

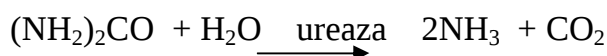
Chương 4:**SẢN XUẤT ENZIM TỪ THỰC VẬT**

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 tấc; 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 latinh: *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 gạc) 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 còn 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 đậm 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, sung khớp, eczema. Rễ làm thuốc cầm máu, sỏi thận. Hoa chữa ho, viêm cuống phổi, lá chữa ung thư phổi. Papain có $M = 20.700$, $t_{op} = 80^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_{op} = 5 - 5,5$. 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 $6 - 10^{\circ}\text{C}$ mới duy trì hoạt tính.

+ Thu nhận papain thương phẩm:

Ngâm papain thô hoà tan nhựa tươi (catex) trong nước cất có bổ sung glyxerin 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 $45 - 50^{\circ}\text{C}$ (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 mắm ngấn ngày, làm mềm thịt.

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

Tailieu.vn

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, agaroza, alghinat canxi, gel polyacylamit, bột thủy 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 phân 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 200Å⁰ (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 enzym trong pha lỏng của hệ thống 2 pha (Reese and Mandels.1958)

Enzim 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 enzym và xảy ra phản ứng với enzym. 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 enzym bằng màng siêu lọc:

Enzim được hoà tan tự do trong dung dịch và tiến hành phản ứng enzym ngay trong dung dịch này. Sản phẩm phản ứng được tách ra nhờ màng siêu lọc chọn lọc còn cơ chất và enzym 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 enzym.

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, agaroza, alginic acid, chitin, collagen, keratin, các polyme tổng hợp: axit acrylic, polyme tan, N – Vinylpyrrolidon...

Bản chất của phương pháp cố định enzym bằng liên kết cộng hoá trị là enzym 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 enzym.

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 enzym, 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 enzym – 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 enzym khác chỉ do phức mono – ion (cation hoặc anion).

- Glutaraldehyt cũng hay được sử dụng làm cầu nối để gắn enzym 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 enzym.

5.3.2. Hấp phụ vật lý:

Chất hấp phụ và enzym 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 (kị nước), liên kết hidro, lực Vandewaals. Nhược điểm của phương pháp này chính là quá trình hấp phụ enzym 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: agaroza 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 vì 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 có 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 hidroxi H_3O^+ (do nước có tính điện ly yếu). 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 trên poly polianion. Trong

khi ở $\text{pH} = 8$ 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 enzyme) chỉ cần là 7. Như vậy mặc dù độ pH hệ thống bằng 8 nhưng thực tế enzyme 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 $\text{pH}_i = 8$ thì enzyme 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 enzyme 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 enzyme.

5.4.2. Hoạt tính enzyme 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 enzyme 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 enzyme 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 enzyme tự do, đây là điều cần chú ý khi mô hình hoá, thiết lập quy trình công nghệ.

5.5. Các reactor chứa enzyme cố định:

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

5.5.1. 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.