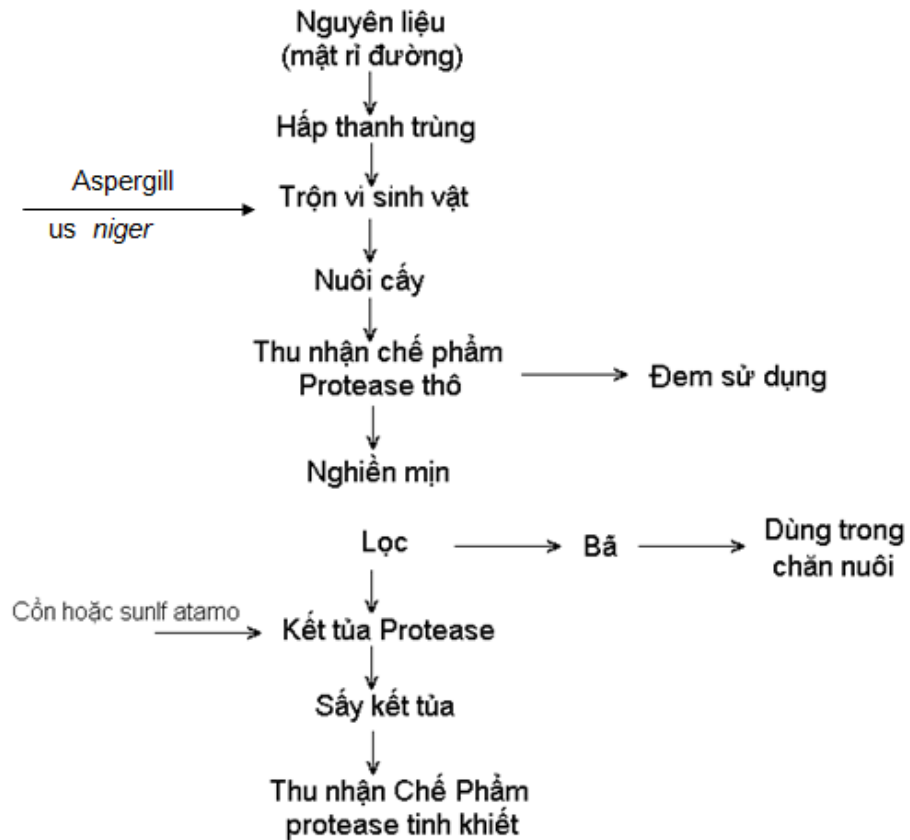
Hình 4.17: Quy trình công nghệ sản xuất enzyme protease từ VSV nuôi cấy trên môi trường rắn-xốp

4.3.4. Công nghệ sản xuất enzyme protease từ VSV theo phương pháp lên men chìm

Sau khi đã bổ xung các chất dinh dưỡng cho môi trường thì ta tiến hành hấp khử trùng môi trường ở nhiệt độ $118 - 125^{\circ}\text{C}$ với thời gian 40 – 60 phút, sau đó để nguội đến nhiệt độ bình thường ($28 - 30^{\circ}\text{C}$) và tiếp giống vi sinh vật (*Aspergillus niger*) vào môi trường, tỷ lệ giống đưa vào là 2 – 2,5 %. Sau đó ta tiến hành nuôi cấy và thu được chế phẩm enzyme protease.

Sau đó Qui trình nuôi cấy và sản xuất cũng được tiến hành theo hai cách giống như sản xuất enzyme amylase theo phương pháp nuôi cấy bề sâu.

Tương tự như thu nhận amylase trong nuôi cấy bề sâu (xem phần trên)



Hình 4.17: Quy trình công nghệ sản xuất enzyme protease từ vsv nuôi cấy chìm

CHƯƠNG 5: CHẾ TẠO VÀ SỬ DỤNG ENZYME CỐ ĐỊNH

5.1. TỔNG QUAN VỀ ENZYME CỐ ĐỊNH

Các enzyme không tan là những enzyme bị giữ, hoặc được cố định trong một vùng, một khoang nhất định, không bị hòa tan trong các điều kiện bình thường, vẫn giữ được hoạt động xúc tác, có thể sử dụng liên tục và lặp lại nhiều lần. Các chất dùng để gắn hoặc giữ enzyme thường được gọi là chất mang (carrier) hay giá thể (support).

Như vậy nếu có thể gắn các enzyme xúc tác cho một dãy các phản ứng theo đúng trật tự của nó (hệ thống nhiều enzyme, multienzyme) sẽ nhận được hệ thống enzyme không tan *xúc tác cho một dãy phản ứng chuyển hóa từ cơ chất đến sản phẩm cuối cùng* (ví dụ: từ đường thành rượu qua quá trình đường phân). Do đặc tính không bị hòa tan mà vẫn giữ được hoạt độ xúc tác, ưu điểm nổi bật của enzyme ở dạng không tan so với khi ở dạng hòa tan là: *có thể sử dụng lặp lại nhiều lần một lượng enzyme xác định*, do đó làm *giảm đáng kể giá thành chế phẩm enzyme*, và có thể sử dụng liên tục trong các hệ thống dòng chảy.

Ngoài ra, enzyme không tan có độ bền với các yếu tố hóa lý lớn hơn khi ở dạng hòa tan.

Ngoài enzyme, người ta cũng tạo các tế bào, cơ quan tử của tế bào, tế bào vi sinh vật ở dạng không tan để sử dụng trong các quá trình sinh học.

Trong tế bào sống, có nhiều enzyme gắn với màng của tế bào, hoặc cơ quan tử của tế bào (các enzyme gắn với màng hoặc matrix của ty thể), một số enzyme xúc tác cho quá trình oxy hóa khử, ATPase v.v..., đó cũng là dạng enzyme không tan.

Đặc điểm của enzyme không hòa tan

Khi nghiên cứu tạo ra enzyme không hòa tan, các nhà khoa học đưa ra một số đặc điểm của enzyme không hòa tan như sau:

+ Hoạt tính riêng của enzyme không hòa tan thường nhỏ hơn enzyme hòa tan cùng loại. Đặc điểm này của enzyme không hòa tan là do những nguyên nhân sau:

- Do đặc điểm điện tích chất mang. Khi gắn enzyme vào chất mang có điện tích khác, cấu trúc không gian của enzyme sẽ bị thay đổi. Từ đó hoạt tính của enzyme sẽ giảm. Mức độ giảm hoạt tính phụ thuộc vào mức độ thay đổi cấu trúc không gian của enzyme khi

ta gắn chúng vào chất mang.

- Do sự nhốt enzyme vào một gel. Khi ta nhốt enzyme vào một gel nào đó, các gel này sẽ bao quanh phân tử enzyme, khi đó cơ chất khó tiếp cận enzyme, và như vậy, phản ứng khó thực hiện được. Phản ứng chỉ xảy ra khi cơ chất tiếp xúc với enzyme. Trong trường hợp này các gel như một vật cản.

+ Enzyme không hòa tan tuân theo định luật Michaelis – Menten (phản ứng giữa enzyme và cơ chất). Tuy nhiên phản ứng giữa cơ chất và enzyme không hòa tan có những sai khác nhất định.

- Có thể xảy ra hiện tượng cạnh tranh cơ chất giữa enzyme và chất mang.

- Hiện tượng khuếch tán cơ chất và các sản phẩm làm giảm hoạt tính của enzyme hay tốc độ phản ứng.

+ Enzyme không hòa tan thường có tính bền nhiệt hơn enzyme hòa tan.

+ Enzyme không hòa tan thường có pH chuyển dịch sang miền kiềm hay miền axit hơn enzyme hòa tan cùng loại.

+ Enzyme không hòa tan có khả năng bảo quản tốt hơn enzyme hòa tan.

+ Enzyme không hòa tan có thể thực hiện phản ứng nhiều lần. Đặc điểm này rất có ý nghĩa trong phản ứng quy mô công nghiệp.

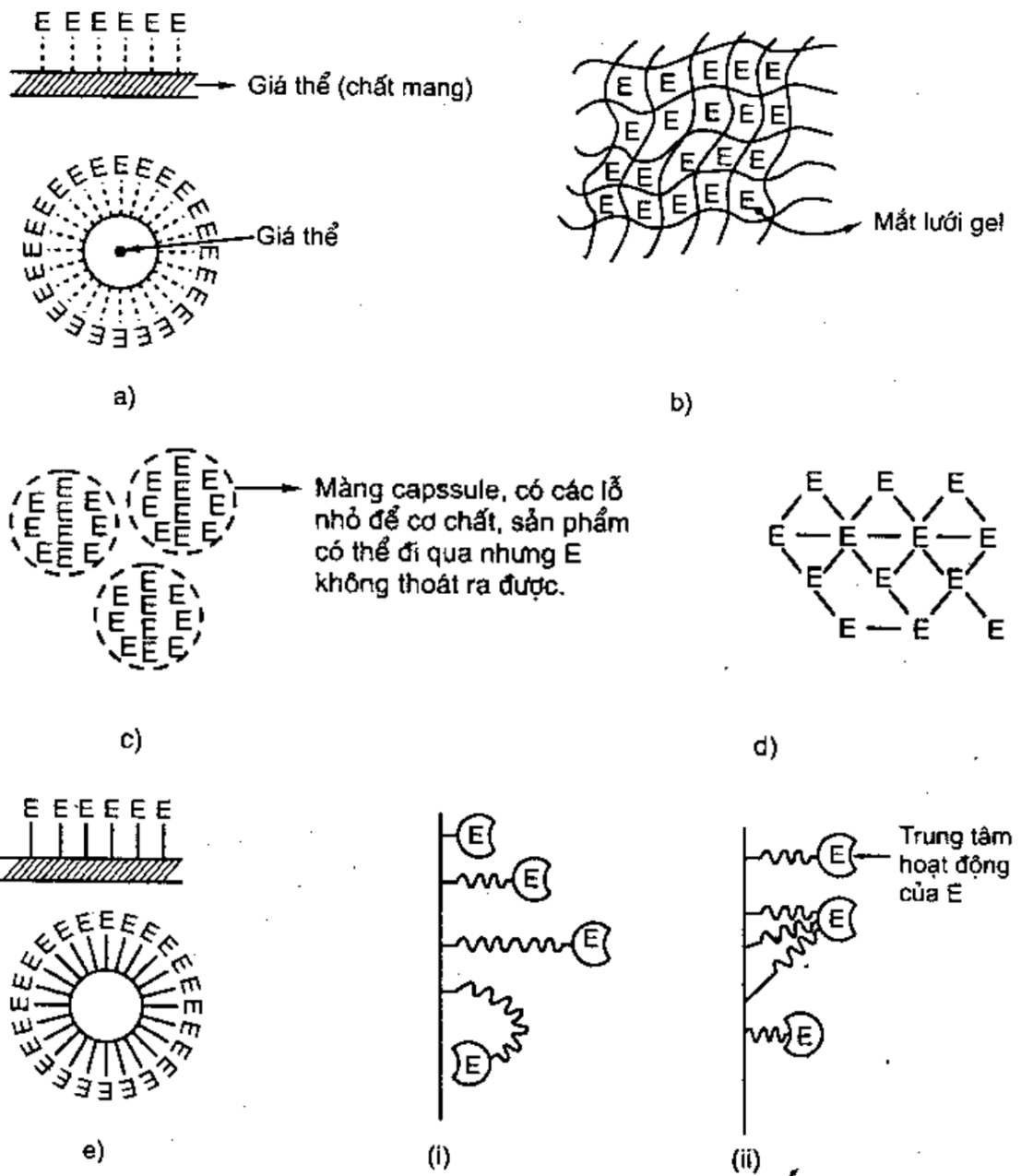
5.2. PHƯƠNG PHÁP CHẾ TẠO CHẾ PHẨM ENZYME KHÔNG TAN

Có thể sử dụng các phương pháp như: hấp phụ, dựa vào tròng mạng lưới của gel (bẫy enzyme trong các lỗ nhỏ của các gel được trùng hợp), bọc trong các nang nhỏ (capsule), liên kết hóa trị với giá thể không tan, tạo các liên kết chéo giữa các phân tử enzyme (hình 5.1). Điều quan trọng là phải lựa chọn được những điều kiện thích hợp sao cho gắn được nhiều enzyme nhất (tính trên một đơn vị diện tích, hoặc một đơn vị khối lượng), enzyme ít bị thôi ra khỏi chất mang, ít ảnh hưởng đến hoạt độ E nhất. Sau đây sẽ mô tả chi tiết thêm về các phương pháp này:

5.2.1. Hấp phụ (adsorption) enzyme được gắn với giá thể không phải bằng liên kết cộng hóa trị, mà được hấp phụ vật lý trên bề mặt giá thể.

Phương pháp này được sử dụng sớm hơn cả, từ năm 1916, người ta đã cho invertase (saccharase, 3.1.2.26) của nấm men hấp phụ trên than mà vẫn giữ được hoạt tính thủy phân

đường (sucrose).



Hình 5.1. Sơ đồ minh họa các chế phẩm enzyme không tan được sản xuất theo các phương pháp khác nhau

a) Hấp phụ; b) Nhốt enzyme trong các lỗ gel; c) Bọc enzyme trong các nang (capsule); d) Tạo liên kết chéo giữa các phân tử enzyme; e) Gắn E vào chất mang bằng liên kết cộng hóa trị (-).

(i). E kết hợp với chất mang khi không qua hoặc qua spacer có chiều dài khác nhau;

(ii). Spacer có thể kết hợp với trung tâm hoạt động của enzyme làm bất hoạt enzyme.

Phương pháp này dễ thực hiện nhất, và thường ít ảnh hưởng đến hoạt độ của

enzyme. Tuy nhiên, enzyme cũng dễ bị rửa trôi trong quá trình sử dụng lặp lại nhiều lần. Mức độ giữ enzyme trên chất mang, phụ thuộc nhiều vào pH, lực ion. Khi muốn tách enzyme khỏi chất mang có thể sử dụng dung dịch có lực ion lớn.

Các giá thể được dùng để hấp phụ có dung tích hấp phụ lớn như:

- Cellulose và các dẫn xuất của nó như diethylaminoethyl (DEAE) hoặc carboxymethyl (CM) cellulose;

- Dextran và các dẫn xuất dextran: DEAE - và CM-dextran;

- Hydroxylapatite, calcium phosphate

Trong thực tế, để hạ giá thành, cũng có thể dùng các nguyên liệu thô hơn như đất sét, alumina, bentonite, than, mặt cưa hoặc bột giấy, v.v... (đã xử lý để loại các tạp chất có thể kìm hãm enzyme). Trong quá trình sử dụng mặt cưa hay đất sét cũng nhận thấy khả năng hấp phụ enzyme phụ thuộc nhiều vào loại gỗ, loại đất sét, kích thước của chúng, phương pháp xử lý. Đối với đất sét còn cần lưu ý chuẩn bị dạng hạt như thế nào để dòng cơ chất có thể đi qua mà không bị nghẽn.

5.2.2. Liên kết ion giữ enzyme và chất mang

Từ năm 1956, Mitz đã tiến hành gắn catalase vào DEAE-cellulose qua liên kết ion. Do phương pháp khá đơn giản, nên cũng đã được sử dụng để tạo các chế phẩm không tan của nhiều enzyme khác. Các chất trao đổi ion khác như CM-cellulose và các dẫn xuất khác của cellulose. Sephadex cũng như các nhựa trao đổi ion khác cũng có thể được dùng trong phương pháp này. Độ bền liên kết giữa enzyme với chất mang phụ thuộc vào pH, loại dung dịch, đệm và lực ion. Thay đổi các yếu tố này có thể thu lại enzyme, chất mang mà không làm biến đổi tính chất và cấu trúc của nó.

5.2.3. Giữ enzyme trong gel (entrapment)

Từ năm 1963, Bernfeld và Wan đã mô tả phương pháp nhốt (entrapment) các enzyme (trypsin, papain, amylase và ribonuclease) trong gel polyacrylamide.

- Ưu điểm của phương pháp này là không kết hợp trực tiếp enzyme vào giá thể hay chất mang, mà có thể hình dung như là enzyme bị bẫy trong các mắt lưới của lưới (hình 5.1. b), nên *cấu trúc của enzyme không bị biến đổi nhiều*.

- Hạn chế của phương pháp:

+ Các cơ chất phân tử lớn (protein, acid nucleic) không đi qua màng được, vì vậy đối với các enzyme như protease, nuclease không dùng phương pháp này.

+ Trong một số trường hợp, kích thước của các mắt lưới cũng khó điều chỉnh thật đồng nhất, do đó enzyme cũng có thể thoát ra một phần.

+ Một số gốc tự do được tạo thành trong quá trình trùng hợp có thể kìm hãm enzyme.

Vì vậy, cần lựa chọn điều kiện về pH, nhiệt độ và các điều kiện khác của quá trình trùng hợp sao cho ít ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme, kích thước các mắt lưới (nơi giữ enzyme) đủ bé để enzyme khó bị thoát ra ngoài khi sử dụng, nhưng cũng phải đủ lớn để cơ chất có thể khuếch tán vào đến enzyme, và sản phẩm được tạo thành có thể khuếch tán ra khỏi mắt lưới.

- Để chuẩn bị chế phẩm theo phương pháp này, có thể thực hiện theo các cách sau:

+ Đưa enzyme vào gel bằng cách trùng hợp gel trong dung dịch có enzyme ở nồng độ cao, việc trùng hợp nhờ tác dụng của các hóa chất (gel polyacrylamide, polymer tự nhiên như alginate, gel K-carrageenan); nhờ bức xạ (gel polyvinyl alcohol, pyrrolidone); hoặc nhờ ánh sáng (polyethylen glycol dimetacrylate).

+ Đưa enzyme vào các sợi: cho hỗn hợp có chứa các thành phần để trùng hợp và E đi qua mắt lưới, sẽ tạo được các sợi có gắn enzyme; hoặc cũng có thể cho dung dịch E đi qua sợi rỗng, sợi có lỗ, tạo điều kiện thuận lợi để gắn enzyme vào.

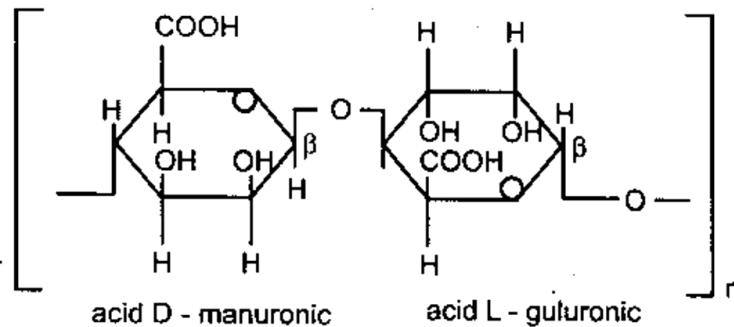
Để thực hiện phương pháp này có hiệu quả, cần nắm vững các điều kiện trùng hợp để có thể dễ dàng đạt được gel đúng theo yêu cầu.

Các chất có thể dùng để tạo gel trong phương pháp này là các chất có cấu tạo mắt lưới như: gelatin, alginate (polysaccharide của tảo), agarose, polyacrylamide, hoặc các prepolymer tổng hợp.

Tùy mục đích sử dụng, có thể cắt gel (đã được trùng hợp có chứa enzyme) thành từng lớp mỏng, từng mẫu nhỏ hay từng hạt (gel đã được loại nước và nghiền thành hạt) để làm tăng bề mặt tiếp xúc của enzyme trong gel với cơ chất trong dung dịch. Sau đây sẽ nêu chi tiết hơn về một số các chất được sử dụng trong phương pháp này.

5.2.3.1. Alginate để tạo chế phẩm calcium – alginate – enzyme không tan

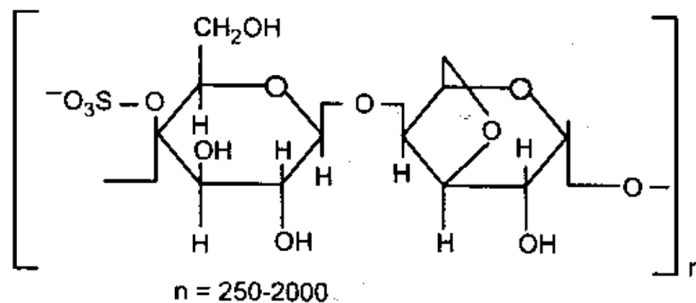
Alginate (acid alginic) là acid polyuronic tách từ rong biển, bao gồm các đơn vị cấu tạo của các acid D- mannuronic và L- guluronic kết hợp với nhau bằng liên kết β -1,4



Muối natri của alginate (sodium alginate) là chất hòa tan trong nước, do đó có thể trộn với enzyme trong dung dịch, sau đó thêm từng giọt dung dịch calcium chloride sẽ tạo thành gel calcium alginat không tan có chứa enzyme. Phương pháp này được dùng khá rộng rãi vì khá đơn giản và alginate cũng dễ tìm.

5.2.3.2.K-carrageenan, tạo gel K-carrageenan – enzyme không tan

K-carrageenan là hỗn hợp các polysaccharide tương tự agar-agar, tách từ tảo đỏ, hòa tan trong nước hoặc trong dung dịch muối, có khoảng 4-5% carragenin, là polysaccharide có chứa galactose và galactose sulfate:

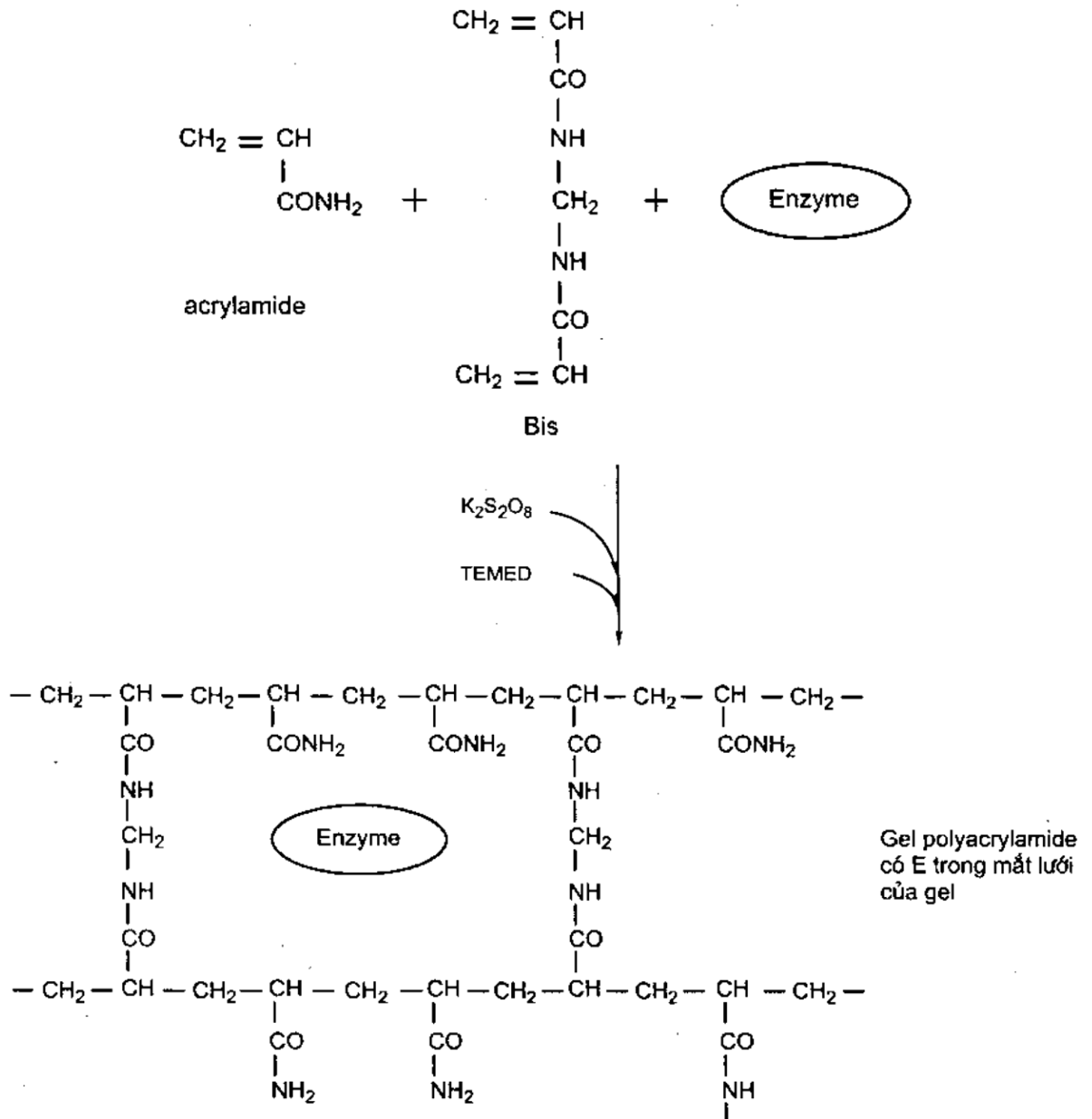


Nguyên tắc: thêm từ từ dung dịch chất tạo gel (potassium chloride, hoặc các cation khác như ammonium, alcium, aluminum) vào dung dịch muối k-carrageenan có chứa enzyme, sẽ nhận được chế phẩm enzyme không tan. Glutaraldehyde và hexamethylenediamine có tác dụng làm cho gel cứng hơn và enzyme được giữ trong gel bền hơn. Theo Chibata và cộng sự, k-carrageenan là nguyên liệu tốt để cố định tế bào vi sinh vật dùng trong công nghiệp sản xuất nhiều chất khác nhau.

5.2.3.3.Polyacrylamide, tạo gel polyacrylamide – enzyme không tan

Tiến hành trùng hợp các monomer acrylamide và N,N'-methylenebisacrylamide

(Bis) trong dung dịch có chứa enzyme, và một số yếu tố cần thiết cho quá trình trùng hợp (TEMED, potassium persulfate, hình 5.2):



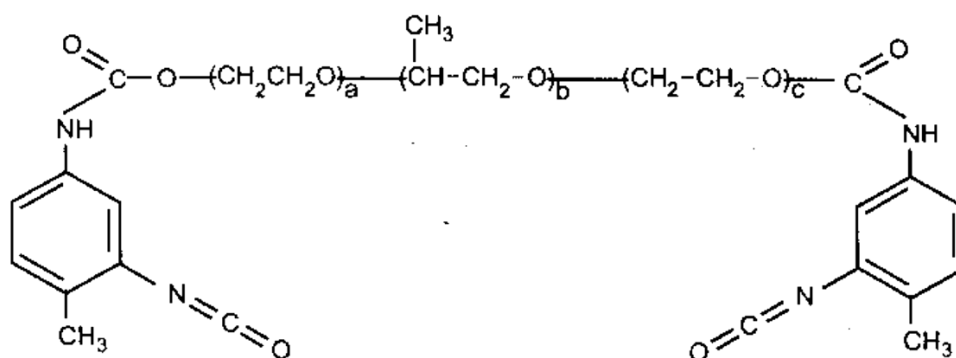
Hình 5.2. Các phản ứng trùng hợp gel polyacrylamide từ các monomer trong dung dịch có enzyme để tạo chế phẩm enzyme không tan (enzyme bị nhốt trong các mắt lưới)

TEMED: N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine

5.2.3.4. Các tiền polymer (prepolymer) tổng hợp để tạo các polymer tổng hợp enzyme không tan

Quá trình trùng hợp được thực hiện nhờ ánh sáng (photo-cross-linkable resin pre.polymer): Chuẩn bị dung dịch có prepolymer, enzyme và chất làm tăng độ nhạy thích hợp như benzoylethylether, chiếu tia UV bước sóng dài (long-wave-length UV light, khoảng 360nm) trong vài phút, sẽ tạo thành liên kết chéo giữa các prepolymer, gel được hình thành, nhốt enzyme trong các lỗ gel. Phương pháp này đã được sử dụng để cố định tế bào nấm men sản xuất ethanol ở quy mô pilot.

Các prepolymer được dùng có chứa các đoạn có tính chất ưa nước hay kỵ nước, tùy thuộc chiều dài của các đoạn này, do đó có thể điều chỉnh tính ưa nước hay kỵ nước của chúng đơn giản hơn. Ví dụ prepolymer urethane:



Khi thay đổi tỷ lệ giữa polyethyleneglycol và polypropyleneglycol sẽ thay đổi cân bằng tính ưa nước của gel. Khi trộn prepolymer urethane lỏng với dung dịch nước của enzyme, các prepolymer phản ứng với nhau, tạo thành các liên kết urea nối các phân tử với nhau, giải phóng dioxyde carbon, enzyme bị nhốt trong các mắt lưới của gel.

- Sử dụng prepolymer tổng hợp có các ưu điểm sau:

+ Chất tiền polymer (prepolymer) không chứa monomer, nên loại trừ được ảnh hưởng của chúng đến phân tử enzyme.

+ Có thể tạo các gel có kích thước của các mắt lưới theo yêu cầu bằng cách sử dụng các prepolymer có chiều dài mạch thích hợp.

+ Có thể tạo gel có các tính chất hóa lý thích hợp (ví dụ cân bằng giữa tính ưa nước – kỵ nước) một cách dễ dàng bằng cách tiến hành các thí nghiệm lựa chọn các prepolymer thích hợp trước khi sử dụng để trùng hợp với enzyme.

5.2.4. Bọc enzyme trong các nang nhỏ (microcapsule)

Phương pháp này lần đầu tiên đã được Chang công bố vào năm 1964, tác giả đã đưa

carbonic anhydrase (E.C.4.2.1.1) vào trong các capsule. Sau đó, năm 1971, Gregoriadis đã tạo được các liposome chứa amyloglucosidase (E.C.3.2.1.3). Cả 2 chế phẩm đã được sử dụng trong điều trị.

Enzyme có thể được bọc bằng các loại màng khác nhau, tạo thành các dạng khác nhau. Có thể phân biệt các kiểu sau:

- **Microcapsule:** Màng dùng để bọc enzyme là màng bán thấm (có các lỗ nhỏ để các chất phân tử thấp có thể đi qua nhưng enzyme không đi ra được) tổng hợp.

- **Liposome:** Màng lỏng, được tạo thành từ các phospholipid, các liposome chứa enzyme thường được dùng trong y tế hoặc trong mỹ phẩm.

- Các sợi có các lỗ rỗng (hollow- fiber).

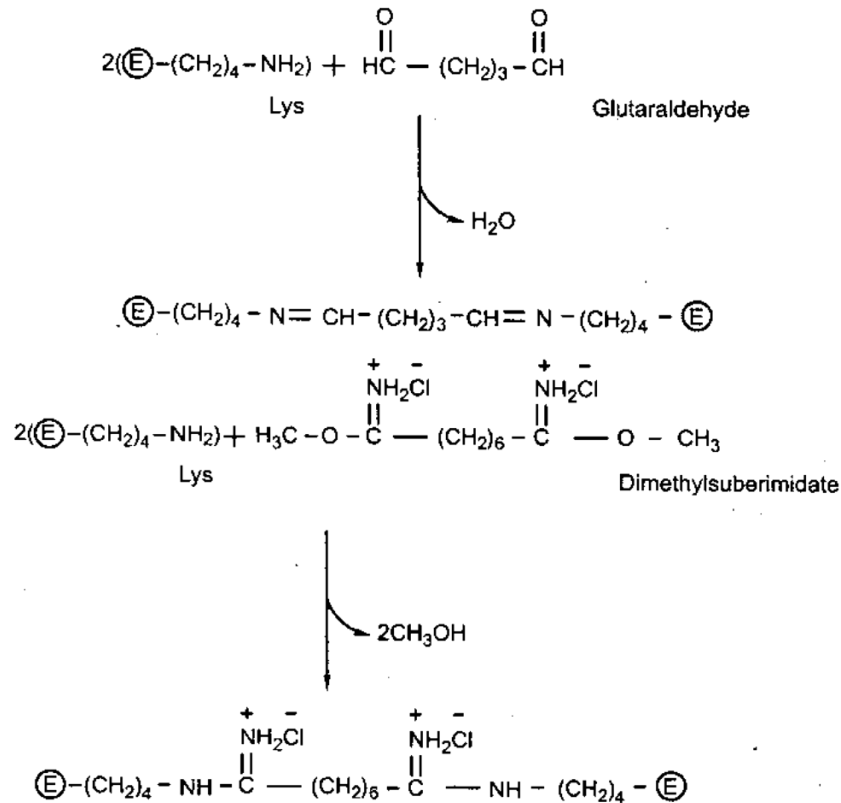
Phương pháp này có thể xem là hầu như không làm ảnh hưởng đến cấu trúc của phân tử enzyme, và có thể đồng thời bọc nhiều enzyme xúc tác cho một dãy phản ứng trong cùng một túi (nhưng cần tránh các protease, vì chúng có thể phân giải các enzyme) để thực hiện một quá trình trao đổi chất qua nhiều phản ứng liên tục như trong hệ thống sống. Các chất thường dùng để bọc enzyme là polyamide hoặc nitrocellulose. Người ta cũng có thể tạo các chế phẩm enzyme không tan ở dạng liposome. Tiến hành như sau: hòa tan các amphipatic lipid (lipide có chứa đầu ưa nước và đầu kỵ nước), như phosphatidyl choline và cholesterol trong chloroform, tráng thành lớp mỏng trên thành của một bình quay; thêm dung dịch enzyme trong nước, làm sao để có thể nhanh chóng phân tán đều enzyme, sẽ tạo thành các liposome ở dạng màng lipid bọc các giọt nước. Do đó có một số enzyme được giữ bên trong liposome, còn một số khác còn lại sẽ kết hợp vào màng liposome.

5.2.5. Tạo liên kết chéo (cross-linking) giữa các phân tử enzyme

Năm 1964, Quioco và Richards đã mô tả phương pháp tạo liên kết chéo giữa carboxypeptidase A với glutaraldehyde. Phương pháp này hoàn toàn không dùng chất mang, mà thương dùng các chất có nhóm chức năng kép (bifunctional reagent), có 2 nhóm, chức ở hai đầu hoàn toàn giống nhau, phản ứng với các nhóm chức của các phân tử enzyme khác nhau, tạo các liên kết chéo giữa chúng, “khâu” các phân tử enzyme lại với nhau thành các phân tử có kích thước lớn hơn, không tan, có thể tách khỏi dung dịch bằng cách ly tâm

hay lọc.

Các chất thường được dùng vào mục đích này là glutaraldehyde, và một số chất khác như dimethylsuberimide (hình 5.3) v.v..., phản ứng với nhóm amine; hoặc một số chất phản ứng với nhóm carboxyl (-COOH), nhóm thiol (-SH), trong đó glutaraldehyde được dùng phổ biến nhất.



Hình 5.3. Sử dụng glutaraldehyde, dimethylsuberimide để tạo liên kết chéo giữa các phân tử enzyme

5.2.6. Gắn enzyme vào chất mang rắn bằng liên kết cộng hóa trị

Vào năm 1953, Grubhofer và Schleith đã tạo được các chế phẩm không tan của một số enzyme như carboxypeptidase, diastase, pepsin, và ribonuclease bằng cách tạo liên kết cộng hóa trị giữa enzyme với polyaminostyrene đã được diazot hóa.

Những ưu điểm của phương pháp

- Có thể tạo các chế phẩm có độ bền cao, có thể sử dụng trong nhiều quá trình sản xuất ở quy mô lớn, trong hệ thống dòng chảy.
- Do enzyme gắn trên bề mặt chất mang nên dễ tiếp xúc với cơ chất.

Những hạn chế của phương pháp

- Cấu trúc của enzyme có thể bị thay đổi một phần trong quá trình gắn với chất mang, làm giảm hoạt độ xúc tác.

- Do liên kết chặt giữa enzyme với chất mang, có thể làm giảm sự di chuyển tự do của enzyme, và từ đó cũng làm giảm hoạt độ của nó.

- Việc tìm được các điều kiện thích hợp cho quá trình sản xuất chế phẩm không tan theo phương pháp này cũng có nhiều khó khăn.

Tuy nhiên, cho đến nay, người ta cũng đã có nhiều biện pháp để khắc phục những nhược điểm đã nêu.

Những đặc tính cần có của các chất mang

- Bề mặt chất mang phải tương thích với enzyme.

- Phải có các nhóm có khả năng phản ứng với các nhóm chức của protein (các nhóm amin, carboxyl, hydroxyl, và cả nhóm thiol).

- Có dung tích kết hợp cao.

- Chất mang phải có tính “trơ” đối với thành phần phản ứng.

- Chất mang phải bền trong điều kiện quá trình phản ứng liên tục kéo dài.

Độ bền của chế phẩm còn tùy thuộc tính chất hóa lý của chất mang và phương pháp gắn enzyme.

Các nguyên liệu thường dùng làm chất mang

- Các chất vô cơ: thủy tinh, aluminum oxyde, gốm (ceramic).

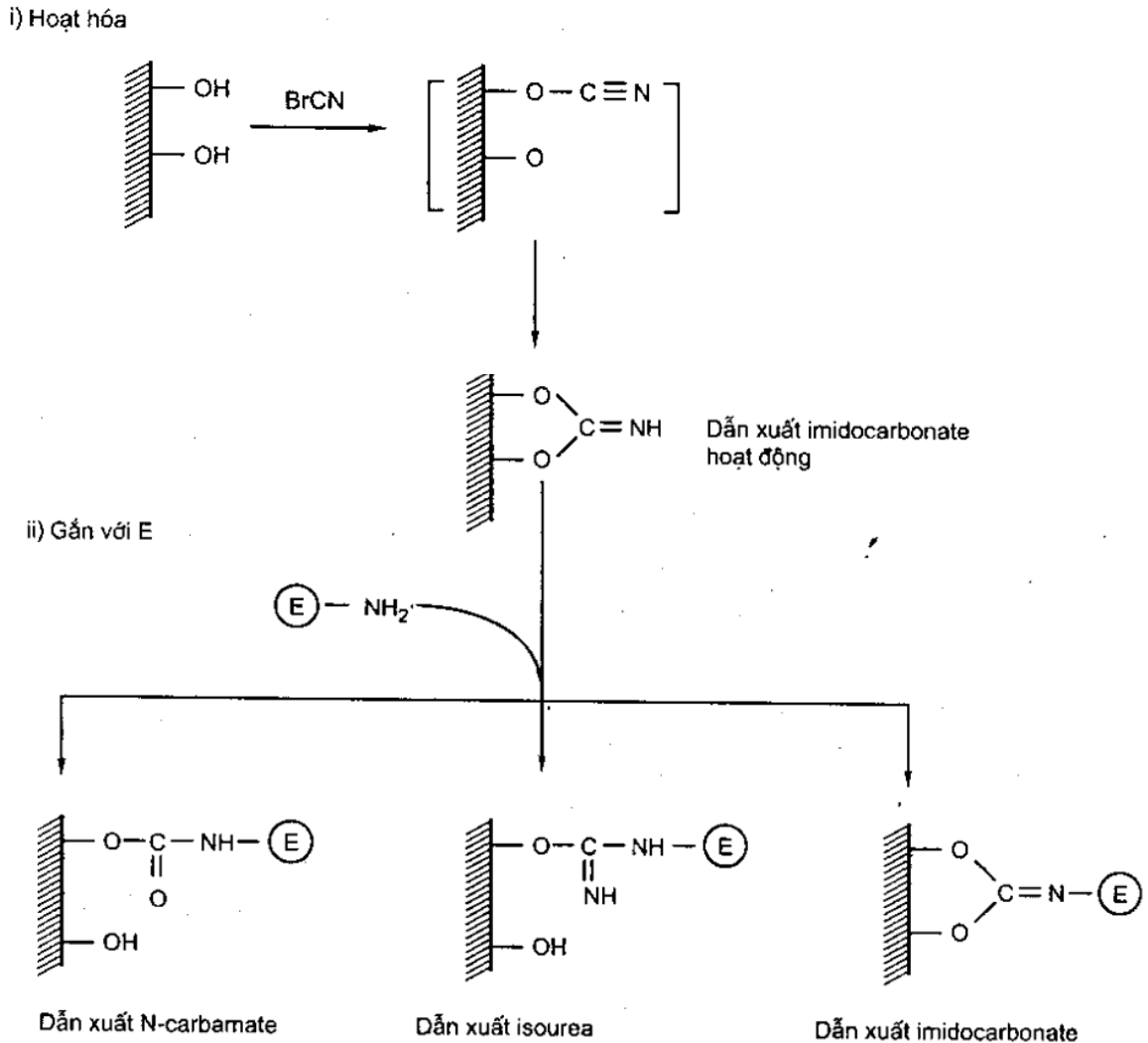
- Các polymer tổng hợp (polyamide, polystyrene, polyacrylate, polyacrylamide, polyester v.v...

- Các polymer của saccharide và dẫn xuất của chúng: agarose, dextran, chitin, cellulose; hay một số protein như collagen, gelatin, albumin (thường được dùng ở quy mô phòng thí nghiệm). Các chất này có bề mặt phân tử ưa nước, lại có nhiều nhóm hydroxyl, có thể dễ dàng tạo thành liên kết cộng hóa trị với enzyme.

Cầu nối (spacer) giữa enzyme và chất mang

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi kết hợp trực tiếp enzyme vào chất mang có thể có ảnh hưởng xấu đến hoạt độ enzyme, một phần là do chất mang có thể cản trở về mặt không gian đối với việc tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất. Vì vậy thường dùng spacer có vai trò

như là cầu nối giữa E và chất mang, có thể ví như tay đòn đưa enzyme ra xa chất mang hơn, làm cho enzyme có thể hoạt động trong phạm vi môi trường rộng hơn, dễ tiếp xúc với cơ chất hơn (hình 5.1 e.i).



Hình 5.4. Sơ đồ phản ứng hoạt hóa chất mang bằng BrCN, gắn enzyme vào chất mang đã hoạt hóa

Khoảng cách giữa enzyme và chất mang cũng có vai trò quan trọng, khi có spacer, khoảng cách giữa enzyme và chất mang khoảng 1 nm. Vấn đề là phải làm thế nào để chọn được chiều dài spacer thích hợp, vừa bảo đảm độ linh động của enzyme và cũng không quá dài, nếu quá dài enzyme lại có thể bị quay lại gần chất mang hơn (hình 5.1 e.ii). Đối với các spacer có các nhóm methyl, việc điều chỉnh độ dài của nó có thể thực hiện bằng cách tăng hay giảm số nhóm methyl (-CH₂-) trong phân tử của nó: nếu muốn tránh tương tác

không có lợi của chất mang, dùng spacer dài hơn; nếu muốn enzyme gần với chất mang hơn thì rút ngắn chiều dài của spacer.

Ngoài chiều dài, để thực hiện có kết quả phương pháp này còn cần lưu ý đến kiểu liên kết giữa enzyme và chất mang, trình tự kết hợp (spacer kết hợp với enzyme trước rồi mới kết hợp với chất mang hay ngược lại).

5.2.6.1. Phương pháp gắn enzyme vào chất mang bằng liên kết cộng hóa trị

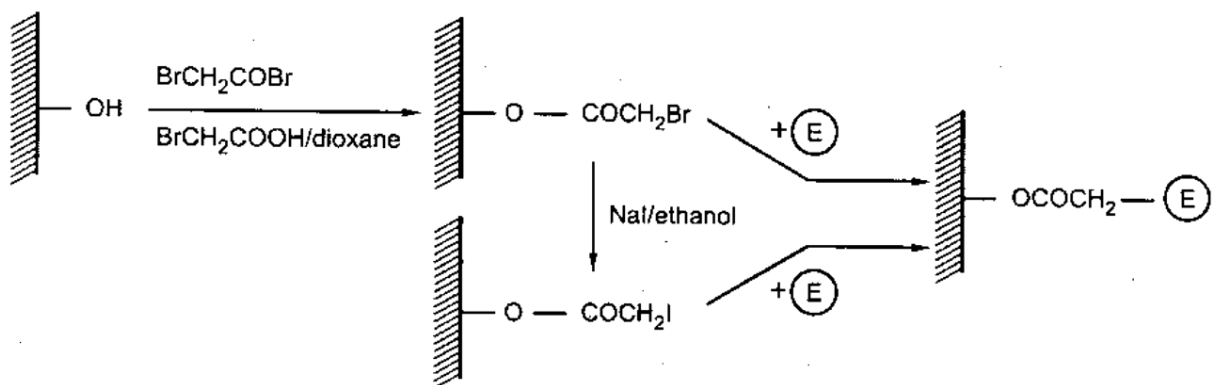
Trong nhiều trường hợp thường tiến hành qua 2 giai đoạn chính:

- Xử lý, hoạt hóa chất mang trước khi gắn enzyme.
- Gắn enzyme vào chất mang đã được hoạt hóa.

Một số phương pháp thường dùng để hoạt hóa chất mang như: dùng cyanogen bromide, diazot hóa (diazotation), azide acid, các chất ngưng tụ (condensing reagent) v.v... Sau đây sẽ trình bày một số ví dụ.

a) Cyanogen bromide (BrCN) được sử dụng phổ biến để hoạt hóa các chất mang có nhiều nhóm hydroxyl như các polysaccharide, các hạt thủy tinh, gốm. Sơ đồ phản ứng quá trình này được trình bày trên hình 5.4.

b) Phương pháp alkyl hóa các nhóm trêi chất mang làm cho nó dễ dàng phản ứng với các nhóm amino, nhóm hydroxyl phenolic, nhóm sulfhydryl của phân tử enzyme. Các dẫn xuất halogen của acetyl cellulose, dẫn xuất triazinyl của cellulose hay các chất trao đổi ion khác đã được dùng trong phương pháp này (hình 5.5).



Hình 5.5: Phương pháp ankil hóa

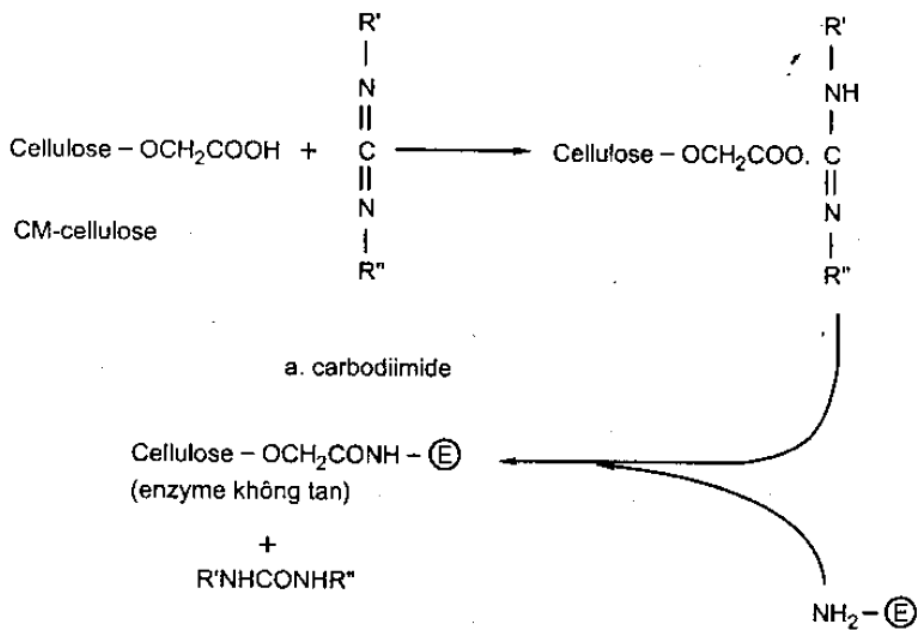
c) Tạo cầu disulphide giữa enzyme và chất mang

Đối với các enzyme có nhóm sulfydryl không có vai trò quan trọng đối với hoạt

động xúc tác của enzyme, có thể dùng *các* chất mang có nhóm sulfhydryl để tạo cầu disulphide với enzyme. Phản ứng này có tính thuận nghịch, có thể dễ dàng tách enzyme khỏi chất mang (nếu hoạt độ của nó bị giảm), để tái tạo chế phẩm, chỉ cần thêm chất khử vào.

d) Dùng các hóa chất ngưng tụ (condensing reagent)

Ví dụ, sử dụng carbodiimide làm yếu tố ngưng tụ để tạo thành liên kết peptide giữa các nhóm carboxyl hoặc nhóm amino của chất mang, với các nhóm amino và các nhóm carboxyl của enzyme. Phương pháp này được sử dụng đối với chất mang cellulose (hình 5.6).

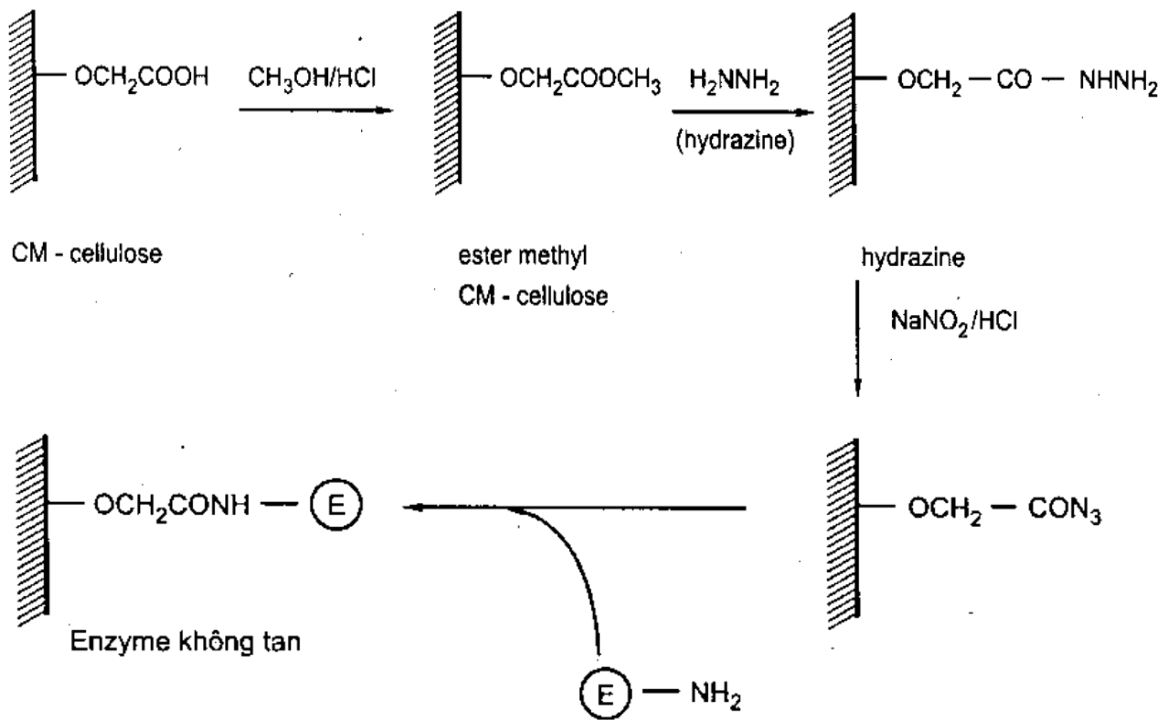


Hình 5.6. Sơ đồ phản ứng tạo thành liên kết peptide giữa enzyme và chất mang CMC-cellulose khi sử dụng acid carbodiimide làm yếu tố ngưng tụ

e) Tạo liên kết peptide bằng phương pháp azide acid

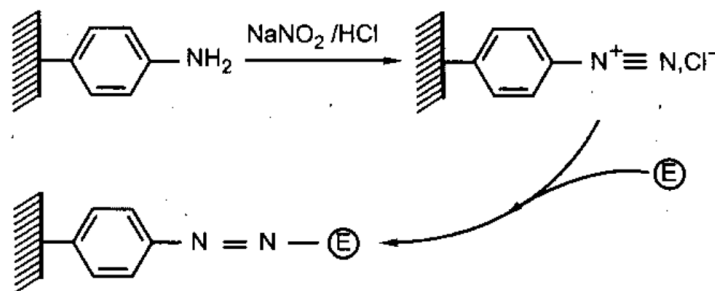
Phương pháp này được dùng trong hóa tổng hợp peptide. Ví dụ, sử dụng chất mang là CM-cellulose, phản ứng tiến hành như sau (hình 5.7).

Trong enzyme cố định chế tạo theo phương pháp này loại liên kết cơ bản được tạo ra là liên kết peptit. Liên kết này giúp cho enzyme được giữ ổn định trên chất mang mà không ảnh hưởng đến trung tâm hoạt động của enzyme. Liên kết peptid là loại liên kết rất bền dựa trên các liên kết cộng hóa trị.



Hình 5.7. Sơ đồ phản ứng tạo liên kết peptide giữa enzyme và chất mang bằng phương pháp azide acid

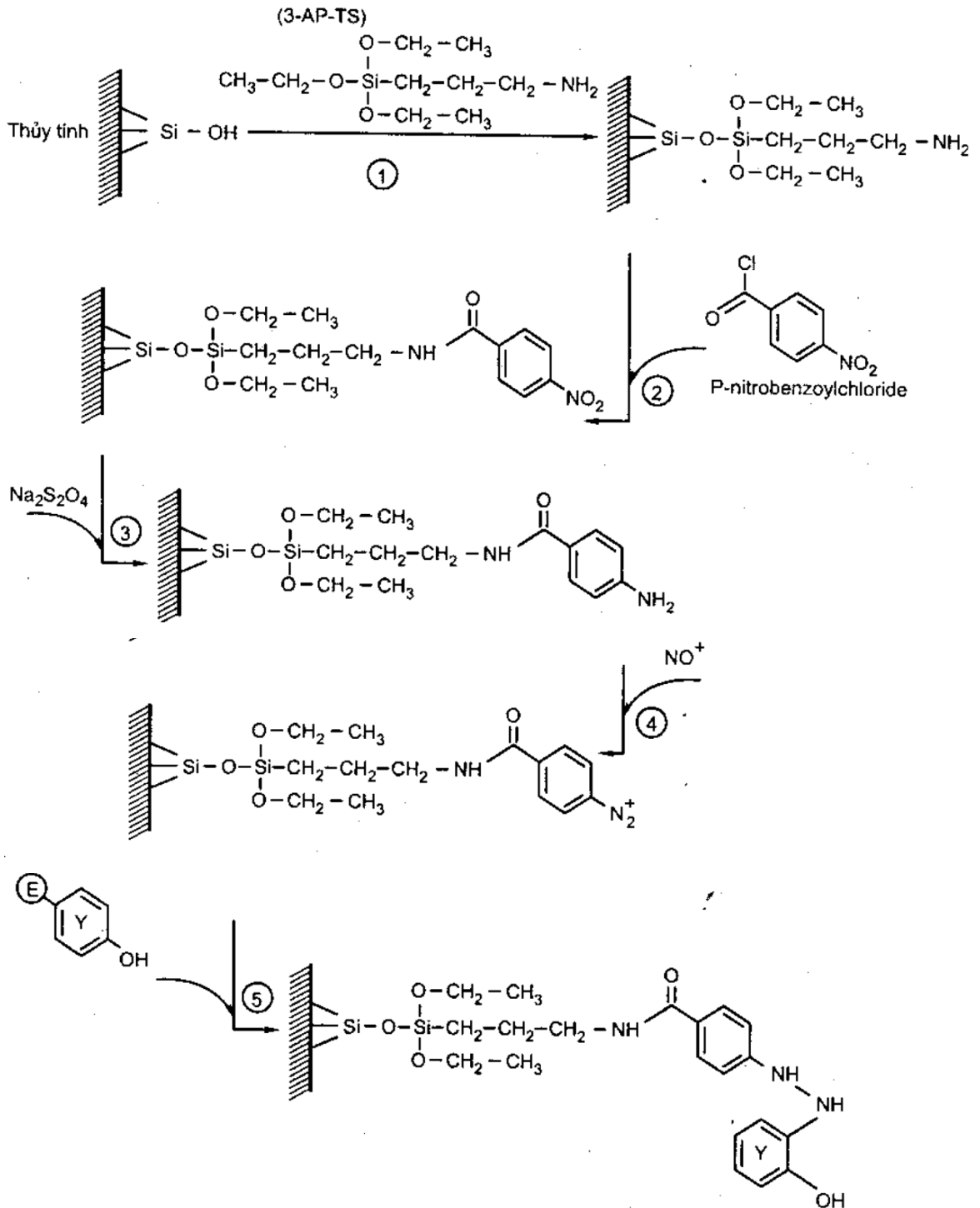
f) **Phương pháp diazot hóa:** Phương pháp này được sử dụng đối với các chất mang có các nhóm amino thơm, nhóm amin của nó được diazot hóa bằng acid nitrous, tạo thành dẫn xuất diazonium. Dẫn xuất này phản ứng với enzyme tạo thành enzyme không tan. Ví dụ: dùng chất mang là 4-aminobenzyl cellulose, phản ứng tiến hành như ở hình 5.8.



Hình 5.8. Phản ứng diazot hóa chất mang 4-aminobenzyl cellulose để tạo chế phẩm enzyme không tan bằng liên kết cộng hóa trị

g) **Cố định enzyme trên bột thủy tinh bằng liên kết cộng hóa trị**

Chất mang bột thủy tinh có nhiều ưu điểm như chịu được các điều kiện khắc nghiệt, có cấu trúc bền vững, vì vậy rất thuận tiện để sử dụng trong công nghiệp.



Hình 5.9. Các giai đoạn hoạt hóa và gắn enzyme vào bề mặt thủy tinh (không có lỗ) 3-AP-TS = 3-aminopropyl-triethoxysilane; Y = gốc tyrosine của enzyme

Hạn chế chính của loại chất mang này là có tính “trơ” về hóa học. Vì vậy để có thể sử dụng chúng có hiệu quả, cần phải gắn thêm các nhóm phản ứng vào bề mặt của nó. Có thể trình bày tóm tắt quá trình gắn E vào bề mặt bột thủy tinh không có lỗ (nonporous

glass) như trên hình 5.9.

Chuẩn bị bột thủy tinh, hạt có đường kính khoảng 1mm, quá trình gắn enzyme được thực hiện qua 5 bước chính như sau:

1)Hoạt hóa bề mặt thủy tinh bằng phản ứng với silane để đưa nhóm amin vào.

2)Phản ứng tiếp với p-nitrobenzoylchloride, nhóm nitro của vòng thơm sẽ **được** chuyển hóa tiếp bằng các phản ứng khác.

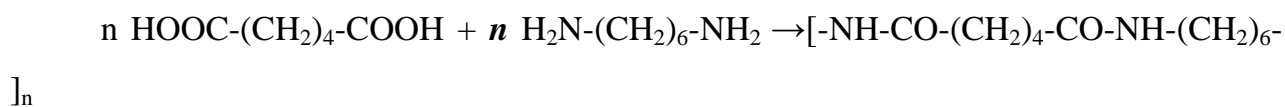
3)Khử nhóm nitro thành nhóm amino.

4)Cho tác dụng với acid nitrous, nhóm amino chuyển thành cation diazonium.

5)Nhóm diazonium sẽ kết hợp với gốc tyrosine trong phân tử E.

h) Cố định enzyme vào polyamide (ví dụ nylon) bằng liên kết cộng hóa trị

Nylon là polyamide kỹ thuật quan trọng nhất, là polymer mạch dài được tạo thành do phản ứng ngưng tụ với lượng tương đương của acid adipic và hexanediamine (polyhexamethylene adipamide, nylon 6,6,6,6-polyamide, số 6 có nghĩa là mỗi thành phần của phản ứng ngưng tụ, acid và amine đều góp vào 6 nguyên tử carbon).



Ưu điểm của nylon là bền dưới tác dụng của vi sinh vật, và cũng có tính ưa nước ở mức độ nhất định. Vì vậy, có thể sử dụng nylon để bọc enzyme (tạo capsule), hoặc có thể dùng để hấp phụ enzyme, nhưng khó tạo được liên kết cộng hóa trị giữa enzyme và nylon vì nó chỉ có 2 nhóm ở hai đầu phân tử là có thể phản ứng với enzyme.

Để tăng số nhóm có khả năng kết hợp với enzyme, cần thủy phân một số liên kết amide trong polymer (nhưng phải không phá hỏng cấu trúc polymer) để tạo thành các nhóm amino và carboxyl tự do có thể kết hợp với enzyme.

i) Cố định E vào các nhóm amin sau khi thủy phân một phần polyamide

Quá trình này gồm 4 bước:

1-Xử lý polymer để làm tăng diện tích bề mặt và tăng khả năng tiếp xúc với nước.

2-Cắt đứt một số liên kết amide.

3-Hoạt hóa các nhóm amin hoặc nhóm carboxyl tự do.

4-Gắn enzyme vào polyamide đã được hoạt hóa.

Chi tiết các bước này như sau:

1) Xử lý polymer: Chuẩn bị khoảng 10 mẫu polyamid tổng hợp có kích thước 2cm^2 , nhúng vào hỗn hợp 18,6% (w/w) CaCl_2 và 18,6% (w/w) nước trong methanol đựng trong bình quay đáy tròn. Lắp bình vào máy quay (không có chân không) ở 50°C . Sau đó rửa các mẫu polymer cẩn thận bằng nước trên phễu lọc hút.

2) Cắt đứt một số liên kết amide: Nhúng các mẫu polyamide đã rửa sạch trong dung dịch HCl 3,65M và quay 40 phút trong máy quay (không có chân không) ở 50°C . Rửa kỹ các mẫu nylon (trên máy lọc hút) bằng nước, sau đó rửa bằng dung dịch đệm borate 0,2M, pH 8,5.

Cũng có thể cắt đứt liên kết amide theo cách khác: Các mẫu polyamide đã khô, sau khi nhúng trong methanol, giữ trong 12 giờ ở 70°C trong 25ml N,N-dimethyl-1,3-propanediamine, rửa kỹ với nước trên phễu lọc hút.

1) Hoạt hóa các nhóm amine tự do: Cho các mẫu polyamide đã xử lý như trên vào bình quay trong 25ml dung dịch 5% (w/v) glutaraldehyde trong dung dịch đệm borate 0,2M pH 8,5, cho máy quay 15 phút ở 20°C . Loại bỏ glutaraldehyde thừa bằng cách rửa trên phễu lọc hút với dung dịch potassium phosphate 0,1M, pH 7,5.

2) Gắn enzyme: Ngay sau khi đã rửa sạch, nhúng các mẫu polyamide vào dung dịch enzyme (0,2- 0,5mg/ml trong dung dịch potassium phosphate 0,1 M, pH 7,5), giữ 3 giờ ở 4°C .

Loại bỏ phần enzyme còn thừa (không gắn vào chất mang) bằng cách rửa nhiều lần với dung dịch NaCl 0,5M trong dung dịch potassium phosphate 0,1M, pH 7,5. Sau đó giảm nồng độ muối bằng cách rửa với dung dịch potassium phosphate 0,1M, pH 7,5. Chế phẩm giữ trong dung dịch potassium phosphate 0,1 M, pH 7,5 ở 4°C .

Nếu cần bảo quản lâu, có thể rửa nhanh với nước và làm khô ở điều kiện bình thường (đối với một số enzyme có thể không bền trong điều kiện này).

Nếu muốn gắn enzyme vào nhóm carboxyl, sau khi đã cắt đứt một số liên kết amide, cần bao vây nhóm amino bằng cách xử lý với dung dịch sodium nitrite 1% (w/v) trong HCl 0,5M đã làm lạnh trong nước đá, tiếp tục giữ trong dung dịch này 20 phút ở 40°C .

Hoạt hóa nhóm carboxyl tự do: Ngâm các mẫu nylon đã xử lý như trên 4 giờ ở 10°C trong dung dịch hexane di a mine 1% (w/v) và dung dịch dicyclohexylcarbodiimide 1%

(w/v) trong dichloromethane. Loại hexanediamine thừa bằng cách rửa với dichloromethane, acetone, và nước đã làm lạnh trong đá, mỗi loại 10ml. Quá trình hoạt hóa được hoàn thành sau khi ngâm 20 phút trong 10 ml dung dịch sodium nitrite 1% (w/v) trong HCl 0,5M ở 0°C. Rửa lại bằng 10ml HCl 1 mM đã làm lạnh trong đá. Tiến hành gắn enzyme và bảo quản như trên.

Tóm lại, để tạo chế phẩm enzyme không tan có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau, nhiều chất mang khác nhau. Trong số các phương pháp đã nêu, phương pháp hấp phụ được sử dụng sớm nhất. Việc sử dụng enzyme không tan trong thực tế mới được bắt đầu từ năm 1953 (sau khi cố định enzyme bằng liên kết cộng hóa trị). Các phương pháp khác mới được phát triển từ khoảng năm 1956 trở về sau. Đến năm 1969, lần đầu tiên sử dụng enzyme không tan ở quy mô công nghiệp để sản xuất L-amino acid.

+ Mỗi phương pháp có những ưu điểm, những hạn chế nhất định.

+ Trong những phương pháp đã nêu, các phương pháp cố định enzyme bằng liên kết chéo, liên kết cộng hóa trị, cần đặc biệt lưu ý sao cho chất mang không kết hợp với các nhóm trong trung tâm hoạt động của enzyme.

+ Cần chú ý cải tiến phương pháp cố định, giảm bớt sự cản trở không gian của chất mang đối với phản ứng enzyme.

+ Để tạo được chế phẩm enzyme không tan có hiệu quả kinh tế, cần thăm dò bằng thực nghiệm để lựa chọn chất mang, phương pháp và điều kiện cố định enzyme cho từng trường hợp cụ thể.

Trong các phương pháp trên, phương pháp đưa enzyme vào liposome hoặc trong capsule thường được sử dụng để sản xuất các chế phẩm không tan phục vụ y tế.

Hạn chế của phương pháp này là trong quá trình tạo liên kết chéo giữa các phân tử enzyme, có thể phá hỏng cấu trúc của enzyme, làm giảm hoạt độ của nó. Vì vậy, cần lựa chọn điều kiện phản ứng, chất tham gia tạo liên kết chéo sao cho hoạt độ enzyme bị giảm ít nhất. Để tăng độ bền của chế phẩm, có thể sử dụng thêm protein không có hoạt tính xúc tác như albumin huyết thanh bò. Nói chung phương pháp tạo liên kết chéo ít được dùng vì không đáp ứng được yêu cầu của nhiều quá trình kỹ thuật trong sản xuất.

5.3. CÁC REACTOR CHỨA ENZYME CỐ ĐỊNH:

Reactor (cột phản ứng) chứa enzyme được sử dụng để tạo tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất trong một khoảng thời gian đủ lớn để tiến hành phản ứng xúc tác, đồng thời tách sản phẩm phản ứng - để lại enzyme.

5.3.1. Reactor hoạt động theo chu kỳ.

Thực tế đó là những bể lớn hay bồn chứa enzyme và cơ chất có trang bị máng khuấy. Như vậy dung tích làm việc và hiệu suất chuyển hoá được giữ cố định và người ta cho phản ứng tiến hành triệt để theo tính toán. Sau đó tháo cạn toàn bộ để tách sản phẩm khỏi enzyme (xong 1 chu kỳ làm việc) rồi lại chuẩn bị tiến hành mẻ khác.

Trong trường hợp enzyme tan (lẫn lộn cơ chất còn dư, sản phẩm phản ứng với enzyme) thì để tách sản phẩm người ta thường làm biến tính enzyme (ví dụ bằng cách xử lý nhiệt).

Phương cách sử dụng này có hiệu quả kinh tế nếu dùng enzyme rẻ tiền mà sản phẩm phản ứng lại có giá trị, enzyme dùng xong không thu hồi lại được.

Để reactor kiểu này có thể dùng enzyme đắt tiền trước hết cần phải cố định nó thành enzyme không tan. Sau chu kỳ phản ứng, chế phẩm enzyme không tan được tách ra bằng ly tâm hay lọc.

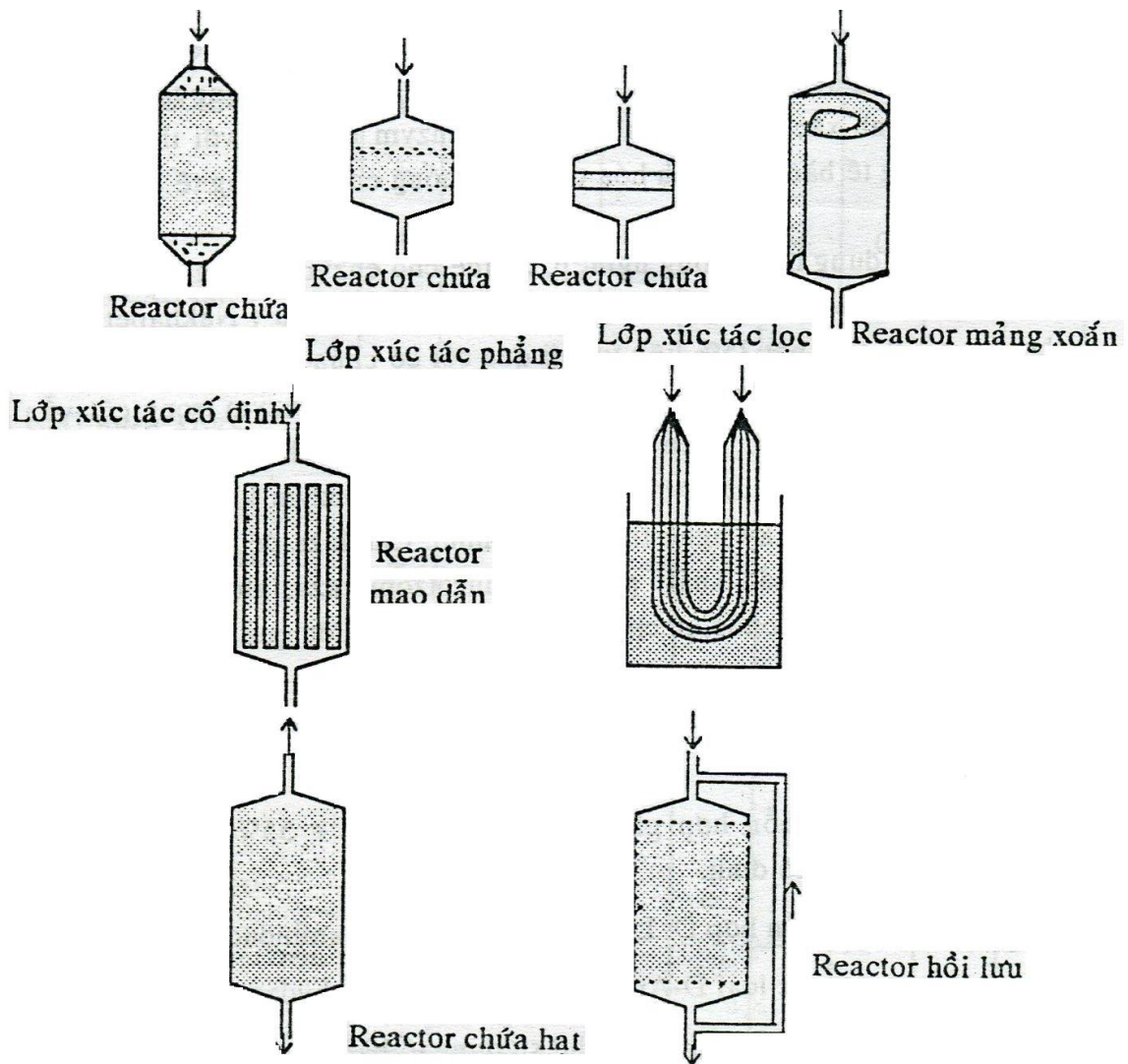
Trong thực tế quy trình thu hồi enzyme này có thể làm phá huỷ cấu trúc của chế phẩm enzyme không tan, nghĩa là phá huỷ enzyme. Vì vậy reactor hoạt động theo chu kỳ thường được sử dụng với enzyme tan rẻ tiền, không cần thu hồi enzyme, chi phí sản xuất thấp hơn so với các phương pháp khác.

5.3.2. Reactor hoạt động theo kiểu dòng chảy:

Nguyên tắc hoạt động của reactor dòng chảy là sự bổ sung cơ chất (liên tục hay gián đoạn, theo chu kỳ) theo dòng nhất định (tốc độ nạp, dung tích nạp) và sản phẩm phản ứng cũng được lấy ra theo hình thức tương tự với quá trình nạp cơ chất. Người ta chia ra 2 nhóm reactor dòng chảy: nhóm có khuấy trộn và nhóm không khuấy trộn khi hoạt động.

Reactor dòng chảy có khuấy trộn là một bể (bồn hay thiết bị) có máng khuấy, có đường dẫn nạp cơ chất và đường lấy hỗn hợp hay sản phẩm phản ứng ra khỏi bể (nguyên tắc chemostat trong nuôi cấy vi sinh vật). Các thông số hoạt động của thiết bị như: dung tích, tốc độ bổ sung cơ chất, hoạt tính enzyme, tốc độ tháo sản phẩm, thời gian duy trì phản

ứng và chu kỳ làm việc thường được tối ưu hóa theo những mục tiêu đã định.



Hình 5.10: Mô hình các kiểu reactor chứa enzyme cố định.

Tuy nhiên do sự khuấy trộn nên các hạt enzyme cố định phân bố trong toàn dung tích làm việc của thiết bị và được tháo ra ngoài cùng với sản phẩm phản ứng. Để duy trì enzyme cố định cần phải liên tục hay định kỳ bổ sung một lượng chế phẩm enzyme cố định bằng cách: tách enzyme ra khỏi sản phẩm bằng cách lọc, hoạt hoá trở lại rồi đưa vào thiết bị; hoặc cố định enzyme trực tiếp trên cánh khuấy, định kỳ bổ sung, thay thế mới.

Reactor dòng chảy có khuấy trộn có thể kết hợp với quá trình siêu lọc, điều này cho phép sử dụng enzyme cố định ở dạng tan trong các reactor, đặc biệt thích hợp với cơ chất không tan hay ở dạng keo.

Reactor dòng chảy không khuấy trộn: Enzyme cố định được nhồi vào cột, dịch cơ chất chảy từ trên xuống ngấm qua lớp enzyme và đầu dưới sẽ nhận được dịch sản phẩm xúc tác. Một reactor dòng chảy lý tưởng khi lớp cơ chất chảy qua toàn bộ diện tích mặt cắt ngang của cột với tốc độ không đổi - đây là hệ thống reactor tách - đầy lý tưởng. Trong thực tế dịch cơ chất cũng có thể đưa từ dưới lên, chảy trên qua cột còn sản phẩm lấy ra từ trên.

5.4. SỬ DỤNG ENZYME CỐ ĐỊNH TRONG Y HỌC VÀ TRONG CÔNG NGHIỆP:

Việc ứng dụng enzyme cố định đã cho phép tạo ra một số công nghệ hoàn toàn trong y học và công nghiệp.

5.4.1. Trong y học:

- Enzyme cố định được sử dụng để điều trị bệnh thiếu hệ enzyme, tích lũy các sản phẩm độc của cơ thể. Ưu điểm của enzyme cố định là tránh được sự phân hủy của các protease của cơ thể gây ra (do phản ứng miễn dịch của cơ thể).

- Enzyme cố định còn được chữa một số bệnh như:

- + Sử dụng enzyme cố định để làm các nội quan giả như: bàng quan, niêm mạc.
- + Sử dụng L - asparaginase cố định trong microcapsule điều trị bệnh bạch cầu, cũng như khả năng ức chế sự phát triển các u ác tính do sự có mặt của L – asparagin.
- + Urokinase gắn trong microcapsule để loại ure máu trong chạy thận nhân tạo.
- + Chymotrysin, superoxit dismutase chống viêm.
- + Steptokinase, lumbrokinase, urokinase làm tan các cục máu đông gây tắc nghẽn động mạch, viêm tĩnh mạch.
- + Nghiên cứu cấu trúc phân tử enzyme, cấu tạo màng tế bào, mô hình hoá hệ thống enzyme trong tế bào.

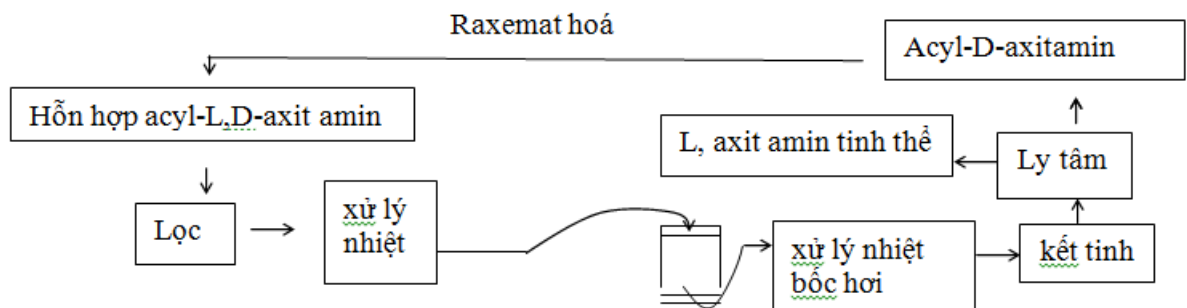
5.4.2. Trong công nghiệp

+ Sử dụng reactor dòng chảy không khuấy trộn: Nakhapetian (1976) đã cho dung dịch tinh bột hồ hoá 35% liên tục qua cột chứa glucoamylase không tan để đường hoá. Sau 22,6 ngày phản ứng ở $t = 45^{\circ}\text{C}$, hoạt độ enzyme trong cột vẫn còn 50%. Hiện nay là thỏa mãn nhu cầu về mạch nha của cả nước.

+ Các chế phẩm enzyme không tan dùng trong công nghệ thực phẩm: catalase để khử trùng sữa, glucoizomerase để đồng phân hoá sản xuất fructoza, glucooxydase để sản xuất axit glutamic, pectinase để làm trong nước quả, sản xuất hỗn hợp đường khử glucose – fructoza dùng glucoizomerase cố định.

5.4.3. Sử dụng aminoacylase cố định để sản xuất axit amin.

Trong quá trình tổng hợp hoá học hay lên men (sinh tổng hợp) để sản xuất các axit amin, nhược điểm lớn nhất của phương pháp này cho ra các sản phẩm raxemic, tức là hỗn hợp của 2 dạng đồng phân quang học D và L trong đó chỉ có dạng L mới có hoạt tính sinh học cao, có ý nghĩa trong khoa học hoá sinh. Nếu sử dụng phương pháp hoá học hay kết hợp với sinh tổng hợp (lên men 2 pha) sẽ rất tốn kém, không khả thi.



Hình 5.11: Sơ đồ công nghệ sản xuất L axit amin của hãng TANABE SEIZAKY.

Từ năm 1969 hãng Tanabe Seizaku (Nhật Bản) sử dụng enzyme cố định aminoacylase (AACD: enzyme đồng phân hoá chuyển từ dạng D sang dạng L của axit amin) để chuyển hoá hỗn hợp D, L axit amin. Trong đó enzyme aminoacylase được cố định trên DEAE - Sephadex bằng liên kết ion với thời gian bán huỷ là 65 ngày ở 50⁰C.

- Phương pháp cố định: 1000-1700 lít dịch enzyme lắc đều với DEAE - Sephadex trong lọ ở 35⁰C, pH = 7,0, sau đó lọc và rửa sạch. Enzyme sau khi gắn vào chất mang có hoạt tính 50 - 60% hoạt tính enzyme tự do. Chế phẩm enzyme cố định sau đó được nhồi vào cột phản ứng (bioreactor) sau 65 ngày làm việc sẽ được tái sinh với dịch enzyme mới, cứ như vậy sau 8 năm mới phải thay chất mang mới.

Phản ứng trong bioreactor xảy ra ở pH=7.0, t=50⁰C, bổ sung 5.10⁻⁴ M Co²⁺. Vận tốc dòng chảy 2000 lít /h với dung tích của bioreactor là 1000 lit.

Ví dụ: quá trình sản xuất L - metionin: nồng độ ban đầu của hỗn hợp acetyl D, L

metionin là 0,2mol. Sau khi chạy qua cột phản ứng thu được 2000 lit dung dịch. Sau khi cho bay hơi và kết tinh thu được 27 kg L - metionin (hiệu suất thu hồi 91%). Dịch acetyl D metionin được xử lý ở 60⁰C với axetaldehyt (raxemet hoá), điều chỉnh pH = 1,8 để chuyển về hỗn hợp D, L-metionin.

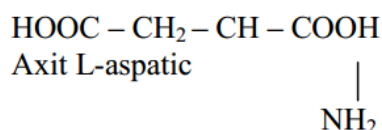
Bảng 5.1- Một số loại axit amin sản xuất bởi enzyme cố định aminacylase trên PEAE-Sephadex (cột dung tích 1m³) của hãng TANABE SEIZAKU.

Axit amin	Vận tốc nạp 1000 lit/h	Sản phẩm axit amin/24h-Kg
L-Alanin	1,0	214
L-metionin	2,0	715
L-phenylalanin	1,5	594
L-triptofan	0,9	441
L-valin	1,8	505

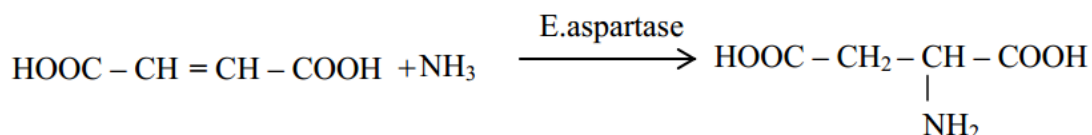
Hiện nay hãng này sản xuất 700-1000 kg axit amin/ngày với chi phí 60% so với qui trình cũ sử dụng enzyme hoà tan.

Qui trình tương tự được hãng SNAM-Progetti (Italy) ứng dụng trên cơ sở cố định enzyme aminoacylase trong sợi triaxetat xenluloza. Chế phẩm hoạt động liên tục 50 ngày chỉ mất tối đa 30% hoạt tính. Cứ 1 kg enzyme cố định cho phép sản xuất được 400 kg L-triptofan.

5.4.4. Sản xuất L - axit aspartic bằng enzyme asparase cố định.



Là cơ chất trung gian của rất nhiều quá trình chuyển hoá sinh tổng hợp các axit amin khác rất quan trọng trong dinh dưỡng động vật và chế biến thực phẩm (sản xuất axit L-valin, tổng hợp axit α-xetoglutaric (tiền chất để chuyển hoá thành axit L-glutamic)). Cơ chế hoá sinh của sự tạo thành axit aspartic là quá trình tạo liên kết đồng hoá trị giữa NH₃ với axit fumaric bởi enzyme aspartase:



Từ năm 1973, hãng TANABE SEIZAKY đã sử dụng tế bào có chứa enzyme

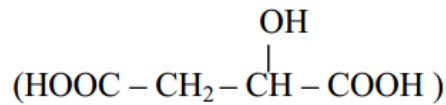
aspartase (nòi vi khuẩn *Brevibacterium flavum* nuôi cấy trên môi trường rỉ đường giàu biotin) và gói nó trong gel polyacrylamit với bán chu kỳ hoạt động là 120 ngày ở 37°C.

Phương pháp cố định như sau: 10 kg tế bào hoà tan 40 lit dung dịch sinh lý (saccaroza + NaCl tổng cộng 1%). Thêm 7,5 kg acryamit, 0,4 Kg bis-acryamit. 5lit dimetyl aminopronitri) 5%. 5 lit amonium persulfat 2,5 %.

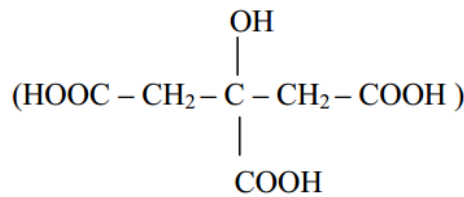
Hỗn hợp để ở 40°C trong 10 – 12 phút, gel tạo thành được cắt thành miếng như hình vuông 2 – 3 mm. Nguyên liệu ban đầu để sản xuất là hỗn hợp axit fumaric-amonisulfat hòa tan trong MgCl₂ 0,1N với nồng độ 1mol/lit dung dịch MgCl₂. Phản ứng thực hiện ở pH = 8,5, t⁰ = 37°C, vận tốc dòng chảy là 0,6 V_{bioreactor}/h. Dịch sau khi qua cột được chuyển về pH = 2,8 bằng H₂SO₄ 60% ở 90°C. Sau đó làm nguội xuống 15°C trong 2h. Tinh thể axit aspartic hình thành được lắng, ly tâm và rửa bằng nước.

Với cột bioreactor dung tích 1m³ trên đã sản xuất được 1700 kg axit L-aspartic/ngày với chi phí bằng <60% so với công nghệ cũ (chuyển hoá bằng phương pháp hoá học)

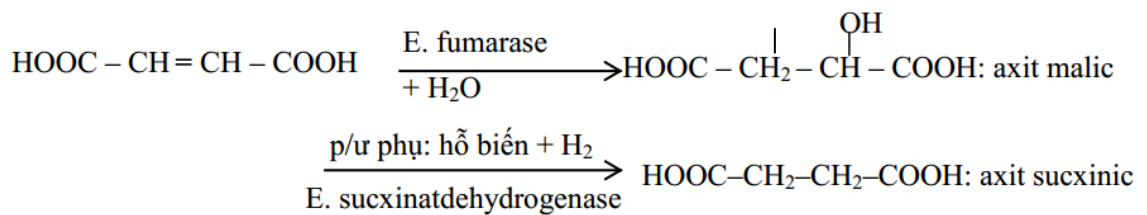
5.4.5. Sản xuất axit L-malic bằng enzyme fumarase cố định:



Axit malic được sử dụng để thay thế axit xitric trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.



Dưới tác dụng của enzyme fumarase, axit fumaric được chuyển hoá thành axit malic (phản ứng phụ tạo thành axit succinic):



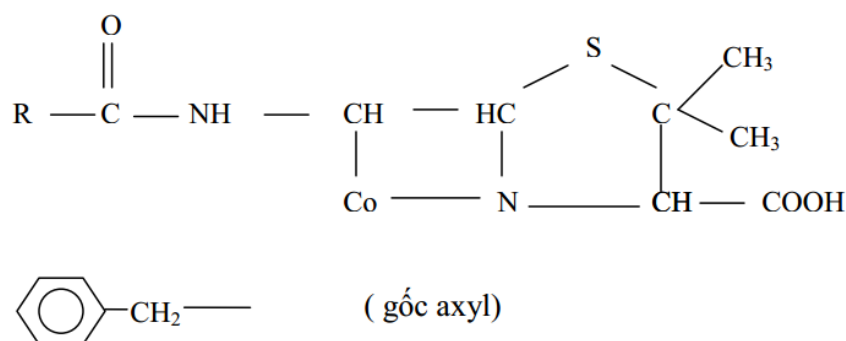
Phản ứng sẽ cân bằng khi chuyển hoá được khoảng 80% axit fumaric. Qui trình được thực hiện năm 1984 bởi hãng TANABE SEIZAKU.

Enzyme fumarase được cố định trong gel polyacriamit, để ức chế phản ứng phụ tạo axit suxinic, tế bào cố định được xử lý bằng axit uric 0,2% ở 37°C, pH = 7,5 trong 20h. Chế phẩm có bán chu kỳ hoạt động là 55 ngày ở 37°C. Cơ chất được sử dụng là muối Na. fumarar nồng độ 1mol/lit, pH = 7, t=37°C, vận tốc dòng chảy 0,2 thể tích bioreactor/h.

Hãng SNAM Progetti lại sử dụng trực tiếp enzyme fumarase cố định trong sợi triaxetat xenluloza. Sau khi chạy qua cột axit malic được thu hồi bằng cách kết tủa với CaCO₃.

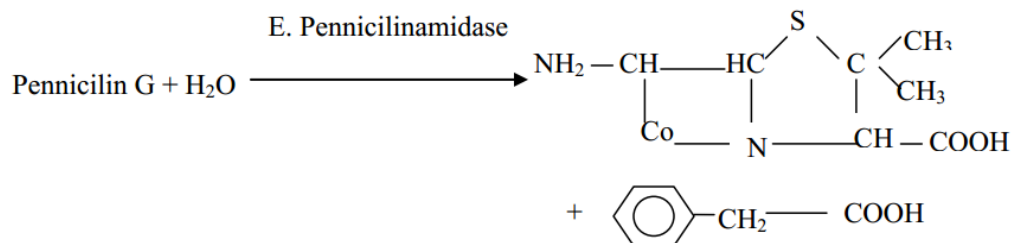
5.4.6. Sản xuất nhóm penixilin-axit 6 amino penicillinic (6-APA) bằng enzyme cố định penicillinamidase.

Penicillin là một nhóm chất có tính kháng sinh, cấu tạo chung là:



Với R là gốc axyl thì ta có penicillin G – là penicillin thương mại và sinh hoạt phổ biến nhất hiện nay.

Enzyme penicillinamidase xúc tác thuỷ phân benzyl penicillin (penicillin G) để tạo thành nhóm penicillin 6-APA và axit phenyl axetic.



6 – APA được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp dược phẩm để sản xuất các loại kháng sinh họ penicillin. Hiện nay toàn bộ 6 – APA của thế giới đều được sản xuất bằng

phương pháp sử dụng enzyme penicillinamidase cố định. Đây là enzyme nội bào khi sinh tổng hợp bởi vi khuẩn *Esterichia-Coli*, *Bacterium faecalic*, *alacaligus* với môi trường casein thủy phân, cao ngô, glucose, axit phelnylaxetic làm chất cảm ứng.

Phương pháp gói enzyme của hãng SNAM Progetti (Italy) như sau: 10 lit dung dịch penicillinamidase pH=8 trộn với 5kg triaxetic xenluloza trong 71,4kg clorimetylin ở 4⁰C, lắ kỹ cho đến khi tạo gel và các sợi. Mỗi kg sợi thành phẩm được nhồi trong các cột kích thước 43 x 14 cm. 26lit penicillin G (muối kali) cho chảy liên tục qua cột ở pH = 8,2 cho đến khi đạt mức chuyển hoá 97% 6-APA.

Công nghệ của hãng TANABE SEIZAKU: sử dụng bioreactor tế bào cố định chứa penicillinamidase trong gel polyacriamit như sau: dung dịch penicillin G 0,65M ở pH=8,5 cho chảy qua cột với tốc độ 0,12 – 0,14 thể tích cột/h. Hiệu suất phản ứng đạt 80%.

5.4.7. Thủy phân lactose bằng enzyme lactase cố định:

Lactose là disaccarit có trong sữa nên được gọi là đường sữa. Loại đường này có độ ngọt thấp (bằng 30% với đường saccaroza ở cùng nồng độ), độ hoà tan kém (gây nên hiện tượng sạn đường trong sữa), một bộ phận người sử dụng sữa không có khả năng tiêu hoá hấp thụ được sữa này. Mặt khác đường sữa hầu như được thải cùng với sữa nếu đem chế biến các sản phẩm sữa chua, phomat sẽ gây ô nhiễm môi trường. Như vậy nếu thủy phân lactose để tạo thành 2 monosaccarit cấu thành nó là glucose và galactose sẽ mang lại hiệu quả to lớn. Lúc đó sữa sẽ có chất lượng cao hơn, loại bỏ hiện tượng sạn sữa, nâng cao độ tiêu hoá, các monosaccarit sẽ được vi sinh vật sử dụng khi lên men sữa (các sản phẩm sữa chua và phomat)

Enzyme lactase được sinh tổng hợp từ một số nòi nấm mốc và nấm men. Nòi được sản xuất dưới dạng chế phẩm cố định thương mại (bảng 5.2).

Bảng 5.2: Một số hãng sản xuất enzyme cố định.

Tên hãng sản xuất	Phương pháp cố định enzyme
Snam Progetti Corning Glass Works	- Nhốt trong sợi triaxetat xenlulose. - Liên kết đồng hóa trị với bột thủy tinh có kích thước 0,4 – 0,8 mm.
Diamond Shamrock Valio Dairies	- Hấp thụ trên các chất trao đổi ion. - Gắn trong gel polyacrylamit.

Hãng SNAM Progetti (Italy) sử dụng bioreactor dung tích 10 lit chứa 4kg latase cố định trong sợi axetat xenluloza. Trước hết sữa được tiệt trùng cực nhanh (142⁰C, 3s), làm

lạnh nhanh đến 4 – 7°C rồi cho chảy qua bioreactor với vận tốc 7lit/phút. Sản phẩm sữa bảo quản tốt trong 3 – 4 tháng ở 4°C. Hiện nay hãng sản xuất hàng ngày 10 tấn sữa không có lactose. Hãng Corning Glass từ năm 1978 sử dụng enzyme lactase liên kết đồng hoá trị với silicagel để xử lý dịch trong sữa với công suất 30 tấn/ngày.

5.4.8. Ứng dụng trong công nghệ môi trường:

Enzyme được cố định một cách hiệu quả trong công nghệ môi trường (xử lý nước thải) bằng phương pháp sinh học. Ví dụ: sử dụng enzyme cố định để khử nitrat trong nước uống.

Nguyên tắc là khử nitrat (độc tính) thành N₂ (không độc) bởi ba enzyme:

- Nitrat reductase (NaR, khử nitrat thành nitrit).
- Nitrit reductase (NiR, khử nitrit thành nitơ oxyt).
- Nitơ reductase (NoR, khử nitơ oxyt thành nitơ).

Sử dụng NaR tinh khiết từ thực vật, NiR và NoR bán tinh khiết từ vi khuẩn đất *Rhodobacter sphaeroides*. Các enzyme được cố định bằng liên kết đồng hóa trị lên các chất mang rẻ tiền và trợ về hóa học. Các phân tử chứa electron cũng được cố định trên chất mang này. Sau đó toàn bộ được nhồi vào giữa các điện cực bằng thép không gỉ trong một buồng nhỏ tạo thành các reactor (điện cực nhằm cung cấp electron cho enzyme để thực hiện phản ứng).

Do NaR kém bền nên có thể trộn thêm hỗn hợp NiR ưa nhiệt và ưa muối vào reactor để mở rộng phạm vi hoạt động tối ưu của enzyme.

Các thử nghiệm với các reactor quy mô nhỏ như trên đã cho kết quả tốt khi xử lý nước uống. Tuy nhiên, để ứng dụng ở quy mô công nghiệp phải khắc phục hai cản trở:

- Chi phí của enzyme rất cao (nhất là NaR).
- Vận chuyển enzyme đến tâm hoạt động của enzyme rất khó khăn.

Hiện nay đã có những nghiên cứu để tách và tinh chế NaR từ nấm men và NiR từ vi khuẩn, cũng như nghiên cứu kỹ thuật cố định, sử dụng các vật liệu khác nhau.

5.5. CHẾ TẠO VÀ SỬ DỤNG CẢM BIẾN SINH HỌC (BIOSENSOR)

Cảm biến sinh học được giới khoa học biết tới từ năm 1956 trong tiếng Anh gọi là Biosensor. Từ sự tìm tòi quan sát sự tồn tại và thích nghi của các sinh vật xung quanh các

nhà khoa học đã nghiên cứu và phát triển ra cảm biến sinh học. Các nhà khoa học đã tìm ra phương pháp để biến các đại lượng không điện (các vật liệu sinh học) thành các đại lượng điện và có thể đo được.

Trải qua thời gian dài hình thành và phát triển cảm biến sinh học càng ngày càng trở nên tinh vi, hiện đại với nhiều ứng dụng trong cuộc sống như: chuẩn đoán bệnh sớm, phát hiện ô nhiễm môi trường, phát hiện nhanh trong kiểm tra an toàn thực phẩm...

5.5.1. Giới thiệu cảm biến sinh học

5.1.1.1. Định nghĩa cảm biến sinh học

Theo IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): Cảm biến sinh học là thiết bị để kiểm tra, xác định trạng thái các phân tử sinh học dựa trên sự tương tác giữa các phân tử cần phân tích với các phân tử sinh học (enzyme, chuỗi DNA, kháng thể, ...).

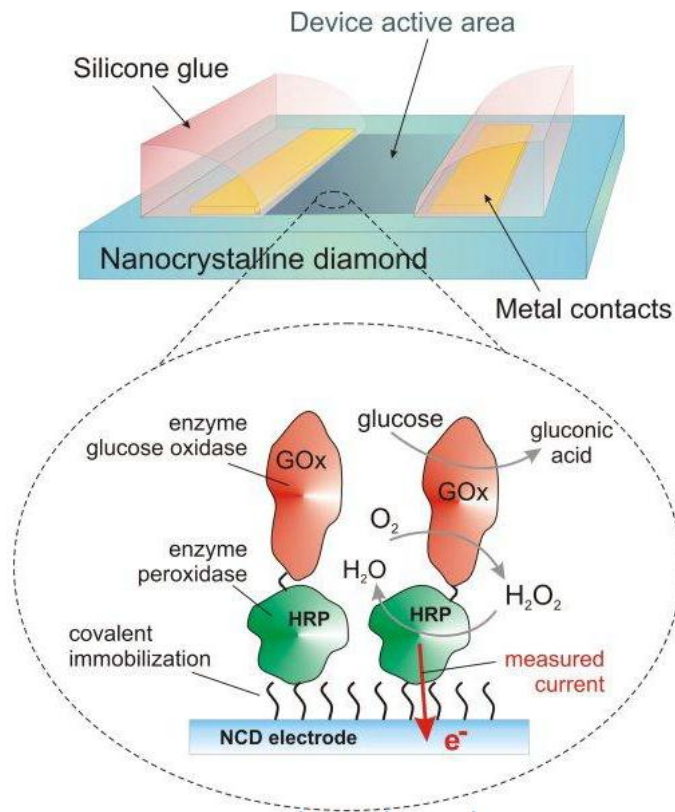
5.1.1.2 Lịch sử hình thành và phát triển của cảm biến sinh học

Giáo sư Leyland D. Clark được biết như là người đi tiên phong trong lĩnh vực cảm biến sinh học. Năm 1956 ông công bố bài báo đầu tiên về điện cực oxy hoá. Những năm tiếp theo ông tiếp tục thực hiện rất nhiều thí nghiệm nhằm cố gắng mở rộng khả năng hoạt động của cảm biến như phát hiện được thêm nhiều tác nhân, nâng cao độ chính xác của cảm biến. Vào năm 1962, tại hội nghị New York Academy of Science, ông đã thuyết trình một bài về cảm biến sinh học: “To make electrochemical sensors (pH, polarographic, potentiometric or conductometric) more intelligent by adding enzyme transducers as membrane enclosed sandwiches”. Ông đưa ra mô hình đầu tiên về cảm biến sinh học (hình 5.12).

Cảm biến sinh học theo mô hình của D. Clark bao gồm điện cực oxy hóa, trên đó có màng giữ enzyme glucose (glucose oxidase). Khi mật độ glucose trong môi trường phản ứng giảm thì mật độ chất oxi hóa trên bề mặt điện cực cũng giảm một cách tương ứng. Dựa trên sự thay đổi đó, Clark đã phát hiện ra sự thay đổi của nồng độ glucose trong môi trường cần kiểm tra.

Những năm tiếp theo, nhóm của Guilbault và Montalvo lần đầu tiên công bố chi tiết về chế tạo thành công cảm biến sinh học dựa trên điện cực chứa enzyme đo điện thế, một

cảm biến đo nồng độ urê dựa trên điện cực cố định enzyme urê (urease) bằng màng chất lỏng chọn lọc NH_4^+



Hình 5.12: Mô hình đầu tiên về cảm biến sinh học

Năm 1975 Lubber và Opitz đã mô tả một cảm biến sợi quang (fibre-optic sensor) gắn các chất chỉ thị dùng để đo nồng độ CO_2 và O_2 . Cũng vào năm 1975, một số vi khuẩn cũng đã được sử dụng như những thành phần sinh học trên các điện cực vi sinh để đo nồng độ cồn.

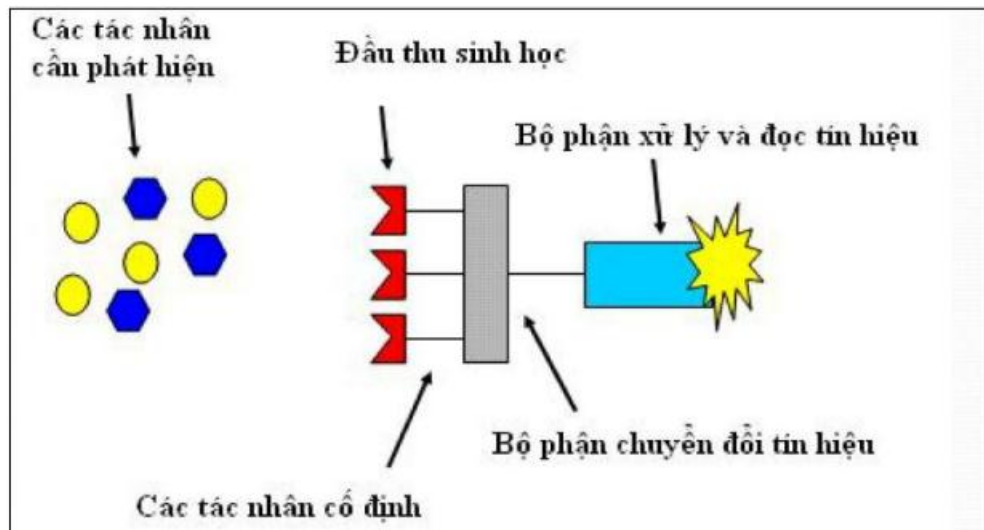
Năm 1975 công ty Yellow Springs Instrument (Ohio) lần đầu tiên biến ý tưởng của Clark thành hiện thực thông qua việc thương mại hóa các cảm biến sinh học. Sản phẩm đầu tiên là thiết bị phân tích glucose dựa trên hydrogen peroxide và đó cũng là cột mốc đầu tiên đánh dấu sự xuất hiện của các cảm biến sinh học trong đời sống.

Vào năm 1982, Shichiri và các đồng nghiệp đã báo cáo và mô tả về cảm biến glucose in vivo, là loại cảm biến dạng kim đầu tiên cho các xét nghiệm dưới da. Cùng với

sự phát triển nhanh chóng của khoa học và công nghệ, đặc biệt là các ngành công nghệ vật liệu nano và công nghệ thông tin, cảm biến sinh học cũng đạt được những tiến bộ vượt bậc, hứa hẹn đưa ra những vi thiết bị nhằm xác định nhanh, chính xác các loại vi khuẩn, virus gây bệnh. Các thiết bị này cũng có thể dò tìm hay phân tích lượng mẫu rất nhỏ (cỡ vài nanomet) với độ tin cậy cao.

5.5.2. Cấu tạo cơ bản của cảm biến sinh học

Cảm biến sinh học gồm ba bộ phận chính sau (hình 5.13):



Hình 5.13: Sơ đồ hiển thị các thành phần chính của một cảm biến sinh học.

1. *Đầu thu sinh học:* Nó có tác dụng bắt cặp, phát hiện sự có mặt của các tác nhân sinh học cần phân tích, tác nhân cố định giúp gắn các đầu thu lên trên điện cực.

2. *Bộ phận chuyển đổi tín hiệu:* bộ phận này giúp chuyển các biến đổi sinh học thành các tín hiệu có thể đo đạc được.

Có các dạng chuyển đổi:

- Chuyển đổi điện hóa.
- Chuyển đổi quang.
- Chuyển đổi nhiệt.
- Chuyển đổi bằng tinh thể áp điện piezoelectric.
- Chuyển đổi bằng các hệ vi cơ.

3. *Bộ phận xử lý giúp đọc tín hiệu ra:* Bộ phận này có tác dụng chuyển các tín hiệu không điện thành các tín hiệu điện có thể xử lý.

Các phần quan trọng của cảm biến sinh học là các bộ chuyển đổi tín hiệu được sử dụng để nhận biết các thay đổi vật lý được tạo ra trong phản ứng. Các thay đổi này có thể là:

1. Lượng nhiệt tỏa ra (hoặc hấp thụ) của các phản ứng (calorimetric biosensor).
2. Thay đổi trong việc phân bố các chất mang điện tạo một hiệu điện thế (potentiometric biosensor).
3. Sự di chuyển của các hạt điện tử tạo ra trong phản ứng oxi hóa khử (amperometric biosensor).
4. Sự khác biệt trong lượng ánh sáng được tạo ra hoặc ánh sáng được hấp thụ giữa chất phân tích và sản phẩm (quang cảm ứng sinh học).
5. Tác dụng do sự thay đổi khối lượng của các chất phản ứng hoặc sản phẩm (piezo-electric biosensor)

5.5.3. Nguyên lý làm việc của cảm biến sinh học.

Các vật liệu sinh học như: vi khuẩn, tế bào, enzyme, kháng thể, DNA,...gây ra một trong các thay đổi :

- ✓ Phản ứng trên bề mặt điện cực.
- ✓ Thay đổi PH.
- ✓ Thay đổi nhiệt độ.
- ✓ Thay đổi tính chất truyền qua của ánh sáng.
- ✓ Thay đổi khối lượng màng.

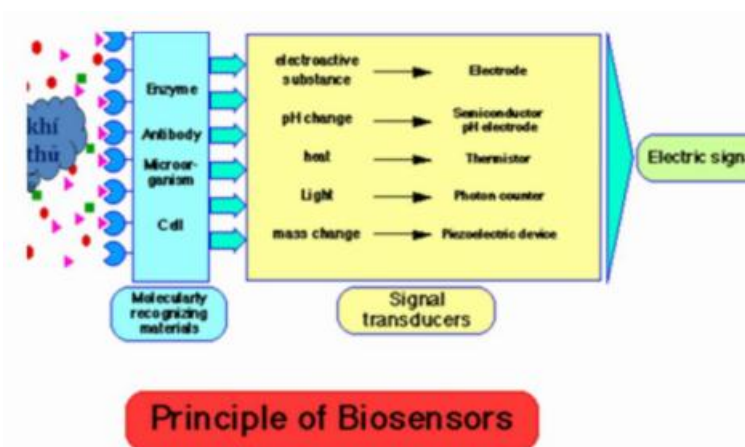
Những sự thay đổi này được nhận biết tương ứng bằng các điện cực đếm electron, điện cực đo độ pH bằng chất bán dẫn, các cặp nhiệt, bộ đếm electron hoặc bộ dao động thạch anh. Các thay đổi này được chuyển thành tín hiệu điện từ đó cho ta thông tin về các vật liệu sinh học. Mối quan hệ giữa nhận biết sinh học và phương pháp chuyển đổi được mô tả rõ trong bảng 5.3 và hình 5.14.

Cảm biến hoạt động theo nguyên tắc nhập các vật liệu sinh học được phép đi qua màng tế bào để các lựa chọn có thể được thực hiện và các phân tử gây nhiễu được giữ lại ở bên ngoài màng. Mẫu này sau đó tương tác với các cảm biến sinh học và hình thức một sản phẩm, mà có thể là dòng điện, nhiệt, khí đốt, hóa học thích hợp. Sản phẩm này sau đó đi

qua màng tế bào khác và đạt đến bộ chuyển đổi, chuyển đổi các tín hiệu sinh hóa thành tín hiệu điện có thể được tiếp tục khuếch đại và có thể là đọc trên bảng điều khiển kỹ thuật số hoặc có thể được ghi trên máy ghi âm.

Bảng 5.3: Quan hệ giữa nhận biết sinh học và phương pháp chuyển đổi

Loại nhận biết	Hệ quả nhận biết	Các phương pháp chuyển đổi và cảm biến
Hệ thống enzym	Thay đổi nồng độ sản phẩm Thay đổi cơ chế oxi hóa khử Thay đổi điện dẫn	Cảm biến dòng điện, điện cực dòng điện Cảm biến điện thế điện cực thế, ENFET Đo điện trở
Loại miễn dịch	Nhiệt của phản ứng Hiệu quả và hình dạng Thay đổi hình dạng kích thước Thay đổi khối lượng Thay đổi các tính dẫn điện	Biến trở nhiệt Thay đổi các tín hiệu quang Cảm biến y sinh điện áp Cảm biến miễn dịch điện dung và đo trở kháng



Hình 5.14: Nguyên tắc hoạt động của biosensor

5.5.4. Phân loại cảm biến sinh học

5.5.4.1. Phân loại theo cơ chế chuyển đổi

- Chuyển đổi điện hoá: Bao gồm chuyển đổi dựa trên điện thế (potentiometric), dòng điện (amperometric) và độ dẫn (conductometric).

- Chuyển đổi quang: Là chuyển đổi hoạt động dựa trên các hiệu ứng như: hấp thụ ánh sáng nhìn thấy và tia UV; phát xạ huỳnh quang và lân quang; bio-luminiscence; chemi-luminiscence.

- Chuyển đổi nhiệt: Hoạt động dựa trên hiện tượng thay đổi entanpi khi hình thành hoặc phá vỡ các liên kết hóa học trong các phản ứng của enzyme. Bộ chuyển đổi này có ưu

điểm hoạt động tốt với tất cả các phản ứng. Tuy nhiên, dạng chuyển đổi này có tính chọn lọc thấp.

- Chuyển đổi bằng tinh thể áp điện (piezoelectric): Chuyển đổi hoạt động dựa trên nguyên lý: tinh thể sẽ thay đổi tần số dao động khi lực tác dụng lên nó thay đổi. Chuyển đổi dạng này có ưu điểm là độ nhạy cao (cỡ picogram), thời gian phản ứng nhanh, khả năng cơ động cao, có thể sử dụng đo đạc

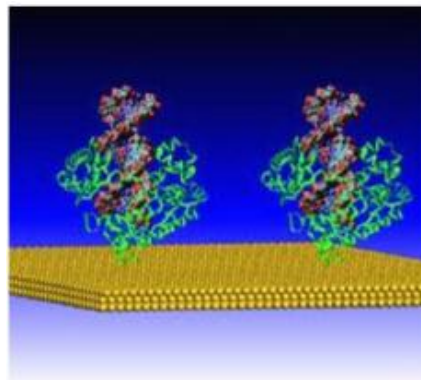
- Chuyển đổi bằng các hệ vi cơ : Nguyên lý hoạt động của cảm biến sử dụng chuyển đổi này như sau: chiếu một chùm laser đến bộ phản xạ trên bề mặt một thanh dầm rất mỏng, ánh sáng phản xạ được thu nhận bởi photodetector. Thanh mỏng này được chế tạo sao cho chỉ với một lực tác động rất nhỏ cũng làm cho thanh bị uốn cong đi. Như vậy tín hiệu phản xạ thu nhận được trên photodetector sẽ bị thay đổi so với trường hợp không có lực tác dụng lên thanh. Căn cứ vào sự thay đổi tín hiệu phản xạ này, người ta có thể xác định được lực tác dụng lên thanh

5.5.4.2. Phân loại theo đầu thu sinh học

- Đầu thu làm từ enzyme: Đầu thu sinh học làm từ enzyme là dạng đầu thu phổ biến nhất. Đó là các đầu thu làm từ các enzyme urease, glucosidase, ...

- Đầu thu làm từ các kháng thể/kháng nguyên: Các đầu thu dạng này có đặc điểm là tính chọn lọc rất cao đồng thời các liên kết được tạo thành khá mạnh.

- Đầu thu làm từ protein: Rất nhiều cảm biến có đầu thu sinh học làm từ các protein như cảm biến phát hiện hormone, xác định các chất kích thích thần kinh, ... Các đầu thu này có đặc điểm là có tính chọn lọc rất cao. Tuy nhiên, chúng có nhược điểm là rất khó cách ly (hình 5.15).



Hình 5.15: Đầu thu protein

- Đầu thu làm từ các axit nucleic: Các axit nucleic như DNA, RNA có thể sử dụng làm đầu thu sinh học. Các cảm biến có đầu thu dạng này thường được sử dụng để phát hiện đột biến và các sai lệch trong cấu trúc di truyền.

- Đầu thu kết hợp: Với các đầu thu dạng này, người ta sử dụng đồng thời hai hay nhiều các phân tử dạng (enzyme, kháng thể, protein, ...) trên một đế. Việc kết hợp này mở rộng khả năng làm việc của các cảm biến sinh học. Một số cảm biến dạng này là cảm biến xác định thuốc nổ TNT, cảm biến xác định vi khuẩn bệnh than và cảm biến thử thai.

- Đầu thu làm từ tế bào: Các đầu thu sinh học không chỉ được làm từ các phân tử, nguyên tử mà nó còn có thể được làm từ các tế bào. Một số tế bào biến đổi gen của vi khuẩn đã được sử dụng làm đầu thu sinh học. Khi có mặt các phân tử chất độc, các tế bào này sẽ phát sáng, thông qua đó chúng ta xác định được sự xuất hiện của các phân tử chất độc.

CHƯƠNG 6: PHẠM VI ỨNG DỤNG VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ ENZYME

Enzyme được xem như là một kỹ thuật quan trọng của công nghệ sinh học do có các chức năng sau:

- Enzyme là chất xúc tác cho mọi biến đổi vật chất trong công nghệ sinh học.
- Enzyme và nhiều hoạt chất sinh học khác là sản phẩm của công nghệ sinh học.

Chúng có thể dùng làm công cụ mới của công nghệ sinh học, hay sử dụng trong các lĩnh vực khác.

- Enzyme được xem là thuốc thử có tính chuyên hóa cao mà không có enzyme thì các quá trình công nghệ sinh học không thể tối ưu hóa được

6.1. THÀNH TỰU CỦA NGÀNH CÔNG NGHỆ ENZYME

Các chế phẩm enzyme ngày càng có nhiều ý nghĩa trong công nghệ sinh học. Chúng được sử dụng không những trong các sản xuất sinh hóa truyền thống như làm bánh mì, làm bia, sản xuất rượu và các loại nước hoa quả mà cả trong các lĩnh vực công nghệ hóa sinh và vi sinh vật học. Các chế phẩm enzyme được sử dụng rất rộng rãi trong các nghiên cứu sinh học với tư cách là các hóa chất dùng để định lượng các hợp chất khác nhau như glucose, urea ... Sự ứng dụng ngày càng rộng rãi những kiến thức này đã được ghi nhận trong lĩnh vực y học.

Lần đầu tiên năm 1884 các chế phẩm enzyme đã được nhà khoa học Nhật Bản Takaminhe sử dụng ở quy mô công nghiệp. Ông đã dùng amylase của nấm mốc *Aspergillus oryzae* để đường hóa tinh bột. Công trình này đã có tác dụng thúc đẩy sự phát triển nhanh chóng của enzyme học ứng dụng. Ngày nay hàng loạt các công ty ở Nhật, Hoa Kỳ, Anh, Pháp và nhiều nước khác đã sản xuất các chế phẩm enzyme với độ tinh khiết cao để sử dụng trong công nghiệp, nông nghiệp, trong thực tiễn phân tích và y học.

Sau đây sẽ xem xét một vài ví dụ về thành tựu ứng dụng các chế phẩm enzyme trong thực tiễn.

Trong công nghiệp sản xuất bánh mì thêm một lượng nhỏ α -amylase (0,002 – 0,003% trọng lượng bột) thu nhận từ *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus awamori* sẽ làm tăng đáng kể hương thơm và vị ngon của bánh mì, làm cho bánh nở đều và màu của bánh

thêm đậm đà. Làm tăng hương vị của bánh là kết quả của quá trình tăng cường tạo melanoidin dưới tác dụng của α -amylase, làm cho các hợp chất carbonyl bay hơi giúp bánh có mùi thơm tăng lên đáng kể.

Các enzyme phân giải tinh bột được sử dụng rộng rãi trong việc đường hóa tinh bột khoai tây, hạt ngũ cốc để sản xuất rượu. Từ thời xa xưa người ta sử dụng bột mầm đại mạch để làm nguồn amylase, tuy nhiên mầm đại mạch có thể được thay thế bằng nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Việc thay thế này đã thúc đẩy đáng kể nghề sản xuất rượu.

Một số loại protease, như papain, pepsin cũng được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất bia để ngăn ngừa hiện tượng bia bị đục (đặc biệt khi bảo quản bia trong điều kiện lạnh) do hiện tượng có tên gọi là lắng tủa protein-tannin gây ra.

Các enzyme phân giải protein cũng được sử dụng trong việc làm mềm thịt. Thịt thường giữ độ cứng khá lâu sau khi con vật bị giết, Để cho thịt có độ mềm cần thiết, thường phải xử lý trong điều kiện lạnh $0 \pm 2^\circ\text{C}$ từ 10 đến 14 ngày. Trong điều kiện bảo quản như vậy cũng chỉ có 14 – 17 % số thịt được đánh giá là thịt loại I. Một điều kiện quan trọng nhất để làm xuất hiện những chất lượng cần thiết của thịt là làm phân giải một phần protein của thịt dưới tác dụng của các enzyme proteinase.

Ngày nay papain và các enzyme proteolytic nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật được dùng phổ biến trong việc xử lý bảo quản, chủ yếu bằng 3 phương pháp sau đây:

- Ngâm trong dung dịch enzyme.
- Bôi bột làm mềm thịt có chứa enzyme cùng với mì chính, muối ăn, tinh bột...
- Bơm dung dịch enzyme vào mô thịt.

Enzyme proteolytic được sử dụng có kết quả trong công nghệ thuộc da và làm mềm da nguyên liệu. Sử dụng enzyme làm tăng đáng kể chất lượng của len và làm nhanh quá trình xử lý.

Quá trình sản xuất da, đặc hiệu là quá trình làm mềm da nguyên liệu, hoàn toàn dựa trên việc sử dụng enzyme nguồn gốc động vật, thực vật và vi sinh vật. Đặc biệt sử dụng khá rộng rãi pancreatin – chế phẩm thô của các enzyme tuyến tụy. Người ta cũng sử dụng các enzyme nguồn gốc thực vật (papain) và enzyme proteolytic thu từ nấm mốc (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*) và vi khuẩn (*Bacillus mesentericus*),

Trong công nghiệp sản xuất nước trái cây thường sử dụng các enzyme phân giải pectin. Chúng làm tăng đáng kể mức thu hoạch sản phẩm (8-15%), giảm độ nhớt và làm cho nước trái cây trong hơn.

Trong công nghệ sản xuất bánh kẹo thường dùng β -fructofuranosidase. Vấn đề là ở chỗ đường saccharose rất dễ bị kết tinh, ảnh hưởng xấu đến chất lượng sản phẩm. Dưới tác dụng của β -fructofuranosidase saccharose bị phân giải, do đó ngăn cản quá trình kết tinh của saccharose.

Nhiều kinh nghiệm của các nhà sản xuất cho thấy các chế phẩm cellulase thu được từ nấm mốc trong đó có chứa hemicellulase có thể sử dụng có hiệu quả trong việc chế biến thức ăn gia súc, làm tăng đáng kể độ hấp thụ của thức ăn, giúp tăng trọng gia súc, giúp cho gà đẻ nhiều. Với sự hỗ trợ của các chế phẩm enzyme cellulase phối hợp tương tự các nhà sản xuất đã thành công trong việc tăng sản phẩm tinh bột từ các nguyên liệu giàu tinh bột, tăng sản phẩm agar – agar từ các nguyên liệu tảo biển, tăng lượng nước trái cây từ cam và các loại trái cây khác.

Việc nghiên cứu ứng dụng enzyme trong y học cũng ngày càng thu được nhiều kết quả. Trong các phòng thí nghiệm y học người ta sử dụng các loại dehydrogenase khác nhau để làm các thuốc thử đặc hiệu, ví dụ dùng lactate dehydrogenase để xác định axit piryvic và axit lactic, sử dụng alcohol dehydrogenase để xác định ethanol... Các bộ chế phẩm enzyme có chứa alcoholdehydrogenase được sử dụng ở một số nước để xác định lượng cồn trong máu lái xe.

Đã nhiều năm trôi qua glucosooxydase được sử dụng rộng rãi trong y học để xác định glucose trong nước tiểu và trong máu.

Một lĩnh vực khác của việc ứng dụng glucosooxydase là sử dụng nó để loại bỏ glucose từ các sản phẩm thức ăn phải bảo quản trong điều kiện khô. Ví dụ sự tồn tại của glucose trong trứng sẽ dẫn đến tình trạng bột trứng chế tạo từ loại trứng này có mùi và vị khó chịu. Đó là do glucose khi sấy khô và bảo quản ở nhiệt độ cao dễ tác dụng với các nhóm amine tự do của axit amin và protein, bột sữa sẽ bị đen và tạo ra hàng loạt các chất có mùi vị khó chịu. Vì vậy trước khi sấy khô nguyên liệu trứng cần được loại bỏ glucose bằng các xử lý glucosooxydase để sản phẩm bột trứng được bền vững trong quá trình bảo

quản. Ở Mỹ người ta sử dụng glucosooxydase để loại bỏ oxy khỏi đồ hộp và nhiều loại nước giải khát khác nhau, ví dụ bia.

Cùng với những thành tựu đạt được trong nghiên cứu lý thuyết về enzyme, các nghiên cứu ứng dụng enzyme trong thực tế ngày càng được mở rộng và đạt hiệu quả cao. Để sử dụng enzyme trong thực tế có thể tiến hành theo hai cách chủ yếu sau đây:

- Điều hoà định hướng tác dụng của enzyme trong các nguyên liệu chứa nó.
- Tách enzyme ra khỏi nguyên liệu ở dạng chế phẩm và sử dụng trong các quá trình sản xuất.

Sử dụng enzyme theo hướng thứ nhất trong nhiều trường hợp có thể đơn giản hơn. Ví dụ, có thể dùng yếu tố nhiệt độ để điều chỉnh hoạt độ một số enzyme có trong cá, chè, thuốc lá... để làm tăng rõ rệt hương vị, màu sắc của sản phẩm. Tuy nhiên, cách sử dụng này hạn chế khả năng ứng dụng của enzyme vì chỉ có thể dùng enzyme đối với quy trình chế biến chính nguyên liệu của nó.

Sử dụng enzyme theo cách thứ hai thường có hiệu quả hơn, vì chế phẩm enzyme nhận được có thể sử dụng rộng rãi tùy theo yêu cầu. Hơn thế nữa còn có thể dễ dàng điều khiển hoạt động của enzyme theo ý muốn và cho phép đề ra quy trình sản xuất. Vì vậy, trong mấy chục năm gần đây đã hình thành và phát triển mạnh kỹ thuật sản xuất chế phẩm enzyme. Hiện nay, trên thế giới hàng năm sản xuất hơn 100.000 tấn chế phẩm enzyme, trong đó Nhật Bản là nước có truyền thống lâu đời nhất trong lĩnh vực này. Ở Nhật Bản có 20 hãng sản xuất chế phẩm enzyme với sản lượng hàng năm 15.000 tấn, trị giá 10 triệu USD. Sau Nhật Bản là một số nước khác như Mỹ, Anh, Pháp, Đan Mạch, Thụy Điển. Hãng Novo của Đan Mạch cũng là một trong những hãng sản xuất chế phẩm enzyme nổi tiếng thế giới. Trong 10 năm gần đây, các nước Đông Âu, Trung Quốc, Ấn Độ cũng bắt đầu phát triển mạnh công nghiệp sản xuất các chế phẩm enzyme, Tuy nhiên, số lượng và chất lượng enzyme còn ở mức độ thấp.

6.2. ỨNG DỤNG CỦA ENZYME

Các chế phẩm enzyme được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như:

6.2.1. Trong hoá phân tích để định tính và định lượng một số chất.

Khi sử dụng enzyme để định lượng các chất, có thể tiến hành theo hai cách:

- Dùng enzyme có tác dụng phân giải riêng chất ấy, sau đó dùng một trong các phương pháp phân tích thông thường để định lượng các chất sau phản ứng. Từ đó suy ra lượng chất cần phân tích. Ví dụ như dùng urease để định lượng ure, sau khi cho enzyme tác dụng với ure ta xác định được amoniac được tạo thành, từ đó suy ra lượng ure có trong nguyên liệu cần nghiên cứu.

- Nếu chất cần phân tích có tác dụng kìm hãm, hoặc kích thích đặc hiệu một enzyme nào đấy, ta có thể định lượng bằng cách xác định mức độ ảnh hưởng của chúng đến hoạt độ enzyme đối chiếu với bảng, hoặc đồ thị chuẩn độ để suy ra lượng chất cần phân tích. Ví dụ: dùng phosphatase để định lượng ion fluo vì fluo có tác dụng kìm hãm enzyme này. Phương pháp này có độ nhạy khá cao, có thể xác định được lượng fluo rất bé, khoảng 0,02mg/ml.

6.2.2. Trong y học có thể sử dụng enzyme để chữa bệnh, để sản xuất các sinh tố và các chất kháng sinh.

- Có thể dùng enzyme để tăng thêm lượng enzyme cho cơ thể, chữa các bệnh thiếu enzyme bẩm sinh, hoặc làm các nội quan nhân tạo, có thể dùng enzyme để chữa bệnh về tiêu hoá kém hoặc để loại bỏ các phần mô bị hỏng, bị thối ở các ổ viêm, các vết thương hoặc hoà tan các cục máu đông làm tắc nghẽn mạch máu. Ngoài ra, cũng có thể dùng enzyme để phân giải thuốc khi cơ thể bị dị ứng mạnh với các thuốc này. Ví dụ: dùng penixilinase khi cơ thể bị dị ứng mạnh với penixilin...

- Chữa bệnh do siêu vi trùng gây nên bằng các loại enzyme phân giải axit nucleic (nuclease).

Dùng kẹo cao su có chứa hai loại enzyme (lactat dohydrogenase và invecalse) để chống bệnh hà răng. Hai loại enzyme này có khả năng làm phân giải hòa tan lớp keo bền ở chân răng do liên cầu khuẩn sinh ra.

- Dùng enzyme chẩn đoán nhanh chóng một số bệnh như dùng glucooxydase và peroxydase cùng với các phụ liệu khác tạo giấy chỉ thị cực nhanh để kiểm tra bệnh tiểu đường, giấy này được làm bằng xenlulase đặc biệt, được tẩm dung dịch hai enzyme trên và chất tiếp nhận sinh màu octotoluidin, hoặc octodiamizin. Khi nhúng giấy chỉ thị này vào nước tiểu, nếu nước tiểu có chứa glucose thì sau 1-2 phút nhấc giấy ra khỏi dung dịch nước tiểu, giấy sẽ chuyển từ trắng sang xanh hoặc sang màu khác.

6.2.3. Trong công nghiệp

- Trong công nghiệp xà phòng dùng để làm chất tẩy rửa dầu mỡ công nghiệp.
- Sử dụng enzyme amylase để khử hồ trên vải trong công nghiệp dệt.
- Sử dụng protease của *Aspergillus oryzae* 33 để khử lông trâu, bò trong công nghiệp thuộc da, cho hiệu suất cao hơn phương pháp vôi sulfua.
- Ứng dụng xenlulase thủy phân bào mòn màng xenlulose để trích ly các chất keo trong rong biển.
- Trong công nghiệp giấy, sử dụng enzyme để sản xuất bột giấy và giấy.

6.2.4. Trong thực phẩm

- Sử dụng α - amylase trong chế phẩm tạo men bia, men bánh mỳ. Nếu đưa vào bột nhào 0,002 - 0,003% chế phẩm amylase thì chất lượng bánh mỳ tăng cao: bánh xốp hơn, ngọt hơn, màu sắc đẹp hơn.
- Sử dụng amylase để sản xuất glucose từ tinh bột, thay cho phương pháp dùng axit HCl (hiệu suất 96 - 97%).

- Sử dụng protease:

- + Làm mềm thịt (protease từ dứa, đu đủ, nội tạng động vật).
- + Công nghiệp cá, thủy phân thịt cá, sản xuất nước mắm, sản xuất cá.

Trong công nghệ chế biến thịt, nếu thịt bị dai phải sử dụng enzyme hoạt tính protease, elastase và keratinase. Hiện nay có loại keratinase từ *Actinomyces fradiae* có tác dụng làm mềm thịt tốt ngang chất làm mềm tandrín

Trong chế biến đồ hộp cá rán: trước khi rán người ta ướp cá với enzyme làm mềm thịt sau đó mới rán. Kết quả thịt cá thơm ngon hơn, màu sắc đẹp hấp dẫn hơn và chất lượng đồ hộp cao hơn.

- + Chế biến nước mắm ngăn ngày, bổ sung chế phẩm protease từ vi sinh vật, thực vật,... đã rút ngắn thời gian chế biến.
- + Dùng protease thủy phân màng tế bào gan cá để trích ly dầu cá.
- + Dùng protease để tinh chế Guanin
- Dùng pectinase để tăng hiệu suất nước ép quả và làm trong dịch quả, chống hiện tượng tủa trắng khi bảo quản. Điều đó được giải thích như sau:

Trong khối quả nghiền chứa nhiều pectin, khi có mặt pectin và đường làm cho khối quả nghiền keo hoá cao, khi ép, dịch quả khó thoát ra, khi khối quả nghiền được trộn với pectinase sẽ thủy phân pectin và làm giảm độ nhớt, dịch thoát ra dễ dàng hơn.

Cấu tạo của pectin (poly α -galacturonic) có nhóm metoxi ($H_3CO-CH=O$).

Axit pectic không có khả năng keo hoá. Sau đó người ta dùng phản ứng: Axit pectic + Ca \rightarrow Pectat canxi (kết tủa)

Và cuối cùng pectin được loại ra khỏi dung dịch nước quả, nhờ vậy mà dịch quả bảo quản lâu không bị keo vẩn đục.

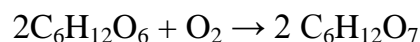
- Sử dụng xenlulase làm mềm xenlulose để tăng hiệu suất tiêu hoá cho trâu, bò, cá trắm...

- Sử dụng glucooxydase làm túi thu oxy trong bảo quản phomat, bột trứng, sữa khô. Túi khử oxy được chuẩn bị như sau:

Cho một ít glucose với chế phẩm glucooxydaza với catalaza và dung dịch đệm cần thiết vào trong túi PE hoặc túi vật liệu khác. Đặc điểm của túi chỉ cho oxy đi qua mà không cho nước đi qua. Sau đó đặt túi vào trong hòm hay thùng kín có sản phẩm cần bảo quản.

Trong sản xuất bột trứng, nếu bột trứng còn chứa một lượng glucose thì sau một thời gian bảo quản ngắn bột trứng bị sẫm màu và có mùi khó chịu. Trong albumin trứng chứa 3% glucose, trong lòng đỏ trứng chứa 0,5% glucose. Do vậy, trong sản xuất bột trứng người ta sử dụng glucooxydase để oxy hoá trước glucose nhằm tránh các quá trình có hại trên, tăng thời gian bảo quản.

- Dùng enzyme để chế biến các sản phẩm nông nghiệp như chè, thuốc lá ... để làm tăng hương vị và giá trị dinh dưỡng của sản phẩm. Có thể dùng enzyme để bảo quản đồ hộp và các nguyên liệu khác. Ví dụ dùng glucooxydase, catalase và một ít glucose vào một hệ thống kín với một lượng oxy có hạn thì sau một thời gian nhất định chúng ta sẽ loại hết oxy trong hệ thống theo phản ứng sau đây:



Như vậy sẽ tránh được việc xảy ra oxy hóa làm ảnh hưởng đến hương vị và chất lượng của sản phẩm.

Dưới đây là bảng tóm tắt khả năng ứng dụng của enzyme trong các ngành công

ngiệp (bảng 6.1).

Bảng 6.1: Ứng dụng của enzyme trong công nghiệp

Công nghiệp	Ứng dụng	Enzyme	Nguồn gốc
Bánh nướng	Làm biến đổi bột nhào bánh mì Tẩy trắng màu tự nhiên của bột	Protease Amylase Lipoxydase	Nấm mốc Malt nghiền Nấm men bánh mì Bột đậu nành
Bia và đồ uống có cồn	Nấu malt Giảm hàm lượng dextrin	Protease Amylase Amyloglucoxydase	Malt Nấm, vi khuẩn Papain Nấm mốc
Kẹo	Làm mềm kẹo	Invectase	Nấm men
Mứt kẹo	Chống “sạn” đường	Amylase	Vi khuẩn
Ngũ cốc	Xử lý sơ bộ ngũ cốc	Amylase	Malt, nấm
Cà phê	Khử chất nhầy từ quả mọng Làm loãng độ đặc	Pectinase Amylase Pectindase	Nấm mốc
Sản xuất bơ sữa	Làm đông sữa trong phomat Thủy phân protein Khử oxy từ bột trứng	Rennet Protease Glucooxydase Catalase	Nấm dạ dày bê Papain Nấm mốc Vi khuẩn
Alcol	Hóa lỏng Đường hóa	Amylase Amyloglucoxydase	Vi khuẩn Malt, nấm mốc
Công nghệ cá	Thủy phân thịt cá	Protease	Vi khuẩn
Quả và nước quả	Ép, lọc và cô đặc Loại vị đắng của quả nhỏ	Pectinase Naringinase	Nấm mốc
Giặt là và làm khô sạch	Ngâm và tẩy trắng Khử chấm đen	Alkaline protease Protease Lipase Amylase	Vi khuẩn Nấm mốc, vi khuẩn, tuyến tụy

6.2.5. Trong nông nghiệp

Có thể dùng enzyme để sản xuất thức ăn cho động vật nhằm tăng giá trị dinh dưỡng của thức ăn thô, tăng hệ số sử dụng thức ăn. Các enzyme được sử dụng với mục đích này thường là các enzyme thủy phân như amylase, proteinase, đặc biệt là xenlulase, hemixenlulase. Chúng thủy phân các chất phân tử lớn thành dạng dễ hấp thụ hơn nên thường làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn lên khoảng 10%, tăng khối lượng đàn gia súc trung bình 10 – 15%. Điều này có ý nghĩa đặc biệt quan trọng khi chuẩn bị thức ăn cho các loài động vật còn non như bê con, lợn con...vì hệ thống tiêu hóa của chúng còn chưa thật thích hợp với việc ăn loại thức ăn thô. Sử dụng enzyme để chuẩn bị thức ăn cho gia súc có

thể tiến hành theo 2 cách:

- Thêm trực tiếp enzyme vào thức ăn trước khi dùng.
- Dùng enzyme để xử lý sơ bộ thức ăn.

Cách thứ nhất đơn giản hơn nhưng cách thứ hai có lợi hơn, vì khi xử lý ngoài cơ thể ta có thể dễ dàng tạo điều kiện thích hợp về pH, nhiệt độ, enzyme hoạt động mạnh hơn, do đó hiệu suất phân giải thức ăn lớn hơn so với cách thứ nhất.

Để sử dụng enzyme trong chăn nuôi tốt nhất là dùng các chế phẩm enzyme từ vi sinh vật và chưa tinh chế, vì thành phần enzyme, đặc biệt là enzyme thủy phân trong các chế phẩm này thường phong phú hơn nhiều so với chế phẩm enzyme từ động vật. Do vậy khi thêm chế phẩm enzyme vi sinh vật vào thức ăn của động vật trưởng thành, khoẻ mạnh vẫn có ảnh hưởng rõ rệt. Trong khi đó, nếu thêm chế phẩm enzyme động vật lại không có hiệu quả gì.

Ngoài việc sử dụng enzyme để chuẩn bị thức ăn cho gia súc, trong nông nghiệp có thể dùng enzyme để xử lý hạt trước khi gieo mầm nhằm rút ngắn thời gian nảy mầm và tăng sản lượng thu hoạch.

6.3. GIỚI THIỆU MỘT SỐ LOẠI ENZYME CHỦ YẾU VÀ KHẢ NĂNG KHAI THÁC

6.3.1. Amylase:

Hệ enzyme amylase là một trong số các hệ enzyme được sử dụng rộng rãi nhiều trong công nghiệp, y học và nhiều lĩnh vực khác.

Ở các nước phương Đông, nhất là ở Trung Quốc, Việt Nam, Nhật Bản người ta đã biết đến amylase có trong mốc tương, misô (đậu tương lên men) từ rất lâu. Ở Trung Cận Đông và phương Tây người ta cũng biết nấu bia, rượu uytxki.

Enzyme amylase có trong nước bọt, dịch tiêu hoá của người và động vật, trong hạt, củ nảy mầm, nấm mốc, vi khuẩn và một số nòi nấm men. Hiện nay người thu nhận enzyme amylase thương mại và công nghệ từ canh trường vi khuẩn, nấm mốc theo phương pháp nuôi cấy bề mặt và bề sâu.

Hiện nay người ta biết rõ có 6 loại enzyme amylase (3 loại thủy phân liên kết α_{1-4} , 3 loại thủy phân liên kết $\alpha_{1,6}$ - glycosit). Các enzyme amylase từ các nguồn, các giống vi sinh

vật tổng hợp khác nhau thì khác nhau về tính chất, cơ chế, điều kiện, sản phẩm thuỷ phân.

6.3.1.1. Enzyme α - amylase (tên hệ thống α -1,4 glucan-hidrolase; mã số 3.2.1.1.EC).

Xúc tác thuỷ phân liên kết α_{1-4} glycosit nằm ở bên trong phân tử cơ chất (tinh bột, glycogen), vì thế được gọi là enzyme amylase nội phân (endoamylase) (hình 6.1).

Dưới tác dụng của α -amylase, amilose (Am) bị phân cắt nhanh thành oligosaccarit gồm 6 – 7 gốc glucose. Sau đó các oligosaccarit này lại tiếp tục bị phân cắt thành maltotetrose, mantotriose và mantose.

Qua một thời gian tác dụng dài bởi enzyme, amilose sẽ bị thuỷ phân thành 23% glucose và 87% maltose. Tác dụng của α -amylase làm amylopectin (AP) cũng xảy ra tương tự nhưng vì nó không phân cắt được liên kết α_{1-6} glycosit ở mạch nhánh của AP nên sau một thời gian lâu thì sản phẩm sẽ là 72% maltose, 19% glucose, dextrin thấp phân tử và izomaltose (8%).

Tuy nhiên thông thường trong một thời gian ngắn 30 – 60 phút (thời gian nấu sơ bộ nguyên liệu tinh bột hay đường hoá sơ bộ khối nấu trong sản xuất rượu ealylic) α -amylase chỉ thuỷ phân tinh bột chủ yếu thành dextrin phân tử thấp và một ít đường maltose. Khả năng dextrin hoá cao này là tính chất đặc trưng của enzyme này. Vì vậy người ta còn gọi loại enzyme này là amylase dextrin hay amylase dịch hoá.

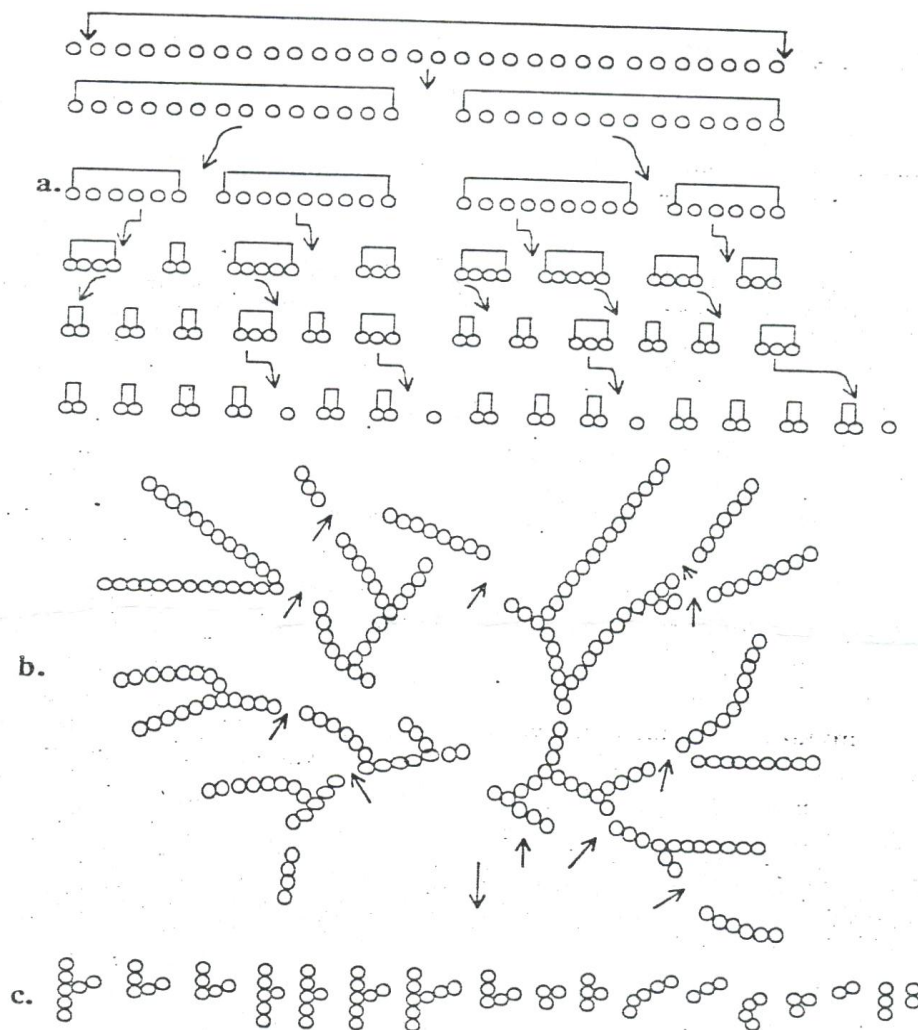
α - amylase là một metaloenzyme (enzyme cơ kim), trong phân tử enzyme có từ 1 – 6 nguyên tử C, chúng tham gia vào sự hình thành và ổn định cấu trúc bậc 3 của enzyme, duy trì cấu hình hoạt động của enzyme, quyết định tính bền nhiệt của enzyme.

α - amylase của vi sinh vật có những đặc tính rất đặc trưng về cơ chế tác dụng, khả năng chuyển hoá tinh bột và khả năng chịu nhiệt:

+ Thể hiện hoạt tính trong vùng axit yếu: α - amylase nấm mốc có $pH_{op} = 4,5 - 4,9$, của vi khuẩn $pH_{op} = 5,9 - 6,1$. Ở $pH < 3$ enzyme bị vô hoạt hoàn toàn trừ α - amylase của *Asp. Niger* có thể chịu được $pH = 2,5 - 2,8$ (trong môi trường sinh tổng hợp axit xitric bằng phương pháp lên men bề mặt).

+ α - amylase của nấm mốc có khả năng dextrin hoá (dịch hoá) cao lại vừa tạo ra một lượng lớn glucose và maltose.

+ α - amylase của vi khuẩn lại có hai loại: α - amylase dịch hoá và α - amylase đường hoá.



Hình 6.1: Các giai đoạn thủy phân tinh bột bởi α - amylase của nấm mốc.

a- Sự thủy phân amilose; b-Giai đoạn đầu thủy phân amilopectin.; c-Giai đoạn cuối đường hóa amilopectin.

b-

+ Nhiệt độ hoạt động của α - amylase từ các nguồn khác nhau là khác nhau. Trong đó đáng chú ý hơn cả là α - amylase của vi khuẩn có thể chịu được ở nhiệt độ cao, có thể giữ được hoạt lực ngay cả khi đun sôi trong nước một thời gian ngắn. Tính bền nhiệt này là một ưu điểm lớn được sử dụng để xử lý nguyên liệu ở các công đoạn phải dùng nhiệt độ cao, hoặc môi trường nhiệt đới như ở nước ta. Đa số các chế phẩm enzyme thương mại

thuộc nhóm amylase đều có tính chịu nhiệt cao (bảng 6.2).

Bảng 6.2. Độ bền nhiệt của α - amylase từ các nguồn khác nhau (theo Miller – Johnson và Palmer)

Nhiệt độ, °C	Hoạt độ α – amylase, % so với hoạt độ ban đầu.		
	Nấm mốc	Malt	Vi khuẩn
65	100	100	100
70	52	100	100
75	3	58	100
80	1	25	92
85	Vô hoạt	1	58
90	Vô hoạt	Vô hoạt	52
95	Vô hoạt	Vô hoạt	8

Những chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp α - amylase được sử dụng trong công nghệ: *Asp. Oryzae*, *Asp. Awamori*, *Asp. Usami*, *Asp. Batatae*, *Asp. Niger*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Endomycopsis fibuliger*.

6.3.1.2. β -amylase (tên hệ thống α -1,4-glucan-maltohidrolaza mã số 3.2.1.2 EC)

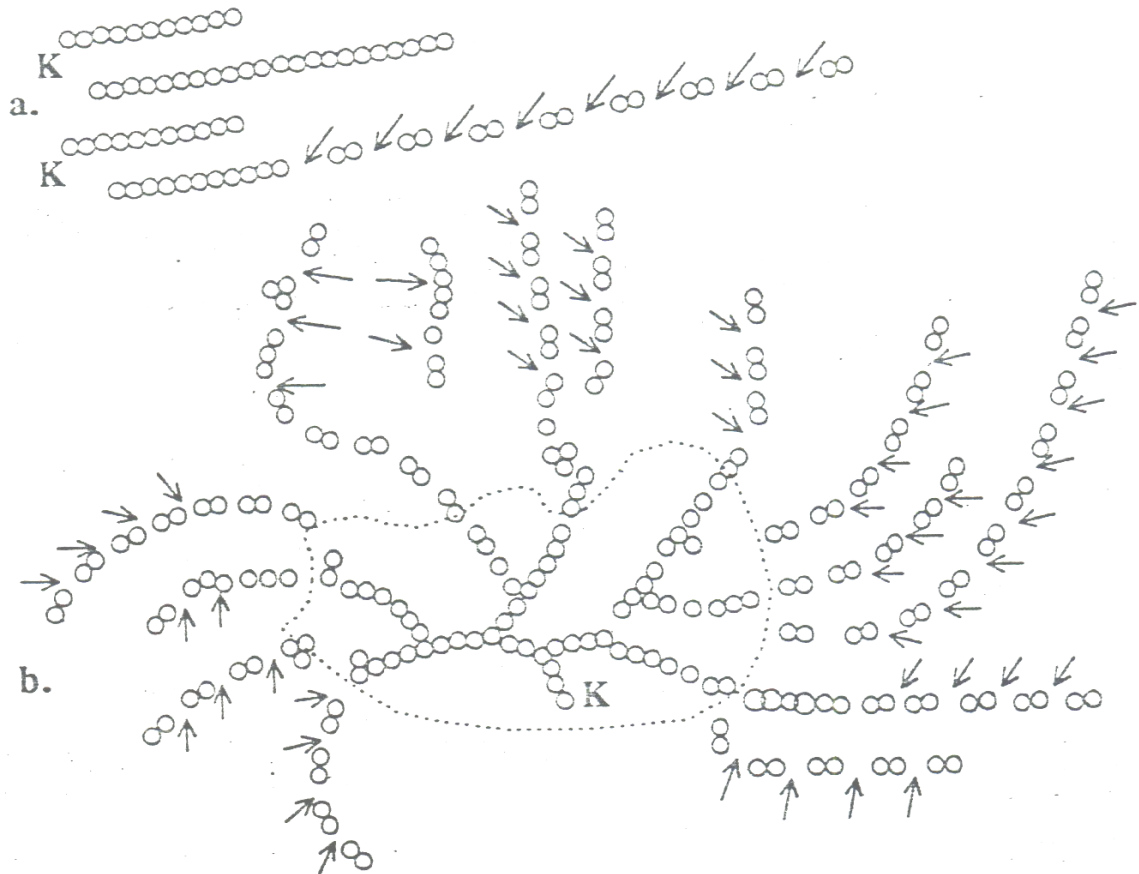
Xúc tác thủy phân liên kết α_{1-4} glycosit tuần tự từng gốc maltose một từ đầu không khử của mạch và do maltose tạo ra cấu hình β vì thế enzyme này được gọi là β – amylase (hình 6.2).

Hầu như không thủy phân hạt tinh bột nguyên mà chỉ thủy phân tinh bột hồ hoá. Có khả năng thủy phân 100% amylose thành maltose và 54 – 58 % amylopectin thành maltose.

Quá trình thủy phân AP bắt đầu từ đầu không khử của nhánh ngoài cùng, mỗi nhánh này có 20 – 26 gốc glucose nên sẽ tạo ra được 10 -13 phân tử maltose. Khi gặp liên kết α_{1-4} đứng kế cận liên kết α_{1-6} thì β -amylase ngừng tác dụng. Phần còn lại không bị tác dụng này gọi là β - dextrin chứa tất cả các liên kết α_{1-6} : cho màu tím đỏ với Iôt.

- Nếu cho cả α và β -amylase cùng đồng thời thủy phân tinh bột thì hiệu suất thủy phân đạt tới 95%.

- β - amylase là một albumin, enzyme ngoại phân (exoenzyme), chỉ có trong malt, vẫn giữ được hoạt tính khi không có C, kém bền ở nhiệt độ cao, bị vô hoạt hoàn toàn ở 70°C. pH_{opt} trong dịch tinh bột thuần khiết là 4,6 , còn trong dịch nấu tinh bột là 5,6. t_{op} trong dịch tinh bột thuần khiết là 40 - 50°C, còn trong dịch nấu tinh bột là 60 - 65°C.



Hình 6.2: Tác dụng của β - amylase lên tinh bột.

a) Sự thủy phân amilose; b) Sự thủy phân các nhánh ngoài của amylopectin.

6.3.2. Glucoamilase (tên hệ thống α -1,4-glucoamylase, mã số

3.2.1.3. EC: còn gọi là amyloglucosidase):

Thủy phân liên kết α_{1-4} và α_{1-6} của phân tử tinh bột và các saccarit khác tương tự. Enzyme này được các nhà khoa học Nhật tách ra lần đầu tiên từ *Asp. Awamori* (katihara, karushima, 1956). Sau đó được tìm thấy ở *Rhizopus delemar*, *Asp. Niger*, *Asp. Oryzae*, các vi sinh vật khác, mô động vật.

Glucoamylase là enzyme ngoại bào (exoenzyme), có khả năng thủy phân liên kết α_{1-2} , α_{1-3} glycosit (Sawasaki, 1960; Ueyamaetal, 1965; Watanabe Fukimbara, 1960). Nó có khả năng thủy phân hoàn toàn tinh bột, glicogen, Am, Ap, dextrin cuối, izomaltose, mantose đến sản phẩm cuối cùng là glucose.

Đa số glucoamylase đều thuộc loại “chịu axit”, $pH_{op}=3,5 - 5$, $t_{op}= 50 - 60^{\circ}C$, mất hoạt tính ở $t > 70^{\circ}C$. Hiện nay enzyme này ở vị trí hàng đầu về hiệu lực thủy phân tinh bột

và các sản phẩm trung gian. Vì thế việc sử dụng các chế phẩm glucoamylase tách từ các chủng vi sinh vật hoạt động trong sản xuất rượu, bia, mạch nha, glucosea có một triển vọng, ý nghĩa vô cùng to lớn.

Những chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp glucoamylase được sử dụng trong công nghệ là: *Asp. Awamori*, *Asp. Niger*, *Asp. Usami*, *Asp. Oryzae*, *Endomyces sp*, *Endomycopsis Caspularis*, *Endomycopsis fibuliger*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus Javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus peka*, *Rhizopus tonkinensis*.

6.3.3. Oligo-1,6-glucozidase hay dextrinase tới hạn (dextrin-6-glucohidrolase 3.1.1.10. EC)

Thủy phân các liên kết α_{1-6} glycosit trong izomaltose, panose, các dextrin tới hạn và có thể chuyển hoá chúng đến các loại đường có thể lên men được.

Các nòi nấm mốc *Asp. Awamori*, *Asp. Usami*, *Asp. Oryzae* sinh tổng hợp rất mạnh mẽ loại enzyme này cho nên nếu đường hoá tinh bột đã nấu chín (trong sản xuất rượu etylic) bằng chế phẩm enzyme nuôi cấy từ các nòi vi sinh vật này sẽ thu được dịch đường có khả năng lên men cuối (lên men dai) rất triệt để, góp phần nâng cao hiệu suất gây men và hiệu suất tổng thu hồi rượu.

Ngoài ra enzyme này cũng có trong malt, trong mô động vật và cả nấm men, đặc biệt chúng còn có các enzyme khác cùng họ hàng với enzyme này là: amylopectin - 1,6 - glucozidase (amylopectin - 1,6 - glucohidrolase 3.2.1.9) và dextrin - 1,6 - glucozidase (dextrin - 1,6 - glucohidrolase 3.2.1.33). Cả 2 enzyme này thủy phân dextrin sâu sắc hơn cả α và β - amylase.

Cả 3 enzyme kể trên (dextrinase) đều hoạt động ở $t_{op} = 40^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_{op} = 5,1$.

6.3.3.1. α -glucozidase hay maltase (α -D-glycosit - glucohidrolase 3.2.1.20 EC)

Có nhiều loài nấm mốc sinh tổng hợp ra enzyme này, tác dụng thủy phân đường maltose thành glucose nhưng không thủy phân được tinh bột. Như vậy giống như dextrinase, enzyme này giúp cho quá trình lên men cuối chuyển đường thành rượu etylic góp phần nâng cao hiệu suất lên men.

6.3.3.2. *Transglucozilase* (α -1,4-glucoan: D-glucoze-4-glucozil transferase 2.4.1.3.EC)

Enzyme này thường tồn tại song song với glucoamylase (trong chế phẩm nấm mốc *Aspergillus*), nó có hoạt tính thủy phân và hoạt tính vận chuyển nhóm. Nghĩa là nó không những chỉ thủy phân maltose thành glucose mà còn tổng hợp nên izomaltose, izotriose và panose, tức là có khả năng chuyển gốc glucose đến gắn nó vào phân tử maltose hoặc phân tử glucose bởi liên kết α_{1-6} glycosit để tạo thành các glycosit nói trên.

Sự có mặt của enzyme này trong các chế phẩm enzyme amylase dùng để biến hình tinh bột (mạch nha, đường glucose, rượu etylic) là điều không mong muốn vì nó xúc tác sự tổng hợp lại các isosaccarit từ chính các sản phẩm thủy phân tinh bột, làm giảm hiệu suất đường hoá, dịch thủy phân có vị đắng không mong muốn.

6.3.4. Protease:

Enzyme protease xúc tác quá trình thủy phân liên kết peptit ($-CO-NH-$)_n trong phân tử protein, polypeptit đến sản phẩm cuối cùng là các axit amin. Ngoài ra, nhiều protease cũng có khả năng thủy phân liên kết este và vận chuyển axit amin.

Theo hệ thống phân loại quốc tế thì nhóm enzyme này được chia làm 4 phân nhóm:

- Aminopeptidase: thủy phân liên kết peptit ở đầu nitơ amin ($-NH_2$) của mạch polypeptit.
- Cacboxypeptidase: xúc tác thủy phân liên kết peptit ở đầu cacbon của mạch polypeptit. Hai phân nhóm này thuộc loại exo-peptidase (enzyme ngoại phân).
- Dipeptit hidrolase: thủy phân các liên kết peptit.
- Protease: xúc tác sự thủy phân liên kết peptit nội mạch (endo-peptidase)

Các protease khá phổ biến ở động, thực vật và vi sinh vật, trong đó đáng chú ý hơn cả là có nhiều vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp mạnh mẽ protease. Các enzyme này có thể ở trong tế bào (protease nội bào) hay được tiết vào môi trường nuôi cấy (protease ngoại bào).

Giống như amylase, một số loại protease đã được dân tộc các nước châu Á, trong đó có Việt Nam sử dụng trong một số ngành sản xuất các sản phẩm thực phẩm truyền thống như: sản xuất nước mắm và các loại mắm, sản xuất tương và chao, một số loại nem, tré. Một số nòi vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, xạ khuẩn thuộc giống *Streptomyces*, nấm mốc thuộc giống *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* là có khả năng sinh tổng hợp enzyme

protease mạnh nhất.

Căn cứ vào cơ chế phản ứng, độ pH_{op} , Hartley (1960) đã phân loại các protease vi sinh vật thành 4 nhóm: protease-serin, P.tiol, P.kim loại và P.axit. Trọng lượng phân tử của 4 nhóm này tương đối bé: chẳng hạn $M_{P-serin}=20000 - 27000$, tuy nhiên nhóm này có một số có M lớn hơn như enzyme của penicillium $M = 44000$. *Asp. Oryzae* 5038 và $M = 52000$, $M_{P.kim\ loai} = 33800 - 48400$, $M_{P.tiol\ và\ axit} = 30000 - 40000$.

Về độ bền thì P. serin bền trong giới hạn pH rộng, từ 5 – 10 ở điều kiện nhiệt độ thấp. P. serin của *Bacillus pumilus* khá bền trong môi trường kiềm, ở $pH = 11$ vẫn giữ được 80% hoạt độ ban đầu.

Ở nhiệt độ $36^{\circ}C$ nhóm này bị mất hoạt tính nhanh chóng. Tuy nhiên các P.serin của *Streptomyces fradiae* và *Stre.reatus* lại bền nhiệt ở $70^{\circ}C$ trong 30 phút chỉ bị mất 10 -15% hoạt tính.

Các protease kim loại kém bền nhất trong số 4 nhóm này, bền trong phạm vi $pH = 6 - 9$, nhanh chóng bị mất hoạt tính ngoài khoảng pH này. Canxi làm tăng độ bền của nhóm enzyme này. Các protease - axit bền trong phạm vi $pH_{axit} = 2 - 6$, trong môi trường axit chúng khá bền nhiệt.

Các protease nói chung được ứng dụng rất rộng rãi trong nhiều lĩnh vực:

Trong chế biến thủy sản:

Khi sản xuất nước mắm (và một số loại mắm) thời gian chế biến thường là dài nhất, hiệu suất thủy phân (độ đậm) lại phụ thuộc rất nhiều vào địa phương, phương pháp gài nén, nguyên liệu cá. Nên hiện nay quy trình sản xuất nước mắm gần đây đã được hoàn thiện trong đó sử dụng chế phẩm enzyme thực vật (bromelain và papain) và vi sinh vật để rút ngắn thời gian làm và cải thiện hương vị của nước mắm. Tuy nhiên vẫn còn một số tồn tại cần phải hoàn thiện thêm về công nghệ.

Trong chế biến thịt: protease được sử dụng để làm mềm thịt và tăng hương vị thịt.

- Ngâm thịt vào dinh dưỡng protease ở pH và nhiệt độ xác định – phương pháp này phổ biến và thuận lợi nhất.

- Tẩm hỗn hợp làm mềm thịt như enzyme, muối, bột ngọt.

- Tiêm dung dịch enzyme vào thịt; tiêm dung dịch enzyme vào con vật trước khi giết

mô.

Trong sản xuất dịch đậm:

Từ *Streptomyces fradiae* tách được chế phẩm keratinase thủy phân được keratin rất có giá trị để sản xuất dịch đậm từ da, lông vũ.

Nếu dùng axit để thủy phân sẽ mất đi hoàn toàn các axit amin chứa lưu huỳnh, nếu dùng kiềm để thủy phân sẽ bị racemic hoá (chuyển dạng L- sang D- làm giảm giá trị sinh học của axit amin).

Để thủy phân sâu sắc và triệt để protein (trong nghiên cứu, chế tạo dịch truyền đậm y tế) cần dùng các protease có tính đặc hiệu cao và tác dụng rộng, muốn vậy người ta thường dùng phối hợp cả 3 loại protease của 3 loại: vi khuẩn, nấm mốc, thực vật với tỉ lệ tổng cộng 1 – 2% khối lượng protein cần thủy phân. Ưu điểm của việc thủy phân protein bởi enzyme là bảo toàn được các vitamin của nguyên liệu, không tạo ra các sản phẩm phụ, không làm sẫm màu dịch thủy phân.

Trong chế biến sữa:

Người ta chỉ sử dụng các protease của vi sinh vật có tính chất tương tự renin hoặc chỉ thay thế 25 – 50% renin như các giống liên kết *Aspergillus Candidus*, *Penicillium roqueforti*, *Bacillus mesentericus*... được ứng dụng để sản xuất phomat. Ngoài ra có thể sử dụng protease để thu casein kỹ thuật (từ sữa) để sản xuất vectri, chất màu, keo dán, hương liệu.

Trong chế biến bia và nước giải khát: protease được dùng để làm trong bia và nước quả.

Trong công nghiệp dệt: papain và protease vi sinh vật được sử dụng để làm sạch tơ tằm, tẩy tơ nhân tạo (các sợi nhân tạo được bằng các dung dịch casein, gelatin) để sợi được bóng, dễ nhuộm.

Trong công nghiệp da: protease được dùng để làm mềm, làm sạch và tẩy lông da, làm tăng tính đàn hồi, cải thiện điều kiện làm việc, tránh ô nhiễm môi trường.

Trong công nghiệp xà phòng, các chất tẩy rửa, mỹ phẩm: thêm enzyme protease trong các loại xà phòng diệt khuẩn, kem dưỡng da, xà phòng có tính tẩy rửa cao.

Trong y học: sử dụng nhiều enzyme protease để sản xuất thuốc hỗ trợ tiêu hoá, nấu

cao động vật, chữa bệnh nghẽn mạch máu, tiêu viêm vết thương.

6.3.5. Pectinase

Pectin là cơ chất của enzyme pectinase. Pectin rất phổ biến trong thực vật, là hợp chất polime tự nhiên tồn tại có 3 dạng: protopectin, pectin và axit pectinic. Protopectin không tan có dạng thực vật xanh, tạo cho rau quả xanh có độ cứng nhất định, bị thủy phân bởi axit hay nhiệt độ, enzyme sẽ chuyển thành pectin hoà tan (quá trình chín của quả có thể gọi là quá trình chuyển hoá này). Pectin là este methyl của axit polygalacturonic.

Tính chất quan trọng nhất của pectin là dễ tạo gel ở nồng độ dịch đường cao 65% trong môi trường 1% axit. Axit pectinic là một axit polygalacturonic nhưng chỉ được este hoá một phần nhỏ bởi metanol. Còn axit pectic hay polypectic là axit đã được giải phóng khỏi nhóm metoxy ($-OCH_3$). Muối tương ứng có tên là pectinat và pectat. Liên kết chính trong pectin là α_{1-4} glycosit.

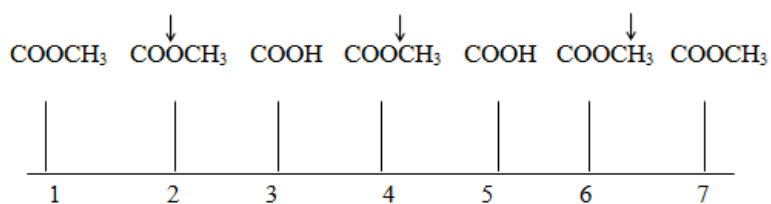
Hiện nay, hệ thống enzyme pectinase được chia thành 2 nhóm chính: hydrolase và transesterase với đặc điểm chung nhất là làm giảm độ nhớt của dung dịch pectin và làm giảm phân tử lượng của các sản phẩm tạo thành.

6.3.6. Hydrolase: (pectinhydrolase)

Thuộc nhóm này có 2 enzyme chủ yếu là: pectimetylsterase và polygalacturonase.

6.3.6.1. Pectimetylsterase: (3.1.1.11.EC) - gọi tắt PE:

Enzyme xúc tác thủy phân liên kết este trong phân tử pectin hoá axit pectinic để giải phóng sản phẩm là metanol và axit polygalacturonic. PE chỉ phân cắt các nhóm metoxy đứng cạnh nhóm ($-COOH$) tự do (hình 6.3).



Hình 6.3 : Sơ đồ tác dụng của pectimetylsterase lên hợp chất pectin.

Vị trí tấn công nhóm metoxy ở vị trí 4 dễ hơn ở vị trí 2 và 6 (2 gốc $-COOH$). Độ pH_{op} của PE thu được từ các nguồn khác nhau: 4,5 – 5,5 (vi sinh vật), 5,0 – 8,0 (thực vật).

PE của nấm mốc có $t_{op} = 30 - 45^{\circ}C$, bị vô hoạt ở $t = 55 - 62^{\circ}C$, PE được hoạt hoá

bởi Ca^{2+} và Mg^{2+} .

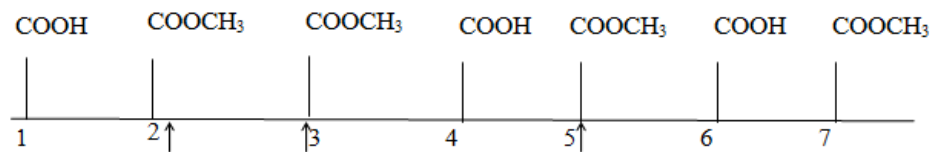
6.3.6.2. Polygalacturonase (PG. 3.2.1.15.EC; poly - $\alpha_{1,4}$ - galacturonit glucanhydrolase).

Enzyme này ít gặp trong thực vật, chủ yếu có trong vi khuẩn và nấm mốc. Đây là một phức hệ enzyme và thường có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất. Dựa vào đó người ta chia ra 4 kiểu sau:

Polymethyl-galacturonase (PMG - poly - $\alpha_{1,4}$ - galacturonit - methyl este glucanhydrolase. 3.2.1.41EC). PMG lại được phân thành 2 nhóm nhỏ phụ thuộc vào vị trí phân cắt liên kết $\alpha_{1,4}$ ở trong hay ở cuối và đầu mạch.

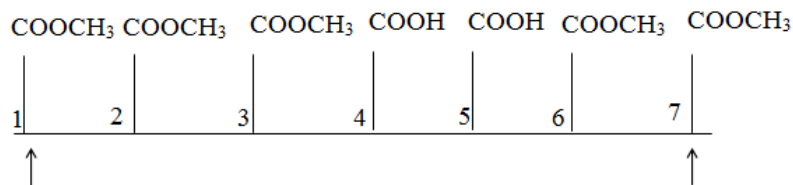
- Endo glucozidase polymetyl galacturonase kiểu I (endo - PMG - I). Đây là enzyme có tính chất dịch hoá. Pectin có mức độ methyl hoá càng cao (nhiều gốc metoxy - OCH_3) thì bị thuỷ phân càng nhanh và triệt để. Trong môi trường khi có mặt pectinesterase (PE) thì enzyme này thường bị giảm hoạt lực. Endo - PMG - I rất phổ biến trong các nòi nấm mốc: *Asp. Niger, Asp. Awamori, Botrytis cinezee, Neurispora crassa.*

Cơ chế tác dụng như hình vẽ 6.4:



Hình 6.4 : Sơ đồ tác dụng của Endo glucozidase polymetyl galacturonase III lên hợp chất pectin.

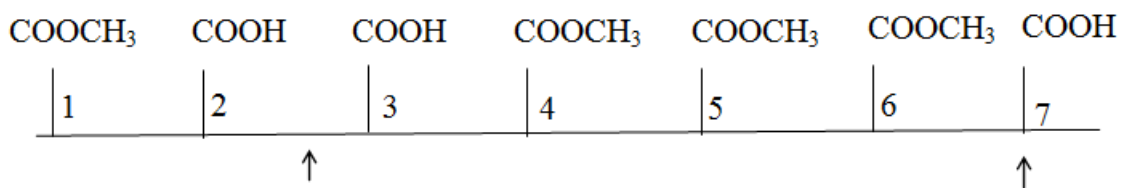
- Exo - glucozidase polymetyl galacturonase kiểu III (exo - PMG - III). Đây là enzyme có tính chất đường hoá, có khả năng cắt từng gốc monome axit galacturonic ra khỏi mạch bắt đầu từ đầu không khử có nhóm metoxy ($-\text{OCH}_3$)



Hình 6.5 : Sơ đồ tác dụng của exo glucozidase polymetyl galacturonase III lên hợp chất pectin.

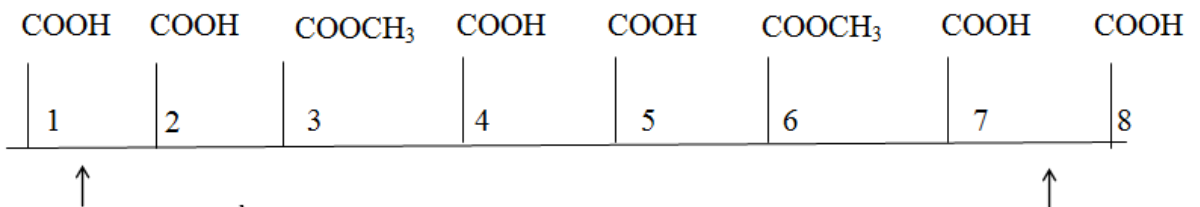
Cơ chế tác dụng như hình vẽ 6.5:

Polygalacturonase là các enzyme chủ yếu tác dụng lên axit pectinic (các axit polygalacturonic không bị ester hóa) hay axit pectic (các axit polygalacturonic bị ester hóa ở mức độ thấp). Các enzyme này cũng được phân thành 2 nhóm nhỏ nhờ từng vị trí liên kết glycosit bị cắt đứt: Endo glucozidase polygalacturonase kiểu II (endo – PG – II). Đây là enzyme có tính chất dịch hoá, chỉ thủy phân cơ chất khi có mặt nhóm – COOH tự do. Hoạt độ của endo – PG – II tăng lên nhiều khi cơ chất được xử lý trước bằng pectinesterase (để tạo ra nhiều gốc – COOH tự do). Nấm mốc và vi khuẩn tổng hợp được enzyme này. Cơ chế tác dụng như hình vẽ 6.6:



Hình 6.6 : Sơ đồ tác dụng của endo glucozidase polygalacturonase II lên axit pectinic.

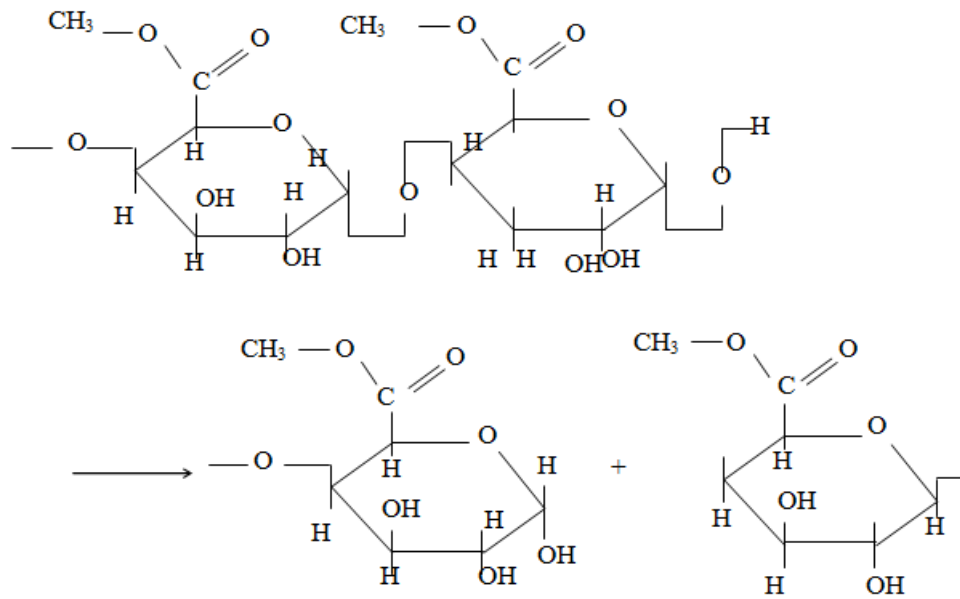
- Exo - glucozidase polygalacturonase kiểu IV (exo – PG – IV) : Thủy phân các liên kết gắn với nhóm – COOH tự do ở đầu hay mỗi mạch.



Hình 6.7 : Sơ đồ tác dụng của exo glucozidase polygalacturonase IV lên axit pectinic.

6.3.7. Transeliminase (TE)

Đây là nhóm enzyme được tìm ra cách đây chưa lâu lắm (khoảng năm 1960 – 1961) bao gồm protopectinase xúc tác sự phân cắt araban, galactan khỏi protopectin để tạo thành pectin hoà tan và enzyme transeliminase phân cắt phi thủy phân (không có sự tham gia của phân tử H₂O) pectin để tạo ra các gốc galacturonic có nối kép giữa nguyên tử C₄ và C₅. Phản ứng xảy ra dễ dàng ở môi trường trung tính hay kiềm yếu.



Hình 6.8: Cơ chế xúc tác của enzyme Transeliminase.

6.3.8. Pectinase

Các chế phẩm enzyme pectinase thường được sử dụng trong sản xuất nước quả, sản xuất rượu vang, trích ly đông dược (sắc thuốc) và trong chăn nuôi.

Ứng dụng chế phẩm pectinase trong sản xuất nước quả:

+ Có các mặt hàng nước quả trong, nước quả đục, nước quả có thịt quả, tất cả đều được sản xuất từ nước ép (chiết rút) của quả. Do đó hiệu quả thu dịch quả của phụ thuộc vào tính chất của nguyên liệu quả (cấu tạo, độ chín, thành phần định tính và định lượng của pectin trong quả, phương pháp ép, chiết rút)

- Khi chế biến nước quả trong thì chế phẩm pectinase phải có endo và exo polygalacturonase (endo – PGII và exo – PGIV).

- Enzyme pectinesterase và protease: Hai loại enzyme đều làm giảm độ nhớt dịch quả. PE góp phần vào tác dụng của enzyme này, còn protein thủy phân protein của vỏ tế bào thực vật làm cho dịch quả dễ thoát ra, cặn và bã dễ lắng hơn.

- Với các loại quả có nhiều protopectin như táo, lê, ổi thì chế phẩm không được có enzyme protopectinase vì nếu có sẽ phân huỷ protopectin làm mềm hoá mô quả, tăng độ nhớt của dịch quả nên làm giảm hiệu suất lấy nước quả trong.

- Ngoài ra, nước quả không được phép chứa các enzyme oxy hoá (ascobatoxydase,

polyphenoloxidase, peroxidase) làm hao tổn vitamin C và sẫm màu, biện pháp sử dụng nhiệt (đun nóng) sẽ vô hoạt hệ enzyme này.

+ Để thu được nước quả với hiệu suất cao, người ta thường nghiền thịt quả, xử lý bằng chế phẩm enzyme pectinase, sau đó mới đem vắt, ly tâm hay ép.

- Ví dụ: nếu xử lý táo nghiền bằng 0,03% chế phẩm pectinase (200 đơn vị hoạt độ) PMG (gam) sau 2 – 4 h sẽ tăng hiệu suất thu dịch quả 20 – 25%.

- Khi ép nho mà không sử dụng chế phẩm pectinase thì hiệu suất ép là 65% nhưng nếu sau khi nghiền chà quả và xử lý bằng 0,2% chế phẩm pectinase trong 3h ở 45⁰C sẽ nâng cao hiệu suất ép lên 77 – 82%.

- Dùng pectinase còn có tác dụng làm trong do sự phá huỷ hệ keo trong nước quả, vị của quả tốt hơn và ít bị đục trở lại.

Ứng dụng chế phẩm pectinase trong sản xuất rượu vang:

- Rượu vang được sản xuất từ các loại quả ngọt (quả có đường): nho, táo, dâu, chuối, dứa, mơ, mận, anh đào, sơn tra (táo mèo).

- Các giai đoạn chủ yếu: điều chế dịch quả lên men, lên men dịch quả, xử lý và tàng trữ vang.

- Chế phẩm pectinase dùng trong công nghệ vang để làm tăng hiệu suất thu dịch quả và để làm trong cần phải bảo toàn được hoạt độ trong điều kiện nồng độ rượu trung bình 10 – 12% và độ pH hơi axit (4 – 5).

- Khi xử lý bã nho bằng pectinase sẽ làm tăng hàm lượng catechin trong rượu (chất chát). Catechin có hoạt tính của vitamin P như vậy đã làm tăng giá trị sinh học của rượu vang.

- Ngoài ra vang còn có độ thuần thực (thành trưởng – ageing) nhanh hơn, hương thơm mạnh hơn, vị dịu hơn do có nhiều glyxerin và este.

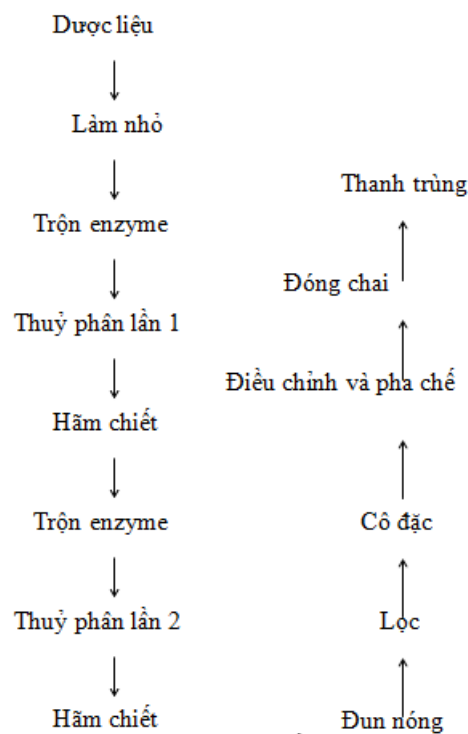
Ứng dụng pectinase trong trích ly các dược liệu đông y (thuốc bắc, thuốc nam).

- Các dược liệu có nguồn gốc thực vật, trong thành phần của chúng ngoài các hoạt chất thì luôn luôn có pectin.

- Từ trước đến nay để thu nhận được các thành phần hoạt chất trong dược liệu để trị bệnh cấp thời (ngay lúc đó), để điều chế dạng cồn (rượu), thuốc (uống và xoa bóp), để điều

chế dung dịch thuốc, viên nén, viên nang, đặc biệt hiện nay để sản xuất thuốc tiêm và dịch truyền từ chính các vị thuốc đông y, các thực phẩm chức năng (functional food) người ta dùng các phương pháp: chiết rút bằng nước nhiệt (còn gọi là sắc thuốc – và đây là phương pháp phổ biến nhất), bằng cồn (ngâm rượu thuốc), trích ly bằng dung môi thích hợp (axeton, etc, nitơ lỏng, axeton lạnh). Do có thành phần pectin nên quá trình sắc thuốc khó khăn, không trích ly được triệt để hoạt chất, dịch thuốc bị biến chất sau một thời gian ngắn.

- Để khắc phục những khó khăn này, người ta dùng chế phẩm enzyme pectinase để phân giải các mô thực vật để các hoạt chất được giải phóng ra dễ dàng và triệt để hơn khi sắc thuốc.



Hình 6.9: Sơ đồ công nghệ ứng dụng pectinase trong trích ly các dược liệu đông y.

- Tuy nhiên, vì sử dụng cho mục đích sản xuất thuốc chữa bệnh nên khi dùng chế phẩm enzyme phải có độ tinh khiết rất cao để không mang theo những hoạt chất lạ vào thuốc, phải có hoạt độ cao để chỉ dùng với một lượng tối thiểu.

Ứng dụng chế phẩm pectinase trong chăn nuôi:

- Khẩu phần ăn của gia súc, gia cầm thường chứa một lượng thức ăn thô, thức ăn xanh nhất định (rơm rạ, cỏ, thân cây, cám...) trong khi đó ở đường tiêu hoá của chúng lại

thiếu các enzyme phân giải xenluloza, hemixenluloza, pectin.

- Chỉ có những động vật nhai lại có dạ cỏ phát triển đầy đủ (trên 6 tháng tuổi) hay gia cầm có manh tràng dài (ngỗng, đà điểu) mới có hệ vi sinh vật sống cộng sinh trong dạ cỏ là có khả năng sinh ra các hệ enzyme để giúp động vật tiêu hoá một phần các chất dinh dưỡng này, tuy vậy khoảng 1/3 nhóm chất này không được đồng hoá.

- Để nâng cao khả năng tiêu hóa hấp thụ, người ta có thể thêm vào thức ăn chăn nuôi các chế phẩm enzyme phân giải nhóm glucit này - đều là chế phẩm có hoạt tính pectinase, xenlulase và hemixenlulase cao.

- Đối với các động vật nhai lại (trâu, bò, dê, cừu, ngựa): do có hệ vi sinh vật sống trong dạ cỏ tham gia tích cực vào quá trình tiêu hoá thức ăn. Khi thêm chế phẩm enzyme pectinase và xenlulase cao ở độ pH = 6 – 7 (axit tính) sẽ có lợi làm tăng độ tiêu hoá của thức ăn.

- Đối với ngỗng và ngan (vịt xiêm): đây là 2 loài gia cầm nuôi lấy thịt, đặc biệt là có loài để sản xuất ra gan béo (nguyên liệu sản xuất ra mặt hàng pete rất nổi tiếng). Hai loài này có năng lực sinh trưởng rất cao, người ta cố gắng nuôi để đạt độ tăng trọng cao và thời gian ngắn (ở độ tuổi gia cầm non tuổi có giá trị thương phẩm cao). Muốn vậy người ta nuôi vỗ béo bằng cách nhồi thức ăn có sử dụng các chế phẩm pectawamorin 0,04% so với khẩu phần.

6.3.9. Cellulase:

- Hằng năm có khoảng 230 tỉ tấn chất hữu cơ được tổng hợp bằng quá trình quang hợp ở thực vật, trong đó có tối đa 70 tỉ tấn (30%) xenluloza. Đây là polyme tự nhiên β – D - glucose được nối với nhau qua liên kết β – D -1,4-glucan, mức độ polyme hoá của phân tử xenluloza: 200 – 15000, trung bình 3000, trọng lượng phân tử 50.000 – 2.500.000.

- Xenluloza là hợp chất tự nhiên khá bền, không tan trong nước, chỉ bị trương phồng do hút nước, bị phân huỷ khi đun nóng với kiềm hay axit hoặc do các enzyme được gọi chung là xenlulase.

- Trong tế bào thực vật xenluloza liên kết chặt chẽ với hemixenluloza, pectin, lignin. Điều này ảnh hưởng rất nhiều đến sự phân huỷ xenluloza của enzyme.

- Theo những hiểu biết hiện nay thì quá trình phân huỷ xenluloza nhờ enzyme được

thực hiện nhờ phức hệ xenlulase, bao gồm các enzyme C_1 , C_x và β -glucosidoza.

- Enzyme C_1 có tính chất không đặc hiệu. Dưới tác dụng của C_1 , các loại xenluloza bị hấp thụ nước, trương lên và chuẩn bị cho sự tác động của các enzyme khác. Nếu tách riêng C_1 cho hoạt động độc lập thì tác dụng này lại không thấy rõ ràng. Vì vậy người ta cho rằng C_1 chỉ là một yếu tố (factor), không phải là enzyme.

- C_x còn gọi là enzyme β -1,4 glucanase, thuỷ phân các xenluloza ngậm nước bởi C_1 nói trên (polyanhydroglucose hydrat hoá) thành xenluloza. Chữ x có nghĩa là enzyme gồm nhiều thành phần khác nhau và người ta thường chia làm 2 loại chính là: exo- β -1,4 glucanase và endo- β -1,4 glucanase.

+ Exo- β -1,4 glucanase xúc tác việc tách liên tiếp các đơn vị glucose từ đầu không khử (non-reducing end) của chuỗi xenluloza (hình trang 122 – VSV tập II).

+ Endo- β -1,4 glucanase phân cắt liên kết β -1,4 glycosit ở bất kỳ vị trí nào của chuỗi xenluloza.

Các tác giả (Ogawa và Toyama, 1967) cho rằng còn có một enzyme trung gian là C_2 (giữa C_1 và C_x). Enzyme này trước hết tác động vào xenluloza đã bị làm trương nước bởi C_1 rồi thuỷ phân thành các dextrin xenluloza hoà tan. Sau đó C_x sẽ tiếp tục thuỷ phân các xenlo dextrin này thành xenlobioza.

- β -glucosidase là enzyme rất đặc hiệu, thuỷ phân xenlobioza thành xenlohexoza (D-glucose) mã số enzyme này là: 3.2.1.21 EC.

- Nguồn enzyme xenlulase:

Có thể nói quá trình phân giải xenluloza bởi vi sinh vật là một trong những chu trình quan trọng nhất của tự nhiên. Người đầu tiên nghiên cứu khả năng phân giải xenluloza của các vi sinh vật kỵ khí là Popov vào năm 1875, tiếp đó là Omelianxki. Các môi trường nghiên cứu phân lập vi sinh vật loại này trở thành kinh điển. Còn người đầu tiên phát hiện khả năng phân giải xenluloza bởi vi khuẩn hiếu khí là G.Van Iterson vào năm 1903.

Trước đó, hoạt động phân giải xenluloza bởi vi sinh vật sống trong dạ cỏ của các động vật nhai lại đã được chứng minh (1955). Đến năm 1971, người ta đã phân lập được một số loài vi sinh vật có khả năng phân giải xenluloza trong dạ cỏ. Trong đó có 2 giai đoạn nghiên cứu kỹ hơn cả là *Ruminococcus* và *R.flavefacicus*.

Về sau này, rất nhiều vi sinh vật phân giải xenluloza được tìm thấy trong đất, nước, phân bón hữu cơ. Đáng chú ý hơn cả là việc ứng dụng vi khuẩn thuộc nhóm cellulomonas vào việc lên men phân giải bã mía và rác thải thực vật. Suu tập giống QM (QM collection) của Massachusetts cũng có khoảng 14000 chủng nấm có khả năng phân giải xenluloza, trong đó các chủng nổi tiếng như *trichoderma viride*, *Sporotrichum P.ruinosum*, *penicillium pusillum*, *Aspergillus fumigatú*, *Asp.terreus*...

Ứng dụng của xenlulase:

+ Phá vỡ thành tế bào (cellwall) thực vật để nuôi cấy các tế bào trên (tế bào không có màng) để lai tạo chúng với nhau nhằm tạo giống thực vật

+ Sản xuất trường glucose thực phẩm, nguyên liệu công nghiệp hoặc nuôi cấy nấm men gia súc.

Ở Nhật, hãng Megiseika đã sử dụng *Trichoderma.Konigii* và hãng Kinkiyakylt đã sử dụng *T.viride* nuôi cấy theo phương pháp bề mặt để sản xuất xenlulase. Sơ đồ phân xưởng thí điểm (pilot) sản xuất siro glucose từ các nguồn xenluloza phế liệu nhờ xenluloza của *T.viride* như sau:

+ Lên men đường chuyển hoá (tạo thành bởi sự thủy phân xenluloza do enzyme) thành etanol nhiên liệu động cơ đốt trong (xe hơi, xe máy)

+ Tách tinh bột ra khỏi hạt và củ bằng cách dùng các enzyme tách tế bào (cell separating enzyme – CSE). Đây là hệ thống enzyme tác động vào phần protopectin của vỏ (hạt, củ) để giải phóng tinh bột, một số chủng nấm *Rhizopus* sinh tổng hợp loại enzyme này.

+ Sản xuất tổ hợp EM (Effect Microbiology – vi sinh vật hữu hiệu) trong xử lý rác thải.

6.3.10. Saccarase và glucooxydase.

- Saccarase: đây là một nhóm enzyme bao gồm: invertase, dextranase, levansaccarase... xúc tác thủy phân các liên kết glycosit của saccaroza và một vài loại đường khác. Trong số các enzyme này thì invertase (B-D-fructofaranozit – fructohidrolase, mã số 3.2.1.26 EC) là có ý nghĩa khoa học và thực tiễn hơn cả. Enzyme này rất phổ biến trong nấm men và nấm mốc: *Saccharomyces cerevisiae*, *Sacch. Carlsbergensis*, *Sacch.*

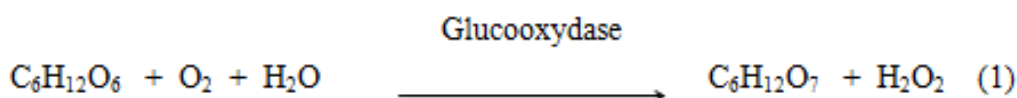
Pastenriabus, Aspergillus Oyae, Asp. Niger...

- Invertase là enzyme nội bào (endoenzyme), $pH_{op} = 4,5$, $t_{op} = 65 - 70^{\circ}C$.

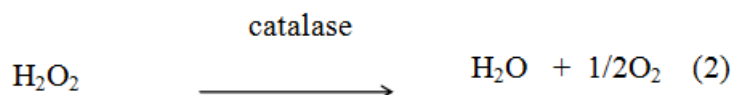
- Invertase được sử dụng rộng rãi trong công nghệ thực phẩm để nghịch đảo đường chống hiện tượng kết tinh đường (lại đường) trong sản xuất bánh kẹo (dung dịch đường nồng độ 65% thì kết tinh nhưng có invertase thì ở nồng độ 80% vẫn không kết tinh), tăng độ ngọt khi thủy phân đường saccaroza thành glucose và fructoza, sản xuất bột mỳ nhân tạo, sản xuất dịch đường y tế (dịch truyền glucose).

Enzyme oxy hoá: glucooxydase, catalase.

+ Glucooxydase (B-D-glucose: O_2 oxydoreductase; 1.1.3.4 EC) là enzyme oxy hoá - khử, chỉ tác dụng lên α -D glucose khi có mặt oxy, oxy hoá glucose thành gluconic và H_2O_2 :



+ Catalase: một enzyme oxy hoá – khử hay đi cùng enzyme glucooxydase để khử hoá H_2O_2 tiếp tục:



Tổng hợp cả (1) và (2) ta có:



Tức là cứ 1 phân tử gam glucose cần 0,5 ptg O_2 . Tính chất này của enzyme có một ý nghĩa thực tế rất lớn là phức hệ enzyme này có thể loại bỏ oxy trong môi trường phản ứng, tránh được sự oxy hoá bởi chính oxy không khí (môi trường). Như vậy có thể kéo dài thời gian bảo quản mà không cần phải tác động của biện pháp hút chân không (đóng gói chân không).

Glucooxydase có nhiều ở các loài nấm mốc *Penicilium notatun*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. vitale*, *Aspergillus. Niger*.

+ Chế phẩm enzyme glucooxydase và đặc biệt là nếu dùng kết hợp với chế phẩm

catalase có rất nhiều ứng dụng trong thực tiễn:

- 1) Chống rỉ mặt trong các bao bì kim loại
- 2) Nâng cao giá trị của bột lòng trắng trứng (albumin): Trong albumin có một lượng đường glucose tự do 0,5%, lượng đường này là tác nhân tham gia phản ứng Maillard làm sẫm màu bột trứng trong thời gian bảo quản. Có thể loại trừ tác động này bằng chế phẩm enzyme glucooxydase như trên.
- 3) Bảo quản bột sữa, đồ cứng không có rượu, cà phê, dầu mỡ, phomat, đồ hộp.
- 4) Giữ tươi rau quả trước khi nấu chín như: chuối, cà chua, táo,... Muốn vậy người ta gói enzyme cùng với glucose, chất độn rồi cho vào giữa khối quả tươi đang bảo quản kín. Enzyme sẽ loại trừ oxy trong môi trường bảo quản để giữ cho quả tươi lâu.
- 5) Tiến hành các phân tích hoá sinh chẩn đoán bệnh như: phân tích đường trong huyết, nước tiểu (bệnh tiểu đường, tăng, hạ đường huyết).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

- [1] Lương Đức Phẩm, Nấm men công nghiệp, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, 2006
- [2] Nguyễn Thị Hiền (chủ biên), Công nghệ sản xuất mì chính và các sản phẩm lên men cổ truyền, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, 2006.
- [3] Mai Xuân Lương, Giáo trình enzyme, trường đại học Đà Lạt, 2005
- [4] Nguyễn Đức Lượng và một số tác giả, Công nghệ enzym, NXB Đại học quốc gia Tp.HCM, 2004
- [5] Nguyễn Đức Lượng, Vi sinh vật công nghiệp (Công nghệ vi sinh Tập 2), NXB Đại học quốc gia Tp.HCM, 2006
- [6] Trần Xuân Ngạch, Bài giảng Công nghệ enzyme, Khoa Hóa-ĐHBK-ĐHĐN, 2004
- [7] Nguyễn Hoàng Minh, Bài giảng Công nghệ enzyme, Khoa Hóa-ĐHBK-ĐHĐN, 2012
- [8] Nguyễn Tiến Thắng, Giáo trình công nghệ enzym, Trường Đại học Kỹ thuật công nghệ Tp.HCM, 2008
- [9] Nguyễn Hữu Chấn. Enzyme và xúc tác sinh học, NXB Y học Hà Nội, 1996
- [10] Lê Khắc Thận (1974), Sinh hoá học động vật, Nhà xuất bản Nông thôn
- [11] Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyền (1998), Sinh hoá hiện đại, Nhà xuất bản giáo dục, Hà Nội.
- [12] Hồ Trung Thông, Lê Văn An (2006), Hoá sinh động vật, Đại học Huế.
- [13] Lê Thị Kim Thu (2002), Hóa sinh lâm sàng, Nhà xuất bản y học, Hà Nội.

TÀI LIỆU TIẾNG NƯỚC NGOÀI:

- [14] Benjamin Harrow, Abraham Mazur, Textbook of Biochemistry (Eighth edition), Saunders company, Philadelphia, London.
- [15] Brody T. (1999), Nutritional biochemistry, Second edition, Academic Press, San Diego, USA.
- [16] CopelADN, R. A (2000), Enzymes, a practical introduction to structure mechanism ADN data analysis, 2 nd ed willey – VCH, A John willey ADN Sons, INC, Puh.
- [17] Hans, U, B (1974), Methods of enzymatic analysis, Second English Edetion Academic Press, Inc, New York, San Fransisco, London, Vol.4
- [18] Mc Donald P., Edwards R.A., Greenhagh J. F. D, Morgtan C.A., (1995), Animal Nutrition, Longman Scientific & Technical, New York – USA, pp 9 – 27.
- [19] Nelson D. L, Cox M, M (2005), Lehnninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition, Freeman ADN Company, New York, USA.
- [20] Pastan L. (1990), Biochemistry, New Delhi – 1990.
- [21] Stryer L. (1981), Biochemistry, W. H. Treeman ADN company, New York.

[22] Walker J, M (1996), The protein protocols, HADNbook, 2 nd ed, Humana Press Inc Totuwa, New Jersey.

[23] White A., HADNker P., Smith E. L. (1964), Principles of Biochemistry, Third edition, McGraw Hill Inc, New York, USA.

[24] Биохимия: учебник / под. Ред. Е.С. Северина. – 2-изд., испр. – М.: ГЕОТАР – МЕД, 2004. – 784 с.: ил. – (Серия «XXI ВЕК»). ISBN 5-9231-0390-7.