

ĐĂNG THỊ THU (Chủ biên)
TÔ KIM ANH - LÊ QUANG HOÀ - ĐỖ NGỌC LIÊN
NGUYỄN THỊ XUÂN SÂM - LÊ NGỌC TÙ - ĐỖ HOA VIÊN

Cơ sở công nghệ **SINH HỌC**

TẬP HAI - CÔNG NGHỆ HÓA SINH



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

ĐẶNG THỊ THU (Chủ biên)
TÔ KIM ANH – LÊ QUANG HOÀ – ĐỖ NGỌC LIÊN
NGUYỄN THỊ XUÂN SÂM – LÊ NGỌC TÚ – ĐỖ HOA VIÊN

Cơ sở công nghệ sinh học
Tập hai
CÔNG NGHỆ HÓA SINH

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

Công ty cổ phần Dịch vụ xuất bản Giáo dục Hà Nội –
Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam giữ quyền công bố tác phẩm

05 – 2009/CXB/17 – 2170 /GD

Mã số : 7K634H9 -NDN

LỜI NÓI ĐẦU

Các hợp phần hoá sinh là thành phần chính của nguyên liệu hoặc sản phẩm trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau : Công nghệ sinh học, công nghệ thực phẩm, công nghiệp dược, nông, lâm, ngư nghiệp... Kiến thức cơ bản về các hợp phần này đã được giảng dạy trong các giáo trình hoá sinh ở nhiều trường đại học trong cả nước trên hai phương diện lý thuyết và thực hành. Trong khuôn khổ của môn học hoá sinh, một hợp phần hoá sinh thường chỉ được trình bày tập trung vào hai khía cạnh : cấu trúc và các tính chất của chúng ở trạng thái tự nhiên cũng như trong quá trình công nghệ.

Cuốn sách "**Công nghệ hoá sinh**" được biên soạn nhằm cung cấp kiến thức một cách toàn diện hơn về các hợp phần hoá sinh chính trên các vấn đề sau :

- Cấu trúc và các tính chất chức năng.
- Các phương pháp khai thác, tách, chiết và làm sạch.
- Các phương pháp biến hình nhằm đa dạng hoá sản phẩm và nâng cao chất lượng cũng như giá trị sử dụng.
- Khả năng ứng dụng của các hợp phần hoá sinh trong các ngành công nghiệp khác nhau.

Chúng tôi hy vọng cuốn sách sẽ là giáo trình cho sinh viên đại học, sau đại học và là tài liệu tham khảo cho các cán bộ nghiên cứu thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, công nghệ thực phẩm và các ngành khoa học có liên quan.

Đặc biệt chúng tôi cũng hy vọng các kỹ sư, nghiên cứu viên thuộc các lĩnh vực trên có thể tìm thấy ở cuốn sách này những kiến thức tổng hợp bổ sung cho định hướng nghiên cứu khoa học và công nghệ của mình.

Phân công biên soạn :

Chương I. Cơ sở lý thuyết công nghệ hoá sinh

PGS. Nguyễn Thị Xuân Sâm, PGS. Lê Ngọc Tú

Chương 2. Công nghệ protein

GS. Đặng Thị Thu, PGS. Nguyễn Thị Xuân Sâm

GS. Đỗ Ngọc Liên, PGS. Tô Kim Anh, TS. Lê Quang Hoà

Chương 3. Công nghệ polysaccharit

GS. Đặng Thị Thu

PGS. Nguyễn Thị Xuân Sâm, PGS. Lê Ngọc Tú

Chương 4. Công nghệ lipit

GS. Đặng Thị Thu, PSG. Lê Ngọc Tú

Chương 5. Công nghệ các chất có hoạt tính sinh học thực vật

PGS. Lê Ngọc Tú, PGS. Đỗ Hoa Viên

Chương 6. Công nghệ enzym

GS. Đặng Thị Thu, PGS. Nguyễn Thị Xuân Sâm

Các tác giả xin cảm ơn và mong muốn nhận được nhiều ý kiến đóng góp của bạn đọc và đồng nghiệp để cuốn sách này ngày càng hoàn chỉnh hơn.

Các tác giả

MỤC LỤC

	Trang
Lời nói đầu	3
Chương I. CƠ SỞ LÍ THUYẾT CÔNG NGHỆ HOÁ SINH.....	7
1.1. Khái niệm và phân loại các thuộc tính chức năng.....	8
1.2. Thuộc tính hydrat hoá	11
1.3. Thuộc tính tương tác giữa các đại phân tử	18
1.4. Thuộc tính bề mặt	22
1.5. Một số kỹ thuật tạo cấu trúc.....	28
Chương II. CÔNG NGHỆ PROTEIN.....	31
2.1. Nguồn protein và nguyên tắc khai thác protein.....	32
2.2. Một số công nghệ protein điển hình.....	45
2.3. Công nghệ protein tái tổ hợp.....	110
Chương III. CÔNG NGHỆ POLYSACCHARIT.....	107
3.1. Nguồn polysaccharit và nguyên tắc khai thác polysaccharit...	117
3.2. Thu nhận và tinh sạch các nguồn polysaccharit	121
3.3. Công nghệ một số polysaccharit	124
Chương IV. CÔNG NGHỆ LIPIT	211
4.1. Đại cương về chất béo.....	211
4.2. Công nghệ thu nhận chất béo	211
4.3. Các gia công làm biến đổi chất béo	214
4.4. Công nghệ một số sản phẩm từ lipit	216
4.5. Tổng hợp DHA.....	231
Chương V. CÔNG NGHỆ MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ THỰC VẬT	240
5.1. Các hợp chất flavonoid.....	241

5.2. Các hợp chất carotenoit.....	253
5.3. Các hợp chất antoxyanin	261
Chương VI. CÔNG NGHỆ ENZYM	272
6.1. Các phương pháp tinh sạch enzym.....	272
6.2. Công nghệ thu một số chế phẩm enzym	289
6.3. Enzym cố định	301
Tài liệu tham khảo.....	314

Chương I

CƠ SỞ LÝ THUYẾT CÔNG NGHỆ HÓA SINH

Các hợp phần hoá học có mặt trong tất cả sinh giới và chiếm một tỷ lệ lớn trong phần vật chất khô của tế bào. Về bản chất, đó là các protein, glutxit (cacbohydrat), lipit, các polyeste, các axit nucleic... Các nhóm hợp chất này đảm trách một loạt các chức năng sinh học quan trọng cho sinh vật như : bảo toàn và truyền đạt các thông tin di truyền, xúc tác các phản ứng, là nguồn dự trữ cacbon, nitơ, photpho, năng lượng, bảo vệ khỏi sự tấn công của các tế bào lạ và sự thay đổi của môi trường, tương tác với môi trường bên ngoài và các tế bào khác hay mản cảm với các yếu tố sinh học và phi sinh học, là các chất trung gian cho sự kết gắn bẽ mặt giữa các cơ thể khác nhau... Hơn nữa, rất nhiều các hợp chất cao phân tử là thành phần cấu tạo của tế bào, mô và toàn bộ cơ thể. Để đảm nhiệm được tất cả các chức năng trên, các hợp phần hoá học này sẽ phải mang nhiều thuộc tính khác nhau. Chúng phải có các tương tác rất đặc hiệu với ái lực và độ bền khá cao với một lượng lớn các chất, các thành phần và các vật liệu khác nhau.

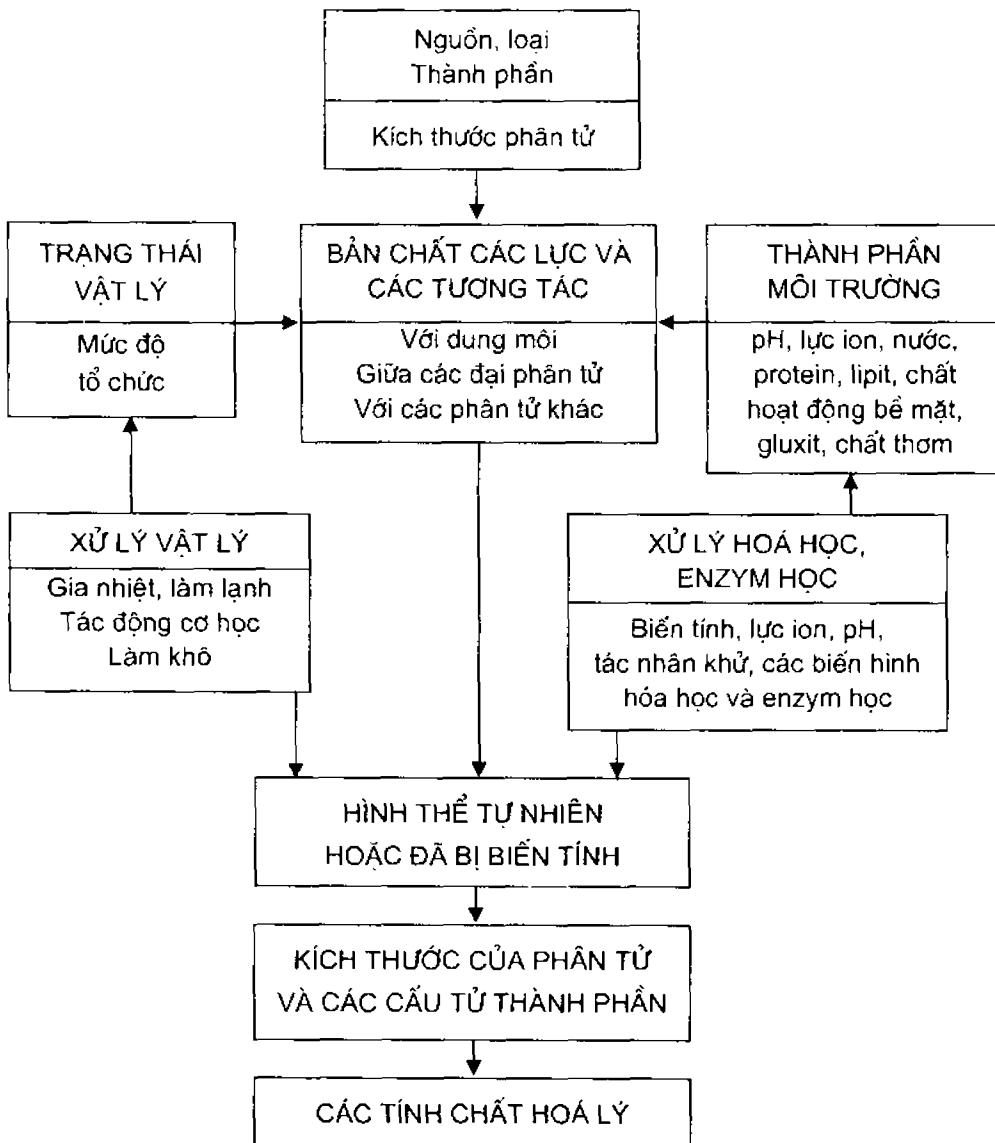
Một trong những thuộc tính trên được khai thác trực tiếp hoặc gián tiếp cho các ứng dụng khác nhau và làm cho các hợp phần hoá học ngày càng hấp dẫn đối với một số ngành công nghiệp, y dược, nông nghiệp, điện tử và trong các lĩnh vực khác. Các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng đã đưa ra nhiều kiến thức về quá trình sinh tổng hợp, các thuộc tính sinh học, hoá học, vật lý và vật liệu học của các đại phân tử. Chính những khám phá mới này đã làm tăng sức hấp dẫn của các hợp phần hoá học đối với các ứng dụng khác nhau, Đò đặc điểm cấu tạo, các chất cao phân tử dưới tác động của một số yếu tố thường có những tính chất đặc hữu của mình như khả năng tạo nhớt, khả năng cô đặc, khả năng tạo gel, khả năng tạo nhũ tương, khả năng tạo bọt, tạo sợi, tạo màng... Các tính chất này được gọi là các tính chất chức năng (functional properties) của các hợp phần hữu cơ, là cơ sở để chế tác và đa dạng hoá các sản phẩm đi từ các hợp phần này. Ví dụ, màng băng vết thương hay chí khâu sinh học được chế từ chitin và chitosan, các vật liệu bao gói được làm từ tinh bột hay nhờ khả năng biến tính và tạo gel của protein mà ta có thể chế tác ra các sản phẩm như giò, chả, surimi, cũng như nhờ tính lưu biến đặc biệt thích hợp nên xanthan gum được sử dụng rộng rãi như tác nhân tạo huyền phù, tạo nhũ tương và gây đặc trong công nghiệp thực phẩm, trong dược phẩm và mỹ phẩm...

1.1. Khái niệm và phân loại các thuộc tính chức năng

1.1.1. Khái niệm thuộc tính chức năng

Thuộc tính chức năng là những tính chất tổng thể tiêu biểu nhất, kết hợp đồng thời nhiều tính chất hoá lý khác nhau nhưng phụ thuộc lẫn nhau.

Các yếu tố liên quan tới cấu trúc và thuộc tính chức năng của các đại phân tử được tóm tắt trong sơ đồ hình 1.1.



Hình 1.1. Các yếu tố ảnh hưởng tới cấu trúc và thuộc tính chức năng của các cao phân tử

Theo sơ đồ này, các yếu tố ảnh hưởng chính tới cấu trúc và thuộc tính chức năng của các hợp chất cao phân tử bao gồm hai nhóm chính sau :

- Thành phần môi trường : nước, protein, gluxit, chất hoạt động bề mặt, chất thơm, pH, các lực ion...
- Các xử lý vật lý, hóa học làm thay đổi môi trường (cô đặc, sấy, xử lý cơ học).

1.1.2. Phân loại các thuộc tính chức năng

Dựa vào mối quan hệ của một chất cao phân tử trong môi trường có thể phân các tính chất chức năng thành 3 nhóm chính sau :

– Nhóm tính chất chức năng do tương tác của chất cao phân tử với nước : khả năng giữ nước, khả năng hòa tan, khả năng tạo nhót, khả năng cố kết tạo mixen, keo là thuộc nhóm tính chất này. Sự hình thành các khả năng này là do các liên kết hydro, lực Vandecvan (Vander Waals), tương tác kỵ nước cũng như do các lực tương tác ion khi solvat hoá các nhóm ion hoá.

– Nhóm tính chất chức năng do tương tác giữa các đại phân tử với nhau : khả năng kết tủa, khả năng tạo gel, khả năng tạo sợi, khả năng tạo màng, khả năng đàm hồi là thuộc nhóm tính chất này. Có được các khả năng này là do có sự liên kết giữa các phân tử ion, giữa các phân tử kỵ nước (hydrophobe) hoặc giữa các phân tử đồng hoá trị.

– Nhóm thuộc tính bề mặt : tương tác của các chất cao phân tử với các phân tử ít phân cực hoặc với pha khí. Khả năng nhũ hoá, khả năng tạo bọt thuộc về nhóm tính chất này.

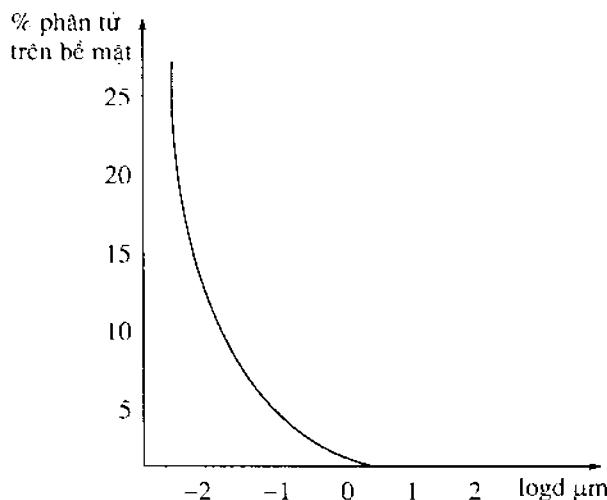
Trên thực tế các tính chất trên không hoàn toàn độc lập, chúng có thể đan xen và hỗ trợ nhau trong một sản phẩm. Ví dụ, sự tạo gel, tạo độ sánh của một sản phẩm protein không những do tương tác protein-protein mà còn do tương tác protein – nước. Mặt khác, sự thiết lập các liên kết và các tương tác giữa các đại phân tử hoặc giữa các phân tử với dung môi (với nước) còn tùy thuộc vào nồng độ của các đại phân tử trong dung dịch và tùy thuộc vào trạng thái dãn mạch và trạng thái liên kết của chúng.

1.1.3. Ảnh hưởng của các pha phân tán tới thuộc tính chức năng

Hệ đồng thể và hệ dị thể : Một hệ là đồng thể khi các cấu tử của hệ có cùng một kích thước và trong một số điều kiện nhất định nó sẽ chuyển thành

hệ dị thể chứa các tiểu phân có kích thước khác nhau. Bình thường do chuyển động Brown sẽ giữ cho các cấu tử ở trạng thái phân tán, tuy nhiên trong một số điều kiện nhất định các cấu tử của hệ có thể tự sát nhập lại tạo thành bông hoặc kết tụ lại tách khỏi pha liên tục bởi trọng lực. Quá trình kết tụ thường là thuận nghịch còn động tu thường bất thuận nghịch.

Với các hệ thống mà các cấu tử thành phần có kích thước khá nhỏ thì tỷ lệ giữa bề mặt với thể tích là khá lớn và khi đó một tỷ lệ đáng kể các phân tử của hệ thống sẽ được phân bố ở bề mặt liên pha. Các phân tử ở bề mặt liên pha này có các thuộc tính về năng lượng, trạng thái duỗi mạch hay liên kết khác với các phân tử ở pha liên tục vì chúng làm tăng bề mặt liên pha. Ví dụ, ở hình 1.2 cho thấy với một chất có thể tích phân tử $30\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ thì tỷ lệ các phân tử phân bố trên bề mặt liên pha sẽ tăng lên rất nhanh khi đường kính các phân tử nhỏ hơn $1\mu\text{m}$. Quan sát này cho thấy tầm quan trọng của các thuộc tính bề mặt trong các hệ vi dị thể chứa các phân tử có kích thước hạt từ $0,01-1\mu\text{m}$. Các hệ thường gặp trong thực tế là các hệ chứa các pha phân tán như hệ nhũ tương (lỏng trong lỏng), hệ bọt (khí trong lỏng), hệ huyền phù (rắn trong lỏng) hoặc các sản phẩm ít bị hydrat hoá (lỏng trong rắn).



Hình 1.2. Sự thay đổi tỷ lệ các phân tử trên bề mặt liên pha theo kích thước các tiểu phân của một chất có thể tích phân tử $30\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$

Để đánh giá các tính chất chức năng của một sản phẩm, các phương pháp công cụ hoặc đánh giá cảm quan thường được áp dụng. Ví dụ, khả

năng tạo gel của một cao phân tử có thể do qua các tính chất lưu biến của chúng như độ cứng, độ xuyên, độ đàn hồi, độ kéo dãn, độ nhớt... Mặc dù vậy, các phương pháp này vẫn còn nhiều bàn cãi bởi sự đa dạng của các hệ thống sản phẩm liên quan. Ví dụ, liệu ta có thể sử dụng cùng một phép thử đánh giá khả năng nhũ hoá cho việc tạo nhũ tương của các sản phẩm như sốt mayonai, kem, kem lạnh hay các sản phẩm dùng trong mỹ phẩm như kem dưỡng da, dầu gội đầu... ?

1.2. Thuộc tính hydrat hoá

Trong các hợp phần cao phân tử nước giữ nhiều vai trò như là dung môi cho các phản ứng, cho sự phân tán các cấu tử hoặc giữ vai trò như một tác nhân tạo cấu trúc cho các đại phân tử. Trong đó khả năng tương tác của nước với các chất hòa tan thường có tính quyết định nhiều hơn tới các vai trò này so với hàm lượng của chúng trong môi trường.

1.2.1. Tương tác giữa nước và các cấu tử thành phần

Các tương tác này xuất hiện là nhờ các nhóm chức có khả năng ion hoá tạo solvat hoặc các nhóm phân cực không tích điện tạo liên kết hydro với nước (bảng 1.1).

Bảng 1.1. Các nhóm chức tạo liên kết với nước

Các nhóm ion hoá phân cực	
Tích điện âm	
- Cacboxylic (COO^-) nếu $\text{pH} > \text{pKa}$	Polysaccarit, protein (Asp, Glu), axit hữu cơ.
- Photphat (HPO_4^{2-})	Photphat, polyphotphat, photphoprotein
- Sunphat (HSO_4^-)	Sunphat, polysaccarit (galactan sunphat)
- Axit sialic	Glucoprotein
- Các anion kim loại khác.	Cl^- , NO_3^- , NO_2^- ...
Tích điện dương	
- Gốc amin, gốc imin ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{NH}_2^+$...) nếu $\text{pH} < \text{pKa}$	Protein (Lys, His, Agr, Pro), osamin, bazơ, nitơ, polyamin...
- Các cation kim loại hoá trị 2	Ca^{2+} , Mg^{2+} tự do hoặc có trong phức của protein và polysaccarit.
- Các cation hoá trị 1	Na^+ , K^+

Nhóm phân cực không ion hoá (liên kết hydro)

-- Nhóm hydroxyl ($-OH$)	-- Gluxit, protein (Ser, Thr, Tyr), polyol
- Nhóm cacboxyl ($-COOH$) (nếu pH < pKa)	- Polysaccarit, protein (Asp, Glu)
- Amin ($-NH_2$)	- Protein (Lys)
- Amit ($-CONH_2$)	- Protein (liên kết peptit, Gln)
- Thiol ($-SH$)	- Protein (Cys)

Các nhóm không phân cực

- Nhóm hydrocacbua mạch thẳng $-(CH_2)_2^-$	- Lipit, axit béo, protein (canh bên của một số axit amin Ala, Val, Leu, Met, Pro, Lys, Arg, chuỗi peptit) và chất màu carotenoit, các hợp chất terpen (nhóm chưa bão hòa).
- Nhóm hydrocacbua mạch vòng thơm hoặc không.	- Protein (chuỗi bên của Phe, Tyr, Trp), các chất màu chứa vòng hem (Hb, Mb, clorophyl...), antoxian, polyphenol và tanin.

Khi hydrat hoá protein, các nhóm tích điện bị hydrat hoá trước các nhóm không tích điện. Mức độ hydrat hoá thay đổi đáng kể theo bản chất các nhóm và vị trí của chúng trong phân tử (các nhóm phân cực phân bố trên bề mặt bị hydrat hoá nhanh nhất). Từ các thông tin này, người ta có thể đưa ra một số nhận xét sau :

- Dựa vào thành phần axit amin của một protein cho phép tiên đoán khả năng hydrat hoá của protein.
- Liên kết giữa các nhóm chức với nước góp phần làm bền cấu hình của các đại phân tử.
- Sự hydrat hoá làm thay đổi sự cân bằng của các tương tác nội tại dẫn đến sự chuyển động, gấp nếp và sắp xếp lại cấu trúc. Kết quả này sẽ làm tăng thể tích, giảm độ rắn chắc của phân tử, nước ở đây đóng vai trò như một chất hoá dẻo (ví dụ bột nhào).
- Khi hydrat hoá tới một hàm lượng nước nhất định sẽ giúp cho các chuỗi bên của phân tử protein enzym trở nên linh động và thể hiện tính xúc

tác của chúng. Ví dụ, sự chuyển động nội tại của các chuỗi bên của phân tử lysozym chậm hơn 1000 lần khi hàm lượng nước là 0,04 g so với 0,2 g/g vật liệu khô.

1.2.2. Các thuộc tính liên quan tới khả năng hydrat hoá

a) Hấp phụ nước và trương nở

Hấp phụ nước và trương nở là một trong những thuộc tính của các nguyên liệu khô như tinh bột, xanthanoza, protein.

Trong trường hợp này nước được hấp phụ trên bề mặt và trong mao quản vật liệu bởi việc cố định phân tử nước lên các nhóm có cực ion hoá hoặc không ion hoá hoặc bởi các lực hấp phụ Vandecvan và lực mao quản...

Khi hoà tan tinh bột vào nước, do kích thước hạt tinh bột lớn nên đầu tiên các phân tử nước sẽ xâm nhập vào giữa các phân tử tinh bột. Tại đây chúng sẽ tương tác với các nhóm hoạt động của tinh bột ($-OH$), tạo ra một lớp vỏ nước, làm cho lực liên kết ở mắt xích nào đó của phân tử tinh bột bị yếu đi rồi bị "rão" ra và trương lên. Nếu sự xâm nhập của nước vào tinh bột dẫn đến quá trình trương không hạn chế, làm bung được các phân tử tinh bột thì hệ thống chuyển thành dung dịch (hoà tan). Tuy nhiên, để đạt tới trạng thái hoà tan của tinh bột còn phụ thuộc vào nhiệt độ. Ở nhiệt độ bình thường, tinh bột hấp thụ 25–50% nước, hạt vẫn chưa trương. Khi nhiệt độ tăng, khả năng hấp thụ nước cũng tăng. Với tinh bột ngũ cốc 60°C chúng hấp thụ 300% nước so với trọng lượng ban đầu, ở 70°C hấp thụ 1000% nước và khi trương nở cực đại tinh bột có thể hút đến 2500% nước.

Việc hấp phụ nước và trương nở đã được ứng dụng trong quá trình chế biến công nghiệp để cải thiện sự hoà tan các sản phẩm bột hoà tan (cà phê hoà tan, sữa bột, bột hoa quả...). Quá trình này bắt đầu bằng việc làm ẩm đến khoảng 10–12% nước (ví dụ cho sữa) để hoà tan một phần các cấu tử. Các hạt được kết dính dễ dàng và tạo được một tập hợp các lỗ rỗng lớn có đường kính trung bình khoảng $200\text{ }\mu\text{m}$, sau đó được sấy khô để bảo quản. Sự phân tán này có thể được cải thiện bởi các chất hoạt động bề mặt như lecitin.

b) Khả năng giữ nước

Khả năng giữ nước của một nguyên liệu được biểu thị bởi một lượng nước nhỏ liên kết chặt trong cấu trúc ($0,2 - 0,5\text{ g/g}$ vật liệu khô). Chúng có thể do :

– Áp suất thẩm thấu được tạo bởi các chất hòa tan trong tế bào có màng bán thẩm.

– Do lực mao dẫn tạo bởi sự chênh lệch nồng độ của các cấu tử hòa tan (lực này càng mạnh khi kích thước của các cấu tử càng nhỏ, ví dụ thực tế cho thấy việc tách nước của các hạt formalin nhỏ thường rất khó hoặc trong các dung dịch polysaccharit đậm đặc).

* Một số yếu tố ảnh hưởng tới khả năng giữ nước :

– Nồng độ các cấu tử : nước hấp thụ tổng số sẽ tăng cùng với nồng độ chất hòa tan.

– pH môi trường : đóng vai trò quan trọng trong khả năng giữ nước của protein : pH thay đổi sẽ làm thay đổi sự ion hoá và sự tích điện của phân tử protein dẫn đến sự thay đổi lực đẩy và lực hút giữa các protein. Do đó sẽ làm thay đổi khả năng kết hợp với nước của phân tử protein. Ở pH đẳng điện, tương tác protein – protein là cực đại và khả năng hydrat hoá là cực tiểu. Ở pH axit hoặc bazơ khả năng giữ nước tăng do làm tăng lực đẩy tĩnh điện của các nhóm NH_3^+ (môi trường axit) hoặc của nhóm COO^- (môi trường trung tính hoặc kiềm). Với các polysaccharit tích điện âm, khi pH tăng cũng làm tăng khả năng giữ nước.

– Nhiệt độ : Nhiệt độ tăng làm giảm các liên kết hydro sẽ giảm khả năng giữ nước. Khi đun nóng, protein bị biến tính và tập hợp lại, giảm bê mặt của phân tử do đó cũng giảm khả năng giữ nước.

– Bán chất và nồng độ các ion : ở nồng độ muối thấp khả năng giữ nước tăng (ví dụ, khi có mặt NaCl 3 – 8% chúng sẽ đính thêm vào phân tử protein, mở rộng mạng lưới phân tử). Ở nồng độ muối cao, khả năng giữ nước có thể giảm do các ion (Na^+ , Cl^-) sẽ trung hoà các nhóm tích điện của phân tử protein.

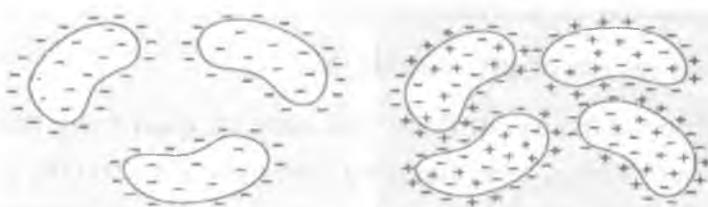
– Diện tích bê mặt của các tiểu phân : khả năng giữ nước của một chất còn phụ thuộc vào số lượng vị trí gắn kết với nước trên bê mặt cũng như vào độ rỗng của các tiểu phân. Đường kính của mỗi lỗ rỗng cũng ảnh hưởng tới tốc độ vào ra của nước. Ví dụ, việc tăng diện tích bê mặt bởi việc biến tính các phân tử protein hình cầu sẽ làm lộ ra các nhóm phân cực ion hoá và các nhóm amin của liên kết peptit sẽ làm tăng khả năng hydrat hoá lên khoảng 10%.

Việc xác định khả năng giữ nước của một chất đôi khi vẫn còn dựa vào kinh nghiệm và phần lớn các phương pháp như nhỏ giọt, ép, ly tâm... chỉ phù hợp với những sản phẩm không hòa tan. Ví dụ, đối với các phương pháp này sẽ không thể áp dụng để đo khả năng giữ nước của casein. Hơn nữa, lực cần thiết để tách nước khỏi mạng lưới không gian của các mẫu phụ thuộc vào cấu trúc và vào kích thước các lỗ mạng nên các phương pháp được sử dụng (thiết bị Bauman, máy ly tâm...) cũng chỉ có thể được dùng để so sánh giữa các mẫu với nhau.

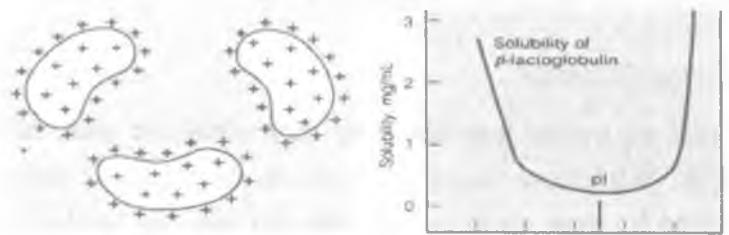
c) *Khả năng hòa tan*

Sự hòa tan là sự phân tán các cấu tử thành phần vào trong một dung môi, đảm bảo bề mặt tiếp xúc liên pha giữa chúng là tối đa. Các yếu tố ảnh hưởng tới độ hòa tan chủ yếu gồm pH, lực ion, kiểu dung môi và nhiệt độ.

– Với pH có ảnh hưởng tương tự như khả năng giữ nước. Khi pH cao hơn hoặc thấp hơn điểm đằng điện, protein sẽ tích điện âm hoặc dương làm tăng khả năng hòa tan, ở điểm đằng điện khả năng hòa tan của protein là thấp nhất.



a) pH cao : protein hòa tan (anion hóa) b) Điểm đằng điện : prôtêin kết tụ



c) pH thấp : protein hòa tan (proton hóa) d) Khả năng hòa tan của β lactoglobulin

Hình 1.3. Ảnh hưởng của pH tới độ hòa tan của protein

- Các ion của muối trung tính ở nồng độ trên 1M sẽ làm giảm khả năng hòa tan của protein, khi đó chúng sẽ lấy lớp vỏ nước bao quanh phân tử protein và tạo điều kiện cho chúng tập hợp lại.
- Các dung môi như etanol, axeton làm giảm hằng số điện môi của môi trường, làm giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các phân tử dẫn đến làm giảm khả năng hòa tan của protein.

d) Khả năng tạo nhớt

Độ nhớt là một trong những tính chất quan trọng góp phần tạo nên kết cấu cho các sản phẩm dạng lỏng.

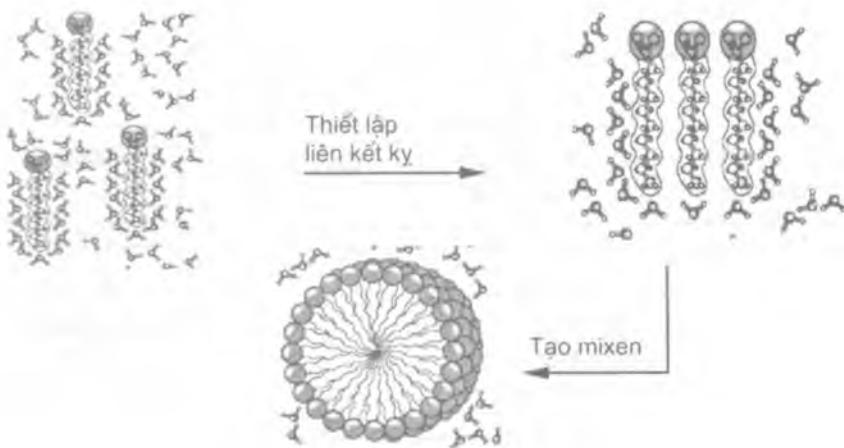
Yếu tố chính ảnh hưởng tới độ nhớt của một dung dịch là đường kính biểu kiến của các hạt phân tán. Đường kính này phụ thuộc vào các yếu tố sau :

- Đặc tính bên trong của cấu tử phân tán : khối lượng, kích thước, thể tích, cấu trúc và sự bất đối xứng của phân tử.
- Tương tác của các cấu tử với dung môi (nước) gây ảnh hưởng tới khả năng hydrat, khả năng hòa tan và sự trương nở.
- Tương tác của các cấu tử với nhau.
- Nồng độ các cấu tử, pH, nhiệt độ, ion.

Hiểu biết độ nhớt của các dung dịch cũng rất quan trọng để tối ưu hoá các công đoạn như bơm, trộn, đun nóng, làm sạch, sấy khô (sấy phun) trong quá trình chế tác các sản phẩm dạng lỏng cũng như xác định được các thuộc tính lưu biến của một dung dịch (nhớt, nhớt dẻo, dẻo, đàn hồi).

e) Khả năng tạo mixen

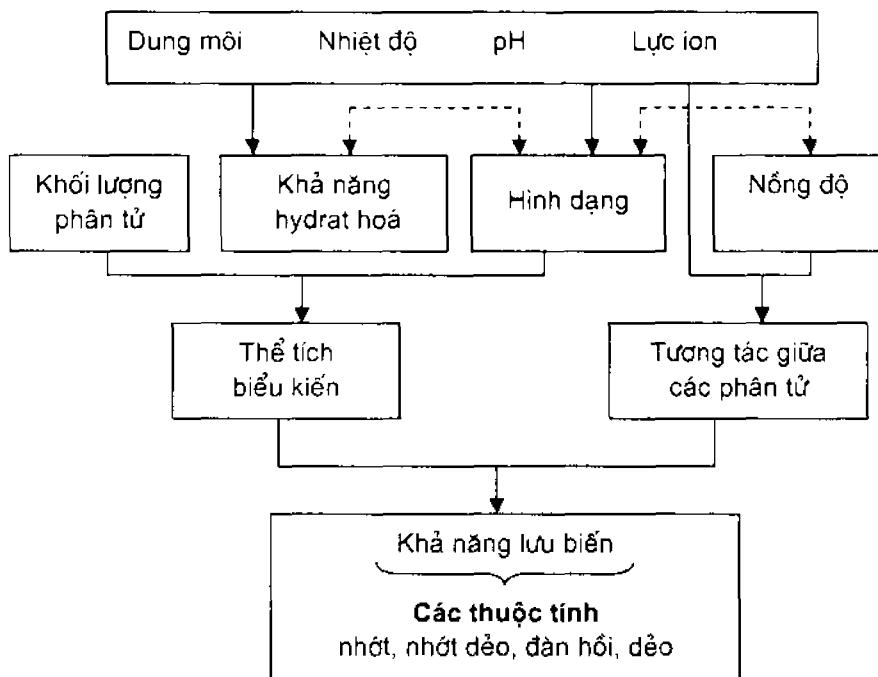
Trong một số trường hợp khi dung dịch chứa các phân tử lưỡng cực (protein, lipit, vitamin) sẽ có sự giảm tối đa các phân tử nước xếp xung quanh các phân tử nước và khi đó độ bền cấu trúc của hệ được quyết định chính bởi các liên kết ky nước. Mặt khác do xu hướng bền nhiệt động một số cao phân tử thường kết tập lại tạo các mixen và được giữ bền cấu hình bởi các liên kết ky nước (hình 1.4).



Hình 1.4. Sự thiết lập các mixen của các phân tử lưỡng cực trong dung dịch

Tóm lại, thuộc tính cấu hình của một dung dịch phụ thuộc vào nhiều yếu tố (hình 1.5). Tuy nhiên, dựa theo bản chất và hình dạng của các cao phân tử có thể đưa ra một vài nhận xét chung như sau :

- Khi ở cùng một nồng độ các dung dịch polysaccarit có độ nhớt cao hơn so với các dung dịch protein.
- Các protein hình cầu cho dung dịch ít nhớt hơn so với các protein dạng sợi hoặc protein biến tính.
- Khi một dung dịch chứa các đại phân tử có khả năng ion hoá và tích điện thì độ nhớt của chúng có thể được kiểm soát bởi lực đẩy tĩnh điện, bởi lực ion hoá hoặc bởi việc thêm vào dung dịch các cation hai và đa hoá trị.
- Sự xuất hiện các đại phân tử trong dung dịch làm rối loạn sự tạo thành các tinh thể đá nhỏ (ví dụ trong quá trình làm kem, các đại phân tử đóng vai trò cơ học ngăn cản sự tăng về kích thước các tinh thể đá).
- Thuộc tính hydrat cũng đóng một vai trò quan trọng đối với các thuộc tính bề mặt (sự tạo bọt, tạo nhũ tương) do chúng ảnh hưởng tới khả năng khuếch tán các phân tử tới bề mặt liên pha và tạo ra các màng liên pha nhớt.



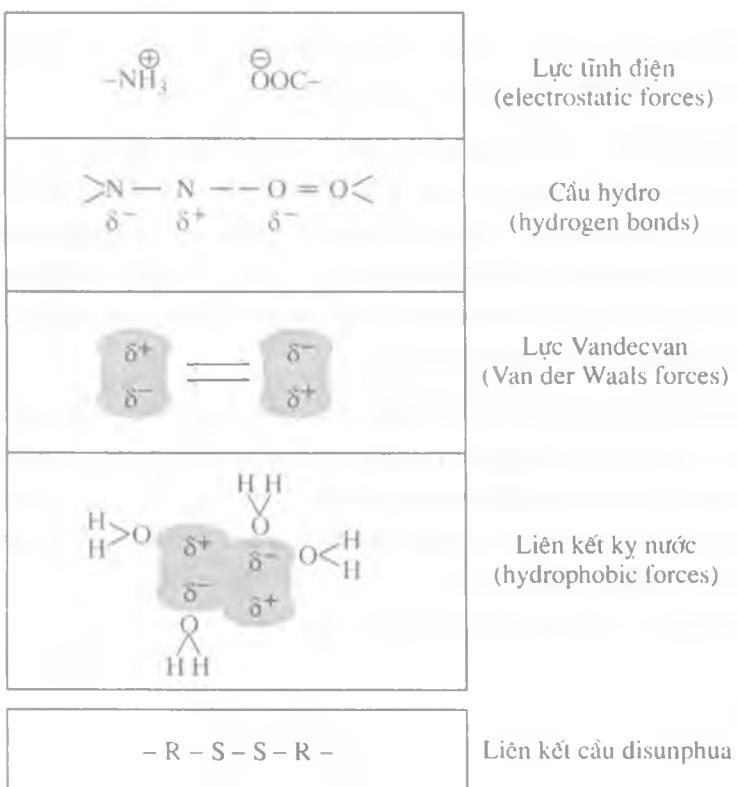
Hình 1.5. Các yếu tố xác định thuộc tính lưu biến của các dung dịch đại phân tử

1.3. Thuộc tính tương tác giữa các đại phân tử

1.3.1. Các lực tham gia trong tương tác của các đại phân tử

Sự tương tác giữa các đại phân tử thường được thiết lập và duy trì nhờ các lực hấp dẫn có năng lượng nhỏ ($<10 \text{ kcal/mol}$) (hình 1.6), ví dụ như :

- Lực tĩnh điện giữa các nhóm COO^- và nhóm NH_3^+ đối diện nhau của các axit amin trong chuỗi peptit.
- Các liên kết hydro giữa các nguyên tử H^+ và N^- hoặc O^-
- Lực Vandeecvan do sự di động của các đám mây electron giữa hai phân tử.
- Các liên kết ky nước giữa các gốc ky nước của axit amin, vitamin, axit béo...
- Liên kết cầu disunphua giữa hai nhóm $-\text{SH}$ đối diện nhau của các chuỗi polyme chứa lưu huỳnh.



Hình 1.6. Các lực tham gia trong tương tác giữa các đại phân tử.

1.3.2. Khả năng tạo bong và kết tụ

Trong quá trình khử bẩn một dung dịch như do sự phá vỡ sự cân bằng giữa lực hút và lực đẩy hay thay đổi các yếu tố môi trường như pH, lực ion, nhiệt độ... các đại phân tử có xu hướng tự kết tụ lại. Xu hướng thiết lập cân bằng về một hệ bền mới thường xảy ra chậm (thường từ vài giờ đến vài ngày).

Các ion của các dung dịch muối trung tính có khả năng trung hòa điện tích của các nhóm tích điện trên bề mặt các cầu tử tạo ra sự kết tụ các phân tử lai với nhau. Mức độ ảnh hưởng của các ion được cho theo trật tự sau :

- Với các ion hoá trị một : $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$
- Với ion hoá trị hai : $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$

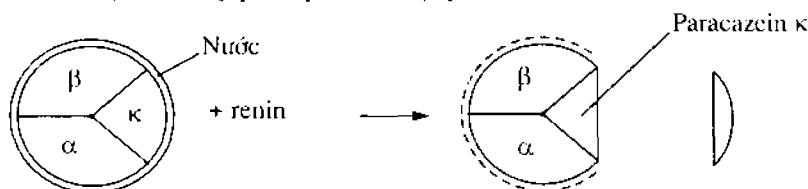
Quá trình tạo bong, kết tụ cũng có thể xảy ra do sự có mặt của các ion hoá trị 2 tạo cầu ion giữa các nhóm tích điện âm (COO^-) của protein hoặc của polysaccharit (pectin, alginat...). Quá trình này phụ thuộc rất chặt chẽ vào

pH và pKa của các nhóm ion hoá và thường xảy ra ở vùng pH trung tính và vùng kiềm. Nếu nồng độ polyme đủ lớn nó sẽ tạo gel.

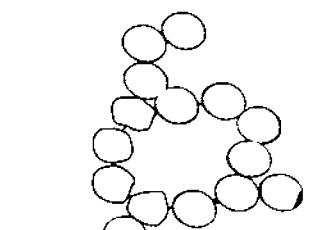
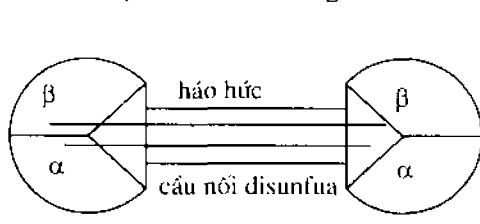
Một dạng khác của việc tạo bông và kết tụ rất thường hay xảy ra trong quá trình tạo gel protein bởi nhiệt. Khi phá vỡ các cầu disunphua nội phân tử làm đuôi mạch một phân tử sắp xếp lại cấu trúc, các vị trí hoạt động (nhóm thiol, nhóm hydrophop, các nhóm ion hoá...) của các phân tử khác nhau sẽ tự liên kết lại với nhau để tạo bông hoặc kết tụ nếu như nồng độ protein đủ lớn cho phép các chuỗi đan xen vào nhau.

Trong một số trường hợp sự khử bẩn một dung dịch còn xảy ra bởi tác động của enzym như trường hợp đông tụ casein trong sản xuất phomat nhờ tác động của renin loại nhóm glucopeptit tích điện âm khỏi mixen casein làm lộ phần kỵ nước tăng khả năng kết tụ các hạt mixen lại với nhau dưới sự có mặt của ion canxi (hình 1.7).

* Giai đoạn 1 : thuỷ phân protein một phân



* Giai đoạn 2 : hình thành gel



* Giai đoạn 3 : thuỷ phân hoàn toàn (sự chín) với sự giải phóng peptit

Hình 1.7. Sự đông tụ casein trong sản xuất phomat

Sự tạo bông xảy ra khi các tương tác trên không bền và có tính chất thuận nghịch, phụ thuộc nhiều vào nhiệt độ. Ngược lại, sự đông tụ thường là bất thuận nghịch do lực đẩy của các phân tử hấp thụ trên bề mặt các tiểu phân là khá nhỏ.

1.3.3. Khả năng tạo gel

Khả năng tạo gel là một tính chất chức năng quan trọng trong việc tạo cấu trúc, hình thái cho nhiều sản phẩm. Gel được tạo ra khi các đại phân tử (protein, polysaccharit) bị biến tính tập hợp lại thành một mạng lưới không gian có trật tự. Ví dụ, khi protein bị biến tính, các cấu trúc bậc cao bị phá hủy, liên kết giữa các phân tử bị đứt, mạch peptit bị dãn ra làm lộ ra ngoài các mạnh bên. Trong điều kiện gia công nhất định các chuỗi peptit trở nên gần nhau và liên kết với nhau thành một mạng lưới không gian 3 chiều vô định hình, rắn, chứa dây pha phân tán là nước. Các nút mạng protein thường được giữ bền bởi các liên kết sau :

- Liên kết hydro (giữa các liên kết peptit, giữa nhóm OH của Ser, Thr, Tyr với các nhóm COOH của Glu, Asp). Các liên kết hydro là liên kết yếu tạo cho gel có độ mềm dẻo và linh động.
- Liên kết tĩnh điện giữa các nhóm tích điện ngược dấu (OH^- , COO^- , với NH_3^+)
- Liên kết giữa các nhóm tích điện cùng dấu qua các ion da hoá trị (Ca^{2+}).
- Liên kết cầu disunphua.

*** Các cách tạo gel :**

– Gel tạo bởi quá trình chuyển hệ sol – gel

Trong trường hợp này thường bắt đầu bằng sự gia nhiệt các dung dịch cao phân tử ở nồng độ cao (protein trên 6–7%, polysaccharit trên 0,5%) gây ra sự biến tính dãn mạch, tiếp đó hạ nhiệt là cần thiết để thiết lập nên mạng lưới gel có trật tự của các đại phân tử. Mạng được giữ bền bởi các liên kết hydro, trong một vài trường hợp, sự có mặt của các cation hoá trị 2 (ion canxi) sẽ làm tăng tốc độ tạo gel hoặc tăng độ cứng cho gel (alginat, pectin). Quá trình tạo gel này phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ và pH môi trường.

– Gel tạo bởi việc tạo ra bởi các liên kết đồng hoá trị

Trường hợp này các đại phân tử tương tác với các tác nhân hai hoặc đa hoá trị để tạo các cầu đồng hoá trị giữa các chuỗi. Sau quá trình khử nước, các gel này có thể thu được một cấu trúc lỗ rỗng chắc chắn.

Khi có mặt của nước, các gel thường bị trương lên. Quá trình trương dừng lại khi áp suất nội tại cân bằng với áp suất thẩm thấu của dung dịch. Mạng lưới gel được hình thành như một màng bán thẩm.

1.4. Thuộc tính bê mặt

1.4.1. Khái niệm và các yếu tố ảnh hưởng tới thuộc tính bê mặt

a) Sức căng bê mặt

Trong lòng một chất lỏng tất cả các phân tử chịu tác động của một trường lực hút cân bằng (lực Vandecvan), tuy nhiên các phân tử trên bê mặt chất lỏng lại nằm trong một trường lực không cân bằng. Trong trường hợp bê mặt khí/lỏng, các phân tử của dung dịch sẽ bị hút vào trong lòng chất lỏng bởi một năng lượng tự do khá lớn. Cùng một hiện tượng cũng được quan sát thấy trên bê mặt liên pha giữa hai pha lỏng không trộn lẫn nhau, năng lượng bê mặt này được tạo ra do sự chênh lệch lực hút các cầu từ về hai lòng chất lỏng.

Năng lượng bê mặt tương ứng với một công trên một đơn vị diện tích bê mặt và được biểu diễn bằng J/m^2 . Trên mặt phẳng 2 chiều nó tương ứng với một lực trên một đơn vị chiều dài (N/m).

Giá trị của lực này phụ thuộc vào dung môi, vào sự có mặt của các cầu từ hoà tan. Ở trạng thái cân bằng, sức căng bê mặt là một hàm của nồng độ các cầu từ hoà tan trong dung dịch. Về mặt lý thuyết, sức căng bê mặt sẽ giảm khi nồng độ các cầu từ trong dung dịch tăng cho tới khi đạt tới một giá trị nhất định (giá trị mà từ đó tạo ra các hạt phân tử hoạt hoá).

Việc khuyếch tán và hấp phụ các phân tử lên bê mặt liên pha thường xảy ra chậm vì các phân tử tới màng trước thường chống lại sự hấp phụ của các phân tử tới sau và cũng đòi hỏi một quá trình xấp xếp lại các cầu từ trước khi đạt tới sự bão hòa bê mặt.

b) Hấp phụ các chất hoạt động bê mặt

Có hai dạng chất hoạt động tập trung ở bê mặt liên pha là chất hoạt động hoà tan trong chất béo và chất hoạt động hoà tan trong nước (ion hoá và không ion hoá).

– *Chất hoạt động hoà tan trong chất béo* : đó là những phân tử chứa một đầu kỵ nước như các chuỗi hydrocacbon C_8 và C_{18} và một đầu hào nước như những nhóm rượu (OH), axit ($COOH$) hoặc amin (NH_2), ví dụ như laury alcool.

– *Chất hoạt động hoà tan trong nước* : Mặc dù chứa một chuỗi béo nhưng các chất này hoà tan trong nước nhờ các nhóm chức như COO^- (xà phòng chứa Na^+), nhóm sunphat, sunphomat ($-SO_4^-$, $-SO_3^-$).

– *Chất hoạt động không ion hoá* : Các chất này có khả năng hòa tan trong nước hoặc trong chất béo do trong phân tử của chúng chứa các nhóm $-O-CH_2-CH_2-$ được gắn vào các vị trí khác nhau của bộ khung hydrocacbua. Nhóm hao nước là do phân tử oxy, do vậy khả năng hòa tan trong nước càng cao khi số nhóm oxy etylen càng nhiều. Tween (20 hoặc 80) là một trong những chất hay gấp nhất trong nhóm chất này.

Các chất thuộc nhóm này thường được đặc trưng bởi tỷ lệ giữa các nhóm hao nước với các nhóm kỵ nước. Thông thường tỷ lệ này dao động trong khoảng 0 – 30 và được biểu thị bằng chữ cân bằng thân dầu thân nước HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance). Ví dụ monostearat glycerol HLB=3,8. Một chất hoạt động bề mặt có giá trị HLB thấp (ví dụ 3) sẽ có xu hướng hòa tan nhiều trong dầu hơn là trong nước. Nếu HLB < 7 sẽ hòa tan trong dầu, còn HLB > 7 sẽ hòa tan trong nước.

c) *Hấp phụ bề mặt các polyme*

Các polysaccarit và đặc biệt là các protein thường có chứa các mạch bên kỵ nước hoặc hao nước nên chúng có thể hấp thụ tốt lên bề mặt liên pha về hướng kỵ nước cũng như hướng hao nước tùy thuộc vào thành phần của chúng, do đó sẽ làm giảm sức căng bề mặt.

Các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng hấp phụ các polyme lên bề mặt liên pha :

– Quá trình hấp thụ này được cải thiện hơn khi các phân tử ở trạng thái biến tính, cấu trúc bậc cao bị phá huỷ làm tăng độ linh động của các chuỗi polyme.

– Tốc độ khuếch tán và hấp phụ các phân tử phụ thuộc vào nồng độ các cấu tử trong dung dịch. Vượt trên một nồng độ nhất định, khi các phân tử muốn bám vào bề mặt liên pha sẽ phải được cấp một công để thăng các phân tử đã được hấp thụ trước đó. Với môi trường kiềm, các phân tử càng dãn mạch đòi hỏi công càng phải cao nhưng nồng độ liên pha hay lớp protein liên pha lại giảm.

– Khả năng hấp phụ các phân tử protein và polysaccarit lên bề mặt liên pha còn phụ thuộc vào độ linh động của các chuỗi polyme và vào khả năng dãn mạch của chúng. Ví dụ β cazein, một protein không có cấu trúc bậc 3 hấp phụ lên bề mặt nhanh hơn nhiều so với lysozym do chúng có độ linh động và khả năng dãn mạch lớn tùy theo các đặc tính của môi trường.

– Khả năng hấp phụ lên bề mặt liên pha phụ thuộc vào cấu trúc và nồng độ của protein. Lysozym thường có hoạt tính bề mặt kém khi ở nồng độ thấp và tăng lên khi ở nồng độ cao. Điều này có thể giải thích dựa trên cấu trúc của chúng. Lysozym có cấu trúc hình cầu, chứa nhiều cấu trúc xoắn α-helix và cầu disunphua S – S nên ít linh động và khá rắn chắc, các gốc kỵ nước phân bố bên trong còn các gốc hào nước được phân bố ở bên ngoài phân tử. Để các phân tử có thể bám vào bề mặt liên pha khí/nước, chúng cần phải có một vài gốc không phân cực ở bề mặt. Khi nồng độ protein tăng lên sẽ làm tăng sự tương tác giữa các phân tử protein gây ra sự gấp nếp và sắp xếp lại phân tử, làm tăng sự biểu hiện các gốc kỵ nước ra phía bề mặt. Nồng độ protein cực đại ở bề mặt liên pha phụ thuộc vào mỗi loại protein nhưng thường dao động 4 – 9mg/m² khi nồng độ dung dịch protein là 10mg/ml. Nhiều kết quả cũng được tìm thấy tương tự với bề mặt liên pha nước/lipit. Trong trường hợp này lipit hoà tan các gốc kỵ nước hơn so với pha khí.

d) Các yếu tố khác ảnh hưởng tới khả năng hấp thụ vào bề mặt liên pha

– pH đóng vai trò quan trọng trong trường hợp của các phân tử có cấu trúc cuộn thống kê. Sự dịch chuyển của casein tới bề mặt liên pha là cực đại ở giá trị pI (mặc dù độ hoà tan của chúng thấp) do khi đó không còn lực đẩy tĩnh điện phân tử hấp phụ với cấu trúc chặt chẽ, ít cồng kềnh.

– Các protein được biến tính trước bởi nhiệt hoặc hoá học cũng làm tăng tốc độ hấp phụ.

e) Cấu trúc và thuộc tính của các màng liên pha

Độ dày của các lớp màng liên pha phụ thuộc vào nồng độ các cấu tử bề mặt. Với các protein hình cầu cho màng dày hơn so với các protein hình sợi. Với các protein hình sợi ngay cả khi có sức căng bề mặt thấp cũng thường tạo nên những màng ít nhót. Ngược lại, với các protein hình cầu thường tạo được các màng có tính dẻo và đàn hồi. Các polysaccharit thường cải thiện độ nhớt và tạo ra các màng gel hoặc tạo phức hợp gel hoá với các phân tử protein.

1.4.2. Khả năng tạo nhũ tương

Nhũ tương là một hệ phân tán của hai chất lỏng không trộn lẫn nhau, trong đó một chất ở dưới dạng những giọt nhỏ (0,1 – 10μm) của pha

phân tán, còn chất kia ở pha liên tục. Có hai dạng nhũ tương nếu đi từ hỗn hợp nước/dầu :

- Giọt dầu trong nước : O/W (Oil in Water).
- Giọt nước trong dầu : W/O (Water in Oil).

Để duy trì hệ nhũ tương cần phải có tác nhân nhũ hoá. Sữa là một hệ nhũ tương tự nhiên dầu trong nước với protein casein đóng vai trò là tác nhân nhũ hoá. Tác nhân nhũ hoá yêu cầu có một dầu hydrophil tương tác với nước và một dầu hydrophobic tương tác với dầu hoặc lipid. Trong trường hợp protein là tác nhân nhũ hoá thì thuộc tính này do các axit amin hydrophil và hydrophobic trên chuỗi protein đảm nhiệm.

a) *Tạo nhũ tương*

Quá trình tạo nhũ tương liên quan tới việc làm tăng diện tích bề mặt liên pha đồng thời làm tăng năng lượng tự do.

Nhũ tương được tạo thành nhờ các lực cơ học. Sức căng bề mặt càng nhỏ, nhũ tương tạo ra càng dễ. Vai trò nhũ hoá của các chất hoạt động bề mặt là làm giảm năng lượng tự do bởi việc hấp phụ vào bề mặt liên pha. Trong trường hợp các polyme, chúng tạo thành một màng liên pha kết dính và chắc xung quanh các hạt của pha phân tán, nếu như các màng này là protein hoặc là các phân tử tích điện thì chúng sẽ góp phần làm bền hệ nhũ tương nhờ các lực đẩy tĩnh điện. Các hệ thống đông hoà, máy tạo giọt (theo nguyên lý xoắn, vặn, va đập) và nhiệt độ (độ lỏng được gia tăng khi ở nhiệt độ cao) thường được sử dụng ở mức độ phòng thí nghiệm hoặc công nghiệp.

b) *Làm bền và khử bền hệ nhũ tương*

Nhũ tương là hệ thống không bền nhiệt động, các giọt có khuynh hướng hợp giọt với nhau để tạo thành giọt to hơn, cuối cùng phân thành hai lớp, tách nhau và không thành nhũ tương nữa.

c) *Làm bền hệ nhũ tương*

- Tăng độ nhớt : là việc bổ sung vào môi trường các polysaccarit có khối lượng phân tử lớn (10^6 Dal) như guar gum, xanthan, alginat...
- Giảm sức căng bề mặt liên pha bằng cách bổ sung các chất hoạt động bề mặt có cấu trúc lưỡng cực để chúng có khả năng hướng phân hào nước và ưa béo của chúng vào hai phía của bề mặt liên pha.

– Cho các chất điện ly vô cơ vào làm cho các giọt tích điện cùng dấu và đẩy nhau.

d) *Sự khai bén hệ nhũ tương*

– Ly tâm : quá trình này có tác dụng nén các giọt lại với nhau và sẽ dẫn đến việc tạo bong hoặc kết tụ.

– Sốc nhiệt : sự thay đổi nhiệt độ đột ngột qua quá trình đóng đá tiếp đến già đóng sẽ phá huỷ hệ nhũ tương.

1.4.3. *Khả năng tạo bọt*

a) *Khái niệm*

Bọt là hệ phân tán của các bong bọt trong một pha liên tục là chất lỏng hoặc chất nửa rắn, có chứa một chất hoạt động bề mặt hòa tan (kem ướp lạnh, bọt kia, bọt bánh mỳ...). Các bong bọt thường chứa không khí hoặc CO₂ có áp suất bên ngoài. Màng lỏng bao quanh bong bọt rất mỏng và có năng lượng dư bề mặt lớn, dễ tác động với nhau, dễ gây hiện tượng nứt, vỡ cục bộ.

b) *Đặc điểm của sự tạo bọt*

Để các bọt được bền, yêu cầu màng bao quanh bọt phải dàn hồi và không thấm khí, protein thường được bổ sung vào dung dịch của một chất làm bền bọt (lòng trắng trứng, máu, protein đậu tương...) hoặc tăng độ nhớt của dung dịch lòng lên bằng các polysaccarit hoặc protein.

Các protein tạo bọt yêu cầu phải có khả năng co dãn và linh động gần giống như một miếng cao su mềm chịu được các tác dụng của các lực kéo và nén mạnh. Khả năng này của protein có thể thu được khi làm biến tính, kéo dãn chuỗi polypeptit để đưa các vùng kỵ nước của chúng từ phía trong lòng phân tử ra phía bên ngoài tạo điều kiện tiếp xúc với pha khí hay pha kỵ nước. Khả năng này cũng có thể có được từ lực tương tác trên phạm vi rộng giữa các phân tử protein và đạt giá trị lớn nhất tại điểm đẳng điện của protein – điểm mà lực đẩy tĩnh điện giữa các phân tử protein là nhỏ nhất.

Sự tạo bọt được đặc trưng bởi chỉ số dãn nở bọt (FEI – Foam Expansion Index) và độ bền của bọt (FLS – Foam Liquid Stability).

Bảng 1.2. Chỉ số FEI và FLS của một số protein

Protein	FEI (%)	FLS (%)
BSA (huyết thanh bò)	280	12
Protein của whey	600	21
Albumin trứng	240	24
Cazein	460	14
Đậu tương (dã thuỷ phân)	500	10
Gelatin	760	55
Lysozym	0	0

Bọt được tạo bởi các màng protein sẽ thường bền và có khả năng chống chịu tốt với các lực xé/kéo do chúng làm giảm sức căng bề mặt gây ra bởi các lực liên kết của các phân tử nước có xu hướng làm vỡ bóng bọt hoặc chúng có khả năng co dãn cao. Bọt được tạo ra khi thực hiện việc khuấy và đảo trộn mạnh dung dịch protein. Khi đó không khí được đưa vào khối dịch protein và khi chúng cố thoát ra khỏi lớp protein linh động sẽ tạo nên những bóng bọt trong khối dịch.

Khả năng tạo bọt và độ bền của bọt phụ thuộc vào từng loại protein khác nhau. Ví dụ, BSA có độ tạo bọt thấp hơn mức trung bình. Cazein tạo bọt tốt nhưng bọt không bền. Protein của trứng tạo bọt không nhiều nhưng bọt khá bền, gelatin vừa cho khả năng tạo bọt cao và bọt tạo ra khá bền. Lysozym không có khả năng tạo bọt do lực đẩy tĩnh điện.

Khả năng tạo bọt còn phụ thuộc vào pH do chúng ảnh hưởng tới khả năng tương tác giữa các phân tử protein – protein, ở giá trị pH đẳng điện lực đẩy tĩnh điện giữa các chuỗi protein là cực tiểu. Nhiệt độ cũng thúc đẩy sự biến tính bề mặt của protein, cho phép các chuỗi protein tương tác với các pha khí/lỏng/béo mạnh hơn. Khả năng tương tác protein – protein được cải thiện khi bổ sung vào dung dịch một protein tích điện trái dấu. Ví dụ, lysozym là một protein kiềm tính sẽ tương tác mạnh với các protein trung tính và axit tính. Các chỉ số tạo bọt được cải thiện khi BSA được trộn vào với lysozym nhưng không thay đổi khi trộn protein của trứng vào.

Bảng 1.3. Chỉ số FEI và FLS của một số protein kết hợp

Proteins	FEI %	FLS %
BSA + lysozym	760	69
Whey protein + lysozym	780	47
Protein trứng + lysozym	220	26
Protein đậu tương (đã thuỷ phân) + lysozym	550	26
Gelatin + lysozym	860	52

c) *Síết vỡ bọt*

Bọt vỡ thường do 3 cơ chế chính sau :

– Sự không cân đối của các bóng bọt : Các bóng bọt giảm thể tích theo thời gian bởi không khí khuếch tán từ phía trong ra ngoài, điều này là do áp suất trong bóng bọt cao hơn so với áp suất khí quyển.

– Bọt vỡ : Các bóng bọt nhanh chóng kết hợp thành khối, làm xuất hiện các lực kéo và đẩy từ đó tạo ra các lỗ hổng giữa hai bóng khí.

– Sự thoát nước : Nước quanh bóng khí sẽ khô tự nhiên tạo thành một lớp nước, làm loại bỏ protein ra khỏi màng quanh bóng bọt làm màng sẽ trở nên rất mỏng dễ vỡ.

Đôi khi trong một số quá trình lại đòi hỏi sự khử bọt (trường hợp môi trường lên men). Các tác nhân khử bọt có thể là :

- Tác nhân cơ học (cho dòng khí nóng).
- Chất chống bọt : các chất khử sự hấp thụ các tác nhân tạo bọt (ete, n-butanol, axit capric...).
- Khử bọt xà phòng bởi nước cứng, canxi sẽ tạo với xà phòng thành các tiểu phần không hòa tan và phá vỡ các màng liên pha.

1.5. Một số kỹ thuật tạo cấu trúc

1.5.1. Các giai đoạn chính trong tạo cấu trúc

Các quá trình tạo cấu trúc thường bao gồm nhiều công đoạn kế tiếp nhau tương ứng với những trạng thái cấu hình khác nhau.

a) Biến tính : Nhằm phá huỷ một phân cấu trúc không gian tự nhiên của các phân tử bằng việc phá vỡ một số liên kết yếu (liên kết hydro, hydrophobe và cầu disunphua). Tác nhân gây biến tính : xử lý nhiệt (lạnh hoặc nóng), cơ học (nghiền, chà...), xử lý bằng các tác nhân oxy hoá hoặc khử (oxy hoá cầu disunphua), bằng các tác nhân hydrophobe (dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa), tác nhân enzym (renin), thay đổi pH môi trường và nồng độ muối cũng có thể tách các liên kết ion.

b) Thiết lập và định hình : Trong giai đoạn này các đại phân tử đã biến tính một phần hoặc toàn bộ sẽ được tạo gel, tạo sợi, tạo màng bằng việc sắp xếp lại các phân tử. Thông thường việc định hình các phân tử đạt được bằng phương pháp ép dùn (tạo sợi, tạo miếng) hoặc kết tủa bề mặt là phương pháp rất hay được dùng trong kỹ thuật tạo cấu trúc truyền thống (tạo màng).

c) Cố định và làm bền : Các cấu trúc thu được ở trên nhờ việc phân bố lại các liên kết nội phân tử bị phá huỷ ở giai đoạn biến tính tạo ra các mạng lưới mong muốn.

1.5.2. Một số kỹ thuật tạo cấu trúc

Các kỹ thuật cơ – nhiệt :

* *Quá trình tạo sợi* :

Quá trình tạo sợi từ protein đậu tương được thực hiện qua các công đoạn sau :

- Tạo isolat đậu tương (có hàm lượng protein trên 85,8%, pH = 8 – 10).
- Ép dùn qua lưới (có các lỗ có kích thước 50 – 200 μm).
- Sợi ra được nhúng ngập trong bồn đông tụ chứa axit (lactic, axetic hoặc photphoric) pH = 2 – 4.
- Sợi được tiếp tục đưa qua một bồn rửa có pH trung tính.
- Sợi được đưa sấy khô tạo sản phẩm.

Để tạo sợi, protein phải có một số tính chất sau :

- + Phân tử biến tính hoặc mạch thẳng phải có độ dài tối thiểu 100mm.
- + Phân tử phải chứa một số lớn các nhóm phân cực cho phép tạo các liên kết giữa các phân tử.
- + Khối lượng phân tử nằm trong khoảng 10000 đến 50000 Dalton (Da) (nếu M quá cao độ nhớt tăng sẽ gây khó khăn cho quá trình kéo sợi, nếu M nhỏ, sợi dễ đứt).

+ Thuộc tính của sợi có thể được cải thiện nhờ xử lý hoá học bởi foocmol hoặc axetic acid. Một số phụ gia cũng thường được sử dụng như gluten (vài %) cải thiện độ bền cơ học. Lipit tạo cho sợi protein mềm trong khi đó tinh bột làm tăng khả năng hydrat hoá và giữ nước.

Các protein dạng sợi được chế tác đầu tiên là ovalbumin, collagen, casein, isolat đậu tương.

Sợi tinh bột là sự chập lại của rất nhiều phân tử amiloza và amilopectin. Sợi được tạo thành khi ép dùn dịch tinh bột đã được hồ hoá qua một bún có đặc lỗ. Khi qua lỗ các phân tử tinh bột sẽ có xu hướng kéo căng ra và tự sắp xếp song song với nhau theo chiều của dòng chảy. Các sợi vừa ra khỏi khuôn được nhúng ngay vào một bể đựng nước nóng để định hình, tiếp đó sợi được chuyển sang bể nước lạnh để các phân tử liên hợp lại với nhau được chặt hơn.

Độ dai hay độ bền đứt của toàn sợi là do lực tương tác giữa các phân tử cũng như lực tương tác nội phân tử quyết định. Sợi của các tinh bột chứa nhiều amiloza (đậu xanh, dong giêng) thường chắc và dai hơn vì phân tử amiloza dài nên lực tương tác giữa các phân tử lớn, do đó có độ bền đứt lớn. Ngược lại, với các sợi từ tinh bột chứa nhiều amilopectin có độ bền đứt kém do các mạch nhánh của amilopectin thường rất ngắn nên lực tương tác giữa các phân tử rất yếu.

Cũng có thể thu được sợi amiloza có độ bền đứt cao bằng cách hòa tan amiloza trong dung dịch nước chứa 10% foocmaldehyt ở nhiệt độ 120°C và pH = 3 để có độ nhớt 20 – 300P. Sau đó ép dùn dung dịch qua bể đồng tụ có chứa hydrat amon hoặc hydrazin và muối vô cơ nitrat photphat.

* *Nén – ép dùn :*

Đây là một kỹ thuật được áp dụng từ rất lâu cho việc chế tác các bột nhào thực phẩm. Theo phương pháp này, vật liệu tạo cấu trúc có độ nhớt khá cao được đưa vào và nhào trộn trong một vit vô tận. Việc nén ép được đảm bảo bởi việc thít chặt sau mỗi bước vit do việc giảm không gian giữa vit và thành xylin. Sản phẩm nén chịu một lực cắt và làm nóng lên do sự cắn giữa vit và thành xylin.

Có hai dạng thiết bị thường được sử dụng : máy ép dùn đơn vit và máy ép dùn hai vit.

Chương II

CÔNG NGHỆ PROTEIN

Cho tới những năm gần đây, việc thu hồi/chiết tách protein từ các nguồn tự nhiên chủ yếu sử dụng cho công nghiệp thực phẩm. Các protein có các đặc tính quý như enzym hoặc các protein có được tính hoặc hoocmon mới được chiết tách và tinh chế. Cùng với sự phát triển, việc thu hồi các protein dạng tinh khiết và tạo cấu trúc cho chúng không còn gặp các trở ngại về kỹ thuật, do vậy xu hướng hiện nay, protein được thu nhận dạng tinh khiết theo mục tiêu sử dụng, thường dưới hai dạng : chế phẩm protein và protein dùng cho phân tích. Trên cơ sở protein thu nhận được, các dạng sản phẩm chứa protein với các cấu trúc mới được tạo ra.

Mục tiêu của thu nhận và tạo các sản phẩm từ protein khá đa dạng :

- Cải thiện tính chất dinh dưỡng của protein : Có thể đạt được mục tiêu này bằng cách loại trừ các nhân tố gây độc hoặc không có lợi vốn tồn tại trong nguyên liệu dầu hoặc tách các thành phần khác liên kết với protein làm tăng giá trị hấp thu của protein.
- Cải thiện tính chất cảm quan của protein nguyên thuỷ : Loại trừ các chất màu, chất tạo vị không phù hợp có trong nguyên liệu dầu. Mục tiêu này cũng có thể đạt được bằng cách làm giàu protein bằng cách loại đi các thành phần khác như lipit, muối... làm tăng tính chất chức năng của protein. Các protein được thu nhận và tạo các sản phẩm mô phỏng, tạo sản phẩm có tính chất cảm quan mong muốn.
- Nâng cao hiệu quả kinh tế của các sản phẩm thực phẩm chứa protein : Các nguyên liệu dầu chứa protein có thể không hấp dẫn người tiêu dùng như protein thực vật, protein cá. Công nghệ protein cho phép cải tạo tính chất chức năng của các protein này, tạo cấu trúc mới cho chúng để phát triển sản phẩm mới, nâng cao giá trị của nguyên liệu dầu.
- Thu nhận các chế phẩm protein sinh học : Các protein có hoạt tính sinh học quý có thể tìm thấy trong các nguyên liệu thực vật, động vật, vi sinh vật. Chúng có thể chỉ có ở hàm lượng rất nhỏ. Cần tách và tinh chế các

protein dạng này từ nguyên liệu đầu và cần đảm bảo tính chất sinh học quý giá của chúng và tính kinh tế của chế phẩm. Tuy nhiên, do đặc tính sinh học quý của chúng nên giá trị kinh tế có thể đem lại của các dạng protein này lại cũng rất cao.

– Thu hồi và nâng cao giá trị phụ phẩm công nghiệp chứa protein : Công nghiệp thực phẩm tạo ra nhiều phụ phẩm chứa protein, trong đó nhiều protein có giá trị cao về dinh dưỡng, về tính chất công nghệ cũng như đặc tính sinh học của chúng. Việc thu hồi protein từ phụ phẩm cũng giúp làm giảm chi phí cho xử lý ô nhiễm môi trường do các chất thải này gây ra nếu xả ra môi trường.

2.1. Nguồn protein và nguyên tắc khai thác protein

2.1.1. Nguồn protein

Protein là thành phần xây dựng cơ thể không thể thiếu được, do vậy, về nguyên tắc có thể tìm thấy protein từ mọi nguồn tự nhiên như từ mô thực vật, động vật, cảnh trường vi sinh vật.

* *Protein động vật :*

Protein động vật là nguồn protein phổ biến nhất, bao gồm hệ thống protein của thịt, cá, trứng, sữa và của phụ phẩm của công nghiệp thực phẩm. Protein cá thông thường ít tan trong nước nếu chưa được khử lipit tốt. Trong công nghệ protein, thường protein của cá được tách ra, thu hồi và tái tạo chất lượng nhờ tạo surimi (một dạng bột protein không mùi, nhót, đàn hồi và không ổn định).

Protein sữa bao gồm casein và caseinat cũng như lactoserum, phụ phẩm của công nghiệp sữa. Casein là một protein mà tính chất tạo nhũ của chúng được sử dụng rất nhiều trong công nghiệp thực phẩm hoặc công nghiệp keo dán, hồ.

Protein của máu và nội tạng động vật là một nguồn protein có thể thu hồi cho sản phẩm giá trị cao như globin, chất tạo nhũ sử dụng cho thực phẩm hoặc các ngành công nghiệp khác.

* *Protein thực vật :*

Do đặc trưng cấu tạo loài, thực vật được xem là nguồn protein ít phổ biến nhất ngoại trừ một số nguồn protein kinh điển như đậu tương, đậu đũa,

protein từ các nguồn đậu đỗ khác như đậu Hà Lan, đậu đỗ, các loại hạt như hạt hướng dương, hạt cải... cũng được khai thác và sử dụng (bảng 2.1).

Bảng 2.1. Hàm lượng protein của một số hạt thực vật (%)

	Protein	Nước
<i>Lương thực</i>		
Lúa mỳ	7 – 18	8 – 18
Ngô	7 – 12	11
Lúa	7,5 – 9	12
<i>Hạt, đậu đỗ (tính theo % chất khô)</i>		
Đậu Hà Lan	27	
Đậu xanh	25	
Đậu tương	35 – 50	
Lạc	25 – 30	
Hạt hướng dương	20 – 38	
Hạt cải	15 – 30	

Nguyên liệu protein hạt thực vật không chỉ khác nhau về hàm lượng mà còn khác nhau nhiều về thành phần cấu tử protein của chúng (bảng 2.2).

Bảng 2.2. Phân đoạn protein một số loại hạt thực vật (%)

Loại thực vật	Albumin	Globulin	Prolamin	Glutenin
Đậu Hà Lan	21	66	–	12
Đậu tương	10	90	–	12
Bột mỳ	5	10	45	40

Các loại lá thực vật là một nguồn protein quan trọng, tuy nhiên do cấu trúc và thành phần phức tạp, protein thường nằm trong hỗn hợp các thành phần khác nhau của lá thực vật, liên kết với các thành phần không có giá trị dinh dưỡng, giá trị sinh học, vì thế, nguồn protein lá thực vật được khai thác rất ít. Rất gần đây, protein trong lá thực vật được khai thác chủ yếu là để thu hồi các enzym có hoạt tính sinh học.

* Protein vi sinh vật :

Protein vi sinh vật được xem là một nguồn protein hấp dẫn do đặc tính chứa khá đầy đủ và cân đối thành phần của các axit amin cũng như hàm lượng protein của tế bào vi sinh vật.

Nguồn protein từ vi sinh vật có một số lợi thế : tốc độ sinh trưởng nhanh, thức ăn rẻ, nâng cấp sản xuất dễ dàng, chủ động thiết kế và xây dựng dây chuyền công nghệ tổng hợp protein, không phụ thuộc vào thời tiết hay khí hậu, có khả năng kiểm soát quá trình chặt chẽ. Các nhóm vi sinh vật dùng trong sản xuất protein thường bao gồm 1) Tảo đơn bào và đa bào (*Spirulina maxima*, *Nostoc commune*, *Nematostoc elagelliforme*, *Chlorella*). Hàm lượng protein của tảo 40 – 70,5% và tỷ lệ axit amin không thay thế cao. 2) Nấm men : Trong các nguồn protein sản xuất từ con đường vi sinh vật, nấm men được sử dụng rộng rãi nhất. Nấm men chứa 40 – 60% protein, các protein gần với protein động vật và chứa đủ các axit amin không thay thế. 3) Xạ khuẩn và nấm mốc : ít được sử dụng làm nguồn protein do giá trị dinh dưỡng của chúng kém hơn và kỹ thuật nuôi cấy phức tạp hơn nấm men. Protein vi sinh vật là nguồn rất hấp dẫn cho sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, và trong chăn nuôi.

* Protein tái tổ hợp :

Bên cạnh các nguồn protein khai thác từ các nguồn tự nhiên, một nguồn protein rất quan trọng là các protein được tổng hợp từ sinh vật cải biến gen. Tiến bộ trong kỹ thuật gen trong vài thập kỷ gần đây cho phép kiến tạo protein mới dựa vào cải tạo và tái tổ hợp các nguồn gen protein. Hiện nay các protein tái tổ hợp với các đặc tính quý được biểu hiện trong các vật chủ là động vật, thực vật hoặc vi sinh vật càng làm phong phú thêm nguồn protein và khả năng sử dụng chúng.

2.1.2. Nguyên tắc thu nhận protein tự nhiên

Các protein có nguồn gốc tự nhiên từ mô động vật, thực vật, canh trường vi sinh vật với các đặc tính khác nhau được khai thác cho các mục tiêu ứng dụng khác nhau : sử dụng trong thực phẩm và công nghiệp thực phẩm, cho công nghệ được, công nghệ enzym, hoocmon...

Một quá trình khai thác protein bao gồm các giai đoạn cơ bản sau :

- Làm giàu hoặc chiết tách protein từ các vật liệu sinh học phức hợp.
- Tinh chế protein.
- Tạo cấu trúc cho sản phẩm.
- Ốn định sản phẩm.

Do đặc tính và khả năng tạo các phức hợp phức tạp của protein với các hợp phân hoá sinh khác trong cơ thể, hiệu suất chiết tách protein thường bị hạn chế. Ngoài ra, do đặc tính cấu trúc phức tạp của protein, việc khai thác protein đảm bảo được nguyên vẹn trạng thái và hoạt tính của chúng là vấn đề cần lưu ý khi khai thác các protein.

Sản phẩm protein được chia thành 2 nhóm : các sản phẩm giàu protein và các chế phẩm protein. Tùy theo dạng sản phẩm, việc thu nhận chúng đi theo các con đường khác nhau.

a) Phương pháp làm giàu protein

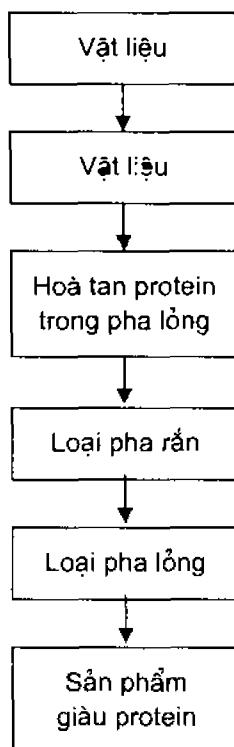
Thông thường cho mục tiêu thực phẩm hoặc dinh dưỡng chỉ cần thu nhận các sản phẩm giàu protein quan tâm mà không đòi hỏi phải phân tách các protein khỏi các protein và các chất khác. Khi đó, một quá trình làm giàu protein thường bao gồm 4 giai đoạn (hình 2.1).

– *Xử lý cơ học* : Giai đoạn phân tán nhỏ vật liệu này nhằm mục đích tăng tỷ lệ bề mặt/ thể tích của vật liệu ban đầu, tạo điều kiện cho giai đoạn phân đoạn protein sau này thuận tiện và hiệu quả.

– *Xử lý nhiệt* : Thông thường vật liệu dùng làm giàu protein được xử lý nhiệt trong khoảng thời gian khác nhau tùy vào bản chất vật liệu. Nhiệt độ xử lý được giữ trong khoảng 40 – 50°C, tránh gây biến tính protein. Quá trình xử lý nhiệt nhằm mục tiêu hoặc làm chuyển trạng thái vật liệu từ rắn sang lỏng (nóng chảy chất béo...), hoặc từ lỏng sang rắn (kết tủa, kết tụ...), hoặc khử nước. Quá trình này đôi khi còn kèm theo mục đích khử trùng hoặc thanh trùng cho vật liệu.

– *Tách pha rắn chứa protein* : Thông thường được thực hiện nhờ việc ép (tách lipit) hay ly tâm (tách nước). Trong giai đoạn này, lipit có thể được loại nhờ các phương pháp chiết hai pha rắn – lỏng.

- Sấy pha rắn chứa protein, loại nước, ổn định sản phẩm.



Hình 2.1. Sơ đồ thu nhận sản phẩm giàu protein

b) Phân tách protein

Một protein có hoạt tính quan trọng nào đó cần phải được thu nhận ở trạng thái tương đối tinh khiết. Điều này đòi hỏi phải tách chúng ra khỏi vật liệu ban đầu và tinh chế ở mức độ tinh khiết của protein tùy theo yêu cầu sử dụng chúng. Nhìn chung có hai mức tinh khiết yêu cầu : mức chế phẩm hoặc mức phân tích.

Thường thì chế phẩm protein cần được thu với lượng lớn các protein với mức độ tinh khiết khác nhau. Các chế phẩm thương mại như các enzym, các protein có giá trị dinh dưỡng (isolat đậu tương), một số các protein có dược tính (insulin) là các sản phẩm khá điển hình của dạng chế phẩm protein. Các dạng protein có mức độ tinh khiết yêu cầu để sử dụng cho phân tích, nghiên cứu thì lượng tinh chế yêu cầu rất nhỏ (nghiên cứu cấu trúc, chức năng protein).

Độ đồng nhất của protein trong một vật liệu sinh học : Có thể cùng lúc tồn tại các protein ở các trạng thái tan khác nhau : hoà tan trong nước (albumin, globulin...) hoặc các dạng không tan hoặc ít tan trong nước (protein hình sợi). Các protein còn tham gia trong cấu tạo phức hợp của hợp chất khác như polysaccharit (hemixenluloza) hoặc các hợp chất nitơ, lipit, chất màu...Với các dạng này, để giải phóng protein, cần thiết có các xử lý ban đầu như xử lý hoá chất, enzym hoặc nghiên cơ học đơn giản. Việc thu nhận protein phụ thuộc nhiều yếu tố, bao gồm : độ đồng nhất của protein trong vật liệu, hình dạng và kích thước phân tử, độ phân cực của protein, độ hoạt động bề mặt (tính chất bề mặt) của chúng.

Quá trình phân tách protein khỏi vật liệu đầu bao gồm 3 giai đoạn cơ bản :

- Hoà tan protein trong dung dịch.
- Chiết, tách protein khỏi vật liệu.
- Tinh sạch protein.

* *Hoà tan protein* :

Khả năng hoà tan protein trong dung dịch có thể được hỗ trợ bằng cách thay đổi các yếu tố hoá học hoặc sử dụng enzym.

Các yếu tố hoá học có ảnh hưởng không đồng thời tới khả năng hoà tan protein bao gồm : lực ion, pH, nhiệt độ và nồng độ Ca^{2+} .

Do tại pI, protein trung hoà về điện tích nên độ hoà tan của chúng nhỏ nhất tại các giá trị pI (khoảng pH = 4,5 – 6), điều này đặc biệt quan trọng với các protein biến tính. Để hoà tan protein, thông thường giá trị pH được chọn là kiềm nhẹ do tại đó độ hoà tan của protein là lớn nhất và môi trường gần với trung tính, nguy cơ biến tính protein là nhỏ nhất. Cũng cần lưu ý là tại các giá trị pH > 9, có thể xảy ra hiện tượng taxemic hoá các axit amin và tạo các cầu đồng hoá trị ngoại hoặc nội phân tử protein, làm thay đổi cấu trúc và giá trị của protein.

Lực ion thông thường được thay đổi tại các pH trung tính hoặc xung quanh pI nhờ việc sử dụng các muối tan. Tại các lực ion cao hoặc thấp quá, độ tan của protein giảm.

Việc hoà tan protein nên thực hiện ở nhiệt độ thấp để giảm nguy cơ biến tính protein và nguy cơ mầm bị phá huỷ bởi vi sinh vật. Nếu protein

cần tách có khả năng chịu nhiệt tốt, chiết chúng ở nhiệt độ cao giúp hạn chế các chất không mong muốn hòa tan trong dung dịch và nâng cao hiệu quả thu nhận protein.

Tuy vậy, việc lựa chọn các yếu tố này luôn gắn liền với phương pháp thu nhận protein tương ứng. Ví dụ, nếu thu nhận protein bằng kết tủa tại pH của chúng thì yếu tố pH là quan trọng nhất trong khi lực ion (nồng độ muối trong dung dịch) đôi khi làm tăng độ hòa tan của protein tại pH. Tương tự như vậy, nếu sử dụng các kỹ thuật sắc ký ion, giá trị pH của dung dịch protein cần tương thích với điện tích cần có để việc phân tách protein trên cột sắc ký được hiệu quả.

Việc sử dụng các enzym trong hòa tan protein khá hạn chế do các enzym phá vỡ các liên kết ngoại phân tử của protein, tạo ra sự hòa tan khá dễ của protein và thường kèm theo việc hòa tan trong dung dịch nhiều hợp chất khác, gây khó khăn cho quá trình chiết tách sau này. Ngoài ra, việc sử dụng enzym có thể mang lại vị đắng cho sản phẩm sau xử lý nếu sử dụng cho thực phẩm.

* *Tách protein :*

Việc tách và thu hồi các protein như protein của máu động vật trong công nghiệp giết mổ, casein, betalactoglobulin từ lactoserum của công nghiệp sữa, protein của cá (surimi), protein của thực vật như đậu tương đã được thực hiện ở quy mô công nghiệp.

Việc tách protein khỏi dung dịch protein nhờ các kỹ thuật khác nhau có thể sử dụng các kỹ thuật :

- Kết tủa protein trong pha lỏng và tách kết tủa khỏi pha lỏng.
- Kỹ thuật lọc dựa trên kích thước phân tử.
- Cố định protein trên các chất mang (hấp thụ/hấp phụ) sau đó rửa thu hồi protein từ các chất mang đó.

Các kỹ thuật kể trên được xem là tối ưu vì hiệu suất thu hồi lớn, tránh biến tính protein, tuy vậy việc thực hiện các kỹ thuật này ở quy mô lớn vẫn cần được xem xét.

Có 3 thông số cần xem xét khi tách protein :

- Hiệu suất tách : Hiệu suất tách protein là tỷ lệ giữa lượng protein tách được và lượng protein cần tách của vật liệu đó (hàm lượng protein đó

của nguyên liệu). Hiệu suất này thường thấp khi tách protein thực vật (trừ đậu tương).

– Khả năng tách chọn lọc : Thông thường các kỹ thuật trên không có tính chọn lọc cao. Trong ứng dụng cho thực phẩm thì đặc điểm này không cần xem xét nhưng đối với các protein cho mục tiêu dược phẩm thì cần có các quá trình tinh chế protein tiếp sau.

– Chi phí : Chi phí của quá trình tách protein phụ thuộc vào tốc độ của việc chiết protein và nồng độ của protein chiết được.

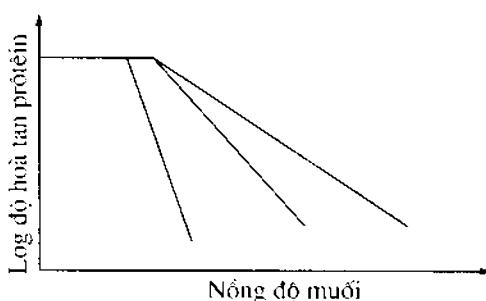
Người ta sử dụng các kỹ thuật sau để kết tủa protein :

+ Kết tủa protein nhờ muối (hiệu ứng salting out) :

Kết tủa protein nhờ muối là phương pháp thông thường nhất trong các phương pháp kết tủa. Thông thường nồng độ muối thấp làm tăng mức độ hòa tan protein do protein được bao bọc bởi lớp vỏ trái dấu của muối, năng lượng tĩnh điện tự do của protein giảm, hoạt tính dung môi tăng (hiệu ứng salting in). Ngược lại, khi tăng nồng độ muối, các ion muối làm giảm lực hydrat hoá của các ion muối, làm giảm độ hòa tan của protein, dẫn tới kết tủa protein (salting out) – Định luật Cohn.

$$\log S = B - KI$$

S : độ hòa tan của protein ; B : hằng số (phụ thuộc pH, nhiệt độ, nồng độ protein) ; K : hằng số salting out (phụ thuộc loại protein, pH và nhiệt độ) ; I : lực ion của dung dịch muối (hình 2.2).



Hình 2.2. Sự phụ thuộc độ hòa tan của protein vào nồng độ muối trong hiệu ứng salting out

Từ hình 2.2 có thể thấy ở cùng một nồng độ muối, các protein khác nhau có độ tan khác nhau. Hay nói khác đi, có thể sử dụng nồng độ muối khác nhau để kết tủa các protein khác nhau (kết tủa phân đoạn protein nhờ muối).

+ *Kết tủa nhờ dung môi :*

Khi dung môi được thêm vào dung dịch protein làm giảm hằng số điện môi của môi trường. Quan hệ giữa độ tan protein và hằng số được thể hiện trong công thức sau :

$$\ln(S/S_w) = (\Lambda/RT)(1/D_w - 1/D)$$

S : độ tan của protein trong dung môi hũn cơ ; Sw : độ tan của protein trong dung dịch nước ; D : hằng số điện môi của dung dịch chứa dung môi ; R : hằng số khí ; T : nhiệt độ tuyệt đối ; A : hằng số.

Cũng cần lưu ý rằng dung môi là một tác nhân gây biến tính protein do chúng có ái lực với bề mặt kỵ nước của protein, vì thế cần giữ nồng độ dung môi thấp. Riêng các dung môi như 2 methyl – 2,4 – pentane diol (MPD), dimetyl sulfoxit (DMSO) và etanol có thể sử dụng ở nồng độ cao. Các dung môi thường hay được sử dụng là ctanol và axeton, các dung môi khác ít được sử dụng do dễ làm biến tính protein.

Các protein có thể bị kết tủa khi bổ sung dung môi ở nồng độ xác định do việc thêm dung môi làm giảm lượng các phân tử nước tương tác với protein. Cũng có thể kết tủa phân đoạn một dung dịch protein bằng cách thay đổi nồng độ dung môi khác nhau để phân tách các protein do các protein khác nhau bị kết tủa tại các nồng độ dung môi khác nhau. Kết tủa protein bằng dung môi có thể đạt hiệu quả thấp tại nồng độ protein cao và pH xa điểm đẳng điện. Thông thường, kết tủa nhờ dung môi thực hiện tại nhiệt độ thấp trong dung dịch có lực ion 0,05 – 2M. Nồng độ protein cao hoặc thấp hơn đều làm giảm hiệu quả kết tủa. Việc lựa chọn dung môi phụ thuộc vào khối lượng phân tử của protein, protein có khối lượng phân tử càng cao thì lượng dung môi cần càng ít hơn. Với axeton, có thể tính theo phương trình sau :

$$[(v/v)\%] = 1.8 - 0.12 \ln [MW]$$

Trong đó : (v/v)% = phần trăm thể tích

MW = khối lượng phân tử protein

+ *Kết tủa đẳng điện các protein :*

Độ phân cực của protein phụ thuộc vào tỷ lệ các mạch bên phân cực được ion hoá ($-COO^-$, $-NH^{3+}$...) hoặc không ion hoá ($-SH$, $-OH$...) so với

các gốc ky nước không phân cực (mạch bên vòng, cacbuahydro). Độ phân cực của chúng còn phụ thuộc vào cấu trúc không gian của protein. Căn cứ vào tính phân cực của protein, có thể tách protein nhờ vào việc kết tủa chúng tại các dung dịch có lực ion và pH khác nhau.

Protein bị biến tính bởi các tác nhân như axit, nhiệt độ, etanol... có thể bị kết tủa hoàn toàn tại giá trị pI của chúng. Việc lựa chọn tác nhân biến tính protein cần tính đến khả năng biến tính thuận nghịch hay không của protein cần thu nhận. Đặc biệt trong trường hợp protein cần thu nhận là protein có hoạt tính sinh học, không áp dụng được các tác nhân biến tính không thuận nghịch như nhiệt độ do sự biến tính làm mất hoạt tính của chúng. Để kết tủa protein có thể sử dụng tricloaxetic để điều chỉnh pH dung dịch protein về pI của chúng.

+ Kỹ thuật đóng kết tủa – hấp phụ – giải hấp phụ :

Việc kết tủa protein có thể được thực hiện nhờ sự hỗ trợ trong dung dịch của các tác nhân như hexametaphosphate, polyetylen glycol, axit deoxycholic, axit polyacrylic, bentonit, chitosan, clorua sắt, lingsunphonat hoặc các chất keo âm điện khác. Trong trường hợp sử dụng hexametaphosphate, có thể kết tủa tới 90% protein của lactoserum. Kết tủa này sau đó được thu lại và hòa tan lại trong đệm pH = 3, khử nhóm photphat bằng cột trao đổi ion và lọc gel. Có thể sử dụng axit polyacrylic hỗ trợ thu nhận protein trong huyết tương có tính chất tương tự với albumin trong lòng trắng trứng. Đầu tiên, các protein được kết tủa tại pH = 4 khi có mặt axit polyacrylic, kết tủa sau đó được hòa tan lại trong đệm pH = 6,5. Axit polyacrylic được loại khỏi dung dịch protein nhờ kết tủa với muối magie cacbonat. Một số tác nhân kết tủa khác ở quy mô phòng thí nghiệm như chitosan, betonit, lingsunphonat...

+ Kết tủa protein bằng enzym :

Các enzym có thể sử dụng kết tủa protein có khả năng tạo cầu ngoại phân tử giữa chúng, làm kết tụ các khối protein, nhờ vậy chúng được tách khỏi dung dịch. Enzym đóng tụ sữa (renin) là một ví dụ điển hình của việc sử dụng enzym cho kết tủa protein trong dung dịch (sữa).

Các kết tủa protein được rửa lại bằng chính dung dịch kết tủa chúng và được tách khỏi dung dịch bằng cách lọc đơn giản hay ly tâm (cho hiệu suất thu hồi cao), sau đó được hòa tan trong đệm có pH thích ứng. Đồng thời với

việc tách protein khỏi dung dịch ban đầu, giai đoạn kết tủa cũng cho phép cô đặc protein trong mẫu ban đầu tới nồng độ cao hơn nhờ sử dụng một thể tích đậm hoà tan kết tủa nhỏ phù hợp. Dung dịch protein đậm đặc này sau đó được đem tinh sạch cho các mục tiêu sử dụng khác nhau.

* *Tinh sạch protein :*

Việc lựa chọn dạng nguyên liệu đầu là nhân tố quan trọng trong thiết kế quá trình tinh chế protein thu hồi từ nguyên liệu đó. Các protein đặc biệt có giá trị cao thường phân bố không đồng đều trong tế bào thực và động vật, thường tập trung ở một số cơ quan hoặc mô nhất định. Việc sử dụng hoặc chọn nguyên liệu là các cơ quan hoặc mô chứa hàm lượng cao các protein quan tâm làm giảm sự phức tạp cho công đoạn tinh chế protein.

Mỗi quá trình khai thác protein tinh khiết bao gồm rất nhiều giai đoạn : tách protein khỏi các vật liệu không protein, rồi sau đó tách protein quan tâm khỏi các protein khác. Việc tách một protein khỏi các protein khác dựa trên đặc trưng về kích thước protein, tính chất lý - hóa học và ái lực của chúng, là các quá trình khó khăn và tốn kém nhất trong khai thác protein.

Quá trình tách protein khỏi các protein khác và tinh chế chúng thông thường sử dụng các tính chất của protein, nhờ đó việc tinh sạch protein được thực hiện nhờ hàng loạt các kỹ thuật lọc, sắc ký và điện di :

– Tính phân ly đẳng điện của protein : Protein tích điện tại các giá trị pH khác nhau của dung dịch ; protein trung hoà điện tại giá trị pI của chúng. Tính chất này làm cho protein tạo liên kết với các ion hoặc di chuyển trong điện trường trong dung dịch có $pH \neq pI$ của chúng, nhờ đó, protein được tách khỏi các protein khác.

– Tính chất bề mặt của protein : Protein có thể hấp thụ/hấp phụ trên bề mặt các chất mang khác nhau. Nhờ đó protein có thể được phân tách nhau nhờ sắc ký ái lực.

– Kích thước phân tử của protein : Protein có thể được tách khỏi các protein khác nhờ vào kích thước phân tử của chúng nhờ vào kỹ thuật "sàng phân tử" hay siêu lọc.

+ *Kỹ thuật lọc :*

Protein là cao phân tử, do vậy các phương pháp phân tách protein sử dụng màng lọc phân tử khá hữu hiệu. Tuy nhiên, các phương pháp này chỉ sử

dụng được đối với các nguồn protein động vật trong dung dịch sinh lý như sữa, máu, huyết thanh mà không áp dụng được đối với các nguồn protein thực vật do chúng nằm trong phức hợp các polyme khác.

Các kỹ thuật phân tách protein theo kích thước phân tử của chúng nhờ một màng "bán thấm" hoặc màng lọc phân tử (bảng 2.2). Dung dịch protein khi đó được phân thành 2 pha : pha (1) không đi qua màng lọc chứa các phân tử có kích thước nhỏ hơn kích thước màng lọc (peptit, gluxit đơn giản, muối...) với nồng độ cân bằng với chúng trong pha (1).

Bảng 2.3. Phân đoạn kỹ thuật lọc màng

Kỹ thuật lọc	Kích thước (μm)	Phân tử
Lọc	5	Virus
	3	Nhũ tương
	1	Sinh vật đơn bào
Vi lọc	0,1	Tập hợp virut
		Keo casein
		Cao phân tử tổng hợp và tự nhiên
Siêu lọc	0,01	Cao phân tử tổng hợp và tự nhiên
		Hạt virut
		Vi khuẩn nhỏ
Thẩm thấu ngược	0,001	Hoocmon, vitamin, phức hữu cơ
		Phân tử hữu cơ đơn giản
		Ion và nguyên tử

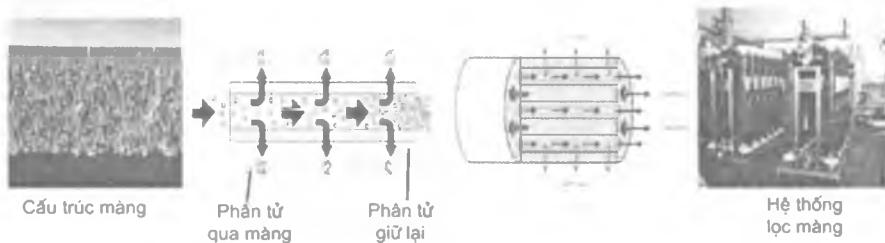
Màng lọc cho protein được phân thành 2 loại theo kích thước màng :

- Màng vi lọc (microfiltration) : Theo nghĩa thông thường, vi lọc có khả năng giữ lại các phân tử có kích thước cỡ $0,1\text{--}1 \mu\text{m}$. Trong kỹ thuật vi lọc protein, màng ceramic hoặc màng oxyt nhôm có khả năng giữ các phân tử lớn tạo thành trên bề mặt màng vi lọc một màng phân cực đóng vai trò như màng siêu lọc.

- Màng siêu lọc (ultrafiltration) : Các màng có bản chất hữu cơ hay khoáng, có khả năng giữ các phân tử $10^{-2} - 10^{-3}$ μm hoặc khối lượng phân tử > 10 000 Da.

Màng lọc có thể được thiết kế dưới nhiều dạng hình học : dạng bản, dạng ống, dạng sợi hoặc dạng cầu. Nguyên tắc lọc và ví dụ hệ thống lọc được trình bày trên hình 2.3.

Trong kỹ thuật siêu lọc, nhiều yếu tố ảnh hưởng tới quá trình lọc. Hiệu ứng màng phân cực protein hạn chế nồng độ của protein chiết được trong phân tử giữ lại ở ngưỡng 20 – 30%. Để quá trình lọc có thể thực hiện tiếp tục và ổn định, áp dụng một áp lực khí nitơ ổn định cho dòng hoặc pha loãng dòng lọc với nước sao cho lưu lượng dòng nước pha loãng bằng lưu lượng dòng qua màng (diafiltration).



Hình 2.3. Màng và hệ thống siêu lọc

Khi sử dụng kỹ thuật siêu lọc để tinh chế protein, các cấu tử chiết được không được chứa các cao phân tử không có bản chất protein. Vì thế, kỹ thuật này không áp dụng được đối với các nguyên liệu dầu như máu, lactoserum hoặc dịch chiết từ thực vật.

Ngoài ra, khi chỉ muốn loại nước, có thể sử dụng các loại màng có độ rỗng thấp : kỹ thuật thẩm thấu ngược. Một kỹ thuật mới có thể sử dụng là lọc qua màng lọc nano. Màng lọc này cho phép loại muối, nước mà giữ lại tất cả các hợp chất có kích thước như peptit.

+ Kỹ thuật sắc ký trao đổi ion :

Sắc ký trao đổi ion giữ lại các chất cần phân tách nhờ tương tác ion với phân tử cần phân tách. Pha cố định trong kỹ thuật sắc ký này chứa các nhóm ion hoá có khả năng tương tác với chất phân tích mang điện trái dấu. Sắc ký trao đổi ion được chia thành hai loại : trao đổi ion âm và trao đổi ion dương :

- Cột trao đổi ion dương có khả năng giữ lại các ion dương do các nhóm chức của pha cố định mang điện tích âm (ví dụ axit photphoric).

- Cột trao đổi ion âm có khả năng giữ lại các ion âm do các nhóm chức của pha cố định mang điện tích dương (ví dụ NH_4^+).

Sắc ký trao đổi ion phân tách protein dựa trên khả năng tích điện của các nhóm chức của protein. Khả năng tích điện của một protein lại phụ thuộc vào pha động, vào pH của pha động, do vậy thay đổi pH và lực ion của pha động làm tăng khả năng gắn hoặc tách protein khỏi pha tĩnh và vì thế tách protein khỏi hỗn hợp các protein khác. Ví dụ, một protein tích điện dương tại pH = 7, khi ấy nó gắn với cột ion âm, được giữ lại trên cột trong khi các protein tích điện âm bị rửa trôi khỏi cột sắc ký. Khi thay đổi pH (tăng pH), protein này tích điện âm, khi ấy nó bị rửa trôi khỏi cột. Bên cạnh đó, thay đổi lực ion của pha động tạo ra tác dụng như "sàng ion" : Các ion trong pha động tương tác với ion trong pha tĩnh, tách các ion gắn trên pha rắn theo lực ion tương ứng.

Có hai phương pháp trao đổi ion được sử dụng ở quy mô công nghiệp : phương pháp Vistec sử dụng dệm anion yếu DEAE (diethylaminoethyl - cellulose) và phương pháp Spherosil sử dụng dệm trao đổi anion yếu hoặc hệ thống trao đổi cation kết hợp với đặc tính ky nước của khối dệm. Phương pháp Spherosil cho phép lựa chọn lọc và phân tách tốt các protein, đặc biệt cho các protein khó phân tách bằng các kỹ thuật thông thường. Tuy vậy, các kỹ thuật sắc ký này vẫn có nhiều hạn chế do sự nhiễm các ion trong dịch rửa giải protein và cần có ít nhất hai cột trao đổi ion khi làm việc tại pH trung tính.

Protein sau khi tinh chế được cô đặc nhờ siêu lọc, sấy hay đông khô tùy vào đặc tính của chúng.

2.2. Một số công nghệ protein điển hình

2.2.1. Công nghệ lectin

2.2.1.1. Lược sử về lectin

Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh học (bioactive compounds) từ các cơ thể sinh vật như các chất có hoạt tính kháng sinh, các hoocmon, các độc tố có ứng dụng trong thực tiễn, các enzym và các chất kìm hãm enzym từ nguồn động thực vật và vi sinh vật...

phát triển rất mạnh. Bên cạnh đó, lectin một chất có hoạt tính sinh học đặc biệt khác với các hợp chất trên cũng đã được phát hiện hơn một thế kỷ nay (từ năm 1888) và đang được nghiên cứu mạnh mẽ, sâu sắc về cấu trúc và chức năng của chúng.

Vậy lectin là gì? Tại sao các nhà sinh học và y học lại đặc biệt quan tâm đến chúng? Chúng ta hãy nêu sơ qua về lịch sử phát hiện và quá trình nghiên cứu lớp hợp chất tự nhiên này.

Vào những năm 1887 và 1888 tại phòng thí nghiệm Kobert của trường đại học Dorpat, trên đối tượng là cây thầu dầu (*Ricinus communis*), Stillmark đã chiết xuất được chất có khả năng ngưng kết tế bào hồng cầu người, làm mất chức năng vận chuyển oxy của chúng. Đó là một chất độc và ông gọi là ricin. Khi công trình được công bố (1888), ricin được đồng đảo các nhà sinh học và y học đặc biệt quan tâm (Kocourek J., 1986). Sau đó cũng chính nhà khoa học Stillmark lại tìm thấy một hợp chất có tính chất tương tự như ricin, cũng là một độc tố được chiết từ hạt cây *Croton tiglium* và ông gọi là crotin.

Năm 1891, một nhà khoa học khác là Hellin cũng đã tách được một độc tố khác trong hạt của cây *Abrus precatorius* có khả năng làm ngưng kết tế bào hồng cầu người, đó là abrin. Các độc tố ricin, crotin và abrin có nguồn gốc thực vật đã thu hút sự chú ý đặc biệt của nhiều nhà khoa học cuối thế kỷ XIX.

Trong hai năm 1897 và 1898 một số nghiên cứu đã chuyển sang đối tượng là các loài động vật. Người mở đầu hướng nghiên cứu này Edfstrand (1898). Ông đã chỉ ra rằng: Trong các tế bào mô thuần khiết của một số loài động vật có xương sống cũng có những chất có đặc tính độc tố tương tự như ricin. Chúng làm ngưng kết tế bào hồng cầu của một số loài động vật: bò, lợn, cá vược... (Barondes, 1986).

Đầu thế kỷ XX, các hợp chất có tính chất đặc biệt làm ngưng kết tế bào hồng cầu của người và một số loài động vật được phát hiện ngày một nhiều trong giới sinh vật từ virut đến con người (Golstein, et al, 1980).

Năm 1920, Karl Landsteiner đã phát hiện ra các nhóm máu đặc trưng ở người theo hệ thống A, B, O và AB. Sau này các nhà di truyền học đã tìm ra đặc điểm di truyền của chúng là do sự tương tác giữa các gen alen và tuân theo định luật Menden.

Bên cạnh những nghiên cứu về sự tương tác của các chất kiềm ricin với tế bào hồng cầu người theo nhóm máu, Landsteiner (1900) cùng với Raubischeck (1903) đã nghiên cứu bản chất của các độc tố có nguồn gốc thực vật nói trên. Bằng thực nghiệm đầy tính thuyết phục hai ông đã chỉ ra rằng : Các chất làm ngưng kết hồng cầu người và động vật tan trong nước, bị kết tủa bởi axeton, alcol và có thể xác định bằng phản ứng Biure và phản ứng xantoprotein là các phản ứng đặc trưng của protein và các axit amin vòng. Kể từ đó các chất độc tố kiềm ricin được thừa nhận có bản chất protein.

Thoạt đầu các nhà khoa học nhận thấy, sự ngưng kết tế bào hồng cầu của các độc tố trên là mang tính chọn lọc. Vì vậy Krupe (1954) đã xem các chất này là kháng thể tự nhiên và gọi là "protein nhận biết đặc biệt". Và cũng chính năm đó, nhà khoa học Boyd (1954) dựa trên đặc tính ngưng kết chọn lọc của các loại protein này đã gọi chúng là "lectin". Thuật ngữ này xuất phát từ chữ Latin "Lectus" là động từ quá khứ của "Legere" nghĩa là chọn lọc. Mặc dù sau này các nhà khoa học nhận thấy số lượng các lectin có khả năng ngưng kết tế bào hồng cầu đặc hiệu nhóm máu là rất ít, chiếm khoảng 25% tổng số các dạng lectin song thuật ngữ này vẫn được dùng như một thuật ngữ khoa học.

Từ nửa cuối những năm 60 của thế kỷ này một số đặc điểm hoá sinh của lectin đã được nghiên cứu tương đối kỹ. Một trong những đặc tính hoá sinh quan trọng của lectin là khả năng ngưng kết tế bào và tương tác với các loại đường đặc biệt là các mono và disaccharit. Từ đặc điểm này khi đưa ra khái niệm về lectin, Goldstein (1980) đã viết : "Lectin là protein và glycoprotein có khả năng gây ngưng kết tế bào hồng cầu".

Khái niệm này đã nêu bật được bản chất hoá học của lectin và hai đặc tính hoá sinh đặc trưng của chúng. Khái niệm này cũng đồng nhất với định nghĩa về lectin mà Houston và Dooley đã đưa ra năm 1982 : "Lectin là protein tương tác đặc hiệu đường, đặc tính cơ bản của nó là khả năng gây ngưng kết tế bào hồng cầu".

Năm 1995, Peuman và Van Dame đã đưa ra một số khái niệm mới về cấu trúc liên quan đến chức năng của lectin do những tiến bộ trong việc tách dòng phân tử các lectin và những protein có quan hệ với lectin. Theo hai tác giả này, dựa vào cấu trúc phân tử và biểu hiện hoạt tính sinh học có thể phân chia lectin làm 3 loại :

– Merolectin có khối lượng phân tử tương đối nhỏ và chỉ có một trung tâm liên kết với đường, do đó không có hoạt tính ngưng kết tế bào và không gây kết tủa các hợp chất liên hợp đường (glycoconjugates). Thuộc về loại này là một số protein của các cây họ Lan (*Orchidaceae*).

– Hololectin có chứa ít nhất hai trung tâm liên kết với đường, làm ngưng kết tế bào và gây kết tủa do tương tác với nhiều chất cộng hợp đường. Đó chính là các lectin quen thuộc đã được nghiên cứu nhiều nhất, dễ phát hiện nhất vì khả năng gây ngưng kết tế bào của chúng và thường được gọi là haemagglutinin.

– Chimerolectin là những phân tử trong đó có ít nhất một vị trí liên kết với đường và có một vùng chức năng sinh học khác (có thể là chức năng xúc tác sinh học). Thuộc về loại này là protein kìm hãm riboxom typ 2 (RIP, Type 2). Người ta thấy phân tử RIP 2 của những hạt thầu dầu (*Ricinus communis L.*,) và hạt cây cam thảo dây (*Abrus precatorius L.*) bao gồm hai chuỗi polypeptit : chuỗi A có hoạt tính xúc tác ARN – N – glycosidaza, có tác động loại di phân tử purin trên ARNt của hạt riboxom gây bất hoạt riboxom và làm ngừng tổng hợp protein ; chuỗi B có hoạt tính ngưng kết tế bào và liên kết đặc hiệu với galactoza, liên kết với màng tế bào để tạo điều kiện cho chuỗi A thâm nhập gây độc cho tế bào đích. Hai chuỗi A và B của RIP 2 nối với nhau bằng các liên kết disunphua và các liên kết cộng hoá trị khác. Tuy nhiên, chuỗi B ở phần lớn các phân tử RIP 2 đã được nghiên cứu chỉ có trung tâm liên kết cacbonhydrat (trừ ricin và abrin) nên chúng không có hoạt tính lectin như các hololectin theo quan niệm của Peuman và Van Dame. Như vậy, theo hai ông, chỉ có hololectin mới được coi là một lectin thực sự, còn ricin và abrin có hai trung tâm liên kết đường, có hoạt tính xúc tác ARN – N – glycosidaza chỉ là một ngoại lệ của lectin.

Từ khi phát hiện ra ricin đến nay đã trên 100 năm. Trong khoảng thời gian đó các nhà khoa học từ nhiều nước khác nhau trên thế giới đã phát hiện và tinh chế được nhiều dạng lectin khác nhau có nguồn gốc từ các cơ thể động vật, thực vật, vi sinh vật và cả cơ thể người. Song tất cả các nhà khoa học đều thừa nhận rằng người chính thức mở đầu lịch sử nghiên cứu lectin là Stillmark và ricin được xem như là lectin đầu tiên được phát hiện. Năm 1888 đã đi vào lịch sử sinh học như một mốc đáng nhớ, mở đầu cho một thời kỳ mới, thời kỳ nghiên cứu và ứng dụng lectin phục vụ đời sống con người.

2.2.1.2. Sự phân bố lectin trong giới sinh vật

a) Sự phân bố lectin trong giới thực vật

Đối với thực vật có mạch tác giả Allen và Brillantine (1969) đã tiến hành điều tra ở 2663 loài thực vật và có kết quả cho thấy có 800 loài chứa lectin, trong đó có các cây họ Đậu (Fabaceae) chiếm trên 600 loài. Các lectin có mặt ở thực vật đã được một số tác giả gọi là *phytohemagglutinin* (nghĩa là lectin thực vật). Loại lectin thực vật được nghiên cứu sâu sắc nhất là ConA từ hạt đậu rùa (*Canavalia ensiformis*) (Edelman et al, 1972 và Cunningham et al, 1975). Ngoài các cây họ Đậu có số lượng loài lớn nhất có chứa lectin, một số thực vật khác như họ Lan (Orchidaceae), họ Trinh nữ (Mimosaceae), họ Thuý tiên (Amaryllidaceae), họ Hoa thảo (Poaceae), một số loài trong chúng cũng chứa lectin.

Năm 1983, nhóm tác giả Nguyễn Quốc Khang, Nguyễn Thị Thịnh và cộng sự đã tiến hành điều tra sơ bộ các loại đậu đang được trồng phổ biến ở Việt Nam đã cho biết : có tới 60% các loài được điều tra có chứa lectin. Lectin họ Dâu tằm (Moraceae) ở nước ta cũng đã điều tra trong những năm gần đây. Tất cả các loài mít và một số loài khác như chay (*Artocarpus tonkinensis*), (Đỗ Ngọc Liên, Trần Tuấn Quỳnh (1991)) sakê (*Artocarpus incia*) chỉ *Artocarpus* đều chứa lectin có hoạt độ rất cao. Các công trình điều tra sự phân bố của lectin ở các cây thuốc đông y cũng đã tiến hành trong năm 1993 ở nước ta do các tác giả Nguyễn Văn Lợi và cộng sự tiến hành trên phạm vi các cây thuốc dân tộc miền bắc Việt Nam.

Nếu như thực vật có mạch, sự phân bố của lectin khá rộng thì ở thực vật không có mạch, lectin chỉ mới được tìm thấy ở một số loài nấm (Fungi), địa y (Lichenes) và tảo (Algae). Trong 105 loài tảo biển ở nước Anh được điều tra thì chỉ có 19 loài tảo chứa lectin có hoạt độ thấp. Từ năm 1950, lectin của loài nấm cũng đã được điều tra. Đối tượng điều tra là loại nấm thật (*Eumycophyta*). Trong 390 loài được nghiên cứu chỉ có 4 loài chứa lectin. Các loài nấm thấp mà điển hình là nấm nhầy (Myxomycetes), lectin cũng đã được tìm thấy.

Năm 1955, Estola và Varitia đã tiến hành điều tra lectin của khoảng 100 loài địa y (Lis và Sharon, 1986).

Mặc dù còn rất nhiều loài thực vật chưa được nghiên cứu nhưng các dẫn liệu khoa học ở trên đã chứng tỏ rằng lectin là protein khá phổ biến trong giới thực vật nhưng ở mức độ khác nhau.

b) Sự phân bố của lectin trong giới động vật

Lectin có nguồn gốc từ động vật cũng được phát hiện khá sớm. Lectin trong giới động vật được phát hiện đầu tiên từ một loài sam biển châu Mỹ (*Limulus polyphemus*), sam biển châu Á (*Tachypleus tridentatus*) (Bùi Phương Thuận, Đỗ Ngọc Liên, 1995) và tôm hùm (*Homarus americanus*) thuộc lớp Giáp xác. Một số loài động vật khác cũng thuộc lớp Giáp xác và các loài động vật thuộc ngành Ruột khoang cũng đã được tiến hành điều tra về lectin. Tuy nhiên, người ta chỉ phát hiện được một số loài có chứa lectin nhưng hoạt độ thấp và không đặc hiệu nhóm máu. Ở Việt Nam khi điều tra 30 loài thuộc ruột khoang ở vùng biển Nha Trang – Khánh Hòa chỉ thấy 10 loài có chứa lectin (Cao Đăng Nguyên và Nguyễn Quốc Khang, 1998).

Ở một số loài động vật có xương sống, lectin cũng đã được điều tra cơ bản. Một số loài thuộc lớp Cá xương (Osteichthyes), lớp Lưỡng cư (Amphibia) lớp Bò sát (Reptilia), lớp Chim (Aves) và lớp Thú (Mammalia) có chứa lectin. Một số dạng lectin từ huyết tương cá chình (*Anguilla rustiata*), từ trứng cá vược (*Perca piuviatitis*)... (Barondes, 1986).

Một số kết quả thật bất ngờ là một số mô và cơ quan cơ thể người như mô cơ, các cơ quan như tim, phổi và các tế bào của hệ miễn dịch cũng chứa lectin (Chilads và Feiry, 1979 ; Powell, 1980 và Whitmy, 1985, Mongsny et al, 1985, Grillon et al, 1990).

Như vậy, có khá nhiều loài động vật có chứa lectin. Đó cũng là bằng chứng về tính phổ biến của lectin trong sinh giới.

c) Lectin có nguồn gốc vi sinh vật

Virut và vi khuẩn cũng được công bố là có chứa lectin, Hirst (1941, 1942) đã phát hiện virut cũng có chứa chất làm ngưng kết tế bào hồng cầu gà con. Đây là lectin đầu tiên từ vi sinh vật được phát hiện. Sau này, một số công trình khoa học của Bruoly (1948), Stone (1949) và Bruet (1951) cũng đã phát hiện thấy lectin ở một số loài virut khác (Doyle và Slifkin, 1997).

Trên đối tượng là vi khuẩn *E. coli*, Ofek (1977, 1978) đã cho biết : trên bề mặt của vi khuẩn này có chứa chất có khả năng gây ngưng kết tế bào. Hoạt tính này mất đi khi có mặt một số loại đường như galactoza và dẫn xuất amin của nó. Đó chính là lectin bề mặt màng tế bào vi khuẩn. Dạng lectin này cũng đã được phát hiện ở một số loài vi khuẩn khác trong những năm gần đây (Houssto et al, 1983, Smit et al, 1984).

Như vậy, lectin phân bố khá rộng trong giới sinh vật. Sự phân bố này vừa mang tính phổ biến tức là có nhiều loài sinh vật đến con người lại vừa mang tính riêng biệt nghĩa là không phải mọi loài đều chứa lectin. Đây là điểm khác biệt cơ bản giữa lectin và enzym.

d) Sự định khu của lectin trong tế bào và cơ thể sinh vật

Trong các cơ thể động vật, lectin có trong huyết thanh ở một số mô và cơ quan đặc biệt là mô cơ. Ngoài ra còn có ở giao tử – tế bào trứng (Tyler và Metz, 1944, 1945).

Với các cơ thể thực vật, sự định khu của lectin khá rộng : ở lá, ở hoa, ở thân và đặc biệt là ở hạt, hầu hết các loài thực vật hạt kín, hạt thường chứa nhiều lectin nhất.

Nghiên cứu động thái lectin đã cho thấy, trong một cơ thể, lectin có ở bộ phận này mà không có ở bộ phận, cơ quan khác. Hàm lượng lectin tăng lên trong quá trình sinh trưởng của chúng.

Ở mức độ tế bào sự định khu lectin cũng đã được phát hiện. Một số công trình đã khẳng định lectin có trong nguyên sinh chất và một số bào quan của tế bào. Gần đây cũng đã chứng minh sự tồn tại của lectin ở trong nhân tế bào ở các tế bào của một số loài bò sát và động vật có vú (Atseve, 1986).

Việc nghiên cứu sự định khu của lectin vẫn đang tiếp diễn. Ở đây chúng tôi muốn nhấn mạnh sự phân bố của lectin khác với sự phân bố của protein nói chung. Khái quát quan trọng mà chúng tôi muốn đề cập ở đây là : Dù sự phân bố của lectin mang tính đặc thù nhưng chúng vẫn nằm trong mối tương quan chung về vai trò của protein đối với sự sống của tế bào và cơ thể.

2.2.1.3. Cấu tạo của lectin

a) Khối lượng phân tử lectin (Mr)

Lectin được xem là một polyme sinh học, vì khối lượng phân tử của nó lớn. Các phương pháp đã sử dụng để xác định khối lượng phân tử của lectin là phương pháp sàng lọc phân tử, phương pháp điện di trên gel polyacrylamit, phương pháp siêu ly tâm. Khối lượng phân tử của lectin được xác định theo các phương pháp trên thường chỉ mang tính tương đối. Ở những điều kiện thí nghiệm khác nhau các số liệu thu được thường có sự chênh lệch. Vì vậy, khi dẫn ra số liệu về khối lượng phân tử của lectin, người ta thường đưa kèm theo phương pháp xác định. Ví dụ, lectin từ mốc nhảy khi

xác định khối lượng phân tử bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit có mặt SDS là 26 kDa. Nhưng khi xác định khối lượng phân tử bằng phương pháp lọc gel phân tử thì $Mr = 28$ kDa.

Bằng các phương pháp nghiên cứu trên, khối lượng phân tử của khá nhiều dạng lectin đã được xác định. Kết luận có thể dẫn ra ở đây là khối lượng phân tử của lectin có sự dao động lớn và lectin có nguồn gốc khác nhau thì Mr có thể khác nhau hoặc giống nhau.

Lectin nguồn gốc từ thực vật có Mr bé nhất là lectin từ rễ cây *Urtica dioica* thuộc họ Gai (Urticaceae), khoảng 8,5 kDa. Lectin có nguồn gốc từ động vật có khối lượng phân tử nhỏ nhất là lectin từ trứng cá vược (*Pereza fluviatilis*) gồm một chuỗi polypeptit khoảng 13 kDa (Krahazh, 1978).

Có thể dẫn ra nhiều công trình đã công bố về khối lượng phân tử của các dạng lectin để thấy được mức độ biến đổi rộng lớn của nó.

Teichberg (1975) đã tinh chế lectin từ huyết thanh cá chình bằng sắc ký ái lực và đã xác định Mr của nó là 16,8 kDa. Lectin từ loài ếch *Rana japonica* có Mr của nó là 13,5 kDa. Dạng lectin này không tương tác với mannoza mà lại tương tác với glycoprotein và glycolipit (Sakakilaza, 1979). Còn lectin cơ lung của người có Mr khoảng 14,5 kDa.

Mr của lectin từ các loài động vật không xương sống lớn hơn Mr của lectin từ các loài động vật có xương sống. Mr của loài sam biển châu Mỹ *Limulus polyphemus* có Mr khoảng 335 kDa. Lectin sam biển Việt Nam (*Tachypleus tridentatus*, Leach) có khối lượng phân tử trên 700 kDa (Bui Phuong Thuan et al.) Một số lectin từ các loài thực vật cũng đã được xác định khối lượng phân tử. Lectin từ mầm lúa mì có Mr là 26 kDa, lectin từ hạt đậu nành (*Canavalia ensiformis* L.,) (ConA) có Mr khoảng 108 kDa. Lectin của một số loài mít chi *Artocarpus* cũng được xác định có Mr khoảng 50 kDa. Lectin từ một số loài thực vật không có mạch cũng đã được xác định Mr . Lectin từ tảo đỏ (*Phumosa phumosa*) có Mr là 150 kDa. Lectin từ mốc nhảy gồm 2 dạng lectin (izolectin), dạng đĩa I dạng đĩa II có Mr tương ứng là 28,1 kDa và 24 kDa.

Hiện nay các dẫn liệu về khối lượng phân tử của lectin ngày một nhiều hơn, khó có thể liệt kê hết được. Song một nhận xét mà chúng tôi muốn nói ở đây là : Chưa thể tìm thấy được mối quan hệ nào giữa khối lượng phân tử

và hoạt độ của lectin. Khối lượng phân tử của lectin không mang tính đặc trưng cho loài và cá thể và không phụ thuộc vào mức độ tiến hoá của cá thể và của loài.

b) Cấu tạo phân tử lectin

* Cấu trúc bậc nhất

Khi nghiên cứu trình tự axit amin trong phân tử lectin các nhà khoa học đã nhận thấy : Trình tự axit amin trong phân tử có phản ánh mối quan hệ trong quá trình tiến hoá. Với các loài khác xa thì số lượng và trình tự axit amin là khác nhau (Irwin, Ronald et al, 1978, Soni, 1982). Trên đối tượng là một số loài của họ Đậu (Fabaceae) : đậu Hà Lan (*Pisum sativum* L.), đậu tương (*Glycine max* L), lạc (*Arachis hypogaea* L.) các tác giả cho biết : lectin từ 3 loài này có 25 axit amin tận cùng đầu N giống hệt nhau. Khi nghiên cứu cấu trúc bậc nhất chuỗi α của lectin ở 3 loài cùng chi *Artocarpus* là mít thường (*A. integrifolia* L), mít tố nữ (*A. champeden* L) và chay (*A. tonkinensis*) tác giả Đỗ Ngọc Liên và cộng sự đã cho biết : trình tự của 20 axit amin tận cùng đầu N của chúng giống hệt nhau (Do Ngoc Lien, et al, 1993) (bảng 2.4).

Bảng 2.4. Trình tự sắp xếp các axit amin đầu tận cùng N của các chuỗi α của một số loài mít Việt Nam

Loài	Polypeptit	Trình tự sắp xếp
<i>A. tonkinensis</i>	17 kDa	GKAFDDGAFTGIREINLSINKETAIGD
<i>A. tonkinensis</i>	14 kDa	GKAFDDGAFTGIREINLSINKETAIGD
<i>A. champeden</i>	14 kDa	GKAFDDGAFTGIREINLSINKETAIGD
<i>A. heterophyllus</i>	17 kDa	GKAFDDGAFTGIREINLSINKETAIGD
<i>A. integrifolia</i>	α -chain ^(*)	GKAFDDGAFTGIREINLSINKETAIGD

Trên cơ sở của nhiều dẫn liệu khoa học về cấu trúc bậc nhất của các phân tử lectin, Soni (1982) đã nhận xét : Các loài càng có quan hệ họ hàng càng gần gũi thì cấu trúc bậc nhất của phân tử lectin càng giống nhau nhiều hơn. Phải chăng đây là một dấu hiệu để phân loại sinh vật ở mức độ phân tử (Lis and Sharon, 1986).

(*) Trình tự axit amin đầu N chuỗi α của mít *A.integifolia* theo Young et al (1991)

* Cấu trúc không gian của lectin :

Có khá nhiều công trình khoa học đã chỉ ra rằng một số phân tử lectin được cấu tạo từ một mạch polypeptit còn đa số các dạng lectin đã được nghiên cứu có cấu tạo từ hai mạch polypeptit trở lên. Mỗi mạch polypeptit tạo thành 1 tiểu đơn vị (subunit). Các tiểu đơn vị này có khối lượng phân tử giống nhau hoặc khác nhau (Strosberg et al, 1986). Nhờ áp dụng các phương pháp hiện đại như : siêu ly tâm phân tích, nhiễu xạ tia Ronghen, quang phổ huỳnh quang hấp phụ... Một số dạng lectin đã được nghiên cứu khá kỹ về cấu trúc không gian phân tử. Cấu trúc không gian của phân tử lectin được nghiên cứu khá kỹ là lectin từ hạt đậu rùa (*Canavalia ensiformis* L.,) còn gọi là ConA.

Cấu trúc phân tử ConA được Bourillon đưa ra năm 1973 khi áp dụng phương pháp nhiễu xạ tia Ronghen với độ phân giải 3Å. Lectin này có dạng hình cầu kích thước $42 \times 39 \times 40\text{\AA}$ do 4 tiểu đơn vị tạo thành, mỗi tiểu đơn vị có khối lượng phân tử giống nhau bằng 26 – 27 kDa. Mỗi tiểu đơn vị có 237 axit amin ở pH = 7, do đó Mr của ConA là 108 kDa. Các tiểu đơn vị này liên kết với nhau bằng các liên kết không cộng đồng hoá trị và tạo thành phân tử giả tứ diện.

Lectin từ mầm lúa mì (*Triticum vulgare*) cũng đã được khảo sát kỹ về cấu tạo. Phân tử này gồm 2 tiểu đơn vị không đối xứng. Mỗi tiểu đơn vị lại có 4 phân tử không tương đồng về cấu tạo. Một phân tử gồm 42 gốc axit amin. Bốn phân tử này nhờ 4 cầu disulfua ($-S-S-$) đã tạo thành một cấu hình khá chắc chắn gồm một số đoạn gấp khúc. Tuy nhiên, sự gấp khúc này là không tuân theo quy luật.

Bất kỳ một dạng lectin nào dù có cấu trúc bậc I hoặc có cấu trúc không gian phức tạp đều chứa trung tâm hoạt động. Đó là trung tâm liên kết cacbonhydrat. Chính trung tâm này quyết định hoạt độ lectin. Nếu như ở enzym, trung tâm hoạt động của chúng là các gốc axit amin hoặc phần phi protein (các coenzym) thì ở hầu hết các lectin trung tâm hoạt động của chúng là do một số gốc axit amin như tyrozin, xerin, treonin, triptophan... có khả năng liên kết mạnh với các gốc đường tạo nên. Theo Decastle và cộng sự, lectin từ hạt đậu thận đỏ (*Phaseolus vulgaris*), gốc axit amin triptophan trong trung tâm liên kết cacbonhydrat giữ vai trò quyết định hoạt động của nó.

Nghiên cứu cấu tạo phân tử ConA, tác giả Agrawal (1967), cho biết : 2 gốc tyrosin ở vị trí 12 và 100 giữ vai trò quyết định trong trung tâm hoạt động. Sự thay đổi 2 gốc này làm giảm hoạt độ lectin Con A.

Các dạng lectin khác nhau, tất nhiên có thành phần axit amin trong trung tâm hoạt động là khác nhau. Cho đến nay, vấn đề trung tâm hoạt động của lectin vẫn còn phức tạp.

Theo Bourillon (1973) ngoài các gốc axit amin tạo nên trung tâm hoạt động, một số ion kim loại cũng tham gia vào hoạt động lectin. Thường gặp nhất là các ion Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} . Đến nay vai trò của các ion này trong trung tâm hoạt động vẫn chưa được sáng tỏ, mặc dù người ta cũng đã biết chúng rất cần thiết cho hoạt động của lectin.

Vậy mỗi phân tử lectin chứa bao nhiêu trung tâm hoạt động ? Các nhà khoa học đã khẳng định, mỗi phân tử lectin phải có từ 2 trung tâm hoạt động trở lên. Và do đó lectin là phân tử có cấu trúc đa trị (polyvalent).

Nhờ phương pháp nhiễu xạ tia Ronghen, người ta đã chứng minh rằng ở mỗi tiểu đơn vị của Con A có một trung tâm liên kết cacbonhydrat (trung tâm hoạt động) và 2 vị trí gắn cả Ca^{2+} và Mn^{2+} . Các trung tâm hoạt động này đều cách vị trí gắn Ca^{2+} là 7Å và cách vị trí gắn Mn^{2+} là 6,8Å. Giữa các trung tâm hoạt động có một khoảng cách tương đối. Trong quá trình hoạt động, các trung tâm xích lại gần nhau, tương tác với nhau tạo nên điểm tiếp nhận cacbonhydrat. Nhờ điểm tiếp cận này, lectin đã liên kết được với các gốc đường trên bề

Khi một trong các trung tâm hoạt động bị biến đổi thì sự tương tác giữa các trung tâm này không xảy ra, điểm tiếp nhận không hình thành và phân tử lectin mất hoạt tính. Phân tử lectin từ hạt đậu tương (*Glycine max*. L.) có hai trung tâm hoạt động. Phân tử lectin từ loài *Lotus tetragonolobus* I có 2 – 4 trung tâm hoạt động. Còn phân tử lectin từ ốc sên (*Helix pomatia*) có đến 6 trung tâm hoạt động.

Cho đến nay chưa tìm thấy một dạng lectin nào chứa một trung tâm hoạt động. Điều này đã được Peuman và Van Dame nêu ra năm 1995.

Có thể nói rằng, các trung tâm hoạt động trong phân tử lectin có cấu trúc giống nhau hoặc khác nhau. Với những phân tử lectin mà các trung tâm hoạt động cấu tạo giống nhau thì chúng chỉ làm ngưng kết một hoặc một vài dạng

tế bào. Điều đó làm cho lectin có tính đặc hiệu nhóm máu cao. Các dạng lectin có chứa các trung tâm hoạt động khác nhau thì hoạt tính đa dạng hơn. Các lectin này thường không đặc hiệu nhóm máu. Đây là dạng lectin rất phổ biến trong tự nhiên.

Về cơ chế hoạt động của lectin, các nhà khoa học đều đã thống nhất như sau :

Các trung tâm hoạt động của các phân tử lectin đều có khả năng liên kết các gốc đường trong các thụ thể tiếp nhận (receptor) trên bề mặt màng tế bào. Các liên kết glucozit được hình thành giữa các receptor trên bề mặt màng tế bào với các trung tâm hoạt động của lectin. Nhờ các liên kết này mà lectin đã kết dính các tế bào, tạo nên hiện tượng ngưng kết tế bào. Các dạng lectin khác nhau, khả năng liên kết với các receptor trên bề mặt tế bào là không giống nhau.

Cũng như enzym, các trung tâm hoạt động của lectin chỉ hoạt động khi nó nằm trong một chính thể thống nhất, hoàn chỉnh của cấu trúc phân tử. Bất kỳ một tác nhân nào phá vỡ cấu trúc phân tử lectin cũng đều làm giảm hoặc mất khả năng hoạt động của các trung tâm này. Chính vì vậy, hoạt độ của lectin phụ thuộc chặt chẽ vào một số tác nhân lý hoá của môi trường.

2.2.1.4. Tính chất hoá lý học của lectin

** Tính tan và kết tủa*

Lectin hoà tan được trong nước nhưng chúng dễ tan trong các dung dịch muối loãng. Đặc tính này tương tự như globulin. Vì vậy, trong quá trình nghiên cứu lectin, các dung dịch muối loãng đã được sử dụng làm dung môi để chiết rút. Lectin có bản chất protein nên chúng dễ bị kết tủa bởi một số tác nhân lý hoá của môi trường như : tác dụng của alcol, axeton, của một số muối trung tính ở nồng độ cao đặc biệt là amon sunphat. Hiện nay axeton và amon sunphat được dùng phổ biến để kết tủa lectin. Muối của một số kim loại nặng dễ làm cho protein biến tính, vì vậy ít được sử dụng.

** Thành phần đường của lectin*

Trải qua hơn 100 năm, đến nay các nhà hoá sinh đã khẳng định lectin có bản chất hoá học là protein và glycoprotein. Đa số lectin là glycoprotein, phần phi protein là saccarit. Phần protein do một hay nhiều mạch polypeptit hình thành bằng liên kết cộng hoá trị hoặc không cộng hoá trị. Bởi vậy lectin

có thể được cấu tạo từ một hoặc nhiều chuỗi polypeptit để hình thành nên các tiểu đơn vị (subunit) và các isolectin.

Phần cacbonhydrat chính là phần phi protein trong phân tử lectin. Hầu hết các dạng lectin đã nghiên cứu đều chứa thành phần này. Tuy vậy, có một vài dạng lectin không chứa cacbonhydrat như ConA là lectin từ hạt đậu rùa (*Canavalia ensiformis*), lectin từ mầm lúa mì (*Triticum vulgare*). Cacbonhydrat có trong lectin thường là monoza loại hexoza và dẫn xuất của nó : glucoza, manzoza, galactoza, fucoza, glucosamin, galactosamin... Một số loại cacbonhydrat khác như xiloza, arabinosa... ít gặp hơn.

Thành phần protein : phần này do các axit amin kết hợp với nhau qua liên kết peptit tạo thành. Các nhà khoa học đều có một nhận xét : Thành phần axit amin của nhiều dạng lectin là khác nhau. Điều này hoàn toàn phù hợp với nguyên tắc cấu tạo phân tử protein. Khi phân tích cấu trúc bậc một của protein lectin, người ta nhận thấy hầu như có một số loại axit amin có tỷ lệ thấp hoặc hầu như không có. Các loại axit amin chiếm tỷ lệ cao thường gặp là serin, threonin, arginin, tryptophan, axit aspartic. Các axit amin ít gặp trong phân tử lectin hoặc có tỷ lệ rất thấp là những axit amin có chứa lưu huỳnh : xystein và methionin. Ví dụ, ConA và lectin từ ốc sên (*Helix pomatia*) có tỷ lệ xystein là rất thấp hoặc không có.

* Sự tương tác của lectin với các loại đường

Trong một số thí nghiệm về khả năng ngưng kết tế bào của lectin, người ta thấy nếu như có mặt một loại đường nào đó thì hoạt tính lectin giảm hoặc mất hẳn. Thế là nhiều công trình đã đi sâu tìm hiểu đặc tính này.

Phương pháp xác định sự tương tác giữa đường và lectin đang được sử dụng hiện nay là xác định hoạt độ ngưng kết hồng cầu của lectin khi có mặt một loại đường nào đó. Trường hợp hoạt độ lectin giảm hoặc mất hoàn toàn chứng tỏ đường đã kìm hãm hoạt tính của lectin. Ngược lại, hoạt độ lectin vẫn ổn định chứng tỏ đường không ức chế. Theo Sharon, phần lớn lectin chỉ tương tác với một loại đường đơn có cấu tạo hoá học tương tự. Các dạng lectin khác nhau, đường ức chế hoạt động của chúng có thể khác nhau hoặc giống nhau. Các loại đường glucoza và dẫn xuất amin của nó, galactoza và dẫn xuất amin của nó, fucoza, manzoza... có khả năng kìm hãm hoạt động của nhiều dạng lectin. Mankela trên cơ sở phân tích các dẫn liệu khoa học về tính chất này đã rút ra nhận xét : các manzoza phản ứng với lectin theo 4 nhóm.

Cơ sở để phân chia 4 nhóm này là dựa vào sự liên kết của phân tử đường với các nhóm hydroxyl (nhóm OH) ở vị trí C₃ và C₄ của các loại đường trong thành phần của các loại lectin khác nhau là không giống nhau. Do đó ái lực hoá học của các loại lectin này đối với đường là khác nhau. Bởi vậy lectin đã tương tác với các loại đường mang tính chọn lọc. Những lectin có nhóm hydroxyl của C₃ và C₄ nằm ở dưới vòng pyranose vị trí α thì thuộc nhóm I, liên kết đặc hiệu với L – fucoza. Những dạng lectin có nhóm hydroxyl của C₃ và C₄ nằm ở trên vòng pyranose vị trí β thì thuộc nhóm II, liên kết đặc hiệu với D – galactoza và N – axetylgalactozamin. Nhóm III bao gồm các lectin liên kết đặc hiệu với manosa và glucoza, khi nhóm OH của C₃ nằm trên vị trí β vòng pyranose còn nhóm OH của C₄ nằm ở dưới vòng vị trí α. Các lectin thuộc nhóm IV có vị trí không gian của các nhóm OH của C₃ và C₄ ngược với sự phân bố nhóm OH của C₃ và C₄ thuộc nhóm III. Lectin thuộc nhóm này không tương tác đặc hiệu với đường.

Vị trí không gian của các nhóm hydroxyl của C₃ và C₄ được biểu diễn như sau :

Nhóm I : Lectin tương tác đặc hiệu với L – fucoza.

Nhóm II : Lectin tương tác đặc hiệu với D – galactoza và N – axetyl galactozamin.

Nhóm III : Lectin tương tác đặc hiệu với glucoza và manosa.

Nhóm IV : Lectin không tương tác đặc hiệu với các loại đường.

Cơ chế tương tác đặc hiệu đường của các dạng lectin đã được Antoniuk (1977) giải thích. Ông cho rằng : Khi có mặt phân tử đường, trung tâm liên kết cacbonhydrat của lectin bị phong toả mất hoạt tính hoá học nên không thực hiện các liên kết hoá học với các receptor trên bề mặt màng tế bào. Do đó lectin không còn khả năng gây ngưng kết tế bào. Cơ chế tương tác với các loại đường của lectin ConA là một dẫn chứng. Trên cơ sở phân tích sự tương tác của ConA với α – methyl manopyranosit bằng tia X, một số tác giả đã cho rằng sự tương tác này là do nhóm cacboxyl (COOH) của các gốc axit amin aspartic vị trí 16 và 108 và nhóm hydroxyl (OH) của các gốc amin tizozin vị trí 12, 100 và serin 108 trong trung tâm hoạt động của ConA liên kết với đường nói trên tạo ra. Nhưng bản chất hoá học của liên kết giữa đường và lectin đến nay vẫn chưa được thống nhất.

Có thể nói rằng cơ chế của sự tương tác với đường của lectin vẫn còn nhiều bí ẩn. Mặc dù vậy, đặc tính này có ý nghĩa cực kỳ quan trọng trong các nghiên cứu về lectin. Với các lectin tương tác đặc hiệu với một loại đường nào đó thì có thể sử dụng lectin này để nghiên cứu sâu cấu trúc màng tế bào. Một số nhà khoa học cũng đã sử dụng lectin tương tác đặc hiệu với đường để xác định kháng nguyên trên bề mặt màng tế bào hồng cầu. Gần đây, dựa vào các loại đường ức chế đặc hiệu hoạt độ lectin mà người ta đã sử dụng chúng để tinh chế nhiều loại lectin bằng sắc ký ái lực và hơn nữa người ta cũng sử dụng cột ái lực lectin để tinh chế và nghiên cứu nhiều loại glycoprotein có chức năng sinh học.

2.2.1.5. Tính chất sinh học và miễn dịch của lectin

*** Khả năng gây ngưng kết tế bào**

Loại tế bào dễ bị lectin làm ngưng kết là các tế bào hồng cầu của động vật và người. Đây là dấu hiệu đặc trưng nhất để nhận biết lectin. Số lượng lectin có khả năng ngưng kết hồng cầu chỉ của một nhóm máu là rất ít. Theo các tác giả Allen và Billantine (1969) trong hơn 800 dạng lectin được phát hiện chỉ có 90 loài chứa lectin đặc hiệu nhóm máu, 711 loài chứa lectin không đặc hiệu nhóm máu. Các lectin đặc hiệu nhóm máu có ý nghĩa thực tiễn rất quan trọng. Nó là công cụ hữu hiệu để định loại nhóm máu theo hệ thống A, B, O, và AB mà không cần sử dụng huyết thanh máu. Trong nhiều năm qua các nhà nghiên cứu đã tìm lectin đặc hiệu nhóm máu. Dưới đây là danh mục các dạng lectin đặc hiệu nhóm máu của người đã được xác định.

Bảng 2.5. Các dạng lectin đặc hiệu nhóm máu của người

Lectin từ loài	Nhóm máu đặc hiệu
<i>Vicia cracca</i>	A
<i>Phaseolus lunatus</i>	A
<i>Helix pomatia</i>	A
<i>Banderirae simplicifolia</i>	A
<i>Dolichos biflorus</i>	A ₁
<i>Sophora japonica</i>	A+B
<i>Ulex europens</i>	O
<i>Lotus tetragonolobus</i>	O
<i>Anguilla anguilla</i>	O

Một số lectin không những gây ngưng kết tế bào hồng cầu người mà còn có khả năng gây ngưng kết tế bào của một số loài động vật và vi sinh vật. Theo Sharon (1986), các lectin gây ngưng kết tế bào động vật và tế bào của một số loài vi sinh vật khác đã được tìm thấy trong một số loài dưới đây.

Bảng 2.6. Lectin gây ngưng kết tế bào

Lectin từ loài	Loại tế bào bị ngưng kết
<i>Glycine max</i>	Hồng cầu thỏ
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Hồng cầu lợn
<i>Limulus polyphemus</i>	Hồng cầu cừu, thỏ, gà
<i>Lathyrus odoratus</i>	Tế bào động vật nguyên sinh
<i>Ricinus</i>	Tế bào vi khuẩn và động vật nguyên sinh

Một số lectin không có khả năng gây ngưng kết tế bào hồng cầu người nhưng lại gây ngưng kết tế bào hồng cầu của một số loài động vật. Vì vậy nếu chỉ lấy máu người làm phương tiện để xác định sự có mặt của lectin trong tự nhiên là phiến diện và không chính xác.

Một số thực nghiệm khoa học xác định rằng lectin trong các bộ phận khác nhau của một cơ thể rất giống nhau và có khả năng gây ngưng kết hồng cầu. Chúng chỉ khác nhau ở mức độ hoạt động. Lectin từ hạt, lá non, từ hoa của cây đậu ván đen (*Lablab purpureus* L.Sweet) đều không đặc hiệu nhóm máu nhưng lectin từ hạt có hoạt độ mạnh nhất. Hoạt độ ngưng kết tế bào hồng cầu của lectin cũng có sự thay đổi trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cơ thể sinh vật.

Lectin từ các loài khác nhau có thể gây ngưng kết tế bào hồng cầu cùng nhóm máu hoặc khác nhóm máu. Khi phân tích sự ngưng kết tế bào hồng cầu dưới nhóm máu, các nhà khoa học đã có nhận xét : một dạng lectin có thể chỉ ngưng kết các tế bào hồng cầu của dưới nhóm này mà không làm ngưng kết các tế bào hồng cầu của dưới nhóm khác trong cùng một nhóm. Ví dụ, lectin từ hạt đậu *Dolichos biflorus* chỉ ngưng kết tế bào hồng cầu của nhóm máu A₁, không ngưng kết tế bào hồng cầu của nhóm máu A₂ của người.

Ngoài các tế bào hồng cầu, hồng cầu người và hồng cầu của một số loài động vật, lectin còn có khả năng gây ngưng kết một số loài tế bào khác. Bourillon (1973) đã xác định các tế bào giao tử, tế bào khối u, tế bào ung thư, các tế bào phôi cũng bị ngưng kết bởi một số dạng lectin. Có thể dẫn ra đây một ví dụ điển hình : Lectin ConA có khả năng gây ngưng kết tế bào ung thư. Bourilon (1973) đã nghiên cứu cụ thể vấn đề này. Ông đã xác định ConA ở nồng độ thấp có khả năng làm ngưng kết tế bào biến dạng do ung thư. Còn các tế bào bình thường, nồng độ ConA phải rất cao mới có khả năng làm ngưng kết chúng. Sự sai khác này đã được giải thích theo các giả thuyết khác nhau. Một số tác giả cho rằng trên bề mặt màng của tế bào ung thư, số lượng receptor nhiều hơn so với số lượng receptor trên bề mặt của tế bào bình thường, vì vậy tế bào ung thư dễ bị ConA gây ngưng kết. Một số tác giả khác lại cho rằng, có sự sai khác về mức độ gây ngưng kết tế bào của ConA và do các tế bào ung thư, các receptor ở gần nhau và bộc lộ, vì vậy tạo điều kiện cho phản ứng giữa receptor với lectin dễ hơn so với các tế bào bình thường.

Khả năng gây ngưng kết tế bào hồng cầu và các loại tế bào khác, kể cả các tế bào biến dạng do ung thư có ý nghĩa lớn trong y học và miễn dịch. Tổng kết các công trình khoa học nghiên cứu khả năng gây ngưng kết tế bào của lectin, Soni (1982) đã chia lectin thành ba loại :

- Các dạng lectin gây ngưng kết tế bào hồng cầu người theo các nhóm máu, có một số lectin chỉ đặc hiệu một nhóm máu.
- Các dạng lectin chỉ gây ngưng kết một loại tế bào có nguồn gốc từ các loài khác nhau. Dạng lectin này được gọi là dạng lectin đặc hiệu cho một dạng tế bào.
- Các lectin chỉ ngưng kết các tế bào của một hoặc một vài loài động vật.

* *Khả năng kích thích và kim hâm phản bào của lectin*

Nếu như khả năng gây ngưng kết tế bào là một đặc điểm sinh học đặc trưng thì khả năng gây kích thích phản bào của lectin đã gây ấn tượng sâu sắc. Đặc tính này được phát hiện từ lectin đậu thận dò (*Phaseolus vulgaris*), khi dùng lectin này làm tác nhân gây kích thích sự phân chia của tế bào lympho người. Chính nhờ khả năng kích thích phản bào (mitogene) điển hình, lectin đã được tinh chế và thương mại hóa dùng trong nghiên cứu tế

bào và miễn dịch (chế phẩm PHA). Các nghiên cứu gần đây đã xác định rằng một vài dạng lectin từ chi *Artocarpus* có khả năng kích thích sự phân chia dòng tế bào lympho T – CD₄⁺ của người. Như chúng ta đã biết dòng tế bào này có chức năng bảo vệ cơ thể tiêu diệt các vi sinh vật và virut. Các protein lạ khi xâm nhập vào cơ thể như những kháng nguyên đã kích thích sự phân chia dòng tế bào này có ý nghĩa quan trọng trong việc tăng cường khả năng miễn dịch của cơ thể. Ngoài các tế bào lympho của người, lectin còn có khả năng kích thích phân bào nhiều loại tế bào khác : các tế bào bình thường và các tế bào phôi già. Các tế bào này không những phân chia nhanh mà còn tăng nhanh quá trình sinh trưởng và sản xuất kháng thể. Tính chất này của lectin đã được ứng dụng trong một số nghiên cứu về miễn dịch học.

Cơ chế của quá trình kích thích phân bào đến nay chưa thật rõ. Có ý kiến cho rằng cacbonhydrat trên màng tế bào là yếu tố kìm hãm sự phân chia của tế bào. Do vậy khi lectin tương tác với chúng, sự kìm hãm bị phá vỡ, tế bào tăng khả năng phân chia. Tuy vậy, luận điểm này chưa đủ sức thuyết phục ở chỗ khi xử lý tế bào bằng các enzym glycosidaza thích hợp, phân cacbonhydrat trên màng bị mất đi và sự có mặt của lectin cũng không làm tăng nhanh hơn quá trình phân chia tế bào.

Bên cạnh đặc tính trên, một số dạng lectin có khả năng ức chế, kìm hãm sự phân chia tế bào. Với tế bào ung thư, lectin có khả năng kìm hãm và phong toả sự phát triển, lây lan của chúng. Brucke (1965) đã giải thích vấn đề này như sau : Các phân tử lectin xâm nhập vào tế bào chủ, tác động đến phân tử ADN, khởi động các interferon. Interferon từ tế bào vật chủ xâm nhập vào các tế bào ung thư và làm ức chế sự phát triển của các khối u. Một số dạng lectin thực vật là độc tố đối với một số cơ thể động vật. Chúng làm chậm quá trình sinh trưởng của cơ thể.

Khả năng kích thích sự phân chia của tế bào bình thường, đồng thời kìm hãm sự phát triển của tế bào ung thư là một tính chất đặc hiệu quý của lectin. Rất có thể trong một tương lai không xa lectin sẽ là công cụ, là dược liệu để ngăn chặn hai căn bệnh thế kỷ của nhân loại : bệnh ung thư và hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS).

2.2.1.6. Vai trò của lectin đối với việc bảo vệ cơ thể sinh vật

Các lectin không phải là một kháng thể chống lại các tác nhân gây bệnh (như các kháng nguyên lạ, các virut và vi khuẩn) nhưng chúng có vai trò bảo

về cơ thể. Điều này đã được khẳng định. Khả năng này của lectin là dựa vào tính chất kết dính tế bào của nó. Các nghiên cứu những năm gần đây đã khẳng định : Lectin có tác dụng gắn tế bào vi khuẩn và kháng nguyên lạ với các đại thực bào. Vì vậy vi khuẩn và kháng nguyên lạ bị tiêu diệt và bị đào thải ra khỏi cơ thể. Quá trình này có ở các cơ thể thực vật. Sharon (1986) cùng nhóm nghiên cứu ở viện Weizman đã phát hiện thấy lectin có khả năng liên kết với các oligosaccharit kiểu chitin. Theo tác giả thì lectin ở một số loài thực vật có khả năng tương tác đặc hiệu với các oligosaccharit kiểu chitin có ở nấm *Trichoderma viride*. Đo đó lectin có thể kết hợp với các tế bào của các sợi nấm này và kìm hãm sự sinh trưởng của chúng, hạn chế sự nhiễm bệnh của một số cơ thể thực vật. Các nhà khoa học cũng đã xác định rằng một số loại lectin còn có khả năng tương tác, kết hợp với một số loài nấm mốc. Sự can thiệp sinh trưởng của các loài nấm bởi lectin đã gợi ý rằng : Lectin thực vật cũng như các hợp chất alkaloit là những mắt xích quan trọng trong hệ thống bảo vệ của cơ thể chúng.

Vì có bản chất là protein và glycoprotein nên một số nhà khoa học dự đoán lectin cũng có thể là một chất dự trữ trong tế bào. Hai tác giả Marylynn và Etzler (1986), khi nghiên cứu lectin trong các hạt nảy mầm ở một số loài thực vật đã thấy có sự thay đổi hàm lượng lectin tương tự như các dạng protein dự trữ khác. Khi nghiên cứu động thái lectin từ cây đậu ván đen (*Lablab purpureus* L. Sweet) và từ hạt cây mít mập (*Artocarpus heterophyllus*) tác giả Trương Văn Châu và cộng sự (1994) đã nhận thấy sự tăng hoặc giảm hàm lượng lectin tương đồng với sự tăng hoặc giảm hàm lượng protein nói chung. Mặc dù các công trình nghiên cứu vẫn đề này còn ít nhưng cũng đã gợi mở rằng lectin có chức năng như là một dạng protein dự trữ trong tế bào và cơ thể sinh vật.

Lectin có vai trò sinh lý như một enzym đã được Halina và Sharon (1987) phát hiện. Hai ông đã tách được từ hạt đậu mung một enzym là galactosidaza có hoạt tính lectin khá mạnh, có khả năng gây ngưng kết tế bào hồng cầu và có khối lượng phân tử khoảng 16kDa. Dạng enzym có hoạt tính lectin này cũng đã được tách ra từ tế bào trụ dưới lá mầm của một số loài thực vật khác. Từ loài *Vicia faba* người ta đã tách được enzym galactosidaza từ hạt có hoạt tính lectin. Lectin này tương tác đặc hiệu với lectin D - glucoza và D - manzoza (Dey, 1982). Một số enzym khác là

mannosidaza tách từ hạt đậu *Phaseolus vulgaris* có khả năng gây ngừng kết và kích thích phân chia tế bào bình thường như một dạng lectin (Paus và Sten, 1978).

Như vậy, trong một chủng mực nào đó, lectin có hoạt tính của enzym. Tuy nhiên, có nhiều loại enzym không có hoạt tính lectin như amilaza, galactoxydaza (Leviski, 1964 ; Honejsi, 1979).

Hiện tượng một số dạng lectin có hoạt tính enzym là một điều rất thú vị đang được nhiều tác giả quan tâm.

* *Khả năng tham gia đáp ứng miễn dịch của lectin*

Trong những năm gần đây, người ta đã phát hiện ra hàng loạt lectin có chức năng sinh lý và miễn dịch trên bề mặt tế bào động vật bậc cao và ở người. Các lectin này được gọi là selectin, có khả năng liên kết với nhiều chất kết hợp đường (glycoconjugates), có vai trò chủ yếu làm kết dính các tế bào nội mô thành mạch, kiểm soát hiện tượng viêm và di căn ung thư. Các lectin động vật này được chia thành 3 nhóm :

– Nhóm lectin C (hoặc lectin E) hoạt động phụ thuộc vào ion, xuất hiện ở màng tế bào nội mô (endothelial cells) có vai trò gây viêm sau khi được hoạt hoá bằng IL-1B, TNF – và độc tố LPS của tế bào vi khuẩn.

– Nhóm selectin – L hoạt động phụ thuộc vào ion Ca, có mặt ở tất cả các tế bào bạch cầu và ở dạng hoà tan trong huyết thanh đóng vai trò tạo kết dính các bạch cầu và nội mô tham gia vào đáp ứng miễn dịch.

– Nhóm selectin – P biểu hiện ở các tiểu cầu và ở cả các tế bào nội mô. Chúng xuất hiện trên màng tế bào sau khi được kích thích bằng histamin, thrombin, các peroxit và phản ứng với chất kết hợp (ligand) có bản chất lactosaminoglycan của các bạch cầu đơn nhân to, bạch cầu trung tính và các tế bào lympho T – CD₄⁺, tham gia vào đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào.

* *Các quyết định kháng nguyên nhận biết*

Các nhà khoa học đã tìm thấy lectin tồn tại bên cạnh các chất kìm hãm. Một số tác giả phát hiện thấy trong nhựa của cây *Ribonia pseudoacacia* có lectin chứa thành phần N – axetyl – D – galactosamin và một số đường trong họ galactoza. Tuy vậy, lectin trong nhựa này lại bị kìm hãm bởi họ đường galactoza, thậm chí các galactosit cũng không được vận chuyển trong

cơ quan thực vật này. Như vậy, có thể nói không phải tất cả các lectin trong thực vật đều trực tiếp tham gia vào cơ chế vận chuyển đường mà hình như chủ yếu đóng vai trò bảo vệ.

Lectin cũng có thể giúp cho thực vật và động vật nhận biết được các vi sinh vật cũng như nhận biết giữa các tế bào của cơ thể (Monsigny và các cộng sự, 1986). Khả năng này cho phép giải thích hàng loạt sự tương tác giữa các tế bào như sự kết dính của tế bào vi khuẩn vào động vật, sự liên kết của vi khuẩn cố định đạm với rễ cây họ Đậu, sự tiếp cận tinh trùng với trứng...

Nhiều nhà nghiên cứu cho rằng tác động của lectin ngoại sinh lên các tế bào động vật *in vitro* có thể giống như tác động của protein liên kết với đường có ở bề mặt của những tế bào lân cận.

Giống như enzym, kháng nguyên và kháng thể, lectin cũng là những protein có khả năng nhận biết tinh vi trình tự cacbonhydrat trên bề mặt tế bào và do đó cũng ảnh hưởng đến việc điều chỉnh hàng loạt chức năng sinh lý của tế bào.

* Vai trò của lectin trong liên kết của vi khuẩn cố định đạm

Theo Lis, Sharon và một số tác giả khác, lectin có thể đóng vai trò vận chuyển chất dự trữ và làm nguyên liệu dự trữ, làm chất trung gian liên kết giữa vi khuẩn và thực vật trong hiện tượng cố định đạm. Sự liên kết giữa các tế bào của các cây họ Đậu (Fabaceae) và vi khuẩn cố định đạm (*Rhizobium*) có tính đặc hiệu cao. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rễ cây của một số loài cây họ Đậu chỉ nhiễm một số loại vi khuẩn nhất định. Chẳng hạn, vi khuẩn chỉ tạo nốt sần cho đậu tương (*Glycine max Merr*) mà không thể tạo nốt sần cho đậu Hà Lan (*Pisum sativum*) và các cây đậu khác. Bằng phương pháp ghi dấu huỳnh quang người ta thấy rằng, lectin đậu tương liên kết được với 23 chủng loại trong số 25 chủng *Rhizobium japonicum* nhiễm vào cây đậu tương, nhưng không thể liên kết được với bất kỳ chủng nào nhiễm vào cây đậu khác. Các nhà khoa học cũng tìm thấy sự liên kết của ConA với các chủng *Rhizobium* có khả năng tạo nốt sần cho cây đậu rựa (*Canavalia ensiformis*).

Lectin có thể có những chức năng khác trong sự tương tác giữa thực vật và vi khuẩn cố định đạm. Lectin chiết từ cây cỏ ba lá có khả năng tương tác giữa kháng nguyên trên bề mặt tế bào vi khuẩn này với tế bào của rễ cây. Như vậy, lectin có tác dụng như cầu nối giữa bề mặt tế bào nốt sần với

kháng nguyên vì khuẩn. Tuy nhiên, trong các loài đậu không phải loài nào cũng có chứa lectin nhưng dù sao với những loài đậu có chứa lectin thì hình như lectin có vai trò nhất định trong việc gắn các vi khuẩn vào tế bào nốt sần. Vấn đề này còn đang được tiếp tục nghiên cứu.

* *Vai trò của lectin trong việc bảo vệ chống lại tác nhân gây bệnh*

Lectin không phải là kháng thể chống lại tác nhân gây bệnh (như các kháng nguyên lạ, vi khuẩn và virut) nhưng chúng lại có vai trò bảo vệ cơ thể. Điều này đã được khẳng định do khả năng kết dính tế bào của lectin. Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh lectin có tác dụng gắn vào tế bào vi khuẩn, virut hay các kháng nguyên lạ khác và đó là liên quan với quá trình hấp dẫn đại thực bào nuốt vi khuẩn, xảy ra ở cơ thể động vật.

Tác dụng bảo vệ này của lectin còn thể hiện ở cơ thể thực vật. Sự tương tác của lectin với sợi nấm lần đầu tiên đã được Sharon và các tác giả chứng minh. Họ thấy rằng lectin của mầm đại mạch bị kìm hãm đặc hiệu bởi đường oligosaccharit kiểu chitin có ở nấm *Trichoderma viride* gây bệnh nấm mốc ở hạt thóc. Trên cơ sở liên kết đó, lectin của mầm đại mạch có thể có chức năng bảo vệ mầm thóc non chống lại các nấm mốc gây bệnh. Các nhà khoa học cũng thấy rằng ngoài lectin mầm đại mạch, các lectin khác cũng có tác dụng kìm hãm sự sinh trưởng của nấm mốc nếu trên bề mặt nấm mốc chứa loại đường có khả năng tương tác đặc hiệu với các lectin này.

2.2.1.7. Ảnh hưởng của một số môi trường đến hoạt độ lectin

* *Ảnh hưởng của pH*

Các nghiên cứu về điểm đẳng điện của lectin đã cho thấy : Tại điểm đẳng điện (pH_i) hoạt độ lectin là bé nhất. Tại đó lectin dễ bị kết tủa. pH ngoài điểm đẳng điện, lectin ở trạng thái phân ly tích điện, dễ hòa tan và có hoạt độ. Mỗi dạng lectin thường có pH thích hợp với hoạt độ của nó, đó là giá trị pH mà ở đó hoạt độ lectin mạnh nhất. Ở pH vùng axit và kiềm mạnh hoạt độ lectin giảm hoặc mất hoàn toàn.

* *Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường*

Lectin có bản chất là protein và glycoprotein nên nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt độ của chúng. Ở nhiệt độ thấp, hoạt độ lectin giảm. Nhiệt độ tăng dần lên, hoạt độ lectin cũng tăng lên và đạt cực đại ở nhiệt độ thích hợp. Hầu hết các lectin hoạt độ bị mất ở nhiệt độ cao. Ở nhiệt độ cao protein

lectin bị biến tính không thuận nghịch. Hiện tượng sốc nhiệt cũng có thể làm mất hoạt độ lectin. Vì vậy, nhiệt độ của môi trường được xem là một yếu tố quan trọng trong nghiên cứu lectin.

* *Ảnh hưởng của một số nhân tố khác*

Emzym có khả năng làm tăng hoạt độ lectin. Trong một số thí nghiệm, các hồng cầu được xử lý bằng các emzym như tripixin, kimotripixin, papain... thì chúng rất dễ bị lectin làm ngưng kết. Ví dụ, khi xử lý hồng cầu nhóm máu O bằng papain thì hoạt độ của lectin từ tảo *Ulva lactuca* tăng lên 7 – 8 lần. Sở dĩ có hiện tượng này là khi hồng cầu xử lý với enzym thì chính enzym đã thuỷ phân giới hạn một số protein trên bề mặt tế bào hồng cầu, làm bộc lộ các nhóm đường của nó, vì vậy lectin dễ gắn vào màng tế bào hồng cầu hơn, dẫn đến hoạt độ lectin tăng lên.

Một số ion kim loại cũng ảnh hưởng đến hoạt độ lectin. Trong nhiều thí nghiệm khi có mặt một loại ion kim loại nào đó hoạt độ lectin sẽ giảm xuống hoặc tăng lên. Ảnh hưởng của chúng khá phức tạp và hầu như không theo quy luật. Có những ion kim loại ở nồng độ cao thì kìm hãm hoạt động lectin, nhưng ở nồng độ thấp làm tăng hoạt tính của chính lectin đó. Trong một số trường hợp khác cùng một loại ion kim loại, ở cùng một nồng độ, với dạng lectin này thi kìm hãm hoạt độ với dạng lectin khác lại làm tăng hoạt độ lên nhiều lần. Cho đến nay chưa có một công trình nào nghiên cứu đầy đủ về vấn đề này.

2.2.1.8. Các phương pháp tách chiết và tinh chế lectin

a) Các kỹ thuật chiết xuất lectin

Lectin có bản chất là protein hay glycoprotein dễ tan trong nước nên việc chiết xuất lectin ra khỏi các mô động vật, thực vật hay vi sinh vật có thể thực hiện dễ dàng bằng cách dùng các dung dịch muối loãng hoặc các dung dịch đậm chứa muối làm dung môi chiết xuất. Tuỳ theo tính chất của mỗi loại lectin người ta có thể sử dụng các dung môi chiết xuất khác nhau như dung dịch nước muối sinh lý NaCl 0,9% ; CaCl₂ 0,1M ; dung dịch đậm muối photphat, đậm Tris – HCl ...

** Kỹ thuật kết tủa bằng muối trung tính*

Phần lớn protein – lectin bị kết tủa bởi một số muối trung tính ở nồng độ cao và có thể được hoà tan trở lại. Các muối thường dùng để kết tủa protein

là muối cation hoá trị 1, anion đa hoá trị như : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2O_4 , Na_2SO_4 ... Các protein khác nhau được kết tủa ở những nồng độ muối trung tính khác nhau. Người ta sử dụng phương pháp này trong các quy trình chiết xuất lectin để cô đặc dung dịch protein cần tách.

* *Kết tủa phân đoạn bằng dung môi*

Một số dung môi hữu cơ có thể dễ hoà tan trong nước như axeton, polyetylenglycol, etanol... làm giảm độ hoà tan trong nước của protein đến mức chúng có thể bị kết tủa nhanh chóng. Nhược điểm chủ yếu của phương pháp này là rất dễ gây biến tính protein, vì vậy việc sử dụng dung môi để kết tủa lectin cần phải được tiến hành ở nhiệt độ thấp.

* *Thẩm tích*

Phương pháp thẩm tích được tiến hành dựa trên nguyên lý sử dụng màng bán thẩm với đặc tính cho qua những phần tử nhỏ hoà tan và giữ lại những phần tử lớn. Trong phương pháp này, màng bán thẩm ở dạng túi chứa chất cần thẩm tích đặt trong môi trường có pH nhất định, các phân tử nhỏ trong túi sẽ khuếch tán ra môi trường ngoài nhờ tác động của máy khuấy từ. Thẩm tích thường dùng để loại muối và những chất phân tử nhỏ không phải protein ra khỏi dung dịch chứa lectin cần thẩm tích.

b) *Các kỹ thuật tinh chế lectin*

* *Sắc ký lọc gel*

Đây là phương pháp tách lectin ra khỏi hỗn hợp protein dựa vào kích thước phân tử. Chất giá thường được sử dụng là Sephadex. Mỗi hạt Sephadex có bản chất là polysaccharit chứa nhiều liên kết ngang tạo thành hệ thống lỗ lưới xốp. Có nhiều loại Sephadex, trong đó mỗi loại có mức độ liên kết khác nhau tạo nên kích thước của lỗ xốp khác nhau. Chính mức độ liên kết này quyết định khả năng phân tách các chất có kích thước phân tử khác nhau. Để tinh chế lectin, người ta thường dùng loại Sephadex G75 và Sephadex G100.

Phương pháp sắc ký lọc gel còn được dùng để xác định khối lượng phân tử của chất cần tách.

* *Sắc ký trao đổi ion*

Lectin có bản chất protein nên phân tử của nó mang điện tích. Tuỳ thuộc vào pH của môi trường mà lectin mang điện tích dương hoặc âm. Lợi dụng

tính chất này người ta đã sử dụng cột sắc ký trao đổi ion để tinh chế lectin. Các chất nhựa gắn các nhóm chứa ion tích điện dương như DEAE – sephadex, DEAE – xenluloza, DEAE – trisacryl... được sử dụng làm chất trao đổi anion. Các chất nhựa gắn các nhóm chức ion tích điện âm như CM – Sephadex, CM – xenluloza, CM – trisacryl... được sử dụng làm chất trao đổi cation. Mỗi chất trao đổi ion đều có khả năng trao đổi một lượng ion nhất định gọi là dung lượng trao đổi. Người ta có thể sử dụng hai loại chất trao đổi ion ở trên để tinh chế lectin dựa vào bản chất ion hoá và khả năng trao đổi ion của phân tử lectin trong những điều kiện môi trường pH nhất định.

* Sắc ký ái lực

Nguyên tắc của phương pháp sắc ký ái lực là dựa trên ái lực kết hợp đặc hiệu của lectin với một phân tử khác gọi là chất kết hợp (ligand) được gắn vào một chất giá tạo nên pha tĩnh của cột sắc ký. Chất giá được sử dụng nhiều nhất là một số loại gel : Sephadex, Sepharose, Sephacryl, Agarose, Ultrogel... Quá trình thực hiện sắc ký ái lực được tiến hành qua 3 giai đoạn : giai đoạn 1 là tạo cột ái lực với lectin ; giai đoạn 2 là gắn hay hấp phụ lectin vào cột ái lực và giai đoạn 3 là phản hấp phụ lectin khỏi cột ái lực.

– *Giai đoạn 1* : Thiết kế cột ái lực lectin : Việc lựa chọn chất kết hợp có ái lực đặc hiệu (ligand) với protein cần tách có ý nghĩa rất quan trọng. Vì vậy, cần phải dựa vào tính chất của protein cần tách, đặc tính lý hoá của chất kết hợp và đặc biệt là khả năng liên kết đặc hiệu giữa protein và chất kết hợp. Người ta thường sử dụng một số cặp protein – chất kết hợp như ở bảng 2.7. Trong các thí nghiệm tinh chế lectin người ta thường lựa chọn các chất đường, glycoprotein hoặc chất cộng hợp đường có ái lực hoá học với một lectin nhất định. Chẳng hạn, người ta thiết kế cột chất giá (Sepharose hoặc Agarose) liên kết với đường galactoza hoặc dẫn xuất N – axetyl – galactosamin để tách các loại lectin đặc hiệu với nhóm đường này.

Hệ số liên kết giữa protein và ligand đóng vai trò quyết định khả năng liên kết giữa hai hợp chất. Hệ số này tăng đồng biến với khả năng gắn của protein và do đó ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thu hồi của quy trình. Không những thế hệ số còn tuỳ thuộc vào một số yếu tố môi trường như nhiệt độ và pH. Khi nhiệt độ và pH thay đổi thì hệ số liên kết cũng thay đổi.

Nếu nhiệt độ tăng quá cao hệ số liên kết sẽ giảm. Thông thường nên thực hiện quá trình súc ký ở pH ổn định và nhiệt độ thấp ($10 - 15^{\circ}\text{C}$).

– *Giai đoạn 2* : Hấp phụ lectin vào cột và loại bỏ các chất không có ái lực với cột : Các protein có ái lực với cột cần được tạo điều kiện tốt cho quá trình hấp phụ (pH, nhiệt độ, quá trình hấp phụ nhiều lần), ở giai đoạn này các protein không có ái lực với ligand và các protein hay lectin thừa sẽ bị đẩy ra khỏi cột.

– *Giai đoạn 3* : Giải hay phản hấp phụ lectin ra khỏi cột : Cần phải dùng một dung dịch giải hấp phụ có ái lực thích hợp để phản hấp phụ lectin ra khỏi cột.

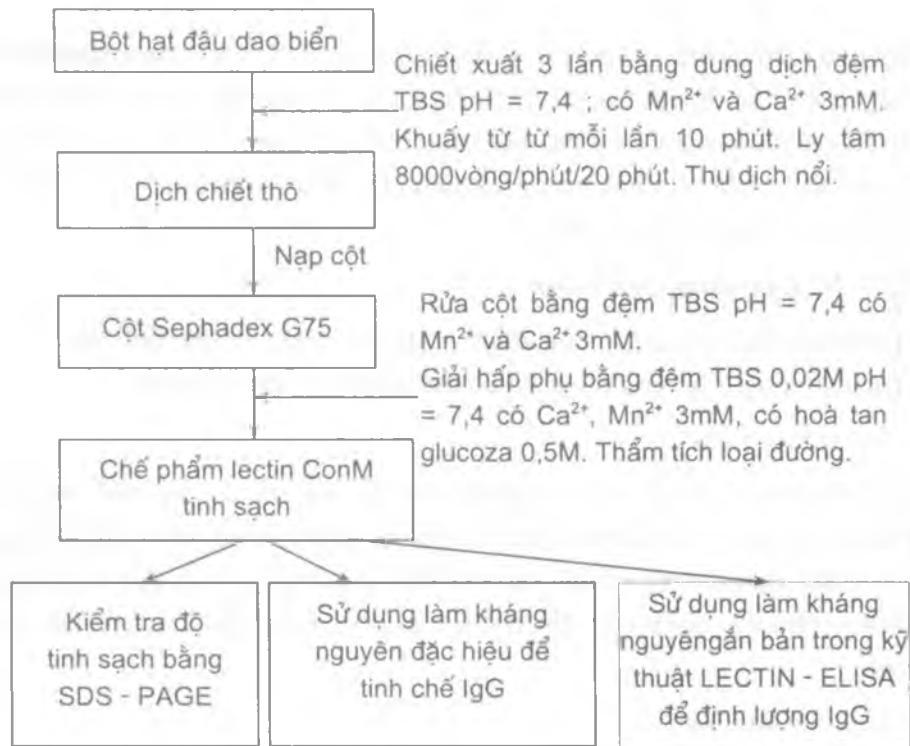
Quá trình thực hiện súc ký phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố dung dịch giải pháp phụ, tốc độ dòng chảy.

Bảng 2.7. Một số cặp protein – chất kết hợp sử dụng trong súc ký ái lực

Protein được tinh chế	Chất kết hợp
Kháng thể	Kháng nguyên
Enzym	Coenzym, chất ức chế cạnh tranh
Receptor	Hoocmon, vitamin
Lectin	Đường, hoặc chất cộng hợp đường mucin hoặc một số glycoprotein
Protein vận chuyển kim loại	Ion kim loại

2.2.1.9. Quy trình tinh chế lectin ConM

ConM đã được tinh chế bằng đệm TBS pH = 7,4 chứa 3mM Ca^{2+} và Mn^{2+} , dịch chiết thô được đưa trực tiếp (bỏ qua giai đoạn kết tủa) qua cột súc ký Sephadex G75, rửa cột bằng đệm TBS pH = 7,4 chứa 3mM Ca^{2+} và Mn^{2+} , giải hấp phụ bằng đệm TBS pH = 7,4 chứa 3mM Ca^{2+} và Mn^{2+} hòa tan glucoza 0,5M. Quy trình tinh chế lectin ConM được hoàn thiện như sau :

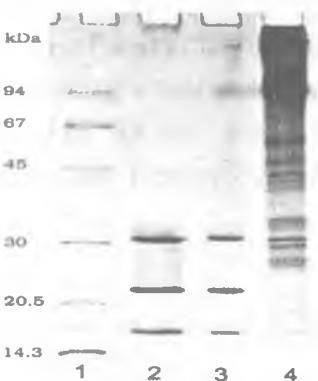


Hình 2.4. Quy trình tinh chế lectin ConM từ hạt đậu dao biển
(*Canavalia maritima* Aublet)

ConM được chiết rút bằng đệm TBS pH = 7,4 ; có Mn²⁺ và Ca²⁺ 3mM. Dịch chiết thô được đưa trực tiếp lên cột Sephadex G75, bỏ qua giai đoạn kết tủa.

* Đánh giá độ tinh sạch của chế phẩm lectin ConM

Để kiểm tra độ tinh sạch và xác định khối lượng phân tử của lectin ConM, bằng kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamit.



Chú thích :

Giếng 1 : Protein chuẩn

Giếng 2, 3 : Chế phẩm lectin ConM
tinh sạch

Giếng 4 : Dịch chiết thô

Lectin ConM thể hiện 3 băng có khối
lượng phân tử 33kDa, 23Da và 18kDa

Hình 2.4. Điện di SDS – PAGE, đánh giá độ tinh sạch của chế phẩm lectin ConM

Kết quả điện di trên gel polyacrylamit 12% có SDS và β – mercaptoetanol cho thấy chế phẩm lectin ConM thể hiện 3 băng : Một băng chính lớn nhất có khối lượng vào khoảng 33 kDa, một băng có khối lượng vào khoảng 23 kDa, một băng nhỏ nhất có khối lượng khoảng 18 kDa : Márcio V.R. (1996), Moreira R.A. Renato A.M. (1993).

2.2.1.10. Ứng dụng của lectin

Lectin đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau của đời sống. Các ứng dụng đó có thể được tóm tắt như sau :

– Trong huyết học :

Sử dụng lectin để phân loại nhóm máu là ứng dụng sớm nhất và đến nay vẫn còn được áp dụng rộng rãi. Phương pháp xác định nhóm máu bằng lectin cho kết quả nhanh, chính xác mà không cần dùng huyết thanh máu. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi lectin phải tinh khiết và có tính đặc hiệu cao.

– Trong tế bào học :

Lectin được sử dụng như một công cụ hữu hiệu để nghiên cứu cấu trúc màng tế bào và những biến đổi trên bề mặt màng tế bào trong quá trình biệt hoá bệnh lý thông qua sự thay đổi thành phần cacbonhydrat trên bề mặt tế bào.

Ví dụ, lectin của *Lotus tetragonolobus* còn gọi là FBP (*fucose-binding protein*) được sử dụng để nghiên cứu quá trình biệt hoá tế bào phôi ở giai đoạn thai sớm. FBP liên kết với những tế bào biệt hoá theo hướng quái thai mà không liên kết với những tế bào bình thường. Đó là do trong quá trình biệt hoá bệnh lý xuất hiện receptor trên bề mặt tế bào chứa 1 – α – fucoza đặc hiệu với FBP thay vì những receptor bình thường là 2 – galactosa không đặc hiệu với FBP. Như vậy, sử dụng kỹ thuật sắc ký lectin (*Lectin chromatography*) đã giúp khẳng định bản chất glycoprotein của các receptor màng tế bào để phát hiện trạng thái bệnh lý.

– Trong lĩnh vực kế hoạch hoá gia đình :

Lectin có thể được sử dụng để ngăn chặn sự thụ thai và chẩn đoán thai sớm nhờ khả năng ngưng kết tinh trùng của lectin và tương tác với hoocmon rau thai của nó.

- Lectin trong y học :

Lectin có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong nhiều lĩnh vực. Lectin được sử dụng như một công cụ chẩn đoán có hiệu quả. Dựa vào khả năng phân biệt một số vi sinh vật, lectin được sử dụng kết hợp với các xét nghiệm thông thường khác để nâng cao giá trị chẩn đoán bệnh. Kỹ thuật ELLA (*Enzym Linked Lectinosorbent – Assay*), được cải tiến từ kỹ thuật ELISA, trong đó lectin được gắn với một enzym. Khi một kháng nguyên vi khuẩn bị ngưng kết bởi lectin thì enzym sẽ hoạt động biến đổi phức hợp cơ chất không màu này thành chất có màu, cho phép xác định vi khuẩn một cách nhanh chóng (khoảng 2 giờ, trong khi phương pháp nuôi cấy thông thường khác cần ít nhất 24 giờ). Trục khuẩn than (*Bacillus anthracis*) có thể được phát hiện nhờ xét nghiệm ELLA với lectin đậu tương (*Glycin max Merr*) (Doyle and Siskin 1994). Ngoài ra dựa vào khả năng phân biệt tế bào bình thường với tế bào ung thư, lectin có thể được sử dụng để phối hợp chẩn đoán sớm một số bệnh ung thư. Đồng thời, một số lectin còn có khả năng nhận biết sự khác biệt của glycoprotein màng tế bào ung thư có khả năng di căn ở các mức độ khác nhau do đó chúng có thể được sử dụng để theo dõi và tiên lượng bệnh. Trong vài năm trở lại đây các nhà khoa học Nhật Bản đứng đầu là tác giả Takeia (1997) đã sử dụng kỹ thuật điện di ái lực lectin và thấm ái lực kháng thể (Lectin affinity electrophoresis and blotting antibody affinity) dùng một số lectin từ hạt đậu lăng (*Lens culinaris*), hạt đậu đũa (*Phaseolus vulgaris*) hạt thầu dầu (*Ricinus communis*)... có ái lực đặc hiệu với AFP trong huyết thanh bệnh nhân UTBMTBG. Trong 8 loại lectin được ứng dụng trong sắc ký ái lực lectin, lectin đậu lăng (*Lens culinaris*) (LCA) và Erythroagglutinating phytohemagglutinin A (E – PHA) là hai lectin được dùng phổ biến hơn cả.

AFP ái lực mạnh với LCA được gọi là AFP – L3 và AFP ái lực mạnh với Erythroagglutinating phytohemagglutinin A (E – PHA) được gọi là AFP – P4. Dựa vào tỷ lệ AFP – L3 và tỷ lệ AFP – P4 dương tính với độ nhạy, độ đặc hiệu và tỷ lệ dự báo dương tính, các tác giả đã phát hiện thấy AFP – L3 và AFP – P4 là những dấu ấn (marker) có độ đặc hiệu cao đối với bệnh nhân UTBMTBG. Khi sử dụng hai marker này cùng một lúc sẽ làm tăng độ nhạy, độ đặc hiệu và tỷ lệ dự báo dương tính bệnh UTBMTBG lên rất cao và phân biệt được với bệnh viêm gan cấp tính và mãn tính.

Việc xác định những marker đặc hiệu này càng trở nên có ý nghĩa khi bệnh nhân UTBMTBG có AFP ở mức bình thường, mức tăng nhẹ, hoặc khi mức tăng của AFP tương đương với hàm lượng AFP huyết thanh ở bệnh nhân gan mãn tính. Vì trong những trường hợp này mức AFP – L3 hay AFP – P4 vẫn tăng có ý nghĩa.

Nhiều nghiên cứu đã đi sâu tìm hiểu vai trò của các marker AFP – L3 và AFP – P4 trong việc theo dõi và phát hiện sớm UTBMTBG ở những đối tượng có nguy cơ cao như viêm gan mãn và sơ gan. Các marker này thường dương tính 10 tháng trước khi xuất hiện u gan ở bệnh nhân viêm gan mãn và dương tính từ 3 đến 10 tháng trước khi xuất hiện u gan ở bệnh nhân xơ gan (Taketa et al, 1998, Vũ Văn Khiêm 2000).

– *Lectin trong nghiên cứu ung thư :*

Ung thư (tumor, cancer) là một biểu hiện tăng sinh vô hạn của một dòng tế bào, tạo nên những khối u có bản chất đơn dòng. Các dòng tế bào này có biểu hiện bất thường về di truyền là do sự hoạt động quá mức của một số gen, sự rối loạn và tổn thương nhiễm sắc thể dẫn đến vi phạm vào quá trình phân chia tế bào. Sự bất thường của bộ máy di truyền tế bào dẫn đến vi phạm vào quá trình tự chết theo chương trình của tế bào (apoptosis). Từ đó các tế bào ung thư tăng khả năng di căn (metastasis) đến khu trú ở những mô tế bào đặc biệt khác như gan, não, tuỷ xương, tạo ra hiện tượng ung thư thứ phát xâm nhiễm.

Gần đây, các nhà khoa học đã chứng minh ung thư là một căn bệnh hiếm nghèo có bản chất gen và bản chất tiếp thu di truyền. Hơn nữa, các yếu tố tác động phức tạp bên trong cơ thể cũng như môi trường xung quanh đã tạo ra những nguyên nhân gây nên bệnh ung thư.

Đa số các dấu ấn ung thư (tumour marker) có bản chất là các glycoprotein, ví dụ : AFP, CEA... Vì vậy, người ta có thể sử dụng lectin để phát hiện các dấu ấn ung thư bằng các phương pháp miễn dịch liên kết đặc hiệu lectin. Ngày nay phương pháp này đã và đang được nhiều nhà khoa học quan tâm phát triển và mang lại hiệu quả chẩn đoán sớm các bệnh ung thư.

Nhiều lectin có khả năng kìm hãm sự phát triển của tế bào ung thư và ngăn chặn quá trình di căn của chúng, chẳng hạn ricin từ hạt thầu dầu (*Ricinus communis*). Hơn nữa lectin còn sử dụng để chẩn đoán sớm các bệnh

ung thư, do đó rất có ý nghĩa trong điều trị. Ví dụ : ConA đã sử dụng để phân biệt nhanh chóng giai đoạn sớm của 2 căn bệnh là ung thư buồng trứng và thương tổn gan. Cả 2 bệnh này đều tiết ra α – feto – protein (AFP) ở hàm lượng rất thấp (10ng/ml). Song AFP lại đặc hiệu với ConA theo tỷ lệ 12 – 43% trong bệnh ung thư buồng trứng và dưới 10% trong bệnh viêm gan.

Nhờ có sự tương tác với đường hoặc các chất liên kết đường tương tự như tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể nên lectin đã được dùng để phát hiện và tinh chế nhiều hợp chất sinh học chứa đường trong đó có các globulin miễn dịch (Ig). Chính vì có các chế phẩm tinh khiết này, các nhà khoa học đã có thể tiến hành nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc, bản chất và vai trò của chúng đối với cơ thể.

Biểu hiện rõ nhất trong ung thư là hàm lượng các kháng thể đơn dòng trong huyết thanh tăng lên nhanh chóng ở nhiều bệnh ung thư. Các kháng thể đơn dòng hiếm biểu hiện thường là IgD và IgE. Đối với các dưới lớp IgG thì các đơn dòng tăng ưu thế là IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4 và IgA₁.

Biểu hiện tăng đơn dòng của các kháng thể còn thấy rõ ở tính bất thường trong cấu trúc của kháng thể. Đó là sự tổng hợp quá mức các mảnh protein chuỗi nhẹ của IgG ở dạng dimer là protein Bence – Jones (BJP), có thể được phát hiện dễ dàng trong điện di lớp mỏng agarosa.

Biểu hiện bất thường thứ hai là sự thay đổi cấu trúc đường phân tử kháng thể. Việc nghiên cứu cấu trúc phân tử kháng thể trong bệnh ung thư (tăng sinh miễn dịch) cho phép hiểu được sự thay đổi cấu trúc đường của các kháng thể IgA và IgG. Bệnh biểu hiện rõ nhất là chuỗi nặng α (của IgA), đơn dòng có mức độ kết hợp đường rất cao (glycosylation), nghĩa là ở chuỗi nặng được gắn thêm các gốc đường (Aucouturier et al, 1996). Hậu quả của bệnh chuỗi nặng α của IgA trong ung thư tuỷ đã tạo ra sự đóng cặn nhiều chuỗi nặng hoặc các chuỗi nhẹ bất thường ở mức độ tiểu cầu thận, gây tổn thương viêm thận nghiêm trọng. Sự thay đổi cấu trúc đường của một số IgA, IgG làm biến đổi đặc tính ái lực hoá học của kháng thể đối với một số hoạt chất tự nhiên, đặc biệt là các lectin có nguồn gốc từ động vật hoặc thực vật. Đó là những nghiên cứu mới đây của Hiki và các cộng sự (1999) về sự thay đổi cấu trúc đường của phân tử kháng thể IgA₁ trong bệnh viêm cầu thận.

Sự thay đổi cấu trúc đường của các IgG u tuỷ cũng đã được chứng minh. Trên phân tử IgG của bệnh nhân u tuỷ đều gắn thêm 2 phân tử đường trên

chuỗi nặng nhưng thiếu hụt axit sialic và không có nhóm Glc – NAc – β 1. Sự biến đổi các chuỗi đường này xảy ra ở protein Bence – Jone (BJP), bắt nguồn từ phân tử IgG.

Như vậy, những biểu hiện của các kháng thể đơn dòng cũng có thể xét nghiệm và theo dõi tình trạng bệnh ung thư bằng các loại lectin gây ngưng kết đặc hiệu với chúng có thể đóng góp cho việc phân biệt các loại bệnh ung thư khác nhau cũng như các bệnh truyền nhiễm khác.

Lectin còn có khả năng kích thích phân chia tế bào lympho, kích thích tế bào B sản xuất kháng thể nên chúng đã được sử dụng để nghiên cứu cơ chế đáp ứng miễn dịch của cơ thể. Với khả năng kích thích phân bào, đặc biệt là các tế bào có thẩm quyền miễn dịch, trong đó có dòng tế bào lympho T – CD $_4^+$ của người, một số lectin thuộc họ Lan, họ Thuỷ tiên có tác dụng kìm hãm *in vitro* sự phát triển của virus HIV trong môi trường nuôi cấy tế bào lympho T – CD $_4^+$ do lectin kết hợp với glycoprotein trên bề mặt tế bào T – CD $_4^+$ thế chỗ của HIV.

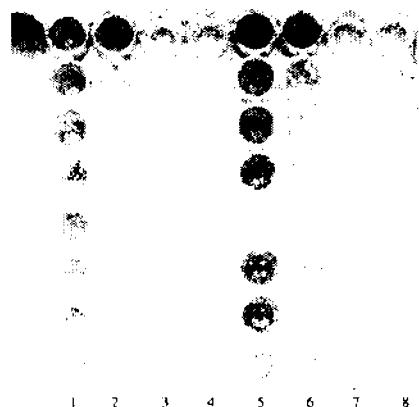
– Khả năng bắt giữ kháng thể IgG từ huyết thanh của ConM

Việc sử dụng lectin liên kết với một dòng kháng thể nào đó có ý nghĩa rất quan trọng khi theo dõi sự biến động hàm lượng kháng thể của dịch cơ thể.

Để chứng minh được khả năng bắt giữ IgG của ConM người ta tiến hành thực nghiệm trong đó có sử dụng 5 loại anti của 5 lớp kháng thể khác nhau như sau :

1. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgG từ huyết thanh người và dùng anti IgG cộng hợp với PO để nhận biết.
2. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgA từ huyết thanh người và dùng anti IgA cộng hợp với PO để nhận biết.
3. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgM từ huyết thanh người và dùng anti IgM cộng hợp với PO để nhận biết.
4. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgE từ huyết thanh người và dùng anti IgE cộng hợp với PO để nhận biết.
5. Sử dụng kháng nguyên gắn bản là ConM cho xét nghiệm ELISA đối với IgD từ huyết thanh người và dùng anti IgD cộng hợp với PO để nhận biết.

Kết quả thể hiện ở hình 2.5 : Từ kết quả này cho thấy lectin ConM không liên kết với các kháng thể khác của người mà chỉ liên kết với kháng thể IgG, do lectin có khả năng nhận biết tinh vi các gốc đường trên các phân tử kháng thể. Đây là một đặc tính quý của lectin đậu đao biển, được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu Hoá sinh và Y học.



Giêng 1, 2, 5, 6. : Lectin đậu đao biển ConM bắt giữ IgG : dương tính, có sự phân biệt màu so với giêng đối chứng và các lớp kháng thể khác.

Giêng 3 : Lectin đậu đao biển ConM không tương tác với IgA.

Giêng 4 : Lectin đậu đao biển ConM không tương tác với IgM.

Giêng 7 : Lectin đậu đao biển ConM không tương tác với IgE.

Giêng 8 : Lectin đậu đao biển ConM không tương tác với IgD.

Hình 2.5. Kết quả bắt giữ IgG của lectin đậu đao biển ConM

* Lectin trong dược học

Việc ứng dụng lectin để làm thuốc tuy còn mới mẻ nhưng đã mở ra nhiều triển vọng trong tương lai. ConA đã được sử dụng làm chất dẫn thuốc để đưa thuốc tới tế bào đích. Lectin đậu tương có khả năng ngưng kết tế bào tuy xương của người mắc bệnh ung thư dòng bạch cầu, khắc phục được hiện tượng thải loại mảng ghép. Do đó phát huy được hiệu quả của ghép tế bào tuy xương sản sinh ra dòng bạch cầu và hồng cầu cũng như kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân. Lectin từ hạt mít (*Artocarpus heterophyllus*) có khả năng tương tác đặc hiệu với phân tử glycoprotein CD4 ở bề mặt tế bào lympho T của người, là phân tử kết hợp đặc hiệu với HIV trong pha đầu tiên của quá trình nhiễm bệnh. Do đó có thể kìm hãm hiện tượng nhiễm HIV và hạn chế được khả năng mắc bệnh.

Như vậy lectin đã và đang được nghiên cứu trước hết là sử dụng trong chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm và rối loạn trao đổi chất, trong nghiên cứu sinh học và miễn dịch, làm mitogen trong nuôi cấy tế bào với mục đích chữa bệnh, mục đích tăng năng suất trong trồng trọt, chăn nuôi và bảo quản lương thực.

2.2.2. Công nghệ protein đậu tương

2.2.2.1. Cấu trúc và thành phần của protein đậu tương

Khoảng 98% protein của đậu tương được cất giữ trong các bào quan của tế bào gọi là "thể protein". Các thể protein này có hình cầu, đường kính 2 – 10 µm và chúng vẫn được giữ nguyên khi nghiên vừa phải và có thể tách riêng từ bột đã khử béo. Dựa trên chức năng, có thể chia các protein này thành 2 loại :

- Protein dự trữ (globulin) có thể bị thuỷ phân trong thời gian hạt này mầm để làm chất dinh dưỡng cho phôi sinh trưởng.
- Protein cấu trúc hoặc protein chức năng như enzym và chất kìm hãm enzym.

Protein đậu tương cũng có 4 bậc cấu trúc, chứa 20 axit amin với tỷ lệ các axit amin phân cực và khả năng hydrat cao làm cho chúng có độ hoà tan cao so với các protein thực vật khác (nhóm cacboxyl, nhóm amin, nhóm hydroxyl, nhóm sunphidril). Tỷ lệ các axit glutamic và axit aspartic trong protein đậu tương khá cao, do đó chúng hoà tan tốt trong kiềm và có giá trị pH đẳng điện ở 4,5 thấp hơn nhiều so với pH đẳng điện của các protein thực vật khác. Bằng các phương pháp sắc ký lọc gel, điện di hoặc siêu ly tâm... người ta đã tách được từ protein đậu tương 4 phân đoạn khác nhau ứng với hệ số sa lắng ($S_{20,w}$) khác nhau là : 2S, 7S, 11S và 15 S. (S : đơn vị Svedberg ở 20°C ; 1S = 10^{-13} Sec).

Phân đoạn 2S chiếm 22% protein tổng số (gồm các chất kìm hãm proteaza có vai trò quan trọng đối với giá trị dinh dưỡng của protein này).

Phân đoạn 7S được biết đến như là β-conglycinin chiếm 37% protein tổng số (gồm : lypoxygenaza, alpha amilaza, hemaglutinin, globulin). 7S chứa 3 dưới đơn vị (α , α' và β) có tính axit và có 6 đồng phân. Là một glycoprotein chứa 5% gluxit.

Phân đoạn 11S là protein dự trữ, chiếm khoảng 31% và có tên gọi là "glycinin". Glycinin được cấu tạo bởi 12 dưới đơn vị tương đối ưa béo, 6 dưới đơn vị có tính axit và 6 dưới đơn vị có tính kiềm, các dưới đơn vị này được nối với nhau qua các cầu disunphua.

Phân đoạn 15S chiếm khoảng 11% protein tổng số, được coi là do sự kết tụ của hai tiểu phân 11S.

Dưới tác động của các điều kiện gia công công nghệ như nhiệt độ, pH, các xử lý hoá học, sinh học đều làm thay đổi cấu trúc bậc cao của phân tử protein.

2.2.2.2. Tính chất hóa lý của protein đậu tương

** Khả năng gắn kết nước*

Protein đậu tương có khả năng gắn kết nước nhờ các nhóm ion hoá trên mạch polypeptit. Quá trình xử lý bằng axit hoặc bằng kiềm làm lộ ra các vị trí gắn kết với nước. Dịch isolat đậu tương gắn kết với 18,9 ; 19,2 và 21,6g nước/100g đậu tương khô ở pH = 4,5 ; 6,0 và 7,5 tương ứng.

** Khả năng giữ nước*

Khả năng giữ nước được xác định bằng lượng nước được giữ trong khung protein, bao gồm cả nước liên kết và nước tự do. Tương tự với khả năng gắn kết nước, khả năng giữ nước tăng khi nồng độ protein tăng. Khả năng giữ nước cũng phụ thuộc vào pH, sự có mặt của các muối trong dung dịch và nhiệt độ...

** Khả năng trương nở*

Khả năng trương nở của protein đậu tương phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ, nhiệt độ, pH và độ bền ion hoá của dịch protein. Khả năng hấp thụ nước của dịch protein đậu tương tăng khi tăng nhiệt độ của dịch trong một giới hạn nhất định. Khi pH của dịch tăng đến 9 trong giới hạn chưa xuất hiện sự phân ly thì khả năng trương nở của protein cũng tăng.

Nhiệt độ (°C)	Thường	70	80	90	100
Khả năng hấp thụ nước (µl/mg dịch)	9,6	16,7	20	17,2	14,2

** Khả năng hòa tan*

Khi ở pH đẳng điện (4,5), protein đậu tương không hòa tan, còn khi ở ngoài khoáng pH này chúng đều hòa tan. Mức độ hòa tan phụ thuộc vào các điều kiện công nghệ. Tốc độ khuấy trộn mạnh cũng làm tăng khả năng hòa tan.

Khả năng hòa tan của protein đậu tương phụ thuộc vào các tương tác giữa các phân tử protein – protein hoặc protein với các dung môi. Tương tác này đều bị ảnh hưởng bởi các điều kiện môi trường như nhiệt độ, pH, các muối... Nhiệt độ làm tăng khả năng hòa tan của protein do chúng làm tăng mức độ phân tán các phân tử protein. pH ảnh hưởng tới khả năng tích điện và tương tác tĩnh điện giữa các phân tử protein, vì vậy nó cũng ảnh hưởng tới tương tác protein – protein và khả năng hòa tan. Sự xuất hiện các ion

trong dung dịch cũng ảnh hưởng tới độ hoà tan theo một số cách. Ion trung hoà điện tích cùng dấu của các phân tử protein do vậy làm tăng tương tác protein – protein, giảm độ hoà tan. Việc tăng các ion bền ở pH = 2 cũng làm giảm độ hoà tan. Do ở pH = 2 các nhóm cacboxyl bị proton hoá, protein tích điện dương, khi xuất hiện một số ion như Cl^- sẽ làm trung hoà các protein tích điện dương, làm giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các protein dẫn đến giảm độ hoà tan.

* *Khả năng tạo độ nhớt*

Độ nhớt của dung dịch protein đậu tương đạt cực tiểu ở pH = 4 và pH = 6 tương ứng với điểm đắng điện của glycinin và conglycinin. Ngoài 2 mốc này ra độ nhớt của protein tăng, ở các giá trị pH quá cao hoặc quá thấp do các protein bị biến tính, dãn mạch và phân ly thành các dưới đơn vị, do đó sẽ làm tăng cường các tương tác hydro, tương tác tĩnh điện và tương tác kỵ nước giữa các nhóm chức của các cạnh bên của các phân tử protein, ảnh hưởng lớn tới độ nhớt của protein đậu tương.

Trong trường hợp protein trương nở, nếu thêm natriclorua vào sẽ làm giảm độ nhớt của dung dịch do chúng làm giảm khả năng tĩnh điện của các phân tử protein dẫn đến làm giảm khả năng hydrat hoá của protein.

* *Khả năng tạo gel*

Gel protein đậu tương được tạo thành là do dưới tác động của nhiệt và một số tác nhân khác làm biến đổi cấu trúc bậc cao của protein tạo ra một mạng lưới không gian 3 chiều. Cấu trúc này được giữ bền là do các liên kết hydro, liên kết tĩnh điện và các liên kết disunphit. Dưới tác dụng của nhiệt, dung dịch protein đậu tương trở thành dạng tiền gel. Dịch isolat protein đậu tương nếu không cho thêm các chất khác sẽ tạo ra các gel cứng và thô. Nếu thêm đến 30% nước gel thu được thường mềm và lỏng lẻo.

Để tạo gel, nồng độ protein tối thiểu phải đạt 8%. Nhiệt độ cho sự tạo gel tối ưu thay đổi theo nồng độ protein ban đầu. Nhiệt độ này tăng 75 – 100°C khi nồng độ protein tăng 8–16%. Thông thường khi nhiệt ở nhiệt độ thấp, gel tạo thành sẽ mềm, điều này có thể giải thích bởi sự gấp nếp của mạch polypeptit không hiệu quả.

Ảnh hưởng của pH tới quá trình tạo gel cũng đã được khảo sát. Khi môi trường tạo gel quá axit hoặc quá kiềm sẽ làm giảm khả năng tạo gel. Trong những điều kiện này, các tương tác protein – protein tạo mạng lưới không gian 3 chiều bị giảm. Nguyên nhân có thể là do làm tăng lực đẩy tĩnh điện

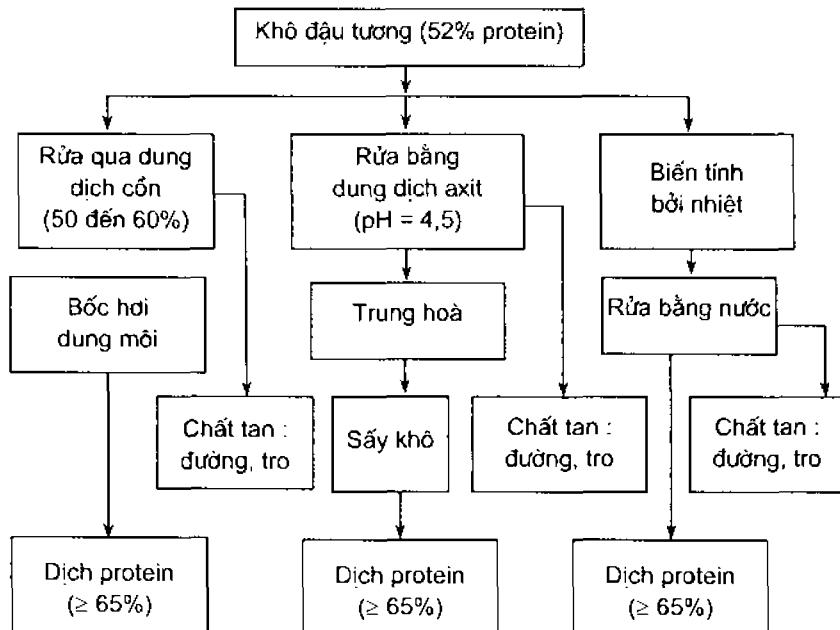
giữa các nhóm tích điện. Khi ở pH trung hoà các tương tác tĩnh điện làm tăng độ bền của gel.

Cấu trúc và độ bền của gel còn phụ thuộc vào nguồn protein đậu tương (phụ thuộc vào hàm lượng glyxinin và conglyxinin). Glyxinin chứa một lượng lớn các nhóm xystein do vậy sẽ tạo một lượng lớn các liên kết disunphua trong gel, còn mạng trong conglyxinin gel được tạo chủ yếu bởi các liên kết hydrophop. Do vậy, từ các nguồn protein đậu tương khác nhau sẽ thu được các gel có cấu trúc và độ bền khác nhau.

2.2.2.3. Một số sản phẩm thu nhận từ protein đậu tương

Hạt đậu tương chứa một hàm lượng dầu và protein khá cao, thông thường chứa khoảng 20% dầu, 40% protein, 35% gluxit và khoảng 5% tro.

Phần lớn đậu tương hiện nay được sử dụng để ép dầu, khô đậu tương (đậu tương đã loại dầu) được dùng làm nước chấm hoặc làm thức ăn cho gia súc. Ngày nay các nhà khoa học trên thế giới rất quan tâm nghiên cứu sản xuất một số sản phẩm từ đậu tương có chất lượng cao (hàm lượng protein cao, không có vị đắng, vị ngọt, độ hòa tan cao...). Sau đây giới thiệu một số công nghệ, đặc tính, ứng dụng các protein đậm đặc :



Hình 2.7. Sơ đồ tổng quát quá trình thu nhận protein đậm đặc
(Soybean protein concentrate – SPC)

a) Soybean protein concentrate (SPC)

SPC là một loại sản phẩm thực phẩm mới. Sản phẩm thương mại SPC đầu tiên được ra đời năm 1959. Trong vòng 30 năm trở lại đây, chúng đã trở thành một thành phần quan trọng, được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp thực phẩm. Trong nhiều ứng dụng, SPC chỉ đơn giản làm chất thay thế cho bột đậu tương, nhưng trong một số ứng dụng khác, SPC có chức năng đặc biệt mà bột đậu tương không thể có được.

Trên thực tế, việc phát triển SPC ban đầu nhằm 2 mục đích là : làm tăng hàm lượng protein và để cải thiện hương vị cho sản phẩm.

Theo các phương pháp thông thường, các sản phẩm bột đậu tương nguyên béo và chưa rang hay bột đậu tương đã tách béo rất khó mất vị đậu tương tươi. Vì vậy, bột đậu tương tươi bị hạn chế sử dụng trong sản xuất. Một số quá trình cải tiến sau này đã tìm cách tách các cầu từ gây vị đắng và vị đặc trưng của đậu tương.

Hàm lượng protein tối đa trong bột đậu tương, ngay cả khi đã hoàn toàn loại bỏ vỏ và dầu, cũng chỉ khoảng 55%. Xét ở một mức độ ứng dụng nhất định, hàm lượng protein trong đậu tương có phần trăm cao hơn, nên thường được dùng trong chế biến thực phẩm, ví dụ trong các sản phẩm thịt.

Nguyên liệu đầu cho sản xuất SPC là bột xay đậu tương khô, đã được tách vỏ và tách béo với hàm lượng protein hòa tan cao. Tiến hành cô đặc protein bằng cách loại bỏ các thành phần hòa tan không có bản chất protein. Những chất này không chỉ là các loại đường hòa tan như mono, di và oligosaccarit, mà còn một số chất chứa nitơ có khối lượng phân tử thấp, các loại khoáng chất. Thông thường từ một tấn bột đậu tương xay khô đã tách béo có thể thu được 750kg SPC.

Có 3 phương pháp chính để tách những cầu từ này mà không cần phải hòa tan phân đoạn các protein chính. Các phương pháp này không phải để sản xuất cùng một sản phẩm, mà mỗi phương pháp sẽ tạo ra một loại sản phẩm sau có đặc khác nhau, với những tính chất khác nhau và ứng dụng riêng biệt. Những phương pháp đó là :

- Phương pháp chiết bằng etanol pha lỏng.
- Phương pháp chiết bằng axit.
- Phương pháp chiết bằng biến tính nhiệt / nước.

* Định nghĩa, thành phần và phân loại :

Hiệp hội kiểm soát dinh dưỡng của Mỹ (AAFCO) định nghĩa SPC như sau : "Protein cô đặc đậu tương (SPC – soybean protein concentrate) được tạo ra từ hạt đậu tương chất lượng cao, không bị hỏng, sạch, tách vỏ ; loại bỏ phần lớn dầu và các thành phần hòa tan trong nước có bản chất không phải protein ; SPC phải chứa không dưới 70% protein ở điều kiện khô tuyệt đối." (Theo '89 Soya Bluebook).

Dưới đây là thành phần của một SPC điển hình (SOLCON, sản xuất bởi Solbar Hatzor Ltd.) :

Bảng 2.8. Thành phần một SPC điển hình

Protein	70%
Hàm ẩm	8%
Sợi thô	4,5%
Tro	7%
Các hạt nhỏ	95% < 150 microns
Hàm lượng béo	1%
Vệ sinh vật tổng số (Standard plate count)	15.000 / g
Salmonella trong 200g	Âm tính
E. coli trong 1g	Âm tính

Như đã đề cập ở trên, có 3 loại SPC cơ bản, phụ thuộc vào phương pháp sử dụng để tách các thành phần hòa tan không phải là protein. Cả 3 loại SPC này đều có những thành phần về cơ bản xấp xỉ với mức như sau :

Protein (N x 6,25)	70%
Cacbonhydrat không hòa tan	20%
Tro	5% – 8%
Chất béo	1%

SPC còn được đặc trưng bởi chỉ số hàm lượng protein hòa tan. Bằng các phương pháp chiết tách nói trên, protein đậu tương tồn tại ở dạng không

hoà tan. Tuy nhiên, sau đó có thể làm tăng tính hoà tan của protein trong hỗn hợp cõi, ví dụ như trung hoà axit trong sản phẩm cõi đặc bằng kiềm. Dịch cõi đặc tạo ra theo phương pháp biến tính nhiệt là dạng biến tính protein không thuận nghịch và màu sắc sẽ bị đậm hơn. Phương pháp chiết bằng etanol có giá trị NSI thấp (10 – 15%) do quá trình biến tính protein bằng etanol. Tuy nhiên, những thay đổi ở mức độ phân tử do etanol gây ra khác hoàn toàn so với các phương pháp biến tính bằng nhiệt. Do đó, mặc dù độ hoà tan của protein thấp (theo các chỉ số chuẩn NSI và NDI), sản phẩm thu được theo phương pháp này vẫn giữ được hầu hết các đặc điểm chức năng (như độ sệt, khả năng tạo nhũ...).

Độ phân tán và chức năng của sản phẩm theo phương pháp etanol có thể được cải thiện bằng cách phun hơi (steam injection) hoặc nấu (jet – cooking), rồi sau đó đem đông hoá lắc mạnh (Hội đồng protein từ đậu tương – Soy Protein Council 1987).

Nhiều đặc điểm của hương đậu tươi cũng bị tách khỏi sản phẩm chiết sau quá trình trích ly. Sản phẩm đậu tương cõi đặc tương đối nhạt. Những loại oligosaccarit từ bột đậu tương như raffinoza, stachyoza cũng bị tách bỏ theo đúng mục sử dụng trong quá trình chiết.

SPC trên thị trường ở nhiều dạng khác nhau : dạng hạt, dạng viên, dạng bột hoặc bột sấy phun. Ngoài ra còn có dạng dịch đặc.

Do một số protein thấp phân tử cũng bị tách ra cùng đường, nên thành phần axit amin trong sản phẩm cõi cũng khác so với dạng bột đậu tương ban đầu (bảng 2.9).

Bảng 2.9. Thành phần axit amin của SPC và bột đậu tương

Axit amin	Bột đậu tương	Soy protein concentrate (SPC)	
		Phương pháp etanol	Phương pháp axit
Alanin	4,0	4,86	4,03
Axit aspartic	6,05	7,08	6,46
Half – xystin	6,05	12,84	11,28
Axit glutamic	6,05	20,20	18,52

Axit amin	Bột đậu tương	Soy protein concentrate (SPC)	
		Phương pháp etanol	Phương pháp axit
Glyxin	3,99	4,60	4,60
Histidin	2,60	2,64	2,59
Isoloxin	4,80	4,80	5,26
Lixin	6,50	7,90	7,59
Lysin	5,70	6,40	5,26
Methionin	1,34	1,40	4,60
Phenylalanin	4,72	5,20	4,60
Prolin	4,72	6,00	4,60
Serin	5,00	5,70	4,60
Threonin	4,27	4,46	4,60
Tryptophan	1,80	1,60	1,35
Tyrosin	3,40	3,70	4,37
Valin	4,60	5,00	5,57

* Quá trình sản xuất :

– Quá trình tách bằng etanol :

Quá trình diễn ra dựa trên khả năng hòa tan trong pha lỏng của một số loại rượu mạch ngắn (methanol, etanol và isopropanol) để chiết phân đường hòa tan trong bột đậu tương đã được tách béo, mà không hòa tan protein của nó. Nồng độ rượu tối đa cho quá trình này là khoảng 60% về khối lượng.

Lý thuyết về chiết bằng dung môi được áp dụng để tách protein khỏi bột đậu tương được tách béo với etanol ở pha lỏng.

Quá trình gồm các bước sau :

- + Trích ly lỏng – rắn.
- + Tách và thu hồi dung môi từ pha lỏng.
- + Tách và thu hồi dung môi từ kết tủa.

- + Sấy khô và nghiền kết tủa vảy (flakes).
- *Trích ly lỏng – rắn* : Quá trình có thể được diễn ra theo từng mẻ hoặc liên tục. Trích ly liên tục có thể được áp dụng đối với các quá trình ở quy mô tương đối lớn. Theo Campell và đồng nghiệp (1985), quá trình liên tục được dùng cho các nhà máy với công suất trên 5000 tấn/năm. Không giống như ngành công nghiệp ép dầu từ hạt, những xí nghiệp nhỏ hơn thường không dùng được phương pháp này. Do vậy, quá trình gián đoạn được áp dụng rộng rãi hơn. Phương pháp và loại thiết bị sử dụng tương đối giống với những thiết bị dùng cho tách dầu từ thực vật. Trong trường hợp tách chiết bằng etanol, dung môi dùng rất dễ bay hơi và dễ bắt cháy vì thế cần áp dụng các biện pháp an toàn với dịch lỏng nhằm tránh hỏa hoạn và nổ.

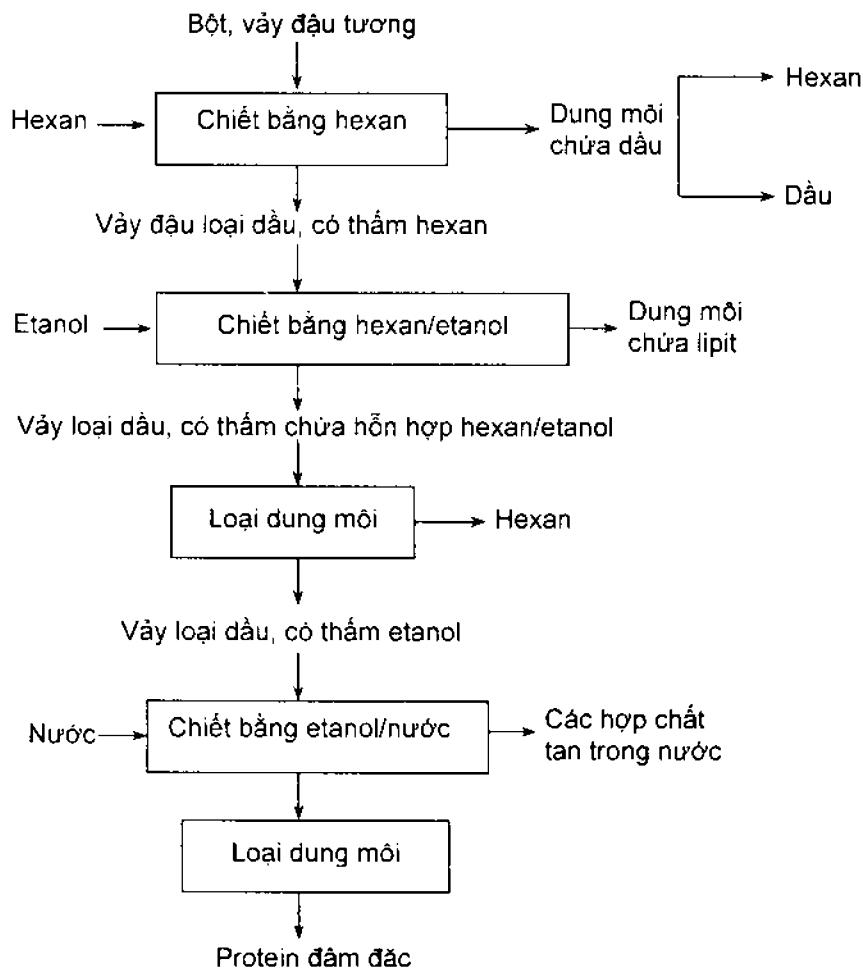
Lý do sử dụng bột đậu tương với hàm lượng NSI cao làm nguyên liệu dầu không hoàn toàn liên quan tới mục đích tạo sản phẩm có hàm lượng protein cao. Lý do chính để sử dụng loại bột này là do tỷ lệ phần trăm các loại đường hòa tan có thể tách được trong bột cao hơn so với loại đậu đã rang. Các loại đậu rang sẽ làm cho đường khó hòa tan hơn vì chúng đã bị liên kết với protein (phản ứng Maillard) hoặc bị caramel hoá. Vì thế, sau quá trình chiết, đường không bị tách bởi dung môi và vẫn còn trong sản phẩm, làm giảm hàm lượng protein. Hơn nữa, màu sắc của sản phẩm cũng bị đậm hơn và giá trị dinh dưỡng cũng bị giảm (do hàm lượng lysin thấp hơn).

- *Tách và thu hồi dung môi khỏi dịch lỏng* : Rượu được tách ra khỏi dịch lỏng bằng cách cho bay hơi hoặc bằng phương pháp chưng cất. Sau đó chúng được hoà lại với nồng độ thích hợp và tái sử dụng trong các thiết bị chiết. Phần dịch còn lại sau quá trình chưng cất là dung dịch lỏng chứa đường và các chất hòa tan khác. Chúng được cô lại tới nồng độ giống như ở mật ong và được bán như là rỉ đậu tương (soy molasses). Thông thường, rỉ đậu tương chứa 50% tổng lượng chất rắn hòa tan. Những chất rắn này bao gồm cacbonhydrat (60%), protein và các chất có chứa nitơ (10%), khoáng (10%), chất béo và các hợp chất lipoit (20%). Rỉ đậu tương thường được sử dụng làm thành phần năng lượng (caloric ingredient) và làm thức ăn chăn nuôi.

- **Tách dung môi khỏi chất rắn kết tủa :** Sau khi tách, dung môi chứa trong kết tủa được tách ra. Phương pháp sử dụng tương tự như phương pháp tách hexan khỏi đậu tương. Hơi ở nhiệt độ cao chứa hỗn hợp nước – rượu có tác dụng tách nhanh dung môi, nước còn lại trong phần rắn được tách nhờ phương pháp sấy bằng khí nóng.

- **Nghiền :** Sử dụng thiết bị nghiên giống thiết bị trong sản xuất bột đậu tương.

– **Quy trình sản xuất SPC bằng phương pháp etanol (trích ly 3 lần) :**



Hình 2.8. Sơ đồ công nghệ sản xuất SPC theo phương pháp etanol

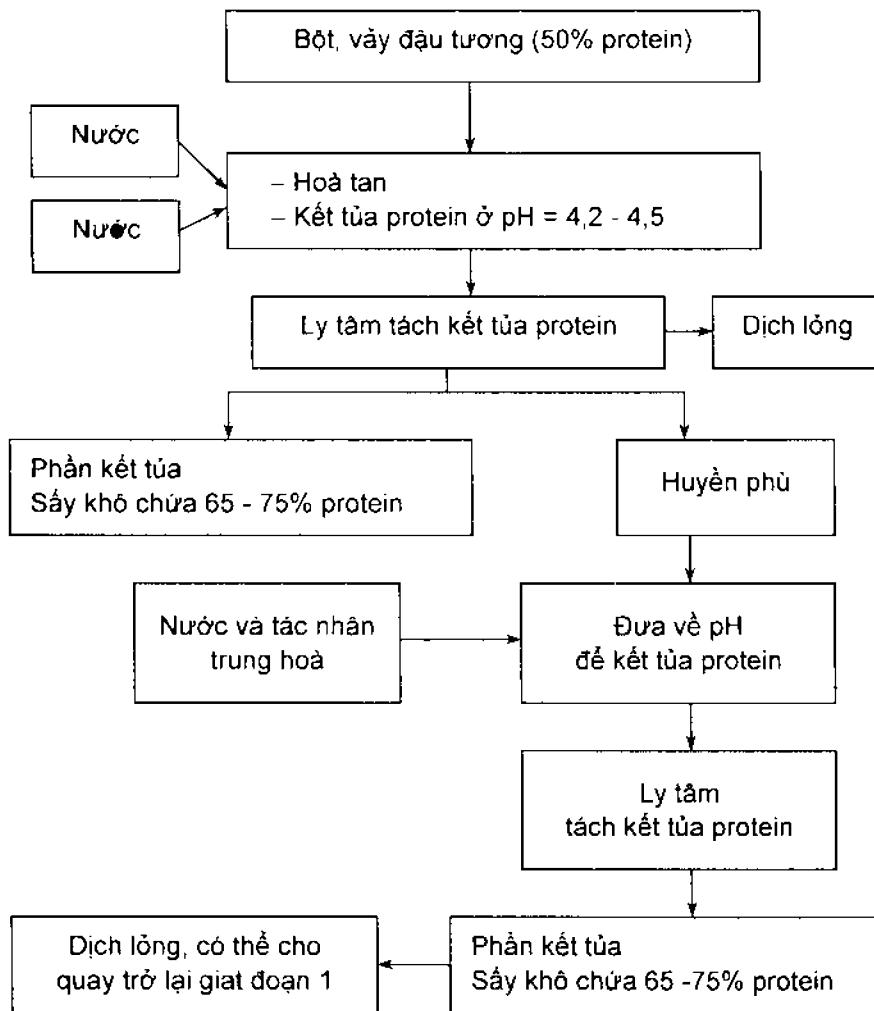
– Quá trình tách bằng axit :

Phương pháp này dựa trên khả năng hoà tan của protein đậu tương ở các khoảng pH khác nhau. Hầu hết protein đậu tương có độ tan kém nhất ở khoảng pH = 4,2 – 4,5 (diểm đẳng điện). Do đó, khi điều chỉnh pH tới khoảng nói trên, protein kết tủa. Chúng ta có thể tách protein khỏi đường tan cùng dung môi sử dụng là nước (có bổ sung axit).

Phương pháp này sử dụng dung môi nước – là một dung môi có ưu điểm hơn so với dung môi rượu cồn : không bắt lửa, không cháy nổ, không gây độc và rẻ tiền. Tuy nhiên, đây cũng là nhược điểm của phương pháp. Quá trình tách chất rắn kết tủa khỏi dung môi nước sẽ khó hơn và không triệt để do phần kết tủa hấp thụ một lượng nước lớn và trương nở. Phương pháp lắng nhờ trọng lực là không thích hợp cho phân tách rắn – lỏng. Thông thường phải sử dụng tới một số phương pháp thay thế khác như lọc thùng quay chân không hoặc ly tâm.

Quá trình sản xuất gián đoạn sử dụng máy ly tâm tách cặn. Bột đậu tương đã tách béo được trộn với nước pha axit trong thùng trộn. Dịch sệt sau đó được chuyển sang thiết bị ly tâm, có nhiệm vụ tách chất rắn đã trích ly khỏi dịch chiết (whey). Chất rắn được lấy ra liên tục với thành phần khoảng 30% nồng độ chất khô. Kết tủa sau khi ly tâm có thể được làm khô để tạo thành protein chiết đẳng điện – protein có độ hoà tan thấp. Nếu muốn tạo ra sản phẩm có giá trị cao hơn, cần phải trung hoà sản phẩm chiết : bánh rắn ở trạng thái đẳng điện được pha vào nước và tồn tại ở dạng huyền phù. Sau đó, trung hoà bằng axit. Tiếp tục ly tâm lần hai và sản phẩm có đặc sắc có hàm lượng protein chiếm 75% lượng chất khô. Bánh thu được vẫn chứa khoảng 70% nước. Sản phẩm ở dạng ẩm, sau được cô thành dạng đặc sệt và cuối cùng sấy phun thành dạng bột. Khả năng hoà tan của sản phẩm sau trung hoà là khá cao, giá trị NSI trên 60%.

Quy trình sản xuất SPC bằng phương pháp axit

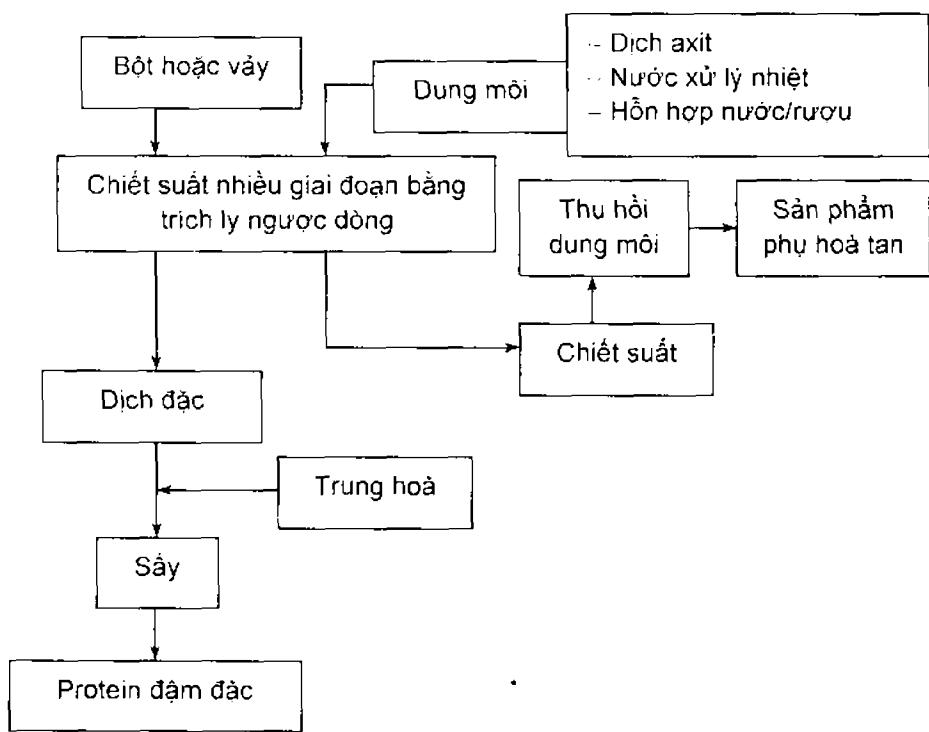


Hình 2.9. Sơ đồ sản xuất SPC theo phương pháp axit

– Quá trình tách bằng biến tính nhiệt :

Quy trình sản xuất này, protein trong bột đậu tương đã tách béo được tách bằng cách cho biến tính nhiệt sử dụng hơi nước bão hòa. Bột sau khi xử lý nhiệt, được tách cùng nước nóng có chứa đường tan trong đó.

Do quá trình sử dụng nước như dung môi để phân tách rắn – lỏng, nên vận hành và hệ thống thiết bị tương tự như phương pháp tách bằng axit.



Hình 2.10. Sơ đồ sản xuất SPC bằng phương pháp xử lý nhiệt

Bảng 2.10. Thành phần hóa học của SPC theo các phương pháp khác nhau.

Phương pháp	Hỗn hợp rượu /nước	Điểm đắng điện (axit)	Biến tính nhiệt
Protein	70,7	70,7	72,2
Chất béo	0,3	0,3	1,2
Sợi thô	3,7	3,6	3,8
Tro	6,0	5,1	3,8
NSI	5,0	6,9	3,8

* Ứng dụng :

– Ứng dụng chung :

Giống như bột đậu tương, SPC được sử dụng như một sản phẩm thực phẩm nhờ đặc tính dinh dưỡng hay đặc tính chức năng sinh học hoặc kết hợp cả hai tác dụng trên.

Về dinh dưỡng : SPC là một loại sản phẩm có hàm lượng protein cao, không chứa antitrypxin và các yếu tố phản dinh dưỡng khác, không còn chất đầy hơi và chứa chất xơ cần thiết cho tiêu hoá. Giá trị dinh dưỡng của protein ở các nồng độ khác nhau được thể hiện qua tỷ số hiệu quả protein (Protein Efficiency Ration : PER). Thường SPC và SPI có giá trị PER thấp hơn protein bột đậu tương.

Bảng 2.11. Giá trị PER* của sản phẩm protein đậu tương

Sản phẩm	Tỷ số hiệu quả protein (PER)
Bột đậu tương (đã tách béo và rang)	2,2 đến 2,3
+ 1,0 % metionin	2,25 hoặc cao hơn
Soy Protein Concentrate	2,0 – 2,2
+ 1,5 % metionin	2,5 hoặc cao hơn
Soy Protein Isolate	1,1 – 1,7
+ 1,5 % metionin	2,0 hoặc cao hơn

* Giá trị PER được hiệu chuẩn : casein = 2,5
Nguồn : Soy Protein Council (1987)

Đặc điểm quan trọng nhất của sản phẩm protein đậu tương cô đặc (SPC) là khả năng liên kết với nước (hấp phụ nước), khả năng liên kết với các chất béo và khả năng tạo nhũ.

– Sử dụng trong các sản phẩm bánh mỳ :

Không có một quy định cụ thể nào về việc sử dụng protein đậu tương cô đặc trong các sản phẩm bánh mỳ, trừ khi sản phẩm đó yêu cầu hàm lượng protein cao. Về mặt dinh dưỡng và chức năng, bột đậu tương cũng có tác dụng tương tự nhưng hiệu quả về mặt kinh tế cao hơn.

– Các sản phẩm thịt :

Đây có lẽ là ứng dụng quan trọng nhất của SPC trong công nghiệp thực phẩm. SPC được sử dụng chủ yếu trong các sản phẩm thịt nghiên, thịt gia cầm và các sản phẩm từ cá (chả, các loại xúc xích thể nhũ...) nhằm làm tăng hàm lượng và duy trì được độ dai. SPC còn là một thành phần quan trọng trong

các sản phẩm có độ đậm thấp, độ béo cao và có giá thành thấp. Điển hình mức độ sử dụng SPC ở một số loại thực phẩm khô tuyệt đối như sau : 5 – 10 % trong chả, 2 – 8% trong thịt bò hầm, 2–12% trong thịt viên, tối đa 3,5% trong xúc xích, 5 – 10% trong chả cá (Theo Campell và đồng nghiệp, 1985).

– Một số ứng dụng khác :

Protein cô đặc từ đậu tương được sử dụng như một chất phân tán béo trong các sản phẩm đồ uống dạng sữa và các sản phẩm già sữa như sản phẩm tương tự kem. Năm 1985, Campell và đồng nghiệp đưa ra công thức cho đồ uống giống sữa. Công thức này được công ty A.E Staley Mfg (một hãng sản xuất SPC) đề nghị bổ sung cho sản phẩm sữa siro ngô.

Bảng 2.12. Công thức cho sản phẩm "Sữa cô đặc đậu tương"

Soy protein concentrate	6,0%
Sucroza	0,6%
Siro ngô dạng rắn	2,0%
Chất béo	3,0%
Mono và di – glyxerit	0,1%
Muối	0,05%
Nước	88,25%

SPC được hòa với nước trong một thùng khuấy với tốc độ khuấy cao, sau đó tất cả các thành phần còn lại (trừ chất béo) được bổ sung và khuấy đều. Hỗn hợp được đun nóng tới 65 – 70°C. Chất béo (dầu đã được hydrat hoá và được khử mùi tốt) cùng một số tác nhân tạo hương vị cũng được bổ sung. Hỗn hợp sau đó được đông hoá, làm nguội và cuối cùng đóng gói.

Non – dairy coffee whitener cũng có thể được tạo ra, sử dụng nguyên tắc tương tự nhưng thành phần và tỷ lệ các chất có khác biệt.

b) ISOLATED SOYBEAN PROTEIN (ISP) (Isolat protein đậu tương)

* Giới thiệu :

ISP là dạng cô đặc nhất của các sản phẩm protein từ đậu tương hiện đang có trên thị trường. Chúng chứa trên 90% là protein ở điều kiện khô tuyệt đối.

ISP được biết tới và sản xuất trong công nghiệp từ trước Chiến tranh thế giới Thứ hai, chủ yếu làm hỗn hợp để phủ lên giấy. Tuy nhiên, ISP còn được sử dụng làm thức ăn, đặc biệt trong vòng 50 năm trở lại đây.

Nguyên tắc sản xuất ISP khá đơn giản. Từ nguồn nguyên liệu đầu là bột đậu tương đã được tách béo, protein đầu tiên được hòa tan trong nước. Các chất lỏng cặn được tách ra khỏi hỗn hợp lỏng. Cuối cùng, protein được kết tủa, tách khỏi dung dịch và sấy khô. Trong quá trình sản xuất ISP làm thực phẩm, khác với các ngành công nghiệp khác, cần tối thiểu hoá những biến đổi về mặt hoá học của protein trong suốt quá trình. Ngoài ra, các yêu cầu về vệ sinh cũng phải được thực hiện nghiêm ngặt hơn.

ISP tồn tại ở dạng gần như protein tinh khiết, nó đã tách được các chất tạo mùi, vị, màu không mong muốn, các chất không có giá trị dinh dưỡng ra khỏi sản phẩm. Hơn nữa, hàm lượng protein cao cho phép dễ điều chỉnh về thành phần ISP hơn khi chúng được sử dụng trong các sản phẩm thực phẩm. Những ưu điểm nói trên là những dự báo hết sức khả quan cho việc sử dụng rộng rãi sản phẩm ISP. Mặc dù quy mô sản xuất ISP ngày càng tăng ở Mỹ, châu Âu, Nhật Bản, Ấn Độ và Brazil, nhưng những con số sản xuất hàng tấn ISP hàng năm là khá thấp so với dự báo khi ISP bắt đầu được bán trên thị trường. Do chi phí sản xuất còn tương đối cao, các sản phẩm ISP không cạnh tranh được với bột đậu tương cô và SPC, ngoài ra còn có sự cạnh tranh giữa ISP với các sản phẩm protein cô truyền thống khác như casein. Tuy nhiên, cũng phải chú ý rằng rất nhiều loại protein cô đặc lý tưởng được tách từ các nguồn như hạt bông, lạc, cá... không thành công bằng ISP. Nhiều sản phẩm trong số kể trên không thể tạo thành sản phẩm thương mại.

ISP có thể được tiếp tục chế biến để tạo ra các sản phẩm tốt hơn như sợi ISP được xe – làm thành phân cho các sản phẩm thực phẩm tương tự như thịt bắp, các sản phẩm protein và enzym từ ISP.

Giá thành của sản phẩm ISP cao hơn gấp 5 đến 7 lần so với sản phẩm bột đậu tương đã được tách béo do phương pháp sản xuất ISP.

* *Định nghĩa, thành phần và phân loại :*

Hiệp hội kiểm soát dinh dưỡng của Mỹ (AAFCO) định nghĩa ISP như sau : "Soy Protein Isolate là sản phẩm có thành phần chính là protein từ hạt đậu tương. ISP được tạo ra từ hạt đậu tương được tách vỏ và loại bỏ các cấu tử không phải là protein, phải chứa ít nhất 90% protein ở điều kiện khô tuyệt đối" (Theo '90 Soy a Bluebook).

Không có một định nghĩa chính thức hay một chuẩn về các loại ISP. Chúng được mua và bán trên thị trường dựa trên các đặc tính và thành phần cung cấp bởi nhà sản xuất hoặc người sử dụng.

Quy trình sản xuất ISP dựa trên độ hoà tan của protein ở pH trung tính hoặc kiềm nhẹ, sau đó tiến hành kết tủa bằng cách axit hoá tới vùng đẳng điện (pH = 4,5). Sản phẩm tạo thành là "ISP đẳng điện", có tính chất ít tan trong nước, hoạt tính chức năng bị hạn chế. ISP đẳng điện có thể được hoà lại vào nước, trung hoà với các bazơ khác nhau, rồi đem sấy phun dung dịch hoặc dịch huyền phù. Tùy thuộc vào từng loại bazơ mà ta có các sản phẩm protein chứa ion kim loại khác nhau như : natri, kali, amoni hay canxi. Protein dịch trung hoà bằng các bazơ kim loại như natri, kali và amoni có khả năng hoà tan tốt trong nước, tạo thành dung dịch có độ nhớt cao, tạo bọt, nhũ tương và có tính tạo gel. Protein từ canxi lại có độ hoà tan thấp hơn. Sản phẩm ISP có độ hoà tan thấp (trơ) sẽ được dùng cho những sản phẩm yêu cầu hàm lượng protein cao mà không làm mất các thành phần chức năng khác trong sản phẩm.

Do phương pháp sấy phun là một phương pháp phổ biến trong sản xuất ISP, nên trạng thái vật lý cơ bản của ISP là dạng bột. Các dạng cấu trúc như dạng hạt, dạng sợi được tạo ra bằng cách chế biến tiếp tục.

* Quá trình sản xuất :

- Nguyên liệu đầu :

Nguyên liệu sử dụng là bột đậu tương đã tách vỏ, tách béo, có thể ăn được và có chỉ số về lượng protein hoà tan cao nhất. Mặc dù tốc độ quá trình chiết protein từ bột nguyên nhanh hơn, nhưng nguyên liệu bột đã tách béo lại dễ tách sau chiết hơn. Trong chiết gián đoạn, nếu thời gian chiết trên 30 phút, kích thước hạt không ảnh hưởng tới sản lượng protein được chiết ra.

- Chiết protein :

Bột đậu tương được trộn với môi trường chiết trong các đường ống được đảo trộn và đun nóng. Môi trường chiết là nước có bổ sung các loại kiềm như natri hydroxit, vôi sống, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ hoặc Na_3PO_4 để pH ở trung tính hoặc kiềm nhẹ. Trong điều kiện như trên, phần lớn các protein được hoà tan trong dung dịch. Đường và các hợp chất khác cũng tan trong dung dịch.

+ Độ kiềm : Ở pH càng cao, càng nhiều protein được chiết. Tuy nhiên, những protein này có thể bị biến đổi về mặt hoá học trong điều kiện môi trường kiềm mạnh, có thể là biến tính protein hoặc thay đổi hoá học trong các axit amin. pH nếu ở khoảng cao quá, còn có thể tạo liên kết giữa đường

và axit amin (phản ứng Maillard), làm màu của sản phẩm tối và mất giá trị dinh dưỡng. Hơn nữa, những protein kết tủa trong môi trường kiềm cao có xu hướng giữ quá nhiều nước và không ổn định. Theo thực nghiệm, khoảng pH = 7,5 – 9,0 là khoảng thích hợp nhất cho quá trình chiết.

Đáng chú ý nhất là trong môi trường kiềm, axit amin xystin sẽ bị phá huỷ và tạo ra dehydroalanin. Ngoài ảnh hưởng do thiếu hụt xystin, chất mới tạo thành có thể gây độc. Dehydroalanin có thể phản ứng với những nhóm ε-NH₂ tự do của lysin, tạo thành lysinoalanin. Hợp chất này theo các nghiên cứu có thể gây tổn thương ở chuột trong một số điều kiện nhất định. Tính độc của lysinoalanin đối với cơ thể người hiện vẫn là một câu hỏi.

+ Thời gian chiết : Quá trình chiết nitơ khỏi bột đậu tương, sử dụng 0,03 mol Ca(OH)₂ làm chất trích ly. Lượng nitơ chiết được dưới những điều kiện này tăng liên tục trong 30 phút đầu, sau đó đạt tới gần mức bão hòa sau 45 phút. Trong quy mô công nghiệp, thời gian chiết kéo dài khoảng một giờ.

+ Nhiệt độ : Hiệu suất protein chiết tăng khi tăng nhiệt độ tới 80°C.

+ Tỷ lệ rắn – lòng : Cùng một lượng bột đậu tương đã tách béo, hiệu suất chiết protein sẽ tăng lên khi lượng môi trường lòng sử dụng tăng lên. Sau khi chiết và tách bằng phương pháp ly tâm hoặc lọc, bột đậu tương sau tách còn lại trong dịch chiết với một tỷ lệ đáng kể, khoảng 2,5 lần khối lượng chất rắn. Trong quá trình tách gián đoạn một pha, nếu sử dụng chất lòng trích ly càng nhiều, thì nồng độ protein trong dịch chiết ít hơn.

Việc lựa chọn tỷ lệ rắn – lòng cho quá trình trích ly là một vấn đề có ý nghĩa. Những tỷ lệ thường được sử dụng trong công nghiệp thường là 1 : 10 và 1 : 20.

+ Quá trình khuấy trộn : Trong bất cứ quá trình trích ly nào, khuấy trộn cũng làm tăng tốc độ hoà tan của protein. Tuy nhiên, trong thời gian chiết gián đoạn (khoảng một giờ), nếu tăng tốc độ khuấy lớn hơn tốc độ hợp lý cũng không làm tăng tỷ lệ protein được chiết ra khỏi dịch huyền phù. Hơn nữa, khuấy trộn mạnh còn làm vỡ các hạt, tăng tỷ lệ các hạt mịn trong trích ly, gây khó khăn cho quá trình phân tách lòng – rắn. Tốc độ khuấy hợp lý là quá trình trộn nhầm giữ các hạt trong dịch chiết ở dạng huyền phù.

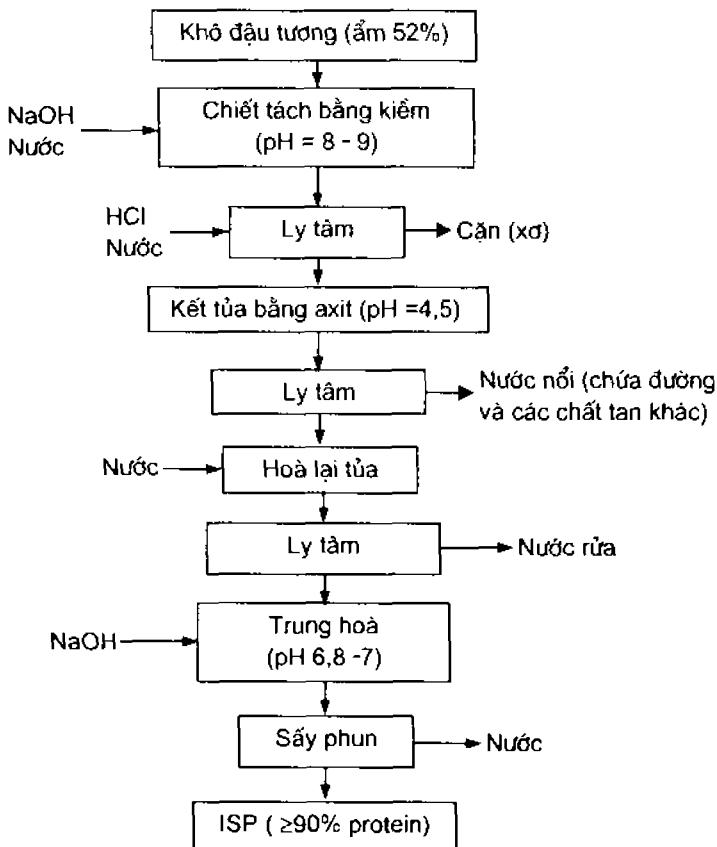
+ Quá trình tách lòng – rắn sau khi trích ly :

Dịch chiết chứa một lượng đáng kể các hạt bột đã được chiết protein. Để loại bỏ các hạt này đầu tiên phải kết tủa nhằm thu được protein có độ tinh khiết chấp nhận được.

Bảng 2.13. Ảnh hưởng quá trình lọc dịch chiết tới độ tinh khiết của ISP

Kích thước màng sàng sử dụng cho tách chất rắn (μm)	% protein ($N \times 6,25$) sản phẩm protein khô
20	83,2
40	83,9
60	84,5
80	85,8
100	88,7
140	84,5
200	85,8
Ly tâm	88,7

– Sơ đồ quy trình sản xuất ISP :



Hình 2.11. Sơ đồ công nghệ sản xuất ISP

**Bảng 2.14 . Thành phần điển hình của một sản phẩm ISP
(điều kiện khô tuyệt đối)**

Thành phần	Nồng độ (%)
Protein	90
Chất béo	0,5
Chất tro	4,5
Đường tổng số	0,3

– Xử lý dịch chiết :

Dịch chiết sau lọc được xử lý nhằm loại bỏ các chất tạp, do đó làm cải thiện, màu sắc, giá trị dinh dưỡng và làm biến đổi đặc tính chức năng của sản phẩm cuối cùng. Xử lý dịch chiết bao gồm : trao đổi ion để loại bỏ phytat, làm giảm thành phần chất tro, xử lý bằng than hoạt tính để loại bỏ các hợp chất phenol, siêu lọc nhằm cô dịch và tách các hợp chất thấp phân tử... Mặc dù những quá trình này đã được khuyến cáo sử dụng nhưng hiện vẫn chưa có cơ sở công nghiệp sản xuất ISP nào sử dụng. Ở châu Âu và Nhật Bản (Elias, 1979), thường dùng màng lọc để lọc và cô dịch chiết.

– Kết tủa :

Protein được kết tủa từ dịch chiết bằng cách hạ pH xuống điểm đắng điện. Loại axit sử dụng cũng như nhiệt độ quá trình kết tủa không ảnh hưởng tới sản lượng hay độ tinh sạch của protein.

– Quá trình tách và rửa protein :

Protein sau kết tủa được tách ra khỏi dịch huyền phù (whey) bằng phương pháp lọc hoặc ly tâm ; có thể dùng các loại máy ly tâm desludger hoặc decanter. Protein thu phải được rửa nhằm loại bỏ các thành phần tan. Ta có thể tiến hành hòa tan lại vào nước rồi ly tâm lại. Quá trình rửa là quá trình quan trọng, ảnh hưởng tới độ tinh sạch của protein.

– Làm khô : Phương pháp làm khô thông dụng nhất là phương pháp sấy phun.

* *Những vấn đề gặp phải trong quá trình sản xuất :*

– Tổn thất của quá trình : Quá trình thông thường tách các chất rắn đậu tương thành 3 phần chính : phần chiết còn lại, phần protein thu (ISP) và whey.

Phân chiết còn lại (okara) là vật liệu rắn không tan còn lại sau quá trình chiết và tách khỏi dịch chiết bằng phương pháp lọc hoặc gạn, chắt. Nó chiếm khoảng 40% lượng chất rắn trong vật liệu thô và làm tiêu hao mất 15% lượng protein tham gia quá trình. Okara thường được ép, làm khô và bán trên thị trường như một sản phẩm phụ của quá trình sản xuất ISP. Nó có thể được dùng làm nguồn protein trong thức ăn gia súc hoặc làm thức ăn dạng sợi (dietary fibre) trong dinh dưỡng ở người. Nó cũng có thể được dùng trong sản xuất thực phẩm nhờ khả năng không hấp thụ nước.

Whey là dịch huyền phù, sau khi protein đã được tách ra khỏi dịch chiết. Whey gồm các đường và các chất chứa nitơ không bị kết tủa do quá trình axit hoá.

Khoảng 25% lượng chất khô của nguyên liệu thô và 10% lượng nitơ trong nguyên liệu đều nằm trong whey. Nhiều nghiên cứu trước đây (Hackler và đồng nghiệp, 1963) cho rằng whey của đậu tương có thể có độc cho động vật. Nghiên cứu này cũng đã được khẳng định sau đó. Hơn nữa, whey ISP được hoà loãng ở mức độ cao, chứa khoảng 1 – 3% chất rắn, phụ thuộc vào tỷ lệ giữa dung môi và bột đậu tương dùng cho quá trình chiết. Chi phí cho quá trình cô đặc và sấy khô whey ISP quá cao. Do đó, whey được coi là một phần thải của quá trình tách.

Phân thu protein (curd) là phân kết tủa tạo ra do quá trình axit hoá của dịch chiết. Sau khi rửa và sấy khô, sản phẩm tạo thành là ISP đẳng điện. Nó có chứa 75% hàm lượng protein trong nguyên liệu đậu. Gần 3 tấn bột đậu tương đã tách béo sản xuất ra 1 tấn protein ISP.

Do sản lượng thấp nên giá thành của ISP khá cao.

– Chất lượng : ISP sản xuất theo quy trình thông thường có chứa một vài loại tạp chất (ví dụ như các hợp chất phenol, dạng phytat), đôi khi làm giảm chất lượng về chức năng sinh học, giá trị cảm quan và giá trị dinh dưỡng của sản phẩm.

– Các quá trình thay đổi :

Trong sản xuất ISP, một số khâu trong quá trình có thể được thay đổi :

+ Protein đậu tương được kết tủa trong dung dịch muối (salting – in), sau đó hoà tan lại protein bằng cách pha loãng với nước.

+ Quá trình kết tủa ở nhiệt độ gần nhiệt độ sôi, sử dụng muối canxi (giống như trong quá trình sản xuất Tofu).

+ Tiến hành lọc dịch chiết bằng phương pháp siêu lọc nhằm loại bỏ các cầu từ có khối lượng phân tử thấp của whey, thu dịch cô protein còn lại ; sau đó đem sấy phun.

+ Có thể tách theo phương pháp vật lý protein từ bột đậu tương như phương pháp phân đoạn .

+ Tinh sạch phần chiết bằng phương pháp siêu lọc, lọc qua than hoạt tính và trao đổi ion, nhằm làm tăng độ tinh khiết của phần thu protein.

* *Ứng dụng :*

- Trong các sản phẩm thịt :

Trong các sản phẩm xúc xích dạng nhũ hoá, như frankfurter và bologna, ISP và các sản phẩm protein được sử dụng do các tính chất về độ ẩm, liên kết với chất béo và hoạt động như một chất làm bền hệ nhũ. Người ta thường sử dụng ISP ở hàm lượng 1 – 4% ở trạng thái tiền hydrat. Việc sử dụng ISP trong các sản phẩm này cho phép làm giảm tỷ lệ thịt đất liền trong công thức, mà không làm giảm hàm lượng protein hay chất lượng cảm quan của sản phẩm.

Việc sử dụng sản phẩm protein đậu tương trong các loại thịt báp đã và đang được phát triển trong thời gian gần đây. ISP được bổ sung trong sản phẩm thịt muối xông khói và được tiêm vào thịt báp. Ngoài ra, có thể liên kết protein isolat (ISP) lên bề mặt của thịt bằng cách lăn hoặc bóp thịt báp với protein isolat, giống như trong ngành công nghiệp sản xuất thịt xông khói. Công thức điển hình cho thịt muối gồm : muối, đường, photphat, nitrit hoặc axit ascorbic.

- Đồ biển : Ứng dụng quan trọng nhất của ISP là bổ sung vào chả cá và surimi – một trong những sản phẩm truyền thống của Nhật Bản. Surimi là sản phẩm thịt cá được tách xương, rửa sạch và nghiền nhó.

- Các sản phẩm ngũ cốc : ISP đôi khi được sử dụng thay thế hoặc kết hợp với bột đậu tương, hoặc sử dụng trong hỗn hợp thay thế sữa dồi với sản phẩm bánh mỳ. ISP được sử dụng để làm tăng hàm lượng protein trong mỳ ống và các loại bánh mỳ đặc biệt. Trong những ứng dụng này, ISP tỏ ra có ưu điểm hết sức rõ rệt về hàm lượng protein cao và độ nhạt thích hợp cho sản phẩm.

– Các sản phẩm dạng sữa : ISP được sử dụng trong chất làm trắng cafe không chứa sữa (non – diary coffee whitener) loại coffee whitener này có chứa các chất béo, protein, đường, chất tạo nhũ và một lượng muối làm ổn định, đủ để làm bền liên kết giữa chất làm trắng với các điều kiện axit và nhiệt của cafe mà không làm ảnh hưởng tới vị và mùi của chất làm trắng (freepatentsonline.com/4092438.html), lớp kem lỏng (liquid whipped topping), kem chua hay phomat, các loại đồ tráng miệng đông lạnh không chứa sữa... Điểm cơ bản của những ứng dụng này là các sản phẩm thực phẩm không chứa sữa (dùng cho ăn kiêng, không chứa cholesterol, không chứa allergen) và có giá trị về kinh tế.

Những loại sản phẩm tương tự phomat có thể được sản xuất từ ISP, có hoặc không có cấu tử sữa whey. Những loại phomat đó có thể là phomat mềm, bán mềm và phomat cứng ủ chín.

– Thức ăn dành cho trẻ sơ sinh :

Thức ăn dành cho trẻ sơ sinh trong đó sữa được thay thế bằng các sản phẩm đậu tương là loại sản phẩm thương mại được sử dụng rộng rãi nhất. ISP là sản phẩm đậu tương được ưa chuộng bởi nó dễ tiêu hóa, không chứa đường gây đầy hơi, chứa lượng sợi không đáng kể. Đặc biệt sản phẩm này không chứa lactoza, gây khó tiêu hóa cho trẻ nhỏ. Tuy nhiên, sản phẩm đậu tương đang ngày càng được sử dụng nhiều hơn cho người già và dành cho chế độ ăn đặc biệt đối với những người giảm cân.

– Một số ứng dụng khác :

Protein đậu tương (ISP) đã được hòa tan một phần có đặc tính làm bền bột tốt và có thể sử dụng làm nhân đánh kem, kết hợp với albumin trứng trong các sản phẩm bánh kẹo và đồ tráng miệng.

Protein đậu tương ISP cũng là một chất hỗ trợ sấy phun hiệu quả trong dịch ép hoa quả. ISP sẽ thay thế maltodextrin, làm tăng hàm lượng protein trong sản phẩm cuối cùng.

2.2.2.4. Ứng dụng protein đậu tương trong sản xuất plastic

Ngoài giá trị dinh dưỡng, protein của đậu tương đã được nghiên cứu sử dụng như một vật liệu sản xuất các plastic từ những năm 1940. Vào thời gian

đó protein đậu tương được dùng làm chất độn để giảm giá thành của các plastic được sản xuất từ dầu mỏ. Ngày nay protein vẫn được dùng làm chất độn trong các plastic từ dầu mỏ để tăng cường khả năng phân huỷ sinh học của các sản phẩm này và một số ứng dụng khác.

* Quá trình chế tác protein đậu tương làm chất dẻo :

Quá trình chế tác này chủ yếu liên quan tới việc làm thay đổi trạng thái vật lý của vật liệu thông qua một vài phản ứng hoá học. Quá trình này thông thường được thực hiện qua một số công đoạn chính sau : vật liệu được trộn đều, nấu chảy, chuyển hoá, định khuôn dịch chảy và sau cùng là làm đặc dịch chảy.

– Ảnh hưởng của các chất hoá dẻo

Các chất dẻo từ đậu tương nếu không có các chất hoá dẻo thường cứng và rắn. Tuy nhiên, khi thêm một số chất hoá dẻo vào sẽ làm tăng độ dẻo và mức độ co giãn của plastic.

Ảnh hưởng của hàm ẩm tới thuộc tính cơ học và khả năng hấp thụ nước của plastic từ protein đậu tương đã được khảo sát. Khi hàm ẩm cao, gel protein thu được hoàn hảo hơn, mạng lưới không gian 3 chiều của phân tử được tạo thành có trật tự hơn, dẫn đến gel ít bị lỗ và khả năng hấp thụ nước cũng giảm hơn.

Một số polyhydric alcohol được thêm vào trong quá trình tạo plastic protein đậu tương làm tăng độ bền kéo của plastic như etylen glycol, glycerol, propylene glycol. Các chất này tương tác với phần kỵ nước của phân tử protein đậu tương, phần có ít các liên kết hydro, ít các tương tác tĩnh điện và tương tác lưỡng cực.

– Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ cũng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới một số thuộc tính của nhựa protein đậu tương. Nhiệt độ đun chảy (melting temperature) ảnh hưởng tới thuộc tính cơ học và khả năng hấp thụ nước của nhựa. Độ bền kéo của nhựa protein đậu tương tăng từ 15 – 39 MPa khi nhiệt độ đun chảy tăng từ 80°C đến 140°C. Tuy nhiên, khi nhiệt độ đun chảy tăng đến 160°C độ bền kéo lại giảm xuống có lẽ do sự phân huỷ bởi nhiệt của protein đậu tương.

– Xử lý với axit

Khi protein đậu tương được xử lý với axit ở pH đẳng điện 4,5 sẽ làm giảm khả năng hòa tan và gây kết tủa protein. Sự kết tủa protein liên quan tới sự tạo thành phức hợp protein. Khi xử lý protein đậu tương ở môi trường axit mạnh có thể gây nên các hiện tượng phân ly, biến tính, kết tụ protein và dẫn đến kết tủa protein. Protein xử lý bằng axit ($\text{pH} = 4,5$) thường cho plastic có khả năng hấp thụ nước thấp hơn so với plastic được chế từ những protein đậu tương không qua xử lý axit.

Plastic được chuẩn bị từ dịch isolat đậu tương xử lý với axit axetic và axit propionic cho thấy không bị ảnh hưởng đáng kể đối với độ bền kéo và độ kéo dãn của mẫu thử. Tuy nhiên, với plastic được chuẩn bị từ isolat đậu tương xử lý với axit sunphuric thì cả độ bền kéo và độ kéo dãn đều bị giảm. Khả năng hấp thụ nước của các mẫu thí nghiệm được chuẩn bị từ isolat đậu tương xử lý bằng axit bị giảm đáng kể từ 90 đến 50% so với khi không xử lý.

– Tạo liên kết ngang

Quá trình tạo liên kết ngang dẫn tới tạo thành một sự kết tụ lớn các protein, kéo theo việc tăng khối lượng phân tử, giảm khả năng hòa tan và tính đàn hồi. Protein đậu tương chứa nhiều nhóm chức hoạt động như $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, và $-\text{SH}$ có khả năng tạo liên kết với một số chất như formaldehyt, glutaraldehyt, adipic/axetic. Trường hợp hòa dịch solat đậu tương với 1% formaldehyt sẽ làm tăng độ bền kéo của mẫu từ 37 đến 41 MPa và làm giảm tính đàn hồi từ 4,1 xuống 3,9, khả năng hấp thụ nước cũng bị giảm dần từ 90% đến 32%.

– Axetyl hoá

Protein đậu tương chứa các nhóm α amin của lysin dễ dàng phản ứng với các chất hoá học khác. Quá trình axetyl hoá là một trong những phương pháp để biến đổi hoá học những vị trí phản ứng này. Các isolat protein đậu tương bị axetyl hoá thường cho các plastic có độ bền kéo, độ kéo dãn thấp hơn ở mọi giá trị hàm ẩm.

– Este hoá

Este hoá nhóm cacboxyl trong phân tử protein là một phương pháp khác để biến đổi hoá học phân tử protein đậu tương. Một số tác nhân có thể được chọn như : diazometan, methyl sunphat, methyl halit.

Quá trình ester hoá protein đậu tương làm giảm các nhóm carboxyl có khả năng ion hoá, do vậy cũng làm giảm số nhóm tích điện trên phân tử protein. Chính sự giảm khả năng tích điện này sẽ làm giảm tương tác tĩnh điện giữa các phân tử protein mà chúng chịu trách nhiệm một phần cho tính giòn của plastic protein đậu tương. Sự ester hoá protein đậu tương thúc đẩy cả độ kéo dãn, độ bền kéo và khả năng hấp thụ nước của các plastic protein đậu tương.

– Ghép đồng trùng hợp

Protein đậu tương được ghép với các monome vinyl khác nhau theo kỹ thuật trùng hợp chuỗi gốc tự do. Các vinyl monome bao gồm : methyl metacrylat, etyl acrylat và hexyl acrylat. Các kết quả thử nghiệm cho thấy độ bền kéo và khả năng hấp thụ nước của plastic protein đậu tương ghép đồng trùng hợp này thường thấp hơn so với đối chứng. Quá trình ghép này thường tạo ra các nhánh phá huỷ mạnh các lực liên kết bên trong và bên ngoài phân tử được tạo nên do các cầu hydro, tương tác tĩnh điện và cầu disunphua. Độ đồng nhất của các monome với protein đậu tương trong các plastic ghép đồng trùng hợp cũng dẫn tới sự khác nhau về độ bền kéo của các polymé. Etyl acrylat, butyl acrylat và hexyl acrylat thường ít phân cực hơn so với methyl metacrylat và metacrylat, do vậy nó ít tương hợp với protein đậu tương. Các monome này khi ghép với protein sẽ tạo ra một polymé hai pha và có độ bền kéo tương đối thấp.

– Gắn với các polymé sinh học khác

Các thuộc tính cơ học và khả năng hấp thụ nước của plastic protein đậu tương không những phụ thuộc vào cấu trúc hoá học của protein mà còn phụ thuộc vào bản chất và hàm lượng các chất phụ gia thường được gọi là các chất nền. Chất nền thường là những vật liệu tương đối trơ được thêm vào plastic để làm thay đổi thuộc tính cơ học hoặc để giảm giá thành. Chất nền thường được thêm vào plastic protein đậu tương là xenluloza dưới các dạng : tinh thể, xenluloza sợi ngắn, sợi dài. Xenluloza tinh thể khi thêm vào plastic protein đậu tương không ảnh hưởng tới độ bền kéo của plastic nhưng lại làm tăng độ cứng chắc cho chúng, độ kéo dãn của plastic bị giảm từ 4,1% xuống 3,2%.

Khả năng hấp thụ nước của các mẫu plastic bị giảm nhẹ khi có mặt của xenluloza. Plastic có 20% tinh thể xenluloza hấp thụ được 28% nước sau 26 giờ nhúng ngập trong nước ở nhiệt độ phòng còn mẫu đối chứng hấp thụ được 32% nước.

Hiện nay khoảng 0,5% protein đậu tương được sử dụng cho sản xuất công nghiệp, chủ yếu dùng làm chất phủ giấy. Nhờ có thuộc tính kết dính tuyệt vời mà protein đậu tương được sử dụng để gắn kết đất sét vào giấy, tạo cho giấy có một bề mặt trắng, có độ bóng và chắc nhất định. Henry Ford, nhà chế tạo ôtô nổi tiếng người đầu tiên đã sử dụng plastic đậu tương để sản xuất vỏ ôtô vào năm 1940.

Các nghiên cứu thực nghiệm gần đây đã cho thấy protein đậu tương được trộn với tinh bột để tạo nhựa, chế tạo một số đồ dùng như thùng đựng rác, đồ chơi, các dụng cụ thể thao... Các dụng cụ này đều đảm bảo các thuộc tính bền nước và thuộc tính cơ học. Sau khi sử dụng, chúng có thể được thu hồi lại làm thức ăn cho gia súc hoặc làm chất ổn định cho đất, giải quyết được vấn đề ô nhiễm môi trường.

Protein đậu tương có thể được ép dùn tạo các màng dùng làm vật liệu bao gói chống sự xâm nhập của các tia tử ngoại, giảm thiểu quá trình oxy hoá và phá huỷ mẫu. Các màng protein đậu tương còn được sử dụng cho nông nghiệp làm các màng che ruộng hoặc các ứng dụng khác cho ngành nông nghiệp và trồng trọt.

Protein đậu tương còn có thể tạo thành các sản phẩm dạng bột, ứng dụng trong chế tạo các vật liệu cách nhiệt thay thế cho styrofoam vẫn thường được dùng là một vật liệu không có khả năng phân huỷ sinh học.

2.2.3. Công nghệ collagen và gelatin

Gelatin là sản phẩm collagen thuỷ phân một phần. Sản lượng toàn cầu của gelatin ước tính 300000 tấn/năm, trong đó, 65% sử dụng cho công nghiệp thực phẩm, 25% cho dược phẩm và phần còn lại sử dụng cho công nghiệp phim ảnh và các ứng dụng khác. Collagen và gelatin thu nhận bằng con đường tái hợp chủ yếu sử dụng cho y tế và công nghiệp được làm chất ổn định vacxin, chất phân tán thuốc, xương nhân tạo... Collagen và gelatin

thương mại có thể ở dạng màng, bột, hay dạng hạt. Các dạng collagen, gelatin có thể được sử dụng trực tiếp cho thực phẩm hay là nguyên liệu cho công nghiệp dược phẩm hay công nghiệp khác.

Trong công nghiệp thực phẩm, gelatin được sử dụng khá phổ biến : chất làm đông đặc (sữa chua), chất tạo gel (mứt quả nghiền, bơ thực vật), chất ổn định cấu trúc (kem). Gelatin cũng được sử dụng tăng cảm vị chất béo. Gelatin cũng được dùng trong làm trong nước quả hoặc vang.



Gelatin dạng bột



Vỏ bọc thuốc bằng gelatin

Hình 2.12. Gelatin

Trong công nghiệp dược phẩm, gelatin sử dụng là vỏ bọc thuốc hoặc là tá dược.

Gelatin sử dụng trong công nghệ ảnh khi giúp giữ tinh thể AgCl tồn tại trong nhũ tương. Cho tới nay chưa có một chất nào có thể thay thế gelatin trong lĩnh vực này.

Gelatin sử dụng nhiều trong công nghiệp mỹ phẩm, dưới các dạng khác nhau của gelatin, nâng cao tính giữ nước của kem dưỡng da... Trong những năm gần đây gelatin được sử dụng như nguồn protein bổ sung cho các sản phẩm dưỡng tóc, da...

Ở quy mô công nghiệp, gelatin được sản xuất chủ yếu từ collagen động vật như da lợn, da bò, xương lợn hoặc bò. Ngoài ra, gelatin từ cá, gà cũng được sử dụng nhưng với số lượng hạn chế.

* *Nguyên liệu để sản xuất gelatin* : Nguyên liệu để sản xuất gelatin có thể là :

- Da lợn : Da lợn tươi từ các cơ sở giết mổ được làm lạnh hay đông lạnh.
- Da bò : Có thể bảo quản da bò tươi bằng muối, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ để giữ da tươi tới khi sử dụng cho thu nhận gelatin. Da bò được rửa, loại lớp mỡ dưới da. Phần lớp collagen còn lại dùng cho sản xuất gelatin.
- Xương : xương cắt lát 5 – 10mm. Khử mỡ với nước nóng, làm khô và nghiền nhó, bảo quản trong xiło cho tới khi sử dụng. Xương nghiên được tẩy khoáng trong dung dịch axit HCl ở nhiệt độ thấp trong vài ngày. Sử dụng quá trình dòng đối lưu ngược, loại bỏ photphat trong xương. Axit sunphuric được tách ra bằng cách rửa khối xương với nước.

* *Quy trình sản xuất gelatin* : Quy trình sản xuất gelatin bao gồm 3 giai đoạn (hình 2.13).

- Xử lý sơ bộ nguyên liệu : loại các tạp chất có thể ảnh hưởng tới quá trình chiết tách và đặc tính lý hoá của sản phẩm cuối.

Nếu đi từ xương, cần sử dụng dung dịch axit loãng để loại bớt canxi và các chất khoáng. Nếu đi từ da lợn hay da bò, các xử lý quan trọng bao gồm : rửa, xả lỏng và khử mỡ. Quá trình khử mỡ có thể thực hiện nhờ nước nóng hay dung môi thích hợp, hàm lượng mỡ còn lại trong nguyên liệu trước khi chiết cần phải <1%.

Có 3 phương pháp chuẩn bị nguyên liệu protein cho chiết protein :

+ Phương pháp axit : thường áp dụng cho nguyên liệu có ít liên kết ngang (ví dụ da lợn). Quá trình xử lý thường khoảng 10 – 48h. Collagen hòa tan trong nước ấm. Axit thừa được trung hoà, muối được tách và rửa với nước. Gelatin nhận được theo phương pháp này gọi là gelatin loại A (không có nhiều ứng dụng).

+ Phương pháp kiềm : áp dụng cho các collagen phức tạp hơn (ví dụ da bò). Kỹ thuật này đòi hỏi thời gian dài tới 3 tháng. Da bò được xử lý với $\text{Ca}(\text{OH})_2$, thay mới một vài lần. Trong quá trình này, các liên kết ngang trong collagen bị phá vỡ, các protein không phải collagen và các thành

phân khác bị loại bỏ. Có một phương pháp khác xử lý da bò với NaOH trong một vài tuần, da bò đã xử lý được rửa, trung hoà và rửa lại để tách hết tạp chất. Gelatin nhận được theo phương pháp này là gelatin loại B, loại thông dụng nhất.

+ Phương pháp enzym : Phương pháp này khá mới và có ưu điểm so với phương pháp hoá học : thời gian xử lý nhanh, thu hồi gần như 100% gelatin, gelatin nhận được tương đối tinh khiết và tính chất vật lý của sản phẩm tốt hơn.

- Chiết gelatin : Gelatin được chiết trong hệ thống liên tục hay nhiều hệ thống, nhiều giai đoạn. Collagen sau khi đi qua mỗi hệ chiết được quay trở lại chiết với nước ở nhiệt độ cao hơn. Collagen đi ra từ giai đoạn chiết đầu tiên ở nhiệt độ thấp (thường là 55°C) có tính chất tạo gel cũng như các đặc tính khác tốt nhất, càng về sau, nhiệt độ chiết cao hơn có thể tới 85°C. Quá trình tiếp tục và tuân hoàn cho tới khi gelatin được chiết hết. Thông thường có thể đạt tới dung dịch gelatin nồng độ 5%. Các quá trình thu nhận gelatin công nghiệp đều tiến hành ở pH trung tính hoặc axit (nồng độ axit có thể thay đổi tùy theo trường hợp). Quá trình chiết như vậy đảm bảo tránh sự phá huỷ nhiệt gelatin chiết được.

- Giai đoạn xử lý cuối : bao gồm lọc, làm trong, bốc hơi, tiệt trùng, sấy, nghiền và phân loại. Giai đoạn này cần tiến hành nhanh và ở nhiệt độ thấp tránh phân huỷ gelatin chiết được.

- Tinh chế : Gelatin chiết được tách khỏi chất béo và collagen còn lại nhờ các thiết bị lọc dạng khung bản hay lớp lọc. Thiết bị lọc màng cũng dồi khi được sử dụng. Có thể loại muối, ion khác nhờ thiết bị trao đổi ion.

- Cò đặc : gia nhiệt khối gelatin tới 90°C trong thiết bị bốc hơi chân không. Cũng có thể sử dụng thiết bị màng để tiết kiệm năng lượng. Dung dịch gelatin thu được (thường có độ nhớt cao) chuyển sang lọc bằng thiết bị lọc dạng tấm : a multi-stage vacuum evaporator.

- Sấy : Dung dịch gelatin đậm đặc được tiệt trùng ở 140°C, làm đông rắn trong thiết bị làm nguội và tạo sợi. Gel gelatin sau đó được sấy trong thiết bị sấy băng tải với không khí nóng tiệt trùng. Sợi gel sau đó được

nghiên và giữ riêng. Kiểm tra các thông số lý, hoá, vi sinh vật, nếu đạt, tiếp tục hoàn thiện sản phẩm.

– Nghiên, phổi trộn : Tùy vào yêu cầu sử dụng, gelatin có thể được chuẩn bị dưới dạng bột nghiên, hạt, được chứa trong các bao bì như túi, bao...

* *Kiểm tra chất lượng sản phẩm*

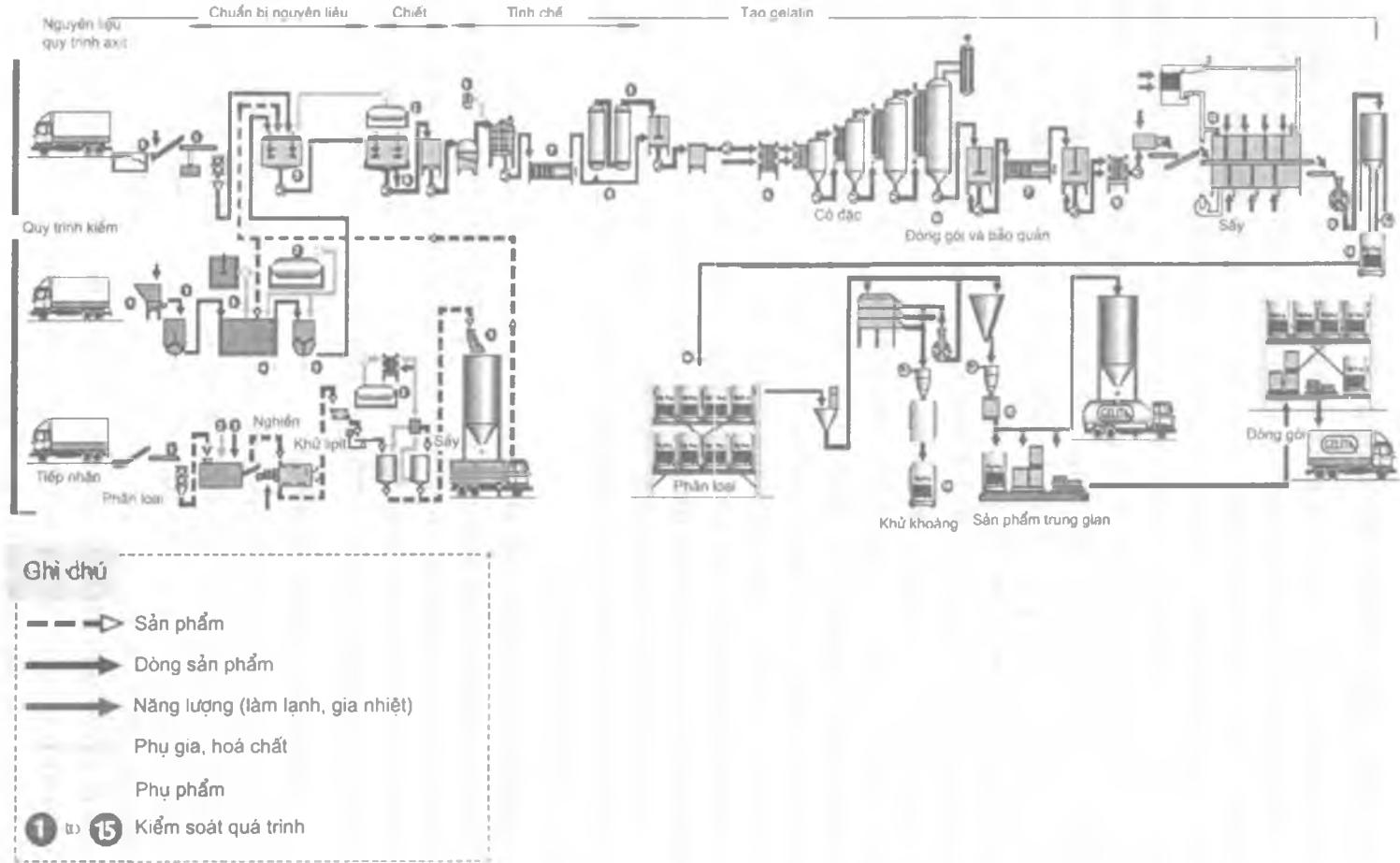
Do xuất xứ nguyên liệu là động vật nên mọi kiểm tra chất lượng về sinh sản phẩm liên quan thú y cần được thực hiện. Tất cả mọi quy trình sản xuất hiện nay đều cần tuân thủ hệ thống quản lý chất lượng ISO 9001 để đạt được yêu cầu ổn định chất lượng sản phẩm. Đối với gelatin là chế phẩm cho dược phẩm, cần áp dụng các hệ thống quản lý và tiêu chuẩn chất lượng cho sản phẩm được quy định theo từng quốc gia (quy định bởi FDA – Mỹ, CPMP – châu Âu, và các cơ quan tương đương). Mọi quy định liên quan tới sản xuất sản phẩm gelatin có thể tham khảo trong " Gelatine Handbook " (Schrieber et Gareis, 2007), en pages 99 –101).

* *Các dạng sản phẩm gelatin*

- Dạng sản phẩm cơ bản nhất là gelatin dạng hạt.
- Gelatin dạng phiến : Gelatin được hoà tan, loại khí, gia nhiệt và sau đó làm nguội trong thiết bị thùng quay. Gelatin khi đó tạo dạng bản mỏng trên trống quay. Gel gelatin được cắt thành phiến, sấy khô với không khí sạch gia nhiệt, cắt thành các đoạn dài tùy ý.
- Gelatin thu được khi sấy phun hoặc sấy thùng quay. Khi đó gelatin có thể được sấy có bổ sung hoặc không bổ sung phụ gia. Gelatin dạng hạt mịn nhận được sau quá trình sấy do bỏ qua pha tạo gel trong quá trình sấy.
- Gelatin thuỷ phân : Dạng sản phẩm này có thể nhận được khi sử dụng enzym thuỷ phân nửa vời gelatin. Sản phẩm sau đó được gia nhiệt, phá huỷ enzym và sấy khô sản phẩm bằng sấy phun, tạo dạng bột mịn.

Gelatin được chiết từ da cá hồi và cá tuyết Đại tây dương bằng phương pháp chiết axit.

Sơ đồ dây chuyền sản xuất gelatin (tập đoàn GELTA) được thể hiện ở hình 2.13.



Hình 2.13. Sơ đồ dây chuyền sản xuất gelatin

2.3. Công nghệ protein tái tổ hợp

Trong những năm gần đây, cùng với sự phát triển của công nghệ gen và sự hoàn thiện của các giải pháp tinh sạch protein, các protein tái tổ hợp ngày càng được sử dụng nhiều hơn trong các lĩnh vực của đời sống xã hội từ y học, công nghiệp thực phẩm đến nghiên cứu cơ bản. Tính đến năm 2005, có đến 66 trong 77 loại protein dược phẩm được FDA (Food and Drug Administration) cho phép lưu hành có nguồn gốc tái tổ hợp. Trong lĩnh vực y, dược học, công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp có nhiều ưu điểm so với các công nghệ sản xuất protein truyền thống như khả năng cung cấp một lượng lớn protein dược phẩm với giá thành rẻ và đặc biệt là tính an toàn do không gây ra các phản ứng miễn dịch không mong muốn và giảm thiểu nguy cơ nhiễm virut và các vật gây bệnh khác. Đối với các nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực khoa học sự sống, công nghệ protein tái tổ hợp cho phép tạo ra một lượng lớn "nguyên liệu" phục vụ các nghiên cứu về cấu trúc, chức năng của các protein mới. Điều này hết sức có ý nghĩa trong giai đoạn nghiên cứu hậu – thế gen (post-genomics). Thực vậy, do trình tự thế gen của nhiều loài sinh vật đã được xác định nên nhiệm vụ của sinh học hiện đại sẽ tập trung vào việc xác định chức năng của các gen, nói một cách khác là xác định chức năng của các protein được các gen mã hoá. Bởi vậy, có thể nói công nghệ protein tái tổ hợp sẽ là một công cụ không thể thiếu của các nhà nghiên cứu sinh học hiện đại.

Trong phần này, đầu tiên các khái niệm về protein tái tổ hợp sẽ được trình bày. Tiếp đó, các bước trong quy trình sản xuất protein tái tổ hợp sẽ được đề cập và thảo luận giúp người đọc có cái nhìn tổng thể về nguyên tắc tạo protein tái tổ hợp và có khả năng lựa chọn được chiến lược sản xuất thích hợp. Cuối cùng, một số công nghệ sản xuất protein điển hình sẽ được giới thiệu.

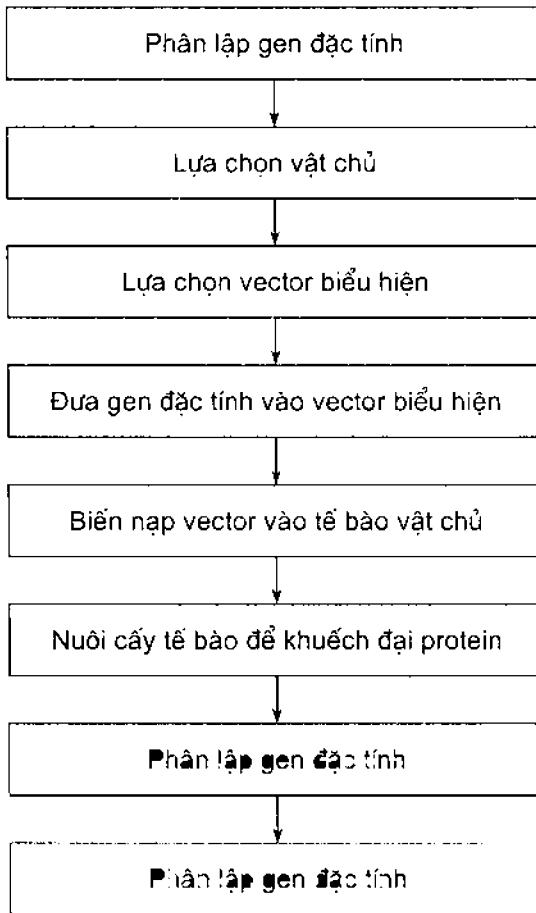
2.3.1. Khái niệm protein tái tổ hợp

Protein tái tổ hợp là các protein được tạo ra bởi công nghệ ADN tái tổ hợp, nói một cách khác là các protein được tạo ra bằng cách kết hợp vật liệu di truyền từ các nguồn khác nhau có sử dụng đến các kỹ thuật gen *in vitro*. Một điểm cần chú ý các vật liệu di truyền hay các thành tố ADN không nhất thiết phải di từ các sinh vật khác nhau mà có thể di từ một sinh vật duy nhất miễn là có diễn ra sự tái tổ hợp *in vitro*. Ví dụ một protein X có nguồn gốc từ *Escherichia coli* vẫn được gọi là protein tái tổ hợp khi được sản xuất trong

vì khuẩn này nếu như gen mã hoá cho protein này được đặt dưới sự điều khiển của một đoạn promoter của một gen khác cũng có nguồn gốc từ *E. coli*.

2.3.2 Quy trình công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp

Toàn bộ quy trình công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp có thể được tóm tắt trong hình 2.14.



Hình 2.14. Quy trình công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp

* Phân lập gen đặc tính

Trong một số trường hợp, gen mã hoá protein đích đã được phân lập trong một vector tách dòng hoặc trình tự của gen này đã được xác định. Khi đó, gen đặc tính có thể được đưa vào vector biểu hiện chỉ bằng cách sử dụng các enzym giới hạn thích hợp hoặc kỹ thuật PCR. Tuy nhiên, trong nhiều

trường hợp, gen đặc tính còn chưa được xác định. Nhiệm vụ của các nhà nghiên cứu lúc này là phải phân lập gen đặc tính từ thể gen phức tạp của sinh vật vốn sinh tổng hợp protein đích. Do thể gen của các sinh vật thường bao gồm một số lượng lớn các gen (thường từ vài nghìn đến vài chục nghìn gen), cần thiết phải có các phương pháp sàng lọc hiệu quả để loại bỏ các trình tự gen nhiều nhằm phân lập nhanh chóng trình tự gen đích.

Để tách dòng các gen đặc tính từ thể gen của sinh vật vốn sinh tổng hợp protein đích, có thể sử dụng hai chiến lược : chiến lược dựa vào sự xây dựng và sàng lọc các thư viện ADN thể gen và chiến lược dựa vào kỹ thuật PCR.

Trong chiến lược đầu tiên, ADN thể gen được phân chia thành các đoạn có kích thước từ vài kb đến vài chục kb, tiếp đó tiến hành tách dòng toàn bộ các đoạn ADN mới được tạo ra này. Tập hợp toàn bộ các dòng ADN, đại diện cho thể gen của sinh vật nghiên cứu, được gọi là một thư viện ADN thể gen. Sau đó, người ta sẽ tiến hành sàng lọc thư viện để xác định các dòng mang gen đích.

Một biến thể của chiến lược vừa được miêu tả ở trên thường được sử dụng ở các sinh vật nhân chuẩn là việc xây dựng các thư viện cADN thay vì thư viện ADN thể gen. Do cADN không chứa intron và các trình tự không mã hoá khác vốn tồn tại trong thể gen của sinh vật nhân chuẩn nên thư viện cADN có nhiều ưu điểm so với thư viện ADN thể gen. Thứ nhất, kích thước của các dòng cADN thường nhỏ hơn so với các dòng ADN thể gen tương ứng. Điều này hết sức quan trọng trong việc tách dòng các gen có nguồn gốc từ thực vật hoặc động vật vì trong nhiều trường hợp kích thước của một gen có thể quá lớn không thể nằm trọn trong một dòng ADN thể gen. Thứ hai, các dòng cADN có khả năng biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *E. coli*, tạo điều kiện cho việc sàng lọc thư viện dựa vào sự biểu hiện protein. Khả năng này là không có được khi ta sử dụng các thư viện ADN thể gen có nguồn gốc từ sinh vật nhân chuẩn.

Nguyên tắc của chiến lược tách dòng thứ hai dựa vào sự khuếch đại đặc hiệu gen đích trực tiếp ADN thể gen hoặc tập hợp cADN bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR sau đó tiến hành tách dòng các sản phẩm của phản ứng PCR. Một điểm cần chú ý là khác với chiến lược tách dòng dựa vào thư viện, bước sàng lọc diễn ra ngay ở giai đoạn đầu của quy trình, khi thiết kế mồi nhử PCR.

* Tách dòng dựa trên thư viện ADN thể gen

Quy trình tách dòng gen dựa trên thư viện ADN thể gen được trình bày tóm tắt ở hình 2.15.

Đầu tiên, ADN thể gen được tiến hành tách và tinh chế từ các dòng tế bào hoặc mô của sinh vật vốn sinh tổng hợp protein đích. ADN thể gen tách chiết được phải tinh sạch và không bị đứt gãy để đảm bảo kích thước của các đoạn chèn vào vector sau này.

Trong bước tiếp theo, người ta sử dụng một enzym giới hạn (ví dụ như *Sau3AI*) hoặc hai enzym (*HaeIII* và *AluI*) để phân cắt một phần ADN thể gen. Tiêu chí lựa chọn enzym hạn chế là khả năng cắt thường xuyên và ngẫu nhiên. Enzym *Sau3AI* với khả năng nhận biết các điểm cắt có trình tự GATC thỏa mãn hoàn toàn các tiêu chí nói trên. Các điều kiện phân cắt được tối ưu sao cho kích thước của phần sản phẩm chính là tương đương với khả năng chứa vector (20kb với các vector thuộc nhóm λ, 40kb với các cosmid).

Tiếp đó, sản phẩm của quá trình phân cắt sẽ được phân loại dựa vào kích thước để loại bỏ các đoạn có kích thước nhỏ hoặc quá lớn. Nếu quá trình phân loại này không được thực hiện, các đoạn có kích thước nhỏ sẽ được nối với vector và tạo ra các dòng ADN không có ý nghĩa về mặt tách dòng sau này. Các đoạn cắt có kích thước quá lớn có thể gắn với vector nhưng không tạo ra các dòng ADN thể gen do vượt quá khả năng chứa của vector ; kết quả là gây ra hiện tượng cạnh tranh với các đoạn cắt có kích thước phù hợp cần đưa vào vector. Thông thường, người ta sử dụng 2 phương pháp để phân loại sản phẩm phân cắt dựa vào kích thước : sử dụng gradient saccaroza và điện di trên gel.

Sau bước phân loại các sản phẩm phân cắt dựa vào kích thước, chúng ta sẽ thu được các đoạn ADN có khả năng nối với vector tách dòng. Các loại vector tách dòng thường được sử dụng để xây dựng các thư viện ADN thể gen bao gồm : các vector thuộc nhóm λ với khả năng chứa được các đoạn chèn 10 – 20kb, cosmid với khả năng chứa được các đoạn chèn 30 – 40 kb hoặc BAC (bacterial artificial chromosome), YAC (yeast artificial chromosome) với khả năng chứa lớn hơn 45kb. Có thể nhận thấy rằng khả năng chứa của vector càng lớn thì số lượng dòng cần thiết phải sàng lọc để phân lập gen đặc tính càng nhỏ. Đồng thời, khả năng các gen có kích thước lớn nằm trọn vẹn trên một dòng là cao hơn, tạo điều kiện cho việc xác định gen đặc tính sau này. Tuy nhiên, việc chuẩn bị các thư viện thể gen có kích thước đoạn chèn lớn thường phức tạp và các vector có kích thước lớn thường không ổn định, có xu hướng bị cắt đoạn (deletion) trong *E. coli*. Do vậy, khi kích thước của gen đặc tính cần phân lập không quá lớn, các vector thuộc nhóm λ vẫn thường được sử dụng nhiều nhất.

Trong bước tiếp theo, các đoạn ADN sẽ được nối với vector tách dòng đã được phân cắt bởi cùng enzym giới hạn. Do số lượng các dòng trong thư viện ADN thể gen cần đạt là rất lớn để đảm bảo phủ hoàn toàn thể gen, phản ứng nối cần thiết phải được tối ưu hoá. Điều này thường được thực hiện bằng cách cố định lượng vector và thay đổi lượng ADN cần chèn vào vector. Tiếp đó, sản phẩm của các phản ứng nối sẽ được đưa vào *E. coli* và số lượng các khuẩn lạc tạo ra được xác định. Điều kiện tối ưu sẽ ứng với phản ứng nối cho số lượng khuẩn lạc lớn nhất. Các điều kiện này sau đó sẽ được áp dụng cho các phản ứng nối có thể tích lớn để tạo ra đủ số lượng khuẩn lạc cần thiết.

Sau khi đã thực hiện xong các phản ứng nối, các vector mang đoạn chèn ADN sẽ được đưa vào tế bào *E. coli*. Đối với các vector thuộc nhóm λ, tập hợp các phân tử ADN phage mang đoạn chèn sẽ được đóng gói *in vitro* (*in vitro* packaging) bằng cách sử dụng các bộ sinh phẩm chuyên dụng trước khi cho lây nhiễm vào *E. coli*. Đối với cosmit, BAC và YAC, sản phẩm của phản ứng nối sẽ được biến nạp trực tiếp vào *E. coli*. Để đảm bảo hiệu quả của quá trình biến nạp, phương pháp biến nạp đục lỗ điện thường được sử dụng.

Đến thời điểm này, chúng ta sẽ thu được một thư viện ADN thể gen với số dòng phù hợp cho việc sàng lọc gen đích. Thông thường, người ta sử dụng một trong 3 phương pháp sàng lọc sau : sàng lọc bằng cách lai với các đoạn dò axit nucleic (ADN, ARN), sàng lọc bằng kháng thể và sàng lọc dựa vào hoạt tính của protein được mã hoá bởi gen đích.

Nguyên tắc cơ bản của phương pháp thứ nhất dựa vào việc các mảng thực khuẩn thể (phage plaques) hay các khuẩn lạc mang plasmid hoặc cosmit có chứa một lượng lớn các đoạn chèn ADN có khả năng được phát hiện trực tiếp bằng cách lai với các đoạn dò đặc hiệu được đánh dấu (thường bằng phóng xạ). Bước đầu tiên của quy trình sàng lọc bằng lai là việc nuôi cấy một số lượng lớn các khuẩn lạc hoặc các mảng trên các đĩa môi trường agar. Tiếp đó, bản sao của các khuẩn lạc này được chuyển lên các mảng nitrocellulose. Sau quá trình xử lý với kiềm để phân giải các khuẩn lạc và biến tính ADN, mảng nitrocellulose sẽ được lai với các mẫu dò được đánh dấu. Các khuẩn lạc cho kết quả lai dương tính trên mảng nitrocellulose sẽ cho phép phân lập các khuẩn lạc tương ứng trên đĩa môi trường agar ban đầu.

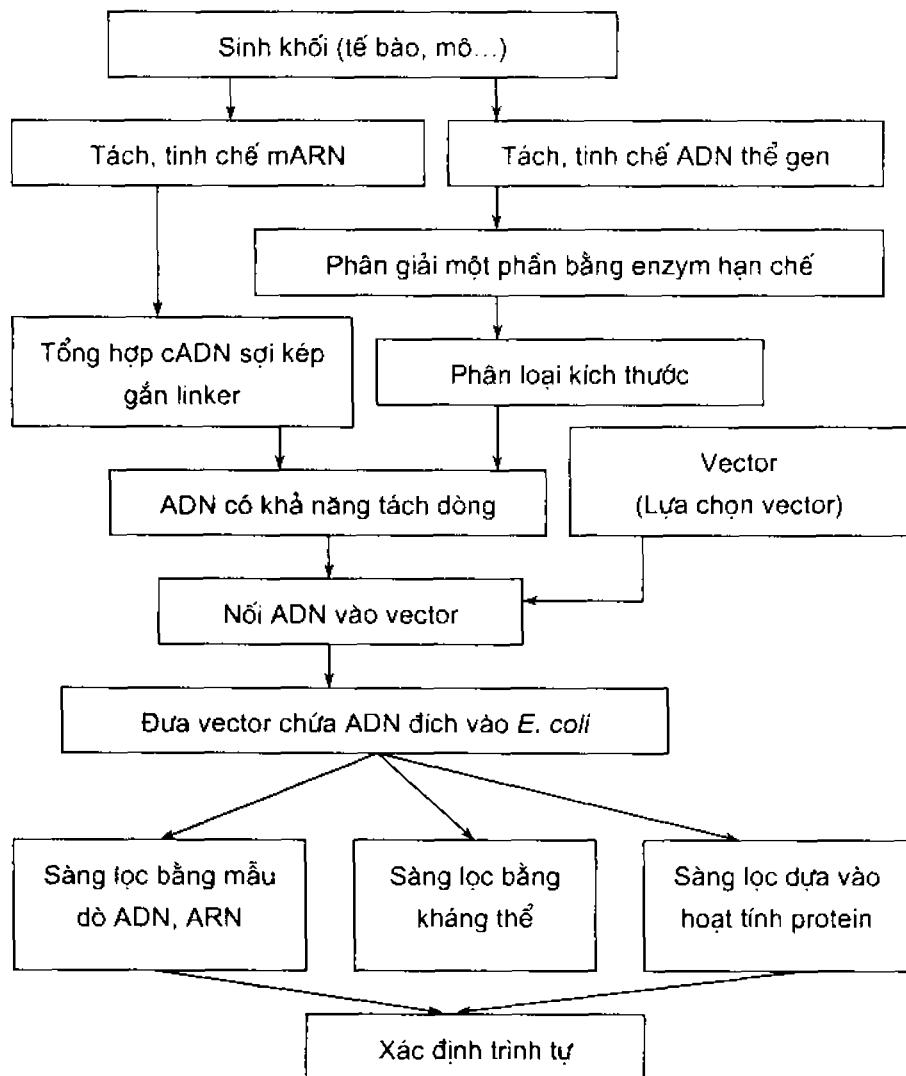
Hai phương pháp còn lại thường được sử dụng để sàng lọc các thư viện ADN thể gen của vi khuẩn và nấm men được xây dựng với các vector biểu hiện. Đối với các tế bào nhân chuẩn bậc cao hơn, các phương pháp này chỉ được dùng để sàng lọc các thư viện cADN do hiện tượng tồn tại intron trong thể gen của các sinh vật này. Phương pháp sàng lọc bằng kháng thể có bản

chất dựa vào phản ứng đặc hiệu giữa các kháng thể với các yếu tố quyết định kháng nguyên nằm trong phân tử protein đích. Phương pháp này thường được sử dụng khi kháng thể nhận biết protein đích đã được phân lập. Vector biểu hiện được sử dụng trong phương pháp sàng lọc bằng kháng thể thường là các vector cho phép tạo ra các protein dung hợp với β – galactosidaza và được điều khiển bằng promoter *lac* (ví dụ vector λgt11). Quá trình sàng lọc được bắt đầu bằng việc trại thu viên thực khuẩn thể lên trên đĩa thạch với chủng *E. coli* Y1090 là vật chủ. Chủng *E. coli* này có sự biểu hiện mạnh yếu tố kìm hãm *lac* (*lac* repressor) nên các protein dung hợp chỉ được biểu hiện khi chất cảm ứng isopropyl- β -D-thiogalactosit (IPTG) được đưa vào môi trường. Điều này giúp bảo vệ các tế bào vật chủ *E. coli* khỏi các tác hại có thể xảy ra khi biểu hiện các protein mới. Đồng thời, chủng Y1090 không mang proteaza *Lon* nên hạn chế hiện tượng phân giải các protein dung hợp. Các protein dung hợp biểu hiện trong các mảng được tạo ra trên đĩa thạch sẽ được hấp thụ lên màng nitroxenluloza. Tiếp đó, màng nitroxenluloza sẽ được cho phản ứng với kháng thể đặc hiệu vốn nhận biết protein đích được đánh dấu phóng xạ hay enzym. Khi các tín hiệu dương tính được xác định trên mảng, mảng tương ứng có thể được phân lập trên môi trường agar ban đầu và ADN mang gen mã hoá protein đích sẽ được tách dòng.

Phương pháp sàng lọc dựa vào hoạt tính của protein thường được sử dụng để tách dòng các gen mã hoá các enzym. Để tách dòng gen mã hoá enzym α – amylaza từ vi khuẩn chịu nhiệt ưa muối *Halothermothrix orenii*, Mijts và Patel (2002) đã tiến hành xây dựng một thư viện ADN thể gen của vi khuẩn này với vector được sử dụng là pBluescriptSK+ (Stratagene). Toàn bộ các dòng của thư viện này sau đó được đưa vào nuôi cấy trên môi trường thạch có chứa thêm tinh bột tan. Các dòng mang gen mã hoá enzym α – amylaza được xác định dựa vào sự xuất hiện các halo khi thêm dung dịch I₂/KI (do có sự thuỷ phân tinh bột dưới sự xúc tác của α – amylaza).

Sau khi đã xác định được dòng ADN thể gen mang gen mã hoá protein đích, nhiệm vụ của chúng ta là phải xác định trình tự gen mục tiêu. Trong trường hợp kích thước đoạn chèn là không quá lớn ($\leq 10\text{kb}$), trình tự của toàn bộ đoạn chèn có thể được xác định trực tiếp bằng chiến lược kéo dài dựa vào mồi (primer – walking strategy). Trong chiến lược này, đầu tiên quá trình xác định trình tự được thực hiện bằng cách sử dụng một đoạn mồi chuẩn của vector. Dựa vào các kết quả trình tự thu nhận được, một đoạn mồi mới được thiết kế ở vị trí cuối lần đọc thứ nhất. Tiếp đó, một phản ứng xác định trình tự thứ hai sẽ được thực hiện với việc sử dụng đoạn mồi mới được thiết kế. Kết quả là cho phép xác định thêm một phần trình tự đoạn chèn.

Quá trình này tiếp tục được tiếp diễn cho đến khi toàn bộ trình tự đoạn chèn được xác định. Để giảm thời gian phân tích, thông thường người ta tiến hành phân tích trình tự từ cả hai đầu. Trong trường hợp kích thước đoạn chèn lớn hơn 10kb, người ta sẽ tiến hành phân chia nhỏ đoạn chèn một cách ngẫu nhiên (thường bằng xử lý cơ học) thành các đoạn có kích thước nhỏ (khoảng trên dưới 1kb) sau đó mỗi đoạn nhỏ này được đưa vào plasmid để xác định trình tự từ cả hai đầu. Các trình tự thu được sẽ được so sánh để xác định các vùng trùng nhau, từ đó cho phép ghép nối các trình tự của các đoạn nhỏ thành trình tự của toàn bộ đoạn chèn ban đầu.



Hình 2.15. Quy trình xây dựng và sàng lọc các thư viện thể gen và cADN

Chương III

CÔNG NGHỆ POLYSACCHARIT

3.1. Nguồn polysaccharit và nguyên tắc khai thác polysaccharit

3.1.1. Các polysaccharit từ thực vật

** Tinh bột*

- Tinh bột là chất dinh dưỡng dự trữ của thực vật. Tinh bột có nhiều trong các hạt, củ, quả.
 - Thường ở dưới dạng không hòa tan trong nước nên tinh bột có thể tích tụ một lượng lớn trong tế bào mà vẫn không ảnh hưởng tới áp suất thẩm thấu (chiếm tới 60 – 90% trọng lượng chất khô).
 - Hầu hết tinh bột được sử dụng trên thị trường là tinh bột ngô (95% lượng tinh bột sử dụng ở Mỹ là tinh bột ngô).
 - Tinh bột thường chiếm một trữ lượng lớn và với giá thành rẻ nên chúng là một trong những vật liệu polyme được chú ý nhiều.

** Xenluloza*

- Xenluloza là một polyme do các β glucoza liên kết với nhau theo liên kết β 1 – 4 glucozit được tổng hợp bởi thực vật và một số vi khuẩn (*Acetobacter xylinum*).
 - Xenluloza là một polyme sinh học có trữ lượng lớn nhất trong tự nhiên.
 - Xenluloza không hòa tan trong nước hoặc trong một số dung môi hữu cơ và bị phân huỷ bởi phức hệ xenlulaza của một số chủng vi sinh vật.
 - Xenluloza từ vi khuẩn gần đây được quan tâm nhiều bởi khả năng kết tinh của chúng cao hơn so với nguồn thực vật, hơn nữa chúng có diện tích bề mặt sợi cũng lớn hơn. Loại này thường được tổng hợp trong môi trường tinh, tạo một mạng lưới sợi ở bề mặt phan pha lỏng – khí. Vi khuẩn có thể sử dụng các nguồn cacbon khác nhau như : glucoza, fructoza, gluconat, piruvat, glycerol... cho quá trình sinh tổng hợp.

** Pectin*

- Bao gồm các gốc axit galacturonic liên kết với nhau theo liên kết α 1 – 4 với các mức độ methyl hoá khác nhau.

– Pectin hòa tan trong nước và tạo độ nhớt cho dung dịch. Hầu hết nguồn pectin trên thị trường được chiết xuất từ vỏ của họ Xitrus hoặc bã táo.

– Pectin dạng metoxyl thấp cũng có khả năng tạo gel khi có mặt ion canxi và được dùng trong công nghiệp thực phẩm như lớp áo hoặc chất phụ gia.

* Konjac

– Là polyme của hỗn hợp glucoza và manzoza (tỷ lệ khoảng 1/6), liên kết với nhau theo liên kết $\beta,1 - 6$ với mức độ axetyl hoá khoảng 1/12 – 18 gốc monome.

– Khả năng hòa tan trong nước có thể được điều chỉnh bởi một số polycation đặc biệt. Có thể bị thuỷ phân bởi một số enzym.

– Là chất làm đặc và có thể tạo lớp màng rắn chắc về cơ học được dùng cho một số ứng dụng trong thực phẩm và dược học.

* Alginat

– Được tách từ vách tế bào tảo nâu là một chuỗi thẳng của axit polyuronnic liên kết 1 – 4 (bao gồm poly β – D mannuronic, poly axit α – L – guluronic, đôi khi là axit D – mannuronic và L – guluronic).

– Thông thường alginat chiếm 40% trọng lượng khô của sinh khối tảo. Tuy nhiên, hàm lượng và tính chất của alginat phụ thuộc vào từng loài tảo. Các loài tảo giàu gốc guluronic thường có sợi tảo cứng hơn còn với những loài chứa nhiều axit D – mannuronic thì mềm hơn.

– Alginat tạo màng bởi quá trình bốc hơi nước hoặc bằng liên kết chéo (liên kết ngang) được dùng trong công nghiệp thực phẩm và dược học.

+ Công nghiệp thực phẩm : tác nhân làm đặc và làm bền.

+ Trong in ấn : chất kết dính, chất phủ giấy.

+ Trong y học : chất làm lành vết thương.

+ Trong công nghệ sinh học : chất cố định tế bào và enzym.

* Gums (Guar gum, Gum arabic, Gum Karaya, Gum Tragacanth, Locust Bean Gum...)

– Là một loại nhựa cây có bản chất polysaccharit hoặc dẫn xuất của chúng (polyme phân nhánh cao chứa galactoza, ramnoza, arabinosa và axit glucuronic...).

- Hoà tan trong nước nóng và nước lạnh tạo dung dịch nhớt.
- Nhựa thường được dùng trong thực phẩm, mỹ phẩm, dược học và khoa học vật liệu : gel, nhũ tương, chất kết dính, chất tuyển nổi, mực in...

* Các loại polysaccharit khác từ tảo :

Các loại này thường là laminaran (các glucoza liên kết với nhau bởi $\beta 1,3$), inulin (fructoza liên kết với nhau bởi $\beta 1,2$), xylan (xyloza liên kết $\beta 1,4$ với glucoza, arabinoza và axyl hoá) và agar.

Agar chứa agaroza và agarpectin. Agaroza là một copolymer 3, β -D - galactopyranoza và 4,3,6 anhydro α - L - galactopyranoza. Agarpectin có cùng cấu trúc như agaroza nhưng trong phân tử của chúng một số monome được thay thế bằng gốc 4,6 - O - (1 - carboxymethylidene) - D - galactopyranoza hoặc các gốc đường bị methyl hoá hoặc sunphat hoá. Agar được chiết tách từ tảo đỏ và có khả năng tạo gel thuận nghịch nhờ nhiệt được ứng dụng trong nha khoa, trong công nghiệp thực phẩm và làm môi trường rắn để nuôi vi sinh vật. Agar không được hấp thu bởi dịch vị người. Agar tạo chuỗi xoắn kép trong dung dịch và kết tụ lại để tạo mạng lưới ba chiều. Tảo đỏ được thu hái bằng tay và agar được chiết tách bằng nước nóng và được tinh chế bằng phương pháp lạnh đông.

3.1.2. Polysaccharit nguồn động vật

* Chitin/chitosan

- Chitin được coi là một polymere phổ biến thứ hai sau xylan trong sinh giới.
 - Đơn vị cơ bản cấu tạo nên chitin là 2 N - axetyl, 2 - deoxy - D - glucoza kết hợp với nhau nhờ liên kết $\beta 1,4$ và bị phân huỷ bởi chitinaza và lysozym.
 - Đơn vị tạo chitosan là 2 amino, 2 - deoxy - D - glucoza kết hợp với nhau nhờ liên kết $\beta 1,4$, phân huỷ bởi chitosanaza.
 - Chitin được tổng hợp bởi côn trùng và lớp Giáp xác được dùng như một cấu trúc composit rắn chắc cho lớp vỏ áo bên ngoài. Chitin cũng được tổng hợp bởi một số nấm mốc chiếm một phần trong vách tế bào đảm bảo sự rắn chắc về mặt cấu trúc của chúng. So với chitin, chitosan chiếm một lượng ít hơn trong tự nhiên và chúng cũng được tổng hợp song song với chitin ở một số nấm mốc nhờ hai enzym chitinaza và chitindeaxetylaza.

– Chitin và chitosan được dùng như những polyme chức năng do chúng có các thuộc tính cơ học tạo màng, tạo sợi, khả năng thấm oxy thấp của màng và dễ hòa tan trong dung dịch axit axetic trong trường hợp của chitosan. Chitosan thương mại hiện nay được tạo ra bằng quá trình khử axetyl từ chitin bằng các xúc tác hoá học. Chitin dùng cho quá trình này được khai thác từ vỏ tôm, cua...

3.1.3. Polysaccharit từ vi khuẩn

** Levan*

Đơn vị cấu tạo cơ bản là các alhydro – D – fructofuranosit liên kết với nhau chủ yếu bởi liên kết $\beta - 2,6$ và một vài nhánh $\beta - 2,1$. Levan thường được tạo ra bởi một vài vi khuẩn thường là những vi khuẩn gây bệnh răng miệng. Levan bị thuỷ phân bởi enzym levanaza để tạo ra oligosaccharit và fructoza. Levan hòa tan trong nước nóng và được ứng dụng như chất phụ trong thực phẩm và dược học. Levan là một trong rất ít các polysaccharit trong tự nhiên tạo tinh thể lỏng.

** Xanthan*

– Xanthan là một dị anion polysaccharit có khối lượng phân tử cao được tạo ra bởi loài *Xanthomonas campestris*.

– Xanthan chứa một chuỗi chính pentansaccharit gồm các đơn vị lặp lại của $\beta - 1,4$ glucoza và chuỗi bên chứa các gốc manzoza, glucuronic axit và các nhóm chức axetyl pyruvic axit.

– Polyme được thu hồi từ dịch lên men qua các bước chiết bằng dung môi.

** Dextran*

– Đơn vị cơ bản là các $\alpha - 1,6 - \text{D glucopyranosit}$ trong mạch chính và với một số ít các liên kết khác ($\alpha - 1,4$) tạo thành một số mạch nhánh.

– Dextran là một polysaccharit điển hình từ nguồn vi sinh vật, chúng được tổng hợp từ loài vi khuẩn *Leuconostoc mesenteroides* trong môi trường lỏng chứa đường saccaroza và các loài vi khuẩn khác. Dextran từ *L. mesenteroides* chiếm 95% liên kết $\alpha - 1,6$ và 5% liên kết $\alpha - 1,3$. Phân lớn các mạch nhánh chứa một hoặc 2 gốc glucoza.

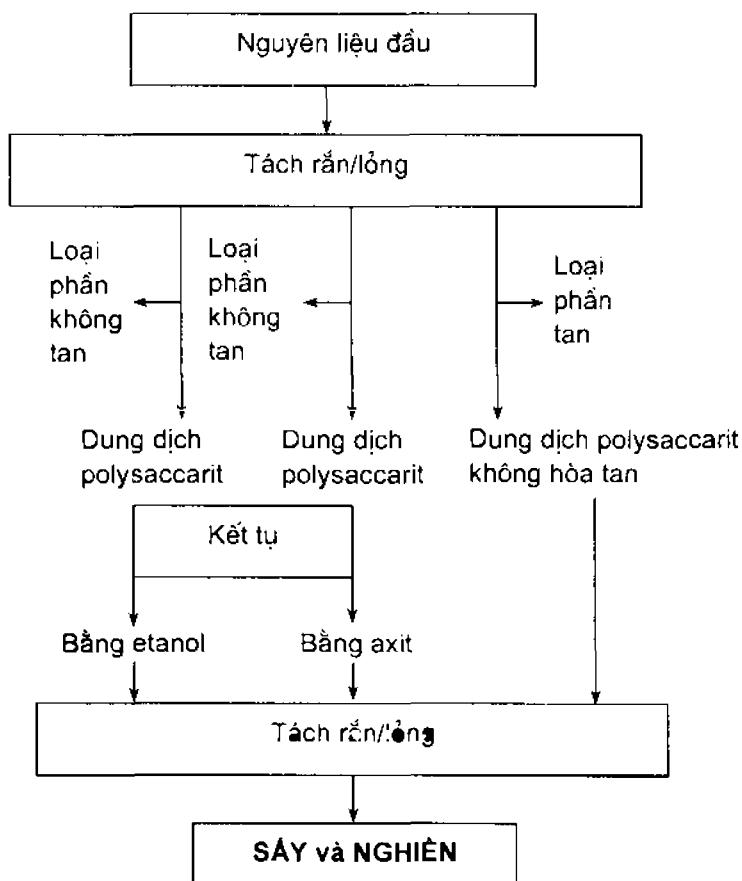
– Dextran là polyme vi sinh vật ngoại bào đầu tiên được ứng dụng trong công nghiệp, chúng được dùng làm chất thay thế huyết thanh máu rất có hiệu quả hoặc được sử dụng trong kỹ thuật tách chiết (nhựa sephadex).

3.2. Thu nhận và tinh sạch các nguồn polysaccharit

3.2.1. Nguyên tắc

Do các polysaccharit chứa số các nhóm định chức ít hơn nhiều so với protein do vậy các kỹ thuật tách và tinh chế chúng không phong phú như nhóm protein và chỉ dựa trên các phản ứng kết tủa liên quan tới việc thay đổi độ phân cực của môi trường hoặc của chính các phân tử polysaccharit.

Hơn nữa không có một polysaccharit nào có một khối lượng phân tử xác định nên các kỹ thuật tách phân tử hoặc kỹ thuật lọc qua các màng lọc ít được áp dụng. Mặt khác, phần lớn các dung dịch polysaccharit thường rất nhớt ngay ở những nồng độ thấp gây hiện tượng bết dính nếu sử dụng các quá trình lọc. Quy trình chung cho quá trình thu nhận và tinh sạch các nguồn polysaccharit được thể hiện qua sơ đồ dưới đây :



Hình 3.1. Sơ đồ thu nhận và tinh sạch các nguồn polysaccharit

Từ nguồn nguyên liệu ban đầu, có thể phân ra 2 trường hợp sau :

- Dạng không hòa tan : Không có phương pháp nào khác ngoài việc làm phân ly các phân tử cấu trúc tạo dạng phân tán. Đó là trường hợp của tinh bột và xanthan. Sau khi nghiền mịn nguyên liệu rồi phân tách bằng ly tâm sản phẩm được sấy hoặc làm ấm lại.
- Dạng hòa tan trong nước ấm hoặc tương nở bởi pH : Sau khi hòa tan, người ta có thể thu nhận chúng bằng cách giảm khả năng phân cực hoặc bằng pH. Ví dụ, các dạng keo nhót như carragenan, xanthan được tách bằng nước ấm còn với pectin, alginat được tách trong môi trường kiềm.

3.2.2. Tách chiết các polysaccharit hòa tan

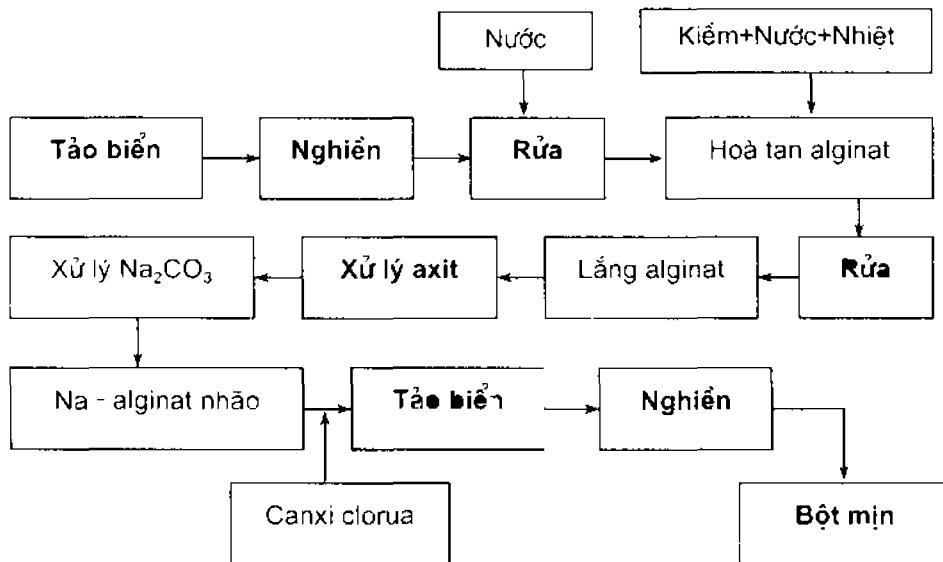
** Tách chiết alginat*

Alginat là polyme mạch thẳng của axit uronic hypocolloids. Chúng được tách ra từ tảo nâu và một số loài vi khuẩn nhất định. Polyme thu được từ tảo biển được sử dụng một cách rộng rãi làm chất nền, chất ổn định, chất nhũ hoá trong công nghiệp thực phẩm cũng như trong công nghiệp hóa chất.

Macrocystis pyrifera, một loại tảo biển nâu là nguồn thu alginat thương phẩm đầu tiên. Loài tảo này là cây mọc lâu năm và có thể thu hoạch quanh năm. Do sinh trưởng nhanh chúng có thể cho thu hoạch bốn lần / năm. Người ta thu hoạch bằng cách cắt các phiến lá nằm dưới mặt nước, sau đó chúng được chuyển tự động lên các xà lan. Một khác, loài *Ascophyllum nodosum*, một nguồn nguyên liệu thay thế, sống trên các vách đá là loài cây nhỏ, thường chỉ cao 3 – 5 ft (feet) và chúng thường được thu hoạch thủ công. Một số loại tảo nâu quan trọng trong khai thác nữa là : *Ecklonia maxima*, *Ecklonia cava*, *Eisenia bicyclis* và *Lessonia nigrescens*.

Nguyên tắc của quá trình sản xuất alginat là sự trao đổi ion. Trong tảo biển, alginat là một hỗn hợp các muối của axit alginic với các ion natri, kali, mangan, canxi. Quá trình tách chiết bắt đầu bằng việc nghiền sinh khối tảo và rửa chúng trong nước. Trong giai đoạn đầu của quá trình alginat không tan trong nước nên các thành phần hòa tan trong nước có thể được rửa trôi bằng nước nóng. Sau đó, polysaccharit được hòa tan và kết tủa, thường bằng muối canxi. Kiềm mạnh sau đó được bổ sung vào để rửa và hỗn hợp sau đó được gia nhiệt để tách và hòa tan alginat. Dung dịch alginat thô sau đó được

gạn lọc và kết tủa bằng cách thêm muối canxi clorua. Tiếp theo canxi alginat thu được lại được xử lý bằng axit để thu được axit alginic. Natri cacbonat được bổ sung tiếp theo để tạo thành dịch nhão natri alginat, dịch nhão này sẽ được làm khô và nghiền thành dạng bột mịn.

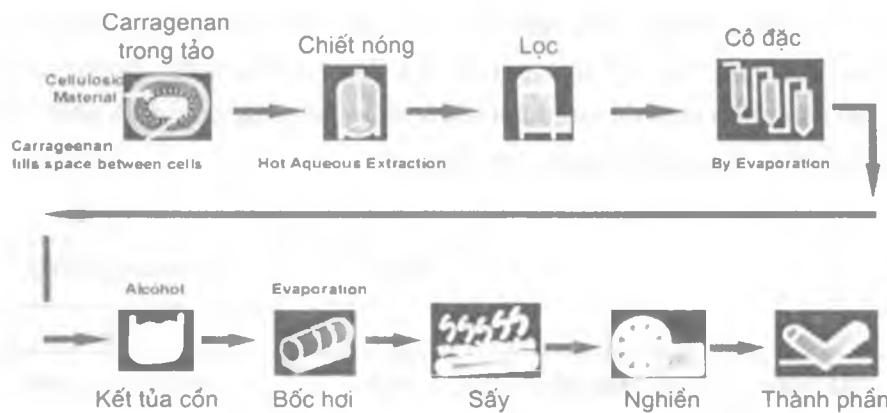


Hình 3.2. Sơ đồ tách chiết alginat

* Tách chiết carragenan

Carragenan cũng là một dạng polysaccharit được tách ra từ các loại tảo đỏ thuộc các loài *Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina* và *Furcellaria*. Carragenan thương phẩm được sử dụng nhiều trong kỹ nghệ sản xuất thực phẩm, được pha với vai trò như chất tạo cấu trúc, chất ổn định cho các sản phẩm.

Sau khi rửa, tảo được nghiền trong nước nóng, carragenan được tách ra khỏi tế bào bởi các tác nhân kiềm. Các tạp chất hòa tan như protein, xylanluloza được loại khỏi dịch bởi quá trình lọc nóng dưới áp suất cao qua lớp đát lọc. Dịch lọc trong thu được sau khi cô đặc bằng quá trình bốc hơi nước sẽ được xử lý với etanol tinh khiết để kết tủa polysaccharit dưới dạng sợi. Kết tủa được rửa lại bằng cồn sau đó được làm khô bằng quá trình bốc hơi và sấy. Thành phẩm được nghiền dưới dạng bột mịn.



Hình 3.3. Sơ đồ quy trình thu nhận carragenan từ tảo đỏ

3.3. Công nghệ một số polysaccharit

3.3.1. Polysaccharit thực vật

3.3.1.1. Tinh bột

Tinh bột là polysaccharit chủ yếu có trong thực vật, đặc biệt có nhiều trong các hạt hoa thảo, củ, lá, quả...

Tinh bột là chất dinh dưỡng dự trữ của thực vật và thường có mặt dưới dạng không hòa tan trong nước, do đó có thể tích tụ một lượng lớn trong tế bào mà không ảnh hưởng đến áp suất thẩm thấu. Có thể thu được một lượng lớn tinh bột từ nhiều nguồn lương thực trong tự nhiên (chiếm 60 – 90% tổng sản lượng) : ngô, khoai, sắn, đậu, lúa mỳ. Tùy thuộc vào từng loại lương thực mà hàm lượng tinh bột khác nhau (bảng 3.1).

Bảng 3.1. Hàm lượng tinh bột của một số loại lương thực

Loại lương thực	Hàm lượng tinh bột (%)
Bột sắn	89
Khoai tây	84
Lúa mỳ	75
Lúa mạch	75
Thóc	82
Ngô	73
Hạt đậu	60 – 66
Dong giềng	81

a) Cấu tạo của tinh bột

* Hình dạng và kích thước của tinh bột

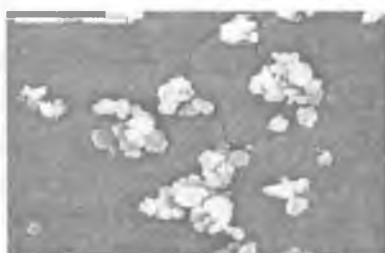
Tinh bột có hình dạng và kích thước rất khác nhau. Ngay cả trên cùng một loại nguyên liệu, hình dạng và kích thước cũng không giống nhau, có thể có dạng hình cầu, hình bầu dục, hình da giác, lục giác... Kích thước thường 2 – 120 μm . Hạt tinh bột khoai tây có kích thước lớn nhất, tinh bột thóc có kích thước nhỏ nhất. Hạt tinh bột lúa mỳ, lúa mạch có kích thước đơn giản hơn tinh bột ngô, thóc. Kích thước khác nhau của hạt tinh bột cũng ảnh hưởng đến tính chất cơ lý của tinh bột như : nhiệt độ hồ hoá, khả năng hấp thụ. Hạt nhỏ có cấu trúc chặt, hạt lớn có cấu trúc xốp.

Bảng 3.2. Kích thước hạt tinh bột của một số lương thực

Lương thực	Kích thước (μm)	Lương thực	Kích thước (μm)
Khoai tây	15 – 120	Ngô	5 – 30
Khoai lang	5 – 50	Lúa mạch	5 – 40
Dong giềng	10 – 50	Thóc	2 – 10
Lúa mỳ	5 – 50	Sắn	5 – 35



Vi ảnh tinh bột sắn



Vi ảnh tinh bột khoai môn

Hình 3.4. Ảnh tinh bột với độ phóng đại 3500X

Từ hình trên cho thấy tinh bột sắn có dạng hình cầu, một số hạt mặt trũng còn tinh bột khoai môn có dạng đa giác – mặt lõm, nhiều góc cạnh. Các hạt có xu hướng tích thành từng đám và kích thước hạt khá đồng đều.

* Cấu trúc

Năm 1928 Walton đã sưu tầm trên 300 công trình nghiên cứu về tinh bột đều cho thấy tinh bột được cấu tạo từ hai cấu tử là amyloza và amylopectin.

Hàm lượng amyloza thường chiếm 20 – 30% và amylopectin khoảng 70 – 80%. Tuy nhiên, tỷ lệ amyloza và amylopectin trong tinh bột ở các nguyên liệu khác nhau thì cũng khác nhau.

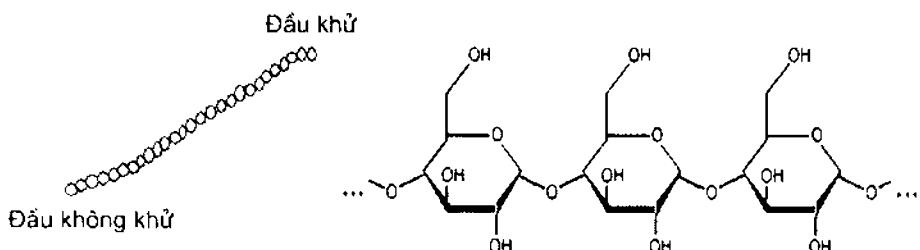
Bảng 3.3. Hàm lượng amyloza và amylopectin trong một số nguyên liệu

Nguyên liệu	Amyloza (%)	Amylopectin (%)
Gạo nếp	0	~100
Gạo té	17(18 – 20)	83
Lúa mỳ	22 – 24	76 – 78
Lúa mạch	20 – 25	75 – 80
Ngô	21 – 23 (20 – 32)	77 – 79
Khoai tây	19 – 22 (20 – 25)	78 – 81
Sắn	17(14 – 27)	83
Đậu	75	25

Tỷ lệ amyloza và amylopectin khoảng 1/4. Trong một số trường hợp tỷ lệ này có thể thay đổi ít nhiều. Ví dụ, tinh bột gạo nếp gần 100% amylopectin trong khi đó tinh bột các loại hạt đậu amyloza chiếm 75%.

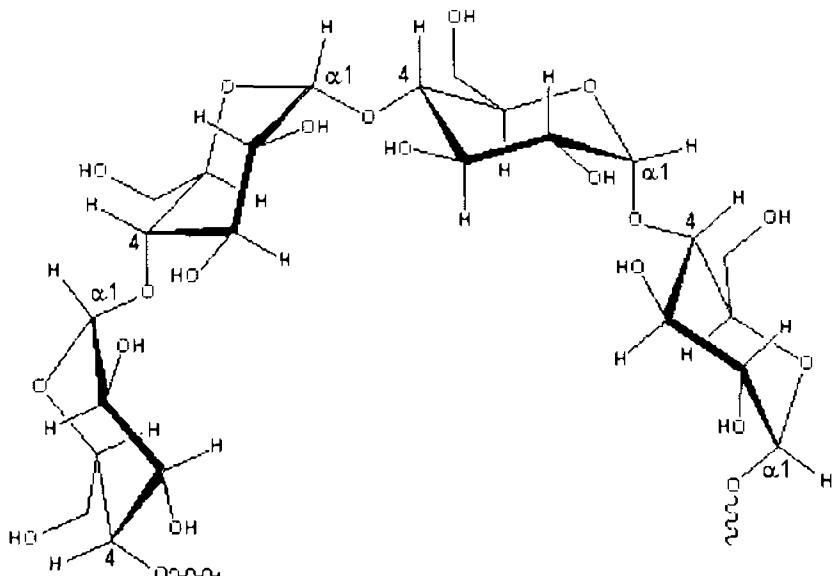
– Amyloza :

+ Cấu tạo amyloza : Amyloza được cấu tạo từ α – D – glucoza nhờ liên kết α – 1,4 – glucozit thông qua cầu oxy giữa nguyên tử C thứ nhất của glucoza này với nguyên tử C thứ 4 của glucoza kế tiếp, tạo nên một chuỗi dài bao gồm 200 – 2000 gốc glucoza phụ thuộc vào nguồn tinh bột khác nhau (ngoài ra còn có khoảng 0,1%), các liên kết 1,6 glucozit và nhóm liên kết photphat có thể tìm thấy trong một số tinh bột, khối lượng phân tử trung bình $3 \cdot 10^5 - 10^6$.



Hình 3.5. Cấu tạo mạch thẳng amyloza

Phân tử amyloza cấu trúc có dạng chuỗi thẳng có một đầu khử và một đầu không khử. Chúng gồm một số chuỗi sắp xếp song song với nhau, trong đó các gốc glucoza của từng chuỗi cuộn vòng thành dạng xoắn ốc, mỗi vòng xoắn có 6 đơn vị glucoza.



Hình 3.6. Cấu trúc amyloza dạng xoắn ốc

+ Tính chất amyloza : Amyloza hòa tan tốt trong nước ấm song không bền và nhanh chóng bị thoái hoá. Trong đa số trường hợp dung dịch amyloza rất nhanh chóng tạo keo ngay cả khi ở nhiệt độ cao. Một khác trong dung dịch các phân tử amyloza có khuynh hướng liên kết lại với nhau để tạo ra các tinh thể.

Khi tương tác với iot, amyloza cho phức màu xanh đặc trưng.

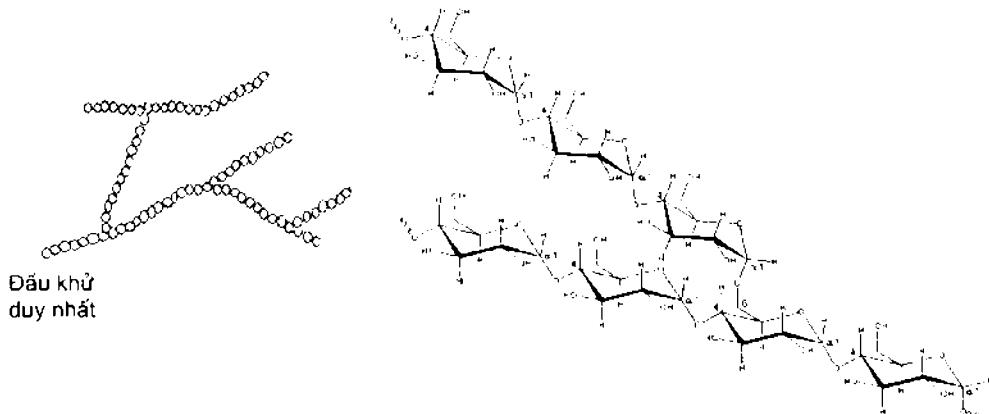
Amyloza có khả năng tạo phức với nhiều hợp chất hữu cơ có cực và không cực tạo phức bền, ít bị oxy hoá, nên có thể sử dụng bảo quản một số chất dễ bị oxy hoá như vitamin A, β – caroten.

Amyloza hấp thụ tốt trên xenzuloza cũng như kết tủa trong dung môi butanol và pentanol nên dễ tách riêng ra khỏi amylopectin.

- Amylopectin :

+ Cấu tạo amylopectin : Amylopectin được cấu tạo từ α – D – glucoza theo liên kết α – 1,4 glucozit và 1,6 – glucozit vì vậy có cấu trúc mạch nhánh với khoảng 20 – 30 gốc glucoza giữa 2 điểm phân nhánh.

Amylopectin chỉ có một đầu khử duy nhất và có khối lượng phân tử $5 \cdot 10^4 - 10^6$.



Hình 3.7. Cấu trúc dạng nhánh của amylopectin

+ Tính chất amylopectin : Amylopectin chỉ hòa tan trong nước nóng và tạo độ nhớt cao. Khi đun nóng làm thay đổi cấu trúc phân tử amylopectin một cách sâu sắc, gây ra trạng thái hồ hoá tinh bột.

Amylopectin tác dụng tốt với iot cho màu xanh tím. Amylopectin không bị kết tủa bởi butanol, pentanol cũng như không bị hấp phụ trên xenluloza. Dựa vào 2 tính chất này người ta có thể tách riêng hai cầu từ amyloza và amylopectin một cách dễ dàng.

b) Tính chất chức năng của tinh bột

Tính chất chức năng của tinh bột là tất cả những tính chất hoá lý đã góp phần vào việc tạo ra những tính chất đặc trưng và mong muốn của thực phẩm có chứa polysaccharit này.

* Tính chất thuỷ nhiệt và sự hồ hoá của tinh bột

Khi hòa tan tinh bột vào nước do kích thước phân tử của tinh bột lớn nên đầu tiên các phân tử nước sẽ xâm nhập vào giữa các phân tử tinh bột. Tại đây chúng sẽ tương tác với các nhóm hoạt động của tinh bột tạo ra lớp vỏ nước làm cho lực liên kết ở mắt xích nào đó của phân tử tinh bột yếu đi rồi "rã" ra và trương lên. Nếu sự xâm nhập của các phân tử nước vào tinh bột dẫn đến quá trình trương không hạn chế nghĩa là làm bung được các phân tử tinh bột thì hệ thống chuyển thành dung dịch. Quá trình trương này luôn luôn

đến trước quá trình hoà tan, để đạt đến trạng thái này còn phụ thuộc vào nhiệt độ.

Nhiệt độ tại đó phá vỡ hạt tinh bột chuyển từ trạng thái dầu sang trạng thái dung dịch keo gọi là nhiệt độ hồ hoá.

Các hạt tinh bột có kích thước khác nhau, nguồn khác nhau thì nhiệt độ hồ hoá cũng khác nhau. Hạt tinh bột lớn bị hồ hoá trước tiên, hạt bé nhất hồ hoá sau cùng.

Tinh bột sau khi hồ hoá thường có độ trong suốt nhất định. Độ trong suốt này có nhiều ý nghĩa quan trọng với các sản phẩm thực phẩm có chứa tinh bột.

* *Tính chất nhớt – dẻo của hồ tinh bột*

Một trong những tính chất quan trọng của tinh bột có ảnh hưởng đến chất lượng và kết cấu của nhiều sản phẩm thực phẩm là độ nhớt và độ dẻo. Phân tử tinh bột có chứa nhiều nhóm hydroxyl có khả năng liên kết được với nhau làm cho phân tử tinh bột tập hợp lại dồ sộ hơn, giữ nhiều phân tử nước khiến cho phân tử có độ đặc, độ dính, độ dẻo và độ nhớt cao, do đó các phân tử di chuyển khó khăn. Tính chất này càng thể hiện mạnh ở những loại tinh bột giàu amylopectin như tinh bột nếp.

* *Khả năng tạo gel và thoái hoá của tinh bột*

– *Khả năng tạo gel :*

Tinh bột được đun nóng, khi để nguội thì các phân tử hồ tinh bột sẽ tương tác với nhau và sắp xếp lại một cách có trật tự để hình thành gel có cấu trúc mạng ba chiều. Để tạo được gel thì dung dịch tinh bột phải có độ đậm đặc vừa phải, phải được hồ hoá để chuyển tinh bột thành trạng thái hoà tan và sau đó được để nguội ở trạng thái yên tĩnh. Khác với gel protein, trong gel tinh bột chỉ có duy nhất các liên kết hydro tham gia. Liên kết hydro có thể nối trực tiếp các mạch polyglucozit lại với nhau hoặc gián tiếp qua cầu phân tử nước.

– *Sự thoái hoá :*

Khi gel tinh bột để một thời gian dài chúng sẽ co lại và một lượng dịch thè sẽ tách ra. Quá trình đó gọi là sự thoái hoá. Quá trình này sẽ càng tăng mạnh nếu gel để lạnh rồi sau đó cho tan giá. Có hiện tượng thoái hoá là do

hình thành nhiều cầu hydro giữa các phân tử tinh bột. Các phân tử amyloza có mạch thẳng nên định hướng với nhau dễ dàng và tự do hơn các phân tử amylopectin. Vì thế hiện tượng thoái hoá hầu như chỉ liên quan đến phân tử amyloza là chủ yếu.

Sự thoái hoá thường kèm theo tách nước và đặc lại của các sản phẩm dạng nứa lỏng của thực phẩm và như gày cứng lại của các sản phẩm bánh mỳ.

* *Khả năng tạo màng*

Giống như các phân tử khác, tinh bột có khả năng tạo màng tốt. Để tạo màng các phân tử tinh bột (amyloza, amylopectin) sẽ dần phẳng ra, sắp xếp lại và tương tác trực tiếp với nhau bằng liên kết hydro hoặc gián tiếp qua phân tử nước.

* *Tạo màng bao*

Màng từ tinh bột giàu amyloza có tính chất đặc biệt như không thấm đối với oxy và các chất béo do đó được dùng để bao thuốc viên, làm túi đựng chất béo lỏng.

Amyloza đã sấy phun có thể bao thuốc bằng phương pháp ép trực tiếp thay cho phương pháp tạo ẩm.

* *Khả năng tạo sợi*

Tinh bột cũng có khả năng tạo sợi. Chính nhờ khả năng này người ta áp dụng để làm miến. Các sợi được tạo ra từ nguồn tinh bột giàu amyloza (như tinh bột đậu xanh, tinh bột dong giềng...) thường dai hơn, bền hơn những sợi làm từ tinh bột ngô, tinh bột gạo... bởi vì độ dai, độ bền đứt của sợi là do lực tương tác giữa các phân tử cũng như lực tương tác nội phân tử quyết định. Chuỗi amyloza liên kết với nhau rất chặt nên khó bị trương ra hơn, do vậy sợi dai và chắc hơn.

* *Khả năng đồng tạo gel với protein*

Tinh bột có thể tương tác với protein làm cho sản phẩm có những tính chất cơ lý nhất định như độ đàn hồi, độ cứng cũng như khả năng giữ nước của protein tăng lên. Tương tác giữa protein và tinh bột ở đây chủ yếu vẫn là liên kết hydro và lực Vandecvan. Trong trường hợp này cả protein và tinh bột đều sắp xếp lại phân tử để tạo thành gel và tương tác với nhau, hay nói cách khác tinh bột có tính đồng tạo gel với protein. Chính nhờ khả năng này

của tinh bột mà các gel protein trong sản phẩm như kamaboko, giò... có được những tính chất lưu biến cũng như tính chất cảm quan hấp dẫn hơn.

* *Khả năng phồng nở của tinh bột*

Khi tương tác các chất béo và có sự tán trợ của nhiệt độ thì khối tinh bột sẽ tăng thể tích lên rất lớn và trở nên rỗng xốp. Ta đều biết chất béo là chất không phân cực có khả năng xuyễn thấm qua các vật liệu gluxit như tinh bột, xenluloza. Khi nhiệt độ tăng thì các tương tác kỵ nước giữa các chất béo phát triển rất mạnh nên chúng có khuynh hướng tích tụ lại với nhau, do đó có khả năng xuyễn qua các "cửa ái" tinh bột. Đồng thời nhiệt độ làm tinh bột hồ hoá và chín, nhưng không khí cũng như các khí có trong khối bột không thấm qua lớp màng tinh bột đã tắm béo do đó sẽ dãn nở và làm tinh bột phồng nở. Các tinh bột giàu amylopectin (tinh bột nếp) có cấu trúc chặt và khả năng không thấm khí lớn, nên khả năng phồng nở lớn hơn. Với các tinh bột oxy hoá (tinh bột tẩy trắng bằng oxy hoá) khả năng này càng mạnh vì các phân tử tích điện cùng dấu sẽ đẩy nhau, nhất là khi sản phẩm có chứa tinh bột có kết cấu rất chặt. Đó là cơ sở để sản xuất ra các sản phẩm như bánh phồng tôm, phồng nấm.

* *Tính chất cơ cấu trúc của tinh bột*

Giống như dung dịch các hợp chất cao phân tử khác, hồ tinh bột có những tính chất cơ cấu trúc nhất định như độ bền, độ dẻo, độ đàn hồi.

Các tính chất cơ cấu trúc này của hồ tinh bột thường chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau.

Khi tác động cơ học thì các cấu trúc đã bị phá huỷ sẽ không hồi phục theo thời gian, có nghĩa là ứng suất trượt giới hạn của hồ tinh bột sau khi phá huỷ cấu trúc sẽ liên tục bị giảm.

Khi bị lão hoá thường xảy ra sự tăng bền mạng cấu trúc của hệ thống, tức là tăng tính cứng và giảm tính co dãn.

Các chất điện ly có ảnh hưởng mạnh đến sự tạo cấu trúc và độ bền của hồ tinh bột. Các chất polyacrylamit, natrialginat, cacboxymetylxenluloza khi thêm vào khung cấu trúc của hồ tinh bột 2% sẽ làm giảm độ bền cấu trúc và độ nhớt của hồ, nhưng lại làm tăng tính đàn hồi, tính dẻo cũng như khả năng dính.

Khi bảo quản, nồng độ chất khô càng cao thì quá trình tạo cấu trúc trong gel sẽ xảy ra càng nhanh. Bởi vì nồng độ đậm đặc sẽ có sự tiếp xúc mật thiết giữa các phân tử với nhau, do đó sẽ có điều kiện thuận lợi phát triển cấu trúc.

c) Các phương pháp biến hình tinh bột

Tinh bột ở dạng không biến hình, khi sử dụng trong công nghiệp thực phẩm thường bị hạn chế. Ví dụ, tinh bột ngô nếp ở dạng chưa biến hình, khi đun nóng sẽ dễ dàng bị hydrat hoá, trương nhanh rồi vỡ hạt làm giảm độ nhớt và dễ chảy. Vì vậy làm hạn chế phạm vi ứng dụng của tinh bột này trong nhiều loại thương phẩm. Nhược điểm của tinh bột tự nhiên là tính kỵ nước ; không hoà tan ; tính kém trương nở ; độ nhớt tăng trong nước lạnh ; không điều chỉnh được độ nhớt sau khi nấu ; đặc biệt là tinh bột ngô nếp, khoai tây, tinh bột sắn ; dễ thoái hoá khi kéo dài thời gian đun nóng hay giảm độ pH ; độ kém trong...

Vì vậy, để có được những loại hình tinh bột phù hợp theo yêu cầu sử dụng người ta tiến hành biến tính tinh bột. Nói chung mục đích của biến hình tinh bột là làm thay đổi cấu trúc của phân tử tinh bột bằng các tác nhân vật lý, enzym hay hoá học, từ đó mang lại cho tinh bột nhiều đặc tính mới để mở rộng phạm vi sử dụng của tinh bột trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau. Sử dụng tinh bột biến hình nhằm :

- Cải biến các tính chất của sản phẩm.
- Tăng giá trị cảm quan.
- Tạo sản phẩm mới.

Tinh bột có thể được biến hình bằng nhiều cách cả về tính chất vật lý lẫn hoá học. Dựa vào bản chất của phương pháp có thể phân loại các phương pháp biến hình tinh bột như sau :

- Phương pháp biến hình vật lý.
- Phương pháp biến hình hoá học.
- Phương pháp biến hình enzym.

1. Phương pháp biến hình vật lý

* *Trộn với chất rắn trơ*

Tinh bột nếu hoà trộn trực tiếp vào nước thì sẽ bị vón cục. Để tinh bột hoà tan tốt trước hết ta đem trộn nó với chất rắn trơ, các hợp chất không phải ion. Khi trộn lẫn đồng đều với các chất này sẽ làm cho các hạt tinh bột cách biệt với nhau về vật lý, do đó sẽ cho phép chúng hydrat hoá một cách độc lập và không kết lại thành cục.

* Biến tính bằng hồ hoá sơ bộ

Trước hết tinh bột được hồ hoá trong một lượng nước thừa, sau đó sấy khô. Dưới tác dụng của nhiệt ẩm sẽ làm đứt các liên kết giữa các phân tử, làm phá huỷ cấu trúc của hạt tinh bột khi hồ hoá, cũng như sẽ tái liên hợp một phần nào đó các phân tử khi sấy sau này. Tinh bột hồ hoá sơ bộ có những tính chất : trương nhanh trong nước, biến đổi chậm các tính chất khi bảo quản, bền ở nhiệt thấp, có độ đặc và khả năng giữ nước, giữ khí tốt. Vì vậy, tinh bột biến hình bằng hồ hoá sơ bộ được dùng rộng rãi trong các trường hợp cần độ đặc, giữ nước mà không cần nấu. Dùng tinh bột hồ hoá sơ bộ còn tránh tổn thất các chất bay hơi trong bánh ngọt, giữ được chất béo... Ngoài ra tinh bột hồ hoá sơ bộ còn được sử dụng trong các ngành công nghiệp khác. Chẳng hạn, thêm tinh bột dạng này vào các dung dịch khoan (khi khoan các giếng dầu mỏ) nhằm giữ cho dung dịch khoan một lượng nước cần thiết.

* Biến hình bằng gia nhiệt khô ở nhiệt độ cao

Tinh bột được gia nhiệt khô ở nhiệt độ cao 120 – 250°C, trong khoảng thời gian nhất định. Sản phẩm thu được từ phương pháp này gọi là dextrin và pirodexrin. Tinh bột biến hình bằng phương pháp này tạo cho nó có độ hòa tan trong nước lạnh cao hơn. Do đó dextrin được dùng làm chất mang các thành phần hoạt động như các bột thực phẩm hoặc dùng làm dung môi hay chất mang các chất màu. Pirodexrin được dùng làm chất làm đặc cho thuốc nhuộm sợi. Người ta thường dùng sản phẩm của quá trình lưu biến tinh bột bằng gia nhiệt ở nhiệt độ cao để pha keo dán phong bì, dán nhãn chai, băng dính thùng các tông. Trong công nghiệp dược, dextrin trắng được dùng làm nguồn cacbon đồng hoá chậm thay cho glucoza khi điều chế một số kháng sinh bằng phương pháp lên men, nó là chất bổ sung cho các loại thuốc dưỡng bệnh, chất độn chuẩn cho các loại thuốc. Trong thức ăn dùng cho trẻ em và người lớn thì dextrin dễ nấu chín và dễ hấp thụ, dễ tiêu hoá. Dextrin có thể thay thế caseinat trong chất nhũ hoá thịt, cà phê sữa, phomat, thay thế bơ trong kem dâ, dầu thực vật trong salat. Dextrin có thể hạn chế sự phát triển của một số vi sinh vật.

2. Phương pháp biến hình bằng enzym

Dưới tác dụng của amylaza (α,β) phân tử tinh bột hoặc bị phân cắt ngẫu nhiên thành những dextrin phân tử thấp hoặc bị cắt ngắn dần thành từng hai đơn vị glucoza một, do đó mà tính chất của tinh bột cũng thay đổi theo.

α - amylaza phân cắt liên kết glucozit (thứ 5 hoặc thứ 6) để tạo pentoza hoặc hexoza và một mảnh polyglucozit ngắn hơn tinh bột gọi là dextrin. Kích thước của polysaccharit càng giảm theo thời gian tác dụng của enzym làm cho dung dịch tinh bột loãng, độ nhớt giảm, người ta gọi đó là quá trình đich hoá. Đich hoá là quá trình rất cần thiết có tính chất khởi đầu cho quá trình đường hoá tiếp theo trong sản xuất rượu, bia, đường glucoza, mạch nha... được dễ dàng.

Enzym α - amylaza xúc tác thuỷ phân các liên kết α -1,4 của amyloza và amylopectin từ đầu không khử của mạch và giải phóng ra mannoza. Tác động của enzym sẽ bị ngừng với liên kết α - 1,6.

3. Phương pháp biến hình hoá học

Cá nhũng phân tử tinh bột ở dạng tự do và dạng hạt đều là đối tượng để biến hình hoá học. Vì vậy, tinh bột được biến hình bằng nhiều cách như biến hình tinh bột bằng axit, bằng phương pháp oxy hoá, phương pháp liên kết ngang (đang gắn photphat), phương pháp este hoá hay chuyển đổi dẫn xuất dextrin. Sự thay đổi về tính chất vật lý và hoá học của tinh bột mang lại nhiều ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và phi thực phẩm.

* Biến hình tinh bột bằng phương pháp oxy hoá

Việc xử lý tinh bột bằng các chất oxy hoá đã được biết đến từ rất lâu và đã được sử dụng rộng rãi. Đầu tiên con người sử dụng các chất oxy hoá như : hypoclorit (natri - hypoclorit), hydro peroxit, axit peraxetic, permanganat persunphat... chủ yếu để làm trắng, loại bỏ các chất bẩn và xử lý quá trình tiệt trùng mà không dùng để biến hình tinh bột.

Khi biến hình bằng oxy hoá, hình dạng tinh bột không thay đổi nhưng kích thước có tăng lên một ít (đối với tinh bột giàu amyloza), trong khi đó tinh bột giàu amylopectin thì không thay đổi. Trong phân tử tinh bột oxy hoá có tạo ra cả nhóm cacboxyl và nhóm cachonyl. Sự oxy hoá thường xảy ra ở cacbon C₂, C₃, C₆.

Tinh bột oxy hoá được sử dụng hô bê mặt trong sản xuất giấy, hô sợi bông, sợi pha tơ nhân tạo trong công nghiệp dệt và là chất làm đặc trong công nghiệp thực phẩm.

* Biến hình tinh bột bằng xử lý tổ hợp để thu tinh bột keo dông

Tinh bột khi xử lý tổng hợp sẽ xảy ra quá trình oxy hoá tinh bột bằng oxy và có thể ozon thoát ra trong phản ứng, ngoài ra còn xảy ra phản ứng thuỷ phân tùng phân tinh bột dưới tác dụng của axit. Khi tăng mức độ biến hình thì phân tử tinh bột có khả năng tạo đòng tốt, không còn mùi đặc biệt

và có độ trắng cao. Tinh bột keo dông được sử dụng làm chất ổn định trong sản xuất kem và có thể dùng thay thế agar – agar và agarosa.

* *Biến hình tinh bột bằng cách gắn thêm nhóm photphat*

Có thể biến hình tinh bột thành tinh bột monohydro photphat khi một nhóm chức của H_3PO_4 được este hoá với nhóm OH của tinh bột, hay tinh bột dihydro photphat nếu hai nhóm chức axit của H_3PO_4 được este hoá. Đặc tính biến hình tinh bột bằng cách gắn thêm gốc photphat được sử dụng trong công nghiệp sản xuất giấy, dệt, chất kết dính, ngoài ra còn sử dụng trong y học để tạo màng mỏng nhầm xử lý da bị thương và bị bỏng.

* *Biến hình tinh bột bằng cách tạo liên kết ngang*

Tinh bột khi cho tác dụng với axit boric thì nó sẽ có tính chất khác, khi đó bốn nhóm của hai mạch tinh bột nằm gần nhau tạo thành phức axit boric. Nói chung, phân tử bất kỳ nào có khả năng phản ứng với hai (hay nhiều) nhóm hydroxyl đều tạo ra được liên kết ngang giữa các mạch tinh bột. Để tạo tinh bột biến hình dùng trong thực phẩm và kỹ thuật, người ta thường dùng epichihydrin và natri trimetaphotphat làm tác nhân phản ứng.

Tinh bột biến hình làm ổn định được độ nhớt của hồ nóng. Trong trường hợp dùng oxyclophotphat để làm tác nhân thì sản phẩm thu được có thể dùng làm nhựa trao đổi cation.

Tinh bột biến hình này thường dai, giòn và cứng hơn tinh bột tự nhiên. Do đó, nó được dùng để rắc lên mặt trong của các găng tay phẫu thuật bằng cao su để khi tiệt trùng không bị dính. Các tinh bột có liên kết ngang còn là thành phần của dung dịch sét để khoan dầu mỏ, là thành phần của sơn, gốm, làm chất kết dính trong các viên than, làm chất mang các chất điện ly trong pin khô.

* *Biến hình bằng axit*

Dưới tác dụng của axit, một phần các liên kết giữa các phân tử và trong phân tử tinh bột bị đứt làm cho kích thước tinh bột bị giảm, thu được tinh bột có những tính chất mới.

Người ta thường biến hình tinh bột bằng cách cho khuếch tán huyền phù tinh bột (36 – 40%) trong dung dịch axit vô cơ, rồi khuấy đều đến nhiệt độ nhỏ hơn nhiệt độ hồ hoá của tinh bột (thường 40 – 60°C), trong khoảng thời gian một đến nhiều giờ. Khi đạt đến độ nhớt hay đạt đến độ biến hình theo yêu cầu, thì trung hoà axit và thu hồi tinh bột bằng cách lọc hay ly tâm, rửa và sấy khô. Nồng độ axit, nhiệt độ, nồng độ tinh bột và thời gian thuỷ phân khác nhau tùy thuộc vào yêu cầu của sản xuất.

Axit vô cơ thường sử dụng là HCl, H₂SO₄. Theo Ferrara thì hỗn hợp axit HCl và HF dùng để xử lý tinh bột để tạo gel sẽ chậm hơn nhiều khi xử lý bằng HCl riêng lẻ.

Tính chất của tinh bột biến hình bằng axit

Tinh bột biến hình bằng axit có sự thay đổi nhiều về tính chất so với tinh bột chưa biến hình và có thêm những đặc tính mới, chúng chỉ giống với tinh bột ban đầu về hình dạng vật lý và không hòa tan trong nước lạnh.

Độ nhớt của hỗn tinh bột biến hình bằng axit giảm thấp. Sự giảm độ nhớt của hỗn tinh bột biến hình bằng axit là do phá huỷ vùng vô định hình giữa các mixen của hạt và làm yếu cấu trúc của hạt, dẫn đến phá huỷ hạt ngay cả khi hạt trương không đáng kể. Nhờ độ nhớt thấp nên tinh bột biến hình bằng axit được dùng trong công nghiệp để hồ sơi vải bông, sợi visco tổng hợp...

Khối lượng phân tử của tinh bột biến hình giảm và mức độ trùng hợp cũng giảm. Tinh bột biến hình bằng axit có độ bền màng và gel cao. Vì vậy, nó thích hợp trong việc ứng dụng tạo gel, tạo màng cho sản phẩm.

d) Công nghệ sản xuất tinh bột và tinh bột biến tính

1. Nguồn nguyên liệu để sản xuất tinh bột

Tinh bột là polysaccarit có nhiều trong các hạt ngũ cốc, củ. Tinh bột là chất dinh dưỡng dự trữ của thực vật và được tạo thành do sự quang hợp của cây xanh.

Do đó, các loại lương thực trên được coi là nguồn nguyên liệu chủ yếu để sản xuất tinh bột. Lượng tinh bột ở ngô, lúa mỳ vào khoảng 60 – 70%, lúa gạo có thể đạt đến 75 – 80%, củ sắn 12 – 35%, củ khoai tây 24 – 26%.

Hình dáng, thành phần cấu tạo và những tính chất của tinh bột phụ thuộc vào giống, điều kiện trồng trọt, quá trình sinh trưởng của cây...

2. Công nghệ sản xuất tinh bột

** Phương pháp sản xuất tinh bột từ các loại hạt ngũ cốc*

– Tách tinh bột gạo : Quy trình tách tinh bột gạo gồm các bước sau :

Ngâm gạo xay trong dung dịch kiềm loãng 0,2 – 0,3% một thời gian để làm mềm hạt → rửa bằng nước để loại bỏ kiềm → nghiền phá vỡ tinh bột → khuấy đều với một lượng dư kiềm loãng để loại bỏ tạp chất → rửa và l้าง gạn nhiều lần → thu tinh bột tinh sạch.

– Tách tinh bột từ bột mỳ : gồm 5 giai đoạn chủ yếu.

Bột mỳ trộn với nước theo tỷ lệ nhất định để thu được khói bột nhuyễn và dẻo → rửa sạch khói bột nhuyễn bằng nước có khuấy → qua rây có kích

thước nhất định, tinh bột hoàn toàn bị trôi còn lại khối gluten → làm sạch tinh bột và khối gluten theo phương pháp thông dụng.

– Tách tinh bột từ hạt ngô : ngâm hạt ngô, đậu trong nước ấm 50°C có chứa SO_2 ($0,1 - 0,2\%$) ở nồng độ nhất định trong thời gian $30 - 50$ giờ để làm mềm hạt → nghiền hạt trong nước với thiết bị nghiền thích hợp để tách phôi → hạt được nghiền mịn để giải phóng tinh bột → qua rây thu tinh bột và gluten → ly tâm lần một, phần gluten nhẹ (màu vàng) tập trung ở lớp trên, tinh bột lắng xuống dưới → ly tâm lần hai thu tinh bột → rửa và sấy khô.

* Phương pháp sản xuất tinh bột từ các loại củ

Hiện nay ở nước ta các loại cây có củ như : sắn, khoai lang, khoai tây... được trồng rất phổ biến và cho năng suất cao. Trong khi đó, việc sản xuất tinh bột từ các loại củ đơn giản hơn so với các loại hạt. Vì vậy, dùng các loại củ làm nguyên liệu sẽ cho hiệu quả kinh tế cao hơn.

– Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) : Sắn là loại lương thực phát triển ở các vùng có khí hậu nhiệt đới. Sắn phát triển từ lưu vực sông Amazon phía nam châu Mỹ. Hiện nay, sắn là một trong những cây lương thực quan trọng ở một số nước châu Á, châu Phi và Mỹ La Tinh.

Ở nước ta, sắn được trồng khắp từ nam chí bắc, nhất là vùng trung du và miền núi. Năng suất trung bình về sắn ở nước ta khoảng $8 - 10$ tấn/ha.

Thành phần hóa học trung bình của củ sắn : $70,25\%$ nước, $21,45\%$ tinh bột, $1,12\%$ protein, $0,40\%$ chất béo, $1,11\%$ xyluloza, $5,13\%$ đường, $0,54\%$ chất tro.

Hàm lượng tinh bột trong củ sắn dao động trong khoảng khá rộng tùy thuộc vào nhiều yếu tố (giống, điều kiện trồng trọt, độ già của củ...).

Tinh bột sắn có rất nhiều ứng dụng trong công nghiệp dệt, công nghiệp giấy, công nghiệp thực phẩm, công nghiệp dược (sản xuất vitamin, kháng sinh) công nghệ hóa chất (dung môi hữu cơ, axit hữu cơ)...

– Khoai lang (*Ipomoea batatas* Lam) : Khoai lang là loại cây lương thực được trồng nhiều ở nhiều nước trên thế giới. Các nước thuộc miền khí hậu nhiệt đới trồng nhiều hơn cả, vì khoai lang ưa ẩm và ưa ám. Ở nước ta, khoai lang là một loại hoa màu quan trọng sau ngô và sắn.

Khoai lang có nhiều loại, người ta thường phân loại dựa vào màu sắc của vỏ và ruột khoai mà chia ra : khoai trắng, khoai nghệ, khoai tím...

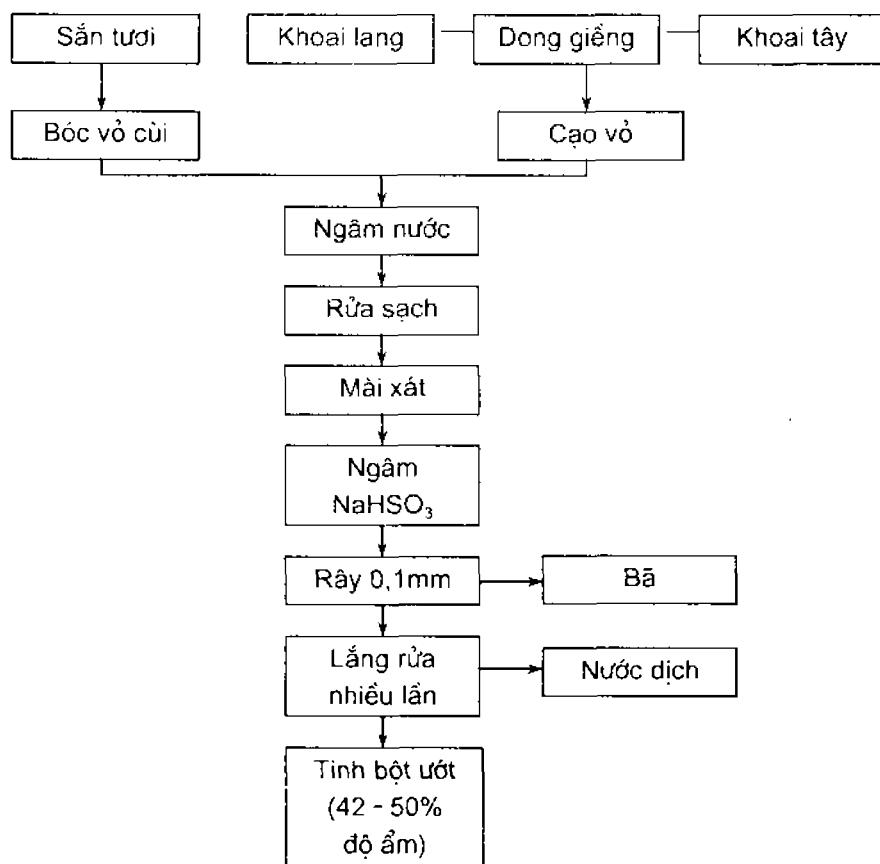
Thành phần hóa học của khoai lang : $68,1\%$ nước, $27,1\%$ tinh bột $1,6\%$ protein, $0,5\%$ chất béo, $0,9\%$ xyluloza và $1,0\%$ chất tro. Chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá chất lượng khoai lang là hàm lượng tinh bột.

Khoai lang là một loại nguyên liệu phổ biến cho ngành công nghiệp thực phẩm như đóng hộp khoai, sản xuất bột hoà tan, đường glucoza, dấm, axit xitic... Khoai lang còn là nguyên liệu tốt cho công nghiệp rượu. Tinh bột khoai lang được dùng để hồ vải và làm pin.

- Khoai tây (*Solanum tuberosum*) : Khoai tây có nguồn gốc từ Nam Mỹ. Ở nước ta khoai tây cũng đã được trồng phổ biến. Khoai tây được phân ra làm 2 loại : khoai tây ruột trắng và khoai tây ruột vàng.

Thành phần hóa học trung bình của củ khoai tây : 75% nước, 18,5% tinh bột, 2,1% hợp chất nitơ, 1,1% xênluloza, 0,2% chất béo, 0,9% chất tro, 2,2% các chất khác.

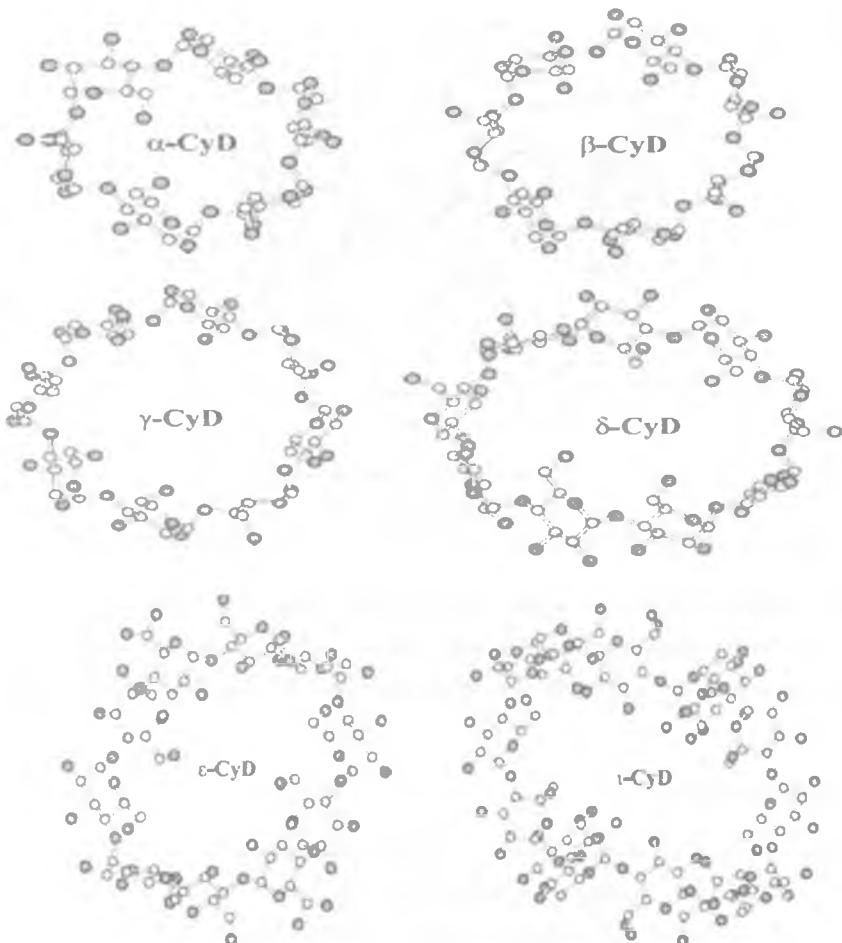
Khoai tây được dùng nhiều nhất dưới dạng tươi, khoai tây còn được dùng làm các sản phẩm như : bột khoai tây, chip, bóng. Nhiều nước đã dùng khoai tây để sản xuất tinh bột. Tinh bột khoai tây được dùng nhiều trong công nghiệp thực phẩm, dệt.



Hình 3.8. Sơ đồ công nghiệp sản xuất tinh bột từ nguyên liệu củ

3. Công nghệ cyclodextrin

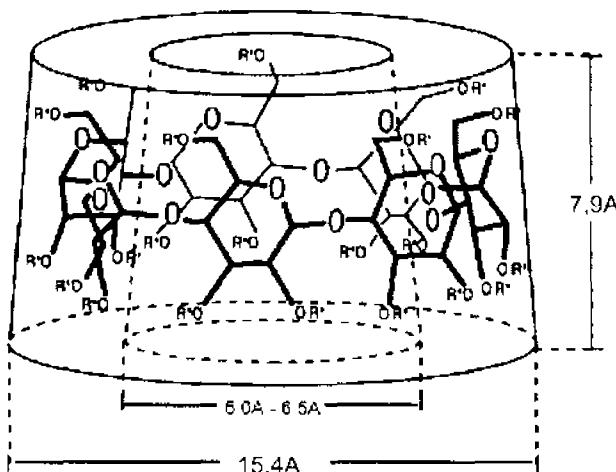
* *Cấu trúc* : Cyclodextrins (CDs) tự nhiên được tạo nên từ tinh bột do sự tác động của enzym transferaza (cyclodextrin glycosyltransferase – CGTase). Cyclodextrin là những oligosaccharit vòng được tạo nên bởi các glucopyranosa nối với nhau bằng liên kết $\alpha - 1,4$ glucozit, bao gồm 6 – 31 đơn vị glucoza. Cấu trúc 3 chiều của CDs đã được xác định, bao gồm các α , β , γ , δ , ϵ , ι có chứa lần lượt 6, 7, 8, 9, 10 và 14 đơn vị glucoza.



Hình 3.9. Cấu trúc các loại cyclodextrin

Các nhà nghiên cứu về tinh thể cho thấy các cyclodextrin đều có dạng hình xuyến và được giữ chặt bởi các liên kết hydro giữa các nhóm hydroxyl bậc hai của các gốc glucoza kề nhau. Các nhóm hydroxyl bậc nhất đều

hướng ra bên ngoài mạch vòng. Kích thước trung bình của hình xuyến là 1,5nm x 0,7nm x 0,8nm. Cấu trúc này làm cho các CDs có bề mặt bên trong kỵ nước, còn bên ngoài hào nước và làm cho chúng trở thành những phức "bao" bền vững với các chất hữu cơ, với muối và với halogen. Vì vậy, các chất kỵ nước đều có thể được hòa tan trong dung dịch. Tuỳ theo kích thước tương đối của chúng mà phân tử "khách thố" được bao bọc toàn bộ hay một phần, còn cyclodextrin thì đóng vai trò của phân tử "chủ thố" hay chất tiếp nhận.



Hình 3.10. Kích thước của một hình xuyến của phân tử cyclodextrin

Phức hợp này có tác dụng làm tăng độ bền của phân tử "khách thố" không chỉ trong nước mà còn trong không khí đối với các sản phẩm khô. Ngoài ra còn làm tăng độ bền đối với nhiệt độ, với oxy hoá và thuỷ phân.

* Tính chất

- Tính chất lí học :

+ *Khả năng tan trong nước* : Ở trạng thái rắn các cyclodextrin không màu có vị ngọt nhẹ, chúng có khả năng tan trong nước khác nhau. Trong số 3 CDs, thì γ - CD có độ hoà tan tốt nhất sau đó đến α - CD và cuối cùng là β - CD. Đó là do chúng có lực căng vòng khác nhau cũng như hướng quay và độ liên kết của cầu hydro giữa các nhóm hydroxyl trên nguyên tử C₂ và C₃ của hai phân tử glucoza kề nhau khác nhau.

Độ hoà tan của các CDs nói chung thấp nhưng sẽ tăng lên cùng với nhiệt độ, ở 25°C độ tan của α - , β - , γ - CD tương ứng là 14,2 ; 1,85 ; 23,2

g/100ml và ở 50°C thì độ tan tương ứng là 43,5 ; 5,62 ; 93,8 g/100ml. Độ hòa tan có thể tăng lên bằng cách thay thế một số nhóm hydroxyl bằng methyl hoá, amin hoá, este hoá hay ete hoá. Trong trường hợp này, kích thước đường kính của cyclodextrin không bị thay đổi, song chiều sâu có được của lỗ hang thì bị giảm xuống.

+ *Khả năng tan trong dung môi hữu cơ* : Các CDs không tan trong hầu hết các dung môi hữu cơ, tuy nhiên chúng tan trong một số dung môi phân cực (ví dụ metanol, etanol, propanol, axeton).

+ *Độ bền nhiệt* : So với các oligosaccharit mạch thẳng tương ứng thì các cyclodextrin là những phân tử rất bền. Các CDs khá bền nhiệt. Ở nhiệt độ 240 – 245°C, CDs sẽ nóng chảy và sự phân huỷ nhiệt bắt đầu xảy ra. Ngoài ra CDs cũng bền với các tác nhân như tia UV hay tia IR.

+ *Khả năng hút ẩm* : Hàm ẩm cân bằng của α – , β – , γ – CD trong môi trường có hàm ẩm tương đối 85% tương ứng là 12% ; 13,5% ; 17% ở 30°C. Các CDs vẫn giữ trạng thái bột mịn không bị ẩm ngay cả khi để lâu ở môi trường có độ ẩm tương đối cao.

+ *Khả năng nhận biết* : Các cyclodextrin có thể nhận biết bằng phương pháp so màu với dung dịch iot khi đó α – cyclodextrin cho màu tím xanh, β – cyclodextrin cho màu vàng nâu và γ – cyclodextrin cho màu nâu.

Các cyclodextrin có thể được phân tách bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi propanol : nước : etylaxetat : amoniac ở tỷ lệ 6 : 3 : 1 : 3 (V/V) hoặc bằng sắc ký khí hay bằng sắc ký lõng cao áp.

Bảng 1. Một số thông số vật lý của cyclodextrin

Các thông số	Alpha α-CDs	Beta β-CDs	Gamma δ-CDs
Khối lượng phân tử	972	1135	1297
Số phân tử glucoza	6	7	1135
Đường kính lỗ hổng bên trong (Å)	5	1135	7
Độ hòa tan nước (g/100ml ; 25°C)	14,2	7	1135
Sức căng bề mặt (mN/m)	71	972	7
Nhiệt độ nóng chảy (°C)	255–260	255–265	240–245
Sự kết tinh nước	1135	13 – 15	8 – 18
Số phân tử nước trong lỗ hổng	?	11	13 – 15

– Tính chất hoá học

+ *Độ bền hoá học* : So với các oligosaccharit mạch thẳng thì các CDs là những phân tử rất bền. Các axit mạnh như axit HCl có thể thuỷ phân CDs tạo ra các oligosaccharit khác nhau (từ mạch thẳng do phân tử CDs bị mở vòng cho đến tận glucoza). Tốc độ thuỷ phân tăng khi nhiệt độ tăng nhưng chậm hơn 3 – 5 lần so với các oligosaccharit mạch thẳng tương ứng. Trong môi trường axit yếu như các axit hữu cơ, sự thuỷ phân hầu như không xảy ra.

Cũng như các oligosaccharit và polisaccharit không có tính khử khác, CDs không bị thuỷ phân bởi bazơ, thậm chí ở nhiệt độ cao và trong dung dịch kiềm đặc (trong dung dịch NaOH 0,35N ở 70°C không thấy có sự thuỷ phân).

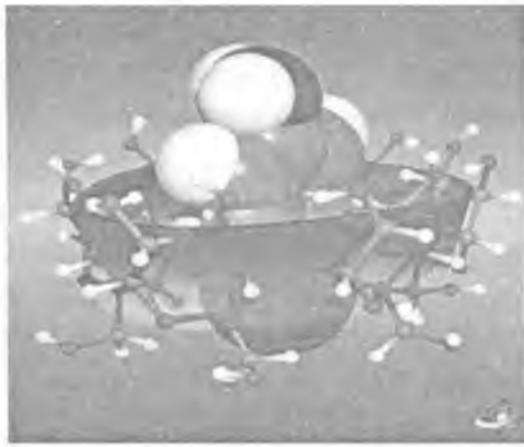
Với các tác nhân oxy hoá, CDs có thể bị oxy hoá làm mở vòng glucoza nhưng không tạo ra foocmaldehyt hay axit foocmic (vốn là các chất độc) do CDs không có tính khử.

+ *Khả năng biến đổi hoá học* : Bằng phương pháp hoá học có thể thay thế các nhóm hydroxyl của CDs bằng các nhóm khác (metyl, amin, este, etc). Khi đó đường kính của CDs sẽ không thay đổi nhưng chiều sâu của các lỗ hang giảm xuống. Mục đích của các biến đổi này nhằm làm thay đổi độ hòa tan, thay đổi khả năng tạo phức (độ bền phức, độ chọn lọc khách thể) hoặc thêm các nhóm có chức năng đặc hiệu dùng xúc tác.

+ *Độ bền đối với enzym amylaza* : Trong các CDs, γ – CD bị thuỷ phân dễ dàng hơn bởi α – amylaza. Nói chung các α – amylaza từ nấm mốc thuỷ phân CDs tốt hơn từ vi khuẩn. B – amylaza và γ – amylaza không thuỷ phân CDs nhưng enzym CGTaza có thể thuỷ phân dễ dàng. Các phức của CDs bền hơn CDs trước sự thuỷ phân bởi enzym. Điều này là do một số chất khách thể có thể ức chế enzym hoặc làm cản trở không gian khiến enzym khó tiếp xúc với cơ chất CDs. Ngoài ra, các CDs biến đổi cũng bền hơn, do nhóm thay thế gây cản trở không gian.

* *Khả năng tạo phức của CDs*

– *Khả năng tạo phức của CDs* : Đây là một tính chất đặc biệt và quan trọng của CDs, nhờ đó mở ra khả năng ứng dụng rộng rãi của CDs. Các CDs có thể tạo phức (dạng khách thể – chủ thể) với nhiều hợp chất khác nhau bao gồm các hợp chất béo mạch thẳng hay phân nhánh, các aldehyt, axit hữu cơ, các chất thơm, chất khí. Các hợp chất phân cực như halogen, oxyt axit và amin.



Hình 3.11. Khả năng tạo phức của CDs

Kích thước lỗ hang khác nhau của các CDs làm cho chúng ít nhiều có tính chất chọn lọc khi tạo phức với các phân tử có kích thước khác nhau. Chẳng hạn, phân tử phenol ăn khớp hoàn toàn với lỗ hang của α – CD, nhưng với lỗ hang của β – CD vẫn còn trống một khoảng không nhỏ, do đó phân tử phenol có thể lung lay nhẹ bên trong lỗ. Với lỗ hang lớn hơn của γ – CD, vòng phenol càng lung lay hơn do phân khoảng không còn trống lớn hơn. Trong nhiều trường hợp, những phân tử liên kết được với α – CD cũng sẽ liên kết được với β – CD, những phân tử liên kết được với γ – CD sẽ liên kết với β – CD. Để phức tạo thành được bền, phân tử khách thể cần được bao khít bởi lỗ hang CDs. Điều này có nghĩa là độ bền phức phụ thuộc vào kích thước của CDs cũng như của phân tử được bao. Các phân tử nhỏ (có ít hơn hoặc bằng 4 đơn vị C) liên kết tốt nhất với các α – CD còn các phân tử lớn hơn sẽ liên kết tốt với các γ – CD.

So với một số chủ thể tạo phức khác (như urê, thiourê), CDs là chủ thể tốt hơn cả do bản chất ít phản ứng, độ bền cao, không độc hại và có khả năng tạo phức rộng rãi với nhiều hợp chất. Đặc điểm nổi bật nữa của CDs là nó có thể tạo phức cả ở trong dung dịch và cả ở trạng thái rắn trong khi nhiều chất chủ thể khác đòi hỏi phải có sự kết tinh thành mạng lưới mới tạo được lỗ hang thích ứng.

– Quá trình tạo phức : Quá trình tạo phức là sự ăn khớp về mặt kích thước giữa lỗ hang CDs và phân tử khách thể. Lỗ hang kỵ nước của phân tử CDs tạo ra một vi môi trường trong đó các phân tử khách thể không cực có

thể đi vào để tạo thành phức. Lúc đầu lỗ hang chứa đầy nước, khi hình thành phức bao, các phân tử nước bị đẩy ra ngoài nhường chỗ cho phân tử khách thể vốn kỵ nước hơn nằm ở dung dịch bên ngoài.

Phức tồn tại trong một cân bằng động vốn phụ thuộc vào nồng độ của CDs, của chất khách thể và của nước. Tốc độ tạo thành phức phụ thuộc phần lớn vào độ khớp của phân tử khách thể vào lỗ hang của CDs và độ lớn của lực nhiệt động. Kích thước của phân tử khách thể càng phù hợp với lỗ hang của CDs thì sự tạo phức diễn ra càng dễ dàng và phức tạo ra càng bền. Ngoài ra tốc độ tạo phức còn phụ thuộc vào một số yếu tố sau :

+ Sự tạo phức diễn ra nhanh hơn khi chất chủ thể và khách thể hoặc hòa tan trong nước hoặc ở dạng phân tán thành các phân tử nhỏ. Do trong dung dịch các phân tử CDs và các chất khách thể tiếp xúc với nhau nhiều hơn, tốc độ tạo phức nhanh hơn.

+ Độ pha loãng CDs và chất khách thể trong dung dịch tạo phức cũng ảnh hưởng đến tốc độ tạo phức. Lượng nước nhiều, độ hòa tan của CDs và chất khách thể tăng, sự tạo phức xảy ra dễ dàng hơn. Tuy nhiên, khi lượng nước quá lớn, CDs và chất khách thể trở nên khó tiếp xúc với nhau, cần trở quá trình tạo phức.

+ Dung môi sử dụng trong quá trình tạo phức cũng quyết định đến khả năng tạo phức. Nước là dung môi được dùng phổ biến. Tuy nhiên, khi chất khách thể không tan trong nước, cần phải dùng dung môi hữu cơ. Dung môi được chọn phải không tạo phức với CDs và dễ dàng loại bỏ được bằng bay hơi. Các dung môi hữu cơ hay được dùng là etanol và dietyl etc.

+ Với các chất khách thể bay hơi, để quá trình tạo phức diễn ra dễ dàng và tránh thất thoát chất khách thể, thường tiến hành tạo phức trong thiết bị kín hoặc có tuần hoàn chất bay hơi.

+ Nhiệt độ cũng ảnh hưởng đến tốc độ tạo phức. Gia nhiệt có thể làm tăng tốc độ hòa tan của CDs cũng như chất khách thể, do đó làm tăng khả năng tạo phức. Tuy nhiên, nhiệt độ cũng có thể phá huỷ phức (đa số các phức bắt đầu bị phá huỷ ở $50 - 60^{\circ}\text{C}$), vì vậy phải cân bằng giữa hai ảnh hưởng này.

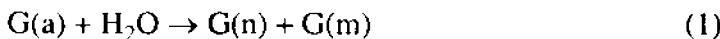
- Kỹ thuật tạo phức : Kỹ thuật chế tác các phức bao CDs khá đơn giản. Nguyên tắc chung là phối trộn CDs với chất cần tạo phức trong môi trường

có nước ở nhiệt độ và thời gian phù hợp. Tùy theo lượng nước sử dụng mà người ta chia ra các kỹ thuật khác nhau. Kỹ thuật sử dụng rộng rãi trong phòng thí nghiệm là kỹ thuật đồng kết tủa. Trong phương pháp này, CDs được hòa tan trong nước rồi cho thêm chất khách thể vào đồng thời khuấy đều. Nồng độ CDs có thể lên tới 20% nếu chất khách thể chịu được nhiệt độ cao. Trong nhiều trường hợp cần làm lạnh dung dịch khi khuấy để kết tủa được hình thành. Kết tủa là các phức bao được thu hồi bằng cách gạn lỏng, ly tâm hay lọc. Có thể rửa kết tủa với nước hay các dung môi khác như như etanol, metanol, hay axeton. Ngoài ra còn có các kỹ thuật tạo phức dạng hô, kỹ thuật tạo phức dạng bột nhão, kỹ thuật trộn ướt và gia nhiệt, kỹ thuật ép dùn, kỹ thuật trộn khô. Trong đó lượng nước dùng làm môi trường tạo phức giảm dần tương ứng theo phương pháp và nhiệt độ cũng có khác nhau giữa các phương pháp.

* *Thu nhận các cyclodextrin (CDs)*

– Cơ chế tác dụng của CGTaza : Đóng vai trò chính trong việc vòng hoá các mạch polysaccharit tạo các CDs là enzym cyclodextrin glycosyltransferaza (CGTase). Cơ chế xúc tác của enzym này nhìn chung rất phức tạp, thông thường gồm 4 phản ứng sau :

➤ Phản ứng thuỷ phân mạch tinh bột :



Trong đó : G(a) là mạch polysaccharit có a gốc glucoza.

G(n), G(m) là các oligosaccharit chứa n, m gốc glucoza.

➤ Phản ứng trao đổi giữa các mạch oligosaccharit :



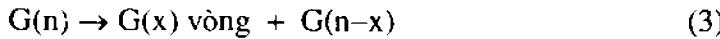
Trong đó :

G(n) là chất cho

G(m) là chất nhận

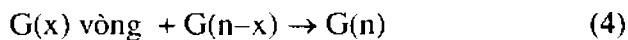
x là số đơn vị glucoza được trao đổi

➤ Phản ứng vòng hoá :



Ở đây một phần (x là số đơn vị glucoza) của chất cho được tách ra tạo thành CDs. Phản ứng theo chiều nghịch cũng được xúc tác bởi enzym như dưới đây :

► Phản ứng kết hợp các oligosaccharit :



Như vậy, đặc tính tạo vòng chỉ là một phần trong các hoạt tính xúc tác của CGTaza. Điều đó làm cho các phản ứng tạo CDs từ tinh bột do CGTaza xúc tác có hiệu suất không cao. Như trên có thể thấy, phản ứng tạo vòng xuất phát từ sự chuyển dịch glucozyl hoá nội phân tử và là phản ứng được dùng để tạo CDs từ các chuỗi tinh bột có nhiều hơn 6 gốc glucoza. Với các chuỗi oligosaccharit có ít hơn 6 đơn vị glucoza, CGTaza có khả năng tổng hợp nên các oligome có khối lượng phân tử lớn hơn bằng phản ứng trao đổi (2) sau đó mới tạo CDs bằng phản ứng vòng hoá (3). Phản ứng kết hợp (4) cũng là phản ứng chuyển glucozyl hoá nội phân tử làm mở vòng CDs. Trong dịch phản ứng tạo CDs phản ứng kết hợp sẽ xảy ra khi có mặt CDs và một số đồng cơ chất khác như glucoza, mantoza và mantotriosa. Đây là phản ứng cạnh tranh với phản ứng tạo vòng làm giảm hiệu suất tạo CDs. Vì vậy, trong sản xuất CDs dịch tinh bột có DE càng thấp sẽ cho hiệu suất tạo CDs càng cao.

– Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của CGTaza : Cũng như các enzym khác, các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của CGTaza gồm có nồng độ dịch tinh bột, nồng độ enzym, pH, nhiệt độ, các chất hoạt hoá và kìm hãm. Các CGTaza hoạt động trong khoảng pH tối ưu 5 – 9 phụ thuộc vào nguồn gốc enzym. Đây là một yếu tố hay được sử dụng để điều hoà phản ứng enzym (chủ yếu để tăng hiệu suất phản ứng và độ đặc hiệu sản phẩm).

Dối với CGTaza nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt tùy thuộc vào nguồn enzym, nằm trong khoảng 50 – 65°C và 35 – 70°C tương ứng.

Các chất kìm hãm gồm có Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , ngoài ra CGTaza còn bị kìm hãm bởi thừa cơ chất và bởi sản phẩm của phản ứng. Sự kìm hãm này làm giảm hiệu suất của phản ứng nên cũng là một yếu tố đáng quan tâm.

Một số CGTaza có thể được hoạt hoá bằng Ca^{2+} . Một số hợp chất hữu cơ có thể làm tăng hoạt tính CGTaza một cách gián tiếp vì nó sẽ tạo phức với CDs góp phần làm giảm nồng độ CDs trong dung dịch phản ứng và do đó làm tăng hiệu suất chuyển hoá. Các chất thường sử dụng là rượu có từ 1 đến 6 các bon như etanol, isopropanol, một số muối vô cơ như muối halogen, muối photphat. Yêu cầu của các chất tạo phức để làm tăng hiệu suất thu hồi

CDs phải là các chất hòa tan, không ảnh hưởng đến độ bền của enzym và phải dễ tách ra khỏi phức để thu hồi được CDs ở dạng tinh khiết, không độc hại.

Chế phẩm CGTaza thương mại TORUZYM 3.0L (3KNU/g) của hãng Novo – Đan Mạch có dạng lỏng, màu nâu, tỷ trọng xấp xỉ 1,2g/ml được thu nhận từ *Thermoanaerobacter* khả năng tạo vòng tốt ở pH = 6,0 và nhiệt độ 55°C.

– Quy trình thu nhận các CDs

Các cyclodextrin thường được sản xuất từ tinh bột bằng phản ứng vòng hoá của các chuỗi glucoza mạch thẳng bởi CGTaza. Đầu tiên tinh bột được làm lỏng hoá bằng nhiệt hoặc bằng α – amylaza, sau đó CGTaza được cho vào để chuyển hoá thành cyclodextrin. Sản phẩm của quá trình vòng hoá thu được là một hỗn hợp các cyclodextrin chứa chủ yếu 3 loại α, β và γ – cyclodextrin với tỷ lệ khác nhau và sau đó chúng được phân tách ra theo nhiều phương pháp khác nhau.

Giai đoạn thuỷ phân dịch tinh bột

Giai đoạn dịch hoá nhằm mục đích là làm tinh bột bị mất đi cấu trúc tinh thể, bị thuỷ phân tạo thành các oligosaccharit dễ tan trong nước và tạo ra dung dịch có độ nhớt thấp, giúp enzym dễ dàng hoạt động trong giai đoạn vòng hoá. Nguyên liệu được sử dụng để sản xuất các CDs thường là tinh bột sắn, ngô, gạo, khoai tây, khoai lang, bột... Nồng độ tinh bột sử dụng thường nằm trong khoảng 2 – 50 %.

Quá trình dịch hoá có thể được thực hiện bằng α – amylaza (pH = 5,5 – 6,5, t° = 80 – 90°C trong 10 – 15 phút) hay CGTaza (pH = 5,5 – 6,0, t° = 80 – 85°C trong 30 – 40 phút). Theo một số công bố sử dụng α – amylaza, tuy giá thành rẻ hơn nhưng hàm lượng CDs tạo ra ít hơn so với dùng CGTaza. Đồng thời quá trình vô hoạt enzym này khó khăn hơn so với CGTaza sau khi dịch hoá.

Kết thúc quá trình dịch hoá, α – amylaza bị vô hoạt bằng CuSO₄ 5mM hoặc hạ pH xuống 2,0 trong 20 phút. CGTaza bị vô hoạt bằng hấp áp lực ở 120°C trong 10 phút, sau đó làm nguội đến nhiệt độ thích hợp mới bổ sung CGTaza vào để tạo CDs .

Giai đoạn vòng hoá tạo các CDs

Điều kiện để thu nhận các CDs phụ thuộc vào nguồn enzym và nguyên liệu sử dụng. Để nâng cao hiệu suất thu hồi γ – CD, người ta thường bổ sung các chất tạo phức với γ – CD trong quá trình vòng hoá để giảm nồng độ cấu tử này trong dung dịch, khi đó phản ứng vòng hoá sẽ ưu tiên tạo γ – CD. Ví dụ, khi bổ sung cyclododecanon với lượng 2 – 10% cơ chất tinh bột, hiệu suất tạo γ – CD đạt 20% sau 48–72 giờ ở 40°C. Sử dụng 2 tác nhân tạo phức metyleetyl xeton và cyclododecanon tỷ lệ theo khối lượng 1 : 1 (tổng lượng 2 chất chiếm 2 – 15% khối lượng tinh bột) cho hiệu suất lên tới 42,4% sau 48 – 72 giờ ở 40°C.

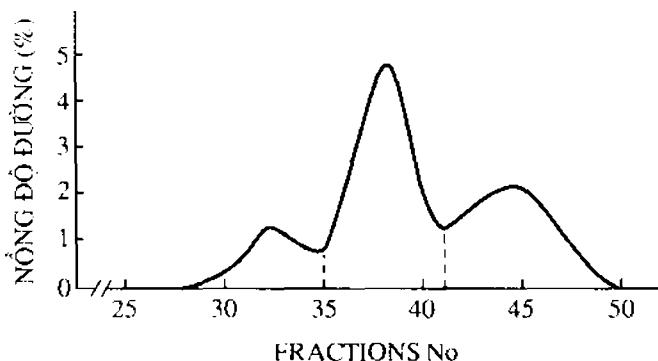
Giai đoạn tách và tinh sạch các CDs

Hỗn hợp nhận được sau khi vòng hoá gồm các oligosaccharit, dextrin và CDs. Nhờ vào sự can thiệp của glucoamylaza thuỷ phân triệt để các dextrin thành glucoza, từ đó sẽ dễ dàng hơn trong việc tách các CDs. Nồng độ glucoamylaza được sử dụng chiếm khoảng 0,05 – 0,12%, hoạt động trong các điều kiện pH = 4 đến 5,5 ở nhiệt độ 40 – 60°C, trong 10 – 50 giờ. Tuy nhiên, glucoamylaza cũng có khả năng thuỷ phân γ – CD dễ dàng. Đây là lý do tại sao glucoamylaza thường dùng với hàm lượng thấp.

Thông thường tỷ lệ β – CD trong dịch hỗn hợp sau vòng hoá cao hơn so với α – CD và γ – CD và được loại ra trong giai đoạn đầu. Lợi dụng tính chất ít tan nhất của β – CD để tách chúng ra ở dạng tinh thể bằng cách cô đặc dung dịch đưa về trạng thái bão hòa. Để quá trình tạo mầm kết tinh dễ dàng, thường đưa vào dung dịch một ít tinh thể của chất hoà tan gọi là chất "trợ mầm". Sau đó quá trình kết tinh diễn ra ở nhiệt độ thấp (nồng độ dịch kết tinh = 25 – 35 Bx, bổ sung 1% chất "trợ mầm", kết tinh ở 5°C trong 3 ngày).

Để tách γ – CD ra khỏi hỗn hợp một số những dung môi sau đây được sử dụng như tricloetylen, tetrachloroetan, bromobenzen, d – limonen (20% khối lượng nguyên liệu tinh bột). Sau quá trình lọc, rửa, chưng cất dung môi thu được γ – CD ở dạng tinh khiết, tỷ lệ tinh sạch của γ – CD khi sử dụng d – limonen lên đến 98,8%.

Ngoài phương pháp trên người ta cũng có thể sử dụng các cột nhựa trao đổi ion hấp phụ chọn lọc để tách và tinh sạch các CDs. Ví dụ, sử dụng cột Toyopearl – HW 40S để tách các CDs, sau đó rửa giải bằng nước ở 60°C. Các phân đoạn thu được như trên hình sau :



Hình 3.12. Biểu đồ minh họa quá trình rửa giải tách các CDs
C : Oligosaccharit ; D : γ – CD ; E : Hỗn hợp α – và β – CD.

Nhựa sử dụng cần phải tái sinh liên tục mới đảm bảo độ hấp phụ tốt, phải dùng HCl để tái sinh nhựa và nhiệt độ phải được điều chỉnh dưới 20°C để ngăn không cho đường hấp phụ ngược trở lại.

e) Ứng dụng của CDs

– Vai trò của sự tạo phức

Phức bao CDs có ảnh hưởng rõ rệt đến tính chất lý hoá của chất khách thể :

- + Làm bền các chất nhạy cảm với ánh sáng, với chất oxy hoá, nhiệt.
- + Làm bền các hợp chất dễ bay hơi, dễ thăng hoa, bảo vệ các chất dễ hút ẩm.
- + Thay đổi khả năng phản ứng hoá học.
- + Phối trộn được các phân tử hoạt động mạnh mà không xảy ra tương tác giữa chúng.
- + Tách các hợp chất ra dưới dạng phức (kết tủa từ dung dịch. Hấp phụ trên polime CDs).
- + Kiểm soát sự giải phóng các thành phần hoạt động như chất thơm hay dược chất.
- + Lựa chọn, định hướng phản ứng (bằng cách bao bọc các nhóm định chức).
- + Tăng độ hòa tan của các hợp chất ưa béo, ít tan trong nước.
- + Thay đổi mùi vị sản phẩm, che dấu mùi vị khó chịu.
- + Thay đổi hợp chất từ thể lỏng sang thể rắn.

- + Tăng khả năng phân tách các hợp chất.
- Tính chất dinh dưỡng và độc hại của Cyclodextrin

Chỉ có các enzym α – amylaza mới có khả năng thuỷ phân các cyclodextrin, nhưng với tốc độ chậm hơn so với thuỷ phân các oligosaccharit mạch thẳng tương ứng. Với α – CD và β – CD thì sau 20 giờ thuỷ phân bởi α – amylaza của *Aspergillus oryzae* vẫn còn tới 98% và 83% trong khi đó các γ – CD lại bị thuỷ phân rất nhanh bởi enzym này. Khi so sánh sự thuỷ phân của γ – CD và của tinh bột bởi α – amylaza từ nước bọt cho thấy tỷ lệ chuyển hoá của γ – CD cao hơn khoảng 1% so với tỷ lệ nhận được từ tinh bột sau 5 giờ thuỷ phân.

Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy đưa β – cyclodextrin được đánh dấu bằng ^{14}C vào thức ăn của chuột đều không gây một sự tích tụ đặc biệt nào ở trong cơ thể. Khoảng 55% lượng ^{14}C đã được thải ra ngoài giữa giờ thứ 4 và giờ thứ 30 sau khi ăn vào. Ngược lại, với đường glucoza có đánh dấu sẽ cho cùng đáp số sau 2 giờ. Antennucci và Palmer (1984) đã chứng minh rằng nhiều vi sinh vật đường ruột có khả năng phân huỷ các cyclodextrin. Trong 30 chủng *Bacteroides* được nghiên cứu, 24 chủng có khả năng sử dụng cyclodextrin làm nguồn năng lượng duy nhất.

Cho dù các cyclodextrin không phải là chất cao phân tử, nhưng chúng vẫn được coi là những "thức ăn sơi". Tuy nhiên, việc cho chuột và chó ăn cyclodextrin sẽ trở nên độc nếu liều lượng hằng ngày vượt quá 600mg/kg, tức là chiếm 3% khẩu phần thức ăn. Ở cơ thể con người, liều lượng hằng ngày không được vượt quá 1 – 2g/ngày (25mg/kg). Ở Pháp, việc sử dụng cyclodextrin đã được cho phép từ 9/2/1987 với liều lượng hằng ngày 10mg/kg trọng lượng cơ thể. Còn ở khối thị trường chung châu Âu, β – CD được phép sử dụng ở Đức, Hà Lan, Bỉ và Luxembua như là chất phụ gia "dẫn xuất của tinh bột".

– Ứng dụng của cyclodextrin trong thực phẩm

Cyclodextrin có vai trò ổn định các chất tạo hương và các gia vị trong thực phẩm. Các hương thơm như hương táo, cam, mận và các gia vị như tiêu, quế, tỏi, gừng và các thảo dược như bạc hà, húng có thể được bao bọc trong CDs rất nổi tiếng trên thị trường về tính định hương của chúng trong quá trình chế biến. Các sản phẩm kẹo, bánh và kẹo cao su sử dụng các loại

hương vị này ở dạng dung dịch thì cần phải sử dụng một lượng rất lớn trong quá trình chế biến. Tuy nhiên, khi sử dụng các hương liệu đã được bao bọc bởi CDs thì chỉ cần một lượng nhỏ mà vẫn đạt hiệu quả cao. Hơn nữa phức hợp CDs với các cấu tử hương sẽ ổn định và giữ được mùi thơm lâu hơn so với khi các cấu tử này ở dạng dịch lỏng.

DHA (Docosa hexananoic acid) là một loại axit béo chiết xuất từ dầu cá, nó được biết là có các chức năng sinh lý như là chất chống đông máu, giảm cholesterol, nhưng DHA lại có mùi rất khó chịu và không ổn định, nó hay bị biến đổi do tác động của ánh sáng, oxy. Tuy nhiên, bằng cách tạo bột với CDs thì mùi và vị khó chịu của chúng đã được giảm đi đáng kể và nâng cao được tính ổn định của DHA. Bột DHA ở dạng phức hợp của CDs được tạo thành dạng viên, hoặc bao mềm có thể đưa ra thị trường dưới dạng các chất phụ gia dinh dưỡng.

Trong cà phê CDs có thể được sử dụng trong công nghệ chế biến cà phê hòa tan, nó có tác dụng làm ổn định các hạt cà phê hòa tan và hạn chế sự mất mùi của cà phê.

Trong trà xanh CDs được sử dụng để giữ màu sắc và mùi vị và hương vị của trà xanh. Nó làm giảm vị đắng, chất do chất catechin có trong lá chè gây ra. Chất catechin trong lá chè còn được gọi là tanin là một chất gây ra vị đắng, chất, nó có tác dụng sinh lý là làm giảm hàm lượng cholesterol, chống oxy hoá, kháng khuẩn, chống u, chống tăng huyết áp nhưng vị đắng và chất này lại là một vấn đề lớn khi sản phẩm được đưa ra thương mại dưới dạng một loại sản phẩm đồ uống hàng ngày. Bằng cách trộn β - CD vào catechin, vị đắng của chè sẽ giảm đi do đó chè xanh trở thành một loại đồ uống phổ biến.

Trong rễ của cây gừng có chứa các thành phần hoạt tính được sử dụng để làm thuốc và làm gia vị. Khi trộn γ - CD với bột chiết xuất từ gừng sẽ giảm được tính hút ẩm và vị cay của gừng.

– Ứng dụng làm chất chống oxy hoá, ổn định và giúp tăng cường hoạt tính sinh học

Một số vitamin, axit béo, chất màu và một số chất có hoạt tính sinh lý khác không ổn định, nó dễ bị phân huỷ dưới tác động của ánh sáng, axit hoặc bị oxy hoá làm cho nó khó có thể được hấp thụ một cách hiệu quả

trong cơ thể. Bằng công nghệ bao gói với CDs có thể giải quyết được vấn đề này.

+ **Ôn định hoá vitamin** : Việc sử dụng các loại CDs khác nhau để bao gói vitamin là một trong những phương pháp hiệu quả để bảo quản vitamin. Đặc biệt γ - CD là một chất thông dụng được sử dụng trong việc bao gói các loại vitamin tan trong dầu và có thể làm cho các loại vitamin này có khả năng tan trong nước. Ví dụ như vitamin E (tocopherol) là một loại vitamin tan trong dầu không ổn định với ánh sáng mặt trời, tia UV và nhiệt độ. Khi giữ ở nhiệt độ 45°C thì nó bị giảm hoạt tính 60% trong 17 tuần. Nhưng khi nó được bao bọc bằng γ - CD ở điều kiện tương tự thì hoạt tính của nó chỉ giảm 20%.

+ **Chống oxy hoá các triglycerit axit béo không no** : Các triglycerit axit béo không no như DHA, eicosapentaenoic (EPA), arachidonic, γ - linolenic và các muối hoặc este của chúng rất dễ bị oxy hoá bởi oxy trong không khí. Dầu cá và dầu thực vật có chứa rất nhiều các loại axit béo không no này nên rất dễ bị biến đổi trong quá trình bảo quản. Nhưng khi sử dụng γ - CD để bảo quản dầu cá và dầu thực vật đã làm cho các loại dầu này ổn định.

+ **Giữ màu tự nhiên** : Các nhà nghiên cứu đã bắt đầu quan tâm đến chức năng của các hoạt chất màu tự nhiên và cố gắng đưa chúng vào trong sản xuất thực phẩm. CDs được sử dụng để ổn định màu và tăng tính hòa tan của các hợp chất màu tự nhiên. Trong các loại α , β , γ - CD thì γ - CD có hiệu quả nhất trong việc ổn định hoạt tính của các hoạt chất màu đỏ như anthocyanin, lycopene, astaxanthin.

- **Ứng dụng của CDs trong sản xuất mỹ phẩm**

+ CDs được sử dụng trong mỹ phẩm với công dụng để hoà tan hương liệu và ngăn cản sự bay hơi của chúng và CDs được sử dụng để sản xuất nước hoa dưới dạng xịt và dạng bột. CDs cũng được sử dụng làm chất định hương, chất khử mùi. Ở châu Âu khoảng 400 tấn CDs được sử dụng hàng năm trong đó 70% được sử dụng làm chất khử mùi.

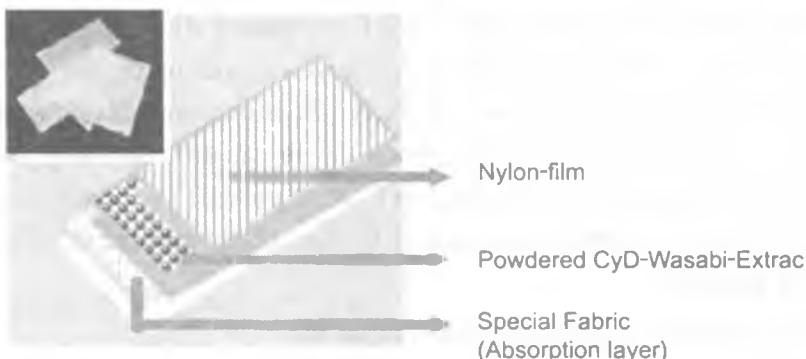
+ Đối với các loại sản phẩm chăm sóc cơ thể như xà phòng tắm, dầu gội dầu có chứa tinh dầu cây bách (Hinokitiol) có tác dụng diệt khuẩn nhưng dễ bị oxy hoá thì CyD có thể cố định được Hinokitiol.

- **Ứng dụng của CyD trong dệt may**

Các sản phẩm dệt may với các chức năng đặc biệt đã được phát triển. CDs là một trong những thành phần thiết yếu của các loại vật liệu mới này. CDs được sử dụng chủ yếu để giữ ẩm trong các sợi squalane (là một chất chiết xuất từ dầu gan cá mập có thể giúp da đỡ khô, và làm cho da mịn màng), giảm mùi của các loại sợi có bổ sung dịch chiết thực vật và giữ hoạt tính chống khuẩn của sợi khi nó được bổ sung các tác nhân chống khuẩn.

Ví dụ như các loại quần áo lót có chứa squalane@CyD là một thành phần hoạt tính đang được bán trên thị trường Nhật Bản, bột squalane@CyD được gắn với các sợi vải bằng một liên kết đặc biệt.

Đồ lót và tất với đặc tính chống vi khuẩn được làm từ các loại sợi có chứa Hinokitiol@CyD đã được sản xuất và bán trên thị trường Nhật Bản.



Hình 3.13. Cấu trúc của lớp chống khuẩn

– Ứng dụng CyD trong sản xuất các vật liệu bao gói

Allylizothioxyanat (AITC) là một thành phần chủ yếu của cây mù tạt có hoạt tính chống khuẩn. Tuy nhiên, chúng dễ bay hơi và bị phân huỷ rất nhanh do bị oxy hoá. CDs được sử dụng để ổn định hoạt chất này trong các loại vật liệu bao gói. Các bao và khay chống khuẩn đã được giới thiệu trên thị trường Nhật Bản. Lớp ngoài cùng là một lớp màng nilon poly-vinyliden clorit, lớp giữa là phức hợp wasabi@CyD và lớp trong cùng là một lớp sợi đặc biệt. Khi bị ẩm hay bị đồ uống dây vào, bao AITC bốc hơi và các thực phẩm được bao gói bởi khí AITC, như vậy vi khuẩn và nấm mốc bị tiêu diệt do đó có thể giữ được mùi vị của thực phẩm và giúp chúng tươi lâu hơn.

– Ứng dụng của xyclodextrin trong y học

Xyclodextrin được áp dụng rộng rãi trong y học để tăng cường tính hòa tan, ổn định và hoạt tính sinh học của các phân tử thuốc. Tuy nhiên, các CDs tự nhiên tương đối khó tan trong nước lẫn trong dung môi hữu cơ, do đó chúng được sử dụng rất ít trong sản xuất thuốc. Một số chất dẫn xuất của CDs như các dẫn xuất kỵ nước, ưa nước, dẫn xuất ion đã được phát triển để có thể mở rộng đặc tính hóa lý của CDs tự nhiên. Các CDs ưa nước có thể biến đổi để giải phóng tốc độ tan của các thuốc ít tan trong nước làm tăng cường sự hấp thụ của thuốc. Mặt khác, các CDs kỵ nước có thể sử dụng như một chất mang duy trì sự giải phóng của các thuốc dễ tan trong nước bao gồm các thuốc có bản chất là peptit hoặc protein. Sự kết hợp sử dụng các CDs khác nhau với các chất phụ gia sẽ tạo ra khả năng sinh học cân bằng hơn với các tác dụng liệu pháp lâu dài. Thuộc tính mong đợi nhất đối với các chất mang thuốc là khả năng phân phối hướng đích của chúng. Sự kết hợp giữa thuốc và CDs có thể giữ thuốc nguyên vẹn trong dạ dày và ruột non nhưng thuốc giải phóng sẽ được giữ lại bởi hệ thống enzym phân hủy trong ruột kết. Như vậy, một CDs kết hợp có thể là cấu trúc đa năng của thuốc hướng đích. Hơn nữa, các hợp chất của CDs và polyme (+) có thể là một ứng cử viên mới cho các vector không phải là virus để tăng thêm sự chuyển gen của ADN plasmid.

* Xyclodextrin trong các hệ thống phân tán

Xyclodextrin tham gia vào các hệ thống phân tán như nhũ tương, vi hạt (microparticle), vi bao (microcapsule), vi cầu (microsphere) và các hạt nano, các túi lipit. Các CDs có thể làm tăng tính tan, tính ổn định và sự vận chuyển của thuốc.Thêm vào đó, chính bản thân CDs có thể hoạt động như một vật liệu thô cho quá trình chuẩn bị hạt thay thế cho các polyme hoặc lipit.

e) Ứng dụng của tinh bột

Tinh bột ngoài chức năng là nguyên liệu để sản xuất hàng loạt các sản phẩm thực phẩm dựa vào các tính chất chức năng còn là nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng để sản xuất các sản phẩm lên men như etanol, glycerin, dung môi hữu cơ, axit hữu cơ, kháng sinh... cũng như các sản phẩm khác

Tinh bột gia nhiệt được chú ý nhiều do chúng được dùng trong các quá trình chế tạo nhựa truyền thống để làm vật liệu dựa trên nền tinh bột. Tuy nhiên, khi xét về các thuộc tính cơ học như độ bền kéo (tensil strength) và khả năng kéo dãn của loại tinh bột gia nhiệt này thường bị giới hạn. Do vậy,

người ta thường tổng hợp nên các loại polyme hỗn hợp, các composit, các copolymer ghép và các tinh bột biến tính hóa học. Tinh bột thường được dùng thêm vào một số vật liệu, một số hỗn hợp (tinh bột–uretan, tinh bột–polyetylen acrylic với etylen–axit acrylic). Một số copolymer ghép với vinyl hoặc acrylic sử dụng quá trình khởi động gốc tự do và được dùng trong các phản ứng trùng hợp (ví dụ tinh bột–xantat cho vật liệu elastomeric). Vật liệu chứa tinh bột ngày càng được chú ý do khả năng phân huỷ sinh học tự nhiên của tinh bột, mặc dù hàm lượng tinh bột trong các loại vật liệu này thường chỉ chiếm dưới 10%. Trong các vật liệu, quá trình oxy hóa xảy ra khi chúng kết hợp với các muối kim loại trong đất hoặc trong môi trường khác tạo nên gốc peroxit xúc tác quá trình phân huỷ các polyme trong vật liệu. Tinh bột được xử lý với tác nhân gắn kết silan tạo khả năng tương hợp với polyetylen và este chưa no như dầu ngô hoặc dầu đậu tương có thể được sử dụng như chất tự oxy hoá. Các loại màng thối chứa tới 60% tinh bột cũng đã được chế tạo thành công. Một số hãng đã đưa ra thị trường loại polyme giả cường bằng tinh bột gia nhiệt với hàm lượng cao dùng trong một số lĩnh vực để làm bao gói thông thường, bao gói dược phẩm, chất hấp thụ...

3.3.1.2. Xenluloza

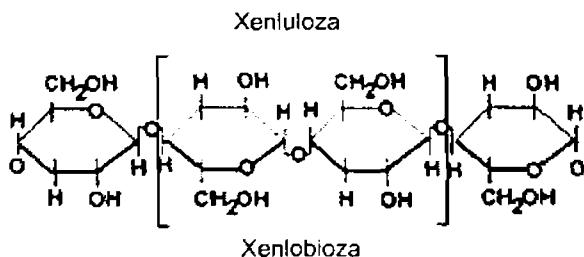
Xenluloza là hợp chất hữu cơ phổ biến trong tự nhiên và là thành phần chủ yếu của thành tế bào thực vật. Hàng năm, lượng xenluloza được tổng hợp nhiều hơn bất kỳ chất hữu cơ nào khác (40% sinh khối quang hợp là xenluloza). Nếu coi toàn bộ sinh khối thực vật của Trái Đất là $1,8 \cdot 10^{12}$ tấn/năm thì xenluloza chiếm $7,2 \cdot 10^{11}$ tấn. Trong gỗ, xenluloza chiếm tỷ trọng 40–50%, trong bông là 90%, trong rơm rạ và cỏ khô là 28 – 46%, trong rau là 16–20%.

Dưới dạng phế thải, xenluloza có trong các phế liệu nông nghiệp (lõi ngô, trấu, mạt cưa, rơm rạ...), phế liệu công nghiệp (phế thải các ngành chế biến chè, cà phê, bã mía trong sản xuất đường...), chất thải sinh hoạt...

a) Cấu tạo phân tử xenluloza

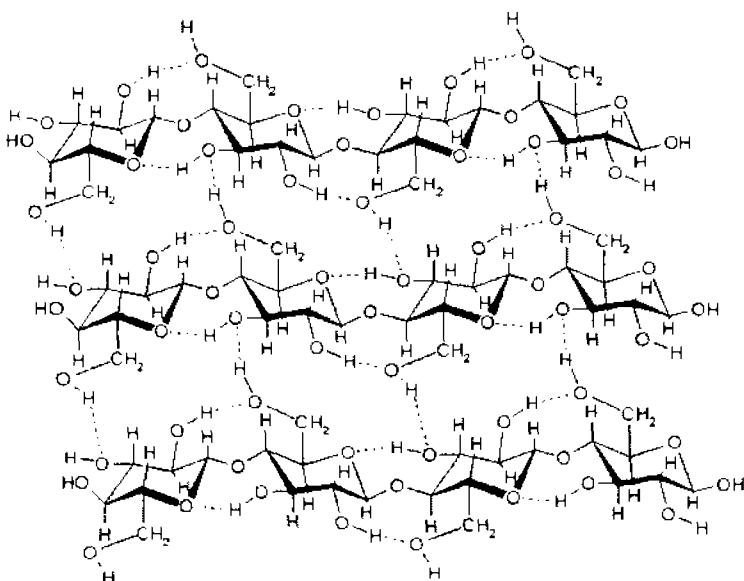
Xenluloza có công thức tổng quát là $(C_6H_{10}O_5)_n$, là polysaccharit của thành tế bào thực vật, có khối lượng phân tử trong khoảng 10^6 – $1,5 \cdot 10^6$ dvC. Thành phần cấu trúc cơ bản của xenluloza là các β -D-glucopyranose với hàm lượng 96–98% so với lý thuyết.

Các đơn vị D-glucoza có dạng vòng 6 cạnh (pyranoza), được liên kết với nhau theo liên kết β -1,4-glucozit. Khi thuỷ phân trong điều kiện nhẹ nhàng thu được disaccarit là xenlobioza.



Hình 3.14. Cấu tạo hoá học của xenluloza (n là độ trùng hợp)

Các nhà khoa học đã xác định rằng các D-glucoza ở điều kiện thường có cấu tạo dạng ghế, quay một góc 180° so với phân tử trước nó. Các nhóm hydroxyl đều nằm trên mặt phẳng nằm ngang.



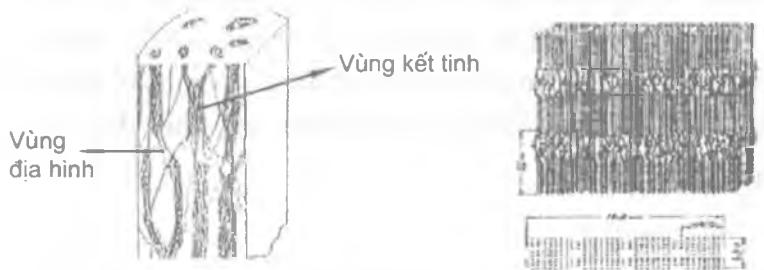
Hình 3.15. Cấu trúc dạng ghế phân tử xenluloza

Dưới tác dụng của một số yếu tố bên ngoài, cấu hình dạng ghế trên có thể bị thay đổi.

* *Hình thái cấu trúc xenluloza*

Cấu trúc xenluloza không đồng nhất và thường có hai vùng là vùng kết tinh và vùng vô định hình có cấu trúc dạng sợi, nhiều sợi xếp song song

thành chùm gọi là mixen có các lỗ trống khí hoá gỗ (già). Các lỗ trống đó chứa dây lignin, nhờ có cấu trúc dạng sợi của lignin làm xenluloza có cấu trúc bền vững.

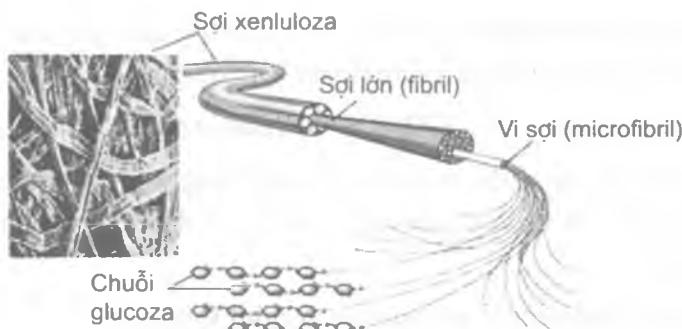


Hình 3.16. Cấu trúc của xenluloza trong tự nhiên

– *Vùng kết tinh* : là vùng có trật tự và có cấu trúc cao. Các sợi của nó được tổ chức thành trạng thái mạng tinh thể và mạng lớp, đoạn mạch xenluloza là phần tham gia vào cấu trúc mạng tinh thể. Trong mạng tinh thể, các đoạn mạch đều xếp theo một hướng và song song với nhau. Hai đoạn mạch nằm trong một mặt phẳng của mạng tinh thể tương tác với nhau, hình thành một lớp. Trong lớp có liên kết hydro của hydroxyl ở C₆ của D-glucopyranose trong một đoạn mạch với O của nhóm hydroxyl ở C₃ của đoạn mạch khác. Thực nghiệm đã chỉ ra rằng, trong xenluloza tự nhiên không có liên kết hydro giữa các lớp khác nhau mà chỉ tồn tại tương tác Vandecvan.

– *Vùng vô định hình* : có cấu trúc lỏng lẻo hơn nhưng toàn bộ cấu trúc của xenluloza vẫn rất bền vững và khó bị tác động.

Các vùng kết tinh cùng với vùng vô định hình tập hợp lại thành một tổ chức gọi là vi sợi (microfibril). Vi sợi có kích thước thay đổi tuỳ thuộc vào loài thực vật. Chiều ngang của vi sợi khoảng 10–20nm, các vi sợi tập hợp lại thành tổ chức lớn hơn gọi là sợi (fibril).



Hình 3.17. Sợi xenluloza trong thành tế bào thực vật

b) Tính chất

1. Tính chất lý học

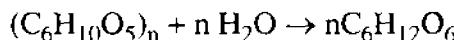
Xenluloza là một loại polyme vừa phân cực mạnh vừa kết tinh cao, không tan trong nước, chỉ hòa tan trong một số ít các dung môi và một số enzym. Chúng bền về mặt cơ học trong điều kiện thường và có thể bị phân huỷ do một số tác nhân vật lý như : ánh sáng, tia năng lượng cao, nhiệt độ cao...

2. Tính chất hoá học

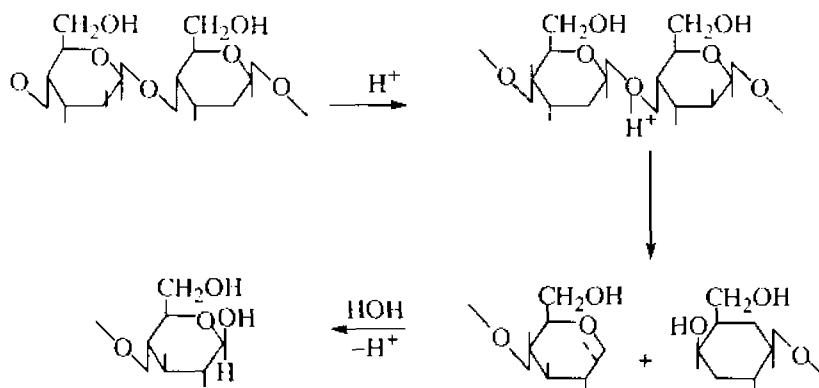
* Tác dụng với axit

Các phân tử xenluloza sẽ chuyển hoá thành glucoza dưới tác dụng của axit vô cơ hay axit hữu cơ như : HCl, H₂SO₄, CH₃COOH...

Phương trình tổng quát :

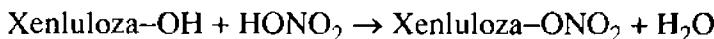


Cơ chế :



- Este của xenluloza với axit vô cơ

Este điển hình là xenluloza nitrat. Với nồng độ của axit HNO₃ cao hơn 75% thì quá trình nitrat hoá mới xảy ra theo phương trình :



Este-xenluloza có nhiều ứng dụng trong công nghiệp chế tạo chất nổ, phim ảnh, sơn, chất dẻo. Với mỗi ứng dụng ta có thành phần hỗn hợp nitrat hoá khác nhau.

- Este của xenluloza với axit hữu cơ (xenluloza axetat)



Dẫn xuất này được dùng trong nhiều lĩnh vực như : tơ nhân tạo, phim ảnh, sơn, chất dẻo, màng lọc, sợi lọc... Người ta dùng xenluloza diaxetat để tạo màng phân riêng các chất, dùng để tách muối và thu nước ngọt từ nguồn nước biển.

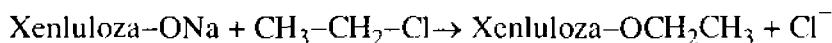
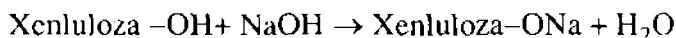
* Tác dụng với NaOH

Xenluloza bị thuỷ phân bởi kiềm nhưng quá trình không có hiệu quả như bị thuỷ phân bởi axit do đó ở đây ta sẽ không xét đến phản ứng với kiềm.

- Phản ứng thế với các cacbonhydro tạo các dẫn xuất ete

Tùy thuộc vào bản chất của nhóm thế định đưa vào xenluloza ta có rất nhiều dẫn xuất ete của xenluloza như : methyl xenluloza, etyl xenluloza, benzyl xenluloza, cacboxyl methyl xenluloza...

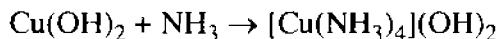
Phương trình phản ứng tạo dẫn xuất etyl xenluloza :



Etyl xenluloza được dùng nhiều trong các lĩnh vực như sơn, chất dẻo, các vật dụng văn phòng : điện thoại, chi tiết ôtô, gọng kính...

- Hoà tan trong dung dịch phức gồm amoniac và hydroxyt kim loại (Cu, Ni...)

Trong dung dịch nước của NH_3 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$ phức cupiamin được tạo thành :



Phức này có nhiều ứng dụng trong sản xuất sợi nhân tạo để nâng cao chất lượng sợi. Hiện nay, dung dịch xenluloza trong phức đồng- amoniac có ứng dụng cả trong y học là sợi rỗng cho thận nhân tạo.

* Thuỷ phân bằng enzym

Nhóm enzym phân huỷ xenluloza được chia làm 3 loại :

- Endo- β -1,4-glucanaza (endo-1,4- β -glucan-4-glucanohydrotaza) [EC 3.2.1.4] có khả năng xúc tác phân cắt các liên kết bền trong phân tử xenluloza giải phóng xenlodextrin, xenlobioza và glucoza. Enzym này phân giải mạnh các xenluloza hòa tan nhất là dạng xenluloza vô định hình nhưng hoạt động yếu ở vùng kết tinh. Chính sự tấn công ngẫu nhiên của endo- β -1,4-glucanaza tạo ra các đầu không khử và tạo điều kiện thuận lợi cho exo- β -1,4-glucanaza hoạt động.

- Exo- β -1,4-glucanaza (exo- β -1,4-glucanaza xenlobioza-hydrolaza) [EC 3.2.1.91] xúc tác phân cắt xenluloza từ dầu không khử và xenlodextrin để giải phóng xenlobioza. Enzym này không phân giải xenluloza kết tinh cũng như các xenluloza hòa tan, tác dụng yếu lên CMC nhưng hoạt động mạnh vùng xenluloza vô định hình.

- β -1,4-glucosidaza [EC 3.2.1.21] là enzym xúc tác quá trình thủy phân xenlobioza giải phóng glucoza. Chức năng của β -1,4-glucosidaza là điều chỉnh sự tích luỹ các chất cảm ứng của enzym xenlulaza.

c) *Ứng dụng*

Xenluloza được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Xenluloza được sử dụng làm giấy và các sản phẩm giấy, màng bao, film, sử dụng trong xây dựng, thực phẩm, trong y học như bông băng... Xenluloza từ vi khuẩn được dùng cho sản xuất các màng ngăn trong các ống nghe do chúng có độ kết tinh cao và đường kính các sợi của chúng nhỏ hơn nhiều hơn so với nguồn từ thực vật. Xenlophan là một trong những dạng phổ biến của xenluloza dùng trong bao gói. Nó được dùng làm giấy bóng kính bao gói cho một vài loại thực phẩm do có độ trong và không thấm dầu mỡ. Xenlophan thường được phủ với nitroxenluloza hay poly (vinyl clorit) để tăng cường thuộc tính chống ẩm của chúng mặc dù lớp phủ này không có khả năng phân huỷ sinh học. Xenluloza tự nhiên không tan trong nước và rất khó tạo thành màng. Khả năng hòa tan tăng thông qua các phản ứng tạo dẫn xuất cacboxylmetyl, methyl xenluloza, hydroxyl propyl xenluloza... Các dẫn xuất này có khả năng tạo màng và mang một số thuộc tính mong muốn cho một số ứng dụng. Ví dụ, một vài dẫn xuất có khả năng tạo gel dưới tác dụng của nhiệt được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm để ngăn chặn sự hấp thụ dầu trong quá trình nấu.

Xenluloza biến đổi hóa học thường không bị phân huỷ sinh học. Ví dụ : nitroxenluloza (với 2 hoặc 3 gốc nitơ gắn vào một monome), xenluloza tripropionat hay xenluloza tributyrat thường rất bền đối với sự tấn công của vi sinh vật.

1. Trong công nghiệp

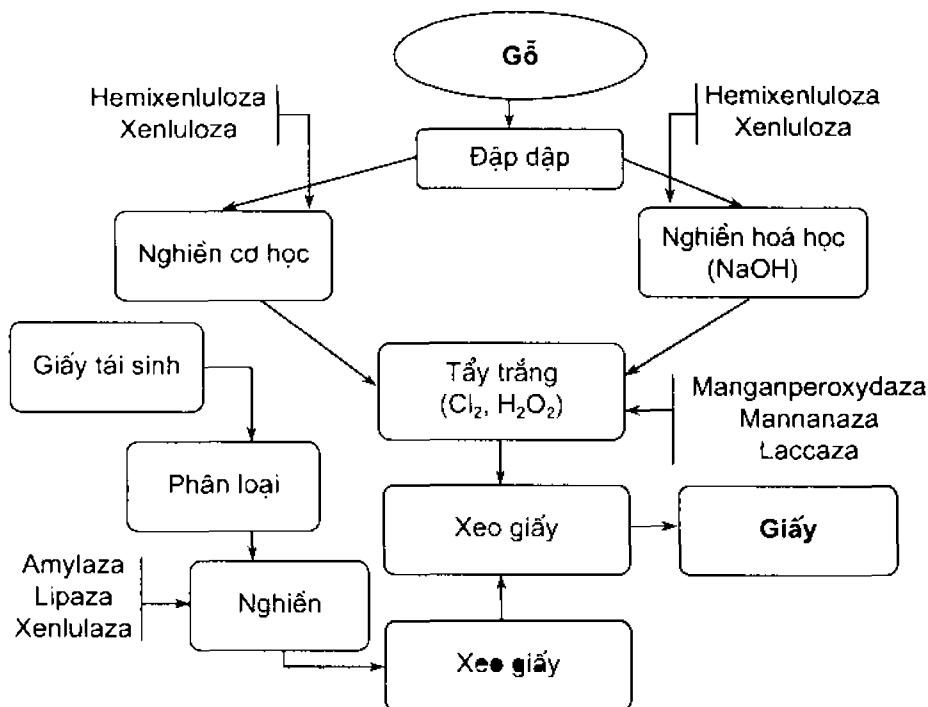
Xenluloza và các dẫn xuất của xenluloza được ứng dụng khá rộng rãi trong các ngành công nghiệp.

* Trong công nghiệp thực phẩm

M-C (metyl xenluloza) làm chất ổn định và chất làm đặc trong công nghiệp chế biến thực phẩm.

* Trong công nghiệp giấy

Xenluloza là thành phần chính của giấy. Để sản xuất giấy, người ta dùng các nguyên liệu chứa xenluloza như : gỗ, tre, nứa, bã mía...



Hình 3.18. Sơ đồ công nghiệp sản xuất giấy sử dụng enzym

* Trong công nghiệp dệt

CMC (cacbon methyl xenluloza) được dùng làm hồ vải hoa có trong thành phần bột in màu hoa.

Xyanuaetyl-xenluloza ($ds = 0,35-0,4$) có thể bảo vệ vải sợi khỏi sự phân huỷ của vi sinh vật.

Etc-xenluloza với nhóm thế mạch C dài có tính ky nước cao thường dùng sản xuất vải không thấm nước.

Khi cho vài xenluloza tác dụng với formandehyt trong môi trường axit độ bền của vải được tăng lên, độ ổn định về kích thước, độ chống chịu đối với việc giặt giũ tốt và nâng cao chất lượng in hoa.

Enzym xenlulaza được sử dụng trong công nghiệp dệt sợi như : xử lý quần áo bò, làm bóng vải bông, sợi nhân tạo. Trong quá trình mài quần áo bò, sử dụng enzym này đảm bảo độ mềm mại cần thiết của vải bò.

* *Trong công nghiệp điện*

Bột xenluloza-krass dùng để sản xuất giấy cách điện dùng cho biến thế.

Benzyl-xenluloza được dùng làm vật liệu cách điện (sợi cách điện, tám cách điện, vỏ bọc cách điện...).

* *Trong công nghiệp sơn, chất dẻo, chất nổ*

Người ta sử dụng M-C (metyl xenluloza), E-C (etyl-xenluloza) để sản xuất sơn, chất dẻo, chất nổ, vật dụng văn phòng, điện thoại, chi tiết ôtô, gọng kính.

* *Trong công nghiệp gốm sứ*

M-C được sử dụng làm tăng độ nhớt và chống co ngót.

CMC tăng độ dẻo của nguyên liệu đất sét, tăng độ bền của sản phẩm.

* *Trong một số ngành công nghiệp khác*

C-diaxetat được sử dụng tạo màng phân tách riêng các chất (tách muối từ nước biển thu nước ngọt).

M-C có tác dụng bảo vệ hệ nhũ tương, dùng trong công nghiệp các hợp chất cao phân tử.

CMC có tác dụng bảo vệ bùn trong khoan mỏ, trong khai thác khoáng sản, làm giàu quặng.

Tạo vật liệu composit gỗ – chất dẻo : đồng trùng hợp ghép xenluloza với các monome : vinylacetat, styren, butylmetacrylat... tạo nhiều đặc tính quý như : thay đổi khả năng hấp phụ ẩm và tăng khả năng chống chịu đối với vi sinh vật, ổn định về kích thước, độ cứng, độ bền kéo, độ chịu nén modun đàn hồi, khả năng chịu uốn, khả năng chống mài mòn.

Có một số loại gỗ, sau khi đồng trùng hợp ghép với hồn hợp polyceste mono styren độ cứng có thể tăng lên 10 lần ở mức độ ghép 50%.

2. Trong nông nghiệp

* Phân bón

Các hợp chất giàu xenzluloza được phân huỷ trở thành mùn dùng làm phân bón hữu cơ sinh học, phân vi sinh nhờ sự phân giải của một số loại vi khuẩn, xạ khuẩn... phân giải xenzluloza đem lại hiệu suất cao trong trồng rau sạch, cây ăn quả, cây cảnh...

* Trồng nấm

Xenzluloza là nguồn nguyên liệu quan trọng trong việc trồng và nuôi các loại nấm : nấm dược liệu, nấm ăn...

* Chăn nuôi

Xenzluloza cũng được sử dụng có hiệu quả để ủ thức ăn cho vật nuôi, tạo ra các sản phẩm chất lượng cao từ xenzluloza phế thải nông nghiệp (rom, rạ, bã mía, bã sắn...). Xenzluloza có bổ sung xenzlulaza, ure, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ giúp chuyển hoá trước xenzluloza, tăng protein, làm tăng trọng trâu bò, tăng hàm lượng sữa và kéo dài thời gian ra sữa của bò sữa.

3. Trong y dược

Xenzluloza trong phức Cu–amoniacyc được dùng trong việc chạy thận nhân tạo.

Xenzluloza từ cây khoai lang được bào chế làm thuốc nhuận tràng.

M-C dùng làm chất kết dính cho thuốc viên, bảo vệ hệ thống huyền phù nhũ tương.

CMC dùng trong hoá dược hoặc trong mỹ phẩm.

4. Một số lĩnh vực khác

Quá trình thuỷ phân xenzluloza bằng enzym xenzlulaza tạo glucoza, tiếp đó lên men tạo thành hàng loạt sản phẩm như etanol, các alcol khác, các axit hữu cơ, protein và chất béo...

Quá trình lên men đường D–glucoza thành etanol sạch được quan tâm rất nhiều trong những năm gần đây nhằm thay thế xăng khi nguồn nguyên liệu dầu mỏ tự nhiên truyền thống dần cạn kiệt.

d) Tách chiết xenzluloza

Thông thường, nguồn xenzluloza tự nhiên như các sợi bông được tạo ra gần như tinh sạch không cần thiết phải tách chiết. Tuy nhiên, trong một số

ứng dụng đặc biệt như tạo chất ổn định cho các sản phẩm thực phẩm, tạo bột giấy chất lượng cao... đòi hỏi một quá trình tinh sạch để loại các tạp chất khỏi xenluloza. Sau khi nghiền, bột gỗ được ngâm trong các dung dịch sunphat canxi nóng để loại lignin và tiếp đến các công đoạn khử màu.

Hiện tại các xenluloza tinh thể (Microcrystallin Xenluloza –MCC) dưới các tên thương mại như Novagel^d & Avicel-plusTM Colloidal MCC được sử dụng như các chất ổn định trong ngành chế biến sữa, nước quả...

3.3.1.3. Pectin

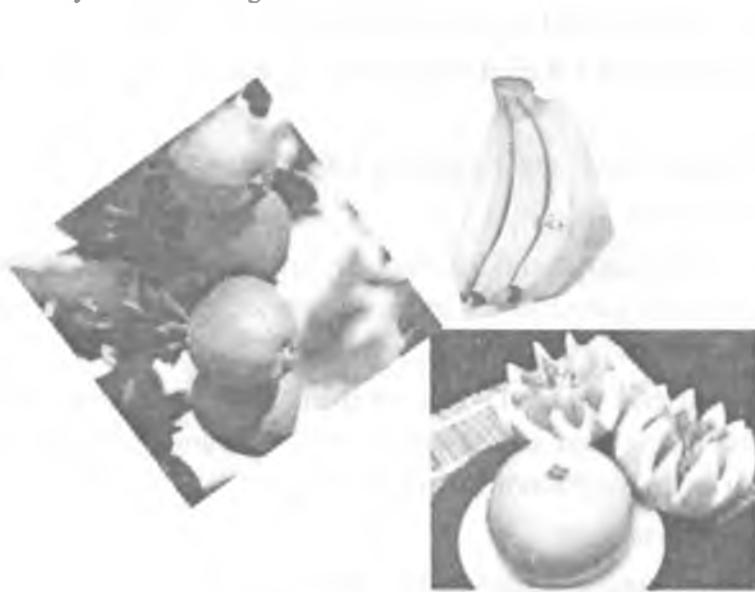
Pectin (còn gọi là chất mộc giao) có nhiều trong vỏ quả táo, cam, chanh, quýt, mận, đào và thán, lá cây...

Pectin được phát hiện đầu tiên vào năm 1790 ở vỏ táo bởi nhà khoa học người Pháp Nicholas Vanquelin.

Mãi đến năm 1824, Branconnot người Hy Lạp mới nghiên cứu và phát hiện pectin có khả năng tạo gel và đông đặc.

Năm 1924, Smolensia đã chứng minh được chất tạo gel đó chính là một chuỗi polyme của axit galacturonic.

Năm 1937, Schmeider và Bock đã thiết lập được công thức cấu tạo cơ bản của pectin. Pectin từ các nguồn gốc khác nhau thì khác nhau về hàm lượng. Ví dụ : táo, mận hàm lượng pectin là 25–35%, vỏ cam, quýt là 20–50%, cây củ cải đường là 10–20%...



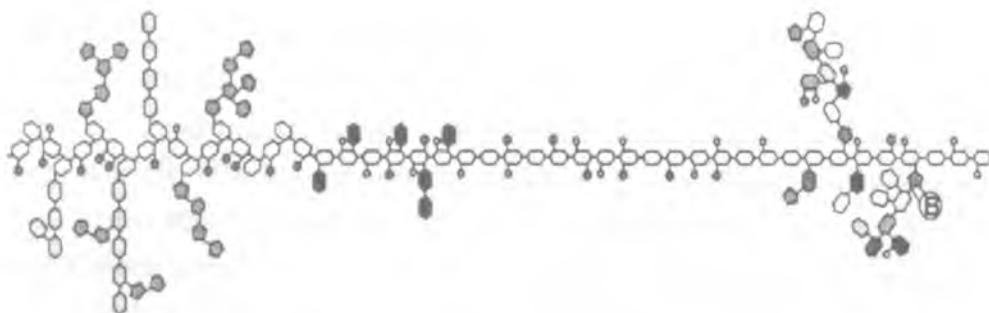
Hình 3.19. Các hoa quả chứa pectin

a) Cấu tạo pectin

Cấu trúc hoá học của pectin là một nhóm các polysaccharit rất giàu axit galacturonic (gal A). Ba dạng polysaccharit pectin chính được tìm thấy trong tất cả các loại pectin là : homogalacturonan (HGA), ramnogalacturonan I (RG-I) và ramnogalacturonan II (RG-II). Ba dạng polysaccharit này có thể liên kết đồng hoá trị dưới dạng một mạng lưới pectin xuyên qua lớp thành tế bào sơ cấp và các phiến mỏng trung gian. HGA là một polymere tuyến tính của 1,4-D-galacturonic bao gồm khoảng 100–200 gốc gal A, là dạng chiếm tỷ lệ nhiều nhất của pectin và được tổng hợp trong bộ máy Gongi, sau đó được đưa vào thành tế bào, ở đó có khoảng 70–80% các gốc gal A được methyl ester hoá ở C-6 carboxyl. Sự dịch chuyển của các nhóm methyl ester bên trong thành tế bào dẫn đến kết quả HGA có khả năng liên kết chéo bởi canxi (Ca) và hình thành các tập hợp và các gel đại phân tử. Các gốc trong HGA có thể O-acetyl hoá chủ yếu ở đầu C-3 nhưng cũng có thể xảy ra ở C-2. Gal của HGA có thể bị thay thế ở vị trí C-3 với gốc đường xyloza tạo thành xylogalacturonan (XGA) có nhiều ở vỏ hạt đậu, pectin táo, dừa và cà rốt. Gal A cũng có thể được thay thế bởi apioza ở vị trí C-2 hoặc C-3 tạo ra apiogalacturonan (trong bèo tẩm lemna minor và spiodela polyrhiza). Các dạng cấu trúc này có thể làm thay đổi các tính chất chức năng của dạng HGA.

RG-I là gal A trong HGA được thay thế bởi đường ramnoza (20–80%) ngoài ra có thể liên kết với D-galactosa theo liên kết β -1,4 glucozit, với L-arabinosa theo liên kết α -1,5-glucozit.

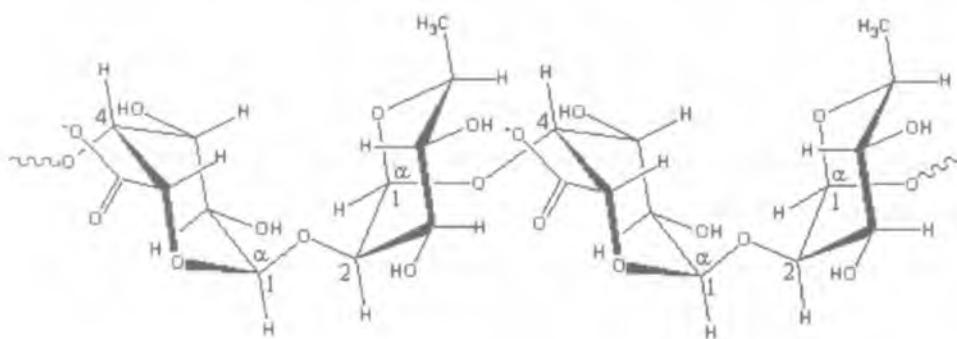
RG-II không có quan hệ về cấu trúc với RG-I vì nó là một dạng pectin được phân nhánh bao gồm một mạch HGA có 9 gốc gala được liên kết bởi α -1,4-glucozit và các chuỗi bên gồm các loại đường khác nhau như : apioza, D-xyloza, L-fucoza, axit axctic và axit 2-keto-3-deoxy-dmanno-octulosonic (KDO). Cấu trúc của HGA, RG-I, RG-II được biểu diễn ở hình 3.20.



◊ = Axit D-Galacturonic
 ◊ = L-Ramnoza
 ● = Axit D-Glucuronic
 ● = Kdo
 ● = L-Arabinosa
 ○ = D-Galactoza
 ● = Axít L-Aceric
 ● = D-Dha
 ● = D-Apioza
 ○ = L-Fucoza
 ● = D-Xyloza
 ◇ = O-Axetyl
 ♦ = O-Methyl
 ® = Borat
 ◻ = L-Galactoza

Hình 3.20. Sơ đồ cấu trúc của pectin : HGA, RG-I, RG-II

– Khi quan sát dưới kính hiển vi, ta thấy pectin có dạng sợi dài, mảnh.



Hình 3.21. Cấu trúc dạng sợi của pectin

Axit polygalacturonic được este hoá từng phần với các gốc methyl và các nhóm axit tự do có thể được trung hoà từng phần hoặc toàn bộ với các ion Na⁺, K⁺ hoặc NH₄⁺.

Tỷ lệ các nhóm axit galacturonic được este hoá so với tổng số axit galacturonic được gọi là mức độ este hoá, ký hiệu DE (degree of esterification). Mức độ este hoá ảnh hưởng lớn đến các tính chất của pectin, đặc biệt là tính hòa tan và khả năng tạo gel.

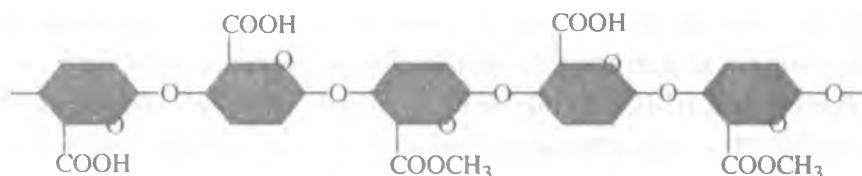
Khả năng este hoá của pectin thương mại chia làm 2 nhóm chính :

– Pectin este methyl hoá cao : (high methyl ester : HM)



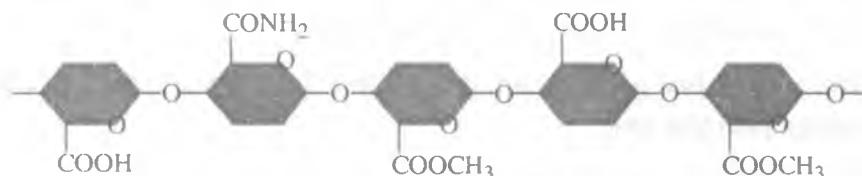
HM : số gốc axit của pectin được methyl hoá lớn hơn 50%.

– Pectin este methyl hoá thấp : (low methyl ester : LM)



LM : số gốc axit của pectin được methyl hoá nhỏ hơn 50%.

– Ngoài ra còn có một số gốc axit của pectin được amid hoá bởi amoniac :



– Pectin amid hoá : Khả năng este hoá cao nhất có thể đạt được ở các dịch chiết nguyên liệu thô tự nhiên khoảng 75%.

b) Tính chất pectin

1. Khả năng tạo gel

Một trong những tính chất quan trọng của pectin là khả năng tạo gel. Sự tạo gel của pectin phụ thuộc vào 2 yếu tố : chiều dài chuỗi pectin và mức độ methyl hoá.

Chiều dài phân tử quyết định độ cứng của gel. Nếu phân tử pectin có chiều dài ngắn thì nó sẽ không tạo gel được mặc dù sử dụng hàm lượng cao.

Các pectin và axit pectinic đều là những keo hao nước nên có khả năng hydrat hoá cao nhờ sự gắn các phân tử nước vào các nhóm hydroxyl của chuỗi polymetyl-galacturonic. Ngoài ra trong các phân tử pectin có mang

diện tích (-) nên chúng có khả năng đẩy lắn nhau làm dãn mạch và tăng độ nhớt của dung dịch. Khi làm giảm độ tích điện và hydrat hoá sẽ làm cho các sợi pectin xích lại gần nhau và tương tác với nhau tạo nên một mạng lưới ba chiều rắn chứa pha lỏng ở bên trong.

Khi pectin có chỉ số methyl cao (mứt quả nghiền, nước quả đông...) mức độ methyl hoá có thể bị giảm khi thêm đường, còn độ tích điện sẽ hạ khi bổ sung ion H^+ hoặc đổi khi chính do độ axit của quả chế biến. Trong trường hợp này liên kết giữa các phân tử pectin với nhau chủ yếu là các cầu hydro giữa các nhóm hydroxyl. Kiểu liên kết này không bền.

Khi chỉ số metoxyl của pectin thấp, cũng có nghĩa là tỷ lệ các nhóm $-COO-$ cao thì các liên kết giữa những phân tử pectin sẽ là liên kết ion qua các nhóm ion hoá trị II, đặc biệt là Ca^{2+} có thể tạo gel khi dùng một lượng canxi dưới 0,1% và chiều dài phân tử pectin phải đạt mức độ nhất định.

* Gel pectin – đường

- Khi dùng nguyên liệu có chứa một loại pectin nhất định thì các yếu tố như hàm lượng pectin, lượng đường, pH môi trường góp phần tạo nên một sự cân bằng mà nếu thiếu thì gel sẽ không hình thành.
- Đối với các loại gel ít pectin, gel chỉ được hình thành ở pH axit cao và lượng đường phải khá lớn.
- Khi hàm lượng pectin cao thì giới hạn pH cũng như hàm lượng đường cho vào có thể biến đổi trong một giới hạn rộng mà vẫn cho phép tạo được gel.

2. Pectin bị phân cắt bởi pectinaza

Các enzym chuyển hoá pectin thường có hai nhóm chính :

* Pectinesteraza (PE)

Thuỷ phân các liên kết este để tách nhóm metoxyl (OCH_3) tạo thành axit pectic và rượu metanol được ứng dụng làm trong nước quả, trong sản xuất rượu vang, sâm panh.

* Polygalacturonaza (PG)

Phân cắt liên kết α -1,4-glucozit trong mạch của pectin.

PG là một phức hệ enzym nhiều cấu tử có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất. Dựa vào tính đặc hiệu và cơ chế tác dụng người ta phân PG thành các nhóm nhỏ sau :

Polymetyl galacturonaza (PMG)

Enzym này tác dụng lên α -polygalacturonic đã được methyl hoá 2/3 pectin. Loại này gồm 2 dạng :

- Endo-polymetyl galacturonaza (ENDO-PMG-K₁) : là enzym phân cắt liên kết 1,4-glucozit ở pectin có mức độ methyl hoá cao.
- Exo-polymetyl galacturonaza (XO-PMG-K₃) : là enzym phân cắt liên kết glucozit đầu mạch nằm giữa 2 gốc axit galacturonic đã được methyl hoá.

Polygalacturonaza (PG)

- Endo-polygalacturonaza (PG-K2) : là enzym dịch hoá, chỉ phân cắt liên kết α -1,4 glucozit đứng cạnh nhóm COOH.
- Exo-polygalacturonaza (PG-K4) : enzym này chỉ có ái lực mạnh đối với liên kết glucozit ở cuối mạch của axit pectinic metoxyl (OCH₃).

Transelimilaza (TE)

Thuỷ phân pectin tạo ra mội liên kết kép trong gốc axit galacturonic giữa nguyên tử C₄₋₅

Phản ứng xảy ra dễ dàng trong môi trường trung tính hoặc kiềm yếu.

c) Công nghệ sản xuất pectin

- Nguyên liệu quan trọng nhất được dùng để sản xuất pectin là vỏ cam, quýt và bã táo. Các phụ phẩm này được sấy khô và bảo quản để sử dụng trong năm. Lượng pectin ở vỏ cam, quýt chiếm 20–50% khối lượng khô, còn ở bã táo 10–20%.

Sau đây là sơ đồ công nghệ sản xuất pectin

- Quy trình công nghệ sản xuất pectin từ vỏ quả

Xử lý nguyên liệu (vỏ, bã quả) rửa, làm khô → Xay nghiền → Xử lý hoá chất hoặc enzym với nước nóng, lọc lấy dịch, làm sạch, cô đặc → Kết tủa pectin → Lọc lấy kết tủa pectin (rửa nhiều lần để loại tạp chất) → Sấy khô → Nghiền thành dạng bột .



Hình 3.22. Pectin dạng bột

d) *Ứng dụng của pectin*

1. Trong công nghệ thực phẩm

* *Mứt dẻo và kẹo dẻo*

– HM-pectin khi có mật đường 55–85% và pH = 2,5–3,8. Có khả năng tạo gel, tạo kết cấu và tạo độ ngọt cho những sản phẩm thực phẩm quả. Khoảng 80% HM-pectin trên thế giới được sử dụng trong công nghệ sản xuất mứt dẻo, kẹo dẻo mà vẫn giữ nguyên các thành phần khác, tạo hương vị thơm ngon và sự đồng đặc thấp nhất (lượng pectin sử dụng trong mứt dẻo và kẹo dẻo thay đổi 0,1–0,4%).

– LM-pectin được sử dụng làm mứt và kẹo dẻo với hàm lượng chất rắn hòa tan dưới 55%. Pectin được để este hoá cần bổ sung thêm muối canxi.

* *Lên men và axit hoá trực tiếp những sản phẩm bơ sữa*

HM-pectin được dùng để làm ổn định những sản phẩm sữa chua truyền thống. Pectin phản ứng với casein, ngăn chặn sự tập hợp các hạt casein tại pH dưới điểm đắng điện và cho phép thanh trùng các sản phẩm sữa chua để kéo dài hạn sử dụng.

2. Trong y dược

Trong y dược, pectin cũng đóng vai trò là một chất dinh dưỡng. Chúng có khả năng làm giảm lượng cholesterol trong máu gây ảnh hưởng đến sự trao đổi glucoza.

Pectin còn có tác dụng để phòng bệnh táo bón, có chức năng như một chất giải độc, chất điều tiết và bảo vệ dạ dày. Nó có tác dụng như những chất kích thích đối với hệ thống miễn dịch và chống lại tác nhân gây bệnh lở loét, phù thận.

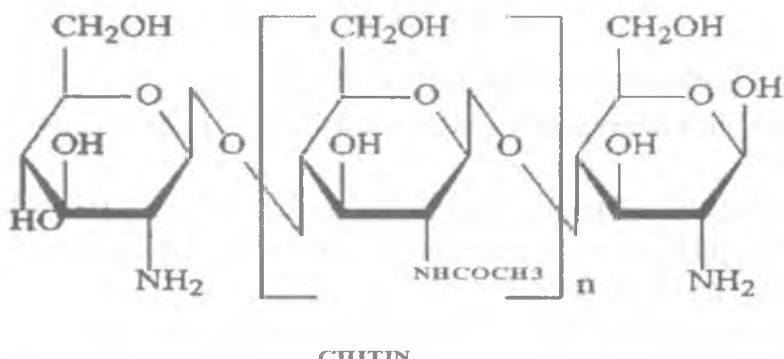
Trong pectin có sự hoạt động của hypocolesterolemic và antithrombotic giúp bảo vệ chống lai bệnh ung thư đại tràng.

3.3.2. Polysaccharit dōng vật – Chitin và chitosan

3.3.2.1. Nguồn gốc và cấu tạo của chitin/chitosan

Chitin và chitosan là polysaccharit gồm hơn 5000 gốc glucosamin và axetylglucosamin được sắp xếp có trật tự với khối lượng phân tử lên tới hàng triệu Da. Chitin có nhiều trong loài giáp xác như : tôm, cua, mai mực... Chitin còn tìm thấy trong thành tế bào nấm, nấm men, trong lớp vỏ cứng của côn trùng. Người ta biết rằng khoảng 50–80% các hợp chất hữu cơ trong vỏ động vật giáp xác và biểu bì của côn trùng có chứa chitin. Chitin là hợp chất được giáo sư Henry Braconnot (người Pháp) tách chiết từ tế bào nấm (fungine) vào năm 1811.

Chitin là một polyme thiên nhiên mạch thẳng, được cấu tạo bởi các đơn vị 2-acetamido 2-deoxy-D-glucoza liên kết với nhau bằng liên kết β -1,4 glucozit.

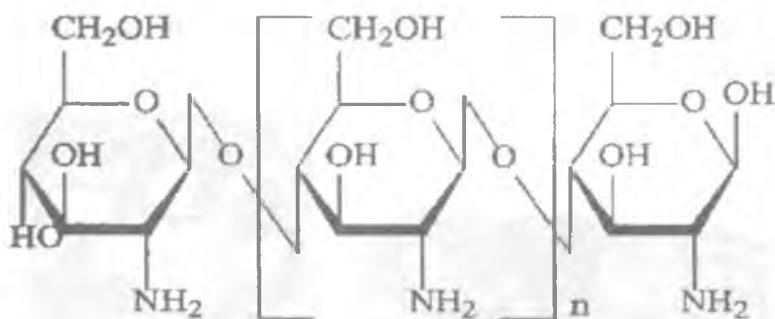


Hình 3.23. Cấu tạo chitin

Chitin có cấu trúc tinh thể rất chặt chẽ và đều đặn. Chitin tồn tại ở 3 dạng cấu trúc α , β , γ ... Các dạng này chỉ khác nhau ở sự sắp xếp các mạch phân tử trong tinh thể, α -chitin có hàm lượng lớn nhất và thường được tách từ vỏ tôm, vỏ cua... β -chitin được tách từ mai mực ống, còn γ -chitin có ít nhất, thường gặp ở sợi kẽm của bọ cánh cứng.

Chitin không tan trong nước, trong môi trường kiềm, axit loãng và các dung môi hữu cơ : ete, etanol... nhưng nó hòa tan trong dung dịch đặc và nóng của muối thioxianat liti (LiSCN) và thioxianat canxi ($\text{Ca}(\text{SCN})_2$) tạo thành dung dịch keo. Chitin tương đối ổn định với các chất oxy hoá khử : KMnO_4 , H_2O_2 , NaClO , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, ...

Chitosan là dẫn xuất quan trọng nhất của chitin. Chitosan được điều chế bằng cách tách gốc axetyl khỏi nhóm acetamit ở vị trí C_2 và hình thành nhóm amino nhờ phản ứng deaxetyl hoá chitin. Đơn vị cấu tạo chitosan : β -D glucosamin hay β -1-4 2-amino 2-desoxy D-glucoza.



Chitosan

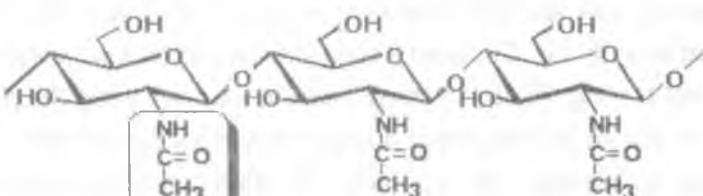
Hình 3.24. Cấu tạo chitosan

Chitosan có công thức phân tử $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4)_n$

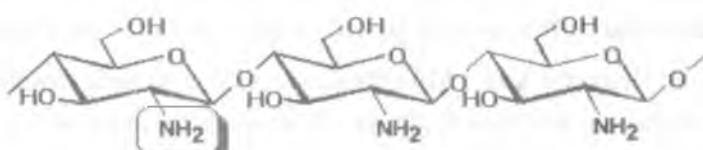
Thành phần nguyên tố hoá học : C : 44,72% ; H : 6,88% ; O : 39,71% ; N : 8,69%.

Trên thực tế, sự deaxetyl hoá xảy ra không hoàn toàn kể cả trong điều kiện khắc nghiệt nên trong chitosan vẫn chứa nhóm acetamit phụ thuộc vào mức độ deaxetyl khác nhau.

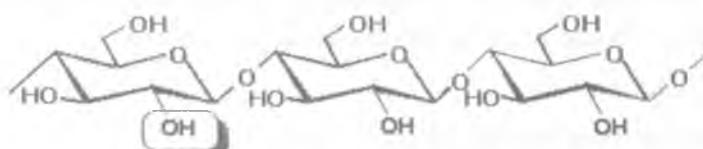
Người ta quy ước, nếu độ deaxetyl hoá DD<50% được gọi là chitin. DD \geq 50% gọi là chitosan. Khi DD=50% thu được chitin tan trong nước. Chitin, chitosan có cấu tạo tương tự như xenluloza chỉ khác nhóm chức ở C_2 của chitin là $-\text{NHCOCH}_3$, còn của chitosan là $-\text{NH}_2$.



Chitin



Chitosan



Xenluloza

Hình 3.25. So sánh cấu tạo của chitin, chitosan và xenluloza

3.3.2.2. Một số tính chất cơ bản của chitosan

a) Tính chất vật lý

Chitosan tồn tại ở thể rắn, xốp nhẹ có màu trắng hoặc vàng nhạt. Dạng bột hay dạng vảy, không mùi, không vị.



Hình 3.26. Các dạng bột, vảy của chitosan

– **Khả năng hòa tan :** Rất nhiều ứng dụng của chitosan liên quan tới thuộc tính hòa tan của chúng. Chitosan không hòa tan trong các dung môi hữu cơ, trong các axit ở nồng độ cao và trong kiềm, không tan trong dung dịch nước ở pH > 6. Chitosan chỉ hòa tan trong dung dịch axit loãng (pH = 4 – 6). Khi hòa tan tạo dung dịch trong suốt, keo sánh. Độ nhớt của dung dịch chitosan liên quan tới kích thước và trọng lượng trung bình của chuỗi polyme. Sự hòa tan phụ thuộc vào mức độ deacetyl hoá của các nhóm amin. Khi độ deacetyl hoá tăng, tính hòa tan cũng tăng. Độ hòa tan còn phụ thuộc cả vào những thông số khác như : pH, nồng độ polyme, nhiệt độ và tốc độ khuấy.

– **Mức độ deacetyl hoá :** Mức độ deacetyl hoá là mức độ chuyển hoá từ chitin sang chitosan, tức là mức độ chuyển hoá nhóm axetamit ($-\text{NHCOCH}_3$) sang nhóm chức amin ($-\text{NH}_2$).

Khối lượng phân tử trung bình của chitosan biến đổi 10000–1000000 Da tùy thuộc vào loại chitosan có nguồn gốc và phương pháp điều chế khác nhau. Chitosan có khả năng tạo phức với các ion kim loại.

b) Tính chất hóa học

Một số phản ứng hóa học chính của chitosan

– **Phản ứng Van-Wisslingh :** Chitosan phản ứng với I₂/KI cho màu nâu, khi có mặt H₂SO₄ chuyển thành đỏ tím. Đây là phản ứng của chitosan với liên kết β-1,4 glucozit được dùng để định tính chitosan.

– **Phản ứng cắt mạch :** Là quá trình cắt đứt liên kết β-1,4 bằng enzym chitinaza bằng dung dịch NaNO₂/H⁺ hoặc bằng tác nhân oxy hoá như H₂O₂, các peroxit. Giai đoạn đầu của quá trình cắt mạch là chitosan trương nở và hòa tan trong môi trường axit loãng. Tiếp theo mới là quá trình cắt đứt liên kết β-1,4 glucozit. Do đó, dung dịch chitosan càng để lâu độ nhớt và khối lượng phân tử càng giảm.

– **Sự khử amin :** Phản ứng khử amin có thể xảy ra bởi một số tác nhân oxy hoá như Ba(BrO)₂, AgNO₃, Al₂O₃, HNO₂...

– **Phản ứng sunphat hoá :** Phản ứng xảy ra bởi tác nhân SO₃ trong N,N-dimetyl-focmamit tạo thành sunphat este.

– **Phản ứng nitrat hoá :** Phản ứng xảy ra trong hỗn hợp alhydratetic/axit axetic và HNO₃ đậm đặc tạo nitrat este.

– **Phản ứng với H₂SO₄ :** tạo các tinh thể hình cầu chitosan sunphat.

c) Hoạt tính sinh học của chitosan

– Độc tính : Để dùng trong y tế và thực phẩm đã có nhiều công trình nghiên cứu về độc tính của chitosan. Từ năm 1968, K.Arai và cộng sự đã thử nghiệm và chứng minh với liều lượng LD = 16g/kg khối lượng cơ thể không gây độc cho người và động vật.

Chitosan là vật liệu có tính hoà hợp sinh học cao, là chất mang lý tưởng trong hệ thống chuyển tải thuốc, không những ứng dụng an toàn cho đường uống, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, dưới da mà còn cả trong cấy ghép mô.

– Tính kháng khuẩn và kháng nấm : Chitosan có khả năng kháng với cả vi khuẩn Gram⁺ và vi khuẩn Gram⁻. Tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm của chitosan được thử nghiệm với chitosan có khối lượng phân tử trung bình khác nhau, cho thấy chitosan có khối lượng phân tử từ 100000 – 300000 Da có tác dụng kháng khuẩn và nấm cao nhất.

– Tác dụng tăng sinh tế bào, kích thích làm liền vết thương : Chitosan có tác dụng kích thích các tổ chức mô phát triển, kích thích sự tăng sinh tế bào, đóng vai trò quan trọng đối với sự phát triển tái tạo và phục hồi các tổ chức mô, làm lành vết thương nhanh chóng.

Ngoài ra, chitosan còn có tác dụng chống viêm, tăng cường hệ thống miễn dịch cơ thể, hạn chế phát triển khối u và ung thư, bảo vệ tế bào, giảm lipit máu, giảm cholesterol.

3.3.2.3. Quy trình sản xuất chitosan

Chitosan là một dẫn xuất polyme cacbohydrat đã được biến hình từ chitin mà chitin là một thành phần có nhiều trong vỏ của loài giáp xác như : tôm, cua, mực ống... Vỏ của tôm, cua... sau quá trình chế biến hải sản tại các nhà máy thực phẩm được đem đi xử lý. Đầu tiên, người ta loại canxi bằng dung dịch axit clohydric loãng, sau đó loại protein bằng dung dịch NaOH loãng. Tiếp đến là quá trình làm mất màu trong dung dịch kali permanganat 0,5% và axit oxalic loãng hoặc điều kiện có ánh sáng mặt trời. Sản phẩm thu được sau quá trình này là chitin. Khi chitin được đun nóng trong dung dịch kiềm (40–50%) tại nhiệt độ cao (90–120°C) để loại bỏ nhóm axetyl và thay vào đó nhóm amin tạo nên chitosan có thể hòa tan được. Quy trình sản xuất chitosan được thể hiện ở sơ đồ sau :

Vỏ tôm, cua, mai mực → Loại canxi bằng dung dịch axit HCl loãng → Loại protein bằng dung dịch NaOH loãng → Loại màu bằng dung dịch KMnO₄ 0,5% và axit oxalic hoặc ánh sáng mặt trời → Chitin → Deaxetyl hoá chitin trong dung dịch NaOH (40–50%), nhiệt độ 90–120°C → Chitosan.

3.3.2.4. Một số ứng dụng của chitosan

Chitosan là những vật vật liệu có tính linh động cao và có thể thu nhận dễ dàng từ phế thải của ngành chế biến thuỷ sản. Chính vì vậy mà các ứng dụng của chúng ngày càng được mở rộng trong các ngành và các lĩnh vực khác nhau.

a) Trong xử lý nước thải

Ứng dụng sớm nhất của chitosan và các dẫn xuất là xử lý nước thải. Chitosan có khả năng tạo phức với kim loại như Cu, Pb, Hg, Cr trong nước thải. Năm 1973, Muzzarelli đã so sánh về tính hiệu quả tạo phức với ion kim loại chuyển tiếp của chitin và chitosan so với các polyme khác. Ông chỉ ra rằng, chitosan là một tác nhân tạo phức rất tốt và khả năng thu hồi các ion kim loại cũng cao nhất so với các polyme khác bởi chúng có chứa khá nhiều nhóm amin.

Chitosan cũng là tác nhân đông tụ và keo tụ rất tốt nhờ mật độ các nhóm amin cao trong chuỗi polyme. Các nhóm này có thể tương tác với các nhóm tích điện âm như : các chất màu, protein... Ví dụ : chitosan hoặc sợi xenluloza có thể hấp thụ được 264mg/g chất màu hoạt động và 421mg/g các chất màu axit có trong nước thải, lớn hơn khả năng hấp thụ của than đùa (<80mg/l).

b) Trong nông nghiệp

Chitosan có thể phân huỷ sinh học và không gây ô nhiễm môi trường. Vì thế nó có nhiều ứng dụng trong nông nghiệp. Chitosan có thể kích thích hạt này mầm và sự nở hoa, phòng trị nấm thực vật (bắp cải, lá chè, đậu), bệnh đạo ôn (cây lúa), làm tăng năng suất 10–30%. Chitosan còn được dùng để cải tạo đất làm phân bón cho cây trồng.

c) Trong công nghiệp thực phẩm

Chitosan được dùng để bảo quản đóng gói thức ăn, tạo màng chitosan trên quả tươi để bảo quản quả đào, lê, kiwi, cà chua, xoài, nho... kéo dài thời gian bảo quản nhờ tính kháng khuẩn, kháng nấm.

Chitosan được dùng để thay thế một số phụ gia thực phẩm như hàn the, fomcalin trong giò, chả, bún, miến, bánh cuốn... giảm tính độc hại mà vẫn đảm bảo độ giòn, độ dai.

Ngày nay, nhiều loại thực phẩm có bổ sung chitosan như bánh quy sữa, kem, các loại nước chấm, khoai tây chiên...

Chitosan được dùng để lọc trong các loại nước quả ép, bia, rượu vang, nước giải khát và làm ổn định màu thực phẩm.

Về độ an toàn của chitosan đã được Cục quản lý Dược và Thực phẩm Mỹ (Food and Drug Association) chấp nhận chitosan được dùng làm chất phụ gia trong thực phẩm và dược phẩm từ năm 1983. Chitosan cũng đã được tổ chức Y tế thế giới WHO (World Health Organisation) cho phép sử dụng trong y tế và thực phẩm.

d) Trong y học

Chitosan và dẫn xuất được dùng trong y học với các mục đích khác nhau :

- Dùng làm hoạt chất chính có tác dụng chữa bệnh (tăng sinh colagen trong điều trị bóng, hỗ trợ điều trị ung thư bằng hoá trị, xạ trị, chữa đau dạ dày, chống đông tụ máu).
- Dùng làm chất mang gắn thuốc có tác dụng phân giải chậm và kiểm soát được sự giải phóng thuốc trong cơ thể.
- Dùng làm thực phẩm chức năng để bồi bổ sức khỏe, giảm cholesterol trong máu, chống béo phì, giảm mỡ trong máu.
- Làm tá dược trong bào chế thuốc.
- Làm vật liệu y sinh : da nhân tạo, chỉ khâu tự tiêu, mổ, rãng giả, kính áp tròng, băng gạc cứu thương.

e) Trong công nghiệp hóa mỹ phẩm

Chitosan được bổ sung vào các loại kem dưỡng da làm tăng độ dính bám, giữ ẩm da, chống tia UV, làm mềm tóc, làm thuốc định hình tóc.

f) Ứng dụng trong các lĩnh vực khác

Chitosan còn được ứng dụng trong công nghiệp giấy làm tăng chất lượng của giấy, công nghiệp in tăng tính bền màu, công nghiệp chế biến gỗ, công nghệ điện tử, phim ảnh.

Trong công nghệ sinh học, chitosan được ứng dụng để cố định enzym, các tế bào vi sinh vật và làm chất mang trong sắc ký chọn lọc.

3.3.3. Polysaccharit vi sinh vật

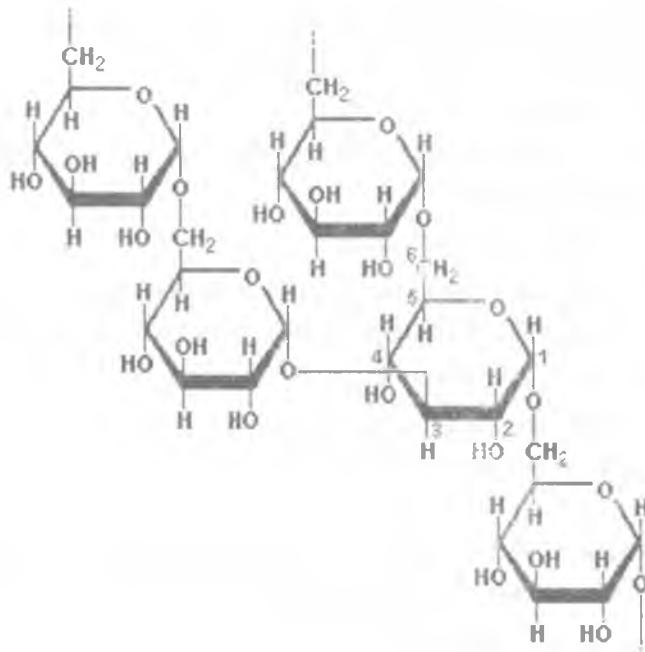
3.3.3.1. Dextran

Dextran là một polysaccharit phân nhánh, phức tạp, có cấu tạo từ những phân tử glucoza liên kết với nhau tạo thành chuỗi có chiều dài khác nhau.

Dextran có thể được thu nhận từ môi trường lên men đường saccaroza của chủng *Leuconostoc mesenteroides* B512F. Do có kích thước phân tử vừa phải và nhiều thuộc tính quý báu nên dextran được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như y dược, nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm. Trong lĩnh vực y học, dextran được ứng dụng chủ yếu làm tăng thể tích huyết tương, làm chất chống đông máu (anti-platelet). Dextran là thành phần chủ yếu cấu tạo nên Sephadex được ứng dụng rộng rãi trong kỹ thuật sắc ký. Đặc tính vật lý và hoá học của dextran phụ thuộc đặc tính từng chủng vi sinh vật được sử dụng và các điều kiện môi trường nuôi vi sinh vật, điều kiện phản ứng của phương pháp sản xuất dextran bằng enzym.

a) Cấu tạo dextran

Dextran là một polysaccharit của các gốc glucoza liên kết với nhau theo liên kết α -D-1,6 glucozit với mạch nhánh thường bắt đầu bằng liên kết α -1,3 (một số trường hợp là liên kết α -1,2 hoặc α -1,4). Mạch nhánh thường chứa 1 đến 2 gốc glucoza (hình 3.27). Mức độ phân nhánh khoảng 5%.



Hình 3.27. Một mảnh cấu trúc dextran

Mức độ phân nhánh giảm khi có sự thuỷ phân axit nào đó, mặc dù sự ảnh hưởng không thật sự rõ nét. Tỷ lệ giảm đi dựa trên cơ sở tính không ổn định của các liên kết 1,3 khi gấp mội trường axit so với liên kết 1,6.

Bảng 3.4. Sự phụ thuộc giữa mức độ phân nhánh và khối lượng phân tử

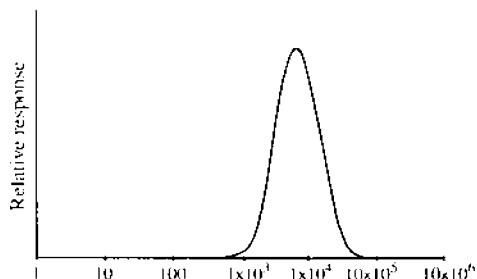
Dextran	Độ phân nhánh (%)
Dextran tự nhiên	4,6
Dextran 80	3,8
Dextran 10	3,0

b) Tính chất dextran

1. Tính chất lý học

* Khối lượng và kích thước phân tử

Khối lượng phân tử dextran nói chung thường vào khoảng 1000 – 2000000 Da. Dextran thường được viết kèm theo với các con số như 5, 10... Các con số này là khối lượng phân tử tính theo đơn vị KDa. Ví dụ dextran 10 là dextran có khối lượng phân tử là 10 KDa.



Hình 3.28. Đường cong phân bố khối lượng phân tử theo phương pháp sắc ký của dextran 10 KDa

Trong dung dịch, các phân đoạn dextran là các polyme rất linh động, trương nở và tồn tại dưới dạng cuộn xoắn. Đường kính phân tử của một vài phân đoạn dextran được nêu trong bảng 3.5.

Bảng 3.5. Đường kính phân tử (Stocke's radius) của dextran

$M_w \times 10^{-3}$	Đường kính phân tử (nm)
2000	27
1000	19,9
500	14,7
200	9,5
100	6,9
70	5,8
50	4,95
40	4,45
10	2,36

* *Khả năng hòa tan của dextran*

Dextran tan được trong nước và các dung môi điện phân, tạo thành dung dịch trong suốt và ổn định. Tuy nhiên, với những phân đoạn nhỏ 5 và 10, dung dịch thu được thường đặc biệt khi pha ở nồng độ cao. Hiệu ứng này có thể giảm bớt bằng cách đun sôi dung dịch ngay sau khi pha chế. Độ pH không ảnh hưởng nhiều đến khả năng hòa tan. Mức độ hòa tan có thể lên đến trên 50% (w/v).

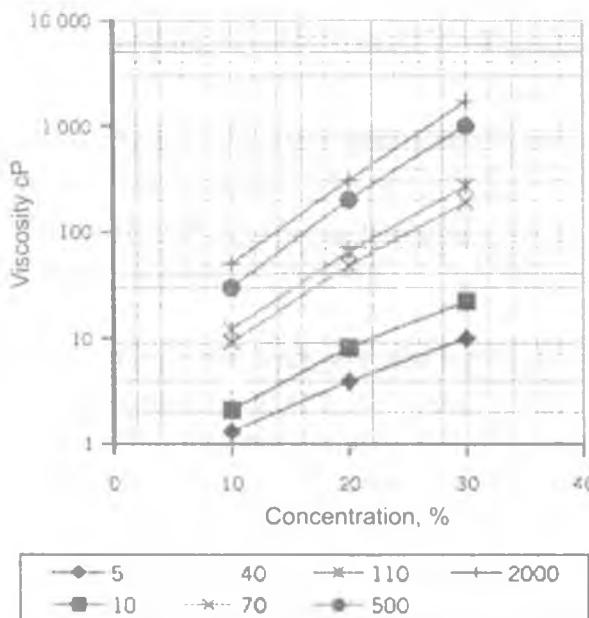
Dextran cũng tan trong các dung môi khác như methyl sunphit, formamit, etylen glycol và glyxerol. Dextran không tan trong rượu đơn chức như metanol, etanol izopropanol và hầu hết các xeton như axeton và 2-propanon.

* *Tính dễ lọc*

Dung dịch dextran dễ lọc bằng màng lọc. Dung dịch càng đặc càng cần màng lọc lớn hoặc áp suất cao để tăng tốc độ lọc. Tốc độ lọc cũng được tăng hơn khi tăng nhiệt độ của dung dịch. Kích thước các màng lọc phụ thuộc vào thể tích và nồng độ dung dịch dextran.

* *Độ nhớt của dung dịch dextran*

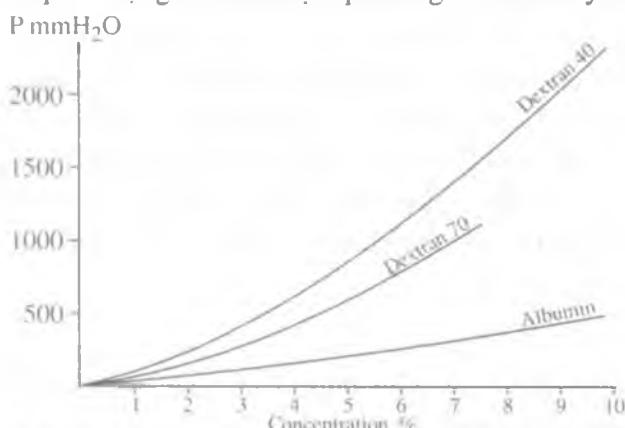
Dung dịch dextran có tính chất của chất lỏng Newton, khi ở nồng độ đậm đặc tốc độ dòng không phụ thuộc vào áp lực nén. Vì dextran là một polysaccharit trung tính nên độ nhớt của nó không bị ảnh hưởng nhiều bởi tác động của pH hoặc nồng độ các muối.



Hình 3.29. Sự phụ thuộc của độ nhớt của dung dịch dextran theo nồng độ ở 25°C

* Áp suất thẩm thấu keo của dung dịch dextran

Áp suất thẩm thấu keo là tính chất quan trọng trong nhiều ứng dụng của dextran. Ở cùng nồng độ, áp suất thẩm thấu phụ thuộc nhiều vào khối lượng phân tử (hình 3.30). Do dextran là polyme trung tính có khối lượng phân tử lớn nên nó khó thẩm qua màng các mô tế bào, nhờ đó nó duy trì áp suất thẩm thấu tốt hơn so với các muối khác. Áp suất thẩm thấu của dung dịch dextran là một thông số rất quan trọng để tính hiệu quả tăng thể tích huyết tương.



Hình 3.30. Đồ thị liên quan giữa áp suất thẩm thấu (mm nước) và nồng độ của dextran 40, dextran 70 và albumin

Áp suất thẩm thấu của dextran 70 cao hơn so với albumin cho thấy có sự tương tác cao giữa nước và dextran. Nước là dung môi tốt cho hòa tan dextran.

2. Tính chất hoá học

Khả năng tham gia phản ứng hoá học của dextran liên quan chủ yếu đến các nhóm hydroxyl ở xung quanh. Một phần nhỏ các nhóm hydroxyl của dextran (1,5%) có khả năng tham gia với các nhóm ngoài có đuôi không khử.

Nghiên cứu metyl hoá cho thấy dextran có độ hoạt động $k_2 : k_3 : k_4 = 8 : 1 : 3,5$.

Khi nghiên cứu metyl hoá một phần, với metyl α và β -D glucopyranosit và dẫn xuất thay thế ở vị trí 6-O- cho thấy độ hoạt động yếu của phia HO-3 không có liên quan đến tính chất polyme. Khi ion hoá phia HO-2 và HO-4, độ hoạt động của HO-3 bị giảm. Tuy vậy, thay thế HO-2 hoặc HO-4 làm mất ảnh hưởng này và làm tăng hoạt động của HO-3.

Độ hoạt động tương ứng của các nhóm hydroxyl đối với oxyetilen cũng gần giống như với quá trình metyl hoá. Ở mức độ thay thế mạnh hơn, các nhóm thế trở nên phức tạp và có thể tham gia vào vị trí hydroxyl chính.

Quá trình axyl hoá có thể khác với alkyl hoá, chúng có thể bị điều khiển quá trình thay thế nhờ nhiệt độ. Việc axetyl hoá dextran bằng axit axetic hoặc pyridin cho thấy $k_2 > k_3 = k_4$. Hệ số hoạt động này giống như khi metyl hoá bằng metyl β -D-glucopyranosit. Tuy vậy, axyl hoá được thực hiện trong môi trường dung dịch kiềm.

Nghiên cứu phân bố của các nhóm sunphat ở trong sunphat dextran, sử dụng dextran N-4 với cấu trúc tương tự dextran của chủng B-512 cho thấy HO-2 hoạt động cao hơn với các hệ số hoạt động $k_2 : k_3 : k_4 = 1,6 : 1,06 : 1,0$. Tỷ lệ các đơn vị thay thế 2 lần glucoza rất cao ngay cả khi mức độ thay thế thấp. Các nhóm carbonyl có thể tham gia vào dextran theo phản ứng Fenton, phản ứng với metyl sunphoxit/axetic anhydrit hoặc bằng dung dịch brom ở pH = 7. Với những chất vừa nêu, sự oxy hoá chủ yếu xảy ra ở C-2 (21%) và ở C-4 (25%). Khi metyl hoá bằng α -D-glucopyranosit thu được kết quả tương tự. Oxy hoá thực hiện khi có mặt borat sẽ kém hơn.

3. Tính bén của dextran

* Bột dextran

Dextran dưới dạng bột khô được bảo quản tốt trên 5 năm trong các thùng kín ở nhiệt độ thường. Bột dextran sẽ hút ẩm chậm khi nó bị để lâu ngoài không khí hoặc đựng trong các thùng không được dày kín.

* Dung dịch dextran và khả năng khử trùng

Dung dịch dextran có thể khử trùng bằng hơi nước. Dung dịch này giữ được ổn định trong nhiều năm khi được bảo quản ở nhiệt độ ổn định. Bảo quản thích hợp ở pH = 6–7. Tuy vậy, dung dịch vẫn bền khi bảo quản ở nhiệt độ môi trường ở pH = 4–10. Các kỹ thuật khử trùng khác như dùng tia phóng xạ có thể dẫn đến sự phân rã dextran.

Trong quá trình khử trùng bằng hơi nước, pH giảm nhẹ và dung dịch có màu hơi vàng, tuy nhiên tính chất của dextran và của dung dịch không bị thay đổi. Sự khử trùng hơi nước cũng không làm biến đổi sự phân bố khối lượng của dextran.

4. Tính tương thích sinh học

Dextran đã được sử dụng trong y dược học được hơn 50 năm cho thấy chúng rất an toàn và đảm bảo. Hầu hết các thử nghiệm an toàn được tiến hành với hai loại dextran 40 và dextran 70. Liều gây chết theo đường tiêm của dextran 70 là 55 g/kg thể trọng ở chuột, 18 g/kg ở thỏ và 10 g/kg ở chó.

Dextran có thể dùng theo đường uống, nó nhanh chóng làm tăng đường máu và mức độ glycogen ở gan. Dextran được dùng trong nhãn khoa, phụ khoa, có thể dùng ở dạng kem hoặc dạng mỡ.

5. Khả năng phân giải sinh học

Các enzym dextranaza từ nấm như *Penicillium* và *Verticillium* có khả năng phân giải dextran. Sản phẩm sau khi phân giải là các đường khối lượng phân tử thấp như glucoza, izomantoza.

Nhiều vi khuẩn cũng có khả năng tổng hợp các enzym ngoại bào dextranaza có thể phân cắt dextran thành các phân tử đường nhỏ hơn. Ví dụ: vi khuẩn *Lactobacillus*, *Cellvibrio*, *Cytophaga* và các vi khuẩn đất *Bacillus* spp. Do vậy, dextran có khả năng phân huỷ sinh học và các sản phẩm phân huỷ từ chúng dễ dàng được hấp thụ vào trong môi trường tự nhiên.

c) Sản xuất và chế tác dextran

Dextran được sản xuất ở nhiều nơi trên thế giới, cả ở những nước phát triển và đang phát triển. Sản lượng hàng năm ước tính vào khoảng 500 triệu tấn. Dextran dùng trong y dược và trong công nghiệp chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp lên men. Ở các nước phương Tây, chủ yếu sử dụng vi khuẩn *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) hoặc chủng B-512. Ở các nước còn lại, nhiều chủng khác nhau được sử dụng. Các nhà sản xuất chính hầu hết nuôi cấy vi khuẩn *Leuconostoc* trên môi trường có chứa đường

saccaroza. Dịch nuôi cấy có tính keo nhót sẽ được kết tủa trong etanol hoặc metanol, sau đó dextran tự nhiên được thuỷ phân trong dung dịch axit loãng và các dextran có khối lượng phân tử mong muốn được thu ở những phân đoạn khác nhau.

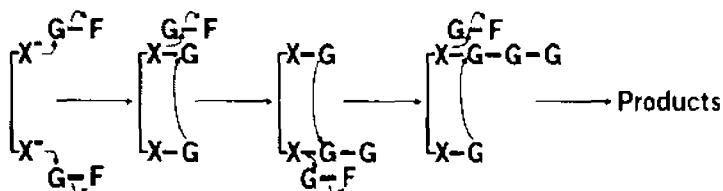
Chủng *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512, thuộc họ Lactobacillaceae, giống Leuconostoc và loài mesenteroides. Vì khuẩn này có dạng hình cầu hoặc hình trứng, khí không bắt buộc, gram⁺, ngoài dextran và axit lactic nó còn tạo ra các sản phẩm khác như etanol, mannitol, axit axetic...

Dextran được sản xuất bằng công nghệ hiện nay thường có khối lượng phân tử tương đối cao, dài phân bố khối lượng cũng khá rộng. Để thu được các dextran mong muốn có độ phân bố khối lượng trong dài hẹp đòi hỏi phải bổ sung vào quá trình sản xuất một số công đoạn, ví dụ : thuỷ phân bằng enzym, tách chiết bằng phương pháp sắc ký. Do vậy, giá thành của các chế phẩm polyme dextran loại này cũng sẽ phải tính đến các công đoạn này.

* Cơ chế tổng hợp dextran bằng enzym

Enzym xúc tác chuyển hoá saccaroza thành dextran là enzym dextransucraza, nó xúc tác sự tổng hợp dextran thông qua phản ứng : sucroza → dextran+fructoza. Sự thuỷ phân saccaroza cung cấp năng lượng cần thiết cho việc tạo thành các đơn vị D-glucopyranosyl. Phản ứng có thể diễn ra trong ống nghiệm mà không cần năng lượng hoặc các chất hỗ trợ, chỉ cần có mặt enzym và đường saccaroza.

Cơ chế tổng hợp dextran bởi enzym dextransucraza có thể được giả thiết bởi việc ban đầu enzym thuỷ phân đường saccaroza và bám vào nửa glucozyl, sau đó nó tổng hợp dextran bằng cách thêm dần các gốc đường.



Hình 3.31. Cơ chế tổng hợp dextran bằng enzym dextransucraza

G-F là một phân tử glucoza gắn với các phân tử fructoza.

G-G là phần đuôi glucoza liên kết α 1,6.

Vị trí gắn X của enzym có thể thay đổi.

Cơ chế này được bắt chước ở mức độ phân tử. Ditson và Mayer sử dụng enzym tinh chế dextranucraza từ *Streptococcus sanguis* ATCC-10558, cũng xác nhận rằng glucose được kết nối vào đầu khử của chuỗi tổng hợp. Bằng các thí nghiệm, họ đã giám định 80% hoạt tính enzym và dùng xung để tác động đến quá trình nối dài mạch. Các thí nghiệm này đã xác nhận lại giả thuyết nêu bởi Ebert và Patai rằng, cơ chế nối dài là chèn thêm các đơn phân.

* Lên men sản xuất dextran

– Ánh hưởng của pH : Hoạt tính tổng hợp dextran cao nhất ở pH = 5,2. Đây là pH thấp hơn pH tối ưu để nuôi cấy chủng sản xuất enzym. Enzym cũng duy trì độ bền tốt nhất ở dải pH = 5–6,5. Độ bền của enzym còn tùy thuộc sự có mặt của các cơ chất khác. Trong quá trình lên men, pH giảm từ 7,2 xuống còn 5 sau 20 giờ tạo ra các axit tự do, làm môi trường thích hợp cho tổng hợp dextran.

– Nồng độ saccharose : Ở nồng độ dưới 2% saccharose, rất ít dextran được tạo thành. Nồng độ cao hơn làm tăng lượng dextran và ảnh hưởng đến sự phân bố khối lượng và cấu trúc của dextran. Tăng nồng độ sucroza trong khoảng 0,5–5% làm tăng lượng dextran tạo thành. Ở nồng độ cao hơn (10–50%), lượng dextran cao phân tử giảm đáng kể, lượng dextran khối lượng phân tử thấp lại tăng lên.

Ở nồng độ cao hơn 20–25% thì nồng độ saccharose tăng lên sẽ không làm tăng lượng dextran.

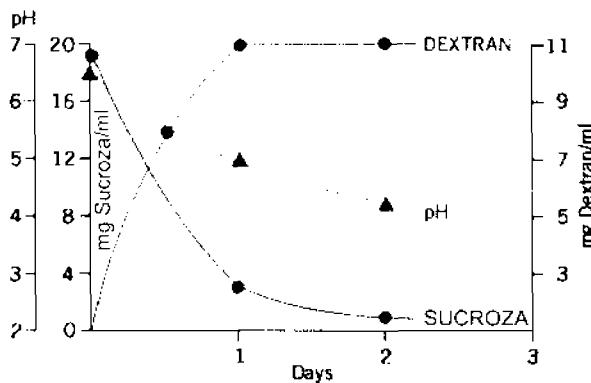
– Nhiệt độ : Nhiệt độ lên men có thể ảnh hưởng đến lượng dextran cao phân tử, lượng tạo thành, cấu trúc dextran. Lượng dextran cao phân tử giảm đi khi nhiệt độ hạ thấp từ 25°C đến 4°C đồng thời làm tăng lượng dextran thấp phân tử. Tuy nhiên, tổng sản lượng thì không thay đổi.

Bảng 3.6. Ánh hưởng của nhiệt độ đối với khối lượng phân tử của dextran

Nhiệt độ	Dextran tổng số (%)	Dextran thấp phân tử (%)	Dextran cao phân tử (%)
30	45,9	21,2	24,7
15	47,4	43,4	4,0
4	47,2	45,9	1,3

– Canxi : Khi bổ sung 0,001–0,1% canxi clorit thì lượng enzym tạo thành khi lên men sẽ tăng gấp đôi. Hoạt tính của enzym ở nồng độ canxi clorit 0,005 – 0,05% cũng tăng gấp đôi. Tuy nhiên, khả năng hòa tan của canxi hydrogenphosphate trong nước chỉ vào khoảng 31 mg/100 ml. Thực tế, người ta phải lọc bỏ cặn canxi sau khi bổ sung phosphate.

– Thời gian : Khác với một số chủng *Leuconostoc* khác, chủng B-512 khi kéo dài thời gian nuôi cấy sẽ làm giảm khối lượng phân tử của dextran. Khi duy trì lên men hơn 273 giờ, khối lượng phân tử trung bình còn 8,6 triệu Da so với khối lượng phân tử trung bình là 39 triệu Da sau 23 giờ lên men. Tổng lượng dextran tạo thành thì không thay đổi.



Hình 3.32. Động học quá trình lên men dextran của *Leuconostoc mesenteroides*

* Chế tác dextran

Để thu được các dextran mong muốn, dịch canh trường lên men trên tiếp tục phải trải qua thêm 2 công đoạn sau :

- Thuỷ phân tách phân đoạn các dextran tự nhiên để tạo ra các dextran có khối lượng phân tử khác nhau.
- Tách phân đoạn dextran bằng etanol hoặc metanol.

Sau khi thuỷ phân, các phân đoạn được kết tủa trong etanol 39–46% ; quá trình kết tủa phân đoạn đòi hỏi nhiệt độ chính xác. Ở điều kiện phân đoạn là 20°C, lượng dextran kết tủa là 20% và có khối lượng phân tử là 32400 Da, tương ứng ở 30°C là 33% và 47600 Da. Nhiệt độ dưới 20°C tạo ra các dextran có tính ứng dụng thấp.

d) Ứng dụng

1. Dextran

Các loại dextran ở mức độ y tế (clinical grade dextran) thường được sử dụng cho dược phẩm hoặc các chất dẫn thuốc.

Dextran 70 chủ yếu dùng ở dạng dung dịch 6% cùng với muối sinh lý để làm chất tăng thể tích huyết tương, được chỉ định trong các trường hợp choáng, xuất huyết, bóng, phẫu thuật, nhãn khoa. Dextran 70 làm giảm nguy cơ huyết khối.

Dextran 40 là dung dịch dextran có khối lượng phân tử thấp. Dung dịch có tác dụng làm tăng nhanh thể tích tuần hoàn. Tác dụng duy trì thể tích kéo dài trong 3–4 giờ. Dung dịch có tác dụng cải thiện vi tuần hoàn, đề phòng huyết khối mà không ảnh hưởng lên loại nhóm máu. Nhờ khả năng gắn với nước mạnh mẽ dextran khối lượng phân tử thấp cải thiện các tính chất lưu biến của máu và vì thế có tác dụng đặc hiệu lên vi tuần hoàn : tăng cấp dịch vào mô, tăng cung cấp oxy cho mô dẫn đến làm loãng máu, giảm độ quánh của máu, tăng cung lượng tim và giảm sức cản ngoại biên.

Trong lĩnh vực công nghệ sinh học, dextran được sử dụng trong sác ký ray phân tử mà mạng lưới được thiết lập nhờ các lớp gel dextran liên kết chéo với nhau.

Trong công nghiệp nhiếp ảnh, dextran T (Technical grade Dextran (T-Dextran)) có độ tinh sạch cao được sử dụng để cải thiện chất lượng nhũ bạc của ảnh.

2. Dextran sunphat

* *Cấu trúc*

Dextran sunphat tồn tại dạng muối natri, có khả năng tan tốt trong nước và ổn định trong dung dịch với nước. Dextran sunphat chứa khoảng 17% sunphua tương đương với khoảng 2,3 nhóm sunphat trong mỗi phân tử glucoza. Bản thân dextran là một polyme nhóm anhydroglucoza. Nó cấu tạo gồm khoảng 95% liên kết α -1,4 glucozit. Còn lại là 5% liên kết 1,6 – glucozit giúp dextran có cấu trúc mạch nhánh.

* *Sản xuất*

Các dextrans được sản xuất từ chủng vi sinh vật *Leuconostoc mesenteroides* B512. Các phân tử dextran khối lượng phân tử khác nhau được sản xuất theo

phương pháp thuỷ phân có giới hạn và phương pháp phân đoạn ngắn. Quá trình este hoá với axit sunphuric được thực hiện trong các điều kiện nhẹ nhàng.

* *Tính ổn định*

Nếu được bảo quản đúng trong điều kiện phù hợp, nhiệt độ phòng thì dextran sunphat dạng bột duy trì tính chất ban đầu trong ít nhất 2–3 năm.

* *Tính tan*

Các thử nghiệm của dextran sunphat tan trong nước ở mức hoà tan 100mg/ml, kết quả thu được các dung dịch trong suốt. Các dung dịch đậm dextran sunphat bão hoà có thể chịu được điều kiện khử trùng bằng hơi nước ở 110–115°C trong 30–45 phút.

Dextran có thể bị thuỷ phân bởi dung dịch axit mạnh ở nhiệt độ cao. Dextran sunphat có ái lực với ion canxi mạnh hơn ion natri. Muối canxi của dextran sunphat không tan trong nước. Dạng dextran sunphat axit tự do thường có tính axit cực mạnh và tự động thuỷ phân nhanh chóng trong dung dịch và thường tồn tại ở dạng bột.

* *Ứng dụng của dextran sunphat*

– Tách và tinh sạch các lipoprotein : Dextran sunphat thường được dùng cho kết tủa có chọn lọc các lipoprotein. Khi có mặt dextran sunphat (khối lượng phân tử 15000) ở nồng độ 0,05% và $MnCl_2$ nồng độ 0,05M, một số lipoprotein sẽ kết tủa. Nếu tăng nồng độ cuối cùng của dextran sunphat lên đến 0,65% và $MnCl_2$ lên đến 0,2M sẽ dẫn đến sự kết tủa tiếp tục các lipoprotein khác. Dextran sunphat (khối lượng phân tử 500000) đã được sử dụng trong các phương pháp để xác định cholesterol.

– Thuỷ phân : Nồng độ dextran sunphat vào khoảng 10% có tính chất kích thích sự thuỷ phân các mẫu dò trên màng cő định ADN. Người ta thường dùng các dextran sunphat với khối lượng phân tử 500000 của Sigma (Sigma Prod. No. D8906) cho các ứng dụng này.

Các ứng dụng liên quan đến axit nucleic khác : Dextran sunphat có tính chất làm giải phóng ADN ra khỏi các phức hợp ADN-histon. Dextran sunphat cũng có tính kìm hãm sự gắn ARN vào riboxom. Dextran sunphat cũng được coi là có thể ứng dụng làm chất kìm hãm các enzym nucleaza inhibitor được sử dụng để tách các riboxom.

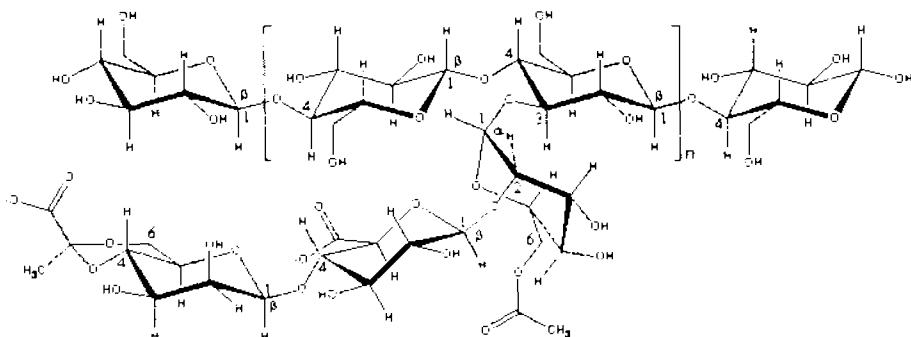
– Các ứng dụng khác của dextran sunphat : Dextran sunphat được dùng nhiều cùng với polyetylen glycol để tách pha các vi sinh vật (vi khuẩn, virus) và các phân tử protein, axit nucleic. Các ảnh hưởng đến sự sinh sản của tế bào cho thấy nó tạo thành các dạng phức hợp không tan với fibrinogen. Dextran sunphat cũng được nghiên cứu cho thấy có tính kết dính virus và kim hàn sự bám của virus vào các tế bào đích.

3.3.3.2. Xanthan gum (gồm xanthan)

Trong các polysaccharit ngoại bào được sản xuất ở quy mô công nghiệp như alginat từ *Azotobacter vinelandii*, xanthan từ *Acetobacter xylium*, curdlan từ *Alcaligenes faecalis var.*, dextran từ *Leuconostoc mesenteroides*, axit hyaluronic từ *Streptococcus zooepidemicus*, levan từ *Aerobacter levanicum*, pululan từ *Pullularia pullulans*, scleroglucan từ *Sclerotilum glucanicum*, xanthan gum từ *Xanthomonas campestris* thì xanthan gum là sản phẩm công nghiệp chủ yếu và hiện đang được sử dụng rộng rãi nhất.

a) Cấu trúc xanthan gum

Cấu trúc bậc 1 của xanthan gum được tạo thành từ một chuỗi gồm các gốc glucoza liên kết với nhau bởi các liên kết β (1-4) (hoàn toàn giống như trong phân tử xanthan) và gồm nhiều chuỗi bên. Phân tử xanthan gum được cấu tạo từ các đơn vị cấu trúc lặp lại, mỗi đơn vị cấu trúc lặp lại của phân tử xanthan gum gồm 5 gốc đường – pentam, trong đó có 2 gốc glucoza trong chuỗi chính và 3 gốc đường khác trong chuỗi bên. Trong mỗi chuỗi bên, gốc mannoza thứ nhất liên kết với gốc glucoza thứ hai trong đơn vị lặp lại của chuỗi chính bởi liên kết α (1-3). Tiếp theo, gốc axit glucuronic liên kết với gốc axit glucuronic bởi liên kết β (1-2), gốc mannoza thứ hai trong chuỗi bên liên kết với gốc axit glucuronic bởi liên kết β (1-4). Các gốc mannoza thứ nhất trong chuỗi bên được thế ở vị trí C₆ bởi nhóm acetyl, hệ số thế của nhóm acetyl chiếm khoảng 98% số gốc mannoza. Khoảng 1/2 hoặc 2/3 gốc mannoza ở cuối chuỗi bên liên kết với các nhóm pyruvat dạng enol, số lượng nhóm pyruvat trong chuỗi bên dao động phụ thuộc vào điều kiện lên men, trung bình chiếm khoảng 67% số gốc mannoza cuối.



Hình 3.33. Cấu tạo của xanthan gum

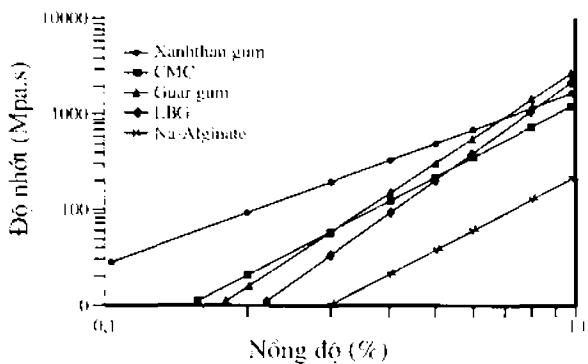
Những đột biến gây ra những thay đổi ở chuỗi bên của phân tử xanthan gum, chuỗi bên có thể bị ngắn lại, mất gốc mannoza hoặc mất luôn cả gốc glucuronic, tạo thành chuỗi polytrime với số gốc mannoza còn lại được axetyl hoá với mức độ khác nhau (đang xanthan gum giả). Thế đột biến có thể thiếu nhóm axetyl hoặc nhóm pyruvat hoặc cả hai nhóm này. Những biến tính hóa học tạo ra nhiều sản phẩm từ xanthan gum, trong đó quan trọng nhất về mặt lý thuyết có các xanthan gum không chứa các nhóm axetyl và pyruvat.

Các giá trị khối lượng phân tử trung bình (M_w) của xanthan gum dao động trong khoảng $6,3 \cdot 10^6 - 8,8 \cdot 10^6$ g/mol phụ thuộc vào nồng độ oxy hòa tan trong môi trường lên men.

b) Tính chất của xanthan gum

* Độ nhớt

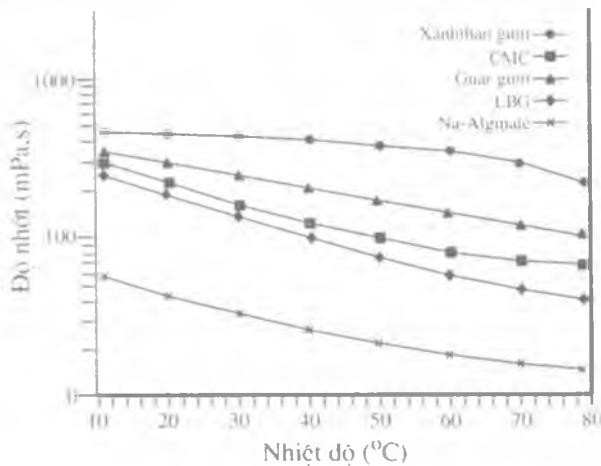
Xanthan gum thường có độ nhớt cao hơn so với các polyme khác như CMC, guar gum, tinh bột, alginat... khi chúng ở cùng một nồng độ (hình 3.29).



Hình 3.34. Sự liên quan giữa độ nhớt và nồng độ

(Trong dung dịch nước máy tiêu chuẩn ở 25°C , tốc độ khuấy 60v/ph, nhớt kế Brookfield LVT)

Độ nhớt khác thường và tính nhớt dẻo động của dung dịch xanthan gum trong nước khi nhiệt độ gia tăng có thể là do sự tồn tại của các liên kết hydro nội phân tử và giữa các phân tử. Xanthan gum giữ được độ nhớt hầu như ổn định trong khoảng nhiệt độ khá rộng ($10\text{--}70^{\circ}\text{C}$) (hình 3.35)



Hình 3.35. Sự biến động độ nhớt theo nhiệt độ
(Nồng độ các dung dịch thử 0,5%, tốc độ khuấy 60v/ph, nhớt kế Brookfield LVT)

* Tính lưu biến của xanthan gum

Dung dịch xanthan gum trong nước có tính giả dẻo cao, độ nhớt của dung dịch giảm dần khi tốc độ trượt tăng. Khi trở lại trạng thái tĩnh, giá trị độ nhớt ban đầu được khôi phục ngay lập tức. Tính chất này tồn tại do sự tạo thành những kết tập phân tử phức tạp nhờ các liên kết hydro và do các đại phân tử sắp xếp thành các sợi rối trong dung dịch. Mạng lưới có trật tự cao này của xanthan gum trong dung dịch nước làm cho dung dịch có tính bắn rắn và do đó, dung dịch xanthan gum có độ nhớt cao ở các tốc độ trượt thấp, dung dịch có tính ổn định huyền phù cao. Tính loãng trượt (tính son – gel thuận nghịch, tính xúc tiến – thixotropy) của dung dịch xanthan gum trong nước là kết quả của quá trình tan rã hệ thống mạng lưới polyme và sự sắp xếp lại các phân tử polyme theo hướng tác dụng của lực trượt. Cấu hình trật tự của xanthan gum được duy trì nhờ các liên kết hydro, đồng thời trong phân tử xanthan gum còn có lực đẩy giữa các nhóm tích điện ($-$) ở những chuỗi bên gối lên nhau. Ở nồng độ các chất điện ly thấp, độ trật tự trong phân tử xanthan gum được tăng cường vì các chất điện ly làm giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các nhóm anion ở chuỗi bên. Cấu trúc xoắn ốc ổn định của

xanthan gum trong dung dịch được duy trì ngay cả khi nhiệt độ gia tăng làm cho độ nhớt của dung dịch giảm không nhiều ở các nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy. Cấu trúc xoắn ốc chắc chắn của xanthan gum làm cho độ nhớt của dung dịch có tính ổn định tương đối cao ở các giá trị khác nhau của cường lực ion và pH. Cách sắp xếp của các chuỗi bên trong phân tử xanthan gum song song một chiều với chuỗi chính và gối lên nhau là nguyên nhân của tính bền thuỷ phân axit, kiềm và enzym. Chính vì có các cấu trúc chắc chắn của hệ sợi polyme nên xanthan gum có tính chất giả gel ngay cả ở những nồng độ 500 – 5000 ppb.

c) *Sinh tổng hợp xanthan gum*

* *Chúng vi khuẩn*

Một số loại *Xanthomonas* riêng rẽ được biết từ trước năm 1990 có khả năng tạo ra những khuẩn lạc nhỏ. Cho đến thời gian trước năm 1967 đã có hơn 100 loài *Xanthomonas* được thông báo. Chúng là những vi khuẩn gram⁻ hình que có kích thước $0,7\text{--}3\mu\text{m} \times 0,4\text{--}0,5\mu\text{m}$, đôi khi hơi cong hoặc phình ra thành dạng chuỳ, tạo chuỗi trong môi trường đường tạo nang không bào tử, có thể có một đỉa mao. Khuẩn lạc có màu vàng nhạt. Vi khuẩn gây bệnh đèn rẽ ở các thực vật họ hoa chữ thập, phát triển trong các đường ống dẫn của thân rễ lá. Chúng thuộc nhóm vi khuẩn oxy hoá và có khả năng oxy hoá đường mạnh hơn *Pseudomonas*.

* *Điều kiện lên men*

Trong tổng hợp xanthan gum, đối với mỗi chủng, các yếu tố có thể điều chỉnh được là hiệu suất lên men, khối lượng phân tử trung bình, hàm lượng các gốc pyruvat và hàm lượng các gốc axetat. Độ dao động trong tính chất của xanthan gum còn biểu hiện ở chỉ số đa phân tán của khối lượng phân tử. Mức độ dao động của các yếu tố trên phụ thuộc vào các điều kiện như trạng thái sinh lý của tế bào, thành phần môi trường lên men, pH, nhiệt độ, oxy hóa tan, độ đồng nhất của dịch lên men, tốc độ pha loãng trong lên men liên tục và thời gian lên men.

– **Ảnh hưởng của pH :** Nhìn chung xanthan gum có thể được tổng hợp trong khoảng pH = 6–7,5 và nhiệt độ 28–31°C với chế độ kiểm soát oxy hóa tan khá nghiêm ngặt ở các nồng độ cao. Trong những nghiên cứu đầu tiên để tổng hợp xanthan gum, pH hoàn toàn không được điều chỉnh trong quá trình lên men nên hiệu suất lên men thấp. Nếu không điều chỉnh pH, chỉ có thể sử

dụng môi trường lên men chứa 2% glucoza, trong khi điều chỉnh pH có thể sử dụng môi trường 5% glucoza. Sử dụng kỹ thuật khống chế pH có thể giảm được nồng độ các chất đệm như K_2HPO_4 xuống tối thiểu, bảo đảm không ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm. Hầu hết các quá trình lên men tổng hợp xanthan gum gần đây được thực hiện với kỹ thuật điều khiển pH tự động ở giá trị 7,0 trong suốt quá trình lên men. Khoảng pH = 6–7,5 là khoảng tối ưu cho tế bào vi khuẩn phát triển, còn đối với tổng hợp xanthan gum và chỉ số độ quánh của dịch lên men thì khoảng pH = 7–8 là tối ưu.

– **Ảnh hưởng của nhiệt độ :** Nhiệt độ tổng hợp xanthan gum thường được duy trì ở 30°C . Hàm lượng pyruvat của xanthan gum tổng hợp ở các nhiệt độ khác nhau dao động trong khoảng 1,9–4,5%, với giá trị cực đại ở khoảng nhiệt độ $27\text{--}30^{\circ}\text{C}$. Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng của tế bào ở khoảng $24\text{--}27^{\circ}\text{C}$, còn nhiệt độ tối ưu cho quá trình tạo thành xanthan gum khoảng $30\text{--}33^{\circ}\text{C}$.

– **Ảnh hưởng của oxy và khuấy cơ học :** Khi độ nhớt tăng cao trong quá trình lên men làm giảm hệ số trao đổi chất đối với oxy và một phần nào đó dẫn đến giới hạn oxy của tốc độ tổng hợp xanthan gum. Tính toán chính xác khả năng trao đổi oxy của thiết bị lên men rất quan trọng đối với sản xuất xanthan gum vì nó quyết định tốc độ tổng hợp tối đa của polysaccharit này, đặc biệt là đối với khối lượng phân tử, một trong các yếu tố quan trọng quyết định hiệu suất độ nhớt. Để đảm bảo hiệu suất, sản lượng và chất lượng sản phẩm xanthan gum, các quy trình sản suất thường được thực hiện ở các tốc độ khuấy cao và tốc độ khuấy được tăng dần theo độ nhớt, bảo đảm cho nồng độ oxy hòa tan trong dịch lên men được duy trì ở giá trị tương đối ổn định. Trong thiết bị lên men dung tích 8 lít có tỷ lệ đường kính cánh khuấy/đường kính trong của thùng lên men bằng 0,63, để duy trì tốc độ oxy hòa sunphit lớn hơn $1,5\text{mMO}_2/\text{lít/phút}$, tốc độ khuấy trong quá trình lên men phải tăng từ 500v/ph lên 900v/ph, trong khi độ nhớt của dịch lên men ở giai đoạn kết thúc đạt tới 15000cp (khi đo với tốc độ 30v/ph bằng nhớt kế Brookfield LVT). Trong khi, nồng độ oxy hòa tan ở khoảng 20–90% bão hòa không khí không ảnh hưởng lên tốc độ tổng hợp của xanthan gum. Quá trình sinh trưởng của tế bào vi khuẩn bị hạn chế bởi các tốc độ khuấy dưới 200v/ph. Khi dải tốc độ 200–800v/ph được khảo sát với thiết bị lên men 15 lít với tỷ lệ cánh khuấy 0,63, hiện tượng giới hạn oxy của tốc độ tổng hợp xanthan gum tồn tại ngay cả với các tốc độ 200–600v/ph. Các giới hạn này

xuất hiện vào thời điểm khác nhau trong quá trình lên men, phụ thuộc vào độ nhớt và tốc độ khuấy. Giá trị của khối lượng phân tử trung bình và hiệu suất tổng hợp tăng theo tốc độ khuấy. Ở tốc độ khuấy 200v/ph chỉ thu được $6,3\text{g/l}$, khối lượng phân tử trung bình tương ứng là $6,9 \cdot 10^{-6}\text{g/mol}$ và $3,6 \cdot 10^{-6}\text{g/mol}$. Ở tốc độ khuấy 400v/ph, khi bổ sung thêm oxy để khắc phục giới hạn oxy, giá trị của khối lượng phân tử trung bình và hiệu suất tổng hợp của xanthan gum còn tăng cao hơn nữa, $8,8 \cdot 10^{-6}\text{g/mol}$ và $18,9\text{g/l}$ tương ứng.

d) *Ứng dụng của xanthan gum*

Vì tính lưu biến đặc biệt thích hợp nên xanthan gum được sử dụng rộng rãi như tác nhân tạo huyền phù ổn định và gây đặc trong công nghiệp thực phẩm, trong chế biến nguyên liệu làm bánh kẹo, các đồ uống từ hoa quả, các gia vị, nước sốt, các loại kem. Trong dược phẩm và mỹ phẩm, xanthan gum được sử dụng như tác nhân ổn định huyền phù cho các chất không tan, chất tạo nhũ tương cho pha dầu, chất gây kết dính.

Xanthan gum được sử dụng để nghiên cứu sản xuất chế phẩm điều biến miễn dịch (Immunostimulant). Bản thân xanthan gum không trực tiếp tiêu diệt các tế bào ung thư nhưng nó có tăng cường tính miễn dịch của động vật. Tính miễn dịch được hoạt hoá bởi xanthan gum rất có hiệu quả trong chữa các bệnh do virus, và vi khuẩn gây ra. Xanthan gum còn được sử dụng trong nhiều lĩnh vực sản xuất khác nhau như sản xuất các chất tẩy rửa, sản xuất thuốc diệt nấm, diệt cỏ, trong in vải, sản xuất giấy, chữa cháy rừng, làm chai trơ tua keo tụ...

Đặc biệt trong nghiên cứu khoa học, sản phẩm nổi ngang của xanthan gum là các hợp chất không tan trong nước đã được sử dụng như những giá mangan để định enzym và các chất có hoạt tính sinh học khác như coenzym, chất ức chế, các cơ chất và các axit amin. Một số thể liên kết của xanthan gum (Conjugates) được sử dụng với chức năng của các phối tử (Ligands) trong sắc ký ái lực. Các ion kim loại như kẽm, đồng, coban khi gắn vào một thể liên kết trên được sử dụng để tách các protein khác nhau bằng sắc ký chelat kim loại. Xanthan gum chứa các nhóm cacboxyl nên các dẫn xuất không tan trong nước của nó còn có thể được sử dụng trong sắc ký trao đổi ion. Khi trộn một dung dịch chứa xanthan gum hoặc dẫn xuất của nó và enzym với một dung dịch chứa các ion kim loại hoá trị III để tạo ra các mồi không tan của xanthan gum hoặc dẫn xuất của nó thì các enzym

được cố định sẽ không tan trong nước hoặc các dung môi hữu cơ có thể được sử dụng lại nhiều lần trong khi vẫn giữ được hoạt tính của enzym. Vì các chất mang dạng này bền nhiệt nên có thể sử dụng các enzym cố định cho các phản ứng ở nhiệt độ cao.

Xanthan gum được đề xuất cho sử dụng để pha chế các chất chống ăn mòn rất có hiệu quả. Đặc biệt là xanthan gum có thể được sử dụng để sản xuất các chất hoạt động bề mặt xử lý cặn dầu mỏ.

So sánh tính cấu trúc, tính lưu biến, tính chịu nhiệt, axit và bền trượt, độ nhạy cảm đối với muối của các polyme thường được sử dụng trong khoan, sửa chữa và hoàn thiện giếng dầu (CMC, GUAR, tinh bột, polyacrylamit, polyamylat, các dẫn xuất của malic anhydrit...), cho thấy tính ưu việt nổi bật của xanthan gum. Dung dịch xanthan gum trong nước là một hệ cấu trúc mạng lưới do các phân tử đan chéo lên nhau, có tính tạo huyền phù rất cao, do đó nó được sử dụng để pha chế các dung dịch nhẹ và các dung dịch có hàm lượng các chất keo thấp, ví dụ như Bentonit. Các dung dịch loại này thường được thiết kế cho sửa chữa và hoàn thiện giếng khoan. Các hệ dung dịch khoan xanthan gum luôn có tính nhớt dẻo, vì thế bảo đảm cho hiệu quả thuỷ lực của các dung dịch, làm giảm mức mất áp suất trong ống khoan, bảo đảm cung cấp áp suất thuỷ lực tối đa cho mũi khoan.

3.4. Công nghệ một số chất ngọt thay thế

3.4.1. Xylitol

- Xylitol là một rượu 5 cacbon, được sử dụng như một nguồn chất ngọt thay thế cho đường.
- Xylitol là hydropentacacbon có dạng tinh thể pha lê, bột màu trắng. Nó đã được phân loại như một loại đường.



Hình 3.36. Tinh thể xylitol

– Xylitol có thể được tìm thấy nhiều trong tự nhiên như : quả dâu tây, quả mận, ngô, yến mạch, nấm. Nó có thể được chiết xuất từ cây bu lô, quả mâm xôi, bã mía, lõi ngô, ngũ cốc. Xylitol có vị ngọt của đường nhưng chứa calo ít hơn so với đường (một thìa cà phê xylitol chứa 9,6 calo, còn một thìa đường chứa 15 calo) và không có vị chát sau khi ăn.

– Trong cơ thể người, xylitol được sản sinh ra qua quá trình trao đổi chất bình thường (khoảng 15g/ngày từ các loại thực phẩm khác nhau). Nó được hình thành từ đường 5 cacbon xyloza ("Xyl" trong tiếng Hy Lạp có nghĩa là gỗ).

3.4.1.1. Lịch sử xylitol

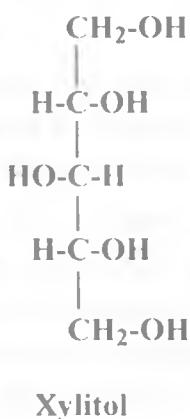
– Xylitol được phát hiện bởi nhà hoá học người Đức Emil-Fischer vào năm 1891. Xylitol sau đó đã không được chú ý đến nhiều cho tới khi sự thiếu đường nghiêm trọng xảy ra tại Phần Lan trong đại chiến Thế giới thứ hai. Khi lượng đường sản xuất ra trong nước không đủ để cung cấp thì các nhà nghiên cứu người Phần Lan phải đi tìm nguồn chất ngọt khác để thay thế đường. Chính vì vậy mà xylitol thu được đầu tiên từ cây bu lô (Birch trees) tại Phần Lan vào thế kỷ XIX và cũng là đầu tiên được sản xuất rộng rãi ở châu Âu như một chất ngọt an toàn cho bệnh đái tháo đường khi không có sự tác động cân bằng của insulin. Cuối thế kỷ XX, xylitol dạng hạt bắt đầu được sản xuất sinh khối ở Mỹ (United states) dưới nhãn hiệu "chất ngọt chủ yếu" từ cây củ cải đường (beet plants) ở California. Ngày nay, nguồn nguyên liệu chủ yếu là ngũ cốc được cung cấp từ Trung Quốc.

– Những năm 1960, xylitol đã được dùng ở Đức, Thụy Sỹ, Liên Xô (cũ), Nhật Bản như là một chất đường ưa thích dành cho người ăn kiêng do bị bệnh đái tháo đường và còn là một nguồn năng lượng dịch truyền cho các bệnh nhân bị chứng glucoza suy yếu và kháng insulin. Kể từ đó, nhiều quốc gia khác như Ý và Trung Quốc đã sản xuất xylitol để dùng trong thị trường nội địa, đem lại những lợi ích đáng kể cho sức khỏe con người.

3.4.1.2. Cấu trúc xylitol

- Tên hoá học : (2S,3R,4R)-Pentan-1,2,3,4,5-pentanol.
- Tên khác : 1,2,3,4,5-pentahydroxy pentan.
- Công thức hoá học : $C_5H_{12}O_5$.
- Khối lượng phân tử : 152,15 g/mol.

- Khối lượng riêng : $1,52 \text{ g/cm}^3$.
- Dạng tồn tại : tinh thể pha lê, bột trắng.



Hình 3.37. Cấu tạo của xylitol

3.4.1.3. Đặc tính của xylitol

a) Tính chất vật lý và hoá học

- Mùi vị : không mùi.
- Nhiệt độ tan chảy : $92\text{--}96^\circ\text{C}$.
- Nhiệt độ sôi : 126°C .
- Tính hoà tan (ở 20°C) : 169g hoà tan được trong 100g nước hoặc trong etanol và metanol.
- pH trong nước (1g/10 ml) : 5–7.
- Giá trị năng lượng : 4,06 cal/g.
- Bền ở nhiệt độ cao : xylitol, sorbitol, manitol bền vững ở nhiệt độ cao, ngay cả trên 180°C và không bị thay đổi màu.
- Bền hoá học cao : sự nấu chảy xylitol, sorbitol, manitol không xảy ra phản ứng maillard (phản ứng hoá nâu). Xylitol có tính ổn định tương đối ở cả pH cao và pH thấp.
- Ngăn chặn sự oxy hoá (An anti-oxydative synergistic) trong chất béo, dầu, hỗn hợp chất có thành phần chất béo do sự tạo phức với ion kim loại.

- Bên với vi sinh vật.
- Hoà tan tốt trong nước và độ hoà tan phụ thuộc vào nhiệt độ.
- Độ ngọt của xylitol phụ thuộc vào nhiệt độ.

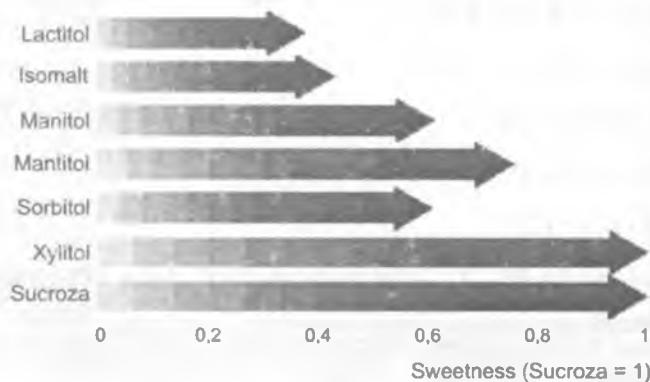
b) Tính chất, chức năng

– Đường xylitol, sorbitol, manitol là giải pháp tuyệt vời cho chế độ ăn kiêng dành cho bệnh nhân đái tháo đường bởi nó làm giảm lượng axit béo tự do trong huyết thanh, từ đó ức chế sự gia tăng của đường glucoza trong máu.

– Sự trao đổi chất : Trong quá trình trao đổi chất, xylitol được trao đổi và tiêu hoá từng phần một. Lương xylitol được chuyển đến ruột già, tại đó được lên men bởi hệ vi khuẩn. Khi ăn quá nhiều xylitol (khoảng 20g hoặc nhiều hơn) sẽ gây ra một số tác dụng phụ như sự nhuận tràng.

– Giá trị năng lượng : Do được hấp thụ chậm mà xylitol có giá trị năng lượng thấp hơn khoảng 2,4 kcal/g

– Khả năng làm ngọt : Xylitol có độ ngọt tương đương với đường saccaroza, còn sorbitol và manitol thì ít ngọt hơn.

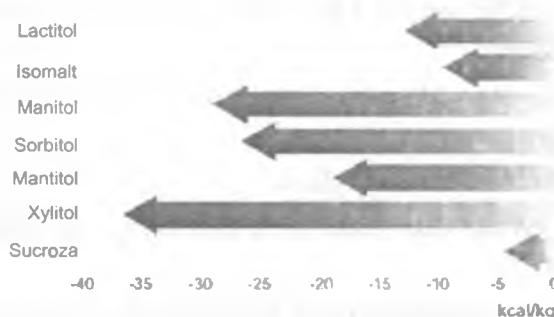


Hình 3.38. Biểu đồ so sánh độ ngọt của xylitol

Từ biểu đồ ta thấy : nếu lấy giá trị độ ngọt của đường saccaroza làm chuẩn với giá trị 1 đơn vị thì độ ngọt của xylitol là xấp xỉ với đường saccaroza, tiếp đến là đường manitol với độ ngọt khoảng 0,75 đơn vị, đường sorbitol và manitol với giá trị độ ngọt bằng nhau bằng 0,6 đơn vị.

Xylitol lại là một chất kìm hoá việc tạo ra axit trong miệng và được coi như là một chất thuốc kháng khuẩn, ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Do đó, xylitol có khả năng ngừa sâu răng.

- Khả năng làm mát : Xylitol có khả năng hòa tan tốt trong nước tạo cảm giác ngọt và mát lạnh do có hiệu ứng thu nhiệt còn manitol thì chỉ có đặc tính ngọt.



Hình 3.39. Biểu đồ so sánh khả năng làm mát của xylitol

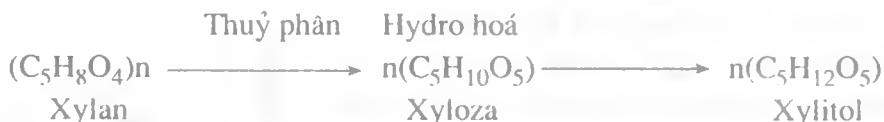
Từ biểu đồ ta thấy : Khi được hòa tan, 1kg xylitol sẽ thu vào một nhiệt lượng là khoảng 36 kcal, manitol thu vào nhiệt lượng là khoảng 28 kcal và sorbitol thu một lượng nhiệt là khoảng 26 kcal. Xylitol có khả năng hòa tan tốt trong nước tạo cảm giác ngọt và mát lạnh do có hiệu ứng thu nhiệt còn manitol thì chỉ có đặc tính ngọt.

3.4.1.4. Sản xuất xylitol (Theo Công nghệ Deutsche Hydrierwerke)

Năm 1931, công nghệ Deutsche Hydrierwerke (DHW) ở Rodleben (Đức) được cấp bằng sáng chế và bắt đầu được áp dụng vào sản xuất đường rượu trên thế giới. Đây là công nghệ được phát triển dựa trên những tiến bộ của công nghệ hydro hoá ở áp suất cao với sự có mặt của chất xúc tác.

Xylitol là một polyol được tạo ra từ xyloza.

a) Sơ đồ chuyển hóa sản xuất xylitol



b) Nguyên liệu sản xuất xylitol

Xylitol có thể được chiết suất từ một số loại hoa quả và rau có chất xơ : cây dâu rừng, quả dâu tây, quả mận, rau súp lơ, vỏ hạt ngô, nấm, lõi bắp ngô, bã mía...

c) Quy trình sản xuất xylitol (theo công nghệ Deutsche Hydrierwerke)

Thuỷ phân, loại bỏ tạp chất

Khoai tây, lúa mạch, ngô... → Xyloza → Hydro hoá
→ Vi lọc → Khử ion → Làm khô → Xylitol → Bao gói sản phẩm
(Finished Product).

d) Những tính chất đặc trưng của xylitol được sản xuất từ công nghệ DHW đã sấy phun

- Giảm tính bở vụn của hạt xylitol.
- Sự tạo hạt có thể được thực hiện mà không cần phải qua quá trình tạo hạt.
 - Tạo cho các hạt sản phẩm có bề mặt mịn hơn và có màu sắc đồng đều.
 - Giảm thiểu sự thấm ẩm của sản phẩm do có lớp vỏ ngoài cứng làm cho thời gian bảo quản được lâu hơn.
 - Tăng độ cứng của viên xylitol sản phẩm.
 - Cải thiện độ hoà tan của xylitol.
 - Tạo cho sản phẩm một hương vị hấp dẫn, có hương thơm lâu hơn.
 - Có thể làm tăng khả năng kết hợp với các phụ gia như : vitamin, chất tạo màu, chất tạo vị...
 - Giữ được hương ngay cả khi đã được đóng gói sản phẩm trong một thời gian dài.

3.4.1.5. Ứng dụng

a) Trong nha khoa

Xylitol ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh sâu răng. Khi sử dụng xylitol một thời gian, lượng vi khuẩn gây sâu răng trong khoang miệng không thể sống sót trên bề mặt răng và lượng axit tấn công mặt răng sẽ giảm xuống. Bên cạnh đó, xylitol còn tăng cường tái tạo canxi, giảm thiểu số lượng mảng bám răng.



b) Trong chế biến thực phẩm

Xylitol được dùng để sản xuất ra kẹo bạc hà không đường tạo cảm giác mịn mát khi cho viên kẹo vào miệng.

Kẹo sử dụng đường xylitol

Xylitol không làm ảnh hưởng đến lượng đường trong máu. Do đó, xylitol được ứng dụng trong thực phẩm chức năng như là một chất ngọt dành cho bệnh nhân đái tháo đường.

c) Trong y học

– Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, xylitol có trong kẹo cao su có thể bảo vệ tai không bị nhiễm trùng. Những cử động nhai và nuốt giúp loại bỏ được ráy tai, làm sạch tai giữa. Bên cạnh đó, xylitol sẽ ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn ở trong đường ống nối tai với mũi. Nhờ những cử động đó mà xylitol đã tác động tới vi khuẩn ở mặt sau của mũi, điều đó lý giải cho tác dụng tích cực của xylitol đối với các bệnh về mũi.

– Khi vi khuẩn xâm nhập vào trong cơ thể, chúng sẽ được giữ chặt vào các mô bằng cách bám vào một hỗn hợp đường khác nhau. Đặc tính mờ tự nhiên của xylitol và khả năng tạo nhiều cấu trúc tương tự đường khác nhau, gây trở ngại sự bám chặt của nhiều vi khuẩn. Chính vì vậy mà xylitol được ứng dụng trong những trường hợp nhiễm trùng hệ hô hấp thông qua một dung dịch muối có chứa xylitol như dung dịch nước vệ sinh khoang mũi (*Xlear Nasal Wash*).

– Giống như hầu hết các loại đường, rượu xylitol có thể tạo hiệu ứng như là một thuốc nhuận tràng loại nhẹ ở hàm lượng cao. Nó không độc, người ta đã tiêu thụ một lượng lớn khoảng 40g/ngày trong một thời gian dài mà không có triệu chứng nhiễm độc.

3.4.2. Sorbitol

3.4.2.1. Cấu tạo và tính chất

Sorbitol là một đường rượu (sugar alcohol) 6 cacbon, độ ngọt bằng 69% so với saccarosa. Sorbitol được tìm thấy trong nhiều loại quả.

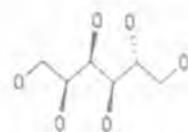
Bảng 3.7. Hàm lượng sorbitol có trong các loại quả

Các loại quả	Hàm lượng sorbitol (g/100g)
Táo	0,2-1,01
Lê	1,2-2,8
Mận	0,6-2,01
Quả đào	0,5-1,25
Quả anh đào	1,4
Nho đen	0,2
Nho trắng	Không có sorbitol

a) Cấu tạo

Sorbitol còn gọi là hexan-1,2,3,4,5,6 hexanol, có công thức phân tử $C_6H_{14}O_6$.

Công thức cấu tạo :



Hình 3.40. Cấu trúc không gian của sorbitol

Khối lượng phân tử : 182,17g/mol.

b) Tính chất

- Sorbitol là tinh thể màu trắng có khối lượng riêng $0,68g/cm^3$ hoặc dạng lỏng trong suốt có khối lượng riêng là $1,28-1,31g/ml$ hoặc dạng bột.
- Nhiệt độ nóng chảy : $95^\circ C$, nhiệt độ sôi $296^\circ C$.
- Chỉ số khúc xạ : $1,455-1,465$.
- Cung cấp năng lượng $2,6cal/g$, thấp hơn năng lượng của đường và tinh bột là $4cal/g$.

3.4.2.2. Công nghệ sản xuất sorbitol

a) Nguồn nguyên liệu

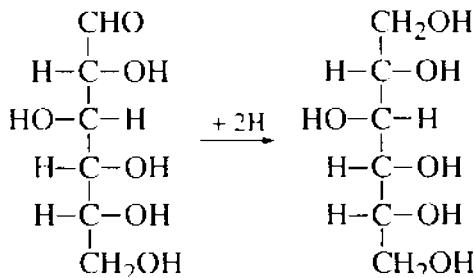
Sorbitol được sản xuất trực tiếp từ D-glucoza theo con đường tổng hợp hoá học hoặc lên men nhờ vi sinh vật. Nguồn glucoza thường được lấy từ dịch thuỷ phân tinh bột của các loại hạt, củ và mì rỉ. Các nguyên liệu trên được thuỷ phân bằng enzym hoặc bằng axit dưới các điều kiện khác nhau, kết quả thu được một hỗn hợp dịch có chứa chủ yếu là glucoza và một số sản phẩm phụ khác.

b) Công nghệ sản xuất sorbitol

Để sản xuất sorbitol thường có 2 phương pháp chính là phương pháp hoá học và phương pháp lên men nhờ vi sinh vật.

Sản xuất sorbitol bằng phương pháp hoá học

Phương pháp hoá học để sản xuất sorbitol trong công nghiệp thực chất là quá trình hydro hoá D-glucoza ở nồng độ khoảng 50% (w/v).



Phản ứng hydro hoá glucoza thành sorbitol là phản ứng toả nhiệt nhẹ. Về mặt nhiệt động học, phản ứng hydro hoá glucoza thành sorbitol xảy ra hoàn toàn tại 150°C dưới áp suất hydro trong khoảng 110–125 atm.

Chất xúc tác truyền thống cho quá trình hydro hoá glucoza thành sorbitol là xúc tác Ni–Raney hoặc Ni hoạt tính trên chất mang. Gần đây, hệ xúc tác Ru trên các chất mang khác nhau đã dần dần thay thế hệ xúc tác Ni vì hệ xúc tác Ru có nhiều ưu điểm hơn. Với các hệ xúc tác mới Ru/C, có thể phản ứng hydro hoá trong điều kiện không quá khắc nghiệt mà vẫn đạt hiệu suất trên 99%. Hơn nữa, các chất xúc tác thế hệ mới không bị tan vào môi trường phản ứng làm cho tuổi thọ của xúc tác kéo dài đồng thời quá trình tinh chế sản phẩm trở nên đơn giản hơn rất nhiều.

Trên thế giới hiện nay tồn tại 2 dạng công nghệ là công nghệ gián đoạn và công nghệ liên tục.

1. Công nghệ gián đoạn

Trên 80% quá trình sản xuất sorbitol trên thế giới dựa trên công nghệ gián đoạn. So với công nghệ liên tục, công nghệ gián đoạn có các ưu điểm là có độ mềm dẻo cao tức là có thể thay đổi nguồn nguyên liệu theo từng mẻ.

Các thông số chính của quá trình :

- Dung dịch glucoza 40–50%.
- Xúc tác : Ni–Raney.
- Nhiệt độ : 120 – 150°C .
- Áp suất hydro : 30–100 bar (29,6–98,7 atm).
- Khối lượng xúc tác/glucoza : 3–6%.
- pH = 5–6
- Thời gian phản ứng : 2–4 giờ.

Các quá trình trên cho phép chuyển hoá nguyên liệu glucoza (độ tinh khiết 98,5–99,5%) với hiệu suất sorbitol nằm trong khoảng 97–98%. Siro sorbitol được lọc và làm sạch bằng nhựa trao đổi ion và than hoạt tính.

Công nghệ của Lurgi Life Science–LLS

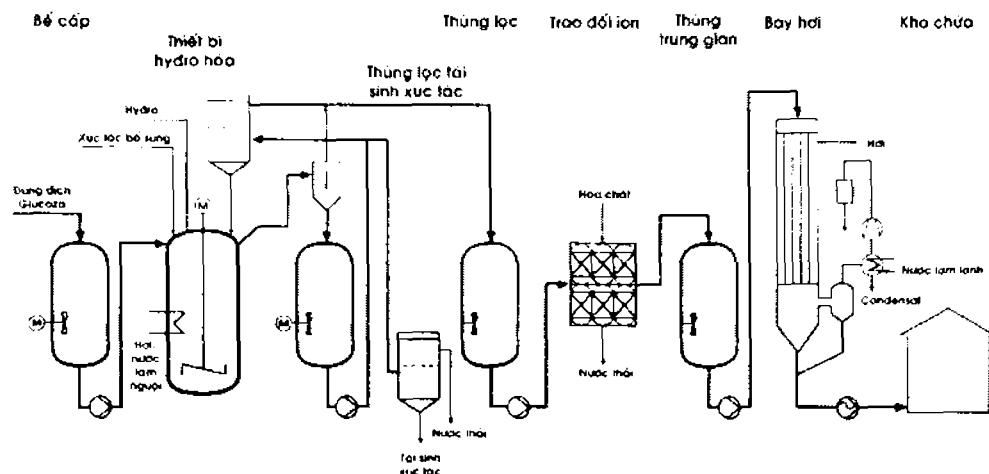
Hãng Lurgi Life Science đưa ra công nghệ dựa trên việc sử dụng xúc tác Ni–Raney hoặc xúc tác Ru/C

Đặc trưng của quá trình Ru/C :

- Chi phí đầu tư thấp.
- Hoạt tính xúc tác cao, tốc độ chuyển hoá nhanh.
- Tỷ lệ nước thải, chất thải rắn thấp.
- Có thể tái sinh và sử dụng tuần hoàn chất xúc tác.
- Đễ dàng cân đối xúc tác bổ sung và xúc tác cũ.
- Không tạo ra nhiều axit glucozanic.
- Thích hợp cho mọi phẩm cấp sorbitol (thực phẩm, dược phẩm, kết tinh, không kết tinh) phù hợp theo tiêu chuẩn UPS, BP, JIS, DAB.

Quá trình sản xuất được biểu diễn theo sơ đồ nguyên lý thiết bị sau :

Trước khi đưa nguyên liệu vào thiết bị phản ứng, pH dung dịch nguyên liệu (glucoza) được điều chỉnh trong thùng cấp nguyên liệu. Giá trị pH là một thông số quan trọng ảnh hưởng tới quá trình phản ứng. Độ axit cao sẽ làm ảnh hưởng tới hoạt tính của xúc tác, đặc biệt là xúc tác Ni–Raney. Thông thường dung dịch sau phản ứng có tính axit nhẹ.



Hình 3.41. Sơ đồ nguyên lý hệ thiết bị hydro hoá theo công nghệ của LLS

Sorbitol được sản xuất theo mè trong thiết bị hydro hoá. Khi hydro hoá được đưa vào tiếp xúc với huyền phù glucoza và xúc tác. Phản ứng tỏa nhiệt

diễn ra ở áp suất lớn nhất là 40bar (39,5atm) và nhiệt độ 100–140°C trong thiết bị. Hệ thống làm lạnh giữ cho nhiệt độ ổn định.

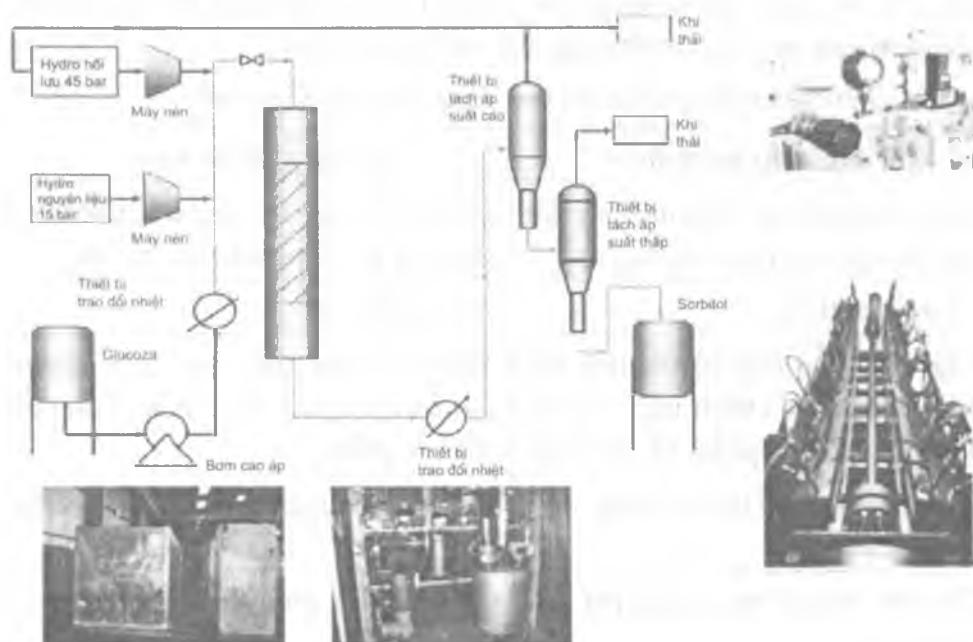
Sau khi kết thúc phản ứng, dung dịch sorbitol thô có lẫn các chất xúc tác (dạng huyền phù) được tháo qua thùng xả áp để chuyển đến thùng lọc.

Sau khi lọc bằng thiết bị lọc cơ học, chất xúc tác được tuân hoàn trở lại thiết bị phản ứng. Đối với xúc tác Ru/C, không cần trang bị thiết bị lọc tinh. Xúc tác mới bổ sung và xúc tác cũ lấy ra từ thiết bị lọc được cân đối nhờ bộ phận điều khiển. Hầu hết các công đoạn được thực hiện tự động.

Trong trường hợp sử dụng xúc tác Ni–Raney, dung dịch sorbitol thô trong thùng lọc còn chứa một phần xúc tác Ni–Raney. Phần còn lại được giữ lại trong thiết bị phản ứng sau khi để lắng. Xúc tác lơ lửng sẽ được loại nhờ quá trình lọc cơ học và được tuân hoàn trở lại thiết bị phản ứng. Dịch lọc sorbitol được chuyển qua thùng chứa dịch lọc. Phần Ni tan trong nước lọc sẽ được bù bởi xúc tác mới.

Tiếp theo quá trình lọc là quá trình trao đổi ion trong thiết bị trao đổi ion. Các hợp chất trong nước lọc được khử khoáng và khử axit bằng nhựa trao đổi ion vận hành theo nguyên tắc lọc kép. Sau đó, dung dịch đã khử khoáng được cô đặc trong thiết bị cô đặc.

2. Công nghệ liên tục



Hình 3.42. Sơ đồ nguyên lý của hệ thống thiết bị hydro hóa glucoza theo công nghệ liên tục

Hệ thống các phần chính sau đây :

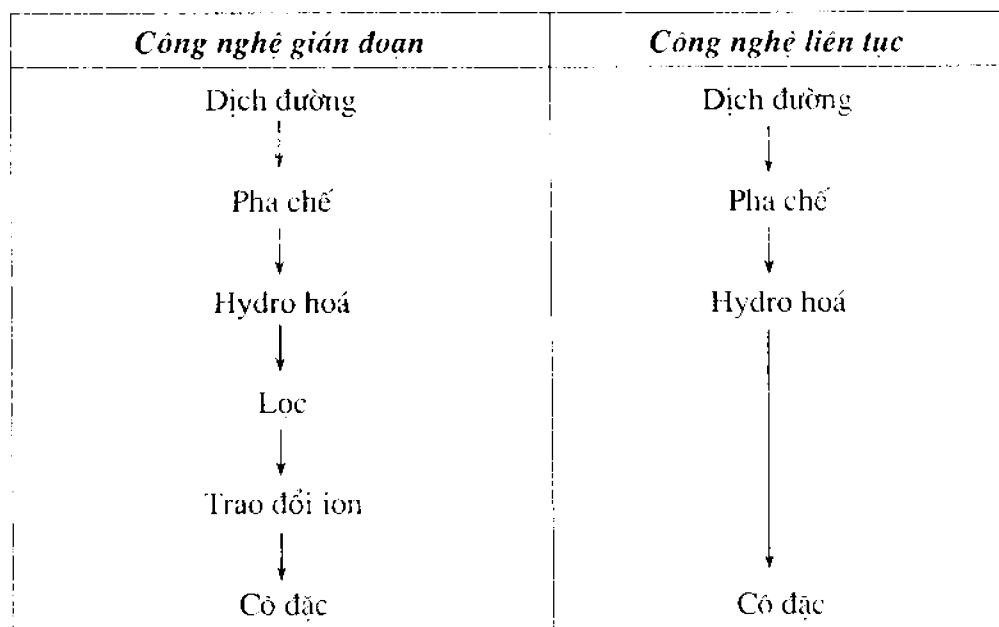
- Hệ thống nạp liệu : Bình chứa dung dịch glucoza 40%, bơm cao áp, các đường ống, van và hệ thống cung cấp hydro (gồm máy nén khí H₂ và máy nén khí hydro hồi lưu).
- Hệ thống tiền gia nhiệt : gia nhiệt lượng glucoza trước khi đưa vào thiết bị phản ứng.
- Hệ thống phản ứng : gồm ống phản ứng bằng thép không gỉ được gia nhiệt bằng điện (chia thành các vùng độc lập) với hệ thống điều khiển nhiệt độ đảm bảo nhiệt độ đóng đều trong toàn bộ phản ứng. Đầu ống phản ứng được trang bị lưới đỡ xúc tác còn định thì được trang bị bộ phận phân phối đặc biệt đảm bảo sự phân phối một cách hiệu quả hỗn hợp khí/lỏng qua lớp xúc tác.
- Hệ thống thu hồi sản phẩm : bao gồm thiết bị làm lạnh sản phẩm mà nhiệt thu được từ quá trình đó được tận dụng để tiền gia nhiệt hỗn hợp phản ứng, thiết bị tách khí lỏng ở áp suất cao và thiết bị tách khí lỏng ở áp suất thấp, van lấy sản phẩm tự động và thùng chứa sản phẩm.

Đặc điểm nổi bật của công nghệ này là không cần hệ thiết bị xử lý và tinh chế sản phẩm bởi vì sản phẩm ra khỏi thiết bị phản ứng không bị nhiễm bẩn như trong trường hợp sử dụng xúc tác trên cơ sở Ni.

So sánh các công nghệ hydro hoá glucoza đang hiện hành

Công nghệ gián đoạn	Công nghệ liên tục
Độ linh động cao vì có thể thay đổi nguồn nguyên liệu theo từng mẻ	Chỉ có thể thay đổi nguồn nguyên liệu khi chạy hết vòng đời của xúc tác
Công suất thấp	Công suất cao
Thiết bị phản ứng có thể tích lớn và đắt tiền. Quá trình lọc, rửa xúc tác, tinh chế sản phẩm rất phức tạp	Thiết bị phản ứng nhỏ, gọn không cần lọc, rửa xúc tác. Không cần tinh chế sản phẩm
Tiêu hao nguyên liệu và năng lượng cao	Tiêu hao nguyên liệu và năng lượng thấp
Chi phí nhân công và chi phí sản xuất cao	Chi phí nhân công và chi phí sản xuất thấp
Có nhiều chất thải rắn được xử lý	Không có chất thải

Các công đoạn chính trong sản xuất sorbitol



Sản xuất sorbitol bằng con đường lên men

* *Vì sinh vật sử dụng lên men*

Một số loại vi sinh vật đã được nghiên cứu và ứng dụng trong lên men sản xuất sorbitol thành công là vi khuẩn *Zymomonas mobilis*.

Đặc điểm chung của *Zymomonas mobilis*:

- Là vi khuẩn gram⁻.
- Có dạng hình que và thường đứng thành dôi.
- Có kích thước $1,0\text{--}2,0 \times 4,0\text{--}5,0 \mu\text{m}$.
- Có khả năng di chuyển.
- Là vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc.
- Chuyển hoá theo con đường Entner-Daudoroff.

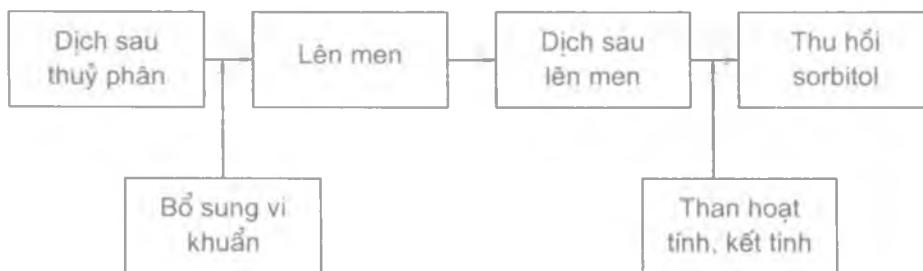
Và có một số ưu điểm lớn :

- Hấp thụ lượng đường lớn và sản phẩm tạo ra nhiều.
- Tạo ít sinh khối.
- Chịu được nồng độ đường cao.
- Không cần điều khiển oxy trong quá trình lên men.
- Dễ dàng trong thao tác gen để tạo ra các biến chủng mới có năng suất cao.

Do vậy vi khuẩn *Zymomonas mobilis* được chọn là chủng vi sinh vật trong sản xuất công nghiệp. Ngoài ra, còn có một số vi sinh vật khác cũng có khả năng tạo ra sorbitol nhưng hiệu suất thấp hơn như *Candida boidinii*, *Saccharomyces cerevisiae*.

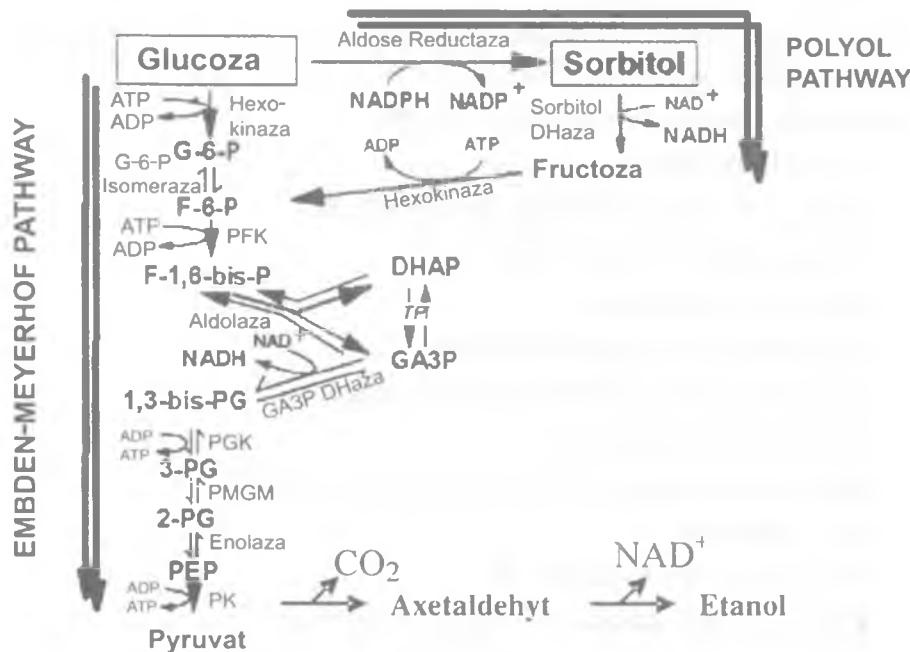
* Công nghệ lên men sorbitol nhờ vi khuẩn *Zymomonas mobilis*

Lên men sorbitol nhờ vi khuẩn *Zymomonas mobilis* được tiến hành theo quy trình sản xuất sau :



Hình 3.43. Sơ đồ lên men sản xuất sorbitol

Intracellular hyperglycaemia and hypotheses diabetic complications



Hình 3.44. Sơ đồ cơ chế lên men sản xuất sorbitol

Như vậy ta thấy, trong quá trình chuyển hoá cơ chất thì các sản phẩm tạo ra bao gồm etanol, sorbitol. Trong đó, hàm lượng etanol chiếm đa số. Để tạo ra nồng độ sorbitol cao và etanol thấp, một số nghiên cứu đã tiến hành làm khô tế bào của *Zymomonas mobilis* bởi khi tế bào *Zymomonas mobilis* bị khô, các enzym oxy hoá-khử chuyển hoá glucoza tạo etanol bị vô hoạt. Ngoài ra theo Rehr, có thể sử dụng Toluol mà không ảnh hưởng đến sự hoạt động của glucoza, fructoza oxydoreductaza (GFOR) và xử lý với xetyl trimetyl ammonium bromit (CTAB) 0,1%(w/v) trong 10 phút để làm ngừng quá trình sản xuất etanol.

Môi trường lên men sorbitol gồm : dịch đường, bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , FeSO_4 , Natri-xitrat. Tuỳ từng chủng mà thành phần khác nhau.

Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men là 25–31°C. pH thích hợp cho quá trình lên men = 4,5–7,5.

Sản phẩm sau lên men được xử lý cùng với than hoạt tính, sau đó kết tinh để thu hồi sorbitol.

3.4.2.3. Ứng dụng của sorbitol

Sorbitol được nhà Hoá học người Pháp Joseph Boussingault phân lập đầu tiên năm 1872 từ quả lê. Sorbitol là một đường rượu tự nhiên thuộc nhóm polyol và được chuyển hoá thành fructoza trong cơ thể con người.

Sorbitol được dùng trong công nghiệp nước hoa và có trong thành phần của nhiều loại mỹ phẩm chăm sóc sắc đẹp vì nó có tác dụng giữ ẩm cho da và làm cho làn da trở nên mềm mại và mịn màng. Sorbitol được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất vitamin C.

Các hãng sản xuất kem đánh răng thường sử dụng sorbitol chiết xuất từ tinh bột sắn để tạo vị ngọt cho kem đánh răng. Sorbitol có ứng dụng trong thành phần thuốc đánh răng vì có những tính chất đặc biệt, có vai trò như một chất ổn định, chất làm dịu vị, chất giữ ẩm, chất kháng khuẩn trong miệng. Với ứng dụng phụ gia thực phẩm, người ta tìm thấy sorbitol trong rất nhiều loại thực phẩm như bánh, kẹo, kem, xúc xích. Trong ngành sản xuất thuốc lá, sorbitol có tác dụng ngăn ngừa sự vỡ vụn của sợi thuốc lá và là chất làm dịu vị trong thuốc lá. Ngoài ra, sorbitol còn được ứng dụng trong tổng hợp polyme (như chất ổn định và chống oxy hoá). Ứng dụng của sorbitol được tóm tắt ở bảng sau :

Bảng 3.7. Ứng dụng của sorbitol

Lĩnh vực	Tính chất	Ứng dụng
Thực phẩm	<ul style="list-style-type: none"> - Tăng thời gian bảo quản - Giữ ẩm - Làm ngọt - Không ảnh hưởng đến hàm lượng đường trong máu - Không làm hỏng răng (không bị lên men) 	Chế biến thực phẩm : <ul style="list-style-type: none"> - Kẹo cao su - Socola - Bánh mỳ - Đồ uống - Kem
Mỹ phẩm	<ul style="list-style-type: none"> - Giữ ẩm - Không làm hỏng răng - Hoá dẻo - Làm cho da mịn màng 	<ul style="list-style-type: none"> - Sữa rửa mặt - Kem đánh răng - Bột cạo râu
Được	<ul style="list-style-type: none"> - Các tính chất sinh lý học - Thay thế đường cho người bị bệnh tiểu đường 	Có trong : <ul style="list-style-type: none"> - Viên nén - Viên nhộng - Dịch nhũ tương - Sirô chống ho
Công nghiệp khác	<ul style="list-style-type: none"> - Hoá dẻo - Làm dịu vị - Bền nhiệt - Bền với axit và bazơ - Nhớt - Giữ ẩm - Tạo nhũ 	<ul style="list-style-type: none"> - Nguyên liệu sản xuất vitamin C - Chất tẩy rửa - Công nghiệp giấy, vải, da - Gelatin - Keo dán - Hạn chế sự oxy hoá dầu bởi các kim loại nặng - Thuốc nổ - Sơn và vecni - Polyuretan - Este nhựa thông

Chương IV

CÔNG NGHỆ LIPIT

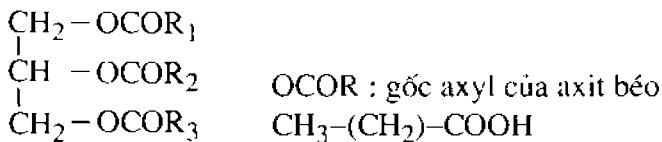
4.1. Đại cương về chất béo

Lipit, chất béo hay dầu mỡ hoặc ở dạng thấy rõ bề mặt ngoài như trong bơ, dầu hoặc ở dạng "ẩn dấu" như trong sữa, phomat, thịt hoặc trứng.

Người ta thường chia ra :

- Lipit xà phòng hoá được bao gồm các lipit trung tính, các photpholipit và các sáp (este của các axit béo với alcol mạch cacbon dài).
- Lipit không xà phòng hoá được bao gồm các cacbonhydro, các sắc tố và các sterol.

Chất béo ăn được, chất béo thực phẩm hay mỡ và dầu thường chủ yếu là các hợp chất triglycerit, triaxylglycerol hay lipit trung tính là trieste của glycerol với các axit béo nói chung là khác nhau trong cùng một phân tử triglycerit.



Trong mỗi mỡ và dầu tự nhiên thường chứa các triglycerit khác nhau.

4.2. Công nghệ thu nhận chất béo

Mỡ và dầu động vật thường được chiết rút ra từ các mô mỡ của động vật bằng cách đun nóng, mỡ sẽ chảy ra, nổi lên trên bề mặt và được tách ra bằng ly tâm. Việc đun nóng được tiến hành hoặc bằng hơi nước hoặc bằng đun "khan" trong chân không. Nhiệt độ đun nóng thường tương đối thấp ($<80^{\circ}\text{C}$) nhằm thu được mỡ có màu sáng và không có mùi.

Mỡ từ loài nhai lại chứa rất ít các axit béo không no. Mỡ bò và mỡ cừu thường được dùng để sản xuất xà phòng.

Mỡ từ cá voi rất giàu các axit béo không no với 20–22 cacbon, trong đó các axit béo có 4, 5 hoặc 6 nối đôi chiếm tới 20%.

Dầu từ các loại cá béo như các trích, lượng axit béo không no còn chiếm tới 75%. Các dầu này là những dầu khô thường được dùng trong hội họa. Để dùng làm thực phẩm cho người hoặc động vật, các mỡ và dầu rất không no này trước tiên phải được hydro hoá.

Các mỡ và dầu thực vật thường được trích ly ra từ các hạt có dầu và quả, trước tiên bằng ép sau đó chiết bằng một dung môi hữu cơ. Một số hạt có thể xử lý trực tiếp bằng dung môi mà không cần phải ép. Việc ép dầu thường được thực hiện ở trong các máy ép thuỷ lực hoặc các máy ép liên tục có vis tải ở áp lực cao hoặc thấp (2500 và 150 bar). Ép ở áp lực thấp sẽ cho dầu có chất lượng tốt hơn, song hiệu suất chỉ đạt 2/3. Sau khi trích ly ở áp lực cao còn khoảng 5% dầu trong khô dầu. Với lạc, hướng dương và cải dầu đôi khi người ta tự bằng lòng với hiệu suất này. Thường thì sự trích ly bằng cơ học (ép) được tiếp theo bằng một sự trích ly bằng dung môi hữu cơ (thường là hexan) ở nhiệt độ thấp.

Dầu thu được bằng ép hoặc bằng trích ly với dung môi, loại bỏ dung môi bằng chưng cất rồi lọc còn chứa khoảng 10–15% tạp chất (chủ yếu là axit béo tự do và các photpholipit) mà người ta phải loại bỏ đi bằng một loạt xử lý tinh luyện tiếp theo nữa.

Hằng năm, lượng dầu và mỡ thực vật được sản xuất ra lên tới 25 triệu tấn chiếm 3/5 tổng sản lượng chất béo.

Thành phần và tỷ lượng các axit béo và nhiệt độ tạo rắn của một số mỡ và dầu thực vật dùng trong thực phẩm nêu ở bảng 4.1.

**Bảng 4.1. Thành phần trung bình của các axit béo (%)
và nhiệt độ đông rắn của các mỡ và dầu thực vật làm thực phẩm**

	Tỷ lệ phần trăm của các axit béo							
	Lauric	Myristic	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic	Nhiệt độ đông rắn (°C)
	C _{12.0}	C _{14.0}	C _{16.0}	C _{18.0}	C _{18.1}	C _{18.2}	C _{18.3}	
Bơ cacao			24	35	39	2		22
Dầu dừa	44	18	10	4	6	2		14–22

	Tỷ lệ phần trăm của các axit béo							
	Lauric C _{12:0}	Myristic C _{14:0}	Palmitic C _{16:0}	Stearic C _{18:0}	Oleic C _{18:1}	Linoleic C _{18:2}	Linolenic C _{18:3}	Nhiệt độ đông rắn (°C)
Dầu cây cọ dâu (Palmiste)	50	15	8	3	15	3		20–25
Dầu cọ (Palme)		1–10	45	4	40	10		35–42
Dầu oliu		10–17		50–80	10			-6
Dầu cải dầu (Colza)			3		15	15	9	-10
Dầu lạc			10	3	60	22		3
Dầu đậu tương			11	3	25	55	6–9	-10 đến -16
Dầu hướng dương			8	5	20	65	1	-17
Dầu bông	1	25	2	18	53			+12 đến -13
Dầu ngô		13	2	30	55	1,5		-10 đến -20

Các dầu dùng trong thực phẩm có thể được phân ra :

- Dầu giàu axit béo no và axit olein : dầu lạc, dầu oliu.
- Dầu giàu các axit béo không no nhiều nối đôi : dầu hướng dương, dầu đậu tương, dầu ngô.
- Dầu trung gian : dầu cải dầu.

Một số nước trong Liên minh châu Âu hiện có những quy định về sử dụng dầu mỡ như sau :

- Các dầu có chứa hơn 2% axit linolenic thì không được ghi ở nhãn mác là "Dầu để chiên (rán) và làm gia vị".
- Các mỡ và dầu có hàm lượng các hợp chất có cực cao hơn 25% không được dùng làm thực phẩm cho người.

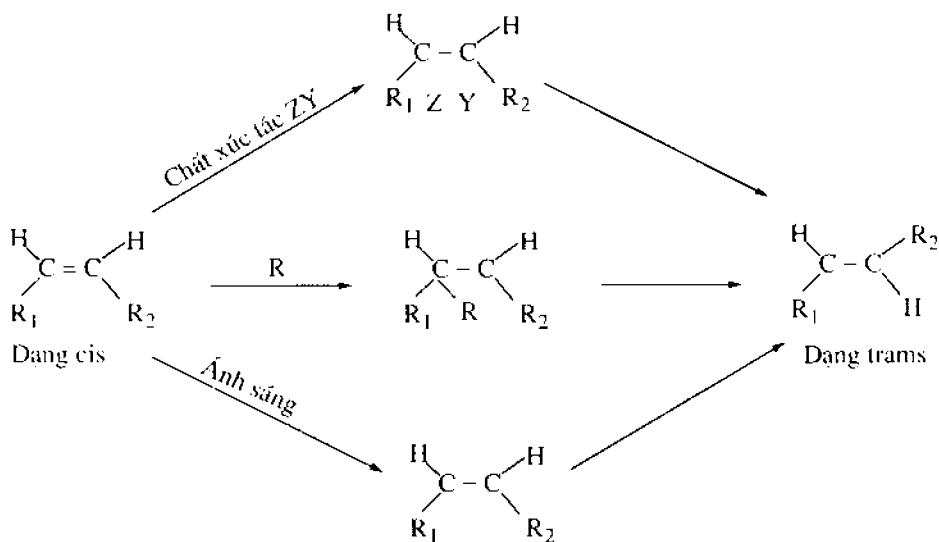
4.3. Các gia công làm biến đổi chất béo

Thường có 2 loại gia công có thể làm biến đổi hóa học các chất béo

4.3.1. Hydro hoá

Hydro là quá trình kết gắn hydro vào nối đôi của các axit béo. Có 2 kiểu hydro hoá :

* *Hydro hoá chọn lọc* : có nghĩa tấn công ưu tiên vào một số nối đôi của các axit béo kém bão hòa nhất. Các chuyển hoá xảy ra khi hydro hoá chọn lọc cho thấy phản ứng không phải là một sự kết hợp đơn giản hydro vào các nối đôi mà còn tạo ra các đồng phân dạng trans.



Chất xúc tác không chỉ cho phép hydro hoá chọn lọc một mình axit linolenic thành axit linoleic mà còn thu được cả axit oleic. Một phân axit linolic vốn có mặt từ ban đầu cũng được chuyển hoá thành axit oleic. Việc chuyển từ các dạng cis vốn có tự nhiên thành các dạng trans cũng có thể xảy ra dưới ảnh hưởng của nhiệt, sự oxy hoá (bởi các gốc tự do) và của ánh sáng.

Vậy việc hydro hoá một số dầu để làm giảm hàm lượng axit linolenic và do đó làm tăng được độ bền của chúng. Chẳng hạn, bằng hydro hoá dầu đậu tương đưa hàm lượng axit linolenic của dầu này từ 9% xuống dưới 1% và đưa chỉ số iot của dầu này từ 130 xuống gần 115.

Có điều là sự hydro hoá không phải là không làm ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng vì khi chuyển hoá một phần hay toàn bộ axit linolenic tức là đã làm giảm hàm lượng axit béo cần thiết.

* *Hydro hoá từng phần hay toàn bộ* : có mục đích chế tác ra những chất béo rắn cơ sở cho sản xuất margarin hoặc cho sản xuất các mỡ nhũ hoá được. Việc tăng điểm nóng cháy để thu được các lipid có độ đặc mong muốn ở nhiệt độ thường chủ yếu là do các dạng trans.

Khi hydro hoá toàn bộ thì không tạo ra những đồng phân vừa kể trên. Khi hydro hoá một phần chẳng hạn như khi hydro hoá dầu đậu tương cần khi có chỉ số iot 40 thì ngược lại, sẽ tạo ra các đồng phân do vị trí (gần 70%) đồng phân do nối đôi liên hợp (gần 2%) và đồng phân lập thể dạng trans (khoảng 40%). Đó chính là chất cơ sở để chế tác ra những margarin thông thường.

Nói chung, sự hydro hoá được tiến hành gián đoạn bằng cách bơm hydro vào dầu đã được nâng nhiệt độ lên trên 100°C với sự có mặt của một chất xúc tác.

Sau khi hydro hoá, dầu được ly tâm rồi được lọc để loại bỏ các hạt rất mịn của chất xúc tác.

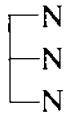
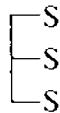
4.3.2. Chuyển este hoá (transesterification)

Trong những điều kiện thích hợp về nhiệt độ và môi trường, nhất là khi không có nước và có mặt chất xúc tác, các chuỗi axit béo của triaxylglycerol có thể trao đổi với nhau trong cùng một triaxylglycerol hoặc giữa các triaxylglycerol khác nhau.

Thực tế, trong khi xử lý các dầu và mỡ, vì chúng luôn chứa nhiều triaxylglycerol khác nhau nên sự chuyển este hoá vừa xảy ra ở trong cùng một phân tử (intramolecular transesterification) vừa xảy ra giữa các phân tử (intermolecular transesterification).

Vậy khi xảy ra các phản ứng chuyển este hoá đã có sự phân bố lại các chuỗi axit béo trên 3 nhóm hydroxyl của các phân tử glycerol theo một luật thống kê (tổ hợp của n yếu tố m với m) và có thể tiên đoán được qua việc tính toán thành phần các triglycerit khác nhau của hỗn hợp cuối cùng ở trạng thái cân bằng.

Chẳng hạn như sự chuyển este hoá giữa các phân tử của một triaxylglycerol gồm 3 axit béo no với một triaxylglycerol gồm 3 axit béo không no



sẽ thu được 8 tổ hợp với xác suất bằng nhau $100/8=12,5\%$ như sau :

SSS 12,5% ; SNS 12,5% ; NSN 12,5% ; NNN 12,5% ; NSS (và SSN) 25% ; SNN (và NNS) 25%.

Sự chuyển este hoá có thể được điều khiển bằng cách tiến hành ở nhiệt độ tương đối thấp để có thể gây ra sự kết tinh của các triaxylglycerol có điểm nóng chảy cao (mà người ta thường loại bỏ bằng cách lọc) ; cân bằng do đó sẽ bị chuyển dịch và người ta thu được một hỗn hợp các triglycerit trong một vùng nóng chảy ở nhiệt độ thấp hơn và có độ đặc mong muốn.

Sự chuyển este hoá không điều khiển có 2 mục đích chính :

- Biến đổi hàm lượng các triglycerit rắn của một số mỡ và do đó làm thay đổi độ đặc của chúng ở các nhiệt độ khác nhau.
- Tạo ra những mỡ rắn giàu axit linoleic để sản xuất margarin.

Sự chuyển este hoá cũng có thể tạo ra được các mono và các diaxylglycerol bằng cách tiến hành trong điều kiện có dư thừa glycerol ở nhiệt độ 200°C trong chân không hoặc trong khí tro.

Có điều là sự chuyển este hoá không làm thay đổi các axit béo. Tuy nhiên, do sự trao đổi vị trí của các axit béo trên glycerol có thể làm thay đổi độ tiêu hoá của triglycerit và do đó thay đổi sự hấp thu của một trong các axit béo.

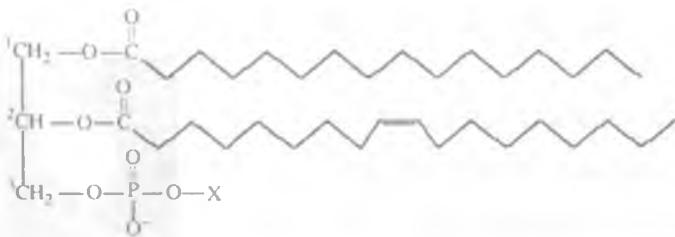
Dựa vào phản ứng chuyển este hoá giữa bơ cacao và dầu đậu tương để tạo ra một bơ cacao có chất lượng tốt hơn.

4.4. Công nghệ một số sản phẩm từ lipit

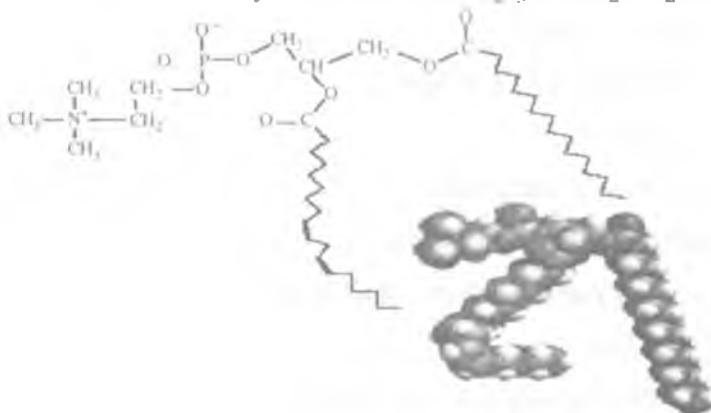
4.4.1. Công nghệ lexithin

4.4.1.1. Cấu tạo của lexithin

Lexithin là ester của glycerol với axit béo có khối lượng phân tử cao và axit photphoric, bazơ có chứa nitơ (là một dạng của glycerolphotpholipit) có công thức cấu tạo chung :



X là colin : Trimethyl etanolamin ($\text{CH}_2)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$



Hình 4.1. Cấu tạo của photphatidylcolin

Lexithin có cấu tạo gồm 2 phần :

- Phần có cực (ưa nước) bao gồm axit photphoric và bazơ nitơ.
- Phần không phân cực (ky nước) bao gồm các axit béo (axit oleic, panmitic và các axit béo khác), rượu glyxerol.

* Colin

Colin là amin bão hòa được tìm thấy dưới dạng photphatidylcolin (hay lexithin).

Chức năng :

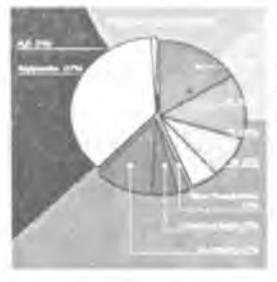
- Tạo cấu trúc và chức năng của màng tế bào.
- Bảo vệ sợi thần kinh và tăng cường khả năng dẫn truyền thần kinh.
- Colin là tiền chất của betain, kiểm soát cân bằng nước và điện giải trong thận. Ở gan, colin là nguồn cung cấp methyl để tạo lipoprotein.
- Colin là thành phần hoạt động của chất hoạt động bề mặt (surfactant) ở phế nang.

Cấu trúc lexitin đậu tương : Gồm 3 loại photpholipit :

- Photphatidylcolin (PC) : 13–18%.
- Photphatidylinositol (PI) : 10–15%.
- Photphatidylethanolamin (PE) : 10–15%

Các photpholipit bao gồm các glycerit.

Trong mỗi glycerit một axit photphoric thay thế cho một gốc axit béo.



4.4.1.2. Tính chất của lexitin

a) Tính chất vật lý

- Lexitin có màu vàng nâu.
- Hoà tan trong etanol và hexan.
- Tồn tại trong nước tạo thành dung dịch giả.

b) Tính chất hóa học

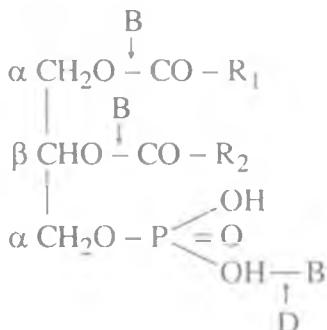
- Bị thuỷ phân bởi axit, kiềm hay enzym.
- + Axit : tất cả các liên kết este bị cắt đứt.
- + Kiềm : chỉ cắt đứt các liên kết este giữa rượu và axit béo.
- + Enzym : 4 loại enzym photpholipaza A, B, C và D tác động lên các liên kết este khác nhau.

c) Tính chất chức năng

- Chất nhũ hoá.
- Làm ẩm.
- Thay đổi độ nhớt : đổi với các sản phẩm lỏng và bán lỏng.
- Tác nhân phân cắt : đẩy mạnh và phân cắt hoàn toàn bề mặt tiếp xúc giữa các thực phẩm. Hình thành màng chắn ổn định để ngăn sự bám dính của các sản phẩm thực phẩm.
- Bổ sung chất dinh dưỡng : các vitamin A,D,E,K.

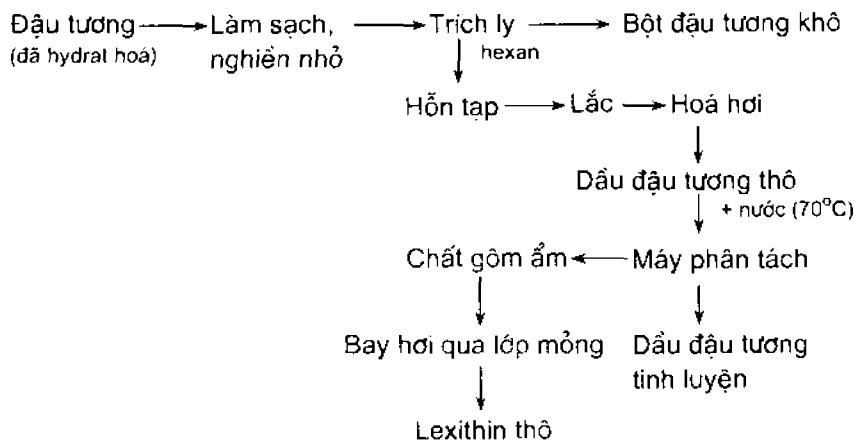
Tác dụng của lexitin với cơ thể :

- Là phần không thể thiếu của màng tế bào.



- Làm giảm cholesterol trong máu.
- Trong gan, lecithin là chất xúc tác nhũ hoá, giúp chức năng của gan hoạt động dễ dàng.
- Giảm lượng đường huyết cho những người bị bệnh đái tháo đường.
- Photpholipit là chất dinh dưỡng cần thiết cho mọi hoạt động của các cơ quan chức năng.

4.4.1.3. Quy trình sản xuất



Hình 4.2. Sơ đồ quy trình sản xuất lecithin

Bảng 4.2. Thành phần photpholipit của lecithin đậu tương

Thành phần photpholipit	Tỷ lệ % theo khối lượng
PC photphatidylcolin	15,6
PE photphatidyl etanolamin	14,0
PI photphatidyl inositol	9,9
PA axit photphatidi	3,9
APE acetyl photphatidyl etanolamin	2,7
LPL lyzophotphatit	<4
Tổng photpho	19000ppm P

- Lexithin thô : chứa 60 – 65% photpholipit ; 35 – 40% dầu và 0,5% nước.
- Lexithin thô : 3 dạng : dạng lỏng, dạng bột, dạng hạt. Trong đó, dạng hạt chứa hàm lượng photpholipitcolein cao nhất.

4.4.1.4. Ứng dụng của lexithin đậu tương

a) Trong công nghiệp thực phẩm

- Tạo sự đồng nhất, tránh sự phân ly phân tách.
- Giúp làm mềm và giữ cấu trúc thực phẩm như socola, margarin và làm thực phẩm ăn liền dễ sử dụng.
- Nhóm thực phẩm thường sử dụng lexithin :
 - + Bánh nướng (cake,cookies, pizza crust, pancakes).
 - + Socola, cacao và bơ cacao.
 - + Các sản phẩm sữa : bơ, phomat, kem, bột sữa và bột sữa tách béo...
 - + Bánh mứt kẹo, chewing gum.
 - + Nước sốt và salat.
 - + Margarin và shortening.
 - + Thực phẩm ăn liền, thực phẩm ăn kiêng...

1. Margarin

Thúc đẩy quá trình kết rắn, ngăn ngừa sự bết dính và chảy nước, hạn chế sự bắn dầu và sự sủi bọt trong lúc rán, làm tăng độ mềm và giúp bảo vệ vitamin A không bị oxy hoá.

2. Socola

Thêm 0,25 – 0,35% làm giảm độ nhớt, tạo kết cấu bề mặt mịn và đồng nhất, tạo ra các sản phẩm có độ ổn định cao hơn.

3. Bơ lạc

Thêm lexithin với tỉ lệ 1 – 2%, làm cho bơ mịn hơn, nhẵn hơn mà không bị phân tách ở các nhiệt độ khác nhau.

b) Trong công nghiệp dược

- Làm thuốc điều trị một số bệnh : viêm gan, gan nhiễm mỡ, đái tháo đường, huyết áp cao, xơ vữa động mạch....

- Sử dụng dưới dạng sản phẩm chức năng : do có khả năng hòa tan và tăng cường sự hấp thụ các vitamin A, D, E, K nên thường sử dụng trong chế độ ăn kiêng dành cho những người bị chứng bệnh béo phì hay muốn giảm cân.
- Sản phẩm thường gặp : thuốc mỡ hay gel, hệ thống thuốc phân tán, hỗn hợp mixen ...

c) Các lĩnh vực khác:

- Mỹ phẩm : uống viên lecithin có tác dụng bảo vệ làn da, khắc phục vết nám đồng thời có tác dụng hấp thụ vitamin hòa tan trong mỡ.
- Trong sơn, sơn phủ : là chất tản sắc.
- Chất phụ gia trong công nghiệp : dầu mỡ bôi trơn motor.
- Các ngành công nghiệp khác : công nghiệp dệt và cao su (là chất nhũ hoá, chất chống oxy hoá), công nghiệp giấy, thuốc gia, gia công kim loại, mực, hò dán, băng từ, nhựa đường...

4.4.2. Công nghệ margarin

Margarin là nhũ tương kiểu nước trong dầu (W/O) gồm 2 pha :

- Pha liên tục (là pha béo).
- Pha phân tán (là pha nước).

Trong margarin còn có các chất phụ gia được phân bố giữa pha béo và pha nước như các tác nhân tạo nhũ, muối, chất màu, chất chống oxy hoá, chất bảo quản, các vitamin.

Chất tạo nhũ có vai trò làm giảm lượng công cần thiết để tạo ra một hỗn hợp đáng kể từ 2 pha không hòa lẫn nhau được. Độ bền cuối cùng của sản phẩm sẽ có được bằng sự kết tinh của pha béo vào trong lòng nhũ tương.

Do đó, margarin là một hệ đa phân tán của các vật béo ở trạng thái rắn và ở trạng thái lỏng của nước và /hoặc của sữa, của nhiều hợp phần khác.

Để sản xuất margarin, các lipit được gia nhiệt đến điểm nóng chảy (khoảng 40°C) và được trộn lẫn với nhau theo những tỷ lệ mong muốn. Nhũ tương nước/dầu thu được bằng cách khuấy mạnh và làm lạnh đồng thời hỗn hợp với sữa tách kem đã lên men trước và những phụ gia khác. Thực tế, sự hình thành nhũ tương đòi hỏi phải có mặt một tỷ lệ nào đó các lipit ở trạng thái rắn. Thao tác được thực hiện trong các xylanh (ống hình trụ), bên ngoài

có vỏ áo để lưu thông chất lỏng làm lạnh ($-10 - -15^{\circ}\text{C}$) và bên trong có một cây xoay được lắp các bản (tấm) để khuấy và để làm cho khối chất đang đông rắn tiến lên. Việc khuấy là để thu được những tinh thể triglycerit nhỏ và đồng đều. Quá trình nhũ hoá–đóng rắn trong xylanh dầu tiên còn được tiếp theo bằng một sự nhào trộn chậm ở nhiệt độ $-10 - -12^{\circ}\text{C}$ để cải thiện kết cấu bằng cách làm giảm kích thước của các tinh thể đến $0,05 - 2\mu\text{m}$.

Sữa đã tách kem và lên men chiếm 17–20% trọng lượng, hàm lượng nước cực đại là 16%. Sự lên men của sữa thường thu được bằng cách cấy vi khuẩn *Streptococcus lactis* và duy trì ở nhiệt độ 22°C nhằm tạo ra được hình thơm gần giống với hình thơm của quả bơ, đặc biệt là để tạo ra được diacetin. Các tác nhân nhũ hoá và ổn định luôn phải được thêm vào trước khi nhũ hoá : đó chính là các mono và diglycerit và lecithin. Việc dùng các phụ gia khác phụ thuộc chủ yếu vào luật pháp (ở Pháp rất nghiêm ngặt) nhằm bảo vệ bơ.

Trong số các phụ gia thường dùng nhất phải kể ra :

- Natri clorua thường được thêm vào dưới dạng nước muối, mục đích để làm tăng độ bền của margarin đối với vi sinh vật.
- Axit sorbic cũng nhằm mục đích như thế, song ở một số nước như Pháp thì bị nghiêm cấm và không được cho vào margarin.
- Các vitamin hòa tan trong chất béo thì ở Pháp bị cấm nhưng ở Hà Lan thì bắt buộc.
- Các chất chống oxy hoá ở Pháp chỉ cho phép sử dụng trong các chất béo dành cho công nghiệp thực phẩm.
- Các chất màu hòa tan trong chất béo như β -caroten và annato ở một số nước bị cấm.
- Các chất thơm của bơ : các axit butyric và caproic, diacetin, các δ -lacton.
- Tinh bột bắt buộc phải cho vào với liều lượng 2% (ở Pháp) vừa là chất hiện hình vừa là chất để biểu lộ (biểu hiện) của margarin (cho dù hiện nay có những phương tiện khác để phân biệt margarin với bơ).

Margarin phải được bảo vệ tránh ánh sáng, oxy, các vi sinh vật và nước. Vì các lipit có nguy cơ bị oxy hoá, bị thuỷ phân các triglycerit và bị các vi sinh vật phát triển.

Để bán lẻ, margarin được bao gói trong băng giấy được xử lý bằng axit sunphuric và giấy nhôm.

4.4.3. Công nghệ sản xuất chất thơm từ lipit nhờ các enzym vi sinh vật

Lipit là một nguồn quan trọng để sản xuất các hợp chất thơm. Ở thực phẩm, lipit được khử hoặc biến đổi nhờ các enzym có sẵn trong nguyên liệu thô hoặc enzym được tạo ra do quá trình phát triển của vi sinh vật. Trong phần này, chúng tôi mô tả việc tạo ra các hợp chất thơm từ nhiều nguồn khác nhau : lacton, green notes và ionon, chủ yếu tập trung vào những điểm đặc biệt của các phản ứng trong môi trường dị ứng : tác động hoá lý liên quan đến sự tương tác giữa cơ chất, sản phẩm và xúc tác sinh học, sự chuyển hoá giữa các pha và và sự phân huỷ của lipit trong 10 bước oxy hoá cần thiết trong các thiết bị phản ứng.

Các chất thơm (hương liệu) có sức hấp dẫn đặc biệt bởi nó liên quan đến hương vị của thực phẩm. Theo quan điểm khoa học và công nghệ, lĩnh vực này có tính hấp dẫn cao do có thể có nhiều nghiên cứu đồng thời ở các khía cạnh khoa học khác nhau. Chất thơm là kết quả sự có mặt của các hợp chất dễ bay hơi có tính chất hoá học và hoá lý đa dạng. Việc chế biến hỗn hợp nguyên liệu thực phẩm thô gồm nhiều yếu tố phụ thuộc vào tính chất của mỗi thành phần. Thay đổi các thông số trong quá trình chế biến, tỷ lệ giữa các thành phần dẫn đến việc tạo ra các hợp chất "yếu hơn" và mang tính "nhân tạo" hoặc tính "hoá học". Để tạo ra "hương thơm tự nhiên và chân thật" trong một quy trình sản xuất sản phẩm cần một kết cấu và thành phần đặc biệt. Để tạo ra các chất thơm này, cần có một phổ rộng các cấu tử hương thơm khác nhau.

– Các cấu tử hương thơm này có thể được chiết xuất từ hoa, quả... thực vật nhưng nồng độ các thành phần cấu tử trong sản phẩm cần tương đồng so với ở nguyên liệu tự nhiên. Việc này có thể tận dụng được nguồn nguyên liệu tự nhiên tuy nhiên thường không đạt hiệu quả kinh tế cao.

– Phần lớn các cấu tử thơm được tổng hợp bằng con đường hoá học tạo ra các hợp chất este hoặc glucozit. Các sản phẩm này không được người tiêu dùng đón nhận, đặc biệt là vùng Tây Âu, ở đây họ ưa chuộng sản phẩm từ tự nhiên hơn.

– Một phương án thay thế đó là sử dụng enzym hoặc vi sinh vật để sản xuất các hợp chất thơm từ cơ chất tự nhiên bằng con đường hoá sinh. Thách

thúc dặt ra là việc tiếp xúc giữa nguồn cơ chất đôi dào và enzym có hoạt tính cao. Trong điều kiện thích hợp có thể tạo ra sản phẩm vài gam chất thơm/kg nguyên liệu thay vì vài mg/kg nguyên liệu như trong các nguyên liệu thô. Các hợp chất thơm tạo thành được gọi là "tự nhiên" bởi chúng được tạo ra từ các sản phẩm nông nghiệp thông qua hoạt tính sinh học tự nhiên (enzym và vi sinh vật) và nhờ đó tỷ lệ các đồng phân (isomers) và đồng vị (isotops) của các chất thơm này có thể so sánh được với sản phẩm chiết xuất từ tự nhiên không như các chất được tổng hợp hoá học. Mặc dù sản lượng của một số quá trình tổng hợp sinh học là cao nhưng các sản phẩm tạo thành vẫn có giá thành đắt hơn so với các sản phẩm được tổng hợp hoá học.

– Có nhiều nhóm các hợp chất thơm khác nhau và người ta phân loại các nhóm này không chỉ dựa vào cấu trúc hoá học, đặc tính hoá lý hay tính chất cảm quan mà thực tế thường sử dụng hơn là dựa vào cơ chất (ví dụ chất thơm được tạo thành từ lipit – phân loại theo lipit).

– Bằng cách phân loại theo nguồn cơ chất thì các hợp chất thơm tạo ra từ lipit là một trong những nhóm quan trọng nhất, bao gồm các axit béo dễ bay hơi hoặc các este, lacton, aldehyt, alcohol, keton và một số nhóm khác như carotenoit.

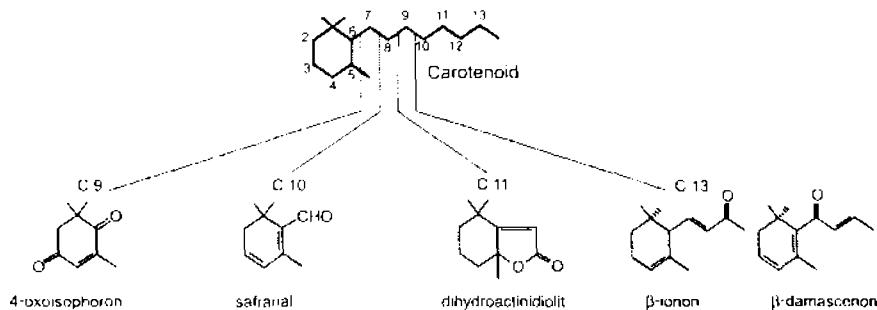
– Mặc dù có rất nhiều nghiên cứu trong việc tạo ra các chất thơm tự nhiên trong thực phẩm nhưng chỉ có một số ít các cấu tử chất thơm được tạo ra bằng con đường sinh học. Sau đây một số ví dụ minh họa các đường hướng chính tổng hợp chất thơm.

Có 3 đường hướng chính là sử dụng động vật, thực vật hoặc enzym vi sinh vật : chuyển hoá carotenoit, con đường hypoperoxyt lyaza/lypoxygenaza và β -oxy hoá tạo ra các sản phẩm tương ứng β -ionon, hexen/hexan và γ -decalacton.

4.4.3.1. Tạo ra các hợp chất thơm từ carotenoit

Carotenoit là chất màu tự nhiên phân bố rộng rãi trong ở thực vật. Chúng thường là C40 tetraterpenoit hình thành từ 8 đơn vị C5-izoprenoit. Dựa vào hệ thống các liên kết đôi, carotenoit có thể bị chuyển hoá trực tiếp bằng việc hoạt hoá như là các gốc tự do. Ngoài chức năng chủ yếu như : quang hợp, photoprotection và dinh dưỡng, carotenoit còn là tiền chất thơm quan trọng. Hương thơm được tạo thành phụ thuộc vào số lượng cacbon và vị trí của

nhóm oxy hoá. Chúng được hình thành thông qua sự oxy hoá bởi enzym và quang oxy hoá (photo-oxidation) từ các carotenoit trong thực vật (hoa quả). Những thành phần dễ bay hơi này rất quan trọng trong công nghiệp sản xuất chất thơm và nước hoa. Cụ thể, ionon được tìm thấy trong rất nhiều hương thơm hoa quả như : quả mâm xôi, đào, mơ và mùi của một số hoa như violet. Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về việc sản xuất ionon từ carotenoit sử dụng enzym, nhiệt và vi sinh vật.

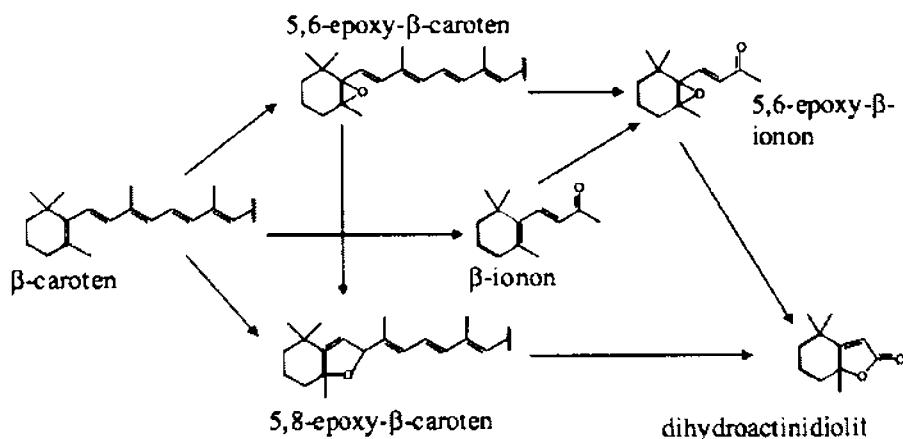


Hình 4.3. Sự tạo thành một số hợp chất thơm sau khi phân cắt carotenoit

4.3.3.2. Tao ionon bằng xử lý hoá lý

Dựa vào tính không bền của carotenoit ở nhiệt độ cao trong điều kiện có oxy, người ta có thể tạo ra các chất dễ bay hơi thông qua việc xử lý lý học các chất carotenoit. Mordi và cộng sự đã phân tích các sản phẩm hình thành trong quá trình tự oxy hoá (autoxidation) của β -caroten trong benzen : trong vài giờ dầu carotenyl và peroxycarotenyl được tạo ra sau đó phản ứng với β -caroten tạo thành β -ionon, epoxy- β -ionon và dihydroactinidiolit. Các hợp chất này cũng được tìm thấy trong quá trình tự oxy hoá của tất cả các trans- β -caroten ở hệ thống lipozoman, nơi các gốc tự do được tạo ra nhờ xử lý nhiệt ở 37°C của AMVN (azo-bis(2,4-dimethyl valeronitrile)).

Crouzet và cộng sự chỉ ra rằng dầu tiên β -caroten được oxy hoá mở cấu trúc (epoxidised) và sau đó bị phân cắt trong quá trình xử lý nhiệt, kết quả là hình thành 5,6-epoxy- β -ionon, dihydroactinidiolit, β -ionon và β -xycloxitral (hình 4.4). Đường hướng này đã được đề cập đến trong thời gian gần đây.



Hình 4.4. Sự phân cắt β -caroten tạo thành β -ionon và các hợp chất liên quan.

Để tạo ra các hợp chất thơm "tự nhiên" từ carotenoit, một số tác giả khác cũng đã sử dụng enzym hoặc vi sinh vật cho mục đích này.

4.3.3.3. Tạo ra ionon nhờ enzym vi sinh vật

Một số nấm mốc có chứa các enzym như : polyphenol oxydaza và lipoxygenaza có khả năng đồng oxy hoá β –caroten tạo thành các hợp chất dễ bay hơi. Lafosse chỉ ra rằng, các chủng nấm mốc : *Gyromitra esculenta*, *Clitocybe geotropa* và *Fibroporia vaillanti* có khả năng chuyển hoá carotenoit thành β –ionon và damascenon nhưng hiệu suất chuyển hoá thấp. Gần đây, Zorn và cộng sự đã kiểm tra sự phân cắt β –caroten thành các hợp chất thơm của 10 chủng nấm mốc khác nhau. Dihydroactinidiolit là sản phẩm duy nhất được hình thành trong môi trường nuôi cấy chìm của các chủng nấm mốc *Ganoderma applanatum*, *Hypomyces odoratus*, *Kuehneromyces mutabilis* và *Trametes suaveolens*. Khi sử dụng dịch nồi của môi trường (không có hệ sợi) từ 5 loài trên, hầu hết sự phân huỷ β –caroten được quan sát thấy sau 12 giờ. Trong môi trường nuôi cấy của các chủng *Ischnoderma benzoinum*, *Marasmius scorodonius* và *Trametes versicolor* thu được các sản phẩm dễ bay hơi (chuyển hoá từ carotenoit) trong đó chủ yếu là β –ionon và có rất ít β –xycloxitral, dihydroactinidiolit và 2-hydroxy-2,6,6-trimethylxyclohexanon. Người ta đã sử dụng phương pháp đo quang để kiểm tra một phản ứng enzym phân cắt β –caroten của chủng *M. scorodonius*.

4.3.3.4. Tao ra ionon bằng enzym

Trong tự nhiên, người ta có thể tạo ra ionon từ carotenoit nhờ tác động của hỗn hợp các enzym. Đã có các nghiên cứu về việc sử dụng enzym để oxy hoá các β -caroten thông qua việc tạo thành các gốc tự do (enzym tạo thành các gốc tự do \rightarrow oxy hoá β -caroten).

Cơ chế của quá trình tương tự như con đường tổng hợp hoá lý (đã được đề cập ở trên). Một số enzym được sử dụng để oxy hoá β -caroten trong môi trường lỏng : phenoloxida, lactoperoxydaza, lipoxygenaza và xanthin oxydaza.

Bosser và cộng sự (1994) đã nghiên cứu và chỉ ra rằng xanthin oxydaza có tiềm năng lớn trong việc tạo ra các gốc tự do và được sử dụng để tạo ra β -ionon.

4.3.3.5. Tao ra ionon bằng lipoxygenaza

Nghiên cứu sự đồng oxy hoá của β -caroten trong môi trường lỏng có mặt lipoxygenaza. Quá trình tiến hành qua 2 giai đoạn.

– Đầu tiên, tách axit béo từ dầu thực vật nhờ lipaza, sau đó axit béo sẽ phản ứng với lipoxygenaza tạo thành gốc tự do. Các gốc tự do này sẽ tương tác với β -caroten tạo thành β -ionon và andehyt.

– Người ta đã tiến hành nghiên cứu với hệ thống nghịch đảo (reserve-micelle system) nhưng những chúng có tác động với oxy chỉ hoạt hoá trong pha lỏng – nơi số lượng cơ chất ít và sản phẩm tạo ra không đáng kể (Waches và cộng sự).

4.3.3.6. Tao ra ionon bằng xanthin oxydaza

Xanthin oxydaza (XO) là enzym có mặt trong sữa. Enzym này đã được nghiên cứu từ hàng thế kỷ trước và đến nay vẫn tiếp tục được nghiên cứu ở khía cạnh động học với việc nhận biết các gốc tự do mà chúng tạo ra. Boser và cộng sự đã nghiên cứu việc tạo ra ionon nhờ XO. Phản ứng đồng oxy hoá thực hiện bởi XO phức tạp do sự xuất hiện của 2 phản ứng : XO xúc tác sự oxy hoá tạo thành axetaldehyt, sau đó chính XO phân cắt β -caroten tạo thành các hợp chất thơm (hình 4.4).

Từ những giờ đầu tiên, β -caroten nhanh chóng chuyển hoá qua tạo thành β -ionon, 5,6-epoxy- β -ionon và dihydroactinidiolit. Tuy nhiên, hiệu

suất chuyển hoá β -caroten thấp bởi các gốc tự do cũng phản ứng với các ionon. Để tránh sự phân huỷ sản phẩm, người ta đã nghiên cứu quá trình đồng oxy hoá β -caroten trong môi trường 2 pha với sự tác động của XO. Trong một pha lỏng, sự chuyển hoá β -caroten đạt 15% sau 6 giờ nhưng sau đó sản phẩm bị phân huỷ và chỉ còn 9% sau 24 giờ. Ở môi trường 2 pha chứa 10% hexan hoặc 10% benzen, lượng ionon tạo thành tăng gấp 11 lần.

Trong hệ thống 2 pha, việc chuẩn bị β -caroten là quan trọng. Nếu β -caroten bị hoà tan trong pha hữu cơ và nếu enzym và cơ chất của nó ở pha lỏng thì việc chuyển hoá β -caroten không xuất hiện (do enzym và cơ chất không tiếp xúc với β -caroten). Ngược lại, nếu β -caroten phân tán trong pha lỏng (bổ sung Tween) thì quá trình đồng oxy hoá β -caroten xuất hiện. Vì vậy, dung môi hữu cơ được bổ sung chỉ để chiết sản phẩm của phản ứng. Hiệu suất chuyển hoá β -caroten trong dung môi hữu cơ (môi trường 2 pha) cao hơn trong môi trường lỏng. Tiêu chí quan trọng nhất để lựa chọn dung môi hữu cơ là phải hoà tan tốt sản phẩm tạo thành mà không ức chế enzym. Hexan và benzen cho phép XO có hoạt tính cao trong khi nhiều dung môi phân cực khác, như diclorometan không có sự oxy hoá xuất hiện. Điều này khẳng định rằng việc kìm hãm hoạt tính enzym phụ thuộc vào độ phân cực của dung môi.

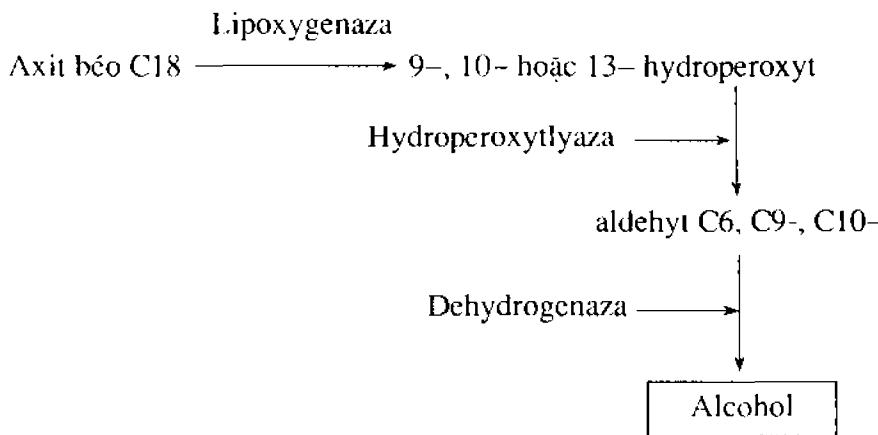
Để thu được hiệu suất chuyển hoá cao, tiếp tục nghiên cứu sự đồng oxy hoá β -caroten trong môi trường 2 pha. Với mục đích đó, người ta đã thay đổi tỷ lệ dung môi và bổ sung thêm chất có hoạt tính bề mặt. Bằng việc tối ưu hoá các thông số này đã thu được tỷ lệ chuyển hoá lên tới 34% trong hệ thống 2 pha chứa 50% dung môi và thêm Tween. Những kết quả này làm nổi bật việc duy trì nồng độ cơ chất trong thời gian phản ứng ở pha lỏng trước khi chiết sản phẩm.

Ngày nay với sự kết hợp những tiến bộ của công nghệ gen trong vi sinh vật, việc thu nhận nhiều loại hợp chất thơm từ carotenoit nhờ các chất xúc tác sinh học có thể tăng trong những năm tới, đặc biệt là β -damasconon hoặc β -ionon – là các chất được kỳ vọng cao.

4.3.3.7. Tạo ra green notes bằng con đường lipoxygenaza/hydroperoxyt lyaza

Các aldehyt và alcohol dễ bay hơi là thành phần chính cho cảm giác tươi và xanh trong rau và hoa quả. Chúng được tạo ra ở thực vật trong nhiều

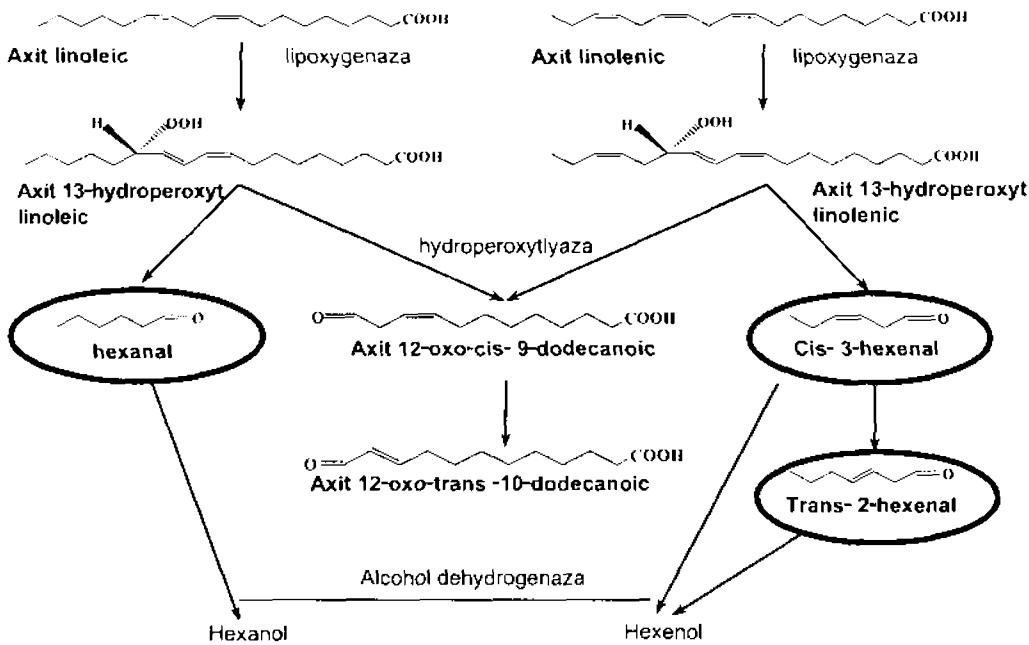
điều kiện khắc nghiệt (stresses) và chúng đóng vai trò chính trong cơ chế phản vệ ở thực vật. Axit béo không no gồm 18 C (C18 polyunsaturated) bị oxy hoá tạo thành 9-, 10- hoặc 13- hydroperoxyt tuỳ thuộc vào hoạt tính xúc tác đặc hiệu của lipoxygenaza. Sau đó, những hợp chất này bị cắt bởi hydroperoxytlyaza tạo thành các aldehyt có C6-, C9- hoặc C10- và bị khử thành alcohol bởi alcohol dehydrogenaza nấm men.



4.3.3.8. Sản xuất green notes bằng con đường công nghệ sinh học

Người ta đã bắt chước (hoặc mô phỏng) con đường chuyển hoá tự nhiên ở thực vật tạo ra green notes để sản xuất các aldehyt và alcohol tự nhiên. Trong ngành công nghiệp chất thơm, chất có nhu cầu sử dụng nhiều nhất là cis-3-hexenol và trans-2-hexenal, bên cạnh đó còn có 2,4-dexadienal.

Trong quá trình sản xuất cơ bản, nguồn lipoxygenaza và hydroperoxytlyaza từ bã táo ép hoặc bột đậu tương được bổ sung vào nguyên liệu chứa axit béo không no (dầu thực vật). Tuy nhiên, khi mở rộng quy mô gấp khó khăn là tính không ổn định của hydroperoxyt lyaza. Mặc dù enzym này có nhạy cảm hay không với hydroperoxyt hoặc với sản phẩm vẫn chưa được khẳng định, nhưng hoạt tính của enzym này giảm nhanh trong môi trường. Hơn nữa, trong dịch chiết thường có hoạt tính izomeraza có tác dụng chuyển hoá cis-3-hexenal thành trans-2-hexanal.



Hình 4.5. Sự phân cắt các axit không no C18 theo con đường lipoxygenaza/hydroperoxyt lyaza và tổng hợp green notes

4.3.3.9. Tạo ra các hợp chất thơm thông qua con đường β -oxy hoá (γ -dexalacton)

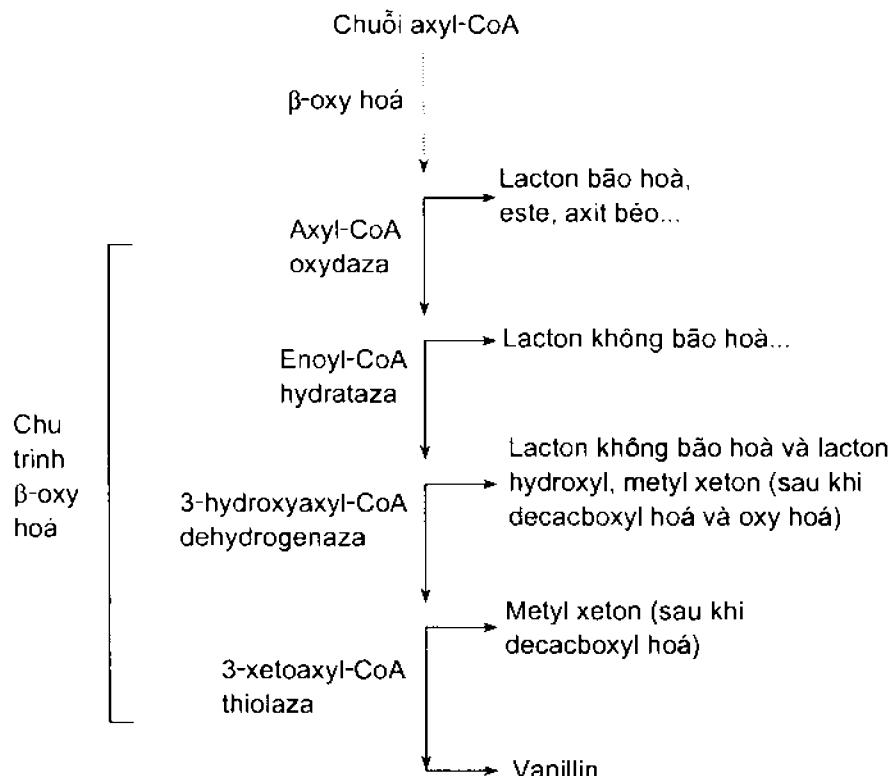
β -oxy hoá là con đường chuyển hoá sinh cơ bản liên quan đến sự phân cắt các axit béo. Nó tác động đến axyl-CoA và bao gồm chuỗi phản ứng 4 bước để chuyển hoá từ axyl-CoA giải phóng 2 cacbon và một axetyl-CoA. Chuỗi phản ứng này được lặp lại cho đến khi hoàn thành quá trình oxy hoá tạo ra các câu tử dễ bay hơi ở dạng chuỗi ngắn hoặc trung bình.

Trong các sản phẩm ở hình 4.6, γ -dexalacton là thành phần chính mặc dù vanillin cũng có thể được tạo ra từ quá trình β -oxy hoá.

Những năm 1960, Okui và cộng sự đã phát hiện ra khả năng tạo ra lacton bằng con đường sinh học trong nghiên cứu về quá trình dị hoá các hydroxyaxit từ nhiều sinh vật. *Candida tropicalis* phân huỷ axit ricinolic thành axit C16, C14, C12, tổng hợp γ -dexalacton, một lacton thể hiện mùi hoa quả và tinh dầu và là lacton quan trọng trong việc hình thành hương thơm của đào, mơ hoặc dâu tây.

Năm 1999, sản lượng các chất thơm đạt 10 tấn làm giá thành giảm đáng kể từ trên 10000 USD/kg (những năm 1980) xuống còn 300 USD/kg năm 2004.

Các nhà sản xuất chất thơm dần quan tâm đến việc hạ giá thành sản xuất. Điều này dẫn tới sự thay đổi trong định hướng nghiên cứu ở lĩnh vực này. Trước kia, họ chú trọng việc sàng lọc các chủng vi sinh vật và chọn lọc điều kiện nuôi cấy trong khi hiện nay người ta chú ý đến cơ chế chuyển hóa sinh học của các hydroxyaxit.



Hình 4.6. Chu trình β-oxy hoá và sự tổng hợp các hợp chất thơm

4.5. Tổng hợp axit docosahexaenoic (DHA)

4.5.1. Các axit béo không no

Việc đánh số các axit béo thường được bắt đầu từ nhóm cacboxyl cho đến nhóm methyl (cacbon n). Nối đôi được chỉ bằng ký hiệu Δ có kèm theo chữ số tương ứng với nguyên tử cacbon đầu tiên tham gia vào liên kết kép đó. Người ta cũng hay dùng dấu ":" tiếp sau con số chỉ số cacbon của axit béo, sau dấu ":" là con số chỉ số nối đôi trong mạch và sau cùng là các con số chỉ vị trí của các nối đôi được đặt trong ngoặc đơn.

Ngoài ra còn có cách gọi tên của nhà hoá sinh, theo danh pháp này, cacbon thứ 1 là nhóm methyl tận cùng. Vị trí của nối đôi cuối cùng được chỉ bằng chữ ω và tiếp theo là chữ số chỉ số thứ tự của nguyên tử cacbon đầu tiên tham gia vào liên kết này.

Các axit béo không no chứa nhiều ở trong các lipit, thường có 1, 2 hoặc 3 nhóm alkyl ở trong gốc axyl của chúng ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2-$) (bảng 4.3).

Các axit béo có nối đôi cô lập (có nhóm metylen cài xen vào giữa hai nối đôi cis) thường được coi là axit béo kiểu izolen hay axit béo có nối đôi không liên hợp hay axit béo có nối đôi dạng malonic.

Khi nối đôi được tính từ đầu nhóm methyl thì có thể chia axit béo không no thành 3 họ ω :

- ω₃ : axit linolenic
- ω₆ : axit linoleic
- ω₉ : axit oleic

Axit erucic (22 :1) chỉ có trong mù tạt thuộc họ ω₉. Axit arachidonic (20 :4) có trong thịt, gan, mỡ lợn và trứng gia cầm là thuộc họ ω₆, trong khi các axit béo từ C₂₀–C₂₂ với 5 hoặc 6 nối đôi thường hay gặp trong lipit của cá lại thuộc họ ω₃.

Có một mối quan hệ về hình thức tồn tại trong một số axit béo không no kiểu olefin, trong đó vị trí của nối đôi được đánh số từ đầu nhóm carboxyl : Axit oleic, axit palmitoleic và axit myristoleic thuộc họ 9 (bảng 4.3). Hai axit héo sau là những hợp phần ít quan trọng trong các thực phẩm có nguồn gốc động vật hoặc thực vật.

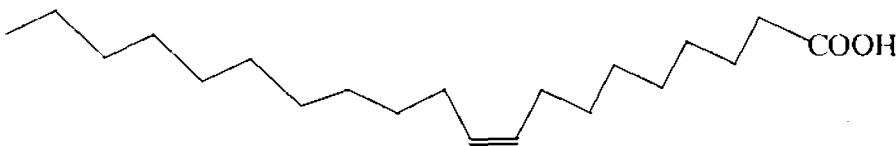
Các axit béo không no có cấu trúc khác thường với một nối đôi trans và/hoặc những nối đôi luân hợp. Các axit béo không no trans như thế có thể coi là những sản phẩm tạo ra trong các quá trình công nghệ (xử lý nhiệt, làm cứng dầu). Axit béo dạng trans của axit oleic thường có trong mỡ cừu, còn dạng trans của axit linoleic thì lại tìm thấy trong hạt chilopsis linearis.

Các axit béo có nối đôi liên hợp với 2, 3 hoặc 4 nối đôi thường hay gặp trong một số hạt có dầu, song không đóng vai trò dinh dưỡng của người. Chẳng hạn như 2 axit có trong tự nhiên với 3 nối đôi liên hợp song chỉ khác nhau về cấu hình của 1 nối đôi ở vị trí thứ 9 (cis, trans).

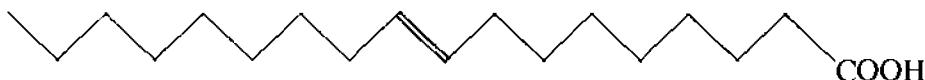
Các axit béo không no, do các nối đôi của mình không thể quay tự do được nên tạo ra những xoắn cứng dọc theo chuỗi cacbon. Tuy nhiên, một phân tử khi có nối đôi dạng trans ít bị bẻ cong hơn khi có nối đôi dạng cis, chẳng hạn cấu hình dạng cis của nối đôi trong axit oleic đã làm mạnh cacbon bẻ cong đi một góc khoảng 40°.

Bảng 4.3. Các axit béo không no

Ký hiệu rút gọn	Cấu trúc	Tên chung	Điểm nóng chảy (°C)
A. Axit béo có nối đôi không liên hợp dạng cis			
<i>Hợp ω - 9</i>			
18:1 (9)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	Axit oleic	13,4
22:1 (13)	$-(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Axit erucic	34,7
24:1 (15)	$-(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Axit nervonic	42,5
<i>Hợp ω - 6</i>			
18:2 (9,12)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	Axit linoleic	-5
18:3 (6,9,12)	$-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$	γ Linolenic	
20:4 (6,9,12,15)	$-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	Arachidonic	-49,5
<i>Hợp ω - 3</i>			
18:3 (9,12,15)	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	α Linolenic	-11,0
20:5 (5,8,11,14,17)	$-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_5-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$	EP A Eicosapentae noic	
22:6 (4,7,10,13, 16,19)	$-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_6-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$	DH A Docosahexac noic	
<i>Hợp ω - 9</i>			
18:1 (9)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	Axit oleic	13,4
16:1 (9)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	Axit palmitoleic	0,5
14:1 (9)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$	Axit myristoleic	
B. Axit béo có nối đôi không liên hợp dạng trans			
18:1 (tr9)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	Axit elaidic	46
18:2 (tr9, tr12)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	Axit linoelaidic	28
C. Axit béo có nối đôi liên hợp			
18:3 (9tr11tr13)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	α Eleostearic	48
18:3 (tr9tr11tr13)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	β Eleostearic	71,5
18:4 (9,11,13,15)	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-(\text{CH}=\text{CH})_2-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ (Hình học của các nối đôi chưa được xác định)	Parinaric	85,0



Trong khi đó axit elaidic tương ứng có cấu hình dạng trans thì có mặt cacbon bị rút ngắn đi một ít song vẫn giống như dạng mạnh thẳng của axit stearic :



Mức độ gấp của phân tử axit béo cũng được gia tăng lên khi số liên kết đôi cis tăng lên. Do vậy, 4 nối đôi cis trong axit arachidonic sẽ làm lệch khỏi đường thẳng một góc 165° .

Các axit béo họ omega 6 ($\omega-6$) và họ omega 3 ($\omega-3$) là những axit béo cần thiết cho con người. Tính cần thiết của các axit béo $\omega-6$ và $\omega-3$ đối với con người là do các mô động vật không có khả năng đưa được các nối đôi vào những vị trí ưu tiên trước cacbon 9 tính từ đầu mút omega. George và Mildred Burr đã đề nghị coi các axit béo sau là những axit béo cần thiết :

- Axit linoleic (hay axit 9, 12 – octadecadienoic, ký hiệu 18:2 $\omega-6$) : do trong phân tử có một liên kết đôi ở cacbon 6 tính từ đầu nhóm methyl (carbon ω).

Axit linoleic không thể được tổng hợp bởi cơ thể người. Axit này và các axit thành viên khác của họ $\omega-6$ được coi là những axit béo cần thiết đòi hỏi phải có để xây dựng nên bộ khung cho các màng sinh chất.

- Axit arachidonic (hay axit 5, 8, 11, 14 – eicosatetraenoic, ký hiệu 20:4 $\omega-6$) : do nó có 20 nguyên tử cacbon và 4 nối đôi trong đó có một nối đôi định vị ở vị trí $\omega-6$.

- Axit α -linolenic (LNA) (hay axit 9, 12, 15 – octadecatrienoic, 18:3 $\omega-3$) : có 18 nguyên tử cacbon và 3 nối đôi, trong đó có một nối đôi đặt ở vị trí cacbon $\omega-3$.

- Axit eicosapentaenoic (EPA) là một axit béo omega-3 ($\omega-3$) : Trong các tài liệu về sinh lý còn có tên 20:5 $\omega-3$. Nó cũng có tên gọi thông thường là axit timnodonic. EPA là một axit cacboxylic có 20 nguyên tử

cacbon và 5 nối đôi cis, trong đó nối đôi đầu tiên đặt ở cacbon thứ ba tính từ đầu cuối omega.

Cơ thể người thu nhận được EPA khi ăn các cá béo hoặc dầu cá như gan cá biển to, cá trích, cá thu, cá hồi. EPA cũng có trong sữa mẹ. Tuy nhiên, cá không sản xuất ra được EPA một cách tự nhiên mà cá thu được EPA khi tiêu thụ các vi tảo. Các vi tảo có thể coi như một nguồn EPA thương phẩm. EPA thường không có trong các cây thương lái mà chỉ có ở dạng vết trong rau sam. Vi tảo và những phần phụ từ vi tảo là những nguồn cung cấp đáng chú ý của EPA và các axit béo khác bởi EPA từ cá thường có chứa các độc tố do ô nhiễm.

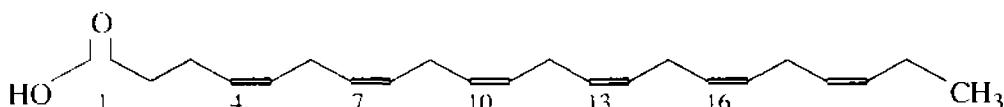
Cơ thể người cũng có thể chuyển hóa axit α -linolenic (LNA) thành EPA, song với cách này ít hiệu quả hơn nhiều so với khi hấp thu EPA từ thực phẩm có chứa nó. Ngoài ra, LNA vốn là một axit béo cần thiết nên phải được đảm bảo cung cấp một lượng thích hợp. Hơn nữa EPA cũng là một chất tiền thân của axit docosahexaenoic (DHA), nếu trong thức ăn không chứa cả EPA và DHA thì EPA phải có mặt với một mức đủ để vừa đảm bảo cho nhu cầu trao đổi chất vừa đảm bảo cho việc chuyển hóa đến DHA.

4.5.5.1. Ý nghĩa làm sàng

EPA có hiệu ứng ức chế đến các enzym của gan CYP2C9 và CYP2C19. Khi liều lượng cao EPA cũng có thể ức chế hoạt động của các CYP2D6 và CYP2A4 là những enzym quan trọng liên quan đến sự biến đổi chất của các chất thuốc (drug).

EPA đã cho thấy có những biểu hiện làm giảm hoặc ức chế sự tiến triển của bệnh ung thư vú cũng như hỗ trợ trong điều trị chung u tuỷ ở người.

– Axit docosahexaenoic (DHA) : 22 :6 (ω –3) là axit 4, 7, 10, 13, 16, 19 hexaenoic hay còn gọi là axit cervonic, là một axit béo cần thiết thuộc họ ω –3. Về cấu trúc hóa học, DHA là một axit carboxylic có 22 cacbon và 6 nối đôi cis, trong đó nối đôi đầu tiên định vị ở cacbon thứ 3 tính từ đầu omega :



Dầu cá rất giàu DHA. Đa phần DHA trong cá và những cơ thể phức tạp khác đều bắt nguồn từ các vi tảo quang hợp và dị dưỡng rồi càng ngày càng tập trung ở trong các cơ thể như thế nó di chuyển dọc theo chuỗi thức ăn. DHA thường phẩm thường được sản xuất từ các loài vi tảo dị dưỡng như Cryptocodiniumcohnii và Schizochytrium SR21. Thraustochytrium strain G13 (Sitsma and Swaaf, 2004 ; Swaaf et al, 2003).

Đa số động vật qua trao đổi chất cũng tạo ra được một lượng rất ít DHA thông qua tiêu thụ axit alpha-linolenic, một axit béo omega-3 tìm thấy trong thực vật, động vật và trong sữa.

DHA là một axit béo quan trọng trong photpholipit ở tinh trùng và trong photpholipit ở bộ não, đặc biệt là trong võng mạc.

DHA trong thức ăn có thể làm giảm nguy cơ các bệnh về tim do nó làm giảm thiểu được mức triglycerit ở máu của người. Mức DHA thấp là do nó phải dùng để hạ thấp mức serotonin ở bộ não có liên quan với bệnh ADHD, bệnh Alzheimer.

4.5.1.2. DHA là hợp phần cấu tạo nên hệ thần kinh trung ương

DHA là axit béo cần thiết chiếm lượng nhiều nhất trong bộ não và trong võng mạc. Nó chiếm tới 40% lượng axit béo đa nối đôi trong bộ não, 60% axit béo đa nối đôi của võng mạc và chiếm 50% khối lượng của màng sinh chất của tế bào thần kinh (nơron) (Meharban Singh, 2005).

Trong tất cả axit béo thì DHA có tác dụng rộng rãi nhất đến thành phần axit béo đa nối đôi của bộ não (Youdim KA, Martin A, Joseph J.A, 2000). DHA thường có trong 3 photpholipit : photphatidyletanamin, etanolamin plasmalogen và photphatidylserin. DHA điều biến sự vận chuyển các thể mang trung gian của colin, glyxin và taurin, điều biến sự vận hành của các kênh kali có điều chỉnh bị chậm trễ và cũng điều biến cả sự đáp ứng của rodopsin có chứa trong các túi (bóng) xinap.

Tình trạng thiếu hụt DHA thường dẫn đến sự sa sút về nhận thức. Photphatidylserin thường kiểm soát sự tự chết (apoptosis) và mức DHA thấp sẽ làm hạ thấp photphatidylserin của tế bào thần kinh và làm tăng sự chết của tế bào thần kinh. Ở trong vỏ đại não của những bệnh nhân có triệu chứng chán nản nghiêm trọng (bị buồn chán trầm trọng) mức DHA thường bị suy kiệt.

4.5.1.3. DHA và ung thư

DHA kìm hãm được sự sinh trưởng của tế bào ung thư ruột kết ở người (Kato T & al, 2002 ; Schonberg S.A & al, 2006) mạnh hơn các axit béo đa nối đôi omega-3 khác. Hiệu ứng gây độc tế bào của DHA không phải do sự peroxy hóa các lipit hay bất kỳ sự hư hại do oxy hóa nào khác được gia tăng mà là do các chất diêu hoà sinh trưởng ở trong tế bào bị giảm sút. Tuy nhiên, các kiểu ung thư khác nhau sẽ tương tác với các axit béo đa nối đôi một cách khác nhau và sẽ biểu hiện độ nhạy cảm khác nhau đối với các axit béo đa nối đôi. Người ta cũng đã chứng minh DHA làm tăng tính hiệu quả của liệu pháp hoá học đối với tế bào ung thư ở tiền liệt tuyến (Shaikh IAA & al, 2008).

4.5.1.4. DHA với phụ nữ ở thời kỳ thai nghén và thời kỳ tiết sữa

Nồng độ DHA ở trong sữa mẹ chiếm khoảng từ 0,07% tới hơn 1% tổng lượng axit béo, trung bình khoảng 0,34%. Mức DHA trong sữa mẹ còn cao hơn nếu người mẹ ăn nhiều cá.

Gần đây người ta chú ý đến DHA hơn và coi DHA như một thức ăn bổ sung cho phụ nữ trong thời kỳ thai nghén nhằm cải thiện sự tập trung và sự sắc bén của thị giác. Khi mức DHA ở trong dịch tương và trong hồng cầu thấp sẽ kéo theo sự phát triển của võng mạc nghèo nàn, tính sắc sảo của thị giác thấp và sự phát triển của nhận thức kém. Trong một nghiên cứu gần đây cho thấy, axit α-linolenic là một nguồn DHA của bào thai.

DHA làm cho công thức sữa nhân tạo cho trẻ em giống với sữa mẹ hơn công thức sữa pha chế có chứa axit α-linolenic và axit linoleic vốn là hai chất tiền thân của DHA. Công thức sữa nhân tạo bán ở Bắc Mỹ đã sử dụng các lipit tổng hợp từ các vi sinh vật làm nguồn DHA (Connell Gary J.et al, 2001).

DHA được coi là rất hữu ích với những người có tiền sử về bệnh tim, với những trẻ em để sớm để hỗ trợ và nuôi dưỡng cho sự phát triển của bộ não được khỏe mạnh, đặc biệt là ở trẻ nhỏ. Một số DHA được sản xuất ra bằng cách trích ly từ tảo là những sản phẩm ăn kiêng.

Một nghiên cứu (Clandinin M.et al, 2005) cho thấy trẻ sinh thiếu tháng được nuôi bằng công thức sữa nhân tạo của trẻ sơ sinh được tăng cường bằng DHA lấy trực tiếp từ tảo thường có trọng lượng cơ thể tốt hơn những trẻ nuôi bằng công thức được tăng cường DHA từ dầu cá. Mặt khác lại không có

nguy cơ bị nhiễm các chất độc hại như methyl thuỷ ngân hay dioxin vốn có mặt trong cá và dầu cá. Điều này đặc biệt quan trọng đối với phụ nữ có thai và đối với trẻ em đang bú sữa.

4.5.1.5. DHA và EPA trong dầu cá

Dầu cá thường được bán rộng rãi dưới dạng viên nang bọc gelatin có chứa một hỗn hợp các axit omega-3 bao gồm EPA và một lượng nhỏ DHA. Các nghiên cứu đã cho thấy dầu cá thường có DHA cao và EPA thấp, có tác dụng làm hạ thấp các xytokin là tác nhân dễ bị viêm nhiễm như các xytokin IL-6. Khi bị viêm nhiễm sẽ dẫn đến các bệnh thoái hoá thần kinh và bệnh tự miễn dịch. Chúng cho thấy rằng bộ não bình thường có chứa DHA mà không chứa EPA (Vedin L et al, 2008).

4.5.2. Tổng hợp DHA qua trao đổi chất

DHA có mặt trong cơ thể người hoặc qua đường thức ăn hoặc là qua con đường tổng hợp từ axit eicosapentaenoic (EPA 20 : 5 ω-3) thông qua axit docosapentaenoic như là chất trung gian.

Các con đường hoá sinh cho sự khử bão hoà (desaturation) các axit béo omega-3 và omega-6 chỉ có mặt trong lục lạp của tế bào. Vì thế chỉ có vi tảo và một số nấm là có khả năng sinh các axit béo cần thiết (EFA_s) này. Thực vật biển và thực vật can là những nguồn đầu tiên của axit béo cần thiết trong chuỗi thức ăn, cá và các động vật biển khác có khả năng kéo dài (elongate) và khử bão hoà (desaturation) các axit béo cần thiết gốc để hình thành nên các axit béo không no đa nối đôi có mạch dài hơn.

Các mô động vật đặc biệt là gan có khả năng kéo dài và khử bão hoà các axit béo cần thiết gốc để hình thành nên dây các hợp chất thuộc những họ ω tương ứng. Axit arachidonic (AA) và axit docosahexaenoic (DHA) có thể được (tổng hợp) tạo thành từ axit linoleic (LA) và axit α-linolenic (LNA) tương ứng song chúng chỉ trở thành axit béo cần thiết khi khả năng kéo dài và khả năng khử bão hoà được giới hạn. Tuy nhiên, thường hay xảy ra sự khử bão hoà cạnh tranh giữa các axit béo omega-3, omega-6 và omega-9 đối với enzym delta-6-desaturase vì đây là giai đoạn kiểm soát cả quá trình. Theo Sprecher, phản ứng này được xúc tác bởi một delta 4 desaturase gồm 3 giai đoạn : giai đoạn đầu tiên (giai đoạn kéo dài), tiếp theo là giai đoạn khử bão hoà và sau cùng là giai đoạn β-oxy hoá ở peroxisom và mạch bị cắt

ngắn đến axit béo đa nối đôi có 22 cacbon. Giai đoạn cuối cùng được coi là có sự chuyển đổi ngược. Nếu trong thức ăn không có hoặc thiếu axit béo omega-3 thì việc kéo dài và khử bão hoà axit béo omega-6 sẽ làm tăng đáng kể axit docosapentaenoic (DPA 20 :5, ω -6). Nếu cả hai axit béo omega-3 và omega-6 thiếu thì axit eicosatrienoic (ETA 20 :3, ω -9) sẽ được tích tụ. Tỷ số trien/tetraen có thể được dùng như một chỉ số của sự thiếu hụt các axit béo cần thiết mà không có giá trị như một dấu hiệu của sự thiếu hụt của riêng axit omega-3.

Sự chuyển đổi các axit béo cần thiết gốc thành những axit béo đa nối đôi có mạch cacbon dài hơn 18C thường xảy ra dưới sự điều khiển một cách chủ động. Vì thế khi có các hiệu ứng của sự cung cấp axit arachidonic sẽ làm cho axit eicosapentaenoic (EPA 20 :5, ω -3) và axit DHA không thể tái sản xuất được khi cung cấp một lượng tương đương của AA hoặc của LNA. Tính độc nhất vô nhị của các hiệu ứng sinh học của việc nuôi dưỡng bằng sữa mẹ hoặc bằng photpholipit động vật đến sự trao đổi chất của axit béo cần thiết dựa vào sự cung cấp trực tiếp các axit béo đa nối đôi mạch dài bằng cách đi vòng qua giai đoạn điều hoà của enzym delta-6 desaturaza. LA trong thức ăn dư kết hợp với một số dầu thực vật, nhất là dầu rum (saflower), dầu hướng dương và dầu ngũ cốc (corn oil) có thể làm giảm sự tạo thành DHA từ LNA bởi lẽ enzym delta-6 desaturaza thường bị kìm hãm bởi lượng cơ chất dư. Việc tạo thành axit arachidonic (AA) thêm sẽ bị giảm xuống khi cung cấp thừa LA. LA thừa, như đã thấy ở các trẻ nhỏ được nuôi ở nội trú hoặc được bổ mẹ nuôi với sự cung cấp dầu ngũ cốc hoặc dầu rum như nguồn axit béo chủ đạo thì sẽ ức chế sự kéo dài và sự khử bão hoà các axit béo cần thiết gốc, do đó sẽ làm giảm sự cung cấp axit béo đa nối đôi mạch dài cần thiết cho sự tổng hợp các màng. Các axit béo đa nối đôi của sinh vật biển thường cung ứng một lượng AA tối thiểu đã hình thành trước và một lượng quan trọng các axit béo đa nối đôi mạch dài thuộc họ omega-3 đã được hình thành trước như EPA và DHA (Voss A. et al, 1991 ; Uayy R. et al, 1989 ; Brenner et al, 1969).

Trong cơ thể người, DHA có thể được sinh tổng hợp từ EPA (20:5, ω -3) kéo dài đến DPA (22 :5, ω -3) rồi đến C24:5, ω -3, sau đó được khử bão hoà đến 24:6, ω -3 rồi được β -oxy hoá ở peroxisom và mạch C bị rút ngắn đến DHA (22:6, ω -3) theo sơ đồ của Sprecher.

Chương V

CÔNG NGHỆ MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ THỰC VẬT

Từ xa xưa, con người đã biết sử dụng một số cây cỏ để làm thực phẩm, điều trị bệnh tật và các vết thương. Theo dòng lịch sử đã hình thành các nền y dược học cổ truyền nổi tiếng ở La Mã, Ai Cập, Trung Quốc, Ấn Độ, châu Âu, Bắc Mỹ, châu Mỹ La tinh...

Từ chỗ chỉ biết khai thác các cây cỏ hoang dại để sử dụng, con người đã biết trồng trọt nhiều loại cây lương thực, thực phẩm và các cây dùng làm thuốc, mỹ phẩm...

Đầu thế kỷ XIX, sau khi Seturner chiết xuất được morphin từ nhựa quả thuốc phiện vào năm 1805 thì các nhà khoa học mà chủ yếu là các nhà Hoá học và Sinh học đã tập trung nghiên cứu các hoạt chất có hoạt tính sinh học từ cây cỏ và đó là tiền đề cho sự ra đời của ngành hoá học thực vật (phytochemistry).

Các nhà hoá học thực vật đã chiết xuất và xác định được nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao từ cây cỏ như quinin trong vỏ cây canh kina để điều trị sốt rét, caphein trong hạt cafe và lá chè có tác dụng kích thích hệ thống thần kinh trung ương, vitamin C từ quả chanh, cam có tác dụng phòng và điều trị bệnh chảy máu dưới da cho các thuỷ thủ đi biển lâu ngày. Ngoài ra còn phát hiện được nhiều hợp chất có hoạt tính trừ sâu phá hoại cây trồng như nicotin của thuốc lá, rotenon của cây ruốc cá, pyrethrin từ cúc...

Trong những năm giữa thế kỷ XX, ngành hoá hữu cơ đã phát triển và đạt nhiều thành tựu rực rỡ trong việc phát hiện các sunfamit, kháng sinh, hoocmon... đã tổng hợp toàn phần được nhiều thuốc mới, có hiệu quả điều trị cao, tuy nhiên phần lớn các thuốc quan trọng là các thuốc tổng hợp hoá học.

Sau đó các nhà khoa học đã phát hiện các thuốc tổng hợp do có cấu tạo hoá học ngoại lai với thiên nhiên nên gây ra nhiều tác dụng độc hại cho con người, mà chủ yếu là gây quái thai, ung thư và các tai biến nguy hiểm như đái ứng, diếc, rụng tóc... Vì vậy, nhiều nhà khoa học đã trở lại nghiên cứu các

hợp chất có hoạt tính sinh học từ cây cỏ vì các chất này có nguồn gốc từ thiên nhiên, ít độc hại. Nhờ những cố gắng nỗ lực đó, ngành hoá học thực vật đã đạt được nhiều thành quả tốt đẹp trong lĩnh vực nghiên cứu, sử dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học phục vụ cho việc phòng và điều trị bệnh tật cho con người, sản xuất các thuốc trừ sâu sinh học cũng như các mỹ phẩm.

Đặc biệt trong vài chục năm trở lại đây, đã xuất hiện và phát triển rất rộng rãi các sản phẩm bổ sung dinh dưỡng (nutritional supplements). Đó là những sản phẩm thực phẩm có tác dụng nâng cao sức khoẻ, kéo dài tuổi thọ cho con người. Các sản phẩm này chủ yếu có tác dụng chống oxy hoá (antioxidant), chống lão hoá (antiaging) và bảo vệ hay tăng cường các chức năng hoạt động trong cơ thể con người.

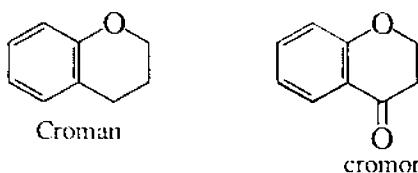
Tuy khoa học đã khám phá và sử dụng được nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học quý giá từ cây cỏ, nhưng thế giới thực vật trên Trái Đất rất phong phú và đa dạng, còn rất nhiều loại cây cỏ chưa được nghiên cứu và khai thác. Theo thống kê thì thế giới có 248428 loài thực vật, riêng nước ta có 13766 loài thực vật trong đó có khoảng 3000 cây được dùng làm thuốc.

Sau đây, chúng tôi sẽ đề cập đến một số nhóm chất có hoạt tính sinh học cao, phân bố rộng rãi trong nhiều loài thực vật, đã và đang được khai thác và đưa vào ứng dụng nhiều trong việc phòng và điều trị bệnh tật, nâng cao sức khoẻ và kéo dài tuổi thọ cho con người.

5.1. Các hợp chất flavonoid

5.1.1. Cấu tạo hóa học

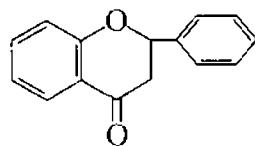
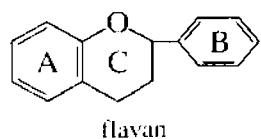
Có thể coi các flavonoid là những dẫn xuất của croman và cromon, có khung cacbon C₆ – C₃ (phenylpropan)



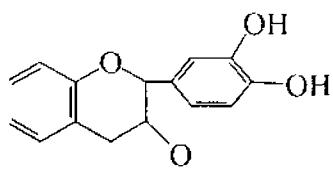
Khi croman ngưng tụ với phenol thì tạo thành flavan.

Khi cromon ngưng tụ với phenol thì tạo thành flavanon.

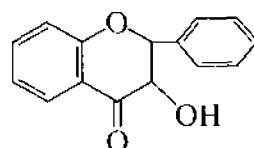
Các dẫn xuất của croman : **Các dẫn xuất của cromon :**



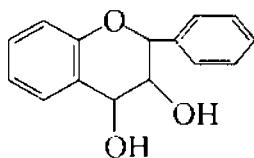
flavanon (không màu, sẽ có màu đỏ
khi đun nóng)



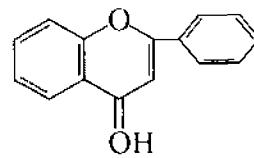
flavanol-3, catechin (không màu)



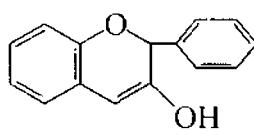
flavanol (da cam, nâu)



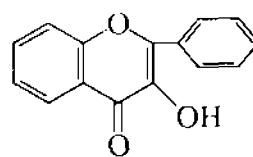
flavandiol-3,4 catechin (không màu)
leucoanthoxyanidin



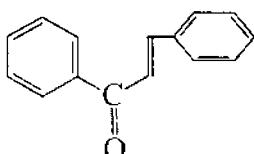
flavon (vàng)



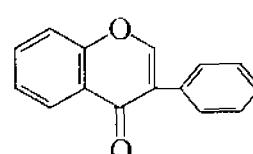
anthoxyanidin (đỏ, xanh)



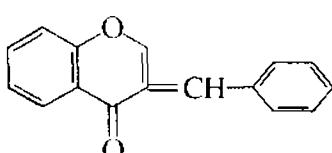
flavonol (vàng)



chalcon (đỏ, tía)



izoflavon (đỏ)

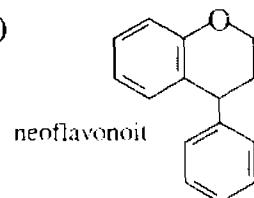


auron (vàng)

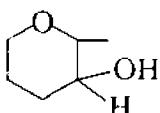
– Trong số các hợp chất cùng loại của C15 kiểu flavonoit, còn có :

+ Izoflavonoit (vòng B nối vào vị trí 3 như izoflavan)

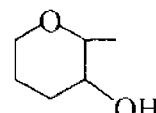
+ Neoflavonoit (vòng B nối vào 4) :



– Có 2 đồng phân thuận nghịch do C₃ gây ra :

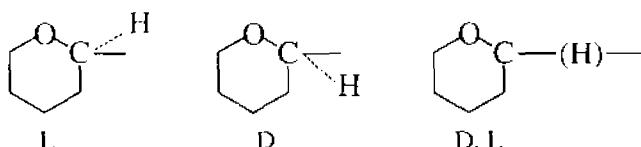


OH nằm trên mặt phẳng quay cực
(epi...)



Không thêm ký hiệu

– Có 3 đồng phân dị cấu thế do C₂ gây ra :



5.1.2. Đặc điểm cấu trúc và tính chất hóa học

5.1.2.1. Đặc điểm cấu trúc

Hệ thống nối đôi liên hợp tạo ra 2 vòng thơm benzen và vòng γ-pyron làm cho flavonoit có khả năng hấp thụ tia tử ngoại. Thường thu được 2 dải hấp thụ cực đại : dải 1 có $\lambda_{\text{max}} = 320 - 380$ nm, dải 2 có $\lambda_{\text{max}} = 240 - 280$ nm. Dải hấp thụ 2 thường cố định hơn dải 1 và giữa 2 dải thường có 1 vai phụ, đặc biệt là đối với flavon và flavonol.

Tùy theo pH của môi trường và điều kiện tạo muối và phức với các kim loại (K, Na, Fe hoặc Al) mà các bước sóng hấp thụ có thể chuyển dịch. Theo Jurd, dải 1 ứng với vòng A, dải 2 ứng với vòng B. Nếu trong phân tử có nhiều nhóm OH thì dải 1 sẽ chuyển dịch về phía có bước sóng dài, còn dải 2 sẽ chuyển dịch về phía có bước sóng ngắn. Quang phổ tử ngoại là một trong những phương pháp phổ biến để phát hiện và định lượng các flavonoit.

Mặt khác, cũng do các nối đôi liên hợp mà các flavonoit thường có màu, đặc biệt là màu vàng. Nếu hệ thống này bị phá vỡ thì hợp chất bị mất màu. Ví dụ : catechin.

5.1.2.2. Tính chất hóa học

Tính chất hóa học của nhóm chất flavonoid được quyết định bởi 2 vòng thơm benzen A, B và 1 dị vòng Cγ – pyron 6 cạnh.

Trong tự nhiên, các hợp chất này thường tồn tại dưới dạng glycozit, do vậy dễ tan trong nước và các dung môi phân cực.

Nhóm đường được gắn trực tiếp vào nguyên tử C hoặc trong đa số trường hợp gắn vào các nhóm OH ở vị trí 3 hoặc 7. Phân tử đường có thể là L-ramnoza, D-glucoza, glucoramnoza, galactoza hoặc arabinoza.

Các glycozit rất dễ bị thuỷ phân trong môi trường axit, kiềm nhẹ hoặc bởi enzym β-glucosidaza, emulsin làm cho phần đường và phần aglycol (đặc trưng cho flavonoid) tách rời nhau.

Các hợp chất flavonoid có hoạt tính sinh học được gọi là bioflavonoid, hiện đã được phát hiện tới 1000 chất.

Các nhóm OH có tính axit (có khả năng đẩy electron), dễ tạo muối tan trong nước với các hydroxyt kiềm.

Khi có thêm nhóm carbonyl (C = O, carbon monoxyt) trong phân tử và khi có nhiều nhóm OH thì tính axit lại càng tăng thêm và flavonoid có thể tan trong dung dịch dicarbonat natri (NaHCO_3).

Nhóm OH thường tạo phức được với AlCl_3 , NaOH , KOH , NH_4OH cho màu vàng đặc trưng. Đồng thời sự có mặt của các nhóm chức này là nguyên nhân làm cho các flavonoid tự nhiên có ái lực mạnh đối với các ion kim loại nặng hoá trị 2 như Fe, Cu, Zn... và có thể tạo phức chất bền vững với các nguyên tố chuyển tiếp thuộc chu kỳ 4. Những kim loại này thường có trong các tế bào sinh vật dưới dạng các nguyên tố vi lượng cần thiết cho sự sinh tồn của tế bào.

Các nhóm OH tự do rất dễ nối với nhau bởi các liên kết hydro nội phân tử hoặc giữa các phân tử. Hiện tượng này ảnh hưởng nhiều tới những tính chất hóa lý học như điểm sôi, điểm nóng chảy, độ hòa tan, đặc tính phô tử ngoại, cấu trúc phân tử... Khả năng phản ứng cũng có thể bị giảm đi đáng kể.

Trong thiên nhiên ít gặp các este của phenol, nhưng trong thí nghiệm, *in vitro*, các nhóm OH của phenol thường dễ dàng cho este, thường gặp là este metylic.

Các flavonoit rất dễ bị oxy hoá. Quá trình này có kèm theo sự mở vòng pyron và đó cũng là nguyên nhân gây ra tác dụng của flavonoit đối với các enzym oxy hoá-khử (oxydoreductaza). Nhiều phản ứng oxy hoá khác như với AgNO_3 , KMnO_4 ... vẫn được dùng để định tính và định lượng flavonoit.

5.1.3. Hoạt tính sinh học

5.1.3.1. Khả năng chống peroxo hóa lipit màng tế bào của flavonoit

Các hợp chất flavonoit trong những điều kiện nhất định dễ tạo ra các gốc tự do ArO (aryl) bền vững. Trong cơ thể sinh vật, các quá trình peroxo hóa lipit màng tế bào thường diễn ra theo phản ứng dây chuyền với sự tham gia của nhiều loại gốc tự do không bền nhưng độc hại cho tế bào. Con đường này thuận lợi nhất cho phản ứng peroxo hóa các lipit chưa no hoặc là các axit béo có trong thành phần photpholipit của màng tế bào sinh vật. Vì lẽ đó, sự peroxo hóa lipit trước hết làm tổn hại chức năng sinh hóa màng và gây ra những thay đổi bệnh lý bất lợi cho cơ thể sống.

Những gốc tự do cùng các hydroperoxyt sinh ra trong quá trình peroxo hóa lipit sẽ làm tổn thương màng tế bào, đặc biệt là làm biến đổi chức năng của nhiều enzym và protein, gây tác hại đến sự hoạt động bình thường của tế bào. Đồng thời, quá trình còn sinh ra các chất xeton, aldehyt, dialdehyt (Ví dụ : aldehyt malonic). Những chất đó sau này có thể tạo ra những liên kết chéo cộng hoá trị nội phân tử và giữa các phân tử với những nhóm chức của protein và các phân tử sinh học khác làm cho các chức năng sinh học bình thường tối cần thiết cho sự sống bị sai lệch và mất đi. Đó là những nguyên nhân làm cho cơ thể chóng già, sức đề kháng giảm do sự suy giảm của hệ thống miễn dịch.

Điều đáng chú ý là những gốc tự do độc hại nói trên không bền và rất dễ phản ứng. Trong khi đó những gốc tự do tạo ra từ những chất flavonoit tự nhiên ArO lại rất bền vững, khó phản ứng. Trong quá trình peroxo hóa lipit màng, những gốc này sẽ loại bỏ và thay thế các gốc kém bền dẫn tới sự cắt đứt quá trình. Đó chính là cơ chế giải thích sự chống peroxo hóa lipit của flavonoit, dẫn tới làm chậm lại quá trình lão hóa của con người. Vì thế có thể gọi các gốc ArO là các tác nhân thu dọn và huỷ diệt các gốc tự do có hại (scavenger).

Mặt khác các flavonoit có thể ngăn chặn sự hình thành các gốc tự do có hại bằng cách kết hợp với các ion kim loại nặng (Fe , Mn) vốn là những tác nhân xúc tác nhiều quá trình sinh hóa làm xuất hiện các gốc tự do.

Để hạn chế và ngăn ngừa sự peroxy hoá lipit màng, còn có nhiều chất chống oxy hoá nội sinh hoặc ngoại sinh như vitamin E, glutathion, xystein, naxctyl xystein, hydro lipoat...

5.1.3.2. Tác dụng của flavonoit đối với các enzym sinh học

a) Bệnh đái tháo đường

Đặc biệt là ở giai đoạn cuối làm tăng hàm lượng lipit máu và làm hẹp các mạch máu lại. Hiện tượng này có thể làm giảm sự tiêu ứ trong ổ mắt và ống tiêu hoá. Áp lực thẩm thấu của dulxitol (D-galactitol) dư thừa không được chuyển hoá bình thường là nguyên nhân làm giảm thị lực và giảm khả năng hấp thu của đường ruột. Trong cơ thể người bình thường, aldoreductaza khử glucoza thành dulcitol. Flavonoit có thể giúp kìm hãm hoạt tính của enzym này.

b) Các bệnh dị ứng

Ví dụ như hen phế quản từ lâu vẫn được điều trị bằng thuốc dinatri cromoglycat. Chất này có cấu trúc tương tự như flavonoit với nhân benzopyron trong phân tử do đó cả 2 chất đều có tác dụng điều trị như nhau. Chúng kìm hãm hoạt tính của enzym proton-ATP.aza trong màng tế bào mastoxyl làm cho các tác nhân histamin và serotonin chứa trong tế bào không bị thoát ra gây nên các triệu chứng đặc trưng của bệnh dị ứng.

c) Các siêu vi trùng (virut)

Chỉ có thể gây bệnh khi lớp vỏ protein bị tiêu huỷ bởi các lyzoxom với sự tham gia của enzym proton-ATP.aza và có thể của cả photpholipaza A2. Các enzym này đều bị flavonoit kìm hãm. Do đó có thể hiểu vì sao nhiều cây thuốc dân gian có chứa flavonoit vẫn được dùng để phòng và điều trị các bệnh cảm cúm do siêu vi trùng.

Theo các công trình nghiên cứu của GS. Racker : đối với những tế bào ác tính gây ra bởi virut thì hoạt động của các màng huyết thanh (K^+ , Na^+) ATP.aza giảm đi chỉ còn 10% so với bình thường. Nguyên nhân của hiện tượng này là do tác dụng của các enzym kinaza (Ví dụ : hexo kinaza).



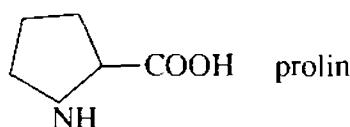
Khi ủ các tế bào nghiên cứu với flavonoit, sự hoạt động của hệ thống bơm trở lại bình thường và các tế bào ác tính trở lại thành các tế bào bình thường vì flavonoit đã vô hoạt các enzym kinaza.

Những người nghiên thuoc lá nặng có tỷ lệ ung thư vòm họng đáng kể do tác dụng của các chất nhựa tạo ra trong khi hút, trong đó có những carbonhydro đa vòng ngưng tụ như benzo α -pyren. Các chất này dễ bị hydroxyl hoá tạo ra epoxyt trung gian có khả năng gắn với các nhóm amin của các bazơ của axit nucleic, đặc biệt là guanin trong nhân tế bào. Kết quả là sự sao chép của tế bào bị rối loạn và tế bào trở thành ác tính. Đã có nhiều thử nghiệm dùng flavonoit trong lâm sàng có kết quả tốt trong ung thư vòm họng do thuốc lá.

5.1.3.3. *Hoạt tính kháng viêm, kháng sinh*

Hiện tượng viêm tấy, sưng, đau có liên quan đến sự giải phóng các prostaglandin, thu hút các bạch cầu đến nơi tổn thương, gây cảm giác đau và sau khi di chuyển từ máu đến não, làm mất sự cân bằng của trung tâm điều tiết thân nhiệt và gây sốt. Do các flavonoit có khả năng kìm hãm hoạt tính của các enzym prostaglandin như cyclooxygenaza và lipoxygenaza nên ta có thể làm giảm đau và hạ nhiệt cho bệnh nhân với các chất này. Cơ chế này cũng giải thích tác dụng chống co thắt cơ trơn, hiện tượng co cứng cơ bắp, đau đầu. Aspirin là một phương thuốc thông dụng trị sốt và giảm đau cũng có tác dụng như trên, tuy nhiên có thể gây ra phản ứng phụ như làm chảy máu trong các trường hợp loét dạ dày. Flavonoit không tạo phản ứng phụ như aspirin và những chất salixilat khác.

Việc điều trị thấp khớp bằng các thuốc loại glucocorticoit để tiêu sưng, giảm đau một cách không thận trọng cũng có nguy cơ làm chảy máu dạ dày. Khi dùng các flavonoit thì các tổ chức liên kết không bị phá huỷ mà còn được củng cố thêm. Cơ chế có thể là do sự kết hợp giữa việc ngăn chặn sinh tổng hợp prostaglandin với việc kích thích phản ứng hydroxyl hoá prolin nghĩa là tạo ra những liên kết chéo trong collagen.



* *Tác dụng gây té tại chỗ*

Flavonoit đã được sử dụng trong các trường hợp bị côn trùng đốt và đốt khi còn có hiệu lực hơn cả cocaine. Có nhiều loại nọc độc có chứa photpholipaza A₂ vốn có khả năng giải phóng axit arachidonic, chất này lại chuyển tiếp thành prostaglandin. Như đã nói ở trên, flavonoit có tác dụng kèm hâm hoạt tính của enzym photpholipaza A₂ và các enzym chuyển hoá prostaglandin, điều này giải thích tác dụng gây té tại chỗ của flavonoit.

Đối với các màng tế bào, flavonoit tự nhiên có khả năng làm thay đổi tính thẩm thấu. Tác dụng này có thể chính là cơ sở làm cho nhiều loại flavonoit có tính sát khuẩn và diệt nấm. Do tính phân cực săn có mà flavonoit có thể xuyên qua màng tạo ra những kẽ hở để cho các ion lọt qua và làm thay đổi hoạt động sinh hoá bình thường của tế bào. Cơ chế này cũng giống như cơ chế của những chất kháng sinh tạo lỗ xốp (pore-forming antibiotics) như gramixidin, monatin.

5.1.4. Công nghệ các hợp chất flavonoit

5.1.4.1. Một số phản ứng định tính phát hiện flavonoit

a) Phản ứng Shinoda (còn gọi là phản ứng Xianidin)

Cho vào ống nghiệm 0,5ml dịch flavonoit toàn phần trong cồn 96°, thêm một ít bột magie (Mg) hoặc kẽm (Zn) và vài giọt HCl đặc. Đun sôi trên nồi cách thuỷ, xuất hiện màu hồng hoặc đỏ (có thể màu da cam) là phản ứng dương tính.

b) Phản ứng Diazo

Chuẩn bị 3 dung dịch :

Diazo I : Parannitroanilin 0,5% pha trong HCl 2N.

Diazo II : Natrinitrit 5% trong nước cất.

Diazo III : Natri acetat 20% trong nước cất.

Thuốc thử Diazo là hỗn hợp các dung dịch trên theo tỷ lệ :

I : II : III = 2ml : 3–5 giọt (đến khi mất màu dung dịch) : 8 ml.

Cho vào ống nghiệm 0,5ml dịch flavonoit toàn phần, hòa tan trong cồn 96°, thêm 2–3 giọt thuốc thử Diazo. Dung dịch cho màu vàng da cam là phản ứng dương tính.

c) *Phản ứng định tính anthoxianin (hoặc anthoxianidin)*

Lấy 5ml dịch chiết cồn cô cạn cách thuỷ, hoà tan trong 2ml HCl 2%. Thêm vào ống nghiệm 0,5 – 1ml cồn izoamilic, lắc kỹ. Dịch chiết anthoxianin bằng izoamilic ở lớp trên, dùng pipet chấm dịch lên giấy lọc như chấm sắc ký. Khi khô chấm khô, dùng pipet đưa 1–2 giọt kiềm đặc (30% – 40%) vào bên cạnh. Nếu xuất hiện màu xanh là phản ứng dương tính.

d) *Phản ứng định tính catechin*

Thuốc thử : dung dịch vanilin 1% trong HCl đặc.

Nhỏ một giọt dung dịch mẫu (dịch cồn cô cạn được chiết lại bằng nước cất nóng) lên giấy lọc, sau đó nhỏ một giọt thuốc thử vào bên cạnh, kết quả cho màu đỏ son là phản ứng dương tính. Dùng nước chè xanh làm chất chuẩn.

5.1.4.2. Chiết xuất và định lượng flavonoid toàn phần (phương pháp B.C. Tali)

Cân 30 gam bột dược liệu, chiết bằng cloroform trên máy soxhlet để loại tạp cho đến khi loại hết clorophyl. Phần bột nguyên liệu cho bay hơi hết cloroform và chiết tiếp trên máy soxhlet bằng cồn 96° cho đến khi dịch chiết không còn cho phản ứng Shinoda. Dịch chiết cồn được giữ ở bình nút nhám và xác định thể tích chính xác (ml).

Lấy 15ml dịch chiết cồn đem cô cạn cách thuỷ (áp suất giảm) sau đó chiết lại bằng 30ml nước cất nóng (chia 3 lần, mỗi lần 10ml) để loại tạp. Lọc dịch nước cho vào một phễu chiết. Dùng 35ml etylaxetat chiết làm 3 lần (lần đầu 15ml, 2 lần sau mỗi lần 10 ml). Đổn dịch chiết etylaxetat vào 1 chén sứ (đã được xác định trọng lượng m_1) và cô trên nồi cách thuỷ cho bay kiệt etylaxetat, phần còn lại trong chén là flavonoid toàn phần.

Làm khô chén và xác định trọng lượng m_2 của cả chén và flavonoid. Lượng flavonoid trong 15ml dịch chiết cồn được tính bằng $(m_2 - m_1)$. Tính hàm lượng phần trăm nguyên liệu theo công thức sau :

$$\frac{(m_2 - m_1)V}{V \times 30} \times 100 = X\%$$

V : thể tích dịch chiết cồn từ 30 gam bột nguyên liệu (ml)

5.1.4.3. Chiết xuất các hợp chất flavonoid

Độ hoà tan của flavonoid tuỳ thuộc vào số nhóm hydroxyl và các nhóm thế khác của chúng. Số nhóm này cũng như vị trí của chúng rất khác nhau giữa các flavonoid, vì vậy không có một phương pháp chung nào để chiết xuất các hợp chất flavonoid khác nhau. Tuy vậy có thể nêu ra một số nguyên tắc chung như sau (Phạm Trương Thị Thọ, 1997) :

Flavonoid có mặt ở hầu hết các bộ phận của cây : rễ, lá, hoa, quả, hạt, sáp... Trường hợp chiết ở bên ngoài lá thì dùng dung môi rửa lấy sáp. Các bộ phận khác thì sấy khô, tán bột. Nếu muốn chiết flavonoid dạng glycozit thì ổn định nguyên liệu trước khi sấy bằng cách nhúng nguyên liệu tươi vào cồn hoặc nước đun sôi bởi vì các enzym có thể thuỷ phân glycozit.

Các glycozit thường có độ phân cực mạnh hơn các aglycol tương ứng. Đối với các aglycol thì izoflavon, flavonol, dihydroflavonol và các flavon có nhiều nhóm metoxyl, ít nhóm hydroxyl đều là những chất phân cực yếu. Để chiết chúng, dùng các dung môi phân cực yếu như benzen, cloroform, etylacetat. Một số có thể tan một phần trong etc dầu hỏa.

Các flavon và flavonol có nhiều nhóm OH, các biflavon, auron, chalcon và glycozit đều là các chất phân cực mạnh. Có thể chiết chúng bằng cồn, nước hoặc hỗn hợp cồn nước. Dung môi có thể áp dụng cho hầu hết flavonoid là dung dịch cồn 80 hoặc 60% (EtOH, MeOH).

Chiết bằng nước nóng áp dụng tốt đối với các polyglucozit (như trường hợp chiết rutin từ hoa hoè) và các anthoxyanin. Các anthoxyanin thường kém bền vững, khi chiết nên cho thêm một lượng nhỏ HCl vào nước chiết nóng dưới dạng clorua, vì chúng khá bền vững với nhiệt độ.

Flavonoid có các nhóm OH – phenol, chúng tan được trong kiềm. Lợi dụng tính chất này có thể chiết chúng bằng dịch kiềm loãng, nước sôi. Sau đó axit hoá dịch chiết để kết tủa flavonoid hoặc tách ra bằng dung môi hữu cơ ở môi trường axit.

Dịch chiết đem cô đặc chân không ở nhiệt độ thấp (40 – 70°C). Đối với những chất dễ bị biến đổi thuộc các nhóm flavan-3-ol, anthoxyanin, flavanon, chalcon glycozit thì nên sấy đông khô.

Đôi khi, để tinh chế hoặc tách flavonoid, người ta dùng muối chì để kết tủa. Sau khi thu tủa, người ta tách chì bằng cách sục dihydrosunphit thì flavonoid được giải phóng.

Để tinh chế từng chất flavonoid, người ta thường áp dụng phương pháp sắc ký cột. Chất hấp phụ thông dụng là bột polyamit. Có thể dùng các chất khác như bột xenluloza, silicagel, sephadex, magnesol, polyvinylpyrrolidon. Silicagel dùng để tách các chất flavanon, izoflavon, methyl, axetyl flavon và flavonol. Khai triển bằng cloroform và hỗn hợp cloroform với etylaxetat hoặc ete hoặc benzen và hỗn hợp benzen với etylaxetat hay metanol. Polyamit dùng để tách tất cả các loại flavonoid, khai triển bằng etanol hoặc metanol với độ cồn giảm dần, hoặc với một số hỗn hợp dung môi khác. Muốn có đơn chất tinh khiết thì cần phải sắc ký cột lại vài lần hoặc sắc ký điều chế. Các flavonoid dimer, trimer có thể tách bằng sephadex LH-20.

Có thể thuỷ phân glycozit flavonoid bằng axit hoặc enzym. Thường sử dụng enzym β – glucosidaza.

5.1.4.4. Phân tích flavonoid bằng phương pháp sắc ký bản mỏng

Sử dụng bản mỏng Silicagel tráng trên tấm kính hoặc trên giấy nhôm.

Hệ dung môi : Etylaxetat – Metanol – Nước (100 : 17 : 13).

Chấm dịch flavonoid đã hoà tan trong cồn 96° lên bản mỏng. Khoảng cách từ điểm chấm (dường khởi điểm) đến giới hạn di chuyển của dung môi là 10cm. Khai triển sắc ký một chiều từ dưới lên. Sau khi khai triển xong, để bản mỏng khô tự nhiên rồi sấy 5 phút ở nhiệt độ 100–120°C. Phun một trong các thuốc thử hiện màu đặc hiệu, quan sát dưới ánh sáng thường và ánh sáng tử ngoại (UV 366 nm) để phát hiện các hợp chất flavonoid.

* Các loại thuốc thử thường dùng cho các hợp chất flavonoid

– Hơi amoniac : màu sắc của flavonoid thay đổi khi hấp thụ hơi amoniac

– Clorua nhôm ($AlCl_3$) : phun thuốc thử $AlCl_3$ 5% trong etanol (m/V), sấy khô, các vết sắc ký của các hợp chất flavonoid có màu vàng khi quan sát dưới ánh sáng thường và có huỳnh quang khi quan sát dưới đèn tử ngoại (UV 366 nm).

– Polyethylenglycol (PEG) : phun dung dịch diphenylboryloxy–etylamin 1% trong metanol (m/V) và dung dịch PEG 4000 5% trong etanol (m/V), sấy khô. Quan sát dưới đèn tử ngoại (UV 366 nm), các hợp chất flavonoid sẽ có huỳnh quang với các màu cam, đỏ, vàng, xanh lục, xanh lá cây.

– Thuốc thử Diazo : phun thuốc thử Diazo lên bản mỏng, sấy khô và quan sát dưới ánh sáng thường và ánh sáng tử ngoại (UV 366 nm).

– Thuốc thử Wilson : phun thuốc thử, sấy khô rồi quan sát dưới đèn tử ngoại (UV 366 nm) (Chuẩn bị thuốc thử Wilson : 0,5g axit boric + 0,5g axit xitric khan + 20 ml metanol khan).

5.1.4.5. Phân tích flavonoit bằng quang phổ tử ngoại

Quang phổ tử ngoại giúp ích nhiều trong việc xác định cấu trúc flavonoit. Trên phổ người ta chia ra 2 dải hấp thụ : dải I nằm trong vùng 290nm trở lên và dải II nằm trong vùng 290nm trở xuống. Trong dải I : flavon có đỉnh hấp thụ cực đại trong vùng 310–350 nm, flavonol có 3-OH đã thế trong vùng 330–360 nm, flavonol có 3-OH tự do thì ở 350–385 nm. Trong dải II thì cả flavon và flavonol đều có đỉnh hấp thụ trong vùng 250–280 nm. Izoflavon do gốc phenyl đính ở C-3, không còn hiệu ứng liên hiệp với nhóm carbonyl nên chỉ có đỉnh hấp thụ cực đại chính ở 245–275 nm, còn dải I chỉ có một uốn có cường độ hấp thụ ở 310–330 nm. Flavanon cũng mất hiệu ứng liên hợp nên dải II là dải hấp thụ chính ở vùng 230–270 nm. Chalcon hấp thụ mạnh ở vùng 300–400 nm. Auron ở vùng 380–430 nm. Anthoxyanin hấp thụ mạnh trong vùng khả kiến từ 500–550 nm (trong MeOH hoặc EtOH + HCl). Người ta còn dựa vào sự chuyển dịch bathocrom hoặc hypsocrom của phổ khi thêm các thuốc thử như AlCl₃, natriacetat, zirconyl clorit... vào dung dịch flavonoit để biện luận cấu trúc.

Bảng 5.1 Dải hấp thụ tử ngoại của một số nhóm flavonoit

Nhóm chất flavonoit	Dải I (nm)	Dải II (nm)
Flavon	250–280	310–350
Flavonol (3-OH thế)	250–280	330–360
Flavonol (3-OH tự do)	250–280	350–385
Izoflavon	245–275	310–330
Flavanon	230–270	300–330
Anthoxyanidin	270–280	465–560

5.1.4.6. Phân tích flavonoit bằng HPLC (sắc ký lỏng cao áp) và HPLC-MS (sắc ký lỏng cao áp – khói phổ)

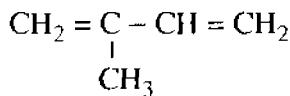
Có thể sử dụng phương pháp HPLC hoặc HPLC – MS, LC – MS để phân tích các hợp chất flavonoit. Đây là các phương pháp hiện đại, thao tác nhanh,

có độ chính xác cao. Các thông số kỹ thuật cụ thể để thực hiện phương pháp như loại cột, detector, hệ dung môi, gradient... đối với HPLC và các thông số khác đối với MS như hoá chất ion hoá, nhiệt độ mao dẫn, nhiệt độ bay hơi, điện áp mao dẫn... tuỳ thuộc vào từng nhóm chất flavonoit. Mỗi nhóm chất có những thông số kỹ thuật đặc hiệu riêng.

5.2. Các hợp chất carotenoit

5.2.1. Cấu tạo hóa học

Caroten được tách chiết từ cà rốt vào năm 1831, là một nhóm đặc biệt của terpen. Đó là những tetraterpen được tạo nên bởi 8 đơn vị izopren :



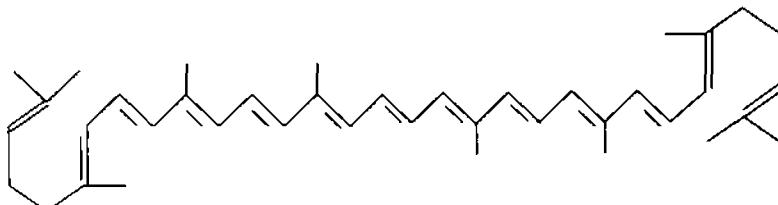
Là những chất màu chính tạo ra các sắc tố màu vàng, da cam và đỏ trong tự nhiên.

Các liên kết kép của các caroten tự nhiên đều có hình thể trans. Có thể chia thành 2 nhóm :

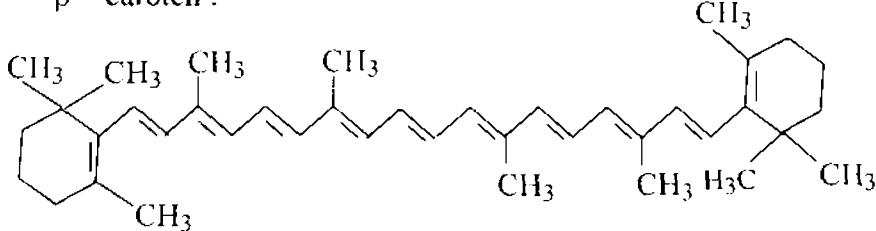
- Caroten : có màu đỏ da cam, là những hydrocacbon ($\text{C}_{40}\text{H}_{58}$) gồm các α , β , γ – caroten có 1 mạch ngang 18 cacbon mang 4 nhóm CH_3 và 9 liên kết đôi liên hợp, chúng khác nhau ở các đầu chuỗi.
- Xantophyl : có màu vàng, là các dẫn xuất oxy (alcol, aldehyt, xeton, epoxyt, axit) của caroten.

5.2.1.1. Các caroten

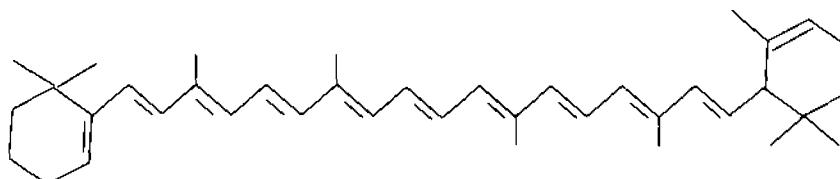
- Lycopene : (C_{40} , 13 nối đôi) là caroten đơn giản nhất : phân tử gồm 2 diterpen (do 4 đơn vị izopren) tạo nên. Lycopene là thành phần chính tạo nên màu đỏ của quả cà chua.



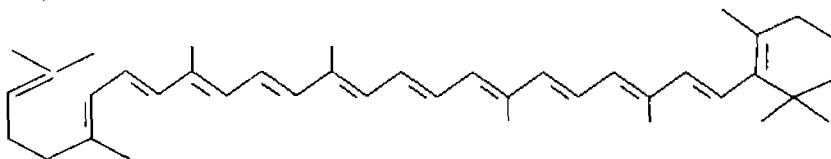
- β - caroten :



- α - caroten :



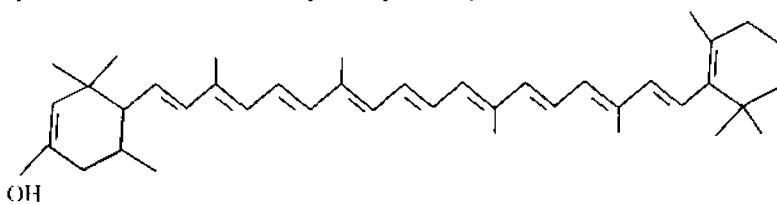
- γ - caroten :



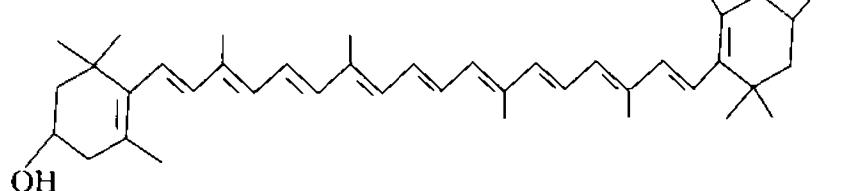
5.2.1.2. Các xanthophyl

Các xanthophyl là những sản phẩm hydroxyl hoá của caroten (zeaxanthin, lutein). Một sự oxy hoá có thể được tiếp tục để tạo ra các epoxyt (anteraxanthin hoặc violaxanthin) hoặc xeton (capsanthin hoặc astaxanthin).

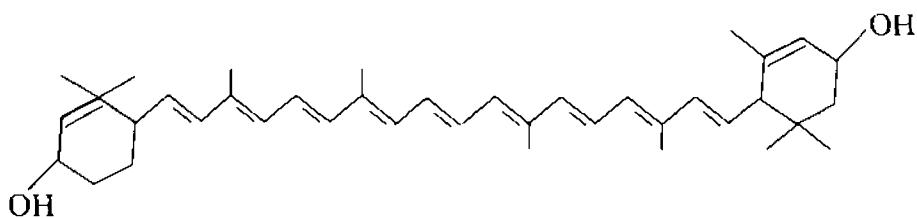
- β -cryptoxanthin (dẫn xuất hydroxyl của β - caroten) :



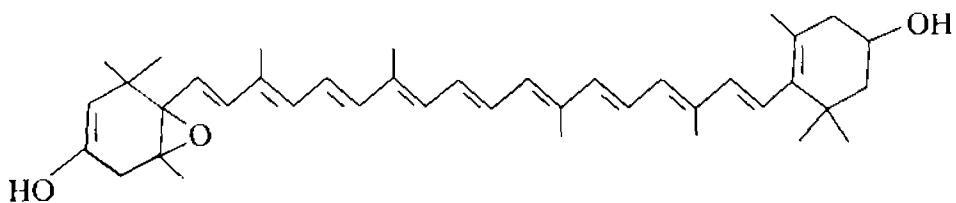
- Zeaxanthin (dẫn xuất hydroxyl của β - caroten) :



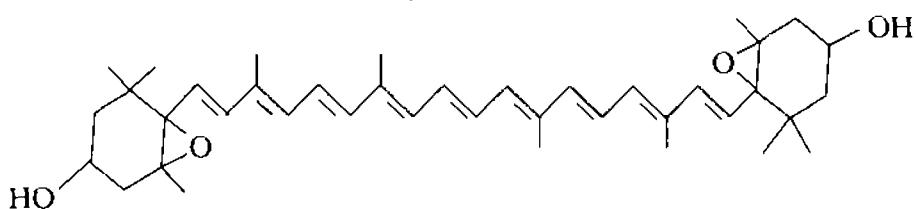
- Lutein (đẫn xuất hydroxyl của α – caroten) :



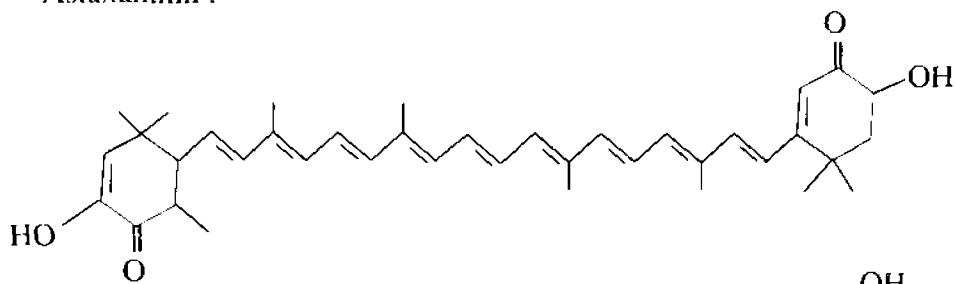
- Anteraxanthin (đẫn xuất epoxyt, hydroxyl của β – caroten) :



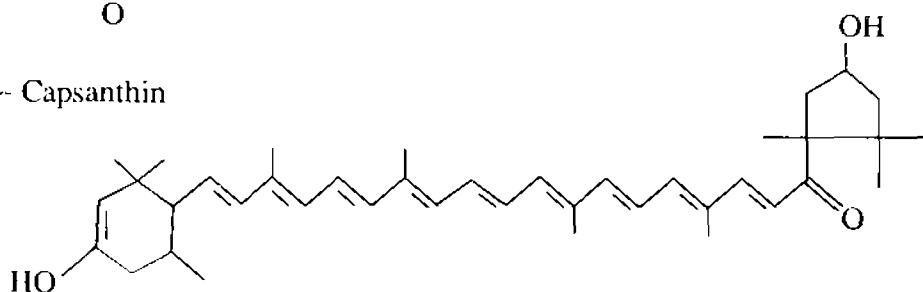
- Violaxanthin (đẫn xuất epoxyt của β – caroten) :



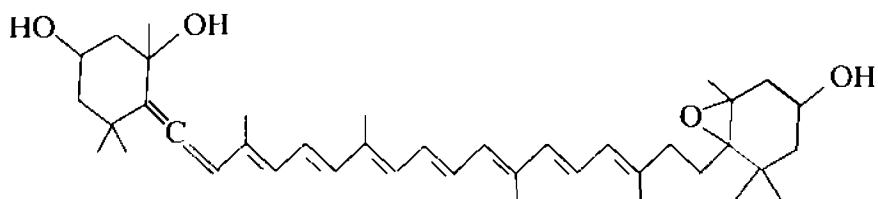
- Astaxanthin :



- Capsanthin



- Neoxanthin : là 1 sản phẩm alenic (allenic) tự nhiên rất hiếm gặp.



- Croxetin (C_{20}) : là một apocarotenoit. Apocarotenoit là một nhóm nhỏ xanthophyl đã mất 1 đầu hay cả 2 đầu của chuỗi.



Các carotenoit không tan trong nước, thường bền trong môi trường tự nhiên. Tuy nhiên, khi gia nhiệt (trong chế biến) thì các liên kết trans có xu hướng chuyển thành dạng cis, do đó cường độ màu bị giảm.

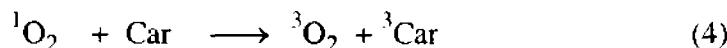
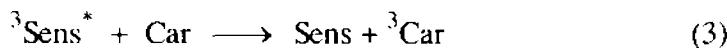
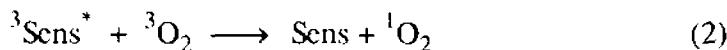
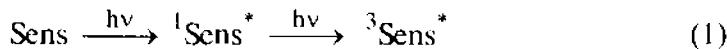
5.2.2. Hoạt tính sinh học của carotenoit

5.2.2.1. Hoạt tính chống oxy hoá

Carotenoit (Car) là chất chống oxy hoá tự nhiên có khả năng bắt giữ oxy đơn phân tử 1O_2 (oxy singlet) và các gốc tự do, khả năng này liên quan đến chiều dài hệ nối đôi liên hợp và năng lượng của trạng thái triplet.

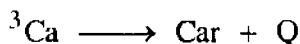
a) Bảo vệ quang hoá

Carotenoit có khả năng bảo vệ quang hoá do có khả năng bắt giữ các chất nhạy quang ở trạng thái triplet ($^3Sens^*$) (electron quay cùng chiều) hoặc các oxy đơn phân tử.



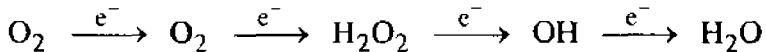
1O_2 được tạo thành trong các quá trình quang hoá, các phản ứng của ozon với các hệ sinh học khác nhau thì có khả năng hoạt hoá protein, oxy hoá chất béo làm hỏng ADN.

Khả năng của carotenoit bắt giữ các $^1\text{O}_2$ phụ thuộc vào số nối đôi liên hợp và cấu trúc phân tử của chúng. Các carotenoit có số nối đôi liên hợp lớn hơn 9 thì khả năng này cao. Trong cả 2 phản ứng (3) và (4), carotenoit triplet có thể dễ dàng mất năng lượng cho môi trường và trở về trạng thái ban đầu. Đặc tính này làm cho carotenoit là tác nhân rất hữu hiệu trong các phản ứng nhạy quang.



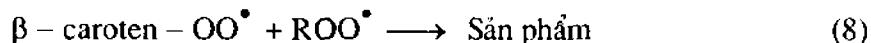
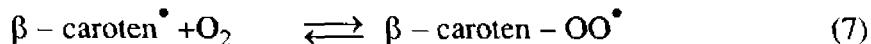
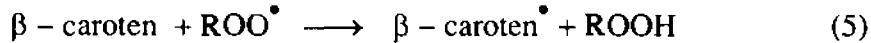
b) Phản ứng với các gốc tự do

Một số dạng oxy hoạt động được tạo thành trong tế bào do quá trình trao đổi chất hoặc các quá trình khác theo sơ đồ sau :



Các dạng này có thể cắt đứt phân tử ADN, các peroxyt của chất béo, thay đổi hoạt tính của enzym, khử trùng hợp các polysaccharit và tiêu diệt tế bào. Carotenoit có khả năng hạn chế tác hại của các gốc oxy tự do. β – caroten có khả năng bảo vệ tế bào nhờ khả năng ức chế quá trình oxy hoá chất béo do các gốc tự do gây ra.

Theo giả thiết của Burton G.W., Ingold K.V. (β – caroten : an unusual type of lipid antioxidant, science, 224, pp. 569–573, 1984) :



Phản ứng của β – caroten với peroxy tự do có thể tạo ra gốc carotenoit tự do (phản ứng 5), nhưng cũng có thể tạo gốc cộng hưởng bền giữa β – caroten với gốc peroxy (phản ứng 6). Khi áp suất oxy đủ lớn thì phản ứng của gốc carotenoit với oxy sẽ xảy ra để tạo thành gốc carotenoit-oxy (phản ứng 7).

5.2.2.2. Hoạt tính phòng chống xơ vữa động mạch

Nguyên nhân của chứng xơ vữa động mạch là do sự tạo thành các cholesterol LDL (Low-density lipoprotein). LDL bị oxy hoá thâm nhập vào

thành mạch, tạo thành các tế bào bọt gây nên các vệt mỡ ban đầu, làm cho bám dính cho các peroxyt của chất béo, tạo thành các mảng xơ vữa của bệnh mạch vành.

Carotenoit có khả năng ngăn chặn sự tạo thành LDL và các peroxyt của chất béo nhờ hoạt tính chống oxy hoá và khả năng ức chế quá trình oxy hoá chất béo do các gốc tự do gây ra.

5.2.2.3. *Hoạt tính phòng chống ung thư*

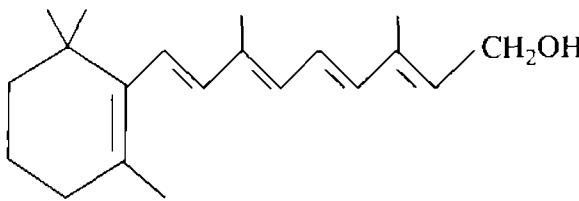
Carotenoit có khả năng ngăn chặn sự khởi phát, sự tăng sinh của tế bào ung thư cũng như sự tiến triển của căn bệnh này. Cơ chế có thể là nhờ khả năng làm tăng sự điều hoà trao đổi thông tin giữa các tế bào do làm tăng biểu hiện của gen kết nối 43, bảo vệ ADN khỏi sự tấn công của các gốc tự do và tăng sự điều hoà chức năng miễn dịch, bảo vệ cơ thể chống lại sự biến đổi ban đầu thành các chất gây ung thư. β -caroten có khả năng tiêu diệt chất bạch sản (leukoplakia), là chất gây tổn thương tiền ác tính của ung thư vòm họng, đồng thời việc bổ sung β -caroten có thể làm tăng lượng nhân tố tiêu diệt khối u TNF- α (Tumor necrosis factor-anpha) trong huyết tương (Richard M. Faulks và Susan Southon, 2001).

Lycopene cũng là một carotenoit có tác dụng phòng chống nhiều căn bệnh ung thư, đặc biệt là đối với ung thư tuyến tiền liệt, ung thư phổi và ung thư dạ dày. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tiêu thụ cà chua 1–4 lần một tuần sẽ làm giảm nguy cơ ung thư tuyến tiền liệt và trong số các carotenoit thì chỉ có lycopene là có tác dụng này. Lycopene còn có khả năng ngăn chặn sự phát triển u ngực, có tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư màng trong dạ con (Richard S. Bruno và Robert E.C. Wildman, 2001).

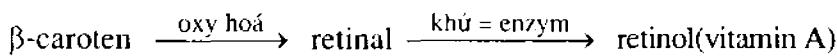
Ngoài ra, carotenoit, đặc biệt là lycopene, do tính chất bảo vệ quang hoá là tác nhân rất hữu hiệu trong các phản ứng nhạy quang, nên có tác dụng bảo vệ, phòng chống ung thư da.

5.2.2.4. *Hoạt tính bảo vệ mắt*

β -caroten là tiền chất chính của vitamin A (retinol), mỗi phân tử β -caroten tạo thành 2 phân tử vitamin A. Ngoài ra còn có các provitamin A khác như α -caroten và β -cryptoxanthin, tuy nhiên những chất này chỉ có 50% hoạt tính provitamin A so với β -caroten.



Vitamin A



Vitamin A tăng cường thị lực, chống bệnh quáng gà, khô mắt.

Trong cơ thể người, chỉ ở mắt là các protein đặc hiệu có thể liên kết với carotenoit. Võng mạc mắt có mặt hai xanthophyl là lutein và zeaxanthin với tỷ lệ như nhau, tuy nhiên zeaxanthin thì chỉ thấy ở vùng điểm đen, còn lutein thì có mặt trong cả võng mạc. Chúng đóng vai trò như là các chất bảo vệ quang hoá, chống lại các oxy đơn phân tử và các phân tử triplet hoạt động được tạo ra bởi ánh sáng, do vậy bảo vệ các protein của mắt khỏi sự oxy hoá. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy mối liên hệ giữa sự có mặt lutein với sự hình thành sắc tố vàng trong điểm đen của võng mạc mắt. Sự gia tăng sắc tố ở điểm đen làm giảm nguy cơ mắc bệnh thoái hoá điểm đen do tuổi già AMD (Age-related macular degeneration) là nguyên nhân của bệnh mù loà. Các carotenoit này cũng có tác dụng làm giảm nguy cơ mắc bệnh đục thuỷ tinh thể (Richard M. Faulks và Susan Southon, 2001).

5.2.2.5. *Hoạt tính bảo vệ da*

Carotenoit thiên nhiên có tác dụng kích thích sự hình thành sắc tố melanin và chống lại các gốc tự do. Chúng kích thích hệ miễn dịch và góp phần vào sự đổi mới các tế bào. β -caroten là tiền chất của vitamin A giúp kìm hãm sự hình thành collagenaza, enzym làm huỷ hoại cấu trúc collagen của làn da. Vitamin A hỗ trợ việc liền sẹo, giúp tái tạo và trẻ hoá tế bào da. Khi vào cơ thể, mỗi phân tử β -caroten sẽ biến đổi thành 2 phân tử vitamin A có tác dụng kích thích sự phân chia các tế bào ở đáy biểu mô làm cho tế bào da luôn được tái tạo. Vì thế, thiếu vitamin A cũng là một trong những nguyên nhân gây nên hiện tượng tăng sừng, da vảy cá, rụng tóc, tóc bạc sớm. Vitamin A còn giúp tạo lập tế bào lympho làm tăng khả năng đề kháng của cơ thể, do đó hạn chế các bệnh nhiễm trùng, trong đó có nhiễm trùng da. Carotenoit có nhiều trong dầu gan cá, gan động vật, lòng đỏ trứng, cà rốt, cà chua, bí đỏ, gấc, quả có màu vàng cam và rau có màu xanh lục đậm.

5.2.2.6. Hoạt tính chống viêm khớp

Nhiều nghiên cứu đã khẳng định khả năng giảm viêm sưng của nhóm chất carotenoit. Các điều tra về dịch tễ học đã cho thấy mức tiêu thụ trung bình β -cryptoxanthin và zeaxanthin ở những bệnh nhân viêm khớp thấp hơn từ 20–40% so với người khỏe mạnh. Những người tiêu thụ β -cryptoxanthin và zeaxanthin nhiều nhất có nguy cơ mắc bệnh viêm đa khớp chỉ bằng một nửa so với nhóm tiêu thụ ít nhất. Lutein và lycopene lại không có hoạt tính này.

5.2.3. Công nghệ các hợp chất carotenoit

5.2.3.1. Chiết xuất và tinh chế carotenoit

Sự phân bố các carotenoit trong thực vật và động vật không tuân theo quy luật tự nhiên nào. Trong rau xanh (rau ngót) có các β -caroten và các xanthophyl như lutein, neoxanthin. Lycopene có nhiều trong cà chua. Trong gấc và cà rốt có α -caroten, β -caroten. Capsanthin là sắc tố đỏ của ớt, đặc biệt là trong ớt cựa gà (paprika). Màu vàng của lòng đỏ trứng là do có mặt lutein, zeaxanthin và 1 lượng nhỏ β -caroten. Thịt của cá hồi (saumon) là do màu hồng của astaxanthin. Tuỳ theo từng đối tượng nguyên liệu cụ thể mà lựa chọn dung môi chiết xuất thích hợp.

Các dung môi và hệ dung môi hữu cơ thường được sử dụng là axeton, axeton : n-hexan (4 : 6), n-hexan : izopropanol (3 : 2), EtOH : n-hexan (4 : 3) là hệ dung môi rất hiệu quả để tách chiết các carotenoit từ cà chua (Lin và Chen, 2003). Người ta cũng thường sử dụng n-hexan và dietyl ete làm dung môi để chiết lutein và zeaxanthin từ hoa cúc vạn thọ.

Nên chiết xuất carotenoit từ nguyên liệu tươi, nếu là nguyên liệu khô thì nên hydrat hoá lại trước khi chiết. Đồng nhất mẫu chiết bằng phương pháp nghiên hoặc nghiên kết hợp với giã. Đối với các loại lá và các nguyên liệu khó chiết khác nên ngâm nguyên liệu vào dung môi chiết 15 – 30 phút trước khi nghiên để làm mềm thành tế bào, đồng thời tránh cho carotenoit khỏi bị đồng phân hoá và bị phân huỷ trong quá trình nghiên.

Có thể bổ sung $MgCO_3$ và các tác nhân trung hoà khác để trung hoà các axit hữu cơ có trong mẫu nhằm tránh sự phân huỷ và đồng phân hoá. Nếu việc chiết xuất được tiến hành nhanh chóng ngay sau khi xử lý mẫu thì không những ngăn chặn được sự oxy hoá bởi xúc tác của enzym mà còn không cần thiết phải bổ sung tác nhân trung hoà.

Việc lọc dịch chiết được thực hiện bằng phèu lọc thuỷ tinh (porosity 3, kích thước lỗ 20–30 μm) hoặc dùng phèu Buchner. Bã lọc được chiết lại cho đến khi mất màu, thường tiến hành chiết 3 lần.

Tiến hành tách nước và dung môi khỏi dịch chiết bằng cách bồ sung ete dầu hoả (điểm sôi 35–60°C), dietyl ete, n-hexan, diclorometan hoặc hỗn hợp của chúng.

Xà phòng hoá bằng KOH, có bồ sung chất chống oxy hoá BHT (butyl hydroxytoluen) để loại clorophyl và các chất béo khác, thu carotenoit tổng.

Để tách từng hợp chất carotenoit tinh khiết, người ta thường sử dụng phương pháp sắc ký cột mờ (OCC) và HPLC điều chế.

5.2.3.2. Phân tích carotenoit

Sắc ký bản mỏng là một phương pháp đơn giản, dễ thực hiện để phân tích định tính các hợp chất carotenoit dựa vào giá trị R_f trên sắc ký đồ bằng cách so sánh với sắc ký đồ chuẩn.

Sắc ký lỏng cao áp HPLC là phương pháp phân tích cho độ chính xác cao. Loại cột HPLC thường dùng để phân tích carotenoit là C₁₈ nghịch đảo pha, dung môi chính thường dùng là axetonitrin và metanol. Một số dung môi khác cũng được sử dụng là THF (tetrahydrofuran), etylaxetat, hexan, axeton và nước. Để nhận biết các carotenoit, người ta thường dựa vào thời gian lưu và phổ UV tương ứng của các pic trong sắc ký đồ HPLC. Hầu hết các carotenoit đều có 3 đỉnh hấp thụ cực đại, chất nào trong phân tử có số nối đôi liên hợp càng nhiều thì các đỉnh hấp thụ cực đại càng ở bước sóng (λ_{\max}) lớn hơn.

Phương pháp so màu cũng thường được áp dụng để phân tích định lượng các hợp chất carotenoit.

5.3. Các hợp chất antoxyanin

5.3.1. Giới thiệu chung

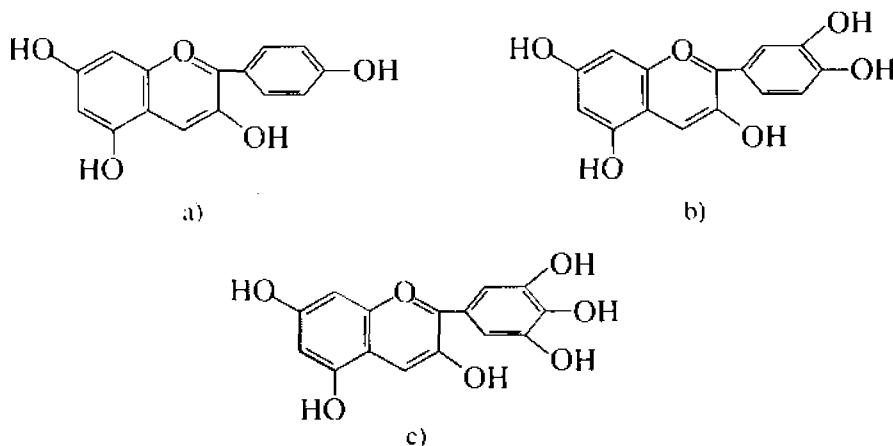
Antoxyanin là nhóm chất tạo sắc tố lớn nhất, rất phổ biến trong tự nhiên, thuộc nhóm flavonoid. Antoxyanin có mặt ở hầu hết các loài thực vật đất, kể cả họ cây xương rồng, củ cải đường... góp phần tạo nên màu sắc cho hoa, quả và một số thành phần khác của cây tạo nên màu từ đỏ đến thâm, từ xanh đến hồng, từ vàng đến không màu, thậm chí tạo màu đen ở

một số thực vật. Anthoxanthin không có mặt trong các loài động vật, thực vật biển hoặc vi sinh vật.

Là những glycozit có trong dịch ép tế bào của hoa quả và một số cơ quan của cây. Phần aglycon của chúng có tên là anthoxanthinol.

Có 3 anthoxanthinol chủ yếu :

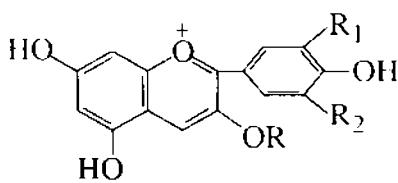
- Pelagonidol 3,5,7,4'-tetrahydroxyl flavyl (đỏ da cam).
- Xianidol 3,5,7,3',4'-pentahydroxyl flavyl (đỏ sáng).
- Delphinidol 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyl flavyl (đỏ, xanh da trời).



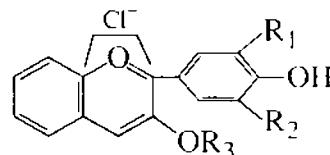
Là những mono hay diglycozit do gốc đường glucoza, galactoza, ramnoza kết hợp với gốc aglycon có màu gọi là anthoxanthinol. Khi thuỷ phân anthoxanthin thu được đường và anthoxanthinol. Anthoxanthin hòa tan trong nước, còn anthoxanthinol thì không hòa tan trong nước.

Anthoxanthin và anthoxanthinol là những chất tạo nên màu sắc cho hoa và rau quả. Các anthoxanthinol tạo màu đỏ, xanh, tím hoặc những gam màu trung gian cho nhiều hoa, quả và rau.

Hiện nay, người ta đã đồng nhất được hơn 200 anthoxanthin. Các chất này khi có màu đỏ thì ở dưới dạng 1 cation flavylium, được biểu diễn như 1 ion oxonium mang một điện tích dương trên nguyên tử oxy của dị vòng pyran. Tuy nhiên, người ta chưa biết được chính xác nguyên tử nào : oxy hay cacbon mang điện tích (+), do đó thường biểu diễn nó dưới dạng công thức trung tính :



Cation



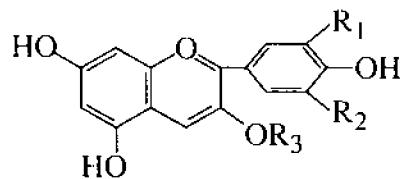
Công thức trung bình

$R_1 = R_2 = H, OH$ hoặc OCH_3 ; R_3 ; Đường

Do đặc trưng này làm cho các antoxyan có tính chất lưỡng tính dẫn đến những thay đổi màu sắc phụ thuộc vào pH. Có nghĩa nhờ diện tích (+) tự do này mà antoxyan trong dung dịch axit tác dụng như những cation và tạo muối được với axit, còn trong dung dịch kiềm thì chất này tác dụng như anion và tạo muối được với bazơ.

Thực tế các antoxyan được sử dụng như những chất màu trong thực phẩm. Chúng có màu từ đỏ tím (hoa cà) đến đỏ ửng... và được sử dụng trong vùng $pH = 3,5-5,5$. Các antoxyan có lợi là tương đối trơ (không nhạy) với nhiệt độ và ánh sáng.

Tuỳ theo bản chất của đường R_3 , người ta thu được một số rất lớn các antoxyan khác nhau nhưng chỉ có 6 antoxyanidol tồn tại ở trạng thái tự nhiên :



R_1 R_2

Pelargonidol (Pg)	- H	- H
Xyanidol (Xi)	- OH	- H
Peonidol (Pn)	- OCH ₃	- H
Delphinidol (Dp)	- OH	- OH
Petunidol (Pt)	- OCH ₃	- OH
Malvidol (Mv)	- OCH ₃	- OCH ₃

Các antoxyanidol có mặt với tỷ lệ khác nhau trong hoa, rau và quả. Trong một số quả, các antoxyanidol chỉ định vị duy nhất ở trong nước quả, vỏ quả, trong một số quả khác thì chúng lại được phân bố trong toàn quả. Antoxyanidol phổ biến nhất là xyanidol có nhiều ở hoa hồng.

Bảng 5.2 Các antoxyanidol trong một số loại rau quả

<i>Hoa, quả hoặc rau</i>	<i>Các antoxyanidol có mặt</i>
Quả nho	Mv, Dp, Pt, Pn, Xi
Quả dâu	Pg, Xi
Phúc bồn tử	Xi, Pg
Anh đào	Xi, Pn
Cây đại hoàng	Xi
Bắp cải đỏ	Xi
Cà tím	Dp
Cây mỏ hạc	Pg
Cây xa cúc lam	Xi
Cây mỹ nhân	Xi
Cây mẫu đơn	Pn

Sự thay đổi nhóm thế ở vòng B chưa đủ để cắt nghĩa gam màu của các antoxyanidol. Thực tế, pH có ảnh hưởng đến màu sắc lớn hơn là bản chất của các nhóm thế của vòng.

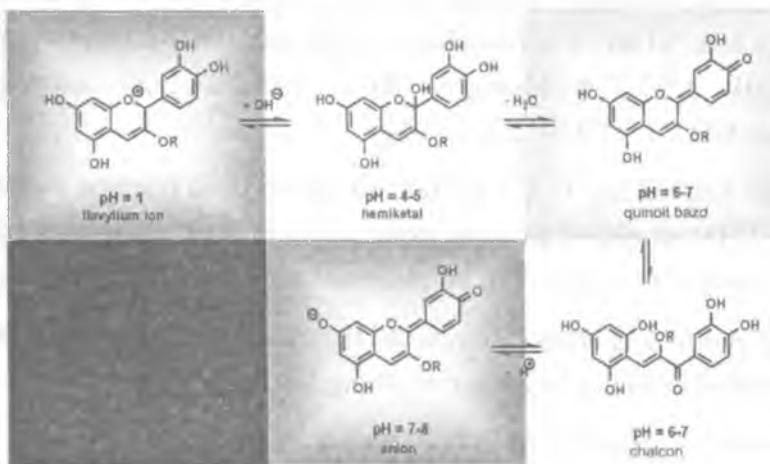
5.3.2. Tính chất hóa học của antoxyanin

Nói chung, các antoxyanin hòa tan tốt trong nước và trong dịch bão hòa.

Màu sắc của các antoxyanin luôn thay đổi phụ thuộc vào pH và nhiệt độ, các chất màu có mặt và nhiều yếu tố khác. Khi tăng số lượng nhóm OH trong vòng benzen thì màu càng xanh đậm (trong vòng B có thể có 1, 2 hoặc 3 nhóm OH). Mức độ methyl hoá các nhóm OH ở trong vòng benzen càng cao thì màu càng đỏ. Nếu nhóm OH ở vị trí thứ 3 kết hợp với các gốc đường thì màu sắc cũng sẽ thay đổi theo số lượng các gốc đường được đính vào nhiều hay ít.

Các antoxyanin cũng có thể tạo phức với các kim loại để cho các màu khác nhau : chẳng hạn muối K sẽ tạo phức với antoxyanin có màu đỏ máu, còn muối Ca và Mg sẽ tạo phức với antoxyanin có màu xanh ve. Hoặc người ta cũng thấy phúc bồn tử đen sẽ chuyển sang màu xanh, còn anh đào thì chuyển sang màu tím khi có mặt Sn, anh đào cũng sẽ có màu tím khi có mặt Al, nhưng Al lại không có ảnh hưởng đến màu của nho đỏ. Các antoxyanin của nho chỉ thay đổi đáng kể khi có Fe, Sn, hoặc Cu.

Màu sắc của các antoxyanin phụ thuộc rất lớn vào pH của môi trường. Thông thường khi pH < 7 thì các antoxyanin có màu đỏ, ở pH = 1 antoxyanin thường ở dạng muối oxonium (cation) màu cam đến đỏ, ở pH = 4–5 chuyển về dạng hemiketal không màu, ở pH = 6–7 chuyển sang dạng bazơ quinonit màu tím hay dạng chalcon màu vàng, ở pH = 7–8 lại về dạng bazơ quinoidal anhydro (anion) màu xanh.



Hình 5.1. Sự thay đổi màu sắc của antoxyanin theo pH của môi trường

Khi dun nóng lâu, các antoxyanin có thể bị phá huỷ và mất màu, đặc biệt là các antoxyanin của dâu tây, anh đào, củ cải đỏ. Ngược lại, các antoxyanin của phúc bồn tử đen cùng trong điều kiện đó lại không bị thay đổi. Nhìn chung khi gia nhiệt các chất màu đỏ dễ dàng bị phá huỷ, còn chất màu vàng thì khó hơn.

Trong môi trường axit, các antoxyanin là những bazơ mạnh (oxonium) và có thể tạo muối bền vững với axit. Antoxyanin cũng có khả năng tạo muối với bazơ. Muối với axit thì có màu đỏ, muối với bazơ thì có màu xanh.

5.3.3. Hoạt tính sinh học của antoxyanin

5.3.3.1. Các antoxyanin có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm

Các antoxyanin có tác dụng làm tăng tính thấm của màng tế bào, ức chế các enzym màng tế bào của vi sinh vật : ATP – aza (ATP synthaza), photpholipaza, lipoxygenaza. Chúng là những hợp chất phân cực có tác

dụng như kháng sinh ionophoric, kháng sinh mang ion kiếu như gramixidin. Các antoxyanin cũng có tác dụng ngăn cản sự tiêu huỷ lớp vỏ protein của vi sinh vật.

5.3.3.2. *Hoạt tính chống oxy hoá*

Hai nhóm OH ở 3', 4' (vòng B) có vai trò quan trọng trong tính chất chống oxy hoá, nhưng nếu thêm 1 nhóm OH ở 5' sẽ làm giảm hoạt tính chống oxy hoá. Ví dụ : khả năng hấp thụ gốc oxy (ORAC) của xyanidol (có 5 nhóm OH : 3,5,7,3',4', không có OH ở 5') là 2,24 ; còn của delphinidol (có 6 nhóm OH : 3,5,7,3',4',5') là 1,84.

Nếu có liên kết kép ở 2, 3 kết hợp với nhóm C=O (cacbon monoxit) ở 4 của vòng C thì sẽ góp phần quan trọng vào tính chất chống oxy hoá vì nó đảm bảo cho quá trình khử định xứ electron (delocalier) khỏi vòng B.

Nếu glycozyl hoá antoxyanin có thể làm tăng, làm giảm hoặc không làm thay đổi tính chất chống oxy hoá của chúng :

xyanidol 3 – glucozit : (3,5)

xianidol : (2,24)

malvidol 3 – glucozit : (1,4)

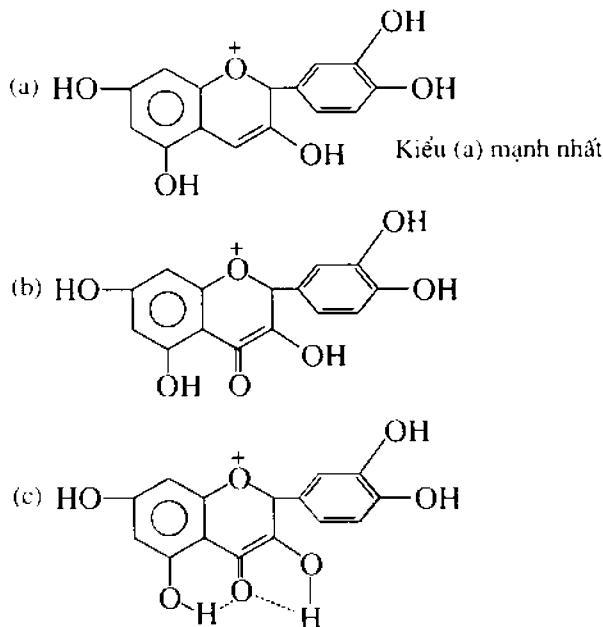
malvidol : (2,0)

pelargonidol 3 – glucozit : (1,56)

pelargonidol : (1,54)

Bản chất của các đường kết hợp với antoxyanidol cũng ảnh hưởng đến tính chất chống oxy hoá. Nếu glycozyl hoá ở C₃ bằng ramnoza và glucoza thì sẽ làm tăng tính chống oxy hoá, nhưng khả năng chống oxy hoá sẽ giảm khi gắn đường galactoza vào C₃.

Khả năng thu dọn gốc tự do "scavenger" của các antoxyanin và của các flavonoid khác phụ thuộc vào cấu trúc của chúng. Các cấu trúc dưới đây có hoạt tính chống oxy hoá mạnh :



Các antoxyanin trong lá tía tô là dẫn xuất của xyanidol 3,5-diglucosit → có cấu trúc kiểu (a), vì vậy có hoạt tính chống oxy hoá rất mạnh. Từ lá tía tô đã sản xuất được nhiều chế phẩm màu khác nhau phục vụ cho ngành thực phẩm, có hoạt tính chống oxy hoá mạnh hơn vitamin E nhiều lần.

5.3.3.3. Khả năng hấp thụ tia cực tím

Các antoxyanin thực sự có vai trò lớn đối với thực vật, đó là tạo ra màu sắc đặc trưng thu hút côn trùng đến thụ phấn cho hoa và đặc biệt là khả năng hấp thụ mạnh tia cực tím (UV) nhờ có cấu trúc phân tử đặc biệt. Các sắc tố antoxyanin liên kết tạo ra một "màng ngăn" UV, bảo vệ phân tử ADN thực vật không bị phá huỷ bởi ánh sáng mặt trời.

5.3.3.4. Các hoạt tính khác

Antoxyanin còn có nhiều tác dụng sinh, dược học khác đã được công bố :

- Điều trị bệnh đái tháo đường (diabetic retinopathy) (Ober 1981).
- Điều trị viêm xơ ở ngực (fibrocystic disease of the breast) (Leonardi 1993).
- Điều trị bệnh về thị giác (vision) (Politrer 1977).
- Duy trì tính thấm của mạch (Vascular permeability) (Main 1977, Henry 1988).

- Tác nhân bảo vệ khỏi các bức xạ (radiation protective agents) (Minkoba et al 1990).
- Tác nhân tăng cường mạch (vasotonic agents) (Colantuoni et al., 1991).
- Tác nhân bảo vệ vành mạch (vasoprotective) và tác nhân chống viêm (antiinflammatory agents) (Lietli et al, 1976).
- Tác nhân bảo vệ gan chống tổn thương do CCl_4 (hepatoprotective agents against carbon tetrachloride damage) (Mitcheva et al., 1993).
- Nhiều tác dụng khác do tác dụng của antoxyanin đến các enzym và các quá trình trao đổi chất (Carpenter et al 1967, 1979).

Tác nhân hoá học bảo vệ chống độc tố platin trong liệu pháp chống ung thư (Chemoprotective agents against platinum toxicity in anticancer therapy) (Karaivanova et al 1990).

Antoxyanin có tác dụng điều trị các bệnh về tim, ung thư, viêm khớp (arthritis), tăng cường huyết quản, nuôi da, cân bằng sản xuất histamin và những bệnh khác có liên quan đến gốc tự do. Hàng ngày, mỗi người có thể tiêu thụ 180 – 215mg, không có bất kỳ tác dụng phụ nào khi sử dụng chất màu chiết từ vỏ nho (Henry 1988). Những người tiêu thụ nhiều quả và rau thì có thể phòng ngừa được bệnh ung thư (Doll 1990), bệnh tim mạch (Armstrong 1975), bệnh mạch máu não (cerebro vascular) (William 1983, Gillman 1995).

Antoxyanin còn là một chất màu tự nhiên được ưa chuộng trong công nghiệp chế biến thực phẩm.

5.3.4. Công nghệ chiết xuất và phân tích các hợp chất antoxyanin

Antoxyanin là nhóm các hợp chất phân cực, do đó chúng tan rất tốt trong dung môi phân cực như nước, các alcohol. Antoxyanin không tan trong dung môi cloroform, etc... Khi tách chiết đối với mẫu dạng khô thì thường sử dụng hệ dung môi metanol : nước, hoặc etanol : nước trong môi trường có axit (0,1–1%) như HCl, trifluoacetic, axit formic...

Sau khi tách chiết, nồng độ antoxyanin trong dung dịch thường được xác định bằng phương pháp pH vi sai, do mật độ quang hoặc dùng sắc ký lỏng cao áp (HPLC).

Thường sử dụng sắc ký cột (Column Chromatography) để tách tinh chế các antoxyanin. Chất mang có thể là nhựa trao đổi ion, sephadex, silicagel G, polyetylen glycol (PEG) tùy thuộc vào đối tượng tách chiết

5.3.4.1. Định lượng antoxyanin tổng bằng phương pháp pH vi sai Wrostad

– Nguyên tắc :

Sắc tố antoxyanin có cấu trúc thay đổi theo pH được thể hiện ở độ hấp thụ. Antoxyanin ở dạng oxonium có màu chiếm ưu thế tại pH = 4,5. Phương pháp pH vi sai của Wrostad dựa trên cơ sở đó để xác định tổng lượng antoxyanin.

– Hoá chất và thiết bị :

+ Đệm pH = 1,0.

+ Đệm pH = 4,5.

+ Máy đo độ hấp thụ.

+ Địch chiết antoxyanin tinh sạch.

– Tiến hành thí nghiệm :

Chuẩn bị hai mẫu đo độ hấp thụ OD bằng cách lấy một thể tích dịch chiết antoxyanin pha loãng trong các dung dịch đệm tương ứng với hệ số pha loãng f.

Xác định bước sóng hấp thụ tại $\lambda_{vis-\max}$ bằng cách đo OD trong mẫu pha trong đệm pH = 1,0 tại các bước sóng khác nhau trong giới hạn nhìn thấy ($\lambda=400-750\text{nm}$).

Đo độ hấp thụ OD của hai mẫu trên tại bước sóng $\lambda_{vis-\max}$ và $\lambda_{700\text{nm}}$. Mẫu đối chứng là dung dịch đệm tương ứng.

Hệ số hấp thụ của mẫu thí nghiệm tính theo công thức :

$$A = (A_{\lambda_{vis-\max}} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\lambda_{vis-\max}} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

Lượng antoxyanin tổng được tính theo công thức :

$$C = \frac{A.M_w.f.10^3}{\epsilon.l}$$

C : Hàm lượng antoxyanin tổng (mg/l).

M_w : Khối lượng phân tử của antoxyanin.

f : Hệ số pha loãng mẫu

ε : Hệ số hấp thụ phân tử

l : Bề dày của cuvet (cm)

5.3.4.2. Định lượng antoxyanin-polyme theo Somer

– Nguyên tắc :

Antoxyanin kết hợp với bisunphat để tạo thành axit sunphonic khép mạch không màu. Phức hợp antoxyanin-tanin vẫn thể hiện màu do không phản ứng với bisunphat, chỉ có phản ứng mất màu của monoantoxyanin nhanh chóng xảy ra. Mật độ màu của mẫu được xác định với độ hấp thụ đo tại các bước sóng $\lambda_{420\text{nm}}$, $\lambda_{\text{vis-max}}$, $\lambda_{700\text{nm}}$.

– Hoá chất và thiết bị :

- + Dung dịch bisunphat 20%.
- + Dung dịch đệm pH = 1,0 và pH = 4,5.
- + Máy đo quang phổ.
- + Dịch chiết antoxyanin tinh sạch.

– Tiến hành thí nghiệm :

Chuẩn bị hai mẫu do độ hấp thụ OD với dung dịch đệm pH₁ tương ứng. Sau đó, cho 2,8ml mẫu đã pha loãng vào hai cuvet, thêm 0,2ml dung dịch bisunphat vào cuvet và thêm 0,2ml nước cất vào cuvet còn lại. Mẫu đối chứng đi với dung dịch đệm. Đo độ hấp thụ cho cả hai mẫu trên tại các bước sóng $\lambda_{420\text{nm}}$, $\lambda_{\text{vis-max}}$, $\lambda_{700\text{nm}}$.

Độ hấp thụ màu của mẫu thêm 0,2 ml nước cất tính theo công thức sau :

$$CD = f \cdot [(A_{420} - A_{700}) + (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})]$$

A_i : Mật độ màu tại các bước sóng

f : Hệ số pha loãng mẫu

Độ hấp thụ màu của mẫu thêm 0,2ml dung dịch bisunphat tính theo công thức sau :

$$PC = f \cdot [(A_{420} - A_{700}) + (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})]$$

A_i : Mật độ màu tại các bước sóng

f : Hệ số pha loãng mẫu

Tính phần trăm polyantoxyanin theo công thức :

$$P = \frac{PC}{CD} \cdot 100 \text{ (%)}$$

5.3.4.3. Phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC) và sắc ký giấy (PC)

Là những phương pháp đơn giản, dễ thực hiện, vẫn được sử dụng ở nhiều phòng thí nghiệm để phân tích định tính các antoxyanin.

5.3.3.4. Phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp HPLC

Đối với một số loại nguyên liệu giàu antoxyanin có thể xác định trực tiếp antoxyanin từ nguyên liệu tươi mà không cần tách chiết. Để tạo sự ổn định cho thành phần antoxyanin và nồng độ antoxyanin trong máu thì người ta sử dụng axit để thuỷ phân tách phần aglycon của antoxyanin ra khỏi phân đường.

Phương pháp HPLC dùng để tách antoxyanin có thể sử dụng với nhiều điều kiện sắc ký khác nhau, chủ yếu sử dụng dạng cột đảo pha, pha động luôn luôn có tính axit. Bước sóng phổ biến được sử dụng là 520nm. Khi thực hiện phương pháp này cần chọn một chất chuẩn đã biết hệ số nồng độ mol để chuẩn máy.

5.3.4.5. Phương pháp HPLC–MS (sử dụng ESI : electrospray ionization)

Đây là một phương pháp phân tích rất hiệu quả được sử dụng để phân tích antoxyanin trong hỗn hợp thực phẩm. Phương pháp này sử dụng điện áp thấp, áp suất khí quyển cũng như kỹ thuật ion hoá rất linh động. Điện tích (+) của antoxyanin ở giá trị pH thấp cho phép phát hiện chúng dễ dàng vì khi sử dụng điện áp thấp thì những hợp chất khác thường không bị ion hoá.

Phương pháp này ngày nay càng được sử dụng nhiều để xác định antoxyanin trong hoa hồng, nho, rượu vang đỏ, quả mâm xôi, hành đỏ, phụ gia thực phẩm dạng khô...

5.3.4.6. Phương pháp cộng hưởng từ hạt nhán (NMR)

Được sử dụng kết hợp với HPLC–MS để xác định cấu tạo hoá học của phân tử antoxyanin cũng như của các hợp chất khác.

Chương VI

CÔNG NGHỆ ENZYM

6.1. Các phương pháp tinh sạch enzym

6.1.1. Khái quát về enzym

Enzym là chất xúc tác sinh học, có bản chất protein, hòa tan trong nước và trong dung dịch muối loãng. Enzym có khối lượng phân tử lớn từ 20000–1000000 Da nên không qua được màng bán thấm.

Tất cả các yếu tố làm biến tính protein như axit đặc, kiềm đặc, muối kim loại nặng... đều có thể làm enzym bị biến tính và mất hoạt tính xúc tác. Ngoài ra có một số kháng thể cũng có hoạt tính xúc tác gọi là abzym, axit ribonucleic có hoạt tính xúc tác gọi là ribozym. Ngày nay, người ta có thể tổng hợp enzym bằng phương pháp hoá học, các enzym này gọi lymzym.

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

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

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

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

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

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

Với những tính chất ưu việt như trên enzym ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong mọi lĩnh vực và tạo nhiều sản phẩm mới.

6.1.2. Nguồn thu chế phẩm enzym

Người ta thường thu nhận enzym từ nguồn tế bào động vật, thực vật và vi sinh vật. Trong hàng trăm enzym được sử dụng trong công nghiệp, hơn 1/2

được sản xuất từ nấm mốc và nấm men, trên 1/3 từ vi khuẩn, còn lại từ nguồn động vật 8% và thực vật 4%

6.1.2.1. Enzym động vật

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

a) Tuy tụy

Là cơ quan chứa nhiều enzym nhất : Amylaza, mantaza, lipaza, colesterolesteraza, excitinaza, nucleaza, trypsin, kimotrypsin, cacboxylpeptidaza A, B, elastaza.

Tất cả các enzym này được tiết ra ngoài tế bào cùng với dịch tụy. Tuy nhiên, người ta thường thu nhận trypsin, kimotrypsin từ tụy tụy lớn.

b) Dạ dày

Màng nhầy của dạ dày lợn, chó, gà, thỏ, chứa pepsin A,B,C,D (dạ dày lợn nhiều nhất). Riêng dạ dày lợn con có gastrinsin (enzym thuỷ phân protein).

Ngân thứ tư của dạ dày bò chứa loại vi khuẩn tổng hợp xenlulaza.

Dạ dày của loài động vật có sừng non (bê, nghé) chứa renin (enzym làm đông tụ sữa trong sản xuất phomat). Dựa trên cơ sở này, có thể thu nhận pepsin từ dạ dày lợn, renin từ ngân thứ 4 của dạ dày bê.

c) Ruột

Enzym ở ruột được tiết ra ngoài tế bào cùng với dịch ruột : Enterokinaza, lactaza, mantaza, saccaraza, nucleaza, photphataza, aminopeptidaza...

e) Gan

Là cơ quan chứa nhiều enzym có chung ở mọi cơ quan, ngoài ra còn thấy những hệ enzym chỉ riêng gan mới có như enzym tham gia tổng hợp urê. Chính nhờ sự phong phú về enzym này mà gan tham gia nhiều quá trình trao đổi chất. Người ta ví gan như một phòng thí nghiệm trung tâm của cơ thể.

f) Tuyến nước bọt

Trong nước bọt, ngoài các enzym tiêu hoá : Amylaza, mantaza còn chứa enzym có tên kalicrein. Enzym này tác dụng lên globin α-2 kali-dinogen để giải phóng ra kalidin là một decapeptit có tác dụng làm tăng sự tiết nước bọt.

g) Huyết thanh

Trong huyết thanh chứa nhiều enzym, bình thường hoạt độ các enzym này không lớn. Một số enzym được coi như là chỉ thị để theo dõi bệnh tật, đó là : Amylaza (tăng khi viêm tuy cấp), photphataza kiềm (tăng khi bị còi xương, tắc mật), transaminaza (tăng khi viêm gan, nhồi máu cơ tim).

6.1.2.2. Enzym thực vật

Từ thực vật có mạch có thể thu được một số enzym thuỷ phân :

- Papain từ nhựa đu đủ.
- Bromelin từ thân, lá dứa và vỏ dứa.
- Các enzym plazmin, elastin, fixin thường có trong họ Ficus như sung, si, vả (quả, lá, thân).
- Các α , β -amylaza có trong malt đại mạch và malt thóc.
- Ngoài ra có thể thu tyrosinaza từ nấm, thực vật (Mushroom), và B-glucosidaza từ hạt mè.

6.1.2.3. Enzym vi sinh vật

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

- Hệ enzym vi sinh vật có khả năng thay đổi bằng cách thay đổi điều kiện nuôi cấy và dùng các tác nhân điều chỉnh, từ một loài vi sinh vật có khả năng tổng hợp mạnh một hoặc một số loại enzym nào đó theo ý muốn.
- Vi sinh vật có khả năng sinh sản, phát triển và sinh tổng hợp enzym với tốc độ cực kỳ lớn, do đó cho phép thu được một lượng lớn enzym trong thời gian ngắn một cách dễ dàng.
- Enzym vi sinh vật có hoạt tính rất mạnh, vượt xa enzym từ các nguồn khác. Người ta đã tính rằng, trong vòng 24 giờ vi sinh vật có thể chuyển hoá lượng lớn thức ăn gấp 30–40 lần so với khối lượng cơ thể chúng. Trong khi đó hệ enzym của con lợn trên 50kg chỉ có thể chuyển hoá vài kg thức ăn trong một ngày.

6.1.3. Các phương pháp tách tinh chế enzym

6.1.3.1. Các dạng chế phẩm enzym

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

a) Chế phẩm khô

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

– Chế phẩm khô từ canh trường bê mặt : Canh trường rán sau khi nuôi vi sinh vật được đem sấy ở nhiệt độ 40°C đến độ ẩm còn khoảng 12% sẽ thu được chế phẩm khô dạng khô.

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

b) Chế phẩm kỹ thuật

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

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

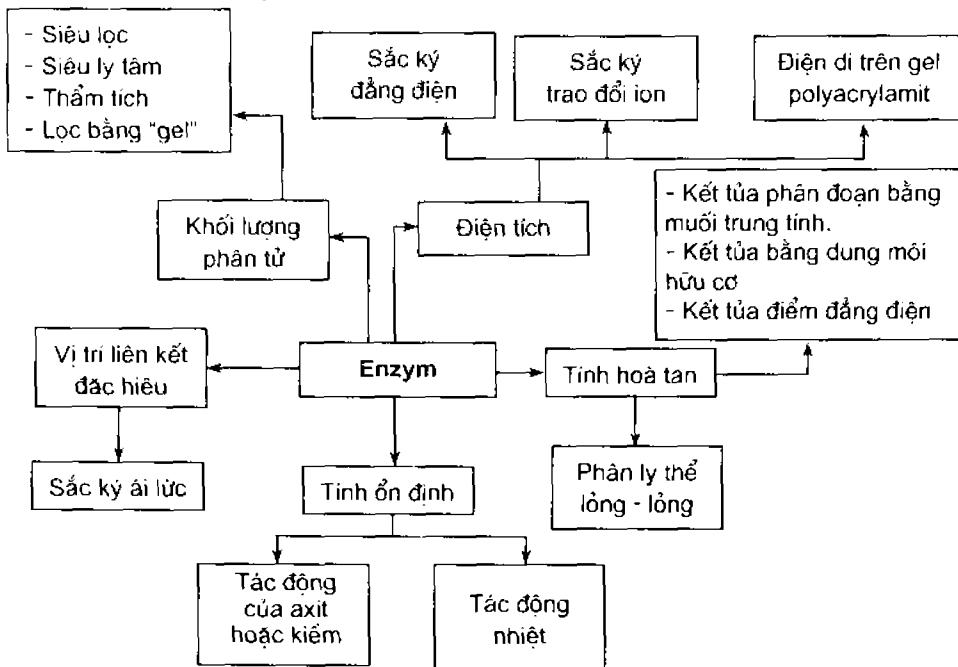
c) Chế phẩm enzym tinh khiết

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

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

6.1.3.2. Các phương pháp tách tinh sạch

Dựa vào đặc tính của enzym người ta có thể đưa ra các phương pháp tách tinh chẽ thu chế phẩm enzym theo sơ đồ sau :



Hình 6.1. Các phương pháp thu chế phẩm enzym.

a) Dựa vào tính chất hòa tan

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

Dựa vào cơ sở khi nồng độ muối thấp tính hòa tan tăng, nồng độ muối cao tính tan giảm, do phân tử protein được bền vững nhờ lớp vỏ nước (vỏ hydrat). Nếu nồng độ muối cao, chúng sẽ cạnh tranh, lấy đi lớp vỏ nước của protein, các phân tử protein bị mất lớp vỏ hydrat liên hợp lại tạo kết tủa.

Như vậy, với mỗi protein enzym sẽ có một khoảng nồng độ muối kết tủa hoàn toàn thường không giống nhau.

Dựa vào cơ sở này có thể tách và tinh chế enzym nhờ phương pháp kết tủa phân đoạn bằng muối trung tính. Muối thường dùng là amon sunphat hoặc natri sunphat, natri clorua. Phương pháp này thao tác đơn giản. Tuy nhiên, các đoạn protein enzym thu được sau đó phải được loại bỏ muối bằng phương pháp thẩm tích hoặc phương pháp lọc gel. Thường các khoảng nồng độ muối tính tương ứng với các protein nói chung và protein enzym nói riêng hay trùng nhau nên protein enzym thu được sau kết tủa phân đoạn chưa thật sạch.

Công thức dưới đây được dùng để tính lượng Y gam muối rắn, phải thêm vào 100ml dung dịch chứa protein đã có độ bão hòa ban đầu là S_1 để thu được một dung dịch có độ bão hòa cuối là S_2 :

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

$$Y = \frac{0,1(S_2 - S_1).G}{1 - [S_2.Vg/100]}$$

G : lượng (gam) amon sunphat trong 1000 ml dung dịch bão hòa :

515g ở 0°C, 530,7g ở 15°C, 536,3g ở 20°C.

VG : thể tích riêng biểu kiến của dung dịch amon sunphat bão hòa :

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

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

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

Bảng tra nồng độ bão hòa muối amon sunphat để kết tủa protein/enzym ở 20°C.

(Theo Green và Hughes, 1955, brewer và cộng sự, 1977)

Nồng độ đầu (Starting concentration (%))	Nồng độ cuối (Final concentration (%))																					
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100		
0	27	55	84	113	144	199	208	242	277	199	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761		
5		27	56	85	115	146	199	212	246	199	199	357	397	439	481	526	572	621	671	723		
10			28	199	33	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685		
15				28	58	33	199	199	185	219	255	292	331	371	413	456		548	596	647		
5					29	59	89	199	199	188	33	260	298	337		421	465	511	559	600		
25					199	29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571		
30						199	30	61	92	126	16	195	232	270	309	351	393	38	485	533		
5							199	30	33	94	128	163	199	236	261	305	358	402	447	495		
40			107	199	199				31	63	96	199	199	202	241	266	322	365	410	457		
45								128	163		31	64	97	132	169	206	386	429	329	373	419	
50								199	199		33	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381	
55						199	199	33		199	199	199		33	199	101		228	215	256	228	343
60			107	33	199	199								33	67	103	228	179	219	261	305	
5				28	58	277	199			33	33				34	69	105	143	185	228	266	
70					199			33	199	199	199	33		33	101	34	70	107	140	186	228	
75					33		199	199	277		199	199		33	236		76	72	110	149	190	
5					199	33	33						199	199	101	107	76	36	73	112	152	
5					199	199	199	277	199				33				266		76	75	114	
5					33	128	163	277	33	199	199	33	33	33	236	421			76	76		
95					199	33	33	199	199	33	33	199	199	199	236	76	76	107			76	

2. Kết tủa enzym bằng dung môi hữu cơ

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

Ví dụ :

- Proteaza kết tủa bằng etanol ở nồng độ 76–78% .
- α -amylaza kết tủa bằng etanol ở nồng độ 70% hoặc bằng izopropanol 55% hoặc bằng axeton 60%.

Các dung môi hữu cơ được dùng phổ biến nhất để kết tủa là etanol, izopropanol, axeton.

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

Phương pháp này được sử dụng cho các enzym ít bị biến tính bởi dung môi hữu cơ.

3. Kết tủa đẳng điện

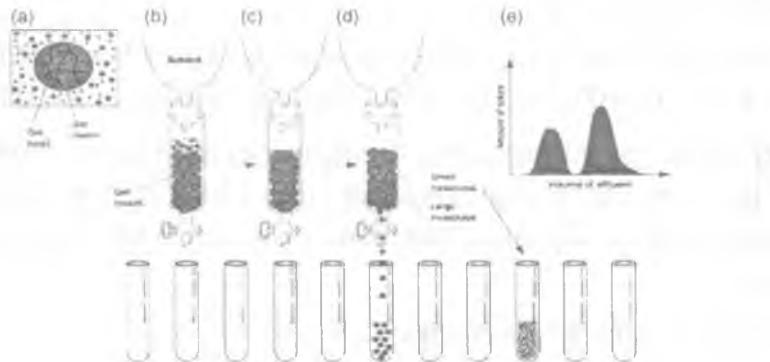
Một protein enzym thường hòa tan ít nhất ở điểm đẳng điện (pI) vì ở pI, các phân tử protein enzym có tổng điện tích bằng 0, tức là không có lực đẩy tĩnh điện nên các phân tử protein enzym sẽ kết hợp với nhau tạo ra kết tủa. Vì vậy, có thể kết tủa đẳng điện enzym quan tâm cũng như các enzym và protein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

b) *Dựa vào khối lượng phân tử : Sắc ký lọc gel (loại trừ phân tử Molecular exclusion chromatography)*

Sắc ký lọc gel cho phép phân đoạn một số hỗn hợp protein theo khối lượng phân tử và kích thước của chúng.

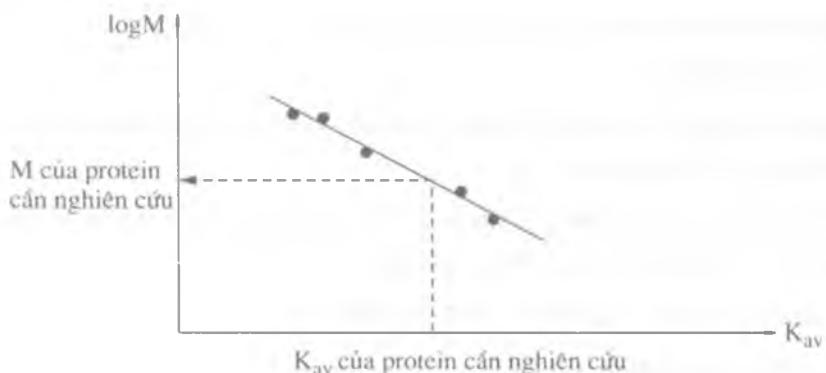
Pha tĩnh là các hạt gel xốp chứa đầy trong cột. Khi cho dung dịch các protein chảy qua cột thì các phân tử lớn của hỗn hợp có đường kính lớn hơn lỗ của pha tĩnh, không thể khuếch tán vào bên trong hạt gel nên đi len lỏi bên ngoài hạt và chúng sẽ đi ra khỏi cột trước.

Các phân tử nhỏ ngược lại, sẽ khuếch tán vào trong hạt gel và ra khỏi cột sau. Nhờ đó có thể thu enzym mong muốn ở các phân đoạn khác nhau.



Hình 6.2. Sắc ký lọc gel

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



Hình 6.3. Đồ thị M protein chuẩn

Gel được sử dụng rộng rãi nhất là gel sephadex và polyacrylamide. Sephadex là một loại dextran có liên kết ngang giữa các mạch polysaccarit với nhau tạo thành mạng lưới ba chiều. Sephadex trung hòa điện tích nên không có tương tác anion cũng như cation, là một loại bột khô, không tan trong nước, nhưng khi ngâm nước sẽ trương ra và tạo thành gel. Mát lưới của

các gel sephadex thường to nhỏ khác nhau, tuỳ theo mức độ liên kết. Nếu giữa các chuỗi polysaccharit có ít liên kết thì gel sẽ có mặt lưới lớn, ngâm nước nhiều và ngược lại.

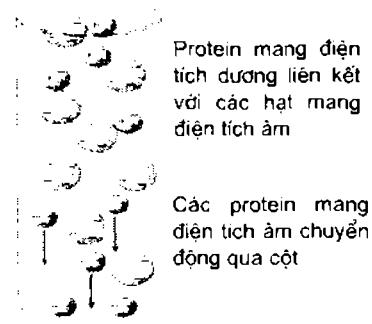
Dựa vào độ liên kết người ta chia sephadex làm 5 loại : sephadex G-25, G-50, G-75, G-100, G-200 với kích thước lỗ gel khác nhau để tách.

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

c) Dựa vào khả năng tích điện

1. Sắc ký trao đổi ion (ion exchange chromatography)

Phương pháp này dựa trên cơ sở phản ứng trao đổi ion của dung dịch protein enzym với nhựa trao đổi ion. Protein nào tích điện trái dấu được liên kết với nhựa trao đổi ion. Sau đó dung dịch đậm photphat, axetat, xitrat... hoặc gradient chất điện giải (NaCl) đẩy protein enzym ra khỏi cột. Protein enzym nào có ái lực với nhựa trao đổi ion yếu nhất sẽ ra khỏi cột trước tiên và ngược lại.

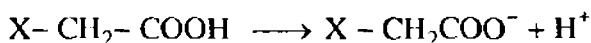


Hiện nay người ta cũng thường sử dụng một số nhựa trao đổi ion từ các dẫn xuất của xenluloza như :

– Nhựa trao đổi cationit : Nhựa trao đổi cation tích điện âm (-), có khả năng trao đổi với protein tích điện dương (+) :

- + Cacboxyl methyl xenluloza CM-xenluloza).
- + Photpho xenluloza.
- + Sunpho etyl xenluloza.
- + Sunpho methyl xenluloza
- + CM – sepharosa

Các loại nhựa trao đổi cation :



Để tinh sạch enzym kiêm tính, người ta thường sử dụng các nhựa cationit này.

– Nhựa trao đổi anionit : Nhựa trao đổi anion tích điện dương (+), có khả năng trao đổi với protein tích điện âm (-) :

+ Dicty laminoethyl xenluloza (DEAE-xenluloza).

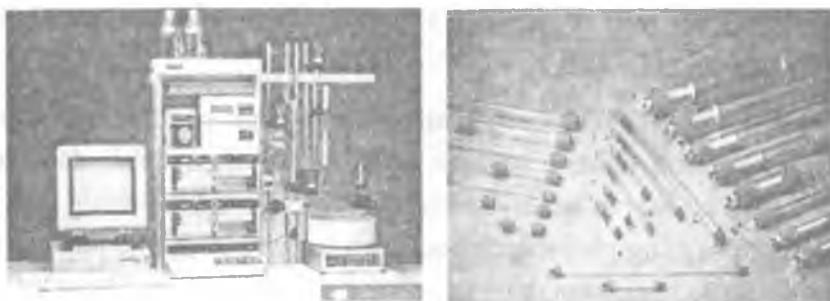
+ DEAE -sephadex.

+ Trietyl amino etyl xenluloza.



Với các enzym axit tính, người ta thường sử dụng các nhựa anionit để tách và tinh chế.

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



Hình 6.4. Sơ đồ tách chiết enzym bằng phương pháp sắc ký cột
(Hệ thống FPLC)

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

2. Phương pháp điện di

Điện di là quá trình dịch chuyển của các phân tử tích điện trong điện trường. Các phân tử protein enzym được tách riêng dựa vào sự tích điện và khối lượng phân tử. Khả năng tách riêng các protein theo phương pháp này khá cao nhưng khó đưa lên quy mô lớn

d) *Dựa vào vị trí liên kết đặc hiệu (Sắc ký ái lực : Affinity Chromatography)*

1. Phương pháp sắc ký ái lực

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

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

* *Chất mang (pha tĩnh)*

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

* *Phôi tử (ligand)*

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

* *Cánh tay đòn*

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

* *Hoạt hoá chất mang*

Phôi tử và cánh tay đòn phải được gắn lên chất mang. Chất mang trước tiên phải được hoạt hoá. Hoạt hoá với bromua xianogen hoặc với glutaraldehyt

là hai phương pháp phổ biến. Bromua xianogen (BrCN) sẽ phản ứng với các nhóm hydroxyl của agaroza chẳng hạn, để tạo ra một imidocarbonat. Và imidocarbonat dễ dàng tác dụng với một amin bậc nhất của cánh tay đòn.

* Rửa giải enzym

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

Dung dịch đậm rửa giải thường :

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

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

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

Hiện nay, phương pháp sắc ký ái lực nhóm được sử dụng rất phổ biến. Với phương pháp này, phôi tử được gắn vào chất mang không chỉ đặc hiệu cho 1 enzym mà còn đặc hiệu cho một nhóm enzym. Chẳng hạn, Sepharosa-AMP sẽ có ái lực với các kinaza và cả với các dehydrogenaza có NAD bởi lẽ phôi tử AMP có cấu tạo một phần của các co- substrat : ATP và NAD của kinaza và dehydrogenaza.

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

2. Phương pháp sắc ký tương tác ưa béo (ky nước)

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

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

Nói chung, các tương tác sẽ mạnh nếu ta tăng lực ion (dung dịch NaCl 4M). Các protein bị giữ, tiếp đó, có thể được rửa giải một cách chọn lọc bằng cách giảm lực ion này hoặc bằng cách giảm độ phân cực của dung môi rửa (chẳng hạn bằng cách thêm etylen glycol hoặc thêm một chất tẩy rửa hoặc tăng độ pH dịch rửa). Có thể gắn các nhóm khác nhau lên chất mang. Chẳng hạn, ở Octyl- sepharosa (R) Cl-4B và phenylsepharosa Cl- 4b các nhóm octyl và phenyl đã được dính lên các đơn vị monosaccharit của agarosa bằng liên kết etc không tích điện và bền hóa học. Ở những chất mang khác thì có thể sử dụng những nhóm ưa béo khác

6.1.4. Đánh giá chế phẩm enzym

6.1.4.1. Đánh giá hiệu suất và độ tinh sạch của chế phẩm enzym

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

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

– Đơn vị IU (đơn vị quốc tế) : Là lượng enzym có khả năng xúc tác chuyển hoá được một micromol cơ chất sau thời gian một phút ở điều kiện tiêu chuẩn.

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

– Đơn vị katal (kat) : Là lượng enzym có khả năng xúc tác chuyển hoá một mol cơ chất sau thời gian một giây ở điều kiện tiêu chuẩn.

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

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

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

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

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

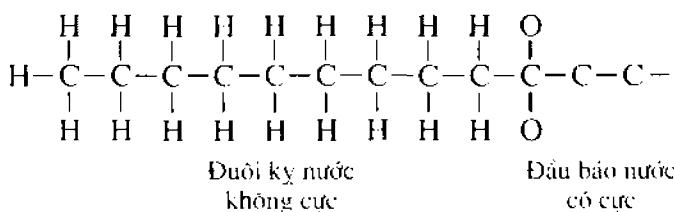
– Hoạt độ phân tử (hoặc hoạt độ riêng phân tử) : Được biểu diễn bằng số phân tử cơ chất được chuyển hoá bởi một phân tử enzym sau một đơn vị thời gian (thường là phút).

– Hoạt độ tâm xúc tác : Là số phân tử cơ chất bị chuyển hoá bởi một trung tâm hoạt động sau một phút.

6.1.4.2. Đánh giá độ tinh khiết bằng phương pháp diện di trên SDS-PAGE

Khi có mặt β -mecaptoetanol ($\text{CH}_2-\underset{\substack{| \\ \text{SH}}}{\text{CH}_2}\text{OH}$) để khử các cầu

disunphua ($-S-S-$) và sodium dodecyl – sunphat (SDS) $CH_3(CH_2)_{11}-SO_3Na$ thì các protein sẽ bị biến tính. Chuỗi polypeptit đã bị dãn ra sẽ được phủ kín bằng phân tử SDS để tạo ra một polyanion (đa anion) có mật độ điện tích trên một đơn vị chiều dài gần như không đổi và không phụ thuộc vào trình tự của chuỗi peptit.



Hình 6.5. Chuỗi polyanion

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

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

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

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

+ Hoá chất đúc gel

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

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

- (C) : dung dịch đệm : tris– HCL0,5M, pH= 6,8.
(D) : SDS10% trong nước.
(E) : ammonium persunphat 10%, TEMED xúc tác cho gel chống đông.

+ Dung dịch đệm pha mẫu

Bromo phenol blue (BPB), pH = 6,8.

Tris– HCl 0,1M, SDS1 – 4%, glycerol 10– 20%, BPB 0,02%,
 β -mecaptoetanol 0,2M.

+ Dung dịch đệm chạy điện di

Tris 0,025M, glycerol 0,2M, SDS 0,1%, pH = 8,3.

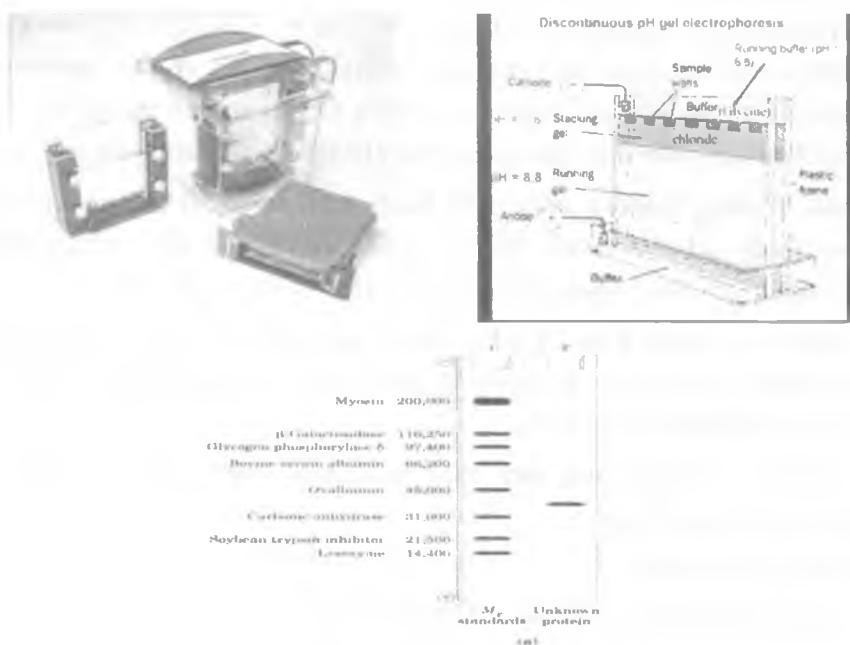
Tiến hành chạy điện di : cường độ dòng điện 15mA/bản gel dày 0,7mm (điện di đứng). Chạy trong buồng kín (dung dịch đệm đổ ngập). Nhiệt độ chạy điện di giữ ổn định ở 4°C.

+ Dung dịch nhuộm màu

Commasiebrilliant blue R – 250, hoặc Amiden 10B.

+ Dung dịch tẩy màu

Metanol : a–axetic : H₂O (4 : 1 : 5).



Hình 6.6. Sơ đồ điện di đứng

Độ tinh sạch của enzym được đánh giá thông qua các đại lượng :

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

– **Tỷ lệ tinh sạch** hay **mức độ tinh sạch T** giữa giai đoạn 1 và giai đoạn 2 là tỷ lệ giữa hoạt độ riêng (chẳng hạn : UI/mg) ứng với giai đoạn hai (AS_2) và hoạt độ riêng với giai đoạn một (AS_1).

$$T = AS_2 / AS_1$$

Tỷ số này càng cao thì enzym càng sạch.

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

Giá sử A_1 và A_2 là hoạt độ của hai giai đoạn, được biểu diễn bằng UI/ml.

V_1 và V_2 là thể tích của hai giai đoạn được biểu diễn bằng ml

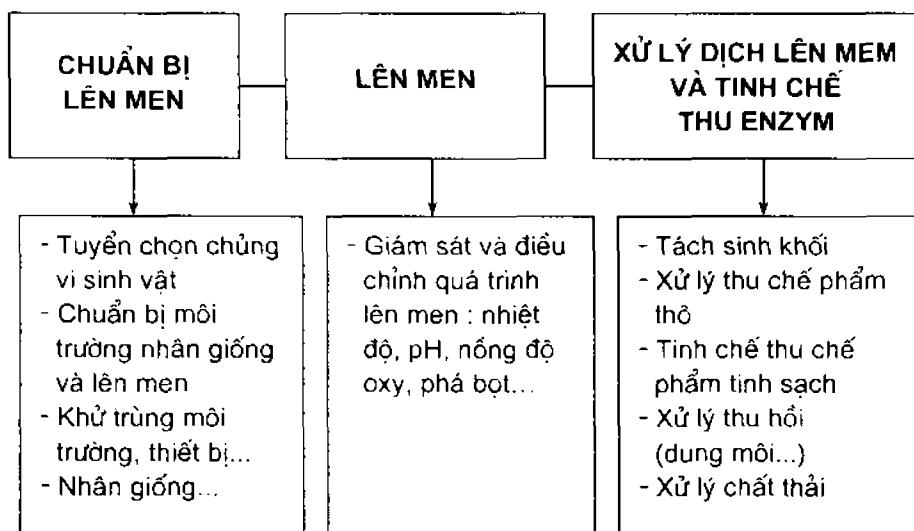
Hoạt độ tổng sẽ là :

Giai đoạn 1 (chưa sạch) = $A_1 V_1$ UI .

Giai đoạn 2 (sạch) = $A_2 V_2$ UI.

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

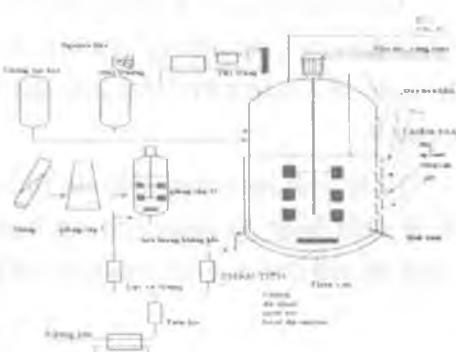
+ Sơ đồ quy trình công nghệ thu chế phẩm enzym từ vi sinh vật



+ Hệ thống thiết bị thu chế phẩm enzym :

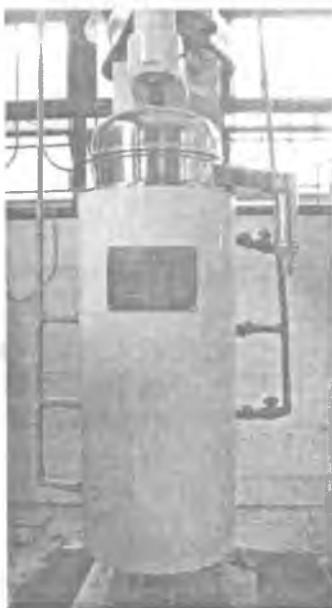


Hệ thống lên men tự động 150 lít

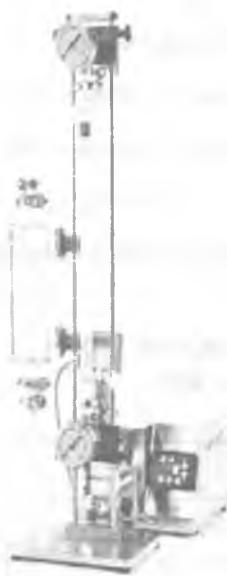


Mặt cắt của thùng lên men

+ Hệ thống thiết bị thu hồi sản phẩm : Thiết bị ly tâm thu chế phẩm enzym khô.

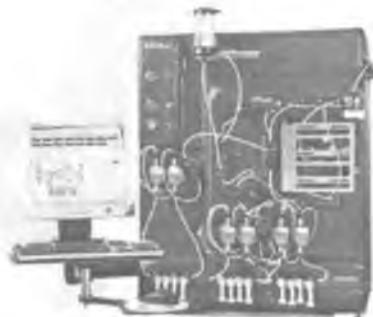


Máy ly tâm lạnh



Lọc luân hồi bằng màng kiểu hollow fiber với hệ thống FlexStand

+ Thiết bị thu chế phẩm tinh khiết : hệ thống sắc ký và cô đặc sản phẩm.



Hệ thống sắc ký FPLC AKT Apilot



Thiết bị hệ thống KwickLab thay đệm sau các bước sắc ký và cô đặc enzym bằng màng cassette.

6.2. Công nghệ thu một số chế phẩm enzym

6.2.1. Công nghệ thu enzym từ thực vật

6.2.1.1. Tyrozinaza từ *Agaricus bisporus*

Tyrozinaza (EC 1.14.18.1) là một enzym thuộc nhóm kim loại có chứa nguyên tử kim loại Cu trong phân tử và thuộc họ polyphenoloxida (PPO). Tyrozinaza có khả năng hydroxyl hoá các cơ chất họ monophenol tạo thành các o-diphenol và sau đó có khả năng chuyển hoá tiếp hợp chất o-diphenol thành hợp chất o-quinon là một chất có liên quan tới sự hình thành những chất trung gian tạo nên các chất có màu nâu sẫm. Bởi vậy, tyrozinaza được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như trong y học, nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm, xử lý môi trường (là khả năng phát hiện và loại bỏ dư lượng các hợp chất phenol).

Tyrozinaza có mặt trong các loại động vật có vú, các loại động vật không xương sống, vi sinh vật, thực vật. Tyrozinaza thực vật có nhiều trong táo, khoai tây, khoai lang, cây chè, thuốc lá, vỏ nho và đặc biệt từ nấm ăn (mushroom).

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu thành công về tách tinh chế thu chế phẩm tyrozinaza từ nấm mồ *Agaricus bisporus* với hoạt lực cao.

a) Cấu tạo của tyrozinaza

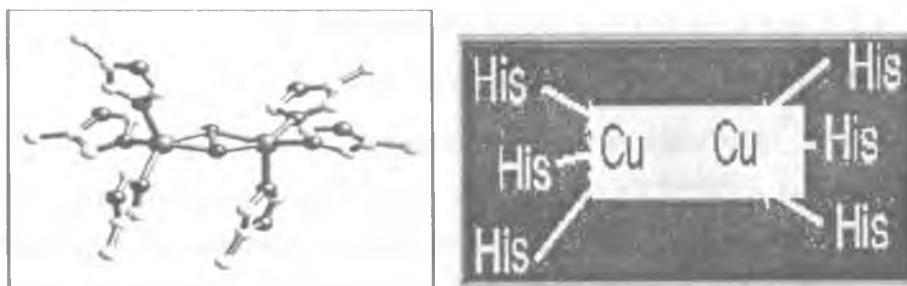
Tyrozinaza (còn gọi là monophenol, o-diphenol oxygen oxydoreductaza (EC.1.14.18.1) với cấu trúc bậc 4.

Phân tử tyrozinaza chứa hai ion đồng nằm rất gần nhau trong mạng lưới liên kết.

Vùng chứa 2 ion Cu gọi là ion Cu_A và Cu_B được tìm thấy trong tất cả các loại tyrozinaza. Mỗi ion Cu kết hợp với 3 histidin tạo thành trung tâm hoạt động của enzym, là nơi kết hợp của enzym với cơ chất và với nguyên tử oxy.



Hình 6.7. Cấu trúc không gian của tyrozinaza



Hình 6.8. Cấu trúc trung tâm hoạt động của tyrozinaza

Tyrozinaza từ các nguồn khác nhau thì khối lượng phân tử và cấu tạo khác nhau. Tuy nhiên, cấu tạo chung của tyrozinaza có hai histidin His-62 và His-189 được xác định là các axit amin liên kết với hai nguyên tử Cu trong tyrozinaza, hai tác nhân đột biến là His 62Asn và His 189Asn làm mất hoạt tính của tyrozinaza và làm mất khả năng liên kết với O_2 . (Huber.M và Lerch.K, 1998).

Về khối lượng phân tử, tyrozinaza từ *A.oryzae* có $M= 180kDa$, gồm 4 tiểu phần, mỗi tiểu phần có $M= 67kDa$. Còn tyrozinaza từ nấm mõ *Agaricus bisporus* là một tetrameric, có khối lượng phân tử $M= 108kDa$. Trong bốn tiểu phần xác định này, có hai tiểu phần nhỏ khối lượng $12kDa$ và 2 tiểu phần lớn khối lượng phân tử mỗi tiểu phần là $42kDa$.

b) *Tính chất*

Tyrosinaza từ các nguồn khác nhau thì các tính chất cũng khác nhau, điều này được thể hiện ở bảng sau :

Bảng 6.1. Một vài tính chất chính của tyrosinaza từ một số loại nấm

Các loại nấm	Khối lượng phân tử (kDa)	pH optimum	pI	Km (mM)	Vm	Hoạt độ riêng (U/mg protein)
<i>A. bisporus</i>	47	Kxd	5,1–5,2	0,44 (L-DOPA) 0,76 (catechol)	24,5 M/min (L-DOPA) 288,0 M/min (catechol)	Kxd
<i>A. oryzae</i>	67	5,0–6,0	Kxd	Kxd	Kxd	Kxd
<i>L. edodes</i>	70–105	6–6,5	4,3–4,7	Kxd	Kxd	Kxd
<i>N. crassa</i>	46(TS*)	Kxd	8,3	0,88 (L-DOPA)	Kxd	1340 (L-DOPA)
<i>N. crassa</i>	46(TL*)	Kxd	8,5	0,95 (L-DOPA)	Kxd	1330 (L-DOPA)
<i>P. sanguineus</i>	45	6,5–7,0	4,5–5,0	1,0 (L-tyrozin) 0,9 (L-DOPA)	54 (U/mg protein) (L-tyrozin) 112 (U/mg protein) (L-DOPA)	30 (L-tyrozin) 84 (L-DOPA)

(Kxd : không xác định)

TS : Thermostable izozym đồng phân bền nhiệt

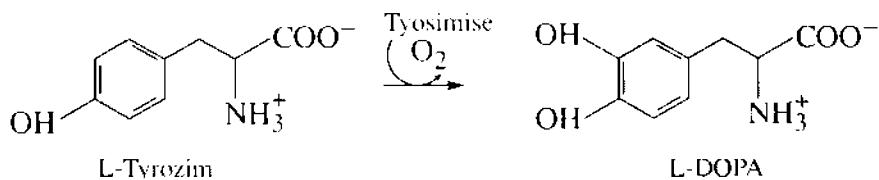
TL : thermolabile izozym : đồng phân không bền nhiệt.

c) *Cơ chế xúc tác phản ứng của tyrosinaza*

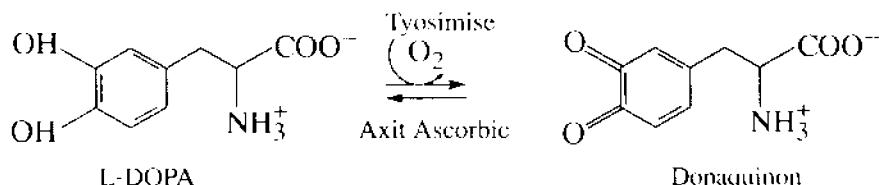
Tyrosinaza có cả hoạt tính cresolaza và catecholoxydaza, vì vậy cơ chất đặc hiệu của tyrosinaza bao gồm monophenol (thể hiện hoạt tính cresolaza) và o-diphenol (thể hiện hoạt tính catecholoxydaza). Tyrosinaza xúc tác

hydroxyl hoá monophenol tạo thành *o*-diphenol và oxy hoá *o*-diphenol thành *o*-quinon.

- Phản ứng hydroxyl hoá các monophenol tạo thành *o*-diphenol

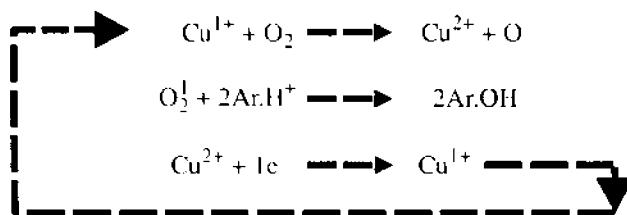


- Phản ứng oxy hoá *o*-diphenol thành *o*-quinon



Cả hai phản ứng trên đều có sự tham gia của phân tử O₂. Và nếu có mặt axit ascorbic thì sẽ xảy ra sự chuyển hoá ngược từ *o*-quinon thành *o*-diphenol, khi đó *o*-diphenol là sản phẩm duy nhất của phản ứng hydroxyl các monophenol với xúc tác là tyrozinaza.

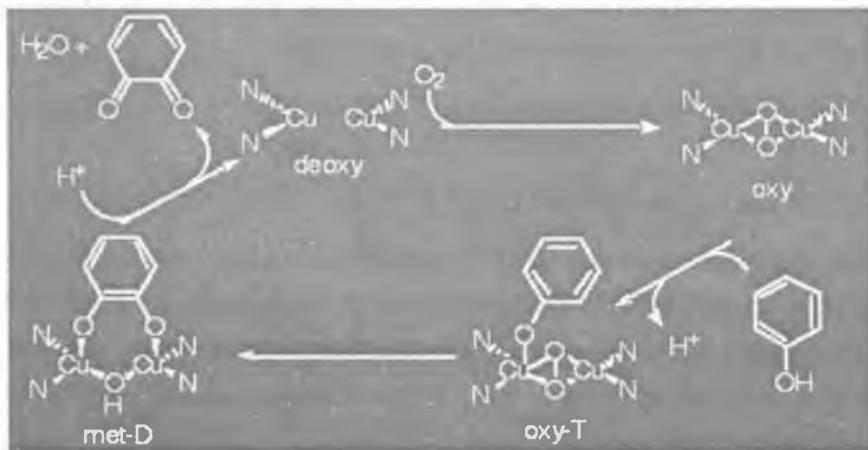
Các nghiên cứu cho rằng, cơ sở tác dụng của tyrozinaza là do sự oxy hóa thuận nghịch nguyên tử đồng hoá trị một (Cu^{1+}) thành đồng hoá trị hai (Cu^{2+}).



Theo Baxendale và George giải thích, ở phản ứng từ Cu^{1+} thành Cu^{2+} là do sự kết hợp của protein – Cu với các homoprotein vận chuyển O₂. Sự chuyển hoá này là một bước rất quan trọng cho phản ứng với diphenol tiếp theo là sự khử của Cu^{2+} .

Các tyrozinaza từ nấm mốc chủ yếu thuộc họ catechol oxydaza, ngoài hoạt tính diphenolaza thường có thì chúng còn có hoạt tính monophenolaza.

Trung tâm hoạt động chứa hai ion Cu xúc tác phản ứng oxy hoá catechol bằng cách khử 4 electron của phân tử O₂ thành hai phân tử H₂O.



Hình 6.9. Cơ chế xúc tác của tyrosinaza với sự tham gia của phân tử O₂

Trong cơ thể sống, đa số tyrosinaza tồn tại ở dạng met không hoạt động. Nói riêng trong bào tử nấm *A.bisporus*, dạng không hoạt động chiếm tới 98–99% tổng hoạt độ tyrosinaza. Dạng này không thể kết hợp với nguyên tử oxy nên enzym không tác dụng với monophenol nhưng lại có ái lực đối với chúng gây ra một khoảng thời gian trễ. Có thể loại bỏ được giai đoạn này bằng cách thêm vào một lượng nhỏ ortho-diphenol (trường hợp của tyrosinaza từ *A.bisporus*). Để khử dạng met thành dạng deoxy có khả năng kết hợp trực tiếp với O₂ tạo dạng oxy hoạt động (Solomon and Lowery 1993).

d) Tách, tinh chế thu tyrosinaza từ nấm ăn

Tyrosinaza từ các nguồn khác nhau thì có các phương pháp tách tinh chế và làm sạch khác nhau. Tuỳ vào mục đích sử dụng mà người ta tinh chế enzym ở các mức độ khác nhau.

Tyrosinaza từ vi sinh vật thường là enzym nội bào, do đó để thu được enzym phải phá vỡ được tế bào bằng sóng siêu âm, cát, nitơ lỏng... Còn đối với tách chiết tyrosinaza từ thực vật và nấm quả thể thì phải nghiền, trích ly enzym bằng dung dịch đệm hoặc dung môi hữu cơ.

Trong quá trình tách chiết tyrozinaza thực vật có sự hình thành một lượng lớn melanin. Mặt khác, các loại nấm ăn chứa tyrozinaza vốn rất giàu các hợp chất phenol cũng có thể kết hợp với tyrozinaza tạo thành các phức chất cao phân tử. Do đó cần phải loại bỏ hỗn hợp các hợp chất phenol và giảm sự tiếp xúc của hỗn hợp với oxy, bởi vậy cần phải bổ sung axit ascorbic và polyvinyl-polypyrrolidon trong thời gian đông hoá.

e) Một số phương pháp tách chiết tyrozinaza từ nấm ăn đã được công bố trên thế giới

1. Chiết enzym bằng đệm

Nấm được bảo quản ở -20°C trong thời gian 24 giờ trước khi sử dụng. Lấy 100g nấm nghiền bằng máy đông hoá Blender, chiết trong 500ml dung dịch đệm photphat 25mM, pH=6,8. Bổ sung thêm axit ascorbic vào hỗn hợp. Quá trình trích ly enzym được thực hiện ở 4°C trong thời gian 1 giờ đồng thời có khuấy đảo, ly tâm lạnh với vận tốc 6000 vòng/phút ở 4°C trong thời gian 15 phút, thu dịch enzym khô (Qin Wang và cộng sự, 2004).

2. Chiết enzym bằng axeton 30%

Nấm được bảo quản ở -20°C trong thời gian 24 giờ trước khi sử dụng. Lấy 100g nấm rửa bằng 130ml axeton (-20°C) trong vòng 1 phút rồi nghiền bằng máy đông hoá Blender, chiết trong 100ml dung dịch axeton 30%. Bổ sung thêm 5% axit ascorbic. Để trong 2–3 phút, ly tâm lạnh với vận tốc 6000 vòng/phút ở 4°C trong thời gian 15 phút, thu được dịch enzym khô (Jan HaaVis, 1997).

3. Chiết enzym bằng nước cất

Nấm được bảo quản ở -20°C trong thời gian 24 giờ trước khi sử dụng. Lấy 100g nấm nghiền bằng máy đông hoá Blender, chiết trong 100ml nước cất. Bổ sung thêm axit ascorbic. Sau 15 phút, ly tâm lạnh với vận tốc 6000 vòng/phút ở 4°C trong thời gian 15 phút, thu được dịch enzym khô (Koeni.D và cộng sự, 2000).

Sau khi thu được dịch enzym khô, để thu chẽ phẩm tyrozinaza kỹ thuật, người ta dùng phương pháp kết tủa bằng dung môi hữu cơ như axeton hoặc etanol hoặc bằng muối amonsunphat.

f) Một số phương pháp tinh sạch tyrozinaza thu chế phẩm enzym

1. Kết tủa enzym bằng axeton

Dịch enzym thô được đông nhát trong axeton ở -20°C theo tỷ lệ axeton : dịch enzym = 1,5 : 1(v/v). Sau 30 phút để ở 0°C , ly tâm với vận tốc 9000 vòng/phút trong 15 phút, sấy chân không kết tủa ở 30°C , được bột enzym kỹ thuật (Koeni.D và cộng sự, 2000).

2. Kết tủa enzym bằng etanol

Dịch enzym thô được đông nhát trong etanol ở 0°C với tỉ lệ etanol là 40% (v/v). Sau 1 giờ, ly tâm với vận tốc 9000 vòng/phút trong 15 phút, sấy chân không ở 30°C , thu được bột enzym kỹ thuật.

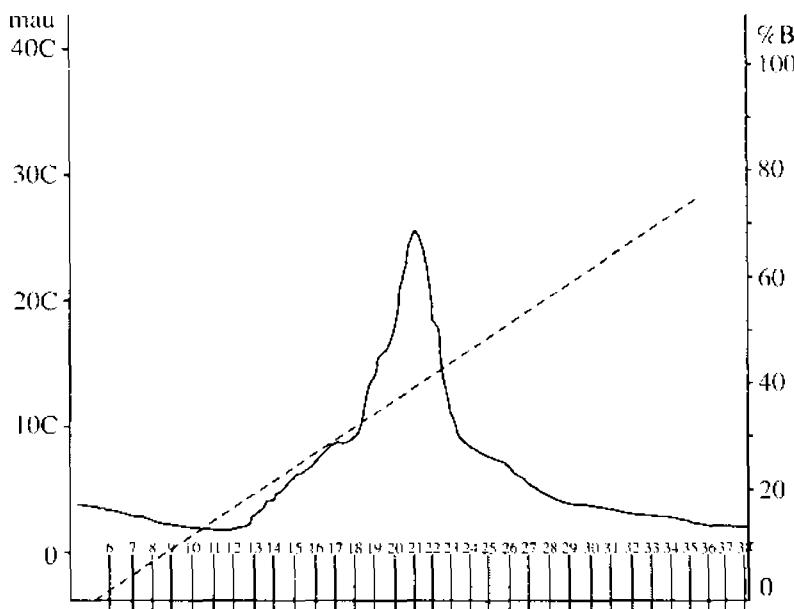
3. Kết tủa enzym bằng muối amonsunphat

Dịch enzym thô được tiến hành tủa phân đoạn bằng muối amonsunphat 10–75% độ bão hòa. Mỗi phân đoạn được thực hiện trong 2 giờ tại nhiệt độ 0°C , ly tâm thu tủa và hoà tan lại tủa vào dung dịch đậm, thẩm tích loại muối trong dung dịch đậm photphat 25 mM, pH=6,8 (Jolley.R.L và cộng sự, 1969).

Sau đó, đưa qua hệ thống sắc ký FPLC với các bước : trước hết là qua cột trao đổi anion yếu tốc độ nhanh DEAE-FF (DEAE fast flow), tiếp theo dịch enzym được đưa qua cột sắc ký lọc gel Sephadryl-100 HR (ở đây, các phân tử protein được phân tách theo kích thước), sau các bước trên ta thu được tyrozinaza tinh khiết. Để kiểm tra độ tinh khiết này người ta sử dụng phương pháp chạy điện di trên gel SDS-PAGE (Huber.M và cộng sự)

Bảng 6.2. Kết quả các bước tinh sạch tyrozinaza từ *Agaricus bisporus*

Bước tinh sạch	Protein tổng số (mg)	Hoạt độ riêng (U/mg)	Độ tinh sạch (lần)	Hiệu suất (%)
Dịch chiết thô	2490	103	1	100
Dịch qua siêu lọc	2150	200	1,9	100
Kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40–60%)	646	1200	11,6	8,6
DEAE-Sepharozza	72	6000	1	1,7
Phenyl-Sepharozza	19	14700	1	0,7
Hydroxyapatit	1,2	83000	1	100



Hình 6.10. Sắc ký đồ tinh sạch tyrozinaza từ cột DEAE Sepharosa HR

6.2.2. Công nghệ thu enzym từ động vật

Pepsin (EC.3.4.4.1) là proteaza axit có trong màng nhầy dạ dày lợn. Trong màng nhầy dạ dày, pepsin ở dạng zimogel, không hoạt động là pepsinogen. Muốn enzym hoạt động được phải hoạt hoá bởi chính pepsin hoặc axit dịch bao.

6.2.2.1. Cấu tạo

Pepsin là một mạch polypeptit, không có cấu trúc bậc 2 (chỉ có rất ít cấu trúc xoắn) và bậc 4, trung tâm hoạt động chứa nhóm COOH của axit aspartic, ngoài ra có nhóm phenol của tyrozin.

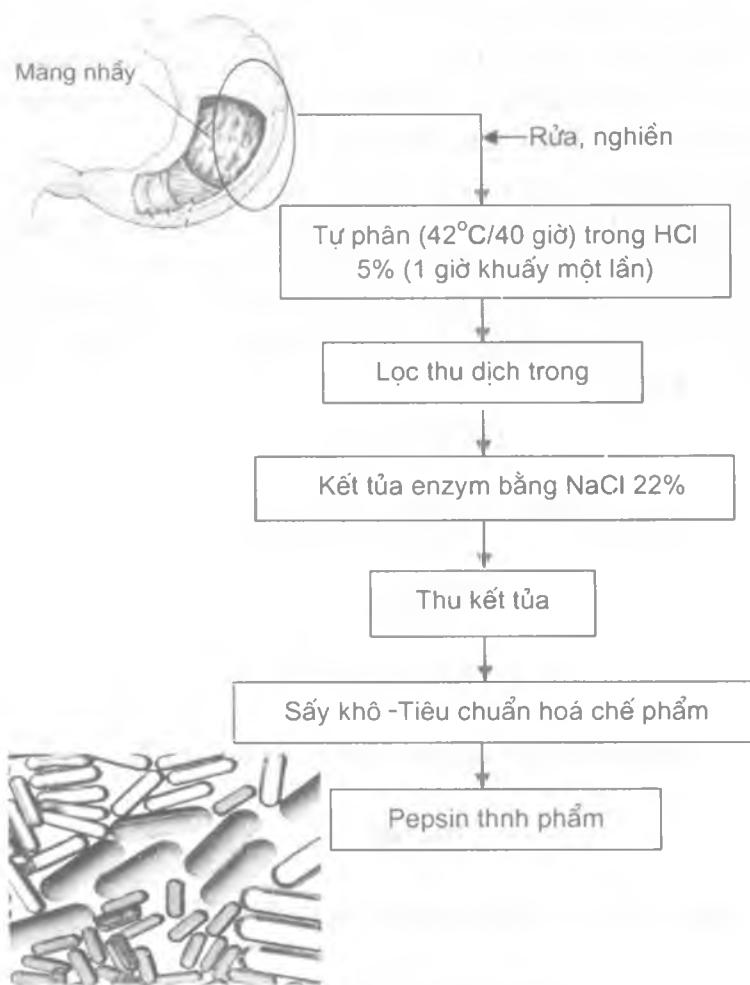
6.2.2.2. Tính chất

Pepsin có pH tối ưu = 1,8–2,0, ở trạng thái khô khá bền, ngay cả ở nhiệt độ thường.

6.2.2.3. Đặc tính thuỷ phân

Pepsin phân cắt 30% liên kết peptit của protein tạo thành các peptit 5–8 axit amin. Pepsin chỉ phân cắt các liên kết peptit giữa các axit amin kỵ nước như : phenylalanin, tyrozin, lóxin với nhóm COOH của gốc axit glutamic, metionin, glyxin, xystein. Ngoài ra có thể cắt liên kết este.

6.2.2.4. Tách, tinh chế pepsin



Hình 6.11. Sơ đồ thu nhận pepsin (Gratreva 1973, Teply 1980)

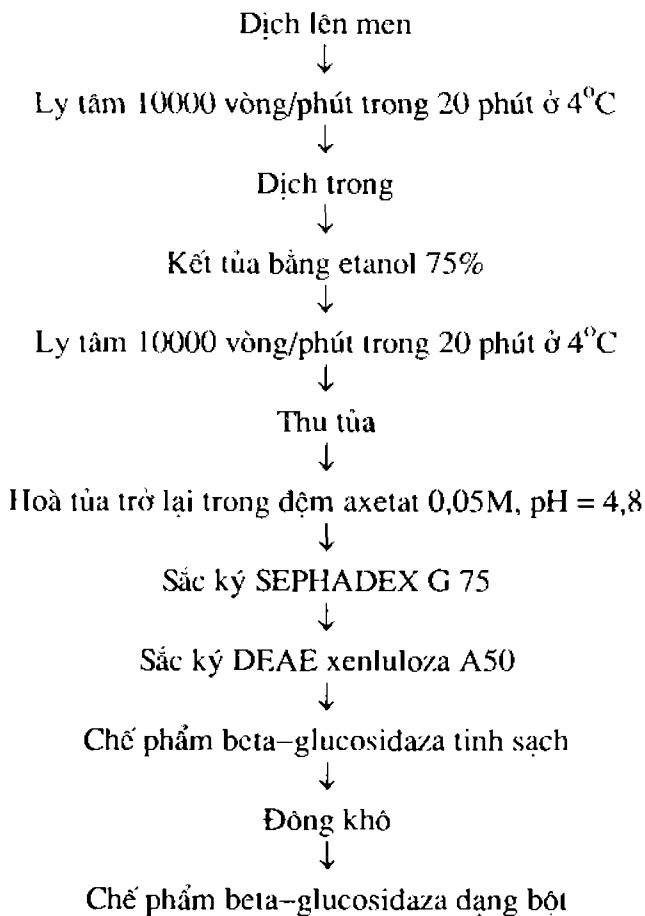
6.2.3. Công nghệ thu enzym từ vi sinh vật

6.2.3.1. Thu nhận β -glucosidaza từ *Aspergillus niger* PBC

Các nghiên cứu về enzym cho biết β -glucosidaza (EC3.2.1.21) tham gia vào các phản ứng thuỷ phân gốc tận cùng không khử β -D-glucoza giải phóng ra gốc β -D-glucoza và được coi là động lực xúc tác cho quá trình thuỷ phân các nguồn cơ chất giàu xenluloza trong các lĩnh vực xử lý môi trường và sản xuất cồn sinh học. Mặt khác, enzym này có phổ tác dụng rộng, ngoài việc thuỷ phân xenlobioza, nó có thể hoạt động trên các

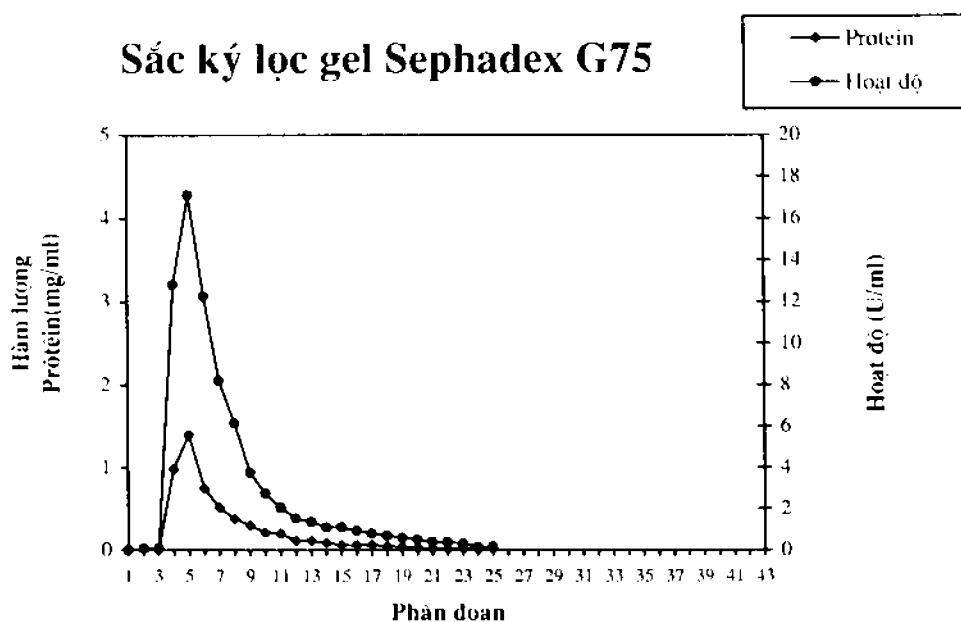
diglucozit, oligosaccazit khác như β -D-galactozit, β -D-xylozit, β -D-sucozit, α -L-arabinozit... cũng như các aryl và alkyl glucozit như p-nitrophenyl- β -D-glucopyranozit, p-nitrophenyl- β -D-xylozit... nên ngày nay β -glucosidaza cũng được xem là một enzym chìa khoá trong sự giải phóng ra các cấu tử thơm từ các tiền chất glucozit có mặt trong các dịch quá hoặc từ các sản phẩm lên men từ quả.

Chính nhờ có phổ tác dụng rộng như trên nên hiện nay, nhu cầu về chế phẩm β -glucosidaza là rất lớn. Những nghiên cứu cho thấy, β -glucosidaza có thể được sinh tổng hợp bởi nhiều loại vi sinh vật khác nhau bao gồm cả vi khuẩn, nấm men, nấm mốc và xạ khuẩn. Sơ đồ dưới đây minh họa một quy trình tách tinh sạch β -glucosidaza từ dịch lên men sau 5 ngày của chủng *Aspergillus niger* PBC.



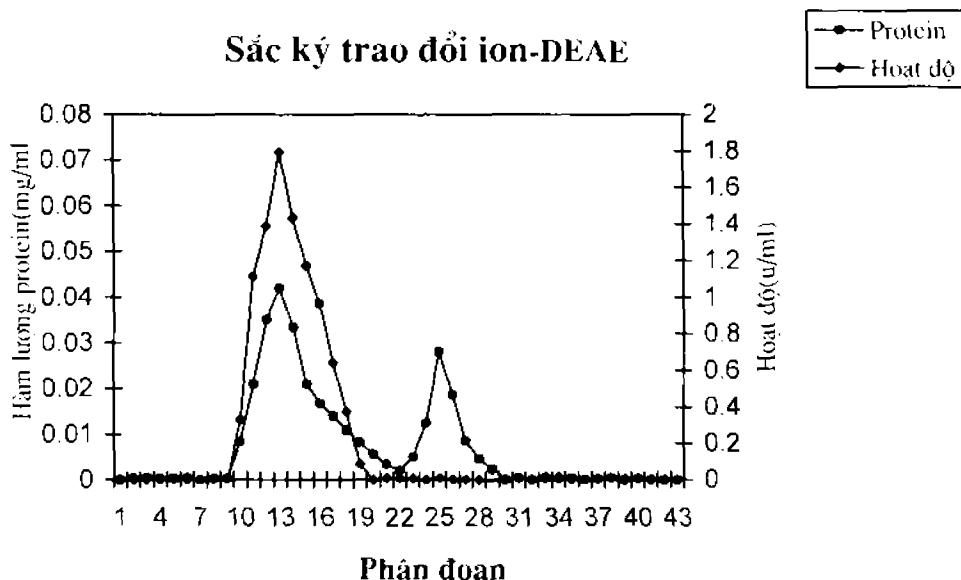
Hình 6.12. Quy trình tách và làm sạch β -glucosidaza từ *Aspergillus niger* PBC

Phân tử thu được sau khi xử lý với cồn 75% được hòa tan trở lại trong đệm axetat 0,05M, pH = 4,8 theo tỷ lệ 1 : 3 và đưa lên cột Sephadex G75 (đường kính 19mm, chiều cao 260mm). Rửa giải bằng đệm trên với tốc độ 0,3ml/phút, mỗi phân đoạn thu 3ml. Kết quả cho thấy protein bị đẩy ra ngay từ các phân đoạn đầu tiên và có hàm lượng cao ở phân đoạn 2–5, hoạt tính β -glucosidaza có giá trị cao tập trung ở phân đoạn 2–6 và có một đỉnh hoạt tính ở phân đoạn thứ 3 (hình 6.15).



Hình 6.13. Sắc ký đồ lọc gel Sephadex G75

Các phân đoạn có hoạt tính β -glucosidaza cao thu được sau sắc ký lọc gel Sephadex G75 được tập trung lại và cho qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE xenluloza A-50 (đường kính 19mm, chiều cao 260mm). Rửa giải bằng NaCl, nồng độ tăng từ 0 đến 1,5M, với tốc độ dòng 0,4ml/phút, mỗi phân đoạn thu 4ml. Kết quả phân tích cho thấy protein bị đẩy ra tại nồng độ NaCl từ 0,5–0,6 M và có hàm lượng protein cao ở phân đoạn 11–15, hoạt tính β -glucosidaza có giá trị cao tập trung ở phân đoạn 11–16 và có một đỉnh hoạt tính tại phân đoạn 13 (hình 6.14).



Hình 6.14. Sắc ký đồ trao đổi ion – DEAE xenluloza A50

Từ các số liệu thực nghiệm thu được và tính toán cho thấy, enzym từ dịch nuôi cấy sau khi qua các bước kết tủa bằng côn và qua hai cột sắc ký Sephadex G75 và DEAE xenluloza A50 có hoạt độ riêng là 44,05U/mgPr, độ tinh sạch tăng lên được 80 lần và hiệu suất thu hồi là 40% (bảng 6.3).

Bảng 6.3 . Hiệu suất thu hồi và mức độ làm sạch β – glucosidaza

Các bước tinh sạch	Protein tổng (mg)	Hoạt độ		Mức độ tinh sạch (lần)	Hiệu suất thu hồi (%)
		Tổng (U)	Riêng (U/mgPr)		
Dịch enzym thô	3818	2100	0,55	1	100
Sau tủa côn 75%	1126,7	1757,7	1,56	2,83	83,7
Sau sắc ký Sephadex G75	66,6	1283,1	19,25	35	73
Sau sắc ký DEAE xenluloza A50	11,7	513,2	44,05	80	40

6.3. Enzym cố định

6.3.1. Khái niệm về enzym cố định

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

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

- Một lượng enzym có thể sử dụng lặp đi lặp lại nhiều lần trong một thời gian dài.
- Enzym không tan lẫn vào trong sản phẩm nên không gây ảnh hưởng xấu đến màu sắc, mùi vị sản phẩm.
- Có thể làm ngừng nhanh chóng phản ứng khi cần thiết bằng cách tách enzym ra khỏi cơ chất.
- Enzym cố định khá bền với nhiệt độ, pH, dung môi hữu cơ...

Tuy có nhiều thuận lợi như trên nhưng việc sử dụng enzym cố định cũng có những hạn chế nhất định như :

- Sự chuyển khối bị hạn chế.
- Có thể mất hoạt tính sau khi cố định.
- Không có hiệu quả đối với cơ chất rắn (inpractical for solid substrates)
- Mất tính thích nghi hình thể.

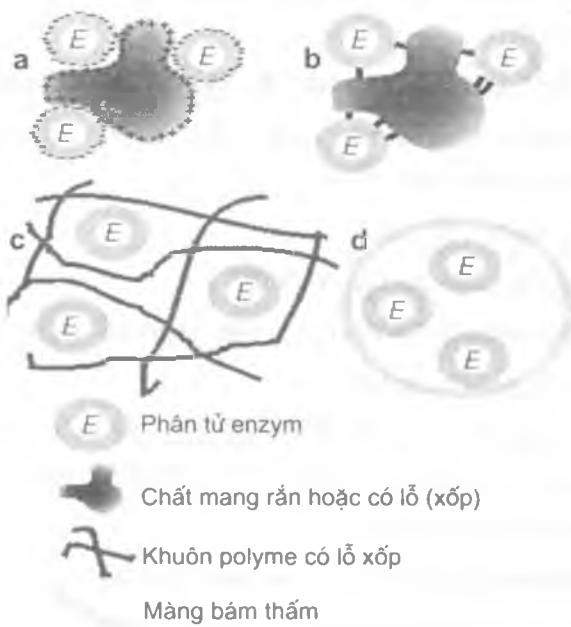
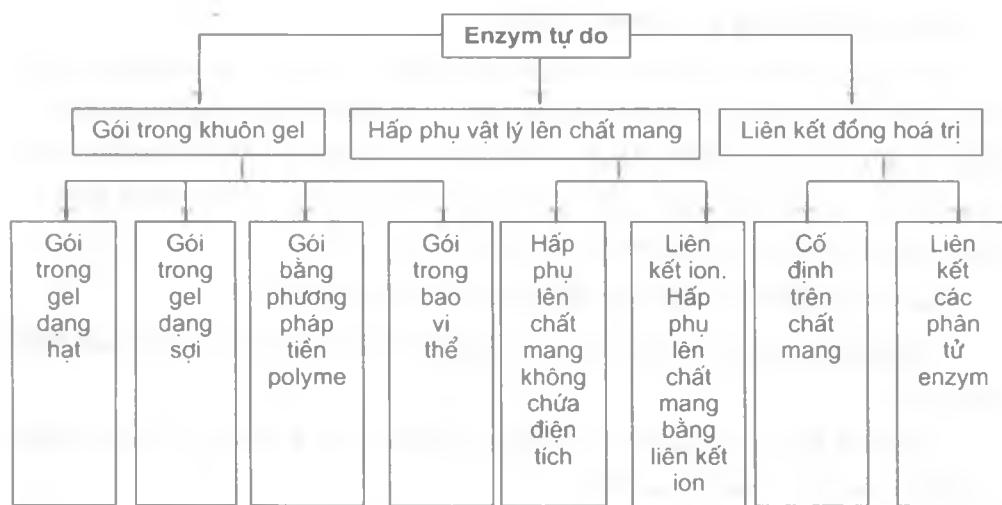
Tuy nhiên, những hạn chế trên là không đáng kể so với những lợi ích mà enzym cố định đem lại. Do vậy, ngày càng có nhiều nghiên cứu mới cũng như các công nghệ mới để cố định enzym

6.3.2. Các phương pháp điều chế enzym cố định

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

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

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



a : Cố định enzym bằng phương pháp hấp phụ lý học

b : Gắn các emzym với nhau bằng liên kết đồng hóa trị

c : Gói emzym trong khuôn gel

d : Gói emzym trong bao vi thể (microcapsul)

6.3.2.1. Gắn enzym lên chất mang bằng phương pháp hấp phụ vật lý và liên kết ion.

a) Nguyên tắc

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

Khi chất mang không có lỗ xốp, enzym bám trên bề mặt chất mang.

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

* Một số chất mang thường sử dụng để cố định enzym bằng hấp phụ hay liên kết ion :

- Chất mang hữu cơ : than hoạt tính, xenluloza, tinh bột, dextran, kitin.
- Chất mang vô cơ : silic, thuỷ tinh xốp, oxit kim loại, nilon.
- Chất trao đổi ion : amberlit, DEAE sephadex, CM sephadex, DEAE xenluloza, CM xenluloza.

* *Ưu nhược điểm của phương pháp :*

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

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

6.3.2.2. Phương pháp gắn enzym bằng liên kết đồng hóa trị

Thường có hai phương pháp :

a) Gắn enzym lên chất mang bằng liên kết đồng hóa trị

Các chất mang thường sử dụng là :

- Các polymc hữu cơ : polypeptit (colagen, gelatin, albumin), polysaccarit (dextran, agarosa, kitosan...)
- Các dẫn xuất của xenluloza : cacboxyl methyl xenluloza (CM –xenluloza), dictyaminocetyl xenluloza (DEAE–xenluloza), DEAE–sephadex, CM–sephadex.
- Các polyme tổng hợp : polyacrylamit, polystirol, polyamit, polyvinyl.
- Các chất vô cơ : silicagel, bentonit, nhôm hydroxyt.

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

– Gắn enzym lên chất mang bằng liên kết đồng hoá trị có hai phương pháp :

1. Gắn một giai đoạn

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

Ví dụ : chất đồng trùng hợp andehyl maleic và các etylen để liên kết đồng hoá trị giữa nhóm ϵ – amin của lizin ở phân tử enzym với gốc anhydrit maleic của polyme.

2. Gắn hai giai đoạn

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

– Giai đoạn hai là giai đoạn kết hợp enzym.

– Các chất mang có chứa nhóm amin như aminobenzoyl xenluloza, polyaminostiol, copolyme của aminophenylalanin có thể được hoạt hoá bằng phản ứng Diazo.

Ví dụ : polyaminostiol trước hết được Diazo hoá bằng natri nitrit trong môi trường axit thành muối Diazo, sau đó mới kết hợp với enzym.

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

– Nếu chất mang có chứa nhóm amin thì có thể hoạt hoá bằng cách cho tác dụng với photgen hoặc tiophotgen để tạo thành dẫn xuất izoxianat hoặc izotioxianat. Các nhóm izoxianat hoặc izotioxianat ở pH trung tính sẽ liên kết dễ dàng với gốc N cuối và nhóm ϵ -amin của enzym.

Bằng phương pháp này người ta điều chế được các dẫn xuất enzym không tan như trypsin, chimotrypsin, α , β – amilaza, glucomamilaza.

– Nếu chất mang có chứa nhóm COOH như CM-xenluloza hoặc nhựa tổng hợp cần được hoạt hoá trước khi cho tác dụng với enzym bằng các phương pháp azit, cacbodimit, anhydrit kép.

– Chất mang là polysaccharit thì được hoạt hoá sơ bộ bằng halogen xyanua.

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

Porath và Barcli lần đầu tiên đã hoạt hoá xanthulose, dextran và agarose bằng phương pháp này

* *Ưu nhược điểm của phương pháp*

– **Ưu điểm :**

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

+ Do enzym được gắn trên bề mặt chất mang nên dễ tiếp xúc với cơ chất.

– **Nhược điểm :**

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

+ Hoạt tính enzym có thể bị giảm do sự biến đổi cấu trúc hình thể enzym trong quá trình cố định và do sự liên kết chẽ giữa enzym và chất mang làm giảm sự di chuyển tự do của enzym để tiếp xúc với cơ chất.

Do đó, khi sử dụng phương pháp cần cân nhắc kỹ giữa hoạt tính và độ bền của enzym. Việc lựa chọn chất mang và phương pháp hoạt hoá tiến hành cần thận trọng.

b) *Phương pháp gắn các enzym với nhau bằng liên kết đồng hoá trị*

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

Tác nhân kết gắn thường dùng là glutaraldehyt với tỷ lệ khoảng 2–10% (w/w) hoặc hexametylendiamin

Phương pháp này chi phí cao, kém hiệu quả, hoạt tính enzym giảm. Tuy nhiên, liên kết tạo ra lại rất bền với các tác nhân pH, nhiệt độ. Vì vậy, phương pháp liên kết chéo thường được dùng kết hợp với một trong những phương pháp cố định khác để làm bền liên kết enzym – chất mang.

6.3.2.3. *Phương pháp gòi enzym trong khuôn gel*

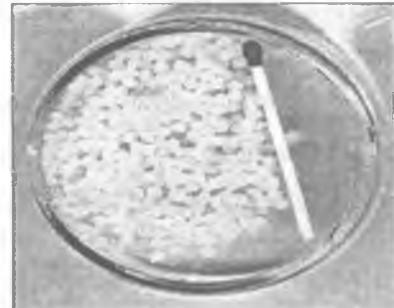
a) *Nguyên tắc*

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

Gel có thể được điều chế từ các polyacrylamit, hydroxyethyl-2-metacrylat tạo mạng lưới bằng etylenglycoldimetacrylat, polyuretan, polyvinyl, Na-alginat và caraghenan lấy từ rong biển cũng có khả năng tạo gel rất tốt. Các gel dạng sợi có thể là xenlulotriaxetat, collagen, kitosan...

b) Enzym được gói vào khuôn gel dưới dạng hạt

Enzym được hòa tan trong một dung dịch monome. Sau đó, monome này được polyme hoá (Na-alginat, chitosan và caraghenan). Hỗn hợp enzym và polyme được cho vào thiết bị tạo hạt đường kính 0,5 – 4mm (bằng cách nhỏ giọt hỗn hợp dung dịch enzym vào dung dịch CaCl_2 để làm bền hạt và tạo kích thước lỗ gel), enzym sẽ được gói trong các lỗ gel của hạt.



Hình 6.15. Enzym được gói trong gel dạng viên

c) Enzym bị "nhốt" trong các lỗ nhỏ của các sợi tổng hợp

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

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

+ Hoặc dùng phương pháp của DINELLI : Dung dịch nhũ tương của triacetat xenluloza trong metylenclorua và enzym trong dung dịch đậm chứa glycerol được ép dunn qua một khuôn có lỗ dưới áp suất nitơ. Các sợi ra khỏi khuôn được nhúng vào bể đông tụ có chứa toluen, sau đó sấy khô sợi trong chân không. Sợi tạo ra khá bền với axit yếu, kiềm yếu, lực ion hoá cao và bền với một số dung môi hữu cơ nhưng phương pháp này chỉ thích hợp với những enzym không bị mất hoạt tính trong các dung môi không tan lân nước

d) Gói enzym trong bao vi thể (Microcapsule)

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

– Cách gói enzym trong 1 Microcapsule : Polyme hoá ở bề mặt liên pha (Interfacial polymeation) : Hỗn hợp nước của enzym và monome hao nước (glycol) được tạo thành nhũ tương trong dung môi hữu cơ không lân nước. Sau đó thêm monome kỵ nước vào và khuấy. Phản ứng trùng hợp các monome xảy ra trên bề mặt liên pha giữa nước và dung môi hữu cơ trong nhũ tương kèm theo sự tạo thành một màng (polyamit, polyeste...) xung quanh pha nước. Kết quả là enzym trong pha nước bị nhốt trong màng polyme. Thường cho thêm các tác nhân hoạt động bề mặt để làm bền nhũ tương và điều chỉnh kích thước lỗ (từ 1– 100μm) theo ý muốn.

e) Phương pháp tiềnl polyme

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

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

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

f) Ưu nhược điểm của phương pháp gói enzym trong khuôn gel

– Ưu điểm :

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

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

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

- Nhược điểm :

+ Enzym cố định bằng phương pháp gói trong khuôn gel chỉ thích hợp cho những phản ứng mà cơ chất có khối lượng phân tử nhỏ. Kích thước của lỗ xốp cần phải đủ lớn để cho cơ chất và sản phẩm đi qua, điều đó cũng đồng thời có thể làm thất thoát enzym.

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

+ Gel kém bền (dễ bị đóng chặt) nên khó sử dụng trong các reactor kích thước nhỏ.

6.3.3. Đặc tính của enzym cố định

6.3.3.1. Enzym cố định có hoạt độ riêng thấp hơn hoạt độ riêng của enzym tự do

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

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

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

6.3.3.2. Hằng số động học enzym cố định tuân theo động học Michaelis-Menten

Tuy nhiên, có những sai khác do ái lực giữa cơ chất và chất mang quyết định hằng số K_m của enzym. Khi cơ chất và chất mang cùng tích điện thì trong môi trường trung gian của enzym sẽ có sự tương tác tĩnh điện (hút hay đẩy) tạo 1 gradient nồng độ. Nếu cơ chất và chất mang có điện tích cùng dấu thì $K_{mK+} > K_{m+}$; nếu cơ chất và chất mang tích điện trái dấu thì $K_{mK+} < K_{m+}$; chất mang không tích điện thì $K_{mK+} \geq K_{m+}$.

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

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

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

Nếu enzym liên kết đồng hoá trị với chất mang có điện tích (-) thì pH tối ưu sẽ chuyển sang phía pH kiềm so với enzym tự do. Trái lại, nếu enzym liên kết đồng hoá trị với chất mang có điện tích (+) thì pH tối ưu sẽ chuyển sang phía axit.

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

6.3.4. Ứng dụng của enzym cố định

6.3.4.1. Ứng dụng công nghệ hoá học

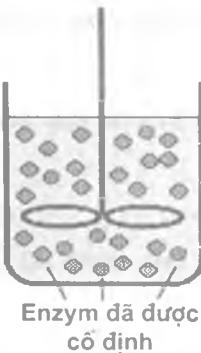
Trong công nghệ hoá học có thể sử dụng enzym để tổng hợp các chất dinh dưỡng, dược liệu như : axit amin, axit hữu cơ, kháng sinh, hoocmon.

a) Sản xuất kháng sinh

Axit 6-aminopenixilinic (6-APA) là một loại kháng sinh quan trọng thuộc họ ampicillin. Có thể thu nhận bằng cách thuỷ phân penixilin G (Benzyl penicillin) hoặc penixilin V (phenoxyethylpenixilin) bằng enzym penixilinaza cố định.

Penixilinaza đặc hiệu với penixilin G được thu nhận từ *E.coli* hoặc *Bacillus megaterium*. Còn enzym đặc hiệu với penixilin V thu nhận được từ *Penecillium chrysogenum* hoặc *Fusarium*.

Penixilinaza có thể được cố định trên một số chất mang như sephadex hoạt hoá bởi xyanogen bromua chuyển hoá penixilin thành axit 6-aminopenixilinic (6-APA), tiếp đến dùng acylaza (arycylaza) cố định chuyển hoá tiếp 6-APA thành ampixilin (D- α -aminobenzen penixilin). Quá trình này được tiến hành trên các reactor làm việc gián đoạn (STR) hay liên tục (CFR) ($35^\circ C$; $pH = 7,8$; 2 giờ) hoặc dạng cột (PBR).

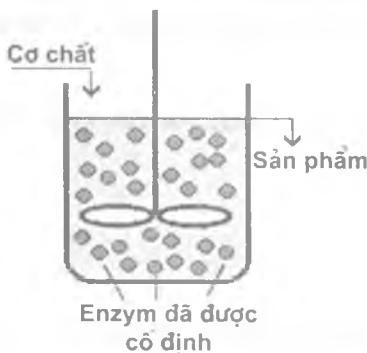


Thiết bị phản ứng gián đoạn (stirred tank reactor - STR)

Gồm bình phản ứng và một thiết bị trộn như là một cánh khuấy, một tuabin cánh hoặc một chân vịt.

Ưu điểm : Thiết lập, vận hành đơn giản, dễ kiểm soát.

Nhược điểm : Enzym bị phá huỷ và chỉ áp dụng cho sản xuất với quy mô nhỏ.

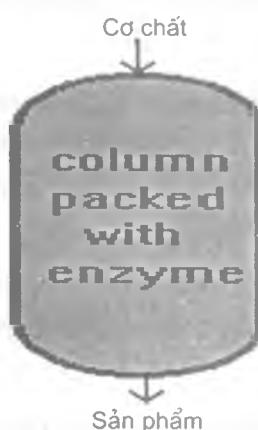


Thiết bị phản ứng liên tục (continuous flow reactor - CFR)

Cấu trúc như thiết bị gián đoạn nhưng vận hành liên tục.

Ưu điểm : Năng suất lớn, sử dụng được cơ chất có độ hòa tan thấp, dễ dàng điều khiển.

Nhược điểm : Vận tốc chuyển hóa thấp.



Thiết bị phản ứng dạng cột (packed bed reactor - PBR)

Có dạng hình trụ, lấp đầy chất mang có gắn enzym, enzym được cố định theo chiều từ trên xuống.

Ưu điểm : Dễ dàng, tự động, kiểm soát được hoạt động và sản phẩm. Giảm chi phí lao động.

Nhược điểm : Chi phí cao do thời gian lưu lớn, hàm lượng sản phẩm phụ cao.

b) Sản xuất L-axit amin sử dụng aminoaxylaza cố định trên DEAE-sephadex.

Aminoaxylaza-Sephadex được sử dụng để sản xuất L- axit amin từ hỗn hợp racemic (D,L). Dựa vào tính đặc hiệu của aminoaxylaza đối với L-axit amin đã được acetyl hoá. Có thể tách riêng tinh thể L-axit amin và dẫn xuất Axyl-D-axitamin. Chẳng hạn, muốn thu nhận L-metionin : nồng độ ban đầu

của axetyl-D-L-metionin là 0,2M. Sau khi cho 200 l hỗn hợp chạy qua cột phản ứng, cho bay hơi và kết tinh, thu được 2,7g L-metionin (đạt 91% so lý thuyết), dịch chứa axetyl-D-L-metionin được xử lý ở 60°C với axetic anhydrit (quá trình racxmat hóa), sau đó axit hoá đến pH = 1,8 để thu hồi axetyl-D-L-metionin.

6.3.4.2. Ứng dụng trong công nghệ thực phẩm

a) Sản xuất glucoza

Sử dụng glucoamylaza để sản xuất dịch glucoza nồng độ cao (92–96%) từ tinh bột đã thuỷ phân bởi α -amylaza. Glucoamylaza có thể cố định bằng liên kết axetonic đồng thời tạo liên kết chéo bằng glutaraldehyt.

b) Sản xuất siro ngọt với nồng độ fructoza cao (HFCS)

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

Hiện nay thường thực hiện phản ứng đồng phân hóa glucoza thành fructoza trong thiết bị phản ứng dạng cột (PBR) cho hiệu quả tốt hơn. Dịch cơ chất có nồng độ cao (35–45% chất khô, 93–97% glucoza), thực hiện phản ứng ở 55–60°C, pH = 7,5–8,0 (điều chỉnh bằng Na₂CO₃), cho thêm Mg₂SO₄ để hoạt hóa enzym (Mg²⁺, CO²⁺ là cofactor của enzym). Sản phẩm thu được chứa 42–46% (w/w) fructoza, 49–53% glucoza, còn lại là các oligosaccharit.

c) Sản xuất đường nghịch đảo

Sử dụng enzym invertaza để chuyển saccharoza thành glucoza và fructoza (đường nghịch đảo – có thể dùng trong sản xuất mứt cho khả năng giữ ẩm tốt hơn) mà không tạo màu như trong trường hợp thuỷ phân bằng axit.

6.3.4.3. Ứng dụng enzym cố định điều chế điện cực enzym

Điện cực sinh học nói chung và điện cực enzym nói riêng thực chất là một thiết bị phân tích chuyển đổi các đáp ứng sinh học thành các tín hiệu dưới dạng điện hoá, quang, nhiệt... Từ các tín hiệu đó có thể đo được nồng độ các chất cần phân tích.

Ngày nay, dựa trên cơ sở nghiên cứu enzym cố định người ta đã chế tạo ra hàng loạt các điện cực enzym để phân tích nhanh, chính xác các chất cần phân tích. Một khác, điện cực có kích thước nhỏ, tái sử dụng được nhiều lần nên khá thuận lợi và mang lại hiệu quả kinh tế đáng kể.

Có hai nhóm enzym được sử dụng chế tạo điện cực là oxydoreductaza và hydrolaza.

a) Đo hàm lượng glucoza bằng điện cực glucooxydaza

Năm 1956, giáo sư Leland Clark, người đầu tiên có ý tưởng nghiên cứu điện cực glucooxydaza (GOD) để phân tích đường glucoza. Năm 1975, điện cực thương mại xác định hàm lượng glucoza đầu tiên ra đời bởi hãng Yellow spring dựa trên cơ sở phản ứng :



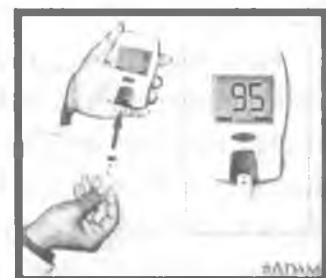
Có thể đo lượng H^+ tạo thành bằng điện cực pH hoặc đo hàm lượng H_2O_2 bởi điện cực do dòng điện hoặc đo hàm lượng O_2 tiêu tốn cho phản ứng bằng điện cực oxy sẽ biết hàm lượng glucoza.



Dùng lâm trích lấy máu



Lấy một giọt máu nhỏ
trên thanh thử



Sau 30 giây kết quả
được hiển thị trên màn
hình điện cực.

Hình 6.16. Xác định hàm lượng glucoza trong máu bằng điện cực oxy

b) Đo nồng độ ure bằng điện cực ureaza

Urê bị thủy phân dưới tác dụng của ureaza.

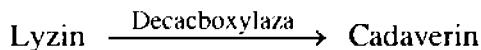
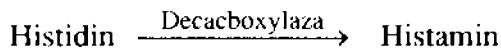


Nồng độ ion NH_4^+ tỷ lệ với nồng độ ure được đo bằng điện cực nhận biết khí.

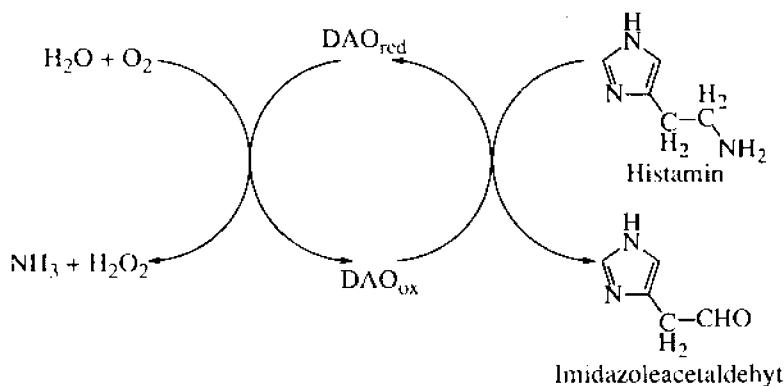
c) Xác định histamin bằng điện cực diaminoxydaza(DAO)

Các “biogenic amin” như histamin, cadaverin, pustresxin được coi là những chất chỉ thị để xác định các vi khuẩn gây thối thực phẩm (thịt, cá, phomat, sữa...).

Nếu các thực phẩm trên có mặt vi khuẩn gây thối, vi khuẩn này chứa enzym decacboxylaza sẽ xúc tác chuyển hoá axit amin :



Có thể xác định histamin bằng điện cực diaminoxydaza (DAO) theo cơ chế phản ứng sau :



Hình 6.17. Sơ đồ phân tích histamin bằng điện cực DAO

Do hàm lượng H_2O_2 hoặc O_2 tiêu tốn sẽ tỷ lệ thuận với hàm lượng histamin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Thị Thu (Chủ biên), Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thuỷ, Nguyễn Thị Xuân Sâm, 2004, Công nghệ enzym, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
2. Hồ Sĩ Tráng, 2005, Cơ sở hoá học gỗ và xyluloza (2 tập), NXB Khoa học và Kỹ thuật.
3. Lê Ngọc Tú (Chủ biên), Bùi Đức Hợi, Đặng Thị Thu, Lưu Duân, 2001, Hoá học thực phẩm, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
4. Lê Ngọc Tú (Chủ biên) và cộng sự, 2000, Biến hình các sản phẩm từ hạt, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
5. Ali.s.z, Kempf.w, 1986, On the degradation of potato starch during acid modification and hypochloride oxidation starch/staerke, 38, 83–86.
6. Andersen.O.M, Kenneth R. Markham, 2006, Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications, Press/Taylor and Francis, Bocaraton publisher.
7. Andres Illanes, 2008, Enzyme Biocatalysis, Principles and applications, Springer science publishing.
8. Belitz H.D., Grosch W, 1999, Food chemistry, translation from the forth edition by MM Burghagen et al. Springer – Verlag Berlin. Heidelberg . Printed in Germany.
9. Brian M, Mc kenna, 2000, texture in food vol Semi-solid foods, Woodhead publishing limited cambridge England.
10. Chapin, M.F, Bucke.C, 2003, Enzyme technology, London South bank, University, Inc.
11. Chemberlain E.K, Rao.M.A, 1999, Rheological properties of acid converted waxy maize starches in water and 90% DMSO/10% water carbohydrate polymers, 40, 251–260.
12. Chitosan and its oligosaccharide healthy products from sea, Jinan Haidebei marine Bioengineering Co, ltd.
13. Chrispeels M.J ; Sa, MFG and Higgins T.J.V (1998). Genetic engineering withr. Amylase Inhibitor makes seeds resistant to brachids. Seed Science Research. 8, 257 – 263.
14. DhimandHK, 2005, Biomaterials, 26(9), 979–986
15. Frod H. Steinke, 1991, The soybean France scientific publisher.
16. G.Linde. D.Lorient, 1984, Biochimie Agroindustrielle, Masson paris–Milan–Barcelone.
17. Gellissen, Production of recombinant protein, Novel Microbial anf eucayoic expression systems, ISBN 13 : 978–3527 310364.
18. Gossen, M.F.A, 1997, Applications of chitin and chitosan. Technomic publishing companybook, Lancaster.

19. Hames B.D, Hooper N.m, houglaton, J.D, 1998, Biochemistry, Bios scientific Publisher Springer.
20. Helena Dodziuk, 2006, Cyclodextrins and Their Complexe, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN : 3-527-31280-3, 2006.
21. Introduction à la biochimie la technologie de aliments vol 1 technique et documentation paris.
22. John.N, Franklin, 2004, Pulp and paper manufacture. The pulping of wood second edition, vol 1, Inc meehaw-Hillbook company.
23. Kin.S.Y, Oh.D.K and Jung.S.R, 2000, Xylitol manufacture with candida, JP2000093188(04.04.2000) and JP3007615 (0207.2000).
24. Kuak petoon.D, Ya-Jame wang, 1986, Structural characteristics and phylicochemical properties of oxidized corn strches varying in amylose content, carbohydrate research, vol 341, pp.1896–1915.
25. Kaplan.D.L, 1998, Biopolymers from renewable resource, Springer.
26. Lawal.O.S, James.N, Bemiller, 1997, Properties of some starch blends, cereal chem, vol 74, No8, pp.399–404.
27. Lehniger, A.L, 2004, Principles of Biochemistry, 4th Edition, U.H.Freeman.
28. Mario Agued etal, 2004, the use of enzymes and microorannisms the production of Aroma compouds from lipids, Food technol biotechnol 42(4) 327–366.
29. Rainer Jonas, Mauricio M, Silveira, 2004, Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologicaly, Applied biochemistry and technology, vol 117, 321–336.
30. Recombinant protein production with prokaryotic and eucaryotic cells : A comparitive view on host physiolog, ISBN-13-978-0792371373.
31. Rogols.S, 1986, Starch modification : A view into the future cereal foods world, 31, 869.
32. Soy protein council, 1987, Soy protein products characteristics, nutritional Aspects and utilization, Soy protein council, Washinton, DC.
33. Soya Bluebook, 1990, Soyatech Inc. bar harbor, ME.
34. Steinbuchel, 2003, Biopolymers, Wiley.VHC.
35. Understanding starch functionality, Food product design, weeks publishing co, 1996.
36. Yokoyama.W, Renner–Nantz.J.J, Shoemaker.C.F, 1998, Cereal chem, 75(4), 530–535.
37. http://en.wikipedia.org/wiki/Docosahexaenoic_acid
38. http://en.wikipedia.org/wiki/Eicosapentaenoic_acid
39. <http://en.wikipedia.org/wiki/sorbitol>
40. <http://www.ellulose.com>

Chịu trách nhiệm xuất bản :

Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập NGUYỄN QUÝ THAO

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung :

Phó Tổng biên tập PHAN XUÂN THIÀNH
Giám đốc Công ty CPDV xuất bản Giáo dục Hà Nội PHAN KẾ THÁI

Biên tập nội dung :

TRẦN THỊ PHƯƠNG – NGUYỄN ĐĂNG KHÔI

Trình bày bìa :

LƯU CHÍ ĐỒNG

Sửa bản in :

NGUYỄN ĐĂNG KHÔI

Chép bản :

NGUYỄN THÀNH TRUNG

Tổng phát hành :

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC TẠI TP. ĐÀ NẴNG

**CƠ SỞ CÔNG NGHỆ SINH HỌC - TẬP 2
CÔNG NGHỆ HÓA SINH**

Mã số : 7K634H9-NĐN

In 1.000 cuốn , khổ 16x24cm, tại Công ty CP In và Dịch vụ Quảng Nam- 260
Hùng Vương, Thành phố Tam Kỳ, Số XB : 05-2009/CXB/17-2170/GD. In xong và nộp
hưu chiểu tháng 11 năm 2009.



VƯƠNG MIỀN KIM CƯƠNG
CHẤT LƯỢNG QUỐC TẾ



Cơ sở công nghệ sinh học I.2.



0803100000017

68,000



8934980931257



Giá : 68.000đ