

Mục lục

Chương 1:	NGUYÊN LIỆU THU ENZIM VÀ PHÂN BỐ.....	3
1.1.	Nguồn động vật:	3
1.2.	Nguồn gốc thực vật:	4
1.3.	Nguồn vi sinh vật:	4
Chương 2:	SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM ENZIM TỪ VI SINH VẬT	5
2.1.	Điều hoà quá trình sinh tổng hợp enzym trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật.....	5
2.2.	Tuyển chọn và cải tạo giống vi sinh vật cho enzym có hoạt lực cao:	11
2.3.	Phương pháp bảo quản giống vi sinh vật :	12
2.4.	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzym:	13
2.5.	Các phương pháp nuôi cấy vi sinh vật:	17
2.6.	Tách và làm sạch chế phẩm enzym :	22
Chương 3:	KỸ THUẬT SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TỪ HẠT CỐC NẤY MÂM (MALT).....	24
3.1.	Nguyên liệu đại mạch:	24
3.2.	Làm sạch và phân loại hạt:	25
3.3.	Rửa, sát trùng và ngâm hạt:	26
3.4.	Nảy mầm:	28
3.5.	Sấy malt:	34
3.6.	Tách mầm, rế, bảo quản malt:	37
3.7.	Kỹ thuật sản xuất một số loại malt đặc biệt:	38
Chương 4:	SẢN XUẤT ENZIM TỪ THỰC VẬT	40
4.1.	Sản xuất ureaza từ đậu rựa:	40
4.2.	Thu nhận bromelain từ dứa:	40
Chương 5:	ENZIM CỐ ĐỊNH.....	44
5.1.	Giới thiệu chung:	44
5.2.	Một số phương pháp chủ yếu chế tạo enzym cố định :	44
5.3.	Một số liên kết trong việc cố định enzym.	45
5.4.	Ảnh hưởng của sự cố định đến hoạt tính của enzym.	46
5.5.	Các reactor chứa enzym cố định:	48
5.6.	.. Sử dụng enzym cố định trong y học và trong công nghiệp:	50
Chương 6:	GIỚI THIỆU MỘT SỐ LOẠI ENZIM CHỦ YẾU VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG	55
6.1.	Amylaza.....	55
6.2.	Proteaza	58
6.3.	Pectinaza.....	60
6.4.	Xenluloza:	64

6.5. Saccharaza và glucooxydaza	66
Chương 7: PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ MỘT SỐ LOẠI ENZIM.....	68
7.1. Đơn vị đo hoạt độ:	68
7.2. Các phương pháp xác định hoạt độ enzym:	69
7.3. Chuẩn bị dịch chiết enzym để xác định hoạt độ.....	71

Chương 1: NGUYÊN LIỆU THU ENZIM VÀ PHÂN BỐ

1.1. Nguồn động vật:

1.1.1. Tụy tạng: (Pan creas)

Đây là nguồn enzym sớm nhất, lâu dài nhất, có chứa nhiều loại enzym nhất như: tripxin, kimotripxin, cacboxy pectidaza A và B, ribonucleaza, amilaza, lipaza.

- + Tripxin y học phải là loại tinh chế.
- + Ứng dụng đầu tiên của chế phẩm tripxin là làm mềm da để lột da, khử các vết nứt trên da.
- + Sản xuất sản phẩm thủy phân protein y học (dịch truyền y tế) và môi trường nuôi cấy vsv.
- + Chế phẩm dịch tụy y học để chữa bệnh về tụy (rối loạn chức năng, bị cắt bỏ tụy).
- + Sản xuất chế phẩm enzym tẩy rửa (vết bẩn, màu khó tan) ở nhiệt độ vừa phải, không thích hợp với nhiệt độ cao và pH thay đổi.

1.1.2. Màng nhầy dạ dày lợn:

Là nguồn enzym pepxin A, B, C, D, gastrisin. Các enzym này được tiết ra ngoài tế bào cùng với dịch vị (khi tiêu hoá thức ăn). Đối với các typ pepxin có $pH_{opt}=1.3\div 2.2$.

1.1.3. Dạ dày bê:

Trong ngăn thứ tư của dạ dày bê có tồn tại enzym thuộc nhóm Proteaza tên là renin. Enzim này đã từ lâu được sử dụng phổ biến trong công nghệ phomat. Renin làm biến đổi casein thành paracasein có khả năng kết tủa trong môi trường sữa có đủ nồng độ Ca^{2+} . Đây là quá trình đông tụ sữa rất điển hình, được nghiên cứu và ứng dụng đầy đủ nhất. Trong thực tế nếu chế phẩm renin bị nhiễm pepxin (trong trường hợp thu chế phẩm renin ở bê quá thì. Khi đó, dạ dày bê đã phát triển đầy đủ có khả năng tiết ra pepxin) thì khả năng đông tụ sữa kém đi.

Gần đây có nghiên cứu sản xuất proteaza từ vsv có đặc tính renin như ở các loài Eudothia Parasitica và Mucor Purillus.

1.1.4. Các loại nội tạng khác:

Gan, lá lách, thận, phổi, cơ hoành tim, dạ con, huyết. Các loại này đều có chứa enzym, đa số tồn tại trong tế bào. Chỉ có một số loại được sản xuất dưới dạng chế phẩm như: gan, tim lợn để tách aspartat-glutamat aminotransferaza, huyết tương (từ huyết) để tách ra trombia (Proenzim chống đông máu)

Nhìn chung nguyên liệu động vật dùng để tách enzym phải tươi tốt (lấy ngay sau khi giết mổ) hoặc giữ ở $-20^{\circ}C$ có thể được 1÷12 tháng vẫn không làm giảm hoạt tính enzym.

1.2. Nguồn gốc thực vật:

1.2.1. Cây đậu rựa (Canavalin ensifirmis):

Đây là cây thuộc họ đậu Canavalia – có nhiều ở châu Phi, ở Việt Nam có nòi kể trên. Trong tất cả các nòi đậu rựa đều rất giàu enzym Ureaza, hàm lượng có thể đến 20% chất khô.

1.2.2. Họ dứa (Bromalaceae):

Bao gồm tất cả các nòi dứa trồng lấy quả, lấy sợi (kể cả các nòi dứa dại). Trong các bộ phận khác nhau của cây dứa (vỏ, lõi, chồi, thân, lá,...) đều có chứa enzym bromelain. Trong đó nhiều nhất là phần lõi đầu quả dứa. Hoạt tính của enzym bromelain phụ thuộc nhiều vào trạng thái và điều kiện bảo quản nguyên liệu. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các nguyên liệu sấy khô ở nhiệt độ 400C sẽ giữ được hoạt tính enzym tốt hơn so với nguyên liệu đã được bảo quản lạnh ở nhiệt độ 4⁰C.

1.2.3. Nhựa đu đủ (Carica Papaya. L):

Đây là loại cây ăn quả phổ biến ở các nước nhiệt đới. Từ quả tươi hoặc thân thu được nhựa (latex) chính là chế phẩm papain thô để từ đó tinh chế thành papain thương phẩm. Hiện nay người ta đã tạo ra được các giống đu đủ có sản lượng mủ và hoạt tính papain cao để khai thác có hiệu quả nguồn enzym này (không đặt vấn đề lấy quả).

1.2.4. Một số loại nguyên liệu thực vật khác:

Khi tiến hành nghiên cứu khoa học, y sinh học, nhiều khi cần xem xét (định tính, định lượng, cấu trúc phân tử, độ hoạt động enzym, ...) của một số loại enzym có trong bản thân nguyên liệu đó để định lượng sử dụng. Đáng chú ý hơn cả là:

Chế phẩm enzym Polyphenoloxydaza (EPPO): điển hình nhất là eppo của lá chè, của nội nhũ hạt ca cao tươi, nước ép quả nho. Chế phẩm loại này phổ biến hơn cả là loại “bột axeton”.

1.2.5. Hạt cốc và một số loại củ chứa tinh bột:

Trong hạt cốc nảy mầm (malt) và một số loại củ nảy mầm (điển hình là khoai lang) có một hệ enzym rất phong phú được người ta sử dụng từ rất lâu trong các lĩnh vực: mật tinh bột (mạch nha), rượu và bia (thậm chí có một phương pháp sản xuất rượu etylic mang tên là phương pháp maltaza hay phương pháp malt)

1.3. Nguồn vi sinh vật:

Đây là nguồn enzym phong phú nhất, có ở hầu hết các loài vi sinh vật như: nấm mốc, vi khuẩn và một số loài nấm men. Có thể nói vi sinh vật là nguồn nguyên liệu thích hợp nhất để sản xuất enzym ở qui mô lớn dùng trong công nghệ và đời sống. Dùng nguồn vi sinh vật có những lợi ích chính như sau:

+ Chủ động về nguyên liệu nuôi cấy vi sinh vật và giống vi sinh vật.

+ Chu kỳ sinh trưởng của vi sinh vật ngắn: 16÷100 giờ nên có thể thu hoạch nhiều lần quanh năm.

+ Có thể điều khiển sinh tổng hợp enzym dễ dàng theo hướng có lợi (định hướng sử dụng và tăng hiệu suất tổng thu hồi).

+ Giá thành tương đối thấp vì một trường tương đối rẻ, đơn giản, dễ tổ chức sản xuất.

Tuy nhiên trong mọi trường hợp cần lưu ý khả năng sinh độc tố (gây độc, gây bệnh) để có biện pháp phòng ngừa, xử lý thích hợp.

Để sản xuất chế phẩm enzym, người ta có thể phân lập các giống vi sinh vật có trong tự nhiên hoặc các giống đột biến có lựa chọn theo hướng có lợi nhất, chỉ tổng hợp ưu thế một loại enzym nhất định cần thiết nào đó.

Chương 2: SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM ENZIM TỪ VI SINH VẬT

2.1. Điều hoà quá trình sinh tổng hợp enzym trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Với mục đích nuôi cấy thu hồi enzym với hiệu suất cao, cần phải nhận rõ quá trình điều hoà sinh tổng hợp enzym để có các định hướng tác động thích hợp trong công nghệ. Tế bào vi sinh vật chỉ tổng hợp enzym khi cần thiết với số lượng thích hợp mong muốn.

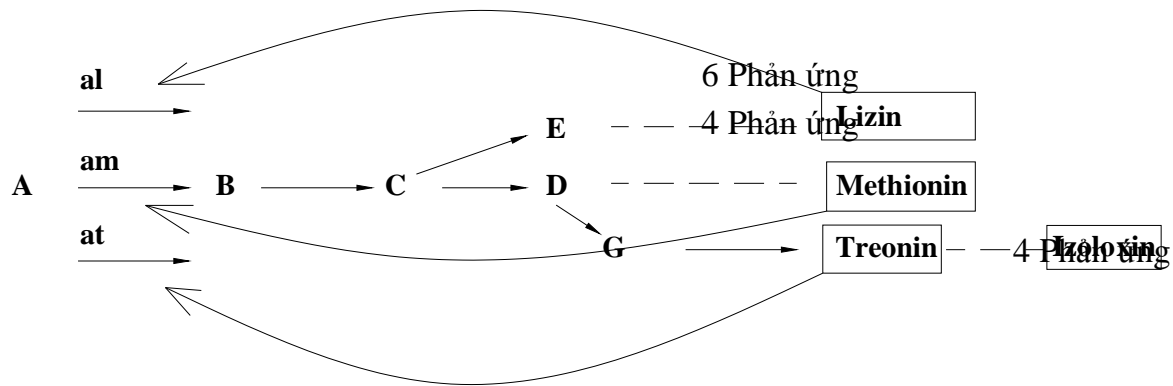
2.1.1. Điều hoà theo hướng đóng mở bởi gen operator (gen điều khiển) _hiện tượng trấn áp :

+ hiện tượng trấn áp (ức chế) (repression): là làm giảm quá trình sinh tổng hợp do sản phẩm cuối cùng của quá trình nuôi cấy. Hiện tượng này thường gặp đối với các enzym xúc tác quá trình sinh tổng hợp một chiều như: quá trình sinh tổng hợp axit amin, nucleotit.

Ví dụ: khi thêm một axit amin nào đó vào môi trường nuôi cấy thì tế bào sẽ không cần tổng hợp nữa. Do đó cũng sẽ đình chỉ quá trình sinh tổng hợp enzym, xúc tác cho quá trình tổng hợp nên chính axit amin đó. Enzym này chỉ được tổng hợp trở lại khi có nhu cầu nghĩa là khi làm giảm nồng độ axit amin tương ứng. Đối với hệ thống phân nhánh nghĩa là quá trình dẫn đến việc tạo thành nhiều sản phẩm cuối cùng khác nhau từ một cơ chất chung ban đầu thì cơ chế trấn áp có thể được thực hiện theo các cách khác nhau.

Ví dụ: Phản ứng đầu tiên của quá trình sinh tổng hợp các axit amin lizin, methionin, treonin đều do enzym aspactokinaza xúc tác. Enzym này có 3 izoenzim.

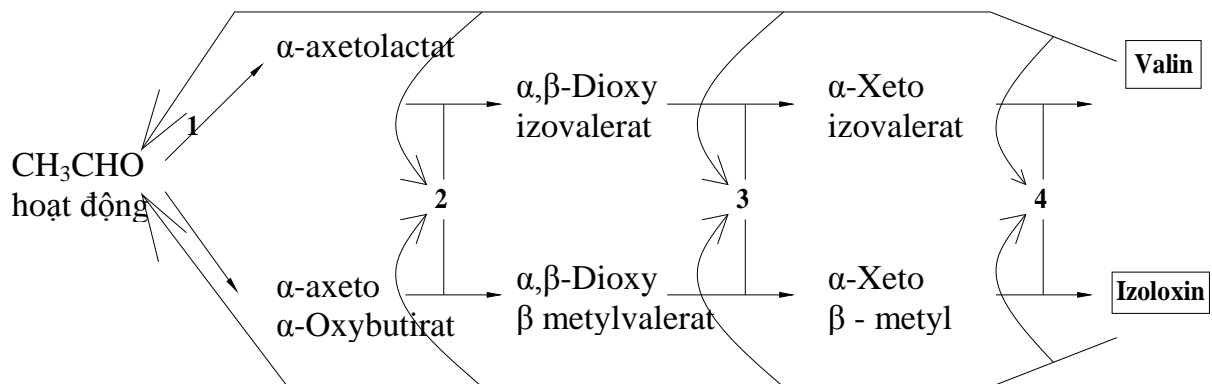
Ký hiệu: a_1 , a_m , a_t . Quá trình sinh tổng hợp a_1 sẽ bị trấn áp bởi nồng độ lizin. a_m của methionin. Riêng đối với a_t thì treonin vừa là sản phẩm cuối cùng của cả quá trình vừa là cơ chất ban đầu để sinh tổng hợp izoloxin. Do đó quá trình sinh tổng hợp axit_t chỉ bị trấn áp khi cả treonin và izoloxin đạt nồng độ cao vượt quá nhu cầu của tế bào. Có thể minh hoạ cơ chế trấn áp này theo sơ đồ:



Ghi chú: A – Cơ chất Aspartic ban đầu.

B, C, D, G là các sản phẩm trung gian có tác dụng trấn áp.

Như vậy ở đây sự trấn áp chỉ xảy ra khi có sự hợp đồng tác dụng của cả 2 sản phẩm. Nếu trấn áp hợp đồng này cùng xảy ra đối với quá trình sinh tổng hợp enzym giống nhau xúc tác cho các phản ứng song song tạo thành 2 sản phẩm cuối cùng khác nhau. Ví dụ: quá trình sinh tổng hợp valin và izoloxin do 4 enzym giống nhau xúc tác theo sơ đồ sau:



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

+ Hiện tượng cảm ứng (induction): là hiện tượng ngược lại với hiện tượng trấn áp làm tăng lượng enzym của tế bào

- (Ghi chú ở sơ đồ trên: 1: α-axeto.α-oxyaxítintetaza
 2: reductoizomeraza (axetolactat mutaza)
 3: hydrooxyaxit dehydrataza
 4: amino transpheraza

Nghĩa là khi trong môi trường nuôi cấy có chất cảm ứng sẽ kích thích cho vi sinh vật sinh tổng hợp nên nhiều enzym hơn so với bình thường.

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

Trong số các enzym do vi sinh vật tổng hợp, có những enzym bình thường chỉ được tổng hợp rất ít ỏi nhưng khi thêm một số chất nhất định vào môi trường nuôi cấy thì hàm lượng của chúng có thể tăng lên rất nhiều lần. Monod và Cohn (1925) gọi các enzym này là enzym cảm ứng, chất gây nên hiệu quả này là gọi là chất cảm ứng. Các enzym cảm ứng thường là những enzym xúc tác cho quá trình phân giải như: Proteinaza, amylaza, pectinaza, penixilinaza, β _galactosidaza ở tế bào E. coli. Khi nuôi cấy E. coli trong môi trường glucoza và glyxerin, vi khuẩn chỉ tổng hợp khoảng 10 phần tử β _galactosidaza/tế bào. Nếu nuôi cấy trên môi trường lactoza là nguồn các bon duy nhất thì hàm lượng enzym là 6÷7% tổng hợp lượng protein của tế bào. Trích ra từ tế bào chứa đến 6000 phần tử enzym, nghĩa là tăng lên gần 1000 lần so với khi nuôi cấy trong môi trường củ.

Sự cảm ứng thường có tính chất dây chuyền. Trong hệ thống gồm nhiều phản ứng, cơ chất đầu tiên của hệ thống có thể cảm ứng quá trình sinh tổng hợp tất cả các enzym xúc tác cho quá trình chuyển hoá của nó. Điều này được thực hiện theo cơ chế sau: Trước hết chất cảm ứng làm tăng quá trình sinh tổng hợp enzym tương ứng, sau đó sản phẩm này lại cảm ứng tổng hợp enzym để phá huỷ nó, tiếp theo sản phẩm thứ 2 này lại cảm ứng tổng hợp nên enzym thứ 3,...

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

+ Cơ chế điều hòa theo kiểu trấn áp và cảm ứng:

Zocob và Monod đã đề ra mô hình giải thích cơ chế của 2 hiện tượng trấn áp và cảm ứng trên cơ sở di truyền. Theo mô hình này, sự trấn áp và cảm ứng sinh tổng hợp enzym được thực hiện theo cùng một cơ chế chung dựa trên cơ sở điều hoà hoạt động của các gene dưới tác dụng của các chất phân tử thấp. Những căn cứ chính của thuyết này như sau:

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

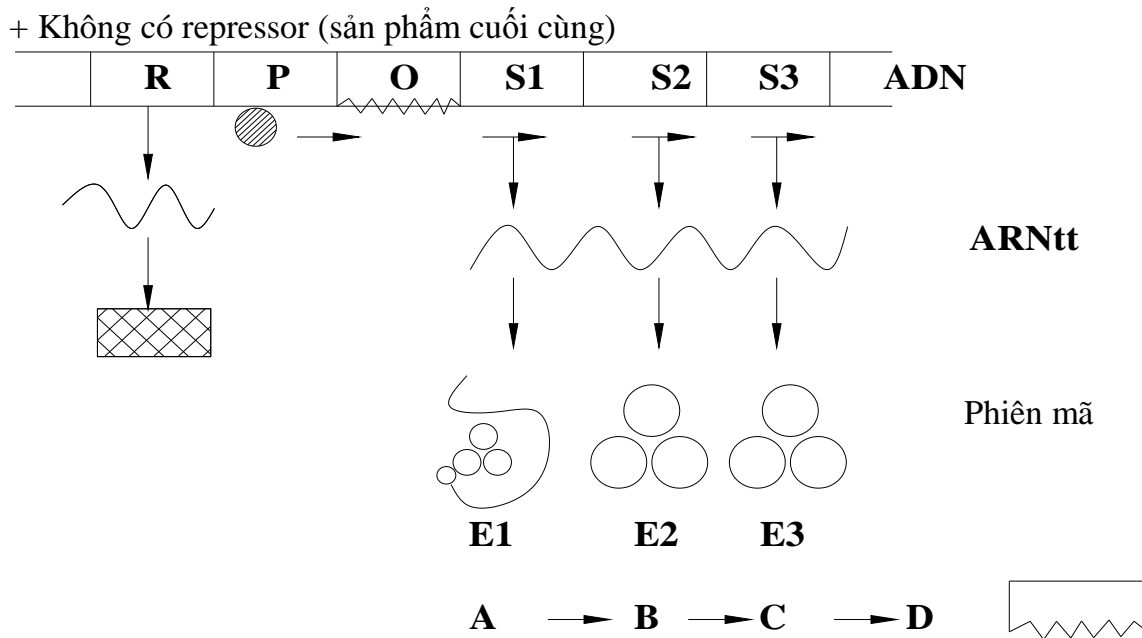
- Gene cấu trúc (ký hiệu: S_1, S_2, S_3) : mã hoá phân tử protein enzym được tổng hợp, tức là thứ tự các axit amin trong phân tử enzym được tổng hợp là tùy thuộc vào thứ tự các nucleotit của đoạn gene này. Các gene mã hóa các enzym được sắp xếp liền nhau thành một nhóm trên nhiễm sắc thể. Chúng là khuôn để tổng hợp phân tử ARN_{tt}.

- Gene Operator (ký hiệu: O): ở cạnh nhóm gene cấu trúc, không mã hoá protein nhưng đảm bảo cho quá trình sao chép mã ở gene cấu trúc theo cơ chế “Đóng mở” tựa như công tắc của một dây đèn. Quá trình sao chép chỉ có thể tiến hành khi gene operator ở trạng thái “mở” (không kết với chất nào cả) và ngừng lại khi nó bị “đóng” (kết hợp với một chất đặc biệt gọi là chất trấn áp represson). Một gene operator có thể “phụ trách” một nhóm gene cấu trúc các gene cấu trúc này cùng với gene operator của chúng hợp thành

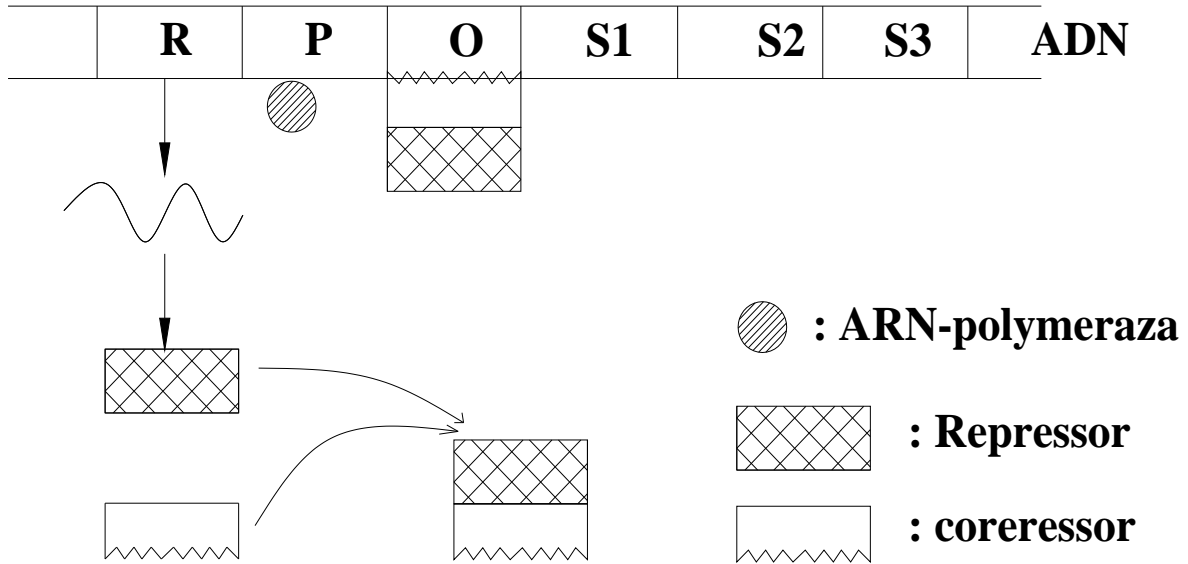
một đơn vị sao chép sơ cấp gọi là một operon. Sự tổng hợp ARN_{tt} được bắt đầu ở một đầu của operon và chuyển qua các gene cấu trúc để đến đầu kia của operon.

- Gene Promotor (gene hoạt hoá ký hiệu P) Đứng trước gene operator là đoạn And mà ARN-polimeraza sẽ kết hợp và bắt đầu quá trình sao chép các gene cấu trúc.

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



+ Có repressor (sản phẩm cuối cùng):

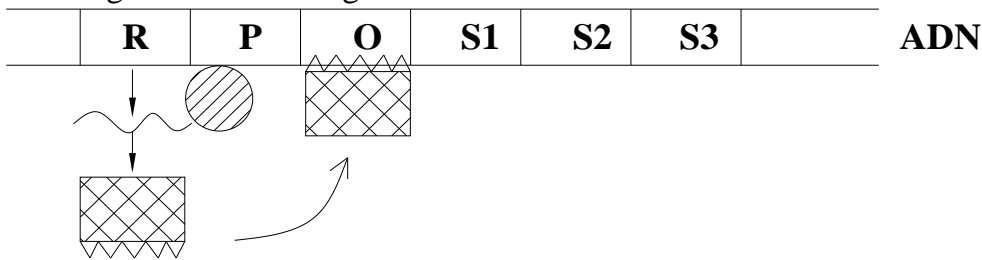


R: Gene điều hoà, P: Gene promotor, O: Gene Operator,
 S1, S2, S3: Các gene cấu trúc.

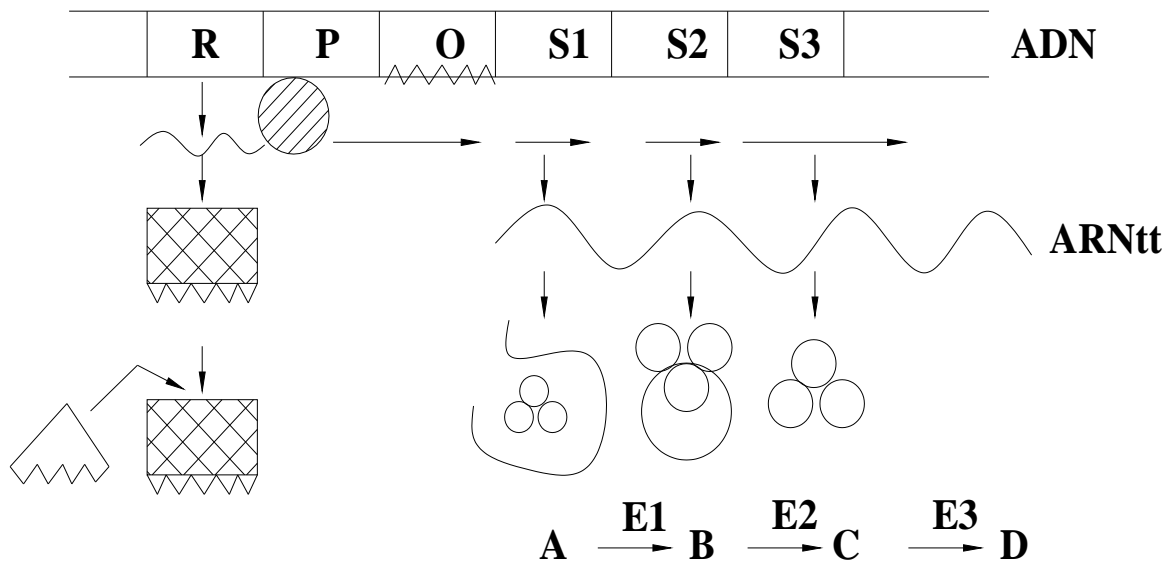
2) Trong trường hợp điều hoà sinh tổng hợp enzym theo cơ chế trấn áp, repressor do gene điều hoà tổng hợp còn ở dạng không hoạt động (aporepressor) chưa có khả năng kết hợp với gene operator nên quá trình sao chép các gene cấu trúc tiến hành bình thường. Các enzym được tổng hợp xúc tác cho các phản ứng để tạo thành các sản phẩm cuối cùng, sản phẩm cuối cùng này lại có khả năng kết hợp với aporepressor và hoạt hoá nó. Aporepressor đã được hoạt hoá sẽ kết hợp với operator ngăn cản quá trình sao chép các gene cấu trúc, làm ngừng việc tổng hợp ARN_t tương ứng do đó đình chỉ quá trình sinh tổng hợp các enzym tương ứng. Trong trường hợp này các sản phẩm mới được coi như là chất trấn áp (repressor).

3) Đối với trường hợp cảm ứng:

+ Không có chất cảm ứng



+ Có chất cảm ứng:



Sơ đồ minh họa cơ chế cảm ứng sinh tổng hợp enzym



: Chất cảm ứng

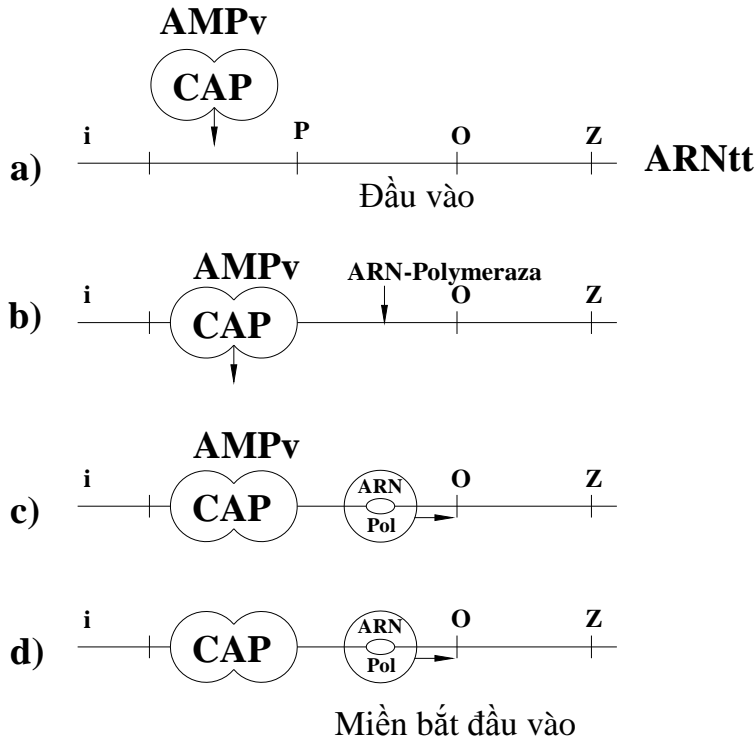
Khi không có mặt chất cảm ứng, chất trấn áp (repressor) được tổng hợp đã ở trạng thái hoạt động, nó kết hợp với gene điều khiển operator, quá trình sao chép mã của gene cấu trúc bị bao vây nên các enzym tương ứng không được tổng hợp.

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

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

2.1.2. Điều hoà tương tác giữa ARN-polymeraza với gene promotor:

Nhiều dấu hiệu thực nghiệm cho thấy các gene bảo đảm sinh tổng hợp một số enzym cảm ứng xúc tác cho quá trình phân giải không chỉ chịu sự kiểm tra theo cơ chế cảm ứng như đã trình bày ở trên mà còn chịu sự kiểm tra theo một cơ chế khác nhờ tác dụng của AMP vòng (AMP_v) gọi là “trấn áp phân giải” (catabolic repressor) AMP_v có tác dụng kích thích của AMP_v đối với quá trình sao chép mã của các operon phân giải. Hiện tượng này đã được nghiên cứu nhiều đối với operon lactoza. Theo nhiều tác giả, tác dụng kích thích của AMP_v đối với quá trình sao chép mã được thực hiện nhờ một protein đặc biệt làm trung gian gọi là protein nhận AMP_v , hay còn gọi là protein hoạt hoá gene phân giải CAP (catabolite gene activator protein). Khi AMP_v kết hợp với CAP tạo thành phức hợp có tác dụng hoạt hoá gene promotor làm cho ARN-polymeraza dễ dàng kết hợp với nó để bắt đầu quá trình sao chép mã. Như vậy AMP_v có tác dụng làm tăng cường quá trình sao chép. Cũng có ý kiến cho rằng phức hợp AMP_v -CAP-ARN-polymeraza cho phép bắt đầu quá trình sao chép mã.



Mô hình bắt đầu sao chép mã của operon lactoza

a – Phức hợp CAP-AMP_v chuẩn bị kết hợp vào miền đặc biệt của ADN.

b – Sau khi phức CAP-AMP_v kết hợp vào, nó làm yếu đoạn ADN.

c - ARN-polymeraza kết hợp vào miền đặc biệt của nó.

d - ARN-polymeraza “trượt” dọc theo đoạn ADN như một “cái bọ” đến miền bắt đầu.

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

2.2. Tuyển chọn và cải tạo giống vi sinh vật cho enzym có hoạt lực cao:

Để chọn giống vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzym cao, người ta có thể phân lập từ môi trường tự nhiên hoặc có thể dùng các tác nhân gây đột biến tác động lên bộ máy di truyền hoặc làm thay đổi đặc tính di truyền để tạo thành các biến chủng có khả năng tổng hợp đặc biệt hữu hiệu một loại enzym nào đó, cao hơn hẳn chủng gốc ban đầu.

2.2.1. Phương pháp gây đột biến:

Đây là phương pháp hay được dùng nhất nhằm để:

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

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

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

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

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

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

2.2.2. Phương pháp biến nạp:

Là sự biến đổi tính trạng di truyền của một nòi vi sinh vật dưới ảnh hưởng của ADN trong dịch chiết nhận được từ tế bào của vi sinh vật khác. Ở đây yếu tố biến nạp là ADN. Sự chuyển vật liệu di truyền (ADN) từ tế bào cho đến tế bào nhận có thể xảy ra trong ống nghiệm (invitro) khi cho tế bào nhận tiếp xúc với dịch chiết từ tế bào cho mà không có sự tiếp xúc giữa các tế bào.

Các tế bào có thể nhận bất kỳ loại ADN nào chứ không đòi hỏi phải là ADN từ các giống họ hàng. Tuy nhiên tế bào chỉ có thể nhận một số đoạn ADN nhất định, thường không quá 10 đoạn. Các đoạn ADN được di truyền trong biến nạp có $M=10^6-10^7$ và phải có cấu trúc xoắn kép. Tế bào không tiếp nhận các đoạn ADN có kích thước nhỏ hơn hoặc các đoạn không có cấu trúc xoắn kép. Hiện tượng biến nạp phổ biến ở nhiều loài vi sinh vật như: Diplococcus, Staphylococcus, Hemophilus, Agrobacterium, Rhizobium, Bacillus, Xantomonas.

2.2.3. Phương pháp tiếp hợp gene:

Khác với biến nạp, ở đây vật liệu di truyền chỉ được truyền từ tế bào cho đến tế bào nhận khi hai tế bào tiếp xúc với nhau. Do vậy các vi sinh vật có khả năng biến nạp thì sẽ không có khả năng tham gia tiếp hợp gene nữa. Hiện nay quá trình tiếp hợp gene đã được nghiên cứu ở một số loài vi khuẩn như E. coli, salmonella, Pseudomonas aeruginosa.

2.2.4. Phương pháp tải nạp:

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

2.3. Phương pháp bảo quản giống vi sinh vật :

Khi sử dụng vi sinh vật để sản xuất enzym cần chọn giống thuần chủng, đã được kiểm tra đầy đủ về các đặc tính hoá sinh, vi sinh, nuôi cấy và cần đặc biệt lưu ý đến điều kiện bảo quản giống. Thực tế khi bảo quản giống gốc trong một thời gian dài có thể tạo ra các biến dị ngẫu nhiên không mong muốn do đó định kỳ phải cấy chuyển và kiểm tra lại các đặc tính ban đầu.

2.3.1. Phương pháp cấy chuyen:

Đây là phương pháp phổ biến nhất để thực hiện bằng cách giữ giống trên môi trường thạch (thạch nghiêng, hộp petri,...) với thành phần môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho giống vi sinh vật đó. Sau khi giống đã mọc tốt cần bảo quản ở nhiệt độ lạnh 3-4⁰C và sau mỗi tuần phải cấy chuyen lại. Khi cấy chuyen chỉ lấy bào tử hoặc khuẩn lạc mà không nên lấy cả môi trường dinh dưỡng để bảo đảm không chuyen các sản phẩm trao đổi chất vào môi trường mới (có thể gây nên những biến đổi bất lợi không thể lường hết được). Nếu là xạ khuẩn thì không nên bảo quản giống trên môi trường thạch mà nên giữ trong đất đã khử trùng.

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

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

2.3.2. Phương pháp làm khô:

Bằng cách giữ giống trên cát, đất, silicagen trong điều kiện khô ráo (tất cả đều được khử trùng cẩn thận). Trong điều kiện như vậy sẽ hạn chế sự phát triển tiếp tục của giống khi bảo quản. Phương pháp này rất hay được sử dụng để bảo quản nấm mốc, xạ khuẩn, một vài loài nấm men, vi khuẩn thời gian giữ giống có thể được 1 năm.

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

2.3.3. Phương pháp đông khô:

Tức là làm khô bằng sấy chân không thăng hoa (nêu nguyên tắc), còn gọi là sấy lạnh để tạo nên sản phẩm đông khô (thực phẩm đông khô, các vật phẩm sinh học, y học đông khô...). Đây là phương pháp bảo quản lâu dài đến 10 năm mà không làm cho giống bị biến đổi đặc tính nhưng đòi hỏi công nghệ cao, thiết bị đắt tiền, chi phí bảo quản lớn. Hơn nữa một số loài vi sinh vật như nấm mốc không có bào tử và một số loại vi rút tỏ ra không thích hợp khi bảo quản đông khô.

2.3.4. Phương pháp làm lạnh đông trong nitơ lỏng:

Khí nitơ hoá lỏng ở nhiệt độ rất thấp -165⁰C đến -196⁰C nên nếu bảo quản vi sinh vật ở môi trường này sẽ rất tốt vì giống được giữ bất biến trên 10 năm. Tuy nhiên đây là lĩnh vực công nghệ cao (cần nitơ nguyên chất và lạnh thâm độ) nên chi phí bảo quản rất cao.

2.4. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzym:

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

2.4.1. Nguồn cacbon:

Thường là hợp chất hữu cơ trong đó chủ yếu là glucit, tùy thuộc vào đặc tính của enzym và nòi vi sinh vật mà người ta lựa chọn cho thích hợp.

- Đối với các hệ vi sinh vật sinh enzym amylaza: đây là enzym cảm ứng điển hình vì vậy môi trường nuôi cấy phải có các chất cảm ứng: tinh bột, dextrin, mantozơ. Qua

nghiên cứu người ta nhận thấy ba loại glucit là nguồn cacbon tốt nhất để sinh tổng hợp amylaza đạt hiệu quả cao. Chẳng hạn hiệu suất sinh tổng hợp trên môi trường glucit khác nhau với một số loại enzym amylaza như sau:

+ Đối với α -amylaza:

Tinh bột > dextrin > mantoza > glucoza > saccaroza > galactoza > manit > avabinoza.

+ Đối với Oligo-1,6-glucoridaza (dextrinaza):

Tinh bột > dextrin > mantoza > saccaroza > glucoza > lactoza > galactoza > orabinoza > manit.

+ Đối với α -1,4-amyloglucoridaza :

Tinh bột > dextrin > mantoza > saccaroza, glucoza, lactoza, orabinoza > rabinoza > lactoza > manit.

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

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

Đối với các hệ vi sinh vật sinh enzym Proteaza:

Có một số nguồn glucit khi dùng nuôi cấy nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzym Proteaza có hoạt lực cao, chẳng hạn theo thứ tự sau:

+ Đối với Asp. Flavus 74: fructoza > glucoza > saccaroza > ramnoza > mantoza > galactoza > orabinoza > lactoza.

+ Đối với Asp. Awamori 200: fructoza > manit > saccaroza > orabinoza > galactoza > lactoza.

+ Đối với Asp. Oryae 79: fructoza > saccaroza > mantoza > glucoza > manit > orabinoza > galactoza > lactoza.

Tinh bột là nguồn cacbon của nhiều chủng vi khuẩn sinh tổng hợp enzym proteaza. Ví dụ: Vi khuẩn Bac. Subtilis có khả năng sinh tổng hợp proteaza ở môi trường tinh bột >8%, giống xạ khuẩn ưa nhiệt Micromonospora vulgaricus sinh tổng hợp proteaza trong môi trường 0.15-0.25% tinh bột.

Ngoài ra một số loại hydrocacbon cũng có nguồn cacbon cho 125 chủng vi sinh vật. Chẳng hạn, một số giống vi khuẩn Pseudomonas semginosa có khả năng sinh tổng hợp proteinaza hoạt lực cao trên môi trường n-paraphin với 12, 14, 16 nguyên tử C hoặc propylenglycol, hydrocacbon thơm.

- Đối với các hệ vi sinh vật sinh enzym Pectinaza:

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

Giống Asp. Niger được nuôi cấy trên môi trường có nhiều nguồn cacbon như: Pectin, tinh bột, isulin, lactoza, saccaroza, mantoza, galactoza nồng độ 2, 4, 6% sẽ cho pectinaza có hiệu suất cao. Tuy nhiên nên nuôi cấy trên môi trường chỉ có monosacarit và glyxerin thì hoàn toàn không thể sinh tổng hợp enzym này. Đường glucoza có tác dụng kìm hãm

(chất trấn áp) sinh tổng hợp enzym pectinaza trên môi trường nuôi cấy là pectin và lactoza đối với loài *Asp. Niger*, *Asp. Awamori*.

- Đối với các hệ vi sinh vật sinh enzym xenluloza.

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

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

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

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

+ Các axit béo phân tử lượng lớn (oleic, stearic, miniotic). Ví dụ: axit oleic có tác dụng kích thích tổng hợp glucoamylaza lên 2.5-3.5 lần so với nồng độ thích hợp 2-3%.

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

+ Trong số các axit hữu cơ thì axit lactic hay được vi sinh vật hấp thụ để tổng hợp enzym. Tuy nhiên người ta thường không bổ sung trực tiếp axit này vào môi trường nuôi cấy mà chỉ bổ sung loại nguyên liệu hay chế phẩm có chứa nó hoặc sẽ gây sinh ra nó trong quá trình nuôi cấy.

2.4.2. Nguồn nitơ:

- Đối với hệ vi sinh vật sinh enzym amylaza:

Ở nhiều loài nấm mốc, nguồn nitơ tốt nhất là NaNO_3 và NH_4NO_3 , nồng độ nitơ dưới mức 0.05% nấm mốc vẫn phát triển được nhưng sinh tổng hợp amylaza rất kém.

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

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

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

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

- Đối với hệ vsv sinh enzyme proteaza:

Nguồn nitơ sử dụng rất phong phú, bao gồm 2 nhóm: vô cơ và hữu cơ.

+ Đối với một số loài nấm mốc thuộc họ *Asp. (oryzae, awamori, niger, flavas)* nếu môi trường có nguồn nitơ hữu cơ thì sẽ sinh tổng hợp proteinaza axit tính cao. Trên môi trường Czapek nếu thay NaNO_3 bằng casein thì hoạt lực proteinaza có thể tăng lên 3,5 lần. Sinh tổng hợp enzyme proteaza được nâng cao khi môi trường nuôi cấy có cả hai nguồn nitơ hữu cơ và vô cơ. Nếu môi trường chỉ có nguồn nitơ vô cơ sẽ dẫn đến ngừng sinh tổng hợp enzyme này.

+ Trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn, trong số các nguồn nitơ vô cơ thì NH_4 , H_2PO_4 là tốt hơn cả. Các muối amon và nitrat khác đều làm giảm hoạt lực enzyme.

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

+ Các axit amin có ảnh hưởng rõ rệt nhất đến quá trình sinh tổng hợp enzyme vsv nói chung. Chẳng hạn glyxin, alanin, metionin, loxin làm tăng hoạt lực proteaza của chủng đột biến *Asp. Oryzae* 251-90 lên 16% và chủng nguyên thủy *Asp. Oryzae* 132-63 lên 7 - 14%. Nhiều axit amin lại có tác dụng ức chế sinh tổng hợp enzyme như: valin, axit glutamic, izoloxin, treonin. Nói chung có khoảng 10 axit amin như vậy. Axit amin có tác dụng kích thích sinh tổng hợp enzyme khi trong tế bào vsv không tự tổng lượng đủ lượng axit amin tự do so với môi trường nuôi cấy.

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

- Đối với hệ vsv sinh tổng hợp enzyme pectinaza:

Cũng giống như đối với hệ vsv sinh tổng hợp enzyme proteaza, nếu dùng kết hợp nitơ hữu cơ và vô cơ sẽ có tác dụng tốt đến quá trình sinh tổng hợp pectinaza. Tuy nhiên, muối nitrat kim loại kiềm lại kiềm hãm enzyme này. Đối với *Asp. Niger*, nguồn nitơ tốt kém nhất để sinh tổng hợp pectinaza là $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Đối với *Asp. Awamori* thì lại là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Trong khi đó thì N từ pepton, casein thủy phân là hoàn toàn ức chế sự tạo thành enzyme.

- Đối với nấm mốc *Asp. Foetidus* thì $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nước chiết cám, nước chiết nấm men có tác dụng nâng cao hoạt lực polygalacturonaza. Nói chung, tỉ lệ thích hợp nhất đối với C/N khi tổng hợp pectinaza trong khoảng 7/1- 13/1.

- Đối với hệ vsv sinh enzyme xenlulaza.:

Nguồn nitơ thích hợp nhất đối với nhóm vsv này là nguồn muối nitrat. Trong đó NaNO_3 làm cho môi trường kiềm hoá tạo điều kiện thuận lợi cho sự tạo thành xenlulaza. Cao ngô và cao nấm men (kể cả nước chiết nấm men) cũng có tác động khác nhau đến khả năng sinh tổng hợp xenlulaza tùy thuộc giống vsv. Các muối amoni đã có tác dụng thậm chí ức chế quá trình sinh tổng hợp vì chúng làm cho môi trường bị axit hoá gây ức chế quá trình sinh tổng hợp thậm chí làm mất hoạt tính enzyme ngay sau khi tạo thành trong môi trường.

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

- Muối khoáng rất cần thiết cho hoạt động của vsv, đặc biệt là đối với các quá trình sinh tổng hợp các enzyme kim loại. Để sinh tổng hợp α -amylaza và glucoamylaza, nồng độ MnSO_4 thích hợp nhất là 0,05%. Nếu thiếu muối này và muối photphat kali thì vsv không thể sinh tổng hợp được dextrinaza. Hoạt lực α -amylaza và dextrinaza được nâng cao ở nồng độ KH_2PO_4 1% và hoạt lực glucoamylaza ở nồng độ KCl 0,05%, dextrinaza ở nồng độ thích hợp nhất là 0,15%.

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

- Lưu huỳnh S với nguồn chủ yếu là các axit amin chứa S như metionin, cystein, sistin, và các muối sunphat (CuSO_4). Các muối khoáng có Fe, Mn, Zn, B, Mo, Cu ảnh hưởng

đến khả năng sinh tổng hợp xenlulaza. Trong đa số trường hợp biotin (VTM H) và một số VTM cũng rất cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp enzyme.

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

1) Phương pháp tối ưu hoá quy hoạch thực nghiệm toàn phần (đủ yếu tố): đòi hỏi nhiều thời gian và không được chính xác lắm.

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

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

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

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

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

- Các nguyên liệu dễ chuẩn bị làm môi trường tự nhiên bao gồm: cám và bột hạt cốc, nước chiết ngô, dịch ép hoa quả, rau, khô dầu, bã rượu, rỉ đường, sản phẩm phân huỷ nấm men bia, trấu, lõi ngô (để làm chất độn, tạo xốp). Khi lựa chọn sử dụng môi trường cần chú ý đến các chất có tác dụng điều hoà sinh tổng hợp enzyme, đặc biệt các chất cảm ứng. Bằng thực nghiệm, người ta thấy rằng chất cảm ứng (tăng cường sinh tổng hợp enzyme) thường là cơ chất chủ yếu, các sản phẩm thủy phân của nó hoặc chất tương tự cơ chất. Ở trên ta đã biết là chất cảm ứng thường kết hợp với chất trấn áp repressor làm cho nó không hoạt động (mất khả năng kết hợp với gene điều khiển operator). Như vậy, chất cảm ứng phải đi vào bên trong tế bào do đó không thể là những chất đại phân tử như protein, tinh bột, xenluloza, pectin. Theo một số tác giả thì các cơ chất này là các cơ chất 'tiền cảm ứng', dưới tác dụng của enzyme gốc chúng bị thủy phân một phần tạo thành chất có phân tử lượng bé hơn để đóng vai trò là chất cảm ứng thực sự. Chẳng hạn, từ năm 1972 Iurikievits cho rằng chất cảm ứng thực sự của α -amylaza không phải là tinh bột mà là sản phẩm thủy phân một phần của nó: erytrodextrin. Tương tự như vậy, chất cảm ứng của enzyme proteinaza là các polypeptin, protein có phân tử lượng nhỏ.

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

2.5. Các phương pháp nuôi cấy vi sinh vật:

Về nguyên tắc có 2 phương pháp nuôi cấy vsv thu enzyme là: phương pháp nuôi cấy bề mặt (còn gọi là phương pháp nổi) và phương pháp bề sâu (còn gọi là phương pháp

nuôi cấy chìm), trong đó ở phương pháp bề sâu còn có thể chia ra 2 phương pháp cụ thể hơn: là nuôi cấy chìm 1 bước (1pha) và nuôi cấy chìm 2 bước (2 pha).

2.5.1. Phương pháp nuôi cấy bề mặt:

- Phương pháp này rất thích hợp để nuôi cấy các loại nấm mốc (sinh tổng hợp các hệ enzyme amylaza, xenlulaza, pectinaza, proteaza) do khả năng phát triển nhanh, mạnh, nên ít bị tạp nhiễm. Khi nuôi, nấm mốc phát triển bao phủ bề mặt hạt chất dinh dưỡng rắn, các khuẩn ty cũng phát triển đâm sâu vào lòng môi trường đã được tiệt trùng, làm ẩm (khuẩn ty cơ chất). Đối với một số mục đích đặc biệt, người ta nuôi vsv trực tiếp trên bề mặt hạt gạo (sản xuất tương), hạt đậu tương (đậu tương lên men - misô) đã được nấu chín trộn hạt cốc còn sống (làm men thuốc bắc, men dân tộc, làm tương).

- Người ta thường dùng cám mì, cám gạo, ngô mảnh, bột ngô, mảnh hạt bo bo có chất phụ gia là trấu. Cám, trấu, có bề mặt tiếp xúc lớn, mỏng, tạo được độ xốp nhiều, không có những chất gây ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của nấm mốc. Tỷ lệ các chất phụ gia (chất độn) phải bảo đảm sao cho hàm lượng tinh bột trong khối nguyên liệu không được thấp hơn 20%, có thể bổ sung thêm nguồn nitơ vô cơ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$), photpho (P_2O_5 , H_3PO_4 kỹ thuật), nitơ hữu cơ và các chất kích thích sinh trưởng như malt, nước chiết ngô, nước lọc bã rượu.

*Quy trình công nghệ:



+ Làm ẩm môi trường :

Có ý nghĩa quan trọng, trong điều kiện sản xuất lớn, hàm ẩm tối ưu của môi trường cám là 58-60%. Khi được nuôi cấy trong điều kiện tiệt trùng nghiêm ngặt thì sẽ đạt hoạt độ enzyme cao nhất khi hàm ẩm 65-68%. Tuy nhiên nếu môi trường quá ẩm sẽ bị dính bột (khi hấp thanh trùng, làm toi, khi nuôi cấy), dễ bị nhiễm vi sinh vật tạp (bị lên men rượu, lên men dấm.....). Để làm ẩm có thể dùng nước trộn với nguyên liệu (nhào) rồi thanh trùng hoặc làm ẩm sơ bộ rồi thanh trùng sau đó dùng nước vô trùng (nước ngưng tụ, nước đun sôi để nguội) để điều chỉnh lại độ ẩm của khối nguyên liệu. Cách sau có thể

rút ngắn thời gian làm nguội, không chế được độ ẩm chính xác hơn nhưng đòi hỏi phải thanh trùng ở nhiệt độ và áp suất sao hơn.

+ Thanh trùng bằng hơi nhiệt:

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

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

Khối môi trường vừa hấp xong còn nóng và dính bết. Vì vậy phải làm nguội và làm toi để thuận tiện cho việc gieo giống và phân phối vào các dụng cụ nuôi. Yêu cầu thời gian này phải ngắn để hạn chế nhiễm khuẩn từ bên ngoài. Nhiệt độ yêu cầu đạt được để gieo giống là 35-39⁰C.

+ Nuôi cấy nấm mốc giống:

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

+ Tiến hành quá trình nuôi cấy :

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

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

*Giai đoạn 2: kéo dài trong 10-18h. Nấm mốc phát triển mạnh, lan khắp bề mặt và trong toàn khối môi trường trường (khuẩn ty ăn sâu vào cơ chất) dẫn đến hiện tượng kết bánh. Quá trình hô hấp và toả nhiệt mạnh làm môi trường trường bị khô xốp, tăng hàm lượng CO₂, nhiệt độ phòng nuôi tăng lên đến 38-40⁰C. Để không chế nhiệt độ thích hợp 28-30⁰C cần thông gió (quạt) và bão hoà ẩm không khí phòng nuôi.

Giai đoạn 3: kéo dài trong 10-20h và đặc trưng nhất vì tạo ra enzyme nhiều nhất. Cường độ trao đổi chất giảm đi chút ít, nhiệt toả ra ít hơn nên tốc độ bốc hơi nước của môi trường nuôi cấy cũng giảm theo. Quá trình nuôi cấy được chấm dứt khi nấm mốc đạt độ già chín sinh lý và bắt đầu tạo thành bào tử.

2.5.2. Phương pháp nuôi cấy chìm:

- Vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường lỏng với cơ chất chủ yếu trong đa số trường hợp là tinh bột. Chỉ có một số ít giống vsv dùng nguồn cơ chất cacbon là đường glucoza, saccharoza. Thực tế, trong một số trường hợp người ta đường hoá sơ bộ tinh bột trước khi thanh trùng (bằng chế phẩm enzyme amylaza). Khi đó đường maltoza được tạo thành là chất cảm ứng tốt, môi trường trường bị giảm độ nhớt nên dễ dàng cho quá trình khuấy trộn và sục khí.

-Một số loại môi trường dinh dưỡng để sản xuất chế phẩm enzyme amylaza dụng trong CNSX rượy etylic như sau:

+Môi trường nuôi cấy 40m³ của Trung Quốc:

Bột khoai lang : 400kg

Bột bánh mì : 240kg

Cám : 160kg.

NaNO₃ : 1,2kg

Nước vừa đủ hàm lượng chất khô:3,33%

+ Môi trường sản xuất thử ở nhà máy rượu Hà Nội:

Nước bã rượu trong : 100 phần

Bột ngô mịn : 1,5-2 phần

Nước đường hoá từ ngô16% : 5-10 phần

(NH₄)₂SO₄ : 0,4-0,5 phần

P₂O₅ : 0,4-0,5 phần

MgO : 0,15-0,20 phần

Điều chỉnh pH đạt 5-5,5

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

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

+ Chuẩn bị môi trường nuôi cấy :

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

+ Nuôi cấy nấm mốc giống:

Được tiến hành qua 2 cấp độ (bước), phòng thí nghiệm và men giống trung gian. Ở cấp PTN được thực hiện trong các bình cầu, tiệt trùng môi trường làm nguội, cấy giống rồi nuôi trên máy lắc (150-200lần/phút). Nấm mốc sử dụng oxy không khí qua nút bông và quá trình lắc, thời gian nuôi 46-50h. Ở cấp phát triển giống trung gian người ta chuyển nước giống PTN vào thiết bị nuôi đã chứa sẵn môi trường tiệt trùng và làm nguội. Nuôi cấy có sục khí vô trùng với lưu lượng 15-20m³/m³h, thời gian 36-40h. Thể tích dịch men giống bằng 10% so với dịch men sản xuất về sau.

+ Nuôi cấy nấm mốc sản xuất:

Trong quá trình nuôi cấy cần phải sục khí vô trùng và khuấy trộn, tiếp dầu phá bọt nếu có hiện tượng tạo bọt trào ra khỏi nồi lên men. Thời gian nuôi 1-4 ngày tùy theo giống vi sinh vật. Việc khống chế pH, chế độ sục khí và bảo đảm vô trùng là những yếu tố quan trọng quyết định hiệu quả quá trình. Chẳng hạn nếu môi trường được thêm muối amôni của NH₄NO₃ thì khi NH₄⁺ được vi sinh vật sử dụng sẽ chuyển môi trường về axit. Nếu sự axit hoá thụ động này có ảnh hưởng xấu đến sinh tổng hợp enzym thì cần phải bổ sung CaCO₃ để trung hoà hoặc duy trì tự động pH_{opt} cho sinh tổng hợp. Nếu nguồn NaNO₃ thì khi vi sinh vật sử dụng NO₃⁻ sẽ còn lại Na⁺ sẽ kiềm hoá môi trường, lúc đó lại phải dùng axit để trung hoà. Trị số pH ban đầu của môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng nhất định đến

sự tạo thành enzym. Ví dụ: đối với enzym α -amylaza thì pH_{opt} của các loại vi khuẩn là 7, của các loại nấm mốc là 5.6–5.7.

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

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

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

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

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

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

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

Pha thứ 2: Tiếp tục nuôi cấy để sinh tổng hợp enzym α - manozilostreptomixinaza trong 18-24^h. Lúc này tốc độ phát triển của vi khuẩn chậm lại, nhưng sự chuyển hoá phức chất manozidostreptomixin nhanh chóng diễn ra dưới tác dụng của enzym thành kháng sinh streptomycin.

2.5.4. So sánh phương pháp nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzym :

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

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

- + Tốn ít năng lượng (Điện, hơi nước, công nhân) thiết bị, dụng cụ nuôi cấy đơn giản, có thể thực hiện ở qui mô gia đình, trang trại cũng như ở qui mô lớn đến 20T/ngày.
- + Nuôi cấy trong điều kiện không cần vô trùng tuyệt đối và trong quá trình nuôi cấy nếu có nhiễm trùng phần nào, khu vực nào thì chỉ cần loại bỏ canh trường phần đó.
- + Tuy nhiên phương pháp bề mặt có năng suất thấp, khó cơ khí hoá, tự động hoá, cần diện tích nuôi lớn, chất lượng chế phẩm ở các mẻ không đồng đều.
 - Phương pháp nuôi cấy bề sâu có những ưu nhược điểm sau:
 - + Phương pháp nuôi cấy hiện đại (công nghệ cao) dễ cơ khí hoá, tự động hoá, năng suất cao, dễ tổ chức sản xuất tiết kiệm diện tích sản xuất.
 - + Có thể nuôi cấy dễ dàng các chủng vi sinh vật đột biến có khả năng sinh tổng hợp enzym cao và lựa chọn tối ưu thành phần môi trường, các điều kiện nuôi cấy, enzym thu được tinh khiết hơn, đảm bảo điều kiện vệ sinh, vô trùng.
 - + Tuy nhiên do thu được canh trường có nồng độ enzym thấp nên khi tách thu hồi enzym sẽ có giá thành cao (có đặt trước). Tốn điện năng cho khuấy trộn, nếu không bảo đảm vô trùng sẽ bị nhiễm hàng loạt, toàn bộ gây tổn thất lớn.

2.6. Tách và làm sạch chế phẩm enzym :

(xem sơ đồ tổng quát ở trang 200 của giáo trình)

- Mục đích yêu cầu: Các chế phẩm enzym được sử dụng ở các dạng khác nhau theo mức độ tinh khiết (hoạt độ riêng). Trong một số trường hợp, canh trường nuôi cấy vi sinh vật có chứa enzym được sử dụng trực tiếp dưới dạng thô không cần tách tạp chất nếu chúng không gây ảnh hưởng đáng kể đến sản phẩm và quy trình công nghệ sau này (Ví dụ: sản xuất rượu, nước chấm thực vật, da). Cũng có khi người ta cần sử dụng chế phẩm enzym tinh khiết trong công nghiệp dệt, công nghiệp mạch nha, y học, nghiên cứu khoa học.

Enzym nói chung rất dễ bị giảm hoạt tính dưới tác dụng của các tác nhân bên ngoài do đó khi tách và tinh chế enzym để tránh sự biến hình protein ảnh hưởng lớn đến hoạt tính enzym cần tiến hành nhanh chóng ở nhiệt độ thấp, độ pH thích hợp không có mặt các chất gây biến hình enzym.

2.6.1. Thu dịch enzym :

- Đối với trường hợp enzym còn nằm trong tế bào (enzym nội bào nuôi bằng phương pháp bề mặt) thì cần phải giải phóng enzym bằng cách phá vỡ tế bào thu nhiều cách như:
 - + Nghiền nhỏ, nghiền với cát, nghiền với vụn thủy tinh, nghiền bi.
 - + Để tế bào tự phân huỷ.
 - + Dùng tác dụng của siêu âm hoặc tạo áp suất thẩm thấu cao, trích ly (chiên) bằng muối, dung dịch muối trung tính, dung môi hữu cơ
 - + Kết tủa enzym bằng các chất điện ly thích hợp.
- Đối với trường hợp enzym tiết ra môi trường (enzym ngoại bào nuôi theo phương pháp chìm), người ta thường tách sinh khối và cặn bã khỏi canh trường bằng cách lọc li tâm, lọc ép có sử dụng tác nhân trợ lọc (diatomit, đất hoạt tính) hoặc các tác nhân trợ kết tủa (Ví dụ: hỗn hợp $\text{CaCl}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CaSO}_4 \downarrow$: lắng cặn kéo theo sinh khối nên lọc dễ hơn)

2.6.2. Thu nhận chế phẩm kỹ thuật:

Chế phẩm kỹ thuật là chế phẩm enzym chưa được tinh chế; có thể chứa một vài loại enzym chủ yếu, một số loại protein không phải enzym, các chất ổn định và các tạp chất khác. Dịch enzym thu được ở trên thường có nồng độ chất khô thấp 4-6g/l, bước đầu người ta cô đặc chân không ở nhiệt độ 35⁰C đến nồng độ 15-20g/l rồi tiếp tục xử lý như sau:

- Tiếp tục cô đặc chân không ở nhiệt độ 40-45⁰ C để đạt nồng độ chất khô 30-35g/l, bổ sung thêm chất bảo quản như NaCl, glyxerin, sorbitol, benzoat ta sẽ thu được chế phẩm enzym kỹ thuật ở dạng có thể bảo quản ở nhiệt độ thường được 1-2 năm.
- Bổ sung thêm các chất ổn định để đạt nồng độ chất khô 30-40g/l rồi sấy phun ở nhiệt độ 120⁰ C (nhiệt độ khí thải 60⁰ C), chế phẩm kỹ thuật thu được ở dạng bột .
- Kết tủa enzym bằng các dung môi thích hợp như: dung môi hữu cơ (etanol, izopropanol, axeton), dùng muối trung tính phổ biến nhất là (NH₄)₂SO₄ dung dịch bão hoà. Sau khi li tâm tách kết tủa có thể trộn thêm các chất ổn định rồi sấy khô và nghiền mịn để thu được chế phẩm dạng bột.

2.6.3. Thu chế phẩm enzym tinh khiết:

Việc tinh chế enzym có thể tiến hành bằng nhiều phương pháp qua nhiều giai đoạn:

- Hoà tan chế phẩm kỹ thuật vào nước hoặc dung dịch muối CaCl₂ ở nồng độ thích hợp hoặc dung dịch đậm, kết tủa trở lại bằng etanol, axeton hay (NH₄)₂SO₄. Quá trình này cần tiến hành nhanh chóng ở nhiệt độ thấp để tránh sự vô hoạt enzym. Ngoài ra muối NaCl cũng được hay được dùng để kết tủa các enzym nguồn gốc động vật. Kết tủa ở pH gần điểm đẳng điện của enzym. Sau khi kết tủa các muối vô cơ được loại đi bằng phương pháp thẩm tích, thẩm thấu ngược hoặc lọc gel.
- Tách enzym bằng phương pháp hấp phụ chọn lọc:

Cho dịch enzym chảy từ từ qua cột chất hấp phụ (thường là hydrat oxit-nhôm, silicagel) các enzym khác nhau sẽ được hấp phụ với khả năng khác nhau, sau đó dùng các dung dịch đậm thích hợp để chiết rút enzym ra khỏi cột. Phương pháp dùng để làm đậm đặc enzym.

- Tách enzym bằng phương pháp trao đổi ion:

Dựa vào sự trao đổi ion giữa enzym có điện tích với các ion trái dấu của chất nhựa khi cho dung dịch enzym chảy từ từ qua cột chứa các chất nhựa trao đổi ion. Sau khi cột đã no (hết hiệu lực) cho dung dịch rửa (dung dịch chất điện giải) có nồng độ tăng dần chảy qua cột để đẩy ra khỏi nhựa các enzym vừa liên kết với chúng. Khi đó enzym nào có áp lực (liên kết) với nhựa kém nhất sẽ bị đẩy ra khỏi cột nhựa trước. Như vậy các enzym khác nhau sẽ được chiết ra khỏi cột theo từng phần chiết khác nhau trong đó cửa phần chiết chứa enzym cần thu với nồng độ cao nhất.

Các nhựa trao đổi ion thường là các chất nhựa tổng hữu cơ : Dowex, Amberlit, Wolfatit, Permuit, các dẫn xuất của xenluloza.

Sau khi làm sạch cần sấy khô chân không ở nhiệt độ thấp hoặc sấy thăng hoa. Enzym tinh khiết có hoạt tính cao hơn nhiều so với chế phẩm ban đầu. Nhưng do quá trình làm sạch rất khắc khe và tốn kém nên loại này chỉ được dùng trong y học, trong nghiên cứu khoa học để xác định khối lượng phân tử, cấu trúc enzym.

Chương 3: KỸ THUẬT SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TỪ HẠT CỐC NẤY MÀM (MALT)

Malt là loại hạt hoà thảo (hạt cốc) nảy mầm trong những điều kiện nhân tạo (nhiệt độ, độ ẩm, thời gian) xác định gọi tắt là quá trình ủ malt. Mục đích chính trong quá trình ủ malt là trích lấy được một lượng lớn các enzym (chủ yếu là enzym amylaza) trong hạt, được sử dụng trong các lĩnh vực sau:

- Trong công nghiệp sản xuất rượu etylic (cồn, rượu etylic) từ nguyên liệu tinh bột. Malt là tác nhân đường hoá tinh bột (phương pháp sản xuất rượu này có tên là phương pháp maltaza hay phương pháp malt). Có thể dùng các loại hạt như: đại mạch, lúa mạch đen, yến mạch, kê, ngô để sản xuất malt loại này.
- Trong công nghiệp sản xuất bia malt vừa là tác nhân đường hoá tinh bột vừa là nguyên liệu chính (cùng với hoa houblon và nước) và có thể có nguyên liệu thay thế (Không phải malt đại mạch). Malt bia chủ yếu được sản xuất từ đại mạch, ngoài ra người ta có thể dùng một tỷ lệ malt thay thế như thóc mầm.
- Trong công nghiệp sản xuất mật tinh bột (đường nha, mạch nha): malt vừa là tác nhân đường hoá tinh bột vừa là nguyên liệu chính. Malt loại này được sản xuất từ lúa, lúa mì, ngô, đại mạch, kê thậm chí từ củ khoai lang nảy mầm. Mạch nha sản xuất từ malt vẫn là ngon nhất, cho chất lượng tốt nhất.
- Trong một số ngành sản xuất thức ăn sinh dưỡng, thức ăn kiêng (cho người bệnh, người già, trẻ em, gia súc, gia cầm non). Malt được dùng để phối chế vào thực đơn của thức ăn.

Quá trình sản xuất malt bao gồm các khâu sau:

Thu nhận, xử lý, làm sạch, phân loại và bảo quản hạt,

Rửa, sát trùng và ngâm hạt.

Ươm mầm (nảy mầm) ta sẽ thu được malt tươi.

Sấy malt tươi.

Xử lý và bảo quản malt khô.

3.1. Nguyên liệu đại mạch:

Đại mạch là cây hạt cốc ở các nước ôn đới, có khoảng 30 giống khác nhau nhưng chỉ có một giống có ý nghĩa kinh tế là đại mạch mùa (Hordeum sativum) còn lại đều là đại mạch dại. Hiện nay diện tích trồng và sản lượng đại mạch trên thế giới đứng vị trí thứ 4 sau lúa mì, lúa, ngô. Thuộc giống đại mạch mùa có 130 loại khác nhau và được chia làm 3 nhóm chính: đại mạch nhiều hàng (6 hàng và 4 hàng)-Hordium hexaticum; đại mạch 2 hàng (Hordium disstichum) và đại mạch trung gian (H. intermedium). Nhóm có giá trị trong sản xuất malt và bia là đại mạch nhiều hàng.

Đại mạch sau khi thu hoạch được phơi sấy đến độ ẩm dưới 13% để bảo quản cùng giống như các hạt hoà thảo khác, cấu tạo hạt đại mạch gồm vỏ trấu, vỏ quả, vỏ hạt, alorông, nội nhũ và phôi. Tỷ lệ trung bình trong các phần như sau:

Tên bộ phận hạt	% khối lượng toàn hạt
Vỏ trấu	12
Vỏ quả	3,5 ÷ 4
Vỏ hạt	2 ÷ 2,5
Alorông	12 ÷ 14
Phôi	2,5 ÷ 3
Nội nhũ	64,5 ÷ 6,8

Thành phần hoá học trung bình của đại mạch theo % chất khô như sau:

Bộ phận hạt	Protein (N*5,7)	Chất béo	tinh bột	Pentosan	Xenluloza	Tro
Hạt	13,4	2,0	54,0	9,0	5,7	3,0
Vỏ	7,1	2,1	8,2	20,0	22,6	10,0
Phôi	28,6	7,6	46,0	20,0	1,1	10,0

Khối lượng 1000 hạt đặc trưng cho độ mảy của hạt nằm trong khoảng 15 ÷ 60 gam và người ta chia thành các loại:

- Đại mạch hạt nhẹ: Khối lượng 1000 hạt tới 30 gam
- Đại mạch tương đối nhẹ: Khối lượng 1000 hạt tới 31 ÷ 40 gam
- Đại mạch nặng: Khối lượng 1000 hạt tới > 51gam

Kích thước hạt dài 8 ÷ 10 mm, rộng 3 ÷ 4 mm, dày 2 ÷ 3 mm.

Chỉ số chất lượng quan trọng của đại mạch để sản xuất malt và bia là độ nảy mầm và năng lực nảy mầm. Ngoài ra, đại mạch còn được đặc trưng bởi độ chiết và hàm lượng protein. đại mạch tốt có độ chiết đạt tới 82% và hàm lượng protein không quá 12%. Nếu hàm lượng đạt quá 12 % thì độ chiết sẽ thấp, bia sẽ bị đục; còn nếu hàm lượng protein quá thấp sẽ làm giảm độ bọt và vị bia.

3.2. Làm sạch và phân loại hạt:

Khối hạt có chứa nhiều tạp chất (bụi, tạp chất nhẹ như cỏ, rơm rạ; tạp chất nặng như sỏi đá, vụn kim loại...) do đó cần phải được làm sạch trước khi đưa vào sản xuất. Mặt khác, khối hạt phải đảm bảo đồng đều để quá trình ngâm và nảy mầm được thuận lợi và đồng đều.

Thông thường người ta làm sạch và phân loại bằng các hệ thống sàng thích hợp:

- Sàng khí động: dùng để tách tạp chất và phân loại hạt theo chiều dày, chiều rộng của nó theo các tính chất khi động (dùng quạt).

Nếu hạt được phân loại theo chiều dày hạt để sản xuất malt bia, người ta được 3 nhóm:

- + Loại I : bề dày hạt > 2,5 mm Dùng để sản xuất malt bia tốt nhất.
- + Loại II : bề dày hạt > 2,2 ÷ 2, 5 mm Dùng để sản xuất malt bia tốt nhất.
- + Loại III : bề dày < 2,2 mm Dphối liệu, được dùng để làm việc khác.

- Sàng ống (Trier): Để phân loại hạt theo chiều dài
- Tách tạp chất kim loại dùng nam châm từ.

- Sơ đồ công nghệ làm sạch và phân loại hạt

3.3. Rửa, sát trùng và ngâm hạt:

3.3.1. Rửa và sát trùng hạt:

Hạt được rửa sạch trong quá trình ngâm, các chất bẩn theo nước và tạp chất nhẹ sẽ nổi lên để được tháo ra ngoài. Trong quá trình bảo quản hạt sẽ bị nhiễm vi sinh vật, trùng bọ, hạt chết và hư hỏng khác. Vì vậy, khi ngâm người ta thường kết hợp với rửa, sát trùng để khối hạt được sạch, đồng nhất, kích thích sự nảy mầm.

Một số các hoá chất dùng để sát trùng hạt khi ngâm:

- CaOCl_2 , Ca(OCl)_2 , HCHO 40 %: 700 gam/ m^3 H_2O

- H_2SO_4 , KmnO_4 : 10 ÷ 15 gam/ m^3 H_2O

- Ca(OH)_2 : 2 ÷ 3 lit/100 gam hạt

Trong đó, Ca(OCl)_2 sát trùng mạnh, kích thích sự nảy mầm nên hay được dùng. Liều lượng 40 g Ca(OCl)_2 33% / 100 kg hạt.

Ca(OH)_2 bão hoà chỉ dùng rửa sát trùng lần thứ 2, không được cho vào nồi ở giai đoạn ngâm vì nó hay bám lên vỏ hạt làm ảnh hưởng đến chất lượng của malt và bia. Có thể dùng H_2O_2 để sát trùng và kích thích nảy mầm: liều lượng 3 lit/ m^3 H_2O . Chế phẩm Gibberelia kích thích thực vật được sử dụng lần đầu tiên ở Nhật Bản vào năm 1940 với liều lượng 40 ÷ 200 mg/1 tấn đại mạch, rút ngắn thời gian nảy mầm từ 8 ngày xuống còn 5 ngày, giảm giá thành Malt 12 ÷ 15 %. Ở Anh, 90 % chế phẩm Gibberelia được dùng trong công nghiệp malt.

3.3.2. Ngâm hạt:

- Mục đích để hạt hút đủ nước cần thiết để chuẩn bị nảy mầm, nảy mầm và phát triển mầm.

- Biến đổi của hạt khi ngâm:

+ Trước khi ngâm, hạt có độ ẩm trung bình 13 % đủ để duy trì khả năng sống.

+ Khi ngâm, nước ngấm (thấm thấu qua vỏ) vào hạt, khi độ ẩm của hạt quá 15 % thì trong hạt xuất hiện nước tự do, hạt trương nở dần (thể tích hạt tăng trung bình khoảng 1,45 lần so với ban đầu). Nước tự do thúc đẩy các quá trình hoá sinh có liên quan đến hoạt động sống, hô hấp và hoạt hoá enzym.

+ Biến đổi hoá học khi ngâm không đáng kể, hạt hô hấp vẫn rất yếu nên tiêu tốn glucit rất ít, một lượng nhỏ các chất hoà tan vào nước ngâm: đường, pentosan, chất khoáng, tiêu hao chất khô khoảng 1 %.

+ Hạt hút nước thì năng lực hô hấp tăng, khi ngâm hạt tiêu thụ 63 mg O_2 /kg hạt.h và thải ra 86 mg CO_2 /kg hạt. nếu không đủ lượng oxi hạt sẽ hô hấp yếm khí tạo ra $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, CO_2 , các axit hữu cơ... Đa số là các chất độc với tế bào, kiềm hãm quá trình sống bình thường, dẫn đến phá huỷ cấu trúc tế bào và hiện tượng tự phân huỷ (gây hư hỏng hạt, thối rữa, nhiễm vi sinh vật).

+ Tốc độ ngâm nước phụ thuộc vào nhiệt độ ngâm nước, mức độ thay nước, thông khí, kích thước của hạt. Nhiệt độ của nước ngày càng cao thì nước thấm vào tế bào ngày càng nhanh. Vì khi đó nhiệt độ sẽ làm tăng sự trương nở các chất keo (protein, tinh bột, xenluloza,...), tăng vận tốc khuếch tán (do chuyển động nhiệt), giảm độ nhớt, tăng độ hô

hấp của hạt đồng thời tăng khả năng nhiễm và phát triển của vi sinh vật tạp, nhu cầu oxy của khối hạt cũng tăng lên nhiều.

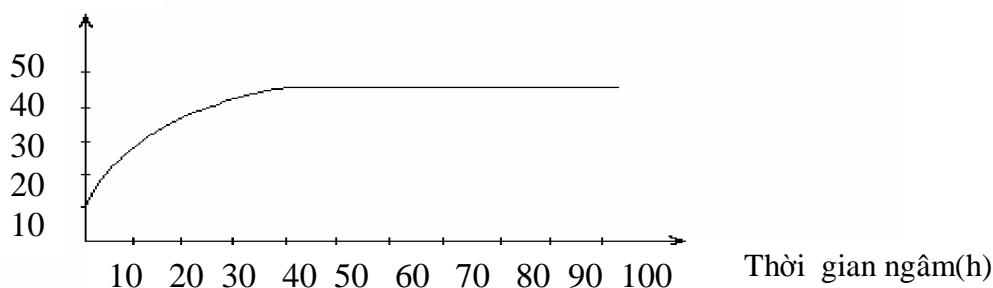
Dựa vào nhiệt độ của nước ngâm, người ta chia ra các chế độ ngâm như sau:

Chế độ ngâm	Nhiệt độ nước ngâm
Ngâm lạnh	< 10 °C
Ngâm thường	10 ÷ 15 °C
Ngâm ấm	20 ÷ 40 °C
Ngâm nóng	50 ÷ 55 °C

Trong đó chế độ ngâm thường được sử dụng rộng rãi nhất, ngâm ấm được sử dụng trong mùa đông, ngâm nóng thường kết hợp với ngâm thường hay ngâm ấm để xử lý hạt (kiểu ngâm 3 sôi 2 lạnh).

*Quá trình hút nước của hạt đại mạch khi ngâm diễn ra theo đồ thị:

Độ ẩm hạt
(%)



Đồ thị biểu diễn sự thay đổi độ ẩm của hạt khi ngâm

Khi độ ẩm khối hạt đạt khoảng 40 % thì tốc độ hút nước của hạt đã bắt đầu giảm. Sau 96 h ngâm độ ẩm khối hạt đạt cao nhất khoảng 47%. Đây cũng chính là mức độ ngâm cực đại cần thiết.

+Các thành phần khoáng trong nước ngâm ảnh hưởng đến tốc độ ngâm hạt. Nước mềm ngâm nhanh hơn nước cứng, tốt nhất sử dụng nước có độ cứng 7mg đường lượng/lit. Iôn Ca^{2+} liên kết với polyphenol trong vỏ hạt tạo muối ít tan có cấu trúc thể keo tạo thành bong bóng trên vỏ ngăn cản sự thấm nước, muối Na_2CO_3 làm tăng vị malt cho bia. Các muối sắt gây kết tủa dạng $Fe(OH)_3$, tác dụng với polyphenol làm cho hạt có màn nâu. $NaCl$ làm chậm quá trình ngâm và nảy mầm, nồng độ muối này quá cao có thể giết chết mầm.

- Các phương pháp và chế độ công nghệ ngâm hạt: có nhiều phương pháp ngâm hạt:

+ Ngâm trong nước-không khí gián đoạn: Hạt lúc được ngâm trong nước, lúc được ngâm trong không khí, mỗi chu kỳ kéo dài $3 \div 6$ h. Không khí nén được thổi cấp cho cả chu kỳ, mỗi lần thổi từ $3 \div 5$ phút, cứ 30 phút lại thổi khí một lần.

+ Ngâm trong luồng nước và không khí liên tục: Dùng nước đã bão hoà không khí được phun liên tục vào bề mặt hạt (cần có thiết bị bão hoà không khí). Với phương pháp này mức độ ngâm hạt được nhanh, rút ngắn được quá trình nảy mầm.

+ Ngâm hạt trong luồng nước phun: Khối hạt được phun nước liên tục chảy thấm qua lớp hạt từ trên xuống dưới rồi chảy vào rãnh thoát nước. Như vậy nước chỉ lưu lại trong hạt một thời gian nhất định nào đó. Phương pháp này cho phép hạt được thông khí tự nhiên liên tục, mầm hạt mau xuất hiện và phát triển.

+ Ngâm hạt trong luồng không khí - nước phun: Đây là phương pháp kết hợp giữa ngâm trong nước liên tục và giữ hạt ở trạng thái hiếu khí (đổi mới không khí) bằng cách hút khí của khối hạt.

Sau khi rửa xong, hạt được phun tưới nước trong 15 phút. Sau đó hút không khí từ phía dưới (bằng quạt hay bơm hút) trong 15 phút rồi để yên trong không khí một giờ, rồi lại phun tưới nước...cứ như thế cho đến khi hạt đạt độ ẩm yêu cầu.

Để sản xuất mạt l, mức độ ngâm đại mạch khoảng $42 \div 48$ %. Để sản xuất mạt l đường hoá khi sản xuất rượu etylic thì thời gian ngâm thường ngắn: đại mạch, lúa mạch, yến mạch: $12 \div 18$ h; mạch đen: $12 \div 14$ h, ngâm nước $15 \div 20^{\circ}\text{C}$ cho đến mức độ ngâm $38 \div 40$ %. Hạt kê, lúa là giống ưa ẩm nên ngâm trong nước $25 \div 30^{\circ}\text{C}$ trong $22 \div 24^{\text{h}}$ đến khi đạt được mức độ ngâm $35 \div 37$ %.

Thường quá trình ngâm kết thúc thì thấy rễ con xuất hiện.

3.4. Nảy mầm:

Thực tế quá trình nảy mầm có thể bắt đầu ở giai đoạn ngâm khi mức độ ngâm hạt đạt $25 (30$ %). Lúc đó các hệ enzym từ trạng thái “ngủ” được đánh thức trở lại hoạt động ở điều kiện nhiệt độ, độ ẩm thích hợp. Kết quả là các polyme dự trữ không tan (tinh bột, protein, hemixenluloza, xenluloza) bị thủy phân một phần (biến hình) thành các chất tan có khả năng nuôi sống mầm và rễ.

Trong giai đoạn đầu của quá trình nảy mầm, trong hạt xảy ra các quá trình sinh lý, hoá sinh tương tự như khi hạt nảy mầm tự nhiên (trong đất khi gieo hạt), trong dung dịch dinh dưỡng (thủy canh), dưới tác dụng của độ ẩm, nhiệt độ, khí CO_2 trong không khí, phôi hạt phát triển sẽ tạo nên mầm và rễ phôi, chất dinh dưỡng nuôi phôi hạt được lấy từ nội nhũ của hạt. Ở đó, dưới tác dụng của hệ enzym sẽ chuyển hoá các chất ở vị trí cao phân tử về dạng các chất hoà tan đơn giản để phôi hấp thụ được. Tuy nhiên, khi phôi hạt càng phát triển thì tiêu hao chất khô trong hạt (chủ yếu ở nội nhũ) càng lớn. Bằng cách khống chế, tác động các điều kiện công nghệ để phôi hạt (mầm và rễ) phát triển một cách hợp lý nhất để tiêu hao hàm lượng chất khô là nhỏ nhất nhưng cho phép tích lũy được nhiều enzym nhất (trừ hệ enzym oxy hoá). Đây là mục đích chủ yếu của quá trình sản xuất mạt l, và cũng là điểm khác biệt giữa nảy mầm nhân tạo và nảy mầm tự nhiên.

Khi nảy mầm, trong hạt đại mạch sẽ xảy ra các quá trình chủ yếu sau:

- Quá trình sinh lý: Sự phát triển của phôi xảy ra đồng thời với sự hô hấp và tổng hợp một số chất mới, mà quan trọng nhất là một số enzym cần thiết.

- Quá trình sinh hoá: Thủy phân các chất dự trữ trong nội nhũ.
- Quá trình hoá học: Tác dụng tương hỗ giữa các chất tạo thành khi thủy phân, hình thành các chất thơm, chất có vị ngọt.
- Quá trình vật lý: Vận chuyển ẩm và các chất dự trữ hoà tan từ nội nhũ đi nuôi phôi và ngược lại.

3.4.1. Sự hình thành và hoạt động của các hệ enzym đồng thời những quá trình xảy ra trong quá trình nảy mầm:

Hạt đạt độ chín và khô ($W \leq 13\%$) thì các enzym trong hạt ở dạng liên kết (không hoạt động) nằm trong tế bào của hạt. Trong quá trình nảy mầm chúng được giải phóng ra ở dạng tự do hoạt động, đồng thời hạt cứng có khả năng hình thành nên những enzym hoạt động mới.

- Hệ enzym oxy hoá - khử:

Hoạt động của hệ enzym này là bước chuẩn bị ban đầu cho quá trình hoá sinh tiếp theo của sự nảy mầm.

Có thể kể đến các enzym oxy hoá hơn: oxydaza, peroxydaza và catalaza sản phẩm phản ứng xúc tác ở quá trình hô hấp của hạt bao gồm: H_2O , CO_2 và O_2 . Cường độ hô hấp phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ và lượng O_2 tham gia. Trong khoảng nhiệt độ $10 \div 30^\circ C$, nhiệt độ tăng sẽ làm tăng cường độ hô hấp, đồng thời hoạt tính của đa số các enzym cũng tăng dần đến làm tăng sự tổn thất chất khô.

Quá trình hô hấp kèm theo sự thải nhiệt: 673 kcal/phân tử gam đường.

Trong hạt ngâm có 2÷3 % đường (tính theo hàm lượng chất khô), trong quá trình nảy mầm do thủy phân nên lượng đường tăng thêm khoảng 20%. Khoảng 9÷10% lượng đường tổn hao do hô hấp, 3÷5% tổn hao do sự phát triển của mầm và rễ, còn lại đi vào thành phần của malt. Như vậy, ta thấy quá trình hô hấp tiêu thụ một lượng đường khá lớn nên lượng nhiệt toả ra nhiều.

Một số axit hữu cơ có sẵn và hình thành trong quá trình nảy mầm như: oxalic, xitric, malic, lactic, formic, axetic, propionic,... Nếu oxi không cung cấp đầy đủ (trạng thái yếm khí) đặc biệt ở giai đoạn đầu của quá trình nảy mầm sẽ xảy ra hiện tượng hô hấp yếm khí tạo nên rượu etylic C_2H_5OH và CO_2 . Nếu hàm lượng C_2H_5OH sinh ra lớn đến mức độ nhất định sẽ ức chế tế bào sống và đình chỉ sự phát triển của mầm. Tiếp đó, các sản phẩm tương hỗ của rượu và axetic là este tạo ra trong malt tươi có mùi đặc trưng.

Đặc trưng cho mức độ hô hấp người ta dùng hệ số hô hấp $k = CO_2/O_2$. Chẳng hạn sự oxy hoá đường trong điều kiện hiếu khí dưới tác dụng của enzym oxydaza:



$$K = \frac{CO_2}{O_2} = 1$$

Khi oxy hoá chất béo : $K = 0,5$; protein $K = 0,8$

Khi hô hấp yếm khí $K > 1$

Sự khác nhau giữa quá trình ngâm và nảy mầm là ở chỗ hệ số hô hấp k khi ngâm thường > 1 , khi nảy mầm $K = 0,74-1,00$. Từ đó người ta khẳng định không phải sự hao tổn chất khô và lượng nhiệt thải ra do hô hấp trong quá trình nảy mầm là hoàn toàn từ glucit (tinh bột và đường)

- Enzim Sitaza: đây là tập hợp enzym gồm sitoplastaza và sitaza chúng hoạt động đầu tiên ngay khi hạt vừa nảy mầm và được gọi là quá trình sitoliza. Những enzym này phân cắt hemixenluloza và polisacarit khác ở dạng gel để hình thành các sản phẩm có gốc C_5 , C_8 ,... Sự phân cắt hemixenluloza nhờ enzym sitaza khi nảy mầm đóng vai trò rất quan trọng trong sản xuất malt. Nhờ đó màng ngăn cách giữa nội nhũ và vỏ trấu bị phá vỡ tạo điều kiện cho các enzym amylaza và proteaza dễ dàng hoạt động trong lòng nội nhũ.

-Enzim amylaza: Nhóm enzym này trong đại mạch nảy mầm bao gồm α -amylaza, β -amylaza và amylofataza tập trung chủ yếu trong nội nhũ, chỉ có một số ít trong màng ngăn giữa nội nhũ và vỏ trấu.

+Hoạt tính α -amylaza tăng sau khi nảy mầm 3÷6 ngày và hoạt tính này đạt được cực đại phụ thuộc nhiệt độ nảy mầm:

$$\begin{aligned} \text{Ở: } t_{nm} = 12 \div 14^{\circ}\text{C} &\rightarrow H_{dmax} = 11 \div 12 \text{ ngày} \\ t_{nm} = 18 \div 20^{\circ}\text{C} &\rightarrow H_{dmax} = 6 \div 7 \text{ ngày} \\ t_{nm} = 25 \div 28^{\circ}\text{C} &\rightarrow H_{dmax} = 4 \div 5 \text{ ngày} \end{aligned}$$

+ β -amylaza có sẵn trong hạt đại mạch ở dạng liên kết và tự do. Trong quá trình nảy mầm hoạt tính β -amylaza tự do tăng lên 3÷4 lần.

+Amylophotphataza tự do không có trong đại mạch mà chỉ được hình thành sau ngày nảy mầm thứ 2, sau 8 ngày thì đạt cực đại nên hoạt tính tăng 150÷200 lần.

Sự tăng hoạt tính chung của amylaza sau khi nảy mầm - kí hiệu là DC (hoạt lực diastaza) được xác định bằng lượng đường maltose tạo thành, có thể biểu diễn theo đơn vị Vindich-Cotback ($^{\circ}\text{Wd}$) hay theo đơn vị Lintner ($^{\circ}\text{L}$) với quan hệ:

$$^{\circ}\text{L} = \frac{^{\circ}\text{Wd} + 16}{3,5}$$

Tác dụng của amylaza đến các quá trình hoá sinh như nảy mầm và đặc biệt trong quá trình đường hoá sau này có ý nghĩa đến sức quan trọng trong quá trình sản xuất bia rượu, mạch nha.

Mục đích của quá trình nảy mầm chủ yếu để tích tụ thật nhiều amylaza hoạt động để khi đường hoá chúng có thể chuyển tinh bột (của chính malt và của các nguyên liệu thay thế malt) thành các sản phẩm trung gian (dextrin) và các đường như maltotriaza, maltotetroza, maltodextrin, glucoza, maltoza. Ngoài ra khi nảy mầm còn tạo thành một lượng đáng kể đường saccaroza và một ít đường fructoza (tổng hợp trong phôi). Tất cả các loại đường làm cho malt có vị ngọt, hàm lượng của chúng trong malt tăng lên 3÷4 lần so với trong hạt ban đầu

(trong hạt ban đầu có 2,3÷2,5% đường, trong malt tươi có 8,5÷9% đường).

Trong thời gian nảy mầm có khoảng 10% tinh bột bị biến đổi, trong đó khoảng 4,5÷5% tinh bột bị hao tổn do hô hấp và tạo rễ, mầm phôi, lượng tinh bột còn lại bị biến hình (thủy phân có mức độ) như ở trên đã trình bày. Kết quả làm cho tính chất tinh bột của malt khác với tinh bột ban đầu: kích thước hạt tinh bột giảm, độ rỗng (xốp) giữa các hạt tinh bột tăng lên, tỉ lệ A_m/A_p cũng có thay đổi,

-Enzim proteaza: Có hoạt tính trong hạt ban đầu không đáng kể nhưng khi nảy mầm đã tăng lên 4÷8 lần, tăng nhanh hơn hoạt tính amylaza và đạt cực đại vào khoảng ngày nảy

mầm thứ 5. Sự thủy phân protein bắt đầu bằng tác dụng của proteinaza để tạo thành albumoza, polypeptit, pepton và sau đó dưới tác dụng của peptidaza tạo thành các axit amin. Tuy nhiên sự biến đổi này thường không hoàn toàn (đến các sản phẩm cuối cùng là các axit amin) vì các điều kiện nẩy mầm (các thông số nẩy mầm) thường không phải là điều kiện tối thích cho hoạt động của hệ enzym proteaza của hạt.

$$\begin{array}{ll} \text{Chẳng hạn:} & t_{\text{opt}} \text{ peptidaza} < 50 \text{ }^{\circ}\text{C} & \text{pH}_{\text{opt}} \text{ peptidaza} = 7,6 \div 8 \\ & t_{\text{opt}} \text{ proteinaza} = 60 \text{ }^{\circ}\text{C} & \text{pH}_{\text{opt}} \text{ peptidaza} = 4,5 \div 5 \\ & t_{\text{nẩy mầm}} \leq 60 \text{ }^{\circ}\text{C} & \text{pH}_{\text{hạt}} = 6,8 \div 7 \end{array}$$

Tuy nhiên, vì nhiệt độ nẩy mầm tương đối thấp và thời gian nẩy mầm kéo dài sẽ có sự thủy phân protein tương đối sâu sắc để tạo thành một lượng đáng kể các polypeptit và axit amin. Tác động này chỉ diễn ra với nội nhũ, trong khi protein ở lớp ngăn cách nội nhũ với vỏ và cả phần vỏ malt thì không bị biến đổi cả trong các quá trình chế biến về sau (sấy malt tươi, bảo quản malt, nấu và đường hoá khi sản xuất bia, mạch nha). Chúng sẽ tồn tại trong bã malt khi lắng, lọc dịch đường.

Sự thủy phân protein bởi enzym proteaza làm tăng lượng nitơ hoà tan (albumoza, pepton, polypeptit, axit amin), một phần các chất này dễ bị kết tủa khi đun sôi dịch đường (với hoa hublon - tức quá trình hublon hoá trong sản xuất bia). Phần khác vẫn tồn tại ở dạng hoà tan, phần này đặc biệt có giá trị trong sản xuất bia (là nguồn nitơ hữu cơ cho nấm men, tạo bọt, kết tủa để tự làm trong, tạo vị bia...) với tỉ lệ thích hợp, nếu quá cao thì bia dễ bị đục và đục trở lại khi tồn trữ bia.

Sự biến đổi các sản phẩm thủy phân proteaza khi nẩy mầm đại mạch được thể hiện trong bảng 4 (trang 139-1)

Qua bảng này, ta thấy trong khoảng nửa thời gian của quá trình nẩy mầm (từ ngày 1 (4), sản phẩm thủy phân protein tăng liên tục, đến nửa thời gian sau thì dừng lại hoặc giảm dần. Có thể giải thích điều này là do hoạt tính của enzym proteaza giảm dần và sẽ ổn định, và một phần sản phẩm thủy phân được dùng vào việc tạo mầm và rễ phôi (chiếm 11÷12% lượng protein của hạt).

Chỉ số quan trọng đặc trưng cho quá trình thủy phân protein khi nẩy mầm nói riêng và mức độ thủy phân của malt nói chung là lượng nitơ formol (lượng sản phẩm nitơ bậc thấp được tạo thành có chứa nhóm axit cacboxylic $-\text{COOH}$ tự do như axit amin, peptic...). Hoạt tính enzym proteaza được xác định theo chỉ số này (phương pháp chuẩn độ formol) bằng hiệu số của lượng nitơ formol tổng cộng (chung) khi đường hoá (tại thời điểm cần xác định hoạt độ enzym) và lượng nitơ formol ban đầu.

- Enzim esteraza: Xúc tác cho quá trình este hoá, trong đại mạch chủ yếu là nhóm enzym photphotaza bao gồm: fitaza, saccarofotfataza, glicero fotfataza, nucleotidaza và amylofotfataza.

+Biến đổi quan trọng đặc trưng là sự thủy phân phitin dưới tác dụng của enzym fitaza để giải phóng rượu inozit, muối fotfat và axit fotforic tự do.

+Saccaro fotfataza, glicero fotfataza, nucleotidaza thủy phân mối liên kết este của các chất hữu cơ chứa fotfat tương ứng và giải phóng ra axit fotforic tự do.

+Amylofotfataza cắt gốc axit fotforic của phân tử amylopectin. Do kết quả của quá trình tích tụ và biến đổi enzym mà lượng các chất hoà tan (chất chiết) tăng đáng kể: ban đầu chỉ có 6,5÷8%, khi nảy mầm tăng lên 26% (tính theo chất khô) nhưng do tổn hao hô hấp và tạo mầm nên còn lại trong malt là 14÷15%.

Cường độ hô hấp và các quá trình biến đổi hoá sinh khi ươm mầm phụ thuộc vào mức độ thông khí, tức là phụ thuộc vào tỉ lệ O_2 / CO_2 trong khối hạt đang ươm mầm. Trong khoảng nửa đầu thời kỳ ươm, xảy ra sự tích lũy enzym lớn nhất thì sự thông khí là cần thiết (ngày 1÷4). Sau đó nên dùng thông khí để giữ lượng CO_2 lại (nồng độ không quá 20% trong hỗn hợp khí) để hạn chế tối đa sự hô hấp của phôi (nhằm hạn chế sự hao hụt tối đa do hô hấp). Không khí thổi cho khối hạt cần có độ ẩm $W=98 \div 100\%$ và nhiệt độ phải bé hơn nhiệt độ ươm $2 \div 3^{\circ}C$.

3.4.2. Đặc điểm ươm mầm của các loại hạt khác nhau:

Như trên đã nói, với mục đích sử dụng malt khác nhau mà người ta dùng các loại hạt khác nhau để sản xuất với chế độ công nghệ phù hợp.

- Trong sản xuất malt dùng làm tác nhân đường hoá trong công nghệ rượu etylic thì chất lượng malt được đánh giá bằng hoạt tính tổng quát của hệ enzym amylaza. Nếu ươm mầm ở nhiệt độ $14 \div 16^{\circ}C$ trong t_{tg} trong thời gian dài thì sẽ tích lũy được rất nhiều các enzym α, β -amylaza, dextrinaza. Chẳng hạn: Đại mạch 10 ngày, yến mạch $10 \div 12$ ngày, mạch đen $7 \div 8$ ngày, kê $5 \div 6$ ngày.

- Trong sản xuất bia, để sản xuất malt sáng màu (malt vàng) người ta ươm mầm ở nhiệt độ không quá $18^{\circ}C$. Để sản xuất malt đen (malt caramen) người ta ươm mầm ở nhiệt độ cao hơn nhưng không vượt quá $25^{\circ}C$, thời gian ươm dài hơn để quá trình thủy phân tinh bột và protein được sâu hơn.

- Trong sản xuất mạch nha, malt cũng là tác nhân đường hoá (chính thức hoặc bổ sung - đường hoá sơ bộ), nếu yêu cầu thời gian ươm mầm dài hơn, ở nhiệt độ cao hơn lúa :12 ngày, kê: 7 ngày, ngô: 8 ngày, to= $28 \div 32^{\circ}C$.

3.4.3. Các phương pháp nảy mầm:

- Nảy mầm không thông gió:

Đây là phương pháp cổ điển hiện vẫn còn sử dụng nhiều trong các cơ sở sản xuất malt bia cũng như malt mạch nha, năng suất từ loại rất nhỏ đến rất lớn (vài trăm tấn hạt / ngày). Sản ươm mầm bằng xi măng phẳng, nhẵn, hơi nghiêng để dễ thoát nước. Trong phòng ươm cần đặt quạt đẩy, quạt hút để lưu thông không khí và hệ thống điều hoà nhiệt độ nhân tạo (nếu sản ươm chìm một nửa sẽ được lợi về nhiệt độ điều hoà nhưng khó thoát nước và vận hành).

Hạt sau khi ngâm được đổ thành đồng trên sàn rồi san đều thành lớp dày ban đầu khoảng 40 cm, sau đó giảm dần cho đến $10 \div 12$ cm ở giai đoạn cuối. Thường xuyên đảo trộn lớp malt, thông gió để đuổi CO_2 và cung cấp không khí mới. Có thể chia làm 3 thời kỳ nảy mầm như sau:

+ Thời kỳ 1: (2 ngày đầu) tăng dần nhiệt độ đến $13 \div 14^{\circ}C$, đảo trộn $2 \div 3$ lần / ngày.

+ Thời kỳ 2: (3 ngày tiếp theo): nhiệt độ khối hạt tăng nhanh do hô hấp mạnh. Nhiệt độ cao nhất cho phép đối với malt vàng $16 \div 17^{\circ}C$, malt đen $19 \div 20^{\circ}C$, đảo trộn $3 \div 4$ lần / ngày.

+ Thời kì 3: (2 ngày cuối) cường độ hô hấp và nẩy mầm giảm, đảo trộn 2÷3 lần / ngày. Rễ mầm bằng 1/5 lần chiều dài hạt, mầm dài 3/4 lần chiều dài hạt.

- Nẩy mầm thông gió trong ngăn:

Phòng nẩy mầm gồm các ngăn hở hình chữ nhật: dài 10÷15 m, rộng 3÷4 m, cao 1,8÷2 m, đáy hơi nghiêng để dễ thoát nước, cách đáy 60 cm đặt một lưới sàn có lỗ với diện tích lỗ 15÷20 % diện tích sàn, mỗi ngăn có thể chứa được 10÷12 tấn hạt khô.

Hạt ngâm xong đổ vào các ngăn rồi san đều theo chiều dày của lớp malt trong ngày nẩy mầm, lượng nước ngâm thừa trong hạt theo lỗ lưới sàn xuống đáy rồi ra ngoài. Malt được đảo trộn nhờ máy đảo trục vít xoắn thẳng đứng. Thổi không khí khô vào lớp hạt (qua sàn đáy) sau 18÷20h thì thổi không khí lạnh và ẩm rồi đảo trộn. Chế độ làm việc của ngăn nẩy mầm xem ở bảng sau. (bảng 5-trang 115).

Sau khi nẩy mầm xong, malt tươi được vận chuyển đến lò sấy (nếu để sản xuất bia hay mạch nha), hoặc máy nghiền sữa malt (làm tác nhân đường hoá trong sản xuất rượu, tinh bột).

- Nẩy mầm thông gió trong thùng quay:

Thiết bị là thùng hình trụ bằng thép, đặt nằm ngang trên hai giá đỡ và quay được trên hai giá này nhờ động cơ quay thùng với hệ thống truyền động bánh răng. Có hai loại thùng quay: kín và hở. Trong đó, thông dụng hơn là loại thùng quay kín, chiều dài thùng 4÷6 m, đường kính 2,3÷3 m đảm bảo để nẩy mầm được 10÷12 tấn hạt khô. (xem hình 47 trang 156).

Hạt ngâm xong được đưa vào qua các cửa phía trên thùng rồi phân bố đều trên lưới thép. Không khí lạnh và ẩm thổi vào thùng qua các lớp malt đang quay theo thùng rồi theo các ống góp ra ngoài thùng (nhờ quạt đẩy - hút). Thời gian nẩy mầm 7 (10 ngày, tốc độ quay thùng 2,5÷3 h/vòng).

Sau khi nẩy mầm xong cho thùng quay vào vị trí ngược với lúc nạp hạt rồi mở cửa chắn để tháo hạt ra qua chính cửa nạp ban đầu.

- Nẩy mầm theo phương pháp bán liên tục và liên tục: (xem tài liệu tham khảo)

- Đánh giá chất lượng malt tươi:

Chất lượng malt tươi được đánh giá qua phương pháp phân tích cảm quan, hoạt độ enzym và thành phần hoá học và thường được gắn liền với mục đích sử dụng malt (sản xuất rượu, bia hay mạch nha). Malt tươi tốt có mùi dưa chuột, nếu malt có mùi chú, vị thiu có thể do malt bản, bị nhiễm VSV, khi nẩy mầm không đúng chế độ công nghệ. Hạt malt phải mềm, nếu hạt còn cứng hay nhào nát thì coi như phẩm chất xấu.

Yếu tố quan trọng để đánh giá chất lượng malt là tỉ lệ nẩy mầm và chiều dài, độ lớn của mầm, rễ. Malt tốt có tỉ lệ nẩy mầm trên 85%, đối với malt vàng chiều dài mầm 2/3÷3/4 chiều dài hạt, malt đen có chiều dài mầm 1/2÷1 chiều dài hạt, rễ dài 1,2÷2 cm.

Chỉ tiêu quan trọng của malt là hoạt tính enzym. Sau đây là bảng chỉ tiêu hoạt tính enzym đối với malt dùng cho sản xuất rượu.

Loại malt	Tốt		Khá		Trung bình	
	AC (g/g.h)	DC (mg/g.h)	AC (g/g.h)	DC (mg/g.h)	AC (g/g.h)	DC (mg/g.h)

Đại mạch	>6	>35	4-6	25-35	3-4	15-25
Yến mạch	>5	>45	3-5	35-45	2-3	25-35
Malt đen và lúa mì	>7	>35	4-7	25-35	3-4	15-25
Kê	>3	>100	2-3	70-100	1-2	50-70

Ghi chú:

AC - hoạt tính amylaza: khả năng thủy phân tinh bột thành mantozo và các dextrin không làm đổi màu dung dịch iốt, đơn vị = g tinh bột / g malt trong 1 h ở nhiệt độ 30 oC.

DC - Nhờ khả năng thủy phân các dextrin thành maltoza, đơn vị = g dextrin / g malt ở nhiệt độ 30⁰C.

Chất lượng malt dùng để sản xuất bia trước hết là hoạt tính amylaza (AC) được biểu thị bằng lượng maltoza tạo thành từ tinh bột dưới tác dụng của enzym có trong 100 g malt vàng tươi tốt có AC bằng 300 - 400, malt đen tươi tốt có AC = 400 - 500.

3.5. Sấy malt:

Malt tươi có độ ẩm cao (42 - 45%) nên không thể bảo quản được (trừ malt tươi dùng) trong sản xuất rượu sẽ được đem đi nghiền thành sữa malt - là chế phẩm enzym đường hoá. Mặt khác, mùi vị và thành phần hoá học, cấu trúc của malt tươi không thích hợp cho việc sản xuất bia (trong mạch nha) như: hầu như không có chất màu, chất thơm (thậm chí có chất thơm phản tác dụng với bia), thành phần protein có thể làm giảm độ bền hoá lý của bia (bia dễ bị đục, bọt không bền), không có tính chất nghiền vỡ thành bột... Và lại malt vốn là nông sản chế biến có thị trường toàn cầu (thương mại thế giới) nên nhất thiết phải sấy malt.

Khi sấy phải chú ý đến giữ lại được đủ lượng enzym (đã tích lũy được trong quá trình nảy mầm) cho sản xuất bia (hay mạch nha). Muốn vậy khi xây dựng đồ thị sấy malt phải hiểu rõ quan hệ giữa nhiệt độ sấy và độ ẩm của malt (có tính đến độ bền của enzym do nhiệt độ và độ ẩm. Độ ẩm malt khi sấy càng cao thì enzym vô hoạt càng nhanh).

Ví dụ: Khi sấy malt vàng: ở giai đoạn hạt có độ ẩm 30% thì nhiệt độ sấy cho phép là 40⁰C. khi sấy ở nhiệt độ 50⁰C thì độ ẩm malt phải giảm còn 12%. Nếu nhiệt độ sấy tăng đến 60⁰C thì độ ẩm malt còn 8%.

Malt đen có thể sấy ở nhiệt độ cao hơn malt vàng, tuy nhiên nhiệt độ sấy không được quá 104⁰C để không phá huỷ nhiều enzym.

Khi malt có độ ẩm cao, nếu tăng nhiệt độ sấy cao sẽ tạo nên malt dạng keo khô vì ở khoảng nhiệt độ 60 oC xảy ra hiện tượng hồ hoá tinh bột, nếu tiếp tục nâng nhiệt thì tinh bột chuyển sang trạng thái thoái hoá - tạo thành hạt cứng. Trong khi đó, một số protein bị tác dụng bởi enzym proteaza sẽ hoà tan và thấm vào hạt tinh bột và chuyển sang dạng keo khi bị mất nước. Malt dạng keo khô do tinh bột và protein bị biến hình nên giảm độ hoà tan, giảm độ chiết.

3.5.1. Những biến đổi của malt trong quá trình sấy:

Theo độ tăng dần của nhiệt độ khi sấy mà ta có thể chia ra làm 3 thời kì như sau:

- Thời kì sinh lí: nhiệt độ sấy tăng dần và đạt đến 45⁰C: malt và rế vẫn tiếp tục phát triển, độ ẩm còn khoảng 30%, sự biến đổi do thủy phân, do enzym vẫn tiếp tục.

- Thời kì men (enzim): Nhiệt độ sấy tăng dần từ 45 - 70⁰C: Các quá trình sống bị ngừng lại: không hô hấp, mầm rế không còn phát triển nhưng sự thủy phân và những

biến đổi khác trong nội nhũ vẫn xảy ra rất mạnh vì nhiệt độ tối thích của đa số men nằm trong khoảng 45 - 60°C. Ở thời kì này, độ ẩm của malt đen từ 20 - 30°C, của malt vàng còn 10 %.

-Thời kì hoá học: Nhiệt độ sấy tăng từ 70 -105°C: Ở nhiệt độ > 75°C thì các hoạt động của enzym bị ngừng trệ vì một số enzym bị vô hoạt một phần (do nhiệt độ cao), số cào lại bị các chất keo của hạt hấp thụ và chuyển sang trạng thái không hoạt động. Ví dụ: Ở nhiệt độ > 40°C, enzym peptidaza ngừng hoạt động, ở nhiệt độ 60°C các enzym sitaza và phytaza mất hoạt tính và enzym amylaza giảm hẳn hoạt tính. Riêng đối với enzym proteinaza do khả năng chịu nhiệt rất lớn nên hoạt tính giảm rất ít khi sấy malt vàng.

Thời kì hoá học được đặc trưng bằng sự tạo thành các chất thơm, sự biến hình protein, sự làm yếu hay vô hoạt từng phần các enzym.

Quá trình quan trọng nhất xảy ra trong quá trình sấy là phản ứng melanoidin do tác dụng tương hỗ giữa những chất chứa nhóm cacbonyl (-COO) với những chất có nhóm amin (-NH₂). Kết quả malt sấy trở nên có màu tối (sẫm) hơn, có mùi vị đặc trưng của malt bia (hay malt mạch nha). Theo Hydge, quá trình tạo melanoit trong khi sấy malt có thể tiến triển theo 3 giai đoạn:

+ Giai đoạn đầu: cô đặc (nâng cao nồng độ) các chất đường và axit amin do mất nước khi sấy để tạo thành các tinh thể không màu.

+ Giai đoạn giữa: xảy ra sự khử hydro, bề gãy phân tử đường, phân tử axit amin để tạo thành các chất không màu hoặc có màu vàng nhạt, có tính khử mạnh, tiêu biểu là một số chất như: CH(OH)C(OH)CHO, hydroquinon (khi bị khử hydro chúng trở về dạng quinon ban đầu). Những chất khử này cùng với những chất khử được tạo thành trong các quá trình nấu bia (đường hoá, đun sôi dịch đường với hoa hublon) đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình oxy hoá - khử của công nghệ bia. Chúng trực tiếp tạo nên mùi vị, độ bọt cho bia, là các chất bảo vệ chống lại sự oxy hoá, chống lại sự kết tủa keo làm cho bia đục

+ Giai đoạn cuối: tạo thành những chất có màu sẫm.

Tốc độ phản ứng melanoit phụ thuộc vào nhiệt độ, pH, thời gian, thành phần các chất tham gia. Trong số các axit amin tham gia mạnh nhất là glixin và alanin, sản phẩm melanoit của chúng cho màu rất đậm và có mùi bia, cho mùi thơm mạnh hơn cả là valin và loxin, phenylalanin và valin cho sản phẩm có màu tối, mùi hoa hồng nhẹ, loxin cho sản phẩm nhạt màu và có mùi bánh mì rõ. Trong số các đường tham gia phản ứng melanoit theo thứ tự là: arabinosa > glucoza > galactoza > fructoza, trong đó các pentoza mạnh nhất là đường cexitoza. Thành phần nguyên tố của melanoit như sau: C= 54 - 60%, O= 31,3 - 35,1%, H=4,9 - 5,2, N= 3,5 - 5,3%

Chúng có chứa các nhóm -CO, -COOH, -OH, M ≈ 1480. Trong ngành bia, melanoit có ý nghĩa rất quan trọng: gây màu và mùi thơm đặc biệt, do có khả năng hoạt động bề mặt rất mạnh nên là những chất tạo bọt tốt, đóng vai trò bảo vệ các keo để ngăn cản sự kết tủa keo không bền vững, có khả năng khử mạnh làm tăng độ bền, chống hiện tượng đục bia do bị oxy hoá.

3.5.2. Các phương pháp và chế độ công nghệ sấy malt:

- Lò sấy nằm ngang hai tầng hoạt động tuần hoàn:

Đây là loại lò sấy cổ điển với phương pháp sấy đối lưu cưỡng bức, hiện nay vẫn được sử dụng rất phổ biến ở những nước có sản xuất malt. Đây là một toà nhà cao 20 - 25 m hình vuông hay chữ nhật có 5 tầng với các chức năng: tầng 1 đặt lò đốt, tầng 2 là buồng nhiệt có đặt clorifer, tầng 3 là buồng trộn không khí để sấy, tầng 4 là một sàng lưới và tầng 5 là một mặt sàng sấy trên cùng có ống hút và quạt hút để thải ẩm ra ngoài. Sàng sấy làm bằng lưới thép đan dày với diện tích lỗ chiếm 30 - 35% diện tích sàng.

+ Tiến hành sấy malt vàng:

Malt tươi nhờ gàu tải chuyển lên sàng sấy trên với chiều dày lớp malt 14 - 22 cm. tăng nhiệt độ sấy đều đặn sau 6 giờ đạt 30 - 35⁰C, độ ẩm còn 2%. Sau 6 h tiếp tục đạt 50⁰C, độ ẩm xuống còn 8 - 10 %. Như vậy phần lớn ẩm của malt được tách ra tại đây. Điều kiện quan trọng để thu được malt vàng chất lượng tốt là nhiệt độ sấy không được quá 40⁰C khi độ ẩm chưa hạ xuống dưới 12 - 14%.

Sau 12^h sấy ở sàng trên, malt được chuyển xuống tiếp tục sấy kiệt ở sàng dưới. Sau 11 - 12^h, nhiệt độ sấy tung lên 55 - 80⁰C, độ ẩm còn 2,5 - 3,3%. Sau khi sấy xong, malt được dồn đóng lại để chuyển sang khâu gia công tiếp tục. Chế độ sấy malt vàng (xem ở bảng 6 - trang 170 của giáo trình).

+ Tiến hành sấy malt đen:

Malt đen sấy lâu hơn và phức tạp hơn malt vàng. Đầu tiên malt tươi cũng được đổ vào và trải đều lên sàng sấy trên với lớp malt dày 22 -30 cm. Giai đoạn đầu dài 14h tăng nhanh nhiệt độ đến 40⁰C, độ ẩm xuống 20%. Trong 3- 5h tiếp theo tăng đến nhiệt độ 60 - 65⁰C, tăng cường đảo trộn. Sau 24^h thì sấy xong ở sàng trên, malt sẽ được chuyển xuống sấy ở sàng dưới. Tiếp tục thời kì sấy thứ nhất trong 9 - 10h ở nhiệt độ 50 -55⁰C, độ ẩm xuống còn 8 - 10%. Thời kì thứ hai nhiệt độ tăng lên: trong 4 - 6^h nhiệt độ tiếp tục đạt 75⁰C, độ ẩm xuống còn 5%, trong 3 - 4^h. Sau nhiệt độ tăng dần lên 100 -105⁰C cho đến khi sấy xong với hàm ẩm cuối cùng đạt 1,5 - 2%.

Vì malt đen sản xuất lâu hơn, hao tổn chất khô nhiều hơn nên giá thành malt đen và bia đen đắt hơn malt vàng và bia vàng. Để phần nào hạ giá thành, người ta sản xuất một số loại malt đặc biệt như malt café, malt mecan để thay thế một phần hay toàn bộ malt đen khi sản xuất bia đen.

Chế độ sấy malt đen (xem bảng 7 - trang 171 của giáo trình).

- Lò sấy nằm ngang một tầng:

Đây là loại lò sấy tương đối mới theo phương pháp sấy đối lưu cưỡng bức. Tức là tác nhân sấy là không khí nóng được thổi cưỡng bức qua lớp malt có độ dày 8 - 10cm mà không đảo trộn. Tiến hành sấy theo phương pháp ngược chiều tĩnh để tiết kiệm nhiệt và đạt độ ẩm cuối cùng của malt. Nghĩa là tác nhân sấy ban đầu được đem đi sấy cho lớp malt đã được sấy khô bằng sàng thứ hai bốc hơi tác nhân sấy mang ẩm của chính sàng đầu tiên này. Sau khi malt sấy xong chuyển đi gia công tiếp thì lại chuyển malt tươi đến để sấy sơ bộ tiếp tục (đổi chiều tác nhân sấy)

- Lò sấy hoạt động liên tục:

Trên cơ sở những loại thiết bị sấy hạt kiểu tháp để lợi dụng tính tự chảy của khối hạt, Viện Hàng Lâm Nông Nghiệp Latvia (một nước Cộng Hoà thuộc Liên Xô cũ) đã thiết kế và ứng dụng thiết bị sấy malt hoạt động liên tục kiểu tháp, gọi tắt là LCXA. Tháp sấy cao

15 m được chia thành 3 khu chính: khu tiếp nhận và sấy sơ bộ malt tươi, khu sấy và khu cấp nhiệt - thu nhận sản phẩm. Cấu tạo của lò sấy xem hình 51 - trang 173 của giáo trình.

Thiết bị sấy làm việc như sau:

Malt tươi được gàu tải chuyển lên bonke chứa và tại đây nó được sấy nóng sơ bộ ở nhiệt độ 30 °C, độ ẩm ban đầu của malt tươi khoảng 44%. Nhờ các van điều chỉnh, malt tự rơi thành đường liên tục xuống thân tháp. Tại đây được chia thành 4 vùng nhiệt sấy (không khí nóng qua calorifer được trộn với không khí ngoài trời nhờ quạt rồi cấp cho các vùng sấy), malt đi qua các vùng sấy này và đạt được độ ẩm sau đây:

Vùng sấy	Nhiệt độ không khí °C	Độ ẩm của malt %
Ban ke sấy sơ bộ (malt tươi)	30	44
Vùng sấy I	50	26
Vùng sấy II	67	12
Vùng sấy III	81	6
Vùng sấy IV	85	3

Malt liên tục chảy qua các cửa thu, vào ban ke chứa ở đáy rồi nhờ vít tải ra ngoài. Tổng thời gian vận chuyển nguyên liệu, sản phẩm và sấy trong khoảng 9,5 - 10h (thời gian sấy 8 h), có thể tự động hoá hoàn toàn quá trình sấy.

3.6. Tách mầm, rễ, bảo quản malt:

- Tách mầm, rễ malt:

Mầm và rễ malt khô có tính hút nước mạnh, có vị đắng khó chịu, vì vậy phải tách bỏ mầm rễ để hạn chế sự hút ẩm, làm đẹp một hàng malt, đảm bảo chất lượng malt, để nấu bia không gây nên vị đắng khó chịu. Tách mầm và rễ malt phải tiến hành ngay sau khi sấy, vì nếu để lâu rễ sẽ hút ẩm trở nên dai rất khó tách khỏi malt.

Để tách mầm và rễ malt người ta dùng thiết bị cắt là một lưới thép hình trụ quay chậm và đặt hơi nghiêng trong một thùng kín, lỗ lưới có kích thước 25x15 mm. Bên trong có trục quay cùng chiều nhưng nhanh hơn, trên có gắn các quạt có các lá thép nhỏ mép hơi cong để cắt mầm, rễ (xem hình ở sách tham khảo). Khi quay thùng thì mầm, rễ sẽ bị cắt cùng với hạt ra ngoài lưới, rồi nhờ quạt hút bụi mầm, rễ ra ngoài.

- Bảo quản malt:

Hạt malt và nhất là vỏ trấu sau khi sấy rất khô và giòn, thành phần chưa ổn định, nên nếu đem đi sản xuất bia thì sẽ không tốt lắm (khi nghiền dễ bị nát vỏ trấu nên khi nấu khó lọc, dịch đường có thể lên men chậm, bia kém bền). Vì vậy người ta thường bảo quản malt sau khi sấy xong ít nhất là 3 -4 tuần, nhiều nhất đến 2 năm. Trong quá trình bảo quản như vậy, độ ẩm malt tăng lên 5 -6% nên vỏ trấu trở nên dai hơn, hạt dẻo hơn, thể tích hạt tăng lên chút ít, malt sẽ ổn định về thành phần hoá học và hoạt tính enzym. Tốt nhất là malt được bảo quản trong thùng sắt tây, định kì thông gió, nhiệt độ bảo quản 20°C.

Ở nước ta hiện nay, toàn bộ lượng malt cho sản xuất bia đều phải nhập khẩu nên thường đã qua quá trình bảo quản, chuyên chở (bằng tàu thủy) rất lâu, bảo quản trong

nước nhiệt đới độ ẩm cao nên độ ẩm của malt khi đem sản xuất bia thường cao đến 8-9%, nên malt bị giảm chất lượng nhiều.

- Đánh giá chất lượng malt khô:

Đại mạch ban đầu	100lit	100kg	độ ẩm	15%
Malt sau khi sấy	90lit	75kg	độ ẩm	2%
Malt sau khi bảo quản	100lit	78kg	độ ẩm	4%

+Cảm quan:

Màu sắc: Malt vàng : vàng tươi
Malt đen : tối sẫm, vỏ óng ánh

Kích thước, hình dáng tương tự như đại mạch

Mùi vị: Đặc trưng cho từng loại malt

Malt vàng : ngọt dịu

Malt đen : vị café, ngọt mạnh

+ Độ sạch: Không lẫn tạp chất

Hạt vỡ tối đa 0,5%

Hạt không nảy mầm: 5%

+ Chỉ số cơ học:

* Dung trọng:

Malt rất nhẹ: 480 - 500 g/l

Malt nhẹ: 500 - 530 g/l

Malt trung bình: 530 - 560

Malt nặng: >560 g/l

* Trọng lượng 1000 hạt: 25 - 38 g

* Chỉ số hoá sinh và hoá học: xem giáo trình (trang 181, 182)

3.7. Kỹ thuật sản xuất một số loại malt đặc biệt:

Để làm tăng chất lượng bia, sản xuất những loại bia đặc biệt, người ta thường dùng những loại malt chất lượng đặc biệt sau đây:

- Malt caramen: dùng để sản xuất bia đen làm cho bia có vị caramen, mùi thơm mạnh, màu cánh gián, tạo bọt tốt. Malt caramen được chế biến từ malt tươi hay malt khô nhờ quá trình đường hoá phụ và sấy ở nhiệt độ cao hơn đến 110 – 170⁰C.

Người ta dùng malt tươi hay malt khô có độ chiết cao (hoạt lực enzym cao) tưới nước 10 – 15 lit/100g - để yên 12h để diễn ra quá trình thuỷ phân những chất nội tại trong malt, sau đó malt được sấy trong lò đặc biệt có khả năng nâng nhiệt độ sấy lên đến 170⁰C, thời gian sấy 2 – 3h.

Từ 100g malt khô thường sẽ thu được 90 – 95 kg malt caramen, dung trọng 400 – 450 g/l, độ ẩm 5 – 6 %.

- Malt cà phê: chế biến từ malt vàng có quá trình đường hoá phụ và sấy ở nhiệt độ cao 220 – 225⁰C. Malt ngâm vào nước nhiệt độ 70⁰C trong 12h để tạo thủ thuỷ phân chất màu. Sấy ở nhiệt độ cao trong 2 – 2,5h, hạ nhanh nhiệt độ sau khi sấy. Hạt malt phải có

màu giống màu hạt cà phê rang, mùi thơm cà phê rang. Từ 100kg malt thường thu được 85 – 90 kg malt cà phê dung trọng 400 – 450 g/l, độ ẩm sau khi sấy 2 – 3%.

- Malt melanoit: còn gọi là malt meland được chế biến từ đại mạch có hàm lượng protein cao (>12%). Nảy mầm ở nhiệt độ cao 20⁰C trong giai đoạn cuối 24h, ủ đồng sau 1 – 2 ngày để nhiệt độ tăng lên 50 – 52⁰C, tiếp tục ủ trong 16 – 24h. Sau đó tiến hành sấy như sấy malt đen.

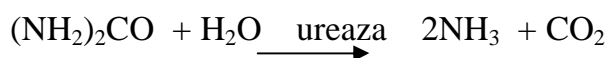
Chương 4: SẢN XUẤT ENZIM TỪ THỰC VẬT

Enzim từ thực vật cũng chiếm một tỷ lệ thích đáng trong công nghệ sản xuất và sử dụng enzim nói chung. Một số loại enzim đã được sử dụng nhiều trong y học, thực phẩm và công nghiệp. Đặc biệt trong nghiên cứu khoa học người ta rất chú trọng chiết tách và xác định cơ chế tác dụng của các enzim trong các mô thực vật như nhóm enzim glycoxydaza, nhóm enzim oxy hoá khử polyphenoloxydaza (EPPO) đã mang lại những giá trị lý thuyết và thực tiễn rất cao trong thời gian gần đây.

4.1. Sản xuất ureaza từ đậu rựa:

Chi họ đậu *Canavalia* ở châu phi, ở Việt Nam có loài *Canavalia ensiformis* - được gọi là cây đậu rựa, đậu tặc; hạt dùng chữa bệnh lui hàn, nấc cụt, yếu thận. Trong hạt đậu rựa, hàm lượng ureaza có thể đạt đến 20% chất khô do đó đây là nguồn nguyên liệu quan trọng để thu nhận ureaza.

- Về mặt ứng dụng: ureaza được sử dụng trong y tế để xác định hàm lượng urê trong huyết, bàng quan, có trong thành phần của thuốc chẹn thận nhân tạo. Trong chế biến một số loại cá có mùi khai (đuôi, nhám, mập) thì dùng ureaza để khử mùi khai rất hiệu quả. Ureaza có thể xúc tác thủy phân urê cả trong và ngoài tế bào (có thể).



+ Chiết xuất lấy enzim:

Nghiền kỹ bột đậu trong dung dịch HCl 0,4% có thêm EDTA (trilon B, complexon III) $5 \cdot 10^{-3}$ M và L.cystein $5 \cdot 10^{-3}$ M. Sau đó ly tâm tách bã lấy dịch chiết.

+ Xử lý nhiệt: Nâng nhiệt nhanh đến 60°C , giữ trong 30 phút đem ly tâm tách bỏ cặn kết tủa.

+ Siêu lọc: dịch ly tâm được lọc qua màng siêu lọc để loại bỏ peptit và polypeptit có trọng lượng phân tử bé ($M > 500$)

+ Kết tủa bằng axeton:

Dịch lọc được xử lý bằng axeton lạnh (tỷ lệ 1:1), ly tâm tách kết tủa. Phần kết tủa đem hoà tan trong trisbuffer 0,1M, pH = 7 chứa EDTA và L.cystein $5 \cdot 10^{-3}$ M.

+Sắc ký trao đổi ion

Dịch enzim được chạy sắc ký trao đổi ion trên cột chứa DEAE – xenluloza với gradien nồng độ NaCl từ 0 – 1M. Phân đoạn chứa enzim được sấy thăng hoa (đông khô) với chất sacaroza làm chất ổn định với tỷ lệ 2,5mg/1mg enzim.

Chế phẩm thu được có hoạt tính tăng 25 lần so với ban đầu và hiệu suất thu hồi 43%.

Xem bảng 8 của giáo trình (trang 186). Một số thông số của quá trình thu nhận ureaza từ đậu rựa.

4.2. Thu nhận bromelain từ dứa:

- Giới thiệu quả dứa: tên latin: *Bromelia ananas*-L: thuộc chi dứa ăn quả. Ngoài ra còn có chi dứa dại (để lấy sợi).

Bromelain có nhiều trong phế liệu dứa như vỏ, lõi, chồi, lõi đầu.
Giới thiệu đặc điểm chế phẩm Bromelain (Xem quá trình trang 187-189).
Nguyên tắc chung để thu nhận Bromelain.

Phế liệu dứa → làm dập → chiết lọc → ly tâm → kết tủa → ly tâm → lọc → chế phẩm kỹ thuật → Sắc ký trao đổi ion → sấy thăng hoa → sản phẩm tinh khiết .

Ghi chú: kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lạnh hay axeton lạnh tỉ lệ 1:1.

- Thu nhận Bromelain bằng phương pháp nhanh sử dụng CMC.

Thu nhận Bromelain bằng phương pháp mô tả như ở trên đòi hỏi thời gian lâu, khó lọc, lượng dịch lớn, khó bảo quản. Hiện nay một số nhà nghiên cứu đã dùng phương pháp nhanh tách Bromelain bằng CMC. Cho phép thu được Bromelain bột trắng có hoạt tính cao, thời gian nhanh, đơn giản như sau:

+ Công nghệ chế tạo CMC (xem giáo trình trang 191).

Chú ý : có thể thay vải màn (hay gạt) bằng bông nón (Xenluloxa ~ 100%).

+ Tách chiết Bromelain từ dịch chiết dứa bằng CMC.

CMC được tẩm ướt bằng dung dịch đậm photphat 0,05 M, pH= 6,1. Cho dịch chồi dứa (chồi dứa → nghiền → ép lọc → nước dịch) vào, thỉnh thoảng khuấy trộn. Enzim Bromelain sẽ hấp thụ lên bề mặt của CMC. Sau 2 giờ lấy ra vắt nước loại bỏ cặn bám vào CMC, rửa trôi các prôtêin không phải enzym bằng đậm photphat ở pH=6,5. Sau đó cho phân hấp thụ lần 1. Dung dịch phân hấp thụ là đậm photphat pH=7,1, NaCl 0,5 N khuấy trộn. Sau 2 giờ lấy ra vắt được dung dịch đậm đặc chứa bromelain. Tiếp tục phân hấp thụ như lần thứ hai rồi gộp chung dịch chiết của cả hai lần kết tủa enzym bằng axeton hay cồn lạnh.

Với phương pháp này hiệu suất thu hồi đạt 0,1% so với chồi dứa tươi, chế phẩm có hoạt tính 24 đơn vị (mg chế phẩm enzym. So với phương pháp kết tủa từ ban đầu bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thì độ sạch cao hơn hai lần, thời gian nhanh hơn, tiến hành thuận lợi hơn.

- Một số ứng dụng của chế phẩm bromelain:

+ Thủy phân gan bò:

Gan bò được xử lý bằng chế phẩm bromelain trong 10 giờ ở 1-55 °C, sau đó vô hoạt enzym ở 100 °C trong 3-4 phút. Dịch được lọc và đông khô thành dạng bột là chế phẩm hỗn hợp axit amin y tế (sản xuất các dịch truyền đạm y tế). Thành phần axit amin của chế phẩm thủy phân gan bò bởi bromelain được trình bày ở bảng 12 (trang 193 của giáo trình).

+ Sử dụng bromelain làm đông sữa:

Để làm đông sữa trong phương pháp truyền thống (trong CN-SX photphat) người ta sử dụng renin thu được từ ngăn thứ 4 của dạ dày bê. Hiện nay, lượng renin chưa đáp ứng đủ nhu cầu của công nghệ. Trong những năm gần đây xu hướng sử dụng proteaza thực vật để thay thế một phần renin trong chế biến phomat đang được phát triển. Trong đó

đáng kể nhất là 2 loại chế phẩm: ficin từ cây cọ ficus và bromelain từ dứa. Kết quả ứng dụng xem bảng 13 (trang 194 của giáo trình)

+ Sử dụng bromelain để thu nhận các chất ức chế proteaza.

Trong một số loại cơ quan động vật, thực vật tồn tại các chất ức chế enzym, trong đó có chất ức chế proteaza, chúng có bản chất protein như enzym. Điển hình như trong các hạt họ đậu: đậu tương, đậu xanh, đậu ván, hạt mít, nội tạng của mực nang, đĩa, trong dứa (tồn tại song song với bromelain). Các chất ức chế thương tác động mạnh lên một số enzym, trong đó có cả enzym trong đường tiêu hoá (của người và động vật) như: ficin, bromelain, tripxin. Để thu hồi được các chất ức chế này, người ta dùng phương pháp hiện đại, hiện nay là dùng enzym cố định. Bromelain sau khi thu nhận bằng CMC như trên được cố định trong gel sepharosa rồi nhồi vào tạo ra cột phản ứng. Dịch nghiền, lọc phế liệu dứa được cho chạy qua cột này: đầu tiên ở pH photphat 4,6, sau đó pH = 7,6 – 7,8, tiếp đó xảy ra quá trình liên kết giữa bromelain với các chất ức chế. Thu hồi chất ức chế bằng NaOH 0,01N + NaCl 0,1N với pH = 11,5 – 12; có độ tinh sạch, hoạt tính cao (xem bảng 14 trang 195 của giáo trình). Ngoài ra bromelain có sử dụng trong quá trình làm mềm thịt, sản xuất nước mắt ngăn ngày, bột cá.

- Thu nhận papain từ nhựa đu đủ:

Cây đu đủ (*carica papaya.L*), quả dùng làm thực phẩm. nhựa quả đu đủ làm thuốc giun, chai chân, mụn cơm, sưng khớp, eczema. Rễ làm thuốc cầm máu, sỏi thận. Hoa chữa ho, viêm cuống phổi, lá chữa ung thư phổi. Papain có $M = 20.700$, $t_{op} = 80^{\circ}C$, $pH_{op} = 5 - 5,5$. Bị ức chế và mất hoạt tính bởi H_2O_2 , Iodoaxetat, I_2 , fericianua. Được hoạt hóa bởi -CN, cystein, H_2S và glutation.

+ Thu nhận papain thô:

Dùng các loại quả đu đủ còn non, đu đủ già (chưa chín), dùng khăn lau sạch vỏ, lấy dao cạo sạch những đường không quá sâu, hứng nhựa (catex) vào cốc rồi làm khô bằng các phương pháp khác nhau, ta thu được chế phẩm papain thô có hoạt tính như bảng 15 (trang 196 của giáo trình).

Kết quả cho thấy hoạt tính papain sau khi chiết tách cao hơn khi đã để 3 tháng. Phương pháp phơi nắng cho kết quả hoạt độ enzym thấp nhất, sấy chân không dung môi (axeton hay rượu etylic lạnh) cho hoạt tính cao nhất. Chế phẩm cần bảo quản lạnh 6 – 10⁰C mới duy trì hoạt tính.

+ Thu nhận papain thương phẩm:

Ngâm papain thô hoà tan nhựa tươi (catex) trong nước cất có bổ sung glycerin để tăng độ hoà tan, lọc qua vải màn. Kết tủa bằng axeton lạnh với tỷ lệ 2:1 so với thể tích dịch lọc. Ly tâm lạnh lấy kết tủa, sấy 45 – 50⁰C (sấy chân không hay phơi khô), đem nghiền thành bột.

Ở nước ta hiện nay viện công nghệ sinh học đã sản xuất thành công chế phẩm papain thương mại dạng đông khô. Bảng 16 so sánh hoạt tính (trang 197) của papain thương mại quốc tế với papain tươi và đông khô Việt Nam. Kết quả điện di đó (trên gel

polyacrilamit), thể hiện trên hình 56 (trang 198). Hoạt tính thành phần các enzym trong chế phẩm papain được trình bày ở bảng 17 (trang 199).

+ Ứng dụng của papain: làm đông sữa, thủy phân protein như sản xuất bột cá thực phẩm, sản xuất nước mắt ngăn ngày, làm mềm thịt.

- Giới thiệu kết quả nghiên cứu chế phẩm EPPO (bột axeton) trong lá chè và hạt ca cao

Chương 5: ENZIM CỐ ĐỊNH

5.1. Giới thiệu chung:

Enzim cố định (hay enzim không tan) là enzim có sự tham gia hoạt động trong một không gian bị giới hạn. Sự giới hạn hoạt động vốn linh hoạt của enzim bằng cách gắn nó vào một pha cách ly tách rời khỏi pha lỏng tự do và ở đó nó vẫn có khả năng tiếp xúc được với các phân tử cơ chất, effector hay inhibitor (chất ức chế). Pha gắn enzim thường không tan trong nước nhưng cũng có thể là các polyme ưa nước.

Enzim không tan được nghiên cứu và ứng dụng từ những năm 1950. Để chế tạo enzim cố định có thể dùng các phương pháp hấp phụ, liên kết hoá trị để gắn kết enzim. Chất dùng để gắn kết enzim gọi là chất mang (enzim), hiện nay người ta thường dùng xenluloza, tinh bột, rephadex, agarosa, alghinat canxi, gel polyacylamit, bột thuỷ tinh, nilon..... Chế phẩm enzim không tan có thể ở dạng bột, hạt, phiến, màng mỏng.

Trong một số trường hợp không cần thiết phải gắn enzim vào chất mang mà có thể giữ nó ở bên trong mạng lưới polyme bao quanh lấy phần tử enzim. Mạng lưới đó có mật độ không cho phép enzim thoát ra khỏi mạng nhưng vẫn đủ lớn để cơ chất và sản phẩm tạo ra qua lại dễ dàng.

Theo thống kê, đầu năm 1995 người ta đã chế tạo được trên 100 chế phẩm enzim cố định.

Lợi ích của việc sử dụng enzim cố định:

- Giảm giá thành do enzim được sử dụng lặp lại nhiều lần với cùng một kiểu phản ứng xúc tác, chế phẩm bền hơn trong các điều kiện pH, nhiệt độ, áp suất thẩm thấu tối ưu, tốc độ phản ứng lớn, dễ tổ chức sản xuất ở mức độ tự động hoá cao.

- Chế tạo enzim tương đối dễ, đầu tư xây dựng và sản xuất tương đối ít, sản phẩm phản ứng không lẫn lộn với enzim (chỉ một số ít bị rửa trôi theo dòng chảy của tác nhân), có thể dễ dàng tổ chức sản xuất các sản phẩm lên men bằng enzim ngoại bào như: rượu etylic, axit hữu cơ, axit amin, vitamin.

5.2. Một số phương pháp chủ yếu chế tạo enzim cố định :

5.2.1. Microencapsulation (gói enzim trong bao cực nhỏ)

Được nghiên cứu bởi Chang et al(1967-1968)

Cái màng polymer thẩm thấu dày 200A⁰ (xenluloza, polysacarit, phi tinh bột) tạo thành hạt đứng vững 10-12M chứa các phân tử enzim bên trong. Lớp màng này cho phép cơ chất và sản phẩm phản ứng enzim được qua lại tự do nhưng các phân tử enzim không thể qua lại được vì các phân tử quá lớn. Như vậy nếu cơ chất có phân tử lượng quá lớn như: poly saccarit, protein cũng không thể qua lại màng được do đó không thể thực hiện phản ứng enzim được.

5.2.2. Liên kết enzim vào chất mang không tan (silman và katchalski-1966)

Các chất mang nay thường là: CMC, silicagen. Lúc đó enzim được gắn vào chất mang tạo một số vị trí xa với trung tâm hoạt động của nó. Như vậy đặc tính của enzim phần nào bị thay đổi không còn như khi nó ở trạng thái hoà tan tự do trong hệ như: độ pH_{op}, t_{op}... dẫn đến sự thay đổi các trị số K_m, V_m

5.2.3. Định vị enzyme trong pha lỏng của hệ thống 2 pha (Reese and Mandels.1958)

Enzyme được hoà tan trong pha lỏng và được giữ lại trên cột của chất rắn không tan như xenluloza. Cơ chất nằm trong pha lỏng khác (pha dung môi) khuếch tán vào pha lỏng chứa enzyme và xảy ra phản ứng với enzyme. Các sản phẩm phản ứng khuếch tán ngược lại đi ra ngoài cột. Hệ thống này gần giống với phương pháp microen capsule mà pha dung môi đóng vai trò như một màng bán thấm.

5.2.4. Giữ enzyme bằng màng siêu lọc:

Enzyme được hoà tan tự do trong dung dịch và tiến hành phản ứng enzyme ngay trong dung dịch này. Sản phẩm phản ứng được tách ra nhờ màng siêu lọc chọn lọc còn cơ chất và enzyme được giữ lại ở phía bên kia của màng.

(Xem hình vẽ trang 204 và giải thích trang 205 của giáo trình)

5.3. Một số liên kết trong việc cố định enzyme.

5.3.1. Liên kết hoá trị: (cộng hoá trị)

Chất mang trong phương pháp này là các polyme tự nhiên và các sản xuất của chúng như: xenluloza, agarosa, alginic acid, chitin, collagen, keratin, các polyme tổng hợp: axit acrylic, polyme tan, N – Vinylpyrrolidon...

Bản chất của phương pháp cố định enzyme bằng liên kết cộng hoá trị là enzyme được nối với chất mang thông qua “cầu nối có cực” nào đó. Cầu nối này có kích thước vừa phải, một đầu gắn với chất mang polyme, đầu kia gắn với enzyme.

Ví dụ: cyanuric chloride (trichloro triazin) có 3 nhóm có khả năng tạo liên kết đáp ứng được yêu cầu trên, trong đó có một nhóm sẽ liên kết mạnh với polyme, nhóm thứ 2 với enzyme, nhóm thứ 3 có thể liên kết với cả 2 ưu thế đặc biệt của chất này là ở chỗ diện tích của nó quyết định các tính chất ion của phức enzyme – xenluloza. Phức này có thể trung tính, âm (anion), dương (cation) phụ thuộc vào bản chất của chất gắn với thứ 3

Trong khi đó một số các phương pháp cố định enzyme khác chỉ do phức mono – ion (cation hoặc anion).

- Glutaraldehyt cũng hay được sử dụng làm cầu nối để gắn enzyme vì nó chứa 2 nhóm – CHO ở hai đầu, ở pH trung tính sẽ liên kết được với các nhóm amin – NH₂ tự do.

Như vậy một đầu sẽ gắn vào chất mang, còn đầu kia gắn vào enzyme.

5.3.2. Hấp phụ vật lý:

Chất hấp phụ và enzyme được trộn lẫn với nhau trong một khoảng thời gian nhất định để sự hấp phụ xảy ra nhờ tương tác bề mặt như: liên kết ion, liên kết ưa béo (kỵ nước), liên kết hydro, lực Vandewaals. Nhược điểm của phương pháp này chính là quá trình hấp phụ enzyme có thể xảy ra do sự thay đổi pH, nhiệt độ, thành phần ion.

- Các chất mang hữu cơ dùng cho hấp phụ vật lý: dẫn xuất polyme tự nhiên, DEAE – xenluloza, DEAF – sephadex. Đây là các amonit (mang điện (-))

- Chất sắt ký xotein - kỵ nước như: agarosa cải biến có gắn các nhóm mang điện ở đầu chuỗi cacbon hydrat của nó (hai loại lực hấp phụ là lực tĩnh điện và lực kỵ nước gắn

kết không thuận nghịch với nhiều enzym). Nhóm enzym thích hợp nhất cho cơ chất loại này là lipaza (cơ chất kỵ nước, không tan trong nước (ưa béo)).

- Các chất mang vô cơ: kim loại kiềm thổ, Al_2O_3 , TiO_2 như: thuỷ tinh xốp, silicagel, silochrom. Ưu điểm của loại chất mang này là độ xốp lớn, tính hấp phụ cao, chế tạo ở dạng hạt để tạo reactor cột (cột phản ứng).

5.3.3. Những điều cần lưu ý khi thực hiện việc cố định enzym:

Khi lựa chọn phương pháp và thử nghiệm cố định enzym cần lưu ý các điều sau:

- Enzym phải ổn định trong những điều kiện xảy ra phản ứng: quan trọng nhất là hoạt lực enzym và độ bền của nó theo thời gian phản ứng, điều này quyết định hiệu suất phản ứng, hiệu suất tổng thu hồi và hiệu quả của toàn bộ quá trình (giá thành, giá trị khoa học và thực tiễn, giá trị kinh tế - xã hội)

- Nếu có thể được thì các hợp chất tham gia phản ứng tạo liên kết ngang (giữa chất mang và enzym) sẽ chủ yếu chỉ tương tác với những nhóm chức năng nằm ngoài tâm hoạt động của enzym. Nếu điều kiện này không thực hiện được hoàn toàn thì chất tham gia phản ứng tạo liên kết ngang phải có kích thước lớn không cho phép nó xâm nhập, ảnh hưởng đến trung tâm hoạt động của enzym.

- Trung tâm hoạt động của enzym phải luôn luôn được bảo vệ (nếu thực hiện được) bằng các phương pháp khác nhau. Chẳng hạn nếu enzym với tâm hoạt động có nhóm -SH thì cần phải xử lý sơ bộ bằng glutation hay cystein và chỉ tái hoạt hoá enzym sau khi đã gắn nó vào chất mang. Hoặc có thể che chắn tâm hoạt động bằng cách bổ sung vào hỗn hợp phản ứng cơ chất đã được bão hoà bởi enzym (nồng độ cơ chất cao nhất mà enzym có thể thực hiện được phản ứng xúc tác)

- Khi rửa thiết bị phản ứng để phục hồi enzym, không được làm ảnh hưởng xấu đến hoạt tính enzym đã được gắn vào chất mang.

- Khi lựa chọn chất mang (hệ cố định) cần phải để ý đến phản ứng enzym sẽ diễn ra cụ thể sao cho không làm ảnh hưởng thậm chí huỷ hoại ngay bản thân chất mang và sản phẩm phản ứng không được ức chế hoạt động của enzym. Chẳng hạn không thể gắn enzym xenluloza vào chính chất mang là xenluloza và các dẫn xuất của nó cũng không thể tiến hành phản ứng thuỷ phân xenluloza trên chính chất mang này.

- Để ý đến độ bền của chất mang (bền cơ học, thuỷ lực học (rửa trôi), bền nhiệt, bền gel) nhất là khi phản ứng trong những cột công suất lớn.

5.4. Ảnh hưởng của sự cố định đến hoạt tính của enzym.

Khi gắn vào chất mang, enzym sẽ bị giới hạn hoạt động trong một phạm vi môi trường xác định, lúc đó cấu trúc không gian của phân tử enzym (và của cả tổ hợp) có thể bị thay đổi do đó có thể làm biến đổi một số tính chất của enzym ban đầu. Ví dụ có thể thay đổi khoảng pH hoạt động, nhiệt độ hoạt động (và do đó có thể thay đổi pH_{op} , t_{op}), tính đặc

hiệu của enzym cũng như hằng số Michaelis. Tất nhiên những thay đổi này phụ thuộc nhiều vào bản chất của chất mang, nói chung enzym cố định thường trở nên bền với các yếu tố gây biến tính hơn (vì nó đã được “làm bền” phần nào bởi chất mang) nhưng độ hoạt động riêng thường thấp hơn enzym ban đầu.

5.4.1. Hoạt tính của enzym cố định phụ thuộc vào bản chất của chất mang:

Khi enzym được giới hạn trong phạm vi môi trường chất mang xác định sẽ xảy ra một số kiểu tương tác khác nhau của chất mang lên môi trường hoạt động vi mô bao xung quanh phân tử enzym cố định

- Kiểu thứ nhất được gọi là “hiệu ứng phân phối” (hay “hiệu ứng đẩy – kéo”) trong đó chất mang polyme nhờ những tính chất đặc trưng sẽ lôi kéo tới bề mặt của nó, hoặc đẩy khỏi cơ chất, sản phẩm phản ứng và các chất khác làm tăng hay giảm tương đối nồng độ của chúng trong phạm vi môi trường vi mô nằm sát cạnh enzym.

- Kiểu thứ hai được gọi là “hiệu ứng ngăn chặn” tức là bản thân chất mang polyme ngăn cản sự khuếch tán tự do của các phân tử hướng tới enzym (trong đó có cơ chất) cũng như đi khỏi enzym (trong đó có sản phẩm phản ứng). Từ đó ảnh hưởng trực tiếp hay gián tiếp đến hiệu quả xúc tác của enzym.

Ví dụ điển hình là trường hợp enzym được cố định bằng chất mang polyanion (poly ion mang điện (-)), lúc đó chất mang sẽ tác động mạnh đến cơ chất cation (mang điện (+)). Khi đó cơ chất kiểu này sẽ tập trung xung quanh trường tác dụng vi mô của chất mang làm cho mật độ (nồng độ) của nó sẽ cao hơn so với mật độ trung bình trong toàn hệ. Đồng thời chất mang cũng sẽ lôi kéo bất kỳ cation nào khác, chẳng hạn như các proton H^+ hay hidroxoni H_3O^+ (do nước có tính điện ly yếu $2H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$). Nghĩa là nồng độ H^+ tăng lên xung quanh trường tác dụng của chất mang (và cũng là của enzym) làm cho pH giảm xuống thấp hơn so với pH trung bình trong toàn hệ. Trong trường hợp polyme chất mang và cơ chất mang điện giống nhau thì quá trình trên lại xảy ra hoàn toàn ngược lại. Nghĩa là nồng độ H^+ lại giảm đi xung quanh trường tác dụng của chất mang (và cũng là của enzym) làm cho pH tăng lên cao hơn so với pH trung bình trong toàn hệ.

Như vậy ta nhận thấy là khi sử dụng polyme dạng polyion làm chất mang sẽ không có sự phân bố đều các ion trong hệ, lúc đó nồng độ ion trong môi trường vi mô xung quanh enzym sẽ khác với nồng độ của chúng trong hệ. Điều đó làm cho quá trình động học của enzym sẽ rất phức tạp, sẽ có sự sai khác (nhiều khi là đáng kể) các thông số liên quan như: nồng độ cơ chất, sản phẩm phản ứng, pH, t^0 ...

Một ví dụ khi khảo sát sự cố định papain trên màng xenluloza nitrat để thủy phân gelatin cho kết quả tốt hơn so với khi enzym ở dung dịch tự do (hoạt độ enzym cố định thấp hơn hoạt độ enzym tự do). Đó là do có chất mang xenluloza nitrat đã hấp thụ gelatin, biến tính sơ bộ nó để tạo điều kiện thuận lợi cho sự thủy phân của enzym dính kèm.

Đồ thị mô tả hiệu ứng phân bố lại proton làm giảm pH xung quanh enzym cố định (chất mang là polyanion) như sau:

Giả sử pH_{op} của enzym tự do trong dung dịch phản ứng là 8 và đường cong 1 mô tả vận tốc phản ứng phụ thuộc vào pH có dạng hình chuông như trên. Đường cong 2 mô tả vận tốc phản ứng phụ thuộc vào pH khi enzym cố định tế bào trên poly polianion. Trong

khi ở pH = 8 ta có vận tốc phản ứng bằng 50% V_{max} , để đạt được giá trị này giá trị pH bên trong (pH xung quanh môi trường vi mô của enzym) chỉ cần là 7. Như vậy mặc dù độ pH hệ thống bằng 8 nhưng thực tế enzym đã hoạt động ở độ pH thấp hơn (=7) mà ở đó hoạt tính của nó bằng 50% giá trị cực đại (điểm A). Do vậy phải tăng giá trị pH_e (pH of effect) tới 9 để khi đó pH_i = 8 thì enzym sẽ thể hiện hoạt tính tối đa của nó (điểm B)

Như vậy ta đã thấy có hiện tượng xê dịch (sai khác) giá trị trong hệ. Để khắc phục người ta thêm vào hệ những phản ứng trao đổi ion điển hình (lực ion, độ phân ly cao) để ngăn cản ảnh hưởng của các nhóm ion ảnh hưởng đến chất mang và làm dịch chuyển pH hoạt động cũng như pH_{op}. Cũng có thể dùng dung dịch đệm nồng độ cao để khắc phục được hiện tượng này.

Chất mang phân tử lượng càng lớn thì càng giảm đáng kể hoạt tính enzym gắn vào đó so với chất mang có phân tử lượng càng nhỏ. Điều này được giải thích bởi sự cản trở không gian của phân tử chất mang đối với phân tử cơ chất trong vùng trung tâm hoạt động của enzym.

5.4.2. Hoạt tính enzym cố định phụ thuộc vào sự khuếch tán của cơ chất, sản phẩm và các phân tử khác:

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; trọng lượng phân tử của cơ chất; sự sai khác do “hiệu ứng phân phối” (sai khác về nồng độ, pH, t^0 hoạt động...). Trong đó đường kính lỗ gel của chất mang polyme và trọng lượng phân tử của cơ chất đóng vai trò quan trọng nhất.

Hiệu ứng phân phối làm xuất hiện gradien nồng độ cơ chất và sản phẩm trong khi tiến hành phản ứng, có thể đo đạc và viết các phương trình động học cho chúng. Những giới hạn khuếch tán có thể được thể hiện hai dạng hàng rào khuếch tán bên ngoài và bên trong.

Hàng rào khuếch tán bên ngoài có được do có sự tồn tại của lớp mỏng dung môi không bị pha trộn bao xung quanh hạt polyme. Sự hình thành nó như có sự kết hợp của khuếch tán phân tử thụ động (chuyển động Brown) và sự đối lưu (do sự xuất hiện gradien nồng độ hay gradien nhiệt độ). Độ dày của lớp khuếch tán bên ngoài phụ thuộc rất nhiều vào tốc độ khuấy trộn dung môi, đây là yếu tố hết sức quan trọng khi tiến hành phản ứng enzym cố định.

Hàng rào khuếch tán bên trong do chính chất mang tạo ra và chỉ có sự khuếch tán phân tử thụ động (chuyển động Brown), không bị ảnh hưởng bởi tốc độ pha trộn. Hàng rào này sẽ tỏ ra có ảnh hưởng to lớn hơn nếu enzym được cố định vào trong lòng chất mang chứ không phải gắn nó vào bề mặt của chất mang.

Những giới hạn khuếch tán này cùng với hiệu ứng phân phối làm cho các thông số công nghệ thay đổi (có khi là khá lớn) so với khi tiến hành với enzym tự do, đây là điều cần chú ý khi mô hình hoá, thiết lập quy trình công nghệ.

5.5. Các reactor chứa enzym cố định:

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

5.5.1. Reactor hoạt động theo chu kỳ.

Thực tế đó là những bể lớn hay bồn chứa enzym và cơ chất có trang bị máng khuấy. Như vậy dung tích làm việc, hiệu suất chuyển hoá được cố định và người ta cho phản ứng tiến hành triệt để theo tính toán. Sau đó tháo cạn toàn bộ để tách sản phẩm khỏi enzym (như vậy là xong 1 chu kỳ làm việc) rồi lại chuẩn bị tiến hành mẻ khác. Trong trường hợp enzym tan (lẫn lộn cơ chất còn dư, sản phẩm phản ứng với enzym) thì để tách sản phẩm người ta thường làm biến tính enzym (ví dụ bằng cách xử lý nhiệt). Phương cách sử dụng này có hiệu quả kinh tế nếu dùng enzym rẻ tiền mà sản phẩm phản ứng lại có giá trị, enzym dùng xong không thu hồi lại được. Để reactor kiểu này có thể dùng enzym đắt tiền có thể thu hồi để dùng lại trước hết cần phải cố định nó thành enzym không tan. Sau chu kỳ phản ứng, chế phẩm enzym không tan được tách ra bằng ly tâm hay lọc. Mà trong thực tế quy trình thu hồi enzym này có thể làm phá huỷ cấu trúc của chế phẩm enzym không tan, nghĩa là phá huỷ enzym. Vì vậy reactor hoạt động theo chu kỳ thường được sử dụng với enzym tan rẻ tiền, không cần thu hồi enzym, chi phí sản xuất thấp hơn so với các phương pháp khác.

5.5.2. Reactor hoạt động theo kiểu dòng chảy:

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

- Reactor dòng chảy có khuấy trộn là một bể (bồn hay thiết bị) có máng khuấy, có đường dẫn nạp cơ chất và đường lấy hỗn hợp hay sản phẩm phản ứng ra khỏi bể (nguyên tắc chemostat trong nuôi cấy vi sinh vật). Các thông số hoạt động của thiết bị như: dung tích, tốc độ bổ sung cơ chất, hoạt tính enzym, tốc độ tháo sản phẩm, thời gian duy trì phản ứng và chu kỳ làm việc thường được tối ưu hoá theo những mục tiêu đã định.

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

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

- Reactor dòng chảy không khuấy trộn (xem hình 63 trang 218 của giáo trình). Enzym cố định được nhồi vào cột, dịch cơ chất chảy từ trên xuống ngấm qua lớp enzym và đầu dưới sẽ nhận được dịch sản phẩm xúc tác. Một reactor dòng chảy lý tưởng khi lớp cơ chất chảy qua toàn bộ diện tích mặt cắt ngang của cột với tốc độ không đổi - đây là hệ thống reactor tách - đẩy lý tưởng. Trong thực tế dịch cơ chất cũng có thể đưa từ dưới lên, chảy trên qua cột còn sản phẩm lấy ra từ trên.

Sơ đồ và nguyên tắc làm việc xem hình 63.

5.6. . Sử dụng enzym cố định trong y học và trong công nghiệp:

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

- Trong y học

+ Sử dụng enzym cố định để làm các nội quan giả như: bàng quan, niêm mạc.

+ Sử dụng enzym dưới dạng micro capsul để đưa enzym vào chữa bệnh thiếu enzym nhưng không gây nên các phản ứng phụ.

+ Nghiên cứu cấu trúc phân tử enzym, cấu tạo màng tế bào, mô hình hoá hệ thống enzym trong tế bào.

- Trong công nghiệp

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

+ Các chế phẩm enzym không tan dùng trong công nghệ thực phẩm: catalaza để khử trùng sữa, glucoizomeraza để đồng phân hoá sản xuất fructoza, glucooxydaza để sản xuất axit glutamic, pectinaza để làm trong nước quả, sản xuất hỗn hợp đường khử glucoza – fructoza dùng glucoizomeraza cố định.

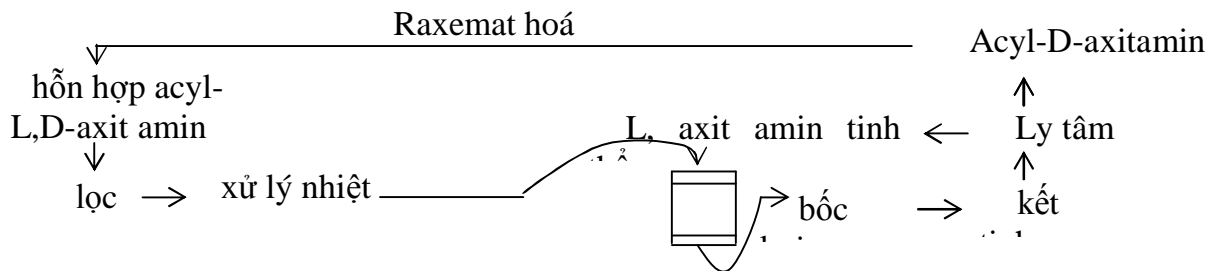
5.6.1. Sử dụng aminoacylaza cố định để sản xuất axit amin.

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

Từ năm 1969 hãng Tanabe Seizaku (Nhật Bản) sử dụng enzym cố định amino acylaza (AACD: enzym đồng phân hoá chuyển từ dạng D sang dạng L của axit amin) để chuyển hoá hỗn hợp D,L axit amin. Trong đó enzym aminoacylaza được cố định trên DEAE. Sephadex bằng liên kết ion với thời gian bán huỷ là 65 ngày ở 50°C .

- Phương pháp cố định: 1000-1700 lít dịch enzym lắc đều với DEAE. Sephadex trong lọ ở 35°C , pH=7.0 sau đó lọc và rửa sạch, enzym sau khi gắn vào chất mang có hoạt tính 50-60% hoạt tính enzym tự do. Chế phẩm enzym cố định sau đó được nhồi vào cột phản ứng (bioreactor) sau 65 ngày làm việc sẽ được tái sinh với dịch enzym mới, cứ như vậy sau 8 năm mới phải thay chất mang mới.

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



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

Ví dụ: quá trình sản xuất L_ metionin: nồng độ ban đầu của hỗn hợp acetyl D,L metionin là 0,2mol. Sau khi chạy qua cột phản ứng thu được 2000 lit dung dịch. Sau khi cho bay hơi và kết tinh thu được 27Kg L_ metionin (hiệu suất thu hồi 91%). Dịch acetyl D metionin được xử lý ở 60⁰C với axetaldehyt (raxemet hoá), điều chỉnh pH=1,8 để chuyển về hỗn hợp D,L-metionin.

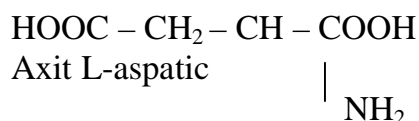
Bảng 19 - Một số loại axit amin sản xuất bởi enzym cố định aminvacylaza trên PEAE-Sephadex (cột dung tích 1m³) của hãng TANABE SEIZAKU.

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

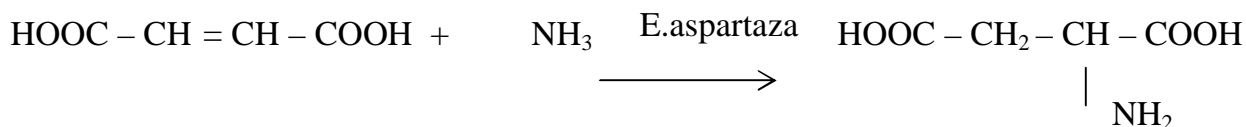
Hiện nay hãng này sản xuất 700-1000 Kg axit amin/ngày với chi phí 60% so với qui trình cũ sử dụng enzym hoà tan.

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

5.6.2. Sản xuất L-axit aspartic bằng enzym asparza cố định.



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

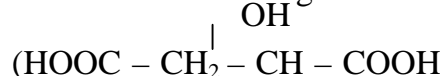


Từ năm 1973, hãng TANABE SEIZAKY đã sử dụng tế bào có chứa enzym aspartaza (nòi vi khuẩn *Brevibacterium flavum* nuôi cấy trên môi trường rỉ đường giàu biotin) và gói nó trong gel polyacrylamit với bán chu kỳ hoạt động là 120 ngày ở 37°C.

Phương pháp cố định như sau: 10 Kg tế bào hoà tan 40lit dung dịch sinh lý (saccaroza + NaCl tổng cộng 1%). Thêm 7,5 Kg acryamit, 0,4 Kg bis-acryamit. 5lit dimetyl aminopronitri) 5%. 5 lit amonium persulfat 2,5 % hỗn hợp để ở 40°C trong 10 – 12 phút, gel tạo thành được cắt thành múng như hình vuông 2 – 3 mm. Nguyên liệu ban đầu để sản xuất là hỗn hợp axit fumaric-amonisulfat hòa tan trong MgCl₂ 0,1N với nồng độ 1mol/lit dung dịch MgCl₂. Phản ứng thực hiện ở pH = 8,5, t^o = 37°C, vận tốc dòng chảy là 0,6V bioreactor/h. Dịch sau khi qua cột được chuyển về pH = 2,8 bằng H₂SO₄ 60% ở 90°C. Sau đó làm nguội xuống 15°C trong 2h. Tinh thể axit aspartichinhf thành được lắng, ly tâm và rửa bằng nước.

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

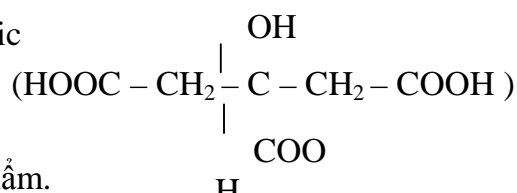
5.6.3. Sản xuất axit L-malic bằng enzym fumaraza cố định:



Axit malic

được sử dụng để thay thế

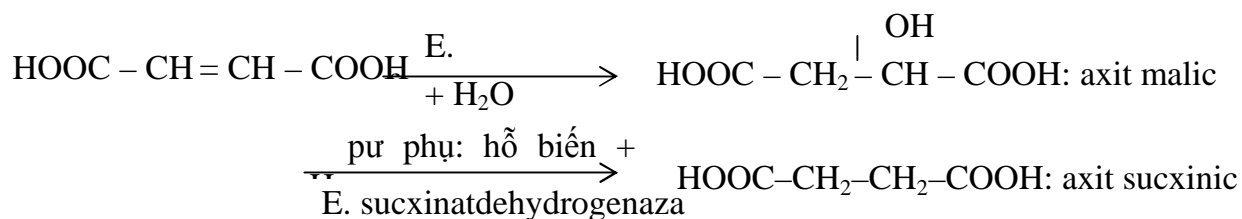
axit xitric



trong công nghiệp thực phẩm và

được phẩm.

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



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

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

Hãng SNAM Progetti lại sử dụng trực tiếp enzym fumaraza cố định trong sợi triaxetat xenluloza. Sau khi chạy qua cột axit malic được thu hồi bằng cách kết tủa với CaCO_3 .

5.6.4. Sản xuất nhóm penixilin-axit 6 amino penicillinic (6-APA) bằng enzym cố định penicillinamidaza.

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

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

Enzim penicillinamidaza xúc tác thủy phân benzyl penicillin (penicillin G) để tạo thành nhóm penicillin 6-APA và axit phenyl axetic.

6 – APA được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp dược phẩm để sản xuất các loại kháng sinh họ penicillin. Hiện nay toàn bộ 6 – APA của thế giới đều được sản xuất bằng phương pháp sử dụng enzym penicillinamidaza cố định. Đây là enzym nội bào khi sinh tổng hợp bởi vi khuẩn *Esterichia-Coli*, *Bacterium faecalic*, *alacaligus* với môi trường casein thủy phân, cao ngô, glucoza, axit phenylaxetic làm chất cảm ứng.

Phương pháp gói enzym của hãng SNAM Progetti (Italy) như sau:

10 lit dung dịch penicillinamidaza pH=8 trộn với 5kg triaxetic xenluloza trong 71,4kg clorimetylin ở 4°C , lắc kỹ cho đến khi tạo gel cả các sợi. Mỗi kg sợi thành phẩm được nhồi trong các cột kích thước 43 x 14 cm. 26lit penicillin G (muối kali) cho chảy liên tục qua cột ở pH = 8,2 cho đến khi đạt mức chuyển hoá 97% 6-APA.

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

5.6.5. Thủy phân lactoza bằng enzym lactaza cố định:

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

Enzim lactaza được sinh tổng hợp từ một số nòi nấm mốc và nấm men. Nòi được sản xuất dưới dạng chế phẩm cố định thương mại (xem bảng 22 trang 228 của giáo trình).

Hãng SNAM Progetti (Italy) sử dụng bioreactor dung tích 10 lit chứa 4kg lactaza cố định trong sợi axetat xenluloza. Trước hết sữa được tiệt trùng cực nhanh (142°C , 3s), làm lạnh nhanh đến $4 - 7^{\circ}\text{C}$ rồi cho chảy qua bioreactor với vận tốc 7lit/phút. Sản phẩm sữa bảo quản tốt trong 3 – 4 tháng ở 4°C . Hiện nay hãng sản xuất hàng ngày 10 tấn sữa không

có lactoza. Hãng Corning Glass từ năm 1978 sử dụng enzym lactaza liên kết đồng hoá trị với silicagel để xử lý dịch trong sữa với công suất 30 tấn/ngày.

Chương 6: GIỚI THIỆU MỘT SỐ LOẠI ENZIM CHỦ YẾU VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG

6.1. Amylaza.

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

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

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

Hiện nay người ta biết rõ có 6 loại enzym amylaza (3 loại thủy phân liên kết α_{1-4} , 3 loại thủy phân liên kết α_{1-6} glucozit). Các enzym amylaza từ các nguồn, các giống vi sinh vật tổng hợp khác nhau thì khác nhau về tính chất, cơ chế, điều kiện, sản phẩm thủy phân.

6.1.1. X-amylaza (tên hệ thống α -1,4 glucan-hidrolaza; mã số 3.2.1.1.EC).

- Xúc tác thủy phân liên kết α_{1-4} glucozit nằm ở bên trong phân tử có chất (tinh bột, glycogen) – vì thế được gọi là enzym amylaza nội phân (endoamylaza). Dưới tác dụng của α -amylaza, amiloza (Am) khá nhanh thành oligosaccarit gồm 6 – 7 gốc glucoza. Sau đó các oligosaccarit này lại tiếp tục bị phân cắt thành maltotetroza, mantotrioza và mantoza (hình 64 trang 234). Qua một thời gian tác dụng dài bởi enzym, amiloza sẽ bị thủy phân thành 23% glucoza và 87% maltoza. Tác dụng của α -amylaza làm amylopectin (AP) cũng xảy ra tương tự nhưng vì nó không phân cắt được liên kết α_{1-6} glucozit ở mạch nhánh của AP nên sau một thời gian lâu thì sản phẩm sẽ là 72% maltoza, 19% glucoza, dextrin thấp phân tử và izomaltoza (8%).

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

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

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

+ Thể hiện hoạt tính trong vùng axit yếu: α -amylaza nấm mốc có $pH_{op} = 4,5 - 4,9$, của vi khuẩn $pH_{op} = 5,9 - 6,1$. Ở $pH < 3$ enzym bị vô hoạt hoàn toàn trừ α -amylaza của

Asp. Niger có thể chịu được pH = 2,5 – 2,8 (trong môi trường sinh tổng hợp axit xitric bằng phương pháp lên men bề mặt).

+ α -amylaza của nấm mốc có khả năng dextrin hoá (dịch hoá) cao lại vừa tạo ra một lượng lớn glucoza và maltoza. α -amylaza của vi khuẩn lại có hai loại: α -amylaza dịch hoá và α -amylaza đường hoá.

+ Nhiệt độ hoạt động của α -amylaza từ các nguồn khác nhau là khác nhau. (bảng III-4 trang 108 – Enzim VSV - Tập I). Trong đó đáng chú ý hơn cả là α -amylaza của vi khuẩn có thể chịu được ở nhiệt độ cao, có thể giữ được hoạt lực ngay cả khi đun sôi trong nước một thời gian ngắn. Tính bền nhiệt này là một ưu điểm lớn được sử dụng để xử lý nguyên liệu ở các công đoạn phải dùng nhiệt độ cao, hoặc môi trường nhiệt đới như ở nước ta. Đa số các chế phẩm enzym thương mại thuộc nhóm amylaza đều có tính chịu nhiệt cao.

Những chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp α -amylaza được sử dụng trong công nghệ: Asp. Oryzae, Asp. Awamori, Asp. Usami, Asp. Batatae, Asp. Niger, Bacillus subtilis, B. licheniformis, Endomycopsis fibuliger

6.1.2. β -amylaza (tên hệ thống α -1,4-glucoamylaza mã số 3.2.1.2 EC)

- Xúc tác thủy phân liên kết α_{1-4} glucozit (hình 65 trang 235 – giáo trình). Tuân tự từng gốc maltoza một từ đầu không khử của mạch và do maltoza tạo ra cấu hình β vì thế enzym này được gọi là β -amylaza.

- Hầu như không thủy phân hạt tinh bột nguyên mà chỉ thủy phân tinh bột hồ hoá, có khả năng thủy phân 100% amylaza thành maltoza và 54 – 58 % amylopectin thành maltoza. Quá trình thủy phân AP bắt đầu từ đầu không khử của nhánh ngoài cùng, mỗi nhánh này có 20 – 26 gốc glucoza nên sẽ tạo ra được 10 -13 phân tử maltoza. Khi gặp liên kết α_{1-4} đứng kề cận liên kết α_{1-6} thì β -amylaza ngừng tác dụng. Phần còn lại không bị tác dụng này gọi là β -dextrin chứa tất cả các liên kết α_{1-6} : cho màu tím đỏ với Iôt.

- Nếu cho cả α và β -amylaza cùng đồng thời thủy phân tinh bột thì hiệu suất thủy phân đạt tới 95%.

- β -amylaza là một albumin, enzym ngoại phân (exoenzym), chỉ có trong malt, vẫn giữ được hoạt tính khi không có C, kém bền ở nhiệt độ cao, bị vô hoạt hoàn toàn ở 70⁰C. pH_{opt} trong dịch tinh bột thuần khiết là 4,6 , còn trong dịch nấu tinh bột là 5,6. t_{op} trong dịch tinh bột thuần khiết là 40-50⁰C, còn trong dịch nấu tinh bột là 60-65⁰C.

6.1.3. Glucoamilaza (tên hệ thống α -1,4-glucoamylaza, mã số 3.2.1.3.EC) còn gọi là amyloglucozidaza.

- Thủy phân liên kết α_{1-4} và α_{1-6} , vì thế các nhà nghiên cứu Nhật (Onoetal, 1964) đề nghị đặt tên hệ thống là α_{1-4} :1,6-glucoamylaza. Enzim này được các nhà khoa học Nhật tách ra lần đầu tiên từ Asp. Awamori (katihara, karushima, 1956). Sau đó được tìm thấy ở Rhizopus delemar, Asp. Niger, Asp. Oryzae, các vi sinh vật khác, mô động vật.

- Glucoamylaza là enzym ngoại bào (exoenzym), có khả năng thủy phân liên kết α_{1-2} , α_{1-3} glucozit (Sawasaki, 1960; Ueyamaetal, 1965; Watanabe Fukimbara, 1960). Nó có khả năng thủy phân hoàn toàn tinh bột, glicogen, Am, Ap, dextrin cuối, izomaltoza, mantoza đến sản phẩm cuối cùng là glucoza.

- Đa số glucoamylaza đều thuộc loại “chịu axit”, $pH_{op}=3,5 - 5$, $t_{op}= 50 - 60^{\circ}C$, mất hoạt tính ở $t>70^{\circ}C$. Hiện nay enzym này ở vị trí hàng đầu về hiệu lực thủy phân tinh bột và các sản phẩm trung gian. Vì thế việc sử dụng các chế phẩm glucoamylaza tách từ các chủng vi sinh vật hoạt động trong sản xuất rượu, bia, mạch nha, glucoza có một triển vọng, ý nghĩa vô cùng to lớn.

Những chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp glucoamylaza được sử dụng trong công nghệ là: *Asp. Awamori*, *Asp. Niger*, *Asp. Usami*, *Asp. Oryzae*, *Endomyces sp*, *Endomycopsis Cápularis*, *Endomycopsis fibuliger*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus Javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus peka*, *Rhizopus tonkinensis*.

6.1.4. Oligo-1,6-glucozidaza hay dextrinaza tới hạn (dextrin-6-glucoanhydrolaza. 3.1.1.10. EC)

- Thủy phân các liên kết α_{1-6} glucozit trong izomaltoza, panoza, các dextrin tới hạn và có thể chuyển hoá chúng đến các loại đường có thể lên men được. Các nòi nấm mốc *Asp. Awamori*, *Asp. Usami*, *Asp. Oryzae* sinh tổng hợp rất mạnh mẽ loại enzym này cho nên nếu đường hoá tinh bột đã nấu chín (trong sản xuất rượu etylic) bằng chế phẩm enzym nuôi cấy từ các nòi vi sinh vật này sẽ thu được dịch đường có khả năng lên men cuối (lên men dai) rất triệt để, góp phần nâng cao hiệu suất gây men và hiệu suất tổng thu hồi rượu. Ngoài ra enzym này cũng có trong malt, trong mô động vật và cả nấm men, đặc biệt chúng còn có các enzym khác cùng họ hàng với enzym này là: amylopectin-1,6-glucozidaza (amylopectin-1,6-glucoanhydrolaza 3.2.1.9) và dextrin-1,6-glucozidaza (dextrin-1,6-glucoanhydrolaza 3.2.1.33). Cả 2 enzym này thủy phân dextrin sâu sắc hơn cả α và β -amylaza

Cả 3 enzym kể trên (dextrinaza) đều hoạt động ở $t_{op}= 40^{\circ}C$, $pH_{op}= 5,1$.

6.1.5. α -glucozidaza hay maltaza (α -D-glucozit-glucohydrolaza 3.2.1.20 EC)

Có nhiều loài nấm mốc sinh tổng hợp ra enzym này, tác dụng thủy phân đường maltoza thành glucoza nhưng không thủy phân được tinh bột. Như vậy giống như dextrinaza, enzym này giúp cho quá trình lên men cuối chuyển đường thành rượu etylic góp phần nâng cao hiệu suất lên men.

6.1.6. Transglucozilaza (α -1,4-glucoan: D-glucoza-4-glucozil transferaza 2.4.1.3. EC)

Enzim này thường tồn tại song song với glucoamylaza (trong chế phẩm nấm mốc *Aspergillus*), nó có hoạt tính thủy phân và hoạt tính vận chuyển nhóm. Nghĩa là nó không những chỉ thủy phân maltoza thành glucoza mà còn tổng hợp nên izomaltoza, izotrioza và panoza, tức là có khả năng chuyển gốc glucoza đến gắn nó vào phân tử maltoza hoặc phân tử glucoza bởi liên kết α_{1-6} glucozit để tạo thành các glucozit nói trên.

Sự có mặt của enzym này trong các chế phẩm enzym amylaza dùng để biến hình tinh bột (mạch nha, đường glucoza, rượu etylic) là điều không mong muốn vì nó xúc tác sự tổng hợp lại các izosaccarit từ chính các sản phẩm thủy phân tinh bột, làm giảm hiệu suất đường hoá, dịch thủy phân có vị đắng không mong muốn.

6.2. Proteaza.

Nhóm enzym proteaza (peptit – hidrolaza 3.4) xúc tác quá trình thủy phân liên kết peptit (-CO-NH-)_n trong phân tử protein, polypeptit đến sản phẩm cuối cùng là các axit amin. Ngoài ra, nhiều proteaza cũng có khả năng thủy phân liên kết este và vận chuyển axit amin.

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

1/ Aminopeptidaza: thủy phân liên kết peptit ở đầu nitơ amin (- NH₂) của mạch polypeptit.

2/ Cacboxypeptidaza: xúc tác thủy phân liên kết peptit ở đầu cacbon của mạch polypeptit. Hai phân nhóm này thuộc toại exo-peptidaza (enzim ngoại phân)

3/ Dipeptit hidrolaza: thủy phân các liên kết peptit

4/ Proteinaza: xúc tác sự thủy phân liên kết peptit nội mạch (endo-peptidaza)

Các proteaza khá phổ biến ở động, thực vật và vi sinh vật, trong đó đáng chú ý hơn cả là có nhiều vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp mạnh mẽ proteaza. Các enzym này có thể ở trong tế bào (proteaza nội bào) hay được tiết vào môi trường nuôi cấy (proteaza ngoại bào). Giống như amylaza, một số loại proteaza đã được dân tộc các nước châu Á, trong đó có Việt Nam sử dụng trong một số ngành sản xuất các sản phẩm thực phẩm truyền thống như: sản xuất nước mắm và các loại mắm, sản xuất tương và chao, một số loại nem, tré. Bảng II-3 trang 131, 132 (Enzim VSV- tập I) giới thiệu một số loại VSV có khả năng nuôi cấy sinh tổng hợp và thu nhận enzym proteaza. Theo bảng này ta thấy một số nòi vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, xạ khuẩn thuộc giống *Streptomyces*, nấm mốc thuộc giống *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* là có khả năng sinh tổng hợp enzym proteaza mạnh nhất. Căn cứ vào cơ chế phản ứng, độ pH_{op}, Hartley (1960) đã phân loại các proteinaza vi sinh vật thành 4 nhóm: proteinaza-serin, P.tiol, P.kim loại và P.axit (Bảng II-6 trang 156, 157 – Enzim VSV- Tập I). Trọng lượng phân tử của 4 nhóm này tương đối bé: chẳng hạn M_{P-serin} = 20000 – 27000, tuy nhiên nhóm này có một số có M lớn hơn như enzym của penicillium M = 44000. *Asp. Oryzae* 5038 và M = 52000, M_{P.kim loại} = 33800 – 48400, M_{P.tiol và axit} = 30000 – 40000.

Về độ bền thì P.serin bền trong giới hạn pH rộng, từ 5 – 10 ở điều kiện nhiệt độ thấp. P.serin của *Bacillus.pumilus* khá bền trong môi trường kiềm ở pH=11 vẫn giữ được 80% hoạt độ ban đầu. Ở nhiệt độ 360⁰C nhóm này bị mất hoạt tính nhanh chóng. Tuy nhiên các P.serin của *Streptomyces fradiae* và *Stre.reatus* lại bền nhiệt ở 70⁰C trong 30 phút chỉ bị mất 10 -15% hoạt tính. Các proteinaza kim loại kém bền nhất trong số 4 nhóm này, bền trong phạm vi pH = 6 – 9, nhanh chóng bị mất hoạt tính ngoài khoảng pH này. Ca làm tăng độ bền của nhóm enzym này.

Các proteaza-axit bền trong phạm vi pH_{axit} = 2 – 6, trong môi trường axit chúng khá bền nhiệt.

Các proteaza nói chung được ứng dụng rất rộng rãi trong nhiều lĩnh vực:

- Trong chế biến thủy sản: khi sản xuất nước mắm (và một số loại mắm) thường thời gian chế biến thường là dài nhất, hiệu suất thủy phân (độ đậm) lại phụ thuộc rất nhiều vào địa phương, phương pháp gài nén, nguyên liệu cá. Nên hiện nay quy trình sản xuất nước mắm ngắn ngày đã được hoàn thiện trong đó sử dụng chế phẩm enzym thực vật

(bromelain và papain) và vi sinh vật để rút ngắn thời gian làm và cải thiện hương vị của nước mắm. Tuy nhiên vẫn còn một số tồn tại cần phải hoàn thiện thêm về công nghệ.

- Trong chế biến thịt, proteaza được sử dụng để làm mềm thịt và tăng hương vị thịt. (ngâm thịt vào dinh dưỡng proteinaza ở pH và nhiệt độ xác định – phương pháp này phổ biến và thuận lợi nhất; Tắm hỗn hợp làm mềm thịt (enzim, muối, bột ngọt). Tiêm dung dịch enzym vào thịt; tiêm dung dịch enzym vào con vật trước khi giết mổ). Sử dụng proteinaza để sản xuất dịch đậm: từ *Streptomyces fradiae* tách được chế phẩm keratineaza thủy phân được keratin rất có giá trị để sản xuất dịch đậm từ da, lông vũ. Nếu dùng axit để thủy phân sẽ mất đi hoàn toàn các axit amin chứa lưu huỳnh, nếu dùng kiềm để thủy phân sẽ bị racemic hoá (chuyển dạng L sang D làm giảm giá trị sinh học của axit amin). Để thủy phân sâu sắc và triệt để protein (trong nghiên cứu, chế tạo dịch truyền đậm y tế) cần dùng các proteinaza có tính đặc hiệu cao và tác dụng rộng, muốn vậy người ta thường dùng phối hợp cả 3 loại proteinaza của 3 loại: vi khuẩn, nấm mốc, thực vật với tỉ lệ tổng cộng 1 – 2% khối lượng protein cần thủy phân. Ưu điểm của việc thủy phân protein bởi enzym là bảo toàn được các vitamin của nguyên liệu, không tạo ra các sản phẩm phụ, không làm sẫm màu dịch thủy phân.

- Trong chế biến sữa: người ta chỉ sử dụng các proteaza của vi sinh vật có tính chất tương tự renin hoặc chỉ thay thế 25 – 50% renin. (renin là enzym làm đông tụ sữa được sản xuất từ dạ dày bê) như các giống liên kết *Aspergillus Candidus*, *Penicillium roqueforti*, *Bacillus mesentericus...* được ứng dụng để sản xuất phomat. Ngoài ra có thể sử dụng proteinaza để thu casein kỹ thuật (từ sữa) để sản xuất vectri, chất màu, keo dán, hương liệu.

- Trong chế biến bia và nước giải khát: proteinaza được dùng để làm trong bia và nước quả.

- Trong công nghiệp dệt: papain và proteinaza vi sinh vật được sử dụng để làm sạch tơ tằm, tẩy tơ nhân tạo (các sợi nhân tạo được bằng các dung dịch casein, gelatin) để sợi được bóng, dễ nhuộm.

- Trong công nghiệp da: proteinaza được dùng để làm mềm, làm sạch và tẩy lông da, làm tăng tính đàn hồi, cải thiện điều kiện làm việc, tránh ô nhiễm môi trường.

- Trong công nghiệp xà phòng, các chất tẩy rửa, mỹ phẩm: thêm enzym proteinaza trong các loại xà phòng diệt khuẩn, kem dưỡng da, xà phòng có tính tẩy rửa cao.

- Trong y học: sử dụng nhiều enzym proteinaza để sản xuất thuốc hỗ trợ tiêu hoá, nấu cao động vật, chữa bệnh nghẽn mạch máu, tiêu viêm vết thương.

6.3. Pectinaza

- Pectin là cơ chất của enzym pectinaza. Pectin rất phổ biến trong thực vật, là hợp chất polime tự nhiên tồn tại có 3 dạng: protopectin, pectin và axit pectinic.

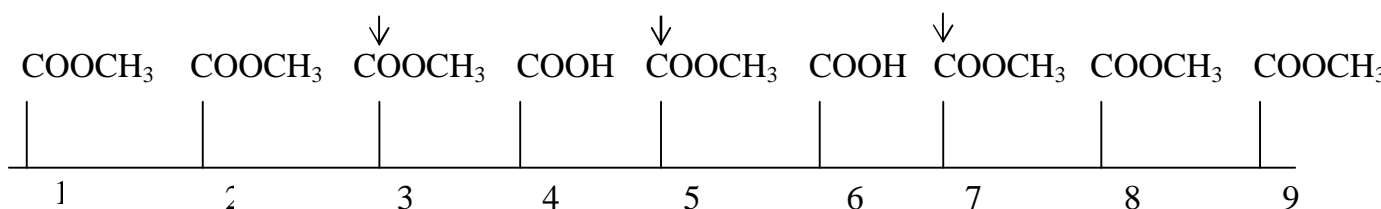
Protopectin không tan có dạng thực vật xanh, tạo cho rau quả xanh có độ cứng nhất định, bị thủy phân bởi axit hay nhiệt độ, enzym sẽ chuyển thành pectin hoà tan (quá trình chín của quả có thể gọi là quá trình chuyển hoá này). Pectin là este metila của axit polygalacturonic. Tính chất quan trọng nhất của pectin là dễ tạo gel ở nồng độ dịch đường cao 65% trong môi trường 1% axit. Axit pectinic là một axit polygalacturonic nhưng chỉ được este hoá một phần nhỏ bởi metanol. Còn axit putic hay polypectic là axit đã được giải phóng khỏi nhóm metoxy ($-OCH_3$). Muối tương ứng có tên là pectinat và pectat. Liên kết chính trong pectin là α_{1-4} glucozit.

- Hiện nay, hệ thống enzym pectinaza được chia thành 2 nhóm chính: hydrolaza và transeliminaza với đặc điểm chung nhất là làm giảm độ nhớt của dung dịch pectin và làm giảm phân tử lượng của các sản phẩm tạo thành.

6.3.1. Hydrolaza: (pectihydrolaza)

Thuộc nhóm này có 2 enzym chủ yếu là: pectinesteraza và polygalacturonaza.

- Pectinesteraza: (3.1.1.11.EC) - gọi tắt PE: enzym xúc tác thủy phân liên kết este trong phân tử pectin hoá axit pectinic để giải phóng sản phẩm là metanol và axit polygalacturonic. PE chỉ phân cắt các nhóm metoxy đứng cạnh nhóm $-COOH$ tự do.



Vị trí tấn công nhóm metoxy ở vị trí 5 dễ hơn ở vị trí 3 và 7 (2 gốc $-COOH$). Độ pH_{op} của PE thu được từ các nguồn khác nhau: Từ vi sinh vật : 4,5 – 5,5

Từ thực vật : 5,0 – 8,0

PE của nấm mốc có $t_{op} = 30 - 45^{\circ}C$, bị vô hoạt ở $t = 55 - 62^{\circ}C$, PE được hoạt hoá bởi Ca^{2+} và Mg^{2+} .

- Polygalacturonaza (PG. 3.2.1.15.EC; poly- $\alpha_{1,4}$ -galacturonit glucanhydrolaza)

Enzym này ít gặp trong thực vật, chủ yếu có trong vi khuẩn và nấm mốc. Đây là một phức hệ enzym và thường có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất. Dựa vào đó người ta chia ra 4 kiểu sau:

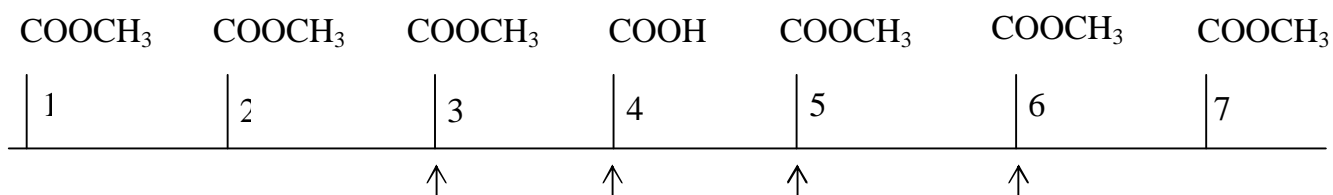
+ Polymetyl-galacturonaza (PMG - poly- $\alpha_{1,4}$ -galacturonit - methyl este glucanhydrolaza. 3.2.1.41EC). PMG lại được phân thành 2 nhóm nhỏ phụ thuộc vào vị trí phân cắt liên kết $\alpha_{1,4}$ ở trong hay ở cuối và đầu mạch.

- Endo glucozidaza polymetyl galacturonaza kiểu I (endo - PMG - I). Đây là enzym có tính chất dịch hoá, pectin có mức độ methyl hoá càng cao (nhiều gốc metoxy $-OCH_3$)

thì bị thủy phân càng nhanh và triệt để. Trong môi trường khi có mặt pectinesteraza (PE) thì enzym này thường bị giảm hoạt lực.

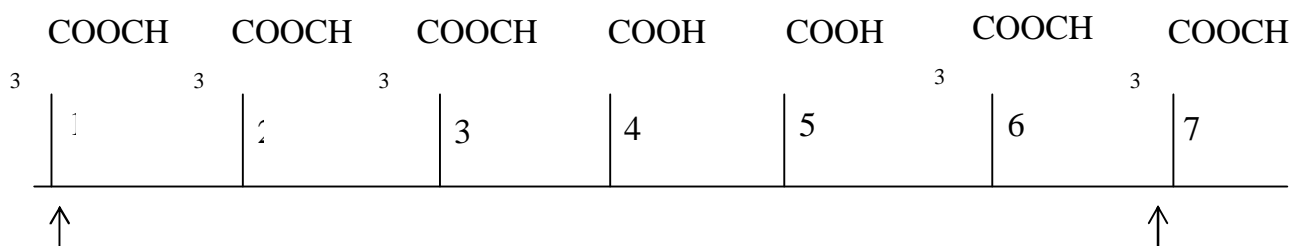
Endo – PMG – I rất phổ biến trong các nòi nấm mốc: Asp. Niger, Asp. Awamori, Botrytis cinea, Neurospora crassa.

Cơ chế tác dụng như hình vẽ:



- Exo - glucozidaza polymetyl galacturonaza kiểu III (exo – PMG – III). Đây là enzym có tính chất đường hoá, có khả năng cắt từng gốc monome axit galacturonic ra khỏi mạch bắt đầu từ đầu không khử có nhóm metoxy (– OCH₃)

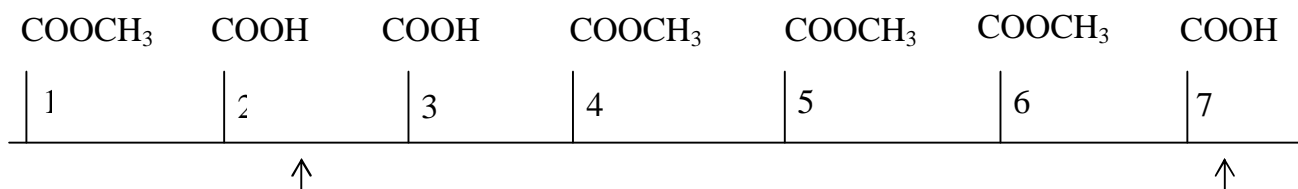
Cơ chế tác dụng như hình vẽ:



+ Enzim tác dụng lên axit pectinic hay axit pectit - gọi là polygalacturonaza (PG) cũng được phân thành 2 nhóm nhỏ:

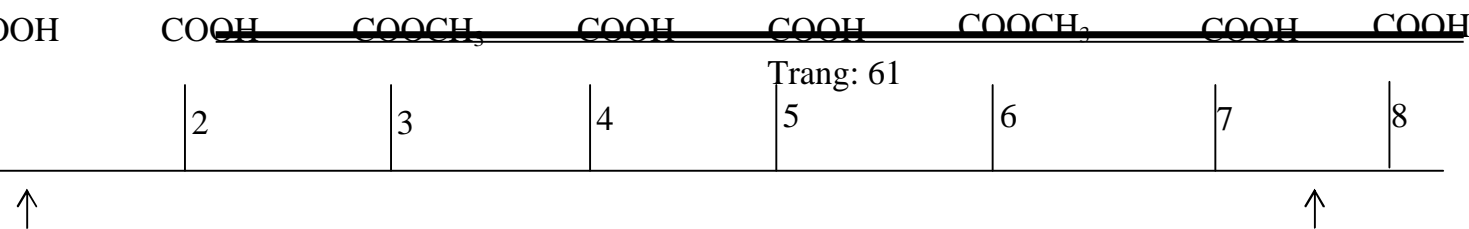
- Endo glucozidaza polygalacturonaza kiểu II (endo – PG – II). Đây là enzym có tính chất dịch hoá, chỉ thủy phân cơ chất khi có mặt nhóm – COOH tự do. Hoạt độ của endo – PG – II tăng lên nhiều khi cơ chất được xử lý trước bằng pectinesteraza (để tạo ra nhiều gốc – COOH tự do). Nấm mốc và vi khuẩn tổng hợp được enzym này.

Cơ chế tác dụng như hình vẽ:



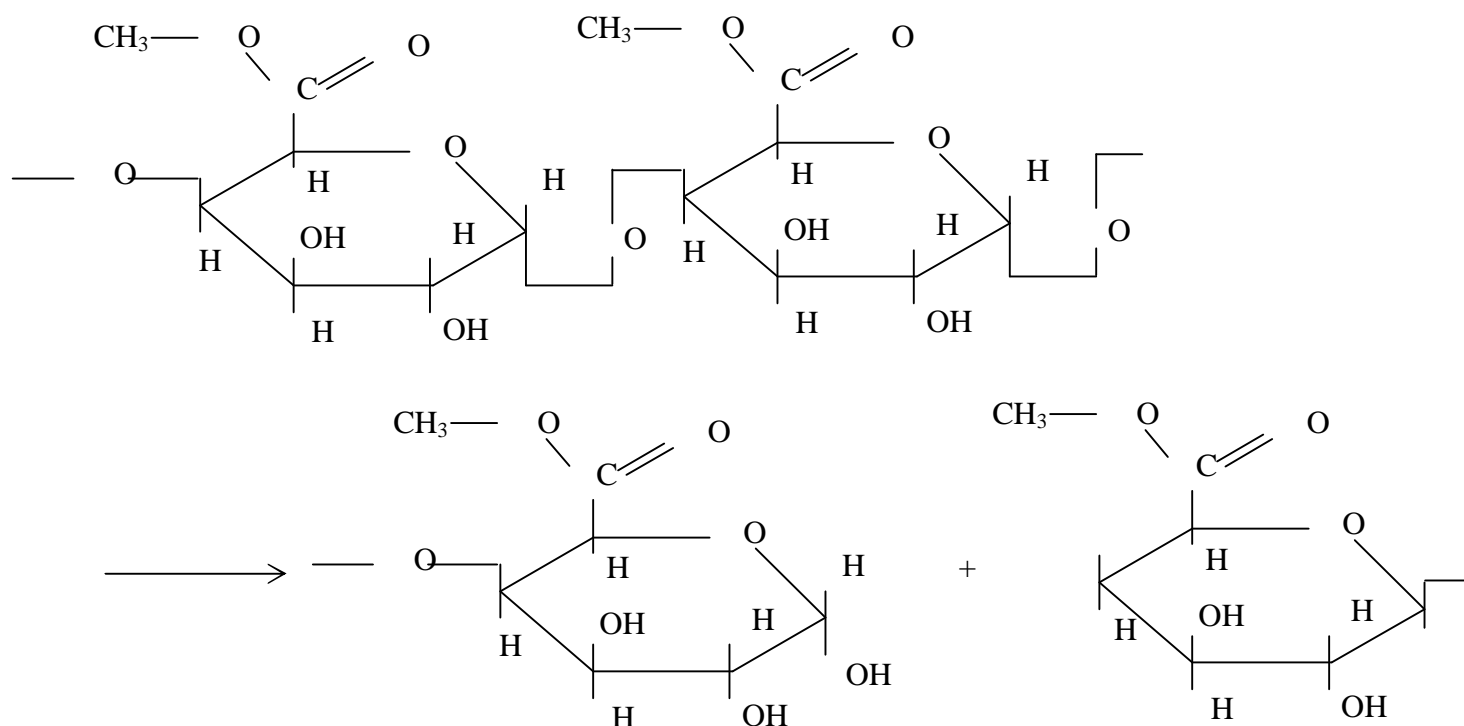
- Exo - glucozidaza polygalacturonaza kiểu IV (exo – PG – IV).

Thủy phân các liên kết gắn với nhóm – COOH tự do ở đầu hay mỗi mạch



6.3.2. Transeliminaza (TE)

Đây là nhóm enzym được tìm ra cách đây chưa lâu lắm (khoảng năm 1960 – 1961) bao gồm protopectinaza xúc tác sự phân cắt araban, galactan khỏi protopectin để tạo thành pectin hoà tan và enzym transeliminaza phân cắt phi thủy phân (không có sự tham gia của phân tử H_2O) pectin để tạo ra các gốc galacturonic có nối kép giữa nguyên tử C_4 và C_5 . Phản ứng xảy ra dễ dàng ở môi trường trung tính hay kiềm yếu.



6.3.3. Một số ứng dụng của chế phẩm pectinaza.

Các chế phẩm enzym pectinaza thường được sử dụng trong sản xuất nước quả, sản xuất rượu vang, trích ly đông dịch (sắc thuốc) và trong chăn nuôi.

- Ứng dụng chế phẩm pectinaza trong sản xuất nước quả:

Có các mặt hàng nước quả trong, nước quả đục, nước quả có thịt quả, tất cả đều được sản xuất từ nước ép (chiết rút) của quả. Do đó hiệu quả thu dịch quả của phụ thuộc vào

tính chất của nguyên liệu quả (cấu tạo, độ chín, thành phần định tính và định lượng của pectin trong quả, phương pháp ép, chiết rút)

+ Khi chế biến nước quả trong thì chế phẩm pectinaza phải có endo và exo polygalacturonaza (endo – PGII và exo – PGIV). Enzim pectinesteraza và proteinaza. Hai loại enzym đều làm giảm độ nhớt dịch quả, còn PE góp phần vào tác dụng của enzym này, còn protein thủy phân protein của vỏ tế bào thực vật làm cho dịch quả dễ thoát ra, cặn và bã dễ lắng hơn. Với các loại quả có nhiều protopectin như táo, lê, ổi thì chế phẩm không được có enzym protopectinaza vì nếu có sẽ phân huỷ protopectin làm mềm hoá mô quả, tăng độ nhớt của dịch quả nên làm giảm hiệu suất lấy nước quả trong. Ngoài ra, nước quả không được phép chứa các enzym oxy hoá (ascobatoxydaza, polyphenoloxydaza, peroxydaza) làm hao tổn vitamin C và sẫm màu, biện pháp sử dụng nhiệt (đun nóng) sẽ vô hoạt hệ enzym này.

+ Để thu được nước quả với hiệu suất cao, người ta thường nghiền thịt quả, xử lý bằng chế phẩm enzym pectinaza, sau đó mới đem vắt, ly tâm hay ép. Chẳng hạn: nếu xử lý táo nghiền bằng 0,03% chế phẩm pectinaza (200 đơn vị hoạt độ) PMG (gam) sau 2 – 4 h sẽ tăng hiệu suất thu dịch quả 20 – 25%. Khi ép nho mà không sử dụng chế phẩm pectinaza thì hiệu suất ép là 65% nhưng nếu sau khi nghiền chà quả và xử lý bằng 0,2% chế phẩm pectinaza trong 3h ở 45⁰C sẽ nâng cao hiệu suất ép lên 77 – 82%.

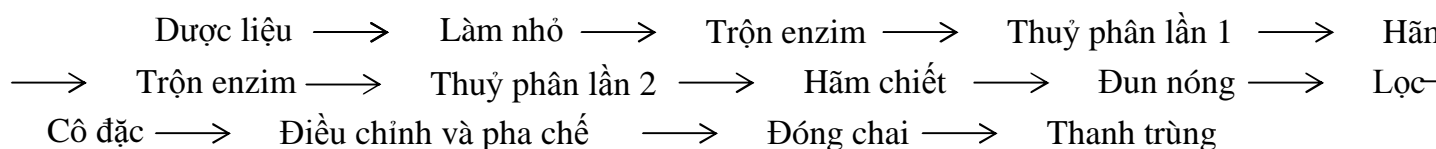
Dùng pectinaza còn có tác dụng làm trong do sự phá huỷ hệ keo trong nước quả, vị của quả tốt hơn và ít bị đục trở lại.

- Ứng dụng chế phẩm pectinaza trong sản xuất rượu vang:

Rượu vang được sản xuất từ các loại quả ngọt (quả có đường): nho, táo, dâu, chuối, dứa, mơ, mận, anh đào, sơn tra (táo mèo) bao gồm các giai đoạn chủ yếu: điều chế dịch quả lên men, lên men dịch quả, xử lý và tàng trữ vang. Chế phẩm pectinaza dùng trong công nghệ vang để làm tăng hiệu suất thu dịch quả và để làm trong. Muốn vậy, chế phẩm phải bảo toàn được hoạt độ trong điều kiện nồng độ rượu trung bình 10 – 12% và độ pH hơi axit (4 – 5). Khi xử lý bã nho bằng pectinaza sẽ làm tăng hàm lượng catechin trong rượu (chất chát). Catechin có hoạt tính của vitamin P như vậy đã làm tăng giá trị sinh học của vang. Ngoài ra vang còn có độ thuần thực (thành trưởng – ageing) nhanh hơn, hương thơm mạnh hơn, vị dịu hơn do có nhiều glyxezin và este.

- Ứng dụng pectinaza trong trích ly các dược liệu đông y (thuốc bắc, thuốc nam). Các dược liệu có nguồn gốc thực vật, trong thành phần của chúng ngoài các hoạt chất thì luôn luôn có pectin. Từ trước đến nay để thu nhận được các thành phần hoạt chất trong dược liệu (để trị bệnh cấp thời (ngay lúc đó), để điều chế dạng cồn (rượu), thuốc (uống và xoa bóp), để điều chế dung dịch thuốc, viên nén, viên nang, đặc biệt hiện nay để sản xuất thuốc tiêm và dịch truyền từ chính các vị thuốc đông y, các thực phẩm chức năng (functional food)) người ta dùng các phương pháp: chiết rút bằng nước nhiệt (còn gọi là sắc thuốc – và đây là phương pháp phổ biến nhất), bằng cồn (ngâm rượu thuốc), trích ly bằng dung môi thích hợp (axeton, ete, nitơ lỏng, axeton lạnh). Do có thành phần pectin nên quá trình sắc thuốc khó khăn, không trích ly được triệt để hoạt chất, dịch thuốc bị biến chất sau một thời gian ngắn. Để khắc phục những khó khăn này, người ta dùng chế phẩm enzym pectinaza để phân giải các mô thực vật để các hoạt chất được giải phóng ra dễ dàng và triệt để

hơn khi sắc thuốc. Tuy nhiên, vì sử dụng cho mục đích sản xuất thuốc chữa bệnh nên khi dùng chế phẩm enzym phải có độ tinh khiết rất cao để không mang theo những hoạt chất lạ vào thuốc, phải có hoạt độ cao để chỉ dùng với một lượng tối thiểu. Có thể tiến hành theo sơ bộ sơ đồ công nghệ sau:



- Ứng dụng chế phẩm pectinaza trong chăn nuôi:

Khẩu phần ăn của gia súc, gia cầm thường chứa một lượng thức ăn thô, thức ăn xanh nhất định (rơm rạ, cỏ, thân cây, cám...) trong khi đó ở đường tiêu hoá của chúng lại thiếu các enzym phân giải xenluloza, hemixenluloza, pectin. Chỉ có những động vật nhai lại có dạ cỏ phát triển đầy đủ (trên 6 tháng tuổi) hay gia cầm có manh tràng dài (ngỗng, đà điểu) mới có hệ vi sinh vật sống cộng sinh trong dạ cỏ là có khả năng sinh ra các hệ enzym để giúp động vật tiêu hoá một phần các chất dinh dưỡng này, tuy vậy khoảng 1/3 nhóm chất này không được đồng hoá. Để nâng cao khả năng tiêu hóa hấp thụ, người ta có thể thêm vào thức ăn chăn nuôi các chế phẩm enzym phân giải nhóm glucit này - đều là chế phẩm có hoạt tính pectinaza, xenluloza và hemixenluloza cao.

+ Đối với các động vật nhai lại (trâu, bò, dê, cừu, ngựa): do có hệ vi sinh vật sống trong dạ cỏ tham gia tích cực vào quá trình tiêu hoá thức ăn. Khi thêm chế phẩm enzym pectinaza và xenluloza cao ở độ pH = 6 – 7 (axit tính) sẽ có lợi làm tăng độ tiêu hoá của thức ăn.

+ Đối với ngỗng và gan (vịt xiêm): đây là 2 loài gia cầm nuôi lấy thịt, đặc biệt là có loài để sản xuất ra gan béo (gan nguyên liệu sản xuất ra mặt hàng pete gan rất nổi tiếng). Hai loài này có năng lực sinh trưởng rất cao, người ta cố gắng nuôi để đạt độ tăng trọng cao và thời gian ngắn (ở độ tuổi gia cầm non tuổi có giá trị thương phẩm cao). Muốn vậy người ta nuôi vỗ béo bằng cách nhồi thức ăn có sử dụng các chế phẩm pectawamoran 0,04% so với khẩu phần.

6.4. Xenluloza:

- Hằng năm có khoảng 230 tỉ tấn chất hữu cơ được tổng hợp bằng quá trình quang hợp ở thực vật, trong đó có tới đa 70 tỉ tấn (30%) xenluloza. Đây là polyme tự nhiên β -D-glucosa được nối với nhau qua liên kết β -D-1,4-glucan, mức độ polyme hoá của phân tử xenluloza: 200 – 15000, trung bình 3000, trọng lượng phân tử 50.000 – 2.500.000.

Xenluloza là hợp chất tự nhiên khá bền, không tan trong nước, chỉ bị trương phồng do hút nước, bị phân huỷ khi đun nóng với kiềm hay axit hoặc do các enzym được gọi chung là xenluloza.

- Theo những hiểu biết hiện nay thì quá trình phân huỷ xenluloza nhờ enzym được thực hiện nhờ phức hệ xenluloza, bao gồm các enzym C_1 , C_x và β -glucosidoza. Enzim C_1 có tính chất không đặc hiệu. Dưới tác dụng của C_1 , các loại xenluloza bị hấp thụ nước, trương lên và chuẩn bị cho sự tác động của các enzym khác. Nếu tách riêng C_1 cho hoạt động độc lập thì tác dụng này lại không thấy rõ ràng. Vì vậy người ta cho rằng đó chỉ là một yếu (factor), không phải là enzym C_x còn gọi là enzym β -1,4 glucanaza, thủy phân các xenluloza ngậm nước bởi C_1 nói trên (polyanhydroglucoza hydrat hoá) thành xenluloza. Chữ x có nghĩa là enzym gồm nhiều thành phần khác nhau và người ta thường chia làm 2 loại chính là: exo- β -1,4 glucanaza và endo- β -1,4 glucanaza. Exo- β -1,4 glucanaza xúc tác việc tách liên kết các đơn vị glucoza từ đầu không khử (non-reducing end) của chuỗi xenluloza (hình trang 122 – VSV tập II). Endo- β -1,4 glucanaza phân cắt liên kết β -1,4 glucozit ở bất kỳ vị trí nào của chuỗi xenluloza.

Có tác giả (Ogawa và Toyama, 1967) cho rằng còn có một enzym trung gian C_2 giữa C_1 và C_x . Enzim này trước hết tác động vào xenluloza đã bị làm trương nước bởi C_1 rồi thủy phân thành các dextrin xenluloza hoà tan. Sau đó C_x sẽ tiếp tục thủy phân các xenlo dextrin này thành xenlobioza.

β -glucosidoza là enzym rất đặc hiệu, thủy phân xenlobioza thành xenlohexoza (D-glucoza) mã số enzym này là: 3.2.1.21 EC.

- Nguồn enzym xenluloza:

Có thể nói quá trình phân giải xenluloza bởi vi sinh vật là một trong những chu trình quan trọng nhất của tự nhiên. Người đầu tiên nghiên cứu khả năng phân giải xenluloza của các vi sinh vật kỵ khí là popov vào năm 1875, tiếp đó là omelianxki. Các môi trường nghiên cứu phân lập vi sinh vật loại này trở thành kinh điển. Còn người đầu tiên phát hiện khả năng phân giải xenluloza bởi vi khuẩn hiếu khí là G.Van Iterson vào năm 1903.

Trước đó, hoạt động phân giải xenluloza bởi vi sinh vật sống trong dạ cỏ của các động vật nhai lại đã được chứng minh (1955). Đến năm 1971, người ta đã phân lập được một số loài vi sinh vật có khả năng phân giải xenluloza trong dạ cỏ (trang 126, VSV, tập II). Trong đó có 2 giai đoạn nghiên cứu kỹ hơn cả là *Ruminococcus* và *R.flavefacicus*.

Về sau này, rất nhiều vi sinh vật phân giải xenluloza được tìm thấy trong đất, nước, phân bón hữu cơ. Đáng chú ý hơn cả là việc ứng dụng vi khuẩn thuộc nhóm cellulomonas vào việc lên men phân giải bã mía và rác thải thực vật. Suu tập giống QM (QM collection) của HHTH Massachusetts cũng có khoảng 14000 chủng nấm có khả năng phân giải xenluloza, trong đó các chủng nổi tiếng như *trichoderma viride*, *Sporotrichum P.ruinosum*, *penicillium pusillum*, *Aspergillus fumigatú*, *Asp.terreus*...

- Ứng dụng của xenluloza:

+ Phá vỡ thành tế bào (cellwall) thực vật để nuôi cấy các tế bào trên (tế bào không có màng) để lai tạo chúng với nhau nhằm tạo giống thực vật

+ Sản xuất trường glucoza thực phẩm, nguyên liệu công nghiệp hoặc nuôi cấy nấm men gia súc.

Ở Nhật, hãng Megiseika đã sử dụng *Trichoderma.Konigii* và hãng Kinkiyakylt đã sử dụng *T.viride* nuôi cấy theo phương pháp bề mặt để sản xuất xenlulaza. Sơ đồ phân xưởng thí điểm (pilot) sản xuất siro glucoza từ các nguồn xenluloza phế liệu nhờ xenluloza của *T.viride* như sau. (hình V-13 trang 164 – VSV học - tập II)

- + Lên men đường chuyển hoá (tạo thành bởi sự thủy phân xenluloza do enzym) thành etanol nhiên liệu động cơ đốt trong (xe hơi, xe máy)
- + Tách tinh bột ra khỏi hạt và củ bằng cách dùng các enzym tách tế bào (cell separating enzyme – CSE). Đây là hệ thống enzym tác động vào phần protopectin của vỏ (hạt, củ) để giải phóng tinh bột, một số chủng nấm *Rhizopus* sinh tổng hợp loại enzym này.
- + Sản xuất tổ hợp EM (Effect Microbiology – vi sinh vật hữu hiệu) trong xử lý rác thải.

6.5. Saccaraza và glucooxydaza.

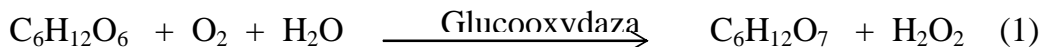
- Saccaraza: đây là một nhóm enzym bao gồm: invertaza, dextranaza, levansaccaraza... xúc tác thủy phân các liên kết glucozit của saccaraza và một vài loại đường khác. Trong số các enzym này thì invertaza (B-D-fructofaranozit – fructohidrolaza, mã số 3.2.1.26 EC) là có ý nghĩa khoa học và thực tiễn hơn cả. Enzim này rất phổ biến trong nấm men và nấm mốc: *Saccharomyces cerevisiae*, *Sach. Carlsbergensis*, *Sach. Pastenriabus*, *Aspergillus Oyae*, *Asp. Niger*...

Invertaza là enzym nội bào (endoenzyme), $pH_{op} = 4,5$, $t_{op} = 65 - 70^{\circ}C$.

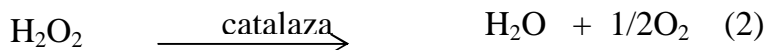
Invertaza được sử dụng rộng rãi trong công nghệ thực phẩm để nghịch đảo đường chống hiện tượng kết tinh đường (lại đường) trong sản xuất bánh kẹo (dung dịch đường nồng độ 65% thì kết tinh nhưng có invertaza thì ở nồng độ 80% vẫn không kết tinh), tăng độ ngọt khi thủy phân đường saccaraza thành glucoza và fructoza, sản xuất bột mì nhân tạo, sản xuất dịch đường y tế (dịch truyền glucoza).

- Enzim oxy hoá: glucooxydaza – catalaza.

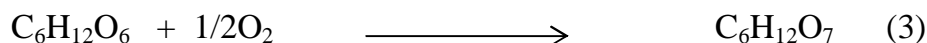
+ Glucooxydaza (B-D-glucoza: O_2 oxydoreductaza; 1.1.3.4 EC) là enzym oxy hoá - khử, chỉ tác dụng lên B-D glucoza khi có mặt oxy, oxy hoá glucoza thành gluconic và H_2O_2 :



+ Catalaza: một enzym oxy hoá – khử hay đi cùng enzym glucooxydaza để khử hoá H_2O_2 tiếp tục:



Tổng hợp cả (1) và (2) ta có:



Tức là cứ 1 phân tử gam glucoza cần 0,5 ptg O₂. Tính chất này của enzym có một ý nghĩa thực tế rất lớn là phức hệ enzym này có thể loại bỏ oxy trong môi trường phản ứng, tránh được sự oxy hoá bởi chính oxy không khí (môi trường). Như vậy có thể kéo dài thời gian bảo quản mà không cần phải tác động của biện pháp hút chân không (đóng gói chân không).

Glucosydatase có nhiều ở các loài nấm mốc *Penicilium notatum*, *Pen.chrysogenum*, *Pen.vitale*, *Aspergillus.Niger*.

+ Chế phẩm enzym glucosydatase và đặc biệt là nếu dùng kết hợp với chế phẩm Catalase có rất nhiều ứng dụng trong thực tiễn:

- 1) Chống rỉ mặt trong các bao bì kim loại
- 2) Nâng cao giá trị của bột lòng trắng trứng (albumin): Trong albumin có một lượng đường glucoza tự do 0,5%, lượng đường này là tác nhân tham gia phản ứng Maillard làm sẫm màu bột trứng trong thời gian bảo quản. Có thể loại trừ tác động này bằng chế phẩm enzym glucosydatase như trên.
- 3) Bảo quản bột sữa, đồ cứng không có rượu, cà phê, dầu mỡ, phomat, đồ hộp.
- 4) Giữ tươi rau quả trước khi nấu chín như: chuối, cà chua, táo,... Muốn vậy người ta gói enzym cùng với glucoza, chất độn rồi cho vào giữa khối quả tươi đang bảo quản kín. Enzym sẽ loại trừ oxy trong môi trường bảo quản để giữ cho quả tươi lâu.
- 5) Tiến hành các phân tích hoá sinh chẩn đoán bệnh như: phân tích đường trong huyết, nước tiểu (bệnh tiểu đường, tăng, hạ đường huyết).

Chương 7: PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘNG MỘT SỐ LOẠI ENZIM

(Copfacto: chất phối hợp hay chất cộng tác của enzym
DEAE – cellulosa: diethylamino – athylcelulose)

7.1. Đơn vị đo hoạt độ:

Mức độ hoạt động của enzym trong chế phẩm là thông tin quan trọng về lượng enzym trong đối tượng nghiên cứu, vì rằng trong những điều kiện xác định, tốc độ phản ứng enzym tỉ lệ với lượng enzym trong hỗn hợp phản ứng. Lượng enzym theo quy ước quốc tế được biểu diễn bằng đơn vị enzym:

Đơn vị tiêu chuẩn enzym là lượng enzym có khả năng xúc tác chuyển hóa 1 micro mol cơ chất sau 1 phút ở những điều kiện xác định cho trước

- Trong trường hợp enzym chỉ phân giải một số liên kết của phân tử cơ chất (ví dụ proteinaza với cơ chất protein, amilaza với cơ chất tinh bột) thì đơn vị hoạt độ tiêu chuẩn của enzym không tính micromol cơ chất bị chuyển hoá mà tính bằng micromol đương lượng của các nhóm tương ứng được tạo thành. Tức là tính theo số liên kết (peptit hay glucozit) bị phân giải.

$$A + B \longrightarrow C + D$$

- Trong trường hợp phản ứng giữa 2 loại phân tử theo kiểu $A + B \longrightarrow C + D$ thì đơn vị enzym là lượng enzym xúc tác chuyển hóa 1 micromol cơ chất A hoặc B, hoặc 2 micromol cơ chất A (hoặc B) nếu A=B sau 1 phút.

- Khi xác định hoạt độ enzym trong pha lỏng (dịch thể) thì tính số đơn vị enzym trong 100 ml.

- Cơ chất dùng các đơn vị dẫn xuất của đơn vị để biểu diễn: mili đơn vị, kilô đơn vị.

- Trong quá trình tách và làm sạch (tinh chế) enzym thì để đánh giá hiệu quả của quá trình này, người ta dùng đơn vị hoạt riêng: đó là số đơn vị enzym tính trên 1 mg protein. Đơn vị này đánh giá mức độ thuần khiết của enzym.

- Nếu biết chính xác trọng lượng phân tử của enzym thì có thể xác định được hoạt độ phân tử của nó: là số phân tử cơ chất (hoặc số đương lượng các nhóm tương ứng) bị chuyển hoá dưới tác dụng của 1 phân tử enzym sau 1 phút.

- Nếu biết được số trung tâm hoạt động trong phân tử enzym có thể biết được hoạt độ của trung tâm xúc tác. Đó là số phân tử cơ chất bị chuyển hoá do 1 trung tâm xúc tác của enzym sau 1 phút. Như vậy nếu enzym chỉ có một trung tâm xúc tác thì đại lượng này trùng với hoạt độ phân tử enzym.

- Nồng độ enzym trong dung dịch được biểu diễn bằng số đơn vị hoạt động trong 1 ml.

- Những điều cần lưu ý khi xác định hoạt độ enzym:

+ Bản chất các enzym là protein nên thường không bền vững, rất nhạy cảm với các tác nhân lý, hoá. Vì vậy khi làm thí nghiệm với enzym cần tránh các yếu tố có thể gây

biến tính vô hoạt enzym như: t^0 cao, pH quá axit, quá kiềm, kim loại nặng và muối của chúng...tránh tạo bọt trong dung dịch vì một số enzym có thể bị kìm hãm trên bề mặt phân chia pha.

+ Các điều kiện (thông số) phản ứng (t^0 , pH, áp suất...) phải ở trong giới hạn enzym có thể tồn tại bền vững và được giữ cố định trong suốt thời gian phản ứng. Muốn vậy phải tiến hành phản ứng trong dung dịch có pH xác định, bình phản ứng phải đặt trong máy siêu ổn nhiệt, các chất phản ứng (cơ chất, cofacto...) phải có nhiệt độ của bình phản ứng trước khi nạp vào.

+ Phản ứng enzym được tiến hành trong điều kiện dư cơ chất và cofacto. Cần tính trước để sao cho khi kết thúc phản ứng chỉ còn độ 20% cơ chất ban đầu bị chuyển hoá. trước đó cần xác định nồng độ cơ chất thích hợp cho phản ứng bằng các thí nghiệm qui hoạch động.

+ Thời gian xác định hoạt độ không nên quá lâu, thường trong khoảng 5 – 30 phút. Tốt nhất là xác định tốc độ phản ứng ở phút đầu tiên (30 – 60s) vì tốc độ phản ứng ổn định enzym chưa bị các tác động ảnh hưởng nhiều đến hoạt độ. Trong một số trường hợp nếu hoạt độ enzym quá thấp hay cần nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố hoá học, hoá sinh (kim loại, gốc axit, bazơ...) cần phải ủ enzym với cơ chất có yếu tố khảo sát trong thời gian đủ lâu (>1h).

+ Khi xác định hoạt độ enzym, bên cạnh mẫu thí nghiệm (enzim tác dụng với cơ chất) cần làm mẫu kiểm tra (kiểm chứng, mẫu trắng) trong đó enzym đã bị mất hoạt động (hoặc không có enzym) trước khi tiếp xúc với cơ chất. Mẫu này cũng thực hiện giống mẫu thí nghiệm nhưng chỉ khác là phải vô hoạt (đình chỉ hoạt độ) enzym hoặc là không thêm enzym. Hoạt độ enzym được tính bằng hiệu số lượng cơ chất (hay sản phẩm phản ứng) giữa mẫu thí nghiệm và kiểm tra.

7.2. Các phương pháp xác định hoạt độ enzym:

Có thể phân chia thành 2 loại phương pháp: liên tục và gián đoạn.

- Phương pháp liên tục: sử dụng máy móc, thiết bị đặc biệt hoạt động tự động liên tục (chuẩn độ, so sánh, đo đặc) với cơ cấu tự động ghi lại liên tục sự biến đổi của các chất và các thông số phản ứng (hiển thị bằng bảng, biểu, đồ thị, biểu đồ, enzym đồ...) trong suốt thời gian tác dụng của enzym.

Như vậy phương pháp này có nhiều ưu điểm, hoàn toàn tự động, có kết quả ngay, cùng một lúc có thể có nhiều mẫu theo một chương trình định sẵn. Đây là xu hướng và thực tiễn hiện nay với công nghệ cao (high – tech)

- Phương pháp gián đoạn: cho enzym tác dụng với cơ chất, sau những khoảng thời gian nhất định thì lấy mẫu phản ứng để phân tích kết quả.

Có thể gọi phương pháp này là phương pháp cổ điển nhưng hiện nay vẫn còn được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu thăm dò, sơ bộ, thí nghiệm đại cương, định tính. Chỉ có một số ít thao tác với enzym tinh khiết được xem là hiện đại.

Sau đây ta xem xét một số phương pháp cụ thể.

7.2.1. Phương pháp đo độ nhớt:

Thường dùng cơ chất của enzym có độ nhớt lớn hơn (hoặc nhỏ hơn) sản phẩm phân huỷ của nó. Sự biến đổi độ nhớt này là thước đo hoạt độ enzym. Phương pháp này thường dùng để xác định hoạt độ enzym thủy phân cho amylaza, proteinaza.

7.2.2. Phương pháp phân cực kế:

Thường dùng khi cơ chất của enzym hoặc sản phẩm phân giải của nó có khả năng làm quay mặt phẳng ánh sáng phân cực và góc quay riêng của chúng có khác nhau. Người ta thường dùng phương pháp này để xác định hoạt độ của saccaraza. Cơ chất của enzym này là đường saccarozơ có góc quay riêng là $+66,5^{\circ}$ (phía phải). Sản phẩm thủy phân của nó là glucoza (góc quay riêng $+52,5^{\circ}$) và fructoza (góc quay riêng là $-92,4^{\circ}$ - phía trái). Khi enzym tác dụng lên saccarozơ theo mức độ thủy phân mà góc quay tổng cộng giảm dần và chuyển từ phải sang trái. Đây là phản ứng nghịch đảo đường rất kinh điển trong nghiên cứu động học phản ứng, đường tạo ra gọi là đường nghịch đảo (từ phải sang trái mặt phẳng ánh sáng phân cực). Tác nhân xúc tác thông thường (không phải enzym) là axit vô cơ (HCl , H_2SO_4).

7.2.3. Phương pháp áp kế:

Được dùng khi phản ứng enzym tạo thành hay hấp thụ khí, chẳng hạn các loại phản ứng oxy hoá có sự tham gia của phân tử oxy (oxy hoá hiệu khí), decacboxy hoá, deamin hoá (loại CO_2 , NH_3). Ngoài ra có thể dùng phương pháp này để xác định hoạt độ của enzym trong quá trình phản ứng không trực tiếp làm biến đổi thể tích nhưng kho thông qua các phản ứng trung gian tiếp theo (thể hiện gián tiếp hoạt động của enzym và do đó thể hiện hoạt độ của nó) lại tạo thành hoặc hấp thụ khí.

Ví dụ: - Các phản ứng tạo axit hữu cơ do enzym oxy hoá khử lipaza xúc tác có thể dung dịch đệm bicacbonat (HCO_3^-) để tạo thành $\text{HCO}_3^- \xrightarrow{\text{phản ứng}} \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$

- Các phản ứng deamin hoá dưới tác dụng của enzym peptidhydrolaza, sau phản ứng cho tác dụng với axit nitơ để tạo thành N_2 ($\text{NH}_3 + \text{HNO}_3 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$)
- Các phản ứng lên men cổ điển (yếm khí và hiếu khí) có thể thực hiện trong bình Enron, hấp thụ CO_2 bằng dung dịch BaSO_4 .

7.2.4. Phương pháp phổ quang kế:

Thường dùng để xác định hoạt độ các enzym mà cơ chất, coenzim hoặc sản phẩm phản ứng có khả năng hấp thụ ánh sáng khác nhau ở những bước sóng xác định. Sự biến đổi độ hấp thụ ở bước sóng ấy trong quá trình phản ứng là đo hoạt độ enzym. Phương pháp này được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu các enzym thuộc nhóm oxy hoá khử oxydoreductaza, chẳng hạn:

- Các dehydrogenaza với coenzim NAD^+ hoặc NADP^+ . Tốc độ phản ứng enzym được xác định theo mức độ khử hoặc oxy hoá coenzim của chúng. Dạng khử NADH , NADPH và dạng oxy hoá của các coenzim này khác nhau rõ rệt về khả năng hấp thụ ở bước sóng

340 nm, sự biến đổi này phản ánh mức độ chuyển hoá giữa 2 dạng và cũng chính là tốc độ và hoạt độ phản ứng enzym.

- Enzim tyrosunaza xúc tác sự oxy hoá các hợp chất phenol thành các quinon. Phản ứng này làm tăng độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm. Đây là phương pháp xác định hoạt độ tyrosinaza (gọi là phương pháp A hay phương pháp tyrosin 280). Tương tự như trên, EPPO xúc tác oxy hoá cơ chất pyrcatechin.

Phương pháp này chỉ cần lượng nguyên liệu nghiên cứu rất ít, lại có độ nhạy cao, cho phép xác định nhanh chóng, chính xác hoạt độ enzym. Vì vậy đây là một trong những phương pháp được sử dụng phổ biến nhất để nghiên cứu enzym học. Thậm chí có trường hợp phản ứng enzym không làm biến đổi rõ rệt quang phổ hấp thụ thì một tác nhân khác (enzim hay một tác nhân khác) tác dụng làm sản phẩm phẩm ứng để thay đổi sự hấp thụ.

7.2.5. Phương pháp chuẩn độ liên tục:

Được dùng để nghiên cứu các phản ứng enzym mà kết quả của nó tạo thành axit hoặc bazơ. Lúc đó dùng thiết bị tự động thêm kiềm hoặc axit vào để giữ pH môi trường phản ứng cố định, đồng thời tự động ghi đường biểu diễn lượng kiềm hoặc axit đã tiêu tốn vào phản ứng trung hoà. Lưu lượng kiềm hoặc axit này phản ánh tốc độ phản ứng enzym.

Phương pháp này có thể được mô tả mở rộng ra để nghiên cứu các đối tượng khác nhưng trên nguyên tắc liên tục định lượng (sản phẩm tạo thành hay lượng cơ chất tiêu hao), chẳng hạn gián tiếp đo thế oxy hoá khử với điện cực tiêu chuẩn khi nghiên cứu các enzym oxy hoá.

7.2.6. Phương pháp sắc ký:

Đây là phương pháp hiện đại, hiện nay được sử dụng rất nhiều và trong nhiều trường hợp dùng để tinh chế enzym. Tất cả các phương pháp sắc ký đều có thể áp dụng để xác định hoạt độ enzym. Từ phương pháp lâu đời nhất như sắc ký giấy, sắc ký trao đổi ion cho đến các phương pháp hiện đại như sắc ký lỏng cao áp, sắc ký khí kết hợp với các phương pháp phân tích hiện đại khác (phân tích axit ami tự động, cộng hưởng từ hạt nhân, cực phổ). Lượng enzym và cơ chất cũng như sản phẩm phản ánh rất ít cũng cho kết quả chính xác, nhanh chóng.

7.2.7. Phương pháp hoá học:

Dùng các phản ứng hoá học khác nhau để định lượng cơ chất bị hao hụt hoặc sản phẩm phản ứng tạo thành dưới tác dụng của enzym. Các phản ứng này thuộc loại atô màu đặc trưng, tạo màu với thuốc thử đặc trưng,nói chung là một dấu hiệu để nói lên mức độ hay thời điểm kết thúc phản ứng. (ví dụ điểm tương đương khi định phân axit – bazơ được xác định bởi sự đổi màu fenolftalein, quì tím...)

Trong tất cả các phương pháp vừa nêu, tùy theo điều kiện, yêu cầu nghiên cứu thực tế mà quyết định phương thức tiến hành (chẳng hạn tiến hành trong điều kiện thời gian như nhau, hay nồng độ enzym, nồng độ cơ chất không đổi ...) qui hoạch thực nghiệm để xác định các thông số tối ưu.

7.3. Chuẩn bị dịch chiết enzym để xác định hoạt độ.

Chế phẩm enzym có thể ở dạng rắn, lỏng, bao gồm giá thể (cơ chất, chất độn, hạt cốc) các bộ phận khác nhau của cơ thể sinh vật sinh enzym (mô, tế bào, khuẩn ty, bào tử...) và

môi trường sinh tổng hợp enzym (chủ yếu là nước) có thể chứa cả enzym trong đó. Trong quá trình nuôi cấy, nảy mầm, enzym có thể tiến hành vào môi trường (enzim ngoại bào) hoặc enzym tồn tại trong tổ chức cơ thể sinh vật (mô, tế bào), vì vậy phải cần xử lý nhằm lấy enzym để xác định.

- Với enzym ngoại bào:

+ Nếu quá trình nuôi cấy hay tích lũy enzym bằng phương pháp bề sâu trong môi trường lỏng. Sau khi lấy mẫu xong cần làm sạch nhanh chóng xuống 0°C rồi ly tâm tốc độ cao 5000 – 6000 vòng/phút để thu được dung dịch trong suốt.

+ Nếu quá trình nuôi cấy hay tích lũy enzym bằng phương pháp bề mặt trên môi trường rắn (hay hạt cốc) thì lấy mẫu 10 – 20 gam, chiết rút bằng dung dịch đệm tương ứng với pH xác định trong điều kiện lạnh (0°C) để enzym không bị biến tính hay giảm hoạt tính, lượng dung dịch này khoảng 200 ml (gấp 10 – 20 lần chế phẩm). Lọc qua phễu hay ly tâm vớt để thu được dung dịch trong suốt.

- Với enzym nội bào:

Phải phá vỡ tế bào để giải phóng enzym tự do bằng nhiều phương pháp:

+ Phương pháp cơ học: phổ biến nhất là nghiền thông thường (trong cối sứ, thủy tinh, máy nghiền quay tay, máy nghiền có động cơ), nghiền với cát, vụn thủy tinh.

+ Phương pháp vật lý: dùng sóng siêu âm để phá vỡ cấu trúc tế bào, mô.

+ Phương pháp hoá sinh: dùng enzym thích hợp (xenluloza, pectinaza) để phân huỷ màng tế bào, mô để giải phóng enzym (trước hết có thể nhận được tế bào trần rất có giá trị trong nghiên cứu tế bào học, enzym học).

Tiếp đó có thể dùng các phương pháp chiết rút thích hợp (dùng dung dịch đệm, dùng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, axeton...) và lọc để nhận được dung dịch trong suốt

Trong trường hợp sau khi xác định xong hoạt độ của dịch chiết cần tính toán hoạt độ của chế phẩm ban đầu (qui về hàm lượng chất khô tuyệt đối)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1- Nguyễn Trọng Cẩn (chủ biên), Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang, Trần Thị Huyền, Công nghệ emzim, NXB Nông Nghiệp TPHCM, 1998.
- 2- Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượn, Phạm Văn Ty - Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập III – NXBKH và kỹ thuật, Hà Nội 1987.
- 3- Lê ngọc tú (chủ biên) và các tác giả - hoá sinh công nghiệp NXBDH và THCN 1977.
- 4- Lê ngọc tú (chủ biên) và các tác giả - enzym vi sinh vật, tập I, II - NXBKH và kỹ thuật, Hà Nội 1982.

Mục lục

Chương 1:	NGUYÊN LIỆU THU ENZIM VÀ PHÂN BỐ	3
1.1.	Nguồn động vật:	3
1.2.	Nguồn gốc thực vật:	4
1.3.	Nguồn vi sinh vật:	4
Chương 2:	SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM ENZIM TỪ VI SINH VẬT	5
2.1.	Điều hoà quá trình sinh tổng hợp enzym trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật	5
2.2.	Tuyển chọn và cải tạo giống vi sinh vật cho enzym có hoạt lực cao:	11
2.3.	Phương pháp bảo quản giống vi sinh vật :	12
2.4.	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzym:	13
2.5.	Các phương pháp nuôi cấy vi sinh vật:	17
2.6.	Tách và làm sạch chế phẩm enzym :	22
Chương 3:	KỸ THUẬT SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TỪ HẠT CỐC NẤY MÀM (MALT).....	24
3.1.	Nguyên liệu đại mạch:	24
3.2.	Làm sạch và phân loại hạt:	25
3.3.	Rửa, sát trùng và ngâm hạt:	26
3.4.	Nảy mầm:	28
3.5.	Sấy malt:	34
3.6.	Tách mầm, rế, bảo quản malt:	37
3.7.	Kỹ thuật sản xuất một số loại malt đặc biệt:	38
Chương 4:	SẢN XUẤT ENZIM TỪ THỰC VẬT	40
4.1.	Sản xuất ureaza từ đậu rựa:	40
4.2.	Thu nhận bromelain từ dứa:	40
Chương 5:	ENZIM CỐ ĐỊNH	44
5.1.	Giới thiệu chung:	44
5.2.	Một số phương pháp chủ yếu chế tạo enzym cố định :	44
5.3.	Một số liên kết trong việc cố định enzym.	45
5.4.	Ảnh hưởng của sự cố định đến hoạt tính của enzym.	46
5.5.	Các reactor chứa enzym cố định:	48
5.6.	. Sử dụng enzym cố định trong y học và trong công nghiệp:	50
Chương 6:	GIỚI THIỆU MỘT SỐ LOẠI ENZIM CHỦ YẾU VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG	55
6.1.	Amylaza	55
6.2.	Proteaza	58
6.3.	Pectinaza	60
6.4.	Xenluloza:	64
6.5.	Saccaraza và glucooxydaza.	66
Chương 7:	PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ MỘT SỐ LOẠI ENZIM	68
7.1.	Đơn vị đo hoạt độ:	68

7.2.	Các phương pháp xác định hoạt độ enzym:	69
7.3.	Chuẩn bị dịch chiết enzym để xác định hoạt độ.....	71