

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 MẦM (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, rỗ, 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 enzim:	69
7.3. Chuẩn bị dịch chiết enzim để xác định hoạt độ.....	71

Tailieu.vn

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 hóa 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 mù 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.

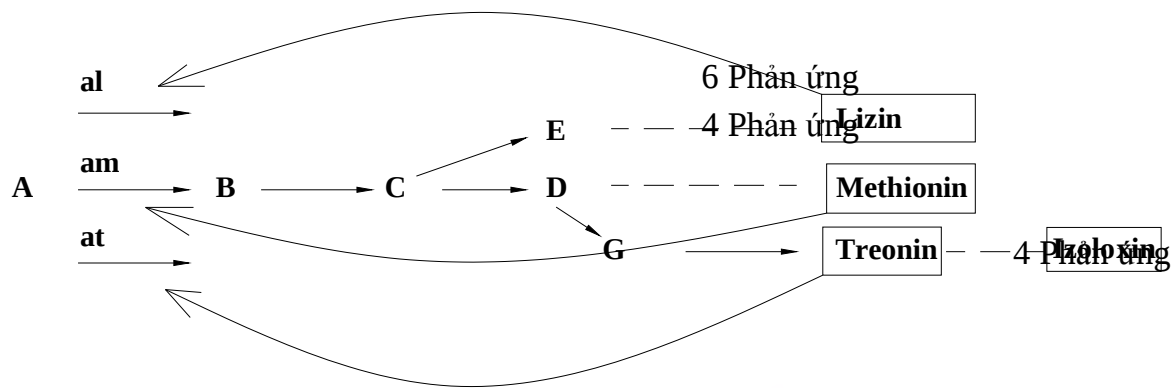
2.1.1. Điều hoà theo hướng đóng mở bởi gen operator (gen điều khiển) _hiện tượng trấn áp :

+ 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 aspartokinaza xúc tác. Enzym này có 3 izoenzym.

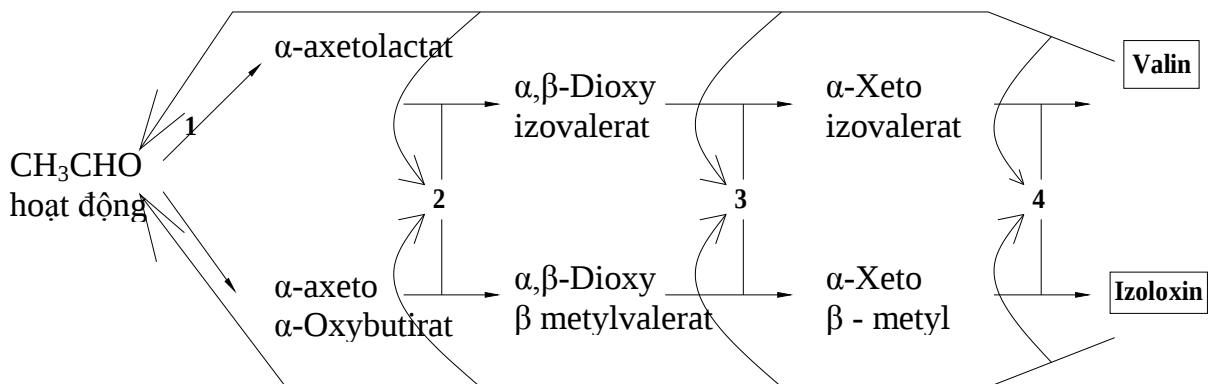
Ký hiệu: a_l , a_m , a_t . Quá trình sinh tổng hợp a_l sẽ bị trấn áp bởi nồng độ lizin. a_m của methionin. Riêng đối với a_t thì treonin vừa là sản phẩm cuối cùng của cả quá trình vừa là cơ chất ban đầu để sinh tổng hợp izolexin. Do đó quá trình sinh tổng hợp a_t chỉ bị trấn áp khi cả treonin và izolexin 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: reductoisomeraza (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, penicilinaza, 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}.

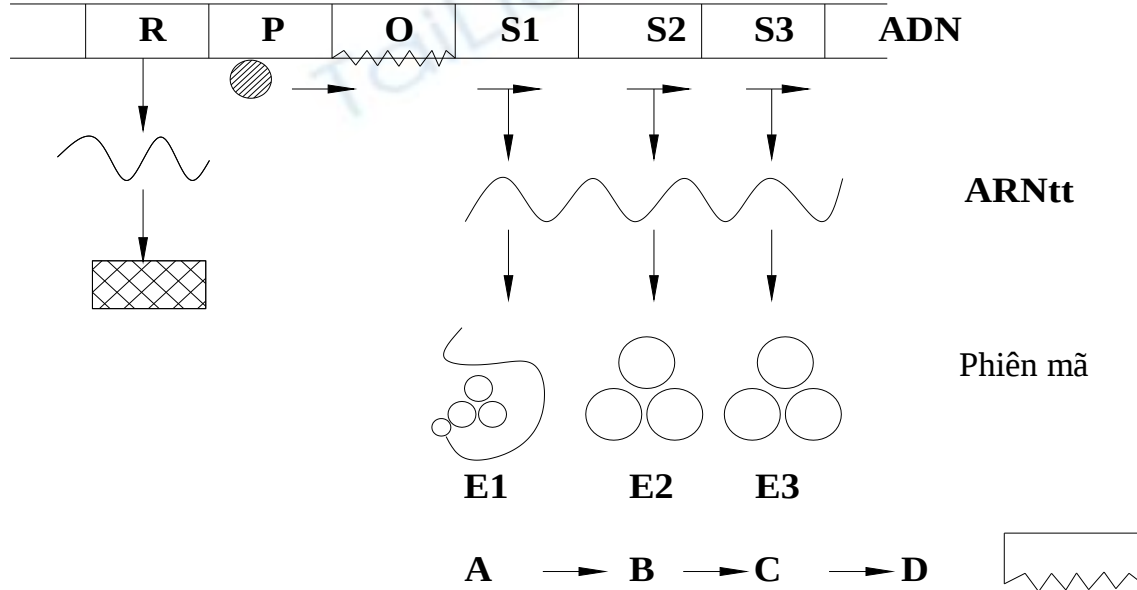
- Gene Operator (ký hiệu: O): ở cạnh nhóm gene cấu trúc, không mã hoá protein nhưng đảm bảo cho quá trình sao chép mã ở gene cấu trúc theo cơ chế “Đóng mở” tựa như công tắc của một dây đèn. Quá trình sao chép chỉ có thể tiến hành khi gene operator ở trạng thái “mở” (không kết với chất nào cả) và ngừng 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.

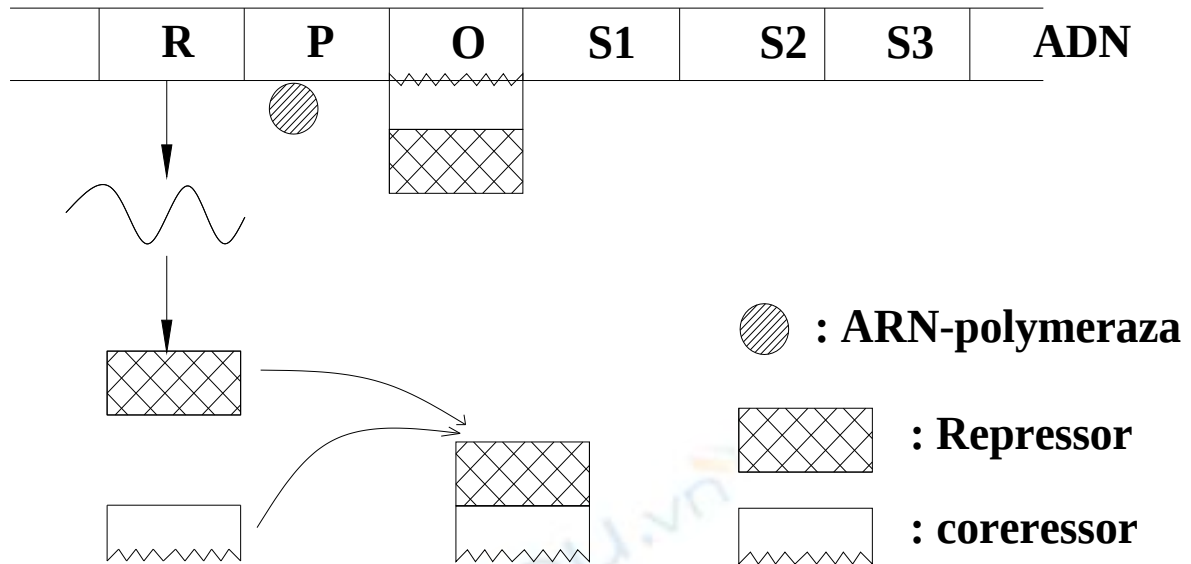
- Gene Promotor (gene hoạt hoá ký hiệu P) Đứng trước gene operator là đoạn And mà ARN-polimeraza sẽ kết hợp và bắt đầu quá trình sao chép các gene cấu trúc.

- 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.

+ Không có repressor (sản phẩm cuối cùng)



+ Có repressor (sản phẩm cuối cùng):

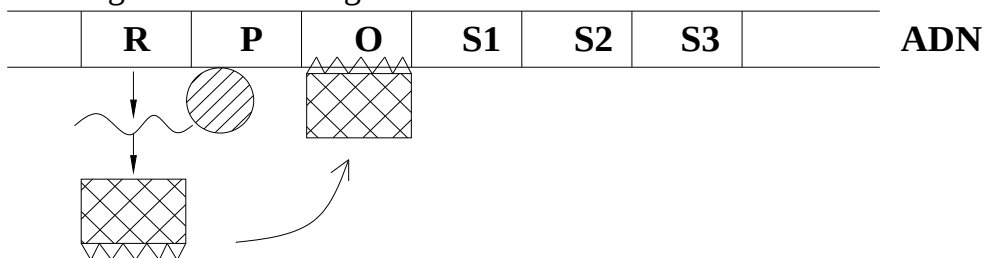


R: Gene điều hoà, P: Gene promotor, O: Gene Operator,
S1, S2, S3: Các gene cấu trúc.

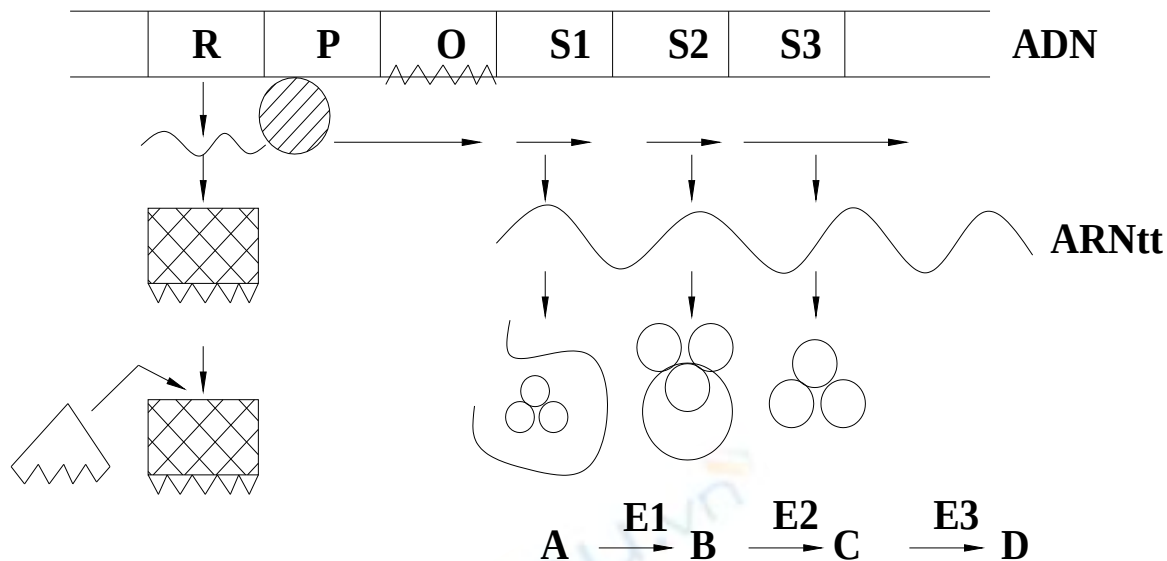
2) Trong trường hợp điều hoà sinh tổng hợp enzym theo cơ chế trấn áp, repressor do gene điều hoà tổng hợp còn ở dạng không hoạt động (aporepressor) chưa có khả năng kết hợp với gene operator nên quá trình sao chép các gene cấu trúc tiến hành bình thường. Các enzym được tổng hợp xúc tác cho các phản ứng 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_{tt} 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.