|  |
| --- |
| **BÀI 7: QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME** |
| **I. Cơ sở khoa học của ứng dụng công nghệ enzyme** |
| **1. Khái niệm và vai trò của enzyme**  **a. Khái niệm**  - Enzyme là  + chất xúc tác sinh học**,** ..............................................................................................  + có tác động xúc tác **các phản ứng xảy ra nhanh** trong các điều kiện sinh lí bình thường của cơ thể sống.  + .............................................................................................. => enzyme có thể được sử dụng nhiều lần.  + .......................................................🡪 không vận chuyển qua được màng sinh chất.  **b. Vai trò**  Emzym đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì các hoạt động sống thông qua một số tác động cụ thể như:  - ..........................................  - ..........................................  **2. Đặc điểm của enzyme**  *-* ..........................................**:** Hoạt tính của enzyme được biểu hiện bằng số vòng quay, tức số phân tử cơ chất được chuyển hoá trong một giây bởi một phân tử enzyme.  - ..........................................: Mỗi enzỵme thường có một trung tâm hoạt động có cấu trúc phù hợp với một hoặc một số cơ chát nhất định nên enzyme sẽ liên kết đặc thù đối với cơ chất mà chúng tác động.  *-* ....................................................................................*:* Trong tế bào, enzyme hoạt động theo kiểu dây chuyền, nghĩa là sản phẩm phản ứng của enzyme trước sẽ là cơ chất của enzyme sau.  - ..........................................**:** Trong tế bào, enzyme có thể ở dạng hoà tan trong tế bào chất hoặc được định khu trong các bào quan.  - .......................................... ..........................................=> có ý nghĩa quan trọng trong công nghệ thực phẩm và y học.  - .......................................... ..........................................Mỗi enzyme hoạt động tối ưu trong những điều kiện nhất định, ở những môi trường không thích hợp, enzyme sẽ mất hoạt tính.  **3. Cơ sở khoa học của ứng dụng công nghệ enzyme**  - .............................................................................................................................  - .............................................................................................................................  - .............................................................................................................................  - .............................................................................................................................  ............................................................................................................................. |
| **II. Quy trình công nghệ sản xuất enzyme tự nhiên** |
| **1. Quy trình chung:**  ................................................ => ................................................=> ................................................=> ................................................  **\* Chọn nguồn nguyên liệu:**  **- Yêu cầu nguồn nguyên liệu lựa chọn:** có chứa một lượng lớn enzyme, cho phép thu được enzyme với hiệu suất cao và dễ dàng tinh chế chúng, giúp sản xuất dễ dàng, giảm chi phí.  **- Nguồn nguyên liệu từ sinh vật**:  *+* ***Thực vật***: ................................................ ................................................  + ***Động vật***: ................................................ ................................................  + ***Vi sinh vật***: ................................................ ................................................ ................................................  **\* Tách chiết enzyme:**  - ***Đặc điểm Enzyme*** là các phân tử có kích thước lớn nên không thể di chuyển qua màng của các bào quan, màng sinh chất và thành tế bào.  *- Phương pháp thu nhận enzyme nội bào*: ................................................ ................................................ ................................................ .....................  *+ Đối với tế bào thực vật*: ................................................ ................................................ ................................................  *+ Đối với tế bào động vật*: ..............................................................................................................................................  .............................................................................................................................................. ..............................................................................................................................................  *+ Đối với tế bào nấm men:* ..............................................................................................................................................  .............................................................................................................................................. ..............................................................................................................................................  *+ Đối với tế bào vi khuẩn:* ..............................................................................................................................................  .............................................................................................................................................. ..............................................................................................................................................  ..............................................................................................................................................  .............................................................................................................................................. ..............................................................................................................................................  Tinh sạch enzyme là quá trình loại bỏ các thành phần không phải là enzỵme (nước, ion khoáng, chất hữu cơ,...) của tế bào ra khỏi enzyme.  + Để loại bỏ muối và các tạp chất có khối lượng phân tử thấp, người ta thường dùng các biện pháp thẩm tích.  + Để loại bỏ các protein tạp và các tạp chất có khối lượng phân tử cao khác, người ta thường dùng kết hợp nhiều biện pháp khác nhau: phương pháp biến tính chọn lọc, phương pháp kết tủa phân đoạn; các phương pháp sắc kí (sắc kí hấp phụ, sắc kí trao đổi ion, sắc kí loại trừ phân tử, sắc kí ái lực,...); điện di; phương pháp lọc gel.  **\* Tạo chế phẩm enzyme:**  - Enzyme sau khi tinh sạch => cô đặc đến nồng độ thích hợp=> bảo quản ở những điều kiện nhất định sao cho hoạt tính của enzyme không bị thay đổi trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng => duy trì hình dạng của enzyme nhằm để bảo quản và sử dụng lâu dài như: sử dụng các chất phụ gia, chỉnh sửa các liên kết cộng hoá trị hoặc cố định enzyme.  - Phương pháp cố định cấu trúc của enzyme: sử dụng các muối vô cơ ((NH4)2SO4, KH2PO4); dùng các polyols có khối lượng phân tử thấp (glycerol, sorbitol và manitol); đông khô để tạo bột enzyme;...  **2. Sản xuất enzyme protease từ nấm mốc**   |  |  | | --- | --- | | **Các giai đoạn** | **Các bước trong quy trình** | | Chọn nguồn nguyên liệu |  | | Tách chiết enzyme |  | | Tinh sạch enzyme |  | | Tạo chế phẩm enzyme |  |   **- Enzyme protease** có vai trò cắt đứt các liên kết peptide trong quá trình thủy phân protein tạo thành amino acid.  **- Ứng dụng Enzyme protease trong nhiều ngành:** công nghiệp thực phẩm, mĩ phẩm, dệt, thuộc da, y học,…  **3. Sản xuất enzyme bromelain từ dứa**  **- Bromelain** có chứa nhóm sulfhydryl (-SH) có khả năng phân giải protein.   |  |  | | --- | --- | | **Các giai đoạn** | **Các bước trong quy trình** | | Chọn nguồn nguyên liệu |  | | Tách chiết enzyme |  | | Tinh sạch enzyme |  | | Tạo chế phẩm enzyme |  |   **4. Sản xuất enzyme pectinase từ nấm mốc**  **- Enzyme pectinase** xúc tác cho quá trình thủy phân pectin (một loại polycaccharide), có vai trò quan trọng trong công nghiệp thực phẩm.   |  |  | | --- | --- | | **Các giai đoạn** | **Các bước trong quy trình** | | Chọn nguồn nguyên liệu |  | | Tách chiết enzyme |  | | Tinh sạch enzyme |  | | Tạo chế phẩm enzyme |  | |
| **III. Quy trình công nghệ sản xuất enzyme tái tổ hợp** |
| **1. Quy trình chung**  **- Công nghệ DNA tái tổ hợp (***kĩ thuật di truyền*) ..............................................................................................................................................  .............................................................................................................................................. ..............................................................................................................................................  - P**hân tử DNA tái tổ hợp** gồm ..............................................................................................................................................  .............................................................................................................................................. ..............................................................................................................................................  *+* ***Vật chủ thường dùng: E.coli, B.subtilis,S.cerevisiae,…***vì chúng có tốc độ sinh trưởng nhanh, điều kiện nuôi cấy đơn giản.  *-* ***Enzyme tái tổ hợp***là **........................................................................................................**  - ***Lợi ích của sản xuất*** ***Enzyme tái tổ hợp***  + chủ động được nguổn nguyên liệu cung cấp enzyme.  + nâng cao hiệu suất sản xuất và chất lượng enzyme.  + dễ dàng công nghệ hoá quy trình sản xuất.  + giảm giá thành sản phẩm.  **- Quy trình chung:**  Tạo DNA tái tổ hợp => chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ => tạo điều kiện cho sự biểu hiện gene => thu nhận và tinh sạch enzyme tái tổ hợp.  **2. Sản xuất enzyme protease tái tổ hợp từ nấm mốc**   |  |  | | --- | --- | | **Các giai đoạn** | **Các bước trong quy trình** | | Chọn nguồn nguyên liệu |  | | Tách chiết enzyme |  | | Tinh sạch enzyme |  | | Tạo chế phẩm enzyme |  |   **Kết luận:**  ***\* Cơ sở khoa học của ứng dụng công nghệ enzyme***: enzyme là chát xúc tác sinh học do tế bào tiết ra; có tính đặc hiệu; có khả nâng xúc tác cả khi ở ngoài tế bào; các enzyme có nguồn gốc tự nhiên có thể được thu nhận từ thực vật, động vật và vi sinh vật; mỗi chế phổm enzyme được sản xuất phải đảm bảo một số yêu câu nhất định.  ***\* Quy trình chung để sản xuất enzyme tự nhiên gồm các giai đoạn chính:*** chọn nguổn nguyên liệu -> tách chiết enzyme ->tinh sạch enzyme -> tạo chế phẩm enzyme.  ***\* Quy trình chung để sản xuất enzyme tái tổ hợp:*** tạo DNA tái tổ hợp -> chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ -> tạo điều kiện cho sự biểu hiện gene -> thu nhận và tinh sạch enzyme tái tổ hợp. |

**Phần dành cho GV**

|  |
| --- |
| **BÀI 7: QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME** |
| **I. Cơ sở khoa học của ứng dụng công nghệ enzyme** |
| **1. Khái niệm và vai trò của enzyme**  **a. Khái niệm**  - Enzyme là  + chất xúc tác sinh học, **thường có bản chất là protein do tế bào sinh ra.**  + có tác động xúc tác **các phản ứng xảy ra nhanh** trong các điều kiện sinh lí bình thường của cơ thể sống.  + **không bị thay đổi khi phản ứng hoàn thành** => enzyme có thể được sử dụng nhiều lần.  + **có khối lượng phân tử lớn**🡪 không vận chuyển qua được màng sinh chất.  **b. Vai trò**  Emzym đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì các hoạt động sống thông qua một số tác động cụ thể như:  - **Xúc tác các phản ứng hoá học**  - **Kiểm soát các phản ứng hoá học đặc biệt.**  **2. Đặc điểm của enzyme**  *-* ***Có hoạt tính mạnh*:** Hoạt tính của enzyme được biểu hiện bằng số vòng quay, tức số phân tử cơ chất được chuyển hoá trong một giây bởi một phân tử enzyme.  - ***Có tính đặc hiệu cao***: Mỗi enzỵme thường có một trung tâm hoạt động có cấu trúc phù hợp với một hoặc một số cơ chát nhất định nên enzyme sẽ liên kết đặc thù đối với cơ chất mà chúng tác động.  *-* ***Có sự phối hợp hoạt động giữa các enzyme****:* Trong tế bào, enzyme hoạt động theo kiểu dây chuyền, nghĩa là sản phẩm phản ứng của enzyme trước sẽ là cơ chất của enzyme sau.  - ***Enzyme có sự định khu trong tế bào*:** Trong tế bào, enzyme có thể ở dạng hoà tan trong tế bào chất hoặc được định khu trong các bào quan.  - ***Hầu hết các enzyme có nguồn gốc tự nhiên đều không độc***=> có ý nghĩa quan trọng trong công nghệ thực phẩm và y học.  - ***Enzyme chịu sự tác động của một số yếu tố: nhiệt độ, pH, áp suất****,...* Mỗi enzyme hoạt động tối ưu trong những điều kiện nhất định, ở những môi trường không thích hợp, enzyme sẽ mất hoạt tính.  **3. Cơ sở khoa học của ứng dụng công nghệ enzyme**  - **Enzyme là chất xúc tác sinh học do tế bào tiết ra.**  - **Enzyme có thể giữ được hoạt tính xúc tác ngay cả khi ở ngoài tế bào.**  - **Mỗi enzyme có hoạt tính xúc tác đặc hiệu cho một phản ứng nhất định**.  - **Tuỳ mục đích sử dụng, mỗi chế phẩm enzyme được sản xuất phải đảm bảo một số yêu cầu nhất định về chất lượng, độ bền, hoạt tính,...** |
| **II. Quy trình công nghệ sản xuất enzyme tự nhiên** |
| **1. Quy trình chung:**  **Chọn nguồn nguyên liệu** => **tách chiết enzyme** => **tinh sạch enzyme** => **Tạo chế phẩm enzyme**  **\* Chọn nguồn nguyên liệu:**  **- Yêu cầu nguồn nguyên liệu lựa chọn:** có chứa một lượng lớn enzyme, cho phép thu được enzyme với hiệu suất cao và dễ dàng tinh chế chúng, giúp sản xuất dễ dàng, giảm chi phí.  **- Nguồn nguyên liệu từ sinh vật**:  *+* ***Thực vật***: Bromelain (dứa), papain (đu đủ), amylase (đại mạch), lipase (thầu dầu),…  + ***Động vật***: Pepsin (dạ dày bê), lipase (tụy), catalase (gan),..  + ***Vi sinh vật***: Penicillin amidase, cellulase (vi khuẩn), pectinase (nấm sợi), invetase (nấm men),…  **\* Tách chiết enzyme:**  - ***Đặc điểm Enzyme*** là các phân tử có kích thước lớn nên không thể di chuyển qua màng của các bào quan, màng sinh chất và thành tế bào.  *- Phương pháp thu nhận enzyme nội bào*: **bước đầu tiên cần phải phá vỡ cấu trúc tế bào có chứa các enzyme.**  *+ Đối với tế bào thực vật*: **cắt nhỏ, cho vào ngăn đá (hoặc cho vào dung dịch nhược trương) trước khi nghiền bằng biện pháp cơ học.**  *+ Đối với tế bào động vật*: **cắtnhỏ (để loại bỏ mô mỡ, mô liên kết), xử lý mô trong thiết bị đồng hóa (để phá vỡ các liên kết của các phân tử), li tâm (để loại bỏ phần thừa của tế bào)**  *+ Đối với tế bào nấm men:* **lắc với hạt thủy tinh (đk 1mm); sử dụng một số hóa chất như toluene, EDTA 15mM, mercaptoethanol 2% (để phá vỡ thành tế bào), li tâm để thu nhận enzyme.**  *+ Đối với tế bào vi khuẩn:***Phá vỡ tế bào bằng nhiều phương pháp: phương pháp cơ học (nghiền bi, sử dụng chất trợ nghiền như bột thủy tinh, cát thạch anh, đồng hóa bằng thiết bị đồng hóa ở áp suất cao), phương pháp vật lí (dùng sóng siêu âm), phương pháp hóa học (dùng sung môi như acetone, glycerol, chất tẩy rửa, lysosome,…)**  **\* Tinh sạch enzyme:**  Tinh sạch enzyme là quá trình loại bỏ các thành phần không phải là enzỵme (nước, ion khoáng, chất hữu cơ,...) của tế bào ra khỏi enzyme.  + Để loại bỏ muối và các tạp chất có khối lượng phân tử thấp, người ta thường dùng các biện pháp thẩm tích.  + Để loại bỏ các protein tạp và các tạp chất có khối lượng phân tử cao khác, người ta thường dùng kết hợp nhiều biện pháp khác nhau: phương pháp biến tính chọn lọc, phương pháp kết tủa phân đoạn; các phương pháp sắc kí (sắc kí hấp phụ, sắc kí trao đổi ion, sắc kí loại trừ phân tử, sắc kí ái lực,...); điện di; phương pháp lọc gel.  **\* Tạo chế phẩm enzyme:**  - Enzyme sau khi tinh sạch => cô đặc đến nồng độ thích hợp=> bảo quản ở những điều kiện nhất định sao cho hoạt tính của enzyme không bị thay đổi trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng => duy trì hình dạng của enzyme nhằm để bảo quản và sử dụng lâu dài như: sử dụng các chất phụ gia, chỉnh sửa các liên kết cộng hoá trị hoặc cố định enzyme.  - Phương pháp cố định cấu trúc của enzyme: sử dụng các muối vô cơ ((NH4)2SO4, KH2PO4); dùng các polyols có khối lượng phân tử thấp (glycerol, sorbitol và manitol); đông khô để tạo bột enzyme;...  **2. Sản xuất enzyme protease từ nấm mốc**   |  |  | | --- | --- | | **Các giai đoạn** | **Các bước trong quy trình** | | Chọn nguồn nguyên liệu | **- Nguồn nguyên liệu: nấm mốc *(Aspergillus oryzae).***  **- Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng → hấp thanh trùng → làm nguội →cho nấm mốc vào môi trường nuôi cấy.** | | Tách chiết enzyme | **Tách chiết enzyme từ môi trường nuôi cấy →nghiền mịn.** | | Tinh sạch enzyme | **Trích li bằng nước - thu nhận kết tủa protease →sấy tủa protease → tinh chế.** | | Tạo chế phẩm enzyme | **Tạo chế phẩm protease.** |   **- Enzyme protease** có vai trò cắt đứt các liên kết peptide trong quá trình thủy phân protein tạo thành amino acid.  **- Ứng dụng Enzyme protease trong nhiều ngành:** công nghiệp thực phẩm, mĩ phẩm, dệt, thuộc da, y học,…  **3. Sản xuất enzyme bromelain từ dứa**  **- Bromelain** có chứa nhóm sulfhydryl (-SH) có khả năng phân giải protein.   |  |  | | --- | --- | | **Các giai đoạn** | **Các bước trong quy trình** | | Chọn nguồn nguyên liệu | **- Nguồn nguyên liệu: dứa.** | | Tách chiết enzyme | **Xay nhuyễn (quả, thân, chồi) → lọc lấy dịch.** | | Tinh sạch enzyme | **Li tâm dịch lọc → thu nhận kết tủa bromelain**  **→Sấy khô → tinh sạch.** | | Tạo chế phẩm enzyme | **Tạo chế phẩm bromelain.** |   **4. Sản xuất enzyme pectinase từ nấm mốc**  **- Enzyme pectinase** xúc tác cho quá trình thủy phân pectin (một loại polycaccharide), có vai trò quan trọng trong công nghiệp thực phẩm.   |  |  | | --- | --- | | **Các giai đoạn** | **Các bước trong quy trình** | | Chọn nguồn nguyên liệu | **- Nguồn nguyên liệu: nấm mốc *(Aspergillus oryzae).***  **- Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng →cho nấm mốc vào môi trường nuôi cấy.** | | Tách chiết enzyme | **Tách chiết enzyme → sấy khô.** | | Tinh sạch enzyme | **Trích li bằng kết tủa → li tâm và lọc lấy kết tủa → sấy kết tủa.** | | Tạo chế phẩm enzyme | **Nghiền nhỏ → tạo chế phẩm pectinase.** | |
| **III. Quy trình công nghệ sản xuất enzyme tái tổ hợp** |
| **1. Quy trình chung**  **- Công nghệ DNA tái tổ hợp (***kĩ thuật di truyền*) **là công nghệ sử dụng các nguyên lí của thao tác gene để tạo nên các phân tử DNA tái tổ hợp từ các nguổn DNA khác nhau.**  - P**hân tử DNA tái tổ hợp** gồm ***có gene mã hoá các protein mong muốn (của tế bào cho)* và *DNA đóng vai trò là vector biểu hiện gene* *(của tế bào vật chủ).***  *+* ***Vật chủ thường dùng: E.coli, B.subtilis,S.cerevisiae,…***vì chúng có tốc độ sinh trưởng nhanh, điều kiện nuôi cấy đơn giản.  *-* ***Enzyme tái tổ hợp***là **enzyme được tạo ra nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp.**  - ***Lợi ích của sản xuất*** ***Enzyme tái tổ hợp***  + chủ động được nguổn nguyên liệu cung cấp enzyme.  + nâng cao hiệu suất sản xuất và chất lượng enzyme.  + dễ dàng công nghệ hoá quy trình sản xuất.  + giảm giá thành sản phẩm.  **- Quy trình chung:**  Tạo DNA tái tổ hợp => chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ => tạo điều kiện cho sự biểu hiện gene => thu nhận và tinh sạch enzyme tái tổ hợp.  **2. Sản xuất enzyme protease tái tổ hợp từ nấm mốc**   |  |  | | --- | --- | | **Các giai đoạn** | **Các bước trong quy trình** | | Chọn nguồn nguyên liệu | **- Nguồn nguyên liệu: Nấm mốc (*Aspergillus oryzae).***  **– Vector biểu hiện gene.** | | Tách chiết enzyme | ***Tách chiết enzyme từ môi trường nuôi cấy →nghiền mịn.*** | | Tinh sạch enzyme | ***Trích li bằng nước - thu nhận kết tủa protease →sấy tủa protease → tinh chế.*** | | Tạo chế phẩm enzyme | ***Tạo chế phẩm protease.*** |   **Kết luận:**  ***\* Cơ sở khoa học của ứng dụng công nghệ enzyme***: enzyme là chát xúc tác sinh học do tế bào tiết ra; có tính đặc hiệu; có khả nâng xúc tác cả khi ở ngoài tế bào; các enzyme có nguồn gốc tự nhiên có thể được thu nhận từ thực vật, động vật và vi sinh vật; mỗi chế phổm enzyme được sản xuất phải đảm bảo một số yêu câu nhất định.  ***\* Quy trình chung để sản xuất enzyme tự nhiên gồm các giai đoạn chính:*** chọn nguổn nguyên liệu -> tách chiết enzyme ->tinh sạch enzyme -> tạo chế phẩm enzyme.  ***\* Quy trình chung để sản xuất enzyme tái tổ hợp:*** tạo DNA tái tổ hợp -> chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ -> tạo điều kiện cho sự biểu hiện gene -> thu nhận và tinh sạch enzyme tái tổ hợp. |