

GS.TS. ĐẶNG THỊ THU (Chủ biên)  
PGS. LÊ NGỌC TÚ  
PGS.TS. TÔ KIM ANH  
PGS.TS. PHẠM THU THỦY  
PGS.TS. NGUYỄN XUÂN SÂM

# Công nghệ

# ENZYM



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

-----

GS.TS. ĐẶNG THỊ THU (CHỦ BIÊN)

PGS. LÊ NGỌC TÚ, PGS.TS. TÔ KIM ANH

PGS.TS. PHẠM THU THỦY, PGS.TS. NGUYỄN XUÂN SÂM

# CÔNG NGHỆ ENZYM



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT  
HÀ NỘI

**GS.TS. ĐẶNG THỊ THU (CHỦ BIÊN)**  
**PGS. LÊ NGỌC TÚ, PGS.TS. TÔ KIM ANH**  
**PGS.TS. PHẠM THU THỦY, PGS.TS. NGUYỄN XUÂN SÂM**

## **CÔNG NGHỆ ENZYM**

*Chịu trách nhiệm xuất bản:* ĐỒNG KHẮC SÙNG  
*Biên tập:* TS. NGUYỄN HUY TIẾN  
*Trình bày bìa:* NGỌC TUẤN

**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT**  
**70 Trần Hưng Đạo - Hà Nội**

---

In 400 bản khổ 16 x 24cm, tại Xí nghiệp In NXB Văn hóa Dân tộc  
Số đăng ký kế hoạch XB: 235 – 2012/CXB/253 - 13/KHKT, cấp ngày 06/3/2012.  
Quyết định XB số: 43/QĐXB – NXBKHKT, cấp ngày 15/5/2012.  
In xong và nộp lưu chiểu Quý III năm 2012.

## *Lời nói đầu*

---

Enzym là chất xúc tác sinh học, tức là chất xúc tác được sản xuất ra do tế bào và vi tế bào. Là tác phẩm của tự nhiên, enzym có bản chất protein có cấu trúc phân tử phức tạp và tinh vi, do đó enzym có lực xúc tác cực kỳ mạnh mẽ và có tính chọn lọc rất cao. Song khi chiết xuất ra ngoài, hoạt tính xúc tác của nó có thể giảm hoặc mất đi khi điều kiện môi trường phản ứng không được duy trì như ở trong tế bào.

Bằng cách nào có thể trích ly được enzym và thu được chế phẩm enzym có độ tinh khiết cao? Bằng phương pháp nào có thể chế tác được chế phẩm enzym ở dạng không hòa tan để sử dụng được lâu bền. Enzym hòa tan và enzym cố định khác nhau về động học như thế nào? Đặc điểm của thiết bị phản ứng enzym và nguyên tắc làm việc của điện cực enzym như thế nào? Phạm vi và hiệu quả sử dụng của enzym trong nền kinh tế quốc dân như thế nào?

Các vấn đề nêu trên được trình bày trong các chương sau của cuốn sách "*Công nghệ enzym*":

*Chương 1.* Công nghệ thu chế phẩm enzym - GS. Đặng Thị Thu, PGS. Lê Ngọc Tú.

*Chương 2.* Enzym cố định (enzym không hòa tan) - GS. Đặng Thị Thu.

*Chương 3.* Động học phản ứng enzym - PGS. Lê Ngọc Tú.

*Chương 4.* Điện cực sinh học (cảm biến sinh học) - GS. Đặng Thị Thu.

*Chương 5.* Thiết bị phản ứng enzym - PGS. Tô Kim Anh.

*Chương 6.* Ứng dụng chế phẩm enzym và triển vọng của công nghệ enzym:

- Ứng dụng chế phẩm trong công nghệ thực phẩm - PGS. Phạm Thu Thủy
- Ứng dụng chế phẩm enzym trong một số ngành công nghiệp khác - PGS. Nguyễn Xuân Sâm
- Triển vọng của công nghệ enzym - PGS. Tô Kim Anh

Cuốn sách này là giáo trình học tập cho sinh viên và học viên cao học ngành Công nghệ sinh học, Công nghệ thực phẩm đại học Bách Khoa Hà Nội và một số trường đại học khác... Cũng như làm tài liệu tham khảo cho sinh viên ngành Công nghệ hóa học, Công nghệ môi trường, Dược, Thủy sản, Nông nghiệp, và cho cán bộ nghiên cứu, quản lý ở các viện nghiên cứu có liên quan.

Các tác giả xin cảm ơn và mong nhận được những ý kiến đóng góp của các bạn đọc để cuốn sách được bổ sung và hoàn thiện hơn trong những lần in sau.

*Hà Nội ngày 01 tháng 2 năm 2012*

**TM. CÁC TÁC GIẢ**  
**Chủ biên**

***Đặng Thị Thu***

# MỤC LỤC

Lời nói đầu .....	3
-------------------	---

## Chương 1. CÔNG NGHỆ THU CHẾ PHẨM ENZYM

1.1. Khái quát về enzym .....	7
1.2. Các đơn vị hoạt độ của enzym. ....	8
1.3. Nguồn nguyên liệu thu enzym. ....	9
1.4. Phương pháp thu chế phẩm enzym vi sinh vật .....	14

## Chương 2. ENZYM CỐ ĐỊNH (Immobilized enzymes)

2.1. Khái niệm enzym cố định. ....	67
2.2. Các phương pháp điều chế enzym cố định.....	68
2.3. Một số đặc tính của enzym cố định .....	82
2.4. Ứng dụng của enzym cố định.....	85

## Chương 3. ĐỘNG HỌC PHẢN ỨNG ENZYM

3.1. Động học của Enzym monome .....	92
3.2. Động học của các enzym dị không gian và sự điều hòa của các enzym oligome.....	127
3.3. Động học của các enzym cố định .....	136

## Chương 4. ĐIỆN CỰC SINH HỌC (Cảm Biến Sinh Học)

4.1. Sơ lược lịch sử phát triển của ĐIỆN CỰC SINH HỌC .....	160
4.2. Khái niệm về điện cực sinh học .....	161
4.3. Một số loại điện cực sinh học .....	169
4.4. Ứng dụng điện cực sinh học .....	195

## **Chương 5. THIẾT BỊ PHẢN ỨNG ENZYM**

5.1 Thiết bị phản ứng gián đoạn .....	218
5.2. Thiết bị phản ứng liên tục .....	220
5.3. Thiết bị phản ứng enzym dạng màng .....	226
5.4. Thiết bị phản ứng dạng cột .....	227
5.5. Thiết bị phản ứng tầng sôi.....	230
5.6. Lựa chọn thiết bị phản ứng enzym.....	231

## **Chương 6. ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM ENZYM VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ ENZYM**

6.1. Ứng dụng enzym trong công nghiệp thực phẩm .....	233
6.2. Ứng dụng enzym trong một số ngành công nghiệp khác .....	281
6.3. Triển vọng của công nghệ ENZYM.....	300

<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>319</b>
---------------------------------	------------

## CÔNG NGHỆ THU CHẾ PHẨM ENZYM

---

### 1.1. KHÁI QUÁT VỀ ENZYM

– Enzym là chất xúc tác sinh học, có bản chất protein, hoà tan trong nước và trong dung dịch muối loãng. Enzym có phân tử lượng lớn từ 20-1.000 KDa nên không qua được màng bán thấm.

– Tất cả các yếu tố làm biến tính protein như axit đặc, kiềm đặc, muối kim loại nặng,... đều có thể làm enzym bị biến tính và mất hoạt tính xúc tác.

– Enzym có nhiều tính chất ưu việt hơn hẳn các chất xúc tác hoá học

Enzym có cường lực xúc tác rất lớn: ở điều kiện thích hợp, hầu hết các phản ứng có xúc tác enzym xảy ra với tốc độ nhanh gấp  $10^8$  -  $10^{11}$  lần so với phản ứng không có chất xúc tác.

– 1g pepsin phân giải được 5kg protein trứng trong 2 giờ.

– 1g renin làm đông tụ được 72 tấn sữa trong sản xuất phô mát.

– 1mol catalase phân huỷ được  $5 \cdot 10^6$  mol  $H_2O_2$ /phút trong khi đó 1mol  $Fe^{+3}$  chỉ phân huỷ  $10^6$  mol  $H_2O_2$ /phút.

Enzym có tính đặc hiệu cao: Mỗi enzym chỉ xúc tác làm chuyển hoá được một hoặc một số cơ chất nhất định theo một kiểu liên kết hoá học nhất định, và một kiểu phản ứng nhất định. Sự tác dụng có tính chất lựa chọn này gọi là tính đặc hiệu của enzym, hay còn gọi là tính chuyên môn hóa cao. Enzym có tính đặc hiệu cao nên không tạo ra những sản phẩm phụ.

Enzym tác dụng trong điều kiện “êm dịu “. Enzym thường tác dụng thích hợp ở nhiệt độ 30-50°C, pH trung tính và ở áp suất thường, không cần nồng độ axit hay nồng độ kiềm mạnh, áp suất cao, do đó không đòi hỏi các thiết bị chịu axit, kiềm và chịu áp suất cao đắt tiền.



Tất cả các enzym có nguồn gốc tự nhiên không độc. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong công nghiệp thực phẩm và y học.

Các chế phẩm enzym được sản xuất từ nguồn nguyên liệu dễ kiếm, rẻ tiền:

- Enzym protease động vật thường thu nhận từ các phụ phẩm lò mổ như : tụy tạng, dạ dày...
- Enzym protease thực vật được thu từ vỏ, lá dứa, lá, thân, nhựa sung, vả, nhựa đu đủ xanh.
- Enzym vi sinh vật được thu nhận bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt hoặc bề sâu.

## 1.2. CÁC ĐƠN VỊ HOẠT ĐỘ CỦA ENZYM

Đơn vị hoạt độ của một enzym được coi là lượng enzym có khả năng xúc tác làm chuyển hoá được một lượng cơ chất nhất định, trong một đơn vị thời gian nhất định, ở điều kiện tiêu chuẩn.

Theo quy ước quốc tế có một số đơn vị hoạt độ sau:

### 1. Đơn vị IU (đơn vị quốc tế)

Là lượng enzym có khả năng xúc tác chuyển hoá được một micromol cơ chất sau thời gian một phút ở điều kiện tiêu chuẩn:

$$1 \text{ IU} = 1 \mu \text{ M cơ chất (} 10^{-6} \text{M/phút)}$$

### 2. Đơn vị katal (kat)

Là lượng enzym có khả năng xúc tác chuyển hoá một mol cơ chất sau thời gian một giây ở điều kiện tiêu chuẩn:

$$1 \text{ kat} = 1 \text{ Mol cơ chất / giây.}$$

$$1 \text{ IU} = 1/60 \times 10^{-6} \text{ kat} = 16,67 \text{ nkat.}$$

Hoạt lực enzym hoặc hoạt lực xúc tác được biểu diễn bằng một số đơn vị hoạt độ enzym.

### 3. Hoạt độ riêng

Hoạt độ riêng của một chế phẩm enzym được biểu diễn bằng số đơn vị hoạt độ enzym trên đơn vị khối lượng protein:

$$1 \text{ IU hoặc kat / 1 mg (ml) protein.}$$

#### 4. Hoạt độ phân tử (hoặc hoạt độ riêng phân tử)

Được biểu diễn bằng số phân tử cơ chất được chuyển hoá bởi một phân tử enzym sau một đơn vị thời gian (thường là phút).

#### 5. Hoạt độ tâm xúc tác

Là số phân tử cơ chất bị chuyển hoá bởi một trung tâm hoạt động sau một phút.

#### 6. Hoạt độ kcat (hoạt độ xúc tác)

Là lượng phân tử cơ chất lớn nhất được chuyển hoá bởi 1 phân tử enzym trong 1 đơn vị thời gian (giây) ở điều kiện enzym được bão hoà cơ chất.

#### 7. Tỷ lệ kcat/k<sub>m</sub>

Là hiệu năng xúc tác của enzym (catalytic efficiency) biểu hiện tính đặc hiệu của enzym với các cơ chất khác nhau.

### 1.3. NGUỒN NGUYÊN LIỆU THU ENZYM

Enzym là những chất không thể điều chế được bằng phương pháp tổng hợp hoá học, mà người ta thường thu nhận chúng từ nguồn tế bào động vật, thực vật hoặc vi sinh vật.

Trong hàng trăm enzym được sử dụng trong công nghiệp hơn một nửa được sản xuất từ nấm mốc và nấm men, trên một phần ba từ vi khuẩn, còn lại từ 8% nguồn động vật và 4% nguồn thực vật.

#### 1.3.1. Enzym động vật

Một số mô động vật chứa nhiều enzym: Dạ dày, tụy tạng, tim, gan, lá lách...

**Tụy tạng:** là cơ quan chứa nhiều enzym nhất như amylase, mantase, lipase, cholesterol esterase, excitinase, nuclease, trypsin, kimotrypsin, cacbocylpeptidase A, B, elastase.

Tất cả các enzym này được tiết ra ngoài tế bào cùng với dịch tụy.

**Dạ dày:** Màng nhầy của dạ dày lợn, chó, gà, thỏ, chứa pepsin A,B,C,D (dạ dày lợn nhiều nhất) riêng dạ dày lợn còn có gastrin (enzym thuỷ phân protein).

Ngăn thứ tư của dạ dày bò chứa loại vi khuẩn tổng hợp cellulase.

Dạ dày của loài động vật có sừng non (bê, nghé) chứa **renin** (enzym làm đông tụ sữa trong sản xuất phô mát).

**Ruột:** enzym ở ruột được tiết ra ngoài tế bào cùng với dịch ruột: Enterokinase, lactase, mantase, saccarase, nuclease, phosphatase, aminopeptidase, v v...

**Gan:** Là cơ quan chứa nhiều enzym có chung ở mọi cơ quan, còn thấy những hệ enzym chỉ riêng gan mới có:

Enzym tham gia **tổng hợp urê**, chính nhờ sự phong phú về enzym này mà gan tham gia nhiều quá trình trao đổi chất. Người ta ví gan như một phòng thí nghiệm trung tâm của cơ thể.

**Tuyến nước bọt:** Trong nước bọt ngoài các enzym tiêu hoá: Amylase, mantase, còn chứa enzym có tên Kalicrein, enzym này tác dụng lên globin  $\alpha$ -2 Kali-dinogen để giải phóng ra kalidin là một decapeptit có tác dụng làm tăng sự tiết nước bọt.

**Huyết thanh:** Trong huyết thanh chứa nhiều enzym, bình thường hoạt độ các enzym này không lớn. Một số enzym được coi như là chỉ thị để theo dõi bệnh tật đó là :

- Amylase (tăng khi viêm tụy cấp).
- Phosphatase kiềm (tăng khi bị còi xương, tắc mật).
- Transaminase (tăng khi viêm gan, nhồi máu cơ tim).

Mặc dù mọi cơ quan động vật đều chứa enzym, song thông thường người ta chỉ thu chế phẩm pepsin từ dạ dày lợn, renin từ dạ dày bê, pancreatin từ tụy tạng lợn.

### 1.3.2. Enzym thực vật

Từ thực **vật thương đắng** có thể thu được một số enzym thuỷ phân:

- Papain từ nhựa đu đủ.
- Bromelain từ thân, lá dứa chổi và vỏ dứa.

Papain và bromelain có tác dụng giống nhau: Làm mềm thịt, đẩy nhanh quá trình thuỷ phân protein và dùng để phá đục protein trong bia, rượu.

- Các enzym plazmin, papain, ficin thường có trong họ *Ficus* như sung, si, vả (nhựa quả, lá, thân).
- Các  $\alpha$ ,  $\beta$ - amylase có trong malt đại mạch và malt thóc.
- Urease có trong giá đậu tương, lipase có trong mầm hạt thầu dầu.
- Polyphenoloxydase có trong lá chè, chuyển hoá hợp chất polyphenol thành quinol tương ứng, có màu sắc đặc trưng của chè.
- Peroxydase tác dụng với tanin tạo thành sản phẩm ngưng tụ không màu.
- Ngoài ra trong lá chè còn chứa một số enzym protease, pectinase, amylase, invertase. Dưới tác dụng của những enzym này, xảy ra sự biến đổi các cơ chất tương ứng trong lá chè ở quá trình chế biến và góp phần tạo nên những chất mới tham gia vào sự hình thành chất lượng của chè (màu sắc và hương thơm).

### 1.3.3. Enzym vi sinh vật

Đây là nguồn thu enzym rất phong phú. Từ vô số loài vi sinh vật, người ta có thể thu được rất nhiều loại enzym khác nhau, trong đó có những enzym mà cơ thể động vật và thực vật không thể tổng hợp được.

- Hệ enzym vi sinh vật có khả năng thay đổi bằng cách thay đổi điều kiện nuôi cấy và dùng các tác nhân điều chỉnh. Từ một loài vi sinh vật có khả năng tổng hợp mạnh một hoặc một số loại enzym nào đó theo ý muốn.

- Vi sinh vật có khả năng sinh sản, phát triển và sinh tổng hợp enzym với tốc độ cực kỳ lớn, do đó cho phép thu được một lượng lớn enzym trong thời gian ngắn một cách dễ dàng.

- Enzym vi sinh vật có hoạt tính rất mạnh, vượt xa enzym từ các nguồn khác. Người ta đã tính rằng, trong vòng 24 giờ vi sinh vật có thể chuyển hoá lượng lớn thức ăn gấp 30-40 lần so với trọng lượng cơ thể chúng. Trong khi đó hệ enzym của con lợn trên 50kg chỉ có thể chuyển hoá vài kg thức ăn trong một ngày.

**Bảng 1.1. Một số enzym quan trọng và nguồn thu chúng**

Tên enzym	Mã số enzym	Nguồn enzym	Nội bào /ngoại bào (I/E)	Qui mô sản xuất	Sử dụng trong công nghiệp
<b>1. Enzym động vật</b>					
Calase	1.11.1.6	Gan	I	-	Thực phẩm
Chymotrypsin	3.4.21.1	Tụy tạng	E	-	Thuộc da
Lipase <sup>a</sup>	3.1.1.3	Tụy tạng	E	-	Thực phẩm
Renet <sup>f</sup>	3.4.23.4	Dạ dày bê	E	+	Pho mat
Trypsin	3.4.21.4	Tụy tạng	E	-	Thuộc da
<b>2. Enzym thực vật</b>					
Actinidin	3.4.22.14	Quả kiwi	E	+	Thực phẩm
α.Amylase	3.2.1.1	Malt đại mạch	E	+++	Đồ uống lên men (brewing)
β. Amylase	3.2.1.2	Malt đại mạch	E	+++	Rượu, bia
Bromelain	3.4.22.4	Lá, vỏ dứa	E	-	Rượu, bia
β.Glucanase <sup>g</sup>	3.2.1.6	Malt đại mạch	E	++	Rượu, bia
Ficin	3.4.22.3	Nhựa sung, vả	E	-	Thực phẩm
Lipoxygenase	1.13.11.12	Đậu tương	I	-	Thực phẩm
Papain	3.4.22.2	Nhựa đu đủ	E	++	Thịt
<b>3. Enzym vi khuẩn</b>					
α.Amylase	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	E	+++	Tinh bột
β.Amylase	2.2.1.2	<i>Bacillus</i>	E	+	Tinh bột
Asparaginase <sup>h</sup>	3.5.1.1	<i>Escherichia Coli</i>	I	-	Sức khỏe
Glucose isomerase <sup>h</sup>	5.3.1.5	<i>Bacillus Steptomyces</i>	I	++	Siro fructose
Penicillinamidase	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	I	-	Dược
Protease <sup>i</sup>	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	E	+++	Tẩy rửa
Puilulanase <sup>j</sup>	3.2.1.41	<i>Klebsiella, bacillus</i>	E	-	Tinh bột
<b>4. Enzym nấm sợi</b>					
α. amylase	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	E	++	Bánh mỳ

Tên enzym	Mã số enzym	Nguồn enzym	Nội bào /ngoại bào (I/E)	Qui mô sản xuất	Sử dụng trong công nghiệp
Aminoacylase	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	I	-	C N dược
Glucoamylase <sup>*</sup>	3.2.1.3	<i>Aspergillus</i> ; <i>Rhizopus</i>	E	+++	Tinh bột
Catalase	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	I	-	Thực phẩm
Cellulase	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	E	-	Chất thải
Dextranase	3.2.1.11	<i>Penicillium</i>	E	-	Thực phẩm
Glucosidase	1.1.3.4	<i>Aspergillus</i>	I	-	Thực phẩm
Lactase <sup>1</sup>	3.2.1.23	<i>Aspergillus</i>	E	-	Sữa
Lipase <sup>o</sup>	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	E	-	Thực phẩm
Rennet <sup>m</sup>	3.4.23.6	<i>Mucor miehei</i>	E	++	Fomat
Pectinase <sup>n</sup>	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	E	++	đồ uống
Pectinlyase	4.2.2.10	<i>Aspergillus</i>	E	-	đồ uống
Protease <sup>m</sup>	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	E	+	Bánh mì
Raffinase <sup>o</sup>	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	I	-	Thực phẩm
<b>5. Enzym nấm men</b>					
<b>Invertase<sup>p</sup></b>	3.2.1.25	<i>Saccharauyces</i>	I/E	-	Mứt kẹo
<b>Lactase<sup>1</sup></b>	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	I/E	-	Sữa
Lipase <sup>o</sup>	3.1.1.3	<i>Candida</i>	E	-	Thực phẩm
Raffinase <sup>o</sup>	3.2.1.11	<i>Saccharomyces</i>	I	-	Thực phẩm

**Chú thích:** I: **Enzym nội bào**

E: **Enzym ngoại bào**

**Dấu:**

+++>100 tấn/năm;

++>10 tấn/năm

+>1 tấn/năm ;

- <1 tấn/năm

e: triacylglycerol lipase,

f: chymosin

g: endo-1,3(4)-beta-glucanase

h: xylose isomerase,

i: subtilisin

j: alpha dextrin endo-1,6 alpha glucosidase

k: glucan 1,4 alpha glucosidase

l: beta-galactosidase

m: protease aspartic từ vi sinh vật

n: polygalacturonase

o: alpha- galactosidase

p: betafructofuranosidase

## 1.4. PHƯƠNG PHÁP THU CHẾ PHẨM ENZYM VI SINH VẬT

Quy trình sản xuất chế phẩm enzym vi sinh vật bao gồm các giai đoạn chủ yếu sau:

- Phân lập, tuyển chọn và cải tạo giống vi sinh vật;
- Nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzym;
- Tách và tinh chế enzym.

### 1.4.1. Phân lập tuyển chọn và cải tạo giống vi sinh vật

#### 1.4.1.1. Phân lập và tuyển chọn

Khả năng sinh tổng hợp enzym của các vi sinh vật rất khác nhau, do đó muốn có được chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp một vài loại enzym nào đó thì cần phải tiến hành phân lập từ đất, nước, không khí, từ một số thực vật, từ một số sản phẩm..vv. Hoặc từ bộ sưu tập giống vi sinh vật có sẵn của đơn vị, nhằm tuyển chọn được chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng phát triển nhanh, sinh tổng hợp enzym cần có cao, ổn định...

#### 1.4.1.2. Cải tạo giống vi sinh vật

Vì cấu trúc của mỗi protein enzym được tạo thành trong tế bào đều được xác định bởi tính chất di truyền của tế bào, do đó có thể dùng các tác nhân đột biến tác động lên bộ máy di truyền của tế bào vi sinh vật để tạo ra các dạng biến chủng có khả năng sinh tổng hợp đặc biệt cao một loại enzym nào đó. Thường có hai phương pháp đột biến tạo biến chủng.

### a. Đột biến bằng các tác nhân vật lý hoặc hoá học

- Các tác nhân vật lý: gồm có tia cực tím (tia tử ngoại), tia X (ronghen), tia  $\gamma$ , hoặc bắn phá bằng hạt neutron, electron. Trong đó người ta thường sử dụng nhất là tia cực tím (uv)

- Tác nhân hoá học: Các hợp chất chứa nitơ như: nitrozometylguanidin, metyldicloroetylamin, nitrithydroxylamin, etylametylsunfonat.

### b. Đột biến bằng phương pháp sinh học phân tử

- **Phương pháp biến nạp**

Là sự truyền ADN từ tế bào cho đến tế bào nhận, có thể xảy ra trong ống nghiệm khi cho tế bào nhận tiếp xúc với dịch chiết từ tế bào cho mà không cần có sự tiếp xúc giữa các tế bào.

Các tế bào nhận có thể nhận bất kỳ loại ADN nào chứ không đòi hỏi phải là ADN từ các nòi có quan hệ họ hàng. Tuy nhiên tế bào có thể nhận một số đoạn ADN nhất định (thường không quá 10 đoạn).

Các đoạn ADN được truyền đi trong biến nạp có phân tử lượng vào khoảng  $10^6$ - $10^7$  và phải có cấu trúc xoắn kép.

Dùng phương pháp biến nạp có thể truyền các tính trạng khác nhau từ vi sinh vật này đến vi sinh vật khác trong đó có tính chất sinh tổng hợp enzym.

- **Phương pháp tiếp hợp gen**

Khác với phương pháp biến nạp, ở đây vật liệu di truyền (ADN) chỉ được truyền đi 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 không có khả năng tham gia tiếp hợp gen.

Hiện tượng tiếp hợp mới chỉ được nghiên cứu ở một số loài vi khuẩn như: *E-coli*, *salmonella*...

- **Phương pháp tải nạp**

Vật liệu di truyền ADN được chuyển từ tế bào cho đến tế bào nhận nhờ vai trò trung gian của thực khuẩn thể (Phage).



Trong quá trình tái nạp các đoạn ADN được chuyển từ tế bào cho đến tế bào nhận tiếp hợp với ADN của tế bào nhận, do đó làm biến đổi tính chất di truyền của tế bào nhận.

Tóm lại, có thể dùng nhiều phương pháp di truyền vi sinh vật khác nhau để tạo các biến chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzym cao hơn hẳn chủng gốc ban đầu: papain, lipase (bột giặt), cellulase (thuỷ phân cellulose), aspartinase (dùng trong công nghệ sữa)...

#### **1.4.2. Các phương pháp nuôi vi sinh vật**

Về nguyên tắc có hai phương pháp nuôi vi sinh vật để thu chế phẩm enzym.

##### **1.4.2.1. Phương pháp nuôi cấy bề mặt (phương pháp rắn, phương pháp nổi: *solid state fermentation*)**

Vi sinh vật phát triển trên bề mặt môi trường dinh dưỡng ở thể rắn đã được làm ẩm và vô trùng. Môi trường dinh dưỡng này thường gồm các nguyên liệu tự nhiên như cám gạo, khô cám, cám mỳ, tấm gạo, ngô (chiếm 90-95%) có bổ sung trấu nhỏ hoặc mùn cưa (khoảng 5-10%) để làm xốp canh trường khiến oxy không khí dễ thâm nhập, tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển tốt. Về cơ bản các nguyên liệu trên 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: amon sulfat, natri nitrat, ure, hoặc nitơ hữu cơ như cao nấm men, cao ngô, dịch chiết malt,... và các chất cảm ứng tùy theo từng loại enzym.

Trước khi gieo vi sinh vật, môi trường cần được làm ẩm đến 50-65% và thanh trùng 1at ở 120°C để diệt vi sinh vật lạ, sau đó hạ nhiệt độ xuống 30-40°C và tiến hành gieo cấy vi sinh vật, rồi nuôi ở nhiệt độ 28-32°C trong 36-48 giờ. Trong điều kiện này hầu hết enzym được sinh tổng hợp.

Phương pháp này cho nồng độ enzym cao hơn phương pháp chìm, canh trường sau khi sấy khô vận chuyển dễ dàng, tránh được nhiễm trùng toàn bộ khối canh trường và ít tốn điện năng. Phương pháp có tính gián đoạn, chiếm

nhiều diện tích nuôi cấy, khó cơ giới hoá và tự động hoá. Do đó năng suất thấp, tốn nhiều lao động thủ công.

#### **1.4.2.2. Phương pháp nuôi chìm (Phương pháp lỏng; Phương pháp bề sâu: *Liquid state fermentation*)**

Ở phương pháp này người ta cho vi sinh vật phát triển trong môi trường dinh dưỡng lỏng, có sục khí liên tục. Thành phần dinh dưỡng của môi trường lỏng thích hợp cho mỗi vi sinh vật để sinh tổng hợp ra một enzym này hay enzym khác là không giống nhau. Nói chung môi trường dinh dưỡng phải có thành phần dinh dưỡng chính sau:

**Nguồn cacbon** (hay nguồn năng lượng): chủ yếu lấy từ các loại đường dễ đồng hoá như: glucose, mantose, rỉ đường, hoặc tinh bột đã thuỷ phân sơ bộ, ngoài ra có thể từ nguồn phi glucit như: glycerol, các axit béo v v...

**Nguồn nitơ:** có thể ở dạng vô cơ hoặc hữu cơ.

- Nitơ vô cơ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ , ure v v...

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 nuôi. Nếu nitơ dưới dạng muối amôn, thì khi ion amoni ( $\text{NH}_4^+$ ) được cơ thể vi sinh vật sử dụng, còn lại gốc anion, sẽ gây axit hoá môi trường, ngược lại nếu nguồn muối vô cơ là nitrat thì khi vi sinh vật sử dụng anion ( $\text{NO}_3^-$ ), còn lại ion kim loại tự do sẽ gây kiềm hoá môi trường. Do vậy việc chọn nguồn nitơ vô cơ thích hợp cho vi sinh vật sinh tổng hợp được một enzym nào đó là rất đáng quan tâm.

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

- **Muối khoáng và vitamin:**

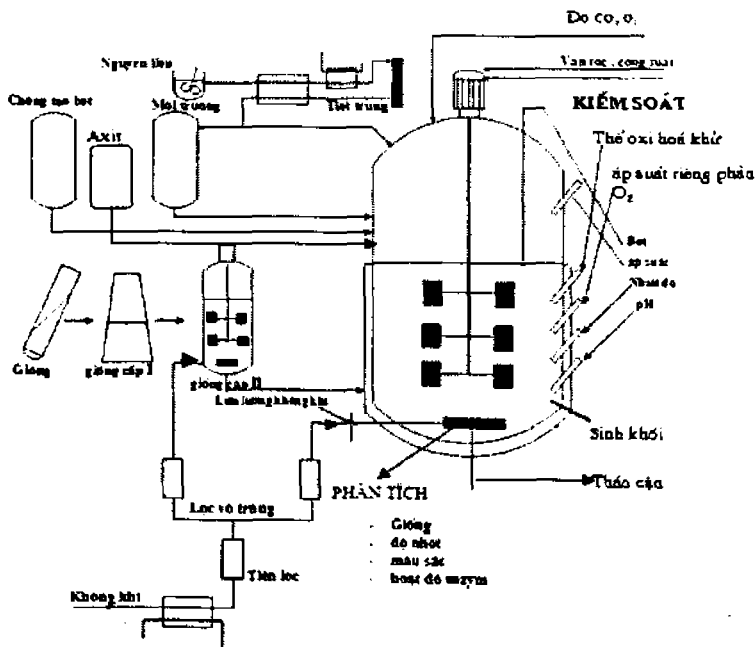
Môi trường dinh dưỡng nuôi chìm ngay cả khi sử dụng nguyên liệu tự nhiên (bột, tinh bột, cellulose) vẫn phải bổ sung muối vô cơ và một số vitamin cần thiết cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển như:  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,... Vitamin  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_{12}$ , Biotin ( $\text{B}_8$ ).

Dịch dinh dưỡng được cho vào thùng lên men. Sau đó đưa trực tiếp hơi nước nóng vào thanh trùng ở nhiệt độ 118-125°C trong 45-60 phút. Hạ nhiệt độ và bổ sung vi sinh vật, nuôi 2-4 ngày. Quá trình nuôi được thực hiện

trong điều kiện sục khí liên tục và vô trùng tuyệt đối. Nuôi cấy chìm thường tạo nhiều bọt, nên có thể sử dụng một số chất hoạt động bề mặt để phá bọt như tween 20, axit oleic...

Ở phương pháp nuôi chìm, sự tiết các enzym vào môi trường xảy ra trong suốt quá trình phát triển.

Đa số enzym thủy phân của nấm mốc, xạ khuẩn, vi khuẩn là những enzym ngoại bào, tuy được tổng hợp nên ở bên trong tế bào, sau đó mới tiết ra ngoài môi trường. Do đó khi kết thúc quá trình nuôi có thể lọc, loại bỏ sinh khối, thu lấy dịch enzym, đem cô đặc được chế phẩm thô, hoặc tinh sạch tiếp theo. Tuy nhiên có một số enzym nội bào (enzym liên kết với các bào quan bên trong tế bào). Muốn thu được enzym cần phải phá vỡ tế bào để tách enzym ra khỏi phần sinh khối tế bào.



**Hình 1.1.** Sơ đồ thiết bị nuôi vi sinh vật để thu enzym bằng phương pháp chìm theo AUNSTRUP, 1979.

Phương pháp chìm có ưu điểm:

- Có tính liên tục tiết kiệm được diện tích sản xuất.
- Dễ cơ giới hoá và tự động hoá, do đó năng suất cao.

- Sử dụng hợp lý các chất dinh dưỡng của môi trường.
- Enzym thu được ít lẫn tạp chất.

Song phương pháp chìm có một số nhược điểm:

- Nồng độ enzym trong canh trường thấp, do đó phải cô đặc, nên giá thành cao.
- Tốn nhiều điện năng do sục khí liên tục. Khi không đảm bảo được vô trùng tuyệt đối thì dễ xảy ra sự nhiễm toàn bộ khối môi trường.
- Phương pháp nuôi chìm là một phương pháp tiến bộ và hiện đại được áp dụng rộng rãi ở nhiều nước phát triển.

Sơ đồ nuôi cấy chìm được biểu hiện ở hình 1.1:

Các thông số phải theo dõi trong thiết bị lên men nuôi vi sinh vật để thu enzym.

• **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 /giờ. Do vậy phải làm nguội nhờ nước chảy thành dòng trong ống ruột gà bên trong thùng lên men.

- **pH:** pH phải được 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 (phosphoric, sulfuric).

- **Bọt:** Trong môi trường thường giàu protein nên khi khuấy và sục khí sẽ tạo ra nhiều bọt, có thể thêm các 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 oxy, có thể gây độc đối với các vi sinh vật. Do đó phải chọn chất đáp ứng được các tiêu chuẩn thực phẩm hiện hành.

- **Oxy:** đây là một thông số khó làm chủ ở quy mô công nghiệp. Khó khăn là do các quá trình của hệ “lên men – thùng lên men” tuân theo những quy luật có bản chất khác nhau, quá trình vật lý (sự chuyển khối), quá trình sinh lý (các vi sinh vật), quá trình hỗn hợp khi có sự tương tác giữa hai quá trình trên.

- **Các thông số về sinh lý:**

- **Cân bằng năng lượng:** Một phần lớn năng lượng phát tán ra dưới dạng nhiệt cần phải thải bỏ. Với thùng lên men có dung tích lớn thì có thể hạn chế bằng cách làm lạnh ở bên ngoài. Tốt nhất là sử dụng năng lượng này vào việc sinh tổng hợp enzym.

- **Áp suất CO<sub>2</sub>:** Khí CO<sub>2</sub> có mặt trong suốt quá trình lên men. CO<sub>2</sub> có vai trò quan trọng trong các phản ứng cacboxyl hoá. CO<sub>2</sub> có vai trò dương tính đối với một số quá trình sinh tổng hợp enzym (trường hợp amylase của *B. Sutilis*) trong những điều kiện này nếu sự tích tụ khí (hiệu khí) quá mạnh sẽ không có lợi.

- **Áp suất oxy:** Tác dụng của oxy sẽ khác nhau tùy theo ở giai đoạn sinh trưởng hay giai đoạn tổng hợp enzym. Chẳng hạn trong trường hợp sinh trưởng của *E.coli* và tổng hợp enzym penicillinacylase thì tỷ lệ oxy hoà tan cao sẽ thuận lợi cho sự sinh trưởng, nhưng lại bất lợi cho sự tổng hợp enzym. Trong trường hợp glucooxydase từ *A.niger* thì vai trò của oxy còn phức tạp hơn vì ở đây oxy với danh nghĩa là cơ chất. Trong trường hợp này sự tăng áp suất oxy sẽ làm tăng sự sinh trưởng và tăng sự bài xuất enzym đến cực đại, rồi sau đó giảm, mặc dù áp suất oxy liên tục tăng.

- **Cảm ứng - ức chế:**

Trong một số quá trình tổng hợp enzym người ta cần một chất cảm ứng (ví dụ cellulase đối với *T.vinide*) còn trong trường hợp khác người ta phải 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:**

Trong trường hợp các enzym nội bào, thì 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.

### 1.4.3. Tách, tinh chế enzym

#### 1.4.3.1. Các dạng chế phẩm enzym

Trong thực tế sản xuất các chế phẩm enzym có thể được sử dụng dưới các dạng khác nhau: chế phẩm thô, chế phẩm kỹ thuật hoặc chế phẩm tinh khiết tùy theo mục đích và yêu cầu sử dụng.

- **Chế phẩm thô**

- *Chế phẩm thô từ canh trường lỏng*

Môi trường nuôi vi sinh vật sau khi lọc, nồng độ enzym rất thấp, nên bước đầu người ta phải cô đặc. Dịch lọc từ canh trường có nồng độ chất khô từ 4-6g/l được cô đặc lên đến 15-20g/l ở nhiệt độ 35°C trong thiết bị có độ chân không cao. Sau đó cô tiếp ở nhiệt độ 40-45°C để đạt nồng độ chất khô 30-50g/l rồi bổ sung chất bảo quản như NaCl, glycerol, sorbitol, natribenzoat... chế phẩm thô thu được ở dạng lỏng có thể bảo quản ở nhiệt độ thường từ 1-2 năm. Hoặc có thể bổ sung thêm chất ổn định vào dịch có nồng độ chất khô 30-40g/l. Sau đó sấy phun ở thiết bị có nhiệt độ đầu 120°C và đầu ra 40°C sẽ thu được chế phẩm thô dạng bột.

- *Chế phẩm thô từ canh trường bề mặt*

Canh trường rắn sau khi nuôi vi sinh vật được đem sấy ở nhiệt độ 40°C đến độ ẩm còn khoảng 12% sẽ thu được chế phẩm thô dạng khô.

Chế phẩm thô có thể sử dụng trong một số lĩnh vực mà không làm ảnh hưởng đến chất lượng màu sắc, và mùi vị của sản phẩm như: công nghiệp sản xuất rượu cồn, công nghiệp thuộc da, công nghiệp giấy, xử lý môi trường,...

- **Chế phẩm kỹ thuật:**

Là chế phẩm đã được tinh chế sơ bộ, trong đó một số protein và enzym tạp đã được tách ra. Trong chế phẩm kỹ thuật thường chứa hỗn hợp một vài enzym chủ yếu.

Chế phẩm kỹ thuật thường được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm để giữ màu sắc, hương vị và chất lượng sản phẩm.

- **Chế phẩm enzym tinh khiết:**

Trong chế phẩm này đã loại hoàn toàn các protein và enzym tạp, chỉ còn lại **duy nhất một enzym** mong muốn.

Các chế phẩm này chỉ dùng trong **y học**, nghiên cứu **khoa học** và phân tích.

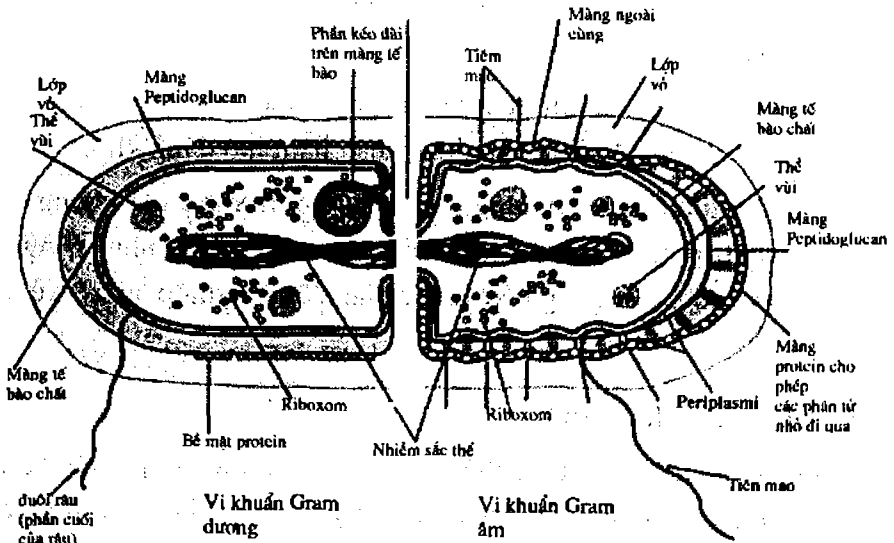
### 1.4.3.2. Khu trú của enzym

Dựa vào vị trí khu trú của enzym trong tế bào, người ta chia làm ba nhóm chính:

- **Enzym ngoại bào:** là enzym được sinh **tổng hợp ra ở trong tế bào** rồi sau đó mới được tiết ra **ngoài môi trường** trong quá trình **nuôi cấy chìm**. Đó là trường hợp các **enzym hydrolase**.

- **Enzym nội bào:** là enzym được **tổng hợp và sử dụng** ở bên trong tế bào. Nói chung các enzym loại này thường có mặt hoặc dưới dạng liên hợp, dưới dạng liên kết hoặc dưới dạng bị **"nhốt"** trong các bào quan của tế bào.

- Các enzym **periplasmic** (là những enzym nằm ở **xoang ngoài màng sinh chất** nhưng trong màng tế bào)



**Hình 1.2. Cấu tạo mặt cắt của vi khuẩn Gram (+) và (-) có chứa periplasmic.**

Thực tế việc trích ly các enzym chủ yếu dành cho các enzym nội bào và enzym periplasmic.

Quá trình tách một enzym có thể phân ra ba giai đoạn lớn.

- Giai đoạn 1: **Trích ly**: Sẽ cho một hỗn hợp phân tử hoà tan.
- Giai đoạn 2: Phân đoạn hỗn hợp dựa vào độ hoà tan, đoạn thu được gồm một họ các phân tử.
- Giai đoạn 3: Tinh sạch bằng các phương pháp hoá lý, hoặc bằng các phương pháp sinh học đặc hiệu, cuối cùng sẽ thu được một phân tử enzym sạch.

### 1.4.3.3. **Trích ly và tinh chế các enzym**

#### 1.4.3.3.A. Cơ sở chung để **trích ly các enzym**

Để trích ly các enzym ra khỏi tế bào một cách dễ dàng trước tiên người ta phải phá vỡ thành tế bào, màng tế bào và những cấu trúc dưới tế bào bằng những phương pháp lý học hoặc hoá học khác nhau.

Năng lượng cần thiết để phá vỡ tế bào phụ thuộc nhiều vào loại tế bào và chùng mục nào đó vào trạng thái sinh lý của cơ thể. Chẳng hạn một số loại tế bào như tế bào động vật, tế bào vi khuẩn gram âm (*Azotobacter species*) có thể bị phá vỡ dễ dàng bằng gây sốc thẩm thấu. Số khác như nấm men, nấm sợi, tảo xanh (lục) và một số vi khuẩn gram dương có vách tế bào và cấu trúc màng có khả năng chống chịu được áp suất thẩm thấu tới 20 atm, đòi hỏi năng lượng lớn hơn.

Thông thường tốc độ protein được giải phóng ra khi phá vỡ tế bào bằng cơ học tỷ lệ với tổng lượng protein có khả năng giải phóng được:

$$dP/dt = -kP \quad (1.1)$$

Trong đó: P: lượng protein còn được liên kết với tế bào;

t: thời gian;

k: hằng số tỷ lệ

Tích phân từ P-P<sub>m</sub> (lượng protein tối đa có khả năng được giải phóng) ở thời điểm 0 đến P = P<sub>t</sub> ở thời điểm t, ta có:

$$\int_{P_m}^{P_t} \frac{dP}{P} = \int_0^t -k dt \quad (1.2)$$

$$\text{Do đó:} \quad \ln(P_m/P_t) = kt \quad (1.3)$$

và protein đã được giải phóng ra khỏi tế bào bằng:



$$\text{Protein} = P_m - P_t \quad (1.4)$$

Thay (1.4) vào (1.3) ta được phương trình sau:

$$\ln\left(\frac{P_m}{P_m - P_t}\right) = kt \quad (1.5)$$

Phương trình thể hiện quá trình phá vỡ tế bào.

Việc lựa chọn phương pháp phá vỡ tế bào có vai trò quan trọng nhất nhằm tránh làm ảnh hưởng đến các enzym. Các yếu tố thường ảnh hưởng đến hoạt tính enzym khi phá vỡ tế bào được tóm tắt trong bảng 1.2. Nhìn chung, trong các yếu tố này quan trọng nhất là nhiệt và lực cắt.

**Bảng 1.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến enzym trong quá trình phá vỡ tế bào**

T.T	Yếu tố	Ảnh hưởng
1	<b>Nhiệt</b>	Tất cả các phương pháp cơ học cần cung cấp một lượng lớn năng lượng để sinh nhiệt. Do đó làm lạnh là rất cần thiết đối với hầu hết các enzym. Sự có mặt của các cơ chất, các chất tương tự cơ chất hoặc các polyol có thể làm bền enzym.
2	<b>Lực cắt</b>	Lực cắt cần thiết để phá vỡ tế bào có thể làm phá huỷ enzym; đặc biệt khi có mặt các ion kim loại nặng hoặc khi có bề mặt phân chia với không khí.
3	<b>Protein</b>	Việc phá vỡ tế bào sẽ không tránh khỏi làm giảm hoạt tính enzym. Tuy nhiên có thể làm giảm thiểu bằng cách làm tăng vận tốc quá trình trong điều kiện lạnh. Cũng có thể sử dụng một lượng dư các cơ chất thay thế (ví dụ protein) hoặc các yếu tố kim hãm trong môi trường tách chiết.
4	<b>pH</b>	Các dung dịch đệm có vai trò quan trọng. Sự có mặt của các cơ chất, các chất tương tự cơ chất, các polyol sẽ giúp cho việc ổn định enzym.
5	<b>Hoá chất</b>	Một số enzym có thể bị biến tính do sự có mặt của chất tẩy rửa và dung môi. Các polyphenol từ thực vật là các yếu tố kim hãm enzym mạnh có thể khắc phục bằng cách sử dụng các chất hấp phụ như polyvinylpyrrolidone và axit ascorbic để làm giảm hoạt tính của polyphenoloxydase.
6	<b>Oxy hoá</b>	Các tác nhân khử như axit ascorbic, mercaptoethanol, dithiothreitol, có thể rất cần thiết.
7	<b>Tạo bọt</b>	Các mặt phân cách giữa pha lỏng - khí trong các bọt có thể phá huỷ hình thể enzym.
8	<b>Tính độc của kim loại nặng</b>	Các ion kim loại nặng (sắt, đồng, niken...) được nhiễm vào do khi lọc qua các thiết bị đồng hoá. các enzym có thể được bảo vệ khỏi sự vô hoạt bất thuận nghịch này bằng cách sử dụng tác nhân EDTA

### 1.4.3.3.B. Các phương pháp phá vỡ tế bào

#### B1. Phương pháp cơ học

##### a. Phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm

Khi xử lý các tế bào vi sinh vật ở dạng huyền phù bằng sóng siêu âm sẽ làm phá vỡ chúng trong chất lỏng. Sóng siêu âm chuyển động theo hình sin, có đặc điểm là cao tần (18kHz-1MHz) bước dịch chuyển nhỏ (dưới  $50\mu\text{m}$ ), vận tốc vừa phải (vài  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) và gia tốc rất lớn (tới  $80000\text{g}$ ), sóng siêu âm tạo nên hiện tượng sủi bong bóng khi tần số âm thanh đủ lớn để tạo nên vô số các vi bọt (microbubbles) tại các vùng tập trung sinh khối trong chất lỏng. Các bọt sẽ lớn lên trong pha giãn (rarefying phase) của sóng âm thanh và bị xẹp đi trong pha nén. Bọt xẹp đi do các sóng gây sốc mạnh xuyên qua chất lỏng. Toàn bộ quá trình hình thành và xẹp đi của các bọt khí do ảnh hưởng của các sóng âm thanh, tần số cao được gọi là hiện tượng sủi bọt trong chất lỏng. Việc xẹp các bong bóng sẽ chuyển năng lượng âm thanh thành năng lượng cơ học ở dạng các sóng gây sốc tương ứng với áp suất hàng ngàn atmosphere (300Mpa). Năng lượng này sẽ truyền chuyển động tới các bộ phận của tế bào. Các tế bào sẽ bị phá vỡ khi động năng của các bộ phận này trong tế bào lớn vượt quá độ vững chắc của vách tế bào. Một yếu tố khác làm tăng khả năng phá vỡ tế bào đó là vi dòng (microstreaming) có các gradien vận tốc lớn, tạo nên ứng suất biến dạng (shear stress) xuất hiện gần các bọt khí tạo thành do sóng siêu âm.

Một lượng lớn năng lượng do dịch huyền phù tế bào hấp thụ được chuyển thành nhiệt. Do đó cần phải sử dụng hệ thống làm lạnh hiệu quả. Lượng protein được giải phóng ra do sóng siêu âm thể hiện ở phương trình (1.5), hằng số (k) không phụ thuộc vào nồng độ tế bào và tỷ lệ với năng lượng âm thanh gần ngưỡng cần thiết để tạo sủi bọt. Sự tan rã bọt (disintegration) không phụ thuộc vào tần số âm thanh, ngoại trừ tần số ngưỡng sủi bọt thì phụ thuộc vào tần số âm thanh.

Sóng âm thanh dễ làm biến đổi cấu trúc của một số enzyme và phá huỷ enzyme do oxy hoá các gốc tự do. Việc sử dụng các chất dọn gốc (radical scavenger) như  $\text{N}_2\text{O}$  có khả năng làm giảm sự mất hoạt tính enzyme. Hầu hết các phương pháp phá vỡ tế bào đều tạo các mảnh tế bào nhỏ, cản trở quá

trình xử lý sau này. Tuy nhiên sử dụng sóng siêu âm vẫn là một phương pháp phá vỡ tế bào phổ biến, hữu ích, đơn giản, sử dụng ở quy mô nhỏ.

*b. Phá vỡ tế bào bằng máy đồng hoá cao áp*

Hiện nay có nhiều loại máy đồng hoá cao áp được sử dụng trong công nghiệp hoá chất, nhưng máy sử dụng để phá vỡ tế bào phổ biến là dạng Manton – Gaulin APV. Loại này gồm một bơm đẩy để đưa dịch huyền phù tế bào (khoảng 12 W/V) qua một van kiểm tra tới xilanh bơm. Tế bào được đẩy với áp suất tới 150MPa (10 tấn trên 1 inch vuông) và với vận tốc dòng tới 10.000 L/giờ qua một van xả có miệng hẹp (hình 1.3). Các tế bào bị va chạm nén lại rồi bị nổ vỡ và giải phóng các chất chứa trong tế bào khi làm giảm áp đột ngột qua van kiểm tra. Vậy áp suất sử dụng và sự giảm áp đột ngột qua van kiểm tra là nhân tố chủ yếu phá vỡ tế bào.

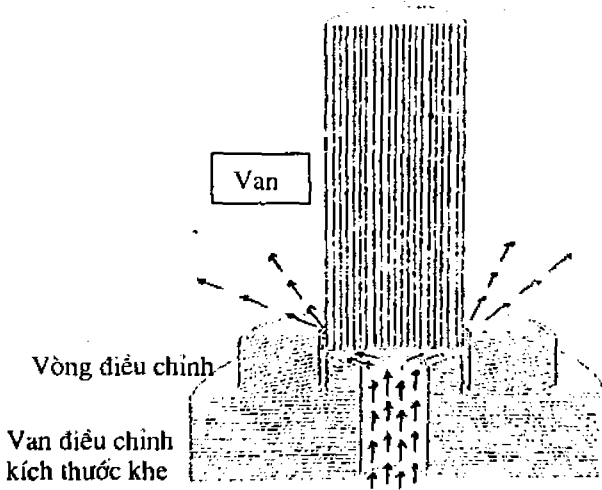
Do có miệng hẹp là phần then chốt của loại máy đồng hoá này nên nó không thích hợp khi sử dụng để phá vỡ các cơ thể dạng sợi mà thường được sử dụng để phá vỡ các cơ thể đơn bào.

Sự giải phóng protein được mô tả ở phương trình (1.5), nhưng thường ở đây, người ta thay biến số thời gian bằng số lượt (N) qua máy đồng hoá:

$$I_n (P_m / (P_m - P_0)) = K N.$$

Thông thường, ở áp suất dưới 75MPa, hằng số K tỷ lệ với áp suất đã lũy thừa (ví dụ:  $K = K'P^{29}$  ở *Sacharomyces cerevisiae* và  $K=K'P^{22}$  ở *Escherichia coli*, trong đó p là áp suất sử dụng và K' là hằng số tỷ lệ). Rõ ràng là áp suất càng cao thì quá trình phá vỡ tế bào càng hiệu quả. Hằng số tỷ lệ giải phóng protein (K) phụ thuộc vào nhiệt độ. Quá trình phá vỡ tế bào nhanh hơn ở nhiệt độ cao.

Ngoài tính dễ vỡ của các tế bào, sự khu trú của enzym trong các tế bào cũng ảnh hưởng đến các điều kiện sử dụng máy đồng hoá. Các enzym nội bào tự do có thể được giải phóng chỉ cần một lượt qua máy đồng hoá, nhưng các enzym liên kết với màng cần nhiều lượt để có thể thu được hiệu suất mong muốn. Các máy đồng hoá cao áp sử dụng hiệu quả đối với các cơ thể đơn bào vốn có các enzym không bền nhiệt. Các lực làm biến dạng tế bào không gây ảnh hưởng đến các enzym tự do trong dung dịch. Thiết bị đồng hoá có thể bị mòn. Do đó cần được chế tạo chính xác và bảo trì tốt. Máy đồng hoá Manton – gaulin xử lý liên tục có thể tới 250 dm<sup>3</sup>/giờ.



**Hình 1.3. Mặt cắt ngang của máy đồng hoá Manto- Gaulin.**

*c. Phá vỡ tế bào bằng cách nghiền hoặc khuấy với các bột/ hạt thủy tinh hoặc thép*

Khi huyền phù tế bào được lắc cùng với hạt bằng thủy tinh hoặc bằng thép nhỏ (thường đường kính 0,2-1,0mm) thì tế bào sẽ bị phá vỡ do lực cắt của chất lỏng cao và do va chạm với các hạt này. Tỷ lệ và hiệu suất giải phóng enzyme có thể thay đổi do thay đổi vận tốc lắc và kích cỡ các hạt cũng như đường kính của thiết bị. Bất kỳ kiểu sinh khối nào dạng sợi đơn bào đều có thể bị phá vỡ bằng máy nghiền bi này nhưng nhìn chung các tế bào có kích thước lớn dễ bị phá vỡ hơn các vi khuẩn có kích thước nhỏ. Với cùng một thể tích hạt thì sử dụng một lượng lớn các hạt nhỏ sẽ hiệu quả hơn một lượng tương đối nhỏ các hạt lớn, vì nó làm tăng sự va chạm giữa các hạt và các tế bào.

Thực tế cho thấy các hạt có đường kính 1mm sẽ làm giải phóng nhanh chóng các enzyme periplasmic từ nấm men, còn các hạt có đường kính 0,25 mm thì làm giải phóng các enzyme liên kết với màng của vi khuẩn tốt hơn.

Động học quá trình giải phóng protein bằng máy nghiền hạt được thể hiện ở phương trình (1.5).

Hằng số K phụ thuộc vào nhiệt độ, nồng độ tế bào vi sinh vật, độ chất đầy hạt và kích cỡ của các hạt.

Nhìn chung chất dày hạt sẽ làm tăng tốc độ giải phóng protein nhưng cũng làm tăng nhiệt và mức tiêu thụ năng lượng. Sự nâng nhiệt là một vấn đề chính khi sử dụng các máy nghiền dạng hạt trong trích ly, đặc biệt ở quy mô lớn (20L). Các máy quy mô nhỏ có thể được làm lạnh qua các lớp vỏ áo giảm nhiệt bao quanh khoang chứa hạt, nhưng các máy lớn hơn cần phải làm lạnh qua trực trộn và các bánh (đẩy) công tác.

Ở quy mô phòng thí nghiệm có thể nghiền tế bào với hạt thủy tinh bằng cối và chày.

#### *d. Phá vỡ tế bào bằng phương pháp lạnh đông*

Huyền phù tế bào dưới dạng bột nhão được làm lạnh đông ở  $-20^{\circ}\text{C}$ , rồi nén dưới áp suất cao (khoảng 10-15 tấn/ inch vuông) qua các lỗ hẹp của máy nén Hughes thì tế bào sẽ bị phá vỡ do sự thay đổi pha và thay đổi thể tích cũng như do lực cắt của các tinh thể đá. Tuy nhiên máy Hughes chỉ có thể sử dụng gián đoạn từng mẻ nhỏ (10kg/giờ).

## **B2. Các phương pháp phá vỡ tế bào không bằng cơ học**

### *a. Sốc thẩm thấu*

Có thể làm dung giải tế bào bằng sốc thẩm thấu khi cho một huyền phù đậm đặc các tế bào vào trong một môi trường ưu trương (20% saccarose) trong nước ở  $4^{\circ}\text{C}$ , thì sẽ làm giải phóng ra một số hợp phần của tế bào. Kỹ thuật này rất nhẹ nhàng, không làm biến tính các protein, song do có nhiều vi sinh vật chống chịu được sốc thẩm thấu, nên kỹ thuật này chỉ dành sử dụng cho các vi khuẩn gram âm (-) như *E.coli* để trích ly các enzym thủy phân có trong xoang periplasmic (ngoại sinh chất). Trong những điều kiện này chỉ duy nhất có enzym thủy phân được trích ly ra, do đó sẽ đơn giản được quá trình tinh chế sau này.

Tuy nhiên có ba lý do sau đây hạn chế áp dụng kỹ thuật này ở quy mô lớn: thể tích làm việc lớn ( $400\text{dm}^3$  cho 10 kg bột nhão tế bào), nhiều giai đoạn ly tâm, và luôn phải duy trì ở nhiệt độ thấp.

### *b. Xử lý kiềm*

Xử lý kiềm (ở pH giữa 11,5 và 12,5) sẽ làm thủy phân màng tế bào và do đó sẽ giải phóng các enzym. Tuy nhiên, kỹ thuật này chỉ áp dụng nếu enzym bền được trong môi trường kiềm ít nhất cũng từ 20-30 phút. Người ta

thường dùng phương pháp này để trích ly asparaginase từ *Erwinia chrysanthemi*.

### c. Sử dụng chất tẩy rửa

Trong điều kiện pH, lực ion và nhiệt độ xác định, các chất tẩy rửa ở dạng ion như laurylsulfatnatri hoặc như tween 20 và triton sẽ tổ hợp với lipoprotein màng tạo ra các mixen do đó sẽ làm cho màng tế bào trở nên có tính thấm, song cũng sẽ làm biến tính enzym. Với ý nghĩa này thì các chất tẩy rửa dạng ion thường tốt hơn.

Các chất tẩy rửa như triton x-100 sử dụng riêng rẽ hoặc cùng với các chất khác như guanidin-HCl được dùng để trích ly các enzym liên kết màng rất có hiệu quả (cholesteroloxydase từ *Nocardia spescies*).

### d. Dung giải bằng enzym

Lysozim thường thủy phân liên kết  $\beta$  (1-4) glucosid của các peptidoglucan vốn tạo ra độ cứng cho tế bào vi khuẩn gram dương và gram âm. Lysozim thường được liên kết với EDTA để tạo phức với canxi sẽ làm giải phóng các lipopolysacrit và phá huỷ tế bào đặc biệt là vỏ tế bào vi khuẩn gram (-). Lysozim có trong nước bọt, trong lòng trắng trứng. Lysozim từ lòng trắng trứng là enzym dung giải duy nhất có thể sử dụng ở quy mô thương mại.

Tuy nhiên kỹ thuật này chỉ áp dụng được ở quy mô nhỏ do các điều kiện thao tác tinh tế và giá thành lysozim cao.

#### 1.4.3.3.C. Phân đoạn và tinh chế enzym

Dịch enzym thô thu được ở trên, ngoài enzym mong muốn, còn chứa nhiều loại enzym, protein không hoạt động và các tạp chất khác. Do đó khâu tiếp theo ở giai đoạn này là phải loại bỏ các enzym và protein tạp này nếu muốn thu được chỉ duy nhất một enzym nào đó. Để tách và tinh chế enzym nói riêng và protein nói chung thường có một loạt các phương pháp hoá lý và hoá học khác nhau. Có thể chia ba nhóm phương pháp.

- Các phương pháp kết tuả.
- Các phương pháp sắc ký.
- Phương pháp phân tách lỏng - lỏng.

## C1. Các phương pháp kết tủa để phân đoạn enzym

### a. Kết tủa đẳng điện

Một protein hay một protein enzym thường hoà tan ít nhất ở điểm đẳng điện (pI) vì ở pI các phân tử protein enzym có tổng điện tích bằng 0, tức là không có lực đẩy tĩnh điện, nên các phân tử protein enzym sẽ kết hợp với nhau tạo ra kết tủa. Vì vậy có thể kết tủa đẳng điện enzym quan tâm cũng như các enzym và protein tạp khác. Lọc hay li tâm để thu hoặc loại bỏ các kết tủa.

### b. Kết tủa phân đoạn bằng muối trung tính (Phương pháp diêm tích).

Độ hoà tan của một protein enzym tăng cùng với lực ion ( $\mu$ ) của môi trường:

$$\mu = \sum (1/2) C_i Z_i^2$$

$C_i$ : nồng độ của loại ion  $i$ ;

$Z_i$ : điện tích của loại ion  $i$  đó.

Tuy nhiên khi lực  $\mu$  vượt quá một ngưỡng nào đó thì độ hoà tan lại giảm nhanh và protein enzym có thể kết tủa.

Như vậy, với mỗi protein enzym sẽ có một khoảng nồng độ muối mà protein enzym đó bị kết tủa hoàn toàn, gọi là khoảng nồng độ muối tích. Khoảng nồng độ muối tích của các protein enzym thường không giống nhau.

Dựa vào cơ sở này có thể tách và tinh chế enzym nhờ phương pháp kết tủa phân đoạn bằng muối trung tính. Muối thường dùng là sunfat amon, hoặc natri sunfat. Thao tác đơn giản. Chỉ cần thêm vào dịch có chứa enzym một thể tích muối (trung tính) bão hoà hoặc một lượng muối trung tính dạng rắn có được một độ phần trăm bão hoà nào đó của muối này. Dĩ nhiên là độ phần trăm bão hoà này sẽ làm kết tủa một protein enzym này hay protein enzym khác. Các đoạn protein enzym thu được sau đó phải được loại bỏ muối bằng phương pháp thẩm tích hoặc phương pháp lọc gel.

Thường các khoảng nồng độ muối tích tương ứng với các protein nói chung và protein enzym nói riêng hay trùng nhau nên protein enzym thu được sau kết tủa phân đoạn chưa thật sạch.

Có hai công thức dưới đây được dùng để tính lượng Y ml thể tích dung dịch muối bão hoà hoặc lượng A gam muối rắn, phải thêm vào 100ml dung dịch chứa protein đã có độ bão hoà ban đầu là  $S_1$  để thu được một dung dịch có độ bão hoà cuối là  $S_2$ .

$$Y = \frac{100.(S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

$$Y = \frac{0,1 (S_2 - S_1). G}{1 - [S_2.V_g/1000]}$$

Trong đó: G: lượng (gam) amon sunfat trong 1000 ml dung dịch bão hoà. Thường G có các giá trị sau :

515g ở  $0^{\circ}C$ , 530,7g ở  $15^{\circ}C$ , 536,3g ở  $20^{\circ}C$

$V_g$  : thể tích riêng biểu kiến của dung dịch amon sunfat bão hoà :

$$V_g/1000 = 0,271 \text{ ở } 0^{\circ}C$$

$$V_g/1000 = 0,288 \text{ ở } 15^{\circ}C$$

$$V_g/1000 = 0,29 \text{ ở } 20^{\circ}C$$

### c. Kết tủa enzym bằng dung môi hữu cơ

Khi thêm dung môi hữu cơ trung tính trộn lẫn được với nước vào dung dịch enzym, sẽ làm giảm hằng số điện môi của dung dịch. Vì vậy làm tăng lực hút tĩnh điện giữa các phân tử protein làm cho các phân tử protein liên hợp lại tạo thành kết tủa. Tùy tính chất từng loại protein enzym, dung môi hữu cơ và điều kiện kết tủa mà mỗi enzym được kết tủa ở nồng độ dung môi hữu cơ khác nhau.

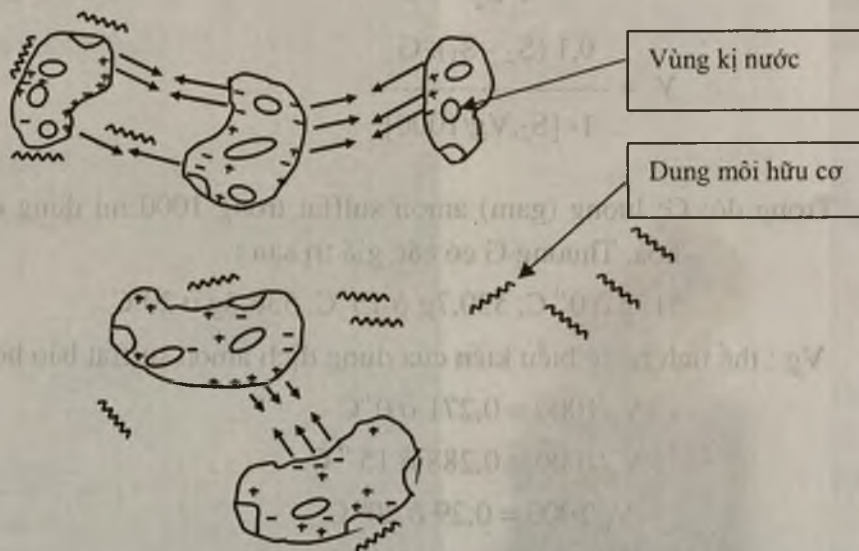
Ví dụ :

- Protease kết tủa bằng etanol ở nồng độ 76- 78% v/ v.
- $\alpha$  amylase kết tủa bằng etanol ở nồng độ: 70% hoặc bằng izopropanol 55%, hoặc bằng axeton 60% v/ v.
- Glucoamylase kết tủa bằng etanol ở nồng độ 45% v/ v.
- Các dung môi hữu cơ được dùng phổ biến nhất để kết tủa là: etanol, izopropanol, acetone.



Một số dung môi sau khi kết tủa có thể chưng cất và thu hồi lại được. Tuy nhiên dung môi dễ làm vô hoạt enzym, nên quá trình kết tủa phải được tiến hành nhanh ở nhiệt độ thấp ( $-5^{\circ}\text{C}$ ).

Phương pháp này thường được sử dụng cho các enzym ít bị biến tính bởi dung môi hữu cơ, và ít được dùng ở quy mô lớn, do chi phí cao, dễ cháy.



**Hình 1.4:** Sự tập hợp lại của protein do tương tác trong một hỗn hợp dung môi hữu cơ - nước.

**d. Thay đổi thành phần hoá học của môi trường để làm sạch enzym**

Khi thêm vào môi trường các chất đặc hiệu, người ta có thể thu được kết tủa của một số phân tử. Chẳng hạn một số muối kim loại ( $\text{Mn}^{+2}$ ) tác dụng với axit nucleic sẽ làm dễ dàng tách biệt các enzym nội bào. Thường trong các tế bào vi khuẩn hàm lượng axit nucleic tương đối cao (ví dụ ở tế bào *E.coli* axit nucleic có thể đến 7%) làm độ nhớt tăng sẽ ảnh hưởng đến giai đoạn tinh chế enzym, nhất là đến quá trình siêu lọc. Có thể kết tủa axit nucleic bằng các protein kiềm tính như protamin. Các protein tích điện dương sẽ kết hợp với nhóm phosphat tích điện âm của axit nucleic. Bằng cách này ta có thể tách enzym ra khỏi hợp chất với axit nucleic, prolamin nucleat tạo thành có thể loại bỏ bằng phương pháp li tâm.

Có thể dùng streptomycin sulfat, protaminsulfat hoặc cetyltrimetylamin bromua để khử axit nucleic, cũng có thể sử dụng nuclease (RNase và DNase) để thủy phân axit nucleic.

#### *e. Sử dụng các chất trợ (supports) kết tủa enzym*

Đối với các enzym ngoại bào, ở quy mô công nghiệp người ta có thể thêm vào các chất như kieselguha (kieselguhr), tinh bột, lactose, dextransulfat hoặc ficoll để làm cho kết tủa tạo thành ở dạng hạt. Thường người ta dùng các chất này khi có mặt rượu, natri sulfat, axit tacnic.

#### *f. Kết tủa bằng các polyme có khối lượng phân tử cao*

Các polyme như dextran, polythylenglycol được sử dụng với nhiều mục đích: chất làm bền, chất làm đặc (bằng thẩm tính) hoặc là chất kết tủa. Các chất này thường rất háo nước nên sẽ làm mất vỏ nước của các phân tử sinh học dẫn đến làm thay đổi hằng số điện môi của môi trường xung quanh do đó mà ảnh hưởng đến các tương tác không gian của các nhóm háo nước của các phân tử protein. Polythylenglycol được dùng với nồng độ 50% (w/w) trong nước có thể làm kết tủa phần lớn các protein có nồng độ từ 6- 20%. Việc kết tủa phụ thuộc vào một số các yếu tố như nhiệt độ, lực ion, pH, nồng độ protein và khối lượng phân tử của các enzym.

## **C2. Phương pháp sắc ký**

### *a. Khái niệm về sắc ký*

Thuật ngữ sắc ký để chỉ một tập các kỹ thuật phân tích và điều chế cho phép tách biệt các hợp phần khác nhau của một hỗn hợp.

Phương pháp phân tích kỹ thuật sắc ký này dựa vào sự di chuyển khác nhau trong một pha động của các chất hoà tan đã được gắn trên một pha tĩnh ở trạng thái rắn.

Người ta thường chọn các chất có khả năng kết gắn được với các chất (hoà tan) định phân tách làm pha tĩnh.

Tương tác giữa chất hoà tan và pha tĩnh có thể là tương tác hấp phụ, tương tác ion (trao đổi ion), tương tác kỵ nước, tương tác kiểu rây phân tử hoặc tương tác đặc hiệu sinh học.

Trong sắc ký hấp phụ các chất hoà tan được gắn vào pha tĩnh bằng liên kết có năng lượng yếu như liên kết kỵ nước, lực Vandervan.

Trong sắc ký trao đổi ion, chất hoà tan mang điện tích được giữ bởi pha tĩnh cũng mang điện tích bằng liên kết ion giữa các điện tích này.

Trong sắc ký lọc gel chất hoà tan tùy theo kích thước một số phân tử khuếch tán được vào trong pha tĩnh xốp, một số phân tử khác đi ngoài pha tĩnh này.

Trong sắc ký tương tác kỵ nước, các liên kết kỵ nước có thể tạo ra giữa pha tĩnh và chất hoà tan (chất hoà tan phải có phần kỵ nước trong phân tử).

Trong sắc ký tương tác đặc hiệu sinh học, giữa pha tĩnh và chất hoà tan có thể tạo ra những tương tác sinh học đặc hiệu (enzym – cơ chất, kháng nguyên – kháng thể) pha tĩnh có thể được giữ trong một cột (sắc ký trên cột) hoặc trên một bình.

**Pha động ở đây là chất lỏng có khả năng phá huỷ dần dần các tương tác giữa chất hoà tan và pha tĩnh rồi kéo theo chất hoà tan cùng với nó.**

#### *b. Sắc ký trao đổi ion (ion- exchange chromatography)*

Nhựa trao đổi ion là một khung vật liệu rắn không hoà tan, trên đó có gắn bằng liên kết đồng hoá trị với các nhóm ion hoá được. Các nhóm mang điện tích này lại được liên kết với các ion đối và các ion đối lại có thể trao đổi thuận nghịch với các ion trái dấu.

Một khung có mang các nhóm tích điện dương và ion đối tích điện âm, được gọi là nhựa trao đổi anion. Ngược lại, một nhựa trao đổi cation sẽ mang điện tích âm.

Ngoài ra, các nhựa trao đổi thường khác nhau về bản chất hoá học của giá khung (là gel polysaccarit hay nhựa tổng hợp) cũng như về lực axit, bazơ của nhóm ion hoá được. Ba nhựa trao đổi ion được trình bày trong bảng 1.3.

Các protein của một hỗn hợp cần phân tích thường có các nhóm bên ion hoá khác nhau do đó có pH khác nhau. Ở một pH nhất định các protein sẽ có một điện tích không giống nhau, do đó chúng được giữ nhiều hay ít bằng tương tác ion trên một nhựa trao đổi ion đã cho và với một pha di động đã cho.

**Bảng 1.3. Bản chất hoá học của các loại nhựa**

Nhựa trao đổi	Hãng sản xuất	Bản chất hoá học giá khung	Nhóm ion hoá	Khả năng trao đổi
DEAE-Sephadex	Pharmacia	Các mạch dextran được liên kết chéo	$-OCH_2CH_2N \begin{matrix} \diagup C_2H_5 \\ \diagdown C_2H_5 \end{matrix}$	Chất trao đổi anion yếu
AMBELITE-IR120	Rohm và Haas	Polystyren được liên kết chéo bằng divinylbenzen	- SO <sub>3</sub> sulfonat	Chất trao đổi cation mạnh
CM-SEPHA-ROSE	Pharmacia	Agarose được liên kết chéo bằng 2,3 dipropmopropanol	- CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> cacbonxymetyl	Chất trao đổi cation yếu.

Quá trình phân tách trên cột bao gồm hai giai đoạn.

1. Hấp thụ thuận nghịch protein – enzym cần tinh sạch (và các protein có điện tích gần giống) vào nhựa trao đổi ion.

2. Khử hấp phụ các protein đã được hấp thụ:

- Bằng cách thay đổi pH của dịch rửa sẽ dẫn đến thay đổi độ ion hoá và do đó thay đổi điện tích tổng của protein.

- Hoặc bằng cách tăng lực ion và tăng nồng độ ion đối cạnh tranh. Các protein enzym nào có ái lực với nhựa trao đổi ion yếu nhất sẽ bị đẩy ra trước tiên và ngược lại.

Khi sử dụng gradient lực ion hoặc/và gradient pH thường làm tăng chất lượng của phép phân tách protein.

Trong thực tế người ta thường dùng các dung dịch đệm: đệm phosphat, axetat, borat, citrat. Để chiết (kéo) protein- enzym ra khỏi cột. Các protein enzym khác nhau sẽ được chiết ra khỏi cột theo từng phần chiết (phần đoạn chiết) khác nhau, trong đó phần chiết enzym cần thu có nồng độ cao nhất. Ngoài ra hiện nay người ta cũng thường sử dụng một số nhựa trao đổi ion từ các dẫn xuất của cellulose như:

Nhựa trao đổi ion cationit:

- Cacboxyl metyl cellulose : (CM cellulose).
- Phospho cellulose.
- Sulfo etyl cellulose.
- Sulfo metyl cellulose.

Các loại nhựa trao đổi cationit đi từ cellulose này thường có ion trao đổi là  $H^+$  theo sơ đồ phân li như sau:



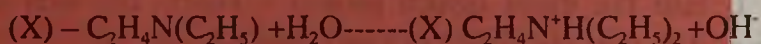
X: gốc cellulose

Để tinh sạch enzym kiềm tính, người ta thường sử dụng các cellulose-cationit này.

Nhựa trao đổi ion anionit:

- Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose).
- Triethylamino etyl cellulose.

Các loại nhựa này có nhóm trao đổi ion:  $OH^-$



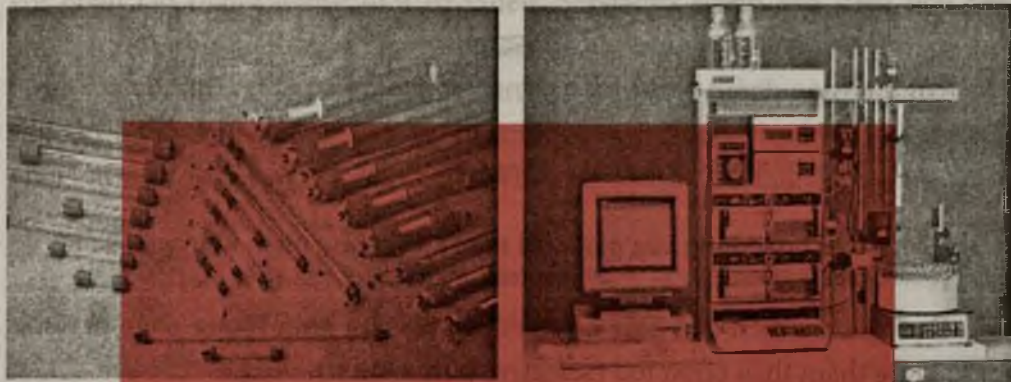
Với các enzym axit tính, người ta thường sử dụng các cellulose anionit này để tách và tinh chế. Các nhựa đi từ các dẫn xuất của cellulose có kích thước lỗ lớn, sử dụng rất thích hợp để tách, tinh chế enzym ở quy mô công nghiệp. Tuy nhiên hệ số nén cao nên phần nào gây khó khăn khi tiến hành sắc ký.

Để khắc phục nhược điểm trên, người ta có thể sử dụng các dẫn xuất của agarose liên kết chéo như: Sepharose CL- 6B hoặc polyme tổng hợp: Trisacryl có công suất cao, hệ số nén không đáng kể, không thay đổi thể tích theo pH và cường độ ion, có thể tái tạo lại nhựa mà không cần tách khỏi cột.

Trong sắc ký trao đổi ion, việc gắn một protein enzym vào nhựa trao đổi ion sẽ phụ thuộc vào trạng thái ion hoá của protein, cũng như trạng thái ion hoá của nhựa trao đổi, pH, lực ion, và nhiệt độ.

Đối với những protein enzym không bị biến tính ở pH cao hơn điểm đẳng điện của chúng thì có thể dùng DEAE-cellulose (nhựa trao đổi anion)

còn đối với protein enzym không bị biến tính ở pH thấp hơn điểm đẳng điện của chúng thì có thể sử dụng ở CM- cellulose (nhựa trao đổi cation).



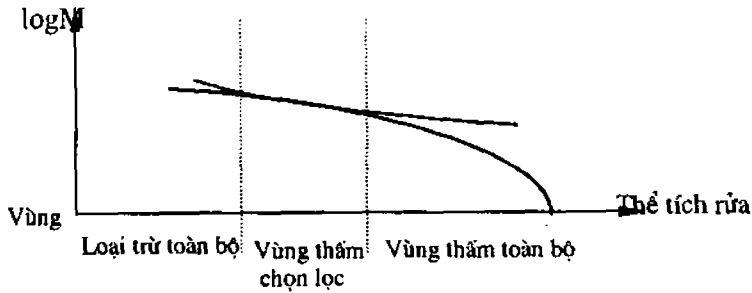
Hình 1.5: Hệ thống thiết bị sắc ký cột tách nhanh protein enzym (FPLC).

### c. Sắc ký loại trừ phân tử (Molecular exclusion chromatography).

Sắc ký loại trừ phân tử (sắc ký loại trừ không gian, loại trừ khuếch tán hay sắc ký lọc gel) cho phép phân đoạn một số hỗn hợp protein theo khối lượng phân tử của chúng. Thực tế, ngoài kích thước ra, hình dạng của phân tử cũng có ảnh hưởng. Tuy nhiên, thông số này có thể bỏ qua nếu các protein trong hỗn hợp đều là hình cầu.

Pha tĩnh là các hạt gel xếp chứa đầy trong cột. Khi cho dung dịch các protein chảy qua cột thì các phân tử lớn nhất của hỗn hợp có đường kính lớn hơn lỗ của pha tĩnh, không thể khuếch tán vào bên trong hạt nên bị loại trừ và chúng sẽ đi ra khỏi cột trước cùng với thể tích dịch rửa bằng thể tích giữa các hạt gel  $V_0$ .

Các phân tử bé nhất, ngược lại, sẽ khuếch tán tối đa vào trong hạt gel và thể tích dịch rửa của chúng sẽ bằng tổng thể tích pha lỏng của cột  $V$ . Còn các phân tử có kích thước trung gian sẽ khuếch tán hạn chế vào bên trong các hạt. Thể tích dịch rửa của chúng càng lớn khi quãng đường đi (của chúng) vào bên trong các hạt càng dài thì kích thước lại càng nhỏ. Sự hoạt động của một chất theo khối lượng phân tử trong sắc ký loại trừ không gian được biểu diễn như hình 1.6.



**Hình 1.6. Các hoạt động của một chất theo khối lượng phân tử trong sắc ký loại trừ (lọc gel).**

Đường biểu diễn cho thấy có tồn tại một vùng khối lượng phân tử được gọi là vùng thấm thấu chọn lọc (selective permeation).

Thay vì thể tích của  $V_e$ , người ta thường dùng thông số  $K_{av}$ :

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_l - V_o).$$

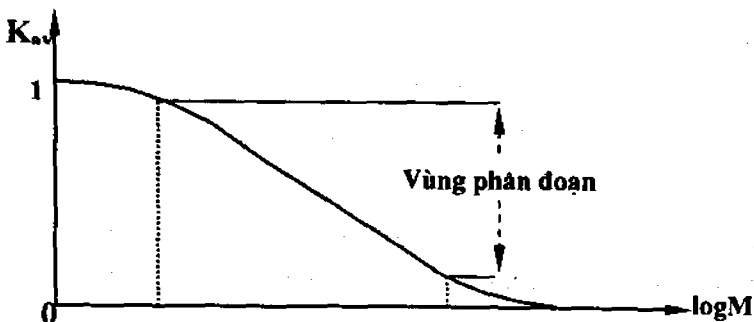
Trong đó:  $V_l$  - thể tích tổng của cột;

$V_e$  - thể tích rửa;

$V_o$  - thể tích giữa các hạt gel.

$K_{av}$  không phụ thuộc vào các kích thước của cột. Đường cong chọn lọc của một gel phụ thuộc vào bản chất và mức độ liên kết chéo của gel đó.

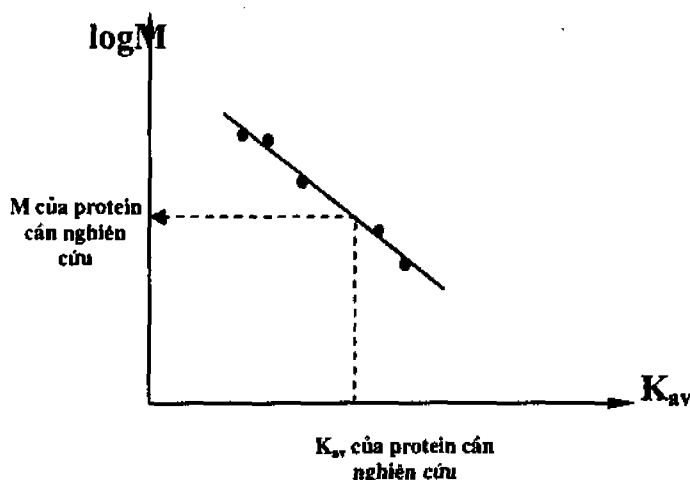
Một gel thường có độ phân giải tối đa trong vùng phân đoạn tuyến tính của nó, do đó người ta chọn một gel như thế nào để vùng này tương ứng với khối lượng phân tử của protein cần tinh chế. Hơn nữa đưa vào mối quan hệ tỷ lệ giữa  $K_{av}$  và  $\log M$ , người ta có thể xác định khối lượng phân tử của một protein theo đường chuẩn của các protein hình cầu, có khối lượng phân tử đã biết khi cho qua cột gel.



**Hình 1.7: Mối liên quan giữa  $K_{av}$  và khối lượng phân tử.**

Gel được sử dụng rộng rãi nhất là gel sephadex và polyacrylamit. Sephadex là một loại dextran có liên kết ngang giữa các mạch polysaccarit với nhau tạo thành mạng lưới ba chiều. Sephadex trung hoà điện tích nên không có tương tác anion cũng như cation, là một loại bột khô, không tan trong nước, nhưng khi ngâm nước sẽ trương ra và tạo thành gel. Mắt lưới của các gel sephadex thường to nhỏ khác nhau, tùy theo mức độ liên kết. Nếu giữa các chuỗi polysaccarit có ít liên kết thì gel sẽ có mắt lưới lớn, ngâm nước nhiều và ngược lại.

Dựa vào độ liên kết người ta chia sephadex làm 5 loại: sephadex G- 25, G- 50, G- 75, G- 100, G- 200 với kích thước lỗ gel khác nhau để tách.



Hình 1.8: Đồ thị M protein chuẩn.

Sephadex thích hợp với từng phân tử cần tách thể hiện ở bảng 1.4.

Bảng 1.4. Các loại sephadex

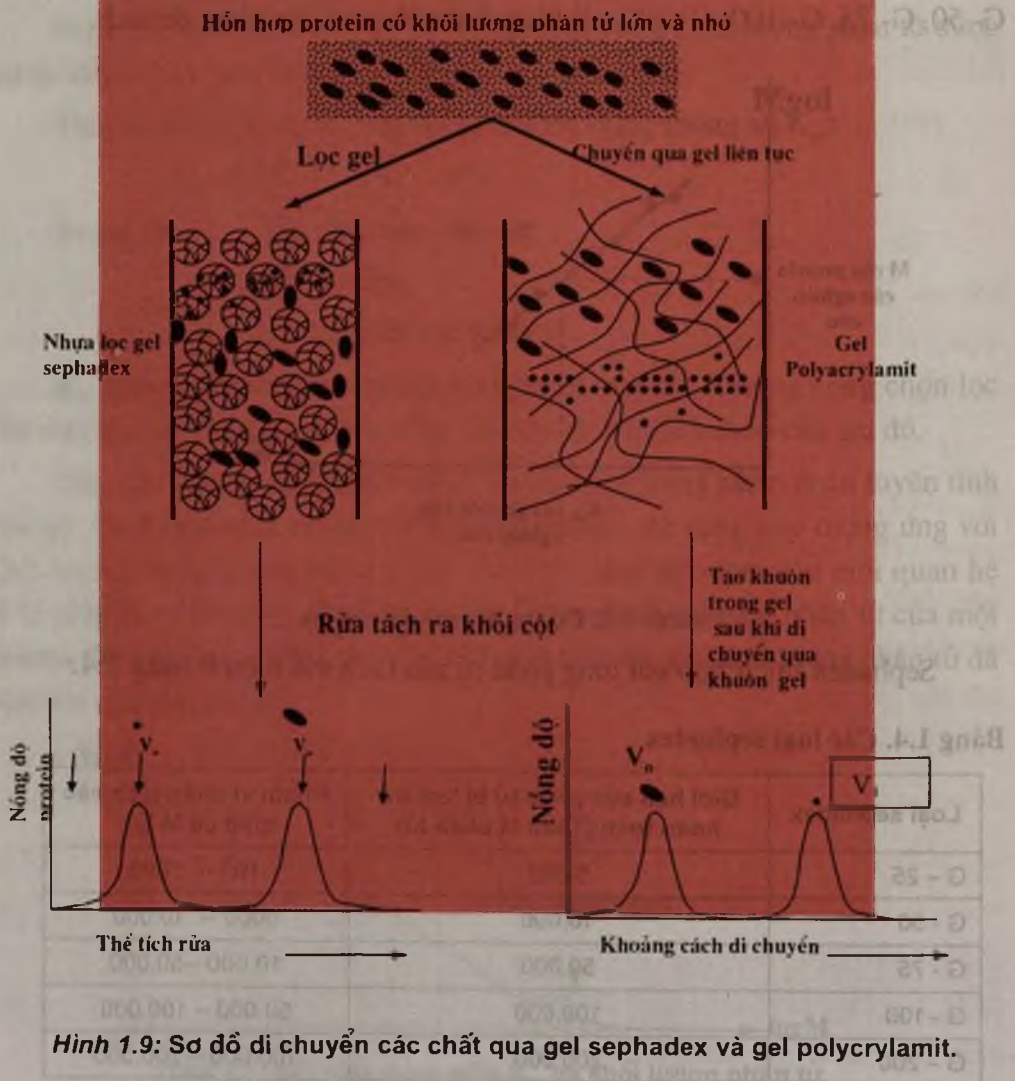
Loại sephadex	Giới hạn của phân tử bị loại trừ hoàn toàn (Theo M phân tử)	Phạm vi phân tách các chất có M từ :
G - 25	5.000	100 -- 5000
G - 50	10.000	5000 -- 10.000
G - 75	50.000	10.000 --50.000
G -100	100.000	50.000 - 100.000
G - 200	200.000	100.000 - 200.000



Sephadex bền trong môi trường axit yếu và kiềm yếu, còn trong môi trường axit mạnh và kiềm mạnh thì các liên kết glucozit trong gel sẽ bị thủy phân. Tất nhiên sự thủy phân còn phụ thuộc vào thời gian.

Ngược lại gel polyacrylamit là polyme của acrylamit và bisacrylamit có cấu trúc các liên kết ngang tạo ra một mạng xốp (giống bột biển). Các chất phải chui vào lỗ gel mới ra được, vì vậy những chất nào có khối lượng phân tử nhỏ ra trước và lớn ra sau.

Sơ đồ di chuyển của các chất qua gel sephadex và gel polyacrylamit được trình bày ở hình 1.9.



Hình 1.9: Sơ đồ di chuyển các chất qua gel sephadex và gel polycrylamit.

Tuy nhiên nếu sử dụng gel sephadex và polyacrylamit có kích thước lỗ lớn để tách enzym có khối lượng phân tử cao thì gel kém bền, nên người ta ít sử dụng ở quy mô sản xuất lớn.

Hiện nay người ta sử dụng một số loại gel bền hơn, để phân đoạn các protein enzym có khối lượng trên 75.000Da. Các gel này thường là dẫn xuất của agarose (Sephacrose CL và Superose) và dextran (Sephacryls) (do công ty Pharmacia Ltd sản xuất) hoặc từ hỗn hợp dẫn xuất của agarose, polyacrylamit co liên kết ngang (Ultrogel AcA) (do công ty LKB instrument Ltd sản xuất), hoặc gel từ các chất đồng trùng hợp metacrylatglycol (do công ty Toyosoda sản xuất). Các gel này có khả năng phân đoạn các enzym có khối lượng phân tử lớn tới  $10^8$  với vận tốc dòng cao. Tuy nhiên các gel này có độ nén đáng kể, nên khi sử dụng không nên tăng chiều cao của cột. Nếu muốn tăng chiều cao của cột để tách tốt cần nối nhiều cột lại với nhau để tạo thành một khối.

#### d. Sắc ký ái lực (affinity chromatography)

Phương pháp sắc ký ái lực dựa vào khả năng liên kết đặc hiệu và thuận nghịch của một enzym với một phân tử khác có tên là phối tử, đã được gắn bằng liên kết đồng hoá trị vào một chất mang không hoà tan chứa trong một cột. Khi cho một hỗn hợp protein có chứa enzym muốn làm sạch đi qua thì chỉ có enzym quan tâm bị giữ lại, còn tất cả các protein khác không tương tác được với phối tử sẽ bị trôi ra khỏi cột (hình 1.10). Tiếp đó, enzym sẽ được rửa giải ra bằng các phương pháp khác nhau.

Các nhân tố như chất mang, phối tử, phương pháp kết gắn phối tử cũng như các điều kiện rửa giải enzym đều có vai trò quan trọng trong sắc ký ái lực.

- **Chất mang (pha tĩnh):** phải có một số tính chất sau:
  - Hoàn toàn không hoà tan trong pha di động.
  - Có độ bền về hoá học và sinh học.
  - Có độ cứng cơ học, có tính háo nước và tính thấm.
  - Không có các tương tác phi đặc hiệu.
  - Có chứa nhiều nhóm chức có khả năng biến đổi khi hoạt hoá trong các điều kiện nhẹ nhàng.

Các chất mang thường là các dẫn xuất của cellulose, các gel dextran, thuỷ tinh xốp... Tuy nhiên, người ta thường dùng agarose hoặc các gel hỗn hợp agarose và polyacrylamit vì chúng có thêm cả khả năng lọc gel.

**Phối tử (ligand):** Phối tử thường là những chất tương tự cơ chất của enzym muốn làm sạch, chất kìm hãm hoặc là cofactor. Phối tử nói chung phải đặc hiệu với enzym và phải có một ái lực trung bình với enzym (kd từ  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  M). Nồng độ phối tử cũng phải được chọn thích hợp, vì nếu thừa phối tử sẽ gây ra những án ngữ không gian đáng kể.

**Cánh tay đòn.** Trường hợp khi phối tử là một phân tử nhỏ hoặc khi phân tử enzym quá lớn có thể gây ra sự “cồng kềnh không gian” thì phối tử sẽ được nối dài thêm bằng một đoạn “cánh tay đòn” để phối tử tiếp cận dễ dàng với tâm hoạt động của enzym. Cánh tay đòn thường được cấu tạo từ một mạch hydrocarbon nhị chức có chiều dài từ 6 đến 8 cacbon. Cánh tay đòn ngắn nhất là axit aminocaproic và hexametylenamin.

**Hoạt hoá chất mang.** Phối tử và cánh tay đòn phải được gắn lên chất mang. Chất mang trước tiên phải được hoạt hoá. Hoạt hoá với cyan bromua hoặc với glutaraldehyd là hai phương pháp phổ biến.

Cyan bromua (BrCN) sẽ phản ứng với các nhóm hydroxyl của agarose chẳng hạn, để tạo ra một imidocacbomat. Và imidocacbomat dễ dàng tác dụng với một amin bậc nhất của cánh tay đòn.

Một chất mang đã được hoạt hoá bằng CNBr, đã được gắn cánh tay đòn và phối tử, là paraaminobenzyl 1,3  $\beta$  D-galactosid agarose thường được sử dụng trực tiếp để tinh chế  $\beta$ -galactosidase.

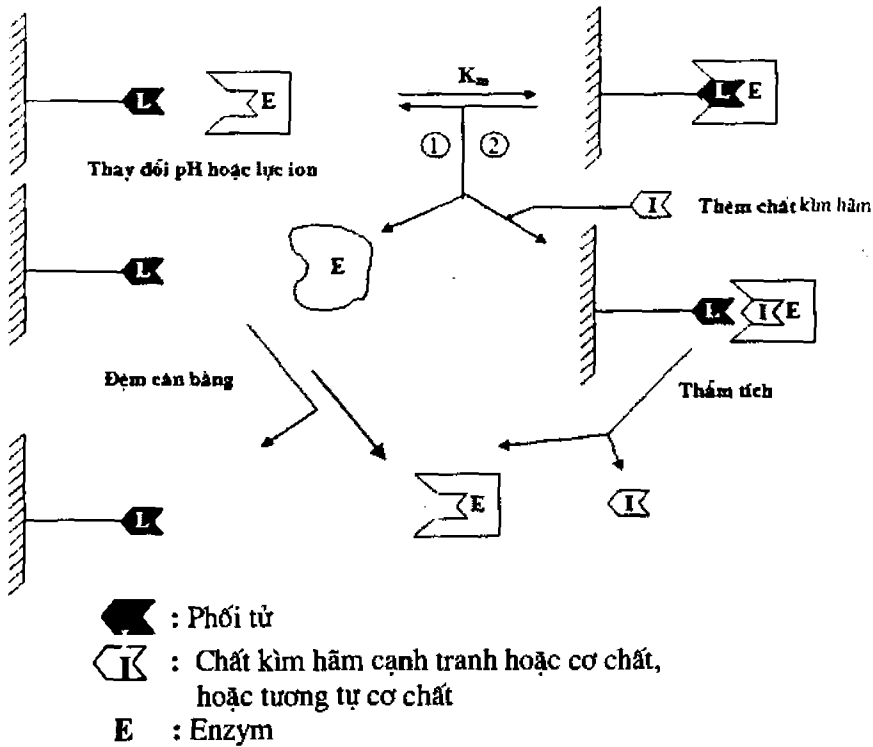
**Rửa giải enzym.** Sau khi loại bỏ các protein khác, enzym có thể được rửa giải ra khỏi cột vì lẽ phức hợp của enzym với phối tử có bản chất là phi đồng hoá trị và thuận nghịch.

Dung dịch đệm rửa giải thường phải:

- Hoặc có chứa một phối tử (tự do) của enzym có khả năng cạnh tranh với phối tử đang ở trạng thái liên kết với enzym.
- Hoặc do pH của mình có thể gây biến tính thuận nghịch enzym do đó làm biến dạng tâm hoạt động của enzym.

Cũng có thể làm yếu tương tác đặc hiệu sinh học bằng cách thay đổi ion.

Phối tử cạnh tranh (hoặc dung dịch đệm làm biến tính) sau đó được loại bỏ bằng phương pháp thẩm tích.



Hình 1.10. Sơ đồ nguyên tắc tinh chế enzyme bằng sắc ký ái lực.

Hiện nay, phương pháp sắc ký ái lực nhóm được sử dụng rất phổ biến. Với phương pháp này, phối tử được gắn vào chất mang không chỉ đặc hiệu cho một enzyme mà còn đặc hiệu cho một nhóm enzyme. Chẳng hạn, Sepharose- AMP sẽ có ái lực với các kinase và cả với các dehydrogenase có NAD bởi lẽ phối tử AMP có một phần cấu tạo của các co- substrat: ATP và NAD của kinase và dehydro-genase.

Sắc ký ái lực là một phương pháp tinh sạch enzyme rất hiệu quả. Nó cho phép thu được enzyme có độ sạch cao (gấp 10 lần so với sắc ký trao đổi ion) chỉ bằng một giai đoạn và trong một thời gian ngắn.

Một số kỹ thuật mới dưới đây có thể được coi là những biến thể của sắc ký ái lực.

\* **Sắc ký ái lực giả (Pseudo affinity chromatography) hoặc sắc ký với phối tử là thuốc nhuộm (Dyeligand chromatography).**

Trong kỹ thuật sắc ký ái lực giả, hoặc sắc ký với phối tử là thuốc nhuộm, người ta dùng các thuốc nhuộm sợi tổng hợp làm phối tử tinh chế 200 enzym và các protein khác nhau. Các thuốc nhuộm như cibacron xanh, procion đỏ, da cam A (orange A), vert A hoặc blue B được gắn bằng liên kết đồng hoá trị vào agarose sẽ có khả năng hấp thụ các enzym có cofactor nucleotid. Cơ chế tương tác thì chưa hoàn toàn sáng tỏ nhưng các nghiên cứu động học đã chứng tỏ có sự kìm hãm cạnh tranh giữa các thuốc nhuộm và các enzym có cofactor này. Hơn thế, người ta còn thấy có sự giống nhau về cấu trúc giữa các phân tử NAD và cibacron xanh.

Ưu điểm phương pháp là phối tử rất rẻ tiền và chất mang có thể sử dụng nhiều lần.

\* **Sắc ký ái lực chelat kim loại (change transfer Metal chelate affinity chromatography).**

Phương pháp sắc ký ái lực chelat kim loại (sắc ký ái lực chuyển giao phức càng cua của các kim loại) dựa vào cơ sở các gốc cystein và histidin của các protein có thể phản ứng với các ion kim loại nặng. Các ion  $Zn^{+2}$  và  $Cu^{+2}$  đã tạo phản ứng càng cua với axit iminoacetic vốn đã được kết gắn vào chất mang agarose, sẽ tương tác với các nhóm imidazol và thiol của các protein. Việc giải hấp thụ các protein hoặc enzym tiếp đó có thể được tiến hành bằng cách giảm pH và bằng cách tăng lực ion của dịch đệm rửa giải.



\* **Sắc ký kết tủa ái lực (affinity precipitation chromatography)**

Trong phương pháp sắc ký kết tủa ái lực có liên quan với hai yếu tố: ái lực và độ hoà tan. Ví dụ tinh sạch trypsin. Cho m- aminobenzamidin thay thế với acrylic để tạo ra monome N- acryletyl m- aminobenzamidin. Tiếp đó cho monome này đồng trùng hợp với axit N- acrylylp- aminobenzoic và acrylamid để tạo ra một polyme tuyến tính nhị chức. Polyme này hoà tan

được trong nước nhờ sự ion hoá của nhóm cacboxyl của gốc axit p-aminobenzoic đến pH=6 – 7. Ở pH thấp hơn 4, polyme này không bị ion hoá nên không hoà tan trong nước.

Gắn trypsin lên polyme bằng liên kết đặc hiệu sinh học ở pH=8. Sau đó giảm pH này đến 4 để kết tủa polyme rồi tách ra bằng ly tâm. Sau khi rửa rồi kéo enzym ra (pH= 2), còn polyme có thể hoà tan và sử dụng lại. Trypsin thu được theo cách này đến 90%. Tuy nhiên phương pháp này sẽ có hiệu quả khi enzym có độ bền ở các pH cực trị.

#### \* Sắc ký lỏng ái lực cao áp

Dưới áp suất cao có thể sắc ký được các protein với năng suất phân giải cao và tốc độ phân tách rất lớn có điều là phương pháp này chất mang phải có độ bền cơ học rất lớn. Người ta thường dùng các gel silic.

Khi gắn một phối tử đặc hiệu cho một protein (hay enzym) lên một gel silic đã được tạo nhánh với glyceropropylsilan nhằm tối thiểu hoá các tương tác phi đặc hiệu, thì có thể dùng sắc ký ái lực cao áp (HPLAC).

#### \* Sắc ký tương tác ưa béo (ky nước)

Các protein sẽ lần lượt được phân tách ra tùy theo tương tác của chúng với một chất mang có chứa các nhóm ưa béo (ky nước).

Các protein chứa các nhóm ưa béo ở trên bề mặt, chất mang ưa béo và dung môi ưa nước tạo thành một hệ 3 thành phần và tương tác được với nhau. Hệ này có thể bị rối loạn khi thay đổi nhiệt độ, pH hoặc lực ion.

Nói chung, các tương tác sẽ mạnh nếu ta tăng lực ion (dung dịch NaCl 4M chẳng hạn). Các protein bị giữ, tiếp đó, có thể được rửa giải một cách chọn lọc bằng cách giảm lực ion này hoặc bằng cách giảm độ phân cực của dung môi rửa (chẳng hạn thêm etylenglycol hoặc thêm một chất tẩy rửa hoặc tăng độ pH dịch rửa). Có thể gắn các nhóm khác nhau lên chất mang. Ví dụ Octyl- sepharose (R) CL-4B và phenylsepharose Cl- 4b các nhóm octyl và phenyl đã được đính lên các đơn vị monosacarit của agarose bằng liên kết ete không tích điện và bền hoá học. Ở những chất mang khác thì có thể sử dụng những nhóm ưa béo khác.

### C.3. Phân tách lỏng- lỏng

Cơ sở của kỹ thuật này dựa vào sự phân bố khác nhau của các protein trong một dung dịch 2 polyme không trộn lẫn nhau: hai polyme này tự phân thành hai pha phân biệt nhau, mỗi pha hoà tan được một trong các protein. Sự phân tách sẽ phụ thuộc vào khối lượng phân tử và nồng độ của các polyme, khối lượng phân tử của protein, nhiệt độ và lực ion. Thường các điều kiện tối ưu phải được xác định bằng thực nghiệm. Việc phân tách giữa hai pha có thể thực hiện bằng kết tủa hoặc bằng ly tâm.

Hệ dung môi sử dụng có thể là polythylenglycol/dextran hoặc polyethylenglycol/amonisulfat. Kỹ thuật này, mới đây được đưa vào sử dụng trong lĩnh vực hoá học protein. Nó có lợi là cho phép phân tách dễ dàng và liên tục các protein của pha rắn cấu tạo nên màng, thành và các mảnh vỡ bán hoà tan khác.

Hoặc để tách và tinh chế enzym người ta dựa vào các tính chất cơ bản của enzym để đưa ra các phương pháp thích hợp như:

- Các phương pháp dựa vào sự thay đổi tính hoà tan:

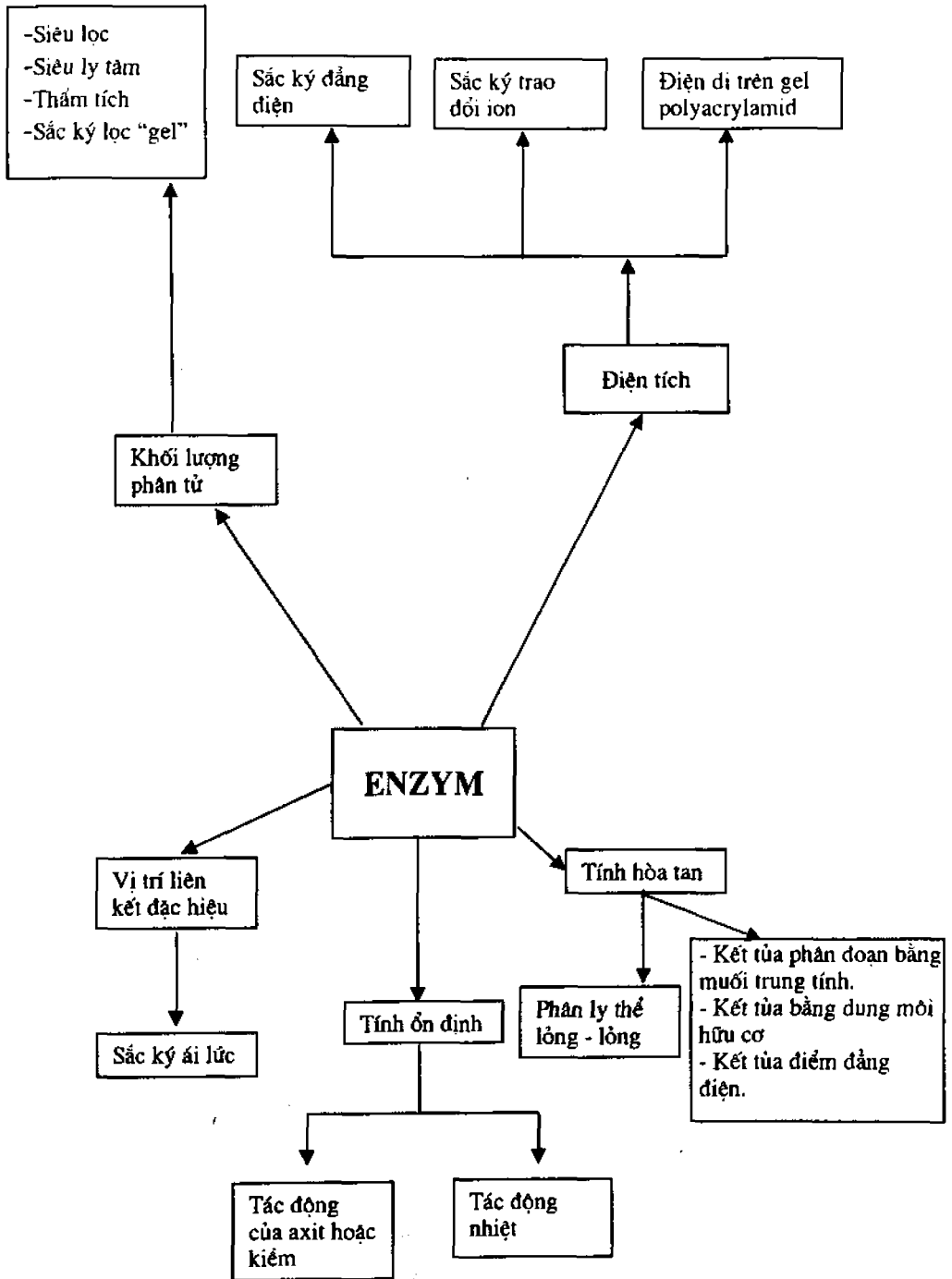
Thay đổi pH (kết tủa ở điểm đẳng điện), thay đổi lực ion (kết tủa enzym bằng muối trung tính), làm giảm hằng số điện môi (kết tủa enzym bằng dung môi hữu cơ),...phân ly thể lỏng - lỏng.

- Các phương pháp phụ thuộc vào điện tích: Điện di, điểm đẳng điện, sắc ký trao đổi ion.

- Các phương pháp phụ thuộc vào khối lượng phân tử: Ly tâm, lọc gel, thẩm tích, siêu lọc và mật độ (siêu ly tâm).

- Phương pháp dựa vào vị trí liên kết đặc hiệu bề mặt: sắc ký ái lực, chiết ái lực.

- Phương pháp dựa vào tính ổn định: Tác động nhiệt, axit hoặc kiềm.



**Hình 1.11:** Các kỹ thuật tách và tinh chế enzym theo các đặc tính của chúng.



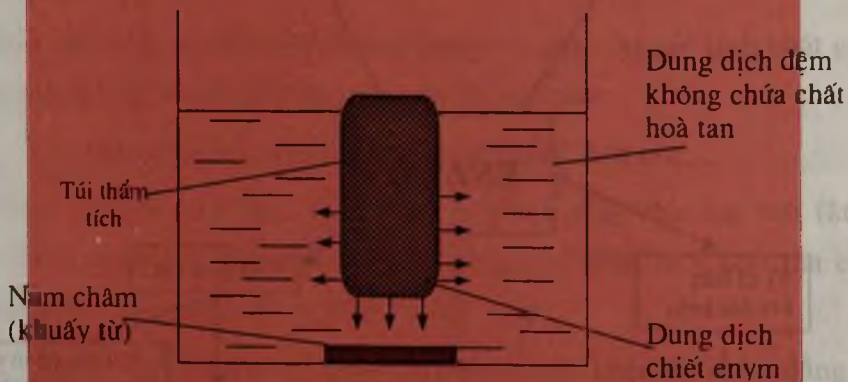
### 1.4.3.3.D. Thẩm tích và làm đặc

#### D1. Thẩm tích

Trong quá trình tinh sạch các enzym, để loại bỏ các phân tử hoà tan nhỏ không mong muốn khỏi dịch trích ly enzym như amonisulfat sau khi kết tủa, dùng một muối để khử hấp thụ enzym trong sắc ký trao đổi ion, hoặc một phôi tử cạnh tranh trong sắc ký ái lực... người ta thường dùng phương pháp thẩm tích.

Túi thẩm tích được cấu tạo bằng một màng bán thấm (thường là màng celophan). Túi thẩm tích có chứa dịch chiết enzym, được đặt vào trong một dung dịch đệm không được chứa chất hoà tan cần loại bỏ.

Chất hoà tan khuếch tán ra khỏi màng theo chiều gradient nồng độ. Ở trạng thái cân bằng thì nồng độ chất hoà tan bên trong túi và bên ngoài dịch đệm sẽ bằng nhau do đó phải dùng một thể tích lớn dung dịch đệm và thỉnh thoảng phải thay dung dịch đệm mới.



Hình 1.12. Sơ đồ thẩm tích loại bỏ muối khỏi dung dịch enzym.

#### D2. Làm đặc

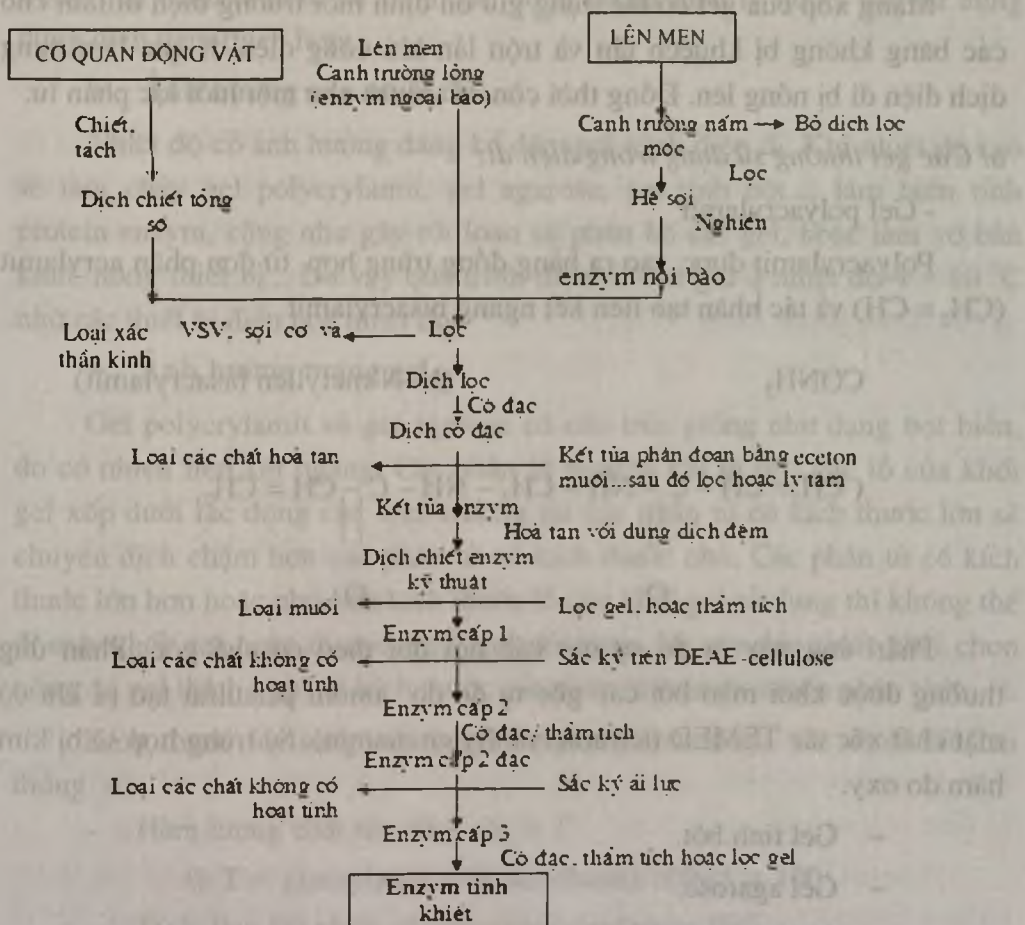
– Trong quá trình tinh sạch enzym, có thể cần phải làm đặc dịch enzym, nhất là sau khi qua giai đoạn sắc ký dịch chứa enzym đã bị pha loãng ra nhiều.

– Có thể làm đặc bằng cách kết tủa enzym nhờ một dung môi hữu cơ vốn không làm biến tính enzym hoặc muối trung tính. Tủa enzym sau khi li tâm được hoà tan trở lại trong một thể tích nhỏ. Phương pháp này thường dùng trong phòng thí nghiệm.

– Hoặc cho một lượng sephadex G25 vào dịch chứa enzym cần làm đặc. Có điều là lượng sephadex G25 này được tính toán như thế nào để sau khi trương lên thì gel sẽ chiếm khoảng 90% thể tích của dịch chứa enzym. Các protein – enzym quá lớn khó thâm nhập vào được trong các mắt lưới của gel thì bị loại ra vào trong 10% chất lỏng (ra phía ngoài gel). Như vậy là dịch enzym đã được làm đặc. Bằng cách này có thể làm đặc lên 10 lần.

– Làm đặc dịch chứa enzym bằng cách cho bốc hơi trong chân không, bằng cách thẩm thấu ngược (tạo áp suất thẩm thấu làm cho dung môi đi qua một màng bán thấm và giữ lại các protein enzym) hoặc bằng siêu lọc (dung dịch enzym được dẫn qua một màng có lỗ nhỏ bằng áp suất hoặc bằng ly tâm).

Hình 1.13 giới thiệu sơ đồ tổng quát thu nhận một chế phẩm enzym tinh khiết.



Hình 1.13. Sơ đồ tổng quát thu nhận một chế phẩm enzym tinh khiết.

### 1.4.3.3.E. Kiểm tra độ tinh khiết của enzym bằng phương pháp điện di

#### E1. Sơ lược điện di

Điện di là quá trình dịch chuyển của các phân tử tích điện trong điện trường. Tốc độ dịch chuyển của các phân tử phụ thuộc vào điện tích, kích thước, và khối lượng phân tử.

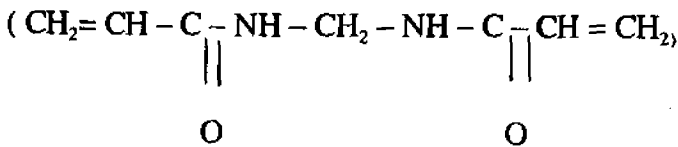
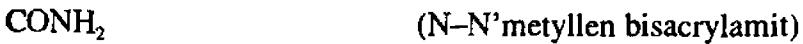
Điện di các chất cao phân tử (protein, enzym, axit nucleic...) thường được thực hiện bằng cách đưa một lượng nhỏ mẫu lên chất mang là một khối gel xốp. Dưới tác động của một hiệu điện thế, các phân tử khác nhau của hỗn hợp mẫu sẽ chuyển động qua khối gel xốp với vận tốc khác nhau, nên sẽ có vị trí dưới dạng các băng khác nhau khi nhuộm màu gel hay chụp phát xạ.

Mạng xốp của gel có tác dụng giữ ổn định môi trường điện di làm cho các băng không bị khuếch tán và trộn lẫn khi dòng điện đi qua làm dung dịch điện di bị nóng lên. Đồng thời còn có vai trò như một lưới lọc phân tử.

a/ Các gel thường sử dụng trong điện di:

- Gel polyacrylamit

Polyacrylamit được tạo ra bằng đồng trùng hợp từ đơn phân acrylamit ( $\text{CH}_2 = \text{CH}$ ) và tác nhân tạo liên kết ngang bisacrylamit



Phản ứng xảy ra do sự mở các nối đôi theo cơ chế gốc. Phản ứng thường được khơi mào bởi các gốc tự do do amoni persulfat tạo ra khi có mặt chất xúc tác TEMED (tetrametylen diamin). Sự trùng hợp sẽ bị kìm hãm do oxy.

- Gel tinh bột.
- Gel agarose.
- Gel acetat-cellulose.

Trong đó gel polyacrylamit và gel tinh bột thường sử dụng để tách protein và protein – enzym, còn gel agarose do có kích thước lỗ gel lớn hơn nên được dùng để tách ADN.

*bt Các yếu tố ảnh hưởng đến điện di*

- **pH và dung dịch đệm**

Ở một pH xác định độ tích điện của một protein phụ thuộc vào mức độ ion hoá của nhóm amin và cacboxyl của mạch bên. Điện tích của protein sẽ phụ thuộc vào pH môi trường, vào số lượng và loại axit amin có trong phân tử của chúng. Vì vậy để giữ điện tích protein và độ dịch chuyển của protein được ổn định trong quá trình điện di, cần phải luôn giữ pH ổn định. Ngoài ra trong quá trình điện di để tránh tác động do sự điện ly nước, cần sử dụng dung dịch đệm thích hợp.

- **Ảnh hưởng của nhiệt độ**

Nhiệt độ có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình điện di. Khi nhiệt độ cao sẽ làm chảy gel polycrylamit, gel agarose, gel tinh bột..., làm biến tính protein enzym, cũng như gây rối loạn sự phân bố các gel, hoặc làm vỡ bản kính, hỏng thiết bị... Do vậy quá trình điện di cần giữ ở nhiệt độ 4 – 10 °C nhờ các thiết bị điều hoà nhiệt độ.

- **Ảnh hưởng mạng gel**

Gel polycrylamit và gel agarose có cấu trúc giống như dạng bột biển, do có nhiều liên kết ngang. Các phân tử protein khi đi qua các lỗ của khối gel xốp dưới tác động của điện trường thì các phân tử có kích thước lớn sẽ chuyển dịch chậm hơn các phân tử có kích thước nhỏ. Các phân tử có kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn kích thước lỗ của khối gel sử dụng thì không thể đi qua khối gel hoặc đi qua khối gel dễ dàng. Vì vậy cần thiết phải chọn nồng độ gel thích hợp với kích thước các phân tử protein muốn phân tích

Kích thước lỗ trong mạng gel polyacrylamit được xác định bởi hai thông số.

- Hàm lượng chất rắn tổng số: % T.

$$\% T = \frac{g(\text{acrylamit} + \text{bisacrylamit})}{100\text{ml}} \times 100$$

- Tỷ lệ liên kết chéo với monomeracrylamit : %C

$$\% C = \frac{g(\text{bisacrylamit})}{g(\text{acrylamit} + \text{bisacrylamit})} \times 100$$

Khi %T cao, kích thước lỗ gel nhỏ sẽ phân tách tốt các protein có khối lượng phân tử nhỏ và ngược lại. Thay đổi hàm lượng bisacrylamit sẽ làm thay đổi kích thước lỗ gel. Bất kỳ %T nào ở 5%C đều thu được gel có kích thước lỗ nhỏ nhất.

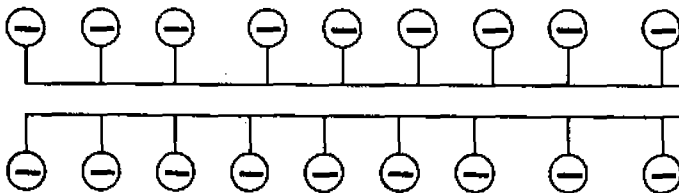
Thường, với những protein có khối lượng phân tử giữa 15.000 và 90.000Da thì người ta phải tạo một gel có tỷ lệ 10 : 0,27, nghĩa là gel được tạo ra từ 10 gam acrylamit tổng số trong đó có 0,27 gam bisacrylamit cho 100ml dung dịch.

### E.2. Phương pháp điện di trên gel polyarylamid khi có mặt SDS (SDS - PAGE)

Khi có mặt  $\beta$  - mercaptoethanol ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ ) Để khử các cầu



disulfua (- S - S -) và sodium dodecyl - sulfat (SDS)  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{-SO}_3\text{Na}$  thì các protein sẽ bị biến tính. Chuỗi polypeptit đã bị giãn ra sẽ được phủ kín bằng phân tử SDS để tạo ra một polyanion (đa anion) có mật độ điện tích trên một đơn vị chiều dài gần như không đổi và không phụ thuộc vào trình tự của chuỗi peptit (hình 1.14).



Hình 1.14. Chuỗi polyanion.

Dưới tác dụng của một điện trường các protein đã được SDS phủ kín sẽ di chuyển trên gel acrylamid về phía anod (cực dương). Do các mắt lưới của gel, mạch polypeptit càng dài thì càng di chuyển chậm. Vì vậy, các protein khác nhau của một hỗn hợp có thể được tách ra tùy theo kích cỡ (chiều dài) và điện tích ban đầu, còn hình dạng của phân tử thì không ảnh hưởng.

Điện di đứng thường được tiến hành trên một bản gel có kích thước 10cm x 10cm x (0,7 - 1mm). Bản gel gồm hai lớp gel khác nhau được đúc từ một buồng gel bằng khung bản kính có kích thước tương ứng.

- Gelcô (staging gel): Có tác dụng làm đậm đặc mẫu và làm tăng sự tách các băng, gel cô có các giếng để mẫu. Gel cô thường ít liên kết ngang hơn và có pH thấp hơn gel tách.

- Gel tách : Có tác dụng tách băng rõ rệt hơn, nhất là khi các chất có tốc độ vận chuyển gần nhau.

*a. Hoá chất đúc gel*

(A) : dung dịch acrylamit: 30,8%T, 2,7%C.

(B) : dung dịch đệm: Tris-HCl 1M, pH=8,8.

(C) : dung dịch đệm: tris- HCl 0,5M, PH= 6,8.

(D) : SDS 10% trong nước.

(E) : amoni persulfat (APS) 10%, TEMED xúc tác cho gel chống đông.

*b. Tiến hành đúc gel.*

- **Đúc gel tách:** Buồng gel bằng bản kính có kích thước 10 cmx10cm dày 0,7- 1 mm, có khoảng 10 giếng. Trộn dung dịch A, B, C sau đó cho dung dịch E+Temed, lắc nhẹ rồi rót nhanh vào buồng gel cho đến khi cách mép trên khoảng 4cm thì dừng lại. Phủ một lớp mỏng butanol lên bề mặt lớp gel vừa rót để polyme hoá trong thời gian 30- 60 phút.

- **Đúc gel cô (staging gel)** trộn dung dịch A, C, D, và E+ TEMED rồi rót nhanh vào buồng gel sau khi đã đổ lớp butanol trên bề mặt gel tách cho đến đáy buồng gel. Đưa lược vào để tạo giếng (tránh bọt khí) rồi để trùng hợp trong khoảng 60 phút sau đó lấy lược ra.

- **Dung dịch đệm pha mẫu :**

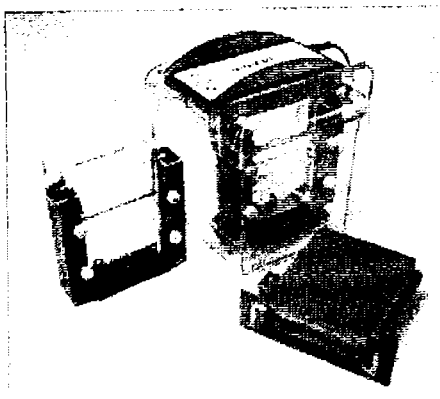
- Bromo phenol blue (BPB), pH6,8.

- Tris- HCL 0,1M, SDS 1- 4%, Glyxerol 10- 20 %, BPB 0,02%,  $\beta$ -mecaptoetanol 0,2M.

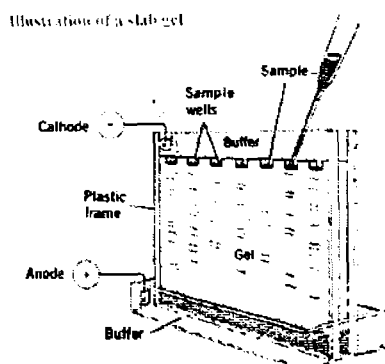
- **Dung dịch đệm chạy điện di:** Tris 0,025M, glyxerol 0,2M, SDS 0,1%, pH8,3. Tiến hành chạy điện di: cường độ dòng điện: 15mA/bản gel dày 0,7 mm (điện di đứng), 5mA/ ống gel (điện di cột). Chạy trong buồng kín (dung dịch đệm phải đổ ngập). Nhiệt độ chạy điện di, giữ ổn định 4°C.

- **Dung dịch nhuộm màu:** Commasiebrilliant blue R- 250, hoặc Amiden 10B.

- Dung dịch tẩy màu: Metanol: axit axetic: H<sub>2</sub>O (4:1:5).



Hình 1.15: Buồng điện di protein mini.



Hình 1.16: Cho mẫu vào giếng.

### E3. Theo dõi và kiểm tra độ sạch của enzym

#### a) Các đại lượng cần phải đo

- Hoạt độ riêng: Lượng enzym được biểu diễn bằng số đơn vị hoạt độ/một đơn vị khối lượng protein. Hoạt độ riêng sẽ tăng lên trong quá trình tinh sạch. Hoạt độ riêng đạt cực đại và không đổi khi một enzym đã hoàn toàn sạch.

- Tỷ lệ tinh sạch hay mức độ tinh sạch T giữa giai đoạn một và giai đoạn hai là tỷ lệ giữa hoạt độ riêng (chẳng hạn :UI/mg). ứng với giai đoạn hai (AS<sub>2</sub>) và hoạt độ riêng với giai đoạn một (AS<sub>1</sub>).

$$T = AS_2 / AS_1$$

Tỷ số này càng cao thì enzym càng sạch.

Hiệu suất R là tỷ số (thường được biểu diễn bằng %) hoạt độ tổng giữa giai đoạn hai và giai đoạn một.

Giả sử A<sub>1</sub> và A<sub>2</sub> là hoạt độ của hai giai đoạn, được biểu diễn bằng UI/ml.

V<sub>1</sub> và V<sub>2</sub> là thể tích của hai giai đoạn được biểu diễn bằng ml.

Hoạt độ tổng sẽ là:

$$\text{Đoạn 1 (chưa sạch)} = A_1 V_1 \text{UI.}$$

$$\text{Đoạn 2(sạch)} = A_2 V_2 U I$$

$$R = A_1 V_1 / A_2 V_2 \cdot 100$$

**b. Các chỉ tiêu về độ sạch**

Enzym được coi là sạch khi vắng mặt các protein nhiễm tạp được đánh giá qua các phân tích:

- Điện di trên gel polyacrylamit.
- Phân tích điểm đẳng điện.
- Phân tích siêu ly tâm.

Thực tế, điện di trên gel polyacrylamit có mặt SDS (SDS- PAGE) hay được sử dụng nhiều nhất.

Các chỉ tiêu về độ sạch của một enzym:

- Hoạt độ riêng cực đại và không đổi.
- Khả năng kết tinh.

Ví dụ: Kết quả tinh sạch enzym cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) từ *Bacillus sp* (EC.2.4.1.19). CGTase là enzym xúc tác cho phản ứng nối vòng (chuyển hoá tinh bột và các  $\alpha$ -1,4 glucan thành các cyclodextrin). Sau đây là kết quả tinh sạch CGTase:

**Bảng 1.5. Tinh sạch CGTase từ chủng *Bacillus sp* 1070.**

Các bước tinh sạch	Thể tích (ml)	Prote-in (mg)	Hoạt độ Ac riêng (u/mg Pr)	Hoạt độ Ad riêng (u/mg Pr)	Ac tinh sạch	Ac còn lại %	Ad tinh sạch	Ad còn lại %
Enzym thô	50	3	1560	2708	0	100	0	100
Sắc ký ái lực trên $\beta$ -CD-sepharose	10.2	1.3	13542	7210	3.0	130	2.7	116
Sắc ký ái lực cố định ion kim loại trên Cu(II)-IDA Agarose	10.5	0.15	68673	39780	15.0	75	14.7	73

*Ghi chú: Ac là hoạt tính dống vòng, Ad là hoạt tính dextrin hoá.*





1. protein chuẩn: 14,2kDa, 20.1 kDa, 24.0 kDa, 29.0 kDa, 45.0 kDa và 66.0 kDa (Sigma)
2. GTase tinh sạch
3. CGTase thô

**Hình 1.17.** Điện di đồ tinh sạch CGTase từ chủng *Bacillus sp 1070*.  
(10cm x 10cm x 0,7mm)

#### 1.4.3.4. Một số quy trình tách, tinh chế enzym

##### 1.4.3.4.A. ENZYM THỰC VẬT

###### \* PAPAİN (EC 3.4.22.2)

PAPAİN được tách từ nhựa đu đủ bao gồm hỗn hợp protease : Papain (EC 3.4.22.2), Chymopapain (EC 3.4.22.6), protease III (EC 3.4.22.30), protease IV (EC 3.4.22.25) và một ít lysozim lipase.

*al Cấu tạo :*

- Papain chứa 15,5% N và 1,2% S.
- Phân tử papain cấu tạo từ 212 axit min, trong đó không chứa methionin.
- Phân tử papain gồm 1 chuỗi polypeptit, đầu "N" là isoleucin, đầu "C" là asparagin có 6 gốc cystein, tạo thành 3 cầu disulfua (ở vị trí 22- 23, 56- 95 và 153- 200). Ngoài ra, còn chứa một nhóm SH tự do ở vị trí 25.
- Papain có M=27.000 Dalton.
- Có cấu tạo gần giống hình cầu.
- Trung tâm hoạt động bao gồm: Nhóm SH của cystein 25 và N bậc 3 của histidin - 159 nên gọi là protease-thiol.
- Vùng trung tâm hoạt động của papain chứa chuỗi polypeptit với các axit amin: Pro- Val- Lys- Can- Gln- Ser- Cys- Gly- Ser - Cys- trip.

### *b/ Tính chất:*

\* Papain thủy phân protein thành peptit và các axit amin sâu hơn các protease từ động vật và các vi sinh vật. Do vậy, nó được dùng để phân giải tiếp các liên kết peptit còn lại khi dùng trypsin hay chymotrypsin thủy phân. Nó đóng vai trò như một endopeptidase vừa như một exopeptidase. Nên nó có thể thủy phân hầu hết các liên kết peptit (trừ liên kết của prolin và axit glutamic).

\* **Nhiệt độ:** Papain chịu được nhiệt độ khá cao, ở dạng nhựa khô  $105^{\circ}\text{C}$ , papain không bị biến tính trong 3 giờ, trong khi đó ở dạng dung dịch thì papain chịu được nhiệt độ thấp hơn, ở  $82,5^{\circ}\text{C}$  papain bị mất hoạt tính sau 30 phút.

#### **\* pH:**

- Papain bền trong vùng pH tương đối rộng: 4,5 – 8,5 trong khoảng 2 giờ.
- Thường bền trong môi trường trung tính và kiềm yếu (pH 7- 8,5).
- Bị biến tính nhanh trong môi trường axit có pH < 4,5 và kiềm mạnh pH > 12.

- pH tối ưu tùy thuộc vào cơ chất phản ứng.

VD: Với casein: pH<sub>t.u</sub> = 7- 7,5

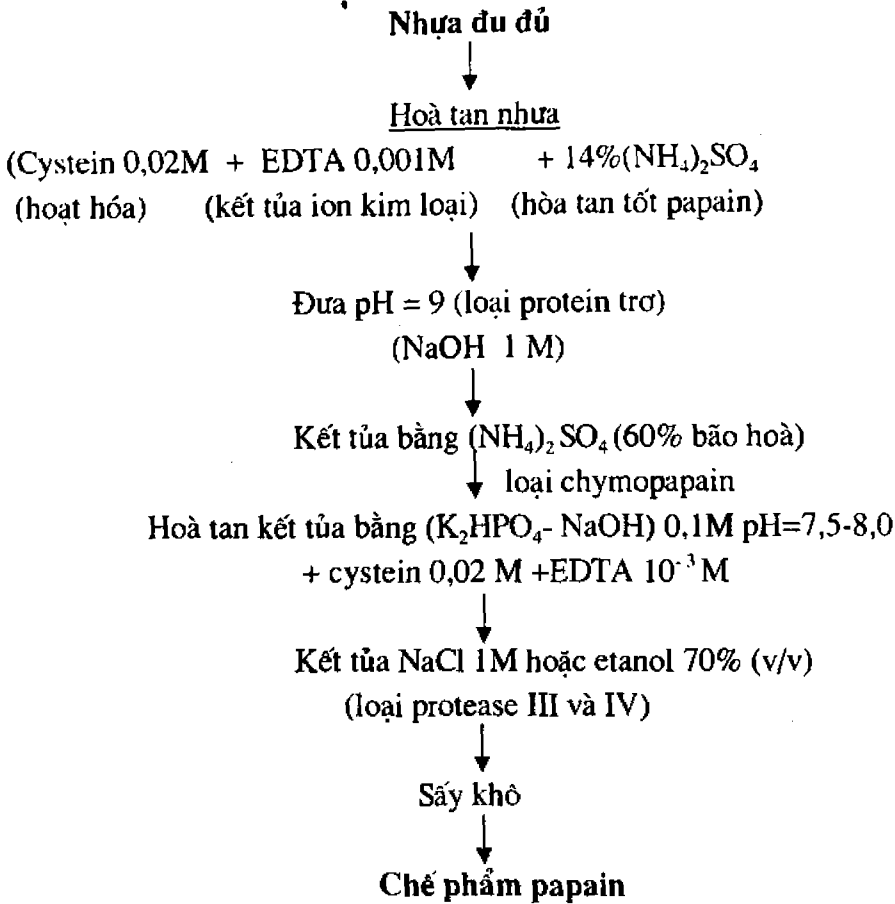
albumin: pH<sub>t.u</sub> = 4,5- 7,1

gelatin: pH<sub>t.u</sub> = 5,2- 6,0

\* Chất hoạt hoá papain là những chất khử như cystein, glutation, thioglycolic,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , v.v.. Trong đó cystein là chất hoạt hoá thường sử dụng nhất, nó làm hoạt tính của papain tăng 20 lần.

\* Chất ức chế papain là các chất có hoạt tính oxy hoá như oxy, ozon, hydroperoxit, iod acetat, iod acetamit, P- chlomercury benzoat và các hợp chất disulfua khác. Các chất này phản ứng với nhóm SH ở trung tâm hoạt động của papain làm kìm hãm sự hoạt động papain.

*cl Tách và tinh chế papain*



**Hình 1.18. Sơ đồ thu nhận papain  
(B.S Bains và cộng sự, 1978 có cải tiến).**

**\* BROMELAIN {EC.3.4.22.4}**

Bromelain nhóm enzym xúc tác thủy phân protein (protease), được tìm thấy trong các phần cuống, chồi, thịt quả và lá của dứa. Các nghiên cứu về bromelain đã được tiến hành khá sớm, từ năm 1894 ..Một số công trình đã được đăng ký patent như : Pat.US6,803,038 B1 (2004), Pat.US 2009/0275105 A1 (2009)

*al Cấu tạo*

Thành phần axit amin ở bromelain cuống và quả thay đổi khác nhau. Bromelain cuống có thành phần axit amin thay đổi trong khoảng 144-321 axit amin. Bromelain quả khoảng 161- 283 axit amin.

Bromelin có đầu 'N' là valin (Val) và đầu 'C' là glycin (Gly).

Bromelain là một glyco-protein, mỗi phân tử chỉ chứa 1 chuỗi oligosaccarit liên kết cộng hóa trị với chuỗi peptid (Feinstein và Whitaker, 1964).

Khối lượng phân tử : 32-33,5 kDa (theo Yasuda và cộng sự, 1970).

Bromelain thuộc nhóm protease cystein nên trung tâm hoạt động chứa nhóm SH.

### *b/ Tính chất*

Bromelain có nhiệt độ tối ưu khác nhau phụ thuộc vào cơ chất tác dụng, pH, thời gian vv..

Chẳng hạn, bromelain ở dạng tinh khiết, với pH 4-10, cơ chất là casein hoạt tính không thay đổi nhiều ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ. Còn ở nhiệt độ 55°C, pH 6, trong 20 phút hoạt tính giảm 50 %.

Biên độ pH khá rộng từ 4-10 nhưng pH tối ưu thường nằm ở vùng 6,5-8 ở pH 37°C, và điểm đẳng điện PI : 9,5 (Lopes et al, 2005, 2009).

Đễ bị ức chế bởi các tác nhân oxy hóa như: iodacetat, hydroperxyt...

### *c/ Ứng dụng*

#### • **Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm**

Tác dụng làm mềm thịt, đông tụ sữa, phá đục bia, thủy phân gluten trong sản xuất bánh mì làm khối bột mềm dẻo hơn, tăng hương và chất lượng bánh...

Cùng với papain, bromelin là một trong những enzym phổ biến nhất được sử dụng để làm mềm thịt. Bromelin được bán ở dạng bột, được trộn với nước ướp thịt hoặc rắc trực tiếp lên thịt chưa nấu. Enzym sẽ thâm sâu vào thịt, làm thịt mềm hơn và ngon hơn khi nấu.

#### • **Ứng dụng trong y học**

Hỗ trợ điều trị ung thư cùng với xạ trị.

Ngăn ngừa cao huyết áp, ức chế sự kết tập tiểu cầu, giảm phù nề.

Bôi lên vết thương, vết bỏng để làm tan các mô hoại tử, điều trị rối loạn tiêu hóa.

Phối hợp với thuốc kháng sinh trong điều trị một số bệnh nhiễm khuẩn như sung phổi, viêm phế quản, viêm thận sẽ làm tăng hiệu quả kháng sinh,

phối hợp với một số thuốc điều trị hen (theophyllin, ephedrin...) làm tăng tác dụng chống hen.



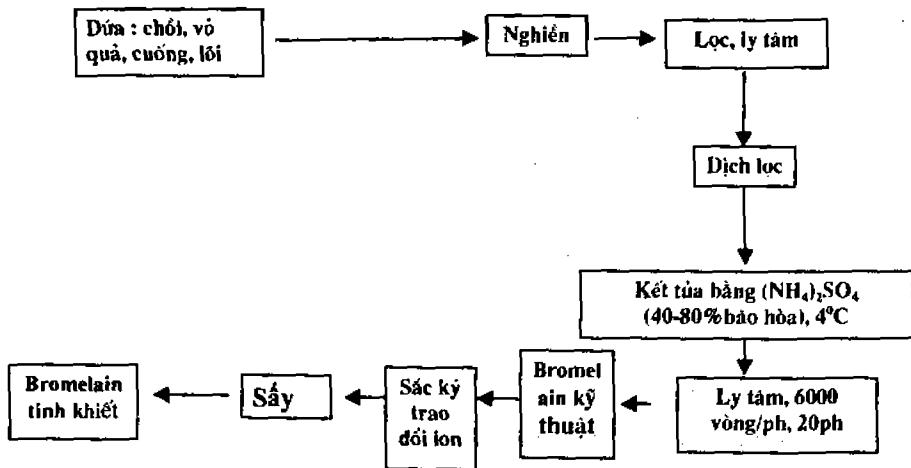
Hình 1.19. Các loại thuốc có chứa bromelain.

#### dl Tách, tinh sạch bromelain

Đã có nhiều công trình công bố qui trình sản xuất bromelain từ các bộ phận khác nhau của dứa như:

\* Heinicke và Gortner: chiết bromelain từ cuống dứa, dịch chiết được làm lạnh ở 0-4°C, kết tủa bằng aceton, ly tâm, sấy chân không thu chế phẩm dạng bột. Hiệu suất tuy không cao nhưng hoạt độ bromelain tương đối tốt.

\* Devakate et al (2009) đã nghiên cứu và đưa ra qui trình tách tinh chế thu chế phẩm bromelain theo sơ đồ hình 1.20 như sau:



Hình 1.20. Qui trình thu nhận bromelain từ dứa (theo Devakate, R.V, Patil, V.V, Waje S.S, Thort B.N, 2009).

- **Tinh sạch bromelain bằng sắc ký trao đổi ion**

Cột sắc ký có đường kính trong 25mm, cao 300mm được nhồi dây nhựa trao đổi cation. Có thể chọn CM-cellulose làm vật liệu nhồi cột. Sử dụng đệm acetate (25mM, pH 4.0) gấp 4 lần thể tích cột.

Dịch bromelain kỹ thuật đi qua cột với tốc độ 324ml/h, cùng với đệm acetat. Sau đó, enzyme đã bị hấp thụ trên nhựa sẽ được rửa giải với dung dịch NaCl 1N. Thẩm tích loại muối bằng đệm amoni phosphat (50mM, pH 7.0). Sấy thu chế phẩm bromelain dạng bột.

### 1. Sấy phun (Spray drying)

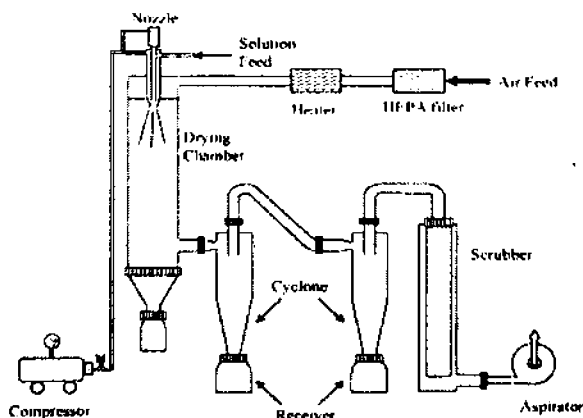


Fig. 1. Schematic of spray dryer.

#### Hình 1.21. Sơ đồ hệ thống thiết bị sấy phun (Model: LU-22, Ando).

Theo Devakate (2009) tiến hành sấy ở áp suất khí nén 2 kG/cm<sup>2</sup> với tốc độ dịch enzyme đi vào 225 mL/h, nhiệt độ vào từ 100-170°C, nhiệt độ ra 27°C, thời gian 90 phút, thu được chế phẩm dạng bột, trắng.

### 2. Sấy thăng hoa (Vacuum freeze drying)

Hệ thống sấy thăng hoa (M/s.Ref-vac Consultancy) gồm có: khoang sấy bằng thép không gỉ hình trụ (L =0.4m, D=0.4m) chứa các tấm gia nhiệt (tổng bề mặt đốt nóng là 0.25m<sup>2</sup>), một bình ngưng (công suất làm đá max=1.8kg, diện tích bề mặt = 0.25m<sup>2</sup>) có khả năng làm việc ở -35°C, một bơm chân không.

Mẫu bromelain đã tinh sạch được đổ đầy các đĩa, đóng băng ở nhiệt độ -23°C trong 6 giờ. Sau khi hệ thống đã sẵn sàng, đặt các đĩa vào khoang sấy, bật bơm chân không. Nhiệt độ của mẫu và áp suất bên trong khoang được thiết lập tại các giá trị là 25°C và 30Pa. Trọng lượng mẫu được đo cách 5phút/ lần cho đến khi đạt giá trị không thay đổi. Khi so sánh kết quả đo hoạt lực của bromelain trong 2 phương pháp sấy trên:

- Hoạt lực của bromelain nếu sấy thăng hoa duy trì khoảng 95% so với ban đầu, trong khi nếu sấy phun chỉ còn 78%.

- Hàm lượng protein trong trường hợp sấy thăng hoa cũng cao hơn (87%) so với sấy phun (73%).

Khi sấy ở nhiệt độ thấp, vật liệu giữ được cấu trúc và hoạt tính enzym.

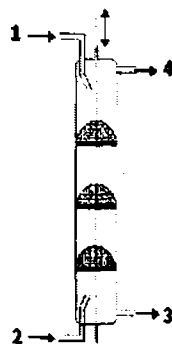
- Ana Maria Frattini Fileti et al (2009) đã thu chế phẩm bromelain bằng phương pháp tách lỏng - lỏng (Reversed Micelles).

Mixen là những vi hạt phân tử có hoạt tính bề mặt, kết hợp lại với nhau và phân tán trong pha liên tục là dung môi. Các mixen này có khả năng hoà tan nhiều hợp chất phân cực trong một dung môi không phân cực, rất có lợi nếu muốn tách tinh sạch thu hồi các chất có hoạt tính sinh học như: enzym, protein, kháng sinh..., bởi nó không làm biến tính protein, có thể tiến hành thu chế phẩm theo mẻ hoặc liên tục (Kilikian et al 2000).

Dung dịch chứa cation mixen được tạo thành từ BDBAC, gồm chất có hoạt tính bề mặt, isoctan và hexanol, sau đó được trộn với dịch enzym thô. Sự phân pha diễn ra, bromelain sẽ di chuyển sang pha chứa mixen, trở thành pha giàu bromelain (pha raffinate), bổ sung đệm natri phosphate và NaCl, ly tâm 8000 vòng/phút để loại bỏ pha nặng. Sau đó tiến hành xác định hoạt độ bromelain.

Tách bromelain bằng phương pháp lỏng-lỏng (Reversed Micelles) theo hình 1.21.

Batch and Continuous Extraction of Bromelain Enzyme



1. Đường dịch bromelain thô vào (pha liên tục).
2. Đường dung dịch mixen vào (pha phân tán).
3. Đường pha nặng ra (pha chiết)
4. Đường pha nhẹ ra (pha raffinate: chứa bromelain).

Hình 1.22. Hệ thống tách chiết bromelain liên tục và bán liên tục trên Micro-column.

- **Cấu tạo cột Reversed Micelles và cơ chế vận hành**

Cột tách chiết bằng thuỷ tinh với chiều cao 19 cm đường kính 2,54 cm, bên trong có 3 nón chóp đã đục lỗ được gắn lên thanh thép ở giữa, cách nhau 4 cm, nón chóp dạng rây 24 ( $710\mu\text{m}$ ) với 38% vùng chảy tự do. Thiết bị điều khiển bằng xung, làm cho thân cột chuyển động liên tục, cứ 2,8 cm lên rồi xuống. Bằng cách này một phần pha nhẹ sẽ phun thành bụi và khuếch tán đều hơn. Phần khác được giữ trên đỉnh chóp, tăng diện tích tiếp xúc giữa các pha (Biazús et al, 2007).

#### 1.4.3.4 B. ENZYM ĐỘNG VẬT

- **PEPSIN (EC. 3.4.4.1)**

Pepsin là protease axit có trong màng nhầy dạ dày lợn. Trong màng nhầy dạ dày pepsin ở dạng zimogel. Không hoạt động là pepsinogen, dưới tác dụng của axit có trong dịch vị, pepsinogen được hoạt hoá chuyển thành pepsin hoạt động mạnh ở  $\text{pH}=2$ , hoặc có thể hoạt hoá bằng pepsin lấy từ nguồn động vật khác.

##### a. Cấu tạo

**Thành phần hoá học:** Pepsin chứa N= 14,7%. Ngoài ra còn có 1 ít S tạo thành 3 cầu disunfua và một gốc axit phosphoric kết hợp với nhóm OH của một trong các serin.

Thành phần axit min:

Pepsin chứa nhiều axit amin.

\* Về mặt cấu trúc pepsin là một protein đơn giản toàn bộ chỉ là một mạch polypeptit, đầu "N" là isoleucin, đầu alamin có cấu trúc hình cầu - Hoàn toàn không có cấu trúc bậc hai hoặc chỉ có một phần rất ít cấu trúc xoắn.

- Do phân tử chỉ có một mạch polypeptit nên không có cấu trúc bậc 4.

- Cấu trúc trung tâm hoạt động: Là nhóm COOH của axit aspartic.

Ngoài ra có nhóm phenol của tyrosin tham gia vào việc kết hợp với cơ chất

##### b. Tính chất

Pepsin hoạt động mạnh trong vùng axit ( $\text{pH} 2- 4$ ).  $\text{pH}$  tối ưu của enzym thay đổi tùy theo bản chất và trạng thái của cơ chất. Thường từ  $\text{pH} 1,8-2,2$ .

Pepsin ở trạng thái khô khá bền, ngay cả ở nhiệt độ thường.

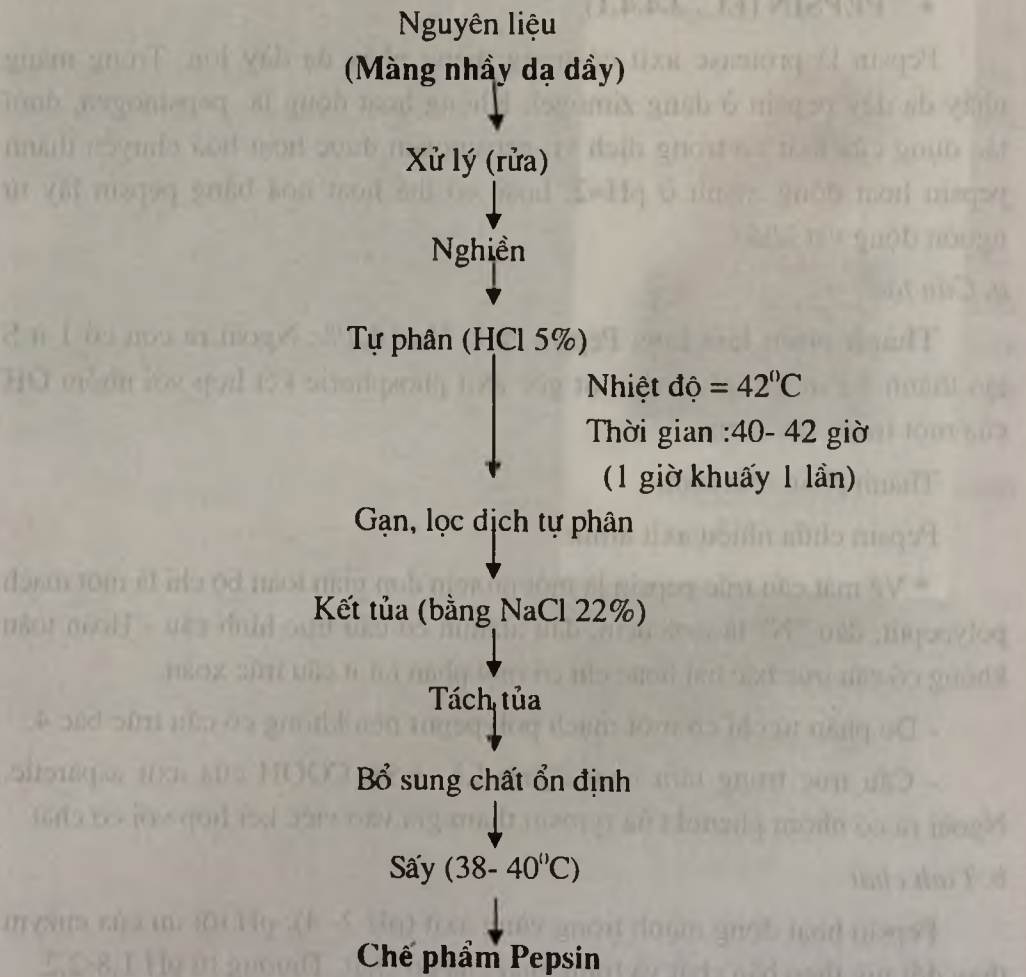


Pepsin bị vô hoạt trong môi trường kiềm nhưng khi đưa về pH tối ưu có thể phục hồi một phần. Tuy nhiên khả năng tái hoạt hoá phụ thuộc vào pH, nồng độ enzym, thời gian biến tính ...

### Đặc tính thuỷ phân

Pepsin có khả năng phân cắt 30% liên kết peptit có trong phân tử protein tạo thành chủ yếu các peptit chứa từ 5 – 8 axit amin, pepsin chỉ phân cắt các liên kết peptit do nhóm amin của axit amin kỵ nước như: phenylalamin, tyrosin, leucin với nhóm COOH của gốc axit glutamic, methionin, glycyl, cystein. Ngoài ra có thể cắt liên kết este.

### Tách, tinh chế pepsin:

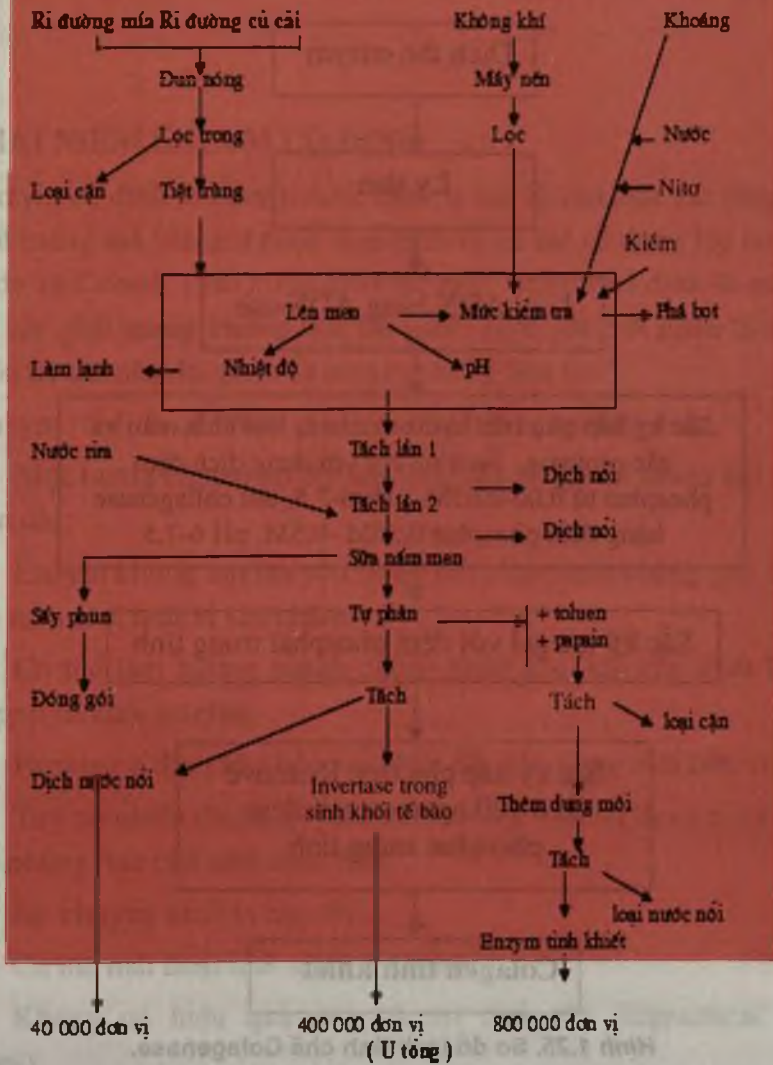


Hình 1.23. Sơ đồ thu nhận pepsin (Gratrêva 1973, Teply 1980).

### 1.4.3.4.C. ENZYM VI SINH VẬT

#### C.1. Thu nhận chế phẩm invertase từ nấm men

Invertase là enzym được phát hiện đầu tiên vào năm 1883, có mặt trong hầu hết các nấm men công nghiệp như men bia, men sản xuất rượu cồn, men bánh mì, ... enzym này xúc tác quá trình chuyển hoá đường saccarose thành đường nghịch đảo (glucose và fructose). Hàng năm trên thế giới sử dụng invertase để chuyển hoá khoảng 10 triệu tấn rỉ đường.

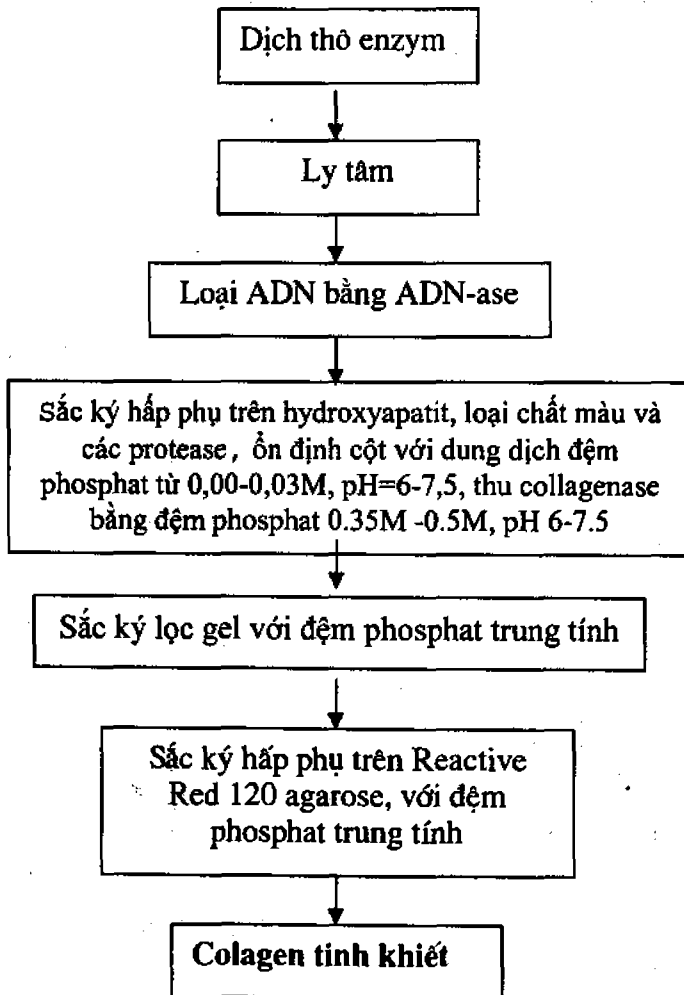


Hình 1.24. Sơ đồ thu nhận invertase (Neuberg et all 1946, tái bản 1985).

## C.2. Thu nhận Collagenase

Collagenase (E.C.3.4.24) là enzym duy nhất có thể thủy phân và thủy phân đặc hiệu các liên kết peptit dạng poly-L-prolin đặc trưng trong vùng xoắn của collagen ở trạng thái tự nhiên của cơ chất thành các mảnh peptid lớn. Chỉ sau tác động của collagenase, collagen mới bị các protease khác tấn công. Collagenase không thủy phân các protein khác như myoglobin, actin...

Collagenase thương mại phổ biến thu nhận từ *Clostridium histolyticum*. Các bước thu nhận collagenase từ vi khuẩn này mô tả như sau:



Hình 1.25. Sơ đồ tách tinh chế Collagenase.

(Bảng sáng chế, Mỹ số 5 332 503, 1994, tác giả Lee và cs).

# ENZYM CỐ ĐỊNH (IMMOBILIZED ENZYMES) (Enzym không tan)

---

### 2.1. KHÁI NIỆM ENZYM CỐ ĐỊNH

Enzym cố định là enzym được định vị vật lý vào một vài vùng xác định trên chất mang mà vẫn giữ được hoạt tính và có thể sử dụng lặp lại nhiều lần (Kennedy và Cabral, 1987). Hoặc có thể nói "enzym cố định là enzym được gắn lên các chất mang không hoà tan hoặc được gắn với nhau bằng liên kết đồng hóa trị tạo nên đại phân tử enzym không hòa tan".

Enzym cố định có nhiều ưu điểm hơn hẳn enzym tự do:

- Một lượng enzym có thể sử dụng lặp đi lặp lại nhiều lần trong một thời gian dài.
- Enzym không tan lẫn vào trong sản phẩm nên không gây ảnh hưởng xấu đến màu sắc, mùi vị sản phẩm.
- Có thể làm ngừng nhanh chóng phản ứng khi cần thiết bằng cách tách enzym ra khỏi cơ chất.
- Enzym cố định khá bền với nhiệt độ, pH, dung môi hữu cơ.v.v..
- Tuy có nhiều thuận lợi như trên, nhưng việc sử dụng enzym cố định cũng có những hạn chế nhất định như:
  - Sự chuyển khối bị hạn chế.
  - Có thể mất hoạt tính sau khi cố định.
  - Không có hiệu quả đối với cơ chất rắn (inpractical for solid substrates).
  - Mất tính thích nghi hình thể.

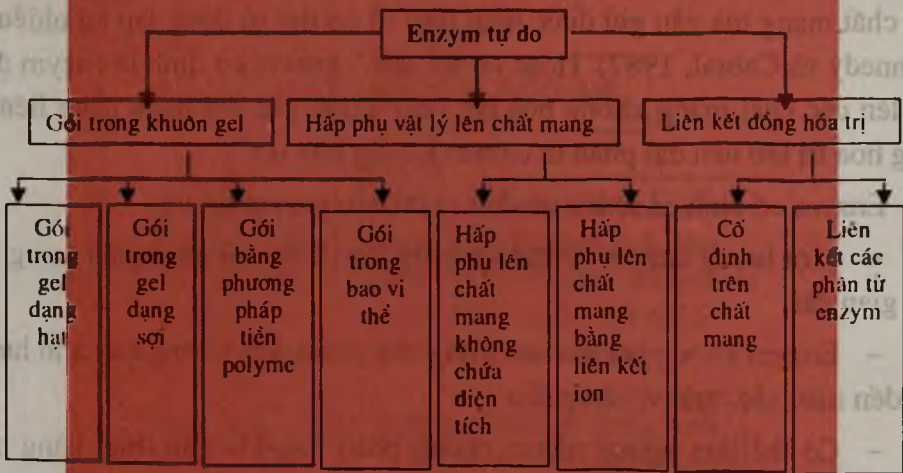
Tuy nhiên những hạn chế trên là không đáng kể so với những lợi ích mà enzyme cố định đem lại. Do vậy ngày càng có nhiều nghiên cứu mới cũng như các công nghệ mới để cố định enzyme.

## 2.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ ENZYM CỐ ĐỊNH

Về nguyên tắc có 3 phương pháp điều chế enzyme cố định:

- Hấp phụ vật lý lên các chất mang có chứa hoặc không chứa điện tích.
- Gắn enzyme vào các chất mang không hòa tan hoặc gắn các phân tử enzyme với nhau bằng liên kết đồng hóa trị tạo đại phân tử enzyme không hòa tan.
- "Gói" enzyme trong khuôn gel.

Có thể biểu diễn sơ đồ các phương pháp cố định enzyme như sau:



Hình 2.1. Các phương pháp cố định enzyme.

### 2.2.1. Gắn enzyme lên chất mang bằng phương pháp hấp phụ vật lý và liên kết ion

\* Nguyên tắc:

Hấp phụ enzyme lên các chất mang nhờ lực tương tác yếu giữa chất mang và protein enzyme như: lực Vandecvan, liên kết hydro và liên kết kỵ nước.

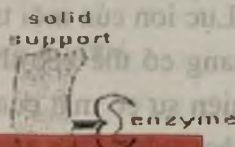
Khi chất mang không có lỗ xốp, enzyme bám trên bề mặt chất mang (hình 2.2).

Khi chất mang có lỗ xốp, enzym chui vào trong các lỗ xốp của chất mang.

Ví dụ enzym được điều chế bằng phương pháp này đầu tiên là:  $\beta$ -D fructofuranosidase trên hydroxyt, nhôm.

Nếu chất mang có chứa điện tích, liên kết giữa enzym và chất mang là liên kết ion (bền hơn so với hấp phụ).

Chàng hạn đã cố định thành công glucoamylase trên DEAE - cellulose hoặc trên DEAE - sephadex sử dụng để sản xuất liên tục glucose.



Hình 2.2. Hấp phụ vật lý lên chất mang.

- Một số chất mang thường sử dụng để cố định enzym bằng phương pháp hấp phụ hay liên kết ion.

- Chất mang hữu cơ: than hoạt tính, cellulose, dextran, agarose, chitin...

- Chất mang vô cơ: silic, thủy tinh xốp, oxyt kim loại.

- Chất trao đổi ion: amberlit, DEAE-Sephadex, CM-sephadex, DEAE-cellulose, CM-cellulose

- Polyme tổng hợp: polyamit, polyacrylamit, polystyrol, nilon, polyvinyl.

\* Phương pháp điều chế: Rất đơn giản. Cho chất mang và enzym tiếp xúc nhau (khuấy trộn), sau đó rửa để loại những phân tử bị gắn yếu lên chất mang.

- Các yếu tố ảnh hưởng đến lượng enzym cố định được và độ bền của liên kết cố định.

- Nồng độ protein enzym: Lượng enzym cố định lên chất mang tỷ lệ thuận với nồng độ của nó ở một giới hạn nhất định.

- pH: pH môi trường phụ thuộc vào số lượng nhóm và bản chất của các nhóm tích điện ở chất mang cũng như ở protein enzym. Sự thay đổi pH thường ảnh hưởng lớn đến lượng enzym cố định được bằng liên kết ion.

Đồng thời sự thay đổi pH đột ngột có thể dẫn đến sự nhả hấp phụ của enzym.

- Lực ion của môi trường: Sự có mặt các ion muối tích điện trái dấu với chất mang có thể kéo theo sự kết tủa cục bộ của protein trong dung dịch. Tuy nhiên sự có mặt của muối cũng có thể làm tăng độ hòa tan của protein do đó làm ảnh hưởng xấu đến hiệu quả cố định.

Bảng 2.1 cho thấy ảnh hưởng của pH đến hiệu suất điều chế invertase cho thấy ảnh cố định bằng phương pháp hấp phụ (Woodward 1985).

**Bảng 2.1. Hiệu suất cố định enzym lên chất mang bằng liên kết ion**

pH	Hiệu suất cố định enzym lên chất mang (%)	
	DEAE-Sephadex trao đổi anion	CM-Sephadex trao đổi cation
pH 2,5	0	100
pH 4,7	100	75
pH 7,0	100	34

- Nhiệt độ: Nhiệt độ tăng làm duỗi mạch protein enzym do đó làm tăng liên kết protein với chất mang. Nhưng hạn chế nhiệt độ cao để tránh làm mất hoạt tính của enzym.

- Khối lượng phân tử và bản chất của chất mang:

Enzym có khối lượng phân tử càng nhỏ thì khả năng hấp phụ càng lớn. Những chất mang chứa nhiều nhóm háo nước hấp phụ tốt hơn và bền hơn.

• Ưu nhược điểm của phương pháp:

- Ưu: Điều chế dễ dàng trong điều kiện nhẹ nhàng nên giữ được hoạt tính enzym. Có thể sử dụng cho tất cả các loại reactor sinh học. Có thể tái sử dụng chất mang.

- Nhược: Do lực tương tác giữa chất mang và enzym yếu nên enzym dễ bị nhả hấp phụ khi khuấy trộn, hoặc thay đổi nhiệt độ, pH, lực ion môi trường.v.v... vì vậy khó áp dụng trong sản xuất thực phẩm và dược phẩm.

### 2.2.2. Phương pháp gắn enzym bằng liên kết đồng hóa trị

Thường có hai phương pháp:

- Gắn enzym lên chất mang bằng liên kết đồng hóa trị.
- Gắn enzym với nhau bằng liên kết đồng hóa trị.

### 2.2.2.1. Gắn enzym lên chất mang bằng liên kết đồng hóa trị

Các chất mang thường sử dụng là:

- Các polyme hữu cơ: Polypeptít, polysaccarit: dextran (sephadex), agarose (sepharose).
- Các dẫn xuất của cellulose: (CM -cellulose), diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose), DEAE-sephadex, CM-sephadex.
- Các polyme tổng hợp: Polyacrylamit, polystirol, polyamit, polyvinyl.
- Các chất vô cơ: Silicagel, bentonit, nhôm hydroxyt.

Các polyme vô cơ bền với các tác nhân lý học (nhiệt, cơ học) hóa học (môi trường axit, kiềm, dung môi hữu cơ), sinh học (vi sinh vật) hơn polyme hữu cơ. Đặc biệt không bị biến đổi cấu hình của khuôn khi thay đổi môi trường xung quanh.

- Các chất mang để gắn enzym phải thoả mãn một số điều kiện sau:
  - Độ hòa tan thấp và bền vững đối với các tác động cơ học, hóa và sinh học.
  - Không gây tác dụng kìm hãm enzym.
  - Không hấp phụ phi chọn lọc đối với các protein khác.
  - Chất mang cơ bản chất háo nước, vì chất mang kỵ nước có thể ức chế enzym vừa được liên kết.

- Chất mang tốt nhất là chất mang có chứa điện tích trái dấu với enzym.

• Các nhóm chức của phân tử protein enzym có khả năng tạo các liên kết đồng hóa trị với chất mang là: nhóm COOH (a aspartic, axit glutamít)  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> (lysin), SH (cystein), OH (serin), nhân indol (tryptophan), imidazol (histidin).

• Các liên kết đồng hóa trị giữa chất mang và enzym có thể phân loại như sau:

- |                         |   |
|-------------------------|---|
| - Diazo hóa             | : Chất mang - N = N - Enzym                             |
| - Tạo cầu amid          | : Chất mang - CO - NH - Enzym                           |
| - Alkyl hóa và aryl hóa | : Chất mang - CH <sub>2</sub> - NH <sub>2</sub> - Enzym |



- Tạo bazơ schiff : Chất mang - CH = N - Enzym
- Trao đổi tiol - disulfua : Chất mang - S - S - Enzym
- Chất mang với chất : Chất mang - O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH-N- Enzym

• Phương pháp gắn enzym lên chất mang bằng liên kết đồng hóa trị có hai phương pháp:

+ Gắn một giai đoạn: Quá trình kết hợp enzym có thể xảy ra qua một giai đoạn nếu chất mang có chứa các nhóm có khả năng tham gia trực tiếp với nhóm amin của protein enzym.

Ví dụ, chất đồng trùng hợp andehyl maleic và các etylen để liên kết đồng hóa trị giữa nhóm ε - amin của lyzin ở phân tử enzym với gốc anhydrit maleic của polyme.

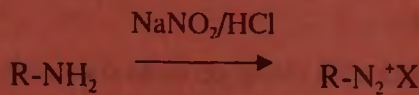
+ Gắn hai giai đoạn:

- Giai đoạn đầu để hoạt hóa chất mang bằng cách đưa vào các nhóm có khả năng phản ứng hơn.

- Giai đoạn hai là giai đoạn kết hợp enzym.

- Các chất mang có chứa nhóm amin như aminobenzoyl-cellulose, polyaminostirol, copolyme của aminophenylalanin có thể được hoạt hóa bằng phản ứng diazo.

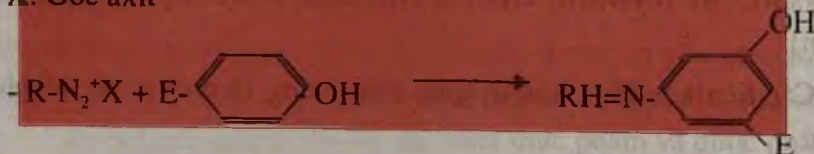
Ví dụ, polyaminostirol trước hết được diazo hóa bằng natri nitrit trong môi trường axit thành muối diazo, sau đó mới kết hợp với enzym:



Muối diazo của chất mang.

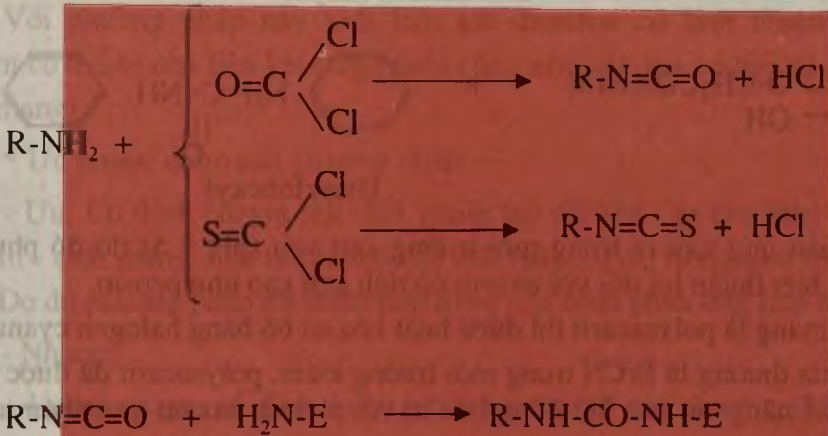
R: Gốc alkyl, aryl.

X: Gốc axit



Phản ứng kết hợp với enzym được tiến hành nhanh chóng trong điều kiện nhiệt độ thường và trong dung dịch nước trung tính.

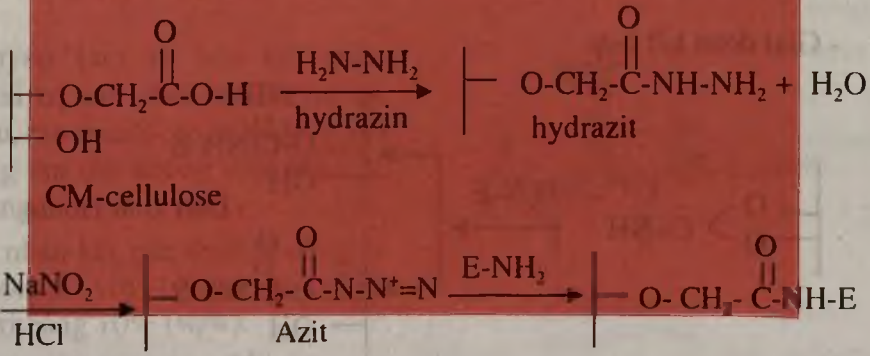
- Chất mang có chứa nhóm amin cũng có thể hoạt hóa bằng cách cho tác dụng với phosgen hoặc tiophosgen để tạo thành dẫn xuất izonianat hoặc izotioxianat. Các nhóm izoxianat hoặc izotioxianat ở pH trung tính sẽ liên kết dễ dàng với gốc N cuối và nhóm ε-amin của enzym.



Bằng phương pháp này người ta điều chế được các dẫn xuất enzym không tan như tripsin, kimotripsin, α, β - amilase, glucoamilase.

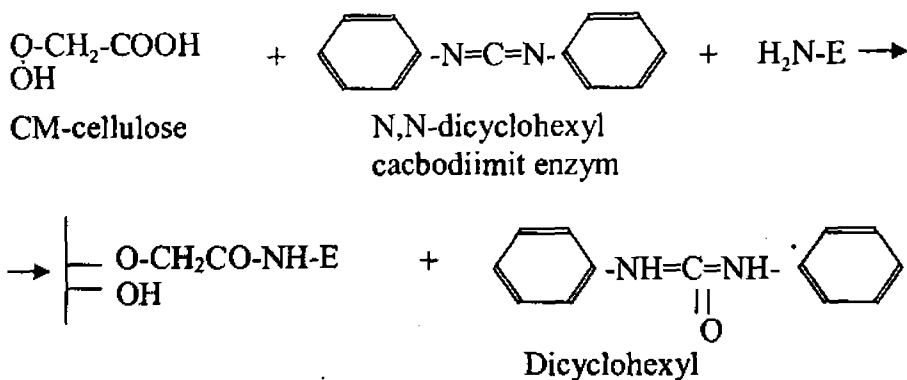
- Nếu chất mang có chứa nhóm COOH như CM-cellulose hoặc nhựa tổng hợp cần được hoạt hóa trước trước khi cho gắn với enzym bằng các phương pháp azit, cacbodiimit, anhydrit kép.

Hoạt hóa bằng phương pháp azit:



Các enzym không tan như tripsin, DNA-ase, chymotrypsin, fixin, bromelin đã được điều chế bằng phương pháp này.

- Hoạt hóa bằng phương pháp cacbodiimit:

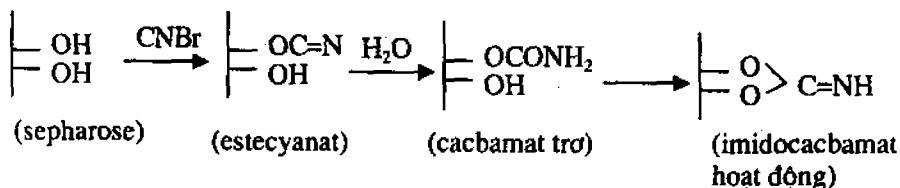


Vì phản ứng xảy ra trong môi trường axit yếu (pH = 5) do đó phương pháp đặc biệt thuận lợi đối với enzym có tính axit cao như pepsin.

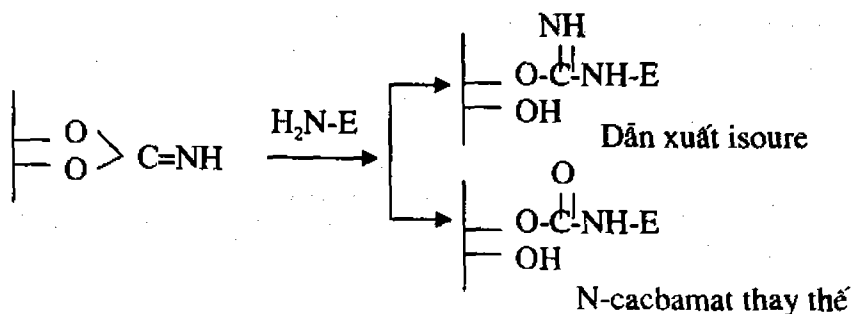
Chất mang là polysacarit thì được hoạt hóa sơ bộ bằng halogen cyanua

Cyanua thường là BrCN trong môi trường kiềm, polysacarit đã được hoạt hóa có khả năng tạo liên kết đồng hóa trị với protein enzym qua nhóm amin bậc nhất.

Porath và bareli lần đầu tiên đã hoạt hóa cellulose, dextran và agarose bằng phương pháp này:

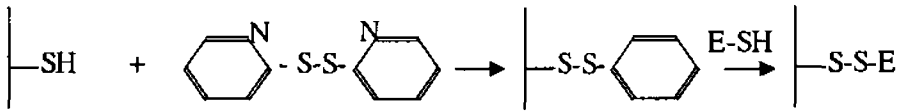


- Giai đoạn kết hợp



- Đối với các chất mang chứa nhóm thiol:

Được hoạt hóa bằng 2,2 - dipyridyldisulfua:



Với phương pháp này mỗi liên kết disulfua có tính thuận nghịch, enzym có thể bị nhả liên kết (tuy nhiên cũng nhờ vậy mà có thể tái hoạt hóa chất mang).

\* Ưu nhược điểm của phương pháp:

- Ưu: Cố định enzym lên chất mang tạo độ bền cao cho liên kết giữa protein - chất mang, nên tránh được sự mất mát enzym trong quá trình phản ứng. Do đó phương pháp rất thích hợp trong các bình phản ứng liên tục.

- Nhược:

+ Lượng enzym cố định thường thấp hơn so với các phương pháp khác.

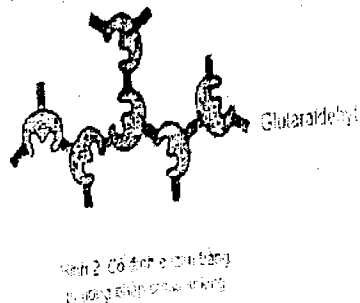
+ Hoạt tính enzym có thể bị giảm do sự biến đổi cấu trúc hình thể enzym trong quá trình cố định và do sự tiếp xúc hạn chế giữa cơ chất và trung tâm hoạt động của enzym.

Do đó khi sử dụng phương pháp cần cân nhắc kỹ giữa hoạt tính và độ bền của enzym. Việc lựa chọn chất mang và phương pháp hoạt hóa được tiến hành cẩn thận bằng các thí nghiệm ở dạng pilot.

### 2.2.2.2. Phương pháp gắn các enzym với nhau bằng liên kết đồng hóa trị

**Nguyên tắc:** là liên kết chéo đồng hoá trị các phân tử enzym lại với nhau, tạo thành cấu trúc đại phân tử không tan mà không cần đến các chất mang.

Tác nhân kết gắn thường dùng là glutaraldehyt với tỷ lệ tác nhân enzym khoảng 10% (w/w).



Hình 2.3. Gắn các enzym bằng liên kết - đồng hóa trị.

Ví dụ: Krechcrds (1964) đã cho các tinh thể "cascocyl-peptidase A" tác dụng với dung dịch aldehytglutaric 1%, sau khi tác dụng enzym trở nên không tan trong NaCl 1M và vẫn giữ được 30% hoạt độ so với ban đầu.

Habecd (1967) cũng đã điều chế dẫn xuất trypsin không tan bằng cách dùng glutaraldehyt 2% để liên kết các phân tử enzym cũng như gắn enzym vào aminoethyl - cellulose.

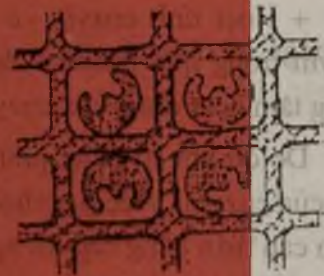
Phương pháp này chi phí cao, kém hiệu quả (điều kiện tiến hành phản ứng khắt khe, hoạt tính enzym giảm do tương tác giữa các phân tử enzym). Tuy nhiên liên kết tạo ra lại rất bền trước các tác nhân pH, nhiệt độ. Vì vậy, phương pháp gắn các enzym với nhau này thường được dùng kết hợp với một trong những phương pháp cố định khác (thường dùng làm bền liên kết enzym chất mang trong phương pháp hấp phụ).

### 2.2.3. Phương pháp gói enzym trong khuôn gel

#### Nguyên tắc:

Phân tử enzym được giữ trong mạng lưới không gian của một polyme không tan trong nước (hình 2.4).

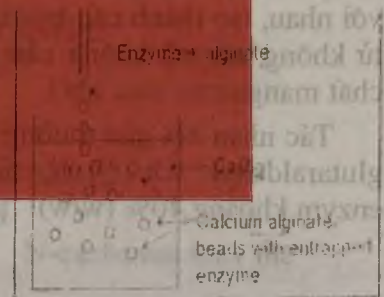
Gel có thể được điều chế từ các polyacrylamid, hydrocylethyl-2-metacrylat tạo mạng lưới bằng etylenglycol-dimetacrylat, polyuretan, polyvinyl, Na-alginat và caraghenan lấy từ rong biển cũng có khả năng tạo gel rất tốt. Các gel dạng sợi có thể là cellulotriaxetal, collagen, chitosan.



Hình 2.4. Cố định enzym bằng phương pháp gói trong khuôn gel.

#### 2.2.3.1. Enzym được gói vào khuôn gel dưới dạng hạt

Enzym được hòa tan trong một dung dịch monome. Sau đó, monome này được polyme hóa với sự có mặt của một hay nhiều tác nhân tạo mạng lưới (reticulation). Gel có thể được cắt thành màng đặt trên một chất mang rắn,



Hình 2.5. Enzym được gói trong gel dạng viên.

hoặc nghiền thành bột sau khi khử nước. Nếu là gel alginat và caraghehan thì có thể tạo khối dưới dạng viên, đường kính 0,5 - 4mm, bằng cách nhỏ giọt dung dịch enzym và alginat natri vào dung dịch giàu  $\text{CaCl}_2$  bền hạt.

### 2.2.3.2. Enzym bị "nhốt" trong các lỗ nhỏ của các sợi tổng hợp

- Enzym được cho vào dung dịch phân tán sợi collagen trong dung môi nước - metanol và có khuấy từ. Các protein đi về phía catot và ở đó nhận được các mạng collagen có "nhốt" enzym.

- Hoặc có thể "nhốt" enzym trong các lỗ nhỏ của sợi tổng hợp bằng cách cho các dòng lỏng chảy tuần hoàn bên trong sợi. Phương pháp này hạn chế được sự phân cực bề mặt và sự bít lấp thường gặp ở phương pháp màng.

- Hoặc dùng phương pháp của Dinelli: Dung dịch nhũ tương của triaxetat cellulose trong metylen-clorua và enzym trong dung dịch đậm chứa glycerol được ép đùn qua một khuôn có lỗ dưới áp suất nitơ. Các sợi ra khỏi khuôn được nhúng vào bể đông tụ có chứa toluen, sau đó sấy khô sợi trong chân không. Sợi tạo ra khá bền với axit yếu, kiềm yếu, lực ion hóa cao và một số dung môi hữu cơ. Nhưng phương pháp này chỉ thích hợp với những enzym không bị mất hoạt tính trong các dung môi không tan lẫn nước.

### 2.2.3.3. Gói enzym trong bao vi thể (Microcapsule)

#### Nguyên tác:

Nhốt enzym trong một bao vi thể (Microcapsule) giới hạn bởi một màng bán thấm. Màng này có kích thước lỗ xốp đủ nhỏ để ngăn chặn sự khuếch tán enzym ra ngoài nhưng đủ lớn để cho cơ chất và sản phẩm đi qua trong quá trình phản ứng.



Hình 2.6. Gói enzym trong bao vi thể.

#### • Cách gói enzym trong bao vi thể

- Polime hóa ở bề mặt liên pha (Interfacial Polymeization): Hỗn hợp nước của enzym và monome háo nước (Glycol) được tạo thành nhũ tương

trong dung môi hữu cơ không lẫn nước. Sau đó thêm monome kỵ nước vào và khuấy. Phản ứng trùng hợp các monome xảy ra trên bề mặt liên pha giữa nước và dung môi hữu cơ trong nhũ tương kèm theo sự tạo thành một màng (polyamit, polyeste...) xung quanh pha nước. Kết quả là enzym trong pha nước bị nhốt trong màng polyme. Thường cho thêm các tác nhân hoạt động bề mặt để làm bền nhũ tương và điều chỉnh kích thước lỗ (từ 1- 100 $\mu$ m) theo ý muốn.

- **Phương pháp sấy lỏng (Liquid Drying)**: Trong phương pháp này, polyme được hòa tan trong dung môi hữu cơ không lẫn nước có điểm sôi thấp hơn điểm sôi của nước. Dung dịch nước của enzym được phân tán trong pha hữu cơ tạo thành nhũ tương dạng nước trong dầu (water-in-oil). Sau đó nhũ tương chứa những vi giọt lỏng được phân tán vào pha nước chứa các chất bảo vệ keo như gelatin, và các chất hoạt động bề mặt tạo thành nhũ tương thứ hai. Từ nhũ tương này, dung môi hữu cơ được loại khỏi bằng phương pháp làm nóng ở chân không. Màng polyme được tạo ra, từ đó hình thành các microcapsule có chứa enzym bên trong.

- **Phương pháp tách pha (Phase Separation)**: Hòa tan polyme có chứa enzym trong một dung môi hữu cơ và tái kết tủa, sau đó làm sạch polyme thu được bằng cách thêm một dung môi hữu cơ khác có thể tan lẫn trong dung môi đầu nhưng không hòa tan polyme.

#### 2.2.3.4. Phương pháp tiền polyme

\* Tạo liên kết chéo giữa các tiền polyme bằng chiếu quang để gói enzym.

Khi chiếu tia cực tím gần (360nm) lên dung dịch có chứa chất tiền polyme, enzym và chất nhạy quang (benzoin etylete, benzoin izobutylete) sẽ tạo ra liên kết chéo giữa các gốc của tiền polyme. Từ đó gel được hình thành và bao lấy enzym.

Các chất tiền polyme thường sử dụng là ENT (metacrylat), PEGM (polyetylenglycoldimetacrylat), ENTP (tổng hợp từ hydroxyetylacrylat), trong đó PEGM và ENT hòa tan trong nước, còn ENTP không tan trong nước.

Phương pháp này có thể tiến hành ở điều kiện nhẹ nhàng tránh được các thay đổi pH quá kiềm hoặc axit trong thời gian ngắn (3-5 phút). Các tính chất hoá lý của gel (như sự cân bằng háo nước - kỵ nước bản chất ion) có thể định hướng trước bằng cách chọn các tiền polyme thích hợp.

- **Phương pháp tiền polyme urêtan**

Cố định enzym bằng cách trộn các chất tiền polyme uretan (thường là polypropylen glycol, polyetylen glycol) với dung dịch nước của enzym. Trong dung dịch nước, các gốc chức năng izoxinat ở hai đầu urêtan phản ứng với nhau tạo thành liên kết chéo ure. Gel được hình thành trong vài phút và bao lấy enzym có thể thu được các tiền polyme háo nước hoặc kỵ nước bằng cách thay đổi tỷ lệ giữa polyetylen glycol và polypropylen glycol. Nếu nồng độ polyetylen glycol cao sẽ tạo gel háo nước (PU-6, PU-9) và ngược lại, nồng độ polypropylen glycol cao sẽ tạo các gel kỵ nước (PU-3).

Ưu nhược điểm của phương pháp gói enzym trong khuôn gel.

- **Ưu**

- Không đòi hỏi phải có các nhóm phản ứng của protein nên thích hợp với nhiều enzym.

- Toàn bộ lượng enzym đều được gói trong khuôn hay trong microcapsule và nhận được bề mặt tiếp xúc giữa enzym và cơ chất lớn trên một thể tích nhỏ.

- Có thể gói đồng thời nhiều enzym trong cùng một khuôn (các enzym này phải có điều kiện hoạt động tối ưu gần nhau).

- **Nhược**

- Enzym cố định bằng phương pháp gói trong khuôn gel chỉ thích hợp cho những phản ứng mà cơ chất có khối lượng phân tử nhỏ. Kích thước của lỗ xốp cần phải đủ lớn để cho cơ chất và sản phẩm đi qua, điều đó cũng đồng thời có thể làm thất thoát enzym. Nếu sử dụng các đại phân tử để cải thiện các lỗ xốp trong mạng lưới thì lại gây sự cản trở không gian, làm giảm hoạt tính của enzym.

- Các điều kiện để tiến hành polyme hóa, đặc biệt là sự tạo các gốc tự do, thường làm biến tính của enzym.



- Gel kém bền (dễ bị đông chặt) nên khó sử dụng trong các reactor kích thước nhỏ (tuy nhiên điều này có thể cải thiện được bằng cách đặt enzyme lên các tấm lưới hoặc các màng plastic).

Tóm lại, mỗi phương pháp cố định enzyme đều có những ưu điểm nhất định, trong đó phương pháp gói trong bao vi thể tỏ ra có ưu điểm hơn cả (bảng 2.2).

Tuy nhiên, lựa chọn phương pháp cố định nào sẽ phụ thuộc nhiều yếu tố khác nhau, do đó cần phải tiến hành nhiều thử nghiệm để có được phương pháp tối ưu. Có điều, dù tiến hành bằng phương pháp nào thì cũng phải lưu ý đến những điểm sau:

- Enzyme phải được ổn định trong điều kiện xảy ra phản ứng.
- Các chất tham gia phản ứng tạo liên kết ngang chỉ tương tác với những nhóm chức năng nằm ngoài tâm hoạt động của enzyme, hoặc:
- Chất tham gia phản ứng tạo liên kết ngang phải có kích thước lớn để không xâm nhập được vào tâm hoạt động của enzyme.
- Tâm hoạt động phải được bảo vệ trong quá trình cố định (có thể thực hiện bằng cách bổ sung vào hỗn hợp phản ứng dung dịch bảo hòa cơ chất của enzyme).
- Lựa chọn biện pháp cố định phải căn cứ vào phản ứng cụ thể và các ưu nhược điểm của phương pháp.

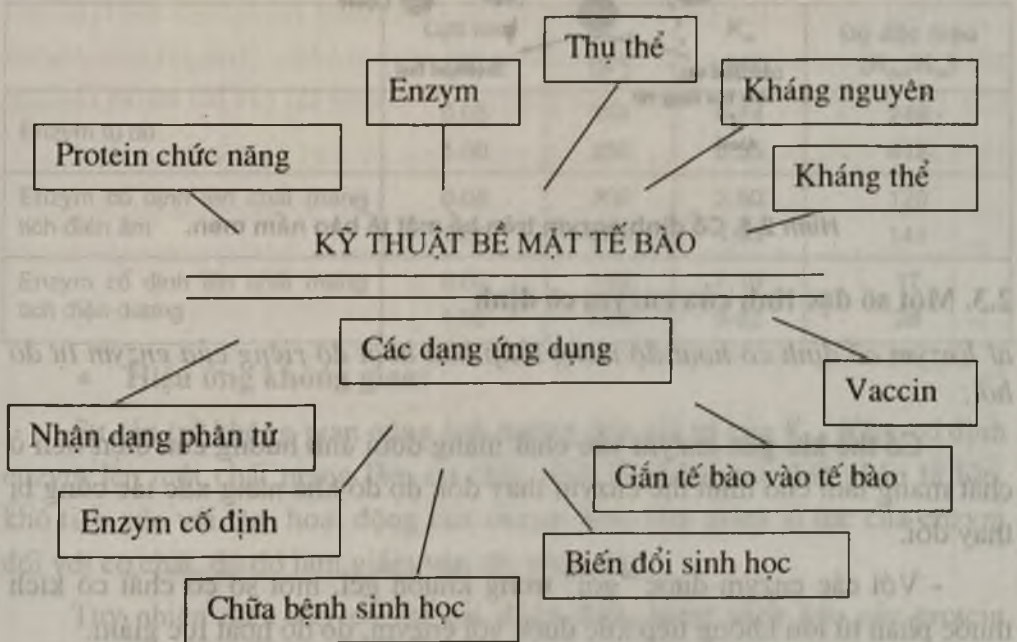
**Bảng 2.2. So sánh các phương pháp cố định enzyme**

Đặc điểm	Phương pháp hấp phụ	Phương pháp liên kết đồng hóa trị	Phương pháp gói trong khuôn gel	Phương pháp gói trong bao vi thể
Phương pháp điều chế	đơn giản	phức tạp	phức tạp	đơn giản
Chi phí	thấp	cao	vừa phải	cao
Lực cố định	thay đổi	mạnh	yếu	mạnh
Hiện tượng nhả cố định enzyme	có	không	có	không
Khả năng áp dụng	rộng rãi	chọn lọc	rộng rãi	rất rộng rãi
Sự cố khi tiến hành	cao	thấp	cao	cao
Ảnh hưởng của chất mang	có	có	có	không
Cản trở khuếch tán lớn	không	không	có	có

#### 2.2.4. Cố định enzym trên tế bào vi sinh vật

Gần đây trên thế giới có khá nhiều công trình nghiên cứu sử dụng bề mặt tế bào vi sinh vật để gắn các chất có hoạt tính sinh học: protein chức năng, enzym, thụ thể, kháng nguyên, kháng thể và ứng dụng vào nhiều lĩnh vực công nghệ khác nhau như: nhận dạng phân tử, cố định enzym, chữa bệnh sinh học, làm biến đổi sinh học, gắn tế bào vào tế bào, sản xuất vaccin.

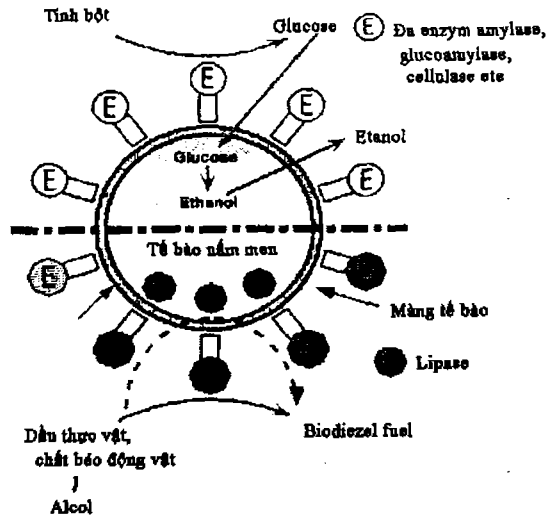
Sơ đồ công nghệ bề mặt tế bào và các ứng dụng được biểu diễn trên hình 2.7.



Hình 2.7. Sơ đồ công nghệ bề mặt tế bào và các ứng dụng.

Trong đó việc nghiên cứu gắn enzym trên bề mặt tế bào vi sinh vật là phương pháp mới cũng được quan tâm. Chẳng hạn người ta đã cố định amylase, glucoamylase, cellulase trên bề mặt tế bào nấm men, chuyển hóa tinh bột và cellulose thành đường glucose một cách dễ dàng. Hoặc người ta cố định lipase để giúp chuyển hóa dầu thực vật và mỡ tạo năng lượng...

Sơ đồ cố định enzym vào nấm men thể hiện trên hình 2.8.



Hình 2.8. Cố định enzym trên bề mặt tế bào nấm men.

### 2.3. Một số đặc tính của enzym cố định

*a/ Enzym cố định có hoạt độ riêng thấp hơn hoạt độ riêng của enzym tự do bởi:*

- Có thể khi gắn enzym vào chất mang dưới ảnh hưởng của điện tích ở chất mang làm cho hình thể enzym thay đổi, do đó khả năng xúc tác cũng bị thay đổi.

- Với các enzym được "gói" trong khuôn gel, một số cơ chất có kích thước phân tử lớn không tiếp xúc được với enzym, do đó hoạt lực giảm.

- Cũng có thể là do tương tác protein - protein giữa các phân tử enzym đã cố định làm biến dạng một phần cấu trúc không gian của phân tử enzym.

*b/ Hằng số động học enzym cố định tuân theo động học Michaelis -Menten.*

Tuy nhiên có những sai khác đáng kể do:

Ái lực giữa cơ chất và chất mang quyết định hằng số  $K_m$  của enzym. Thực tế, một chất mang có chứa các vùng phân cực trên bề mặt sẽ hút cơ chất háo nước và đẩy cơ chất kỵ nước. Cũng như vậy khi cơ chất và chất mang cùng tích điện thì trong môi trường trung gian của enzym sẽ có sự tương tác tĩnh điện (hút hay đẩy) tạo 1 gradient nồng độ. Nếu cơ chất và chất mang có điện tích cùng dấu thì  $K_m$  enzym không tan lớn hơn  $K_m$  enzym hòa

tan ( $K_{mK^+} > K_{m+}$ ), nếu cơ chất và chất mang tích điện trái dấu thì  $K_m$  enzym không tan nhỏ hơn  $K_m$  enzym tan ( $K_{mK^+} < K_{m+}$ ), chất mang không tích điện thì  $K_{mK^+} \geq K_{m+}$  (bảng 2.3).

Cũng như đối với pH, lực ion môi trường tăng sẽ dẫn đến giá trị  $K_m$  của enzym tự do và enzym cố định gần nhau hơn.

**Bảng 2.3. Ảnh hưởng của liên kết đồng hóa trị của chất mang tích điện lên hằng số động học của chimotrysin đối với N-acetyl-L-tyrosin etyl este (Goldstein 1972).**

	Lực ion (M)	$K_{cat}$ (S <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	Độ đặc hiệu ( $K_{cat}/K_m$ )
Enzym tự do	0.05	184	0.74	249
	1.00	230	0.55	418
Enzym cố định lên chất mang tích điện âm	0.05	300	2.50	120
	1.00	280	1.93	145
Enzym cố định lên chất mang tích điện dương	0.05	119	7.10	17
	1.00	1.65	5.82	28

- **Hiệu ứng không gian:**

Sự cản trở không gian cũng ảnh hưởng đến giá trị của  $K_m$ . Việc cố định enzym lên một chất mang làm cơ chất, nhất là những cơ chất phân tử lớn, khó tiếp xúc với tâm hoạt động của enzym hơn, làm giảm ái lực của enzym đối với cơ chất, do đó làm giảm vận tốc phản ứng.

Tuy nhiên điều này có thể cải thiện được bằng cách kéo các protein enzym ra xa cơ chất bằng một cầu trung gian, từ đó làm tăng độ tự do của hệ thống.

- **Hiện tượng khuếch tán:**

Những hạn chế về mặt khuếch tán làm ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của enzym. Tốc độ khuếch tán của cơ chất, sản phẩm và các chất khác phụ thuộc vào các yếu tố:

- Kích thước lỗ gel của chất mang polyme.
- Khối lượng phân tử của cơ chất.

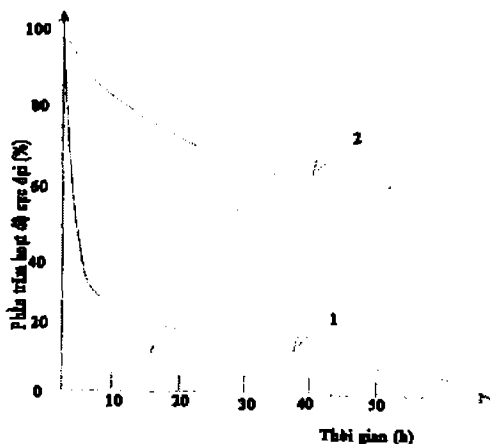
*cl Enzym cố định thường có tính bền nhiệt cao hơn so với enzym tự do.*

Ví dụ: Độ bền nhiệt của enzym tự do và cố định của  $\beta$ -D - glucosidase (hình 2.9).

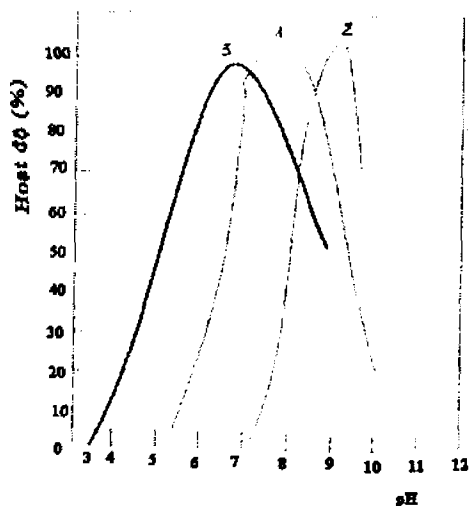
*dl pH tối ưu của enzym cố định thường bị chuyển sang miền kiềm hoặc axit so với pH tối ưu của enzym tự do.*

Sở dĩ có sự sai khác này là do ảnh hưởng của trường tĩnh điện chất mang gây nên. Sự có mặt của trường tĩnh điện mạnh làm nồng độ  $H^+$  ở gần chất mang và trong dung dịch khác nhau.

Nếu enzym liên kết đồng hòa trị với chất mang có điện tích âm thì pH tối ưu sẽ chuyển sang phía pH kiềm so với enzym tự do. Trái lại nếu enzym liên kết đồng hóa trị có chất mang điện tích dương thì pH tối ưu sẽ chuyển sang phía axit.



**Hình 2.9.** Độ bền nhiệt của enzym tự do và cố định:  
1-  $\beta$ -D glucosidase tan;  
2-  $\beta$ -D glucosidase không tan.



**Hình 2.10.** Sự thay đổi pH của các loại chimotrypsin:  
1- chimotrypsin tự do; 2- chimotrypsin cố định trên polyornitin (-);  
3- chimotrypsin cố định trên polyeste axit etylenmaleic(+)

Ví dụ: Chimotrypsin gắn trên chất mang là polyme của axit etylenmaleic thì pH tối ưu bị chuyển dịch về phía kiềm gần 2 đơn vị pH. Nhưng khi gắn trên chất mang polyornitin thì pH tối ưu chuyển về phía axit 2 đơn vị pH.

*el Enzym cố định có thời gian bảo quản lâu hơn và bền với các chất kìm hãm cũng như các tác nhân gây biến tính hơn.*

Ví dụ: trypsin liên kết đồng hóa trị với sephadex bằng bromcyanua giữ trong dung dịch ure sau 24 giờ vẫn giữ được 75% hoạt độ so với ban đầu.

## **2.4. ỨNG DỤNG CỦA ENZYM CỐ ĐỊNH**

### **2.4.1. Ứng dụng trong y học**

\* Enzym cố định được sử dụng để điều trị các bệnh thiếu hệ enzym, tích lũy các sản phẩm độc trong cơ thể. Sử dụng enzym cố định sẽ tránh được sự phá huỷ do các protease của cơ thể gây ra (do phản ứng miễn dịch của cơ thể).

\* Enzym cố định còn được sử dụng để chữa một số bệnh như:

- L-asparaginase cố định trong microcapsule điều trị bệnh bạch cầu, cũng như có khả năng ức chế sự phát triển u ác tính do sự có mặt của L-asparagin.

Chimotrypin, superoxide dismutase chống viêm.

- Streptokinase, urokinase, nattokinase... làm tan các cục máu đông gây tắc nghẽn động mạch, viêm tĩnh mạch.

- Urokinase gắn trong microcapsul đã được sử dụng có hiệu quả để loại ure máu trong chạy thận nhân tạo.

### **2.4.2. Ứng dụng công nghệ hóa học**

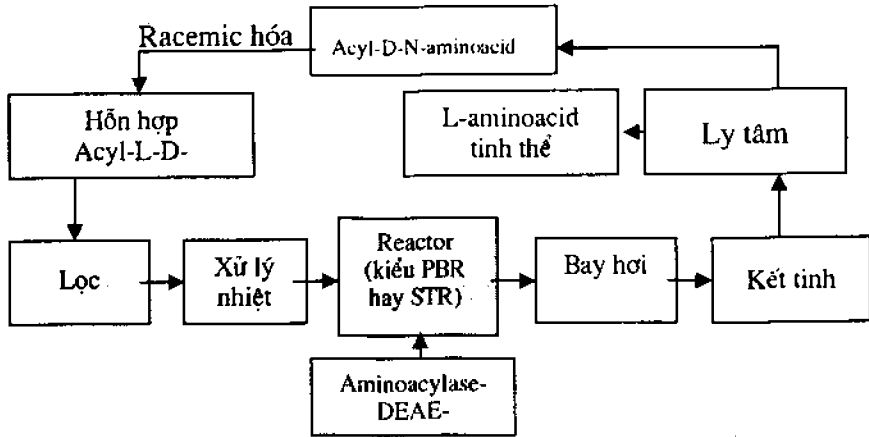
Trong công nghệ hóa học có thể sử dụng enzym để tổng hợp các chất dinh dưỡng, dược liệu như: axit amin, axit hữu cơ, kháng sinh, hoocmon (bảng 2.4).

*a/ Sản xuất L-axit amin sử dụng aminoacylase cố định trên DEAE-sephadex*

Trên cơ sở tính đặc hiệu của amino acylase đối với L-axit amin đã được acetyl hóa (L-N-acetylated amino acid). Người ta sử dụng aminoacylase-DEAE-sephadex để sản xuất L-axit amin từ hỗn hợp racemic (D-L-axit amin). Dựa vào tính hòa tan khác nhau giữa các axit amin tự do và dẫn xuất N-acetyl –axit amin, cho phép thu được dạng L- axit amin, còn acyl-D-axit amin trong dung dịch sau đó đun nóng để chuyển về dạng acyl-D-L-axit amin và quá trình trên được lặp lại. Ví dụ, muốn thu nhận L-methionin : nồng độ ban đầu của acetyl-D-L-methionin là 0,2M, sau khi cho 2000lit hỗn hợp

chạy qua cột phản ứng có chứa enzym cố định, cho bay hơi và kết tinh, thu được 27 kg L-methionin (đạt 91% so với lý thuyết), dịch chứa acetyl-D-methionin được xử lý ở 60°C với anhydrid acetic (quá trình racemic hóa), sau đó axit hóa đến pH 1,8 để thu hồi acetyl-D-L methionin.

Quá trình sản xuất L- axit amin thể hiện ở sơ đồ hình 2.11.



Hình 2.11. Sơ đồ sản xuất L-axit amin bằng aminoacylase –DEAE- Sephadex.

Ngoài ra có thể sử dụng enzym cố định để sản xuất một số chất khác theo bảng 2.4.

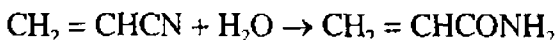
Bảng 2.4. Một số ứng dụng của enzym cố định trong công nghiệp

Enzym cố định	Sản phẩm
Aminoacylase	L-Amino acid
Aspartate ammonialyase	L-Aspartic acid
Aspartate decarboxylase	L-alanin
Cyanidase	D- formic acid
Gluco amylase	D-glucose
Gluco-isomerase	Siro ngô nồng độ fructose cao (High Fructose Com Sirup - HFCS)
Hystidin ammonialyase	Axit urocanic
Dihydropyri midinase	D và L - aminoaxit
Invertase	Đường nghịch đảo
Lactase (β-galactosidase)	Sữa không có lactose
Lipase	Chất thay thế bơ cacao
Nitril hydratase	Acrylamit
Penicillium amidase	Penicillin
Raffinase	Đường không có raffinose
Thermolysin	Aspartan

Phương pháp sản xuất L-axit amin này đặc biệt phát huy ưu điểm đối với các axit amin khó thu nhận được bằng con đường lên men (như L-alanin, L-phenylalanin, L-tryptophan, L-valin).

#### b. Sản xuất Acrylamit

Sản xuất acrylamit bằng phản ứng cộng nước vào acrylonitril:



Sử dụng enzym cố định nitril hydratase (thường gọi là nitrilase), thu nhận từ *Rhodococcus*, chứa ít hoạt tính amidase nên tránh sinh ra các acrylic axit không mong muốn từ acrylamit. Enzym được gói trong gel polyacrylamit/ dimethylaminoethylmetacrylat 10% (w/w) liên kết chéo, dạng hạt. Phản ứng ở 10°C, pH 8,0 - 8,5, nồng độ cơ chất acrylonitril dưới 30% (w/w), nồng độ enzym 1% (w/w). Nồng độ sản phẩm thu được trên 20% acrylamit, chứa các acrylic axit dưới 0,02%.

#### c. Sản xuất kháng sinh.

6-Aminopenicillin acid (6-APA) là một loại kháng sinh quan trọng thuộc họ ampicillin. Có thể thu nhận bằng cách thủy phân penicillin G (benzyl penicillin) hoặc penicillin V (phenoxymethylpenicillin) bằng enzym penicillin amidase cố định.

Penicillin amidase đặc hiệu với penicillin G được thu nhận từ *E.coli* hoặc *Bacillus megaterium*. Còn enzym đặc hiệu với penicillin V thu nhận được từ *penicillium chrysogenum* hoặc *Fusarium*.

Penicillin amidase từ *E.coli* có thể được cố định trên một số chất mang như sephadex hoạt hóa bởi cyanogen bromua, sử dụng thích hợp đối với các reactor làm việc gián đoạn hay liên tục kiểu STR (35°C, pH 7,8, 2 giờ) hoặc kiểu PBR. Cũng có thể cố định bằng phương pháp hấp phụ trên DEAE-cellulose, dùng PBR.

### 2.4.3. Ứng dụng trong công nghệ môi trường

Enzym cố định được sử dụng một cách có hiệu quả trong công nghệ môi trường (xử lý nước thải...) bằng phương pháp sinh học.

Ví dụ: Sử dụng enzym cố định để loại nitrat trong nước uống.

Nguyên tắc là khử nitrat (độc tính) thành N<sub>2</sub> (không độc) bởi 3 enzym:



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

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

Do NaR kém bền nên có thể trộn thêm hỗn hợp nitrat reductase ưa nhiệt và ưa muối vào reactor để mở rộng phạm vi hoạt động tối ưu của enzym. Hoặc có thể cho thêm một isozym reductase biến hình bằng phương pháp sinh học phân tử để tăng thêm khả năng phản ứng.

Các thử nghiệm với các bioreactor quy mô nhỏ như trên đã cho kết quả tốt khi xử lý nước uống. Tuy nhiên, để ứng dụng khả thi ở quy mô công nghiệp, còn có hai cản trở chính đó là:

- Chi phí cho enzym cao (nhất là NaR).
- Vận chuyển electron đến tâm hoạt động của enzym khó khăn.

Để khắc phục hai trở ngại trên, việc nghiên cứu tách tinh chế NaR từ nấm men và NiR, NoR từ vi khuẩn, cũng như nghiên cứu kỹ thuật cố định, sử dụng thử các vật liệu khác nhau, kể cả một số vật liệu mới như polytic graphit đang được tiến hành và hy vọng sẽ có những kết quả khả quan.

#### 2.4.4. Ứng dụng trong công nghệ thực phẩm

Enzym cố định được sử dụng rộng rãi trong công nghệ thực phẩm (bảng 2.4).

##### *a/ Sản xuất glucose:*

Sử dụng glucoamylase để sản xuất dịch glucose nồng độ cao (92-96%) từ tinh bột đã thủy phân bởi  $\alpha$ -amylase. Glucoamylase có thể cố định bằng liên kết acetonic đồng thời tạo liên kết chéo bởi glutaraldehyt.

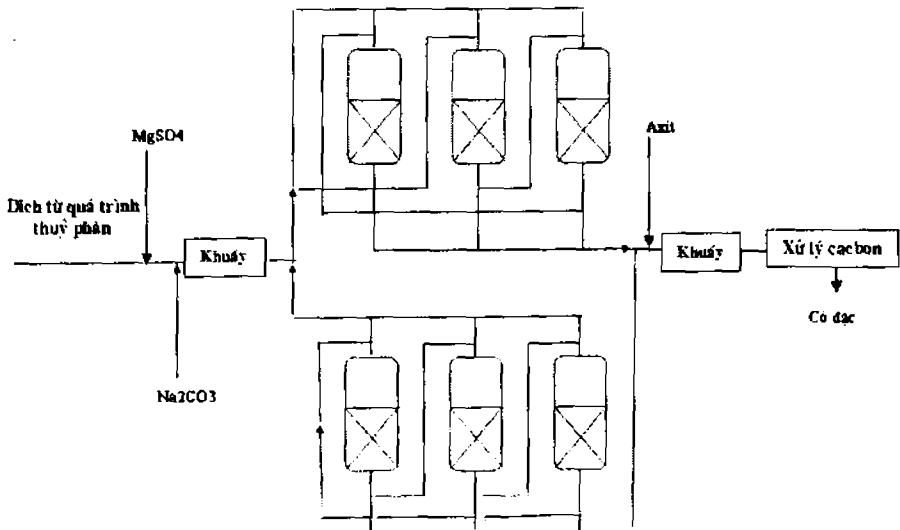
### h) Sản xuất siro ngô với nồng độ fructose cao (HFCS)

Dịch glucose nồng độ cao có thể được sản xuất bằng glucoamylase. Tuy nhiên độ ngọt của glucose thấp (73% độ ngọt của saccarose). Trong khi đó đường fructose ngọt 174% so với đường saccarose và có độ ngọt gấp 2,5 lần glucose. Do đó nếu chuyển một phần glucose trong dịch thành fructose thì có thể cho độ ngọt tăng lên đáng kể ở cùng nồng độ. Kỹ thuật này có thể được tiến hành với enzym glucoisomerase cố định.

Gluco-isomerase thu nhận từ *Antinoplane misouriensis*, *bacilluscoagulans*, các chủng *streptomyces*. Đây là những enzym có độ bền nhiệt cao và khả năng tác dụng ở nồng độ cơ chất cao.

Có nhiều phương pháp cố định khác nhau được sử dụng cho các enzym từ các nguồn vi sinh vật khác nhau, nhưng chủ yếu là dùng phương pháp liên kết chéo (Crosslinking) các enzym nhờ tác nhân glutaraldehyt.

Hiện nay thường thực hiện phản ứng đồng phân hóa glucose thành fructose trong PBR (cho hiệu quả tốt hơn). Dịch cơ chất có nồng độ cao (35-45% chất khô, 93-97% glucose), thực hiện phản ứng ở 55-60°C, pH 7,5 - 8,0 (điều chỉnh bằng  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), cho thêm  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  để hoạt hóa enzym ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{CO}^{2+}$  là cofactor của enzym). Sản phẩm thu được chứa 42-46% (w/w) fructose, 49-53% glucose, còn lại là các oligosaccarit. Để sản xuất 100 tấn (chất khô) chứa 42% HFCS/ngày, cần lượng enzym khoảng  $4\text{m}^3$ .



Hình 2.12. Sơ đồ dây chuyền sản xuất dịch fructose (100 tấn/ngày).

Sau khi đông phân hóa, pH của dịch từ 4-5, được làm sạch bằng sắc ký trao đổi ion và xử lý với than hoạt tính. Sau đó cô đặc để thu hồi được dịch khoảng 70% chất khô. Nếu muốn thu được dịch fructose nồng độ cao hơn (ví dụ 55%-có độ ngọt bằng saccarose ở cùng nồng độ), có thể sử dụng cột sắc ký zeolit hoặc muối canxi của nhựa trao đổi ion để hấp phụ và tách fructose ra khỏi các chất khác. Sau đó cho dòng dịch fructose 90% trộn với dòng dịch 42% sẽ cho dịch 55%.

#### *c/ Sản xuất sữa và sữa whey không có lactose (LACTAID)*

Sử dụng  $\beta$ -galactosidase (lactase) thủy phân lactose (một loại disaccarit khó tiêu hóa thường gặp trong sữa) thành glucose và galactose là những đường dễ tiêu hóa hơn, độ ngọt cao hơn đồng thời ít bị kết tinh.  $\beta$ -galactosidase được thu nhận từ *Saccharomyces lactis*, *Kluiveromyces fragillis* và *Aspergillus niger*. Enzym từ *Saccharomyces lactis* (có  $pH_{opt} = 6,6 - 6,8$ ) và *Kluiveromyces fragillis* (có  $pH_{opt} = 6,4 - 6,8$ , cố định bằng cách “gói” trong sợi cellulose triaxetat, sợi được cắt ra và sử dụng thiết bị phản ứng gián đoạn STR ở  $5^{\circ}C$ ) được dùng cho sữa và whey ngọt. Còn enzym từ *Aspergillus niger* (có  $pH = 3,5 - 4,5$ , cố định trong silic dioxit rỗng đường kính 0,5mm, sử dụng thiết bị phản ứng dạng cột PBR) được dùng cho sữa chua.

#### *d/ Sản xuất đường nghịch đảo*

Sử dụng enzym invertase để chuyển saccarose thành glucose và fructose (đường nghịch đảo - có thể dùng trong sản xuất mứt cho khả năng giữ ẩm tốt hơn) mà không tạo màu như trong trường hợp thủy phân bằng axit.

Invertase được thu nhận từ nấm men *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Saccaromyces carlbergensis*, cố định trên rafle của ngô bằng liên kết đồng hóa trị hoặc dùng phương pháp tạo liên kết chéo (cross-linking) (thời gian bán hủy 90 ngày,  $pH = 5,5$ ,  $t^{\circ} = 50^{\circ}C$ , có thể sử dụng thiết bị phản ứng dạng cột PBR với thời gian lưu 15ph, chuyển được 95%). Một lít enzym dạng viên có thể sản xuất được 15 tấn siro nghịch đảo (tính theo chất khô).

#### *e/ Sản xuất dịch đường không chứa raffinose*

Sử dụng raffinase ( $\alpha$ -D-galactosidase) (thủy phân raffinose thành galactose và saccarose) được thu nhận từ nấm *Mortierella vinaacea*

(raffinoseutilizer). Nấm phát triển dưới dạng hạt, được thu nhận, sấy khô và sử dụng trực tiếp như enzym cố định.

Enzym được khuấy với nước chiết củ cải đường, trong thiết bị phản ứng (BSTR batch). Khi raffinose đã thủy phân hoàn toàn, cánh khuấy ngừng hoạt động và nước chiết được bơm ra khỏi thùng chứa enzym. Enzym được thay mới cho mẻ tiếp theo. Galactose sinh ra bị phân huỷ trong môi trường kiềm ở giai đoạn làm trong dịch và không ảnh hưởng gì khi thu hồi đường saccarose.

Raffinase cố định cũng có thể được sử dụng để loại raffinose và stachyose từ sữa đậu tương.

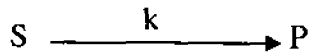
### 3.1. ĐỘNG HỌC CỦA ENZYM MONOME

Như chúng ta đều biết, một chất xúc tác dù là hóa học hay sinh học đều có tác dụng làm tăng vận tốc của phản ứng. Vận tốc của phản ứng enzym là lượng cơ chất bị chuyển hóa hoặc lượng sản phẩm được tạo thành trong một đơn vị thời gian. Thông thường, lượng cơ chất hoặc lượng sản phẩm được biểu diễn bằng nồng độ phân tử (M) và đơn vị thời gian là giây.

#### 3.1.1. Thứ bậc của phản ứng

##### 3.1.1.1. Phản ứng bậc nhất

Một phản ứng bậc nhất thường tương ứng với sự chuyển đổi chỉ một cơ chất thành sản phẩm:



S - hàm số mũ của thời gian :  $[S] = [S_0] \exp^{-kt}$

K - hằng số vận tốc.

Lấy log ta được phương trình ở dạng tuyến tính :

$$\ln[S] = -kt + \ln[S_0] \quad (3.1)$$

Ta thấy, vận tốc của phản ứng ở thời điểm t được xác định bằng số các phân tử P tạo thành (hoặc số các phân tử cơ chất bị mất đi) trong một đơn vị thời gian:

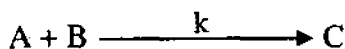
$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[S]$$

Nếu nồng độ được biểu diễn bằng mol/lít hoặc M và thời gian được biểu diễn bằng giây (s) thì  $v \approx M \times s^{-1}$  và k là bằng  $s^{-1}$ .

Ta thấy vận tốc  $v$  của phản ứng sẽ giảm theo thời gian và sẽ tiến đến không khi  $t$  tăng. Hằng số vận tốc chỉ phụ thuộc vào một cơ chất và nồng độ của cơ chất này liên tục bị giảm. Trong thực tế, nếu nồng độ cơ chất rất cao, thì có thể coi như là không đổi trong quá trình phản ứng, khi phản ứng được xem xét trong khoảng thời gian ngắn. Trong điều kiện này vận tốc phản ứng là không đổi, lượng sản phẩm tạo ra chỉ phụ thuộc vào thời gian phản ứng và phản ứng có thứ bậc không.

### 3.1.1.2. Phản ứng bậc hai

Phản ứng bậc hai thường được biểu diễn dưới dạng phương trình phản ứng sau :



Là một phản ứng có 2 cơ chất phản ứng với nhau để cho một (hoặc nhiều) sản phẩm.

Vận tốc phản ứng có thể viết :

$$v = \frac{d[C]}{dt} = k [A] [B]$$

Ở đây, ta thấy  $v$  tỉ lệ với một sản phẩm hai nồng độ.

Vận tốc  $v$  luôn được biểu diễn bằng  $M \times s^{-1}$ , còn hằng số vận tốc  $k$  được biểu diễn bằng  $M^{-1} \times s^{-1}$

Nếu 1 trong 2 cơ chất chẳng hạn  $A$  rất lớn so với  $B$  thì nồng độ  $[A]$  thực tế coi như không đổi và bằng nồng độ ban đầu  $[A]_0$  trong thời gian phản ứng và  $v$  có thể viết :

$$V = k' [B]$$

trong đó  $k' = k[A]_0$

Điều này có nghĩa là một phản ứng bậc hai có thể xem như một phản ứng bậc 1 nếu 1 trong 2 cơ chất có nồng độ rất lớn. Chẳng hạn phản ứng thủy phân một cơ chất :



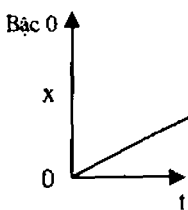
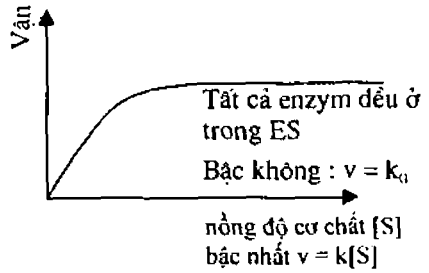
Ở đây phản ứng là bậc nhất đối với nồng độ  $[A-B]$  vì nước là rất lớn. Và dù thứ bậc của phản ứng thế nào thì  $v$  là một hàm nghịch biến của thời gian vì lẽ các nồng độ cơ chất giảm trong khi nồng độ sản phẩm lại tăng.

Vậy  $v$  là một tham số biến đổi mà người ta chỉ có thể đo trong những điều kiện đặc biệt, là điều kiện mà có  $v$  không đổi. Các điều kiện này được gọi là điều kiện ban đầu và vận tốc này được gọi là vận tốc đầu.

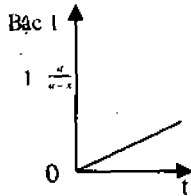
Vậy khi nồng độ của cơ chất thấp phản ứng xảy ra có thứ bậc 1

$$v = k_1[S]$$

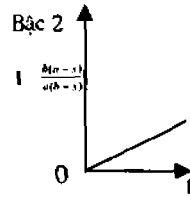
Còn khi nồng độ của cơ chất khá cao thì phản ứng có thứ bậc không :  $v = V_{\max}$



$$k_0 = \frac{x}{t} \text{ (M.s}^{-1}\text{)}$$



$$k_1 = \frac{2,303}{t} \log \frac{a}{a-x} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$



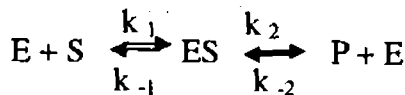
$$k_2 = \frac{2,303}{t(a-b)} \log \frac{b(a-x)}{a(b-x)} \text{ (M}^{-1}\text{.s}^{-1}\text{)}$$

Hình 3.1. Ảnh hưởng nồng độ cơ chất tới thứ bậc phản ứng enzym x- lượng cơ chất bị chuyển hóa trong thời gian t.

### 3.1.2. Động học của enzym monome có một cơ chất

#### 3.1.2.1. Mô hình Michaelis

Sự xúc tác của enzym thường được thực hiện bằng cách tạo ra ít nhất một phức hợp tạm thời giữa enzym và cơ chất. Mô hình đơn giản nhất là mô hình của Michaelis. Mô hình này thừa nhận rằng phản ứng chỉ xảy ra với một cơ chất và tạo thành chỉ một sản phẩm:



#### a) Các pha của phản ứng enzym

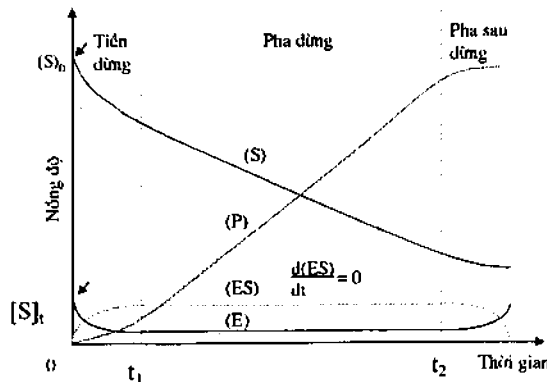
- Khi enzym và cơ chất của nó có mặt dưới dạng dung dịch thì phức ES được tạo thành một cách nhanh chóng và tăng theo thời gian, đặc biệt là khi

S có nồng độ rất lớn. Người ta nói là phản ứng ở trạng thái tiền dừng (prestationary phase), thường pha này chỉ kéo dài trong khoảng thời gian vài phần ngàn giây.

- Khi pha này kết thúc thì phản ứng bắt đầu vào trạng thái dừng (stationary phase). Ở trạng thái dừng, cơ chất vẫn bão hòa enzyme, phức hợp ES có nồng độ cực đại và ổn định. Lượng sản phẩm tạo ra tăng lên một cách tuyến tính. Người ta nói phản ứng đang ở trong điều kiện ban đầu. Vận tốc phản ứng lúc này không đổi và phản ứng có thứ bậc không. Vận tốc này được gọi là vận tốc đầu và đặc trưng cho pha dừng. Đôi khi người ta cũng gọi là vận tốc dừng vì nó vẫn giữ không đổi chừng nào nồng độ S còn bão hòa enzyme. Điều kiện ban đầu thường có thời gian phản ứng ngắn (một số phút và có thể tới hàng chục phút) và lượng cơ chất được tạo thành sản phẩm còn rất ít (do đó có thể bỏ qua phản ứng nghịch).

- Sau một thời gian dài hay ngắn phụ thuộc vào enzyme (thường từ vài phút đến vài giờ) lượng cơ chất bị cạn kiệt và nồng độ phức ES cũng giảm dần theo. Vận tốc phản ứng giảm và cuối cùng triệt tiêu hoàn toàn. Phản ứng ở trạng thái sau dừng (post – stationary state).

Dựa vào cơ chế và các quá trình có thể chia phản ứng enzyme ra hai giai đoạn :



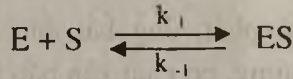
**Hình 3.2. Các pha của phản ứng enzyme một cơ chất.**

*b/ Hai giai đoạn của phản ứng enzyme*

Trong những điều kiện ban đầu, nồng độ của cơ chất là rất lớn so với nồng độ enzyme:  $[S]_0 \gg [E]_0$ , ta có thể mô tả quá trình enzyme qua hai giai đoạn kế tiếp nhau.



\* **Giai đoạn đầu:** phức hợp enzym cơ chất được tạo thành một cách nhanh chóng và thuận nghịch nhờ các tương tác phi đồng hóa trị giữa cơ chất và các axit amin nhận biết của tâm hoạt động của enzym.

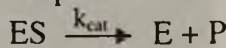


Sự kết hợp giữa E và S là một phản ứng bậc 2, nên hằng số kết hợp  $k_1$  được đo bằng  $M^{-1} \times s^{-1}$ , còn sự phân ly phức ES là phản ứng bậc 1 nên  $k_{-1}$  được đo bằng  $s^{-1}$ .

Thường tỷ số  $k_1/k_{-1}$  là khá cao và được gọi là hằng số ái lực  $k_{a1}$  của enzym đối với cơ chất :

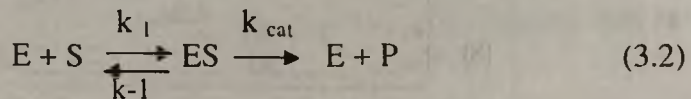
$$k_{at} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

- **Giai đoạn 2 (giai đoạn xúc tác) :** gồm một chuỗi các phản ứng trung gian nhằm biến đổi phức ES thành trạng thái quá độ trong đó cơ chất được liên kết với các gốc axit amin xúc tác của tâm hoạt động enzym (thường bằng liên kết đồng hóa trị). Rồi trạng thái quá độ này sẽ tự chuyển hóa thành phức enzym- sản phẩm và cuối cùng phức enzym -sản phẩm sẽ phân ly thành enzym tự do và sản phẩm :



Vậy là toàn bộ chuỗi sự kiện này đều có liên quan với các axit amin xúc tác và vận tốc chung (tổng) của quá trình này thường được đặc trưng bởi hằng số xúc tác  $k_{cat}$ . Vì phản ứng tổng là phản ứng bậc nhất đối với phức ES do đó  $k_{cat}$  được biểu thị bằng  $s^{-1}$ .

Và quá trình enzym tổng thể có thể viết :



Thường thì giai đoạn xúc tác chậm so với giai đoạn tạo ra phức ES do đó hằng số xúc tác  $k_{cat}$  ( $k_2$ ) nhỏ hơn hằng số kết hợp  $k_1$ .

- **Vận tốc đầu**

Theo (3.2) vận tốc đầu có thể viết :

$$v_0 = \left( \frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} = k_{cat}[ES]$$

Vì trong pha đầu, sự hình thành mỗi mol P đều tương ứng với sự chuyển hóa một mol [ES]. Do đó việc tính  $v_0$  có liên quan với việc tính nồng độ [ES].

### 3.1.2.2 Giả thuyết của Brigg và Haldane

Để tính toán nồng độ này, Brigg và Haldane đã đề ra giả thuyết về trạng thái gần dừng hoặc dừng bề ngoài (biểu kiến). Họ coi rằng nồng độ [ES] là không đổi trong giai đoạn ban đầu, có nghĩa là vận tốc tạo thành ES ( $v_a$ ) bằng vận tốc phân giải phức ES ( $v_d$ )

$$v_a = k_1[E][S]$$

$$v_d = k_{-1}[ES] + k_{cat}[ES]$$

Vậy phương trình ở trạng thái dừng có thể viết :

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_{cat})[ES]$$

hay 
$$K_m[ES] = [E][S] \text{ với } K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad (3.3)$$

$K_m$  được gọi là hằng số Michaelis - Menten.  $K_m$  được đo bằng nồng độ mol (M).

### 3.1.2.3. Phương trình Michaelis - Menten

Enzym là một chất xúc tác nên trong quá trình phản ứng số lượng enzym tổng không thay đổi, có nghĩa :

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

Thay  $[E] = [E]_0 - [ES]$  vào trong phương trình Brigg-Haldane (3.3), ta được:

$$K_m[ES] = ([E]_0 - [ES])[S]$$

hay 
$$(K_m + [S])[ES] = [E]_0[S]$$

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{[S] + K_m}$$

Vậy 
$$v_0 = k_{cat}[ES] = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{[S] + K_m} \quad (3.4)$$

Phương trình này gọi là phương trình Michaelis –Menten. Nếu tất cả phân tử enzym đều ở trong phức với cơ chất thì nồng độ [ES] bằng nồng độ tổng của enzym [E]<sub>0</sub>. Vận tốc đầu của phản ứng sẽ đạt đến giá trị cao nhất của nó : vận tốc cực đại :

$$v_0 = V_{max} = k_{cat}[E]_0$$

Phương trình Michaelis –Menten (3.4) có thể viết :

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \quad (3.5)$$

Vậy vận tốc cực đại sẽ đạt được nếu nồng độ cơ chất là rất lớn so với nồng độ enzym. Hằng số K<sub>m</sub> có thể xác định như giá trị của nồng độ cơ chất mà tại đó vận tốc đầu bằng một nửa vận tốc cực đại.

- Hằng số K<sub>m</sub> cũng liên quan với ái lực của enzym đối với cơ chất :

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} = \frac{1}{k_{a1}} + \frac{k_{cat}}{k_1}$$

Ở trên, ta đã thấy hằng số k<sub>cat</sub> là rất nhỏ so với k<sub>1</sub> nên có thể coi K<sub>m</sub> = 1/k<sub>a1</sub>, có nghĩa là K<sub>m</sub> bằng nghịch đảo của hằng số ái lực.

Vậy việc đo hằng số K<sub>m</sub> là một cách tốt để đánh giá ái lực của một enzym đối với một cơ chất đã cho.

- Thường hiệu quả xúc tác của enzym được đánh giá qua hằng số đặc hiệu k<sub>A</sub> :

$$k_A = \frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_{cat}}{k_{-1} + k_{cat}} = \frac{k_1}{1 + \frac{k_{-1}}{k_{cat}}}$$

k<sub>1</sub> là giới hạn trên của tỷ số này và tỷ số này sẽ đạt đến giới hạn trên nếu k<sub>1</sub> là bé so với k<sub>cat</sub>.

k<sub>1</sub> lại bị giới hạn bởi vận tốc khuếch tán của enzym và cơ chất đến với nhau nên không thể vượt qua giá trị tối đa của vận tốc khuếch tán này, thường vào khoảng 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>

Với một enzym có k<sub>1</sub> và k<sub>cat</sub> = 10<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>; k<sub>1</sub> = 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> sẽ có các giá trị như sau: k<sub>a1</sub> = 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> :

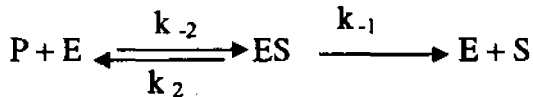
$$K_m = 2 \times 10^6 \text{ M} \Rightarrow \frac{1}{K_m} = 0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$$

Vậy

$$k_{al} = \frac{2}{K'_m} \cdot \frac{k_{-1}}{K'_m} = 0,5 \cdot 10^5$$

### 3.1.2.4. Tính thuận nghịch và hệ thức Haldane

Ở chừng mực nào đó, các phản ứng enzym đều có tính thuận nghịch, có nghĩa là các enzym có thể xúc tác cả phản ứng ngược :



Ta có thể viết :

$$v = \frac{V'_{max}[P]}{(K'_m + [P])} \quad \text{với } K'_m = \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_2}$$

Vận tốc cực đại của phản ứng thuận  $V'_{max}$  :

$$V'_{max} = k_2[E]_0$$

Vận tốc của phản ứng nghịch,  $V'_{max}$  :

$$V'_{max} = k_{-1}[E]_0$$

Ta có thể suy ra :

$$\frac{K'_m}{K_m} = \frac{k_1}{k_{-2}} \quad \frac{V'_{max}}{V_{max}} = \frac{k_2}{k_{-1}}$$

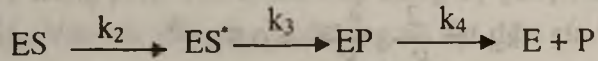
Từ đây ta có hệ thức Haldane:

$$K_{cb} = \frac{K'_m \times V_{max}}{K_m \times V'_{max}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = \frac{[P]}{[S]}$$

$K_{cb}$  : hằng số cân bằng của phản ứng tổng.

Hệ thức này chỉ rõ có sự phụ thuộc lẫn nhau giữa hằng số cân bằng và các tham số động học của một phản ứng enzym thuận nghịch do đó không thể bỏ qua phản ứng nghịch khi sản phẩm đã được tích tụ.

- *Chú ý*: Hằng số  $k_{cat}$  là tổng hợp của nhiều giai đoạn liên tiếp chuyển hóa phức Michaelis -Menten đến trạng thái quá độ, rồi từ trạng thái quá độ này đến phức enzym- sản phẩm và cuối cùng phân ly phức này đến enzym tự do và sản phẩm:



Do đó, giá trị của hằng số  $k_{cat}$  phụ thuộc vào giá trị của hằng số tương ứng với giai đoạn chậm nhất tức là giai đoạn giới hạn.

Phải luôn nhớ rằng phương trình Brigg –Haldane và phương trình Michaelis –Menten chỉ có giá trị khi được đặt trong những điều kiện ban đầu đã xác định trước. Ngoài ra, cũng cần chú ý rằng trong các phương trình ở trên, người ta luôn coi nồng độ cơ chất tự do  $[S]$  bằng với nồng độ cơ chất  $[S]_0$  lúc khởi đầu. Và trong điều kiện ban đầu này thì nồng độ sản phẩm được tạo ra còn rất bé so với nồng độ của cơ chất. Khi nồng độ sản phẩm đạt đến mức có ý nghĩa thì các phương trình này sẽ không áp dụng được nữa.

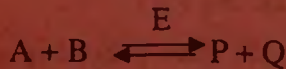
Phương trình Michaelis –Menten cũng có thể được biểu diễn dưới dạng sau:

$$v = \frac{[E_t] k_2 k_A [S]}{k_2 + k_A [S]} \quad (3.6)$$

$$v = \frac{[E_t]}{1/k_2 + 1/k_A [S]} \quad (3.7)$$

### 3.1.3. Động học của các enzym monome nhiều cơ chất

Trong thực tế, ít có phản ứng enzym một cơ chất. Phần lớn các phản ứng enzym có hai hoặc nhiều cơ chất và tạo ra hai hoặc nhiều sản phẩm. Một số lớn enzym thường gặp có hai cơ chất. Phản ứng tổng của các enzym có hai cơ chất và hai sản phẩm thường có dạng như sau :



Trong cơ chế của phản ứng giữa enzym và cơ chất thường tạo ra nhiều kiểu tổ hợp khác nhau :

– Tổ hợp hai (binary): EA, EB, EP, EQ.

– Tổ hợp ba (ternary): EAB, EAQ, EBP.

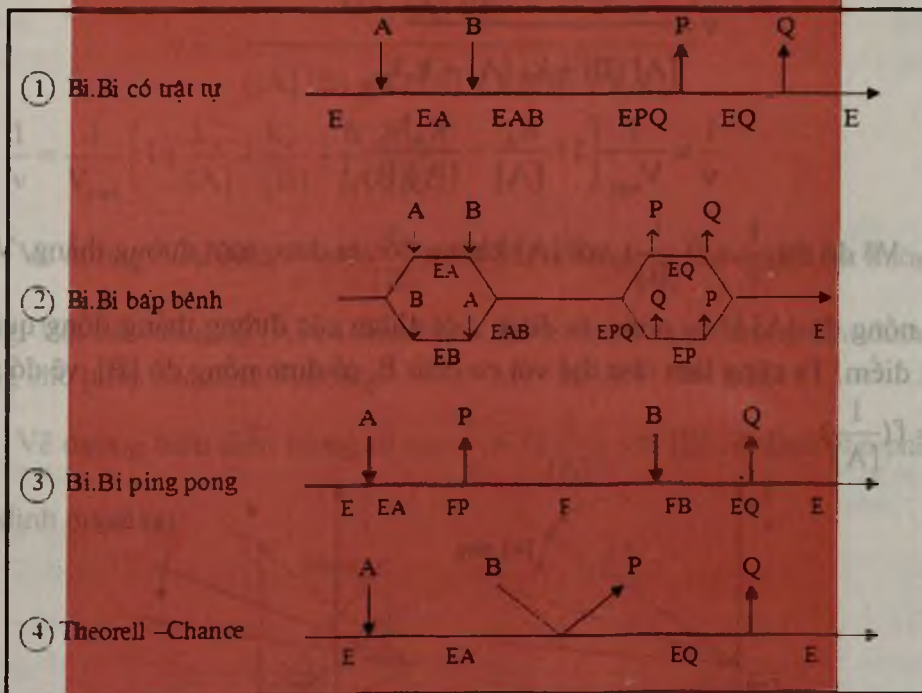
Cleland (1963) đã biểu diễn các cơ chế của phản ứng enzym hai cơ chất như sơ đồ dưới đây, trong đó:

- A, B, C: là các cơ chất theo thứ tự kết gắn.
- P, Q, R: là các sản phẩm theo thứ tự xuất hiện.
- E : là enzym tự do ban đầu.
- F, G : là dạng tạm thời của enzym trong quá trình phản ứng.
- **uni, bi, ter là những tiếp đầu ngữ để chỉ số cơ chất và số sản phẩm trong phản ứng.**

Trong thực tế, ít gặp những cơ chế enzym vượt quá ba cơ chất và ba sản phẩm (Ter Ter). Cơ chế thường gặp là cơ chế hai cơ chất và hai sản phẩm (Bi Bi)

Theo Cleland, trong kiểu xúc tác Bi Bi này, thường có bốn mô hình lớn như bảng 3.1.

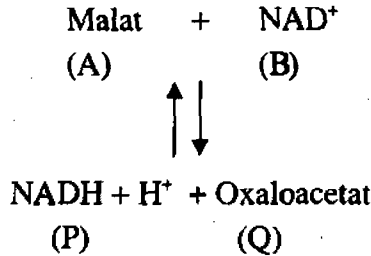
**Bảng 3.1**



Có thể nói, trừ các enzym : isomerase, lyase và hydrolase (nồng độ nước không đổi và dư thừa) các enzym khác: oxydoreductase, transferase và ligase đều tuân theo động học hai cơ chất, cơ chất thứ hai có thể là một coenzym.

### 3.1.3.1. Phản ứng kiểu Bi Bi có trật tự

Trong mô hình này, một cơ chất A bắt buộc phải gắn vào enzym ở giai đoạn đầu tiên. Cơ chất B chỉ có thể được gắn thứ hai để tạo ra tổ hợp kép ba EAB. Phản tiếp theo của phản ứng sẽ dẫn đến giải phóng P (từ B) rồi sản phẩm Q (từ A). Một ví dụ có tính chất cổ điển của cơ chế này là enzym malatdehydrogenase



\* Vận tốc của phản ứng tổng v có dạng :

$$v = \frac{V_{\max} [A] [B]}{[A] [B] + k_B [A] + k_A k_B}$$

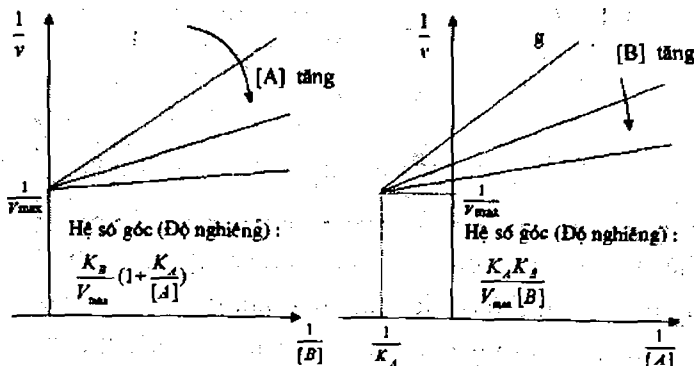
hay

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{k_A}{[A]} + \frac{k_A k_B}{[A][B]} \right)$$

Vẽ đồ thị  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[B]}\right)$  với [A] không đổi, ta được một đường thẳng. Với

các nồng độ [A] khác nhau, ta được một chùm các đường thẳng đồng qui ở một điểm. Ta cũng làm như thế với cơ chất B, cố định nồng độ [B], vẽ đồ thị

$$\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[A]}\right)$$



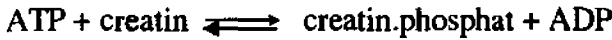
Hình 3.3. Động học hai cơ chất. Cơ chế Bi Bi có trật tự.

Với các nồng độ [B] khác nhau ta cũng được một chùm các đường thẳng.  
 Từ đồ thị có thể xác định được các tham số đặc trưng.

### 3.1.3.2. Phản ứng kiểu Bi-Bi bấp bênh

Trong trường hợp này, hai cơ chất A và B có một ái lực riêng đối với enzym. Chúng tự kết gắn với enzym một cách ngẫu nhiên để tạo ra tổ hợp kép đôi EA hoặc EB và cuối cùng thì tạo ra tổ hợp kép ba EAB. Các sản phẩm của phản ứng P và Q cũng được giải phóng ra theo một trật tự bấp bênh.

Các enzym phosphotransferase có động học theo cơ chế bấp bênh này.  
 Chẳng hạn enzym creatin phosphokinase xúc tác phản ứng :



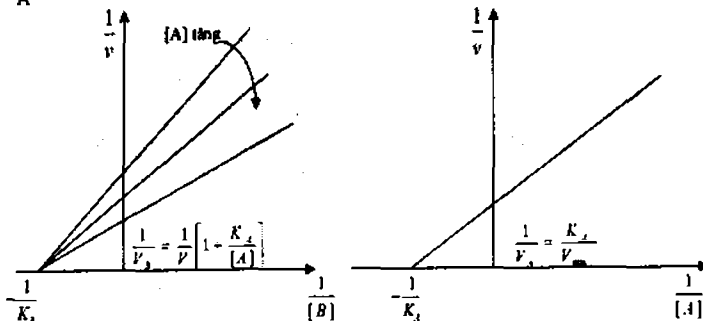
Phương trình vận tốc có dạng sau :

$$v = \frac{V_{\max} [A] [B]}{([A] [B] + k_B [A] + k_A [B] + k_A k_B)}$$

$$\text{hay } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{k_A}{[A]} + \frac{k_B}{[B]} + \frac{k_A k_B}{[A][B]} \right)$$

Vẽ đường biểu diễn  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[B]}\right)$  với [A] cố định sẽ thu được một đường thẳng. Với các nồng độ [A] cố định khác nhau, sẽ thu được một chùm đường thẳng cho phép xác định được  $k_B$ .

Vẽ đường biểu diễn tương tự của  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[A]}\right)$  với [B] cố định cho phép xác định được  $k_A$ .



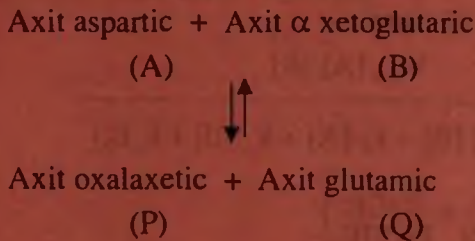
Hình 3.4. Động học hai cơ chất - cơ chế bấp bênh.



### 3.1.3.3. Phản ứng kiểu Bi-Bi ping-pong

Cơ chế khá đơn giản : cơ chất thứ nhất kết gắn với enzym để tạo ra sản phẩm đầu tiên, rồi cơ chất thứ hai sẽ gắn vào và tạo ra sản phẩm thứ hai. Vì có sự trao đổi giữa hai cơ chất, nên hiển nhiên là cơ chất thứ nhất đã phải để lại ở tâm hoạt động của enzym một hay nhiều nguyên tử. Các nguyên tử này sau đó sẽ liên kết gắn với cơ chất thứ hai.

Trong mô hình này, A và B, cả hai đều có ái lực với enzym. Các transaminase có nhóm ngoại là phosphat pyridoxal thường theo cơ chế này, trong đó nhóm  $\text{NH}_2$  đóng vai trò như quả bóng bàn (ping-pong). (Ở các enzym này, nhóm ngoại được liên kết chặt chẽ với apoenzym và được coi như là một phần toàn vẹn của enzym). Chẳng hạn, trong phản ứng thuận nghịch sau được xúc tác bởi enzym transaminase :



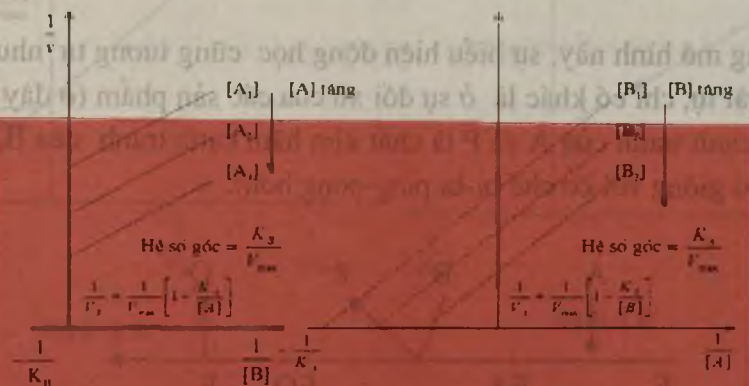
Thực tế, phản ứng xảy ra lần lượt như sau:

- 1) Kết gắn cơ chất thứ nhất : axit aspartic.
- 2) Tách nhóm amin đến kết gắn với nhóm phosphat pyridoxal tạo thành phosphat pyridoxamin.
- 3) Giải phóng ra sản phẩm thứ nhất : axit oxalaxetic.
- 4) Kết gắn cơ chất thứ hai : axit  $\alpha$  xetoglutaric.
- 5) Chuyển nhóm amin từ phosphat pyridoxamin (chất này lại trở về dạng phosphat pyridoxal) đến  $\alpha$  xetoglutaric tạo ra axit glutamic.
- 6) Giải phóng ra sản phẩm thứ hai : axit glutamic.

Phương trình vận tốc của phản ứng có dạng :

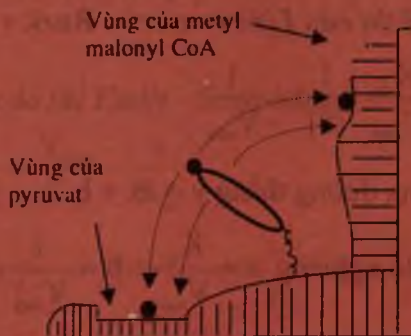
$$v = \frac{V_{\max} [A] [B]}{([A] [B] + k_B [A] + k_A [B])}$$

$$\text{Hay } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{k_A}{[A]} + \frac{k_B}{[B]} \right)$$



Hình 3.5. Động học hai cơ chất - cơ chế ping-pong.

Hình dưới đây, mô tả một cách có hình ảnh cơ chế ping – pong đặc trưng cho sự chuyển động của một nhóm cacboxyl giữa metyl – malonylcoenzym A và pyruvat khi có mặt của enzym carboxylase có biotin.

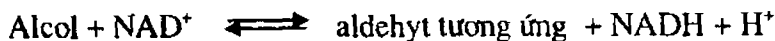


Hình 3.6. Sự di chuyển của nhóm cacboxyl giữa metylmalonyl CoA và pyruvat để tạo ra propionyl CoA và oxaloaxetat khi có mặt enzym có biotin.

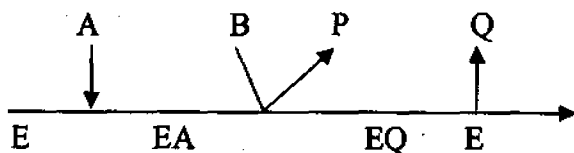
### 3.1.3.4. Phản ứng kiểu Theorell - Chance

Trong một số phản ứng kiểu Bi –Bi có trật tự, phức kép ba EAB có nồng độ rất thấp và có đời sống rất ngắn sơ dĩ như vậy là do các hằng số phân ly của cơ chất thứ hai (B) và của sản phẩm thứ nhất (P) là rất cao so với hằng số phân ly của cơ chất thứ nhất (A) và của sản phẩm thứ hai (Q).

Các enzym alcoldehydrogenase và lactatdehydrogenase vận hành với NAD theo cơ chế này. Các coenzym được sử dụng vừa như cơ chất thứ hai và sản phẩm thứ hai:



Trong mô hình này, sự biểu hiện động học cũng tương tự như ở cơ chế bi-bi có trật tự, chỉ có khác là ở sự đối xử của các sản phẩm (ở đây Q là chất kìm hãm cạnh tranh của A và P là chất kìm hãm cạnh tranh của B, điều này làm cho nó giống với cơ chế bi-bi ping-pong hơn).



Hình 3.7. Phản ứng kiểu Theorell -Chance.

### 3.1.4. Phương pháp xác định bằng thực nghiệm các tham số động học

#### 3.1.4.1. Phương pháp đồ thị của Lineweaver và Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

Phương trình có dạng đường thẳng  $y = ax + b$ .

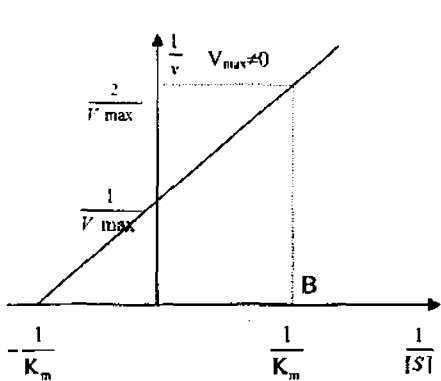
Ở đây  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$  độ nghiêng  $a = \frac{K_m}{V_{\max}}$ ;  $b = \frac{1}{V_{\max}}$

\* Với  $\frac{1}{v} = 0$  thì  $\frac{K_m}{V_{\max}} \left( \frac{1}{[S]} \right) = -\frac{1}{V_{\max}} (V_{\max} \neq 0)$

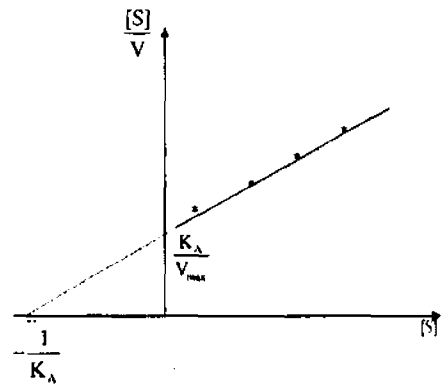
$$\frac{1}{[S]} = \frac{-1}{K_m} \text{ (điểm A)}$$

\* Với  $\frac{1}{v} = \frac{2}{V_{\max}}$  thì  $\frac{2}{V_{\max}} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} (V_{\max} \neq 0)$

$$1 = K_m + \left( \frac{1}{[S]} \right) \text{ hay } \frac{1}{[S]} = \frac{1}{K_m} \text{ (điểm B)}$$



Hình 3.8.



Hình 3.9.

**3.1.4.2. Phương pháp đồ thị của Eadie-Hofstee (hình 3.9)**

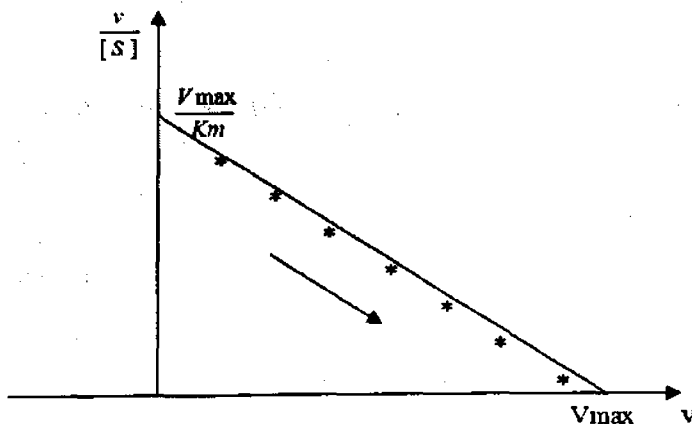
$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot [S] + \frac{K_m}{V_{\max}}$$

$$y = \frac{[S]}{v} = f([S]) \rightarrow a = \frac{1}{V_{\max}} ; b = \frac{K_m}{V_{\max}}$$

**3.1.4.3. Phương pháp đồ thị Eadie - Scatchard**

$$\frac{v}{[S]} = \frac{V_{\max}}{K_m} - \frac{v}{K_m}$$

$$y = \frac{v}{[S]} = f(v) \Rightarrow a = \frac{-1}{K_m} ; b = \frac{V_{\max}}{K_m}$$



Hình 3.10.

### 3.1.4.4. Phương pháp đồ thị Woolf-Hofstee

$$v = V_{\max} - \frac{K_m v}{[S]}$$

(Nhân 2 vế của phương trình Lineweaver - Burk với tích ( $V_{\max} v$ ))

$$y = v = f\left(\frac{v}{[S]}\right) \Rightarrow a = -K_m \cdot b = V_{\max}$$

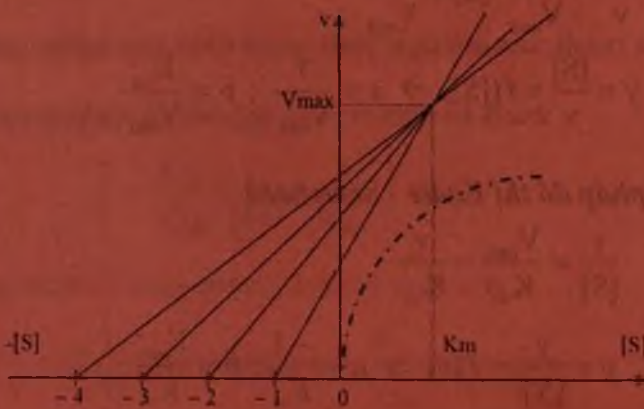
### 3.1.4.5. Phương pháp Eisenthal và MacCornish - Bowden

Các giá trị của  $[S]$  được đặt ở hoành độ âm.

Các giá trị của  $v$  đặt ở tung độ.

$$y = v = f([-S])$$

Các đường thẳng thu được đồng quy ở một điểm có hoành độ  $K_m$  và tung độ  $V_{\max}$ .



Hình 3.11.

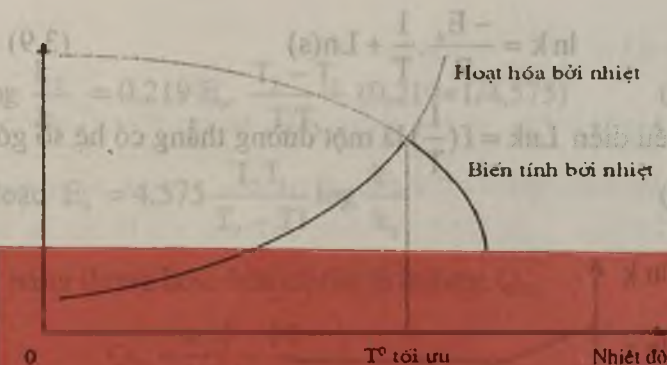
### 3.1.5. Ảnh hưởng của các tác nhân vật lý đến động học của các phản ứng enzym

#### 3.1.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Tác động của nhiệt độ đến hoạt độ của enzym là kết quả của hai hiện tượng:

Nhiệt hoạt hóa các phản ứng hóa học.

Nhiệt làm biến tính protein và làm vô hoạt hóa enzym.



**Hình 3.12:** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ enzym

### al Hoạt hóa các phản ứng hóa học bởi nhiệt

Ta đều biết, vận tốc của các phản ứng enzym cũng như của tất cả các phản ứng hóa học đều bị ảnh hưởng do sự tăng lên của nhiệt độ, theo hệ thức Arrhenius

$$k = s \times e^{E_a/RT} \quad (3.8)$$

Trong đó: k - hằng số vận tốc của phản ứng;

$E_a$  - năng lượng hoạt hóa của phản ứng;

s - hằng số;

R - hằng số khí lý tưởng (1,987 cal/mol độ);

T - nhiệt độ tuyệt đối.

Hệ thức này cho thấy vận tốc của một phản ứng hóa học tăng cùng với sự tăng nhiệt độ (tăng nhiệt độ lên 10 độ thì vận tốc của phản ứng tăng lên 2 lần).

Với phản ứng enzym thì sự tăng này lớn hơn nhưng không phải là vô hạn, thường chỉ trong một vùng nhiệt độ nào đó. Nói chung, nhiệt độ làm biến tính enzym là từ 45<sup>o</sup> -50<sup>o</sup>C. Một số enzym bền nhiệt thì có thể hoạt động ở nhiệt độ cao hơn nhiều (có thể tới 100<sup>o</sup>C).

Thông số đặc trưng cho enzym là năng lượng hoạt hóa của phản ứng E, được đo bằng kJ.mol<sup>-1</sup>.

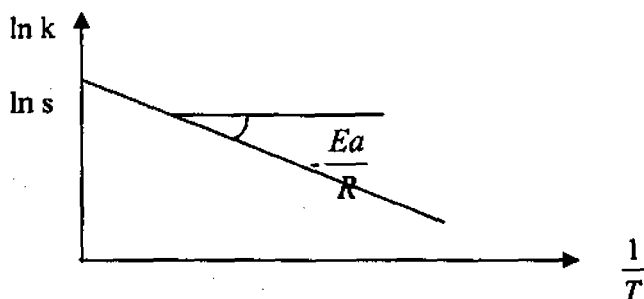
### Xác định năng lượng hoạt hóa

Hệ thức Arrhenius có thể viết dưới dạng:

$$\ln k = \frac{-E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(s) \quad (3.9)$$

Đường biểu diễn  $\ln k = f\left(\frac{1}{T}\right)$  là một đường thẳng có hệ số góc là  $(E_a/R)$

hoặc  $(E_a/2,3R)$



Hình 3.13. Xác định năng lượng hoạt hóa của phản ứng.

$$E_a = (\text{hệ số góc}) (-4,575)$$

$$(4,575 = 1,987 \times 2,303)$$

Vi phân (3.9) theo T :

$$\frac{d \ln K}{dt} = \frac{-E_a d\left(\frac{1}{T}\right)}{RdT} = \frac{E_a}{R} d\left(-\frac{1}{T}\right) \frac{1}{dT} \quad (\text{mà } d\left(-\frac{1}{T}\right) = \frac{dT}{T^2})$$

$$\frac{d \ln K}{dT} = -E_a \frac{dT}{RT^2}$$

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{E_a}{RT^2} \quad (3.10)$$

Tích phân (3.10) từ  $k_1$  ở nhiệt độ  $T_1$  đến  $k_2$  ở nhiệt độ cao hơn  $T_2$

$$\int_{k_1}^{k_2} d \ln k = \frac{E_a}{R} \int_{T_1}^{T_2} T^{-2} dT \quad (3.11)$$

$$\text{mà } \int_{T_1}^{T_2} T^{-2} dT = \frac{T^{-2+1}}{-2+1} \Big|_{T_1}^{T_2} = \frac{T^{-1}}{-1} \Big|_{T_1}^{T_2} = -\frac{1}{T} \Big|_{T_1}^{T_2} = -\frac{1}{T^2} - \left(-\frac{1}{T_1}\right) = \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} = \frac{T_2}{T_1 T_2} - \frac{T_1}{T_1 T_2} = \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}$$

$$\text{Vậy (3.11) sẽ bằng: } \int_{k_1}^{k_2} d \ln k = \ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{R} \left( \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2} \right)$$

$$\log \frac{k_2}{k_1} = 0,219 E_a \cdot \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2} \quad (0,219 = 1/4,575) \quad (3.12)$$

$$\text{Hoặc } E_a = 4,575 \frac{T_2 T_1}{T_2 - T_1} \log \frac{k_2}{k_1} \quad (3.13)$$

Biết năng lượng hoạt hóa có thể tính được  $Q_{10}$

$$Q_{10} = \frac{k_2}{k_1} \left( \frac{10}{T_2 - T_1} \right) \quad (3.14)$$

Phần lớn các enzym của động vật có vú, giá trị của  $Q_{10}$  bằng từ 2÷4 (trung bình là 2) tương ứng với năng lượng hoạt hóa từ 50 đến 100kJ.

*b/ Biến tính và vô hoạt các enzym bằng nhiệt*

Khi nhiệt độ tăng, các nguyên tử của phân tử enzym sẽ thu được một năng lượng lớn hơn nên có xu hướng chuyển động nhanh hơn. Năng lượng mà chúng thu được có thể đủ để thắng các tương tác yếu vốn quyết định cấu trúc của các prôtein hình cầu, dẫn đến một sự biến đổi hình thể protein và do đó làm giảm hoạt tính của enzym. Phản ứng vô hoạt một enzym bởi nhiệt thường có động học bậc một:

$$[E] = [E_0] \times e^{-kt}$$

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -kt$$

Trong đó: k - Hằng số vận tốc của phản ứng;

[E] - Nồng độ của enzym hoạt động ở thời điểm t;

[E<sub>0</sub>]- Nồng độ ban đầu của enzym hoạt động.

Trong thực tế người ta đo hoạt độ riêng còn lại A của enzym sau các thời gian gia nhiệt khác nhau:

$$A = a [E], \quad a \text{ là một hệ số tỷ lệ}$$

$$dA = ad[E]$$

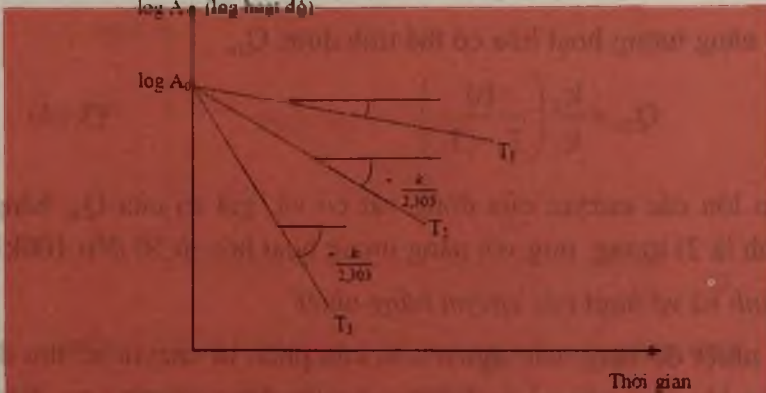
$$\frac{dA}{dt} = -ka [E] = -kA$$

$$\ln \frac{A}{A_0} = 2,303 \log \frac{A}{A_0} = -kt$$



$$\log A = \frac{-kt}{2.303} + \log A_0$$

Vẽ đồ thị  $\log A = f(t)$ , sẽ thu được một đường thẳng có hệ số góc :  $\frac{-k}{2.303}$ , từ đó có thể xác định được  $k, A_0, \dots$

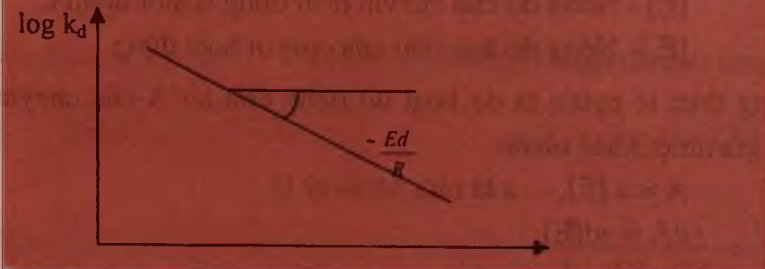


Hình 3.14. Xác định hằng số vận tốc của phản ứng biến tính enzym ở các nhiệt độ khác nhau.

- **Năng lượng hoạt hóa của quá trình biến tính enzym**

Có thể xác định năng lượng hoạt hóa của sự biến tính enzym  $E_d$ . Muốn thế, người ta gia nhiệt chế phẩm enzym trong một thời gian  $t$  thay đổi, ở một nhiệt độ  $\theta$  đã cho. (Sau khi đã làm lạnh chế phẩm ngay tức khắc xuống  $25^\circ\text{C}$  trong khoảng 20-30 phút). Người ta đo hoạt độ enzym trong những điều kiện hóa lý chuẩn. Vẽ đồ thị  $\log A = f(\theta)$ , từ đó xác định hằng số vận tốc biến tính  $k_d$ .

Vẽ đồ thị  $\log k_d = f(1/T)$  được đường thẳng có hệ số góc  $-E_d/R$ .



Hình 3.15. Xác định năng lượng hoạt hóa của biến tính enzym.

### 3.1.5.2. Tác động của pH

Tất cả enzym đều nhạy cảm với sự thay đổi pH của môi trường. Có một vùng pH mà hoạt độ của enzym là cực đại. Vùng pH này là kết quả của nhiều tham số: nhiệt độ, lực ion, nồng độ cơ chất,... nghĩa là những yếu tố bên ngoài, cũng như bản chất của enzym.

Quả vậy, enzym là protein do các axit amin trùng ngưng với nhau tạo nên. Trong số các gốc axit amin của phân tử enzym có các nhóm ion hóa được, một số gốc tham gia vào phản ứng, còn đa phần gốc được dùng để duy trì hình thể của enzym. Các gốc này cũng như cơ chất trong nhiều trường hợp, rất nhạy với pH và thường có các trạng thái ion hóa khác nhau phụ thuộc vào giá trị của pH. Ta có thể dễ dàng hiểu được khi một nhóm  $-COO^-$  của tâm hoạt động vốn cần thiết cho sự kết gắn cơ chất, nếu giảm pH của môi trường dẫn đến biến thành nhóm  $COOH$  thì nó sẽ không kết gắn được cơ chất nữa và enzym sẽ bị mất hoạt tính.

Ở pH tối ưu, protein enzym thường có điện tích tổng cực tiểu. Nói chung pH tối ưu của enzym thường khá gần với điểm đẳng ion của protein.

Người ta cũng đã chứng minh rằng vận tốc của phản ứng thường phụ thuộc trạng thái ion hóa của phức hợp enzym-cơ chất, trong khi hằng số ái lực ( $K_m$ ) lại phụ thuộc đồng thời vào trạng thái ion hoá của enzym và của phức hợp enzym- cơ chất.

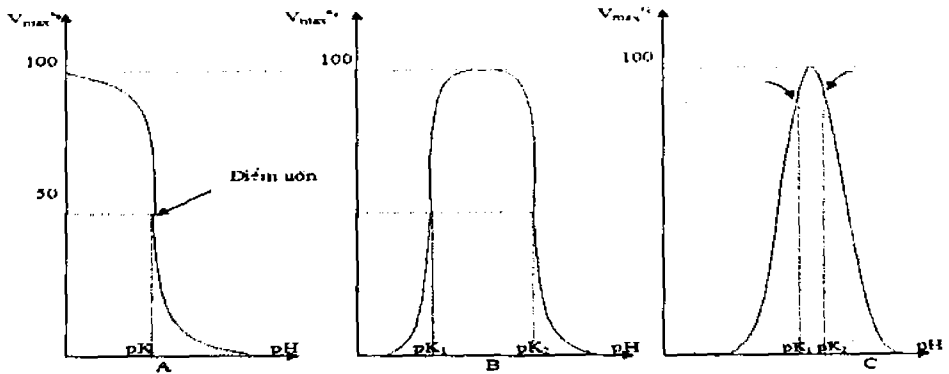
Để xác định hiệu ứng của pH đến một phản ứng enzym, người ta thường có thói quen đưa phản ứng vào vùng có nồng độ cơ chất bão hoà enzym, có nghĩa là vùng để có vận tốc xúc tác gần với vận tốc cực đại. Và người ta vẽ đường biểu diễn “ phần trăm vận tốc cực đại,  $V\%$  phụ thuộc vào pH”. Sẽ có ba trường hợp xảy ra :

- Đường cong A (hình 3.16 A) chỉ có một điểm uốn. Một nhóm ion hóa tham gia vào tâm hoạt động.  $pK$  của nhóm này tương ứng với điểm uốn.

- Đường cong B (hình 3.16 B) có hai điểm uốn và một vai (phần đường cong có dạng hình nón) có hai nhóm ion hóa tham gia vào tâm hoạt động.  $pK$  của chúng lần lượt tương ứng với hai điểm uốn.

- Đường cong C (hình 3.16 C) cũng có mặt hai điểm uốn, nhưng đường cong thường nhọn và không có vai. Hai nhóm ion hóa tham gia vào tâm hoạt

động. Và pK của chúng khó xác định hơn vì chúng không nằm ở các điểm uốn của đường cong.



Hình 3.16: Ảnh hưởng của pH đến vận tốc của xúc tác enzym.

### 3.1.5.3. Ảnh hưởng của các tác nhân hóa học đến phản ứng enzym

Các tác nhân hóa học, các chất vô cơ hoặc hữu cơ đều có khả năng làm biến đổi vận tốc của phản ứng enzym. Chúng có thể tác động như là chất hoạt hóa hoặc là chất kìm hãm.

#### 3.1.5.3.A. Chất hoạt hóa

Chất hoạt hóa có bản chất hóa học rất khác nhau. Có thể phân ra những loại như sau :

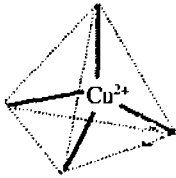
- Chất hoạt hóa thực : như các ion kim loại.
- Chất chống kìm hãm : như ion cyanua ( $CN^-$ ) có thể làm mất tác dụng kìm hãm của các muối đồng đến enzym urease.
- Chất tác nhân bảo vệ : như cystein có tác dụng bảo vệ các nhóm thiol của tâm hoạt động nhiều enzym.
- Chất hoạt hóa tiền enzym : như enterokinase của dịch ruột có khả năng chuyển trypsinogen không hoạt động thành trypsin hoạt động.

#### A.1. Hoạt hóa bởi các ion kim loại

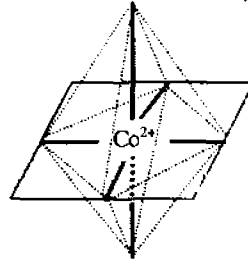
Một số ion kim loại có khả năng liên kết phối trí với các nguyên tử oxy hoặc với các nguyên tử nitơ... của các nhóm cacboxyl, imidazol, amin hoặc peptit của các coenzym hoặc của các apoenzym. Một số các ion này như cobalt trong các enzym có vitamin B<sub>12</sub>, hoặc sắt trong các enzym có

coenzym hematinic... là những phần toàn vẹn của cấu trúc coenzym mà chưa hẳn là những ion hoạt hóa. Các ion này thường làm cho tâm hoạt động của enzym có mật độ bền rất lớn do sự định hướng các liên kết của mình theo một hình học hoàn toàn xác định.

Định hướng tứ diện các liên kết của Cu



Định hướng bát diện các liên kết của Co hoặc của Fe



**Hình 3.17.** Sự định hướng các quỹ đạo (orbital) trong các liên kết phối trí giữa các ion kim loại và một coenzym hoặc một apoenzym.

Một sự hoạt hoá thực sự bởi các ion kim loại thường xuất hiện khi ion phân ly được khỏi enzym, nhưng ngược lại nó rất cần thiết hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiến hành xúc tác của enzym. Ion kim loại có thể góp phần tạo ra một hình thể thuận lợi cho enzym hoặc làm dễ dàng cho enzym kết gán được cơ chất hoặc đơn giản là tham gia trực tiếp vào xúc tác như trong nhiều phản ứng oxy hoá- khử. Trong những trường hợp này, ion kim loại đóng vai trò như một cơ chất thứ hai. Vì thế các phương trình phản ứng gần giống với các phương trình biểu diễn hệ hai cơ chất kiểu bi – bi bập bênh hoặc thường gặp hơn là kiểu bi – bi có trật tự. Nếu gọi  $K_m$  là hằng số Michaelis của cơ chất enzym,  $K'_m$  là hằng số ái lực của kim loại và  $[M]$  là nồng độ kim loại, thì ta có hệ thức :

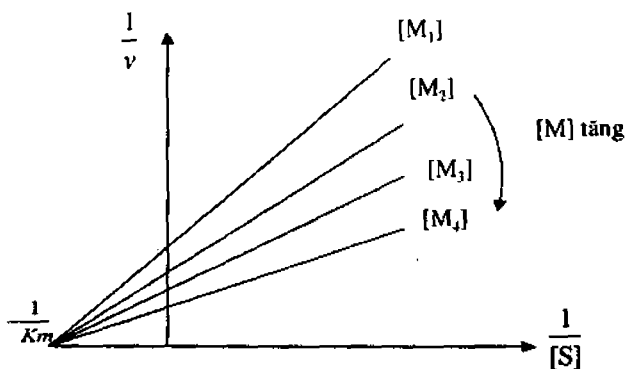
$$v = \frac{V_{max} \cdot [S] \cdot [M]}{K_m \cdot K'_m + K_m \cdot [M] + K'_m \cdot [S] + [S] \cdot [M]}$$

hoặc

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} \left( \frac{K'_m}{[M]} + 1 \right) + \frac{1}{V_{max}} \left( \frac{K'_m}{[M]} + 1 \right)$$

Từ hình 3.18 cho thấy trong quá trình xúc tác, cơ chất của enzym sẽ kết gán vào đầu tiên. Kim loại hoạt hóa phản ứng nhưng không làm thay đổi ái lực giữa enzym và cơ chất. Nhiều enzym được hoạt hóa bởi các ion kim loại. Gần như tất cả kinase đều được hoạt hóa bởi  $Mg^{2+}$ ; các enzym : lipase,

trypsin và chimotrypsin được hoạt hoá bởi  $\text{Ca}^{2+}$ ; enzym pyruvat – decarboxylase được hoạt hóa bởi  $\text{Mn}^{2+}$ , còn alcoldehydrogenase thì được hoạt hóa bởi  $\text{Zn}^{2+}$ . Tất cả những nguyên tố trung lượng này có một tầm quan trọng sinh học đặc biệt. Vì vậy, những rối loạn bệnh học do thiếu những nguyên tố này gây ra phải được cắt nghĩa bằng cơ chế enzym.



**Hình 3.18.** Động học kiểu Bi-Bi có trật tự khi có mặt ion kim loại với nồng độ tăng dần.

## A.2. Chất kìm hãm

Chất kìm hãm các phản ứng enzym tác dụng nhiều cách khác nhau. Những chất kìm hãm bất thuận nghịch thường tác dụng một cách đột nhiên bằng cách làm biến tính enzym. Những chất kìm hãm thuận nghịch lại tác dụng bằng cách gây nhiễu động học enzym và có thể làm ngừng phản ứng.

Người ta phân ra ba kiểu chất kìm hãm :

- Chất kìm hãm cạnh tranh.
- Chất kìm hãm không cạnh tranh.
- Chất kìm hãm phi cạnh tranh.

### a/ Chất kìm hãm cạnh tranh (competitive inhibitors)

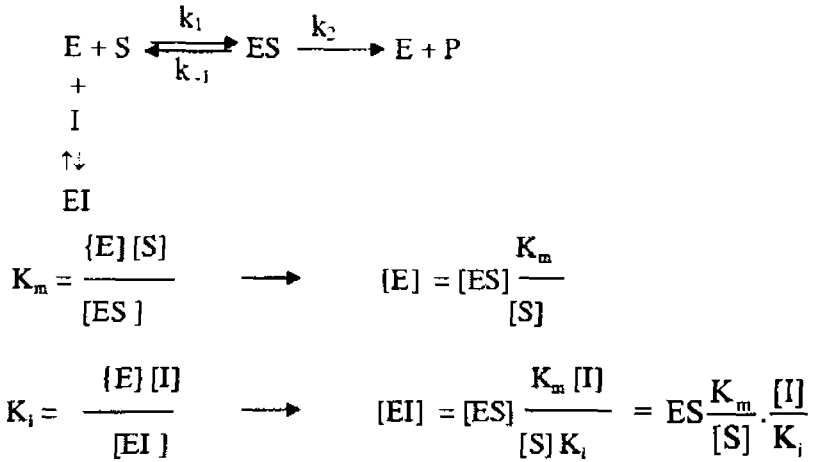
\* Kìm hãm cạnh tranh tuyệt đối (toàn phần) (absolute competitive inhibitor).

- Cơ chất và chất kìm hãm kết gắn với enzym tại cùng một địa điểm (một tâm) và tạo ra các phức ES và EI.

- Chỉ có phức ES là hoạt động và cho sản phẩm.

- Nồng độ chất kìm hãm là rất nhỏ so với nồng độ enzym  $[E] \gg [I]$

Cơ chế và phương trình:



$K_i$  : là hằng số phân ly của phức enzym – chất kìm hãm.

Phương trình bảo toàn :

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] = [ES] (1 + K_m/[S] + K_m/[S] \cdot [I]/K_i)$$

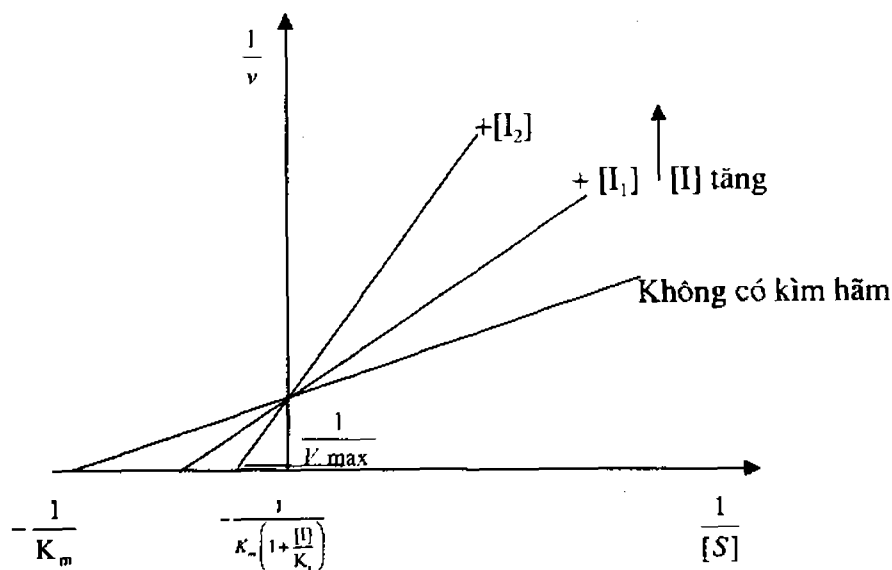
$$[E_t] = [ES] (1 + K_m/[S] (1 + [I]/K_i))$$

Phương trình vận tốc :

$$\begin{aligned}
 \frac{v}{V_{\max}} &= \frac{[ES]}{[E_t]} = \frac{1}{(1 + K_m/[S] (1 + [I]/K_i))} \\
 v &= V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \\
 \frac{1}{v} &= \frac{K_m}{V_{\max}} (1 + [I]/K_i) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}
 \end{aligned}$$

- Hằng số Michalis ( $K_m$ ) được nhân lên một hệ số (được gọi là hệ số kìm hãm  $F_i$ ) có nghĩa là trạng thái phân ly của phức ES sẽ được dễ dàng tức là ái lực của E với S sẽ bị giảm đi.

- Sự kìm hãm có thể bị mất đi khi thừa cơ chất. Khi tăng nồng độ S, theo định luật tác dụng khối lượng, S sẽ di chuyển I ra khỏi tâm xúc tác mà nó đang chiếm.



**Hình 3.19. Kim hãm cạnh tranh.**

Malonat ( $\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) là chất kim hãm cạnh tranh của succinat - dehydrogenase. ( $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ).  $K_m$  của succinat là :  $1,4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ , còn  $K_i$  của malonat:  $0,04 \cdot 10^{-3}\text{M}$ .

Cơ chế tác dụng điều trị của các sulfamid là một quá trình kim hãm cạnh tranh. Quả vậy axit para aminobenzoic là một bộ phận của coenzym axit pholic. Ở nhiều vi khuẩn axit paraaminobenzoic là một yếu tố sinh trưởng. Axit paraamonophenyl-sulfonamid (hoặc sulfanilamid) có công thức cấu tạo rất giống axit para aminobenzoic.



Woods (1940) đã chứng minh rằng khi đưa vào trong môi trường một nồng độ sulfanilamid đủ thì chất này sẽ chiếm tâm xúc tác của các enzym bình thường vốn xúc tác sự tổng hợp axit folic. Khi không có axit folic thì vi khuẩn sẽ ngừng phát triển. Người ta gọi các sulfamid là những bacteriostatic (kim hãm vi khuẩn).

\* *Chất kim hãm cạnh tranh bộ phận (Partial competitive inhibitors)*

- Cơ chất và chất kìm hãm gắn với enzym tại hai vùng khác nhau và tạo ra các phức ES, EI và ESI.

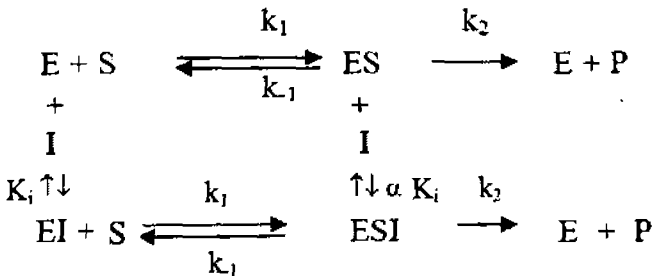
- Cơ chất có ái lực với enzym tự do mạnh hơn với enzym của phức EI.

- Chất kìm hãm có ái lực với enzym tự do mạnh hơn với phức ES.

- Các phức ES và ESI đều hoạt động và cho sản phẩm với cùng một hằng số vận tốc.

- Nồng độ chất kìm hãm là rất nhỏ so với nồng độ enzym.

Cơ chế và phương trình:



Ta có thể viết :

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \qquad \alpha K_m = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \qquad \alpha K_i = \frac{[E][S]}{[ESI]}$$

với  $\alpha > 1$

Kết quả ta có :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m \frac{(1 + [I]/K_i)}{(1 + [I]/\alpha K_i)} + [S]}$$

*b) Chất kìm hãm không cạnh tranh (non-competitive inhibitors)*

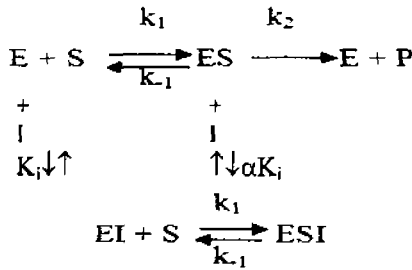
*\* Chất kìm hãm không cạnh tranh tuyệt đối (Absolute non-competitive inhibitors)*

- Cơ chất và chất kìm hãm kết gắn với enzym tại hai tâm khác nhau và tạo ra những phức ES, EI và ESI.



- Cơ chất có cùng ái lực với enzym tự do cũng như với phức EI
- Chất kìm hãm có cùng ái lực với enzym tự do cũng như với phức ES
- Chỉ có phức ES là hoạt động
- Nồng độ của chất kìm hãm là rất nhỏ so với nồng độ enzym  $[E] \gg [I]$

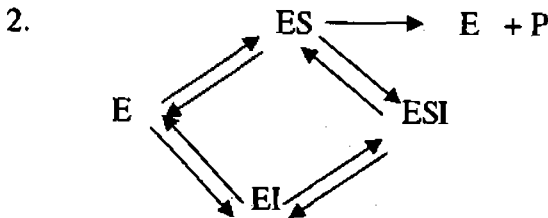
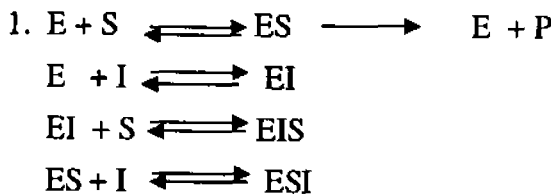
Cơ chế và các phương trình



$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Một cách thiết lập khác :



Ta có :

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]} \longrightarrow [E] = [ES] \frac{K_m}{[S]} \quad \text{và} \quad [ESI] = [EI] \frac{[S]}{K_m}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \longrightarrow [EI] = [ES] \frac{K_m[I]}{[S] \cdot K_i} \quad \text{và} \quad [ESI] = [ES] \frac{[I]}{K_i}$$

Phương trình bảo toàn:

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] = [ES] (K_m/[S] + 1 + K_m[I]/[S]K_i + [I]/K_i)$$

$$[E_t] = [ES] (1 + K_m/[S]) (1 + [I]/K_i)$$

Phương trình vận tốc :

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[ES]}{[E_t]} = \frac{1}{(1 + K_m/[S]) (1 + [I]/K_i)}$$

$$v = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

$$v = \frac{\frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \cdot [S]}{K_m + [S]} = \frac{F_i \cdot V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{với } F_i = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

hoặc

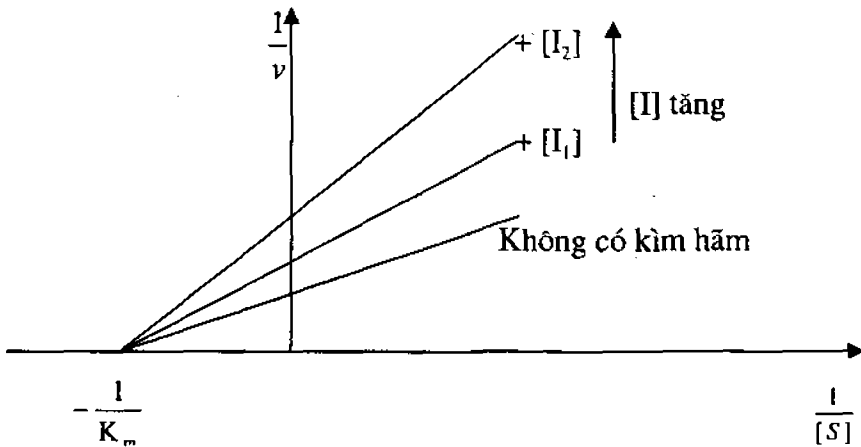
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Vẽ đồ thị  $1/v = f(1/[S])$  khi  $[I]$  thay đổi, các đường thẳng thu được sẽ cắt nhau (sau khi ngoại suy) tại một điểm trên trục  $1/[S]$  có hoành độ bằng  $(-1/K_m)$  và cắt trục tung  $1/v$  tại điểm có tung độ :

$$1/v_{\max} = 1/V_{\max} (1 + [I]/K_i)$$

Chất kìm hãm không làm thay đổi ái lực của cơ chất với enzym. Khi có chất kìm hãm này vận tốc cực đại  $V_{\max}$  bị giảm đi một số trị  $F_i$ . Các chất kìm hãm loại này thường là :

- Các kim loại nặng ( $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ ) tác dụng với các nhóm  $-\text{SH}$  của enzym.
- Etylendiamin tetraaxetat (EDTA) tạo phức với cation  $\text{Mg}^{2+}$  của enzym.
- Tác dụng của cafein đến phosphodiesterase,... đều thuộc kiểu chất kìm hãm không cạnh tranh này.



Hình 3.20. Kìm hãm không cạnh tranh

\* Chất kìm hãm không cạnh tranh bộ phận (partial non competitive inhibitors)

- Cơ chất và chất kìm hãm kết gắn với enzym tại hai tâm khác nhau để tạo thành các phức ES, EI, và ESI.

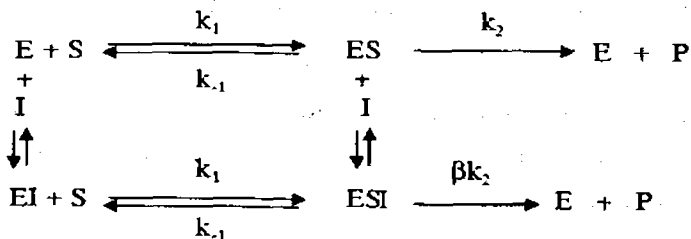
- Cơ chất có cùng ái lực với enzym tự do cũng như với phức EI.

- Chất kìm hãm có cùng ái lực với enzym tự do cũng như với phức ES.

- Các phức ES và ESI đều hoạt động, song ESI kém hoạt động hơn ES.

- Nồng độ chất kìm hãm là rất nhỏ so với nồng độ enzym  $[\text{E}] \gg [\text{I}]$ .

Ta có thể viết:



Ta có :

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad \text{Với } \beta < 1$$

Cuối cùng ta được :

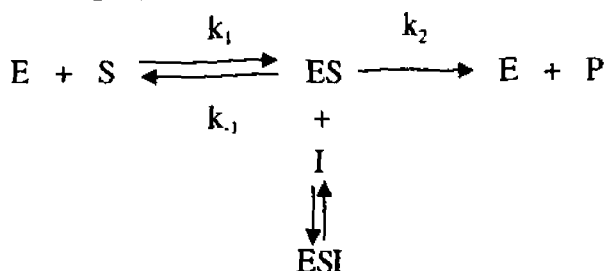
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \frac{(1 + [I]/K_i)}{(1 + \beta[I]/K_i)} + [S] \frac{(1 + [I]/K_i)}{(1 + \beta[I]/K_i)}}$$

c/ Chất kìm hãm phi cạnh tranh (*uncompetitive inhibitors*).

- Trong trường hợp này chất kìm hãm không gắn được với enzym tự do mà chỉ duy nhất kết gắn được với phức ES.

- Chỉ phức ES là hoạt động.

- Nồng độ chất kìm hãm là rất nhỏ so với nồng độ enzym  $[E] \gg [I]$ .



Ta có :

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$[ESI] = \frac{[ES][I]}{K_i}$$

$$[E_t] = [ES] + [ESI] + [E]$$

$$v = k_2 [ES]$$

Từ đây ta có phương trình vận tốc :

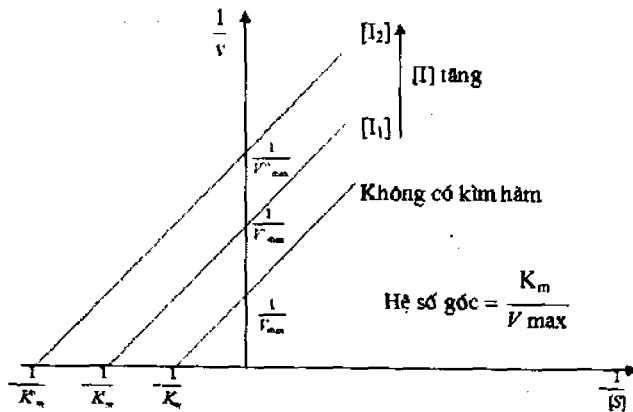
$$v = \frac{\frac{V_{\max}}{(1 + [I]/K_i)} \cdot [S]}{\frac{K_m}{(1 + [I]/K_i)} + [S]}$$

hoặc

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Trong kiểu kìm hãm này, vận tốc cực đại  $V_{\max}$  và hằng số biểu kiến  $K_m$  đều bé hơn  $V_{\max}$  và  $K_m$  khi không có chất kìm hãm.

Vẽ đường biểu diễn  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$  với các nồng độ  $[I]$  khác nhau ta sẽ được một dãy các đường thẳng song song.



Hình 3.21. Kìm hãm phi cạnh tranh.

Nếu hằng số phân ly của phức:



là không đáng kể so với hằng số phân ly của phức :



thì bằng thực nghiệm ta sẽ không thu được một dãy các đường thẳng mà sẽ được một dãy các đường hypecbol hoặc các đường parabol. Và ta sẽ có kiểu kìm hãm phi cạnh tranh không tuyến tính (non-linear incompetitive inhibitors).

Người ta còn biết ít kiểu kìm hãm phi cạnh tranh đối với enzym có một cơ chất nhưng rất thường gặp ở những enzym có hai cơ chất.

Bảng 3.2 tóm tắt các tham số chính của động học phản ứng enzym.

**Bảng 3.2. Các tham số chính của động học phản ứng enzym**

Kiểu kìm hãm	Hệ số góc	Hoành độ	Tung độ
Không có kìm hãm	$\frac{K_m}{V_{max}}$	$\frac{-1}{K_m}$	$\frac{1}{V_{max}}$
Kìm hãm cạnh tranh	$\frac{K_m}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$	$-\frac{1}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$	$\frac{1}{V_{max}}$
Kìm hãm không cạnh tranh	$\frac{K_m}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$	$\frac{-1}{K_m}$	$\frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$
Kìm hãm phi cạnh tranh	$\frac{K_m}{V_{max}}$	$-\frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{K_m}$	$\frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$

*d/ Kìm hãm do thừa cơ chất*

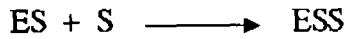
Giả sử có phản ứng enzym :



Ta có:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \longrightarrow [E] = [ES] \frac{K_m}{[S]}$$

Giả sử có một phân tử cơ chất thứ hai có khả năng kết gắn vào phức ES và làm cho ES trở thành không hoạt động. Phân tử này sẽ kết gắn vào một tâm khác với tâm xúc tác, được gọi là tâm kìm hãm. Phân tử này được coi như là một chất kìm hãm.



Ta có:

$$K_i = \frac{[ES][S]}{[ESS]} \longrightarrow [ESS] = [ES] \frac{[S]}{K_i}$$

$$[E_t] = [E] + [ES] + [ESS] = [ES] (1 + K_m/[S] + [S]/K_i)$$

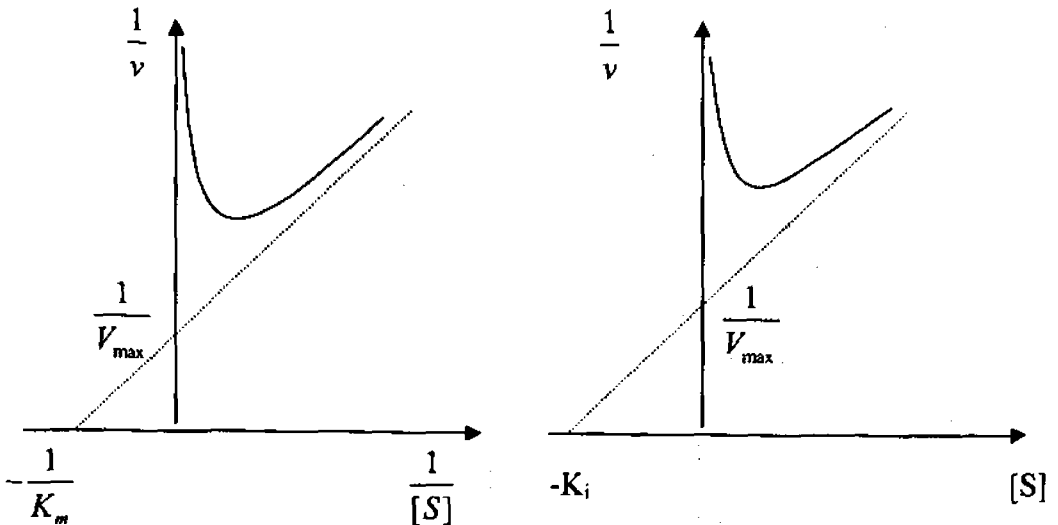
Ta có thể viết được :

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[ES]}{[E_t]}$$

và phương trình vận tốc :

$$v = \frac{V}{1 + K_m/[S] + [S]/K_i}$$

hay 
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i} \right)$$



Hình 3.22. Kìm hãm do thừa cơ chất.

Vẽ đường biểu diễn  $1/v = f(1/[S])$  sẽ được một hypecbol mà tiệm cận xiên của nó có hệ số góc là  $K_m/V_{max}$  và cắt trục hoành ở điểm:  $-1/K_m$ .

Còn đường biểu diễn của  $1/v = f[S]$  cũng là một hypecbol mà tiệm cận xiên của nó có hệ số góc là  $1/(V_{max}K_i)$  và cắt trục hoành ở điểm  $(-K_i)$

Trong cả hai trường hợp  $v$  qua một cực đại khi  $[S] = \sqrt{K_m \cdot K_i}$

## 3.2. ĐỘNG HỌC CỦA CÁC ENZYM DỊ KHÔNG GIAN VÀ SỰ ĐIỀU HÒA CỦA CÁC ENZYM OLIGOME

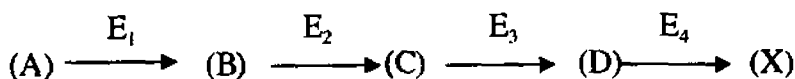
Hiệu ứng dị không gian và các enzym dị không gian thường có vai trò quan trọng trong các quá trình trao đổi chất cũng như trong sự vận hành của các receptor và các protein điều hòa.

### 3.2.1. Một số khái niệm

#### 3.2.1.1. Khái niệm về hiệu ứng dị không gian

- Trong một chuỗi phản ứng trao đổi chất thường có một enzym và một phản ứng có tính đặc biệt. Enzym này thường là enzym đầu tiên của chuỗi trao đổi chất. Người ta gọi enzym này là enzym điều hòa (regulator enzyme).

Ví dụ: Trong chuỗi phản ứng trao đổi chất sau:



$E_1$  là enzym điều hòa của chuỗi trao đổi chất dẫn đến (X).

- Enzym điều hòa này thường bị kìm hãm bởi sản phẩm cuối cùng của phản ứng và chỉ bởi sản phẩm cuối cùng này mà thôi. Trong ví dụ trên enzym  $E_1$  chỉ bị kìm hãm bởi X mà không bị kìm hãm bởi B, C hoặc D.

- Enzym điều hòa này là enzym duy nhất của chuỗi bị kìm hãm bởi sản phẩm cuối cùng của phản ứng. Trong ví dụ trên enzym  $E_1$  nhạy cảm với X, còn các enzym  $E_2, E_3, E_4$  thì không nhạy cảm với X.

Sản phẩm cuối cùng của phản ứng, bằng tác dụng đặc hiệu và duy nhất của mình đến enzym điều hòa đã kiểm tra được toàn bộ động học phản ứng.

- Theo quy luật chung, sản phẩm cuối cùng của phản ứng có một cấu trúc hoàn toàn khác với cấu trúc của cơ chế khởi đầu. Sản phẩm cuối cùng



này chưa bao giờ tác dụng đến enzym điều hòa bằng cơ chế kìm hãm cạnh tranh với cơ chế bình thường và chuẩn mực của enzym này. Ở ví dụ trên, X có cấu trúc khác cơ bản với cấu trúc của A. X không tác dụng với enzym điều hòa E<sub>1</sub> bằng cơ chế kìm hãm cạnh tranh với cơ chất A.

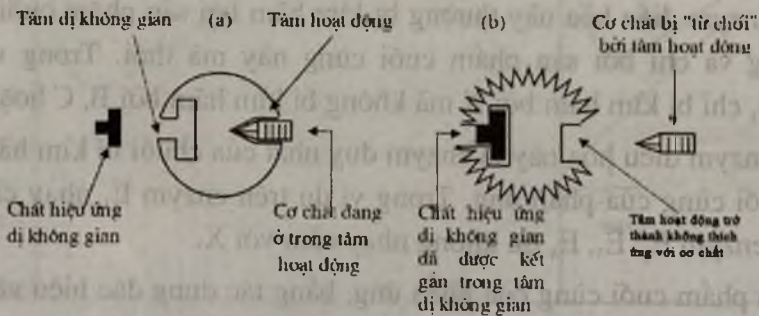
Tác động này của sản phẩm cuối cùng đến enzym điều hòa không phải trong cùng một không gian (isosteric effect) mà là khác không gian. Vì vậy mà Monod, Changeux và Jacob (1963) gọi là hiệu ứng dị không gian (allosteric effect). Còn sản phẩm cuối cùng có tính chất điều hòa đặc hữu được gọi là chất hiệu ứng điều hòa (allosteric effector).

**3.2.1.2. Khái niệm về sự chuyển tiếp dị không gian (allosteric transition)**

Trong các cấu trúc protein của enzym điều hòa thường có ít nhất là hai vùng chức năng:

- Một vùng là tâm hoạt động, đảm bảo cho enzym hoạt động. Hình thể không gian của tâm này thích ứng được với hình thể không gian của cơ chất phản ứng và chỉ với cơ chất của nó mà thôi.
- Một vùng khác là tâm dị không gian (allosteric site). Hình thể không gian của tâm này lại thích ứng với hình thể không gian của chất hiệu ứng dị không gian và chỉ với chất này thôi. Chất hiệu ứng dị không gian này có thể thích ứng một cách đặc biệt và thuận nghịch với tâm dị không gian.

Khi chất hiệu ứng dị không gian kết hợp với tâm dị không gian thường dẫn đến một sự biến hình cấu trúc rất nhẹ nhàng trên toàn bộ protein enzym. Tuy nhiên sự biến hình này có tính rời rạc (discrete) và thuận nghịch. Người ta gọi là sự chuyển tiếp dị không gian.



**Hình 3.23. Sơ đồ chuyển tiếp dị không gian:**

- (a) : Enzym điều hòa trước khi có sự chuyển tiếp dị không gian;
- (b) : Enzym điều hòa trở thành không hoạt động sau khi có sự chuyển tiếp dị không gian.

Một trong những hậu quả quan trọng nhất của sự chuyển tiếp dị không gian này là sự biến đổi hình thể của tâm hoạt động nên sẽ làm ảnh hưởng trực tiếp đến động học của phản ứng được xúc tác bởi enzym và do đó đến hoạt tính sinh học của enzym này:

### **3.2.1.3. Hiệu ứng hãm nhạy**

Enzym điều hòa có tâm dị không gian nhạy cảm với chất hiệu ứng dị không gian. Song, độ nhạy cảm này có thể mất đi dưới ảnh hưởng của các tác nhân lý học (nhiệt) hoặc hóa học (như urê, hoặc các dẫn xuất của thủy ngân) mà người ta gọi là hiệu ứng hãm nhạy (desensitization effect).

Trong trường hợp này người ta nhận thấy:

Vẫn tồn tại một hoạt độ enzym nào đó, có nghĩa là tâm hoạt động chưa bị phá huỷ.

Enzym không còn nhạy cảm với chất hiệu ứng dị không gian nữa. Có thể giải thích hiệu ứng hãm nhạy theo hai cách:

Cách thứ nhất, ta phải thừa nhận rằng trong quá trình xử lý bằng các yếu tố hãm nhạy, tâm dị không gian (không phải tâm hoạt động) đã bị tổn thương do đó chất hiệu ứng dị không gian sẽ không kết gắn được vào đây nữa. Kết quả là sự chuyển tiếp dị không gian sẽ không thể xảy ra và enzym điều hòa sẽ không "đảm nhận" được chức năng điều hòa của mình.

Cách thứ hai, cũng phải thừa nhận rằng, sự vận hành tốt của enzym điều hòa không những phụ thuộc vào tính toàn vẹn của tâm dị không gian mà còn phụ thuộc vào sự duy trì cấu trúc không gian của protein ở trong một trạng thái hình thể xác định đủ đảm bảo cho khả năng tương tác được giữa tâm dị không gian và tâm hoạt động.

### **3.2.1.4. Khái niệm về tính hợp tác của các tâm**

Khi nghiên cứu động học tác dụng của enzym điều hòa threonin-desaminase, người ta đã chứng tỏ rằng chỉ một phân tử protein enzym có thể kết hợp với nhiều phân tử cơ chất và nhiều phân tử chất hiệu ứng dị không gian. Vậy là ở enzym này có nhiều tâm hoạt động giống nhau và nhiều tâm dị không gian giống nhau. Tuy nhiên động học chung của phản ứng enzym lại không tương ứng với một sự cộng đơn giản các hoạt độ đơn của nhiều

tâm hoạt động của enzym này, vì bậc của phản ứng lớn hơn một. Cũng như vậy, động học của hiệu ứng kìm hãm của isoleucin (là chất hiệu ứng dị không gian của enzym threonin-desaminase) không tương ứng với số cộng đơn giản các hiệu ứng đơn của nhiều tâm dị không gian về động học kìm hãm cùng có thứ bậc lớn hơn một. Vậy là do tương tác hỗ trợ giữa các tâm hoạt động mà tiềm năng phản ứng của chúng đã được nhân lên. Nói cách khác, các tâm hoạt động đã hợp tác với nhau.

Tuy nhiên dưới tác động của các tác nhân hãm nhảy, các tâm hoạt động của cùng một protein enzym sẽ không còn hợp tác với nhau nữa mà "vận hành" riêng rẽ theo động học bậc 1.

Như vậy hiệu ứng của một tác nhân hãm nhảy bao gồm:

- Huỷ bỏ các tương tác giữa tâm hoạt động và tâm dị không gian do đó sự chuyển tiếp dị không gian sẽ không xảy ra nữa.
- Huỷ bỏ sự hợp tác giữa nhiều tâm hoạt động trong cùng một enzym.
- Huỷ bỏ sự hợp tác giữa nhiều tâm dị không gian trong cùng một enzym.

Một hợp chất như thế có thể coi là một *tác nhân phân ly phân tử*.

### 3.2.2. Bản chất oligome của các enzym được điều hòa bằng các chuyển tiếp dị không gian

Có thể coi enzym điều hòa có tất cả các chức năng của mình như là một tập hợp các dưới đơn vị riêng liên kết lại với nhau. Các dưới đơn vị này sẽ hợp tác với nhau một cách chuẩn xác nhằm có cùng một chức năng. Tuy nhiên, trong cấu trúc của protein enzym, người ta đã biết có một trạng thái kết hợp các dưới đơn vị cơ sở như thế: đó là cấu trúc bậc 4. Trong quá trình chuyển tiếp dị không gian, cấu trúc bậc 4 này sẽ bị biến đổi. Nhưng sự biến đổi là tối thiểu, vì sự chuyển tiếp dị không gian mới làm thay đổi các lực liên kết vốn có tác dụng kết hợp các dưới đơn vị lại với nhau trong một protein enzym mà chưa dẫn đến trạng thái phân ly hoàn toàn. Và phân tử enzym xuất hiện hoặc ở trạng thái chặt (contraint) hoặc ở trạng thái lỏng lẻo (relaché).

Có thể tóm tắt các quan điểm cơ bản về các enzym dị không gian bằng ba mệnh đề Changeux (1965) như sau:

1- Các protein enzym dị không gian là những oligome do một số protome hạn chế kết hợp lại với nhau bằng cách như thế nào để phân tử có ít nhất một trục đối xứng.

2- Mỗi protome của phân tử dị không gian đều có mang một vài và chỉ một vùng tiếp nhận có không gian đặc hiệu hỗ trợ được cho một loại phối tử (ligand) và enzym sẽ tạo lập nên với phối tử này những phức thuận nghịch.

3- Một phân tử dị không gian có thể có nhiều trạng thái hình thể khác nhau cân bằng thuận nghịch với nhau. Các trạng thái này thường khác nhau:

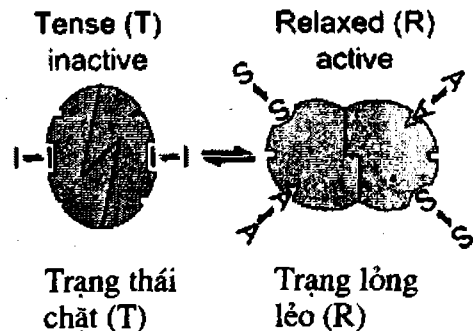
- Bởi số lượng và sự phân bố các protome hoặc bởi năng lượng của các liên kết giữa các protome.

- Bởi ái lực của chúng với một hoặc nhiều phối tử có không gian đặc hiệu. Như protein chuyển từ một trạng thái hình thể này sang một trạng thái hình thể khác thì tính đối xứng của nó vẫn được bảo toàn.

Như vậy sự điều hòa dị không gian là sự chuyển giao các tín hiệu nội phân tử (intramolecular signals).

### 3.2.2.1. Các mô hình phân tử

Trong điều hòa dị không gian, chất hiệu ứng dị không gian thường khác với cơ chất và ta có sự điều biến dị hướng (modulation heterotrophe). Trong một số trường hợp, chính cơ chất lại là chất điều biến (modulator); nhưng lại có hai tâm kết gắn khác nhau, trường hợp này ta có sự điều biến đồng hướng (isotropic modulation). Các cơ chất và các chất hiệu ứng được gọi là các phối tử của enzym dị không gian.



Hình 3.24. Mô hình sự kết gắn hợp tác của các phối tử.

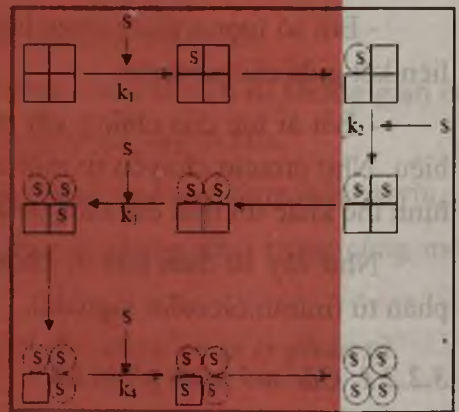
Có hai mô hình khác nhau nhằm giải thích sự kết gắn hợp tác của các phối tử. Hai mô hình đều dựa trên một giả thiết đã được khẳng định bằng thực nghiệm: với dị không gian có tồn tại hai hình thể không gian khác nhau: một hoạt động và một không hoạt động. Hình thể hoạt động được gọi là hình thể lỏng lẻo (R) vì các liên kết giữa các protome ở đây rất yếu. Hình thể không hoạt động được gọi là hình thể chặt (T). Hình thể R sẽ kết gắn cơ chất và chất hoạt hóa, còn hình thể T thì kết gắn chất kìm hãm. Giữa hai trạng thái R và T chỉ cách biệt nhau bằng một hàng rào năng lượng thấp. Hiệu năng lượng tự do giữa R và T phải khá thấp để có thể dễ dàng được bù trừ bằng các liên kết giữa protein enzyme và các phối tử của nó.

### 3.2.2.2. Mô hình của Kosland và Atkinson

Mô hình này được gọi là mô hình hợp tác dây hay chuyển tiếp dây (sequential co-operation hoặc sequential transition) cho rằng, khi kết gắn phối tử đầu tiên vào một dưới đơn vị này thì sẽ dẫn đến sự biến dạng nối tiếp các dưới đơn vị khác với các hằng số ái lực ( $k_1, k_2, k_3, k_4$ ) khác nhau nhưng tuân theo đẳng thức sau:

$$k_2 \cdot k_1 = k_3 \cdot k_4$$

Mô hình này được biểu diễn bằng sơ đồ hình 3.25.



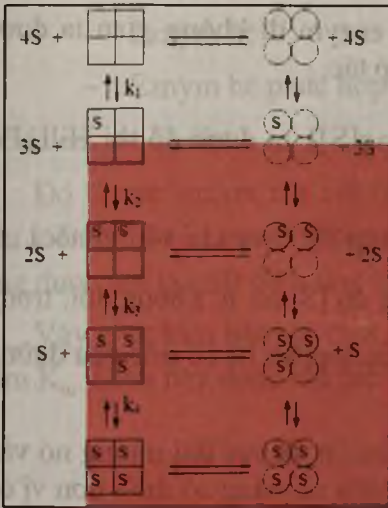
Hình 3.25. Mô hình chuyển tiếp dây của Kosland và Atkinson.

### 3.2.2.3. Mô hình của Monod, Wyman và Changeux

Mô hình này có tên gọi là mô hình sắp xếp (Concerted model). Các quy tắc của mô hình này như sau:

- Về phương diện chức năng thì các dưới đơn vị không thể khác nhau.
- Cả cơ cấu tứ diện (lấy ví dụ) phải giữ trục đối xứng của mình một cách thường xuyên.
- Các biến đổi hình thể (kiểu chuyển tiếp  $R \rightleftharpoons T$ ) đều đụng chạm tới tất cả các dưới đơn vị cùng một lúc.

- Phối tử có thể gắn kết với dạng R hoặc T nhưng với ái lực khác nhau cho những hình thể R hoặc T này.



**Hình 3.26.** Mô hình sắp xếp của Monod, Wyman và Changeux.

- Chính sự kết gắn của phối tử sẽ làm biến đổi cân bằng giữa các dạng R và T và sẽ hướng các protome về phía các dạng có ái lực cao (điều biến dương).

- Các enzym tuân theo sự điều hòa dị không gian thường được cấu thành từ một số chẵn các protome.

Một cách khác, theo mô hình xếp đặt này, các protome được coi là tương đương nhau trong không gian, có nghĩa là chúng được phân bố như thế nào để ứng với ít nhất một trục đối xứng, mỗi protome luôn được bao quanh bởi cũng một số protome như thế bên cạnh.

Mô hình sắp đặt có thể coi như trường hợp riêng hay trường hợp giới hạn của mô hình dây.

### 3.2.3. Động học của các enzym dị không gian

Các enzym dị không gian không tuân theo động học cổ điển của Michaelis-Menten, mà theo đường cong hình sin vốn thể hiện hiện tượng hợp tác. Cho đến nay, các enzym dị không gian đã được nghiên cứu có ít nhiều giống với mô hình này hay mô hình khác của hai mô hình lý thuyết trên. Áp dụng những giả thuyết đã được công thức hóa đối với một mô hình này hay khác và bằng những tính toán tương đối phức tạp người ta đã chứng minh rằng vận tốc đầu không tương ứng với công thức Michaelis-Menten mà theo công thức thực nghiệm của Hill:

$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{K + [S]^n} \text{ hoặc } vK + v[S]^n = V_{\max} [S]^n$$

$$V_{\max} - v = \frac{vK}{[S]^n} \rightarrow \frac{v}{V_{\max} - v} = \frac{[S]^n}{K}$$

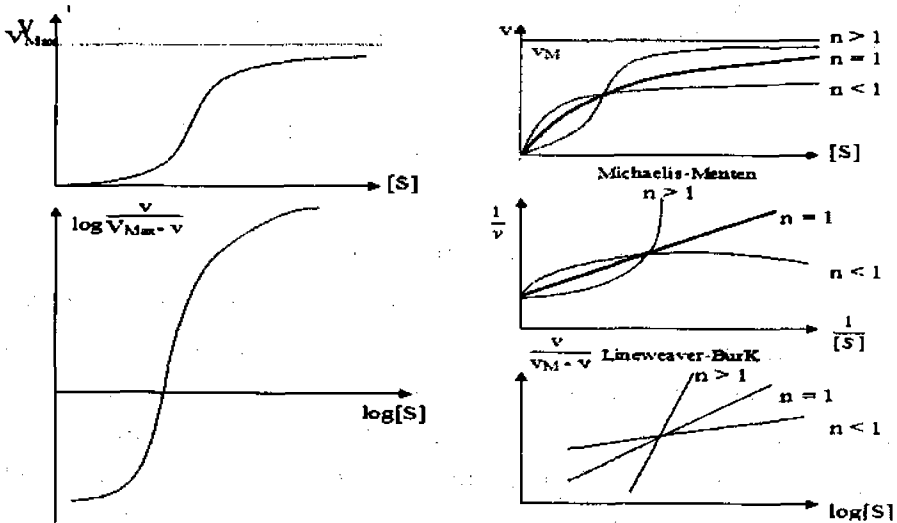
hay 
$$\log \frac{v}{V_{\max} - v} = n \log[S] - \log K$$

Khi vẽ đường biểu diễn  $v = f([S])$ , với enzym dị không gian ta được đường cong hình chữ S thể hiện hiện tượng hợp tác.

Vẽ đường biểu diễn  $\log \frac{v}{V_{\max} - v} = f(\log[S])$  ta được đồ thị Hill. Hệ

số góc  $n$  của đường thẳng được gọi là hệ số hợp tác (hay chỉ số hợp tác).  $n$  phụ thuộc vào  $[S]$ . Tuy vậy có một vùng nồng độ  $[S]$  có  $n$  không đổi: trong vùng này  $\log \frac{v}{V_{\max} - v}$  là một hàm bậc nhất của  $\log[S]$ , hệ số góc của đường

thẳng tương ứng là  $n$ . Trong vùng nồng độ này,  $n$  là cực đại nhưng nó vẫn luôn luôn nhỏ hơn số dưới đơn vị của enzym (nếu nó bằng số dưới đơn vị có nghĩa là sự hợp tác sẽ là toàn bộ).



**Hình 3.27.** Biểu hiện động học khi không có hợp tác ( $n=1$ ), khi có hợp tác dương ( $n>1$ ) và khi có hợp tác âm ( $n<1$ ) theo Michaelis-Menten, theo Lineweaver-Burk và theo Hill.

Ở ngoài vùng này,  $n$  sẽ biến thiên với  $[S]$ : đường thẳng sẽ không tuyến tính nữa mà bị uốn cong. Với các giá trị của  $[S]$  rất thấp hoặc rất cao hệ số góc của đường cong tiến tới 1, có nghĩa là sự hợp tác bằng không. Và ta lại có động học Michaelis cổ điển.

Các enzym dị không gian thường được phân thành ba nhóm:

- Ezym hệ K.
- Ezym hệ V.
- Ezym hệ phức hợp.

*a/ Các enzym hệ K.*

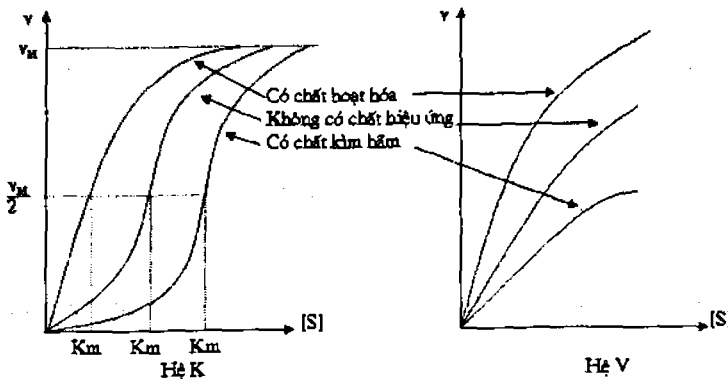
Đó là các enzym mà với chúng, chất hiệu ứng chỉ làm thay đổi ái lực biểu kiến ( $K_m$ ) của enzym đối với cơ chất. Chất hiệu ứng của enzym hệ này cũng được gọi là chất hiệu ứng kiểu K.

Vậy chất kìm hãm là chất làm tăng  $K_m$ , còn chất hoạt hóa là chất làm giảm  $K_m$ . Điều này được thể hiện bằng các phương trình sau:

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]^{n'}}{K_i}\right) \text{ và } K''_m = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[A]^{n''}}{K_a}\right)}$$

$n'$  và  $n''$  là số Hill tương ứng đối với chất kìm hãm và chất hoạt hóa. Các số Hill này lớn hơn 1 và bé hơn hoặc bằng số tâm kết gán I và kết gán A trên mỗi phân tử enzym.

Ở hình (3.29) cho thấy ở đây cơ chất và chất hoạt hóa làm dịch chuyển cân bằng về phía có lợi cho trạng thái R, trong khi đó chất kìm hãm lại làm chuyển dịch cân bằng theo chiều ngược lại, về phía trạng thái T. Tình trạng này gọi nhớ lại, trong sự kìm hãm cạnh tranh thì sự cạnh tranh giữa S và I không tiến hành ở tại cùng một tâm, trên cùng một phân tử enzym mà bằng những sự chuyển dịch đối nhau của cân bằng giữa hai hình thể R và T.



**Hình 3.28.** Biểu diễn động học các enzym dị không gian hệ K và hệ V.



## b) Các enzym hệ V.

Đó là những enzym mà với chúng, chất hiệu ứng chỉ làm biến đổi vận tốc cực đại ( $V_{\max}$ ) của phản ứng. Và chất hiệu ứng của hệ enzym này được gọi là chất hiệu ứng kiểu V.

Trong trường hợp này, cơ chất có cùng ái lực đối với hai hình thể R và T do đó không cảm ứng đến sự chuyển tiếp dị không gian. Bằng tính toán, người ta có thể chứng minh rằng sự biến thiên của vận tốc đầu theo nồng độ cơ chất là tuân theo định luật Michaelis-Menten:

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

Vậy là ở đây, sự kết gắn S là không có tính hợp tác.

Khi có mặt chất kìm hãm kiểu V, trạng thái T được ưu tiên và  $V_{\max}$  bị chia cho hệ số  $(1 + \frac{[I]^n}{K_i})$  do đó bị nhỏ đi.

Khi có mặt chất hoạt hoá kiểu V, thì trạng thái R sẽ chiếm lĩnh và  $V_{\max}$  được nhân lên với thừa số  $(1 + \frac{[A]^n}{K_a})$  do đó được tăng lên. Trường hợp thứ hai này gọi cho ta nhớ lại sự kìm hãm không cạnh tranh.

Tóm lại, tùy theo enzym dị không gian là thuộc hệ K hay hệ V, mà đường cong  $v_o = f([S])$  là một đường hình chữ S hay một đường hypecbol. Nhưng trong tất cả mọi trường hợp, các chất hiệu ứng đều làm cảm ứng sự chuyển tiếp dị không gian về phía có lợi cho trạng thái có khả năng kết gắn chúng. Các đường cong  $v_o = f([I])$  hoặc  $v_o = f([A])$  cũng có dạng hình chữ S. Các đường hình xích ma này thường biểu diễn cho các phương trình Hill tức là những phương trình có nồng độ phối tử được luỹ thừa lên n, n' hoặc n".

## 3.3. ĐỘNG HỌC CỦA CÁC ENZYM CỐ ĐỊNH

### 3.3.1. Đại cương về động học của enzym cố định

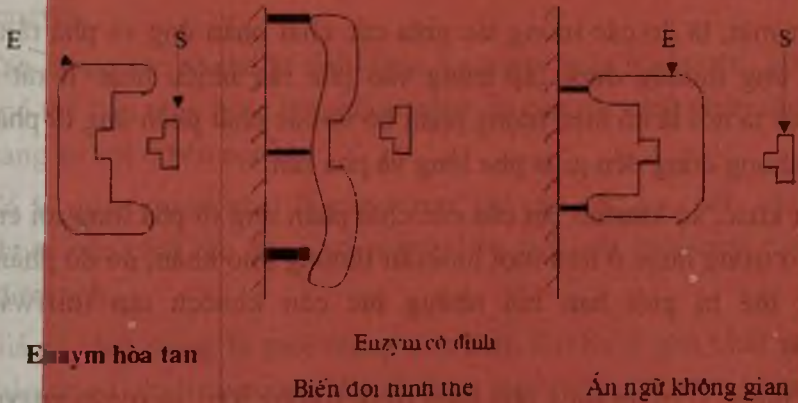
Việc cố định enzym dẫn đến tạo ra một pha rắn dị thể. Và trong môi trường phản ứng lúc này thường có mặt:

- Một pha lỏng chứa cơ chất, dung dịch đệm và các chất hiệu ứng.

- Một pha rắn chứa enzym, thường ở dưới dạng khối, màng, màng mỏng hoặc hạt tròn. Ngay cả pha rắn này của quần thể enzym cũng dị thể: Các phân tử enzym phân bố không đồng đều, bị biến dạng không giống nhau và bị giữ vào chất mang cũng khác nhau.

Vì vậy khi nghiên cứu động học của enzym cố định phải tính đến hai dạng mới so với động học của enzym đồng thể:

- Một mặt có liên quan với chính enzym: Sự biến đổi các tính chất nội tại của enzym do sự cố định tạo ra.
- Mặt khác có liên quan với sự có mặt của một pha rắn, điều này sẽ dẫn đến những hiện tượng lý học đặc thù phải xem xét.



**Hình 3.29.** Sơ đồ biến đổi các đặc tính của các enzym do cố định.

### 3.3.1.1. Biến đổi các tính chất nội tại của enzym

Khi enzym được kết gắn vào chất mang sẽ gây ra những biến đổi về hình thể không gian của enzym, cũng như sẽ tạo ra những án ngữ không gian giữa chất mang và tâm hoạt động hoặc giữa chất tác động và tâm của nó, do đó cũng làm biến đổi các tính chất động học của enzym.

Quả vậy, toàn bộ các phân tử enzym lúc này sẽ không giống nhau: chúng có thể được liên kết với chất mang bằng một số liên kết khác nhau (đồng hóa trị hoặc phi đồng hóa trị) và hình thể của chúng có thể bị mất cân đối nhiều hay ít. Các phân tử enzym không được phân bố một cách đồng đều trong pha rắn, thường ở phía ngoài, mật độ các phân tử enzym cao hơn ở phía trong. Vì vậy khả năng tương tác của tâm xúc tác sẽ phụ thuộc vào sự

định hướng của phân tử enzym so với chất mang, vị trí của phân tử enzym trên bề mặt hoặc trong các lỗ của chất mang.

Vì những lý do đó, các tham số động học của một enzym có thể rất thay đổi từ phương pháp cố định này sang phương pháp cố định khác.

### 3.3.1.2. Các hiện tượng vật lý liên quan với sự cố định của pha rắn

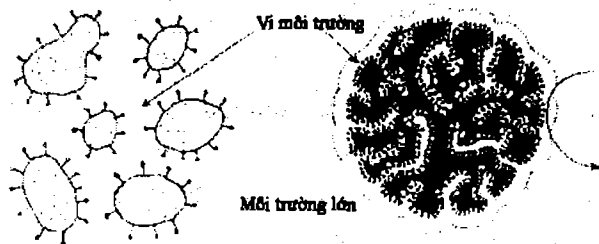
Trong xúc tác đồng thể tất cả các tham số có ảnh hưởng đến hoạt động của enzym ([S], [P], pH, nhiệt độ, chất tác động...) ở tất cả mọi điểm của dung dịch phản ứng đều có một giá trị đồng nhất. Trong xúc tác dị thể các tham số đặc trưng cho hỗn hợp phản ứng ở tất cả mọi điểm sẽ không có cùng một giá trị là do:

- Mật độ, là do các tương tác giữa các chất phản ứng và pha rắn: các chất phản ứng thường được tập trung vào pha rắn nhiều hoặc ít rất khác nhau. Người ta nói là có hiện tượng phân bố và các chất phản ứng tự phân bố một cách không đồng đều giữa pha lỏng và pha rắn.

- Mật khác, sự khuếch tán của các chất phản ứng từ pha lỏng tới enzym đang nằm ở trong hoặc ở trên một lưới rắn thường khó khăn, do đó phản ứng enzym có thể bị giới hạn bởi những lực cản khuếch tán (diffusional resistances).

Nói chung, ở trong lòng pha lỏng (môi trường lớn) và ở gần enzym (vi môi trường) nồng độ cơ chất sẽ không giống nhau.

Nếu như trong môi trường đồng thể sự diễn biến của các nồng độ chỉ phụ thuộc vào thời gian thì trong môi trường dị thể, sự diễn biến nồng độ còn phụ thuộc vào cả không gian nữa: nồng độ của các chất phản ứng biến thiên theo vị trí trong không gian, có nghĩa là nồng độ triển khai thành các gradient nồng độ.



Hình 3.30. Vi môi trường và môi trường lớn.

Người ta thường gặp hai kiểu gradient nồng độ:

- Ở trong các gradient gián đoạn, nồng độ không thay đổi một cách tuần tự mà thay đổi một cách đột ngột. Sự khác nhau về nồng độ trong trường hợp này là do hiện tượng phân bố.

- Ở trong các gradient liên tục, nồng độ thay đổi dần dần và gradient sẽ càng lớn khi sự biến thiên nồng độ càng nhiều. Sự khác nhau về nồng độ trong trường hợp này là do hiện tượng khuếch tán.

#### *a/ Hiện tượng phân bố.*

Hiện tượng phân bố là (do) kết quả tương tác của các phân tử: phân tử cơ chất, phân tử sản phẩm hoặc phân tử tác động với các nhóm của chất mang enzym.

Các tương tác có thể là tĩnh điện, kỵ nước hoặc háo nước. Hậu quả là chúng có thể làm tăng hoặc làm giảm nồng độ của các chất phản ứng ở trong chất mang so với ở bên ngoài.

Có lẽ quan trọng nhất là các tương tác của các cơ chất, của các sản phẩm hoặc các chất tác động có mang điện tích với một chất mang cũng mang điện tích.

Giả sử chất mang là một màng tích điện âm thì ở gần chất mang một chất phản ứng tích điện dương  $R^+$  sẽ được tập trung vào nhiều hơn ở trong dung dịch (bên ngoài), trong khi đó chất phản ứng tích điện âm  $R^-$  lại được tích tụ ít hơn. Hiệu ứng phân bố này sẽ thể hiện ra bằng một gradient nồng độ gián đoạn.

Hiệu ứng phân bố có thể làm thay đổi pH tối ưu biểu kiến cũng như các hằng số động học của enzym cố định.

#### • **pH tối ưu của enzym cố định**

pH tối ưu có thể khác nhau tới hai đơn vị tùy theo enzym được nghiên cứu ở trạng thái cố định hay trạng thái hòa tan. Có hai trường hợp xảy ra:

- Chất mang tích điện âm: ở gần các hạt rắn sẽ tạo ra một sự tập trung các proton của môi trường. pH ở vi môi trường của enzym sẽ axit hơn pH của dung dịch bên ngoài. Mặc dù trong thực tế, pH tối ưu thực vẫn không thay đổi và pH đo được ở môi trường lớn (của dịch) đã có một sự chuyển dịch về vùng bazơ.

- Chất mang tích điện dương: Các ion  $H^+$  bị đẩy ra nên enzym được bao bọc trong một môi trường kiềm hơn môi trường trong thiết bị phản ứng và pH tối ưu biểu kiến sẽ chuyển dịch về phía axit hơn. Chẳng hạn như enzym chimotrypsin hòa tan có pH tối ưu 8,4 sẽ giảm xuống 7,0 sau khi cố định nó trên một polyme cation (polyornitin) và sẽ tăng lên 9,6 sau khi cố định nó trên một copolyme etylen/anhydrid malic.

Thực tế, sự suy luận này chỉ đúng đối với những môi trường có lực còn yếu. Khi lực ion tăng lên, các điện tích của chất mang có thể bị trung hòa bởi các ion muối trái dấu nên các khác biệt về pH giữa vùng lân cận chất mang và dung dịch ngoài sẽ ít đi.

Trong một số trường hợp pH tối ưu là bằng pH tối ưu của enzym dạng ban đầu nhưng đáy của đường cong được nới rộng ra, điều này cho phép enzym làm việc trong một phổ pH rộng hơn.

- **Hằng số  $K_m$  của enzym cố định**

Ái lực mà cơ chất với chất mang sẽ quy định giá trị  $K_m$  của enzym. Quà vậy, một chất mang thường trên bề mặt có chứa nhiều vùng có cực nên sẽ hút cơ chất nếu cơ chất cũng háo nước, hoặc sẽ đẩy cơ chất nếu cơ chất kỵ nước. Bằng cách như thế, khi chất mang và cơ chất cả hai đều tích điện thì trong môi trường cận sát với enzym, sẽ tạo ra những tương tác sinh điện hút hoặc đẩy và kết quả là thiết lập nên một gradient nồng độ cơ chất và một sự thay đổi của ái lực biểu kiến:

$K_m$  sẽ tăng lên nếu các điện tích của chất mang và của cơ chất là cùng dấu.

$K_m$  sẽ giảm xuống nếu các điện tích của chất mang và của cơ chất là trái dấu.

Cũng như với pH, sự tăng lực ion của môi trường sẽ có xu hướng làm cho giá trị  $K_m$  của enzym ban đầu và enzym cố định gần nhau.

- **Hiệu ứng không gian**

Các tương tác tĩnh điện chưa phải là những yếu tố duy nhất quy định giá trị của  $K_m$  mà các hiện tượng công kênh không gian cũng đóng một vai trò rất quan trọng. Việc gắn kết enzym vào một chất mang cứng thường làm giảm sự tiếp cận của cơ chất, đặc biệt khi cơ chất là cao phân tử thì sẽ dẫn

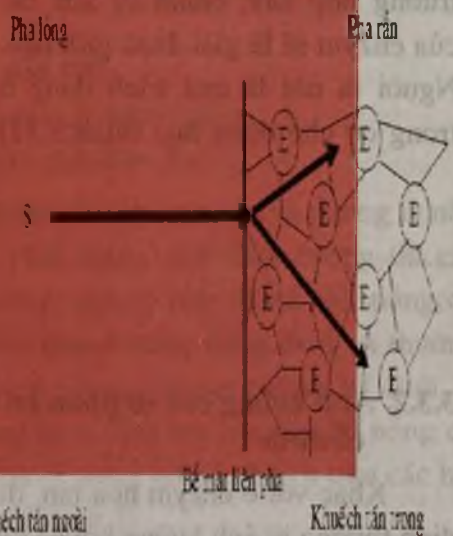
đến làm giảm ái lực biểu kiến của enzym với cơ chất. Các hiện tượng công kênh không gian đôi khi cũng dẫn đến những điểm phân cắt khác nhau trên cơ chất cao phân tử bởi cùng một enzym ở trạng thái tự do và ở trạng thái cố định. Nhiều dẫn chứng về sự hạn chế không gian đến hoạt tính của các enzym cố định đã được mô tả. Chẳng hạn, ribonuclease được cố định trong những viên bi agarose bị giảm hoạt độ 10-20% so với enzym tự do nếu cơ chất là citidin-monophosphat vòng (CMP-vòng), và giảm đi 50-75% nếu cơ chất là một ARN có khối lượng phân tử cao. Hoạt độ của glucoamylase cố định trên CM-Cellulose chỉ bằng 77% hoạt độ của enzym ban đầu nếu cơ chất là amylose có khối lượng phân tử là 8000Da và sẽ giảm xuống chỉ bằng 15-17% hoạt độ của enzym ban đầu nếu amylose có khối lượng trên 500.000Da. Tuy nhiên, có thể cải tiến tính hiệu quả của xúc tác bằng cách để cách xa protein enzym với chất mang của nó qua một "cánh tay" trung gian để làm tăng độ tự do của hệ thống, do đó sẽ làm cho enzym được vây quanh bằng môi trường phản ứng

*bi Hiện tượng khuếch tán.*

Các hiện tượng vận chuyển vật chất đóng vai trò rất quan trọng trong xúc tác dị thể. Ở đây vật chất phải được chuyển từ pha lỏng sang một pha rắn có nghĩa là phải vượt qua một bề mặt liên pha, bao gồm:

- Vận chuyển ngoài (hay khuếch tán ngoài): từ dung dịch tới bề mặt của chất mang và ngược lại bằng khuếch tán và bằng đối lưu.
- Vận chuyển trong (khuếch tán trong): vận chuyển vật chất ở bên trong một chất mang có lỗ, bên trong một gel hoặc bên trong một màng bằng khuếch tán.

Trở lực cho sự vận chuyển vật chất là do thiết lập nên một gradient nồng độ của các loại phân tử hòa tan



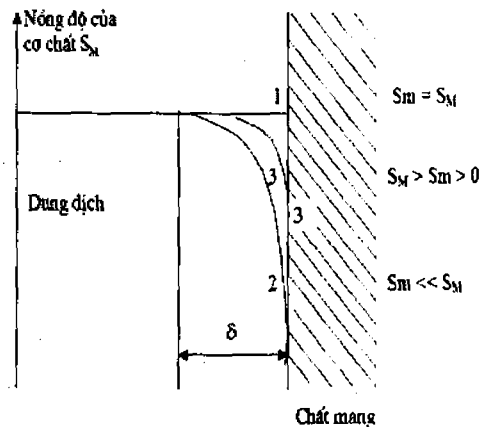
Hình 3.31. Khuếch tán trong và ngoài.

trong môi trường giữa dung dịch bên ngoài và bề mặt liên pha rắn-lỏng của chất mang và dung dịch. Trở lực này sẽ phụ thuộc vào khối lượng và nồng độ của các chất phản ứng, vào độ nhớt của môi trường và vào các đặc tính của chất mang (kích thước các hạt, độ xốp...). Có thể làm tăng tốc độ vận chuyển bằng cách tăng lưu lượng cung cấp của thiết bị phản ứng, bằng cách khuấy môi trường mạnh hơn hoặc bằng cách giảm kích thước của các hạt, sẽ góp phần làm giảm chiều dày của lớp giới hạn.

Sự giới hạn (quá trình) khuếch tán bởi các hiện tượng vận chuyển vật chất bên trong hoặc bên ngoài sẽ phụ thuộc chủ yếu vào mối tương quan giữa tốc độ phản ứng enzym và tốc độ vận chuyển.

- Nếu nồng độ cơ chất ở bề mặt liên pha lỏng-rắn là bé hơn hẳn nồng độ cơ chất trong dung dịch:  $S_m \ll S_M$ , ta sẽ thấy có sự tăng biểu kiến  $K_m$  của enzym. Trong trường hợp này, sự vận chuyển vật chất sẽ là giai đoạn giới hạn của phản ứng. Người ta nói là quá trình đang trong chế độ khuếch tán.

- Nếu vận tốc của phản ứng được xúc tác là bé hơn vận tốc vận chuyển thì nồng độ cơ chất ở lân cận enzym thực tế sẽ bằng nồng độ trong dung dịch:  $S_m = S_M$ . Trong trường hợp này, chính sự xúc tác của enzym sẽ là giai đoạn giới hạn. Người ta nói là quá trình đang ở trong cơ chế động học (hình.3.32)



**Hình 3.32.** Diện nồng độ cơ chất ở lân cận bề mặt liên pha lỏng-rắn theo bản chất của giai đoạn giới hạn.

### 3.3.2. Ảnh hưởng của sự phân bố chất hòa tan đến động học các enzym cố định

Khác với ở enzym hòa tan, dung dịch ở gần bề mặt của một enzym cố định thường bị ảnh hưởng bởi cả điện tích và độ kỵ nước của bề mặt. Do tính chất lưỡng tính của các enzym nên trên bề mặt của các hạt enzym cố định luôn có mặt các điện tích. Sự tích điện bề mặt còn được tạo ra do khi sử

dụng các chất trao đổi ion hoặc các chất mang điện tích để cố định. Khi các điện tích dương và âm không cân bằng nhau thì điện tích thực trên bề mặt sẽ có ảnh hưởng đáng kể đến các tính chất của vi môi trường. Chính sự tích điện này sẽ có tác dụng đẩy lùi các phân tử chất tan có điện tích cùng dấu và hút các phân tử có điện tích trái dấu. Lực hút hoặc đẩy do sự tích điện này là đáng kể đối với khoảng cách phân tử nhưng sẽ suy giảm nhanh chóng theo bình phương khoảng cách từ bề mặt xúc tác. Vì vậy, giữa dung dịch và vi môi trường luôn xảy ra sự phân bố các phân tử tích điện (các cơ chất và các sản phẩm). Các phân tử ngược dấu với các phân tử của bề mặt enzym cố định thì được phân bố vào trong vi môi trường, còn các phân tử có điện tích cùng dấu với các phân tử của bề mặt enzym cố định thì bị đẩy ra vào dung dịch. Có thể định lượng sự phân bố trong dung dịch bằng cách đưa vào hệ số phân bố tĩnh điện (A):

$$A = \frac{[C_0^{n+}]}{[C^{n+}]} = \frac{[A^{n-}]}{[A_0^{n-}]} \quad (3.15)$$

Trong đó  $[C_0^{n+}]$  và  $[A_0^{n-}]$  - nồng độ mỗi cation và anion trong dung dịch

$[C^{n+}]$  và  $[A^{n-}]$  - nồng độ của cation và anion trong vi môi trường.

$n$  : số điện tích của mỗi ion.

A nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100.

$A > 1$  đối với các bề mặt enzym tích điện dương.

$A < 1$  đối với các bề mặt enzym tích điện âm.

Hiệu ứng của sự phân bố đến các phân tử tích điện âm và dương là như nhau nhưng ngược nhau. Đối với một chất mang tích điện dương thì các cation được phân bố ra khỏi vi môi trường, trường hợp ngược lại, nồng độ các anion trong vi môi trường này lại lớn hơn ở trong dung dịch. A thường phụ thuộc vào mật độ điện tích ở trên và ở trong mỗi hạt enzym cố định. A bị ảnh hưởng mạnh bởi lực ion của dung dịch. Khi lực ion lớn thì nồng độ các phân tử chất hòa tan tích điện tăng lên sẽ trung hòa điện tích trên các hạt do đó làm giảm lực tĩnh điện và khiến A tiến tới 1.

Theo động học Michaelis -Menten, vận tốc của phản ứng được xúc tác bởi enzym cố định có thể viết:



$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (3.16)$$

trong đó nồng độ cơ chất là nồng độ trong vi môi trường.

- Nếu cơ chất tích điện dương, thì (theo 3.15) ta có:

$$A = \frac{[S_o]}{[S]} \quad (3.17)$$

$$\text{Do đó: } v = \frac{V_{\max}}{1 + K_m^{bk} / [S_o]} \quad (3.18)$$

$$\text{Trong đó: } K_m^{bk} = K_m A \quad (3.19)$$

$K_m^{bk}$  là hằng số Michaelis biểu kiến, thường được xác định bằng thực nghiệm với nồng độ cơ chất của dung dịch đã biết.

- Nếu cơ chất tích điện âm, ta có:

$$A = \frac{[S]}{[S_o]} \quad (3.20)$$

$$K_m^{bk} = \frac{K_m}{A} \quad (3.21)$$

Ta thấy  $K_m$  của một enzym đối với một cơ chất bị giảm rõ rệt nếu nồng độ cơ chất ở vùng lân cận tâm hoạt động của enzym cao hơn ở trong dung dịch. Bởi vì một nồng độ cơ chất trong dung dịch thấp hơn là cần thiết nhằm tạo cho nồng độ cơ chất cục bộ cao hơn để bán bão hòa được enzym.

Các hiệu ứng tương tự đến nồng độ cục bộ của các sản phẩm, các chất kìm hãm, các cofactor và các chất hoạt hóa có thể làm thay đổi các hằng số động học biểu kiến của các phân tử này. Chẳng hạn hằng số kìm hãm biểu kiến của một chất kìm hãm cạnh tranh tích điện dương như sau:

$$K_i^{bk} = K_i A \quad (3.22)$$

Nếu enzym cố định chứa một số nhóm có khả năng tạo phức càng của với các cation thì sự phân bố của các cation như thế nào vi môi trường sẽ lớn hơn so với sự phân bố được mô tả theo hệ số phân bố tĩnh điện A ở trên. Chẳng hạn enzym glucoisomerase hòa tan cần một nồng độ các ion  $Mg^{+2}$  cao hơn so với nồng độ mà enzym cố định đòi hỏi.

Một sự tập trung các nhóm ion hóa cao cũng có thể làm phân bố các khí khỏi vi môi trường do đó sẽ có ảnh hưởng đến các tham số động học biểu kiến của chúng. Đó cũng là phương pháp hay dùng để bảo vệ những enzym nhạy cảm với oxy bằng cách "muối tích" để tách oxy khỏi vùng phụ cận của enzym.

Sự phân bố các ion  $H^+$  là một trường hợp quan trọng của sự phân bố chất hòa tan. pH của vi môi trường có thể khác đáng kể với pH của dung dịch nếu các ion  $H^+$  được phân bố vào phía trong hoặc ra phía ngoài của khung enzym cố định.

Khả năng liên kết với cơ chất và hoạt độ của enzym cố định đều phụ thuộc vào pH của vi môi trường, trong khi đó pH đo được bằng máy đo pH là pH của dung dịch.

Bên cạnh ảnh hưởng đến việc phân bố các chất hòa tan, gradient tinh diện cục bộ còn có thể ảnh hưởng đến cả  $K_m$  và  $V_{max}$  bằng cách hỗ trợ hoặc ngăn cản sự tiếp cận giữa các nhóm tích điện trong phân tử enzym hoặc trong phức cơ chất - enzym trong quá trình xúc tác. Bảng 3.3 cho thấy ảnh hưởng của sự gắn kết chimotrypsin bằng đồng hoá trị với chất mang tích điện đến các hằng số động học của enzym đối với cơ chất N-acetyl-L.tyrosin-etyl-este:

**Bảng 3.3. Ảnh hưởng của chất mang tới động học của chimotrypsin cố định**

	Nồng độ ion (M)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	Tính đặc hiệu ( $k_{cat}/K_m$ )
Enzym tự do	0,05	184	0,74	249
	1,00	230	0,55	418
Enzym gắn với một chất mang tích điện âm	0,05	300	2,50	120
	1,00	280	1,93	145
Enzym gắn kết với một chất mang tích điện dương	0,05	119	7,10	17
	1,00	165	5,82	28

Các tương tác kỵ nước thường có vai trò quan trọng đối với độ hoà tan tương đối của các phân tử hữu cơ trong các dung môi nước - hữu cơ. Do các tương tác này mà làm cho các phân tử nước sắp xếp lại một cách có trật tự khi tiếp cận với các bề mặt kỵ nước. Lực hút giữa các bề mặt kỵ nước sẽ

giảm theo số mũ với khoảng cách giữa chúng. Các tương tác kỵ nước làm giảm hằng số điện môi của vi môi trường kèm theo làm thay đổi các hằng số axit của các nhóm axit và kiềm trong enzym, trong cơ chất, trong sản phẩm và trong các đệm do đó mà ảnh hưởng đến  $K_m$  của enzym cố định. Các tương tác kỵ nước thường không bị ảnh hưởng bởi lực ion hoặc pH của dung dịch nhưng có thể bị mất tác dụng do có mặt các nhóm háo nước ở bên cạnh. Vì thế các tương tác kỵ nước có thể gây ra sự phân bố các phân tử giữa dung dịch (pha lớn) và vi môi trường.

Nếu bề mặt của các hạt enzym cố định có tính kỵ nước là chủ yếu thì các phân tử kỵ nước sẽ phân bố vào trong vi môi trường của enzym còn các phân tử ưa nước sẽ bị đẩy vào trong dung dịch. Trường hợp ngược lại sẽ xảy ra nếu bề mặt có tính ưa nước. Sự phân bố sẽ làm thay đổi nồng độ cục bộ của các phân tử do đó ảnh hưởng đến các hằng số động học biểu kiến của enzym. Chẳng hạn, enzym alcol-dehydrogenase cố định, với cơ chất là butanol, sẽ có  $K_m = 0,1\text{mM}$  nếu chất mang là acrylamid, nhưng nếu chất mang là chất đồng trùng hợp giữa metacrylat và acrylamid có tính kỵ nước hơn thì  $K_m$  sẽ giảm xuống còn  $0,025\text{mM}$ . Các ảnh hưởng tương tự cũng có thể xảy ra trong trường hợp các chất kìm hãm cạnh tranh. Chẳng hạn ảnh hưởng của sự cố định enzym invertase trên chất mang kỵ nước đến hằng số kìm hãm ( $K_i$ ) của enzym đối với các chất kìm hãm cạnh tranh.

**Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chất mang kỵ nước và háo nước đến hằng số kìm hãm của Invertase**

Hằng số kìm hãm $K_i(\text{mM})$	Invertase	
	Dạng tự do	Dạng liên kết với polystyren (kỵ nước)
Anilin ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-NH}_2$ ) (kỵ nước)	0,94	0,39
Tris (hydroxy methyl amino metan) (ưa nước)	0,45	1,10

$K_i$  sẽ giảm khi cả chất kìm hãm và chất mang đều kỵ nước.

Các khí (như oxy) được phân bố vào trong môi trường khi chất mang (là) kỵ nước.

### 3.3.3. Ảnh hưởng của sự khuếch tán chất hòa tan đến động học của các enzym cố định

Để một enzym cố định xúc tác cho một phản ứng thì cơ chất phải có khả năng khuếch tán khắp dung dịch tới tâm hoạt động và sản phẩm phải có khả năng khuếch tán vào dung dịch. Quá trình khuếch tán xảy ra do gradient nồng độ: các chất hòa tan chuyển dịch từ nơi có nồng độ cao đến nơi có nồng độ thấp hơn. Các cơ chất tiếp cận với bề mặt các hạt enzym qua một lớp dung dịch mỏng bao quanh, sau đó mới khuếch tán vào các lỗ hạt và tiếp xúc với enzym ở đây. Sự chuyển dịch của các chất hòa tan thường xảy ra theo hai bước:

- Khuếch tán bên ngoài: ở đây, sự chuyển dịch các cơ chất hướng tới bề mặt, còn các sản phẩm tạo thành thì chuyển dịch ra khỏi bề mặt đó. Bước này thường xảy ra ở trên bề mặt và gồm một chuỗi các chuyển đổi cơ chất thành sản phẩm.

- Khuếch tán bên trong: ở đây sự vận chuyển các cơ chất và sản phẩm ở bên trong các lỗ của các hạt enzym - cố định xảy ra song song với phản ứng được xúc tác.

Vận tốc của một phản ứng được xúc tác bởi một enzym cố định ( $v$ ) thường thấp hơn vận tốc phản ứng được xúc tác bởi cùng một lượng enzym tự do trong dung dịch ( $v_{tự\ do}$ ) là do có sự kiểm tra bởi quá trình khuếch tán cơ chất từ dung dịch tới bề mặt xúc tác. Do cơ chất trong vi môi trường đã tham gia vào phản ứng, nên nồng độ cơ chất trong vi môi trường  $[S]$  thường thấp hơn nồng độ cơ chất  $[S_0]$  ở trong dung dịch. Có thể biểu hiện định lượng sự thay đổi vận tốc phản ứng bằng cách đưa vào hệ số hiệu quả ( $\eta$ ) (effectiveness factor):

$$\eta = v/v_{tự\ do} \quad (3.23)$$

Nói chung,  $\eta$  nằm giữa 0 và 1, phụ thuộc vào nồng độ cơ chất có trong dung dịch và phụ thuộc vào các yếu tố khác nữa.

Đôi khi,  $\eta > 1$  do quá trình không đẳng nhiệt, do các hiệu ứng phân bố hoặc kìm hãm, hoặc nếu enzym cố định được làm bền tương đương với enzym tự do trong suốt thời gian sử dụng.

Có thể thấy được ảnh hưởng của sự khuếch tán ngoài đến vận tốc của một phản ứng có enzym xúc tác nếu giả thiết rằng :

- Phản ứng tuân theo động học Michaelis - Menten.
- Enzym được cố định với một chất mang trơ - phẳng.
- Không có mặt các hiệu ứng phân bố hoặc tĩnh điện.

Nếu phản ứng xảy ra trong các điều kiện ổn định thì vận tốc tăng của sản phẩm trong dung dịch phải bằng vận tốc của ba quá trình nối tiếp : vận tốc của quá trình khuếch tán cơ chất tới bề mặt xúc tác, vận tốc xúc tác của enzym và vận tốc của quá trình khuếch tán sản phẩm khỏi bề mặt xúc tác. Giả thiết trên là hợp lý nếu thể tích của dung dịch là đủ lớn và không tính đến sự thay đổi của  $[S_0]$  theo thời gian.

Ta đều biết, enzym cố định cũng là những hệ thống mở nên có thể trao đổi cả năng lượng và vật chất qua bề mặt giới hạn với môi trường. Điều này cho phép quá trình hoạt động ở trạng thái ổn định ngay cả khi "mật độ" enzym rất cao. Rõ ràng, trong bất kỳ trường hợp nào, nồng độ cơ chất ở bề mặt xúc tác không thể tăng hoặc giảm liên tục ở tốc độ đáng kể so với tốc độ của phản ứng.

Từ phương trình Michaelis - Menten, ta có thể viết được:

$$v = \frac{AV_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (3.24)$$

Trong đó:

A : là tổng diện tích bề mặt xúc tác;

$V_{\max}$ : tốc độ tối đa của phản ứng được xúc tác bởi một đơn vị diện tích bề mặt.

Kết hợp với phương trình (3.23) ta có:

$$v = \frac{\eta AV_{\max} [S_0]}{K_m + [S_0]} \quad (3.25)$$

Bằng phương pháp đồ thị Eadie-Hofstee, có thể chuyển phương trình (3.25) thành dạng tuyến tính:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \eta A - (v/V_{\max})(K_m/[S_0]) \quad (3.26)$$

Nếu thừa nhận tất cả bề mặt tiếp xúc đều có khả năng tiếp xúc bằng nhau thì tốc độ dòng cơ chất tới bề mặt tiếp xúc sẽ tỷ lệ với cả diện tích bề

mặt và với hiệu nồng độ cơ chất giữa dung dịch và vi môi trường xung quanh sát bề mặt. Vận tốc này được thể hiện trong phương trình sau:

$$v = k_1 A ([S_0] - [S]) \quad (3.27)$$

Hằng số tỷ lệ ( $k_1$ ) được gọi là hệ số chuyển khối (đơn vị  $ms^{-1}$ ), thường phụ thuộc vào hệ số khuếch tán của cơ chất và khoảng cách hữu hiệu giữa bề mặt và dung dịch:

$$k_1 = \frac{D_s}{\delta} \quad (3.28)$$

Trong đó:  $D_s$  - hệ số khuếch tán của cơ chất trong dung dịch tự do (đơn vị là  $m^2s^{-1}$ ).

$\delta$  - Bề dày hữu hiệu của lớp động (unstired layer) bao quanh bề mặt xúc tác mà cơ chất phải khuếch tán qua nó.

Theo định luật Fick, hệ số khuếch tán được coi là tốc độ của một đơn vị khối lượng ( $m$ ) của một hợp chất đi qua một đơn vị diện tích bề mặt ( $A$ ) nhờ một gradient nồng độ của sự thay đổi một đơn vị tỷ trọng ( $P$ ):

$$\frac{dm}{dt} = -D_s \cdot A \cdot \frac{d\delta}{dx} \quad (3.29)$$

$D_s$  phụ thuộc vào khối lượng phân tử và kích thước của cơ chất cũng như vào nhiệt độ, độ nhớt và thành phần của pha lỏng (bảng 3.5). Nhìn chung, khối lượng và độ nhớt của dung dịch càng lớn thì hệ số khuếch tán càng thấp (bảng 3,5)  $\delta$  có thể coi như một khoảng cách hữu hiệu, mặc dù không xác định chính xác được  $\delta$  bằng bề dày của lớp động (vì ở khoảng cách bé hơn  $\delta$  người ta còn phát hiện được sự chuyển động của chất lỏng).

**Bảng 3.5. Hệ số khuếch tán của các phân tử trong dung dịch nước ở 20°C.**

Các chất	Khối lượng phân tử	Hệ số khuếch tán ( $m^2s^{-1} \times 10^{10}$ )
Oxy	32	21,0
Glucose	180	6,7
Saccrose	342	4,5
Inulin	5.200	2,3
Albumin	67.000	0,7
Urease	480.000	0,3
Virus	10.700.000	0,1

Trong các điều kiện có dòng động thì  $\delta$  bằng bán kính của các hạt hình cầu. Thường  $\delta$  phụ thuộc vào các điều kiện thủy động lực học,  $\delta$  giảm khi tăng tốc độ khuấy và  $\delta$  giảm lại làm tăng hệ số chuyển khối  $k_L$ . Phụ thuộc vào các điều kiện,  $\delta$  có thể biến thiên theo hệ số khuếch tán, tỷ trọng và độ nhớt của chất lỏng; tăng với sự tăng hệ số khuếch tán và độ nhớt nhưng lại giảm khi tăng hiệu tỷ trọng giữa các enzym cố định và môi trường.  $\delta$  giảm đi một nửa khi sử dụng sóng siêu âm (với các hạt có kích thước lớn hơn có thể sử dụng sóng siêu âm).

Với các hạt xúc tác sinh học nhỏ thường được sử dụng thì có thể làm giảm tối đa  $\delta$  bằng cách làm tăng sự cuốn xoáy của dung dịch quanh enzym cố định lên khoảng 10 lần.

Vận tốc khuếch tán thường bị ảnh hưởng đáng kể khi có sự phân bố. Đối với các phân tử tích điện thì vận tốc khuếch tán sẽ phụ thuộc vào gradient thế tĩnh điện và gradient nồng độ. Gradient thế tĩnh điện thường gây nên các thay đổi biểu kiến ở cả  $\delta$  và  $D_s$  trong vùng lân cận của bề mặt (nghĩa là ở khoảng cách nhỏ hơn  $\delta$  nhiều).

Do tính chất nối tiếp của quá trình, nên vận tốc của phản ứng enzym ( $v$  trong phương trình 3.24) phải bằng vận tốc khuếch tán của cơ chất tới bề mặt xúc tác ( $v$  trong phương trình 3.27), ta có:

$$\frac{V_{\max} [S]}{K_m [S]} = k_L ([S_o] - [S]) \quad (3.30)$$

Phương trình này là bậc hai đối với nồng độ cơ chất  $[S]$  trong vi môi trường do đó rất khó xác định được giá trị của phương trình bằng các cách độc lập nhau. Phương trình này có thể được đơn giản hóa với các cực trị của  $[S]$  liên quan với  $K_m$  của enzym đối với cơ chất.

- Nếu  $[S] \gg K_m$  thì vế trái của phương trình (3.30) chỉ còn  $V_{\max}$ , do đó:

$$V_{\max} = k_L ([S_o] - [S]) = v_A \quad (3.31)$$

Ở đây,  $v_A$  là vận tốc phản ứng được xúc tác bởi một đơn vị diện tích bề mặt của enzym cố định. Do đó mà vận tốc phản ứng được xúc tác bởi enzym cố định bằng vận tốc cực đại của phản ứng được xúc tác bằng enzym không cố định khi  $[S]$  và do đó  $[S_o] \gg K_m$ . Tuy nhiên, thường thì người ta nhận thấy  $[S] \ll K_m$ . Trong điều kiện này phương trình (3.30) trở thành:

$$[S] (V_{\max}/K_m) = k_L ([S_0] - [S]) \quad (3.32)$$

Nhóm [S] vào một vế, ta có:

$$[S] = \frac{k_L (S_0)}{k_L + V_{\max} / K_m} \quad (3.33)$$

$$\text{hay } [S] = \frac{[S_0]}{1 + V_{\max} / K_m (1/k_L)} \quad (3.34)$$

Từ phương trình (3.24) khi  $[S] \ll K_m$ :

$$V_A = [S] \frac{V_{\max}}{K_m} \quad (3.35)$$

Thay [S] từ phương trình (3.34) vào (3.35), ta có:

$$V_A = \frac{[S_0](V_{\max} / K_m)}{1 + (V_{\max} / K_m)(1/k_L)} \quad (3.36)$$

$$\text{Do đó: } V_A = \frac{[S_0]}{1 + \frac{V_{\max}}{K_m} + \frac{1}{k_L}} \quad (3.37)$$

Các giá trị tương đối của hai số hạng ở mẫu số trong phương trình (3.37) quyết định phản ứng được điều khiển chủ yếu bằng sự khuếch tán của cơ chất ( $k_L$ ) hay bằng khả năng xúc tác của enzym cố định (giá trị  $V_{\max}/K_m$ ). Có thể so sánh bằng cách đưa vào modun  $\mu$  của cơ chất bên ngoài ( $\mu$  còn được gọi là số Damkohler, là tỷ số không thứ nguyên của vận tốc phản ứng/vận tốc dịch chuyển):

$$\mu = \frac{V_{\max}}{k_L K_m} \quad (3.38)$$

Trong đó:  $V_{\max}$  - vận tốc cực đại của phản ứng được xúc tác bằng một đơn vị diện tích bề mặt.

Thay  $\mu$  vào (3.36), ta có:

$$V_A = \frac{[S_0](V_{\max} / K_m)}{1 + \mu} \quad (3.39)$$

- Khi  $k_L \gg \frac{V_{\max}}{K_m}$  (nghĩa là tại  $\mu=0$  khi sự chuyển khối xảy ra với vận tốc nhanh hơn vận tốc của phản ứng được enzym xúc tác) thì vận tốc chung



của quá trình là do xúc tác enzym quyết định và phương trình (3.37) được đơn giản hoá thành:

$$v_A = [S_0] \cdot \frac{V_{\max}}{K_m} \quad (3.40)$$

- Tuy nhiên khi  $k_L \ll \frac{V_{\max}}{K_m}$  (nghĩa là tại modun cơ chất cao), khi vận

tốc chuyển khối chậm hơn nhiều so với vận tốc của phản ứng có enzym xúc tác thì vận tốc chung của quá trình là do vận tốc khuếch tán quyết định. Khi đó phương trình (3.37) được đơn giản hóa thành:

$$v_A = k_L [S_0] \quad (3.41)$$

Từ phương trình này, ta thấy tốc độ phản ứng độc lập với hoạt tính của enzym. Điều này có nghĩa, phản ứng không bị ảnh hưởng bởi các thay đổi về pH, nhiệt độ (ngoại trừ nó có thể bị ảnh hưởng bởi độ nhớt) hoặc lực ion của dung dịch, cũng như không bị ảnh hưởng bởi các chất kìm hãm hay các chất hoạt hóa. Tuy nhiên nếu tỷ số  $V_{\max}/K_m$  bị giảm do thay đổi các điều kiện này để tiến tới giá trị  $k_L$ , thì mối quan hệ trong phương trình (3.41) sẽ không còn đúng nữa. Khi sự khuếch tán bị kìm lại thì nồng độ cơ chất trong dung dịch để cho vận tốc phản ứng bằng một nửa vận tốc cực đại ( $[S_{1/2}]$  tương ứng với  $K_m^{app}$  biểu kiến) cao hơn  $K_m$  của enzym tự do. Còn nồng độ cơ chất ở vi môi trường để cho vận tốc phản ứng bằng một nửa vận tốc cực đại vẫn bằng  $K_m$ .

$v_A$  có thể được thay thế bằng  $V_{\max}/2$  trong phương trình (3.27) khi  $[S]$  bằng  $K_m$ , lúc này ta có:

$$v_A = V_{\max}/2 = k_L ([S_{1/2}] - K_m) \quad (3.42)$$

$$\text{Do đó } [S_{1/2}] = K_m + V_{\max}/2k_L \quad (3.43)$$

$$\text{hay } [S_{1/2}] = K_m^{app} = K_m (1 + \mu/2) \quad (3.44)$$

Rõ ràng,  $K_m$  tăng theo modun cơ chất bên ngoài. Điều này cũng có nghĩa là làm giảm tính đặc hiệu biểu kiến. Đưa các nồng độ cơ chất không

thứ nguyên  $\beta (= \frac{[S]}{K_m})$  và  $\beta_0 (= \frac{[S_0]}{K_m})$  vào phương trình (3.30) ta được:

$$\frac{V_{\max} \beta}{1 + \beta} = k_L K_m (\beta_0 - \beta) \quad (3.45)$$

Thay  $\mu$  từ phương trình (3.38) vào ta có:

$$\frac{\mu\beta}{1+\beta} = \beta_0 - \beta \quad (3.46)$$

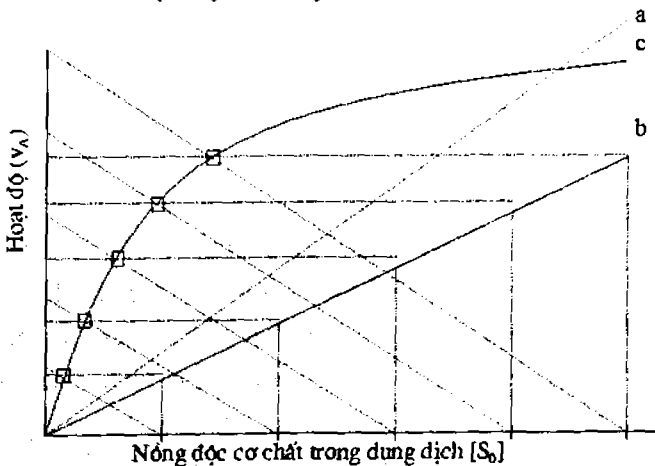
Phương trình này có thể được đơn giản hóa ở giá trị  $\beta_0$  thấp, khi  $\beta$  tiến tới 0, ta có:

$$\beta = \frac{\beta_0}{(1+\mu)} \quad (3.47)$$

và 
$$[S] = \frac{[S_0]}{(1+\mu)} \quad (3.48)$$

Do đó nếu biết giá trị  $\mu$  thì có thể tính được nồng độ cơ chất ở bề mặt của enzym cố định.

Thông thường người ta cần phải xác định các tham số động học của một enzym cố định khi có mặt các hiệu ứng khuếch tán ngoài nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của việc cố định đến độ bền (thực) hoặc tới hoạt độ của enzym. Có thể xác định được  $V_{max}$  thực nếu tạo được nồng độ cơ chất ở vi môi trường đủ cao. Còn xác định  $K_m$  thực sẽ nhờ vào nồng độ cơ chất đã biết ở vi môi trường. Có thể xác định các tham số động học này bằng phương pháp đồ thị nếu biết được hệ số chuyển khối.



**Hình 3.33. Sơ đồ minh họa một phương pháp xác định các tham số động học thực ( $V_{max}$  và  $K_m$ ):**

- Đường a - Giá trị  $k_L$  có thể được xác định từ đường tiếp tuyến của đường cong thực nghiệm.
- Đường b- Tốc độ phản ứng với nồng độ cơ chất trong dung dịch.
- Đường c- Tốc độ phản ứng với nồng độ cơ chất trong vi môi trường. Từ đây có thể xác định các tham số động học.

Các enzym cố định thường bị ảnh hưởng bởi các chất kìm hãm khác với ở enzym hòa tan.

Với enzym cố định, ta cũng có thể biết được ảnh hưởng của các chất kìm hãm cạnh tranh, không cạnh tranh và phi cạnh tranh bằng cách xem xét sự thay đổi của các hằng số động học biểu kiến  $K_m^{bk}$  và  $V_{max}^{bk}$  thu được.

Từ phương trình (3.38), gọi  $\mu_i$  là giá trị của modun cơ chất bên ngoài khi có chất kìm hãm.

Và từ các giá trị tương ứng  $K_m$  và  $V_{max}$  của enzym hòa tan khi có chất kìm hãm cạnh tranh, không cạnh tranh và phi cạnh tranh (bảng 3.2) ta có thể viết được đối với enzym cố định:

- Với chất kìm hãm cạnh tranh, ta có:

$$\mu_i = \frac{\mu}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (3.49)$$

- Với chất kìm hãm không cạnh tranh, ta được:

$$\mu_i = \mu \quad (3.50)$$

- Với chất kìm hãm phi cạnh tranh, ta được:

$$\mu_i = \frac{\mu}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (3.51)$$

Từ đây ta thấy cả hai chất kìm hãm cạnh tranh và phi cạnh tranh đều có  $\mu_i$  giảm so với  $\mu$ . Vậy là sự cản khuếch tán cơ chất ở hai quá trình bị kìm hãm này sẽ ít hơn so với ở enzym cố định không bị kìm hãm. Điều này là do các phản ứng bị kìm hãm vốn đã chậm hơn và ít có khả năng được kiểm soát bởi tốc độ khuếch tán cơ chất. Còn trong trường hợp kìm hãm không cạnh tranh thì không có ảnh hưởng nào đáng kể nhất là khi ở nồng độ cơ chất thấp. Trong hai trường hợp trước, thậm chí ảnh hưởng của mức độ kìm hãm sẽ trở nên không đáng kể ngay cả khi ở modun cơ chất bên ngoài cao ( $\mu > 50$ ).

• Trong trường hợp các enzym cố định, sự kìm hãm bởi sản phẩm có thể còn nghiêm trọng hơn do sản phẩm khuếch tán khỏi tâm phản ứng, do đó làm cho nồng độ sản phẩm ở trong vi môi trường có thể cao hơn ở trong

dung dịch nhiều. Ở giai đoạn đầu của phản ứng, nồng độ sản phẩm sẽ tích lại cho đến khi tạo được gradient nồng độ đối với dung dịch đủ lớn để cho phép sản phẩm khuếch tán ra ngoài với tốc độ ngang bằng với tốc độ tạo thành nó từ phản ứng.

Nếu gọi  $k_L^S$  và  $k_L^P$  là hệ số chuyển khối cơ chất và hệ số chuyển khối sản phẩm,  $[P]$  và  $[P_o]$  là nồng độ sản phẩm trong vi môi trường và nồng độ sản phẩm trong dung dịch, từ phương trình (3.27) ta có:

$$v_A = k_L^S ([S_o] - [S]) = k_L^P ([P] - [P_o]) \quad (3.52)$$

Do sự kiểm soát của khuếch tán nên  $[P]$  và  $[S_o]$  lớn hơn  $[P_o]$  và  $[S]$  rất nhiều:  $[P] \gg [P_o]$  và  $[S_o] \gg [S]$ , do đó:

$$[P] = [S_o] \frac{k_L^S}{k_L^P} \quad (3.53)$$

Ở phần trước, ta đã thấy chất kìm hãm cạnh tranh có cấu tạo giống cơ chất và thường là sản phẩm của một phản ứng (kìm hãm bởi sản phẩm, như trường hợp galactose kìm hãm lactase). Tương tự như phương trình vận tốc của phản ứng có kìm hãm cạnh tranh, ta có thể viết được phương trình vận tốc của phản ứng có kìm hãm bởi sản phẩm.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m (1 + [P]/K_p) + [S]} \quad (3.54)$$

Thay  $[P]$  ở phương trình (3.53) vào đây và giả thiết rằng  $K_m \gg [S]$ , ta được:

$$v_A = \frac{V_{max} [S]}{K_m + K_m k_L^S [S] / (K_p k_L^P)} \quad (3.55)$$

Từ đây ta thấy, ảnh hưởng của sự kìm hãm bởi sản phẩm (số hạng thứ hai ở mẫu số) phụ thuộc vào nồng độ cơ chất trong dung dịch và tỷ số  $K_m k_L^S / (K_p k_L^P)$ , thể hiện sự cạnh tranh giữa cơ chất và sản phẩm đối với bề mặt enzym. Việc tích tụ sản phẩm ở bề mặt enzym sẽ tăng theo tỷ số này và sẽ làm giảm cả vận tốc phản ứng và hệ số hiệu lực. ảnh hưởng này sẽ lớn hơn khi  $K_m/K_p$  hoặc  $k_L^S/k_L^P$  lớn và  $\mu$  nhỏ ( $<50$ ).

$k_L^S$  thường xấp xỉ  $k_L^P$  nhưng có thể lớn hơn khi phản ứng tạo ra sản phẩm có trọng lượng phân tử lớn hơn nhiều một phân tử cơ chất hoặc thấp hơn trong phản ứng khử trùng hợp (hay phản ứng thủy phân).

• Kim hãm bởi cơ chất là một quá trình phức tạp hơn. Và ta đã có phương trình vận tốc:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S](1 + [S]/K_s)} \quad (3.56)$$

Kết hợp phương trình (3.56) với phương trình (3.37) ta được:

$$v_A = k_L \cdot ([S_0] - [S]) = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_s}} \quad (3.57)$$

Đây là phương trình bậc 3 đối với nồng độ cơ chất  $[S]$  ở trong vi môi trường. Do đó có thể có các trạng thái bền vững miễn là sự khuếch tán của cơ chất đến enzym đủ chậm. Cùng một nồng độ cơ chất trong dung dịch có thể cho hai nồng độ ổn định khác nhau trong vi môi trường:

1 - Một nồng độ cơ chất thấp vừa tạo được một vận tốc phản ứng tương đối nhanh không có sự kim hãm của cơ chất, vừa tạo được một vận tốc khuếch tán cơ chất vào bên trong nhanh đều nhờ một gradient nồng độ cao.

2 - Một nồng độ cơ chất rất cao vừa tạo được một vận tốc phản ứng tương đối chậm nhờ có sự kim hãm bởi cơ chất vừa tạo được một vận tốc khuếch tán cơ chất vào trong chậm đều do (dưới) một gradient nồng độ tương đối thấp.

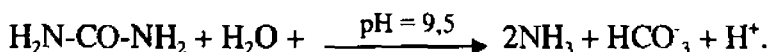
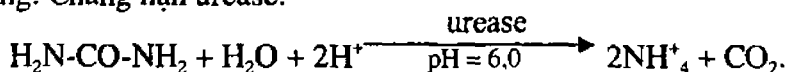
Một khả năng thứ ba là có một nồng độ trung gian, thể hiện một trạng thái không bền, không được hình thành một cách tự nhiên và không có hiệu quả thực tế.

• Các phản ứng thuận nghịch được xúc tác bằng các enzym cố định có thể bị ảnh hưởng nghiêm trọng do sự khuếch tán của sản phẩm khỏi bề mặt xúc tác khá chậm. Ngay cả khi nồng độ sản phẩm được tích tụ ở vi môi trường còn thấp cũng làm tăng vận tốc phản ứng nghịch do đó làm giảm mạnh hiệu suất của enzym.

Sự cản khuếch tán có thể làm tăng biểu kiến độ bền của các enzym cố định. Hiệu suất của enzym cố định sẽ duy trì không đổi cho đến khi hoạt độ riêng của enzym bị suy giảm và phản ứng khi đó sẽ không còn bị kiểm soát bởi khuếch tán nữa.

Một trường hợp đặc biệt của quá trình kiểm chế các phản ứng có enzym cố định bằng khuếch tán là trường hợp các ion hydro. Nhiều phản

ứng do enzym xúc tác có thể giải phóng ra hoặc tiêu thụ ion  $H^+$  (chẳng hạn như dehydrogenase, peptidase và esterase). Điều này có thể xảy ra ở bất kỳ phản ứng nào có sự tham gia của các phân tử chứa các nhóm ion hóa được, giá trị  $pK_a$  của các nhóm này trên các cơ chất và sản phẩm có thể khác nhau. Đôi khi, phản ứng có thể tạo ra hoặc tiêu thụ ion  $H^+$  tùy thuộc vào pH của phản ứng. Chẳng hạn urease:



Các ion  $H^+$  khuếch tán tương đối chậm, tương tự như các ion một hóa trị khác khi không có một điện trường, là do bốn nguyên nhân sau:

1- Ion  $H^+$  thường được hydrat hóa ( $H_3O^+$ ,  $H_9O_4^+$ ) do đó làm tăng khối lượng phân tử biểu kiến và làm giảm hệ số khuếch tán của mình.

2- Yêu cầu một sự trung hòa điện địa phương đòi hỏi phải khuếch tán đồng thời các phân tử mang điện tích dương và âm, cũng làm tăng khối lượng phân tử lên đáng kể (vì mỗi ion  $H^+$  khuếch tán với một anion).

3- Các ion  $H^+$  được đệm bằng histidin và những nhóm khác ở trên các hạt enzym cố định sẽ làm giảm khả năng khuếch tán của chúng vào dung dịch.

4- Thường, nồng độ ion  $H^+$  trong dung dịch thấp ( $pH = 7$  tương ứng với  $10^{-7} \text{ MH}^+$ ) do đó tạo nên các gradient nồng độ rất nhỏ, nhất là khi sự chênh lệch pH chỉ bằng một hoặc hai đơn vị.

Vì thế nhiều phản ứng có thể được kiểm chế bằng sự khuếch tán các ion  $H^+$  tới bề mặt enzym cố định hoặc tách khỏi bề mặt enzym cố định. Ảnh hưởng của sự kiểm chế khuếch tán này có thể thấy rõ khi kết hợp phương trình:

$$V_{\max} = \frac{k_{+2}[E]_0}{([H^+]/K_{a1}) + 1 + (K_{a2}/[H^+])} \quad (3.58)$$

với phương trình (3.37) đối với 1 phản ứng giải phóng  $H^+$ , ta được:

$$\frac{V^*}{([H^+]/K_{a1}) + 1 + (K_{a2}/[H^+])} = k_L^H ([H^+] - [H^+]_0) \quad (3.59)$$

Trong đó:  $V^*$ - Vận tốc cực đại của phản ứng nếu  $pK_{a1}$  và  $pK_{a2}$  tách biệt rõ ràng.

$k_L^H$  - Hệ số chuyển khối của  $H^+$ .

$[H^+]$ - Nồng độ của ion  $H^+$  trong vi môi trường.

$[H_0^+]$ - Nồng độ của ion  $H^+$  trong dung dịch.

Nếu phản ứng xảy ra sự tiêu thụ ion  $H^+$  thì nó sẽ tuân theo phương trình sau:

$$\frac{V^*}{([H^+]/K_{a1}) + 1 + (K_{a2}/[H^+])} = k_L^H ([H^+] - [H_0^+]) \quad (3.60)$$

Độ lớn của sự cản khuếch tán được xác định bởi modun proton ( $\mu_H$ ):

$$\mu_H = \frac{V^*}{k_L^H K_{a1}} \quad (3.61)$$

Chú ý là khái niệm modun proton tương tự khái niệm modun cơ chất ngoài (phương trình 3.38).

Người ta nhận thấy rằng các ion  $H^+$  tích lại trên bề mặt xúc tác khi modun proton lớn hơn  $10^4$ . Các phản ứng như thế (này) có thể xảy ra tương đối nhanh ở một pH cách xa giá trị pH tối ưu cho enzym tự do. Điều này rất có ích trong trường hợp ở một pH khiến cơ chất có tính tan cao hơn hoặc tạo ra một môi trường thuận lợi hơn cho phản ứng. Sự khuếch tán của các ion hydro có thể được dễ dàng thậm chí ở các nồng độ thấp hơn đáng kể so với nồng độ cần thiết cho tác dụng đệm thông thường của chúng bằng cách liên kết các cặp axit-bazơ. Bởi lẽ các đệm có thể có các gradient nồng độ cao hơn nhiều so với các ion hydro mà không làm ảnh hưởng đến pH trong dung dịch (hình 3.34). Trong trường hợp này phương trình (3.59) cần được mở rộng để bao gồm được cả sự vận chuyển và khuếch tán của các ion hydro do các axit liên hợp. Để một phản ứng sinh ra được các ion  $H^+$ , phương trình (3.59) được biến đổi thành:

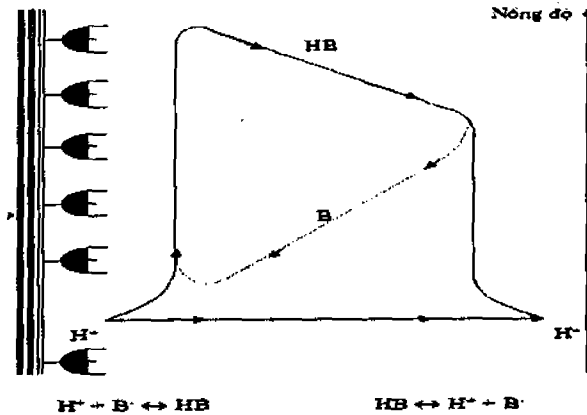
$$\frac{V^*}{([H^+]/K_{a1}) + 1 + (K_{a2}/[H^+])} = k_L^H ([H^+] - [H_0^+]) + k_L^{HB} ([HB] - [HB_0]) \quad (3.62)$$

Trong đó:  $k_L^{HB}$  - Hệ số chuyển khối của HB.

[HB]- Nồng độ của acid liên hợp trong vi môi trường.

[HB<sub>o</sub>]- Nồng độ của HB trong dung dịch.

Ở pH của dung dịch bằng 7, các ion H<sup>+</sup> được vận chuyển bằng đệm milimol (10<sup>-3</sup>M) có pK<sub>a</sub> = 7 hàng ngàn lần lớn hơn so với các ion hydro tự do. Sự có mặt của các ion đệm này có thể có ảnh hưởng đáng kể đến điện pH hoạt động của các phản ứng có sự khuếch tán của ion H<sup>+</sup>.



Hình 3.34. Giản đồ chỉ rõ sự vận chuyển nhẹ nhàng của các ion hydro ra khỏi một enzym cố định lại xúc tác cho một phản ứng sản sinh ra các ion hydro.

- Gradient nồng độ ion H<sup>+</sup> rất nhỏ do nồng độ ion H<sup>+</sup> trong dung dịch thấp nên không thể tạo ra một nồng độ ion H<sup>+</sup> thực trong vi môi trường.
- Cặp đệm HB/B<sup>-</sup> sẽ làm di chuyển proton khỏi bề mặt và phân bố chúng trong vi môi trường và trong dung dịch.



**ĐIỆN CỰC SINH HỌC (CẢM BIẾN SINH HỌC -  
BIOSENSORS)**

---

**4.1. SƠ LƯỢC LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA ĐIỆN CỰC SINH HỌC**

Năm 1956, giáo sư Leland Clark Jnr-người khai sinh về khái niệm cảm biến sinh học (biosensors) đã công bố về điện cực oxy. Dựa trên kinh nghiệm và tâm huyết của mình ông đã phát triển lĩnh vực phân tích giúp có thể đo lường được trong cơ thể.

Năm 1962, tại hội nghị khoa học ở Viện hàn lâm New York, ông có bài diễn thuyết "Làm thế nào để các điện cực điện hoá (phương pháp pH, phương pháp cực phổ, phép đo điện thế, phép đo độ dẫn điện) thông minh hơn". Trong đó ông trình bày cách làm điện cực điện hóa thông minh bằng việc thêm enzym vào máy chuyển đổi như những chiếc bánh sandwich được bao bọc bởi một lớp màng.

Năm 1975, ý tưởng của Clark trở thành hiện thực với sự công bố của công ty Yellow Springs Instrument (Ohio) về máy phân tích glucose dựa trên việc đo dòng điện của hydropeoxyt. Đây là lần đầu tiên các phòng thí nghiệm trên thế giới phân tích dựa trên một điện cực sinh học (DCSH).

Năm 1975, điện cực sinh học tiến thêm một bước nữa đó là khi Divis đề xuất rằng vi khuẩn có thể được dùng như một yếu tố sinh học trong điện cực vi khuẩn để đo hàm lượng etanol.

Năm 1976, La Roche (Thụy Sĩ) giới thiệu máy phân tích Lactat (Lactate Analyser - LA640) trong đó có tác nhân trung gian hexacyanoferrat hoà tan được sử dụng để chuyển các điện tử từ lactatdehydrogenase tới một điện cực. Mặc dù không thành công trên thương trường nhưng là bước đột

phá quan trọng cho một thế hệ điện cực sinh học mới được ứng dụng trong thể thao và chẩn đoán lâm sàng.

Năm 1987, điện cực enzym screen-printed được công bố bởi Medisense (Cambridge, USA) với dụng cụ đo có kích thước như một chiếc bút cho phép giám sát lượng glucose trong máu tại nhà. Điện cực này được thiết kế lại làm cho thông dụng hơn và số lượng bán của Medisense đã đạt tới 175 triệu đôla năm 1996 khi họ được Abbott mua lại.

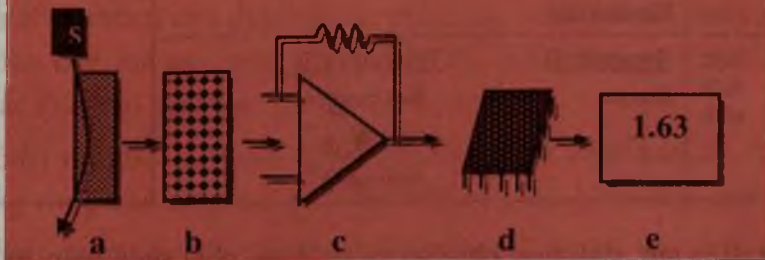
Hiện nay hãng Boehringer, Mannheim và Bayer đang cạnh tranh nhau rất gay gắt về điện cực sinh học và lượng bán ra của ba công ty chiếm ưu thế trên thị trường điện cực sinh học của thế giới tới 85%.

## 4.2. KHÁI NIỆM VỀ ĐIỆN CỰC SINH HỌC

Một bộ điện cực sinh học thực chất là một thiết bị phân tích chuyển đổi các đáp ứng sinh học thành các tín hiệu điện, nhiệt, hoặc quang (Theo Enzyme Technology, Cambridge University press). Từ các tín hiệu đó người ta có thể đo được nồng độ các chất cần phân tích.

Điện cực sinh học dựa trên việc kết hợp các chất có hoạt tính sinh học đã được cố định với một thiết bị chuyển đổi tín hiệu (signal transducer) và một bộ khuếch đại điện tử. Ngoài ra, còn có thể có thêm một số thiết bị đầu ra như thiết bị phân tích, xử lý (computer). Điện cực sinh học có thể sử dụng các hệ thống sinh học (biological system) ở các mức độ khác nhau.

Cấu tạo và nguyên lý hoạt động của một điện cực sinh học được thể hiện ở hình 4. 1 và bảng 4.1.



**Hình 4.1:** Sơ đồ nguyên lý cấu tạo của một ĐCSH:

S: cơ chất cần đo (glucose, ure...);

a: màng sinh học: là màng đã được cố định các chất có hoạt tính sinh học như : enzym, ADN, vi sinh vật hoặc phân tử miễn dịch (kháng nguyên, kháng thể).

- b: Thiết bị chuyển đổi (transducer): là một thiết bị chuyển đổi tín hiệu nhằm chuyển đổi đáp ứng sinh học thành tín hiệu (điện áp, dòng điện, điện thế, nhiệt, quang...)
- c: Bộ khuếch đại tín hiệu: thường sử dụng với các trường hợp tín hiệu điện hoặc đơn giản chỉ là thu các tín hiệu gốc để đưa vào bộ xử lý tín hiệu.
- d: Bộ xử lý tín hiệu: xử lý tín hiệu để đưa ra kết quả, thông qua việc so sánh với các mức chuẩn hoặc công thức tính toán.
- e: Biểu hiện kết quả

**Bảng 4.1: Các nguyên lý của điện cực sinh học**

<p>1. Điện cực ái lực sinh học (bioaffinity sensor)</p>	<p><math>S + R \leftrightarrow SR</math>            Thay đổi mật độ electron  <u>Receptor R</u>                      <u>Tín hiệu hoá học S</u>            Lectin                                  Sacarit               Glycoprotein            Enzym                                  Cơ chất               Chất ức chế            Kháng thể (Ab)      Kháng nguyên (Ag)            Receptor                                  Hormon</p>	<p>Các chuyển đổi (transducer)            - Điện cực đo điện thế            - Điện cực đo dòng điện            - Điện cực đo nhiệt            - Điện cực đo quang.            - Điện cực chọn lọc ion sử dụng transistor có hiệu ứng trường (ISFET)</p>
<p>2. Điện cực chuyển hoá (metabolism sensor)</p>	<p><math>S + R \leftrightarrow SR \rightarrow P + R</math>            Tiêu thụ cơ chất và tạo thành sản phẩm  <u>Receptor R</u>                      <u>Tín hiệu hoá học S</u>            Enzym                                  Cơ chất            Bào quan                              Cofactor            Vi sinh vật                              Chất ức chế            Lát mô                                      Hoạt tính enzym</p>	
<p>3. Các hệ thống cặp đôi và lai</p>	<p>Các chuỗi            Cạnh tranh            Khuếch đại</p>	
<p>4. Điện cực nhai (bất chức) sinh học</p>	<p><u>Receptor R</u>                      <u>Tín hiệu vật lý S</u>            Enzym                                  Âm thanh               Áp lực               Ánh sáng</p>	

Một điện cực sinh học khi đưa ra sử dụng phải thoả mãn một số yêu cầu sau:

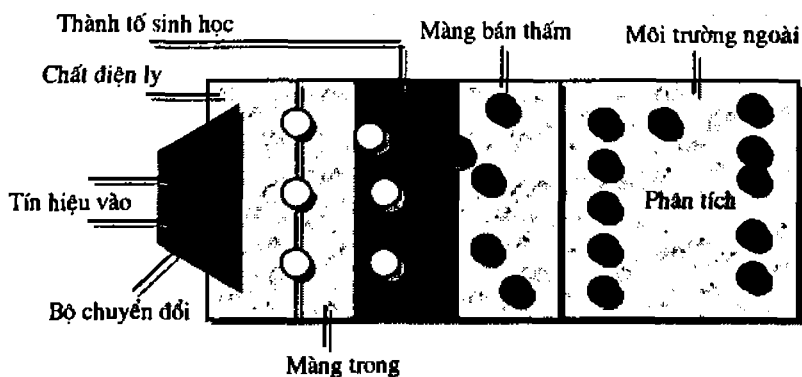
Chất xúc tác sinh học phải có tính đặc hiệu cao, ổn định trong điều kiện bảo quản thường.

- Phản ứng sinh học không phụ thuộc và các điều kiện vật lí như khuấy, pH, nhiệt độ ...

- Đáp ứng sinh học phải chính xác, rõ ràng, thời gian hồi đáp tín hiệu không quá dài và phải sử dụng lặp lại được nhiều lần.

- Điện cực hoàn chỉnh phải có kích thước nhỏ, phát hiện được các chất ở nồng độ thấp và rẻ tiền.

Nguyên lý chung của một điện cực sinh học được biểu diễn hình 4.2.



**Hình 4.2. Nguyên lý chung của một cảm biến sinh học:**

- : chất cần phân tích;
- : tác nhân kích thích (tạo ra tín hiệu).

Các chất cần phân tích (được mô tả bằng những vòng tròn đậm) ở trong mẫu phân tích sẽ đi vào trong điện cực. Màng ngoài (external membrane) của điện cực cho các chất cần phân tích thấm qua. Thành tố sinh học (biological element) của điện cực sẽ phản ứng với chất cần phân tích và tạo ra các đáp ứng mà các thiết bị chuyển đổi (transducers) có thể phát hiện được. Các thành tố sinh học tại đây có thể làm:

- Biến đổi các chất cần phân tích thành các chất hoá học khác (biểu diễn bằng vòng tròn rỗng trong sơ đồ thông qua các phản ứng sinh hoá).

- Giải phóng ra các sản phẩm hoá học rồi từ đây tạo ra các tác nhân kích thích.

- Thay đổi các đặc tính như quang học, điện học, cơ học.

- Tạo ra một số các đáp ứng khác nhau với lượng có thể đo được.

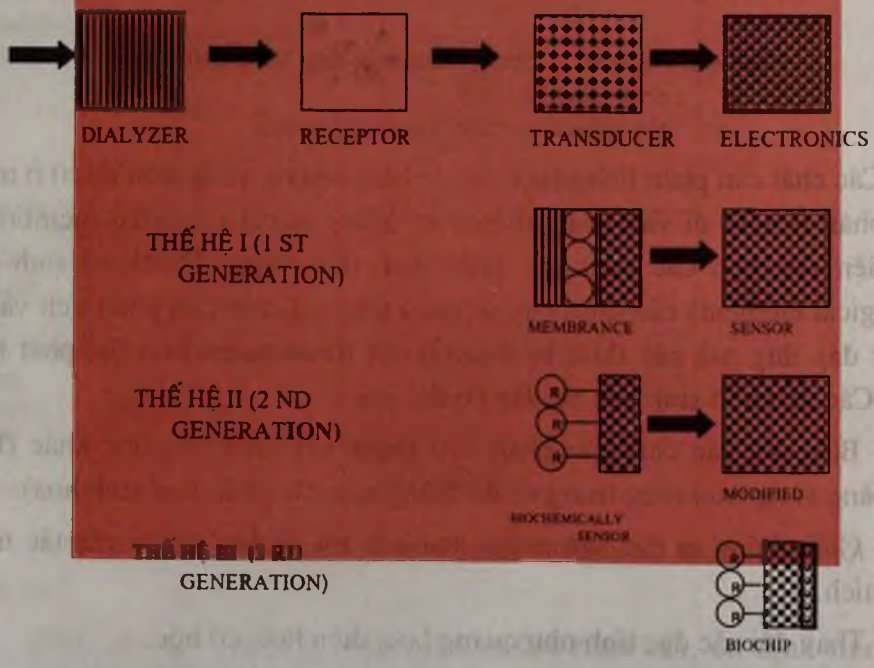
Còn có một số màng khác gắn bộ phận transducer, những màng này có thể có các đặc tính thấm khác nhau so với màng bên ngoài. Tín hiệu ra của điện cực thường phụ thuộc vào loại biến năng (transducer) mà nó sử dụng.

Trong bảng 4.2 giới thiệu một số điện cực enzyme thường sử dụng.

**Bảng 4.2: Các điện cực enzyme thường sử dụng**

Stt	Chất để xác định	Điện cực Enzym	Sản phẩm
1	Glucose	Glucooxydase và catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub>
2	Saccharose	Invertase, glucooxydase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3	Lactose	$\beta$ -galactosidase, glucooxydase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
4	Alcohol	Alcol oxydase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
5	Ure	Urease	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , CO <sub>2</sub>
6	Penicillin	Penicillinase	H <sup>+</sup>

Dựa theo mức độ các mạch của điện cực sinh học có thể chia điện cực sinh học ra làm ba thế hệ (thể hiện ở hình 4.3).



**Hình 4.3. Các thế hệ điện cực sinh học (biosensor).**

– *Thế hệ đầu I*: Các chất xúc tác sinh học được gói hoặc liên kết với màng xảy ra trên bề mặt transducer.

– *Thế hệ thứ II*: Các cấu tử có hoạt tính sinh học được liên kết với bề mặt transducer bằng liên kết cộng hóa trị hay liên kết hấp phụ mà không sử dụng màng bán thấm.

– *Thế hệ thứ III*: Các chất xúc tác sinh học được liên kết trực tiếp với một thiết bị điện tử và thiết bị này có khả năng chuyển đổi và khuếch đại các tín hiệu, ví dụ như cổng của một FET (field effect transistor).

#### 4.2.1. Các phần biến đổi sinh học (biological transducers)

Như đã mô tả ở phần trên, các thành tố biểu hiện sinh học là bộ phận nhất định phải có trong một điện cực sinh học. Nó là nhân tố quyết định và chịu trách nhiệm phát hiện chất cần phân tích một cách có chọn lọc. Việc tạo ra các tín hiệu hoá lý được theo dõi bởi các transducer vật lý.

Các thành tố biểu hiện sinh học được chia thành hai phần:

Loại xúc tác: Điển hình là xúc tác bằng enzym, vi sinh vật.

Loại có ái lực: Điển hình là kháng thể, receptor.

Đôi khi còn có loại thứ 3 là loại kết hợp của hai loại trên.

Loại xúc tác bao gồm hệ thống đơn enzym, đa enzym, các bào quan, các lát mô động vật, thực vật và vi sinh vật. Trong đó enzym được sử dụng phổ biến và có hiệu quả nhất do những ưu điểm của nó như: cường lực xúc tác lớn, tính đặc hiệu cao, không độc và dễ điều chế. Theo quan điểm phân tích, các enzym được coi là quan trọng nhất gồm:

– Oxidoreductase: là các enzym sử dụng oxy hay  $\text{NAD}^+$  để oxy hoá các hợp chất.

– Hydrolase: các enzym xúc tác thủy phân các hợp chất.

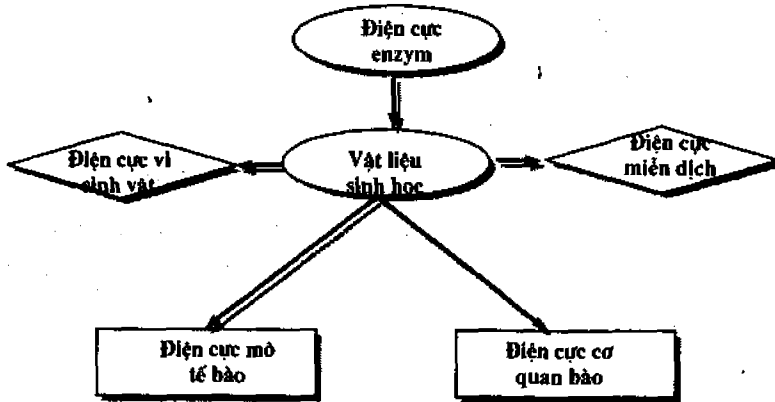
Ví dụ: Glucooxidase xúc tác oxy hoá glucose thành axit gluconic. Đây là cơ sở cho việc theo dõi hàm lượng glucose ở các bệnh nhân tiểu đường.

Tuy nhiên các hệ đơn enzym chưa hẳn là lý tưởng vì chúng thiếu ổn định do biến tính vì nhiệt hoặc tương tác với sản phẩm hoặc với các chất trung gian. Chúng cũng có thể bị mất hoạt động trong giai đoạn cố định. Để khắc phục những hạn chế đó, hệ thống đa enzym được sử dụng để chuyển

đổi và tạo ra những sản phẩm mà các đơn enzym không có được. Việc sử dụng các lát mô thực vật, động vật hoặc toàn bộ tế bào cho phép các chuỗi phản ứng phức tạp xảy ra, vì các coenzym và các cofactor có mặt trong một môi trường ổn định và tự nhiên hơn. Mặc dù tính đặc hiệu của các hệ thống trên sẽ kém hơn so với hệ thống đơn enzym nhưng trong một số trường hợp thì việc sử dụng chúng sẽ thuận lợi hơn.

Không giống như loại xúc tác, loại ái lực đặc trưng hơn vì sự liên kết có tính tự nhiên. Các cấu tử sinh học này thường dễ dàng phát hiện ra một chất rất đặc hiệu trong suốt quá trình, bởi lẽ các tương tác ái lực không thay đổi. Các thụ quan miễn dịch (kháng nguyên - kháng thể) là loại nổi bật nhất trong các receptor ái lực và thường được sử dụng rộng rãi trong các điện cực sinh học. Các loại khác có mức độ ái lực và đặc hiệu cao như glycoprotein, lectin cũng được sử dụng nhiều.

Dưới đây là sơ đồ tóm tắt các loại điện cực sinh học.



Hình 4.4. Hệ thống phân loại của điện cực sinh học dựa vào vật liệu sinh học.

#### 4.2.2. Cố định các thành tố sinh học trong điện cực sinh học

Việc cố định các thành tố sinh học nhất là enzym thường đem lại nhiều lợi nhuận hơn trong việc ứng dụng như:

- Làm cho enzym trong nhiều trường hợp được bền hơn.
- Tách phức enzym - chất mang ra khỏi mẫu rất dễ dàng.
- Hoạt độ enzym giữ được ổn định trong một thời gian dài.

Người ta thường cố định các thành tố sinh học này trên một giá thể rắn bằng nhiều cách khác nhau. Trong kỹ thuật cố định, cần đảm bảo những yêu

cấu nhất định, nhất là khi các điện cực sinh học được đưa vào sử dụng trong thực tế.

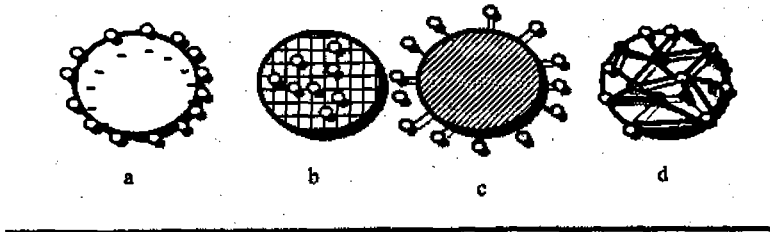
– Các cấu tử sinh học phải được giữ hoạt độ khi gắn trên bề mặt điện cực (cảm biến).

– Màng sinh học phải được gắn chặt với bề mặt cảm biến và vẫn giữ được cấu trúc và chức năng.

– Màng sinh học đã được cố định phải ổn định và bền trong một thời gian dài.

– Vật liệu sinh học cần có tính đặc trưng riêng đối với từng cấu tử sinh học.

Để cố định các thành tố sinh học trong ĐCSH người ta thường sử dụng các kỹ thuật như: hấp thụ vật lý, bao gói trong khuôn gel hoặc trong polyme, liên kết đồng hoá trị với chất mang và liên kết chéo các protein. Các phương pháp cố định được minh họa qua hình 4.5.



**Hình 4.5. Một số phương pháp cố định thường dùng trong ĐCSH:**

- : phân tử enzym;
- : phân tử liên kết;
- a/ phương pháp hấp thụ;
- b/ phương pháp bao trong gel;
- c/ liên kết cộng hoá trị với bề mặt ngoài;
- d/ liên kết chéo.

Nhược điểm của phương pháp là làm giảm hoạt lực do làm thay đổi các vị trí xúc tác thiết yếu của protein.

#### 4.2.3. Các bộ phận chuyển đổi vật lý (physical transducer)

Trong toàn bộ công nghệ ĐCSH có thể chia làm bốn phương pháp chuyển đổi tín hiệu, bao gồm: quang, khối, điện và nhiệt. Chính sự khác biệt



của tính chất bề mặt của ĐCSH, khả năng đo lường trong thời gian thực (real time) hay khả năng sử dụng lại ĐCSH phụ thuộc vào từng phương pháp chuyển đổi tín hiệu trên. Những đặc điểm cơ bản của bốn phương pháp đó được mô tả dưới đây.

#### **4.2.3.1. Chuyển đổi quang (optical transducer)**

Sự chuyển đổi tín hiệu do những thay đổi đặc tính quang học có thể đo được như: huỳnh quang, lượng ánh sáng bị hấp thụ, chỉ số khúc xạ, sự nhiễu xạ hay sự phân cực. Thiết bị chuyển đổi quang học được chia làm hai phần: bên ngoài (extrinsic) và bên trong (intrinsic). Trong loại extrinsic, ánh sáng có thể xuyên qua mẫu và phản ứng trực tiếp với mẫu. Trong loại "intrinsic", sóng ánh sáng không trực tiếp qua khối mẫu mà truyền theo một bộ phận hướng sáng. Nó chỉ tương tác với mẫu tại bề mặt và nhanh chóng biến mất.

#### **4.2.3.2. Chuyển đổi khối (mass transducer)**

Phương pháp áp điện hay âm thanh bề mặt của sự chuyển hướng tín hiệu bằng khối chủ yếu dựa trên việc đo tia của các thiết bị.

Loại ĐCSH này nhạy với sự thay đổi tỷ trọng, độ đàn hồi hay tính bán dẫn của bề mặt có các sóng âm truyền qua. Hệ thống áp điện nhất thiết phải cân bằng và dựa trên tính chất của các tinh thể thạch anh. Những tinh thể này sẽ bị biến dạng cơ học khi cho qua một điện thế.

#### **4.2.3.3. Chuyển đổi điện (electrical transducer)**

Gồm sáu loại sau: đo điện thế, đo dòng điện, đo độ bán dẫn, đo công suất, đo trở kháng và đo trạng thái oxy hoá. Trong các phương pháp này, phương pháp đo điện thế (theo dõi sự thay đổi pH trong môi trường) và phương pháp đo dòng điện là các phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất trong ĐCSH.

#### **4.2.3.4. Chuyển đổi nhiệt (thermal transducer)**

Do hầu hết các phản ứng có enzym hoặc vi sinh vật xúc tác đều giải phóng nhiệt, nên các thiết bị chuyển đổi nhiệt được sử dụng để theo dõi sự thay đổi nhiệt độ. Trong công nghiệp thực phẩm thì loại thiết bị này được sử dụng rộng rãi hơn cả.

Một số transducer được sử dụng trong ĐCSH được tóm tắt ở bảng 4.3.

**Bảng 4.3. Một số thiết bị chuyển đổi (transducer) được sử dụng trong điện cực sinh học**

Thiết bị chuyển đổi (transducer)	Tác nhân sinh học	Các yếu tố để đo
Điện cực dòng điện (amperometric)	Enzym, kháng thể, bào quan, vi sinh vật	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , I <sub>2</sub> , NADH
Hiệu ứng trường chọn lọc ion (Ion selective field effect transistor - ISFET)	Enzym, kháng thể	CN <sup>-</sup> , CO <sub>2</sub> , I <sub>2</sub> , H <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>
Điện cực đo quang	Enzym, kháng thể	H <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>
Điện cực đo nhiệt	Enzym, kháng thể, vi sinh vật	Nhiệt của phản ứng enzym
Điện cực tinh thể áp điện	Enzym, kháng thể	Hấp phụ khối

### 4.3. MỘT SỐ LOẠI ĐIỆN CỰC SINH HỌC

#### 4.3.1. Điện cực điện hoá (electrochemical biosensor)

Nguyên tắc: Điện cực enzym được chế tạo dưới dạng một màng enzym mà một mặt của màng tiếp xúc với môi trường nghiên cứu (cơ chất), còn mặt kia tiếp xúc với vùng đo. Phản ứng oxy hoá khử cơ chất do enzym xúc tác sẽ xảy ra trên lớp màng enzym. Kết quả sự thay đổi năng lượng tự do được điện cực thu nhận rồi truyền qua hệ thống đo dưới dạng dòng điện hoặc điện thế.

##### 4.3.1.1. Điện cực đo điện thế (potention metric biosensor)

Điện cực đo điện thế hoạt động dựa trên nguyên tắc xác định sự khác nhau về điện thế giữa điện cực đo và điện cực so sánh (là điện cực có điện thế không đổi). Sự khác nhau về điện thế giữa hai điện cực là hàm của hoạt độ các ion trong dung dịch điện phân nơi đặt điện cực (điều kiện hoạt động của điện cực điện thế là không có dòng điện trong mạch đo, vì thế người ta gọi nó là điện cực cơ dòng điện bằng không) (hình 4.6). Điện thế này được xác định theo phương trình NERST:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \times \ln \frac{a_1}{a_2}$$

$E_0$  : điện thế oxy hoá - khử tiêu chuẩn;

$R$  : hằng số khí;

$T$  : nhiệt độ tuyệt đối;

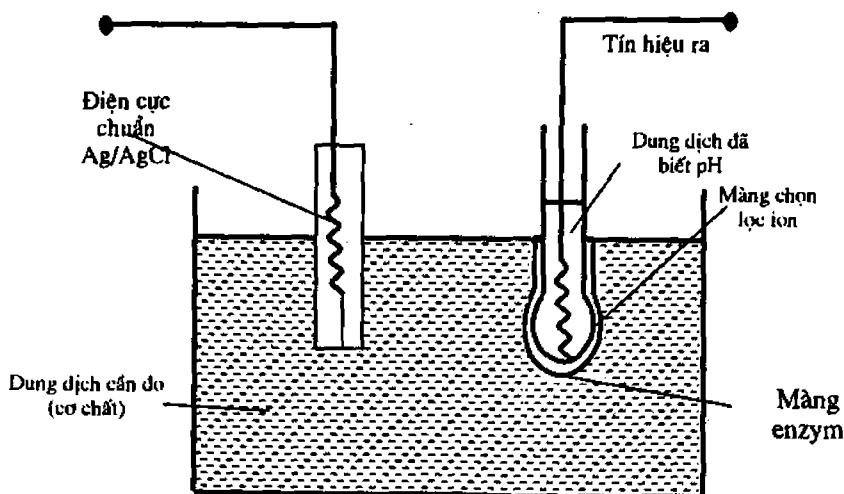
$F$  : hằng số Faraday;

$n$  : số điện tử trao đổi của cơ chất;

$a_1, a_2$  : hoạt độ trong dung dịch và trong lớp màng điện cực.

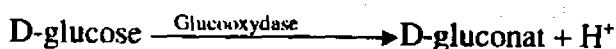
Các điện cực màng đo điện thế như điện cực pH, điện cực polyme, điện cực nhận biết khí, điện cực cacbondiôxít đã được sử dụng rộng rãi như các bộ phận nhận biết bên trong của biosensor.

Điện cực đo điện thế dựa trên cơ sở điện cực màng nhận biết khí, bao gồm màng thấm khí kỵ nước và điện cực pH phân cách bởi lớp màng mỏng của dung dịch điện phân. Điện cực loại này có tính chọn lọc cao, màng của nó chỉ cho các chất khí thấm qua mà thôi. Các mẫu phân tích phải hoàn toàn ở dạng nước lỏng. Một khi tính kỵ nước của màng bị tấn công bởi dung môi hữu cơ thì sẽ làm hỏng màng.



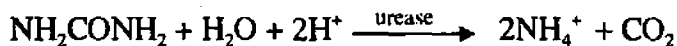
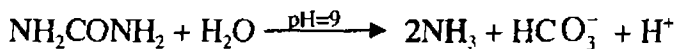
Hình 4.6. Sơ đồ cấu tạo điện cực đo điện thế.

Ví dụ: - Xác định glucose

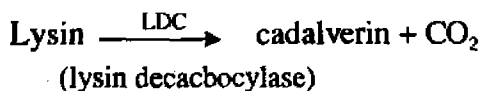


Đo lượng  $H^+$  tạo thành (do pH sau khi giải phóng  $H^+$ ) sẽ xác định được hàm lượng D-glucose.

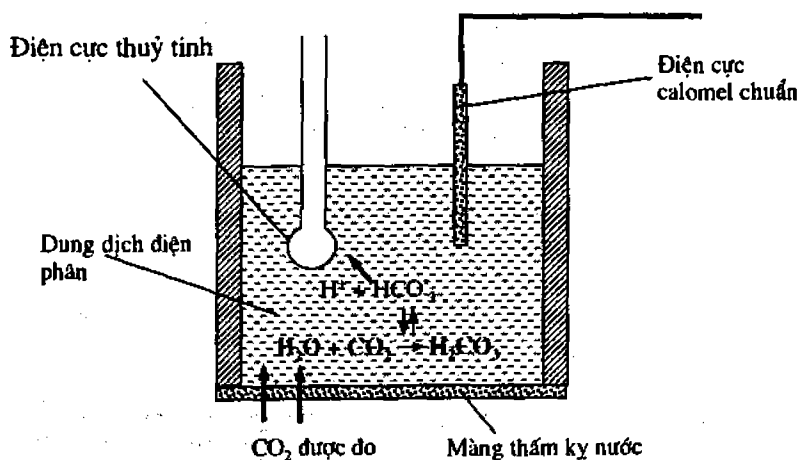
- xác định ure:



- xác định Lysin:



Đo lượng  $NH_4^+$  giải phóng ra thông qua đo pH sẽ xác định được hàm lượng ure ban đầu. Khi xác định ure hay lysin qua  $CO_2$  thì điện cực enzym sẽ được kết hợp với điện cực  $CO_2$ . Sơ đồ cấu tạo điện cực  $CO_2$  như hình 4.7.

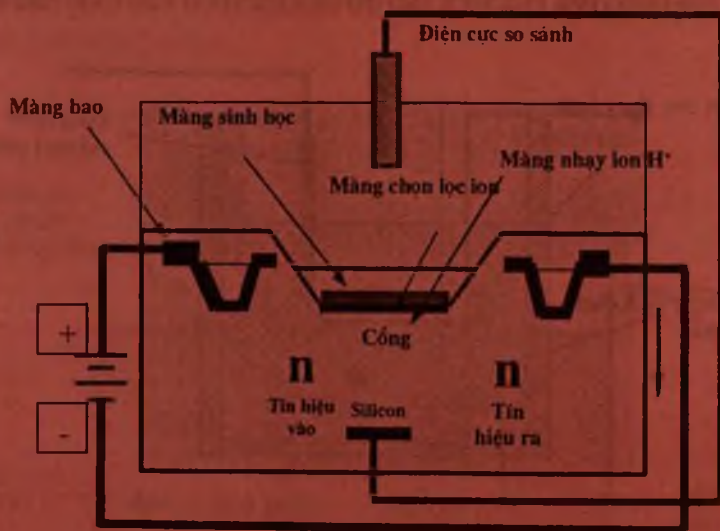


**Hình 4.7: Điện cực màng chọn lọc khí  $CO_2$ .**

Trong trường hợp các điện cực  $CO_2$  và điện cực  $NH_3$  tín hiệu phát ra là điện thế thì thường gồm: một điện cực thủy tinh đo pH của một dung dịch điện phân được phân cách với dung dịch đo bằng một màng thấm khí kỵ nước. Sau khi cân bằng, thì pH bên trong là hàm của áp suất phần của khí đo như hình 4.7.

### 4.3.2. Điện cực ENFET (enzyme linked field effect transistor)

Điện cực ENFET được chế tạo dựa trên cơ sở của loại điện cực chọn lọc ion sử dụng transistor có hiệu ứng trường ISFET (ion-selected field effect transistor) gồm có một màng chọn lọc ion tiếp xúc với transistor và một điện cực so sánh. Nguyên lý hoạt động của nó cũng giống như điện cực đo điện thế. ISFET là loại điện cực duy nhất không tiếp xúc với dung dịch cần đo. Đây là loại điện cực dùng vật liệu cách điện để đo hoạt độ ion trong dung dịch điện phân. Các biosensor dựa trên cơ sở ISFET bao gồm một ISFET với màng polyme có gắn enzym lên trên bề mặt màng chọn lọc ion. Các enzym có vai trò xúc tác cho phản ứng thủy phân hoặc oxy hoá dung dịch cơ chất làm cho pH của dung dịch thay đổi. Sự thay đổi này lập tức được xác định bởi ISFET. Tức là ta sẽ xác định được mối tương quan giữa nồng độ của dung dịch cơ chất (dung dịch phân tích) và tín hiệu ra (điện thế) của ISFET.

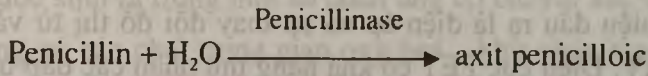


Hình 4.8. Điện cực ENFET.

Ngày nay thiết bị ENFET được sử dụng rất rộng rãi, người ta có thể dùng nó để xác định dư lượng thuốc trừ sâu hay sự có mặt của penicilin, glucose trong máu... Hoạt tính của enzym bị ức chế bởi sự có mặt của thuốc trừ sâu trong dung dịch làm giảm tín hiệu lối ra của ISFET. Dựa vào độ giảm tín hiệu (so sánh tín hiệu được đo với dung dịch kiểm chứng không có mặt của thuốc trừ sâu) ta có thể đánh giá được % hoạt tính xúc tác còn lại của

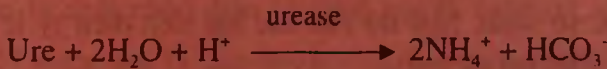
enzym tức là có thể xác định sự có mặt của thuốc trừ sâu một cách định lượng.

Người ta cũng dùng ENFET để đo nồng độ penicillin.

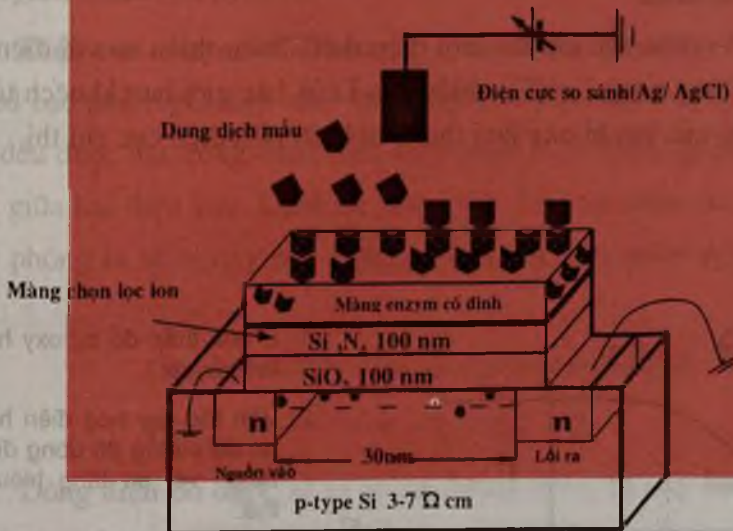


Penicillinase đóng vai trò là chất xúc tác cho phản ứng này. Nếu chúng ta cố định penicillinase lên màng và ngâm nó vào trong dung dịch có penicillin thì ion  $\text{H}^+$  sẽ được sinh ra, bởi penicillin là một axit mạnh. Sự thay đổi pH được đo bằng thiết bị FET nhạy ion  $\text{H}^+$ .

Điện cực này cũng có thể đo được lượng ure dựa vào phản ứng phân huỷ ure nhờ urease:



Khi ure bị phân giải,  $\text{NH}_4^+$  được sinh ra và pH tăng lên. Do đó nồng độ ure có thể tính được qua xác định sự thay đổi pH nhờ ISFET. Hình 4.9 là thiết bị ENFET để đo ure. Trong thiết bị này bề mặt cổng của ISFET là lớp  $\text{Si}_3\text{N}_4$  đã xử lý với  $\gamma$ -amino-propyltriethoxylane ( $\gamma$ -APTES). Nhóm ethoxy của  $\gamma$ -APTES được liên kết với bề mặt của  $\text{Si}_3\text{N}_4$  và nhóm amin được lộ ra ở trên bề mặt.



Hình 4.9. Điện cực sinh học đo ure kiểu FET.

Màng cố định urease được xử lý với aldehytglutaric vì vậy có sự hình thành liên kết hoá học giữa nhóm amin này và nhóm CO của aldehytglutaric.

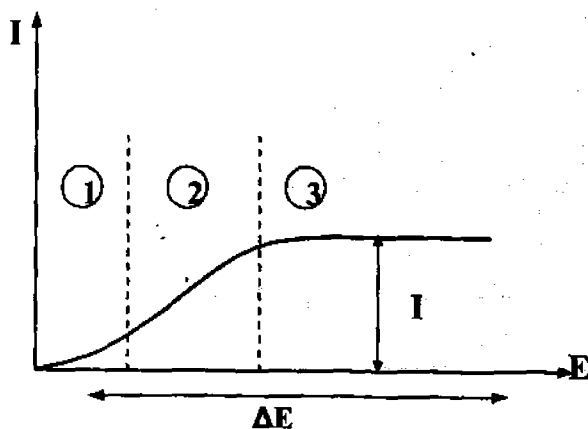
Điện cực điện thế FET do ure, có thể đo được trong khoảng 0,05-10 mg/ml. Tín hiệu đầu ra là điện áp và sự thay đổi đồ thị từ vài milivon đến khoảng 50mV. Điện cực FET có khả năng thu nhận các đáp ứng tín hiệu tốt khi sử dụng một lần trong một ngày trong một tháng. Đối với người bình thường, hàm lượng ure trong máu là 0,1-0,2mg/ml.

#### 4.3.1.2. Điện cực đo dòng điện (amperometric biosensor)

Điện cực đo dòng điện hoạt động nhờ một dòng điện chạy qua mạch đo khi đặt một hiệu điện thế giữa hai điện cực, thường là một điện cực kim loại và một điện cực so sánh. Mật độ của các hạt tích điện tỷ lệ với cường độ dòng điện chạy giữa hai điện cực.

Cường độ dòng điện chạy giữa hai điện cực là hàm của mật độ các hạt tích điện trong dung dịch và điện thế đặt giữa hai điện cực. Trong những điều kiện xác định, sau khi chuẩn có thể xác định được nồng độ từ phép đo cường độ dòng điện. Trong đa số trường hợp người ta thường tiến hành oxy hoá hoặc khử một loại hạt tích điện trên điện cực chỉ thị, còn điện cực thứ hai là điện cực so sánh.

Nếu đặt vào điện cực chỉ thị một điện thế(E)biến thiên so với điện cực so sánh và vẽ đường cong  $I = f(E)$ , chiều cao I của bậc giới hạn khuếch tán sẽ tỷ lệ với nồng độ của hạt bị oxy hoá (hoặc bị khử) trên điện cực chỉ thị.



- 1- E quá thấp để sự oxy hoá có thể xảy ra;
- 2- Vận tốc oxy hoá điện hoá và do đó cường độ dòng điện sẽ tăng với sự tăng hiệu điện thế;
- 3- Cường độ không phụ thuộc vào hiệu điện thế nữa và  $I = K \cdot C_{\text{red}}$

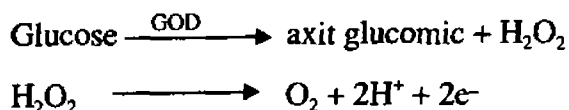
Hình 4.10. Đồ thị  $I = f(E)$ .

Hiện nay các điện cực đo dòng điện đang được sử dụng rộng rãi là điện cực oxy và điện cực hydroperoxyt. Oxy và hydroperoxyt ( $H_2O_2$ ) đều là những chất được sinh ra trong một số phản ứng có enzym xúc tác, cũng như trong phản ứng có các chất trung gian oxy hoá - khử nhân tạo: ferocyanua, ion N-methylphenazinium (NMP), benzoquinon và chúng có thể được xác định nhờ đo dòng điện.

Các điện cực đo dòng điện thường sử dụng các enzym oxidoreductase để gắn vào màng. Oxy,  $NAD^+$ ,  $NADP^+$  được dùng như là chất nhận điện tử để phục hồi enzym sau khi phản ứng xúc tác các cơ chất. Các enzym sử dụng oxy như là chất nhận điện tử được gọi là oxydase, còn enzym dùng  $NAD^+$ ,  $NADP^+$  được gọi là dehydrogenase hay reductase. Trong hai nhóm này thì oxydase được dùng nhiều nhất, như là một thành tố sinh học gắn vào lớp màng của điện cực.

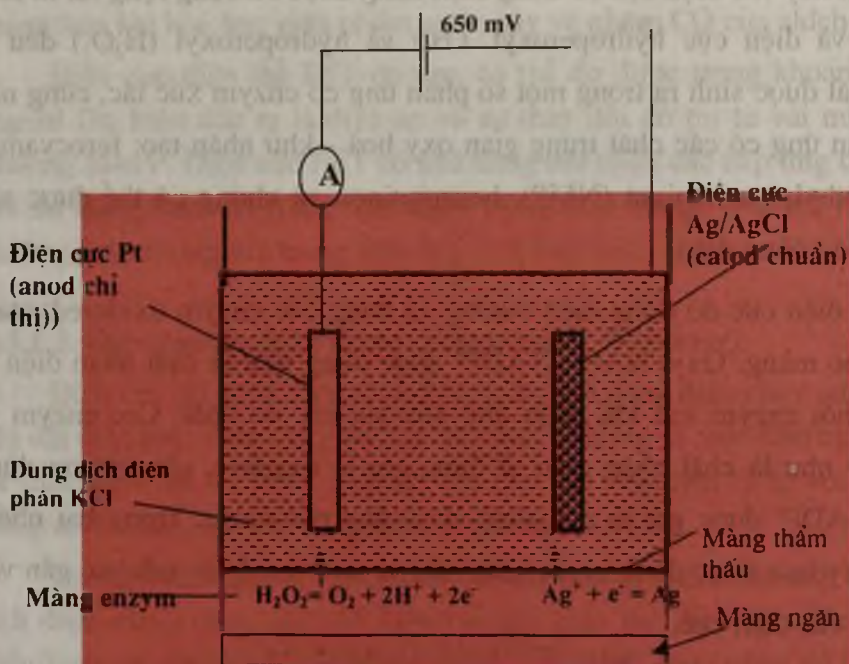
Các điện cực đo dòng điện được sử dụng để xác định các cơ chất của enzym như: glucose, monosaccarit, hypoxantin, lactat, axit amin, sulffit, salicylat, oxalat, và pyruvat.

Điện cực enzym để đo lượng glucose bao gồm một anod Pt và một catod bạc phủ AgCl tiếp xúc với màng đã cố định glucooxydase (GOD). Cả hai đều được đặt trong dung dịch điện phân KCl. Điện áp phân cực được đặt vào giữa hai điện cực. Dưới tác động của điện áp phân cực này  $H_2O_2$  được giải phóng ra sẽ bị oxy hoá ở mặt phân cách giữa anod và màng theo phản ứng:



Dòng điện đo được sẽ tỷ lệ với lượng  $H_2O_2$  bị oxy hoá và do đó tỷ lệ với lượng glucose có trong môi trường nghiên cứu.





Hình 4.11. Sơ đồ nguyên tắc của điện cực đo dòng điện.

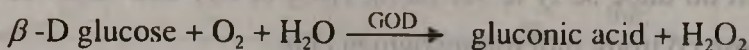
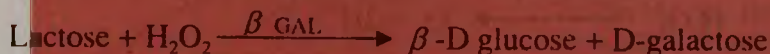
Cũng như đo glucose để đo lượng lactat, dùng điện cực có gắn lactatoxydase (LOD) từ *pediscoccuspecies* xúc tác phản ứng :



Để đo cholesterol thì gắn enzym cholesteroloxydase (ChOD) từ *Rhodococcus erythropolis*, xúc tác phản ứng :



Để đo lượng lactose thì gắn enzym  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) từ *E.Coli* và Glucooxydase (GOD) từ *A.niger*, xúc tác các phản ứng:



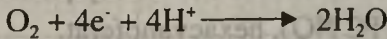
Có điều là điện áp phân cực phải như thế nào để phản ứng oxy hoá điện hoá ở anod tiến hành được. Vận tốc của phản ứng này thường bị giới hạn bởi

quá trình chuyển khối của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đến điện cực. Trong trường hợp này, cường độ dòng điện ở anod tỷ lệ thuận với nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trong môi trường tiếp xúc với anod.

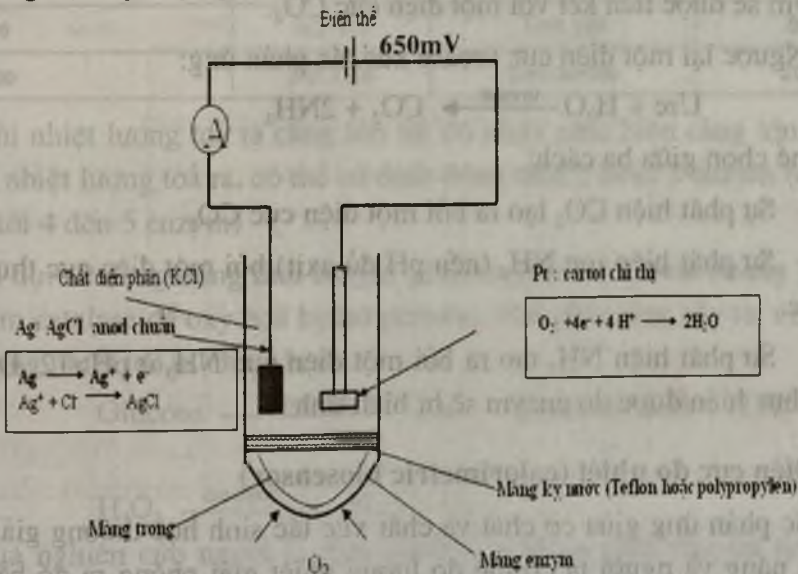
$$I_A = K \cdot [H_2O_2]$$

Cũng có thể xác định lượng glucose qua đo nồng độ oxy hoà tan trong dung dịch nhờ điện cực oxy hay điện cực Clark.

Đầu đo oxy cấu tạo từ hai điện cực có khả năng phân cực: một catod bằng platin (Pt) và một anod bằng bạc phủ clorua bạc (Ag/AgCl). Cả hai điện cực được đặt vào chất điện phân là Ka li clorua. Hệ thống điện cực này được ngăn cách với môi trường nghiên cứu bằng một màng thấm khí kỵ nước (bằng teflon hoặc bằng polypropylen) cho oxy thấm qua. Dưới tác dụng của điện áp phân cực 650mV đặt vào giữa hai điện cực, oxy khuếch tán qua màng sẽ bị khử tại catod theo phản ứng:



Dòng điện chạy giữa hai điện cực do phản ứng điện hoá tỷ lệ với lượng oxy bị khử và do đó tỷ lệ với lượng oxy và lượng glucose. Dòng điện được đo sau khi khuếch đại và được chỉ thị trực tiếp bằng số hoặc biểu diễn dưới dạng nồng độ oxy hay áp suất riêng phần của oxy.



Hình 4.12. Điện cực oxy của Clark.

Phương pháp đo dòng điện này có những đặc điểm sau:

- Phản ứng enzym sẽ phụ thuộc vào tốc độ khuếch tán của cơ chất qua màng.

- Khi phản ứng oxy hoá-khử xảy ra, gradient nồng độ của cơ chất giảm dần, do đó tốc độ chuyển khối chậm và có thể dòng điện bị khử, để duy trì dòng điện không đổi cần phải giữ vững vùng tiếp xúc càng nhỏ càng tốt (tức là phải điều chế các vi điện cực có đường kính rất nhỏ, đến vài micromét).

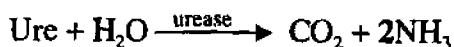
- Vận tốc phản ứng oxy hoá-khử phụ thuộc vào nồng độ oxy hoà tan. Để hạn chế ảnh hưởng của nồng độ oxy hoà tan trong dung dịch đến kết quả phân tích thì người ta không sử dụng oxy làm chất nhận điện tử mà sử dụng các chất trung gian để vận chuyển điện tử đến bề mặt điện cực. Các chất vận chuyển điện tử trung gian có thể là ion  $Fe^+$ , N-methylphenazinium (NMP) hoặc tetracyanoquinodimethan (TCNQ), hexacyanoferrat.

- Điện cực có gắn enzym lysin decarboxylase (LDC), enzym xúc tác phản ứng:



thì enzym sẽ được liên kết với một điện cực  $\text{CO}_2$ .

- Ngược lại một điện cực urease xúc tác phản ứng:



thì có thể chọn giữa ba cách:

- Sự phát hiện  $\text{CO}_2$  tạo ra bởi một điện cực  $\text{CO}_2$ .

- Sự phát hiện ion  $\text{NH}_4$  (nếu pH đủ axit) bởi một điện cực thủy tinh chọn lọc.

- Sự phát hiện  $\text{NH}_3$  tạo ra bởi một điện cực  $\text{NH}_3$  ở  $\text{pH} > 12$ . Điều này không thực hiện được do enzym sẽ bị biến tính.

#### 4.3.2. Điện cực đo nhiệt (calorimetric biosensor)

Các phản ứng giữa cơ chất và chất xúc tác sinh học thường giải phóng ra nhiệt năng và người ta có thể đo lượng nhiệt giải phóng ra đó bằng một thiết bị đo nhiệt (điện cực đo nhiệt) sẽ tính được lượng cơ chất ban đầu.

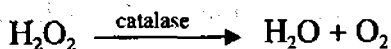
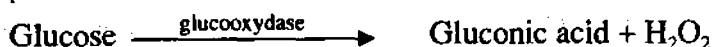
Nhiệt lượng toả ra của một số phản ứng có enzym xúc tác biểu diễn ở bảng 4.4.

**Bảng 4.4: Entanpi của một số phản ứng có enzym xúc tác**

Enzym	Mã số EC	Cơ chất	$-\Delta H$ (kJ/mol)
Catalase	1.11.1.6	$H_2O_2$	100,4
Cholesterol- oxydase	1.1.3.6	Cholesterol	52,9
Glucocxydase	1.1.3.4	Glucose	80,0
Hexokinase	2.7.1.1	Glucose	27,6
Lactat- -dehydrogenase	1.1.1.27	Pyruvate	62,1
$\beta$ -Lactamase	3.5.2.6	Penecillin G	67,0
Trypsin	3.4.21.4	Benzoyl-L-arginineamide	27,8
Urease	3.5.1.5	Urea	6,6
Uricase	1.7.3.3	Uric acid	49,1
Chymotrypsin	3.4.21.1	Ester	4-16
Penicillinase	3.5.1.11	Penicillin G	67
Amylase	3.2.1.1	Tinh bột	8
Invertase	3.2.1.25	Saccarose	20

Khi nhiệt lượng toả ra càng lớn thì độ nhạy phát hiện càng lớn. Do đó để tăng nhiệt lượng toả ra, có thể cố định đồng thời 2 hoặc 3 enzym (cũng có thể lên tới 4 đến 5 enzym)

Ví dụ: sử dụng đồng thời enzym glucocxydase oxy hoá đường glucose và enzym catalase để oxy hoá hydro peroxyt. Hai phản ứng xảy ra cùng một lúc. Lượng nhiệt toả ra nhiều hơn.



Qua nghiên cứu người ta thấy cứ 0,1  $\mu M$  cơ chất chuyển hoá hoàn toàn thành sản phẩm thì sẽ sinh ra 100 kJ/mol. Các thiết bị này phải luôn được đặt trong hệ thống cách nhiệt để giữ môi trường ổn định nhiệt độ.

Có hai loại điện cực đo nhiệt:

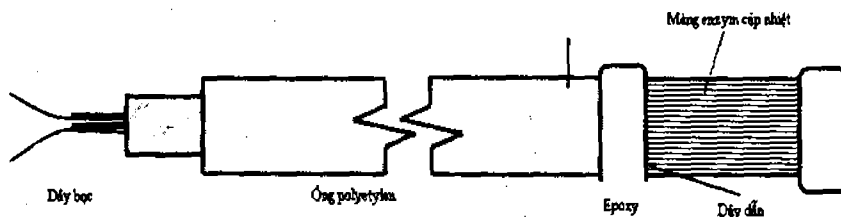
- Điện cực enzym - cặp nhiệt (còn gọi là điện cực enzym nhiệt dây dẫn đo dòng điện). Loại này ít được sử dụng.

- Điện cực enzym-nhiệt điện trở, thường được sử dụng rộng rãi.

*Điện cực enzym cặp nhiệt:*

Trong loại điện cực này, bộ chuyển đổi vật lý là cặp nhiệt điện. Trên cặp nhiệt người ta phủ một lớp màng chứa enzym.

Cặp nhiệt có cấu tạo gồm hai dây dẫn nối với nhau nhờ mối hàn. Suất điện động  $E$  của mạch phụ thuộc vào bản chất vật lý của dây dẫn và vào nhiệt độ  $T_1, T_2$ . Thông thường nhiệt độ của một mối hàn được giữ ở giá trị không đổi và biết trước, gọi là nhiệt độ chuẩn  $T_1 = T_{ref}$ . Nhiệt độ của mối hàn thứ hai khi đặt trong môi trường nghiên cứu sẽ nhạy cảm với sự thay đổi nhiệt độ của môi trường gây ra do phản ứng xúc tác bởi enzym.



**Hình 4.13. Sơ đồ điện cực enzym-cặp nhiệt.**

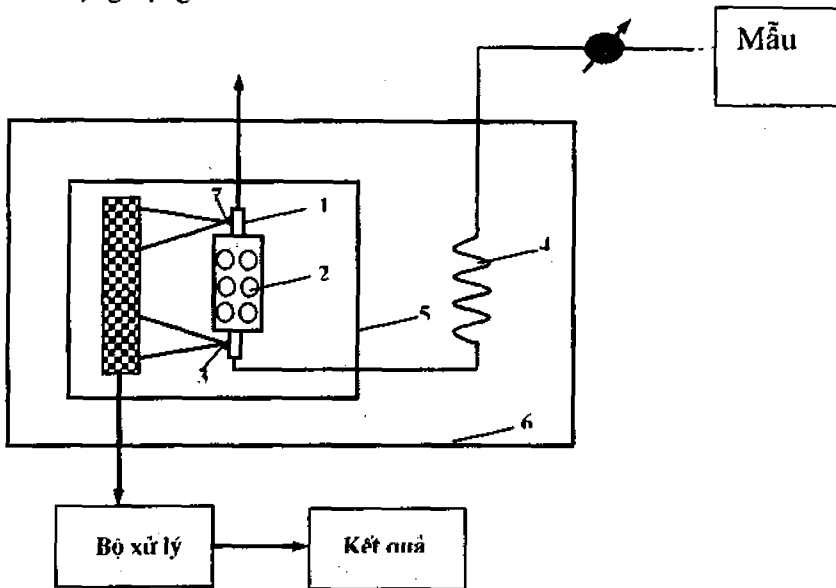
Việc sử dụng cặp nhiệt điện có ưu điểm là kích thước cặp nhiệt nhỏ nên có thể đo nhiệt độ ở từng điểm của đối tượng cần nghiên cứu và tăng tốc độ hồi đáp (do nhiệt dung nhỏ).

Trên cơ sở này, Bataillard đã đưa ra cải tiến là sử dụng một cặp nhiệt bán dẫn (intergrated silicon) để định lượng glucose, ure và penicillin. Do tính chất của cặp nhiệt và lớp tiếp xúc enzym-cặp nhiệt có tính truyền nhiệt cao cho phép không phải kiểm soát chặt chẽ nhiệt độ của môi trường xung quanh, do đó có thể thu nhỏ kích thước của thiết bị để có thể cấy vào dưới da đo trực tiếp nồng độ các chất trong máu.

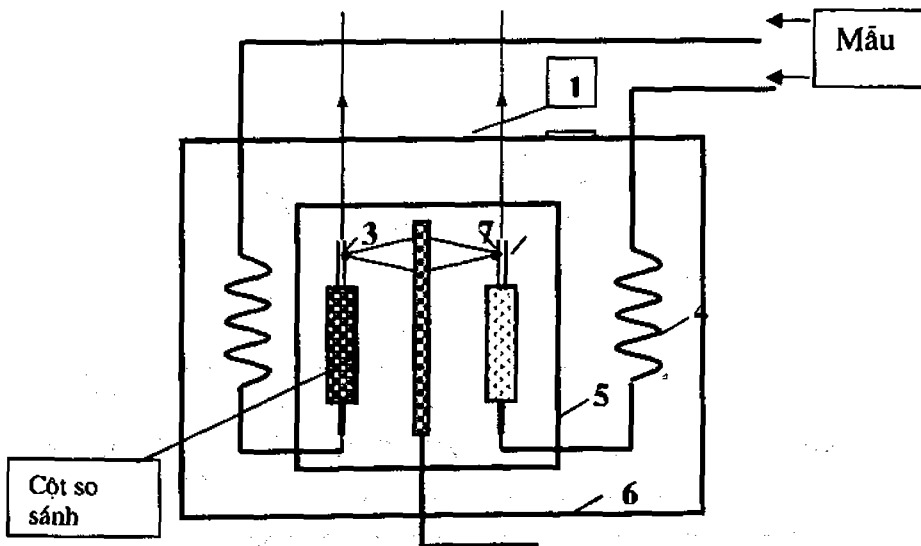
- **Điện cực enzym-nhiệt điện trở:**

Loại điện cực này còn có thể gọi là điện cực áo nhiệt vì buồng đo nhiệt hoàn toàn bị cô lập với môi trường xung quanh nhờ lớp áo nhiệt, quá trình

này gần giống với quá trình đoạn nhiệt. Loại thiết bị này có cấu tạo đơn giản và được sử dụng rộng rãi nhất.



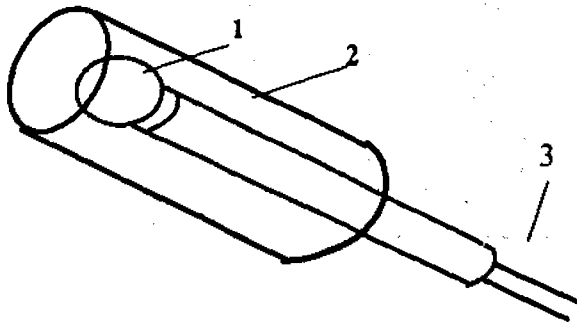
**Hình 4.14.** Sơ đồ điện cực enzym-nhiệt điện trở:  
 1- ống mao dẫn ; 2- cột enzym; 3- nhiệt điện trở so sánh;  
 4- bộ tản nhiệt; 5,6- lớp cách nhiệt; 7- nhiệt điện trở.



**Hình 4.15.** Sơ đồ điện cực enzym - nhiệt điện trở trong phép đo vi sai.

Cơ chất đi vào bộ tản nhiệt (4) thì sẽ đi đến (3) và (2), để phản ứng với enzym và giải phóng ra nhiệt, nhiệt độ giải phóng ra sẽ được đo bởi nhiệt trở (7). Kết quả đo được đi ra qua bộ xử lý.

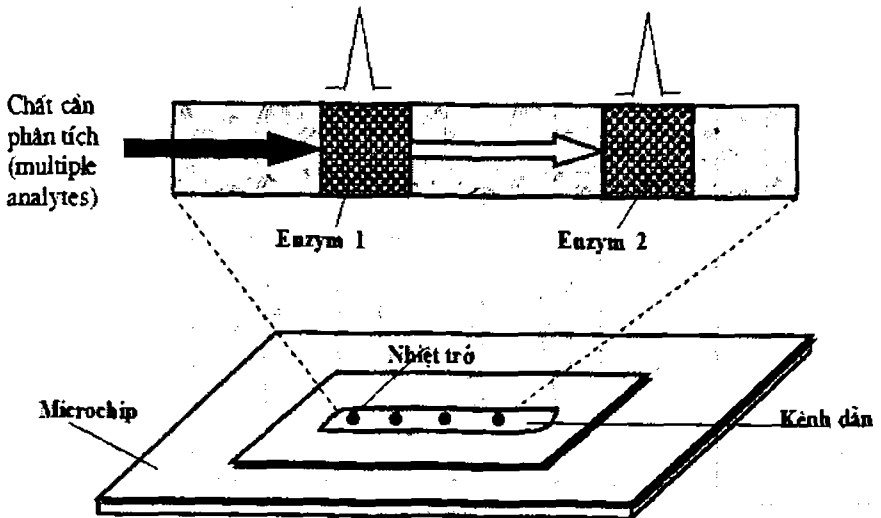
Ngoài cách chế tạo cột vật liệu sinh học như trên, người ta còn có thể bao bên ngoài nhiệt điện trở một lớp vỏ silicon và đặt màng cố định enzym ở trên, nhờ đó thu nhỏ được kích thước thiết bị.



**Hình 4.16.** Điện cực enzym – nhiệt điện trở có vỏ bọc silicon:

1: Nhiệt điện trở; 2: Khung cố định enzym; 3: Dây dẫn.

Cũng có thể tích hợp nhiều điện trở tạo ra điện cực nhiệt định lượng đồng thời nhiều chất.



**Hình 4.17.** Điện cực nhiệt điện trở tích hợp.

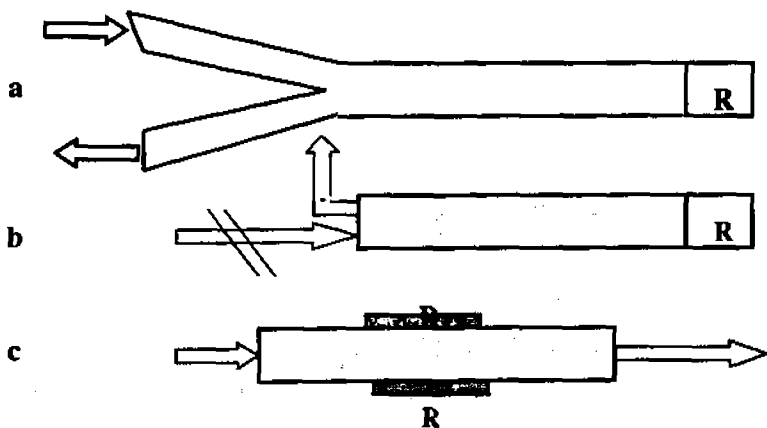
Các nghiên cứu về loại điện cực nhiệt độ cho thấy ngoài những ứng dụng trong các lĩnh vực: y tế, môi trường, thực phẩm, chúng còn có thể có những ứng dụng đặc hiệu như:

- Xác định các hằng số  $K_i$ ,  $K_m$ ,  $V_m$  của enzym cố định (Stefuca, 1990)
- Định lượng ADP, ATP bằng cách sử dụng pyruvatkinase và hexokinase đồng thời cố định trên aminopropyl CPG (Kirstein, 1989).

### 4.3.3. Điện cực đo quang (optical biosensor)

Điện cực quang được chế tạo dựa vào các tính chất vật lý của ánh sáng để phát hiện ra sự biến đổi nhỏ trong mẫu phân tích.

Các điện cực này hoạt động theo nguyên tắc dung dịch phân tích được tiếp xúc với màng và khi phản ứng enzym xảy ra thì sẽ có hiện tượng ánh sáng bị hấp thụ hoặc phát ra ánh sáng màu. Người ta có thể xác định được hàm lượng các chất của mẫu phân tích thông qua việc đo độ hấp thụ ánh sáng hoặc sự phát quang ánh sáng của các chất tạo thành do phản ứng xúc tác bởi enzym.



**Hình 4.18.** Các kiểu điện cực sinh học quang điện dựa trên cơ sở quang sợi píp: a/ điện cực quang sợi rẽ nhánh; b/ quang sợi đơn với bộ tách chùm tia để phân tách tia tới và tia phản xạ; c/ quang sợi đơn mà ở đó pha phản ứng được phủ lớp quang ánh sáng; R- chất phản ứng (thuốc nhuộm) nhạy hoá học.

Cơ sở của kiểu điện cực quang điện là sự kết hợp các sợi dẫn ánh sáng với phép trắc phổ quang, phép trắc huỳnh quang hoặc phép đo phản xạ quang. Nó có khả năng chỉ báo những thay đổi của các thông số quang học, chẳng hạn như sự hấp thụ ánh sáng, chiều dài bước sóng hoặc chỉ số phản xạ



trong môi trường đo bao quanh sợi dẫn. Những thiết bị này gắn vào hoặc là sợi đơn hoặc là chùm sợi kép để ánh sáng tới và chùm tia sáng sẽ được đo.

Các thiết bị điện cực quang có thể được phân loại như sau:

- Thiết bị đo hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance-SPR)
- Thiết bị phản xạ bên trong toàn phần (total internal reflection-TIR) và thiết bị phổ tương quan photon (photon correlation spectroscopy-PCS).

#### 4.3.2.1. Điện cực đo phản xạ quang

Điện cực này hoạt động theo nguyên lý: năng suất phản xạ từ mặt phản xạ tuân theo phương trình:

$$R = \frac{I}{I_0} \cdot R_0, \%$$

Trong đó: R: năng suất phản xạ;

$R_0$ : hằng số phản xạ của môi trường chuẩn;

I: cường độ của tia tới;

$I_0$ : cường độ của tia phản xạ.

R có quan hệ với nồng độ chất hấp thụ màu theo phương trình:

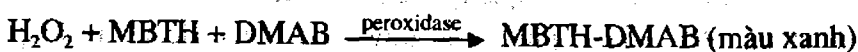
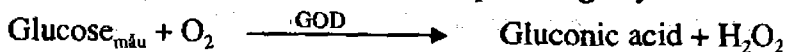
$$C K / \varepsilon = (1-R)^2 / 2R$$

C- nồng độ chất hấp thụ;

K- hằng số hấp thụ;

$\varepsilon$  - hằng số tán sắc.

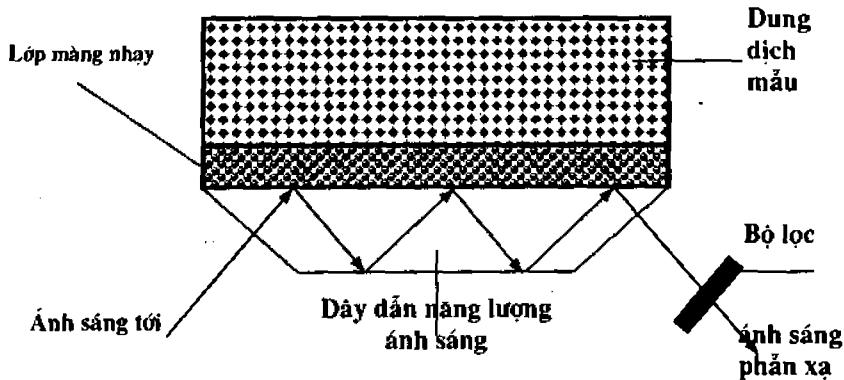
Ví dụ như kỹ thuật này được dùng để định lượng glucose trong máu nhờ thuốc hiện màu MBTH (3-metyl 2-benzothiazolinon) và DMAB (3-dimethylaminobenzoic acid). Hai enzym glucooxydase (GOD) và peroxidase được cố định bằng cách hấp thụ lên bề mặt tấm nền đã phủ thuốc nhuộm. Khi mẫu phân tích tiếp xúc với tấm nền thì phản ứng xảy ra như sau:



Nếu  $\text{H}_2\text{O}_2$  có nồng độ cao thì phải dùng enzym catalase.

Mẫu phân tích sau đó được đem đo năng suất phản xạ ở bước sóng thích hợp. Và từ đó ta sẽ tính được hàm lượng glucose.

Với điện cực sinh học dựa trên nền tảng của sự phản xạ toàn phần (total internal reflection: TIR) thì bề mặt dây dẫn được phủ các kháng thể, sẽ tiếp xúc với mẫu phân tích. Khi sóng ánh sáng đi đến lớp màng nhạy thì chỉ có một phần nhỏ sóng ánh sáng bị hấp thụ vào trong môi trường, còn tất cả chúng bị phản xạ lại nhiều lần và dần dần nguồn sáng bị suy giảm. Dựa vào lượng ánh sáng phản xạ, ta có thể tính được hàm lượng mẫu phân tích.



Hình 4.19. Điện cực sinh học dựa trên cơ sở của TIR.

#### 4.3.2.2. Điện cực đo phát quang

Điện cực này hoạt động theo nguyên tắc: cơ chất tác dụng với enzyme cố định để tạo thành sản phẩm có khả năng phát ra ánh sáng màu. Do ánh sáng màu đó ở một bước sóng nhất định sẽ suy ra được nồng độ cơ chất.

Dựa vào đặc tính này, người ta thường sử dụng nó để xác định các vi khuẩn trong thực phẩm. Khi các vi khuẩn tác dụng đặc hiệu với ATP và D-luciferin dưới tác dụng của enzyme luciferase sẽ tạo thành oxyluciferin, AMP, pyrophosphat, CO<sub>2</sub> và ánh sáng vàng đo được ở bước sóng 562nm. Từ đó xác định được lượng vi khuẩn có mặt trong thực phẩm.

#### 4.3.4. Điện cực điện áp (piezoelectric biosensor)

Nguyên lý của loại điện cực này dựa vào sự dao động của các tinh thể, và sự dao động sẽ gia tăng khi có tạp chất hấp thụ trên bề mặt của tinh thể. Một số chất điện môi tự nhiên như: thạch anh, tuamalin, hoặc nhân tạo như:

sulfatiti, thạch anh tổng hợp...dưới tác dụng của một lực nhất định, chúng sẽ bị biến dạng tạo nên tần số dao động của tinh thể. Đo tần số dao động đó sẽ biết được nồng độ của cơ chất cần đo.

Tần số dao động được tính theo công thức:

$$\Delta f = -f^{2/3} \cdot n \cdot \left( \frac{\eta_1 \cdot P_1}{\Pi \cdot \mu_q \cdot P_q} \right)^{1/2}$$

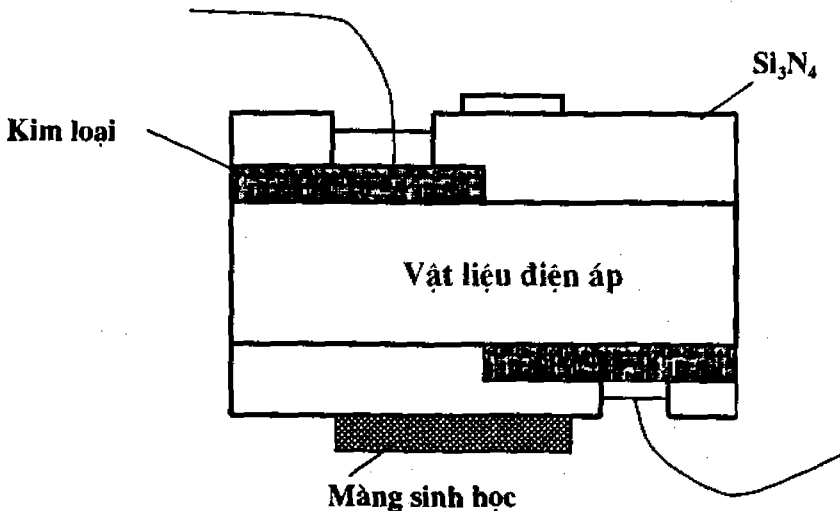
Trong đó: f: tần số cộng hưởng;

$\eta_1$ : độ nhớt của dung dịch;

$P_1, P_q$ : khối lượng riêng của chất lỏng và tinh thể;

$\mu_q$ : áp suất biến dạng của tinh thể.

Điện cực điện áp được dùng để đo amoniac, metan, sulfuadioxid và các chất phosphat hữu cơ (Guilbault,1980). Ta có thể dùng điện cực này để xác định nồng độ formaldehyt nhờ formaldehyt dehydrogenase, hay xác định dư lượng thuốc trừ sâu cơ phospho vốn kìm hãm enzym cholinesterase.



Hình 4.20. Sơ đồ cấu tạo điện cực điện áp.

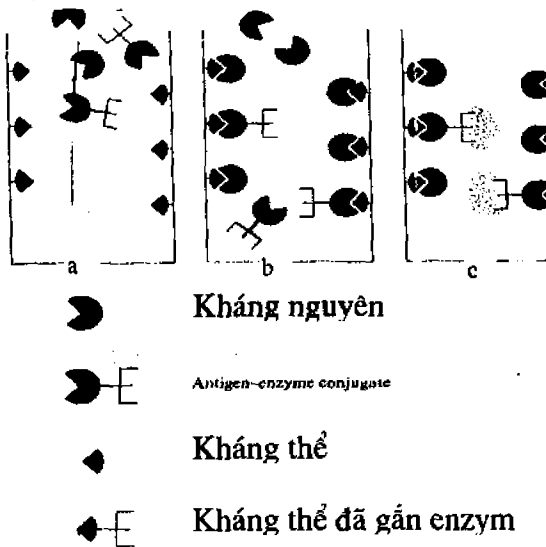
#### 4.3.5. Điện cực miễn dịch (immuno-biosensor)

Điện cực miễn dịch hoạt động dựa trên tính chất kháng nguyên-kháng thể. Tức là kháng thể phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên sinh ra nó.

Phản ứng kháng nguyên - kháng thể được xác định bằng nhiều cách, trong đó có kỹ thuật ELISA (Enzym linked Immunosorben assay: kỹ thuật hấp thụ miễn dịch có gắn enzym).

Nguyên lý của việc sử dụng điện cực miễn dịch ELISA kết hợp với sử dụng một điện cực điện hoá hoặc điện cực đo nhiệt độ để định hướng sự biến đổi nồng độ cơ chất trong các phản ứng xúc tác bởi enzym đánh dấu. Tốc độ chuyển hoá cơ chất tỷ lệ thuận với lượng kháng thể đã gắn với enzym. Nhờ đó định lượng được kháng nguyên cần phân tích.

Nguyên tắc của kỹ thuật ELISA được trình bày ở hình 4. 21.



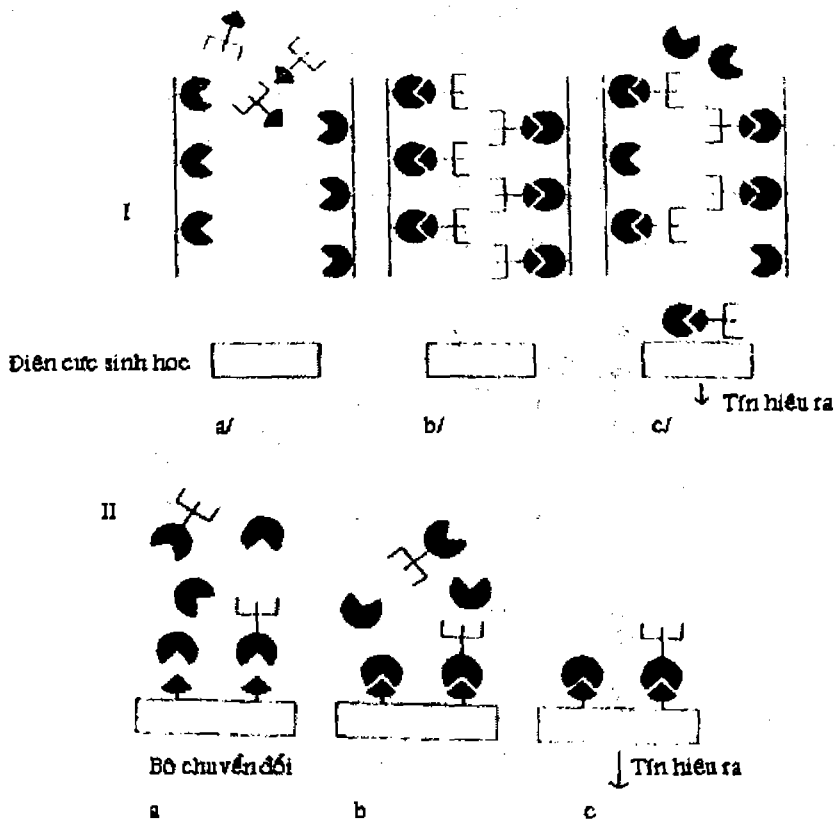
**Hình 4.21. Nguyên lý hoạt động của kỹ thuật ELISA.**

Nguyên lý hoạt động của kỹ thuật Elisa như sau:

a): Kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên được cố định trên bề mặt của một ống. Một hỗn hợp gồm một lượng đã biết phức kết enzym - kháng nguyên và một lượng chưa biết kháng nguyên của mẫu được đặt vào ống;

b): Sau một thời gian thích hợp kháng thể, phức enzym - kháng nguyên và kháng nguyên tự do có thể gắn kết hoặc vẫn ở trạng thái tự do, phụ thuộc vào nồng độ của chúng;

c): Các kháng nguyên tự do được rửa trôi và loại bỏ. Lượng phức kết enzym - kháng nguyên gắn với kháng thể được xác định bằng tốc độ phản ứng enzym theo sơ đồ (I) và (II) hình 4.22.



Hình 4.22. Nguyên lý hoạt động của điện cực miễn dịch.

Nguyên lý hoạt động của điện cực miễn dịch như sau:

I-

a) ống được phủ kháng nguyên cố định. Một lượng dư phức kết enzym-kháng thể được đặt vào ống và xảy ra sự gắn kết.

b) Sau một thời gian thích hợp, những phân tử nào không được gắn kết sẽ bị rửa trôi.

c) Dung dịch chứa kháng nguyên phân tích được đưa vào ống, phụ thuộc vào nồng độ kháng thể mà xảy ra sự gắn kết và loại một số phức kết enzym-kháng thể. Lượng phức kết enzym-kháng thể loại ra được xác định bằng tín hiệu đáp ứng từ 1 điện cực sinh học.

## II-

a) Bộ chuyển đổi được phủ kháng thể (cố định) đặc hiệu với kháng nguyên phân tích. Bộ chuyển đổi được ngâm trong một dung dịch chứa một hỗn hợp gồm một lượng đã biết phức kết enzym-kháng nguyên và nồng độ chưa biết kháng nguyên phân tích.

b) Sau một thời gian thích hợp, kháng nguyên và phức kết enzym-kháng nguyên được gắn kết với kháng thể.

c) Những phân tử nào không được gắn với kháng thể bị rửa trôi và loại bỏ. Lượng phức enzym-nguyên gắn với kháng thể được xác định trực tiếp từ tín hiệu chuyển đổi.

ELISA được sử dụng để phát hiện và khuếch đại một phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Lượng kháng nguyên liên kết enzym gắn với kháng thể cố định được xác định bằng nồng độ tương đối giữa kháng nguyên liên kết và kháng nguyên tự do và được định lượng bằng tỷ lệ của phản ứng enzym. Để có được đáp ứng nhanh chóng, người ta sử dụng các enzym có khả năng sử dụng lại nhiều lần. Độ nhạy của phương pháp này cũng có thể tăng lên bằng cách sử dụng các phản ứng có xúc tác enzym. Các phản ứng này cho đáp ứng nhanh hơn: chẳng hạn tạo ra các sản phẩm phát quang, hoặc huỳnh quang hoặc có màu đậm hơn. Kỹ thuật này hiện nay được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm phân tích.

Gần đây, để tăng phạm vi ứng dụng, tốc độ và độ nhạy, kỹ thuật ELISA được kết hợp với các bộ điện cực sinh học hình thành phương pháp sử dụng điện cực miễn dịch (immunosensor). Cấu hình của một immunosensor đơn giản được thể hiện ở hình 4.22(I), ở đây, điện cực sinh học chỉ thay thế cho hệ thống giám định màu truyền thống. Tuy nhiên các điện cực miễn dịch hiện đại đang được phát triển hình 22 (II). Chúng dựa vào khả năng giám định trực tiếp các kháng nguyên gắn bề mặt được phủ kháng thể của điện cực sinh học. Phương pháp này rất thích hợp khi sử dụng với điện cực điện áp và các điện cực đo điện thế.

### 4.3.5. Điện cực vi sinh vật (microbial biosensor)

Điện cực vi sinh vật được chế tạo để phát hiện các chất hoá học, dựa vào sự hô hấp và trao đổi chất của vi sinh vật.

Điện cực này có hai loại:

- Điện cực dùng để đo sự thay đổi hoạt lực hô hấp của vi sinh vật cố định với một thiết bị đo điện thế.
- Điện cực dùng để đo các chất sinh ra từ vi sinh vật và phản ứng dễ dàng được với điện cực.

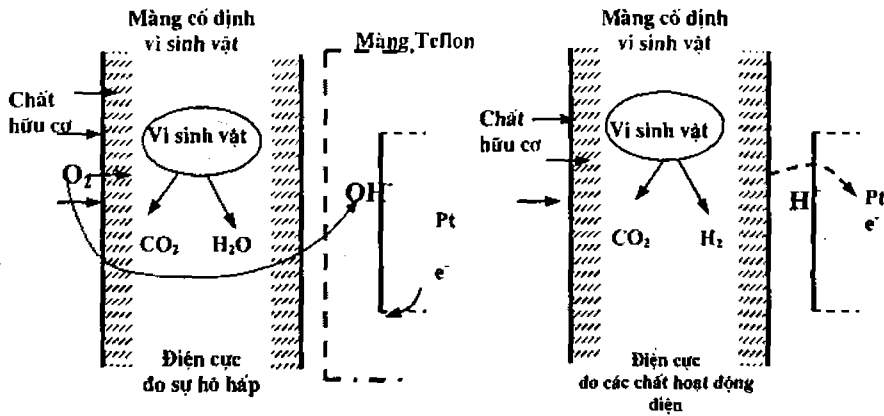
Các vi khuẩn hiếu khí sử dụng oxy và sản sinh năng lượng. Nhờ việc đo lượng oxy tiêu thụ thông qua điện cực  $O_2$ , ta có thể đánh giá được hoạt lực hô hấp. Oxy thấm qua màng teflon và bị khử trên điện cực platin. Nếu vật liệu trong dung dịch thử nghiệm có ảnh hưởng đến hoạt lực hô hấp, thì nồng độ của nó có thể được định lượng thông qua việc xác định nồng độ oxy.

Người ta thường dùng điện cực này để xác định chỉ số, BOD. COD là thước đo lượng chất hữu cơ gây ô nhiễm nước và nó được sử dụng để đánh giá chất lượng nước. Các chất gây ô nhiễm có thể bị phân huỷ bởi vi sinh vật nhờ tiêu thụ oxy. Vì vậy mức độ ô nhiễm có thể được xác định thông qua việc đo lượng oxy.

Điện cực được chế tạo bằng cách cố định trichosporon cutaneum vào màng cellulose và gắn với điện cực oxy.

Nguyên lý của điện cực đo BOD có thể diễn giải như sau: Oxy khuếch tán từ dung dịch bão hoà không khí qua màng thấm tích đi vào màng có chứa các tế bào vi sinh vật rồi qua màng teflon và cuối cùng chúng bị khử trên bề mặt catod của điện cực oxy. Dòng của điện cực oxy dần dần ổn định, bởi vì tốc độ khuếch tán của oxy qua màng cân bằng với tốc độ tiêu thụ oxy do hô hấp nội sinh của cơ thể vi sinh vật cố định trên màng. Người ta gọi dòng này là dòng cơ bản (base current). Nếu ta cho chất đồng hóa hữu cơ vào dung dịch đo, chúng thấm qua màng thấm tích rồi được vi sinh vật sử dụng. Kết quả là tốc độ hô hấp tăng dần còn nồng độ oxy hoà tan thì giảm dần, dẫn đến dòng giảm dần cho tới khi đạt đến trạng thái ổn định mới và người ta gọi dòng này là dòng đỉnh (peak current). Sự khác nhau giữa dòng cơ bản và dòng đỉnh được gọi là dòng ra (output), tín hiệu của dòng ra tỷ lệ thuận với nồng độ của các chất hữu cơ bị phân huỷ sinh học của mẫu đo. Vì vậy ta có thể biết được nồng độ BOD dựa trên kết quả đo của điện cực vi sinh.

Hình 4.23 là sơ đồ cấu tạo hai loại điện cực vi sinh vật.



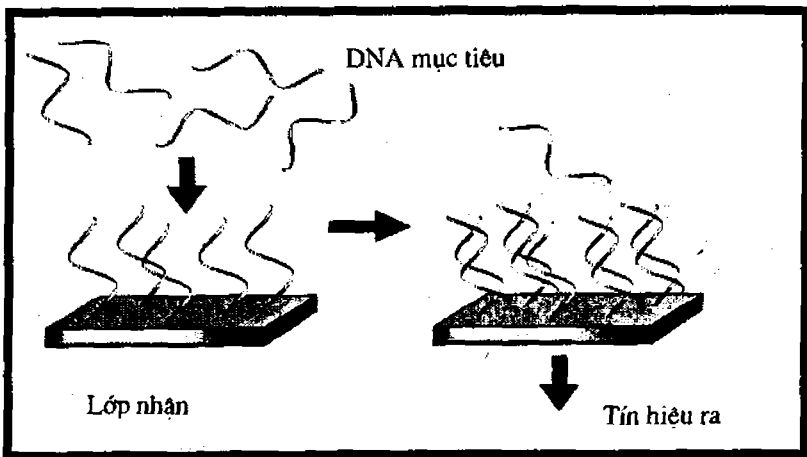
Hình 4.23. Sơ đồ nguyên lý hoạt động của hai loại điện cực vi sinh vật.

#### 4.3.6. Điện cực DNA

DNA sensor sử dụng bioreceptor là các acid nucleic nhằm phát hiện đặc hiệu các DNA mục tiêu. Đáp ứng sinh học đặc hiệu của DNA sensor là phản ứng bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung giữa các trình tự DNA sợi đơn (mục tiêu) và DNA dò (probe).

Các base nito liên kết với nhau bằng liên kết hydro tạo sợi đôi DNA bền.

DNA sensor gồm nhiều loại khác nhau, được phát triển dựa trên các kỹ thuật thu nhận và chuyển đổi tín hiệu khác nhau: điện hóa; quang...



Hình 4.24: Nguyên tắc chung của DNA sensor.



Khi quá trình “lai” giữa DNA mục tiêu và DNA đầu dò xảy ra, tín hiệu “lai” sẽ được DNA sensor thu nhận và chuyển đổi, tùy theo loại transducer được sử dụng. Ví dụ

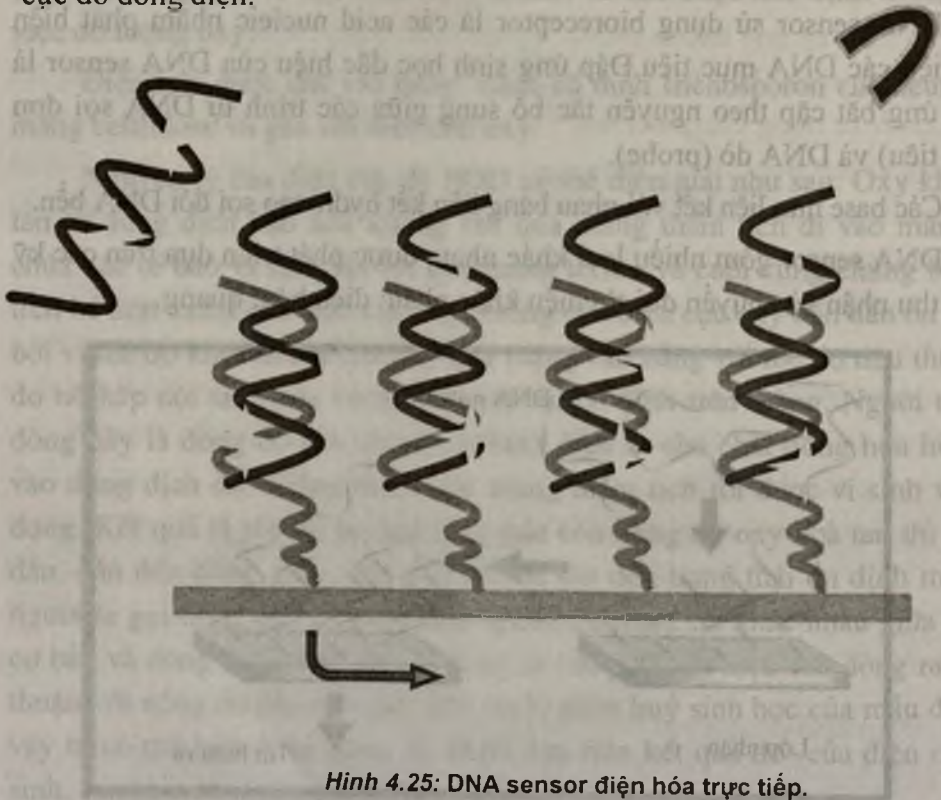
- DNA điện hóa (Electrochemical DNA sensor):

DNA được cấu tạo từ các base nito Purine (A,G) và Pyrimidine (T,C). Ở điện thế phù hợp, các base nito purin dễ dàng tham gia phản ứng oxi hóa khử trực tiếp hay thông qua các chất trung gian. Sự trao đổi điện tích chính là tín hiệu đáp ứng của phản ứng bắt cặp đặc hiệu DNA.

Lợi dụng tính chất này để phát hiện quá trình “lai” của DNA.

• DNA sensor điện hóa trực tiếp:

Các DNA mục tiêu “lai” với DNA probe trên lớp nhận biết. Ở điều kiện điện thế phù hợp base (G) của DNA, mục tiêu bị oxi hóa gây ra hiện tượng tích điện trên bề mặt điện cực. Sự biến đổi điện tích được đo bởi điện cực đo dòng điện.



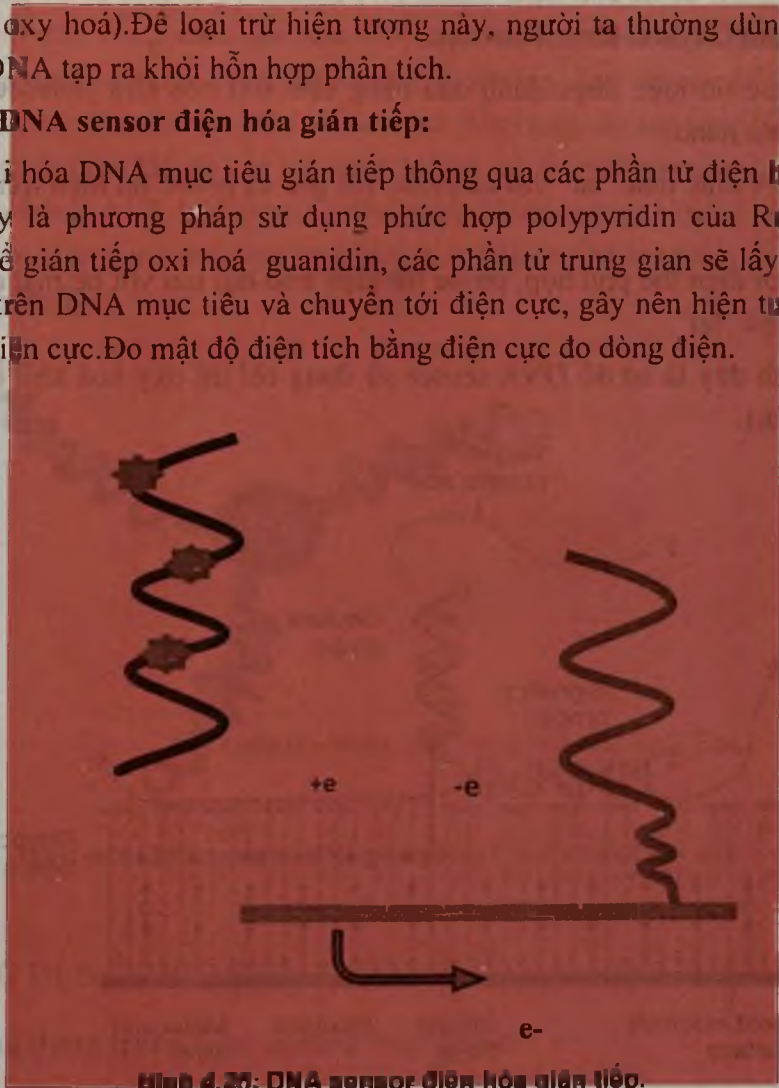
Hình 4.25: DNA sensor điện hóa trực tiếp.

Kỹ thuật này đạt độ nhạy khá cao nhờ tạo ra sự tích tĩnh điện của các chất phân tích trên bề mặt điện cực trước khi tiến hành phát hiện. Các base purin của DNA có thể bị oxy hoá điện hoá học, và quá trình này có thể được tiến hành trên điện cực cacbon, vàng, hay indiumtin oxide (ITO).

Tuy nhiên phương pháp này thường bị nhiễu nền (do G của DNA tạp cũng bị oxy hoá). Để loại trừ hiện tượng này, người ta thường dùng từ tính để hút DNA tạp ra khỏi hỗn hợp phân tích.

- **DNA sensor điện hóa gián tiếp:**

Oxy hóa DNA mục tiêu gián tiếp thông qua các phân tử điện hóa trung gian. Đây là phương pháp sử dụng phức hợp polypyridin của Ru (II) và Os(II) để gián tiếp oxy hoá guanidin, các phân tử trung gian sẽ lấy e từ các base G trên DNA mục tiêu và chuyển tới điện cực, gây nên hiện tượng tích điện ở điện cực. Đo mật độ điện tích bằng điện cực đo dòng điện.



Hình 4.26: DNA sensor điện hóa gián tiếp.

\* DNA sensor điện hóa sử dụng chất oxy hoá-khử đặc hiệu.

- Nguyên lý :

Sử dụng hai loại probe có trình tự bổ sung lại với hai đầu của DNA mục tiêu: probe bắt giữ và probe tín hiệu.

- Probe bắt giữ được cố định trên bề mặt điện cực.

- Probe tín hiệu có thể cố định trên bề mặt điện cực hoặc tự do trong dung dịch.

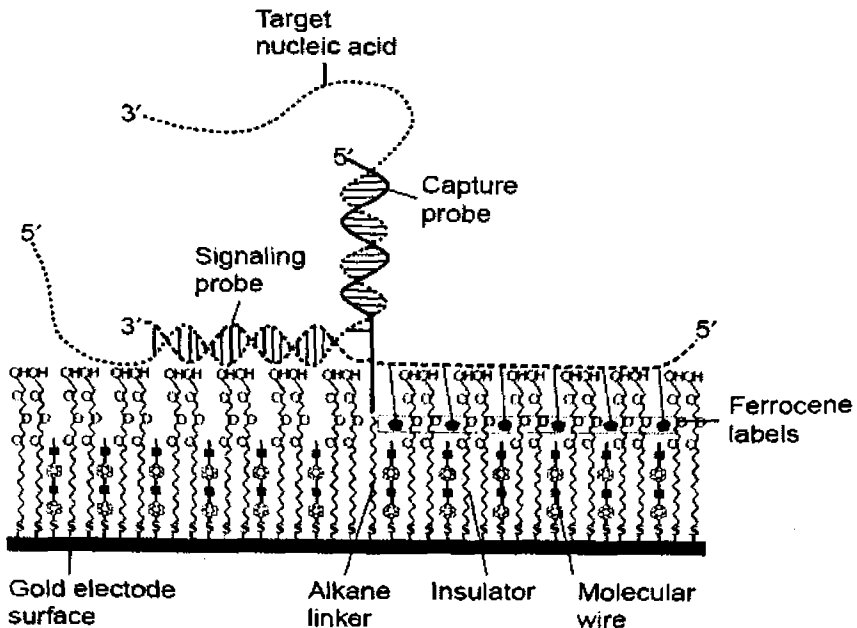
- Chất Oxyhoá-khử : Ferrocen.

Probe tín hiệu được đánh dấu bằng chất oxi hóa khử (ferrocen) hoặc gắn với hạt nano.

DNA mục tiêu "lai" với cả probe bắt giữ và probe tín hiệu trên bề mặt điện cực.

Dưới điện thế phù hợp, probe tín hiệu trao đổi ion với bề mặt điện cực tạo tín hiệu "lai".

Dưới đây là sơ đồ DNA sensor sử dụng chỉ thị oxy hoá khử đặc hiệu (sandwich).



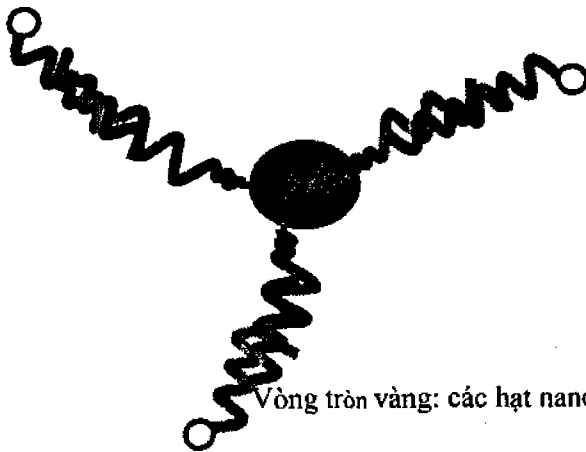
**Hình 4.27: DNA sensor điện hóa sử dụng chất oxy hoá-khử đặc hiệu.**

- Vùng sợi xanh (trên): sợi OLIGOPHENYLETHYNYL-làm nhiệm vụ truyền điện tử giữa phần đánh dấu ferrocen và điện cực.

- Vùng sợi xanh (dưới): sợi POLYETHYLENGLYCOL –là lớp cách điện, ngăn cản ferrocen trong dung dịch tiếp xúc với điện cực. Điện tử truyền từ ferrocene tới điện cực được ghi dưới dạng dòng điện bởi detector.

- Kỹ thuật DNA sensor điện hoá có gắn hạt nano đánh dấu

Wang và cs đưa ra kỹ thuật DNA sensor điện hóa có sử dụng các hạt nano đánh dấu bằng cách gắn các DNA probe lên các hạt từ tính lai với DNA mục tiêu và được phân tách trong từ trường. Sau đó các DNA probe này lai lần thứ hai với các sợi tín hiệu đánh dấu bằng các hạt nano. Sản phẩm lai sẽ được tách ra, khi đó các hạt nano bị hoà tan trong dung dịch và có thể phát hiện bằng AVS (Adsorption Stripping Voltametry). Với kỹ thuật này có thể phát hiện cùng một lúc ba DNA mục tiêu với ba hạt nano đánh dấu : CdS, ZnS, PbS.



**Hình 4.28:** DNA sensor điện hoá với các hạt nano đánh dấu.

## 4.4. ỨNG DỤNG ĐIỆN CỰC SINH HỌC

### 4.4.1. Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm

Trong công nghiệp thực phẩm, việc kiểm tra chất lượng thực phẩm dựa trên các phương pháp truyền thống thường đòi hỏi nhiều giờ hoặc thậm chí nhiều ngày.

Trong những năm gần đây, hệ thống quản lý chất lượng và an toàn thực phẩm đã được phát triển trong ngành công nghiệp thực phẩm. Đây là những hoạt động đi trước và mang tính chất phòng ngừa. HACCP (Hazard Analysis critical control point) là một công cụ quản lý được nhiều nước sử dụng trong quản lý chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm. Nó cũng là cơ sở cho các tiêu chuẩn sản phẩm thực phẩm khi buôn bán trên thị trường quốc tế. Để HACCP có hiệu quả và thành công, các phương pháp kiểm tra nhanh để theo dõi là rất cần thiết.

Kỹ thuật điện cực sinh học có thể mang đến cho ngành công nghiệp thực phẩm một thiết bị theo dõi và đo lường nhanh, độ nhạy cao, sử dụng thuận lợi hơn so với các phương pháp truyền thống.

Một số ứng dụng của điện cực sinh học trong phân tích thực phẩm được tóm tắt ở bảng 4.5.

**Bảng 4.5: Ứng dụng của ĐCSH trong công nghiệp thực phẩm**

Hợp chất cần đo	Ứng dụng
Các axit amin	Alanin, arginin, asparagin, aspartic acid, cystein, glutamin, glutamic acid, glutathion, histidin, leucin, lysin, methionin, N-acetylmethionin, phenylalanin, sarcosin, serin, tyrosin, tryptophan, valin
Các hợp chất amin, amid, dị vòng	Aminopyrin, anilin, amin thơm, acetylcholin, cholin, phosphatidylcholin, creatin, guanidin, guanosin, penicillin, spermin, creatinin, uric acid, ure, xanthin, hypoxanthin
Hydratcacbon	Amygdalin, galactose, glucose, glucose-6-phosphat, lactose, maltose, saccarose, tinh bột
Axit hữu cơ	acid Acetic, acid formic, acid gluconic, acid isocitric, acid ascorbic, acid lactic, acid malic, acid oxalic, acid pyruvic, acid succinic, acid nitrilacetic
Các rượu và các phenol	Acetaldehyd, bilirubin, catechol, cholesterol, cholesterol ester, ethanol, glycerol, glycerol ester, methanol, phenol
Các hợp chất khác	Chất kháng sinh, độ tươi của thịt cá vitamin...

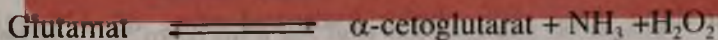
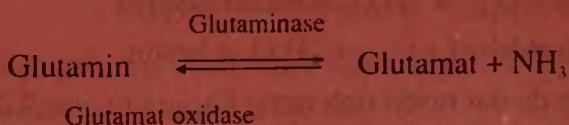
**Bảng 4.6: Một số ĐCSH ứng dụng trong thương mại**

ĐCSH	Chất xác định	Công ty sản xuất
Điện cực enzym	Glucose, saccarose, fructose, tinh bột, etanol, glycerol	Enzo Biochem (Mỹ); Fuji, Kyoto, Omeron, Toyoba (Nhật Bản); Solea-Tacssel (Pháp); Eppendorf (Đức)
Điện cực enzym	Độ tươi của cá(bằng nucleotid/nucleosid)	Pegasus Biotechnology (Canada), Oriental Electric Co (Nhật Bản)
Điện cực H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ĐCSH dòng điện	Glucose	Control Equipment Co. (Mỹ), NEC (Nhật Bản)
FET	Glucose, cồn, lactat, glycerol	Ajinomoto Co., Mitsubishi, NEC (Nhật Bản)
Cực dò ADN	Salmonella trong thực phẩm	Integrated Genetics Mỹ
Cực dò ADN	Chlamydia	Enzo Biochem (Mỹ)
Cực dò ADN	Vi khuẩn	Hybritech Industries (Mỹ)

• **Đo nồng độ glutamin và nồng độ glutamat**

Sử dụng điện cực đo dòng điện có gắn màng cố định glutamat oxidase được ứng dụng rộng rãi trong chế biến thực phẩm để định lượng glutamat vì: nồng độ glutamat trong thực phẩm không những chỉ ảnh hưởng đến mùi vị của thực phẩm mà còn liên quan đến khía cạnh an toàn thực phẩm. Các loại đồ hộp như nước xúp, dầu giấm, nước sốt được bổ sung một lượng mono sodiumtri glutamat (MSG) có tác dụng làm tăng mùi vị nhưng một lượng lớn glutamat có thể gây ra những phản ứng nghiêm trọng ở một số người như: tim đập nhanh, đau dạ dày.

Glutamat oxidase cũng được đồng cố định với glutaminase để đo nồng độ glutamin dựa trên cơ sở của phản ứng:



Việc đo nồng độ glutamin có ý nghĩa rất quan trọng bởi đó là chỉ tiêu đánh giá nguồn nitơ của môi trường nuôi cấy vi sinh vật công nghiệp.

Điều đáng chú ý ở đây là glutamat oxidase có hoạt tính tối ưu tại pH=7,8 còn glutaminase từ *E.coli* lại hoạt động tại vùng pH axit. Nếu thay thế bằng glutaminase trung tính từ *Bacillus* cho thấy: cả hai enzym đều có hoạt tính tối ưu tại pH=7 và có tính chịu nhiệt tốt. Màng enzym tạo thành rất ổn định và có hoạt tính tốt để đưa vào sản xuất thương mại.

Màng enzym cho kết quả đo đạt tuyến tính đến 8mM glutamin, không đáp ứng với các chất khác (trừ glutamat), và giữ được ổn định ở trạng thái khô trong thời gian ít nhất 6 tháng, ở 4°C.

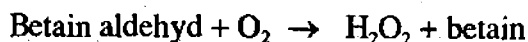
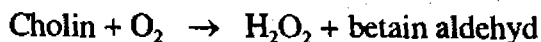
Các kết quả thu được khi sử dụng thiết bị điện cực enzym YSI-2700 và phương pháp HPLC (sắc kí lỏng cao áp) cho thấy những lợi thế rõ rệt khi sử dụng phương pháp ĐCSH: kết quả đưa ra chính xác chỉ sau 30 giây, trong khi phương pháp HPLC đòi hỏi thời gian phân tích rất dài.

#### • Đo nồng độ cholin

Trong cơ thể cholin là thành phần của phospholipid cấu thành nên màng tế bào và màng của nhiều bào quan trong tế bào, mặt khác cholin còn là tiền chất để tổng hợp nên acetylcholin (chất có vai trò chuyển sự kích thích thần kinh) đồng thời cũng là nguồn cung cấp các nhóm metyl trong cơ thể. Cholin thường được bổ sung vào thức ăn cho trẻ em và các sản phẩm dinh dưỡng cho người lớn.

Việc xác định nồng độ cholin có thể thực hiện bằng phương pháp theo dõi sự phát triển của vi sinh vật trên môi trường cơ chất, bằng phương pháp đo quang hoặc sắc kí. Tuy nhiên các phương pháp này thường ít chính xác, thời gian dài và giá thành cao.

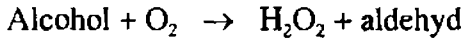
Điện cực enzym để định lượng cholin được chế tạo dựa trên cơ sở phản ứng oxi hoá cholin xúc tác bởi cholin oxidase:



Giá trị của phép đo đạt tuyến tính trong khoảng từ 5mg/l đến ít nhất là 160mg/l khi sử dụng dung dịch cholin hydroxyd nồng độ 111mg/l làm chuẩn. Thời gian thu được kết quả chỉ sau 30 giây và giá rẻ. Giá thành của mỗi phép đo càng giảm khi số lượng thử nghiệm tăng lên.

- **Đo hàm lượng cồn**

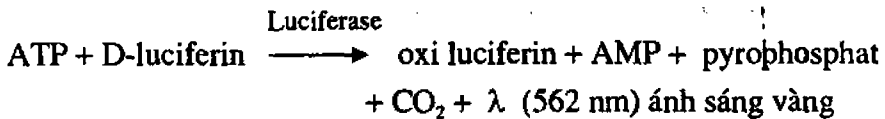
Hàm lượng cồn được xác định bằng cách sử dụng alcohol oxidase:



Tuy nhiên một hạn chế của loại điện cực này là tính không bền của alcohol oxidase ở dạng khô vì vậy cần có biện pháp bảo quản thích hợp để giữ được tính ổn định của enzym.

- **Phát hiện sự có mặt của vi khuẩn trong thực phẩm**

Loại điện cực này gọi là điện cực sinh học phát quang, nó phát hiện sự có mặt của vi khuẩn trong các loại thực phẩm khi các vi khuẩn này tác dụng đặc hiệu với ATP và chất D-luciferin để giải phóng ra ánh sáng phát quang nhờ tác dụng xúc tác của enzym luciferase:



Đo ánh sáng vàng tại bước sóng 562nm, biết được lượng vi khuẩn cần phân tích.

- **Điện cực miễn dịch đo hàm lượng albumin, insulin**

- Điện cực miễn dịch kết hợp với điện cực đo dòng điện để xác định insulin hoặc albumin.

Cho kháng thể kháng insulin đã biết (lấy từ huyết thanh lợn) lên trên một lớp màng đã gắn điện cực oxy để các kháng thể có thể bám vào lớp màng đó, sau đó cho insulin cần kiểm tra lên trên màng và cho tiếp kháng nguyên (insulin) đã gắn catalase và bổ sung cơ chất là  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lúc đó sẽ xảy ra phản ứng:

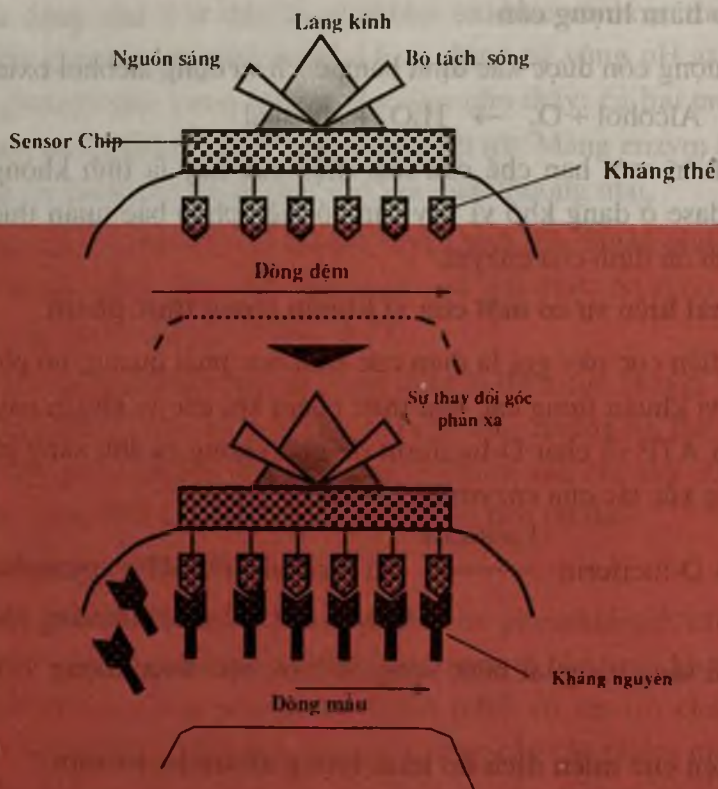


Hàm lượng  $\text{O}_2$  tạo thành được định lượng nhờ điện cực  $\text{O}_2$ , từ đó xác định được hàm lượng insulin.

- Điện cực miễn dịch kết hợp với điện cực đo quang.

Hình 4.24 minh họa một điện cực miễn dịch sử dụng bộ chuyển đổi quang học. Trong đó biến đổi sinh học tạo ra đáp ứng quang học thông qua một màng điện cực (sensor chip).





**Hình 4.24.** Sơ đồ nguyên lý phân tích kháng nguyên của điện cực miễn dịch kết hợp điện cực quang.

Điện cực này được cấu tạo bởi ba phần: 1- là hệ thống chiếu sáng và thu nhận ánh sáng phản xạ bởi một bộ tách sóng (detector array), 2- là một màng có gắn kháng thể, 3- là ống bơm mẫu.

Khí mẫu có chứa kháng nguyên đi qua, sẽ phản ứng đặc hiệu với kháng thể trên bề mặt sensor chip và do đó làm thay đổi bước sóng và góc phản xạ của ánh sáng chiếu vào mặt bên kia của sensor chip. Đo các thông số quang học sẽ cho ta nồng độ kháng nguyên có trong mẫu.

- **Kiểm tra hàm lượng chloramphenicol trong sản phẩm thủy sản**

Một ứng dụng khác của điện cực miễn dịch đang được ứng dụng vào việc kiểm tra hàm lượng chloramphenicol trong thủy sản vốn đang được Cộng đồng Châu Âu (EU) và một số thị trường khác như Mỹ, Canada, Hàn Quốc xem xét rất nghiêm ngặt.

Nguyên tắc phương pháp ELISA dựa trên phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Các giếng được phủ lớp kháng thể kháng kháng thể kháng chloramphenicol (chloramphenicol chuẩn hoặc dung dịch mẫu). Chloramphenicol gắn enzyme và kháng thể kháng chloramphenicol được bổ sung vào giếng. Chloramphenicol tự do và chloramphenicol gắn kết enzyme sẽ cạnh tranh các vị trí kết gắn của kháng thể kháng chloramphenicol (phản ứng miễn dịch enzyme cạnh tranh). Đồng thời các kháng thể kháng chloramphenicol cũng được cố định lại bởi các kháng thể phủ trên thành giếng. Chloramphenicol kết gắn enzyme thừa ra sẽ được loại bỏ bằng cách rửa. Bổ sung vào giếng cơ chất của enzyme (ure peroxit) và chất tạo màu (tetrametyl benzidin) và ủ. Enzyme gắn kết sẽ chuyển hoá chất tạo sắc vốn không màu thành sản phẩm có màu xanh. Khi bổ sung chất kết thúc phản ứng sẽ chuyển từ xanh sang vàng. Đo cường độ màu trên máy đo màu quang điện ở bước sóng 450 nm. Cường độ màu tỉ lệ nghịch với hàm lượng chloramphenicol có trong mẫu.

Cơ chế phản ứng sử dụng thiết bị ELISA để kiểm tra chloramphenicol được minh họa trong hình 4.25.

**Trên khay có phủ sẵn lớp kháng thể kháng kháng thể chloramphenicol**



1. Pha loãng mẫu có chứa chloramphenicol đem ủ với sự có mặt kháng thể, nó sẽ gắn kết với kháng thể

2. Bổ sung enzyme kết gắn chloramphenicol và kháng thể kháng chloramphenicol đem ủ. Xảy ra sự cạnh tranh chloramphenicol gắn kết enzyme với chloramphenicol tự do ở vị trí gắn kháng thể

3. Bổ sung cơ chất của enzyme và chất tạo màu, đem ủ. Enzyme kết gắn chuyển hoá cơ chất thành sản phẩm màu. Đo màu biết hàm lượng chất cần đo.

**Hình 4.25. Cơ chế phản ứng sử dụng điện cực miễn dịch kiểm tra hàm lượng chloramphenicol.**

Giai đoạn ủ được thực hiện trong máy ủ ổn định nhiệt độ. Kết quả phản ứng được đọc bằng máy đọc theo nguyên tắc so màu và so sánh với đồ thị chuẩn để xác định nồng độ kháng sinh.

Phương pháp này có thể phát hiện chloramphenicol ở nồng độ 0,05 ppb. Tuy nhiên đây cũng chỉ là một phương pháp bán định lượng.

Loại thiết bị này còn được sử dụng để kiểm tra một số chất khác bằng các loại chất chuẩn khác nhau (các kit chuẩn) với giới hạn phát hiện rất thấp như nêu trong bảng 4.7.

**Bảng 4.7**

Loại kit	Giới hạn phát hiện
*Chloramphenicol	
- Mẫu sữa	0,15 ppb
- Mẫu thịt, trứng	0,10 ppb
- Mẫu tôm	0,05 ppb
*Clenbuterol	
- Mẫu nước tiểu	0,1 ppb
- Mẫu thịt	0,04 ppb
*Diethylstilbestrol	0,02 ppb
*Histamin	
- Cá tuyết	20 ppm
- Bột cá	125 ppm

- **Xác định hàm lượng mycotoxin trong ngũ cốc và thực phẩm**

Mycotoxin là độc tố sinh ra trong quá trình phát triển của nấm mốc có mặt trong các sản phẩm như: lạc, ngũ cốc, hoa quả. Chúng cũng có thể xuất hiện trong thức ăn gia súc. Gia súc khi ăn các thức ăn này, độc tố mycotoxin có thể đi qua quá trình trao đổi chất rồi có mặt trong các sản phẩm của chúng như: trứng, sữa, thịt. Có nhiều phương pháp xác định mycotoxin trong đó có phương pháp xác định bằng điện cực miễn dịch đang được sử dụng rộng rãi.

Phương pháp này dựa trên nguyên tắc liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên, kháng thể. Một nồng độ cố định của kháng thể được trộn với mẫu

cần phân tích có chứa hàm lượng mycotoxin chưa biết. Kháng thể và mycotoxin sẽ tạo thành phức. Điện cực sẽ xác định nồng độ kháng thể tự do (không tạo phức với mycotoxin). Dựa vào đồ thị mycotoxin chuẩn có thể định lượng được mycotoxin có mặt trong mẫu cần phân tích.:

Các kháng thể được sử dụng trong phương pháp này là kháng thể đơn dòng.

#### 4.4.2. Ứng dụng trong môi trường

Các điện cực enzym sử dụng trong phân tích môi trường có thể chia thành ba nhóm dựa vào đặc điểm của một phản ứng enzym:

- Nhóm thứ nhất: các chất được định lượng là cơ chất của phản ứng enzym.

- Nhóm thứ hai: các chất được định lượng là các chất kìm hãm hoạt tính xúc tác của enzym.

Ví dụ: Các hợp chất cơ phospho và cacbamat.

Nhóm thứ ba: Nồng độ các ion kim loại được phát hiện nhờ vào việc chúng liên kết với phần "apoenzym" do đó phục hồi hoạt tính của enzym.

- **Định lượng ion kim loại nặng**

Các enzym thuộc nhóm metalloenzym cần có các ion kim loại tham gia vào trung tâm hoạt động để duy trì được hoạt tính xúc tác của enzym, do đó khi các ion kim loại này bị tách ra khỏi enzym (ví dụ: do tác dụng của tác nhân tạo phức) thì sẽ làm mất hoạt tính xúc tác của enzym. Hoạt tính xúc tác của enzym có thể phục hồi khi cho enzym tiếp xúc với môi trường chứa ion kim loại thì ion kim loại sẽ thu hút lại vào trung tâm hoạt động của enzym. Do đó có thể định lượng được nồng độ kim loại nặng trong mẫu thông qua việc xác định hoạt độ xúc tác của enzym tạo thành sau khi cho phần "apoenzym" đã được cố định tiếp xúc với mẫu.

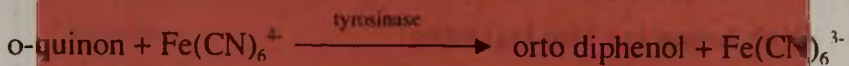
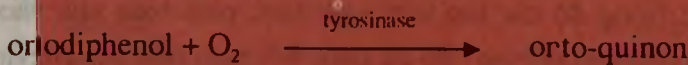
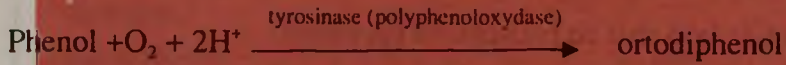
Ưu điểm của phương pháp này là có thể phát hiện các kim loại ở nồng độ rất nhỏ ( $\mu\text{mol}$ ) và có thể phát hiện được bất kỳ một kim loại nào có mặt trong nhóm metalloenzym.

**Bảng 4.8: Giới thiệu một số điện cực xác định ion kim loại**

Kim loại	Enzym	Điện cực	Nồng độ (mmol/l)	Tác giả
Hg(II)	Urease	Điện cực NH <sub>3</sub>	0-150nm/l	Orgen và Johansson, 1978
Zn(II)	Phosphatase kiềm	PH-ISFET	0,01-1,0 (sai số 2,3%)	Satoh và Atoki, 1990
Zn(II)	Apoenzym: phosphatase kiềm	Điện cực nhiệt điện trở	0,01-1,0	Satoh, 1991
Cu(II)	Apoenzym: Galacto oxidase	điện cực PVAg/AgCl	0,1-1,0 (sai số 7%)	Satoh, 1991
Cu(II)	Apoenzym: Tyrosinase	điện cực O <sub>2</sub>	< 0,5	Mattiamon, 1979

• **Định lượng phenol**

Việc phân tích nồng độ các hợp chất phenol dựa trên các phản ứng:



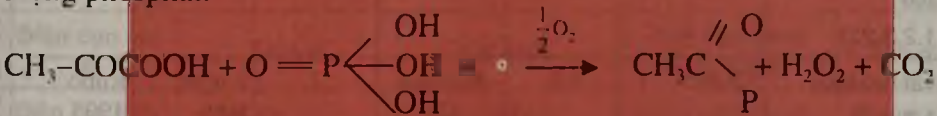
**Bảng 4.9: Điện cực dùng tyrosinase**

Điện cực	Nồng độ phát hiện (μmol/l)	Sai số	Thời gian	Tác giả
Điện cực graphit với TCNQ	0,23-0,65		12-35 giây	Kulys và Schmid (1990)
Điện cực O <sub>2</sub> (Clark)	1-46 (trong hexan) 5-190 [trong dd đậm]	4,4% (trong hexan) 7,2% (trong dd đậm)	< 2 phút	Campanella (1992)
Điện cực O <sub>2</sub> (Clark)	0,1-5 (trong dd đậm + cloroform)		3 phút	Schubert (1992)

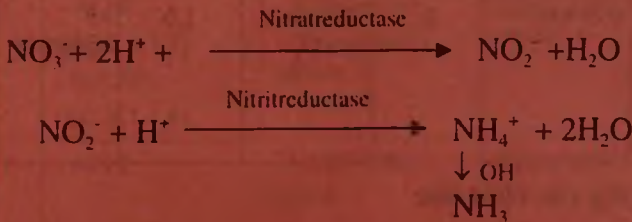
• **Định lượng phosphat, nitrit, nitrat, sulphat**

Các hợp chất này ngày càng có mặt nhiều trong môi trường, đặc biệt là trong nước uống. Sự gia tăng nguồn nitơ, phospho trong nước có thể gây ra hiện tượng phì dưỡng, gây mất cân bằng sinh thái (Theo tiêu chuẩn EC, nồng độ cho phép của phospho là: 5mg/l P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Nồng độ của phospho thông thường được xác định bằng phương pháp đo màu. Tuy nhiên, nồng độ của phospho trong nước cũng có thể được định lượng bằng các điện cực enzym.

Theo Kubo (1991), nồng độ phospho có thể xác định bằng cách sử dụng điện cực pyruvatoxidase: pyruvatoxidase từ *Pediococcus* xúc tác sự oxi hoá pyruvat trong điều kiện có mặt phosphat và O<sub>2</sub> để tạo thành acetylphosphat, hydro peroxid và CO<sub>2</sub>. Lượng O<sub>2</sub> tiêu thụ được dùng để định lượng phosphat:



Các hợp chất nitrat, nitrit có thể định lượng theo phản ứng oxi hoá khử xúc tác bởi nitrat và nitritreductase:



**Bảng 4.10. Định lượng nitrit, nitrat, sulphat**

Chất	Enzym	Điện cực chỉ thị	Giới hạn phát hiện (mmol/l)	Tác giả
Nitrit	Nitrit reductase	Điện cực NH <sub>3</sub>	50	Kiang (1975)
Nitrat	Nitrat reductase và Nitritreductase	Điện cực NH <sub>4</sub>	50	Kiang (1975)
Sulphat	arylsulphatase	Điện cực Pt	100	Cserfalvi và Guilbaut (1976)

**Bảng 4.11. Điện cực enzym định lượng phosphat**

Enzym	Nồng độ (μmol/l)	Sai số %	Điện cực chỉ thị	Thời gian đáp ứng (phút)	Tính ổn định	Tác giả
Phosphotase kiềm (EC 3.1.3.1) và gluco-oxidase (EC 1.1.3.4)	Thấp nhất: 10 <sup>-4</sup> M	5,9	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5-10	>100 TN/3 tháng	Guilbault và Nanjo 1975
Nuclosid-phosphorylase và Xanthin-oxydase	0,3-1,0 mmol/l	10	O <sub>2</sub>	3	>70 TN/30 ngày	Watanabe 1988
Nuclosid phosphorylase (EC 2.4.2.1) và Xanthin oxidase (EC 1.2.3.22)	10-250	5,9	điện cực H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	30 thí nghiệm	Haemmerli 1990
Pyruvat oxidase (EC 1.2.3.3)	12-80	5,9	điện cực O <sub>2</sub>	7	7 ngày (khả năng đáp ứng giảm 50%)	Kubo 1991
Nuclosid phosphorylase (EC 2.4.2.1) và Xanthin oxidase (EC 1.1.3.22)	0,5-100	5	điện cực O <sub>2</sub>	1,5	>8 ngày/300	Wollenberger 1992

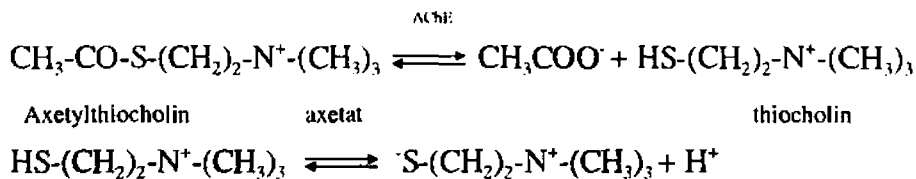
• **Định lượng các chất độc**

Các loại thuốc trừ sâu cơ phospho có độc tính rất cao, ngoài tác dụng độc sơ cấp, chúng còn làm biến đổi các quá trình trao đổi chất của tế bào bằng cách tác dụng lên các enzym thiết yếu như esterase, oxidase, phosphorylase, dehydrogenase. Theo tiêu chuẩn EC, nồng độ tối đa cho phép của dư lượng các chất này trong nước uống là 0,1 μg/l đối với mỗi loại riêng biệt và 0,5 μg/l đối với hỗn hợp. Việc xác định nồng độ các chất này thường được thực hiện qua hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC) hoặc sắc ký khối phổ (GC/MS) đòi hỏi thiết bị phức tạp, đắt tiền và trình độ kỹ thuật cao.

Dựa vào đặc điểm các chất này thường kìm hãm enzym cholinesterase do đó có thể định lượng được nồng độ của chúng bằng cách xác định hoạt độ của enzym sau khi cho tiếp xúc với mẫu nước, kết quả thu được có thể xác

định được nồng độ các chất này đồng thời có thể đánh giá được khả năng gây độc của chúng.

Quá trình thủy phân cholin bởi cholinesterase như sau:



Phản ứng oxy hoá tạo thành ion H<sup>+</sup>, trên cơ sở đó có thể dùng điện cực pH hoặc dùng phương pháp oxy hoá thiolcholin tại điện cực Pt để xác định hoạt độ enzym.

**Bảng 4.12: Giới thiệu một số điện cực dùng cholinesterase**

Điện cực chỉ thị	Enzym	Cơ chất	Giới hạn phát hiện (µg/l)	Tác giả
Điện cực thủy tinh	- BuChE (EC 3.1.1.8)	- Butyrylcholin clorua	1ppm carbofuran 4ppm carbaryl 0,2ppm paraoxon	Kumarand Trần Minh 1992
Điện cực pH	- AChE (EC 3.1.1.7) - BuChE (EC 3.1.1.8)	- Acetylcholin - Butyrylcholin clorua	8ppm methyl- paraoxon	Durand 1984
Điện cực pH	- AChE	-Acetylcholin clorua	3,2 parathion	Schwedt- Hauck 1998
Điện cực thủy tinh hoặc Pd/PdO (pH)	-AChE (EC 3.1.1.7)	-Acetylcholin clorua	10 <sup>-9</sup> M paraoxon, methyl parathion 10 <sup>-10</sup> M malathion	Trần Minh 1990
Điện cực Pt (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	-AChE (EC 3.1.1.7) -ChO (EC 1.1.3.17)	- Acetylcholin- cholin	2 paraoxon	Bernebei 1991
Điện cực Pt (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	-AChE (EC 3.1.1.7) - ChO (EC 1.1.3.17)	- Acetylcholin clorua - Cholin clorua	10nM paraoxon	Marty 1992



Trong các ứng dụng trên, sử dụng ĐCSH để xác định dư lượng thuốc trừ sâu hay xác định vi sinh vật có trong nguyên liệu hay sản phẩm thực phẩm là những ứng dụng rộng rãi nhất.

- **Sử dụng kỹ thuật ELISA trong xác định dư lượng thuốc trừ sâu**

Kỹ thuật ELISA được sử dụng phổ biến trong phân tích các phân tử nhỏ như thuốc trừ sâu là competitive ELISA (ELISA cạnh tranh) theo hai phương thức trực tiếp (cd ELISA-competitive, direct ELISA) và gián tiếp (ci ELISA-competitive, indirect ELISA). Hình 4.26 và 4.27 sẽ minh họa hai kỹ thuật trên.

- Trong cd ELISA, kháng thể được cố định trên bề mặt các giếng giá thể rắn, cho mẫu thuốc trừ sâu có hàm lượng nhất định đã được gắn enzym và thuốc trừ sâu cần phân tích vào các giếng này, chúng sẽ cạnh tranh để bám vào kháng thể. Sau một thời gian phản ứng, các chất còn dư sẽ bị rửa trôi. Cuối cùng, cơ chất được cho vào, cơ chất này sẽ bị enzym xúc tác và tạo ra các sản phẩm có màu sắc. Cường độ màu tỷ lệ nghịch với lượng thuốc trừ sâu cần xác định trong mẫu thí nghiệm. Nếu thuốc trừ sâu nhiều thì lượng cộng hợp enzym do tính cạnh tranh kém hơn sẽ bị giữ lại ít, màu yếu và ngược lại. Tính toán theo phương pháp sau sẽ tìm ra được hàm lượng chính xác.

- **Tính toán kết quả**

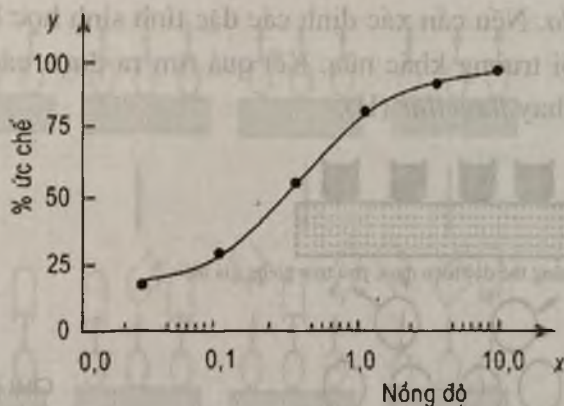
Kết quả cho thấy nồng độ chất cần phân tích càng tăng thì mật độ quang càng giảm. Người ta chọn cách dung đường chuẩn cho phương pháp ELISA như sau: trục x sẽ thể hiện nồng độ chuẩn, chia độ theo logarit. Trục y sẽ thể hiện phần trăm ức chế được tính theo công thức dưới đây:

$$C_{\% \text{ ức chế}} = 1 - \frac{A_{\text{mẫu}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{blank}}} \cdot 100$$

Trong đó: A- mật độ quang của mẫu (hoặc chuẩn);

$A_{\text{control}}$  mật độ quang của đối chứng âm, nghĩa là không có chất cần phân tích, đây là mật độ quang cao nhất;

$A_{\text{blank}}$  mật độ quang của giếng blank.



Hình 4.26. Đường chuẩn điển hình của Elisa.

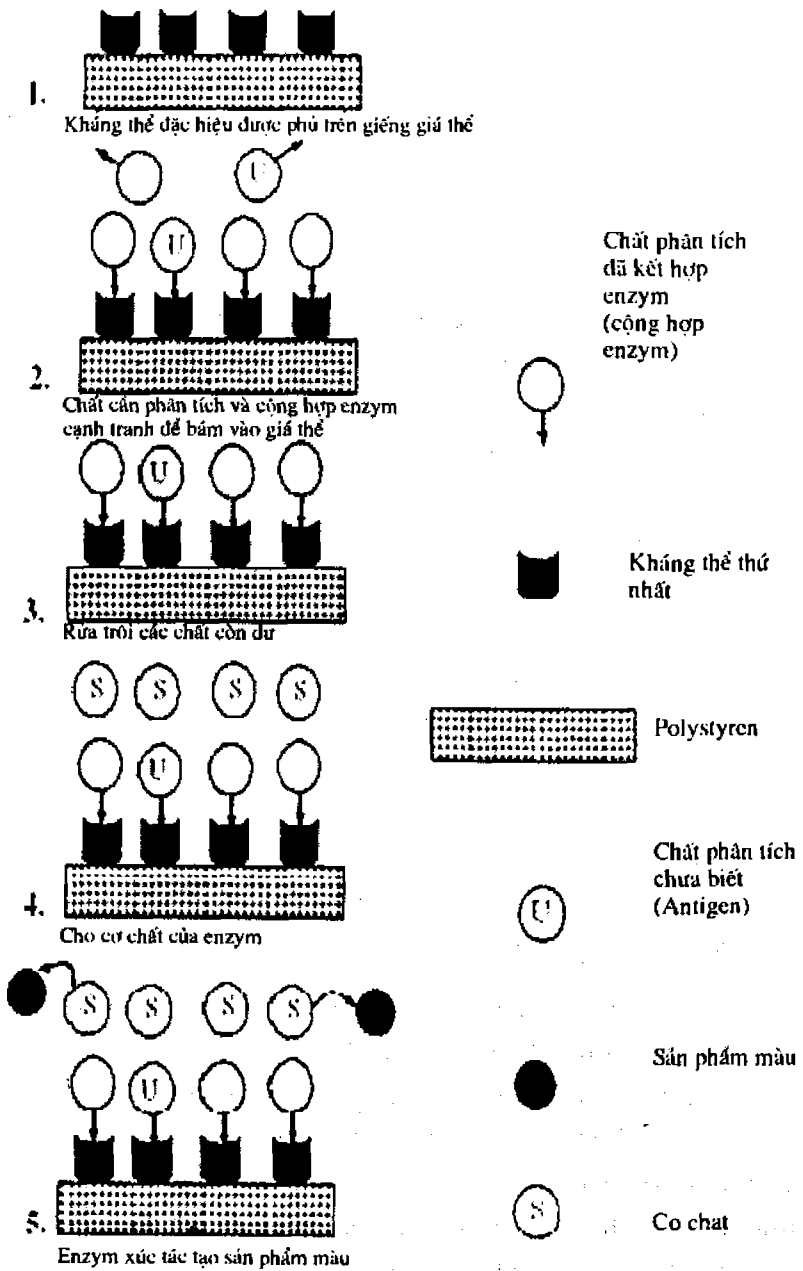
- Trong kỹ thuật ciELISA, các giếng được phủ một lớp thuốc trừ sâu liên kết protein, còn thuốc trừ sâu cần xác định được thêm vào với một lượng kháng thể (antibody) cố định. Để một thời gian, thuốc trừ sâu cần phân tích (kháng nguyên) và thuốc trừ sâu liên kết sẽ cạnh tranh bám vào các kháng thể, lượng thuốc trừ sâu càng nhiều thì lượng kháng thể bị thuốc trừ sâu liên kết protein giữ lại càng ít. Sau rửa trôi các chất còn dư, dùng một lượng kháng thể thứ hai có gắn enzym để phát hiện lượng kháng thể ban đầu được giữ lại bằng cách cho cơ chất vào, chuyển hoá tạo ra các sản phẩm có màu. Cường độ màu tỷ lệ thuận với lượng chất cần xác định trong mẫu ban đầu.

- Phương pháp này có ưu điểm là giá thành rẻ và dễ tự động hoá. Tuy nhiên, nhược điểm chính của phương pháp này là trong một thời gian chỉ phát hiện được một loại thuốc trừ sâu (one pesticide at a time).

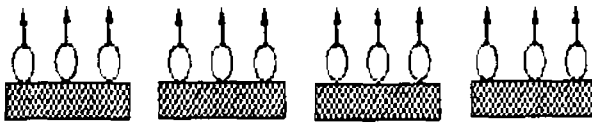
- **Điện cực đếm vi sinh vật**

Theo các phương pháp truyền thống, số lượng và loại vi sinh vật được xác định bằng các thí nghiệm vi sinh. Một số phương pháp trong các phương pháp đó thường tốn nhiều thời gian, đặc biệt khi xác định các vi sinh vật gây bệnh, như xác định *Salmonella* và *Listeria* sp. Ví dụ, khi xác định *Salmonella*, trước tiên cần 24 giờ để làm môi trường, làm cho vi sinh vật cần xác định từ trạng thái tĩnh trong thực phẩm trở thành dạng hoạt động. Sau đó canh trường được ủ để *Salmonella* phát triển. Sau 24 giờ phát triển, cấy môi trường có chứa vi sinh vật sang đĩa thạch. Một hoặc hai ngày sau, xác định

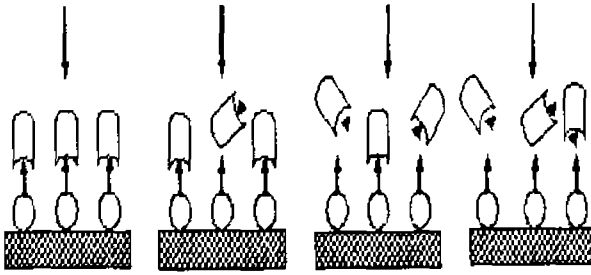
lượng *Salmonella*. Nếu cần xác định các đặc tính sinh học khác thì phải cấy sang một số môi trường khác nữa. Kết quả tìm ra được các loại như kháng thể *somatic* (O) hay *flagellar* (H).



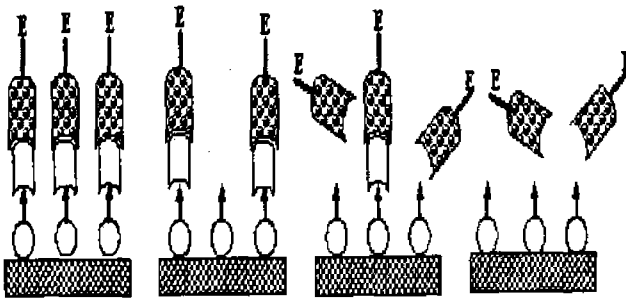
Hình 4.27. Giới thiệu thí nghiệm ELISA cạnh tranh trực tiếp (cd ELISA).



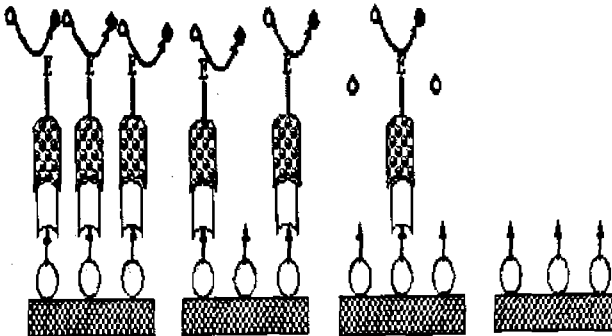
1. Cộng hợp  
kháng nguyên-  
protein được phủ  
trên giá thể rắn




2. Kháng nguyên  
tự do và liên kết  
cạnh tranh bám  
vào kháng thể




3. Bổ sung kháng  
thể thứ 2 gắn  
enzyme để phát  
hiện lượng  
kháng thể đầu  
được giữ lại





4. Bổ sung cơ  
chất của  
enzym để tạo  
sản phẩm màu



 Mô phỏng chất cần  
phân tích


 Polystyren


 Kháng nguyên liên  
kết protein


 Kháng thể thứ nhất


 Enzym liên kết vào  
kháng thể thứ hai


 Cơ chất tạo sản  
phẩm màu

**Hình 4.28.** Giới thiệu thí nghiệm ELISA cạnh tranh gián tiếp (ci ELISA).

Phương pháp trên chính xác nhưng để xác định cần khoảng 5 ngày và kết quả đưa ra chỉ mang tính chất định tính. Các dụng cụ phân tích nhanh hơn thuộc loại “phân tích miễn dịch enzym” (EIA) đã được sử dụng để xác định *Salmonella*, *Staphylococcus* và các nội độc tố. Một phương pháp nhanh hơn để xác định vi sinh vật có thể đạt được bằng cách thay đổi môi trường chọn lọc. Mẫu thực phẩm được xử lý bằng enzym để đạt tới một kích thước nhất định, sau đó nó được lọc trên màng lọc kỵ nước HGMF (hydrophobic grid membrane filter) để chuẩn bị cho bước xác định tiếp theo. Các hệ thống thu nhỏ như API, Enterrotek hay Minitek Spectrum 10, Micro ID được sử dụng để xác định và đang được bán trên thị trường. Một hướng tiếp cận khác là thay đổi các bước làm dịch mẫu, trang trên đĩa thạch. Từ đó phương pháp để tự động hoá và do đó sẽ nhanh hơn. Loại Spiral Plater (Spiral System, Bethesda, MD) và các thiết bị đếm tế bào vô tính điện tử (Fisher Scientific, Biomatic, artek, Biotran) là những tiến bộ của các thiết bị tự động.

#### 4.4.3. Một số công nghệ mới của điện cực sinh học

Trong những năm gần đây, một số dụng cụ thiết bị hiện đại đã được nghiên cứu và chế tạo dựa trên nguyên lý của ĐCSH. Những thiết bị đó đã được ứng dụng có hiệu quả hoặc sẽ có những ứng dụng rộng rãi hơn, hiệu quả hơn trong công nghiệp thực phẩm, cũng như trong các ngành công nghiệp khác trong một tương lai gần, như kỹ thuật điện tử, Flow Cytometry, kỹ thuật cực dò ADN hay in mẫu phân tử (molecular imprinting), trong đó kỹ thuật cực dò ADN và kỹ thuật in mẫu phân tử được sử dụng hiệu quả hơn cả.

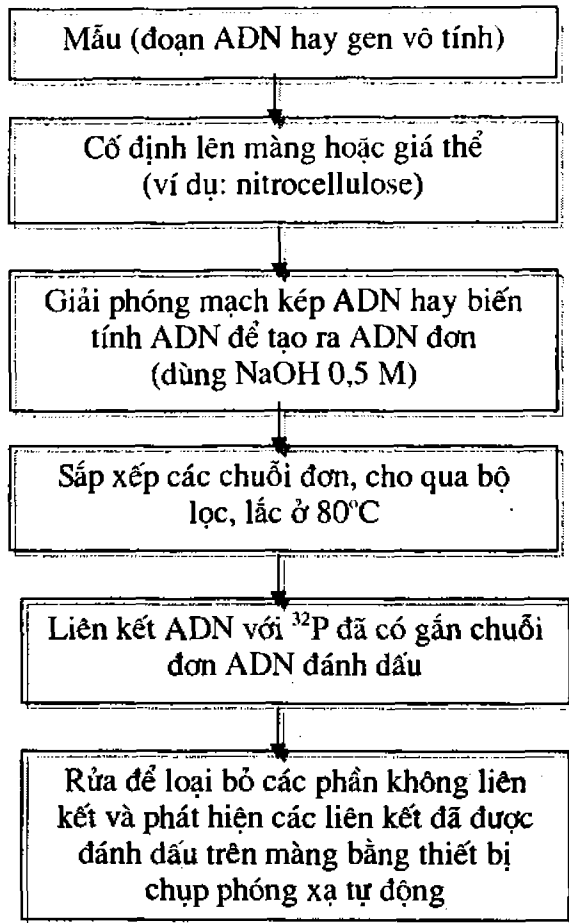
- **Cực dò ADN**

Các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và các chuẩn đoán dựa vào cực dò ADN ngày càng đóng vai trò quan trọng trong xác định vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm. Các kỹ thuật này dựa trên sự phân cắt có chọn lọc ADN bằng các endonuclase giới hạn và dựa trên sự địa phương hoá các chuỗi nucleotide đặc trưng sau khi kết hợp với các đoạn ADN hoặc ARN đã được đánh dấu bằng các đồng vị phóng xạ (ví dụ như  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ), bằng đánh dấu huỳnh quang (như sử dụng các chất florexen, rodami, ethidi, phức cation của đất hiếm), bằng đánh dấu phát quang (như các dẫn xuất của luminol, acridinium

ester, luciferen) hoặc các enzym đánh dấu (như phosphatase kiềm, peroxidase cây cải ngựa) và cũng có thể sử dụng kết hợp hai hay nhiều cách trên. Như vậy, các hệ thống phát hiện sinh học được sử dụng trong lĩnh vực miễn dịch cũng có khả năng sử dụng trong cực dò ADN.

Cực dò ADN được chế tạo từ các chuỗi đơn và có thể liên kết với các ADN hoặc ARN bổ sung. Chuỗi xoắn kép có thể dễ dàng được tách ra bằng nhiệt độ hoặc pH cao, sau đó nó được cho lại để tạo ra một chuỗi xoắn kép mới dưới những điều kiện nhất định. Sự lai này không phụ thuộc vào toàn bộ thành phần của ADN (phần trăm của từng bazo nitơ trong ADN) mà phụ thuộc vào sự sắp xếp của chuỗi các bazo nitơ. Sự lai hay kết hợp đó của các chuỗi ADN đơn mang tính đặc trưng riêng cao và biểu hiện tương tự như biến đổi gen. Để phát hiện các chất, kỹ thuật sử dụng các chất đánh dấu và phương pháp phát hiện các đầu dò. Các phương pháp đánh dấu được sử dụng như sử dụng đồng vị phóng xạ, phát quang hay enzym đánh dấu. Thiết bị phát hiện dấu có thể là các thiết bị đếm các đốm phát sáng. Một chuỗi ADN đầy đủ sử dụng làm một cực dò có được bằng cách sinh sản vô tính một gen đặc biệt trong vi khuẩn, mà loại vi khuẩn đó ta cần xác định. Đây là việc khó thực hiện và thường tìm ra bằng các thử nghiệm. Có trường hợp các chuỗi ADN không liên kết với các chuỗi ADN khác. Công nghệ này cần tìm ra một hướng tiếp cận mới để có thể có khả năng phát hiện có tính đặc trưng cao các vi sinh vật trong bất cứ một môi trường nào. Quá trình chung được thể hiện trong sơ đồ sau (trang 214).

Cực dò ADN cũng có thể được tạo ra từ mRNA bằng cách sử dụng một enzym phiên mã ngược. Sau khi một cực dò ADN thích hợp được chọn lựa, axit nucleic được chuẩn bị cho việc lai. Một gen vô tính hay một chuỗi ADN đã được phân lập từ tế bào bởi enzym giới hạn được đưa tới và chúng trở thành các cực để phát hiện ra các đoạn ADN của các chuỗi tương tự. Các vi khuẩn vô tính được tái tạo trên bộ lọc nitrocellulose và bị phân giải bằng NaOH 0,5 M và NaCl 1,5M để biến tính ADN, tiếp đó lắc trong 2 giờ ở 80°C để đảm bảo ADN vẫn gắn trên bộ lọc. Bộ lọc được gắn với các cực dò đã được đánh dấu phóng xạ. Các chuỗi ADN liên kết với cực dò ADN và được phát hiện bởi phóng xạ.



- **Công nghệ in mẫu phân tử**

Công nghệ in mẫu phân tử có thể giúp giải quyết một số vấn đề liên quan đến các yếu tố phát hiện sinh học. Công nghệ này cung cấp các polyme tổng hợp có đặc tính phát hiện phân tử có chọn lọc. Sở dĩ các polyme có được đặc tính này là do trên phân tử polyme có các vị trí phát hiện, có hình dạng và các nhóm chức bù trừ được cho các chất cần phân tích. Một số polyme còn có độ chọn lọc cao và ái lực không đổi, có thể so sánh được với các hệ thống phát hiện tự nhiên như các kháng thể hay các thụ thể. Vì vậy các polyme này tương hợp được với các cấu tử trong điện cực nhái sinh học (biomimetic).

Sự nhận biết của các phân tử giữa một phân tử chất tiếp nhận hay chất chủ và một cơ chất hay chất khách chỉ có thể xảy ra vị trí liên kết của các

phân tử “chủ và khách” bổ sung cho nhau về hình dạng kích thước và nhóm chức hoá học. Trong tự nhiên thì đó chính là các hệ thống sinh học như enzym - cơ chất, kháng thể - kháng nguyên, hay hoocmôn - chất tiếp nhận.

Như chúng ta đều biết, các quá trình phân tích phụ thuộc nhiều vào độ tin cậy và độ nhạy của các yếu tố phát hiện sinh học như các kháng thể, thụ thể hay các enzym. Vì vậy, bằng cách tổng hợp để tạo ra các bản sao của các yếu tố trên có tính ổn định cao là một tham vọng có thể thực hiện được. Đó là sự chế tạo các polyme đã được in mẫu phân tử (Molecularly Imprinted Polymers - Mips).

In mẫu phân tử là một phương pháp tổng hợp đã biết trước các vị trí phát hiện cũng như độ chọn lọc đối với từng chất khác nhau. Thường có thể đi theo một trong hai hướng sau:

*Hướng 1:* Bao gồm các phức: “chủ - khách” được tạo ra bằng các tương tác yếu (như tương tác ion, tương tác kỵ nước hay liên kết hydro) giữa chất phân tích và monome tiền thân. Các phức này được tạo ra trong pha lỏng, sau đó được polyme hoá để tạo nhiều liên kết ngang. Sau khi loại bỏ các phân tử in khỏi khuôn, các vị trí phát hiện khuyết đặc trưng với các phân tử in đã được tạo ra. Hình dạng của các vị trí đã tạo được trên polyme và sự sắp xếp của các nhóm chức trong các vị trí phát hiện sẽ tạo ra ái lực với các chất cần phân tích.

*Hướng 2:* Các liên kết đồng hoá trị mạnh như liên kết este min... được tạo thành giữa các monome và các phân tử in trước khi polyme hoá. Do đó trước khi thực hiện in cần phải tạo dẫn xuất giữa các phân tử in với các monome. Sau khi phân cắt các liên kết đồng hoá trị giữa các phân tử in trên khuôn thì các vị trí phát hiện bổ sung với các chất cần phân tích đang ở trên polyme.

Kỹ thuật Mips đã thực hiện thành công đối với các chất như: protein, dẫn xuất axit amin, đường và các dẫn xuất của đường, các vitamin, các nucleotit thuốc trừ sâu và một lượng lớn các dược phẩm. Liên kết của một số polyme có thể so sánh với các liên kết tự nhiên của một số kháng thể.

Ưu điểm của Mips là có thể tạo ra được ái lực cao giống như các kháng thể, độ bền lâu và có khả năng chống chịu với các môi trường hoá học. Hơn nữa đặc tính phát hiện của chúng không bị ảnh hưởng bởi axit, bazơ hay nhiệt.



Hạn chế của Mips là khả năng đáp ứng chậm, thời gian dài (15-60 phút). Điều này có thể khắc phục bằng cách tối ưu hoá độ chọn lọc của polyme. Tuy nhiên độ nhạy của chúng kém hơn nhiều so với hệ thống tự nhiên. Mặc dù vậy, với những cải tiến của Mips sẽ tăng độ nhạy và sẽ ứng dụng rộng rãi hơn trong tương lai.

Hiện nay, Mips đã được ứng dụng để phân tích một số chất sau.

**Bảng 4.13. Một số ví dụ của cảm biến nhạ sinh học dựa trên Mips.**

Chất phân tích	Phạm vi phân tích ( $\mu\text{g/ml}$ )	Thiết bị chuyển đổi
Morphin	0-10	Đo dòng điện
Vitamin K1	0-4	Đo điện thế
Phenylalanin anilid	33-3300	Huỳnh quang
Dansyl-L-phenylalanin	0-30	Đo độ dẫn điện
Atrazin	0-0,5	Huỳnh quang
Sialic acid	0-3	

#### 4.4.4. Ứng dụng trong Y tế

Điện cực enzym có rất nhiều ứng dụng trong việc phát hiện, chẩn đoán và theo dõi sức khoẻ người bệnh. Ngày nay, nó còn được xem như một công cụ hữu hiệu trong lĩnh vực chăm sóc sức khoẻ tại nhà với rất nhiều những tính năng hứa hẹn trong tương lai.

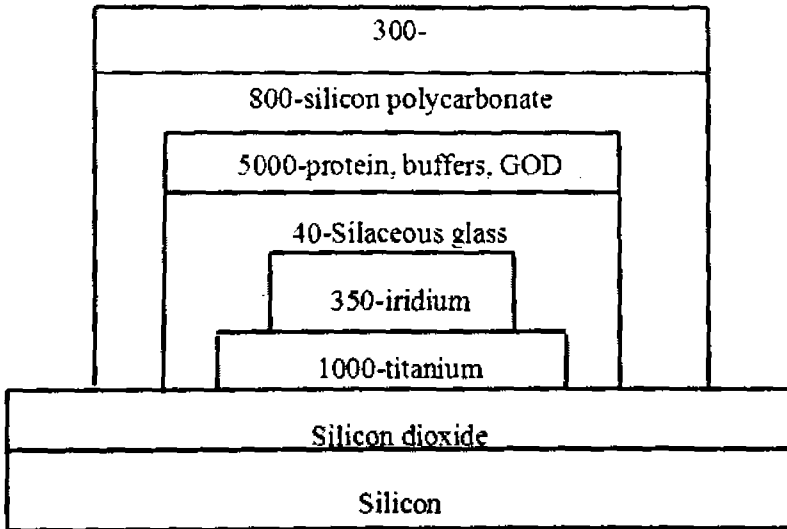
- **Đo nồng độ glucose:**

Hàng năm trên thế giới có hàng triệu người mắc bệnh tiểu đường. Đây là chứng bệnh mà người bệnh mất khả năng kiểm soát nồng độ glucose trong máu dẫn đến sự quá tăng đường huyết, có thể gây tử vong do quá ít glucose đến được não.

Việc điều trị bệnh tiểu đường đòi hỏi người bệnh phải được theo dõi thường xuyên hàm lượng glucose trong máu. Do đó yêu cầu đặt ra là phải phát triển một thiết bị cho phép người bệnh có thể tự theo dõi được ở nhà. Chỉ có điện cực sinh học với khả năng chính xác, rẻ, có thể sử dụng lại và đáp ứng được các yêu cầu trên.

Các loại điện cực đo nồng độ glucose hiện nay rất đa dạng, có thể hoạt động theo các nguyên tắc như điện cực đo dòng điện, điện cực đo quang,

nhưng đều dựa trên phản ứng xúc tác oxi hoá glucose của glucooxidase (GOD). Trong đó đáng chú ý là loại thiết bị cầm tay với loại chip chế tạo trên cơ sở của điện cực chọn lọc ion và điện cực đo dòng điện, kích thước nhỏ, dễ mang theo, tiện sử dụng.

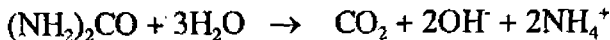


**Hình 4.27. Cấu tạo điện cực màng i-STAT glucose biosensor.**

- **Đo nồng độ ure**

Việc kiểm tra nồng độ ure trong máu, đặc biệt đối với những người mắc bệnh thận có ý nghĩa quan trọng.

Thiết bị này hoạt động trên nguyên tắc điện cực đo điện thế, ure bị thủy phân dưới tác dụng xúc tác của urease:

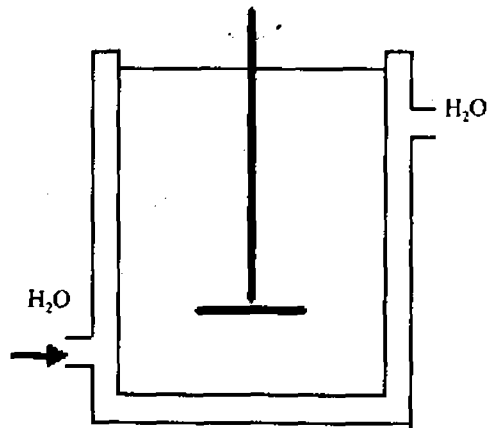


Nồng độ ion  $NH_4^+$  tỷ lệ với nồng độ ure được đo bằng cách dùng một lớp màng thấm chọn lọc ion  $NH_4^+$ .

Thiết bị phản ứng enzym là nơi diễn ra các phản ứng chuyển hoá các hợp chất nhờ sự xúc tác của enzym. Thiết bị phản ứng enzym gồm một hay nhiều bình phản ứng nối tiếp nhau với các bộ phận hỗ trợ như cánh khuấy hay khối vật liệu đệm. Các thiết bị phản ứng được lựa chọn và sử dụng tùy theo đặc điểm của từng phản ứng hoặc quá trình sử dụng. Chúng ta sẽ xem các dạng cơ bản và phương thức hoạt động của thiết bị enzym: thiết bị phản ứng dạng bình, dạng cột, dạng màng, thiết bị cho enzym tự do, enzym cố định, thiết bị hoạt động liên tục hay gián đoạn.

### 5.1. THIẾT BỊ PHẢN ỨNG GIÁN ĐOẠN

Thiết bị phản ứng enzyme gián đoạn (stirred tank reactor – STR) thường gồm một bình phản ứng có trang bị bộ phận khuấy và các tấm ngăn làm tăng hiệu quả khuấy. Nguyên tắc hoạt động chung của các thiết bị là dung dịch cơ chất được đưa vào bình phản ứng theo từng mẻ. Sau một thời gian khuấy, phản ứng enzym kết thúc, toàn bộ dung dịch phản ứng enzym được lấy ra khỏi thiết bị. Như vậy, cả enzym và cơ chất đều có một thời gian lưu như nhau trong thiết bị. Trong một số trường hợp, người ta có thể bỏ



Hình 5.1. Sơ đồ thiết bị phản ứng gián đoạn.

sung thêm enzym hoặc cơ chất để phản ứng diễn ra triệt để (fed-batch operation).

Ưu điểm lớn nhất của thiết bị gián đoạn là thiết lập và vận hành quá trình đơn giản. Thiết bị gián đoạn thích hợp cho sản xuất ở quy mô nhỏ các sản phẩm có giá trị cao, đặc biệt là cùng một thiết bị có thể dùng cho nhiều giai đoạn phản ứng chuyển hoá các vật liệu khác nhau. Thiết bị gián đoạn cho phép tiến hành các phản ứng trong điều kiện môi trường gần giống nhau, thích hợp cho các phản ứng chậm, với các thành phần phản ứng được kiểm soát chặt chẽ trong điều kiện phản ứng thay đổi theo thời gian (pH, nhiệt độ, nồng độ coenzym).

Dạng thiết bị phản ứng gián đoạn thích hợp sử dụng khi các quá trình liên tục không thể thực hiện được do độ nhớt dịch phản ứng quá cao hoặc bản chất hỗn hợp phản ứng không thích hợp. Thiết bị gián đoạn thường dùng cho các phản ứng sử dụng enzym dạng tự do và ảnh hưởng của việc tạp nhiễm là không lớn.

Phản ứng trong thiết bị gián đoạn có đặc điểm là vận tốc phản ứng enzym giảm dần do nồng độ cơ chất giảm dần. Nồng độ sản phẩm tăng lên theo thời gian phản ứng sẽ ảnh hưởng kìm hãm vận tốc các phản ứng enzym bị ức chế bởi sản phẩm cuối.

Năng suất phản ứng trong thiết bị gián đoạn có thể tính toán khi coi phản ứng enzym là không thuận nghịch và tuân theo mô hình Michaelis-Menten trong trường hợp enzym không bị ức chế hoặc không bị biến tính:

$$V = -V_s \frac{dS}{dt} = \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (5.1)$$

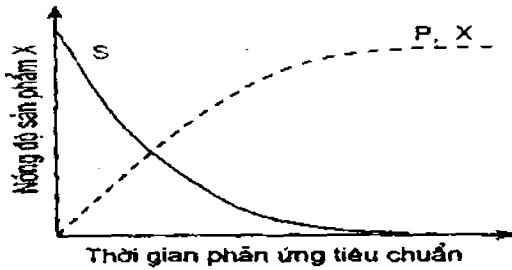
với  $V_s$  – thể tích dung dịch cơ chất.

Tích phân với điều kiện biên  $S = S_0$  tại  $t = t_0$

$$\frac{V_{\max}}{V_s} t = S_0 X - K_m \ln(1-X) \quad (5.2)$$

với  $X = \frac{S_0 - S}{S_0}$  - phân đoạn cơ chất được chuyển hóa tại thời điểm kiểm soát.

Động thái phản ứng enzym trong thiết bị phản ứng gián đoạn được trình bày trên hình 5.2.



**Hình 5.2.** Động thái phản ứng enzyme trong thiết bị phản ứng gián đoạn.

Các thiết bị gián đoạn có nhiều nhược điểm. Chi phí vận hành của thiết bị gián đoạn cao do các khâu đưa vào hoặc lấy dịch phản ứng ra khỏi thiết bị. Ngoài ra, khi vận hành thiết bị gián đoạn, điều kiện phản ứng thay đổi suốt trong quá trình phản ứng cũng như có thể thay đổi theo từng mẻ. Điều đó làm cho khả năng điều khiển và nâng cấp thiết bị trở nên khó khăn.

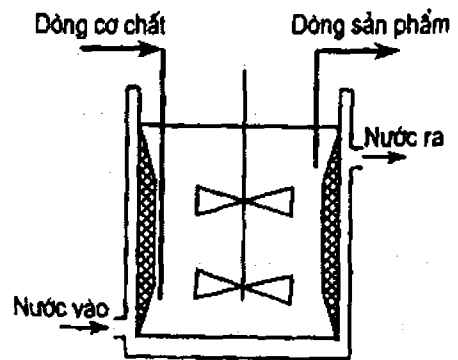
Phản ứng chuyển hóa  $S \rightarrow P$  với điều kiện  $S_0/K_m = 10$ . Thời gian phản ứng tiêu chuẩn là thời gian cần thiết để tất cả cơ chất được chuyển hóa thành sản phẩm với vận tốc phản ứng  $V_{max}$ . Trong thực tế, thời gian phản ứng sẽ dài hơn do nồng độ của cơ chất giảm dần

## 5.2. THIẾT BỊ PHẢN ỨNG LIÊN TỤC

Thiết bị phản ứng liên tục (continuous flow reactor) có cấu trúc như thiết bị gián đoạn nhưng vận hành liên tục với vận tốc dòng cơ chất vào thiết bị bằng vận tốc dòng sản phẩm + cơ chất ra khỏi thiết bị. Thiết bị phản ứng liên tục chỉ vận hành với enzyme cố định.

Trong thiết bị phản ứng liên tục, thời gian lưu trung bình của cơ chất trong thiết bị (bằng  $V/F$ , với  $V$  là thể tích của thiết bị,  $F$  là vận tốc dòng cơ chất) ngắn hơn rất nhiều so với thời gian lưu của cơ chất trong thiết bị phản ứng gián đoạn sử dụng enzyme tự do.

Đặc điểm này làm cho thiết bị có năng suất lớn hơn nhiều lần so với



**Hình 5.3.** Thiết bị liên tục có khuấy

thiết bị gián đoạn khi sử dụng cùng một lượng enzym. Thiết bị dạng này cũng cho phép sử dụng cơ chất có độ hoà tan thấp trong dung dịch phản ứng khi có thể cho một thể tích lớn dung dịch cơ chất nồng độ thấp tiếp xúc với một lượng enzym cố định. Ngoài ra, thiết bị liên tục còn tạo ra điều kiện phản ứng không đổi trong suốt quá trình cho phép dễ dàng điều khiển quá trình.

Hệ thống phản ứng liên tục có thể hoạt động theo hai phương thức khác nhau: có khuấy trộn và không khuấy trộn. Trong thiết bị không có khuấy trộn, enzym sẽ tiếp xúc với dung dịch phản ứng có nồng độ cơ chất cao và nồng độ sản phẩm thấp. Người ta cũng có thể sử dụng một hệ thống gồm nhiều thiết bị phản ứng nối tiếp nhau, dòng sản phẩm ra khỏi thiết bị thứ nhất sẽ là dòng cơ chất vào thiết bị thứ hai. Như vậy, hiệu suất chuyển hoá của toàn bộ hệ thống sẽ được nâng cao.

Trong thiết bị liên tục có khuấy trộn, dòng phản ứng được trộn lẫn hoàn toàn và tức thời với toàn bộ dung dịch có nồng độ cơ chất thấp và nồng độ sản phẩm cao. Trong điều kiện vận hành lý tưởng, toàn bộ dung dịch trong thiết bị được đảo trộn đồng đều. Dòng sản phẩm có cùng thời gian lưu với pha lỏng trong khi một vài phân tử cơ chất có thể được lưu lại trong thiết bị ngắn hơn hoặc lâu hơn do hiện tượng đảo trộn ngược của dòng chảy. Thiết bị phản ứng liên tục có khuấy trộn có thể bắt đầu vận hành như một thiết bị gián đoạn cho tới khi đạt được mức độ chuyển hoá cơ chất mong muốn, thiết bị sẽ chuyển sang vận hành liên tục.

Thiết bị phản ứng liên tục có khuấy trộn có cấu trúc đơn giản, tác dụng đa năng và giá thành rẻ, cho phép nạp hoặc thay đổi enzym dễ dàng. Khả năng đảo trộn đồng đều của thiết bị cho phép kiểm soát pH và nhiệt độ phản ứng dễ dàng, cấp hoặc tách khí đơn giản. Thể tích của thiết bị thường được thiết kế gấp 5 - 10 lần thể tích khối enzym cố định cần sử dụng. Tuy nhiên do thiết bị không tạo ra một cản trở đáng kể nào đối với dòng cơ chất, các cơ chất không tan hoặc tạo keo trong dung dịch ít có khả năng tiếp xúc với enzym. Ngoài ra, các chất mang làm từ vật liệu dễ phân tách cũng không được sử dụng cho thiết bị liên tục có khuấy do chúng có thể vỡ thành các mảnh nhỏ trong quá trình khuấy trộn và đi theo dòng sản phẩm. Thông thường, các hạt enzym có kích thước đến  $10\mu\text{m}$  cần đủ bền vững để tồn tại trong dòng khuấy, khi đó quá trình khuếch tán cơ chất vào hạt enzym sẽ thuận lợi hơn.

Một thiết bị phản ứng liên tục có khuấy trộn lý tưởng sẽ đảm bảo sự đảo trộn đồng đều toàn bộ dịch, và do vậy nồng độ cơ chất được giữ ở mức tối thiểu còn nồng độ sản phẩm tạo ra đạt tới tối đa. Hiệu suất chuyển hoá tại mọi điểm trong thiết bị là đồng nhất. Thiết bị phản ứng liên tục có khuấy trộn là thiết bị phản ứng thích hợp cho các quá trình chịu ảnh hưởng của hiệu ứng ức chế cơ chất hay hoạt hoá sản phẩm. Ngoài ra, nhờ sự pha loãng cơ chất trong dòng phản ứng, thiết bị này còn thích hợp khi dòng cơ chất có chứa các chất kìm hãm enzym. Điều này rất có ý nghĩa trong trường hợp nồng độ chất ức chế lớn hơn  $K_i$  và tỷ lệ  $S_0/K_m$  thấp trong trường hợp ức chế cạnh tranh và cao hơn trong trường hợp ức chế không cạnh tranh khi mức độ pha loãng chất ức chế lớn hơn sự pha loãng cơ chất. Động học quá trình chuyển hoá trong thiết bị phản ứng liên tục có khuấy trộn lý tưởng sẽ bị sai lệch khi không đảm bảo được chế độ khuấy trộn đồng đều. Có thể cải thiện động học phản ứng bằng cách tăng vận tốc khuấy, giảm độ nhớt, giảm nồng độ cơ chất hoặc tăng hiệu quả cánh khuấy trong thiết bị.

Quá trình truyền động lượng, truyền nhiệt và chuyển khối là các quá trình rất quan trọng trong thiết bị liên tục. Nó quyết định khả năng vận chuyển các phân tử, dòng chất lỏng trong thiết bị và chế độ thuỷ động của dung dịch phản ứng. Thông thường, các quá trình này được biểu diễn bởi hàng loạt các mối quan hệ phức tạp, trong đó có các thông số không phụ thuộc kích thước thiết bị. Một trong các thông số đó là chỉ số Reynolds ( $Re$ ), liên quan tới lực quán tính gây bởi dòng chất lỏng và lực nhớt chống lại dòng chảy. Giá trị  $Re$  thấp mô tả chế độ chảy dòng của dòng chảy, giá trị  $Re$  cao chỉ ra chế độ chảy rối của dòng chất lỏng. Tồn tại trị số  $Re$  tới hạn phụ thuộc vào cấu hình thiết bị, tại đó dòng chảy chuyển từ chảy dòng sang chảy rối.

$Re$  được xác định theo:

$$Re = L \cdot f_m / \eta \quad (5.3)$$

hoặc

$$Re = L \cdot f / \nu \quad (5.4)$$

Trong đó:  $L$  - chiều dài đặc trưng của hệ thống (m);

$f_m$  - vận tốc chuyển khối của dòng chảy ( $g \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ );

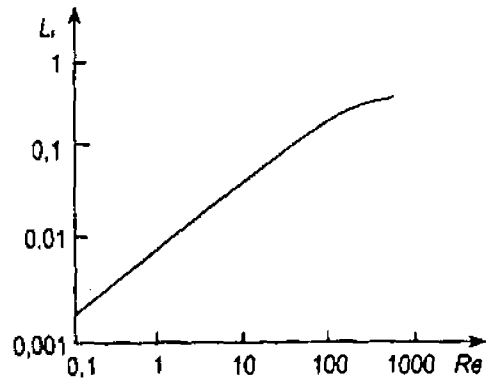
$f$  - vận tốc dòng chất lỏng ( $m \cdot s^{-1}$ );

$\eta$  - độ nhớt động lực học ( $g \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$ );

$\nu$  - độ nhớt động học ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ).

Trong thiết bị phản ứng enzym, chiều dài đặc trưng của hệ thống là đường kính của thiết bị. Giá trị  $L_f$  của một hệ thống có khuấy có thể tính bằng (vận tốc khuấy)  $\times$  (đường kính cánh khuấy)<sup>2</sup>. Trong các thiết bị có dòng chảy vận tốc cao và độ nhớt thấp, chỉ số  $Re$  thường cao.

Bên cạnh chỉ số  $Re$ , chỉ số  $Goff$  ( $L_f$ ) được sử dụng để mô tả và so sánh các thiết bị enzym liên tục. Chỉ số  $L_f$  biểu diễn hiệu suất năng lượng dòng chảy dùng vận chuyển vật liệu hoặc nhiệt tới các bề mặt xúc tác. Giá trị  $L_f$  thấp mô tả hệ thống cân chi phí năng lượng lớn để có thể đạt tới trạng thái xúc tác của bề mặt các enzym cố định và cơ chất. Trị số  $L_f$  cao thường đạt tới trong các thiết bị có áp suất thấp, vận tốc dòng lớn và vận tốc chuyển hoá cao. Quan hệ giữa  $L_f$  và  $Re$  trong thiết bị liên tục có khuấy được mô tả trong hình 5.4 phản ánh nhu cầu khuấy trộn trong thiết bị ngay cả ở vận tốc dòng thấp.



Hình 5.4. Quan hệ giữa  $L_f$  và  $Re$  trong thiết bị liên tục có khuấy trộn

Vận tốc phản ứng trong thiết bị liên tục có khuấy trộn được tính theo công thức:

$$V = F(S_0 - S) = V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad (5.5)$$

Do vậy:

$$\frac{V_{\max}}{F} = K_m \frac{(S_0 - S)}{S} + (S_0 - S) \quad (5.6)$$

Với  $\frac{(S_0 - S)}{S} = \frac{X}{1 - X}$  (5.7)

$$\frac{V_{\max}}{F} = S_0 X + \frac{K_m X}{(1 - X)} \quad (5.8)$$

Năng suất phản ứng enzym thay đổi do tác động các điều kiện của dòng chảy tới phản ứng enzym. Trong trường hợp phản ứng bị ức chế bởi cơ chất, năng suất phản ứng được tính theo:



$$\frac{V_{\max}}{F} = S_0 X + \frac{K_m X}{(1-X)} + S_0^2 \frac{(X-X^2)}{K_s} \quad (5.9)$$

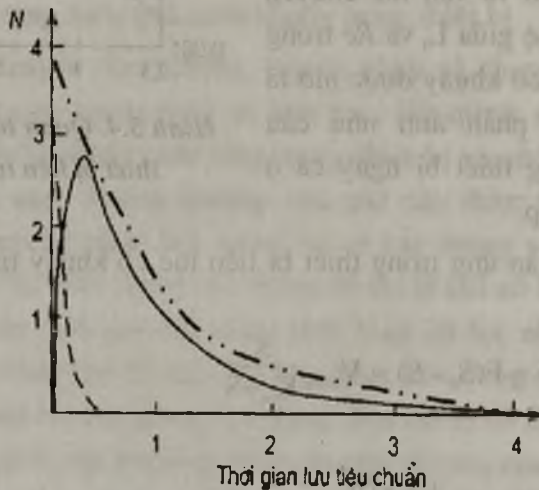
Trường hợp phản ứng bị ức chế bởi sản phẩm:

$$\frac{V_{\max}}{F} = S_0 X + K_m \frac{X}{(1-X)} \left(1 + \frac{X S_0}{K_p}\right) \quad (5.10)$$

Trong trường hợp bị tác động của phản ứng thuận nghịch:

$$\frac{V}{F} = X S + K \frac{X}{1-X} \quad (5.11)$$

Thiết bị phản ứng liên tục khuấy trộn lý tưởng tạo ra sự đồng đều tuyệt đối về nồng độ cơ chất enzyme và các sản phẩm trong suốt thời gian vận hành nhờ sự đảo trộn hoàn toàn trong thiết bị. Tuy nhiên, một vài phân tử cơ chất có thể bị lấy ra khỏi thiết bị nhanh hơn, một vài phân tử có thể có thời gian lưu lại trong thiết bị dài hơn. Mô hình phân bố thời gian lưu của các phân tử cơ chất trong dòng cơ chất được trình bày trong hình 5.5.



**Hình 5.5.** Phân bố thời gian lưu trong thiết bị liên tục có khuấy trộn.

N- số phân tử cơ chất trong thiết bị tại thời điểm t, (- - -), thời gian lưu của cơ chất; (\_\_\_) thời gian lưu của cơ chất không phản ứng; (- . -), thời gian lưu của sản phẩm.

Thời gian lưu tiêu chuẩn được tính bằng  $t.F/V$  là thời gian cần thiết để một thể tích cơ chất bằng thể tích thiết bị đi qua thiết bị.

Mô hình phân bố thời gian lưu của các phân tử cơ chất không bị chuyển hoá trong phản ứng trong dòng cơ chất tuân theo công thức sau:

$$M_t = M_0 e^{-1.4t/V} \quad (5.12)$$

với  $M_t$  là nồng độ phân tử cơ chất trong môi trường tại thời điểm  $t$ .

Thời gian lưu bán phần của các phân tử cơ chất trong thiết bị:

$$T = \ln 2 \cdot \frac{V}{F} = 0,7 \cdot \frac{V}{F} \quad (5.13)$$

Nếu giả thiết mọi phân tử cơ chất đều được chuyển hoá thành sản phẩm, khi ấy các phân tử có thời gian lưu dài hơn trong thiết bị cũng được chuyển hoá. Do vậy thời lưu trung bình của sản phẩm sẽ lớn hơn thời gian lưu trung bình của cơ chất trong thiết bị. Thành phần của dòng sản phẩm là đồng nhất trong toàn bộ thiết bị và có thể tính toán từ diện tích của các vùng trong đồ thị trên hình 5.5, trên hình là 90%(P/S). Nếu thiết bị vận hành liên tục (giả thiết trong thời gian  $> 4 \frac{V}{F}$ ), về lý thuyết, thời gian lưu trung bình của các phân tử cơ chất trong thiết bị là  $\frac{V}{F}$ . Tuy nhiên, hình 5.5 cho thấy rằng, thực tế chỉ có một số ít phân tử có thời gian lưu gần với giá trị trên (7% trong khoảng  $0,9 - 1,1 \frac{V}{F}$ ), còn lại là cơ chất có thời gian lưu hoặc là ít hơn ( $20\% 0,1 \frac{V}{F}$ ) hoặc là cao hơn ( $2,3 \frac{V}{F}$ ).

Thông thường trong thiết bị phản ứng liên tục có khuấy trộn, hiệu ứng tăng áp ngược hầu như không có hoặc có nhưng ở mức không đáng kể. Thiết bị dạng này thường không được sử dụng trong quá trình yêu cầu vận tốc chuyển hoá cao. Cũng có thể vận hành các thiết bị nối tiếp nhau tạo thành một chuỗi thiết bị liên tục có hiệu suất chuyển hoá tổng thể cao. Chuỗi thiết bị này có thể bao gồm từ ba thiết bị trở lên, liên kết theo từng cặp hoặc một bình phản ứng được chia thành các khoang có thể vận hành độc lập nhằm tránh hiện tượng đảo trộn ngược.

Các thiết bị liên tục có khuấy trộn có thể sử dụng được với enzym tự do khi thiết bị có gắn kết một màng siêu lọc nhằm tách sản phẩm ở cửa ra của thiết bị. Khi đó có thể gặp một số khó khăn như nồng độ enzym không đồng đều trong thiết bị hoặc có sự bất hoạt enzym trên bề mặt màng. Tuy nhiên dạng hệ thống thiết bị này thích hợp khi có nhu cầu gắn kết phản ứng enzym

và việc phân tách sản phẩm trong cùng một hệ thống, hoặc khi không thực hiện được phản ứng với enzym cố định.

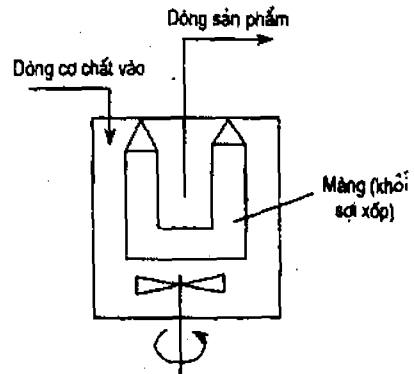
### 5.3. THIẾT BỊ PHẢN ỨNG ENZYM DẠNG MÀNG

Thiết bị dạng màng (membrane reactor – MR) được trang bị một màng bán thấm cho phép các phân tử sản phẩm đi qua mà không cho phép các phân tử enzym đi qua (hình 5.6). Dạng màng đơn giản và rẻ nhất là màng bán thấm selophan dùng trong kỹ thuật thẩm tích enzym. Loại màng thông dụng sử dụng cho thiết bị màng được tạo bởi hàng trăm sợi xốp nhỏ có đường kính 200 $\mu$ m, độ dày của màng 50 $\mu$ m.

Thiết bị phản ứng dạng màng có thể hoạt động gián đoạn hay liên tục. Sau phản ứng, sản phẩm được tách ra khỏi enzym và cơ chất dư. Thiết bị dạng màng có thể dùng cho enzym tự do hoặc cố định. Thiết bị sử dụng cho enzym hoà tan giúp giảm các chi phí và các vấn đề

thường gặp phải khi sử dụng enzym cố định. Nếu cơ chất có thể khuếch tán qua màng, có thể đặt cơ chất và enzym ở hai phía khác nhau của màng. Nếu cơ chất không khuếch tán được qua màng, enzym và cơ chất phải được đặt trong cùng một khoang của thiết bị, khi ấy cần có sự kiểm soát chặt chẽ về vận tốc dòng trong trường hợp thiết bị vận hành liên tục. Trong trường hợp thiết bị sử dụng màng siêu lọc nhằm tách các sản phẩm phản ứng, sử dụng enzym tự do có thể tránh được các khó khăn như sự phân cực nồng độ hay vô hoạt enzym trên bề mặt màng.

Thiết bị dạng màng được thiết lập một cách dễ dàng nên thường được sử dụng ở quy mô nhỏ cỡ vài gam đến kg cơ chất/sản phẩm, đặc biệt các trường hợp phản ứng nhiều giai đoạn hoặc cần tái tạo CoE. Thiết bị phản ứng dạng màng cho phép dễ dàng thay thế enzym, đặc biệt khi enzym không bền. Ngoài ra, thiết bị này có thể dùng trong các phản ứng hai pha. Tuy nhiên, thiết bị màng có giá thành cao do màng đắt và thường phải thay thế sau một thời gian hoạt động nhất định.

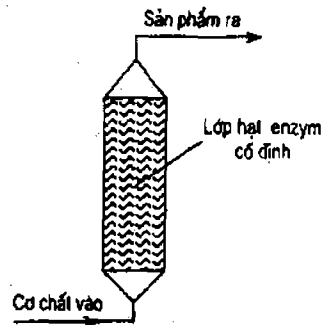


Hình 5.6. Thiết bị phản ứng màng

Động học phản ứng enzym trong thiết bị màng giống như trong trường hợp thiết bị gián đoạn đã mô tả ở trên nếu thiết bị vận hành gián đoạn (mục 5.1), hoặc giống như trường hợp thiết bị liên tục nếu thiết bị vận hành liên tục (mục 5.2). Sự khác biệt của động học phản ứng enzym trong thiết bị màng với thiết bị gián đoạn hay liên tục là do sự khuếch tán hạn chế của enzym và của các sản phẩm qua màng bán thấm. Như vậy, phản ứng enzym trong thiết bị dạng màng sẽ chịu ảnh hưởng của hiệu ứng ức chế bởi sản phẩm cuối hơn so với phản ứng enzym trong các thiết bị khác.

#### 5.4. THIẾT BỊ PHẢN ỨNG DẠNG CỘT

Thiết bị phản ứng dạng cột (packed bed reactor) có dạng hình trụ, được lấp đầy chất mang có gắn enzym bằng một trong các nguyên tắc cố định enzym. Đặc điểm của thiết bị phản ứng dạng cột là cơ chất chảy qua khối enzym cố định theo chiều từ trên xuống song song với trục dọc của thiết bị và không bị khuấy trộn ngược. Trong điều kiện lý tưởng, dòng cơ chất có vận tốc không đổi trong suốt chiều cao cột. Cơ chất tại mọi khu vực trong thiết bị đều có cơ hội tiếp xúc với enzym như nhau, sản phẩm tại mọi vị trí trong thiết bị đều có thời gian lưu như nhau.



Hình 5.7. Thiết bị phản ứng dạng cột

Hiệu quả chuyển hoá cơ chất của thiết bị phản ứng dạng cột tương đương với thiết bị gián đoạn có khuấy có cùng thời gian lưu. Có thể xem mỗi phân đoạn chiều cao cột thiết bị như một thiết bị phản ứng gián đoạn (hình 5.1). Mức độ chuyển hoá mong muốn có thể đạt được bằng cách sử dụng cột phản ứng có độ cao thích hợp.

Vận tốc dòng trong thiết bị phản ứng dạng cột tương đương với vận tốc dòng trong thiết bị gián đoạn tính theo thể tích. Vì vậy, phương trình 5.2 có thể chuyển đổi để mô tả thiết bị phản ứng dạng cột lý tưởng khi giả định không có hạn chế về khuếch tán (ít khi gặp trong thực tế):

$$\frac{V_{\max}}{F} = S_0 X - K_m \ln(1 - X) \quad (5.14)$$

Để có thể tạo ra chế độ chảy lý tưởng trong thiết bị cột, chất lỏng trong thiết bị cần giữ ở chế độ chảy màng để ổn định mức độ đảo trộn và truyền nhiệt bình thường của dòng chảy, hạn chế sự đảo trộn ngược của dòng chất lỏng. Không thể đạt được giá trị  $Re$  cao trong thiết bị do khó đạt được vận tốc dòng cơ chất cao. Vì thế nồng độ cơ chất trong thiết bị phản ứng dạng cột thường là rất cao và nồng độ sản phẩm thường là rất thấp, kéo theo hệ số chuyển hoá thường rất cao ở cửa vào và rất thấp ở cửa ra của thiết bị. Thiết bị dạng cột thích hợp cho các quá trình bị ảnh hưởng của sự ức chế bởi sản phẩm cuối, bởi sự hoạt hoá cơ chất và tính thuận nghịch của phản ứng. Trong thiết bị dạng cột lý tưởng, 100% phân tử cơ chất có thời gian lưu bằng với thời gian lưu trung bình của cơ chất trong thiết bị. Đây là điểm khác biệt lớn của thiết bị dạng cột so với thiết bị liên tục có khuấy.

Tại giá trị  $Re$  thấp, vận tốc dòng tỷ lệ thuận với sự giảm áp trong thiết bị. Thông thường sự giảm áp trong thiết bị tỷ lệ thuận với chiều cao lớp chất mang, vận tốc dòng, độ nhớt động học của dòng cơ chất và thể tích của dung dịch choán trong thiết bị (tính theo  $(1 - \epsilon)^2 / \epsilon^3$  với  $\epsilon$  là độ rỗng của thiết bị) và tỷ lệ nghịch với diện tích cắt ngang của hạt enzyme cố định. Thông thường thiết bị dạng cột được sử dụng với các hạt enzyme cố định trên chất mang có độ bền tương đối, kích thước 1- 3 mm. Sự tăng vận tốc dòng có thể dẫn đến biến dạng vật lý và độ chắc của các hạt enzyme cố định trên chất mang mềm. Sự biến dạng các hạt enzyme có thể dẫn tới giảm bề mặt tiếp xúc của các hạt enzyme với dòng cơ chất, giảm vận tốc chuyển khối, hạn chế dòng chảy và gây giảm áp lớn trong thiết bị. Ảnh hưởng nổi tiếp của các hiệu ứng tăng áp suất ngược, biến dạng hạt enzyme, hạn chế dòng chảy có thể dẫn tới hoàn toàn không có dòng chảy trong thiết bị.

Thiết bị phản ứng dạng cột giống như một giá lọc cố định đối với dòng cơ chất. Do vậy cần sử dụng giá lọc sao cho thiết bị không bị các hạt enzyme nhỏ bịt kín. Ngoài ra, cần tính đến khả năng lớp lọc bị bịt kín bởi sự tạo keo hoặc kết tủa của cơ chất. Các thiết bị phản ứng dạng cột có kích thước lớn (đường kính lớn hơn 15 cm) thường gặp khó khăn trong kiểm soát nhiệt độ và kiểm soát pH bằng cách bổ sung axit hay bazơ.

Hiện tượng đảo trộn ngược trong thiết bị phản ứng dạng cột làm sai lệch mô hình dòng chảy và làm cho thời gian lưu của cơ chất trong thiết bị

thay đổi. Trong những trường hợp thiết bị chịu ảnh hưởng lớn của hiện tượng đảo trộn ngược, cơ chất có thể chảy qua thiết bị nhanh hơn ở một số kênh được tạo ra do sự đảo trộn. Ngược lại, vận tốc dòng chảy lại làm giảm ở một số vị trí khác. Các kênh này chỉ được tạo ra trong trường hợp có sự giảm áp lớn, lớp đệm không đồng đều, hoặc dòng chảy cơ chất thay đổi, tạo ra vận tốc dòng khác nhau trong toàn bộ khối đệm. Khi đó, động học phản ứng trong thiết bị phản ứng dạng cột cố định giống với trong trường hợp thiết bị liên tục khuấy, dẫn tới khó có thể đạt được mức độ chuyển hoá cơ chất cao trong thiết bị. Các ảnh hưởng kể trên có thể được hạn chế nếu sử dụng các hạt enzyme cố định có kích thước đồng đều.

Năng suất phản ứng enzyme thay đổi khi phản ứng enzyme bị hạn chế bởi cơ chất, sản phẩm hoặc do tác động của phản ứng thuận nghịch. Trong trường hợp phản ứng bị ức chế bởi cơ chất, năng suất phản ứng được tính theo:

$$\frac{V_{max}}{F} = S_0 X - K_m \ln(1 - X) + \frac{S_0^2 (2X - X^2)}{2K_s} \quad (5.15)$$

Trong trường hợp phản ứng bị ức chế bởi sản phẩm:

$$\frac{V_{max}}{F} = S_0 X \left(1 - \frac{K_m}{K_p}\right) - K_m \ln \frac{1-X}{1 + \frac{S_0}{K_p}} \quad (5.16)$$

Trong trường hợp bị tác động của phản ứng thuận nghịch:

$$\frac{V_{max}}{F} = XS - K_m \ln(1 - X) \quad (5.17)$$

Trong đó:  $X$  – nồng độ các phân đoạn chuyển hoá trong phản ứng thuận nghịch và được xác định bởi:

$$X = \frac{S_0 - S_1}{S_0 - S_\infty} \quad (5.18)$$

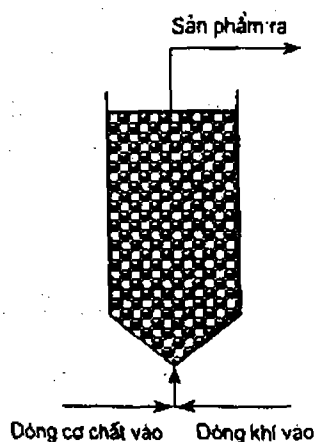
Các công thức này giúp tính toán và so sánh năng suất thiết bị dạng cột với thiết bị phản ứng liên tục trong việc lựa chọn thiết bị phản ứng enzyme.

Trước đây, quá trình sản xuất mật tinh bột (sirô fructose) từ tinh bột được thực hiện bằng cách thủy phân tinh bột nhờ glucoamylase và bước izome hoá glucose thu được thành fructose được thực hiện nhờ glucoizomerase cố định trong thiết bị phản ứng gián đoạn. Phương pháp này

có chi phí cao do thời gian lưu của hỗn hợp phản ứng trong thiết bị lớn, hàm lượng sản phẩm phụ cao. Ngoài ra, rất khó tách các ion  $Mg^{2+}$  và  $Co^{2+}$  (bổ sung để ổn định hoạt tính enzyme) cũng như khó thu hồi enzyme sau phản ứng. Hiện nay, để giải quyết các vấn đề tồn tại, hầu hết các quá trình này được thực hiện trong các thiết bị dạng cột.

## 5.5. THIẾT BỊ PHẢN ỨNG TẦNG SÔI

Đây là dạng thiết bị trung gian giữa thiết bị dạng cột và thiết bị phản ứng liên tục có khuấy trộn. Thiết bị này bao gồm một lớp hạt enzyme cố định được thổi ngược lên phía trên nhờ dòng cơ chất, có hoặc không kết hợp với dòng khí (oxy hay khí trơ) hoặc các chất cần thiết cho phản ứng diễn ra trong thiết bị phản ứng. Thường thì dòng khí không làm thay đổi nồng độ cơ chất và enzyme trong thiết bị. Trong suốt phản ứng enzym, các hạt enzyme được giữ ở trạng thái lơ lửng trong dòng cơ chất nhờ vào vận tốc của dòng cơ chất và/hoặc dòng khí. Vận tốc dòng nhỏ nhất của hỗn hợp hạt enzyme và cơ chất để duy trì trạng thái tầng sôi trong thiết



**Hình 5.8. Thiết bị phản ứng tầng sôi**

bị phụ thuộc vào kích thước, dạng, độ xốp và tỉ trọng của hạt enzyme cố định cũng như tỉ trọng và độ nhớt của dung dịch phản ứng. Vận tốc tối thiểu của dòng sôi tương đối nhỏ, khoảng 0,2 – 1 cm/s do hầu hết các enzyme cố định có tỉ trọng xấp xỉ tỉ trọng các dịch phản ứng. Như vậy, độ phân tán của các hạt enzyme tỉ lệ thuận với vận tốc bề mặt của khí và tỉ lệ nghịch với  $\sqrt{d}$  ( $d$  là đường kính thiết bị). Khi bắt đầu khởi động thiết bị, cần cung cấp một lượng năng lượng lớn để tạo “trạng thái sôi” của các hạt enzyme. Nhưng một khi trạng thái tầng sôi được thiết lập, chỉ cần một lượng năng lượng nhỏ để duy trì thiết bị hoạt động, trừ khi cần tăng vận tốc dòng cơ chất trong thiết bị.

Thiết bị có đường kính nhỏ và vận tốc dòng lớn thường có đặc tính của một thiết bị tầng sôi lý tưởng. Còn nhìn chung, động học phản ứng trong thiết bị dạng này thường là dạng trung gian giữa thiết bị dạng cột và thiết bị

liên tục do vận tốc dòng nhỏ trong thiết bị tạo ra một mức độ đảo trộn ngược cục bộ. Động học quá trình sẽ do hình dạng của thiết bị quyết định. Thiết bị dạng này đặc biệt phù hợp trong trường hợp cơ chất sử dụng hoặc sản phẩm quá trình ở dạng khí. Enzym cố định sử dụng trong thiết bị dạng này cần có kích thước hạt nhỏ 20 - 40  $\mu\text{m}$ , (và vì thế có bề mặt tiếp xúc/phản ứng lớn) và cần có mật độ hạt enzym đủ lớn để không bị rửa trôi khỏi thiết bị. Trong trường hợp mật độ hạt enzym thấp, kích thước hạt enzym có thể lớn hơn.

Để thiết bị hoạt động hiệu quả, các hạt enzym nên có kích thước đồng đều tránh tạo ra sự khác biệt về nồng độ enzym trong thiết bị. Thiết bị tầng sôi không hoạt động được ở vận tốc dòng lớn do có thể tạo ra các khu vực rỗng trong thiết bị hoặc có thể rửa trôi enzym.

Nhược điểm lớn nhất của thiết bị tầng sôi là khó khăn khi nâng cấp thiết bị do đặc tính thuỷ lực dòng chảy thay đổi rất lớn khi thay đổi kích thước thiết bị. Hệ số nâng cấp thiết bị trên thực tế chỉ cho phép tới 10-100 lần. Ngoài ra, sự thay đổi dòng cơ chất cũng tạo ra sự thay đổi phức tạp không dự đoán được của dòng chảy trong thiết bị, và do vậy cũng ảnh hưởng tới vận tốc chuyển hoá enzym.

## 5.6. LỰA CHỌN THIẾT BỊ PHẢN ỨNG ENZYM

Để lựa chọn thiết bị phản ứng enzym, các yếu tố quan trọng cần quan tâm là đặc tính của phản ứng enzym-phản ứng thuận nghịch hay không, có bị ức chế bởi cơ chất hay các thành phần của cơ chất không, có bị ức chế bởi sản phẩm cuối không..., đặc tính sản phẩm, dạng enzym sử dụng (tự do hay cố định), động học phản ứng enzym và các tính chất lý-hoá học của các chất mang (đệm) trong trường hợp sử dụng cố định. Ngoài ra, việc lựa chọn thiết bị phản ứng enzym còn phụ thuộc vào năng suất và quy mô của quá trình, mức độ kiểm soát phản ứng và khả năng kiểm soát tự động quá trình phản ứng enzym như kiểm soát pH, nhiệt độ, nồng độ cơ chất hay sản phẩm. Cuối cùng, việc lựa chọn thiết bị cho phản ứng enzym phụ thuộc vào chi phí của bản thân thiết bị và phương thức vận hành chúng.



## CHƯƠNG 6

# ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM ENZYM VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ ENZYM

---

Trong vài thập kỷ trở lại đây, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ sinh học, các chế phẩm enzym được sản xuất ngày càng nhiều và được sử dụng hầu hết trong các lĩnh vực kinh tế. Enzym đã dần từng bước làm thay đổi và nâng cao một số các quá trình công nghệ trong chế biến thực phẩm, nông nghiệp, chăn nuôi, y tế... đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của xã hội. Hàng năm, lượng enzym được sản xuất ra trên thế giới đạt khoảng trên 300 000 tấn với trị giá trên 500 triệu USD được phân bố trong các lĩnh vực khác nhau.

Hiện nay trên thị trường có khoảng 12 hãng sản xuất enzym chính với trên 60 nhà cung cấp lớn. Châu Âu với hai hãng sản xuất lớn nhất thế giới là Novo Nordisk và Gist Brocades chiếm trên 60% lượng enzym thị trường, các chế phẩm enzym của Mỹ chỉ chiếm 15% trong đó 2/3 lượng enzym được sử dụng nội địa, chủ yếu cung cấp cho quá trình sản xuất cồn và đường nghịch đảo. Nhật bản với các chế phẩm enzym khá đa dạng chiếm khoảng 12 đến 15% thị trường thế giới. Trung quốc và Nga các chế phẩm enzym được sản xuất ra chủ yếu được dùng cho nhu cầu trong nước.

Phần lớn enzym được sử dụng ở mức độ công nghiệp đều thuộc loại enzym đơn cấu tử, xúc tác cho các phản ứng phân huỷ. Khoảng 75% chế phẩm là **những enzym thuỷ phân được sử dụng cho việc phân huỷ các cơ chất tự nhiên.**

Các protease là các enzym được sử dụng nhiều nhất hiện nay trong một số ngành sản xuất như chế biến thực phẩm (đông tụ sữa làm pho mat, làm

mềm thịt), sản xuất các chất tẩy rửa, thuộc da...Tiếp đến là các hydratcacbonase được ứng dụng nhiều trong kỹ nghệ chế biến thực phẩm, trong công nghiệp dệt nhuộm, công nghiệp giấy và bột giấy, chế biến thức ăn gia súc như các enzym amylase, glucoizomerase, cellulase, pectinase.

Một số enzym khá phức tạp và đặc hiệu cũng được đưa ra sử dụng trong lĩnh vực thực phẩm, phân tích, dệt nhuộm, trong chuẩn đoán và điều trị bệnh như glucooxydase, catalase, pepsin, trypsin, chimotrypsin

## **6.1. ỨNG DỤNG ENZYM TRONG CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**

### **6.1.1. Vai trò của enzym trong công nghiệp thực phẩm**

Trong công nghiệp thực phẩm các chế phẩm enzym được sử dụng với nhiều mục đích và tác động ở nhiều mức độ khác nhau. Người ta có thể sử dụng tác động của enzym để điều chỉnh những khiếm khuyết tự nhiên của nguyên liệu. Enzym có thể tham gia cải thiện hoặc tiêu chuẩn hoá các quá trình chuyển hoá, từ đó cho phép nhận các sản phẩm mới hay sản phẩm có chất lượng cao hơn. Đặc biệt, enzym cũng có thể can thiệp vào chính quá trình chế biến và đóng vai trò công cụ công nghệ. Nhờ tác dụng của enzym chúng ta có thể nhận được các sản phẩm trung gian hay cuối cùng khác nhau.

Trong thực tế sản xuất, các chế phẩm được sử dụng nhiều trong hay cuối quá trình chế biến nông sản nhằm nâng cao chất lượng sản phẩm cuối cùng, đặc biệt trên khía cạnh cảm quan.

Đối với một số nguyên liệu nông sản thực phẩm, hoạt độ enzym trong nguyên liệu được coi là một trong những chỉ tiêu đánh giá chất lượng chính.

- **Enzym - công cụ điều chỉnh những khiếm khuyết tự nhiên của nguyên liệu**

Nguyên liệu của công nghiệp thực phẩm là các sản phẩm phức tạp có nguồn gốc thực vật và động vật. Chúng được hình thành qua nhiều giai đoạn tổng hợp sinh học. Do đó, thành phần nguyên liệu dao động tùy thuộc vào các yếu tố bên trong như giống loài, các yếu tố bên ngoài như các điều kiện canh tác, khí hậu trong thời gian phát triển. Các yếu tố này có thể làm thay đổi thành phần chung của nguyên liệu và chuyển hoá nó. Các chế phẩm

enzym có thể được sử dụng như một chất phụ gia nhằm lấp đầy những thiếu hụt tự nhiên.

Trong công nghiệp chế biến tinh bột, sản xuất đường, bánh mì, bia, người ta thường bổ sung amylase vào công thức để bù lại hoạt lực enzym yếu của nguyên liệu ngũ cốc. Trong công nghiệp sản xuất phomat, các chế phẩm enzym lipase và protease được sử dụng thay thế các enzym tự nhiên của sữa bị vô hoạt bởi thanh trùng.

- **Enzym - công cụ công nghệ của chuyển hoá**

Khả năng xúc tác chuyển hoá của các enzym được khai thác trong nhiều quá trình sản xuất thực phẩm : bánh bisqui, phomat, nước uống.

Protease cho phép cải thiện tính chất lọc của bia và tăng tính ổn định của nó ở nhiệt độ thấp. Amylase, pectinase và hemicellulase tạo điều kiện cho việc tách chiết và lọc nước quả. Pectinase cần thiết cho quá trình lên men rượu vang ở nhiệt độ cao để làm trong rượu. Trong công nghệ sản xuất bánh bisqui, protease trung tính dùng để làm mềm dẻo khung gluten cải thiện độ nở của bột nhào và độ giòn của bánh bisqui. Trong công nghệ phomat, sử dụng protease làm đông tụ sữa ở giai đoạn đầu tiên của quá trình sản xuất, còn protease và lipase cho phép thúc đẩy quá trình chín của phomat.

- **Enzym - công cụ làm tăng giá trị của nguyên liệu tự nhiên**

Enzym có thể tham gia vào việc đa dạng hoá sản phẩm nhận được từ nguyên liệu tự nhiên.

Tiêu biểu nhất là quá trình đề polyme hoá tinh bột. Cho tới những năm 70, sirô glucoza nhận được từ ngũ cốc đã trở thành sản phẩm quen thuộc. Sự phát triển của ngành Công nghệ enzym cho ra đời một loạt các chế phẩm enzym đã cho phép tạo ra nhiều sản phẩm như : chất làm đặc, tiền chất và dẫn suất của chất thơm, chất tạo ngọt acariogenes, chelatants, chất tạo chua. Chính việc cải thiện đặc tính của enzym về tính đặc hiệu và tính chịu nhiệt là nguồn gốc của việc sản xuất các chế phẩm enzym mới. Sản xuất các chất xúc tác thích ứng hơn với các điều kiện vật lý của môi trường (nhiệt độ, độ nhớt môi trường) và đặc hiệu hơn đòi hỏi phải kéo theo sự đa dạng của các sản phẩm trung gian nhận được từ nguyên liệu tự nhiên.

- **Enzym - công cụ cải thiện chất lượng của sản phẩm**

Trong trường hợp này enzym phải có tác động để thay đổi trực tiếp sản phẩm cuối cùng. Tác động của nó đặc biệt quan trọng trên khía cạnh cảm quan của thực phẩm.

Các enzym được sử dụng để loại bỏ các chất tự nhiên có ảnh hưởng xấu tới chất lượng cảm quan của thực phẩm. Ví dụ naringinase, kết hợp với rhamnosidase và beta-glucosidase có thể thủy phân rhamno-glucozit của tri-hydroflavon, chất làm đắng nước agrumes.

Enzym cũng cho phép tạo ra hương vị mới. Lipase được bổ sung vào giai đoạn đông tụ sữa bò cùng với renin tham gia vào việc tạo hương cho phomat. Hương vị đặc trưng của các sản phẩm phomat chủ yếu nhờ tác dụng của nhóm enzym này.

Vị bổ sung cũng có thể nhận được bởi enzym. Vị ngọt có thể được tạo nên trong sữa nhờ tác dụng của enzym lactase, hay được tăng lên nhờ tác dụng đồng phân hoá glucose thành fructose dưới tác dụng của enzym izomerase.

Enzym cũng có thể tham gia vào cải thiện cấu trúc của sản phẩm. Colagenase và papain bằng cách thủy phân protein của cơ bắp làm tăng độ mềm của thịt. Protease trung tính làm yếu mạng gluten nên tăng được độ giòn của bánh bisqui.

Enzym cũng có vai trò trong việc tạo ra màu sắc của sản phẩm :

Pectinase giúp cho việc tách chiết màu trong rượu vang đỏ.

Lipoxygenase oxy hoá các chất màu caroten của bột làm trắng ruột bánh mì.

Proteinase tạo ra các axit amin tự do tạo điều kiện cho phản ứng Maillard, đóng vai trò chính trong việc tạo màu của các sản phẩm nướng, bánh bisqui, thịt ...

## **6.1.2. Tiêu chí chọn enzym trong công nghiệp thực phẩm**

### **6.1.2.1. Độ hoạt động của enzym**

Mối quan hệ giữa các điều kiện sử dụng và đặc tính của chế phẩm enzym sử dụng:

- pH của môi trường phản ứng phải tương ứng với pH hoạt động của enzym.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt độ của enzym phải được tính đến khi lựa chọn enzym. Mối liên quan giữa nhiệt độ và hoạt lực enzym được đặt ra phức tạp hơn :

+ Nếu thời gian tác dụng của enzym nhanh, chất xúc tác sẽ phản ứng tối đa với khả năng xúc tác của mình, sau đó phải nhanh chóng bị vô hoạt.

+ Nếu thời gian tác dụng lâu nên sử dụng enzym có độ bền hoạt lực cao.

- Không được bỏ qua sự có mặt của các chất hoạt hoá hay kìm hãm enzym trong môi trường phản ứng.

Chọn lựa enzym cũng cần phải tính đến các chất ảnh hưởng có thể sử dụng trong qui trình để thúc đẩy hay đình chỉ một phản ứng xác định. Các chất này cần có tính đặc hiệu và giá phải rẻ tiền.

#### **6.1.2.2. Tính đặc hiệu**

Các enzym được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm có thể có tính đặc hiệu chặt chẽ hay ngược lại rất rộng, chính vì vậy đặc trưng hoá trước hoạt độ enzym mong muốn là vấn đề thiết yếu. Tính đặc hiệu là một trong các đặc tính xúc tác có thể được thay đổi qua biến đổi của các vi môi trường. Nên kiểm tra lại tính đặc hiệu của enzym trong các môi trường phản ứng gần giống với môi trường thực tế sử dụng về thành phần và tính chất lý hoá học.

Hơn nữa không nên bỏ qua các hoạt tính phụ của các chế phẩm enzym, vì các hoạt tính phụ này có thể không mong muốn hay ngược lại rất có giá trị.

Trong thực tế không có chiến lược lựa chọn chung. Giải pháp duy nhất là tiến hành các phép thử so sánh nhiều enzym trong các điều kiện thực của các qui trình công nghệ.

#### **6.1.2.3. Điều kiện ứng dụng enzym**

Một khi một hay nhiều chất xúc tác đáp ứng được các tiêu chuẩn của phản ứng, thì cần lựa chọn dựa trên tính chất lượng và số lượng của chế phẩm enzym. Nếu việc bổ sung enzym làm thay đổi lớn tới công nghệ sản xuất cần phải xây dựng các nhà máy lớn thì việc cung cấp enzym thường xuyên và ổn định đóng vai trò quan trọng.

Giá enzym tác động rất ít tới giá của sản phẩm. Do đó tốt hơn nên lấy tỷ lệ giữa giá/ chất lượng là tiêu chuẩn cần xem xét trong việc lựa chọn nhà cung cấp.

### 6.1.3. Các enzym được phép sử dụng

Sử dụng các chế phẩm enzym phải tuân theo một luật chung. Các chế phẩm enzym chỉ được sử dụng khi đã được các chuyên gia xét nghiệm và cho phép. Danh sách các chế phẩm enzym được phép không dừng lại mà luôn được bổ sung. Liên quan tới các chế phẩm enzym dùng trong sản xuất thức ăn và nước uống cho người, luật quan trọng nhất ra đời 5/ 9/ 1989 được ban hành tại Cộng hoà pháp (JORF, 1.10.89) ngoài ra còn có các luật khác như:

- Luật 20/ 6/ 1985 (JORF, 13.07.85) cho phép sử dụng lactase để thủy phân lactoza.
- Luật 21/ 12/ 1988 (JORF, 7.01.89) đưa ra một danh sách các chế phẩm enzym protease thực vật, động vật và vi sinh vật cho phép được sử dụng để thủy phân protein dùng làm thức ăn đặc biệt cho người.
- Luật 24/ 3/ 1993 (JORF, 27.03.93) cho phép sử dụng  $\beta$ -cyclodextrin và cho phép sử dụng cyclodextrin – glycozyl- transferase của *Bacillus macerans* và của *Bacillus circulans*.
- Một loạt các luật 15/6/1993 (JORF, 10.07.93); luật 27/8/1993 (JORF, 4.09.93); 1/2/1994 (JORF, 25.02.94) và 18/8/1994 (JORF, 11.09.94) vừa mới ban hành bổ sung cho luật 5/9/1989 cho phép sử dụng một loạt enzym mới.

#### 6.1.3.1. Luật 5/ 9/ 1989 đưa ra các tiêu chuẩn về độ tinh khiết

- **Chỉ tiêu tinh khiết hoá học, trong đó chủ yếu đề cập đến các kim loại nặng:**
  - Cadmium và thủy ngân < 0.5 mg/ kg
  - Arsen < 3 mg/ kg
  - Chì < 10 mg/ kg

• **Chỉ tiêu vi sinh vật**

- Các mầm hiếu khí < 50 000 /g
- *Salmonelles* không có trong 25 g
- *Coliformes* < 30 trong 1 gam
- Các mầm yếm khí < 30 trong 1 gam
- *Staphylococcus aureus* không có trong 1 gam

Sự vắng mặt của mycotoxin và hoạt tính kháng sinh phải được đảm bảo trong chế phẩm.

**6.1.3.2. Luật 5/ 9/ 1989 đưa ra một loạt enzym được phép sử dụng**

Các chế phẩm enzym này được xếp loại theo các nhóm sau :

- Enzym phân cắt các liên kết  $\alpha$  -1,4 và  $\alpha$  -1,6 glucozit ( $\alpha$  -amilase và enzym cắt nhánh).

- Enzym phân cắt các liên kết  $\beta$  -1,3 và  $\beta$  -1,4 glucozit ( $\beta$  -glucanase).

- Disacaridase (invertase và sacarase).

- Gluco-izomerase

- Pectinase

- Protease và izozym clohydrat.

Danh sách các chế phẩm enzym đầu tiên được bổ sung bởi các luật sau này:

-  $\alpha$ -amylase, pullulanase, gluco izomerase

- Cellulase và phức hợp cellulase – hemicellulase –beta-glucanase

- inulilase,  $\beta$ -fructofuranosidase.

- Pentosidase.

- Photpholipase A<sub>2</sub>.

-  $\alpha$ -acetolactat decacboxylase.

Bốn enzym tiếp theo nhận được từ việc tái tổ hợp gen :

-  $\alpha$ -amilase của *Bacillus licheniformis* được biến đổi bằng cách tổ hợp với chủ thể tương tự.

-  $\alpha$ -amilase của *Bacillus licheniformis* chứa gen của *Bacillus stearothermophilus*.

- Một enzym maltogenase của *Bacillus subtilis* chứa gen của *Bacillus brevis*.

Bảng sau đây đưa ra danh sách các chế phẩm enzym được phép sử dụng. Trong danh sách này enzym được xếp thành các nhóm hoạt độ lớn. Khi cần thiết phải kiểm tra điều kiện hoạt động, vì giấy phép sử dụng không phải tồn tại vĩnh viễn, nó có thể được thay đổi tùy theo yêu cầu của thực tế.

**Bảng 6.1. Các enzym được phép sử dụng theo luật của Pháp  
(danh sách được đưa ra tháng 4 năm 1996)**

Enzym	Nguồn gốc	Sử dụng	Luật
$\alpha$ -amilase	<i>B. subtilis</i>	Thuỷ phân tinh bột, bisqui, bia	05.09.89
	<i>B. licheniformis</i>	Nước quả, rau, bánh ngọt	
	<i>A. niger</i>	Thuỷ phân tinh bột	05.09.89
	<i>A. oryzae</i>	Bisqui, bia, nước quả, rau, bánh ngọt, bánh mì	
	<i>B. subtilis</i>	Bánh mì đặc biệt	15.06.93
$\alpha$ -amilase	<i>B. licheniformis</i> (tổ hợp với đồng dạng)	Thuỷ phân tinh bột, bia, rượu	01.02.94
	<i>B. licheniformis</i> ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> )	Nước quả, rau, bánh ngọt	
amyloglucosidase	<i>A. niger</i>	Thuỷ phân tinh bột	05.09.89
	<i>A. oryzae</i>	Bisqui, bia, bánh ngọt	
	<i>A. niger</i>	Nước quả, rau	18.8.94
maltogenase	<i>B. subtilis</i> ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> )	Bánh mì, sirô maltoza	01.02.94
Pullulanase	<i>B. acidopullulyticus</i>	Thuỷ phân tinh bột, bia, bánh mì đặc biệt	05.09.89 27.08.93
	<i>Klebsiella planticola</i>	Thuỷ phân tinh bột, bia	18.08.94
Glucose isomerase	<i>Streptomyces violaceaniger</i>	Sirô glucoza có hàm lượng fructoza cao	05.09.89



Enzym	Nguồn gốc	Sử dụng	Luật
	<i>S. olivochromogenes</i> <i>S. rubiginosus</i> <i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>B. coagulens</i> <del><i>Streptomyces murinus</i></del>		15.06.93
Invectase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mứt quả	05.09.89
Lactase	<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>K. fragilis</i> <i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i>	Lactoza thủy phân	20.06.85
Cyclodextrin glucozyl transferase	<i>B. macerans</i> <i>B. circulans</i>	$\beta$ -cyclodextrin	24.03.93
$\beta$ -glucanase	<i>B. subtilis</i> ; <i>A.niger</i> <i>Disporotrichum dimorphosporum</i>	Bia	15.09.89
Endoglucanase Pentozanase	<i>Humicola insolens</i>	Bánh mì ; bia	18.08.94
Pectinase	<i>A. utentii</i> ; <i>A. niger</i>	Fructo-oligosacarit	05.06.93
Cellulase	<i>Trichoderma reesei</i>	Fructo-oligosacarit	05.06.93
Phức hợp Xellulase- Xellobias- hemicenlulase- $\beta$ -glucanase	<i>A. niger</i>	Fructo-oligosacarit	05.06.93
Inulase	<i>A. niger</i>	Fructo-oligosacarit	15.06.93
$\beta$ fructofuranozidas e	<i>A. niger</i>	Fructo-oligosacarit	27.08.93
Hemicenlulase	<i>A. niger</i>	Bisqui, bánh ngọt, bánh mì	18.08.94
$\alpha$ -cetolactat decacboxylase	<i>B. subtilis</i> ( <i>B. brevis</i> )	Bia, rượu	01.02.94
Photpholipase A <sub>2</sub>	dịch tuy lớn	nước sốt được tạo nhũ	15.08.94
Papain	<i>Cocica papaya</i>	Bia, dịch thủy phân protein	05.09.89
Protease	<i>B. subtilis</i>	Bisqui, bánh ngọt, nước quả,	05.09.89

Enzym	Nguồn gốc	Sử dụng	Luật
	<i>oryzae</i> , <i>A. ventii</i> <i>B. licheniformis</i>	rau Thuỷ phân protein	05.09.89
Protease axit	<i>Endothia parasitica</i> <i>Mucor pusillus</i> , <i>M. miehei</i>	Phomat	05.09.89
Protease	<i>Micrococcus caseolyticus</i>	Phomat	05.09.89
Pepxin, trypsin, chimotrypsin tách chiết dịch tụy papain protease xerin protease kimloại protease axit		Dịch thuỷ phân protein dành cho các thực phẩm đặc biệt	21.12.88

#### 6.1.4. Sử dụng các chế phẩm enzym trong công nghệ thịt cá

##### 6.1.4.1. Một số chế phẩm enzym thường được sử dụng trong chế biến các sản phẩm giàu protein

al Các chế phẩm enzym có nguồn gốc thực vật

- **Papain và chymopapain**

Hai loại chế phẩm enzym này chứa chủ yếu các protease và đều nhận được từ nhựa đu đủ. Hàm lượng chymopapain trong nhựa đu đủ cao hơn papain.

Chế phẩm papain có hoạt tính cao trong phân giải amit và este. Papain thực hiện thuỷ phân sâu sắc hơn so với những protease của VSV. So sánh với những protease khác thì papain có khả năng chịu nhiệt cao hơn. Nhiệt độ hoạt động tối hạn là 80°C.

Chymopapain xúc tác thuỷ phân các mối liên kết peptit và este. Tốc độ thuỷ phân hemoglobin và casein của enzym này nhỏ hơn papain 2 lần, nhưng ổn định ở pH thấp hơn.

- **Phyxin**

Phyxin thu được từ mù nhựa quả sung. Trung bình quả xanh trọng lượng từ 10 -15 g có thể chiết được 100 - 200 mg phyxin. Tinh thể phyxin

thu được ở pH = 5 và giữ được độ bền hoạt lực trong thời gian vài tháng ở -50°C. Phyxin tương đối giống nhiều với papain như được hoạt hoá bằng hợp chất tiol và bất hoạt bằng tác nhân sulfuahydrin. Phyxin ổn định ở pH = 6 - 8.

- **Bromelin**

Enzym này có nhiều trong lá và vỏ dứa. Enzym tách từ dứa cũng thuỷ phân casein tốt như papain, nhưng đối với hemoglobin tốc độ tăng lên 4 lần.

Khi tách bằng sắc ký thu được bromelin không thuần khiết. Hỗn hợp bromelin gồm 5 phần khác nhau về tính chịu nhiệt và khoảng dịch chuyển trên điện di. Điểm đẳng điện của các bromelin không thuần khiết là 9,55.

Chế phẩm không thuần khiết thuỷ phân được este của arginin và amit, nhưng không thuỷ phân được L-leucin. Bromelin được hoạt hoá bằng cystein và KCl, còn HgCl<sub>2</sub> có tác dụng làm bất hoạt.

*b/ Các chế phẩm enzym có nguồn gốc vi sinh vật*

- Alcalase 2,4L ; Neutrase 0,5L ; Esperase 7,5L ; Protamex ; Novozyme FM2.0L chúng là các chế phẩm enzym chứa chủ yếu là endopeptidase thu nhận từ vi khuẩn. Các chế phẩm này được sử dụng để cải thiện các tính chất công nghệ, dinh dưỡng và hương vị của protein.

- Flavourzyme MG ; Kojizyme đây là hỗn hợp của enzym exo- và endo-peptidase thu nhận từ nấm mốc. Các chế phẩm này dùng để tăng cường thuỷ phân protein.

#### **6.1.4.2 Sử dụng các chế phẩm enzym trong công nghệ chế biến thịt**

Các chế phẩm enzym có thể được bổ sung dưới nhiều dạng : Muối làm mềm, tiêm vào gia súc trước hay sau khi giết mổ.

*a/ Muối làm mềm*

Muối làm mềm chứa 30g papain trong 1 kg muối ăn. Sự có mặt của NaCl cho phép khuếch tán tốt hơn enzym và phân giải một phần cấu trúc protein, do đó làm cho cơ chất lại gần protease hơn. Hoạt độ xúc tác của protease đưa từ ngoài vào bị hạn chế khi bảo quản thịt ở nhiệt độ thấp, nhưng trở nên cực đại vào giai đoạn đầu khi nấu. Hiệu quả của chúng càng cao khi nâng nhiệt độ chậm. Đối với papain hoạt độ tối đa ở 40 - 50°C, và bị vô hoạt

bởi nhiệt ở nhiệt độ vượt quá 75 - 80°C. Muối làm mềm thịt được đưa vào ngay trước khi nấu bằng các phương pháp :

- Ngâm thịt vào dung dịch có chứa hỗn hợp protease, giữ ở pH và nhiệt độ xác định. Hiện nay, phương pháp này được dùng phổ biến và thuận lợi hơn cả.

- Tẩm bột làm mềm thịt (protease, muối, mì chính) trên bề mặt thịt.

**Bảng 6.2. Chế phẩm enzym protease sử dụng trong công nghệ chế biến thịt**

Enzym	Nguồn gốc	Hiệu quả phân huỷ		Hiệu quả làm mềm	
		Sợi cơ	Colagen	Cơ bắp giàu tế bào chức năng	Các dạng cơ bắp khác
Papain	Thực vật cây đu đủ	++++	±	-	+++
Phyxin	quả sung	+++	±	-	++
Bromelin	dứa	+	++	++	+
Collagenase	Vi khuẩn <i>Clostridium</i>	...	++++	++++	...
Collagenase	<i>histoliticum</i>	...	++++	++++	...
Protomesen- terin	<i>achromobacter</i> <i>iophagus</i>		..	..	
Protosubtilin	<i>Bacillus</i> <i>mesentericus</i>	++			++
	<i>Bacillus subtilis</i>	++			++
Protease asp	Nấm mốc <i>aspergillus</i> <i>oryzae</i>	++			++
Trypsin	Các động vật khác	+++	±		+++
Pancreatin	Dịch vị dạ dày	+++	±		+++
	Dịch tụy				

*b/ Tiêm chế phẩm enzym vào trước khi giết mổ*

Dung dịch đậm đặc của papain được tiêm vào ven tĩnh mạch của động vật 10 - 30 phút trước khi giết mổ để nó có thể theo máu vào các tế bào cơ bắp (đảm bảo chắc chắn sự phân bố đồng đều trong các bộ phận con vật). Dung dịch 5% enzym được tiêm vào ở dạng không hoạt động, trong enzym

này mạch bên Cys-25 bị oxy hoá tới dạng dẫn suất disulfit. Papain tồn tại dưới dạng bị oxy hoá này trong động vật sống. Nếu động vật không bị giết enzym sẽ bị thải ra. Sau khi giết mổ sự phân huỷ glucose vẫn tiếp tục nên loại bỏ các cơ chứa oxygen, do vậy các chất lưu huỳnh và các tác nhân khử khác tích tụ và papain trở nên hoạt động. Quá trình hoạt hoá xảy ra chậm ở thịt ướp lạnh, nhưng nhanh ở thịt ấm. Tiến hành vô hoạt enzym bằng sự oxy hoá trước khi tiêm vào vật là hết sức cần thiết, vì enzym hoạt động sẽ gây sốc thần kinh nghiêm trọng trong hô hấp. Lượng papain được tiêm vào dao động từ 1 – 3mg/ kg vật sống tùy theo độ tinh khiết của chế phẩm. Sau khi giết con vật được xử lý bình thường, nhưng thời gian chín của thịt giảm đi 2 lần (5 ngày thay cho 10 – 12 ngày đối với thịt bò).

Tiêm enzym vào tĩnh mạch trước khi mổ cho phép tăng được độ mềm và tỷ lệ thịt sử dụng làm bít tết hay quay, nhưng nó cũng làm tích tụ enzym trong gan và thận, điều này gây ra mùi khó chịu.

#### *c/ Tiêm chế phẩm enzym vào sau khi giết mổ*

Tiêm dung dịch enzym vào sau khi mổ cũng rất hiệu quả để làm mềm miếng thịt. Công nghệ này hứa hẹn một tương lai tốt hơn vì nó được người tiêu thụ dễ chấp nhận hơn. Tuy nhiên sự khuếch tán enzym trong tế bào cơ bắp sau khi động vật chết đòi hỏi phải có xử lý kèm theo (làm mềm cơ học hay xử lý bởi muối). Mặt khác phải sử dụng chế phẩm enzym tinh khiết để kiểm tra được lượng enzym thực tế tiêm vào, do đó giá thành cao hơn. Liều lượng sử dụng thay đổi tùy theo loại động vật (gà, cừu, bò ...) và công nghệ sử dụng enzym. Các cơ bắp có thể được tiêm hay nhúng chìm trong thùng chứa dung dịch enzym với nồng độ 0,1 – 0,001% tùy theo kích thước của miếng thịt, thời gian tiếp xúc và hiệu quả của enzym.

#### *d/ Sử dụng enzym để làm tăng giá trị các sản phẩm phụ của thịt*

- **Sản phẩm thuỷ phân làm chất độn giống thịt**

Sử dụng các loại protein động vật có giá trị thấp để thuỷ phân thành các sản phẩm có giá trị cao. Khi các chất thuỷ phân này được đưa vào khối thịt thì hình dạng và vị của các sản phẩm đã trộn tương tự như loại chưa trộn (thịt lợn muối, bít tết, thịt xay, giò xúc xích). Việc ứng dụng này của enzym protease ngoài lợi ích về kinh tế, nó còn mang lại một số cải thiện về mặt công nghệ như sau :

- Trường hợp protein không được phân bố đồng đều trong thịt, việc đưa thêm chất thuỷ phân vào sẽ nhận được loại thịt có hàm lượng protein đồng nhất hơn, đáp ứng được yêu cầu của khách hàng.

- Nhờ đặc tính keo dính của chất thuỷ phân, sau khi phối trộn thịt nhận được sẽ không tiết nước, chắc hơn, dễ cắt miếng hơn.

- Việc phân bố hương vào thịt đã ngâm tẩm sẽ tốt hơn.

Trong ứng dụng này người ta thường dùng chế phẩm enzym protamex. Nguyên liệu ban đầu là các sản phẩm phụ của thịt, xương gia súc, gia cầm trong các lò mổ. Nguyên liệu thô phải được nghiền trước khi thuỷ phân trong thời gian khoảng 30 phút tới 4 giờ tùy thuộc vào lượng enzym sử dụng và mức độ thuỷ phân yêu cầu. Hỗn hợp sau thuỷ phân gồm 3 phần : mỡ, dịch lỏng và protein không hoà tan. Chúng sẽ được tách ra bằng phương pháp ly tâm hay gạn lọc. Dịch thuỷ phân thu được phải bảo quản bằng muối, thành phần của nó bao gồm :

Protein	: 66%
Muối, tro	: 33%
Mỡ	: 1%

Chất thuỷ phân dạng lỏng có chứa 33% protein được cho thêm vào thịt, tỷ lệ bổ sung là 6 - 10%. Chất thuỷ phân có thể bổ sung vào cùng với các chất ngâm tẩm khác, do đó không đòi hỏi phải thay đổi qui trình sản xuất.

#### • Sản phẩm thuỷ phân như nước hầm xương thịt

Nước hầm xương thịt được sử dụng cùng với các loại rau thơm để tăng hương vị của các loại nước súp sấy khô, đóng hộp, các loại nước sốt, các sản phẩm đóng lọ, các sản phẩm thực phẩm đông lạnh, các sản phẩm thực phẩm cao cấp.

Nhằm mục đích sử dụng này thường dùng chế phẩm enzym flavouzyme vì nó có những ưu điểm sau :

- Hiệu suất thuỷ phân cao hơn chế phẩm enzym protamex.
- Hương và vị của sản phẩm tốt hơn.
- Có thể nâng cao hàm lượng chất khô của sản phẩm. Các loại nước hầm này đặc sánh hàm lượng chất khô đạt tới 80% (thông thường 35 - 40%).

- **Tăng giá trị của máu**

Máu là một sản phẩm giết mổ. Ngược với các sản phẩm khác từ động vật, máu rất ổn định về thành phần, nó chỉ thay đổi tùy theo từng loài. Trong thực tế chỉ có 73% máu được sử dụng, trong đó chỉ khoảng 12% thực sự có giá trị do sự hư hỏng của nó diễn ra nhanh, giá thành bảo quản đắt. Máu từ động vật nuôi là nguồn gây ô nhiễm lớn BOD > 67 g/l đối với bò, > 207 g/l đối với lợn con.

Thuỷ phân hemoglobin bởi enzym cho phép nhận được các peptit có giá trị cao hơn. Protease lựa chọn là pepxin, bởi vì pH phản ứng là 1,8, do đó hạn chế đáng kể nguy cơ nhiễm tạp vi sinh vật. Các thực nghiệm trong thiết bị phản ứng cho phép nhận được ổn định peptit. Các peptit kích thước < 10kDa không có màu, còn peptit hem do có trọng lượng phân tử gần 20 kDa nên có màu rõ rệt. Xử lý khử màu với magiê nồng độ 40 g/l ở 50°C trong 1h30 là cần thiết. Sản phẩm sau đó được loại muối bằng điện di rồi cô đặc và sấy khô.

Các peptit nhận được có thể sử dụng làm môi trường nuôi cấy VSV nhiễm tạp của thực phẩm, làm giàu sữa mẹ. Hơn nữa một số peptit thể hiện hoạt tính sinh học.

### **6.4.1.3. Sử dụng các chế phẩm enzym trong sản xuất protein thực vật thuỷ phân**

#### **a/ Sản phẩm thuỷ phân dùng thay cho sữa mẹ**

Sử dụng chế phẩm enzym Flavouzyme để thuỷ phân casein và protein của lúa mì với mức thuỷ phân trên 50% protein thường được đưa vào công thức sữa đặc biệt cho trẻ em.

#### **b/ Sản xuất nước chấm magi**

Nguyên liệu được sử dụng là đậu tương tách chất béo, gluten của lúa mì và ngô. Các sản phẩm thuỷ phân có hương vị thịt và có màu nâu sẫm. Sử dụng enzym Flavouzyme, Alkalaza và Protamex, thuỷ phân qua 2 bước trung tính và axit. Protein thực vật thuỷ phân bằng enzym đắt hơn so với phương pháp thuỷ phân bằng axit nhưng có các ưu điểm sau:

- Tạo ra các sản phẩm muối thấp hoặc không muối. Điều này rất khó thực hiện khi sử dụng phương pháp axit. Sản phẩm nước chấm đậu tương chứa 12 - 14% muối, do đó thường nước chấm đậu tương được pha chế với protein thực vật thủy phân 10% protein theo tỷ lệ 1 : 1 để đạt nước chấm đậu tương có chứa 6% muối.

- Tạo ra sản phẩm phụ có giá trị cao.

Flavourzyme và Kojizyme được bổ sung vào giai đoạn lên men với các thông số công nghệ:

Thông số	Flavourzyme	Kojizyme
Nhiệt độ (°C)	30-60	30-60
pH	5-7	4,5-6,5
Liều lượng (% protein)	1-2	1-2

Vô hoạt enzym: Chỉ cần tiến hành thanh trùng là đủ loại bỏ sự có mặt của enzym trong sản phẩm cuối cùng.

Sử dụng chế phẩm enzym mang lại nhiều ưu điểm : Thời gian lên men ngắn nên tăng được năng suất. Sản xuất được nước sốt có hàm lượng muối thấp. Có thể kiểm tra được mức độ thủy phân, do vậy tránh được nguy cơ tạo thành các sản phẩm phụ (vị đắng). Độ thủy phân 5% protein hay gây ra vị đắng và vị đắng sẽ mất khi độ thủy phân đạt trên 40%. Sử dụng Flavourzyme và Kojizyme có thể đạt được độ thủy phân là 55%. Tăng được hàm lượng nitơ tổng số trong sản phẩm cuối cùng 20%.

#### *cl Chất thơm tổng hợp từ thủy phân đậu tương bằng enzym*

Tổng hợp enzym các sản phẩm thủy phân đậu tương đã được phát triển. Hỗn hợp các protease đặc hiệu khác nhau đã được sử dụng để cho phép phân huỷ mạnh protein. Phương pháp bao gồm 3 giai đoạn :

- Đầu tiên endoprotease được sử dụng ở 60°C và pH = 8. Các protease kiềm tính của vi khuẩn không được sử dụng trong giai đoạn này để tránh tạo nên các peptit đắng. pH không được điều chỉnh và giảm xuống tới pH = 5, đầu tiên tạo ra các peptit đắng, sau đó chúng được thủy phân.



- Hỗn hợp endoprotease – exopeptidase hoàn chỉnh việc thủy phân protein.

- Cuối cùng hỗn hợp exopeptidase cung cấp những cơ chất cần thiết cho phản ứng Maillard.

Mức độ thủy phân protein khoảng 40%. Bổ sung NaCl, đường, lipit vào hỗn hợp nhận được, sau đó sấy phun. Một số chất thơm có thể được tạo thành tùy thuộc vào lượng đường và sản phẩm thủy phân lipit bổ sung.

#### **6.4.1.4. Sử dụng các chế phẩm enzym trong công nghệ chế biến cá**

Trong phần này chúng tôi đề cập tới việc sử dụng enzym làm phụ trợ trong chế biến thực phẩm nguồn gốc biển.

##### *al Các sản phẩm thủy phân của cá và tôm cua*

Phần lớn các sản phẩm cá được tiêu thụ trực tiếp, chỉ có một lượng nhỏ được chế biến thành dạng bột. Khoảng 50% lượng cá bị mất đi dưới dạng chất thải (phù tạng, đầu, vụn cá) tới 70% đối với tôm. Bột cá thô là những sản phẩm phụ có trữ lượng protein lớn có thể được tiêu thụ sau khi thủy phân bằng enzym. Các dạng sản phẩm được chuyển hoá, một phần là sản phẩm truyền thống (tự phân tự nhiên), hay tự phân công nghiệp mà mục đích của nó là biến đổi các chất protein có sẵn nhằm tăng thêm giá trị dinh dưỡng và kinh tế. Trên thị trường nhiều nhất là sản phẩm thủy phân enzym cá.

- **Cá lên men truyền thống**

Kỹ thuật lên men các sản phẩm biển đã được biết đến từ lâu như là một phương tiện bảo quản cá. Ở các nước Đông nam Á, hàng trăm triệu lít nước mắm và mắm tôm được sản xuất ra hàng năm. Hầu hết tất cả các loại cá và tôm cua đều có thể được sử dụng làm nguyên liệu. Phương pháp sản xuất nước mắm rất đơn giản : cá được trộn với 20 – 40% muối và bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 6 – 12 tháng. Dịch thủy phân protein thu được có màu sẫm được lấy ra, lọc và đóng chai. Nói chung một nửa nitơ amin có mặt ban đầu trong nguyên liệu nằm trong phần dịch lỏng này.

Trong quá trình chế biến cá truyền thống, phần lớn chuyển hoá là do enzym nội bào, các protease tiêu hoá. Lượng và hoạt độ của enzym cần thiết cho sự chín của sản phẩm phụ thuộc vào nhiều yếu tố: mùa thu hoạch, chế độ nuôi, điều kiện lên men.

Đưa thêm protease ngoại bào có nguồn gốc vi sinh vật từ ngoài vào sẽ làm tăng rõ rệt quá trình thủy phân, rút ngắn thời gian chế biến. Mức độ thủy phân phải được theo dõi chặt chẽ để tránh tạo thành peptit quá nhỏ, là nguyên nhân gây ra vị đắng.

- **Sản xuất nước mắm**

Sản xuất nước mắm theo phương pháp lên men tự nhiên mất rất nhiều thời gian, từ 6 tháng đến 1 năm. Nếu bổ sung một lượng rất nhỏ protease vào quá trình ủ chượp thì thời gian làm nước mắm sẽ rút lại còn rất ngắn chỉ từ 15 đến 30 ngày. Hiệu quả kinh tế nhất của việc bổ sung enzym là cấy một lượng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease có hoạt độ cao và chống chịu được các điều kiện bất lợi vào nguyên liệu trong quá trình ủ chượp (NaCl 4M). Các loài vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp protease gồm có *Bacillus subtilis*, *B. Megaterium*, *B. Cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Halobacterium*... Nước mắm Thái lan từ hỗn hợp cá với muối theo tỷ lệ 3 : 2, sản phẩm cuối cùng nhận được sau 6 – 12 tháng. Việc sử dụng 3 loại enzym thực vật (bromelin, papain, phyxin) cho sản phẩm nước mắm có hương vị nhẹ, có thể bổ sung vào nước mắm sản xuất theo phương pháp truyền thống.

Bromelin (nồng độ 0,8%, cofactor xystein 0,025M, 33°C) cho kết quả tốt nhất và sản phẩm có chất lượng được chấp nhận thu được sau 21 ngày. Sử dụng bromelin cho phép nhận được sản phẩm thủy phân ít có vị đắng. Sử dụng hỗn hợp trypsin: chymotrypsin (50 : 50) ; nồng độ 0,3% ; 37°C cho phép giảm thời gian ủ chín 2 tháng mà vẫn giữ được hương vị theo yêu cầu của nước mắm sản xuất theo phương pháp truyền thống.

*b/ Bột cá*

Cá được nghiền, sau đó trộn với nước 60°C theo tỷ lệ 1:1 (g/v). Trường hợp cá nhiều mỡ, bổ sung hỗn hợp etoxyquin và galatte etyl (1:1, 0,01% theo chất béo) như là chất chống oxy hoá. Papain được bổ sung vào theo tỷ lệ 0,05%. Hỗn hợp được giữ với sự khuấy trộn trong thời gian 30 phút, sau đó phản ứng được dừng lại bằng cách đun nóng tới 100°C trong thời gian 10 phút để làm biến tính enzym. Sau khi lọc, sản phẩm thủy phân được sấy khô. Bột cá nhận được chứa 93% chất khô, trong đó 82% protein, 2% lipit và 6% tro.

### c/ Các ứng dụng khác của enzym

- **Đánh vẩy cá**

Đánh vẩy cá bằng enzym được sử dụng trong trường hợp xử lý cơ học không thể đáp ứng được. Kỹ thuật dựa trên cơ sở sử dụng một hỗn hợp protease của cá để phân huỷ tế bào cấu trúc liên kết với vẩy cá.

Tế bào này chủ yếu chứa collagen, mà tính ổn định của nó dao động tùy theo kích thước và loại cá. Do đó, điều kiện thủy phân phải được xác định đối với từng trường hợp.

Trong thực tế, dung dịch enzym được hoà tan trong axit axetic 0,5%, sau đó cá được giữ ở nhiệt độ đã định trong khoảng thời gian thích hợp. Phương pháp này thường không cho kết quả tốt đối với các loại cá nhiều chất béo, da của nó thường bị tuột ra khi rửa.

**Bảng 6.3. Các điều kiện thực hiện đánh vẩy bằng enzym**

Nhiệt độ (°C)	Thời gian tác dụng	Nhận xét
2	3 – 11 giờ	phụ thuộc vào kích thước cá
10	1 – 5 giờ	
15 – 20	15 phút	với máy đồng hoá đối với cá nước nóng 25 – 30°C

- **Làm mềm cấu trúc thịt**

Sử dụng enzym để làm mềm mô thịt được sử dụng từ lâu ở các nước nhiệt đới. Sò, ốc được trộn với quả đu đủ băm nhỏ để được làm mềm. Papain tự nhiên có mặt trong quả làm mềm thịt bởi sự thủy phân một phần protein.

- **Bảo quản cá bằng enzym**

Phun dung dịch glucose, gluco-oxydase và catalase lên bề mặt của cá cho phép tạo ra axit gluconic và  $H_2O_2$  làm giảm pH và hạn chế phát triển của vi khuẩn. Kết quả nhận được bằng phương pháp này thấp hơn lysozym.

Lysozym là enzym có khả năng xúc tác thủy phân peptidoglucan của màng vi khuẩn. Lysozym được sử dụng ở Nhật Bản để bảo quản các sản phẩm biển lạnh đông như trai hay tôm.

Lactoperoxydase được tách chiết từ sữa và xúc tác oxy hoá thiocyanat ( $SCN^-$ ). ion hypotiocyanat được tạo nên ( $OSCN^-$ ), hợp chất trung gian của sự oxy hoá, có hoạt tính kháng khuẩn.

## 6.1.5. Sử dụng các chế phẩm enzym trong công nghệ sữa

### 6.1.5.1. Enzym đông tụ của sữa

Sản xuất phomat cần một giai đoạn đông tụ sữa, giai đoạn này cho phép đẩy ra một phần nước và các chất hoà tan, do đó người ta nhận được vẩy sữa hay gọi là phomat không tinh chế. Một số các enzym đông tụ của sữa được phân ra như sau :

- Dịch vị : tách chiết nhận được từ dạ dày của bò sữa và có tỷ lệ : khối lượng chymosin hoạt động/ khối lượng pepxin hoạt động = 1,38.
- Pepsin bò : tách chiết lỏng nhận được từ dạ dày bò trưởng thành có tỷ lệ khối lượng chymosin hoạt động/ khối lượng pepxin bò hoạt động < 0,154.
- Hỗn hợp của dịch vị và pepsin bò cho phép với tỷ lệ 2/ 2 hay 3/ 1 tùy theo độ giàu về chymosin.

Hiện nay gen của chymosin đã được tách dòng trong nhiều vi sinh vật để có thể sản xuất enzym này bằng phương pháp lên men. Enzym vi sinh vật thể hiện là một chất đông tụ thay thế tuyệt vời bởi tính chất của nó không khác xa với tác dụng của dịch vị bò sữa.

- Protease axit có nguồn gốc nấm mốc : protease axit sử dụng trong công nghiệp phomat nhận được từ nuôi cấy nấm mốc *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* hay *Mucor miehei*.

- Chế phẩm có nguồn gốc thực vật : tách chiết từ hoa của *Cynara cardunculus*, hiện chúng đang được sử dụng rộng rãi đối với một số phomat truyền thống.

#### *a/ Các tính chất chung của enzym đông tụ*

Dịch vị (hỗn hợp của chymosin và pepsin) là các protease thu nhận được từ dịch dạ dày. Các enzym này được tiết ra dưới dạng không hoạt động (hay zymogen). Nó phải trải qua một giai đoạn chuyển hoá thành enzym hoạt động ở điều kiện axit của dịch dạ dày. Đây là các enzym protease axit đặc hiệu mang 2 gốc aspartic trong tâm xúc tác của chúng. Các enzym đông tụ tạo nên một nhóm tương đối đồng nhất, bởi vì nó thích tấn công những

liên kết peptit được tạo nên từ các axit amin không kền và nói chung chúng kỵ nước như phenylalanin, leucin hay tyrosin.

Tồn tại sự giống nhau tương đối rõ rệt giữa pepsin của bò, chymosin và protease của *mucor*. Các enzym đông tụ sữa có các tính chất chung sau:

- Hoạt tính đông tụ sữa : Trong số các protein của sữa, tất cả casein đều chứa 1 dưới đơn vị casein K đóng vai trò chất bảo vệ keo toàn bộ các chuỗi protein trong sữa bằng cách duy trì ở trạng thái phân tán và ổn định. Enzym đông tụ có khả năng xúc tác chuyển hoá các casein K qua 3 giai đoạn tạo ra hiện tượng đông tụ sữa.

- Hoạt độ thuỷ phân protein chung.

Protease của *Endothia parasitica* là enzym có hoạt độ thuỷ phân protein mạnh nhất đối với casein hoàn chỉnh cũng như casein  $\alpha_{s1}$ , casein  $\beta$  và casein K.

Đường cong thuỷ phân protein của casein hoàn chỉnh và casein K bởi protease *Mucor pussilus* có tính chất tương tự tính chất của thuỷ phân protein bởi chymosin, do casein  $\alpha_{s1}$  và casein K ít bị thuỷ phân.

Các casein  $\alpha_{s1}$  và casein  $\beta$  được thuỷ phân nhiều hơn bởi protease của *Mucor miehei* so với *Mucor pussilus*.

#### • Các yếu tố ảnh hưởng tới thuỷ phân casein K

**pH:** pH tối ưu đối với chymosin và pepsin bò lên các peptit nhỏ chứa phemet là 4,7 và 5,3 – 5,5 lên đoạn His-98-Lys-111 của casein K hay lên chính casein K. pH tối ưu đối với tác dụng của dịch vị giai đoạn đầu trong sữa là 6,0. Đối với hầu hết các loại phomat sữa được dịch vị hoá ở pH = 6,5.

**Lực ion:** tăng lực ion (0,01 – 0,11) giảm tỷ lệ thuỷ phân peptit His 98 – Lys 112, ảnh hưởng trở nên đáng kể khi pH phản ứng tăng lên ở 1mM CaCl<sub>2</sub>, NaCl và MgCl<sub>2</sub> kích thích thuỷ phân casein K.

**Nhiệt độ:** Nhiệt độ tối ưu cho đông tụ sữa bởi dịch vị ở pH = 6,6 là 45°C.

**Xử lý nhiệt sữa:** xử lý nhiệt sữa có ảnh hưởng nghịch tới đông tụ dịch vị ở T > 65°C và bị cản trở bởi xử lý nhiệt > 90°C trong 10 phút. Ảnh hưởng nghịch của nhiệt có thể được đảo ngược lại nhờ việc axit hoá trước hay sau khi xử lý nhiệt hoặc bởi bổ sung CaCl<sub>2</sub>.

### *b) Vai trò của các tác nhân đông tụ trong quá trình ủ chín phomat*

- Lượng tác nhân đông tụ được giữ trong vẩy sữa: trong quá trình tách nước, một phần tác nhân đông tụ đi theo dịch sữa, phần khác nằm lại trong vẩy sữa. Tùy thuộc vào các điều kiện công nghệ lượng enzym này nằm trong khoảng 6 – 40%. Đối với dịch vị bò thì sự phân bố giữa vẩy sữa và dịch trong phụ thuộc nhiều vào pH, nếu pH càng thấp thì lượng dịch vị được giữ lại càng lớn. Trong khi đó các enzym của *Mucor* lại ít chịu ảnh hưởng hơn. Người ta thấy protease đông tụ từ nấm mốc *Mucor* được giữ lại trong vẩy sữa ít hơn chymoxin.

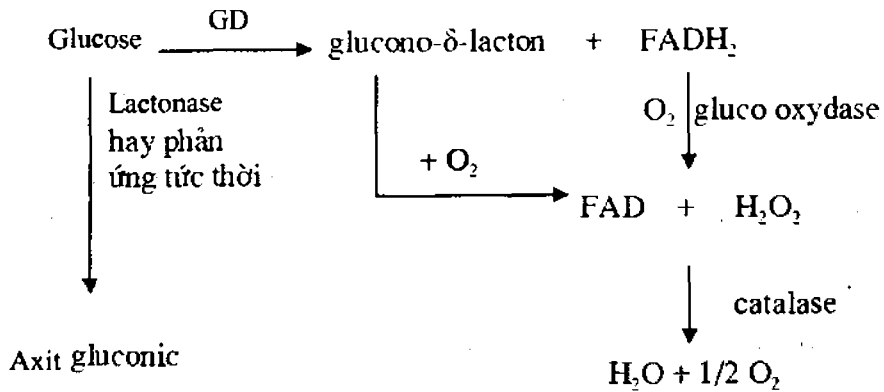
- Phân huỷ protein trong quá trình ủ chín phomat: một phần (thậm chí là rất nhỏ) enzym đông tụ được giữ trong vẩy sữa thường là nhân tố thuỷ phân protein đầu tiên nằm trong cơ chế chung thuỷ phân casein trong quá trình ủ chín phomat. Sự thuỷ phân protein này cải thiện cấu trúc của vẩy sữa và chuẩn bị cho tác động của enzym vi sinh vật. Thường sử dụng các chế phẩm enzym dịch vị và một số protease vi sinh vật từ *Mucor* và *Asp. Candidus*. Dịch vị thương mại giải phóng chủ yếu các peptit có trọng lượng phân tử lớn và thực tế không can thiệp vào giải phóng các peptit rất ngắn và các axit amin tự do. Việc giải phóng các peptit bởi dịch vị thương mại chỉ đủ để đạt các giá trị nitơ hoà tan ở pH = 4,6 giống như nhận được trong phương pháp truyền thống.

Enzym đông tụ của *mucor* mang tính chất gần giống dịch vị bò, còn enzym của *endothia parasitica* thuỷ phân protein tốt hơn và được tính như một enzym ủ chín.

- Vấn đề đáng: trong quá trình ủ chín phomat, các enzym đông tụ có thể tạo ra các peptit có vị đắng, đặc biệt là enzym của *endothia parasitica*. tất cả các yếu tố tạo điều kiện cho việc giữ mạnh hơn tác nhân đông tụ trong vẩy sữa đều kéo theo xu hướng tạo vị đắng nhiều. Nhưng thực tế vị đắng không phải hoàn toàn chỉ do enzym đông tụ, mà một phần do chủng vi khuẩn lactic có hoạt động mạnh của protease thành tế bào.

#### **6.1.5.2. Enzym Glucooxydase (beta-D glucoza : O<sub>2</sub> - oxydoreductase, EC 1.1.3.4)**

Glucooxydase là enzym xúc tác sự oxy hoá glucose thành axit gluconic theo sơ đồ phản ứng:



Glucosyl oxydase được sử dụng như một chất chống oxy hoá đối với các sản phẩm giàu chất béo như bơ, bột sữa. Sử dụng glucosyl oxydase cho phép tạo ra  $\text{H}_2\text{O}_2$  để hoạt hoá hệ thống kháng khuẩn (Lactoperoxydase-Thioxyanat-Hydroperoxyt, LTP).

### 6.1.5.3. Một số chế phẩm enzym được sử dụng trong công nghệ chế biến sữa

Ngoài nước chua làm đông tụ sữa, nhiều hoạt động enzym cũng được đưa vào trong sữa và dịch sữa. Trong giai đoạn đầu tiên, enzym lactase được đưa vào để thủy phân lactose tạo thành glucose. Có 3 loại lactase hay dùng trong công nghệ sữa :

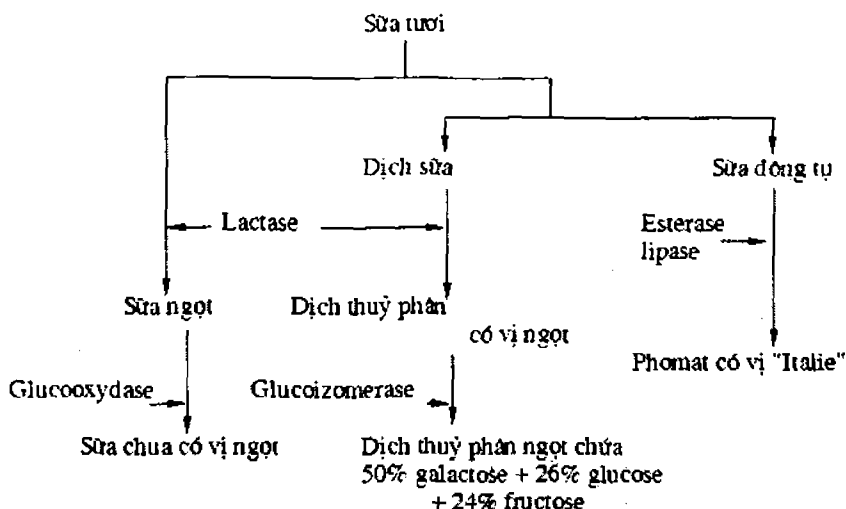
Lactase từ *Aspergillus niger* được cố định dễ dàng và có  $\text{pH}_{\text{opt}}$  ở vùng axit, thích hợp cho làm dịch sữa.

Lactase từ *Aspergillus oryzae* kém ổn định hơn, thích hợp trong điều kiện axit yếu.

Lactase từ *Kluyveromyces fragilis*, có  $\text{pH}_{\text{opt}}$  gần 6,0, được sử dụng trong sản xuất sữa tươi để tăng vị ngọt và cải thiện được độ hấp thụ lactose.

Tác động lần lượt của lactase và glucosyl oxydase lên sữa tươi, tạo ra axit gluconic, kéo theo sự giảm pH, do đó gây nên sự kết tủa đẳng điện casein. Cuối cùng cho ta một sản phẩm ngọt đặc của sữa chua.

Trong sản xuất dịch sữa, người ta có thể kết hợp hoạt động của glucoizomerase với hoạt động của lactase để thu được sản phẩm ngọt hơn. Thường sử dụng 2 enzym này ở dạng cố định.



**Hình 6.1. Sơ đồ chế biến các sản phẩm từ sữa tươi.**

#### *b/ Công nghiệp sản xuất phomat*

Bổ sung enzym từ ngoài vào cho phép ta có sự biến đổi đặc hiệu hơn ở nhiệt độ cao thúc đẩy các phản ứng tạo hương vị trong quá trình ủ chín phomat. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy : Bổ sung hỗn hợp enzym (protease axit, protease trung tính, lipase, decarboxylase và lactase) thúc đẩy được quá trình ủ chín phomat. Protease axit từ VSV thường gây ra vị đắng, nhưng protease trung tính và peptidase lại tăng hương vị của phomat sau 1 tháng ủ ở 20°C. Xử lý sữa dùng để sản xuất phomat bằng beta-galactosidase cho phép ta giảm thời gian sản xuất, quá trình ủ chín phomat được thúc đẩy tới 50%, cải thiện hương thơm và cấu trúc của phomat thu được.

- **Sử dụng protease ngoại bào**

Có 3 phương pháp bổ sung enzym, mỗi phương pháp đều có những ưu và nhược điểm riêng.

#### *1. Bổ sung enzym trực tiếp vào sữa để sản xuất phomat*

Phương pháp này đảm bảo được sự phân bố đồng đều enzym trong quá trình tạo vẩy, nhưng đặt ra ít nhất 3 vấn đề :

Protease thường hoà tan trong nước và phần lớn enzym bổ sung nằm lại trong sữa trong.



Sữa trong bị nhiễm enzym phải được xử lý nhiệt sớm nhất có thể được, nếu sữa trong được sử dụng làm nguồn protein thực phẩm tạo cấu trúc, do đó việc lựa chọn enzym bị hạn chế vì nó phải bị vô hoạt bởi nhiệt độ xử lý của sữa trong.

Trong thực tế bổ sung protease vào sữa để sản xuất phomat tạo ra sự thủy phân protein sớm và đột ngột, đây là nguyên nhân tạo ra nitơ hoà tan với nồng độ lớn trong dịch sữa trong và cũng tạo ra peptit đắng trong quá trình ủ chín phomat, peptit và axit amin gây ra nhiều cảm vị. Tính kỵ nước có bản chất tạo vị đắng.

### 2. Bổ sung enzym trực tiếp vào phomat vẩy

Phương pháp này gặp một khó khăn lớn trong quá trình phối trộn đảm bảo sự phân bố enzym đồng đều trong toàn khối phomat vẩy.

### 3. Bổ sung enzym được bao bọc vào sữa để sản xuất phomat

Protease được gói trong liposom, vì vậy casein của sữa được bảo vệ khỏi thủy phân protein sớm, quá trình thủy phân này sẽ được thúc đẩy dần dần theo sự giải phóng protease nhờ sự thủy phân các liposom trong vẩy sữa. Các bao enzym phải đủ lớn để có thể đi vào vẩy sữa và phải được nhả ra hoàn toàn sau khi tạo thành vẩy sữa. Đường kính của bao thường vào khoảng 0,2 – 4,5  $\mu\text{m}$ , với kích thước này có tới 90% bao enzym được giữ lại trong vẩy sữa (thành phần của bao enzym là phosphatidylcholin và cholesterol). Các bao này bị phá vỡ cũng có thể do sốc thẩm thấu về nồng độ muối hay hoạt động của phospholipase.

#### • Sử dụng lipase ngoại bào

Lipase chủ yếu được sử dụng để sản xuất phomat có hương vị Italy. Nguồn lipase được lấy từ động vật (dạ dày bò, cừu, dê non), từ nấm mốc (*A. niger* ; *mucor miehei*). Các axit béo tự do được giải phóng ra từ sự thủy phân có thành phần rất khác nhau tùy theo nguồn enzym được sử dụng.

Lipase nguồn gốc động vật giải phóng chủ yếu axit béo bay hơi (C4 : O và C6 : O).

Lipase nguồn gốc vi sinh vật (*penicillium camembert* và *penicillium roqueforti*) là lipase kiềm tính  $\text{pH}_{\text{opt}} = 9,0$  ở  $T = 30^\circ\text{C}$ , nhưng nó vẫn hoạt

động tới pH = 4,5, độ bền hoạt lực được tăng lên nhờ  $\text{Ca}^{+2}$ . Các axit béo được giải phóng ra có phân tử lượng thấp, được chuyển hoá tạo thành chất thơm.

#### *b/ Sử dụng $\beta$ -galactozidase*

$\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactozit galactohydrolase, EC 3.2.1.23): Enzym xúc tác thủy phân lactose thành glucose và galactose. Do đó, enzym có tác dụng giảm được mức độ kết tinh và làm tăng độ ngọt của sữa có nồng độ cao. Việc sử dụng  $\beta$ -galactozidase trong công nghiệp sữa đã mở ra nhiều triển vọng. Lĩnh vực áp dụng chủ yếu là : sản xuất sữa và sản phẩm sữa có nồng độ lactose thấp cho người bệnh thiếu  $\beta$ -galactozidase. Sản xuất sữa chua và phomat. Biến đổi các sản phẩm sữa dùng để sản xuất kem và sữa chua. Xử lý sữa trước khi lạnh đông. Sản xuất siro và những chất làm ngọt dùng cho thực phẩm.

Sử dụng  $\beta$ -galactosidase mang lại nhiều ưu điểm như : thủy phân lactose trong sữa để làm sữa chua nhằm mục đích tăng độ ngọt mà năng lượng không tăng, hương vị của sữa chua thu được không thay đổi. Thời gian sản xuất phomat được giảm xuống, chất lượng được cải thiện. Chồng kết tinh đường là điểm chính trong sản xuất các sản phẩm bảo quản lạnh, sữa cô đặc và siro lactose (glucose – galactose). Độ ngọt của siro glucose – galactose có thể được cải thiện bằng cách đồng phân hoá glucose bởi gluco-izomerase.

### **6.1.6. Enzym trong công nghiệp chế biến tinh bột**

#### **6.1.6.1. Một số chế phẩm enzym thương mại**

##### *a/ Termamyl 120L*

Được sử dụng trong quá trình dịch hoá tinh bột để đạt mức độ thủy phân cần thiết cho quá trình tiếp theo. Quá trình dịch hoá tinh bột được tiến hành trong nồi hơi hoặc trong những thiết bị tương tự hoạt động ở nhiệt độ 105 - 110 °C, do đó lợi dụng được tính ổn định nhiệt độ cao của enzym.

Enzym thường được sử dụng để đạt mức độ thủy phân DE = 8 – 12, hoặc các mức độ DE cao hơn cần thiết cho sản xuất maltodextrin. Độ thủy phân tối đa đạt được khi sử dụng Termamyl là DE = 40.

Trong một số trường hợp enzym phải được khử hoạt tính một cách tuyệt đối sau khi hoàn thành dịch hoá, để hoạt tính không còn lại trong sản phẩm cuối cùng, maltodextrin.

Điều kiện khử hoạt tính dung dịch DE = 20 tại 30% chất khô

pH = 3,5                      T = 95°C                       $\tau = 0,5$  phút

pH = 4,0                      T = 95°C                       $\tau = 5$  phút

#### *b/ Fungamyl 800L*

Enzym  $\alpha$ - amylase từ nấm mốc xúc tác chuyển hoá tinh bột và các dextrin thành chủ yếu là đường maltose. Được sử dụng để sản xuất sirô maltose nồng độ cao 40 - 60% maltose (2 - 7% glucose) hay sirô có độ chuyển hoá cao DE = 60 - 70 ; 35 - 43% glucose ; 30 - 37% maltose.

Chế phẩm enzym  $\alpha$ -amylase này có nhiệt độ tối ưu  $T_{opt} = 60 - 65^\circ\text{C}$ . Sản phẩm nhận được sau thuỷ phân chứa nhiều maltose. Enzym có thể chịu được pH xuống tới 4,5 và không bị ảnh hưởng gì nếu thêm ion  $\text{Ca}^{+2}$ .

#### *c/ Promozyme 200L*

Promozyme 200L là một chế phẩm chứa chủ yếu enzym phân nhánh pullulanase (EC.3.2.1.41, pullulan 6-glucano-hydrolase). Đây là enzym chịu nhiệt nhận được từ một chủng nấm mốc của loài *Bacillus acidopullulyticus*.

Promozyme xúc tác thuỷ phân liên kết  $\alpha$ - 1,6 glucozit của các amilopectin đã được thuỷ phân một phần bởi enzym  $\alpha$ - amylase và của các pullulan có ít nhất 2 đơn vị glucose trong chuỗi mạch bên. Do đó Promozyme thích hợp cho việc phân giải các mạch nhánh của tinh bột sau khi dịch hoá, do đó giảm được hàm lượng các oligosacarit trong dịch đường glucose.

Trong sản xuất đường dextrin, promozyme được sử dụng trong giai đoạn đường hoá cùng với glucoamylase. Sử dụng promozyme tăng tỷ lệ dextrin bằng cách giảm hàm lượng oligosacarit và cho phép giảm được hàm lượng glucoamylase sử dụng.

Trong sản xuất đường maltose, promozyyme được sử dụng đồng thời với fungamyl. Nhờ đó tăng được tỷ lệ maltose và giảm được lượng oligosacarit nhánh trong sản phẩm.

Lượng enzym sử dụng phụ thuộc chủ yếu vào thời gian phản ứng, độ chuyển hoá mong muốn cũng như điều kiện nhiệt độ và pH. Thường liều lượng sử dụng thích hợp là 0,25 - 3 kg/ tấn tinh bột khô.

Độ ổn định hoạt độ : pH và nhiệt độ là 2 yếu tố có ảnh hưởng đồng thời tới hoạt độ của promozyyme.

$$T = 62,5^{\circ}\text{C} \quad \text{pH}_{\text{opt}} = 5,0$$

$$T = 60^{\circ}\text{C} \quad \text{pH}_{\text{opt}} = 4,5$$

$$T = 57,5^{\circ}\text{C} \quad \text{pH}_{\text{opt}} = 4,5 - 5,5$$

So sánh độ ổn định của promozyyme, của glucoamylase AMG và của  $\beta$ -amylase cho thấy đường cong hoạt độ của chúng rất gần nhau. Như vậy fromozyyme có thể sử dụng đồng thời cùng với các enzym đường hoá.

Khi dịch đường hoá được xử lý qua trao đổi ion hay than hoạt tính sẽ loại bỏ được hoạt động của promozyyme. Hoạt độ của nó cũng có thể được loại bỏ khi đun nóng dịch tới  $85^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 5 phút hay  $80^{\circ}\text{C}$  trong 40 phút.

- **AMG 300L**

Enzym glucoamylase xúc tác thủy phân dextrin thành đường glucose.

- **Dextrozyyme 75**

Đây là hỗn hợp cân bằng của AMG và promozyyme dùng để sản xuất đường glucose có hàm lượng cao, nhờ tiến hành song song 2 quá trình phân giải nhánh và tạo glucose.

- **BAN 240L**

Chế phẩm chứa chủ yếu enzym  $\alpha$ -amylase được tách chiết từ vi khuẩn. Enzym thường được sử dụng để dịch hoá tinh bột thành các dextrin phân tử lượng thấp ở nhiệt độ  $90^{\circ}\text{C}$ .

- **Sweetzyme 350T**

Chế phẩm chứa chủ yếu enzym glucoizomerase xúc tác chuyển hoá glucose thành fructose. Do đó enzym thường được sử dụng trong công nghiệp sản xuất đường fructose.

#### **6.1.6.2. Công nghiệp sản xuất các loại đường và các loại mật tinh bột**

- **Sản xuất đường glucoza và các loại mật tinh bột**

Khi thủy phân tinh bột bằng enzym của vi sinh vật không xảy ra sự phân huỷ đường bởi axit và bởi nhiệt và không xảy ra sự phân huỷ các tạp chất có lẫn trong tinh bột (protein, cellulose...) làm cho chất lượng của dịch thủy phân tốt hơn. Dễ dàng tinh chế hơn.

Trong những năm gần đây ở nhiều nước trên thế giới người ta đã sử dụng amylase của vi sinh vật với qui mô lớn để sản xuất glucose tinh thể, glucose khan, glucose nước và các loại mật tinh bột khác. Khi đó hiệu suất thu hồi glucose tăng lên nhiều có thể lên tới 106 - 109% so với trọng lượng tinh bột. Hiệu suất chuyển hóa cao (>95%), độ phân cắt chính xác, nâng cao độ tinh khiết của sản phẩm và giảm giá thành sản phẩm một cách đáng kể. Mặt khác, dùng phương pháp enzym tiện lợi trong việc sử dụng các trang thiết bị cho sản xuất, giảm tiền đầu tư thiết bị, do đó cũng giảm được giá thành sản phẩm.

Sử dụng enzym còn cho phép tăng gấp đôi, gấp ba nồng độ tinh bột đem thủy phân (tới nồng độ 30 -40%) và đơn giản hoá quy trình xử lý dịch thủy phân. Ngoài ra cho phép không cần tách tinh bột sơ bộ trước mà có thể chuyển hoá trực tiếp nguyên liệu chứa tinh bột thành glucose.

Thường sử dụng các enzym amylase và glucoamylase để sản xuất mật tinh bột và glucose. Transglucosilase làm giảm hiệu suất thu hồi glucose nên muốn có hiệu suất glucose cao cần phải loại bỏ enzym này khỏi chế phẩm glucoamylase. Trong các chế phẩm amylase cũng không được lẫn protease vì enzym này sẽ làm biến dịch thủy phân tinh bột bởi các sản phẩm thủy phân của protein.

## Ứng dụng các sản phẩm thủy phân

Sản phẩm thủy phân	Lĩnh vực áp dụng chính
Dịch glucose và malto-dextrin	Mứt quả, thức ăn trẻ em, thức ăn kiêng, công nghệ lên men
Dịch thủy phân có DE 97	Công nghệ đường glucose, công nghệ lên men, sorbitol, isoglucose
Glucosa kết tinh nghiệp	Mứt quả, siro và rượu mùi, công nghệ lên men, sorbitol-mannitol, fructose
Siro fructose	Đồ uống, thức ăn nhanh, bánh mì và đồ hộp
Isoglucose	Nước giải khát, nước quả, mứt quả, fructose
Siro maltose	Công nghệ bia, siro, mứt quả

### • Sản xuất đường fructose

Fructose là đường có độ ngọt cao nhất, ngọt gấp 2,5 lần glucose. Để mở rộng khả năng sử dụng các dẫn xuất có vị ngọt từ tinh bột, người ta tìm cách chuyển hoá đường glucose thành fructose. Có thể thực hiện quá trình này bằng phương pháp hoá học, tuy nhiên do thiếu tính đặc hiệu cũng như do thiếu các điều kiện tiến hành phản ứng khắc nghiệt về pH và nhiệt độ, nên một phần sản phẩm tạo thành bị phân huỷ làm cho hiệu suất thu hồi thấp.

Đồng phân hoá bằng phương pháp enzym thường cho ta kết quả khả quan hơn. Khi dịch glucose đưa sang công đoạn đồng phân hoá cần phải tuân thủ một số nguyên tắc sau :

Dịch đường glucose phải được làm sạch để giữ được hoạt lực của enzym (lọc, tẩy bằng than hoạt tính, trao đổi ion).

- Dịch sau khi làm sạch phải có  $[Ca^{+2}] \leq 10^{-6}M$ , vì cation này sẽ làm mất hoạt lực của glucoisomerase.

- Bổ sung  $Mg^{+2}$  vào dịch glucose:  $[Mg^{+2}] \approx 5.10^{-4}M$ , vì cation này có tác dụng làm tăng độ bền của isomerase.

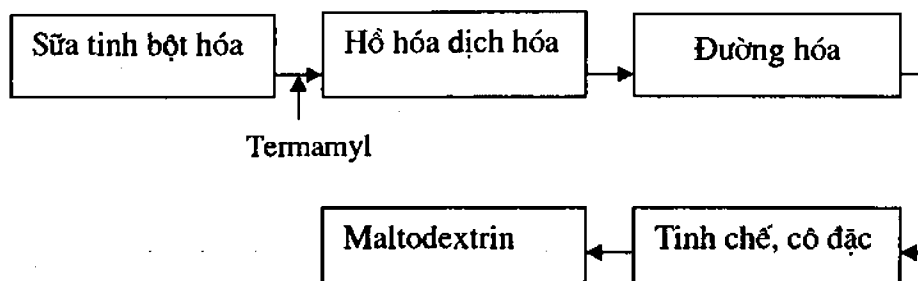
- pH được chỉnh tới pH = 7,5 – 8,2.

- Nhiệt độ thích hợp là 60°C.

- Tách fructose có thể sử dụng phương pháp trao đổi ion  $Ca^{+2}$ .

### 6.1.6.3. Một số công nghệ sản xuất các loại đường từ tinh bột có sử dụng chế phẩm enzym

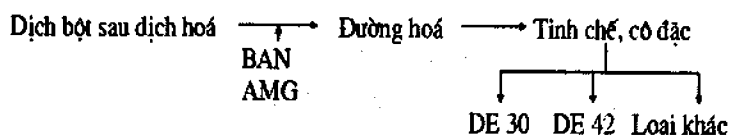
#### SƠ ĐỒ DỊCH HOÁ CAO ÁP KẾT HỢP SỬ DỤNG TERMAMYL



Điều kiện	Hồ hóa	Dịch hóa
Hàm lượng tinh bột (%CK) 30-40% hay 17-22 Bome		
pH loại 120L (loại LS)	6,0-6,5	5,7- 6,2
Nhiệt độ (°C)	105	95
Thời gian giữ	5 phút	1-2 giờ
Hàm lượng Canxi		30-60ppm
Termamyl 120L (kg/t CK)		0,5-0,7
Termamyl LS (kg/t CK)		0,35-0,5
DE cuối cùng đạt được		8-16

#### SƠ ĐỒ ĐƯỜNG HOÁ

- Đường hoá sản xuất maltodextrin; sirô glucose

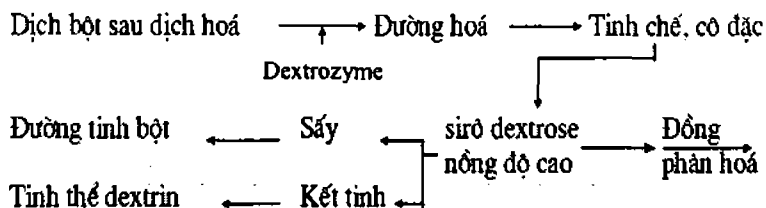


#### Điều kiện

Độ DE của tinh bột dịch hóa	12	20
Nồng độ chất khô (%CK)	35	35
pH	6,0	4,5
Nhiệt độ (°C)	75	58-60
Thời gian đường hóa (giờ)	6	6
BAN 120L (kg/tấn CK)	1,5	
AMG 300L (ml/tấn CK)		150

Độ thủy phân cuối cùng nhận được (DE)	30	42
Glucose (%)	5	18
Maltose (%)	15	14

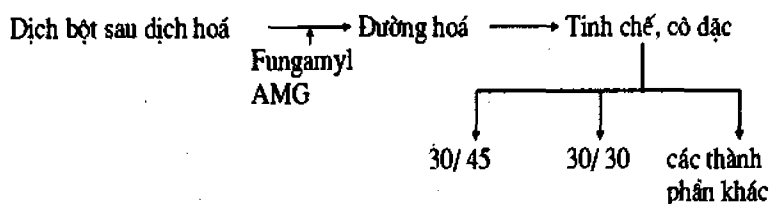
• Đường hoá sản xuất sirô dextrose nồng độ cao



Điều kiện

Độ DE của tinh bột dịch hóa	8-16
Nồng độ chất khô (%CK)	30-35
pH	4,3-4,5
Nhiệt độ (°C)	58-60
Thời gian đường hóa (giờ)	40-70
Dextrozyme 225/75 (l/tấn CK)	0,7-1,1
Độ thủy phân cuối cùng nhận được (DE)	97-98
Dextroza cuối cùng nhận được (%)	95-97

• Đường hoá sản xuất sirô glucose nồng độ cao



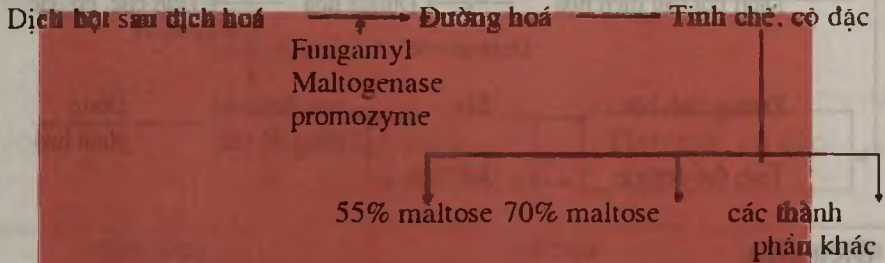
Điều kiện

Độ DE của tinh bột dịch hóa	12	52
Nồng độ chất khô (%CK)	35	45
pH	5,0	5,5
Nhiệt độ (°C)	55	55
Thời gian đường hóa (giờ)	21	21
AMG 300L (ml/tấn CK)	150	
Fungamyl 800L (g/tấn CK)	300	200



Độ thủy phân cuối cùng nhận được (DE)	62	60
Glucose (%)	30	30
Maltose (%)	45	30

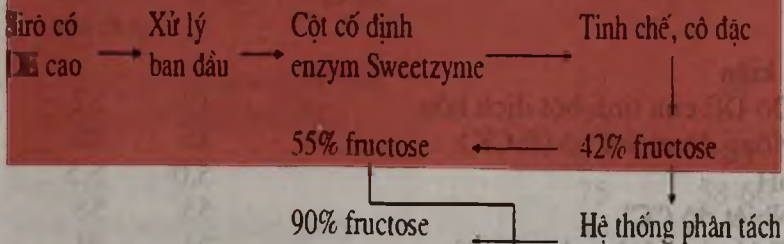
• Đường hoá sản xuất sirô maltose



Điều kiện

Độ DE của tinh bột dịch hóa	12-20	12-20
Nồng độ chất khô (% CK)	35	30
pH	5,5	5,5
Nhiệt độ (°C)	55	55
Thời gian đường hóa (giờ)	42	42
Fungamyl 800L (g/ tấn CK)	300	
Maltogenase 4000L (kg/tấn CK)	2	
Promozyyme 200L (kg/tấn CK)		2
Glucose (%)	4	8
Maltose (%)	55	70
Maltotriose (%)	20	3

**Đồng phân hoá sản xuất đường fructose**  
(theo phương pháp liên tục và cố định enzym)



#### Điều kiện

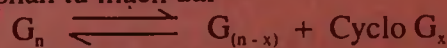
Nồng độ chất khô (%CK)	35-45
Hàm lượng dextrose (%)	94-97
pH (tại 25°C)	7,3-7,5
Nhiệt độ đi vào (°C)	55-60
Nồng độ Mg trong siro (ppm)	40-50
Sweetzyme (kg/tấn CK)	0,09-0,14
Thành phần sản phẩm điển hình	
Fructose (%CK)	42
Dextrose (%CK)	53
Oligosacarit (%CK)	5

#### 6.1.6.4. Một số các sản phẩm khác

Các enzym thuộc nhóm này xúc tác quá trình chuyển một phân tử gọi là chất cho lên một phân tử gọi là chất nhận (transferase). Sự tạo thành cyclodextrin là ví dụ điển hình nhất trong trường hợp của tinh bột.

Các enzym cyclodextrin glucantransferase (CGTase) và cyclodextrin glucosyl-transferase là các enzym có khả năng chuyển hoá các mạch thẳng của tinh bột thành phân tử mạch vòng quen biết dưới tên cyclodextrin. Tác động của enzym này rất phức tạp, bởi vì đường như nó xúc tác ít ra 3 phản ứng với quá trình tạo vòng, nối mạch và thủy phân.

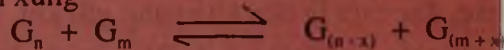
- Tạo vòng từ các phân tử mạch dài



- Nối mạch hay liên kết các oligosacarit



- Tạo sự không cân xứng



Nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của các enzym CGTase nằm trong khoảng 50 - 70°C, pH tối ưu nằm giữa 5,0 - 7,0. Trọng lượng phân tử của enzym dao động từ 67000 đến 88000. pH tối ưu sản xuất ra các cyclodextrin nằm trong khoảng rộng 4,5 - 9,0.

*B. Macerans* sản xuất chủ yếu  $\beta$ -cyclodextrin. Lúc đầu tạo ra  $\beta$ -cyclodextrin, tiếp sau là  $\alpha$ -cyclodextrin và  $\gamma$ -cyclodextrin. Tỷ lệ cuối cùng đạt được 42, 44 và 14 đối với  $\alpha$ ,  $\beta$  và  $\gamma$ -cyclodextrin.

*B. magaterium* sản xuất chủ yếu  $\beta$ -cyclodextrin

Thuỷ phân tinh bột bằng enzym CGTase thường cho ta hỗn hợp  $\alpha$ -,  $\beta$ - và  $\gamma$ -cyclodextrin, cùng với cả maltose và các oligosacarit khác. Nói chung  $\alpha$ -,  $\beta$ -cyclodextrin được tạo thành nhiều nhất.

Sử dụng cyclodextrin cho phép ổn định được sản phẩm, chuyển hoá từ dạng lỏng sang dạng rắn, giảm được bao bì.

- Trong công nghiệp dược dùng cyclodextrin để sản xuất steroid, thuốc làm dịu đau, thuốc chống nhiễm trùng.

- Trong nông nghiệp : các cyclodextrin làm tăng năng suất của ngũ cốc khi mầm được xử lý bằng  $\beta$ -cyclodextrin.

Trong công nghiệp thực phẩm : sử dụng cyclodextrin để sản xuất dầu ăn, mỡ, chất thơm, chất màu....  $\beta$ -cyclodextrin được dùng để loại chất béo của sữa.

## 6.1.7. Công nghiệp sản xuất bánh mì và bánh kẹo

### 6.1.7.1. Công nghiệp sản xuất bánh mì và bánh bisqui

#### A/ Ứng dụng một số chế phẩm amylase

Trong sản xuất bánh mì đường không chỉ có ý nghĩa đối với quá trình lên men, mà còn có vai trò quan trọng trong tạo thành chất mùi và vị của bánh mì.

Một đối tượng khác đóng vai trò rất quan trọng trong công nghệ chuẩn bị bột nhào để sản xuất bánh mì là các chất protein trong bột. Các protein và sự biến đổi do enzym của chúng có tác dụng quyết định đến tính chất vật lý của bột nhào, đặc biệt là đến khả năng giữ khí. Do vậy ảnh hưởng tới độ nở, độ xốp và cấu trúc của ruột bánh. Độ xốp của bánh phụ thuộc vào sự tạo khí  $\text{CO}_2$  trong quá trình lên men bột nhào và khả năng giữ khí này của bột. Cụ thể hơn, độ xốp phụ thuộc vào hàm lượng đường, hoạt động amilaza, hàm lượng và tính chất của gluten trong bột.

Trong bột mì thông thường hàm lượng đường thấp không đủ để nấm men tạo ra độ xốp cho bánh. Vì vậy đã từ lâu người ta quan tâm tới việc cho thêm amilase vào bột nhào.

Các chế phẩm amilase dùng trong công nghiệp bánh mì được sản xuất từ canh trường nấm mốc *A.oryzae*, *A. awamori* hoặc từ vi khuẩn. Trong đó amylase của nấm mốc là tốt hơn cả, do  $\alpha$ -amylase của nấm mốc nhạy cảm với nhiệt hơn amylase của vi khuẩn và malt nên dễ bị vô hoạt khi nâng nhiệt độ lên tới 65 - 80°C. Mặt khác  $\alpha$ -amylase nấm mốc chịu được môi trường axit tốt hơn, phù hợp với điều kiện hoạt động của nấm men trong bột nhào, sau đó vô hoạt ngay trong thời gian nướng bánh, nên có cho dư cũng không sợ tinh bột bị thủy phân quá mức cần thiết. Mặc dù vậy ở nhiều nước amylase của vi khuẩn vẫn được nghiên cứu để giữ cho bánh mì được "tươi" lâu nhờ độ thủy phân sâu sắc của nó. Các chế phẩm enzym thường được sử dụng là :

- **AMG** : enzym làm tăng hàm lượng glucose, tức là tăng khả năng lên men của bột nhào, tăng độ ngọt cho bánh mì và cải thiện màu sắc của vỏ bánh.

- **Fungamyl** : làm nở bánh, cải thiện cấu trúc của ruột bánh.

- **Novamyl** : chống lão hoá tinh bột, giúp lưu trữ bánh lâu hơn với hình dạng như mới.

- **Pentosan** : enzym Pentosanase/ Xylanase giúp tăng cường độ nở, độ ổn định của bột ủ.

### **B/ Ứng dụng một số chế phẩm protease**

Về nguyên tắc chung, hoạt độ của protease nội bào của lúa mì rất thấp nếu không có sự nảy mầm. Do vậy, hoạt động của nó không được chú ý tới trong công nghệ chế biến bột. Ngược lại người ta rất quan tâm tới protease ngoại bào có nguồn gốc vi khuẩn và thực vật. Sử dụng protease trung tính (neutralse) phân giải protein trong bột mì cho phép thay đổi tính chất đàn hồi của gluten, do nó làm mềm dẻo mạng lưới gluten, nhưng thủy phân kéo dài có thể phá huỷ nó. Nhờ những biến đổi của pH trong thời gian sản xuất bánh protease trung tính hay kiềm sẽ hoạt động mạnh hơn vào thời điểm nhào bột và các protease axit vào thời điểm lên men.

Bổ sung đồng thời amylase và protease tạo thuận lợi cho protease hoạt động, bởi vì các tâm hoạt động của enzym trở nên dễ tiếp xúc với tinh bột sau khi thủy phân sơ bộ.

Nói chung với mức độ thủy phân thấp (<10%) người ta nhận thấy sự tăng độ xốp (thể tích lỗ xốp tạo nên). Tuy nhiên nó kéo theo sự giảm lớn của sự ổn định lỗ xốp. Do vậy, cần lựa chọn loại enzym protease và mức độ thủy phân cho thích hợp.

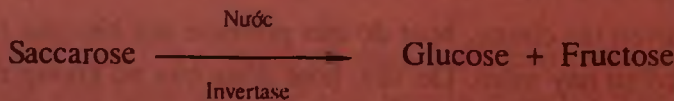
Chất lượng của bánh mì quyết định chủ yếu do hương và vị của bánh. Tạo thành màu của vỏ và chất thơm của bánh mì là do các phản ứng amin. Kết quả là tạo thành các sản phẩm trung gian - furfurool và oxymetilfurfurool, còn từ axit amin - aldehyt tương ứng trong đó ít hơn 1 nguyên tử cacbon so với axit amin ban đầu.

Qua nghiên cứu người ta thấy khi sử dụng chế phẩm enzym, thì lượng đường khử và các dạng nitơ hoà tan tăng lên khá nhiều. Đây là nguồn tạo hành chất màu và chất thơm của bánh mì.

Khi sản xuất bánh mì, thường cho vào bột đầu 0,002% (so với khối lượng bột) chế phẩm sạch cô đặc từ *A Oryzae*. Cho thêm chế phẩm enzym đã làm tăng hàm lượng axetaldehyt trong ruột bánh và trong vỏ bánh.

### 6.1.7.2. Công nghiệp sản xuất kẹo

Enzym đóng vai trò chuyển hoá chính là invertase hay còn gọi là saccarase, enzym này xúc tác thủy phân saccarose thành glucose và fructose. Ngoài ra nó còn có khả năng phân giải một số trisacarit và tetrasacarit khác, chúng tách các phân tử glucose và fructose ở đầu và cuối mạch ra.



Sự thủy phân saccarose với sự có mặt của invertase hình thành glucose mạch vòng và fructose mạch vòng.

Invertase bền trong khoảng pH = 3,5 - 5,5 hoạt động tốt ở pH = 4,5. Nhiệt độ tối thích của enzym này khó xác định vì chế phẩm chưa tinh khiết có tính ổn định cao hơn. Nồng độ đường trong dung dịch ảnh hưởng lớn tới tính ổn định của nó, ở nồng độ đường loãng nhiệt độ thích hợp cho invertase

khoảng 55°C, còn khi nhiệt độ lên tới 65 - 70°C thì nồng độ đường phải cao hơn. Nhiệt độ tối hạn của enzym là 59°C, ở nhiệt độ này enzym sẽ bị phá huỷ nhanh chóng khi nồng độ đường loãng.

Thuỷ phân saccarose đạt tốc độ tối đa khi nồng độ dịch đường 2 - 8%, khi nồng độ dịch đường đạt 70 - 80% thì tốc độ chỉ còn 1/4 tốc độ cực đại ở pH = 4,5.

Invertase của nấm men rất nhạy cảm với ion kim loại như  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ..., đặc biệt là ion  $\text{Ag}^+$ . Nó hoàn toàn mất hoạt lực khi có 7 - 8  $\text{Ag}^+$ /mol invertase, có thể do ion  $\text{Ag}^+$  liên kết với histidin bên trong phân tử enzym, nhưng không liên kết với nhóm -SH.

Invertase rất nhạy cảm với ánh sáng. Khi có sự tham gia của oxy nó dễ dàng bị phá huỷ, ngay cả trong bóng tối dưới tác dụng của tia tử ngoại invertase bị phá huỷ nhanh chóng. Ngoài ra invertase còn bị giảm hoạt lực dưới tác dụng của dòng điện xoay chiều và sóng siêu âm.

## 6.1.8. Ứng dụng enzym trong chế biến quả và rau

### 6.1.8.1. Một số chế phẩm enzym được sử dụng trong chế biến rau và quả

Sử dụng các chế phẩm enzym có thể coi là một trong những phương hướng tiến bộ có triển vọng nhất của sản xuất nước quả và nước uống không cồn. Khi đó cần phải lựa chọn các chế phẩm enzym có chứa một lượng nhất định các phức hợp enzym. Trong nhiều trường hợp cần có các chế phẩm của các enzym riêng rẽ. Ngoài ra, chế phẩm enzym cần phải thoả mãn các yêu cầu công nghệ sản xuất từng loại sản phẩm cụ thể, không những chỉ về dạng phản ứng xúc tác, mà cả điều kiện tác dụng tức là pH, nhiệt độ, độ ổn định và một số yếu tố khác, quyết định hiệu quả tác dụng của chế phẩm trong môi trường đã cho. Với một chế phẩm enzym không nên dùng để chế biến nhiều loại quả khác nhau hoặc dùng chế biến các sản phẩm khác nhau từ các loại quả ấy.

#### • Pectinex Ultra SP-L

Chế phẩm enzyme này được sản xuất từ *A. niger*, ở dạng dung dịch, có màu thâm, mùi thơm nhẹ đặc trưng của sản phẩm lên men, chứa chủ yếu pectinase và có hoạt tính nhất định của hemicellulase. Nó có khả năng phân

huỷ màng tế bào thực vật. Người ta thường sử dụng chế phẩm enzym này để xử lý quả nghiền và ngâm mô tế bào thực vật. Pectin hoà tan và không hoà tan cũng như các polysaccarit làm đục nước quả đều bị phân huỷ.

- **Pectinex 3XL và Pectinex AR**

Chế phẩm enzym được sản xuất từ một chủng chọn lọc của *Aspergillus niger*. Chế phẩm enzym ở dạng dung dịch màu thâm, có mùi thơm nhẹ đặc trưng của sản phẩm lên men chứa chủ yếu pectinase. Nó có khả năng phân huỷ hoàn toàn araban thành arabinose, đồng thời thuỷ phân nhanh và hoàn toàn polyssacarit. Người ta thường sử dụng chế phẩm enzym này để xử lý làm trong nước quả, vì trong nước ép quả cô đặc thường chứa nhiều araban làm vẩn đục.

- **Viscozyme120L**

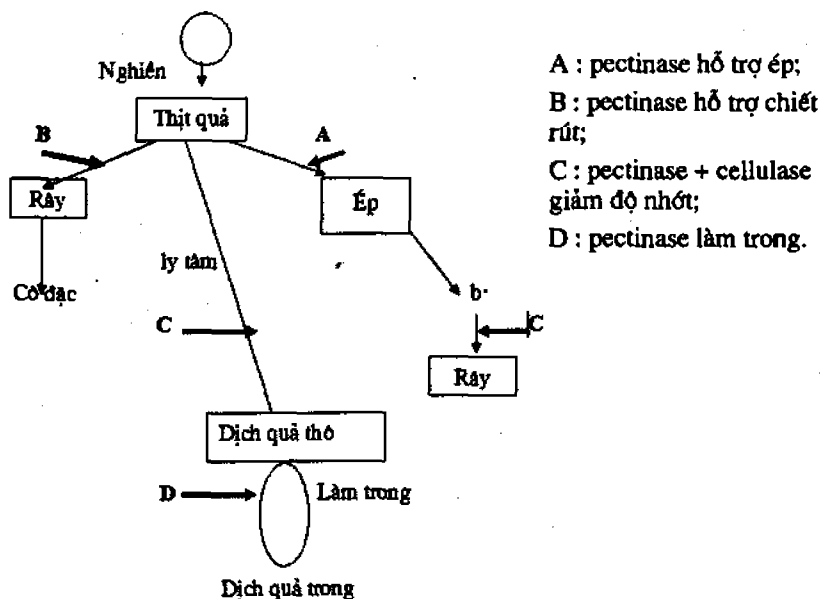
Chế phẩm enzym được sản xuất từ một chủng chọn lọc của *Aspergillus niger*. Chế phẩm enzym ở dạng dung dịch màu nâu, có tỷ trọng  $d = 1,2$  g/ml chứa chủ yếu pectinase và một lượng lớn cacbohydrolase bao gồm arabanase, glucanase, beta-glucanase và hemicellulase. Người ta thường sử dụng chế phẩm enzym này để xử lý phá vỡ màng tế bào đậu tương.

### **6.1.8.2. Ứng dụng các chế phẩm enzym**

- **Ép chiết dịch quả**

Để nhận được dịch quả phải tiến hành nhiều công đoạn : nghiền, ép, ly tâm hay lọc, sau đó tùy theo dạng sản phẩm mong muốn mà tiến hành làm trong, cô đặc và thanh trùng. Nghiền kéo theo hoà tan một phần pectin và thịt quả, môi trường phức tạp mà trong đó pha lỏng rất nhớt. Pha rắn tạo nên một khối nửa dẻo có khả năng giữ nước lớn ngăn cản thoát dịch quả khi ép. Bổ sung enzym pectinolytic vào khối thịt quả nghiền làm tăng hiệu suất thu hồi dịch quả. Thêm vào đó, sự phân huỷ một phần tế bào quả bởi enzym tạo thuận lợi cho việc tách chiết các chất màu, chất thơm và góp phần vào cải thiện chất lượng cảm quan của dịch quả. Dịch quả từ dâu, dâu tây, nho rất giàu pectin, do đó dịch quả rất nhớt và không thể lọc hay ly tâm được với năng suất lớn.

Hiện nay sử dụng enzym hỗ trợ cho quá trình ép ngày càng được mở rộng ra các lĩnh vực sản xuất khác, đặc biệt là chế biến táo. Thực vậy nhu cầu ngày càng tăng về các sản phẩm sản xuất từ táo (nước táo lên men, nước quả táo...) đòi hỏi phải kéo dài thời gian thu hoạch. Mặc dù đã sử dụng các biện pháp bảo quản lạnh nhưng vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu đặt ra. Việc chế biến táo có độ chín cao cần thiết phải được hỗ trợ bằng tác dụng của enzym để tăng hiệu suất thu hồi khi ép. Ngược lại dịch quả thu được sau khi ép chứa nhiều pectin hơn nên đục hơn và đòi hỏi phải có tác dụng hỗ trợ của enzym khác làm tăng độ trong cho sản phẩm thu được.



Hình 6.1. Sử dụng enzym phân huỷ các polysacarit trong chế biến quả và rau.

Bảng 6.4. Tác dụng xử lý thịt quả bằng enzym tới hiệu suất thu hồi dịch quả

Xử lý thịt quả	Táo tươi	Táo được bảo quản lạnh
Không xử lý enzym	80 – 82%	70 – 74%
Xử lý enzym khi nghiền	83 – 85%	81 – 83%
Xử lý enzym dịch hoá	93 – 96%	93 – 95%

Hoạt động chính của enzym giúp quá trình ép là thủy phân các khung xương chính của pectin, tức là endo-polygalacturonase, pectinmetylesterase



và pectinlyase. Mức độ tác dụng của mỗi loại enzym phải được kiểm soát kỹ, vì endo-polygalacturonase, pectinmetylesterase tác dụng đồng thời, trong khi đó dư thừa pectinmetylesterase kìm hãm hoạt động của pectinlyase. Thành phần của các polysaccarit thực vật của tế bào cần thuỷ phân ảnh hưởng trực tiếp tới hiệu suất xử lý enzym. Khả năng phân huỷ của màng tế bào không những phụ thuộc vào loại thực vật mà còn phụ thuộc vào các loại tế bào của cùng một loại thực vật. Các điều kiện bảo quản cũng làm thay đổi ít nhiều tới khả năng phân huỷ của tế bào do nó thay đổi một phần thành phần tế bào.

Tuy nhiên, các chế phẩm enzym pectin bán trên thị trường thường được sản xuất từ *Aspergillus* và nó có những hoạt động của arabinase và galactanase. Do đó, chúng cũng tham gia vào việc tăng hiệu suất thu hồi dịch quả. Điều này cho thấy lợi ích lớn của việc tái tổ hợp gen sinh tổng hợp enzym  $\beta$ -(1-4) galactanase của *Aspergillus aculeatus*, tách dòng và biểu hiện gen ở *Aspergillus oryzae*. Vi sinh vật tái tổ hợp sẽ có thể cho ta chế phẩm enzym giàu hoạt độ galactanase, điều này cải thiện đáng kể quá trình ép.

Liều lượng enzym được sử dụng được tạo lập tùy theo loại quả và điều kiện công nghệ (nhiệt độ, thời gian tác dụng, loại hình ép). Thường chúng được dùng với liều lượng 100 – 150 g/ tấn thịt quả. Thường dịch quả thu được có hàm lượng các chất khô và tro cao hơn, màu đậm hơn và pH thấp hơn mẫu đối chứng (cà rốt, mướp, khoai tây, hành, mơ, dứa, mận).

**Bảng 6.5. Enzym cần bổ sung khi xử lý táo phù hợp với phương pháp công nghệ**

Để pectin hoá/ làm trong	Xử lý enzym khi ép	Xử lý enzym dịch hoá
Pectin lyase	Pectin lyase	Pectin lyase
Pectin esterase	Pectin esterase	Pectin esterase
Polygalacturonase	Polygalacturonase	Polygalacturonase
Arabinase	Arabinase	Arabinase
	Rhamnogalacturonase	Rhamnogalacturonase
	Galactanase	Galactanase
		Xyloglucanase
		Endoglucanase
		Cellulohydrolase
		Glucosidase

Enzym hoá trước khi nghiền cũng làm giảm độ nhớt của dịch quả tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình lọc, điều này cho phép giảm được thời gian lọc cũng như thời gian làm trong dịch quả, chính vì vậy giảm được thời gian cô đặc dịch quả.

- **Ngâm dầm và ổn định nectar**

Nectar là các loại nước uống, mà nước quả nhớt chứa một lượng lớn các chất ở dạng huyền phù. Độ đục này chủ yếu là do các tế bào được chiết ra và các tập hợp tế bào. Sự phân tán tế bào này nhận được do sự phân huỷ pectin có độ metoxy hoá thấp của các lát mỏng trung bình bởi endogalacturonase. Tuỳ theo quả xử lý và đặc biệt đối với cam quýt, nectar tạo ra độ đục nhiều khi rất không ổn định. Tính không ổn định này liên quan trực tiếp tới hàm lượng pectimetylsterase của quả : pectimetylsterase của quả dễ este hoá các pectin hoà tan, nó sẽ phản ứng với canxi của môi trường để tạo nên gel pectatcanxi không hoà tan, làm kết tủa các phần tử gây đục. Chính vì vậy các chế phẩm enzym tạo đục phải không được chứa hoạt độ của enzym pectimetylsterase. Ngược lại, hoạt độ của enzym endopolygalacturonase phải đủ lớn để thuỷ phân các pectin hoà tan được ở dạng oligomer có kích thước phân tử quá nhỏ để tạo nên các gel.

Để tránh tạo thành gel pectat, pectin hoà tan phải có độ metoxy hoá cao. Vấn đề đặt ra là không có một chế phẩm enzym thương mại nào, không có một loại quả nào không chứa pectimetylsterase.

- **Dịch hoá**

Ngược với ngâm dầm, dịch hoá đòi hỏi có sự phân huỷ hoàn toàn của màng tế bào. Sự phá huỷ hoàn toàn màng tế bào đòi hỏi tác dụng đồng thời của các enzym pectinase và cellulase. Tuy nhiên, tỷ lệ hoạt độ của chúng có ảnh hưởng tới hiệu suất dịch hoá và thành phần polysaccharit của dịch quả. Thực vậy, dịch hoá enzym cà rốt tạo ra nhiều pectin hơn và nhớt hơn khi dùng chế phẩm enzym chứa nhiều endoglucanase. Enzym này là điểm mấu chốt cải thiện hiệu suất dịch hoá.

Các enzym pectinesterase, hemicellulase và cellulase lại là những enzym quyết định hiệu quả tác dụng của chế phẩm, vì chúng làm cho độ đồng thể của nước quả có thịt tốt hơn. Trong trường hợp này chế phẩm không được phép có enzym polygalacturonase, đặc biệt là endo-

polygalacturonase, vì chúng làm giảm độ nhớt của dịch quả, gây kết tủa pectin.

Hiệu suất tách chiết tốt nhất làm thay đổi đặc tính cảm quan của sản phẩm. Chính vì vậy, dịch táo nhận được bằng xử lý enzym nhiều khi có hương vị không thích hợp với người tiêu thụ và thường the the hay axit và biểu hiện thiếu hụt về mùi vị. Vị the the liên quan trực tiếp với sự giảm pH của dịch quả do thủy phân pectin.

Những năm gần đây với sự phát triển của công nghệ enzym đã có nhiều chế phẩm enzym hoạt lực cao nên đã giảm được thời gian tác dụng và hoạt động ở khoảng nhiệt độ xác định tạo điều kiện cho các phản ứng mong muốn và kìm hãm các phản ứng có hại khác.

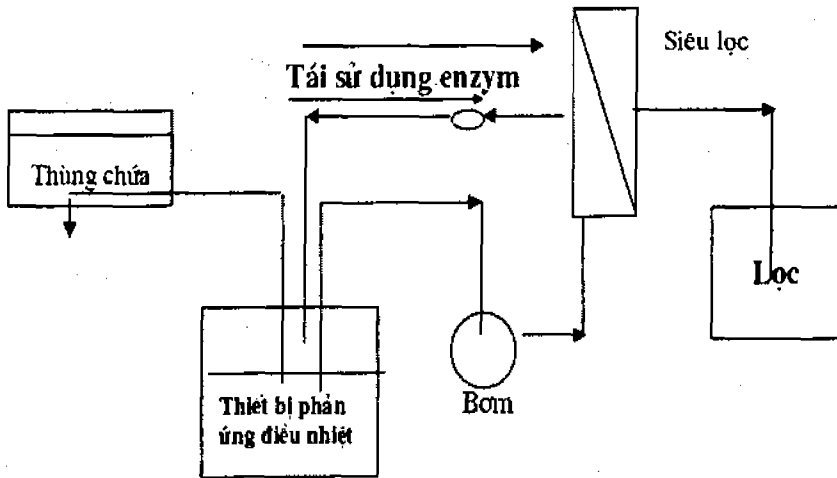
- **Làm trong**

Quá trình ép có được sử dụng hay không chế phẩm enzym, thì dịch quả thu được đầu là dịch quả thô, mà độ nhớt và độ đục của nó rất cao. Làm trong là loại bỏ các phần tử gây đục. Loại bỏ các chất pectin có thể được thực hiện bằng cách kết tủa hay thủy phân. Trường hợp kết tủa, enzym thuần khiết pectimetylsterase được sử dụng kết hợp với việc bổ sung ion canxi kéo theo sự tạo thành các gel pectat canxi, tạo nên cái bẫy để kéo theo các phần tử gây đục. Các gel này co lại và lắng trong dịch quả, hay ngược lại chúng nổi lên bề mặt khi lên men do tác dụng của  $\text{CO}_2$  : đây là trường hợp sản xuất nước quả lên men độ rượu thấp. Làm trong bằng tác dụng kết hợp giữa enzym pectimetylsterase và polygalacturonase. Các phần tử đục được tạo nên từ protein liên kết với các pectin thường có mạch bên giàu arabinan và galactan. Ở pH của dịch quả các protein này tích điện dương và bao quanh nó là các lớp pectin tích điện âm. Phân huỷ pectin sẽ giải phóng ra một phần protein tích điện dương và pectin tích điện âm. Chính vì vậy các phần tử này kết lắng bởi tương tác tĩnh điện với nhau và dịch quả được làm trong.

Hoạt độ của enzym pectimetylsterase thể hiện nhược điểm lớn là giải phóng ra metanol trong dịch quả. Sử dụng enzym pectinlyase để dễ polyme hoá không có để methyl hoá đã được thử nghiệm. Kết quả nhận được đáp ứng yêu cầu trong trường hợp của cam, táo, nhưng chưa làm trong được hoàn toàn trong trường hợp của nho. Sự khác nhau này là do mức độ methyl hoá

thấp của pectin nhỏ. Thực vậy, ái lực của pectinlyase giảm xuống theo mức độ methyl hoá của cơ chất.

Trên khía cạnh công nghệ, làm trong có thể tiến hành gián đoạn hoặc liên tục. Phương pháp liên tục có ưu điểm dung hoà phản ứng enzym liên tục và phân tách đồng thời sản phẩm và enzym mà chúng có thể được tái sử dụng. Mặc dù cải thiện tính chất lọc của dịch quả bằng sử dụng enzym vào các giai đoạn khác nhau của quá trình chế biến thực vật, nhưng phương pháp siêu lọc để phân tách làm cho phương pháp này không có khả năng áp dụng đối với dịch quả nhớt nhất như đào.



Hình 6.3. Sơ đồ của một thiết bị phản ứng liên tục để làm trong (Alkorta et al, 1995).

#### • Ứng dụng của một số enzym khác

Các enzym phân huỷ polysacarit thực vật được sử dụng trong công nghệ sản xuất quả và rau.

Sử dụng quả không đạt độ chín để sản xuất các sản phẩm cô đặc dễ bị đục bởi tinh bột. Chúng có thể được loại ra bằng việc sử dụng amylase.

Các protease đôi khi cũng được bổ sung vào enzym pectiolytic, hoặc để cải thiện hiệu suất ép, hoặc để tránh tạo thành đục protein khi đun nóng, hoặc để tham gia vào cải thiện việc tách chiết chất màu trong sản xuất rượu vang đỏ.

Vị đắng của một số dịch quả, cam và bưởi liên quan tới sự có mặt của naringin (trihydroxyflavanon 7-rhamnoglucosid). Chất này có thể bị thủy phân bởi naringinase giải phóng ra phân ozidic của phân tử và naringenin làm giảm vị đắng.

Cặp gluco-oxydase/ catalase có thể được sử dụng để loại bỏ oxygen và bảo vệ dịch quả khỏi sự oxy hoá.

### **6.1.8.3. Ứng dụng enzym để tăng giá trị của các sản phẩm phụ thực vật**

- **Thức ăn gia súc**

Thức ăn gia cầm được chế biến từ các loại ngũ cốc. Glucan, thành phần của ngũ cốc không tiêu hoá được làm tăng độ nhớt của dịch dạ dày, do đó hạn chế sự hấp thụ lại các chất dinh dưỡng, làm giảm khả năng tiêu hoá của động vật. Bổ sung beta-glucanase vào thức ăn cho phép tăng khả năng hấp thu và chuyển hoá thức ăn của động vật. Sử dụng lúa mì làm thức ăn cho gà cũng bị hạn chế bởi sự có mặt của các polysacarit thực vật : arabinoxylan. Những chất này làm tăng độ nhớt của dịch dạ dày, do đó làm giảm khả năng tiêu hoá tinh bột và protein. Bổ sung xylanase vào thức ăn cho phép tăng năng lượng chuyển hoá.

- **Sản xuất etanol sinh học**

Sản xuất etanol sinh học sử dụng hệ enzym ligno-cellulase ( cellulase, hemicellulase, laccase, lignin-peroxydase, Mn-peroxydase để thủy phân sinh khối lignocellulose (sản phẩm phụ nông sản, rác thải sinh hoạt) tạo glucose cho phản ứng lên men tiếp theo. Các vật liệu này rất bền với tác động thủy phân, do đó cần phải có xử lý hoá học hay vật lý trước giúp enzym tấn công cơ chất dễ dàng hơn. Nhiều phương pháp sản xuất được đặt ra:

- Phương pháp thủy phân và lên men riêng biệt, thực hiện trong 2 giai đoạn khác nhau : dịch hoá enzym, sau đó lên men bởi nấm men.

- Chuyển hoá sinh học trực tiếp : thực hiện toàn bộ chuyển hoá chỉ trong một giai đoạn, mà ở đó vi sinh vật sử dụng có khả năng vừa thủy phân toàn bộ cellulose và lên men các đường tạo thành.

- Đường hoá và lên men đồng thời là con đường hay được sử dụng nhất. Nó cũng diễn ra chỉ trong một giai đoạn với sự có mặt đồng thời của enzym và nấm men chịu trách nhiệm lên men. Cellulase bị kìm hãm bởi

glucose mà nó giải phóng ra, nên sự chuyển hoá nó ngay lập tức sẽ tạo điều kiện nâng cao hiệu suất chuyển hoá.

Cần phải thấy rằng trong thực tế thuỷ phân cellulose thành monome rất khó khăn, trong khi đó lại có rất nhiều vi sinh vật có khả năng chuyển hoá monome này thành etanol. Nhưng các sản phẩm phụ giàu heteroxylan (gỗ, cỏ) rất dễ dàng phân huỷ thành các monome, nhưng lại ít VSV có khả năng lên men rượu từ các pentoza.

## 6.1.9. Enzym trong công nghệ rượu cồn và bia

### 6.1.9.1. Enzym trong công nghệ rượu cồn

#### a) Một số chế phẩm enzym thường được sử dụng

- Termamyl 120L

- Neutrase 0,5L : Chế phẩm enzym chứa chủ yếu protease được sản xuất từ vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Đây là protease kiềm tính, protease kim loại (Zn) được ổn định bằng  $\text{Ca}^{2+}$  và bị ức chế bởi EDTA. Ngoài ra chế phẩm còn chứa một lượng nhỏ  $\beta$ -glucanase.

Điều kiện hoạt động tối ưu cho protease là  $T = 45 - 55^{\circ}\text{C}$  và  $\text{pH} = 5,5 - 7,5$ . Neutrase có thể bị mất hoạt tính bằng xử lý nhiệt  $T = 55^{\circ}\text{C}$  trong thời gian  $\tau = 2$  phút.

- Sansuper 240L: Chế phẩm enzym được sản xuất từ nấm mốc *Asperillus niger*, chứa glucoamylase, ngoài ra còn có  $\alpha$ -amylase, protease. Chế phẩm enzym ở dạng chất lỏng màu nâu,  $d = 1,25\text{g/ml}$ , hoạt tính 240 AGU/ml.

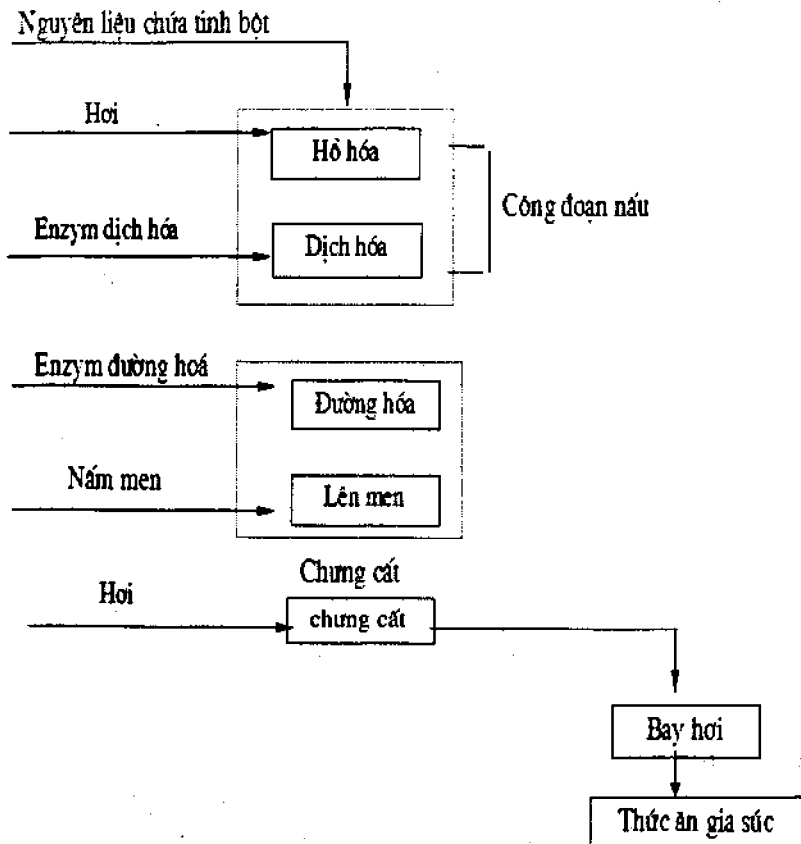
#### b) Ứng dụng một số chế phẩm enzym

Dùng chế phẩm các enzym amylase vi sinh vật cho phép tăng cao nồng độ enzym trong môi trường lên men, do đó cho phép thuỷ phân sâu sắc tinh bột thành đường lên men trong một thời gian ngắn (chỉ cần 30 - 40 phút).

Trong chế phẩm amylase dùng trong công nghệ rượu, ngoài enzym amylase ra còn có các enzym đồng hành khác nữa như protease và các enzym phân huỷ thành tế bào. Như vậy khi dùng chế phẩm enzym amylase không chỉ có tinh bột bị thuỷ phân mà cả thành tế bào nguyên liệu thực vật, màng, vỏ cũng bị thuỷ phân giúp cho tinh bột tiếp xúc với amylase tốt hơn.

Hiệu suất thu hồi rượu tăng lên trung bình là 1,5% nhờ các đường lên men được tạo thêm từ các polysacarit khác (hemicellulose, cellulose). Trong quá trình đường hoá, dịch hoá tinh bột trong công nghiệp rượu cồn, Sansuper thường được sử dụng với quá trình nấu không áp suất. Liều lượng là 1 lít/ tấn tinh bột.

Mặt khác enzym protease có trong các chế phẩm sẽ thuỷ phân protein, polypeptit của nguyên liệu tạo ra các axit amin làm nguồn đạm dinh dưỡng cho nấm men.



**Hình 6.4.** Những công đoạn chính trong sản xuất rượu cồn có sử dụng enzym.

Chế phẩm amylase không những chỉ được dùng trong giai đoạn đường hoá mà còn ở cả giai đoạn hồ hoá nữa. Chế phẩm  $\alpha$ -amylase của vi khuẩn dùng cho giai đoạn này rất thích hợp vì khả năng chịu nhiệt độ cao của enzym. Nhờ sử dụng chế phẩm enzym ở giai đoạn này mà hoạt động của thiết bị dễ dàng hơn (do độ nhớt của dịch bột giảm xuống) chi phí hơi giảm,

hiệu suất rượu tăng, đặc biệt được sử dụng để dịch hoá tinh bột trong phương pháp nấu liên tục. Việc dùng  $\alpha$ -amylase vi khuẩn để dịch hoá dịch bột khi nấu đến 85 - 90°C cho phép có thể hoàn toàn chỉ dùng hơi thứ cấp cho đun nóng sơ bộ và làm dịu chế độ nấu. Điều này làm giảm chi phí hơi trong gia nhiệt và làm giảm tổn thất tinh bột.

Trong quá trình đường hoá, dùng chế phẩm glucoamylase hoạt động mạnh, giảm thời gian lên men từ 73 giờ xuống 48 giờ, thậm chí 36 giờ, tăng năng suất phân xưởng lên men từ 1,5 đến 2 lần.

Tóm lại, áp dụng enzym trong sản xuất rượu cần từ ngũ cốc có nhiều ưu điểm như : nâng cao hiệu suất thu hồi cồn. Nấu nguyên liệu ngũ cốc bột tại nhiệt độ thấp. Không sử dụng axit (không làm hư thùng nấu), không gây nguy hiểm cho người phụ trách công đoạn nấu. Thiết bị nấu đơn giản.

### 6.1.9.2. Enzym trong công nghệ bia

Trong sản xuất bia có thể dùng chế phẩm enzym amylase vi sinh vật ở các công đoạn khác nhau nhằm thay thế một phần hay thậm chí hoàn toàn malt bằng các nguyên liệu không nảy mầm khi dùng các chế phẩm enzym của nấm mốc và vi khuẩn. Nguyên liệu không nảy mầm thường dùng là ngô, gạo, lúa mì, tiểu mạch.

**Bảng 6.6. Các enzym sử dụng trong sản xuất bia (Slaughter, 1994)**

Enzym	Chức năng	Áp dụng
$\alpha$ -amylase	Thuỷ phân tinh bột tới glucose và oligosacarit	Sử dụng khi malt chất lượng kém, hoặc sử dụng nguyên liệu thay thế không nảy mầm
$\beta$ -glucanase	Thuỷ phân một phần các phân tử trọng lượng cao $\beta$ -glucan	Làm lỏng bổ sung Lọc dịch đường
Protease	Thuỷ phân các liên kết peptit	Tăng khả năng lên men Tăng khả năng bọt của bia
Amyloglucosidase	Thuỷ phân hoàn toàn tinh bột và dextrin tới glucose	Sản xuất bia nhẹ độ
$\alpha$ -axetolactat decacboxylase	Để cacboxyl hoá $\alpha$ -axetolactat tới exetoin	Quá trình ủ bia



Sử dụng chế phẩm enzym để nâng cao hiệu suất thu hồi sản phẩm, sử dụng nguyên liệu thay thế, tăng khả năng lọc dịch đường, tăng độ hoà tan của các hợp chất nitơ, tăng khả năng giữ bọt và độ bền vững của bia.

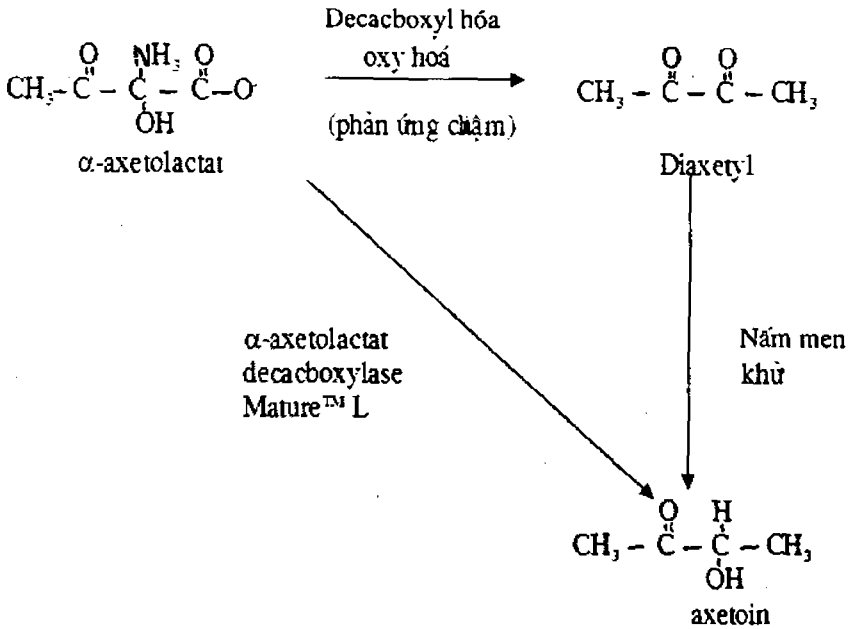
**Bảng 6.7. Các chế phẩm  $\alpha$ -amylase vi sinh vật dùng trong sản xuất bia**

Nguồn chế phẩm	Sản phẩm phản ứng	Nhiệt độ (°C)	pH	Ca <sup>++</sup> (ppm)	Áp dụng
Fungamyl asp. oryzae	chủ yếu là maltose	55-60	4,5-6	50	Nâng cao khả năng lên men
Ceremix 2X L B. amyloliquefaciens	dextrin hoà tan, olygosacarit	60-80	5-7	250-500	Tăng khả năng lọc dịch đường
Termamyl loại L B. Licheniformis	dextrin hoà tan, olygosacarit	85-100	6-7	50-150	Làm loãng dịch hồ hoá

**Bảng 6.8. Các chế phẩm enzym  $\beta$ -glucanase sử dụng trong sản xuất bia**

Nguồn chế phẩm	Sản phẩm phản ứng	Nhiệt độ (°C)	pH	Tâm hoạt động
Cereflo 200L B. amyloliquefaciens	Olygosacarit không lên men được	50-60	6-7,5	$\alpha$ -Amylase
Finizym 200L A. niger	Glucose, cellobiose, olygosaccarit	< 60	4-4,5	Cellulase

Các chế phẩm enzym amylase, glucanase và protease đã được sử dụng trong công nghệ sản xuất bia từ rất lâu, nhưng từ 5 năm trở lại đây một chế phẩm enzym mới được đưa vào sử dụng ngày càng nhiều, đó là chế phẩm Maturex. Maturex chứa chủ yếu là enzym  $\alpha$ -axetolactat decacboxylase xúc tác quá trình decacboxyl hoá  $\alpha$ -axetolactat tới axetoin. Chế phẩm enzym được sản xuất từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Enterobacter aerogenese*. Nó được sử dụng trong quá trình lên men để ngăn chặn sự tạo thành diaxetyl, do đó giảm lượng diaxetyl được tạo thành, rút ngắn được thời gian cần thiết để ủ bia.



**Hình 6.5. Chuyển hoá diacetyl.**

## 6.2. ỨNG DỤNG ENZYM TRONG MỘT SỐ NGÀNH CÔNG NGHIỆP KHÁC

### 6.2.1. Công nghiệp dệt, nhuộm

Trong công nghiệp dệt, việc sử dụng enzym đã được áp dụng từ những năm 50 của thế kỷ này. Trong kỹ thuật dệt vải, để làm tăng độ bền đối với các tác động kéo và mài mòn, các sợi vải thường được hồ hoá trước với các chất cao phân tử có khả năng kết dính với cellulose. Các chất kết dính thường được dùng là tinh bột, gelatin, cacboxylmetyl cellulose hoặc rượu polyvinyl. Trong đó tinh bột dưới dạng tự nhiên hoặc biến tính là chất kết dính được dùng nhiều và phổ biến hơn cả.

Tuy nhiên trước khi tẩy trắng và nhuộm, vải mộc phải được loại bỏ các chất kết dính nhưng yêu cầu không xâm hại đến các sợi vải. Với các sợi vải được hồ hoá bằng tinh bột, trước kia nguồn enzym từ nước chiết malt đại mạch hoặc pancrease được sử dụng để rũ hồ, tuy nhiên hai loại enzym này thường kém bền với nhiệt. Năm 1917, Boidin và Effront sử dụng amylase của *Bacillus subtilis* để rũ hồ ở nhiệt độ 80-90°C trong thời gian từ 5 đến 15 phút, rút ngắn được thời gian rũ hồ vải so với phương pháp truyền thống. Từ

đó đến nay,  $\alpha$ -amylase từ vi khuẩn đóng một vai trò quan trọng trong công nghiệp dệt. Enzym chịu nhiệt từ *Bacillus licheniformis* được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực này có tên thương mại là termamyl, chế phẩm ở dạng lỏng, chịu được nhiệt độ cao, là một endo-amylase có tác dụng thủy phân liên kết  $\alpha$  1-4 glucosit của tinh bột tạo ra các sản phẩm dextrin và oligosacarit tan trong nước. Trên thị trường hiện nay cũng xuất hiện một số chế phẩm  $\alpha$ -amylase dạng lỏng từ *Bacillus subtilis* với tên là Tinozym L40 hoặc Tinozym ADC có phổ pH hoạt động rộng từ 5-9,5 và chịu được nhiệt độ cao tới 95°C đến 120°C tương ứng với lượng dùng trung bình từ 2-4 ml/kg, xử lý trong thời gian từ 1-2 giờ tùy từng quá trình.

Với những loại sợi được hồ hoá bằng gelatin (thường là những loại sợi nhân tạo như acetat, rayonne, visco...) người ta thường sử dụng các protease trung tính từ *Bacillus subtilis* hoặc từ protease kiềm tính từ *Bacillus licheniformis*.

Protease trung tính từ *Bacillus subtilis* cũng được ứng dụng trong sản xuất tơ tằm làm tăng hiệu suất kéo kén đồng thời làm cho sợi tơ mềm mại và bóng mượt hơn. Sợi tơ tằm gồm hai sợi fibroin sơ cấp dính lại với nhau nhờ lớp vỏ bằng xerixin. Lượng cerixin chiếm khoảng 30% sợi tơ và được tách ra bằng cách nấu với dung dịch xà phòng trong khoảng từ 1,5 đến 2 giờ. Chỉ sau khi có sự gia công này tơ mới được kéo chỉ. Một lượng nhỏ cerixin nằm lại trên lụa sẽ làm giảm độ đàn hồi của lụa, làm cho lụa bắt màu không đồng đều và gây khó cho khâu trang trí lụa sau này. Lượng cerixin còn lại sau khâu nấu thường được tách ra bởi các chế phẩm protease.

Để nhuộm được vải, sợi bông và sợi pha (polyeste/bông, polyeste/visco) cần tiến hành xử lý trước, trong đó nấu là một công đoạn quan trọng nhằm loại bỏ các thành phần không phải cellulose ra ngoài như pectin, protein, các chất sáp, dầu máy... Sợi và vải sau khi nấu có độ ngấm thấu cao, có khả năng hút nước nhanh đảm bảo nhuộm đạt chất lượng tốt. Với công nghệ truyền thống thường sử dụng các chất như xút (NaOH), cacbonatnatri ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), thêm một số chất trợ khác như chất ngấm thấu, khuếch tán, nhũ hoá, càn hoá để nấu trong điều kiện nhiệt độ cao (100 °C) sẽ loại bỏ được hoàn toàn các tạp chất không mong muốn. Tuy nhiên với cách xử lý này sẽ sản sinh ra oxycellulose làm giảm cường lực của sợi vải hơn nữa nước thải sau khi nấu có các chỉ số COD, BOD khá cao.

Nhiều công trình nghiên cứu đã cho thấy việc xử lý trước sợi và vải bằng enzym có tính kỹ thuật khả thi hơn hẳn. Các enzym có thể được sử dụng như glucanase, pectinase, esterase, protease, trong đó pectinase là enzym quan trọng nhất trong quá trình nấu. Pectin nằm ở bên ngoài của xơ bông, nó là một chất keo chứa các axit poligalacturonic và thường được chuyển sang các dạng muối canxi, magie, sắt và cả nhôm trong quá trình phát triển của xơ bông. Các muối pectin không tan trong nước này kết dính với sáp và protein tạo ra “tấm chắn” bảo vệ xơ trong quá trình trưởng thành. Thủy phân pectin bằng các pectinase, biến các muối không tan thành các sản phẩm hòa tan trong nước, như vậy phá vỡ có hiệu quả “tấm chắn”, đạt được mức độ hút nước cao mà không có hiệu ứng phụ bất lợi phân giải cellulose. Hiện nay trên thị trường đã có bán loại enzym kiềm tính với tên thương mại là BioPrep 3000L (Novozymes AS, Đan mạch) và Baysalex VP-SP 20022 (Bayer, Đức).

Bảng 6.9 cho kết quả so sánh xử lý vải dệt kim bông trước nhuộm giữa công nghệ nấu truyền thống bằng xút với công nghệ nấu bằng pectinase kiềm BioPrep 3000L. Kết quả cho thấy xử lý bằng enzym có nhiều ưu điểm hơn so với xút, vừa đảm bảo chất lượng vải, vừa tiết kiệm được năng lượng và nước.

**Bảng 6.9. So sánh xử lý vải dệt kim bông trước nhuộm bằng enzym và bằng xút**

Các chỉ tiêu	Xử lý bằng pectinaza	Xử lý bằng xút
PH	8-9	13-14
Nhiệt độ	60°C	95-100 °C
Tổn thất trọng lượng	<3%	5-10%
Độ ngấm thấu (phép thử nhỏ giọt)	< 1 giây	< 1 giây
Độ bền đột phá (% so với ban đầu)	95-100	90-97
Độ cứng sờ tay	Mềm	Cứng
Tiêu thụ nước giặt	40-50%	100%
BOD	33-45%	100%
COD	36-45%	100%

*Nguồn: (Đặng Trán Phòng-2002)*

Ngoài pectinase, hiện nay một số enzym cũng được sử dụng trong một số khâu khác của quá trình nhuộm như catalase (Tinozym 7678- CL heonc) để loại các gốc peroxit sau quá trình tẩy trắng sợi vải nhằm tăng hiệu suất bắt màu.

### 6.2.2. Công nghiệp sản xuất giấy và bột giấy

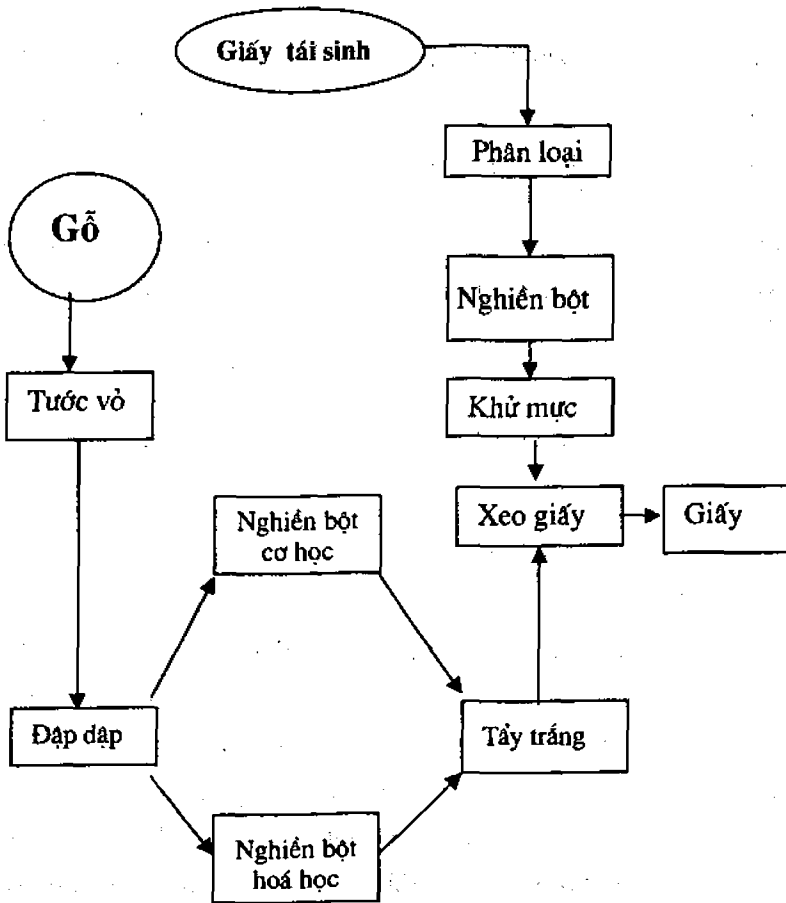
Trong những năm gần đây số lượng những ứng dụng enzym trong công nghiệp sản xuất bột giấy và giấy đã tăng lên đáng kể. Các quá trình chính trong ngành công nghiệp này là nghiền bột, tẩy trắng và xeo giấy. Với quá trình sản xuất giấy tái sinh thì việc phân loại, làm sạch và khử mực cho giấy tái chế cũng chiếm một phần quan trọng trong quá trình sản xuất (hình 6.6).

**Bảng 6.10. Vai trò tác động của enzym lên một số thành phần của gỗ**

Thành phần	Enzym	Thay đổi hoá lý	Lợi ích kỹ thuật
Cellulose	Cellobiohydrolase (CBH) Endoglucanase (EG) Hỗn hợp CBH và EG	Làm nhỏ sợi Khử tính trùng hợp Khử tính trùng hợp	Tiết kiệm năng lượng trong quá trình lọc bột giấy. Đa dạng sản phẩm. Loại mực
Xylan	Endo xylanase	Khử tính trùng hợp	Tách chiết lignin
Glucomanan	Endomannanase Axetyl glucomanan - esterase	Khử tính trùng hợp. Độ bền kết tụ giảm. Khả năng hoà tan giảm	Tách chiết lignin Tăng hiệu xuất nghiền bột và các thuộc tính bền
Pectin	polygalacturonase	Khử tính trùng hợp	Tiết kiệm năng lượng trong công đoạn tước vỏ. Giảm lượng cation yêu cầu trong sản xuất.
Lignin	Laccase Mn-peroxydase	Khử tính trùng hợp Trùng hợp hoá	Tăng độ sáng màu Trùng hợp lignin
Các chất khác	lipase	Tăng tính háo nước	Cải thiện thuộc tính bền. Tăng độ kéo của giấy.

Trong quá trình nghiền bột các sợi gỗ được tách riêng khỏi nhau bằng quá trình cơ học hoặc hoá học để chuyển thành bột giấy chứa các sợi và các bột mịn. Khi nghiền hoá học thì phần lớn lignin trong sợi và một phần hemicellulose được hoà tan và loại bỏ. Quá trình tẩy trắng nhằm mục đích khử hoặc làm sáng màu các cấu tử mang màu có nguồn gốc chính từ lignin còn tồn đọng trong bột giấy sau khi nấu. Trong quá trình xeo giấy, bột giấy được chuyển thành giấy với sự thêm vào của một số chất hoá học, các chất phụ gia.

Vì quá trình sản xuất giấy là một phức hợp các phản ứng hoá học nên ngày nay một số lớn enzym có thể được sử dụng để cải tiến các quá trình truyền thống nhằm nhiều mục đích khác nhau. Bảng 6.10 tóm tắt một số enzym được sử dụng trong quá trình sản xuất giấy.



**Hình 6.6.** Các công đoạn chính trong quá trình sản xuất giấy.

Enzym cellobiohydrolase được bổ sung vào công đoạn nghiền bột giấy sẽ làm thay đổi nhẹ cấu hình của sợi cellulose tăng khả năng nghiền và tiết kiệm khoảng 20% năng lượng cho quá trình nghiền bột giấy cơ học. Trong quá trình nghiền bột hoá học, nếu gỗ được xử lý trước với một số enzym như hemicellulase, pectinase và cellulase làm cho lớp vỏ ngoài của gỗ bị phá vỡ tăng khả năng khuếch tán các hoá chất vào phía trong gỗ, tăng hiệu quả khử lignin.

Trong quá trình tẩy trắng, enzym có thể được sử dụng để nâng cao hiệu suất của quá trình. Trong phương pháp gián tiếp quá trình tẩy trắng bột giấy được cải thiện thông qua hoạt động của xylanase hoặc mannanase nhằm loại bỏ lignin còn trong phương pháp trực tiếp sử dụng hệ thống “laccase-chất trung gian” để phân huỷ lignin (bảng 6.11).

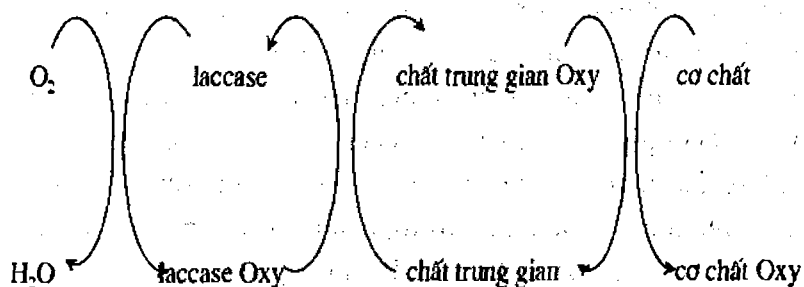
**Bảng 6.11. Các enzym dùng trong quá trình tẩy trắng bột giấy hoá học**

Enzym	Cơ chế	Lợi ích và hạn chế
Xylanase	Phân huỷ xylan và phức hợp lignin-hydratcacbon	Tiết kiệm 10-20% hoá chất Tăng độ sáng
Mannanase	Phân huỷ glucomannan	Lợi ích phụ thuộc vào loại bột giấy
Laccase (kết hợp với các chất trung gian)	Phân huỷ lignin	Thay thế hoàn toàn các hoá chất clo Có tính đặc hiệu Khả năng quay vòng còn hạn chế và giá của các chất trung gian còn cao
Mn- peroxydase (với các chất phụ trợ)	Phân huỷ lignin	Hiệu quả cao Giá của enzym và các chất phụ trợ cao
Lignin- peroxydase (với chất phụ trợ)	Phân huỷ lignin	Hiệu quả cao Giá cả còn cao

Xylanase thủy phân một phần xylan hoặc loại bỏ xylan khỏi phức hợp lignin-hydratcacbon, cả hai cơ chế này đều làm tăng khả năng tách lignin khỏi lớp thành ngoài của sợi gỗ. Các kết quả thử nghiệm cho thấy xylanase có khả năng tác động lên mọi loại sợi và chúng không phụ thuộc vào nguồn gốc của enzym từ nấm mốc hay vi khuẩn. Gần đây khoảng 20 nhà máy giấy và bột giấy ở miền nam nước Mỹ đã sử dụng enzym này trong công đoạn tẩy trắng bột giấy và so với công nghệ truyền thống đã làm giảm được lượng hoá

chất sử dụng (khoảng 25% lượng clo và 15% lượng axit hexenuronic), cải thiện được độ trắng, duy trì tính bền của sợi và giá thành sản phẩm giảm. Chế phẩm xylanase bền nhiệt dùng cho tẩy trắng bột giấy đã xuất hiện trên thị trường từ năm 1995 và khoảng vài năm trở lại đây một số chế phẩm mới có khả năng chịu được cả nhiệt độ và pH cao (90°C và pH 10) đã được đưa ra thị trường. Giá trung bình tính cho xylanase là nhỏ hơn 2 USD cho 1 tấn bột giấy (1999).

Laccase thuộc nhóm enzym phenoloxylase cũng mới được nghiên cứu ứng dụng cho quá trình tẩy trắng bột giấy. Laccase cùng với một số chất khác tạo thành một chuỗi oxyhoá khử để oxy hoá hoàn toàn một số cơ chất như polyphenol, amin thơm, lignin... đến  $O_2$  và nước. Quá trình này được sơ đồ hoá như sau:



Nguồn thu laccase chủ yếu từ nấm mốc, một số thực vật và côn trùng cũng có chứa enzym này, ở vi khuẩn mới chỉ phát hiện được ở một vài loài. Các chất trung gian tham gia vào chuỗi vận chuyển điện tử trên là 2,2'-azino-bis(3 ethylbenzothiazolone-6-sulfonic axit) di amonium (ABTS), 1-hydroxy benzotriazole (HBT), hoặc một số chất chứa nhóm chức N-OH có khả năng khử nhanh lignin nhưng không gây biến động tới cấu trúc của cellulose mới được công bố như axit violuric (VIO), N-hydroxy-N-phenylacetamide (NHA).

So với công nghệ tẩy trắng bằng oxy và ozon truyền thống, bột gỗ được xử lý bằng hệ thống laccase có cùng độ trắng nhưng độ nhớt và hiệu suất đạt cao hơn (bảng 6.12).



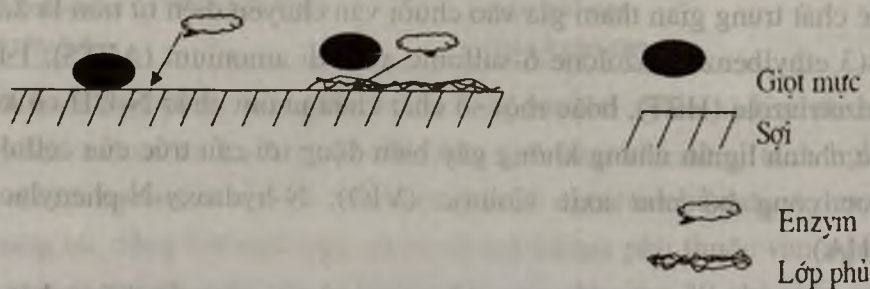
**Bảng 6.12. So sánh hiệu quả của hai công đoạn tẩy trắng bột gỗ thông Kraft ( $\kappa = 24,7$ ) bằng hệ laccase và bằng oxy hoặc azon**

Quá trình xử lý*	Độ trắng (%)	Chỉ số kappa	Độ nhớt (mg/g)	Hiệu suất (%)
OQPZ/QP	84,1	2,5	720	42,0
LQPZ/QP	83,2	2,4	730	42,6
OOQZP	85,6	2,3	670	42,1
OOLQP	87,6	3,0	790	42,9

\* O: oxy; Q: chất càn hoá; P: peroxyt; Z: ozon; L: hệ thống laccase.

Trong công nghiệp giấy,  $\alpha$ -amylase từ vi khuẩn cũng được sử dụng phổ biến với mục đích dịch hoá hồ tinh bột ở nồng độ cao để thu được keo hồ có độ nhớt cần thiết dùng trong sản xuất các loại giấy tốt.

Trong nhiều năm qua việc sử dụng các sợi tái chế từ các loại giấy thải loại để sản xuất bột giấy và xeo giấy đã tăng lên đáng kể. Các loại giấy báo cũ trước khi dùng để sản xuất giấy in, giấy viết cần phải được tẩy mực. Trong công nghệ tẩy mực truyền thống phải bổ sung các tác nhân kiềm và hoá chất tẩy ở công đoạn nghiền bột. Gần đây phức hợp enzym cellulase và hemicellulase đã được đưa ra ứng dụng và là một trong những ứng dụng công nghệ sinh học hứa hẹn nhất trong ngành công nghiệp giấy và bột giấy. Cơ chế khử mực bằng enzym dựa trên hai hướng chính: thứ nhất là mực được tách khỏi bề mặt sợi bởi các enzym thuỷ phân hydratcacbon như cellulase, hemicellulase hoặc pectinase, thứ hai là enzym thuỷ phân các chất mang mực hoặc lớp phủ bề mặt giấy như dầu đậu tương, lignin, tinh bột (hình 6.7).



**Hình 6.7. Cơ chế khử mực bởi enzym.**

### 6.2.3. Công nghiệp thuộc da

Trong công nghiệp thuộc da có hai quá trình sử dụng enzym là tách lông và làm mềm da. Thông thường da tươi nhập về được rửa sạch sau đó được bảo quản bằng muối NaCl với tỷ lệ 300kg muối/tấn da sống. Trước khi thuộc, da được rửa, hồi tươi khoảng 12 giờ tùy theo nhiệt độ môi trường để da lấy lại lượng nước đã mất do bảo quản. Sau công đoạn này da được tẩy lông, ngâm vôi chứa sulfua natri ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) để làm lỏng chân lông hoặc hoà tan chúng thành dạng nhão và mở cấu trúc sợi của da. Hình 6.8 minh họa sơ đồ lát cắt ngang của da và sợi lông.



Hình 6.8. Sơ đồ lát cắt ngang của da và sợi lông.

Thành phần chính của da là collagen và được xếp vào nhóm các protein cứng dạng sợi, hoàn toàn không tan trong nước, trong dung môi, trong dung dịch muối trung tính, trong các pH khác nhau kiềm cũng như axit và tương đối trơ về mặt hoá học. Dưới tác dụng của các enzym như collagenase, trypsin, chymotrypsin và cacboxypeptidase các chất nhờn bị tách ra và một số liên kết trong sợi collagen bị phá huỷ. Kết quả lông được tách khỏi da và da thu được có độ mềm nhất định.

Khả năng dùng protease để khử lông của da thú đã được biết đến từ đầu thế kỷ với việc lợi dụng hoạt động của các vi khuẩn gây thối rữa trộn trong nước bột mì phết trên da chúng sẽ làm rã các protein của lớp bao phủ da. Tiếp đến là các chế phẩm enzym thu được từ đường tiêu hoá của động vật (trypsin tuyến tụy hoạt động thích hợp ở pH 7-9) được sử dụng để làm mềm và khử các vết sứt trên da sau khi xử lý bằng vôi. Hiện nay các chế phẩm protease từ vi khuẩn, nấm mốc đã được sử dụng để thay thế cho enzym tuyến tụy. Các chế phẩm enzym này thường được sử dụng dưới dạng chế phẩm thô (nước chiết canh trường nuôi cấy) chứ không cần đòi hỏi phải tinh chế cẩn thận. Da thú thường được xử lý ở 30-35°C bằng protease từ *B.licheniformis* với sự bổ sung sulfite ở các giá trị pH kiềm trung bình rồi sau đó mới xử lý bằng kiềm. Hiện nay với sự phát hiện các loại protease kiềm cao trong *Bacillus* đã cho phép đẩy nhanh quá trình này. Quá trình bao gồm việc xử lý da thú bằng dung dịch chứa 8% vôi và 1% enzym khử lông, trong thời gian 18-24 giờ ở 20-30 °C và pH 12-12,5. Với quy trình xử lý này các sắc tố của da bị phá huỷ, diện tích bề mặt của da tăng lên, da trở nên mềm hơn, thời gian ngâm vôi thuộc da rút ngắn hoặc được loại bỏ, hàm lượng  $\text{Na}_2\text{S}$  sử dụng cũng giảm. Hiện tại hãng Novo thường xuyên cung cấp hai chế phẩm NU.E0 6MPX và Aquaderm dùng cho công nghiệp da.

Mục đích của công đoạn thuộc da là làm cho da mềm và đàn hồi, có khả năng ngấm thấu sâu các chất thuộc vào da để da không bị phân huỷ hay thối rữa trong điều kiện môi trường bình thường hay nóng ẩm. Trước đây da thường được làm mềm bằng vỏ cây hay bằng chất "pommet" chứa các enzym và vi khuẩn lấy từ ống thực quản của chim hay chó. Ngày nay để làm mềm da người ta thường sử dụng các protease thu được từ một số chủng nấm mốc và vi khuẩn như *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Bacillus subtilis*, *B.licheniformis* *Atinomyces fradiae*, *Streptomyces rimosus*. Hình 6.9 minh họa một mẫu da trâu trước và sau khi xử lý bằng chế phẩm protease kiềm từ *B.brevis* B1.



Mẫu da trâu trước khi xử lý



Da trâu sau công đoạn rũ lông



Da trâu sau công đoạn làm mềm

**Hình 6.9. Mẫu da trâu được xử lý bằng protease kiềm từ *B.brevis* B1 (Nguyễn Liêu Ba-2001).**

#### 6.2.4. Công nghiệp sản xuất bột giặt và các chất tẩy rửa

Theo các số liệu thống kê, ngành công nghiệp này sử dụng một lượng enzym lớn nhất so với các ngành công nghiệp khác (45%), chiếm khoảng 30% lợi nhuận thu được từ các enzym bán trên thị trường. Với các chất tẩy rửa thông thường không thể tẩy sạch một số các vết bẩn có nguồn gốc protein đôi khi còn làm chúng bám chặt thêm vào quần áo. Nhưng khi protease kiềm tính được thêm vào các chất tẩy rửa thì chúng có khả năng làm sạch một cách có hiệu quả các vết bẩn trên vì protease thủy phân protein thành các dạng hoà tan. Hiện nay khoảng 80-85% các loại bột giặt trên thị trường có chứa enzym trong đó chủ yếu là các protease và một số enzym khác như lipase, cellulase, amylase, oxydoreductase để tăng tốc độ và hiệu quả cho quá trình tẩy rửa.

Năm 1971, doanh số của thị trường thế giới về protease đã giảm từ 150 triệu USD xuống chỉ còn 1/3 do nhiều người bị dị ứng khi sử dụng bột giặt chứa protease. Đến khi kỹ thuật bao gói vi thể ra đời thị trường enzym trong ngành công nghiệp bột giặt mới phát triển trở lại. Mặc dù tỷ lệ protease bổ

sung vào bột giặt không cao (1g chế phẩm/kg) nhưng hàng năm lượng enzym sử dụng cho ngành công nghiệp này cũng lên tới 50-60 ngàn tấn.

Các chế phẩm enzym có thể thu nhận từ nhiều nguồn, nhiều chủng và nhiều cách khác nhau nhưng để có thể ứng dụng một cách có hiệu quả trong quá trình tẩy rửa, chúng đều phải mang một số thuộc tính chung sau:

- Bền vững trong quá trình bảo quản bột giặt và thể hiện hoạt tính xúc tác trong các dung dịch tẩy rửa thường có độ pH khá cao (9-10) và sự có mặt của một số chất tạo phức, chất hoạt động bề mặt, các tác nhân nội liên kết như photphat, EDTA...

- Có tính bền nhiệt cao phù hợp với các chế độ nhiệt của quá trình giặt.
- Có tính đặc hiệu rộng đảm bảo thủy phân được nhiều loại protein.
- Tồn tại trong bột giặt dưới dạng không bốc bụi, giảm khả năng dị ứng cho người sử dụng.

Yêu cầu đối với độ bền nhiệt cho các chế phẩm protease ở các nước châu Âu và ở Mỹ là khác nhau. Ở châu Âu, trong quá trình giặt tốc độ tăng nhiệt độ từ nhiệt độ phòng lên đến 100°C là gần 2 °C /phút do vậy đòi hỏi enzym phải làm việc có hiệu quả trong vòng 15-20 phút đầu trước khi nhiệt độ đạt tới 60°C, trên khoảng nhiệt độ này enzym bị mất hoạt tính nhanh chóng. Còn ở Mỹ tiêu chuẩn nhiệt độ cho các protease hoạt động chỉ nằm trong khoảng 45-55°C trong thời gian từ 10-15 phút đầu của quá trình giặt. Tuy nhiên, các nhà sản xuất đều khuyến cáo nên ngâm quần áo trước khi giặt sẽ nâng cao đáng kể khả năng tẩy bỏ các chất bẩn (Novoenzym).

Để có thể hoạt động trong môi trường pH cao, protease kiềm tính là thích hợp hơn cả so với các loại protease khác, chúng thường được thu từ các vi khuẩn, tiếp đến là nấm và một ít từ pancreatin (trypsin). Hiện nay hầu hết protease kiềm sử dụng trong thành phần chất tẩy rửa được thu từ các chủng *Bacillus* còn các enzym khác dùng trong bột giặt như catalase, esperase và savinase mà hãng NOVO Đan mạch cung cấp trên thị trường đều thu từ hai chủng *Bacillus licheniformis* và *Bacillus alkalophilus*.

Nhiều phương pháp làm giảm bụi cho các bột enzym và các chất tẩy rửa đã được nghiên cứu. Ví dụ các chế phẩm enzym được gói trong các chất hoạt động bề mặt không ion hoá (polyethylenglycol) tạo thành các hạt nhỏ

hoặc dung dịch enzym được trộn với các chất tẩy rửa không ion hoá đã được nghiền nhỏ rồi phun thành bụi mù trong khí quyển lạnh, khi đó các giọt nhỏ li ti sẽ cứng lại, hình thành các hạt, các hạt đó sẽ không bị thay đổi khi trộn chúng với những chất tẩy rửa khác trong bột giặt.

Ngoài việc được sử dụng để bổ sung vào các chất tẩy rửa, xà phòng giặt, ngày nay một số enzym còn được dùng để bổ sung vào các loại xà phòng tắm, kem bôi mặt dưỡng da, thuốc đánh răng như bromelin, collagenase, lipase... các enzym này có tác dụng tẩy hôi, tẩy các vết bẩn bám trên da khá tốt, hơn nữa nó còn làm mịn và tăng độ đàn hồi cho da.

### 6.2.5. Công nghiệp dược và y tế

Vai trò của enzym trong điều trị cũng như chuẩn đoán một số bệnh đã được biết đến từ khá lâu trong lĩnh vực y-dược và ngày càng được phát triển. Mặc dù lượng enzym sử dụng cho lĩnh vực này chỉ chiếm 1% so với các ngành công nghiệp khác nhưng nó đã đem lại khoảng 8% lợi nhuận từ các enzym bán trên thị trường.

Ngày nay các nhà khoa học đôi khi cũng lợi dụng "tín hiệu enzym" làm chỉ tiêu đánh giá tình trạng cơ thể bị bệnh. Ví dụ hoạt độ aldolase tăng trong huyết thanh là tín hiệu của viêm gan, lượng creatinkinase huyết tăng vọt vài giờ đầu sau khi bị nhồi máu cơ tim. Các nghiên cứu gần đây cho thấy khi hoạt độ methemoglobin reductase ở hồng cầu tăng cao là triệu chứng của bệnh thiếu máu do suy tuỷ (thường cao hơn gấp đôi so với người khỏe mạnh bình thường). Đặc điểm chung của thiếu máu trong suy tuỷ xương là thiếu máu nặng, thiếu hemoglobin (Hb) một protein của hồng cầu đảm nhận chức năng vận chuyển và cung cấp oxy cho toàn cơ thể. Lượng hemoglobin có khi chỉ còn dưới 20g/l nhưng bệnh nhân vẫn thích nghi được với cuộc sống thiếu oxy của tế bào. Sự thích nghi trên là nhờ sự tăng hoạt độ của methemoglobin reductase hồng cầu, enzym này xúc tác cho phản ứng khử MetHb (dạng Hb đã gắn oxy) thành Hb.

Trong điều trị bệnh bằng enzym cơ thể lấy thí dụ enzym trypsin và chimotrypsin. Do đặc điểm chỉ phân giải các protein bị hoại, các enzym này thường được sử dụng để làm thuốc tiêu viêm, làm lành vết thương, vết bỏng, làm giãn và tiêu biến niêm mạc bị hoại trong một số bệnh viêm phổi, viêm

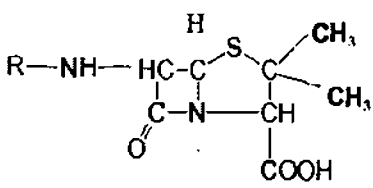
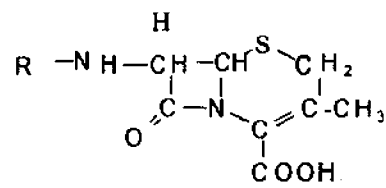
khí quản. Trypsin dùng trong chữa bệnh viêm tĩnh mạch huyết khối (trypsin, chimotrypsin, peptidase, lipase và amylase), viêm phổi (xông khí dung bao gồm trypsin và deoxyribonuclease). Chimotrypsin dùng để chữa bệnh loét dạ dày, loét kết tràng. Một số enzym tiêu hoá cũng đã được nghiên cứu và sử dụng góp phần khắc phục tình trạng suy dinh dưỡng ở trẻ em, người già và người bệnh. Ví dụ pepsin (từ dạ dày lợn) được sử dụng để nâng cao hiệu quả chuyển hoá protein của cơ thể, nhất là đối với trẻ em vì ở lứa tuổi này hệ enzym tiêu hoá của chúng chưa hoàn chỉnh. Sự tiêu hoá protein bắt đầu xảy ra ở dạ dày, giai đoạn tiêu hoá protein ở đây giữ vai trò đặc biệt quan trọng. Ở đó các phân tử protein được phân cắt chủ yếu thành các peptit chứa từ 5-8 axit amin nhờ tác dụng của pepsin, các peptit này sẽ tiếp tục được phân cắt ở ruột non nhờ tác dụng của hệ protease của dịch ruột và dịch tụy. Nếu ở dạ dày protein không được tiêu hoá tốt sẽ ảnh hưởng xấu đến sự tiêu hoá protein chung, làm giảm hiệu quả sử dụng protein chung của cơ thể, gây nên hiện tượng rối loạn tiêu hoá, để lại những hậu quả nguy hại.

Ngày nay một số thuốc được tổng hợp bằng con đường hoá học đã dần được thay thế bằng các quá trình enzym nhờ những ưu điểm vốn có của nó. Một ví dụ điển hình là sản xuất các penicillin bán tổng hợp, bằng việc sử dụng penicillin acylase để sản xuất ra hai dẫn xuất ban đầu là 6 APA và 7ADCA và từ đó tổng hợp nên hàng loạt kháng sinh thế hệ thứ II, III, IV, V đóng góp không nhỏ vào thu nhập của ngành công nghệ kháng sinh.

Tất cả các penicillin đều chứa gốc 6 aminopenicillin axit (6-APA) gắn với các cạnh bên R khác nhau. Do vậy cấu trúc của các cạnh bên sẽ quyết định các thuộc tính quan trọng cho mỗi loại penicillin như phổ kháng sinh, đặc tính gắn kết thành tế bào, liều lượng trong máu, tính bền axit.... Trong thực tế chỉ có hai loại kháng sinh penicillin -V và penicillin -G là được tổng hợp với hiệu suất cao bằng phương pháp lên men (hình 6.10).

Tuy nhiên, trong tự nhiên vốn tồn tại và ngày càng xuất hiện thêm nhiều biến chủng vi sinh vật kháng lại được hai loại kháng sinh này. Để tăng cường hiệu quả kháng sinh của penicillin đối với những chủng bên này, các chuỗi bên của penicillin V và G được loại bỏ khỏi gốc 6-APA và thay bằng các chuỗi bên khác, tạo ra các loại penicillin khác. Một vài loại penicillin

bán tổng hợp theo kiểu này đã tỏ ra khá hiệu quả, đặc biệt là ampicillin và amoxycillin.

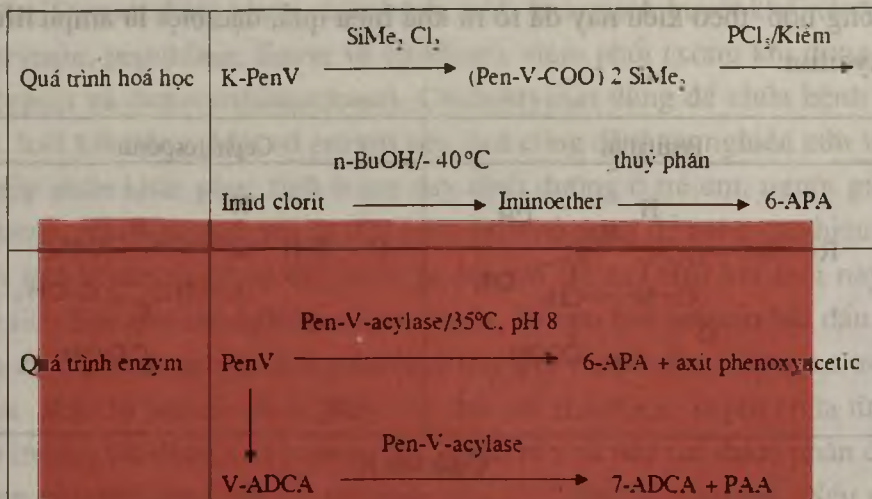
Penicillin		Cephalosporin
		
Cạnh bên R		
6-APA	H-	7-ADCA
G-penicillin	$C_6H_5-CH_2-CO-$	-
V-penicillin	$C_6H_5-O-CH_2-CO-$	(V-ADCA)
Ampicillin	$C_6H_5-CH(NH_2)-CO-$	Cephalexin
Amoxycillin	$(OH)C_6H_4-CH(NH_2)-CO-$	-

Hình 6.10. Cấu tạo cạnh bên R của một vài loại penicillin.

Các cạnh bên V và G của penicillin có thể được loại bỏ bằng con đường hoá học và bằng enzym (hình 6.11). Theo con đường hoá học, bước đầu tiên phải bảo vệ nhóm cacboxyl, tiếp đến tạo ra iminoether như là bước trung gian trong dung môi butanol ở  $-40^{\circ}C$ . Hiệu suất của quá trình đạt cao tuy nhiên giá thành của sản phẩm cũng rất cao do giá thành của dung môi sử dụng cao và phản ứng phải duy trì ở nhiệt độ thấp.

Từ năm 1960, quá trình chuyển hoá trên được thực hiện nhờ các enzym penicillin acylase (EC.3.5.1.11) thu từ một số chủng vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc. Khoảng năm 1966, Penicillin-G-Acylase cố định ra đời, góp phần cải thiện quá trình một cách đáng kể. Ngày nay con đường chuyển hoá bằng enzym đã được sử dụng một cách rộng rãi trong công nghiệp, với sản lượng hàng năm khoảng trên 3000 tấn 6-APA. Quá trình diễn ra trong môi trường nước, ở nhiệt độ  $35^{\circ}C$ . Năng suất của chế phẩm "Novo Semacylase" đạt khoảng 250-500 kg 6-APA cho 1 kg enzym cố định.





**Hình 6.11. Chuyển hoá Penicillin - V thành 6-APA.**

Cùng với sự phát triển của kỹ thuật gen và lai tế bào với sự hỗ trợ đặc lực của các enzym người ta có thể sản xuất trên qui mô công nghiệp những chất mà cơ thể sống chỉ có thể tổng hợp với lượng cực nhỏ như interferon, hocmon sinh trưởng người, một số kháng thể, vaccin... Insulin người, một hocmon đầu tiên được tổng hợp theo kỹ thuật gen vào năm 1978, nay đã được hãng Eli Lilly và Genetech Inc của Mỹ sản xuất và bán rộng rãi trên thị trường. Interferon tổng hợp theo con đường sinh học ra đời ở Aillen năm 1985 (hãng Schering-Plough). Bằng kỹ thuật lai soma giữa một tế bào B với một tế bào ung thư, năm 1975 Kohler và Milster đã tìm ra phương pháp sản xuất các kháng thể đơn dòng. Do có tính đặc hiệu cao nên ngày nay các kháng thể đơn dòng đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị cũng như để tạo ra những bộ kit thử dùng để chuẩn đoán một số bệnh nhiễm khuẩn, nhiễm virus, chuẩn đoán thai nghén (phương pháp miễn dịch gắn enzym ELISA).

### 6.2.6. Chế biến thức ăn cho gia súc

Vai trò của enzym trong lĩnh vực này cũng đã được biết đến và khai thác từ rất sớm dựa trên hai nguyên tắc chính, một là bổ sung trực tiếp một số enzym vào khẩu phần ăn của gia súc, gia cầm nhằm tăng nhanh quá trình trao đổi chất trong cơ thể chúng, đồng thời làm tăng trọng rất nhanh. Hai là, sử dụng các chế phẩm enzym để xử lý các món ăn "cồng kềnh" khó tiêu, có

giá trị dinh dưỡng thấp như chất bột, chất xơ, chất béo... thành các món ăn dễ tiêu, có giá trị dinh dưỡng cao hơn như các axit amin, protein, các loại đường tan, vi tamin, hocmon... làm tăng hiệu suất tiêu hoá và cuối cùng là tăng năng suất vật nuôi.

Ví dụ, protease được sử dụng để thủy phân phế liệu bột cá, thịt cá, trộn vào thức ăn gia súc, sản xuất dịch thủy phân giàu đạm bổ sung thức ăn cho lợn và gia cầm. Amylase kết hợp với một số enzym khác của nấm men thường được dùng để xử lý sơ bộ thức ăn tươi như ngô, khoai, sản chuyển một phần tinh bột thành đường, rượu, axit hữu cơ... kích thích ngon miệng và tăng khả năng hấp thu cho vật nuôi. Việc ứng dụng phức hệ cellulase trong phân giải các nguồn phế liệu giàu cellulose như rơm, rạ, bã khoai, bã sắn, bã mía... đã và đang được triển khai ở nhiều nước với tốc độ nhanh chóng trong mọi lĩnh vực, nhất là trong xử lý ô nhiễm môi trường, sinh tổng hợp protein đơn bào, sản xuất dược phẩm, sản xuất cồn công nghiệp, axit hữu cơ... Trong lĩnh vực sản xuất protein đơn bào (Single Cell Protein -SCP) làm thức ăn cho gia súc, nấm sợi thường được sử dụng để lên men rắn trực tiếp trên các nguồn phế liệu giàu cellulose, do chúng có khả năng phát triển dễ dàng trên các cơ chất rắn, nghèo dinh dưỡng, có khả năng đâm xuyên lớn tạo ra sinh khối có chứa hàm lượng protein cao với tỉ lệ axit amin cân đối, ít axit nucleic, không chứa độc tố ngoài ra chúng còn chứa cả các vitamin, các chất kích thích sinh trưởng và các hương thơm có lợi cho tiêu hoá của vật nuôi. Ví dụ, các nhà khoa học Philipine đã sử dụng chủng *Aspergillus niger* 3104 để lên men bã sắn và sau 72 giờ lên men đã nâng được hàm lượng protein trong bã từ 2,5% lên tới 40%. Ở Cuba chủng *Cellulomonas* được sử dụng để chuyển hoá hàng triệu tấn bã mía thải ra từ công nghiệp sản xuất đường làm nguồn thức ăn cho gia súc có hiệu quả, có hàm lượng protein cao tới 30-40% (trước khi lên men, bã mía được xử lý bằng kiềm ở 140°C).

### 6.2.7. Sản xuất các đường chức năng (prebiotic)

Sự phát triển mạnh mẽ của khoa học cơ bản, khoa học ứng dụng, của công nghệ thực phẩm, dinh dưỡng học, của y học điều trị và chăm sóc sức khỏe cộng đồng trong những năm cuối thế kỷ XX đã khẳng định sức khỏe con người luôn gắn kết chặt chẽ với việc duy trì sự phát triển cân đối và cân bằng hệ sinh thái các vi sinh vật có ích sinh sống trong mỗi cơ thể đó. Luận

cứ khoa học này đã trở thành nền tảng ra đời cho một hướng nghiên cứu về: “ Sản phẩm chứa vi sinh vật lành hữu ích cho cơ thể và các thành tố cần thiết để duy trì sự phát triển cân bằng của chúng”- (*Probiotic and prebiotic*), mới xuất hiện và thu hút ngay được sự quan tâm và nỗ lực tập trung nghiên cứu ở nhiều quốc gia trên thế giới, đặc biệt là ở các nước công nghiệp phát triển trong khoảng hai chục năm gần đây.

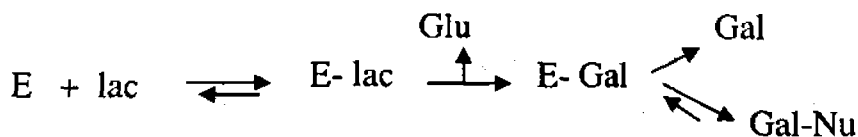
Probiotic là các dạng thực phẩm (hoặc các dạng chế phẩm dùng để ăn uống) có chứa vi sinh vật sống, có khả năng góp phần làm cải thiện chất lượng và duy trì trạng thái cân bằng hệ sinh thái khỏe mạnh. Đại biểu điển hình cho nhóm vi sinh vật có lợi này là các giống *Lactobaccillus*, *Bifidobacterium*... Khi con người sử dụng, các vi sinh vật này có khả năng sống sót qua quá trình tiêu hóa thức ăn ở dạ dày và ruột non, rồi chúng khu trú và phát triển ở đại tràng, kết quả sẽ làm thay đổi hệ sinh thái vi sinh vật đường ruột theo hướng có lợi cho sức khỏe.

Prebiotic là nhóm oligosaccarit chức năng, sử dụng trong sản phẩm thực phẩm (hay sản phẩm ăn uống) với mục đích chính để cung cấp thức ăn cho hệ vi sinh vật có lợi trong đường tiêu hóa, đặc biệt là hệ vi sinh vật có lợi khu trú trong đại tràng. Điểm mấu chốt quan trọng của các cấu tử prebiotic chức năng này là chúng không bị phân giải ở dạ dày và không bị hấp thu ở ruột non, mà tồn tại ở cuối đường tiêu hóa (ruột kết) và trở thành nguồn dinh dưỡng cho hệ vi sinh vật đường ruột phát triển cân bằng. Việc duy trì cân bằng sinh thái ổn định này đã ngăn chặn hữu hiệu sự phát triển của các loài vi sinh vật có hại khác; qua đó, góp phần tăng sức đề kháng cho cơ thể chủ, tránh bị táo bón, hạn chế béo phì, kiểm soát tốt hơn quá trình lão hóa và giảm nguy cơ xơ vữa động mạch...

Ngày nay, khoa học đã xác định được các cấu tử chức năng có hiệu quả tác dụng prebiotic điển hình là các loại đường chức năng (oligosaccarit) như: galactooligosaccarit (GOS), mannoooligosaccarit (MOS), fructooligosaccarit (FOS), rafinoseoligosaccarit (ROS), xyloseoligosaccarit (XOS)...

Nhiều công trình nghiên cứu khoa học liên quan đến việc tổng hợp cũng như vai trò chức năng của các loại đường trên đã được công bố. Người ta đã phát hiện được vai trò của phản ứng transgalactosyl hóa trong việc hình thành các galactooligosaccarit từ vai trò của phản ứng thủy phân mannan để

tạo mannoooligosaccarit hay hiệu quả cảm ứng phát triển tốt của fructooligosaccarit đối với vi khuẩn *Lactobacillus* trong đại tràng... Cơ chế cho việc tạo ra galactooligosaccarit GOS được minh họa theo sơ đồ dưới đây:



Enzym (E) tham gia phản ứng thường là  $\beta$ -galactosidase hoặc  $\beta$ -glucosidasae sẽ kết hợp với lactose (Lac), giải phóng ra glucose (Glu) và phức enzym-galactose (E-Gal). Mối liên kết giữa E-Gal dễ dàng bị chuyển hóa bởi các chất ái nhân (Nu) như là lactose, glucose hoặc galactose để tạo oligosaccarit hơn là nước để tạo galactose tự do. Hiệu suất tổng hợp oligosaccarit của phản ứng transgalactosyl phụ thuộc nhiều vào điều kiện phản ứng như pH, nhiệt độ và có lẽ quan trọng hơn là phụ thuộc vào nồng độ cơ chất ban đầu, hoạt độ enzym và thời gian phản ứng. Bằng cách sử dụng các chế phẩm enzym bền nhiệt sẽ là giảm đáng kể các chủng nhiễm tạp vào sản phẩm và tăng hiệu suất tổng hợp lên nhiều.

Trên đây chỉ là một số lĩnh vực minh họa về ứng dụng enzym, cùng với những tiến bộ của khoa học kỹ thuật enzym đã, đang và sẽ thâm nhập nhiều hơn vào mọi lĩnh vực của cuộc sống con người. Riêng trong lĩnh vực nông nghiệp, enzym đang là một trong những công cụ đắc lực cho việc lai tạo các giống cây, con mới sạch bệnh và có những đặc tính di truyền quý giá. Hay trong lĩnh vực bảo vệ môi trường, các phương pháp xử lý sinh học thân thiện với môi trường đang dần chiếm ưu thế. Thực chất của các phương pháp này đều là quá trình biến đổi sinh hóa được điều khiển bởi sự hoạt động của các vi sinh vật chứa các phức hệ enzym khác nhau phụ thuộc vào từng nguồn thải. Trong lĩnh vực khoa học vật liệu, với sự trợ giúp của enzym, các nhà khoa học cũng đã chế tác ra được nhiều loại polyme sinh học mang những thuộc tính tương hợp sinh học cao... được ứng dụng trong hầu hết các lĩnh vực kinh tế quốc dân như hàng không, xây dựng, khai thác...

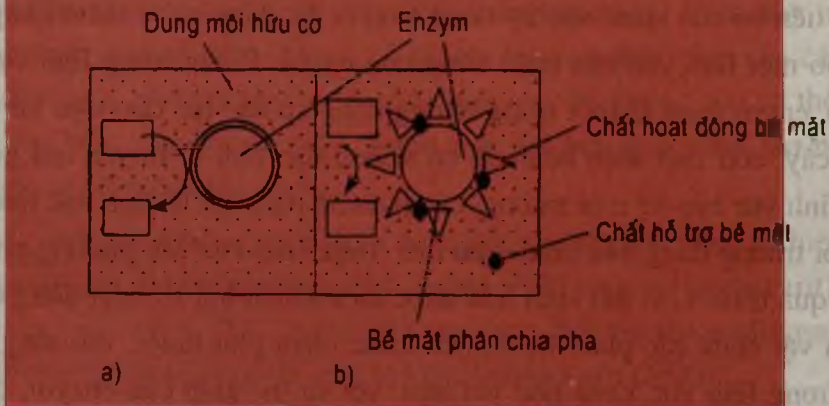
## 6.3. TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ ENZYM

### 6.3.1. Phản ứng của enzym trong hệ hai pha lỏng

#### 6.3.1.1. Phản ứng enzym trong hệ hai pha lỏng không trộn lẫn: pha hữu cơ - nước

Trong quá trình sử dụng enzym, người ta nhận thấy rằng dung môi lý tưởng cho nhiều phản ứng của các chất hữu cơ không phải là nước. Nhiều cơ chất như oxy, steroid, chất béo... cũng như sản phẩm phản ứng hòa tan tốt trong dung môi hữu cơ hơn là trong dung môi nước. Các phản ứng như vậy nếu được thực hiện trong dung môi hữu cơ có thể diễn ra hoàn toàn với hoạt tính enzym cao hơn nhiều so với phản ứng diễn ra trong môi trường nước. Ngoài ra, nếu phản ứng được thực hiện trong môi trường hữu cơ, sự nhiễm vi sinh vật còn có thể được hạn chế, điều này đặc biệt có ý nghĩa đối với các phản ứng nhạy cảm với tác động của protease của vi sinh vật nhiễm tạp.

Sử dụng enzym trong hệ dung môi hữu cơ dẫn tới phản ứng enzym trong hệ hai pha do các phân tử enzym có ái lực cao với các phân tử nước và được bao bọc bởi một lớp các phân tử nước ngay cả khi enzym ở trạng thái khô. Khi đó, enzym tồn tại ở trạng thái huyền phù trong dung môi hữu cơ được bao bọc bởi lớp phân chia pha hoặc bởi cấu trúc micell tạo bởi các chất có hoạt tính bề mặt khi có hoặc không có các chất hỗ trợ bề mặt (hình 6.12).



**Hình 6.12. Trạng thái tồn tại của enzym trong dung môi hữu cơ:**

a) enzym với vỏ nước / hoặc vật liệu cố định bao quanh;

b) enzym với vỏ micell tạo bởi các chất bề mặt / chất hỗ trợ bề mặt

## - Độ ổn định của enzym trong hệ hai pha hữu cơ - nước

Vấn đề cơ bản khi sử dụng enzym trong hệ hai pha là ổn định trạng thái enzym trong môi trường dung môi hữu cơ. Tính ổn định này của các enzym ưa nước rất khác với các enzym kỵ nước. Tính ổn định và khả năng gắn kết ở trạng thái hoạt động của enzym ưa nước phụ thuộc vào sự có mặt của lớp mỏng các phân tử nước (khoảng 50 - 300 phân tử nước/ phân tử enzym) trong vi môi trường phản ứng. Khi ấy, enzym có thể hoạt động ở trạng thái ngâm nước. Các enzym kỵ nước (như lipase) chỉ cần rất ít các phân tử nước để ổn định cấu hình của trung tâm hoạt động của enzym. Enzym có thể bị vô hoạt nếu dung môi hữu cơ sử dụng là dung môi hòa tan nước, khi ấy lớp nước bao quanh phân tử enzym sẽ bị hòa tan, dẫn tới sự không ổn định của trung tâm hoạt động và cuối cùng là enzym bị vô hoạt.

Một vấn đề khác gặp phải là trong môi trường dung môi hữu cơ có rất ít phân tử nước, và do vậy rất ít ion  $H^+$ . Khi ấy rất khó và không thể kiểm tra và kiểm soát giá trị pH của môi trường phản ứng. Dường như enzym còn "lưu lại" giá trị pH của dung dịch nước của nó trước đó và thể hiện phản ứng tại giá trị pH đó.

Môi trường dung môi hữu cơ có hoạt độ nước thấp, vì thế độ ổn nhiệt của enzym trong môi trường dung môi hữu cơ được tăng cường. Hiệu quả ổn định nhiệt này có tác dụng đối với mọi enzym. Có thể lấy ví dụ lipase để xem xét. Trong môi trường tributyl chứa 0,02% nước, chu kỳ bán hủy của lipase ở  $100^{\circ}C$  là 12h, khi môi trường chứa 0,8% nước, chu kỳ bán hủy của lipase giảm xuống còn 12 phút và enzym bị vô hoạt ngay tức khắc ở môi trường 100% nước.

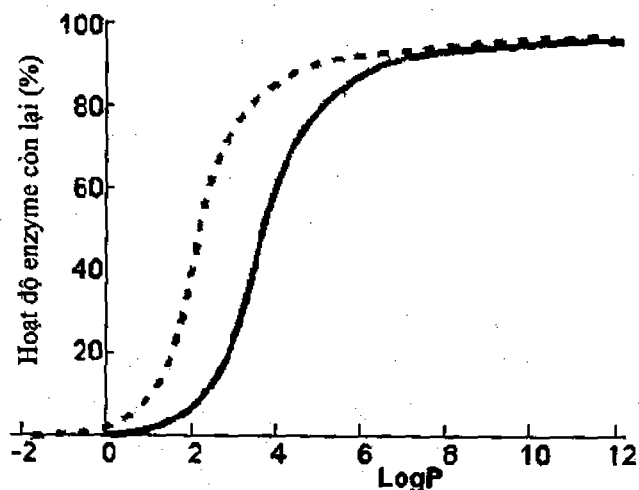
Ngoài ra, trong dung môi hữu cơ, điểm đóng băng của nước giảm xuống cho phép sử dụng các enzym nhạy cảm nhiệt ở nhiệt độ thấp. Hoạt độ nước thấp có xu hướng làm các phân tử enzym rắn lại. Điều đó có thể ảnh hưởng tới  $K_m$  và  $V_{max}$  của phản ứng enzym và thậm chí có thể dẫn tới thay đổi tính chất xúc tác của enzym. Lipase tụy tạng của lợn là một trường hợp điển hình cho sự thay đổi khả năng xúc tác ở môi trường có hoạt độ nước thấp. Khi phản ứng trong hệ phản ứng hai pha có  $a_w$  thấp, enzym này không thể hiện hoạt tính xúc tác phản ứng chuyển este hóa dẫn tới sự bùng nổ các rượu bậc cao.

Yếu tố quan trọng nhất kiểm soát sự cân bằng giữa độ ổn định và khả năng vô hoạt enzym trong môi trường hữu cơ là độ phân cực của dung môi.

Dung môi có độ phân cực thấp (tính kỵ nước cao) ít có khả năng phá vỡ cấu trúc của các phân tử nước gắn chặt xung quanh enzym. Độ phân cực có thể biểu thị bằng  $\log P$  ( $P$  là hệ số phân bố) của dung dịch hữu cơ trong n-octanol và nước:

$$\log P = \log \frac{n_{\text{Octanol}}}{n_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (6.1)$$

Trong đó  $n_{\text{Octanol}}$  là nồng độ chất tan phân bố trong octanol,  $n_{\text{H}_2\text{O}}$  là nồng độ chất tan phân bố trong nước. Giá trị  $\log P$  càng lớn, độ phân cực của dung môi càng nhỏ.  $\log P$  tăng 0,52 lần khi có thêm một nhóm  $-\text{CH}_2-$  gắn thêm vào mạch cacbon của dung môi. Ví dụ,  $\log P$  của butanol là 0,8.  $\log P$  của hexanol (thêm hai nhóm  $-\text{CH}_2-$ ) có thể tính được là  $0,8 + 2 \times 0,52$  (1,84). Hoạt tính của enzym trong hệ hai pha phụ thuộc vào  $\log P$  (hình 6.13). Có thể thấy rằng enzym thường bị vô hoạt khi  $\log P < 2$ . Khi  $\log P > 4$  (dung môi ít phân cực hơn), enzym ít bị ảnh hưởng hơn. Các dung môi thông dụng thường có  $\log P$  nằm trong khoảng từ 2 – 4 (bảng 6.13).



Hình 6.13. Sự phụ thuộc hoạt tính của enzyme trong hệ hai pha vào giá trị  $\log P$  của pha hữu cơ:

— enzyme tự do, --- enzym cố định trên chất mang kỵ nước.

**Bảng 6.13. Giá trị logP của một số dung môi hữu cơ thông dụng**

Dung môi	logP	Dung môi	logP
Butan	0,3	1,1,1 – Tricloetan	2,8
Etylacetat	0,7	Carbon tetraclorea	2,8
Butanol	0,8	Dibutyl ete	2,9
Dietyl ete	0,8	Cyclohexan	3,1
Metylen clorua	1,4	Hexan	3,5
Butylacetat	1,7	Petroleum ete (60-80)	3,5
Diizopropyl ete	2,0	Petroleum ete (80-100)	3,8
Benzen	2,0	Dipentyl ete	3,9
Cloroform	2,2	Heptan	4,0
Tetracloroetylen	2,3	Petroleum ete (100-120)	4,3
Toluen	2,7	Hexan decan	8,7

Tính tan của một số cơ chất hoặc sản phẩm phản ứng có thể làm thay đổi logP. Nhiều phân tử không phân cực có chứa các vùng cấu trúc phân cực làm cho phân tử loại này kém hòa tan trong dung môi không phân cực. Việc lựa chọn dung môi hữu cơ còn phụ thuộc vào các yếu tố khác như giá cả, khả năng thu hồi, đặc tính dễ cháy, bay hơi hoặc các đặc tính ức chế khác.

Việc cố định enzym trên các chất mang phân cực mạnh có thể làm đường cong phụ thuộc logP và hoạt tính enzym lệch về trái. Có thể đạt được điều đó bằng cách cố định enzym trên các chất mang cao phân tử như agarose, sephadex, sau đó ngâm ngập khối enzym cố định trong pha hữu cơ. Nếu đường cong lệch trái, khả năng lựa chọn dung môi hữu cơ thích hợp được mở rộng. Ngoài ra, khối enzym cố định này còn có các ưu điểm như: 1) bảo vệ enzym trong chất mang chống lại sự biến đổi của bề mặt phân chia pha lỏng – lỏng trong dòng khuấy mạnh; 2) dễ thu hồi enzym; 3) có thể sử dụng cùng với các coenzym trọng lượng phân tử thấp ưa nước như NAD(P)<sup>+</sup> khi có hệ thống tái sinh coenzym; 4) cho phép sử dụng liên tục và



hiệu quả thiết bị phản ứng hai pha dạng cố định, pha động là dung môi hữu cơ có thể bão hòa nước. Ngay cả trong trường hợp dung môi hữu cơ có logP thấp và tan trong nước, việc mất hoạt độ enzym có thể được bù đắp bằng sự thay đổi hằng số cân bằng. Ví dụ glucoisomerase được sử dụng trong dung môi etanol để sản xuất mật tinh bột có hàm lượng fructose cao do phân đoạn fructose trong ethanol 80<sup>0</sup> tăng từ 10% đến 55% khối lượng ở 30<sup>0</sup>C. Hiệu suất kinh tế thu được trong trường hợp sử dụng dung môi hữu cơ cao hơn mặc dù hoạt tính enzym giảm còn 10% so với trường hợp sử dụng dung môi nước.

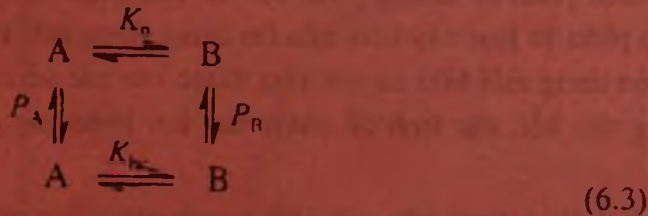
- *Trạng thái cân bằng trong hệ hai pha hữu cơ – nước*

Trong phản ứng enzym thông thường, đối với phản ứng đơn phân, luôn luôn tồn tại trạng thái cân bằng giữa cơ chất A và sản phẩm B thông qua hằng số cân bằng  $K_n$  trong pha nước:



Trong hệ hai pha, A và B sẽ phân bố vào cả hai pha với hệ số phân bố  $P_A$  và  $P_B$  và trạng thái cân bằng được thiết lập nhờ hằng số cân bằng  $K_{hc}$  trong pha hữu cơ:

Pha nước



Pha hữu cơ

với  $K_n = [B_n] / [A_n], \quad (6.4)$

$$K_{hc} = [B_{hc}] / [A_{hc}], \quad (6.5)$$

$$P_A = [A_{hc}] / [A_n] \quad (6.6)$$

và  $P_B = [B_{hc}] / [B_n], \quad (6.7)$

trong đó, chỉ có ba thông số là độc lập với nhau, còn một thông số còn lại phải phụ thuộc vào ba thông số kia. Hằng số cân bằng trong hệ hai pha được tính theo:

$$K_{\text{hai pha}} = [B_{\text{tổng}}] / [A_{\text{tổng}}] \quad (6.8)$$

với  $[B_{\text{tổng}}]$  và  $[A_{\text{tổng}}]$  là nồng độ hòa tan tổng số của A và B. Tương tự biến đổi các biểu thức sau cho phép tính được  $K_{\text{hai pha}}$ :

$$[A_{\text{tổng}}] \cdot V_{\text{tổng}} = [A_n] \cdot V_n + [A_{\text{hc}}] \cdot V_{\text{hc}} \quad (6.9)$$

và  $[B_{\text{tổng}}] \cdot B_{\text{tổng}} = [B_n] \cdot V_n + [B_{\text{hc}}] \cdot V_{\text{hc}} \quad (6.10)$

$$V_{\text{tổng}} = V_n + V_{\text{hc}}$$

$$K_{\text{hai pha}} = \frac{[B_n] \cdot V_n + [B_{\text{hc}}] \cdot V_{\text{hc}}}{[A_n] \cdot V_n + [A_{\text{hc}}] \cdot V_{\text{hc}}} \quad (6.11)$$

Kết hợp (6.6) và (6.7):

$$K_{\text{hai pha}} = K_n \frac{(1 + \alpha P_B)}{(1 + \alpha P_A)} \quad (6.12)$$

với tỷ lệ thể tích hai pha hữu cơ và nước:

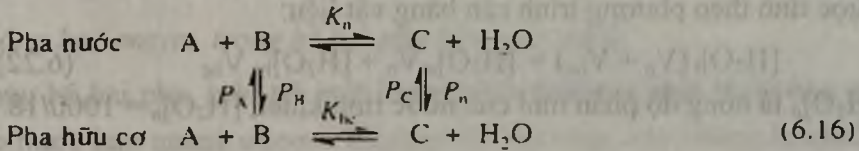
$$\alpha = V_{\text{hc}}/V_n \quad (6.13)$$

Nếu  $\alpha$  có trị số nhỏ, thể tích pha nước rất lớn hơn pha hữu cơ,  $K_{\text{hai pha}}$  tiến gần tới  $K_n$ , nếu  $\alpha$  đủ lớn, thể tích pha hữu cơ lớn,  $K_{\text{hai pha}}$  tiến đến  $K_{\text{hc}}$ . Có thể thấy rõ điều này khi biến đổi  $K_{\text{hai pha}}$  như sau: khi  $\alpha$  đủ lớn, công thức (6.12) trở thành:

$$K_{\text{hai pha}} = K_n P_B/P_A \quad (6.14)$$

$$K_{\text{hai pha}} = [B_{\text{hc}}]/[A_{\text{hc}}] = K_{\text{hc}} \quad (6.15)$$

Đối với các phản ứng nhị phân, hệ hai pha ảnh hưởng đến phản ứng phức tạp hơn đối với các phản ứng đơn phân. Trong trường hợp này, quá trình được đơn giản hóa theo mô hình sau:



$$P_C = [C_{\text{hc}}]/[C_n] \quad (6.17)$$

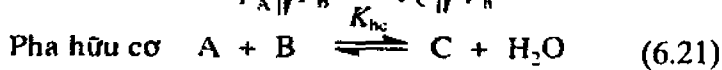
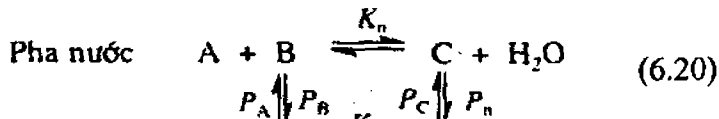
$$P_D = [D_{\text{hc}}]/[D_n] \quad (6.18)$$

Bằng cách tương tự,  $K_{\text{hai pha}}$  được tính bằng:

$$K_{\text{hai pha}} = K_n \frac{(1 + \alpha P_C)(1 + \alpha P_D)}{(1 + \alpha P_A)(1 + \alpha P_B)} \quad (6.19)$$

Khi thể tích pha hữu cơ đủ lớn,  $K_{\text{hai pha}}$  tiến tới  $K_{\text{hc}}$  như trong trường hợp phản ứng đơn phân. Tuy nhiên, do  $K_{\text{hai pha}}$  phụ thuộc bậc 4 vào  $\alpha$ , do vậy, tại các giá trị trung gian của  $\alpha$ ,  $K_{\text{hai pha}}$  sẽ nhận các giá trị cực đại hoặc cực tiểu khác với  $K_n$  và  $K_{\text{hc}}$ . Như vậy,  $K_{\text{hai pha}}$  có thể có giá trị lớn hơn các phản ứng tương tự xảy ra trong hệ một pha hữu cơ hoặc nước. Trong trường hợp này, vận tốc phản ứng trong hệ hai pha có thể lớn hơn nhiều so với phản ứng trong hệ một pha.

Một trường hợp đặc biệt của phản ứng nhị phân trong hệ hai pha là một trong các cấu tử của phản ứng là nước. Khi ấy, quá trình (6.16) sẽ trở thành:



$$P_n = [\text{H}_2\text{O}_{\text{hc}}] / [\text{H}_2\text{O}_n]$$

Thông thường trong hệ dung môi nước, phản ứng thủy phân sẽ xảy ra, nghĩa là theo chiều từ phải sang trái. Tuy nhiên trong hệ hai pha, hằng số cân bằng của phản ứng thay đổi như đã mô tả ở trên, cho phép enzym thủy phân hoạt động theo chiều từ trái qua phải. Điều này rất có ý nghĩa bởi vì phản ứng tổng hợp rất khó xảy ra trong các phản ứng hóa học hữu cơ thông thường do đòi hỏi các vùng đặc hiệu và lựa chọn các nhóm phản ứng.

Có hai yếu tố ảnh hưởng tới năng suất thu nhận sản phẩm C, đó là: 1) sự thay đổi của  $K_{\text{hai pha}}$ , và 2) nồng độ ( $[\text{H}_2\text{O}]_i$ ). Nồng độ nước tổng cộng được tính theo phương trình cân bằng vật liệu:

$$[\text{H}_2\text{O}]_i (V_n + V_{\text{hc}}) = [\text{H}_2\text{O}]_n V_n + [\text{H}_2\text{O}]_{\text{hc}} V_{\text{hc}} \quad (6.22)$$

$[\text{H}_2\text{O}]_n$  là nồng độ phần mol của nước tinh khiết,  $[\text{H}_2\text{O}]_n = 1000/18 = 55,5M$

$$[\text{H}_2\text{O}]_i = \frac{55,5(1 + \alpha P_n)}{1 + \alpha} \quad (6.23)$$

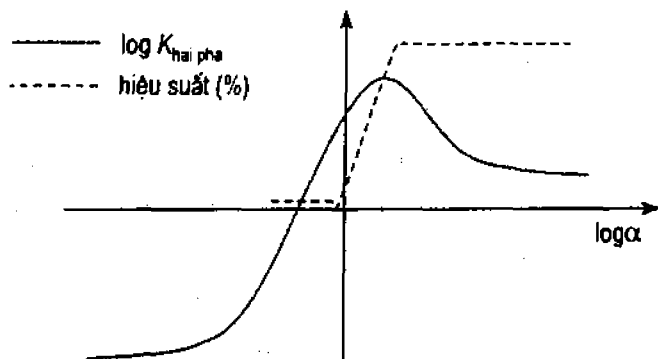
$$\text{Với } K_{\text{hai pha}} = \frac{[A_i][B_i]}{[Ct] \cdot [\text{H}_2\text{O}]}$$

Và (6.19), thay  $P_n$  cho  $P_D$ , được:

$$[C_i] = K_n \frac{(1 + \alpha P_c) \cdot (1 + \alpha) \cdot [A_i] \cdot [B_i]}{55,5 \cdot (1 + \alpha P_A) \cdot (1 + \alpha P_B)} \quad (6.24)$$

Nếu C ít phân cực hơn A và B, hiệu suất phản ứng sẽ tăng lên cùng nồng độ pha hữu cơ. Ví dụ hình 6.14 về sự tổng hợp este từ axit và rượu trong hệ hai pha cho thấy khi nồng độ pha hữu cơ tăng lên, hiệu suất phản ứng có thể tăng từ 0% lên 100%.

Để đạt được hiệu suất chuyển hóa cao, cần loại bỏ lượng nước tạo thành trong hệ hai pha để tránh giảm  $\alpha$ . Tuy nhiên loại bỏ nước trong hệ hai pha là không dễ đạt được. Có thể bổ sung đều đặn enzyme hoặc một thể tích nhất định pha hữu cơ để giữ cho hằng số cân bằng pha của hệ không thay đổi.



**Hình 6.13. Tổng hợp etyl este N-benzoyl-L-phenylalanin từ N-benzoyl-L-phenylalanin và rượu etylic trong hệ hai pha cloroform - nước**

*- Động học enzyme trong hệ hai pha hữu cơ - nước*

Trong hệ hai pha, luôn có một lượng nhất định các chất phản ứng tan trong lớp nước bao quanh enzyme. Thường thì lớp nước này không bị khuấy trộn cho dù pha hữu cơ được khuấy đều đặn trong suốt quá trình phản ứng. Nếu chiều dày lớp nước này là lớn, vận tốc phản ứng enzyme bị kiểm soát bởi vận tốc khuếch tán của cơ chất qua lớp nước do độ hòa tan thấp của cơ chất trong pha nước. Trong trường hợp enzyme hòa tan tốt trong nước, lớp nước này thường rất mỏng, và vận tốc phản ứng phụ thuộc vào vận tốc

khuyết tán cơ chất ở nồng độ cao trong pha hữu cơ qua lớp phân chia bề mặt tới vi môi trường bao quanh enzym có nồng độ cơ chất rất thấp. Trong trường hợp enzym cố định, vận tốc dòng cơ chất tới bề mặt xúc tác và hiệu suất của phản ứng phụ thuộc vào bề mặt riêng của hạt enzym. Trong trường hợp hệ một pha, bề mặt riêng này là bề mặt của hạt enzym tiếp xúc với môi trường phản ứng. Trong hệ hai pha, bề mặt riêng là bề mặt phân chia hai pha. Trong các trường hợp thông thường, bề mặt phân chia pha phụ thuộc vào thể tích của giọt nước bao quanh hạt enzym. Nếu thể tích pha hữu cơ tăng lên, thể tích giọt nước này giảm đi, làm giảm năng suất thể tích phản ứng. Khi phản ứng tạo thành nước, cần tách nước ra do hàm lượng nước tích tụ không những làm chuyển dịch cân bằng của hệ thống mà còn làm giảm vận tốc phản ứng. Các nguyên tắc cho phép tối ưu hóa phản ứng enzym trong hệ hai pha chủ yếu phụ thuộc vào logP:

- Giảm tối đa sự khác biệt giữa logP của cơ chất và bề mặt phân chia pha. LogP của dung môi hữu cơ cần lớn hơn logP của cơ chất rất nhiều để đảm bảo nồng độ cơ chất cao trong khu vực phân chia pha và nhờ đó có thể đạt được vận tốc khuếch tán cao của cơ chất từ pha hữu cơ vào pha nước.

- Sự khác biệt của logP của sản phẩm và pha hữu cơ cần phải rất nhỏ, đồng thời logP của sản phẩm phải lớn hơn logP của bề mặt phân chia pha. Nhờ đó có thể đạt được vận tốc chuyển dịch lớn của sản phẩm sau phản ứng từ pha nước qua bề mặt phân chia vào pha hữu cơ.

- Có thể thay đổi logP của bề mặt phân chia pha độc lập với pha hữu cơ nhờ bổ sung các chất hoạt động bề mặt hoặc các chất hiệp trợ thích hợp. Tuy nhiên trong thực tế, việc sử dụng và lựa chọn các chất hoạt động bề mặt phức tạp hơn nhiều. Đặc biệt khi phản ứng tạo ra nước, các chất hoạt động bề mặt sẽ tạo ra các lớp màng kép của chất hoạt động bề mặt bao quanh giọt nước. Có thể hạn chế nồng độ nước xung quanh hạt enzym bằng cách sử dụng các màng lọc phân tử (K-Al-silicagel) để hấp thụ nước trong pha hữu cơ. Nếu dung môi hữu cơ có nhiệt độ sôi cao, có thể tách nước bằng chưng cất chân không (ví dụ, trong phản ứng este hóa các axit béo và các rượu kỵ nước nhờ lipase trong công nghệ sản xuất các loại sáp).

### 6.3.1.2. *Phản ứng enzym trong hệ hai pha lỏng tan lẫn: pha nước – nước*

Hệ hai pha nước cho phép chuyển dịch cân bằng phản ứng về phía tạo ra sản phẩm bằng cách đảm bảo cơ chất và enzym phân bố chủ yếu vào một pha, sản phẩm phân bố chủ yếu trong pha còn lại. Lý thuyết của hệ hai pha hữu cơ – nước hoàn toàn có thể áp dụng trong trường hợp hai pha nước. Có thể minh họa hệ thống này thông qua ví dụ thủy phân tinh bột nhờ  $\alpha$ -amylase và gluco-amylase trong hệ hai pha nước tạo bởi nước (pha trên) và nước – propyenglycol (PFG 20000) (pha dưới). Tinh bột và phần lớn enzym phân bố trong pha dưới, glucose phân bố chủ yếu trong pha trên. Một lượng nhỏ glucoamylase phân bố trong pha trên giúp chuyển hóa oligosaccarit trong pha này thành glucose nâng nồng độ sản phẩm tới 140 g/l trong pha trên. Hệ thống này cho phép enzym và cơ chất tồn tại trong cùng một pha, do vậy tránh được hạn chế của hiện tượng chuyển khối qua bề mặt phân chia pha như trong trường hợp hệ hai pha không tan lẫn. Ngoài ra, không cần tách sản phẩm khỏi cơ chất chưa được chuyển hóa và giảm được mất mát enzym.

#### *- Phản ứng tổng hợp do enzym xúc tác*

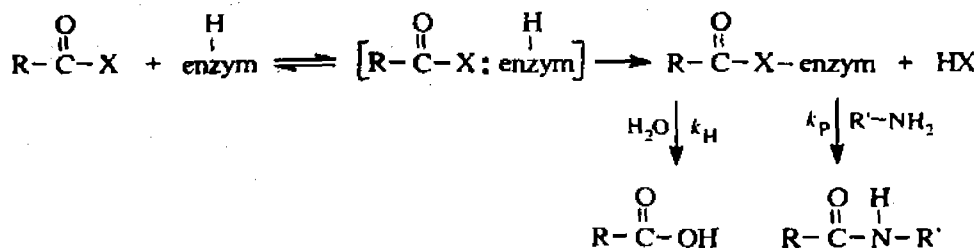
Các phản ứng tổng hợp nhờ enzym đang là mối quan tâm của các nhà công nghệ sinh học do việc tổng hợp các chất nhờ con đường hóa học là rất khó khăn, tạo ra nhiều sản phẩm phụ và giá thành sản phẩm cao. Việc sử dụng enzym với tính đặc hiệu nhóm, đặc hiệu mạch bên hoặc đặc hiệu quang học cao trong điều kiện cân bằng phản ứng chuyển dịch theo chiều từ phải sang trái (tổng hợp) có thể thu được các sản phẩm sạch với giá thành thấp hơn nhiều so với phương pháp hóa học. Chúng ta xem xét các ví dụ sử dụng protease trong phản ứng plastein, glycozidase trong phản ứng tổng hợp các oligosaccarit và lipase trong phản ứng chuyển vị este.

#### *Phản ứng plastein*

Sử dụng protease trong dung dịch protein, axit amin và peptit có nồng độ cao có thể tổng hợp ngẫu nhiên các polyme. Phản ứng này thường được sử dụng để cải biến các chất dinh dưỡng, cảm quan không hấp dẫn của các protein, ví dụ như tạo ra các protein có mùi, vị hoặc màu sắc hấp dẫn hơn so với protein nguyên thủy. Phản ứng này cũng có thể sử dụng để gắn thêm

vào các protein một thành phần axit amin nào đó nhằm nâng cao giá trị dinh dưỡng hoặc biến đổi cấu trúc bậc 1 của protein nhằm cải biến tính chất chức năng của protein.

Hầu như các protease phân cắt protein ở các liên kết đặc hiệu, vì thế có thể sử dụng các enzym này theo chiều phản ứng tổng hợp để tổng hợp các liên kết peptit định trước. Yếu tố tăng cường quá trình tổng hợp bao gồm pH, các nhóm cacboxyl hoặc nhóm amin được lựa chọn để bảo vệ, khả năng kết tủa sản phẩm, phản ứng trong hệ hai pha lỏng. Các yếu tố này đạt được bằng cách kiểm soát cân bằng phản ứng. Một cách khác để tổng hợp các peptit là dựa vào quá trình được kiểm soát động thái khi quá trình tổng hợp có vận tốc tạo sản phẩm ( $k_p$ ) cao hơn quá trình thủy phân ( $k_h$ ). Quá trình này được mô tả như sau (X có thể là este, amit hoặc cacboxyl):



Vận tốc tạo thành sản phẩm phụ thuộc vào tỷ số  $k_p / k_h$ , và  $k_m$  cũng như nồng độ của nước và hợp chất amin. Hiệu suất quá trình này được nâng cao nếu giảm hoạt độ nước của môi trường phản ứng.

Có thể kéo dài một peptit bằng cách thêm vào peptit đó từng axit amin hoặc bằng cách ngưng tụ các peptit. Phản ứng ngưng tụ các peptit được thực hiện bằng quá trình kiểm soát động thái, phản ứng kéo dài peptit được thực hiện tốt nhất trong hệ hai pha rắn - lỏng (thông qua việc kết tủa) hoặc quá trình kiểm soát động thái trong hệ hai pha lỏng - lỏng. Để kiểm soát động thái của phản ứng, cần có enzym hoạt độ cao, và do vậy giá thành sản phẩm cao. Để giảm chi phí, có thể sử dụng enzym cố định.

Tổng hợp chất ngọt thay thế aspartam là một ví dụ đơn giản của phản ứng plastein. Aspartam là một dipeptit  $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanyl-O-metyl-este tạo bởi L-aspartic và metyl este của phenylamin. Trong phương pháp tổng hợp aspartam bằng con đường hóa học, cần bảo vệ cả hai nhóm  $\beta$ -

carboxyl và  $\alpha$ -amin của L-aspartic. Nếu nhóm  $\beta$ -carboxyl không được bảo vệ, phản ứng sẽ tạo ra cả dạng  $\beta$ -izome mà để loại bỏ nó, giá thành sản phẩm sẽ tăng lên 30%. Hiệu suất tổng hợp theo con đường này rất thấp, giá thành sản phẩm cao. Nếu sử dụng protease thermolysin, chỉ cần bảo vệ nhóm  $\alpha$ -amin của L-aspartic nhờ phản ứng với benzyl chloroformat để tạo thành dẫn xuất của benzyloxy-carbonyl-BOC (BOC-L-aspartic), tránh tạo thành poly L-aspartic. Có thể sử dụng hỗn hợp racemic của L-aspartic để tổng hợp aspartam do tính đặc hiệu quang học của enzym.

Việc tổng hợp isulin người từ isulin của lợn đòi hỏi thay thế alanin ở đầu cacbon của mạch peptit lợn bằng threonin. Có thể thực hiện được phản ứng này nhờ phản ứng chuyển peptit do trypsin xúc tác với sự tham gia của threonin có nhóm carboxyl được bảo vệ. Phản ứng xảy ra trong pha nước với dung môi hữu cơ tan trong nước. Sản phẩm tạo thành được thủy phân nhẹ để tách nhóm carboxyl của threonin để tạo ra insulin người.

#### - Phản ứng tổng hợp sử dụng glycozidase

Bên cạnh việc sử dụng protease trong các phản ứng plastein, glycozidase cũng được sử dụng khá rộng rãi hiện nay để tổng hợp các oligosaccarit khử hoặc không khử từ các đường khử quen thuộc như glucose, fructose... trong việc phát triển các thực phẩm chức năng.  $\beta$ -galactosidase có thể sử dụng trong phản ứng tổng hợp N-acetyllactosamin từ lactose và N-acetylglucosamin để loại bỏ lactose trong sữa trong sản xuất các chế phẩm sữa cho người tiểu đường hoặc bệnh nhân mẫn cảm với lactose.

#### *Phản ứng chuyển vị este*

Vị trí và bản chất các gốc carboxyl trong cấu tạo các lipit tạo nên các lipit có tính chất vật lý hoặc cảm quan hoàn toàn khác nhau. Một số lipit có giá trị thương mại lớn, ví dụ như bơ cacao. Bơ cacao có giá trị rất cao do nhiệt độ nóng chảy đặc biệt của nó (nằm giữa nhiệt độ môi trường và nhiệt độ cơ thể người). Trong thành phần cấu tạo của bơ cacao, 80% triglycerit có thành phần axit palmitic và stearic ở vị trí 1 và 3, axit oleic ở vị trí 2. Có thể sản xuất các lipit có giá trị cao từ các lipit thông thường hoặc rẻ nhờ các phản ứng chuyển vị este hoặc thay thế các gốc carboxyl hoặc gốc rượu trong lipit dưới tác dụng của lipase.



Để sản xuất bơ cacao từ dầu cọ, các gốc axit trong dầu cọ cần được thay thế bằng gốc stearic. Phản ứng được thực hiện trong hexan chứa một lượng vừa đủ nước cho hoạt hóa lipase. Cũng có thể nâng cao chất lượng của dầu oliu bằng cách thay các gốc oleic ở vị trí 1,3 bằng các gốc palmitic, chất lượng dầu cọ hoặc dầu hướng dương bằng cách tăng tỷ lệ gốc oleic trong dầu. Ngoài ra, lipase còn được sử dụng trong các phản ứng tổng hợp các chất thơm tự nhiên trong hệ hai pha (ví dụ tổng hợp isoamyl acetat và rượu isoamyllic). Các phản ứng tổng hợp này có thể thực hiện được chỉ khi sử dụng lipase có tính đặc hiệu phù hợp và điều kiện phản ứng thích ứng sao cho quá trình hợp ưu thế hơn quá trình thủy phân. Đối với các lipase công nghiệp, thông thường hoạt tính thủy phân cao hơn hoạt tính tổng hợp 10 - 15 lần. Có thể hạn chế phản ứng thủy phân bằng cách làm giảm hàm lượng nước của hệ thống phản ứng hoặc sử dụng phản ứng trong hệ hai pha hữu cơ - nước.

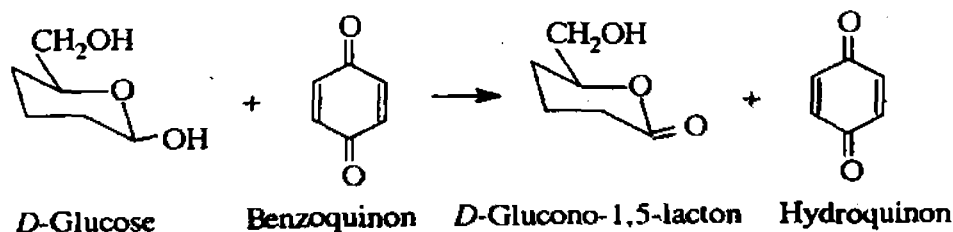
### **6.3.2. Triển vọng tương lai của công nghệ enzym**

Hiện tại, mới có một số ít enzym được sản xuất ở quy mô lớn và thích ứng với sản xuất công nghiệp. Ngành công nghiệp enzym hiện nay phát triển dựa trên những hướng sau: kiểm tìm nguồn enzym mới; thiết lập và sử dụng đa năng hóa enzym công nghiệp; sử dụng công cụ kỹ thuật di truyền để thiết kế và sản xuất các chất xúc tác hữu cơ tương tự enzym và sử dụng các hệ enzym phức tạp. Để đáp ứng yêu cầu của phát triển công nghiệp enzym, cần có sự phối hợp của các nhà enzym học, các nhà di truyền và các nhà hóa học.

#### **6.3.2.1. Cơ chất phi tự nhiên**

Rất nhiều enzym không thể hiện tính đặc hiệu với cơ chất tự nhiên hoặc đôi khi trong điều kiện phản ứng thay đổi các enzym thể hiện hoạt tính hoàn toàn khác với các hoạt tính biết trước của chúng. Nhờ các phản ứng này, có thể thực hiện được các phản ứng enzym với vận tốc cao hơn nhiều lần so với sử dụng cơ chất thông thường của chúng hoặc có thể tạo ra cách thức mới để sản xuất một sản phẩm nào đó. Có thể minh họa các khả năng này của enzym trong các trường hợp sau:

Enzym glucooxydase đặc hiệu trong phản ứng oxy hóa đường khử với cơ chất đặc hiệu D-glucose nhưng không đặc hiệu với chất nhận electron của phản ứng oxy hóa. Thông thường, oxy đóng vai trò chất nhận electron của phản ứng oxy hóa D-glucose bằng enzym glucooxydase. Benzoquinon cũng có thể đóng vai trò chất nhận điện tử thay thế cho oxy, khi ấy phản ứng diễn ra như sau:



Hydroquinon là hợp chất hữu cơ quý sử dụng nhiều trong kỹ thuật nhiếp ảnh. Phản ứng này xảy ra với hiệu suất gần 100%, enzym không bị vô hoạt bởi peroxyt như trong phản ứng với oxy. Vận tốc phản ứng giữa glucooxydase với benzoquinon cao hơn vận tốc phản ứng của enzym với oxy do tính tan của benzoquinon trong pha nước cao hơn oxy.

Acetylcholinesterase là enzym xúc tác sự thủy phân acetylcholin, một chất dẫn truyền thần kinh của động vật có xương sống, tạo thành cholin và acetic. Enzym này cũng có thể xúc tác đặc hiệu việc thủy phân acetyl-D-carnitin và không có hoạt tính đối với acetyl-L-carnitin. L-carnitin có hoạt tính vitamin và được sử dụng rất hữu ích trong điều trị, trong khi đó, dạng D-carnitin lại không có giá trị này. Vì thế, enzym acetylcholinesterase có thể sử dụng để phân tách hỗn hợp racemic của hai hợp chất này. Người ta tổng hợp hỗn hợp racemic L,D-carnitin bằng con đường hóa học, sau đó acetyl hóa hỗn hợp bằng acetyl clorua để tạo ra acetyl-L,D-carnitin. Cho hỗn hợp này qua cột phản ứng với acetylcholinesteraza, thu được acetyl-L-carnitin và D-carnitin. Tách hỗn hợp bằng sắc ký trao đổi ion, thu được acetyl-L-carnitin, chất này có tác dụng tương tự L-carnitin.

### 6.3.2.2. Biến đổi cấu trúc enzym

Một xu hướng rất phát triển trong những năm vừa qua trong lĩnh vực enzym là áp dụng kỹ thuật di truyền làm biến đổi có định hướng cấu trúc

enzym, làm thay đổi hoạt tính, hiệu suất phản ứng hoặc động học enzym, hoặc làm cho quá trình thu hồi enzym trở nên hiệu quả hơn. Một khía cạnh nữa trong sản xuất enzym cũng được tính đến là gắn các gen chịu trách nhiệm tổng hợp enzym có nguồn gốc từ các nguồn không an toàn vào các cơ thể chủ an toàn và tổng hợp chúng với năng suất cao nhờ việc chứa nhiều bản sao của gen đó. Trong tương lai, enzym có thể được thao tác sao cho dễ dàng phù hợp với các điều kiện trong sản xuất như điều kiện nhiệt độ, các ion, kiềm hoặc pH...

Một xu hướng cũng rất hứa hẹn trong công nghệ enzym là sử dụng công nghệ protein trong cải biến trung tâm hoạt động của enzym, nhờ đó có thể thu được enzym có hoạt tính rất cao hoặc có hoạt tính mới. Một trong các kỹ thuật được xem là triển vọng là đột biến điểm cho protein enzym. Điểm mấu chốt của kỹ thuật này là chỉ thay đổi một hoặc vài axit amin trong cấu tạo protein của enzym, có thể dẫn tới thay đổi rất lớn về cấu hình của protein, và do vậy hoạt tính hoặc tính chất của enzym sẽ thay đổi theo. Để kỹ thuật này có thể phát triển được, cần có một hệ dữ liệu đủ chi tiết và các phần mềm hỗ trợ, cộng thêm các kỹ thuật đột biến điểm bằng các phương pháp truyền thống, hóa học cũng như phân tử cả về lý thuyết cũng như thực nghiệm.

### **6.3.2.3. Tổng hợp enzym nhân tạo**

Các chất có hoạt tính tương tự enzym (synzym) có thể được tổng hợp bằng con đường nhân tạo. Để tổng hợp các synzym, cần thiết kế và tổng hợp trung tâm gắn cơ chất và trung tâm xúc tác. Thực tế cho thấy việc thiết kế trung tâm gắn cơ chất khá đơn giản còn thiết kế trung tâm xúc tác gặp rất nhiều khó khăn. Nhìn chung các synzym cũng tuân thủ mô hình Michaelis-Menten, cơ chế phản ứng tương tự như phản ứng do enzym xúc tác.

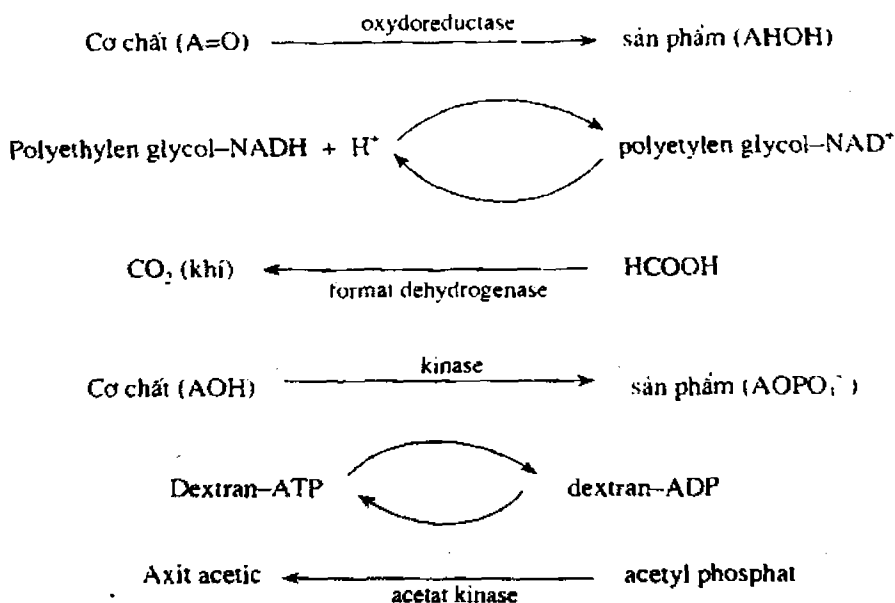
Cho tới nay, các enzym nhân tạo chưa thể được thiết kế từ các protein do chưa có đầy đủ thông tin và nguyên tắc về cấu hình không gian từ cấu trúc bậc một của protein. Hơn thế nữa, enzym được tạo nên từ protein cũng sẽ gặp phải các nhược điểm của enzym tự nhiên là dễ biến tính, dễ bị oxy hóa và thủy phân.

Một vài enzym nhân tạo đã được sử dụng thành công, ví dụ như trường hợp axit polyglutamic với tính chất tương tự esteraza, hoạt động ở pH rất hẹp, tối ưu ở pH = 5,3;  $K_m = 2\text{mM}$  và  $V_{\max} = 10^{-4} \div 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  đối với phản ứng thủy phân cơ chất 4-nitrophenyl acetat.

#### 6.2.3.4. Hệ thống tái tạo coenzym

Đối với các enzym sử dụng coenzym, việc tái tạo coenzym là vô cùng quan trọng do giá thành cao của các coenzym và khó khăn trong tái tạo coenzym. Có thể giải quyết vấn đề này nếu cố định coenzym cùng các enzym trên chất mang thích hợp. Một trong các biện pháp như vậy là hệ thống cố định tế bào. Tuy nhiên hệ thống này làm việc với hiệu suất thấp và tính ổn nhiệt không cao. Có thể thực hiện phản ứng enzym trong thiết bị phản ứng màng với kích thước lỗ màng lọc phải nhỏ hơn kích thước coenzym. Hoặc các coenzym được cố định trên các chất mang. Thông thường cần dẫn xuất hóa coenzym để dễ dàng cố định chúng trên chất mang nhưng không ảnh hưởng tới chức năng hỗ trợ xúc tác của chúng. Các chất phân tử lượng cao hòa tan trong nước thường được sử dụng làm chất mang coenzym do ít ảnh hưởng tới sự khuếch tán của coenzym so với các chất mang không tan trong nước. Các chất hay sử dụng là dextran, propylenglycol, polyetylenimin. Thường coenzym chỉ nên gắn ở mức độ thấp tránh làm giảm khả năng chuyển động và khuếch tán cũng như ảnh hưởng ức chế của chúng tới phản ứng enzym. Động thái của các phản ứng enzym này thay đổi theo từng hệ thống, tuy nhiên chúng đều tuân theo mô hình Michaelis-Menten với  $K_m$  cao hơn và  $V_m$  thấp hơn trong trường hợp không cố định coenzym. Hiện nay, đã có một số hệ thống tái tạo coenzym dựa trên nguyên tắc hóa học, điện hóa và nguyên tắc enzym. Tái tạo coenzym theo nguyên tắc enzym là ưu việt hơn cả do tính đặc hiệu cao của nó, nhưng phương pháp điện hóa lại có tính cạnh tranh hơn.

Dưới đây là hai ví dụ về tái tạo coenzym theo nguyên tắc enzym. Để có thể thực hiện được nguyên tắc này, cơ chất enzym phải rẻ và các enzym hỗ trợ quá trình phải dễ kiểm, sản phẩm cần tách ra dễ dàng, cơ chất cũng như sản phẩm của phản ứng tái tạo coenzym không ảnh hưởng tới hệ thống.



### 6.3.2.5. Sử dụng enzym trong phân tích, chẩn đoán và điều trị

Một lĩnh vực phát triển quan trọng của công nghệ enzym là sử dụng enzym trong phân tích – chẩn đoán và điều trị. Trong những năm gần đây, kỹ thuật enzym đã tiếp cận các phân tích trong chăn nuôi, trồng trọt, trong nghiên cứu sinh thái học và công nghiệp thực phẩm và đặc biệt việc sử dụng các công cụ enzym trong chẩn đoán y tế và vệ sinh môi trường.

Việc sử dụng enzym trong y học hiện mới chỉ đạt được các thành công khá hạn chế, chủ yếu là các phân tích và chẩn đoán. Việc sử dụng enzym như là một tín hiệu cảnh báo hoặc điều trị hiện đang gặp nhiều khó khăn, chủ yếu là:

- Các enzym là các polyme lớn, khó có thể đưa vào trong các tế bào của cơ thể. Đây là lý do cơ bản hạn chế khả năng khai thác việc sử dụng enzym trong chẩn trị các bệnh di truyền. Nhiều phương pháp đã được phát triển và áp dụng để giải quyết vấn đề này bằng cách sử dụng enzym hướng đích. Ví dụ như enzym với liên kết cộng hóa trị gắn vào gốc galactose có tác dụng hướng đích tế bào gan, enzym với liên kết cộng hóa trị gắn kháng thể đơn dòng đặc hiệu được sử dụng để tránh các hiệu ứng phụ do tính không đặc hiệu gây nên.

– Do có bản chất protein, các enzym khi vào cơ thể có thể đóng vai trò một kháng nguyên và cảm ứng phản ứng miễn dịch của cơ thể. Điều này có thể gây nên các phản ứng dị ứng đặc biệt khi sử dụng trong thời gian dài. Trong một vài trường hợp có thể giải quyết vấn đề này bằng cách biến đổi enzym thành chất không còn bản chất protein nhờ các liên kết cộng hóa trị. Khi ấy, enzym này thể hiện hoạt tính chống khối u và không gây nên bất cứ một đáp ứng miễn dịch nào. Tuy nhiên việc sử dụng enzym cần đảm bảo không kèm theo độc tố. Chính vì thế mà các enzym động vật được sử dụng phổ biến hơn enzym vi sinh vật cho dù giá thành của chúng cao hơn enzym vi sinh vật.

– Các enzym có thể được kéo dài thời gian bán hủy nhờ các phương pháp khác nhau: tạo ra các liên kết cộng hóa trị, bao enzym bởi một lớp vỏ nhân tạo. Tuy thời gian hoạt động của các enzym được cải thiện song cũng có thể gây nên các phản ứng miễn dịch hoặc tạo ra các cục máu đông.

Các enzym sử dụng trong chẩn đoán, điều trị cần có độ tinh sạch và đặc hiệu cao. Các giá trị  $K_m$  phải thấp và  $V_{max}$  cao để đạt được hiệu quả sử dụng ngay cả ở nồng độ enzym và cơ chất thấp. Giá thành của các chế phẩm enzym này tuy cao nhưng vẫn có thể cạnh tranh được với các hóa trị đắt tiền.

#### **6.3.2.6. Bảo vệ môi trường**

Việc sử dụng enzym quan trọng nhất trong công tác bảo vệ môi trường là sử dụng enzym trong “công nghệ cuối đường ống”- trong xử lý chất thải, chuyển các chất thải thành các sản phẩm có ích, hoặc trong công nghệ tái sử dụng phế thải, chuyển các phế thải thành các sản phẩm có ích. Trong trường hợp này, các enzym được sử dụng dưới dạng các chế phẩm kỹ thuật. Ngoài ra, do trong môi trường còn chứa rất nhiều các thành phần khác nên đòi hỏi các enzym phải có độ đặc hiệu cao. Chính yêu cầu này đặt ra thách thức lớn cho việc sử dụng enzym trong công tác bảo vệ môi trường. Một trong các xu hướng bảo vệ môi trường là sử dụng enzym vì mục đích phát triển công nghiệp bền vững. Người ta hy vọng enzym sẽ giúp phát triển chiến lược sản xuất sử dụng nguyên liệu tái chế, thay thế các kỹ thuật sử dụng hóa chất bằng các vật liệu và quá trình sinh học.

Công nghệ enzym hiện đang ở giai đoạn chín mùi để phát triển. Lý thuyết về enzym đã và đang được tích lũy. Việc sử dụng enzym đã và đang được nhân rộng trong nghiên cứu, trong công nghiệp và ngày càng tìm thấy các ứng dụng đặc biệt không thể thay thế được. Tuy vậy, vẫn còn rất nhiều khoảng trống trong kiến thức về enzym cả về phương diện lý thuyết cũng như thực nghiệm. Việc phát hiện các enzym tự nhiên mới trong hệ sinh thái cũng như thiết kế các enzym còn đều đang ở phía trước.

## Tài Liệu Tham Khảo

1. Aehle Wolfgang, 2004 Enzyme in industry, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co.kgA.
2. Andres Illanes, 2008, Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications, Springer Science Publishing
3. Anthony P. Turner F, 1996, Biosensors: Past, Present and Future, Institute of Bioscience and Technology
4. Ashok Mulchandani, 2008, Principles of Enzyme Biosensors, vol 6 : Enzyme and Microbial Biosensors.
5. Byong H. Lee, 1996, Fundamentaks of Food Biotechnology, VCH Publisher
6. Bommarius, A. S, Riebel. B. R, 2004, Biocatalysis and Applications Wiley -VCH Verlag GmbH and Co.kgA.
7. Campbell, C. N, Gal. D, Cristies. N, Barditrat. C, 2002, Enzyme – amplified amperometric Sandwich test for RNA and DNA – Anal chem, pp158-162.
8. Erika Kressroger, 1997, Handbook of Biosensors and Electronic Noces Medicine, Foof and the Environment. CRC Press.
9. FOX. P.F, 1991, Food Enzymology-Vol2-Elivier Science Publishers LTD.
10. Georgres Hennen, 1998, Biochimie 1<sup>er</sup> Cycle, Dunod, Paris
11. Gerard Coutouly, 1991, Genie Enzymaticque. CO-Edition Masson-Doin.
12. Graham Romsay, 1998, Commercial Biosensors-Application to Chilical Bioprocess and Environment Samples, Chem, Anal. Vol 148.
13. Hideaki Nakamura, Isao Karube, 2003, Current Reseach Activity in Biosensors Anal Bianal Chem 377.
14. Josh Haacker, 1997, Immobilized Enzyme. Weiley, Chichester.



15. Jacquer-Henry Well, 1997, *Biochimie General*. Masson Paris.
16. Kiyoshi Toko, 2000, *Biometric Sensor Technology*. Cambridge University Press.
17. Lehninger, A. L, 2004, *Principles of Biochemistry*, 4<sup>th</sup> Edition, U. H. Freeman.
18. Martin Chaplin, Christopher Buckler, 1990, *Enzym Technology*, Cambridge University Press.
19. Nicholas, Price, Lewis Stevens, 1984, *Fundamentals of Enzymology*. Oxford University Press.
20. Publications of " 2001 Annual Meeting and Food Expo" -6-2002. Anaheim, California, Session 76A-Biotechnology.
21. R.Monsan.G, Durand, 1985, *Biochimie Appliquee*.
22. Wang D.I.C, Cooney C.L, Demain A.L, 1979, *Fermentation and Enzyme Technology*, Wiley, New York.