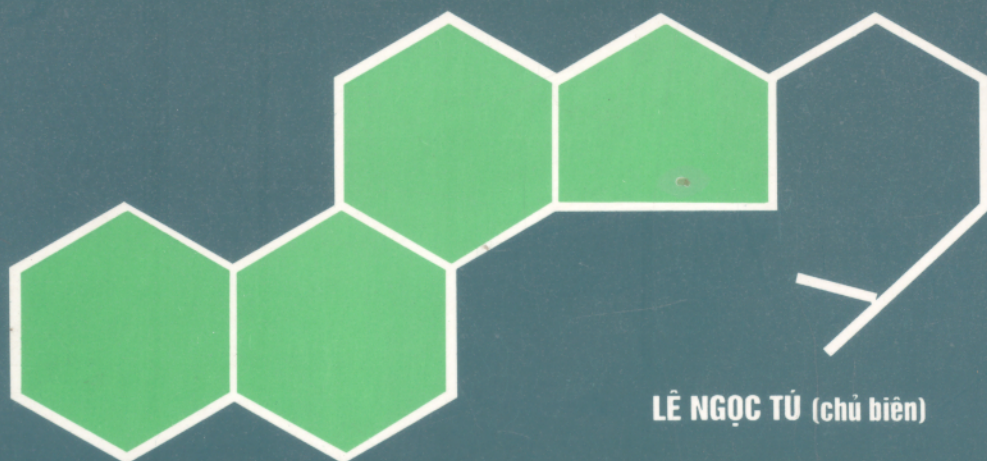




LÊ NGỌC TÚ (chủ biên)

Hóa sinh *Công nghiệp*



NHÀ XUẤT BẢN
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

LÊ NGỌC TÚ (chủ biên)

LÊ VĂN CHÚ - ĐẶNG THỊ THỤY -

PHẠM QUỐC THĂNG

NGUYỄN THỊ THỊNH - BÙI ĐỨC HỢI - LƯU DUẤN - LÊ DOÃN DIỄN

HÓA SINH CÔNG NGHIỆP



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI - 2002

Lời nói đầu

Sản xuất thực phẩm có đặc điểm là các nguyên liệu chính, thường có nguồn gốc từ sinh vật. Mỗi nguyên liệu và mỗi thành phẩm đều chứa các chất hợp phần của tế bào, đặc biệt là các enzym. Do đó, các phản ứng hóa học xảy ra trong nguyên liệu cũng như trong quá trình sản xuất, thực chất là những phản ứng enzym. Do phản ứng enzym mà chất lượng của các nguyên liệu trong quá trình bảo quản và cất giữ có thể bị tổn thất, giảm sút. Và cũng nhờ phản ứng enzym mà tân tạo ra được trạng thái, kết cấu và hương vị đặc thù cho các sản phẩm. Các biện pháp công nghệ trong sản xuất thực phẩm hoặc là tìm cách kìm hãm hoạt độ các enzym hoặc là tạo các điều kiện để chúng hoạt động đến mức tối đa.

Hóa sinh học công nghiệp là môn kỹ thuật nhằm cung cấp cho sinh viên những kiến thức cơ sở chủ yếu đó. Trong lần tái bản này có sửa chữa và bổ sung một số phần, song nội dung chính vẫn không ngoài các phần sau :

1- Cấu trúc và các tính chất của enzym tan và không tan. Các phản ứng enzym có quan hệ đến cấu trúc, trạng thái, màu sắc và chất lượng của các sản phẩm ;

2- Cấu trúc, tính chất công nghệ cũng như khả năng chuyển hóa của các chất trong điều kiện tự nhiên cũng như trong các quá trình công nghệ ;

3- Cơ sở hóa sinh của một số quá trình công nghệ tiêu biểu như quá trình bảo quản, quá trình khai thác, làm giàu và quá trình chế biến.

Cuốn sách có thể sử dụng rộng rãi không những làm tài liệu học tập cho sinh viên các ngành công nghệ thực phẩm, công nghệ sinh học và công nghệ hóa học mà còn có thể là tài liệu tham khảo cho các kỹ sư, học viên cao học, cán bộ kỹ thuật và cán bộ quản lý có liên quan đến việc chế tác và xử lý nguồn nguyên liệu sinh học này.

Các tác giả cũng xin trân trọng cảm ơn những ý kiến đóng góp của các bạn đọc gần xa để lần in sau được hoàn chỉnh hơn.

Danh sách các tác giả biên soạn :

Chương 1 : Phạm Quốc Thắng, Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú

Chương 2 : Lê Ngọc Tú, La Văn Chữ, Lưu Duẩn

Chương 3 : Nguyễn Quỳnh Anh, Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú

Chương 4 : Nguyễn Thị Thịnh, Lê Ngọc Tú

Chương 5 : Lê Ngọc Tú, Lê Doãn Diên

Chương 6 : Nguyễn Thị Thịnh

Chương 7 : Lê Ngọc Tú

Chương 8 : Lê Ngọc Tú, Lưu Duẩn

Chương 9 : Bùi Đức Hợi

Chương 10 : Lê Ngọc Tú, Nguyễn Văn Hiệu, Lê Thị Liên Thanh

Chương 11 : Lê Ngọc Tú, La Văn Chữ, Đặng Thị Thu

ENZIM

I.1. CẤU TẠO HÓA HỌC CỦA ENZIM

I.1.1. Bản chất protein của enzym

Enzim là những chất hữu cơ có phân tử lượng lớn từ 20 000 đến 1 000 000 (có kích thước nhỏ nhất là *Ribonucleaza* 12 700 dalton). Do có kích thước lớn nên cũng như protein, enzim không đi qua các màng bán thấm.

Enzim có thể hòa tan trong nước, trong dung dịch muối loãng, trong các dung môi hữu cơ có cực, nhưng không hòa tan trong các dung môi không phân cực. Dung dịch enzim có tính chất của dung dịch keo ưa nước. Khi hòa tan enzim vào nước, các phân tử nước lưỡng cực sẽ kết hợp với các ion, các nhóm ion hoặc các nhóm phân cực trong phân tử enzim tạo thành lớp vỏ hydrat.

Giống như protein, enzim không bền đối với tác dụng của nhiệt độ. Dưới tác dụng của nhiệt độ cao, enzim bị biến tính và mất khả năng xúc tác, mức độ giảm hoạt tính của enzim tương ứng với mức độ biến tính của protein enzim. Enzim cũng bị mất khả năng hoạt động dưới tác dụng của các tác nhân gây biến tính protein khác như axit hay kiềm mạnh hoặc muối kim loại nặng.

Enzim cũng có tính lưỡng tính, nghĩa là trong điều kiện điện ly của môi trường có thể tồn tại ở dạng anion, cation hoặc dạng trung hòa điện. Chính dựa trên tính chất này, cho phép có thể tiến hành phân tách cũng như xác định độ thuần khiết của enzim bằng phương pháp điện di.

Từ những đặc điểm trên cho thấy bản chất hóa học của enzim là protein. Tuy nhiên chỉ sau công trình của Summer (1926) người đầu tiên đã thu nhận được ureaza của đậu tương dưới dạng tinh thể, tiếp theo là Northrop và Kunitz (1930, 1931) đã tách được pepxin và tripxin, sau đó một số nhà nghiên cứu khác cũng đã kết tinh được một số enzim khác, nên có đủ bằng chứng xác nhận các tinh thể protein thu được chính là enzim.

Enzim được cấu tạo từ các $L - \alpha -$ axitamin kết hợp với nhau qua liên kết peptit. Dưới tác dụng của các peptidhydrolaza, axit, hoặc kiềm các enzim bị thủy phân hoàn toàn tạo thành các $L - \alpha -$ axitamin, trong nhiều trường hợp ngoài axitamin còn nhận được các chất khác. Trong trường hợp thứ nhất enzim là một protein đơn giản gọi là enzim một cấu tử. Trường hợp thứ hai enzim là một protein phức tạp gọi là enzim hai cấu tử (hai thành phần). Trong phân tử enzim hai cấu

tử phân, protein có tên gọi là "feron" hoặc "apoenzim" được kết hợp với một phần không phải protein gọi là nhóm ngoại "agon". Trường hợp khi nhóm ngoại tách khỏi phần "apoenzim" (khi cho thấm tích qua màng bán thấm) và có thể tồn tại độc lập, thì những agon đó còn có tên riêng là coenzim.

Apoenzim thường quyết định tính đặc hiệu cao của enzym và làm tăng hoạt tính xúc tác của coenzim.

Ví dụ, ion Fe^{3+} có thể xúc tác phân ly H_2O_2 , nhưng rất yếu, nếu Fe^{3+} kết hợp với bốn vòng pirol tạo thành nhân hematin thì lực xúc tác đã khá mạnh nhưng nếu hematin lại kết hợp với một protein đặc biệt để tạo thành enzym catalaza thì lực xúc tác của nó tăng lên hàng triệu lần. Mặt khác hai enzym catalaza và peroxydaza có cùng nhóm ngoại như nhau nhưng do phần apoenzim khác nhau nên xúc tác hai phản ứng hoàn toàn khác nhau.

Phần agon quyết định kiểu phản ứng mà enzym xúc tác, trực tiếp tham gia trong phản ứng và làm tăng độ bền của apoenzim đối với các yếu tố gây biến tính. Trong thành phần của nhóm ngoại thường có vitamin hòa tan trong nước.

Ví dụ, piruvatdecacboxylaza (xúc tác phản ứng loại CO_2 khỏi axit piruvic) là enzym hai thành phần trong đó có nhóm hoạt động là dẫn xuất pirophosphat của vitamin B_1 (tiaminpirophosphat).

Enzym aminotransferaza (xúc tác chuyển hóa axitamin) chứa vitamin B_6 , dehydrogenaza kỵ khí chứa vitamin PP, còn dehydrogenaza hiếu khí chứa vitamin B_2 , v.v. Điều này giải thích vì sao khi ăn thiếu vitamin lại ảnh hưởng lớn đến trao đổi chất.

Ngoài ra, một số hợp chất khác như glutation dạng khử, nucleotit và dẫn xuất, este phosphat của monosacarit, ... cũng tham gia vào thành phần nhóm ngoại của enzym.

Nhiều enzym hai cấu tử cũng như một cấu tử, trong phân tử còn có chứa cả kim loại. Ví dụ trong thành phần của catalaza, peroxydaza, xitocromoxydaza có chứa sắt, polyphenoloxydaza chứa đồng, α - amilaza chứa canxi, v.v. Trong nhiều trường hợp những ion kim loại này cũng tham dự vào hoạt động xúc tác của enzym.

Đa số enzym thuộc loại enzym hai cấu tử. Hiện nay người ta cũng đã xác định được rằng phần lớn các enzym trong tế bào là những protein có cấu trúc bậc bốn, ở những điều kiện xác định, phân tử của chúng có thể phân ly thuận nghịch tạo thành các phần dưới đơn vị (protome). Khi đó hoạt độ enzym bị giảm hoặc bị mất hoàn toàn. Ở những điều kiện thích hợp các phần dưới đơn vị lại có thể kết hợp lại với nhau và hoạt độ xúc tác của enzym được phục hồi.

Phần lớn phân tử các enzym có phân tử lượng rất cao thường chứa nhiều phần dưới đơn vị. Ví dụ, catalaza có phân tử lượng bằng 252 000 chứa sáu phần dưới đơn vị mỗi phần có phân tử lượng bằng 42 000.

Các protome của enzym thường có cấu trúc ít nhiều khác nhau. Tùy thuộc vào kiểu kết hợp của các protome này có thể tạo nên các izozim khác nhau. Chẳng hạn lactatdehydrogenaza do hai loại tiểu phần H và M (H từ chữ heart tiếng Anh nghĩa là tim, còn M từ chữ muscle tiếng Anh nghĩa là bắp thịt), kết hợp với nhau theo năm kiểu để tạo thành năm izozim khác nhau.

H	H
H	H

H	H
H	M

H	H
M	M

H	M
M	M

M	M
M	M

Hình 1.1 Sơ đồ của các izozim lactatdehydrogenaza

Các izozim này đều cùng xúc tác phản ứng oxy hóa axit lactic thành axit piruvic, nhưng khác nhau về thành phần axit amin, về tính bền nhiệt, về tính di động khi điện di và sắc ký, v.v.

1.1.2. Trung tâm hoạt động của enzym

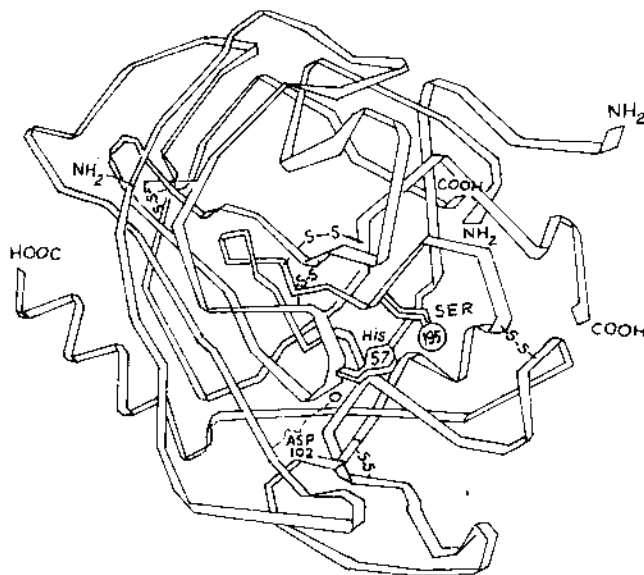
Trong quá trình xúc tác, chỉ một phần rất nhỏ của phân tử enzym tham gia kết hợp đặc hiệu với cơ chất, phần đó được gọi là trung tâm hoạt động của enzym.

Cấu tạo trung tâm hoạt động của các enzym hiện còn biết rất ít.

Ở các enzym một cấu tử, trung tâm hoạt động thường bao gồm một tổ hợp các nhóm định chức của axitamin không tham gia tạo thành trục chính của sợi polypeptit. Ví dụ, nhóm -SH của xystein, -OH của xerin, tyrozin, ϵ - NH₂ của lizin, - COOH của axit glutamic, aspartic, vòng imidazol của histidin, indol của triptophan.

Các nhóm này có thể ở xa nhau trong mạch polypeptit nhưng lại gần nhau trong không gian, được định hướng xác định trong không gian cách nhau những khoảng cách nhất định sao cho chúng có thể tương tác với nhau trong quá trình xúc tác.

Ví dụ, α - kimotripxin của tụy tạng là enzym một cấu tử, phân tử chứa 246 gốc axitamin, trung tâm hoạt động gồm nhóm hydroxyl của ser - 195, imidazol của his - 57, và nhóm cacboxyl của asp - 102.



Hình 1.2. Sơ đồ trung tâm hoạt động của α - kimotripxin

Trung tâm hoạt động của các enzym hai cấu tử thường bao gồm nhóm ngoại (vitamin, ion kim loại,...) và các nhóm định chức của các axitamin ở phần apoenzim.

Trong các nhóm chức tham gia vào tâm hoạt động của enzym thường phân biệt các nhóm của "tâm xúc tác" tham gia trực tiếp vào hoạt động xúc tác của enzym và các nhóm của "miền tiếp xúc" làm nhiệm vụ kết hợp đặc hiệu enzym với cơ chất để tạo thành phức hợp enzym - cơ chất.

Trung tâm hoạt động có cấu hình không gian rất tương ứng với cấu trúc của cơ chất và thường được hình thành trong quá trình enzym tiếp xúc với cơ chất.

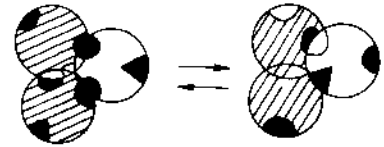
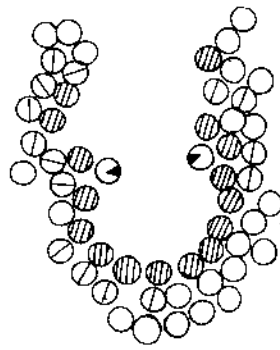
Theo Emil - Fischer (1890) thì trung tâm hoạt động của enzym vốn có cấu trúc không gian tương ứng với cấu trúc của phân tử cơ chất cũng giống như tương ứng giữa ổ khóa và chìa khóa (h.1.4a).

Quan niệm này đã nêu được một hình ảnh khá rõ ràng về sự tương ứng hình thể giữa enzym và cơ chất đã được thừa nhận trong một thời gian dài. Tuy nhiên hiện nay đã có nhiều dẫn liệu thực nghiệm chứng minh cấu trúc không gian của enzym cũng như protein không cứng mà mềm dẻo, linh động. Theo quan niệm hiện nay, khi enzym tương tác với cơ chất các nhóm chức ở phần trung tâm hoạt động của phân tử enzym thay đổi vị trí không gian tạo thành hình thể khớp với hình thể của cơ chất, vì vậy gọi là sự "khớp cảm ứng" (h.1.4b).

Giữa cơ chất và trung tâm hoạt động tạo thành nhiều tương tác yếu, do đó có thể dễ dàng bị cắt đứt trong quá trình phản ứng để giải phóng enzym và các sản phẩm phản ứng.

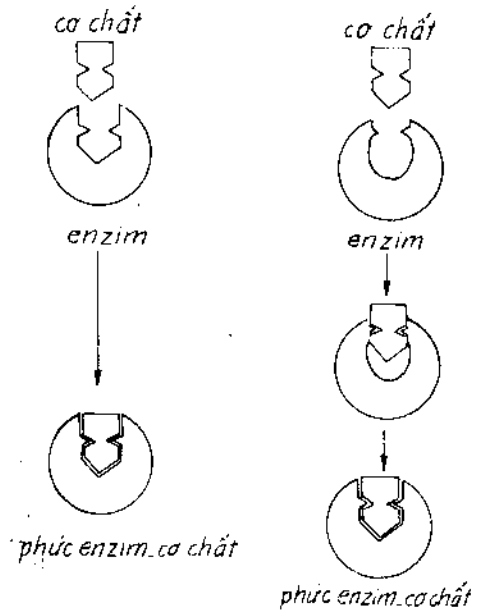
Một số enzym có trung tâm hoạt động tồn tại dưới dạng chưa được hoạt hóa gọi là zimogen hoặc proenzim.

Ví dụ, pepxinogen, tripxinogen, kimotripxinogen, protrombin, ... có thể được hoạt hóa bằng cơ chế tự xúc tác hoặc nhờ các proteaza khác, như tripxinogen có thể được hoạt hóa nhờ tripxin hoặc nhờ enterokinaza của ruột non. Cơ chế hoạt hóa dựa trên sự phá vỡ một số liên kết peptit trong phân tử zimogen, kết quả là loại bỏ đi một vài đoạn peptit có tác dụng kìm hãm trung tâm hoạt động của enzym, đôi khi sự hoạt hóa kèm theo cả sự sắp xếp lại các nhóm trong nội tại phân tử enzym dẫn tới sự hình thành trung tâm hoạt động ở trạng thái hoạt hóa.

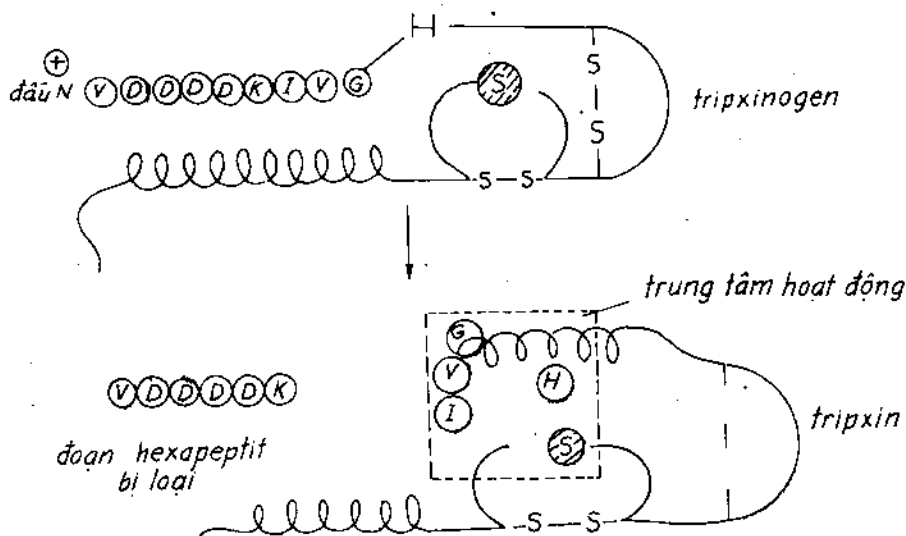


Hình 1.3. Sơ đồ trung tâm hoạt động của enzym (theo Karpejxki) :

○ - các gốc axitamin ; ● - nhóm xúc tác ;
 ⊗ - nhóm tiếp xúc ; ⊕ - nhóm cố định



Hình 1.4. Mô hình Fischer (a) và mô hình Koshland (b)



Hình 1.5. Sơ đồ minh họa quá trình hoạt hóa tripxinogen : S ở trong vòng có sọc là gốc xerin trong trung tâm hoạt động. Mũi tên chỉ liên kết peptit bị cắt đứt trong quá trình hoạt hóa, liên kết giữa Lys-6 và Ile-7. đoạn hexapeptit ở đầu N bị loại khỏi phân tử. Các axit amin được viết theo ký hiệu một chữ

Enzim allosteric (enzim dị lập thể, enzim điều hòa) trong phân tử của chúng ngoài trung tâm hoạt động còn có một số vị trí khác có thể tương tác với các chất khác gọi là "trung tâm allosteric" (trung tâm dị lập thể, trung tâm điều hòa) các chất kết hợp vào các trung tâm này gọi là "các chất điều hòa allosteric" (chất điều hòa dị lập thể). Khi các chất này kết hợp với enzim làm thay đổi cấu trúc không gian của phân tử enzim, của trung tâm hoạt động, do đó làm thay đổi hoạt độ xúc tác của enzim. Nếu làm tăng hoạt độ đó gọi là chất điều hòa dương, nếu làm giảm hoạt độ gọi là chất điều hòa âm. Đáng chú ý là các chất điều hòa này kết hợp với enzim nhưng không bị chuyển hóa dưới tác dụng enzim mà nó kết hợp.

Hầu hết các enzim allosteric là các protein có cấu trúc bậc bốn, trong phân tử thường có hai hay một số trung tâm hoạt động có thể kết hợp với hai hay một số phân tử cơ chất. Trường hợp cơ chất có thể thực hiện chức năng của chất điều hòa thì có điều hòa homotropic (đồng hướng). Khi chất điều hòa có cấu trúc khác cơ chất thì có điều hòa heterotropic (dị hướng).

Thông thường các enzim allosteric được điều hòa theo kiểu hỗn hợp, vừa là homotropic và heterotropic.

1.2. TÍNH CHẤT CỦA ENZIM

1.2.1. Cường lực xúc tác

Enzim là chất xúc tác sinh học, nó có đầy đủ các tính chất của một chất xúc tác. Tuy nhiên enzim có cường lực xúc tác mạnh hơn nhiều so với xúc tác thông thường. Ví dụ :

- 1 mol Fe^{3+} xúc tác phân ly được 10^{-6} mol H_2O_2 /phút. Một phân tử catalaza có một nguyên tử Fe xúc tác phân ly $5 \cdot 10^6$ mol H_2O_2 /phút ;

- 1 g pepxin trong 2 giờ thủy phân 5 kg protein trứng luộc ở nhiệt độ bình thường ;

- 1 phân tử β - amilaza sau 1 giây, có thể phân giải 4 000 liên kết glucosit trong phân tử tinh bột.

1.2.2. Tính đặc hiệu của enzym

Tính đặc hiệu cao của enzym là một trong những khác biệt chủ yếu giữa enzym với các chất xúc tác khác. Mỗi enzym chỉ có khả năng xúc tác cho sự chuyển hóa một hay một số chất nhất định theo một kiểu phản ứng nhất định. Sự tác dụng có tính lựa chọn cao này gọi là tính đặc hiệu hoặc tính chuyên môn hóa của enzym.

1.2.2.1. Đặc hiệu kiểu phản ứng

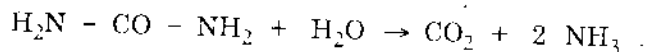
Đặc hiệu này thể hiện ở chỗ mỗi enzym chỉ có thể xúc tác cho một trong các kiểu phản ứng chuyển hóa một chất nhất định, ví dụ, phản ứng oxy hóa khử, chuyển vị, thủy phân, v.v.

1.2.2.2. Đặc hiệu cơ chất

Cơ chất là chất có khả năng kết hợp vào trung tâm hoạt động của enzym và bị chuyển hóa dưới tác dụng của enzym. Mức độ đặc hiệu của các enzym không giống nhau, người ta thường phân biệt thành các mức sau.

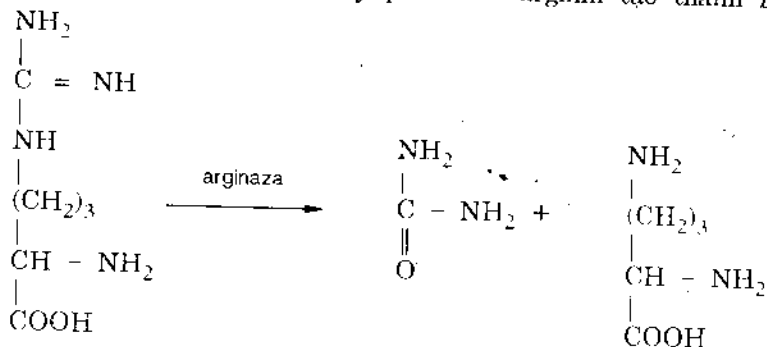
a) Đặc hiệu tuyệt đối

Enzym chỉ tác dụng trên một cơ chất nhất định và hầu như không có tác dụng với chất nào khác. Ví dụ, ureaza hầu như chỉ tác dụng với ure, thủy phân nó thành khí cacbonic và amoniac :



Tuy nhiên, sau này người ta tìm thấy rằng ureaza cũng tác dụng được với các chất khác có cấu trúc gần giống ure (hydroxyure) nhưng với vận tốc bé hơn 120 lần.

Các enzym khác nhau arginaza, glucosydatase cũng thuộc loại có tính đặc hiệu tuyệt đối, vì arginaza chỉ xúc tác thủy phân L - arginin tạo thành L - ornitin và ure :



L - arginin

ure

L - ornitin

mà không tác dụng lên este metylic của arginin.

Những enzym có tính đặc hiệu tuyệt đối được dùng để định lượng chính xác cơ chất của nó.

b) Đặc hiệu tương đối

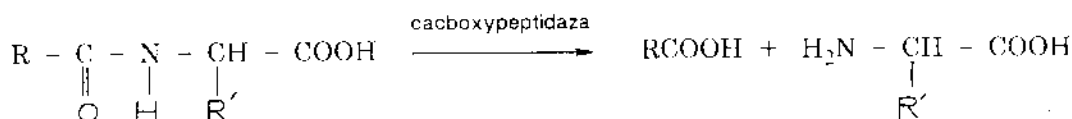
Enzim có khả năng tác dụng lên một kiểu liên kết hóa học nhất định trong phân tử cơ chất mà không phụ thuộc vào cấu tạo của các phần tham gia tạo thành mối liên kết đó.

Ví dụ, lipaza có khả năng thủy phân được tất cả các mối liên kết este. Aminopeptidaza có thể xúc tác thủy phân nhiều peptit.

c) Đặc hiệu nhóm

Enzim có khả năng tác dụng lên một kiểu liên kết hóa học nhất định với điều kiện một trong hai phần tham gia tạo thành liên kết phải có cấu tạo xác định.

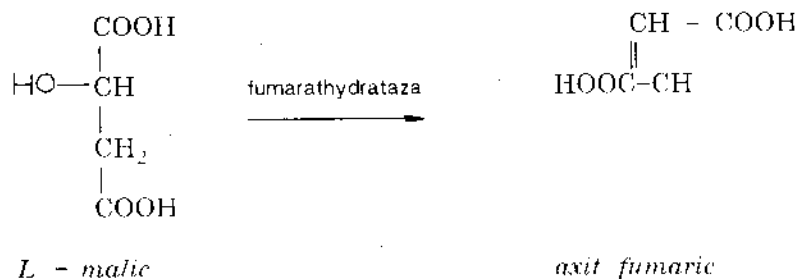
Ví dụ, cacboxypeptidaza có khả năng phân cắt liên kết peptit gần nhóm cacboxyl tự do :



d) Đặc hiệu quang học (đặc hiệu lập thể)

Enzim chỉ tác dụng với một trong hai dạng đồng phân quang học của các chất.

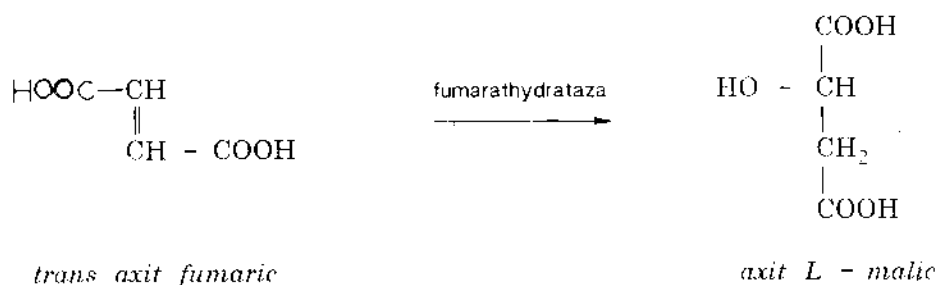
Ví dụ, phản ứng khử nước của axit malic để tạo thành axit fumaric dưới tác dụng của fumarathhydrataza chỉ xảy ra đối với axit *L* - malic mà không tác dụng lên axit *D* - malic



Theo thuyết đa ái lực của Berman và Fruton (1941) trong cơ chế đặc hiệu quang học, cơ chất phải kết hợp với enzym ít nhất ở ba điểm. Điều đó cho phép giải thích rõ vì sao enzym chỉ tác dụng lên một dạng đồng phân quang học mà không tác dụng lên các dạng khác.

Enzim cũng thể hiện tính đặc hiệu lên một dạng đồng phân hình học *cis* hoặc *trans*.

Ví dụ, fumarathhydrataza chỉ tác dụng lên dạng *trans* của axit fumaric mà không tác dụng lên dạng *cis*



Trong tự nhiên cũng có các enzim xúc tác cho các phản ứng chuyển hóa tương hỗ giữa các cặp đồng phân không gian tương ứng.

Ví dụ, lactatracemaza của vi khuẩn xúc tác cho phản ứng chuyển hóa lẫn nhau giữa axit D - và L - lactic, aldol - epimeraza xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa α - D - glucoza thành β - D - glucoza. Maleinat *cis-trans* izomeraza của vi khuẩn xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa giữa axit malic (dạng *cis*) và axit fumaric (dạng *trans*), v.v. Các enzim này có vai trò quan trọng khi sản xuất các chất dinh dưỡng bằng phương pháp hóa học, vì chúng có thể chuyển các chất từ dạng cơ thể không thể sử dụng được thành dạng có thể hấp thụ.

Enzim còn có khả năng phân biệt được hai gốc đối xứng trong phân tử giống nhau hoàn toàn về mặt hóa học.

Ví dụ, hai nhóm CH_2OH trong phân tử glixerin, glixerophosphatkinaza xúc tác cho phản ứng chuyển vị gốc phosphat từ ATP đến C_3 của glixerin (chứ không phải C_1).

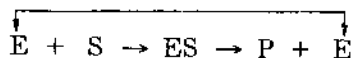
1.3. CƠ CHẾ TÁC DỤNG CỦA ENZIM

Theo quan điểm hiện nay trong phản ứng có xúc tác enzim, nhờ sự tạo thành phức hợp trung gian enzim - cơ chất mà cơ chất được hoạt hóa, bởi lẽ khi cơ chất kết hợp vào enzim do kết quả của sự cực hóa, sự chuyển dịch của các electron và sự biến dạng của các liên kết tham gia trực tiếp vào phản ứng dẫn tới làm thay đổi động năng cũng như thế năng, kết quả làm cho phân tử cơ chất trở nên hoạt động hơn, nhờ đó tham gia phản ứng dễ dàng.

Năng lượng hoạt hóa khi có xúc tác enzim không những nhỏ hơn rất nhiều so với trường hợp không có xúc tác mà cũng nhỏ hơn so với cả trường hợp có chất xúc tác thông thường.

Ví dụ, trong phản ứng phân hủy H_2O_2 thành H_2O và O_2 nếu không có chất xúc tác thì năng lượng hoạt hóa là 18 kcal/mol, nếu có chất xúc tác là keo platin thì năng lượng hoạt hóa là 11,7 kcal/mol, còn nếu có enzim catalaza xúc tác thì năng lượng hoạt hóa chỉ còn là 5,5 kcal/mol.

Qua nhiều dẫn liệu thực nghiệm cho thấy rằng quá trình tạo thành phức enzim - cơ chất (ES) và biến đổi phức này thành sản phẩm, giải phóng enzim tự do thường trải qua ba giai đoạn như ở sơ đồ dưới đây :



- Giai đoạn thứ nhất : enzim kết hợp với cơ chất bằng liên kết yếu tạo thành phức enzim - cơ chất (ES) không bền, phản xứng này xảy ra rất nhanh và đòi hỏi năng lượng hoạt hóa thấp ;

- Giai đoạn thứ hai : xảy ra sự biến đổi cơ chất dẫn tới sự kéo căng và phá vỡ các liên kết đồng hóa trị tham gia phản ứng ;

- Giai đoạn thứ ba : tạo thành sản phẩm, còn enzim được giải phóng ra dưới dạng tự do.

Các loại liên kết chủ yếu được tạo thành giữa E và S trong phức ES là : tương tác tĩnh điện, liên kết hydro, tương tác Van der Waals. Mỗi loại liên kết đòi hỏi những điều kiện khác nhau và chịu ảnh hưởng khác nhau khi có nước.

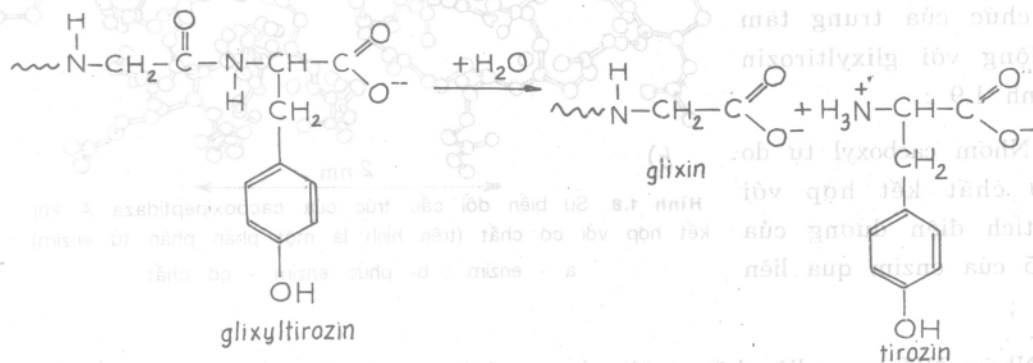
Có thể lấy phản ứng thủy phân cơ chất A - B, dưới tác dụng của enzym làm ví dụ :



Khi hợp chất AB kết hợp với enzym thì liên kết A - B bị kéo căng, kèm theo sự chuyển dịch electron dẫn đến làm đứt liên kết A - B và gắn nhóm HO^- của nước vào phần A còn H^+ của nước vào phần B của phân tử.

Sau khi hoàn thành phản ứng, enzym được giải phóng dưới dạng tự do (h. 1.7).

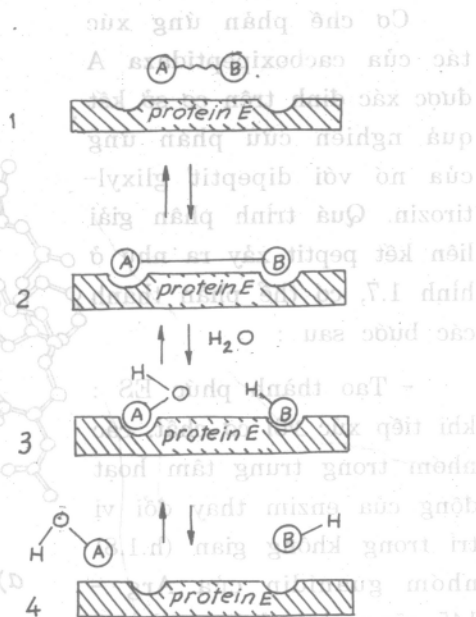
Ví dụ, cơ chế tác dụng của cacboxipeptidaza A. Cacboxipeptidaza A thuộc nhóm peptidhydrolaza, xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptit ở đầu C của các peptit và protein, phản ứng xảy ra với vận tốc lớn nếu axitamin đầu C là axitamin thơm. Enzim này cũng thủy phân liên kết este.



Hình 1.7. Phản ứng thủy phân liên kết peptit do cacboxipeptidaza A xúc tác

Cacboxipeptidaza A có khối lượng phân tử 34,3 kDa chứa 1 mol Zn/1 mol E. Zn tham gia trong hoạt động xúc tác của enzym. Khi thay thế Zn bằng các kim loại hóa trị hai khác làm thay đổi hoạt độ và có thể cả tính đặc hiệu của enzym. Trong phân tử enzym, Zn ở gần bề mặt phân tử, tương tác với các gốc His-69, His-196 và Glu-72.

Các gốc axit amin có vai trò xúc tác trong trung tâm hoạt động của enzym là : Arg-145, Tyr-248 và Glu-270.



Hình 1.8. Sự tạo thành biến đổi hợp chất trung gian enzym - cơ chất

Cơ chế phản ứng xúc tác của cacboxipeptidaza A được xác định trên cơ sở kết quả nghiên cứu phản ứng của nó với dipeptit glixyl-tirozin. Quá trình phân giải liên kết peptit xảy ra như ở hình 1.7, có thể phân thành các bước sau :

- Tạo thành phức ES : khi tiếp xúc với cơ chất, các nhóm trong trung tâm hoạt động của enzym thay đổi vị trí trong không gian (h.1.8) nhóm guanidin của Arg - 145 cũng như nhóm cacboxyl của Glu - 270 dịch chuyển 2Å, nhóm hydroxyl của Tyr - 248 dịch chuyển nhiều nhất (12Å) từ chỗ gắn trên bề mặt phân tử chuyển vào trong đến vùng gần với liên kết peptit của cơ chất.

Tương tác giữa các nhóm chức của trung tâm hoạt động với glixyltirozin như hình 1.9 :

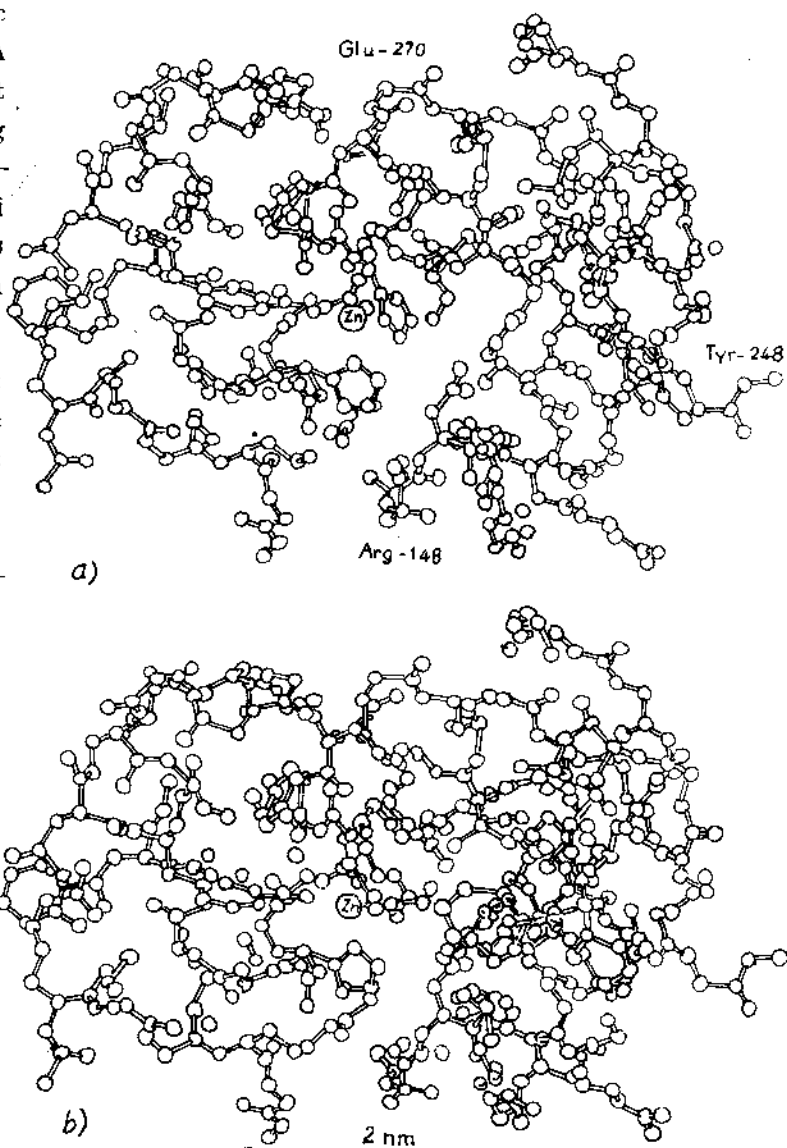
- Nhóm cacboxyl tự do của cơ chất kết hợp với nhóm tích điện dương của Arg-145 của enzym qua liên kết ion ;

- Nhóm-NH trong liên kết peptit của cơ chất tạo thành liên kết hydro với nhóm - OH của Tyr - 248 ;

- Oxy trong nhóm - CO - của liên kết peptit tương tác với Zn, còn cacbon trong nhóm - CO - này tương tác với nhóm cacboxyl của Glu - 270 qua phân tử nước ;

- Cắt đứt liên kết peptit giải phóng sản phẩm.

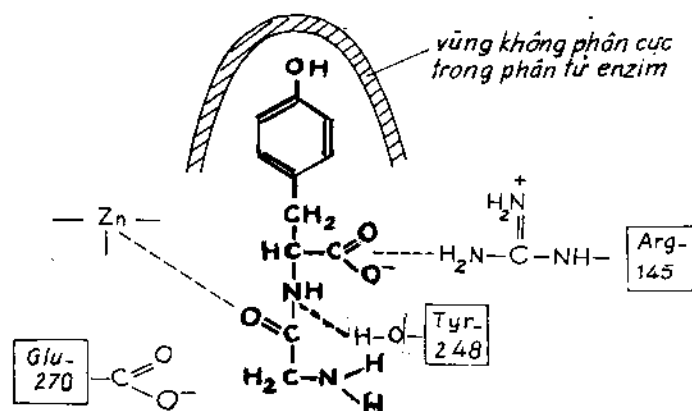
Nguyên tử Zn phân cực liên kết - CO, tăng tính ái điện tử của nguyên tử cacbon, do đó làm tăng tương tác của nó với nước hoặc với nhóm ái nhân của phân tử protein enzym.



Hình 1.8. Sự biến đổi cấu trúc của cacboxipeptidaza A khi kết hợp với cơ chất (trên hình là một phần phân tử enzym) :

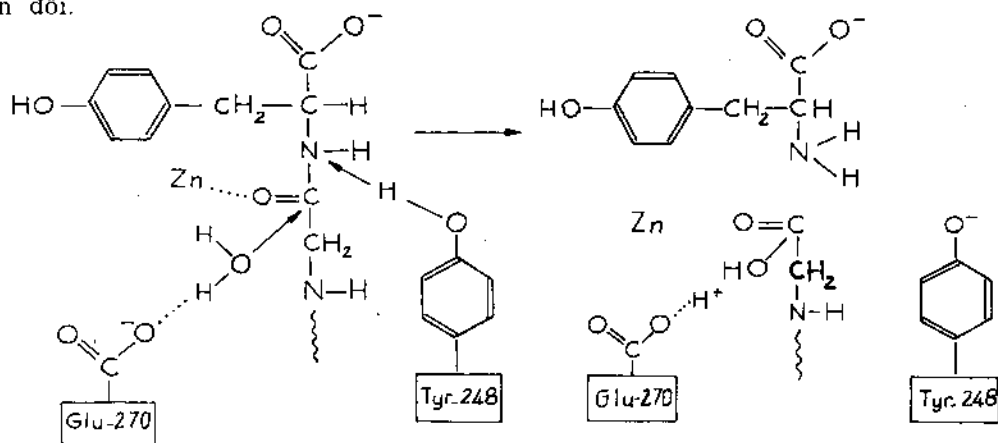
a - enzym ; b- phức enzym - cơ chất

Gốc Glu - 270 hoạt hóa phân tử nước, nhóm OH⁻ được tạo thành, tấn công trực tiếp vào nguyên tử cacbon của - CO - (trong liên kết peptit của cơ chất), liên kết peptit bị kéo căng ra và bị đứt. Gốc Tyr-248 nhường hydro cho nhóm -NH trong liên kết peptit của cơ chất, giải phóng sản phẩm đầu tiên là tirozin của cơ chất và axyl-enzim (h.1.10).



Hình 1.9. Sơ đồ biểu diễn tương tác giữa glyxyltyrosin với các nhóm chức trong trung tâm hoạt động của cacboxipeptidaza A (c⁺ chất viết nét đậm)

Liên kết peptit bị cắt đứt, trạng thái ion hóa của các nhóm axit và nhóm bazơ bị biến đổi.



Hình 1.10. Cơ chế phản ứng xúc tác của cacboxipeptidaza

1.4. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN VẬN TỐC PHẢN ỨNG ENZIM

Phản ứng do enzym xúc tác phụ thuộc vào nhiều yếu tố như : nồng độ enzym, nồng độ cơ chất, nhiệt độ, pH của môi trường, các ion kim loại, các chất vô cơ và hữu cơ khác v.v. Điều đáng lưu ý là các yếu tố hóa lý không chỉ ảnh hưởng đến phản ứng enzym theo kiểu giống như các phản ứng hóa học thông thường mà còn ảnh hưởng đến vận tốc phản ứng thông qua tác dụng của chúng đối với cấu trúc phân tử enzym.

Sau đây sẽ xét cụ thể hơn về một số yếu tố.

1.4.1. Nồng độ enzym

Nói chung trong điều kiện thừa cơ chất, vận tốc phản ứng phụ thuộc tuyến tính vào nồng độ enzym :

$$v = k [E] ,$$

v - vận tốc phản ứng ;

$[E]$ - nồng độ enzym.

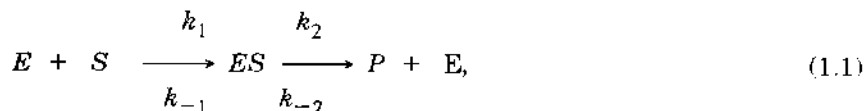
Cũng có trường hợp khi nồng độ enzym quá lớn, vận tốc phản ứng tăng chậm.

1.4.2. Nồng độ cơ chất, mô hình Michaelis - Menten

Năm 1913, Leonon Michaelis và Maud Menten đã đưa ra mô hình để giải thích tính chất động học của phản ứng enzym và đã lập được phương trình biểu diễn mối quan hệ giữa vận tốc phản ứng với nồng độ cơ chất của enzym.

Đặc điểm quan trọng nhất của mô hình này là : mở đầu phản ứng cần thiết phải tạo thành phức trung gian enzym - cơ chất (ES). Sau đó phức ES chuyển hóa tiếp tạo thành sản phẩm cuối cùng của phản ứng và enzym tự do, enzym lại kết hợp với phân tử cơ chất khác bắt đầu vòng xúc tác mới.

Trường hợp đơn giản nhất, phản ứng chỉ có một cơ chất S , enzym (E) xúc tác cho sự chuyển hóa nó chỉ tạo thành một sản phẩm P , phản ứng xảy ra như sau :



k_1 , k_{-1} , k_2 và k_{-2} - hằng số vận tốc của các phản ứng tương ứng.

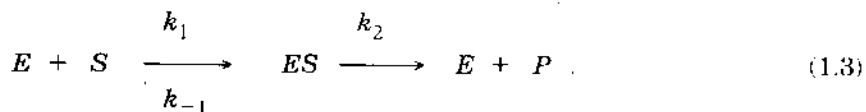
Qua sơ đồ phản ứng (1.1) ta thấy, phản ứng chuyển hóa phức $ES \rightarrow P + E$ là phản ứng quyết định quá trình xúc tác chuyển hóa $S \rightarrow P$ của enzym. Vận tốc của phản ứng này sẽ tỷ lệ với nồng độ ES , nồng độ ES càng cao thì vận tốc phản ứng càng lớn :

$$v = k_2 [ES] . \quad (1.2)$$

Khi nghiên cứu động học phản ứng enzym, người ta thường xác định vận tốc ban đầu của phản ứng khi :

- nồng độ cơ chất $[S]$ rất lớn so với nồng độ tổng của enzym $[E_0]$;
- lượng sản phẩm $[P]$ tạo thành chưa đáng kể, nên $k_{-2} [E] [P] \sim 0$.

Trong những điều kiện ấy, phản ứng sẽ diễn ra :



Vì $[S]$ rất lớn so với $[E_0]$, lượng S nằm ở trong phức có thể coi là không đáng kể, nên nồng độ cơ chất ban đầu cũng được xem là nồng độ cơ chất lúc phản ứng đạt đến trạng thái dừng. $[ES]$ khi đó gần như không đổi và vận tốc ban đầu $v_i = k_2[ES]$ cũng gần như không đổi, từ đây ta có :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2) [ES] = 0. \quad (1.4)$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (1.5)$$

Vì S chưa được chuyển hóa thành P nên :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_p \quad (1.6)$$

K_p - hằng số phân ly của phức enzym-cơ chất.

Và k_2 là không đáng kể so với k_1 nên : $K_m \sim K_p$. Người ta nói K_m là hằng số phân ly biểu kiến của phức enzym-cơ chất. K_m cho biết một cách gần đúng ái lực của enzym đối với cơ chất : K_m càng nhỏ thì ái lực của enzym đối với cơ chất càng lớn và ngược lại.

Khi ở trạng thái dừng, ta có :

$$[E_0] = [E] + [ES] = [ES] \cdot \frac{K_m}{[S]} + [ES] \quad (1.7)$$

$$[E_0] = [ES] \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad (1.8)$$

Khi $[S] \gg [E_0]$ tất cả enzym đều tham gia tạo phức ES và vận tốc phản ứng v_i sẽ đạt cực đại ($v_{\max}$) :

$$v_{\max} = k_2 [E_0] \quad (1.9)$$

Có thể viết :

$$\frac{v_i}{v_{\max}} = \frac{[ES]}{[E]_0} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (1.10)$$

$$v_i = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.11)$$

Đây là phương trình Michaelis-Menten đã được Holden và Briggs hoàn thiện. K_m được gọi là hằng số Michaelis. Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng nồng độ cơ chất đến vận tốc phản ứng (theo phương trình (1.11)), trong đó v là hàm số của $[S]$ có dạng của nhánh hypebol vuông góc (h.1.11).

Từ phương trình (1.11) ta có thể xét đến ba trường hợp :

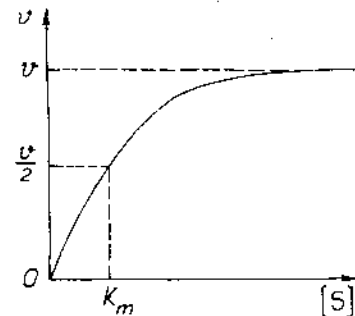
- Nếu $[S] \ll K_m$

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{K_m},$$

như vậy, ở nồng độ cơ chất thấp, v phụ thuộc tuyến tính vào $[S]$;

- Nếu $[S] \gg K_m$, $v = v_{\max}$ vận tốc phản ứng đạt vận tốc cực đại, không phụ thuộc $[S]$. Như vậy $[S]$ đã đủ lớn đến mức nào đó, nếu tiếp tục tăng $[S]$, v cũng sẽ không tăng theo;

- Nếu $[S] = K_m$, $v = \frac{v_{\max}}{2}$ vận tốc phản ứng



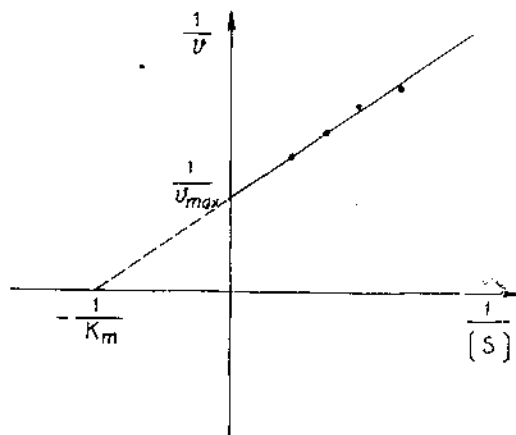
Hình 1.11. Dạng chung của đường biểu diễn sự phụ thuộc vận tốc phản

bằng một nửa vận tốc cực đại. Như vậy, K_m bằng nồng độ cơ chất mà ở đó vận tốc ban đầu của phản ứng bằng một nửa vận tốc cực đại. Do đó trị số của K_m cũng được biểu diễn bằng đơn vị đo nồng độ cơ chất : mol, hoặc gam hoặc phần trăm (nếu chưa biết khối lượng phân tử của cơ chất). Đối với phần lớn các enzym đã được nghiên cứu trị số K_m vào khoảng $10^{-1} - 10^{-6}$. Như đã nêu trên, hằng số

Michaelis $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, đối với phần lớn phản ứng enzym $k_{-1} \gg k_2$ do đó đối

với enzym này có thể căn cứ vào K_m để đánh giá ái lực giữa enzym và cơ chất. K_m lớn, ái lực giữa E và S thấp và ngược lại. Ở những điều kiện hoàn toàn xác định về nhiệt độ, pH, ... K_m của một enzym đối với một cơ chất là hằng số. Nếu enzym có thể tác dụng với các cơ chất khác nhau thì K_m có thể khác nhau tùy cơ chất. Do đó xác định trị số K_m có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu enzym.

Để xác định K_m cũng như v có thể dựa vào đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa vận tốc phản ứng với nồng độ cơ chất : thay đổi nồng độ cơ chất, với mỗi nồng độ cơ chất ta xác định được vận tốc ban đầu của phản ứng. Theo cách biểu diễn ở phương trình (1.11), cần tiến hành khá nhiều thí nghiệm mới vẽ được chính xác. Vì vậy người ta cải biến phương trình này thành dạng có đường biểu diễn thẳng. Cách đơn giản nhất là lấy số nghịch đảo của cả hai vế trong phương trình (1.11) (Lineweaver và Burk 1934), do đó sẽ có :



Hình 1.12. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa $\frac{1}{v}$ và $\frac{1}{[S]}$; độ dốc của đường biểu diễn là $\frac{K_m}{v}$.

Đường biểu diễn cắt trục tung ở điểm $\frac{1}{v_{max}}$, cắt trục hoành ở điểm $-\frac{1}{K_m}$.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (1.12)$$

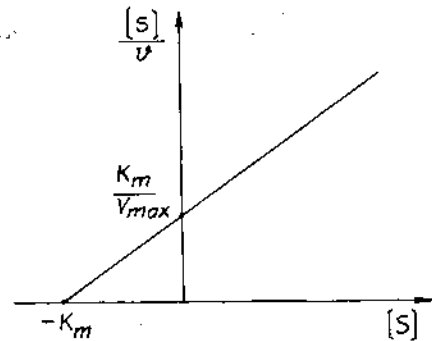
Phương trình (1.12) có dạng $Y = ax + b$, đường biểu diễn của nó là thẳng, cắt trục tung ở điểm $\frac{1}{v_{max}}$ và cắt trục hoành ở điểm $-\frac{1}{K_m}$ (h.1.12). Theo cách này, chỉ cần tiến hành thí nghiệm với ba, bốn nồng độ cơ chất đã có thể vẽ được đồ thị khá chính xác và xác định được các trị số K_m , v . Điều quan trọng, cần nhấn mạnh là khi nghiên cứu động học phản ứng enzym, để xác định vận tốc ban đầu của phản ứng cần sử dụng chế phẩm enzym tinh khiết. Ngoài ra, nồng độ cơ chất cũng không nên quá lớn vì nó có thể làm giảm vận tốc phản ứng enzym.

Cũng có thể xác định hằng số K_m và v_{max} theo phương trình (1.13) :

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{max}} [S] + \frac{K_m}{v_{max}} \quad (1.13)$$

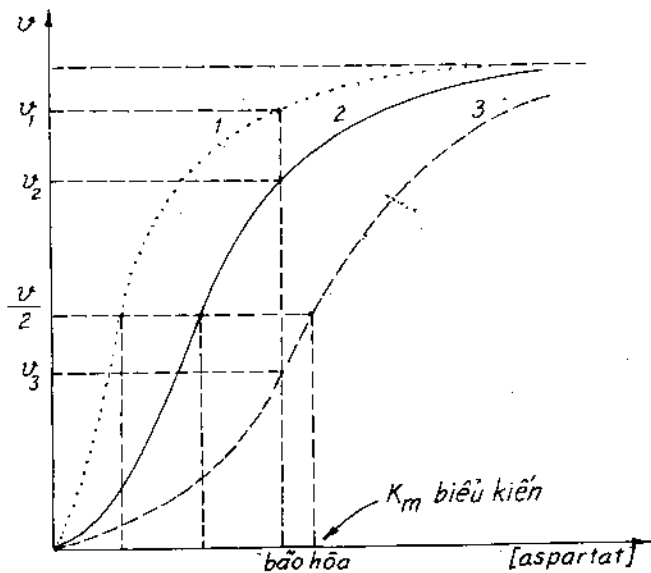
Đồ thị của phương trình (1.13) có dạng như hình 1.13.

Tính chất phổ biến của phương trình Michaelis-Menten thể hiện ở chỗ nó không chỉ đúng trong trường hợp đơn giản như đã nêu trong phương trình phản ứng (1.1) (chỉ một cơ chất tạo thành một sản phẩm), mà nó cũng đúng trong những trường hợp phức tạp hơn. Tuy nhiên trong những trường hợp này vận tốc xúc tác cực đại khi enzyme bão hòa cơ chất, ký hiệu là K_{cat} , còn phụ thuộc vào một số hằng số vận tốc khác chứ không phải chỉ k_2 như trên.



Hình 1.13

Đối với các enzyme allosteric, đường biểu diễn sự phụ thuộc của v vào $[S]$ không có dạng hypebol như ở hình 1.11. Trong nhiều trường hợp, đường biểu diễn quan hệ giữa vận tốc ban đầu của phản ứng với nồng độ cơ chất có dạng gần như chữ "S" (dạng sigmoid) (h.1.14). Điều đó có nghĩa là khi phân tử cơ chất đầu tiên kết hợp vào một trung tâm hoạt động của enzyme đã làm tăng nhanh việc kết hợp các phân tử cơ chất tiếp theo vào các trung tâm hoạt động khác trong phân tử enzyme. Điều này cũng giống như khi một phân tử O_2 kết hợp vào Hb đã làm tăng nhanh sự tương tác của các phân tử O_2 tiếp theo. Đường biểu diễn có dạng chữ "S" cũng cho thấy chỉ cần nồng độ cơ chất tăng lên rất nhỏ cũng có thể làm tăng vận tốc xúc tác nhiều lần lớn hơn so với các enzyme tuân theo phương trình Michaelis-Menten.

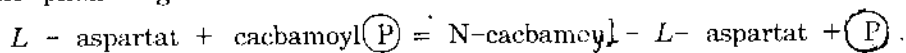


Hình 1.14. Ảnh hưởng nồng độ aspartat đến vận tốc phản ứng của aspartat carbamoyltransferaza :

- 1- có chất điều hòa dương ATP ; 2- không có chất điều hòa ; 3- có chất điều hòa âm XTP

Các chất điều hòa có thể ảnh hưởng khác nhau đến các thông số động học của các enzyme allosteric. Chúng có thể làm tăng hay giảm riêng rẽ một trong hai giá trị K_m hoặc v . Một số enzyme allosteric khi kết hợp với chất điều hòa, thay đổi giá trị K_m biểu kiến đối với cơ chất (gọi là enzyme K) mà không thay đổi giá trị vận tốc cực đại ; ngược lại, một số enzyme khác chỉ thay đổi giá trị v (gọi là enzyme M) mà không thay đổi K_m .

Ví dụ, aspartate carbamoyltransferaza là enzyme allosteric kiểu K, enzyme này xúc tác cho phản ứng sau :



ATP là chất điều hòa dương và XTP là chất điều hòa âm của aspartate carbamoyl-

transpheraza (ACT - aza). Trên hình 1.14 biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ aspartat đến vận tốc phản ứng của ACT-aza khi không có và có các chất điều hòa khác nhau.

Qua hình này ta thấy giá trị K_m biểu kiến khi cho XTP là lớn hơn cả, ở một nồng độ cơ chất thấp hơn nồng độ bão hòa, vận tốc phản ứng khi có XTP là thấp nhất.

1.4.3. Ảnh hưởng của các chất kìm hãm

Hoạt độ của enzym có thể bị thay đổi dưới tác dụng của một số chất có bản chất hóa học khác nhau. Các chất làm giảm hoạt độ enzym nhưng không bị chuyển hóa bởi enzym được gọi là các chất kìm hãm hoặc các chất ức chế (inhibitor), thường ký hiệu là I . Các chất này có thể là những ion, các phân tử vô cơ, hữu cơ kể cả các protein. Các chất ức chế tham gia trong điều hòa, kiểm tra các quá trình trao đổi chất trong hệ thống sống.

Các chất gây biến tính protein là những chất kìm hãm không đặc hiệu của enzym. Nhiều chất khác không làm biến tính protein enzym nhưng vẫn làm giảm hoạt độ xúc tác của nó theo cơ chế khác.

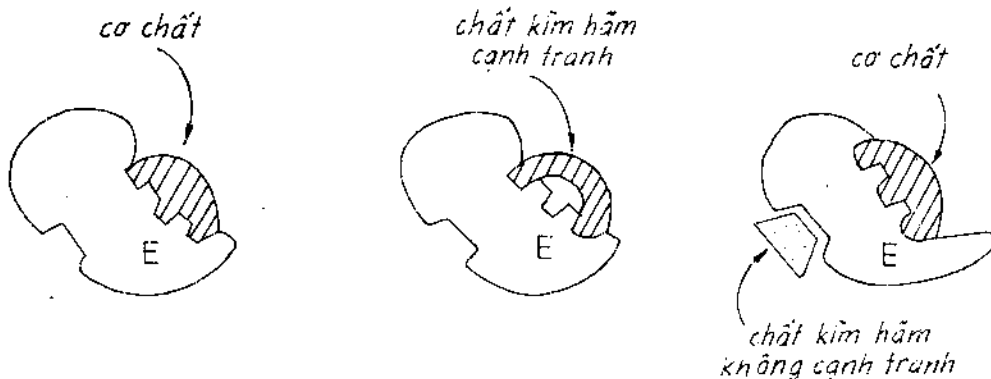
Các chất này có thể kìm hãm thuận nghịch hoặc không thuận nghịch enzym. Nếu là kiểu kìm hãm thuận nghịch, phản ứng kết hợp giữa enzym và chất kìm hãm (I) nhanh chóng đạt đến cân bằng :



Trong trường hợp kìm hãm không thuận nghịch, k_{-1} rất bé có thể xem như bằng không, I kết hợp với E bằng liên kết đồng hóa trị hoặc kết hợp rất chặt chẽ đến mức khó lòng tách khỏi E , sự phân ly phức EI là rất chậm.

1.4.3.1. Các chất kìm hãm cạnh tranh

Các chất kìm hãm cạnh tranh là những chất kìm hãm thuận nghịch enzym, có cấu trúc tương tự với cấu trúc của cơ chất, do đó có khả năng kết hợp vào trung tâm hoạt động của E chiếm chỗ kết hợp của cơ chất (h.1.15). Sự kết hợp của I và



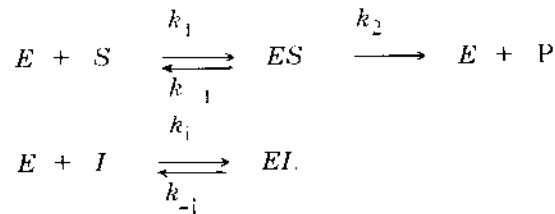
Hình 1.15. Mô hình minh họa sự sai khác giữa chất kìm hãm cạnh tranh và chất kìm hãm không cạnh tranh trong cách kết hợp với enzym

S vào trung tâm hoạt động của enzym có tính chất loại trừ lẫn nhau. Như vậy, I cạnh tranh làm giảm vận tốc phản ứng xúc tác là do làm giảm số lượng phân tử enzym có khả năng kết hợp với cơ chất.

Ví dụ, axit malonic ($\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$) là chất kìm hãm cạnh tranh của enzym suxinatdehydrogenaza, có cấu tạo rất giống với axit suxinic ($\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$) là cơ chất của enzym.

Hoặc như trong phản ứng lên men glycerin, thì axetaldehit là chất kìm hãm cạnh tranh của enzym etanoldehydrogenaza. Axetaldehit ($\text{CH}_3\text{CH} = \text{O}$) có cấu tạo khá giống của aldehytglixerinic ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}=\text{O}$) là cơ chất của enzym.

Ở kiểu kìm hãm này, I và S đều cạnh tranh với nhau để kết hợp với enzym. Vận tốc phản ứng sẽ phụ thuộc vào tương quan nồng độ của S và I cũng như tương quan ái lực giữa S và I đối với enzym. Thường thì nếu nồng độ $[S]$ rất lớn so với $[I]$ có thể loại trừ hoàn toàn tác dụng kìm hãm của I . Trường hợp đơn giản nhất, khi có chất kìm hãm cạnh tranh, các phản ứng xảy ra như sau :



Ở phương trình (1.5) ta đã có :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \rightarrow [E] = [ES] \frac{K_m}{[S]}$$

và (1.13) ta cũng có thể viết :

$$\frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_i}{k_{-i}} = K_i \rightarrow [EI] = [ES] \frac{K_m}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i}$$

K_i là hằng số phân ly của phức EI . K_i cũng được gọi là hằng số kìm hãm. K_i càng lớn ái lực giữa E và I càng thấp và ngược lại.

Khi có kìm hãm cạnh tranh, một số enzym sẽ bị liên kết với I , do đó :

$$\begin{aligned} [E_0] &= [E] + [ES] + [EI] = [ES] \left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{K_m}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i} \right) \\ &= [ES] \left[1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \right] \end{aligned}$$

$$\frac{v_i}{v_{\max}} = \frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

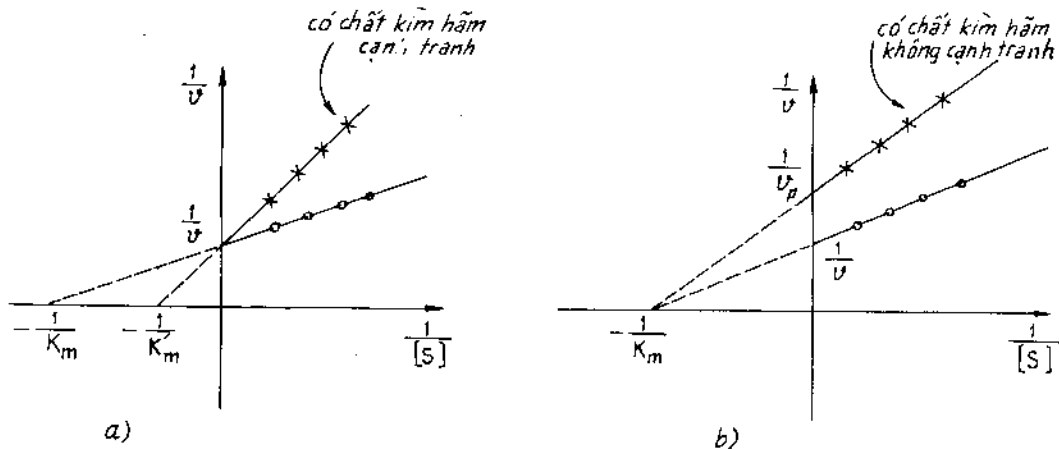
$$v_i = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (1.15)$$

hoặc

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (1.16)$$

Vậy là khi có kim hãm cạnh tranh, hằng số Michaelis K_m được tăng lên do chất kim hãm cạnh tranh với cơ chất nên làm giảm ái lực của enzym với cơ chất :

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \quad (1.17)$$



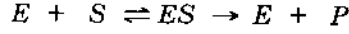
Hình 1.16. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa $\frac{1}{v}$ vào $\frac{1}{[S]}$ khi có (-x-x-x-) và không có (-o-o-o-) chất kim hãm : a- kim hãm cạnh tranh ; b- kim hãm không cạnh tranh (chi tiết xem trong bài)

Phương trình (1.15) cũng cho thấy khi $[S] \gg [I]$ thì $\frac{K_m}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i} \longrightarrow 0$. Điều này xác nhận đặc điểm của kiểu kim hãm cạnh tranh là có thể bị loại trừ ở điều kiện nồng độ cơ chất đủ lớn.

Các chất kim hãm cạnh tranh được sử dụng trong nghiên cứu cơ chế phản ứng enzym. Như đã nói, chất kim hãm cạnh tranh cũng kết hợp vào trung tâm hoạt động của enzym nhưng khác với cơ chất ở chỗ bản thân chất kim hãm không bị chuyển hóa dưới tác dụng của enzym.

1.4.3.2. Các chất kim hãm không cạnh tranh

Chất kim hãm này kết hợp với enzym ở chỗ khác với trung tâm hoạt động (h.1.15) làm thay đổi cấu trúc không gian của phân tử enzym theo hướng không có lợi cho hoạt độ xúc tác của nó do đó làm giảm vận tốc phản ứng xúc tác. Sau khi kết hợp với chất kim hãm không cạnh tranh, enzym vẫn có thể kết hợp với cơ chất tạo thành phức EIS có thể viết phương trình phản ứng (1.1) khi có chất kim hãm không cạnh tranh như sau :



Chất kìm hãm kiểu này kết hợp với enzym một cách độc lập với cơ chất và không làm thay đổi K_m . Việc kết hợp S vào E cũng không làm thay đổi K_i .

Ứng với các phương trình phản ứng trên ta có :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \rightarrow [S] = [ES] \frac{K_m}{[S]}$$

$$\frac{[E][I]}{[EI]} = K_i \rightarrow [EI] = [ES] \frac{K_m}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i}$$

$$\frac{[ES][I]}{[EIS]} = K_i \rightarrow [EIS] = [ES] \frac{[I]}{K_i}$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \rightarrow [EIS] = [EI] \frac{[S]}{K_m}$$

$$\begin{aligned} \text{và} \quad [E_0] &= [E] + [ES] + [EI] + [EIS] = \\ &= [ES] \left(\frac{K_m}{S} + 1 + \frac{K_m}{S} \cdot \frac{[I]}{K_i} + \frac{[I]}{K_i} \right) = \\ &= [ES] \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \end{aligned}$$

$$\frac{v_i}{v_{\max}} = \frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (1.18)$$

hoặc

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (1.19)$$

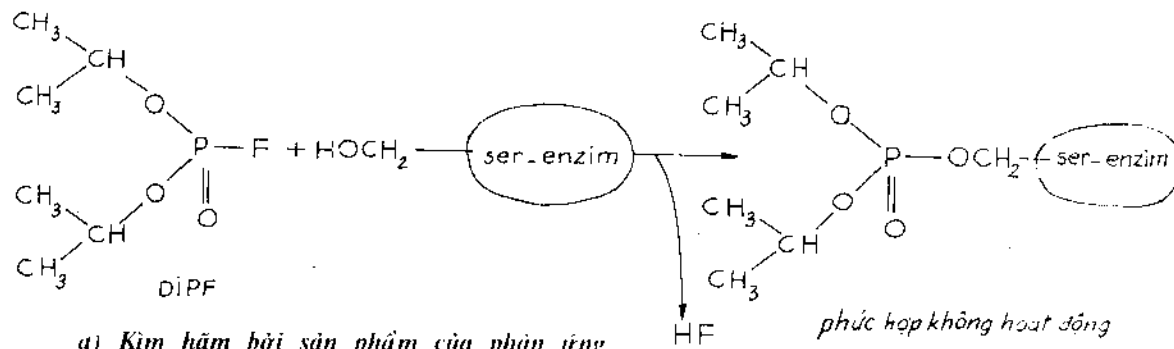
Đường biểu diễn của phương trình (1.19) như đã trình bày trên hình 1.16b, cắt trục tung ở điểm $\frac{1}{v_{\max}}$ và cắt trục hoành vẫn ở điểm $-\frac{1}{K_m}$.

Khi có chất kìm hãm không cạnh tranh vận tốc cực đại bị giảm $\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ lần, trong khi đó K_m không thay đổi có nghĩa là không làm thay đổi ái lực giữa E và S , song vận tốc phản ứng bị giảm tương ứng. Dưới tác dụng của chất kìm hãm không cạnh tranh, mức độ kìm hãm không phụ thuộc vào tương quan nồng độ giữa S và I , nồng độ cơ chất lớn cũng không loại trừ được tác dụng kìm hãm.

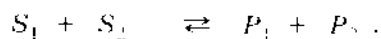
Ngoài ra cũng có trường hợp chất kìm hãm chỉ kết hợp với ES mà không kết

hợp với E tự do, trong trường hợp này cả v và K_m đều bị giảm $(1 + \frac{I}{K_i})$ lần do đó độ dốc của đường biểu diễn không đổi.

Các chất kim hãm nhất là các chất kim hãm có tính đặc hiệu cao có ý nghĩa lớn trong nghiên cứu khoa học cũng như trong thực tế, ví dụ, diisopropylphosphoridat (DIPF hoặc DEP), iodoacetamid, P - cloromercuribenzoat, v.v. thường được dùng để phát hiện các nhóm chức trong trung tâm hoạt động của enzym, DIPF chỉ phản ứng với gốc ser có vai trò xúc tác trong trung tâm hoạt động của enzym axetalcolinesteraza, tripsin, kimotripsin, tạo thành phức không hoạt động :



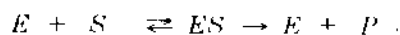
Trong một số trường hợp các sản phẩm của phản ứng có thể tác dụng như những chất kim hãm không cạnh tranh của enzym. Giả sử trong phản ứng :



Do tính thuận nghịch của phản ứng, enzym có ái lực với P_1 và P_2 cũng như là với S_1 và S_2 . $P_1 + P_2$ trong trường hợp này có thể coi là những chất kim hãm của enzym so với S_1 và S_2 .

b) Kim hãm do thừa cơ chất

Có trường hợp do thừa cơ chất cũng kim hãm phản ứng enzym. Chẳng hạn, có phản ứng enzym bình thường :



Giả sử có một phân tử cơ chất thứ hai dính được vào một chỗ nào đó trên phức ES , ngoài miễn xúc tác, rồi làm cho nó trở nên không hoạt động. Phân tử này có thể coi như là chất kim hãm :



và ta cũng thiết lập được :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \rightarrow [E] = [ES] \frac{K_m}{[S]}$$

$$\frac{[ES][S]}{[ESS]} = K_i \rightarrow [ESS] = [ES] \frac{[S]}{K_i}$$

và

$$[E_0] = [E] + [ES] + [ESS] = ES \left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i} \right)$$

$$\frac{v_i}{v_{\max}} = \frac{[ES]}{[E_0]}$$

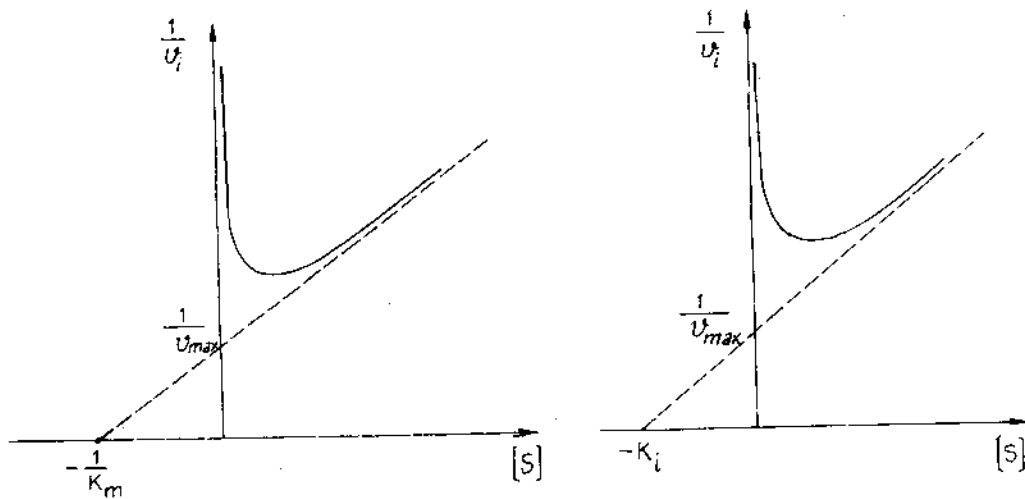
$$v_i = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i}} \quad (1.20)$$

hoặc

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i} \right) \quad (1.21)$$

Đường biểu diễn của $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ sẽ là một hypebol mà tiệm cận xiên của nó có hệ số góc là $\frac{K_m}{v_{\max}}$ sẽ cắt trục hoành ở điểm $-\frac{1}{K_m}$.

Còn đường biểu diễn của $\frac{1}{v_i} / [S]$ là một hypebol mà tiệm cận xiên của nó có độ nghiêng $\frac{1}{v_{\max} K_i}$ sẽ cắt trục hoành ở điểm $-K_i$. Trong cả hai trường hợp v_i qua một cực đại khi $[S] = \sqrt{K_m \cdot K_i}$.



Hình 1.17. Đường biểu diễn $\frac{1}{v_i}$

1.4.4. Các chất hoạt hóa

Chất hoạt hóa làm tăng hoạt độ xúc tác của enzym, thường có bản chất hóa học khác nhau, có thể là các anion, các ion kim loại nằm ở ô thứ 11 đến ô thứ 55 của Bảng tuần hoàn Mendeleev hoặc các chất hữu cơ có cấu tạo phức tạp hơn làm nhiệm vụ chuyển nhóm chuyển hydro hoặc những chất có khả năng phá vỡ một

số liên kết trong phân tử tiền enzym hoặc các chất có tác dụng phục hồi những nhóm chức trong trung tâm hoạt động của enzym.

Ví dụ, tác dụng của anion clo, brom, iot đến hoạt độ của α - amilaza động vật, tác dụng của một số ion kim loại như Mn^{2+} , Zn^{2+} , ... đối với hoạt độ của các proteaza. ... Tuy nhiên tác dụng hoạt hóa chỉ giới hạn ở những nồng độ xác định, vượt quá giới hạn này có thể làm giảm hoạt độ enzym.

Glutation dạng khử (Glu - Cys - Gli) có tác dụng khử liên kết disulfua thành nhóm sulfidril tự do (-SH) nên cũng có tác dụng hoạt hóa nhiều enzym. Các chất đã nêu thường kết hợp trực tiếp với phân tử enzym, làm thay đổi cấu tạo không gian của nó theo hướng có lợi cho hoạt độ xúc tác của enzym. Một số chất khác có thể tác dụng theo cách gián tiếp, ví dụ, loại trừ các yếu tố kìm hãm khỏi môi trường phản ứng.

1.4.5. Nhiệt độ

Vận tốc phản ứng do enzym xúc tác chỉ tăng theo nhiệt độ trong một giới hạn xác định mà ở đó phân tử enzym vẫn còn bền chưa bị biến tính. Đại lượng đặc trưng cho ảnh hưởng nhiệt độ đến vận tốc phản ứng hóa học cũng như phản ứng enzym là hệ số nhiệt Q_{10} .

Hệ số Q_{10} càng lớn, phản ứng càng khó xảy ra ở nhiệt độ bình thường, hệ số Q_{10} của phản ứng enzym là từ 1 đến 2 (của phản ứng hóa học là từ 2 đến 3). Từ hệ số Q_{10} có thể tính được năng lượng hoạt hóa của phản ứng enzym, đánh giá quá trình xúc tác.

Đường biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ đến vận tốc phản ứng của nhiều enzym có dạng như ở hình 1.17. Nhiệt độ ứng với hoạt độ enzym cao nhất gọi là nhiệt độ tối ưu của enzym (t_{opt}). Đa số enzym có t_{opt} vào khoảng 40 - 50°C. Tuy nhiên t_{opt} của một enzym không cố định mà có thể thay đổi tùy cơ chất, pH môi trường, thời gian phản ứng, v.v. Nhiệt độ mà enzym bị mất hoàn toàn hoạt tính xúc tác gọi là nhiệt độ tối hạn thường vào khoảng trên 70°C. Ở nhiệt độ tối hạn enzym bị biến tính, ít khi có khả năng hồi phục lại được hoạt độ. Ngược lại, ở nhiệt độ dưới 0°C, hoạt độ enzym tuy bị giảm nhưng lại có thể tăng lên khi đưa về nhiệt độ bình thường.

Độ bền của mỗi enzym thường tăng lên khi có cơ chất, coenzim, Ca^{2+} , v.v.

Phản ứng vô hoạt của một enzym bởi nhiệt thường có thứ bậc 1

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -kt,$$

k - hằng số vận tốc của phản ứng ;

E - nồng độ của enzym hoạt động ở thời gian t ;

E_0 - nồng độ ban đầu của enzym hoạt động.

Trong thực tế, người ta thường đo hoạt độ riêng còn lại A của enzym sau những khoảng thời gian gia nhiệt khác nhau :

$$A = a [E]$$

$$dA = a d[E]$$

$$\frac{dA}{dt} = -k_a [E] = -kA$$

$$\ln \frac{A}{A_0} = 2,303 \log \frac{A}{A_0} = -kt$$

$$\log A = -\frac{kt}{2,303} + \log A_0$$

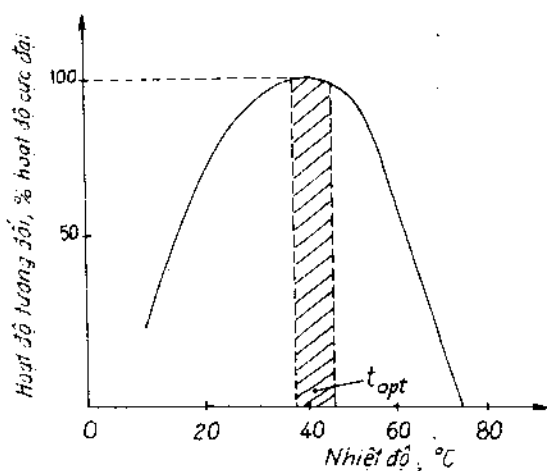
a – hệ số tỷ lệ.

Về đồ thị của $\log A$ theo t sẽ thu được một đường thẳng có hệ số góc là $-\frac{k}{2,303}$.

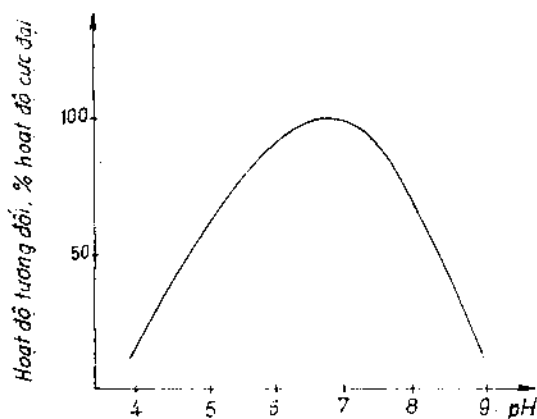
Trong công nghệ sản xuất và bảo quản các sản phẩm thực phẩm, yếu tố nhiệt độ thường được sử dụng để điều hòa các phản ứng enzym theo chiều mong muốn.

1.4.6. pH môi trường

pH môi trường ảnh hưởng rõ rệt đến phản ứng enzym vì nó ảnh hưởng đến mức độ ion hóa cơ chất, enzym và ảnh hưởng đến độ bền protein enzym. Đa số enzym bền trong giới hạn pH giữa 5 và 9, độ bền của enzym có thể tăng lên khi có cơ chất, coenzim, Ca^{2+} , v.v.



Hình 1.18. Đường biểu diễn minh họa ảnh hưởng nhiệt độ đến vận tốc phản ứng enzym.



Hình 1.19. Đường biểu diễn minh họa ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của enzym.

Đường biểu diễn ảnh hưởng pH đến vận tốc phản ứng của nhiều enzym có dạng như ở hình 1.19. pH tối ưu (pH_{opt}) cho hoạt động của nhiều enzym vào khoảng 7. Tuy nhiên cũng có một số enzym có pH_{opt} rất thấp (pepxin, proteinaza axit của vi sinh vật, v.v.) hoặc khá cao (subtilizin, $\text{pH}_{\text{opt}} > 10$). pH_{opt} của một enzym cũng không cố định mà phụ thuộc nhiều vào nhiều yếu tố khác như cơ chất, tính chất dung dịch đệm, nhiệt độ, v.v.

Ngoài các yếu tố chính đã nêu trên, hoạt độ của enzym còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác như : ánh sáng (đặc biệt là tia tử ngoại), sóng siêu âm, tia bức xạ, v.v. Trong hệ thống sông, hoạt độ enzym còn phụ thuộc vào giai đoạn sinh trưởng phát triển ...

1.5. CÁCH GỌI TÊN VÀ PHÂN LOẠI ENZIM

Trước kia thường gọi tên enzym một cách tùy tiện, tùy theo tác giả. Các tên đã quen dùng như pepxin, tripxin, kimotripxin, ... hiện nay vẫn được dùng gọi là tên thông dụng. Tên gọi đầy đủ, chính xác theo qui ước quốc tế - tên gọi hệ thống của enzym được gọi theo tên cơ chất đặc hiệu của nó cùng với tên của kiểu phản ứng mà nó xúc tác, công thêm đuôi "aza".

Tên gọi hệ thống thường gồm hai phần :

- Phần thứ nhất là tên gọi cơ chất (nếu phản ứng lưỡng phân thì phần thứ nhất là tên gọi của hai cơ chất viết cách nhau bằng hai chấm) ;

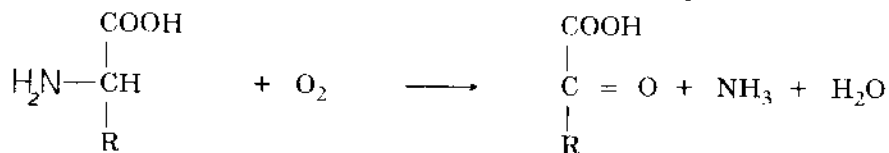
- Phần thứ hai : chỉ một cách khái quát bản chất của phản ứng xúc tác.

Ví dụ : . tên thông dụng: ureaza

. tên gọi hệ thống : cacbamat-amidohydrolaza

Nếu phản ứng bao gồm hai sự chuyển hóa tương hỗ thì người ta còn thêm vào sau phần thứ hai của tên gọi một phần tương ứng trong dấu ngoặc.

Ví dụ, enzym xúc tác oxy hóa axitamin trong phản ứng :



L - axitamin

có tên gọi : *L - axitamin* : oxydoreductaza (déamin),

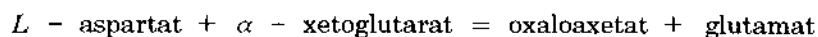
Dựa vào tính đặc hiệu phản ứng của enzym, từ năm 1960 Hội hóa sinh quốc tế (IUB) đã thống nhất phân loại enzym thành sáu lớp, đánh số từ 1 đến 6. Các số thứ tự này là cố định cho mỗi lớp :

- 1- Oxydoreductaza : các enzym xúc tác cho phản ứng oxy hóa - khử ;
- 2- Transpheraza : các enzym xúc tác cho phản ứng chuyển vị ;
- 3- Hydrolaza : các enzym xúc tác cho phản ứng thủy phân ;
- 4- Liaza : các enzym xúc tác cho phản ứng phân cắt không cần nước, loại nước tạo thành liên kết đôi hoặc kết hợp phân tử nước vào liên kết đôi ;
- 5- Izomeraza : các enzym xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa ;
- 6- Ligaza : các enzym xúc tác cho phản ứng tổng hợp có sử dụng liên kết giàu năng lượng của ATP, v.v.

Mỗi lớp lại chia thành nhiều tổ. Mỗi tổ lại chia thành nhiều nhóm. Do đó, trong bảng phân loại, đứng trước tên enzym thường có bốn con số : số thứ nhất chỉ lớp,

số thứ hai chỉ tổ, số thứ ba chỉ nhóm và số thứ tư chỉ enzym.

Ví dụ, 2.6.1.1. *L*-aspartat : α - xetoglutarat aminotransferaza xúc tác cho phản ứng chuyển vị (lớp 2) nhóm chứa nitơ (tổ 6), nhóm chứa nitơ ấy là nhóm amin (nhóm 1) ; phản ứng do enzym này xúc tác :



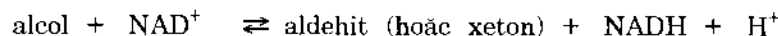
-(nhóm amin được chuyển từ *L*-aspartat đến α -xetoglutarat)

1.5.1. Oxydoreductaza

Các enzym thuộc lớp này là những enzym hai thành phần có các coenzim như NAD^+ , NADP^+ , FMN, FAD, hem, v.v. Ngoài kiểu phân loại chính thức theo quy ước quốc tế như đã ghi, thông thường người ta phân biệt các enzym của lớp này thành các nhóm sau : dehydrogenaza, reductaza, oxygenaza và peroxydaza (tác dụng trên H_2O_2 như là chất nhận).

a) *Dehydrogenaza* : xúc tác cho phản ứng tách H trực tiếp từ cơ chất và chuyển đến NAD^+ , NADP^+ , FMN, FAD. Các dehydrogenaza xúc tác cho giai đoạn đầu của chuỗi hô hấp, vận chuyển H nghĩa là vận chuyển đồng thời proton và electron. Các dehydrogenaza cũng xúc tác cho phản ứng theo chiều ngược lại : chuyển H từ $[\text{NADH} + \text{H}^+]$ hoặc $[\text{NADPH} + \text{H}^+]$, FMNH_2 , FADH_2 đến cơ chất, khử cơ chất. Các phản ứng khử này có vai trò quan trọng trong các quá trình sinh tổng hợp. Một số ví dụ về các dehydrogenaza :

- Alcoholdehydrogenaza (1.1.1.1), enzym chứa Zn, có coenzim là NAD^+ , xúc tác cho phản ứng :



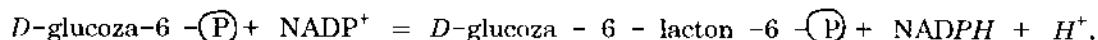
Phản ứng này có vai trò quan trọng trong quá trình lên men rượu. Người ta đã tách được enzym này ở dạng tinh thể, có thể sử dụng để định lượng etanol (khi hàm lượng etanol rất thấp).

Các coenzim NAD^+ và NADP^+ mặc dầu khá giống nhau về cấu tạo (h.1.17) nhưng trong một số trường hợp không thể thay thế cho nhau được. Ví dụ, lactat-dehydrogenaza (1.1.1.24) (LDH) xúc tác cho phản ứng khử axit lactic tạo thành axit piruvic :

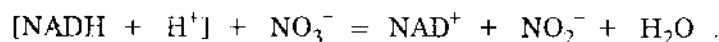


LDH có coenzim là NAD^+ , nếu thay bằng NADP^+ hoạt độ của nó có thể bị giảm 100 lần.

Ngược lại, glucoza - 6-P- dehydrogenaza (1.1.1.49) lại sử dụng coenzim NADP^+ mà không thể thay thế bằng NAD^+ . Enzym này xúc tác cho phản ứng sau :

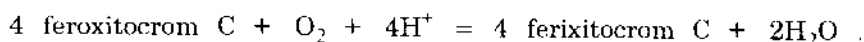


Reductaza xúc tác cho quá trình chuyển proton và electron, hoặc chỉ chuyển riêng electron giữa các chất mang. Ví dụ nitratoreductaza ($\text{NADH} + \text{H}^+$: nitrat-oxydoreductaza 1.6.6.1) xúc tác cho phản ứng chuyển hóa NO_3^- thành NO_2^- :



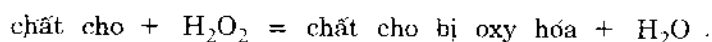
Phản ứng này có ý nghĩa lớn trong nông nghiệp. Enzim này có coenzim là FAD, cần kim loại cho hoạt động xúc tác của nó. Ví dụ, nitratreductaza của mốc, thực vật cần molipden.

b) Oxydaza : xúc tác cho quá trình chuyển electron đến oxy do đó hoạt hóa oxy làm cho nó có khả năng kết hợp với proton có trong môi trường. Các enzim này tác dụng trực tiếp với oxy. Ví dụ, xitocrom C oxydaza (1.9.3.1) xúc tác cho phản ứng cuối cùng của chuỗi hô hấp :

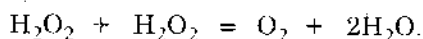


c) Oxygenaza : xúc tác cho phản ứng kết hợp trực tiếp oxy vào phân tử của hợp chất hữu cơ (thường là các chất có vòng thơm). Có thể phân biệt hai loại : oxygenaza và hydroxylaza. Oxygenaza xúc tác cho phản ứng kết hợp toàn bộ phân tử oxy (O_2) còn hydroxylaza chỉ kết hợp một nửa phân tử oxy (thường ở dạng OH) vào hợp chất hữu cơ. Ví dụ điển hình là phenylalanyl - 4 - monooxygenaza (1.14.16.1), cũng gọi là phenylalanyl- 4 - hydroxylaza xúc tác cho phản ứng chuyển phenylalanin thành tirozin.

d) Peroxydaza : các peroxydaza điển hình và catalaza có coenzim là hem, xúc tác cho phản ứng oxy hóa các chất hữu cơ khi có H_2O_2 . Do đó chúng có vai trò loại tác dụng độc của H_2O_2 được tạo thành trong cơ thể. Peroxydaza xúc tác cho phản ứng :



Catalaza xúc tác cho phản ứng :

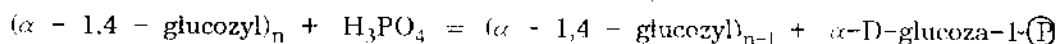


1.5.2. Transpheraza

Các enzim lớp này cũng là những protein phức tạp, bản chất hóa học các coenzim của chúng rất khác nhau, tùy theo bản chất của nhóm được chuyển vị.

a) Aryltranspheraza : xúc tác cho phản ứng chuyển nhóm axyl thường là thông qua coenzim A, tạo thành phức CoAS-axyl. Nhóm cacboxyl của axit kết hợp với nhóm - SH của coenim A tạo thành liên kết tioeste là liên kết giàu năng lượng. Các enzim này có vai trò quan trọng trong nhiều quá trình trao đổi chất quan trọng như quá trình trao đổi lipid, quá trình phân giải glucoza, v.v.

b) Glucozyltranspheraza : xúc tác cho phản ứng vận chuyển gốc đường (hexoza, pentoza) từ chất cho đến các chất nhận khác nhau, thường gặp nhất là nhóm OH của một gốc sacarit khác hoặc của gốc phosphat, nguyên tử N của nhân - vòng. Ví dụ, α -glucanphosphorylaza (2.4.1.1), cũng thường gọi là phosphorylaza, xúc tác cho phản ứng phân giải tinh bột, glicogen, trong đó axit phosphoric đóng vai trò như H_2O (phosphoryl phân).



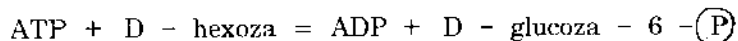
Các glucozyltranspheraza cũng xúc tác cho quá trình tạo cấu trúc phân nhánh trong phân tử glicogen, amilopectin.

Trong mô có enzim tồn tại ở hai dạng : phosphorylaza a và b, cả hai dạng đều có cấu trúc bậc bốn. Nhiều bằng chứng thực nghiệm xác thực rằng monome của

phosphorylaza a (FA) và b (FB) là hoàn toàn giống nhau về khối lượng phân tử, số trung tâm hoạt động, trung tâm điều hòa, ..., nhưng khác nhau ở chỗ các monome của FA được phosphoryl hóa. Hai dạng FA và FB có thể chuyển hóa lẫn nhau. FB hầu như không có hoạt động xúc tác sau khi phosphoryl hóa chuyển thành FA. Khi dephosphoryl hóa FA tạo thành FB.

c) *Aminotranspheraza* : các enzym này có coenzim là piridoxal phosphat xúc tác cho phản ứng chuyển vị nhóm amin. Các phản ứng quan trọng như chuyển thuận nghịch nhóm amin của axit amin đến α -xetoaxit.

d) *Phosphotranspheraza* : hầu hết các phản ứng vận chuyển gốc phosphoryl thường có ATP tham gia với tính chất là chất cho, gốc phosphat được chuyển từ ATP (hoặc có thể là NTP khác) đến nhóm hydroxyl của alcol hoặc sacarit. Các enzym này thường có tiếp vĩ "kinaza". Ví dụ, hexokinaza xúc tác cho phản ứng sau :



Các kinaza cũng xúc tác cho phản ứng chuyển gốc phosphat theo kiểu A :

$\text{ATP} + \text{AMP} = \text{ADP} + \text{ADP}$ (enzim xúc tác cho phản ứng này gọi là adenilat kinaza).

1.5.3. Hydrolaza

Hydrolaza xúc tác cho phản ứng thủy phân, vì vậy các phản ứng do enzym lớp này xúc tác luôn có nước tham gia. Đặc điểm khác là các hydrolaza thường không cần coenzim cho hoạt động xúc tác của chúng. Một số hydrolaza phổ biến có vai trò quan trọng đối với quá trình tiêu hóa như amilaza, peptidhydrolaza, lipaza, v.v.

a) *Peptidhydrolaza* : xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptit, tạo thành peptit phân tử thấp, axitamin. Các peptidhydrolaza khác nhau có tính đặc hiệu khác nhau đối với liên kết peptit. Một số enzym phân giải các liên kết peptit ở giữa chuỗi mạch polypeptit, gọi là endopeptidhydrolaza, hay proteinaza (pepxin, tripxin, kimotripxin, v.v.), một số khác lại thủy phân các liên kết ở đầu mút của chuỗi mạch gọi là exopeptidhydrolaza hay peptidaza.

Theo cách phân chia của Hartley (1960) các proteinaza được chia thành bốn nhóm :

- Proteinaza - xerin : gốc xerin đóng vai trò xúc tác trong trung tâm hoạt động (tripxin, kimotripxin, elastaza, subtilizin tách từ *Bacillus*, các proteinaza xúc tác cho quá trình đông máu, acrozin, v.v.) ;
- Proteinaza - tiol : có nhóm SH trong trung tâm hoạt động trực tiếp tham gia phản ứng xúc tác (bromelîn, papain, fixin, v.v.) ;
- Proteinaza - kim loại : trung tâm hoạt động có chứa ion kim loại trực tiếp tham gia phản ứng xúc tác (proteinaza trung tính của *Bacillus*, collagenaza, v.v.) ;
- Proteinaza - axit : (cũng gọi là aspartic proteinaza) : nhóm γ - cacboxyl của aspartat trong trung tâm hoạt động tham gia trong phản ứng xúc tác (pepxin, renin, proteinaza axit của vi sinh vật) các enzym này có pH hoạt động thích hợp nhất ở vùng axit.

Proteinaza tham gia trong nhiều quá trình hoạt động sống quan trọng và được

sử dụng rộng rãi trong y học và nhiều ngành công nghiệp khác.

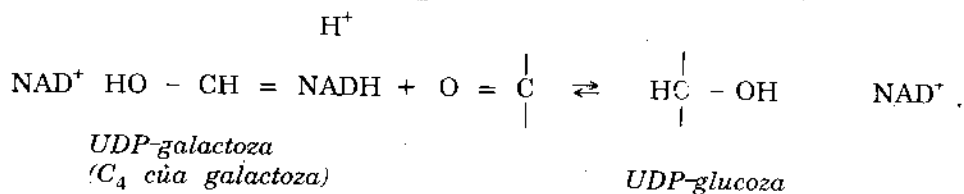
b) *Lipaza* (triacylglycerollipaza 3.1.1.3): xúc tác cho phản ứng thủy phân triacylglycerol (dầu thực vật, mỡ động vật) tạo thành các axit béo tự do và glycerol. *Lipaza* xúc tác phản ứng thủy phân lần lượt từng liên kết este trong phân tử chứ không phải cắt đứt cả ba liên kết este cùng một lúc.

1.5.4. Liaza

Piruvatdecaboxylaza (cacboxylaza-2-exo axit 4.1.1.1) xúc tác cho phản ứng loại CO_2 khỏi phân tử axit piruvic, tạo thành aldehyt tương ứng là axetaldehyt, phản ứng này có vai trò quan trọng trong quá trình lên men rượu. Enzim này có coenzim là tiaminpirophosphat. Fumarathydrolaza (*L* - malathydrolaza 4.2.1.2) xúc tác cho phản ứng tách thuận nghịch phân tử H_2O khỏi axit malic, tạo thành axit fumaric (có một nối đôi).

1.5.5. Izomeraza

UDP - glucoza-4- epimeraza (5.1.3.2) xúc tác cho phản ứng chuyển hóa tương hỗ phức tạp giữa galactosa và glucoza. Enzim có chứa NAD^+ , nghiên cứu cho thấy NAD^+ tham gia trực tiếp trong phản ứng xúc tác theo sơ đồ sau :



1.5.6. Ligaza

Piruvatcacboxylaza (6.4.1.1) : xúc tác cho phản ứng cacboxyl hóa axit piruvic tạo thành axit oxaloaxetic. Enzim này có chứa nhóm thêm là biotin, cần axetyl-CoA và Mg^{2+} cho phản ứng xúc tác. Biotin là chất mang CO_2 đã hoạt hóa và chuyển đến axit piruvic.

1.6. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ HOẠT ĐỘNG CỦA ENZIM

Trong enzym học, người ta không định lượng enzym một cách trực tiếp mà thường xác định gián tiếp thông qua xác định mức độ hoạt động (hoạt độ) của enzym. Bởi vì, khi có mặt enzym thì sự hoạt động của nó được biểu hiện ra ở chỗ nó làm thay đổi các tính chất vật lý, hóa lý cũng như tính chất hóa học của hỗn hợp phản ứng. Theo dõi những biến đổi đó có thể biết được chính xác mức độ hoạt động của enzym thông qua xác định lượng cơ chất bị mất đi hay lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng.

Về nguyên tắc, có thể chia ra ba nhóm phương pháp sau :

1- Đo lượng cơ chất bị mất đi hay lượng sản phẩm được tạo thành trong một thời gian nhất định ứng với một nồng độ enzym xác định ;

2- Đo thời gian cần thiết để thu được một lượng biến thiên nhất định của cơ chất hay sản phẩm ứng với một nồng độ enzym nhất định ;

3- Chọn nồng độ enzym như thế nào để trong một thời gian nhất định thu được sự biến thiên nhất định về cơ chất hay sản phẩm.

Ba nhóm phương pháp này được tóm tắt trong bảng sau :

Nhóm	Các thông số cố định	Các thông số thay đổi
1	Thời gian Nồng độ enzym	Biến thiên của S hay P
2	Lượng S mất đi (hay lượng P tạo thành) Nồng độ [E]	Thời gian
3	Thời gian Lượng S mất đi (hay P tạo thành)	Nồng độ E

Đơn vị hoạt độ

a) Đơn vị enzym quốc tế (UI) là lượng enzym có khả năng xúc tác làm chuyển hóa được một micromol cơ chất sau một phút ở điều kiện tiêu chuẩn

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol cơ chất} (10^{-6} \text{ mol})/\text{phút.}$$

b) Katal (Kat) là lượng enzym có khả năng xúc tác làm chuyển hóa được 1 mol cơ chất sau một giây ở điều kiện tiêu chuẩn.

$$1 \text{ Kat} = 1 \text{ mol cơ chất/giây}$$

$$1 \text{ UI} = \frac{1}{60} \cdot 10^{-6} \text{ Kat} = 16,67 \text{ nKat (nanokatal)}$$

c) Hoạt độ riêng của một chế phẩm enzym là số đơn vị UI (hoặc số đơn vị Katal) ứng với một mililit dung dịch (nếu là dịch) hoặc một miligam protein (nếu là bột khô) của chế phẩm.

Ví dụ :

- một dung dịch enzym chứa 10 UI (hoặc 166,7 Kat) trong 1 ml;
- hoặc một bột enzym chứa 10 UI (hoặc 166,7 nKat) trong 1 mg protein.

Nếu chế phẩm enzym đã tinh sạch, hoạt độ được biểu thị bằng số UI (hoặc Kat) trên 1 mg enzym.

Khi đã biết khối lượng phân tử của enzym thì có thể tính hoạt độ riêng phân tử.

d) Hoạt độ riêng phân tử : là số phân tử cơ chất được chuyển hóa bởi một phân tử enzym trong một đơn vị thời gian.

Khi xác định hoạt độ enzym cần chú ý một số điểm sau :

- Nồng độ cơ chất trong phản ứng phải ở trong một giới hạn thích hợp đủ thừa để bão hòa enzym nhưng không quá cao để đến mức kìm hãm enzym ;
- Với những enzym cần cơ chất hoạt hóa hoặc chất làm bền thì phải cho các

chất này vào enzym trước khi cho cơ chất vào hỗn hợp phản ứng ;

- Xác định hoạt độ cần tiến hành ở pH thích hợp và cố định. Nhưng cần chú ý là pH thích hợp có thể thay đổi khá nhiều tùy thuộc vào cơ chất và thành phần dung dịch đệm, lực ion của dung dịch đệm (thường trong phạm vi 0,01 - 0,1) ;

- Nhiệt độ dùng để xác định hoạt độ phải thấp hơn nhiệt độ tối ưu của enzym để đề phòng tác dụng kìm hãm enzym do nhiệt độ cao ;

- Thời gian xác định hoạt độ thường từ 5 đến 30 phút. Trong một số trường hợp có thể kéo dài 24 giờ nếu hoạt độ của enzym quá thấp. Trong trường hợp đó cần phải cho thêm vào dung dịch các chất diệt vi sinh vật và tránh dùng những dung dịch đệm thuận lợi cho sự phát triển của vi sinh vật.

1.7. PHƯƠNG PHÁP TÁCH VÀ LÀM SẠCH ENZIM

Gần đây ứng dụng các phương pháp mới (điện di, sắc ký trao đổi ion, lọc gel, v.v.) phối hợp với các biện pháp thường được dùng trước đây (biến tính chọn lọc, kết tủa phân đoạn, sắc ký hấp phụ) cho phép thu được phẩm vật của nhiều enzym với độ thuần khiết cao.

Mặc dù trong việc xây dựng phương pháp mới đã đạt được nhiều kết quả, tuy nhiên vấn đề tách làm thuần khiết enzym hiện nay vẫn còn là một công tác phức tạp, khó khăn. Nguyên nhân chủ yếu do một mặt enzym có trong tế bào với lượng rất ít, mặt khác nó luôn có đồng thời với các protein khác cũng có các tính chất lý hóa rất giống nhau, hơn nữa enzym lại rất không bền, dễ bị mất khả năng xúc tác do tác động của các yếu tố bên ngoài.

Trong cơ thể sinh vật, enzym có trong tế bào chất và các cấu tử (nhân, microsom, mitokondri, v.v.) của tế bào. Các phân tử enzym không có khả năng đi qua màng của tế bào và màng của các cấu tử (mitokondri) của tế bào. Do đó để có thể chiết rút các enzym nội bào, trước hết cần phải phá vỡ cấu trúc của các tế bào. Có thể phá vỡ cấu trúc của các tế bào bằng các biện pháp cơ học (nghiền với bột thủy tinh hoặc làm đông hóa bằng thiết bị đông hóa) bằng tác dụng của các dung môi hữu cơ (rượu butylic, axeton, glixerin, etylaxetat, v.v.), của sóng siêu âm, v.v. Sau khi đã phá vỡ cấu trúc của các tế bào, enzym được chiết bằng nước, bằng các dung dịch đệm thích hợp hoặc các dung dịch muối trung tính.

Trong dịch chiết, ngoài enzym còn chứa các protein tạp và nhiều chất khác, để loại bỏ chúng phải sử dụng phối hợp nhiều biện pháp khác nhau.

Để loại bỏ muối và các tạp chất có phân tử lượng thấp thường dùng các biện pháp thẩm tích đối với nước hay đối các dung dịch đệm loãng hoặc bằng cách lọc qua gel sephadex.

Để loại bỏ các protein tạp và các tạp chất có phân tử lượng cao khác, thường dùng kết hợp nhiều biện pháp khác nhau : phương pháp biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của nhiệt độ hoặc pH của môi trường, phương pháp kết tủa phân đoạn bằng muối trung tính hoặc các dung môi hữu cơ, các phương pháp sắc ký (sắc ký hấp

phụ, sắc ký trao đổi ion), điện di, phương pháp lọc gel.

Phương pháp biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của nhiệt độ hoặc pH của môi trường chỉ dùng đối với trường hợp của các enzym bền nhiệt hoặc bền axit. Dịch enzym được giữ ở 50 - 70°C hay ở pH = 5 hoặc nhỏ hơn trong thời gian xác định sau đó protein tạp đã bị biến tính được loại bỏ bằng cách lọc hoặc ly tâm.

Phương pháp kết tủa phân đoạn bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dựa trên cơ sở sự khác nhau về khả năng kết tủa của các protein (enzim) ở một nồng độ muối (tính theo phần trăm nồng độ bão hòa) xác định được dùng phổ biến để loại bỏ bước đầu protein tạp của các dịch enzym. Cũng có thể kết tủa phân đoạn bằng các dung môi hữu cơ. Phương pháp này chỉ dùng với những enzym ít bị biến tính bởi các dung môi hữu cơ được chọn dùng. Để giữ cho enzym khỏi bị mất khả năng hoạt động, quá trình kết tủa phải được thực hiện ở nhiệt độ thấp (-5°C).

Phương pháp hấp phụ chọn lọc - hấp phụ "trong thể tích" (thêm chất hấp phụ trực tiếp vào dịch enzym) hoặc trên cột (sắc ký hấp phụ) được dùng phổ biến trong việc tách và làm sạch enzym. Chất hấp phụ chủ yếu thường được dùng là hydroxyapatit cho hiệu quả phân tách đặc biệt cao. Hấp phụ chọn lọc enzym có thể thực hiện bằng một trong hai cách - chất hấp phụ protein tạp hoặc hấp phụ enzym. Quá trình hấp phụ thường được tiến hành ở 0°C. Enzim sau đó được chiết bằng các dung môi thích hợp.

Phương pháp sắc ký trao đổi ion dựa trên cơ sở của phản ứng trao đổi ion giữa protein được tan trong nước hoặc dung dịch đậm loãng và các tác nhân trao đổi ion. Tác nhân trao đổi ion có thể là nhựa trao đổi ion hoặc các dẫn xuất este của xelluloza (cacboxymetylxelluloza, diethylaminoetylxelluloza, triethylaminoetylxelluloza, v.v.). Phương pháp sắc ký trên diethylaminoetylxelluloza (DEAE - xelluloza) có ưu điểm là với dịch chiết thích hợp ngoài tạp chất protein còn có khả năng loại bỏ cả các tạp chất axit nucleic. Điều đó cho phép không cần dùng đến các biện pháp nhằm loại bỏ axit nucleic khó và phức tạp như kết tủa protamin hoặc streptomixin sunfat thường được dùng trước đây.

Sephadex là dẫn xuất của polysacarit dextran trong đó các phân tử của chúng liên kết với nhau bởi các liên kết ngang xuất hiện nhờ tác dụng của epichlorhydrin tạo thành "sàng phân tử". Số liên kết ngang tạo thành càng nhiều, kích thước của lỗ sàng phân tử càng nhỏ. Khi lọc và chiết bằng dung môi thích hợp một hỗn hợp gồm nhiều chất trên cột sephadex, các chất phân tử có kích thước nhỏ sẽ khuếch tán vào bên trong các sephadex đã được ngâm trong dung dịch đậm, còn các phân tử chất có kích thước lớn hơn không có khả năng đi vào các hạt sẽ được chiết nhanh khỏi cột. Vậy cơ sở của phương pháp lọc gel sephadex dựa vào sự khác nhau về kích thước, hình dạng và phân tử lượng của các chất có trong hỗn hợp. Sự chênh lệch nhiều về phân tử lượng của các enzym (12 700 - 1 000 000) cho phép tách và làm sạch enzym bằng phương pháp lọc gel sephadex là phương pháp có nhiều triển vọng.

Cho đến nay không có phương pháp tách làm sạch chung cho các enzym. Để xây dựng phương pháp tách và làm sạch một enzym nào đó cần biết lựa chọn và phối hợp một cách có hiệu quả nhất các biện pháp tách và làm sạch khác nhau.

1.8. ENZIM KHÔNG TAN

1.8.1. Ý nghĩa của enzym không tan

Enzim hòa tan sau khi sử dụng thường lẫn vào cùng với sản phẩm không tách ra được. Nếu tách ra thì enzym cũng bị vô hoạt, vì vậy với một lượng enzym nhất định chỉ có thể sử dụng được một lần, hơn nữa kém bền.

Sử dụng enzym không tan có một số ưu điểm sau :

- một lượng enzym sử dụng lặp đi lặp lại được nhiều lần trong một thời gian dài ;
- enzym không lẫn vào trong sản phẩm do đó tránh được ảnh hưởng không tốt đến sản phẩm ;
- dùng enzym không tan có thể ngừng nhanh chóng phản ứng khi cần thiết bằng cách tách ra khỏi cơ chất.

1.8.2. Các phương pháp điều chế enzym không tan

Về nguyên tắc có ba phương pháp điều chế các enzym không tan :

- Gắn bằng liên kết đồng hóa trị phân tử enzym vào chất mang không hòa tan hoặc gắn các phân tử enzym với nhau để tạo nên đại phân tử không hòa tan ;
- Đính enzym vào khuôn gel có kích thước lỗ khá nhỏ đủ để giữ enzym, còn để các chất khác qua lại tự do ;
- Hấp phụ lý học enzym lên trên các chất mang không hòa tan có mang hoặc không mang điện tích.

1.8.2.1. Phương pháp gắn enzym bằng liên kết đồng hóa trị

Đa số các enzym không tan thu được bằng phương pháp này.

Với phương pháp này có thể thu enzym không tan theo hai cách :

a) Kết hợp phân tử protein enzym vào chất mang không hòa tan

Các chất mang để gắn enzym phải thỏa mãn những yêu cầu nhất định sau :

- Có độ hòa tan thấp và bền vững đối với tác động cơ học và hóa học ;
- Không gây tác dụng kìm hãm đến enzym ;
- Không hấp phụ phi chọn lọc đối với các protein khác ;
- Chất mang tốt hơn cả là có bản chất háo nước, vì chất mang kỵ nước có thể sẽ gây ra tác dụng ức chế đến enzym đã được liên kết ;
- Việc gắn enzym, sẽ có hiệu quả hơn khi điện tích của enzym và của chất mang có dấu ngược nhau.

Các chất mang loại này thường là polypeptit, polysacarit dẫn xuất xelluloza, dextran (DEAE - xelluloza, CM - xelluloza, DEAE - sephadex, CM - sephadex), agarosa và các chất polyme tổng hợp khác như polyacrylamit, polystirol, polyamit và các chất vô cơ : silicagel, bentonit, nhôm hydroxit v.v.

Chất mang phổ dụng hơn cả là dextran có liên kết ngang (sephadex) và agarosa hạt (sepharosa) cả hai loại chất mang này đều có cấu trúc lỗ xốp khiến cho các phân tử lớn có thể xâm nhập vào gel một cách dễ dàng.

Polyacrylamit cũng là chất mang rất tiện lợi vì có độ bền vững cơ học và hóa học cao.

Chất mang vô cơ thường rất bền đối với nhiệt, cơ học, với dung môi hữu cơ và với các vi sinh vật và nhất là không bị biến đổi cấu hình của khuôn khi thay đổi tính chất của môi trường xung quanh. Nhiều dẫn liệu đã chứng tỏ rằng enzym đính với khuôn vô cơ khi bảo quản thường bền vững hơn enzym gắn với khuôn polyme hữu cơ.

Tham gia tạo thành các liên kết đồng hóa trị có thể có các nhóm chức của phân tử protein enzym như : nhóm cacboxyl (COOH) của axit aspartic, axit glutamic, COOH cuối, ϵ - amin của lyzin, SH của cystein, vòng phenol của tirozin, nhân imidazol của histidin, nhóm OH của serin, treomin, nhóm guanidin của arginin và nhân indol của tryptophan.

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.

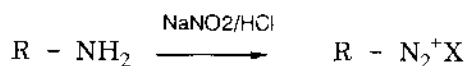
Ví dụ, chất đồng trùng hợp anhydrit maleic và etylen để liên kết đồng hóa trị giữa nhóm ϵ - amin của lyzin ở phân tử enzym với gốc anhydrit maleic của polyme.

Trường hợp ngược lại quá trình xảy ra qua hai giai đoạn :

- Giai đoạn đầu để hoạt hóa 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 aminobenzoylxelluloza, polyaminostirol, copolyme của paminophenylalanin có thể được hoạt hóa bằng phản ứng diazo.

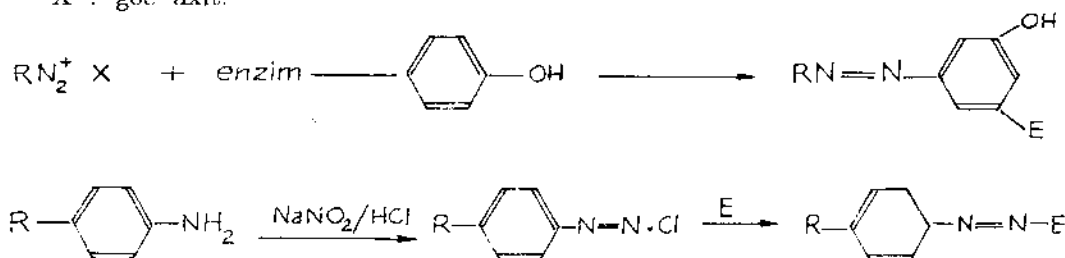
Ví dụ, polyaminostirol trước hết được diazo hóa bằng natri nitrit trong môi trường axit thành muối diazo, sau đó mới kết hợp với enzym :



muối diazo của chất mang

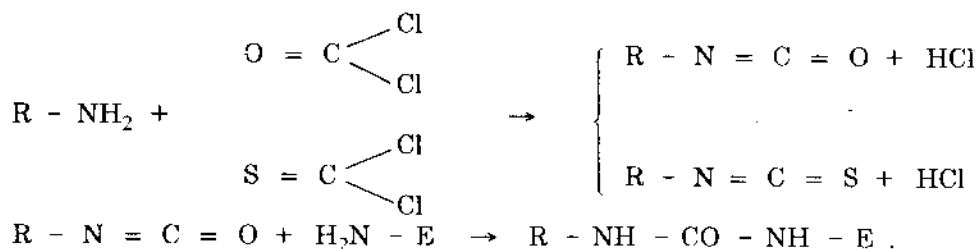
R : gốc alkyl, aryl ;

X : gốc axit.



Phản ứng kết hợp enzym được tiến hành nhanh chóng trong điều kiện nhiệt độ thường và trong dung dịch nước trung tính.

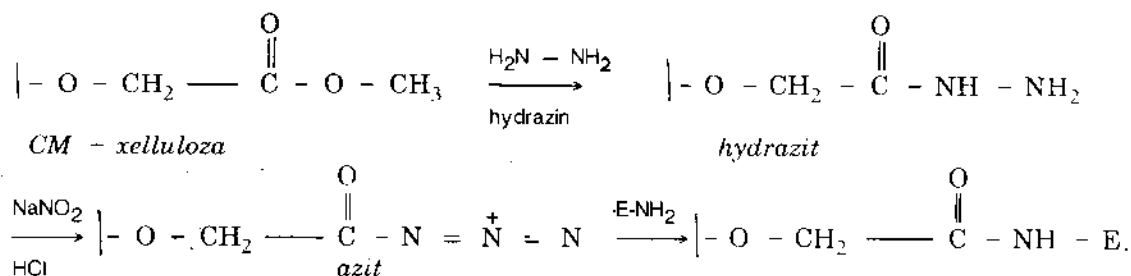
Nếu chất mang có chứa nhóm amin có thể hoạt hoá bằng cách cho tác dụng với phosgen hoặc tiophosgen để tạo thành dẫn xuất izoxianat hoặc izotioxianat. Các nhóm izoxianat hoặc izotioxianat ở pH trung tính sẽ liên kết dễ dàng với gốc N cuối và nhóm ε-amin của enzym.



Bằng phương pháp này người ta đã điều chế được các dẫn xuất enzym không tan như tripxin, kimotripxin, α, β-amilaza, glucoamilaza.

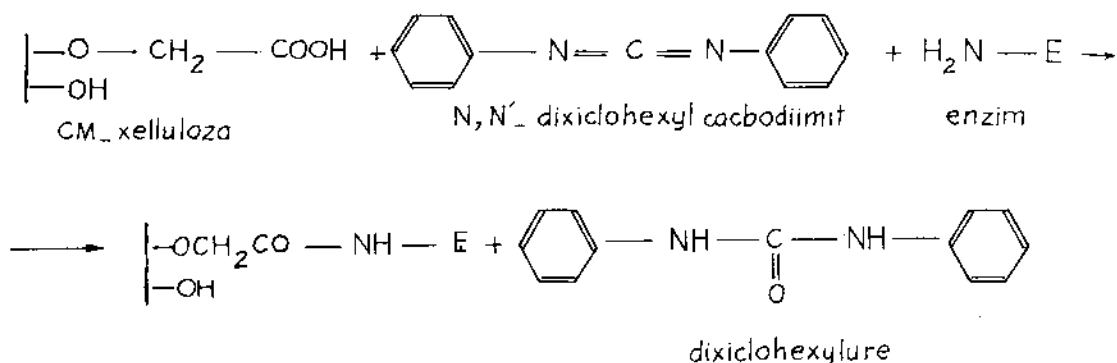
Nếu chất mang có chứa nhóm COOH như CM-xelluloza hoặc nhựa tổng hợp cần được hoạt hóa trước khi cho tác dụng với enzym bằng các phương pháp axit, cacbodiimit, anhydrit kép.

Hoạt hóa bằng phương pháp azit :



Các enzym không tan như tripxin, ADN-aza, kimotripxin, fixin, bromelin đã được điều chế bằng phương pháp này.

Hoạt hóa bằng phương pháp cacbodiimit :

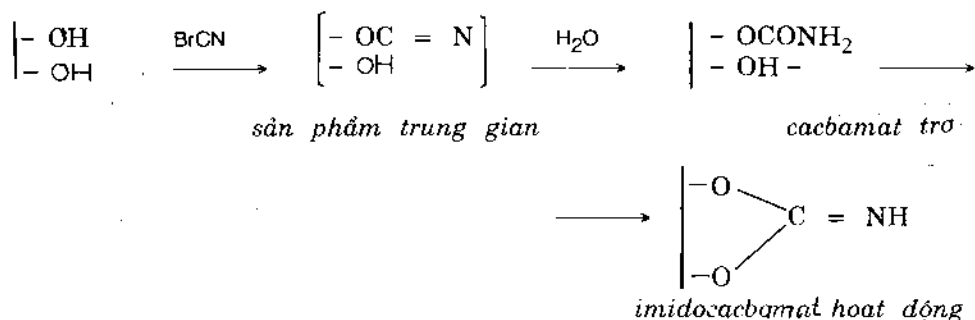


Vì phản ứng xảy ra trong môi trường axit yếu (pH = 5) do đó phương pháp đặc biệt thuận lợi đối với các enzym có tính axit như pepxin.

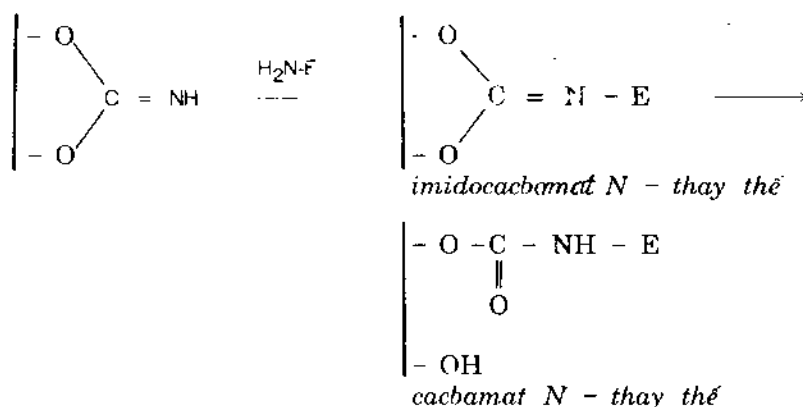
Chất mang là polysacarit thì được hoạt hóa sơ bộ bằng halogen xyanua thường là BrCN trong môi trường kiềm, polysacarit đã hoạt hóa có khả năng tạo thành liên

kết đồng hóa trị với protein enzym qua nhóm amin bậc nhất.

Porath và Bar Eli lần đầu tiên đã hoạt hóa xelluloza, dextran và agaroza bằng phương pháp này :



Giai đoạn kết hợp :



b) Kết hợp đồng hóa trị các phân tử enzym riêng biệt lại thành một đại phân tử không hòa tan

Cũng có thể điều chế các enzym không tan bằng cách dính các phân tử enzym lại với nhau nhờ các tác nhân lưỡng hoặc đa chức.

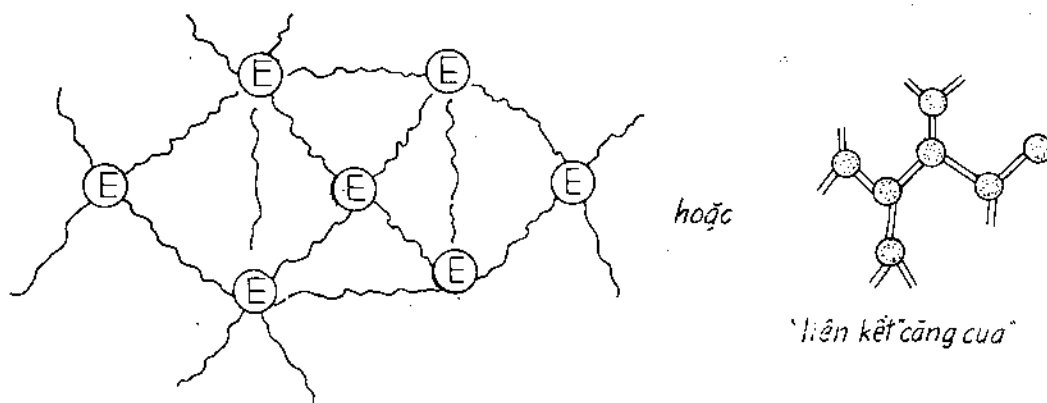
Người ta thường dùng aldehyt glutaric để gắn các nhóm amin của lyzin ở các phân tử enzym.

Krechards (1964) đã cho các tinh thể "cacboxipeptidaza A" tác dụng với dung dịch aldehyt glutaric 1% sau khi tác dụng enzym trở nên không tan trong NaCl 1M và vẫn giữ được 30% hoạt độ so với ban đầu.

Habeed (1967) cũng đã điều chế dẫn xuất tripxin không tan bằng cách dùng aldehyt glutaric 2% để liên kết các phân tử enzym cũng như gắn enzym vào aminoetyl-xelluloza.

Các enzym thu được bằng liên kết đồng hóa trị thường có tính rắn do enzym được liên kết vào chất mang. Tuy số lượng enzym được cố định ít hơn trường hợp gói hoặc cố định bằng hấp phụ, nhưng sự tổn thất do giải phóng ra môi trường lại tối thiểu.

Ngoài ra kiểu cố định này thường làm tăng tính chống chịu của enzym đối với các yếu tố biến tính, do đó để thực hiện được trong công nghiệp phải dùng các bình phản ứng liên tục.



Hình 1.20. Sơ đồ điều chế enzyme không tan bằng cách dính mạch ngang nhờ tác nhân lưỡng hoặc đa chức

1.8.2.2. Phương pháp gói enzyme trong khuôn gel

Để gói enzyme vào khuôn gel người ta tiến hành trùng hợp hóa các gel khi có mặt đồng thời enzyme. Sau khi hoàn thành quá trình thì enzyme bị giữ chắc trong gel. Gel đã có enzyme có thể nghiền nhỏ bằng cách đông hóa hoặc ép qua rây có lỗ nhỏ rồi đem sấy khô ở nhiệt độ thấp.

Dẫn xuất enzyme loại này lần đầu tiên do Bernfeld (1933) thu được bằng cách trùng hợp acrylamit với N, N'-metylenbisacrylamit. Phương pháp này thường dùng gắn dây do chất trùng hợp thu được dễ tạo thành dạng hạt và tùy thuộc điều kiện tiến hành mà gel có thể có độ xốp khác nhau.

Enzyme không tan "gói" trong gel kiểu này thường phân bố không đồng đều. Chỉ những phần enzyme nằm gần bề mặt gel là tiếp xúc được với cơ chất và tham gia hoạt động xúc tác.

Sau đây là một số phương pháp gói enzyme :

a) Các gel có thể được hình thành từ các polyme tổng hợp như polyacrylamit, hydroxyletyl - 2- metacrylat đã tạo phức chéo của bằng etylen glycoldimetacrylat, polyvinyl, polyureetan.

Enzyme được hòa tan hoặc phân tán trong một dung dịch monome và sau đó trùng hợp trong sự có mặt của một hay nhiều tác nhân tạo phức chéo của. Gel có thể cắt thành màng đặt trên một giá rắn, hoặc cũng có thể nghiền thành bột sau khi khử nước.

Alginate và caraghenan lấy từ rong biển thường có khả năng tạo gel rất tốt và rất thuận lợi để bao gói các enzyme hoặc tế bào nguyên vẹn. Có thể tạo khối dưới dạng viên có đường kính 0,5 - 4mm bằng cách nhỏ từng giọt dung dịch natri alginate 2% vào trong dung dịch giàu canxi clorua.

b) Các enzyme cũng có thể bị "nhốt" trong các lỗ nhỏ của các sợi tổng hợp

Với cách này người ta cho dịch lỏng chảy tuần hoàn bên trong sợi do đó hạn chế được sự phân cực bề mặt và sự bịt lấp thường gặp với các màng.

Phương pháp Dinelli được tiến hành giống như tạo sợi xelluloza trong công nghiệp

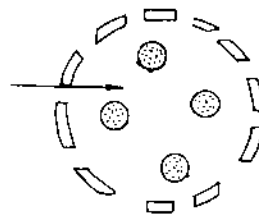
dệt. Một nhũ tương của xelluloza triaxeta¹ ng metylen clorua và enzym dạng dung dịch trong đệm có chứa glixerol được ép đùn qua một khuôn lọc dưới áp suất nitơ. Các sợi đi ra khỏi khuôn được nhúng vào trong một cái bể đồng tụ có chứa toluen, sau đó được làm khô trong chân không.

Các sợi này bền chịu được với axit yếu hoặc kiềm, lực ion cao và với một số dung môi hữu cơ. Nhưng phương pháp này chỉ thích hợp cho các enzym khó bị mất hoạt tính trong các dung môi không hòa lẫn với nước.

c) Phương pháp gói enzym trong bao vi thể (microcapsul)

Enzim được gói trong các bao vi thể có màng bán thấm được tạo ra từ các polyme có kích thước lỗ đủ nhỏ để ngăn cản sự khuếch tán của enzym ra ngoài và đủ lớn để cơ chất đi vào và sản phẩm phản ứng đi ra dễ dàng.

Có nhiều phương pháp gói enzym trong microcapsul, sau đây là một trong các phương pháp đó. Cho một dung dịch lỏng chứa enzym và một monome ưa nước trong một dung môi hữu cơ không hòa lẫn trong nước để tạo nhũ tương, sau đó thêm một monome kỵ nước để gây phản ứng trùng hợp tạo ra một màng bao quanh những giọt lỏng nhỏ, thường phải thêm vào một tác nhân hoạt động bề mặt để làm bền nhũ tương cũng như để điều chỉnh kích thước, các capsul có đường kính mong muốn có thể từ 1 đến 100 μm .



Hình 1.21. Sự gói trong bao vi thể

d) Phương pháp tiền polyme để gói các chất xúc tác sinh học

Cố định enzym bằng phương pháp này có những ưu điểm như sau :

- Quá trình gói rất đơn giản trong những điều kiện nhẹ nhàng ;
- Các chất tiền trùng hợp không chứa các monome có ảnh hưởng xấu đến enzym đã được gói ;
- Cấu trúc mạng lưới của gel có thể được điều chỉnh bằng cách dùng các tiền polyme có chiều dài chuỗi bất kỳ ;
- Các tính chất hóa lý của gel (như sự cân bằng hao nước - kỵ nước, bản chất ion) có thể định hướng trước bằng cách chọn các chất tiền polyme thích hợp vốn đã được tổng hợp hóa học trong điều kiện vắng mặt enzym.

Dưới đây một vài ví dụ các phương pháp tiền polyme :

Phương pháp tạo liên kết chéo giữa các tiền polyme bằng chiếu quang để gói enzym.

Khi chiếu tia cực tím gần lên dung dịch có chứa chất tiền polyme và enzym thì sẽ tạo ra các liên kết chéo giữa các gốc của tiền polyme và một gel được hình thành bao lấy enzym.

Sự gói enzym bằng phương pháp này có thể tiến hành ở điều kiện nhẹ nhàng, tránh được các thay đổi pH quá kiềm hoặc axit, và thời gian lại rất nhanh chỉ trong vòng từ 3 - 5 phút.

Các chất nhựa tiền polyme có thể quang liên kết chéo thường là những chất sau :

PEGM : polyetylen glycol dimetacrylat được tổng hợp từ polyetylen glycol.

ENT : metacrylat và ENTP được tổng hợp từ hydroxyetylacrylat trong đó PEGM và ENT hòa tan trong nước còn ENTP không hòa tan trong nước.

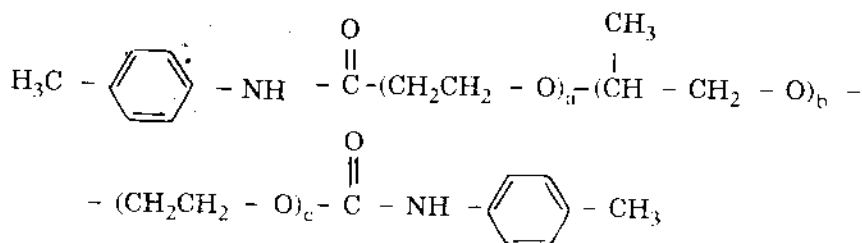
Với phương pháp này có thể gói enzyme, tế bào vi sinh vật, hoặc các cơ quan bào bằng cách trộn một hỗn hợp gồm có chất tiền polyme, một chất nhạy quang như : benzoinetyleter (hoặc benzoinizobutyleter) một dung dịch huyền phù có chứa enzyme, dung dịch đệm thích hợp cho chất tiền polyme háo nước (hoặc một dung môi hữu cơ thích hợp nếu chất tiền polyme là kỵ nước). Sau đó chiếu tia cực tím gần có chiều dài sóng từ 300 - 400nm (đạt cực đại ở bước sóng 360 nm) trong 3 phút.

Phương pháp tiền polyme ureetan

Cố định các enzyme bằng cách trộn chất tiền polyme ureetan với dung dịch nước của enzyme là phương pháp khá đơn giản và thuận lợi vì các gốc chức năng izoxianat ở hai đầu cuối của ureetan chỉ phản ứng với nhau trong điều kiện có mặt nước để tạo thành liên kết chéo ure và giải phóng cacbon đioxit. Gel dễ dàng hình thành trong vài phút và bao gói lấy enzyme.

Có thể thu được các tiền polyme háo nước, hoặc kỵ nước bằng cách thay đổi tỷ lệ giữa polyetylen glycol và polypropylen glycol. Ví dụ PU - 3 có nồng độ polypropylen glycol cao sẽ tạo các gel kỵ nước, trong khi đó PU-6 và PU-9 có nồng độ polyetylen glycol cao sẽ tạo được gel háo nước.

Dạng công thức chung của chất tiền polyme nước (PU)

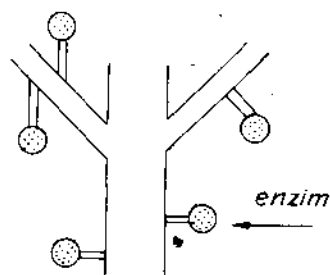


1.8.2.3. Cố định enzyme bằng phương pháp hấp phụ trên các chất mang có hoặc không có điện tích

Với phương pháp này enzyme được hấp phụ trên các chất có hoạt tính bề mặt như : than hoạt tính, xelluloza, tinh bột, dextran, collagen, albumin, agaroza, kitin, polyacrylamit, nylon, polystirol, v.v. và một số nhựa trao đổi ion, silicagel thủy tinh.

Trong trường hợp chất mang không có lỗ enzyme được dính vào chất mang thành từng lớp trên bề mặt.

Khi chất mang có lỗ xốp, các phân tử enzyme sẽ xâm nhập vào trong các lỗ.



Hình 1.22. Sơ đồ sự hấp phụ vật lý

Nếu chất mang có tích điện thì sẽ tạo thành các liên kết ion.

Với phương pháp này, người ta đã cố định được glucoamilaza trên DEAE - xeluloza hoặc trên DEAE - sephadex. Nói chung các proteaza axit tính như pepxin rất dễ dàng cố định trên DEAE - xeluloza, còn các proteaza kiềm tính như : tripxin, kimotripxin dễ liên kết với CM-xeluloza. Các nhựa trao đổi ion có nền xeluloza có khả năng hấp phụ từ 2 - 50% protein enzym.

Nhược điểm của phương pháp này là enzym dễ bị nhả hấp phụ và hòa tan trở lại khi thay đổi pH hoặc lực ion của dung dịch chung quanh.

1.8.3. Một số đặc tính của enzym không tan

a) *Enzim không tan có hoạt độ riêng thấp hơn hoạt độ riêng của enzym hòa tan.*

- Có thể khi gắn enzym vào chất mang dưới ảnh hưởng của điện tích ở 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 do đó mà hoạt lực giảm.

- Cũng có thể là do tương tác protein - protein giữa các phân tử enzym đã cố định làm biến dạng một phần cấu trúc không gian của phân tử enzym.

b) *Enzim không tan tuân theo động lực Michaelis - Menten*

Tuy nhiên có những sai khác đáng kể do :

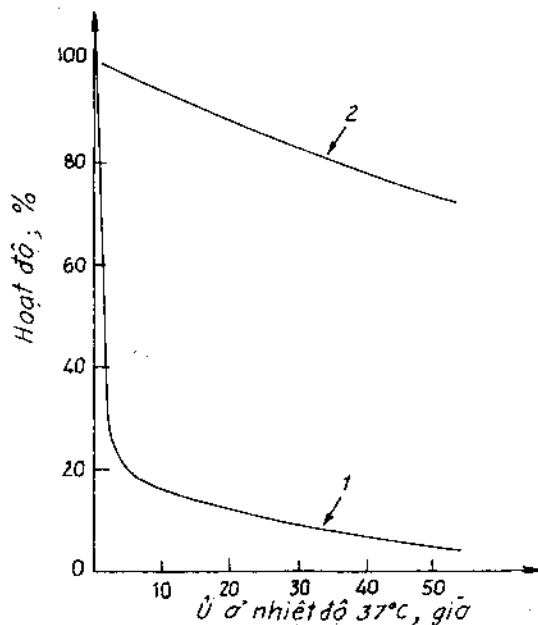
- Có thể có hiện tượng cạnh tranh cơ chất giữa chất mang và dung dịch;

- Hiện tượng khuếch tán có tác dụng hạn chế vận tốc của phản ứng của enzym;

- Chất mang và cơ chất tích điện cùng dấu thì $K_{mkt} > K_{mt}$; nếu cơ chất và chất mang tích điện trái dấu thì $K_{mkt} < K_{mt}$. Chất mang không tích điện thì $K_{mkt} \approx K_{mt}$.

c) *Enzim không tan thường có tính bền nhiệt cao hơn so với enzym tan.*

d) *pH tối ưu của enzym không tan thường bị chuyển sang miền kiềm hoặc axit so với pH tối ưu của enzym tan, sẽ dễ có sai khác này là do ảnh hưởng của trường*



Hình 1.23. Độ bền nhiệt của enzym tan và không tan:

1-β-D-glucosidaza tan; 2-β-D-glucosidaza không tan

- Đưa vi tiểu cầu có gắn enzym *L*-asparaginaza vào cơ thể, có khả năng ức chế sự phát triển của một số u ác tính bởi sự phát triển của các u này phụ thuộc vào sự có mặt của *L*-asparagin.

c) Trong phân tích hóa sinh

- Glucooxidaza gắn đồng hóa trị với polystirol được dùng để xác định tự động glucoza.

- Điện cực ureaza không tan dùng để xác định tự động ure trên dòng liên tục.

- Điện cực alcoloxydoreductaza không tan dùng để xác định metanol, etanol trong dung dịch nước.

CHƯƠNG II

CÁC PHẢN ỨNG ENZIM PHỔ BIẾN TRONG SẢN XUẤT THỰC PHẨM

II.1. PHẢN ỨNG THỦY PHÂN BỞI ENZIM

II.1.1. Ý nghĩa của phản ứng thủy phân

Phản ứng thủy phân là phản ứng rất phổ biến và rất quan trọng trong bảo quản và sản xuất thực phẩm. Do phản ứng thủy phân mà chất lượng các sản phẩm thực phẩm bị giảm đi và cũng nhờ phản ứng thủy phân để tăng thêm phẩm chất cho thành phẩm. Qua phản ứng thủy phân, không những chỉ các tính chất cảm quan mà các tính chất hóa học của sản phẩm cũng có thể bị biến đổi.

Phản ứng thủy phân thường là mở đầu cho một loạt các phản ứng khác tiếp diễn. Các phản ứng khác có thể xảy ra khi phản ứng thủy phân đã kết thúc.

Xét về mặt sinh học, phản ứng thủy phân thường đặc trưng cho giai đoạn phân giải - giai đoạn kết cùng của một quá trình sinh học.

Bên cạnh đó, trong kỹ thuật sản xuất các sản phẩm thực phẩm, phản ứng thủy phân có vai trò rất quan trọng. Để giảm bớt sự tổn thất các chất thực phẩm, người ta phải tìm những biện pháp kỹ thuật tương ứng để ngăn ngừa và hạn chế các phản ứng thủy phân. Trái lại, nếu qua phản ứng thủy phân mà chất lượng thành phẩm tăng lên thì người ta phải tạo điều kiện cho phản ứng ấy xảy ra đến tận cùng.

Chẳng hạn dầu mỡ hoặc các sản phẩm của hạt trong quá trình bảo quản chất lượng thường bị giảm đi, là do phản ứng thủy phân đã tạo điều kiện cho phản ứng oxy hóa tiếp diễn làm giảm phẩm chất của sản phẩm.

Từ tinh bột, muốn có được đường nha hay đường glucoza người ta phải tạo điều kiện để phản ứng thủy phân tinh bột bằng enzym đạt đến mức tối đa. Để có được nước mắm hay nước chấm, phomat hay chao, hoặc làm mềm thịt đều xuất phát từ nguyên lý của phản ứng thủy phân. Hoặc như trong sản xuất bánh mì, các phản ứng oxy hóa, caramen hóa và melanoidin, nghĩa là những phản ứng tạo nên toàn bộ chất lượng của sản phẩm bánh chỉ có thể xảy ra khi đã có phản ứng thủy phân mở đầu.

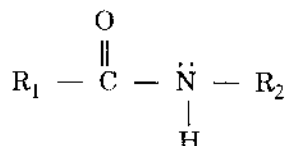
Quá trình sản xuất rượu, bia thực chất là quá trình oxy hóa sinh học, nhưng để có được quá trình thực chất này trước đó phải có phản ứng thủy phân. Vì vậy,

trước khi cho lên men rượu người ta phải đường hóa tinh bột thành đường, nghĩa là phải thực hiện phản ứng thủy phân.

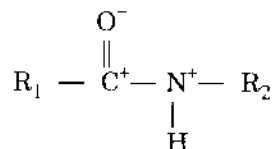
II.1.2. Đặc điểm của các cơ chất bị enzym thủy phân

a) Các cơ chất được enzym thủy phân thường là protein, glucit, lipid v. v. Theo Bernard Pullman và Alberte Pullman, đặc điểm chung của những cơ chất này là có "liên kết bị thủy phân" do các nguyên tử tích điện dương tạo nên. Người ta gọi liên kết này là "liên kết nhị dương".

- Chẳng hạn, liên kết peptit trong protein :



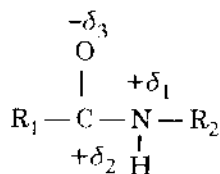
Liên kết này do các electron σ định vị của liên kết đơn và một hệ thống electron π linh động tạo nên. Hệ thống đó gồm bốn electron trong đó hai electron của nối kép $\text{C} = \text{O}$ và hai electron của cặp không chia của nitơ. Bốn electron này tạo thành một hệ thống cộng hưởng và theo qui tắc chung : Khi ở nguyên tử dị mạch nằm kế liền với nối kép có cặp electron không chia thì sẽ xảy ra sự chuyển dịch một phần điện tích của cặp không chia từ nguyên tử dị mạch tới nguyên tử cuối của nối kép. Như vậy, sự phân bố điện tích trong liên kết peptit có thể như sau :



Khi đó nguyên tử nitơ tích điện dương, nghĩa là thay cho hai electron của cặp không chia, nó sẽ chỉ giữ lại một phần nào đó của hai electron này thôi

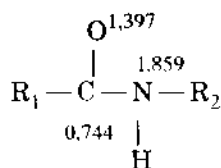
Ngoài ra do sự khác nhau về độ âm điện của nguyên tử cacbon và oxy của liên kết $\text{C} = \text{O}$, (có thể xem liên kết $\text{C} = \text{O}$ như là sự lai hóa giữa cấu trúc đồng hóa trị $\text{C} = \text{O}$ và cấu trúc ion $\text{C}^+ = \text{O}^-$) mà nguyên tử cacbon cũng phải có điện tích tổng dương. Như vậy các nguyên tử cacbon và nitơ góp vào hệ thống electron π ít hơn một electron π . Còn nguyên tử oxy góp vào hệ thống hơn một electron π , do đó có điện tích tổng âm.

Nếu biểu diễn các phần điện tích đó bằng δ thì sự phân bố điện tích trong liên kết peptit như sau :

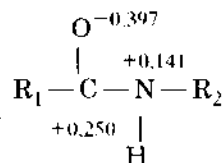


Rõ ràng $\delta_3 = \delta_1 + \delta_2$
và $(1 + \delta_3) + (1 - \delta_2) + (2 - \delta_1) = 4$.

Bằng phương pháp quỹ đạo phân tử người ta đã tính được sự phân bố bốn electron của hệ thống như sau :



Từ đây điện tích sẽ được phân bố như sau :



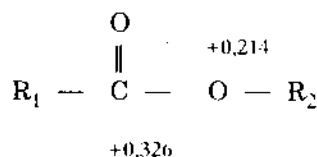
Thuật ngữ "liên kết nhị dương" chỉ sự khuyết electron π ở cả hai nguyên tử tạo nên liên kết đó.

Đặc trưng nhị dương này của liên kết được bảo toàn trước mọi công kích bất kỳ kể cả sự tấn công của enzym.

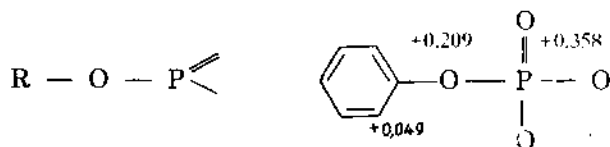
- Các liên kết nhị dương thường gặp

Liên kết este :

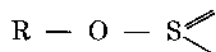
Trong este của axit cacboxylic



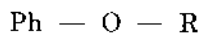
Trong este của axit phosphoric :



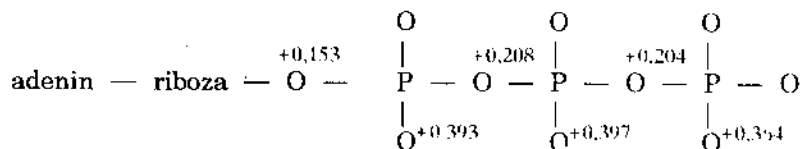
Trong este của axit sulfuric :



Este của phenol :

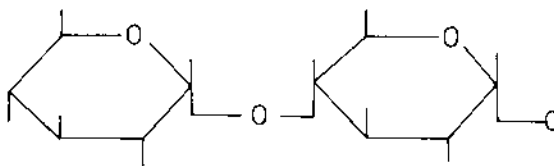


Liên kết trong các anhidrit, đặc biệt liên kết $-\text{P} - \text{O} - \text{P}$ trong hợp chất phosphat giàu năng lượng ATP :



Liên kết glucozit trong các polysacarit. Khác với các liên kết kể trên, liên kết glucozit chỉ có các electron σ mà không có electron π tham gia. Trong trường hợp

riêng này, đóng vai trò phân cực là bộ electron σ . Do hiệu ứng cảm ứng của nguyên tử oxy trung tâm, nên gây ra một sự tập trung điện tích nào đó trên nguyên tử oxy, do đó oxy tích điện âm. Còn các nguyên tử cacbon kết hợp với nó bị khuyết electron nên tích điện dương.

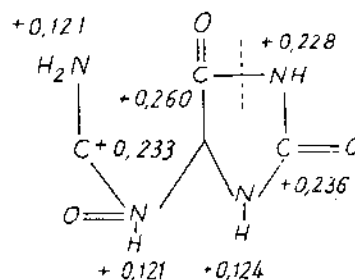


b) Sự thủy phân bởi enzym sẽ càng dễ dàng khi sự khuyết electron trong liên kết bị thủy phân càng lớn.

Sự khuyết đó có thể được tăng lên khi tăng tổng điện tích dương của cả hai nguyên tử tạo thành liên kết hoặc khi chỉ tăng điện tích của một trong hai.

Nếu trong phân tử cơ chất có nhiều liên kết giống nhau thì liên kết nào nhĩ dương hơn cả sẽ bị phân ly thủy phân bởi enzym (với điều kiện không có ảnh hưởng không gian và đặc hiệu lập thể của từng liên kết).

Chẳng hạn như trong phân tử alantoin có năm liên kết peptit, nhưng liên kết bị thủy phân trước tiên là liên kết có chấm chấm như trong hình bên.



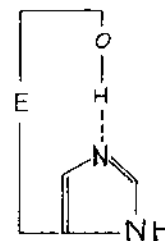
II.1.3. Đặc điểm chung của tâm hoạt động của enzym thủy phân

Đa số enzym thủy phân (hydrolaza) không có nhóm ngoại. Như vậy bắt buộc tâm hoạt động của chúng phải có các gốc axitamin đặc hiệu.

Tâm hoạt động của enzym hydrolaza thường chứa nhóm imidazol của histidin và nhóm hydroxyl của một trong số các gốc serin.

Nhiều hydrolaza, người ta đã biết được thứ tự sắp xếp của các axitamin chung quanh tâm hoạt động

Kimotripxin A ...	— Gly — Asp — Ser — Gly —
Tripxin	— Gly — Asp — Ser — Gly —
Trombin	— Asp — Ser — Gly —
Kimotripxin B	— Asp — Ser — Gly —
Colinesteraza	— Gly — Glu — Ser — Ala —
Cacboxylesteraza	— Gly — Glu — Ser — Ala —



Do cấu trúc bậc ba của phân tử protein-enzim mà nhóm hydroxyl của serin và vòng imidazol của histidin gần gũi nhau. Khi đó giữa nhóm hydroxyl của serin và nguyên tử nitơ bậc ba của nhân imidazol tạo thành liên kết hydro như hình bên.

Nhờ thế, oxy của nhóm hydroxyl thu được tính chất ái nhân và có thể tương tác được với liên kết nhĩ dương của các cơ chất.

II.1.4. Cơ chế tác dụng của enzym hydrolaza

Sự khuyết electron trong liên kết bị thủy phân là yếu tố quan trọng quyết định khả năng và sự dễ dàng của phản ứng thủy phân.

Tác dụng xúc tác của enzym sẽ phụ thuộc vào từng trường hợp và do sự phân bố electron đã tồn tại trước đó quyết định.

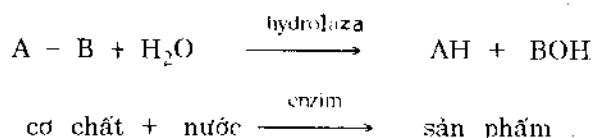
Enzim có thể tác dụng bằng các cách khác nhau. Cơ chế đơn giản nhất cho phép liên hệ "phân dương" của liên kết bị thủy phân với tác dụng của enzym là : tâm ái nhân của enzym sẽ tương tác trực tiếp với một trong hai nguyên tử tích điện dương của liên kết bị thủy phân. Sự tạo thành phức hợp trực tiếp như thế với trung tâm phản ứng sẽ làm cho sự đứt các liên kết và sự thủy phân được dễ dàng thuận lợi. Enzim colinesteraza và nhiều esteraza khác đều tác dụng thủy phân cơ chất theo cơ chế này.

Một cơ chế khác liên hệ tính tác dụng của enzym với sự khuyết electron của liên kết bị thủy phân là : enzym làm tăng sự khuyết electron vốn đã tồn tại trước đó, bằng cách tạo thành liên kết tương ứng với cơ chất ở những vị trí ít nhiều gần gũi với liên kết bị thủy phân. Nhờ vậy mà làm cho sự phân bố electron trong phân tử cơ chất bị thay đổi theo một chiều hướng cần thiết, khiến cho việc đứt liên kết được dễ dàng hoặc khiến cho một trong hai nguyên tử của liên kết tương tác được với các tác nhân ái nhân.

II.1.5. Một số đặc điểm của phản ứng thủy phân bởi enzym

II.1.5.1. Thứ bậc của phản ứng

Sơ đồ chung của phản ứng thủy phân bởi enzym có thể biểu diễn như sau :



Nhìn sơ đồ chúng ta thấy : phản ứng thủy phân bởi enzym là phản ứng lưỡng phân. Nhưng vì nồng độ của nước rất lớn coi như không thay đổi trong suốt thời gian phản ứng, do đó vận tốc của phản ứng chỉ phụ thuộc nồng độ cơ chất. Như vậy, phản ứng thủy phân bởi enzym là phản ứng đơn phân và bậc nhất.

Như chúng ta đều biết, trong các phản ứng đơn phân các phân tử khởi đầu sẽ phản ứng một cách độc lập không phụ thuộc vào sự có mặt của những phân tử khác. Nếu gọi a là số phân tử gam ban đầu của cơ chất, gọi x là số phân tử gam cơ chất bị thủy phân trong khoảng thời gian từ t tới $t + dt$, thì x sẽ tỉ lệ với khoảng thời gian dt và số phân tử gam còn lại $(a - x)$ chưa bị thủy phân trong thời gian t . Ta sẽ có :

$$v = \frac{dx}{dt} = k(a - x)$$

Sau một số biến đổi, ta sẽ có hệ thức để tính lượng cơ chất bị thủy phân trong khoảng thời gian bất kỳ

$$x = a(1 - e^{-k_1 t})$$

và hằng số vận tốc của phản ứng thủy phân bởi enzym k_1 :

$$k_1 = \frac{2,303}{t} \lg \frac{a}{a-x}$$

Tuy vậy trong giai đoạn đầu khi mà nồng độ của cơ chất rất lớn, thì vận tốc của phản ứng coi như không thay đổi và phản ứng có thứ bậc không :

$$k_{11} = \frac{dx}{dt}$$

Như vậy, tất cả các phản ứng thủy phân bởi enzyme trong giai đoạn đầu có thứ bậc không, sau đó phản ứng có thứ bậc nhất.

II.1.5.2. Yếu tố điều chỉnh

Đối với phản ứng thủy phân bởi enzyme thì nước không những là môi trường để khuếch tán enzyme và cơ chất mà còn là tác nhân tham gia vào phản ứng nữa. Nước có ảnh hưởng không những đến vận tốc mà cả chiều hướng của phản ứng thủy phân bởi enzyme nữa. Bằng thí nghiệm trộn tinh bột đã được hồ hóa và đã sấy thăng hoa với enzyme α - amilaza của vi khuẩn, sau đó đem phun hơi nước vào đến những độ ẩm nhất định. Người ta thấy khi hàm ẩm đạt 20% (khoảng 4% nước tự do) thì α -amilaza sẽ thủy phân tạo thành chủ yếu là glucoza và maltoza. Khi hàm ẩm cao hơn thì ngoài glucoza và maltoza còn tạo thành các oligosacarit khác nữa.

Như vậy nước cũng là một yếu tố điều chỉnh các phản ứng thủy phân bởi enzyme. Có thể dùng nước làm nhân tố để tăng cường hay kìm hãm các phản ứng thủy phân có xúc tác enzyme. Khoa học về bảo quản các nguyên liệu có nguồn gốc sinh học chính là dựa trên nguyên lý này. Như chúng ta biết, các nguyên liệu sinh học khi bảo quản có thể bị hư hỏng do một loạt các phản ứng phức tạp mà khởi đầu là phản ứng thủy phân bởi enzyme. Để bảo quản được tốt thì một trong những biện pháp kỹ thuật tương ứng là tách nước bằng cách phơi, sấy v.v. Các biện pháp kỹ thuật tương ứng để tách nước trong quá trình tinh luyện dầu béo cũng là nhằm ngăn ngừa phản ứng thủy phân bởi enzyme lipaza

Ngoài ra, cũng như đối với những phản ứng enzyme khác, có thể dùng yếu tố nhiệt độ và pH để điều chỉnh các phản ứng thủy phân bởi enzyme. Mỗi enzyme thủy phân (hydrolaza) có một nhiệt độ và pH tối ưu riêng. Ngay cùng một enzyme hydrolaza, nhưng lấy từ các nguồn khác nhau cũng có nhiệt độ và pH xúc tác thủy phân khác nhau. Các quá trình đường hóa trong sản xuất bánh mì, trong sản xuất bia và trong sản xuất rượu là những quá trình thủy phân bằng enzyme với mức độ khác nhau. Quá trình sản xuất nước chấm, nước mắm, phomat, đậu phụ nhự (chao) thực chất cũng là những quá trình thủy phân bằng enzyme với mức độ khác nhau. Ở đây người ta chủ yếu là dựa vào nhiệt độ hoặc pH để điều chỉnh các phản ứng thủy phân theo những chiều hướng mong muốn.

Khi thủy phân bằng enzyme hydrolaza có một số ưu nhược điểm sau :

- Do enzyme hydrolaza có tính đặc hiệu cao nên không tạo thành sản phẩm phụ do đó dịch thủy phân thu được có độ thuần khiết cao ;

- Phản ứng thủy phân bởi enzyme tiến hành ở nhiệt độ thấp và pH cao, nghĩa là ở điều kiện tạo thành rất ít tạp chất (không có phản ứng đảo chiều và phản ứng phân hủy như trong thủy phân bằng axit) do đó vừa giảm được yêu cầu về độ thuần

khuyết của nguyên liệu (có thể thủy phân trực tiếp trên nguyên liệu), vừa có hiệu suất cao ;

- Khi thủy phân bằng enzym còn cho phép điều chỉnh được thành phần hóa học của sản phẩm do đó làm tăng được mặt hàng ;

- Enzim hydrolaza có thể thủy phân trong điều kiện nồng độ cơ chất rất cao do đó giảm được chi phí hơi ;

- Thời gian thủy phân của enzym hydrolaza dài hơn so với axit nhiều, do đó chu kỳ sản xuất kéo dài ;

- Muốn có hiệu suất cao và chất lượng sản phẩm tốt phải có chế phẩm enzym tinh khiết do đó phải có phân xưởng chuyên sản xuất chế phẩm tinh khiết này ;

- Dung dịch do enzym thủy phân thường khó lọc hơn khi thủy phân bằng axit.

Nhằm phát huy những ưu điểm và khắc phục các nhược điểm của phương pháp thủy phân bằng enzym, hiện nay trong một số ngành sản xuất thực phẩm đang xuất hiện phương pháp thủy phân mới : phương pháp thủy phân bằng axit - enzym và bằng enzym-axit.

Phương pháp mới này kết hợp được tính chất nhanh chóng và đơn giản của thủy phân bằng axit và khả năng to lớn, tiềm tàng và đầy triển vọng của thủy phân bằng enzym.

II.2. PHẢN ỨNG OXY HÓA - KHỬ SINH HỌC

II.2.1. Ý nghĩa của các phản ứng oxy hóa - khử sinh học trong công nghiệp thực phẩm

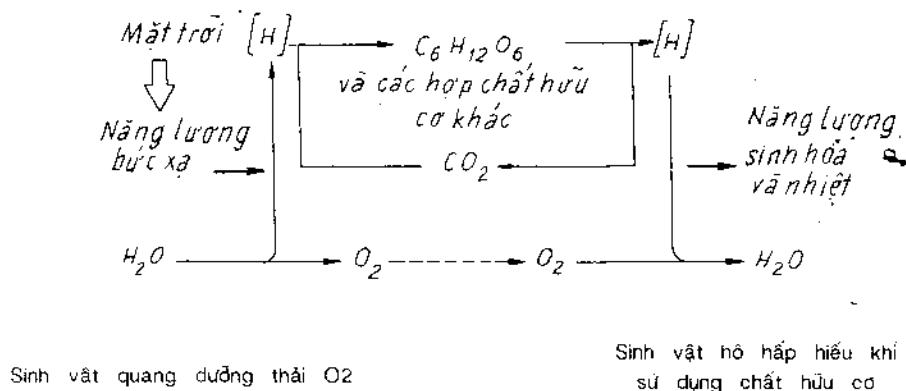
Muốn tồn tại và duy trì được các chức năng hoạt động sống (sinh trưởng, sinh sản, vận động cơ học, bài tiết, ...) sinh vật cần có năng lượng.

Nguồn năng lượng duy nhất đối với cơ thể người, động vật và đa số vi sinh vật là năng lượng hóa học tàng trữ trong các phân tử của các chất dinh dưỡng có trong thức ăn. Suy cho cùng thì nguồn năng lượng cần thiết do cơ thể sinh vật thu được từ ánh sáng mặt trời. Năng lượng do ánh sáng mặt trời chiếu xuống là một đại lượng khổng lồ ($9 \cdot 10^{22}$ kcal/giây). Tuy nhiên, chỉ có một phần rất nhỏ bé của khối năng lượng đó đi tới bề mặt trái đất và cũng chỉ có một lượng rất nhỏ của phần năng lượng đi tới trái đất (khoảng 1%) được chuyển vào và tàng trữ trong các liên kết hóa học của các hợp chất hữu cơ do thực vật tạo nên từ CO_2 và H_2O trong quá trình quang hợp. Trong quá trình này, năng lượng mặt trời chuyển thành năng lượng hóa học : nước bị phân giải thành hydro và oxy. Oxy được thải vào không khí, còn hydro liên hợp với cacbon (trong CO_2) để tạo ra các chất hữu cơ của thực vật. Chính hiệu thế năng giữa hydro và oxy do thực vật tạo nên đó là nguồn năng lượng cho tất cả các sinh vật hô hấp hiệu khí (người, động vật, đa số vi sinh vật và ngay cả thực vật nữa).

Cơ thể sinh vật "đốt cháy" các sản phẩm dinh dưỡng bằng oxy, chuyển hóa chúng thành CO_2 và H_2O đồng thời sử dụng năng lượng được giải phóng ra để đáp ứng các nhu cầu hoạt động sống. Khi đó, hydro lại được giải phóng khỏi hợp chất

hữu cơ và kết hợp với oxy kèm theo sự tỏa năng lượng. Những biến đổi dị hóa (phân hủy) này có kèm theo sự giải phóng năng lượng được tiến hành trong tế bào sống với sự tham gia của những hệ enzym đặc biệt chính là các quá trình oxy hóa-khử sinh học.

Toàn bộ những điều vừa trình bày trên đây có thể minh họa bằng sơ đồ sau :



Các chất thành phần chủ yếu của sản phẩm dinh dưỡng là glucit, lipid và protein đều bị oxy hóa trong cơ thể. Lipit và glucit đi vào cơ thể bị "đốt cháy" sẽ sinh ra CO_2 và H_2O , còn protein (axitamin, amin) khi bị oxy hóa sẽ tạo ra CO_2 , H_2O và amoniac, chất này tác dụng với CO_2 chuyển thành cacbamit (ure).

Các quá trình oxy hóa-khử sinh học thuộc các phản ứng dị hóa không những chỉ là nguồn năng lượng quan trọng dùng để thực hiện các phản ứng tổng hợp khác nhau, mà còn là nguồn cung cấp các hợp chất trung gian dùng làm nguyên liệu cho các phản ứng tổng hợp và đóng vai trò hết sức quan trọng trong việc liên hợp các quá trình trao đổi chất.

Nguyên liệu dùng để chế biến lương thực, thực phẩm thường là các cơ thể sống hoặc các mô sống và các tác nhân chuyển hóa trong một số ngành thực phẩm như công nghiệp lên men chẳng hạn lại là vi sinh vật, vì vậy, trong lĩnh vực công nghiệp thực phẩm các quá trình oxy hóa-khử sinh học có một ý nghĩa đặc biệt quan trọng.

Trong khi chế biến thực phẩm, nhiều quá trình oxy hóa-khử sinh học tạo ra các sản phẩm có màu sắc đẹp, vị ngon, hương thơm làm cho phẩm vật thực phẩm có tính chất đặc trưng riêng hoặc làm tăng giá trị cảm quan và tiêu dùng của thành phẩm.

Ví dụ như cùng một thứ lá chè, nhờ sự khống chế và lợi dụng tài tình hệ enzym polyphenoloxylaza của bản thân nguyên liệu mà người ta tạo ra được chè xanh, chè đen, chè đỏ, chè vàng, ... có hương vị và sắc nước khác nhau. Enzym polyphenoloxylaza xúc tác sự oxy hóa các polyphenol (pirocatechin, pirogalol, hydrokinon,...) của lá chè tạo thành các octokinon tương ứng. Các octokinon này trong những điều kiện xác định có thể trùng hợp với các chất khác như axitamin, amin, ... tạo nên sản phẩm có màu đỏ, màu nâu, ... Cho nên khi lợi dụng hoạt động của hệ enzym polyphenoloxylaza đến mức tối đa, người ta đã sản xuất ra chè đen, hoặc khi khống chế hoàn toàn tác dụng của nó bằng cách hấp chè bằng hơi nóng (95 - 100°C) để làm vô hoạt enzym, người ta sản xuất được chè xanh.

Trong sản xuất cacao, thuốc lá người ta cũng lợi dụng hoạt động của hệ enzim này. Màu vàng sẫm hoặc nâu của thuốc cũng là do các sản phẩm oxy hóa của các polyphenol tự do có trong thuốc tạo nên khi lên men. Ngoài ra, trong kỹ nghệ chế biến thuốc lá, nhất là ở giai đoạn lên men, thành phần hóa học của thuốc (quyết định phẩm chất hương vị của thành phẩm) chịu nhiều biến đổi do các quá trình oxy hóa-khử sinh học gây nên như hàm lượng đường tan, axit hữu cơ, hàm lượng nicotin, tinh dầu,...

Theo quan điểm hóa học thì sự lên men là quá trình phân giải oxy hóa-khử đường do hệ enzim của các vi sinh vật tiến hành trong điều kiện yếm khí. Năng lượng giải phóng ra khi oxy hóa các chất đường cũng được dùng để tạo nên các hợp chất cao năng nhằm thỏa mãn nhu cầu về năng lượng của tế bào vi sinh vật. Tuy nhiên, phần lớn năng lượng được giải phóng lại tản xạ dưới dạng nhiệt năng. Về quan điểm năng lượng thì sự lên men và các quá trình phân giải yếm khí glucose là bất lợi, không kinh tế; bởi lẽ những sản phẩm cuối cùng của sự lên men còn tàng trữ trong phân tử một thế năng lớn. Cho nên, muốn cung cấp đủ năng lượng cho hoạt động sống, vi sinh vật phải phân giải một lượng lớn đường và do đó cũng tạo nên một lượng lớn sản phẩm cuối cùng. Người ta đã lợi dụng điều này để sản xuất rượu, bia, cón, nước giải khát có rượu, dấm, axit thực phẩm, ... Vì vậy có thể nói rằng các phản ứng oxy hóa-khử sinh học là cơ sở của ngành công nghiệp lên men.

Quá trình hô hấp hay là quá trình phân giải oxy hóa-khử các chất dinh dưỡng ở cơ thể sinh vật trong điều kiện hiếu khí cũng có tầm quan trọng đặc biệt đối với kỹ nghệ bảo quản và chế biến lương thực, thực phẩm.

Gluxit là nguyên liệu chính của sự hô hấp. Ở rau quả, củ, hạt và các sản phẩm giàu gluxit có nguồn gốc thực vật khác nhau, trong thời gian bảo quản thường xảy ra quá trình hô hấp. Quá trình phân giải oxy hóa-khử sinh học này thường làm giảm trọng lượng khô của nguyên liệu, gây hao hụt sản phẩm, làm thay đổi thành phần không khí xung quanh (thải ra CO_2 và hấp thụ O_2), gây nên sự thoát nước làm cho độ ẩm tăng lên và tỏa ra một lượng nhiệt lớn khi hô hấp mạnh làm cho nhiệt độ của khối sản phẩm (hạt, rau, quả) tăng nhanh, có thể dẫn đến hiện tượng tự đốt nóng... Vì thế, trong những trường hợp cụ thể người ta phải tìm biện pháp hữu hiệu nhất để ngăn ngừa tới mức tối đa các quá trình oxy hóa-khử bất lợi đó. Có nghĩa là làm giảm tới mức tối đa có thể được cường độ hô hấp của hạt, rau, quả trong khi bảo quản.

Nhiều phản ứng oxy hóa-khử tiến hành dưới tác dụng của oxy không khí và các enzim oxy hóa-khử của bản thân nguyên liệu hoặc của vi sinh vật ngoại lai làm mất màu tự nhiên, gây tổn thất vitamin, nhất là vitamin C, cũng như các carotenoid - tiền vitamin A - của sản phẩm thực phẩm. Ví dụ, bột (gạo, mì, khoai, sắn) bị thâm đen do sự oxy hóa axit amin tirozin tạo thành hợp chất màu đen melanin dưới tác dụng của enzim tirozinaza. Vitamin C (axit ascorbic) dễ bị oxy hóa bởi enzim ascorbatoxydaza khi có oxy không khí, làm cho phẩm chất rau quả bảo quản kém đi. Các axit béo chưa no có trong dầu thực vật dưới tác dụng của enzim lipoxydaza bị oxy hóa thành hydro peroxit. Các hydro peroxit tạo thành có khả năng oxy hóa cao, chúng có thể oxy hóa những phần mới của axit béo chưa no cũng như các

carotenoit, axitamin, clorofil, axit ascorbic,... gây nên sự ôi hỏng thực phẩm. Phản ứng oxy hóa các hợp chất polyphenol được lợi dụng tài tình trong kỹ nghệ chế biến chè, thuốc lá, cacao,... lại là phản ứng bất lợi trong công nghiệp đồ hộp rau quả. Phản ứng oxy hóa polyphenol (xảy ra mãnh liệt khi rau quả bị dập nát, cắt, thái,...) làm cho phẩm vật thực phẩm mất màu sắc tự nhiên, giảm giá trị cảm quan.

Để ngăn ngừa các quá trình bất lợi trên đây, bảo vệ được màu sắc tự nhiên và phẩm chất của thực phẩm, người ta tìm các biện pháp kỹ thuật khống chế như sau :

- Rút ngắn thời gian chế biến để giảm thời gian của các phản ứng oxy hóa và nhanh chóng làm vô hoạt enzym oxy hóa - khử ;
- Loại trừ oxy không khí ;
- Bảo quản nguyên liệu và bán thành phẩm ở nhiệt độ thấp ;
- Dùng các chất chống oxy hóa,v.v.

Tóm lại, như đã trình bày ở trên, đối với cơ thể sinh vật, các phản ứng oxy hóa-khử sinh học có ý nghĩa quan trọng bậc nhất trong sự trao đổi chất cũng như trao đổi năng lượng.

Riêng đối với công nghiệp thực phẩm, các phản ứng oxy hóa-khử sinh học có thể có lợi hoặc bất lợi tùy theo mục đích cụ thể, đối tượng bảo quản và chế biến. Điểm quan trọng ở đây là sự khám phá và hiểu biết sâu sắc về cơ chế của các phản ứng oxy hóa sinh học đã cho phép con người điều khiển được chúng vào những mục đích mong muốn.

II.2.2. Cơ chế của quá trình oxy hóa - khử sinh học

II.2.2.1. Các thuyết oxy hóa sinh học cổ điển

Từ lâu các nhà khoa học đã quan tâm tới vấn đề bản chất của sự oxy hóa sinh học. Ngay từ thế kỷ XVIII Lavoisier đã chỉ rằng trong sự hô hấp cũng như sự cháy, oxy không khí oxy hóa các chất của cơ thể tạo thành nước và khí cacbonic. Ông khẳng định : "Sự hô hấp - đó là sự cháy chậm và hoàn toàn giống như là sự cháy của than". Lịch sử của vấn đề oxy hóa sinh học bắt đầu từ đây, nghĩa là từ khi Lavoisier sáng lập ra học thuyết về sự cháy và hô hấp (1774 - 1777). Ở thời kỳ này người ta xem sự oxy hóa sinh học và sự cháy thông thường là một. Song, việc nghiên cứu các loại quá trình oxy hóa khác nhau sau này cho thấy là Lavoisier chỉ đúng khi đánh giá toàn bộ quá trình. Thực ra về bản chất thì sự oxy hóa chậm các chất hữu cơ trong cơ thể khác xa với sự cháy thông thường, mặc dù các sản phẩm chuyển hóa cuối cùng của cả hai hiện tượng trên đều là nước và CO_2 .

Tuy nhiên, việc sáng lập ra học thuyết hô hấp dựa trên quan niệm về sự oxy hóa các chất của cơ thể bằng oxy không khí của ông đã mở đầu cho phương thức hóa học và tạo tiền đề cho việc nghiên cứu bản chất các quá trình oxy hóa sinh học.

Từ đó cho đến nay, một loạt các học thuyết oxy hóa sinh học lần lượt ra đời.

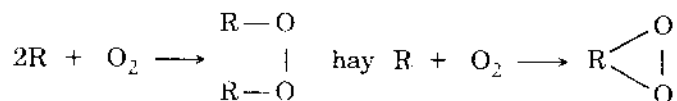
Những quan niệm đầu tiên về sự oxy hóa sinh học (trong suốt thế kỷ XIX) được xây dựng trên nền tảng của thuyết hoạt hóa oxy xem đó là điều kiện cơ bản

để thực hiện các phản ứng oxy hóa trong cơ thể sinh vật. Tiếp sau đó, thời kỳ thống trị của các thuyết hoạt hóa oxy được thay thế bằng thời kỳ phát triển và hưng thịnh của các thuyết hoạt hóa hydro và những ý định hợp nhất các học thuyết khác biệt đó lại. Cuối cùng là thời kỳ phát triển của những quan niệm hiện đại dựa trên việc xác nhận các quá trình oxy hóa cơ chất rất phức tạp, đa giai đoạn, có tổ chức cao, tồn tại trong tế bào sống với các loại cơ chế xúc tác khác nhau thực hiện cả hoạt hóa oxy lẫn hoạt hóa hydro và sáng lập ra giản đồ oxy hóa cuối cùng. Trong các thuyết hoạt hóa oxy và hoạt hóa hydro thì thuyết peroxyt của Bach và thuyết khử hydro của Palladin - Wieland là có ý nghĩa hơn cả.

a) Thuyết peroxyt của Bach

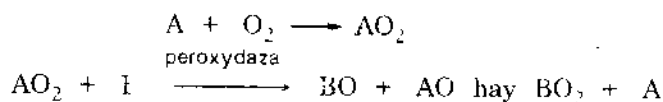
Cuối thế kỷ XIX Bach đã sáng lập ra học thuyết oxy hóa sinh học được gọi là thuyết peroxyt dựa trên quan niệm về hoạt hóa xúc tác oxy.

Theo Bach, sự oxy hóa là sự kết hợp oxy phân tử vào chất bị oxy hóa để tạo ra peroxyt, khi đó oxy phân tử ($O = O$) tham gia vào phản ứng ở dạng nhóm $-O-O-$:



Peroxyt được tạo thành bằng cách đó có chứa một nửa oxy kết hợp ở trạng thái "hoạt động" được xem như là chất mang oxy hoạt hóa. Oxy này sẽ oxy hóa các chất khác. Bach cho rằng tế bào sống thích ứng được với peroxyt là do nó có khả năng phân giải peroxyt hoạt hóa chúng và sử dụng oxy của chúng để oxy hóa các chất khó oxy hóa hơn. Cả hai quá trình này đều là các quá trình xúc tác và được tiến hành dưới ảnh hưởng của các enzym đặc biệt là calataza và peroxydaza.

Quá trình oxy hóa sinh học theo thuyết Bach có thể biểu diễn bằng sơ đồ sau :



trong đó A - chất dễ bị oxy hóa ;

B - chất khó oxy hóa.

Bach cũng đã đặt nền móng cho khái niệm về sự tồn tại các enzym xúc tác việc kết hợp oxy vào cơ chất. Các enzym này gọi là oxydaza. Ông cùng nhiều nhà nghiên cứu khác đã chứng minh được sự có mặt của oxydaza trong dịch chiết không có tế bào.

Như vậy là theo thuyết của Bach thì sự tạo thành peroxyt hữu cơ có ý nghĩa quyết định đối với quá trình oxy hóa sinh học. Khả năng sử dụng các hợp chất oxy hóa trong cơ thể khi hô hấp, không đòi hỏi năng lượng bên ngoài được thực hiện nhờ các hệ xúc tác sau :

- Các enzym hoạt hóa oxy phân tử - oxydaza ;
- Các hợp chất hữu cơ không no có khả năng tạo thành peroxyt kém bền khi tự oxy hóa bởi oxy phân tử - oxygenaza;

- Các enzym xúc tác sự oxy hóa nhờ oxy hoạt động của peroxyt - peroxydaza.

Thuyết peroxyt của Bach về bản chất là học thuyết hóa sinh thật sự đầu tiên. Theo thuyết này thì sự oxy hóa sinh học không phải là một quá trình đơn độc mà là kết quả của hai quá trình enzym phối hợp xảy ra tuần tự.

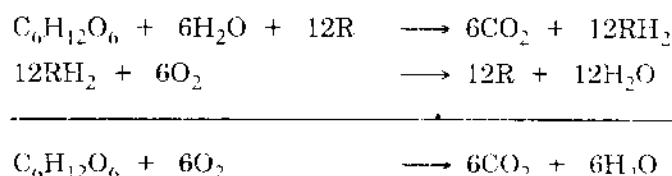
Tuy rằng ý nghĩa của thuyết peroxyt bị hạn chế ở chỗ chỉ giải thích được cơ chế một số quá trình oxy hóa-khử trong thực vật, song nghiên cứu về cơ chế oxy hóa peroxyt cho đến nay vẫn không kém phần quan trọng. Những thành tựu hóa lý mới nhất và những số liệu gần đây nhất đều cho thấy rằng cơ chế peroxyt ở các giai đoạn đầu của sự oxy hóa là cơ sở của một loạt các phản ứng khác nhau như phản ứng oxy hóa các hợp chất vô cơ, hydrocacbon, rượu, aldehyt, các chất thơm, v.v.

b) Thuyết khử hydro của Palladin - Wieland

Năm 1914, Palladin đã đưa ra một quan niệm mới có ý nghĩa rất lớn đối với sự hình thành và phát triển các quan niệm hiện đại về sự oxy hóa sinh học. Theo ông, giai đoạn đầu của sự oxy hóa chất hữu cơ là sự loại hydro và quá trình hô hấp được thực hiện nhờ các tác nhân trung gian đặc hiệu có khả năng oxy hóa-khử thuận nghịch. Palladin gọi các chất này là các chất sinh màu hô hấp. Các chất loại này rất phổ biến trong thực vật.

Khi bị oxy hóa (bị tách mất hydro) chất sinh màu hô hấp (không màu) chuyển thành chất màu hô hấp (có màu). Chất màu hô hấp bị khử (kết hợp với hydro) lại thành chất sinh màu hô hấp. Như vậy là những chuyển hóa oxy hóa-khử các chất sinh màu hô hấp trong tế bào sống được tiến hành bằng cách tách và kết hợp hydro vào chúng. Vai trò của các chất màu hô hấp trong quá trình oxy hóa là chiếm lấy hydro của cơ chất, chúng không phải là chất chuyển oxy mà là chất chuyển hydro và toàn bộ quá trình oxy hóa không phải là quá trình chuyển oxy đến cơ chất mà là chuyển hydro từ chất bị oxy hóa đến oxy phân tử hoạt động hay oxy của peroxyt. Trong tế bào, chất màu hô hấp đóng vai trò chất nhận hydro, còn chất sinh màu hô hấp là chất nhận oxy. Sự tạo thành nước được xem như là giai đoạn cuối cùng của quá trình.

Palladin biểu diễn sự oxy hóa sinh học do các enzym oxydaza xúc tác như sau :



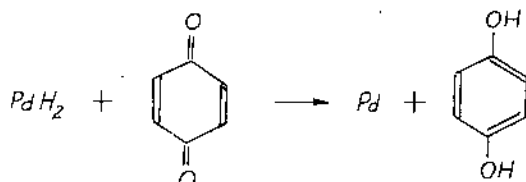
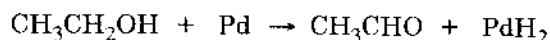
trong đó R - biểu thị chất màu hô hấp;

RH_2 - chất sinh màu hô hấp.

Palladin xếp hợp chất phenol vào nhóm chất sinh màu hô hấp và nhấn mạnh rằng các hợp chất khác cũng có thể làm chức năng của chất sinh màu hô hấp.

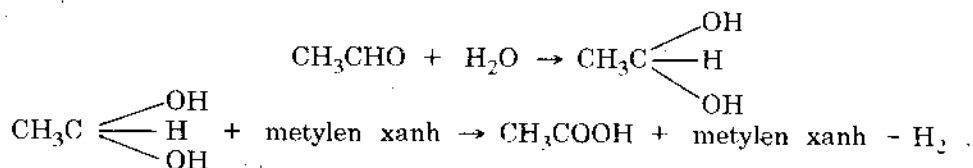
Hiện nay người ta đã chứng minh được sự tồn tại của nhiều loại phenol khác nhau cũng như tìm ra nhiều hệ chất đóng vai trò các chất xúc tác hô hấp trung gian. Ngoài polyphenol oxydaza ra còn có nhiều chất làm chức năng này như các dehydrogenaza kỵ khí và coezim của chúng : nicotinamitadeninđinucleotit (NAD), nicotinamitadeninđinucleotit phosphat (NADP), v.v.

Quan niệm hoạt hóa hydro của Palladin được Wieland hoàn thiện về mọi mặt. Wieland đã phát triển và cụ thể hóa quan niệm này bằng các thí nghiệm mẫu (mô hình hóa). Ông đã thu được axetaldehit từ rượu etylic trong điều kiện yếm khí ở nhiệt độ thường khi có paladi xúc tác và quinon hoặc metylen xanh làm chất nhận hydro và ông giả thiết cơ chế tạo thành axetaldehit như sau :



Nghiên cứu này của Wieland có ý nghĩa quan trọng về nguyên lý cho ta thấy rằng khi oxy hóa một số chất hữu cơ có thể không cần oxy không khí và sự oxy hóa có thể xảy ra nhờ sự khử hydro của cơ chất.

Ý nghĩa quan trọng các công trình của Wieland còn ở chỗ ông chỉ rõ vai trò của nước trong các quá trình oxy hóa. Theo tác giả, khi oxy hóa nhiều chất trong đó có axetaldehit, nước được kết hợp vào cơ chất tạo thành hydrat sau đó chất này bị khử hydro (nghĩa là bị oxy hóa) khi có mặt chất nhận hydro như metylen xanh chẳng hạn, trong trường hợp này oxy của nước tham gia vào phản ứng oxy hóa :



Các thí nghiệm của Thunberg, Battelli và Stern cùng nhiều tác giả khác tiến hành với mục đích xác minh thuyết hoạt hóa hydro đã đưa đến sự phát minh ra các dehydrogenaza.

Trong khi Wieland phủ nhận vai trò hoạt hóa oxy và cho bản chất của phản ứng oxy hóa-khử chỉ là phản ứng khử hydro thì Warburg có quan điểm hoàn toàn ngược lại. Theo ông, hoạt hóa oxy là điều kiện cơ bản và cần thiết của quá trình oxy hóa, không có hoạt hóa sơ bộ oxy thì các phản ứng oxy hóa chất hữu cơ bằng oxy phân tử không thể thực hiện được. Trên cơ sở các dẫn liệu thực nghiệm về kim hãm oxy hóa bằng các muối xianua và cacbon oxyt cũng như các chất tạo phức với kim loại (các chất này không ảnh hưởng đến sự hoạt hóa hydro), Warburg đã đi đến kết luận rằng trong cơ thể phải có enzym hoạt hóa oxy và oxy được hoạt hóa sẽ oxy hóa cơ chất mà không cần hoạt hóa cơ chất. Ông gọi các enzym loại metaloprotein này là "enzim hô hấp". Hiện nay "enzim hô hấp" của ông có tên là xitocromoxydaza.

II.2.2.2. Quan niệm hiện đại về cơ chế quá trình oxy hóa - khử sinh học

Các loại phản ứng oxy hóa - khử

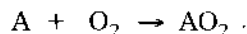
Theo các quan niệm hiện đại, quá trình mất electron hoặc hydro của phân tử chất nào đó gọi là sự oxy hóa, quá trình ngược lại - nạp thêm electron hoặc hydro vào phân tử - gọi là sự khử.

Chất nhường electron và hydro (chất bị oxy hóa) gọi là *chất khử*. Chất nạp thêm electron và hydro (chất oxy hóa) gọi là *chất oxy hóa*.

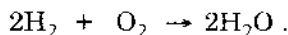
Sự oxy hóa và sự khử luôn luôn xảy ra đồng thời và liên hợp chặt chẽ với nhau thành một phản ứng oxy hóa-khử thống nhất. Các chất tham gia vào phản ứng này được gọi là hệ oxy hóa-khử (cấp chất cho và nhận electron hoặc hydro).

Các quá trình oxy hóa-khử có thể xảy ra theo một trong những cách sau đây.

a) *Kết hợp (gắn) trực tiếp oxy vào cơ chất bị oxy hóa và tạo ra sản phẩm oxy hóa*

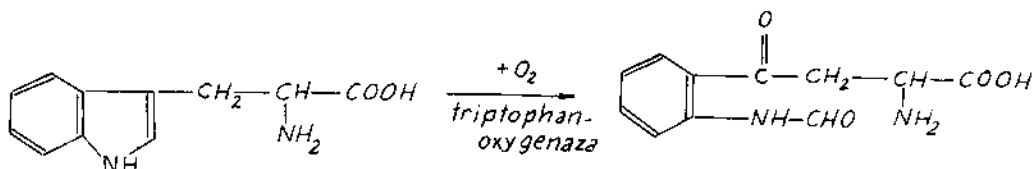


Ví dụ, trong quá trình tạo thành nước, hydro nhường điện tử cho oxy và bị oxy hóa, còn oxy nhận electron và bị khử



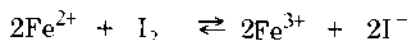
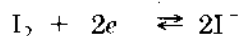
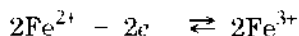
Phản ứng oxy hóa-khử kiểu này khá quan trọng đối với tế bào và thường do các enzym "oxygenaza" (theo Hayaishi) hay "transferaza oxy" (theo Mason) xúc tác. Các enzym này thuộc nhóm các enzym hoạt hóa oxy.

Phản ứng oxy hóa trực tiếp tryptophan dưới tác dụng của enzym tryptophanoxigenaza của vi khuẩn tạo ra formilkinurenin là một ví dụ điển hình của kiểu oxy hóa này :



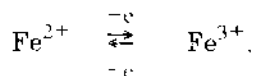
b) *Cho và nhận electron không cần có oxy tham gia*

Trong nhiều trường hợp phản ứng oxy hóa-khử có thể xảy ra bằng cách nhường và thu electron không cần có oxy tham gia. Ví dụ, trong phản ứng sau đây :



Sắt hóa trị hai (Fe^{2+}) là chất cho electron và bị oxy hóa thành sắt hóa trị ba (Fe^{3+}), còn iot là chất nhận electron và bị khử thành I^- .

Ở cơ thể sinh vật, các chuyển hóa oxy hóa-khử của hệ xitocrom thường xảy ra theo kiểu oxy hóa này. Fe trong hem các xitocrom có khả năng oxy hóa-khử thuận nghịch khi cho hoặc nhận electron và do vậy mà thay đổi hóa trị :

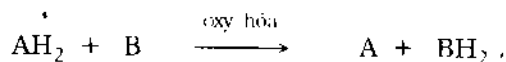


Nhờ tính chất này các xitocrom tham gia vào việc chuyển vận electron từ cơ chất đến oxy.

c) *Khử hydro hóa*

Nhiều phản ứng oxy hóa được thực hiện bằng cách tách hydro khỏi cơ chất,

nghĩa là khử hydro hóa. Chúng có thể biểu diễn ở dạng tổng quát sau :



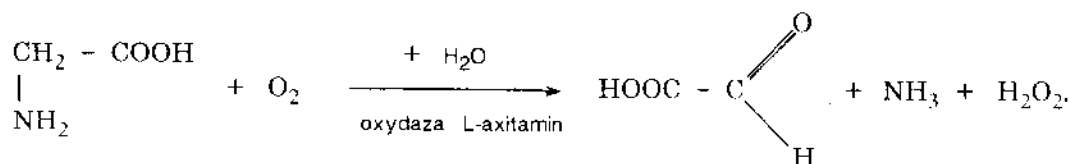
Ở đây cơ chất AH_2 nhường hydro cho chất nhận B và bị oxy hóa thành A , còn B bị khử thành BH_2 .

Đa số quá trình oxy hóa-khử trong tế bào sống thường xảy ra theo kiểu này. Phản ứng oxy hóa xảy ra thường kèm theo sự chuyển không những chỉ có electron mà cả proton nữa. Electron và proton đều được chuyển sang chất tiếp nhận.

Chất nhận hydro ở đây có thể là oxy hoặc chất tiếp nhận khác.

Các phản ứng khử hydro trong đó oxy là chất nhận trực tiếp do các dehydrogenaza hiệu khí hay là các oxydaza (cơ chất : O_2 - oxydoreductaza) xúc tác.

Ví dụ, sự oxy hóa axitamin tự nhiên dưới tác dụng của oxydaza của *L*-axitamin :

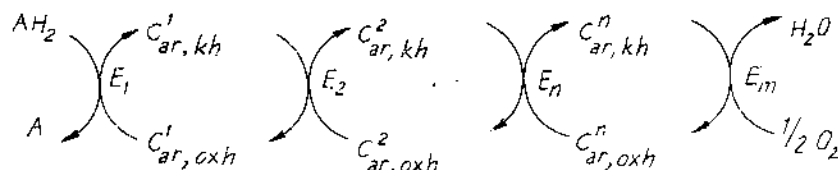
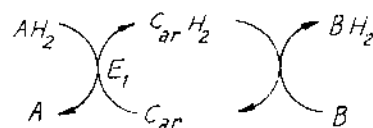


Các phản ứng oxy hóa cơ chất bằng oxy phân tử gồm một giai đoạn do một enzym xúc tác để tạo thành hydro peroxyt kiểu như thế này thường ít gặp.

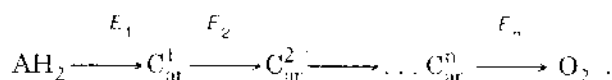
Phần lớn các quá trình oxy hóa-khử sinh học được tiến hành bằng cách khử hydro với sự tham gia của một hay nhiều chất chuyển hydro ($C_{ar}^I, C_{ar}^{I'}, C_{ar}^{II}, \dots$) trung gian. Các phản ứng này do các dehydrogenaza chứa coenzim (cơ chất : chất nhận - oxydoreductaza) xúc tác. Thứ tự các chuyển hóa xảy ra có thể biểu diễn như hình bên.

Từ đây ta thấy rõ một cách hiển nhiên là chất tiếp nhận hydro thứ nhất ($C_{ar}^{I'}$) được dehydrogenaza thứ nhất (E_1) khử đến $C_{ar}^{I'} - H_2$ có thể làm cơ chất cho một enzym thứ hai nào đó. Và như vậy là khi có một số các chất chuyển trung gian tương tự hoạt động nối tiếp nhau thì có thể tạo thành một chuỗi được gọi là *chuỗi hô*

hấp hay *chuỗi (hệ) chuyển electron*. Chuỗi này đứng giữa cơ chất, dehydrogenaza đầu tiên của nó và chất nhận hydro (hay electron) cuối cùng. Trong điều kiện hiệu khí thì oxy phân tử là chất nhận hydro cuối cùng. Quá trình chuyển hóa phức tạp này có thể biểu diễn bằng sơ đồ sau :



hay là

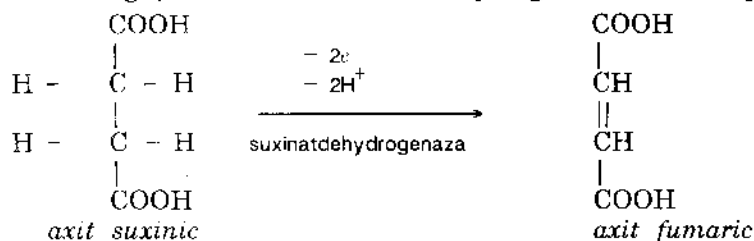


Ở ti thể, giữa flavin và chất nhận cuối cùng là O_2 có các chất chuyển trung

coenzim Q, các xitocrom, Fe phihem, Cu và xitocromoxydaza là mắt xích cuối cùng của chuỗi.

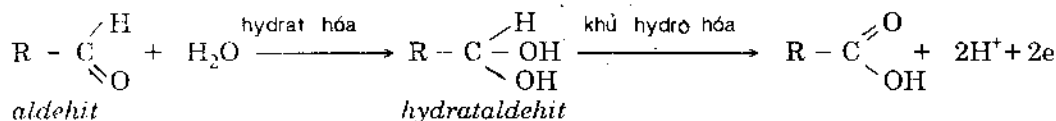
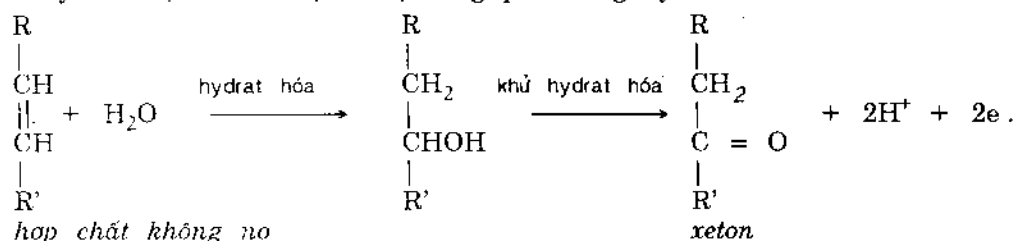
Nhiều công trình nghiên cứu (chủ yếu là của Thunberg và Keilin) đã chỉ rõ rằng các tế bào sống và dịch chiết của chúng có khả năng thực hiện khử hydro hóa sản phẩm trao đổi chất quan trọng như glucoza, lactat, suxinat, axitamin, ... hoặc ở điều kiện yếm khí (khi có các chất nhận electron nhân tạo như metylen xanh) hoặc ở điều kiện hiếu khí (khi có oxy).

Sự oxy hóa axit suxinic thành axit fumaric là một minh họa cụ thể cho quá trình oxy hóa-khử phức tạp kiểu này. Hai ion hydro và hai electron tách ra từ cơ chất (axit suxinic) đều được chuyển sang flavin là chất nhận hydro và electron, đóng vai trò nhóm ngoại của enzym suxinatdehydrogenaza xúc tác phản ứng này :



Sau đó, electron được chuyển sang hệ xitocrom và cuối cùng là oxy.

Trong một số lớn phản ứng oxy hóa sinh học, chất bị oxy hóa thường được hydrat hóa sơ bộ để làm tăng khả năng oxy hóa (mất hydro), nói cách khác phản ứng khử hydro được chuẩn bị sơ bộ bằng phản ứng hydrat hóa :



Sự chuyển hóa axit fumaric ta sẽ nghiên cứu ở phần sau cũng thuộc kiểu này.

Như vậy là trong tế bào sống xảy ra cả ba kiểu oxy hóa-khử đã trình bày trên đây. Các quá trình này liên quan khăng khít với nhau. Kiểu oxy hóa thứ nhất ít gặp. Kiểu oxy hóa thứ hai và thứ ba xảy ra khá dễ dàng và nhiều khi không cần có sự tham gia trực tiếp của oxy không khí.

Thế oxy hóa-khử

Trong mọi trường hợp việc chuyển electron chỉ có thể thực hiện được khi trong tế bào cơ chất có khả năng thu nhận electron, nghĩa là có ái lực đối với electron. Trong phản ứng oxy hóa-khử, các chất tham gia phản ứng có ái lực đối với electron khác nhau. Chất nào có ái lực đối với electron lớn hơn thì chất đó là chất nhận. Người ta đo ái lực đối với electron cho từng chất trong máy đo điện thế với điện cực chuẩn hydro có điện thế bằng không. Đại lượng này phản ánh khả năng thu hay nhường electron tức là khả năng oxy hóa-khử của chất và được gọi là thế oxy hóa - khử.

Dại lượng thế oxy hóa - khử chỉ rõ chiều chuyển vận electron. Các chất có điện thế âm chỉ có thể khử các chất có điện thế dương. Đối với mỗi chất có khả năng tạo nên một hệ oxy hóa - khử sẽ tồn tại hai dạng : dạng oxy hóa và dạng khử trong dung dịch. Thế oxy hóa - khử có thể tính được theo phương trình sau :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{dạng oxy hóa}]}{[\text{dạng khử}]}$$

trong đó E - thế oxy hóa-khử của một chất nhất định trong những điều kiện xác định ;

E_0 - thế oxy hóa-khử ở các điều kiện tiêu chuẩn (nồng độ của hai dạng bằng nhau) ;

R - hằng số khí, $R = 1,98 \text{ cal/mol}^\circ\text{C}$;

T - nhiệt độ tuyệt đối, $^\circ\text{K}$;

n - số electron được di chuyển ;

F - hằng số Faraday, $F = 95\,000 \text{ C/phân tử gam}$ hay $23,066 \text{ kcal/mol}$.

Dưới đây là thế oxy hóa-khử tiêu chuẩn của một số hệ oxy hóa-khử sinh học (ở pH = 7,0 thế năng chuẩn ký hiệu là E_0) đo được bằng thực nghiệm.

Bảng 2.1. Thế oxy hóa - khử tiêu chuẩn của một số hệ oxy hóa - khử sinh học

Hệ oxy hóa - khử	E_0 , V	ΔE_0 , V	ΔG_0 , Kcal	Phosphoryl hóa ADP→ATP
Điện cực hydro $2\text{H}^+/\text{H}_2$	- 0,420			
$\text{NADP}^+/\text{NADPH} + \text{H}^+$	- 0,324			
$\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$	- 0,320			
Oxalacetat/ β -oxybutirat	- 0,282			
Riboflavin oxy hóa/riboflavin khử	- 0,208			
Piruvat/lactat	- 0,185			
Oxalacetat/malat	- 0,160			
$\text{FAD}^+/\text{FADH}_2$	- 0,100	+0,22	- 10,1	1
Axetaldehyt/etanol	- 0,090			
Xitocrom b ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)	+ 0,040	+0,14	- 6,4	
Fumarat/suxinat	+ 0,020			
Co Q oxy hóa/Co Q khử	+ 0,122	+0,082		
Dehydroascorbat/ascorbat	+ 0,139			
Xitocrom c_1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)	+ 0,230	+0,19	- 8,7	1
Xityocrom c ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)	+ 0,260	+0,03		
Xitocrom a ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)	+ 0,290	+0,03		
$\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$	+ 0,300			
<i>o</i> -Quinon/diphenol	+ 0,350			
Xitocrom a_3 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)	+ 0,550	+0,26	- 12,0	1
Điện cực oxy $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{O}^{2-}$	+ 0,810	+0,26	- 12,0	

Trong tế bào sống, oxy có thế oxy hóa-khử cực lớn, nhờ vậy mà nó là chất oxy hóa vạn năng, còn vai trò chất cho electron thuộc về phân tử các hợp chất hữu cơ

khác nhau. Tuy nhiên, electron không trực tiếp chuyển tới ngay oxy mà được chuyển qua một chuỗi phức tạp nhiều mắt xích bao gồm các hệ oxy hóa-khử có thế oxy hóa - khử nằm ở khoảng giữa thế oxy hóa - khử của cơ chất và của oxy. Các hệ này tuần tự chuyển electron về phía oxy và đồng thời bị biến đổi oxy hóa-khử thuận nghịch.

Thế oxy hóa-khử còn có thể dùng để tính năng lượng tự do (ΔG) được giải phóng ra trong quá trình oxy hóa - khử bằng phương trình sau :

$$\Delta G = -nF\Delta E ,$$

n - số điện tử được chuyển đi ;

F - hằng số Faraday, $F = 23,066$ kcal/mol ;

ΔE - hiệu thế oxy hóa - khử của hai hệ.

Ví dụ, khi oxy hóa NAD.H_2 bằng oxy không khí nhờ chuỗi hô hấp thì năng lượng tự do được giải phóng ra sẽ là :

$$\Delta G \approx -2.23,066(0,82 + 0,32) \approx -53 \text{ kcal/mol} .$$

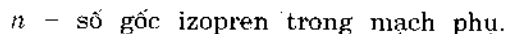
Chuỗi hô hấp

Ngay từ những năm đầu của thế kỷ này, cơ chế các quá trình oxy hóa sinh học được nghiên cứu rất mạnh.

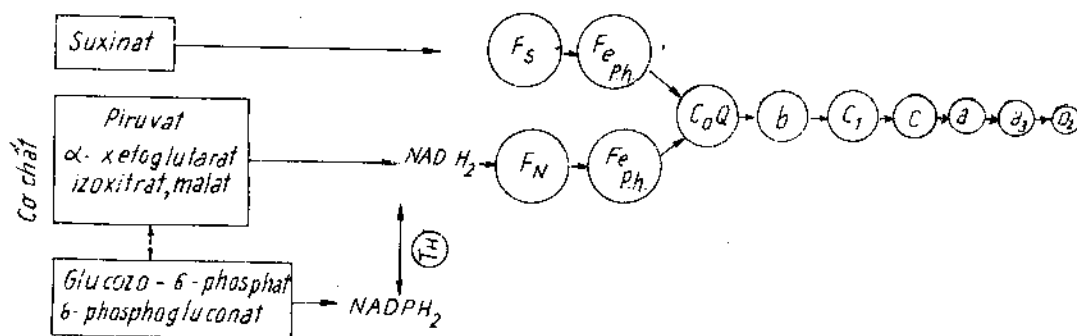
Người ta nhận thấy rằng đa số các quá trình oxy hóa sinh học là quá trình tách hydro khỏi cơ chất và trong mọi trường hợp sự nhường electron thường xảy ra đồng thời với sự nhường hydro. Vì thế mà sự chuyển vận hydro được đánh giá như là sự chuyển vận electron (nguyên tử hydro gồm ion hydro và electron gắn với nó : $\text{H}^+ + e = \text{H}$) và sự chuyển vận electron được xem như là cơ sở của các quá trình oxy hóa sinh học, bởi lẽ electron là những phần tử mang năng lượng. Sự tách hydro khỏi cơ chất do các enzym dehydrogenaza xúc tác. Trong đa số trường hợp, hydro và electron không được chuyển trực tiếp cho oxy không khí mà chúng phải qua một chuỗi nhiều mắt xích gồm các hệ enzym oxy hóa-khử (hệ các chất chuyển hydro và electron) có thế oxy hóa-khử nằm ở khoảng giữa thế năng của các hợp chất hữu cơ và thế năng của oxy. Các hệ enzym đặc biệt này được bố trí theo trật tự tăng dần về thế oxy hóa-khử và tạo thành một chuỗi gọi là *chuỗi hô hấp* hay *chuỗi chuyển electron*. Nhiệm vụ của chuỗi hô hấp là oxy hóa từng bậc hydro của cơ chất đến H_2O .

Người ta qui ước chia chuỗi hô hấp ra phần chuyển vận hydro và phần chuyển vận electron. Các cấu tử của chuỗi hô hấp khu trú trên màng trong của ti thể. Nếu chất cho hydro là NADP.H_2 thì chuỗi hô hấp bắt đầu từ transhydrogenaza (ký hiệu là T_{11}). Nếu chất cho hydro là NAD.H_2 thì chuỗi hô hấp bắt đầu từ NAD.H_2 dehydrogenaza (ký hiệu là F_N), còn cơ chất là suxinat thì chuỗi hô hấp đi từ suxinat-dehydrogenaza (ký hiệu là F_s). Tiếp sau các cấu tử đó là hệ xitocrom gồm các xitocrom b , c_1 , c và aa_3 (xitocromoxydaza). Gần đây người ta còn thấy trong thành phần của phức hợp xitocromoxydaza có Cu. Ngoài các chất chuyển hydro và electron trên đây, trong thành phần của chuỗi hô hấp còn có các chất khác nữa như ubiquinon (coenzim Q) và sắt phihem.

NADH₂ - ubikinon : reductaza



Sắt phihem - sắt không liên kết với pocphirin - ($\text{Fe}_{\text{p.h}}$) được tìm ra trong thời gian gần đây ở các đối tượng động vật và thực vật cũng tham gia vào việc chuyển vận electron. Một phần sắt phihem liên kết chặt chẽ với suxinatdehydrogenaza; một phần gắn với NAD.H_2 - dehydrogenaza, phần còn lại ở vị trí nào thì chưa rõ.



Hình 2.1

Bản chất hóa học, cơ chế tác dụng, vai trò và sự phân bố trong tự nhiên của các hệ enzym oxy hóa - khử cũng như cơ chế của sự oxy hóa từng bậc hydro đến

H₂O kèm theo việc giải thoát năng lượng sẽ trình bày chi tiết ở các phần tiếp sau.

II.2.3. Enzim oxy hóa - khử

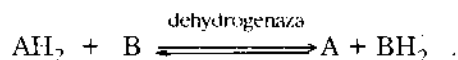
Quá trình oxy hóa các hợp chất hữu cơ ở cơ thể sinh vật do các hệ enzim oxy hóa-khử xúc tác. Các enzim này có tên gọi chung là oxydoreductaza. Ngoài các enzim thủy phân ra, nhóm enzim này có ý nghĩa to lớn đối với công nghiệp thực phẩm.

Như ta đã biết, oxy phân tử trong điều kiện sinh học hầu như không có khả năng oxy hóa cơ chất mà cần phải được hoạt hóa dưới tác dụng của các enzim đặc hiệu - các chất hoạt hóa oxy - oxydaza. Mặt khác, muốn cho hydro hoặc electron của cơ chất bị oxy hóa có thể chuyển sang oxy hoặc chất nhận khác cũng phải hoạt hóa chúng nhờ enzim đặc biệt - các chất hoạt hóa hydro - là dehydrogenaza và vận chuyển chúng nhờ các chất chuyển trung gian. Trong tế bào, các chất chuyển hydro (hoặc electron) này hoạt động như là một "cầu thang" chuyển hydro từ cơ chất tới oxy.

Như vậy là sự oxy hóa trong điều kiện sinh học được tiến hành với sự tham gia của các enzim hoạt hóa oxy, các enzim hoạt hóa hydro và các chất chuyển trung gian.

II.2.3.1. Các enzim hoạt hóa hydro (dehydrogenaza)

Đa số các phản ứng oxy hóa sinh học là phản ứng tách hydro khỏi cơ chất. Enzim xúc tác quá trình tách hydro gọi là dehydrogenaza. Sơ đồ cơ chế tác dụng của chúng có thể biểu diễn như sau :



Tất cả dehydrogenaza là các enzim lưỡng cấu tử - các proteit. Tính đặc hiệu của chúng do phần protein của enzim quyết định. Một codehydrogenaza có thể là cấu tử của nhiều hệ enzim dehydrogenaza khác nhau.

Theo bản chất của chất nhận hydro, người ta chia dehydrogenaza ra làm hai nhóm chính :

- các dehydrogenaza hiếu khí là những enzim có khả năng hoạt hóa hydro của cơ chất và chuyển nó trực tiếp cho oxy không khí ;
- các dehydrogenaza yếm khí là những enzim không có khả năng chuyển hydro trực tiếp cho oxy không khí mà chuyển hydro cho một chất chuyển trung gian nào đó.

Theo bản chất của nhóm ngoại, các dehydrogenaza được phân ra thành :

- dehydrogenaza piridin ;
- dehydrogenaza flavin.

Coenzim của các dehydrogenaza piridin là nicotinamitadeninucleotit (NAD) hoặc nicotinamitadeninucleotit phosphat (NADP). NAD và NADP còn có các tên gọi tương ứng là coenzim I, codehydrogenaza I và coenzim II, codehydrogenaza II. Các dehydrogenaza piridin thuộc nhóm enzim dehydrogenaza yếm khí.

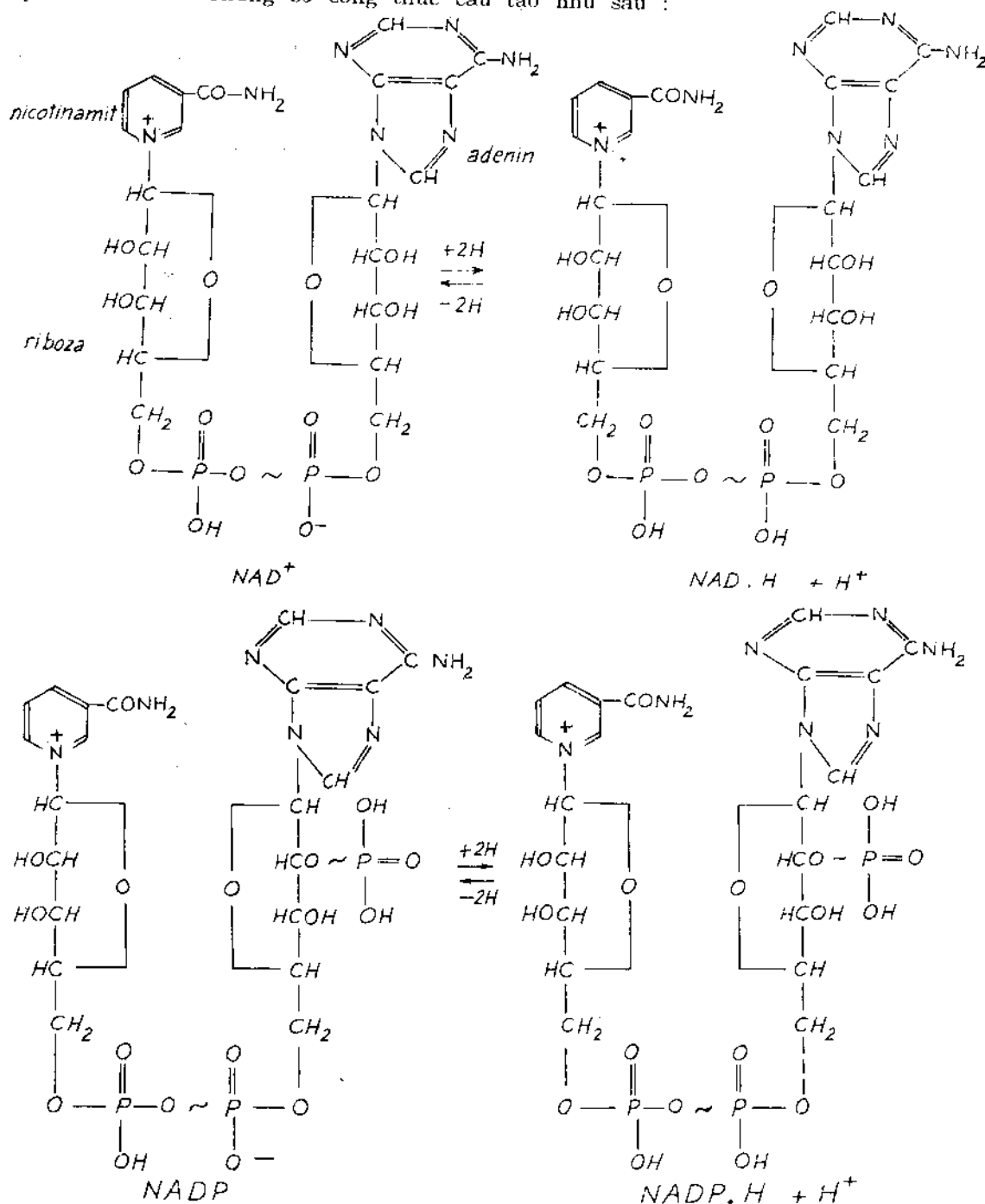
Nhóm ngoại của các dehydrogenaza flavin (flavoproteit) là flavinmononucleotit FMN hay flavinadeninucleotit FAD có riboflavin (vitamin B₂) trong thành phần.

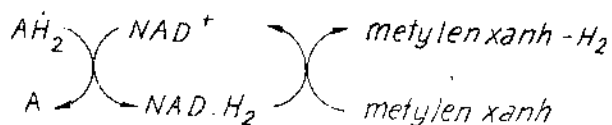
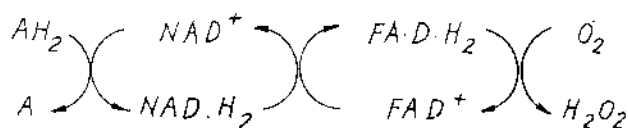
Một số enzym flavin là các chất chuyển trung gian (dehydrogenaza yếm khí), một số khác lại là dehydrogenaza hiếu khí hay là oxydaza flavin.

Dehydrogenaza rất phổ biến trong mô động vật, thực vật và vi sinh vật. Chúng tham gia vào các quá trình hô hấp hiếu khí và yếm khí. Hàm lượng của chúng trong các cơ thể khác nhau, thậm chí ngay trong mô và cơ quan khác nhau của một cơ thể cũng rất khác nhau.

Dehydrogenaza piridin

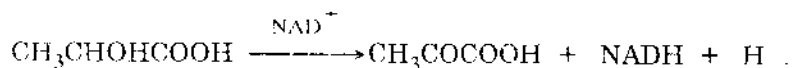
Trong tiến trình oxy hóa sinh học codehydrogenaza piridin là các chất tiếp nhận hydro đầu tiên. Chúng có công thức cấu tạo như sau :





Khi đó, một nguyên tử hydro (gồm 1H^+ và $1e$) dính vào nguyên tử cacbon trong vòng piridin của vitamin PP, còn electron thứ hai kết hợp với điện tích dương của nguyên tử nitơ. Proton thứ hai gắn vào nguyên tử oxy tích điện âm của gốc axit phosphoric. Các piridinnucleotit như này, đặc biệt là NAD.H_2 sau đó bị oxy hóa tuần tự trong chuỗi hô hấp bằng các enzym flavin. Hydro của NAD.H_2 và NADP.H_2 được hoạt hóa bằng enzym flavin có khả năng phản ứng hoặc với oxy hoặc với xitocrom c hay với metylen xanh.

Dehydrogenaza yếm khí oxy hóa các chất khác nhau: axit lactic, malic, izoxitric, glutamic, hexozaphosphat, rượu..., có nghĩa là các dehydrogenaza yếm khí hay dehydrogenaza piridin thường khử hydro (oxy hóa) của các chất có nhóm $-\text{CHOH}-$ thành chất có nhóm $-\text{CO}-$, ví dụ:



Người ta đã biết rõ có khoảng 200 enzym piridin. Đó là các enzym xúc tác sự oxy hóa - khử trong các quá trình lên men và hô hấp chẳng hạn như malat-dehydrogenaza, β - oxybutyratdehydrogenaza, izoxitratdehydrogenaza, glucoso - 6 - phosphatdehydrogenaza, α - glixerophosphatdehydrogenaza, alcoldehydrogenaza, glucozodehydrogenaza, formatdehydrogenaza, v.v.

Dehydrogenaza flavin

Nhóm dehydrogenaza flavin gồm có suxinatdehydrogenaza, NAD.H_2 -dehydrogenaza, nitratreductaza và nhiều enzym khác. Suxinatdehydrogenaza và NAD.H_2 -dehydrogenaza là hai cấu tử quan trọng của chuỗi hô hấp. Chúng đóng vai trò các chất chuyển hydro, suxinatdehydrogenaza xúc tác phản ứng tách hydro của suxinat và chuyển electron cho hệ xitocrom, còn NAD.H_2 -dehydrogenaza thì tiếp nhận hydro từ NAD.H_2 rồi sau đó cũng chuyển electron tiếp tục cho hệ xitocrom.

Do riboflavin có màu vàng và là nhóm ngoại của các enzym flavin nên các enzym này còn được gọi là các enzym "vàng" hay flavoprotein. Trong các flavin người ta phân biệt flavinadenindinucleotit (FAD) và flavinmononucleotit (FMN).

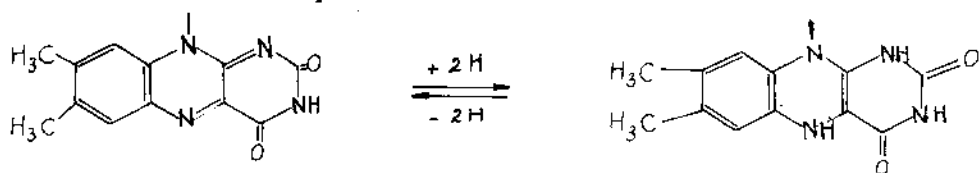
Đa số flavoprotein có chứa FAD và chỉ có một số nhỏ có FMN trong thành phần.

Dạng oxy hóa của flavin nhận electron và proton từ NAD.H_2 hay NADP.H_2 và

Cấu tạo của NADP cũng tương tự như NAD chỉ khác là trong thành phần có ba gốc axit phosphoric.

Khả năng của các dehydrogenaza kỵ khí bắt hydro khỏi một cơ chất nhất định phụ thuộc vào bản chất của protein enzym. Dưới tác dụng của dehydrogenaza yếm khí, hai nguyên tử hydro được chuyển từ cơ chất sang NAD hay NADP.

chuyển thành dạng khử (không màu), khi ấy xảy ra sự phân bố lại electron trong izoalloxazin :

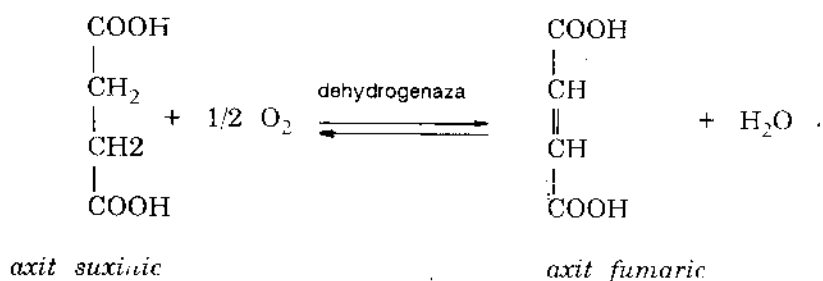


Ở ti thể, NAD.H_2 bị oxy hóa bởi NAD.H_2 - xitocrom c ; reductaza hay là NAD.H_2 - dehydrogenaza. Các enzym này đã tách được từ ti thể. Phức hợp NAD.H_2 -xitocrom c ; reductaza gồm có các cấu tử sau :

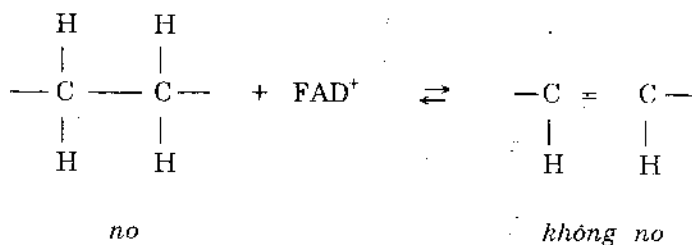
- NAD.H_2 -dehydrogenaza-flavoprotein (F_N) chứa FMN ;
- Xitocrom b và c_1 ;
- Ubikinon - coenzim Q ;
- Sắt phihem ($\text{Fe}_{p.h.}$).

Một số phản ứng do dehydrogenaza flavin xúc tác, chẳng hạn như phản ứng khử hydro của axetyl-coenzim A (sự β -oxy hóa axit béo) không những chỉ cần có nhóm ngoại của dehydrogenaza mà cần có cả flavoprotein thực hiện việc chuyển electron từ FAD.H_2 -dehydrogenaza sang hệ xitocrom. Vì thế flavoprotein này được gọi là flavoprotein chuyển vận electron hay flavin chuyển vận electron.

Flavoprotein có thể bỏ qua dehydrogenaza piridin (piridinnucleotit) mà tương tác trực tiếp với cơ chất hô hấp. Ví dụ như suxinatdehydrogenaza oxy hóa trực tiếp suxinat, bằng cách chiếm lấy hydro của nó rồi chuyển cho hệ xitocrom và oxy không khí. Phức hợp enzym xúc tác sự oxy hóa axit suxinic bao gồm : suxinatdehydrogenaza (có nhóm ngoại là FAD), xitocrom c_1 , b , c , ubikinon, Fe phihem và xitocromoxydaza. Cơ chế tác dụng của suxinatdehydrogenaza do Keilin tìm ra. Ông cho thấy enzym này khử xitocrom khi có mặt suxinat ; xitocrom khử tới lượt mình lại bị oxy hóa bởi xitocromoxydaza.

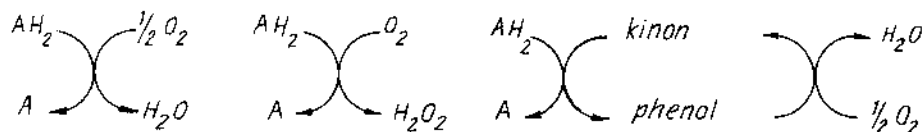


Nói chung, các dehydrogenaza flavin thường xúc tác phản ứng khử hydro của các cơ chất có cấu trúc $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ thành sản phẩm có cấu trúc $-\text{CH}=\text{CH}-$



II.2.3.2. Các enzym hoạt hóa oxy (oxydaza)

Các enzym hoạt hóa oxy phân tử là những enzym có khả năng chuyển trực tiếp hydro (hoặc electron) cho oxy phân tử cũng như hoạt hóa oxy phân tử làm cho nó có khả năng kết hợp trực tiếp vào cơ chất tạo ra peroxyt hữu cơ :



Các enzym hoạt hóa oxy tiêu biểu là xitocromoxydaza, polyphenoloxydaza, ascorbatoxydaza, peroxydaza, catalaza, các oxydaza flavin (enzim flavin hiếu khí).

Nhóm enzym hoạt hóa oxy bao gồm một số lượng lớn enzym khác nhau. Tùy thuộc vào bản chất của kim loại có trong thành phần nhóm ngoại của chúng mà các oxydaza cuối có thể chia làm hai nhóm nhỏ :

- Sắt proteit (Fe - proteit) ;
- Đồng proteit (Cu-proteit).

Fe - proteit

Fe-proteit là những chất xúc tác hai cấu tử có nhóm ngoại là hemin (Fe-pocphirin).

Trong quá trình xúc tác, Fe của enzym chịu những chuyển hóa oxy hóa-khử thuận nghịch.

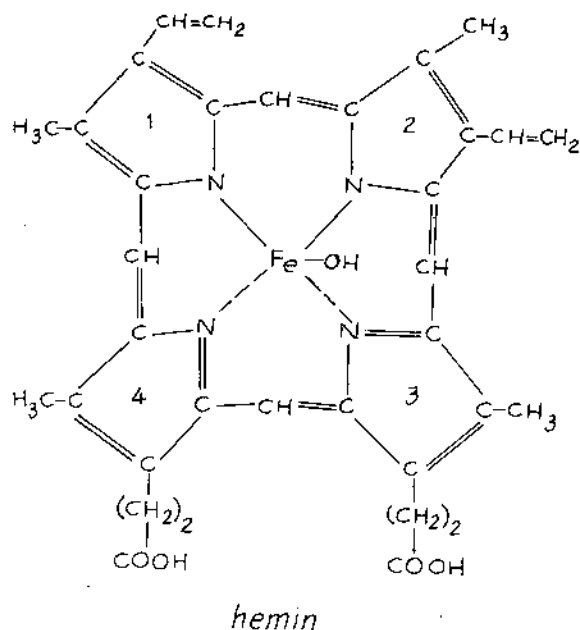
Hệ xitocrom và catalaza, peroxydaza là những Fe-proteit quan trọng thuộc nhóm này.

Hệ xitocrom

Chỉ có một số nhỏ enzym flavin ở dạng khử có khả năng chuyển hydro nhận được của mình cho oxy không khí. Nhìn chung giữa các dehydrogenaza flavin và oxy không khí còn có một hệ enzym trung gian nữa đó là hệ xitocrom.

Xitocrom - chất màu tế bào - là những protit phức tạp có nhóm ngoại là hem. Cấu tạo của xitocrom c là một trong những xitocrom có thể biểu diễn bằng sơ đồ ở trang 70.

Hiện nay, người ta đã biết được trên 20 xitocrom khác nhau. Xitocrom rất phổ biến trong tự nhiên. Chúng có trong động vật, thực vật, nấm men, vi khuẩn hiếu khí và một số vi khuẩn kỵ khí bắt buộc.



Vai trò của các xitocrom trong tế bào sống là chuyển electron cho oxy. Fe của xitocrom có khả năng oxy hóa-khử thuận nghịch. Dạng oxy hóa (chứa Fe^{3+}) của xitocrom nhận electron từ nguyên tử hydro của dehydrogenaza flavin và chuyển sang dạng khử, khi đó Fe^{3+} chuyển thành Fe^{2+} ($\text{Fe}^{3+} + e \rightarrow \text{Fe}^{2+}$).

Nguyên tử hydro của flavin bị lấy mất electron trở thành ion hydro : $\text{H} - e \rightarrow \text{H}^+$. Dạng khử (chứa Fe^{2+}) của xitocrom chuyển electron nhận được cho dạng oxy hóa của xitocrom thứ hai đứng sau nó và lại trở về dạng oxy hóa ban đầu, khi này Fe^{2+} chuyển thành Fe^{3+} ($\text{Fe}^{2+} - e \rightarrow \text{Fe}^{3+}$).

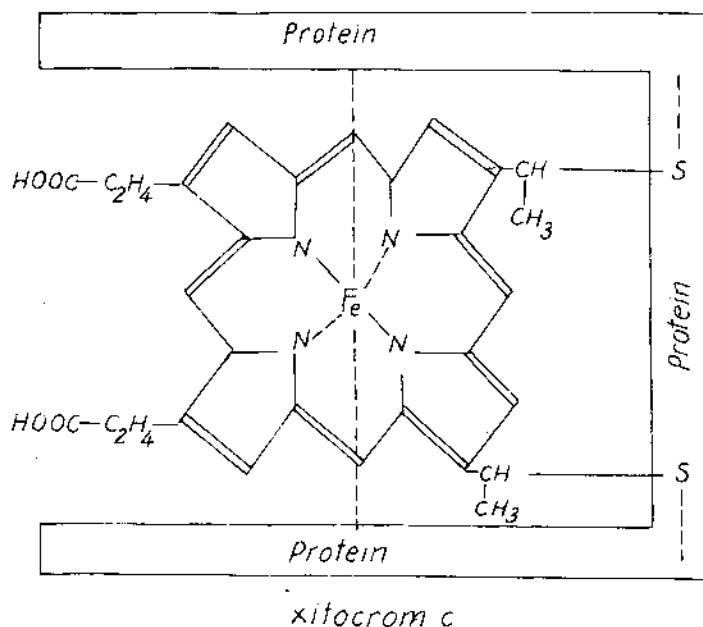
Do có khả năng oxy hóa-khử thuận nghịch nên quang phổ hấp thụ của chúng thay đổi và nhờ những nghiên cứu về quang phổ hấp thụ, người ta phân biệt được ba nhóm xitocrom chính là *a*, *b* và *c*. Keilin tìm ra xitocrom *a*, *b* và *c*₁. Okunuki tìm ra xitocrom *c*. Ngày nay, người ta mới chỉ biết chính xác được 5 xitocrom nhóm *c*, 8 xitocrom nhóm *b*, 3 xitocrom nhóm *a*. Ngoài ra, trong thực vật, nấm men và vi khuẩn người ta còn tìm được xitocrom *f*.

Ở trạng thái khử các xitocrom cho ba vạch phổ hấp thụ (α , β và γ). Trong bảng 2.2 là phổ hấp thụ của một số xitocrom (độ dài bước sóng tính bằng nanomet, nm).

Bảng 2.2. Phổ hấp thụ của một số xitocrom

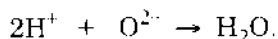
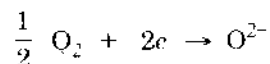
Loại xitocrom	α	β	γ
Xitocrom <i>a</i>	605	532	449
Xitocrom <i>a</i> ₁	589		-
Xitocrom <i>a</i> ₂	628		-
Xitocrom <i>b</i>	566	520	432
Xitocrom <i>b</i> ₂	557	528	-
Xitocrom (khử)	550	522	417
Xitocrom (oxy hóa)	565	530	407

Trong hệ hô hấp thường có bốn xitocrom : *b*, *c*₁, *c* và *aa*₃. Các xitocrom này khác nhau về quang phổ hấp thụ và ái lực đối với oxy phân tử. Thứ tự sắp xếp các xitocrom trong chuỗi hô hấp tương ứng với thế oxy hóa-khử của chúng (xem

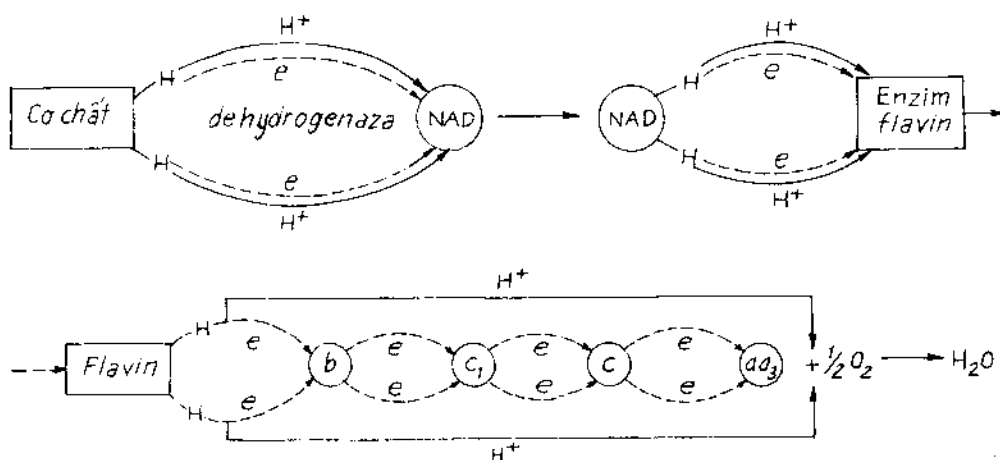


phần trên). Các xitocrom thường kết gắn trên màng ti thể. Ở vi khuẩn chúng khu trú trên màng vi khuẩn.

Trong quá trình oxy hóa sinh học, electron từ enzym flavin trung gian chuyển cho xitocrom *b* rồi lần lượt qua *c*₁, *c* đến xitocromoxydaza (*aa*₃) là một oxydaza cuối. Xitocromoxydaza chuyển electron trực tiếp cho oxy phân tử. Oxy kết hợp với electron dưới tác dụng của xitocromoxydaza bị ion hóa và sau đó liên kết với ion hydro tạo thành nước :



Quá trình oxy hóa cơ bản các chất hữu cơ trong cơ thể sống có thể biểu diễn bằng sơ đồ sau :

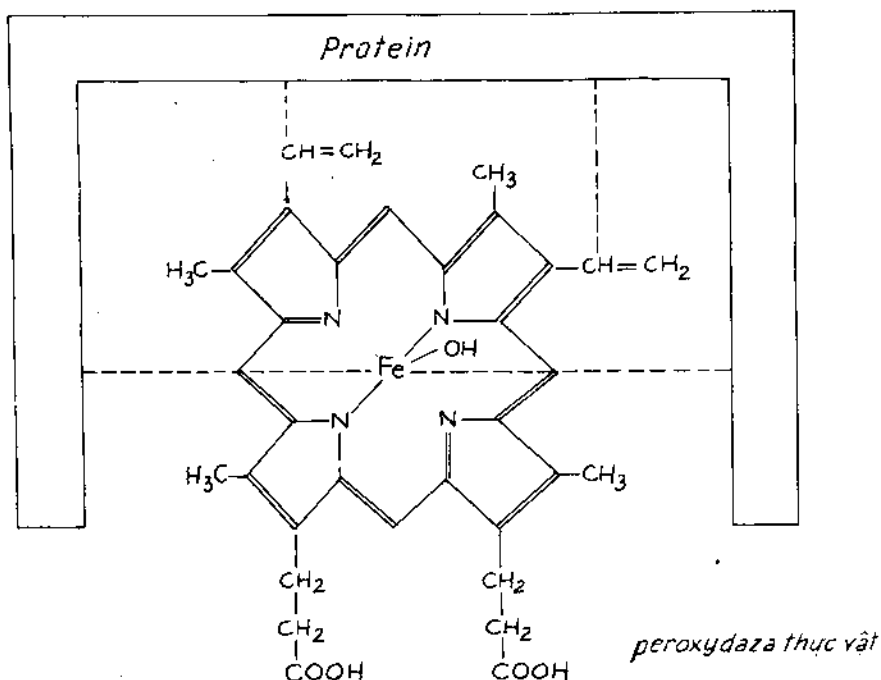


Peroxydaza

Hiện nay, người ta đã biết có ít nhất là bốn peroxydaza :

- peroxydaza thực vật thượng đẳng ;
- peroxydaza mô động vật (veedoperoxydaza) ;
- peroxydaza của sữa (lactoperoxydaza) ;
- xitocrom:peroxydaza (có trong nấm men và một số thực vật thượng đẳng).

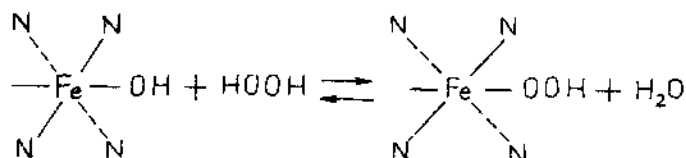
Peroxydaza là những enzym hai cấu tử hem và protein. Về phương diện thành phần hóa học và cơ chế tác dụng thì peroxydaza được nghiên cứu kỹ hơn cả. Nhóm ngoại của enzym này hoàn toàn giống Fe-pocfirin (hemin đỏ) của hemoglobin và catalaza. Fe trong peroxydaza ở dạng hóa trị ba. Theo quan điểm của đa số các nhà nghiên cứu thì hóa trị của Fe trong nhóm ngoại của peroxydaza không thay đổi trong quá trình xúc tác. Sơ đồ cấu tạo của peroxydaza thực vật ở trang 72 (peroxydaza động vật có hemin xanh chưa rõ cấu tạo).



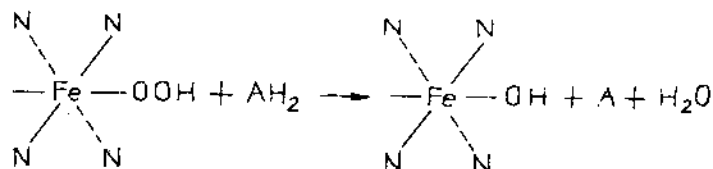
Cơ chế tác dụng của peroxydaza có thể khái quát như sau :



Đầu tiên, peroxydaza tương tác với phân tử H_2O_2 :



Sau đó phức hợp tạo thành phản ứng với cơ chất :



Như vậy là peroxydaza xúc tác sự oxy hóa cơ chất bằng hydro peroxyt.

Trong đó, nó phân hủy hydro peroxyt : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + 2O$ giải phóng ra oxy nguyên tử. Sau đó, oxy nguyên tử oxy hóa các chất khác nhau.

Các cơ chất có thể bị oxy hóa bởi peroxydaza khi có hydro peroxyt là :

- hầu hết các phenol (pirocatechin, pirogallol, axit galic, benzinidin, phenilendiamin, ...);
- các amin thơm;
- các chất dễ oxy hóa (axit ascorbic, nitrit, ...)

Theo Bach, peroxydaza có vai trò quan trọng bậc nhất đối với các quá trình oxy hóa xảy ra trong cơ thể. Enzim này có thể xúc tác sự oxy hóa không những chỉ như hydro peroxyt mà còn nhờ peroxyt hữu cơ khác nữa. Nó có thể sử dụng cả peroxyt của axit béo không no tạo thành dưới tác dụng của lipoxydaza và peroxyt của carotenoid. Polyphenol ở trạng thái tự do cũng như ở dạng các hợp chất phức tạp (glucozit, chất chất, ...) và các amin thơm là những cơ chất phổ biến của

peroxydaza thực vật.

Ngoài ra, peroxydaza còn có khả năng hoạt động như là oxydaza thực thụ, nghĩa là xúc tác sự oxy hóa cơ chất bằng oxy phân tử khi không có hydro peroxyt.

Các quá trình oxy hóa-khử do peroxydaza tiến hành là những mắt xích quan trọng trong chuỗi các quá trình trao đổi chất và năng lượng.

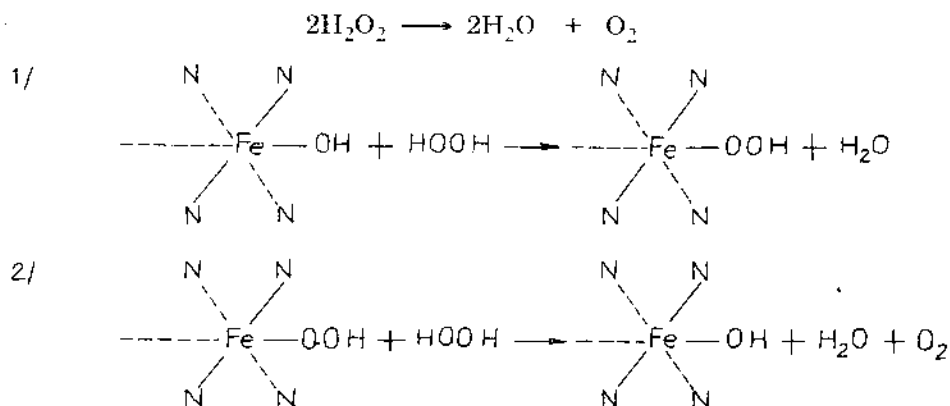
Catalaza

Catalaza cũng như peroxydaza, rất phổ biến trong động vật (nhiều ở gan, thận, hồng cầu), thực vật, vi sinh vật và một số vi khuẩn yếm khí bắt buộc.

Catalaza cũng là hemoprotein giống như peroxydaza. Catalaza của thực vật chỉ chứa một nhóm hemin trong phân tử, còn catalaza động vật lại có bốn hemin. Trong quá trình xúc tác Fe của nhóm ngoại không thay đổi hóa trị.

Catalaza xúc tác sự phân hủy hydro peroxyt, giải phóng ra oxy phân tử. Catalaza có hai tác dụng :

a) Khi nồng độ H_2O_2 cao, nó xúc tác phân hủy H_2O_2 tạo ra oxy phân tử theo cơ chế sau :



Trong phản ứng này có hai phân tử H_2O_2 tham gia một phân tử H_2O_2 hoạt động như là chất nhường electron, phân tử kia - chất nhận electron.

b) Nếu nồng độ H_2O_2 thấp (không quá $10^{-3}M$), catalaza biểu lộ hoạt tính peroxydaza. Trong điều kiện sinh học (dư cơ chất, nồng độ H_2O_2 thấp) catalaza hoạt động hầu như giống peroxydaza. Keilin và Hartree đã chỉ rõ rằng catalaza có khả năng oxy hóa rượu etylic, metylic cũng như formandehit khi có hydro peroxyt được hình thành dưới tác dụng của các oxydaza flavin (alcoldehydrogenaza, xantinoxydaza, oxydaza của các axitamin).

Peroxyt tạo thành trong các phản ứng trao đổi chất ở nồng độ nhất định là chất độc đối với cơ thể, do vậy vai trò của catalaza là ngăn ngừa sự tích tụ H_2O_2 .

Cu - protein

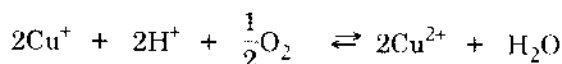
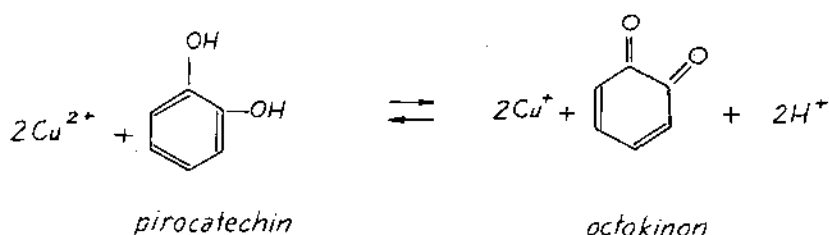
Cu-protein là những enzym oxydaza cuối rất quan trọng, có chứa nguyên tử đồng trong nhóm ngoại. Các chất tiêu biểu của nhóm enzym này là polyphenoloxydaza, ascorbatoxydaza.

Polyphenoloxydaza

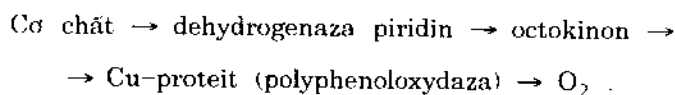
Polyphenoloxydaza (còn gọi là phenolaza hay phenoloxydaza) xúc tác sự oxy hóa các polyphenol khác nhau và các dẫn xuất của chúng, cũng như một loạt các monophenol tạo thành các kinon tương ứng khi có oxy phân tử. Chúng khá phổ biến

trong thực vật thượng đẳng và vi khuẩn. Polyphenoloxydaza không có tính đặc hiệu cơ chất cao.

Đa số các nhà nghiên cứu cho rằng cơ sở tác dụng của các polyphenoloxydaza là sự oxy hóa thuận nghịch nguyên tử đồng hóa trị một (Cu^+) thành đồng hóa trị hai (Cu^{2+}). Có một số người cho rằng, ion đồng liên kết bền vững với protein của enzym và không thay đổi hóa trị khi phản ứng. Theo quan điểm thứ nhất, phản ứng oxy hóa pirocatechin (một ví dụ điển hình về sự xúc tác của polyphenoloxydaza) có thể minh họa bằng các phương trình sau :

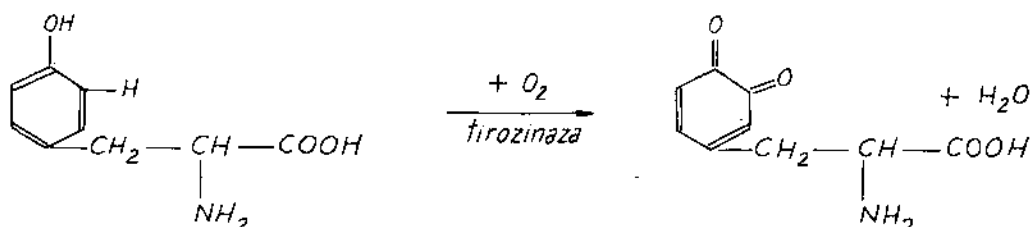


Trong điều kiện hô hấp bình thường, các kinon xuất hiện khi oxy hóa polyphenol lập tức bị khử ngay bởi NAD.H_2 và NADP.H_2 (các chất này thường bị oxy hóa trong chuỗi hô hấp), rồi lại bị oxy hóa khi cho hydro, sau đó lại bị khử ... và từ đây mở ra những đường hướng oxy hóa phụ :



Polyphenoloxydaza và polyphenol có trong quả và lá cây, nên khi rau quả bị dập nát, cắt, thái, ... thì sự phối hợp giữa các giai đoạn oxy hóa và khử của sự hô hấp bị phá vỡ, do đó mà các octokinon được tạo nên khi oxy hóa polyphenol có thể trùng hợp với các chất không có bản chất phenol như axitamin, các amin để hình thành các sản phẩm có màu. Đây là nguyên nhân của các hiện tượng thâm đen thường thấy khi cắt táo, khoai tây, khi vỏ lá chè, thuốc lá, ... Hoạt lực xúc tác của polyphenoloxydaza trong các đối tượng này rất cao.

Trong nhóm polyphenoloxydaza có những enzim oxy hóa các monophenol gọi là monophenoloxydaza (monophenolaza). Tirozinaza là chất điển hình, nó xúc tác sự oxy hóa axitamin tirozin tạo ra kinon tương ứng (tirozinaza có trong vi khuẩn, nấm men, trong bột mì và trong động vật) :



Sau một loạt chuyển hóa các kinon này cho ra chất màu xám đen gọi là melanin. Đây là nguyên nhân bị thâm đen của bột mì khi bảo quản không tốt.

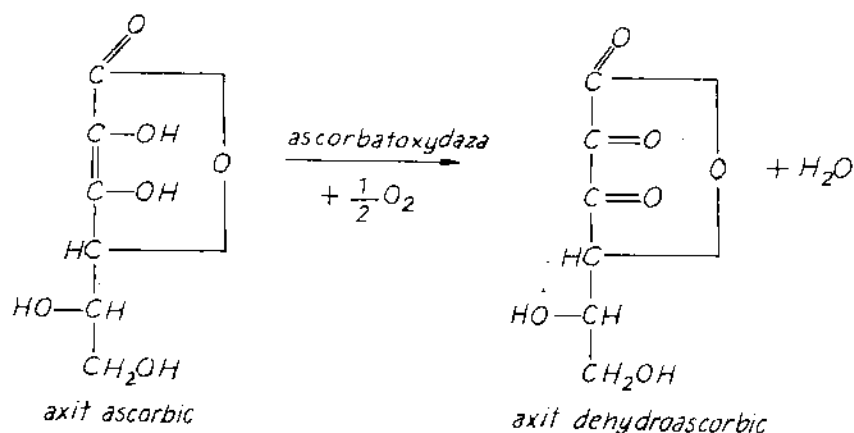
Polyphenoloxydaza đóng vai trò quan trọng trong hoạt động của cơ thể thực vật. Nhiều tác giả cho rằng polyphenoloxydaza hoàn thành chức năng của oxydaza cuối, cùng với xitocromoxydaza và ascorbatoxydaza.

Ascorbatoxydaza

Ascorbatoxydaza có chứa trong hầu hết các mô xanh của thực vật và trong tảo nâu, tảo hồng; có nhiều trong cải bắp, súp lơ, bầu bí, dưa chuột, cà rốt, chuối, táo, đào, lê, ...

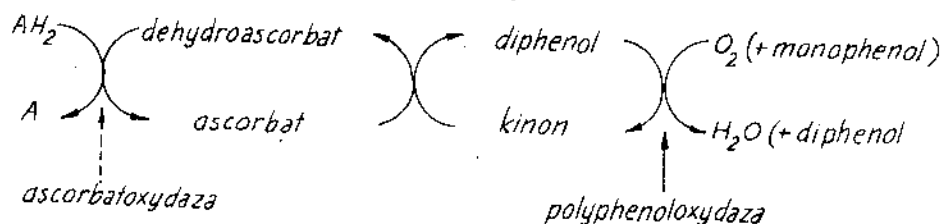
Enzim này là một protein có chứa đồng (0,24%), xúc tác oxy hóa axit ascorbic (vitamin C). Enzim này rất quan trọng trong kỹ nghệ thực phẩm, vì nó có quan hệ mật thiết tới phẩm chất của thực phẩm.

Cơ chế tác dụng của ascorbatoxydaza có thể biểu diễn như sau :



Axit ascorbic có thể bị oxy hóa trực tiếp dưới tác dụng của ascorbatoxydaza đặc hiệu hay xitocromoxydaza và gián tiếp qua các kinon hoặc các sản phẩm oxy hóa tạo thành bởi các oxydaza khác. Điều này cho phép :

- Mở rộng các đường hướng oxy hóa phụ :



- Liên hợp sự hô hấp với các đường hướng oxy hóa phụ mà dehydroascorbat là chất nhận hydro của cơ chất, rồi sau đó ascorbat tạo thành sẽ bị oxy hóa bởi xitocromoxydaza.

Oxygenaza

Trong những năm gần đây, ngoài các oxydaza "cổ điển" sử dụng oxy phân tử làm chất nhận electron ra, người ta còn tìm thấy các enzim hoạt hóa oxy phân tử làm cho nó có khả năng kết hợp trực tiếp vào cơ chất để tạo ra peroxyl hữu cơ. Hayaishi gọi chúng là "oxygenaza", còn Mason đề nghị gọi là "transferaza oxy". Nhóm

enzim này gồm có : pirocatechinaza, tryptophanoxigenaza, lipoxydaza ...

Pirocatechinaza xúc tác sự phân hủy oxy hóa vòng thơm của catechin tạo ra peroxyt vòng.

Tryptophanoxigenaza xúc tác oxy hóa trực tiếp tryptophan thành formylkinurenin.

Trong nhóm này, lipoxydaza là enzim quan trọng hơn cả.

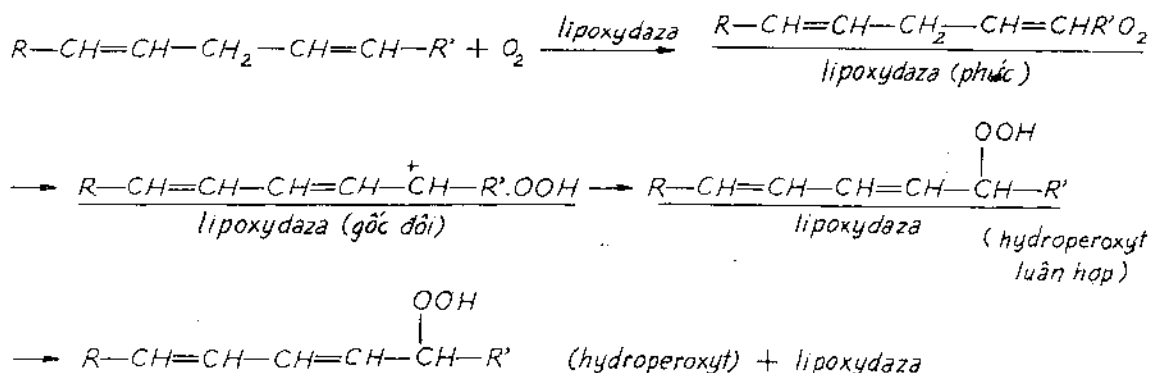
Lipoxydaza

Lipoxydaza xúc tác sự oxy hóa chất béo có chứa axit béo không no (có 2-3 liên kết kép trở lên) thành peroxyt và hydro peroxyt. Các axit béo không no là hợp phần của lipid tế bào rất phổ biến trong thế giới thực vật. Vì vậy, lipoxydaza là cấu tử quan trọng của hệ hô hấp. Lipoxydaza rất phổ biến trong thực vật (trong cây họ đậu, khoai tây, cà rốt, ...).

Nó là một globulin có 881 gốc axitamin. Chưa rõ bản chất của nhóm ngoại, chỉ biết là nó không chứa kim loại và nhóm -SH.

Lipoxydaza chỉ xúc tác oxy hóa các axit linoleic, linolenic và arachidic, đồng thời chỉ tác dụng lên dạng *cis* mà không tác dụng lên dạng *trans*. Sản phẩm hình thành là hydro peroxyt, sau khi bị phân hủy hydro peroxyt cho epoxyt, aldehyt, xeton, rượu bậc cao và các sản phẩm oxy hóa khác. Cơ chế tác dụng của lipoxydaza đến nay vẫn chưa rõ hoàn toàn. Một số tác giả cho rằng sự oxy hóa chất béo xúc tác bằng enzim này cũng tương tự như sự tự oxy hóa theo cơ cấu phản ứng mạch. Trong trường hợp này, lipoxydaza phản ứng với oxy phân tử tạo ra peroxyt và chuyển oxy hoạt động sang phân tử axit béo. Lipoxydaza chỉ làm chức năng của chất mào đầu phản ứng mạch có khả năng lấy hydro từ nhóm metylen $-\text{CH}_2-$ của axit linoleic. Sau đó, phản ứng tiếp diễn theo cơ cấu phản ứng mạch không có sự tham gia của enzim. Hiện nay, giả thuyết này được ít người ủng hộ.

Theo Tappel và Bower, mỗi một phân tử linoleat đều bị oxy hóa trực tiếp dưới tác dụng của lipoxydaza. Sự oxy hóa bắt đầu bằng việc tạo thành phức chất enzim - cơ chất - oxy. Sau đó, hình thành gốc đôi do hydro được chuyển từ linoleat đến oxy. Gốc đôi tạo ra hệ luân hợp và sau cùng bị phân giải cho hydro peroxyt và lipoxydaza tự do :



Hydro peroxyt của cơ chất được tạo thành có khả năng oxy hóa rất lớn. Với sự tham gia của chúng, trong tế bào các phenol bị oxy hóa tạo ra kinon. Kinon lại

tham dự vào sự oxy hóa thứ cấp sản phẩm phân hủy của protein, glucit, axit ascorbic và các hợp chất khác. Như thế là qua hệ polyphenol-kinon, lipoxydaza liên hợp với toàn nhóm enzym oxy hóa - khử trong tế bào sống.

Hydro peroxyt có thể oxy hóa những phần mới của axit béo chưa no, cũng như các carotenit, clorofil, axitamin, axit ascorbic,... Vì thế, lipoxydaza có ý nghĩa rất lớn đối với kỹ nghệ sản xuất, bảo quản lương thực, thực phẩm. Nó là một tác nhân gây nên quá trình ôi của các sản phẩm như bột, các loại gạo xay khác nhau.

Các oxydaza flavin (dehydrogenaza hiệu khí)

Ngoài các enzym flavin đã nói ở phần dehydrogenaza yếm khí, còn có các enzym flavin làm chức phận các oxydaza cuối. Nhóm enzym flavinoxydaza này xúc tác sự chuyển trực tiếp hydro (hoặc electron) của cơ chất cho oxy phân tử. Về đặc điểm phản ứng do chúng xúc tác, các dehydrogenaza hiệu khí rất gần với oxydaza. Trong nhóm enzym này có glucooxydaza, oxydaza của các axitamin và amin, xantinoxydaza, oxydaza của axit glicolic,...

Nhóm ngoại của đa số oxydaza flavin là FAD chỉ một số nhỏ enzym này có nhóm ngoại là FMN (xem mục II.2.3.1).

Nhiều enzym flavin có chứa trong thành phần nhóm ngoại ion kim loại như sắt, đồng, molipden, ... Xuất phát từ quan niệm hiện đại, tất cả enzym flavin có thể chia ra làm hai nhóm :

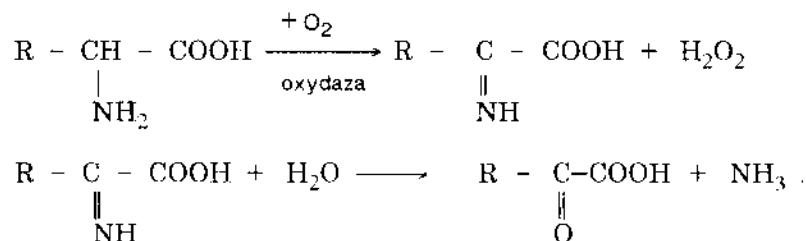
- flavoprotein chứa kim loại ;
- flavoprotein không chứa kim loại.

Trong các enzym flavin chứa kim loại thì xantinoxydaza có chứa molipden, nitratreductaza cũng chứa molipden ; dehydrogenaza của butyryl - CoA là Cu-flavoprotein ; NAD.H - xitocrom c - reductaza và NADP.H - xitocrom c - reductaza có sắt trong thành phần.

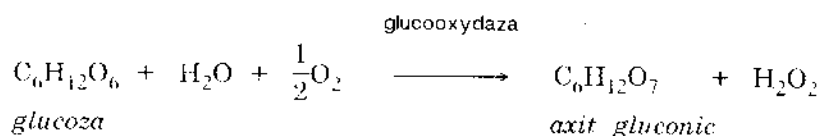
Xantinoxydaza đóng vai trò quan trọng trong trao đổi purin ở cơ thể động, thực vật. Nó xúc tác sự oxy hóa hipoxantin thành xantin và xantin thành axit uric.

Trong nhóm các flavoprotein không chứa kim loại thì oxydaza của các axitamin cũng như glucooxydaza là quan trọng hơn cả.

Oxydaza của axitamin xúc tác phản ứng oxy hóa axitamin tạo ra xetoaxit hoặc aldehytaxit, NH_3 và hydro peroxyt.



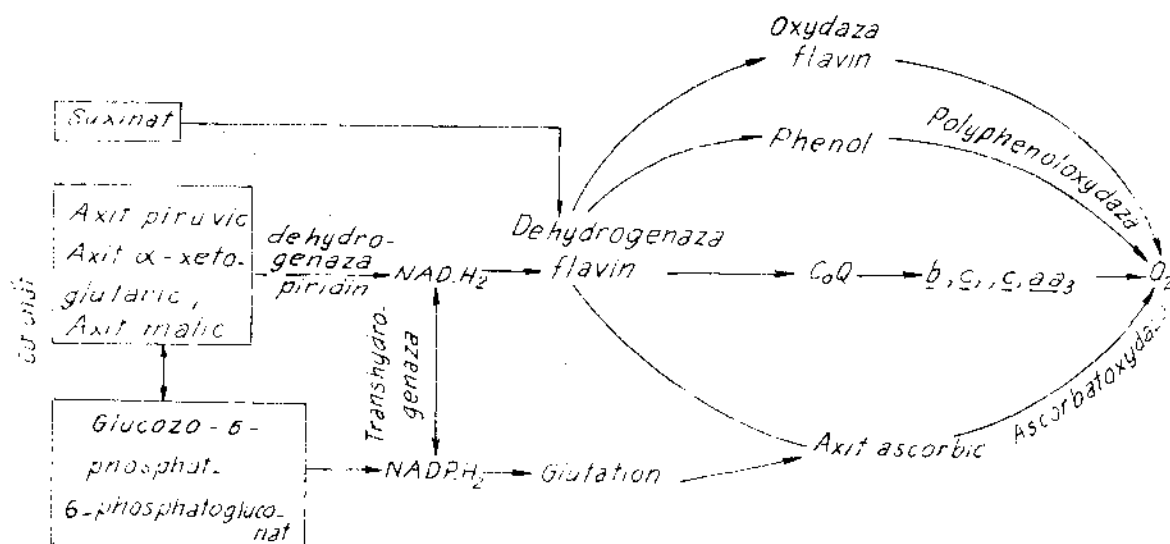
Glucooxydaza oxy hóa trực tiếp phân tử glucosa không phosphoryl hóa. Nhóm ngoại của enzym này là FAD. Nó rất phổ biến trong nấm mốc và có trong mô thực vật.



Đáng chú ý là oxy của hydro peroxit tạo thành dưới tác dụng của các dehydrogenaza hiệu khí được peroxydaza sử dụng để oxy hóa các chất khác. Do đó, các dehydrogenaza flavin hiệu khí tạo nên hệ liên hợp với peroxydaza.

Một số oxydaza flavin có khả năng chuyển hydro (hoặc electron) không những cho oxy mà còn cho một số chất tiếp nhận khác (nirat, kinon,...), nên các oxydaza flavin cũng như các dehydrogenaza flavin có thể xem như là các chất chuyển hydro trung gian.

Trên cơ sở những điều đã trình bày về enzym oxy hóa - khử (dehydrogenaza, oxydaza, các chất chuyển trung gian) có thể hiểu một cách khái quát sự tham gia của chúng vào quá trình chuyển vận electron tức là quá trình oxy hóa sinh học cơ bản (hô hấp) trong tế bào sống như sau (để cho tiện ta lấy ví dụ về các quá trình oxy hóa - khử trong tế bào thực vật) :



Đồng thời ta có thể rút ra một số đặc điểm lớn của nhóm enzym này.

Đặc điểm thứ nhất của các oxydoreductaza trong tế bào sống là chúng tạo thành chuỗi hô hấp (chuỗi các enzym oxy hóa - khử) để thực hiện việc chuyển vận đa bậc nguyên tử hydro hoặc điện tử từ cơ chất sơ cấp đến chất nhận cuối cùng là oxy.

Đặc điểm thứ hai của chúng là khả năng xúc tác một số lớn phản ứng oxy hóa - khử khác nhau mặc dù lượng coenzim không nhiều lắm, nhưng do một coezim có thể kết gán với nhiều apofemen hay apoenzim.

Đặc điểm thứ ba - đặc điểm chính của nhóm enzym này là chúng xúc tác các quá trình hóa học liên hợp với việc giải phóng năng lượng.

II.2.4. Chu trình xitrat và chuỗi hô hấp - quá trình oxy hóa - khử sinh học cơ bản

Các quá trình oxy hóa - khử sản sinh ra năng lượng liên hợp với việc tổng hợp nên các liên kết phosphat cao năng, về nguyên tắc có thể chia thành hai nhóm. Nhóm thứ nhất bao gồm các quá trình oxy hóa có sự tham gia của oxy không khí (*hô hấp hiếu khí*). Nhóm thứ hai gồm các quá trình tiến hành trong điều kiện yếm khí - *lên men và hô hấp yếm khí*. Sự lên men về bản chất là sự phân giải yếm khí glucit (glucoza) do vi sinh vật tiến hành.

Các chất dinh dưỡng cơ bản dùng làm nguyên liệu cho các quá trình oxy hóa là glucit, protein và chất béo,... Trước khi được sử dụng làm nguyên liệu hô hấp, chúng chịu những biến đổi chuyển hóa khác nhau và thực chất của các chuyển hóa này là phân hủy chúng thành các cấu tử hợp phần đơn giản.

Ở các sinh vật đơn bào như vi khuẩn và một số loài nấm, glucit bị phân giải thành các cấu tử hợp phần (glucoza) ở ngoài môi trường xung quanh tế bào dưới tác dụng của những enzim do tế bào tiết ra hoặc dưới tác dụng của enzim có trên bề mặt tế bào.

Ở cơ thể động vật glucit, protein, lipit bị phân giải thành các cấu tử hợp phần dưới tác dụng của các enzim ngoại tế bào. Tiếp đó, glucoza và các đơn cấu tử khác thấm vào tế bào nhờ các cơ chế đặc biệt.

Sau khi vào tế bào, quá trình oxy hóa các chất dinh dưỡng khác nhau (glucoza, axit amin và axit béo) chỉ khác nhau ở giai đoạn đầu. Trong đó, từ axit amin, axit béo và đường đều tạo thành cùng một sản phẩm chuyển hóa như nhau, đó là axetyl-coenzim A.

Vào tế bào, glucoza tiếp tục bị phân giải dưới tác dụng của một bộ các enzim hòa tan tạo ra axit piruvic. Quá trình này gọi là *quá trình đường phân* (glucolizơ, cơ chế sẽ nghiên cứu ở phần sau). Trong tiến trình đường phân không có sử dụng oxy phân tử. Tuy vậy, quá trình đường phân vẫn có thể tiến hành ngay cả khi có mặt oxy phân tử. Đây là giai đoạn đầu - giai đoạn chuẩn bị cho sự hô hấp hiếu khí. Ý nghĩa chính của quá trình đường phân là làm biến đổi về căn bản cấu trúc ban đầu của phân tử cơ chất (glucoza) hô hấp, do đó xúc tiến các chuyển hóa tiếp theo ở giai đoạn hiếu khí dễ dàng hơn. Axit piruvic là chất trao đổi trung gian rất hoạt động về phương diện hóa học.

Còn khi phân giải oxy hóa các axit amin chủ yếu cũng tạo ra axit piruvic (từ axit amin alanin dễ dàng tạo thành axit piruvic ; từ axit amin glutamic thành axit α - xetoglutaric ; từ axit aspartic thành oxaloaxetic).

Axit piruvic (khi nó thấm vào ti thể) bị oxy hóa tiếp tục sẽ tạo nên axetyl - coenzim A.

Ở trong tế bào, axit béo bị oxy hóa cũng tạo thành các gốc axit axetic (đúng hơn là axetylcoenzim A). Axetylcoenzim A là sản phẩm chính của sự phân hủy 2/3 khung cacbon của glucit, glixerin, axit béo 1/2 khung cacbon của axit amin.

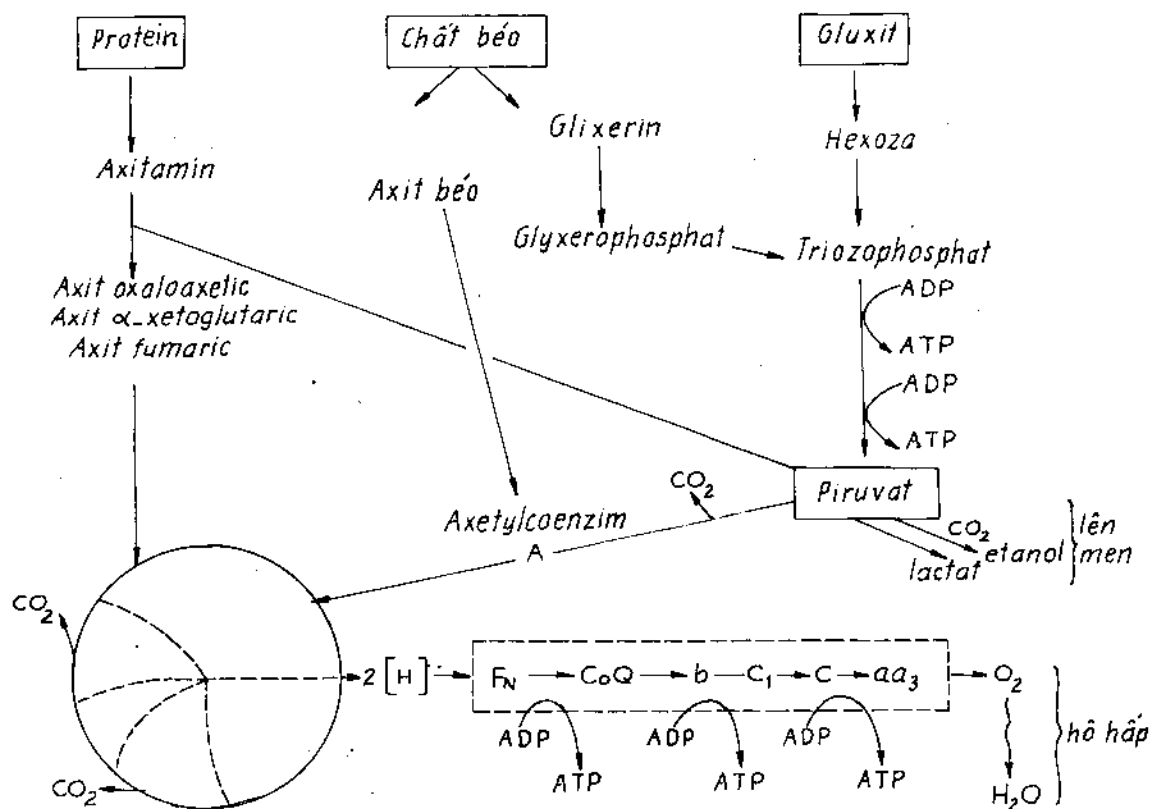
Như vậy, về thực chất, sự oxy hóa sinh học cơ bản kèm theo sản sinh năng lượng qui tụ lại ở oxy hóa axit piruvic và các gốc axit axetic.

Sự oxy hóa các gốc axit axetic (axetylcoenzim A) được tiến hành trong một chu trình kín gọi là *chu trình xitrat* (chu trình axit xitric hay chu trình các axit dicarboxylic, tricarboxylic, chu trình Krebs). Chu trình xitrat là một vòng tuần tự các biến đổi sinh hóa, trong đó axetylcoenzim A "bị đốt cháy" hoàn toàn bởi oxy không khí tới cacbon dioxyt kèm theo sự tạo nên các coenzim khử : NAD.H_2 , NADP.H_2 và flavin khử.

CO_2 là sản phẩm cuối cùng của sự oxy hóa được hình thành do sự khử cacboxyl oxy hóa các xetoaxit của chu trình.

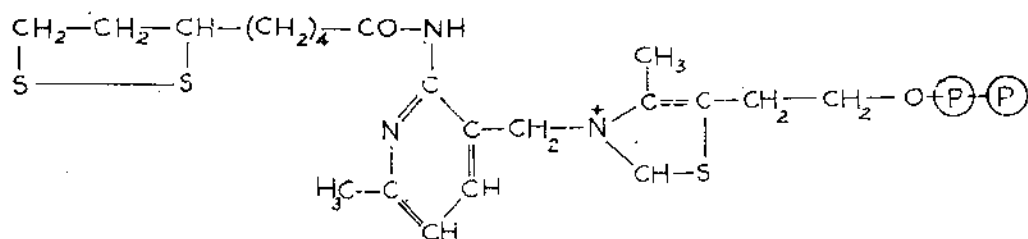
Còn sản phẩm cuối cùng thứ hai là H_2O được hình thành do sự oxy hóa các chất khử NAD.H_2 , NADP.H_2 và FAD.H_2 bởi oxy phân tử. Sự oxy hóa các chất khử này bởi oxy phân tử kèm theo giải phóng năng lượng được tiến hành nhờ chuỗi hô hấp gọi là *sự oxy hóa cuối cùng*:

Mối tương quan của các đường hướng chuyển hóa cơ chất hô hấp đã trình bày trên đây có thể khái quát hóa bằng sơ đồ minh họa sau :

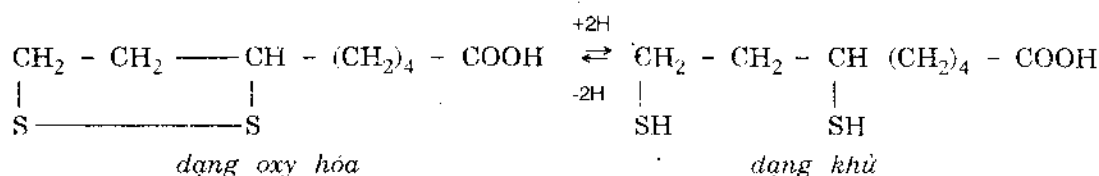


II.2.4.1. Sự oxy hóa axit piruvic và chu trình xitrat

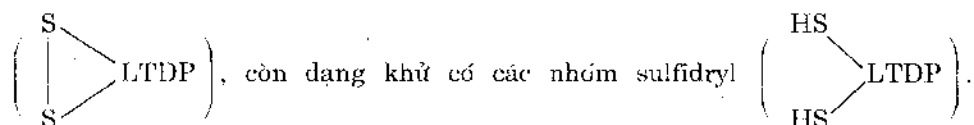
Trong quá trình hô hấp, tiếp sau giai đoạn đường phân là sự oxy hóa hiếu khí axit piruvic thành axetylcoenzim A. Đây là quá trình chuyển hóa khá phức tạp với sự tham gia của hệ enzym piruvatdehydrogenaza và coenim A. Trong quá trình khử cacboxyl oxy hóa axit piruvic này có một loạt hợp chất tham gia xúc tác như : NAD, tiamin, axit lipoic. Ngoài ra, cần phải có cả Mg^{2+} hoặc Mn^{2+} . Nhóm ngoại của enzym **piruvatdehydrogenaza** là lipotiamindiphosphat (LTDP). LTDP là hợp chất gồm axit lipoic, tiamin và hai gốc axit phosphoric :



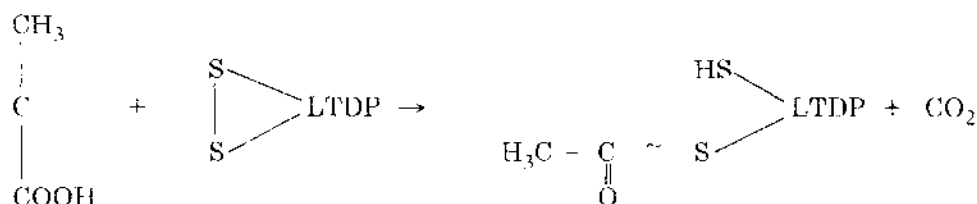
Axit lipoic là chất chuyển hydro trung gian rất phổ biến. Nó dễ dàng chuyển từ dạng oxy hóa sang dạng khử :



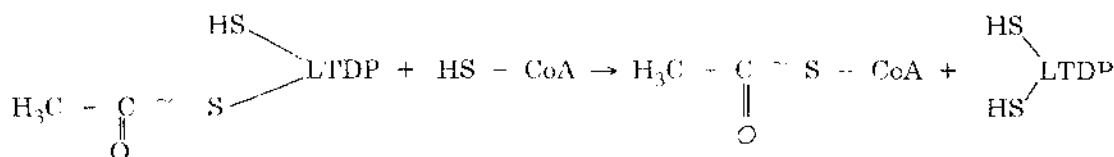
Chính vì thế mà dạng oxy hóa của lipotiamindiphosphat có chứa nhóm disulfua



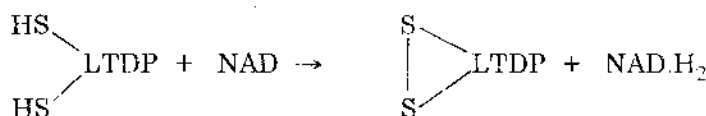
Đầu tiên, dưới tác dụng của enzym piruvatdehydrogenaza, axit piruvic bị khử CO_2 và tạo với enzym một phức. Kết quả là LTDP chuyển thành dạng khử, còn năng lượng khử cacboxyl oxy hóa được tích tụ trong liên kết cao năng của axylmercaptan $\text{C} \sim \text{S}$.



Sau đó, nhóm axetyl cùng với liên kết cao năng được chuyển sang coenzim A nhờ enzym lipoat - axetyltransferaza, đồng thời tạo thành axetylcoenzim A và LTDP dạng khử



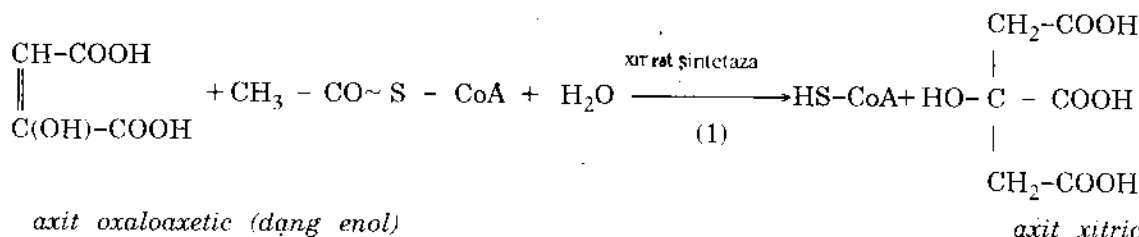
Cuối cùng, dạng khử của LTDP được oxy hóa nhờ enzym lipoatdehydrogenaza có nhóm hoạt động là NAD



Kết quả của phản ứng khử cacboxyl oxy hóa axit piruvic là tạo nên axetylcoenzim A có chứa liên kết cao năng, NAD.H_2 và thải ra nguyên tử cacbon thứ nhất của

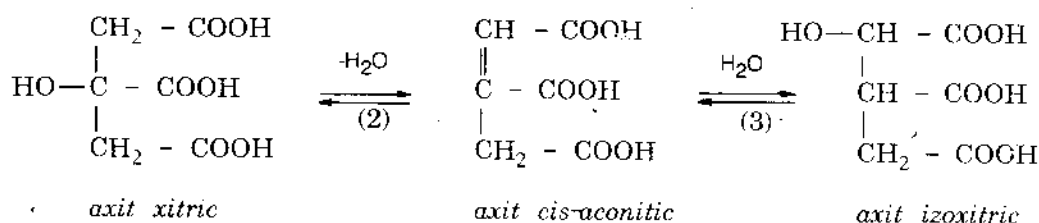
axit piruvic ở dạng CO_2 . Khi oxy hóa NAD.H_2 cũng giải phóng ra một lượng lớn năng lượng.

Axetylcoenzim A đi vào chu trình các axit dicarboxylic, tricarboxylic bằng phản ứng ngưng tụ với axit oxaloaxetic (dạng enol) và nước (1) để tạo thành axit xitric. Phản ứng này do enzym xitratsintetaza (oxaloaxetattransaxetaza) xúc tác. Năng lượng để "ngưng tụ" do liên kết cao năng của axetylcoenzim A cung cấp

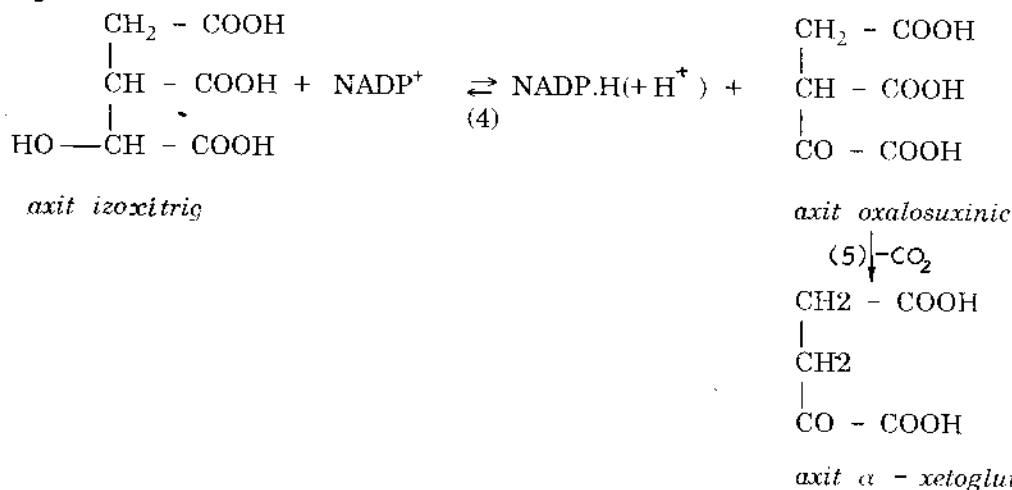


Các giai đoạn tiếp theo của chu trình về thực chất là sự oxy hóa axit xitric đến axit oxaloaxetic.

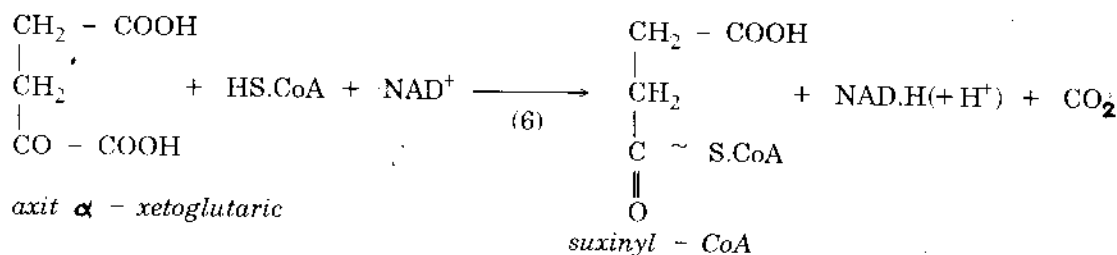
Quá trình bắt đầu từ sự đồng phân hóa axit xitric để tạo ra axit izoxitric bằng cách khử hydrat hóa và hydrat hóa tiếp sau qua sản phẩm trung gian là axit *cis*-aconitic. Enzim aconitathydrataza xúc tác chuyển hóa axit xitric thành axit *cis*-aconitic (2) và sau đó thành axit izoxitric (3) :



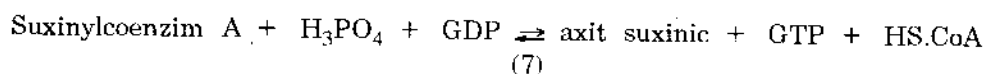
Giai đoạn tiếp theo của chu trình Krebs là sự oxy hóa axit izoxitric dưới tác dụng của enzym izoxitratdehydrogenaza. Axit izoxitric bị khử hydro và hai nguyên tử hydro của nó được chuyển sang cofermen nicotinamitadeninucleotitphosphat (NADP^+) của dehydrogenaza (4). Kết quả là NADP.H_2 và axit oxalosuxinic được tạo thành. Ngay sau đó axit oxalosuxinic lại bị khử cacboxyl hóa tiếp tục bởi chính hệ enzym izoxitratdehydrogenaza và chuyển thành axit α -xetoglutaric. Ở giai đoạn này một phân tử CO_2 được tách ra (5)



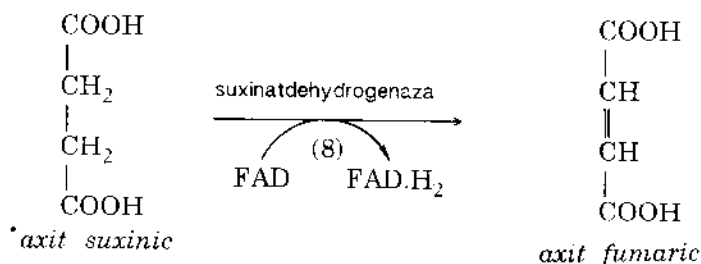
Ở giai đoạn tiếp theo, axit α - xetoglutaric lại khử cacboxyl oxy hóa do hệ enzym α - xetoglutaratdehydrogenaza xúc tác (6). Đây cũng là một phản ứng phức tạp giống như trường hợp oxy hóa axit piruvic ở trên và có coenzim A tham gia. Sản phẩm trực tiếp của phản ứng không phải là axit suxinic mà là dẫn xuất của nó : suxinyl-coenzim A



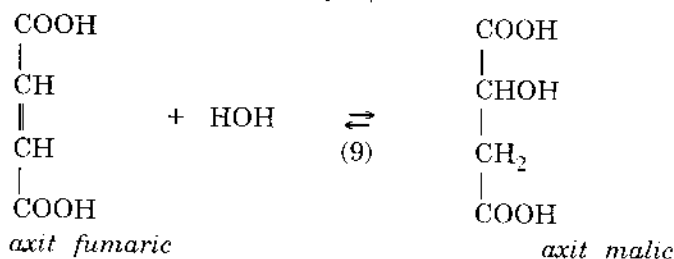
Ở đây còn có giai đoạn tích lũy năng lượng nữa. Đó là năng lượng của liên kết cao năng trong suxinyl-CoA được chuyển sang guanozintriphosphat (GTP) khi coenzim A giải phóng khỏi suxinylcoenzim A có guanozindiphosphat (GDP) và phosphat vô cơ tham dự (7) :



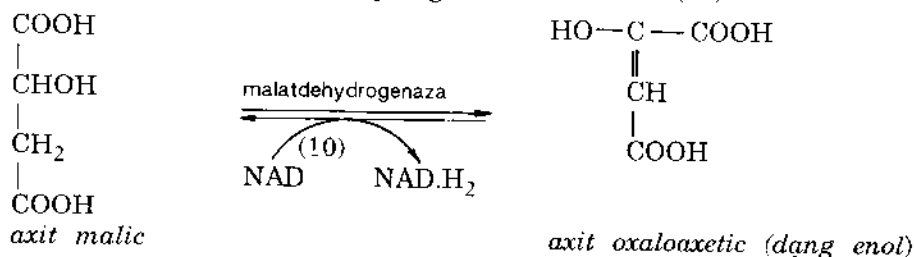
Tiếp đó, axit suxinic được hình thành bị oxy hóa tới axit fumaric dưới tác dụng của suxinatdehydrogenaza (8) :



Giai đoạn tiếp theo là sự kết hợp H_2O với axit fumaric tạo thành axit malic (9) với sự tham gia của fumarathydrataza :



Giai đoạn cuối cùng của chu trình xitrat là giai đoạn khử hydro axit malic tạo ra axit oxaloaxetic do enzym malatdehydrogenaza tiến hành (10) :

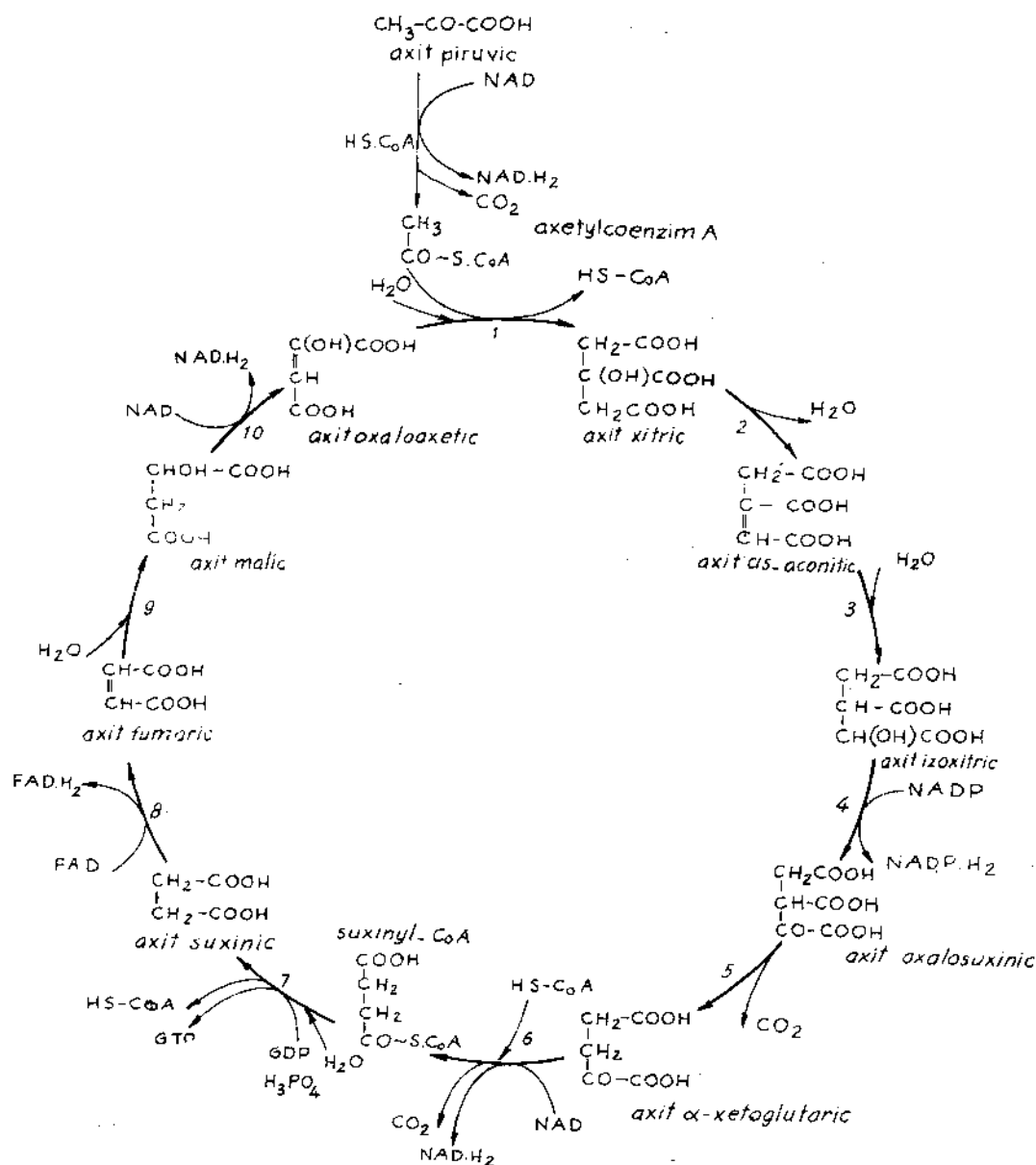


Như vậy là sau một vòng tròn vận của chu trình Krebs, phân tử axit oxaloaxetic dường như được tái tạo. Thật ra, đây hoàn toàn không phải chính phân tử axit oxaloaxetic ban đầu của chu trình bởi lẽ phân tử khởi đầu này đã nhường đi hai nguyên tử cacbon của nó ở dạng CO_2 và sau đó được bổ sung nguồn cacbon mới từ axetylcoenzim A.

Phân tử axit oxaloaxetic mới này lại tiếp tục ngưng tụ với phân tử axetylcoenzim A để tạo nên axit xitric và chu trình lại tái lập.

Kết quả là trong mỗi một vòng của chu trình Krebs, khi oxy hóa hoàn toàn gốc axetyl tạo ra hai phân tử CO_2 , 1 NADP.H_2 , 2 NAD.H_2 và 1 FAD.H_2 .

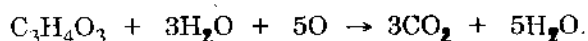
Có thể tóm tắt sự oxy hóa axit piruvic và chu trình xitrat bằng sơ đồ trong hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ chu trình xitrat (chu trình Krebs) và sự oxy hóa axit piruvic

Từ sơ đồ hình 2.2 ta thấy rằng khi oxy hóa hoàn toàn một phân tử axit piruvic qua chu trình xitrat có ba phân tử CO_2 được giải phóng và năm cặp nguyên tử hydro được tách khỏi cơ chất nằm trong các coenzim khử : 1 NADP. H_2 , 3 NAD. H_2 và 1 FAD. H_2 . Trong bản thân phân tử axit piruvic chỉ có chứa bốn nguyên tử hydro thôi, còn các nguyên tử hydro khác là của nước môi trường xâm nhập vào chu trình khi hydrat hóa các axit *cis*-aconitic, α -xetoglutaric và fumaric. Năm cặp nguyên tử hydro này bị oxy hóa từng bậc bởi oxy phân tử qua chuỗi hô hấp sẽ giải phóng ra một lượng năng lượng lớn.

Do vậy, sự oxy hóa axit piruvic có thể biểu diễn bằng phương trình sau :



Chu trình xitrat mô tả trên đây là phương thức phân hủy oxy hóa "chính thống" các hợp chất dinh dưỡng trong tế bào động vật, thực vật và vi sinh vật và có vai trò quan trọng nhất trong quá trình trao đổi chất nội tế bào. Chu trình Krebs là mắt xích liên hợp, là điểm giao lưu của nhiều đường hướng phân giải và tổng hợp các cấu tử khác nhau của tế bào.

Ngoài con đường "chính thống" này, còn có những đường chuyển oxy hóa phụ khác nữa. Ví dụ như chu trình pentozaphosphat - một đường rẽ của quá trình đường phân cũng thường xảy ra ở nấm men, vi khuẩn, ở mô động, thực vật.

Ở một số vi khuẩn (*Pseudomonas*, *Escherichia coli*) và nấm mốc, quá trình chuyển hóa trung gian các hợp chất cacbon còn có thể thực hiện qua chu trình axit glyoxilic. Chu trình này là cơ sở của sự chuyển hóa chất béo thành glucit trong cây.

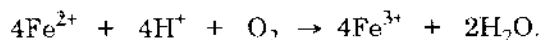
Các chu trình trên đây cũng như chu trình đường phân đều hình thành axit piruvic, sau đó axit piruvic bị oxy hóa tiếp tục trong chu trình Krebs.

II.2.4.2. Chuỗi hô hấp và sự photophoryl oxy hóa

Như trên đã trình bày, trong chu trình xitrat, axit piruvic (và axetylcoenzim A) không bị oxy hóa trực tiếp bởi oxy không khí mà bị oxy hóa bởi oxy của nước cũng như bằng sự khử hydro hóa. Oxy phân tử không tham gia trực tiếp vào các phản ứng của chu trình xitrat, do đó mà hydro và electron được các chất chuyển đặc biệt tiếp nhận rồi tuần tự chuyển cho nhau, cuối cùng chuyển cho oxy. Các chất nhận đầu tiên là NAD, NADP và FAD. Ta cũng có nhận xét là khi khử hydro của đa số cơ chất thì dòng electron chính được chuyển cho NAD.

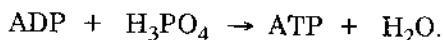
NAD. H_2 bị oxy hóa dưới tác dụng của NAD. H_2 - dehydrogenaza, một cấu tử của chuỗi hô hấp và nhường hydro cho flavin là nhóm ngoại của enzym này. Sau đó, flavoprotein khử chuyển electron nhận được cho xitocrom *b*.

Ở giai đoạn tiếp theo, electron từ xitocrom *b* được chuyển lần lượt qua c_1 , c rồi a và a_3 cuối cùng chuyển sang oxy phân tử. Oxy bị ion hóa và kết hợp với ion hydro tạo thành nước :



Sự chuyển vận electron từ cơ chất đến oxy qua chuỗi hô hấp lần lượt từ chất chuyển có thể oxy hóa - khử cao sang chất chuyển có thể oxy hóa - khử thấp hơn tương tự như là một dòng thác : nước ở mức năng lượng cao (cơ chất) đổ xuống mức năng lượng thấp (oxy) qua một loạt các bậc trung gian. Ở mỗi một bậc của "thác" electron, năng lượng tiềm tàng trong cấu hình hóa học của cơ chất được giải phóng ra và chuyển sang dạng năng lượng hóa học "vận năng" đó là liên kết phosphat

giàu năng lượng của phân tử adenosinotriphosphat (ATP). Ở mỗi một bậc chuyển vận electron này chỉ giải tỏa ra một lượng năng lượng không lớn lắm đủ để tổng hợp nên một liên kết phosphat cao năng. Điều này có ý nghĩa hết sức to lớn, bởi lẽ chỉ có sự oxy hóa từng bậc này mới có khả năng thực hiện được phản ứng liên hợp năng lượng. Còn nếu không, khi oxy hóa cơ chất mà toàn bộ năng lượng giải thoát ra tức khắc với một lượng lớn như vậy sẽ không tránh khỏi dẫn đến hủy diệt tế bào. Năng lượng giải phóng ra trong quá trình chuyển vận electron được tế bào sử dụng để tổng hợp ATP từ ADP và phosphat vô cơ theo phương trình phản ứng :



Sự phosphoryl hóa ADP bằng H_3PO_4 xảy ra trong khi chuyển vận electron trên chuỗi hô hấp gọi là *sự phosphoryl hóa oxy hóa*.

Người ta còn phân biệt *sự phosphoryl hóa ở mức cơ chất*. Đó là sự phosphoryl hóa ADP xảy ra khi oxy hóa trực tiếp cơ chất, liên hợp với sự truyền trực tiếp năng lượng cho phosphat vô cơ và tạo thành cơ chất phosphoryl hóa với liên kết phosphat cao năng giữa cơ chất và gốc axit phosphoric. Trên toàn bộ con đường chuyển hóa cơ chất hô hấp (hexoxa) gồm cả giai đoạn đường phân và chu trình Krebs chỉ có hai phản ứng oxy hóa liên hợp với phosphoryl hóa ở mức cơ chất. Phản ứng thứ nhất là phản ứng oxy hóa aldehyt 3 - phosphoglyceric thành axit 3 - phosphoglyceric xảy ra trong giai đoạn đường phân. Phản ứng thứ hai là phản ứng decarboxyl hóa oxy hóa axit α - xetoglutaric một trong các mắt xích của chu trình xitrat.

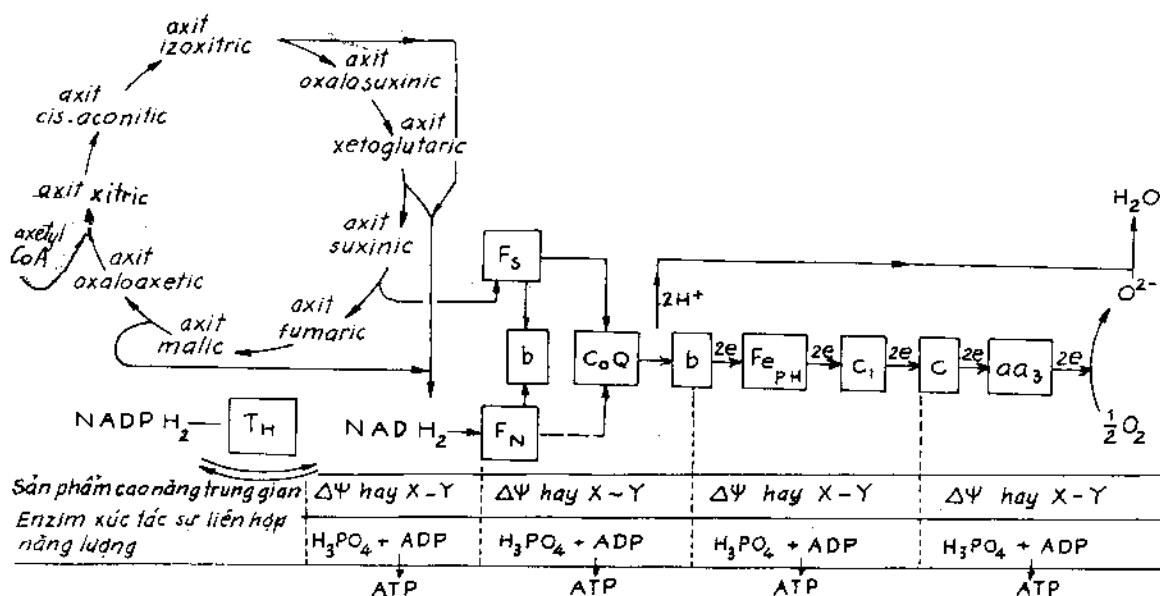
Hiện nay, người ta đã biết khá chính xác tại những điểm nào của chuỗi chuyển vận electron có những *điểm phosphoryl hóa* - những điểm ở đó xảy ra sự liên hợp phản ứng oxy hóa với phản ứng phosphoryl hóa.

Ta đều biết, để tạo thành phân tử ATP từ ADP và H_3PO_4 cần có năng lượng tự do (ΔG) vào khoảng 7 kcal, từ đó, tính được $\Delta E_0 = 0,152 \text{ V}$ ($\Delta E_0 = \frac{\Delta G_0}{nF} = \frac{7}{2.23,06} = 0,152 \text{ V}$). Do đó, để tạo ra được một phân tử ATP, thì giữa các chất tham gia phản ứng trong chuỗi hô hấp cần có một hiệu thế oxy hóa - khử (ΔE_0) và khoảng 0,152 V.

Những kết quả nghiên cứu và tính toán về nhiệt động học, enzym học và quang phổ cực nhạy đã cho phép người ta xác lập được các điểm phosphoryl hóa như sau : Điểm phosphoryl hóa thứ nhất xảy ra ở đoạn mạch giữa NAD và xitocrom b. Điểm liên hợp năng lượng thứ hai nằm trong đoạn giữa xitocrom b và xitocrom c. Điểm phosphoryl hóa thứ ba định khu ở đoạn giữa xitocrom c và xitocromoxydaza. Cách đây không lâu, người ta mới tìm ra một điểm phosphoryl hóa thứ tư nữa nằm ở đoạn giữa transhydrogenaza và NAD.H_2 - dehydrogenaza.

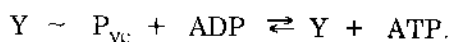
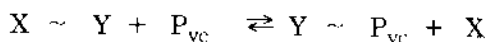
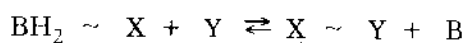
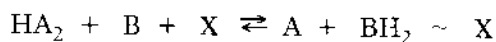
Người ta cũng đo được hiệu suất năng lượng khi oxy hóa cơ chất hay hiệu ứng phosphoryl hóa bằng hệ số phosphoryl hóa (P/O) - tỉ lệ giữa số mol phosphat vô cơ dùng để tổng hợp ATP trên một nguyên tử gam oxy. Khi oxy hóa axit malic, $P/O = 3$; khi oxy hóa axit suxinic $P/O = 2$; còn khi oxy hóa axit α - xetoglutaric, $P/O = 4$, trong đó một phân tử ATP được tạo thành bằng sự phosphoryl hóa ở mức cơ chất, ba phân tử khác tạo thành ở trên chuỗi hô hấp.

Toàn bộ quá trình oxy hóa cuối cùng - oxy hóa hydro từng bậc bằng oxy phân tử liên hợp với quá trình phosphoryl hóa oxy hóa có thể minh họa bằng sơ đồ dưới đây :



Cơ chế của quá trình phosphoryl hóa oxy hóa cho đến nay chưa thật rõ hoàn toàn. Có rất nhiều giả thuyết nêu lên để giải thích cơ chế liên hợp năng lượng này. Song, tựu trung lại có ba nhóm giả thuyết sau :

1 - *Luận điểm hóa học về liên hợp năng lượng của Lipman, Sleiter, Leninger và Hunter...* cho rằng sự liên hợp chuyển vận electron với phosphoryl hóa được thực hiện nhờ sản phẩm trung gian nào đó tham gia vào cả hai loại phản ứng. Sản phẩm trung gian này không chứa ADP, cũng không có phosphat vô cơ. Các tác giả của thuyết này giả định rằng có một chất chuyển nào đó ở dạng khử (AH_2) tương tác với chất chuyển đứng nối tiếp với nó (B) trong chuỗi khi có mặt một hợp chất (X) nửa và khử B thành BH_2 . Đồng thời, tạo thành liên kết cao năng ($\sim$) giữa các hợp chất BH_2 và X, nghĩa là xuất hiện hợp chất $BH_2 \sim X$ tích lũy một lượng năng lượng tương ứng với ATP. Hợp chất này lại tham gia phản ứng với một chất giả thiết khác (Y) để tạo ra sản phẩm cao năng trung gian ($X \sim Y$). Song đến giai đoạn tiếp theo, năng lượng của $X \sim Y$ được truyền sang phosphat vô cơ và tạo ra $Y \sim P_{vc}$, khi đó X được giải phóng. Sau đó $Y \sim P_{vc}$ tương tác với ADP và hình thành ATP ; Y lại chuyển về trạng thái tự do. Toàn bộ chuyển hóa trên đây có thể biểu diễn bằng các phương trình dưới đây :



Như vậy, $X \sim Y$ đóng vai trò cầu nối trung gian giữa các chất chuyển electron và các enzym phosphoryl hóa. Cho đến nay đã hơn nửa thế kỷ từ khi học thuyết "cổ điển" này ra đời, nó vẫn chưa có bằng chứng thực nghiệm đầy đủ để chứng minh sự đúng đắn của mình.

2 - *Luận điểm cơ hóa của Boyer, Banks, Vernon ...* Luận điểm này cho rằng, đầu tiên năng lượng chuyển vận electron được chuyển thành cơ năng (làm biến dạng

ti thể) rồi sau đó mới thành hóa năng tiềm tàng trong phân tử ATP. Luận điểm này còn nhiều chỗ yếu và ngày càng ít người ủng hộ.

3 - *Luận điểm hóa thẩm thấu của Mitchell.* Ông giả thiết rằng, trong quá trình hô hấp giữa hai phía của màng trong ti thể xuất hiện *hiệu thế điện hóa các ion* H^+ . Chính hiệu thế điện hóa H^+ này ($\Delta\mu H^+$) là nguồn năng lượng để tổng hợp ATP. Hiệu thế điện hóa các ion H^+ , theo Mitchell, gồm hai cấu tử hợp phần là *điện thế màng* ($\Delta\psi$) và *gradien pH* :

$$\Delta\mu H^+ = \Delta\psi - Z\Delta pH.$$

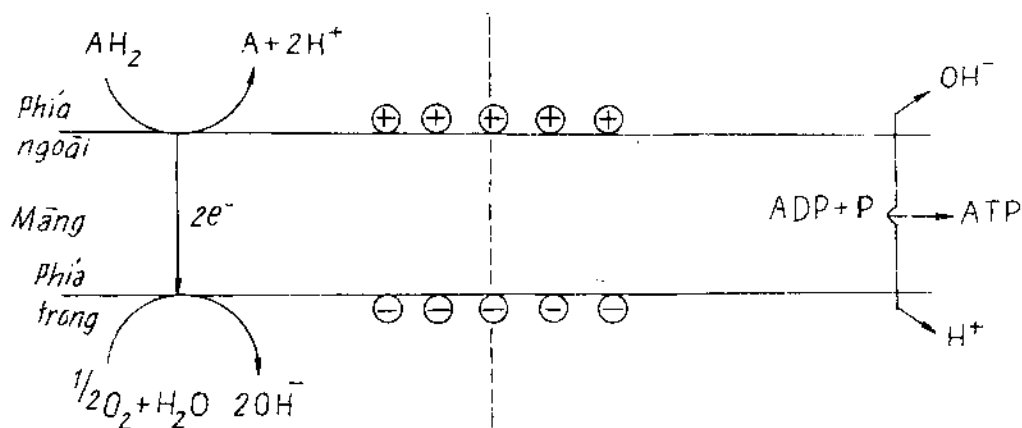
Trong quá trình oxy hóa cơ chất, các ion hydro tích điện dương chuyển dịch một phía của màng, còn electron chuyển về phía khác. Sự phân bố điện tích này dẫn đến xuất hiện một điện trường. Do màng trong của ti thể rất ít thấm dẫn đối với proton và ion nên nó giống như là một tụ điện và làm phát sinh gradien, gradien nồng độ H^+ được thể hiện ở sự tồn tại *điện thế màng*.

Hầu hết các dẫn liệu thực nghiệm thu được đều có thể giải thích được bằng luận điểm hóa thẩm thấu của Mitchell. Một vài năm gần đây ở một số phòng thí nghiệm tiên tiến trên thế giới (Skulachev - Nga, Racker - Mỹ, Mitchell - Anh...) đã thu được những bằng chứng thực nghiệm chứng minh sự đúng đắn của học thuyết này.

Sơ đồ cơ chế phosphoryl hóa oxy hóa theo Mitchell có thể biểu diễn như sau :

Gradien proton xuất hiện khi
chuyển vận electron

Phosphoryl hóa bằng cách đảo chiều phản
ứng ATP - aza khi có gradien proton



II.2.4.3. Vai trò của ATP và hiệu suất tích lũy năng lượng

Như đã trình bày trên đây, năng lượng được giải phóng ra trong quá trình oxy hóa sinh học tích lũy ở dạng các liên kết phosphat cao năng. Năng lượng của các liên kết này có tính chất tuyệt diệu, cho phép nó chuyển hóa dễ dàng sang các dạng năng lượng khác - hóa năng, nhiệt năng, cơ năng, điện năng, ... cần cho hoạt động sống của tế bào.

Các liên kết cao năng có trong ATP, ADP, glixerin diphosphat, argininphosphat, axetylcoenzim A, v.v. (xem bảng 2.3).

Trong số các hợp chất cao năng ATP chiếm vị trí đặc biệt. Trước hết, sự tạo thành các liên kết cao năng của ATP luôn luôn là giai đoạn thu năng lượng cuối cùng của các phản ứng oxy hóa - khử. ATP lại là chất cho năng lượng trực tiếp đối với đa số các phản ứng thu nhiệt của sự trao đổi chất. Các hợp chất cao năng khác chỉ là sản phẩm trung gian để tạo ra ATP hoặc được tạo thành từ ATP. Tóm lại, ATP có vai trò quan trọng bậc nhất trong các chuyển hóa năng lượng và là mắt xích liên hợp giữa các phản ứng tỏa nhiệt và thu nhiệt. Do đó, ATP là chất cho năng lượng vạn năng, tạo nên nguồn lượng dự trữ chung của tế bào. Chính vì thế, việc tổng hợp ATP trong quá trình oxy hóa sinh học là một phương pháp tích lũy năng lượng vạn năng và mang tính chất thống nhất hóa. Đồng thời, qua đó ta thấy rõ ý nghĩa của các chuyển hóa oxy hóa - khử cơ chất hô hấp là ở chỗ từ dạng năng lượng không đặc hiệu của các liên kết hóa học bất kỳ chất nào cũng tạo nên dạng năng lượng đặc hiệu thống nhất (ATP).

Bảng 2.3

Nhóm chất	Kiểu liên kết	Năng lượng tự do, kcal/mol	Chất
Polyphosphat nucleotit	$ \begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{OH} \\ \parallel \qquad \\ \text{R}-\text{O}-\text{P} \sim \text{O}-\text{P}- \\ \qquad \parallel \\ \text{OH} \qquad \text{O} \end{array} $	7 - 16	ATP, ADP
Carbonylphosphat	$ \begin{array}{c} -\text{C}-\text{O} \sim \text{P} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} $	11,5	Phosphoenolpiruvat
Axylphosphat	$-\text{C}-\text{O} \sim \text{P}$	12	Glixerin - 1,3 - diphosphat axetylphosphat
Guanidinphosphat	$-\text{N} \sim \text{P}$	8	Arginin-phosphat
Axylmercaptan	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C} \sim \text{S}-\text{P} \end{array} $	7	Axylcoenzim A

Xét toàn bộ quá trình oxy hóa sinh học đường hexoza bao gồm cả hai giai đoạn yếm khí và hiếu khí thì trong quá trình đường phân (giai đoạn cung cấp năng lượng cho các quá trình lên men) các chuyển hóa của glucoza tới axit piruvic chỉ tạo ra trực tiếp có hai phân tử ATP bằng con đường phosphoryl hóa ở mức cơ chất, đồng

thời sản sinh ra hai phân tử NAD.H_2 . Chất này khi qua chuỗi hô hấp bị oxy hóa và bằng con đường phosphoryl hóa tạo ra sáu phân tử ATP.

Hai phân tử axit piruvic được hình thành từ phân tử hexoza khi bị oxy hóa đến axetylcoenzim A cũng sản sinh ra hai phân tử NAD.H_2 rồi cũng tương tự như trên qua chuỗi hô hấp sẽ tạo ra sáu phân tử ATP.

Khi oxy hóa hoàn toàn hai phân tử axetylcoenzim A trong chu trình Krebs và trên chuỗi hô hấp tạo nên 24 phân tử ATP.

Như vậy là khi oxy hóa hoàn toàn một phân tử gam hexoza đến CO_2 và H_2O giải phóng ra một lượng năng lượng tương ứng với 38 (mol) ATP, tức là 380 000 cal. Hiệu suất tích lũy năng lượng trong quá trình này khoảng 55% toàn bộ năng lượng tiềm tàng trong phân tử hexoza (khi đốt cháy một mol glucoza tỏa ra 690 000 cal. Hiệu suất sử dụng năng lượng này vượt xa các loại máy móc hoàn thiện nhất. Trong đó, năng lượng giải phóng ra ở giai đoạn đường phân được tích lũy trong ATP bằng phosphoryl hóa ở mức cơ chất chỉ chiếm có khoảng 5%. Còn toàn bộ năng lượng tiềm tàng trong cơ chất được giải phóng ra ở chu trình Krebs và tích lũy trong ATP bằng phosphoryl hóa oxy hóa. "Hiệu suất" năng lượng tích lũy trong ATP của quá trình lên men thua 19 lần sự hô hấp hiếu khí

Trên đây là những điểm cơ bản về bản chất và cơ chế của quá trình oxy hóa sinh học liên hợp với sự phosphoryl hóa oxy hóa.

Tuy vậy, sự phosphoryl hóa oxy hóa (tổng hợp ATP) tuyệt nhiên không phải là quá trình duy nhất phụ thuộc trực tiếp vào sự chuyển vận electron trong ti thể. Có những phản ứng tiêu thụ năng lượng được tiến hành nhờ năng lượng của chính phản ứng liên hợp hoặc nhờ các sản phẩm hoạt động trung gian được tạo thành trong phản ứng liên hợp. Điện thế màng là một dạng năng lượng thống nhất hóa trong tế bào, gần đây được xem như là một mắt xích trung gian liên hợp hai quá trình oxy hóa và phosphoryl hóa. Người ta đã chứng minh được rằng điện thế màng thực chất hoàn thành tất cả các chức năng của một hợp chất cao năng trung gian vận năng, tham gia vào các loại hoạt động hóa học, thẩm thấu khác nhau cũng như sản sinh ra nhiệt năng. Do vậy, người ta cũng đi đến kết luận rằng tế bào sống không phải chỉ có một mà là hai dạng năng lượng thống nhất hóa : hóa năng ATP và điện năng (điện thế màng). Bởi lẽ, tế bào với một hệ màng rất phát triển. Nếu chỉ sử dụng có một chất chuyển năng lượng ái nước là ATP thì việc trao đổi năng lượng giữa các cấu trúc nội tế bào sẽ gặp nhiều khó khăn. Nhiệm vụ này sẽ rất đơn giản nếu như truyền năng lượng trực tiếp theo màng ở dạng điện thế màng.

Trong những năm gần đây, người ta đã phát hiện thấy rằng trong tế bào sống không phải bất kỳ lúc nào và không phải quá trình oxy hóa nào cũng liên hợp với sự phosphoryl hóa ở mức độ khác nhau. Sự chuyển hydro và electron đến oxy phân tử có thể tiến hành không liên hợp với sự phosphoryl hóa. Khi đó, quá trình này gọi là *sự oxy hóa tự do*. Sự oxy hóa tự do được tiến hành trên bề mặt ti thể và trong tế bào chất. Ở màng ngoài của ti thể có các hệ enzym oxy hóa - khử không tương tác với các enzym liên hợp phosphoryl hóa nằm ở màng trong ti thể. Các hệ này cũng gồm các enzym oxy hóa và các chất chuyển trung gian thông thường. Có lẽ chức năng chính của chúng là tạo ra các sản phẩm oxy hóa trung gian và nhiệt năng. Hai kiểu phosphoryl oxy hóa và oxy hóa tự do ở tế bào liên quan tương hỗ

với nhau. Tùy thuộc vào trạng thái sinh lý của cơ thể, nhiệt độ môi trường xung quanh, nhịp độ sinh trưởng, sự có mặt của các hormone riêng biệt, sinh tố, các ion, v.v. mà hoặc là tăng cường oxy hóa tự do, hoặc chỉ xúc tiến oxy hóa liên hợp với phosphoryl hóa.

II.2.5. Sự khác nhau giữa quá trình oxy hóa - khử sinh học và oxy hóa - khử thông thường

Có thể nói một cách khái quát rằng sự oxy hóa sinh học là sự oxy hóa các cơ chất tự nhiên xảy ra trong cơ thể sinh vật do các enzyme đặc hiệu xúc tác. Các quá trình này xảy ra trong các hệ sinh học có lịch sử phát triển và tiến hóa rất dài và ngày càng hoàn thiện với cấu trúc ở mức độ phân tử vô cùng tinh tế cũng như các cơ chế chuyển hóa và sử dụng năng lượng hết sức kỳ diệu cho phép sử dụng năng lượng với hiệu suất cao nhất. Chính vì thế mà giữa sự oxy hóa sinh học và sự cháy thông thường có những điểm khác biệt nhau về nguyên lý. Ta có thể tóm tắt sơ lược sự khác biệt này ở những điểm sau :

- Sự oxy hóa sinh học không phải là phản ứng phát nhiệt một giai đoạn như sự cháy, mà là một chuỗi phản ứng trong đó năng lượng được giải phóng ra, một mặt dưới dạng bức xạ nhiệt, mặt khác phần lớn được tích lũy ở dạng liên kết hóa học đặc biệt gọi là liên kết cao năng ;

- Sự oxy hóa trong các hệ sinh học hầu như luôn là quá trình có xúc tác enzyme, cho nên cũng có thể nói rằng đây là sự oxy hóa có xúc tác enzyme ;

- Nhìn chung, khi đốt cháy các chất hữu cơ (ở ngoài cơ thể) năng lượng được giải thoát ra nhờ sự oxy hóa cacbon đến cacbon dioxyt. Trong lúc đó, phản ứng oxy hóa từng bậc hydro đến nước xảy ra trong quá trình oxy hóa sinh học ở cơ thể lại là phản ứng cung cấp năng lượng. Phản ứng oxy hóa hydro này ở điều kiện thường là phản ứng nổ.

Hầu như là ở mọi tế bào tiến trình oxy hóa liên hợp với việc sản sinh ra năng lượng đều tuân theo các giai đoạn sau :

- Tạo ra các đoạn mạch hai cacbon (axetylcoenzim A). Axetylcoenzim A có thể có nhiều nguồn gốc khác nhau tùy thuộc vào những bộ cơ chất tham gia vào quá trình oxy hóa (ví dụ, nó xuất hiện trong quá trình đường phân hexoza, trong sự oxy hóa axit béo, v.v.). Do vậy mà các phản ứng đưa đến xuất hiện axetylcoenzim A cũng khác nhau ;

- Chuyển hóa các hợp chất hai cacbon trong chu trình xitrat. Ở đây hình thành nên cacbon dioxyt (bằng cách khử cacboxyl hóa cơ chất), NAD.H_2 , NADP.H_2 và flavin khử. Sự tạo thành CO_2 không liên hợp với sự thải ra năng lượng ;

- Oxy hóa NAD.H_2 , NADP.H_2 hay flavin khử trong chuỗi hô hấp tạo ra H_2O và năng lượng.

Số lượng hệ enzyme oxy hóa - khử không lớn lắm. Do đặc điểm của đối chất ban đầu (gluxit, lipid, axit amin,...) mà các phản ứng tiến khởi rất khác nhau, song các giai đoạn cuối cùng đều tiến hành theo một sơ đồ chung với vận tốc lớn. Đây là một đặc điểm khác biệt nổi bật, biểu hiện tính thống nhất và sự liên quan khăng khít giữa các quá trình trao đổi chất ở cơ thể sinh vật cũng như khả năng sử dụng nhiều loại cơ chất phong phú của thức ăn.

CHƯƠNG III

PROTEIN

III.1. VAI TRÒ VÀ GIÁ TRỊ CỦA PROTEIN TRONG DINH DƯỠNG VÀ TRONG CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

III.1.1. Vai trò sinh học của protein

Protein là thành phần không thể thiếu được của tất cả các cơ thể sống. Protein là nền tảng về cấu trúc và chức năng của cơ thể sinh vật. Dưới đây là một số chức năng quan trọng của protein.

III.1.1.1. Xúc tác

Các protein có chức năng xúc tác các phản ứng gọi là enzym. Hầu hết các phản ứng của cơ thể sống từ những phản ứng đơn giản nhất như phản ứng hydrat hóa, phản ứng khử nhóm cacboxyl đến những phản ứng phức tạp như sao chép mã di truyền,... đều do enzym xúc tác.

III.1.1.2. Vận tải

Một số protein có vai trò như những "xe tải" vận chuyển các chất trong cơ thể. Ví dụ, hemoglobin, mioglobin (ở động vật có xương sống), hemoxiamin (ở động vật không xương sống) kết hợp với oxy rồi tải oxy đến khắp các mô và cơ quan trong cơ thể. Nhờ các chất "tải" này, mặc dù oxy có độ hòa tan trong nước thấp vẫn đảm bảo thỏa mãn được nhu cầu oxy của cơ thể.

III.1.1.3. Chuyển động

Nhiều protein trực tiếp tham gia trong quá trình chuyển động như : cơ cơ, chuyển vị trí của nhiễm sắc thể trong quá trình phân bào.

Ở động vật có xương sống có sự co cơ vẫn được thực hiện nhờ chuyển động trượt trên nhau của hai loại sợi protein : sợi to chứa protein miozin và sợi mảnh chứa các protein actin, troponiozin và troponin.

III.1.1.4. Bảo vệ

Các kháng thể trong máu động vật có xương sống là những protein đặc biệt có khả năng nhận biết và "bắt" những chất lạ xâm nhập vào cơ thể như protein lạ, virus, vi khuẩn hoặc tế bào lạ. Như vậy ở đây ta thấy protein như những "lính gác" nhận biết được những vật lạ để loại trừ chúng ra khỏi cơ thể.

Các interferon là những protein do tế bào động vật có xương sống tổng hợp và tiết ra để chống lại sự nhiễm virus. Tác dụng của các interferon rất mạnh chỉ cần ở nồng độ 10^{-11} M đã có hiệu quả kháng virus rõ rệt. Interferon kết hợp vào màng nguyên sinh chất của các tế bào khác trong cơ thể và cảm ứng trạng thái kháng virus của chúng.

Các protein tham gia trong quá trình đông máu có vai trò bảo vệ cho cơ thể sống khỏi bị mất máu.

Ở một số thực vật có chứa các protein có tác dụng độc đối với động vật, ngay cả ở liều lượng rất thấp chúng có tác dụng bảo vệ thực vật khỏi sự phá hại của động vật.

III.1.1.5. Truyền xung thần kinh

Một số protein có vai trò trung gian cho phản ứng trả lời của tế bào thần kinh đối với các kích thích đặc hiệu. Ví dụ, vai trò của chất màu thị giác rodopsin ở màng lưới mắt (xem phần vitamin A).

III.1.1.6. Điều hòa

Một số protein có chức năng điều hòa quá trình truyền thông tin di truyền, điều hòa quá trình trao đổi chất. Protein điều hòa quá trình biểu hiện gen, như các protein repressor ở vi khuẩn có thể làm ngừng quá trình sinh tổng hợp enzym của các gen tương ứng. Ở cơ thể bậc cao sự điều hòa hoạt động biểu hiện gen theo một cơ chế phức tạp hơn, nhưng các protein cũng đóng vai trò quan trọng.

Các protein có hoạt tính hormon, các protein ức chế đặc hiệu enzym đều có chức năng điều hòa nhiều quá trình trao đổi chất khác nhau.

III.1.1.7. Kiến tạo chống đỡ cơ học

Các protein này thường có dạng sợi như sclerotin trong lớp vỏ ngoài của côn trùng, fibroin của tơ tằm, tơ nhện, collagen, elastin của mô liên kết, mô xương, collagen bảo đảm độ bền và tính mềm dẻo của mô liên kết.

III.1.1.8. Dự trữ dinh dưỡng

Protein còn là chất dinh dưỡng quan trọng cung cấp các axit amin cho phôi phát triển. Ví dụ, ovalbumin trong lòng trắng trứng, gliadin trong hạt lúa mì, zein của ngô, ferritin (dự trữ sắt) trong lá.

III.1.2. Giá trị dinh dưỡng của protein

- Protein là hợp phần chủ yếu, quyết định toàn bộ các đặc trưng của khẩu phần thức ăn. Chỉ trên nền tảng protein cao thì tính chất sinh học của các cấu tử khác mới thể hiện đầy đủ.

- Khi thiếu protein trong chế độ ăn hàng ngày sẽ dẫn đến nhiều biểu hiện xấu cho sức khỏe như suy dinh dưỡng, sút cân mau, chậm lớn (đối với trẻ em), giảm khả năng miễn dịch, khả năng chống đỡ của cơ thể đối với một số bệnh.

- Thiếu protein sẽ gây ảnh hưởng xấu đến hoạt động bình thường của nhiều cơ quan chức năng như gan, tuyến nội tiết và hệ thần kinh.

- Thiếu protein cũng sẽ làm thay đổi thành phần hóa học và cấu tạo hình thái của xương (lượng canxi giảm, lượng magie tăng cao). Do vậy mức protein cao chất lượng tốt (protein chứa đủ các axit amin không thay thế) là cần thiết trong thức ăn cho mọi lứa tuổi.

III.1.3. Vai trò của protein trong công nghệ thực phẩm

Ngoài giá trị sinh học và dinh dưỡng trong công nghệ sản xuất thực phẩm, protein cũng có vai trò rất quan trọng :

- Protein là chất có khả năng tạo cấu trúc, tạo hình khối, tạo trạng thái cho các sản phẩm thực phẩm. Nhờ khả năng này mới có qui trình công nghệ sản xuất ra các sản phẩm tương ứng từ các nguyên liệu giàu protein.

Ví dụ, nhờ có protein của tơ cơ ở thịt, cá mới tạo ra được cấu trúc gel cho các sản phẩm như giò lụa kamaboko. Công nghệ sản xuất bánh mì là dựa trên cơ sở tính chất tạo hình, tính chất cố kết và tính chất giữ khí của hai protein đặc hữu trong bột mì là gliadin và glutenin.

Nhờ có các protein hòa tan của malt mà bột CO₂ (một thành tố quan trọng của chất lượng bia) trong bia mới giữ được bền. Nhờ tính chất đặc thù của casein trong sữa mới chế tạo ra được 2 000 loại phomat hiện nay trên thế giới.

Gelatin của da có khả năng tạo ra gel và giữ gel bền bằng liên kết hydro nên mới có công nghệ tạo ra màng để bọc kẹo và bao các thuốc viên (mà khi cho vào miệng thì với nhiệt độ thân nhiệt đủ phá vỡ liên kết hydro và gel tan chảy).

- Protein còn gián tiếp tạo ra chất lượng cho các thực phẩm.

Các axit amin (từ protein phân giải ra) có khả năng tương tác với đường khi gia nhiệt để tạo ra được màu vàng nâu cũng như hương thơm đặc trưng của bánh mì gồm 70 cấu tử thơm.

Hình thơm đặc trưng của chè gồm tới 34 cấu tử thơm cũng là nhờ các axit amin và các polyphenol của lá chè tương tác với nhau khi gia nhiệt.

Các protein còn có khả năng cố định mùi tức là khả năng giữ hương được lâu bền cho thực phẩm.

III.2. CẤU TẠO PHÂN TỬ PROTEIN

III.2.1. Thành phần nguyên tố của protein

Tất cả các protein đều chứa các nguyên tố C, H, O, N. Một số còn có chứa một lượng nhỏ S. Tỷ lệ phần trăm khối lượng các nguyên tố này trong phân tử protein như sau :

C : 50 - 55% ; H : 6,5 - 7,3% ; O : 21 - 24% ;

N : 15 - 18% và S : 0 - 0,24%.

Ngoài các nguyên tố trên, một số protein còn chứa một lượng rất nhỏ các nguyên tố khác như : P, Fe, Zn, Cu, Mn, Ca,...

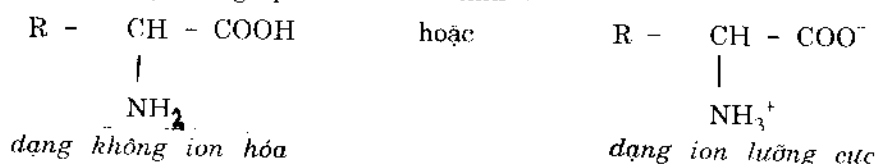
III.2.2. Đơn vị cấu tạo cơ sở của protein

- Axitamin là cấu tử cơ bản của protein, hay nói một cách khác, axitamin là những "viên gạch" để xây nên "các tòa lâu đài muôn hình nghìn vẻ" của phân tử protein.

- Axitamin là những hợp chất hữu cơ mạch thẳng hoặc mạch vòng trong phân tử có chứa ít nhất một nhóm amin ($-\text{NH}_2$), và một nhóm cacboxyl ($-\text{COOH}$).

- Các axitamin thường gặp trong các protein (trong tự nhiên) là những $L - \alpha$ - axitamin có nhóm amin đính vào nguyên tử cacbon α đứng cạnh nhóm cacboxyl.

- Công thức cấu tạo tổng quát của axitamin :



R : được gọi là mạch bên hay nhóm bên, vậy là các axitamin chỉ khác nhau ở mạch R.

Đa số các protein đều được cấu tạo từ 20 $L - \alpha$ - axitamin và 2 amit tương ứng.

III.2.2.1. Các axitamin thường gặp

Dựa vào đặc tính mạch bên người ta phân chia các axitamin thường gặp thành một số nhóm chính (bảng 3.1)

Bảng 3.1. Các axit amin thường gặp trong phân tử protein

Tên gọi	Công thức cấu tạo	Độ tan, g/100 gH ₂ O	PI	Tên viết tắt ba chữ	Ký hiệu một chữ
1	2	3	4	5	6
AXITAMIN					
MẠCH THẲNG					
1. Axit monoamin monocacboxyl					
Glixin (axit aminoaxetic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	24,99	5,97	Gly	G
L (+) Alanin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	16,51	6,0	Ala	A
L (-) Lixin (axit α - amino - izocaproic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \diagdown \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	2,19	5,98	Leu	L

Tiếp bảng 3.1

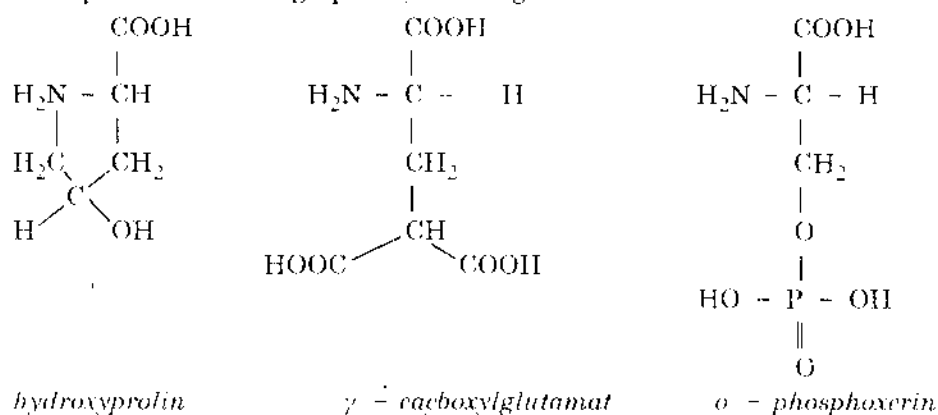
1	2	3	4	5	6
L (+) Izoldxin (axit α - amino - β -methyl valeric)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{C}_2\text{H}_5 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	4,117	6,02	Ile	I
L (+) Valin (axit α - amino- izovaleric)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	8,85	5,96	Val	V
L (-) Xerín (axit α - amino β -hydroxypropionic)	$\text{CH}_2(\text{OH}) - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	5,023 (DL)	5,68	Ser	S
L(-) Treonin (axit α - amino - β - hydroxybutiric)	$\text{CH}_3 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	20,5 (DL)	6,16	Thr	T
2. Axit monoamin dicarboxylic					
L (-) Aspartic (axit α -amino- suxinic)	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	0,500	2,77	Asp	D
L (+) Glutamic (axit α - amino- glutaric)	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	0,843	3,22	Glu	E
3. Axit diamin monocarboxylic					
L (+) Lizin (axit α - ϵ - diaminocaproic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$		9,74	Lys	K
L (+) Arginin (axit α - amino - δ - guanidinvaleric)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{C}=\text{NH} \quad \quad \quad \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$		10,76	Arg	R
4. Axitamin có chứa lưu huỳnh					
L (-) Xistein (axit α - amino- β -tioproponic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{SH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$		5,07	Cys	C
L (-) Xistin (dixit α - amino- β -tioproponic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \end{array}$		4,80		

Tiếp bảng 3.1

1	2	3	4	5	6
L(-) Metionin (axit α -amino γ -metyltio- butiric) AXITAMIN VÒNG THỎM	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \qquad \\ \text{S} - \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	3,35 (DL)	5,74	Met	M
L(-) Phenyl- alamin (axit α -amino- β -phenyl propionic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \\ \text{C}_6\text{H}_5 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	2,965	5,48	Phe	F
L(-) Tyrozin (axit α -amino- β -hydroxyphenyl propionic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \\ \text{C}_6\text{H}_4 \quad \text{NH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	0,045	5,66	Tyr	Y
AXITAMIN DỊ VÒNG L(-) Tryptophan (axit α -amino β -indolylpropionic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \\ \text{Indole} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	1,14	5,89	Trp	W
L(-) Histidin (axit α -amino β -imidazolyl- propionic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \\ \text{Imidazole} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	4,29	7,59	His	H
L(-) Prolin (axit α -pirolidin- cacboxylic)	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{Pyrrolidine ring} \end{array}$	162,3	6,30	Pro	P
AMIT CỦA AXIT- AMIN Asparagin (amit của axit aspartic)	$\begin{array}{c} \text{CO} - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	3,11 (28°C)	5,41	Asp.NH ₂	B
Glutamin (amit của axit glutamic)	$\begin{array}{c} \text{CO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	3,6 (18°C)	5,65	Glu.NH ₂	Q

III.2.2.2. Các axitamin ít gặp

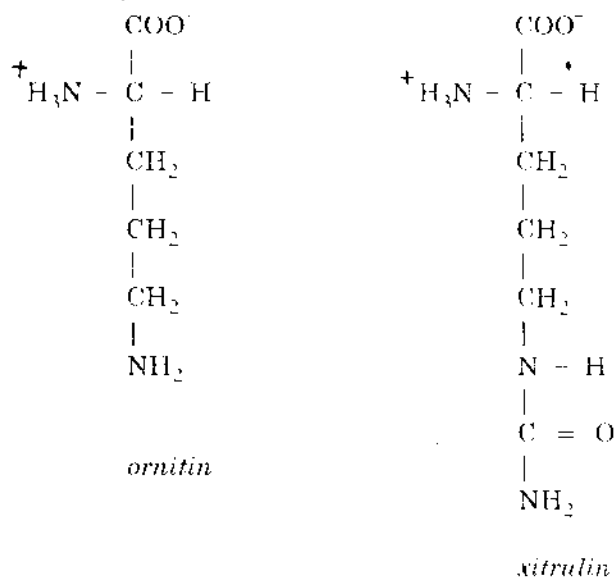
Ngoài các axitamin đã nêu trên trong phân tử một số protein còn chứa một số axitamin khác. Các axitamin này thường là dạng hiệu chỉnh của các axitamin thường gặp đã nêu. Quá trình hiệu chỉnh thường xảy ra sau khi chuỗi polypeptit đã được tổng hợp. Ví dụ, collagen có chứa hydroxyprolin, hydroxylizin; protrombin có chứa cacboxylglutamic, nhiều protein khác có chứa phosphoxerin. Các axitamin này có vai trò quan trọng trong cấu trúc và chức năng của các protein tương ứng. Hydroxyprotein làm tăng độ bền của sợi collagen. Cacboxylglutamat đảm bảo thực hiện vai trò của protrombin trong quá trình đông máu v.v.



III.2.2.3. Các axitamin không có trong protein nhưng được tìm thấy trong cơ thể sống

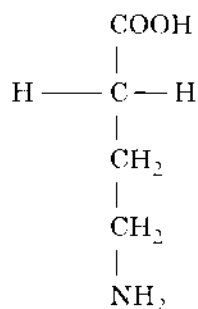
Ornitin và xitruclin là sản phẩm trung gian quan trọng của các quá trình trao đổi chất.

Công thức cấu tạo :

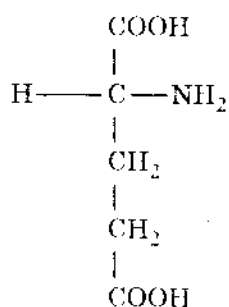


Axit γ - aminobutiric có vai trò truyền xung thần kinh.

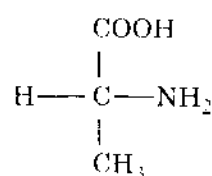
Một số D - axitamin như D - glutamic có trong vách tế bào của nhiều vi khuẩn. D-alanin có trong ấu trùng của một số sâu bọ.



axit γ - aminobutiric



axit D - glutamic



D - alanin

III.2.2.4. Axitamin cần thiết (axitamin không thay thế)

Trong số 20 axitamin thường gặp trong phân tử protein có một số axitamin mà cơ thể người và động vật không thể tự tổng hợp được mà phải đưa từ ngoài vào qua thức ăn gọi là axitamin cần thiết hoặc axitamin không thay thế.

Khi thiếu, thậm chí chỉ một trong số các axitamin cần thiết có thể làm cho protein được tổng hợp ít hơn protein bị phân giải kết quả dẫn đến cân bằng nitơ âm. Các axitamin cần thiết đối với cơ thể còn tùy thuộc vào những điều kiện riêng biệt loài động vật, lứa tuổi ... Theo nhiều tài liệu có tám axitamin cần thiết cho người lớn : valin, leuxin, izoleuxin, metionin, treonin, phenylalanin, triptophan và lyzin. Đối với trẻ em có thêm hai axitamin cần thiết : arginin và histidin.

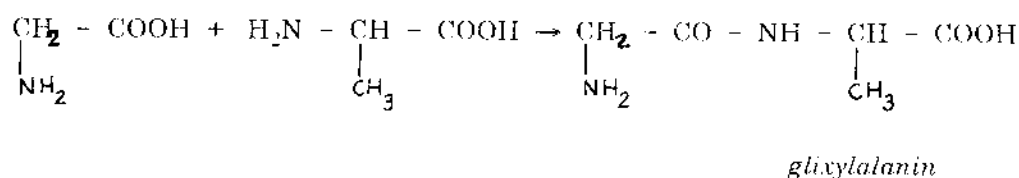
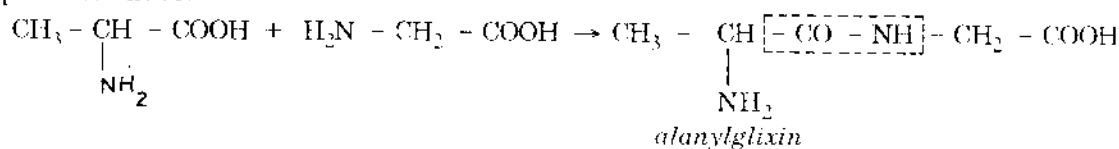
Hàm lượng các axitamin không thay thế và tỉ lệ giữa chúng trong phân tử protein là một tiêu chuẩn quan trọng để đánh giá chất lượng protein.

III.2.3. Các mức cấu trúc của protein

III.2.3.1. Cấu trúc bậc một

Cấu trúc bậc một của protein là thành phần và trình tự sắp xếp các gốc axitamin trong mạch polypeptit. Cấu trúc này được giữ vững nhờ liên kết peptit (liên kết đồng hóa trị).

Liên kết peptit (-CO-NH-) được tạo thành do phản ứng kết hợp giữa nhóm α - cacboxyl của một axitamin này với nhóm α - amin của một axitamin khác, loại đi một phân tử nước.



Sản phẩm của phản ứng giữa hai axitamin là dipeptit. Nếu có 3, 4, 5... hoặc nhiều axitamin kết hợp không lặp lại với nhau thì sẽ có : tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit ... và polypeptit.

Cách gọi tên các peptit

Ghép tất cả tên các axitamin cấu tạo nên nó theo thứ tự sắp xếp của chúng trong chuỗi peptit bắt đầu từ axitamin thứ nhất, nhưng axitamin nào có nhóm cacboxyl tham gia trong liên kết peptit thì đuôi của nó đổi thành "yl". Theo cách kết hợp này có liên kết peptit nằm trên một mạch thẳng không phân nhánh có hai đầu khác nhau gọi là đầu "N" (có nhóm α - amin tự do) và đầu "C" (có nhóm α - cacboxyl tự do). Đánh số thứ tự các gốc axitamin trong chuỗi peptit bắt đầu từ đầu "N" và ký hiệu bằng dấu "+" và đầu "C" bằng dấu "-".

Từ hai axitamin có thể tạo thành các peptit khác nhau sau :

Ví dụ, ab, ba, aa, bb : bốn dipeptit

Nếu có ba axitamin khác nhau (a, b, c) tạo thành sáu tripeptit khác nhau.

Nếu có n axitamin thì số đồng phân không lặp lại của n peptit là $n!$.

Số đồng phân lặp lại còn lớn hơn nhiều.

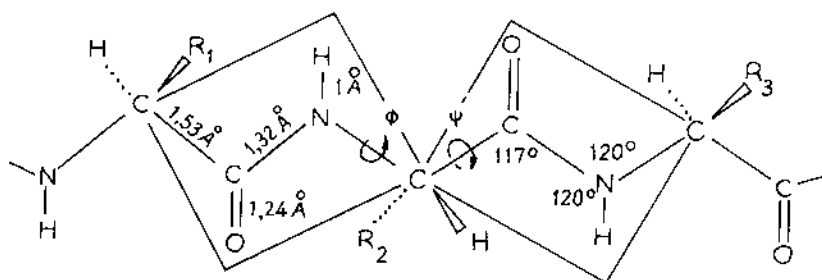
Phân tử protein được cấu tạo từ 20 axitamin khác nhau, nên số lượng đồng phân vô cùng lớn ($2 \cdot 10^{18}$). Tuy nhiên số đồng phân trong thực tế thường ít hơn số đồng phân tính theo lý thuyết nhiều, do trong phân tử protein có các đoạn peptit giống nhau hoặc gần giống nhau.

Hiện nay cấu trúc bậc một của nhiều protein đã được thiết lập, protein có mạch ngắn nhất là từ 20 - 100 axitamin. Đa phần protein có số gốc axitamin giữa 100 và 500, có một số còn có tới hàng ngàn gốc.

Cấu hình không gian của liên kết peptit và chuỗi peptit như sau :

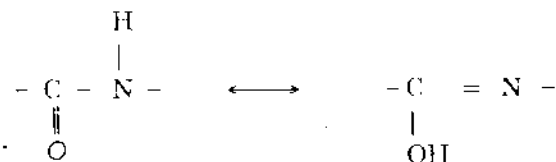
- Bốn nguyên tử của liên kết peptit và hai nguyên tử cacbon α nằm trong cùng một mặt phẳng, trong đó nguyên tử oxy và hydro lại ở vị trí *trans* so với C - N ;
- Các mạch bên $R_1, R_2, R_3 \dots$ ở vị trí *trans* ($\phi = \psi = 180^\circ$) thì nằm bên ngoài mạch polypeptit ;
- Chuỗi peptit có thể được biểu diễn bằng một dãy các mặt phẳng cách nhau bằng những nhóm - HCR -.

Chỉ có các liên kết hóa trị đơn giữa C và C_α và giữa N và C_α là có khả năng quay tự do với các góc xoắn ϕ và ψ xung quanh cacbon α (h.3.1).



Hình 3.1. Cấu trúc một mảnh của chuỗi α - L - polypeptit (cấu hình *trans*) : sáu nguyên tử trong hình bình hành nằm trên cùng một mặt phẳng ϕ và ψ góc xoắn quanh cacbon α : hai liên kết peptit kế bên cacbon α nằm trong cùng một mặt phẳng ; R_1, R_2, R_3 ở vị trí *trans* ($\phi = \psi = 180^\circ$)

Độ dài của liên kết C - N bằng 1,32 Å ngắn hơn độ dài của liên kết đơn C - N bình thường (1,47 Å), còn độ dài của liên kết C = O ở đây bằng 1,24 Å lại lớn hơn độ dài của liên kết C = O bình thường (1,215 Å). Do đó liên kết C - N có một phần mang đặc tính của liên kết đôi (khoảng 40%), nên có thể hình thành dạng enol :



- Liên kết peptit rất bền (thơn 400 J/mol). Độ bền của liên kết này có được là do sự cộng hưởng của hai dạng mesome (đồng phân không hoạt quang) như đã nói ở trên, do đó, một mặt, nhóm - NH - không được proton hóa giữa pH = 0 và pH = 14, mặt khác, sẽ không có sự quay tự do của liên kết - C - N ;

- Cấu trúc bậc một là bản phiên dịch mã di truyền. Cấu trúc bậc một cho biết quan hệ họ hàng và lịch sử tiến hóa của thế giới sống.

Biết được cấu trúc bậc một của một protein cũng tương tự như đọc được một câu văn (hay câu thơ) có ý nghĩa trọn vẹn.

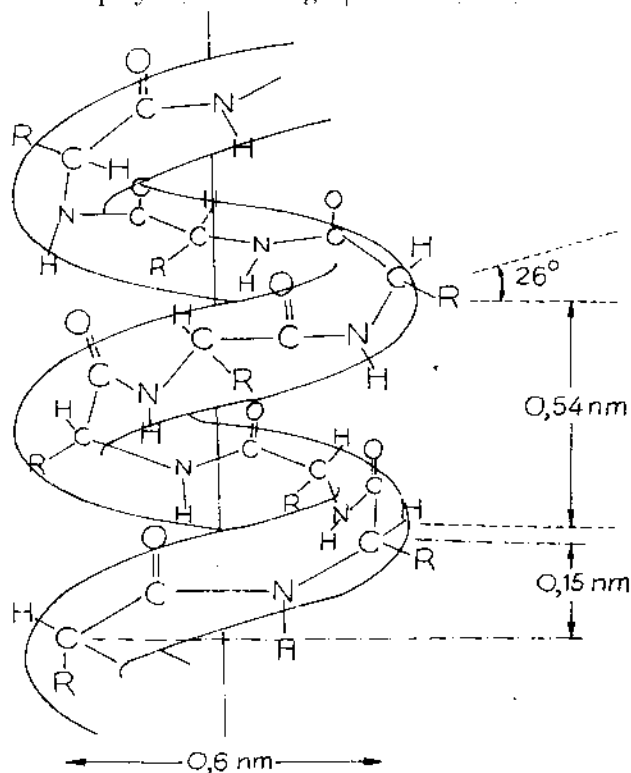
III.2.3.2. Cấu trúc bậc hai

Sự sắp xếp thích hợp trong không gian của một chuỗi polypeptit tạo ra cấu trúc bậc hai.

Do các nguyên tử cacbon α có thể quay tự do xung quanh trục tạo thành bởi các liên kết đồng hóa trị đơn làm cho chuỗi polypeptit có rất nhiều hình thể.

Tuy nhiên trong những điều kiện bình thường, đặc biệt là pH và nhiệt độ, thì mỗi chuỗi protein có một hình thể đặc trưng gọi là hình thể tự nhiên. Về phương diện nhiệt động học, hình thể đó tương ứng với một hệ thống bền, có tổ chức và có năng lượng tự do là cực tiểu. Đương nhiên, để có được một hình thể như thế là tùy thuộc vào độ có cực, độ kỵ nước và độ cứng kénh không gian của các mạch bên R.

Trong các protein, người ta đã phát hiện thấy các cấu trúc bậc hai chủ yếu như sau :



Hình 3.2. Sơ đồ cấu trúc không gian của xoắn phải (R : mạch bên)

- Cấu trúc xoắn ốc : xoắn α , xoắn α_{π} , xoắn γ và xoắn 3_{10} ;
- Cấu trúc gấp nếp β : cấu trúc tờ giấy xếp, cấu trúc mặt cong β .

a) Cấu trúc xoắn α

Cấu trúc xoắn α là cấu trúc có trật tự, rất bền vững, tương tự lò xo. Mỗi vòng xoắn ốc có 3,6 gốc axit amin (18 gốc thì tạo được 5 vòng). Các nguyên tử cacbon α nằm trên đường sinh của hình trụ. Các mạch bên R hướng ra phía ngoài. Đường kính biểu kiến của xoắn ốc (không kể đến các mạch bên R) vào khoảng 0,6 nm. Khoảng cách giữa các vòng (hay là một bước) là 0,54 nm. Góc xoắn là 26° . Có thể có xoắn α phải và xoắn α trái (ngược chiều kim đồng hồ). Với các axit amin thì tạo xoắn trái không thuận lợi.

Xoắn ốc α được giữ chặt bởi một số liên kết hydro tối đa. Các liên kết hydro gần như song song với trục của xoắn ốc và nối nhóm - NH - của liên kết peptit này với nhóm - CO - của liên kết peptit thứ ba kế đó. Cứ mỗi nhóm - CONH - tạo được hai liên kết hydro với hai nhóm - CONH - khác.

Vì mỗi liên kết peptit đều tham gia vào việc tạo liên kết hydro và vì các dipol (lưỡng cực mang điện) được hình thành và cũng được hướng theo chiều như thế nên cấu trúc xoắn α có độ bền rất lớn. Hơn nữa cấu trúc này lại có mật độ dày đặc (thực tế hầu như không có khoảng trống bên trong xoắn) nên sẽ làm giảm tương tác với các phân tử khác (chẳng hạn không có liên kết hydro với các phân tử nước).

Xoắn α rất phổ biến trong mọi protein. Có protein tỉ lệ xoắn đến 75% (như trong hemoglobin và mioglobin) nhưng cũng có protein tỉ lệ xoắn rất thấp (như trong kimotripxin).

Các axit amin như Ala, Leu, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met, His, Asn, Glu, Val có khả năng tạo ra xoắn α bền trong khi đó các axit amin như Ser, Ile, Lys, Arg, Thr, Gly cũng tạo được xoắn α nhưng không bền. Nếu có prolin xen giữa các bước sẽ phá vỡ độ đồng đều của xoắn làm cho nó có hình thể khác đi. Ví dụ, trong casein, các gốc prolin phân bố rất đồng đều làm cho phân tử casein có cấu trúc hình thể cuộn thống kê.

Vì vậy, nếu biết được cấu trúc bậc một của một protein thì có thể dự đoán được tỉ lệ xoắn α cũng như vị trí của cấu trúc xoắn α trong phân tử protein đó.

Thỉnh thoảng trong một số vùng của protein hình cầu còn có cấu trúc xoắn 3_{10} , là một dạng xoắn α với ba gốc axit amin một vòng.

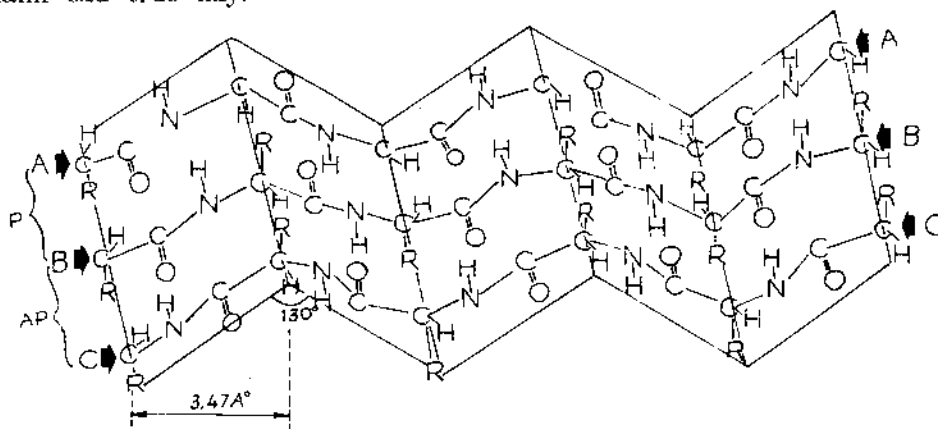
Cấu trúc xoắn α_{π} và xoắn γ thì có 4,4 và 5,2 gốc axit amin trong một vòng, thường ít gặp hơn.

b) Cấu trúc gấp nếp β

Cấu trúc gấp nếp β là một cấu trúc hình chữ chi. Xoắn α có thể chuyển thành cấu trúc gấp nếp β khi không còn các liên kết hydro (chẳng hạn là do nhiệt).

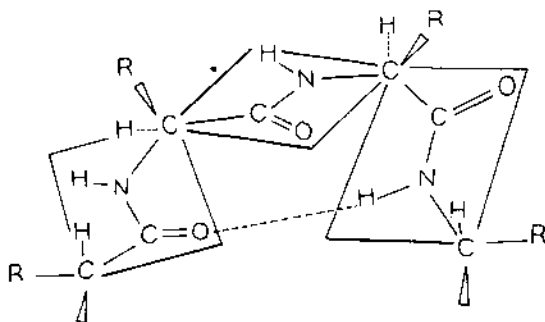
- Các mạch đã duỗi ra sẽ liên kết với nhau bằng liên kết giữa các phân tử để tạo ra cấu trúc tờ giấy xếp. Các mạch polypeptit có thể song song (A và B trong

hình 3.3) hoặc đối song song (B và C trong hình 3.3). Các gốc bên R của các axit amin có thể ở trên hoặc ở dưới mặt phẳng của tờ giấy do đó độ tích điện hoặc độ công kênh không gian của chúng ít có ảnh hưởng đến sự tồn tại của cấu trúc này. Tuy nhiên một số axit amin như Asp, Glu, His, Lys, Pro, Ser không thể tham gia vào cấu trúc này. Có điều là tất cả các liên kết peptit đều tham gia vào sự hình thành cấu trúc này.



Hình 3.3. Cấu trúc không gian của ba chuỗi polypeptit có cấu trúc tờ giấy xếp (cấu trúc β) : P - hai chuỗi A và B song song ;
AP - hai chuỗi B và C đối song song

- Cấu trúc mặt cong β là cấu trúc rất thường gặp (h.3.4). Các chuỗi polypeptit có thể tự gấp lại thành một cấu hình có góc và được ổn định nhờ một liên kết hydro. Có thể coi cấu trúc mặt cong β như là điểm xuất phát của xoắn α với bước bằng không.



Hình 3.4. Sơ đồ cấu trúc mặt cong β : các hình bình hành chỉ vị trí của mỗi liên kết peptit ; đường chấm chấm chỉ cầu nối hydro

- Trong một số protein còn có cấu trúc tương tự xoắn ốc gọi là *polyprolin I* (xoắn trái với 3,3 góc/một vòng, liên kết peptit có hình thể *cis*) và *polyprolin II* (xoắn trái với 3 góc/một vòng, liên kết peptit có hình thể *trans*, khoảng cách giữa hai góc tính từ hình chiếu của chúng trên các trục là 0,31 nm). Hai cấu trúc này có thể chuyển đổi cho nhau và thường thì dạng II trong môi trường nước, bền hơn.

Cấu trúc tương tự xoắn ốc này thường gặp trong collagen, là protein rất giàu trong da, gân, xương và sừng).

- Cấu trúc hình thể cuộn thông kê hay xoắn ngẫu nhiên là một cấu trúc không xác định, không có cả mặt phẳng lẫn trục đối xứng. Cấu trúc kiểu này sẽ hình thành khi những nhóm bên R của các gốc axit amin có mang điện tích hoặc có ảnh hưởng không gian khiến cho chúng không thể tạo ra được cấu trúc xoắn. Khi đó mạch polypeptit sẽ có cấu trúc trong đó khoảng cách giữa các nhóm mang điện tích cùng dấu sẽ là cực đại do đó năng lượng tự do của sự đẩy tĩnh điện là cực tiểu. Chuỗi polyisoleuxin cũng tạo ra được cấu trúc này là do ảnh hưởng không gian của mạch bên.

III.2.3.3. Cấu trúc bậc ba

Chuỗi peptit với các vùng có cấu trúc bậc hai xác định (xoắn α , tờ giấy xếp, mặt cong β) và kém xác định (xoắn ngẫu nhiên) sắp xếp lại thành cấu trúc ba chiều sẽ tạo ra một dạng cấu trúc gọi là cấu trúc bậc ba.

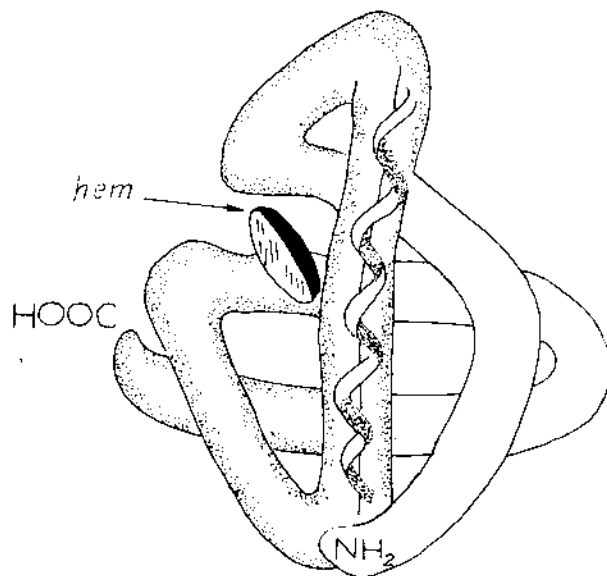
Phần lớn các protein hình cấu trúc bậc ba đã biết, đều hòa tan trong nước. Ở những protein này các gốc axit amin kỵ nước quay vào phía trong, còn các gốc axit amin ưa nước thì được phân bố chủ yếu ở bề mặt một cách khá đều đặn.

Trường hợp, một số protein không hòa tan trong nước, hòa tan trong dung môi hữu cơ thì các axit amin kỵ nước (ví dụ, các lipoprotein) lại phân bố ở trên bề mặt của phân tử.

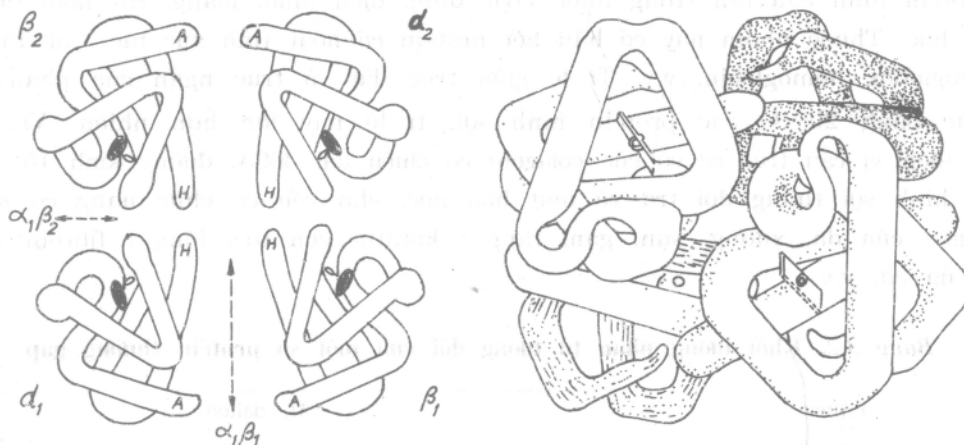
Nếu như ở cấu trúc bậc hai việc làm bền cấu trúc chủ yếu là do liên kết hydro, thì ở cấu trúc bậc ba, sự ổn định của phân tử chủ yếu lại do các tương tác kỵ nước, thứ đến là các liên kết hydro. Ở vùng có liên kết hydro thì có thể tương tác được với các phân tử khác như nước.

III.2.3.4. Cấu trúc bậc bốn

Các "phần dưới đơn vị" có cấu trúc bậc ba liên hợp lại với nhau bằng liên kết phi đồng hóa trị (liên kết hydro, tương tác tĩnh điện, tương tác kỵ nước, tương tác dipol-dipol) tạo ra cấu trúc gọi là cấu trúc bậc bốn. Các phần dưới đơn vị này có thể là giống nhau hoặc không giống nhau và sự sắp xếp của chúng không bắt buộc phải đối xứng.

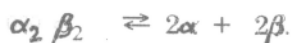


Hình 3.5. Cấu trúc bậc ba của myoglobin



Hình 3.6. Cấu trúc bậc bốn của hemoglobin

Ví dụ, phân tử hemoglobin (Hb) do bốn "phần dưới đơn vị" gồm hai chuỗi α và hai chuỗi β ($\alpha_2 \beta_2$). Mỗi chuỗi α đều tiếp xúc với hai chuỗi β , giữa các chuỗi cùng một loại thì có một số ít tương tác. Dưới tác dụng của ure, Hb có thể bị phân li thuận nghịch như sau :



Mỗi chuỗi có một nhóm hem, là trung tâm để kết hợp oxy. Một phân tử Hb có thể kết hợp với bốn phân tử oxy :



Khi kết hợp với oxy cấu trúc bậc bốn của Hb bị thay đổi ; thể tích phân tử giảm, các phần dưới đơn vị dịch lại gần nhau hơn. Khi tách oxy, thể tích phân tử tăng trở lại.

III.3. MỘT SỐ TÍNH CHẤT QUAN TRỌNG CỦA PROTEIN

Tính chất của protein phụ thuộc vào thành phần trình tự sắp xếp các gốc axitamin trong phân tử của nó. Do cách kết hợp giữa các axitamin trong phân tử protein dễ dàng thấy rằng protein còn mang dấu ấn rõ rệt tính chất các mạch bên của các gốc axitamin cấu tạo nên nó. Ví dụ, một số phản ứng màu đặc trưng, tính chất điện li, v.v. Tuy nhiên, protein có những tính chất hoàn toàn khác axitamin, đó là những tính chất phụ thuộc vào liên kết peptit, phụ thuộc vào cấu trúc không gian phân tử lớn của protein. Sau đây sẽ trình bày chi tiết hơn một số tính chất này.

III.3.1. Khối lượng và hình dạng phân tử protein

Protein có khối lượng phân tử (M_r) tương đối lớn và thay đổi trong một dải rộng từ hơn mười nghìn đến hàng trăm nghìn dalton hoặc lớn hơn nữa (bảng 3.2). Các phân tử lớn này có thể có dạng cầu (hình hạt, hình bầu dục) hoặc dạng sợi. Giữa hai nhóm protein này có khác nhau về một số tính chất.

Các protein hình cầu tan trong nước hoặc dung dịch muối loãng, rất hoạt động về mặt hóa học. Thuộc nhóm này có hầu hết protein có hoạt tính xúc tác : albumin, globulin, mioglobin, hemoglobin, v.v. Tỷ lệ giữa trục dài và trục ngắn của phân tử bé hơn hoặc bằng 20. Ở các protein hình sợi, tỷ lệ này lớn hơn nhiều. Ví dụ, tropocollagen (đơn vị cấu trúc cơ sở của collagen) có chiều dài 300Å, đường kính 15 Å. Các protein hình sợi tương đối trơ về mặt hóa học, chủ yếu có chức năng cơ học. Ví dụ, collagen của da, xương, sụn, gân, răng ; keratin của tóc, lông ; fibroin của tơ, miozin của cơ, v.v.

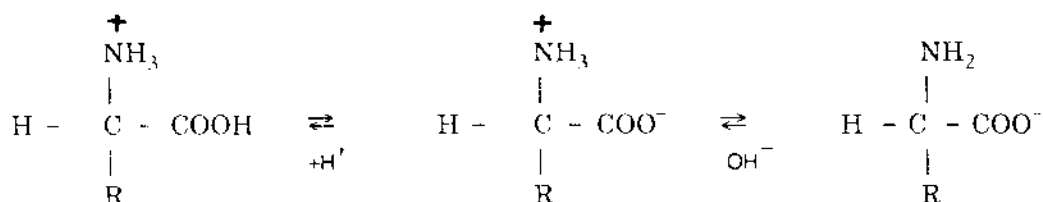
Bảng 3.2. Khối lượng phân tử tương đối của một số protein thường gặp

Protein	M_r , dalton
Xitocrom C	11 600
Ribonucleaza	12 700
Lizozim (lòng trắng trứng)	14 400
Mioglobin	17 800
Tripsin	24 000
Bromelin	25 000
Pepsin	36 000
Hemoglobin	64 500
Albumin huyết thanh	69 000
Hexokinaza	96 000
Lactatdehydrogenaza	150 000
Ureaza	483 000
Miozin	620 000

Ghi chú : Protein có M_r lớn, để xác định cần dùng các phương pháp đặc biệt như : ly tâm siêu tốc, đo áp suất thẩm thấu, dùng chất rây phân tử, v.v. Các kết quả nhận được khi sử dụng các phương pháp khác nhau, theo các tác giả khác nhau không hoàn toàn giống nhau, vì vậy các giá trị trong bảng có thể dao động ít nhiều.

III.3.2. Tính chất lưỡng tính của axitamin và protein

Axitamin và protein có tính chất lưỡng tính, có nghĩa là vừa có tính chất axit vừa có tính chất bazơ. Theo thuyết Brenstet, một chất có tính chất axit có khả năng cho proton, phản ứng với bazơ tạo thành muối. Tính chất bazơ thể hiện ở khả năng nhận proton, kết hợp với axit tạo thành muối. Phân tử axitamin đồng thời có cả nhóm amin và nhóm cacboxyl. Trong dung dịch, ở pH trung tính, axitamin tồn tại chủ yếu ở dạng ion lưỡng cực (chi 1% ở dạng trung hòa). Ở dạng ion lưỡng cực, nhóm cacboxyl bị phân ly, nhóm amin bị proton hóa. Trạng thái ion hóa của các nhóm này tùy thuộc vào pH môi trường. Trong môi trường axit (pH = 1) nhóm cacboxyl không ion hóa, nhóm amin ở dạng proton hóa ; ngược lại trong môi trường kiềm (pH = 11), nhóm cacboxyl ion hóa, nhóm amin không ion hóa :



dạng ưu thế ở pH 1 dạng ưu thế ở pH 7 dạng ưu thế ở pH 11

Như vậy khi đặt axitamin trong điện trường tùy thuộc pH môi trường có thể di chuyển về catốt hoặc anốt. Ở một pH nào đó, axitamin không di động trong điện trường, chứng tỏ tổng số điện tích trong phân tử của nó bằng không, pH này được gọi là pH đẳng điện của axitamin, ký hiệu là pH_i .

Các axitamin chứa một nhóm amin, một nhóm cacboxyl mạch bên không phân cực (Ala, Val, Leu, Ile) có giá trị pH_i vào khoảng 6 ; axitamin có hai nhóm cacboxyl (Asp, Glu) có pH_i ở vùng axit, ngược lại các axitamin kiềm, pH_i ở vùng kiềm (bảng 3.3).

Tương tự như axitamin, protein cũng là chất điện ly lưỡng tính, vì trong phân tử protein có nhiều nhóm phân cực của mạch bên (gốc R) của axitamin. Ví dụ, nhóm cacboxyl thứ hai của Asp, Glu, nhóm amin của Lys, guanidin của Arg, imidazol của His, hydroxyl của Ser, Thr, Tyr, v.v.

Bảng 3.3. Giá trị pH_i của một số axitamin

Axitamin		pH_i
Asp	(D)	2.77
Glu	(E)	3.22
Cys	(C)	5.07
Ser	(S)	5.68
Val	(V)	5.96
Gly	(G)	5.97
Leu	(L)	5.98
Ala	(A)	6.02
Ile	(I)	6.02
Lys	(K)	9.74
Arg	(R)	10.76

Trạng thái điện tích của các nhóm này cũng tùy thuộc pH môi trường. Ở một pH nào đó mà tổng số điện tích dương và điện tích âm của phân tử protein bằng không, phân tử protein không di chuyển trong điện trường, gọi là pH_i của protein. Như vậy nếu protein có chứa nhiều Asp, Glu (axitamin axit) pH_i của nó ở vùng axit và ngược lại, nếu chứa nhiều axitamin kiềm (Lys, Arg, His) thì pH_i của nó ở vùng kiềm. Giá trị pH_i của một số protein như sau :

Pepxin	1,0	Hemoglobin	6,8
Albumin trứng	4,6	Ribonucleaza	7,8
Cazein	4,7	Tripxin	10,5
Albumin huyết thanh	4,9	Xitocrom c	10,6
Gelatin	4,9	Prolamin	12,0
Globulin	5,2		

Ở môi trường có $pH < pH_i$ protein là một đa cation, số điện tích dương lớn hơn số điện tích âm. Ở $pH > pH_i$ phân tử protein thể hiện tính axit, cho ion H^+ , do đó số điện tích âm lớn hơn số điện tích dương, protein là đa anion, tích điện âm.

Ở trong môi trường có $pH = pH_i$ protein dễ dàng kết tụ lại với nhau (h. 3.7) có thể sử dụng tính chất này để xác định pH_i của protein cũng như để kết tủa protein. Mặt khác, do sự sai khác về pH_i giữa các protein khác nhau, có thể điều chỉnh pH môi trường để tách các protein ra khỏi hỗn hợp của chúng.

III.3.3. Tính kỵ nước (hay ưa béo) của protein

Dựa vào độ kỵ nước trung bình của một protein có thể biết trước được mức độ đáng của dịch thủy phân (hydrolyzat) từ protein đó, hoặc biết trước được vị trí của một protein màng nào đó là ở trong hay ngoài màng phospholipit.

Có thể tính độ kỵ nước trung bình của một protein đi từ thành phần axitamin của nó.

Mức độ đáng của dịch thủy phân protein được tính theo hệ thức :

$$\text{Độ kỵ nước trung bình} = \bar{G}_0 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Delta G_0 \text{ (mạch bên)}$$

trong đó n - số gốc axitamin ;

$\Delta \bar{G}_0$ - năng lượng chuyển dời tự do (bảng 3.4).

Nếu $\bar{G}_0 > 5,85$ kJ/gốc thì dịch thủy phân sẽ đáng ; nếu $G_0 < 5,43$ kJ/gốc, dịch thủy phân sẽ không đáng.

$\bar{G}_0$ của izolat protein của đậu tương là 6,44 kJ/gốc, của casein là 6,71, của zein là 6,19 và của collagen là 5,38.

$$\Delta G_0 \text{ (mạch bên)} = \Delta G_0 \text{ (axitamin)} - \Delta G_0 \text{ (glixin)}$$

$$\Delta G_0 \text{ (axitamin)} = -RT \ln \frac{S_{\text{etanol}}}{S_{H_2O}}$$

S_{etanol} , S_{H_2O} - độ hòa tan của axitamin trong etanol và trong H_2O .

Pepxin	1,0	Hemoglobin	6,8
Albumin trứng	4,6	Ribonucleaza	7,8
Cazein	4,7	Tripxin	10,5
Albumin huyết thanh	4,9	Xitocrom c	10,6
Gelatin	4,9	Prolamin	12,0
Globulin	5,2		

Ở môi trường có $pH < pH_i$ protein là một đa cation, số điện tích dương lớn hơn số điện tích âm. Ở $pH > pH_i$, phân tử protein thể hiện tính axit, cho ion H^+ , do đó số điện tích âm lớn hơn số điện tích dương, protein là đa anion, tích điện âm.

Ở trong môi trường có $pH = pH_i$ protein dễ dàng kết tụ lại với nhau (h. 3.7) có thể sử dụng tính chất này để xác định pH_i của protein cũng như để kết tủa protein. Mặt khác, do sự sai khác về pH_i giữa các protein khác nhau, có thể điều chỉnh pH môi trường để tách các protein ra khỏi hỗn hợp của chúng.

III.3.3. Tính kỵ nước (hay ưa béo) của protein

Dựa vào độ kỵ nước trung bình của một protein có thể biết trước được mức độ đáng của dịch thủy phân (hydrolyzat) từ protein đó, hoặc biết trước được vị trí của một protein màng nào đó là ở trong hay ngoài màng phospholipit.

Có thể tính độ kỵ nước trung bình của một protein đi từ thành phần axitamin của nó.

Mức độ đáng của dịch thủy phân protein được tính theo hệ thức :

$$\text{Độ kỵ nước trung bình} = \bar{G}_0 = \frac{\sum_{i=1}^n \Delta G_0 \text{ (mạch bên)}}{n}$$

trong đó n - số gốc axitamin ;

$\Delta \bar{G}_0$ - năng lượng chuyển dời tự do (bảng 3.4).

Nếu $\bar{G}_0 > 5,85$ kJ/gốc thì dịch thủy phân sẽ đáng ; nếu $G_0 < 5,43$ kJ/gốc, dịch thủy phân sẽ không đáng.

$\bar{G}_0$ của izolat protein của đậu tương là 6,44 kJ/gốc, của casein là 6,71, của zein là 6,19 và của collagen là 5,38.

$$\Delta G_0 \text{ (mạch bên)} = \Delta G_0 \text{ (axitamin)} - \Delta G_0 \text{ (glixin)}$$

$$\Delta G_0 \text{ (axitamin)} = \frac{1}{T} - RT \ln \frac{S_{\text{etanol}}}{S_{H_2O}}$$

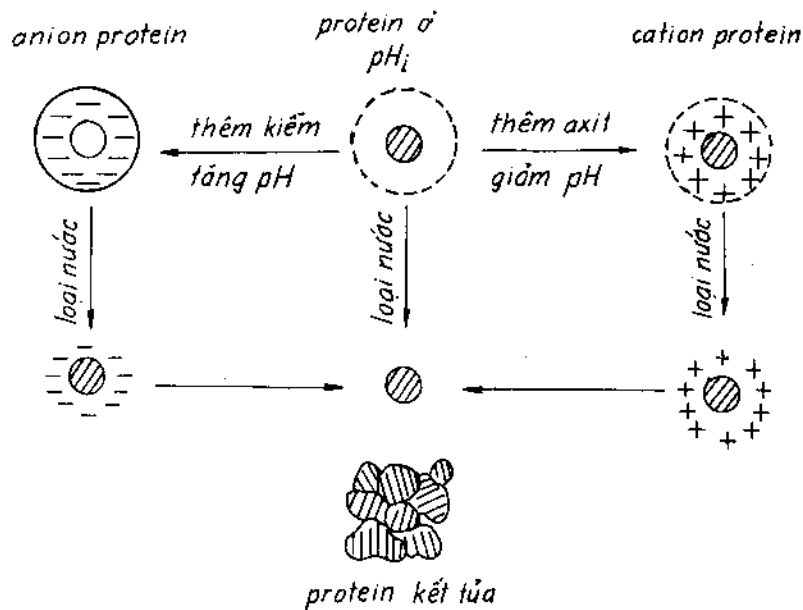
$S_{\text{etanol}}, S_{H_2O}$ - độ hòa tan của axitamin trong etanol và trong H_2O .

Bảng 3.4. Độ kỵ nước của mạch bên của một số axit amin

Axit amin	ΔG_o (mạch bên), J/mol	Axit amin	ΔG_o (mạch bên), J/mol
Alanin	3 100	Lôxixin	10 100
Arginin	3 100	Lizin	6.250
Asparagin	40	Metionin	5.450
Axit aspartic	2 250	Phenylalanin	11.100
1/2 Xistin	4 200	Prolin	10.850
Glutamin	400	Serin	170
Axit glutamic	2 300	Treonin	1.850
Glixin	0	Triptophan	12.550
Histulin	2 100	Tyrozín	12.000
Izolôxin	12 400	Valin	7.050

III.3.4. Tính chất dung dịch keo protein, sự kết tủa protein

Khi hòa tan, protein tạo thành dung dịch keo. Các phân tử keo có kích thước lớn, không đi qua màng bán thấm. Sử dụng tính chất này, có thể tinh sạch protein khỏi các chất phân tử thấp bằng phương pháp thẩm tích. Do trên bề mặt phân tử protein có các nhóm phân cực, khi hòa vào nước, các phân tử nước lưỡng cực cao được hấp phụ bởi các nhóm này, tạo thành màng nước bao quanh phân tử protein gọi là các lớp vỏ hydrat. Dùng phương pháp phân tích Röntgen đã xác định được rằng lớp nước ở sát bề mặt phân tử protein có bề dày 3Å (đúng bằng kích thước phân tử nước) là lớp nước đơn phân tử. Những phân tử nước ở xa hơn sắp xếp ít trật tự hơn. Độ bền của dung dịch keo protein phụ thuộc vào nhiều yếu tố như : sự tích điện của phân tử protein, mức độ hydrat hóa, nhiệt độ, v.v. Khi thay đổi



Hình 3.7. Sơ đồ minh họa sự kết tủa protein

các yếu tố này, ví dụ làm trung hòa điện phân tử protein, loại bỏ lớp vỏ hydrat, các phân tử lớn protein sẽ kết tụ lại với nhau tạo thành khối lớn, tách khỏi dung dịch thường gọi là kết tủa protein (h.3.7). Như vậy để kết tủa protein có thể thay đổi pH dung dịch đến pH_i của protein bằng cách thêm các muối trung hòa, dung môi hữu cơ (axeton, etanol) ở nồng độ cao, tăng nhiệt độ, v.v.

Sau khi protein bị kết tủa, nếu loại bỏ các yếu tố gây kết tủa, protein lại có thể tạo thành dung dịch keo bền như trước hoặc mất khả năng này. Trường hợp thứ nhất gọi là "kết tủa thuận nghịch", trường hợp thứ hai gọi là "kết tủa không thuận nghịch".

Tóm lại, hai yếu tố đảm bảo độ bền dung dịch keo protein là :

- sự tích điện cùng dấu của các phân tử protein ở $pH \neq pH_i$
- lớp vỏ hydrat bao quanh phân tử protein.

Loại bỏ hai yếu tố này protein sẽ bị kết tủa.

Các yếu tố kết tủa thuận nghịch protein được dùng để thu nhận chế phẩm protein. Để đạt mục đích này thường dùng muối trung hòa như $(NH_4)_2SO_4$, dung môi hữu cơ như axeton, etanol và phải tiến hành kết tủa ở nhiệt độ thấp dưới $0^\circ C$.

Muối trung hòa vừa làm trung hòa điện vừa loại bỏ lớp vỏ hydrat của protein, còn dung môi hữu cơ hao nước, phá hủy lớp vỏ hydrat rất nhanh chóng. Trong chế phẩm protein nhận được còn lẫn các chất đa dạng kết tủa, cần sử dụng các phương pháp thích hợp để loại bỏ các chất này, ví dụ dùng phương pháp thẩm tích để loại bỏ muối $(NH_4)_2SO_4$.

III.3.5. Sự biến tính của protein

III.3.5.1. Khái niệm về biến tính

Dưới tác dụng của các tác nhân vật lý (tia cực tím, sóng siêu âm, khuấy cơ học) hoặc hóa học (axit, kiềm mạnh, muối kim loại nặng, tanin), protein bị biến đổi các cấu hình bậc hai, ba và bốn không phá hủy cấu trúc bậc nhất, kèm theo các tính chất tự nhiên ban đầu của nó cũng bị mất đi. Hiện tượng đó gọi là sự biến tính của protein. Ví dụ, thịt, trứng, sữa sau khi gia nhiệt hoặc lỏng trạng trứng sau khi khuấy mạnh thành bột kem thì không trở về trạng thái ban đầu được nữa.

Protein sau khi bị biến tính, thường thu được những tính chất sau :

- độ hòa tan giảm là do làm lộ các nhóm kỵ nước ;
- khả năng giữ nước bị giảm ;
- mất hoạt tính sinh học (tính chất enzym hay tính chất miễn dịch) ;
- tăng độ nhạy đối với sự tấn công của enzym proteaza là do làm xuất hiện các liên kết peptit ứng với vùng tác dụng đặc hiệu của enzym ;
- tăng độ nhớt nội tại ;
- mất khả năng kết tinh.

Biến tính có thể là thuận nghịch hay bất thuận nghịch. Thường khi cầu disulfua bị phá hủy thì biến tính là bất thuận nghịch.

III.3.5.2. Tác nhân biến tính

a) Nhiệt độ là tác nhân biến tính protein thường gặp nhất. Dưới tác dụng của nhiệt độ thì phân tử protein bị giãn mạch. Ví dụ, phân tử serumalbumin nguyên thể có hình elip với tỉ lệ $\frac{\text{chiều dài}}{\text{chiều rộng}} = 3$, sau khi bị tính bởi nhiệt, thì tỉ lệ đó lên tới 5,5.

Vận tốc biến tính phụ thuộc rất mạnh vào nhiệt độ. Phần nhiều phản ứng hóa học, vận tốc thường tăng gấp đôi khi tăng nhiệt độ lên 10°C , trái lại, cùng với khoảng tăng nhiệt độ đó (trong vùng liên quan đến biến tính) vận tốc biến tính protein tăng lên 600 lần. Điều đó chứng tỏ năng lượng của các liên kết vốn làm bền cấu trúc bậc hai, bậc ba và bậc bốn của protein là yếu.

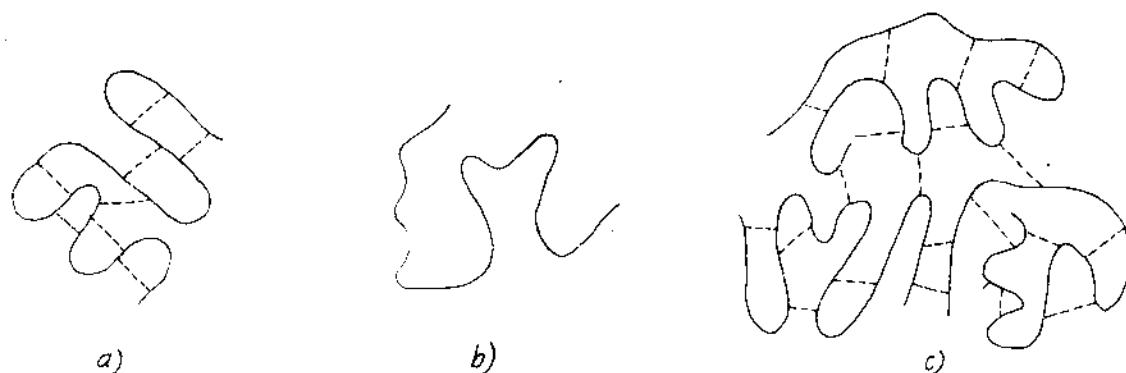
Sự biến tính của các protein do nhiệt thường phụ thuộc vào bản chất và nồng độ của protein, hoạt độ nước, pH, lực ion cũng như bản chất của các ion có mặt.

Sau biến tính nhiệt độ hòa tan của protein bị giảm xuống là do xuất hiện các nhóm kỵ nước ở bề mặt phân tử làm dễ dàng cho các phân tử protein bị giãn mạch và tập hợp lại.

Các protein (ví dụ enzym) cũng như các vi sinh vật khi ở trạng thái khô thường bền với biến tính nhiệt hơn.

Không những nhiệt độ cao mà nhiệt độ thấp cũng làm biến tính nhiều protein. Có nhiều enzym bền khi ở nhiệt độ thường nhưng lại bị vô hoạt khi ở 0°C . Một số protein như protein 11S của đậu tương, gliadin, protein của trứng và sữa thường bị tập hợp và kết tủa khi để ở nhiệt độ lạnh đông. Và ngược lại, nhiệt độ thấp cũng có thể làm phân ly hoặc sắp xếp lại các phần dưới đơn vị của oligome.

Nói chung, các protein có tỉ lệ axitamin kỵ nước/axitamin có cực cao thì rất dễ bị biến tính ở nhiệt độ thấp.



Hình 3.8. Sơ đồ cơ chế biến tính của protein :

- a - mạch polypeptit chưa biến tính
- b - mạch polypeptit đã biến tính :
- c - tập hợp của các mạch polypeptit đã biến tính

b) Xử lý cơ học. Các xử lý cơ học như nhào trộn hoặc cán bột mì, tạo ra các lực cắt cũng làm biến tính protein. Động tác kéo lặp đi lặp lại nhiều lần cũng làm biến tính protein do phá hủy các xoắn α .

c) Các bức xạ tia cực tím thường bị hấp thụ bởi các gốc axit amin thơm (Trp, Tyr, Phe) do đó có thể dẫn đến làm biến đổi hình thể và nếu mức năng lượng đủ cao, thì làm đứt được các cầu disulfua. Các bức xạ của tia γ và các tia ion hóa cũng làm biến đổi hình thể, oxy hóa một số gốc axit amin, phá hủy cầu đồng hóa trị, ion hóa và tạo thành các gốc protein tự do, cũng như gây ra phản ứng tái tổ hợp và trùng hợp protein.

d) Phần lớn protein bị biến tính khi ở pH quá cao hoặc quá thấp. Vì ở pH cực trị này sẽ tạo ra lực đẩy tĩnh điện giữa các nhóm bị ion hóa do đó sẽ làm giãn mạch các phân tử protein.

e) Các ion của kim loại kiềm (như Na, K) chỉ tác dụng một cách hạn chế với protein trong khi đó các kim loại kiềm thổ hoạt động hơn. Các ion kim loại chuyển tiếp như Cu, Fe, Hg, Ag phản ứng một cách nhanh chóng với protein, trong đó có những chất tạo được phức bền với nhóm tiol.

g) Phần lớn các dung môi hữu cơ là những tác nhân biến tính của protein. Vì chúng làm biến đổi hằng số điện môi của môi trường và do đó cũng làm biến đổi các lực tĩnh điện vốn làm bền phân tử protein.

Các dung môi hữu cơ không cực có thể xâm nhập vào các vùng kỵ nước, phá hủy các tương tác kỵ nước do đó làm dễ dàng cho biến tính.

Các hợp chất hữu cơ như ure, muối guanidin có khả năng phá hủy các liên kết hydro do đó cũng làm biến tính protein.

Các chất hoạt động bề mặt tác dụng như những chất trung gian giữa vùng kỵ nước của protein và môi trường hao nước do đó gây phá hủy các liên kết kỵ nước nên làm giãn mạch protein. Các chất khử (xistein, vitamin C) phá hủy cầu disulfua và làm biến đổi hình thể protein.

Trong quá trình tách và làm thuần khiết protein, để tránh hiện tượng biến tính cần tiến hành ở điều kiện nhiệt độ chiết bằng dung dịch đệm có nồng độ và pH thích hợp, có thể thêm đường đơn giản (sacaroza, glucoza), rượu đa chức (glixerin), phẩm vật thu được thường được sấy thăng hoa, giữ ở trạng thái khô, nhiệt độ thấp.

Các yếu tố làm biến tính protein thường được sử dụng để loại bỏ protein khỏi dung dịch, làm ngừng phản ứng enzym. Đơn giản hơn cả là đun sôi dung dịch protein. Các hóa chất thường dùng làm biến tính protein là các axit, kiềm ở nồng độ cao, phổ biến hơn cả là : axit tricloaxetic, axit volframic, axit picric, axit sulfosalixilic, ... Ngoài ra có thể dùng muối của các kim loại nặng như Pb, Hg, Cu, Fe, ...

III.3.6. Các phản ứng thường dùng để định tính, định lượng axit amin và protein

Như trên đã nói, axit amin là đơn vị cấu tạo cơ sở của peptit và protein. Các axit amin kết hợp với nhau qua liên kết peptit ($-\text{CO}-\text{NH}-$) tạo thành peptit có chiều dài mạch khác nhau gọi là polypeptit.

Phân tử protein có thể bao gồm một hay nhiều chuỗi polypeptit. Từ đó có thể phân các phản ứng của protein thành ba nhóm :

- phản ứng của liên kết peptit (phản ứng Biure) là phản ứng đặc trưng cho tất cả polypeptit, protein ;

- phản ứng đặc trưng của một hay một số gốc axitamin trong phân tử polypeptit, protein ;

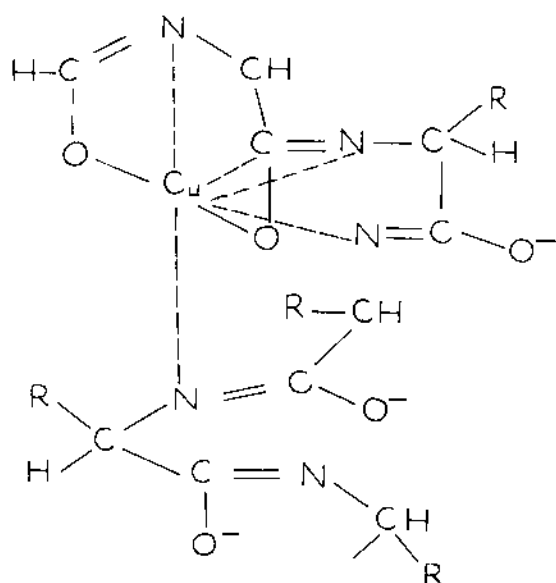
- phản ứng của nhóm α - amin tự do đầu N của chuỗi polypeptit.

Sau đây là một số phản ứng đặc trưng thường dùng để định tính và định lượng axitamin và protein.

a) *Phản ứng Biure* là phản ứng đặc trưng của liên kết peptit, tất cả các chất có chứa từ hai liên kết peptit trở lên đều cho phản ứng này (axitamin và dipeptit không có phản ứng Biure). Trong môi trường kiềm mạnh, liên kết peptit trong phân tử protein phản ứng với CuSO_4 tạo thành phức chất màu tím hoặc tím đỏ. Công thức cấu tạo của phức chất màu như hình sau :

Phức chất màu có cực đại hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Phản ứng này được sử dụng rộng rãi để phát hiện và định lượng protein. Độ nhạy phản ứng tăng lên nhiều lần khi có thuốc thử Folin - Ciocalteau. Hiện nay nhiều tác giả đã cải tiến phương pháp Biure, làm tăng độ nhạy phản ứng lên hàng chục lần gọi là phản ứng microbiure.

b) *Phản ứng với thuốc thử Folin - Ciocalteau* (phương pháp Lowry định lượng protein). Thuốc thử Folin - Ciocalteau có chứa axit phosphomolipdic và axit phosphovolframíc. Các chất này một mặt làm tăng độ nhạy phản ứng Biure, mặt khác phản ứng với gốc Tyr và Trp trong phân tử protein. Các gốc axitamin này tham gia trong quá trình tạo phức chất màu. Phức được tạo thành có màu xanh da trời, hấp thụ cực đại ở bước sóng 750 nm.



Trong phương pháp Lowry, giai đoạn đầu thực hiện phản ứng Biure, sau đó mới thêm thuốc thử Folin - Ciocalteau để tạo phức màu xanh. Phương pháp này có độ nhạy cao, cho phép phát hiện được protein trong dung dịch ở nồng độ $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Vì vậy phương pháp Lowry được dùng khá phổ biến trong phân tích protein. Tuy nhiên cường độ màu phản ứng còn tùy thuộc nhiều vào loại protein. Ví dụ, ở cùng một nồng độ, dung dịch triptxin cho cường độ màu cao gấp ba lần gelatin ; hemoglobin cho cường độ màu thấp hơn triptxin nhưng cao hơn gelatin.

Ngoài ra, nhiều chất khác có thể làm tăng hay giảm cường độ màu phản ứng, vì vậy phương pháp này cho kết quả chính xác khi xác định protein đã được tinh sạch ít nhiều.

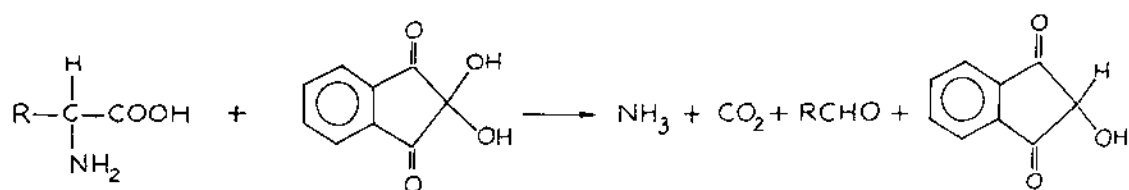
Các chất làm tăng cường độ màu phản ứng : phenol, purin, pirimidin, axit uric, các chất chứa nhóm $-\text{SH}$, một số ion kim loại, v.v. (do chúng cũng phản ứng với thuốc thử Folin - Ciocalteau).

Các chất làm giảm cường độ màu phản ứng : etanol, ete ở nồng độ cao hơn 5%, axeton, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ở nồng độ cao hơn 1% ; Cl_3COOH , HClO_4 trung hòa.

c) *Phản ứng với ninhidrin*. Phản ứng màu đặc trưng quan trọng để định tính và định lượng axitamin.

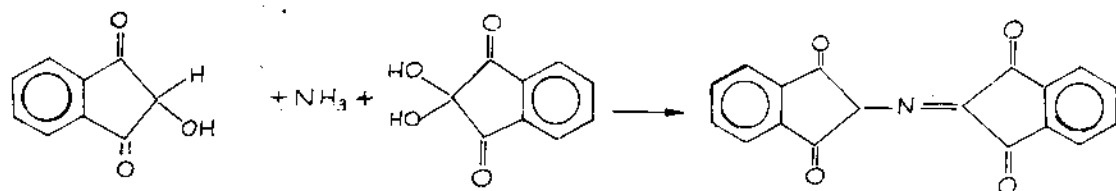
Tất cả các α - axitamin của protein đều phản ứng với ninhidrin tạo thành hợp chất màu xanh tím, riêng iminoaxit như prolin tạo thành màu vàng. Phản ứng này rất nhạy ; có thể phát hiện được đến microgram axitamin, vì vậy được dùng nhiều trong phân tích định tính và định lượng axitamin (trong các phương pháp sắc ký và điện di). Cơ chế phản ứng khá phức tạp và có nhiều chỗ chưa thống nhất. Có thể nêu một số phản ứng chính như sau :

- Dưới tác dụng của ninhidrin ở nhiệt độ cao, axitamin tạo thành NH_3 , CO_2 và aldehyt tương ứng có mạch cacbon ngắn hơn axitamin một cacbon ; ninhidrin chuyển thành dioxoxyhindriden

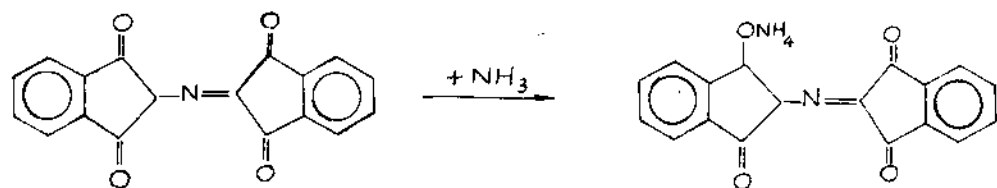


dioxoxyhindriden

- Dioxoxyhindriden, NH_3 mới được tạo thành, tiếp tục phản ứng với một phân tử ninhidrin khác tạo thành hợp chất màu xanh tím có công thức như sau :



indandion - 2 - N - 2 - indanon

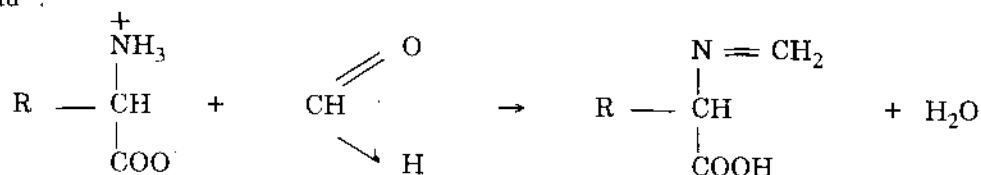


hợp chất màu xanh tím (Ruheman)

Để định lượng axitamin có thể dùng phương pháp so màu, đo cường độ màu phản ứng hoặc dùng phương pháp đo thể tích khí CO_2 hoặc NH_3 được tạo thành. Phương pháp so màu được dùng nhiều hơn.

Ngoài axitamin, peptit, protein, muối amon, amoniac,... cũng tạo màu với thuốc thử ninhidrin. Vì vậy muốn xác định chính xác axitamin phải loại bỏ các chất này. Để xác định axitamin liên kết trong peptit hoặc protein phải thủy phân các chất này để tạo thành axitamin tự do rồi mới thực hiện phản ứng với ninhidrin.

d) *Phản ứng của nhóm α - amin với formaldehit (phản ứng Xioresen).* Đây là phản ứng quan trọng thường dùng để đánh giá mức độ thủy phân protein. Formaldehit phản ứng với nhóm amin tạo thành dẫn xuất metilen của axitamin theo phản ứng sau :



(do nhóm amin đã bị khóa nên có thể chuẩn độ nhóm cacboxyl bằng kiềm, từ đó tính được số nhóm amin. Phương pháp xác định nitơ amin dựa trên phản ứng này gọi là phương pháp chuẩn độ formol).

III.4. PHÂN NHÓM PROTEIN

Do cấu trúc phức tạp, sự đa dạng về cấu trúc và chức năng của protein nên việc phân loại chúng gặp nhiều khó khăn. Để thuận lợi, người ta thường dựa vào hình dạng, tính tan hoặc chức năng, thành phần hóa học để phân nhóm protein. Dựa vào thành phần hóa học các protein hình cầu được phân thành hai nhóm lớn :

- Protein đơn giản ;

- Protein phức tạp : phân tử của nó bao gồm phần protein và phần không phải protein gọi là "nhóm ngoại" ; tùy theo bản chất hóa học của nhóm ngoại, có thể phân thành các nhóm nhỏ như : metaloprotein, phosphoprotein, lipoprotein, nucleoprotein, glicoprotein, cromoprotein.

Theo cách phân chia trên, khó vạch một ranh giới rõ rệt giữa các protein hấp phụ kim loại, sacarit (hoặc chỉ chứa một lượng rất ít các chất này trong phân tử), với các protein phức tạp có chứa các chất trên là một bộ phận cấu tạo nên phân tử. Do đó một số protein thuộc nhóm protein đơn giản sẽ giới thiệu dưới đây cũng có chứa sacarit.

III.4.1. Protein đơn giản

Dựa theo tính tan, có thể phân thành các nhóm nhỏ như sau :

a) *Albumin* : tan trong nước, bị kết tủa ở nồng độ muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ khá cao (70 - 100% độ bão hòa). Các protein thuộc nhóm này phổ biến ở tế bào động vật và thực vật. Tinh thể albumin lòng trắng trứng, albumin huyết thanh được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Khối lượng phân tử của các protein thuộc nhóm này rất khác nhau, từ 12 000 - 60 000 dalton, hoặc có thể đến 170 000 dalton.

b) *Globulin* : không tan hoặc tan rất ít trong nước, tan trong dung dịch loãng của muối trung hòa (NaCl , KCl , Na_2SO_4 , K_2SO_4). Các protein nhóm này thường bị kết tủa ở nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bán bão hòa. Globulin có trong huyết thanh máu, lòng trắng trứng, v.v. Ở thực vật, globulin có trong lá và đặc biệt là trong hạt các cây họ đậu. Globulin là protein dự trữ chủ yếu của các cây họ đậu, chiếm khoảng 60 -

80% protein tổng số của các hạt này. Ở nhiều hạt hòa thảo, globulin chỉ chiếm khoảng từ 2 - 13% protein tổng số của hạt và chủ yếu tập trung ở tầng aluron của hạt.

Các protein thuộc nhóm này cũng có khối lượng phân tử rất khác nhau, và thường có chứa sacarit.

c) *Prolamin* : không tan trong nước hoặc dung dịch muối khoáng, tan trong etanol hoặc izopropanol 70 - 80%. Prolamin hầu như chỉ có trong phần nội nhũ chứa tinh bột của hạt hòa thảo. Ví dụ, gliadin của hạt lúa mì, hordein của đại mạch, zein của ngô ... Ở một số hạt hòa thảo, hàm lượng protein tan trong cồn có thể chiếm đến 30 - 60% protein tổng số của hạt. Hàm lượng prolamin trong lúa ít hơn nhiều, vào khoảng 5%.

Prolamin có khối lượng phân tử rất khác nhau. Ví dụ từ chế phẩm gliadin của hạt lúa mì có thể tách được bốn protein ký hiệu là F_1 , F_2 , F_3 , F_4 có M_r tương ứng là 15 000, 44 000, 27 000 và 10 000 dalton - các protein này còn khác nhau về thành phần axit amin. Loại có M_r lớn (F_1) có nhiều Pro và Glu (cả hai axit amin này chiếm 60% số gốc axit amin trong phân tử). Protein F_4 có thành phần axit amin gần với albumin và globulin.

Phần lớn các protein gliadin có cấu trúc bậc bốn. Ví dụ, protein F_1 của hạt lúa mì gồm có ba phần dưới đơn vị, có M_r là 40 000, 50 000 và 53 000 dalton.

e) *Glutelin* : chỉ tan trong dung dịch kiềm hoặc axit loãng. Glutelin có trong nội nhũ hạt hòa thảo và một số hạt của các cây khác, ví dụ, glutelin của lúa mì, orizenin của lúa. Hàm lượng orizenin trong hạt lúa chiếm 80% protein tổng số hạt. Ở các hạt hòa thảo khác glutelin chỉ chiếm khoảng 5 - 40% protein tổng số của hạt. Các protein thuộc nhóm này có M_r cao, và rất khác nhau, đa số có M_r từ 50 000 đến vài triệu dalton.

Glutelin được nghiên cứu kỹ nhất là glutelin của lúa mì. Sau khi khử các cầu disulfua trong phân tử của nó, dùng phương pháp điện ly tách được 15 loại phần dưới đơn vị có M_r từ 11 600 - 133 000 dalton. Glutelin có cấu trúc bậc bốn phức tạp.

Prolamin và glutelin là các protein dự trữ điển hình của hạt hòa thảo, chúng kết hợp với các thành phần khác trong nội nhũ của hạt tạo thành hợp phức có khối lượng phân tử rất lớn, gọi là gluten. Gluten có cấu trúc không gian cực kỳ phức tạp.

Trong hạt hòa thảo còn có một số protein không tan trong bốn loại dung dịch kể trên.

g) *Histon* : protein kiềm, có chứa nhiều axit amin kiềm như Lys, Arg, dễ tan trong nước, không tan trong dung dịch amoniac loãng. Người ta đã tách được từ nhiễm sắc thể của tế bào eucariot năm dạng histon, ký hiệu là H1, H2A, H2B, H3 và H4. Sự khác nhau giữa các dạng được tóm tắt trong bảng 3.5.

Bảng 3.5. Một số tính chất của năm dạng histon

Histon	Tỉ lệ Lys/Arg	Số gốc amin	M, dalton
H1	20,00	215	21 000
H2A	1,25	129	14 500
H2B	2,50	125	13 800
H3	0,72	135	15 300
H4	0,79	102	11 300

Cấu trúc bậc một của H₃ và H₄ có tính bảo thủ rất lớn, hầu như không thay đổi sau hàng trăm triệu năm kể từ khi có sự phân hướng động vật và thực vật trong quá trình tiến hóa.

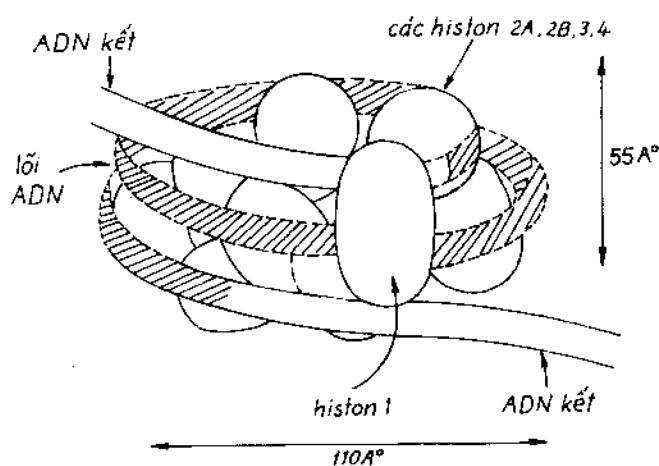
III.4.2. Protein phức tạp

Do protein kết hợp với nhóm ngoại. Phần protein trong phân tử protein phức tạp gọi là apoprotein.

III.4.2.1. Nucleoprotein

Nhóm ngoại là axit nucleic, apoprotein là polypeptit hay protein có tính kiềm, vì vậy chúng kết hợp với nhau khá chặt. Muốn tách riêng chúng phải dùng dung dịch muối hoặc axit loãng. Nucleoprotein tập trung trong nhân tế bào, riboxom.

Trong nhiễm sắc chất, có các đơn vị lặp lại là nucleoxom, giữa các nucleoxom là các đoạn ADN kết. Nucleoxom bao gồm một đoạn ADN khoảng 160 - 240 cặp bazơ quấn quanh một lõi gồm bốn cặp phân tử của bốn dạng histon H2A, 2B, 3 và 4 (h.3.9). Dạng H1 có ít hơn so với các dạng khác và ở mặt ngoài của nucleoxom, gắn vào đoạn ADN kết có thể có vai trò như cầu giữa các nucleoxom khác nhau.



Hình 3.9. Sơ đồ cấu trúc của một nucleoxom : phân tử ADN xoắn kép quấn quanh một lõi bao gồm 8 phân tử histon (mỗi loại hai phân tử), histon H1 ở bên ngoài lõi và gắn vào phần ADN kết

Nucleoprotein trong tinh dịch cá do axit nucleic kết hợp với protamin. Protamin là một polypeptit có $M_r < 5\,000$ dalton, có tính kiềm, chứa nhiều arginin.

III.4.2.2. Cromoprotein

Nhóm ngoại là hợp chất có màu. Tùy theo đặc tính của nhóm ngoại ta có các cromoprotein có màu khác nhau. Ví dụ, hem (porphirin chứa sắt) có màu đỏ, là nhóm ngoại của mioglobin ; hemoglobin, xitocrom c, catalaza, riboflavin có màu vàng, là

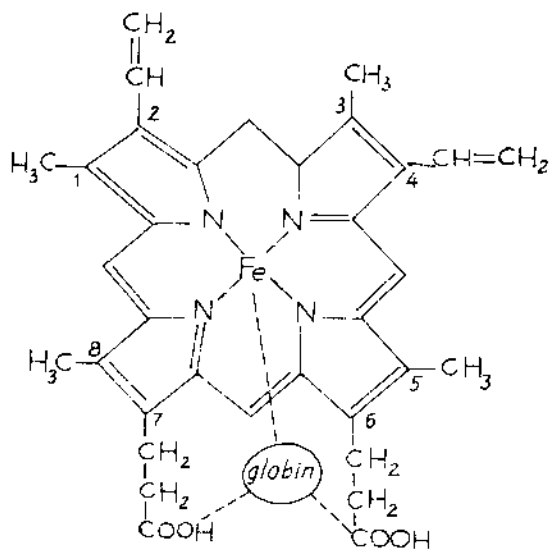
nhóm ngoại của các flavoprotein (các dehydrogenaza hiếu khí, ...).

Các cromoprotein có hoạt tính sinh học cao, tham gia trong nhiều quá trình sống quan trọng như hô hấp, oxy hóa khử, quá trình thu nhận ánh sáng (rodopsin). Sau đây sẽ giới thiệu chi tiết hơn về hemoglobin.

III.4.2.3. Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) bao gồm bốn chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi kết hợp với một nhóm ngoại hem.

a) Nhóm ngoại hem có vòng protoporphirin và nguyên tử sắt. Vòng porphirin được cấu tạo từ bốn vòng piron, các vòng này nối với nhau qua cầu meten tạo thành vòng tetrapiron. Bốn nhóm methyl, hai nhóm vinyl, hai nhóm propionat gắn với vòng protoporphirin. Các nhóm này có thể gắn vào các vị trí khác nhau của vòng theo 15 cách khác nhau nhưng chỉ một cách có trong hệ thống sinh học gọi là protoporphirin IX (1, 3, 5, 8 - tetramethyl - 2, 4 - divinyl - 6, 7 - dipropionic porphirin). Công thức cấu tạo như sau : nguyên tử sắt trong hem có thể có hóa trị hai (fero) hoặc hóa trị ba (feric), hemoglobin có các tên tương ứng là ferohemoglobin và ferihemoglobin (còn gọi là metemoglobin). Chỉ có ferohemoglobin (Fe^{2+}) mới kết hợp với O_2 . Nhóm ngoại hem của tất cả các dạng Hb đều có cấu trúc như trên. Sự sai khác giữa các dạng Hb là ở phần apoprotein của nó.



hem(Fe - protoporphirin IX)

b) Apoprotein của Hb. Như trước đây (trong phần cấu trúc bậc bốn của protein) đã giới thiệu, Hb do bốn chuỗi polypeptit kết hợp lại với nhau nhờ các tương tác yếu. Mỗi chuỗi có một nhóm ngoại hem, như vậy Hb có thể kết hợp với bốn phân tử oxy. Có nhiều dạng khác nhau, trong cơ thể bình thường có ba dạng là HbA, HbA₂ và HbF.

HbA : Hb chủ yếu của người lớn được cấu tạo từ hai chuỗi α , hai chuỗi β , do đó HbA = $\alpha_2\beta_2$.

HbA₂ : Hb thứ yếu, chỉ chiếm khoảng 2% tổng số Hb trong cơ thể người lớn. Nó có cấu tạo là $\alpha_2\delta_2$ (hai chuỗi α , hai chuỗi δ).

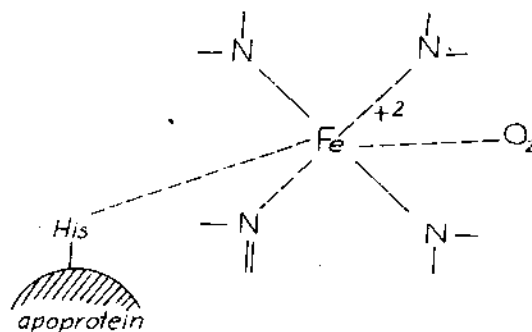
HbF : Hb của bào thai, có cấu tạo là $\alpha_2\gamma_2$.

Chuỗi α gồm 141 gốc axitamin, các chuỗi β , δ , γ đều bao gồm 146 gốc axitamin, có trình tự axitamin trong phân tử khá giống nhau, chỉ khác nhau ở một số ít vị trí. So sánh trình tự axitamin trong phân tử Hb của các loài khác nhau cho thấy chỉ có chín vị trí ít thay đổi, trong đó có các gốc ở gần nhóm hem, các gốc tham gia trong trung tâm kết hợp O_2 . Như vậy những vị trí thay đổi là vị trí bảo đảm chức năng sinh học của Hb.

c) Mỗi hem kết hợp với apoprotein qua ba liên kết phối trí giữa sắt và nitơ của vòng imidazol của các gốc His (vị trí phối trí thứ năm).

Hb kết hợp với O_2 qua liên kết phối trí thứ sáu với sắt : $Hb + O_2 \rightarrow HbO_2$. Trong HbO_2 sắt vẫn giữ hóa trị hai.

Sự kết hợp O_2 của phân tử Hb có tính chất "hợp tác" : sau khi một phân tử oxy kết hợp vào một trung tâm kết hợp oxy, trong phân tử Hb sẽ kích thích sự kết hợp thêm phân tử oxy khác với chính phân tử HbO_2 ấy.



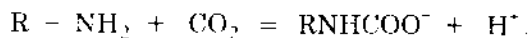
Nhờ sự "hợp tác" giữa các trung tâm liên kết oxy trong phân tử Hb đã làm tăng khả năng phân phát oxy của Hb lên hai lần so với khi các trung tâm này hoạt động riêng lẻ. Tóm lại là làm tăng hiệu quả vận chuyển oxy của Hb.

Oxyhemoglobin dễ dàng bị phân ly, giải phóng oxy (ở điều kiện áp suất riêng phần của oxy bị giảm), do đó oxy được vận chuyển từ phổi đến các tế bào mô ở khắp cơ thể.

Ái lực của Hb với O_2 còn giảm khi tăng nồng độ H^+ , nồng độ CO_2 (ở một pH xác định). Do đó ở các mô hoạt động trao đổi chất mạnh (khi co cơ), tạo thành nhiều axit, CO_2 sẽ làm tăng sự tách O_2 khỏi oxyhemoglobin. Mối liên hệ giữa khả năng kết hợp O_2 , H^+ , CO_2 gọi là hiệu ứng Bohr.

Ngoài O_2 , Hb còn tham gia vận chuyển H^+ và CO_2 . Có ba cặp nhóm kết hợp proton là : nhóm amin đầu N và hai gốc His. Ba cặp nhóm này có vị môi trường khác nhau trong oxy và deoxy - Hb. Trong deoxy - Hb môi trường trực tiếp của chúng tích điện âm nhiều hơn, kết quả là chúng lấy H^+ khi giải phóng O_2 .

CO_2 kết hợp với nhóm amin đầu N của Hb. Dạng không ion hóa của nhóm α - amin đầu N của Hb phản ứng thuận nghịch với CO_2 tạo thành dạng cacbamat :



Khi kết hợp với CO_2 làm giảm ái lực của Hb với O_2 , CO_2 kết hợp với deoxy - Hb chặt hơn là với oxy - Hb.

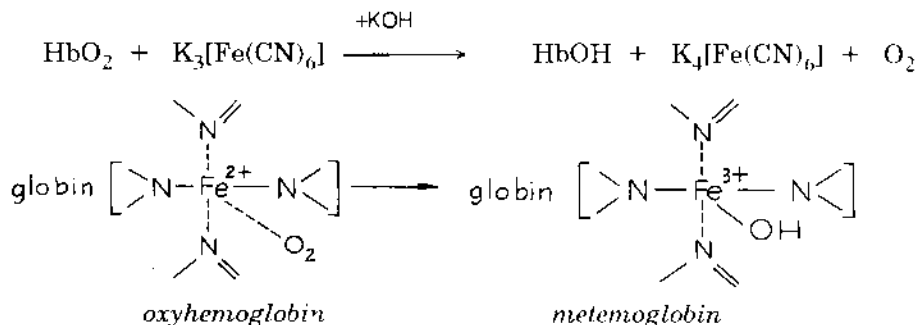
Tóm lại, ta thấy Hb có khả năng kết hợp với O_2 , H^+ , CO_2 ở ba trung tâm khác nhau. tương tác giữa các trung tâm này được truyền bằng những thay đổi dạng không gian của phân tử protein, gọi là tương tác allosteric. Tính chất allosteric của Hb xuất phát từ tương tác giữa các phần dưới đơn vị α và β của chúng, Hb là một protein allosteric.

Ngoài những chất nói trên, Hb còn có thể kết hợp với cacbon monooxyt (CO), hơn nữa ái lực của Hb với CO gấp 200 lần ái lực của nó với O_2 . Vì vậy cacbon monooxyt là chất độc nguy hiểm, nó đẩy O_2 khỏi oxy - Hb làm cho O_2 không được vận chuyển đến tế bào, mô, cơ thể bị ngạt (ngộ độc khí than) :



cacboxihemoglobin

Oxy hóa Hb, tạo thành metemoglobin (Fe^{3+}) mất khả năng kết hợp với O_2 . Các hợp chất xianua, H_2O_2 , KMnO_4 đều có tác dụng này, ở điều kiện nhẹ nhàng không làm biến tính globin, chỉ oxy hóa Fe^{2+} :



III.4.2.4. Lipoprotein

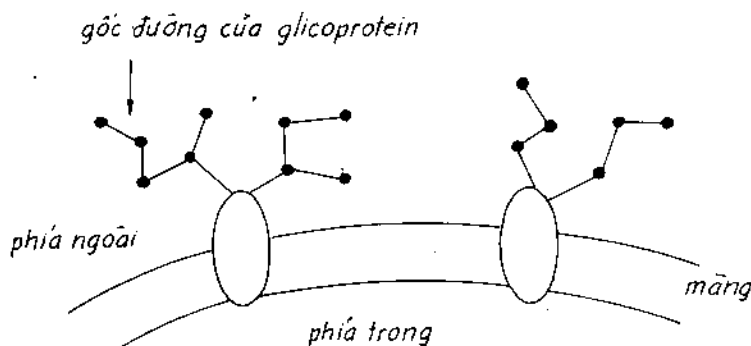
Lipoprotein đóng vai trò quan trọng trong quá trình vận chuyển lipid trong cơ thể. Nhóm ngoại là lipid. Lipid không tan trong nước, nhưng sau khi kết hợp với protein, phần kỵ nước lipid cuộn vào trong, phần apoprotein tạo thành lớp vỏ bọc xung quanh, do đó nó có thể được vận chuyển trong môi trường nước, ví dụ như máu.

Trong huyết tương có một số lipoprotein khác nhau về tỉ trọng và có vai trò khác nhau trong quá trình vận chuyển lipid. Ví dụ, chylomicron có tỉ trọng thấp nhất ($d < 0,940$), vận chuyển triaxylglycerol, cholesterol và các lipid khác của thức ăn từ ruột non đến mỡ, gan và bị mất đi sau 5 giờ. Loại lipoprotein khác có tỉ trọng 0,940 - 1,006 vận chuyển triaxylglycerol được tổng hợp trong cơ thể đến mô mỡ. Cholesterol lại được vận chuyển đến mô mỡ nhờ lipoprotein có tỉ trọng 1,006 - 1,063. Lipoprotein có tỉ trọng 1,663 - 1,210 có vai trò vận chuyển cholesterol từ mô ngoại đến gan.

III.4.2.5. Glicoprotein

Nhóm ngoại là sacarit. Các sacarit trong glicoprotein có thể là monosacarit, oligosacarit và dẫn xuất của chúng. Hàm lượng sacarit trong phân tử thay đổi khá nhiều, có thể đạt đến 80% khối lượng phân tử glicoprotein.

Glicoprotein có trong tất cả các mô động vật, thực vật và vi sinh vật. Thuộc nhóm glicoprotein có nhiều protein của máu (các globulin miễn dịch, fibrinogen, v.v.) ; mucin trong nước bọt và màng nhầy ; một số enzym (bromelain, ribonucleaza B của tuyến tụy, v.v.), các protein cấu trúc của màng tế bào. Các glicoprotein của màng tế bào, phần sacarit của nó quay ra mặt ngoài của màng nguyên sinh chất (h.3.10).



Hình 3.10. Gốc sacarit của glicoprotein quay ra mặt ngoài của màng nguyên sinh chất

Nhóm ngoại sacarit có thể có vai trò định hướng glycoprotein trong màng, và còn có thể có vai trò "nhận biết" giữa các tế bào.

Các gốc sacarit thường kết hợp với các nhóm OH của Ser, Thr, và thường là qua gốc N-axetylglucozamin hoặc N-axetylgalactozamin.

III.4.2.6. Phosphoprotein

Nhóm ngoại là axit phosphoric, kết hợp với apoprotein qua - OH của Ser hoặc Thr của protein. Phosphoprotein phổ biến trong cơ thể sinh vật, tham gia điều hòa nhiều quá trình quan trọng. Thuộc nhóm này có một số enzym (phosphoglucomutaza, phosphorilaza A, v.v.) casein của sữa, vitelin của lòng đỏ trứng. Casein có $M_r = 75\ 000 - 1\ 000\ 000$ dalton, có đủ các axitamin cần thiết. Trong sữa casein ở dạng tiền chất caseinogen (chiếm 80% protein trong sữa bò), bị kết tủa ở pH axit.

Dưới tác dụng của kimozin và một số proteinaza axit khác, khi có ion Ca^{2+} , casein chuyển thành casein không tan (làm đông sữa). Kết tủa casein được giữ trong dạ dày lâu hơn và được hấp thụ hoàn toàn hơn. Các dạng casein khác nhau (α , β , γ) có thành phần axitamin và hàm lượng phospho khác nhau. Hàm lượng phospho trong phân tử α , β , γ - casein là 0,96, 0,52 và 0,1% theo thứ tự tương ứng.

III.4.2.7. Metaloprotein

Định nghĩa metaloprotein cũng có một số vấn đề chưa thống nhất. Theo định nghĩa chung của protein phức tạp, trong phân tử metaloprotein có chứa kim loại thì kim loại là bộ phận cần thiết trong phân tử của nó. Các kim loại thường gặp là : Fe, Mg, Cu, Zn, Mn, Mo, v.v.

Các metaloprotein có thể có nhiều chức năng khác nhau như sau:

- Vận chuyển và dự trữ kim loại (transferin và ferritin chứa sắt, xeruplazmin chứa đồng), liên kết giữa kim loại và apoprotein không bền;
- Trực tiếp tham gia trong hoạt động xúc tác của enzym, khi loại bỏ kim loại thì enzym mất hoạt tính xúc tác. Ví dụ, tirozinaza (enzim chứa Cu), cacboxipeptidaza (chứa Zn) santinoxidaza (chứa Mo), hệ thống nitrogenaza tham gia trong quá trình cố định đạm (chứa Fe và Mo). Kim loại liên kết bền với protein;
- Kim loại ở trong nhóm ngoại, ví dụ, Fe trong hem, nhóm ngoại của nhiều protein, enzym.

III.5. CÁC BIẾN ĐỔI CỦA PROTEIN CÓ ỨNG DỤNG VÀO CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

Mỗi sản phẩm thực phẩm đều có hình dáng, trạng thái, màu sắc và mùi vị nhất định. Mỗi hợp phần có mặt trong sản phẩm, ngoài giá trị dinh dưỡng có hữu còn có những vai trò riêng trong việc tạo ra cấu trúc cùng giá trị cảm quan cho thực phẩm.

Protein, trước hết là chất tạo hình, nghĩa là chất có khả năng tạo ra bộ khung, hình dáng, trạng thái, cùng với độ cứng, độ đặc, độ dai và độ đàn hồi cho các sản phẩm thực phẩm.

Protein cũng là chất góp phần không nhỏ vào việc tạo ra màu sắc và hình thơm cho nhiều sản phẩm thực phẩm (xem chương phản ứng tạo màu và tạo hương của thực phẩm).

Để chế tạo được những sản phẩm từ các nguyên liệu giàu protein nhà công nghệ đều phải dựa vào những tính chất, khả năng này của protein.

III.5.1. Khả năng tạo gel của protein

Có thể nói các thực phẩm như giò lụa, giò cá (kamaboko), phomat, bánh mì ... là những sản phẩm có kết cấu bộ khung từ gel protein.

Vậy gel protein là gì? Khi các phân tử protein bị biến tính tập hợp lại thành một mạng lưới không gian có trật tự gọi là sự tạo gel. Khi protein bị biến tính thì các cấu trúc bậc cao bị phá hủy, liên kết giữa các phân tử bị đứt, mạch peptit bị giãn ra, các nhóm bên trước ẩn ở phía trong bấy giờ xuất hiện ra ngoài. Các mạch polypeptit đã bị duỗi ra (trong điều kiện gia công nhất định) trở nên gần nhau, tiếp xúc với nhau và liên kết lại với nhau mà mỗi vị trí tiếp xúc là một nút, phần còn lại hình thành mạng lưới không gian ba chiều vô định hình, rắn, trong đó có chứa đầy pha phân tán (H_2O).

Các nút mạng lưới có thể được tạo ra do tương tác giữa các nhóm kỵ nước. Khi các nhóm này gần nhau tương tác với nhau hình thành ra liên kết hydrophop (kỵ nước hay ưa béo), các phân tử nước bao quanh chúng bị đẩy ra và chúng có khuynh hướng tụ lại. Tương tác ưa béo thường được ổn định và tăng cường khi tăng nhiệt độ, làm cho các mạch polypeptit sát lại với nhau hơn, khiến cho khối gel trở nên cứng hơn.

Các nút lưới có thể được tạo ra do các liên kết hydro giữa các nhóm peptit với nhau, giữa nhóm OH của serin, treonin hoặc tirozin với các nhóm COOH của axit glutamic hoặc axit aspartic. Liên kết hydro là liên kết yếu, tạo ra một độ linh động nào đó giữa các phân tử với nhau, do đó làm cho gel có được một độ dẻo nhất định. Khi gia nhiệt các liên kết hydro bị đứt và gel bị nóng chảy ra. Khi để nguội (và nhất là khi ở gần $0^{\circ}C$) cấu hydro lại tái lập và càng được tăng cường.

Các nút lưới trong gel cũng có thể do các liên kết tĩnh điện, liên kết cầu nối giữa các nhóm tích điện ngược dấu hoặc do liên kết giữa các nhóm tích điện cùng dấu qua các ion đa hóa trị như ion Ca^{2+} .

Các nút lưới còn có thể do các liên kết disulfua tạo nên. Trường hợp này, gel rất chắc và bền.

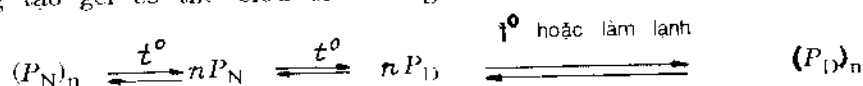
Điều kiện tạo gel

- Nhiệt độ thường là yếu tố cần thiết đầu tiên để tạo gel. Theo sau sự gia nhiệt người ta thường làm lạnh để tạo nhiều liên kết hydro cho kết cấu gel được bền.

- Đôi khi axit hóa hoặc kiềm hóa nhẹ để đưa pH của protein về điểm đẳng điện, làm cho gel tạo thành chắc hơn.

- Có thể thêm các chất đông tạo gel như các polysacarit để làm cầu nối giữa các hạt do đó gel protein tạo ra có độ cứng và độ đàn hồi cao hơn.

Phản ứng tạo gel có thể biểu diễn bằng sơ đồ sau :



P_N - protein tự nhiên ban đầu;

P_D - protein bị biến tính.

III.5.2. Khả năng tạo bột nhào

Các protein (gliadin và glutenin) của gluten bột mì còn có khả năng tạo hình , đặc biệt là có khả năng tạo ra "bột nhào" (pâte) có tính co kết, dẻo và giữ khí, để cuối cùng khi gia nhiệt thì hình thành một cấu trúc xốp cho bánh mì.

III.5.3. Khả năng tạo màng

Protein như gelatin còn có khả năng tạo màng. Màng này do các gel gelatin tạo ra chủ yếu bằng các liên kết hydro nên có tính thuận nghịch. Khi nhiệt độ khoảng trên 30°C thì tan chảy và để nguội thì tái lập.

III.5.4. Khả năng nhũ hóa

Nhũ tương là hệ phân tán của hai chất lỏng không trộn lẫn nhau được, trong đó một chất ở dưới dạng những giọt nhỏ của pha bị phân tán, còn chất kia ở dưới dạng pha phân tán liên tục. Phần lớn các nhũ tương thực phẩm là kiểu dầu trong nước (D/N) hoặc nước trong dầu (N/D). Nhiều nhũ tương thực phẩm còn chứa các bọt khí và/hoặc chất rắn phân tán.

Nhiều sản phẩm thực phẩm là những nhũ tương: sữa, kem, bơ, phomat nóng chảy, lòng đỏ trứng, thịt nghiền nhỏ để làm xúc xích....

Nhũ tương là hệ không bền nhiệt động. Các giọt có khuynh hướng hợp giọt với nhau để tạo ra giọt to hơn, cuối cùng phân thành hai lớp, tách ra và không thành nhũ tương nữa. Để làm cho nhũ tương bền, nghĩa là để các giọt ở trạng thái phân tán bền, người ta dùng các chất khử nhũ hóa:

- Cho các chất điện ly vô cơ vào để làm cho các giọt tích điện và đẩy nhau;
- Hoặc thêm các chất hoạt động bề mặt có cấu trúc lưỡng cực để chúng hướng hai cực háo nước và ưa béo của chúng vào hai phía của bề mặt liên pha dầu/nước do đó làm giảm được sức căng bề mặt giữa hai pha;
- Hoặc cho thêm những chất cao phân tử hòa tan được trong pha liên tục, như polysacarit để làm tăng độ nhớt của pha liên tục, hoặc như protein để hấp phụ vào bề mặt liên pha.

Khi protein được hấp phụ vào bề mặt liên pha giữa các giọt dầu phân tán và pha nước liên tục sẽ tạo ra những tính chất cơ lý như độ dày, độ nhớt, độ đàn hồi, độ cứng có tác dụng bảo vệ làm cho các giọt không hợp giọt được. Ngoài ra, phụ

thuộc vào pH, sự ion hóa các nhóm bên của protein cũng sẽ tạo ra lực đẩy tĩnh điện làm cho nhũ tương bền.

Các sản phẩm thực phẩm vừa kể ở trên thường do protein làm bền.

III.5.5. Khả năng tạo bọt

Bọt thực phẩm là hệ phân tán của các bóng bọt trong một pha liên tục là chất lỏng hoặc chất nửa rắn, có chứa một chất hoạt động bề mặt hòa tan. Các loại kem ướp lạnh, bọt bia, bánh mì,... là những bọt thực phẩm.

Các bóng bọt thường chứa không khí hoặc khí CO_2 mà áp suất lớn hơn áp suất ngoài nhưng ép sát vào nhau do đó các bóng bọt có hình đa diện. Màng lỏng bao quanh bóng bọt rất mỏng, vì hệ có năng lượng dư bề mặt, các bóng bọt tác động lẫn nhau có thể gây ra những chỗ nứt, vỡ cục bộ.

Muốn tạo cho bọt bền nghĩa là các bóng bọt không bị vỡ thì màng mỏng bao quanh bóng bọt phải đàn hồi và không thấm khí. Khi protein được hấp thụ vào bề mặt liên pha thì sẽ tạo ra được một màng như thế nên bảo vệ được bóng bọt. Các chất tạo bọt thực phẩm thường là protein (lòng trắng trứng, máu, protein của đậu tương, ...)

III.5.6. Khả năng cố định mùi

Protein có thể cố định được các chất có mùi khác nhau. Ta đều biết, các chất có mùi là những chất bay hơi. Các protein có thể hấp phụ lý học hoặc hấp phụ hóa học các chất có mùi qua tương tác Van der Waals hoặc qua liên kết **đồng** hóa trị và liên kết tĩnh điện.

Các hợp chất bay hơi có cực như rượu thường được dính vào protein bằng liên kết hydro. Còn các hợp chất bay hơi có khối lượng phân tử thấp lại cố định vào các gốc axit amin không cực qua tương tác kỵ nước (ưa béo).

Cũng có một số hợp chất có mùi "cố định" vào protein bằng liên kết đồng hóa trị. Trong trường hợp này quá trình là không thuận nghịch. Chẳng hạn cố định các chất **sinh** mùi là aldehyt hay xeton vào nhóm NH_2 của protein, hoặc dính chất bay hơi có nhóm NH_2 vào nhóm cacboxyl của protein.

Nhờ khả năng cố định mùi của protein mà người ta có thể tái mùi của thị "thật" vào một protein thực vật đã được tạo hình.

III.6. CÁC BIẾN ĐỔI CỦA PROTEIN TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT VÀ BẢO QUẢN THỰC PHẨM

III.6.1. Biến đổi do nhiệt

Trong quá trình gia công kỹ thuật các nguyên liệu giàu protein, bên cạnh những biến đổi cố định hướng và mong muốn, còn xảy ra những biến hóa phụ ngoài dự định và nhiều khi cũng không mong muốn. Đó là những biến đổi của protein trong quá trình gia nhiệt. Gia nhiệt gần như là một công đoạn phổ biến cho mọi sản phẩm thực phẩm. Tùy mức độ gia nhiệt mà chất lượng của thực phẩm có thể là tốt hơn hoặc kém đi.

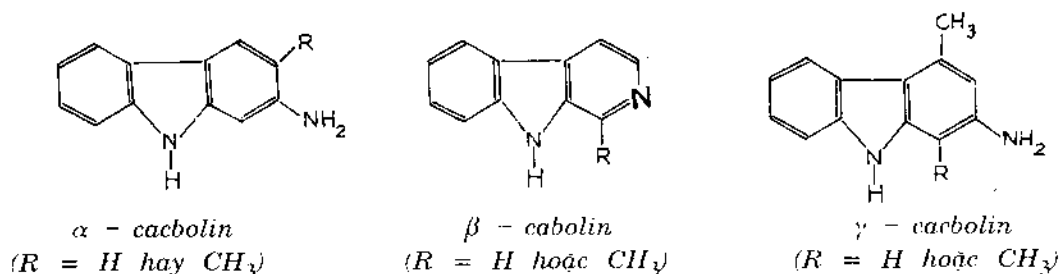
- Khi gia nhiệt vừa phải thì protein chỉ bị biến tính. Khi đó, các độc tố có bản chất protein có trong thực phẩm (như enterotoxin của *Staphylococcus aureus*) hoặc các chất kìm hãm các enzym đường tiêu hóa (như các antitripxin Kunitz và Bowman có trong hạt đậu tương) đi vào thực phẩm theo nguyên liệu, sẽ mất độc tính.

Gia nhiệt vừa phải như biện pháp chặn trước khi đông hộp một số rau quả cũng nhằm làm biến tính và vô hoạt các enzym (protease, polyphenoloxylase, lipoxydase...) vốn xúc tác các phản ứng tạo ra màu sắc và mùi vị không mong muốn cũng như xúc tác phản ứng phá hủy các vitamin.

Gia nhiệt vừa phải, còn có tác dụng làm cho một số thực phẩm giàu collagen, glyxinin đậu tương, ovalbumin sẽ dễ dàng tiêu hóa hơn vì khi đó mạch peptit bị đứt ra, giải tỏa các gốc axit amin trước đây bị vùi trong phân tử do đó tạo điều kiện cho protease tác dụng được thuận lợi hơn.

- Khi gia nhiệt kiểu thanh trùng ở nhiệt độ lớn hơn 110 - 115°C các sản phẩm giàu protein như thịt, cá, sữa sẽ gây phá hủy một phần các gốc xistin, xistein để hình thành nên H₂S, dimetylsulfua, axit xisteic và các hợp chất bay hơi khác khiến cho các sản phẩm này có mùi đặc trưng.

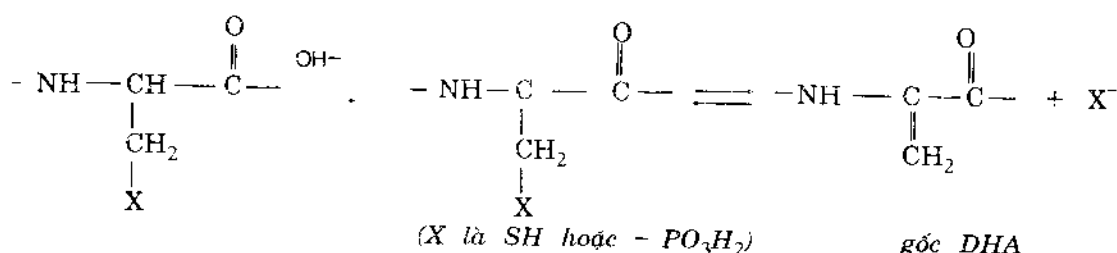
- Khi gia nhiệt khan các protein ở nhiệt độ trên 200°C (nhiệt độ đạt được khi rán thịt và cá) thì triptophan sẽ bị vòng hóa để tạo ra α , β hoặc γ cacbolin :



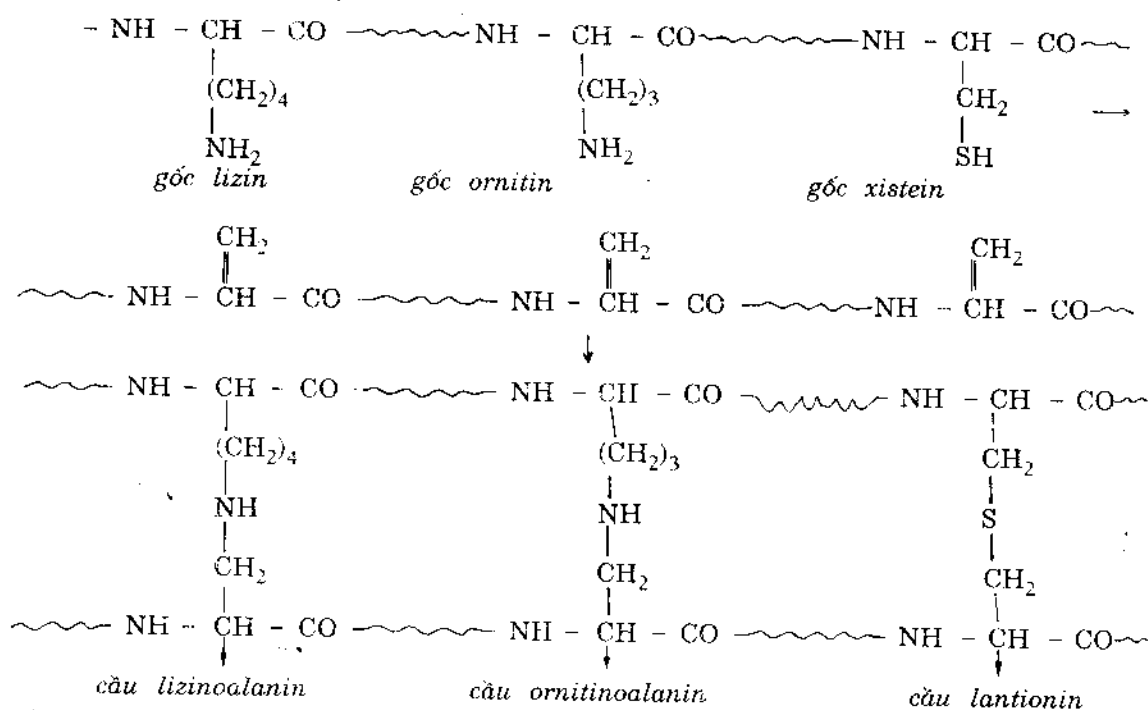
- Khi gia nhiệt ở nhiệt độ cao ($t > 200$ °C) các thực phẩm giàu protein có pH trung tính hoặc gia nhiệt các thực phẩm giàu protein có môi trường kiềm thì sẽ xảy ra :

- Thủy phân các liên kết peptit và đồng phân hóa các gốc axit amin, tạo ra hỗn hợp raxemic do đó làm giảm giá trị dinh dưỡng đi 50%. Hơn nữa khi có mặt đồng phân D sẽ làm giảm độ tiêu hóa của protein đi vì các liên kết peptit có chứa gốc D - axit amin thường khó bị thủy phân hơn ;
- Phá hủy một số axit amin : như arginin sẽ bị chuyển thành ornitin, ure, sitrulin và amoniac. Xistein bị chuyển thành dehydroalanin. Gia nhiệt ở môi trường kiềm, serin, treonin và lizin cũng bị phá hủy;
- Tạo nối cầu đồng hóa trị kiểu lizinoalanin, ornitinoalanin hoặc lantionin liên kết gốc dehydroalanin (DHA) ở chuỗi polypeptit này với các gốc lizin, ornitin hoặc gốc xistin ở chuỗi polypeptit khác.

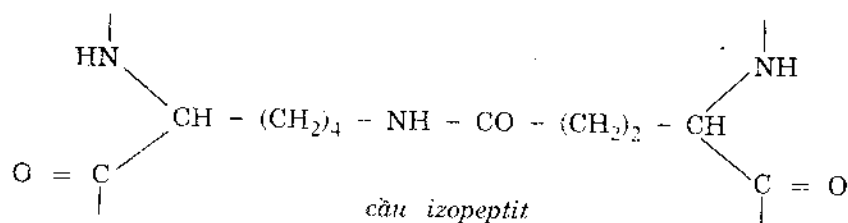
Gốc DHA được tạo ra do phản ứng loại (khử) β gốc xistein hoặc phosphoserin :



Mạch polypeptit có chứa gốc lizin, gốc ornitin hoặc gốc xistein sẽ kết hợp với mạch polypeptit có chứa gốc DHA theo sơ đồ sau :



- Khi xử lý nhiệt thật hoặc cả ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ thanh trùng thì còn tạo ra cầu đồng hóa trị liên isopeptit giữa gốc lizin của chuỗi peptit này với gốc glutamic hoặc gốc aspartic của chuỗi peptit khác :

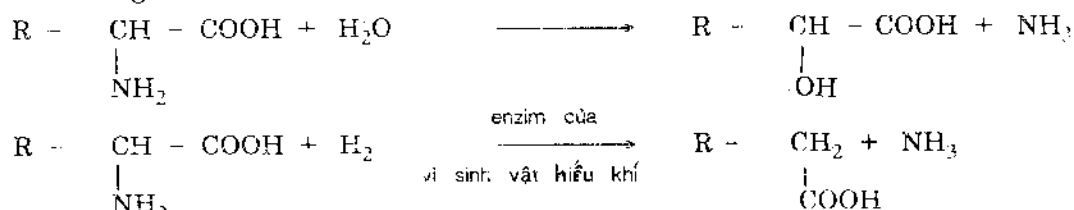


Về phương diện dinh dưỡng, việc tạo ra cầu đồng hóa trị isopeptit trong cùng một phân tử hoặc giữa các phân tử sẽ làm giảm độ tiêu hóa của nitơ, giảm hệ số sử dụng protein và giá trị sinh học của protein. Hơn nữa do hiệu ứng không gian các cầu đồng hóa trị (glutaminilzyl hoặc aspartyl-lizyl) sẽ ngăn cản không cho các proteaza đến được vùng đặc hiệu để thủy phân do đó làm cho quá trình tiêu hóa protein bị chậm lại.

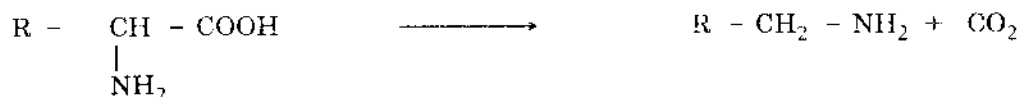
III.6.2. Biến đổi do enzym

Trong quá trình bảo quản các thực phẩm giàu protein thường xảy ra hiện tượng ôi thối làm mất giá trị dinh dưỡng của thực phẩm. Nguyên nhân gây ra hiện tượng trên là do tác dụng của enzym có sẵn trong thực phẩm cũng như của vi sinh vật xâm nhập từ môi trường ngoài vào. Khi đó protein bị chuyển hóa theo những phản ứng cơ bản sau :

a) Phản ứng khử amin

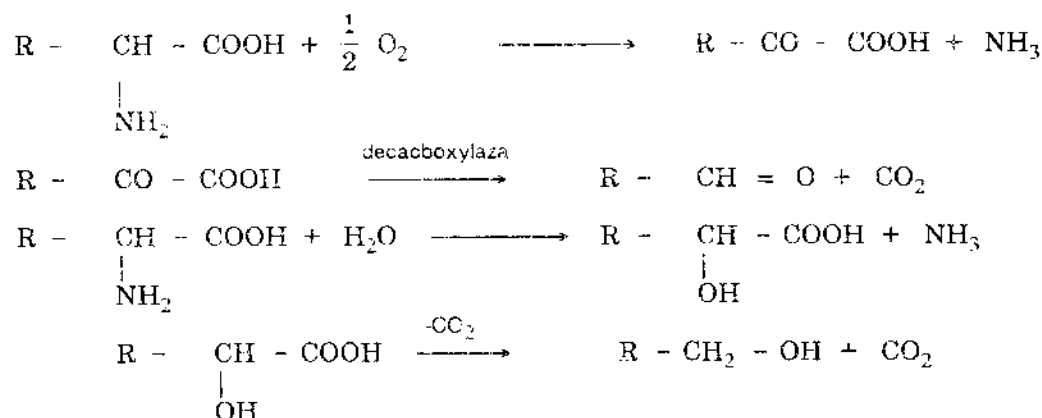


b) Phản ứng khử nhóm cacboxyl



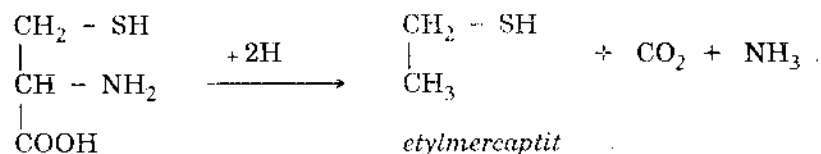
Phản ứng này tạo thành các amin khác nhau. Từ lizin tạo thành cadaverin, từ histidin tạo thành histamin, là những chất độc

c) Phản ứng khử amin khử cacboxyl



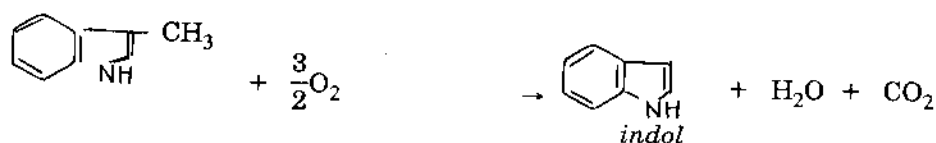
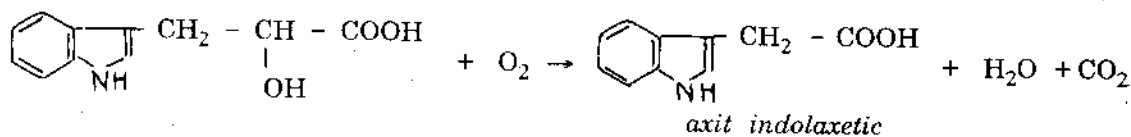
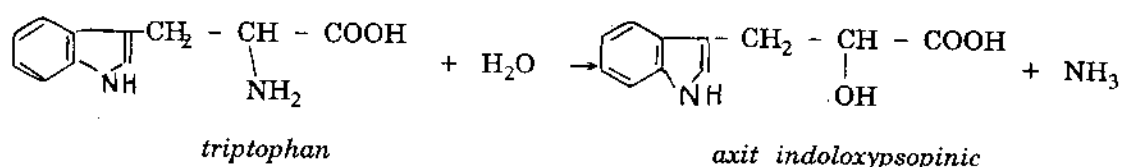
d) Phản ứng tạo thành mercaptan. Thường xảy ra đối với các axitamin có chứa lưu huỳnh :

Ví dụ :

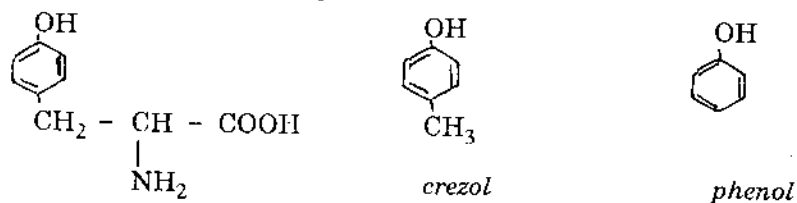


e) Phản ứng tạo thành scatol, crezol, phenol. Trong quá trình hoạt động sống các vi sinh vật gây thối rữa thường gặp trong đường ruột và trong quá trình cất giữ protein các axitamin vòng chuyển hóa thành các sản phẩm độc có mùi khó chịu như : scatol, indol, crezol, phenol.

- Phản ứng tạo scatol, indol

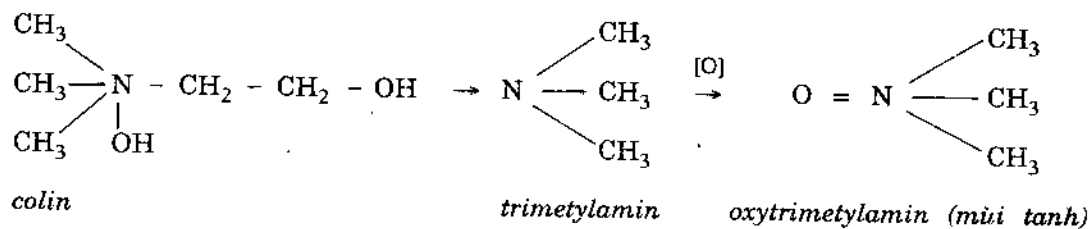


- Phản ứng tạo thành crezol, phenol :

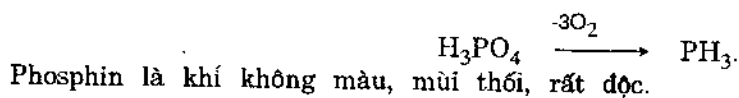


g) Phản ứng tạo thành di-trimetylamin từ các lipoprotein. Phần lipid sau khi tách từ lipoprotein sẽ bị chuyển hóa thành các di-trimetylamin :

Ví dụ :



h) Phản ứng tạo thành phosphin. Xảy ra với phosphoprotein và nucleoprotein. Nguồn tạo thành phosphin là các axit phosphoric có trong protein được giải phóng ra khi bị phân hủy :



CHƯƠNG IV

GLUXIT

Gluxit là nhóm hợp chất hữu cơ khá phổ biến ở cả cơ thể động vật, thực vật và vi sinh vật. Ở cơ thể thực vật, gluxit có thể chiếm một tỉ lệ khá cao, tới 80 - 90% của trọng lượng khô, còn ở cơ thể người và động vật hàm lượng gluxit thường thấp hơn hẳn (không quá 2%). Cũng cần chú ý rằng, ngay ở thực vật, hàm lượng gluxit cũng biến đổi trong giới hạn khá rộng rãi. Ví dụ, ở các hạt hòa thảo khoảng 3/4 các chất của hạt là gluxit trong khi đó ở các dạng rau quả khác nhau hàm lượng gluxit lại thấp hơn hẳn, như ở khoai tây, tổng số gluxit chỉ chiếm khoảng 20% trong đó trên 17% là tinh bột, còn ở cà rốt hàm lượng gluxit là 8%, ở cà chua là 3,7%, v.v. Trong cơ thể thực vật gluxit có thể tồn tại ở dạng dự trữ hoặc tham gia vào thành phần của các mô năng đỡ. Gluxit được tổng hợp bởi cây xanh từ CO_2 , H_2O và năng lượng của ánh sáng mặt trời, còn cơ thể người và động vật không có khả năng đó nên phải sử dụng nguồn gluxit từ thực vật. Gluxit thuộc nhóm chất dinh dưỡng đặc biệt quan trọng đối với người và động vật. Các nguyên tố cấu tạo nên gluxit là C, H và O. Công thức cấu tạo của gluxit thường được biểu diễn dưới dạng $\text{C}_m\text{H}_{2n}\text{O}_n$. Trong công thức này, thông thường hydro và oxy có tỉ lệ như trong nước, vì vậy chúng còn được gọi là hydrat cacbon. Cần chú ý rằng công thức trên không phải luôn luôn phù hợp và tên hydrat cacbon không hoàn toàn chính xác. Tuy nhiên, cho đến nay tên hydrat cacbon vẫn được dùng phổ biến trong nhiều tài liệu về sinh hóa. Gluxit đảm nhiệm nhiều vai trò quan trọng ở cơ thể sinh vật :

- Gluxit là chất cung cấp năng lượng chủ yếu của cơ thể. Riêng gluxit đã cung cấp tới 60% năng lượng cho các quá trình sống. Tuy độ sinh nhiệt kém xa lipid (chỉ bằng một nửa) song gluxit lại có ưu thế nổi bật là hòa tan tốt trong nước, môi trường cho các phản ứng xảy ra trong cơ thể ;

- Gluxit có vai trò tạo cấu trúc, tạo hình (xelluloza) ;

- Gluxit có vai trò bảo vệ (mucopolysacarit) ;

- Gluxit cùng góp phần tạo cho tế bào có được các tương tác đặc biệt (ví dụ, polysacarit trên màng tế bào hồng cầu hay trên thành tế bào một số vi sinh vật).

Vai trò của gluxit trong công nghệ sản xuất thực phẩm cũng rất đa dạng và vô cùng quan trọng :

- Gluxit là chất liệu cơ bản, cần thiết và không thể thiếu được của ngành sản xuất lên men. Các sản phẩm như rượu, bia, nước giải khát, mì chính, axitamin, vitamin, kháng sinh, đều được tân tạo ra từ cội nguồn gluxit;

- Gluxit tạo ra được cấu trúc, hình thù, trạng thái cũng như chất lượng cho các sản phẩm thực phẩm :

Tạo kết cấu :

- Tạo sợi, tạo màng, tạo gel, tạo độ đặc, độ cứng, độ đàn hồi cho thực phẩm như tinh bột, thạch và pectin trong miến, giấy bọc kẹo, mút quả, kem đá, kamaboko, trong giò lụa, v.v ;
- Tạo ra được kết cấu đặc thù cho một số sản phẩm thực phẩm : như độ phồng nở của bánh phồng tôm, tạo bọt cho bia, độ xốp cho bánh mì và tạo vị chua cho sữa chua, v.v. ;
- Tạo ra được những "bao vi thể" để cố định enzym và cố định tế bào (trong sản xuất sâm panh).

Tạo chất lượng :

- Chất tạo ngọt cho thực phẩm (các đường) ;
- Tham gia tạo ra màu sắc và hình thơm cho sản phẩm (đường trong phản ứng Maillard) ;
- Tạo ra các tính chất lưu biến cho các sản phẩm thực phẩm : độ dai, độ trong, độ giòn, độ dẻo, v.v. ;
- Có khả năng giữ được các chất thơm trong các sản phẩm thực phẩm ;
- Tạo ẩm cũng như làm giảm hoạt độ nước làm thuận lợi cho quá trình gia công cũng như bảo quản.

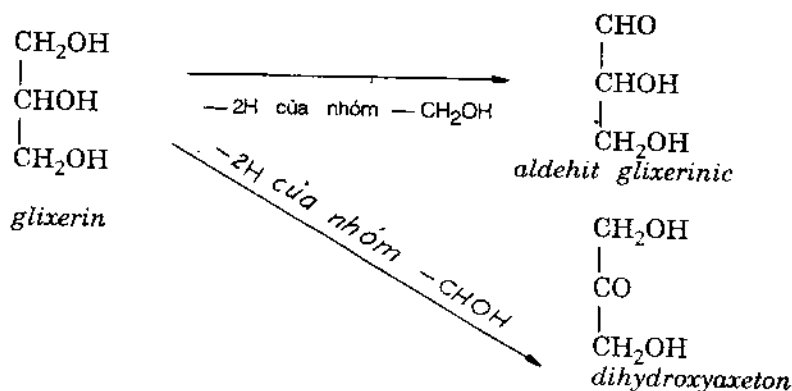
Tùy thuộc thành phần, tính chất và cấu tạo, có thể chia gluxit thành hai nhóm lớn :

- 1) Gluxit đơn giản hay là monosacarit ;
- 2) Gluxit phức tạp hay là polysacarit. Nhóm polysacarit lại được phân thành hai phân nhóm nhỏ :
 - polysacarit loại một (hay oligosacarit, oligoza) ;
 - polysacarit loại hai.

IV.1. MONOSACARIT

IV.1.1. Đặc tính cấu tạo của monosacarit

Monosacarit (gluxit đơn giản) là các dẫn xuất aldehyt hoặc xeton của các polyol. Ví dụ, chất glixerin là một loại polyol đơn giản nhất, khi oxy hóa glixerin sẽ thu được các hợp chất sau :

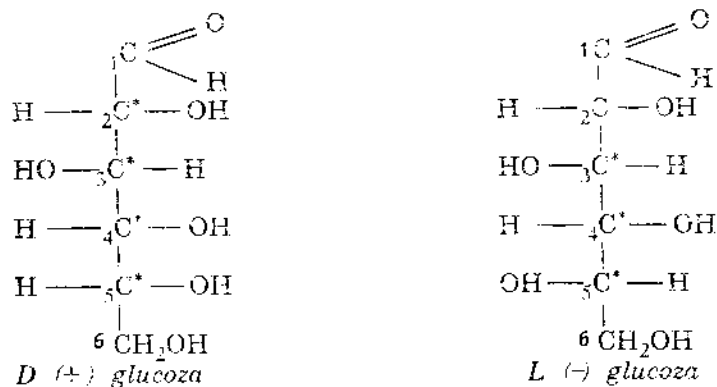


Chất aldehyt glixerinic là một loại monosacarit đơn giản nhất có chứa nhóm aldehyt, vì vậy nó còn được gọi là một aldoza. Đồng phân của nó là dihydroxyazeton thuộc loại monosacarit có cấu tạo xetoza do có chứa nhóm xeton trong phân tử.

Như vậy có thể thu được các aldoza hoặc xetoza bằng cách oxy hóa các polyol tương ứng. Tùy thuộc vào số lượng cacbon có trong mạch của monosacarit chúng sẽ có tên tương ứng như trioza (ba cacbon) tetroza (bốn cacbon), pentoza (năm cacbon), hexoza (sáu cacbon),... Việc gọi tên chất monosacarit cũng tùy thuộc cả vào sự có mặt của chức aldehyt hoặc chức xeton. Ví dụ, chất aldohexoza là monosacarit chứa sáu cacbon và chứa nhóm aldehyt, chất xetopentoza là monosacarit chứa năm cacbon và nhóm xeton, v.v. Trong phân tử monosacarit, ngoài các nhóm hydroxyl và cacbonyl ra còn có thể có nhóm amin, nhóm cacboxyl, v.v. Để nhận biết vị trí của các nhóm này, trong phân tử monosacarit có thể đánh số lần lượt các nguyên tử cacbon. Cách đánh số dựa trên nguyên tắc sau : đánh số được bắt đầu từ nguyên tử cacbon ở đầu mạch có nhóm cacbonyl để cho nguyên tử cacbon của nhóm cacbonyl có chỉ số nhỏ nhất.

Các dạng cấu tạo của monosacaru

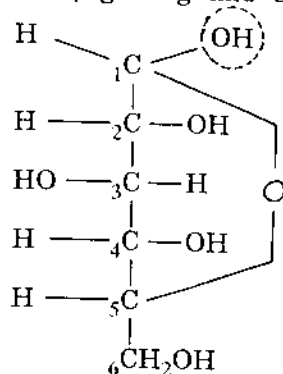
Khi nghiên cứu cấu tạo của monosacarit có thể nhận thấy rằng trong phân tử của chúng có chứa một số nguyên tử cacbon bất đối vì vậy mỗi monosacarit có thể tồn tại dưới dạng các đồng phân lập thể khác nhau, số đồng phân lập thể được tính theo 2^n với n là số nguyên tử cacbon bất đối. Trước kia người ta dùng các chữ *d* (dextrogyre) để chỉ đồng phân quay phải và *l* (levogyre) để chỉ đồng phân quay trái. Hiện nay cách dùng các chữ đã thay đổi. Người ta dùng chữ *L* và *D* để chỉ cấu hình của đồng phân và thêm vào đó dấu (+) hoặc (-) để chỉ độ quay cực về bên phải hoặc bên trái. Dùng công thức hình chiếu của Fischer có thể biểu diễn được khá đầy đủ các đồng phân lập thể của các monosacarit. Ví dụ, đối với glucoza hai chất nghịch quang của nó có công thức hình chiếu như sau :



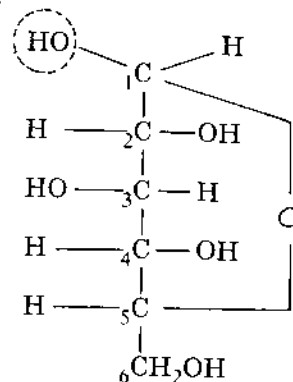
Nguyên tử cacbon có dấu sao là nguyên tử cacbon bất đối. Trên công thức hình chiếu, nếu lấy aldehyt glixerinic làm mẫu, ta thấy rằng khi nhóm OH của nguyên tử cacbon bất đối ở bên phải của trục thẳng sẽ tương ứng với dạng *D* và ngược lại khi nhóm OH ở bên trái của trục thẳng sẽ có dạng *L*. Dựa trên nguyên tắc trên và coi tất cả các monosacarit có số cacbon nhiều hơn ba là do sự kéo dài mạch

carbon về phía nhóm aldehyt có thể sắp xếp các đồng phân của chúng vào dạng *D* hoặc dạng *L*.

Khi nghiên cứu kỹ về các tính chất hóa học của monosacarit, người ta thấy rằng công thức hình chiếu trình bày ở trên chưa hoàn toàn phù hợp. Ví dụ, một số phản ứng thường xảy ra với chức aldehyt thông thường song lại không xảy ra đối với monosacarit. Vì vậy có thể nghĩ rằng chức aldehyt trong monosacarit còn có thể tồn tại dưới dạng cấu tạo riêng biệt nào đó. Mặt khác người ta lại nhận thấy monosacarit có thể dễ dàng tạo nên hợp chất ete với metanol và khi đó lại thu được một hỗn hợp hai đồng phân có chứa nhóm metoxy - OCH_3 . Điều đó chứng minh rằng trong phân tử monosacarit tồn tại một nhóm OH đặc biệt khác với các nhóm OH rượu thông thường. Các nghiên cứu chi tiết hơn của Kolle (1870) đã cho thấy rằng số đồng phân lập thể thu được nhiều hơn khi tính theo số carbon bất đối công thức trên là do monosacarit còn tồn tại ở dạng vòng. Sự tạo vòng xảy ra do tác dụng của nhóm cacbonyl với một trong các nhóm OH rượu trong cùng một phân tử monosacarit tạo nên dạng hemiaxetal vòng. Như vậy, từ công thức cấu tạo hở sẽ có thể tạo nên hai dạng vòng như sau của *D* - glucoza :



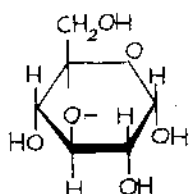
α - *D* - glucoza



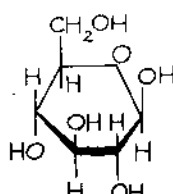
β - *D* - glucoza

Nhóm OH gắn vào C_1 của aldoza (hoặc C_2 của xetoza) trong công thức vòng được gọi là hydroxyl glucosit. Sự sắp xếp của nhóm OH glucosit về bên phải hoặc bên trái của trục carbon làm thay đổi hàng loạt tính chất của phân tử monosacarit, ví dụ hai dạng α - và β - *D* - glucoza có độ quay cực khác hẳn nhau. Dạng α - *D* - glucoza có độ quay cực bằng $+115^\circ$ còn β - *D* - glucoza có độ quay cực bằng $+19^\circ$. Khi đem hòa tan một trong các dạng trên vào nước sẽ có biến đổi quay cực và dần dần đạt tới giá trị không đổi là $+52,5^\circ$. Như vậy, trong dung dịch, *D* - glucoza, có thể tồn tại ở cả ba dạng : hai dạng vòng là α - *D* - glucoza, β - *D* - glucoza và một dạng hở (như trong công thức hình chiếu). Như trên đã trình bày, sự tạo vòng có thể xảy ra giữa nhóm cacbonyl (ở C_1 hoặc C_2) và một trong các nhóm OH rượu của phân tử monosacarit thông thường là nhóm rượu ở vị trí C_4 hoặc C_5 đối với các aldoza và ở vị trí C_6 đối với xetoza. Như vậy, dạng vòng của monosacarit có thể là năm cạnh hoặc sáu cạnh.

Ví dụ, dạng vòng sáu cạnh của glucoza được hình thành do tương tác giữa nhóm cacbonyl ở C_1 với nhóm OH ở vị trí C_5 . Dạng vòng sáu cạnh được gọi là piranoza.

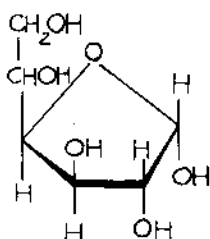


$\alpha - D - \text{glucopiranoza}$

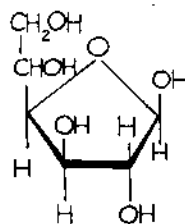


$\beta - D - \text{glucopiranoza}$

Với dạng vòng năm cạnh thì sự tạo vòng xảy ra giữa nhóm cacbonyl và OH ở vị trí C_4 :

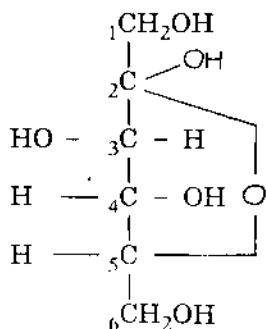


$\alpha - D - \text{glucofuranaza}$

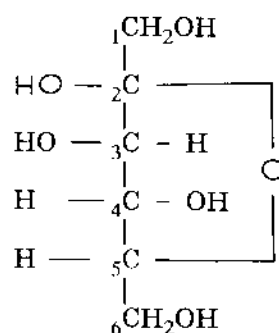


$\beta - D - \text{glucofuranaza}$

Trong trường hợp đối với các xetoza như fructoza cũng tồn tại các dạng vòng do nhóm chức xeton của cacbon ở vị trí 2 tạo được cầu oxy hoặc với C_6 để tạo vòng piranoza hoặc với C_5 để tạo vòng furanoza

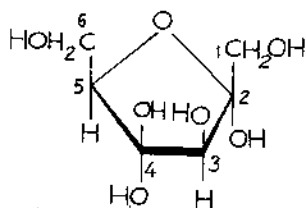


$\alpha - D - \text{fructofuranaza}$

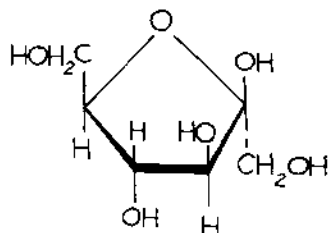


$\beta - D - \text{fructofuranaza}$

Có thể biểu diễn công thức của fructoza dưới các dạng sau đây :

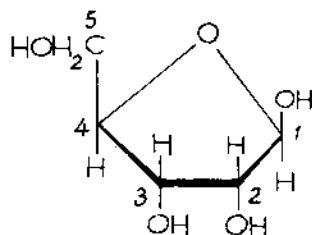


$\alpha - D - \text{fructofuranaza}$



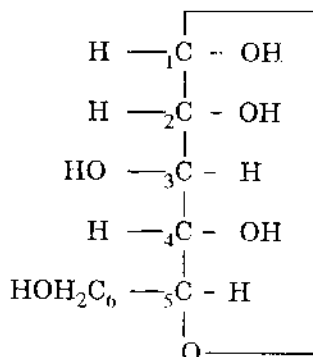
$\beta - D - \text{fructofuranaza}$

Với các hexoza thì vòng piranoza là dạng phổ biến còn với các pentoza thì dạng furanoza lại là phổ biến



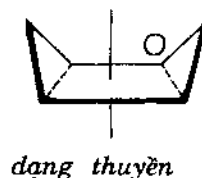
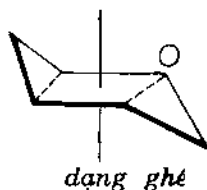
$\alpha - D - \text{ribofuranosa}$

Cách biểu diễn công thức vòng theo kiểu trên dựa trên nguyên tắc của Hayworth để ra. Theo tác giả này, vòng monosacarit được coi như đặt trên một mặt phẳng, như vậy toàn bộ mạch C và cầu nối oxy được xếp cùng trên một mặt phẳng phần đậm nét của phân tử biểu diễn vị trí của vòng gần với tầm mắt của người quan sát, còn các nhóm OH và H sẽ được sắp xếp ở trên hoặc ở dưới mặt phẳng chứa vòng monosacarit. Nếu ở công thức hình chiếu, chúng được xếp bên phải chuỗi cacbon thì trong công thức của Hayworth chúng sẽ được xếp ở phần dưới của mặt phẳng chứa vòng và ngược lại các nhóm ở bên trái sẽ chiếm các vị trí ở phía trên mặt phẳng. Chỉ riêng trong trường hợp đối với nguyên tử cacbon mà nhóm OH được dùng để tạo nên cầu oxy thì cách sắp xếp các nhóm thế lại theo nguyên tắc ngược lại. Ví dụ ta thấy ở công thức hình chiếu của D - glucoza, hydro của C₅ ở về bên trái của mạch cacbon, nhưng khi chuyển sang công thức vòng nó lại được xếp ở phần dưới của mặt phẳng chứa vòng. Sở dĩ có tình trạng đó, vì công thức hình chiếu của Fischer còn chưa biểu diễn được cấu trúc của monosacarit một cách hoàn hảo. Để có sự thống nhất giữa hai kiểu công thức cấu tạo trên, người ta sửa kiểu biểu diễn công thức hình chiếu như sau :

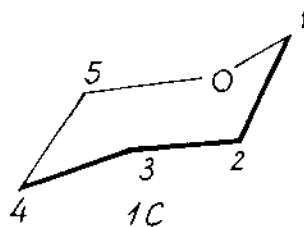
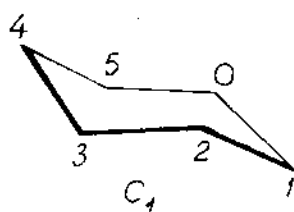


Trong công thức vòng, dạng α - tương ứng với vị trí của nhóm OH glucosit sắp xếp ở bên dưới vòng, còn dạng β - nhóm OH glucosit ở bên trên vòng.

Qua những điều đã trình bày ở trên có thể thấy được rằng trong dung dịch monosacarit tồn tại ở nhiều dạng cấu tạo khác nhau và luôn luôn có một cân bằng giữa các dạng đó. Dạng hở của monosacarit thường chỉ chiếm một tỉ lệ nhỏ. Sự chuyển hóa giữa các dạng hở và dạng vòng piranoza hoặc furanoza của monosacarit phụ thuộc vào điều kiện môi trường, điều kiện phản ứng và tác nhân phản ứng. Cũng cần chú ý rằng monosacarit tồn tại phần lớn dưới dạng vòng sáu cạnh kiểu piranoza. Ở dạng này nó lại có thể có cấu hình dạng ghế hoặc dạng thuyền tương tự như cấu hình của các chất loại xiclohexan :

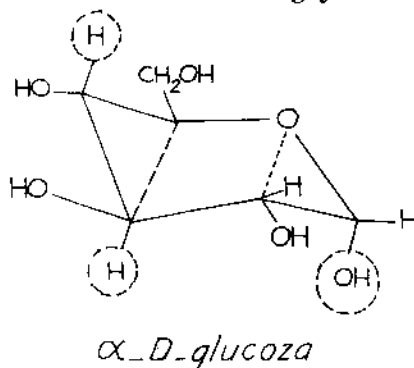


Các nghiên cứu chi tiết về cấu hình của monosacarit cho thấy chúng có thể tồn tại ở hai dạng ghế và sáu dạng thuyền khác nhau tùy theo sự khác nhau của vị trí của oxy trong phân tử sáu cạnh. Các nhóm thế được sắp xếp theo mặt phẳng thẳng đứng hoặc theo mặt phẳng nằm ngang thẳng góc với trục đứng và tính chất của chúng thay đổi tùy theo từng sự sắp xếp ở các vị trí khác nhau. Thông thường dạng ghế bền hơn cả. Hai dạng ghế của monosacarit có cấu hình như sau :



Dạng C_1 là dạng gặp nhiều hơn cả. Kiểu biểu diễn cấu hình của monosacarit theo dạng này hoàn hảo hơn các kiểu khác. Để biểu diễn các nhóm thế người ta sắp xếp chúng theo trục thẳng đứng hoặc theo vị trí nằm ngang cùng trên mặt phẳng của vòng. Ví dụ đối với α - D - glucoza ta có cấu hình sau (các nguyên tử hoặc gốc trong vòng chấm nằm theo trục thẳng đứng) :

Cấu hình bên đúng với dạng tinh thể của glucoza và có thể cũng đúng với cả khi nó tồn tại trong dung dịch. Tuy nhiên người ta chưa xác định được đầy đủ cấu hình của nhiều dạng monosacarit khác, vì vậy hiện nay chủ yếu người ta vẫn biểu diễn cấu trúc của monosacarit theo kiểu của Hayworth.



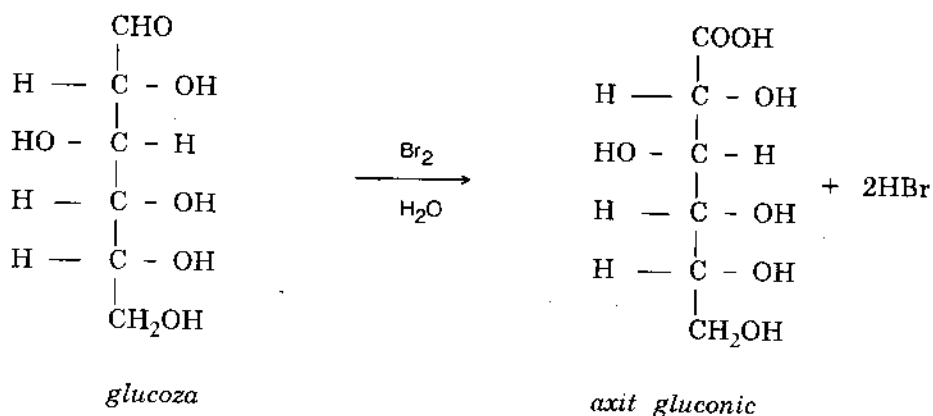
IV.1.2. Tính chất của monosacarit

Do sự có mặt của nhiều nhóm hydroxyl trong phân tử nên nhìn chung monosacarit là những chất dễ hòa tan trong nước và không tan trong các dung môi hữu cơ. Khi cô đặc dung dịch monosacarit sẽ thu được các tinh thể. Tuy nhiên quá trình kết tinh các monosacarit có thể bị ảnh hưởng bởi hiện tượng sonvat hóa do tương tác với dung môi và hiện tượng chuyển hóa hổ biến giữa các dạng cấu tạo của monosacarit. Vì vậy để thu được hiệu suất cao khi kết tinh đường cần chú ý chọn những phương pháp thích hợp làm giảm những hậu quả gây nên bởi các hiện tượng trên.

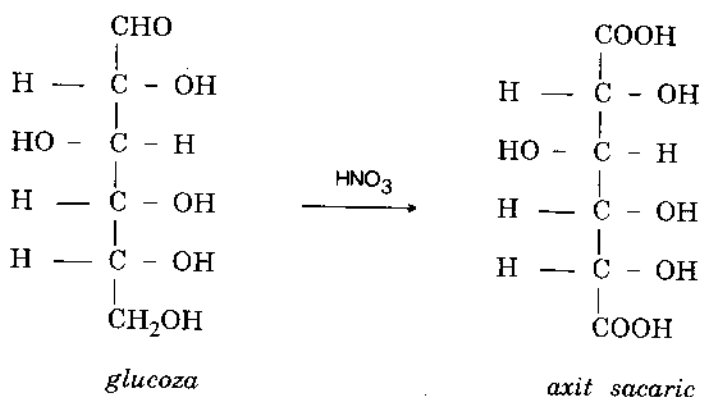
Sự có mặt của các nhóm cacbonyl và các nhóm hydroxyl trong phân tử monosacarit làm cho nó có những tính chất hóa học đặc trưng của các nhóm chức đó. Mặc dầu dạng cấu tạo hở chỉ chiếm một tỉ lệ nhỏ trong dung dịch, song cũng đủ để thể hiện nhiều tính chất của chức aldehyt hoặc xeton điển hình là tính khử.

IV.1.2.1. Tác dụng của các chất oxy hóa

Tùy thuộc vào điều kiện oxy hóa monosacarit ta sẽ thu được các sản phẩm khác nhau. Ví dụ, nếu oxy hóa nhẹ bằng nước brom (hoặc clo, iot) trong môi trường kiềm thì từ monosacarit sẽ thu được hợp chất axit tương ứng do chức aldehyt bị oxy hóa. Sản phẩm thu được khi oxy hóa glucoza sẽ có tên là axit gluconic :

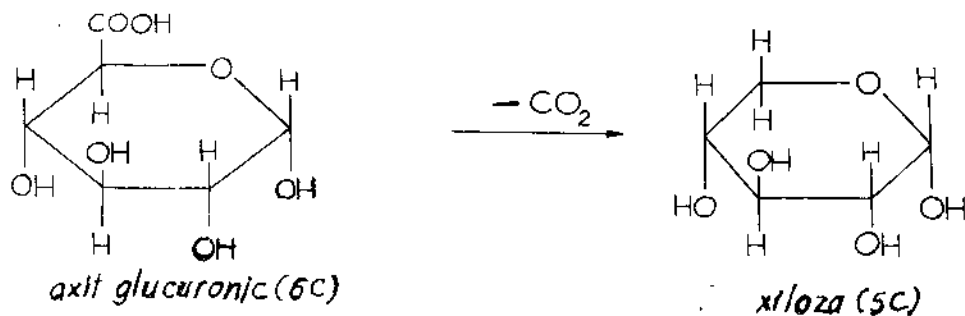
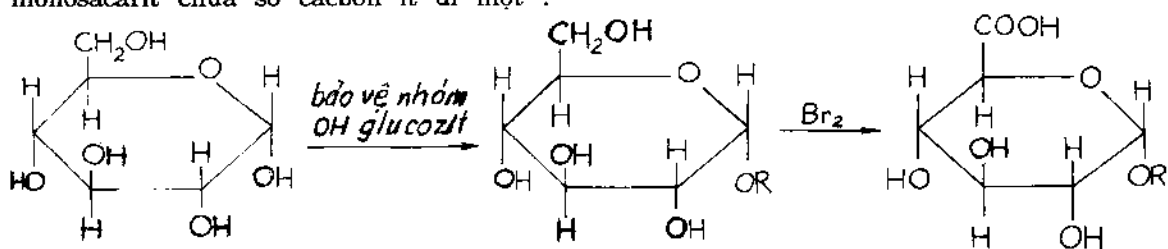


Riêng với các xetoza thì phản ứng này không xảy ra. Khi oxy hóa bằng các chất oxy hóa mạnh hơn, ví dụ, HNO_3 thì cả chức aldehyt và chức rượu bậc một trong phân tử đều chuyển thành chức axit và sẽ thu được một diaxit, gọi là axit sacarinic



Khi oxy hóa các aldoza bằng dung dịch nước brom, nếu đã bảo vệ chức aldehyt bằng cách metyl hóa hoặc axetyl hóa chức đó thì quá trình oxy hóa chỉ xảy ra ở nhóm rượu bậc một và sản phẩm thu được sẽ chứa một nhóm axit. Sản phẩm này được gọi là axit uronic. Các hợp chất axit uronic là thành phần của nhiều loại polysacarit quan trọng của cơ thể thực vật cũng như một số sinh vật. Nó cũng là sản phẩm trung gian, khi xảy ra sự chuyển hóa các hợp chất đường hexoza thành pentoza trong quang hợp. Khi axit uronic bị loại bỏ nhóm cacboxyl nhờ tác dụng của

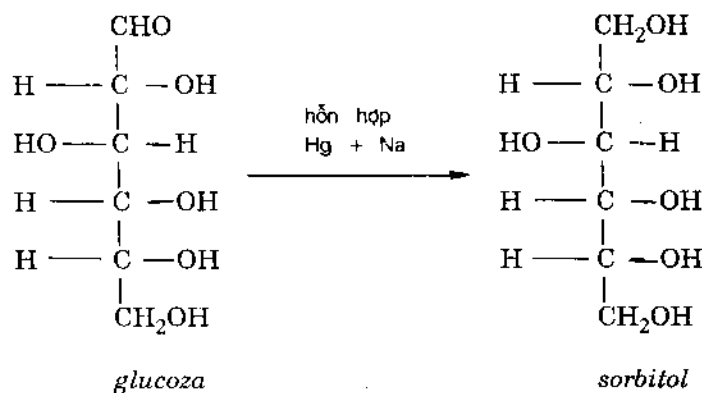
một số kim loại hoặc nhờ một số enzym, sẽ tạo nên sản phẩm tương ứng với monosacarit chứa số cacbon ít đi một :



IV.1.2.2. Tác dụng của các chất khử

Dưới tác dụng của các chất khử monosacarit chuyển thành các polyol. Khi đó các nhóm aldehyt hoặc xeton của monosacarit chuyển thành các nhóm rượu tương ứng.

Ví dụ, từ glucoza sẽ thu được rượu tương ứng gọi là sorbitol :

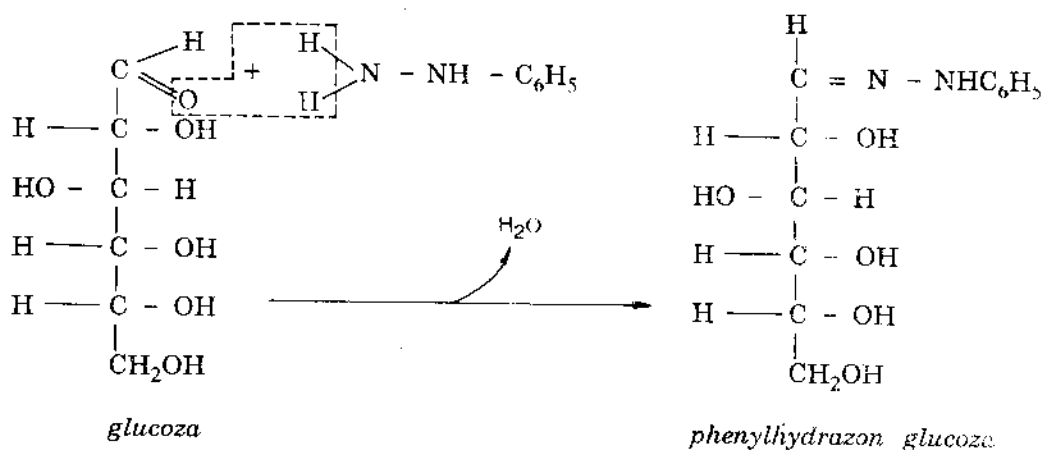


Chất rượu tương ứng với đường galactoza là dulxitol.

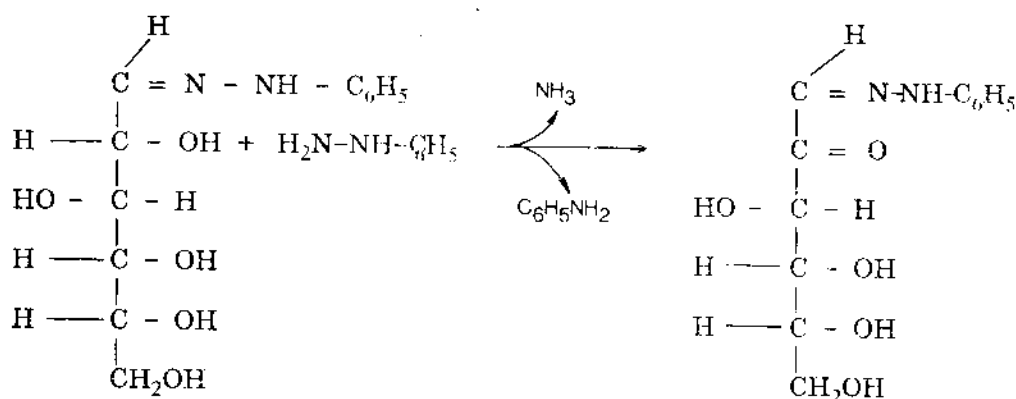
IV.1.2.3. Tác dụng của phenylhydrazin

Monosacarit có thể phản ứng với các amin. Ví dụ điển hình nhất về kiểu phản ứng này là tác dụng giữa monosacarit và phenylhydrazin $C_6H_5NH - NH_2$ dư. Phản ứng xảy ra theo ba giai đoạn :

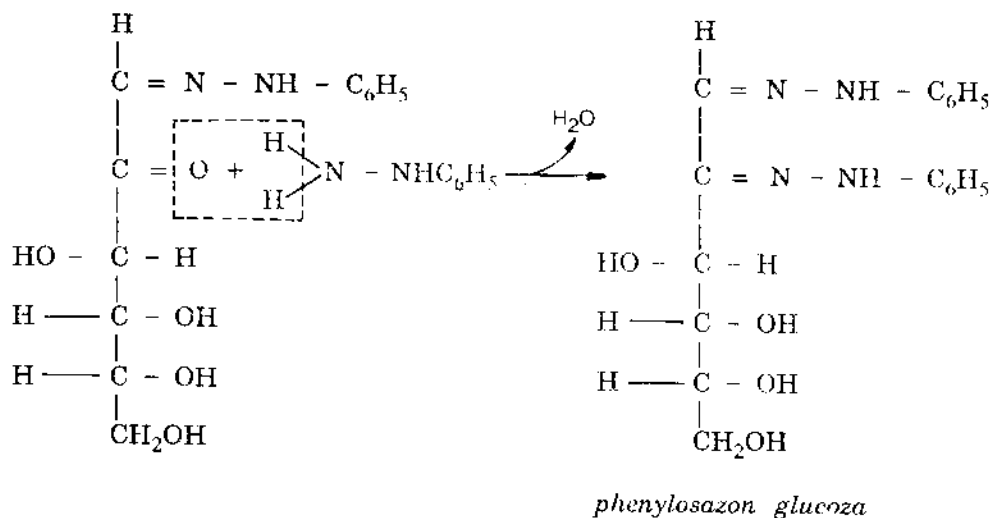
- Giai đoạn một là sự tạo nên phenylhydrazon :



- Giai đoạn hai tương ứng với sự oxy hóa ở nguyên tử cacbon ở vị trí 2 tạo nên nhóm cacbonyl :

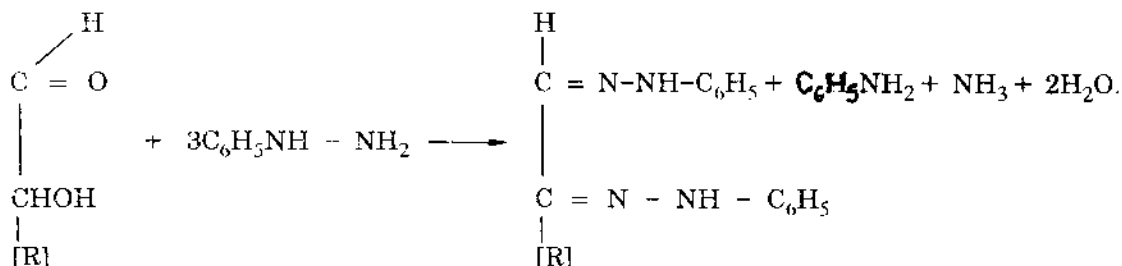


Ở giai đoạn ba, một phân tử phenylhydrazin thứ ba sẽ tham gia phản ứng với nhóm cacbonyl và tạo nên sản phẩm cuối cùng là phenylosazon của glucoza :



Phản ứng dừng lại ở giai đoạn này do sự hóa vòng của osazon có tác dụng chặn nhóm OH tự do bên cạnh. Theo cơ chế phản ứng trên các chất đường có phần gốc tương tự nhau sẽ cho cùng loại osazon.

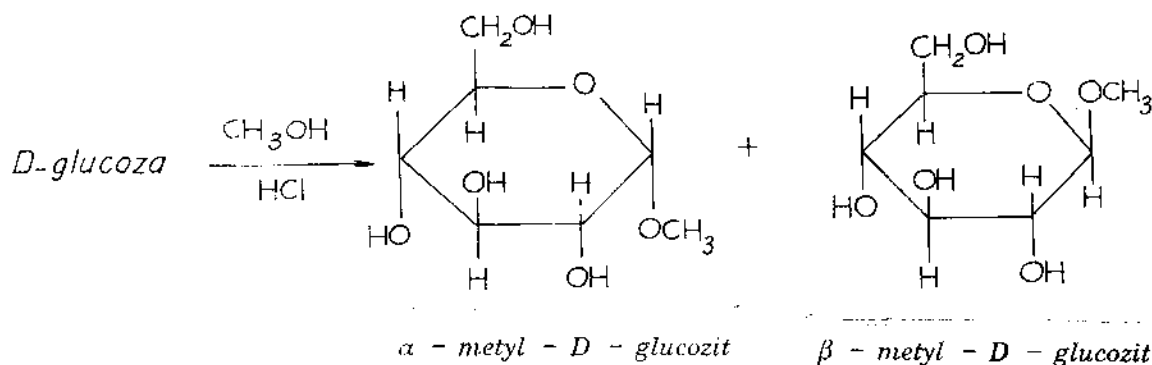
Có thể tóm tắt phản ứng của glucoza với phenylhydrazin như sau :



Các osazon thường là các chất tinh thể, có thể dựa vào dạng tinh thể tạo thành để nhận ra loại monosacarit tương ứng. Tinh thể của các phenylosazon có hình dạng, điểm nóng chảy và độ hòa tan khác nhau. Tuy nhiên một số loại monosacarit như glucoza, fructoza và manozo lại cho các tinh thể phenylosazon như nhau. Điều đó chứng tỏ rằng cấu trúc của các loại đường này ở các vị trí C₃, C₄ và C₅ là giống nhau.

IV.1.2.4. Phản ứng của nhóm hydroxyl glucozit và sự tạo ra các hợp chất glucozit

Sự tạo thành các dẫn xuất glucozit của monosacarit là một đặc tính rất quan trọng của chúng. Tương ứng với các monosacarit dạng α hoặc β sẽ thu được các dẫn xuất glucozit α hoặc β . Ví dụ từ D - glucoza nếu cho tác dụng với metanol với sự có mặt của HCl sẽ thu được hai chất sau :



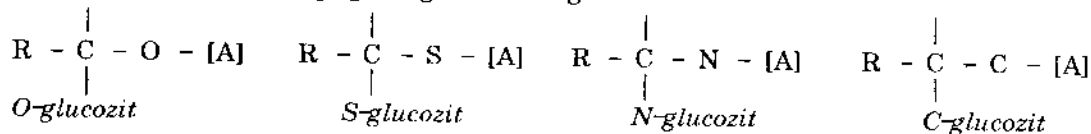
Liên kết glucozit trong các hợp chất của glucozit là loại liên kết cơ bản có ý nghĩa quan trọng đối với việc tạo nên các oligosacarit, polysacarit và nhiều hợp chất phi gluxit khác. Phần phi gluxit thế vào vị trí hydro của nhóm OH glucozit gọi là phần aglucon. Các gốc rượu, các gốc của những hợp chất thơm và của những hợp chất thơm đã được hydro hóa, các gốc sterit, các gốc alcaloit, đều có thể tham gia trong việc xây dựng nên các phân tử glucozit với vai trò là các aglucon. Tùy theo cấu tạo của phần gluxit có trong phân tử mà người ta chia glucozit thành một số phân nhóm :

- Pentozit là các glucozit của pentoza, trong đó aglucon được kết hợp với chất đường năm cacbon như xiloza, arabinoza, hoặc riboza, đôi khi người ta cũng gọi các glucozit này là xilozit và ribozit;

- Hexozit là các glucozit của hexoza, trong đó aglucon được kết hợp với chất đường sáu cacbon, ví dụ như galactozit.

Ngoài ra còn có các glucozit, trong đó aglucon kết hợp các disacarit và một số

các chất đường khác. Maltozit, lactozit, ... đều là những glucosit này. Tùy theo bản chất của liên kết giữa phần gluxit và aglucon mà người ta chia ra O - glucosit, trong đó gốc aglucon kết hợp với gluxit qua oxy; S - glucosit, trong đó gốc aglucon được kết hợp qua lưu huỳnh, N - glucosit trong đó có liên kết C - N, và C - glucosit có liên kết C - C trực tiếp giữa gluxit và aglucon :



trong đó R - phần gluxit của phân tử glucosit ;

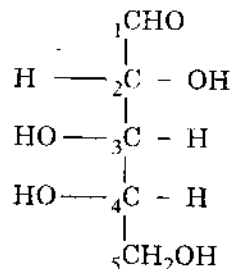
A - aglucon.

Tất cả glucosit dễ dàng bị thủy phân, khi đó liên kết glucosit bị đứt và tạo thành monosacarit tương ứng. Phản ứng thủy phân các glucosit được xúc tác bởi axit, chỉ trong một số trường hợp mới do kiềm xúc tác. Đa số glucosit bền vững đối với kiềm.

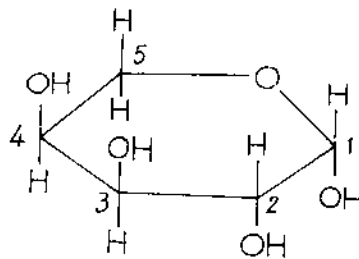
IV.1.3. Các dạng monosacarit quan trọng và tính chất của chúng

Pentoza

Pentoza là monosacarit chứa năm cacbon, gặp trong thành phần của nhiều tổ chức động vật và thực vật, chúng cũng tồn tại một phần ở trạng thái tự do. Các pentoza quan trọng thường gặp là L - arabinaza, D - xiloza, D - riboza và D - deoxyriboza. L - arabinaza có trong thành phần của các polysacarit như hemixelluloza, các chất nhầy, các pentozan. Nó không bị lên men bởi nấm men và thường gặp trong thực vật ở dạng L :



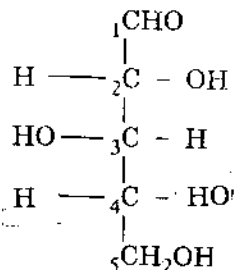
L - arabinaza



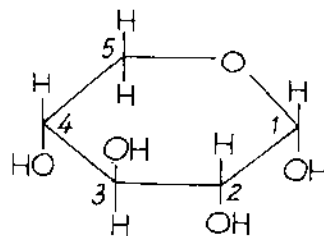
dạng β - piranoza của L - arabinaza

D - xiloza

Tồn tại một phần ở trạng thái tự do, nhưng chủ yếu dưới dạng polysacarit gọi là xilan và pentozan có trong gỗ, rơm rạ. Có thể dùng axit thủy phân các nguyên liệu trên để thu D - xiloza trong công nghiệp. D - xiloza cũng không bị lên men bởi nấm men và không bị đông hóa bởi người và động vật.



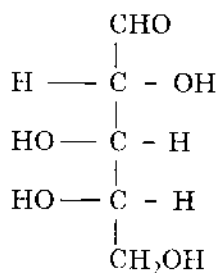
D - xiloza



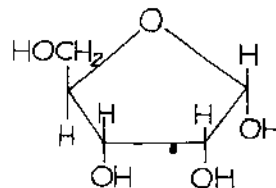
dạng α - piranoza của D - xiloza

D - riboza

Là monosacarit gặp trong thành phần của nhiều hợp chất như axit ribonucleic, một số vitamin và coenzim nicotinamid adenin dinucleotit. Trong thực vật, *D - riboza* tồn tại ở dạng furanoza :



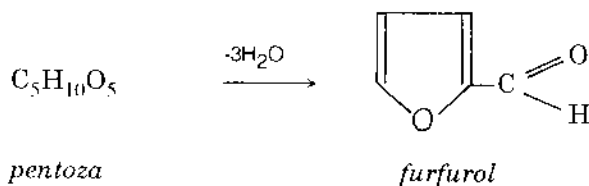
D - riboza



dạng α - furanoza của *D - riboza*

Một dẫn xuất quan trọng của riboza là chất *D - deoxyriboza*. Trong chất này không có nguyên tử oxy ở vị trí C_2 . Nó là một thành phần quan trọng của axit deoxyribonucleic (xem phần axit nucleic).

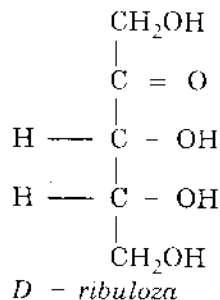
Khi đun nóng các pentoza nói trên với axit, chúng sẽ bị loại nước và chuyển thành dẫn xuất aldehyt gọi là furfural



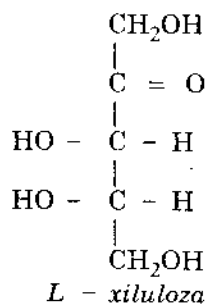
Furfural khi tác dụng với anilin và axit clohydric sẽ cho hợp chất có màu đỏ. Phản ứng này là cơ sở để định lượng đường pentoza. Furfural cũng được tạo thành khi nướng bánh do các đường pentoza của bột bị loại nước, ở nhiệt độ cao furfural bay hơi và cho mùi thơm như mùi táo, vì vậy nó cũng tham gia tạo mùi thơm đặc trưng của bánh nướng.

Ngoài các aldopentoza kể trên, cũng cần chú ý tới hai loại xetopentoza quan trọng là *D - ribuloza* và *L - xiluloza*. Chúng thường gặp trong thực vật, vi sinh vật và cả ở mô động vật.

Các este phosphat của *D - ribuloza* là chất nhận CO_2 trong quá trình quang hợp (xem phần quang hợp). Ribuloza và xiluloza dưới dạng este phosphat cũng giữ vai trò quan trọng trong các quá trình chuyển hóa tương hỗ giữa các monosacarit khác nhau.



D - ribuloza



L - xiluloza

Hexoza

Hexoza là nhóm monosacarit phổ biến hơn cả trong thiên nhiên. Thông thường hexoza tồn tại ở dạng vòng piranoza, dạng furanoza ít gặp hơn, trừ đối với fructoza.

Aldohexoza ở dạng vòng chứa bốn nguyên tử cacbon bất đối, số đồng phân là $2^4 = 16$, trong đó chất đại diện là glucoza. Các hexoza điển hình thường gặp trong thiên nhiên là các chất sau : *D* - glucoza, *D* - galactoza, *D* - fructoza,...

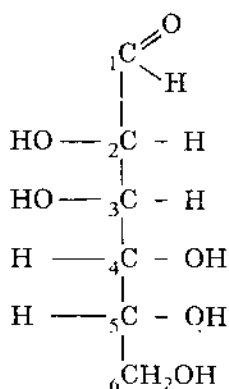
D - glucoza (đường nho, dextroza)

D - glucoza là monosacarit phổ biến ở thực vật cũng như ở động vật, có nhiều ở nho chín nên còn gọi là đường nho. Dung dịch glucoza làm quay mặt phẳng của ánh sáng phân cực sang phải nên cũng có tên là dextroza.

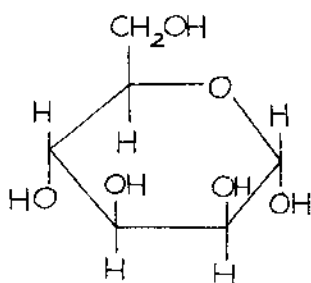
Trong dung dịch, *D* - glucoza tồn tại chủ yếu ở dạng piranoza. *D* - glucoza là thành phần cấu tạo của rất nhiều loại polysacarit như tinh bột, glicogen, xelluloza,... Ở cơ thể người và động vật, glucoza là thành phần cố định trong máu. Đưa glucoza vào máu người bệnh, sẽ làm hồi phục sức khỏe nhanh chóng vì glucoza là monosacarit được hấp thụ dễ dàng hơn cả.

D - manozo

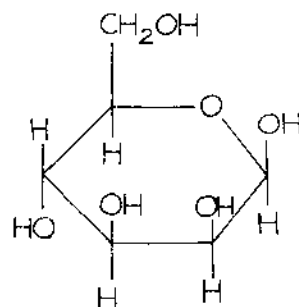
Là loại hexoza có trong thành phần của nhiều loại polysacarit khác nhau như hemixelluloza, các chất nhầy, v.v. Manozo dễ dàng bị lên men bởi nấm men.



D - manozo



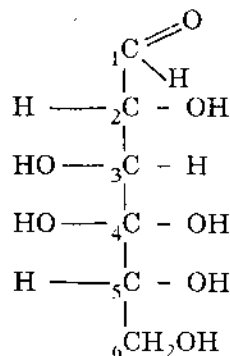
α - *D* - manozo



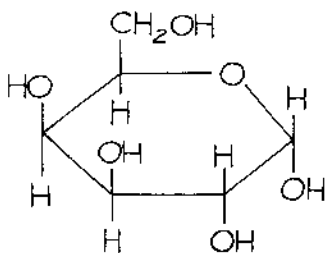
β - *D* - manozo

D - galactoza

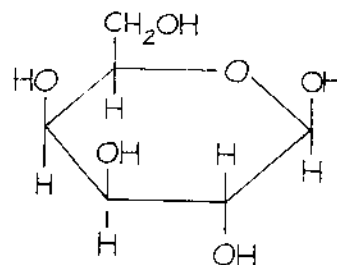
Là monosacarit có trong thành phần của disacarit lactoza. Nó cũng có trong thành phần của các polysacarit galactan của thực vật *D* - galactoza còn là đơn vị cấu tạo của melibioza và aga-aga (thạch). Dẫn xuất axit galacturonic là thành phần của polysacarit pectin. Galactoza chỉ bị lên men bởi các loại nấm men riêng biệt.



D - galactoza



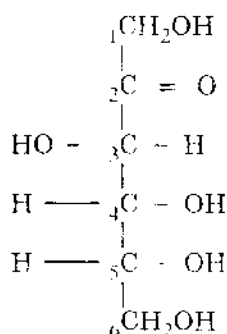
α - *D* - galactoza



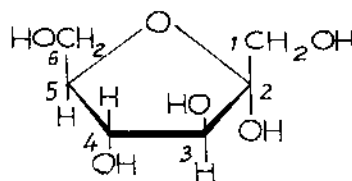
β - *D* - galactoza

D - fructoza (đường quả, levuloza)

D - fructoza có nhiều trong quả, mật hoa. Nó làm quay mặt phẳng của ánh sáng phân cực sang trái nên còn có tên là levuloza. *D* - fructoza là thành phần của disacarit sacaroza và của các polyfructozit thường gặp trong thực vật, ví dụ, inulin của củ cây thuộc dứa, củ cải đường, v.v. Fructoza thường tồn tại dưới dạng furanoza. Nó dễ dàng bị lên men bởi nấm men. Fructoza có nhiều trong mật ong, do độ ngọt rất cao của nó nên mật ong có vị ngọt mạnh. Khi kết tinh trong dung dịch nước fructoza có hình kim, tinh thể của nó ngậm một phân tử nước : $2C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$.



D(-)*fructoza*



α - *D*(-)*fructoza*

IV.2. POLYSACARIT

Tùy thuộc vào số lượng monosacarit có trong thành phần của polysacarit (gluxit phức tạp) có thể chia nhóm polysacarit thành hai phân nhóm như sau :

- Polysacarit loại một hay oligosacarit ;
- Polysacarit loại hai gọi tên chung là polysacarit.

IV.2.1. Oligosacarit (polysacarit loại một)

Oligosacarit là nhóm gluxit cấu tạo bởi sự liên kết của một số ít monosacarit. Vì vậy phân tử lượng của chúng không lớn lắm và chúng còn giữ được một số tính chất như các đường đơn giản. Chúng dễ tan trong nước và dễ kết tinh. Khi thủy phân bằng axit hoặc enzym tương ứng sẽ làm đứt các liên kết glucozit giữa các monosacarit thành phần của oligosacarit và giải phóng các monosacarit. Thông thường người ta xếp vào nhóm oligosacarit các gluxit chứa từ 2 đến 10 monosacarit, trong số đó quan trọng và phổ biến hơn cả là các disacarit như sacaroza, lactoza, maltoza,...

IV.2.1.1. Disacarit

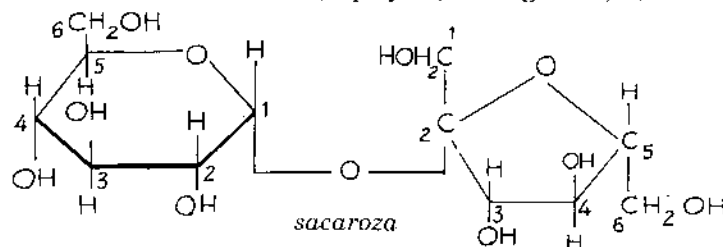
Disacarit là oligosacarit có hai gốc monosacarit kết hợp với nhau. Khi kết hợp như vậy sẽ loại ra một phân tử nước. Sự kết hợp có thể xảy ra đối với hai monosacarit giống nhau hoặc khác nhau. Còn về kiểu liên kết giữa hai monosacarit thì đó là kiểu liên kết glucozit, vì vậy có thể coi disacarit là một glucozit trong đó aglucon là một monosacarit thứ hai. Sự kết hợp giữa hai monosacarit có thể xảy ra theo hai kiểu khác nhau và phụ thuộc vào các kiểu kết hợp đó mà sẽ có các disacarit có tính chất khác nhau. Trong kiểu liên kết thứ nhất, một monosacarit này liên kết

với một monosacarit khác nhờ nhóm OH glucosit của nó với một nhóm OH rượu của chất thứ hai, như vậy ở disacarit tạo thành vẫn còn lại một nhóm OH glucosit ở dạng tự do, kết quả là nó vẫn duy trì được tính chất khử. Ví dụ, đường maltoza hoặc lactoza có cấu tạo theo kiểu liên kết thứ nhất. Trong kiểu liên kết thứ hai, hai monosacarit kết hợp với nhau nhờ hai nhóm OH glucosit của chúng, kết quả là hình thành nên disacarit không còn chứa OH glucosit tự do. Các disacarit loại này không còn tính khử, ví dụ, sacaroza là disacarit thuộc kiểu liên kết thứ hai.

Một số disacarit quan trọng

Sacaroza

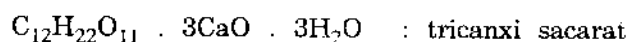
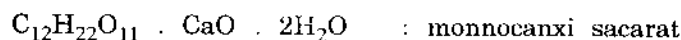
Sacaroza thuộc loại đường rất phổ biến trong thiên nhiên. Nó có nhiều trong củ cải đường, trong mía và ở lá, thân, rễ, quả của nhiều loại thực vật. Trong công nghiệp sản xuất đường, người ta dùng nguyên liệu là củ cải đường hoặc mía vì chúng có thể chứa từ 20 - 25% đường sacaroza. Sacaroza là loại đường dễ hòa tan, nó có ý nghĩa rất quan trọng đối với sự dinh dưỡng của người. Sacaroza là loại disacarit cấu tạo từ glucoza và fructoza. Hai monosacarit này liên kết với nhau nhờ hai nhóm OH glucosit của chúng, vì vậy sacaroza không có tính khử. Khi thủy phân bằng axit hoặc enzym invertaza, sẽ giải phóng glucoza và fructoza. Trong phân tử sacaroza gốc glucoza ở dạng piranoza, còn gốc fructoza ở dạng furanoza, liên kết xảy ra ở C₁ của glucoza và ở C₂ của fructoza, do đó sacaroza còn được gọi là α - D - glucopiranozit (1 → 2) β - D - fructofuranozit (có độ quay cực bằng +66,5°)



Khi tác dụng với chất kiềm hoặc kiềm thổ, sacaroza tạo nên các sacarát là hợp chất tương tự với các alcolat. Trong sacarát, hydro của nhóm hydroxyl được thay thế bởi kim loại. Như vậy, trong môi trường này có thể coi sacaroza như một axit yếu. Có thể kết tủa sacarát khỏi dung dịch của nó bằng rượu. Phản ứng tạo thành sacarát phụ thuộc vào nồng độ của dung dịch, vào lượng kiềm cũng như vào lượng sacaroza. Trong dung dịch đậm đặc và dư kiềm, sacaroza sẽ tạo nên nhiều sacarát :



Khi tác dụng với vôi sẽ thu được các dạng phức sacarát như sau :



Phản ứng tạo thành tricanxi sacarát được ứng dụng trong sản xuất sacaroza từ rỉ đường. Vì tricanxi sacarát rất ít hòa tan trong nước còn hai dạng monocanxi và dicanxi dễ hòa tan trong nước. Dung dịch Fehling có thể phân nào gây ra sự oxy hóa chậm sacaroza khi cho oxy hoặc không khí qua dung dịch kiềm sacaroza.

Sự thủy phân sacaroza và sự tạo đường nghịch đảo

Sacaroza có đặc tính dễ bị thủy phân thành glucoza và fructoza. Quá trình này có thể được thực hiện nhờ enzym invertaza hoặc nhờ axit (axit clohidric ở nhiệt độ cao). Ở thực phẩm có pH axit cũng thuận lợi cho sự nghịch đảo, ở dịch quả khi bảo quản tạm quá trình này xảy ra tự động. Sản phẩm hình thành khi thủy phân sacaroza được gọi là đường nghịch đảo. Nó có trong mật ong ở dạng tự nhiên. Sở dĩ nó mang tên này vì dung dịch sacaroza ban đầu có $[\alpha]_D$ bằng $+66,5''$ nhưng sau khi thủy phân độ quay cực lại bằng $-20''$ nghĩa là có sự thay đổi góc quay cực từ phải sang trái. Trong hỗn hợp glucoza và fructoza được hình thành $[\alpha]_D$ của glucoza là $+52,5''$ còn $[\alpha]_D$ của fructoza là $-92,4''$ và do đó dung dịch đường nghịch đảo có $[\alpha]_D$ bằng $-20''$. Sự nghịch đảo cũng làm tăng chất khô lên 5,26%, đồng thời tăng nhẹ vị ngọt và nhất là tăng độ hòa tan của đường trong dung dịch. Dung dịch đường

Bảng 4.1. Tính hòa tan của một số loại đường trong nước ở 20°C

Đường	Độ hòa tan, g/100g nước
Sacaroza	204
Fructoza	375
Glucoza (hydrat)	107
Maltoza	83
Lactoza	20

nghịch đảo thường ít nhớt hơn so với dung dịch sacaroza khi dùng một trọng lượng khô ngang nhau. Sự tăng tính hòa tan gây ra nhờ quá trình nghịch đảo là do tính hòa tan cao của đường fructoza cũng như tính khó kết tinh của đường glucoza so với đường sacaroza.

Tính hòa tan của đường chung không những có thể được tăng lên nhờ thêm đường nghịch đảo mà cả khi thêm glucoza hay sirô glucoza. Điều đó còn cho phép điều chỉnh độ nhớt của các dung dịch đường. Khi làm lạnh các dung dịch bão hòa đường sacaroza (thu được ở nhiệt độ cao) sẽ có thể tạo nên các dung dịch quá bão hòa của sacaroza. Vận tốc kết tinh sacaroza từ các dung dịch này cũng như kích thước của các tinh thể tạo thành có thể giảm đáng kể nhờ thêm vào dung dịch glucoza, đường nghịch đảo, sirô glucoza. Tính chất này được sử dụng trong kỹ nghệ mứt kẹo để tạo nên các sản phẩm trong đó sacaroza dù ở nồng độ rất cao nhưng vẫn không kết tinh.

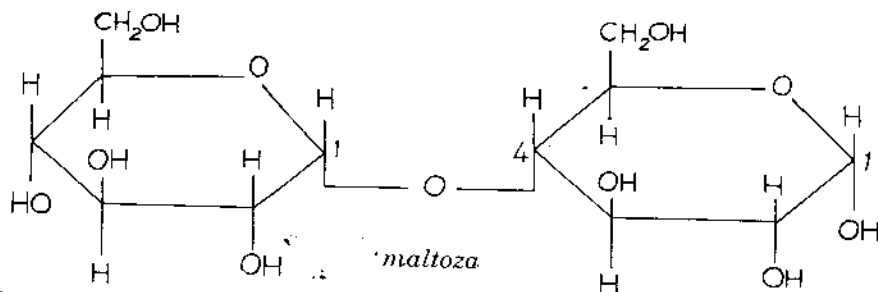
Tính hút ẩm của đường

Tính chất này ảnh hưởng tới kết cấu của một số thực phẩm. Về tính chất hút ẩm so sánh giữa các loại đường nhận thấy đường glucoza, maltoza các sirô glucoza là những chất có tính khử cao thường có tính hút ẩm kém hơn so với sacaroza nhất là so với đường nghịch đảo và fructoza. Khi cần duy trì một độ ẩm nhất định trong thực phẩm thì sự có mặt của chất hút ẩm là cần thiết. Ví dụ, khi làm bánh, mứt, kẹo có thể thêm các chất hút ẩm như đường nghịch đảo hoặc mật ong để duy trì kết cấu mềm, láng. Ngoài các loại đường có thể dùng các polyalcol như sorbitol, manitol, glixerol, v.v. Tuy nhiên, trong một số trường hợp ở các chế phẩm mứt kẹo nếu đường tồn tại ở trạng thái vô định hình thì sự có mặt của các chất hút ẩm lại không có lợi vì khi đó sự hấp phụ nước sẽ làm tăng nhanh quá trình kết tinh

đường và làm cho chế phẩm sẽ trở nên dính. Để khắc phục tình trạng trên có thể giảm lượng đường nghịch đảo và thêm "sirô glucoza". Trong nhiều loại thực phẩm chứa một lượng nước thấp, đường tồn tại ở dạng vô định hình có độ nhớt cao do đó cản trở quá trình kết tinh đường. Tuy nhiên trạng thái này không bền vững vì khi vượt trên một vùng nhiệt độ "chuyển đổi", độ nhớt sẽ giảm đi và xảy ra quá trình kết tinh đường. Mặt khác đường ở dạng vô định hình thường có độ hút ẩm cao và sự hấp thụ nước lại làm tăng nhanh vận tốc kết tinh đường.

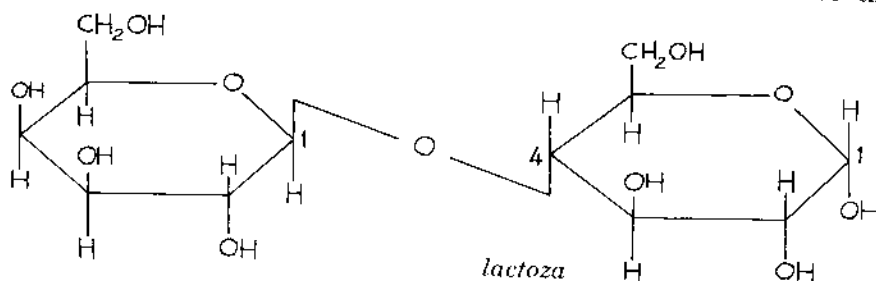
Maltoza

Maltoza là disacarit chứa hai gốc α - glucopiranoza hai gốc này liên kết với nhau nhờ các nhóm OH ở vị trí C_1 và C_4 . Do đó maltoza còn giữ được một nhóm OH glucosit và duy trì được tính chất khử bằng một nửa của glucoza. Maltoza còn được gọi là α - D - glucopiranozit (1 $\rightarrow$ 4) D - glucopiranoza. Khi thủy phân tinh bột bằng enzym có thể thu được maltoza. Trong thức này mầm và mầm mạch có nhiều maltoza do enzym amilaza thủy phân tinh bột tạo thành. Maltoza còn được gọi là đường mạch nha (từ chữ latin mạch nha là maltum). Khi thủy phân bằng axit hoặc bằng enzym maltaza, đường maltoza sẽ bị phân ly và giải phóng ra hai phân tử α - D - glucoza.



Lactoza

Lactoza còn gọi là đường sữa vì nó có trong sữa người, động vật (5 - 8%). Lactoza cấu tạo từ một phân tử β - D - galactozoza và một phân tử α - D - glucoza. Trong phân tử lactoza còn lại một nhóm hydroxyl glucosit nên nó vẫn có tính chất khử :



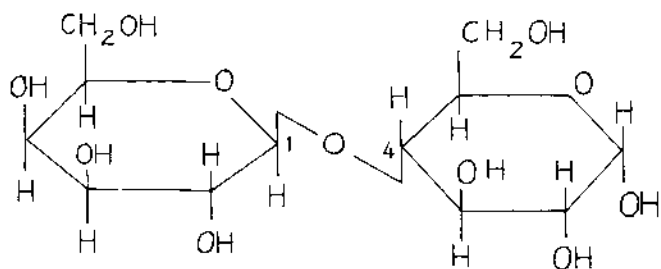
Lactoza còn được gọi là β - D - galactopiranozit (1 $\rightarrow$ 4) D - glucopiranoza. Ở nhiệt độ thường lactoza hòa tan trong nước ít hơn sacaroza mười lần nhưng ở 100°C thì độ hòa tan của nó xấp xỉ sacaroza. Lactoza kết tinh chậm, tinh thể cứng và có nhiều dạng tinh thể. Vitamin B₂ có thể ức chế sự kết tinh của lactoza. Độ ngọt của lactoza chỉ bằng 1/6 sacaroza.

Lactoza khó bị thủy phân bởi axit hơn sacaroza. Để thủy phân phải đun sôi với axit và không xảy ra sự nghịch đảo.

Enzim β - galactosidaza (lactaza) do phần ruột chảy của trẻ em tiết ra thủy phân dễ dàng lactoza. Đáng chú ý là enzim này bị mất đi nhanh hay chậm tùy thuộc vào sắc tộc. Ở trẻ em da màu enzim này mất đi nhanh hơn có khi đến 3 tuổi. Ở trẻ con da trắng thì chậm hơn.

Xellobioza

Disacarit này chứa một phân tử α - D - glucoza và một phân tử β - D - glucoza liên kết với nhau nhờ các nhóm OH ở vị trí C₁ và C₄. Xellobioza là đơn vị cấu tạo của polysacarit xelluloza. Nó vẫn duy trì được tính khử vì còn chứa một nhóm hydroxyl glucosit tự do. Khi thủy phân xelluloza nhờ enzim xellulaza sẽ thu được xellobioza :

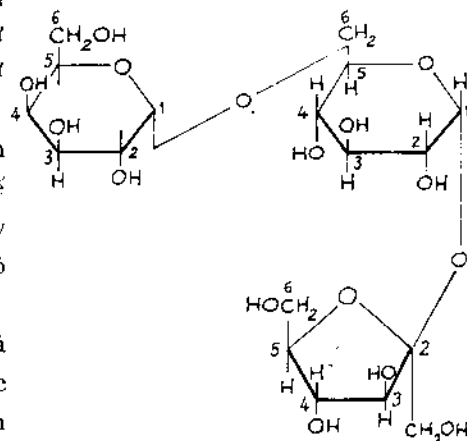


xellobioza (β - D - glucopiranozit (1 $\rightarrow$ 4) α - D - glucopiranoza)

IV.2.1.2. Trisacarit

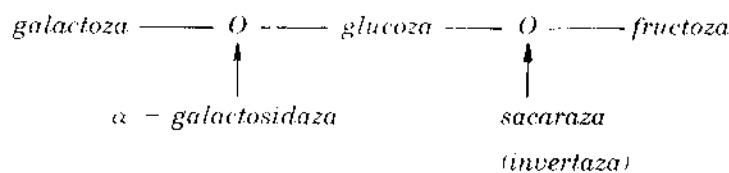
Trisacarit là nhóm oligosacarit chứa ba gốc monosacarit. Loại trisacarit phổ biến hơn cả trong thiên nhiên là chất rafinoza. Nó có nhiều trong hạt bông và trong củ cải đường. Rafinoza chứa một gốc galactoza, một gốc glucoza và một gốc fructoza. Các monosacarit này gắn với nhau nhờ các nhóm hydroxyl glucosit của chúng, vì vậy trong phân tử rafinoza không còn chứa nhóm hydroxyl glucosit tự do, nó không có tính khử.

Rafinoza có nhiều ở củ cải đường thu được khi sản xuất đường từ củ cải đường. Rafinoza tinh thể không có vị ngọt, hòa tan trong nước, khi thủy phân bằng axit trong thời gian ngắn và ở nhiệt độ không cao sẽ xảy ra sự giải phóng fructofuranoza. Tác dụng của enzim invertaza cũng cho kết quả tương tự. Phân tử disacarit hình thành nếu tiếp tục bị thủy phân thì sẽ phân giải hoàn toàn thành D - galactoza và D - glucoza. Rafinoza kém bền đối với nhiệt hơn sacaroza. Sự phân giải rafinoza nhờ enzim ở các vị trí khác nhau được trình bày như sau :



rafinoza

(α - D - galactozit (1 $\rightarrow$ 6) α - D - glucozit (1 $\rightarrow$ 2) β - D - fructozit)



IV.2.2. Polysacarit loại hai

Thuộc nhóm polysacarit loại hai có nhiều chất đặc biệt quan trọng gặp trong thực vật, động vật hoặc vi sinh vật. Chúng được cấu tạo bởi nhiều monosacarit liên kết với nhau nhờ các kiểu liên kết α hoặc β glucosit. Trong thành phần của polysacarit có thể có cùng một loại monosacarit hoặc nhiều loại monosacarit khác nhau (khoảng dưới 5 - 6 loại). Thông thường người ta gặp các hexoza hoặc cả pentoza. Trong nhiều trường hợp các gốc monosacarit trong polysacarit còn chứa một số gốc thế phi glucit như gốc axit sulfuric, gốc axit phosphoric, gốc axit axetic, v.v. Để gọi tên các polysacarit người ta dựa vào các thành phần monosacarit có mặt trong polysacarit đó và thay thế chữ "oza" bằng chữ "an". Ví dụ, nếu trong thành phần của polysacarit chứa toàn *D* - glucoza thì nó sẽ được gọi là *D* - glucan. Nếu trong thành phần của polysacarit có chứa cả gốc galactôza và gốc glucoza thì gọi là *D* - galactoglucan v.v. Sau đây chúng ta sẽ xét về cấu tạo và tính chất của một số polysacarit thuộc các nguồn khác nhau có ý nghĩa quan trọng và phổ biến hơn cả trong cơ thể sinh vật. Để thuận tiện cho việc nghiên cứu các polysacarit có thể chia chúng theo các nguồn khác nhau : polysacarit nguồn thực vật, polysacarit nguồn vi sinh vật và polysacarit nguồn động vật. Những polysacarit nguồn thực vật có tầm quan trọng đặc biệt trong thực phẩm như tinh bột và pectin sẽ được mô tả chi tiết ở phần tiếp theo.

IV.2.2.1. Các polysacarit nguồn thực vật

a) Tinh bột

Tinh bột là polysacarit chủ yếu có trong các hạt hòa thảo, trong củ, thân cây và lá cây. Lượng tinh bột ở hạt ngô, và lúa mì vào khoảng 60 - 75%. Trong hạt lúa có thể đạt từ 75 - 80%. Tinh bột cũng có nhiều ở các loại củ như khoai tây, sắn, củ mài. Một lượng tinh bột đáng kể cũng nhận thấy ở các loại quả như chuối và cá ở nhiều loại rau trong đó xảy ra sự biến đổi thuận nghịch từ tinh bột thành

Bảng 4.2. Hàm lượng tinh bột của một số thực phẩm giàu tinh bột

Sản lượng	Lượng tinh bột. % trọng lượng khô
Khoai tây	84
Bột sắn	95
Lúa mì	75
Lúa	
Hạt mạch	
Ngô	
Hạt đậu (giai đoạn chín)	60-66
Chuối	90

đường glucoza phụ thuộc vào quá trình chín và chuyển hóa sau thu hoạch. Điều này có ảnh hưởng quan trọng tới chất lượng của sản phẩm thu được. Tinh bột có vai trò dinh dưỡng đặc biệt lớn vì trong quá trình tiêu hóa, chúng bị thủy phân thành đường glucoza là chất tạo nên nguồn calo chính của thực phẩm cho con người.

Tinh bột giữ vai trò quan trọng trong kỹ nghệ thực phẩm do những tính chất lý hóa của chúng. Tinh bột thường được

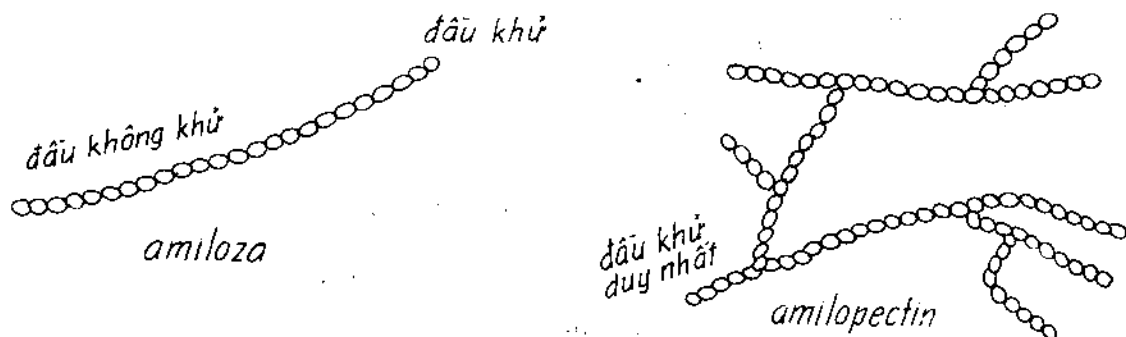
dùng làm chất tạo độ nhót sánh cho các thực phẩm dạng lỏng hoặc là tác nhân làm bền các loại thực phẩm dạng keo hoặc nhũ tương. Người ta cũng sử dụng chúng như các yếu tố tạo kết dính và làm đặc, tạo độ cứng và độ đàn hồi cho nhiều thực phẩm.

Trong hạt, tinh bột tồn tại dưới dạng các hạt có kích thước biến đổi từ 0,02 tới 0,12 mm. Hạt tinh bột của các loại hạt khác nhau có hình dạng khác nhau. Hạt tinh bột khoai tây có kích thước lớn hơn cả, còn hạt tinh bột của lúa có kích thước nhỏ hơn. Hạt tinh bột lúa mì, lúa mạch có cấu tạo đơn giản còn hạt tinh bột ngô, lúa có cấu tạo phức tạp, nghĩa là bao gồm nhiều loại hạt nhỏ. Khi tác dụng với iot, tinh bột cho màu rất đặc trưng. Phản ứng này dùng để xác định tinh bột. Tinh bột không phải là một chất riêng biệt. Nó bao gồm hai cấu tử là amiloza và amilopectin, các chất này khác hẳn nhau về nhiều tính chất lý học và hóa học. Ví dụ, amiloza tạo màu xanh với iot còn amilopectin lại cho màu tím đỏ, amiloza và amilopectin cũng khác nhau về tính hòa tan : amiloza dễ hòa tan trong nước ấm và tạo nên dung dịch có độ nhót không cao còn amilopectin chỉ hòa tan khi đun nóng và tạo nên dung dịch có độ nhót cao. Về phân tử lượng cũng có sự khác biệt khá rõ rệt. Với amiloza phân tử lượng từ $3 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ còn amilopectin có phân tử lượng từ $5 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^6$. Dựa trên những sự khác nhau đó, có thể phân chia được hai thành phần cấu tạo của tinh bột bằng những phương pháp khác nhau và điều chế chúng dưới dạng tinh khiết. Các phương pháp quan trọng hơn cả để tách và xác định hàm lượng amiloza và amilopectin trong các loại tinh bột từ các nguồn khác nhau là những phương pháp sau :

- Chiết rút amiloza bằng nước nóng ;
- Kết tủa amiloza bằng rượu butylic hoặc các loại rượu khác, để tinh chế amiloza thu được có thể lặp lại quá trình kết tủa vài lần ;
- Hấp thụ chọn lọc amiloza trên xelluloza.

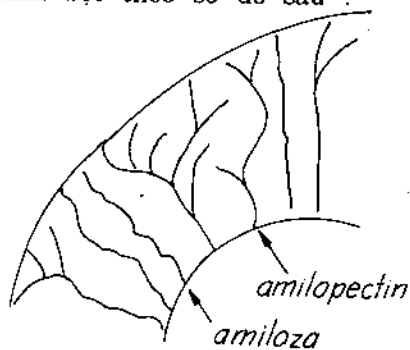
Trong tinh bột, tỉ lệ amiloza trên amilopectin bằng khoảng 1/4. Trong một số trường hợp tỉ lệ này có thể thay đổi ít nhiều, ví dụ, ở một số hạt lúa nếp chứa rất ít amiloza, trong khi đó ở một số hạt đậu, lượng amiloza lại chiếm đến 75%. Trong hạt tinh bột khoai tây có 19 - 22% amiloza và 78 - 91% amilopectin, ở hạt lúa mì và hạt ngô amiloza chiếm 25% còn amilopectin chiếm 75%.

Về cấu tạo hóa học, hai thành phần trên đều có chứa các đơn vị cấu tạo là monosacarit glucoza. Trong amiloza các gốc glucoza được gắn vào nhau nhờ liên kết $1 \rightarrow 4$ và tạo nên một chuỗi dài bao gồm từ 200 - 1000 gốc glucoza. Phân tử amiloza bao gồm một số chuỗi sắp xếp song song với nhau, trong đó các gốc glucoza của từng chuỗi cuộn vòng lại hình xoắn ốc. Phân tử amiloza có một đầu không khử và một đầu khử (đầu có nhóm OH glucosit). Trong phân tử amilopectin, các gốc glucoza gắn với nhau không chỉ nhờ liên kết $1 \rightarrow 4$ mà còn nhờ liên kết $1 \rightarrow 6$. Vì vậy có cả cấu trúc nhánh trong amilopectin. Phân tử amilopectin chỉ có một đầu khử duy nhất. Sơ đồ cấu trúc của amiloza và amilopectin như sau :



Amiloza tác dụng với iot sẽ tạo phức hợp có màu xanh, khi đó phân tử iot được sắp xếp ở bên trong vòng xoắn của amiloza ; còn phản ứng màu của amilopectin với iot xảy ra do kết quả của sự hình thành nên các hợp chất hấp phụ.

Tuy nhiên dung dịch nước của amiloza không bền nhất là khi nhiệt độ hạ thấp. Các dung dịch đậm đặc của amiloza nhanh chóng tạo nên dạng gel vô định hình ít nhiều cứng rắn hoặc co giãn, ít lâu sau sẽ tạo nên các gel tinh thể và các kết tủa không thuận nghịch. Vận tốc thoái hóa đó phụ thuộc vào pH, vào sự có mặt các ion, vào nồng độ amiloza cũng như khối lượng phân tử của amiloza. Khi thêm axit béo hoặc các monoglixerit sẽ hình thành với amiloza các phức hợp ít nhiều hòa tan, sẽ làm giảm sự trương phồng và độ nhớt trong khi nấu chín nhưng lại bảo vệ được một phần khỏi thoái hóa. Còn amilopectin có mức kết tinh thấp hơn nhiều so với amiloza. Có thể trình bày sự sắp xếp của các phân tử amiloza và amilopectin trong hạt tinh bột theo sơ đồ sau :



Phân tử amilopectin có khối lượng biến đổi từ 200 000 đến khoảng 1 000 000 thông thường có 20 - 30 gốc glucoza giữa hai điểm phân nhánh.

Amilopectin hấp thụ nhiều nước khi nấu chín và là thành phần chủ yếu tạo nên sự trương phồng của hạt tinh bột. Các hạt tinh bột giàu amilopectin sẽ dễ hòa tan trong nước ở 95°C hơn các hạt giàu amiloza. Do có sự công kênh lập thể nên các phân tử amilopectin không có xu hướng kết tinh và do đó chúng có khả năng giữ nước lớn khác với các phân tử amiloza. Các dung dịch amilopectin thông thường không bị hiện tượng thoái hóa.

Tính chất lý hóa của amiloza và amilopectin cho phép giải thích các hiện tượng hồ hóa và thoái hóa cũng như tạo gel của tinh bột. Khi hạt tinh bột được xử lý đồng thời bằng nhiệt và ẩm thì sẽ xảy ra hiện tượng hồ hóa : trên 55 - 70°C, các hạt tinh bột sẽ trương phồng do hấp phụ nước vào các nhóm hydroxyl phân cực. Khi đó độ nhớt của huyền phù tinh bột tăng mạnh vì các hạt trương phồng kết dính vào nhau. Nếu tiếp tục kéo dài việc xử lý thủy nhiệt, có thể gây ra nổ vỡ hạt tinh bột, thủy phân từng phần và hòa tan phần nào các phân tử cấu thành của tinh bột, kèm theo giảm độ nhớt của dung dịch.

Khi dung dịch rất đậm đặc thì tinh bột hình thành gel (độ nhớt lại tăng lên) và đôi khi còn tạo kết tủa. Hiện tượng này cũng xảy ra đôi khi với dung dịch ít đậm đặc hơn nhưng được làm lạnh nhanh chóng hoặc để yên.

Khi có mặt các đường (như chất hút nước) các mono - và digliserit (tạo phức với amiloza) cũng có tác dụng làm giảm sự trương phồng của các hạt tinh bột.

Nhiệt độ hồ hóa tinh bột biến đổi tùy thuộc vào nguồn gốc của thực vật cũng như kích thước của hạt tinh bột. Với lúa mì là 52 - 64°C, sắn: 52 - 64°C, khoai tây: 56 - 69°C, ngô: 62 - 74°C.

Tính chất của các tinh bột nguồn thực vật và các tinh bột biến hình

Tinh bột thiên nhiên từ ngũ cốc và các loại củ khác nhau thường chứa khoảng 20 - 25% amiloza. Tinh bột ngũ cốc thường tạo nên các dung dịch đục. Chúng chỉ phù hợp cho việc chế biến các gel thực phẩm và đặc biệt làm các chất "gôm" trong mứt kẹo. Khi sử dụng các loại tinh bột chứa hàm lượng amiloza cao hơn hoặc các loại tinh bột đã xử lý axit thì sẽ thu được các gel rắn hơn. Chúng cũng bền hơn khi nấu vì amiloza ở trạng thái tinh thể chỉ trương phồng rất nhẹ nhàng ở nhiệt độ cao và không làm tăng độ nhớt. Tinh bột giàu amiloza có thể dùng để chế tạo các màng bao ăn được (bọc kẹo, thuốc viên). Tinh bột sắn, khoai tây tạo độ nhớt cao và ít bị thoái hóa, được dùng trong chế biến gia vị, nước sốt với danh nghĩa là chất làm đặc tạm thời để giữ cho huyền phù được đồng nhất. Tuy nhiên chúng cũng không bền khi nấu kéo dài, nhất là khi khuấy mạnh và ở pH thấp. Điều đó sẽ kéo theo sự nổ vỡ các hạt tinh bột hòa tan và thủy phân một phần các cấu tử của tinh bột và hạ độ nhớt của chế phẩm. Chính vì lý do đó người ta xử lý trước tinh bột nhằm mục đích tạo dạng lưới nhờ biến đổi hóa học. Để đưa thêm các liên kết ngang vào giữa các phân tử amiloza và (hoặc) amilopectin người ta cho tác dụng của các hóa chất tạo lưới như : epichlorhydrin tạo cầu ete, natri trimetaphosphat tạo cầu este. Chỉ cần một tỉ lệ tạo mạng lưới thấp (một cầu đối với 1 300 gốc glucoza) đã có thể chống được sự nổ vỡ các hạt trương phồng và duy trì được độ nhớt cao của dung dịch. Tỉ lệ tạo mạng lưới cao hơn sẽ làm giảm độ trương phồng và cả độ nhớt nhưng lại bảo vệ được tinh bột khi đun nóng kéo dài. Đối với các sản phẩm giữ lâu ở nhiệt độ thấp thì tinh bột dạng lưới hay tinh bột giàu amilopectin lại không phù hợp vì dễ bị thoái hóa, tạo gel nhất là ở pH thấp. Trong trường hợp này người ta dùng tinh bột đã xử lý bằng etylen oxyt (hoặc propylen) có tác dụng thế các nhóm hydroxyl 2,3 và 6 bởi các nhóm axetyl, hydroxyetyl, ... làm tăng khả năng giữ nước và chống kết tinh cũng như thoái hóa. Sự có mặt của các nhóm trên cũng làm tăng hấp thụ nước, sự trương phồng và hồ hóa.

Nhiều loại tinh bột biến đổi khác cũng được đưa ra dùng nhưng chưa được phổ biến vì có thể gây ra những tác dụng phụ trong thực phẩm như khó tiêu vì vậy còn bị hạn chế.

Các enzym phân giải tinh bột và ứng dụng trong kỹ nghệ chế biến tinh bột

Enzim α - amilaza có trong tuyến tụy, thực vật và vi sinh vật tấn công liên kết α - 1,4 của thành phần amiloza cũng như của amilopectin tạo nên các polysaccharit có kích thước nhỏ và một lượng rất ít disaccharit hoặc glucoza. Khi đó có sự giảm nhanh chóng độ nhớt của dung dịch tinh bột.

Enzim β - amilaza của thực vật (ví dụ, mầm mạch) tác dụng trên amiloza và amilopectin bắt đầu từ các đầu tận cùng không có tính khử của các chuỗi và giải phóng lần lượt các gốc maltoza. Enzim này cũng tấn công liên kết α - 1,6. Đường

maltoza giải phồng ở dạng đồng phân β , như vậy enzym này đã gây ra một sự đảo nghịch (gọi là đảo nghịch Walden). Đường maltoza có thể bị thủy phân thành glucoza dưới tác dụng của maltaza (α - glucosidaza). Tác dụng của β - amilaza được hỗ trợ bởi sự có mặt của α - amilaza.

Ngoài hai α - và β - amilaza còn có phosphorilaza cũng phân giải amiloza và amilopectin từ các đầu tận cùng không khử. Enzim này có tác dụng thuận nghịch nên có thể xúc tác cho sự tổng hợp tinh bột trong những điều kiện phù hợp. Sản phẩm tạo thành là glucoza - 1 - phosphat. Tác dụng của enzym phosphorilaza dừng lại ở mức từ hai đến ba gốc glucoza trước các điểm phân nhánh của amilopectin. Một loại enzym khác có tên là amiloglucosidaza (hoặc glucoamilaza) sẽ bổ sung tác dụng của các loại enzym trên để tạo nên glucoza vì nó tác dụng lên các liên kết 1,4 và 1,6. Enzim này có trong một số vi sinh vật. Tác dụng của các enzym phân giải tinh bột phụ thuộc nhiều vào mức hydrat hóa cũng như cấu trúc của các hạt tinh bột.

Một ứng dụng quan trọng đặc biệt của amilaza là sản xuất các malto-dextrin và các "sirô glucoza". Các chất này được tạo nên do sự thủy phân ít nhiều tinh bột ngô hoặc khoai tây trong dung dịch. Lúc đầu sự thủy phân xảy ra nhờ tác dụng của axit clohidric ở nhiệt độ cao sau đó tiếp tục thủy phân nhờ enzym. Tùy thuộc vào mức độ thủy phân và bản chất của các enzym sử dụng mà sẽ thu được một hỗn hợp chứa glucoza, maltoza và các oligo - cũng như polysacarit theo những tỉ lệ khác nhau. Hỗn hợp thủy phân được đánh giá theo chỉ số đường khử tổng số.

Các "sirô glucoza" thông thường có chỉ số đường khử (tính theo glucoza) là 20 đến 65. Dung dịch "sirô glucoza" có độ nhớt tương đối thấp và thường được bảo quản ở pH 3,5 - 5,5 (thêm axetat, xitrat hoặc lactat). Người ta dùng dung dịch này để tạo độ ngọt, để ngăn cản sự kết tinh sacaroza và làm giảm nhiệt độ đông lạnh của các dung dịch (hỗn hợp kem lạnh). Ngoài ra dung dịch "sirô glucoza" có khả năng để lên men và có độ hút ẩm cao.

Để điều chế glucoza từ tinh bột người ta dùng enzym amiloglucosidaza để thủy phân và sẽ thu được chỉ số glucoza tới 98-99. Glucoza lại có thể đồng phân hóa thành fructoza nhờ tác dụng của glucoizomeraza vi sinh vật. Sản phẩm này có độ ngọt cao hơn hẳn so với đường sacaroza.

Khi đun sôi tinh bột với axit, tinh bột chuyển thành glucoza, nếu dùng axit tác dụng lên tinh bột ở điều kiện nhẹ nhàng thì sẽ tạo nên dạng "tinh bột tan". Dưới tác dụng của enzym amilaza có trong hạt nảy mầm, nước bọt, dịch tụy và vi sinh vật, tinh bột bị thủy phân tạo thành maltoza. Quá trình thủy phân tinh bột nhờ enzym tiến hành qua hàng loạt sản phẩm trung gian có phân tử lượng khác nhau gọi là các dextrin. Lúc đầu thu được các dextrin có phân tử lớn khác biệt ít với tinh bột về cấu tạo như tính chất tác dụng với iot, sau đó các dextrin thu được càng ngày càng có phân tử lượng thấp dần, tính chất tác dụng với iot thay đổi hẳn. Tùy theo tính chất của dextrin có thể chia chúng thành các loại như sau :

- amilodextrin, bột trắng cho màu tím với iot ;
- eritrodextrin cho màu đỏ nâu với iot ;
- acrodextrin không cho màu với iot ;

- maltodextrin không cho màu với iot.

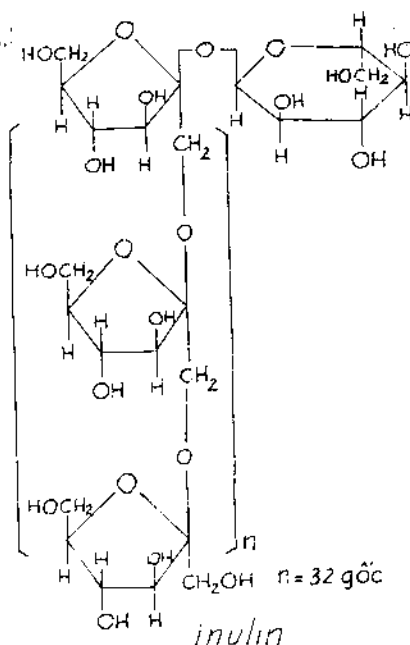
Tinh bột và các dẫn xuất của nó cũng có ứng dụng trong các ngành kỹ thuật như nghề dệt, giấy, sơn, kỹ thuật điện di, v.v. Tóm lại tinh bột có vai trò rất quan trọng trong nhiều ngành kinh tế. Vì vậy việc sản xuất tinh bột từ các nguồn nguyên liệu thực vật được đẩy mạnh ở nhiều nước trên thế giới. Tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu, phương pháp sản xuất tinh bột có ít nhiều khác nhau, song cơ sở chung gồm những giai đoạn chính như loại bỏ tạp chất, thu dung

dịch chứa tinh bột, làm lắng tinh bột và tinh chế tinh bột.

Tùy theo mục đích sử dụng, người ta điều chế các loại tinh bột có tính chất phù hợp với yêu cầu nhờ những quá trình xử lý nhiệt hoặc phối hợp cả các phương pháp lý học và hóa học.

b) Inulin

Inulin là loại polysacarit hòa tan được trong nước, khi thêm rượu vào dung dịch trong nước sẽ kết tủa được inulin. Inulin cấu tạo bởi *D* - fructoza nên còn được gọi là fructan. Nó có nhiều ở củ mấu đơn, rễ cải đắng và một số cây họ hòa thảo. Ở các thực vật này, inulin thay thế cho tinh bột. Phân tử lượng của inulin biến đổi từ 5000 - 6 000. Trong phân tử inulin, các gốc fructoza liên kết với nhau nhờ liên kết 2 → 1. Số gốc fructoza trong một phân tử inulin là 34. Phần tận cùng của phân tử là gốc disacarit sacaroza.

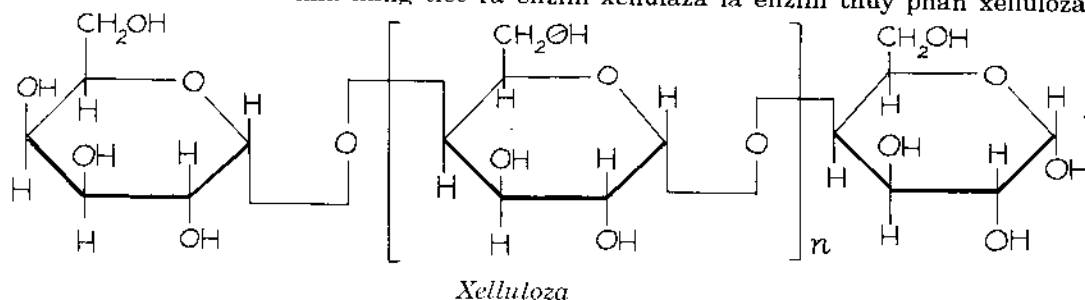


c) Xelluloza

Xelluloza là polysacarit chủ yếu của thành tế bào thực vật. Trong bông nó chiếm trên 90%, còn trong gỗ hơn 50%. Khi đun sôi với axit sulfuric đặc, xelluloza sẽ chuyển thành glucoza còn khi thủy phân trong điều kiện nhẹ nhàng sẽ tạo nên disacarit xellobioza. Các đơn vị cấu tạo xellobioza gắn với nhau nhờ liên kết glucosit. Phân tử xelluloza chứa từ 1 400 đến 10 000 gốc glucoza. Phân tử lượng của các xelluloza thu được từ các nguồn khác nhau xê dịch trong giới hạn khá rộng rãi (từ $5 \cdot 10^4$ tới $1 \cdot 10^6$ hoặc cao hơn nữa). Dùng phương pháp phân tích tia Röntgen, người ta đã chứng minh được rằng phân tử xelluloza có dạng sợi. Các dạng sợi của xelluloza lại gắn vào nhau nhờ các liên kết hydro tạo nên cấu trúc mixen của xelluloza. Trong phân tử xelluloza có nhiều nhóm hydroxyl tồn tại dưới dạng tự do, hydro của chúng dễ được thay thế bởi một số gốc hóa học ví dụ gốc metyl ($-\text{CH}_3$) hoặc gốc axetyl ($-\text{CH}_3\text{CO}$) hình thành nên các dẫn xuất ete hoặc este của xelluloza. Việc tạo nên các dẫn xuất đó cũng góp phần vào việc nghiên cứu cấu trúc của xelluloza, mặt khác người ta đã biết nhiều dẫn xuất của xelluloza có ý nghĩa rất quan trọng trong nhiều ngành công nghiệp, ví dụ, các dẫn xuất nitroxelluloza, axetyl xelluloza trong kỹ nghệ sợi nhân tạo, da nhân tạo, kỹ nghệ chất nổ, chất dẻo. Trong thời gian gần đây, các dẫn xuất của xelluloza như cacboximetyl xelluloza, dietylaminooetyl xelluloza được dùng rất hiệu quả trong các phương pháp sắc ký trao đổi ion để phân chia hỗn hợp protein. Trong cacboximetyl xelluloza một số nhóm hydroxyl của xelluloza được thay thế

bằng các gốc $-OCH_2COOH$, còn trong dẫn xuất diethylaminoethylxelluloza một số nhóm hydroxyl của xelluloza lại được thay thế bằng gốc $-O-CH_2CH_2N(C_2H_5)_2$.

Xelluloza không có ý nghĩa về mặt dinh dưỡng của người vì không tiêu hóa được ở ống tiêu hóa. Động vật nhai lại có thể tiêu hóa dễ dàng xelluloza, vì trong ruột của chúng có chứa các vi khuẩn có khả năng tiết ra enzym xellulaza là enzym thủy phân xelluloza.



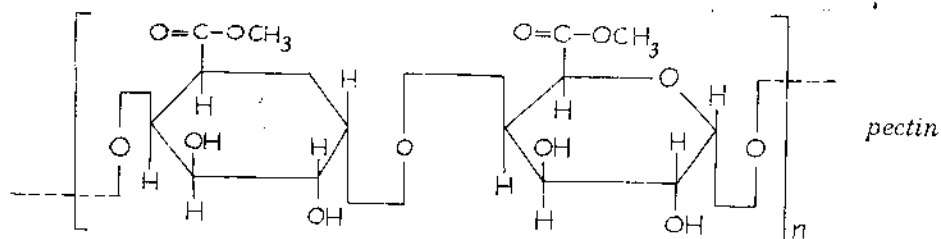
d) Hemixelluloza

Hemixelluloza là nhóm polysacarit có tính chất đặc biệt là không hòa tan được trong nước mà chỉ tan trong dung dịch kiềm. Hemixelluloza cũng là thành phần của thành tế bào thực vật và tồn tại chủ yếu ở các phần như vỏ hạt, bẹ ngô, cám, rơm rạ, trấu. Khi thủy phân hemixelluloza sẽ thu được các monosacarit thuộc nhóm hexoza như manôza, galactôza, nhóm pentoza như arabinoza, xiloza. Tùy theo trong thành phần của hemixelluloza có chứa monosacarit nào mà nó sẽ có những tên tương ứng như manan, galactan và pentozan (araban hoặc xilan). Các polysacarit như manan, galactan, araban và xilan đều là các chất phổ biến trong thực vật, chủ yếu ở các thành phần của màng tế bào của các cơ quan khác nhau như gỗ, rơm rạ, v.v.

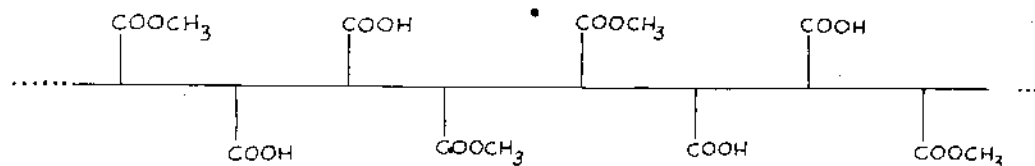
e) Pectin

Pectin là polysacarit có nhiều ở quả, củ hoặc thân cây. Trong thực vật, pectin tồn tại dưới hai dạng : dạng protopectin không tan, tồn tại chủ yếu ở thành tế bào có lẽ dưới dạng kết hợp với polysacarit araban, dạng hòa tan của pectin tồn tại chủ yếu ở dịch tế bào. Dưới tác dụng của axit, của enzym protopectinaza hoặc khi đun sôi, protopectin chuyển sang dạng pectin hòa tan. Đặc tính quan trọng của pectin là khi có mặt axit và đường, nó có khả năng tạo thành chất gel, vì vậy nó được ứng dụng phổ biến trong kỹ nghệ sản xuất mứt kẹo. Để tạo thành chất gel pectin có thể thêm đường sacarôza tới tỷ lệ 65 - 70% (bão hòa đường) và tạo môi trường có pH khoảng 3,1 - 3,5 nhờ các axit hữu cơ như axit xitric. Pectin lấy từ các nguồn khác nhau sẽ khác nhau về khả năng tạo gel và khác nhau ít nhiều về số các nhóm thế CH_3O- (metoxy) trong phân tử. Pectin hòa tan là polysacarit cấu tạo bởi các gốc axit galacturonic trong đó một số gốc axit có chứa nhóm thế metoxy.

Phân tử lượng của các loại pectin tách từ các nguồn quả khác nhau thay đổi trong giới hạn rộng rãi. Ví dụ từ nguồn táo, mận đã thu được pectin có phân tử lượng từ 25 000 - 35 000, trong khi đó pectin lấy từ cam lại có phân tử lượng đạt tới 50 000



Phân tử pectin có thể được trình bày theo sơ đồ sau :



Tên gọi pectin dùng để chỉ các chuỗi polygalacturonic metyl hóa 100%. Tên gọi axit pectinic để chỉ chất được metyl hóa thấp hơn 100%. Còn tên gọi axit pectic để chỉ axit polygalacturonic hoàn toàn không chứa nhóm metoxy. Trong thực tiễn thì tên pectin dùng để chỉ cả axit pectinic và pectin. Tỷ lệ metyl hóa được biểu hiện bằng chỉ số metoxy. Sự metyl hóa hoàn toàn tương ứng với chỉ số metoxy bằng 16,3% còn các pectin tách ra từ thực vật thường có chỉ số metoxy từ 10 đến 12%. Chiều dài của chuỗi axit polygalacturonic có thể biến đổi từ vài đơn vị tới hàng trăm đơn vị axit galacturonic. Theo một vài dẫn liệu cho thấy một số nhóm hydroxyl có thể bị axetyl hóa. Trong thực vật các pectin thường liên kết với xelluloza ở vách tế bào dưới dạng phức hợp chưa biết rõ.

Pectin hòa tan khi bị tác dụng của chất kiềm loãng hoặc enzym pectaza sẽ giải phóng nhóm metoxy dưới dạng rượu metylic và polysacarit còn lại khi đó được gọi là axit pectic tự do, nghĩa là axit polygalacturonic. Axit pectic có thể tạo nên dạng muối canxi pectat, chất này chuyển thành dạng kết tủa dễ dàng, do đó được dùng để định lượng các chất pectin. Dưới dạng axit pectic tự do, nó mất khả năng tạo gel khi có đường như trong trường hợp của pectin hòa tan ban đầu. Vì vậy, để duy trì khả năng tạo gel của pectin hòa tan cần chú ý tránh môi trường kiềm hoặc tác dụng thủy phân của enzym pectaza. Các chất pectin giữ vai trò quan trọng trong quá trình chín của quả. Khi quả đang phát triển, protopectin phân tán ở thành tế bào và chiếm tỷ lệ khá cao, tới lúc quả bắt đầu chín, protopectin biến dần sang dạng pectin hòa tan dưới tác dụng của các axit hữu cơ và enzym protopectinaza trong quả. Trong khi bảo quản quả cũng nhận thấy sự giảm dần lượng protopectin và tăng dần pectin hòa tan.

Tính chất tạo gel và ý nghĩa đối với kỹ thuật thực phẩm

Khả năng tạo gel của pectin phụ thuộc chủ yếu vào hai yếu tố : chiều dài của chuỗi pectin và mức độ metyl hóa.

Chiều dài của phân tử quyết định độ cứng của gel. Nếu phân tử pectin có chiều dài quá thấp thì nó sẽ không tạo được gel mặc dù sử dụng liều lượng cao.

Các pectin (và axit pectinic) đều là những keo háo nước nên có khả năng hydrat hóa 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 điện tích âm nên chúng có khả năng đẩy lẫn nhau do đó làm giãn mạch và làm tang độ nhớt của dung dịch. Khi làm giảm độ tích điện và hydrat hóa 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.

Tùy thuộc vào chỉ số metoxy cao ($> 7\%$) hoặc thấp ($3 - 5\%$) ở phân tử pectin mà các kiểu kết hợp giữa chúng sẽ khác nhau trong việc tạo gel. Khi pectin có chỉ số metoxy cao (mứt quả nghiền, nước quả đông, ...) mức độ hydrat hóa có thể giảm thấp nhờ thêm đường còn độ tích điện sẽ hạ đi nhờ thêm ion H^+ hoặc đôi khi chính nhờ độ axit của quả chế biến. Trong trường hợp này liên kết giữa các phân tử pectin với nhau chủ yếu nhờ các cầu hydro giữa các nhóm hydroxyl. Kiểu liên kết này không bền do đó các gel tạo thành sẽ mềm dẻo do tính di động của các phân tử trong khối gel, loại gel này khác biệt với gel thạch hoặc gelatin.

Khi chỉ số metoxy 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 ion hóa trị hai đặc biệt là Ca^{2+} . Có thể tạo gel khi dùng một lượng canxi dưới $0,1\%$ miễn là chiều dài phân tử pectin phải đạt mức độ nhất định. Khi đó gel được hình thành ngay cả khi không thêm đường và axit. Ý nghĩa thực tế của các pectin có chỉ số metoxy thấp là nó cho phép chế tạo được mứt quả đông, sữa đông mà không cần thêm đường hoặc tạo được thịt đông có độ cứng bền ngay cả ở khí hậu nhiệt đới (khác với đông gelatin). Gel pectin có chỉ số metoxy thấp thường có tính chất đàn hồi giống như gel agar-aga.

Sự chế tạo gel pectin - đường - axit

Để sản xuất loại gel này người ta dùng pectin có chỉ số metoxy cao lấy từ nguồn quả dùng làm mứt, nước đông quả và mứt quả nghiền. Ngoài yếu tố chiều dài của phân tử pectin trong nguyên liệu, cần phải xét tới nhiều yếu tố ảnh hưởng đến tính chất của gel được tạo thành. Khi dùng một nguyên liệu có chứa một loại pectin nhất định thì các yếu tố như lượng pectin, lượng đường và pH môi trường góp phần tạo nên một cân bằng mà thiếu thì gel sẽ không hình thành. Đối với các loại gel nghèo pectin, gel chỉ được tạo nên ở pH axit cao, và lượng đường cuối cùng phải khá lớn. Ngược lại, đối với quả có hàm lượng pectin cao thì giới hạn pH cũng như hàm lượng đường đưa vào có thể biến đổi trong một giới hạn rộng mà vẫn cho phép tạo được gel. Nói chung, không thể tạo gel nếu lượng đường đưa vào thấp hơn 50% và nếu pH cao hơn $4,5 - 5,0$. Còn về hàm lượng của pectin, người ta nhận thấy cần dùng khoảng $0,5\%$ loại pectin có khả năng tạo gel tương ứng với chỉ số $130^{(1)}$ để tạo được một độ cứng thỏa mãn ở nồng độ 65% của đường. Ngoài ra cần duy trì độ pH thấp để khi đun nấu sẽ gây ra quá trình nghịch đảo đường sacaroza ($30 - 50\%$ đường thêm vào pectin) để ngăn cản sự kết tinh của đường. Cũng không nên dùng quá nhiều axit, vì pH quá thấp sẽ gây ra sự nghịch đảo một lượng lớn sacaroza từ đó gây kết tinh glucoza và hóa gel nhanh tạo nên các vón cục. Thường dùng độ pH từ 3 tới 3,5. Khi dùng lượng pectin vượt quá lượng thích hợp sẽ thu được gel quá cứng, vì vậy đối với các loại quả chứa dư pectin người ta cần tiến hành phân giải bớt chúng bằng cách đun lâu hơn.

Ngoài ra cũng cần chú ý tới lượng đường cuối cùng tồn tại trong sản phẩm thu được. Đó là các glucoza và fructoza của chính quả cũng như được sinh ra từ sự

(1) Chỉ số dùng để biểu diễn khả năng tạo gel của pectin.

thủy phân một phần sacaroza thêm vào, cuối cùng là sacaroza. Trong hỗn hợp chế phẩm, không loại đường nào được phép vượt quá giới hạn hòa tan của chúng. Tuy nhiên cũng cần duy trì một lượng đường thích hợp phụ thuộc vào từng gel cụ thể. Hiện nay, việc nghiên cứu pectin đã đạt được nhiều tiến bộ nên người ta có xu hướng thay thế bột lượng quả nguyên liệu bằng bột pectin thương phẩm và tăng độ axit, nhờ thêm axit xitric hoặc axit tactric.

Điều chế pectin

Nguyên liệu quan trọng nhất được dùng để chế tạo pectin là vỏ cam quýt và bã táo. Các phụ phẩm này được sấy khô bảo quản để sử dụng suốt năm. Trong các loại quả họ cam quýt thì chanh và bưởi được ưa thích hơn cam. Lượng pectin ở vỏ cam quýt chiếm từ 20 - 50% trọng lượng khô, còn ở bã táo từ 10 - 20%. Trong thực tế người ta biểu thị khả năng tạo gel của các loại pectin bằng các chỉ số hay bậc tạo gel.

Với 1g bã táo khô, bậc tạo gel ứng với 25 - 35, còn với cùng lượng vỏ cam quýt khô thì bậc tạo gel đạt ít ra là 6 lần cao hơn bậc tạo gel của bã táo khô.

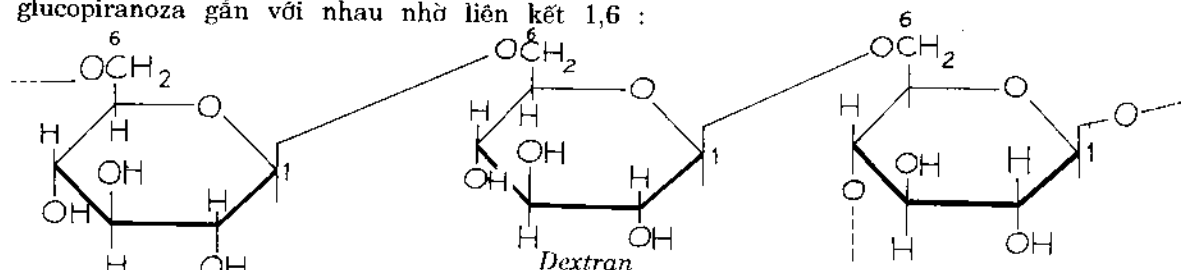
Vỏ cam quýt đã được trích ly tinh dầu được rửa sạch, cắt nhỏ rồi rửa nước ấm (50 - 60°C) để loại bỏ các glucosit còn sót lại. Sau đó đưa nhiệt độ lên tới 95 - 98°C để làm mất hoạt của enzym phân giải pectin. Nước dùng trong sản xuất pectin phải chứa ít khoáng, nhất là canxi và magie hay tốt hơn cả là vô khoáng. Cần đun nóng vừa phải và nhanh để không phân giải pectin. Sau đó là giai đoạn chiết rút pectin bằng cách đun nóng trong nước chứa axit (clohidric, sulfuric hoặc sulfuro). Thông thường người ta dùng lượng nước gấp ba lần lượng vỏ khô, pH 1,3 - 1,4, nhiệt độ 90 - 100°C và thời gian đun là khoảng 1 giờ. Hỗn hợp thu được sẽ được ép bằng máy ép thủy lực, sau đó dung dịch pectin được làm lạnh và lắng gạn. Một ít tạp chất như tinh bột và protein lẫn với pectin sẽ được loại bỏ nhờ các enzym phân giải protein. Việc xử lý này được thực hiện ở pH 4,5 (điều chỉnh bằng dung dịch natri cacbonat) và ở nhiệt độ 40 - 50°C. Khi đã loại bỏ hết tinh bột (kiểm tra bằng iot) điều chỉnh pH dung dịch tới 3 bằng cách thêm axit xitric rồi đưa nhiệt độ lên 80°C để làm mất hoạt tính của enzym. Dung dịch có thể được làm mất màu nhờ anhydrit sulfur, rồi cho lọc ép, thu dung dịch pectin trong suốt. Cô đặc dung dịch, rồi kết tủa pectin bằng etanol (hoặc izopropanol) hoặc bằng nhôm sulfat.

g) Aga - aga (thạch)

Aga - aga là polysacarit tập trung trong một số loại rong biển. Nó không tan trong nước lạnh. Khi đun nóng nó bị hòa tan, nếu để nguội sẽ đông lại thành một khối. Nó là một hỗn hợp của hai loại polysacarit : agarozơ và agaropectin. Agarozơ chứa các gốc D - và L-galactopiranoza gắn với nhau nhờ liên kết 1,3 - glucosit còn cấu trúc của agaropectin chưa biết đầy đủ. Có lẽ trong agaropectin, các gốc D - galactopiranoza là đơn vị cấu tạo trong đó một số gốc được gắn với gốc sulfat nhờ liên kết este. Aga - aga được dùng trong công nghiệp thực phẩm và làm môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.

IV.2.2.2. Polysacarit của vi sinh vật

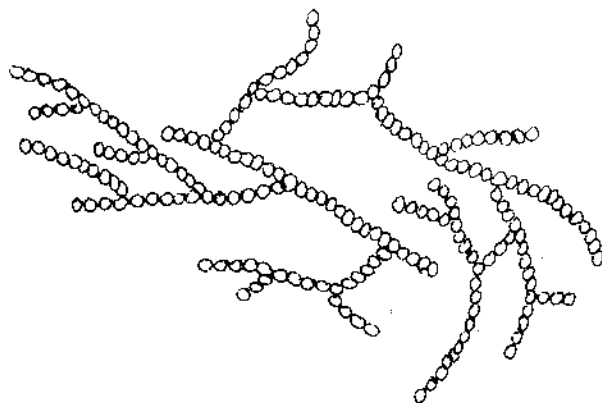
Dextran là loại polysacarit điển hình từ nguồn vi sinh vật. Nó là một loại polyglucozit được tổng hợp bởi một số vi khuẩn loài *Leuconostoc* khi nuôi cấy trên môi trường chứa đường sacaraza, cấu trúc của dextran bao gồm các gốc *D* - glucopiranoza gắn với nhau nhờ liên kết 1,6 :



Dextran hòa tan được trong nước. Phân tử lượng khoảng 10^6 . Ngoài các nhánh liên kết $1 \rightarrow 6$ còn có thể có cả các gốc liên kết bằng kiểu $1 \rightarrow 4$ hoặc $1 \rightarrow 3$. Tùy theo các chủng vi sinh vật tổng hợp dextran, có thể thu được các dextran có cấu trúc khác nhau. Dextran là nguyên liệu để tổng hợp các loại nhựa sephadex có ứng dụng rất tốt trong các phòng thí nghiệm để lọc phân tử. Ngoài ra một số sản phẩm thủy phân của dextran có phân tử lượng từ $7 \cdot 10^4 - 9 \cdot 10^4$ còn được dùng làm chất thay thế huyết thanh máu rất có hiệu quả.

IV.2.2.3. Polysacarit nguồn động vật

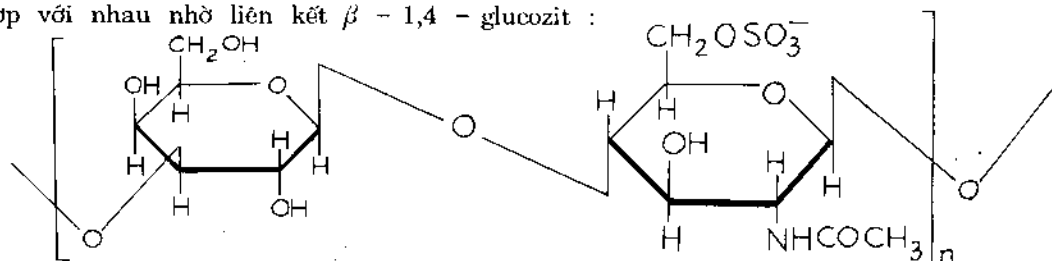
Glicogen là polysacarit dự trữ của cơ thể người và động vật. Vì vậy người ta coi nó là polysacarit đặc trưng của động vật hay "tinh bột động vật". Tuy nhiên người ta còn phát hiện glicogen ở các nguồn khác như nấm mốc, nấm men và ở một vài loại hạt ngô. Hàm lượng glicogen trong gan đạt tới 10% hoặc hơn nữa, còn ở cơ tới 2%. Nó phụ thuộc vào mức độ dinh dưỡng của động vật, khi cơ thể bị đói hoặc cơ ở trạng thái mệt mỏi, lượng glicogen giảm đi rất mạnh. Glicogen có vai trò quan trọng trong chuyển hóa glucit ở cơ thể động vật và ở nấm men khi lên men rượu. Glicogen hòa tan được trong nước nóng. Khi tác dụng với iot sẽ cho màu đỏ tím hoặc đỏ nâu giống màu của amilopectin với iot. Khi thủy phân bằng axit hoặc bằng enzim, glicogen chuyển thành α - *D* - glucoza. Phân tử lượng của glicogen xê dịch trong giới hạn khá lớn và có thể đạt tới $4 \cdot 10^6$ tương ứng với số gốc glucoza khoảng 24 000. Về cấu tạo của glicogen người ta đã chứng minh rằng nó gần giống với amilopectin của tinh bột, nhưng mức độ phân nhánh nhiều hơn của amilopectin. Trong phân tử glicogen cũng có các liên kết kiểu $1 \rightarrow 4$ và $1 \rightarrow 6$, kiểu thứ hai nhiều hơn so với ở phân tử amilopectin.



Hình 4.1. Sơ đồ cấu tạo của glicogen :
các vòng tròn là phân tử glucoga

Kitín là thành phần chủ yếu của mô biểu bì ở côn trùng và giáp xác. Về cấu tạo nó gần giống với xelluloza và cũng có chức năng tương tự. Kitín rất khó

tan trong nước. Đơn vị cấu tạo cơ bản của kitin là N-axetyl - β - D - glucosamin kết hợp với nhau nhờ liên kết β - 1,4 - glucosit :



Axit, kiềm loãng và các dung môi hữu cơ đều không có khả năng hòa tan được kitin. Khi đun kitin trong dung dịch đậm đặc của một số muối nó có thể bị hòa tan. Hợp chất tạo thành khi xử lý kitin bằng kiềm và đun nóng được gọi là kitozan. Trong hợp chất này, một số nhóm axetyl được giải phóng.

IV.3. KHẢ NĂNG CHUYỂN HÓA CỦA GLUXIT

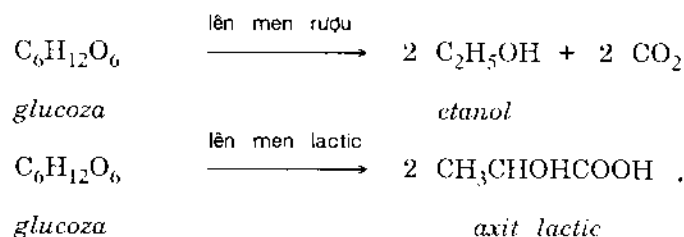
IV.3.1. Sự phân giải gluxit

IV.3.1.1. Sự chuyển hóa của các monosacarit

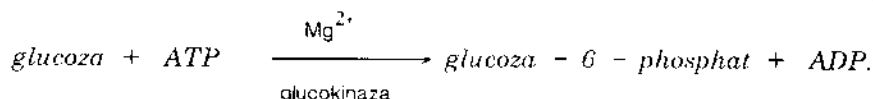
a) Sự đường phân

Trong điều kiện không có oxy của không khí, nghĩa là trong điều kiện yếm khí, và dưới tác dụng xúc tác của một phức hệ enzym của vi sinh vật, đặc biệt là nấm men, các monosacarit bị chuyển hóa thành rượu, axit lactic, glixerin, v.v. Quá trình này gọi là quá trình lên men.

Phản ứng tổng quát như sau :



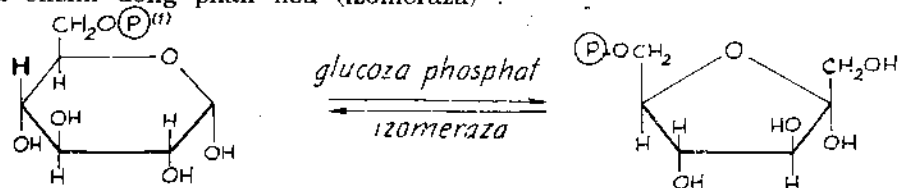
Thật ra, cơ chế phản ứng của sự lên men rất phức tạp, bao gồm một chuỗi phản ứng, bắt đầu bằng phản ứng phosphoryl hóa monosacarit. Các este phosphat được tạo thành có khả năng phản ứng mạnh hơn so với monosacarit, nên giai đoạn tạo este phosphat của monosacarit cũng chính là giai đoạn hoạt hóa chúng. Phản ứng phosphoryl hóa thực hiện được nhờ sự tham gia của enzym kinaza và chất cho gốc phosphat là ATP. Ion Mg^{2+} cũng tham gia như một yếu tố phụ của phản ứng :



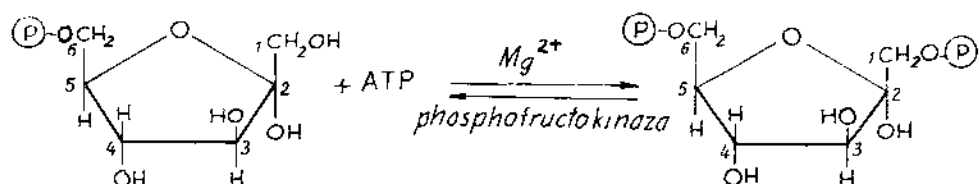
Tương tự như trên, từ fructoza sẽ cho fructoza-6-phosphat, từ riboza sẽ tạo nên riboza-5-phosphat v.v.

Tính chất quan trọng của các dẫn xuất trên là chúng có thể đồng phân hóa dễ dàng, ví dụ, từ glucoza-6-phosphat dễ dàng chuyển thành fructoza-6-phosphat dưới tác

dụng của enzym đồng phân hóa (izomeraza) :

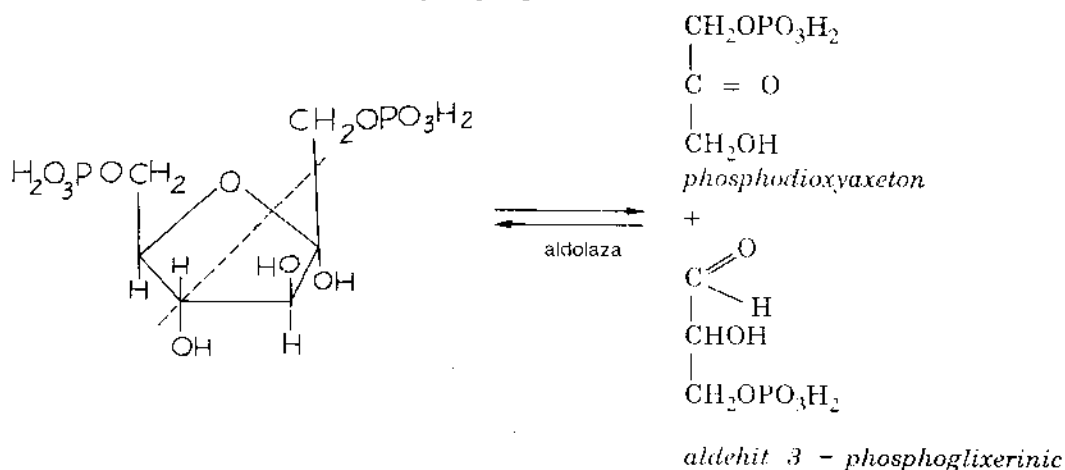


Fructoza - 6 - phosphat tiếp tục bị phosphoryl hóa ở C₁ tạo nên dẫn xuất fructoza - 1- 6 - diphosphat :

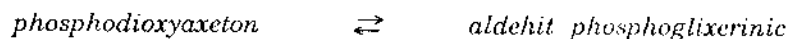


Phản ứng tạo fructoza-1-6-diphosphat là phản ứng cơ bản chuẩn bị cho giai đoạn phân giải monosacarit theo kiểu hiếu khí và yếm khí.

Phân tử fructoza-1,6-diphosphat do chứa hai gốc phosphat ở hai vị trí đối xứng nên có thể dễ dàng bị cắt đứt thành hai phân tử phosphotrioza. Ở giai đoạn này xảy ra sự cắt đứt mạch cacbon của đường hexoza và tạo nên hai chất là phosphodioxyaxeton và aldehyt 3 - phosphoglixerinic.



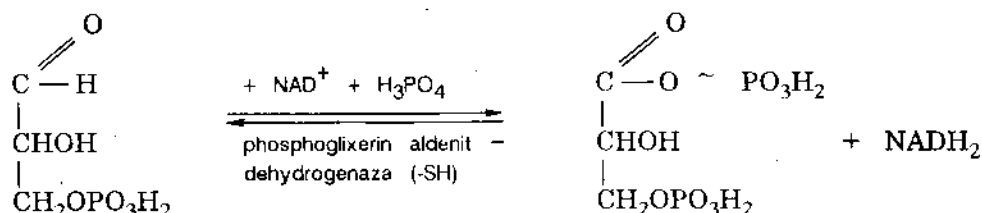
Hai chất phosphotrioza hình thành ở trên dưới tác dụng của triozophosphatizomeraza lại có thể chuyển từ chất nọ sang chất kia :



Sau giai đoạn cắt đôi mạch cacbon, tiếp đó là quá trình oxy hóa-khử. Khi đó chỉ aldehyt phosphoglixerinic tham gia vào sự chuyển hóa. Cần chú ý rằng phản ứng trên là thuận nghịch và khi ở trạng thái cân bằng phosphodioxyaxeton chiếm ưu thế nhưng đồng thời với sự chuyển hóa tiếp của aldehyt phosphoglixerinic, phosphodioxyaxeton lại biến thành aldehyt phosphoglixerinic, nên quá trình biến đổi này xảy ra hầu như hoàn toàn. Vì thế có thể coi như từ một phân tử fructozo - 1,6 - diphosphat sẽ cho hai phân tử aldehyt phosphoglixerinic.

(1) (P) là ký hiệu chỉ nhóm $-PO_3H_2$.

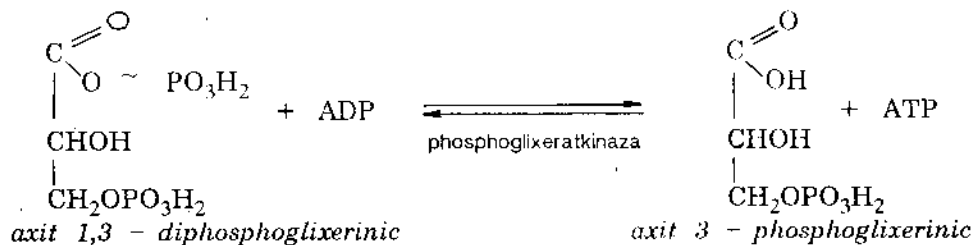
Giai đoạn oxy hóa-khử aldehyt phosphoglycerinic bao gồm một số phản ứng trung gian dẫn tới một sản phẩm quan trọng chung cho quá trình đường phân ở các đối tượng sinh vật khác nhau, đó là chất axit piruvic. Phản ứng bắt đầu xảy ra như sau :



aldehyt - 3 - phosphoglycerinic

axit 1,3 - diphosphoglycerinic

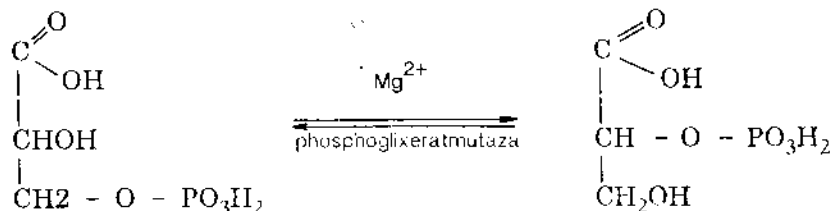
Enzim xúc tác cho phản ứng trên đã được tách ra ở dạng tinh thể từ nấm men và từ cơ. Phân tử phosphoglycerinaldehyt dehydrogenaza bao gồm bốn mảnh tiểu đơn vị, mỗi mảnh chứa một phân tử NAD và bốn nhóm - SH tự do (của các gốc xistein). Khi tạo phức hợp giữa cơ chất và enzim xảy ra sự gắn aldehyt - 3 - phosphoglycerinic vào một trong bốn nhóm - SH tự do của enzim, sau đó NAD tham gia loại hydro của phức hợp và một liên kết cao năng sẽ xuất hiện trong phức hợp. Liên kết cao năng này bị phân ly tức khắc khi có mặt axit phosphoric và tạo nên axit 1, 3 - diphosphoglycerinic chứa một liên kết cao năng. Từ chất này lại xảy ra sự chuyển gốc phosphat cao năng sang phân tử ADP dưới tác dụng của phosphoglyceratkinaza:



axit 1,3 - diphosphoglycerinic

axit 3 - phosphoglycerinic

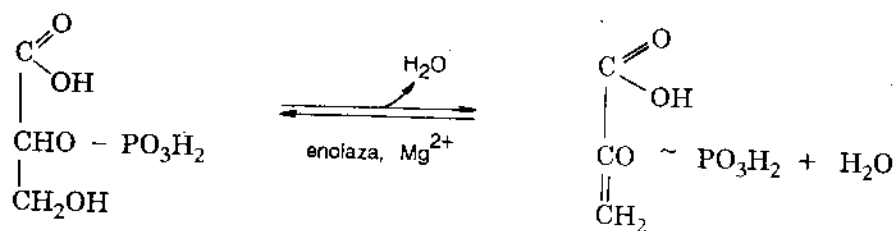
Nhờ phản ứng này, năng lượng giải phóng trong khi oxy hoá được tích lũy lại trong phân tử ATP. Ở giai đoạn tiếp theo xảy ra sự chuyển axit 3-phosphoglycerinic thành axit 2-phosphoglycerinic nhờ phosphoglyceratmutaza:



axit 3 - phosphoglycerinic

axit 2 - phosphoglycerinic

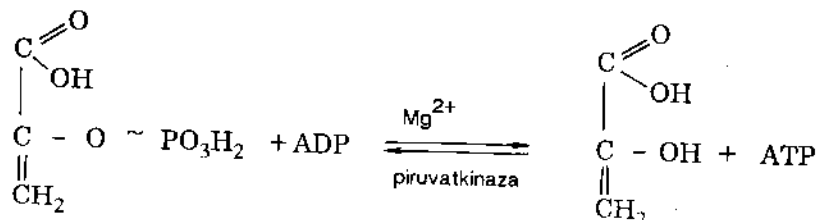
Axit 2-phosphoglycerinic bị loại đi một phân tử nước nhờ tác dụng của enzim enolaza và chuyển thành axit phosphoenolpiruvic. Enolaza được hoạt hóa nhờ các ion Mg^{2+} , Mn^{2+} , ... Quá trình loại nước, kèm theo sự phân phối lại nội năng và làm xuất hiện một liên kết cao năng trong phân tử axit enolpiruvic :



axit 2 - phosphoglycerinic

axit phosphoenolpiruvic

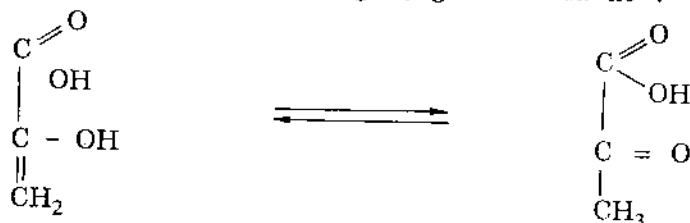
Ở giai đoạn tiếp theo, axit phosphoenolpiruvic loại gốc phosphat sang phân tử ADP và tạo thành axit enolpiruvic và phân tử ATP



axit phosphoenolpiruvic

axit enolpiruvic

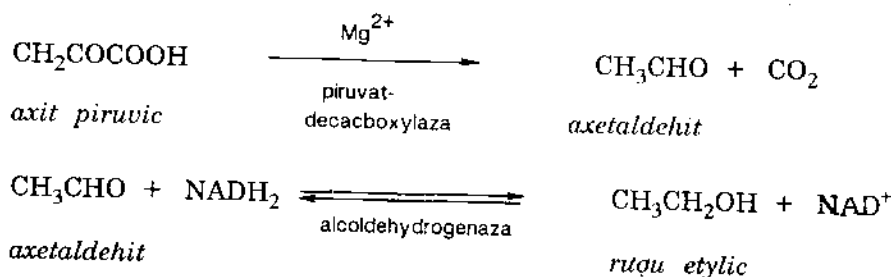
Axit enolpiruvic có thể chuyển sang dạng xeton của nó :



axit enolpiruvic

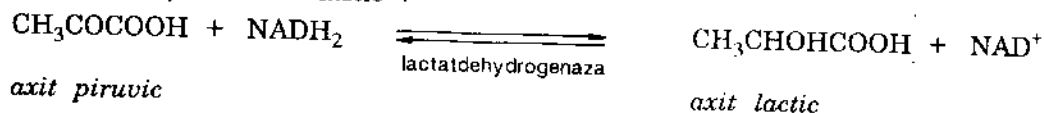
axit piruvic

Axit piruvic trong điều kiện yếm khí dưới tác dụng của enzym piruvat decarboxylaza (enzim có chứa B₁) và alcoldehydrogenaza của nấm men sẽ chuyển thành rượu etylic :



Hằng số cân bằng của phản ứng sau bằng 1.10^{-11} mol/l (25°C), có nghĩa là cân bằng chuyển dịch về phía tạo ra rượu etylic. Glucoza, fructoza là những monosacarit dễ lên men hơn cả, sau đó tới manôza và galactôza. Các pentoza không bị lên men một cách thông thường mà chỉ lên men được nhờ một vài loài nấm mốc *Fusarium*.

Axit piruvic trong điều kiện yếm khí dưới tác dụng của enzym lactatdehydrogenaza của vi khuẩn sẽ tạo ra axit lactic :



Phản ứng tạo nên axit lactic từ axit piruvic cũng xảy ra trong mô động vật trong điều kiện yếm khí. Chỉ khác là axit lactic được tạo ra trong mô động vật thường là dạng *L* - lactic.

Chặng đường từ glucoza (monosacarit) tới axit piruvic gọi là sự đường phân (glicoliza) do Embden - Meyerhof tìm ra nên cũng mang cái tên là sơ đồ Embden - Meyerhof.

b) Sự oxy hóa axit piruvic (chu trình Krebs)

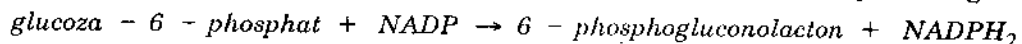
Ở điều kiện hiếu khí, axit piruvic được tạo thành ở giai đoạn đường phân sẽ bị oxy hóa đến CO_2 , H_2O và giải phóng ra toàn bộ số năng lượng còn lại của phân tử glucoza. Nhưng để đạt đến mục tiêu đó, axit piruvic phải qua một chu trình phản ứng gọi là chu trình tricarboxylic (chu trình xitric hay là chu trình Krebs). Chu trình này bao gồm một chuỗi phản ứng hóa học với năm bước oxy hóa khác nhau. Vì vậy năng lượng giải phóng ra một cách từ từ. Các phản ứng và sơ đồ chuyển hóa của chu trình Krebs được trình bày kỹ ở chương III.

Tính tổng cộng số ATP được tạo thành khi oxy hóa hiếu khí hai phân tử axit piruvic là 30 mol. Nếu tính cả số ATP tạo nên ở giai đoạn đường phân thì sự oxy hóa toàn bộ một phân tử glucoza sẽ tạo được 38 mol ATP.

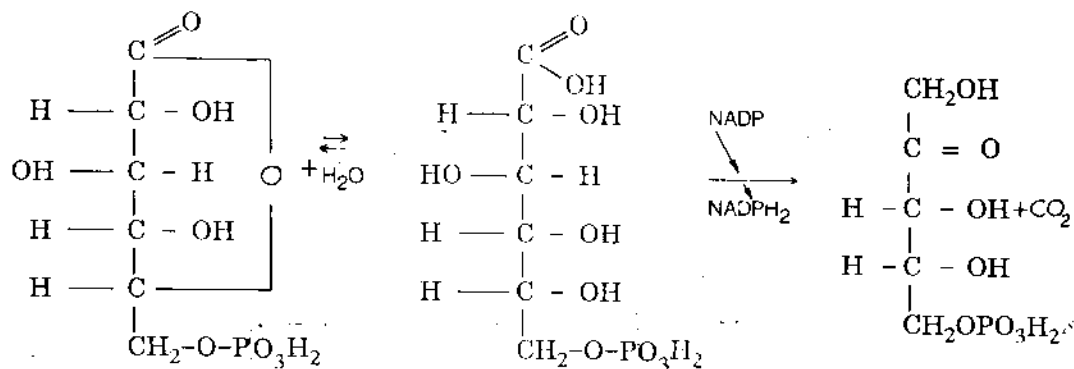
Như vậy con đường để các cơ thể sinh vật sử dụng được glucit làm chất cung cấp năng lượng là phải qua các giai đoạn đường phân và giai đoạn chu trình Krebs. Nói khác đi, đó là hai chặng đường của một quá trình oxy hóa-khử sinh học.

c) Sự oxy hóa trực tiếp glucoza (chu trình pentozaphosphat)

Ở cơ thể sinh vật còn tồn tại một kiểu chuyển hóa glucoza tới CO_2 và H_2O không qua quá trình đường phân và chu trình Krebs. Người ta gọi con đường này là kiểu phân giải hexozamonophosphat và chu trình qua đó xảy ra sự chuyển hóa gọi là chu trình pentozaphosphat. Phản ứng bắt đầu từ giai đoạn tạo nên glucoza-6-phosphat. Chất này bị oxy hóa thành 6 - phosphogluconolacton nhờ phản ứng sau :



Enzim xúc tác cho phản ứng trên là glucoza-6-phosphat dehydrogenaza. Sản phẩm tạo thành bị thủy phân nhờ gluconolactonaza và chuyển thành axit phosphogluconic, chất này lại bị oxy hóa decarboxyl hóa tạo nên ribuloza - 5 - phosphat nhờ enzim phosphogluconatdehydrogenaza và NADP.

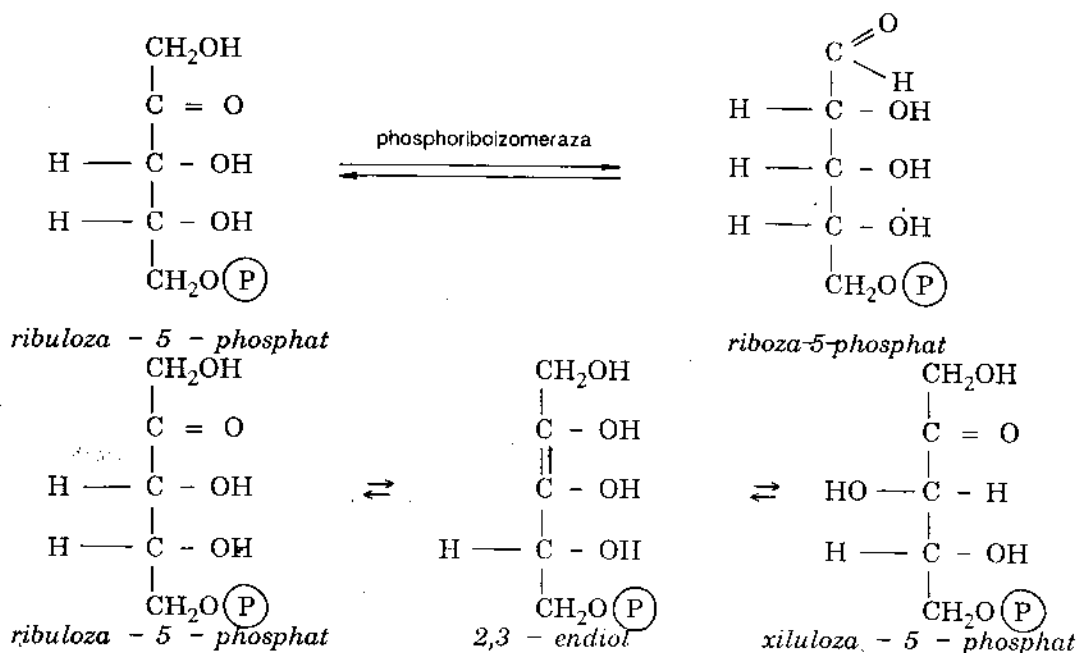


6 - phosphogluconolacton

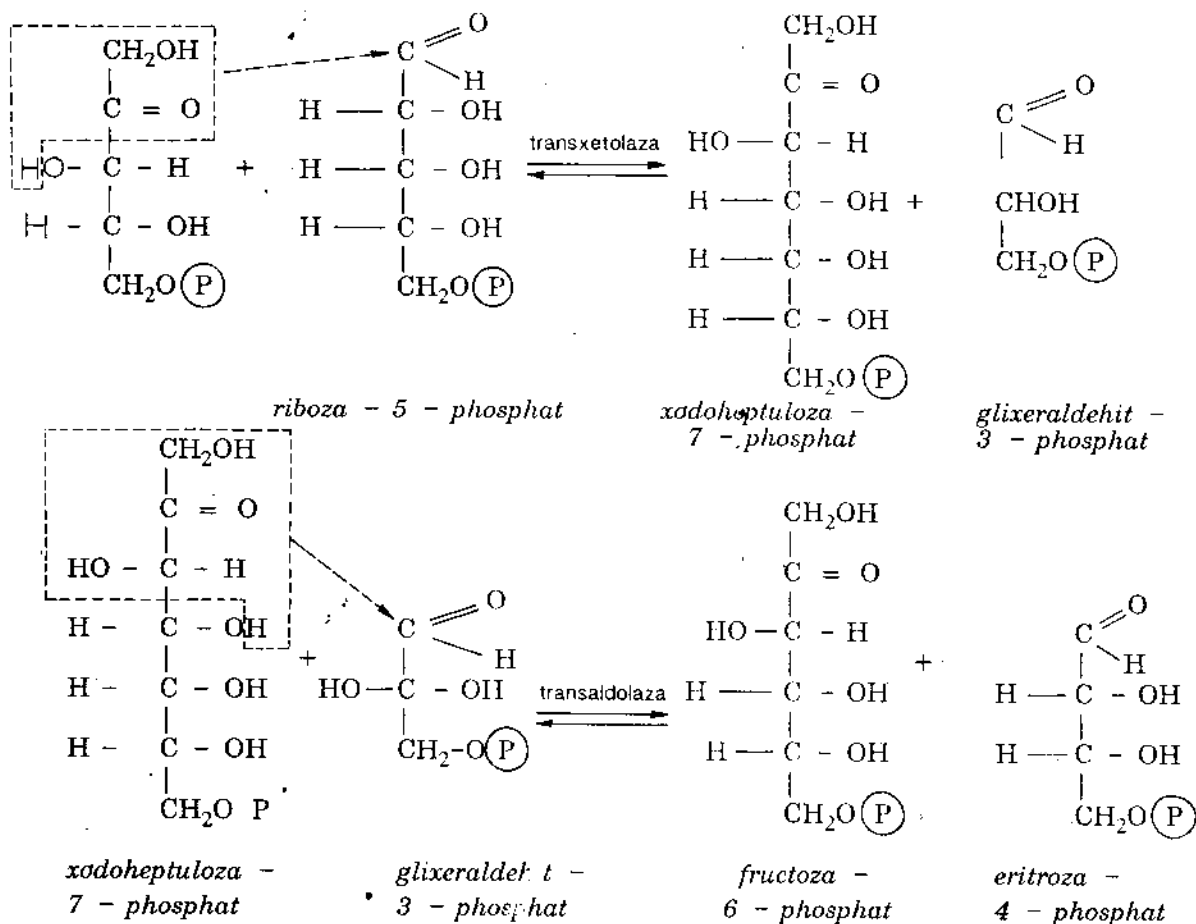
axit phosphogluconic

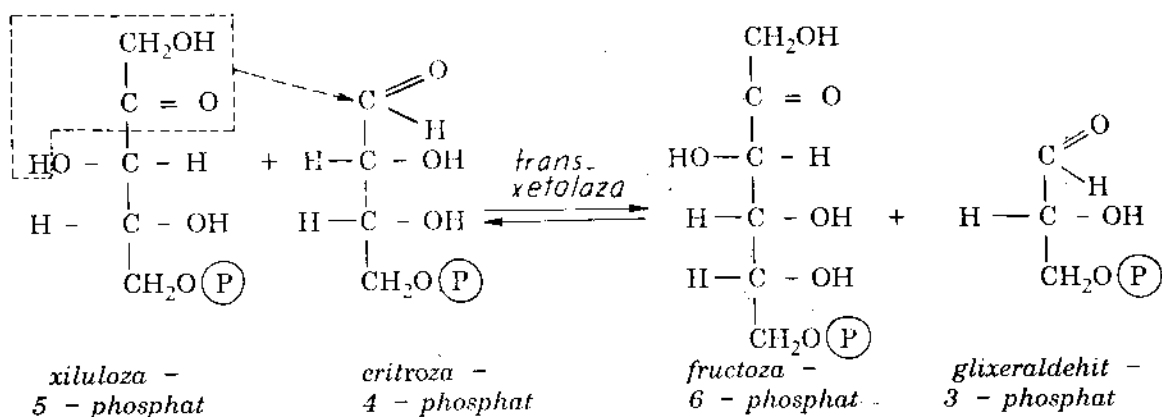
ribuloza - 5
phosphat

Tiếp theo đó là quá trình đồng phân hóa các phân tử ribuloza - 5 - phosphat thành riboza - 5 - phosphat và xiluloza - 5 - phosphat dưới tác dụng của các enzim phosphoriboizomeraza và ribuloza - 5 - phosphat epimeraza tương ứng :

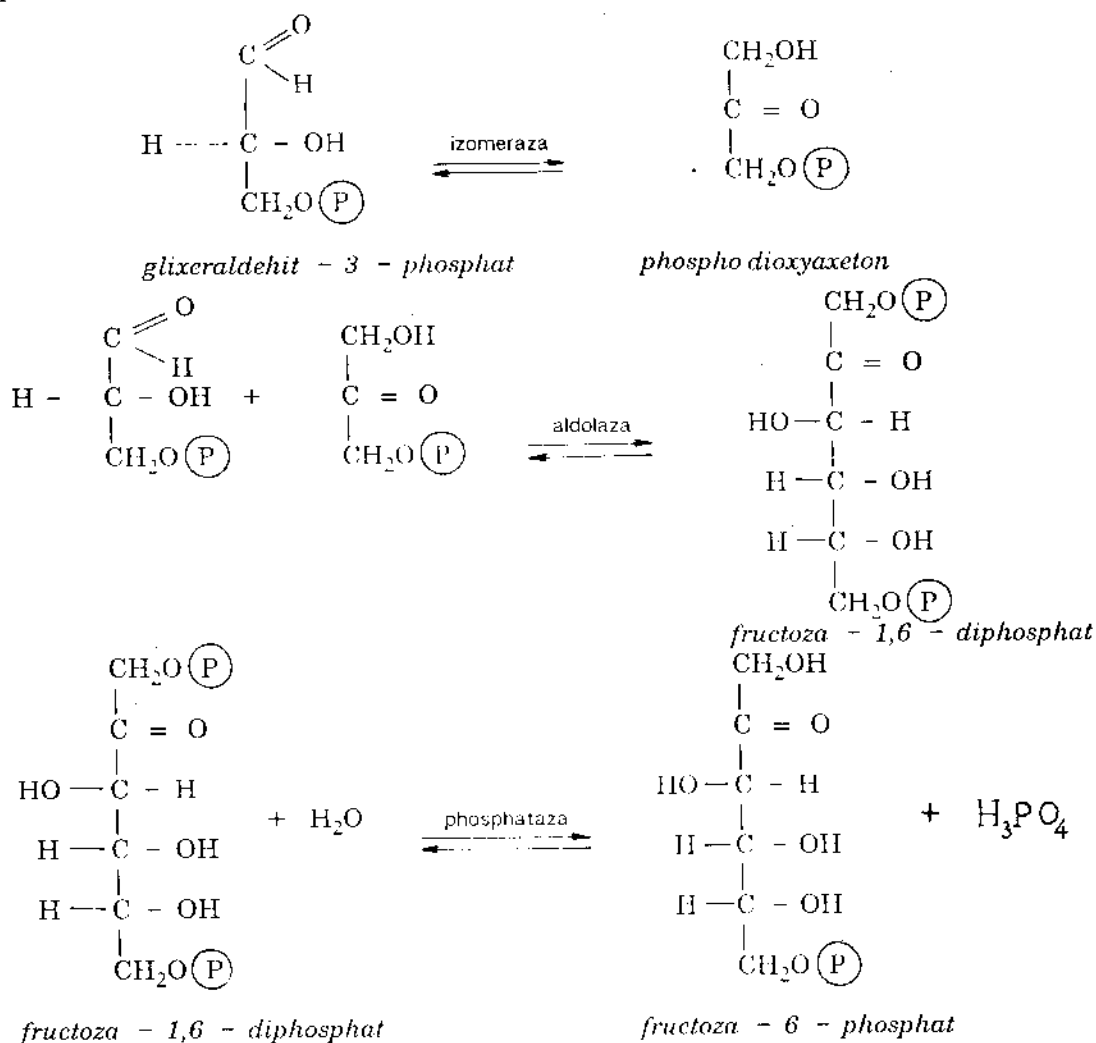


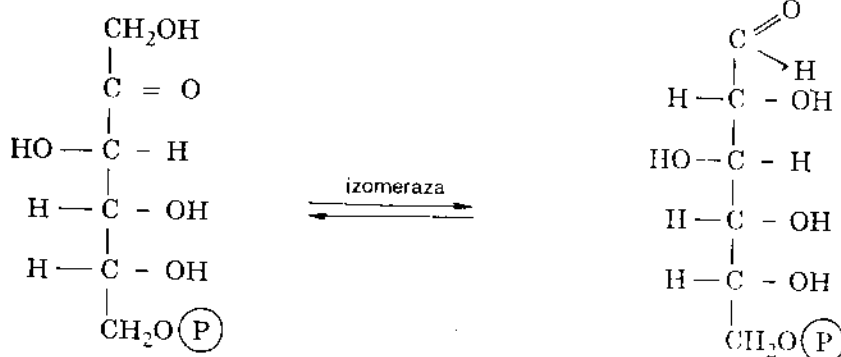
Sau đó dưới tác dụng của các enzym transxetolaza và transaldolaza các xetoza (xiluloza - 5 - phosphat) và aldoza sẽ tương tác với nhau :





Glixelaldehyt-3-phosphat dưới tác dụng của enzym izomeraza sẽ chuyển thành phosphodioxyaxeton. Hai chất này lại tương tác với nhau để tạo thành fructoza-1,6-diphosphat dưới tác dụng của enzym aldolaza. Fructoza-1,6-diphosphat dưới tác dụng của enzym phosphataza sẽ mất đi một gốc axit phosphoric để tạo ra fructoza-6-phosphat. Dưới tác dụng của enzym izomeraza fructoza-6-phosphat lại chuyển thành glucoza-6-phosphat và chu trình lại bắt đầu :

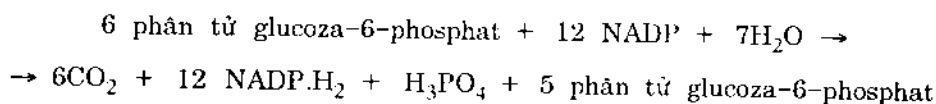




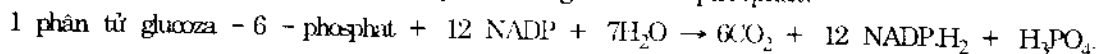
fructoza - 6 - phosphat

glucoza - 6 - phosphat

Cuối cùng có thể thấy rằng từ 6 phân tử ribuloza-5-phosphat sẽ thu được năm phân tử glucoza-6-phosphat, như vậy chỉ một phân tử glucoza-6-phosphat trên 6 phân tử glucoza-6-phosphat xuất phát từ đầu chu trình bị phân giải hoàn toàn. Có thể tóm tắt trên sơ đồ chung sau :



Qua cả hai chu trình pentozaphosphat không có phản ứng nào dẫn tới tổng hợp trực tiếp ra các phân tử ATP mà chỉ tạo được ATP nhờ sự chuyển hóa tiếp tục của các NADP.H₂ qua chuỗi oxy hóa-khử. Như vậy sự oxy hóa glucoza theo chu trình pentozaphosphat sẽ tạo nên toàn bộ 36 phân tử ATP. Điều đó thể hiện trong sơ đồ rút gọn sau (loại đi ở mỗi vẽ nam phân tử glucoza-6-phosphat).

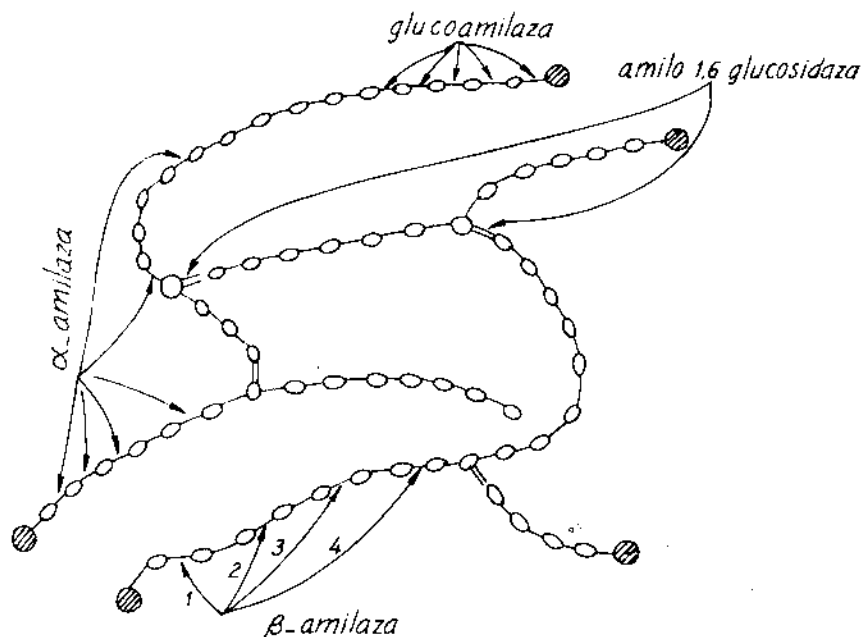


Do sử dụng một phân tử ATP để phosphoryl hóa glucoza ở giai đoạn đầu nên số ATP tạo thành là 35.

Tóm lại trong cơ thể sinh vật, sự phân giải đường có thể tiến hành theo nhiều kiểu khác nhau. Các kiểu này bổ sung cho nhau có thể xảy ra song song cùng nhau hoặc một vài kiểu chiếm ưu thế ở những điều kiện nhất định. Điều đó cũng nói lên sự phong phú của các quá trình thích nghi của sinh vật đối với môi trường sống, vì quá trình phân giải đường cung cấp năng lượng chủ yếu cho mọi hoạt động sinh sống của cơ thể. Ý nghĩa quan trọng nữa của chu trình pentozaphosphat là nó cung cấp các pentozaphosphat cần thiết cho các quá trình tổng hợp các nucleotit đồng thời các phân tử NADPH₂ tạo thành giữ vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp axit béo, các steroid và nhiều chất khác của cơ thể.

IV.3.1.2. Phân giải polysacarit và disacarit

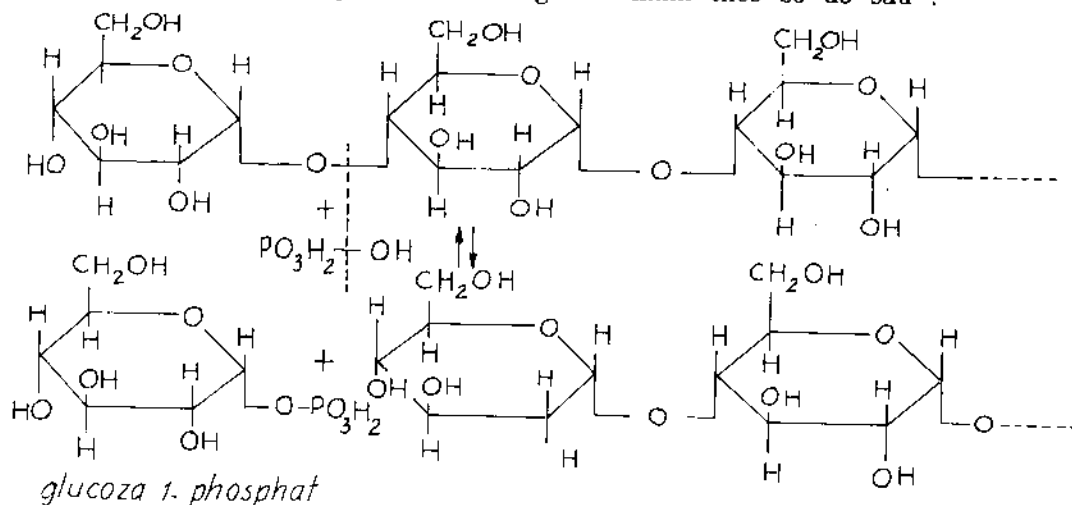
Sự phân giải polysacarit và disacarit thực hiện theo hai kiểu : *thủy phân và phosphoroliza*. Ví dụ, tinh bột bị thủy phân nhờ tác dụng xúc tác của các dạng amilaza khác nhau như α - amilaza, β - amilaza và glucoamilaza (γ - amilaza). Tùy thuộc vào tính chất của enzym, sự thủy phân có thể xảy ra ở các vị trí khác nhau của phân tử tinh bột và tạo nên các sản phẩm khác nhau như glucoza, maltoza hoặc các sản phẩm trung gian dextrin. Tác dụng của các dạng amilaza như trong hình 4.2.



Hình 4.2. Sơ đồ tác dụng của các dạng amilaza :

○ - đầu không khử của phân tử : ○ - đầu khử (chứa OH glucosit) ;
 — - liên kết 1,4 : == - liên kết 1,6

Cũng như đối với tinh bột và glicogen, các loại polysacarit khác của cơ thể bị thủy phân nhờ tác dụng xúc tác của nhiều loại enzym khác nhau, ví dụ xellulaza thủy phân xelluloza, inulaza thủy phân inulin, v.v. Tác dụng của các enzym thủy phân polysacarit có thể dẫn tới tạo thành các disacarit hoặc monosacarit. Khi ở dạng disacarit, chúng lại được phân giải thành monosacarit nhờ enzym tương ứng. Ví dụ, maltoza hình thành khi thủy phân tinh bột sẽ chuyển thành hai phân tử glucoza khi có tác dụng của maltaza là một loại α -glucosidaza. Ngoài kiểu phân giải theo con đường thủy phân nói trên còn có một kiểu thứ hai quan trọng, đó là con đường phosphoroliza. Có thể nói rằng trong kiểu phân giải loại này, axit phosphoric sẽ thay thế vai trò của nước ở quá trình thủy phân. Chính vì vậy nó được gọi là phosphoroliza hay quá trình lân phân. Phản ứng tiến hành theo sơ đồ sau :



Phosphorilaza chỉ tác dụng vào liên kết 1,4 của phân tử tinh bột và sẽ dừng lại khi tới liên kết 1,6. Tác dụng của nó chỉ tiếp tục được sau khi liên kết 1,6 đã

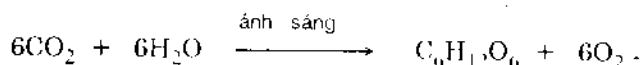
được giải phóng nhờ enzym amilo - 1,6 - glucosidaza. Có thể coi phosphorilaza là enzym glucozyltranspheraza, vì nó xúc tác cho sự chuyển gốc glucoza tới gốc axit phosphoric. Quá trình phản ứng cứ tiếp diễn lần lượt và tạo nên hàng loạt phân tử glucoza - 1 - phosphat.

Sự phân giải glicogen cũng tiến hành tương tự và cũng tạo nên glucoza - 1 - phosphat. Các disacarit cũng có thể bị tác dụng của enzym phosphorilaza tương ứng và tạo nên một dẫn xuất phosphat của monosacarit đồng thời giải phóng một monosacarit thứ hai. Ví dụ enzym maltozaphosphorilaza xúc tác cho quá trình phân giải maltoza thành glucoza - 1 - phosphat và glucoza nhờ sự tham gia của H_3PO_4 . Phản ứng phosphoroliza nói trên là thuận nghịch nên có thể xúc tác cho sự phân giải các polysacarit và oligosacarit cũng như sự tái tổng hợp chúng. Phosphorilaza tồn tại ở dạng hoạt động gọi là phosphorilaza A và ở dạng không hoạt động gọi là phosphorilaza B. Quá trình chuyển hóa giữa hai dạng trên lại do một số enzym đặc hiệu xúc tác và do hiệu lệnh của một số hormon. Đó chính là một cách để điều hòa hoạt tính của phosphorilaza ở cơ thể.

IV.3.2. Sự tổng hợp gluxit ở cơ thể sinh vật

IV.3.2.1. Tổng hợp các gluxit đơn giản (quang hợp)

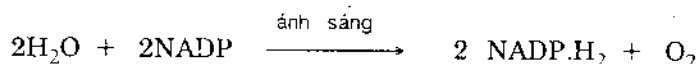
Các gluxit đơn giản được tổng hợp dễ dàng bởi các cơ thể tự dưỡng như cây xanh và các vi khuẩn có khả năng quang hợp hoặc tổng hợp được gluxit nhờ năng lượng thải ra từ sự oxy hóa các hợp chất vô cơ. Gluxit đơn giản là chất hữu cơ xuất hiện trong quá trình sinh tổng hợp đầu tiên của các chất hữu cơ trên trái đất. Quá trình tổng hợp gluxit ở cây xanh chính là nguồn chủ yếu để tạo nên các chất hữu cơ. Cây xanh hấp thụ CO_2 của khí quyển sau đó khử hợp chất này và tổng hợp thành gluxit nhờ năng lượng của ánh sáng mặt trời. Quá trình đó được gọi là quang hợp. Có thể biểu diễn quá trình đó bằng phản ứng tổng quát như sau :



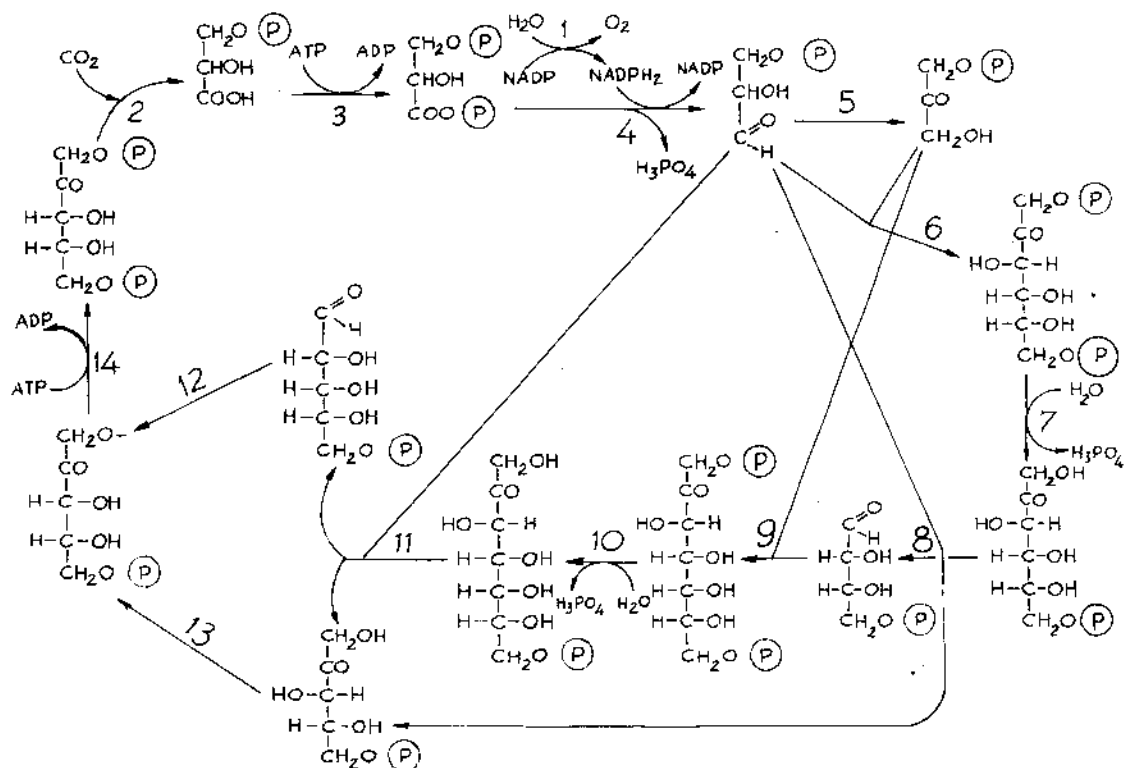
Quá trình quang hợp ở cây xanh bao gồm ba giai đoạn sau : giai đoạn một xảy ra quá trình quang phân ly nước kèm theo sự giải phóng oxy phân tử. Trong giai đoạn này có sự tham gia của clorophyl. Giai đoạn hai tiến hành một chuỗi phản ứng oxy hóa-khử nhờ sự tham gia của clorophyl cũng như nhiều loại chất vận chuyển electron khác nhau như các xitocrom dẫn tới sự chuyển hydro của nước vào NADP và tạo nên ATP. Quá trình này được thực hiện nhờ năng lượng của ánh sáng. Giai đoạn ba, hydro và ATP được dùng để khử CO_2 tạo nên gluxit. Chỉ hai giai đoạn đầu cần tới năng lượng của ánh sáng được hấp thụ bởi clorophyl. Giai đoạn ba tiến hành không có sự tham gia của ánh sáng (gọi là phản ứng tối).

Vai trò của clorophyl trong quang hợp thể hiện ở chỗ nhờ hấp thụ năng lượng ánh sáng, nó tham gia xúc tác cho chuỗi phản ứng oxy hóa-khử quang hóa học của quá trình. Sự khử CO_2 trong quang hợp để tạo nên gluxit bao gồm hàng loạt phản ứng trung gian phức tạp. Calvin và các cộng tác viên của ông đã nghiên cứu quá trình khử CO_2 và đưa ra sơ đồ của chu quang hợp gọi là chu trình Calvin như hình 4.3.

Qua chu trình trong hình 4.3 có thể thấy rằng phản ứng thứ nhất của quá trình quang hợp là sự quang phân ly nước. Có thể tóm tắt phản ứng này như sau :



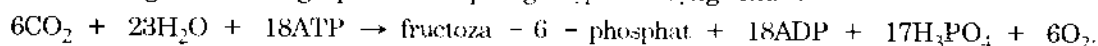
Cơ chế của phản ứng quang phân ly H_2O và chuyển hydro tới NADP còn nhiều điểm chưa được biết đầy đủ. Người ta cho rằng ở giai đoạn này có sự tham gia của chlorophyl và nhiều hệ enzym oxy hóa-khử khác nhau. NADP.H₂ được tạo thành sẽ được dùng để khử các hợp chất khác nhau của chu trình (phản ứng 1). Phản ứng thứ hai là sự kết hợp CO_2 vào phân tử đường chứa 5C là ribuloza - 1,5 - diphosphat để tạo nên hai phân tử axit 3 - phosphoglixerinic (chứa 3C) nhờ enzym diphosphoribulozocacboxylaza (phản ứng 2). Ở giai đoạn thứ ba xảy ra sự phosphoryl hóa axit 3 - phosphoglixerinic nhờ ATP và enzym phosphoglixeratkinaza. Sản phẩm được tạo thành là axit 1,3 - diphosphoglixerinic (phản ứng 3). Chất này bị khử dưới tác dụng của triozaphosphatdehydrogenaza và NADP.H₂ và chuyển thành aldehyt 3 - phosphoglixerinic (phản ứng 4). Aldehyt - 3 - phosphoglixerinic lại có thể bị đồng phân hóa thành phosphodioxyaxeton (phản ứng 5) ở giai đoạn tiếp theo, sau đó xảy ra sự kết hợp giữa chúng tạo nên hợp chất chứa sáu cacbon là fructoza-1,6-diphosphat (phản ứng 6). Từ fructoza -1,6-diphosphat có thể xảy ra sự loại bỏ đi một gốc phosphat để hình thành fructoza-6-phosphat (phản ứng 7). Fructoza-6-phosphat là nguyên liệu từ đó sẽ tạo nên các dạng hexoza khác như glucoza-6-phosphat, từ các dạng đường này tạo nên oligosacarit và polysacarit khác nhau ở cơ thể thực vật như đường sacaroza, tinh bột, v.v.



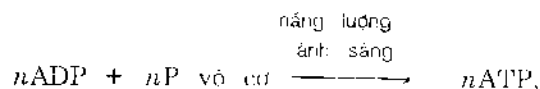
Hình 4.3. Chu trình Calvin. (chu trình quang hợp) (P) = PO₃H₂

Đồng thời trong chu trình Calvin fructoza-6-phosphat lại tác dụng với aldehyt 3-phosphoglixerinic tạo nên hai hợp chất chứa năm cacbon và bốn cacbon là xiluloza-

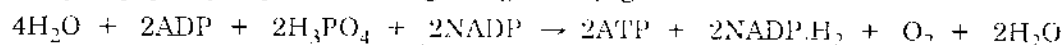
5-phosphat và eritroza- 4-phosphat (phản ứng 8). Sau đó là giai đoạn hình thành hợp chất bảy cacbon là xedoheptuloza -1,7-diphosphat nhờ sự kết hợp giữa eritroza-4-phosphat và phosphodioxyaxeton (phản ứng 9). Phản ứng 10 là sự tách bỏ một phân tử axit phosphoric khỏi xedoheptuloza-1,7-diphosphat để tạo nên xedoheptuloza-7-phosphat. Tiếp theo đó là phản ứng tạo thành hai phân tử đường pentoza nhờ tương tác giữa xedoheptuloza-7-phosphat và aldehyt 3-phosphoglixerinic (phản ứng 11). Các phân tử pentoza được tạo thành (xiluloza-5-phosphat, riboza-5-phosphat) nhờ các phản ứng đồng phân hóa (phản ứng 12) hoặc epime hóa (phản ứng 13) lại chuyển thành các đường chứa năm cacbon ribuloza-5-phosphat. Cuối cùng ở giai đoạn (phản ứng 14) ribuloza-5-phosphat gắn thêm một gốc phosphat thứ hai nhờ tác dụng của enzym phosphoribulozokinaza và chất cho phosphat ATP sẽ chuyển thành ribuloza-1,5-diphosphat là chất giữ vai trò gắn CO₂ trong quang hợp và như vậy chu trình lại được lặp lại từ đầu. Phương trình tổng quát của quang hợp có dạng sau :



Như vậy sự khử sáu phân tử CO₂ sẽ dẫn tới hình thành sản phẩm cuối cùng của quang hợp là fructoza-6-phosphat. Khi cố định một phân tử CO₂ sẽ tạo nên hai phân tử axit 3-phosphoglixerinic, chất này lại chuyển thành dạng aldehyt tương ứng nhờ tác dụng của NADP.H₂ và ATP. Ngoài ra, từ ribuloza-5-phosphat chuyển thành ribuloza-1,5-diphosphat cũng cần tới ATP. Như đã thấy trên sơ đồ của chu trình quang hợp để tạo thành một phân tử fructoza-6-phosphat cần phải cung cấp một số NADP.H₂ và ATP. Tính toán cụ thể về lượng NADP.H₂ và ATP cần tiêu thụ cho một quá trình quang hợp có thể thấy rằng lượng NADP.H₂ cần thiết là 12 phân tử, còn lượng ATP là 18. Như vậy, cần có sự tái tạo lại các hợp chất đó. Để đảm bảo⁽¹⁾ một phần năng lượng ánh sáng do chlorophyl hấp thụ, được chuyển thành năng lượng hóa học tích trữ trong các liên kết cao năng của ATP. Quá trình này kèm theo sự sử dụng cả phosphat vô cơ và được gọi là sự *phosphoryl hóa quang hợp* hay *quang phosphoryl hóa*. Quang phosphoryl hóa gồm hai quá trình khác nhau : sự quang phosphoryl hóa vòng và sự quang phosphoryl hóa không vòng. Trong quá trình quang phosphoryl hóa vòng, năng lượng ánh sáng được sử dụng để tạo nên ATP, còn trong quá trình quang phosphoryl hóa không vòng một phần năng lượng ánh sáng chuyển vào ATP, một phần khác được dùng để tạo nên NADP.H₂. Theo Aconon, sự quang phosphoryl hóa vòng được biểu diễn bằng phương trình sau :



còn sự quang phosphoryl hóa không vòng có dạng như sau :



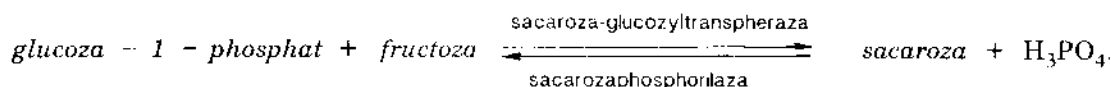
ATP và NADP.H₂ được tạo thành do kết quả của quang phosphoryl hóa không vòng đều được sử dụng trong quang hợp cũng như trong nhiều phản ứng trao đổi khác của cơ thể thực vật.

IV.3.2.2. Tổng hợp oligosacarit

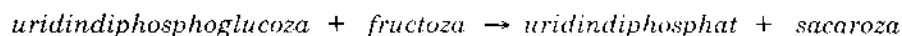
Sự sinh tổng hợp các oligosacarit được thực hiện nhờ phản ứng chuyển gốc glucozyl dưới tác dụng của glucozyltransferaza. Ví dụ, sự tổng hợp disacarit sacaroza

(1) Sự hình thành NADP.H₂ và ATP cần thiết.

tiến hành bằng con đường chuyển gốc glucoza từ glucoza-1-phosphat tới phân tử fructoza và giải phóng gốc axit phosphoric. Có thể coi quá trình này là quá trình ngược của phosphoroliza :



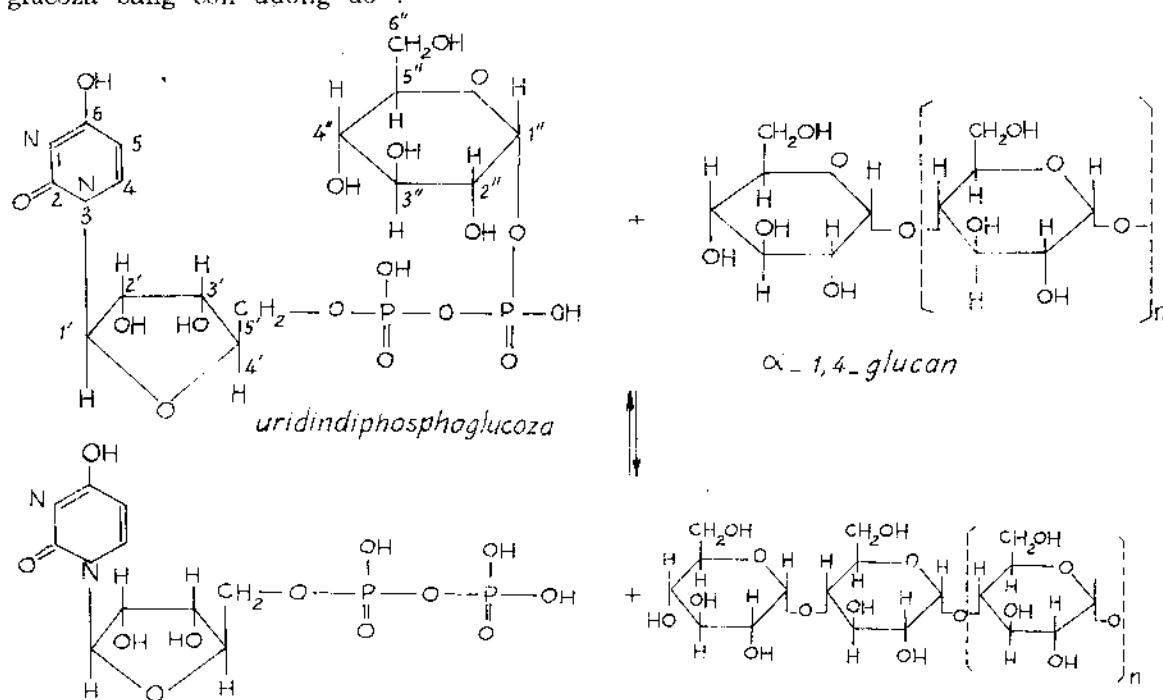
Enzim xúc tác cho quá trình này đã được phát hiện ở vi-khuẩn. Đường maltoza cũng được tổng hợp theo con đường tương tự ở vi khuẩn. Ngoài dạng este phosphat thông thường, người ta còn chứng minh được rằng gốc glucoza có thể ở dạng dẫn xuất uridin-diphosphoglucoza, khi đó nó dễ dàng chuyển sang fructoza để tạo nên đường sacaroza :



Như vậy các dẫn xuất uridindiphospho của đường là những chất cho gốc glucozyl rất hoạt động. Ngoài ra chính các oligosacarit hoặc cả các dextrin cũng có thể là chất cho gốc glucozyl trong các phản ứng tổng hợp oligosacarit.

IV.3.2.3. Tổng hợp các polysacarit

Sự tạo polysacarit cũng xảy ra bằng con đường chuyển gốc glucozyl như khi tổng hợp các oligosacarit. Chất cho gốc glucozyl để gắn vào đầu chuỗi đang tăng lên của polysacarit cũng là các dẫn xuất este phosphat của monoza, uridindiphospho đường hoặc oligosacarit. Phản ứng tiến hành nhờ các enzim glucozyltranspheraza tương ứng. Ví dụ, sự tổng hợp amiloza hoặc các glucan chứa liên kết 1,4 tương tự, thực hiện nhờ sự chuyển gốc glucoza từ glucoza-1-phosphat. Đó là phản ứng thuận nghịch của quá trình phosphoroliza. Các nucleozit diphosphat dương như uridindiphosphoglucoza cũng tham gia vào sự tổng hợp polysacarit nhờ tác dụng của các transglucozidaza tương ứng. Ví dụ sau đây chứng minh cho kiểu tăng thêm cho 1,4-glucan một gốc glucoza bằng con đường đó :



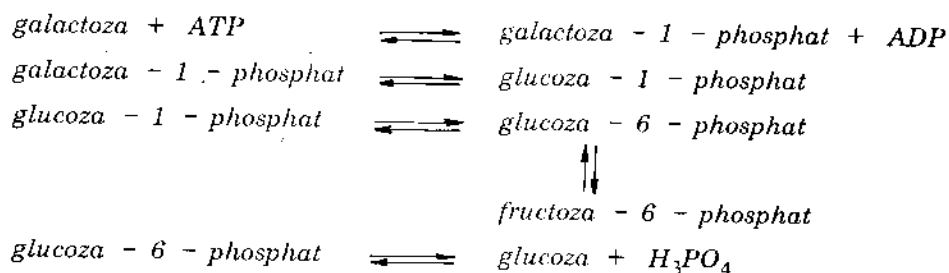
Chất cho gốc glucosyl còn có thể là các oligosacarit như maltoza, sacaroza, ... Sự chuyển gốc có thể xảy ra không chỉ tới cacbon 4 mà tới cả cacbon 6 của gốc monosacarit tận cùng để tạo nên các glucan chứa liên kết 1,6 và các polysacarit có cấu tạo nhánh. Ngoài ra cũng còn thấy rằng có sự chuyển cả một mảnh bao gồm nhiều gốc glucosyl từ một polysacarit này sang một polysacarit khác hoặc từ một vị trí này của phân tử sang một vị trí khác của cùng phân tử đó để tạo nên các phân tử polysacarit có cấu tạo nhánh như tinh bột hoặc glicogen.

Phản ứng tạo nhánh trên xảy ra nhờ tác dụng enzym α - glucan glucosyltransferaza.

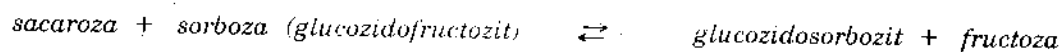
IV.3.2.4. Sự chuyển hóa tương hỗ giữa các glucit

Khi nghiên cứu quá trình quang hợp có thể thấy rằng sản phẩm đầu tiên hình thành của quá trình đó là axit phosphoglycerinic. Chất này tiếp tục bị chuyển hóa để tạo nên các loại monosacarit như glucoza, fructoza, hoặc các sản phẩm đồng phân hóa của chúng như mannoza, galactoza. Sau đó tới giai đoạn tạo sacaroza và tinh bột từ các monosacarit nhờ các hệ enzym tương ứng. Khi cho thấm vào lá cây các loại đường glucoza, fructoza và cả các loại khác như mannoza, galactoza, lactoza, maltoza cũng như aldehyt glyxerinic đều nhận thấy sự tăng tích lũy sacaroza ở thực vật. Tuy nhiên từ pentoza như arabinoza, xiloza lại không tạo được sacaroza.

Sự chuyển hóa tương hỗ giữa các monosacarit như glucoza, fructoza và mannoza được giải thích nhờ phản ứng enol hóa của các dạng hydrat của các monosacarit này, song đối với việc chuyển hóa tương hỗ giữa galactoza và glucoza, fructoza thì không giải thích được và không rõ theo cách nào. Hiện nay người ta đã chứng minh rằng điều đó xảy ra nhờ tác dụng của enzym tương ứng xúc tác cho phản ứng phosphoryl hóa và tạo thành các dạng este phosphat của đường. Sau đó nhờ các enzym đồng phân hóa sẽ tạo được các dạng este phosphat của các loại đường khác nhau và dưới tác dụng của enzym phosphataza từ este phosphat đường sẽ giải phóng đường ở dạng tự do. Có thể minh họa điều đó như sau :

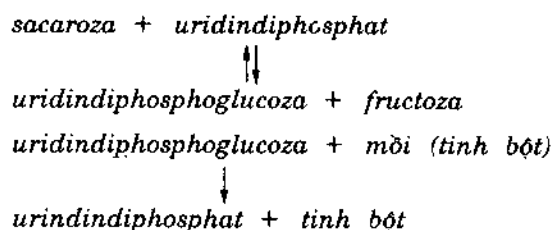


Ngoài ra cũng nhận thấy có sự chuyển hóa tương hỗ giữa các monosacarit và sacaroza nhờ các hệ enzym tương ứng. Các phản ứng liên quan đến sự tổng hợp sacaroza từ các monosacarit đã được xét trong phần tổng hợp các oligosacarit. Sacaroza chuyển hóa tương hỗ với các monosacarit khác nhau lại có thể là nguồn gốc tạo nên các disacarit khác. Phản ứng xảy ra nhờ sự chuyển gốc glucosit từ sacaroza sang monosacarit :

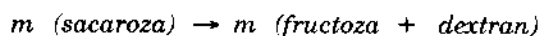


Ngược lại, từ các disacarit trên, nhờ phản ứng chuyển nhóm glucosyl lại tạo được sacaroza. Sacaroza cũng chuyển hóa tương hỗ thành các polysacarit như tinh bột hoặc các dextrin, các levan, v.v. Sacaroza là dạng đường vận chuyển chủ yếu ở thực vật. Khi quang hợp, tinh bột được tích lũy ở lá có thể chuyển nhánh thành

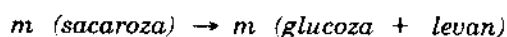
sacaroza, chất này đi vào hạt, vào củ,... rồi lại chuyển thành tinh bột hoặc inulin. Khi bảo quản khoai tây ở nhiệt độ từ 0 đến +9°C ở khoai tây xảy ra sự giảm tinh bột và tăng sacaroza. Khi đó cũng xảy ra sự tăng tích lũy fructoza-6-phosphat. Ở nhiệt độ cao hơn, lại xảy ra quá trình ngược lại nghĩa là chuyển sacaroza thành tinh bột. Quá trình chuyển hóa giữa tinh bột và sacaroza xảy ra theo sơ đồ sau :



Quá trình này xảy ra cả ở thực vật và một số vi sinh vật nhờ tác dụng của các hệ enzym tương ứng. Ở thực vật và vi sinh vật có các hệ enzym xúc tác cho sự chuyển sacaroza thành các polyglucozit và polyfructozit khác nhau. Ví dụ, từ sacaroza có thể tạo nên polysacarit nhầy dextran ở *Leuconostoc mesenteroides*, vì vậy sự phát triển của vi sinh vật này trong quá trình sản xuất đường có thể gây ra mất mát một lượng lớn đường sacaroza :

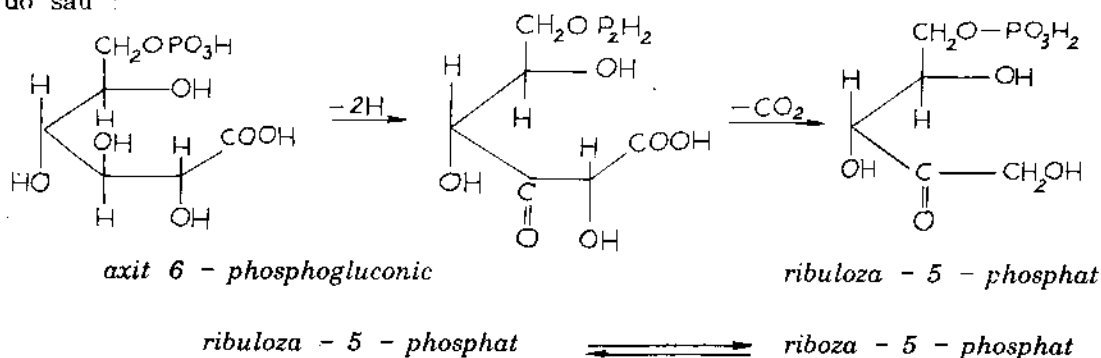


Tương tự như vậy; *Bacillus subtilis* lại gây ra sự tạo levan từ sacaroza :



Sự tạo levan và dextran từ sacaroza có thể xảy ra nhờ các chế phẩm enzym chiết từ các vi sinh vật.

Quá trình tạo các đường pentoza có thể thực hiện nhờ phản ứng loại CO₂ ra khỏi các dẫn xuất axit uronic của hexoza hoặc các axit polyuronic. Người ta cũng đã chứng minh được rằng sự loại CO₂ của axit galacturonic hoặc axit glucuronic (hoặc các dạng polyme tương ứng) là nguồn gốc quan trọng để tạo nên các pentoza như araban và xilan ở thực vật. Pentoza cũng được tạo nên nhờ sự loại CO₂ của axit dẫn xuất oxy hóa của phân tử hexoza (ở C₁). Ví dụ khi loại CO₂ ra khỏi axit phosphogluconic nhờ các chế phẩm enzym sẽ tạo nên este phosphat của xetopentoza ribuloza ; chất này nhờ phản ứng đồng phân hóa sẽ chuyển thành ribozaphosphat và từ đó tạo nên hàng loạt các pentoza khác. Phản ứng tạo pentoza từ dẫn xuất axit phosphogluconic xảy ra chủ yếu ở vi sinh vật. Có thể trình bày quá trình ở sơ đồ sau :



CHƯƠNG V

LIPIT

Lipit hay là chất béo là nhóm hợp chất hữu cơ tự nhiên rất phổ biến trong tế bào động vật và thực vật, có thành phần hóa học và cấu tạo khác nhau nhưng cùng có tính chất chung là không hòa tan trong nước mà hòa tan trong các dung môi hữu cơ (ete, cloroform, benzen, ete petrol, toluen, ...). Lipit là hợp phần cấu tạo quan trọng của các màng sinh học, là nguồn cung cấp năng lượng ($37,6.10^6$ J/kg), nguồn cung cấp các vitamin A, D, E, K và F cho cơ thể.

Lipit góp phần tạo ra kết cấu cũng như tính cảm vị đặc trưng của rất nhiều thực phẩm.

Dựa vào phản ứng xà phòng hóa, các lipit có thể chia ra hai nhóm sau :

- Lipit xà phòng hóa được, nhóm này bao gồm các glixerit, glixerophospholipit và sáp (cerid) nghĩa là những lipit mà trong phân tử có chứa este của axit béo cao phân tử ;

- Lipit không xà phòng hóa được, tức là những lipit trong phân tử không chứa chức este, nhóm này gồm các hydrocacbon, các chất màu và các sterol.

Dựa vào độ hòa tan người ta chia lipit thành hai nhóm :

- Lipit thực sự, là những este hoặc amit của axit béo (có từ bốn cacbon trở lên) với một rượu. Nhóm này bao gồm :

glixerolipit (este của glixerol)

sphingolipit (amit của sphingozin)

cerid (este của rượu cao phân tử)

sterit (este của sterol)

etolit (este tương hỗ của hợp chất đa chức axit rượu)

- Lipoit, là những chất có độ hòa tan giống lipit. Nhóm này bao gồm :

các carotenoit và quinon (các dẫn xuất của izopren)

sterol tự do

các hydrocacbon

Nếu dựa vào thành phần cấu tạo, có thể coi lipit gồm hai nhóm :

- Lipit đơn giản, là este của rượu và axit béo, thuộc nhóm này có :

triacylglixerin

- sáp (cerid)

- sterit

- Lipit phức tạp : trong phân tử của chúng ngoài axit béo, và rượu còn có các thành phần khác như axit phosphoric, bazơ nitơ, đường. Nhóm này bao gồm các nhóm nhỏ sau :

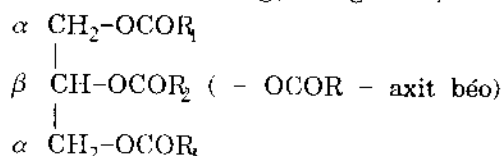
- glixerophospholipit, trong phân tử có glixerin, axit béo và axit phosphoric. Gốc axit phosphoric có thể được este hóa với một aminalcol như colin hoặc colamin
- glixeroglucolipit, trong phân tử ngoài glixerin và axit béo còn có mono hoặc oligosacarit kết hợp với glixerin qua liên kết glucozit
- sphingophospholipit : phân tử được cấu tạo từ aminalcol sphingoizin, axit béo và axit phosphoric
- sphingoglucolipit : phân tử được cấu tạo từ sphingoizin, axit béo và đường.

V.1. LIPIT ĐƠN GIẢN

V.1.1. Triaxylglixerin

V.1.1.1. Cấu tạo

Triaxylglixerin còn gọi là lipit trung tính, dầu mỡ hoặc triglixerit. Triaxylglixerin là este của glixerin với axit béo do đó gọi là glixerit, có công thức chung như sau :



Khi cả ba nhóm OH của glixerin đều được este hóa thì gọi là triglixerit hay triaxylglixerin. Các axit béo phần lớn đều ở dạng este triglixerit còn ở dạng tự do rất ít do đó dầu mỡ cũng có tên là lipit trung tính.

a) Các axit béo

Các axit béo trong triglixerit của dầu mỡ thường có mạch cacbon không phân nhánh, có số cacbon chẵn, bắt đầu từ axit có bốn cacbon đến axit béo có 38 cacbon.

Các axit béo no có công thức chung là $C_nH_{2n}O_2$.

Axit butyric (C_4), axit caproic (C_6), axit capilic (C_8) và axit capric (C_{10}) có trong bơ sữa bò. Axit miristic (C_{14}) có trong dầu lạc. Axit palmitic (C_{16}) và axit stearic (C_{18}) gần như có mặt trong tất cả các chất béo và thường chiếm lượng nhiều nhất.

Từ C_{12} trở đi tất cả các axit béo là những chất rắn và hoàn toàn không hòa tan trong nước.

Các axit béo không no thường gặp là :

- Axit oleic : C_{18} có một nối đôi ở C_9 , ký hiệu là $C_{18}\Delta^9$;
- Axit linoleic : C_{18} có hai nối đôi ở C_9 và C_{12} , ký hiệu là $C_{18}\Delta^{9,12}$, rất phổ biến và là thành tố quan trọng của vitamin F;
- Axit linolenic : C_{18} có ba nối đôi ở C_9 , C_{12} và C_{15} , ký hiệu $C_{18}\Delta^{9,12,15}$, có trong dầu cá sardin;
- Axit arachidonic : C_{20} có bốn nối đôi ký hiệu là $C_{20}\Delta^{5,8,11,14}$, có trong dầu cá

(chiếm gần 20% trong dầu gan cá ngừ), trong phosphatit của tủy xương, trong não và trong phôi lúa.

Độ không no hay không bão hòa của các axit béo được biểu thị bằng chỉ số iod, là lượng gam iod kết hợp được với 100 g axit béo. Chỉ số iod của các axit oleic, axit linoleic và axit linolenic theo thứ tự là 90, 181 và 275.

Các nối đôi của axit béo không no tự nhiên thường ở dạng cis, khi đun nóng, có mặt chất xúc tác thì dạng cis chuyển thành dạng trans (ví dụ, axit oleic có dạng cis khi đun nóng thì chuyển thành axit elaidic có dạng trans, có nhiệt độ nóng chảy cao hơn).

Điều đáng chú ý là các axit béo có hoạt tính vitamin F như axit linoleic thường có nối đôi cuối cùng nằm ở vị trí C_{12} và các nối đôi không ở dạng luân hợp ($=CH-CH=$) mà ở dạng malonic ($=CH-CH_2-CH=$).

Các axit béo không no trong dầu thực vật thường ở vị trí β , trái lại trong mỡ lợn và dầu cá chúng lại ở vị trí α và α' . Ví dụ, trong bơ cacao chứa hơn 60% palmityl-1, oleyl-2, stearyl-3-glixerol. Còn trong mỡ lợn thì dioleyl-1,3 palmityl-2-glixerol chiếm tỉ lệ khá cao.

Vị trí của axit béo ở một số dầu và mỡ như ở bảng 5.1.

Bảng 5.1

Loại dầu, mỡ	$C_{14} : O$	$C_{16} : O$	$C_{18} : O$	$C_{18} : 1$	$C_{18} : 2$	$C_{18} : 3$	$C_{20} : 1$	$C_{20} : 5$	$C_{22} : 1$
Dầu ôliu { 1 2 3		13 14 17		72 83 74	10 14 5				
Dầu lạc { 1 2 4		14 16 11		59 58 57	18 39 10				
Dầu dẻ tương { 1 2 3		14 1 13		23 21 28	48 70 45	9 7 8			
Dầu cọ { 1+3 2		66 18		27 59	5 19				
Dầu dừa { 1+3 2	28 10	11 1		5 4	2 12	32 79			
Mỡ bò { 1 2 3	4 9 1	41 17 22	17 9 24	20 41 37	4 5 5				
Mỡ lợn { 1 2 3	1 4 1	12 57 1	26 3 13	36 18 57	13 7 22				
Dầu cá trích { 1 2 3	6 10 4	12 17 7		16 10 8	3 3 1		25 6 20	3 18 4	14 5 50

Ghi chú: Các con số chỉ số phần trăm của axit béo ở mỗi vị trí.

b) Dầu mỡ tự nhiên

Có thể nói dầu mỡ tự nhiên là những triglixerit hỗn tạp. Quả vậy, trong dầu hoặc mỡ tự nhiên các triglixerit đơn rất ít, trong lúc đó hàm lượng các triglixerit hỗn tạp lại rất cao. Điều này phù hợp với định luật về tính không đồng nhất tối đa. Chẳng hạn, thành phần của mỡ lá ở lợn gồm có : tristearin : 0% ; steardiolein : 15% ; β - palmitodiolein : 42 - 57% ; β - palmitostearoolein : 21 - 36% ; β palmitodistearin : 2% ; dipalmitostearin : 3% ; dipalmitoolein : 2%. Có thể tính số lượng các triglixerit trong một dầu mỡ theo công thức :

$$(a + b + c + \dots)^3 = 1$$

$a, b, c, \dots$ - lượng axit béo có trong hỗn hợp, biểu diễn bằng phần trăm số phân tử.

Nếu có ba axit palmitic, axit stearic và axit oleic tham gia thì sẽ có :
- 10 triglixerit khác nhau về thành phần hóa học như ở phương trình sau

$$(P + S + O)^3 = GP^3 + GS^3 + GO^3 + 3GP^2S + 3GS^2P + 3GO^2P + 3GO^2S + 3GP^2O + 3GS^2O + 6GP.S.O = 1 ;$$

- 18 triglixerit, nếu kể thêm các đồng phân do vị trí của các gốc axit béo trên chức rượu bậc nhất hoặc bậc hai của glixerin ;

- 27 triglixerit nếu kể cả các đồng phân enantiome.

c) Triaxylglixerin của động vật

Triaxylglixerin của động vật thường được tập trung trong các tế bào của mô mỡ làm thành một lớp mỡ dưới da, hoặc bao quanh một số cơ quan hoặc nằm xen giữa các mô khác. Trong tế bào đã trưởng thành của mô mỡ, các triglixerit được khuếch tán rất tinh vi, khó phân biệt được hình dạng chúng ngay cả dưới kính hiển vi tốt nhất. Mô mỡ của lợn gọi là mỡ lá. Có thể thu được mỡ nước bằng cách nấu nóng chảy ở nhiệt độ dưới 80°C (để mỡ không có màu và không có mùi), mỡ nổi lên bề mặt, tách ra bằng ly tâm.

Triaxylglixerin của động vật trên cạn và của chim thì rắn và được gọi là mỡ, còn của cá và động vật dưới nước thì lỏng và được gọi là dầu động vật. Gan của một số động vật biển và cá thường rất giàu dầu này. Tỷ lệ các axit béo không no trong dầu cá, đặc biệt là trong dầu cá trích có thể chiếm tới 75%.

Lipit trung tính còn chứa trong dịch lỏng của động vật, ví dụ, trong sữa bò có 3,7%, sữa dê có 4,8% đặc biệt trong sữa voi có 20% và sữa cá voi có 46%.

d) Dầu thực vật

Chất béo lấy từ nguyên liệu thực vật được gọi là dầu thực vật. Dầu thực vật khác với dầu khoáng ở chỗ, dầu khoáng có bản chất hydrocacbon và thường thu được khi chưng cất dầu mỏ. Dầu thực vật cũng khác với tinh dầu ở chỗ, tinh dầu không chứa các glixerit mà chứa một hỗn hợp gồm aldehyt, xeton, rượu, hydrocacbon và este của axit béo phân tử thấp.

Trong cây, glixerit là phần tạo thành tất yếu của hạt. Hạt của một số cây chứa rất nhiều glixerit gọi là hạt có dầu, thường là nguyên liệu công nghiệp để khai thác dầu, ví dụ, hạt bông, hạt lanh, hạt thầu dầu, hạt lạc. Hạt một số cây khác chứa ít dầu hơn nhưng không một cây nào mà hạt lại không có dầu.

Trong các quả như quả dừa cũng có nhiều glixerit. Nói chung trong hạt và quả có dầu, triaxylglixerin phân bố ít nhiều đồng đều. Còn trong hạt hòa thảo, ví dụ, trong hạt ngô, hạt lúa mì dầu béo chủ yếu tập trung ở trong phôi.

Dựa vào nguồn khai thác, dầu thực vật có thể chia ra: dầu từ hạt và dầu từ thịt quả.

Dựa vào mục đích kỹ thuật có thể phân ra: dầu rắn và dầu lỏng. Dầu lỏng lại chia ra dầu khô, dầu bán khô và dầu không khô tương ứng với khả năng tạo màng khác nhau của chúng khi để khô trong không khí.

Dầu khô như dầu châu, dầu lanh, có chứa nhiều axit béo chưa no ba nối đôi, khi để thành lớp mỏng để ngoài không khí, dưới tác dụng của oxy phân tử sẽ bị khô sau vài ngày. Màng oxin tạo thành sẽ rắn, không hòa tan trong dung môi hữu cơ thông thường, còn trong dung môi ete dietyl thì chỉ bị trương ra. Màng không bị nóng chảy mà chỉ bị mềm ra khi ở nhiệt độ đạt đến 230 - 250°C, rồi bị phá hủy. Dầu loại này thường có chỉ số iot lớn hơn 130.

Dầu bán khô như dầu bông, dầu hướng dương, dầu cá, ... chỉ chứa axit linoleic, để ngoài không khí trong điều kiện tương tự bị khô chậm hơn. Màng oxin tạo ra mềm, dính, dễ hòa tan trong ete dietyl. Khi đun nóng đến 95°C - 125°C đã bị chảy ra. Dầu loại này có chỉ số iot là 85 - 130.

Dầu không khô như dầu oliu, dầu lạc, ... trong điều kiện tương tự không tạo thành màng mà chỉ bị đặc lại. Trong tất cả các loại dầu, dầu thầu dầu hoàn toàn không khô, không tạo thành màng và cũng không đặc lại.

V.1.1.2. Tính chất chung của triaxylglixerin

Ở nhiệt độ thường, triaxylglixerin có thể ở trạng thái rắn hoặc lỏng. Triaxylglixerin không hòa tan trong nước mà tách thành lớp. Tuy nhiên trong những điều kiện nhất định, dưới tác dụng của chất nhũ hóa, chúng có thể tạo ra nhũ tương. Nhiều triaxylglixerin ở nhiệt độ thường có tính dẻo, do đó tạo cho các thực phẩm có được những tính chất chức năng riêng.

Nhiệt độ nóng chảy của triaxylglixerin cũng tương đối thấp, do đó nhiều thực phẩm bị mềm hoặc hóa lỏng khi được gia nhiệt vừa phải.

Nhiệt độ nóng chảy của một triglixerit phụ thuộc nhiều yếu tố: sự có mặt của axit béo mạch ngắn hoặc axit béo không no thường làm giảm điểm nóng chảy. Các đồng phân của các axit béo (đồng phân do vị trí và đồng phân *cis* hoặc *trans* của các nối đôi) và vị trí của các axit béo trên glixerin cũng ảnh hưởng đến nhiệt độ nóng chảy của triglixerit.

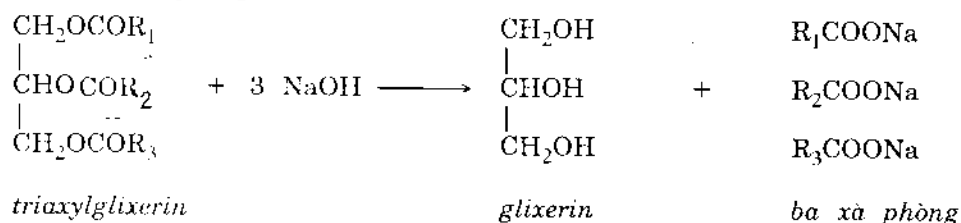
Như chúng ta đã thấy, tất cả mỡ và dầu tự nhiên đều chứa các triglixerit khác nhau, do đó không bao giờ có một điểm nóng chảy rõ ràng mà thường có khoảng nóng chảy. Các triglixerit có điểm nóng chảy tương đối cao (ở nhiệt độ thường) thường tồn tại dưới dạng các tinh thể rắn lơ lửng trong các triglixerit lỏng. Chính sự có mặt của các tinh thể rắn trong một pha lỏng làm cho các mỡ rắn có được tính dẻo đặc trưng. Một chất béo chỉ gồm toàn một kiểu triglixerit thì chỉ là rắn hoặc lỏng. Nhiệt độ nóng chảy của mỡ hoặc dầu còn phụ thuộc độ hòa tan của các chất béo rắn trong các chất béo lỏng, và các dạng tinh thể khác nhau của các triglixerit rắn.

Số lượng, kích thước và hình dạng của các tinh thể triglixerit trong một chất béo cũng phụ thuộc vào vận tốc làm lạnh hoặc đun nóng, vận tốc khuấy trong quá trình chế biến, thời gian và nhiệt độ bảo quản sau này.

Các chất béo còn có những tính chất chức năng rất đặc trưng. Ví dụ, bơ và margarin thì có khuynh hướng lan tỏa ra, cacao thì có tính giòn khi ở nhiệt độ thường nhưng lại dễ chảy ra khi ở nhiệt độ của miệng, dầu ăn thì có độ trong suốt hoặc một số chất béo dùng trong sản xuất bánh qui thì có khả năng nhũ hóa không khí và bôi trơn cấu trúc của bánh qui.

a) Phản ứng xà phòng hóa

Dưới tác dụng của enzym lipaza, axit hoặc kiềm, liên kết este trong phân tử glixerit bị thủy phân tạo thành gliserin và axit béo hoặc muối của axit béo. Các muối này được gọi là xà phòng.



Xà phòng bình thường là hỗn hợp các muối natri của các axit béo. Muối kali của axit béo tạo ra xà phòng mềm. Xà phòng làm từ dầu oliu thường nổi trong nước vì bão hòa khí. Người ta thường thêm vào xà phòng các chất thơm và chất diệt khuẩn.

b) Phản ứng chuyển este hóa

Trong những điều kiện nhiệt độ và môi trường thích hợp, nhất là khi vắng mặt nước và có mặt chất xúc tác, các gốc axit béo trong cùng một triglixerit hoặc giữa các triglixerit có thể đổi chỗ cho nhau. Trong thực tế, khi xử lý dầu mỡ, phản ứng chuyển este hóa sẽ xảy ra vừa trong cùng một phân tử vừa giữa các phân tử glixerit.

Ví dụ, phản ứng chuyển este hóa giữa các phân tử của một triglixerit chứa ba axit béo no với một triglixerit chứa ba axit béo không no :



Nếu lấy lượng phân tử bằng nhau thì sẽ cho hỗn hợp các triglixerit với phân tử phần như sau :

SSS 12,5% ; SNS 12,5% ; NSN 12,5% ; NNN 12,5% ; NSS (và SSN) 2,5% ; SNN (và NNS) 25%.

Tám tổ hợp đều có cùng khả năng với xác suất $100/8 = 12,5/100$.

Chất xúc tác thường dùng là alcolat kiềm (natri etylat hoặc natri metylat) với nồng độ 0,1 đến 0,3%. Nhiệt độ chuyển este hóa thường là từ 110 - 160°C.

Có thể dùng phản ứng chuyển este hóa để thu được từ mỡ lợn các chất béo có khả năng nhũ hóa, để dùng trong sản xuất bánh ngọt và kem đá. Qua phản ứng này sẽ loại bỏ được các tinh thể glixerit thô vón tạo ra trong kem các hạt cứng.

Để đạt mục đích này người ta tiến hành chuyển este ở nhiệt độ tương đối thấp nhằm làm cho các trigliserit có điểm nóng chảy cao bị kết tinh rồi tách ra (có thể bằng cách lọc). Cân bằng bị chuyển dịch và khi đó thu được một hỗn hợp các trigliserit có vùng nhiệt độ nóng chảy thấp hơn.

Cũng có thể dùng phản ứng chuyển este để chế hóa ra các mỡ rắn (cứng) giàu axit linoleic để sản xuất margarin. Ví dụ, phản ứng chuyển este hóa giữa dầu cọ đã hydro hóa với dầu hướng dương, có natri etylat xúc tác để tạo ra macgarin không chứa axit béo dạng *trans*.

Phản ứng chuyển este còn cho phép thu được các mono- và digliserit bằng cách tiến hành với một lượng glixerin dư, ở nhiệt độ 200°C trong chân không hoặc khí trơ.

Sự chuyển este không làm biến đổi các axit béo. Tuy nhiên do sự thay đổi vị trí của các axit béo trên glixerin mà khả năng tiêu hóa của trigliserit và do đó sự hấp thu của mỗi axit béo có thể bị biến đổi theo.

c) Phản ứng hydro hóa

Hydro hóa là phản ứng gắn hydro vào nối đôi của axit béo không no trong các gliserit.

Như chúng ta đã thấy, ở nhiệt độ thường mỡ động vật ở trạng thái rắn còn dầu thực vật ở trạng thái lỏng là do trong mỡ động vật hàm lượng axit béo no tương đối cao hơn. Khi kết hợp hydro vào nối đôi của axit béo sẽ làm cho dầu thực vật trở nên giống với chất béo động vật. Dầu thực vật đã hydro hóa hoàn toàn cũng giống hệt như mỡ cừu, do đó trong thực tế sản xuất, có trường hợp người ta chỉ hydro hóa đến một mức độ nào đó nghĩa là vẫn giữ lại một số nối đôi. Có hai kiểu hydro hóa :

1- *Hydro hóa chọn lọc* một số dầu thực vật để làm giảm hàm lượng axit linolenic và do đó làm tăng độ bền của dầu. Chẳng hạn hydro hóa dầu đậu tương đã làm giảm hàm lượng axit linolenic từ 9% xuống dưới 1%, ứng với chỉ số iot từ 130 xuống 115.

Chất xúc tác phản ứng là bột niken (hoặc đồng và paladi). Hydro phải thật sạch vì cacbon oxyt và các hợp chất lưu huỳnh có thể bị hấp thụ vào chất xúc tác rồi đầu độc nó.

Cần chú ý là chất xúc tác không chỉ hydro hóa một mình axit linolenic thành axit linoleic mà còn hydro hóa cả axit linoleic thành axit oleic. Ngoài ra sự hydro hóa còn tạo ra các đồng phân do vị trí (40 - 50%), đồng phân do nối đôi liên hợp (2%) và các đồng phân *trans* (10 - 15%) của các axit oleic và linoleic.

2- *Hydro hóa từng phần hay toàn bộ* nhằm mục đích tạo ra các chất béo rắn làm nền để sản xuất margarin hoặc sản xuất mỡ nhũ hóa. Để thu được chất béo có độ đặc mong muốn ở điều kiện nhiệt độ bình thường, có nghĩa là phải nâng cao được điểm nóng chảy của nó bằng cách chuyển sang dạng *trans*.

Khi hydro hóa toàn bộ, không tạo ra các đồng phân như đã nêu ở trên. Ngược lại khi hydro hóa từng phần dầu đậu tương đến chỉ số iot 40 sẽ tạo ra 70% các

đồng phân do vị trí, 2% đồng phân do nối đôi luân hợp và khoảng 40% các đồng phân *trans*. Đây chính là chất làm nền của các margarin thông thường.

Nói chung, sự hydro hóa chọn lọc tiến hành ở nhiệt độ cao (195°C), áp suất cao (8000 tor), trong một thời gian ngắn (30 phút), trong khi sự hydro hóa từng phần thực hiện ở nhiệt độ và áp suất thấp hơn, nhưng thời gian dài hơn và nồng độ xúc tác 10 lần lớn hơn. Sau khi hydro hóa, dầu được ly tâm, lọc, tinh luyện và tẩy màu. Còn chất xúc tác thì thu hồi lại và tái sinh.

Phản ứng hydro hóa có ảnh hưởng đến giá trị dinh dưỡng vì nó làm giảm hàm lượng các axit béo cần thiết, hàm lượng vitamin, và màu sắc của các chất màu carotenoit thường có mặt trong dầu.

V.1.2. Sáp

Sáp cũng thuộc lipid đơn giản, là este của axit béo bậc cao với rượu đơn chức mạch thẳng, phân tử lớn. Các este này có tên gọi là xeron và là phần chủ yếu của sáp.

Sáp thiên nhiên, ngoài các este nói trên, còn có một ít rượu bậc cao tự do và axit bậc cao tự do cũng như một ít hydrocacbon luôn luôn có số nguyên tử cacbon lẻ (từ 27 đến 33), các chất màu và các chất thơm. Hàm lượng tổng số của các tạp chất này có thể đến 50%. Trong sáp thiên nhiên ta thường gặp các loại rượu có phân tử lớn và các axit béo bậc cao sau đây :

Axit		Nguồn
axit palmitic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	Sáp ong, spermaxeti
axit cauraubic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$	Sáp của cây cọ
axit xerotic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{24}-\text{COOH}$	Sáp ong, sáp của lá và của quả
axit montanic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{26}-\text{COOH}$	
axit melisic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{28}-\text{COOH}$	
Rượu		
rượu xetylic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2\text{OH}$	Spermaxeti
rượu xerylic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{24}-\text{CH}_2\text{OH}$	Sáp ong
rượu montanic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{26}-\text{CH}_2\text{OH}$	Sáp ong, sáp của lá và của quả
rượu mirixylic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{28}-\text{CH}_2\text{OH}$	

Căn cứ vào nguồn gốc thì người ta chia sáp ra làm ba loại : sáp thực vật, sáp động vật và sáp khoáng. Sáp thường có một lượng không lớn lắm ở trong thực vật trên bề mặt của quả, lá, thân cành, v.v. Lớp sáp trên quả táo, lê, quả đào, mận, ... đã bảo vệ cho chúng khỏi bị thấm nước, khỏi bị khô và không cho vi sinh vật xâm nhập vào. Một phần đáng kể của lớp sáp này là hydrocacbon. Ví dụ lớp sáp trên lá bắp cải chủ yếu được tạo nên từ hydrocacbon dãy parafin nonacozan $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$ và dẫn xuất của nó là nonacozanon có nhóm carbonyl $>\text{CO}$. Trong thuốc lá người ta tìm thấy hydrocacbon heptocozan $\text{C}_{27}\text{H}_{56}$, và untriacontan $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$. Trong thành phần của lớp sáp ở quả nho có axit palmitic tự do, có este của nó với rượu có phân tử lớn enocaprol, có các rượu xerylic, mirixylic và axit xerotic. Sáp hoa có màu, chính là

este dipalmitat của rượu hai chức có bản chất carotenoit như xantophyl, zearxantin.

Người ta thấy rằng thời gian bảo quản của quả phụ thuộc vào chất lượng lớp sáp.

Người ta cũng rất hay gặp sáp có nguồn gốc động vật, ví dụ, sáp ong, sáp ở lông cừu - lanolin, spermaxeti. Sáp động vật thường được tiết ra từ tuyến sáp của côn trùng, từ tuyến xương cụt của chim và từ tuyến da của động vật có vú. Các côn trùng thường sử dụng sáp làm vật liệu xây dựng. Sáp ong dùng để bảo vệ cho mật ong khỏi bị hư hỏng và tổn thất cũng như để bảo vệ ấu trùng của ong phát triển được bình thường. Lanolin của lông cừu giữ cho lông và da không bị tác dụng của nước. Trong sáp ong chủ yếu có este của axit palmitic với rượu mirixylic, thứ đến có este của axit béo không no có tên là hypogeic ($C_{16}H_{31}O_2$) với rượu mirixylic (mirixyl hypogeat). Ngoài ra trong sáp ong, người ta còn tìm thấy các rượu và các axit có số nguyên tử cacbon từ 32 - 34, nhiệt độ nóng chảy của sáp ong bằng 62 - 70°C.

Lanolin hay sáp len được tích tụ một lượng lớn ở trong lông, là một hỗn hợp các este của rượu sterol với các axit béo cao phân tử có nhánh (axit lanopalmitic, axit lanostearic).

Spermaxeti, chiếm một tỉ lượng khá lớn trong chất béo của não cá cachalot, là este của axit palmitic với rượu xetylic (xetyl palmitat). Spermaxeti là chất rắn có nhiệt độ nóng chảy 41 - 49°C.

Sáp khoáng được chiết xuất từ than đá linhhit hoặc than bùn nhờ dung môi hữu cơ. Trong thành phần của sáp khoáng có axit montanic và các este của nó. Sáp khoáng có tỉ trọng bằng 1 và có nhiệt độ nóng chảy 72 - 77°C.

Sáp là chất vô định hình dễ bị mềm ra khi đun nóng, nóng chảy ở nhiệt độ 40 - 90°C. Sáp không bị mềm bởi nước, không thấm nước không dẫn điện, cháy được, không hòa tan trong nước và trong rượu lạnh, hòa tan tốt trong benzen, cloroform, etc.

Sáp ít khả năng phản ứng và rất bền. Sáp chỉ bị xà phòng hóa trong môi trường kiềm ở nhiệt độ 150° - 160°C và có áp suất. Trong môi trường axit không những không bị thủy phân và ngược lại khi đun nóng hỗn hợp rượu cao và axit béo ngay cả khi có mặt nước cũng xảy ra sự tổng hợp sáp. Khi tinh chế sáp tự nhiên người ta nấu nóng chảy lại trong sự có mặt của nước rồi làm trắng bằng các chất hấp thụ và chất oxy hóa.

Sáp có nhiều ứng dụng trong thực tế để pha chế làm vật liệu cách điện, vật liệu làm khuôn in, sơn, bút chì, phục hồi các bức tranh. Lanolin và spermaxeti để pha chế kem và pomat trong mỹ phẩm.

Bên cạnh sáp tự nhiên, người ta còn điều chế sáp nhân tạo bằng cách este hóa các sản phẩm oxy hóa của xerezin và parafin với axit béo.

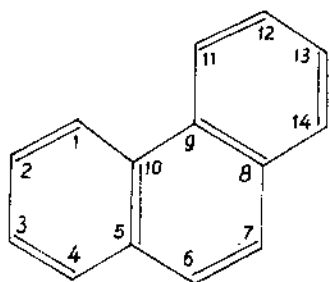
V.1.3. Sterit

Các sterit là những este của rượu vòng sterol với các axit béo cao. Sterit là một nhóm khá lớn của các lipid đơn giản.

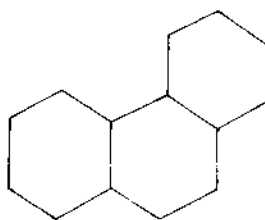
Trong thiên nhiên, các sterol tự do và các hợp chất tương tự sterol chiếm nhiều hơn so với sterit. Ví dụ, cơ thể người chỉ có 10 sterol được este hóa ở dạng sterit, còn 90% sterol ở dạng tự do. Tỷ số của sterol và sterit trong các mô khác nhau của cơ thể động vật và thực vật hoàn toàn khác nhau.

Các sterol là những chất rượu chưa no đơn chức, có vòng. Đó là những dẫn xuất của xiclopentanoperhydrophenantren. Xiclopentanoperhydrophenantren có thể xem như là sản phẩm ngưng tụ của xiclopentan và của phenantren đã hoàn toàn được hydro hóa (perhydrophenantren). Xiclopentanoperhydrophenantren còn có tên gọi là steran.

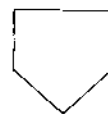
Steran vốn có đính thêm một chuỗi cacbon và hai nhóm methyl (ở nguyên tử cacbon thứ 10 và thứ 13 của vòng) được gọi là colean.



phenantren



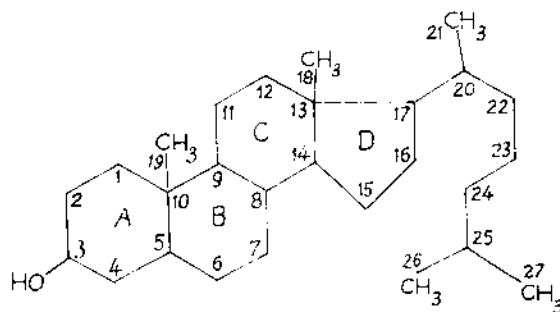
perhydrophenantren



xiclopentan

Các nguyên tử cacbon trong hydrocacbon này đều được đánh số theo thứ tự như ở công thức đã trình bày. Các vòng được ký hiệu bằng chữ A, B, C, D.

Nếu như bị oxy hóa ở vị trí thứ ba (vòng A) thì colean sẽ chuyển thành rượu đa vòng, tức là coleanol và coleanol là chất tiền khởi của nhóm sterol.



coleanol

Tuy nhiên không nên nghĩ rằng trong thiên nhiên, các sterol đều được tạo thành bằng phản ứng khử phenantren. Người ta đã chứng minh được rằng việc sinh tổng hợp các sterol được tiến hành bằng cách vòng hóa polyisoprenoit. Do đó thực chất các sterol là những dẫn xuất của polyisoprenoit.

Nhân đặc trưng của coleanol được lặp lại trong tất cả các sterol với những biến đổi không đáng kể, ví dụ, xuất hiện liên kết đôi giữa các nguyên tử cacbon thứ năm và thứ sáu, thứ bảy và thứ tám của vòng B hoặc giữa các nguyên tử cacbon thứ 22 và thứ 23 của mạch bên, hoặc xuất hiện ở vị trí 24 (trong mạch bên) một gốc, gốc này có cấu tạo là $-CH_3$; $-C_2H_5$; $-CH=CH_2$ v.v.

Trong sterol tự nhiên, vòng A và B (có nối đôi ở 4 - 5 hoặc ở 5 - 6), thường có dạng kết hợp *trans* hoặc dạng kết hợp *cis*, còn vòng B và C cũng như vòng C

và D lại có dạng kết hợp *trans*. Ngoài ra, các vòng xiclohexan với cấu hình dạng ghế thường thuận lợi hơn về phương diện năng lượng. Do đó các nhóm thế trong vòng có thể ở dạng β (ở trên) hoặc ở dạng α (ở dưới). Mạch hydrocarbon ở vị trí 17 và nhóm chức hydroxyl (OH) ở vị trí thứ ba thường ở dạng β . Phân tử sterol có thể chứa 1, 2 hoặc 3 liên kết kép, nhưng quan trọng hơn là liên kết kép ở các vòng, đặc biệt là ở vòng B. Mạch bên của sterol có thể chứa nối đôi và có thể phân nhánh.

Hàm lượng sterin trong các chất béo không nhiều, thường chỉ chiếm dưới 0,5%. Trong dầu thực vật lượng sterol nhiều hơn trong chất béo của động vật trên cạn.

Các sterol đều không màu, dễ kết tinh nhưng dạng tinh thể và nhiệt độ nóng chảy của chúng khác nhau.

Sterol không hòa tan trong nước nhưng hòa tan dễ dàng trong các dung môi thông thường của chất béo (cloroform, ete, ...) và trong rượu nóng. Sterol là những chất hoạt quang. Khi chưng cất ở áp suất khí quyển sterol bị phân hủy, nhưng ở trong chân không thì không bị phân hủy và phần nào được kéo theo với hơi nước quá nhiệt khi khử mùi chất béo trong chân không. Tính chất hóa học của sterol do nhóm rượu bậc hai (ở vị trí 3) và các liên kết đôi trong vòng quyết định.

Nhóm rượu bậc hai này có thể được axit hóa (tạo este axetat) cũng như có thể bị oxy hóa đến xeton.

Sterol là chất có chứa liên kết đôi nên có thể bị oxy hóa (bởi oxy phân tử, axit perbenzoic hoặc ozon), có thể kết hợp với halogen cũng như có thể bị hydro hóa. Đáng chú ý, nối đôi Δ^5 dễ bị hydro hóa còn liên kết đôi Δ^7 khi hydro hóa thì bị chuyển sang vị trí $\Delta^{8(14)}$.

Các sterol khi hydro hóa có mặt xúc tác sẽ tạo ra rượu no, sau đó (khi ở nhiệt độ cao) sẽ chuyển thành hydrocarbon. Nếu sterol ở trong dung dịch rượu amylic có thể bị khử đến hydrocarbon khi tác dụng với natri kim loại.

Sterol tác dụng với alcaloit digitonin ($C_{35}H_{94}O_{28}$) tạo thành hợp chất phân tử có tên là digitonit không hòa tan trong rượu. Khi đun sôi với xylene hợp chất phân tử này bị phân giải thành các chất đầu. Khi đó sterol hòa tan trong xylene, còn digitonin thì ở dạng kết tủa. Người ta thường dùng phản ứng này để tách sterol khỏi chất béo.

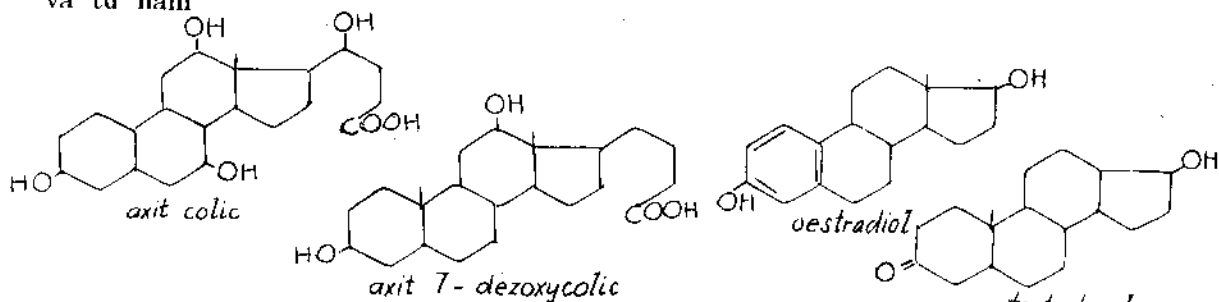
Các sterol có thể tạo este với các axit béo bậc cao để hình thành một nhóm hợp chất có tên là sterit.

Trong cơ thể động vật các sterol bị oxy hóa và cho nhiều dẫn xuất ví dụ, axit colic, axit 7-dezoxycolic, oestradiol, testosterol. Axit colic là chất quan trọng nhất của mật vốn đảm bảo tiến trình bình thường của sự hấp thu axit béo ở trong ruột người và động vật. Oestradiol và testosterol là những hormon chung tính nữ và nam có ảnh hưởng rất lớn đến các quá trình hoạt động sống của cơ thể.

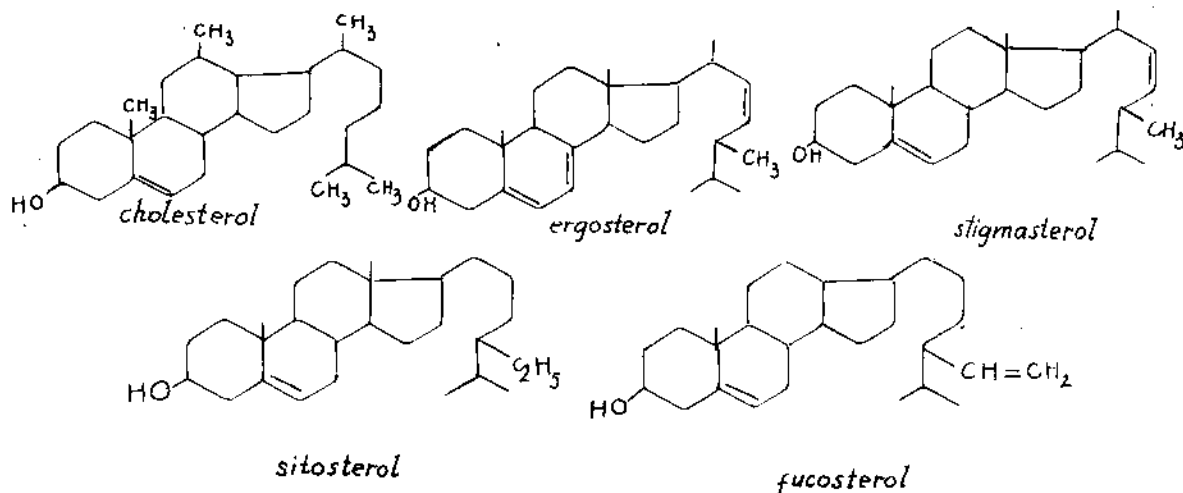
Các sterol có ảnh hưởng đến tính thấm của nguyên sinh chất đối với các chất khác nhau, có thể bao vây tác dụng của một số chất độc hoặc có thể liên kết với các độc tố.

Nhiều công trình nghiên cứu trong những năm gần đây đã chứng tỏ một số dẫn xuất của sterol là những chất gây ung thư, một số khác (ví dụ, testosterolpropionat) lại dùng để chữa một số bệnh ung thư.

Dưới đây là công thức của một số sterol (và dẫn xuất) từ động vật, thực vật và từ nấm



Cholesterol (từ chole tiếng latin là mật) là sterol chủ yếu của người và động vật, nghĩa là thuộc vào loại *zoosterol*. Ergosterol là sterol đặc trưng của các loại nấm. Sitosterol và stigmasterol là những sterol đặc trưng cho thực vật (phitosterol). Ví dụ, phitosterol trong dầu đậu tương, còn stigmasterol có trong dầu của phôi hạt lúa mì, fucosterol có trong các loài tảo xám.

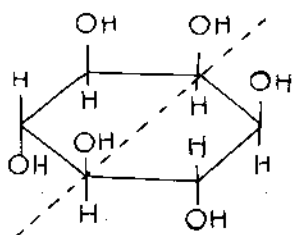


V.2. LIPIT PHỨC TẠP

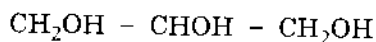
V.2.1. Phospholipit

Như trên đã nói, phospholipit là những este của các rượu đa chức với các axit béo cao và có gốc axit phosphoric và những bazơ chứa nitơ đóng vai trò là các nhóm phụ bổ sung.

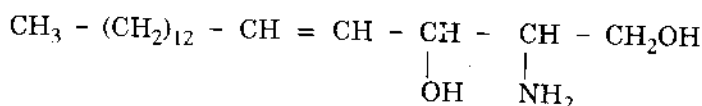
Trong thành phần của các phospholipit khác nhau, người ta tìm được ba trong số các rượu đa nguyên tử : glixerin, inozit, sphingoizin :



mezoinozit



glixerin

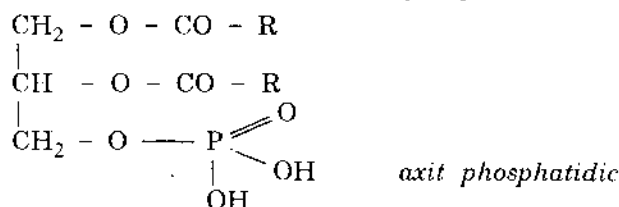


sphingoizin

(trans - 1,3 - dioxo - 2 - amin - octa - dexe - 4)

(dạng mezo không có tính hoạt quang, đường chấm chấm là biểu thị trục đối xứng).

Do đó các phospholipit được chia thành ba nhóm : glixerophospholipit, inozitphospholipit và sphingophospholipit. Glixerophospholipit thường được gọi là phosphatit, vì chúng có thể xem như là các dẫn xuất của axit phosphatidic :



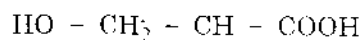
Trong các phân tử của phospholipit thường có axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, axit linolenic, axit arachidonic cũng như axit lignoxeric, axit nervonic, v.v.

Trong thành phần của phospholipit thường có một phân tử axit phosphoric. ở một vài loại inozitphospholipit có hai gốc axit phosphoric.

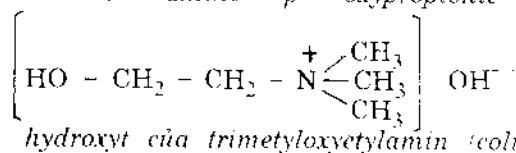
Các bazơ nitơ của phospholipit rất khác nhau, thường gặp nhất là những dẫn xuất của etanolamin. Đó là colin và serin



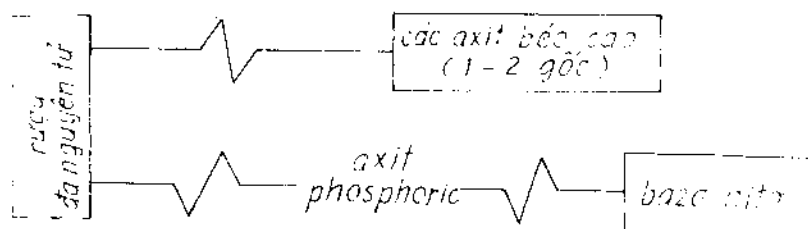
etanolamin (colamin)



axit α - amino - β - oxypropionic (serin)



Sơ đồ cấu tạo của phospholipit được trình bày trên hình 5.1. Từ cấu tạo hóa học của phospholipit ta thấy rằng trong phân tử, của chúng có những vùng có khả năng tương tác khác nhau với các phân tử của dung môi. Gốc hydrocacbon của các axit béo cao tạo thành vùng kỵ nước, còn các gốc của axit phosphoric và của bazơ nitơ vốn có khả năng ion hóa thì tạo thành vùng ưa nước. Nhờ đặc tính đó mà phospholipit tham gia trong việc đảm bảo tính thấm một chiều của các màng cấu trúc dưới tế bào. Khi hướng vùng kỵ nước về phía môi trường ngoài, các phospholipit có thể xúc tiến việc hấp thụ các hợp chất không phân cực hòa tan trong chất béo (tương tác với các gốc hydrocacbon) từ môi trường ngoài và chuyển chúng vào trong cấu trúc dưới tế bào.

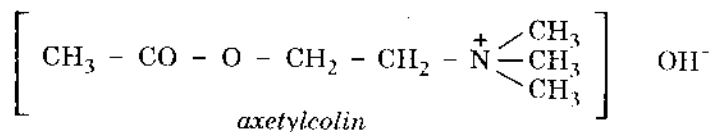


Hình 5.1 Sơ đồ cấu trúc hóa học của các phospholipit
đầu $\text{—}\text{Z}\text{—}$ là liên kết theo kiểu este

Khi định hướng ngược lại, nghĩa là khi hướng vùng ưa nước về phía môi trường ngoài, chúng sẽ chuyển các phân tử phân cực từ trong ra ngoài.

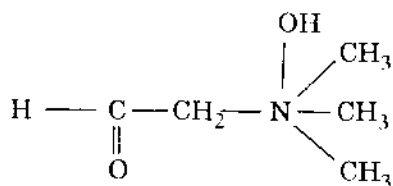
Các phospholipit có gốc colin, hình như cũng có liên quan với vai trò, chức năng của chúng trong cơ thể.

Colin đã được axetyl hóa, tức là axetylcolin rất hoạt động về mặt sinh lý và có một ý nghĩa lớn đối với hoạt động của mô thần kinh với tư cách là chất chuyển sự kích thích thần kinh

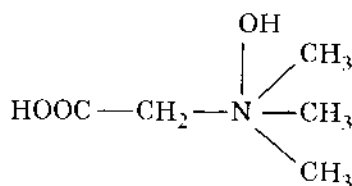


Đồng thời trong cơ thể colin là nguồn các nhóm metyl, người ta cho rằng phospholipit có liên quan đến các quá trình metyl hóa trong việc tổng hợp nhiều hợp chất quan trọng trong cơ thể sinh vật.

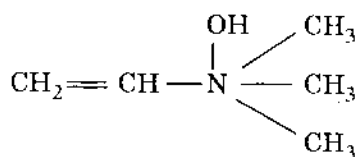
Colin dễ dàng bị oxy hóa lúc đầu biến thành aldehyt muscarin và sau đó biến thành axit betain có trong thực vật và động vật. Khi mất đi một phân tử nước, colin biến thành norin vốn có rất ít ở trạng thái liên kết trong thành phần của não, máu và thượng thận. Norin tự do rất độc. Cấu tạo hóa học của các dẫn xuất của colin như sau :



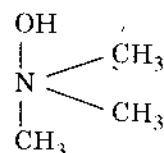
muscarin



betain



norin

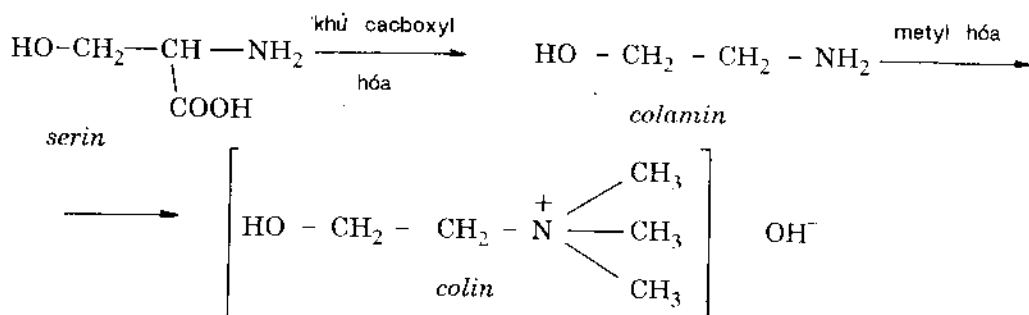


oxytrimetylamin

Phospholipit là những chất rắn, vô sắc nhưng hóa thành màu tối sẫm rất nhanh ở ngoài không khí do sự oxy hóa ở các liên kết đôi của các axit béo chưa no có trong thành phần của chúng. Chúng hòa tan rất dễ trong benzen, trong ete dầu hỏa, trong cloroform, v.v. Chúng không tan trong nước, nhưng có thể tạo thành các huyền phù phosphat khá bền và trong một số trường hợp chúng tạo thành các dung dịch keo.

Trong các hạt thực vật, trong tim gan của động vật, trong trứng của gia cầm, ... có rất nhiều phospholipit.

Phospholipit dễ dàng tạo thành phức hợp với protein ở dạng phospholipoprotein. Chúng có mặt trong tất cả các tế bào của người, động vật, thực vật và vi sinh vật, với tư cách tham gia chủ yếu trong việc hình thành nên vỏ tế bào và các màng nội tế bào.



Việc biến đổi tương hỗ của các phosphatit khác nhau rõ ràng là có thể tiến hành không những chỉ do sự cải biến của các bazơ nitơ mà còn bằng cách thay thế hoàn toàn các bazơ này.

Vì có cấu tạo bất đối (nguyên tử cacbon thứ hai của gốc glixerin luôn luôn bất đối) cho nên phosphatit có tính hoạt quang và tạo thành các đồng phân lập thể tương ứng.

Khi thủy phân bằng kiềm nhẹ thì chỉ liên kết este giữa axit béo và glixerin bị đứt. Chẳng hạn khi thủy phân bằng kiềm nhẹ phosphatidylcolin sẽ được sản phẩm là glixerol-3-phosphorylcolin.

Khi thủy phân trong môi trường kiềm mạnh thì không những cả hai gốc axit béo mà cả gốc bazơ hữu cơ (rượu) cũng bị tách ra. Trong điều kiện này, liên kết giữa glixerin và axit phosphoric tương đối bền vững, vì thế còn thu được cả sản phẩm là glixerol-3-phosphat. Hợp chất này sẽ bị phân giải khi thủy phân bằng axit.

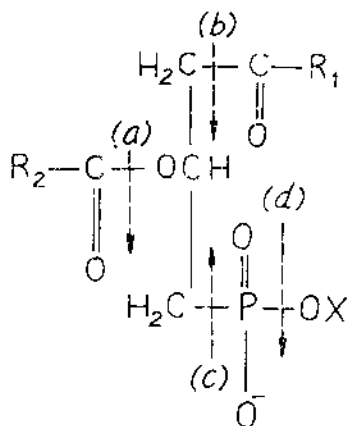
Phosphatit cũng có thể bị thủy phân bằng những enzym đặc hiệu gọi là phospholipaza. Phospholipaza thường được chia ra những enzym sau :

- Phospholipaza A có trong nọc rắn chỉ tách được gốc axit béo ở vị trí β . Do đó sản phẩm tạo thành có tên là lizophosphatit. Trong tế bào và mô bình thường không có lizophosphatit. Lizophosphatit làm phá hủy màng, nên độc ;

- Phospholipaza B tách được gốc axit béo thứ hai (hoặc cả hai gốc). Khi xử lý phosphatidylcolin bằng phospholipaza B ta sẽ thu được glixerol - 3 - phosphorylcolin ;

- Phospholipaza C thì xúc tác thủy phân liên kết giữa axit phosphoric và glixerin ;

- Còn phospholipaza D thì tách được gốc bazơ hữu cơ.



Vị trí tác dụng của phospholipaza:

- a - phospholipaza A;
- b - phospholipaza B;
- c - phospholipaza C;
- d - phospholipaza D

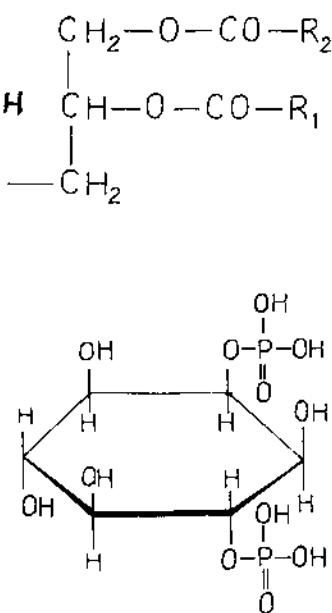
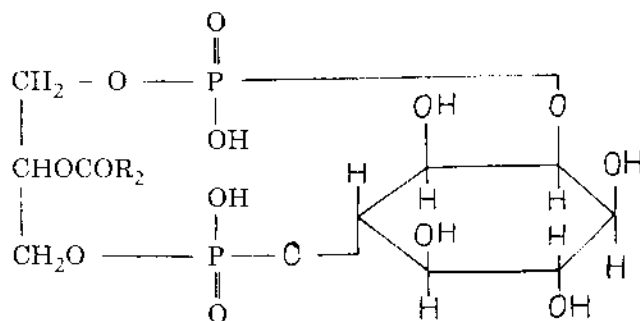
V.2.1.2. Inozitphospholipit

Cấu tạo của nhóm phospholipit này vẫn chưa được rõ. Ngoài inozit (1 mol), axit phosphoric (1 - 2 mol) và axit béo cao (1 - 2 mol) khi thủy phân các inozit phospholipit còn thấy glixerin (1 mol), galactosa và axit tartric.

Như ta đã thấy từ công thức, chúng cũng tương tự như phosphatit, trong đó bazơ nitơ được thay thế bằng gốc inozit.

Khi có mặt hai gốc axit phosphoric trong phân tử inozitphospholipit thì hai nhóm phosphat sẽ liên kết với gốc inozit ở vị trí mêtá :

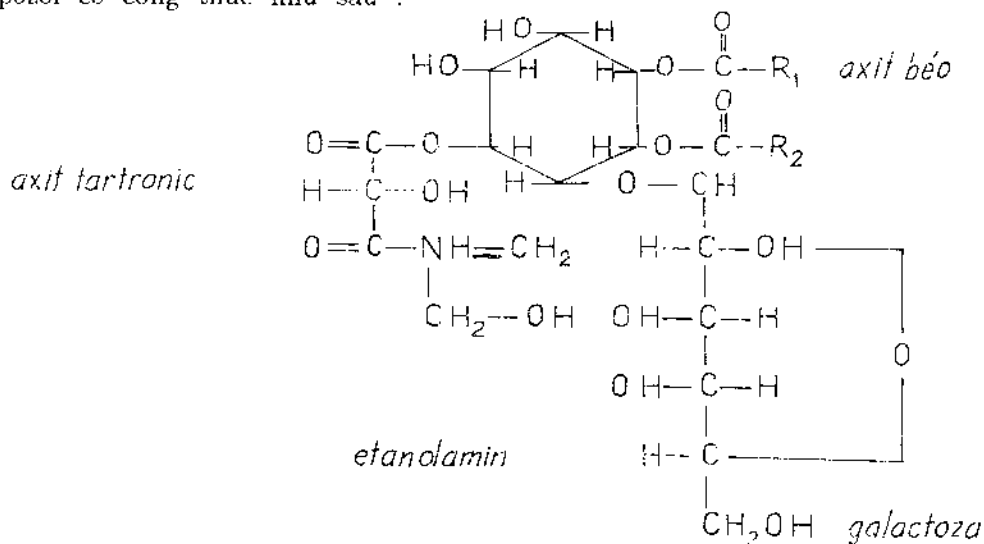
Và công thức của diphosphoinozit có thể trình bày như sau :



inozitol M. diphosphat

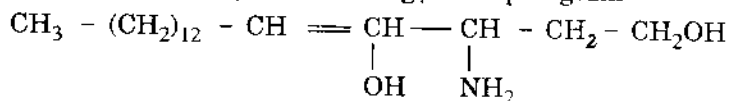
Nếu cho rằng inozit có rất nhiều đồng phân không gian do sự phân bố khác nhau của các nguyên tử hydro và của các nhóm hydroxyl so với mặt phẳng của vòng thì ở inozit phospholipit có rất nhiều dạng đồng phân.

Cũng cần nói thêm rằng từ đậu tương và từ mô não, người ta đã chiết xuất được một inozitphospholipit rất phức tạp, có tên là *lipozol*. Khi thủy phân hoàn toàn lipozol sẽ được inozit, axit phosphoric, axit tartronic, galactosa, etanolamin và axit béo. Lipozol có công thức như sau :



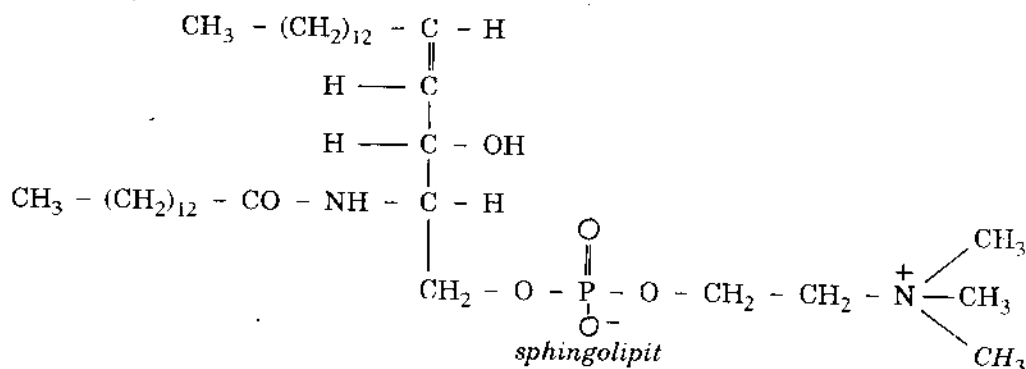
V.2.1.3. Sphingolipit

Sphingolipit hoặc sphingomielin cũng đều là những este được tạo nên từ axit béo, colin, axit phosphoric và amin rượu chưa no gọi là sphingozin



sphingozin

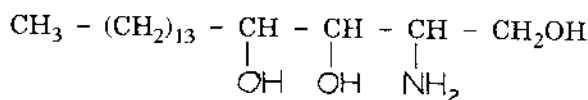
Khác với các phospholipit đã xét ở trên, gốc axit béo cao trong phân tử sphingolipit được kết hợp với amin-rượu hai nguyên tử bằng liên kết peptit (nghĩa là axit béo không phải được kết hợp với nhóm hydroxyl của rượu mà kết hợp với nhóm amin của amin - rượu) :



sphingolipit

Các cấu tử còn lại khác của sphingolipit tức là axit phosphoric và colin đều được kết hợp như ở phosphatit. Chính trong sphingolipit người ta đã phát hiện được axit lignoxeric và axit nervonic với một lượng đáng kể, các loại axit béo này có ít hơn ở trong các phospholipit khác.

Các sphingolipit đặc trưng đối với thế giới động vật hơn so với thế giới thực vật. Tuy nhiên từ các phospholipit có nguồn gốc thực vật (từ hạt ngô) người ta đã tách được amin-rượu hoàn toàn giống sphingozin gọi là *phitosphingozin* và có công thức như sau :



phitosphingozin

Sphingolipit không hòa tan trong ete etylic. Tính chất này được dùng để chiết xuất chúng khỏi các phospholipit khác.

Các cấu hình không gian rất phức tạp vốn liên quan với hiện tượng đồng phân quang học (hai nguyên tử cacbon bất đối trong phân tử) và liên quan với hiện tượng đồng phân *cis - trans* ở vị trí của liên kết đôi là đặc tính quan trọng của các sphingolipit.

Tính đặc hiệu về loài và tính đặc hiệu của các cơ quan đều có liên quan đến vấn đề này.

V.2.2. Glicolipit

Glicolipit là những lipid phức tạp không có phospho. Chúng được đặc trưng ở chỗ là trong thành phần của chúng có cấu tử glucit, thường là galactosa hoặc là các

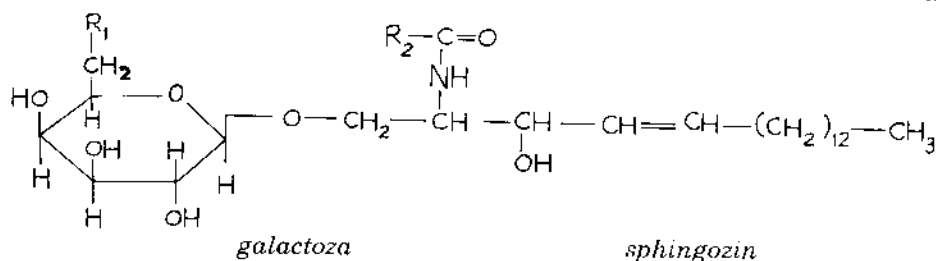
dẫn xuất của galactosa (N-axetyl-galactozamin, lactosa, ...).

Người ta chia glicolipit ra làm hai nhóm là xerebrozit và gangliozit.

2.2.1. Xerebrozit

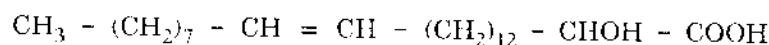
Xerebrozit được tạo nên từ amin-ruợu hai nguyên tử chưa no sphingozin, axit béo và galactosa. Các xerebrozit riêng biệt khác nhau bởi các axit béo có trong thành phần của chúng. Những axit béo này đều được tạo nên từ 24 nguyên tử cacbon và có thể có liên kết đôi và các nhóm hydroxyl.

Cấu tạo của xerebrozit có thể trình bày dưới dạng công thức chung sau đây :

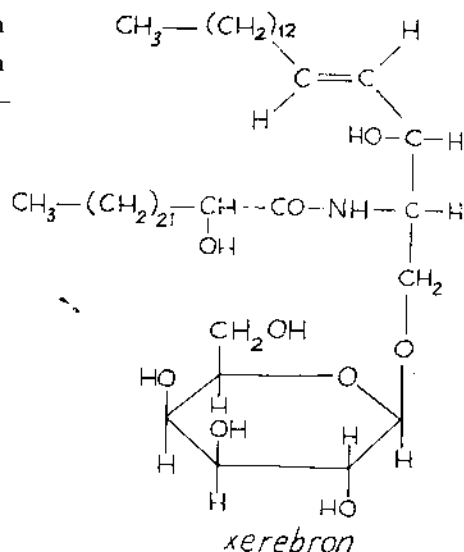
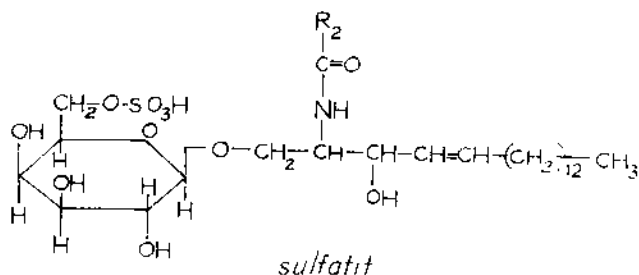


ở đây R_1 trong các xerebrozit là $-OH$, còn trong sulfatit R_1 là $-SO_3H$, R_2 là gốc axit béo (axit stearic, axit lignoxeric, axit nervonic, axit xerebronic, v.v.), axit béo này được kết hợp vào sphingozin nhờ liên kết peptit $-CO-NH-$

Các chất điển hình của xerebrozit là xerebron (hoặc frenozin), kerazin, nervon, oxynervon. Trong phân tử xerebron có axit xerebronic $CH_3-(CH_2)_{21}-CHOH-COOH$, trong phân tử kerazin có axit lignoxeric $CH_3-(CH_2)_{22}-COOH$, trong phân tử nervon có axit nervonic chưa no $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_{13}-COOH$, trong oxynervon có axit oxynervonic chưa no



Trong não người ta còn phát hiện thấy các xerebrozit có lưu huỳnh (sulfatit), trong đó có nhóm hydroxyl bậc nhất ở nguyên tử cacbon thứ sáu của galactosa được liên kết ở dạng este với axit sulfuric :

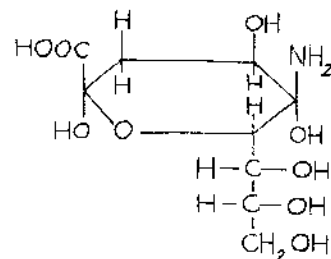


V.2.2.2. Gangliozit (hoặc mucolipit)

Đó là những glicolipit cao phân tử gồm có axit béo (thường là axit stearic), sphingozin, galactosa và glucoza galactozamin và axit noraminic.

Những năm gần đây người ta đã cho rằng axit noraminic có một ý nghĩa rất quan trọng và người ta coi nó như là một cấu tử của mô thần kinh.

Trong thiên nhiên, axit noraminic thường có ở dạng các dẫn xuất N-axetyl và N-glicozyl. Do đó các dẫn xuất này đều là những cấu tử không thể thay thế được của gangliozit vốn đảm bảo chức năng bình thường của hệ thần kinh.



axit noraminic

V.3. KHẢ NĂNG CHUYỂN HÓA CỦA LIPIT

Trong điều kiện bảo quản cũng như trong cơ thể, lipit có thể bị chuyển hóa để tạo thành những phẩm vật khác nhau. Các quá trình chuyển hóa này rất phức tạp, dưới tác dụng của một loạt các nhân tố và có enzym hoặc không có enzym xúc tác.

V.3.1. Sự ôi hóa

Khi bảo quản lâu, dưới tác dụng của nhiều nhân tố như ánh sáng, không khí, nhiệt độ, nước và vi sinh vật ... lipit bị thay đổi trạng thái, màu sắc và có mùi vị khó chịu. Thường người ta gọi quá trình tổng hợp này là sự ôi hóa. Thực chất của sự ôi hóa là quá trình oxy hóa. Tuy vậy, nếu dựa vào cơ chế phản ứng thì có thể phân ra ôi hóa do thủy phân và ôi hóa do oxy hóa.

V.3.1.1. Ôi hóa do phản ứng thủy phân

Phản ứng thủy phân lipit cũng có thể xảy ra, khi có enzym cũng như không có enzym xúc tác.

Trường hợp thứ nhất xảy ra trong pha "béo" và chỉ có nước hòa tan trong lipit (dầu, mỡ, ...) mới tham gia phản ứng nghĩa là phản ứng tiến hành trong môi trường đồng thể. Khi trong lipit có mặt nước với một lượng đáng kể, nhưng ở nhiệt độ thường, thì vận tốc phản ứng cũng rất bé. Vì lẽ ở nhiệt độ thường vận tốc phản ứng thủy phân rất chậm. Hơn nữa khả năng không hòa tan của pha nước trong pha "béo" cũng ngăn cản sự tiếp xúc cần thiết giữa chúng.

Trường hợp thủy phân do enzym xúc tác thường xảy ra ở trên bề mặt tiếp xúc giữa lipit và nước. Enzym lipaza xúc tác phản ứng thủy phân có thể có trong nguyên liệu cũng như do vi sinh vật mang vào.

Chúng ta đều biết lipaza là một globulin. Nó xúc tác không những phản ứng thủy phân mà cả phản ứng tổng hợp nữa. Do đó cân bằng phản ứng phụ thuộc vào từng điều kiện cụ thể mà có thể chuyển dịch về phải cũng như về trái. Theo Cretovich khi hàm ẩm cao thì sự thủy phân ưu thế hơn sự tổng hợp. Ngược lại, trong hạt khô thì sự tổng hợp lại ưu thế hơn. Lipaza có trong hạt và trong các cơ quan dinh dưỡng của cây. Lipaza có nhiều trong hạt thầu dầu. Tác dụng tối ưu của lipaza của hạt là ở 35 - 38°C. Hoạt độ của nó giảm xuống một cách đáng kể khi chế biến thủy nhiệt các hạt cũng như khi ép nóng các hạt có dầu. Phản ứng lipolizơ sẽ tăng mạnh khi hạt bị nghiền cơ học hoặc bị tổn thương do côn trùng. Lipaza có đặc hiệu thấp so với cấu trúc của lipit nhưng lại có đặc hiệu quang học cao đối với

những cơ chất có hoạt quang. Nói chung đối với những cơ chất không mang điện tích thì độ dài của mạch cacbon của axit béo tham gia trong lipid có ý nghĩa lớn đối với hoạt độ của lipaza

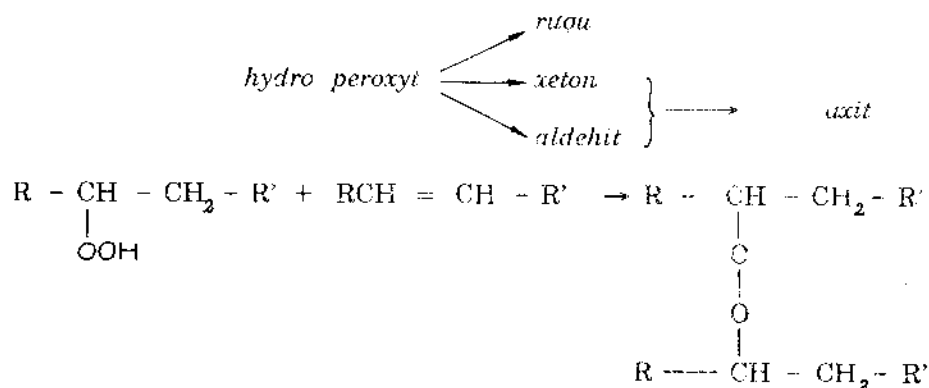
Trường hợp đơn giản nhất của sự ôi hóa do phản ứng thủy phân thường thấy khi bảo quản bơ và margarin. Khi đó sẽ giải phóng ra axit butiric là axit có mùi rất khó chịu.

Trong chế biến lương thực, để bảo quản được hạt, bột và tấm, vai trò quyết định là nhiệt độ và thủy phần. Chẳng hạn bột khi ở nhiệt độ dưới 5°C vẫn bảo quản được tốt ngay cả khi có hàm ẩm cao. Người ta nhận thấy rằng khi bảo quản bột có hàm ẩm cao hơn 15% thì phản ứng thủy phân chủ yếu là do enzym của nấm mốc. Khi đó độ axit chung sẽ tăng lên do tích tụ các axit hữu cơ hòa tan và bột sẽ có mùi vị khó chịu. Người ta còn nhận thấy đối với bột khô, nấm mốc không phát triển được, độ axit cũng tăng nhưng không có mùi vị axit, vì chủ yếu là tạo ra những axit béo không hòa tan trong nước.

V.3.1.2. Ôi hóa do phản ứng oxy hóa - khử

Ôi hóa theo kiểu này là dạng phổ biến nhất trong bảo quản các lipid. Thường người ta phân biệt hai loại: ôi hóa hóa học và ôi hóa sinh học.

Ôi hóa hóa học là quá trình tự oxy hóa. Khi đó xảy ra sự tấn công các gốc axit béo tự do cũng như kết hợp bởi oxy phân tử. Áp suất của oxy và lượng nối đôi trong phân tử axit béo có ảnh hưởng đến tiến trình phản ứng. Sản phẩm đầu tiên là hydro peroxyt. Từ đó tạo nên aldehyt no và không no, xeton, axit monoc và dicarboxylic, aldeaxit, xetoaxit, epoxyt, v.v. Ngoài ra còn có thể trùng hợp hóa các sản phẩm oxy hóa nữa :



Đa số những chất này có vai trò quyết định trong việc phát triển mùi vị.

Ôi hóa sinh hóa học lại bao gồm sự ôi hóa do enzym lipoxygenaza và sự ôi hóa xeton. Kiểu ôi hóa thứ hai này thường đặc trưng đối với lipid có chứa axit béo no với phân tử lượng trung bình và thấp, khi có hàm ẩm đáng kể. Khi đó axit béo bị β -oxy hóa và decarboxyl hóa, kết quả sẽ là tích tụ các alkylmetylketon có mùi khó chịu.

Khi lipid bị ôi hóa, thường bị mất hoạt tính vitamin. Vì lẽ khi đó các axit béo không no cao phân tử cũng như các vitamin đều bị phá hủy bởi các phẩm vật oxy

hóa tích tụ trong lipit.

Các sản phẩm oxy hóa của lipit thường làm vô hoạt enzym và đặc biệt làm giảm hoạt độ của *suxinoxidaza*, *xitocromoxidaza* và *colinoxidaza*.

Sản phẩm oxy hóa còn có khả năng phản ứng cao với protein. Hợp chất tạo thành này bền vững, không hòa tan trong nước cũng như trong dung môi hữu cơ và cũng không bị phân ly bởi enzym.

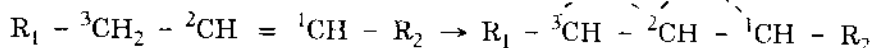
Người ta còn cho rằng sự phát triển của bệnh vữa xơ động mạch là do sự tạo thành phức giữa sản phẩm oxy hóa của lipit với protein có trong thành phần của thành huyết quản.

Lipit bị oxy hóa còn kìm hãm sự phát triển của động vật.

a) Cơ chế của quá trình ôi hóa hóa học

Chúng ta đều biết, trong mạch hydrocacbon của axit béo không no thì có khả năng phản ứng cao hơn cả là nguyên tử hydro ở cacbon α so với nối kép. Vì C_{α} này được quyết định bởi hiệu ứng liên hợp tĩnh của nối đơn và nối kép. Điều đó có nghĩa là nguyên tử hydro ở nhóm metylen nằm giữa hoặc bên cạnh nối đôi có khả năng phản ứng rất cao. Ở nhóm β -metylen hiện tượng đó bé hơn do sự yếu nhanh đi của hiệu ứng cảm ứng theo mạch cacbon. Thông thường đến mắt xích thứ tư của mạch cacbon (khoảng trên 6 Å) thì hiệu ứng cảm ứng này hầu như không còn.

Cùng với việc đứt nguyên tử hydro khỏi C_{α} so với nối kép, sẽ tạo thành hệ thống liên hợp từ electron π của nối đôi và electron p độc thân ở vị trí hóa trị tự do :



Do sự liên hợp đó, H không những ở vị trí 3 mà ở vị trí 1 cũng rất hoạt động. Kết quả là phản ứng có thể xảy ra với xác suất bằng nhau ở vị trí 1 và 3.

Quá trình ôi hóa hóa học là phản ứng chuỗi nên thường có ba thời kỳ sau.

Phát sinh

Đầu tiên, phản ứng được khơi mào bằng việc một vài phân tử lipit (RH) bị oxy hóa để tạo thành gốc tự do :



$R^{\cdot}$ - gốc của axit béo no hoặc không no tự do hoặc gốc của axit béo trong phân tử glixerit ;

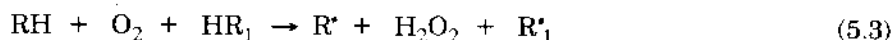
$H^{\cdot}$ - nguyên tử H ở C_{α} so với nối đôi, hoặc nguyên tử H của nhóm metylen bất kỳ trong axit béo no.

Để tạo thành gốc, nghĩa là để đứt liên kết C-H trong phản ứng (5.1) đòi hỏi năng lượng là 70 - 100 kcal/mol.

Tuy nhiên khi có oxy hòa tan thì tương tác giữa RH ban đầu với oxy sẽ xảy ra một cách mạnh mẽ hơn. Vì lẽ sự tạo thành gốc theo phản ứng lưỡng phân (5.2) đòi hỏi năng lượng chỉ là 47 kcal/mol :

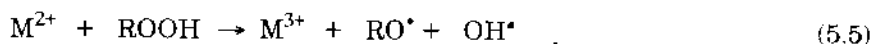
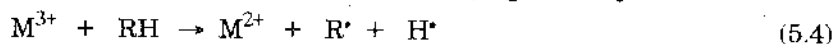


Trường hợp khi nồng độ RH cao thì có thể xảy ra phản ứng tam phân :



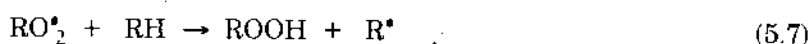
phản ứng này đòi hỏi năng lượng còn bé hơn phản ứng lưỡng phân.

Gốc tự do cũng có thể phát sinh khi có ion kim loại giao chuyển :



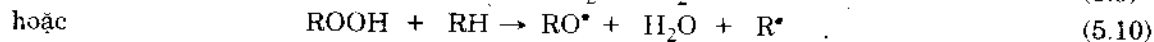
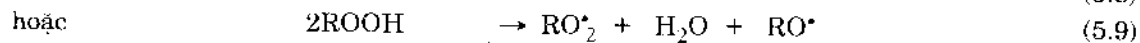
Phát triển

Gốc tự do R^* hoặc RO^* được tạo thành do quá trình khơi mào sẽ bắt đầu chuỗi chuyển hóa oxy hóa :



Phản ứng (5.6) đặc biệt nhanh, thực tế không cần năng lượng hoạt hóa. Còn năng lượng hoạt hóa của phản ứng (5.7) là 4 - 12 kcal/mol. Từ đây ta thấy gốc RO_2^* là gốc chủ đạo trong mạch oxy hóa. Và phản ứng có ý nghĩa quyết định vận tốc phát triển của quá trình tự oxy hóa là phản ứng tương tác giữa gốc RO_2^* với phân tử lipid [phản ứng (5.7)].

Từ hydro peroxyt sẽ phân mạch để cho những gốc tự do khác theo đường hướng sau :



Việc đứt liên kết O - O để tạo thành hai gốc tự do theo phản ứng (5.8) đòi hỏi năng lượng hoạt hóa 30 - 35 kcal/mol.

Sự liên hợp các hydro peroxyt thành dime [theo phản ứng (5.9)] sẽ thuận lợi khi nồng độ hydro peroxyt lớn. Việc tạo nên dime (do liên kết hydro) sẽ làm yếu liên kết O - H và O - O, do đó làm giảm bớt năng lượng phân giải dime thành các gốc.

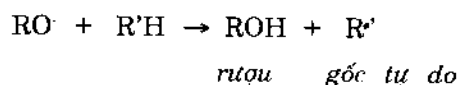
Hydro peroxyt có thể phân giải theo phản ứng (5.10) đòi hỏi năng lượng hoạt hóa bé hơn phản ứng đơn phân (5.8).

Cần chú ý rằng gốc peroxyt có xu hướng phản ứng với sản phẩm đã bị oxy hóa hơn là với phân tử chưa bị oxy hóa do chỗ trong sản phẩm đã bị oxy hóa thường chứa các liên kết C - H có khả năng phản ứng hơn.

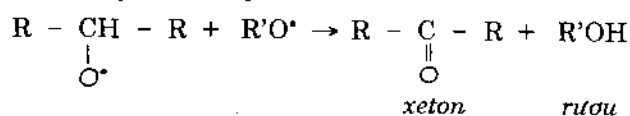
Gốc peroxyt cũng có thể đứt nguyên tử H - đặc biệt ở vị trí β do quá trình nội phân và cũng có thể kết hợp với nối đôi olefin. Vì vậy việc chuyển hóa các gốc peroxyt sẽ đưa tới tạo nên không những hydro peroxyt mà cả peroxyt polyme, peroxyt vòng, oxyt, aldehyt và các sản phẩm khác.

Do quá trình phát triển của chuỗi phản ứng oxy hóa với các phản ứng phân mạch (5.8), (5.9), (5.10) nên tích tụ gốc alcocoxyl RO^* , peroxyt RO_2^* và hydroxyl $^*OH$.

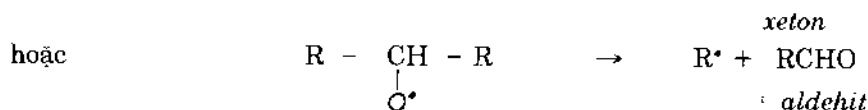
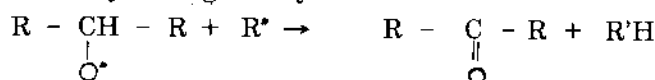
Từ gốc alcocoxyl có thể tạo nên những sản phẩm thứ cấp như rượu, xeton, aldehyt, v.v. :



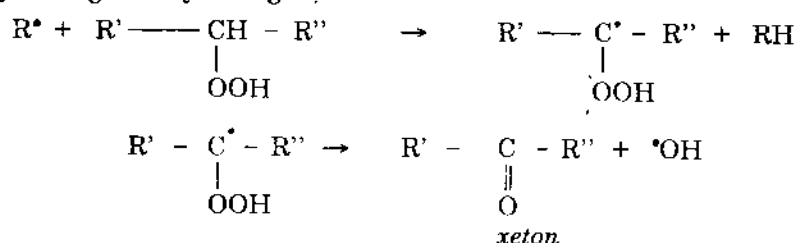
Tương tác của hai gốc alcocxyl :



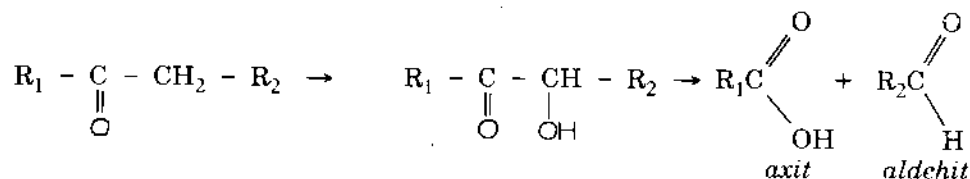
Tương tác của gốc alcocxyl với gốc alkyl :



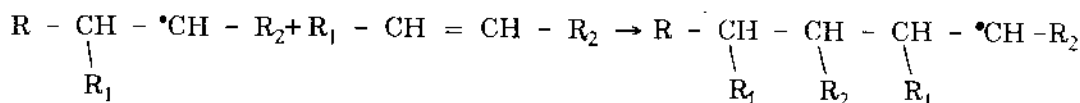
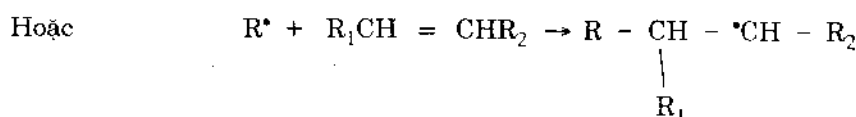
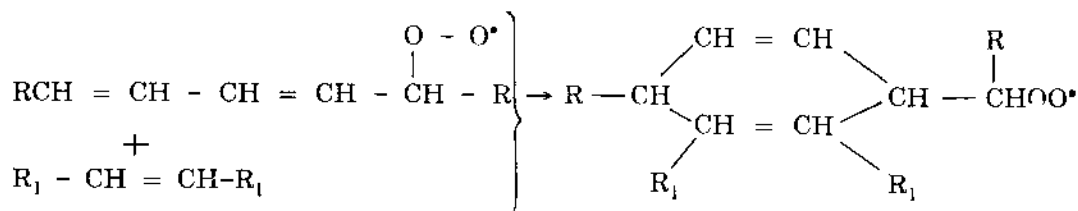
hoặc, từ hydro peroxyt và gốc alkyl cũng tạo ra xeton :

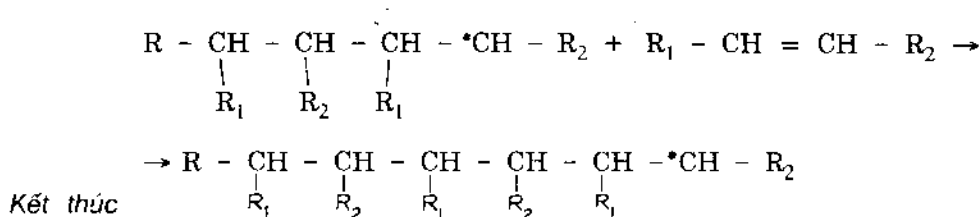


Aldehyd cũng có thể được tạo thành từ xeton bằng cách oxy hóa chúng đến α - xetohydroperoxyt rồi đến aldehyd và axit :

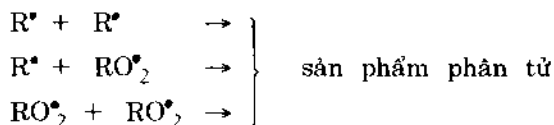


Ngoài ra, trong lipid bị oxy hóa còn có thể tạo thành các sản phẩm trùng hợp cao phân tử :





Việc đứt mạch, nghĩa là mất các gốc tự do xảy ra chủ yếu do kết quả tương tác của các gốc theo cơ chế lưỡng phân :



Năng lượng hoạt hóa của các phản ứng này rất không đáng kể (1 - 2 kcal/mol) do đó vận tốc phản ứng rất lớn.

b) Các yếu tố ảnh hưởng đến vận tốc oxy hóa

Các yếu tố kích thích

Ảnh hưởng của axit béo tự do : axit béo tự do có tác dụng xúc tác quá trình oxy hóa, làm tăng nhanh sự phân giải hydro peroxyl thành các gốc.

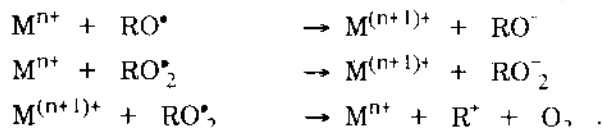
Ảnh hưởng của oxy : vận tốc tự oxy hóa phụ thuộc vào lượng oxy trong môi trường. Vì sự phát sinh chuỗi phản ứng chủ yếu phụ thuộc vào $\text{RH} + \text{O}_2$.

Ảnh hưởng của nhiệt độ : nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến vận tốc phản ứng hóa học. Tăng nhiệt độ, lượng peroxyl tạo thành tăng. Ở nhiệt độ 40 - 45°C và cao hơn, sự phân giải hydro peroxyl sẽ tăng.

Ảnh hưởng của trạng thái lipid : bề mặt tiếp xúc của chất béo với không khí càng lớn thì vận tốc oxy hóa càng cao. Vận tốc tự oxy hóa còn phụ thuộc vào chiều dày của lớp. Khi lớp dày thì oxy xâm nhập khó. Giảm nhiệt độ đến lúc chất béo chuyển sang trạng thái rắn thì vận tốc oxy hóa cũng giảm.

Ảnh hưởng của ion kim loại chuyển tiếp : các ion cũng như các hợp chất của kim loại chuyển tiếp có tác dụng xúc tác sự oxy hóa lipid. Thực nghiệm cho thấy rằng khi có mặt sắt ở trong dầu với lượng 0,2 - 1,0 mg/kg sắt sẽ làm giảm độ bền của dầu đối với oxy hóa 20 - 50%. Với Cu chỉ cần 0,05 - 0,2 mg/kg sẽ làm giảm độ bền của dầu đối với oxy hóa 20 - 50%.

Ion kim loại chuyển tiếp có các electron độc thân và thực chất là gốc. Nhưng tính chất "gốc" ở chúng thể hiện yếu do đó chúng có thể tồn tại trong dung dịch với nồng độ lớn. Tuy nhiên chúng có thể chuyển hoặc lấy electron từ một hạt bão hòa hóa trị nào đó để tạo thành gốc tự do hoạt động hoặc gốc ion.

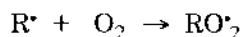


Ảnh hưởng của năng lượng mặt trời và tia ion : năng lượng ánh sáng đặc biệt là tia cực tím và tia ngắn của quang phổ nhìn thấy có tác dụng xúc tác quá trình oxy hóa lipid. Có lẽ năng lượng ánh sáng sẽ quang phân hydro peroxyl thành các gốc tự do.

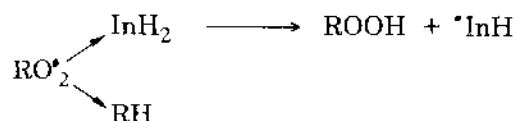
Ảnh hưởng của nước : người ta nhận thấy rằng, nước có tác dụng làm tăng tính ổn định của chất béo sữa đối với sự oxy hóa ở nhiệt độ 95°C. Và người ta cũng nhận thấy khi ở 50°C, nước không có ảnh hưởng gì đến mỡ lợn.

Ảnh hưởng của các yếu tố kim hãm

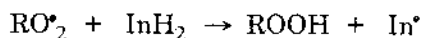
Ở trên chúng ta đã thấy phản ứng:



xảy ra tức thời, do đó vận tốc quá trình oxy hóa do nồng độ $RO_2^{\bullet}$ quyết định. Trị số của nồng độ đó được xác định bằng tỉ lệ vận tốc tạo thành và mất đi của các gốc tự do. Có thể giảm vận tốc phản ứng $RO_2^{\bullet} + RH$ bằng cách hướng các phản ứng của gốc peroxyt theo chiều khác. Điều đó đạt được bằng cách đưa vào trong lipid chất chống oxy hóa InH_2 , nghĩa là chất có khả năng phản ứng dễ dàng với gốc $RO_2^{\bullet}$ hơn :



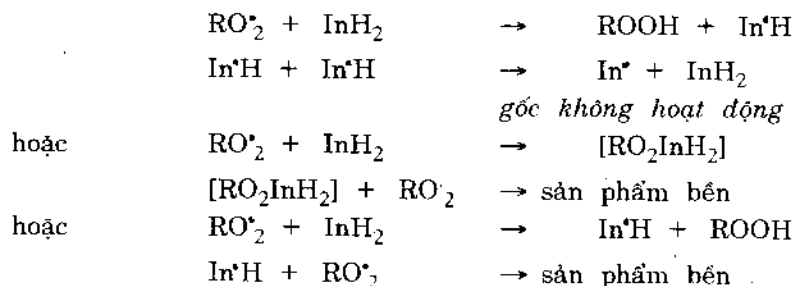
Kết quả là thay gốc peroxyt $RO_2^{\bullet}$ bằng gốc của chất chống oxy hóa $In^{\bullet}$ là gốc yếu không thể tương tác với phân tử lipid. Các gốc $In^{\bullet}$ sẽ bị vô hoạt do sự tổ hợp :



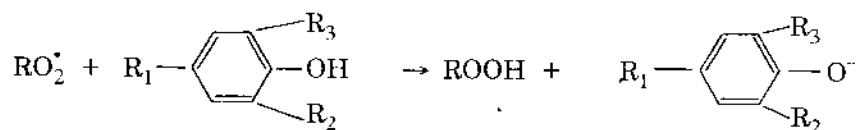
Điều kiện đó thỏa mãn được bằng cách đưa vào những chất chống oxy hóa có bản chất phenol hoặc amin v.v. Phenol có năng lượng liên kết của nguyên tử hydro trong nhóm hydroxyl rất bé (60 - 70 kcal) so với năng lượng liên kết của nguyên tử hydro trong nhóm metylen của mạch cacbon (80 - 90 kcal). Một cách khác để giảm nồng độ $RO_2^{\bullet}$, là giảm vận tốc sinh thành ra chúng.

Kim hãm sự oxy hóa bằng cách làm đứt mạch

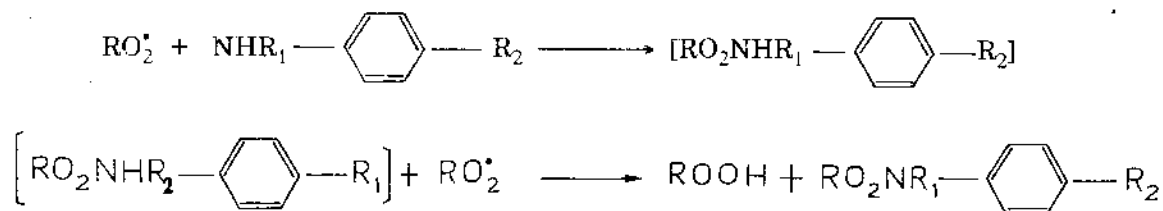
Cơ chế tác dụng của những chất chống oxy hóa loại này (như phenol, amin) có thể như sau :



Ví dụ, với chất chống oxy hóa là phenol có thể xảy ra phản ứng trao đổi sau :



Với chất chống oxy hóa là amin thì có thể kết hợp với gốc RO_2^* nhờ cặp electron tự do của nguyên tử nitơ.

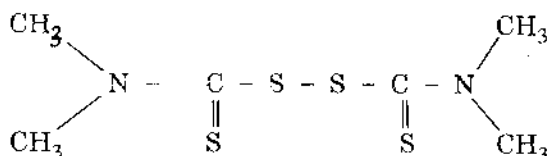


Kìm hãm sự oxy hóa bằng cách làm giảm vận tốc phát sinh mạch

Ví dụ, các sulfua có khả năng phá hủy hydro peroxit :

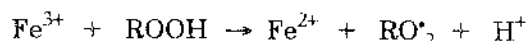
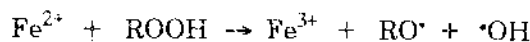


Các sulfua kiểu này như tiuram (tetratien A, tetrametyltiuramdisulfua)

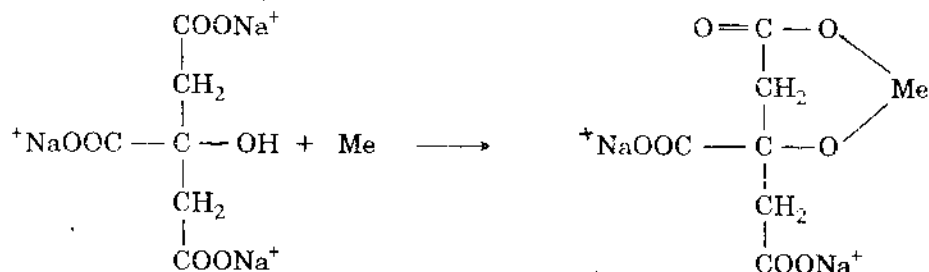


Vô hoạt các hợp chất chứa kim loại có hoạt động xúc tác

Các kim loại chuyển tiếp có thể tương tác với hydro peroxit để tạo thành gốc tự do, đồng thời kim loại chuyển sang hóa trị khác :



Vì vậy phải chọn những chất chống oxy hóa có khả năng tạo phức với ion kim loại qua đó mà "phong tỏa" được sự chuyển electron từ mức N tới mức M, nghĩa là loại trừ được khả năng chuyển hóa trị. Những chất chống oxy hóa loại này như axit xitric, axit malic, axit fitinic, ...



Axit cacboxymethylmercaptosuxinic ($\text{HOOC} - \text{CH}_2\text{SCH}(\text{COOH}) - \text{CH}_2\text{COOH}$) có "tính

năng" khá mạnh thường được dùng để bảo quản dầu đậu, dầu bông.

Trong bảo quản lipid, người ta có thể dùng cộng tính của hai chất để làm tăng hiệu quả của chất chống oxy hóa. Chất làm tăng tính chất chống oxy hóa của chất kia gọi là chất hiệp trợ. Chất hiệp trợ có thể có hoặc không có tính chất chống oxy

hóa. Bản chất của chúng cũng có thể là vô cơ hay hữu cơ. Axit phosphoric, axit ascorbic, axit xitric và muối của chúng, polyphosphat, axitamin, xephalin là những chất thuộc loại đó. Cơ chế hiệp trợ của chúng là ở chỗ chúng là những chất cho hydro để khử các dạng chất kim hãm đã bị oxy hóa. Chẳng hạn kim hãm oxy hóa chất béo bằng hỗn hợp axit ascorbic và quinon. Axit ascorbic chuyển hydro đến quinon (khử quinon thành semiquinon hoặc hydroquinon) để cho chất này tác dụng được với gốc peroxyt. Quá trình chuyển hydro cũng được coi là sự hiệp trợ của axit ascorbic với tocoferol. Tác dụng hiệp trợ của α -alanin đến hydroquinon (α -axitamin đến phenol nói chung) trong chống oxy hóa cho dầu hướng dương là ở chỗ khi bị deamin hóa đến axit piruvic thì đồng thời cũng khử được hydroquinon đã bị oxy hóa.

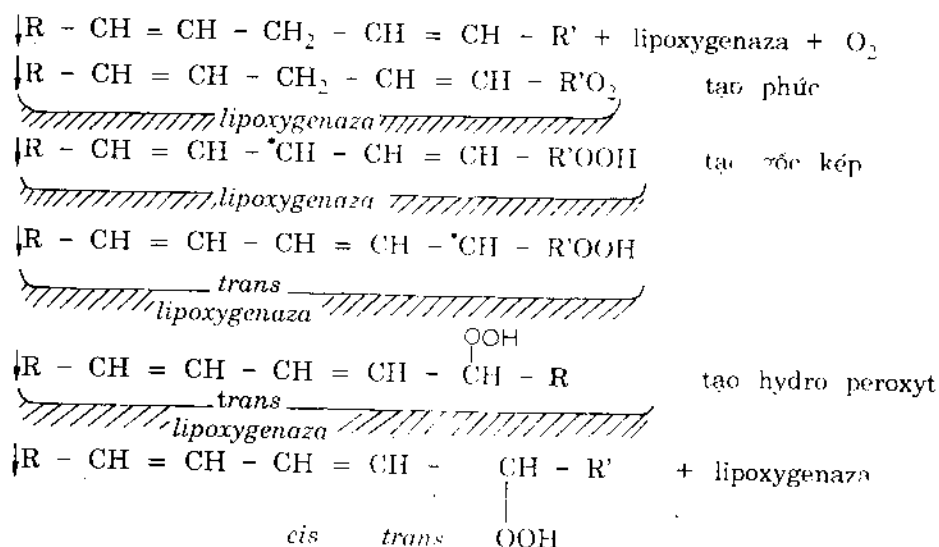
Các chất như tocoferol, xemazol, phosphatit, gossipol, quecsetin, ... là những chất chống oxy hóa tự nhiên, vì thường chứa trong các nguồn lipid tự nhiên. Trong quá trình khai thác và tinh luyện những chất này có thể bị mất đi, do đó những nguồn lipid này dễ bị ôi hóa. Một số chất chống oxy hóa cũng được tân tạo ra khi gia công các hạt có dầu như melanoidin, gossiphosphatit, melanophosphatit, ... Hiện nay người ta còn sử dụng nhiều chất chống oxy hóa tổng hợp như butyloxyanizol, butyloxytoluen, dodexigalat, v.v. trong bảo quản dầu mỡ.

c) Cơ chế của quá trình ôi hóa sinh hóa học

Ôi hóa do enzym lipoxydaza

Trong quá trình khai thác cũng như bảo quản, lipid và đặc biệt là dầu mỡ, có thể bị oxy hóa dưới tác dụng xúc tác của enzym lipoxydaza để tạo thành những sản phẩm khác nhau.

Lipoxydaza hay lipoxygenaza là enzym oxy hóa khử, thường có tên gọi hệ thống là linoleat : O_2 - oxydoreductaza (1.13.1.13). Enzim lipoxygenaza xúc tác sự oxy hóa các axit béo không no chứa 2-3 nối kép (hoặc nhiều hơn) như axit linoleic, linolenic, axit arachidic. Điểm đặc biệt là lipoxygenaza chỉ oxy hóa dạng *cis* - *cis* còn dạng *cis* - *trans* hoặc *trans* - *trans* thì hoàn toàn không tác dụng. Cả ba axit này đều bị oxy hóa với vận tốc như nhau. Điểm khác là các hydro peroxyt được tạo thành ở đây có hình thể *cis* - *trans* và có hoạt động quang học. Cơ chế tác dụng của lipoxygenaza như sau :



Tappel và Boyer cho rằng mỗi một phân tử linoleat đều bị oxy hóa trực tiếp dưới tác dụng của enzym. Đầu tiên tạo thành phức hợp giữa linoleat, oxy và lipoxigenaza. Tiếp đó gốc kép được tạo thành do kết quả của sự chuyển hydro từ linoleat tới oxy. Một nối đôi bị chuyển chỗ để tạo nên một hệ thống nối đôi luân hợp. Phức hợp bị phân ly giải phóng ra enzym lipoxidaza và hydro peroxyt có dạng *cis-trans*. Từ hydro peroxyt sẽ chuyển hóa một cách bình thường để tạo ra epoxyt, aldehyt, xeton và những phẩm vật oxy hóa khác.

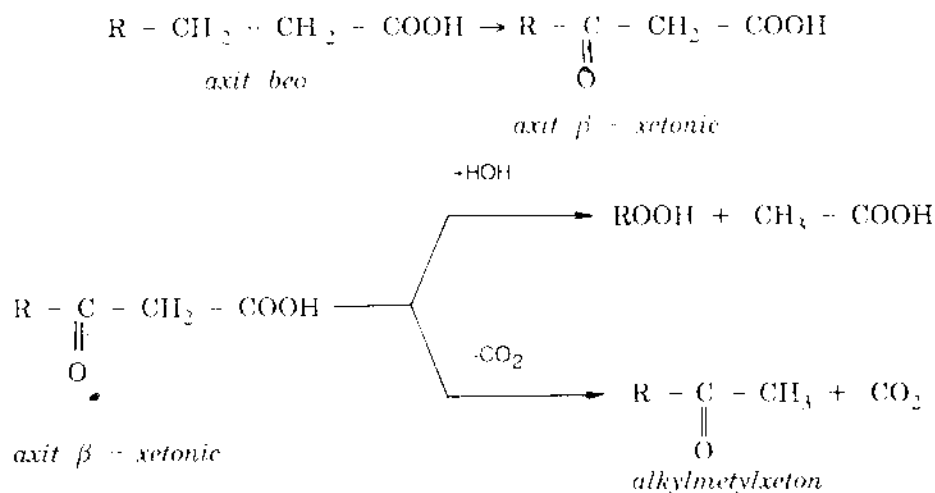
Nhiều hợp chất hữu cơ là những chất kìm hãm của lipoxigenaza. Propylgalat, diphenylamin và oxyquinolin là những chất kìm hãm lipoxigenaza. Tác dụng kìm hãm của những chất này là ở chỗ làm giảm vận tốc oxy hóa linoleat và hấp thụ oxy.

Lipoxigenaza có nhiều trong hạt đậu tương và trong hạt hòa thảo. pH tối ưu của lipoxigenaza của đậu tương là 9,0 và của các cây khác là 7,0. Lipoxigenaza của động vật có pH tối ưu từ 4 - 7.

Ôi hóa xeton

Ôi hóa xeton thường đặc trưng đối với lipit có chứa axit béo no, phân tử lượng trung bình và thấp. Chẳng hạn, trong bảo quản bơ và margarin khi bị nhiễm nấm mốc (*Aspergillus*, *Penicillium*) thường xảy ra kiểu ôi hóa này. Dưới tác dụng của các enzym của vi sinh vật, axit béo bị β -oxy hóa và decarboxyl hóa mà kết quả là tạo ra các alkylmetylketon có mùi khó chịu.

Sơ đồ phản ứng như sau :

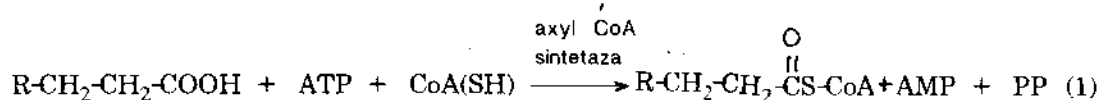


d) Sự oxy hóa các axit béo trong cơ thể sinh vật

Trong mô động vật cũng như thực vật, các axit béo còn bị chuyển hóa oxy hóa theo một đường hướng riêng, thực hiện theo từng nấc, mỗi nấc axit béo lại bị cắt ngắn đi một mảnh hai cacbon ra khỏi phân tử. Các axit béo chưa no, trước tiên phải được khử thành axit béo no sau đó mới bị oxy hóa theo con đường đó. Quá trình oxy hóa axit béo theo đường hướng này cũng có tên là β -oxy hóa. Lựa đó các phản ứng của quá trình β -oxy hóa được minh họa ở hình 5.2.

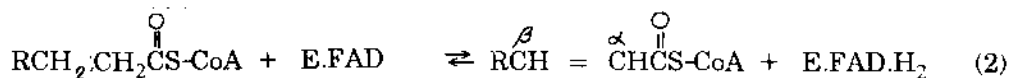
Quá trình β -oxy hóa axit béo bao gồm năm phản ứng :

- Phản ứng 1 là phản ứng hoạt hóa axit béo nhờ axylcoenzim A CoA-SH, ATP và sự xúc tác của enzym axyl - CoA - sintetaza :



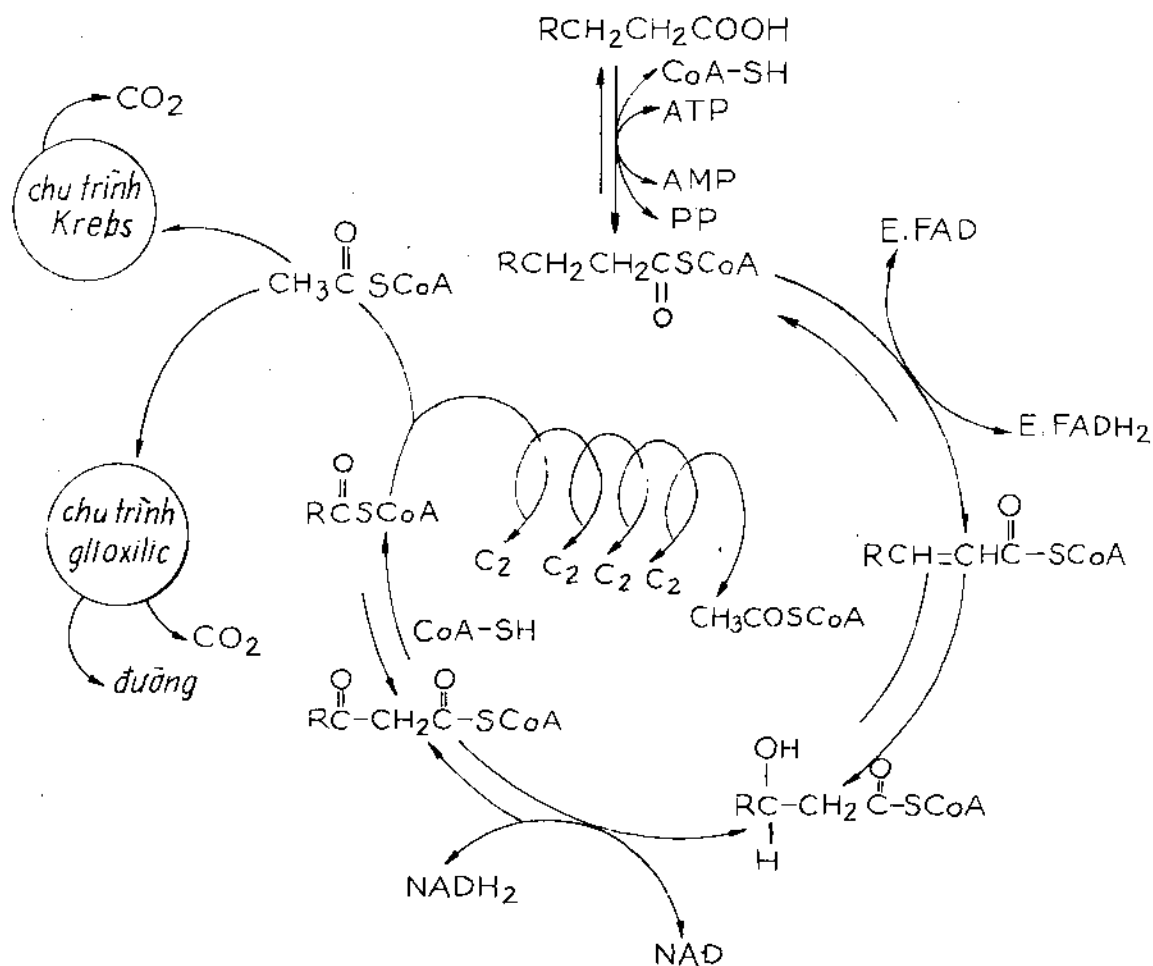
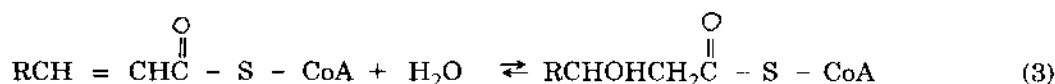
Pirophosphat vừa tạo thành sẽ bị phân giải thành axit phosphoric (khi có enzym pirophosphataza xúc tác) do đó cân bằng phản ứng sẽ chuyển dịch về phía phải ;

- Phản ứng thứ 2 là phản ứng oxy hóa axylCoA nhờ enzym axylCoA-dehydrogenaza. Enzim này là một flavoprotein có nhóm ngoại là FAD :



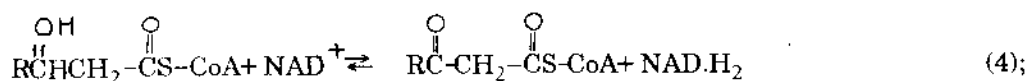
Các enzym này khác nhau về tính chất lý học và về tính chất đặc hiệu theo độ dài của mạch cacbon của cơ chất ;

- Phản ứng 3 do enzym enoil - CoA - hydrataza xúc tác :

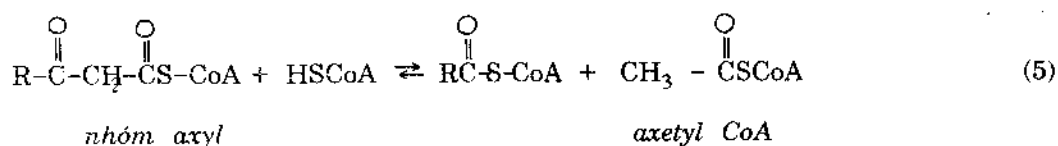


Hình 5.2. Quá trình β-oxy hóa

- Phản ứng 4 do enzym β - oxyaxylCoA-dehydrogenaza chứa nhóm ngoại là NAD xúc tác :



- Phản ứng 5 bao gồm việc chuyển nhóm axyl của phân tử β -xetoaxylCoA lên một phân tử coenzim A mới. Enzim xúc tác phản ứng này là β -xetoaxylCoA tiolaza (vì phản ứng này thực chất là đứt liên kết C-C và kết hợp nhóm -SH vào vị trí bị đứt do đó có tên là phản ứng tiao - phân) :



Như vậy là cứ qua năm phản ứng thì phân tử axit béo lại bị ngắn đi hai nguyên tử cacbon để tạo thành axit axetic (dưới dạng axetylCoA). Quá trình cứ thế được lặp đi lặp lại nhiều lần cho đến khi toàn bộ sản phẩm cuối cùng là axetyl CoA. Từ axetylCoA sẽ đi vào chu trình Krebs (hoặc chu trình glioxilic) để cung cấp năng lượng cho cơ thể sinh vật.

Khi oxy hóa một phân tử glucoza sẽ cung cấp cho cơ thể 38 mol ATP. Khi oxy hóa một phân tử lipid đơn giản (ví dụ, tristearin) thì sẽ cung cấp cho cơ thể 458 mol ATP.

Oxy hóa glixerin đến CO_2 và H_2O sẽ tạo ra : $19 - 2 = 17$ mol ATP

Oxy hóa 3 gốc axit stearic (C_{18}) tới axetyl CoA

sẽ tạo ra :

$(40 \times 3) - 3 = 117$ mol ATP

Oxy hóa 27 phân tử axetylCoA đến CO_2 và H_2O

sẽ tạo được

$12 \times 27 = 324$ mol ATP

Tổng cộng : 458 mol ATP

Như vậy cùng với gluxit, lipid cũng là nguồn năng lượng dự trữ to lớn của cơ thể.

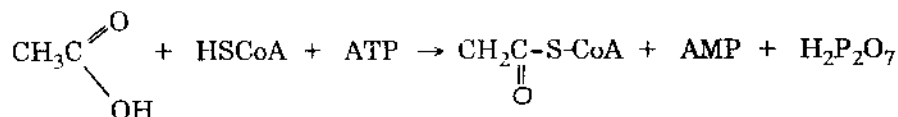
V.4. TỔNG HỢP LIPIT

Hợp phần quan trọng của lipid là axit béo. Vì vậy trước lúc xét cơ chế tổng hợp nên lipid chúng ta cần xét quá trình sinh tổng hợp nên các axit béo.

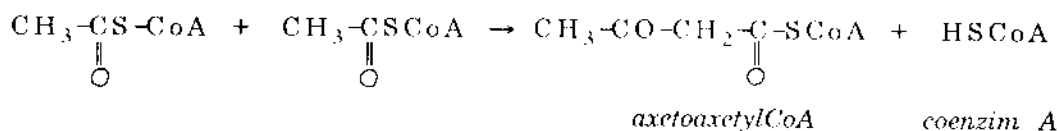
V.4.1. Sinh tổng hợp axit béo

Quá trình sinh tổng hợp axit béo bao gồm năm phản ứng sau :

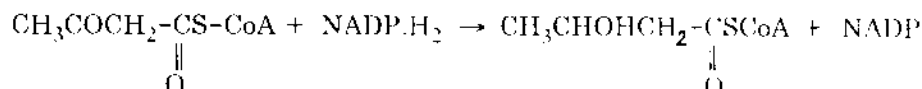
1- Tạo nên axetyl coenzim A. Để thực hiện được phản ứng này phải có năng lượng của ATP và enzym axetyl-CoA-sintetaza xúc tác :



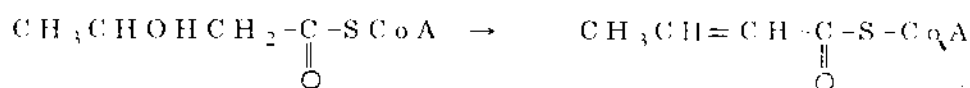
2- Ngưng tụ hai phân tử axetylCoA với nhau. Phản ứng này do enzym axetoaxetylCoA - tiolaza xúc tác :



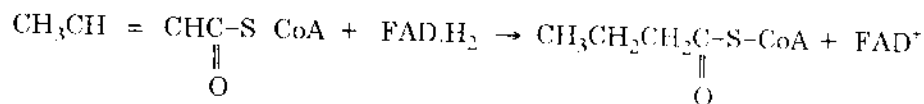
3- Dưới tác dụng của axetoaxetylCoA - reductaza, axetoaxetylCoA bị khử để tạo thành 3 - oxybutyryl - coenzim A :



4- Dưới tác dụng của enoylCoA - hydrataza sẽ tạo thành crotonylCoA :



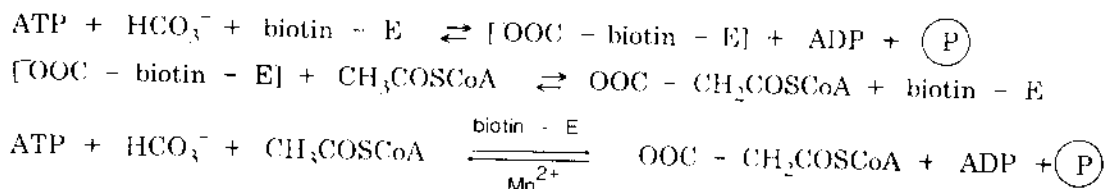
5- Dưới tác dụng của enzym butyrylCoA - dehydrogenaza có nhóm ngoại là FAD, crotonylCoA bị khử và tạo thành butyrylCoA theo phản ứng :



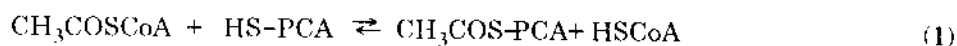
Như vậy từ axetylCoA và qua một chuỗi năm phản ứng như trên mạch axit béo lại được nối dài thêm hai nguyên tử cacbon nữa. Khi loại trừ coenzim A các axit béo tự do sẽ được hình thành và số nguyên tử cacbon trong chúng luôn luôn chẵn.

Trong những năm gần đây người ta cũng đã tìm thấy một cơ chế sinh tổng hợp axit béo cao từ malonylCoA. Quá trình này được xúc tác bởi hai hệ enzym : axetylCoA - cacboxylaza và sintetaza của axit béo.

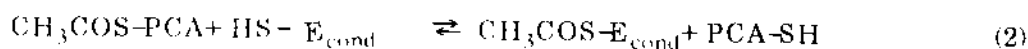
Enzim axetylCoA - cacboxylaza xúc tác phản ứng cacboxyl hóa axetylCoA để tạo thành malonylCoA. Người ta gọi enzym này là enzym phụ thuộc biotin vì để phản ứng tiến hành được phải có biotin. ATP và Mn^{2+}



Còn sintetaza của axit béo thì có cấu tử trung tâm là một protein vận chuyển nhóm axit (viết tắt là PCA từ tiếng Anh Acyl Carrier Protein). PCA không chứa xistein và xistin nhưng có nhóm SH của $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$. Gốc $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ được nối với axit pantotenin và axit này lại được nối với cấu tử protein nhờ nhóm OH của serin. Do đó PCA có thể viết PCA - SH.

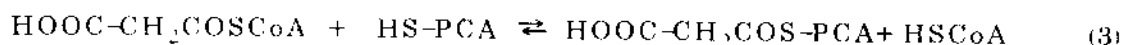


Phản ứng 1 do enzym axetylCoA - PCA - transaxylaza xúc tác.

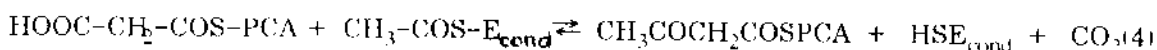


Phản ứng 2 do enzym ngưng tụ (viết tắt E_{cond}) xúc tác, enzym này có chứa nhóm SH do đó có thể viết HS- E_{cond} .

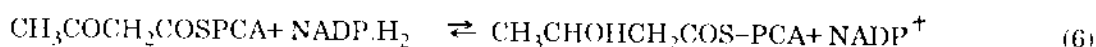
PCA-SH vừa giải phóng ra từ phản ứng 2 sẽ tương tác với malonylCoA do enzym malonyl CoA - PCA - transaxylaza xúc tác :



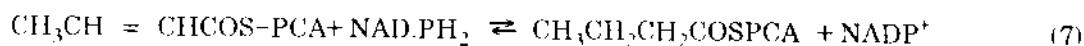
Tiếp đó xảy ra phản ứng ngưng tụ giữa $\text{CH}_3\text{COS-E}_{\text{cond}}$ và dẫn xuất malonyl của PCA để tạo thành dẫn xuất β -xetoaxyl của PCA :



Dưới tác dụng của enzym β -xetoaxylPCA - reductaza sẽ tạo thành dẫn xuất β -hydroxy-axyl của PAC :



Phản ứng 6 do enzym β -hydroxyaxylPCA - dehydrataza xúc tác :

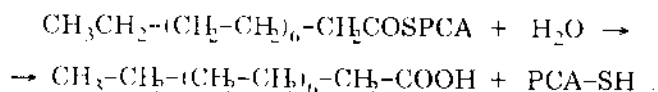


trans 2-enoil PCA tioeste

dẫn xuất butyryl của PCA

Phản ứng 7 do enzym PCA-reductaza xúc tác.

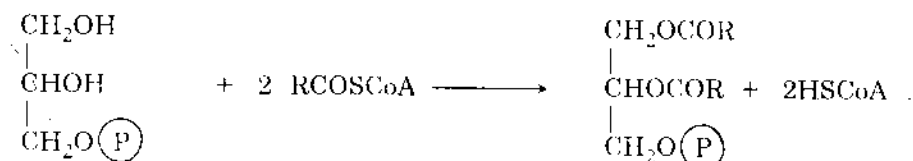
Quá trình cứ lặp lại như thế cho đến khi tạo thành dẫn xuất 16 C (tức là panmityl-PCA). Dưới tác dụng của enzym panmityl-PCA-tioesteraza dẫn xuất panmityl của PCA bị thủy phân để tạo ra axit panmitic tự do :



Khi mạch cacbon của axit béo đã đạt đến C_{16} sẽ xảy ra sự cạnh tranh giữa enzym axyltransferaza và enzym ngưng tụ với malonylPCA. Khi đó ái lực của malonylPCA với hệ enzym ngưng tụ bị giảm, nhưng với enzym axyltransferaza thì tăng lên. Do đó enzym axyltransferaza sẽ gắn dẫn xuất panmitylPCA vào axit glixerophosphoric để tạo thành axit lizophosphatidic.

V.4.2. Tổng hợp lipid đơn giản

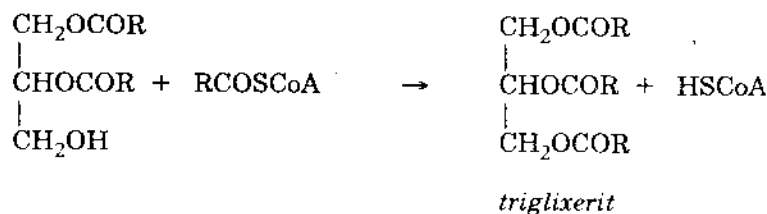
Từ glixerin (dưới dạng α -phosphatglixerin) và axit béo (dưới dạng axylCoA) là những nguyên liệu đầu tiên để tổng hợp ra lipid đơn giản. Lược đồ các phản ứng như sau :



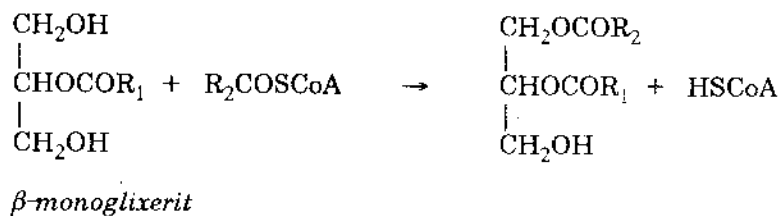
Phản ứng này do glixerophosphattransferaza xúc tác. Tiếp đó dưới tác dụng của phosphataza axit phosphatidic bị thủy phân để tạo thành diglixerit :



Diglycerit lại tương tác với axylCoA để tạo thành triglycerit dưới tác dụng của transaxylaza :



Trong màng nhầy của ruột, sự tổng hợp triglycerit được tiến hành từ β -monoglycerit nhờ enzym monoglycerit transaxylaza.



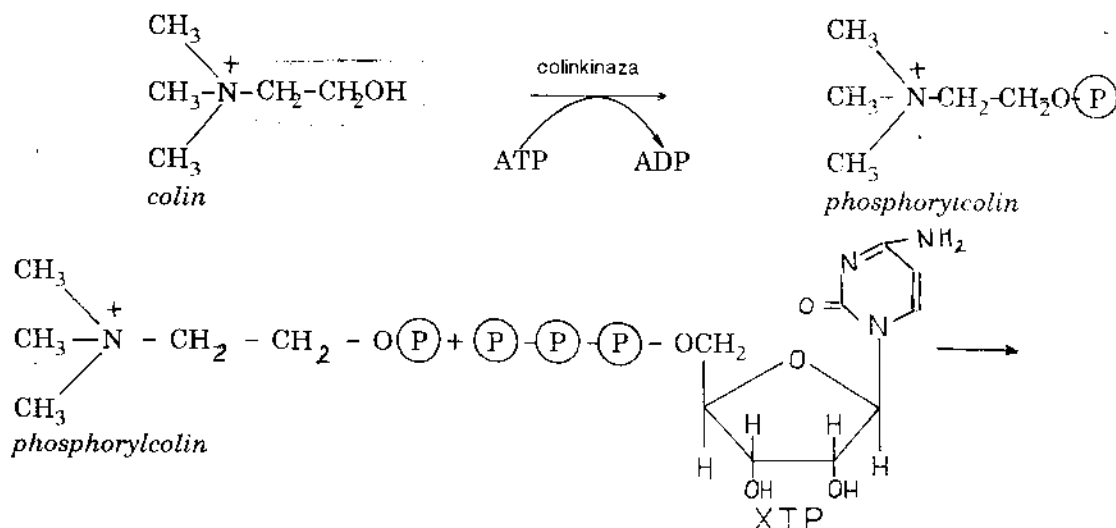
Sau đó diglycerit lại chuyển thành triglycerit nhờ enzym diglycerit transaxylaza xúc tác. Kiểu sinh tổng hợp này về năng lượng có lợi hơn qua axit phosphatidic hai lần.

V.4.3. Tổng hợp lipid phức tạp

Quá trình tổng hợp phosphatit đến giai đoạn axit phosphatidic giống như ở triglycerit. Chỉ sau đó colin hoặc colamin đã được hoạt hóa mới được kết hợp vào.

Phản ứng hoạt hóa các hợp phần như colin, colamin được tiến hành nhờ ATP và xitidindiphosphat (XDP) hoặc xitidintriphosphat (XTP).

Giai đoạn sau cùng của việc tổng hợp phosphatit bao gồm phản ứng giữa diglycerit với XDP-colin hay XDP-colamin.



CHƯƠNG VI

VITAMIN

Vitamin là một nhóm chất hữu cơ có phân tử tương đối nhỏ và có bản chất lý hóa học rất khác nhau. Nhóm chất hữu cơ này đặc biệt cần thiết cho hoạt động sinh sống bình thường của các cơ thể sinh vật dị dưỡng. Tuy nhiên, tác dụng sinh lý của vitamin trên các cơ thể động vật, thực vật và vi sinh vật thể hiện rất khác nhau. So với nhu cầu về các chất dinh dưỡng cơ bản như protein, lipid, glucit thì nhu cầu về vitamin rất thấp, ví dụ, con người cần trung bình khoảng 600g (tính theo trọng lượng khô) các chất dinh dưỡng cơ bản trong khi đó chỉ cần khoảng 0,1 - 0,2g vitamin. Như vậy ở cơ thể, vitamin đảm nhiệm vai trò như những chất xúc tác.

Trong những năm gần đây người ta đã chứng minh rằng vitamin còn cần thiết cho cả các cơ thể tự dưỡng như thực vật là những đối tượng có khả năng tổng hợp nên hầu hết các vitamin. Thật vậy, một số bộ phận của thực vật xanh không có khả năng tổng hợp vitamin, vì thế cần cung cấp thêm cho chúng một số vitamin để đảm bảo cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Người ta đã chứng minh rằng vitamin B₁ và một số vitamin khác có khả năng kích thích mạnh sự sinh trưởng của các rễ nhỏ tách rời trồng trên các môi trường tổng hợp. Đối với các thực vật hạ đẳng - nấm và vi khuẩn - nhu cầu về vitamin có thể rất khác nhau. Như vậy, *vitamin là nhóm chất (bắt buộc) cần thiết cho hoạt động sinh sống của bất kỳ cơ thể nào và chúng có khả năng ở nồng độ thấp hoàn thành chức năng xúc tác ở cơ thể sinh vật.* Nhiều dẫn liệu thực nghiệm đã chứng minh rằng đa số các vitamin có tác dụng như các coenzim. Dưới dạng coenzim, chúng tham gia vào các quá trình dị hóa và đồng hóa ở mức tế bào và mô, cũng như ở mức phân tử bên trong tế bào, ở các ti thể, v.v.

Cho đến nay, người ta đã tách ra được khoảng 30 loại chất thuộc nhóm vitamin, đa số đã được xác định đầy đủ cả cấu trúc hóa học cũng như tính chất lý hóa học và sinh lý học. Về cách gọi tên các vitamin hiện nay người ta vẫn duy trì gọi theo ba kiểu khác nhau. Kiểu thứ nhất dựa theo tác dụng sinh lý của vitamin : thêm chữ anti (chống) vào một bệnh đặc trưng của hiện tượng thiếu vitamin, kiểu thứ hai là dùng chữ cái để đặt tên, còn kiểu thứ ba dựa trên cấu trúc hóa học, hiện nay người ta có xu hướng gọi bằng tên hóa học nhiều hơn. Ví dụ, đối với vitamin C, tên hóa học là axit ascorbic còn tên sinh lý là antiscorbut. Cũng cần chú ý rằng thứ tự sắp xếp của các chữ cái không hoàn toàn phù hợp với lịch sử phát minh lần lượt ra các vitamin.

Mặc dù cho tới nay, thuật ngữ vitamin không còn ứng dụng với bản chất hóa học của nhiều chất mới được phát hiện ra, song người ta vẫn dùng tên gọi này để chỉ nhóm chất có chức năng xúc tác, đặc biệt cần thiết đối với hoạt động sinh sống bình thường của cơ thể sinh vật. Do tầm quan trọng của nó, hiện nay trong hóa sinh học đã tách riêng ra một ngành chuyên nghiên cứu về vitamin, về cấu trúc hóa học, tính chất lý hóa và sinh lý học của chúng, đó là ngành vitamin học. Các thành tựu mới của ngành vitamin học lại là cơ sở cho sự phát triển kỹ nghệ sản xuất vitamin phục vụ cho y học, cho chăn nuôi,... Thật vậy, việc phát hiện ra các nguồn vitamin chế biến và bảo quản nhằm sử dụng tốt nguồn vitamin sẵn có đều dựa trên những thành tựu đạt được của ngành hóa sinh vitamin.

Để nghiên cứu về vitamin, thông thường người ta chia thành hai nhóm lớn : nhóm vitamin hòa tan trong nước và nhóm vitamin hòa tan trong chất béo. Nhiều loại vitamin thuộc nhóm thứ nhất, là thành phần coenzim của các enzym xúc tác cho các quá trình khác nhau ở cơ thể và tham gia chủ yếu vào các quá trình liên quan với sự giải phóng năng lượng (oxy hóa-khử, phân giải các hợp chất hữu cơ,...) còn đa số các vitamin thuộc nhóm thứ hai (có lẽ cũng là coenzim của các hệ enzym chưa được biết rõ) tham gia vào các quá trình tạo hình, nghĩa là tạo nên các chất cấu thành của các cơ quan và mô khác nhau. Thực ra, việc phân chia theo cơ chế tác dụng chưa phải hoàn toàn hợp lý vì cho tới nay người ta còn chưa biết rõ chức năng của các loại vitamin. Hai nhóm lớn nói trên lại bao gồm nhiều nhóm nhỏ với các loại vitamin có cấu trúc hóa học gần nhau gọi là các vitame. Chúng ta sẽ xét lần lượt các nhóm vitamin quan trọng thuộc hai nhóm hòa tan trong nước và trong chất béo.

VI.1. CÁC VITAMIN TAN TRONG CHẤT BÉO

VI.1.1. Vitamin A và caroten

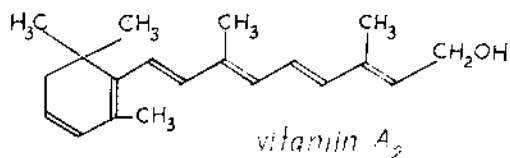
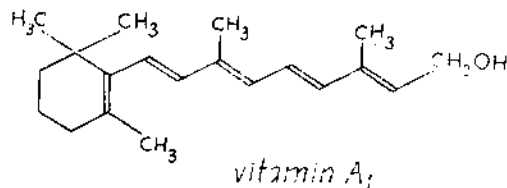
Từ năm 1909, Step đã tiến hành thí nghiệm cho chuột ăn thực phẩm đã bị rút hết chất béo bằng hỗn hợp ete - rượu. Chuột nuôi theo cách này bị sụt cân nhanh chóng và chết. Nếu thêm vào thực phẩm yếu tố đã bị rút ra ở trên thì động vật lại hồi phục sức khỏe và tiếp tục phát triển. Dựa trên thí nghiệm này, Step đã đưa ra nhận xét rằng trong thực phẩm có các yếu tố hòa tan trong mỡ cần thiết cho hoạt động sống của cơ thể gọi là yếu tố A, sau này gọi là vitamin nhóm A. Cơ thể bị thiếu vitamin A sẽ bị ngừng lớn, giảm tính chống nhiễm trùng và bị một bệnh mắt đặc trưng gọi là khô mắt. Từ lâu người ta cho rằng vitamin A chỉ tồn tại chủ yếu ở các sản phẩm động vật như gan cá và các sản phẩm khác từ cá, mỡ bò, trứng, gan các động vật ở biển ; trong thịt, lượng vitamin A thấp hơn. Do vitamin A có nhiều ở cá và các động vật sống ở biển cho phép giải thích vì sao trẻ em sống tại vùng biển rất hiếm mắc phải các triệu chứng thiếu vitamin A. Mãi đến năm 1920, Osborn, Mendel và một số tác giả khác phát hiện thấy có các hợp chất tương tự ở thực vật và sau đó tới Eiler (1929), Mur (1930) đã đưa ra ý kiến cho rằng các hợp chất tương tự đó, các caroten chính là provitamin A. Thông thường ở thực vật lượng caroten phụ thuộc vào màu của nó. Rau xà lách màu xanh nhạt chứa ít caroten hơn rau màu xanh sẫm. Người ta đã xác định được rằng ở các mô của thực vật xanh giàu chlorophyl thì đồng thời hàm lượng caroten cũng cao. Các sản

phẩm giàu caroten hơn cả là ớt, cà rốt, bí đỏ, gấc, hành lá,... Khi đưa vào cơ thể động vật, caroten chuyển thành vitamin A nhờ các hệ enzym đặc trưng. Điều đó được chứng minh rõ ràng nhờ các thí nghiệm tiến hành trên động vật. Ví dụ, khi quan sát sự phát triển của chuột bạch nuôi bằng ngô trắng và ngô vàng (có chứa caroten) người ta đã nhận thấy rằng chuột ăn ngô vàng lớn nhanh hơn và ít mắc các bệnh nhiễm trùng hơn. Hơn nữa, có thể dùng caroten để ngăn cản các triệu chứng thiếu vitamin A ở động vật nghiên cứu. Trong cơ thể động vật, sự chuyển hóa caroten thành vitamin A có thể xảy ra ở tuyến giáp trạng nhờ sự tham gia của chất tireoglobulin là chất có tính chất của enzym carotenaza. Cũng có những dẫn liệu cho rằng vị trí chuyển hóa của caroten thành vitamin A là thành ruột non. Như vậy rõ ràng caroten là chất tiền thân của vitamin A hay gọi là provitamin A. Chính vì lẽ đó, trong kỹ nghệ sản xuất vitamin người ta đã điều chế các chế phẩm caroten tinh khiết và thêm các chế phẩm này vào các thực phẩm để làm tăng giá trị của chúng về mặt vitamin A.

Từ năm 1928 - 1931 nhà hóa học Đức là Karrer đã dùng phương pháp sắc ký để phân chia và phát hiện ra cấu trúc của vitamin A và caroten. Sau đó Arens đã tổng hợp được vitamin A và tới năm 1950 nhiều nhà hóa học trong số đó có Karrer đã tổng hợp thành công chất β -caroten là một trong số ba dạng đồng phân quan trọng của caroten.

Hiện nay người ta biết hai dạng vitamin quan trọng của nhóm vitamin A là vitamin A₁ và vitamin A₂. Vitamin A₁ và A₂ tồn tại dưới một số dạng đồng phân hình học, nhưng chỉ một vài dạng có hoạt tính sinh lý. Vitamin A₁ gặp nhiều ở gan cá nước mặn, còn vitamin A₂ lại phổ biến ở gan cá nước ngọt.

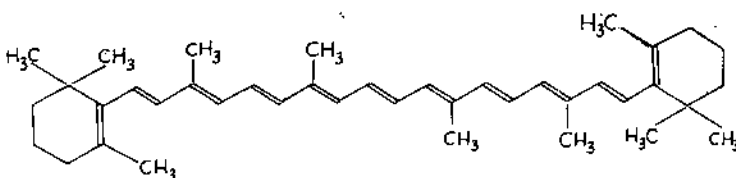
So sánh về cấu trúc của hai loại này ta thấy rằng vitamin A₂ khác với vitamin A₁ là có thêm một nối đôi thứ hai trong vòng. Số cacbon trong vitamin A là 20, còn trong caroten số cacbon là 40. Như vậy có thể nghĩ rằng từ một phân tử caroten có thể tạo nên hai phân tử vitamin A. Như trên đã trình bày, caroten cũng tồn tại dưới dạng một số



đồng phân và cũng là các hợp chất chưa no (polien) chứa nhiều nối đôi như vitamin A. Bằng phương pháp sắc ký, người ta đã phân chia được các đồng phân α -caroten, β -caroten, γ -caroten, δ -caroten ..., trong số các chất này β -caroten là chất có hoạt tính cao hơn cả.

Vitamin A dễ bị oxy hóa trong điều kiện phòng thí nghiệm. Ở cơ thể, dưới tác dụng của các chất xúc tác sinh học, vitamin A dạng alcol (retinol) dễ chuyển thành vitamin A dạng aldehyt (retinal). Vitamin A ở gan tồn tại dưới dạng este với axit axetic và axit palmitic. Ở dạng này nó bền vững hơn ở dạng tự do. Khi cơ thể cần

thì dạng dự trữ vitamin A ở gan sẽ được giải phóng dần. Vitamin A bị phân hủy khi có oxy không khí, tuy nhiên nó khá bền đối với axit, kiềm và khi đun nhẹ.

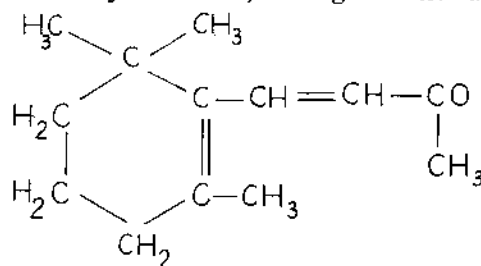


β - caroten

Hàm lượng caroten ở thực vật biến đổi theo từng bộ phận và theo mùa, vì vậy, việc nghiên cứu sự tích lũy caroten ở thực vật có ý nghĩa quan trọng trong việc đảm bảo vitamin A cho người cũng như cho các động vật chăn nuôi. Lượng vitamin A ở các sản phẩm như sữa, trứng cũng biến đổi theo mùa, phụ thuộc vào thức ăn cung cấp cho động vật, thường về mùa xuân và hè lượng vitamin A cao hơn mùa đông. Lượng vitamin A ở thực phẩm tính theo đơn vị quốc tế, mỗi đơn vị này tương đương với 0,6 γ (gamma)⁽¹⁾ β -caroten hoặc 0,3 γ vitamin A.

Nhu cầu về vitamin A vào khoảng 6 gamma trên 1 kg thể trọng. Để bù vào sự mất mát, thông thường người ta dùng tới 2 500 đơn vị quốc tế vitamin A hoặc 3 000 đơn vị quốc tế β -caroten trong một ngày đêm. Nguồn vitamin A và caroten chủ yếu đối với người là cá, mỡ bò, trứng, còn trong thực vật là ớt, cà rốt, hành lá, bí đỏ, gấc, cà chua, v.v. Nguồn điều chế vitamin A trong kỹ nghệ sản xuất vitamin là gan cá và động vật ở biển. Vì hàm lượng vitamin A biến đổi theo các loài cá, môi trường sống cũng như tuổi cá, nên khi chọn nguồn để điều chế vitamin A người ta phải chú ý đầy đủ tới các yếu tố trên. Thông thường ở cá sống lâu năm, hàm lượng vitamin A ở gan tăng lên. Nguồn cá thường dùng là cá mập, cá voi và cá thu. Ngoài ra, người ta còn tổng hợp vitamin A từ các nguyên liệu dầu có chứa vòng β -ionon, ví dụ, từ dầu cây *Coriandrum sativum*. Chất β -ionon thường tồn tại ở dạng hỗn hợp với α -ionon phổ biến trong kỹ nghệ mỹ phẩm.

Vitamin A và caroten tham gia vào quá trình oxy hóa-khử, chúng có thể đồng thời là chất nhận oxy cũng như chất nhường oxy. Khi kết hợp với oxy sẽ tạo nên các peroxyt ở các vị trí nối đôi, sau đó các peroxyt lại có khả năng nhường oxy cho các cơ chất một cách dễ dàng. Khả năng đó chính là do sự có mặt của hệ nối đôi cách ở trong phân tử bảo đảm sự hình thành nên các peroxyt hữu cơ không bền vững. Trong quá trình cảm quang của mắt, vitamin A có vai trò đặc biệt quan trọng.

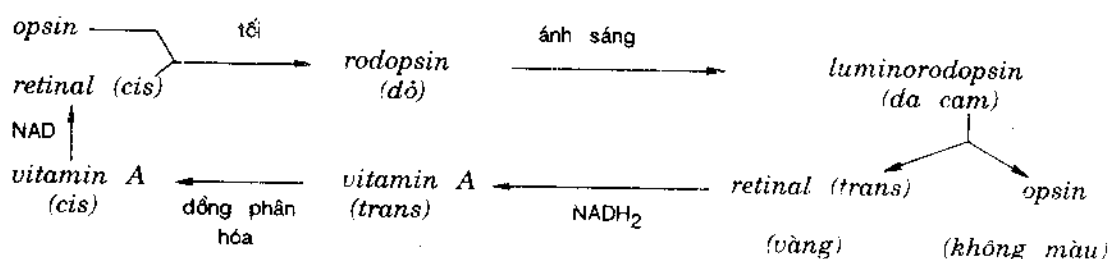


β - ionon

Dạng aldehyt của vitamin A kết hợp với chất protein opsin tạo nên sắc tố thị giác gọi là rodopsin. Chất này bảo đảm tính nhạy cảm của mắt đối với ánh sáng. Dưới tác dụng của ánh sáng, rodopsin sẽ bị phân giải thành opsin và aldehyt của vitamin A (retinal) dạng *trans*. Ngược lại, trong tối lại xảy ra sự tổng hợp rodopsin để làm tăng độ nhạy cảm của mắt đối với ánh sáng. Để tổng hợp được rodopsin,

1) 1 γ = 0,001 mg.

retinal phải tồn tại ở dạng *cis*. Sơ đồ sau mô tả sự tham gia của vitamin A trong quá trình cảm quang :



Vitamin A tham gia vào các quá trình trao đổi protein, lipid, glucit và muối khoáng. Ví dụ, người ta biết rằng khi thiếu vitamin A sẽ giảm tích lũy protein ở gan và ngừng tổng hợp albumin ở huyết thanh. Quá trình hydroxyl hóa các axit amin như phenylalanin và tirozin cũng bị ngừng trệ. Ảnh hưởng tới trao đổi lipid thể hiện qua hiện tượng giảm coenzim A. Khi thiếu vitamin A cũng làm giảm lượng glicogen và tăng tích lũy axit piruvic ở não, cơ và gan do ảnh hưởng làm giảm vitamin B₁ và axit lipoic cần thiết để chuyển hóa axit piruvic. Vitamin A cũng ảnh hưởng tới trao đổi khoáng ở cơ thể. Thiếu vitamin A sẽ dẫn tới hiện tượng tăng tạo sỏi thận và giảm kali ở nhiều bộ phận khác nhau. Vitamin A còn tham gia vào việc duy trì trạng thái bình thường của biểu mô, tránh hiện tượng sừng hóa.

Cơ chế của quá trình này còn chưa được rõ.

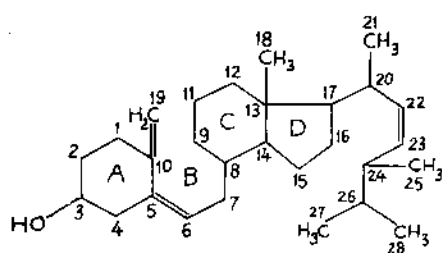
Vitamin A và carotenoid trong thực phẩm. ảnh hưởng của các quá trình bảo quản và chế biến tới hàm lượng vitamin A trong thực phẩm

Nhìn chung ở hạt, hàm lượng carotenoid không cao, ở hạt lúa mì hầu như không chứa carotenoid, còn ở gạo chỉ có rất ít. Riêng đối với ngô, đặc biệt ở ngô vàng, hàm lượng carotenoid tính theo β -caroten đạt từ 60 - 600 γ trên 100g hạt, còn trong ngô trắng chỉ có khoảng 5 γ . Trứng gà là nguồn vitamin A và carotenoid rất quý. Vì mỡ thường chỉ tập trung ở lòng đỏ nên các loại vitamin tan trong mỡ như vitamin A và carotenoid cũng tập trung chủ yếu ở đó. Trong thành phần lipid, trứng chứa rất nhiều axit béo chưa no do đó ảnh hưởng đến tính bền của vitamin A trong khi bảo quản trứng. Tùy theo phương pháp bảo quản, sự biến đổi của các vitamin hòa tan trong mỡ có thể xảy ra theo các chiều hướng khác nhau. Trong một lòng đỏ trứng gà có khoảng 57 γ vitamin A, vì vậy chỉ cần 3 - 5 quả trứng là bảo đảm đủ vitamin A cho mỗi người trong một ngày. Tuy nhiên, cần chú ý rằng hàm lượng vitamin A ở trứng thay đổi theo nòi gà, theo mùa và theo chế độ thức ăn cho gà. Theo Banderer và Evans, sau 7 tháng bảo quản trứng gà ở 0°C thấy mất đi tới 24% của hoạt tính ban đầu của vitamin A. Các dẫn liệu thu được khi theo dõi sự biến đổi của vitamin A ở trứng đã chứng minh rằng chính lipid của trứng lại phá hủy vitamin A. Đó là do sự oxy hóa các axit béo chưa no của lipid. Thực vậy, chỉ cần một lượng nhỏ lipid (của lòng đỏ) bị oxy hóa là đủ để oxy hóa hoàn toàn vitamin A của trứng. Vì vậy, nên bảo quản trứng ở nhiệt độ thấp và ở các thiết bị chứa khí nitơ. Còn về hàm lượng carotenoid ở trứng, người ta đã nhận xét thấy rằng nếu thêm các chất màu tổng hợp vào thức ăn cho gà thì lòng đỏ trứng sẽ có màu sẫm hơn. Hàm lượng xanthophyl đạt tới 70%, còn β -caroten có ít hơn. Sự biến đổi của

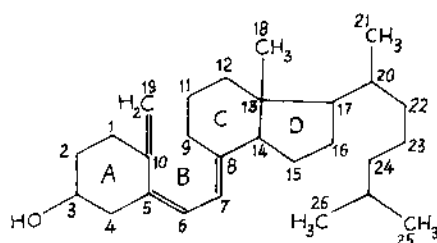
carotenoit cũng phụ thuộc vào điều kiện bảo quản như đối với vitamin A. Thông thường cả vitamin A và carotenoit đều bền đối với nhiệt, nhưng nhiệt độ cao lại phá hủy chúng gián tiếp qua các hiện tượng oxy hóa mà chúng đều rất nhạy cảm. Dầu cá, bơ, thịt, gan, thận cũng là nguồn vitamin A rất quý. Trong 100g thịt bò, thịt cừu có 0,006 mg vitamin A và carotenoit. Đặc biệt gan là nơi tập trung rất nhiều vitamin A. Ở gan bò có 1,2 - 1,5 mg vitamin A trên 100g. Hàm lượng vitamin A ở thịt phụ thuộc vào chế độ thức ăn và sự vỗ béo. Động vật càng béo càng chứa nhiều vitamin A trong khi đó các vitamin tan trong nước lại biến đổi theo chiều hướng ngược lại. Theo J. Rozier trong thịt bò béo có 200 đơn vị vitamin A trên 100g thịt, còn ở bò gầy chỉ có 70 đơn vị, trong khi đó hàm lượng vitamin B₁ là 100 đơn vị/1000g ở thịt bò béo và 120 đơn vị ở thịt bò gầy. Quá trình bảo quản thịt cũng như chế biến đều làm biến đổi ít nhiều các vitamin của thịt. Sự biến đổi ít nhiều này phụ thuộc vào nồng độ vitamin, vào dạng tự do hay kết hợp, vào pH, vào oxy, ... Ở pH trung tính và kiềm, nhiệt độ sẽ phá hủy dễ dàng các loại vitamin trong đó có vitamin A và carotenoit. Thông thường, thịt và các chế phẩm từ thịt đều có pH axit do đó bảo vệ được ít nhiều vitamin. Khi giữ thịt ở nhiệt độ thấp, 0°C hoặc dưới 0°C, mặc dù vẫn tồn tại các phản ứng sinh hóa chậm ở bên trong và oxy hóa một phần ở bên ngoài, song vitamin A và carotenoit chỉ bị biến đổi không đáng kể. Nếu bảo quản ở nhiệt độ cao hơn, sau một năm có thể mất đi 10 - 20% vitamin hòa tan trong mỡ. Khi giữ nhiệt trong các bao bì không thấm nước hoặc chân không hay trong khí nitơ thì sự mất mát rất nhỏ. Nhìn chung, vitamin A và caroten không bền với nhiệt độ, khi có cả oxy và ánh sáng. Như vậy nhiệt độ chỉ làm tăng thêm các quá trình biến đổi nhất là quá trình oxy hóa. Nếu tránh được oxy thì khi đun nóng thịt tới 120°C trong chất béo vẫn duy trì được vitamin A. Ánh sáng cũng làm tăng nhanh quá trình oxy hóa vitamin A. Việc thêm các chất chống oxy hóa như vitamin E, lexitin, hydroquinon, ... sẽ có tác dụng bảo vệ tốt vitamin A. Thời gian gần đây, để duy trì được vitamin A trong thịt, người ta còn thêm cả vitamin C và vitamin E là những vitamin chỉ tồn tại rất ít trong thịt. Axit ascorbic là chất chống oxy hóa có khả năng bảo vệ được cả vitamin E và vitamin A, do nó có thể nhường hydro trực tiếp cho các peroxyt. Trong quá trình này, vitamin E đóng vai trò là một chất trung gian. Khi nấu nướng thông thường, các vitamin hòa tan trong mỡ chỉ bị phá hủy ít do tác dụng của oxy không khí. Ví dụ, sự mất vitamin A ở gan là dưới 10%. Việc ướp muối thịt cũng làm biến đổi ít nhiều các vitamin nhất là khi có sự xâm nhập của vi khuẩn. Trong trường hợp này, người ta nhận thấy khi thì vitamin bị giảm đi, có khi lại tăng lên ở mức độ đáng kể phụ thuộc vào điều kiện ướp khác nhau và cả thời gian bảo quản thịt ướp.

VI.1.2. Vitamin D (canxipherol)

Các công trình nghiên cứu về vitamin D được bắt đầu từ năm 1916. Tới năm 1931 người ta đã tổng hợp thành công vitamin D. Vitamin D cũng bao gồm một số dạng có cấu trúc gần nhau như vitamin D₂, D₃, D₄, D₅, D₆, v.v. Tuy nhiên chỉ hai dạng đầu, D₂ và D₃ là phổ biến và có ý nghĩa hơn cả. Vitamin D là dẫn xuất của sterol. Cấu tạo của vitamin D₂ và D₃ như sau :



vitamin D_2
(*ergocanxipherol*)



vitamin D_3
(*colecaxipherol*)

Cấu tạo của vitamin D_2 và vitamin D_3 cho thấy chúng là các dẫn xuất của ergosterol và cholesterol. Khi cho chiếu tia tử ngoại vào ergosterol và cholesterol, sẽ thu được các vitamin D_2 và D_3 tương ứng. Trong điều kiện này xảy ra sự phá vỡ ở vòng B. Trên da người có bầy dehydrocolesterol, chất này chính là tiền thân (provitamin) trực tiếp của vitamin D_3 , vì vậy người ta chữa trẻ con bị còi xương do thiếu vitamin D bằng cách cho tắm nắng. Trong thực vật có các loại sterol, chủ yếu ergosterol dưới tác dụng của tia tử ngoại cũng chuyển thành các vitamin nhóm D. Nấm men và nấm mốc là nguồn giàu ergosterol, vì vậy chúng được dùng trong kỹ nghệ sản xuất vitamin D. Nhìn chung ở động vật, gan là nguồn dự trữ của tất cả các vitamin, song lại chứa ít vitamin D. Riêng đối với cá và động vật có vú ở biển thì ở gan lại chứa một lượng lớn vitamin D.

Vitamin D_2 và D_3 là các tinh thể nóng chảy ở nhiệt độ $115 - 116^\circ\text{C}$, không màu, không hòa tan trong nước mà chỉ hòa tan trong mỡ và dung môi của mỡ như cloroform, benzen, axeton, rượu, v.v. Vitamin D dễ bị phân hủy khi có mặt các chất oxy hóa và axit vô cơ. Sự phân hủy xảy ra ở nối đôi có trong vòng B của phân tử vitamin.

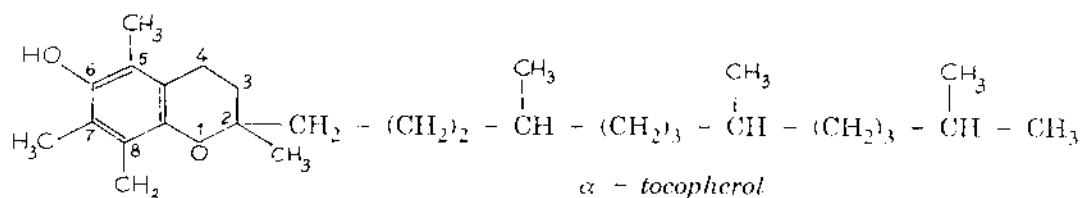
Khi bị thiếu vitamin D ở trẻ em sẽ dẫn tới các triệu chứng như suy nhược chung, tăng kích thích, chậm mọc răng, xương trở nên mềm và cong. Bệnh còi xương ở trẻ em có thể xảy ra vào thời gian từ 3 - 4 tháng và kéo dài đến 1 - 2 tuổi. Cũng có thể gặp hiện tượng còi xương ở tuổi muộn hơn (5 - 7 tuổi). Vitamin D tham gia vào quá trình điều hòa trao đổi phospho và canxi, làm tăng hàm lượng phospho ở huyết thanh, chuyển phospho ở dạng hợp chất hữu cơ thành vô cơ. Có lẽ, vitamin D là nhóm hoạt động của các enzym xúc tác cho quá trình trao đổi phospho - canxi ở cơ thể.

Một đơn vị quốc tế của vitamin D_2 tương đương với 0,025 γ ergocanxipherol và của vitamin D_3 tương đương với 0,025 γ colecaxipherol. Nguồn vitamin D đối với người là mỡ cá, gan, lòng đỏ trứng, sữa. Sữa động vật mùa hè giàu vitamin D hơn sữa mùa đông, đó là do sự hình thành vitamin D từ sterol được tăng mạnh dưới tác dụng của ánh sáng mặt trời. Trong mỡ gan cá có khoảng 125 γ vitamin D trên 100g; còn ở gan các động vật khác chứa 0,2 - 1,2 γ . Lòng đỏ trứng gà mùa đông chứa 3,5 γ còn lòng đỏ trứng gà mùa hè chứa tới 12,5 γ trên 100g. Dầu thực vật chỉ chứa vitamin D sau khi được chiếu tia tử ngoại (25 - 50 γ trên 100g). Đặc biệt nấm men bia khô sau khi chiếu tia tử ngoại chứa một lượng vitamin D rất cao (12

500 - 25 000γ trên 100g). Nhu cầu về vitamin D phụ thuộc vào điều kiện dinh dưỡng, nhiệt độ, khí hậu và điều kiện hấp thụ canxi và phospho của cơ thể. Đối với trẻ em bình thường cần 300 - 400 đơn vị quốc tế vitamin D trong một ngày, còn đối với đàn bà có mang và cho con bú, nhu cầu về vitamin D tăng lên tới 500 đơn vị. Đối với súc vật, vitamin D cũng rất cần thiết cho hoạt động sống bình thường. Động vật có sừng, gà, chim phát triển tốt khi thêm vitamin D vào thức ăn của chúng. Người ta đã công nhận tác dụng tốt của việc chiếu tia tử ngoại hoặc phơi nắng đối với sự chuyển provitamin D thành vitamin D ở da động vật có sừng và dẫn tới tăng lượng sữa ở động vật thí nghiệm. Khi thêm vitamin D vào thức ăn của gà mái cũng làm tăng độ nở trứng nhất là về mùa đông. Khi chế biến, vitamin D có thể chịu được nhiệt độ thông thường. Ví dụ, trứng đun sôi 20 phút vẫn giữ được nguyên vẹn vitamin D. Trong y học thực hành, người ta dùng các chế phẩm vitamin D dưới nhiều dạng khác nhau, dạng viên hoặc dạng hòa tan trong dầu để điều trị các bệnh thiếu vitamin D.

VI.1.3. Vitamin E (tocopherol)

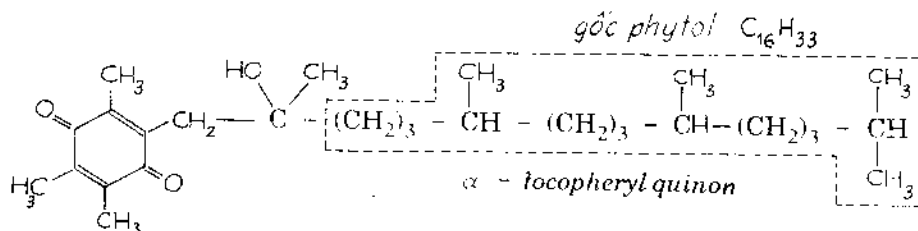
Từ năm 1922 - 1923 Evans và Bishop đã chứng minh rằng trong thực phẩm có chứa một loại vitamin cần thiết đối với quá trình sinh sản bình thường ở chuột. Loại vitamin này không có trong mỡ cá, nước cam và có nhiều trong bơ, trong rau xà lách hoặc các loại dầu thực vật khác. Đến năm 1936 người ta đã tách được từ dầu mầm lúa mì và dầu bông ba loại dẫn xuất của benzopiran và đặt tên là nhóm vitamin E. Các dẫn xuất thu được ở trên có tên tương ứng là α - tocopherol, β - tocopherol và γ - tocopherol. Năm 1938 đã tiến hành tổng hợp được α -tocopherol. Công thức cấu tạo của α - tocopherol như sau :



Tất cả các loại tocopherol đều có nhánh bên giống nhau tương ứng với gốc rượu phytol ($C_{10}H_{21}$). Sự khác nhau giữa chúng là do sự sắp xếp khác nhau của các nhóm methyl ở phần vòng benzopiran. Ví dụ, β - tocopherol khác α - tocopherol ở vị trí 7 không chứa nhóm methyl còn γ - tocopherol lại thiếu nhóm methyl ở vị trí 5. Các loại tocopherol khác mới được tách ra vào thời gian gần đây cũng khác nhau bởi sự sắp xếp và số lượng của các nhóm CH_3 ở các vị trí 5, 7 và 8 của vòng benzen. Trong số bảy loại tocopherol đã biết chỉ có ba loại α -, β - và γ - tocopherol có hoạt tính cao còn bốn loại khác lại có hoạt lực rất thấp.

Tocopherol là chất dầu lỏng không màu, hòa tan rất tốt trong dầu thực vật, trong rượu etylic, ete etylic và ete dầu hỏa. α -tocopherol thiên nhiên có thể kết tinh chậm trong rượu metylic nếu giữ ở nhiệt độ thấp tới $-35^{\circ}C$. Khi đó sẽ thu được các tinh thể hình kim có nhiệt độ nóng chảy ở $2,5 - 3,5^{\circ}C$. Tocopherol khá bền đối với nhiệt. Nó có thể chịu được tới $170^{\circ}C$ khi đun nóng trong không khí. Tuy nhiên, tia tử ngoại sẽ phá hủy nhanh tocopherol. Trong số các tính chất hóa học của tocopherol, tính chất quan trọng hơn cả là khả năng bị oxy hóa bởi các chất oxy hóa khác

nhau như sắt (III) clorua hoặc axit nicric. Khi đó sẽ tạo nên các sản phẩm oxy hóa khác nhau. Một sản phẩm oxy hóa quan trọng được tạo thành là chất α -tocopherylquinon có cấu trúc như sau :



Chất này có cấu trúc hóa học gần giống với cấu trúc của các vitamin K và Q, do đó các loại vitamin E, K và Q có thể có vai trò giống nhau trong quá trình oxy hóa kèm theo dự trữ năng lượng ở cơ thể. Việc nghiên cứu tỉ mỉ về tác dụng sinh lý của vitamin E đã cho thấy rằng ngoài ảnh hưởng lên quá trình sinh sản ở động vật, vitamin E còn tham gia vào việc bảo đảm chức năng bình thường và cấu trúc của nhiều mô và cơ quan. Khi thiếu vitamin E, sự tạo phôi sẽ bị ngăn trở, đồng thời xảy ra sự thoái hóa các cơ quan sinh sản, sự teo cơ, thoái hóa tùy sống và suy nhược chung của cơ thể. Vitamin E làm tăng sự sử dụng protein và vitamin A. Có lẽ chức năng chủ yếu của vitamin E là tham gia vào sự trao đổi lipid, qua đó ảnh hưởng tới khả năng sinh sản của động vật. Vitamin E có tác dụng ngăn cản các axit béo chưa no khỏi bị oxy hóa. Kunkel và Nelson (1950) đã chứng minh rằng tocopherol bảo vệ caroten và axit linoleic khỏi bị oxy hóa. Về khả năng chống oxy hóa thì δ -tocopherol mạnh nhất, còn α -tocopherol mặc dầu có hoạt tính sinh học cao song khả năng chống oxy hóa lại thấp hơn. Vitamin E còn tham gia trong hệ vận chuyển electron của các phản ứng oxy hóa-khử liên quan với sự tích lũy năng lượng. Vì vậy, khi cơ thể bị thiếu vitamin E, sẽ dẫn tới vi phạm nhiều chức năng khác nhau. Nguồn vitamin E chủ yếu là dầu thực vật, rau xà lách, rau cải. Vitamin E có nhiều trong dầu mầm hạt hòa thảo (mầm lúa mì, lúa, ngô), trong dầu một số hạt có dầu (lạc, hướng dương,...) hoặc một số quả. Ở động vật, vitamin E có trong mỡ bò, mỡ cá, nhưng hàm lượng thấp hơn nhiều so với dầu thực vật. Dầu hạt cây hướng dương chứa chủ yếu α -tocopherol, còn dầu đậu tương và dầu ngô lại chứa các dạng khác nhiều hơn và bảo vệ được các vitamin hòa tan trong mỡ như vitamin A, vitamin D cũng như các axit béo chưa no khỏi bị oxy hóa.

Bảng 6.1. Hàm lượng tocopherol trong dầu thực vật

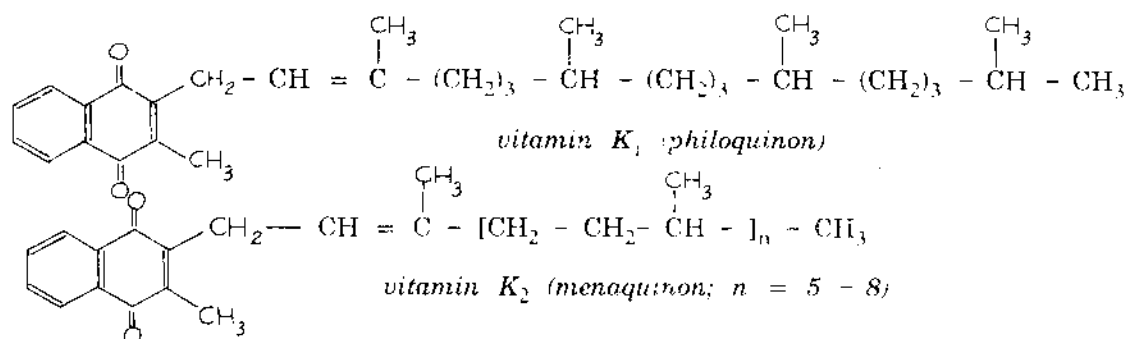
Dầu	Tocopherol chung, mg/100g	α -Tocopherol, % lượng chung	β -Tocopherol, % lượng chung	γ -Tocopherol, % lượng chung	δ -Tocopherol, % lượng chung
Hạt hướng dương	50 - 75	100	-	-	-
Hạt bông	70 - 110	55 - 70	-	25 - 40	0 - 10
Hạt ngô	90 - 105	10	-	90	0
Đậu tương	75 - 170	10	-	60	30
Lạc	20 - 50	40 - 50	-	30 - 40	20
Mầm lúa mì	200 - 300	60 - 70	30 - 40	0	0

Nhu cầu về vitamin E đối với cơ thể không lớn lắm và trong cơ thể lượng vitamin E dự trữ đủ để bảo đảm được một thời gian dài tới vài tháng, vì vậy ít khi xảy ra hiện tượng thiếu vitamin E. Bình thường có thể cần từ 14 - 19 mg α -tocopherol trong 24 giờ. Nhu cầu về vitamin E còn phụ thuộc vào hàm lượng axit béo chưa no có trong thực phẩm. Nếu thực phẩm chứa 30g axit linoleic thì cần thêm 30g α -tocopherol trong 24 giờ. Ngoài ra cần tính đến sự hao hụt vitamin E trong quá trình bảo quản, nấu và mức độ hấp thụ bởi cơ thể. Vitamin E trong dầu thực vật khá bền, có thể chịu được mọi quá trình chế biến mà không bị hao hụt đáng kể. Do tính chất chống oxy hóa mạnh của vitamin E nên trong kỹ nghệ dầu, mỡ, vitamin E được dùng làm chất bảo vệ lipit khỏi bị oxy hóa và tránh hiện tượng ôi mỡ.

Để điều chế vitamin E, có thể dùng phương pháp tổng hợp hoặc chiết xuất từ các nguyên liệu thiên nhiên. Quá trình tổng hợp được tiến hành từ chất rượu phytolic là loại rượu cao phân tử điều chế khó khăn, vì vậy phương pháp chiết rút có ưu thế hơn. Có thể dùng nguồn nguyên liệu là mầm lúa mì điều chế dịch cô đặc vitamin E. Khi cần tinh chế, đem cất dầu mầm lúa mì hoặc tốt hơn, cất dịch cô đặc vitamin E đã thu được.

Vitamin K (philoquinon)

Từ năm 1929, Dam đã đưa ra nhận xét rằng ở gà con nuôi bằng thức ăn tổng hợp đặc biệt xuất hiện các triệu chứng như chảy máu ở ống tiêu hóa hoặc ở cơ. Sau đó, tới năm 1934, Dam chứng minh rằng yếu tố hoạt động bảo vệ được gà con khỏi các triệu chứng bệnh lý nói trên có tính chất hòa tan trong chất béo và dung môi của chất béo. Yếu tố chống chảy máu đó được đặt tên là vitamin K (Koagulation vitamin). Người ta đã tách được các loại vitamin K_1 và vitamin K_2 . Chúng là dẫn xuất của naphthoquinon.

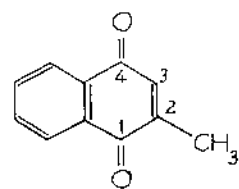


Cấu tạo của vitamin K_2 chỉ khác vitamin K_1 ở phần nhánh bên. Nó chứa từ 30 tới 45 nguyên tử cacbon ở nhánh bên trong, khi đó ở nhánh bên của vitamin K_1 chỉ chứa tới 20 nguyên tử cacbon. Vitamin K_1 hình thành chủ yếu trong thực vật, còn vitamin K_2 là sản phẩm của các vi khuẩn gây thối.

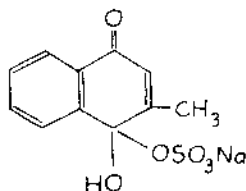
Đồng thời với các thí nghiệm tiến hành trên gà con nói trên, người ta đã thử tác dụng một số dẫn xuất của naphthoquinon đơn giản hơn vitamin K_1 và vitamin K_2 , đó là chất 2-metyl-1,4-naphthoquinon. Chất này tỏ ra có hoạt tính tương đương với vitamin K_1 và được gọi là vitamin K_3 .

Năm 1942, Paladin đã tổng hợp được một hợp chất gọi là vicasol, hợp chất này hòa tan được trong nước, hoạt tính chống chảy máu vượt hơn cả vitamin K₁ và vitamin K₂.

Vitamin K₁ là chất dầu vàng nhạt, kết tinh ở nhiệt độ -20°C, còn vitamin K₂ là tinh thể vàng nóng chảy ở 52°C. Vitamin K₁ và K₂ không tan trong nước mà chỉ tan trong chất béo và các dung môi như ete, rượu etylic, benzen, axeton, ... Vitamin K bị phân hủy nhanh dưới tác dụng của tia tử ngoại vì khi đó cấu trúc quinon của nó bị biến đổi. Khi đun trong dung dịch nước thường vitamin K khá bền, nhưng khi đun nóng trong môi trường kiềm, vitamin K bị phá hủy nhanh chóng. Hoạt tính của vitamin K₂ thấp hơn hẳn so với vitamin K₁ (bằng 60%). Vitamin K₃ cũng là các tinh thể vàng, hòa tan tốt trong các dung môi hữu cơ và không hòa tan trong nước, còn vicasol là bột tinh thể không màu, hòa tan tốt trong nước nên quan trọng trong y học thực hành để chống bệnh chảy máu. Các vitamin nhóm K đều có tính chất oxy hóa - khử : chúng bị khử thành các dẫn xuất hydroquinon và khi oxy hóa trở lại sẽ chuyển thành dạng quinon. Khi cơ thể bị thiếu vitamin K hay xảy ra các hiện tượng chảy máu ở các nội quan hoặc đồ máu cam. Có lẽ rằng vitamin K tham gia vào thành phần coenzim của các enzym xúc tác quá trình tạo nên protrombin là một loại hợp chất protein có vai trò quan trọng trong quá trình đông máu. Thực vậy, sự đông máu xảy ra theo ba pha như sau :



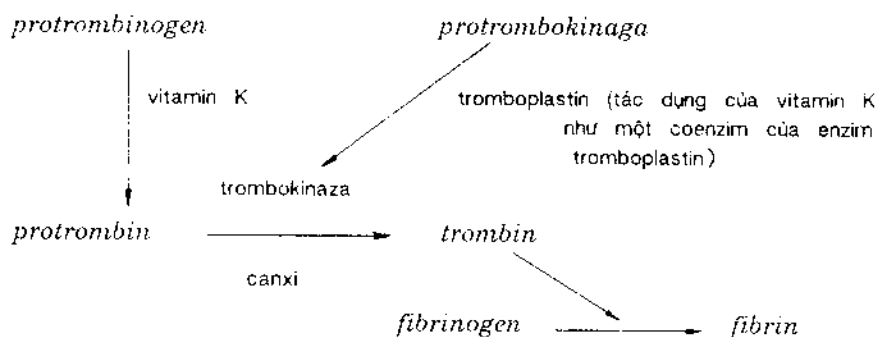
vitamin K₃ (2-metyl-14-naphtoquinon)



vicasol

1. protrombin + protrombokinaza → trombokinaza ;
2. trombokinaza + canxi + protrombin → trombin ;
3. trombin + fibrinogen → fibrin.

Sự chuyển fibrinogen thành fibrin là quá trình làm cho máu đông. Tuy nhiên, vận tốc đông máu không chỉ phụ thuộc vào vitamin K mà còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nữa của máu, ví dụ, nồng độ muối canxi và các hệ enzym khác của máu. Có thể hình dung vai trò của vitamin K đối với quá trình đông máu như sau :



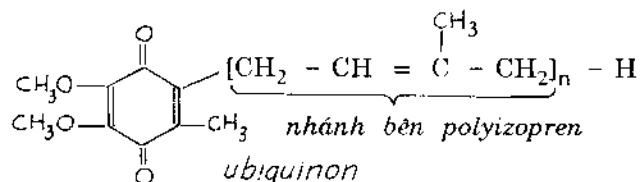
Ngoài ra, chức năng bình thường của gan cũng là yếu tố đặc biệt quan trọng vì vitamin K sẽ không có tác dụng làm tăng vận tốc đông máu nếu chức năng gan bị hỗn loạn do những bệnh lý nào đó.

Như vậy, vitamin K chỉ là một trong những yếu tố tham gia vào quá trình đông máu. Ngoài chức năng đông máu, vitamin K còn có các chức năng khác. Nó bảo đảm việc vận chuyển electron trong quá trình quang hợp ở thực vật và quá trình phosphoryl oxy hóa ở ti thể của các động vật khác nhau. Vitamin K cũng có tác dụng đối với chất protein cơ cơ miozin và ảnh hưởng lên tính chất cơ giãn cũng như tính chất enzym của miozin, nó còn làm tăng tính chất co bóp của dạ dày và ruột. Khi thiếu vitamin K, lượng protrombin ở máu giảm đi và thời gian đông máu sẽ kéo dài, vì vậy việc thử trước vận tốc đông máu trong mọi trường hợp cần mổ xẻ là rất cần thiết. Thông thường bệnh thiếu vitamin K ở người ít khi xảy ra vì ở ruột có các vi khuẩn có khả năng tổng hợp được vitamin đó. Tuy nhiên, trong trường hợp sự hấp thụ vitamin K bị vi phạm hoặc sự tổng hợp vitamin K ở ruột bị ức chế thì sẽ xuất hiện các triệu chứng thiếu vitamin K. Riêng đối với trẻ sơ sinh do chưa đủ các vi khuẩn đường ruột tạo được vitamin K nên lúc đầu có thể bị thiếu ít nhiều. Vitamin K có nhiều trong các sản phẩm nguồn thực vật ở các phần xanh, trong cà chua, đậu, cà rốt, đậu tương, còn trong nguồn động vật, nó có trong gan, thận và thịt, thịt đỏ giàu vitamin K hơn loại thịt trắng. Để tổng hợp vitamin K₁ có thể tiến hành phản ứng ngưng tụ của rượu phytol với dẫn xuất 2-metyl-1,4-naphthoquinon nhờ các chất xúc tác như axit oxalic hoặc tốt hơn dùng kali axit sulfat. Sah (1950) đã tổng hợp chất 2-metyl-1,4-naphthoquinon bằng cách metyl hóa α -naphtylamin và sau đó oxy hóa chất 2-metyl- α -naphtylamin thu được bằng axit crôm. Từ chất 2-metyl-1,4-naphthoquinon lại có thể điều chế được phức hợp bisulfit hòa tan trong nước (có hoạt tính vitamin K rất mạnh), nhờ phản ứng với natri bisulfit. Vitamin K được tổng hợp bởi thực vật và vi khuẩn đường ruột nhất là *Bact.coli*. Khi cây *Bact.coli* trên môi trường thạch có chứa amon lactat sẽ tạo được một lượng lớn vitamin K₂. Vì vậy, bằng cách tạo các điều kiện thích hợp, có thể lợi dụng quá trình sinh tổng hợp vitamin K₂ bởi vi khuẩn để sản xuất nó trong kỹ nghệ.

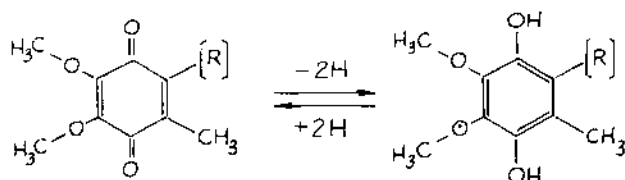
VI.1.5. Vitamin Q (ubiquinon)

Nhóm vitamin Q (ubiquinon) thuộc loại hòa tan trong chất béo, mới được tìm ra trong thời gian gần đây. Vitamin Q có cấu trúc hóa học và có lẽ cả một phần chức năng gần giống với vitamin E và vitamin K :

n - chỉ số gốc izopren của phân nhánh bên. Số n biến đổi từ 6 tới 10.



Về vai trò của ubiquinon ở cơ thể sinh vật, người ta đã xác định được rằng do sự có mặt của vòng quinon nên nó có thể chuyển sang dạng hydroquinon tương ứng, do đó tham gia vào các quá trình vận chuyển hydro trong các phản ứng oxy hóa - khử của tế bào :



Thực vậy, ở ti thể là trung tâm xảy ra các quá trình oxy hóa-khử kèm theo dự trữ năng lượng, người ta đã phát hiện thấy một lượng đáng kể ubiquinon. Tuy nhiên, việc xác định rõ ràng cơ chế tham gia của ubiquinon cũng như của vitamin K, vitamin E vào chuỗi oxy hóa-khử chưa phải đã hoàn chỉnh. Mặt khác, người ta cho rằng ubiquinon cũng tham gia vào quá trình vận chuyển gốc phosphat trong chuỗi oxy hóa-khử kèm theo tạo năng lượng ở tế bào. Ubiquinon gặp trong nhiều sản phẩm từ các nguồn gốc khác nhau : vì sinh vật, thực vật, động vật và tập trung nhiều ở các mô trong đó tiến hành các quá trình oxy hóa-khử với cường độ cao. Trong chuỗi hô hấp của tế bào sự vận chuyển electron từ các dehydrogenaza flavinic tới hệ xitocrom xảy ra nhờ sự tham gia của hàng loạt ubiquinon dưới dạng các coenzim Q.

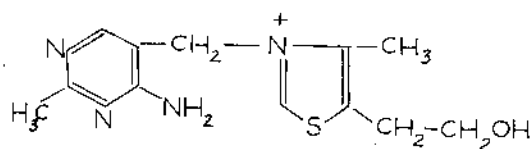
VI.1.6. Vitamin F (phức hợp các axit béo không no)

Nhóm vitamin F bao gồm một phức hợp các axit béo không no trong đó các chất axit linoleic, axit linolenic, axit arachidonic, v.v. Khi cơ thể bị thiếu vitamin F, sẽ nhận thấy các triệu chứng như ngứa lớn, sứt cân, khô da, rụng lông, tóc, v.v. Tuy nhiên việc xác định rõ vai trò của nhóm vitamin này chưa được tiến hành đầy đủ. Người ta đã chứng minh được rằng chúng tham gia vào sự điều hòa trao đổi lipid (đặc biệt loại ra khỏi cơ thể chất coleslerin). Vì vậy vitamin F được gọi là nhóm vitamin làm trẻ người. Cơ chế tác dụng của nhóm vitamin này chưa được nghiên cứu đầy đủ. Theo Thomasson (1954) các axit béo chưa no có chứa các nối đôi ở vị trí 6 - 7 và 9 - 10, bắt đầu từ đầu CH_3 trở đi sẽ có hoạt tính của vitamin F. Có lẽ hoạt tính vitamin F phụ thuộc vào các nối đôi đó. Các axit béo chưa no tập trung nhiều trong các loại dầu thực vật, vì vậy dầu thực vật là nguồn vitamin F rất quý.

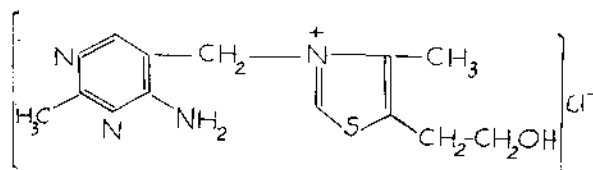
VI.2. CÁC VITAMIN TAN TRONG NƯỚC

VI.2.1. Vitamin B₁ (tiamin)

Vitamin B₁ là loại vitamin phổ biến rộng rãi trong thiên nhiên, đặc biệt nhiều trong nấm men, mầm lúa mì, cám gạo, v.v. ở động vật có nhiều trong gan, thận, tim, ... Đó là loại vitamin được tách ra ở dạng tinh thể đầu tiên bởi Casimir Funk năm 1912. Đa số tồn tại ở dạng tự do, còn một phần ở dạng tiaminpirophosphat.



tiamin tinh khiết



muối tiamin - clorit

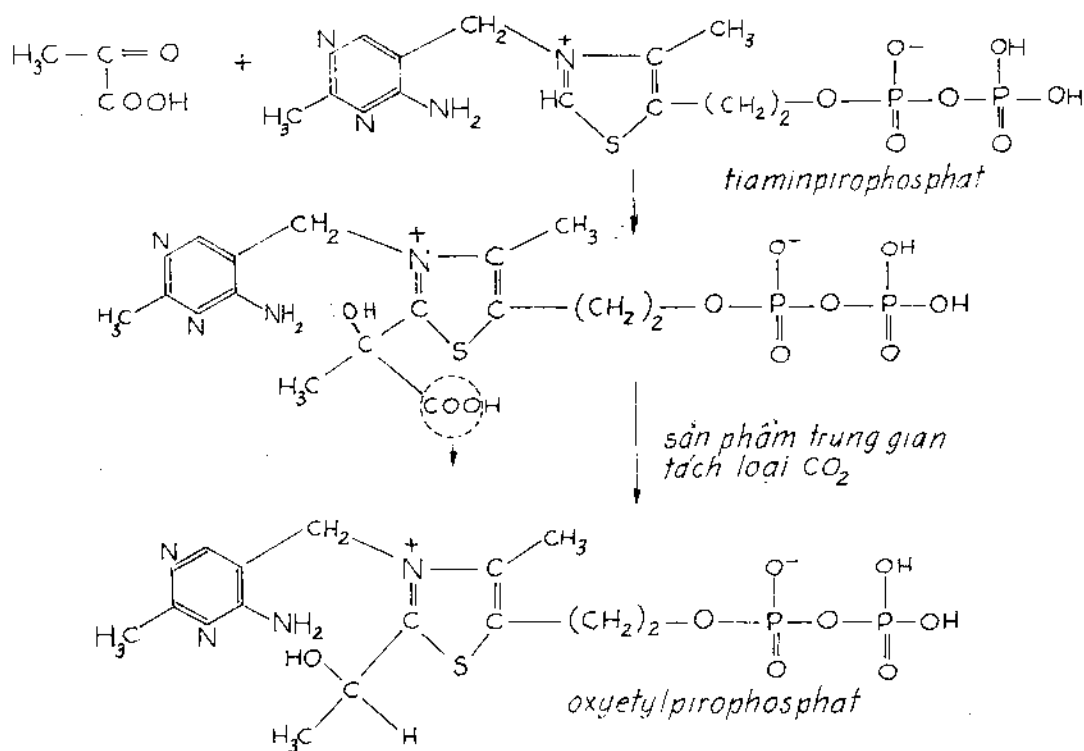
Trong thực tế, tiamin thường tồn tại ở dạng muối tiaminclorit.

Vitamin B₁ chỉ bền trong môi trường axit, còn ở môi trường kiềm nó bị phá hủy nhanh chóng khi đun nóng. Dưới dạng tiaminpirophosphat, vitamin B₁ tham gia vào hệ enzym decarboxyl - oxy hóa các xetoaxit như axit piruvic hoặc axit α -xetoglutaric. Vì vậy khi cơ thể bị thiếu vitamin B₁ sẽ dẫn tới tích lũy các xetoaxit làm hỗn loạn trao đổi chất kèm theo hiện tượng bệnh lý trầm trọng, ví dụ, giảm sút tiết dịch vị, tê phù, v.v. Ngoài ra, vitamin B₁ cùng với axit pantotenic còn tham

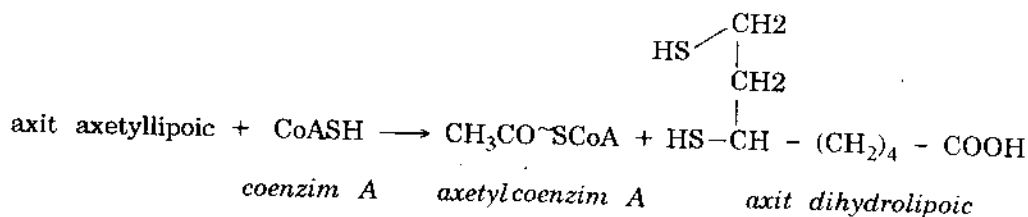
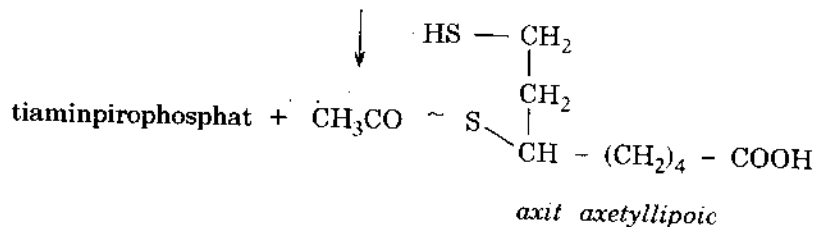
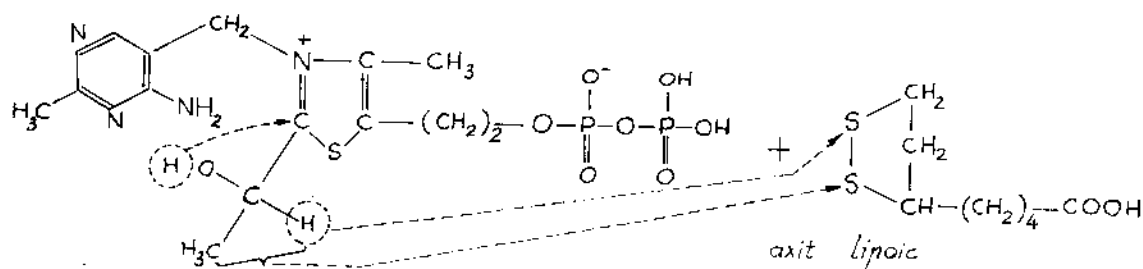
gia tạo nên chất axetylcolin là chất giữ vai trò quan trọng trong việc truyền xung động thần kinh. Chính vì vậy mà khi thiếu vitamin B₁, ở hệ thần kinh, nơi xảy ra trao đổi mạnh gluxit, sẽ bị ảnh hưởng nhiều hơn cả.

Vitamin B₁ là những tinh thể hòa tan tốt trong nước và chịu được các quá trình gia nhiệt thông thường. Khi oxy hóa vitamin B₁ sẽ chuyển thành một hợp chất gọi là tiocrom phát huỳnh quang. Tính chất này được ứng dụng phổ biến để định lượng vitamin B₁ trong các nguồn thực phẩm khác nhau. Vitamin B₁ được tổng hợp dễ dàng bởi thực vật, một số vi sinh vật, đặc biệt vi sinh vật ở ruột các động vật nhai lại. Cơ thể người và đa số động vật không có khả năng đó nên phải lấy từ các thực phẩm. Nấm men cung cấp một lượng vitamin B₁ rất lớn nên thường được dùng vào mục đích chữa bệnh khi bị thiếu vitamin nhóm B. Trong thịt của một số cá nước ngọt hoặc một số nhuyễn thể có chứa các chất chống tác dụng của tiamin do chúng có khả năng làm phân giải tiamin.

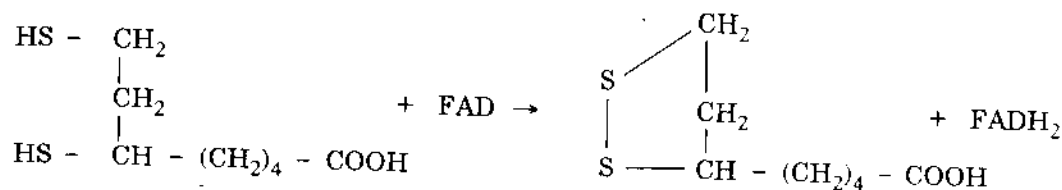
Về cơ chế tác dụng của tiamin cho đến nay người ta đã biết rõ rằng tiamin-pirophosphat là coenzim của các enzym piruvatdecarboxylaza hoặc α -xetoglutarat decarboxylaza. Các axit piruvic và axit α -xetoglutaric chính là các sản phẩm của quá trình trao đổi gluxit. Chính vì vậy khi thiếu vitamin B₁ thì sự trao đổi gluxit sẽ ngừng trệ. Trong cơ thể người và động vật, tiamin chuyển thành dạng pirophosphat. Dưới dạng này nó tham gia phân giải axit piruvic theo sơ đồ phản ứng :



Chất oxyetylpirophosphat hình thành ở trên sẽ tiếp tục tác dụng với axit lipoic là nhóm hoạt động của enzym lipoilreductaza - axetyltranspheraza theo sơ đồ sau :



Chất này lại tác dụng với FAD và tạo trở lại dạng axit lipoic ban đầu :



Như vậy piruvat tác dụng với tiaminpirophosphat ở vị trí C₂ của vòng tiazol. Qua hàng loạt các sản phẩm trung gian piruvat chuyển thành axetat dưới dạng axetyl-coenzim A. Cũng có tài liệu cho rằng quá trình loại CO₂ và oxy hóa axit piruvic xảy ra nhờ sự tham gia của NAD⁺ ở giai đoạn oxy hóa axit dihydrolipoic thay cho FAD. Ngoài ra tiaminpirophosphat còn tham gia vào thành phần coenzim của tranxetolaza trong chuyển hóa pentoza. Nó có liên quan với các enzym phân giải các sản phẩm của mỡ và axitamin.

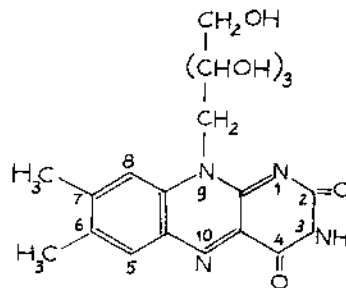
Nhu cầu về vitamin B₁ phụ thuộc vào các điều kiện khác nhau như trạng thái sinh lý của cơ thể, chế độ thức ăn, làm việc, v.v. Trung bình người cần từ 1 - 3 mg vitamin B₁ trong 24 giờ. Nhìn chung vitamin B₁ thường tồn tại song song với vitamin B₂ và vitamin PP trong các thực phẩm, đặc biệt trong phần phôi của hạt thực vật. Tuy nhiên, nó tập trung chủ yếu ở phần vỏ, vì vậy bột càng cao cấp càng nghèo vitamin B₁. Có những dẫn liệu cho biết nếu ở gạo lứt lượng tiamin là 0,45 mg trên 100g thì sau khi xát lần một chỉ còn chứa 0,09 mg và sau khi gạo xát lần thứ ba chỉ còn lại 0,03 mg. Trong cám gạo hàm lượng tiamin là 2,32 mg trên 100g. Trong quá trình bảo quản thóc gạo vitamin B₁ dễ bị phân hủy. Bảo quản sau một năm có thể mất tới 20% của lượng vitamin B₁ ban đầu. Tùy theo điều kiện bảo quản

trong bao không thấm nước hoặc bao cói, hàm lượng vitamin B₁ ở gạo có thể mất đi với các mức độ khác nhau. Nếu giữ trong bao bì không thấm nước sau 6 tháng vẫn chưa có sự giảm sút đáng kể về tiamin, trong khi đó bảo quản ở bao cói sau 6 tháng đã mất tới 40%, có thể cả oxy và nhiệt độ đều tham gia vào sự phá hủy vitamin B₁ khi bảo quản. Tuy nhiên, người ta vẫn chưa hiểu rõ nguyên nhân của sự dễ oxy hóa đó là do vitamin B₁ tập trung ở phần vỏ bên ngoài hoặc do tác dụng phân hủy của enzim. Trong quá trình nhào bột và cho lên men, do đưa thêm nấm men nên làm cho bột giàu các vitamin nhóm B nhất là vitamin B₁, đồng thời sự tăng vitamin B₁ cũng như các vitamin B₂ và vitamin PP ở bột mì lên men còn do sự tăng tổng hợp các loại vitamin đó. Khi đun nấu hoặc nướng bánh, vitamin B₁ bị phân hủy vì nhạy cảm với nhiệt độ. Có thể là do phân tử mất hoạt tính ở nhiệt độ cao, đồng thời cũng do khả năng tác dụng với các hợp chất cacbonyl (aldehyd, xeton) tạo nên phản ứng Maillard, vì trong phân tử vitamin B₁ có chứa nhóm NH₂. Quá trình nướng bánh làm giảm 8 - 20% lượng vitamin B₁ và sự biến đổi này ở phần vỏ bánh khác với ruột bánh. Sự biến đổi về hàm lượng vitamin B₁ còn phụ thuộc vào dạng tồn tại của vitamin B₁, dạng bột nhào, pH của bột nhào và thời gian cũng như nhiệt độ nướng bánh. Ở dạng tiaminpirophosphat, vitamin B₁ nhạy cảm hơn với nhiệt độ nên bị tổn thất nhiều hơn. Ngoài ra tính bền của vitamin B₁ còn phụ thuộc vào độ ẩm của môi trường. Khi nướng bánh quí, nếu cho thêm bột nở có tính kiềm sẽ làm giảm lượng vitamin B₁ trong khi đó lại giải phóng phần lớn vitamin PP ở dạng hoạt động. Để bảo tồn được hàm lượng vitamin B₁ trong gạo, ở một số nước người ta đã tiến hành nhiều nghiên cứu và đạt được những kết quả khả quan. Ví dụ, người ta ngâm gạo vào nước ở 15 - 27°C, sau đó sấy ở 120°C trong 25 phút. Ở gạo đã xử lý như vậy phần lớn các chất tan trong nước tồn tại ở bên lớp ngoài của hạt được chuyển vào bên trong và cố định ở đó. Vì vậy khi cho xát trắng chỉ mất đi rất ít vitamin B₁ (khoảng 1/5 so với khi không xử lý). Hơn nữa, gạo được xử lý như trên lại giữ được vitamin B₁ tốt hơn cả khi vo gạo và nấu cơm. Nếu như bình thường từ mất mát khi vo gạo và nấu cơm là 77% thì ở gạo được xử lý toàn bộ sự mất mát chỉ là 36%. Vitamin B₁ ở các sản phẩm khác như trứng, sữa, thịt cũng bị biến đổi nhiều trong quá trình bảo quản và chế biến, còn các loại quả nói chung chỉ chứa ít vitamin B₁. Tính chất nhạy cảm cao đối với nhiệt độ của vitamin B₁ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ như nhiệt độ xử lý, độ dài ngắn của thời gian xử lý, pH của môi trường (pH axit có tác dụng bảo vệ vitamin B₁), oxy không khí (phá hủy vitamin B₁), v.v. Các hệ điện ly như các α- và β- axitamin, các axit có nồng độ thấp đều làm tăng tính bền của vitamin B₁. Khi có mặt các chất gelatin, ovalbumin, tinh bột, ..., tính nhạy cảm đối với nhiệt độ của vitamin B₁ cũng giảm đi. Ví dụ, nếu đem sấy thịt, có thể làm mất 46% vitamin B₁, trong khi đó sự có mặt của khoai tây sẽ làm giảm sự mất mát một cách rõ rệt, hàm lượng vitamin B₁ mất đi chỉ là 8%. Các đường hexoza, hàm lượng nước cao của môi trường và sự có mặt của kim loại nặng trái lại, làm tăng sự phân giải vitamin B₁ bởi nhiệt độ. Trong quá trình này, xảy ra sự phá vỡ liên kết giữa hai vòng pirimidin và tiazol của phân tử vitamin B₁. Sau đó, vòng tiazol có thể bị phá vỡ tiếp tục và giải phóng H₂S.

Do tính nhạy cảm đặc biệt đối với nhiệt độ của vitamin B₁ nhất là khi có oxy không khí nên quá trình bảo quản cũng như chế biến các sản phẩm giàu vitamin B₁ đòi hỏi phải có những nghiên cứu thận trọng và tỉ mỉ. Điều đó sẽ giúp cho việc duy trì được tốt các nguồn vitamin B₁ đảm bảo cho nhu cầu hàng ngày của chúng ta.

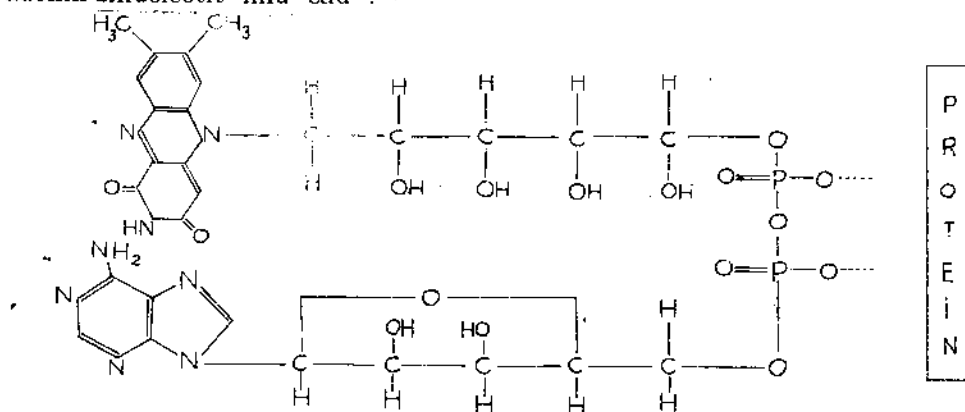
VI.2.2. Vitamin B₂ (riboflavin)

Vitamin B₂ được Kun tách ra lần đầu ở dạng tinh khiết vào năm 1933 từ sữa, vì vậy lúc đầu nó mang tên là lactoflavin. Chất này có màu vàng và phát huỳnh quang xanh. Sau đó, người ta tách được các loại chất tương tự lactoflavin ở các đối tượng khác như gan, nấm men, ..., các chất này có tác dụng rất tốt đối với sinh trưởng của chuột. Tới năm 1935 Karrer và các cộng tác viên đã tổng hợp được hàng loạt các dẫn xuất của lactoflavin và chứng minh rằng dẫn xuất có cấu tạo là 6,7 - dimetyl - 9 - izoloxazin tương ứng đúng với lactoflavin tách được từ các nguyên liệu thiên nhiên. Vì trong cấu tạo của vitamin B₂ có hợp chất riboza nên sau đó người ta gọi tên là riboflavin.

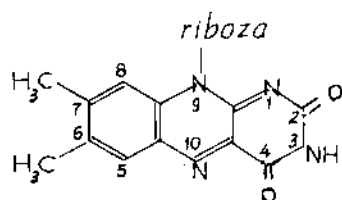


riboflavin

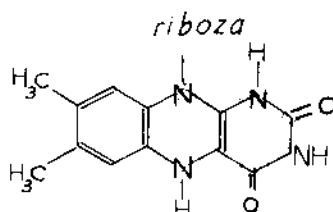
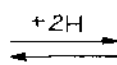
Phân tử lượng của vitamin B₂ là 374,4. Đó là các tinh thể màu vàng da cam, hòa tan tốt trong nước và rượu, không hòa tan trong các dung môi của chất béo. Tinh thể khô bền với nhiệt độ và dung dịch axit. Trong cơ thể, vitamin B₂ dễ bị phosphoryl hóa tạo nên nhóm hoạt động của các enzym xúc tác cho các quá trình oxy hóa-khử, các coenzim thường gặp là riboflavin mononucleotit hoặc riboflavin-adenin-dinucleotit. Khi gắn vào các protein sẽ tạo nên các enzym như các loại dehydrogenaza khác nhau, men vàng *Vacbua*, oxydaza *D*-axitamin, reductaza, xitocrom c, v.v. Vitamin B₂ tham gia vận chuyển hydro ở nhiều enzym, trong đó nó tồn tại dưới dạng flavin-adenin dinucleotit như sau :



Quá trình vận chuyển hydro của vitamin B₂ được thực hiện nhờ khả năng gắn hydro vào các nguyên tử nitơ ở các vị trí 1 và 10. Khi đó vitamin B₂ sẽ chuyển từ dạng có màu (dạng oxy hóa) thành dạng không màu (dạng khử) :



dạng oxy hóa (màu vàng)

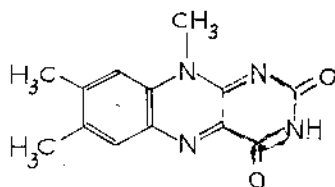


dạng khử (không màu)

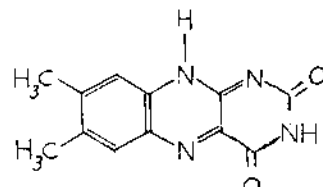
Do tính chất trên nên khi cơ thể bị thiếu vitamin B₂, việc tạo nên các enzym oxy hóa-khử ở cơ thể sẽ bị ngừng trệ ảnh hưởng tới các quá trình tạo năng lượng cần thiết cho sự phát triển bình thường của cơ thể. Vitamin B₂ còn cần thiết đối với việc sản sinh ra các tế bào của biểu bì ruột, tăng sức đề kháng của cơ thể, tăng tốc độ tạo máu và ảnh hưởng tới sự phát triển của bào thai.

Vitamin B₂ có nhiều trong các sản phẩm thiên nhiên : nấm men bánh mì, nấm men bia, đậu, thịt, gan, thận, tim, sữa, trứng và các sản phẩm từ cá. Trong rau xanh cũng chứa nhiều vitamin B₂. Nó được tổng hợp bởi các tế bào thực vật và vi sinh vật. Các động vật có sừng không cần tới riboflavin, vì ở ruột của chúng có các vi sinh vật tổng hợp được riboflavin và cung cấp cho động vật chủ. Để sản xuất riboflavin từ các nguyên liệu thiên nhiên

có thể dựa vào khả năng sinh tổng hợp riboflavin bởi các vi sinh vật như các loại nấm mốc *Eremothecium ashbyii*. Khi tạo các điều kiện nuôi cấy thích hợp, các vi sinh vật này sẽ tổng hợp và tiết vào môi trường một lượng riboflavin khá cao (1,8 mg riboflavin/1 ml). Từ các môi trường nuôi cấy đó có thể tiến hành kết tinh riboflavin. Riboflavin dễ bị phân giải khi đun sôi và dễ ngoài ánh sáng. Trong trường hợp đem chiếu sáng và giữ riboflavin ở môi trường kiềm nó sẽ chuyển thành lumiflavin còn trong môi trường trung tính hoặc axit yếu sẽ thu được dẫn xuất lumicrom.



lumiflavin



lumicrom

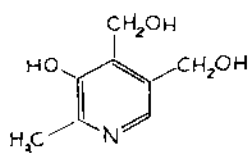
Trong quá trình bảo quản gạo hoặc các loại hạt khác, người ta nhận thấy rằng ngược với vitamin B₁, vitamin B₂ có xu hướng tăng lên rõ rệt nhất là khi bảo quản ở dạng bao cới, bao tải, bao PP, nghĩa là có sự xâm nhập dễ dàng của oxy không khí. Ví dụ, sau 6 tháng bảo quản ở lọ nâu đầy kín, lượng vitamin B₂ ở gạo có thể tăng tới 53% còn hàm lượng vitamin B₁ giảm đi 1%. Nếu giữ trong bao cới, bao tải thì cũng thời gian đó, hàm lượng vitamin B₁ giảm mất 40%, còn hàm lượng vitamin B₂ lại tăng tới 95%. Đối với các loại hạt khác cũng nhận thấy sự tăng vitamin B₂ trong quá trình bảo quản, nhưng không thật rõ rệt như đối với trường hợp của gạo. Trong khi cô đặc sữa nếu không thêm đường thì hàm lượng vitamin B₂ hầu như không đổi, tuy nhiên Kuzuya cho biết nếu cô đặc có đường sẽ làm giảm mất một lượng dưới 10%. Đối với trứng gà, vitamin B₂ ở lòng trắng không biến đổi khi bảo quản, còn ở lòng đỏ, có lẽ do nó tồn tại ở dạng tự do nhiều hơn nên vitamin B₂ dễ bị biến đổi hơn. Vitamin B₂ có nhiều ở thịt, đặc biệt là ở gan. Tùy thuộc vào

điều kiện làm lạnh thịt khi bảo quản và xử lý, sự mất vitamin B₂ có thể thay đổi ít nhiều, nhưng nhìn chung tổn thất không đáng kể. Khi chế biến thịt bằng cách quay hoặc rán thông thường giữ được vitamin B₂ nhiều hơn so với khi luộc thịt. Cũng có những dẫn liệu cho biết rằng vitamin B₂ có nhiều ở thịt nấu chín hơn so với thịt còn sống. Điều đó có thể là do vitamin B₂ tồn tại ở các dạng khác nhau : dạng tự do hoạt động và dạng liên kết không hoạt động. Nhiệt độ làm phân ly các phức hợp của vitamin B₂ và giải phóng nó ra ở dạng tự do có thể định lượng được. So sánh về tính nhạy cảm đối với nhiệt độ thì người ta nhận thấy vitamin B₂ bền hơn so với vitamin B₁. Nhu cầu của người bình thường về vitamin B₂ là 2 mg trong 24 giờ.

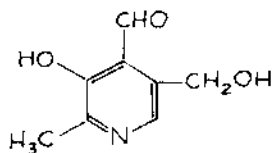
VI.2.3. Vitamin B₆ (piridoxin, piridoxal, piridoxamin)

Vitamin B₆ được tách ra ở dạng tinh khiết vào năm 1938, đầu tiên từ nấm men sau đó từ cám gạo. Cấu tạo của vitamin B₆ được xác nhận năm 1939 nhờ sự tổng hợp hóa học, đó là chất piridoxin.

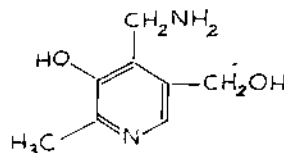
Vitamin B₆ còn tồn tại ở các dạng như piridoxal, piridoxamin.



piridoxin

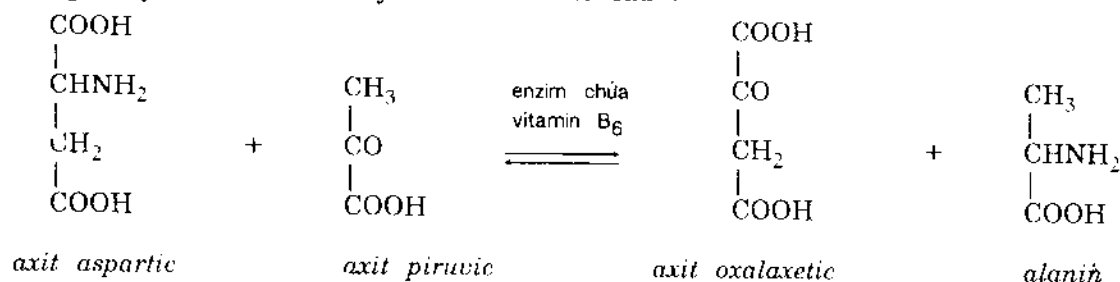


piridoxal

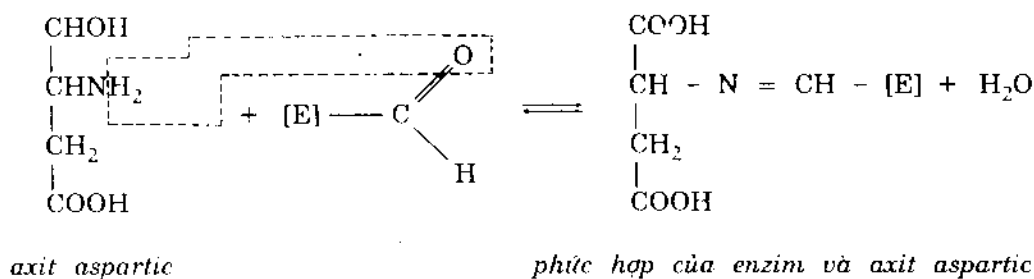


piridoxamin

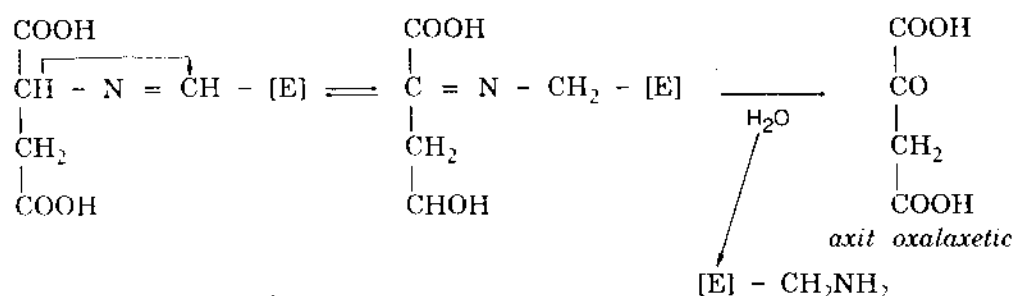
Vitamin B₆ có nhiều ở nấm men bia, lúa mì, ngô, đậu, thịt bò, gan bò, thận và các sản phẩm của cá. Nó cần thiết đối với động vật, người và cũng kích thích sự phát triển của các vi sinh vật. Khi thiếu vitamin B₆ sẽ xuất hiện một số triệu chứng bệnh lý đặc trưng như bệnh ngoài da, bệnh thần kinh, sụt cân, rụng lông, tóc, v.v. Piridoxin là tinh thể không màu, có vị hơi đắng và hòa tan tốt trong nước, rượu. Cả ba loại piridoxin, piridoxal và piridoxamin đều bền khi đun sôi trong dung dịch axit hoặc kiềm nhưng không bền khi có mặt các chất oxy hóa. Chúng bị phân hủy nhanh nếu đem chiếu sáng ở môi trường kiềm cũng như trung tính, còn khi chiếu sáng ở dung dịch axit (0,1 N HCl) thì các dạng piridoxin và piridoxal bền hơn so với piridoxamin. Vitamin B₆ ở dạng piridoxal phosphat tham gia vào thành phần của hàng loạt các enzym như transaminaza, decarboxylaza, kinureninaza, v.v. Nó còn cần thiết cho các quá trình trao đổi chất béo, chuyển hóa protein thành chất béo và tạo các axit béo chưa no cần thiết đối với cơ thể. Trong các phản ứng chuyển amin hóa, vitamin B₆ giữ vai trò đặc biệt quan trọng. Người ta biết khá rõ cơ chế tác dụng của enzym aminotransferaza trong đó vitamin B₆ giữ vai trò là coenzim. Phản ứng chuyển amin hóa xảy ra theo sơ đồ sau :



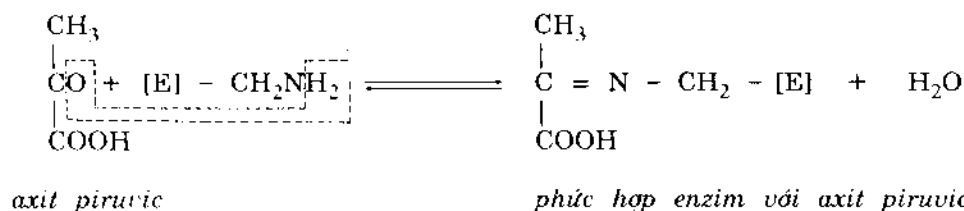
Ở giai đoạn đầu, nhóm hoạt động piridoxal phosphat ($E - C \begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{smallmatrix}$) ⁽¹⁾ tác dụng với nhóm amin của axit aspartic tạo nên phức hợp :



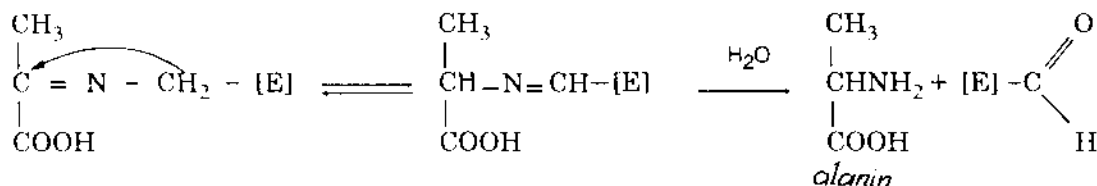
Tiếp theo đó tới giai đoạn chuyển nhóm hồ biến trong phức hợp và kết hợp với nước, giải phóng axit oxalaxetic và enzym ở dạng piridoxamin phosphat :



Enzym dạng piridoxaminphosphat lại tác dụng với xetoaxit (là cơ chất thứ hai) :



Ở giai đoạn này xảy ra sự chuyển hóa hồ biến tiếp theo đó là kết hợp với nước, giải phóng sản phẩm alanin cùng enzym dưới dạng piridoxal phosphat :



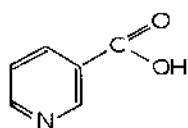
Ngoài phản ứng chuyển amin hóa ra, vitamin B₆ còn tham gia vào quá trình loại CO₂ của các axitamin và liên quan đến cân bằng năng lượng ở cơ thể. Vitamin B₆ cũng có vai trò quan trọng đối với sự tổng hợp các coenzim như nicotinamit-adenin-dinucleotit, coenzim A, v.v. Vì vậy khi thiếu vitamin B₆ cũng làm rối loạn sự trao đổi các coenzim nói trên, từ đó dẫn tới vi phạm trao đổi hàng loạt các hợp chất liên quan tới chúng (trao đổi gluxit, lipid, protein ...). Cả ba dạng của vitamin

(1) Ký hiệu chỉ enzym.

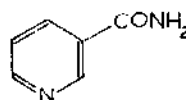
B₆ đều có hoạt tính như nhau nên thông thường người ta chỉ điều chế một dạng piridoxin. Việc điều chế vitamin B₆ từ các nguyên liệu thiên nhiên như nấm men và cám thường khó khăn và lâu, lại tốn kém nguyên liệu, vì vậy người ta thường tổng hợp bằng phương pháp hóa học từ xianaxetamid và dẫn xuất của axetylaxeton (theo Harris, Folkers 1939). Thực vật và nhiều loại vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp vitamin B₆ đủ cho nhu cầu của chúng. Ví dụ các vi khuẩn của dạ dày động vật nhai lại, tổng hợp được vitamin B₆ và cung cấp cho động vật chủ. Tuy nhiên, cũng có một số vi sinh vật không có khả năng đó và đòi hỏi phải cung cấp piridoxin cho chúng. Khi bảo quản và chế biến các sản phẩm chứa nhiều vitamin B₆ như sữa, trứng hoặc thịt, người ta nhận thấy có sự biến đổi khá rõ rệt về hàm lượng vitamin B₆ tùy thuộc vào điều kiện bảo quản hoặc chế biến. Ví dụ, khi tiệt trùng sữa bằng cách đun trực tiếp sẽ mất đi tới 20%, còn đun gián tiếp chỉ mất khoảng 5%. Khi cô đặc sữa không thêm đường có thể làm biến đổi ít nhiều về vitamin B₆, song nếu thêm chất kháng sinh nizin thì sự mất mát sẽ giảm đi. Sau 4 năm bảo quản sữa cô đặc không có đường ở nhiệt độ thấp, hàm lượng vitamin B₆ hầu như không biến đổi. Đối với trứng gà khi bảo quản sau một năm có thể mất đi 50% hàm lượng vitamin B₆ ban đầu. Sự tổn thất này ở cả lòng đỏ và lòng trắng trứng đều như nhau. Nhu cầu của người bình thường về vitamin B₆ là 2 mg trong 24 giờ.

VI.2.4. Vitamin PP (axit nicotinic, nicotinamid, niacin, vitamin B₅)

Từ năm 1870, Huber đã tổng hợp được axit nicotinic bằng cách oxy hóa nicotin bởi axit cromic. Tuy nhiên mãi đến năm 1937 người ta mới phát hiện ra tính chất vitamin của nó. Vitamin PP có tác dụng chống được một loại bệnh da sần sùi gọi là bệnh pelagra, đó là xuất phát của tên gọi PP (preventive pelagra). Khi thiếu vitamin PP sẽ xảy ra các triệu chứng như sưng màng nhày da dày, ruột, sau đó da bị sần sùi nhất là các vị trí tiếp xúc nhiều với ánh sáng mặt trời. Cấu tạo hóa học của vitamin PP như sau :

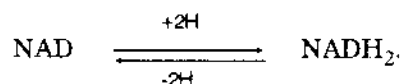


axit nicotinic

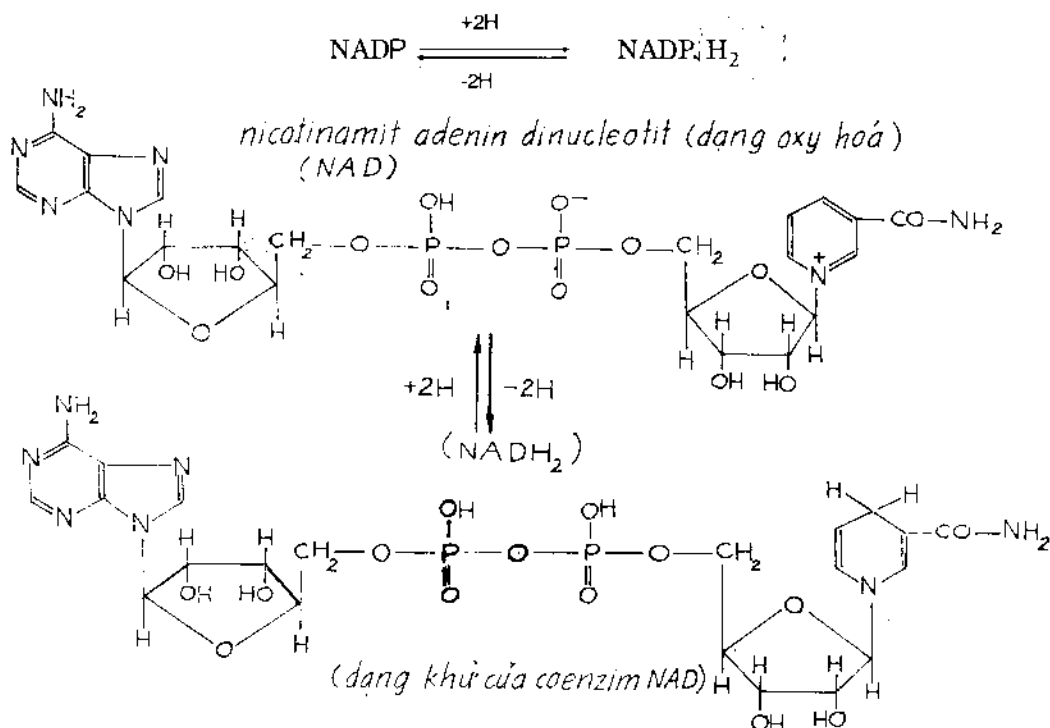


amit của axit nicotinic

Cả hai dạng trên đều có hoạt tính như nhau. Axit nicotinic là tinh thể hình kim màu trắng có vị amit, hòa tan được trong nước và rượu. Vitamin PP dạng axit bền với nhiệt, axit và kiềm ; còn dạng amit là tinh thể trắng có vị đắng cũng hòa tan tốt trong nước, song ít bền hơn đối với axit và kiềm. Ở cơ thể động vật, một phần vitamin PP có thể được tổng hợp từ triptophan nhờ sự tham gia của các loại vitamin B₂ và B₆. Chính vì vậy, khi dùng các thức ăn chứa protein có giá trị thấp, nghĩa là chứa ít triptophan đồng thời nếu thiếu cả vitamin B₂ và B₆ thì sẽ kéo theo cả hiện tượng thiếu vitamin PP. Về cơ chế tác dụng của vitamin PP, người ta đã chứng minh rất rõ ràng rằng nó là thành phần quan trọng của các coenzim như NAD và NADP trong các enzym dehydrogenaza. Quá trình vận chuyển hydro nhờ các enzym này được thực hiện như sau :



Trường hợp của coenzim NADP cũng tham gia vận chuyển hydro tương tự. Coenzim này chứa thêm một gốc phosphat gắn vào đường riboza của mononucleotit tạo bởi adenin nên được gọi là nicotinamitadenin-dinucleotit-phosphat :

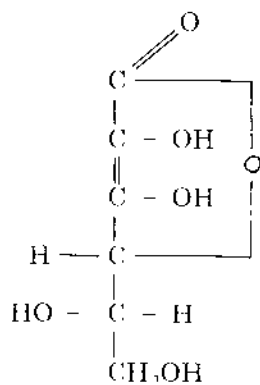


Như vậy dưới dạng coenzim NAD hoặc NADP, vitamin PP tham gia vào các quá trình oxy hóa - khử khác nhau ở cơ thể sinh vật. Vitamin PP có nhiều ở động vật và thực vật, đặc biệt ở nấm men. Trong hạt, phần chủ yếu vitamin PP tồn tại ở dạng este khó hấp thụ. Các sản phẩm của đậu chứa vitamin PP ở dạng hấp thụ được, hạt ngô chứa rất ít vitamin PP. Vitamin PP có nhiều trong thịt bò, gan bò, thận, tim, còn sữa chỉ chứa ít vitamin PP nhưng lại giàu triptophan là nguồn tạo nên vitamin PP. Thực vật bậc cao, nhiều vi sinh vật và cả một số động vật như chuột, ngựa, chim có thể tổng hợp được vitamin PP nhờ hai con đường : nhờ sự chuyển hóa triptophan ở các mô, hoặc nhờ sinh tổng hợp vitamin PP bởi các vi khuẩn đường ruột. Có thể tiến hành tổng hợp nhân tạo vitamin PP từ nicotin nhờ các chất oxy hóa khác nhau như axit cromic, axit nitric, kali permanganat, v.v.

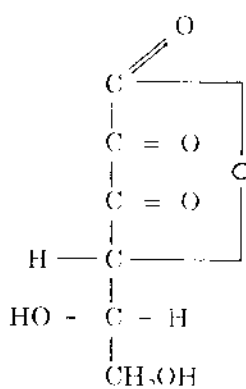
Trong quá trình bảo quản gạo, lượng vitamin PP hầu như không đổi. Khi chế biến bột trong môi trường kiềm hàm lượng vitamin B₁ giảm mạnh trong khi đó vitamin PP lại được giải phóng ra ở dạng hoạt động. Vitamin PP chịu được các quá trình gia nhiệt thông thường. Khi bảo quản trứng gà, người ta nhận thấy vitamin PP lúc đầu có nhiều ở lòng trắng, sau đó chuyển dần vào lòng đỏ và hao hụt mất 18% sau 7 tháng bảo quản. Vitamin PP có nhiều trong thịt nhất là thịt gà. Nhu cầu của người bình thường bằng 25 mg trong 24 giờ.

VI.2.5. Vitamin C (axit ascorbic)

Vitamin C tồn tại trong thiên nhiên dưới ba dạng phổ biến là axit ascorbic, axit dehydroascorbic và dạng liên kết ascorbigen. Nó chỉ tồn tại ở dạng *L* trong các sản phẩm thiên nhiên. Cho tới nay người ta phát hiện thấy 14 đồng phân và đồng đẳng của vitamin C có hoạt tính chống bệnh hoại huyết và 15 chất đồng phân không có hoạt tính. Các chất này phân biệt nhau bởi số lượng nguyên tử cacbon, sự sắp xếp của các nhóm nguyên tử ở các nguyên tử cacbon bất đối và dạng khử hoặc dạng oxy hóa. Công thức cấu tạo của vitamin C cho thấy nó là một dẫn xuất của đường :



axit *L* - ascorbic



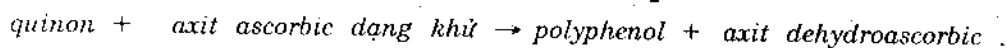
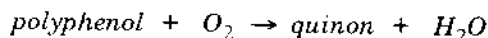
axit *L* -dehydroascorbic

Tính chất khử mạnh của vitamin C phụ thuộc vào sự có mặt của nhóm dienol trong phân tử của nó. Chính vì vậy mà dung dịch Fehling, bạc nitrat hoặc một số hợp chất có màu, đặc biệt chất 2,6 - diclôphenolindophenol bị khử bởi axit ascorbic ngay ở nhiệt độ thường. Trong thực phẩm có các chất ổn định vitamin C như protein trứng, thịt, gan, tinh bột, muối an, v.v. Dạng ascorbigen của vitamin C là dạng liên kết của nó với polypeptit. Trong thực vật nó chiếm tới 70% tổng hàm lượng vitamin C. Dạng ascorbigen bền đối với các chất oxy hóa nhưng hoạt tính chỉ bằng một nửa của vitamin C tự do. Ngoài dạng liên kết với polypeptit còn có các dạng liên kết khác, ví dụ, dạng liên kết với Fe và axit nucleic, với polyphenol. Vitamin C được tổng hợp dễ dàng ở thực vật. Đa số động vật, trừ chuột bạch, khỉ và người, đều có khả năng tổng hợp được vitamin C từ đường glucoza. Sở dĩ người không có khả năng đó có lẽ vì thiếu các enzym đặc hiệu xúc tác cho sự chuyển hóa glucoza thành vitamin C.

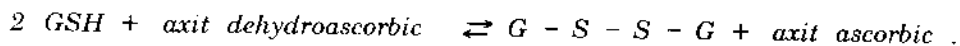
Khi cơ thể bị thiếu vitamin C sẽ xuất hiện các triệu chứng bệnh lý như chảy máu ở lợi, răng, ở các lỗ chân lông hoặc các nội quan. Vitamin C tham gia vào các quá trình oxy hóa - khử khác nhau ở cơ thể. Nó xúc tác cho sự chuyển hóa nhiều hợp chất thơm thành các dạng phenol tương ứng. Ví dụ, quá trình hydroxyl hóa triptophan thành hydroxytryptophan, hoặc phenylalanin chuyển thành tirozin. Phản ứng chuyển amin hóa giữa tirozin và axit α - xetoglutaric tạo nên sản phẩm là axit paraoxyphenylpyruvic cũng thực hiện với sự tham gia của vitamin C. Ngoài ra, vitamin C còn tham gia điều hòa sự tạo ADN từ ARN hoặc chuyển procollagen thành collagen. Nhờ quá trình hydroxyl hóa prolin tạo nên chất oxyprolin cần thiết cho sự tổng hợp collagen. Chính vì vậy nó có tác dụng làm cho vết thương chóng lành sẹo. Vitamin C

còn liên quan với sự hình thành các hormon của tuyến giáp trạng và tuyến trên thận. Nó rất cần thiết cho cơ thể để tăng sức đề kháng và chống lại các hiện tượng choáng hoặc ngộ độc bởi các hóa chất cũng như các độc tố của vi trùng. Người ta cũng chứng minh rằng vitamin C có liên quan tới sự trao đổi glucit ở cơ thể, vì khi bị bệnh hoại huyết trao đổi glucit ở cơ tim bị rối loạn, sự phân giải glicogen và glucoza tăng lên mạnh, đồng thời tăng tích lũy axit lactic. Hiện tượng này sẽ biến đi nhanh chóng nếu thêm vitamin C vào các chất dinh dưỡng.

Vitamin C có nhiều trong các loại rau quả như cam, chanh, dâu, dưa chuột, ớt, cà chua, rau cải, hành, v.v. Còn trong các loại hạt ngũ cốc hoặc trong trứng, thịt, hầu như không có vitamin C. Hàm lượng vitamin C biến đổi nhiều phụ thuộc vào loài, vị trí trồng trọt và các yếu tố như độ chiếu sáng, khí hậu, v.v. Bình thường lượng vitamin C giảm dần từ phía vỏ ngoài vào bên trong ruột của quả. Khi bảo quản rau quả ở nhiệt độ thấp vẫn có thể xảy ra sự oxy hóa trực tiếp vitamin C bởi oxy của không khí mặc dầu hoạt tính của enzym *ascorbatoxydaza* lúc đó không đáng kể. Enzim *ascorbatoxydaza* xúc tác sự oxy hóa trực tiếp axit ascorbic bằng oxy là một loại enzym chứa Cu có pH thích hợp khoảng 4,6 - 6,6. Khi làm lạnh tới -20°C, hoạt động của enzym sẽ bị ngừng hẳn lại. Ánh sáng cũng tham dự vào việc xúc tiến sự oxy hóa vitamin C. Trong môi trường axit, vitamin C khá ổn định, vì vậy khi chiết rút vitamin C từ các nguyên liệu, người ta thường dùng các axit tricloaxetic hoặc metaphosphoric. Nhìn chung, khi bảo quản quả ở nhiệt độ 0 - 4°C sự giảm sút về vitamin C không đáng kể. Ở một số dịch quả, người ta nhận thấy vitamin C có thể bị oxy hóa gián tiếp bởi enzym *phenoloxydaza*. Chính vì vậy khi có mặt vitamin C, dịch quả sẽ sẫm màu chậm hơn (do quá trình ngưng tụ các hợp chất quinon) :



Axit dehydroascorbic lại có thể bị khử bởi các hợp chất như glutathion hoặc xistein theo sơ đồ sau :

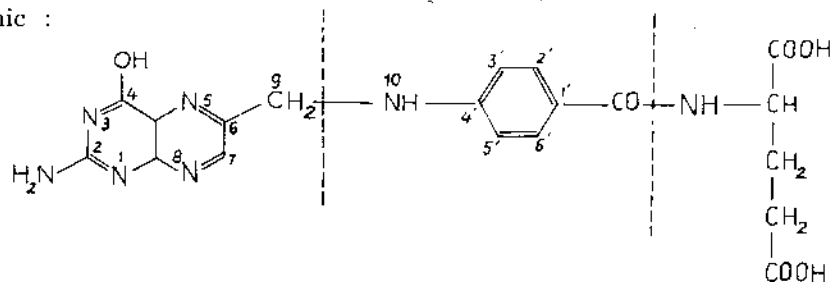


GSH và G - S - S - G là công thức tóm tắt của glutathion dạng khử và dạng oxy hóa. Dựa vào tính chất chống oxy hóa của axit ascorbic, người ta thường thêm nó vào dịch quả để ngăn cản quá trình sẫm màu. Tính chất chống oxy hóa của axit ascorbic còn được sử dụng để bảo vệ tocopherol và cả vitamin A ở thịt khi bảo quản, vì axit ascorbic là nguồn dự trữ hydro, nó có thể nhường hydro trực tiếp cho các peroxyt. Để giữ được vitamin C, người ta thêm một số chất ổn định, ví dụ, đường sacaroza, axit hữu cơ, sorbitol, glixerin hoặc một số hợp chất của antoxian, flavonoid bao gồm cả một số chất có tác dụng của vitamin PP. Các hỗn hợp thiên nhiên như các flavin, carotenoid bảo vệ được vitamin C tốt hơn so với các chất chống oxy hóa thông thường khác. Chất kháng sinh penixilin cũng bảo vệ tốt vitamin C, ngược lại streptomixin lại làm tăng nhanh sự oxy hóa vitamin C, còn CO₂ được coi như chất kháng vitamin C vì khi bảo quản, nhất là quả xanh, hàm lượng vitamin C giảm đi rất nhanh nếu thổi CO₂ vào quả. Khi nghiên cứu sự oxy hóa vitamin C ở dịch chanh, cam người ta nhận thấy rằng ở dịch lọc nó bị oxy hóa nhanh hơn so với dịch chưa

lọc, đó là do ở cận lọc có chất "bảo vệ" vitamin C, chất này lại không thấy có ở dịch tảo. Ở một số quả, vitamin C được duy trì lâu nhờ có các chất kìm hãm oxy hóa, các chất này được gắn vào các chất màu đỏ và vàng của quả. Cùng có thể tính axit của quả là một yếu tố góp phần bảo vệ vitamin C. Do tính chất không bền của vitamin C nên mọi quá trình bảo quản và chế biến rau quả phải được nghiên cứu đầy đủ để giữ được lượng vitamin C cao nhất trong các sản phẩm chế biến. Nhu cầu về vitamin C thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố : tuổi, điều kiện lao động, nghề nghiệp, khí hậu, v.v. Người bình thường cần khoảng 80 - 100 mg vitamin C trong 24 giờ. Có thể điều chế dịch cô đặc vitamin C từ các nguyên liệu thực vật hoặc tổng hợp từ D - glucoza.

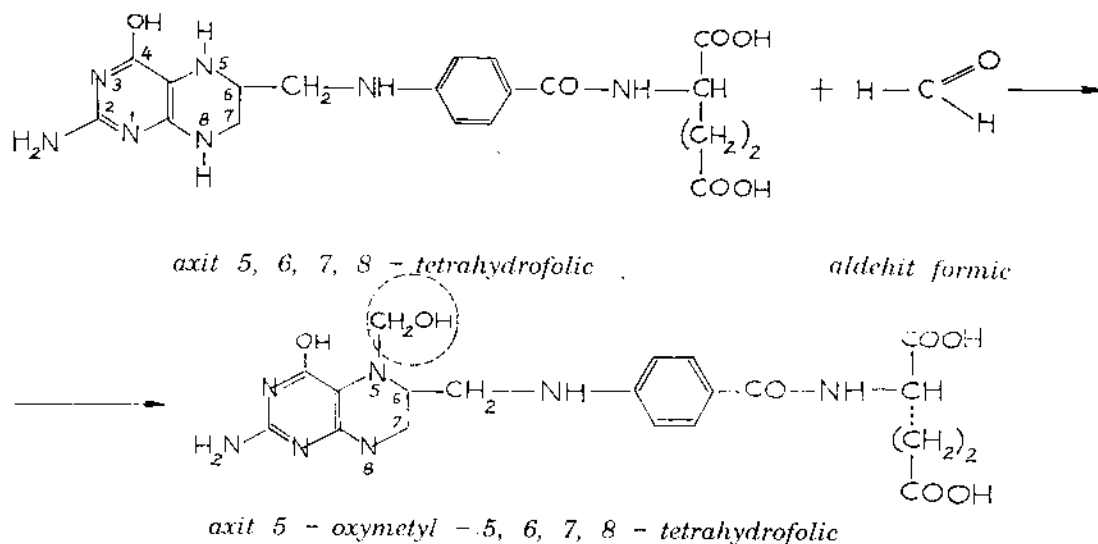
VI.2.6. Các vitamin nhóm axit folic (vitamin B_c)

Việc phát hiện ra các vitamin nhóm axit folic gắn liền với các nghiên cứu về vitamin nhóm B. Khi nghiên cứu về các chất cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật năm 1941, Williams đã nhận thấy rằng ở các nguyên liệu như nấm men, gan và cả ở lá cây có các yếu tố kích thích sinh trưởng của nhiều loại vi sinh vật *S.lactis*, *L.casei*, v.v. Do tính chất phổ biến ở lá nên người ta đặt tên các yếu tố đó là axit folic. Axit folic bao gồm cả một nhóm chất tương tự nhau về cấu trúc hóa học và tính chất sinh học tùy thuộc vào nguồn chứa các vitamin đó. Axit folic mang tên là vitamin B_c (c là chữ viết tắt của từ chicken tiếng Anh nghĩa là gà con) vì nó cũng cần thiết cho sự phát triển của gà con. Ngoài ra một dạng axit folic khác được gọi là vitamin M (M là từ monkey tiếng Anh nghĩa là khỉ). Đó là dạng liên kết của axit folic vốn cần thiết đối với sự sinh trưởng của khỉ. Axit folic bao gồm ba gốc liên kết với nhau: đó là gốc pterin, gốc axit paraaminobenzoic và gốc axit glutamic :



Axit pteroylmonoglutamic trên đây là chất chính của nhóm axit folic. Các hợp chất thuộc nhóm axit folic có thể phân biệt nhau về gốc axit glutamic. Ví dụ, người ta biết có các loại axit pteroyltriglutamic, axit pteroylheptaglutamic, v.v. Axit folic là tinh thể hình kim, màu vàng, hòa tan ít trong nước, không hòa tan trong đa số các dung môi hữu cơ. Nó bị phân giải nhanh ngoài ánh sáng, nhất là trong môi trường axit, bền ở môi trường có pH từ 5,0 - 10,0. Khi tồn tại trong các sản phẩm thiên nhiên, nó bền hơn so với khi ở dung dịch tinh khiết. Dạng axit folic phổ biến trong nấm men, cám gạo và gan là axit 5, 6, 7, 8 - tetrahydrofolic dạng khử. Dưới dạng này, axit folic tham gia vận chuyển các gốc chứa một cacbon trong các quá trình sinh tổng hợp nhiều loại chất quan trọng ở cơ thể. Ví dụ, vận chuyển nhóm methyl (-CH₃) khi tổng hợp metionin và timin, nhóm oxymethyl (-CH₂OH) khi tổng hợp serin, nhóm formyl (-CHO) khi tổng hợp các bazơ purin, pirimidin hoặc một số axitamin, v.v. Trong những trường hợp này, các gốc chứa một cacbon được gắn vào vị trí N₅.

của axit tetrahydrofolic. Người ta đã chứng minh được rằng axit tetrahydrofolic có trong thành phần coenzim của nhiều loại enzym khác nhau song nhiều chi tiết về cơ chế tác dụng còn chưa rõ. Trong phản ứng tổng hợp serin từ glixin, axit tetrahydrofolic giữ vai trò của chất vận chuyển nhóm oxymetyl :



Chất này tác dụng với glixin ($\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$) sẽ tạo nên serin ($\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$) bằng cách chuyển gốc CH_2OH cho glixin và lại chuyển thành axit 5, 6, 7, 8 - terahydrofolic. Trong quá trình vận chuyển gốc CH_2OH cho glixin có sự tham gia của các protein đặc hiệu gắn với axit tetrahydrofolic. Khi vận chuyển gốc CH_3 trong phản ứng tổng hợp metionin từ homoxistin, axit tetrahydrofolic tác dụng phối hợp với cả vitamin B_{12} .

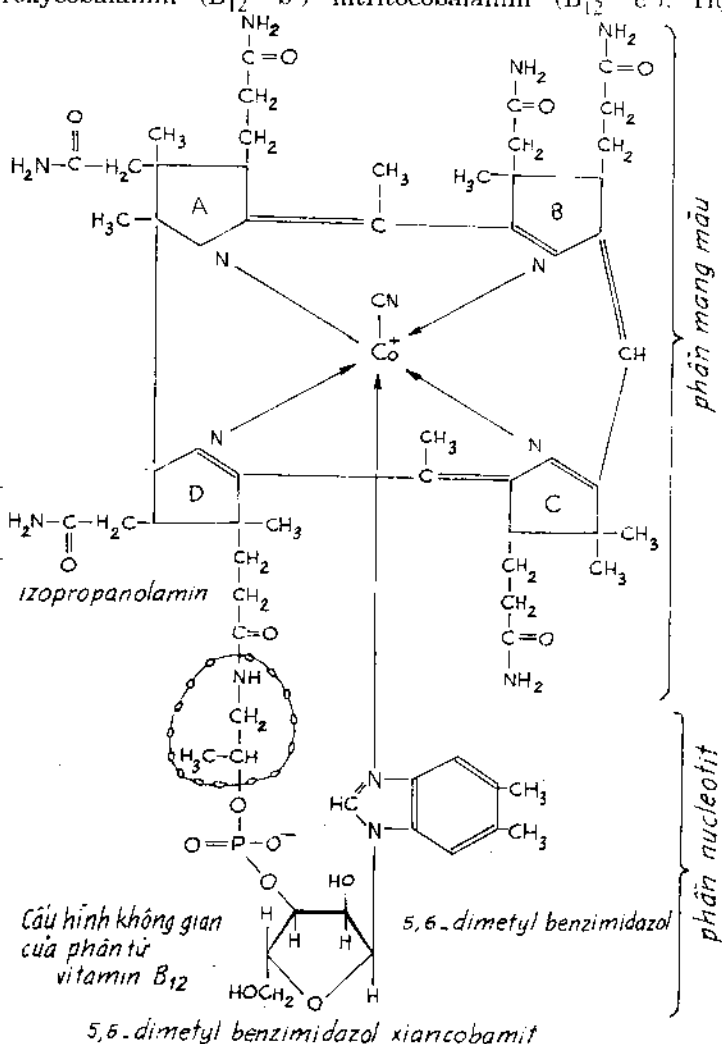
Do chức năng tạo vòng porphirin và hemin nên axit folic có tác dụng chống bệnh thiếu máu. Axit folic cần thiết đối với sự sinh trưởng của người, động vật, chim, còn đa số vi khuẩn, nấm men và thực vật bậc cao đều tự tổng hợp lấy axit folic. Do axit folic tham gia vào sự trao đổi các hợp chất chứa một cacbon, từ đó tạo nên nhiều chất quan trọng của cơ thể nên khi thiếu axit folic sẽ kéo theo những rối loạn trầm trọng về trao đổi chất. Thông thường người ít mắc phải các triệu chứng thiếu axit folic vì các vi khuẩn sống ở đường tiêu hóa có khả năng sinh tổng hợp axit folic đủ để cung cấp cho nhu cầu của cơ thể. Nguồn axit folic là rau xanh, gan, thận, nấm men v.v. Trong các sản phẩm đậu, thịt, sữa hàm lượng axit folic thấp hơn, còn trong quả chỉ chứa rất ít axit folic. Khoảng 50% axit folic chung tồn tại ở dạng khử (dạng dẫn xuất 5 - formyl - 5, 6, 7, 8 - tetrahydrofolic). Dạng này không bền, dễ oxy hóa và chuyển trở lại thành axit folic. Do tính nhạy cảm đối với nhiệt độ nên khi chế biến rau, quả axit folic giảm khá nhiều. Thịt kho mất từ 70 - 90%, còn thịt rán mất 95%. Trứng luộc mất 20 - 50% axit folic. Khi bảo quản trứng sống, hàm lượng axit folic giảm đi khoảng 26,6%, một ít axit folic chuyển từ lòng đỏ vào lòng trắng còn sự giảm sút tập trung chủ yếu ở lòng đỏ. Axit folic đặc biệt nhiều trong nấm men nên có thể dùng nguồn này để bổ sung cho các sản phẩm chứa ít axit folic. Hiện nay trong kỹ nghệ người ta điều chế axit folic hoàn toàn bằng phương pháp tổng hợp từ ba loại sản phẩm là chất 2, 4, 5 - triamino - 6 - oxypirimidin diclorua, aldehyt - 2, 3 - đibrompropionic và axit paraaminobenzoilglutamic.

Sau quá trình ngưng tụ, sản phẩm được tinh chế lại bằng cách kết tinh trong nước nóng.

VI.2.6. Vitamin B₁₂ (corinoit , xiancobalamin)

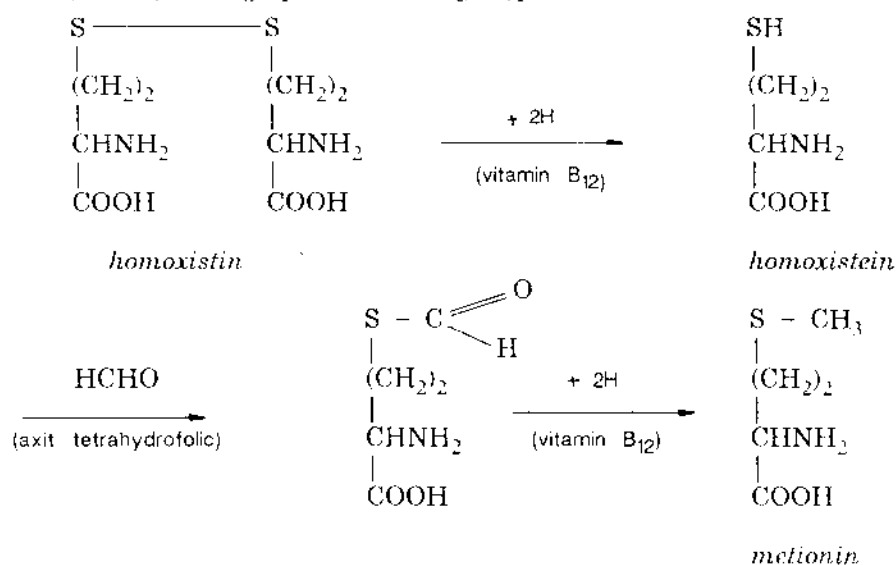
Từ năm 1926, Minot và Mecfi đã phát hiện tác dụng chữa bệnh của gan đối với bệnh thiếu máu ác tính và được giải thưởng Nobel. Sau đó 22 năm mới thu được dạng kết tinh của yếu tố hoạt động từ dịch gan và đặt tên là vitamin B₁₂. Đó là các tinh thể màu đỏ, không có vị và mùi. Phân tử lượng của vitamin B₁₂ bằng 1490 ± 150 . Nó hòa tan tốt trong nước và rượu. Dung dịch trung tính hoặc axit yếu của vitamin B₁₂ bền trong tối và ở nhiệt độ thường, ở ngoài sáng nó lại dễ dàng bị phân hủy. Vitamin B₁₂ được gọi chung là cobalamin, vì trong phân tử của nó có kim loại coban. Tại Hội nghị quốc tế về hóa sinh năm 1961, các nhà bác học đã đề nghị gọi tên nhóm vitamin B₁₂ là corinoit. Hiện nay, người ta biết khoảng 100 loại chất tương tự vitamin B₁₂ trong số đó có các chất quan trọng thường gặp như xiancobalamin (B₁₂), hydroxycobalamin (B₁₂ "b") nitritocobalamin (B₁₂ "c"). Hợp chất corinoit bị loại mất coban được gọi là corin, còn axit corinic là corin có cả các nhánh bên. Cấu trúc hóa học của vitamin B₁₂ bao gồm một mặt phẳng chứa các vòng pirol và nguyên tử coban chiếm vị trí trung tâm của các vòng đó, phần thứ hai của phân tử là một nhóm nucleotit thẳng góc với mặt phẳng, trên phần nucleotit này bao gồm thành phần bazơ nitơ là dimetylbenzimidazol và thành phần đường là α - D - ribofuranoza.

Vitamin B₁₂ chuyển vào cơ thể gắn với một hợp chất glucoproteit của dạ dày để tạo nên một phức hợp dễ hấp thụ cho cơ thể. Vai trò của vitamin B₁₂ được nghiên cứu rất nhiều, song vẫn còn những chi tiết chưa rõ. Nhiều dẫn liệu thí nghiệm đã chứng minh rằng nó tham gia vào quá trình tổng hợp protein và axit nucleic ở cơ thể. Có lẽ rằng, cũng như các vitamin nhóm B khác, vitamin B₁₂ là thành phần của các coenzim



1) Cobamit là tên dùng để chỉ cobalamin không chứa phần nucleotit 5, 6 - dimethylbenzimidazol

xúc tác cho các quá trình đó. Vitamin B₁₂ cũng tham gia vào sự trao đổi các hợp chất chứa một cacbon và thường phối hợp, tác dụng với axit folic trong các phản ứng metyl hóa, ví dụ, trong quá trình tổng hợp metionin từ homoxistin :



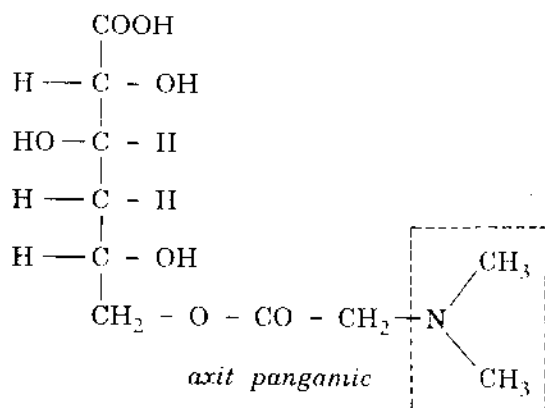
Các phản ứng chuyển metyl hóa khác trong đó có sự tham gia của vitamin B₁₂ là phản ứng tổng hợp N - metylnicotinamit từ nicotinamit hoặc tổng hợp creatin.v.v. Vitamin B₁₂ còn liên quan tới sự chuyển hóa của các hợp chất sulfidryl, nó tham gia vào sự khử các hợp chất disulfit tạo thành các hợp chất sulfidryl do đó nó duy trì hoạt tính của các enzym chứa nhóm SH và ảnh hưởng tới sự trao đổi protein, gluxit cũng như lipid. Vitamin B₁₂ là loại vitamin hầu như độc nhất được tổng hợp bởi các vi sinh vật. Thực vật chỉ chứa rất ít vitamin B₁₂. Vitamin B₁₂ chỉ phát hiện thấy một lượng nhỏ ở hạt cũng là do nguồn vi sinh vật phát triển trên bề mặt của hạt. Ở một số loài tảo cũng có vitamin B₁₂ do các vi sinh vật cộng sinh tạo ra. Ở động vật, các vi khuẩn của ruột có khả năng tổng hợp vitamin B₁₂ và cung cấp nó cho động vật chủ, vì vậy các sản phẩm động vật thường giàu vitamin B₁₂. Gan, thịt, cá, trứng, sữa là các nguồn sản phẩm giàu vitamin B₁₂. Khi bảo quản các sản phẩm giàu vitamin B₁₂, như sữa, gan, trứng, ... người ta nhận thấy, hàm lượng vitamin B₁₂ trong sản phẩm có thể thay đổi ít nhiều tùy theo điều kiện xử lý trước khi bảo quản và trong khi bảo quản. Ví dụ, khi tiệt trùng sữa bằng phương pháp làm nóng trực tiếp (sục hơi nước vào sữa) hoặc gián tiếp (hấp trong các thiết bị vô trùng) sự hao hụt vitamin B₁₂ thay đổi từ 10 - 20%. Khi bảo quản sữa cô đặc không thêm đường ở nhiệt độ thấp, sau 4 năm sẽ mất đi khoảng 35% lượng vitamin B₁₂. Trứng cũng là sản phẩm rất quý về phương diện vitamin nói chung và vitamin B₁₂ nói riêng. Trong 7 tháng đầu khi bảo quản trứng, vitamin B₁₂ khá bền, nhưng sau thời gian đó hàm lượng vitamin B₁₂ sẽ giảm đi rõ rệt và mất đi tới 32% sau một năm. Ở lòng trắng trứng chỉ có ít vitamin B₁₂. Do trọng lượng phân tử của vitamin B₁₂ lớn, nên không có sự di chuyển nó từ lòng đỏ sang lòng trắng trong quá trình bảo quản. Trong kỹ nghệ, người ta lợi dụng khả năng sinh tổng hợp vitamin B₁₂ bởi hàng loạt vi sinh vật, đặc biệt các loại xạ khuẩn, nấm mốc loại *Streptomyces*, các vi khuẩn lên men propionic để sản xuất vitamin B₁₂. Trong quá trình ủ thức ăn cho gia súc, các vi sinh vật phát triển ở thức ăn ủ cũng tổng hợp được một lượng đáng

kể vitamin B₁₂. Thêm muối coban vào dịch nuôi cấy của chúng hoặc thức ăn ủ sẽ kích thích sự tổng hợp vitamin B₁₂. Vitamin B₁₂ có ý nghĩa quan trọng đối với chăn nuôi gia súc. Nó làm tăng sự hấp thụ thức ăn protein thực vật, tăng trưởng và tích lũy mỡ. Vitamin B₁₂ cũng làm tăng sinh sản đẻ trứng và nở trứng ở gà mái. Ngoài ra còn có những dẫn liệu chứng minh rằng tác dụng của vitamin B₁₂ sẽ tăng lên nhiều nếu phối hợp thêm vào thức ăn của gia súc một ít chất kháng sinh biomixin.

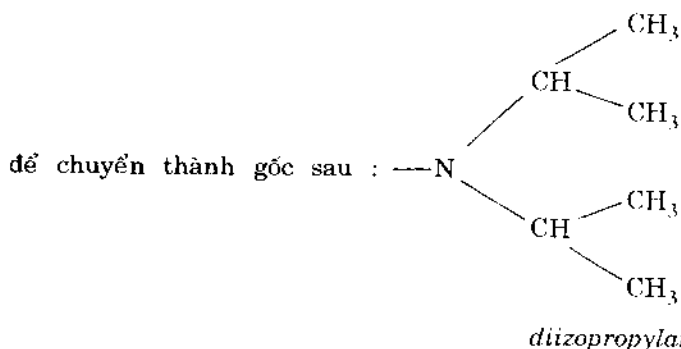
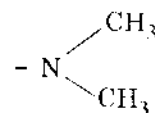
Nhu cầu về vitamin B₁₂ ở người chưa được xác định rõ ràng. Một vài tác giả đã cho biết rằng đối với các bệnh nhân thiếu máu ác tính, để có thể hồi phục lượng vitamin dự trữ trong gan cần phải dùng tới 50 γ vitamin B₁₂ hoặc hơn nữa trong một ngày. Sau thời gian hồi phục, chỉ cần từ 1 - 1,5 γ vitamin B₁₂ trong một ngày là đủ. Để đảm bảo hấp thụ được đủ lượng vitamin B₁₂ đó cho cơ thể, trung bình cần một chế độ thức ăn chứa khoảng 3 - 5 γ vitamin B₁₂ một ngày. Đối với cơ thể đau ốm, già, phụ nữ có chửa, nhu cầu về vitamin B₁₂ tăng lên.

VI.2.7. Vitamin B₁₅ (axit pangamic)

Năm 1950 Tomiyama đã phát hiện thấy trong dịch chiết của gan bò một yếu tố khác với vitamin B₁₂ và đặt tên nó là vitamin B₁₅. Tới năm sau, Krebs và các tác giả khác phân tích các sản phẩm thực vật cũng tìm thấy một loại chất rất phổ biến ở các hạt do đó đặt tên axit pangamic (từ pan tiếng latinh là khắp nơi, gami tiếng latinh là hạt giống). Sau đó người ta đã xác nhận rằng vitamin B₁₅ và axit pangamic là một. Axit pangamic có trong mầm lúa, nấm men bia, nhân hạt mơ, máu bò, gan ngựa.



Axit pangamic còn có các dạng dẫn xuất trong đó nó chứa 4, 8 nhóm methyl hoặc tới 12 nhóm methyl. Các dẫn xuất này thu được bằng cách thay thế vào vị trí của các hydro ở các nhóm methyl bằng các gốc -CH₃. Ví dụ, có thể thu được dẫn xuất đó ở gốc dimetylamin :



Dẫn xuất này chứa tới bốn gốc -CH₃. Khi thay thế hai nguyên tử hydro của -CH₃ bằng các nhóm diizopropylamin sẽ thu được dẫn xuất chứa 8 nhóm methyl.

Việc tổng hợp axit pangamic được thực hiện hai kiểu khác nhau, kiểu thứ nhất là cho *D* - gluconolacton tác dụng với axit monocloaxetic sau đó sản phẩm thu được lại tác dụng tiếp với dimetylamin. Kiểu này cho hiệu suất khoảng 56%. Kiểu thứ hai dựa trên phản ứng este hóa axit gluconic bằng dimethylglixin. Hiệu suất của phản ứng này là 25%.

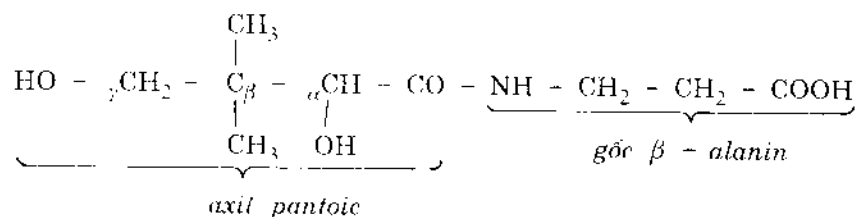
Ở cơ thể động vật người ta chưa chứng minh được đầy đủ là axit pangamic có được tổng hợp hay không hoặc phải lấy hoàn toàn từ thức ăn, nhưng có điều chắc chắn là các thành phần cấu tạo của nó như axit *D* - gluconic hoặc dimethylglixin là những sản phẩm trao đổi thông thường của sự chuyển hóa colin ở cơ thể.

Do tính chất linh động của các nhóm metyl trong phân tử của axit pangamic nên nó có khả năng tham gia vào các phản ứng metyl hóa khác nhau của cơ thể. Dẫn xuất canxi pangamat là một loại bột trắng hòa tan tốt trong nước, không hòa tan trong các dung môi hữu cơ. Nó bền trong axit và ở nhiệt độ tới 100°C, không bền trong kiềm.

Vitamin B₁₅ kích thích chức năng của hệ não thùy, tuyến trên thận và hệ thần kinh trung ương. Nó tham gia vào quá trình metyl hóa trong phản ứng tổng hợp creatin, metylnicotinamit, ..., do đó cũng có tác dụng ngăn cản sự thâm mỡ ở gan như các chất metionin, colin, betain hoặc axit folic, vitamin B₁₂. Vitamin B₁₅ bảo đảm sự tổng hợp bình thường metionin và colin ở cơ thể. Vitamin B₁₅ còn tham gia vào sự hoạt hóa trao đổi oxy ở cơ thể và có tác dụng làm cho cơ thể chống độc tốt, có lẽ đó là do nó còn có vai trò như một coenzim xúc tác cho các quá trình oxy hóa. Như vậy, hoạt tính của vitamin B₁₅ có thể liên quan đồng thời đến cả khả năng metyl hóa và khả năng tham gia vào các quá trình oxy hóa ở cơ thể. Sự có mặt của gốc dimethylglixin trong phân tử vitamin B₁₅ có lẽ là nguyên nhân làm cho nó có khả năng dimetyl hóa. Khi đó vitamin B₁₅ được sử dụng như một nguồn nhóm oxymetyl. Tuy nhiên giả thuyết này còn cần được kiểm tra đầy đủ hơn.

VI.2.8. Vitamin B₃ (axit pantotenic)

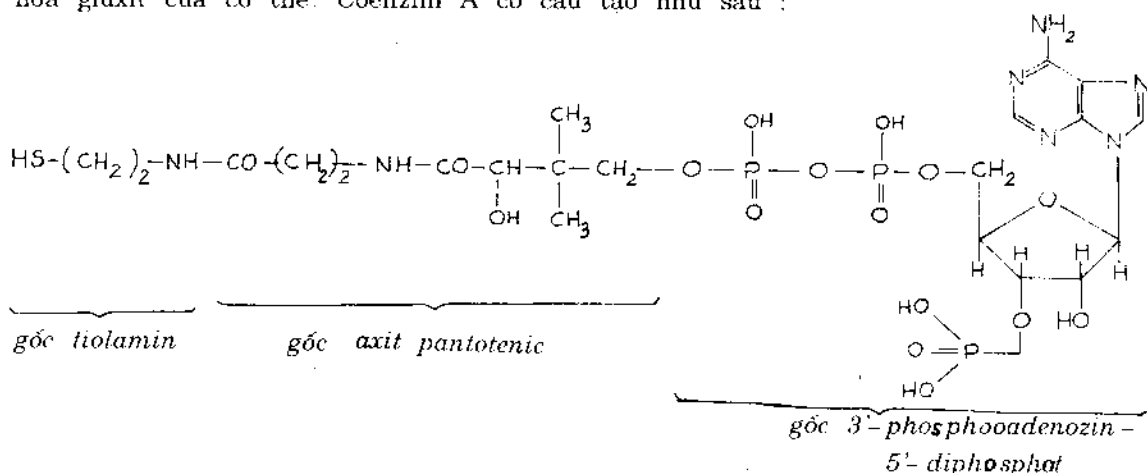
Axit pantotenic được tìm ra vào khoảng năm 1933 nhờ các nghiên cứu của Williams về các chất kích thích sự sinh trưởng của nấm men. Tới năm 1939 người ta thu được axit pantotenic dạng tinh thể từ dịch gan và đến năm 1940 thì xác định được cấu tạo hóa học của nó. Đó là chất α, γ - dioxy - β, β - dimethylbutyryl - β - alanin :



Vitamin B₃ rất phổ biến ở các đối tượng sinh vật khác nhau do đó có tên là axit pantotenic (từ pantoten tiếng latin là khắp nơi).

Axit pantotenic là một chất lỏng nhớt có màu vàng, dễ hòa tan trong nước, axit axetic, rượu etylic và hòa tan rất ít trong các dung môi hữu cơ khác. Nó bền với nhiệt và với oxy không khí trong môi trường trung tính, còn trong môi trường axit và kiềm nóng liên kết peptit - CONH - của axit pantotenic dễ bị thủy phân. Dạng được sử dụng phổ biến của axit pantotenic là dạng muối canxi pantotenat.

Cơ thể người không có khả năng tự tổng hợp lấy axit pantotenic, nhưng có thể sử dụng axit pantotenic có sẵn để tổng hợp coenzim A là thành phần đặc biệt quan trọng tham gia vào các quá trình tổng hợp và phân giải axit béo cũng như chuyển hóa glucit của cơ thể. Coenzim A có cấu tạo như sau :



Vì vậy khi cơ thể bị thiếu axit pantotenic sẽ kèm theo hiện tượng coenzim A không được tổng hợp, từ đó gây rối loạn trao đổi hàng loạt chất ở cơ thể. Đồng thời dẫn tới sự xuất hiện các triệu chứng bệnh lý như sưng ngoài da và màng nhầy các nội quan, rụng tóc, thoái hóa nhiều cơ quan, ví dụ, một số tuyến nội tiết.

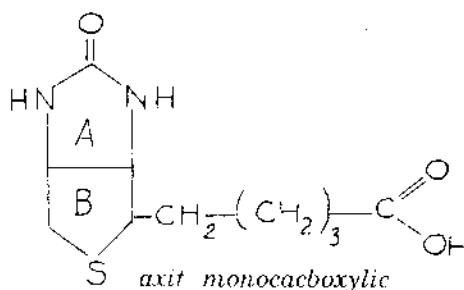
Axit pantotenic có nhiều ở nấm men, gan, các phần xanh của thực vật và được tổng hợp bởi các vi khuẩn đường ruột. Thông thường cơ thể ít bị thiếu loại vitamin này vì nó phổ biến trong các sản phẩm dinh dưỡng. Nhu cầu của người bình thường là 7 - 10 mg trong 24 giờ. Trong các phương pháp được sử dụng để tổng hợp axit pantotenic, người ta đặc biệt chú ý tới phương pháp của Bir và Preobragiensi, xuất phát từ nguyên liệu đầu tiên là alcol tương ứng với phần axit pantoic và gắn thêm các hợp chất chứa một carbon, sẽ ngưng tụ với muối natri của β - alanin để chuyển thành natri pantotenat.

VI.2.9. Vitamin H (biotin)

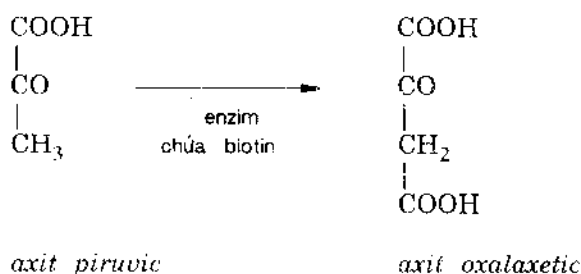
Vitamin H hay biotin được tách ra ở dạng tinh thể năm 1936 từ lòng đỏ trứng. Nó là một loại axit monocarboxylic có cấu trúc vòng.

Vòng A của biotin là vòng imidazol còn vòng B là vòng tiophen. Vitamin H là tinh thể hình kim không màu, hòa tan tốt trong nước, hòa tan ít trong rượu và không tan trong các dung môi hữu cơ khác. Nó bền đối với oxy và H_2SO_4 , biotin lại bị phân hủy bởi H_2O_2 , HCl và các chất kiềm.

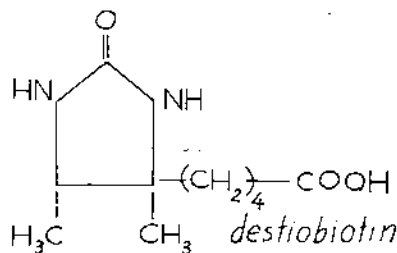
Biotin thuộc loại vitamin ít bị thay đổi khi bảo quản thực phẩm. Ví dụ, ở sữa cô đặc hoặc ở trứng khi bảo quản, hàm lượng vitamin H chỉ biến đổi không đáng



kể. Trong trứng, biotin tập trung chủ yếu ở lòng đỏ, tương tự như trường hợp của axit pantotenic. Tuy nhiên, trong khi bảo quản, người ta nhận thấy biotin không bị biến đổi hoặc di chuyển vào lòng trắng trứng, ngược lại axit pantotenic ở lòng đỏ trứng lại giảm đi nhiều sau khi bảo quản và chuyển từ lòng đỏ vào lòng trắng trứng. Biotin tham gia vào thành phần của các loại enzym xúc tác cho các quá trình cacboxyl hóa. Ví dụ :



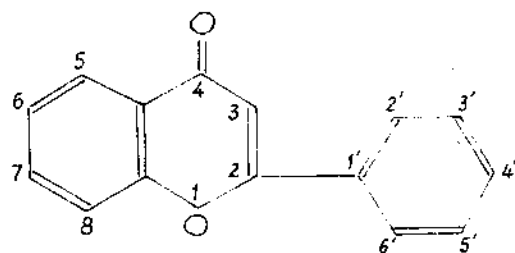
Quá trình cacboxyl hóa trên đã được chứng minh ở vi khuẩn lactic và cả ở động vật. Từ axit oxalaxetic hình thành ở trên có thể nhờ phản ứng chuyển amin hóa tiếp tục để tạo nên axit aspartic. Khi xúc tác cho quá trình cacboxyl hóa, biotin kết hợp với CO_2 tạo thành phức hợp, do đó CO_2 trở nên hoạt động và có khả năng gắn vào nhóm methyl của axit piruvic. Sự liên kết với CO_2 xảy ra nhờ nguyên tử nitơ của vòng imidazol trong phân tử biotin còn phần coenzim của biotin được gắn vào phần protein - enzym qua nhóm cacboxyl của biotin và nhóm NH_2 của lizin trong protein-enzim. Gần đây nhiều tài liệu cho biết rằng biotin còn tham gia vào các phản ứng khử amin, trao đổi triptophan hoặc chuyển nhóm cacboxyl từ một hợp chất này sang một hợp chất khác. Biotin là thành phần đặc biệt quan trọng đối với quá trình tổng hợp các axit béo. Nó còn có thể tham gia vào các giai đoạn nhất định của sự tổng hợp protein, bazơ purin hoặc nhiều chất khác. Việc tổng hợp biotin theo phương pháp hóa học bắt đầu từ quá trình xây dựng các thành phần vòng sau đó gắn thêm nhánh bên là khá lâu và phức tạp. Vì vậy cho tới năm 1945 người ta đã đưa ra một phương pháp đơn giản để tổng hợp một chất tương tự với chất destiobiotin dẫn xuất của biotin, đó là chất hexylglioxylicon, chất này có hoạt tính tương tự destiobiotin. Khi nuôi cấy nấm men và đưa thêm hexylglioxylicon vào môi trường sẽ thu được rất nhiều biotin. Hexylglioxylicon khác destiobiotin ở chỗ là nó không chứa nhóm CH_3 ở nguyên tử cacbon gần trong vòng và nhóm COOH lại được thay thế bởi gốc methyl.



Biotin có nhiều trong gan động vật có sừng, sữa, nấm men, đậu tương. Các sản phẩm khác như rau cải, hành khô, thận, tim, lòng đỏ trứng, ... cũng là nguồn giàu biotin. Biotin có thể kết hợp với một loại protein độc của trứng gà gọi là avidin, quá trình kết hợp này xảy ra ở ruột. Vì vậy việc sử dụng nhiều trứng gà sống làm thực phẩm sẽ gây ra thiếu biotin ở cơ thể. Nếu đun chín thì avidin sẽ không còn khả năng tạo phức hợp với biotin. Do tính phổ biến ở nhiều sản phẩm dinh dưỡng và được tổng hợp bởi các vi khuẩn đường ruột nên bình thường nhu cầu về biotin được thỏa mãn đầy đủ. Trong trường hợp thiếu biotin sẽ xuất hiện các triệu chứng như sưng ngoài da, rụng tóc, tăng thải axit béo, v.v. Bình thường cần khoảng 150 - 300 γ biotin trong 24 giờ.

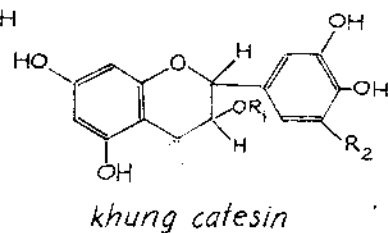
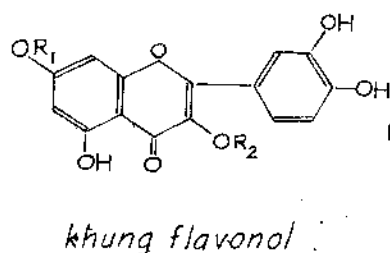
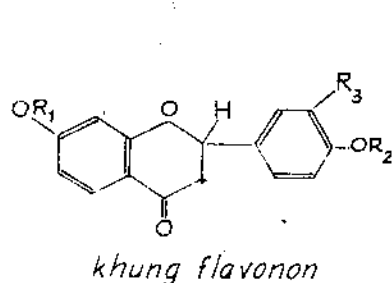
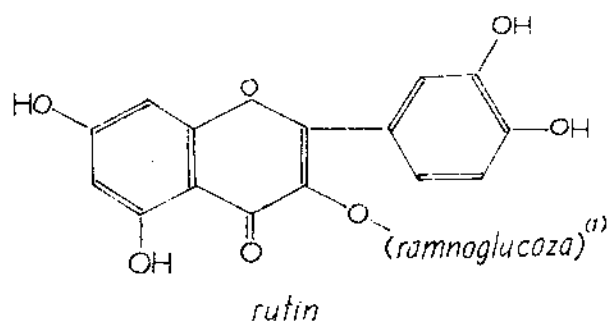
VI.2.10. Vitamin P (rutin, bioflavonoit)

Vitamin P hay rutin bao gồm một nhóm hợp chất có cấu trúc cơ sở là khung flavon:



Các chất thuộc nhóm vitamin P khác nhau bởi mức độ hydroxyl hóa vòng benzen và bởi các gốc glucosit gắn vào C₂ của vòng piran trong nhân flavon. Các chất flavon trong thiên nhiên tồn tại chủ yếu dưới dạng hợp chất glucosit. Một ví dụ về hợp chất flavonoid có hoạt tính của vitamin P là chất rutin.

Hiện nay người ta biết rất nhiều loại flavonoid có tác dụng của vitamin P. Các chất chứa khung flavonon như hesperidin, khung flavonol như rutin, kverxetin, khung catesin như epicatechin, epicatechingallat, ... đều thuộc nhóm vitamin P



Ở hesperidin R₁ là gốc ramnoglucosa, R₂ là CH₃ và R₃ là OH. Trong công thức của rutin R₁ là H còn R₂ là gốc ramnoglucosa. Epicatechin là hợp chất rất quan trọng của lá chè, nó chứa khung catesin trong đó R₁ là H và R₂ là H. Nếu thay thế gốc R₁ bằng axit gallic sẽ thu được dẫn xuất gọi là epicatechin gallat

Chế phẩm hóa học tinh khiết của vitamin P có dạng tinh thể màu vàng da cam, ít hòa tan trong nước, hòa tan được trong rượu và không có vị, không có mùi.

Vitamin P có tác dụng củng cố và làm giảm tính thấm của thành mao quản. Người ta giả thiết rằng vitamin P tham gia trong các phản ứng oxy hóa - khử và

(1) Đường renunosa là dẫn xuất 6 - deoxymanoza

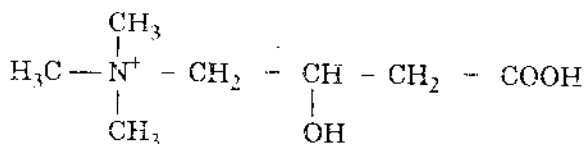
tác dụng của nó liên quan chặt chẽ với tác dụng của vitamin C. Khi thiếu vitamin P trong thức ăn, tính thấm của mao quản tăng lên, dễ băng huyết bất thường, mệt mỏi nhanh. Tác dụng ức chế của các bioflavonoit lên hoạt tính của hàng loạt enzym có lẽ liên quan tới cấu trúc polyphenol của chúng. Khi đó có thể xảy ra phản ứng giữa nhóm quinon của phân tử flavonoit và các nhóm amin của enzym.

Vitamin P có nhiều trong cam, chanh, nho, xà lách, chè. Nhu cầu về vitamin P chưa được nghiên cứu kỹ. Theo Efremop nhu cầu của cơ thể về vitamin P có thể bằng 50% so với nhu cầu về vitamin C của cơ thể. Mối liên quan tương hỗ giữa vitamin C và vitamin P thể hiện ở chỗ, mỗi loại này khi có mặt của loại kia sẽ có hiệu quả chữa bệnh cao hơn khi tác dụng riêng rẽ. Người ta đã chứng minh được rằng khi đưa vào cơ thể động vật các hợp chất có hoạt tính vitamin P, ví dụ, các polyphenol catesin sẽ nhận thấy sự tăng hàm lượng axit ascorbic ở các mô, đó là do phản ứng giữa catesin và axit dehydroascorbic, nhờ phản ứng này mà bảo vệ được axit ascorbic khỏi bị oxy hóa. Mặt khác, theo Samrai (1953) có thể vitamin P gắn với vitamin C thành một phức hợp bền hơn đối với sự oxy hóa. Vitamin P được ứng dụng rất tốt trong y học để giảm nhẹ các bệnh xảy ra do nguyên nhân bị chiếu nhiều tia Röntgen.

VI.3. CÁC LOẠI VITAMIN ÍT NGHIÊN CỨU

VI.3.1. Vitamin B₁ (carnitin)

Đó là một loại vitamin cần thiết đối với sự sinh sống bình thường của côn trùng được tìm ra từ năm 1948. Vitamin B₁ đặc biệt cần thiết đối với loại *Tenebrio molitor* (do độ mang tên là B₁).



vitamin B₁

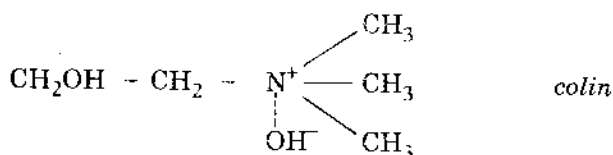
Cho đến nay cơ chế tác dụng của vitamin B₁ hay carnitin còn chưa được nghiên cứu kỹ. Có lẽ nó thay thế cho colin trong các quá trình chuyển nhóm CH₃ ở các côn trùng.

Vitamin B₁ hay carnitin là một

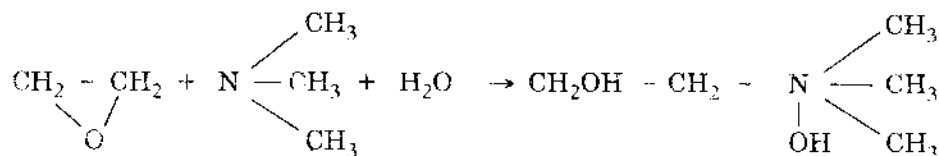
hợp chất được Gulevich tách ra lần đầu từ cơ, nó hòa tan được trong nước và không hòa tan trong đa số các dung môi hữu cơ. Sự sinh tổng hợp carnitin xảy ra phổ biến ở động vật và thực vật. Các mô cơ rất giàu vitamin B₁. Nhiều loại côn trùng không có khả năng đó nên phải lấy carnitin từ các thức ăn khác.

VI.3.2. Colin

Colin được Strecher tìm ra lần đầu tiên vào năm 1849. Đến năm 1862 nó được tách ra dưới dạng tinh khiết và được đặt tên là colin. Colin khá phổ biến ở các sản phẩm động vật và thực vật như mầm lúa, đậu tương, thịt, gan, tôm, đặc biệt nhiều ở lòng đỏ trứng trong hợp chất lexitin.

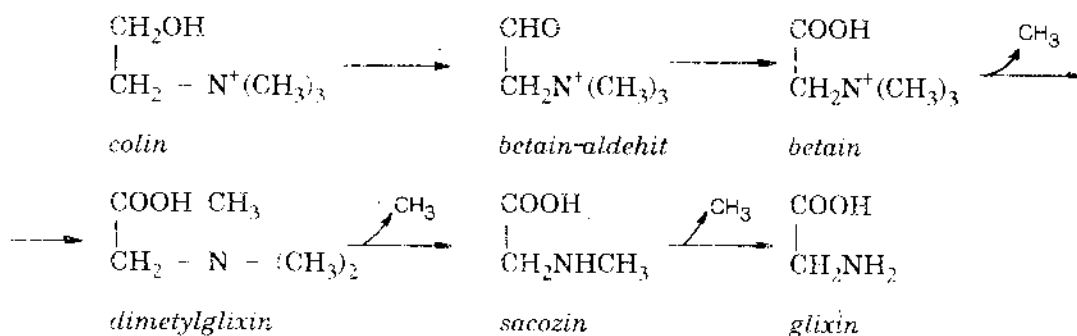


Colin có tính kiềm, dễ hòa tan trong nước, rượu và không tan trong ete. Nó bền trong dung dịch axit và dễ bị phân hủy trong môi trường kiềm. Có thể tổng hợp colin bằng cách cho tác dụng dung dịch nước trimetylamin với etylen oxyt ở nhiệt độ thường.

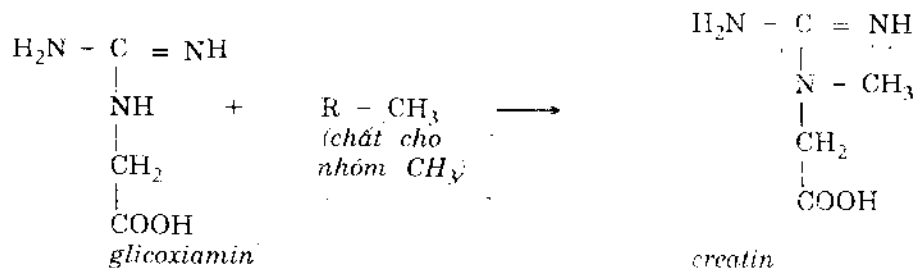


Ở cơ thể động vật, colin là chất dễ nhường các nhóm CH_3 . Nhóm này được sử dụng trong quá trình tổng hợp nhiều chất khác nhau của cơ thể, nó cũng là nguyên liệu đầu để tổng hợp axetylcolin là chất truyền xung động thần kinh. Colin có tác dụng ngăn cản được hiện tượng hóa mỡ của gan giống như tác dụng của metionin, betain, vitamin B_{15} , vitamin B_{12} , v.v.

Khi chuyển vào cơ thể, colin bị oxy hóa thành betain, chất này sau đó chuyển nhóm CH_3 cho các chất nhận nào đó và chuyển thành glixin:



Khi nhóm CH_3 của betain được chuyển sang homoxistein sẽ thu được dimethylglixin và metionin. Colin và betain còn tham gia vào sự tổng hợp creatin nhờ phản ứng methyl hóa chất glicoxiamin. Trong phản ứng này, metionin có năng lực methyl hóa mạnh hơn.

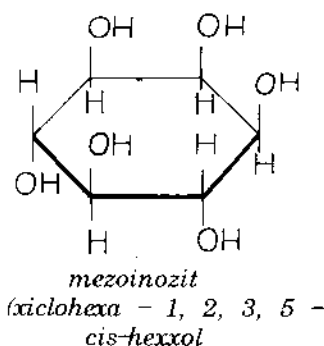


Ngoài các phản ứng trên, colin còn có thể tham gia vào hàng loạt phản ứng methyl hóa khác như methyl hóa nicotinamit, noradrenalin, .. để tổng hợp N- methyl-nicotinamit, adrenalin. Nhiều loại vi khuẩn sống ở ruột tổng hợp được colin. Nguyên liệu đầu để tổng hợp colin có thể là etanolamin hoặc các dẫn xuất methyl hóa của etanolamin. Nhu cầu về colin vào khoảng 250 - 600 mg trong 24 giờ.

VI.3.3. Inozit

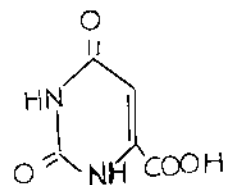
Inozit là rượu có cấu tạo vòng chứa sáu cacbon, dẫn xuất của xiclohexan. Trong thiên nhiên có nhiều dạng đồng phân, nhưng chỉ dạng mezoinozit là có hoạt tính vitamin đối với động vật và nấm men.

Mezoinozit là tinh thể dễ hòa tan trong nước, có vị ngọt và không có màu, không hòa tan trong rượu tuyệt đối và ete, nó bền đối với axit và kiềm loãng. Nguyên liệu để tổng hợp mezoinozit là D - glucoza. Do mezo - inozit phổ biến ở lá thực vật nên có thể thu được chất này bằng cách cho thủy phân bằng axit hợp chất phitin (muối Ca, Mg của axit mezoinozit hexophosphoric) có nhiều ở thực vật. Inozit được tổng hợp bởi đa số vi khuẩn và cây xanh. Ở quả và hạt, hàm lượng inozit cao nhất vào trước lúc chín. Khi chuyển vào cơ thể động vật mezoinozit sẽ tập trung chủ yếu ở thận và não dưới dạng phospholipit. Các hợp chất của inozit giữ vai trò quan trọng đối với các quá trình trao đổi ở hệ thần kinh. Ở các mô cơ thể, inozit tham gia vào quá trình chuyển hóa mỡ ở gan tương tự như tác dụng của colin. Inozit hoạt động phối hợp với vitamin E và có tác dụng làm giảm các triệu chứng thiếu vitamin E. Inozit có nhiều ở đậu Hà Lan, hành, bí, khoai tây, não, tim, gan, v.v. Nhu cầu về inozit chưa được xác định rõ, người ta cho rằng chỉ cần khoảng 1g inozit trong 24 giờ.

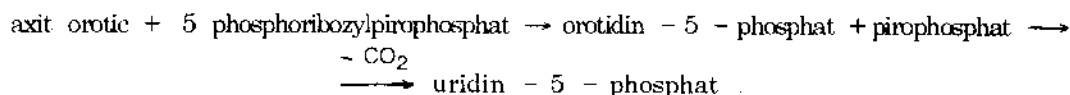


VI.3.4. Vitamin B₁₃ (axit orotic)

Trong phế liệu của công nghiệp rượu vang người ta thấy một yếu tố có tác dụng duy trì sự sinh trưởng của chuột, gà, lợn, v.v. Yếu tố này hòa tan được trong nước, rượu, và một số dung môi hữu cơ khác. Sau này người ta chứng minh rằng nó có cả ở gan, lúa mì và đặt tên là axit orotic. Tuy nhiên axit orotic không hoàn toàn đồng nhất với yếu tố gọi là vitamin B₁₃, phát hiện thấy ở các sản phẩm của nấm men rượu và hoạt tính của nó hơi thấp so với vitamin B₁₃. Có lẽ axit orotic là một sản phẩm phân giải của vitamin B₁₃.



Axit orotic được tổng hợp từ axit aspartic. Ý nghĩa sinh học quan trọng của chất này là ở chỗ nó chính là chất tiền thân để tổng hợp nên các hợp chất tạo nucleozit như xitozin, timin, uraxyl :



Nhờ khả năng trên, axit orotic tham gia vào sự tổng hợp axit nucleic, vì vậy mà nó kích thích sự sinh trưởng của động vật cũng như thực vật. Axit orotic cũng tham gia vào sự trao đổi các hợp chất chứa một cacbon cần cho các quá trình sinh tổng hợp quan trọng giống như tác dụng của vitamin B₁₂ và axit folic và có tác dụng phối hợp chữa bệnh gan. Việc thêm axit orotic vào thức ăn của động vật cho thấy nó có tác dụng kích thích cả sự trao đổi protein và glucit ở cơ thể. Axit orotic làm giảm việc sử dụng axetat để tổng hợp lipid nói chung và coleslerin nói riêng.

Khi sử dụng phối hợp với cả vitamin PP, nó có tác dụng rõ rệt trong việc hạ thấp sự chuyển axetat vào coleslerin ở gan, do đó hai loại vitamin này có khả năng ngăn cản hiện tượng quá dư thừa coleslerin ở cơ thể.

VI.4. VITAMIN VÀ THỰC PHẨM

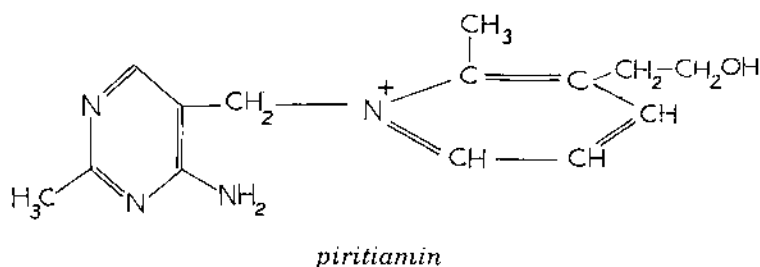
Tất cả những điều đã trình bày trên về vai trò của vitamin đối với sự dinh dưỡng của cơ thể cho thấy rõ rằng thực phẩm chỉ được coi là hoàn thiện nếu nó thỏa mãn được nhu cầu của cơ thể không những về các chất cơ bản như protein, lipid, glucit, muối khoáng, ... mà cả về mặt vitamin nữa. Các chất này mặc dù chỉ cần một lượng rất nhỏ, nhưng lại có tác dụng rất mạnh. Cho tới nay người ta đã chứng minh được rằng đa số vitamin đều có trong thành phần của enzym, do đó mà chúng có ảnh hưởng rất lớn tới hoạt động sống của cơ thể. Vì vậy bệnh thiếu vitamin được coi như những trạng thái bệnh lý phát sinh khi thiếu một số coenzim nào đó. Nhu cầu về vitamin đã làm nảy sinh ra một ngành kỹ nghệ thực phẩm mới - kỹ nghệ sản xuất vitamin. Các vitamin được sử dụng để bổ sung vào một số thực phẩm thông thường nghèo vitamin hoặc bị mất vitamin trong khi bảo quản và chế biến. Từ khi hiểu biết các nguyên nhân phát sinh ra các bệnh do thiếu vitamin, người ta đã kịp thời ngăn ngừa và chữa được bệnh thiếu vitamin rất có hiệu quả. Bình thường nếu ăn uống đầy đủ, nhu cầu về vitamin có thể được thỏa mãn nhưng khi bị một số bệnh nào đó hoặc khi thay đổi trạng thái sinh lý, điều kiện lao động ... cơ thể dễ bị thiếu vitamin, vì vậy cần tăng cường cung cấp thêm vitamin để bù đắp lại lượng vitamin bị tiêu hao. Việt Nam ta là một trong những nước nhiệt đới có cây cối xanh tươi bốn mùa nên có thể nói rằng chúng ta được thiên nhiên ưu đãi về mặt vitamin. Tuy nhiên như chúng ta đã biết, các vitamin thường ít bền, vì vậy cần nghiên cứu đầy đủ các điều kiện bảo quản và chế biến thực phẩm, theo dõi sự biến đổi của chúng trong các quá trình đó để có thể đề ra các phương pháp thích hợp nhất nhằm hạn chế những sự mất mát về vitamin.

VI.4.1. Sự liên quan giữa vitamin và enzym

Khi nghiên cứu về thành phần cấu trúc của enzym người ta đã chứng minh được rằng trong thành phần coenzim của đa số các enzym đều có các vitamin. Ví dụ, dẫn xuất phosphat của tiamin là coenzim của decarboxylaza xetoaxit, trong thành phần của các enzym oxy hóa - khử người ta thấy các vitamin thường gặp như vitamin B₂, vitamin PP, ... Piridoxal phosphat là thành phần hoạt động của enzym aminotransferaza, các vitamin như cobalamin, biotin, axit folic ... cũng đều gặp trong thành phần coenzim của nhiều enzym quan trọng đối với trao đổi chất ở cơ thể. Như vậy rõ ràng là có một mối liên quan chặt chẽ giữa vitamin và enzym. Qua những tài liệu đã trình bày ở trên chúng ta thấy rõ rằng cơ chế tác dụng của đa số các vitamin đều được làm sáng tỏ nhờ việc nghiên cứu các enzym có chứa các vitamin đó. Như vậy cũng đồng thời giải thích được tại sao nhu cầu về vitamin lại rất thấp. Khi cơ thể bị thiếu vitamin thì xuất hiện các triệu chứng bệnh lý tương ứng, các triệu chứng này phát sinh do không có các coenzim chứa các vitamin. Mối liên quan giữa vitamin và enzym thể hiện qua thành phần coenzim còn được chứng minh đầy đủ hơn nữa khi xét tới tác dụng của các chất antivitamin (kháng vitamin).

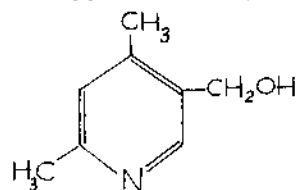
VI.4.2. Các antivitamin

Khi nghiên cứu về bản chất hóa học và tác dụng sinh học của các vitamin, người ta nhận thấy có nhiều loại chất có khả năng làm mất hoạt tính sinh học của vitamin

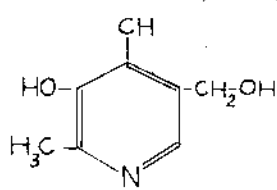


và có tác dụng chống lại chúng. Người ta gọi các chất đó là các antivitamin, hay chất kháng vitamin. Thông thường chúng gây ra các bệnh thiếu vitamin ở người, động vật và thực vật cũng như vi sinh vật. Cấu tạo hóa học của các antivitamin thường gần giống với vitamin tương ứng. Khi chuyển vào cơ thể sinh vật antivitamin vì không có hoạt tính vitamin nên tạo nên các hệ enzym hoàn toàn không hoạt động. Như vậy có thể nghĩ rằng các antivitamin đã đẩy các vitamin ra khỏi các hệ enzym, chiếm chỗ của chúng và thể hiện tính chất là "giả vitamin". Ta sẽ xem một số ví dụ cụ thể về các antivitamin. Các chất antivitamin quan trọng của vitamin B₁ là oxytiamin, piritiamin, v.v. Chúng gây ra các hiện tượng thiếu vitamin B₁ điển hình ở chuột. Oxytiamin là dẫn xuất của tiamin trong đó ở vị trí 4 của vòng pirimidin có sự thay thế nhóm amin bởi oxy, còn trong piritiamin nguyên tử lưu huỳnh được thế bởi nhóm $-CH=CH-$. Như vậy ở công thức cấu tạo của oxytiamin chỉ có sự khác nhau trong phần vòng pirimidin, còn trong piritiamin thì sự khác nhau chỉ xảy ra ở vòng tiazol. Piritiamin là chất antivitamin điển hình của tiamin.

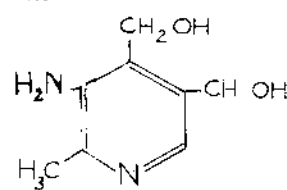
Đối với vitamin B₆, người ta cũng phát hiện thấy hàng loạt dẫn xuất có tác dụng là antivitamin trong đó có các chất có hoạt tính antivitamin yếu như 2, 4 - dimetyl - 5 - oxymetyl - piridin hoặc có hoạt tính antivitamin mạnh như 4 - deoxypyridoxin hoặc 2 - metyl - 3 - amin - 4,5 - oxymetylpiridin.



2,4 - dimetyl - 5 -
oxymetylpiridin

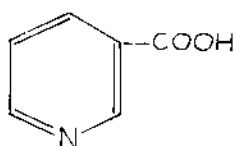


4 - deoxypyridoxin

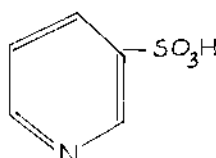


2 - metyl - 3 - amino - 4,5 -
oxymetylpiridin

Đồng đẳng có tính chất antivitamin của axit nicotinic là piridin - 3 - sulfoaxit :

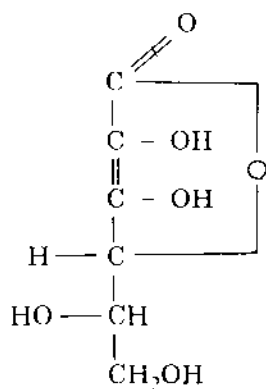


axit nicotinic

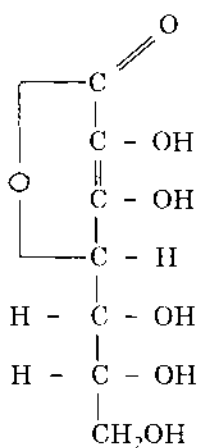


piridin - S - sulfoaxit

Chất này có khả năng ức chế sự sinh trưởng của một số vi khuẩn do tác dụng antivitamin của nó. Antivitamin của vitamin C là axit glucoascorbic



axit ascorbic



axit glucoascorbic

Axit glucoascorbic có tác dụng gây ra các triệu chứng của bệnh hoại huyết ở chuột bạch. Đối với axit folic, chất antivitamin mạnh hơn cả là dẫn xuất của axit folic trong đó nhóm OH ở vị trí 4 của vòng pterin được thay thế bởi nhóm NH₂. Chất này ức chế sự sinh trưởng của *L.casei* và gây ra các hiện tượng thiếu vitamin rất đặc trưng ở chuột, khỉ, v.v.

Ngoài ra trong thời gian gần đây người ta còn tìm thấy các antivitamin của nhiều loại vitamin khác như biotin, colin, vitamin K, vitamin E, v.v. Do tác dụng ức chế sinh trưởng của một số vi khuẩn gây bệnh, nên một số antivitamin được sử dụng rất hiệu quả trong y học thực hành.

Có một loại chất khác, mặc dầu không có bản chất hóa học tương tự vitamin song vẫn thể hiện được tính chất là antivitamin. Ví dụ, người ta biết một số protein có khả năng tạo phức hợp với một số vitamin như chất avidin có trong trứng, có thể gắn với biotin làm cho biotin bị mất hoạt tính. Vì vậy avidin được coi như một loại antivitamin gây ra hiện tượng thiếu biotin ở cơ thể.

Hiện nay việc nghiên cứu các chất đồng đẳng có tác dụng antivitamin đang được tiến hành rộng rãi nhằm ứng dụng ngày càng nhiều vào việc chữa các bệnh do nguyên nhân nhiễm trùng gây ra.

CHƯƠNG VII

CÁC CHẤT MÀU

VII.1. Ý NGHĨA CỦA CÁC CHẤT MÀU TRONG SẢN XUẤT THỰC PHẨM

Chất lượng của các sản phẩm thực phẩm không những bao hàm giá trị dinh dưỡng mà còn bao hàm cả giá trị cảm quan của chúng nữa. Màu sắc là một chỉ số quan trọng của giá trị cảm quan. Màu sắc của các sản phẩm thực phẩm không chỉ có giá trị về mặt hình thức mà còn có tác dụng sinh lý rất rõ rệt. Màu sắc thích hợp sẽ giúp cho cơ thể đông hóa thực phẩm đó dễ dàng. Vì vậy trong kỹ thuật sản xuất thực phẩm người ta không những chỉ bảo vệ màu sắc tự nhiên mà còn cho thêm chất màu mới, tạo ra những màu sắc thích hợp với tính chất và trạng thái của sản phẩm.

Có thể thực hiện được điều đó bằng những cách sau :

- Xây dựng một qui trình gia công nguyên liệu, bán thành phẩm để bảo toàn được tối đa các chất màu có sẵn trong nguyên liệu ;
 - Tách ra, cô đặc và bảo quản các chất màu từ chính nguyên liệu thực vật đó hoặc từ các nguyên liệu khác giàu màu sắc ấy. Sau đó từ các chất màu tự nhiên đã cô đặc này có thể dùng để nhuộm màu cho chính nguyên liệu mà từ đó ta đã thu được chất màu hoặc cho những dạng nguyên liệu hoàn toàn khác ;
 - Tổng hợp nhân tạo các chất màu giống như các màu tự nhiên của sản phẩm thực phẩm rồi dùng chúng để nhuộm màu cho các sản phẩm khác mà ở dạng tự nhiên không đủ mạnh hoặc bị mất màu ban đầu do quá trình chế biến ;
 - Dùng các biện pháp kỹ thuật thích hợp để điều chỉnh các phản ứng theo chiều tạo ra những chất màu mới từ những hợp phần có trong nguyên liệu.
- Dựa vào quá trình hình thành có thể chia các chất màu thành hai loại :
- các chất màu tự nhiên ;
 - các chất màu hình thành trong quá trình gia công kỹ thuật.

VII.2. CÁC CHẤT MÀU TỰ NHIÊN

Các chất màu tự nhiên thường gặp chủ yếu ở trong các nguyên liệu thực vật, có thể chia ra ba nhóm chính :

- clorofil, diệp lục hay chất màu xanh lá cây ;
- các carotenoid có trong lục lạp, cho quả và rau màu da cam, màu vàng và đôi khi màu đỏ ;
- các chất màu flavonoid có trong các không bào, có màu đỏ, xanh và vàng.

VII.2.1. Clorofil

Màu xanh lá cây của thực vật là do có mặt chất màu clorofil. Chất màu này đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong quá trình quang hợp - quá trình chủ yếu tạo ra các hợp chất hữu cơ và tạo ra nguồn oxy tự do duy nhất của quả đất. Clorofil không những cho màu xanh mà còn che mờ các chất màu khác. Trong các phần xanh của cây, clorofil có trong tổ chức đặc biệt, phân tán ở trong nguyên sinh chất, gọi là lục lạp hoặc hạt diệp lục. Hàm lượng clorofil trong cây xanh chiếm khoảng 1% chất khô.

Clorofil có hai dạng : clorofil a có công thức là : $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ và clorofil b có công thức : $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ có màu nhạt hơn clorofil a. Tỷ lệ clorofil a và clorofil b trong thực vật khoảng 3 : 1.

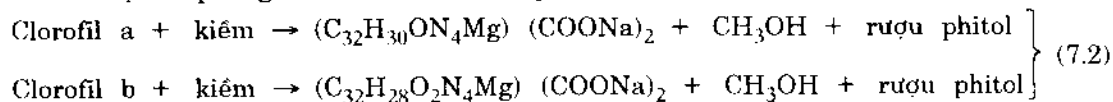
Tính chất

a) Dưới tác dụng của nhiệt độ và axit của dịch bào màu xanh bị mất đi, một mặt là do protein bị đông tụ làm vỏ tế bào bị phá hủy, mặt khác là do liên kết giữa clorofil và protein bị đứt làm cho clorofil dễ dàng tham gia phản ứng (7.1)



để tạo ra feofitin có màu xanh oliu.

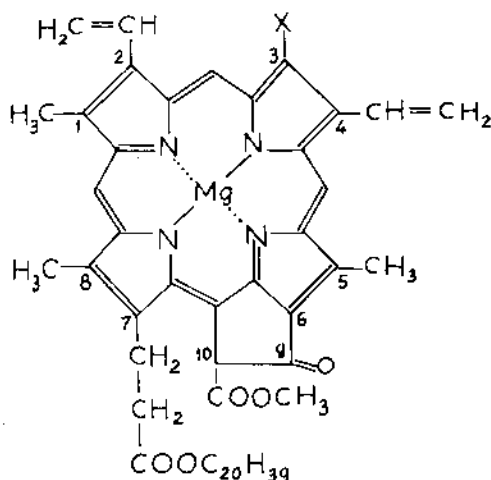
b) Khi cho tác dụng với các kiềm nhẹ như cacbonat kiềm, kiềm thổ thì chúng sẽ trung hòa axit và muối axit của dịch tế bào và tạo nên môi trường kiềm làm cho clorofil bị xà phòng hóa để cho rượu phitol, metanol và axit clorofilic.



Các axit $(C_{32}H_{30}ON_4Mg) (COOH)_2$ và $(C_{32}H_{28}O_2N_4Mg) (COOH)_2$ thu được do xà phòng hóa clorofil a và b gọi là clorofilin hoặc clorofilic. Các axit cũng như muối của chúng đều cho sản phẩm màu xanh đậm.

Trong một số cây còn có enzym clorofilaza cũng có thể thủy phân được các liên kết este này để giải phóng ra phitol và metanol. Enzim này thường được định vị trong các sắc lạp, khá bền với nhiệt và chỉ được hoạt hóa trong thời gian chín.

c) Clorofil cũng có thể bị oxy hóa do oxy và ánh sáng (quang oxy hóa), do tiếp xúc với các lipid bị oxy hóa hoặc do tác dụng của enzym lipoxydaza. Các quá trình oxy hóa này có thể xảy ra trong các rau (nhất là rau sảy) bảo quản ở độ ẩm tương đối dưới 30% ; còn khi độ ẩm tương đối của không khí cao hơn thì clorofil lại bị biến đổi thành feofitin [phản ứng (7.1)]. Một số hợp chất bay hơi có thể làm tăng (etylen) hay làm chậm (khí CO_2) sự biến hóa của clorofil.

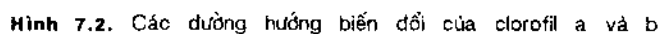


Hình 7.1. Cấu tạo của clorofil a và b:
a - X là CH_3 ; b - X là CHO

- với Fe sẽ cho màu nâu ;
- với Sn và Al cho màu xám ;
- với Cu sẽ cho màu xanh sáng.

- Gia nhiệt nhanh trong một lượng nước sôi lớn (3 - 4 lit/kg) để giảm hàm lượng axit. Axit lúc này sẽ bị bay đi cùng với hơi nước ;

- Gia nhiệt rau xanh trong nước cứng, cacbonat kiềm thổ sẽ trung hòa một phần axit của dịch bào.



Trong thực tế, để bảo vệ màu xanh của đậu đóng hộp, người ta cho vào hộp một ít dinatri glutamat. Hoặc để nhuộm màu xanh cho đậu vàng, người ta dùng clorofilin (clorofil + kiềm). Clorofil dễ bị hấp thụ trên bề mặt của hạt đậu và giữ được bền màu trên bề mặt đó làm cho màu hạt rất đẹp.

VII.2.2. Carotenoit

Carotenoit là nhóm chất màu hòa tan trong chất béo làm cho quả và rau có màu da cam, màu vàng và màu đỏ. Nhóm này gồm từ 65 đến 70 chất màu tự nhiên, tiêu biểu là caroten, lycopene, xantofil, capxantin, và xitroxantin. Carotenoit có trong đa số cây (trừ một số nấm) và hầu như có trong tất cả cơ thể động vật. Hàm lượng carotenoit trong lá xanh chiếm khoảng 0,07 - 0,2% chất khô, trong trường hợp hạn hữu người ta thấy nồng độ carotenoit rất cao ví dụ trong bao phấn của nhiều loài hoa loa kèn có nhiều xantofil và anteraxantin.

Tất cả carotenoit đều không hòa tan trong nước, rất nhạy đối với axit và chất oxy hóa, nhưng lại bền vững với kiềm. Một trong những đặc điểm của carotenoit là có nhiều nối đôi liên hợp tạo nên những nhóm mang màu của chúng. Màu của chúng phụ thuộc vào những nhóm này.

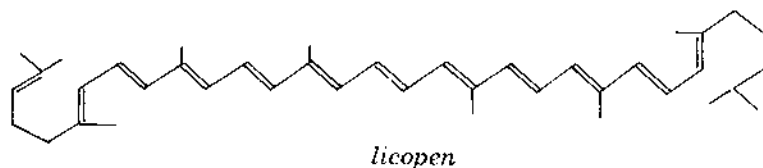
Tất cả carotenoit tự nhiên có thể xem như dẫn xuất của lycopene.

VII.2.2.1. Lycopene

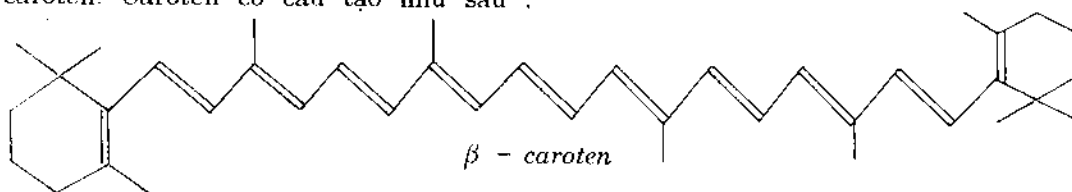
Lycopene có trong quả cà chua và một số quả khác. Màu đỏ của cà chua chín chủ yếu do có mặt lycopene mặc dầu trong cà chua còn một loạt các carotenoit khác nữa như :

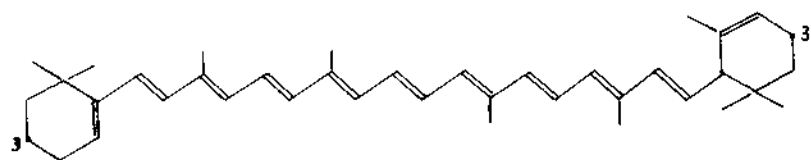
fitoflutin	0,29 mg/quả
α - caroten	0,42 mg/quả
β - caroten	1,00 mg/quả
γ - caroten	0,29 mg/quả
licopen	5,66 mg/quả

Trong quá trình chín, hàm lượng lycopene trong cà chua tăng lên 10 lần. Tuy nhiên, chất màu này không có hoạt tính vitamin. Lycopene có cấu tạo như sau :

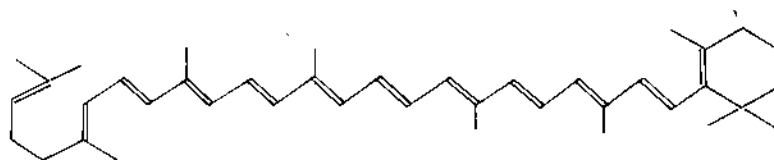


Bằng cách tạo thành vòng ở một đầu hoặc cả hai đầu của phân tử lycopene thì sẽ được các đồng phân α , β , γ - caroten. Màu da cam của cà rốt, mơ chủ yếu là do caroten. Caroten có cấu tạo như sau :





α - caroten

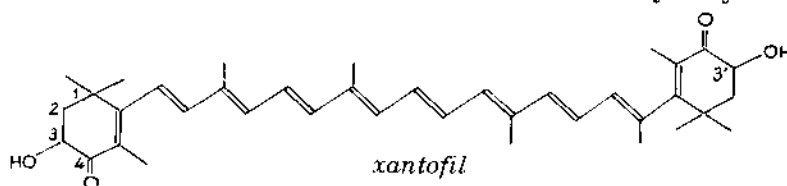


β - caroten

Tất cả những carotenoit tự nhiên khác đều là dẫn xuất của lycopene và caroten. Chúng được tạo thành bằng cách đưa nhóm hydroxyl, cacbonyl hoặc metoxy vào mạch, nhờ phản ứng hydro hóa hoặc oxy hóa.

VII.2.2.2. Xantofil

Xantofil có công thức $C_{40}H_{56}O_2$ và có được bằng cách gắn thêm hai nhóm hydroxyl vào phân tử α - caroten, do đó có tên 3,3' - dihydroxy - α - caroten



xantofil

Xantofil là chất màu vàng nhưng màu sáng hơn caroten vì chứa ít nối đôi hơn. Trong lòng đỏ trứng gà có hai xantofil là dihydroxy - α - caroten và dihydroxy - β - caroten với tỉ lệ 2 : 1. Xantofil cùng với caroten có chứa trong rau xanh và cùng với caroten và lycopene có trong cà chua.

VII.2.2.3. Capxantin

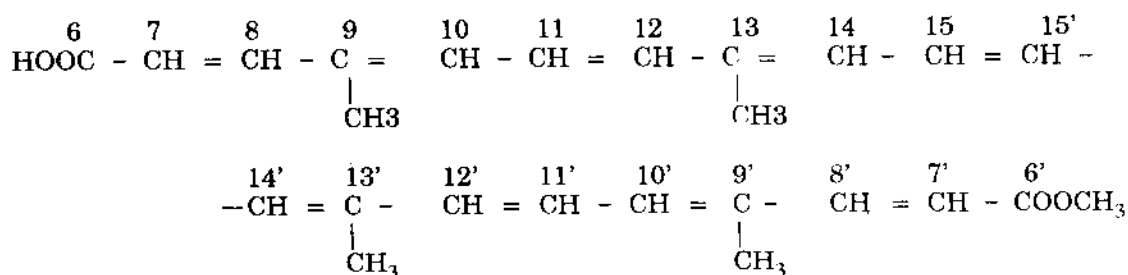
Capxantin có công thức $C_{40}H_{58}O_3$, là chất màu vàng có trong ớt đỏ. Capxantin chiếm 7/8 tất cả chất màu của ớt. Capxantin là dẫn xuất của caroten, nhưng có màu mạnh hơn các carotenoit khác 10 lần. Trong ớt đỏ có các carotenoit nhiều hơn trong ớt xanh 35 lần.

VII.2.2.4. Criptoxantin

Criptoxantin có công thức nguyên $C_{40}H_{56}O$ (3 - hoặc 4 - hydroxy β - caroten). Màu da cam của quýt, cam chủ yếu là do criptoxantin.

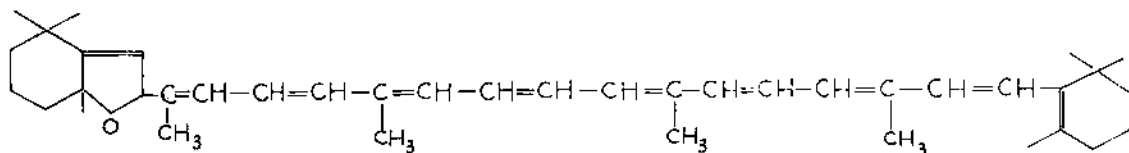
VII.2.2.5. Birxin

Birxin là chất màu đỏ có trong quả cây nhiệt đới tên là *Bixa orellana*, birxin được dùng để nhuộm màu dầu, margarin và các sản phẩm thực phẩm khác. Birxin là sản phẩm oxy hóa của các carotenoit có 40 nguyên tử cacbon. Birxin có công thức cấu tạo như sau :



VII.2.2.6. Xitroxantin

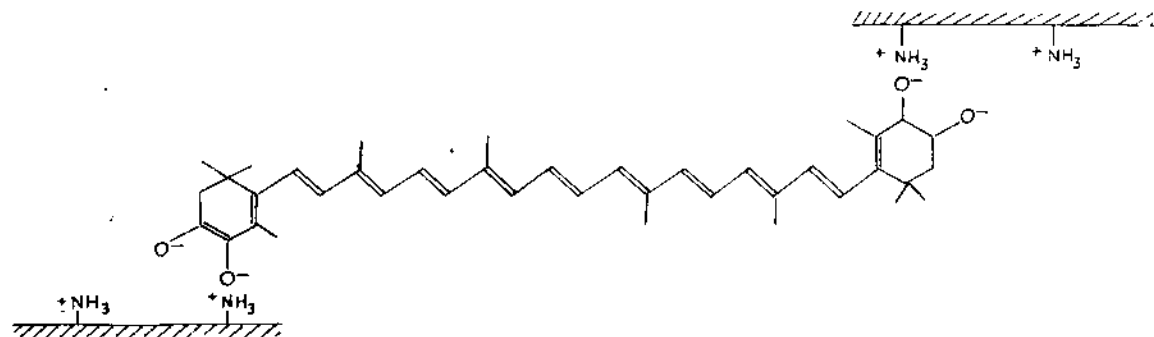
Xitroxantin có công thức $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{O}$. Xitroxantin có trong vỏ quả chanh. Xitroxantin có được khi kết hợp vào phân tử β - caroten một nguyên tử oxy để tạo thành cấu trúc furanoit:



VII.2.2.7. Astarxantin

Astarxantin cũng là dẫn xuất của caroten và có tên gọi là 3,3' - dihydroxy - 4,4 - dioxeto - β - caroten.

Trong trứng của loài giáp xác có chất màu xanh ve gọi là ovoverdin có thể coi như là muối dạng endiol của astarxantin và nhóm amin của protein (kết hợp của astarxantin và protein) :

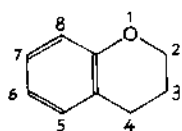


Trong mai và giáp của cua, tôm astarxantin cũng tham gia vào thành phần của lipoprotein gọi là xianin.

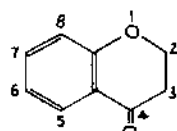
Trong quá trình gia nhiệt do protein bị biến tính và astarxantin bị tách ra dưới dạng chất màu đỏ.

VII.2.3. Các chất màu nhóm flavonoid

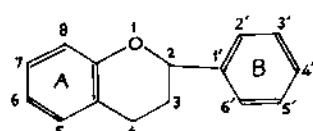
Các chất màu này hòa tan trong nước và chứa trong các không bào. Trong rau, quả và hoa, số lượng cũng như tỉ lệ các flavonoid khác nhau, do đó làm cho chúng có nhiều màu sắc khác nhau : từ màu đỏ đến màu tím. Flavonoid là những dẫn xuất của croman và cromon. Croman và cromon là những phenylpropan vì có chứa bộ khung cacbon $\text{C}_6 - \text{C}_3$. Khi croman hoặc cromon ngưng tụ với một vòng phenol nữa thì được dẫn xuất có tên là flavan.



croman

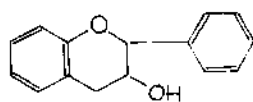


cromon

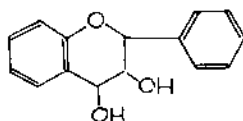


flavan

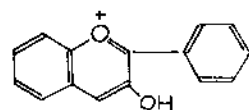
Dựa vào mức độ oxy hóa (hoặc khử) của dị vòng, có thể chia flavonoid ra các nhóm có dạng cấu trúc chủ yếu như sau :



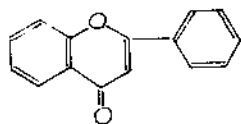
catechin (flavanol-3 không màu)



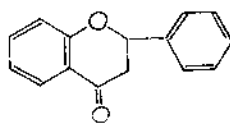
leucoantoxianidol (flavandi-3,4 không màu)



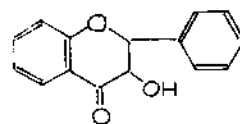
antoxianidol (màu đỏ, màu xanh)



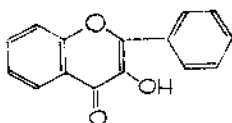
flavon (màu vàng)



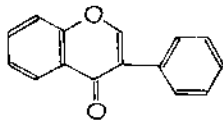
flavanon (không màu, khi đun nóng có màu đỏ)



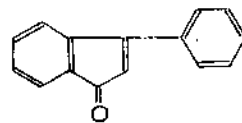
flavanonol (vàng da cam, nâu sẫm)



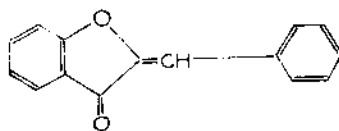
flavanol (màu vàng)



isoflavon



chalcon (màu đỏ tía)

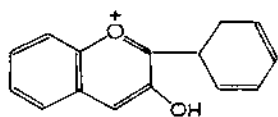


auron (màu vàng)

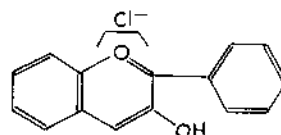
VII.2.3.1. Antoxian

Antoxian hay antoxianozit là mono - hay diglucosit do gốc đường glucoza, galactoza hoặc ramnoza kết hợp với gốc aglucon có màu gọi là antoxianidin. Do đó khi thủy phân antoxian thì được đường và antoxianidin (antoxianidol). Antoxian hòa tan trong nước, còn antoxianidol thì không hòa tan trong nước. Các antoxianidol và các antoxian là những chất tạo nên màu sắc cho hoa và quả. Các antoxianidol có màu đỏ, xanh, tím hoặc những gam màu trung gian.

Tất cả antoxianidol đều có chứa trong vòng pyran oxy hóa trị tự do. Tuy nhiên người ta chưa biết được chắc chắn nguyên tử nào : oxy hay cacbon mang điện tích dương tự do. Do đó antoxianidol thường được biểu diễn dưới dạng công thức trung tính :



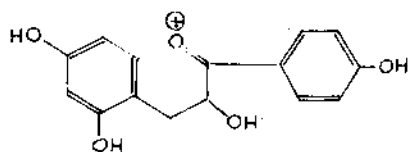
công thức thường



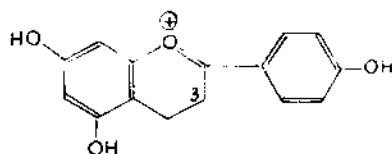
công thức trung tính

Nhờ điện tích dương tự do này mà các antoxianidol trong dung dịch axit tác dụng như những cation và tạo muối được với các axit. Còn trong dung dịch kiềm thì antoxianidol lại tác dụng như anion và tạo muối được với bazơ.

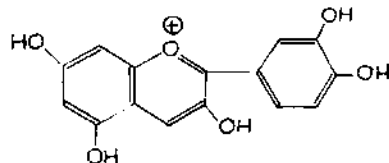
Thường gặp ba antoxianidol chính là : pelargonidol, xianidol, và delphinidol. Còn apigenidol thì ít gặp hơn.



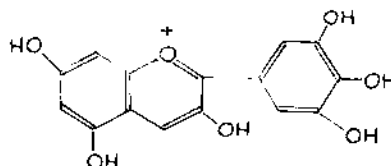
pelargonidol



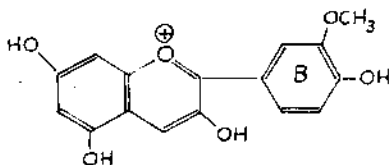
apigenidol (không có nhóm OH ở vị trí 3)



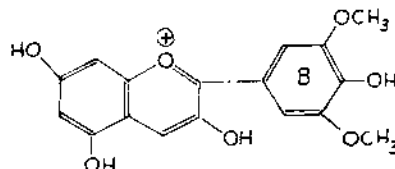
xianidol (màu xanh)



delphinidol



peonidol



xirinhidol (malvidol)

Tính chất của antoxian

Nói chung các antoxian, hòa tan tốt trong nước và trong dịch bão hòa. Khi kết hợp với đường làm cho phân tử antoxian càng hòa tan hơn.

Màu sắc của các antoxian luôn luôn thay đổi phụ thuộc vào 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 benzen có thể có 1-2 hoặc 3 nhóm OH).

Bảng 7.1. Một số antoxian phổ biến

Antoxianozit	Antoxianidol	Đường	Có ở cây
Pelargonin	Pelargonidol	Hai glucoza	Cúc tây (<i>Aster</i>), mỏ cò (<i>Polargonium</i>)
Xianin	Xianidol	Hai glucoza	Hoa hồng
Ceraxianin	Xianidol	Glucoza, ramnoza	Quả anh đào (<i>Cerasus</i>)
Prunixianin	Xianidol	Galactoza	Quả mận (<i>Prunus domestica</i>)
Idain	Delfinidol	Ramnoza, glucoza	Quả việt quất (<i>Vaccinium Vitis idaea</i>)
Delfin	Xirinidol (este dimetyl của delfinidol)	Hai glucoza	Hoa cẩm quỳ (<i>Malva</i>)
Malvin		Hai glucoza	
Peonin	Peonidol	Glucoza	Hoa mẫu đơn (<i>Paeonia officinalis</i>)
Enin	Enidol	Glucoza	Quả nho
Hirxutin	Hirxutidol		Hoa anh thảo, hoa ngọc trâm (<i>Primula</i>)

Mức độ metyl hóa các nhóm OH ở trong vòng benzen càng cao thì màu càng đỏ. Nếu nhóm OH ở vị trí thứ ba 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 antoxian cũng có thể tạo phức với các ion kim loại để cho các màu khác nhau : chẳng hạn muối kali sẽ cho với antoxian màu đỏ máu, còn muối canxi và magie sẽ cho với antoxian phức có màu xanh ve. Hoặc người ta cũng thấy phức bốn tử đen sẽ chuyển sang màu xanh, còn anh đào thì chuyển sang màu tím khi có mặt thiếc, anh đào cũng sẽ cho màu tím khi có mặt nhôm, nhưng nhôm lại không ảnh hưởng đến màu của nho đỏ. Các antoxian của nho chỉ thay đổi đáng kể khi có Fe, Sn, hoặc Cu. Điểm đáng chú ý là màu sắc của các antoxian phụ thuộc rất mạnh vào pH của môi trường.

Thông thường khi pH > 7 các antoxian cho màu xanh và
khi pH < 7 các antoxian có màu đỏ.

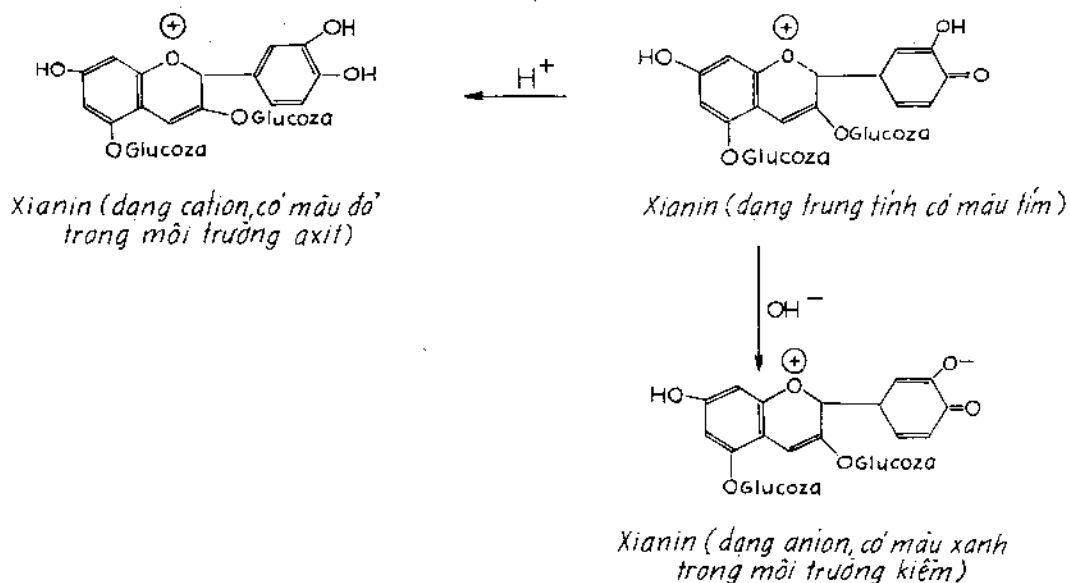
Chẳng hạn : rubrobraxinin clorua là antoxian của bắp cải đỏ, là một triglucozit của xianidin.

Khi pH = 2,4 - 4,0 thì có màu đỏ thẫm
pH = 4 - 6 thì có màu tím
pH = 6 thì có màu xanh lam
pH là kiềm thì có màu xanh lá cây

Hoặc như xianin có trong hoa hồng, màu sắc sẽ thay đổi khi pH của dịch bào thay đổi.

Màu sắc của antoxian còn có thể thay đổi do hấp thụ ở trên polysacarit.

Khi đun nóng lâu dài các antoxian có thể phá hủy và mất màu, đặc biệt là các antoxian của dâu tây, anh đào, củ cải. Ngược lại, các antoxian của phức bốn tử đen cũng trong điều kiện đó lại không bị thay đổi. Nhìn chung khi gia nhiệt, các chất màu đỏ dễ dàng bị phá hủy, còn chất màu vàng thì khó hơn.



Các màu sắc khác nhau của hoa có được là do tổ hợp các antoxianidin và các este metylic của chúng với axit và bazơ.

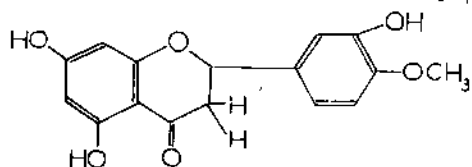
Tóm lại, trong môi trường axit, các antoxian là những bazơ mạnh (oxonium) và có thể tạo muối bền vững với axit. Antoxian cũng có khả năng cho muối với bazơ. Như vậy chúng có tính chất amphotơ. Muối với axit thì có màu đỏ, còn muối với kiềm thì có màu xanh.

Trong sản xuất đồ hộp, để bảo vệ các màu sắc tự nhiên, người ta có thể cho thêm chất chống oxy hóa, ví dụ, thêm rutin để bảo vệ màu của anh đào và mận, thêm tanin, axit ascorbic để bảo vệ màu của dâu và anh đào. Một biện pháp khác có thể bảo vệ được màu tự nhiên của các đồ hộp rau quả là thêm enzym glucosyltransferase, chẳng hạn như thêm glucosyltransferase để giữ màu tự nhiên của nước quả đục, ...

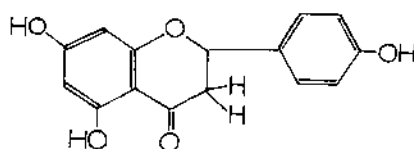
Các dẫn xuất của cromon đáng chú ý hơn cả là flavanon và flavonol.

VII.2.3.2. Flavanon

So với các flavonoid khác thì các flavanon ít gặp hơn. Hesperidin và naringin là hai flavanon có trong vỏ cam quýt bên cạnh các catesin có hoạt tính vitamin P. Aglucon của các glucosid này là hesperetin và naringenin :

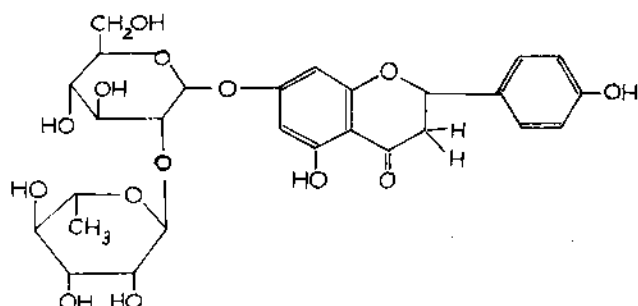


hesperetin



naringenin

Naringin là diholozit (với glucoza và ramnoza) thường gây ra vị đắng của bưởi nhất là ở bưởi trước khi chín.



naringin

Naringin là một flavonoid không màu, ít tan trong nước, dễ dàng kết tủa dưới dạng các tinh thể nhỏ do đó gây khó khăn cho sản xuất nước quả cũng như pure cam quýt. Khi quả chín enzyme naringinase phân cắt liên kết glucoza - rannoza do đó mất vị đắng.

VII.2.3.3. Flavonol

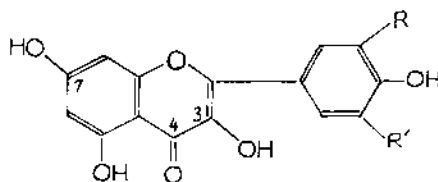
Flavonol là glucosid làm cho rau quả và hoa có màu vàng và da cam. Khi flavonol bị thủy phân thì giải phóng ra aglucon màu vàng. Các glucosid nhóm flavonol rất nhiều, nhưng thường gặp hơn cả là những aglucon dẫn xuất sau đây :

kempherol $R = R' = H$

querxetol $R = OH, R' = H$

mirixetin $R = R' = OH$

Astragalin là 3 - glucosid của kempherol, có trong hoa tử vân anh, hoa dẻ ngựa, trong lá chè và trong hoa hồng. Querxetol có trong vỏ sồi, lá chè, táo, nho, thuốc lá, hoa huylông.



Rutin là 3 - ramnoglucosid của querxetol, rất thường gặp ở trong cây. Rutin được ứng dụng rộng rãi trong y học làm thuốc bổ mao mạch.

Các flavonol đều hòa tan trong nước. Cường độ màu của chúng phụ thuộc vào vị trí nhóm OH : màu xanh nhất khi OH ở vị trí octo.

Flavonol tương tác với sắt cho ta phức màu xanh lá cây, sau chuyển sang màu nâu. Phản ứng này thường xảy ra khi gia nhiệt rau quả trong thiết bị bằng sắt hoặc bằng sắt tráng men bị dập.

Với chì axetat, flavonol cho phức màu vàng xám. Trong môi trường kiềm, flavonol rất dễ bị oxy hóa và sau đó ngưng tụ để tạo thành sản phẩm màu đỏ.

VII.3. CÁC CHẤT MÀU HÌNH THÀNH TRONG QUÁ TRÌNH GIA CÔNG KỸ THUẬT

Trong các nguyên liệu đưa vào chế biến thực phẩm, thường chứa một tổ hợp các chất khác nhau. Trong quá trình gia công cơ nhiệt, chúng sẽ tương tác với nhau để tạo thành những chất màu mới có ảnh hưởng tốt hoặc xấu đến thành phẩm.

Các phản ứng tạo màu trong thực phẩm thường phức tạp và đa dạng. Chẳng hạn như màu sắc của nước chè là do phản ứng oxy hóa các polyphenol bằng enzyme,

màu sắc xuất hiện khi sấy malt, khi nướng bánh mì hoặc trong các sản phẩm chế biến hạt khác lại hầu như chủ yếu do phản ứng ozamin. Nếu như trong các sản phẩm bánh kẹo, màu được tạo nên chủ yếu là do phản ứng caramen hóa các đường thì trong chế biến rau quả màu được hình thành nên còn do một loạt các phản ứng khác nữa.

Chung qui lại, các phản ứng tạo màu là những phản ứng oxy hóa và những phản ứng khác có enzym xúc tác hoặc không có enzym xúc tác. Đó là phản ứng trùng hợp hóa các phẩm vật oxy hóa của polyphenol và phản ứng giữa bisflavonoit với axitamin. Chúng gồm có :

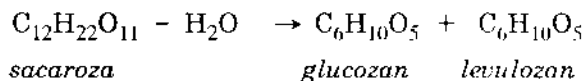
- phản ứng giữa đường và axitamin ;
- phản ứng dehydrat hóa các đường hay là phản ứng caramen hóa ;
- phản ứng phân hủy axit ascorbic, axit limonic, axit maleic, axit tetric và một số axit hữu cơ khác ;
- phản ứng oxy hóa các hợp chất của sắt và tạo thành phức có màu ;
- phản ứng tạo nên các sulfua kim loại có màu.

VII.3.1. Tạo màu mới do phản ứng caramen

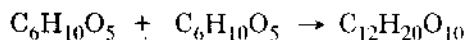
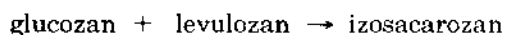
Phản ứng caramen hóa có ảnh hưởng lớn đến màu sắc của các sản phẩm giàu đường như bánh kẹo, mứt, ... Phản ứng xảy ra mạnh mẽ ở nhiệt độ nóng chảy của đường. Chẳng hạn, với glucoza ở 146 - 150°C, fructoza ở 95 - 100°C, sacaroza ở 160 - 180°C, lactoza 223 - 252°C. Tuy nhiên, phụ thuộc vào nồng độ đường, thành phần pH của môi trường, thời gian đun nóng, ... người ta vẫn tìm thấy các sản phẩm của sự caramen ở nhiệt độ thấp hơn điểm nóng chảy của đường. Ví dụ, sacaroza có thể bắt đầu biến đổi ngay khi ở nhiệt độ 135°C.

Giai đoạn đầu của phản ứng tạo nên các anhydrit của glucoza, fructoza, sacaroza như glucozan, fructozan, sacarozan là những hợp chất không màu. Sau đó, bên cạnh sự dehydrat hóa còn xảy ra sự trùng hợp hóa các đường đã được dehydrat hóa để tạo thành các phẩm vật có màu nâu vàng.

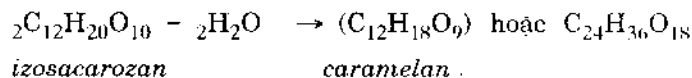
Chẳng hạn, với sacaroza, sơ đồ phản ứng caramen hóa như sau :



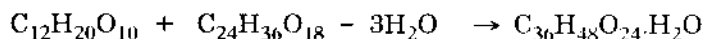
Đến 185 - 190°C sẽ tạo thành izosacarozan :



Khi ở nhiệt độ cao hơn sẽ mất đi 10% nước và tạo thành caramelan ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9$ hoặc $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_{18}$) có màu vàng :



Khi mất đi 14% nước sẽ tạo thành caramelen :



và khi mất đi 25% nước sẽ tạo thành caramelin có màu nâu đen.

Cần chú ý rằng tất cả các sản phẩm caramen hóa đều có vị đắng.

VII.3.2. Sự tạo màu mới do phản ứng melanoidin

Phản ứng ozamin, cacbonylamin, aminoza hay phản ứng melanoidin là phản ứng có vai trò đặc biệt quan trọng trong kỹ thuật sản xuất thực phẩm. Các hợp phần tham gia phản ứng là protein (hoặc các sản phẩm phân giải của chúng) và glucit.

Điều kiện để phản ứng xảy ra được là chất tham gia phản ứng phải có nhóm cacbonyl ($>C=O$). Khác với phản ứng caramen hóa, phản ứng ozamin đòi hỏi năng lượng hoạt hóa bé hơn, nhưng để tiến hành phản ứng bắt buộc trong môi trường phản ứng phải có nhóm amin hoặc amoniac. Theo Hodge, phản ứng tạo melanoidin bao gồm một loạt các phản ứng xảy ra song song hoặc nối tiếp. Dựa vào mức độ về màu sắc của các sản phẩm có thể chia thành ba giai đoạn kế tiếp nhau. Sản phẩm của giai đoạn đầu không màu và không hấp thụ ánh sáng cực tím. Giai đoạn này bao gồm hai phản ứng: phản ứng ngưng tụ cacbonylamin và phản ứng chuyển vị Amadori. Sản phẩm của giai đoạn thứ hai không màu hoặc có màu vàng, nhưng hấp thụ mạnh ánh sáng cực tím. Giai đoạn này bao gồm phản ứng khử nước của đường, phân hủy đường và các hợp chất amin. Sản phẩm của giai đoạn cuối có màu đậm. Giai đoạn này gồm có phản ứng ngưng tụ aldol, trùng hợp hóa aldehytamin và tạo thành hợp chất dị vòng chứa nitơ.

Thực tế trong hỗn hợp phản ứng có chứa đồng thời tất cả các sản phẩm, nhưng tỉ lệ của sản phẩm này hay sản phẩm khác chiếm ưu thế là phụ thuộc mức độ tiến hành của phản ứng.

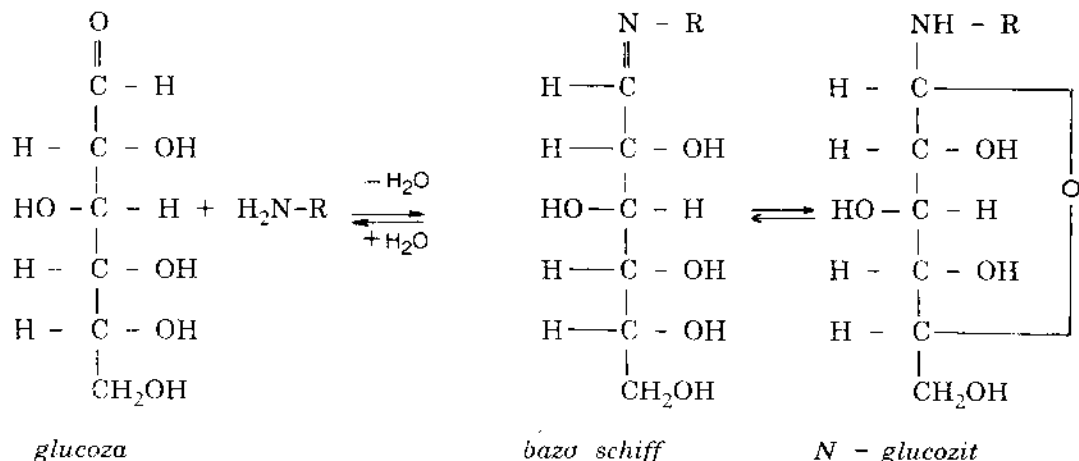
VII.3.2.1. Các giai đoạn của phản ứng tạo melanoidin

a. Giai đoạn đầu của phản ứng tạo melanoidin

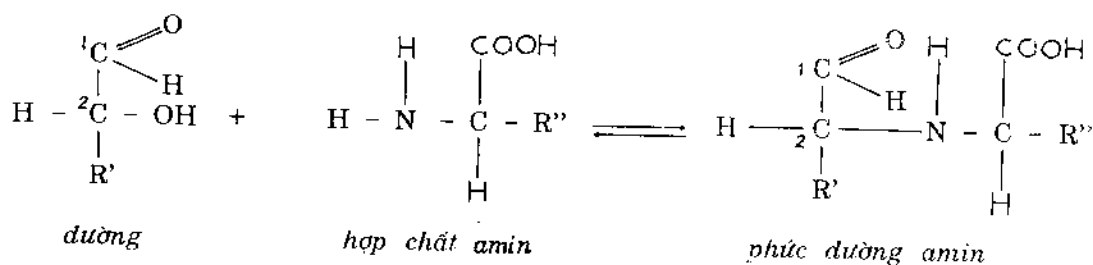
Phản ứng ngưng tụ cacbonylamin

Giai đoạn đầu tiên của sự tạo thành melanoidin là sự ngưng tụ đường với axitamin.

Trong điều kiện nhiệt độ sinh lý thì tạo thành bazơ schiff (hợp chất hữu cơ có nhóm $-HC=N-$) hoặc glucozit:



Trong điều kiện sản xuất khi ở nhiệt độ cao, phản ứng được bắt đầu không phải từ N-glucozit mà từ sacaroamin (đường amin) theo sơ đồ:

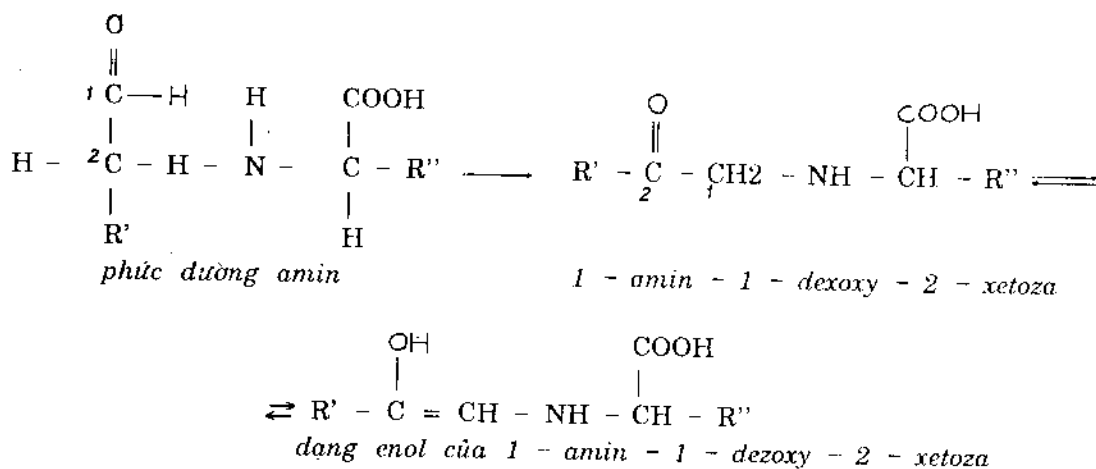


Phức đường amin được tạo thành không màu và không có tính chất nào của melanoidin cả.

Phản ứng này có thể tiến hành ở chỗ lạnh và qua một vài giờ thì đạt được cân bằng. Nhưng có thể tăng rất nhanh khi đun nóng hỗn hợp phản ứng.

Phản ứng chuyển vị Amadori

Khi ở nhiệt độ cao thì phức đường amin bị đồng phân hóa hay người ta gọi là bị chuyển vị nội phân Amadori. Kết quả là giữa nguyên tử cacbon thứ nhất và thứ hai phát sinh ra nối kép và tạo thành 1 - amin - 1 - dezoxy - 2 - xetoza :



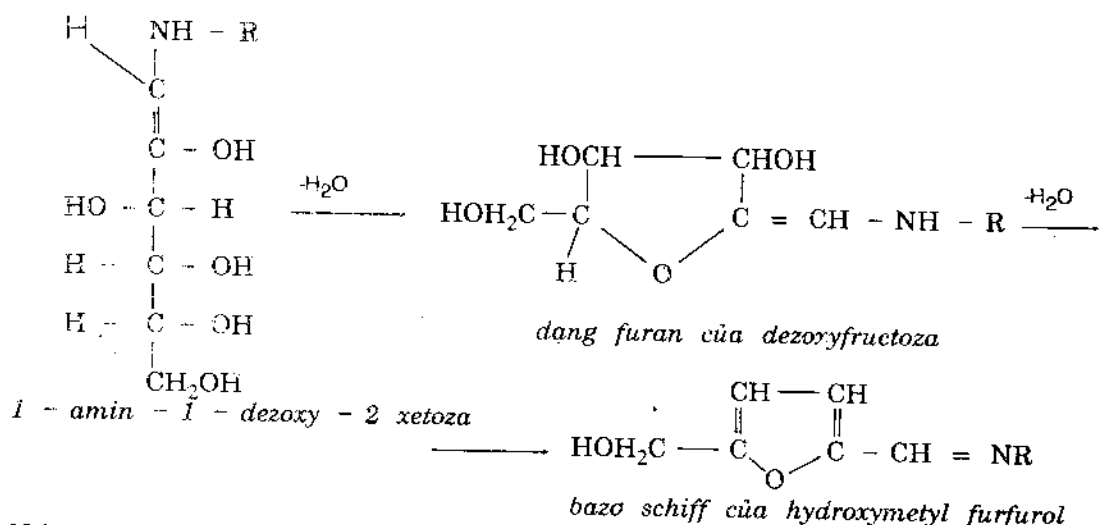
Phẩm vật của sự chuyển vị Amadori là hợp chất có khả năng phản ứng và là chất khởi đầu để tạo thành polyme có màu sẫm gọi là melanoidin.

b) Giai đoạn trung gian của phản ứng melanoidin

Ở giai đoạn này xảy ra sự khử nước của 1 - amin - 1 - dezoxy - 2 - xetoza tạo thành các sản phẩm phân ly khác nhau. Phụ thuộc vào điều kiện của môi trường và nhiệt độ mà giai đoạn trung gian có thể tiến hành bằng một vài con đường. Sự tạo thành furfural hoặc hydroxymethylfurfural là một trong những con đường khử nước của dezoxyxetoza. Một con đường khác (của sự khử nước dezoxyxetoza) là tạo thành reducton mạch hở. Con đường thứ ba là phân hủy hợp phần đường để tạo thành aldehyt, axeton, diaxetyl. Con đường thứ tư là tạo thành ozon.

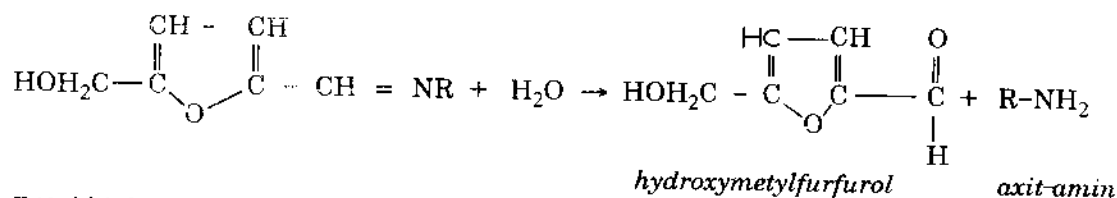
Tạo thành furfural và ozon

Nếu cấu tử đầu tiên của sự tạo thành melanoidin là glucoza, thì sản phẩm chuyển vị Amadori khi đun nóng sẽ chuyển sang dạng furan và sau đó thành bazơ schiff của hydroxymethylfurfural :



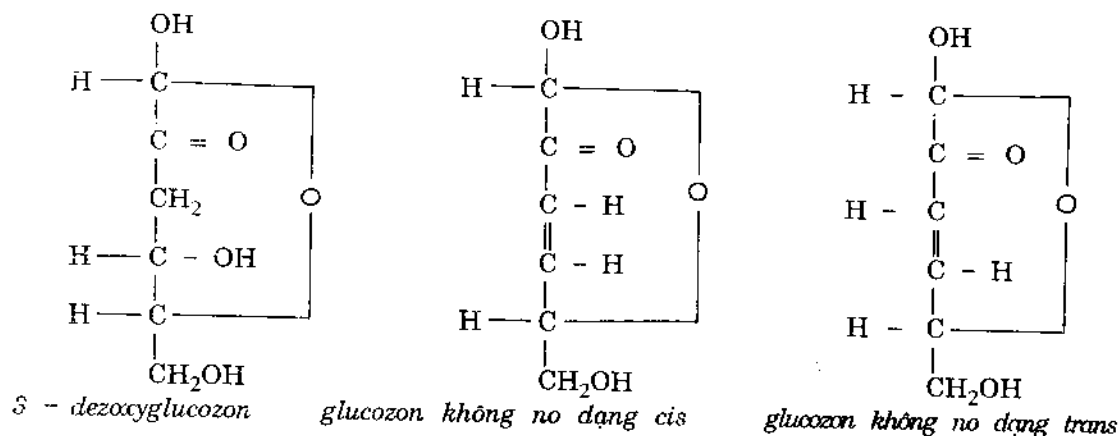
Nếu đường khởi đầu không phải là hexoza mà là pentoza thì tạo thành bazo schiff của furfural.

Sau này khi bị thủy phân, bazo schiff của hydroxymetylfurfural hoặc của furfural có thể bị phân hủy để tạo thành hydroxymetylfurfural hoặc furfural và axitamin tự do theo sơ đồ :



Đôi khi bazo schiff của hydroxymetylfural và của furfural cũng có thể ngưng tụ để tạo thành melanoidin chứa nitơ. Trong môi trường axit hoặc trung tính và ở nhiệt độ cao thì furfural và các dẫn xuất của nó sẽ tạo thành trước tiên.

Reinol, Anst và Ingled đã tìm thấy một con đường khử nước khác của deoxyxetoza. Ban đầu deoxyxetoza phản ứng với phân tử glucoza để tạo thành difuranozamin. Sau đó difuranozamin bị phân hủy để tạo thành 3 - deoxyglucozon, các ozon không no dạng *cis* và *trans* :

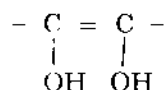


Hydroxymethylfurfuroi cũng có thể được tạo thành. Các tác giả này **cho rằng** các sản phẩm vừa kể trên là những chất tiền thân cơ bản của các polyme có màu **nâu sẫm**.

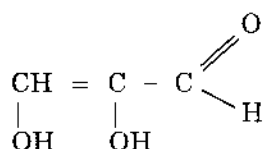
Tạo thành reducton có sáu cacbon

Các aminodezoxoxetoza được tạo thành khi chuyển vị Amadori, có thể bị khử đi hai phân tử H_2O để tạo thành các reducton có sáu cacbon.

Reducton là những hợp chất hữu cơ có tính chất chung là khử mạnh do có mặt nhóm endiol :

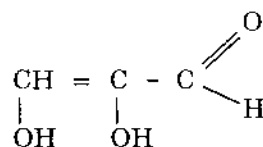


Theo thường lệ, nhóm endiol của reducton được liên kết với gốc aldehyt hoặc gốc axit. Ví dụ :

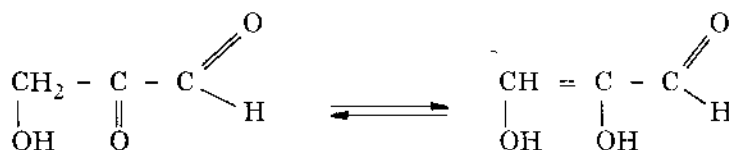


Do đó những hợp chất này rất nhạy với phản ứng oxy hóa và khử.

Chẳng hạn, reducton đơn giản nhất là triozoreducton :



Chất này thực chất là enol của hydroxymethylglyoxal :

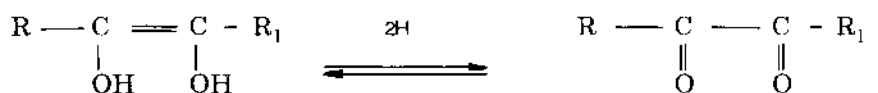


hydroxymethylglyoxal

*reducton hay là enolaldehyt
của axit tartric*

Sự tổ hợp của nhóm endiol với nhóm cacbonyl làm cho các chất này có khả năng nhạy cảm đặc biệt đối với phản ứng oxy hóa và khử.

Khả năng phản ứng của reducton có thể dẫn đến sự khử hydro để chuyển nhóm endiol thành nhóm cacbonyl



reducton

dehydroreducton

Đĩ nhiên, reducton có thể dễ dàng kết hợp oxy và chính đó là điều rất quan trọng cho sự bền vững của covat.

Reducton không khử nước Feling lại dễ dàng khử iot và 2,6 - diclophenolindophenol.

Axit dehydroascorbic có thể coi là một ví dụ của reducton có sáu cacbon.

Không phải chỉ riêng reducton mà các dạng dehydro của chúng cũng tham gia vào việc tạo nên màu nâu.

Phân hủy đường

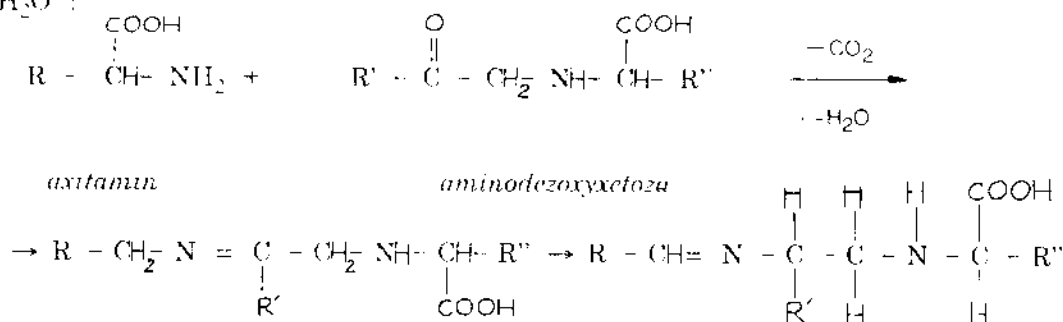
Một trong những giai đoạn trung gian của phản ứng tạo melanoidin là sự phân hủy cấu tử đường của sản phẩm chuyển vị Amadori để tạo thành các phẩm vật khác nhau : triozoreducton, aldehyt piruvic, axeton, axetoin, diaxetyl.

Một số chất tạo thành khi phân hủy đường có mùi và vị dễ chịu do đó quyết định chất lượng của sản phẩm

Phân hủy các hợp chất amin

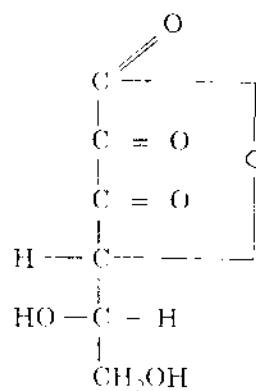
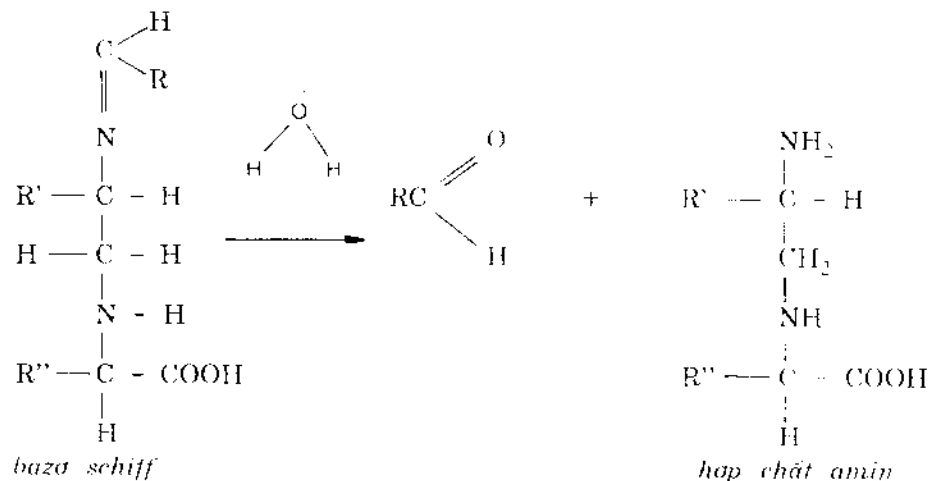
Trong quá trình tạo nên melanoidin thì CO_2 , aldehyt và NH_3 là những phẩm vật của phản ứng khi ở nhiệt độ cao. Nguyên do của hiện tượng này là sự phân hủy strecker theo những hướng khác nhau :

1 - Phẩm vật chuyển vị Amadori có thể kết hợp với axitamin để thoát ra CO_2 và H_2O :



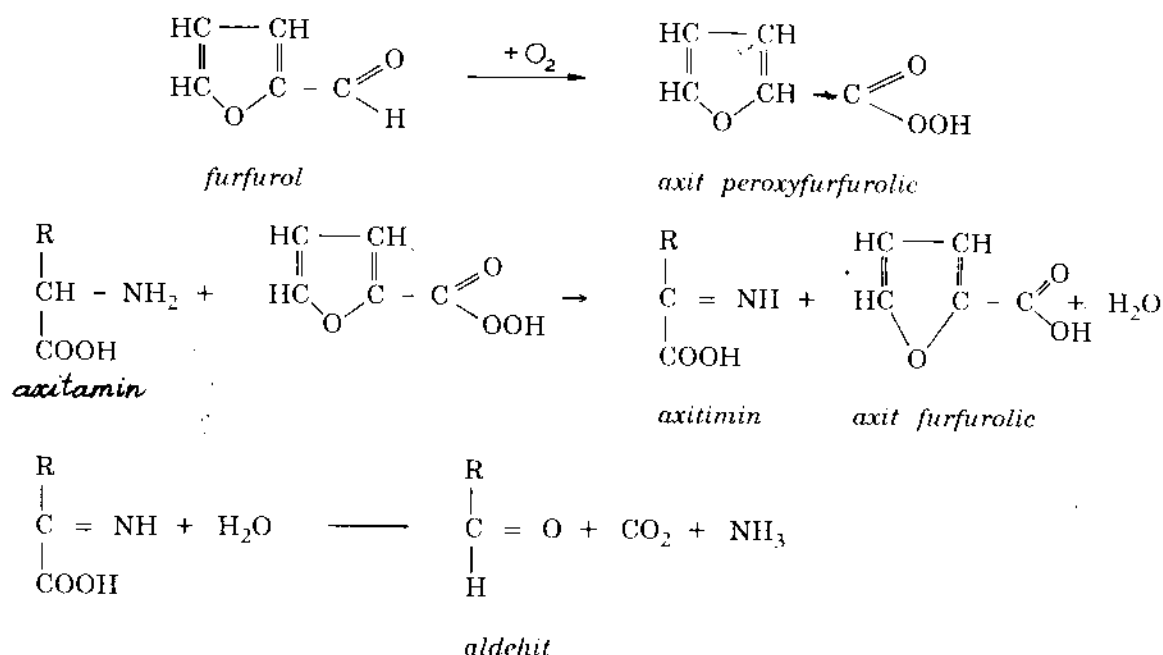
baza schiff

Baza schiff được tạo thành bị phân ly thủy phân thành aldehyt và hợp chất amin. Chính hợp chất amin này sẽ cho các phẩm vật chứa nitơ và có màu nâu sau này. Còn aldehyt được tạo thành trong phản ứng này, so với axitamin đã tham gia tương tác với aminodezoxycetoza thì có ít hơn một cacbon.



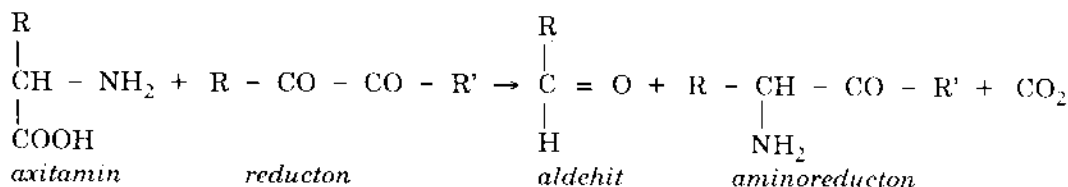
axit dehydroascorbic

2 - Giữa furfural hoặc hydroxymethylfurfural và axitamin có thể xảy ra sự tương tác oxy hóa :



Kết quả là từ axitamin tạo thành aldehyt có ít hơn một nguyên tử cacbon.

3 - Aldehyt cũng có thể được tạo thành do kết quả của sự chuyển amin giữa axitamin với reducton



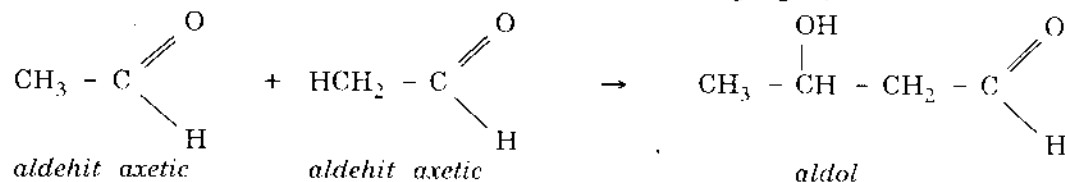
Giả sử, do sự chuyển amin mà dẫn đến hình thành nên aldehyt là phản ứng chủ yếu, thì rõ ràng là do kết quả của phản ứng đó mà nitơ tham gia vào polyme màu nâu. Phần lớn CO₂ thoát ra trong quá trình tạo melanoidin đều do axitamin bị phân hủy strecker. Các aldehyt tạo thành đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành hương vị của sản phẩm thực phẩm khi chế biến nhiệt.

c) Giai đoạn cuối cùng của phản ứng tạo melanoidin

Giai đoạn cuối cùng này bao gồm rất nhiều phản ứng phức tạp. Có thể chia thành hai kiểu phản ứng :

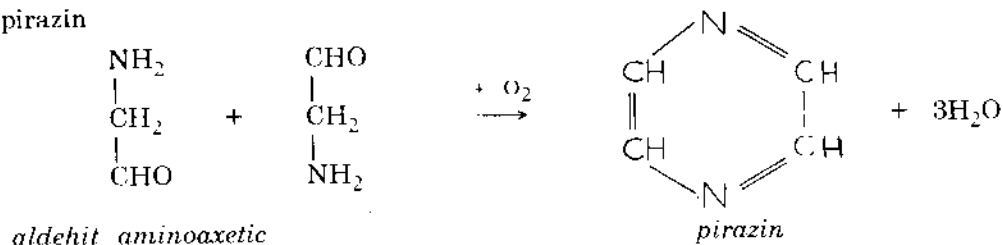
- Phản ứng ngưng tụ aldol với sự tạo thành polyme màu nâu không chứa nitơ ;
- Phản ứng trùng hợp hóa aldehytamin với sự tạo thành các hợp chất nitơ dị vòng.

Sự ngưng tụ aldehyt axetic có thể cũng là ví dụ về ngưng tụ aldol :



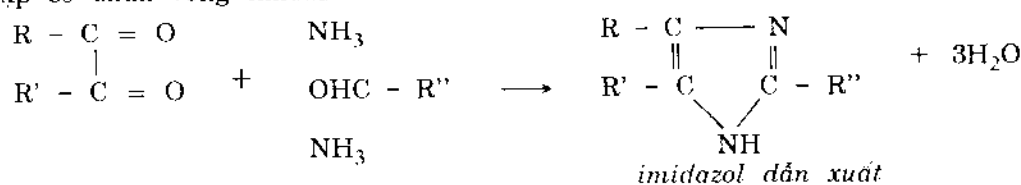
Khi đó nguyên tử hydro của nhóm metyl của một phân tử aldehyt này được liên kết với nguyên tử oxy của nhóm cacbonyl của phân tử aldehyt thứ hai.

Sự trùng hợp hóa và oxy hóa đồng thời các aldehyt aminoaxetic dẫn đến tạo thành pirazin



Pirazin có mùi dễ chịu nhưng yếu, hòa tan trong nước.

Khi trùng hợp hóa dehydroreducton với amoniac và aldehyt sẽ tạo thành hợp chất phức tạp có chứa vòng imidazol :



Ngoài những hợp chất đã kể, do kết quả của phản ứng ngưng tụ aldehyt, piridin và pirol cũng có thể được tạo thành.

Sự ngưng tụ aldol chỉ tiến hành được khi caramen hóa dung dịch đường thuần khiết. Khi có mặt các hợp chất amin mặc dầu chỉ là vết cũng xảy ra đồng thời cả hai kiểu phản ứng.

Giai đoạn cuối cùng của phản ứng melanoidin sẽ tạo nên đầu tiên là các polyme không no hòa tan được trong nước, sau đến là các polyme không no và không hòa tan được trong nước, nhưng đều có màu đậm và có cùng tên gọi chung là melanoidin.

Các melanoidin hấp thụ mạnh tia cực tím ($\lambda < 220 \text{ nm}$), không khử được dung dịch Feling, nhưng khử được iot và 2,6 - diclophenolindophenol. Khả năng hòa tan của melanoidin phụ thuộc vào nhiệt độ mà phản ứng tiến hành.

Khi nhiệt độ cao thì quá trình xảy ra mãnh liệt hơn nhưng melanoidin tạo thành có hương thơm kém hơn và ít hòa tan trong nước hơn. Các melanoidin không hòa tan về tính chất thì gần giống với humin.

VII.3.2. Điều kiện tiến hành của phản ứng tạo melanoidin

a) Ảnh hưởng của axitamin và đường

Như đã thấy ở trên, cường độ sẫm màu của phản ứng phụ thuộc vào bản chất của axitamin, bản chất của đường, nồng độ chất khô nói chung trong dung dịch, nhiệt độ, pH và một loạt yếu tố khác.

Qua cơ chế phản ứng, ta thấy một trong những phản ứng của giai đoạn trung gian là tạo thành furfural và oxymetylfurfural có kèm theo sự tái tạo lại axitamin vốn đã tham gia tương tác với đường từ phản ứng đầu tiên. Như vậy axitamin có

thể xem như một chất xúc tác ở trong giai đoạn đầu. Mặt khác, melanoidin - sản phẩm cuối cùng của phản ứng lại là chất có chứa nitơ. Một phần axitamin tiêu tốn cho sự tân tạo aldehyt và thoát ra NH_3 . NH_3 tương tác với đường và tạo ra melanoidin.

Các axitamin tham gia phản ứng khác nhau phụ thuộc vào nhiệt độ, pH và lượng nước.

Theo Kretovic, axitamin có khả năng phản ứng và cho sản phẩm màu mạnh hơn cả là glicocol, alanin, asparagin. Xistin và tirozin trải lại cho sản phẩm màu yếu hơn cả. Nhưng cho mùi mạnh mẽ hơn cả cố valin và loxin. Glicocol cho màu rất đậm, mùi của bia và vị hơi chua. Alanin phản ứng chậm hơn và cho sản phẩm cũng tương tự. Phenylalanin phản ứng rất chậm, tạo thành sản phẩm có màu nâu sẫm và có mùi thơm hoa hồng. Loxin cho sản phẩm có màu không đáng kể, nhưng có mùi bánh mỳ rõ rệt. Axit glutamic có hoạt độ cao, nhưng cho sản phẩm có màu nhạt.

Protein, peptit, amin, amon và một số chất chứa nitơ khác cũng có khả năng phản ứng với đường khử tạo thành chất có màu sẫm. Chẳng hạn di - và tripeptit phản ứng mạnh liệt với xiloza, arabinosa. Các protein sẽ di tương tác được với đường là do có các nhóm $-\text{NH}_2$ tự do quyết định. Nhóm $-\text{NH}_2$ trong protein càng nhiều thì khả năng tạo melanoidin càng mạnh. Khả năng tham gia phản ứng của axitamin phụ thuộc rất mạnh vào độ dài của mạch cacbon và vị trí của nhóm amin so với nhóm carboxyl. Nhóm amin càng xa nhóm carboxyl thì tham gia phản ứng càng mạnh mẽ hơn axit monoamin. α - axitamin hoạt động kém hơn β - axitamin.

Cường độ của phản ứng cũng phụ thuộc vào bản chất của đường khử. Glucoza phản ứng mạnh liệt hơn cả, sau đến galactoza và lactoza. Theo Kretovic, fructoza phản ứng nhanh hơn glucoza, còn pentoza (arabinosa, xiloza) lại có hoạt động cao nhất. Sacaroza không phản ứng với axitamin. Maltoza cũng phản ứng như glucoza. Như vậy điều kiện cần thiết để tạo phản ứng melanoidin là có nhóm carbonyl.

Cường độ của phản ứng melanoidin còn phụ thuộc vào nồng độ đường. Tỷ lệ giữa axitamin và đường thích hợp nhất là 1/2 hoặc 1/3. Cùng với việc tăng hợp phần đường thừa sẽ làm cho melanoidin tạo được có dạng hòa tan ngay cả khi nồng độ rất cao. Do đó người ta có khuynh hướng xê dịch tỷ lệ về phía tăng hàm lượng đường.

Nói chung phản ứng có thể tiến hành ngay cả khi nồng độ axitamin không đáng kể và tỷ lệ axitamin/đường rất bé 1:40 thậm chí 1:300.

b) Ảnh hưởng của nước

Để phản ứng Maillard tiến hành cực đại thì xung quanh mỗi phân tử protein phải tạo nên lớp đơn phân glucoza và lớp đơn phân nước. Như vậy, sự có mặt của nước là điều kiện cần thiết để tiến hành phản ứng. Nồng độ chất tác dụng càng cao, lượng nước càng ít thì tạo thành melanoidin càng mạnh.

c) Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH của môi trường

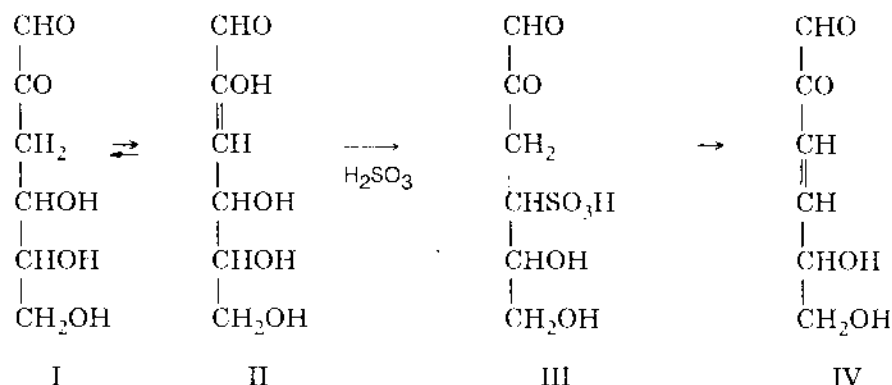
Ở 0°C và dưới 0°C , phản ứng melanoidin không xảy ra. Cùng với sự tăng nhiệt độ, vận tốc phản ứng tăng lên rất mạnh mẽ. Ở các nhiệt độ khác nhau, các sản

phẩm tạo thành cũng khác nhau. Người ta nhận thấy khi ở nhiệt độ từ 95 - 100°C, phản ứng sẽ cho các sản phẩm có tính chất cảm quan tốt hơn cả. Khi nhiệt độ quá cao thì các melanoidin tạo được sẽ có vị đắng và mùi khét. Vì vậy trong sản xuất để thu được malt màu, người ta thường không chế phản ứng melanoidin ở 160°C (mặc dù lượng chất màu sẽ cực đại khi ở nhiệt độ 190°C). Vì lẽ ở nhiệt độ trên 160°C các melanoidin tạo thành sẽ không hòa tan trong nước do đó làm giảm khả năng cho màu và độ trích ly của malt thu được.

Phản ứng Maillard có thể tiến hành trong một khoảng pH khá rộng, tuy nhiên trong môi trường kiềm phản ứng nhanh hơn. Trong môi trường axit (pH < 3) quá trình tạo melanoidin thể hiện rất yếu và chủ yếu là sự phân hủy đường. Cùng với sự tăng nhiệt độ phản ứng sẽ được tăng nhanh ngay cả khi trong môi trường axit (pH = 2).

d) Chất kìm hãm và chất tăng tốc phản ứng melanoidin

Phản ứng caramen hóa, oxy hóa và melanoidin là những phản ứng có sự tham gia của các hợp chất cacbonyl. Vì vậy chất kìm hãm là những chất phản ứng được với nhóm cacbonyl : như dimedon, hydroxylamin, bisulfít. Những chất này sẽ kết hợp với các chất khác nhau phát sinh ra ở trong giai đoạn trung gian, do đó làm ngừng các quá trình tiếp theo của phản ứng. Chẳng hạn dimedon kết hợp được với aldehyt nên có thể làm ngừng hẳn phản ứng tạo melanoidin. Khí sulfuro, axit sulfuro hoặc muối của nó (bisulfít của natri và kali) là những chất kìm hãm rất mạnh mẽ phản ứng tạo màu melanoidin. Tác dụng kìm hãm của axit sulfuro có liên quan với các reducton :



Bằng cách đun dung dịch glucoza và sulfít ở 100°C, người ta đã thu được hợp chất 3,4 - dideoxy - 4 - sulfohexozon (III). Các dẫn xuất của axit sulfuric là những hợp chất rất bền vững, thậm chí bằng phương pháp thủy phân người ta vẫn không thể thu lại được SO₂ khi chưng cất. Do đó, các sản phẩm trung gian tương tự của phản ứng melanoidin đều không được chuyển hóa thành các hợp chất màu cuối cùng.

Ngoài ra, khi kết hợp nhóm rượu bậc hai ở glucozon không no dạng *trans*, axit sulfuro còn gạt bỏ khả năng vòng hóa sau này của glucozon (khi tương tác với amoniac).

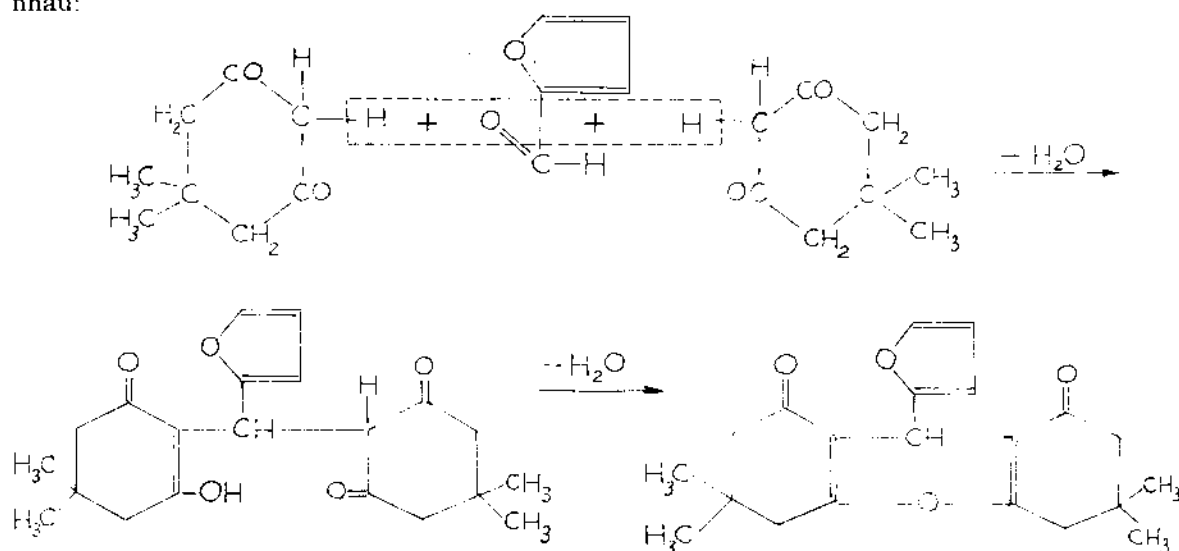
Axit sulfuro còn thể hiện tác dụng kháng khuẩn mạnh mẽ và là chất chống oxy hóa. Axit sulfuro ổn định được axit ascorbic ở dạng hydroascorbic ở trong các sản phẩm. Người ta nhận thấy rằng, trong một số sản phẩm (nước chanh, nước nho,

nước táo) khi lượng axit ascorbic bị giảm thì cường độ sẫm màu tăng lên, lượng axitamin và đường khử bị giảm xuống còn hàm lượng furfural lại tăng lên. Có lẽ do tính khử của axit ascorbic và khả năng phản ứng của nó với các sản phẩm trung gian của phản ứng Maillard. Do đó khi vitamin hóa các sản phẩm thực phẩm sẽ làm yếu sự tạo thành các melanoidin. Tuy chất kim hàm axit ascorbic này làm tăng giá trị sinh học của sản phẩm, nhưng ý nghĩa thực tiễn lại hạn chế, vì axit ascorbic cũng như những axit hữu cơ khác, khi phân hủy sẽ cho hợp chất có màu sẫm. Ngoài ra axit ascorbic là một reducton, nghĩa là một sản phẩm trung gian của phản ứng melanoidin mà sau này sẽ tương tác với axitamin để tạo thành chất có màu sẫm.

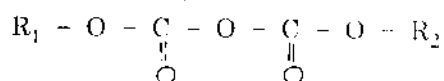
Cần thấy rằng, trong các sản phẩm có màu đậm do antoxian truyền cho, thì dưới tác dụng của vitamin C, màu tự nhiên sẽ bị nhạt đi. Như vậy dùng axit ascorbic để kim hàm sự sẫm màu là không có giá trị van nang. Người ta chỉ có thể ứng dụng nó đối với từng sản phẩm cụ thể khi đã nghiên cứu kỹ thành phần hóa học của nó.

Chất kim hàm phản ứng melanoidin tốt nhất là dimedon (dimetyldihydrorezorxin). Nó có khả năng liên kết các furfural và aldehyt do đó làm ngừng sự tạo melanoidin.

Dimedon trong những điều kiện nhất định có thể kết tủa hoàn toàn furfural bằng cách tạo ra sản phẩm ngưng tụ furfuroidimedon (hai phân tử). Các chất oxy hóa (KMnO_4 , H_2O_2 , quinhidron) và các chất khử (H_2SO_3 , natri hyposulfit, hydroquinon, hydro mới sinh) đều kim hàm phản ứng tạo melanoidin nhưng với cường độ khác nhau:

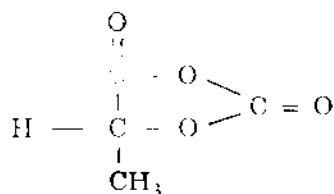


Gần đây người ta còn dùng este của axit pirocarbonic làm chất kim hàm phản ứng melanoidin. Este đó có cấu tạo như sau :

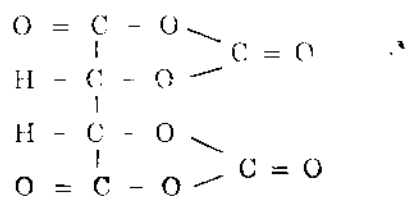


R_1 và R_2 có thể là các gốc alkyl, aryl (benzyl) hoặc các gốc dị vòng (furfuryl).

Trong một số sản phẩm thực phẩm người ta còn dùng các anhydrit cacbonic của các α - hydroxyaxit như sau :



trường hợp dùng axit lactic



trường hợp dùng axit tartaric

Về phương diện lý thuyết, hiệu quả kìm hãm của pirocacbonat cũng như của anhydrit cacbonic thể hiện ở chỗ chúng tương tác với nhóm amin tự do. Do đó axitamin trở nên không có khả năng phản ứng với nhóm cacbonyl của đường.

Các chất tăng tốc phản ứng melanoidin có axit lactic và phosphat. Muối của axit lactic làm tăng tốc phản ứng này rất mạnh. Dung dịch đậm phosphat không những làm tăng nhanh vận tốc phản ứng giữa axitamin và glucosa mà còn làm tăng phản ứng nâu hóa dung dịch glucosa tinh khiết.

VII.3.2.3. Tính phổ biến của phản ứng Maillard

Như đã nêu ở trên, phản ứng giữa axitamin và đường xảy ra trong điều kiện rất dễ dàng, do đó phản ứng này rất phổ biến trong sản xuất và bảo quản các sản phẩm thực phẩm. Tùy thuộc vào yêu cầu về tính chất cảm quan của từng sản phẩm mà người ta hoặc tạo điều kiện để tăng cường phản ứng đến tối đa hoặc kìm hãm phản ứng đến mức tối thiểu.

Một trong những quá trình để tạo điều kiện phản ứng này phát triển tối đa là sản xuất bánh mì. Màu sắc của vỏ bánh mì hầu như do phản ứng này quyết định. Vì vậy những biện pháp kỹ thuật tương ứng trong qui trình sản xuất lên men để tạo axitamin tự do, đường khử, điều chỉnh nhiệt độ trong giai đoạn nướng đều nhằm mục đích đó.

Trong sản xuất bia (và covat), màu sắc và hương vị của bia phần lớn do malt quyết định. Các biện pháp kỹ thuật trong sản xuất malt đều nhằm điều hòa phản ứng melanoidin. Để thu được malt vàng, người ta cho mọc mầm trong một thời gian ngắn, làm mất nước nhanh để thu được lượng axitamin và ít đường làm khó khăn cho phản ứng cacbonylamin. Trái lại để sản xuất malt đen thì nhiệt độ sấy phải cao hơn thời gian sấy lâu hơn. Theo Manxev, do thủy phân glucxit và protein mà tích tụ những hợp chất có khả năng tạo thành chất thơm. Malt sấy ở nhiệt độ thấp quá sẽ ảnh hưởng xấu đến vị của bia, còn khi sấy ở nhiệt độ quá cao, bia sẽ có vị khét. Vì vậy khi sản xuất bia vàng cần phải kiểm tra sự tạo melanoidin và hạn chế thời gian đun sôi dung dịch lên men.

Trái lại trong sản xuất rượu người ta tìm cách kìm hãm phản ứng tạo melanoidin một cách triệt để. Vì phản ứng sẽ gây tổn thất tinh bột và đường, đồng thời melanoidin tạo thành có tác dụng kìm hãm hoạt động của enzym. Zavrexki đã đề ra kỹ thuật nấu nguyên liệu với một lượng lớn nước để khắc phục ảnh hưởng xấu của phản ứng này, đồng thời giảm tổn thất đường và tăng hiệu suất rượu.

Trong sản xuất thuốc là, quá trình sấy, trước khi lên men và lên men cũng do

phản ứng Maillard quyết định. Việc làm giảm độ ẩm của môi trường sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng đó và tăng cường màu sẫm. Nguyên nhân cơ bản của sự tự ẩm hóa thuốc lá là phản ứng melanoidin có kèm theo thoát nước. Khi tỉ lệ giữa axitamin và đường bằng 1/2 thì lượng ẩm thoát ra là cực đại và lượng chất khô là cực tiểu. Thay đổi tỉ lệ này sẽ có ảnh hưởng nhanh chóng đến lượng nước thoát ra trong phản ứng.

Trong sản xuất đường, khi cô đặc, đường bị sẫm màu cũng là do phản ứng melanoidin. Phản ứng melanoidin còn có ảnh hưởng lớn đến việc chế biến quả, rau cũng như bảo quản chúng. Người ta đã thấy rằng do phản ứng giữa đường nghịch đảo và axitamin hoặc muối amon mà tất cả sirô và nước quả cô đặc đều bị sẫm màu khi bảo quản, nhất là ở nhiệt độ cao. Trong đồ hộp quả và rau, người ta có khuynh hướng bảo vệ màu tự nhiên và hương thơm của chúng. Phản ứng Maillard luôn luôn làm xấu đi không những tính chất cảm quan mà cả giá trị thực phẩm của sản phẩm nữa.

Tóm lại, phản ứng melanoidin rất phổ biến trong mọi sản phẩm thực phẩm có liên quan với gia nhiệt và thời gian bảo quản dài.

VII.3.3. Sự tạo thành các chất màu do phản ứng oxy hóa polyphenol

Bên cạnh phản ứng melanoidin, còn có phản ứng tạo màu do oxy hóa các polyphenol có enzym và không có enzym tham dự. Người ta cũng gọi là phản ứng sẫm màu do enzym.

VII.3.3.1. Các cơ chất phenol

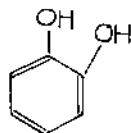
Hợp chất phenol là những chất mà phân tử có chứa vòng benzen, trong đó có một, hai hoặc nhiều hơn hai nhóm hydroxyl. Dựa vào đặc trưng của "bộ xương" cacbon, các hợp chất phenol tự nhiên có thể chia ra làm ba nhóm chính :

- nhóm hợp chất phenol $C_6 - C_1$ (axit galic) ;
- nhóm hợp chất phenol $C_6 - C_3$ (axit cafeic) ;
- nhóm hợp chất phenol $C_6 - C_3 - C_6$ (catechin và flavonoid).

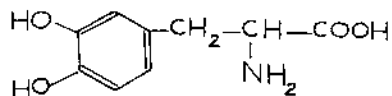
Khả năng phản ứng tạo màu mạnh hay yếu phụ thuộc vào cấu trúc của phenol cũng như vào nguồn enzym xúc tác phản ứng oxy hóa này. Chẳng hạn các metadiphenol thường là những cơ chất xấu.

Các cơ chất phenol chủ yếu của phản ứng tạo màu do enzym xúc tác như sau :

- 1) Pirocatechol và các dẫn xuất (ngoại trừ galicol hay o-metoxyphecol)

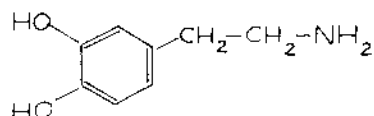


- 2) 3, 4 - Dihydroxyphenylalanin (DOPA)



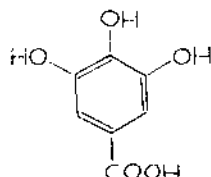
được tạo ra từ tyrosin (trường hợp trong khoai tây) và dễ bị oxy hóa thành dopa-quinon.

3) 3, 4 - Dihydroxyphenyletylamin hay dopamin



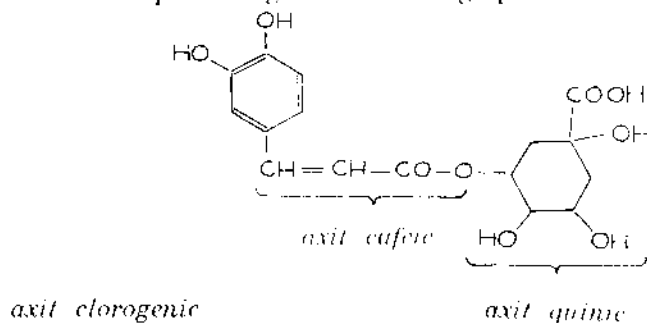
là chất chính làm cho chuối bị sẫm màu.

4) Axit galic



là axit có nhân thơm, khi bị oxy hóa thì cho màu đỏ sẫm, hòa tan được trong nước.

5) Axit clorogenic, có trong táo, khoai tây và lê, là chất có khả năng tạo ra chất màu xanh đen khi phản ứng với sắt trong quá trình nấu khoai tây

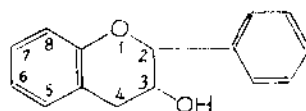


Khi giảm pH xuống nhỏ hơn 4 hoặc dùng các tác nhân tạo phức được với Fe như phosphat hoặc axit etylendiamintetraaxetic (EDTA, trong điều kiện cho phép) thì có thể tránh được phản ứng tạo màu này.

6) Các flavonoid, trong đó antoxian, flavon và flavonol là những hợp chất nguyên thủy đã có màu.

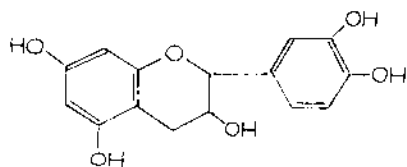
Catechin và leucoantoxianidol là những hợp chất không màu, dễ dàng bị oxy hóa (nhất là khi gia nhiệt trong môi trường axit), mất nước để chuyển thành những sản phẩm (antoxianidol) có màu khác nhau.

Catechin hay catechol là tên gọi chung cho các phenol có dạng flavanol - 3

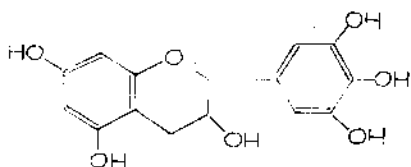


Quan trọng nhất trong nhóm này có catechin và galocatechin chứa nhiều trong lá chè :

- Catechin, (3, 5, 7, 3', 4' - pentahydroxyflavan)

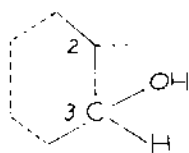


- Galocatechin, (3, 5, 7, 3', 4', 5' - hexahydroxyflavan)



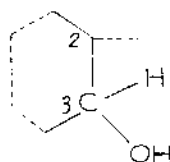
Trong phân tử catechin và galocatechin có hai nguyên tử cacbon bất đối ở vị trí C_2 và C_3 do đó tạo ra nhiều đồng phân quang học (24 đồng phân) :

- Hai đồng phân thuận nghịch do C_3 gây ra :



đồng phân thuận

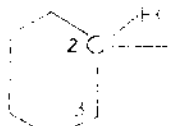
(OH nằm phía trên mặt phẳng quay cực, khi viết thêm ký hiệu epi)



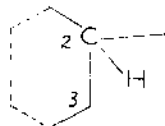
đồng phân nghịch

(OH nằm dưới mặt phẳng quay cực, khi viết không thêm ký hiệu)

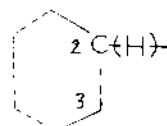
- Ba đồng phân dị cấu thể do C_2 gây ra :



dạng L

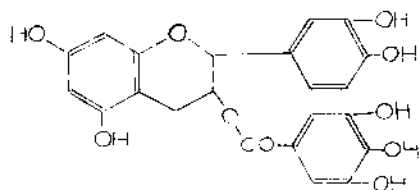


dạng D

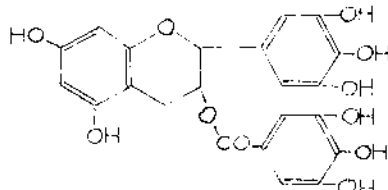


dạng D, L

- Nhóm - OH ở C_3 cũng có thể kết hợp với axit galic để tạo ra catechingalat hoặc galocatechingalat.



catechingalat

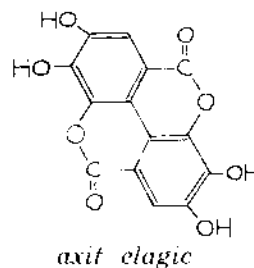
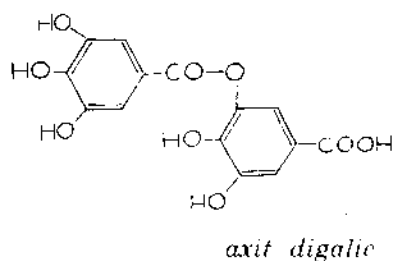


galocatechingalat

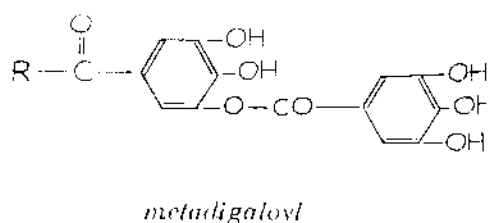
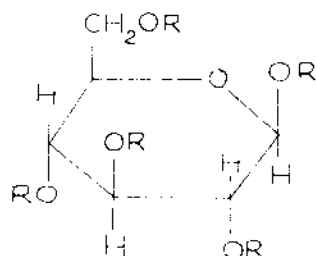
7) Tanin không những là cơ chất của phản ứng sẫm màu do enzym xúc tác mà còn góp phần tạo ra kết cấu và tạo vị cho các tổ chức thực vật. Người ta thường phân biệt hai nhóm tanin : tanin thủy phân và tanin ngưng tụ :

- *Tanin thủy phân* (tanin pyrogalic) là este của đường glucosa với các axit polyphenolic khác nhau (axit galic, axit digalic, axit elagic và axit luteic). Este của

đường glucoza với axit galic là galotanin, của đường glucoza với axit elagic là elagotanin. Dưới tác dụng của axit, kiềm hoặc enzym chúng bị thủy phân thành các chất ban đầu.



Chàng hạn như tanin Trung quốc là β - pentadigaloylglucoza.



Tanin có tính chất thuộc da là hợp chất có khối lượng phân tử từ 500 đến 3 000, là este của axit digalic và glucoza.

- *Tanin ngưng tụ* (hay tanin catechic) là hợp chất do các catechin ngưng tụ với nhau theo kiểu "đầu nối đuôi" ($C_6 - C_4$ với catechin) hoặc kiểu "đuôi nối đuôi" ($C_6 - C_6$, với galocatechin) hoặc kiểu "đầu nối đầu" ($C_4 - C_8$ với flavandiol - 3, 4) tạo thành. Tanin ngưng tụ không bị phân giải bởi axit vô cơ cũng như bởi enzym.

VII.3.3.2. Tính chất chung của các hợp chất polyphenol

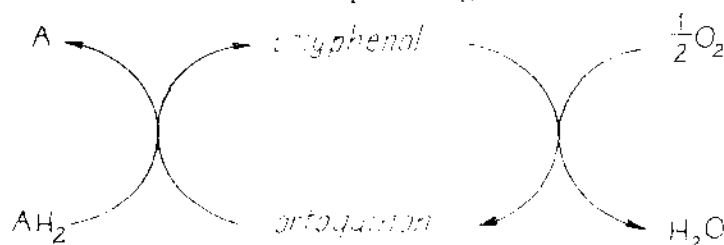
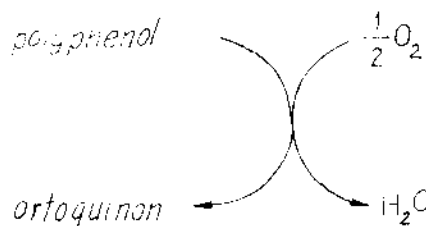
Các polyphenol có chứa gốc pyrocatechic hoặc pyrogalic nên chúng có thể tham gia phản ứng oxy hóa - khử, phản ứng cộng và phản ứng ngưng tụ.

a) Phản ứng oxy hóa - khử

Dưới tác dụng của enzym polyphenoloxylaza, các polyphenol bị oxy hóa để tạo thành các quinon, sơ đồ phản ứng như hình bên :

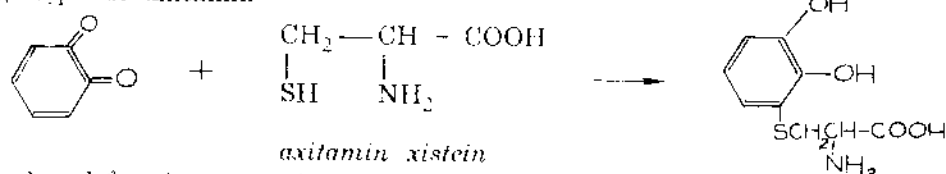
Bản thân các octoquinon cũng là những chất oxy hóa.

Nếu có các chất khử khác như vitamin C, glucoza, chúng sẽ ngưng tụ với nhau và sẽ oxy hóa các chất đó, theo sơ đồ phản ứng :



b) Phản ứng cộng

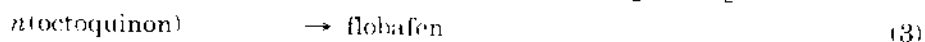
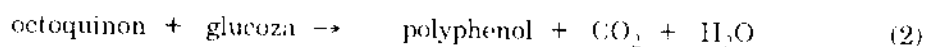
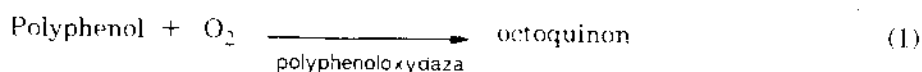
Khi có mặt các axitamin thì các octoquinon được tạo thành sẽ tiến hành phản ứng cộng hợp với axitamin :



Các sản phẩm được tạo thành của phản ứng cộng lại có thể bị oxy hóa để tạo nên các octoquinon tương ứng.

c) Phản ứng ngưng tụ

Các octoquinon cũng dễ dàng ngưng tụ với nhau để tạo nên các sản phẩm có màu gọi chung là flobafen.



Trong điều kiện hô hấp bình thường thì phản ứng (1) và (2) chiếm ưu thế. Trái lại, trong điều kiện sản xuất thì phản ứng (1) và (3) chiếm ưu thế.

VII.3.3.3. Chức năng của các polyphenol

Các polyphenol có tác dụng ức chế nấm. Người ta thường dùng phenol (axit cacbovic) làm chất khử trùng cũng với ý nghĩa đó. Thực ra, bình thường ở trong thực vật, tác dụng đó thể hiện tương đối yếu, nhưng sẽ tăng lên một cách mạnh mẽ trong quá trình polyphenol bị oxy hóa bởi enzym. Thậm chí, một số polyphenol với một nồng độ nhất định có tác dụng kích thích sự phát triển của ký sinh trùng, còn tác dụng kìm hãm chỉ thể hiện ra trong quá trình oxy hóa chúng bởi enzym. Tuy nhiên, đóng vai trò quan trọng trong hiện tượng miễn dịch thực vật này không phải chỉ một mình polyphenol mà là hệ polyphenol-polyphenoloxydaza. Người ta đã chứng minh rằng trong nhiều cây bị dập cơ học hay bị nhiễm trùng thì hàm lượng polyphenol và hoạt độ polyphenoloxydaza đều tăng lên. Ở chỗ mô bị dập bắt đầu tạo thành hợp chất polyphenol mới và kèm theo là sự ngưng tụ oxy hóa trong lớp bề mặt. Sản phẩm ngưng tụ tạo thành lớp bảo vệ.

Nhiều polyphenol có hoạt tính sinh tố P, nghĩa là có khả năng làm tăng độ đàn hồi và chuẩn hóa tính thẩm của vi ti huyết quản. Trong số đó, catechin có hoạt tính vitamin P cao hơn cả. Cần chú ý rằng, tất cả flavonoid có hoạt tính sinh học đều bắt buộc phải có hai nhóm octohydroxyl, trong đó hydro của một nhóm có thể được thay thế bằng gốc bất kỳ. Vòng chính là floriglucin, vòng phụ là pirocatechic.

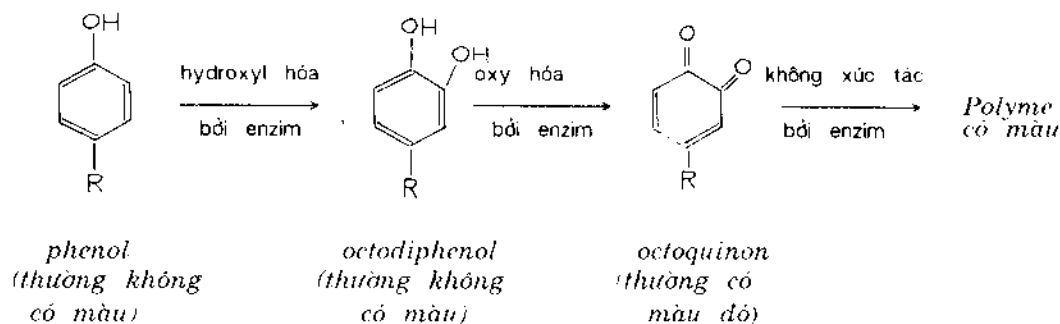
Polyphenol là những chất chuyển hydro (electron) trong chuỗi hô hấp bình thường định cư trong ti thể. Ubiquinon (coenzim Q) là một trong những chất này. Nhiều polyphenol là những chất chống oxy hóa, do đó chúng có ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm để làm bền chất béo. Hoạt tính chống oxy hóa của chúng có thể do :

- phenol tạo phức bền vững với các kim loại nặng, do đó làm mất tác dụng xúc tác của chúng ;

- phenol là chất nhận các gốc tự do tức là có khả năng dập tắt các quá trình tạo ra gốc tự do.

VII.3.3.4. Enzim xúc tác phản ứng oxy hóa phenol

Phản ứng tạo màu do enzim thường gồm các giai đoạn sau :

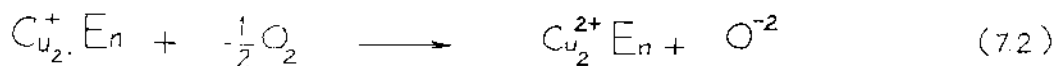
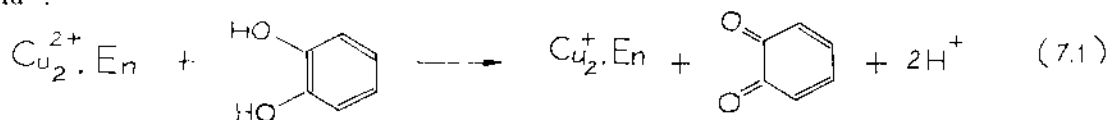


Sự hydroxyl hóa các monophenol và oxy hóa các diphenol là hai "tác động" khác nhau và tách biệt nhau. Tuy nhiên, đôi khi cùng một enzim cũng có thể xúc tác cả hai phản ứng. Nói chung, các enzim có nguồn gốc khác nhau sẽ có tỉ số hoạt lượng hydroxyl hóa/hoạt lượng oxy hóa cũng như hàm lượng Cu^+ và Cu^{2+} khác nhau.

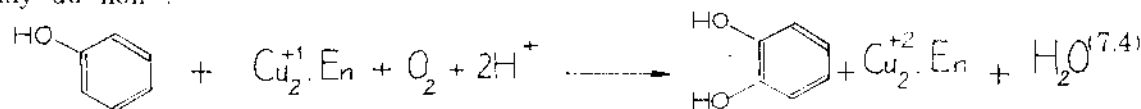
Enzim xúc tác giai đoạn đầu có tên là monophenolaza hoặc cresolaza, còn enzim xúc tác giai đoạn hai có tên là polyphenolaza hoặc catecholaza. Tên gọi hệ thống của enzim "đảm trách" giai đoạn oxy hóa là *octodiphenoloxyl - oxydoreductaza* (E.C.1.10.3.1). Ở đây, oxy phân tử đóng vai trò chất tiếp nhận hydro.

Polyphenoloxydaza là metaloenzim có chứa khoảng 0.2% Cu ở trong phân tử. Chẳng hạn như polyphenoloxydaza ở lá chè có khối lượng phân tử bằng 144 000 dalton và có tới 7 mol đồng/mol.

Phương trình phản ứng oxy hóa các diphenol bởi polyphenoloxydaza có thể như sau :

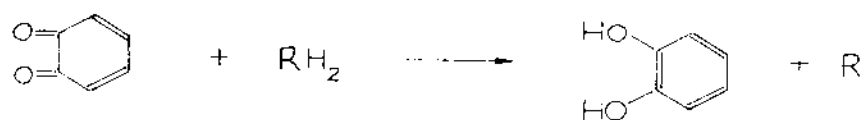


Ta thấy phương trình (7.1) tạo ra polyphenoloxydaza ở dạng khử (chứa Cu^+), do đó có thể đưa "tác động" hydroxyl hóa monophenol vào phương trình tổng để cho đầy đủ hơn :



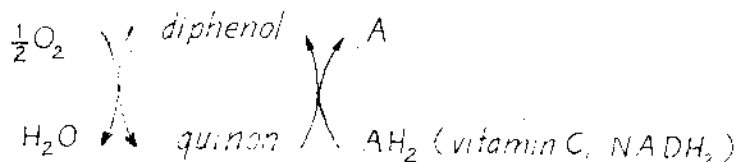
Như vậy, theo (7.4), chính diphenol có tác dụng xúc tác sự hydroxyl hóa các monophenol

Các quinon tạo ra do hậu quả tác dụng của polyphenoloxydaza cũng có thể oxy hóa các chất có thể oxy hóa - khử bé hơn quinon :

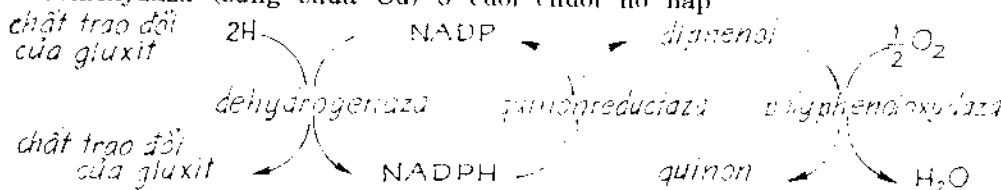


Các chất như vitamin C, NADH_2 , glutation dạng khử, xistein, các antoxianidol, ... có thể khử các quinon thành diphenol.

Như vậy, polyphenoloxydaza có thể oxy hóa được nhiều cơ chất khác nhau :

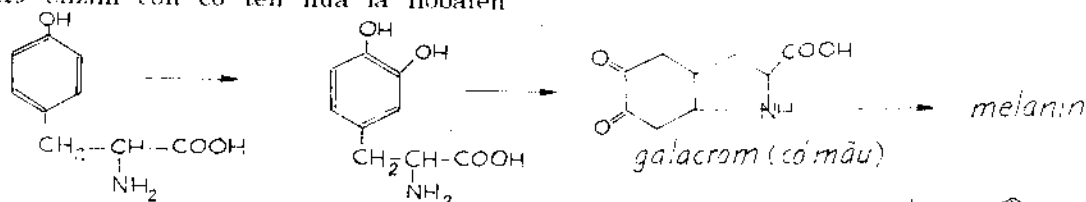


Do đó, về mặt này polyphenoloxydaza cũng có vai trò tương tự như enzym xitocromoxydaza (cũng chứa Cu) ở cuối chuỗi hô hấp



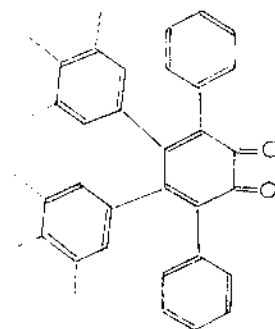
VI.3.3.5. Cơ chế chung của phản ứng tạo màu do enzym

Các chất màu được tạo thành do phản ứng kiểu này thường có tên gọi chung là melamin. Thực ra, thuật ngữ melanin là phỏng theo tên gọi của một sản phẩm có màu do sự oxy hóa tyrozin bởi enzym tạo ra. Các chất màu của phản ứng sẫm màu enzym còn có tên nữa là flobafen



Nói chung, sản phẩm cuối cùng, thường có màu nâu, màu đen hoặc các gam màu trung gian như : hồng, đỏ, nâu, xanh đen, v.v. Phản ứng tạo thành các chất màu được bắt đầu từ quinon và không có enzym tham gia.

Đầu tiên, quinon phản ứng với nước tạo ra trihydroxybenzen, tiếp đó, các trihydroxybenzen lại phản ứng với các quinon khác để hình thành ra các hydroxyquinon và cuối cùng chính các hydroxyquinon này lại là nơi để ngưng tụ oxy hóa (ở giai đoạn này còn tiêu thụ oxy) dẫn đến tạo thành các polyme theo sơ đồ ở trên.



- Các quinon cũng có thể tác dụng với nhóm SH và NH_2 của protein, axitamin và amin theo cơ chế sau :

chiều hướng của phản ứng oxy hóa bằng enzym (và phi enzym) các polyphenol có trong lá chè. Nếu như ở chè xanh phản ứng oxy hóa được "đình chỉ" ngay từ đầu, thì ở chè đen lại được tiến triển đến mức tối đa.

Nhiều nghiên cứu cho thấy thành phần các polyphenol của lá chè rất đa dạng nhưng các chất thuộc nhóm catechin chiếm tỷ lượng nhiều nhất (chiếm 15 - 20% chất khô và trên 70% tổng lượng polyphenol của lá chè).

Các catechin đó là :

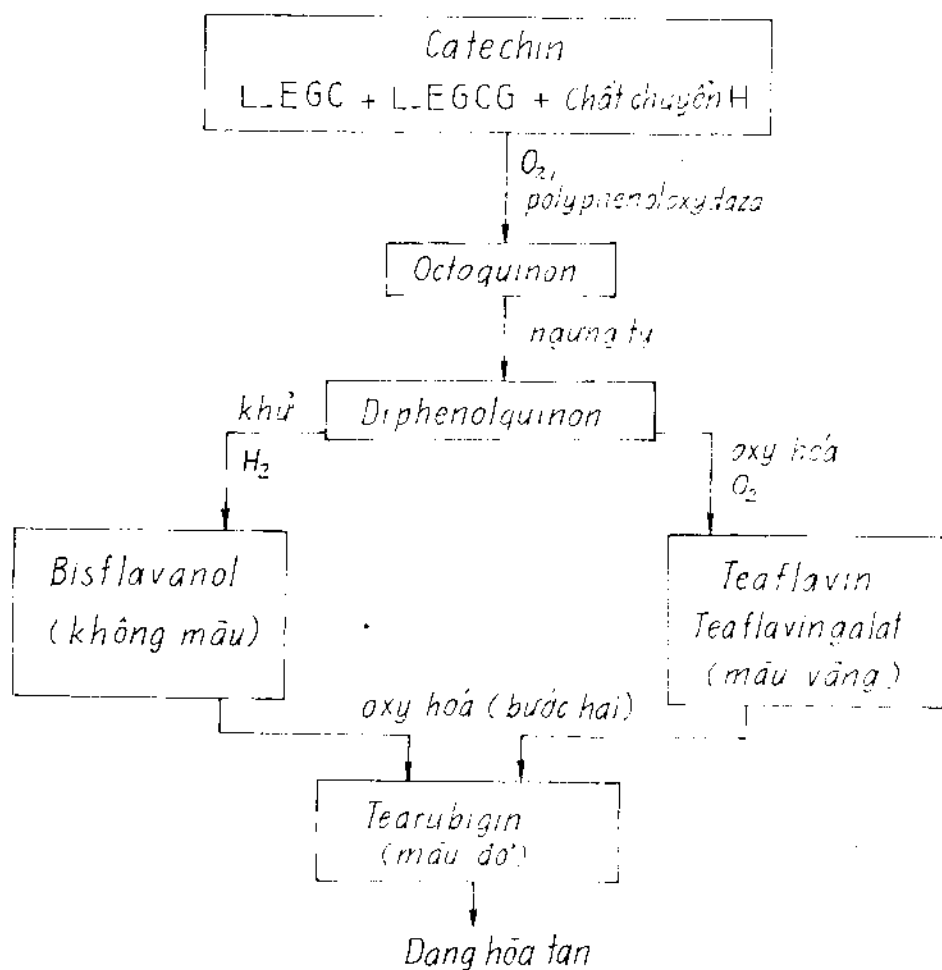
L - epicatechin (*L* - EC) ; *L* - epicatechingalat (*L* - ECG)

D, L - catechin (*D, L* - C) ; *L* - epigallocatechingalat (*L* - EGC)

L - epigallocatechin (*L* - EGC); *L* - galocatechin (*L* - GC)

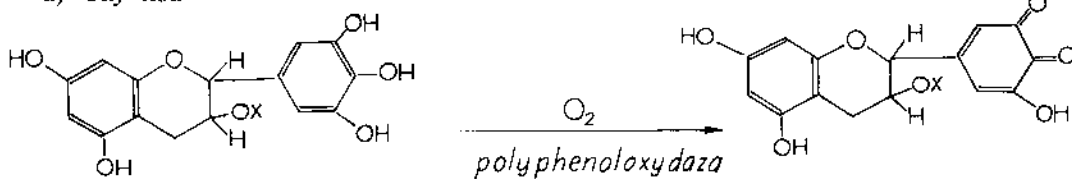
D, L - galocatechin (*D, L* - GC)

Theo Robert, chỉ có *L* - epigallocatechin (*L* - EGC) và *L* - epigallocatechingalat (*L* - ECG) mới có khả năng tạo thành sản phẩm có màu đỏ tươi đặc trưng cho chè đen. Nhưng nếu thuần túy chỉ có hai chất này thì mới tạo ra được màu vàng. Muốn có màu đỏ, trong hỗn hợp phản ứng phải có mặt các chất vận chuyển hydro, tức là chất catechin chưa bị oxy hóa. Có thể tóm tắt trong sơ đồ dưới đây :



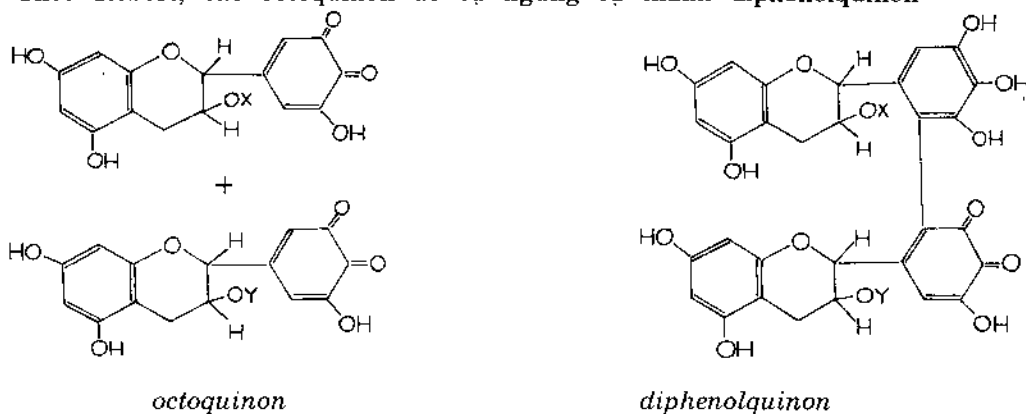
Lược đồ các phản ứng tạo màu do sự oxy hóa các polyphenol như sau :

a) Oxy hóa



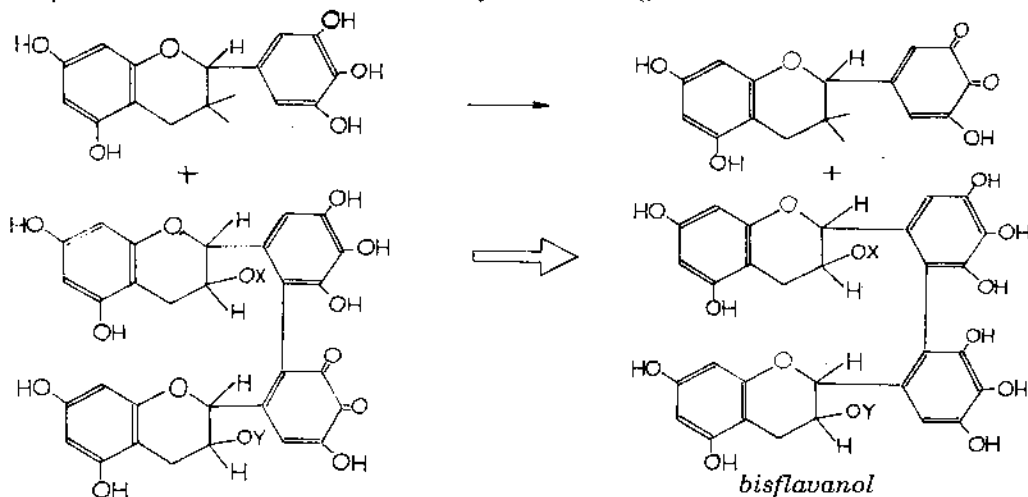
b. Ngưng tụ tạo thành dime

Theo Robert, các octoquinon dễ tự ngưng tụ thành diphenolquinon



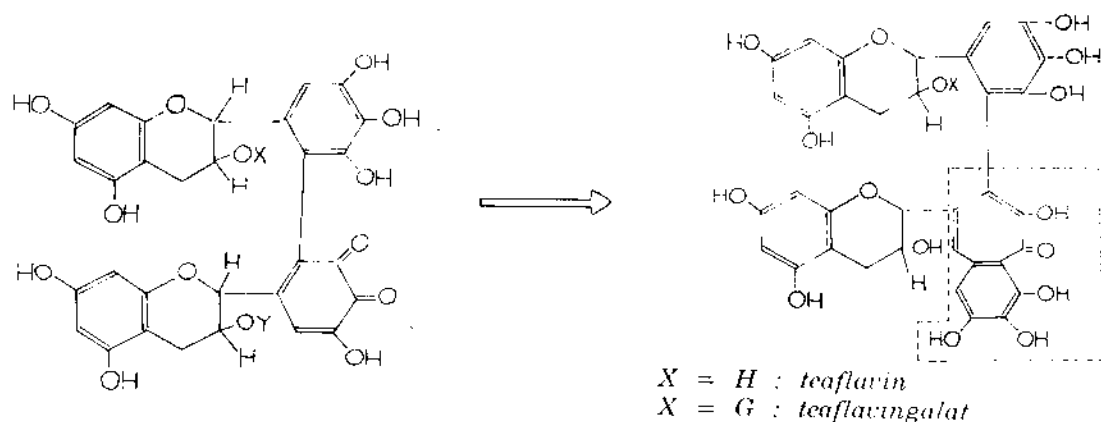
Các dime thường có màu và vẫn giữ được hoạt tính vitamin P của monome ban đầu. Chẳng hạn, nếu xuất phát từ catechin thì dime tạo được sẽ có vị chất nhẹ và có màu đỏ.

c) Khi tương tác của phân tử diphenolquinon với một polyphenol thì phân tử diphenolquinon sẽ bị khử để tạo thành bisflavanol không màu



d) Phản ứng oxy hóa các dime trung gian

Các diphenolquinon có thể tương tác với nhau qua phản ứng oxy hóa - khử, sắp xếp lại phân tử để tạo ra teaflavin có màu vàng. Để phản ứng tiến triển được gốc Y ở C₃ phải là gốc galoyl



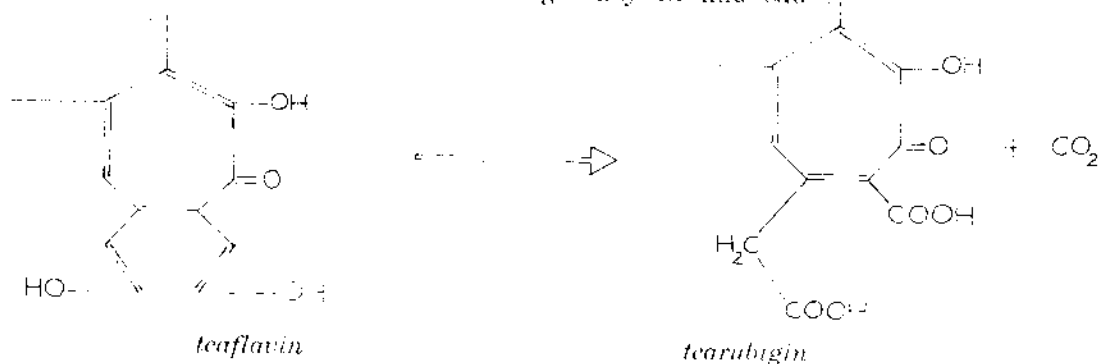
Phần trong vòng chấm gọi là gốc tạo màu benzotropolon. Theo Roberts, nếu oxy hóa đồng thời epigallocatechin và epigallocatechingalat đều dẫn tới tạo nên teaflavin. Còn nếu chỉ oxy hóa một mình epigallocatechingalat thì chỉ tạo nên teaflavingalat.

c. Phản ứng tạo thành tearubigin

Theo Roberts, tearubigin là sản phẩm chuyển hóa oxy hóa của teaflavin và bisflavanol. Trước khi tạo thành tearubigin không thể có giai đoạn trùng hợp ở mức độ cao hơn nữa của các phẩm vật oxy hóa vì có an ngữ không gian. Do đó mà các dime mất đi khả năng trùng hợp.

Tearubigin là hợp chất có tính axit do có các nhóm carboxyl được tạo nên khi mở vòng pirogalol trong gốc benzotropolon của teaflavin. Theo Roberts, để tạo nên được tearubigin bắt buộc phải có mặt trong môi trường phản ứng các catechin có nhân pirocatechin.

Sự oxy hóa teaflavin thành tearubigin xảy ra như sau:



Vì tearubigin là sản phẩm oxy hóa của teaflavin và các bisflavanol, cho nên chúng không phải là một đơn chất mà là hỗn hợp của nhiều chất.

Tearubigin ở trạng thái tự do có màu hồng nhạt. Khi định với Na có màu nâu gạch, với K và Ca có màu đỏ tươi.

Theo Roberts, màu sắc của nước chè chủ yếu phụ thuộc vào tearubigin. Còn vị đậm đà của nước chè là do tỉ lệ giữa teaflavin và tearubigin quyết định.

Roberts phân tích tearubigin thấy có chứa 0,55% nitơ. Còn khi thủy phân tearubigin bằng axit thì được alanin, arginin, glycol, loxin, izoloxin, lizin, phenylalanin, prolin, serin, treonin, tirozin, valin, axit aspartic và axit glutamic. Như vậy tearubigin là một hỗn hợp các hợp chất khác nhau và có lẽ do sự ngưng tụ octoquinon của catechin (hoặc dicatechin) với axitamin.

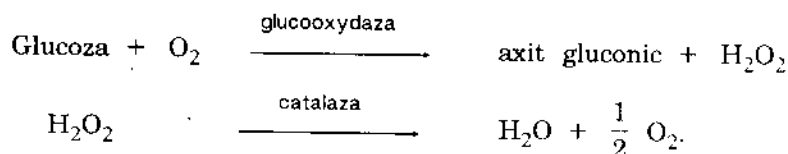
VII.3.3.7. Một số biện pháp phòng ngừa phản ứng sẫm màu do enzym xúc tác

Phản ứng sẫm màu do enzym xúc tác là phản ứng rất thường xảy ra trong quá trình chế biến các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc thực vật như rau quả, các sản phẩm đồ hộp rau quả, các sản phẩm chè, thuốc lá, v.v. Có nhiều nhân tố ảnh hưởng đến phản ứng này như các nhân tố sau :

- nồng độ cơ chất phenol ;
- hàm lượng và trạng thái của polyphenoloxydaza ;
- nồng độ oxy ;
- nồng độ quinon ;
- pH v.v.

Trong thực tế để ngăn ngừa phản ứng người ta thường hay dùng những biện pháp kỹ thuật tương ứng sau :

- Tránh dụng cụ gây tổn hại các mô, để enzym không có điều kiện tiếp xúc với cơ chất tạo màu ;
- Vô hoạt enzym polyphenoloxydaza bằng nhiệt (chần, thanh trùng) rất có hiệu quả, nhưng có thể làm thay đổi tính chất cảm quan của sản phẩm do đó không thể áp dụng cho mọi trường hợp ;
- Thêm các phụ gia có tính khử để chuyển hóa quinon thành phenol, do đó cũng làm chậm hoặc ngăn cản sự sẫm màu. Người ta hay dùng vitamin C cho vào các nước quả và các sản phẩm quả, cát lát cũng với mục đích đó. Khi liều lượng vitamin C cao (có thể cho từ 0,5 - 1% so với khối lượng sản phẩm) enzym polyphenoloxydaza có thể bị vô hoạt hoàn toàn trước khi lượng vitamin này biến hết trong môi trường ;
- Nhúng ngập quả sau khi cắt lát hoặc sau khi gọt vỏ vào trong dung dịch nước muối nhạt, dung dịch sacaroza hoặc dung dịch glucoza để hạn chế oxy xâm nhập vào quả cũng như đã ngăn cản quá hấp thụ oxy. Khi đường xâm nhập vào mô còn có tác dụng làm quả chắc lại do tăng áp suất thẩm thấu. Nói chung các quả để ở lạnh đông thường được bao bằng sirô (có thể dùng một phần sirô có nồng độ 30 - 50% sacaroza cho 3 - 7 phần quả). Trong trường hợp này, đường vừa có tác dụng như một chất bảo vệ lạnh vừa là chất giữ hương thơm cho quả.
- Dùng axit xitric làm giảm pH để làm chậm phản ứng sẫm màu ;
- Lấy oxy trong các mô của quả bằng chân không hoặc bằng các chất có khả năng sử dụng oxy như axit ascorbic, hoặc như enzym glucooxydaza và catalaza ;



Tuy nhiên cần tránh làm yếm khí các mô thực vật để bảo đảm hoạt động sinh lý bình thường cho chúng. Cần chú ý là việc khử oxy phải đi kèm ngay với xử lý bảo quản và phải bao gói bằng bao bì không thấm oxy.

- SO_2 và bisulfit cũng có tác dụng ức chế phản ứng sẫm màu do enzym xúc tác. Hợp chất này chẳng những có tác dụng sát trùng (nhưng không phải với liều lượng dùng để chống phản ứng sẫm màu) mà còn có khả năng liên kết với các nhóm cacbonyl của các đường cung như phản ứng với các quinon. Nhưng có thể SO_2 tác dụng trực tiếp đến polyphenoloxydaza. Người ta còn nhận thấy rằng axit ascorbic và tiamin có thể làm giảm liều lượng bisulfit. SO_2 còn có tác dụng bảo vệ màu sắc tự nhiên cho quả đặc biệt là quả sấy (chuối sấy).

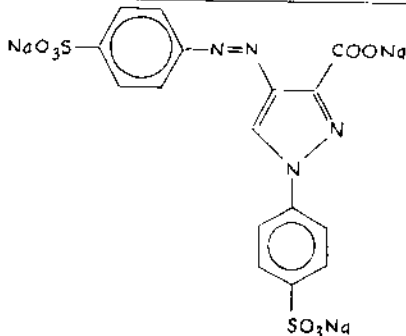
Trong thực tế, với những quả nhằm bảo quản lạnh đông, thì đầu tiên người ta nhúng (ngâm) 45 giây trong dung dịch NaHSO_3 0,25%, tiếp đó ngâm 5 phút trong một dung dịch K_2HPO_4 0,2%. Chính K_2HPO_4 là tác nhân làm giảm khả năng phản ứng của polyphenol.

VII.4. MỘT SỐ CHẤT MÀU TỰ NHIÊN VÀ TỔNG HỢP DÙNG TRONG THỰC PHẨM

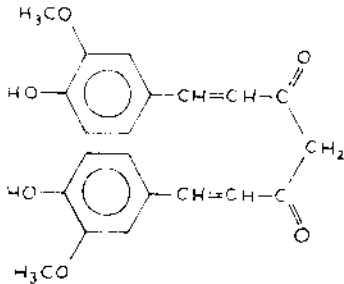
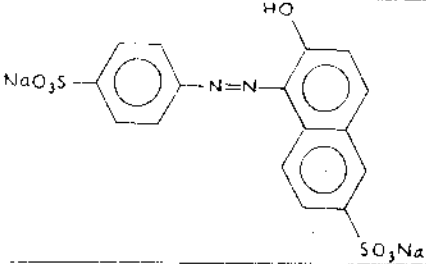
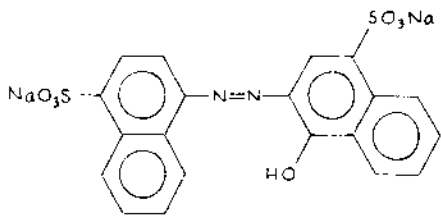
Trong thực tế, người ta có thể dùng các chất màu tự nhiên hoặc tổng hợp để tạo màu cho các thực phẩm để làm tăng giá trị cảm quan của chúng. Các chất màu đỏ và màu vàng thường được sử dụng nhiều hơn. Carotenoid là nhóm chất màu tự nhiên được sử dụng nhiều nhất.

Cấu trúc và cách sử dụng của một số các chất màu tự nhiên và tổng hợp quan trọng trong thực phẩm được trình bày ở trong bảng 7.2.

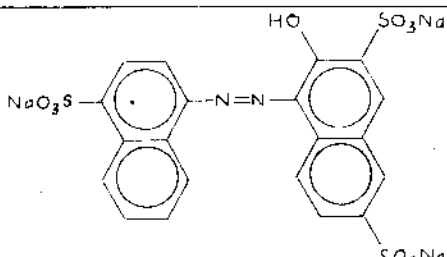
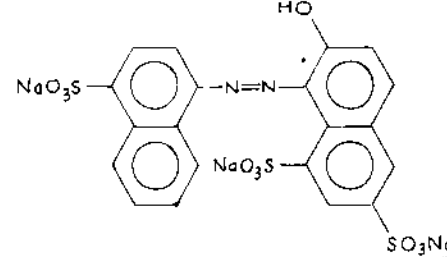
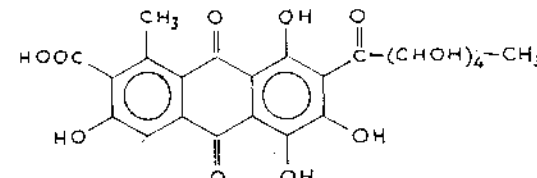
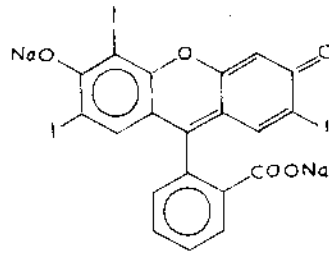
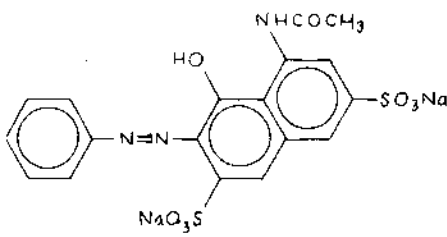
Bảng 7.2

Tên	Màu sắc	Công thức cấu tạo	Đối tượng sử dụng
1	2	3	4
Tartrazin	Vàng chanh (N)		Tạo màu cho mứt và kẹo, kem đá, đồ uống có gaz

Tiếp bảng 7.2

1	2	3	4
Riboflavin	Vàng (N)		Tạo màu cho xúp, pudding, sản phẩm mứt kẹo
Zeaxantin	Vàng (D)		Tạo màu cho mỡ, đồ uống nóng và lạnh, pudding
Curcumin	Vàng đỏ (etanol)		Tạo màu cho mứt
Sunset Yellow	Da cam (N)		Tạo màu cho đồ uống, mứt quả, sản phẩm mứt kẹo, cá hồi biển, cua
β - caroten	Da cam (D)		Tạo màu cho mỡ, đồ uống, xúp, pudding, mứt kẹo, sữa chua
Astaxantin	Da cam (D)		Tạo màu cho đồ uống, sản phẩm cá chua, mứt kẹo
Carmoisin	Đỏ ánh xanh (N)		Tạo màu cho đồ uống, mứt kẹo, kem, mứt quả

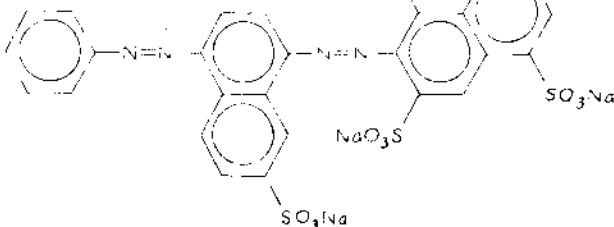
Tiếp bảng 7.2

1	2	3	4
Amaran	Đỏ ánh xanh (N)		Tạo màu cho đồ uống, mứt quả, mứt kẹo, mứt nhũ
Ponceau 4R	Đỏ tươi (N)		Tạo màu cho đồ uống, kẹo, cá hồi biển
Carmin	Đỏ sáng		Tạo màu cho đồ uống có rượu
Antoxyanidin (từ bã ép nho đỏ)	Đỏ - tím (N) (phụ thuộc pH)		Mứt nhũ, nước uống có gaz
Erytrosin	Đỏ ánh đào (N)		Tạo màu cho quả, mứt nhũ, kẹo
Đỏ 2G	Đỏ ánh xanh		Tạo màu cho mứt kẹo

Tiếp bảng 7.2

1	2	3	4
Indigocarmin	Xanh đậm (N)		Phối hợp với màu vàng để tạo màu cho các đồ uống, các sản phẩm mứt kẹo
Patent Blue V (E.131)	Xanh xám (N)		Chủ yếu là phối hợp với màu vàng để tạo màu cho bánh mứt kẹo và đồ uống
Brilliant blue FCF	Xanh xám (N)		Chủ yếu phối hợp với màu vàng để nhuộm màu cho mứt kẹo, đồ uống
Clorofil	Xanh lá cây		Tạo màu cho dầu ăn
Green S	Xanh lá cây (N)		

Tiếp bảng 7.2

1	2	3	4
Đen BN	Tím xanh NaO_3S 	Tạo màu cho trứng cá, sản phẩm mứt kẹo	

Ghi chú :

N - dung môi nước ; D - dung môi dầu

CÁC CHẤT THƠM

VIII.1. Ý NGHĨA CỦA CÁC CHẤT THƠM TRONG SẢN XUẤT THỰC PHẨM

Cũng như màu sắc, hương thơm là một tính chất cảm quan quan trọng của thực phẩm, vì chúng có những tác dụng sinh lý rất rõ rệt. Chất thơm có ảnh hưởng đến hệ tuần hoàn, đến nhịp đập của tim, đến hô hấp, đến nhịp thở, đến sự tiêu hóa, đến thính giác, thị giác và cả xúc giác nữa. Vì vậy trong sản xuất thực phẩm, người ta tìm mọi biện pháp kỹ thuật để bảo vệ những chất thơm tự nhiên, mặt khác người ta còn tìm cách để điều khiển các phản ứng tạo ra những hương thơm mới.

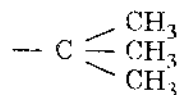
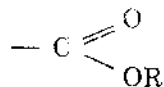
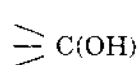
Thông thường, người ta thực hiện một trong ba biện pháp sau để tạo cho sản phẩm có hương thơm :

- Chất thơm vốn dễ bay hơi và thường không bền ; vì vậy người ta dùng các biện pháp kỹ thuật và thiết bị phức tạp để thu hồi các chất thơm đã bị tách ra khỏi sản phẩm trong quá trình gia nhiệt (đun hoặc có đặc), tạo điều kiện giữ chúng lại, hấp thụ trở lại vào thành phẩm các chất thơm tự nhiên vốn có trong nguyên liệu ban đầu;
- Chưng cất và cô đặc các chất thơm tự nhiên từ các nguồn giàu chất thơm, sau đó dùng các chất thơm này để cho vào các sản phẩm thực phẩm khác nhau;
- Tổng hợp các chất thơm nhân tạo có mùi thích ứng để cho vào các sản phẩm thực phẩm.

VIII.2. VÀI NÉT VỀ MÙI

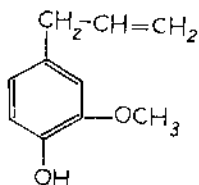
Trong hơn hai triệu chất hữu cơ, thì 400 000 chất có mùi nhiều hoặc ít. Đa số chất thơm có mùi đặc trưng riêng của mình. Mùi của chúng do những nhóm nguyên tử đặc biệt gọi là nhóm mang mùi quyết định. Tuy nhiên nếu tăng số nhóm mang mùi trong một phân tử lên thì không làm tăng mùi mà lại làm yếu mùi và đôi khi còn làm mất mùi hoàn toàn.

Những nhóm mang mùi cơ bản thường là nguyên tử O, S, N, P, As, Se. Các nhóm mang mùi hữu cơ là :

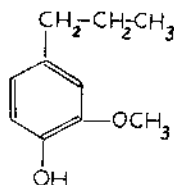


Có thể tang mạnh hoặc làm yếu mùi này bằng một mùi khác, hoặc cho mùi mới mà đôi khi không giống và hoàn toàn bất ngờ. Chẳng hạn, mùi xạ hương của trinitrobutyltoluen hoàn toàn mất đi khi thêm vào một lượng nhỏ quinin sulfat là chất vốn không có mùi.

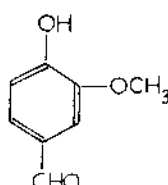
Mùi của caosus, iot, long não và gỗ bá hương khi phối hợp sẽ triệt tiêu lẫn nhau hoàn toàn. Mùi của vani để trong chỗ lạnh sẽ mất hoàn toàn qua một vài phút, nhưng nếu thêm một ít cumarin thì hương của vani sẽ cảm thấy được rất lâu.



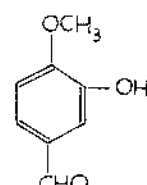
eugenol



dihydroxyeugenol



vanilin



izovanilin

Các chất rất giống nhau về cấu tạo và tính chất có thể có mùi khác nhau. Chẳng hạn, công thức của hai chất họ hàng eugenol và dihydroxyeugenol chỉ khác nhau ở mạch bên.

Nhưng eugenol là thành phần chủ yếu của dầu đinh hương và có mùi đinh hương mạnh, còn dihydroxyeugenol lại hầu như không có mùi.

Vanilin và izovanilin chỉ khác nhau ở vị trí của nhóm thế.

Nhưng vanilin là hương liệu nổi tiếng nhất có mùi dễ chịu, còn izovanilin chỉ bắt đầu có mùi khi đun sôi.

Ngược lại, các chất hoàn toàn khác nhau có thể cho mùi giống nhau. Chẳng hạn, công thức của xạ hương và các chất thay thế nó không giống nhau nhưng lại cho mùi giống nhau.

Đôi khi mùi còn phụ thuộc vào nồng độ của chất trong không khí. Chẳng hạn mùi của ionon đậm đặc giống bá hương, nhưng khi ở trạng thái loãng thì ionon lại có mùi cây hoa tím.

Cần phải thấy rằng, nhiều hiện tượng liên quan với mùi không thể giải thích được một cách chắc chắn, vì chưa có một quan niệm đầy đủ về khứu giác làm việc như thế nào và tại sao một chất nào đó lại có mùi.

VIII.2.1. Thuyết hóa học về mùi

Năm 1920, nhà hóa học Thụy Điển Leopold Rujit đã đề ra giả thuyết về mùi như sau : chất có mùi rơi vào mũi, đầu tiên nó lan rộng ra trong chất lỏng bao phủ vùng khứu giác. Sau đó chất có mùi bắt đầu liên kết với một chất hóa học đặc biệt gọi là chất tiếp nhận mùi (mỗi một chất tiếp nhận mùi chỉ có những nhóm nguyên tử nhất định tham gia tương tác). Kết quả là một chất mới phát sinh ra và tác động đến đầu cuối dây thần kinh. Chất mới này không bền vững và rất nhanh chóng bị phân hủy. Chính điều này giải thích lý do tại sao mùi không được duy trì. Khi có một mùi rất mạnh thì dần dần tất cả các chất tiếp nhận mùi đều

bị giữ bởi các phân tử chất có mùi. Do đó mùi không được thụ cảm nữa, vì chúng ta đã quen và đã hoàn toàn thích ứng với mùi mạnh và bền.

Như vậy, trong vùng khứu giác của mũi với một thời gian chớp nhoáng như thế thì phản ứng nào đã xảy ra? Các sản phẩm của phản ứng siêu vận tốc đó có thể sẽ gây nên ở đầu cuối dây thần kinh cảm giác mùi như thế nào?

2000 năm về trước, nhà thơ và triết gia Lucretia Car cho rằng trong mũi có những lỗ nhỏ. Khi có hạt chất mùi rơi vào lỗ đó thì mũi sẽ được cảm thụ. Ý kiến chủ đạo của Lucretia là ở chỗ đặc trưng của mùi phụ thuộc vào tính tương ứng giữa hình dáng của hạt chất mùi và của các lỗ nhỏ trong hố mũi.

Cách đây không lâu, một người xứ Ecôt tên là Moncrieff (1951) cũng đã đề ra một giả thuyết tương tự như ước đoán của Lucretia Car. Moncrieff giả định rằng trong mũi có một vài kiểu tế bào cảm giác. Mỗi kiểu tế bào sẽ chỉ tác dụng với một mùi "cơ bản" nhất định. Các phân tử vật chất sẽ chỉ gây cảm giác mùi khi chúng tương ứng với hồ sâu trong tế bào cảm giác như chìa khóa với ổ khóa. Mỗi một mùi phức tạp, theo Moncrieff, có thể chia thành một loạt các mùi cơ bản. Mỗi mùi cơ bản sẽ có thể bao hàm một mùi bất kỳ nào đó.

Nhà hóa học hữu cơ Amoore (1962) ở trường đại học tổng hợp Oaxpho đã nghiên cứu hàng trăm hợp chất hữu cơ và đưa tới kết luận có bảy mùi sơ cấp (cơ bản) :

- mùi băng phiến (long não);
- mùi xạ hương (pentadecanolacton) ;
- mùi hoa thơm (phenylmethylcacinol) ;
- mùi bạc hà (mentol) ;
- mùi ete (dicloetylen) ;
- mùi cay (hàng)(axit formic) ;
- mùi thối (butylmercaptan).

Theo Amoore, trên những mùi đó theo những tỉ lệ nhất định có thể thu được hương thơm bất kỳ nào đó. Với ý nghĩa đó, bảy mùi cơ bản của Amoore giống với ba màu cơ bản (đỏ, xanh, lam) và bốn vị cơ bản (ngọt, mặn, chua và đắng).

Amoore và một số nhà nghiên cứu khác cho rằng hình học lập thể và hình dáng của phân tử vật chất có vai trò quyết định đối với mùi của nó. Theo Amoore, mỗi mùi cơ bản sẽ tương ứng với một kiểu tế bào cảm giác nhất định.

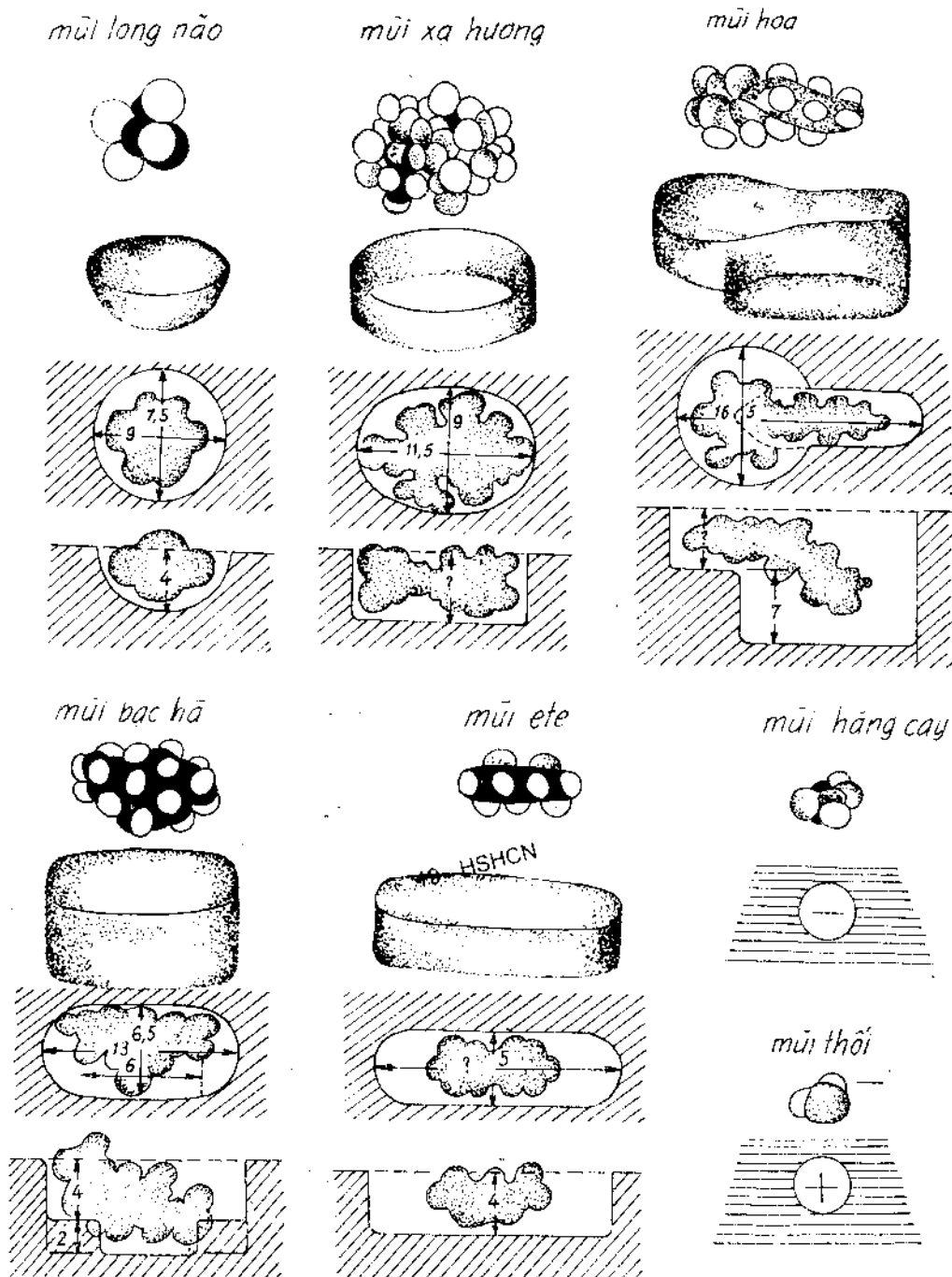
Đầu tiên Amoore nghiên cứu các chất có mùi băng phiến và cho rằng tất cả phân tử của các chất này đều có dạng hình cầu hoặc gần hình cầu có đường kính khoảng 7 Å. Mùi xạ hương thì phân tử có hình đĩa với đường kính là 10 Å. Nếu đĩa lại có thêm phân tử tương tự dưới thì được mùi hoa. Mùi ete có phân tử hình gậy. Đối với chất có mùi bạc hà thì ngoài dáng đặc biệt (cái chêm) còn phải có những nhóm nguyên tử có khả năng tạo liên kết hydro ở những vị trí nhất định.

Hình 8.1 mô tả cấu trúc phân tử và hình dáng của hóc trong tế bào thụ cảm tương ứng với những cấu trúc phân tử đó.

Mùi phức tạp sẽ phát sinh ra trong trường hợp khi các nhóm khác nhau của cùng một phân tử rơi vào trong một vài hóc khác nhau.

Mùi hăng và mùi thối không liên quan với hình dáng của phân tử mà liên quan với trạng thái điện của chúng. Điện tích dương lớn thì có mùi cay, mùi chua, điện tích âm thì có mùi thối.

Theo lý thuyết hóa lập thể, trên bề mặt của màng tế bào khứu giác phải có những hố, rãnh và khe có hình dáng và kích thước tương ứng với các phân tử có mùi sơ cấp.



Hình 3.1. Sự tương ứng giữa cấu trúc phân tử của các mùi và hình dáng các ổ trong tế bào thụ cảm

Phụ thuộc vào hình dáng của mình mà phân tử có mùi sẽ được đặt vào hồ kiểu này hay kiểu khác, như chìa khóa đặt vào ổ khóa, để "mở" tế bào khứu giác và kích thích nó. Trong tế bào sẽ phát sinh ra dòng điện sinh vật đi vào não, truyền cho trung tâm khứu giác cao cấp các thông tin về bản chất và cường độ mùi.

Đa số phân tử chất mùi có hình dáng phức tạp với nhiều mấu lồi ra có hình que, hình chêm và hình cầu. Do đó có thể thích ứng được với nhiều kiểu hồ khác nhau về hình dáng của tế bào khứu giác. Kết quả sẽ phát sinh ra không phải một mùi đơn giản, sơ cấp mà là một mùi hỗn hợp, ví dụ như mùi của các quả.

Xuất phát từ giả thuyết hóa học lập thể, Amoore đã thành công, thậm chí dự đoán được mùi của nhiều chất mới được tạo nên.

VIII.2.2. Thuyết lý học về mùi

Theo lý thuyết lý học, nguyên nhân của mùi không phải là hình dáng của phân tử mà là khả năng phát sóng điện từ của chúng. Theo thuyết này, để cảm giác được mùi không nhất thiết phân tử chất có mùi tiếp xúc với cái cảm biến của tế bào.

Tất cả các chất thơm đều phát các tia hồng ngoại một cách mạnh mẽ. Mỗi chất có một phổ riêng của mình. Nói một cách khác, phân tử dao động phát ra sóng điện từ. Như vậy, phân tử chất có mùi được xem như một máy phát tia hồng ngoại độc đáo. Các tia này được thu hồi bằng máy thu là tế bào thần kinh khứu giác. Như vậy, sự khứu giác gắn với sự thị giác. Giả định đó được xác nhận ở chỗ : các phân tử nhạy của mũi thụ cảm các mùi, có màu giống như màu tế bào mắt thụ cảm ánh sáng.

Ta đều biết rằng các phân tử có màu, theo thường lệ, kém bền hơn và dễ dàng bị kích thích hơn các chất không màu. Sự dao động của phân tử các chất có mùi được chống lên trên sự dao động riêng của các hạt chất màu, nên sẽ bị cộng hưởng và sẽ gây nên sự phân bố lại điện tích ở trong mô thần kinh. Cuối cùng sẽ dẫn đến sự xung động thần kinh, tức là tín hiệu về mùi.

Cần chú ý rằng, lý thuyết hóa học và lý học về mùi bổ sung lẫn nhau. Có thể coi rằng các phân tử có hình dáng gần giống nhau (giống nhau về cấu tạo) sẽ dao động như nhau. Các phổ bức xạ ở chúng sẽ ít khác nhau.

VIII.3. CÁC CHẤT MÙI TỰ NHIÊN

VIII.3.1. Tinh dầu và nhựa

Các chất có mùi thường gặp trong tự nhiên là tinh dầu và nhựa. Tinh dầu và nhựa thuộc nhóm hợp chất izoprenoit, nghĩa là những hợp chất được coi như là dẫn xuất của izopren. Nhóm hợp chất izoprenoit bao gồm rất nhiều chất : ngoài tinh dầu và nhựa còn có steroid, carotenoid và caosu. Các chất thuộc nhóm izoprenoit có đặc tính chung là không hòa tan trong nước mà hòa tan trong các dung môi hữu cơ.

Tinh dầu và nhựa được tạo thành và thoát ra trong các cơ quan đặc biệt của cây : trong lông tuyến và vảy đối với tinh dầu và trong ống nhựa đối với nhựa. Tinh dầu và nhựa có hương thơm nhất định quyết định mùi của nhiều cây, của hoa và của quả.

Về bản chất hóa học, tinh dầu (và nhựa) thường là một hỗn hợp các chức khác nhau : hydrocacbon, rượu, phenol, aldehyt, xeton, axit, este,... Tuy nhiên quan trọng và thường gặp hơn cả trong hợp phần tinh dầu là terpen và các dẫn xuất chứa oxy của terpen.

Terpen là hydrocacbon mạch thẳng hoặc vòng có công thức chung là $(C_{10}H_{16})_n$.

$n = 1$ ta có monoterpen

$n = 1,5$ ta có sesquiterpen

$n = 2$ ta có diterpen

$n = 3$ ta có triterpen

$n = 4$ ta có tetraterpen

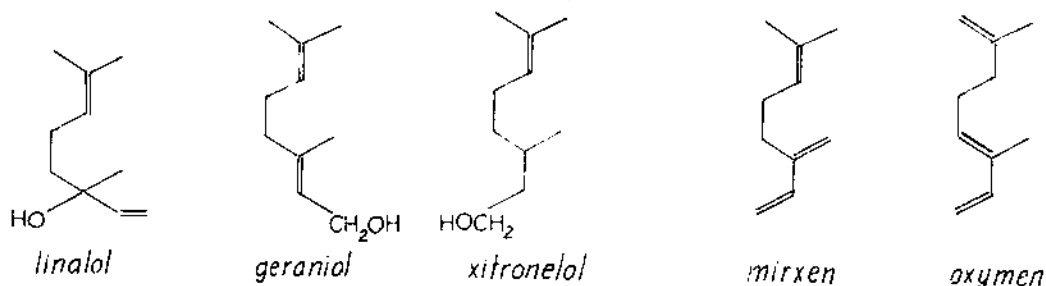
Các dẫn xuất chứa oxy của terpen thường là rượu, aldehyt, xeton v.v.

VIII.3.1.1. Monoterpen

Các monoterpen thẳng tiêu biểu là mirxen, oxymer và các dẫn xuất chứa oxy của chúng là linalol, geraniol, xitronelol, xitronelal và xitral.

Mirxen có trong một loạt tinh dầu. Trong tinh dầu của hoa huylông có 30 - 50% mirxen.

Linalol, geraniol và xitronelol đều là rượu.



Linalol có trong hoa lan chuông, trong quít và trong cây mùi. Linalol được dùng trong hương phẩm dưới nguyên dạng hay dưới dạng este axetat. Người ta cho rằng hương thơm của đào là do các este khác nhau formiat, valerianat của linalol quyết định.

Geraniol gặp trong tự nhiên ở trạng thái tự do cũng như ở dưới dạng este. Geraniol có trong tinh dầu khuynh diệp và cùng với xitronelol là thành phần chủ yếu của tinh dầu hoa hồng.

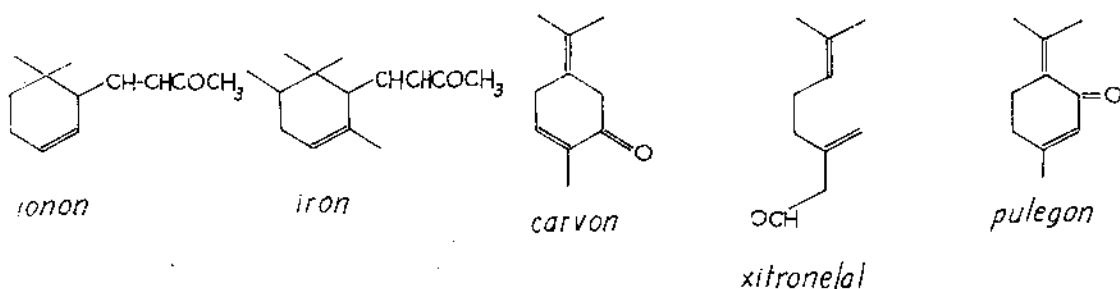
Xitronelol có trong tinh dầu hoa hồng, phong lữ và các tinh dầu khác. Xitronelol có mùi hoa hồng.

Xitral có chứa trong tinh dầu họ cam quít và trong các tinh dầu khác. Xitral tương tác với axeton tạo thành ionon là hợp chất vòng có trong thành phần của phân tử caroten. Ionon và đồng phân của nó là ionon có ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp hương phẩm. Xitral là hỗn hợp của hai đồng phân hình học : dạng *cis* gọi là dạng a và dạng *trans* hay là dạng b.

Xitronelal gặp trong tự nhiên dưới dạng hai đối quang.

Monoterpen đơn vòng phổ biến và quan trọng hơn cả là limonen và các dẫn xuất chứa oxy của nó là menton, piperitenon, piperiton và carvon, v.v.

Limonen có trong nhựa, thông, trong tinh dầu cam, chanh, và thì là.

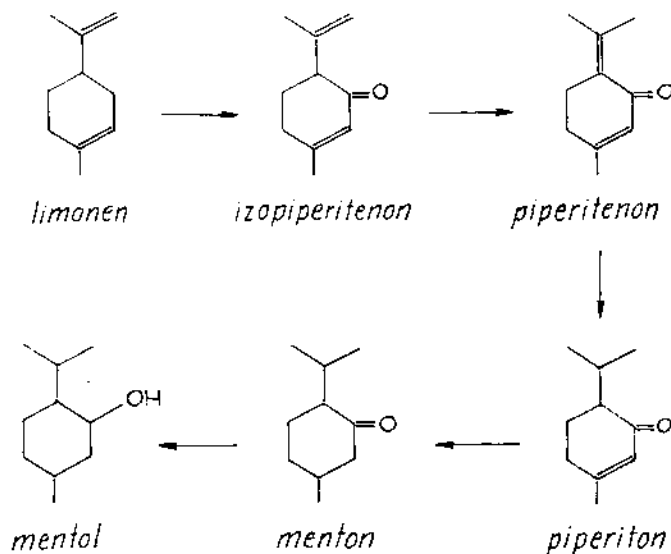


Piperitenon, piperiton, pulegon, menton và mentol hợp thành nhóm menton, có trong tinh dầu bạc hà.

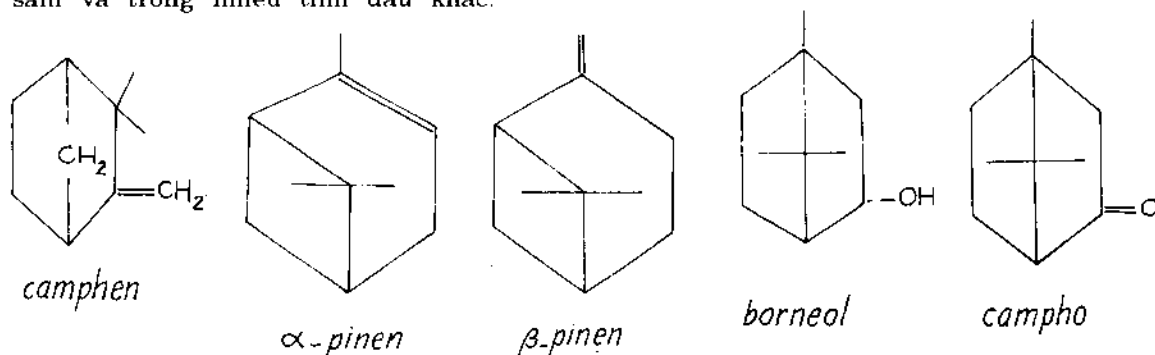
Piperitenon là chất không hoạt quang do không có tâm bất đối. Menton có hai tâm bất đối và mentol thì có ba tâm bất đối. Mối liên quan tương hỗ về cơ cấu giữa limonen và các dẫn xuất chứa oxy của nó có thể biểu diễn bằng sơ đồ như hình bên :

Trong số monoterpen hai vòng có pinen và camphen chứa trong tinh dầu chanh và dẫn xuất oxy của chúng là borneol và campho.

Phân tử pinen là tổ hợp vòng sáu cạnh và bốn cạnh gồm hai đồng phân α - và β - pinen. Pinen là hợp phần của nhiều tinh dầu và là cấu tử chủ yếu của dầu thông. Nó cho dầu thông mùi đặc trưng, dễ dàng bị oxy hóa trong không khí chuyển thành sản phẩm dạng nhựa.



Camphen có cấu tạo đối xứng và gồm hai vòng năm cạnh. Camphen có chứa trong tinh dầu chanh, tinh dầu loại lavang, tinh dầu họ hoa trác bách, tinh dầu linh sam và trong nhiều tinh dầu khác.

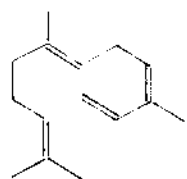


Borneol là rượu bậc hai có chứa trong tinh dầu long não, lavang, họ *Rosmarinus*. Borneol ở thể rắn. Khi oxy hóa borneol thì tạo thành campho. Campho có trong tinh dầu của nhiều thảo mộc.

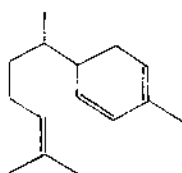
Cũng như borneol, campho ở thể rắn. Campho có trong gỗ và lá cây long não. Campho được ứng dụng rộng rãi trong y học làm chất kích thích hoạt động của tim. Trong công nghiệp hóa học campho dùng để chế tạo xelluloit và thuốc nổ không khói.

VIII.3.1.2. Sesquiterpen

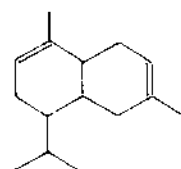
Sesquiterpen có thể xem như hợp chất do ba đơn vị izopen tạo nên, có công thức chung là $C_{15}H_{24}$. Sesquiterpen cũng chia ra mạch thẳng và mạch vòng. Đa số sesquiterpen là hợp chất đơn vòng hoặc đa vòng. Những sesquiterpen thẳng và vòng tiêu biểu là farnezen, xinhiberen, humulen, cardinen và α - xantalen. Trong đó đặc biệt là xinhiberen có nhiều trong tinh dầu gừng, humulen có trong tinh dầu huplông



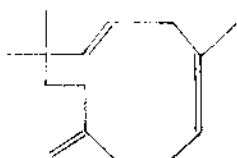
farnezen



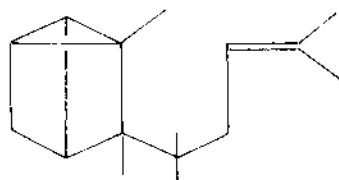
xinhiberen



cardinen

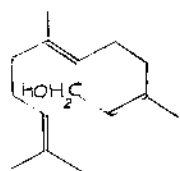


humulen

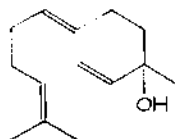


α - xantalen

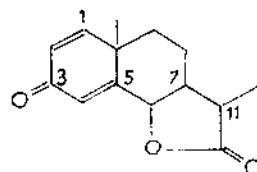
Trong số dẫn xuất chứa oxy của sesquiterpen có farnezol, nerolidol, xantonin.



farnezol



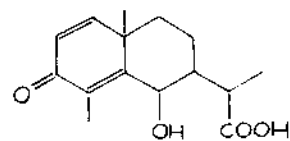
nerolidol



xantonin

Farnezol rất phổ biến trong tự nhiên. Farnezol có trong tinh dầu cam, chanh, hoa hồng và trong một số tinh dầu khác. Ở côn trùng farnezol có vai trò quan trọng : có trường hợp farnezol là chất "hấp dẫn" được côn trùng đực tiết ra để lôi kéo côn trùng cái.

Nerolidol có trong tinh dầu của hoa cam và trong nhựa thơm Pêru. Nerolidol có ứng dụng quan trọng trong kỹ nghệ nước hoa với danh nghĩa là chất cố định mùi, nghĩa là chất có khả năng làm giảm được độ bay hơi của chất có nhiệt độ sôi thấp và dễ dàng bay hơi khi trộn với nó. Các chất cố định mùi có mùi thơm tương tự nerolidol được coi là quý.



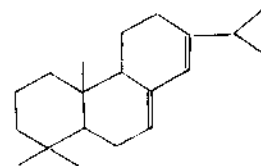
Xantonin có trong họ thầu dầu. Xantonin được dùng rộng rãi làm thuốc tẩy giun sán. Khi hòa tan trong kiềm, xantonin tạo thành muối của axit xantonic. Khi axit hóa môi trường thì lại được xantonin.

axit xantonic

VIII.3.1.3. Diterpen

Diterpen có công thức chung là $C_{20}H_{32}$. Trong tự nhiên, diterpen bao gồm một số hợp chất không lớn. Diterpen hoàn toàn không bị bay hơi cùng với hơi nước. Đặc biệt phổ biến rộng rãi trong các nhựa là axit nhựa.

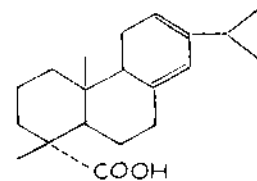
Khi chích một chỗ ở trên vỏ thông thì sẽ cho thông tiết ra một thứ nhựa mà nếu chưng cất với hơi nước thì sẽ được phân bay hơi và phần không bay hơi. Khi làm nguội phần không bay hơi, ta sẽ được một thể thủy tinh màu nâu gọi là canifol. Phần bay hơi của dầu thông chủ yếu là pinen. Còn canifol chính là hỗn hợp phức tạp các axit, có công thức chung là $C_{19}H_{29}COOH$ và có tên chung là axit nhựa.



axit abietic

Axit abietic là chất tiêu biểu của axit nhựa chiếm phần chính trong canifol.

So với các axit nhựa khác, axit abietic tương đối bền vững, mặc dù nó rất dễ dàng bị oxy hóa trong không khí. Tuy nhiên trong nhựa "nguyên thủy" axit abietic chỉ chiếm một lượng rất nhỏ. Trong quá trình hình thành nên canifol, axit abietic mới được tạo nên từ một loạt các chất tiền thân linh động khác có tên gọi chung là galipot. Axit levopimaric nằm trong galipot đó. Khi gia nhiệt cũng như dưới tác dụng của axit, axit levopimaric chuyển thành axit abietic. Axit levopimaric khác với axit abietic về vị trí của nối đôi.



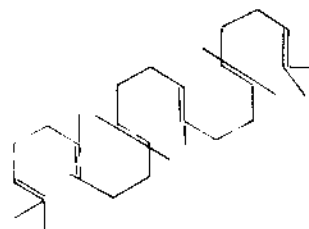
axit levopimaric

VIII.3.1.4. Triterpen

Triterpen thường gặp trong thực vật dưới dạng este, glucosid hoặc ở trạng thái tự do.

Tiêu biểu cho triterpen là squalen. Squalen có trong chất béo của gan cá mập, cũng như trong các cá khác.

Một triterpen khác đã được biết từ lâu là axit masticadienic. Axit này được dùng để làm sơn bóng.

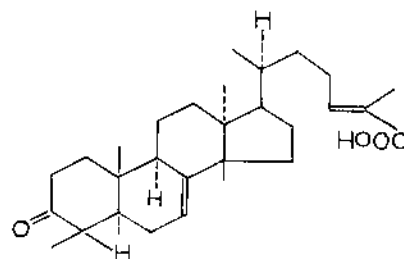


squalen

Nguyên liệu đầu tiên để tổng hợp các terpen ở trong cây là axit axetic hay nói đúng hơn là gốc axetyl hoặc đồng nghĩa là từ gluxit và lipit.

VIII.3.2. Tính chất chung của tinh dầu

Nói chung, tinh dầu hòa tan rất ít ở trong nước và hòa tan nhiều trong rượu đậm đặc. Độ hòa tan lẫn nhau của hai chất lỏng càng nhiều khi độ có cực của phân tử chúng càng lớn. Khi đầu tích điện dương của một phân tử này ở gần đầu tích điện âm của phân tử kia thì chúng sẽ hút lẫn nhau và dẫn đến liên hợp các phân tử. Độ hòa tan tương hỗ càng được tăng mạnh khi hằng số điện môi càng gần nhau và các yếu tố liên hợp các chất đó càng gần nhau. Rượu etylic là dung môi có cực mạnh vì hằng số điện môi của nó rất lớn ($\epsilon = 27$). Do có cực mạnh nên nó có thể hòa tan trong nước theo tất cả các tỉ lệ và có khả năng hòa tan được nhiều chất hữu cơ trong đó có các cấu tử của tinh dầu.



axit masticadienic

Dưới tác dụng của oxy, một phần tinh dầu chủ yếu là các hợp chất không no bị oxy hóa và cho mùi nhựa.

Nói chung mùi thơm của tinh dầu là do este, phenol, aldehyt, xeton và những hợp chất hữu cơ khác quyết định. Tổng lượng của những chất này thường chỉ chiếm đến 10% lượng tinh dầu, 90% còn lại là những chất đậm. Sesquiterpen là chất ổn định (chất đậm) đó.

VIII.3.3. Phương pháp khai thác tinh dầu

Phương pháp khai thác đơn giản nhất là chưng cất với hơi nước. Tuy nhiên phương pháp này gây tổn thất nhiều chất thơm bay hơi. Trong đa số trường hợp người ta khai thác bằng cách ép, trích ly nhờ dung môi có nhiệt độ sôi thấp hoặc phương pháp hấp thụ.

Việc trích ly tinh dầu cũng như những chất hòa tan khác ở trong nguyên liệu là quá trình chuyển khối. Để trích ly được tốt thì dung môi phải xâm nhập vào nguyên liệu. Các chất có trong tế bào nguyên liệu cách biệt với dung môi bởi thành tế bào. Chúng chỉ được tách ra khi dung môi xâm nhập vào trong tế bào và khuếch tán qua thành tế bào thành dạng hòa tan do kết quả của sự ngoại thẩm thấu.

Việc trích ly bằng rượu sẽ được dễ dàng do rượu có khả năng làm mất nước nguyên sinh chất của tế bào, làm đông tụ protein và pectin. Do đó thành tế bào mất tính thấm và chất hòa tan khuếch tán được tự do.

Khai thác bằng phương pháp hấp thụ bao gồm trộn nguyên liệu (cây hoặc hoa) với mỡ lợn hoặc mỡ bò và để một thời gian. Khi đó, chất béo sẽ hấp thụ và hòa tan trong nó các chất thơm. Sau đó, tách các chất thơm này ra khỏi chất béo bằng rượu. Còn các glixerit hòa tan trong rượu thì được tách ra khỏi chất thơm bằng cách làm lạnh.

Trong thực tế, người ta thường sử dụng tinh dầu dưới dạng các etxăng, tức là dưới dạng dung dịch đậm đặc trong rượu các chất thơm tự nhiên hoặc tổng hợp.

Do đó mà có etxăng tự nhiên và etxăng tổng hợp. Dung dịch các tinh dầu được chiết rút ra từ thực vật bằng cách ép, chưng cất với hơi nước hoặc trích ly bằng dung môi gọi là etxăng tự nhiên. Etxăng tổng hợp là dung dịch rượu nước của các chất thơm thu được bằng phương pháp tổng hợp.

Étxăng có được bằng cách hòa tan tinh dầu trong rượu etylic. Trong quá trình chuẩn bị ét xăng xảy ra sự deterpen hóa tinh dầu, do đó làm giảm độ hòa tan của terpen trong dung dịch rượu nước. Vì vậy phải tách kết tủa terpen ra bằng cách lọc.

Trong sản xuất thực phẩm, tùy theo tính chất đặc thù của từng sản phẩm mà người ta cho thêm những ét xăng thích hợp.

VIII.4. CÁC CHẤT THƠM HÌNH THÀNH NÊN TRONG QUÁ TRÌNH GIA CÔNG KỸ THUẬT

Như chúng ta đều biết, sau các quá trình gia công kỹ thuật, không những trạng thái, màu sắc mà hương vị của các sản phẩm thực phẩm cũng bị thay đổi. Có những nguyên liệu hay bán thành phẩm qua những quá trình gia công kỹ thuật nào đó (chẳng hạn gia nhiệt) thì mùi thơm bị yếu đi hoặc mất đi hoàn toàn. Ngược lại, cũng có không ít trường hợp, các sản phẩm sau khi qua một số gia công kỹ thuật nào đó thì hương thơm của chúng lại mạnh thêm, hoặc thậm chí sản phẩm từ chỗ không có mùi chuyển sang có mùi thơm hoàn toàn mới.

Nghiên cứu những chất thơm mới được tân tạo ra trong các quá trình gia công kỹ thuật của nhiều sản phẩm thực phẩm, người ta thấy rằng chúng thường là những hợp chất có nhóm cacbonyl. Vì lẽ khi cho những chất liên kết được với nhóm aldehyt như dimedon, natri sulfit, ... vào các sản phẩm đó đều dẫn đến làm tắt mùi.

Vậy thì từ những hợp chất "nguyên thủy" nào và bằng con đường nào để tân tạo nên được những cấu tử aldehyt này?

Khi nghiên cứu các phản ứng tạo màu ở chương trước, chúng ta đã thấy các aldehyt có thể được hình thành nên bằng phản ứng Maillard cũng như bằng phản ứng polyphenolamin (hay đúng hơn là phản ứng quinonimin). Như vậy, rõ ràng hợp chất "nguyên thủy" để tân tạo ra chất có mùi là axitamin, đường và polyphenol. Trong những quá trình này, axitamin có một vai trò quyết định có tính chất trực tiếp hết sức quan trọng. Dưới đây chúng ta sẽ xem xét những đường hướng tân tạo nên các aldehyt ấy.

VIII.4.1. Phản ứng Maillard là nguồn tạo ra aldehyt

Trong quá trình gia nhiệt, các axitamin tương tác với đường và tạo thành các aldehyt và reducton theo sơ đồ phản ứng như sau :

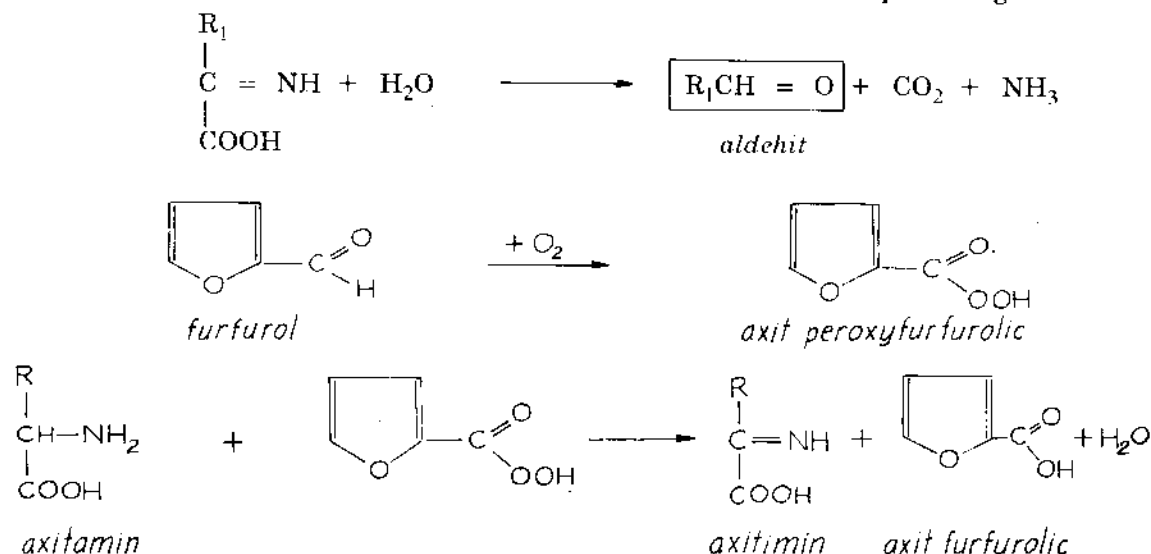


Bản thân các furfurol và oxymetylfurfurol cũng là những aldehyt vòng có mùi đặc trưng.

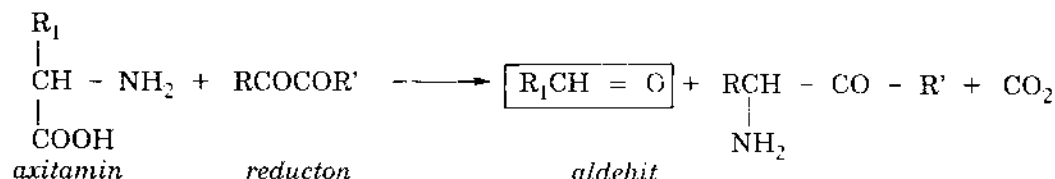
Furfurol có mùi táo và do đường pentoza tạo thành. Oxymetylfurfurol có mùi thật dễ chịu và được tạo thành từ đường hexoza.

Hai furfural này có thể được tạo thành do tương tác của đường với axitamin qua phức hợp trung gian 1 - amin - 1 - dezoxy - 2 - xetoza (xem cơ chế phản ứng Maillard ở chương trước). Tuy nhiên chúng cũng có thể được tạo nên bằng con đường dehydrat hóa các đường.

Ngoài furfural và oxymetylfurfural, các aldehyt khác có thể được tân tạo do tương tác của axitamin với furfural hoặc với các reducton theo sơ đồ phản ứng sau :



Với reducton thì sơ đồ phản ứng tổng quát như sau :

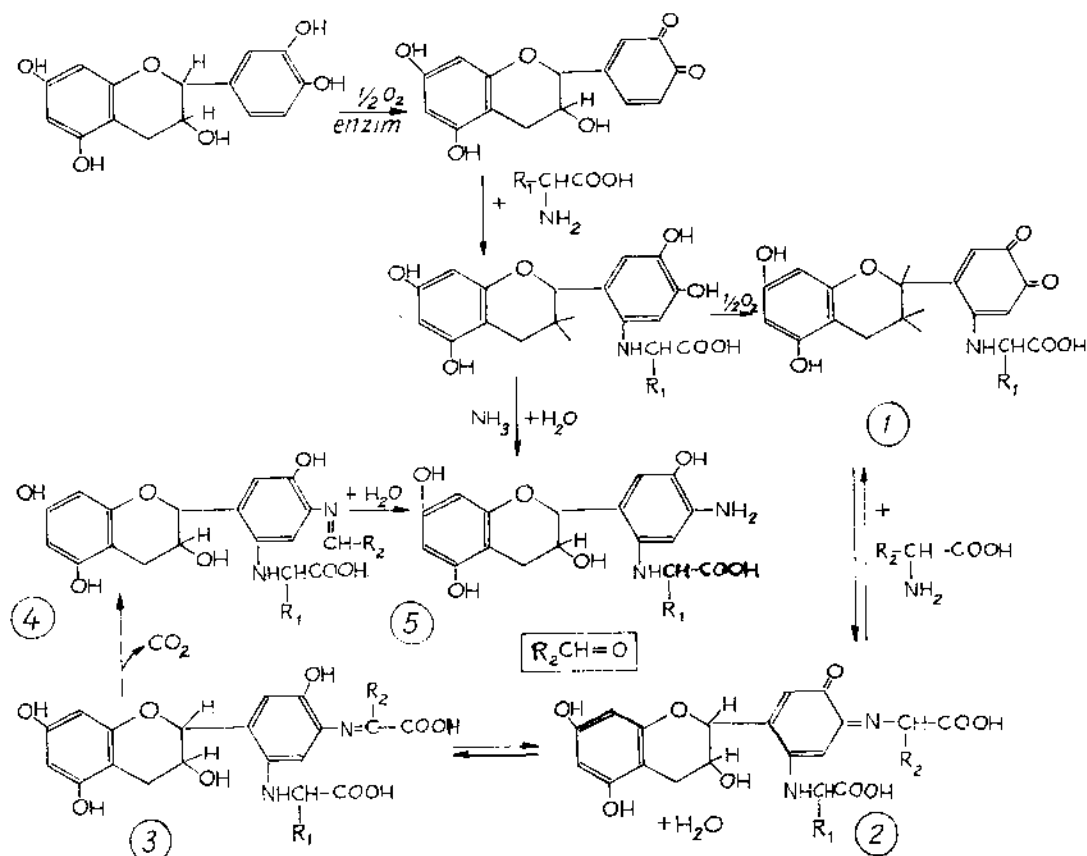


Từ sơ đồ phản ứng ta thấy các aldehyt $\text{R}_1\text{CH}=\text{O}$ được tân tạo ra có mạch cacbon bé hơn axitamin "nguyên thủy" một cacbon. Các aldehyt này do bản chất các axitamin "nguyên thủy" quyết định. Như vậy cũng có nghĩa là hương thơm của các bán thành phẩm hay thành phẩm là do các axitamin quyết định.

Thực nghiệm cho thấy rằng, từ loxin sẽ cho aldehyt có mùi thơm của bánh mì, từ glixin sẽ cho aldehyt có mùi mật và mùi thơm bia, từ valin, và phenylalanin sẽ cho aldehyt có mùi thơm dịu của hoa hồng, v.v.

VIII.4.2. Phản ứng quinonamin là nguồn tân tạo ra các aldehyt

Các aldehyt còn được tân tạo nên do tương tác của axitamin với polyphenol khi có sự xúc tác của enzym polyphenoloxydaza hoặc trong điều kiện nhiệt độ cao. Sơ đồ phản ứng trong hình 8.2. Từ đây chúng ta cũng thấy aldehyt được tân tạo nên có mạch cacbon bé hơn mạch cacbon của axitamin "nguyên thủy" một nguyên tử cacbon. Như vậy, trong trường hợp này axitamin cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra hương thơm mới của sản phẩm.



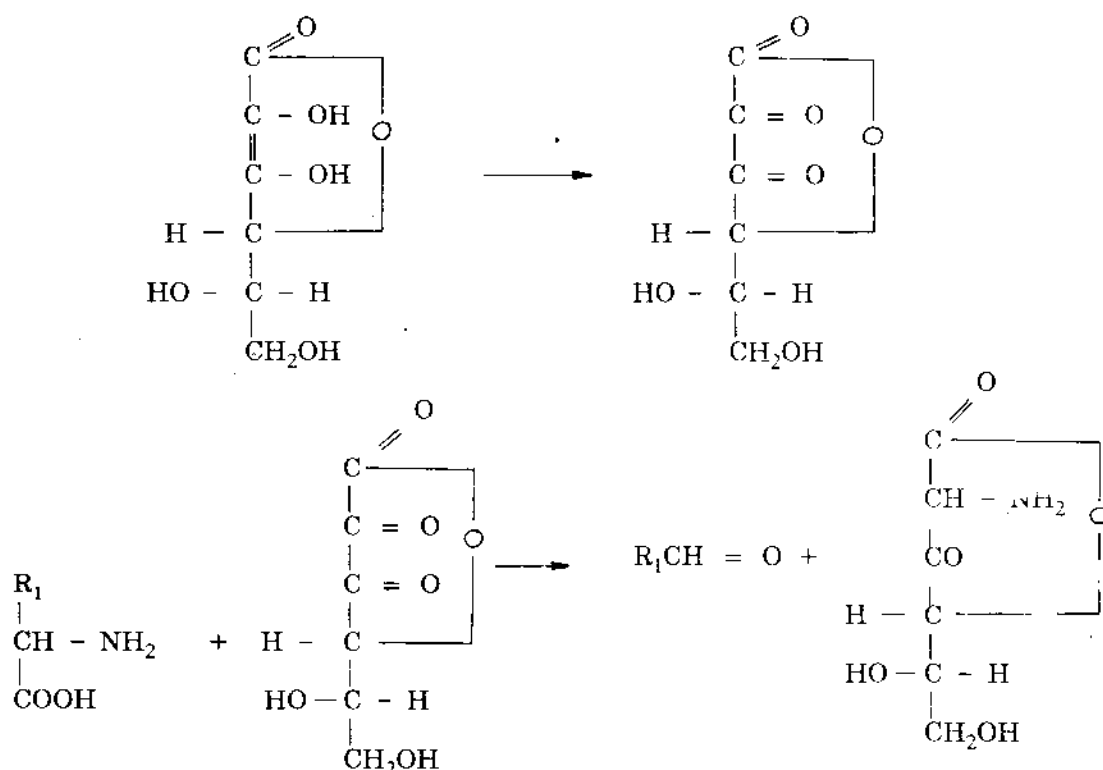
Hình 8.2. Phản ứng oxy hóa - deamin hóa các axitamin bởi quinon

Trong thực tế, khi chế biến nhiệt, các bán thành phẩm chè chưa được lên men, người ta nhận thấy rằng hàm lượng các axitamin như alanin, phenylalanin, valin, lóxin, izolóxin bị giảm đi, trong khi đó hàm lượng các aldehyt : axetaldehyt, phenylaxetic, butyric và valerianic tăng lên một cách tương ứng.

Trong điều kiện không gia nhiệt, nhưng có sự xúc tác của enzym polyphenoloxydaza, phản ứng này cũng xảy ra một cách dễ dàng. Đó là trường hợp khi lên men các lá chè đã qua giai đoạn vò.

VIII.4.3. Tương tác giữa axitamin và axit ascorbic là một nguồn tân tạo các aldehyt

Người ta còn nhận thấy rằng, các aldehyt có thể được hình thành nên do tương tác của axitamin với axit ascorbic khi có mặt catechin (polyphenol), ion Cu^{2+} hoặc khi gia nhiệt đến $80 - 90^\circ C$. Ở đây rõ ràng cũng là phản ứng oxy hóa - deamin hóa các axitamin. Chúng ta đều biết, dưới tác dụng của Cu^{2+} , nhiệt độ, ... axit ascorbic bị oxy hóa đến axit dehydroascorbic. Axit dehydroascorbic cũng là một reduton do đó có thể tương tác với các axitamin để tân tạo ra các aldehyt khác nhau :



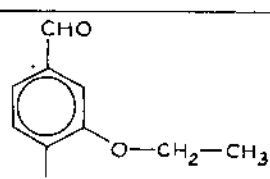
Phản ứng Maillard có vai trò rất quan trọng trong sản xuất bánh mì, và sản xuất bia. Các biện pháp kỹ thuật tương ứng khi nướng bánh mì cũng như khi sấy malt đều là nhằm tạo ra hương thơm đặc trưng cho những sản phẩm đó.

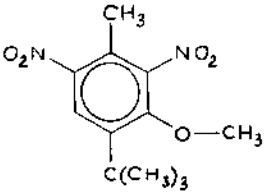
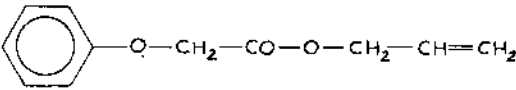
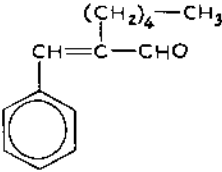
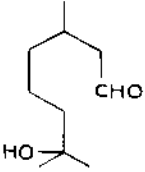
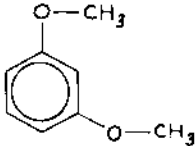
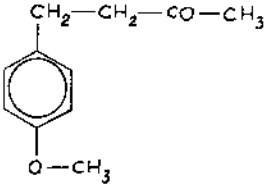
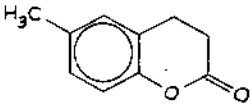
Chẳng hạn hương thơm của bánh mì được tân tạo nên sau khi nướng là một hỗn hợp gồm 70 cấu tử thơm, trong đó quan trọng là furfural, oxymethylfurfural và aldehyt valerianic.

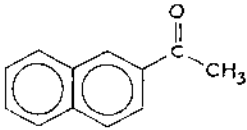
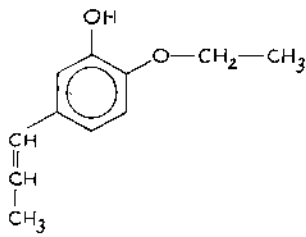
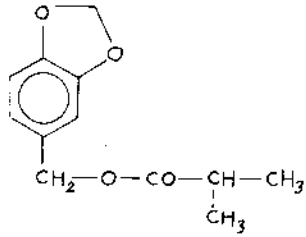
Trong sản xuất chè thì phản ứng quinonamin lại đặc biệt quan trọng. Người ta thấy rằng mùi thơm có thể được tân tạo nên ở trong giai đoạn làm héo và ủ (lên men). Nhưng mùi thơm đặc trưng của các sản phẩm chè thì được tân tạo ở trong giai đoạn sấy. Chẳng hạn, trong sản phẩm chè người ta đã tìm thấy 34 cấu tử thơm khác nhau trong đó có aldehyt phenylaxetic, aldehyt izovalerianic, geraniol, rượu benzylic, ...

VIII.5. CÁC CHẤT THƠM TỔNG HỢP

Một số chất thơm tổng hợp sau đây thường được dùng để tạo hương cho các sản phẩm thực phẩm

Tên	Công thức cấu tạo	Mô tả mùi
Etylvanilin		Mùi thơm ngọt (2 đến 4 lần mạnh hơn vanilin)

Tên	Công thức cấu tạo	Mô tả mùi
Musk ambrette		Mùi hương xạ
Alylphenoxaxetat		Mùi trái cây, mùi thơm dứa
Aldehyt α-amyloxinnamic		Mùi hoa nhài
Hydroxyxitronelal		Mùi ngọt của hoa, mùi thơm hoa huệ
Resorindimetylete		Mùi thơm hắc, mùi trái cây
Anisylaxeton		Mùi thơm ngọt của hoa trái
6-Metylcumarin		Mùi thơm cỏ khô

Tên	Công thức cấu tạo	Mô tả mùi
β - Naphthylmetylaxeton		Mùi thoảng hoa cam, mùi giống dầu tây
Propenylguaetol (vanatrop)		Mùi phenol, mùi thơm anit
Piperonylizobutytrat		Mùi thơm ngọt của quả mọng

VIII.6. CÁC HÌNH THƠM (TỔ HỢP THƠM)

VIII.6.1. Sự tạo ra hình thơm

Một hỗn hợp các cấu tử tương tác hài hòa với nhau qua đó mùi của các cấu tử đơn thể bị biến đổi đi để tân tạo ra một mùi thơm nhất định, gây cho khứu giác một cảm giác dễ chịu gọi là một hình thơm.

Trong một hình thơm, hàm lượng và vai trò của các cấu tử không giống nhau. Có những cấu tử cần có mặt với một lượng nhiều nhưng cũng có cấu tử thậm chí chỉ cần ở dạng vết. Có những cấu tử có vai trò quyết định hương thơm chủ yếu của hình thơm gọi là "chất nền thơm". Chất nền thơm trong một hình thơm có thể là một cấu tử thơm đơn thể (ví dụ, ionon cho mùi hoa tím) hoặc là hỗn hợp của một số chất thơm đơn thể hoặc là tổ hợp một vài cấu tử đơn giản. Có những cấu tử thường với lượng rất nhỏ nhưng có tác dụng làm tăng hay giảm hương, làm cho hình thơm được hòa hợp hoàn toàn, nghĩa là tạo ra sự hài hòa cho hình thơm. Những chất này thường là indol, scatol, metylheptylaxeton, phenyletylaxetat, ... Ngoài ra lại có cấu tử đóng vai trò chất định hương tạo khả năng giữ được mùi thơm của hình thơm. Chất định hương thường là các nhựa và bazam (nhựa benzoic, stirac), mus và xibet (động vật, tinh dầu tuyết đối, các chất hữu cơ kết tinh (vani, mus và xibet (động vật), tinh dầu tuyết đối, các chất hữu cơ kết tinh (vani, mus nhân tạo), các chất tổng hợp (diethylphthalat, benzylbenzoat, ...). Các chất định hương dạng nhựa làm cho dung dịch có độ nhớt cao. Chúng lại là hệ keo phân tán nên có khả năng

hấp thụ năng lượng, khiến cho sự di chuyển của dung môi và các chất dễ bay hơi lên bề mặt của dung dịch bị cản trở vì không đủ năng lượng để thắng ma sát nội tại. Còn những chất định hương dạng tinh thể có khả năng hấp thụ một lượng lớn chất thơm dễ bay hơi lên bề mặt mạng tinh thể. Như vậy, chung qui chất định hương có tác dụng làm thay đổi áp suất riêng của hỗn hợp và điều chỉnh sự bay hơi của các cấu tử.

Chẳng hạn, hình thơm mùi hoa nhài bao gồm các cấu tử sau :

1 - Phenylaxetaldehit	2 g
2 - Benzylaxetat	680 g
3 - Aldehit benzylic	530 g
4 - Linalol	225 g
5 - Aldehit phenyletylic	100 g
6 - Tinh dầu cam	100 g
7 - Metylantranilat	8 g
8 - Xilet nhân tạo	18 g
9 - Nhài tuyết đối	20 g
10 - Tinh dầu chanh	100 g
11 - Geranylaxetat	10 g
12 - Aldehit dexylic	2 g
13 - Hydroxyxitronelal	100 g
14 - Benzylbenzoat	90 g
15 - Scatol	0,2 g

VIII.5.2. Các tương tác tạo ra hình thơm

Trong quá trình phối hợp các cấu tử để tân tạo ra hình thơm, các tương tác lý học và hóa học có vai trò quan trọng.

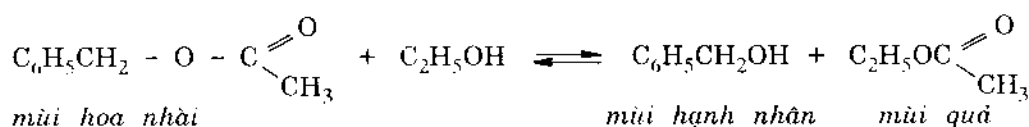
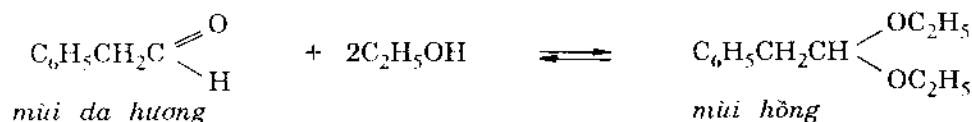
Tương tác lý học gây ra hiện tượng tạo cặn và lắng xuống.

Tương tác hóa học xảy ra giữa các cấu tử thơm với dung môi và giữa các cấu tử thơm với nhau, ... Các tương tác hóa học đó có thể biểu diễn dưới dạng những phản ứng sau.

VIII.5.2.1. Phản ứng của dung môi với cấu tử thơm

Dung môi thường là rượu, nên có thể phản ứng với aldehyt, xeton và este.

Ví dụ :



Quá trình tân tạo ra một hình thơm có thể chia thành ba giai đoạn :

- Giai đoạn đầu hay giai đoạn "tuổi trẻ", lúc này mùi của hình thơm chưa hoàn chỉnh, cường độ và sắc thái kém, mùi không chính xác ;
- Giai đoạn "phát triển", lúc này mùi của hình thơm đã hoàn chỉnh, ổn định và cực đại, hoàn toàn đẹp đẽ ;
- Giai đoạn "già", ở giai đoạn này mùi bị giảm và xấu đi.

Trong thực tế, dựa vào kinh nghiệm người ta đã tạo ra được những hình thơm thích ứng dùng cho nước hoa, phấn sáp, xà phòng thơm và thực phẩm. Đặc biệt các hình thơm dùng cho thực phẩm (kẹo, bánh, nước giải khát, ...) đòi hỏi các cấu tử phải có độ tinh khiết cao.

HÓA SINH HỌC CÁC QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN VÀ CHẾ BIẾN NGŨ CỐC

Lịch sử của ngành học chuyên nghiên cứu về những biến đổi hóa sinh của ngũ cốc được phát triển theo yêu cầu của công nghệ bảo quản và chế biến lương thực. Phần lớn các công trình hướng vào các nghiên cứu thành phần hóa học của ngũ cốc cũng như các quá trình xảy ra trong khi bảo quản và chế biến thành sản phẩm (gạo, bột, mì sợi, bánh mì, ...).

Tác phẩm đầu tiên được công bố về lĩnh vực này là công trình nghiên cứu của nhà bác học người Italia Bécari năm 1745. Công trình này đề cập đến việc tách gluten từ bột mì bằng cách rửa. Tiếp đó, nhà bác học Pháp Bussego (1802 – 1887) đã tìm các phương pháp hóa học chính xác đương thời để xác định ảnh hưởng các điều kiện bốn phân và độ trắng trong đến thành phần hóa học của hạt lúa mì.

Từ giữa thế kỷ XIX nhiều nhà bác học trên thế giới đã hướng các công trình của mình vào việc nghiên cứu thành phần hóa học và giá trị thực phẩm của lúa mì, bột mì, bánh mì, ... Bước sang thế kỷ XX nhiều công trình đều xoay quanh việc nghiên cứu giá trị dinh dưỡng của các thành phần hóa học của hạt ngũ cốc, nghiên cứu sự biến đổi chất lượng của lương thực trong quá trình bảo quản và chế biến. Các nhà bác học Bac và Oparin đã nhiều cống hiến lớn lao trong lĩnh vực nghiên cứu về men trong hạt lương thực, về các quá trình lên men xảy ra trong thời gian chế biến hạt thành bột và trong sản xuất bánh mì.

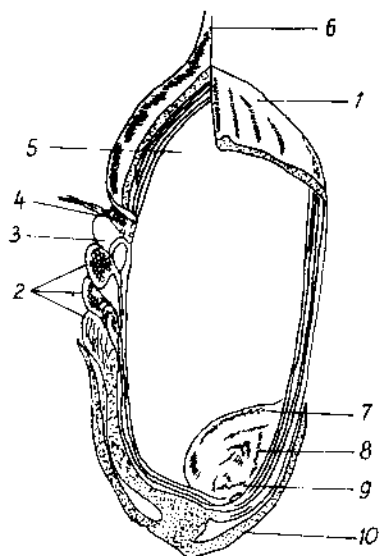
Các công trình nghiên cứu về gạo đều tập trung vào vấn đề xác định mức độ xát hợp lý để duy trì giá trị dinh dưỡng và nâng cao độ tiêu hóa của gạo, chế biến gạo, đồ, làm giàu gạo bằng vitamin, sản xuất các loại gạo ngô, gạo đại mạch, gạo mạch hoa, gạo nhân tạo, ... và nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng gạo trong thời gian bảo quản.

IX.1. SƠ LƯỢC VỀ CẤU TẠO VÀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA MỘT SỐ LOẠI NGŨ CỐC

Các loại hạt ngũ cốc có hình dáng, kích thước, cấu tạo bên trong và thành phần hóa học khác nhau, nhưng tựu trung đều có ba phần chính : vỏ, nội nhũ và phôi. Tỷ lệ giữa vỏ, phôi và nội nhũ thay đổi tùy theo loại ngũ cốc (bảng 9.1).

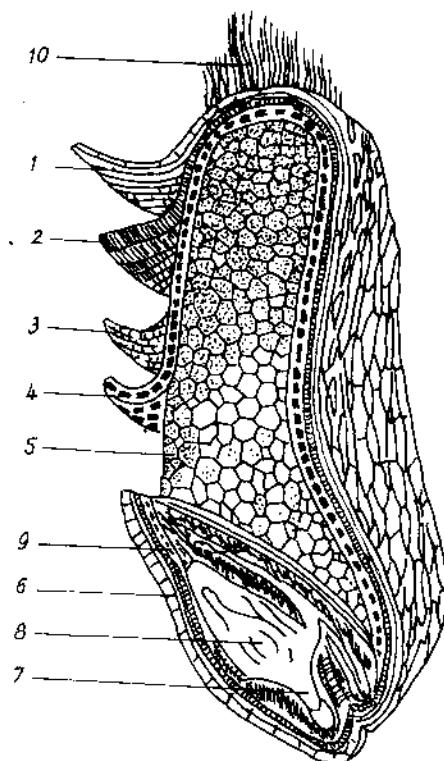
Bảng 9.1. Tỷ lệ trọng lượng vỏ, phôi và nội nhũ

Loại hạt	Vỏ, %	Phôi, %	Nội nhũ, %
Lúa	15,0 - 27,0	2,0 - 2,5	72
Ngô	5,0 - 8,5	10,0 - 15,0	79 - 83
Lúa mì	15,0 - 19,0	2,2 - 3,2	77 - 82



Hình 9.1. Hình cắt dọc hạt thóc :

1 - vỏ trấu ; 2 - vỏ quả ; 3 - vỏ hạt ;
4 - lớp alorông ; 5 - nội nhũ ; 6 - râu ;
7 - ngù ; 8 - chồi mầm ; 9 - rễ mầm ;
10 - mầm thóc



Hình 9.2. Hình cắt dọc hạt lúa mì : 1, 2, 3 - các lớp vỏ (vỏ quả và vỏ hạt) ; 4 - lớp alorông ; 5 - nội nhũ ; 6 - phôi ; 7 - rễ mầm ; 8 - chồi mầm ; 9 - ngù ; 10 - râu

IX.1.1. Vỏ

Vỏ là bộ phận bảo vệ cho phôi và nội nhũ khỏi bị tác động cơ học cũng như hóa học từ bên ngoài. Thành phần của vỏ chủ yếu là xelluloza, hemixelluloza, licnin, không có chất dinh dưỡng nên trong quá trình chế biến càng tách ra được nhiều vỏ càng tốt.

Vỏ cấu tạo từ nhiều lớp tế bào, lớp ngoài cùng gồm những tế bào kích thước lớn sắp xếp theo chiều dọc hạt, lớp giữa gồm những tế bào tương tự lớp ngoài nhưng sắp xếp theo chiều ngang. Đối với hạt đã chín thì lớp tế bào giữa trống rỗng, còn ở hạt xanh thì lớp tế bào này chứa các hạt lục diệp tố nên hạt có màu xanh. Lớp tế bào trong cùng còn gọi là lớp vỏ quả, gồm những tế bào hình ống sắp xếp theo chiều dọc hạt. Trong cùng một hạt, chiều dày lớp tế bào vỏ quả không giống nhau,

ở phôi lớp vỏ quá mỏng hơn cả. Trong vỏ quả là vỏ hạt. Vỏ hạt gồm hai lớp tế bào. Lớp ngoài là những tế bào xếp khít với nhau chứa đầy chất màu, khi hạt chín thì lớp này chứa chất màu vàng (với gạo đỏ, gạo cẩm thì ở lớp này chứa chất màu đỏ nâu). Lớp trong gồm những tế bào không màu, ít thấm nước.

Chiều dày lớp vỏ phụ thuộc vào loại và giống hạt, vào điều kiện trồng trọt.

IX.1.2. Lớp alorông và nội nhũ

Bên trong các lớp vỏ là lớp alorông của thóc, ngô, lúa mì được cấu tạo từ một hàng tế bào lớn, thành dày. Tế bào alorông hình khối chữ nhật hay vuông. Càng gần phôi thì tế bào nhỏ dần. Trong tế bào alorông có chứa hợp chất nitơ, các chất khoáng và các giọt chất béo. Chiều dày lớp alorông chẳng những chỉ phụ thuộc vào loại và giống hạt mà còn phụ thuộc nhiều vào điều kiện canh tác, chẳng hạn như lúa cấy ruộng khô có chiều dày lớp alorông khoảng 40 μm , nhưng cấy ở ruộng nước thì chiều dày chỉ vào khoảng 30 μm .

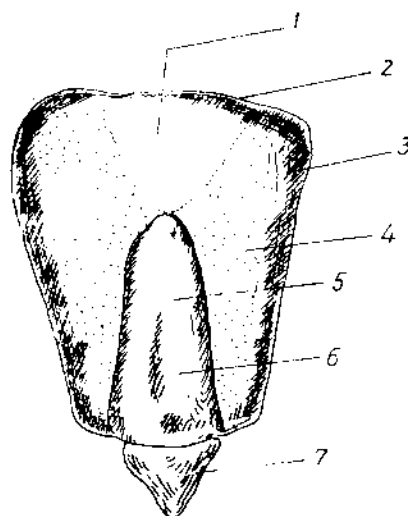
Sau lớp alorông là các tế bào lớn, thành mỏng có hình dạng khác nhau, sắp xếp không thứ tự. Đó là các tế bào nội nhũ. Nội nhũ là phần dự trữ chất dinh dưỡng của hạt. Thành phần chủ yếu của tế bào nội nhũ là tinh bột và protein. Ngoài ra trong nội nhũ còn có một lượng nhỏ chất béo, muối khoáng và sinh tố.

IX.1.3. Phôi

Phôi là phần phát triển thành cây non khi hạt nảy mầm, vì thế trong phôi có khá nhiều chất dinh dưỡng để tiêu hóa để cung cấp cho sự sống ban đầu của cây non. Chất dinh dưỡng trong phôi chủ yếu gồm có 35% protein, 25% các glucit hòa tan, 15% chất béo, đặc biệt là phôi ngô có chứa đến 40% chất béo. Phần lớn lượng sinh tố và enzym của hạt cũng đều tập trung ở phôi.

Phôi cách nội nhũ bởi lớp ngù. Trong đời sống của cây non, ngù đóng vai trò vô cùng quan trọng vì tất cả lượng chất dinh dưỡng từ nội nhũ muốn sang phôi đều phải đi qua ngù. Ngù cấu tạo từ những tế bào có khả năng cho thấm thấu các chất hòa tan.

Thành phần hóa học của các hạt khác nhau thì không giống nhau, và tỉ lệ các chất cũng phân bố không đều trong vỏ, nội nhũ, phôi.



Hình 9.3. Cấu tạo hạt ngô.

1 - nội nhũ dọc ; 2 - vỏ ; 3 - lớp alorông ;
4 - nội nhũ trắng trong ; 5 - chồi mầm ;
6 - lá mầm ; 7 - củing hạt

Bảng 9.2. Thành phần hóa học trung bình của một số loại ngũ cốc

Loại hạt	Nước %	Gluxit,%	Protein. %	Chất béo %	Xelluloza, %	Tro. %
Thóc	13,0	63,0	6,7	2,1	8,8	5,4
Lúa mì	14,0	68,7	12,0	1,7	2,0	1,6
Ngô	14,0	67,9	10,0	4,6	2,2	1,3
Đậu nành	10,0	26,0	36,6	17,5	4,5	5,5
Vừng	9,3	10,0	18,7	50,7	7,0	5,0

Thóc, lúa mì và ngô là loại hạt giàu tinh bột. Đậu nành và các loại đậu nói chung là hạt giàu protein. Còn vừng, lạc, thầu dầu, ... là hạt giàu chất béo.

Thành phần hóa học của hạt ngũ cốc phân bố không đều trong các phần của hạt. Trong nội nhũ chủ yếu là chất tinh bột. Tinh bột và protein chiếm tới 90 – 95% trọng lượng nội nhũ. Còn trong phôi thì gồm một nửa là protein, một phần tư là đường và có chứa khá nhiều chất béo. Trong vỏ thì chủ yếu là chứa xelluloza và hemixelluloza. Thành phần hóa học từng phần của hạt thóc cho trong bảng 9.3 và của hạt ngô cho trong bảng 9.4.

Bảng 9.3. Sự phân bố thành phần hóa học trong từng phần của hạt thóc

Tên các thành phần của hạt	Protein, %	Tinh bột, %	Đường, %	Xelluloza, %	Pentozan, %	Chất béo, %	Tro, %	Các chất khác, %
Toàn bộ hạt	10,07	59,00	4,43	2,76	8,10	2,24	2,18	1,22
Nội nhũ	12,91	79,56	3,54	0,15	2,72	0,67	0,45	-
Phôi	41,30	rất ít	25,12	2,46	9,74	15,04	6,31	0,03
Vỏ và lớp aleurone	28,70	ít	4,18	16,20	32,56	7,78	10,51	0,07

Bảng 9.4. Sự phân bố thành phần hóa học trong từng phần của hạt ngô

Tên các phần của hạt	Protein, %	Tinh bột, %	Đường, %	Chất béo, %	Tro, %
Nội nhũ	9,4	86,4	0,64	0,8	0,31
Phôi	18,8	8,2	10,80	34,5	10,10
Vỏ	3,7	7,3	0,34	1,0	0,84

Trong mỗi phần riêng biệt của hạt, các chất dinh dưỡng cũng phân bố không đồng đều. Lớp nội nhũ ngoài nhiều protein hơn lớp nội nhũ trong (xem bảng 9.5).

Bảng 9.5. Sự phân bố protein trong các phần của hạt ngô

Các phần của hạt	Phần trăm trọng lượng của toàn hạt	Hàm lượng protein (N.6,25) %
Vỏ quả	6,5	3,0
Lớp alorông	2,2	19,2
Nội nhũ lớp ngoài cùng	3,9	27,7
Nội nhũ lớp gần ngoài	58,1	7,5
Nội nhũ lớp giữa	17,1	5,6
Phôi	11	26,5
Ngũ	10,6	16,0

Muối khoáng phần lớn tập trung ở vỏ và lớp alorông, trong nội nhũ có ít và phân bố không đồng đều. Còn sinh tố thì tập trung nhiều ở phôi và lớp alorông. Vì thế gạo xát quá kỹ sẽ mất đi khá nhiều chất cần thiết cho cơ thể con người.

Các loại củ giàu tinh bột (khoai, sắn, ...) có cấu tạo và thành phần hóa học khác hạt lương thực. Thường các loại củ giàu tinh bột gồm có ba phần chính: vỏ lụa (vỏ gỗ), vỏ cùi (vỏ bột) và nội nhũ. Với sắn thì còn có lõi nằm dọc giữa thân củ.

Ở nước ta, sau lúa và ngô thì khoai lang và sắn là nguồn quan trọng cung cấp tinh bột cho người và gia súc.

Bảng 9.6. Thành phần hóa học của khoai và sắn

Loại củ	Nước, %	Gluxit, %	Protein, %	Chất béo, %	Xelluloza, %	Tro, %
Khoai lang tươi	68,1	27,9	1,6	0,5	0,9	1,0
Khoai lang khô	13,0	80,5	2,0	0,8	0,2	0,5
Sắn tươi	70,25	26,6	1,1	0,4	1,1	0,5
Sắn khô	13,2	73,3	0,2	-	-	1,7

Các loại ngũ cốc nói chung đều giàu tinh bột (trừ hạt họ đậu nhiều protein, hạt béo nhiều lipid, ...). Tinh bột, protein, chất béo, ... của các nguồn nguyên liệu khác nhau thì không giống nhau về thành phần cũng như về tính chất.

IX.2. HOẠT ĐỘNG SINH LÝ CỦA HẠT NGŨ CỐC VÀ CỦA CÁC SẢN PHẨM ĐÁ CHẾ BIẾN TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN

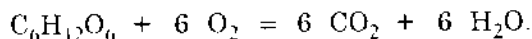
Hạt ngũ cốc là một cơ thể sống. Tuy đã lìa khỏi bông nhưng trong hạt vẫn xảy ra các quá trình trao đổi chất phức tạp để duy trì sự sống của nó.

IX.2.1. Sự hô hấp của hạt ngũ cốc

Tùy điều kiện bảo quản mà hạt có thể hô hấp hiếu khí hoặc yếm khí (lên men). Nếu có đủ không khí thì trong hạt xảy ra quá trình hô hấp hiếu khí. Trong điều

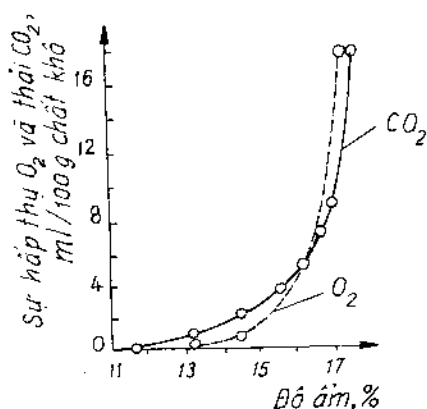
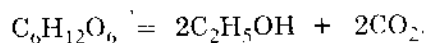
kiện bảo quản thiếu không khí, hạt sẽ tiến hành hô hấp yếm khí.

Phương trình tổng quát của hô hấp hiếu khí như sau :

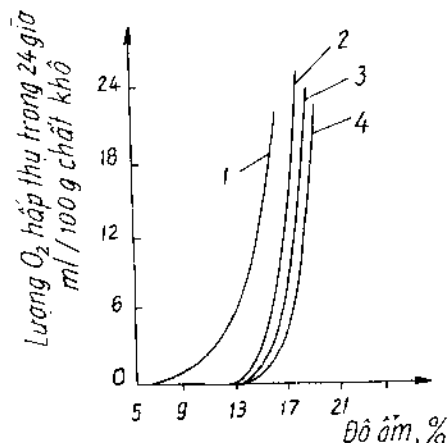


Hô hấp hiếu khí cần đường glucoza và oxy, và cuối cùng tạo thành khí cacbonic và nước. Ngoài ra hô hấp hiếu khí có sinh nhiệt : 674 kcal cho mỗi phân tử gam glucoza (180 g).

Phương trình tổng quát của hô hấp yếm khí (lên men rượu) như sau :

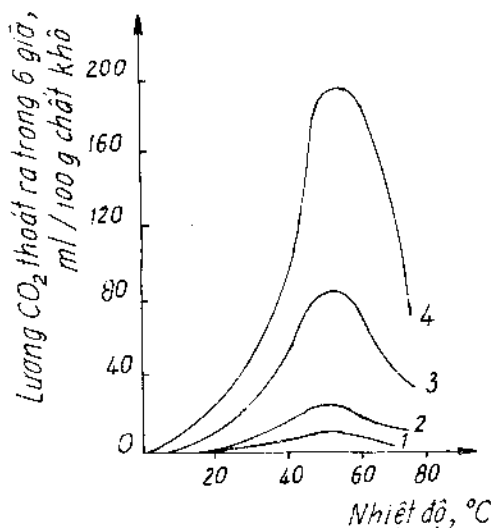


Hình 9.4. Sự phụ thuộc cường độ hô hấp của hạt kê vào độ ẩm



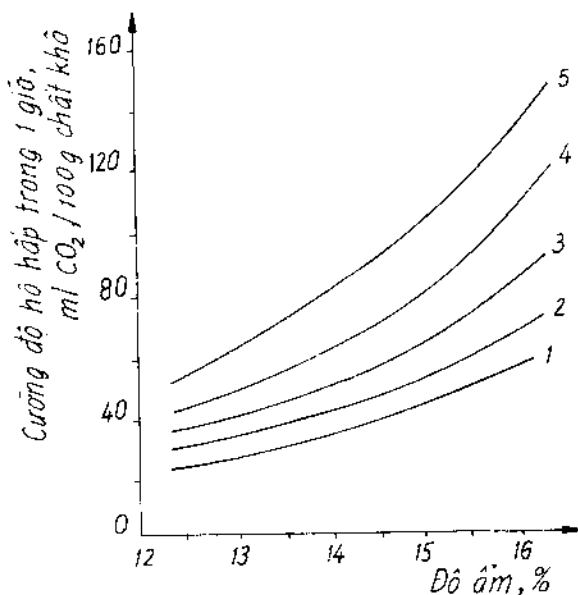
Hình 9.5. Sự phụ thuộc cường độ hô hấp của các hạt vào độ ẩm :

1 - gai ; 2 - thóc ; 3 - kê ; 4 - yến mạch



Hình 9.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến cường độ hô hấp của hạt :

1 - độ ẩm của hạt 14% ; 2 - độ ẩm của hạt 16% ; 3 - độ ẩm của hạt 18% ; 4 - độ ẩm của hạt 22%



Hình 9.7. Sự phụ thuộc cường độ hô hấp của lúa nông nghiệp 8 vào nhiệt độ và độ ẩm :

1 - ở 20°C ; 2 - ở 25°C ; 3 - ở 30°C ; 4 - ở 35°C ; 5 - ở 40°C

Mỗi phân tử gam glucoza qua quá trình hô hấp yếm khí sẽ sinh ra 28 kcal.

Như vậy dù là hô hấp hiếu khí hay yếm khí lượng chất khô dần dần hao hụt đi. Mặt khác, trong khoảng trống giữa các hạt dần dần tích lũy khí cacbonic, có thể đến 12 - 15% (thông thường không khí chỉ chứa khoảng 0,03% CO_2). Ngoài ra hô hấp có sinh ra nước, lượng nước này tích tụ trong khối hạt và làm cho độ ẩm của hạt tăng lên. Và đặc biệt là quá trình hô hấp có tỏa nhiệt, mà khối hạt lại có độ dẫn nhiệt kém, do đó nhiệt lượng tỏa ra làm nhiệt độ của khối hạt tăng lên rõ rệt. Độ ẩm và nhiệt độ của khối hạt tăng lên làm cho quá trình hô hấp của hạt càng mãnh liệt thêm và có thể dẫn đến tự bốc nóng của khối hạt.

Nếu khối hạt được bảo quản trong điều kiện kín, quá trình hô hấp yếm khí sẽ tạo ra rượu etylic làm ngộ độc phôi, nghĩa là hạt mất khả năng nảy mầm. Vì vậy hạt giống bao giờ cũng được bảo quản trong điều kiện thoáng.

Cường độ hô hấp của hạt ngũ cốc phụ thuộc vào hàng loạt yếu tố, trong đó độ ẩm và nhiệt độ của hạt đóng vai trò quan trọng nhất. Độ ẩm của hạt càng cao, hạt càng hô hấp mạnh.

Nhưng cũng cần nhấn mạnh rằng cường độ hô hấp của hạt chỉ tăng lên rõ rệt khi nào độ ẩm của hạt vượt quá một giới hạn nào đó. Độ ẩm giới hạn (bảo quản hạt ở độ ẩm giới hạn sẽ an toàn hơn) đối với hạt lương thực khoảng 14 - 15%, đối với hạt có dầu khoảng 8 - 9%.

Ở nhiệt độ 50 - 55°C cường độ hô hấp của hạt mạnh nhất. Ở nhiệt độ lớn hơn, cường độ hô hấp giảm xuống, đó là do protein bị biến tính, hạt bị mất sức sống.

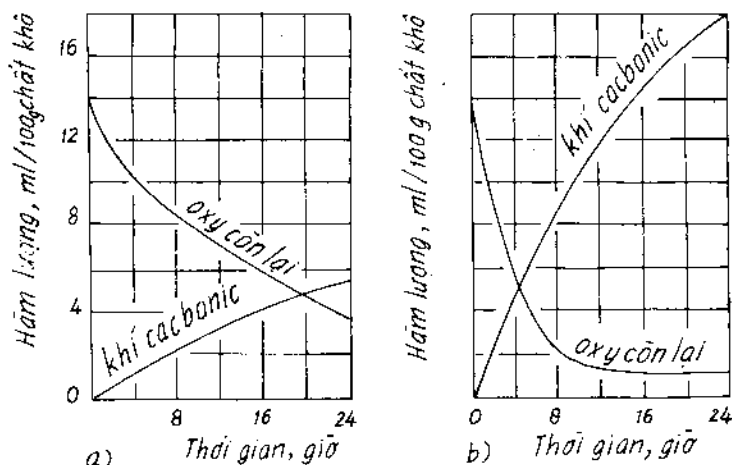
Ngoài ra trạng thái của bản thân hạt ngũ cốc có ảnh hưởng rõ rệt đến cường độ hô hấp. Nói chung là hạt càng kém phẩm chất thì càng hô hấp mạnh và càng khó bảo quản.

Quá trình hô hấp có thể coi là một quá trình tự xúc tác. Độ ẩm và nhiệt độ do hô hấp gây ra làm quá trình hô hấp càng mãnh liệt hơn. Và khối hạt cứ hô hấp như vậy cho đến khi hỏng hoàn toàn.

Do đó, biện pháp cơ bản để giữ hạt lâu là phải bảo quản hạt ngũ cốc ở trạng thái độ ẩm nhỏ hơn độ ẩm giới hạn và trong môi trường nhiệt độ bình thường.

IX.2.2. Quá trình chín sau thu hoạch

Sự chín sau xảy ra trong giai đoạn đầu của quá trình bảo quản hạt mới thu hoạch. Trong giai đoạn này sức sống của hạt, độ nảy mầm và năng lượng nảy mầm



Hình 9.8. Vận tốc tiêu thụ oxy và thải khí cacbonic của khối hạt khi bảo quản trong kho kín :

a - độ ẩm hạt 20% ; b - độ ẩm hạt 25%

của hạt được tăng lên, chất lượng của hạt trở nên tốt hơn (ví dụ, với lúa mì tỉ lệ gluten tươi và chất lượng gluten cũng tăng lên rõ rệt). Trong các hạt có dầu, chất béo được tiếp tục tổng hợp.

Toàn bộ các quá trình xảy ra trong hạt khi bảo quản có tác dụng làm hoàn thiện chất lượng hạt giống và tính chất, kỹ thuật của hạt được gọi là sự chín sau thu hoạch.

Hiện tượng chín sau thu hoạch rất phức tạp. Cho đến nay chưa có thể viết đầy đủ tất cả các quá trình sinh hóa xảy ra trong thời gian chín sau được.

Các hạt mới thu hoạch có độ nảy mầm rất thấp, điều này loài người đã thấy từ lâu. Nguyên nhân của hiện tượng trên được nhiều nhà nghiên cứu giải thích khác nhau. Có người cho rằng sự nảy mầm của hạt bị chậm là do các hợp chất hóa học (aldehyt axetic và aldehyt formic) tồn tại trong hạt mới thu hoạch. Người khác giải thích rằng đó là do chưa đầy đủ các men thủy phân trong phôi hạt, hoặc do độ thấm khí và thấm nước kém của hạt. Gần đây một số nhà bác học cho rằng độ nảy mầm thấp của hạt mới thu hoạch là do tình trạng khác thường của nguyên sinh chất trong tế bào phôi. Trong thời gian chín sau, do hoàn thiện các quá trình tổng hợp hoạt động enzym và giảm cường độ hô hấp, hạt bước vào giai đoạn chín sinh lý và ở trạng thái yên nghỉ.

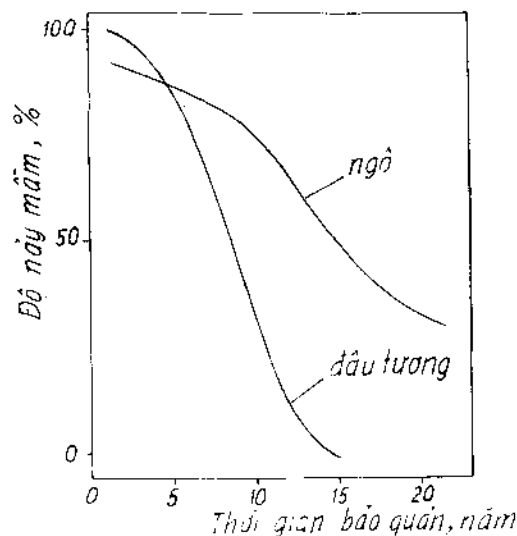
Độ ẩm, nhiệt độ, mức độ thoáng khí và thành phần không khí trong khối hạt có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả của quá trình chín sau.

Có thể khẳng định rằng, sự chín sau được tiến hành trong trường hợp các quá trình tổng hợp trong hạt ưu thế hơn các quá trình thủy phân. Điều này chỉ xảy ra khi hạt có độ ẩm thấp. Muốn cho quá trình chín sau được tiến hành tốt, cần phải bảo quản khối hạt ở trạng thái độ ẩm dưới độ ẩm giới hạn.

Trong thời gian chín sau, lượng chất hòa tan trong hạt giảm xuống, độ hoạt động của các enzym giảm dần, cường độ hô hấp của hạt yếu đi và trong hạt vẫn tiếp tục tổng hợp các hợp chất thành phần của hạt (tổng hợp protein từ các axit amin, tinh bột từ đường, chất béo từ các axit béo và glixerin, ...). Trong quá trình chín sau, đồng thời với sự tăng độ nảy mầm và năng lượng nảy mầm của hạt, còn kéo theo sự giảm độ hoạt động của amylaza, giảm hàm lượng nitơ phi protein, ...

Muốn rút ngắn quá trình chín sau thì tốt nhất là đem hạt tươi phơi nắng cho khô. Dùng không khí khô thổi vào đồng hạt để giảm độ ẩm, hoặc sấy hạt với nhiệt độ tác nhân sấy 45°C cũng có tác dụng rút ngắn thời gian chín sau.

Giai đoạn chín sau thường chỉ kéo dài trong vài tuần lễ, rồi hạt bước vào thời kỳ ổn định. Nhưng nếu bảo quản hạt quá lâu thì các tế bào phôi sẽ già đi và độ nảy mầm của hạt giảm xuống (h.9.9).



Hình 9.9. Sự thay đổi độ nảy mầm của hạt ngô và đậu tương theo thời gian bảo quản

IX.2.3. Sự nẩy mầm của hạt khi bảo quản

Trong thực tế bảo quản, người ta quan sát thấy không phải chỉ có sự tăng độ hoạt động sinh lý của khối hạt mà còn thấy có hiện tượng nẩy mầm cá biệt của một số hạt hoặc cả nhóm hạt trong góc nào đó của kho. Trong khi bảo quản hoàn toàn không cho phép để hạt nẩy mầm. Hạt nẩy mầm là do kết quả của sự bảo quản không đúng nguyên tắc.

Bảng 9.7. Sự thay đổi thành phần hóa học của hạt ngô khi nẩy mầm

Đối tượng nghiên cứu	Nitơ, %	Tinh bột dextrin và hemixelluloza, %	Đường, %	Chất béo, %	Tro, %	Xelluloza, %	Những chất khác, %
Hạt	2,5	73,95	0	5,36	1,80	5,98	2,72
Mầm	3,2	17,15	21,04	3,31	3,46	29,64	6,54

Để hạn chế hoặc tiêu diệt hiện tượng nẩy mầm trong quá trình bảo quản, cần phải biết tường tận các điều kiện nẩy mầm của hạt.

Như mọi người đều rõ, nước, không khí và nhiệt độ là các yếu tố cơ bản làm cho hạt có thể nẩy mầm.

Sự phát triển của hạt giống bắt đầu từ sự trương nở, nghĩa là quá trình vật lý trong đó nước được các phần tử keo hấp nước (chủ yếu là protein và tinh bột) hấp thụ, thể tích của hạt tăng lên. Mức độ trương nở, cũng như cường độ trương nở phụ thuộc vào thành phần hóa học của hạt, độ thấm thấu của vỏ và hàng loạt các điều kiện khác. Hạt giàu protein có thể hút nước đến 150%, hạt giàu glucit - 80%. Nhưng hạt có thể nẩy mầm với lượng nước nhỏ hơn lượng nước mà hạt có khả năng hấp thụ (40 - 70%).

Hạt có thể nẩy mầm ngay cả ở nhiệt độ dưới không độ. Ở nhiệt độ dương, hạt càng dễ nẩy mầm hơn. Do đó có thể nói rằng rất ít khi thấy nhiệt độ phát huy tác dụng hạn chế khả năng nẩy mầm của hạt khi bảo quản.

Trong điều kiện bảo quản thông thường, lượng không khí trong khối hạt đủ cho yêu cầu nẩy mầm của hạt. Nếu như không tính đến khả năng hạt có thể nẩy mầm trong bóng tối thì có thể rút ra kết luận : độ ẩm của hạt thấp là yếu tố cơ bản kìm hãm sự nẩy mầm.

Khi có nước rơi vào đồng hạt, mái kho đột hoặc có hiện tượng ngưng tụ nước ở một chỗ nào đó thì nơi đó có khả năng xảy ra sự nẩy mầm bộ phận.

Khi nẩy mầm, hạt hô hấp mãnh liệt, tỏa ra nhiều năng lượng hơn và tổn thất chất khô rõ rệt hơn. Trong hạt giàu tinh bột, khi nẩy mầm thì quá trình thủy phân tinh bột thành đường xảy ra rất mạnh. Quá trình chuyển tinh bột thành đường là do sự phục hồi hoạt động của amylaza. Theo Oparin, độ hoạt động của amylaza đạt giá trị cực đại sau khi hạt nẩy mầm 6 - 8 ngày. Độ hoạt động của enzym thủy phân protein cũng tăng lên, và xảy ra sự thủy phân protein đến pepton, peptin và

axitamin, đồng thời xảy ra cả quá trình phân hủy chất béo.

Và cuối cùng cấu tạo của hạt bị thay đổi, tế bào phôi phát triển và xuất hiện mầm.

Tóm lại, trong quá trình bảo quản nếu hạt nảy mầm sẽ có những ảnh hưởng không tốt sau đây :

- Tổn thất chất khô trong hạt ;
- Nhiệt lượng thoát ra có thể dẫn đến sự tăng nhiệt độ toàn khối hạt và làm mãnh liệt thêm quá trình sống của hạt ;
- Giảm chất lượng của hạt.

Và như vậy khối hạt không thể tiếp tục bảo quản an toàn được nữa.

IX.2.4. Quá trình gây đắng của sản phẩm chế biến

Quá trình gây đắng thường xảy ra trong khi bảo quản bột và gạo. Sự gây đắng có liên quan chặt chẽ với sự biến đổi của thành phần chất béo, là hậu quả của các quá trình thủy phân và oxy hóa. Sự phát sinh phát triển của các quá trình gây đắng trong bột phụ thuộc vào các điều kiện sau : chất lượng ban đầu của bột (hay nói cách khác chất lượng của hạt để chế biến ra bột), sự xâm nhập của không khí, nhiệt độ bảo quản, độ xâm nhập của tia nắng.

Bột chế biến từ các hạt chất lượng khác nhau có độ bền bảo quản không giống nhau. Bột chế biến từ hạt đã bị bốc nóng hoặc đã nảy mầm sẽ nhanh chóng bị đắng hơn là bột chế biến từ hạt có chất lượng bình thường. Đó là do trong các loại hạt kém phẩm chất nói trên có chứa một lượng khá lớn các axit béo tự do, enzym lipaza và lipoxydaza ở dạng hoạt động. Chất béo của bột chế biến từ hạt đã bốc nóng hoặc nảy mầm có chỉ số axit cao và rất dễ bị oxy hóa. Bột loại này bảo quản trong vòng ba tháng ở nhiệt độ khoảng 35°C hoặc 4 - 5 tháng ở nhiệt độ 20°C là đã thấy xuất hiện những dấu hiệu ban đầu của quá trình gây đắng. Bột chế biến từ hạt chất lượng bình thường có thể bảo quản 6 - 8 tháng vẫn chưa thấy có triệu chứng gì đặc biệt. Do đó nên bảo quản dài ngày các loại bột được chế biến từ hạt có chất lượng bình thường.

Trong trường hợp bảo quản thông thường, lượng không khí xâm nhập vào khối bột đủ để đáp ứng yêu cầu oxy hóa và gây đắng chất béo trong bột. Bột bị nén chặt thì khó xảy ra quá trình gây đắng. Chỉ có chất lượng ban đầu của bột và nhiệt độ thấp của không khí trong kho là có khả năng ngăn cản quá trình gây đắng. Người ta đã làm thí nghiệm bảo quản bột trong môi trường khí trơ và trong chân không thì thấy quá trình gây đắng không hề xảy ra.

Nhiệt độ cao của không khí trong kho làm cho quá trình gây đắng phát triển nhanh, đặc biệt là ở nhiệt độ 30 - 35°C. Ở nhiệt độ này, vận tốc của các phản ứng oxy hóa và thủy phân chất béo tăng lên rõ rệt.

Khác với các quá trình sinh hóa khác, độ ẩm của bột tăng có tác dụng kìm hãm quá trình oxy hóa chất béo và gây đắng sản phẩm. Đó là do độ ẩm cao đã ngăn cản sự xâm nhập của oxy vào chất béo. Nhưng cũng không nên bảo quản bột

ở độ ẩm cao, coi độ ẩm cao là yếu tố phòng tránh hiện tượng gây đắng, vì nếu làm như vậy thì các quá trình khác sẽ xảy ra mãnh liệt hơn và sản phẩm sẽ hỏng do chính các nguyên nhân khác. Hơn nữa, độ ẩm cao tạo điều kiện tốt cho vi sinh vật phát triển và làm hỏng sản phẩm nhanh hơn.

Tia nắng có tác dụng đẩy mạnh quá trình oxy hóa và gây đắng sản phẩm. Nhưng nếu bảo quản trong kho tốt thì hoàn toàn có thể tránh được tác hại này.

Ngoài ra tỉ lệ lấy bột trong quá trình chế biến cũng có quan hệ đến hiện tượng gây đắng. Trong khi nghiên cứu các hằng số hóa học của chất béo trong nội nhũ và phôi, người ta đã phát hiện thấy trong phôi hạt có những chất đặc biệt : những chất chống oxy hóa. Tỉ lệ lấy bột cao, nghĩa là trong bột có lẫn nhiều phần tử phôi hạt. Chính bột loại này ít bị đắng hơn bột thượng hạng và bột hạng nhất.

Nếu quá trình gây đắng mới chớm xuất hiện, sản phẩm làm từ bột chưa có vị đắng rõ rệt, nghĩa là bột vẫn còn dùng được. Khi thấy chỉ số axit của chất béo tăng lên đột ngột thì đó là dấu hiệu ban đầu của quá trình gây đắng và phải kịp thời xử lý bột ngay, không nên bảo quản lâu hơn nữa.

Sản xuất bột và gạo có qua giai đoạn chế biến nước nhiệt thì có thể tránh được hiện tượng sản phẩm bị đắng trong thời gian bảo quản.

IX.2.5. Quá trình chín của bột mì

Trong khi bảo quản bột mì thường thấy chất lượng của gluten và chất lượng bánh nướng thay đổi rất rõ rệt. Chất lượng gluten và chất lượng bánh nướng của bột mì thượng hạng và hạng nhất bảo quản trong vòng 2 - 4 tuần đầu ngay sau khi nghiền tăng lên khá rõ. Gluten trở nên đàn hồi hơn, ít nhão hơn, dẻo hơn và do đó chất lượng bánh nướng tốt hơn, thể tích của bánh lớn hơn và bánh xốp hơn. Quá trình tăng chất lượng gluten và chất lượng bánh nướng khi bảo quản được gọi là sự chín của bột mì. Vì sự chín chỉ xảy ra trong giai đoạn đầu bảo quản bột mì, nhất là 2 - 4 tuần đầu sau khi nghiền hạt thành bột, nên bột mì xuất xưởng bao giờ cũng cần có thời gian tàng trữ nhất định.

Sự tăng chất lượng gluten và chất lượng bánh nướng của bột mì trong giai đoạn chín có thể giải thích rằng sau khi nghiền trong bột bắt đầu xảy ra quá trình thủy phân chất béo nhờ tác dụng của enzym lipaza. Các axit béo chưa no tạo thành do kết quả thủy phân (axit oleic, axit linoleic, ...) có tác dụng mạnh mẽ đến protein gluten, làm gluten chặt hơn, và do đó mà gluten trở nên dẻo và đàn hồi hơn trước.

Ngoài ra sau mấy tuần lễ bảo quản đầu tiên bột mì trở nên trắng hơn so với lúc xuất xưởng. Thành phần sắc tố trong hạt chủ yếu là gồm caroten và xantofin. Caroten rất dễ bị oxy hóa để trở thành sản phẩm không màu (tạo thành các dẫn xuất của caroten). Bột sẽ trở nên trắng hơn nếu như trong đó đủ lượng oxy cần thiết. Thực nghiệm cho thấy rằng càng nhiều không khí xâm nhập vào khối bột thì bột càng mau chóng trở nên trắng hơn.

IX.3. SỰ THAY ĐỔI THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA HẠT NGŨ CỐC TRONG QUÁ TRÌNH CHẾ BIẾN RA GẠO VÀ BỘT

Qui trình công nghệ sản xuất các loại gạo bao giờ cũng bắt đầu từ khâu làm sạch tạp chất, sau đó là xay (bóc vỏ) để tách trấu, rồi đến xát để thu thành phẩm (gạo trắng). Tùy theo chất lượng nguyên liệu ban đầu, hiệu suất kỹ thuật của thiết bị, mức độ hợp lý của dây chuyền sản xuất, trình độ quản lý kỹ thuật của kỹ sư và công nhân mà thành phẩm thu được có chất lượng cao hay thấp rất khác nhau.

Sau quá trình làm sạch, hàm lượng chất béo và protein của hạt lúa thực tế không có gì thay đổi (bảng 9.8). Riêng hàm lượng tro giảm là do trong nguyên liệu đầu được loại ra các tạp chất khoáng, hàm lượng xelluloza giảm chủ yếu do râu thóc đã được tách bỏ đi.

Bảng 9.8. Sự thay đổi thành phần hóa học của thóc trong quá trình làm sạch

Tên sản phẩm	Hàm lượng, % theo chất khô			
	protein N _{6,25}	chất béo	tro	xenluloza
Thóc trước khi làm sạch	7,28	2,33	5,24	9,64
Thóc sau khi làm sạch	7,25	2,33	5,06	9,43

Sau khi xay, trấu được tách ra và người ta thu lấy gạo xay. Thành phần hóa học của gạo xay và trấu được ghi ở bảng 9.9.

Bảng 9.9. Thành phần hóa học của các sản phẩm sau khi xay

Tên sản phẩm	Hàm lượng, % theo chất khô			
	protein N _{6,25}	chất béo	tro	xelluloza
Gạo xay nguyên	8,76	1,87	1,42	0,84
Tấm xay	8,56	1,88	1,63	1,221
Cám xay	11,48	9,40	11,85	19,09
Trấu	3,09	0,69	20,32	49,15

Xát gạo nhằm mục đích tách đến mức tối đa các lớp vỏ quả, vỏ hạt và alorông. Tùy theo cường độ xát (mức bóc cám) cao hay thấp mà thành phần hóa học của gạo thành phẩm khác nhau khá nhiều.

Bảng 9.10. Sự thay đổi thành phần hóa học của gạo theo mức độ xát

Tên sản phẩm	Hàm lượng, % theo chất khô				
	protein	chất béo	tinh bột	tro	xelluloza
Gạo lứt (xay)	8,6 - 10,1	1,5 - 2,0	76,8 - 82,5	1,32 - 1,70	0,86 - 1,60
Gạo xát 1 lần	8,1 - 9,9	1,4 - 1,9	78,4 - 85,8	1,20 - 1,40	0,6 - 1,2
Gạo xát 2 lần	7,9 - 9,6	1,3 - 1,6	80,0 - 87,1	1,10 - 1,26	0,5 - 1,1
Gạo xát 3 lần	7,8 - 9,4	1,0 - 1,1	83,0 - 88,0	0,98 - 1,14	0,4 - 0,8
Gạo xát 4 lần	7,7 - 9,3	0,7 - 0,9	84,5 - 89,0	0,70 - 0,98	0,2 - 0,5
Gạo xát 5 lần	7,6 - 9,2	0,5 - 0,6	90,8	0,48 - 0,72	0,1 - 0,4

Gạo càng xát kỹ thì hàm lượng xelluloza càng thấp và như vậy độ tiêu hóa của gạo sẽ tăng. Nhưng do quá trình xát đã loại đi các lớp vỏ và một phần lớp alorông nên hàm lượng protein và chất béo trong gạo cũng giảm đi. Và đặc biệt là hàm lượng các vitamin giảm đi rất rõ rệt. Theo Williams V và Fieger E.A thì trong quá trình xát gạo lượng vitamin có thể mất đi đến 56 - 81% tùy theo từng loại gạo.

Thành phần hóa học của gạo không những chỉ phụ thuộc nhiều vào mức độ xát mà còn phụ thuộc vào giống hạt nữa. Bảng 9.11 nêu lên thành phần hóa học và một số đặc tính của một vài loại gạo thường gặp.

Bảng 9.11. Thành phần hóa học và đặc tính của một số loại gạo

Các chỉ số	Loại gạo			
	tám thơm	chìem chanh	Mộc tuyền	nếp cái
Nước				
Nitơ chung, % theo chất khô	12,0	11,50	12,20	11,80
trong đó nitơ hòa tan, % theo chất khô	1,13	1,34	1,25	1,29
Đường chung, % theo chất khô	0,15	0,10	0,10	0,08
trong đó đường khử, % theo chất khô	0,71	0,92	0,87	0,71
	0,19	0,13	0,16	0,21
Tinh bột, % theo chất khô	85,00	83,00	82,40	84,80
Dextrin, % theo chất khô	0,70	0,95	0,72	2,20
Xelluloza, % theo chất khô	0,46	0,53	0,45	0,49
Tro, % theo chất khô	0,72	0,70	0,72	0,61
Vitamin B ₁ , mg %	-	0,050	0,068	-
Vitamin B ₂ , mg %	-	0,012	0,024	-
Thời gian nấu, phút	27-30	30-33	27-30	27-30
Hệ số nở của cơm, $V_{\text{com}}/V_{\text{gao}}$	3,76	4,62	4,11	3,80

Nói chung về mặt thành phần hóa học thì giữa gạo tẻ và gạo nếp không khác nhau nhiều lắm. Riêng thành phần của tinh bột gạo nếp và gạo tẻ thì có khác nhau rõ rệt. Trong tinh bột gạo tẻ hàm lượng amiloza vào khoảng 18 – 26%, trong tinh bột gạo nếp hầu như chỉ có amilopectin. Trong quá trình xát gạo, hàm lượng amiloza của tinh bột gạo tăng lên, như vậy có nghĩa là tinh bột ở lớp ngoài của hạt gạo có chứa ít amiloza hơn các lớp trong (bảng 9.12).

Bảng 9.12. Sự thay đổi hàm lượng amiloza trong quá trình xát gạo

Loại gạo	Hàm lượng amiloza. % theo tinh bột của thóc			
	tám thơm	chiêm chanh	Mộc tuyền	nếp cái
Gạo xay (lát)	17,8	25,2	19,2	rất ít
Gạo xát	18,3	26,3	21,0	rất ít

Gạo ngô (ngô mảnh) được loài người sử dụng từ rất lâu. Để có thể bảo quản ngô mảnh được lâu, trong dây chuyền sản xuất người ta cố gắng dùng mọi biện pháp để tách phôi càng nhiều càng tốt. Phôi ngô chiếm đến 80% lượng chất béo của toàn hạt. Chất béo trong phôi ngô dễ bị oxy hóa trong thời gian bảo quản và gây nên mùi ôi khét làm giảm chất lượng của sản phẩm. Trong gạo ngô, nếu tách phôi tốt, thì chỉ còn chứa khoảng dưới 1% chất béo. Thành phần của ngô mảnh chủ yếu là tinh bột.

Bảng 9.13. Thành phần hóa học của hạt ngô và gạo ngô

Loại ngô	Hàm lượng, % theo chất khô				
	protein	tinh bột	chất béo	xelluloza	tro
Ngô hạt	11,30	64,20	7,20	2,05	1,05
Ngô mảnh	9,40	86,40	0,88	0,80	0,31

Quy trình kỹ thuật sản xuất bột thường gồm có : làm sạch tạp chất, làm ẩm hạt và nghiền. Tùy theo yêu cầu chất lượng thành phẩm mà có thể dùng các phương pháp nghiền khác nhau, nghiền một lần (không tách cám) và nghiền nhiều lần (có tách cám). Nghiền một lần thường được thực hiện trên các loại cối nghiền hoặc máy nghiền búa. Nghiền một lần thì bột thu được có chất lượng kém. Phương pháp nghiền nhiều lần có hai dạng : nghiền đơn giản và nghiền phức tạp. Nghiền nhiều lần thường được thực hiện trên các loại máy nghiền đôi trục. Các dạng nghiền nhiều lần có thêm khâu làm giàu sản phẩm trung gian, có thể tách riêng nội nhũ khỏi vỏ và phôi, do đó lấy được nhiều loại bột chất lượng khác nhau (bột thượng hạng, bột hạng nhất, bột hạng hai).

Bảng 9.14. Thành phần hóa học của các sản phẩm nghiền từ lúa mì (% theo chất khô)

Tên sản phẩm	Tỉ lệ lấy bột	Tro, %	Xelluloza, %	Pentozan, %	Tinh bột, %	Chất béo, %	Gluten, %		
							ướt	khô	protein
Hạt	100	1,74	1,51	6,42	62,99	2,06	42,74	15,16	12,51
Bột thượng hạng	10,14	0,47	0,13	1,57	80,10	0,99	39,16	11,58	10,33
Bột hạng nhất	22,40	0,53	0,22	1,84	77,84	1,20	43,21	12,90	11,15
Bột hạng hai	47,50	1,20	0,48	3,44	72,52	2,02	48,42	16,95	14,80
Cám	18,40	5,40	8,35	22,02	13,80	4,77	không có	không có	16,17

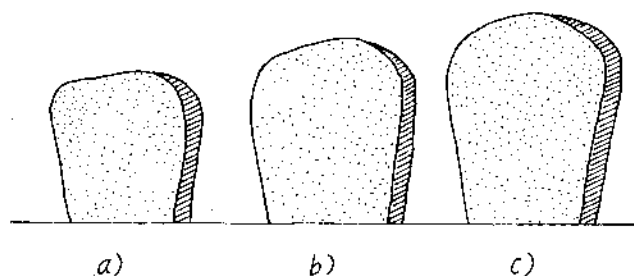
Qua bảng trên ta thấy bột mì thượng hạng được lấy từ phần nội nhũ tinh khiết nên chứa rất ít xelluloza và pentozan. Trong bột mì loại này tinh bột chiếm tỉ lệ cao nhất, tro và chất béo chiếm tỉ lệ thấp nhất so với bột hạng nhất và hai.

IX.4. NHỮNG BIẾN ĐỔI HÓA SINH TRONG QUÁ TRÌNH CHẾ BIẾN NƯỚC NHIỆT CÁC LOẠI HẠT NGŨ CỐC

Kỹ thuật chế biến nước nhiệt đã được áp dụng từ rất lâu trong công nghiệp sản xuất bột mì. Trong quá trình chế biến nước nhiệt, tính chất của hạt lương thực bị biến đổi cả về mặt hóa lý lẫn sinh hóa. Vỏ hạt mì dai hơn so với nội nhũ, do đó dễ tách vỏ hơn, tỉ lệ lấy bột được nâng cao và chất lượng bột mì cũng tốt hơn (bảng 9.15).

Theo kết quả nghiên cứu của nhiều nhà bác học thì bột đã qua chế biến nước nhiệt có độ tro thấp hơn so với bột chế biến thông thường là 0,05 - 0,15%, năng lượng tiêu hao cho quá trình nghiền giảm được 8 - 15%, chất lượng gluten được tăng lên và do đó bánh nở hơn.

Gạo đồ (gạo làm từ thóc đã qua chế biến nước nhiệt) được sản xuất từ lâu và phổ biến ở các nước Ấn Độ, Miến Điện, Srilanca, Malaixia. Theo tài liệu của Roberts R.L. thì khoảng 1/5 sản lượng lúa của thế giới được qua chế biến nước nhiệt, và



Hình 9.10. Ảnh hưởng của quá trình chế biến nước nhiệt đến thể tích bánh mì

a- mẫu đối chứng ; b- mẫu chế biến nước nhiệt theo phương pháp lạnh ; c- mẫu chế biến nước nhiệt theo phương pháp nóng

chủ yếu là chế biến theo phương pháp thủ công. Ở nước ta và Trung Quốc cũng đã có nhiều địa phương làm gạo dẻo

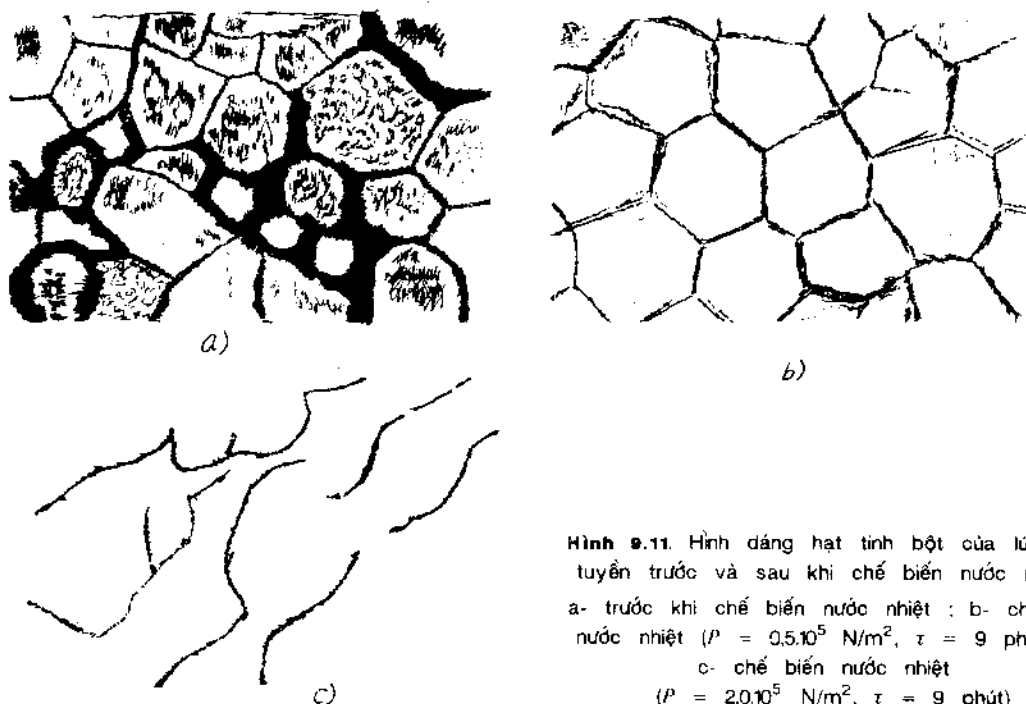
Bảng 9.15. Sự thay đổi chất lượng bột mì khi chế biến nước nhiệt

Tên sản phẩm	Độ tro của bột, %	Chất lượng gluten		Độ hoạt động diastaza, maltoza/10g bột	Khả năng tạo khí của bột nhào, ml/100g bột	Thể tích bánh, ml/100g bột	Màu sắc của bột (đơn vị sắc kế)
		độ căng riêng, cm/phút	thời gian, đo độ dẻo, phút				
Bột bình thường độ ẩm 12,9%	0,95	160	48	212,5	1562	325	63
Bột qua chế biến nước nhiệt theo phương pháp lạnh với độ ẩm 16,5%	0,78	166	40	160,0	1296	377	41
Bột qua chế biến nước nhiệt theo phương pháp nóng với độ ẩm 16,5% nhiệt độ 50°C, thời gian 45 phút	0,70	100	55	152,5	1276	387	35

Quy trình sản xuất gạo dẻo gồm có các khâu chủ yếu sau đây. Thóc sạch đem ngâm (bằng nước lạnh hoặc nước nóng) đến độ ẩm khoảng 25 - 30%, sau đó hấp bằng hơi nước. Tùy theo trình độ sản xuất (thủ công hoặc cơ khí) mà các điều kiện hấp có khác nhau (áp suất hơi, thời gian hấp, ...). Tiếp đó, thóc đã được phơi hoặc sấy đến độ ẩm vào khoảng 13% (trước khi sấy có thể qua giai đoạn ủ nóng) và rồi đem xay xát để lấy gạo.

Thóc đã qua chế biến nước nhiệt rồi đem xay xát thì tỉ lệ thu hồi gạo thành phẩm tăng 2,5 - 4,0%, tỉ lệ tấm giảm đi rất rõ rệt (3,5 - 17,0%). Ngoài ra thóc dẻo dễ xay (bóc vỏ) hơn nhiều so với thóc chưa dẻo.

Về mặt biến đổi sinh hóa cũng đã có rất nhiều công trình nghiên cứu (Rao W., Kik M.C., Sreenivisan A., Ginzburg M.E., ...). Sự sắp xếp và hình dáng các hạt tinh bột trong tế bào bị thay đổi tùy theo các thông số kỹ thuật của quá trình chế biến nước nhiệt. Trong hạt lúa chưa dẻo, các hạt tinh bột sắp xếp không thứ tự, giữa các hạt tinh bột với nhau có những khe hở lớn và bên cạnh các hạt tinh bột đa diện có lác đác những hạt tròn hoặc bầu dục. Trong tế bào hạt lúa đã qua chế biến nước nhiệt ($P = 0,5.10^5 \text{ N/m}^2$ và $\tau = 9$ phút) các hạt tinh bột được nằm thứ tự và khít với nhau hơn, và người ta thấy rõ các hạt tinh bột gạo được xếp thành từng chùm. Trong trường hợp đổ lúa với áp suất cao ($P = 2,0.10^5 \text{ N/m}^2$, $\tau = 9$ phút) thì các hạt tinh bột bị vỡ ra và mất hình dáng ban đầu.



Hình 9.11. Hình dáng hạt tinh bột của lúa mộc
tuyền trước và sau khi chế biến nước nhiệt :
a- trước khi chế biến nước nhiệt ; b- chế biến
nước nhiệt ($P = 0,5 \cdot 10^5 \text{ N/m}^2$, $\tau = 9$ phút) ;
c- chế biến nước nhiệt
($P = 2,0 \cdot 10^5 \text{ N/m}^2$, $\tau = 9$ phút)

Trong quá trình chế biến nước nhiệt một số vitamin phân bố ở các lớp ngoài của hạt được chuyển dịch dần vào trong nội nhũ. Do đó hàm lượng vitamin của gạo đổ tăng lên so với gạo thường (lượng vitamin B_1 tăng khoảng ba lần, B_2 tăng 1,5 lần và PP tăng hai lần). Do sự hồ hóa tinh bột và sự biến tính protein nên hạt gạo đổ hút nước kém hơn gạo thường. Dưới tác dụng của nhiệt độ cao khi hấp lúa, các men trong hạt bị tiêu diệt nên gạo đổ có khả năng bảo quản lâu hơn gạo chưa đổ. Cũng do sự hồ hóa tinh bột trong quá trình đổ thóc mà độ dính của hồ tinh bột gạo đổ giảm xuống. Thời gian nấu cơm của gạo đổ giảm được 30% và cơm nở nhiều hơn so với gạo thường.

Bảng 9.16. Sự thay đổi tính chất của gạo đổ

Giống lúa	Chế độ gia nhiệt		Độ dính của hồ tinh bột. Ngiây/m ²	Thời gian nấu cơm, phút	Độ nở của cơm
	áp suất hơi, $P \cdot 10^5 \text{ N/m}^2$	thời gian, phút			
Tám thơm	0	0	$1225 \cdot 10^{-6}$	27 - 30	3,76
	10	12	$1136 \cdot 10^{-6}$	18 - 21	5,26
Mộc tuyền	0	0	$1156 \cdot 10^{-6}$	27 - 30	4,11
	10	12	$1127 \cdot 10^{-6}$	18 - 21	5,86
Nếp cái	0	0	$1333 \cdot 10^{-6}$	27 - 30	3,80
	10	12	$1176 \cdot 10^{-6}$	21 - 24	5,00

Một nhược điểm rõ nét của phương pháp chế biến nước nhiệt là hạt gạo dễ bị sẫm màu. Hiện tượng sẫm màu là do phản ứng tạo thành hợp chất melanoidin (phản ứng giữa đường khử và axit amin) trong quá trình chế biến nước nhiệt.

Áp suất đồ lúa càng cao, thời gian đồ càng lâu thì màu của hạt gạo càng sẫm lại.

IX.5. NHỮNG BIẾN ĐỔI HÓA SINH TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT BÁNH MÌ

Qui trình sản xuất bánh mì thường bao gồm sáu khâu chính : nhào bột, lên men, chia bột, vê bánh, tạo hình và nướng. Những biến đổi hóa sinh của bột mì trong từng khâu sản xuất cũng không giống nhau.

Mục đích của quá trình nhào bột với nước, muối và nấm men (đôi khi tùy loại bánh có thể thêm mỡ, đường, ...) là để thu được một khối bột nhào đồng nhất. Trong khi nhào, protein và tinh bột hút nước, trương lên và kết lại thành khối cùng với các cấu tử khác. Lượng oxy xâm nhập vào bột tùy theo cường độ nhào và chất lượng của bột (tinh bột, gluten, chất béo, các chất hòa tan).

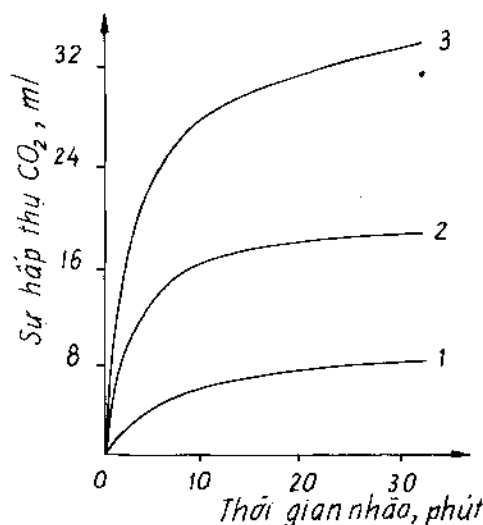
Hợp chất protein của bột đóng vai trò chủ yếu để tạo thành độ đàn hồi và độ dẻo

của khối bột nhào. Các hợp chất protein không tan trong nước, hút nước trương lên và tựa như bị căng ra tạo nên màng hoặc mạng dây bền chắc chắn. Do đó khối bột nhào có tính dai và đàn hồi. "Bộ xương" cấu tạo từ protein đó được gọi là gluten. Tinh bột cũng hút nước nhưng thể tích tăng không đáng kể (trong trường hợp độ ẩm của bột nhào khoảng 42%).

Sự lên men bắt đầu ngay từ khi nhào bột và tiếp tục trong các khâu chia bột, vê bánh, tạo hình, và ngay cả giai đoạn đầu của quá trình nướng bánh. Mục đích của quá trình lên men là tạo cho bánh có độ xốp và tăng mùi vị của bánh.

Nấm men bánh mì thuộc chủng *Saccharomyces cerevisiae*.

Trong quá trình lên men bột nhào thì sự lên men rượu đóng vai trò chủ yếu. Các monosacarit chuyển hóa thành rượu và khí cacbonic. Phân tử đường hexoza phân hủy thành hai phân tử rượu etylic và hai phân tử khí cacbonic. Phức hệ enzym dùng trong bánh mì có khả năng phân hủy tất cả các loại đường cơ bản trong bột nhào (glucoza, fructoza, sacaroza, maltoza). Glucoza và fructoza bị phân hủy trực tiếp. Sacaroza chuyển thành glucoza và fructoza nhờ enzym sacaraza. Vận tốc chuyển hóa sacaroza bằng enzym sacaraza rất lớn, chỉ vài phút sau khi nhào bột là tất cả lượng



Hình 9.12. Ảnh hưởng của chất lượng bột mì đến sự hấp thụ oxy trong bột nhào :

1- bột mì thượng hạng ; 2- bột mì hạng nhất ; 3- bột mì hạng hai

sacaroza đều được chuyển thành glucoza và fructoza. Phân tử maltoza cũng phân thành hai phân tử glucoza nhờ tác dụng của enzym maltaza. Sacaroza và maltoza được tạo thành do các enzym thủy phân tinh bột hoạt động trong quá trình lên men bột nhào.

Lượng khí cacbonic tích tụ trong khối bột nhào tạo nên những túi khí. Bộ xương gluten có tác dụng giữ các túi khí cacbonic, do đó khối bột trở nên xốp và thể tích tăng lên rõ rệt.

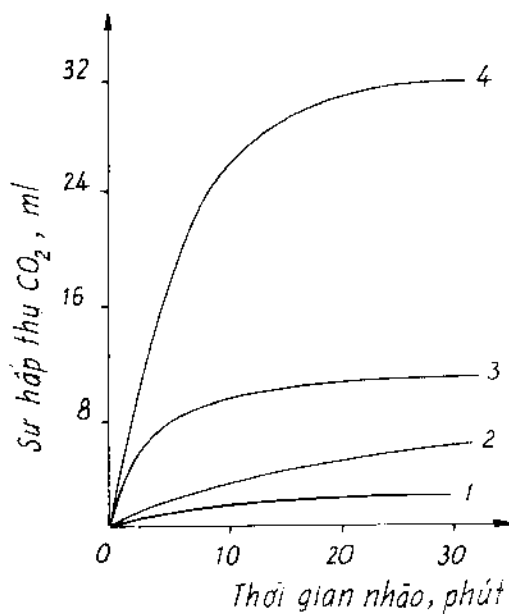
Ảnh hưởng đến vận tốc của quá trình lên men rượu có các yếu tố sau: nhiệt độ khối bột nhào, nồng độ ion H^+ , các vitamin (B_1 , B_2 , PP, ...), các chất khoáng cần cho sự sống của tế bào nấm men, hợp chất nitơ để nấm men tiêu hóa, ...

Trong quá trình lên men, độ axit của bột nhào tăng lên. Độ axit (pH) của bột nhào trong thời gian lên men thay đổi từ 6,0 đến 5,0. Đó là do trong khi lên men có một số axit được tạo thành như các axit lactic, axetic, xitric, formic, tartric, suxinic, malic và một vài axit hữu cơ khác, trong đó axit lactic và axit axetic được tích tụ nhiều hơn cả (trên 2/3 lượng axit nói chung).

Sự thay đổi độ axit của bột mì trong thời gian lên men có ý nghĩa khá lớn. Quá trình trương và peptin hóa các hợp chất protein trong bột được tăng cường khi độ axit tăng. Độ axit còn ảnh hưởng đến tác dụng của enzym trong khối bột nhào. Vị và mùi thơm của bánh cũng là do trong khối bột được tích tụ axit, một số aldehyt, các sản phẩm tác dụng tương hỗ giữa axit axetic và các thành phần khác có trong bột. Axit lactic làm cho bánh có vị dễ chịu, trái lại axit axetic và một số axit bay hơi khác làm cho bánh có vị khó chịu.

Trong quá trình lên men protein trong bột nhào không chỉ thay đổi trạng thái (trương lên) mà còn bị thủy phân. Đó là do trong men bánh mì có chứa một lượng khá lớn glutation có khả năng hoạt hóa proteinaza trong bột. Màu của vỏ bánh một phần cũng do sự tạo thành hợp chất melanoidin (kết quả của sự tác dụng giữa đường khử và sản phẩm thủy phân protit).

Trong bảng 9.17 trình bày thành phần của bột làm bánh mì và vai trò của các thành phần đó.



Hình 9.13. Ảnh hưởng của các cấu tử trong bột mì đến sự hấp thụ oxy khi nhào:

- 1- không có các chất hòa tan; 2- không có chất béo; 3- không có gluten; 4- có tất cả các cấu tử

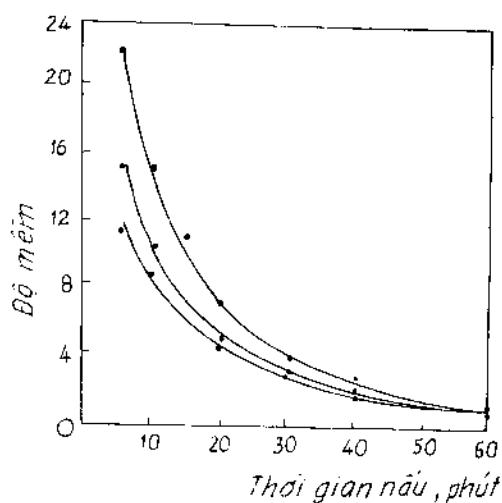
Bảng 9.17. Những cấu tử thành phần

Những cấu tử thành phần	Khối lượng	Vai trò
Bột mì	0	Nguồn gluten, tinh bột, chất béo, ...
Nước	50 - 65	
Muối ăn	2	Vị, làm dai gluten
Men bánh mì (levure)	2	Lên men
Bột mầm (malt)	0,5	Nguồn amilaza và proteaza
Muối amon	0,5	Cơ chất của men bánh mì
Đường (sacaroza hoặc glucoza)	6	Vị, màu sắc, cơ chất của men bánh mì
Sữa bột đã tách bơ	6	
Chất béo (este của sacaroza hoặc lactoza và axit béo)	4	Mùi vị, màu sắc
Canxi propionat	0,2	Tăng độ đàn hồi
Vitamin và muối khoáng	vết	Chất chống nhiễm khuẩn Làm giàu giá trị dinh dưỡng

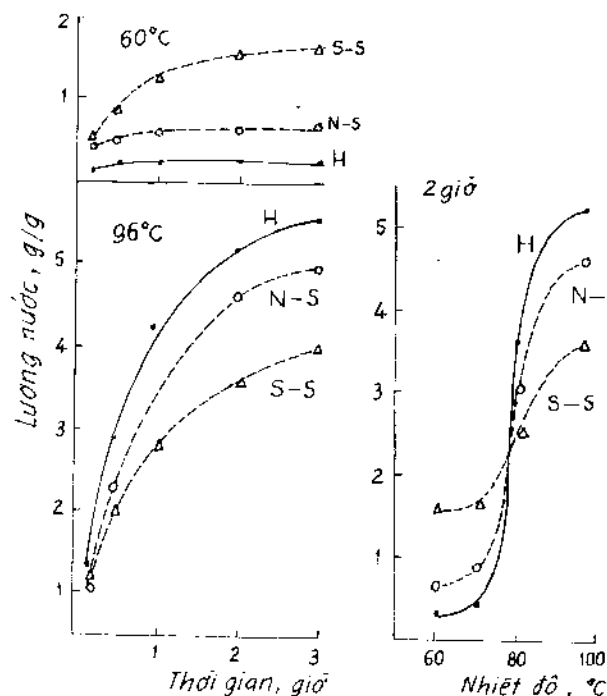
IX.6. NHỮNG BIẾN ĐỔI HÓA SINH CỦA HẠT GẠO TRONG QUÁ TRÌNH NẤU

Trong quá trình nấu, ở hạt gạo đồng thời xảy ra nhiều quá trình biến đổi hóa sinh phức tạp, ba quá trình sau đây là phổ biến nhất.

IX.6.1. Sự hút nước của các cấu tử thành phần trong hạt gạo



Hình 9.14. Ảnh hưởng của thời gian nấu đến độ mềm của cơm (bằng máy đo Instron).

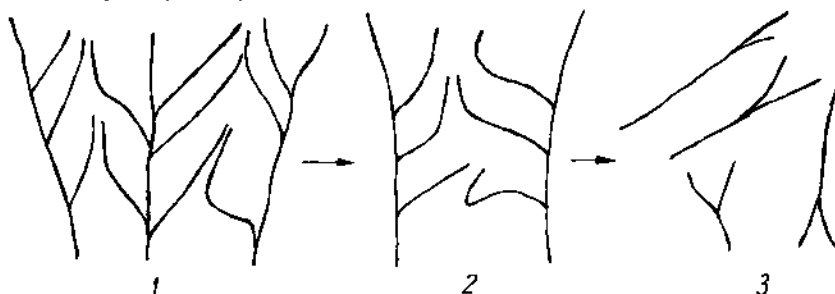


Hình 9.15. Sự hút nước, sự chín bán phần và sự chín hoàn toàn của cơm theo nhiệt độ và thời gian khác nhau: H- hút nước; N-S- chín bán phần; S-S- chín hoàn toàn.

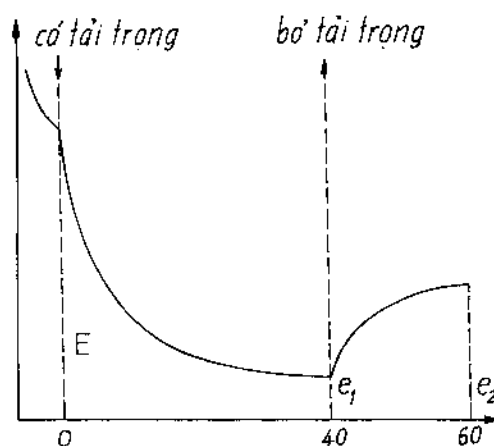
Trong quá trình nấu, do tác dụng đồng thời của nước và nhiệt mà hạt gạo hút nước rất mạnh. Vận tốc hút nước của từng cấu tử thành phần rất khác nhau. Kết quả cuối cùng là hạt gạo trương nở, có cấu trúc mềm dần. Độ mềm của hạt gạo phụ thuộc vào lượng nước và thời gian nấu. Lượng nước do hạt gạo hút vào cũng phụ thuộc nhiệt độ nước và thời gian nấu (h.9.14 và h. 9.15).

IX.6.2. Sự hồ hóa tinh bột gạo

Hạt gạo mềm ra và tăng độ dẻo sau khi nấu. Dưới tác dụng của nhiệt độ cao, với lượng nước ở mức độ nào đó các phần tử tinh bột bị hồ hóa. Độ dẻo tăng lên rõ rệt (h.9.16). Các phần tử tinh bột trương nở và tách xa nhau dần dần theo thời gian chịu tác dụng của nhiệt độ cao (h.9.17)



Hình 9.17. Các giai đoạn keo hóa của tinh bột



Hình 9.18. Biểu đồ nhớt kế của cơm

IX.6.3. Sự khuếch tán một số chất hòa tan trong môi trường nấu

Các chất có khả năng hòa tan trong môi trường nước sẽ khuếch tán vào môi trường nấu. Thời gian nấu càng kéo dài thì hàm lượng các chất hòa tan cũng tăng dần. Trong giai đoạn đầu của quá trình nấu, do hàm ẩm của phần phía trong hạt gạo thấp hơn ở phía ngoài nên một số chất hòa tan có xu hướng đi vào phía trong, sau đó quá trình xảy ra theo chiều ngược lại, các chất hòa tan đi vào môi trường nấu.

Các quá trình hóa sinh học xảy ra trong hạt gạo trong khi nấu cơm diễn ra khá phức tạp, nhiều biến đổi hóa sinh xen kẽ và đan chéo nhau. Trên đây mới chỉ đề cập đến ba loại biến đổi có tính tổng hợp kết quả, chưa đi sâu vào từng quá trình riêng biệt.

HÓA SINH HỌC CÁC QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT LÊN MEN

X.1. KHÁI NIỆM CHUNG

Sự lên men theo nghĩa rộng là quá trình trao đổi chất, qua đó các chất hữu cơ mà trước tiên là đường bị biến đổi dưới tác dụng của các enzym của vi sinh vật. Dựa vào cơ chế của quá trình, có thể chia ra : lên men yếm khí và lên men hiếu khí. Lên men yếm khí là quá trình phân giải bằng enzym các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản mà không có sự tham gia của oxy phân tử. Ví dụ, lên men rượu, lên men axetonbutylic, lên men lactic, ... Lên men hiếu khí cũng là quá trình phân giải đường thành các hợp chất đơn giản nhưng cần phải có oxy tự do. Ví dụ, lên men axetic, lên men xitric, ...

Trong sản xuất lên men, người ta thường dùng các vi sinh vật khác nhau : nấm mốc, nấm men và vi khuẩn. Dựa vào tác nhân cung cấp hệ enzym người ta chia ra ba nhóm sản xuất lên men chính :

- Lên men ứng dụng nấm men : như trong sản xuất rượu etylic, glixerin, sản xuất bia, rượu vang và nấm men bánh mì ;
- Lên men ứng dụng vi khuẩn : như trong sản xuất axetonbutylic, axit axetic, axit lactic, axit butiric, butilenglicol ;
- Lên men ứng dụng nấm mốc : như trong sản xuất axit xitric, axit gluconic, axit fumaric, penixilin, streptomixin.

Các sản phẩm thu được của các quá trình lên men cũng khác nhau và đa dạng. Dựa vào tính chất của các sản phẩm người ta thường chia ra : công nghiệp lên men cổ điển và công nghiệp lên men hiện đại. Công nghiệp lên men cổ điển là những ngành sản xuất lên men qua đó người ta thu được những sản phẩm có phân tử lượng nhỏ hơn chất "khởi thủy" trong nguyên liệu. Một đặc điểm nữa của lên men cổ điển là có thể thay thế bằng phương pháp hóa học. Ví dụ như sản xuất rượu, sản xuất axetonbutylic, ... Thực chất của quá trình là những 'phản ứng dị hóa.

Với công nghiệp lên men hiện đại, các sản phẩm thu được phức tạp hơn, khác xa về bản chất với chất "khởi thủy" trong nguyên liệu và không thể thay thế bằng phương pháp hóa học. Về thực chất, các quá trình ở đây là những phản ứng tổng hợp. Ví dụ, sản xuất vitamin, kháng sinh, axitamin, protein bằng con đường sinh tổng hợp.

X.2. BẢN CHẤT CỦA CÁC QUÁ TRÌNH LÊN MEN

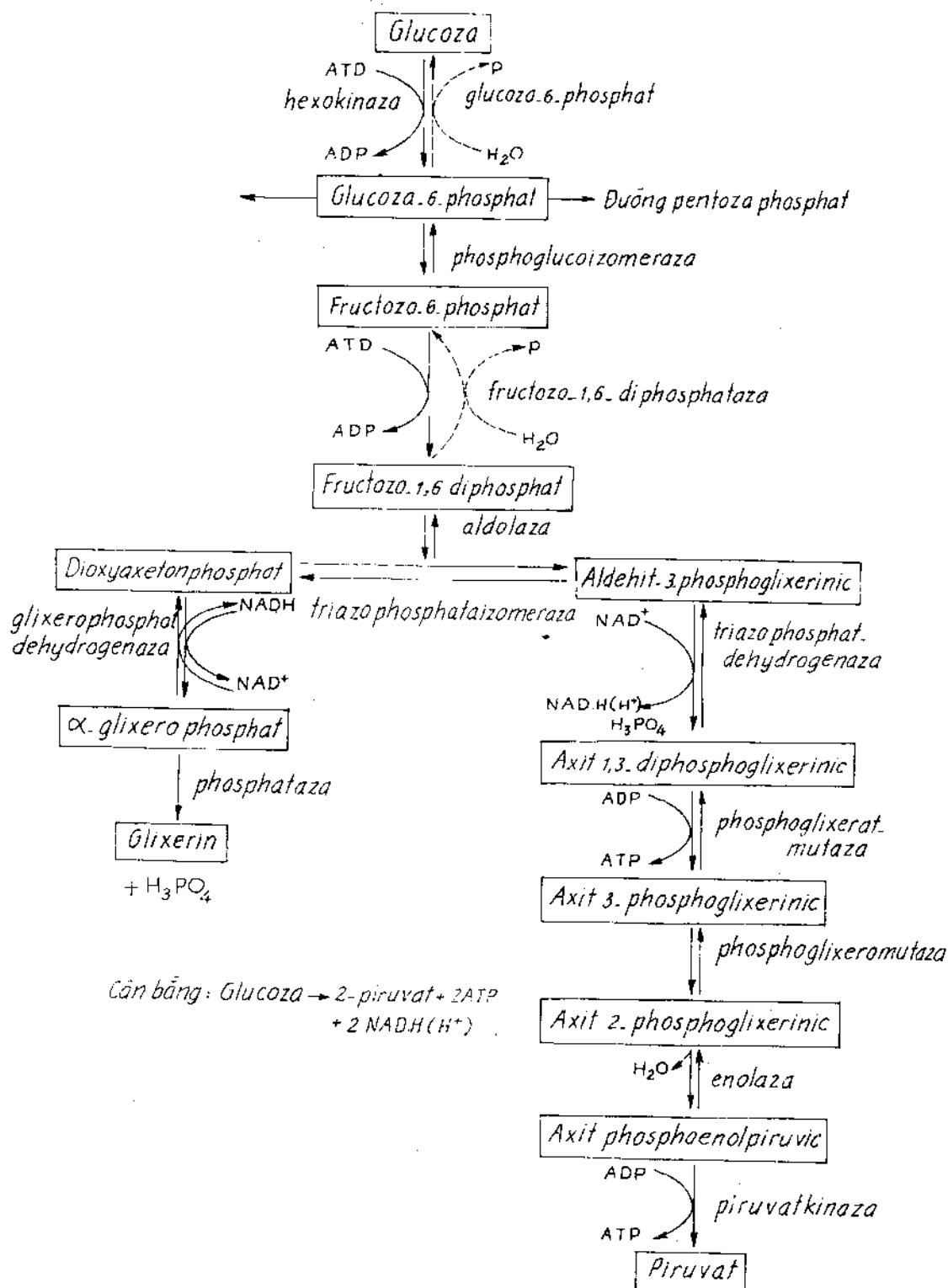
X.2.1. Lên men là quá trình oxy hóa - khử sinh học để thu năng lượng và các hợp chất trung gian

Chúng ta đều biết, mọi quá trình muốn tiến hành được đòi hỏi phải có năng lượng. Để thực hiện được các hoạt động sống như sinh trưởng, sinh sản và phát triển của mình, vi sinh vật cũng đòi hỏi phải có năng lượng. Lên men là quá trình cung cấp năng lượng và các hợp chất trung gian cho tế bào vi sinh vật. Nhưng tế bào sống chỉ sử dụng năng lượng dưới dạng hóa năng tàng trữ trong mạch cacbon và được giải phóng ra trong các phản ứng enzym do sự chuyển electron từ mức năng lượng này sang mức năng lượng khác. Các phản ứng sinh hóa xảy ra trong các quá trình lên men là những phản ứng chuyển hydro. Nhưng sự chuyển hydro cũng tương đương với sự chuyển electron, vì lẽ nguyên tử hydro có thể tách ra thành proton H^+ và electron. Các enzym xúc tác quá trình tách nguyên tử hydro khỏi cơ chất gọi là enzym dehydrogenaza. Như vậy, lên men là quá trình oxy hóa - khử có enzym xúc tác hay nói cách khác là quá trình oxy hóa - khử sinh học. Trong quá trình đó, các nguyên tử cacbon của cơ chất bị oxy hóa đến CO_2 , còn các nguyên tử hydro tách ra khỏi cơ chất, đầu tiên được chuyển đến NAD^+ , sau đó từ $NADH_2$ trong điều kiện yếm khí hydro có thể được chuyển đến những sản phẩm trung gian khác nhau hoặc đến chất tiếp nhận được tổng hợp nên chỉ nhằm mục đích đó, nghĩa là để tái sinh lại NAD^+ . Tùy thuộc vào chất tiếp nhận hydro cuối cùng mà phân biệt hô hấp lên men và hô hấp yếm khí.

Lên men là quá trình để thu năng lượng, qua đó *hydro tách ra khỏi cơ chất được chuyển đến chất tiếp nhận cuối cùng là chất hữu cơ*. Hợp chất hữu cơ được khử đi vào môi trường dinh dưỡng và tích tụ lại trong đó. Phụ thuộc vào sản phẩm nào được tích tụ chiếm ưu thế hoặc sản phẩm nào đặc trưng mà người ta phân ra lên men rượu, lên men lactic hay lên men butiric, v.v.

Lên men khác với hô hấp yếm khí và sự oxy hóa không hoàn toàn. Hô hấp yếm khí cũng tiến hành trong điều kiện không có oxy tham gia nhưng hydro lại được chuyển qua mạch hô hấp mà đến chất tiếp nhận cuối cùng như nitrat hoặc sulfat.

Cần chú ý rằng quá trình oxy hóa sinh học khác với quá trình đốt cháy các vật liệu tương tự ở trong lò hay trong nhiệt lượng kế mặc dầu các sản phẩm đầu và cuối giống nhau. Chẳng hạn, khi đốt cháy đường tất cả năng lượng tàng trữ trong chúng được thoát ra dưới dạng nhiệt, trong khi đó khi lên men và hô hấp chỉ một phần năng lượng thoát ra dưới dạng nhiệt, một phần khác và là phần chủ yếu được tích tụ dưới dạng những hợp chất phospho giàu năng lượng hoặc trong các liên kết cao năng. Năng lượng tàng trữ trong các liên kết cao năng có tính chất đặc biệt, nghĩa là có thể chuyển thành hóa năng, nhiệt năng hoặc cơ năng. Trong tế bào vi sinh vật luôn luôn có các hợp chất phospho giàu năng lượng và khi phân ly những hợp chất này sẽ cung cấp cho cơ thể những năng lượng cần thiết. Một trong những hợp chất phospho giàu năng lượng quan trọng đó là ATP. Khi lên men (và hô hấp)



Hình 10.1. Con đường fructoza-1,6-diphosphat để phân giải oxy hóa glucose

ATP liên tục được tạo thành từ ADP và phân tử phosphat vô cơ. Sau đó ATP lại bị phân giải để giải phóng ra năng lượng và phosphat vô cơ. Trong tế bào vi sinh vật, sự tạo thành và sự thủy phân ATP được kết hợp với những phản ứng khác. Bằng cách như vậy vi sinh vật sử dụng rất có hiệu quả năng lượng đã được thoát ra.

Như vậy, sự lên men và hô hấp đều là những quá trình oxy hóa-khử sinh học qua đó tế bào vi sinh vật thu được năng lượng.

X.2.2. Sơ đồ Embden - Meyerhof - Parnas và chu trình Krebs

Lên men là quá trình trao đổi chất. Qua con đường trao đổi chất mà cung cấp năng lượng và "nguyên vật liệu" để tạo nên các cấu tử của tế bào. Trong trao đổi chất một số chu trình phản ứng có vai trò hết sức quan trọng. Trong số đó sơ đồ Embden-Meyerhof-Parnas và đặc biệt là chu trình Krebs có vị trí trung tâm. Vì những chu trình này đáp ứng được các yêu cầu về nguồn năng lượng, nguồn cacbon và nguồn các chất khử là những yếu tố rất cần thiết để duy trì các hoạt động sống của tế bào.

X.2.2.1. Sơ đồ Embden - Meyerhof - Parnas

Trong trao đổi chất nói chung và lên men nói riêng, chặng đường đi từ glucoza đến hợp chất C_3 và đến axit piruvic được gọi là sơ đồ Embden-Meyerhof-Parnas hay là con đường fructoza-1,6-diphosphat (h.10.1).

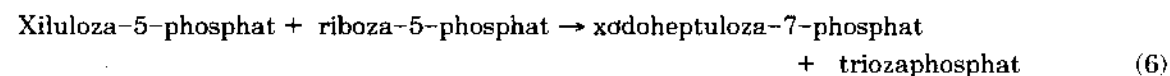
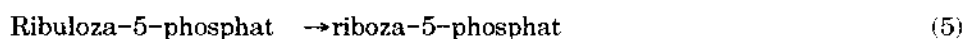
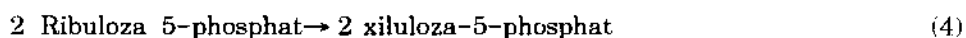
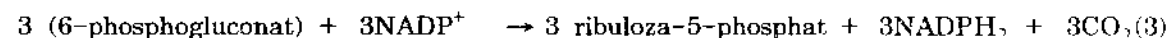
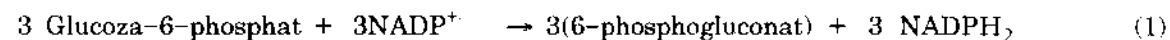
Qua sơ đồ chúng ta thấy : nếu toàn bộ triozaphosphat được tạo thành đều chuyển sang axit piruvic thì cân bằng vật chất của quá trình oxy hóa glucoza sẽ là :

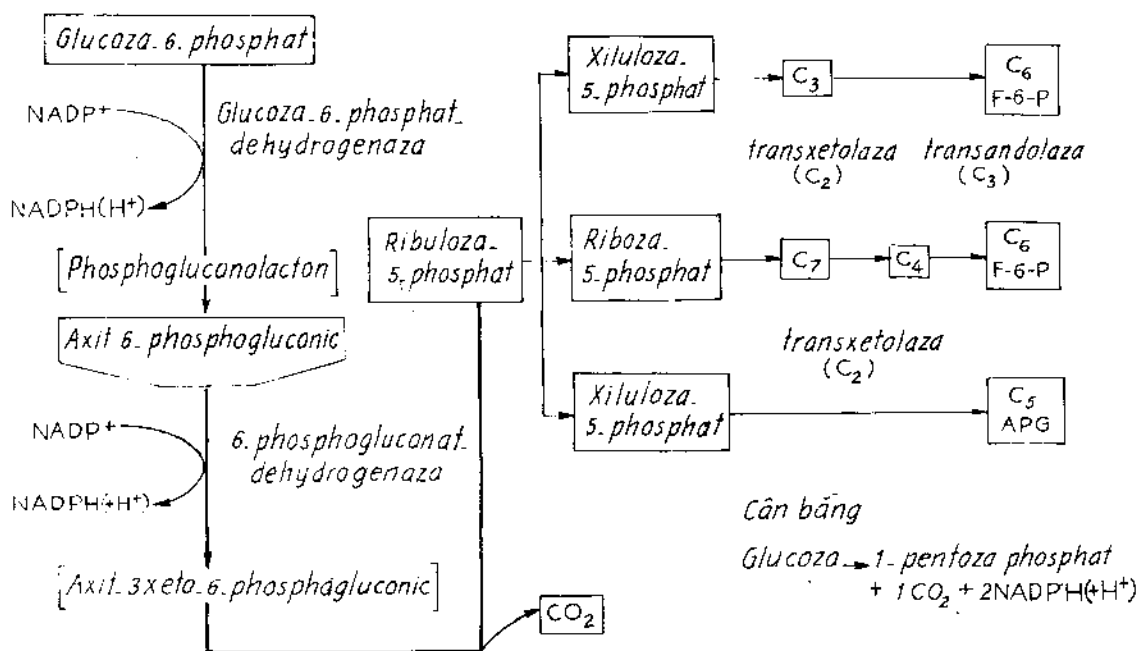
- 2 mol axit piruvic.
- 2 phân tử ATP ($4 - 2 = 2$)
- 2 phân tử $NADH_2$.

Cả hai phản ứng đều thoát ra năng lượng. Vì vậy đối với những cơ thể yếm khí thì con đường này là một giai đoạn cho năng lượng quan trọng hơn cả. Trong điều kiện yếm khí, tất cả các vi sinh vật lên men gluxit đều sử dụng năng lượng của sự oxy hóa triozaphosphat thành piruvat.

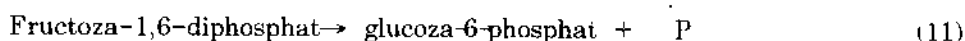
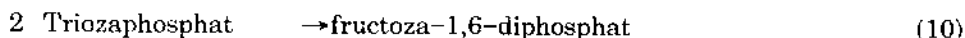
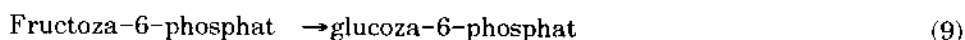
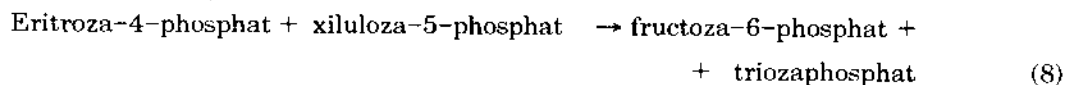
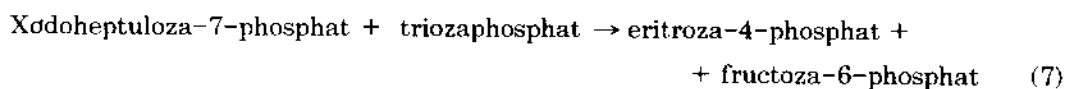
X.2.2.2. Chu trình pentozaphosphat

Chu trình này còn có những tên gọi khác như chu trình hexozamonophosphat, chu trình pentoza, v.v. Sơ đồ hoạt động của chu trình này được trình bày ở hình 10.2. Các phản ứng của chu trình được trình bày ở chương IV. Có thể ghi tóm tắt các phản ứng đã xảy ra trong từng giai đoạn như sau :

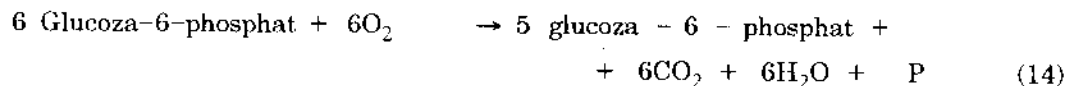
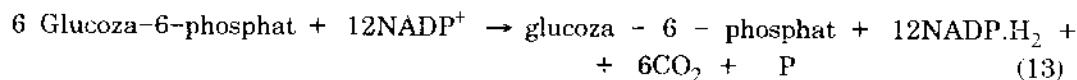




Hình 10.2 Con đường pentozaphosphat để phân ly oxy hóa G-G-P



Lấy phản ứng tổng cộng nhân với 2 (vì mạch phản ứng phải lập lại hai lần mới oxy hóa một phân tử glucoza đến CO_2 và H_2O) ta có :



Theo phản ứng 14 ta thấy cứ sáu phân tử glucoza - 6 - phosphat tham gia vào chu trình thì một phân tử bị oxy hóa hoàn toàn đến CO_2 và H_2O , còn năm phân tử lại được tái sinh. Bằng cách như thế tất cả các glucoza có mặt dưới dạng glucoza-6-phosphat cuối cùng đều bị oxy hóa hoàn toàn đến CO_2 và H_2O . Như vậy năm phân tử glucoza-6-phosphat phụ này cùng với tất cả những sản phẩm trung gian đều đóng vai xúc tác.

Trong chu trình, thực chất chỉ có hai phản ứng oxy hóa (1) và (3).

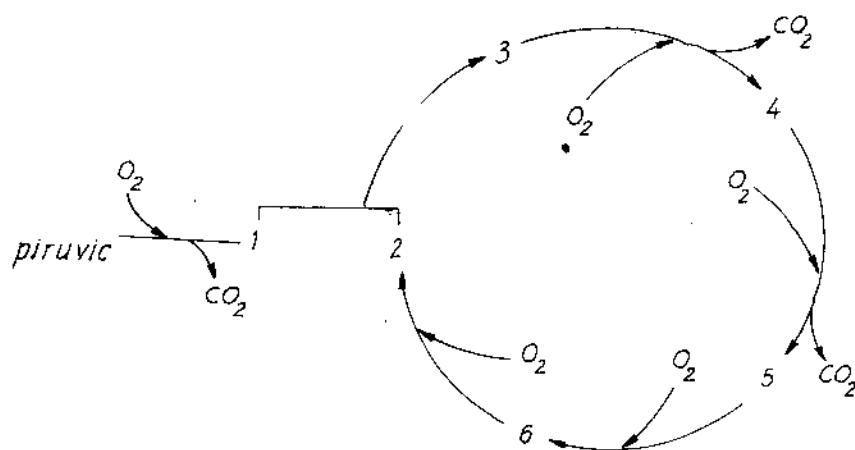
Ý nghĩa của chu trình này là ở chỗ cung cấp được nhiều NADP.H_2 (NADPH_2) là chất cho electron, nghĩa là chất cung cấp năng lượng, mỗi phân tử bị oxy hóa tổng hợp được ba phân tử ATP) bằng một số phản ứng rất ít. Mỗi phân tử glucoza bị oxy hóa hoàn toàn đến CO_2 và H_2O ở trong chu trình này tạo ra được 12 phân tử NADPH_2 . Như vậy về mặt năng lượng cũng xấp xỉ như khi oxy hóa glucoza qua piruvat với chu trình Krebs.

Ý nghĩa của chu trình pentozaphosphat còn là ở chỗ cung cấp cho các quá trình tổng hợp những hợp chất đầu quan trọng như pentozaphosphat, eritrozaphosphat, aldehyt 3-phosphatglixerinic. Các pentoza là những chất tiền thân cần thiết để tổng hợp các nucleotit và axit nucleic. Cân bằng vật liệu của chu trình này là :

- 1 pentozaphosphat
- 1 CO_2
- 2 NADP.H_2

X.2.2.3. Chu trình tricacboxylic

a) Sơ đồ nguyên tắc làm việc của chu trình



(O_2 chỉ các giai đoạn oxy hóa)

1- axetyl CoA	$\text{CH}_3\text{COS.CoA}$
2- axit oxalaxetic	$\text{COOHCH}_2\text{COCOOH}$
3- axit xitric	$\text{COOHCH}_2\text{COH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$
3a- axit izoxitric	$\text{COOHCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$
4- axit α -xetoglutaric	$\text{COOHCH}_2\text{CH}_2\text{COCOOH}$
5- axit suxinic	$\text{COOHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
6- axit fumaric	$\text{COOHCH} = \text{CHCOOH}$
6a- axit malic	$\text{COOHCHOHCH}_2\text{COOH}$

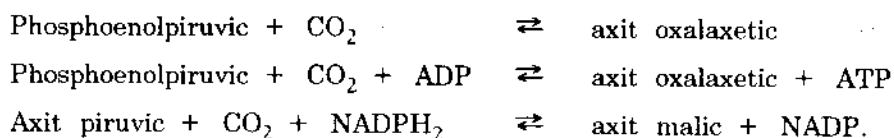
Nhìn sơ đồ chúng ta thấy :

- Sau một vòng của chu trình, phân tử 1 bị đốt cháy đến CO_2 và H_2O , còn phân tử 2 thì được hồi phục. Chu trình lặp đi lặp lại nhiều lần cho đến khi tất cả axit piruvic có mặt đều bị oxy hóa đến CO_2 và H_2O . Cần chú ý rằng axit piruvic không bị oxy hóa "tuần tự nhị tiến", nghĩa là bằng cách tách nguyên tử cacbon này sau nguyên tử cacbon kia. Thực tế, sau khi axit piruvic bị oxy hóa thành axetylCoA thì cơ chế trở nên phức tạp hơn.

Bốn giai đoạn oxy hóa sau [giai đoạn từ (3) $\rightarrow$ (4), (4) $\rightarrow$ (5), (5) $\rightarrow$ (6) và (6) $\rightarrow$ (2)], không phải axetat bị oxy hóa mà là sản phẩm ngưng tụ của axetylCoA với axit oxalaxetic. Nằm trong các hợp chất như thế (axit xitric, axit izoxitric, ...) axit piruvic mới bị oxy hóa một cách tuần tự cho đến khi chỉ còn axit oxalaxetic. Như vậy, axit oxalaxetic đóng vai trò như một chất khơi mào phản ứng.

Nhờ chu trình như thế, một lượng nhỏ axit xitric, axit malic và các axit hữu cơ khác trong cơ thể có thể xúc tác oxy hóa hàng trăm gam axit axetic, vì mỗi vòng của chu trình một phân tử axit axetic bị oxy hóa. Khi số vòng quay khá lớn thì tác dụng xúc tác của chu trình rất hiệu quả và trong một số trường hợp rất gần với tác dụng của các enzym.

- Thiếu một chất bất kỳ trong các phẩm vật trung gian của chu trình thì hoạt động tiếp theo của chu trình sẽ ngừng trệ nếu như một chất khác (của chu trình) không được tái sinh với vận tốc bằng vận tốc mất đi của chất đầu. Thường axit oxalaxetic và axit malic tạo thành trong các phản ứng dưới đây được dùng để duy trì cân bằng trong chu trình :



b) Tác dụng của chu trình Krebs

Chu trình Krebs là một "lò" để thiêu cháy các bộ xương cacbon

Qua sơ đồ trên, chúng ta thấy chu trình Krebs tương tự như một "lò đốt" nhưng chỉ thiêu cháy được những hợp chất nhất định : hợp chất thành viên của chu trình. Một chất nào đó có thể bị đốt cháy đến CO_2 và H_2O nếu nó có khả năng chuyển thành một chất bất kỳ trong sáu hợp chất thành viên kể trên. Muốn được oxy hóa trong chu trình, đường (gluxit) phải chuyển thành axit piruvic, axit béo (lipit) phải chuyển thành axetat hoặc axetylcoenzim A, các axitamin (protein) như glixin, alanin, glutamat, aspartat, ... phải chuyển thành những chất tương ứng : glioxilat, piruvat, α -xetoglutarat và oxalaxetat.

Rõ ràng chu trình tricarboxylic là trung tâm của các quá trình trao đổi nói chung và lên men nói riêng.

Chu trình Krebs là nguồn coenzim khử và nguồn năng lượng dự trữ to lớn

Qua sơ đồ phản ứng chúng ta thấy khi oxy hóa axit piruvic đến CO_2 và H_2O , có năm giai đoạn tạo thành các coenzim khử :

- oxy hóa axit piruvic $\rightarrow$ axetylCoA và CO_2 tạo thành 1 mol NAD.H_2 ;
- oxy hóa axit izoxitric $\rightarrow$ α -xetoglutamic và CO_2 tạo thành 1 mol NAD.H_2 ;

- oxy hóa axit α -xetoglutaric $\rightarrow$ suxinylCoA và CO_2 tạo thành 1 mol NAD.H_2 ;
- oxy hóa axit suxinic $\rightarrow$ fumaric tạo thành 1 mol FAD.H_2 ;
- oxy hóa axit malic $\rightarrow$ oxalaxetic tạo thành 1 mol NAD.H_2 .

Trong chu trình Krebs không tổng hợp trực tiếp ra ATP mà hình thành ra năm phân tử NAD.H_2 và FAD.H_2 . Khi oxy hóa một mol NAD.H_2 thì tổng hợp nên được 3 mol ATP, còn một mol FAD.H_2 chỉ tổng hợp được 2 mol ATP.

Các coenzim khử được tạo thành trong chu trình còn dùng để khử các liên kết kép, các nhóm cacbonyl, imit, ... trong các phản ứng khử khác nhau cần thiết cho tế bào.

Chu trình Krebs là nguồn cung cấp các bộ xương cacbon để tổng hợp nên các chất trao đổi cần thiết của tế bào

Chúng ta đều biết các axitamin đều bắt nguồn từ những chất tiền thân. Những chất tiền thân này thường là những chất thành viên của chu trình. Chúng ta sẽ thấy rõ hơn vai trò về mặt này của chu trình tricacboxylic trong phản sinh tổng hợp axitamin.

X.2.2.4. Một số đặc điểm của các sơ đồ phản ứng và chu trình phản ứng trong quá trình lên men

Như chúng ta đều biết, tất cả các cơ thể sống trong đó có vi sinh vật đều thuộc hệ thống hở, nghĩa là hệ thống được đặc trưng bằng sự trao đổi vật chất thường xuyên với môi trường ngoài.

Trong hệ thống hở này, các quá trình chuyển hóa như sơ đồ Embden-Meyerhof, chu trình pentozaphosphat, chu trình Krebs ... có đặc điểm chung là những quá trình gồm nhiều nấc, tạo thành mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch phản ứng chu trình.

Một đặc điểm nữa là các mạch phản ứng này không đứng riêng rẽ, biệt lập mà liên hệ mật thiết với nhau tạo thành sơ đồ mạng các phản ứng liên phối với nhau trong không gian và thời gian một cách rất chuẩn xác và đặc hiệu đối với mỗi cơ thể (đây cũng là lý do khiến cho trong các quá trình lên men có nhiều sản phẩm khác nhau). Sự có mặt sơ đồ mạng các phản ứng này còn khiến cho khi thay đổi một điều kiện bất kỳ nào đó sẽ không làm thay đổi cục bộ một giai đoạn chuyển hóa hóa học nào đó, mà sẽ phân bố lại nhiều tham số động học của hệ thống hở, làm cho khả năng thích ứng của vi sinh vật với điều kiện mới hiệu quả hơn.

Một trong những trạng thái quan trọng hơn cả của mạch phản ứng hoặc của sơ đồ mạng phản ứng trong hệ thống hở là *trạng thái dừng*. Ở trạng thái dừng, nồng độ của tất cả cấu tử được duy trì ở mức không đổi theo thời gian do cân bằng động của các quá trình chuyển dời và các chuyển biến hóa học.

Một tính chất quan trọng nữa của hệ thống hở là khả năng tự bảo toàn trong một chừng mực nào đó trạng thái dừng khi thay đổi các điều kiện bên ngoài. Chẳng hạn khi tăng vận tốc phản ứng (do tác dụng của chất xúc tác hay nhiệt độ) thì nồng độ các sản phẩm của phản ứng sẽ tăng lên, nhưng cũng do đó mà sự khuếch tán các sản phẩm này ra khỏi hệ thống cũng tăng lên. Do đó nồng độ dừng mới sẽ gần với nồng độ ban đầu hơn là (nồng độ trong hệ kín) khi không có sự chuyển

dịch đó. Sự tự ổn định trạng thái dừng theo ý nghĩa của nguyên lý Le Chatelier mở rộng, là nằm trong cơ chế liên hệ ngược và có mặt trong tất cả hệ thống hở.

Trong hệ thống hở, giữa hai giai đoạn của một quá trình chuyển hóa thường có hơn một đường hướng phản ứng. Chẳng hạn từ glucoza-6-phosphat tới aldehyt 3-phosphoglixerinic có thể đi bằng con đường glicolizơ hoặc đi bằng chu trình pentozaphosphat. Đường hướng phản ứng khác nhau sẽ có hiệu quả khác nhau. Lượng chất được tạo thành theo mỗi hướng sẽ do hàng số vận tốc của phản ứng đó quyết định. Đường hướng nào mà theo đó các phản ứng có thể phát triển với vận tốc lớn nhất sẽ là đường hướng chủ đạo. Hay nói cách khác, chiều hướng của các quá trình hóa học song hành được xác định theo *nguyên lý vận tốc phản ứng lớn nhất*.

Trong hệ thống hở, chất xúc tác ảnh hưởng không những đến vận tốc phản ứng mà còn đến nồng độ dừng của chất tác dụng.

Trong quá trình lên men, một tổ hợp các mạch phản ứng khác nhau đã diễn ra, trong đó có mạch phản ứng thẳng như sơ đồ Embden-Meyerhof, mạch rẽ như sơ đồ tạo ra glixerin, và mạch phản ứng chu trình như chu trình pentozaphosphat, chu trình tricarboxylic, ... Trong số đó các mạch phản ứng chu trình có vai trò cực kỳ quan trọng.

Trong mỗi chu trình các cấu tử cơ chất được sử dụng ở vị trí này, còn các sản phẩm phân hủy được thoát ra ở một chỗ khác của chu trình.

Chu trình phụ thuộc vào cân bằng chung mà có thể phát triển theo chiều thuận hay chiều nghịch hoặc đạt đến trạng thái cân bằng bền.

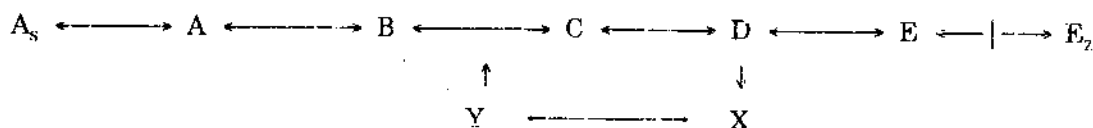
Theo thường lệ, cân bằng động được thiết lập khi mỗi giai đoạn hoặc mỗi phản ứng ở trong trạng thái gần với trạng thái cân bằng, nhưng không ở trong điểm cân bằng và mặc dù một số cấu tử có mặt với nồng độ rất thấp, chúng vẫn thường xuyên được tạo thành và được phân giải.

Trước lúc toàn bộ hệ thống có cân bằng thì chu trình được "quay", nghĩa là phản ứng "theo chiều kim đồng hồ" xảy ra nhanh hơn phản ứng theo "chiều ngược kim đồng hồ" hay ngược lại. Và cũng như trong hệ mạch phản ứng thẳng, chu trình có thể đạt đến trạng thái dừng. Vận tốc quay của chu trình phụ thuộc vào *nồng độ tương đối của các chất thành viên tham gia trong từng giai đoạn* riêng biệt của chu trình. Vận tốc quay sẽ càng lớn khi tỉ số đó chênh càng nhiều so với tỉ số tương ứng ở trạng thái cân bằng. Trong chu trình, khi có mặt các quá trình thứ bậc không (chẳng hạn giai đoạn được enzim xúc tác) thì một hàng số vận tốc, đặc biệt là hàng số vận tốc bé nhất của phản ứng bậc không sẽ điều chỉnh vận tốc của cả chu trình ở trong trạng thái dừng. Nếu nồng độ của cơ chất tăng, còn nồng độ của tất cả các cơ chất khác giữ nguyên không đổi thì khi ở trạng thái dừng, vận tốc của chu trình sẽ đạt đến cực đại.

Cần chú ý rằng, những chu trình được liên thông với mạch rẽ không thuận nghịch là rất có ý nghĩa. Cứ mỗi vòng quay của chu trình lại làm chuyển hóa không thuận nghịch một chất nào đó (chẳng hạn trong chu trình Krebs cứ mỗi vòng quay của chu trình sẽ oxy hóa một phân tử axit axetic đến CO_2 và H_2O). Điều này sẽ dẫn đến việc khiến cho hướng quay của chu trình thiên về một chiều nào đó. Thực tế, trong chu trình Krebs mạch phản ứng theo chiều từ axit oxalaxetic tới axit xitric

(và các axit tiếp theo) ưu thế hơn mạch phản ứng có hướng ngược từ axit oxalaxetic tới axit malic. Điều này cũng phù hợp với đặc trưng dừng của chu trình, vì khi ở trạng thái dừng, vận tốc phản ứng trong một hướng này luôn lớn hơn vận tốc phản ứng theo hướng ngược lại một trị số không đổi nhất định.

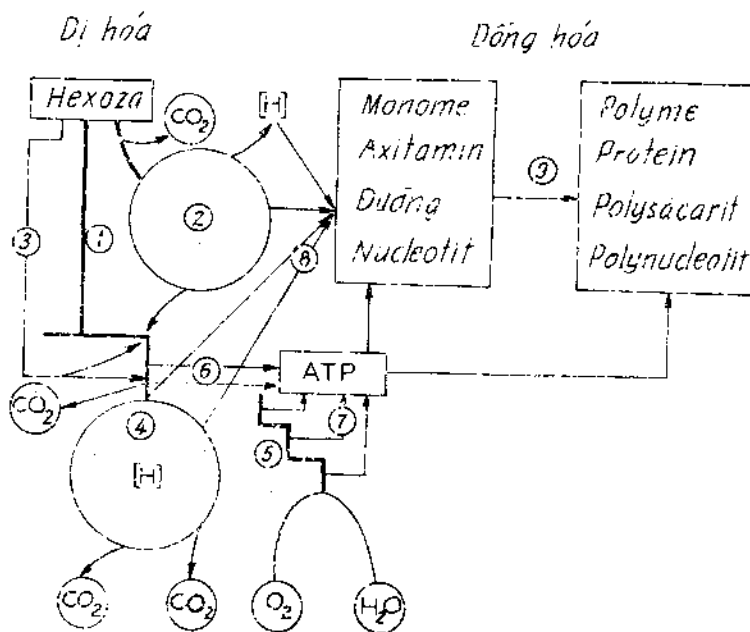
Một trường hợp riêng quan trọng nữa của mạch phản ứng chu trình là khi có mặt trong nó một giai đoạn tự xúc tác. Chẳng hạn, sản phẩm của một phản ứng nào đó có tác dụng làm tăng nhanh một giai đoạn nào trước nó, như ở sơ đồ 1.



Ví dụ như ở trong sơ đồ, Y làm tăng nhanh phản ứng $B \longleftrightarrow C$. Trong trường hợp đó sự quay của chu trình BCDXY sẽ dần dần tăng lên và chế độ làm việc của chu trình sẽ không dừng. Cùng với sự nhích gần đến trạng thái dừng của mạch phản ứng chính, vận tốc của phản ứng $A \rightarrow E$ sẽ được tăng lên ; nhưng sau đó, khi ở nồng độ đã cho của chất A, thì vận tốc tạo thành B bởi phản ứng $A_s \rightarrow A \rightarrow B$ sẽ đạt được cực đại. Trong thời gian đó, sự tăng của giai đoạn $B \rightarrow C$ lớn hơn do nồng độ chất Y tăng lên sẽ làm tăng sự tiêu tốn tương đối của B.

Kết quả là vận tốc cực đại của phản ứng $A_s \rightarrow A \rightarrow B$ sẽ thực hiện được khi nồng độ chất B cực tiểu.

Một đặc điểm nữa là không thể hãm (phanh) chu trình tại một vị trí bất kỳ nào, vì chu trình là một hệ thống cân bằng động. Chẳng hạn nếu từ hệ thống tách đi một cấu tử bất kỳ nào thì toàn bộ chu trình sẽ tác dụng theo hướng đạt được một cân bằng mới. Các phương pháp ứng dụng trong công nghiệp đều dẫn đến hạn chế những chất dinh dưỡng quan trọng nhất định cho sự sống hoặc các nguyên tử vi lượng trong hệ thống



Hình 10.3. Sự liên quan giữa các chu trình phản ứng trong trao đổi chất :

1- sơ đồ Embden-Meyerhof (con đường fructozo-1,6-diphosphat) ; 2- chu trình pentozaphosphat ; 3- con đường 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic ; 4- chu trình axit tricacboxylic ; 5- mạch hô hấp ; 6- phosphoryl hóa trên mức độ cơ chất ; 7- phosphoryl hóa - oxy hóa trong mạch hô hấp ; 8- tổng hợp các monome ; 9- tổng hợp các polyme

sinh học nhằm kìm hãm một giai đoạn enzym nào đó. Theo định luật tác dụng khối lượng và theo nguyên lý Le Chatelier thì hiệu ứng đáp lại phải là tăng nồng độ sản phẩm của giai đoạn xảy ra trước.

Mối tương quan giữa các chu trình phản ứng trong quá trình trao đổi chất nói chung và sự lên men nói riêng được mô tả ở sơ đồ trong hình 10.3.

Muốn thu được các sản phẩm như rượu, axitamin, protein, axit hữu cơ, ... nghĩa là những sản phẩm của quá trình trao đổi chất ở vi sinh vật, nhiệm vụ của nhà kỹ thuật là tìm những biện pháp để điều khiển những chu trình phản ứng trên theo hướng mong muốn.

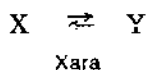
X.2.3. Cơ chế điều hòa phản ứng hóa học trong các quá trình lên men

Như chúng ta thấy ở phần trên, lên men là quá trình oxy hóa-khử sinh học, nghĩa là quá trình oxy hóa-khử có enzym xúc tác. Vì vậy, cơ chế có vai trò quyết định trong việc điều hòa các phản ứng hóa học ở đây, phải là cơ chế tác dụng trên mức độ enzym. Về nguyên tắc có hai phương pháp điều hòa các phản ứng enzym. Điều hòa bằng những yếu tố ảnh hưởng đến việc sinh tổng hợp ra enzym và điều hòa bằng những nhân tố ảnh hưởng đến độ hoạt độ của enzym. Nhưng điều hòa theo nguyên tắc đầu thường là chậm hay gọi là điều chỉnh thô. Kiểu điều hòa theo cách thứ hai nhanh hơn, có hiệu quả hơn và tinh tế hơn do đó người ta gọi là điều chỉnh tinh.

X.2.3.1. Điều hòa bằng cách tác động đến hoạt độ của enzym

a) Đối với một phản ứng enzym đơn giản, một giai đoạn

Giả sử, có phản ứng :



được xúc tác bởi enzym Xaza. Chúng ta dễ dàng thấy vận tốc phản ứng phụ thuộc vào nồng độ cơ chất, nồng độ enzym Xaza, nhiệt độ pH các chất hoạt hóa và các chất kìm hãm. Thay đổi một trong những nhân tố này sẽ làm thay đổi vận tốc của phản ứng hay nói cách khác sẽ điều chỉnh được phản ứng.

Trong những nhân tố đó, việc thay đổi nồng độ cơ chất có ý nghĩa quan trọng hơn cả. Ở chương enzym, chúng ta đã thấy vận tốc của phản ứng enzym được biểu diễn bởi phương trình Michaelis-Menten :

$$V = k [E] \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Dĩ nhiên, khi nồng độ cơ chất thấp hơn lượng mà enzym cần để kết hợp, thì hoạt độ của một lượng enzym không đổi sẽ hoàn toàn phụ thuộc vào nồng độ cơ chất. Khi enzym đã bão hòa cơ chất thì vận tốc phản ứng sẽ không phụ thuộc vào nồng độ cơ chất mà chỉ phụ thuộc vào nồng độ enzym và hoạt độ xúc tác của nó :

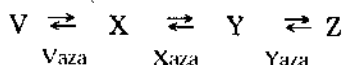
$$v_{\max} = k [E].$$

Như vậy, tham gia vào hằng số k bây giờ chỉ còn lại pH, nhiệt độ và các điều kiện khác.

Khi nhiệt độ và pH thay đổi không đáng kể và nồng độ cơ chất tối ưu thì hoạt độ của Xaza chỉ phụ thuộc vào chất kìm hãm hay chất hoạt hóa có trong môi trường. Trong trường hợp này thậm chí thay đổi một lượng rất nhỏ các chất này cũng có ảnh hưởng lớn đến vận tốc phản ứng.

b) Đối với một chuỗi phản ứng enzym

Đối với một hệ phản ứng enzym thì ngoài những nhân tố trên còn thêm những nhân tố phụ nữa. Vì mỗi phản ứng trong hệ còn phụ thuộc vào kết quả của những phản ứng còn lại. Giả sử, có hệ phản ứng :

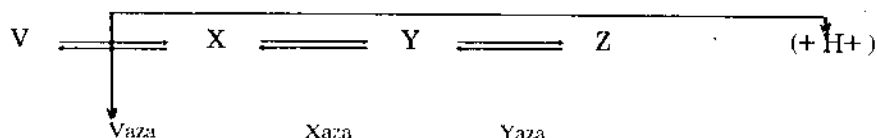


Giả sử enzym Vaza rất nhạy đối với sự thay đổi pH, còn sản phẩm Z cuối cùng là một chất axit.

Ta sẽ thấy cùng với sự tăng hàm lượng Z thì độ axit của dung dịch tăng lên và ảnh hưởng đến hoạt độ của Vaza do đó vận tốc tạo thành X từ V bị giảm. Lượng X giảm thì Y và Z cũng giảm theo. Z giảm thì độ axit của dung dịch giảm. Độ axit giảm, lập tức tác dụng của Vaza lại tăng. Lượng Z và độ axit tăng thì hoạt độ của Vaza lại giảm. Cuối cùng sẽ đạt đến trạng thái cân bằng bền.

Như vậy, sự tạo thành Z là yếu tố điều chỉnh hoạt động của Vaza và ngược lại vận tốc tác dụng của Vaza lại quyết định lượng Z tạo thành. Kiểu điều chỉnh như thế người ta gọi là cơ chế phản hồi, cơ chế nối ngược (hay là cơ chế nuôi ngược).

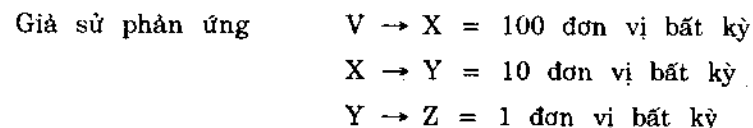
Hệ thống phản ứng có cơ chế nuôi ngược có thể biểu diễn như sau :



Có hai kiểu nối ngược. Nếu sản phẩm cuối cùng của phản ứng Z kìm hãm hoạt độ của Vaza, ta sẽ có *nối ngược âm*. Nhưng nếu sản phẩm cuối cùng Z làm giảm pH, lại hoạt hóa Vaza thì ta có *nối ngược dương*. Tuy nhiên nguyên tắc chung của tất cả phản ứng có nối ngược : vận tốc của phản ứng được điều chỉnh bằng sản phẩm không tham gia trực tiếp vào phản ứng đó.

c) Điều chỉnh bằng vận tốc của phản ứng chậm nhất trong hệ

Chúng ta trở lại với hệ phản ứng enzym ở trên. Để đơn giản, chúng ta coi vận tốc của mỗi phản ứng trong điều kiện thuận lợi nhất là cực đại và dĩ nhiên sẽ khác nhau.



Như vậy phản ứng xúc tác bởi Vaza 10 lần nhanh hơn phản ứng với sự tham gia của Xaza và 100 lần nhanh hơn phản ứng với sự xúc tác của Yaza. Trong trường hợp này, phản ứng nào hạn chế sự tạo thành Z từ V? Ta dễ dàng thấy Vaza sản

xuất ra X 10 lần lớn hơn lượng có thể sử dụng bởi Xaza, trong khi đó Xaza lại sản xuất ra Y 10 lần nhiều hơn lượng được sử dụng bởi Yaza. Vì trong quá trình phản ứng tạo thành một lượng dư rất lớn X và Y mà các enzym Xaza và Yaza không sử dụng hết. Như vậy vận tốc chuyển hóa $V \rightarrow Z$ chỉ bị hạn chế bởi vận tốc của phản ứng $Y \rightleftharpoons X$ xúc tác bởi Yaza.

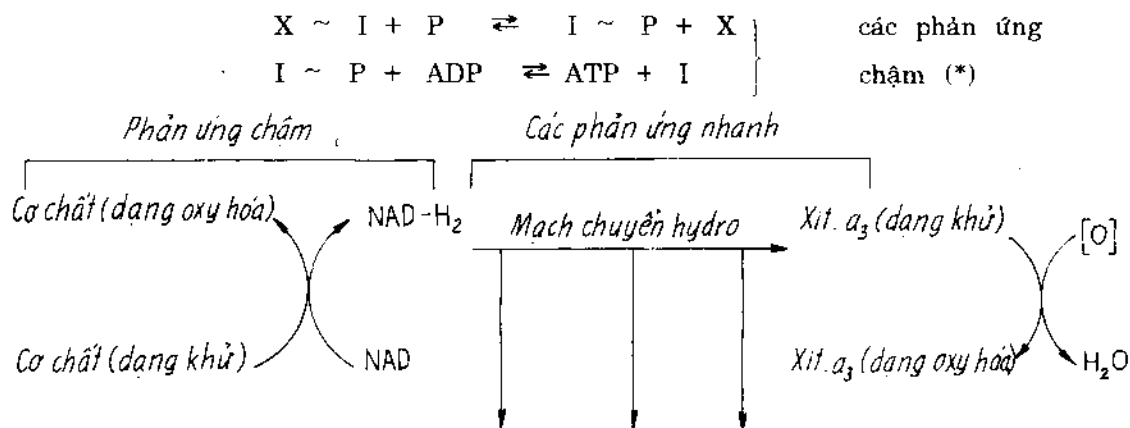
Vậy vận tốc của hệ phản ứng enzym do vận tốc của phản ứng chậm nhất trong hệ quyết định.

Trong trường hợp đó nếu gây ra biến đổi pH đủ để giảm hoạt độ của Vaza đi 10 lần thì vận tốc sản xuất ra sản phẩm cuối cùng Z cũng không thay đổi vì nó phụ thuộc vào hoạt độ của Yaza mà không phụ thuộc vào Vaza. Như vậy sản phẩm cuối cùng của hệ Z sẽ không tiến hành kiểm tra sự tạo thành bản thân theo cơ chế nối ngược.

Như vậy, phản ứng chậm nhất của hệ là phản ứng duy nhất quyết định vận tốc tiến hành của cả hệ. Do đó tế bào vi sinh vật có thể điều hòa vận tốc của một hệ phản ứng bất kỳ bằng cách chỉ làm thay đổi các yếu tố điều chỉnh vận tốc của phản ứng chậm nhất của hệ. Chẳng hạn trong quá trình đường phân gồm một hệ 10 phản ứng nối tiếp, mỗi phản ứng được xúc tác bởi một enzym đặc hiệu. Trong số đó, hai phản ứng phosphoryl hóa đầu tiên quyết định vận tốc làm việc của toàn hệ thống.

d) Điều chỉnh do sự chuyển hóa năng lượng

Hoạt động sống của tế bào vi sinh vật thể hiện đầy đủ khi có năng lượng. Lúc đó, tế bào không những phải điều chỉnh các phản ứng cần năng lượng mà cả những phản ứng sản xuất ra năng lượng. Dự trữ năng lượng chủ yếu của tế bào được tập trung và kiểm tra ở trong ti thể nhờ có ATP tổng hợp được khi oxy hóa các cơ chất trong mạch chuyển hydro. Như vậy, lượng ATP tích tụ được do kết quả của sự oxy hóa quyết định lượng năng lượng thu được bởi tế bào. Sự phân giải hợp chất cao năng đó thành ADP và phosphat vô cơ sẽ giải phóng ra năng lượng để chi dùng cho các quá trình trao đổi. Ti thể phải có một hệ thống kiểm tra nội tại riêng để đảm bảo cho được nhịp độ đốt cháy các "nhiên liệu". Sơ đồ của hệ thống kiểm tra đó hay là sơ đồ các "công đoạn" trong quá trình oxy hóa có thể biểu diễn như ở hình vẽ dưới đây. Nói một cách có hình ảnh thì có thể gọi sơ đồ này là "sơ đồ các quá trình kỹ thuật".



Hình 10.4. Sơ đồ phosphoryl hóa - oxy hóa

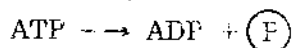
Từ sơ đồ chúng ta thấy, sự oxy hóa cơ chất sẽ bị chậm trễ nếu:

- Lượng oxy tham gia trong hệ thống không đủ để oxy hóa toàn bộ lượng xitocrom a_3 -khử ở cuối mạch chuyển. Thông thường sự oxy hóa xitocrom a_3 không giới hạn quá trình oxy hóa cơ chất nếu không có những chất độc (xianua, cacbon oxyt) vào tế bào;

- Lượng phosphat vô cơ và ADP có mặt không đủ để tiến hành các phản ứng liên hợp giữa quá trình tổng hợp ATP với sự oxy hóa. Điều đó có nghĩa là các phản ứng chậm (*) không thể tiến hành được, và do đó sẽ ứ đọng lại hợp chất trung gian $X \sim I$. Kết quả là dòng các nguyên tử hydro từ cơ chất tới oxy theo mạch chuyển bị phá hoại. Toàn bộ mạch phản ứng oxy hóa bị lâm vào trạng thái hỗn loạn và cuối cùng sẽ bị hãm lại.

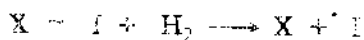
Như vậy, vận tốc oxy hóa vật chất trong mạch chuyển electron được điều chỉnh bởi hàm lượng ADP và phosphat vô cơ có mặt trong ti lạp thể. Khi có thừa ADP và phosphat, sự oxy hóa sẽ tiến hành một cách nhanh chóng và thông suốt. Khi nồng độ các chất này thấp thì vận tốc oxy hóa sẽ thấp.

Tuy nhiên nồng độ ADP và phosphat vô cơ đến lượt mình lại được kiểm tra bởi quá trình tạo thành ATP một cách liên tục cùng với sự oxy hóa. Trong thời gian đó, ở những phần khác của tế bào, ATP lại được dùng làm nguồn năng lượng cho những quá trình khác (tổng hợp protein).



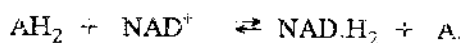
Như vậy, các phản ứng tiến hành có sử dụng năng lượng sẽ làm tăng lượng ADP và phosphat vô cơ, do đó cũng xúc tiến nhanh sự oxy hóa. Đương nhiên trong một hệ thống tế bào bất kỳ vận tốc oxy hóa cơ chất sẽ phụ thuộc vào vận tốc sử dụng ATP. Điều đó có nghĩa là tế bào có thể thay đổi vận tốc tổng hợp ATP kèm theo sự oxy hóa để thỏa mãn được các nhu cầu biến động về năng lượng. Tỷ lệ giữa ATP và $(ADP + P)$ có trong nội bào là nhân tố có vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự trao đổi năng lượng.

Nếu ADP thiếu thì bắt đầu tăng nồng độ $X \sim I$ và những chất trung gian khác. Việc tăng nồng độ $X \sim I$ có thể bị ngừng lại nhờ ADP và phosphat vô cơ có ở trong tế bào hoặc nhờ cơ chế phân li $X \sim I$ theo phản ứng:



Ở đây $X \sim I$ bị thủy phân, còn năng lượng tàng trữ trong liên kết cao năng thì bị khuếch tán ra dưới dạng nhiệt và không liên hiệp với sự tổng hợp ATP. Nếu phản ứng đó được thực hiện thì sự oxy hóa có thể tiếp tục một cách độc lập với sự phosphoryl hóa. Khi đó cả hai quá trình sẽ bị ngăn cách.

Nếu ADP, P và O_2 có mặt một lượng thừa thì không có một cơ chế kiểm tra nào tham gia điều hòa vận tốc phosphoryl oxy hóa cả. Trong điều kiện đó, sự tham gia của hydro vào mạch chuyển nhờ phản ứng dehydrogenaza sẽ trở thành nhân tố giới hạn:



Nếu lượng AH_2 và NAD^+ lớn, còn lượng A và $NAD.H_2$ bé thì phản ứng sẽ tiến hành theo chiều thuận. Vì trong nhiều phản ứng dehydrogenaza có NAD^+ là chất

cung cấp hydro, nên vận tốc phản ứng sẽ phụ thuộc vào lượng NAD^+ và NAD.H_2 có mặt trong hệ. Nếu NAD^+ có thừa, còn NAD.H_2 có mặt với một lượng không đáng kể thì phản ứng sẽ tiến hành theo chiều thuận. Khi thừa NAD.H_2 nhưng lại thiếu NAD thì phản ứng bị chậm lại, sau đó bị ngừng và sự vận chuyển hydro bị kìm lại. Như vậy tỉ lệ NAD^+ và NAD.H_2 là cái điều chỉnh sự oxy hóa.

Cùng liên quan chặt chẽ với coenzim NAD^+ , còn một coenzim nữa là NADP . Coenzim này tham gia vào việc tổng hợp chất béo và cũng đòi hỏi thường xuyên một dòng hydro để thực hiện các phản ứng khử. Tỉ lệ $\text{NADP}/\text{NADP.H}_2$ là nhân tố giới hạn vận tốc trong các phản ứng tổng hợp. Mối liên quan tương hỗ của các đồng nhân tố trên có thể biểu diễn bằng sơ đồ phản ứng sau :



Trong phản ứng này, một coenzim bị oxy hóa còn một coenzim bị khử do đó đảm bảo một tỉ lệ cần thiết :

$$\frac{\text{NAD}^+}{\text{NAD.H}_2} = \frac{\text{NADP}}{\text{NADP.H}_2}$$

Như vậy enzym transhydrogenaza bảo đảm được cân bằng giữa các quá trình phá hủy tạo ra năng lượng tích lũy và quá trình kiến tạo làm tiêu tốn năng lượng.

e) Điều chỉnh bằng các yếu tố cấu trúc của tế bào

Các cấu tử dưới tế bào cũng có vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh các hoạt động của tế bào vì sinh vật như điều hòa việc tổng hợp các chất trao đổi và tích lũy năng lượng hữu ích. Người ta biết nhiều bào quan độc lập và màng đã tham gia trực tiếp vào nhiệm vụ điều chỉnh đó.

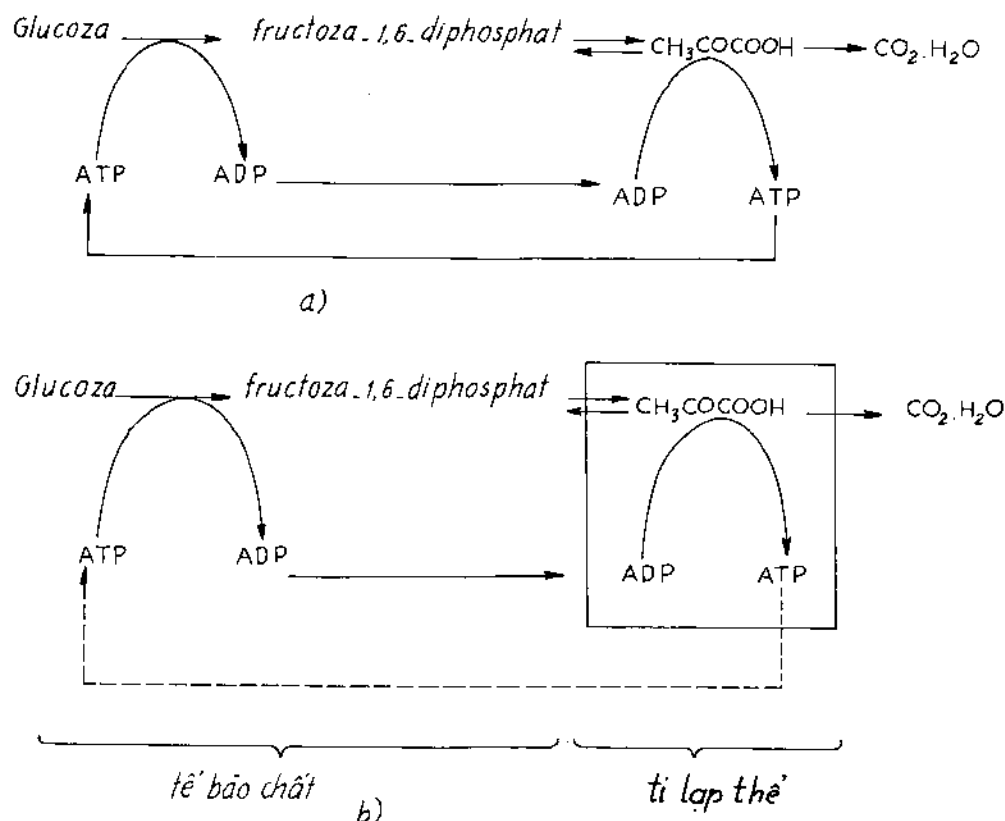
Trong tế bào, nếu lượng ti thể gồm khoảng 500 - 1 000 thì lượng ribosom có đến vài trăm nghìn và thay đổi phụ thuộc vào trạng thái vật lý của tế bào. Số lượng phân tử enzym trong tế bào có khoảng gần một tỉ. Song mỗi một bào quan chỉ chứa những enzym và cơ chất đặc hữu của mình. Cơ chất định vị trong một bào quan nào đó sẽ không tới được đối với những enzym tương ứng có trong những bào quan khác. Hoặc chẳng hạn các enzym thủy phân thường cư trú ở trong lizoxom và chỉ trong trường hợp rất đặc biệt mới có thể thoát ra ngoài. Người ta cũng nhận thấy rằng, màng của tế bào cũng như của các bào quan có khả năng chọn lọc rất cao. Màng có thể chỉ cho ion này đi vào mà không cho đi ra hoặc ngược lại. Chẳng hạn như màng của ti thể rất "háo" ion canxi. Tương tự như máy hút bụi nó có thể hấp thu và tích tụ ion canxi vào bên trong ti thể với một lượng rất lạ lùng.

Vai trò điều chỉnh của màng ti thể có thể thấy rõ trong ví dụ sau

Trong quá trình oxy hóa axit piruvic thì ATP chủ yếu được tổng hợp nên ở trong ti thể. Màng ti thể có tác dụng cản trở các ATP này chuyển dịch tự do sang các phần khác của tế bào. Do vậy chúng hoàn toàn được định vị ở trong ti thể.

Ngược lại ADP được tạo thành trong tế bào chất ở giai đoạn đường phân lại không thể xâm nhập vào trong ti thể một cách dễ dàng, do đó không được phosphoryl hóa để tạo ra ATP. Chúng ta đều biết, phản ứng đầu tiên, chậm nhất và quyết định vận tốc làm việc của toàn bộ hệ thống phản ứng đường phân là phản ứng phosphoryl glucoza bởi ATP do enzym hexokinaza xúc tác. Vì vậy, sự có mặt ATP

nhất là sự tổng hợp ra ATP là nhân tố điều chỉnh toàn bộ hệ phản ứng đường phân. Lượng ATP, trong trường hợp này chủ yếu được tạo thành khi phân ly toàn bộ glucoza. Rõ ràng cơ chế điều chỉnh quá trình glucolizơ là cơ chế nuôi ngược dương (h.10.5a). Tuy nhiên khi có hiệu ứng Pasteur nghĩa là khi có màng ngăn nối vào mạch điều chỉnh glucolizơ thì sự chuyển dịch tự do của ATP và ADP sẽ bị phong tỏa và ta sẽ có cơ chế nuôi ngược âm (h.10.5b)



Hình 10.5. Hiệu ứng Pasteur - một trong những ví dụ về sự tham dự của các yếu tố cấu trúc tế bào vào quá trình điều chỉnh

X.3. ĐIỀU KIỆN CỦA CÁC QUÁ TRÌNH LÊN MEN

X.3.1. Các cấu tử của môi trường

X.3.1.1. Nguồn glucit

Trừ vi khuẩn tự dưỡng ra, nguồn năng lượng cần cho các vi sinh vật khác là do sự phân hủy các hợp chất cao năng thành chất thấp năng, nghĩa là nguồn năng lượng của sự trao đổi chất. Năng lượng thu được bằng cách này có thể được sử dụng bằng những con đường khác nhau cho những mục đích khác nhau sau đây :

- Để duy trì các hệ thống khi nhiệt độ của môi trường xung quanh cơ thể cao hơn, nghĩa là để thoát nhiệt ;
- Một phần đáng kể năng lượng thu được do dị hóa đường được dùng để xây dựng tế bào mới ;

- Nếu hệ thống tạo ra khí lớn hơn yêu cầu thì cơ thể phải sản xuất ra công để chống lại áp suất khí quyển. Các khí thoát ra khi đó cũng có thể mang theo một lượng nhiệt nhất định. Những trường hợp như thế thường đặc trưng đối với các quá trình yếm khí, trong đó có sự lên men ;

- Trong quá trình hoạt động của cơ thể vi sinh vật, luôn luôn có trạng thái không cân bằng với môi trường xung quanh do đó đòi hỏi phải tiêu tốn năng lượng ;

- Để đảm bảo được độ bền cơ học cho các tế bào vi sinh vật thì trạng thái tương là có ý nghĩa phổ biến hơn cả. Do đó đòi hỏi phải tiêu tốn năng lượng để tạo nên thế hiệu khác nhau ở hai bên màng tác dụng chọn lọc ;

- Sự chuyển động của các tiêm mao, các sợi nấm và các bộ máy chuyển động khác cũng đòi hỏi tiêu tốn năng lượng.

Vì vậy một trong những thành phần chủ chốt của môi trường trong quá trình lên men là glucit. Gluxit không những là nguồn cung cấp năng lượng mà là nguồn cung cấp vật liệu xây dựng cần thiết để sinh tổng hợp các cấu tử cần thiết của tế bào. Trong điều kiện thí nghiệm, các chất này thường được cho vào dưới dạng hợp chất thuần khiết, đặc biệt là glucoza. Trong điều kiện sản xuất công nghiệp, người ta thường chú ý sử dụng những nguyên liệu ban đầu rẻ tiền và trong điều kiện có thể, với sự tính toán như thế nào để chúng không những chứa glucit tương ứng mà còn chứa những yếu tố phát triển khác nữa. Ví dụ, trong sản xuất penixilin đầu tiên người ta dùng lactoza, sau người ta thay bằng glucoza, sau nữa người ta thay thế bằng nước chiết ngô.

Các nước chiết có đường và mật rỉ thường được sử dụng trong nhiều quá trình sản xuất. Khi sử dụng các vật liệu có tinh bột thì phải cho thủy phân sơ bộ thành đường bằng axit hoặc bằng enzim của malt.

X.3.1.2. Phosphat vô cơ

Phosphat có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển năng lượng của hệ thống sinh học. Phosphat thường được đưa vào môi trường dưới dạng kali phosphat hoặc amon phosphat. Nồng độ phosphat thường xê dịch từ 0,1 đến 0,5%. Trong trường hợp khi cần khuyết chất dinh dưỡng thì phosphat được đưa vào với nồng độ hạn chế. Ngoài phosphat vô cơ người ta cũng đưa vào môi trường một lượng nhỏ phospho dưới dạng hợp chất hữu cơ.

X.3.1.3. Nitrơ

Nitrơ là hợp phần đặc biệt của protein, axit nucleic và phần lớn các hợp chất phức tạp của chất sống. Nhiều vi sinh vật có thể đồng hóa nitrơ dưới dạng ion amoni; một số dưới dạng nitrat, còn đa số đòi hỏi hợp chất nitrơ có nguồn gốc sinh học.

X.3.1.4. Các nguyên tố vi lượng

Ngoài các nguyên tố trên, các nguyên tố vi lượng cũng rất cần thiết. Các nguyên tố vi lượng thường gặp là Mn, Mo, Zn, Cu, Co, Ni, Vd, B, Cl₂, Na và Si.

Ngoài các nguyên tố vi lượng vô cơ, các nguyên tố vi lượng hữu cơ cũng rất quan trọng.

Nói chung các nguyên tố vi lượng có thể có hiệu quả với nồng độ cực kỳ nhỏ. Chẳng hạn β - alanin có hiệu quả khi nồng độ là $1 : 10^8$, axit pantotenic là $1 : 50\ 000$.

Các nguyên tố vi lượng cũng như những chất khác ở dạng vết là những yếu tố sinh trưởng, thường chứa trong các nguyên liệu ban đầu khi dùng để chuẩn bị các cơ chất. Những nguyên liệu đó là malt, nước chiết thịt, nước chiết nấm men và các dịch thủy phân như pepton, ...

X.3.1.5. Vitamin

Khó có thể xác định một cách chính xác nhu cầu các chất dinh dưỡng cho từng trường hợp cụ thể. Thông thường thì những chất sinh trưởng hay những yếu tố sinh trưởng đều có liên quan với sự có mặt của các vitamin nhóm B, như B₁, B₂, pan-totenic, PP, B₆, biotin.

Trong nhiều quá trình lên men, biotin có vai trò rất quan trọng.

Cần chú ý rằng các vitamin nhóm B cũng như các chất sinh trưởng khác rất dễ dàng bị vô hoạt bởi nhiệt và pH giới hạn.

X.3.2. Các tác nhân bên ngoài

X.3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ làm việc có ảnh hưởng đến vi sinh vật và các quá trình trao đổi chất của chúng. Do đó người ta có thể sử dụng nhân tố này trong một số ngành sản xuất lên men. Chẳng hạn chọn điều kiện nhiệt độ như thế nào để hướng vi khuẩn *Clostridium acetobutylicum* sản xuất ra một trong hai sản phẩm axeton hoặc rượu butylic. Người ta thấy rằng nếu nuôi cấy bắt đầu ở 25°C rồi tăng dần dần lên đến 37°C thì vi khuẩn đó sẽ sản xuất ra butanol. Tương tự như vậy, sản xuất penixilin có thể phân ra hai pha. Mỗi pha tương ứng với một nhiệt độ riêng của mình. Trong pha đầu để cho hệ sợi phát triển, còn trong pha thứ hai để vi sinh vật sản xuất và giải phóng ra kháng sinh.

Cũng cần chú ý rằng khoảng nhiệt độ để các quá trình trao đổi chất của vi sinh vật xảy ra với một cường độ mong muốn rất hẹp và thường không quá 20°C.

Nhiệt độ còn có vai trò thực sự đến những khía cạnh khác của các quá trình sinh tổng hợp. Đó là những ảnh hưởng của nhiệt độ đến :

- vận tốc tạo thành và giải phóng các sản phẩm cuối cùng ;
- trạng thái vật lý của hệ thống như sự hợp thể hoặc sự tạo nên các hạt của hệ sợi ;
- điều kiện cuối cùng để đảm bảo được sự lọc nhanh chất lỏng và tách được chất lỏng khỏi sinh khối bằng một phương pháp nào đó ;
- nhiệt độ còn có vai trò quan trọng trong việc điều hòa chất lượng của các nước giải khát và sản phẩm thực phẩm thu được bằng phương pháp lên men. Người ta thấy rằng thời gian tàng trữ ở hầm lạnh lâu thu được những sản phẩm có vị ưa thích. Do vậy, trong sản xuất bia, rượu vang, người ta hy sinh vận tốc phản ứng để có ưa thích về cảm quan.

X.3.2.2. Ảnh hưởng của pH

Các vi sinh vật cũng có vận tốc sinh trưởng cực đại trong một khoảng pH hạn chế và cũng bị vô hoạt hoàn toàn hoặc bị chết khi ở pH giới hạn. Các vi sinh vật khác nhau tồn tại ở những pH tối ưu khác nhau và thường ở trong khoảng từ 4,0 – 8,0. Tuy nhiên, không phải luôn luôn cần thiết phải tiến hành toàn bộ quá trình ở điều kiện sinh trưởng tối ưu. Chẳng hạn, trong sản xuất penixilin nấm mốc phát triển tốt nhất ở pH 4,5 nhưng lại sản xuất và giải phóng ra penixilin tốt hơn khi ở pH 7,5.

Trong một số quá trình lên men, mức pH ban đầu thường được bảo toàn một cách tự động do tạo thành CO_2 và các axit hữu cơ khác nhau. Do vậy phải hoàn thiện các phương pháp kiểm tra những chất đó. Khi tiến hành các quá trình ở phòng thí nghiệm, nhằm mục đích đó người ta thường đưa các cấu tử của hệ đệm, ví dụ, đưa phosphat vào trong thành phần của môi trường dinh dưỡng.

X.3.3. Tác nhân gây lên men – vi sinh vật

Vi sinh vật là tác nhân chủ yếu gây nên sự lên men. Trong tế bào vi sinh vật có một hệ enzym rất phức tạp. Chẳng hạn trong tế bào của *Aspergillus oryzae* có chứa ít nhất là 23 enzym :

Các enzym chứa trong tế bào Aspergillus oryzae

(theo Tauber 1949)

α – Amilaza	Pirophosphataza
β – Amilaza	Phosphomonoesteraza
Maltaza	Phosphodiesteraza
Lactaza	Tannaza
Proteinaza	Catalaza
Peptidaza	Nucleaza
Dipeptidaza	Fitaza
Renin	Trehalaza
Pectinaza	Amidaza
Pectozanaza	Xitaza
Lipaza	Sulfataza
Xellulaza	

Tuy nhiên, không phải tất cả vi sinh vật đều có khả năng sinh tổng hợp một phức hệ enzym như nhau. Nhiều thí nghiệm nghiên cứu các enzym riêng biệt có nguồn gốc vi sinh vật chứng tỏ rằng ngay cả cùng một loài cũng khác nhau về lượng enzym tổng hợp được. Vì vậy việc tuyển chọn chủng có hệ enzym đặc trưng cho một sản xuất nào đó luôn luôn liên quan với việc khảo nghiệm hàng chục, hàng trăm loài vi sinh vật khác nhau. Để có được chủng ứng dụng cho từng sản xuất riêng là vấn đề khó khăn phức tạp và lâu dài.

X.4. CÁC QUÁ TRÌNH LÊN MEN

X.4.1. Lên men bởi nấm men

X.4.1.1. Sự lên men rượu và sơ đồ kỹ thuật của sản xuất rượu

Dứng trên quan điểm sinh hóa, quá trình sản xuất rượu có thể chia thành các giai đoạn sau :

- Chuẩn bị malt hoặc canh trường nấm mốc làm nguồn cung cấp các enzym đường hóa ;
- Thủy phân gluxit đến đường đơn giản thuận lợi cho việc lên men ;
- Nhân giống nấm men trong điều kiện yếm khí ;
- Lên men ;
- Chưng cất và tinh luyện rượu.

Chúng ta dễ dàng nhận thấy rằng mỗi một giai đoạn được đặc trưng bởi những quá trình sinh hóa đặc hiệu cho giai đoạn đó. Các biện pháp kỹ thuật tương ứng trong mỗi một giai đoạn đều nhằm điều khiển các phản ứng sinh hóa đó tiến hành theo chiều hướng mong muốn.

Khi sản xuất rượu từ tinh bột của hạt hoặc củ thì trước hết cần phải chuyển các gluxit phức tạp của nguyên liệu đó thành các đường đơn giản. Thường thì tinh bột của nguyên liệu được thủy phân đến maltoza và glucoza nhờ các enzym amilolizơ. Malt hoặc các canh trường nấm mốc nuôi cấy theo phương pháp bề mặt hay phương pháp chiếu sâu là những nguồn giàu có các enzym đó. Ngoài amilaza trong những nguồn đó còn chứa các enzym khác nữa. Do đó khi sử dụng phức hệ enzym của các nguồn trên, bên cạnh gluxit thì các thành phần khác của nguyên liệu như protein, lipit, pectin, hợp chất phospho cũng bị thủy phân. Các sản phẩm khác loại của quá trình thủy phân đó rất cần thiết đối với sự dinh dưỡng của nấm men cũng như để cho sản phẩm cuối cùng những hương vị cần thiết. Dĩ nhiên để enzym thủy phân tinh bột được tốt thì ngoài việc tạo điều kiện nhiệt độ và pH tối ưu, người ta phải hồ hóa tinh bột (bằng cách nấu có áp suất) để enzym tiếp xúc với cơ chất được mật thiết.

Etanol được tạo thành ở trong giai đoạn lên men. Muốn có được sản phẩm chủ yếu trong môi trường lên men là rượu thì tác nhân cung cấp hệ enzym đặc thù đó phải là nấm men *Saccharomyces Cerevisiae*. Nấm men có đặc điểm là trong điều kiện sinh hoạt yếm khí, chúng có khả năng chuyển đường thành etanol và CO_2 một cách hợp thức. Trong điều kiện yếm khí nấm men không có khả năng chuyển hóa tiếp các etanol đã được tạo thành, có nghĩa là sự lên men sẽ dừng lại ở giai đoạn hình thành và tích lũy rượu etylic. Như vậy biện pháp kỹ thuật tương ứng là phải cho lên men trong thùng kín.

Tế bào nấm men còn có đặc điểm nữa là khả năng tạo ra các nội enzym (endofermen) nghĩa là những enzym tiến hành xúc tác ở bên trong tế bào. Như vậy sự phân ly đường sẽ xảy ra ở bên trong tế bào nấm men, còn rượu etylic và CO_2 được tạo thành thì đi ra khỏi tế bào và tích tụ ở trong môi trường.

Liên biến của quá trình lên men như sau.

Đường cùng với các chất dinh dưỡng khác của môi trường lên men, trước tiên được hấp phụ vào trên bề mặt của tế bào nấm men, sau đó khuếch tán qua màng bề mặt bán thấm đó mà vào bên trong tế bào. Sự khuếch tán này tuân theo những định luật chung của sự thẩm thấu.

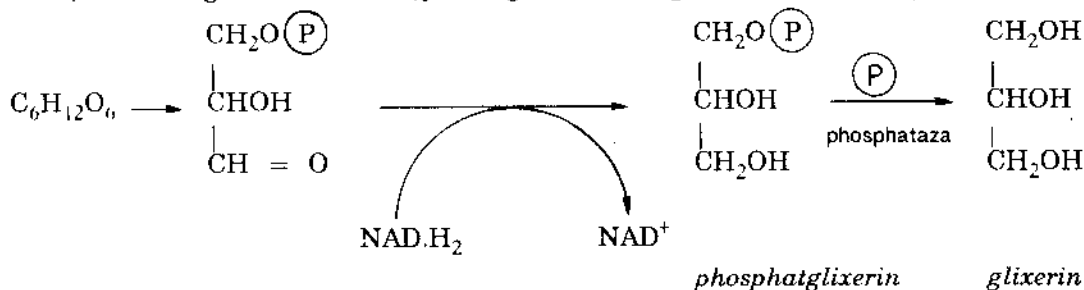
Trong khi nước được vào ra tế bào một cách tự do thì đường và các chất dinh dưỡng khác chỉ được màng tế bào cho đi vào mà không cho quay ra. Vì vậy, đường bị chuyển hóa qua một chuỗi phản ứng enzym để tạo thành sản phẩm cuối cùng của sự lên men là rượu etylic và CO_2 . Như vậy, là thông qua các hoạt động sống của tế bào nấm men mà trong nguyên sinh chất của chúng liên tục xảy ra những phản ứng sinh hóa rất phức tạp để rồi cuối cùng dẫn đến tổng hợp ra một chất này và phân hủy một chất kia.

Rượu etylic và khí cacbonic được tạo thành liên tục thoát ra khỏi tế bào và khuếch tán vào môi trường xung quanh. Vì rượu hòa tan được với nước theo bất cứ tỉ lệ nào nên nó có thể khuếch tán vào môi trường một cách nhanh chóng và tạo ra một độ đậm lớn ở xung quanh tế bào nấm men. Khí cacbonic cũng hòa tan được trong dịch thể, song độ hòa tan của nó trong nước không lớn lắm (ở nhiệt độ $25 - 30^\circ\text{C}$ và áp suất 860 mmHg một lít nước hòa tan được 0,865 - 0,837 lít CO_2). Độ hòa tan của khí cacbonic trong rượu lớn hơn trong nước ba lần. Do vậy mà trong môi trường lên men nhanh chóng được bão hòa khí cacbonic. Liên đó khí cacbonic được hấp phụ vào trên bề mặt của tế bào nấm men và những vật thể rắn khác của môi trường. Khi thoát ra khỏi dung dịch khí cacbonic liên tục tạo thành các bọt và kết hợp vững chắc với tế bào nấm men. Khi các bọt đạt đến độ lớn nào đó thì lực nâng của chúng vượt quá trọng lượng của tế bào và thế là bọt cùng với cả tế bào được nổi lên trên bề mặt, rồi bọt bị vỡ ra, khí bay vào khí quyển, còn tế bào nấm men lại bị chìm xuống. Như vậy là tế bào nấm men vốn dĩ không di động, trở thành chuyển động được ở trong môi trường lên men, khiến cho sự trao đổi chất ở trong tế bào trở nên mạnh mẽ hơn và sự lên men cũng được tăng nhanh lên một cách tương ứng.

Xét về mặt hóa học, sự lên men rượu bình thường có thể chia ra hai thời kỳ : thời kỳ cảm ứng và thời kỳ tĩnh.

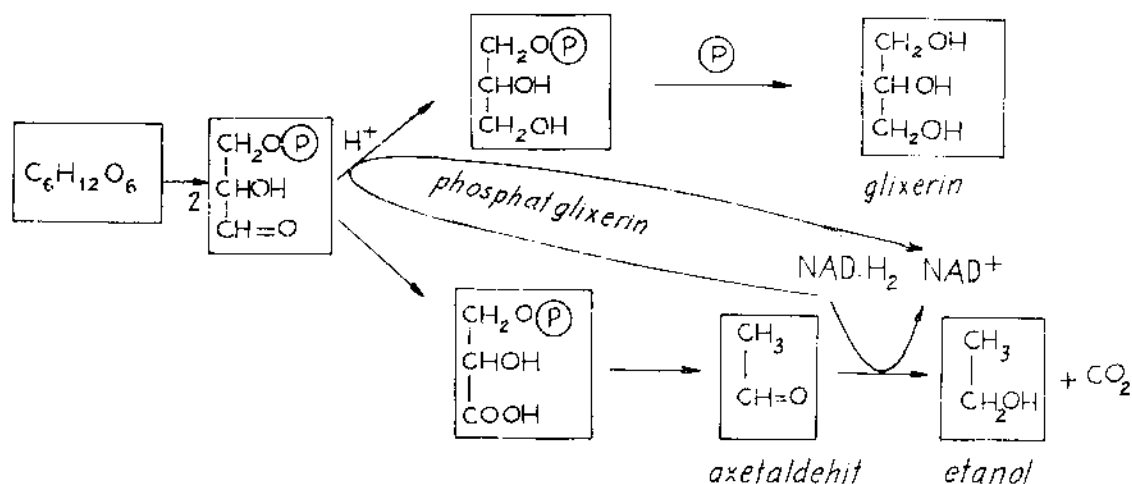
a) Thời kỳ cảm ứng

Ở giai đoạn này, chất tiếp nhận hydro của enzym alcoldehydrogenaza là axetaldehit được tạo thành chưa đủ, do đó enzym sẽ chuyển hydro đến cho aldehyt phosphatglixerinic. Dưới tác dụng của enzym phosphataza, phosphatglixerin bị thủy phân để tạo thành glixerin. Như vậy trong môi trường sẽ hình thành glixerin và CO_2 :



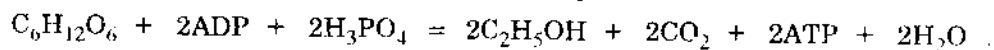
b) Thời kỳ tĩnh

Đến lúc này lượng axetaldehit là cơ chất bình thường của enzym alcohol-dehydrogenaza được tạo thành đã có nhiều, nên enzym sẽ chuyển hydro đến cho cơ chất của nó và rượu etylic được hình thành từ đây :



Glixerin chỉ được tạo nên trong thời kỳ cảm ứng nên nó chỉ là sản phẩm phụ trong môi trường axit.

Phương trình phản ứng tổng quát của quá trình lên men :



Thực tế cho thấy rằng, sự lên men rượu sẽ xảy ra một cách bình thường để cho ta sản phẩm chủ yếu là rượu và một số sản phẩm phụ khác như glixerin ... chỉ trong điều kiện pH của môi trường từ 4 - 5 và môi trường thật yếm khí. Trong điều kiện yếm khí sự lên men xảy ra rất mạnh mẽ (nghĩa là ethanol tạo thành sẽ nhiều) nhưng sự phát triển của tế bào nấm men hầu như không có. Vì khi ấy nấm men có thể thu được năng lượng để duy trì các hoạt động sống của mình chỉ bằng cách gây lên men glucoza. Khi có không khí thì sự lên men yếu đi vì nấm men sẽ thu năng lượng cần thiết cho sự phát triển của chúng bằng con đường hô hấp hiếu khí nghĩa là bằng cách oxy hóa sinh học glucoza đến CO_2 và H_2O . Hiện tượng kìm hãm sự lên men rượu dưới ảnh hưởng của oxy gọi là hiệu ứng Pasteur.

Như vậy, trong điều kiện môi trường thật yếm khí và pH 4 - 5 thì sự lên men rượu sẽ xảy ra theo cơ chế nuôi ngược dương. Trái lại khi có hiệu ứng Pasteur thì sự lên men rượu sẽ xảy ra theo cơ chế nuôi ngược âm (h. 10.5b).

Vì vậy, biện pháp kỹ thuật tương ứng trong sản xuất rượu là phải cho lên men trong những thùng bít kín, nghĩa là trong điều kiện yếm khí.

Ngoài độ pH và độ yếm khí ra, nhiều nhân tố khác như nhiệt độ, nồng độ đường và các sản phẩm khác cũng có ảnh hưởng đến quá trình lên men.

Trong điều kiện sản xuất, sự lên men rượu sẽ tiến hành một cách thuận lợi khi nhiệt độ từ 29 - 32°C.

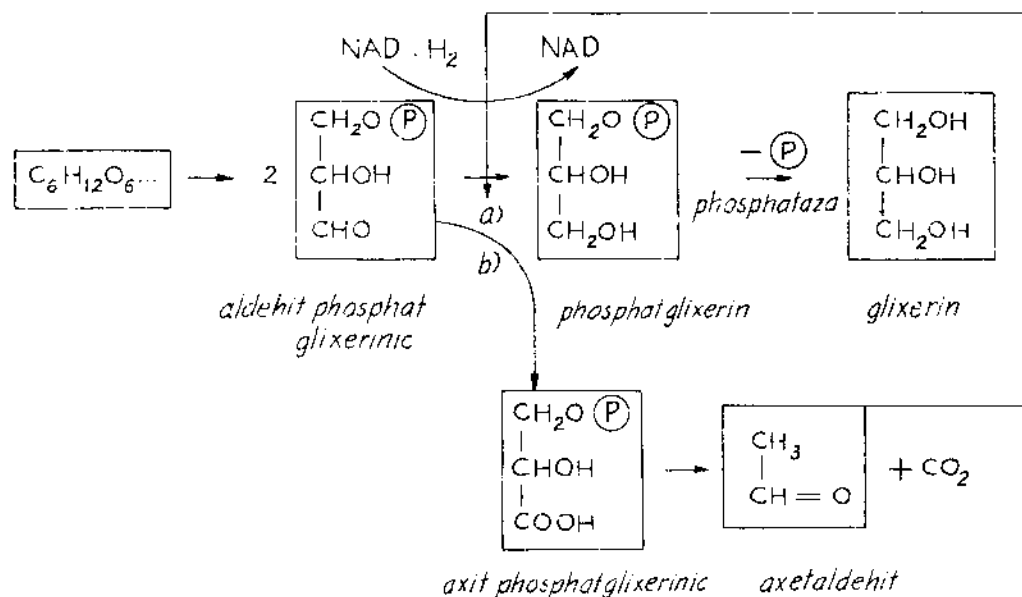
Người ta thấy, nấm men có thể làm lên men được mặc dù chìm ngập những dung dịch đường có nồng độ 25 - 30%. Tuy nhiên môi trường thuận lợi cho lên men là chứa từ 10 - 18% đường. Dung dịch đường có nồng độ rất cao sẽ tạo ra áp suất thẩm thấu lớn gây phá hủy trạng thái sinh lý bình thường của nấm men. Thời gian lên men sẽ kéo dài, sử dụng không triệt để hết đường, đồng thời lượng rượu tạo thành lớn sẽ ức chế hoạt động của nấm men. Môi trường lên men có nồng độ đường quá thấp sẽ không thuận lợi về kinh tế (chi phí hơi, dung tích thiết bị, ...).

Nồng độ rượu và khí cacbonic cũng có tác dụng kìm hãm đến sự sinh sản cũng như khả năng lên men của nấm men. Sự sinh sản của nấm men sẽ bị chậm lại khi nồng độ rượu có trong môi trường là 2% và sẽ bị ngừng lại khi nồng độ rượu 5%. Khí cacbonic ức chế sự lên men nhưng việc thoát khí CO_2 lại có tác dụng tốt đến quá trình lên men. Sự thoát khí CO_2 sẽ làm cho môi trường lên men luôn luôn bị khuấy động, kéo dài được trạng thái lơ lửng của nấm men do đó làm tăng nhanh sự lên men.

X.4.1.2. Sự lên men rượu và sản xuất glixerin

Khi lên men rượu, bên cạnh sản phẩm chính là rượu và CO_2 còn có nhiều sản phẩm phụ khác nữa. Theo Pasteur, trong khi lên men rượu, ngoài rượu ra còn có glixerin (3,2%) và axit suxinic (0,6%).

Dựa vào cơ chế và điều kiện các phản ứng enzym, người ta có thể điều khiển các phản ứng trong sự lên men rượu theo chiều tạo ra sản phẩm chính là glixerin. Trong thực tế có thể thu được 40% glixerin so với lượng đường cho vào. Cơ chế phản ứng :



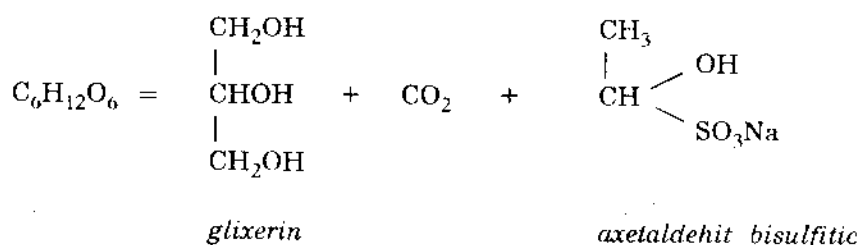
Nhìn sơ đồ phản ứng chúng ta thấy, để tạo thành glixerin, phản ứng xảy ra theo chiều (a). Rõ ràng là việc hình thành ra axetaldéhit theo chiều (b) sẽ làm ngắt mạch phản ứng theo chiều (a), nghĩa là sẽ điều chỉnh phản ứng này theo cơ chế

nổi ngược âm. Vì lẽ khi có axetaldehyt thì coenzim khử NAD.H_2 sẽ khử axetaldehyt để tạo ra etanol mà không khử aldehyt phosphatglixerinic để tạo ra phosphatglixerin rồi sau đó ra glixerin.

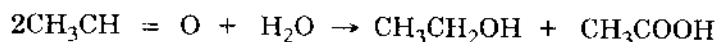
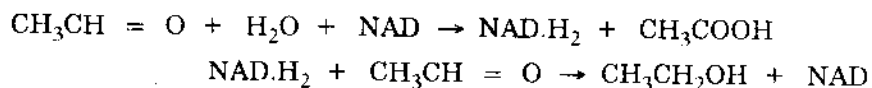
Neiberg đã cho ta biết rằng khi đưa natri bisulfit hoặc hydrazin thế (thuốc thử tác dụng lên nhóm cacbonyl) vào dịch lên men thì natri bisulfit (hoặc hydrazin thế) sẽ kết hợp với axetaldehyt tạo thành hợp chất khó tan. Nói cách khác, khi đó mất axetaldehyt nên coenzim khử NAD.H_2 bắt buộc phải khử aldehyt phosphatglixerinic để tạo ra glixerin.

Như vậy, việc đưa natri bisulfit vào môi trường lên men là một biện pháp kỹ thuật để điều khiển phản ứng theo chiều (a).

Kết quả là từ một phân tử glucoza tạo thành một phân tử glixerin, CO_2 và hợp chất của axetaldehyt với bisulfit. Do đó trong môi trường có bisulfit, phẩm vật chính là glixerin. Sơ đồ phản ứng tổng quát của kiểu lên men thứ hai hay là của sự "lên men glixerin" như sau :

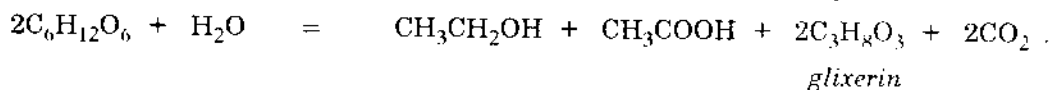


Cũng cần thấy rằng, glixerin cũng có thể được tạo ra khi thêm vào dung dịch lên men NaHCO_3 hoặc Na_2HPO_4 (nghĩa là khi kiềm hóa nhẹ môi trường lên men). Vì lẽ khi ở trong môi trường kiềm thì axetaldehyt vừa bị oxy hóa vừa bị khử (phản ứng hóa hai) theo sơ đồ phản ứng :



Do axetaldehyt đã mất cho phản ứng hóa hai này nên chất tiếp nhận hydro ở đây cũng là aldehyt phosphatglixerinic.

Sơ đồ phản ứng tổng quát của kiểu lên men thứ ba này như sau :



X.4.1.3. Lên men rượu và kỹ thuật sản xuất bia

Sản xuất bia cũng dựa trên quá trình lên men rượu nhờ nấm men. Tính chất đặc trưng của bia được thành tạo nên thông qua con đường trao đổi chất của nấm men ở trong một môi trường đặc biệt. Vì vậy việc chọn cho được nòi nấm men tương ứng và điều khiển quá trình trao đổi chất của nó theo chiều mong muốn là rất quan trọng.

Nguyên liệu chủ yếu để sản xuất bia là malt và hoa huplông. Từ đây qua sự lên men để tạo ra bia trong đó ngoài rượu, khí cacbonic, còn có nhiều chất dinh dưỡng khác (gluxit hòa tan, hợp chất nitơ hòa tan, ...) và những chất thơm đặc trưng của hoa huplông. Vì vậy tất cả các biện pháp kỹ thuật tương ứng trong sản xuất bia đều nhằm điều chỉnh các phản ứng enzym theo hướng đó.

Dựa trên cơ sở hóa sinh, qui trình sản xuất bia có thể phân ra các giai đoạn sau :

- Chuẩn bị malt ;
- Chuẩn bị dịch để lên men ;
- Lên men chính và phụ ;
- Lọc.

a) Chuẩn bị malt

Trong sản xuất bia, malt có một ý nghĩa rất quan trọng. Chất lượng của bia phụ thuộc khá nhiều vào chất lượng của malt, do đó yêu cầu của malt trong sản xuất bia cao hơn trong sản xuất rượu. Trong sản xuất bia người ta dùng chủ yếu là malt đại mạch. Vì lẽ protein của đại mạch có vai trò rất lớn trong việc hình thành nên vị, bọt và tạo cho các keo của bia được bền vững.

Để tạo ra malt phải cho hạt nảy mầm. Mục đích chủ yếu của biện pháp này là để tích tụ được ở trong hạt một lượng tối đa các phức hệ enzym hoạt động. Trong hạt chín, phần lớn các enzym bị hấp thụ bởi các cấu trúc nguyên sinh của tế bào, do đó các enzym ở dưới dạng tiền enzym không hoạt động. Trong khi nảy mầm không những các enzym được chuyển sang trạng thái hoạt động mà còn được tân tạo thêm.

Các enzym của malt có giá trị hơn cả đối với sản xuất lên men là α - và β - amilaza. α - amilaza, một phần được giải phóng ra từ trạng thái tiền enzym còn một phần thì được tân tạo thêm. Qua nảy mầm hoạt động của dextrinaza (thủy phân phosphodextrin đến maltoza), maltaza và xitaza (thủy phân hemixelluloza của nội nhũ) tăng lên từ 2 - 3 lần. Hoạt độ của các enzym proteaza, dezaminaza, pectinaza, lipaza, catalaza, peroxydaza cũng tăng lên một cách mạnh mẽ.

Tóm lại qua nảy mầm các enzym thủy phân cũng như các enzym thuộc chu trình tricarboxylic đều tăng hoạt độ lên một cách mạnh mẽ.

Malt đặc biệt

Malt đặc biệt hoặc hoàn toàn không chứa enzym hoặc chứa enzym nhưng không đáng kể. Do đó khi nấu, malt đặc biệt không được đường hóa. Trong sản xuất nó được sử dụng cùng với malt thường. Malt này thường được chuẩn bị từ malt thường nhưng do gia nhiệt ở nhiệt độ cao (không quá 105°C trong khi đó sấy malt thường không quá 70 - 80°C) nên thu được những tính chất đặc biệt tạo cho bia có hương vị và màu sắc đặc trưng.

b) Chuẩn bị dịch để lên men

Chuẩn bị dịch để lên men được bắt đầu khi trộn malt nghiền nhỏ với nước và nấu.

Mục đích của nấu là để thu được từ malt một lượng chất hòa tan tối đa có thành phần nhất định đặc trưng cho bia.

Trong malt, lượng chất hòa tan trong nước, vốn có không nhiều : chỉ chiếm 10 - 15% trọng lượng chất khô, và thường là đường, một phần protein và các sản phẩm phân giải của chúng, một ít pentozan, pentoza, pectin, tanin và axit đắng. Khi trộn malt với nước những chất này được chuyển vào dung dịch. Tuy nhiên, phần lớn chất hòa tan đều được thành tạo nên khi nấu. Khi đó dưới tác dụng của các hệ enzym hoạt động có trong malt, các chất không hòa tan còn lại sẽ được chuyển thành hòa tan ở những mức độ cần thiết. Vì vậy các biện pháp kỹ thuật tương ứng ở trong giai đoạn nấu đều nhằm điều hòa các phản ứng enzym này.

Nhân tố điều chỉnh các quá trình enzym khi nấu là nhiệt độ, pH, nồng độ enzym và chế độ nước.

Chẳng hạn, nếu khống chế ở nhiệt độ 45 - 50°C thì quá trình phân ly các hợp chất chứa nitơ sẽ tốt hơn cả. Nhưng nếu ở nhiệt độ 50°C thì sự tích tụ axitamin lại thuận lợi hơn.

Khi nhiệt độ 60 - 65°C, thì phản ứng tạo ra các đường lên men được, rất thuận lợi.

Khi nhiệt độ 70 - 75°C, thì phản ứng phân ly tinh bột sẽ tiến hành nhanh hơn, nhưng cũng tạo ra lượng dextrin lớn hơn khi nhiệt độ 60 - 65°C.

Nồng độ enzym có thể khống chế bằng cách sử dụng hỗn hợp các malt khác nhau, hoặc bằng cách đun sôi dịch nấu từng phần nhiều hay ít.

Tỉ lệ nước cái cũng có thể làm cho phản ứng tiến hành nhanh hay chậm. Chẳng hạn, để có bia trắng thì tinh bột phải bị thủy phân đến một mức độ cao hơn, có nghĩa là phải khống chế tỉ lệ nước malt nghiêng tương đối cao hơn (5 hl nước cho 100 kg malt nghiêng). Còn để có bia vàng thì khống chế tỉ lệ nước-malt nghiêng bé hơn (4 hl nước cho 100 kg malt). Vì dung dịch đậm đặc hơn thì sẽ bị thủy phân yếu hơn.

Thực tế, trong giai đoạn nấu, bằng cách dùng những nhân tố như vậy có thể điều chỉnh được quá trình thủy phân tinh bột và protein.

Về thành phần glucit của dịch để lên men phải thỏa mãn hai điều kiện :

- Không có amilodextrin và eritrodextrin ;
- Ngoài maltoza trong môi trường phải có một lượng nhất định acrodextrin và maltodextrin để tạo ra dư vị và độ nhớt của bia.

Nói chung, tỉ lệ glucit trong dịch để lên men phải như sau (tính thành phần trăm) :

Fructoza	1 - 3	Maltotrioza	11 - 19
Glucoza	8 - 10	Maltotetraoza	2 - 6
Sacaroza	2 - 6	Dextrin	14 - 22
Maltoza	38 - 40		

Về thành phần, các sản phẩm thủy phân của protein phải có trong dịch để lên men cũng rất quan trọng. Vì lẽ những sản phẩm đó có ảnh hưởng đến dư vị, bọt và độ bền của bia, cũng như rất cần thiết để làm thức ăn cho nấm men.

Người ta đã xác lập được rằng khả năng tạo bọt của bia do các keo protein

quyết định, còn khả năng giữ bọt lại do các sản phẩm của sự lên men (như rượu, este, axit bay hơi, ...) và những chất đắng của huplông quyết định. Trong số protein có ý nghĩa hàng đầu là albumin, albumozo có hoạt động bề mặt cao và những chất hòa tan của huplông giàu pectin và gôm. Còn axitamin mặc dầu không phải là chất hoạt động bề mặt, nhưng nó có thể tương tác với đường tạo ra melanoidin cũng có khả năng tạo bọt.

Albumozo, pepton và polypeptit, ... là những hợp chất nitơ hòa tan và bền vững, nghĩa là khi đun sôi chúng vẫn không bị tách ra khỏi dung dịch. Các protein kiểu albumozo này là sản phẩm thủy phân protein của nhóm enzym proteinaza khi ở 60°C (còn nhóm peptidaza hầu như đã hoàn toàn bị vô hoạt khi sấy malt).

Để tạo cho bia bền vững hơn thì không phải là albumozo mà lại là những protein kém phức tạp hơn nữa. Những chất loại này được tạo ra một lượng khá khi không chế nhiệt độ 45 - 50°C.

Rõ ràng dùng nhân tố nhiệt độ có thể điều chỉnh được tỉ lệ giữa các sản phẩm thủy phân của protein phải như thế nào đó để có ảnh hưởng tốt đến chất lượng của bia. Thông thường trong dịch để lên men phải có khoảng 1/3 là các hợp chất nitơ cao phân tử kết tủa được bởi tanin. Còn tổng lượng axitamin so với trong malt thì phải gấp đôi. Cứ 100g nitơ của malt khi nấu chuyển vào dung dịch từ 35 - 53%.

pH tối ưu của đa số enzym có trong malt thường là thấp hơn pH của dịch nấu (pH 5,8), do đó axit hóa nhẹ môi trường bằng axit lactic để đưa pH về 5 - 5,2 cũng sẽ thuận lợi cho sự thủy phân protein, cũng như cho sự tạo thành các phosphat hòa tan.

Để bia sau này có hương vị đặc trưng thì dịch nấu sau khi lọc đem đun sôi với huplông. Khi đó từ huplông sẽ trích ly ra được các axit đắng, nhựa, tinh dầu và tanin. Axit đắng và nhựa sẽ làm cho bia có vị đặc trưng, ổn định các keo và tạo cho các bọt bền vững. Ngoài ra các chất đắng của huplông có tính chất sát trùng làm tăng độ bền của thành phẩm. Tinh dầu của huplông tạo nên vị và hương thơm của bia. Do các hợp phần đặc biệt đó của huplông hòa tan ra khiến cho hương vị và màu sắc của dịch thay đổi. Dịch lên men sẽ có vị đắng của huplông. Khi đun sôi còn xảy ra phản ứng melanoidin và phản ứng caramen hóa nên cũng góp phần tạo ra hương vị và màu sắc của dịch lên men.

c) Lên men dịch để lên men

Nấm men là tác nhân cung cấp phức hệ enzym "zimaza" để gây men dịch lên men.

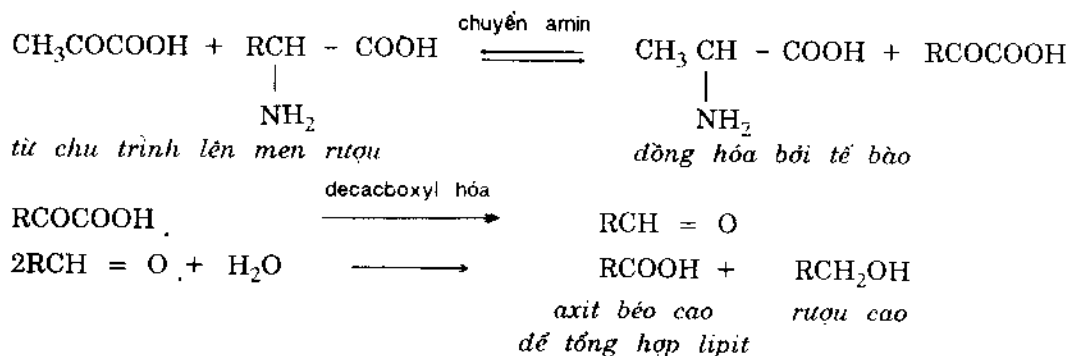
Sự trao đổi chất ở nấm men có vai trò chủ đạo trong việc hình thành nên sản phẩm chính cũng như sản phẩm phụ của sự lên men. Nói cách khác, toàn bộ tính chất đặc trưng của bia đều được thành tạo nên thông qua sự trao đổi chất của vi sinh vật này.

Nấm men có chứa tất cả bộ enzym, coenzim và các hệ oxy hóa-khử cần thiết để chuyển hóa các đường ở trong dịch lên men. Qua sự trao đổi chất của mình, nấm men không những tạo cho bia có vị và độ bền vững cần thiết mà còn tân tạo ra hình thơm tương ứng cho bia. Hình thơm đặc trưng của bia chủ yếu là do các sản phẩm phụ: aldehyt, rượu cao, ... gây ra. Thành phần của sản phẩm phụ này phụ thuộc vào loài nấm men, điều kiện lên men và thành phần của môi trường.

Theo I.M.Griachova rượu cao có thể được tổng hợp nên theo hai đường hướng :

- Thứ nhất là do phản ứng chuyển amin giữa các axitamin của môi trường và của tế bào với axit piruvic được sinh ra khi lên men rượu ;
- Thứ hai là do quá trình tổng hợp một số axitamin bởi các hoạt động sống của tế bào nấm men.

Sự sinh tổng hợp ra các rượu cao theo đường hướng thứ nhất có thể biểu diễn bằng sơ đồ phản ứng sau :



Khả năng tiến hành các quá trình này bởi tế bào đã được xác nhận bằng các tính toán về nhiệt động lực học.

Sự tổng hợp ra các rượu cao theo đường hướng thứ hai có thể biểu diễn bằng sơ đồ ở hình 10.6.

Xuất phát từ quan điểm hiện đại về các enzym dị không gian, người ta cho rằng các rượu cao được tạo thành và tích tụ lại khi các axitamin nào đó tổng hợp nên bị thừa. Vì lẽ sự thừa những axitamin này sẽ dẫn đến cơ chế nuôi ngược ức chế toàn bộ hay một phần các enzym của giai đoạn đầu. Do đó sự trao đổi chất của tế bào bị thay đổi và sẽ tích tụ những chất trao đổi khác. Sự tích tụ rượu cao là một ví dụ. Người ta đã chứng tỏ rằng nếu đưa vào môi trường α -alanin, axit α -aminbutiric, glixin, valin, leuxin và izoleuxin thì sẽ tăng cường mạnh mẽ sự sinh tổng hợp tất cả các cấu tử của rượu cao. Hiện nay người ta đã biết trong các sản phẩm của sự lên men có khoảng 50 rượu cao, chiếm gần 90 - 95% dầu fusel. Nhưng nhiều hơn cả là rượu izoamylic, izobutylic và propylic (chiếm 85 - 93% tổng lượng rượu cao).

Quá trình tạo thành rượu cao phụ thuộc vào nhiều nhân tố : đặc điểm sinh lý của chủng nấm men, mức độ thoáng khí, thành phần nitơ và pH của môi trường, nhiệt độ lên men, ...

Lượng rượu cao tích tụ trong môi trường một mặt được quyết định bởi sự sinh trưởng và sinh sản của nấm men, mặt khác còn được quyết định bởi sự trao đổi chất của các tế bào hình thành nên nhưng không sinh sản. Griachova coi quá trình tạo ra rượu cao là một hàm số của sinh khối nấm men, và có thể tính được theo hệ thức sau :

$$C = k_1 \Delta M + k_2 \int_0^t M dt ,$$

trong đó C - lượng rượu cao, mg/100 ml ;

k_1, k_2 - hệ số tỉ lệ, mg/g và mg/g ngày ;

$$\int_0^t M dt - \text{lượng tế bào nấm men tham gia vào trao đổi chất trong thời gian đã}$$
[illegible]

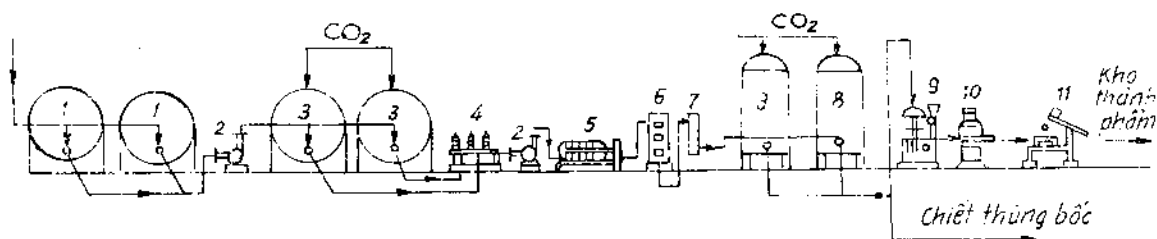
357

Người ta thường chia quá trình lên men trong giai đoạn này ra hai thời kỳ. Thời kỳ đầu gọi là sự lên men chính, thời kỳ sau gọi là sự lên men phụ. Thời kỳ đầu được đặc trưng bởi cường độ lên men mạnh mẽ ; lúc này phần lớn các đường được chuyển thành rượu và CO_2 . Lên men chính tiến hành ở trong các thiết bị lên men kín hoặc hở ở nhiệt độ 6 – 10°C.

Ngoài rượu ra, khi lên men chính còn tạo ra rượu cao, axit và este. Rượu cao và este có ảnh hưởng lớn đến hình thơm của bia. Chẳng hạn tirozoi là một cấu tử quyết định hương thơm của bia.

Khi lên men do tạo ra CO_2 và axit hữu cơ nên pH sẽ bị giảm. Sự tạo ra rượu, axit, este và giảm pH sẽ làm đông tụ protein.

Sau khi lên men chính thì sẽ thu được bia non. Bia non được bơm vào thiết bị lên men kín để lên men phụ. Lên men phụ có ý nghĩa quyết định đến vị, độ bọt, độ bết của bia. Trong thời gian này cũng xảy ra những quá trình như trong lên men chính nhưng chậm chạp hơn. Ở đây, người ta điều chỉnh vận tốc phản ứng bằng cách giảm nhiệt độ (0 – 2°C) và lượng tế bào nấm men.



HÌNH 10.7. Sơ đồ lên men dịch đường, tăng trữ, lọc và chiết bia .

- 1- thùng lên men ; 2- bơm ly tâm ; 3- thùng tăng trữ ; 4- thùng pha trộn ; 5- máy lọc ;
6- máy lạnh ; 7- máy bão hòa CO_2 ; 8- thùng chứa bia đã lọc ; 9- máy dập nút tự động ;
10- máy phân loại bán tự động ; 11- máy dán nhãn tự động

Một trong những mục đích của lên men phụ là để cacbonyl hóa bia, bão hòa bia bằng khí CO_2 , tăng vị và khả năng tạo bọt và ức chế sự phát triển của các vi sinh vật ngoại có hại. Sau khi lên men xong đem lọc.

X.4.2. Lên men bởi vi khuẩn

X.4.2.1. Lên men axeton – butylic

Axeton và rượu butylic là những sản phẩm rất quý đối với công nghiệp hóa học.

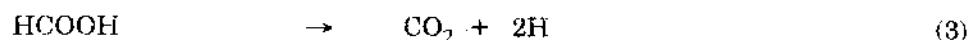
Để thu được axeton và rượu butylic bằng phương pháp lên men, người ta dùng tác nhân cung cấp phức hệ enzym là vi khuẩn *Clostridium acetobutylicum*. Vi khuẩn này là vi khuẩn yếm khí do đó hiệu suất của các sản phẩm lên men chỉ có thể thu được cao trong điều kiện thật kỵ khí.

Cơ chế của sự lên men axeton – butylic theo Cleuberg có thể biểu diễn như sau :



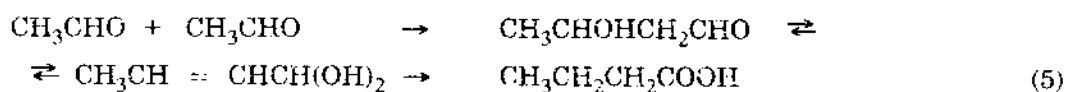
hydrat metylglioxal aldehyt axetic axit formic

Phản ứng tách hydro :

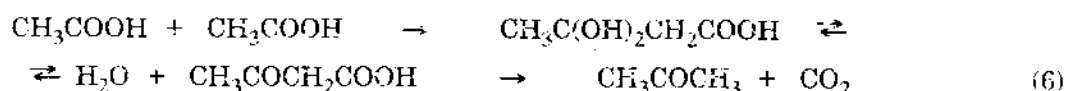


axit axetic

Phản ứng ngưng tụ :

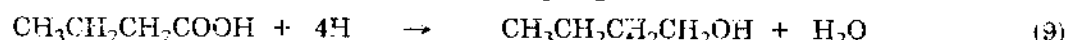
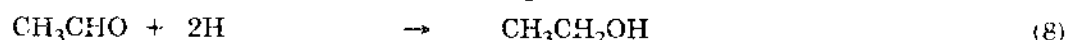


aldehyt crotonic axit butiric



axeton

Phản ứng hydro hóa :



rượu butylic



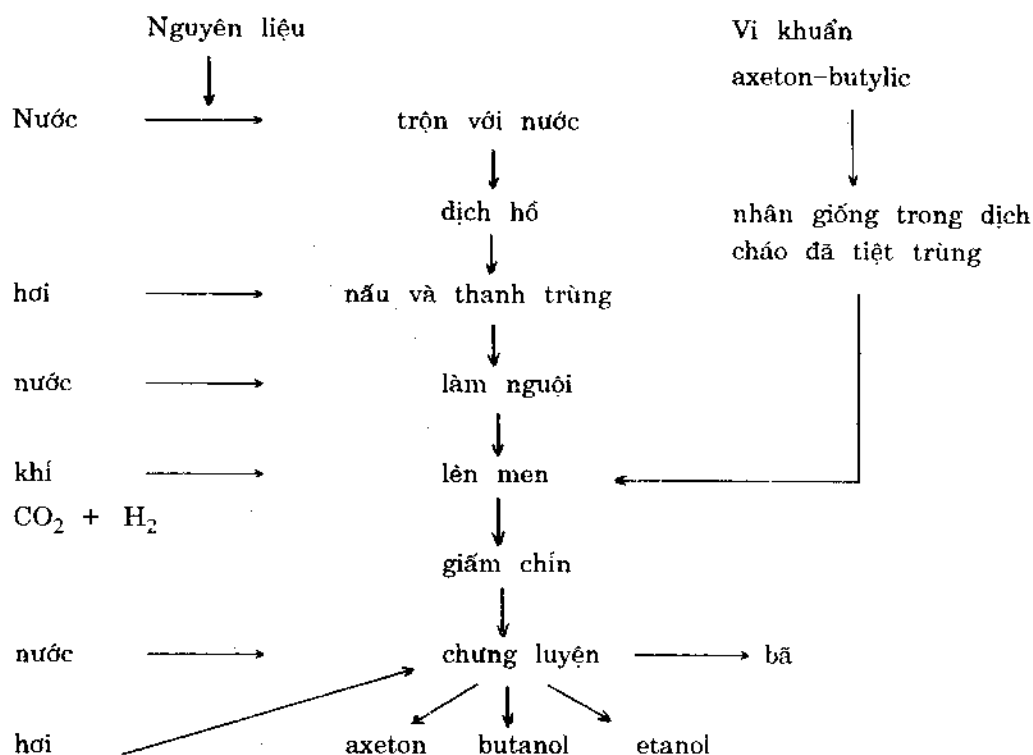
rượu izopropylic

Như vậy, thông qua sự trao đổi chất của vi khuẩn axeton-butylic mà trong môi trường tích tụ được các sản phẩm lỏng như axeton, butanol, etanol và các sản phẩm khí như CO_2 và H_2 . Ngoài các sản phẩm chính đó ra còn có một loạt phẩm vật khác như axit butiric, axit axetic, axit formic, axetylmetylcacbinol và hexanol, ...

Các axit axetic và axit butiric chỉ là những sản phẩm trung gian của sự lên men : axit butiric bị khử thành rượu butylic, còn axit axetic bị chuyển hóa thành axeton. Trong quá trình lên men axit butiric bị mất đi nhanh hơn axit axetic, do đó lượng rượu butylic tạo thành lớn hơn lượng axeton.

Hiệu suất của các sản phẩm trung tính sẽ thu được cao khi tỉ lệ giữa glucit và protein bằng từ 5 : 1 đến 10 : 1. Tỉ lệ glucit : protein tốt nhất là 5,5 : 1. Thấp hơn tỉ số đó sẽ thuận lợi cho việc tạo axeton, cao hơn tỉ số đó, rượu etylic tạo thành sẽ lớn, còn axeton sẽ ít. Thường, hiệu suất axeton cao đi kèm với độ axit chuẩn được lớn. Các nhân tố xúc tiến sự hình thành axeton một cách mạnh mẽ sẽ dẫn đến làm giảm hiệu suất của rượu etylic. Như vậy sự tạo ra axeton-butylic được quyết định bởi sự phân ly protein, bởi sự thoát axit và bởi tỉ lệ giữa glucit và protein trong dịch lên men.

Sơ đồ kỹ thuật sản xuất axeton - butylic như sau :



Về phương diện sinh hóa có thể chia quá trình sản xuất axeton-butylic làm ba giai đoạn :

- chuẩn bị dịch hồ để lên men ,
- lên men ;
- chưng cất để tách các sản phẩm.

Nguyên liệu để sản xuất axeton và butylic bằng phương pháp lên men là tinh bột (các nguyên liệu có tinh bột), không cần phải đường hóa trước vì vi khuẩn có amilaza khá hoạt động. Yêu cầu đối với nguyên liệu là có glucit, nitơ và phospho. Do đó bột các hạt ngũ cốc là nguyên liệu hoàn hảo có chứa tất cả các thành phần cần thiết cho sự lên men. Rỉ đường và các dịch thủy phân gỗ, rơm, bẹ ngô... là nguyên liệu không đầy đủ bắt buộc phải trộn với bột ngũ cốc.

Nồng độ dịch hồ để lên men không cao : 8 - 10% tính theo chất khô hoặc 4 - 6% tính theo tinh bột. Vì lẽ lượng butanol, axeton và etanol tạo ra chỉ tỉ lệ với nồng độ glucit trong giới hạn nồng độ 5,5 - 6%. Nồng độ glucit cao hơn sẽ thừa lại và không được lên men. Khi nồng độ butanol đạt đến xấp xỉ 1,5% (tương ứng với nồng độ ban đầu của glucit là 6%) thì quá trình lên men bị ngừng.

Nhiệt độ để lên men thích hợp của vi khuẩn axeton-butylic là 36-37°C.

Quá trình lên men axeton - butylic có thể chia ra hai thời kỳ : ở thời kỳ đầu, trong môi trường lên men tích tụ axit (nên có tên gọi là lên men axit), song thời kỳ thứ hai thì trong môi trường tích tụ butanol, etanol, và axeton (nên có tên gọi là lên men rượu). Trong thời kỳ thứ hai này độ axit chuẩn ở trong môi trường lên men bị giảm nhanh : giảm đi gần một nửa so với giá trị cực đại ở cuối thời kỳ đầu. Đồng thời cũng xảy ra sự chuyển hóa một cách nhanh chóng các axit thành

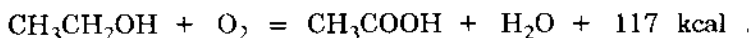
những hợp chất trung tính tương ứng : axit butiric bị khử thành rượu butylic, còn axit axetic bị chuyển hóa thành axeton. Tiếp đó độ axit chuẩn có tăng lên một ít, còn vận tốc tạo ra dung môi dần dần bị chậm lại và đến cuối thời kỳ lên men thì ngừng hoàn toàn.

Trong quá trình lên men còn kèm theo sự thoát khí CO_2 và H_2 . Qua 5 - 6 giờ đầu sự thoát khí còn chậm chạp, sau đó thì tăng nhanh rồi đạt đến cực đại. Và tiếp đến lại giảm một cách mau lẹ và quá trình ngừng. Các khí này được dẫn từ các thùng lên men vào các thiết bị gom khí rồi sau đó thải ra không khí.

Sau khi lên men xong thì dấm chín được bơm vào thiết bị chưng cất để tách mỗi thứ ra khỏi hỗn hợp.

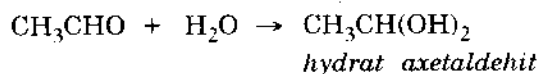
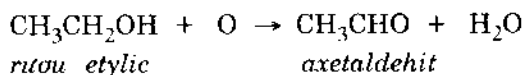
X.4.2.2. Sự lên men dấm

Lên men dấm là quá trình axetyl hóa etanol thành axit axetic trong điều kiện hiếu khí dưới tác dụng của enzym oxy hóa của vi khuẩn. Phương trình phản ứng tổng quát của sự lên men dấm như sau :

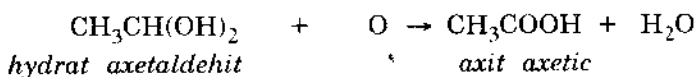


Để chuyển hóa thành axit axetic, rượu phải xâm nhập vào bên trong tế bào vi khuẩn và cả oxy cũng phải đi vào để oxy hóa. Axit axetic tạo thành thoát ra khỏi tế bào vào môi trường.

Lên men dấm là quá trình oxy hóa tuần tự etanol $\rightarrow$ axetaldehit $\rightarrow$ axit axetic. Đầu tiên từ rượu etylic tạo thành axetaldehit, rồi axetaldehit được chuyển thành hydrat của axetaldehit và sau cùng axetaldehit bị oxy hóa thành axit axetic



Hai nguyên tử hydro trong phân tử hydrat - axetaldehit được hoạt hóa rồi kết hợp với oxy là chất tiếp nhận hydro :



Các rượu khác nhau, đường và một số axit cũng có thể bị vi khuẩn axetic oxy hóa. Chẳng hạn nó có thể oxy hóa rượu butylic thành axit butiric, rượu propylic thành axit propionic, glixerin thành dioxyaxeton, sorbit thành sorboza, manit thành fructoza, arabinoza thành axit arabanic, glucoza thành axit gluconic, axit lactic thành axit piruvic.

a) Nguyên liệu

Nguyên liệu trực tiếp là rượu. Tuy nhiên để duy trì các hoạt động sống bình thường của vi khuẩn thì trong thành phần của môi trường lên men phải có không những nước, rượu và axit axetic mà cả muối khoáng, glucit và các chất có nitơ để đồng hóa. Nguồn glucit là đường, nguồn nitơ là muối amon.

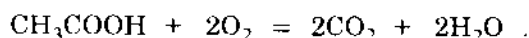
b) Ảnh hưởng của nồng độ axit axetic và rượu

Môi trường axit (pH 3) là điều kiện thuận lợi đối với vi khuẩn dấm.

Song axit axetic tích tụ trong môi trường đến một mức độ nào đó sẽ ức chế

hoạt động của vi khuẩn. Khi trong dung dịch tích tụ được 8% axit axetic thì hoạt động của vi khuẩn trở nên ngày càng giảm dần và bị ngừng hoàn toàn khi lượng axit đạt được 12 - 14%.

Nồng độ rượu trong môi trường lên men là 6 - 7% thể tích (đối với loài vi khuẩn này) hoặc 9 - 14% thể tích (đối với loài vi khuẩn khác). Khi thiếu rượu trong môi trường lên men thì vi khuẩn sẽ bắt đầu sử dụng axit axetic. Việc sử dụng axit axetic bởi vi khuẩn được gọi là sự quá oxy hóa và axit axetic sẽ bị mất đi theo phản ứng :



Do vậy, phải luôn luôn để thừa lại một lượng rượu khoảng 0,3 - 0,5%.

Sự quá oxy hóa phụ thuộc vào độ axit hoạt động của môi trường. Đối với những loài vi khuẩn khác nhau tồn tại một giá trị pH giới hạn làm ngừng sự quá oxy hóa. Giá trị pH giới hạn đối với sự quá oxy hóa luôn luôn cao hơn giá trị pH giới hạn đối với sự oxy hóa rượu một ít. Do vậy, khi có rượu thì kìm hãm sự quá oxy hóa, đầu tiên rượu có mặt bị oxy hóa và chỉ khi độ axit chuyển sang giá trị giới hạn thì sự quá oxy hóa bắt đầu.

c) Ảnh hưởng của sự thoáng khí

Sự chuyển hóa etanol thành axit axetic do phản ứng oxy hóa (hoặc dehydro hóa) trong đó oxy của khí quyển là chất tiếp nhận hydro. Do vậy trong sản xuất, sự oxy hóa rượu thành axit axetic chỉ xảy ra trong trường hợp nếu vi khuẩn tiếp xúc trực tiếp với oxy của không khí. Trong điều kiện yếm khí thì vi khuẩn nấm sẽ sử dụng cơ chất dinh dưỡng mà không tạo thành axit axetic. Như vậy chế độ cung cấp oxy là nhân tố điều chỉnh quá trình lên men.

d) Ảnh hưởng của nhiệt độ

Khi nhiệt độ thấp sự lên men xảy ra rất chậm chạp. Còn khi nhiệt độ quá cao thì sẽ làm rượu và axit axetic bốc hơi. Thường nhiệt độ lên men trong sản xuất được khống chế từ 32 - 34°C.

X.4.2.3. Sự lên men lactic

Axit lactic thu được bằng phương pháp lên men chính là hỗn hợp racemic của hai dạng đồng phân. Axit lactic được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp hóa học, dược học, thực phẩm và công nghiệp lên men.

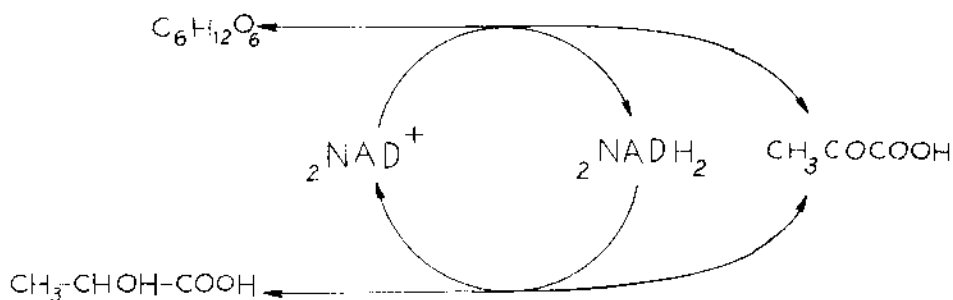
Nguyên liệu để sản xuất axit lactic trong công nghiệp thường dùng là rỉ mật, rỉ đường, đường kính và tinh bột đã được đường hóa sơ bộ bằng malt, tức là những nguyên liệu có chứa glucoza, sacaroza hoặc maltoza.

Tác nhân gây lên men hay là tác nhân cung cấp hệ enzym là vi khuẩn họ *Lactobacteriaceae* (vi khuẩn này là vi khuẩn yếm khí hoặc vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn này còn có đặc điểm là không tạo ra enzym catalaza).

Phụ thuộc vào hệ enzym của từng nòi vi khuẩn mà trong môi trường lên men hoặc chỉ có axit lactic hoặc ngoài axit lactic còn có những sản phẩm khác và CO₂.

Trường hợp thứ 1, cơ chế tạo ra axit lactic như sau :

Nói đúng hơn, trong trường hợp này axit lactic được tạo thành theo sơ đồ Embden-Meyerhoff. Hydro đã tách ra khi dehydro hóa triozaphosphat, được chuyển



đến piruvat. Phụ thuộc vào đặc hiệu quang học của enzym lactatdehydrogenaza và vào sự có mặt của lactatracemaza mà sẽ tạo ra axit *D* (-), *D* (+) - lactic hoặc *D*, *L* - lactic. Axit lactic tạo thành chiếm hơn 90% tổng sản phẩm lên men. Chỉ một phần nhỏ piruvat bị khử cacboxyl để chuyển thành axit axetic, etanol, CO_2 và axetoin. Lượng phẩm vật phụ tạo ra phụ thuộc vào sự có mặt của oxy.

Trường hợp thứ 2, xảy ra khi vi khuẩn lactic không có các enzym cơ bản của sơ đồ Embden-Meyerhoff là aldolaza và triozaphosphatizomeraza. Nói khác ra, axit lactic tạo thành ở đây theo chu trình pentozaphosphat : nghĩa là qua glucoza - 6 - phosphat, 6 - phosphogluconat và ribuloza-5-phosphat. Xiluloza-5-phosphat dưới tác dụng của enzym pentozaphosphoxetolaza (trong phản ứng phụ thuộc tiaminpirophosphat) bị phân ly để tạo thành aldehyt phosphoglixerinic và axetylphosphat.

Axetylphosphat hoặc bị phân ly dưới tác dụng của axetatkinaza (có phosphoryl hóa ADP) sẽ tạo thành axetat (*L.brevis*), hoặc bị khử để tạo thành axetaldehyt rồi thành rượu etanol (*L.mesenteroides*).

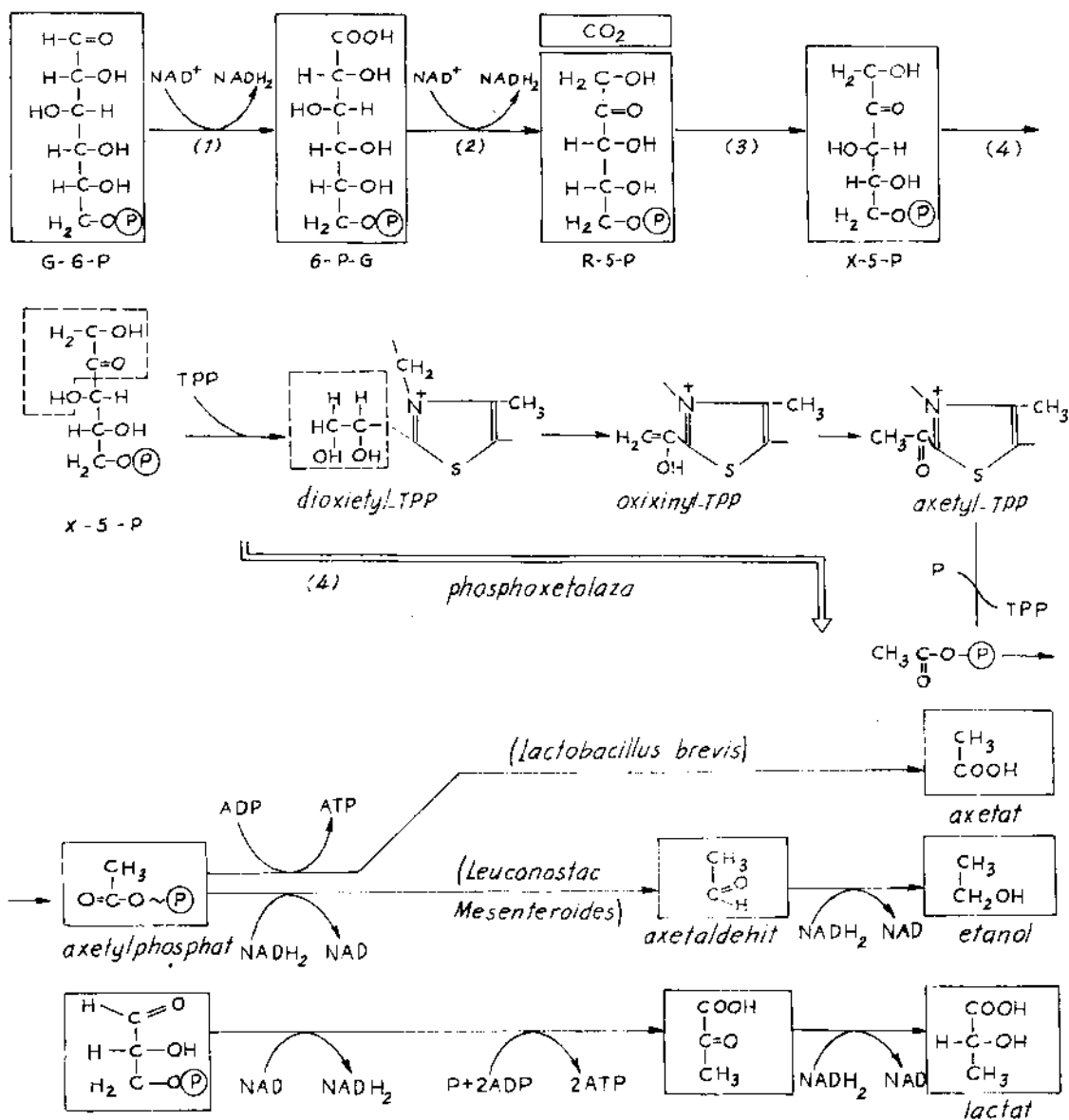
Con aldehyt phosphoglixerinic thì bị oxy hóa thành lactat theo con đường thông thường của sơ đồ Embden-Meyerhoff (h.10.8).

a) Các nhân tố ảnh hưởng đến sự lên men lactic

Nồng độ đường để lên men xê dịch từ 5 - 20%. Nếu nguyên liệu là mật rỉ hay rỉ đường thì cần phải làm trong. Vì trong những nguyên liệu đó, đặc biệt là rỉ đường có chứa những hợp chất của nitơ có hại cho sản xuất axit lactic. Những hợp chất đó như axitamin khi tương tác với đường sẽ tạo ra melanoidin, khi tương tác với axit lactic tạo ra chất gần giống axit humic. Tất cả những phẩm vật này sẽ làm cho thành phẩm có màu nâu sẫm khó loại trừ bằng than hoạt tính.

Quá trình lên men lactic sẽ tiến hành thuận lợi khi môi trường có phản ứng axit. Tuy nhiên vi khuẩn lactic sẽ không chịu được khi nồng độ axit trong dịch lên men rất lớn. Do đó nếu lượng axit lactic thừa không được trung hòa thì sự lên men sẽ bị dừng lại trước khi toàn bộ đường chuyển thành axit lactic. Vì vậy, biện pháp kỹ thuật tương ứng trong sản xuất là phải trung hòa lượng axit thừa đến pH 6,3 - 6,5. Thường người ta dùng vôi tôi hoặc canxi cacbonat để trung hòa và cho vào trước hoặc cho vào từ từ trong suốt quá trình lên men. Song cách trung hòa thứ hai tốt hơn vì vẫn giữ được phản ứng axit của môi trường lên men làm cho các vi sinh vật ngoại rơi vào không phát triển được.

Nhiệt độ thuận lợi cho lên men lactic phải là đúng $50^{\circ}C$. Giảm thấp hơn hay tăng cao hơn nhiệt độ đó (chẳng hạn giảm xuống $48^{\circ}C$ hay tăng lên $53^{\circ}C$,...) đều làm yếu, hoặc vô hoạt hệ enzym của vi khuẩn và sẽ có ảnh hưởng đến quá trình lên men.



Hình 10.8. Sơ đồ phản ứng tân tạo ra axit lactic :

- phản ứng (1) do enzym glucoza 6-phosphatdehydrogenaza xúc tác ;
- phản ứng (2) do enzym 6-phosphogluconatdehydrogenaza ;
- phản ứng (3) do enzym epimeraza ;
- phản ứng (4) do enzym pentozaphosphoxetolaza

Dựa vào cơ chế và các điều kiện lên men lactic mà quá trình sản xuất axit lactic bằng phương pháp lên men thường bao gồm ba giai đoạn

- Chuẩn bị dung dịch để lên men ;
- Lên men ;
- Tách canxi lactat và xử lý canxi lactat để thu axit lactic.

X.4.2.4. Lên men malolactic và sản xuất rượu vang

Rượu vang là sản phẩm lên men từ quả nho hoặc từ dịch nước ép nho và không qua chưng cất. Gần đây, người ta mở rộng khái niệm rượu vang để chỉ các loại nước uống lên men từ các quả khác ngoài nho như dâu, táo, mơ, dưa ... Nói chung, các quả để sản xuất rượu vang, ngoài thành phần đường ra còn phải chứa các axit hữu cơ (axit malic, axit citric, axit tartaric, ...), các polyphenol, các chất màu và các chất thơm.

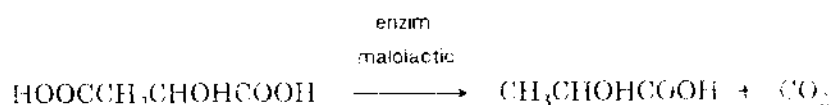
Dựa vào cơ chế tác dụng, có thể chia quá trình sản xuất rượu vang thành hai giai đoạn

- Giai đoạn lên men rượu được tiến hành bởi nấm men ;
- Giai đoạn lên men malolactic được thực hiện bởi vi khuẩn lactic.

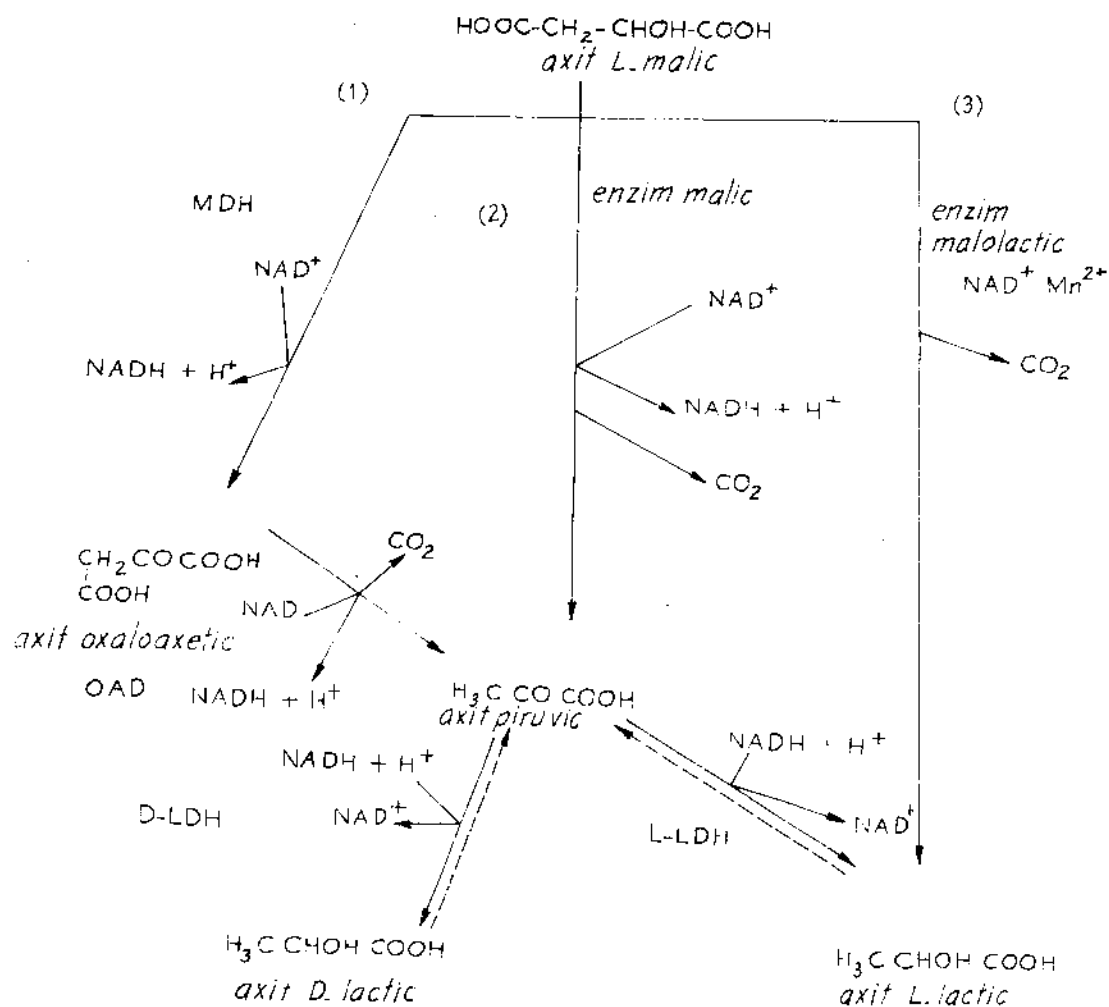
Trong giai đoạn lên men rượu nhằm tạo cho vang một độ rượu thích hợp có khả năng ức chế hoàn toàn hoạt động của nấm men ở cuối giai đoạn. Để lên men rượu được phải có cơ chất chính là đường. Ở trong nho, đường glucoza là chủ yếu thường chứa từ 150 đến 250 g/l nước ép nho. Cũng có thể bổ sung thêm đường sacaroza tính toán sao cho sao khi lên men trong vang có được độ rượu từ 9 đến 15° GL [thông thường để có được 1° GL (độ Gay - Lussac) phải cần đến 17 g/l đường] nghĩa là có lượng etanol từ 73 đến 120 g/l.

Ở giai đoạn lên men malolactic hay còn gọi là giai đoạn lên men phụ được thực hiện nhờ một số loài vi khuẩn đặc biệt, nhằm tạo cho rượu vang những tính chất cảm vị đặc thù cũng như tạo cho thành phẩm một khả năng bảo quản nhất định. Điểm đặc trưng nhất của giai đoạn này là các axit hữu cơ, dưới tác dụng của phức hệ enzym của vi khuẩn lactic, đã bị biến đổi rất sâu góp phần thành tạo nên vang. Ví dụ như :

Axit malic có trong quả cũng như được tạo ra trong giai đoạn lên men rượu, là thành tố quan trọng nhất, sẽ được chuyển hóa bởi phức hệ enzym của vi khuẩn thành axit lactic và khí carbonic theo những đường hướng khác nhau (h.10.9). Trong đó đường hướng tiêu biểu nhất là đường hướng (3), qua đây axit L - malic dưới sự xúc tác của enzym malolactic đã được chuyển hóa theo phương trình phản ứng sau :



Vì thế mà giai đoạn lên men phụ này có tên là lên men malolactic



Hình 10.9. Sự chuyển hóa axit malic :

(1) chuyển hóa axit malic bởi enzym malátdehydrogenaza :

NAD^+ - nicotin-adenin-dinucleotit dạng oxy hóa

OAD - enzym oxalacetatdecarboxylaza

NADH -nicotin - adenin - dinucleotit dạng khử

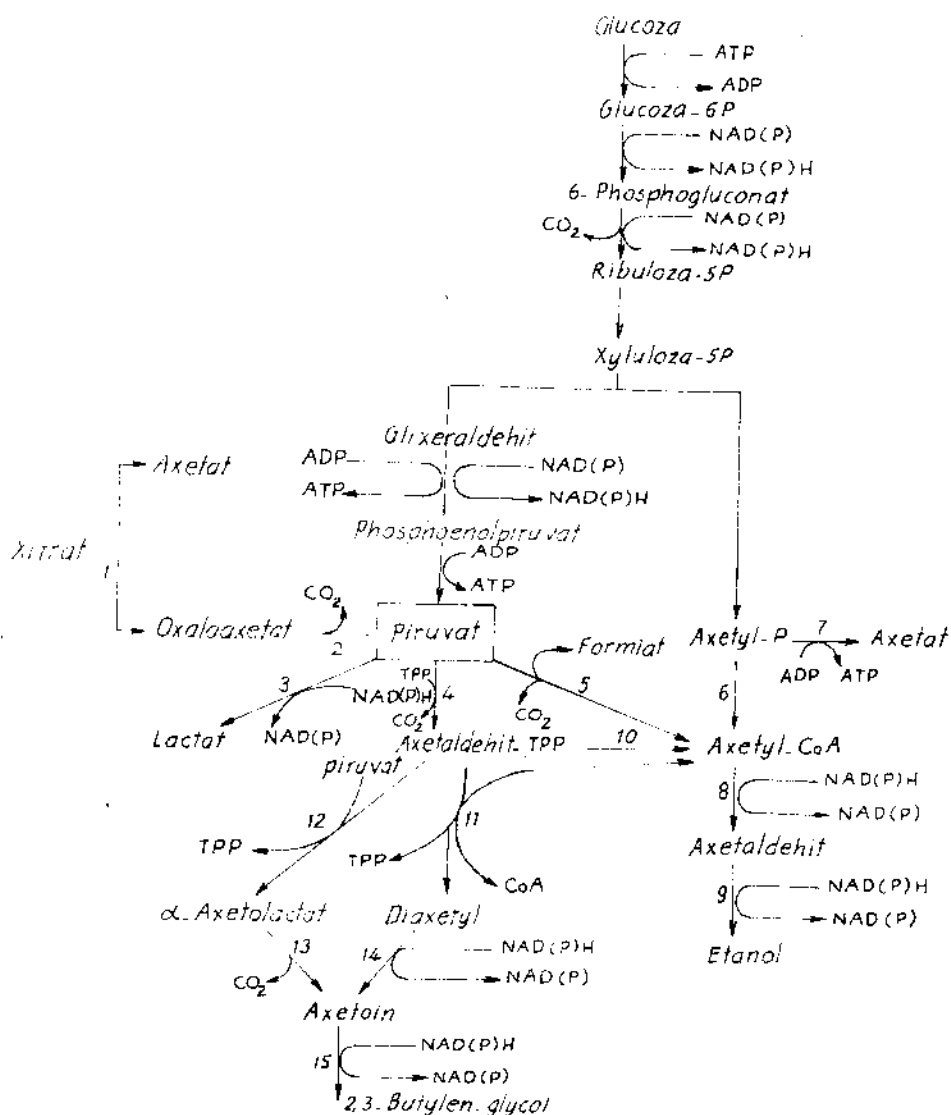
D-LDH- enzym D - lactatdehydrogenaza

L- LDH - enzym L - lactatdehydrogenaza

(2) chuyển hóa axit malic bởi enzym malic ;

(3) chuyển hóa axit malic bởi enzym malolactic

- Axit xitric (có trong quả cũng như được tạo ra trong giai đoạn lên men rượu) sẽ được các enzym của giai đoạn malolactic chuyển hóa thành diacetyl, axetoin và 2, 3 - butylenglicol là những chất tiền thân trong việc tạo nên hình thơm đặc trưng cho vang. Đồng thời quá trình chuyển hóa axit này còn tạo ra axit axetic và axit lactic (h.10.10).



Hình 10.10. Sự chuyển hóa axit xitric :

1- enzym xitratliaza ;	2- enzym oxalaxetatdecaboxylaza ;
3- enzym lactatdehydrogenaza ;	4- enzym piruvatdecaboxylaza ;
5- enzym piruvatformatlyaza ;	6- enzym phosphotransaxetylaza ;
7- enzym axetatkinaza ;	8- enzym aldehythhydrogenaza ;
9- enzym etanoldehydrogenaza ;	10- enzym lipovatxetyltransferaza ;
11- enzym diaxetylsintetaza ;	12- enzym α - axetolactatsintetaza ;
13- enzym α - axetolactatdecaboxylaza ;	14- enzym diaxetylreductaza ;
15- enzym axetoinreductaza	

Trong giai đoạn lên men malolactic, toàn bộ arginin được chuyển thành ornitin. Đây cũng là một đặc trưng của giai đoạn này.

Cuối giai đoạn này, rượu vang được hình thành, CO₂ được bão hòa, các hạt lơ lửng trong vang, các tanat và muối tartrat được lắng xuống làm cho vang trở nên trong.

Cac rượu vang bọt thường chứa 0,2 - 6 g/l khí CO_2 hòa tan, có nghĩa là ở nhiệt độ thường trong chai phải có áp suất trên 3 atm. Để làm sấm panh người ta thường cho tiến hành một giai đoạn lên men mới để tạo ra CO_2 bằng cách khi đóng chai thì bổ sung thêm một lượng đường thích hợp nào đó. Giai đoạn lên men này thường chậm chạp, để được sấm panh phải từ 2 năm trở lên.

Tác nhân gây lên men malolactic trong sản xuất rượu vang là vi khuẩn lactic, thường gặp là *Lactobacillus*, *Pediococcus* và *Leuconostoc*. Trong đó *Leuconostoc oenos* (*Loenos*) được coi là tác nhân chính yếu của quá trình lên men này. *Loenos* có hoạt độ enzym malolactic cao nhất (enzim malolactic quyết định chiều hướng của quá trình chuyển hóa tạo ra các sản phẩm cuối, là enzym cảm ứng có cơ chất là axit malic, có pH tối ưu để chuyển hóa axit L-malic là 2,9 - 3,1). Vi khuẩn *Loenos* lại có pH tối ưu để phát triển là 4,5 - 6,5 (tối thiểu là 3,1) pH tối ưu để chuyển hóa đường là lớn hơn 3,5 và pH tối ưu để chuyển hóa axit malic thấp hơn 3,0. Ở pH thấp này hoàn toàn thích hợp cho quá trình lên men malolactic và cũng không tạo ra các chất bất lợi.

Quá trình lên men malolactic chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố công nghệ và môi trường :

- Nhiệt độ : thường nhiệt độ 20°C là tối ưu. Dưới 15°C thì quá trình lên men malolactic khó xảy ra ;

- Anhydric sulfuro (SO_2) : hàm lượng SO_2 tổng số từ 100 đến 150 mg/l (tức là từ 1 - 10 mg/l SO_2 tự do) đủ để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn có trong vang. Hàm lượng SO_2 còn lại sau quá trình lên men rượu không vượt quá 40 - 50 mg/l (tức 5 mg/l SO_2 tự do) thì không làm ảnh hưởng đến tiến trình lên men malolactic. Ở vang có pH thấp sẽ làm cho tỉ lệ SO_2 tự do lớn nên tăng cường được tác dụng diệt khuẩn ;

- pH : pH của vang là yếu tố quyết định đến sự phát triển và tiến trình lên men malolactic. pH < 3,0 rất thích hợp cho quá trình lên men malolactic ;

- Etanol : nếu hàm lượng etanol trong dịch vang vượt quá 10% (V/V) thì sự sinh trưởng và quá trình lên men malolactic sẽ bị ức chế mạnh mẽ. *Leuconostoc* và *Pediococcus* có thể chịu được hàm lượng etanol từ 12 - 14% còn *Lactobacillus* thì chịu được tới 15% etanol. Nói chung etanol can thiệp vào sự phát triển của vi khuẩn mạnh hơn là vào chính quá trình lên men malolactic ;

- Axit hữu cơ : trong số các axit hữu cơ tự nhiên có mặt trong nước ép nho hoặc trong dịch lên men thì chỉ có axit oxalic ức chế hoàn toàn hoạt độ enzym malolactic. Axit xitric và axit tartric ức chế không đáng kể quá trình lên men malolactic. Cũng như axit piruvic và axit fumaric, axit L-lactic không có ảnh hưởng đến hoạt độ malolactic. Nhưng khi ở pH 3,0 là pH tại đó dạng proton của axit lactic chiếm ưu thế thì hoạt độ malolactic bị ức chế đến 75%.

Có thể tiến hành lên men hai giai đoạn tách riêng. Sau khi kết thúc lên men rượu (7-10 ngày), tách can, bổ sung thêm chất dinh dưỡng rồi cho lên men malolactic. Với cách này cho phép điều chỉnh dễ dàng các yếu tố môi trường có liên quan đến sự sinh trưởng của từng vi sinh vật. Hơn nữa trong điều kiện tách riêng, giữa nấm men và vi khuẩn không có đối kháng nhau.

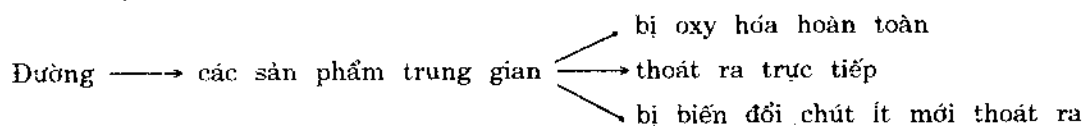
Có thể cho lên men hỗn hợp nấm men và vi khuẩn, sẽ tạo điều kiện cho sự lên men malolactic xảy ra tức thời do tạo cho vi khuẩn có được sự thích nghi cường bức đối với rượu.

X.4.3. Lên men bởi các nấm mốc

X.4.3.1. Sự lên men tạo ra các axit hữu cơ

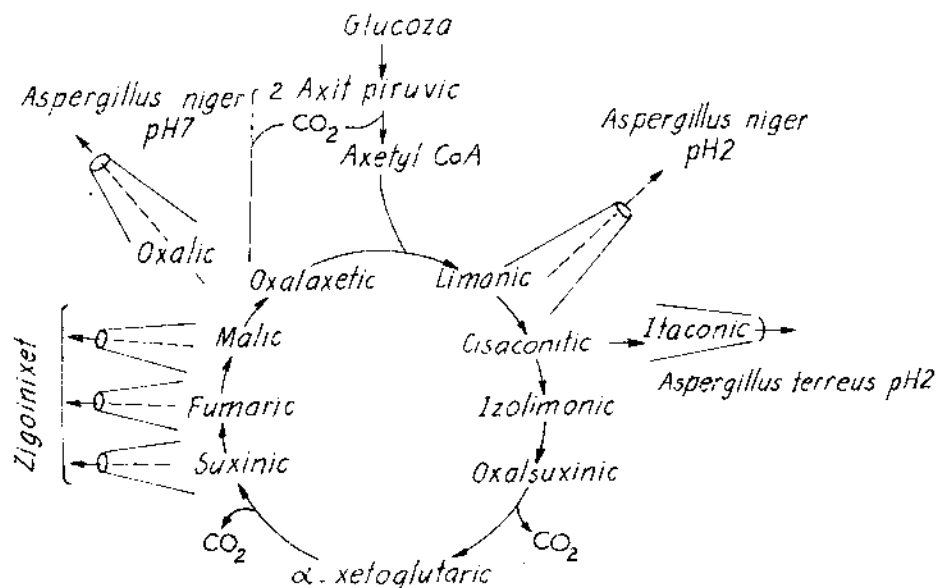
Các axit hữu cơ như axit limonic, axit fumaric, axit gluconic, axit malic, axit suxinic, axit itaconic, v.v có thể thu được trong qui mô công nghiệp bằng phương pháp lên men. Thực chất của các quá trình lên men ở đây là những phản ứng oxy hóa không hoàn toàn bằng phức hệ enzym của nấm mốc qua chu trình tricarboxyl.

Các axit hữu cơ này là những sản phẩm trung gian của chu trình phản ứng đó và thường được tích tụ lại ở những "điểm nút" của các quá trình trao đổi. Phụ thuộc vào từng điều kiện cụ thể mà các sản phẩm trung gian tích tụ được này đi vào môi trường một cách trực tiếp hoặc là sau khi đã có biến đổi chút ít. Như vậy, sự lên men theo "kiểu oxy hóa" này có liên quan với việc phá hủy sự điều hòa trao đổi chất.



Pasteur đã đặc biệt nhấn mạnh rằng có sự sai lệch trong trao đổi chất khi thừa cơ chất. Điều này cũng có nghĩa là khi cung cấp thừa glucit sẽ tạo ra tích tụ các sản phẩm trung gian này. Tuy nhiên trong nhiều trường hợp, muốn các sản phẩm trung gian của sự trao đổi của nấm mốc tích lũy được trong môi trường thì cần phải giảm một cách đáng kể hàm lượng của một nguyên tố vi lượng cần thiết nào đó. Có được tác dụng đó, thường gặp khi thay đổi nồng độ của Zn, Fe, Mn, Cu cũng như Mg, K và Ca.

X.4.3.2. Cơ chế tạo ra các axit hữu cơ ở nấm mốc



Hình 10.11. Sơ đồ tạo thành axit hữu cơ ở nấm mốc

Chu trình Krebs là trung tâm để qua đó tạo thành các axit hữu cơ.

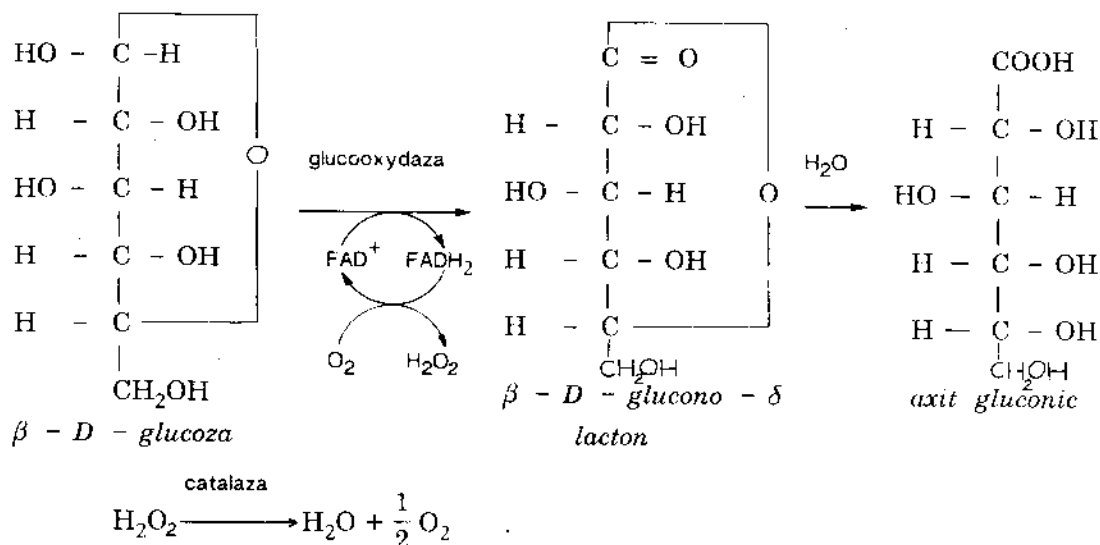
Cơ chế tạo ra các axit hữu cơ ở nấm mốc có thể trình bày tóm tắt như ở sơ đồ ở hình 10.11.

Tùy thuộc vào pH và hệ enzym trong vi sinh vật mà sẽ tích tụ axit này hay axit khác. Chẳng hạn, người ta đã thấy rằng, ở *Aspergillus niger* khi pH 2,5 - 3,5 thì tích lũy một lượng lớn axit xitric, tăng pH lên nữa thì tiếp đến xuất hiện axit gluconic, sau đó là axit oxalic.

a) Axit gluconic

Axit gluconic được tân tạo ra bởi nấm mốc theo sơ đồ dưới đây. Axit gluconic chính là sản phẩm của sự oxy hóa glucoza bởi enzym glucooxydaza của nấm mốc tiết vào môi trường. Ở *Aspergillus niger* enzym này rất hoạt động, do đó quá trình tạo ra axit gluconic có hiệu suất khá cao ngay cả trong dung dịch glucoza từ 30 đến 35% miễn là lượng axit tạo thành được trung hòa nhờ CaCO_3 .

Glucooxydaza là enzym có nhóm ngoại là FAD. Khi oxy hóa glucoza, dưới tác dụng của enzym này sẽ tạo thành sản phẩm trung gian là β - D - glucono- δ -lacton, chất này tiếp đó kết hợp với nước và chuyển thành axit gluconic. Giai đoạn sau có thể xảy ra một cách tự nhiên hoặc có enzym gluconolactonaza xúc tác :



Glucooxydaza dạng khử liên chuyển hydro đến oxy của không khí để tạo thành H_2O_2 . H_2O_2 dưới tác dụng của catalaza bị phân ly thành H_2O và O_2 .

Qua sơ đồ phản ứng ta thấy nguyên liệu dùng trong sản xuất axit gluconic là glucoza. Trong thực tế người ta có thể dùng mannoza, manit, và maltoza. Ngoài cơ chất glucoza môi trường để lên men phải có các muối MgSO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ và lượng khá CaCO_3 (chiếm 1/4 - 1/5 lượng đường có trong một lít môi trường).

Vì pH thích hợp cho quá trình lên men là 5,5, do đó lượng CaCO_3 nhiều như thế mới đảm bảo được phản ứng của môi trường, khiến cho vận tốc chuyển hóa glucoza thành axit gluconic tăng lên rõ rệt. Hơn nữa số lượng CaCO_3 đó cũng dễ dàng hòa tan trong môi trường. Song thừa CaCO_3 sẽ làm chậm sự lên men do canxi

gluconat khi đó bị kết tinh làm ngăn cản sự tiếp xúc tự do giữa môi trường và hệ sợi nấm.

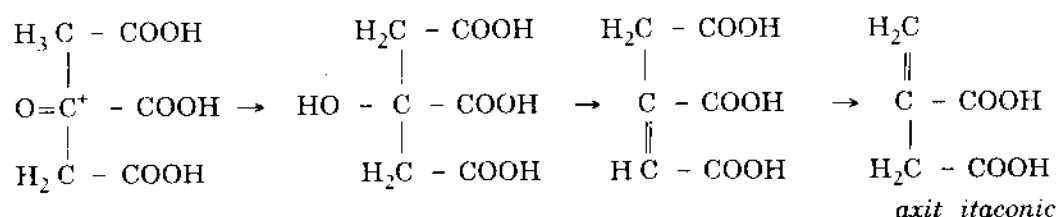
Muốn thu được axit gluconic tự do thì thêm axit sulfuric trực tiếp vào dịch lên men (với lượng tương đương lượng canxi gluconat có mặt trong đó). Lọc kết tủa canxi sulfat. Còn dung dịch đem cô đặc trong chân không. Bằng phương pháp chiếu sâu, hiệu suất của axit gluconic đạt 95% tính theo lý thuyết.

b) Axit itaconic

Axit itaconic (axit metilensuxinic) có công thức $C_5H_6O_4$, chính là axit metacrilic thay thế. Este axit này trùng hợp lại sẽ cho sản phẩm giống với sản phẩm kiểu metacrilat, có thể dùng trong sản xuất chất dẻo và chất hoạt động bề mặt. Còn axit itaconic thì ứng dụng chủ yếu trong sản xuất nhựa và các chất tẩy rửa.

Axit itaconic được tân tạo ra khi lên men glucoza hoặc sacaroza bởi nấm mốc *Aspergillus terreus*.

Cơ chế tạo ra axit itaconic như sau :



Axit *cis*-aconitic là nguồn để tổng hợp nên axit itaconic. Trong thời gian decarboxyl hóa thì đồng thời xảy ra sự chuyển dịch electron trong mạch cacbon và kết quả là nối đôi được chuyển từ vị trí 2,3 sang vị trí 3,4.

Nguyên liệu để sản xuất axit itaconic là glucoza. Nồng độ glucoza thích hợp là 60 g/l. Nồng độ cao hơn sẽ không sử dụng hết.

Nhiệt độ thích hợp để tạo ra axit itaconic là 30°C, pH tối ưu là từ 1,8 - 1,9.

Các muối vô cơ như MgSO_4 (0,75 g/l) và sắt tartrat (0,25 g/l) có vai trò rất quan trọng. MgSO_4 không những là chất dinh dưỡng mà còn là chất kích thích sự tân tạo axit itaconic và tăng cường khả năng chịu axit của nấm mốc. Nguồn nitơ tốt nhất để tạo axit itaconic là amon nitrat.

Trong thời gian lên men thì thêm axit hoặc amoniac để duy trì pH.

Khi lên men kết thúc thì đem lọc, cô đặc rồi kết tinh.

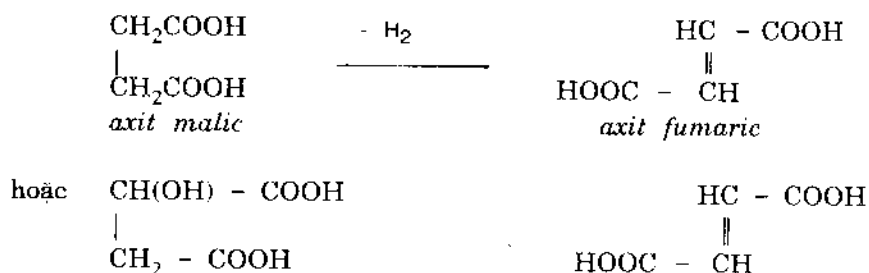
Bằng phương pháp chiếu sâu, hiệu suất của axit itaconic đạt được 65% so với lượng đường sử dụng.

c) Axit fumaric

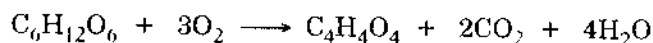
Axit fumaric là axit không no, có khả năng chuyển thành axit malic. Axit này được sử dụng nhiều trong tổng hợp nhựa, sơn, v.v. Còn muối của axit fumaric thì được ứng dụng trong việc sản xuất các chất thẩm ướt kiểu xon khí.

Axit fumaric là sản phẩm trung gian của chu trình Krebs do đó có thể sản xuất bằng phương pháp lên men. Tác nhân gây lên men là *Rhizopus*.

Axit fumaric có thể tạo thành theo sơ đồ phản ứng :



Phương trình phản ứng tổng quát :



Nguyên liệu để sản xuất axit fumaric là glucoza, fructoza đường nghịch đảo, sacaroza, mật ri, maltoza, tinh bột. Ngoài ra, các muối vô cơ phải có trong môi trường là kali phosphat và amon sulfat, pH tối ưu là 5 - 7.

d) Axit xitric

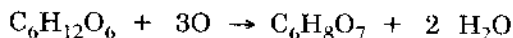
Axit limonic hay axit xitric là axit rất phổ biến trong thực vật, nhưng có nhiều trong chanh, lựu.

Axit limonic có nhiều ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, trong nhiếp ảnh, trong y học, trong nghề in, v.v.

Trong công nghiệp axit xitric chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp lên men.

Cơ chế phản ứng tân tạo axit như phản ứng dưới đây :

Phản ứng tổng quát như sau :



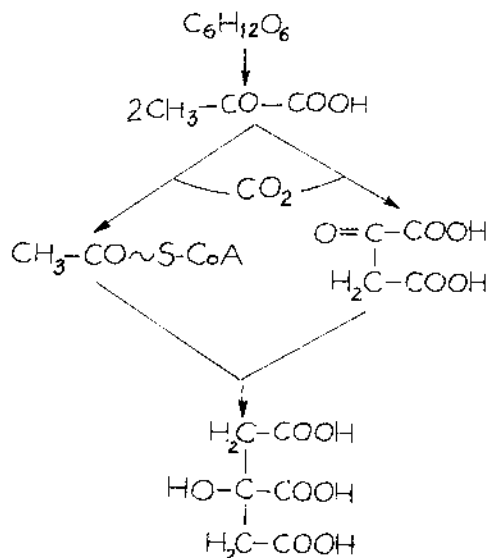
Nếu như axit limonic chỉ được tạo ra từ axetyl CoA, thì một mol glucoza chỉ cho 2/3 mol axit xitric. Bằng phương pháp nguyên tử đánh dấu, người ta đã thấy rằng có sự gắn thêm CO_2 vào nguyên tử cacbon thứ sáu của axit limonic.

Quá trình sản xuất axit xitric bằng phương pháp lên men có thể chia ra ba giai đoạn sau :

- Chuẩn bị dung dịch để lên men ;
- Lên men ;
- Xử lý dịch đã lên men để thu axit xitric.

Chuẩn bị dịch lên men

Nguyên liệu chủ yếu để lên men xitric là đường. Ngoài ra N_2 , P, S, Zn, Fe và Mg cũng là những thành phần rất quan trọng của môi trường lên men. Người ta đã chứng tỏ rằng hiệu suất của axit limonic sẽ cao khi màng nấm mỏng mảnh và



khi có hình thành bào tử nhưng rất yếu hoặc hoàn toàn không hình thành. Và điều đó thường xảy ra khi hàm lượng muối trong môi trường là cực tiểu.

Nitơ là thành phần quan trọng nhất thường được đưa vào môi trường lên men dưới dạng NH_4Cl , NH_4NO_3 . Hiệu suất của axit limonic sẽ cực đại khi hàm lượng nitơ có trong dung dịch lên men là 0,07%.

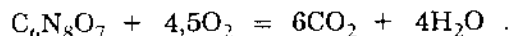
Phospho cũng là nguyên tố rất quan trọng. Thiếu P, hệ sợi nấm tạo thành yếu và sẽ thiên về tổng hợp ra axit gluconic. Còn khi không có P thì hệ sợi nấm lại không phát triển. Thường hàm lượng P_2O_5 khoảng 0,016 – 0,021% là thích hợp để cho hiệu suất axit cao.

Lưu huỳnh thường được đưa vào môi trường lên men dưới dạng muối magie sulfat, kẽm sulfat và sắt sulfat. Lượng S thích hợp là 71,1 ml/l. Tăng lượng S cao hơn sẽ giảm khả năng tổng hợp axit xitric của hệ sợi.

Các nguyên tố khác như Mg, Zn và Fe cũng không kém quan trọng. Loại trừ Zn ra khỏi môi trường thì hầu như không tổng hợp ra được axit xitric. Hiệu suất của axit sẽ rất cao khi Zn và Fe có mặt với lượng giới hạn.

Như vậy, các nguyên tố vô cơ là những yếu tố điều chỉnh sự tân tạo axit xitric rất quan trọng.

Trong các đường dùng làm nguyên liệu thì sacaroza (chứa trong ri đường) và glucoza kỹ thuật là tốt hơn cả. Đường củ cải tạo điều kiện cho hệ sợi nấm sinh trưởng tốt và hiệu suất axit cao. Hiệu suất axit cực đại khi nồng độ đường trong dịch lên men tương đối lớn (25%). Nồng độ đường cao hơn, quá trình lên men bị ức chế. Khi hết glucit thì hệ sợi nấm bắt đầu sử dụng đến axit limonic. Khi đó phần lớn (85%) axit được hệ sợi dùng cho hô hấp :



Lên men

Trong giai đoạn lên men axit xitric thì độ pH, nhiệt độ và độ thoáng khí có ý nghĩa rất quan trọng.

Để cho hệ sợi nấm tạo axit sinh trưởng và hình thành dung dịch phải được axit hóa bằng HCl đến pH 3 – 4, pH tối ưu còn phụ thuộc vào dạng nitơ có trong dung dịch. Nếu nitơ ở dạng NH_4NO_3 thì pH tối ưu xấp xỉ 3, còn nếu ở dạng NH_4Cl thì pH tối ưu gần 4. Trong quá trình lên men do sự tạo thành liên tục axit limonic nên pH của dung dịch lên men giảm xuống 2,4. Như vậy, dung dịch có giá trị pH tối ưu chỉ trong thời kỳ sinh trưởng của nấm.

Sự thoáng khí môi trường lên men có ý nghĩa quan trọng trong sản xuất, vì tất cả nấm mốc có hệ sợi đều là cơ thể hiếu khí điển hình. Sự tổng hợp nên các sản phẩm oxy hóa khác nhau là nhờ các sản phẩm của sự phân ly mạch cacbon của glucit. Các phản ứng phân giải đầu tiên không phụ thuộc vào sự có mặt của oxy không khí. Còn các phản ứng phân giải thứ đến là những phản ứng oxy hóa có oxy phân tử tham gia. Nấm mốc cần một lượng lớn oxy trong thời gian phát triển của mình. Sự thoáng khí được thực hiện bằng cách thông gió cho buồng lên men.

Oxy khi có nồng độ vượt quá hàm lượng bình thường của nó trong không khí (21%) sẽ làm chậm sự sinh trưởng của nấm mốc nhưng lại kích thích sự sinh tổng hợp axit limonic. Còn khi không có oxy kéo dài, hệ sợi nấm sẽ bị chết. Như vậy lượng không khí nhiều hay ít đều không thuận lợi cho sự lên men limonic. Oxy cần cho sự hô hấp và cho sự tổng hợp axit xitric.

Nhiệt độ có ảnh hưởng đến cường độ sinh trưởng và tạo axit của nấm mốc. Nhiệt độ tối ưu do tính chất của vi sinh vật cũng như do yêu cầu trong các giai đoạn của chu trình sản xuất quyết định. Nhiệt độ thấp hơn sẽ tạo ra axit gluconic, nhiệt độ cao hơn sẽ ngừng quá trình tạo ra axit xitric.

Có thể lên men bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt hoặc bằng phương pháp nuôi cấy chiếu sâu.

Xử lý dịch đã lên men

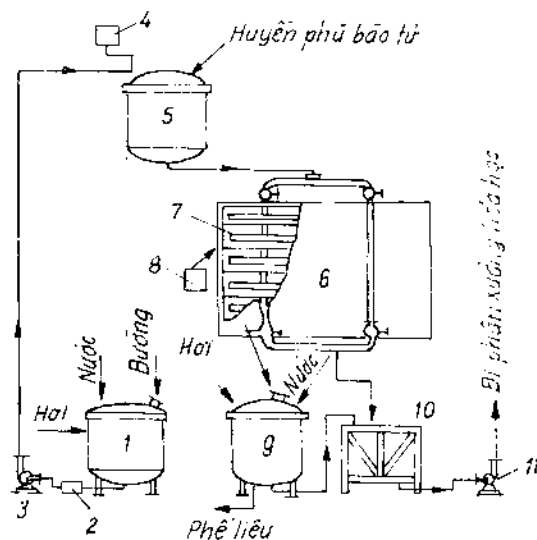
Dung dịch đã lên men là một hỗn hợp các axit limonic, axit gluconic, axit oxalic, đường chưa bị lên men và các tạp chất vô cơ (trong đó axit xitric 40 - 50 g/l, axit gluconic 3 g/l, axit oxalic 1 g/l, đường chưa lên men 70 g/l).

Trung hòa dung dịch bằng phan.

Dựa vào độ hòa tan khác nhau của các muối tạo thành để tách muối canxi limonat. Xitrat hòa tan ít trong nước sôi, nhưng hòa tan trong nước lạnh, canxi oxalat không hòa tan, còn canxi gluconat thì hòa tan ở bất kỳ nhiệt độ nào. Lọc để tách kết tủa canxi xitrat ra.

Phân ly canxi xitrat bằng axit sulfuric để tạo ra axit xitric.

Cô đặc và kết tinh axit xitric.



Hình 10.12. Sơ đồ kỹ thuật phân xưởng lên men axit xitric bằng phương pháp bề mặt :

- 1 - nồi nấu sirô ; 2 - máy lọc ; 3 - bồn khuấy ; 4 - bồn chứa dung dịch nấm dinh dưỡng ; 5 - nồi thanh trùng ; 6 - bộ phận lên men ; 7 - khay khuẩn ; 8 - bồn chứa formalin ; 9 - nồi đun ; 10 - bồn chứa dịch đã lên men ; 11 - máy bơm

X.4.4. Sinh tổng hợp các axitamin

Như chúng ta đã thấy ở những chương trước, axitamin là viên gạch để xây dựng nên protein của tế bào mọi cơ thể sống. Do đó để bù vào cho cơ thể lượng axitamin nhất là các axitamin không thể thay thế, thì hàng ngày phải thường xuyên cung cấp một lượng axitamin.

Theo một số tác giả, nhu cầu các axitamin không thể thay thế của một người trong một ngày đêm, như ở trong bảng dưới đây :

Bảng 10.1. Nhu cầu sinh lý về các axitamin không thể thay thế của một người trưởng thành (1 ngày đêm)

Axitamin không thể thay thế	Tác giả			
	A.E. Charperac	Bloc và Bolling	Rose	Focs
Metionin	2,5	3,8	3,50	2,2
Triptophan	1,6	1,1	1,82	0,5
Phenylalanin	4,5	4,4	4,13	2,2
Lizin	8,0	5,2	5,88	1,6
Lơxin		9,1	4,69	2,2
Izoldxin	10,0	3,3	2,94	1,4
Valin	6,0	3,8	4,13	1,6
Treonin		3,5	2,94	2,0

Nhu cầu về các axitamin nhất định phụ thuộc vào một loạt điều kiện trong đó cả sự có mặt hoặc không có trong thức ăn các hợp chất gần giống nhau về phương diện trao đổi chất. Ví dụ, tirozin làm giảm lượng phenylalanin mà cơ thể đòi hỏi, còn axit glutamic có thể thay thế arginin bằng một cách tương tự như thế. Ngoài ra, nhu cầu về axitamin cũng bị thay đổi tùy theo trạng thái sinh lý của động vật, tùy theo lứa tuổi và có thể tùy theo thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột của nó.

Thường lượng axitamin cung cấp cho cơ thể dưới dạng protein của thức ăn hoặc dưới dạng một hỗn hợp các axitamin (nước chấm, nước mắm, dịch thủy phân) hoặc dưới dạng đơn axitamin tinh khiết (mì chính).

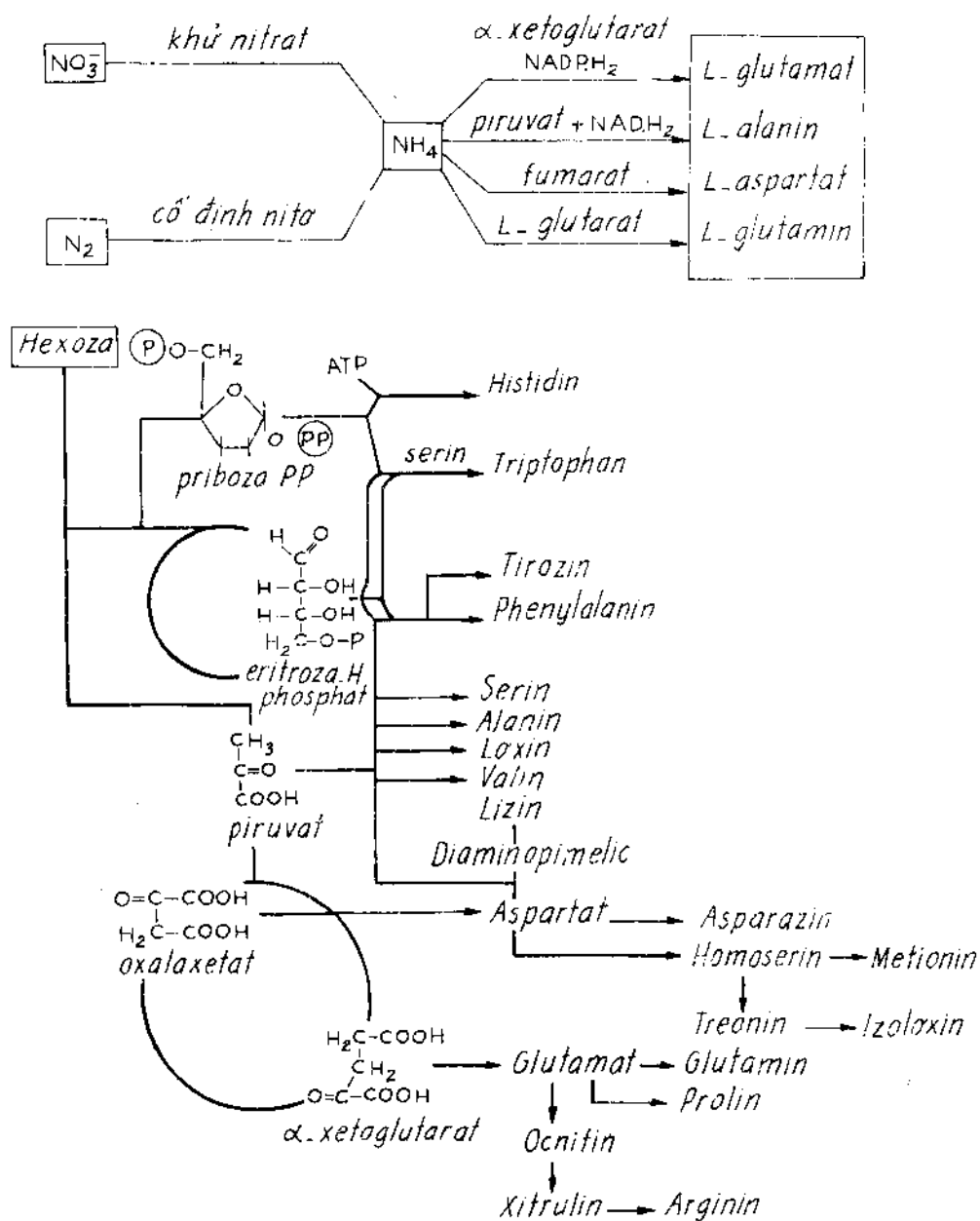
Có thể tổng hợp được các axitamin bằng phương pháp hóa học, phương pháp lên men hoặc bằng phương pháp kết hợp hóa học và vi sinh vật. Tuy nhiên phương pháp hóa học thường là đắt là không định hướng được : các axitamin tổng hợp được chứa cả hai dạng *D* và *L*. Phương pháp kinh tế và triển vọng hơn cả là sinh tổng hợp hay là tổng hợp bằng phương pháp lên men.

Đường hướng sinh tổng hợp axitamin

Đa số các vi sinh vật và cây xanh có khả năng tổng hợp *de novo* toàn bộ 20 axitamin vốn tạo nên các phân tử protein của chúng. Khung cacbon của các axitamin được tạo thành từ các sản phẩm trung gian của sự trao đổi chất như piruvat, α - xetoglutarat, fumarat, eritroza - 4 - phosphat, riboza - 5 - phosphat, riboza - 5 - phosphat. Còn nhóm amin được gắn vào khung đó nhờ phản ứng amin hóa trực tiếp hoặc chuyển amin.

Việc chuyển nitơ vô cơ thành hợp chất hữu cơ luôn luôn xảy ra qua amoniac. Nitrat, nitrit và nitơ phân tử, trước tiên phải bị khử thành amoniac sau đó mới được gắn vào khung cacbon.

Cần nhấn mạnh rằng khung cacbon ở các axitamin không thể thay thế là phần không thể thay thế của chúng.



Hình 10.13

X.4.4.1. Sinh tổng hợp axitamin bằng phản ứng amin hóa trực tiếp

Sự amin hóa trực tiếp các axit hữu cơ chưa no là một phản ứng ít gặp và chủ yếu chỉ có ở thực vật và vi khuẩn. Các chất tiền thân để amin hóa như axit fumaric, axit piruvic, axit oxalaxetic, ... là những sản phẩm trung gian vốn được tạo nên trong chu trình Krebs.

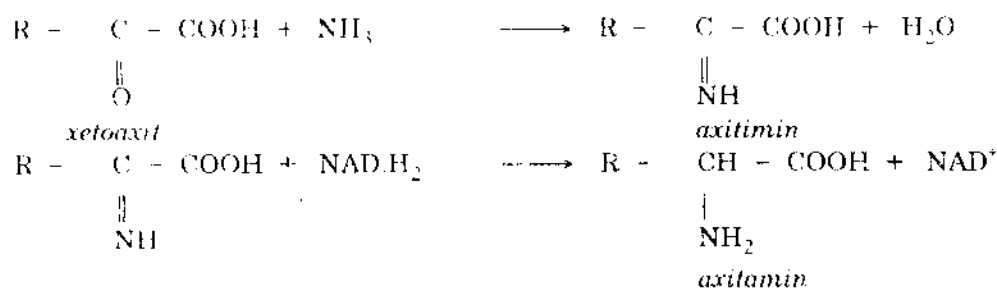
Axit fumaric, dưới tác dụng của enzym aspartat - amoniac - liaza, tạo nên axit aspartic :



Phản ứng này là một phản ứng thuận nghịch.

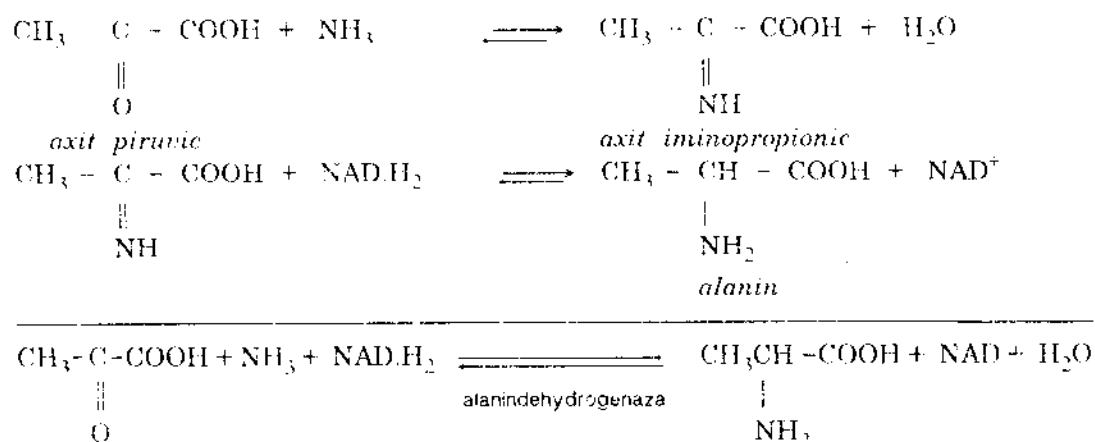
Axit aspartic cũng có thể được tổng hợp bằng cách chuyển amin hóa giữa axit oxalaxetic và axit glutamic.

Sự amin hóa các xetoaxit cũng là một đường hướng chủ yếu của việc tân tạo axitamin. Phương trình phản ứng tổng quát có thể biểu diễn như sau :

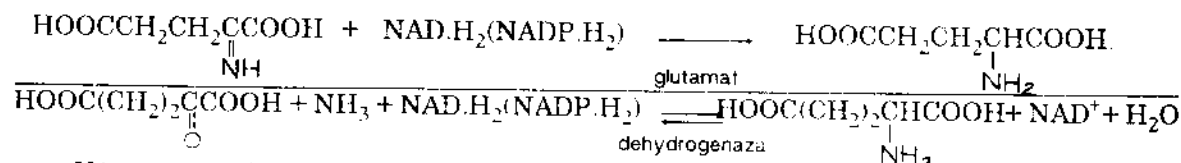
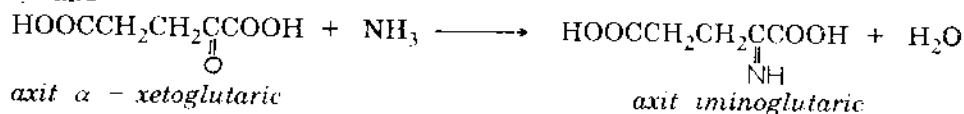


Phản ứng ra qua hai giai đoạn : kết hợp amoniac vào xetoaxit để tạo ra axitimin và khử axitimin thành axitamin

Chẳng hạn :



Hoặc như



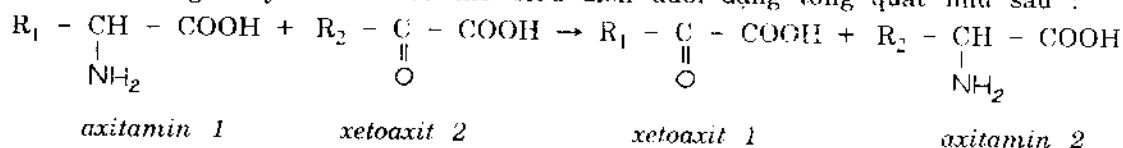
Về nguyên tắc, sự amin hóa có thể tiến hành đối với bất kỳ một xetoaxit nào. Tuy nhiên hoạt tính của tất cả các dehydrogenaza tự nhiên của các axitamin, trừ glutamatdehydrogenaza và alanindehydrogenaza, đều không đáng kể. Vì thế sự sinh tổng hợp các axitamin bằng cách amin hóa các xetoaxit là không có ý nghĩa thực tế.

Các axitamin : aspartic, alanin và glutamic là những axitamin sơ cấp. Sự sinh tổng hợp bằng phản ứng amin hóa trực tiếp này gọi là sinh tổng hợp sơ cấp các axitamin.

X.4.4.2. Sinh tổng hợp axitamin bằng phản ứng chuyển amin

Phản ứng chuyển amin cũng là một đường hướng sinh tổng hợp các axitamin.

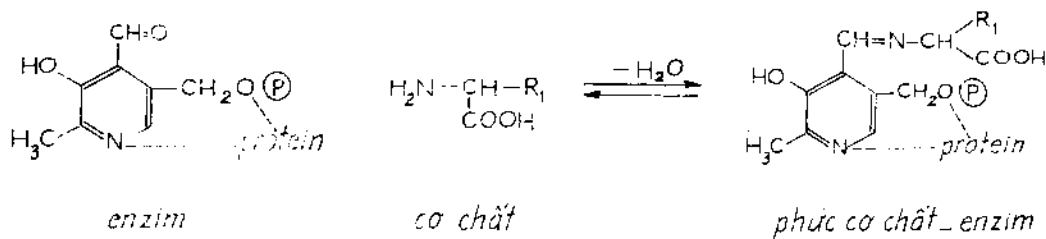
Phản ứng chuyển amin có thể biểu diễn dưới dạng tổng quát như sau :



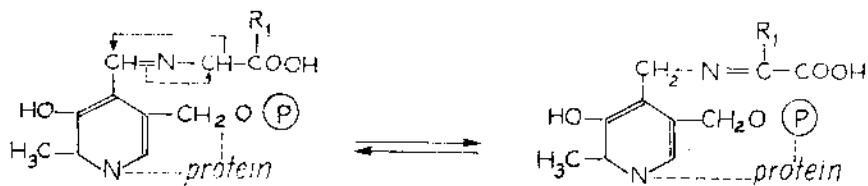
Phản ứng chuyển amin được xúc tác bởi enzym aminotransferaza. Aminotransferaza là enzym hai cấu tử có nhóm ngoại là phosphopiridoxal (este phosphoric của vitamin B₆).

Cơ chế phản ứng như sau :

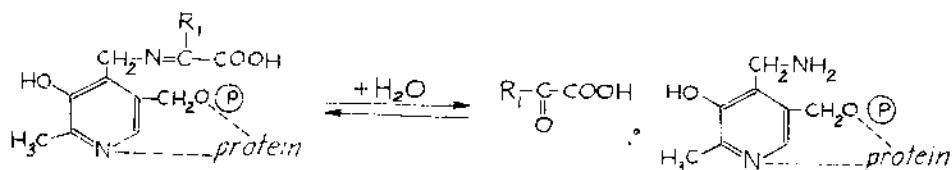
Đầu tiên nhóm ngoại của enzym sẽ kết hợp với nhóm amin của axitamin 1 ở nhóm aldehyt của phosphopiridoxal



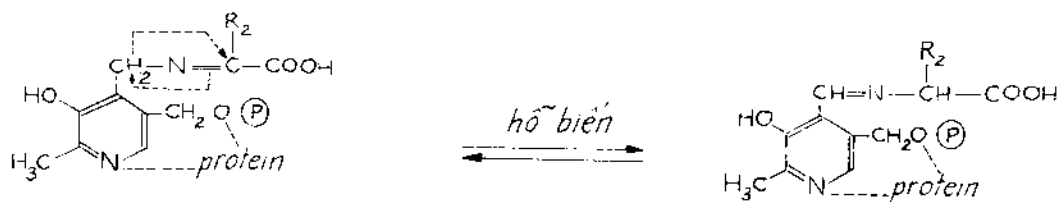
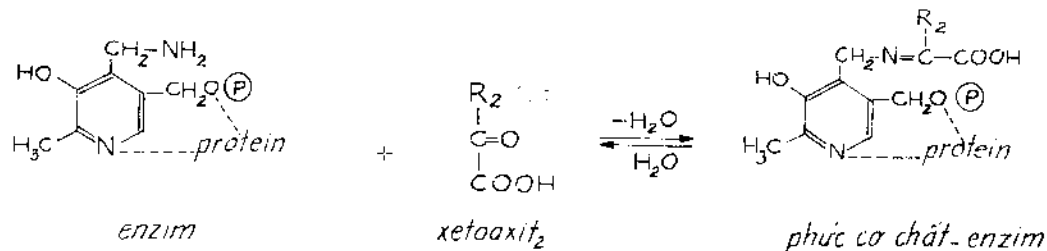
Tiếp đó phức hợp cơ chất enzym chịu sự hỗ biến :



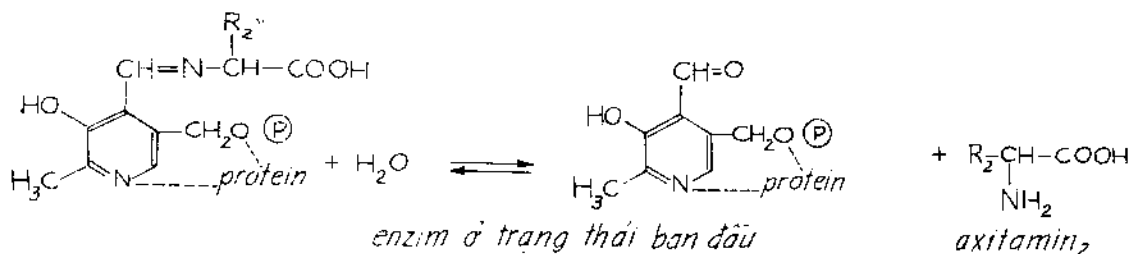
Phức hợp bị thủy phân để giải phóng ra xetoaxit₁ và enzym :



Đến lượt enzym lại tương tác với xetoaxit₂ ;



Cuối cùng axitamin₂ và enzym ở trạng thái đầu được hình thành do kết quả thủy phân phức hợp cơ chất - enzym vừa tạo thành :



Cần chú ý rằng phản ứng chuyển amin khi không có enzym xúc tác, cũng sẽ tiến hành được trong điều kiện nhiệt độ 100°C, pH từ 3,8 và có ion kim loại và piridoxal tham gia.

Nhiều vi sinh vật có khả năng tạo nên một lượng lớn xetoaxit trong điều kiện hiếu khí (đôi khi đến 60% lượng cacbon đưa vào môi trường). Để amin hóa nhóm -CH- khi có mặt nitơ của NH₃, nghĩa là để chuyển nhóm -CO- thành nhóm -CH-NH₂ người ta dùng các vi sinh vật khác nhau. Và điều quan trọng là người ta đã tìm ra những vi sinh vật có khả năng hoàn thành đồng thời cả hai quá trình đó. Thuộc những vi sinh vật đó có nấm mốc và vi khuẩn, trong đó tốt hơn cả là *Micrococcus*. Những vi sinh vật này trong thời gian ba ngày đêm có thể tạo thành

hơn 30% axit so với lượng đường đưa vào. *Micrococcus* vừa có các enzym của chu trình Embden-Meyerhof vừa có các enzym của chu trình pentozaphosphat và chu trình pentoza sẽ chiếm ưu thế khi môi trường hiếu khí. Nếu thiếu oxy thì chu trình đầu sẽ chiếm ưu thế và sẽ tạo nên axit lactic thay cho axit glutamic.

Gần đây người ta đã tìm được những vi sinh vật có thể dùng để thu một số axitamin : lizin, valin, ocnitin và triptophan.

X.4.4.3. Sinh tổng hợp axitamin bằng cách chuyển từ axitamin này thành axitamin khác ở vi sinh vật

Đây là con đường rất quan trọng để thu các axitamin trong công nghiệp. Sơ đồ như vậy vì ở sinh vật có những đặc điểm sau :

- Vi sinh vật có thể hấp thu các axitamin của môi trường bên ngoài làm nguồn nitơ và cacbon một cách chọn lọc, đồng thời chuyển hóa các axitamin hấp thu được thành các axitamin khác ;

- Ở vi sinh vật, ngoài các axitamin liên kết tham gia vào phức hệ protein của tế bào còn có một lượng các axitamin tự do (khoảng 0,25 - 1,5% trọng lượng khô của tế bào) làm nền tảng cho sự trao đổi. Các axitamin ở trong tế bào vi sinh vật đó có thể đi vào môi trường trong suốt quá trình phát triển. Sự có mặt một cách bắt buộc một lượng axitamin tự do nhất định để trao đổi với các axitamin của protein và với các axitamin của môi trường bên ngoài là đặc điểm rất quan trọng và có tính chất đặc hiệu của vi sinh vật. Người ta thấy rằng khi nuôi vi sinh vật trên môi trường chứa axitamin này thì có thể thay vào môi trường một số axitamin khác. Với những vi sinh vật nhất định trong những điều kiện nuôi cấy cụ thể nhất định có thể tích tụ được ở trong môi trường một lượng axitamin đáng kể từ 5-6 đến 60 g/l canh trường). Hiện tượng sinh tổng hợp một axitamin nào đó với lượng thừa người ta gọi là siêu tổng hợp ;

- Sự sinh tổng hợp các axitamin ở vi sinh vật chịu ảnh hưởng nhiều bởi một loạt các nhân tố bên ngoài. Người ta nhận thấy rằng các chất kháng sinh thường ức chế sự tổng hợp và sự trao đổi các axitamin riêng biệt. Biotin, piridoxin và các vitamin khác lại kích thích sự tổng hợp sinh khối và cũng có ảnh hưởng đến sự sinh tổng hợp axitamin. Hàm lượng các ion Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , và Mn^{2+} ở trong môi trường cũng có ảnh hưởng lớn đến nhịp độ tổng hợp axitamin.

Nguyên nhân của hiện tượng tích tụ thừa các axitamin riêng biệt trong canh trường có thể khác nhau

Người ta thấy rằng trong quần thể vi sinh vật phát triển bình thường thì có cơ chế điều chỉnh sự sinh tổng hợp một cách hòa hợp. Do vậy cơ thể sẽ tổng hợp một cách rất tiết kiệm các axitamin với một lượng vừa đủ cho việc phát triển. Khi cơ chế điều chỉnh bị phá hoại hoặc bị sai lệch mới xảy ra tích tụ một hoặc vài axitamin. Chẳng hạn, đa số các vi sinh vật khi phát triển trong môi trường không đầy đủ tích tụ các axitamin riêng biệt ở trong canh trường. Nếu thêm vào đây các cấu tử không đầy đủ đó thì hiện tượng siêu tổng hợp sẽ bị giảm. Ví dụ, nuôi cấy trong môi trường tổng hợp chứa S ở dạng SO_4^{2-} sẽ tạo điều kiện để siêu tổng hợp alanin, axit glutamic và valin bởi các vi sinh vật khác nhau. Nhưng nếu thêm vào

môi trường đó S dạng khử thì sẽ dẫn đến tăng sự tổng hợp sinh khối và giảm siêu tổng hợp những axitamin trên.

Sự thoát axitamin ra môi trường bên ngoài bởi vì sinh vật còn do nguyên nhân nữa là khi sự tổng hợp thành tế bào bị phá hoại. Chẳng hạn khi nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ biotin đến sự tổng hợp axit glutamic ở *Micrococcus glutamicus* người ta thấy rằng khi biotin thiếu sẽ dẫn đến tổng hợp thành tế bào có tính thấm cao do đó làm cho axit glutamic thoát ra khỏi tế bào một cách dễ dàng. Vì vậy phải tổng hợp thêm axit glutamic bổ sung.

Tuy nhiên cơ chế phổ biến và thực tế vẫn là cơ chế nổi ngược.

Như vậy là bằng cách dựa vào những nhân tố vốn chi phối quá trình sinh tổng hợp phức tạp này và bằng những biện pháp kỹ thuật rất tinh tế người ta có thể hướng sự tổng hợp axitamin ở vi sinh vật theo chiều mong muốn. Hiện nay, bằng con đường sinh tổng hợp đó, ngoài axit glutamic ra, một số axitamin khác như lizin, valin, triptophan, metionin cũng đang bắt đầu thu được trên qui mô công nghiệp.

Quá trình để thu được các axitamin nói chung có thể gồm ba giai đoạn :

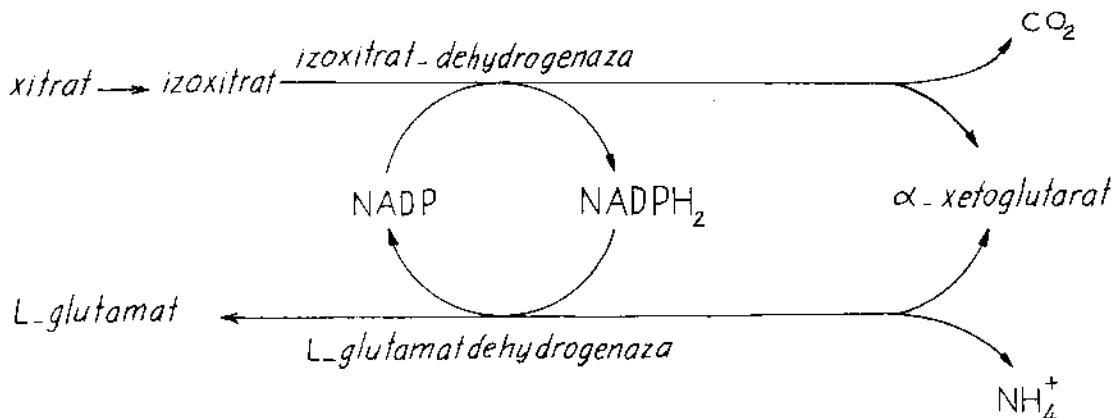
- Chuẩn bị môi trường ;
- Lên men ;
- Tách, tinh chế và làm giàu axitamin.

Dưới đây chúng ta sẽ điếm qua sơ đồ sinh tổng hợp một số axitamin.

a) Tạo thành axit glutamic

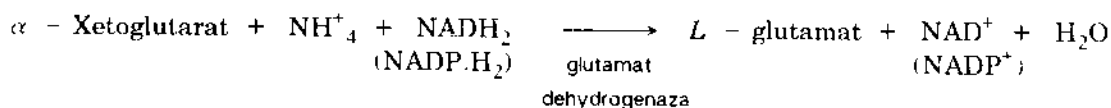
Năm 1957, Kinoshita đã tìm ra vi khuẩn *Corybacterium glutamicum* có khả năng tích tụ một lượng lớn axit glutamic.

Sơ đồ phản ứng tạo ra axit glutamic như sau :



Từ glucoza qua sơ đồ Embden-Meyerhof sau đó qua xitrat và α -ketoglutarat rồi đưa đến tạo thành L-glutamat.

Phản ứng chủ yếu để tạo thành axit glutamic là phản ứng amin hóa xetoaxit :



Enzim glutamatdehydrogenaza xúc tác cho sự tân tạo ra axit glutamic từ α - xetoglutarat và amoniac khi có sự tham gia của coenzim NAD.H_2 (hoặc NADP.H_2). Enzim này rất phổ biến trong các hệ thống sống. NADP.H_2 (dạng khử) thường được sử dụng trong các trường hợp khi mà glutamatdehydrogenaza có chức năng như một tác nhân sinh tổng hợp, còn NAD.H_2 (dạng khử) được sử dụng trong các trường hợp khi enzim này hoàn thành chức năng dị hóa.

Sự thoát ra axit glutamic phụ thuộc vào sự tích tụ axit α - xetoglutaric và dĩ nhiên phải được giải thích bằng sự vắng mặt của enzim α - xetoglutaratdehydrogenaza. Khi không có NH_4^+ thì axit α - xetoglutaric sẽ bị tách ra.

Nguồn cung cấp năng lượng và bộ khung carbon là glucit (dung dịch glucoza 10%). Nguồn cung cấp nitơ là ure. Tác nhân cung cấp hệ enzim là vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* và *Brevibacterium lactofermentus*. Những vi sinh vật này vừa có các enzim của sơ đồ Embden-Meyerhof vừa có các enzim của chu trình pentozaphosphat. Khi thiếu oxy thì sơ đồ Embden-Meyerhof sẽ chiếm ưu thế, do đó trong môi trường sẽ tích tụ axit lactic. Ngược lại khi hiếu khí, thì chu trình pentozaphosphat sẽ chiếm ưu thế và sẽ tích tụ axit glutamic. Do đó axit glutamic chỉ được tân tạo ra trong điều kiện hiếu khí nghiêm ngặt. Như vậy yếu tố điều chỉnh ở đây là chế độ khí. Ngoài ra biotin cũng có vai trò quyết định đến việc tích tụ axit glutamic. Hàm lượng thích hợp của biotin là 2,5 $\mu\text{g/l}$ canh trường. Khi nồng độ thấp hơn sự sinh trưởng của vi khuẩn rất yếu. Khi nồng độ cao hơn sẽ kích thích sự sinh trưởng và làm giảm hiệu suất của axit glutamic.

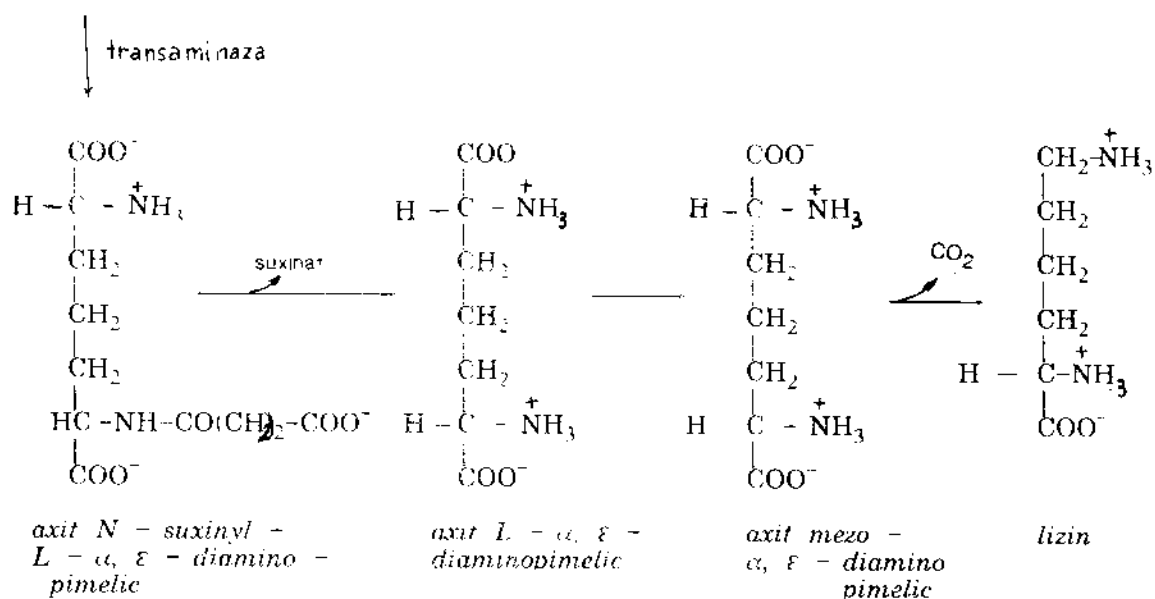
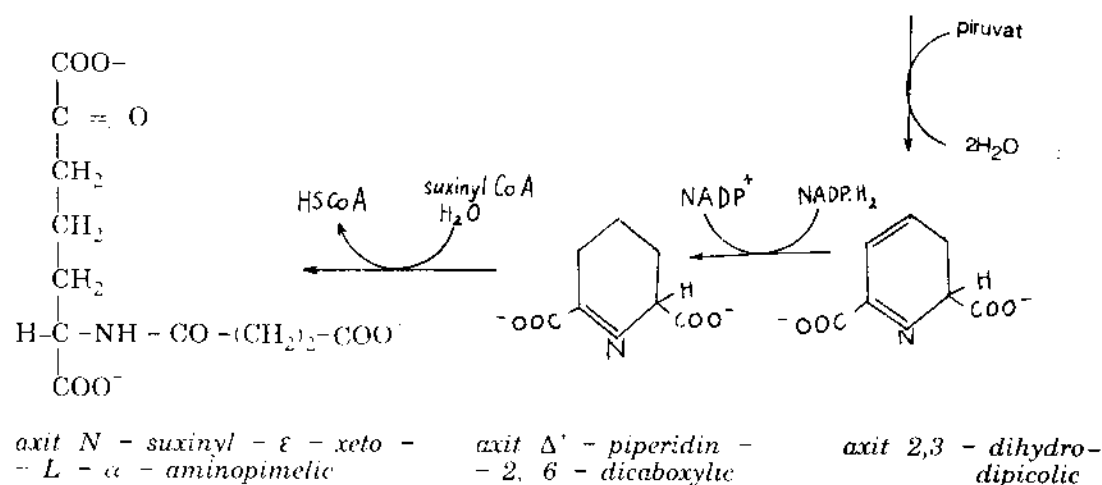
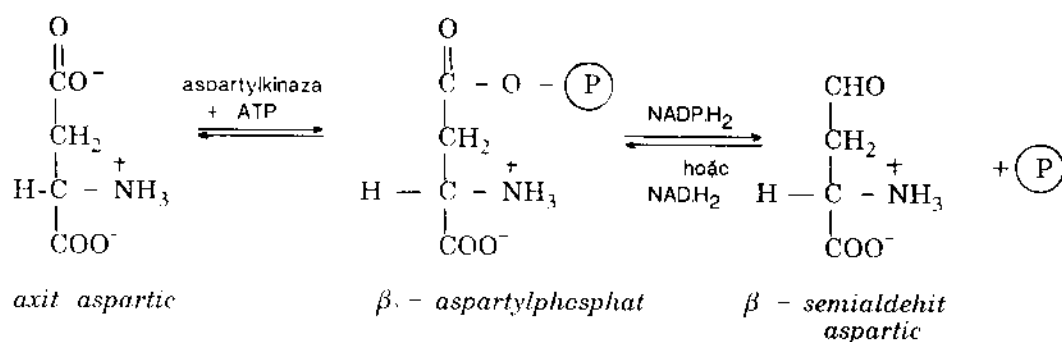
b) Sinh tổng hợp lizin

Giống như treonin và metionin, lizin cũng là axitamin được tổng hợp nên từ axit aspartic và cùng chung một sản phẩm trung gian là β - semialdehit của axit aspartic (xem trang 383).

c) Sinh tổng hợp valin, loxin và izoloxin

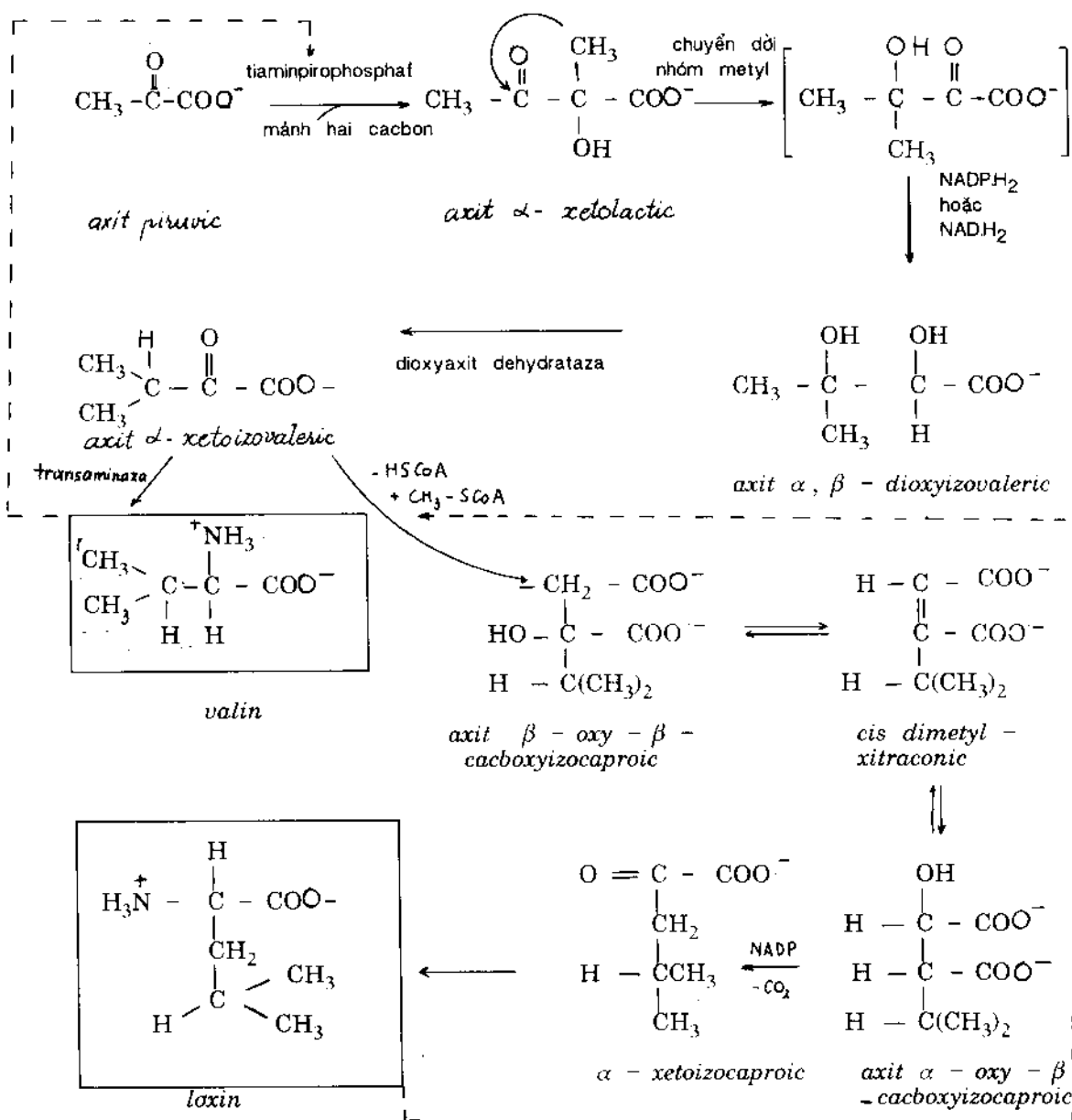
Valin, loxin và izoloxin đều là những axitamin có mạch nhánh. Valin và loxin đều đi từ piruvat và cùng chung sản phẩm trung gian là axit α - xetoizovalerianic. Quá trình sinh tổng hợp valin và loxin được trình bày trên sơ đồ hình 10.14.

Phụ thuộc vào tiaminpirophosphat mà piruvat sẽ ngưng tụ với mảnh hai carbon để tạo nên axit axetolactic. Dưới tác dụng của enzim izomeroreductaza của axetooxyaxit (enzim này đòi hỏi phải có mặt Mg^{2+} và piridinnucleotit dạng khử) axit axetolactic sẽ chuyển vị pinacolic để tạo nên axit α , β - dioxizovalerianic. Axit dioxizovalerianic này dưới sự xúc tác của enzim dehydrataza của dioxiyaxit sẽ bị mất nước và tạo thành axit α - xetoizovalerianic, sau khi chuyển amin hóa axit này sẽ trực tiếp biến thành valin.



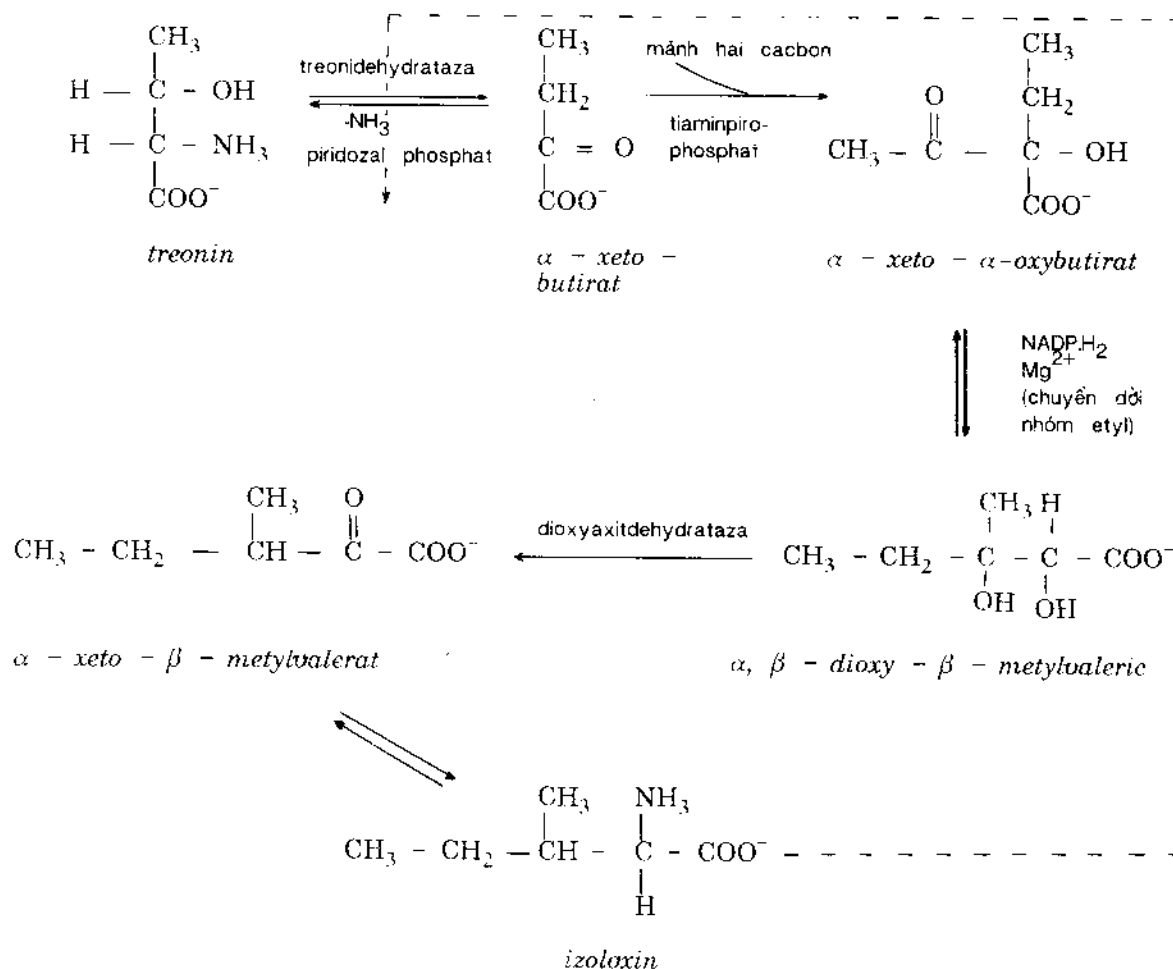
Hình 10.14. Sơ đồ phản ứng sinh tổng hợp lizin

Axit α - xetoizovaleric ngưng tụ với axety-SCoA để tạo nên axit β -oxy- β -cacboxyizocaproic. Axit này sẽ biến thành axit α -oxy- β - cacboxyizocaproic, do kết quả của hai phản ứng khử nước và tái kết hợp nước kế tiếp nhau (tương tự như khi chuyển xitrat thành izoxitrat dưới tác dụng của aconitaza trong chu trình Krebs). Cuối cùng α - oxy - β - cacboxyizocaproic sẽ bị khử cacboxyl hóa bằng cách oxy hóa và chuyển amin hóa để tạo thành lxin. Còn izoloxin thì được tạo thành từ treonin.



Hình 10.15. Sơ đồ phản ứng sinh tổng hợp valin và lxin

Dưới tác dụng của enzym treonidehydrataza, treonin bị chuyển hóa thành α -xetobutirat. α -xetobutirat sẽ ngưng tụ với "axetaldehit hoạt hóa" ("axetaldehit hoạt hóa" là nhóm α -oxyetyl của chất α -oxyetyl - 2 - tiaminpirophosphat) để tạo thành axit α -axeto α -oxybutiric - một sản phẩm trung gian then chốt trong việc tổng hợp izoloxin. Sự tổng hợp izoloxin từ sản phẩm này tiến hành rất giống sự tổng hợp valin từ axetolactat. Hình như, ở giai đoạn cuối cùng trong phản ứng chuyển amin hóa, cả hai phản ứng liên tiếp nhau đều chỉ có cùng một loại enzym xúc tác. Tuy nhiên để tổng hợp valin cả hai transaminaza đều được sử dụng, còn để tổng hợp izoloxin thì chỉ có một enzym được sử dụng. Điều đó giải thích được hiện tượng là trong thiên nhiên có tồn tại những biến chủng cần izoloxin và không cần valin. Sơ đồ các phản ứng sinh tổng hợp izoloxin được trình bày ở hình 10.16.

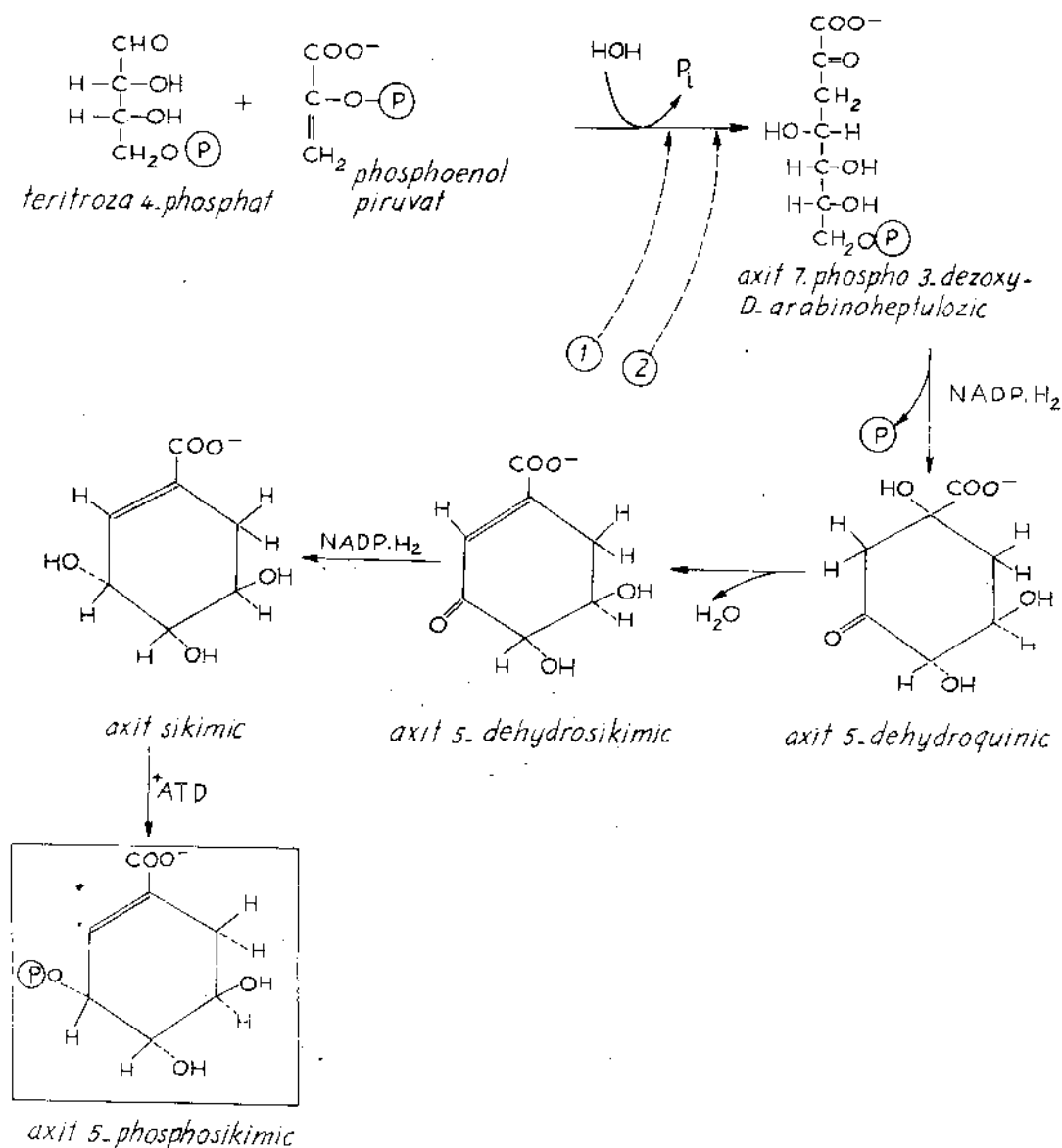


Hình 10.16. Sơ đồ phản ứng sinh tổng hợp izoloxin

Cần chú ý rằng izoloxin ức chế hoàn toàn enzym treonindehydrataza (đúng hơn là enzym treonindezaminaza) là enzym xúc tác phản ứng đầu tiên của chuỗi phản ứng sinh tổng hợp izoloxin. Sự kìm hãm treonindehydrataza ở đây mang tính chất cạnh tranh vì ái lực của enzym với *L*- izoloxin lớn hơn với *L*- treonin 100 lần.

d) Sinh tổng hợp phenylalanin, tirozin và triptophan

Phenylalanin, tirozin và triptophan là những axit amin vòng và cùng được tổng hợp nên từ eritroza - 4 - phosphat (sản phẩm của chu trình pentoza) và phosphoenol-piruvat. Các phản ứng tổng hợp nên ba axit amin này đều qua một sản phẩm trung gian chung là axit 5 - phosphosikimic. Sơ đồ phản ứng tổng hợp nên axit 5 - phosphosikimic như ở hình 10.17.



Hình 10.17. Sơ đồ phản ứng sinh tổng hợp axit 5 - phosphosikimic

Đầu tiên eritroza - 4 - phosphat sẽ ngưng tụ với phosphoenolpiruvat để tạo thành axit 7 phospho 3 dextro *D* arabino heptulozic. Sau đó chất này sẽ vòng hóa để cho ta axit -5 dehydroquinic. Axit 5 dehydroquinic bị khử nước, bị oxy hóa và phosphoryl hóa để tạo nên axit 5 - phosphosikimic.

Dưới tác dụng của enzym 3 - enolpiruvilsikimat - 5 - phosphatsintetaza, axit 5 - phosphosikimic sẽ ngưng tụ với phosphoenolpiruvic để tạo thành 3 - enolpiruvilsikimat - 5 - phosphat. Từ chất này sẽ tạo nên axit khorizmic và tiếp đó axit khorizmic chuyển thành axit antranilic (chất tiền thân của triptophan) và axit prefenic (chất tiền thân của phenylalanin và tirozin).

Axit prefenic sẽ bị decarboxyl hóa hoặc bị decarboxyl hóa kết hợp với khử để tạo nên những chất tiền thân trực tiếp của phenylalanin. Giai đoạn cuối cùng của việc tổng hợp hai axitamin này là phản ứng chuyển amin hóa.

Từ axit antranilic qua một số chuyển hóa bởi enzym sẽ tạo nên dẫn xuất của indol. Phản ứng cuối cùng của dây chuyển tạo ra triptophan là phản ứng trao đổi giữa mảnh có ba cacbon (serin) với vòng indol enzym triptophansintetaza xúc tác.

Sơ đồ phản ứng sinh tổng hợp tirozin, phenylalanin, và triptophan như ở hình 10.18.

e) Sinh tổng hợp histidin

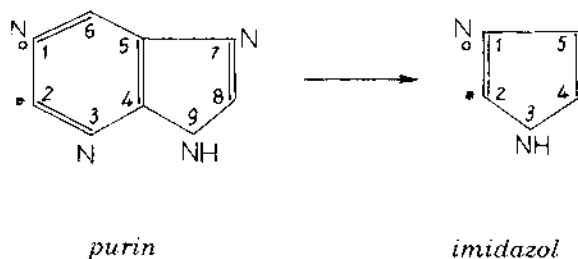
Histidin là axitamin được tạo nên từ riboza - 5 - phosphat và ATP.

Bằng phương pháp nguyên tử đánh dấu, người ta đã chứng minh được rằng N₁ và C₂ của vòng imidazol đều được hình thành từ N₁ và C₂ của nhân purin.

Đầu tiên riboza - 5 - phosphat sẽ ngưng tụ với ATP cho ta hợp chất N₁ - (5' - phosphoribozyl) - ATP dưới tác dụng của enzym phosphoribozyl - ATP - pirophosphorilaza. Hợp chất

này bị biến đổi cho ta một sản phẩm trung gian quan trọng là "hợp chất III". Hợp chất III thực chất là sản phẩm ngưng tụ của riboza - 5 - phosphat và dẫn xuất N₁ của AMP có vòng hở và có tên là N - (5' - phospho - *D* - 1' - ribulozyl - formimino) - 5 (5' - phosphoribozyl) - 4 - imidazolcacboxamit.

Sự kết hợp nitơ của glutamin vào hợp chất III sẽ tạo ra imidazol - glixerophosphat và 5 - aminoimidazol - 4 - cacboxamit - ribonucleotit.



HÓA SINH HỌC CÁC QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT VÀ SỬ DỤNG CÁC CHẾ PHẨM ENZIM

Enzim là những chất xúc tác hữu cơ có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất do tế bào sống tổng hợp nên, điều khiển vận tốc và sự chuyển hóa của hàng ngàn phản ứng hóa học xảy ra trong sinh chất. Enzim rất có ích cho con người trong việc nghiên cứu và sử dụng chúng để giải quyết các vấn đề quan trọng của khoa học, công nghiệp và kinh tế quốc dân. Người ta ngợi ca chúng bằng những hình dung từ đẹp để "máy phân tử" "thống soái" và "kỳ diệu" của cơ thể.

Lịch sử phát sinh và phát triển của một số ngành công nghiệp lên men đã chứng tỏ rằng các "máy phân tử" này có trong một số nguyên liệu tự nhiên (như trong hạt nảy mầm, trong lá và quả đu đủ, trong ngân thủ tư của dạ dày bê nghé, ...) đã được sử dụng trong thực tế đời sống từ cổ xưa.

Tuy nhiên, việc coi enzim như là những chế phẩm đặc biệt được tách ra từ các dạng nguyên liệu sinh học khác nhau và ứng dụng chúng trong công nghiệp cũng như các lĩnh vực khác của nền kinh tế quốc dân mới chỉ bắt đầu từ cuối thế kỷ XIX. Tiến đề lý thuyết để tạo nên lĩnh vực công nghiệp chế phẩm enzim là :

- Nhiều enzim chứa trong mô và cơ quan động, thực vật cũng như trong tế bào vi sinh vật đều hòa tan trong nước, đồng thời có thể tách chúng ra khỏi tế bào hoặc tự chúng chuyển từ tế bào ra môi trường bên ngoài ;

- Các enzim vẫn bảo tồn được tính chất và khả năng xúc tác của mình khi tách chiết ra ở dạng chế phẩm khô. Sự ra đời của ngành công nghiệp sản xuất chế phẩm enzim gắn liền với những yêu cầu thúc bách của thực tiễn sản xuất như cần phải tìm các biện pháp có hiệu quả và hợp lý nhất để rū hồ vải, sản xuất rượu, nước giải khát có rượu, bia, bánh mì, đường glucoza, thực phẩm, ... ;

Cho đến nay, nhất là trong vòng vài chục năm gần đây, nền công nghiệp sản xuất chế phẩm enzim đã có những bước tiến khổng lồ với tiến độ phát triển khá mạnh mẽ. Ngày càng xuất hiện nhiều nhà máy sản xuất các loại chế phẩm enzim khác nhau. Một khối lượng lớn chế phẩm enzim được sản xuất ở các nước Tây Âu (như ở Pháp, Đan Mạch, Hà Lan, ...) ở Mỹ, Nhật Bản, Nga và nhiều nước khác. Năm 1967, ở Mỹ sản xuất trên 30 000 tấn chế phẩm. Hiện nay ở Mỹ có trên 12 hãng lớn sản xuất các chế phẩm enzim có độ thuần khiết khác nhau. Công nghiệp enzim của Nhật Bản bắt đầu phát triển mạnh từ những năm năm mươi (lúc này đã có đến trên 10 hãng sản xuất chế phẩm, enzim từ nấm mốc). Năm 1967, Nhật

Bán sản xuất 21 000 tấn. Hiện nay Nhật Bản là nước có nền công nghiệp enzym phát triển hơn cả.

Trong một số nhà máy cỡ lớn ở Mỹ, Nhật bản và châu Âu, sản xuất chế phẩm enzym từ vi sinh vật liên hợp với sản xuất các chất hoạt động sinh học khác như chất kháng sinh, vitamin, chất kích thích sinh trưởng.

Số lượng enzym được sản xuất ngày càng tăng, các phương pháp tách, tinh chế enzym ngày càng được hoàn thiện và hợp lý hóa, lĩnh vực ứng dụng chế phẩm enzym ngày càng được mở rộng.

Ở Việt Nam cũng có nhiều nghiên cứu và ứng dụng enzym trong công nghiệp thực phẩm, y học, v.v.

Một trong những nhân tố quan trọng nhất có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của ngành công nghiệp chế phẩm enzym là sự hiểu biết và nghiên cứu về cơ sở để cập đến các vấn đề : nguồn nguyên liệu để thu enzym, cơ chế điều hòa và sinh tổng hợp enzym, ứng dụng các loại chế phẩm enzym, ...

XI.1. NGUỒN NGUYÊN LIỆU ĐỂ THU ENZIM

Vì enzym là những chất không thể chế biến được bằng phương pháp tổng hợp hóa học nên người ta thường thu chúng từ các nguồn sinh học. Mặc dù enzym có trong tất cả các cơ quan, mô của động, thực vật cũng như trong tế bào vi sinh vật, song việc tách enzym nhất là tách với qui mô công nghiệp thuận lợi về kinh tế chỉ có thể tiến hành trong những trường hợp mà vật liệu có chứa một lượng lớn enzym cũng như cho phép thu được enzym với hiệu suất cao.

Trong tay con người có ba nguồn nguyên liệu sinh học cơ bản : các mô và cơ quan động vật, mô và cơ quan thực vật, tế bào vi sinh vật.

Trong tất cả các nguyên liệu có nguồn gốc động vật thì tuyến tụy, màng nhày dạ dày, tim, ... những phế liệu của công nghiệp thịt - dùng để tách enzym rất tiện lợi. Dịch tụy có chứa amilaza, lipaza, proteaza, ribonucleaza và một số enzym khác.

Từ ngân thủ tư của dạ dày bê nghé người ta thu chế phẩm renin để làm đông sữa trong sản xuất phomat. Người ta cũng sản xuất pepxin từ dạ dày động vật. Khác với pepxin, renin có khả năng đông tụ sữa cao mà không thủy phân sâu sắc casein. Renin là chế phẩm enzym có giá trị lớn trong công nghiệp.

Tuy vậy, để sử dụng rộng rãi trong công nghiệp và trong nền kinh tế quốc dân, proteaza động vật ít thuận lợi do sản xuất chúng bị hạn chế và lượng nguyên liệu để thu enzym không lớn lắm. Các nguyên liệu này có thể dùng trong nhiều lĩnh vực khác.

Từ thực vật thượng đẳng người ta cũng thu được một số chế phẩm enzym thủy phân như papain, bromelin, fixin. Đó là các proteinaza thực vật. Người ta thu papain từ nhựa (mủ) đu đủ xanh bằng cách khuấy nhựa đu đủ một thời gian và sau đó tách lấy kết tủa protein và đem sấy khô nghiền nhỏ. Bromelin thu từ thân dứa. Sau khi hái quả người ta bỏ lá và ép thân lấy dịch rồi dùng dung môi hữu cơ kết tủa enzym trong dịch ép. Fixin được tách từ dịch ép thân và lá giống *Ficus*.

Thực vật (malt đại mạch và các hạt nảy mầm khác) cũng là nguồn enzym có truyền thống được dùng trong công nghiệp rượu, bia, bánh kẹo. Malt chủ yếu có chứa amilaza hoạt động, còn các enzym thủy phân khác hoạt động yếu. Tuy thế, thu các chế phẩm enzym thuần khiết từ malt không phổ biến và không kinh tế, bởi lẽ khi tách enzym tinh khiết từ malt thì những chất không hòa tan quý giá (tinh bột, protit) sẽ không được sử dụng. Mặt khác, malt là nguyên liệu thiếu và đắt vì để thu được nó cần phải có hạt có độ phát dục cao. Lượng enzym thu được từ các nguyên liệu thực vật không lớn lắm so với lượng nhiên liệu tiêu hao.

Sau khi đã điếm qua các nguồn nguyên liệu động, thực vật chính có thể từ đó chiết suất các chế phẩm enzym, chúng ta thấy rằng hai nguồn nguyên liệu đó vì nguyên nhân nào khác (về công nghệ hay kinh tế, ...) không thể dùng làm nguyên liệu để sản xuất với qui mô công nghiệp lớn các chế phẩm enzym nhằm thỏa mãn các nhu cầu của nền kinh tế quốc dân. Như vậy, trong các nguồn nguyên liệu sinh học thì nguồn nguyên liệu vi sinh vật là dồi dào và đầy hứa hẹn. Vì dùng vi sinh vật làm nguồn nguyên liệu để sản xuất các chế phẩm enzym sẽ khắc phục được mọi khó khăn và hạn chế trên đây.

Thực tế đã chứng tỏ tính ưu việt và khả năng to lớn của nguồn nguyên liệu vi sinh vật :

- Trước hết phải nói rằng vi sinh vật là nguồn nguyên liệu vô tận để sản xuất enzym với một lượng lớn và có thể mở rộng để sản xuất tới phạm vi cần thiết, đồng thời việc thu chế phẩm cũng dễ dàng và có thể thỏa mãn trong một mức độ lớn nhu cầu của các ngành công nghiệp khác nhau ;

- Hệ enzym vi sinh vật vô cùng phong phú. Từ vi sinh vật không những chỉ có thể thu được một số lớn các enzym khác nhau, mà từ một số rất lớn các vi sinh vật đã biết luôn luôn có thể tìm được những vi sinh vật có phức hệ enzym thích ứng tốt hơn nhiều với điều kiện của sản xuất. Vi sinh vật có thể đồng hóa bất kỳ một chất nào trong thiên nhiên. Trong lúc đó có nhiều chất mà động vật và thực vật không thể đồng hóa được. Tất nhiên, muốn sử dụng được nguồn chất vô cùng phong phú đó (từ các chất vô cơ đơn giản như CO_2 , N_2 , S, Fe cho đến các chất hữu cơ phức tạp như protein, xelluloza, tinh bột, pectin, linhin, ...) trong tế bào vi sinh vật phải chứa những hệ enzym cần thiết cho các nhu cầu kỹ thuật khác nhau, đặc biệt là những nhóm enzym không thể khai thác được từ các nguồn khác. Ví dụ, xellulaza, raxemaza, ... ;

- Enzym của vi sinh vật có hoạt tính rất mạnh, vượt xa các sinh vật khác. Người ta đã tính rằng, trong vòng 24 giờ, vi sinh vật có thể chuyển hóa một lượng thức ăn gấp 30 - 40 lần so với trọng lượng cơ thể của chúng. Trong khi đó, hệ enzym của con lợn trên 50 kg, chỉ có thể chuyển hóa được vài ba kilogram thức ăn trong một ngày ;

- Ưu việt lớn của sự thu enzym từ vi sinh vật là có khả năng tăng cường sinh tổng hợp các enzym nhờ chọn giống khi tạo được những biến chủng có hoạt lực cao. Vi sinh vật rất nhạy cảm với tác động của môi trường, có khả năng thích ứng nhanh chóng với nguồn dinh dưỡng. Vì vậy, khi thay đổi điều kiện sống của vi sinh vật hoặc tác động lên chúng bằng các tác nhân khác nhau có thể thay đổi dễ dàng hệ enzym cũng như hoạt tính của chúng và tăng tối đa sự sinh tổng hợp các enzym

trong vi sinh vật nuôi cấy. Điều đó cho phép ta có thể tạo được những enzym theo ý muốn, dễ dàng thu được enzym có độ thuần khiết cao ;

- Vi sinh vật sinh sản với vận tốc cực kỳ nhanh chóng, khối lượng lại nhỏ, kích thước bé ; nhưng tỉ lệ enzym trong tế bào tương đối lớn nên qui trình sản xuất chế phẩm enzym khá dễ dàng, thao tác thuận lợi, hiệu suất thu hồi cao. Trong một thời gian ngắn, với một qui mô nhỏ, có thể sản xuất được một lượng lớn chế phẩm enzym. Đối với một số trường hợp có thể dùng 100% sinh khối vi sinh vật làm nguồn enzym ;

- Phần lớn các thức ăn để nuôi vi sinh vật lại dễ kiếm và rẻ tiền. Đa số vi sinh vật cho enzym thường có khả năng phát triển trên các môi trường đơn giản rẻ tiền như các phế liệu, phế phẩm của các ngành sản xuất. Có thể dùng những nguyên liệu không phải thực phẩm, những dung dịch muối vô cơ để nuôi sinh vật. Do đó dùng vi sinh vật làm nguồn thu enzym sẽ đem lại hiệu quả kinh tế lớn.

Chính do những nguyên nhân ấy mà việc đề xướng và hoàn chỉnh các phương pháp tách enzym từ vi sinh vật có một ý nghĩa rất lớn.

Hiện nay có hàng chục enzym khác nhau ở dạng đơn chất cũng như chế phẩm kỹ thuật với mức độ tinh khiết khác nhau đã được sản xuất trên qui mô công nghiệp từ nấm mốc, vi khuẩn, nấm men và xạ khuẩn.

XI.2. SINH TỔNG HỢP ENZIM BẰNG VI SINH VẬT

XI.2.1. Sinh tổng hợp enzym

Enzim đều là những protein. Vì vậy, khi hiểu rõ quá trình sinh tổng hợp protein trong tế bào chúng ta đồng thời khám phá ra cơ chế sinh tổng hợp enzym.

Sinh tổng hợp enzym (protein) là một trong hai vấn đề quan trọng bậc nhất và sôi nổi nhất của khoa học tự nhiên hiện đại. Hiện nay có hai thuyết về cơ chế sinh tổng hợp protein : thuyết khuôn và thuyết peptit. Người ta tin tưởng chắc chắn rằng có nhiều đường hướng sinh tổng hợp protein và ít ra là có hai cơ chế, cơ chế khuôn và cơ chế peptit, được sử dụng trong quá trình tân tạo protein. Giữa hai cơ chế này có những "giao điểm" để đảm bảo mối liên quan tương hỗ của chúng. Đồng thời người ta cũng cho rằng cơ chế khuôn chủ yếu đảm nhiệm sự tổng hợp các protein chức năng (enzim, hormon, ...), còn cơ chế peptit chủ yếu phục vụ cho việc tổng hợp các protein kiến tạo. Trong phạm vi của chương này chỉ nêu ra những điểm cơ bản của cơ chế khuôn về sinh tổng hợp enzym.

Cơ chế sinh tổng hợp enzym

Quá trình sinh tổng hợp enzym là một quá trình rất phức tạp, gắn liền mật thiết với cấu trúc tế bào và được tiến hành qua nhiều giai đoạn với sự tham gia của nhiều hệ enzym và các axit nucleic khác nhau.

Theo thuyết khuôn và dựa trên những quan điểm hiện đại có thể chia quá trình này một cách ước lệ ra làm bốn giai đoạn chính :

- Giai đoạn 1 : hoạt hóa axit amin ;

- Giai đoạn 2 : vận tải axit amin đã được hoạt hóa đến ribosom là địa điểm tổng hợp protein mạnh mẽ nhất của tế bào ;

- Giai đoạn 3 : xếp đặt và phối tác các amin đã được hoạt hóa theo một trật tự đã cho trên khuôn ARN thông tin và hình thành liên kết peptit;

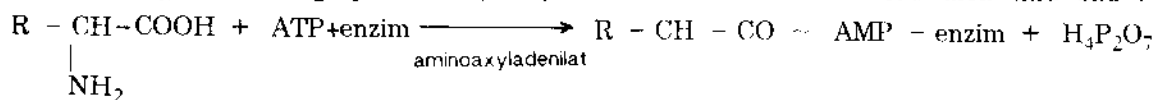
- Giai đoạn 4 : giải phóng mảnh polypeptit đã được tổng hợp và thiết lập cấu trúc không gian của phân tử enzym đặc hiệu trong không gian ba chiều.

XI.2.1.1. Hoạt hóa axitamin

Trước khi axitamin được đưa đến và đặt vào vị trí thích hợp trên khuôn cũng như tương tác với nhau, chúng cần phải được hoạt hóa, bởi lẽ sự tổng hợp liên kết peptit từ các axitamin tự do tiến hành với sự hấp thụ năng lượng gần 3000 cal/mol. Do vậy mục đích của sự hoạt hóa là để làm cho phân tử của axitamin trở nên hoạt động mạnh hơn, có khả năng phản ứng cao hơn và dễ tương tác với nhau hơn.

Phản ứng hoạt hóa axitamin do những enzym đặc biệt xúc tác (aminoaxit - ARN - sintetaza) và có thể sử dụng năng lượng ATP, đồng thời hình thành aminoaxyladenilat và pirophosphat. Toàn bộ năng lượng dự trữ có trong liên kết giữa nhóm phosphat thứ nhất và thứ hai của ATP chuyển sang axitamin, nhờ vậy mà axitamin trở nên hoạt động hơn, như người ta thường nói axitamin chuyển sang mức năng lượng cao hơn. Axitamin liên kết với nhóm phosphat của adenosin - 5' - phosphat (AMP) qua nhóm cacboxyl và tạo thành anhydrit hỗn tạp với gốc axit phosphoric. Aminoaxyladenilat không tồn tại ở trạng thái tự do mà ở trạng thái liên kết với enzym hoạt hóa.

Phương trình tổng quát về sự hoạt hóa axitamin có thể biểu diễn như sau :



Trong thành phần của phân tử enzym thường có 20 axitamin, mỗi axitamin đều được hoạt hóa bằng enzym đặc hiệu của mình và như vậy, trong việc sinh tổng hợp enzym có ít ra là 20 enzym hoạt hóa axitamin. Các ion Mg^{2+} , đôi khi cả Ca^{2+} rất cần cho hoạt động của các enzym này.

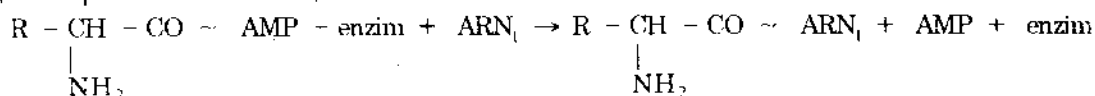
XI.2.1.2. Vận chuyển axitamin đã được hoạt hóa đến riboxom

Trong giai đoạn này, axitamin sau khi đã được hoạt hóa ở dạng aminoaxyladenilat được chuyển sang một loại hợp chất hóa học đặc biệt có khả năng duy trì đặc tính cao năng của axitamin hoạt hóa và vận chuyển chúng đến địa điểm tổng hợp enzym. Hợp chất hóa học đặc biệt là axit ribonucleic hòa tan (ARN_s) hay axit ribonucleic vận tải (ARN_t) (xem chương axit nucleic). Ngoài chức năng vận tải và giải phóng axitamin đã được hoạt hóa khỏi bề mặt enzym hoạt hóa ARN_t còn ý nghĩa lớn trong khâu quan trọng nhất của sinh tổng hợp enzym là đảm nhiệm sự phân bố axitamin trong phân tử enzym tân tạo theo một trình tự xác định. Để hoàn thành được chức năng cuối cùng này, phân tử ARN_t có một "nút" đặc biệt trong đó có chứa ba bộ nucleotit bổ trợ (kết đôi) với bộ ba nucleotit của axit ribonucleic thông tin (ARN_i). Bộ ba này được gọi là đối codon hay anticodon.

Cơ chế chuyển axitamin đã được hoạt hóa từ aminoaxyladenilat sang ARN_t được thực hiện bằng cách kết hợp gốc axitamin vào nhóm - OH ở nguyên tử cacbon thứ ba của gốc ribosa trong gốc nucleotit cuối cùng là adenosine nucleotit của ARN_t . Liên

kết este sinh ra trong trường hợp này, giữa axitamin và ARN_1 có đặc tính cao năng. Phản ứng chuyển gốc axitamin từ aminoaxyladenilat sang ARN_1 cũng được xúc tác bởi chính enzym hoạt hóa axitamin. Sau khi axit amin chuyển sang ARN_1 nghĩa là tạo nên aminoaxyl - ARN_1 thì enzym và AMP được giải phóng. Enzym lại có thể tham gia vào việc hoạt hóa axitamin mới.

Phương trình tổng quát của cơ chế chuyển gốc axitamin từ aminoaxyladenilat sang ARN_1 có thể minh họa như sau :



Mỗi một axitamin cần có ARN_1 của riêng mình. Như vậy 20 axitamin đã sử dụng 20 enzym đặc hiệu để hoạt hóa chúng và liên kết với 20 ARN_1 đặc hiệu.

Tuy nhiên, hiện nay người ta thấy rằng nhiều axitamin có thể được vận tải từ enzym hoạt hóa đến riboxom bằng một số ARN_1 , ví dụ, để vận tải leucin có 3 ARN_1 , đối với serin có 5 ARN_1 , valin có 2 ARN_1 , v.v. Thế là, trên thực tế đối với 20 axitamin có một số lượng ARN_1 lớn hơn 20 nhiều.

XI.2.1.3. Cơ chế tổng hợp liên kết peptit trong riboxom

và sự hình thành cấu trúc bậc nhất của phân tử enzym

Như trên đã nói, mỗi một enzym riêng biệt có một trật tự xếp sắp các gốc axitamin trong mạch polypeptit đặc thù của mình. Sự tạo thành các mạch polypeptit của phân tử enzym xảy ra trong tế bào với sự tham gia trực tiếp của axit nucleic. Tế bào tổng hợp hàng trăm enzym và protein khác nhau, gián đó cấu tạo của mỗi một enzym đều được ghi trong phân tử axit deoxyribonucleic (ADN).

Khi tế bào cần phải tổng hợp một enzym hoặc một hệ enzym nào đó thì ADN phải tạo nên một hay nhiều "bản sao" ("bản phiên âm") thông tin. Lượng thông tin này chứa trong trình tự xếp sắp đặc trưng của các nucleotit. Tiếp theo đó, người mang "bản phiên âm" này - ARN thông tin - sẽ liên kết với riboxom để tổng hợp nên các enzym đặc hiệu.

ADN được cấu hình từ bốn loại nucleotit, còn enzym thì từ 20 axitamin, vậy ADN đã chỉ đạo việc sinh tổng hợp enzym ra sao?

Để hiểu thấu vấn đề này, cụ thể là để hiểu rõ cơ chế tổng hợp liên kết peptit và sự tái lập cấu trúc bậc nhất của phân tử enzym chúng ta cần lần lượt tìm hiểu các vấn đề về mật mã di truyền, về sự sao chép, phiên âm mã và sự phiên dịch mã từ "ngôn ngữ" nucleotit của ADN qua ARN thông tin sang "ngôn ngữ" axitamin của enzym.

a) Mã di truyền

Theo những quan niệm hiện đại, tùy thuộc vào nhu cầu của tế bào về enzym hoặc vào chương trình đã định trước mà ADN chỉ đạo sự tổng hợp các enzym khác nhau. ADN chỉ đạo sinh tổng hợp enzym qua các axit ribonucleic thông tin. Mỗi một ARN thông tin là một bản sao chính xác một mạch (một phần) nhất định của ADN. Đoạn mạch xoắn kép của ADN đó gọi là gen. Gen là một đơn vị di truyền qui định trước trình tự xếp sắp các gốc axitamin trong một enzym hoặc một protein đặc thù nào đó. Như vậy, lượng thông tin cần để tổng hợp nên enzym được mã hóa trong các gen và thứ tự sắp xếp các gen và thứ tự sắp xếp các axitamin trong enzym được ghi trong phân tử ADN bằng mật mã, tức là bằng trật tự bốn nucleotit.

Trong thiên nhiên chỉ có bốn "chữ cái" nucleotit (A, X, G, T của ADN và A, X, G, U của ARN). Làm như thế nào để từ bốn "chữ cái" đó tạo được 20 "từ" cho tương ứng với 20 axit amin? Điều trước tiên là phải giải quyết vấn đề : mỗi "từ" gồm mấy "chữ cái", nghĩa là mỗi axit amin được mã hóa bởi tổ hợp gồm bao nhiêu nucleotit? Hiện nay những điểm cơ bản về mã di truyền của ADN đã được xác lập. Người ta đã khám phá ra bí mật này của thiên nhiên và biết rằng mỗi một axit amin được xác định bởi ba nucleotit, nói cách khác cứ mỗi tổ hợp gồm ba nucleotit của ADN, thì mã hóa cho một axit amin, tức là mỗi "từ" gồm ba "chữ cái" (cả thầy được $4 \times 4 \times 4 = 64$ tổ hợp, bộ ba khác nhau). Bộ ba nucleotit này gọi là *triplet* hay *codon*. Có 64 bộ ba mã hóa mà chỉ có 20 axit amin, như thế số triplet có quá dư không? Thực nghiệm đã chứng minh rằng một axit amin có thể được mã hóa bằng 2 đến 6 bộ ba khác nhau. Nirenberg, Choran và các cộng tác viên đã có công lớn trong việc tìm ra bản chất của mật mã bộ ba bằng con đường thực nghiệm. Dưới đây là bảng thống kê tổng hợp các codon của ARN thông tin mã hóa cho các axit amin (bảng 11.1).

Từ cuốn "từ điển mật mã di truyền" trên ta thấy trong 64 codon có thể có thì có ba codon UAA, UAG và UGA không mã hóa cho một axit amin nào như người ta thường nói "từ" (codon) này "vô nghĩa". Song, các bộ ba UAA, UAG, UGA có thể được dùng làm tín hiệu kết thúc, thông báo sự ngừng tổng hợp mạch polypeptit.

Bảng 11.1. Từ điển mã di truyền (theo Crick)

Chữ cái thứ nhất	Chữ cái thứ hai								Chữ cái thứ ba	
	U		X		A		G			
U	UUU	phenyl	UXU	serin	UAU	tirozin	UGU	xistein	U	
	UUX	alanin	UXX		UAX		UGX		X	
	UUA	lôxin	UXA		UAA		UGA		A	
	UUG		UXG		UAG		UGG		triptophan	G
X	XUU	lôxin	XXU	prolin	XAU	histidin	XGU	arginin	U	
	XUX		XXX		XAX		XGX		X	
	XUA		XXA		XAA		XGA		A	
	XUG		XXG		XAG		glutamin		XGG	G
A	AUU	izolôxin	AXU	treonin	AAU	asparagin	AGU	serin	U	
	AUX	metionin	AXX		AAX		AGX		X	
	AUA		AXA		AAA		AGX		A	
	AUG		AXG		AAG		lizin		AGG	arginin
G	GUU	valin	GXU	alanin	GAU	axit	GGU	glixin	U	
	GUX		GXX		GAX		aspartic		GGX	X
	GUA		GXA		GAA		axit		GGA	A
	GUG		GXG		GAG		glutamic		GGG	G

Tóm lại, vị trí của axitamin này hay axitamin khác trong mạch polypeptit của enzym được xác định bằng các bộ nucleotit trong phân tử ADN.

b) Sự phiên âm mã - sự tổng hợp ARN thông tin

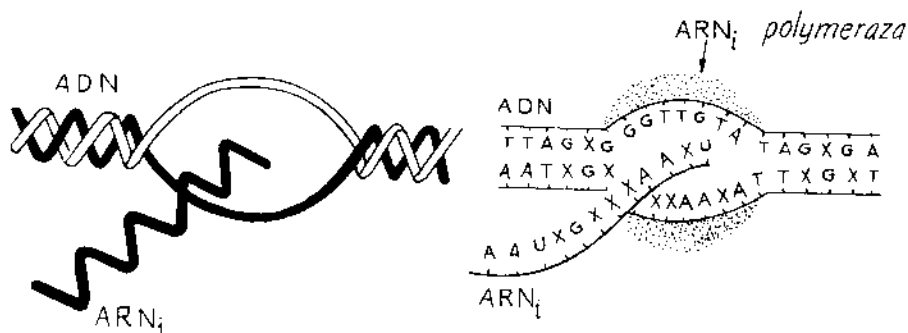
Trong quá trình tổng hợp enzym lượng thông tin chứa trong phân tử ADN được truyền cho ARN thông tin ARN_i . Chất này làm nhiệm vụ như một "giao liên" giữa ADN của nhân và các tiểu thể ribo.

ARN_i được tổng hợp trong nhân tế bào trên khuôn ADN. Trong tiến trình tạo thành ARN_i , cấu trúc mạch xoắn kép của ADN được "tháo" "mở" ra từng phần và hai mạch tách rời nhau thành hai mạch đơn. Mạch đơn ADN bắt đầu liên kết bổ trợ vào mình các ribonucleotit tự do ở ngoài môi trường theo nguyên tắc kết đôi (xem phần axit nucleic). Giả sử trên một đoạn mạch đơn nào đó của ADN có thứ tự các bazơ như sau : - A - G - T - X - thì khi đó trong phân tử ARN_i sẽ có thứ tự tương ứng sau : - U - X - A - G - .

Sự tổng hợp ARN_i do enzym đặc biệt ARN_i polymeraza xúc tác. Sau khi hình thành phân tử ARN_i trên khuôn ADN, cả hai chuỗi lại tách đôi nhau ra và thu được các chuỗi đơn của ADN và ARN_i (sơ đồ hình 11.1). ADN lại cuộn thành xoắn như cũ. Như vậy, ARN_i được tổng hợp trên khuôn ADN sẽ phản ánh hoàn toàn đầy đủ thứ tự xếp sắp nucleotit trong phân tử ADN bằng trật tự xếp sắp nucleotit của mình.

Quá trình chuyển thông tin di truyền từ ADN sang ARN_i gọi là sự sao mã (phiên âm mã).

ARN_i được tạo thành trong nhân tế bào từ giả nhân và chuyển vào tế bào chất rồi nhập vào riboxom. Ở đây ARN_i làm "khuôn" để "đúc" nên các phân tử enzym (protein) đặc hiệu.



Hình 11.1. Sơ đồ phiên âm mã

c) Sự phiên dịch mã - sự tổng hợp mạch polypeptit đặc trưng trong riboxom trên khuôn ARN_i

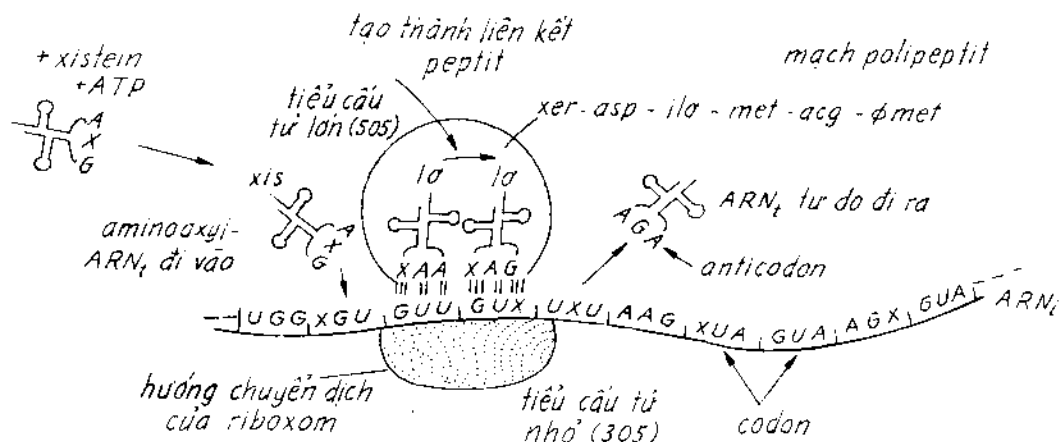
ARN_i thông tin nhập vào riboxom bằng một phần nhất định của phân tử của mình và tạo thành khuôn để tổng hợp protein.

Các aminoaxyl - ARN_i được tạo thành (ở giai đoạn hai) cũng đến riboxom. Song không có tương tác trực tiếp giữa các axitamin và các triplet của khuôn. Vậy sự sinh tổng hợp mạch polypeptit của enzym được bắt đầu ra sao và kết thúc như thế nào?

Tạo thành phức "khởi đầu". Một thời gian người ta cho rằng sự tổng hợp chuỗi polypeptit trong riboxom được bắt đầu bằng việc đính axit amin thứ nhất đầu - NH_2 của enzym tân tạo vào một điểm xác định trên khuôn ARN_i và codon của axit đầu N này phải có những đặc điểm khác biệt nào đó cho phép riboxom có thể nhận biết được nó như là điểm khởi đầu, điểm xuất phát của mạch. Hiện nay người ta đã tìm thấy rằng ở *E.coli* các vi khuẩn khác cũng như ở ti thể động vật, đa số enzym và protein được sinh tổng hợp bắt đầu từ axit amin metionin và gốc khởi đầu của metionin là N-formylmetionin - ARN_i (FMet - ARN_i). Riboxom cấu tạo từ hai tiểu cấu tử (hai tiểu đơn vị): lớn (50 S) và nhỏ (30 S). Tiểu cấu tử nhỏ (30 S) liên hợp với ARN_i và FMet - ARN_i tạo thành phức "khởi đầu", sau đó phức này liên kết chặt chẽ với cấu tử lớn (50 S) để tạo thành riboxom hoạt động (70 S). Như vậy, hiệu lệnh mở đầu sự sinh tổng hợp mạch polypeptit là sự tạo thành phức khởi đầu giữa ARN_i , aminoaxyl - ARN_i thứ nhất đầu N với riboxom. Dẫn xuất N - formyl của axit amin được ARN_i đặc hiệu dẫn đến codon đầu của ARN_i và được đính vào đó.

Kéo dài mạch petit. Muốn đặt đúng được các axit amin vào vị trí của chúng trên khuôn ARN_i thì phải "đọc" được "từ" mật mã. Các ARN_t đã dùng đối codon của mình để "đọc" và tìm được codon tương ứng một cách dễ dàng theo qui tắc bổ trợ.

Giả sử, nếu ở vị trí đầu tiên trong mạch polypeptit của enzym phải là metionin thì ARN chuyển vận metionin có mang gốc metionin sẽ tới gần codon tương ứng của ARN_i . Giả dụ axit amin thứ hai đứng sau đó phải là arginin thì ARN vận chuyển arginin có mang gốc arginin sẽ đến gần triplet đứng cạnh đó của ARN_i . Giữa hai axit amin này sẽ xảy ra phản ứng do một enzym tương ứng xúc tác và metionin liên kết với arginin bằng nhóm $-COOH$ của mình, liên kết peptit (giữa $-COOH$ của metionin và $-NH_2$ của arginin) được hình thành ARN_i của metionin được giải phóng khỏi riboxom ARN vận chuyển thứ ba với gốc axit amin của mình lại tìm đến codon tương ứng bằng anticodon (gắn với codon bằng liên kết hydro). Arginin tới lượt mình lại kết hợp với nhóm $-NH_2$ của axit amin thứ ba và hình thành tripeptit. Cứ như thế, quá trình kéo dài (tổng hợp) mạch polypeptit tiếp tục cho đến khi nào toàn bộ mạch polypeptit của phân tử enzym được tổng hợp hoàn toàn (cho đến khi có tín hiệu ngừng lại). Cần chú ý rằng sau khi tạo xong một liên kết peptit thì cả phân tử ARN_i lẫn mạch peptidyl - ARN_i sẽ chuyển dịch ("trượt") trên riboxom sao cho codon tiếp sau được đến vị trí làm việc của mình. GTP cung cấp năng lượng cho quá trình này.

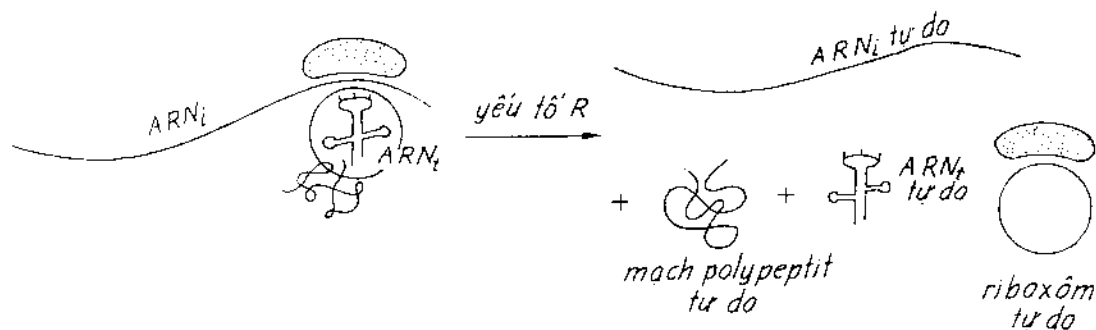


Như vậy là trong quá trình xếp đặt các axit amin vào vị trí thích hợp trong mạch polypeptit xảy ra trên khuôn ARN_i đã thực hiện một *sự phiên dịch mã* từ "ngôn ngữ" nucleotit của axit nucleic sang "ngôn ngữ" axit amin của enzym (h.11.2).

Kết thúc sinh tổng hợp mạch polypeptit. Tín hiệu ngừng (kết thúc) sự kéo dài mạch polypeptit là sự xuất hiện những (3) codon cuối cùng đặc biệt trong ARN_i ở vị trí làm việc khi ARN_i "trượt" trên riboxom. Các codon này không mã hóa cho axit amin nào cả.

XI.2.1.4. Giải phóng mạch polypeptit đã được tổng hợp và thiết lập cấu trúc không gian của phân tử enzym

Sự tách mạch polypeptit đã được tổng hợp khỏi riboxom chưa được nghiên cứu đầy đủ. Người ta cho rằng việc giải phóng polypeptidyl - ARN_i khỏi riboxom được thực hiện nhờ một *yếu tố giải phóng* đặc hiệu (factor R) ; yếu tố này liên kết với riboxom và làm cho sự thủy phân liên kết este giữa polypeptit và ARN_i xảy ra dễ dàng. Sau đó riboxom đi khỏi ARN_i và sau khi phân ly ra hai cấu tử thành phần (30 S và 50 S) lại bắt đầu tham gia vào chu kỳ sinh tổng hợp mới (h.11.3). Người ta vẫn chưa rõ lắm về trạng thái của mạch polypeptit lúc đi ra khỏi riboxom, nghĩa là lúc này enzym mới chỉ có ở dạng cấu trúc bậc nhất thôi hay là đã có cấu hình không gian nhất định rồi.



Hình 11.3

Toàn bộ quá trình sinh tổng hợp enzym trên đây có thể minh họa khái quát bằng sơ đồ ở hình 11.4.

Tóm lại, để tổng hợp enzym cần phải có nguyên liệu (axit amin) và năng lượng (ATP, GTP) cũng như phải có thông tin (ARN_i). Trình tự các nucleotit trong phân tử ADN là một bản mặt mã hoàn toàn có thực. Đó là một bản mặt mã mà thiên nhiên đã dùng để lưu truyền lượng thông tin di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác.

2. Điều hòa sinh tổng hợp enzym

Sự điều hòa trao đổi chất của cơ thể sống được tiến hành ở hai mức độ :

- Ở mức độ điều hòa sinh tổng hợp enzym ;
- Ở mức độ điều chỉnh hoạt lực của enzym.

Sự điều chỉnh sinh tổng hợp enzym có thể xem như là "sự điều chỉnh thô" trao đổi chất, còn điều chỉnh hoạt lực của enzym (còn gọi là *điều chỉnh dị không gian*) được xem như là "sự điều chỉnh tinh". Cả hai điều chỉnh này bổ sung và hỗ trợ cho nhau.

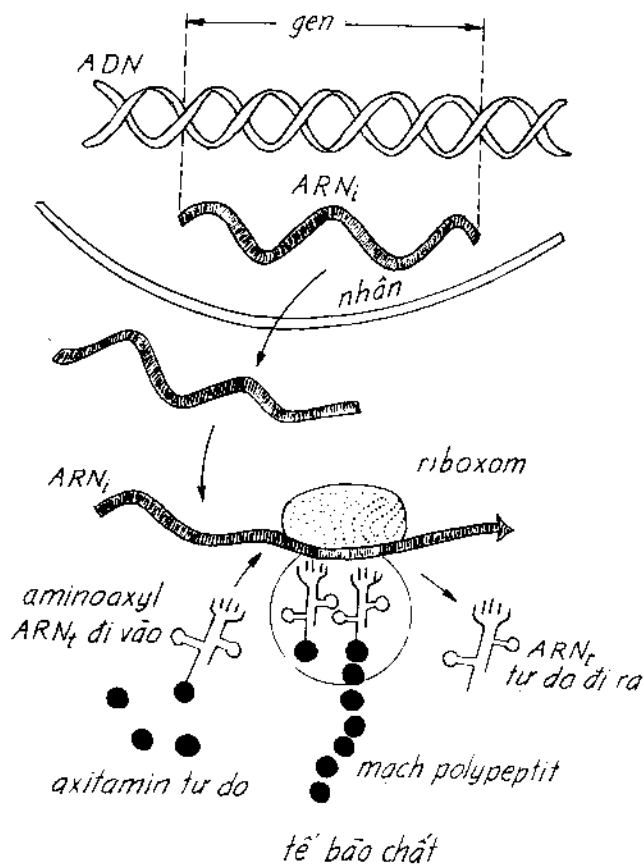
Điều hòa sinh tổng hợp enzym có một vai trò cực kỳ quan trọng làm cho những chuyển hóa cơ chất nội bào trên các đường hướng trao đổi khác nhau được phối hợp một cách hài hòa, đồng thời tạo nên một sự tương quan hết sức cân đối về hoạt độ của các hệ enzym riêng biệt, ngăn ngừa sự dư thừa enzym cũng như các sản phẩm trung gian và cuối cùng, cho phép tế bào sử dụng một cách tiết kiệm nhất, hợp lý nhất và có chủ đích các chất dinh dưỡng.

Vận tốc sinh tổng hợp enzym được điều chỉnh một phần bằng bộ máy di truyền, còn một phần do các yếu tố của môi trường bên ngoài quyết định. Đa số các dẫn liệu về điều hòa sinh tổng hợp enzym trong tế bào đều thu được khi nghiên cứu trên vi sinh vật, đặc biệt là trên trực khuẩn đường ruột (*E. coli*).

Sự tổng hợp enzym trong tế bào sống có thể được tăng cường (kích thích) hoặc có thể bị kìm chế (trấn áp).

Sự tăng cường sinh tổng hợp một enzym nào đó hoặc một nhóm enzym cùng tham gia vào việc xúc tác một trình tự phản ứng dưới ảnh hưởng của hợp chất hóa học (mà thường là cơ chất phản ứng) gọi là *sự cảm ứng sinh tổng hợp enzym*. Chất gây nên sự cảm ứng sinh tổng hợp (gây nên sự gia tăng lượng enzym nào đó) gọi là *chất cảm ứng* (yếu tố cảm ứng) ; còn enzym được tạo thành bằng cơ chế cảm ứng gọi là *enzim cảm ứng*.

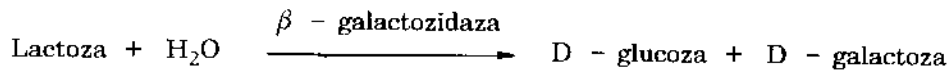
Sự kìm hãm sinh tổng hợp một enzym nào đó hoặc một nhóm enzym cùng xúc tác một trình tự phản ứng bằng các hợp chất hóa học đặc biệt (thường là sản phẩm cuối cùng của phản ứng) gọi là *sự kìm tỏa sinh tổng hợp enzym*. Chất gây nên sự kìm tỏa này gọi là *chất kìm tỏa phụ* (yếu tố kìm tỏa). Các enzym bị kìm hãm không được tổng hợp gọi là *enzim bị kìm tỏa*.



Hình 11.4. Sơ đồ khái quát của sự sinh tổng hợp enzym

Sự tạo thành các enzym dị hóa (enzim xúc tác sự phân giải cơ chất) được điều chỉnh bằng cơ chế cảm ứng sinh tổng hợp ; còn sinh tổng hợp các enzym đồng hóa (enzim xúc tác các phản ứng tổng hợp) thường được điều chỉnh bằng cơ chế kiểm soát.

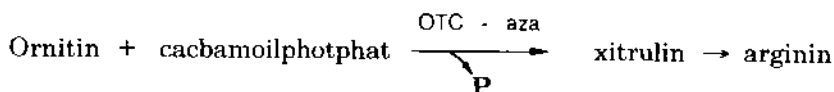
Một trong những ví dụ điển hình về cơ chế cảm ứng sinh tổng hợp enzym đã được nghiên cứu khá cặn kẽ là sự tổng hợp enzym β - galactozidaza cần để sử dụng lactoza và tế bào *E.coli*



Các tế bào *E.coli* hoang dại nguyên thủy có thể sinh trưởng trên nhiều cơ chất chỉ chứa một lượng rất nhỏ β - galactozidaza. Nếu cho thêm vào môi trường lactoza hay β - galactozit khác trong một ít thời gian thì hoạt lực β - galactozidaza của chúng tăng lên 1 000 lần. Trong trường hợp như vậy có đến 3% toàn bộ protein tế bào là β - galactozidaza.

Một ví dụ sinh động khác minh họa cho cơ chế kiểm soát sinh tổng hợp enzym cũng được thực hiện trên tế bào *E.coli*.

Nếu các tế bào *E.coli* được nuôi cấy trên môi trường tối thiểu thì tất cả các enzym tham gia vào sự sinh tổng hợp arginin có trong chúng với lượng "bình thường". Arginin được tổng hợp từ glutamat qua ornitin, xitruclin và argininosuxinat. Một trong các giai đoạn tổng hợp này được xúc tác bởi enzym ornititranscarbamylaza (OTC - aza) :



Khi cho thêm arginin vào môi trường tối thiểu (20 g/l) thì sự tạo thành OTC - aza bị đình chỉ, nghĩa là phát sinh ra sự kiểm soát sinh tổng hợp OTC - aza. Nếu bây giờ rửa tế bào khỏi arginin và đưa chúng trở lại môi trường tối thiểu không có arginin thì sẽ xảy ra sự giải tỏa kiểm soát và sự sinh tổng hợp OTC - aza lại tiến hành ngay tức khắc ngay tức khắc cho đến khi đạt mức độ bình thường.

a) Cơ chế cảm ứng và kiểm soát sinh tổng hợp enzym

Axit nucleic cũng đóng một vai trò quyết định trong việc điều hòa sinh tổng hợp enzym.

Jacob và Monod đưa ra thuyết điều hòa sinh tổng hợp bằng các gen điều chỉnh, gen chỉ huy và gen cấu trúc để giải thích sự cảm ứng và kiểm soát sinh tổng hợp enzym trên nền tảng một cơ chế thống nhất. Theo thuyết này sự kiểm soát sinh tổng hợp enzym là quá trình chính, còn cảm ứng sinh tổng hợp chỉ là phương thức giải tỏa, phá bỏ sự kiểm soát.

Người ta thấy rằng các phân đoạn khác nhau của phân tử ADN không đồng nhất về chức năng. Các đoạn mạch này gọi là gen. Và người ta phân biệt gen cấu trúc là những đoạn mạch ADN qui định trật tự xếp sắp các axit amin trong mạch polypeptit của enzym. Sự tổng hợp enzym đã cho chỉ xảy ra khi mà gen chỉ huy (gen tác động) không kìm hãm hoạt động của các gen cấu trúc. Gen chỉ huy nằm sát cạnh các gen cấu trúc và có khả năng kiểm soát, chỉ đạo hoạt động của chúng. Người ta cho rằng gen chỉ huy là điểm xuất phát từ đó khởi đầu quá trình tổng hợp ARN_i trên các gen cấu trúc.

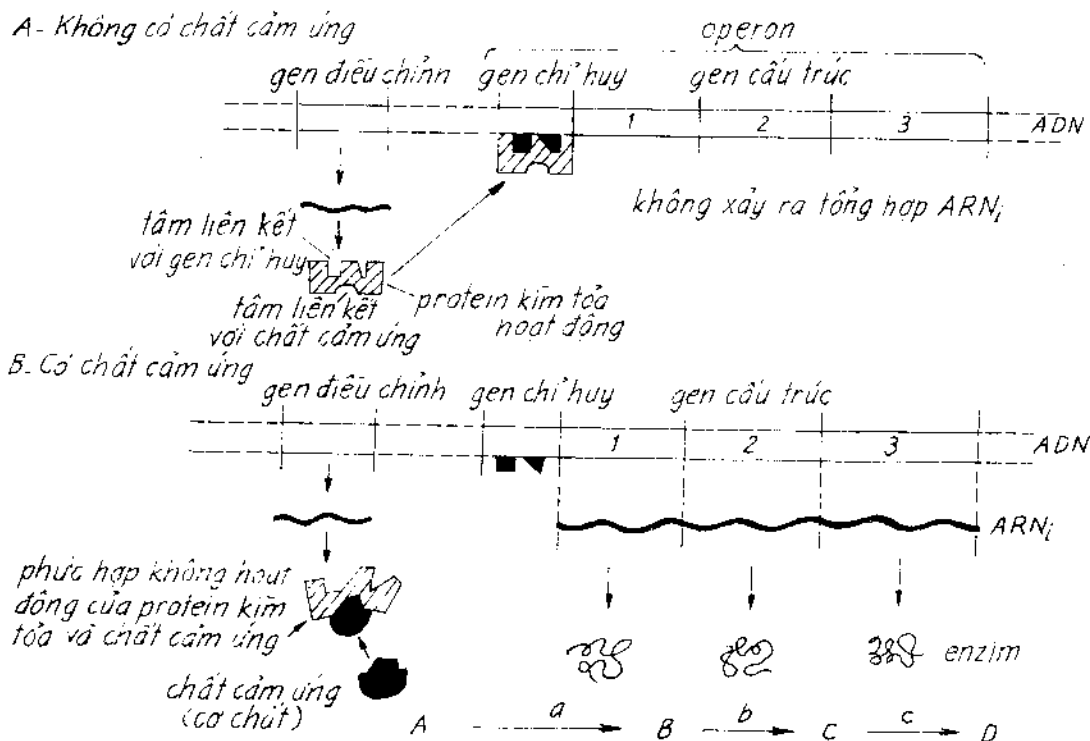
Tổ hợp của gen chỉ huy và các gen cấu trúc nằm sát cạnh nhau cùng chịu sự kiểm tra, chỉ đạo chung của một gen chỉ huy được gọi là *operon*.

Hiện nay người ta đang thảo luận về hai mô hình, điều hòa hoạt động của operon. Mô hình thứ nhất xuất phát từ sự tổng hợp một phân tử ARN_i trên một gen cấu trúc và một enzym được tạo thành (thuyết 1 gen - 1ARN_i - 1 enzym). Trong mô hình thứ hai ARN_i được tổng hợp trên cả operon, nghĩa là trên một số gen cấu trúc (thuyết 1 operon, 1 ARN_i - 1 nhóm enzym). Đa số các nhà nghiên cứu thiên về mô hình thứ hai.

Hoạt động của operon, chính xác hơn là của gen chỉ huy được điều hòa bằng gen điều chỉnh. Gen này nằm ở phía ngoài operon. Hoạt động điều hòa của gen điều chỉnh được thực hiện nhờ một chất kim tủa đặc hiệu có bản chất protein do chính nó sản sinh ra. Chất kim tủa này gọi là "chất kim tủa di truyền" hay protein kim tủa. Ở trạng thái hoạt động, protein kim tủa sẽ "bao vây" gen chỉ huy, kìm hãm hoạt động của nó.

Jacob và Monod giả thiết có hai loại chất protein kim tủa : một loại hoạt động ở trạng thái tự do, dùng trong các hệ cảm ứng sinh tổng hợp enzym ; một loại không hoạt động ở trạng thái tự do, dùng trong các hệ kim tủa sinh tổng hợp. Cả hai loại chất kim tủa này đều có hai tâm liên kết, một tâm liên kết với chất cảm ứng hoặc chất kim tủa phụ ("chất kim tủa trao đổi"), còn một tâm đặc hiệu cho gen chỉ huy. Chất kim tủa phụ (sản phẩm cuối cùng) có thể tác dụng lên gen chỉ huy một cách độc lập hoặc là cùng với protein kim tủa.

b) Cơ chế cảm ứng sinh tổng hợp enzym



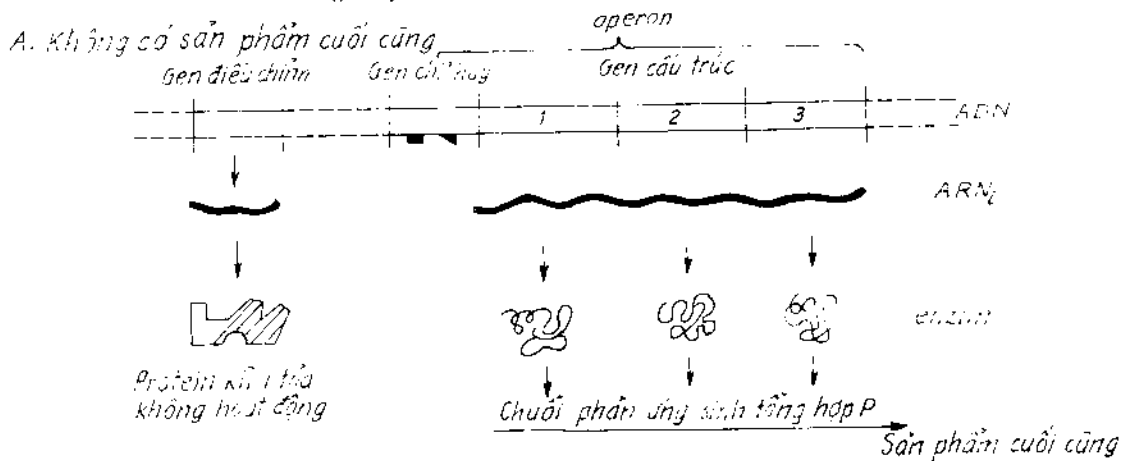
Hình 11.5. Sơ đồ cơ chế cảm ứng sinh tổng hợp enzym

Gen điều chỉnh mã hóa trình tự sắp xếp các axit amin của protein kim tủa đặc hiệu vào "phái" ARN_i đến riboxom để làm khuôn tổng hợp nên protein kim tủa đó. Phân tử protein kim tủa này khuếch tán từ riboxom vào nhân và tạo thành một phức đặc biệt với gen chỉ huy của operon mã hóa các enzym bị không chế không được tổng hợp. Sự liên kết của chất protein kim tủa này vào ADN (gen chỉ huy) làm cản trở sự sao chép mã của các gen cấu trúc tương ứng. Do vậy mà ARN_i không được tổng hợp trên các gen cấu trúc và không có thông tin từ ADN đến riboxom nên các enzym không được tổng hợp. Operon ở trạng thái bị kim tủa.

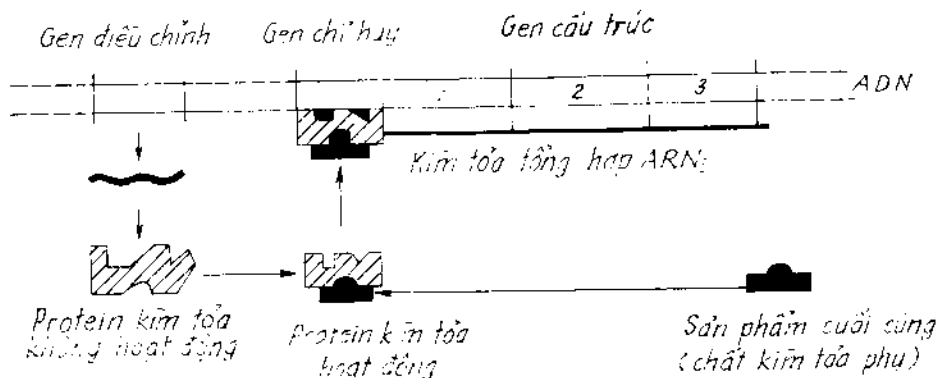
Nếu như trong tế bào có chất phản ứng (cơ chất) thì chất cảm ứng sẽ tạo thành với protein kim tủa một phức : protein kim tủa - chất cảm ứng không hoạt động (khi liên kết với protein kim tủa chất cảm ứng đã làm biến đổi cấu hình không gian của nó) làm cho protein kim tủa không còn khả năng "bao vây" "phong tỏa" gen chỉ huy nữa (không còn khả năng liên kết vào gen chỉ huy nữa). Do đó mà sự sao chép mã trên gen cấu trúc được tiến hành và enzym được tổng hợp (h.11.5).

Sự tương tác giữa chất cảm ứng và protein kim tủa là sự tương tác thuận nghịch nên khi khử bỏ chất cảm ứng khỏi môi trường thì sự hoạt lực của protein kim tủa được phục hồi nhanh chóng và sự tổng hợp enzym lại bị kim hãm. Vậy là tâm liên kết với gen chỉ huy của protein kim tủa chỉ hoạt động khi mà tâm liên kết với chất cảm ứng của nó được tự do.

c) Cơ chế kim tủa sinh tổng hợp enzym



B. Có sản phẩm cuối cùng



Hình 11.6. Sơ đồ cơ chế kim tủa sinh tổng hợp enzym

Thuyết của Jacob cũng giải thích được sự kim tủa sinh tổng hợp enzym hay một hệ enzym bằng sản phẩm cuối cùng của sự sinh tổng hợp. Trong trường hợp này, các tác giả cho rằng gen điều chỉnh sản sinh ra loại protein kim tủa không hoạt động ở trạng thái tự do và nó chỉ trở nên hoạt động sau khi được kết hợp với chất kim tủa phụ (yếu tố kim tủa) như sản phẩm cuối cùng của chuỗi phản ứng sinh tổng hợp chẳng hạn. Phức hợp của protein kim tủa với sản phẩm cuối cùng hay chất trao đổi sẽ kết gắn vào gen chỉ huy "bao vây", "phong tỏa" nó và như thế mà kim tủa sự tổng hợp ARN_i trên các gen cấu trúc. Như vậy là sản phẩm cuối cùng của chuỗi phản ứng sinh tổng hợp nếu như nó dư thừa, có thể liên hợp với protein kim tủa, tăng cường hoạt động của nó và bằng cách ấy mà điều hòa toàn bộ quá trình sinh tổng hợp theo nguyên lý liên hệ ngược (h.11.6).

Cảm ứng và kim tủa sinh tổng hợp enzym được xem như là hai mặt đối ngược nhau của một quá trình sinh hóa thống nhất và là các quá trình thích nghi đảm bảo sự sinh tồn của sinh vật.

Để thực hiện sinh tổng hợp enzym cần phải có gen cấu trúc. Trong khi đó để đảm bảo sinh tổng hợp enzym với những lượng lớn thì ngoài gen ra, trong tế bào cũng cần phải có các chất phân tử thấp có tác dụng như là các chất cảm ứng hay các chất kim tủa phụ. Tới lượt mình, sự tạo thành các chất trao đổi phân tử thấp này lại chịu ảnh hưởng trực tiếp của điều kiện ngoại cảnh - các yếu tố của môi trường sinh dưỡng.

XI.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp enzym

XI.2.3.1. Tuyển lựa và chọn giống các chủng vi sinh vật có hoạt lực enzym cao

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự tạo thành enzym và hiệu suất thu hồi enzym, song đặc điểm và các tính chất sinh lý sinh hóa của vi sinh vật có ý nghĩa quyết định hơn cả. Vì vậy, việc tuyển chọn chủng hoạt động bằng cách phân lập các vi sinh hoạt động từ các nguồn tự nhiên và tăng cường các tính chất của chúng bằng phương pháp gây đột biến hay "chọn giống cảm ứng" có một ý nghĩa vô cùng quan trọng.

Không phải tất cả mọi vi sinh vật đều có khả năng sinh tổng hợp enzym như nhau. Ngay cả những chủng cùng giống, cùng loài cũng có thể rất khác nhau về lượng enzym do chúng sản sinh ra. Vì vậy việc tuyển chọn vi sinh vật tạo enzym nhiều khi cần phải luôn luôn kết hợp chặt chẽ với sự kiểm tra hoạt lực của hàng chục, hàng trăm chủng vi sinh vật để tìm ra chủng có khả năng sinh tổng hợp enzym đã cho cao nhất.

Nhiều vi sinh vật đặc trưng khá đầy đủ về thành phần tương đối các enzym do chúng tạo nên. Chẳng hạn như người ta đã biết các enzym thủy phân hoạt động amilaza, proteinaza, pectinaza được tạo thành bởi những loài nấm mốc khác nhau từ các giống *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicilium*, ... Ở các nước, người ta thu amilaza và pectinaza vi khuẩn từ *Bacillus subtilis*. Để thu xenllulaza hoạt động thường người ta dùng nấm mốc thuộc cả giống *Trichoderma*, *Myrothericum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, ...

Người ta phân lập vi sinh vật từ các vật liệu tự nhiên bằng con đường thực nghiệm và thường phân lập từ đất có chứa một lượng lớn bào tử các loại vi sinh vật khác nhau. Các chủng có amilaza hoạt động có thể phân lập từ đất, nhưng thường người ta phân lập chúng từ lương thực, thực phẩm giàu tinh bột bị nhiễm mốc. Vi sinh vật sản sinh pectinaza có thể phân lập từ hoa quả bị lên mốc, còn các chủng có xellulaza hoạt động có thể phân lập từ đất giàu xác thực vật bị phân hủy. Điều này rất dễ hiểu, bởi lẽ trong các vật liệu và môi trường tự nhiên đó đã sẵn những điều kiện xúc tiến việc hình thành các hệ enzym riêng biệt cần để phân hủy các cơ chất đặc hiệu (tinh bột, pectin, xelluloza, ...).

Trong khi tuyển chọn chủng hoạt động, người ta không chỉ chú ý đến hoạt lực của enzym đã cho mà còn chú trọng đến cả đặc điểm về sinh lý và hình thái của vi sinh vật nữa.

Để việc tuyển chọn tiến hành thuận lợi cần phải có phương pháp xác định hoạt độ enzym nhanh, đơn giản để thực hiện và đáng tin cậy, vì rằng trong khi tuyển chọn phải kiểm tra hoạt lực của enzym này hay enzym khác của hàng chục, hàng trăm chủng đã chọn trong bộ sưu tập các chủng thuần khiết hoặc được phân lập từ vật liệu tự nhiên.

Việc tìm kiếm các chủng hoạt động như thế này đòi hỏi nhiều công sức và chi phí.

Do cấu tạo của mỗi một enzym hình thành nên trong tế bào phụ thuộc vào tính chất di truyền của tế bào, nên ngoài việc tuyển chọn các chủng vi sinh vật hoạt động bằng cách phân lập chúng từ các vật liệu tự nhiên ra, còn xuất hiện khả năng thu các chủng có hoạt lực enzym cao bằng cách dùng tác nhân gây đột biến (lý học, hóa học, sinh học) tác động vào bộ máy di truyền của tế bào. Các phương pháp gây đột biến có liên quan đến sự biến đổi một gen nào đó định khu trong nhiễm sắc thể.

Các phương pháp chọn giống và di truyền vi sinh vật đã đem lại những thành tựu rực rỡ trong lĩnh vực sinh tổng hợp chất kháng sinh, vitamin, axitamin và enzym. Người ta đã thu được những biến chủng có khả năng sinh tổng hợp enzym, thủy phân gấp 2 - 3 lần chủng ban đầu. Ví dụ, khi chiếu tia tử ngoại vào huyền dịch đỉnh bào tử của *Aspergillus oryzae* 153, người ta thu được biến chủng *Aspergillus oryzae* 3 - 9 - 15 có khả năng sinh tổng hợp α - amilaza cao hơn nhiều. Trong những năm gần đây người ta thu được biến chủng *Asp.oryzae* 176 có hoạt lực α - amilaza cao hơn chủng đã dùng trước đây 2 - 2,5 lần. Người ta cũng thu được biến chủng *Aspergillus* có hoạt độ proteaza, pectinaza và glucoamilaza cao.

Trong công tác chọn giống, việc tuyển chọn sơ bộ cũng có một ý nghĩa rất lớn, bởi lẽ chủng vi sinh vật mà ta cần tăng cường và nâng cao khả năng sinh tổng hợp một enzym nào đó phải có hoạt lực của enzym đó cao hơn cả cũng như nhiều tính chất quan trọng khác nữa (sinh trưởng nhanh, không đòi hỏi khắc khe về môi trường dinh dưỡng, dấu hiệu hình thái quý giá,...)

Để ứng dụng trong thực tế sản xuất, ngoài việc tăng cường sinh tổng hợp các enzym xác định ra, đôi khi còn phải có biện pháp làm ngừng sinh tổng hợp enzym bất lợi nào đó, do enzym này gây nên những hiện tượng xấu không mong muốn.

Các công trình tiến hành để tuyển lựa và chọn giống vi sinh vật có hoạt lực enzym cao là cơ sở để tạo nên công nghiệp enzym.

Ngoài việc chọn giống vi sinh vật có khả năng tổng hợp các hệ enzym hoạt động cao cần phải đồng thời tiến hành nuôi cấy chúng trong các điều kiện tối ưu nhằm đảm bảo khả năng sinh tổng hợp của chúng và duy trì hoạt độ cao của enzym.

XI.2.3.2. Ảnh hưởng của các cấu tử môi trường dinh dưỡng

a) Thành phần môi trường dinh dưỡng

Điều kiện môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng trực tiếp đến sinh tổng hợp enzym.

Thành phần môi trường là những nhân tố có tác dụng đến hoạt động sống của vi sinh vật và sinh tổng hợp enzym. Dựa trên quan điểm điều khiển sinh tổng hợp các sản phẩm theo chủ đích thì thành phần môi trường dinh dưỡng phải đáp ứng được yêu cầu chính là có độ hoàn thiện đảm bảo. Trong thành phần môi trường phải có đủ các chất đảm bảo được sự sinh trưởng bình thường của vi sinh vật và tổng hợp enzym. Vi sinh vật muốn phát triển được cần phải có các nguồn cung cấp các hợp chất chứa C, N, H và O. Trong thành phần môi trường cũng phải có chứa các chất khoáng như Mg, Ca, P, S, Fe, K và một số chất khác nữa. Đối với mỗi loại vi sinh vật, thành phần môi trường có khác nhau, song tất cả các vi sinh vật tạo enzym đều hấp thụ cacbon chủ yếu ở dạng các hợp chất hữu cơ, đồng hóa hydro chủ yếu ở dạng nước và hydro có trong thành phần các hợp chất hữu cơ, đồng hóa oxy có trong thành phần cơ bản của môi trường và ở dạng oxy phân tử. Các chất dinh dưỡng của môi trường không chỉ tiêu thụ cho việc xây dựng nên để tế bào mà còn đáp ứng nhu cầu về năng lượng cho các quá trình sống của vi sinh vật nữa.

Đối với đa số vi sinh vật, glucit thường là nguồn cacbon tốt nhất. Do đại đa số vi sinh vật cho enzym đều là vi sinh vật hiếu khí nên mọi glucit đều được sử dụng bằng cách oxy hóa tới CO_2 và H_2O . Các sản phẩm trung gian của sự oxy hóa tích tụ lại trong quá trình sinh trưởng như các xetoaxit, các axit di-, tricarboxylic, các aldehyt là nguồn cacbon trực tiếp được tạo ra trong môi trường.

Ngoài glucit ra, chất béo (dầu, mỡ) cũng là nguồn cacbon rất tốt. Chúng có thể là nguồn cacbon duy nhất của môi trường.

Các axit hữu cơ, rượu cũng có thể là nguồn cacbon cho môi trường nuôi cấy vi sinh vật tạo enzym.

Nguồn nitơ đối với vi sinh vật cho enzym có thể là các hợp chất hữu cơ phức tạp (protein), dịch thủy phân của chúng và muối vô cơ. Nước chiết ngô, bột đậu nành bột mì, dịch thủy phân casein, rất giàu các hợp chất nitơ. Nitơ vô cơ trong thành phần môi trường có thể ở dạng các muối amon và nitrat. Các muối amon và hợp chất hữu cơ có chứa nitơ ở dạng khử nên vi sinh vật dễ dàng và nhanh chóng sử dụng nó, còn nitơ của nitrat thì đầu tiên phải khử đã rồi sau đó vi sinh vật mới hấp thụ.

Sự có mặt của các nguyên tố vô cơ (đa lượng và vi lượng) ảnh hưởng lớn đến sinh tổng hợp enzym. Phosphot, lưu huỳnh rất cần cho vi sinh vật, vì chúng tham gia vào thành phần của những chất quan trọng của tế bào như : nucleotit, protein,

enzim, lipid, vitamin, ... Phospho còn tham gia vào rất nhiều phản ứng trao đổi chất của tế bào. Các nguyên tố như sắt, kẽm, đồng, coban ... rất cần thiết cho vi sinh vật để cấu tạo nên một loại enzim tuy chỉ với một lượng rất nhỏ. Phần lớn các nguyên tố vi lượng được đưa vào môi trường cùng với nước (chúng hòa tan trong nước) và các nguyên liệu hữu cơ như bột, nước ngâm ngô, khô dầu, ... Các nguyên tố đa lượng thì được đưa vào thành phần môi trường ở dạng các muối vô cơ. Cần chú ý rằng chúng thường có sẵn trong các sản phẩm tự nhiên có trong thành phần của môi trường dinh dưỡng.

b) Các cấu tử của môi trường

Các cấu tử của môi trường là những nhân tố cơ bản ảnh hưởng đến sinh tổng hợp enzim.

Khi chọn môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy vi sinh vật cần phải chú ý đến thành phần chất lượng và sự tương quan về số lượng giữa các cấu tử của môi trường. Tăng quá lớn nồng độ dù chỉ của một cấu tử thôi cũng đưa đến sự tăng cao áp suất thẩm thấu và phá hủy trao đổi chất của tế bào và hậu quả là trong đa số trường hợp đưa đến sự ức chế khả năng sinh tổng hợp enzim của vi sinh vật.

Khi chọn môi trường dinh dưỡng cho một vi sinh vật cụ thể, cần nhớ rằng trong nhiều trường hợp các cấu tử của môi trường kìm hãm việc tích lũy sinh khối lại xúc tiến mạnh mẽ sinh tổng hợp một số enzim mong muốn.

Vi sinh vật sẽ chỉ tổng hợp phức hệ enzim cần cho việc tiến hành trao đổi chất bình thường của nó thích ứng với điều kiện ngoại cảnh. Vì vậy có thể điều khiển sinh tổng hợp enzim cần thiết bằng cách chọn môi trường dinh dưỡng có thành phần định tính và định lượng phù hợp nhất.

Như đã biết, muốn sử dụng được hỗn hợp phức tạp các chất dinh dưỡng ít nhất tế bào vi sinh vật phải có 60 - 80 enzim khác nhau. Hơn nữa, thành phần của môi trường có thể thay đổi. Trong thiên nhiên, sự chọn lọc vi sinh vật được tiến hành theo nguyên tắc "tiết kiệm" nhất nên đương nhiên là để thể hiện hoạt động sống cần có cơ chế điều hòa. Các cấu tử riêng rẽ của môi trường có thể là các chất cảm ứng hoặc kìm hãm sinh tổng hợp enzim. Nếu như trong thành phần môi trường có các chất cảm ứng thì chất đó hay sản phẩm phân giải của nó sẽ kìm hãm hoặc làm yếu tác dụng kìm tỏa của chất kìm hãm nhằm bảo đảm khả năng sinh tổng hợp enzim đã cho không bị cản trở.

Hiện nay, người ta đã chứng minh được rằng sự tổng hợp enzim cảm ứng không chỉ đặc thù cho vi sinh vật mà còn xảy ra trong tế bào và mô động vật, thực vật. Các enzim thủy phân của vi sinh vật (những enzim rất cần đối với tế bào để hấp thụ nguồn dinh dưỡng khó tiêu hóa) là những enzim được cảm ứng. Khi nghiên cứu về cảm ứng sinh tổng hợp enzim, người ta đã rút ra những điểm quan trọng sau :

- Việc tạo enzim cảm ứng không có liên quan gì tới khả năng sinh sản nhanh của một số tế bào biến dị, nghĩa là không có liên quan gì tới sự chọn giống. Nó xảy ra ở mọi tế bào, khi chúng không sinh sản và bị ngừng lại khi chất cảm ứng đặc hiệu được tách bỏ khỏi môi trường

- Sự tạo enzym cảm ứng là sự tổng hợp enzym de novo mà không phải là sự hoạt hóa chất tiền thân bằng cơ chất.

Từ những luận điểm cơ bản đó người ta đã rút ra một kết luận thực tiễn là khi nuôi cấy các vi sinh vật tạo enzym cảm ứng (nhất là khi nuôi cấy vi sinh vật trên các môi trường tổng hợp và bằng phương pháp chìm) phải loại bỏ những chất gây nên sự kìm tỏa càng triệt để càng tốt.

Theo sự khẳng định của nhiều nhà nghiên cứu thì tinh bột, panoza, izomaltoza, maltoza và các oligosacarit có chứa liên kết $\alpha - 1,6 -$ glucozit là những chất cảm ứng tốt nhất để tổng hợp $\alpha -$ amilaza từ nấm mốc (*Asp.oryzae*).

Pectin là chất cảm ứng sinh tổng hợp pectinaza (*Asp.niger*). Đối với hemixellulaza thì chất cảm ứng là hemixelluloza ; còn đối với proteinaza chất cảm ứng có hiệu lực là protein, bột đậu nành, lông, sừng nghiền nhỏ, v.v. (*Actinomyces fradiae*). Những nguồn cacbon và năng lượng dễ đồng hóa, đặc biệt là glucoza, thường kìm hãm sinh tổng hợp các enzym cảm ứng. Người ta thấy rằng trong 100 trường hợp thì có đến 90 trường hợp glucoza là nguyên nhân kìm hãm sinh tổng hợp cảm ứng enzym nhất là đối với các enizim của hệ amilaza của vi sinh vật. Glucoza không có tác dụng kìm hãm sinh tổng hợp enzym proteolizơ bằng nấm mốc. Như vậy, các cấu tử của môi trường có thể kích thích sinh tổng hợp một số enzym (bảng 11.2) trong lúc không có ảnh hưởng đến sự tạo thành một số khác, nhưng lại có thể kìm hãm sinh tổng hợp một số.

Ngoài tính chất của chúng và sự có mặt chất cảm ứng trong môi trường, quá trình sinh tổng hợp enzym có thể được tăng cường bằng các hợp phần khác của môi trường như muối vô cơ chẳng hạn.

Rất nhiều vi sinh vật lại cần thiết phải có các yếu tố sinh trưởng bổ sung. Để tăng cường sinh tổng hợp enzym và quá trình sinh trưởng người ta thường cho thêm vào môi trường tổng hợp các nước chiết hoặc dịch chiết cũng như các môi trường tự nhiên được điều chế từ các loại ngũ cốc khác nhau hay từ các sản phẩm có nguồn gốc động, thực vật khác nhau. Các yếu tố sinh trưởng bổ sung có thể là axitamin, bazơ purin và dẫn xuất của chúng, ARN và sản phẩm thủy phân, v.v.

Để kết luận có thể khẳng định chắc chắn rằng hoàn toàn có khả năng tăng cường sinh tổng hợp enzym lên hàng chục lần và hơn nữa bằng cách thay đổi thành phần môi trường một cách chuẩn xác có tỉ lệ lượng các cấu tử chính tối ưu, tuyển chọn và cho thêm các chất cảm ứng có hiệu lực, bổ sung đủ lượng cần thiết các hợp chất khoáng cũng như các yếu tố sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy. Và chỉ có phối hợp chặt chẽ công tác chọn giống vi sinh vật với việc chuẩn xác thành phần môi trường tối ưu cho sinh tổng hợp enzym cũng như các điều kiện nuôi cấy thích hợp, mới có thể đạt được mức độ sinh tổng hợp enzym cao trong tế bào vi sinh vật, do đó mà tạo ra cơ sở khoa học để sản xuất enzym.

Bảng 11.2. Ảnh hưởng của chất cảm ứng đến sinh tổng hợp enzym bằng vi sinh vật

Chủng vi sinh vật	Môi trường	Chất cảm ứng	Enzim	Hoạt độ của enzym ngoại bào
<i>Asp.oryzae</i>	Zapeck có $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,3% N_2)	Tinh bột (2%)	Amilaza	93,7 dv/100 ml, 64,2 dv/g
	như trên	Dextrin	Amilaza	69,1 dv/100 ml, 33,4 dv/g
	như trên	Maltoza	Amilaza	77,7 dv/100 ml, 44,4 dv/g
	như trên	Sacaroza	Amilaza	0,53 dv/100 ml, 0,28 dv/g
<i>Asp.awamori</i>	Zapeck có 6% tinh bột	Không có chất cảm ứng	Lipaza	Vết
	Zapeck có 6% tinh bột và 6% mỡ cá nhà táng	Mỡ	Lipaza	512 - 576 dv/100 ml
<i>Asp.awamori 16</i>	Mắm mach 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7% KH_2PO_4 0,1% MgSO_4 0,05% như trên	Pectin của bã củ cải (4%)	Pectinaza	25 - 30 dv/ml
		Không có pectin	Pectinaza	Vết

XI.3. PHƯƠNG PHÁP THU CÁC CHẾ PHẨM ENZIM

Để thu được nguồn enzym dồi dào từ vi sinh vật, người ta phải nuôi cấy chúng. Về nguyên tắc, có hai phương pháp nuôi cấy vi sinh vật để thu enzym : phương pháp nuôi cấy bề mặt và phương pháp nuôi cấy bề sâu hay là phương pháp nổi và phương pháp chìm.

XI.3.1. Phương pháp nuôi cấy bề mặt

Trong phương pháp nuôi cấy bề mặt, người ta cho vi sinh vật phát triển và bao phủ trên bề mặt các hạt chất dinh dưỡng rắn, đã được làm ẩm, dùng làm môi trường (cám gạo, cám mì, ...). Đối với một số mục đích đặc biệt, người ta nuôi vi sinh vật trực tiếp trên bề mặt của hạt gạo, hạt đậu, ... đã được hấp chín. Nói chung trong tất cả mọi trường hợp, vi sinh vật lấy thức ăn từ những chất chứa trong môi trường và sử dụng oxy phân tử của không khí để hô hấp. Môi trường để nuôi cấy nấm mốc và một số vi khuẩn bằng phương pháp bề mặt, thường dùng là cám mì, cám gạo, ... vì trong này có chứa nhiều chất dinh dưỡng nhưng chủ yếu là tạo cho môi trường có được cấu trúc cần thiết ở trong trạng thái ẩm. Trong điều kiện đó, hệ sợi nấm của vi sinh vật sẽ phát triển nhanh chóng và đồng bộ, nhưng nấm mốc sẽ không thu được sự nuôi dưỡng quá dồi dào, do đó sự sản tạo ra enzym ở chúng sẽ được hoàn thành một cách nhanh chóng - sau khoảng 36 đến 48 giờ. Để tăng hoạt độ của một số enzym, người ta còn thêm vào cám những vật liệu có chứa những chất cảm ứng cần thiết.

Muốn cho cấu trúc của môi trường được tốt hơn, người ta có thể thêm trấu, mùn cưa, ... nhất là khi dùng cám mịn làm môi trường. Những phụ liệu này có thể là những chất cảm ứng của xellulaza và hemixellulaza, vì đa phần những chất trong đó ở trạng thái không hòa tan và ít nhiều đã được linh hóa. Thường những phụ liệu này sẽ làm nghèo môi trường đi, do đó nếu thêm vào nhiều hơn 15 - 20% thì sẽ làm giảm hoạt độ của các enzym thủy phân trong canh trường bé mặt. Nếu trường hợp lượng chất dinh dưỡng trong cám gạo bị giảm đi do thêm các phụ liệu thì có thể bổ sung thêm nguồn nitơ vô cơ, phospho cũng như các vật liệu giàu chất hữu cơ quý như malt, nước chiết ngô, dịch khoai tây, v.v.

Việc tiệt trùng môi trường được tiến hành ở trong các thiết bị thanh trùng với áp suất 1 - 1,5 atm trong thời gian 45 - 60 phút. Sau khi làm nguội môi trường bằng không khí lạnh, sạch hoặc bằng nước sạch xuống nhiệt độ 38 - 40°C thì gieo cấy vi sinh vật vào.

Quá trình nuôi cấy nấm mốc thường kéo dài từ 35 - 48 giờ tùy thuộc vào thời gian hoàn thành việc tạo ra enzym.

Ở một số loài *Aspergillus*, sự tạo thành lượng enzym tối đa sẽ trùng với sự bắt đầu tạo ra đỉnh bào tử, do đó cho ngừng quá trình phát triển vào lúc này là thích hợp. Trong một số trường hợp khác, sự tích lũy enzym có thể còn tiếp tục kéo dài trong cả thời gian tạo ra đỉnh bào tử một cách mạnh mẽ. Và canh trường nấm mốc hoạt động kiểu này thường có nhiều đỉnh bào tử. Do đó khi sấy, nghiền và bao gói sẽ làm cho không khí bị nhiễm bởi đỉnh bào tử của chúng đó. Để tránh hiện tượng này, tất cả thiết bị phải kín và có cơ cấu hút bụi. Tốt hơn cả là trong sản xuất enzym, chọn những biến chủng tạo đỉnh bào tử yếu.

Toàn bộ chu trình phát triển của nấm mốc trên cám có thể chia thành ba thời kỳ sau :

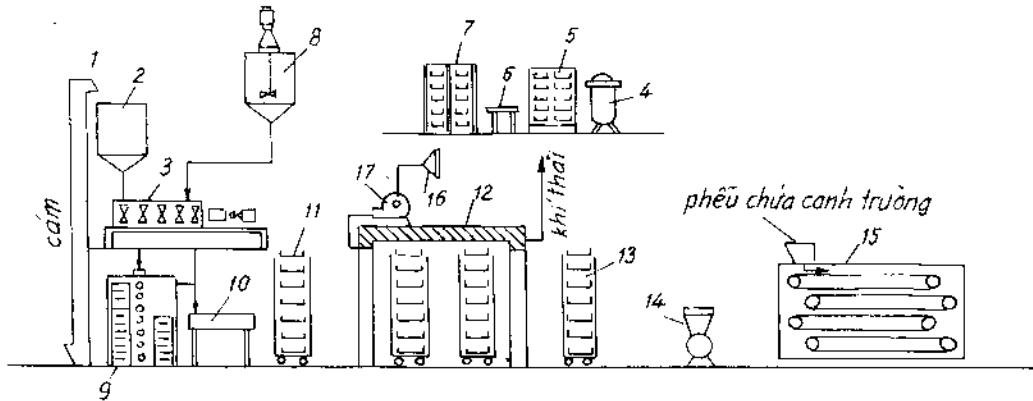
- Trong 10 - 14 giờ đầu, xảy ra sự trương đỉnh bào tử và bắt đầu mọc nấm. Trong thời kỳ này phòng nuôi cấy cần giữ ở nhiệt độ không dưới 28 - 30°C ; để không kìm hãm sự phát triển ban đầu của chúng ;

- Qua thời gian trên, hệ sợi nấm bắt đầu phát triển nhanh. Thời kỳ này kéo dài trong 14 - 18 giờ. Nấm mốc phát triển mạnh mẽ, sử dụng một lượng lớn các chất dinh dưỡng, hô hấp rất mạnh và lượng nhiệt thoát ra nhiều. Vì vậy trong lớp canh trường nhiệt độ tăng lên đến 37 - 40°C và có thể còn cao hơn tùy thuộc vào độ dày của lớp. Do đó cần phải thổi không khí điều tiết có nhiệt độ không thấp hơn 28 - 29°C và có độ ẩm tương đối cực đại vào ;

- Thời kỳ thứ ba kéo dài trong 10 - 20 giờ. Trong thời kỳ này, quá trình trao đổi chất xảy ra không mạnh mẽ lắm và dần dần yếu đi, lượng nhiệt thoát ra bé hơn, nhưng sự tạo nên enzym có thể còn xảy ra. Phụ thuộc vào tính chất sinh lý của chúng và sự kết thúc sinh tổng hợp enzym, mà có thể làm ngừng sự phát triển của nấm mốc vào một thời gian bất kỳ.

Canh trường bé mặt của nấm mốc sau đó đem nghiền nhỏ (trong máy nghiền đặc biệt) mà sấy khô đến độ ẩm 8 - 12% để sử dụng. Chế phẩm enzym dưới dạng này là chế phẩm thô.

Muốn thu được chế phẩm enzym sạch thì đem canh trường đã nghiền nhỏ trích ly bằng nước. Hình 11.7 là sơ đồ kỹ thuật nuôi cấy nấm mốc bằng phương pháp bề mặt.



Hình 11.7. Sơ đồ kỹ thuật nuôi cấy nấm mốc bằng phương pháp bề mặt :

- 1 - gầu tải cám ; 2 - thùng chứa cám ; 3 - thiết bị thanh trùng ; 4 - nồi hấp ; 5 - tủ chứa khay đựng mốc giống đã vô trùng ; 6 - bàn trung gian ; 7 - phòng nuôi mốc giống ; 8 - thùng chuẩn bị môi trường ; 9 - phòng hấp khay đựng mốc sản xuất ; 10 - bàn trung gian cho mốc sản xuất ; 11 - tủ chứa khay đã cấy mốc ; 12 - phòng nuôi mốc sản xuất ; 13 - tủ đựng khay mốc sau sản xuất ; 14 - máy nghiền ; 15 - phòng sấy ; 16 - lọc không khí ; 17 - quạt nén không khí

Các yếu tố ảnh hưởng đến việc tạo ra enzym khi nuôi cấy bằng phương pháp bề mặt

Tính chất lý hóa của cám, cấu trúc của môi trường có một ý nghĩa nhất định. Chẳng hạn để thu chế phẩm enzym amilaza thì hàm lượng tinh bột trong cám không được ít hơn 20 - 23%. Người ta thấy rằng khi hàm lượng tinh bột trong cám bị giảm đi thì hoạt độ của enzym cũng sẽ giảm.

Hàm ẩm của môi trường cũng có ý nghĩa quan trọng. Thông thường trong điều kiện sản xuất, hàm ẩm tối ưu của môi trường cám là 58 - 60%. Khi nấm mốc được nuôi cấy trong điều kiện tiết trùng nghiêm ngặt, thì hoạt độ của enzym sẽ tốt nhất khi hàm ẩm cao hơn 65 - 68%. Vì vậy việc bảo vệ cho được hàm ẩm tối ưu trong suốt quá trình phát triển của vi sinh vật sẽ rất quan trọng. Thật ra, ngay cả khi thổi không khí bão hòa hơi nước vào buồng nuôi cấy thì canh trường vẫn bị mất ẩm và khô. Giảm hàm ẩm thì lượng enzym tạo ra cũng bị giảm đi. Do đó trong hướng nuôi cấy, việc bố trí các ngăn, các giá, ... phải tính toán sao cho hợp lý. Ngoài ra trong suốt thời kỳ phát triển của nấm mốc cần phải thông gió tự nhiên hoặc bằng cách thổi gián đoạn không khí vào buồng (mỗi giờ 10 - 15 phút).

Việc tăng nhiệt độ lên do hô hấp trong thời kỳ phát triển mạnh mẽ của nấm mốc sẽ có ảnh hưởng khác nhau đến sự tân tạo ra các enzym. Chẳng hạn, sự tân tạo ra α - amilaza ở nấm mốc *Aspergillus oryzae* sẽ không bị kìm hãm ngay cả khi nhiệt độ trong lớp canh trường lên đến 40 - 45°C và kéo dài trong 10 - 12 giờ. Ngược lại để tạo nên proteaza thì không cho phép nhiệt độ tăng lên quá 30°C. Vì hoạt độ của proteaza sẽ bị giảm đi hai lần và giảm hơn nữa nếu không duy trì được nhiệt độ ở mức tối ưu.

XI.3.2. Phương pháp nuôi cấy bề sâu

Khác với phương pháp nuôi cấy bề mặt, trong phương pháp nuôi cấy bề sâu người ta cho vi sinh vật phát triển trong môi trường lỏng. Thành phần dinh dưỡng của môi trường lỏng thích hợp cho mỗi chủng vi sinh vật sẽ khác nhau. Trong nhiều trường hợp, môi trường để nuôi cấy bề sâu thường chứa tinh bột, các dạng bột và một số vật liệu khác làm nguồn cacbon. Chỉ một số ít chủng dùng nguồn cacbon là các đường dễ dàng đồng hóa như glucoza. Thực tế, trong một số trường hợp người ta đường hóa sơ bộ tinh bột bằng amilaza (trước khi thanh trùng). Khi đó maltoza được tạo thành sẽ được đồng hóa tốt hơn và so với tinh bột, maltoza là chất cảm ứng tốt hơn của enzym đường hóa của nấm mốc. Ngoài ra thể lỏng của môi trường cũng tốt hơn do độ nhớt của nó bị giảm xuống một cách sâu sắc.

Nguồn nitơ hữu cơ thường dùng là nước chiết ngô, nước chiết malt, dịch tự phân của nấm men. Cần chú ý là khi thêm những vật liệu này phải kiểm tra một cách cẩn thận vì hỗn hợp axitamin mang vào sẽ tăng sinh tổng hợp các enzym đường hóa, nhưng có thể không có ảnh hưởng gì tốt đến việc tạo thành các enzym khác.

Thành phần khoáng của môi trường cũng có ý nghĩa lớn đối với việc tân tạo ra các enzym. Chẳng hạn khi nuôi cấy *Aspergillus oryzae* 3 - 9 - 15 trên môi trường tổng hợp có tinh bột và nitrat. Khi trong môi trường không được thêm magie sulfat thì nấm mốc phát triển bình thường, nhưng amilaza hoàn toàn không được tạo thành. Với những thí nghiệm tiếp sâu hơn người ta thấy S có giá trị mà không phải là Mg vì các axitamin chứa S tham gia vào thành phần của amilaza.

Tất cả các cấu tử cần thiết của môi trường được cho vào một thùng đặc biệt sau đó cho nước và hơi vào. Nếu là tinh bột thì phải hồ hóa sơ bộ rồi dịch hóa bằng một ít amilaza, sau đó cho các cấu tử còn lại vào. Môi trường được thanh trùng bằng hơi trực tiếp ở trong các thùng hai vỏ (để có thể dẫn nước lạnh vào làm nguội môi trường đã thanh trùng ; cho nước ấm hoặc hơi có nhiệt độ không cao để duy trì nhiệt độ tối ưu cho vi sinh vật phát triển). Môi trường được đun nóng đến một nhiệt độ nhất định (118 - 125°C) và giữ ở nhiệt độ đó trong thời gian từ 45 - 60 phút. Môi trường sau khi được làm nguội đến nhiệt độ cần thiết (30°C đối với đa số nấm mốc) thì người ta tiến hành gieo cấy nấm mốc giống vào.

Quá trình sinh tổng hợp các enzym trong canh trường bề sâu sẽ tiến hành trong khoảng 2 - 4 ngày với điều kiện sục khí vào liên tục và khuấy đều bằng cánh khuấy. Để làm mất bọt có thể cho vào một ít axit oleic đã thanh trùng.

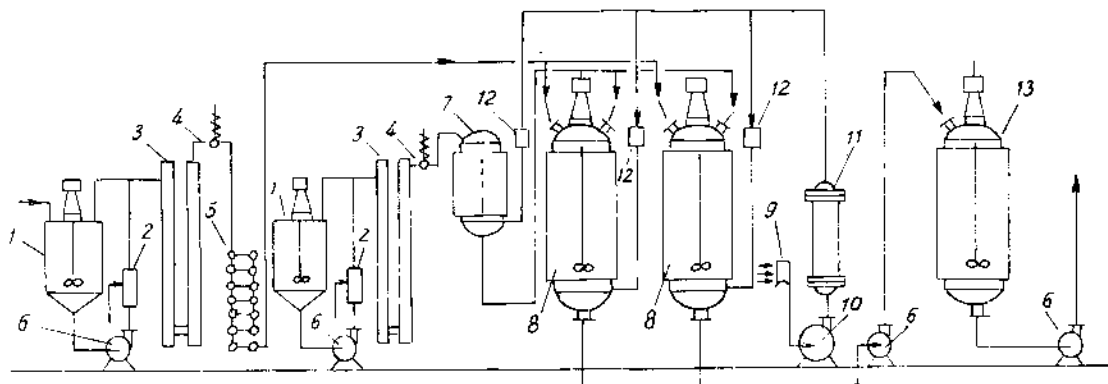
Vấn đề quan trọng khi nuôi cấy bằng phương pháp bề sâu là sự tiết các enzym vào môi trường trong suốt quá trình phát triển. Đa số các enzym thủy phân của nấm mốc, xạ khuẩn và vi khuẩn là những enzym ngoại bào và được tiết ra môi trường bên ngoài. Khi đó, trong hệ sợi của chúng đã nuôi ba ngày thường còn lại không quá 10 - 15% enzym. Do đó các chế phẩm enzym có thể thu được từ nước lọc sau khi đã tách bỏ hệ sợi nấm.

Trường hợp khi enzym không được tiết ra môi trường bên ngoài mà liên kết với các cơ quan của tế bào, thì chỉ có thể chiết rút được từ tế bào sau khi đã xử lý chúng kỹ. Ví dụ, có thể tách được glucooxydaza từ hệ sợi nấm của *Aspergillus niger* sau khi đã nghiền nhỏ và có tác động của các enzym có khả năng thủy phân thành tế bào của hệ sợi.

Trong phương pháp bề sâu, ngoài tính di truyền của chủng và thành phần của môi trường, sự sinh tổng hợp enzym còn phụ thuộc vào những điều kiện khác nữa. Một trong những điều kiện có ảnh hưởng đến sinh tổng hợp enzym là nồng độ ion hydro trong môi trường và sự biến đổi của nó trong quá trình phát triển của chủng.

Môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy bề sâu ngay cả khi sử dụng nguyên vật liệu tự nhiên (bột, tinh bột, v.v.) dĩ nhiên vẫn phải luôn luôn chứa đầy đủ trong những muối vô cơ cần thiết cho cơ thể. Thành phần và tính chất của các muối vô cơ có trong môi trường cũng như sự tiêu thụ muối đó sẽ quyết định độ axit hoạt động trong canh trường phát triển. Giá trị pH của canh trường trước tiên phụ thuộc vào tính chất của nguồn nitơ vô cơ. Chẳng hạn, nếu môi trường được thêm muối amoni của axit vô cơ, thì khi ion amoni được cơ thể sử dụng đi, anion còn lại sẽ axit hóa môi trường. Nếu sự axit hóa lớn và có ảnh hưởng xấu đến sự sinh tổng hợp enzym thì cần phải thêm canxi cacbonat để trung hòa môi trường hoặc duy trì một cách tự động giá trị pH ở mức tối ưu cho sự sinh tổng hợp enzym. Nếu nguồn muối vô cơ là nitrat, khi cơ thể sử dụng anion (NO_3^-), thì ion kim loại tự do sẽ kiềm hóa môi trường. Trị số pH ban đầu của môi trường cũng có thể gây ảnh hưởng nào đó đến sự tạo thành enzym, nhưng khi đó cũng cần phải tính đến khả năng biến đổi nhanh chóng chỉ số đó bởi vì sinh vật.

Thông thường đối với α - amilaza, pH tối ưu cho sinh tổng hợp (pH 7 - 8) khác với pH tối ưu cho hoạt động của nó (pH 4,7 - 4,9). Các enzym đường hóa khác của nấm mốc như glucoamilaza, thì pH tối ưu cho sinh tổng hợp và cho hoạt động là chung nhau (4,5 - 5,0).



Hình 11.8. Sơ đồ kỹ thuật nuôi cấy vi sinh bằng phương pháp bề sâu :

- 1 - thùng trộn môi trường dinh dưỡng ; 2 - nôi thanh trung ; 3 - thùng chứa ; 4 - van xả ;
- 5 - thiết bị trao đổi nhiệt ; 6 - bơm ly tâm ; 7 - thùng dịch lên men ; 8 - thùng lên men ;
- 9 - lọc khí sơ bộ ; 10 - nén khí ; 11 - lọc khí bước một ; 12 - lọc khí bước hai ; 13 - thùng canh trường thành phẩm

Ngoài ra, việc chọn độ hiệu khí đúng trong một chủng mục đáng kể sẽ quyết định không những sự sinh trưởng và phát triển của các vi sinh vật hiếu khí mà còn cả sự tạo ra enzym nữa. Người ta thấy rằng khi nuôi cấy các vi sinh vật hiếu khí, việc tạo chế độ hiếu khí tối ưu có ảnh hưởng lớn đến mức độ và vận tốc hình thành nên enzym. Chẳng hạn, ở *Aspergillus oryzae* 3 - 9 - 15, khi hàm lượng oxy hòa tan cao thì lượng enzym α - amilaza tạo ra sẽ được tăng lên, quá trình xảy ra

với vận tốc lớn kết thúc sớm hơn một ngày, trong hình 11.8 là sơ đồ kỹ thuật nuôi cấy vi sinh vật bằng phương pháp bề mặt.

Khi so sánh hai phương pháp, người ta thấy phương pháp nuôi cấy bề mặt có một số ưu điểm như sau :

- Nồng độ các enzym được tạo thành trong canh trường bề mặt lớn hơn trong dịch canh trường bề sâu rất nhiều. Dù đã bị pha loãng thì dịch trích ly từ canh trường bề mặt của nấm mốc vẫn có hoạt độ của enzym cao hơn. Ví dụ sau đây cho chúng ta thấy rõ điểm đó. Trong sản xuất rượu, để đường hóa 100 kg tinh bột, cần đến 5 kg canh trường bề mặt của nấm mốc, nhưng phải cần đến 100 lít dịch canh trường bề sâu ;

- Ưu điểm nữa là, canh trường nấm mốc bề mặt khi sấy khô dễ dàng và nhanh chóng mà không gây tổn thất đáng kể đến hoạt độ của enzym. Canh trường khô như thế dễ dàng chuyên chở và sử dụng trong mọi trường hợp mà chất lượng của sản phẩm không bị ảnh hưởng ;

- Một khía cạnh nữa của phương pháp nuôi cấy bề mặt là cần ít điện năng hơn so với phương pháp bề sâu ;

- Ngoài ra, phương pháp nuôi cấy bề mặt xảy ra trong điều kiện không thật vô trùng. Đó cũng là một ưu điểm. Tuy nhiên chính môi trường và các ngăn nuôi cấy, ... cũng đã được tiệt trùng trước. Trước mỗi mẻ sản xuất mới, phòng nuôi cấy cũng như tất cả các thiết bị trong đó đều phải được sát trùng. Trong phương pháp nuôi cấy bề sâu, tất cả quá trình phải tiến hành trong điều kiện vô trùng nghiêm ngặt - một mặt đó là ưu điểm lớn của phương pháp, mặt khác cũng là khó khăn lớn, vì một sai sót nhỏ về mức độ vô trùng sẽ dẫn đến nhiễm trùng hàng loạt và có thể ngừng hoàn toàn việc tạo ra enzym.

Tuy nhiên cần thấy rằng phương pháp chìm xét về tính chất kỹ thuật thì hiện đại hơn, vì dễ dàng cơ khí hóa và tự động hóa cũng như sự chuyển sang qui mô sản xuất lớn rất dễ dàng và đơn giản.

XI.3.3. Phương pháp thu nhận các chế phẩm enzym sạch

Trong thực tế sản xuất, các chế phẩm enzym được sử dụng dưới các dạng khác nhau. Trong một số lĩnh vực công nghiệp có thể dùng chế phẩm dưới dạng canh trường sấy khô, nghĩa là dưới dạng thô, nếu chất lượng thành phẩm không bị ảnh hưởng. Chẳng hạn trong sản xuất rượu, người ta có thể dùng canh trường nấm mốc để đường hóa tinh bột mà chất lượng của rượu vẫn không bị xấu đi, ngược lại hiệu suất của rượu lại được tăng lên do sự đường hóa hoàn toàn hơn.

Đa số ngành sản xuất thực phẩm cũng như công nghiệp nhẹ thì lại đòi hỏi phải sử dụng chế phẩm enzym sạch, nghĩa là chế phẩm trong đó phần lớn các tạp chất đã được tách ra.

Chúng ta đều biết khi nấm mốc phát triển trên gạo thì 30 - 35% chất khô chứa trong đó bị hòa tan và bị thủy phân. Tinh bột, hemixelluloza và pectin bị thủy

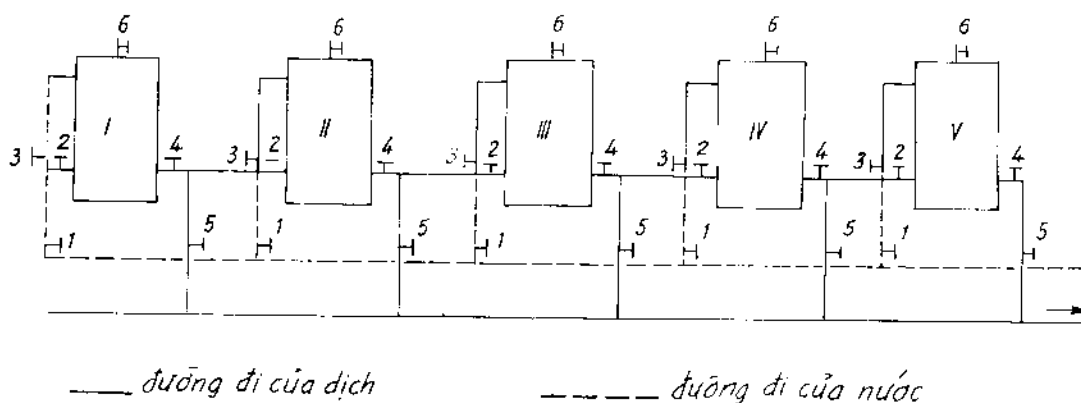
phân hoàn toàn. Một số loài nấm mốc có thể hòa tan và thủy phân một phần xelluloza. Các protein cũng bị thủy phân trong quá trình phát triển của nấm mốc. Các sắc tố do nấm mốc tạo thành cũng hòa tan trong nước. Như vậy, trong nước chiết từ canh trường bề mặt của nấm mốc sẽ chứa một lượng lớn các tạp chất hòa tan phân tử. Phần lớn các enzym thủy phân hòa tan rất tốt trong nước, do đó có thể dễ dàng chiết rút ra khỏi canh trường nấm mốc. Vì trong các tế bào già của hệ sợi, các quá trình trao đổi chất đã kết thúc, tính thấm của màng tăng lên, nên các enzym chuyển từ trong tế bào của hệ sợi ra môi trường xung quanh hoặc môi trường nước một cách tự do.

Mức độ chiết rút các enzym từ canh trường bề mặt phụ thuộc vào các phương pháp khác nhau. Để quá trình chiết rút được nhanh người ta thường nghiêng nhỏ canh trường nấm mốc bằng máy nghiêng (trong điều kiện thủ công có thể nghiêng trong cối với cát, thạch anh, thủy tinh, ...). Tuy nhiên việc xử lý phụ này thường làm cho nước chiết ra bị đục và việc tách các tiểu phân lơ lửng này cũng không phải dễ dàng. Thường thì các enzym thủy phân như proteinaza, pectinaza, xellulaza, ... được chiết rút ra khá hoàn toàn.

Dùng môi tốt nhất để chiết enzym là nước. Tuy nhiên trong điều kiện sản xuất cần tránh pha loãng nước chiết, vì sẽ làm giảm nồng độ enzym và tốn dung môi để kết tủa sau này. Để giải quyết được việc này, tốt hơn cả là dùng phương pháp ngâm nhiều lần, kết quả là chiết rút được hoàn toàn các chất hòa tan trong nước mà không cần pha loãng.

Chúng ta đều biết, do sự khác nhau về nồng độ của enzym (chất hòa tan) trong nấm mốc và trong môi trường nước mà xảy ra sự khuếch tán enzym vào dung dịch nước. Sự khuếch tán thường được tiến hành ở trong một dây (bộ) gồm nhiều thiết bị khuếch tán. Thiết bị khuếch tán là những bể hình trụ có đáy giả và được nối với nhau bằng những đường ống như thế nào để phần dưới của bể khuếch tán này an thông với phần trên của bể khuếch tán kế bên (h. 11.9).

Quá trình khuếch tán được tiến hành như thế nào được để nước (dung môi) đi vào từ phía bể khuếch tán chứa vật liệu nấm mốc có hàm lượng enzym (và các chất hòa tan) ít nhất, còn dung dịch nước giàu enzym hơn thì đi ra từ bể khuếch tán có vật liệu nấm mốc mới nạp. Muốn vậy, người ta nạp vật liệu nấm mốc vào bể khuếch tán thứ nhất, xong cho nước vào và để ngâm trong một thời gian nhất định. Sau đó nạp vật liệu nấm mốc vào bể khuếch tán thứ hai rồi bơm vào dây dịch chiết từ bể khuếch tán thứ nhất và để ngâm trong một thời gian nhất định. Thao tác nạp liệu và bơm dịch chiết được tiến hành tuần tự với tất cả bể khuếch tán của dây. Như vậy khi chuyển từ bể khuếch tán này sang bể tiếp khác dịch chiết sẽ được bão hòa thêm enzym và từ bể cuối cùng được bơm vào bể thu. Từ bể khuếch tán thứ nhất, sau khi tháo bã nấm mốc đã được chiết rút hết enzym ra, người ta nối vào vị trí cuối cùng của dây khuếch tán. Và bể khuếch tán thứ hai sẽ chiếm vị trí thứ nhất.



Hình 11.9. Sơ đồ chuyển động của dịch trong hệ thống khuếch tán :

I, II, III, IV, V - thùng khuếch tán ;

1 - van cho đường nước ; 2, 3, 4, 5 - van cho đường dịch ; 6 - van tù khí

Trích ly enzym bằng phương pháp khuếch tán hiện nay được áp dụng trong nhiều nhà máy để sản xuất các chế phẩm enzym sạch từ canh trường bề mặt của nấm mốc. Bằng phương pháp này trích ly được trên 90 - 95% enzym. Dịch chiết thu được không chứa các tạp chất không hòa tan vì bản thân lớp canh trường nấm mốc cũng là vật liệu lọc giữ được các hạt không hòa tan lại.

Người ta thường tiến hành khuếch tán enzym bằng nước ở nhiệt độ 25 - 28°C. Để tránh nhiễm trùng, người ta thêm vào nước một ít formalin hoặc chất sát trùng khác. Dịch chiết rút được thường trong suốt, có màu xám và chứa 10 - 15% chất khô và tất cả enzym của nấm mốc. Dịch chiết thu lại trong bình thu và được làm lạnh tức khắc xuống nhiệt độ 10 - 12°C.

Đối với một số ngành công nghiệp - như thuộc da - thì chỉ cần loại chế phẩm không chứa các hạt không hòa tan (đỉnh bào tử, sợi, cặn môi trường), còn các tạp chất hòa tan thì không ảnh hưởng gì đến chất lượng của da. Do đó với công nghiệp da người ta thường dùng chế phẩm enzym ở dạng dịch cô đặc hoặc canh trường bề sâu cô đặc (không cần tách các tạp chất hòa tan). Để có loại chế phẩm này, người ta lấy dịch chiết thu được sau khi khuếch tán, cô đặc lại 3 - 5 lần dưới áp suất thấp trong chân không để dịch cô đặc có hàm lượng chất khô không bé hơn 50 - 55%. Dịch như vậy có khả năng hòa tan hoàn toàn, dễ dàng định lượng và có thể bảo quản trong một thời gian dài mà không mất hoạt độ. Trong công nghiệp dệt, để rũ hồ cũng có thể dùng chế phẩm enzym dưới dạng này. Trong sản xuất phomat người ta dùng dịch chiết renin cô đặc và tiêu chuẩn hóa.

Điều quan trọng để thu được dung dịch cô đặc là phải gia công ở nhiệt độ tối ưu để cho enzym bị tổn thất ít nhất, vì đa số enzym rất nhạy cảm đối với nhiệt. Ngoài ra cũng phải tiêu chuẩn hóa dịch cô đặc và phải bảo vệ được hoạt độ enzym lâu dài. Hiện nay, để thu được chế phẩm khô loại kỹ thuật, người ta sấy dịch đã cô đặc một phần hoặc chưa cô đặc trong máy sấy phun.

Muốn thu được chế phẩm enzym tinh khiết ở dạng bột khô thì phương pháp phổ biến là kết tủa enzym từ dung dịch nước bằng các dung môi hữu cơ : etanol,

izopropanol hoặc axeton. Khi sử dụng dung môi hữu cơ, người ta dựa vào chỗ dung môi hữu cơ làm giảm được hằng số điện môi của môi trường. Lực hút và đẩy tĩnh điện tỉ lệ nghịch với hằng số điện môi. Do vậy, trong dung dịch rượu nước, các protein enzym và toàn bộ các protein khác cũng như các tạp chất phân tử lớn khác đều bị kết tủa. Vì khi giảm hằng số điện môi sẽ làm cho các phân tử protein tương tác với nhau tạo thành tập hợp và lắng xuống một cách dễ dàng. Các yếu tố như nồng độ rượu, nhiệt độ, phản ứng môi trường, lực ion của dung dịch và thuộc tính của chính protein enzym có ảnh hưởng nhiều đến chất lượng của kết tủa enzym. Thông thường khi thêm 3 - 4 thể tích etanol trên một thể tích dung dịch nước của enzym thì toàn bộ enzym sẽ kết tủa. Để tránh vô hoạt enzym cần phải kết tủa ở nhiệt độ thấp 3 - 5°C (đưa dung dịch enzym và dung môi rượu đến nhiệt độ đó trước khi kết tủa). Ngoài ra khi thêm rượu vào dung dịch enzym cần phải khuấy đều để san bằng nồng độ rượu một cách nhanh chóng. Khi kết tủa xong đem lọc hoặc ly tâm. Trường hợp khi thể tích lớn thì nên gạn nước trong trên kết tủa sau đó lọc hoặc ly tâm. Rửa kết tủa bằng rượu đậm đặc 2 đến 3 lần để tách bớt lượng nước trong kết tủa đi làm cho việc sấy khô được dễ dàng. Kết tủa sau đó phải tách hết rượu ngay tức khắc và sấy khô trong bình hút ẩm chân không (thu chế phẩm trong điều kiện phòng thí nghiệm) hoặc trong máy sấy chân không (trong điều kiện sản xuất lớn). Vì nếu tiếp xúc rượu với enzym lâu, enzym sẽ bị vô hoạt.

Khi sử dụng izopropanol làm tác nhân kết tủa thì chỉ cần 1,5 - 2 thể tích izopropanol trên một thể tích dịch enzym. Tuy izopropanol có tác dụng chọn lọc hơn etanol, song cấu trúc của kết tủa tạo nên vẫn chưa thỏa mãn: kết tủa có dạng bột nhão và dính do đó khi sấy sẽ khó khăn. Đôi khi người ta cũng dùng axeton (1,5 - 2 thể tích trên một thể tích dịch enzym), song axeton dễ gây nổ rất nguy hiểm, đặc biệt trong điều kiện nhà máy.

Để tăng hoạt độ của enzym trong chế phẩm thu được có thể dùng những biện pháp sau :

- Thẩm tích sơ bộ dịch chiết để tách các tạp chất phân tử thấp chứa trong đó;
- Tách sơ bộ một phần các tạp chất không hoạt động bằng nồng độ rượu thấp (40 - 45%) khi các enzym chủ yếu vẫn ở lại trong dung dịch;
- Hòa tan kết tủa enzym với một lượng nước tối thiểu, lọc các tạp chất không hòa tan rồi kết tủa lại bằng rượu có nồng độ như thế.

Ngoài ra để tách một số tạp chất cao phân tử không hoạt động người ta cũng có thể kiềm hóa dịch chiết đến pH 8,6. Tách các kết tủa không hoạt động đó bằng cách ly tâm hoặc lắng gạn, axit hóa trở lại môi trường bằng axit axetic đến pH thích hợp để kết tủa enzym (pH 5,0 - 5,5), rồi mới kết tủa enzym bằng rượu đã làm lạnh như ở trên.

Người ta còn nhận thấy, nếu thêm vào dịch chiết CaCl_2 0,2% sẽ làm cho kết tủa enzym tốt hơn và cấu trúc của kết tủa cũng tốt hơn. Biện pháp này thường được áp dụng trong điều kiện sản xuất ở nhà máy.

Tóm lại, bằng những biện pháp ở trên, ta sẽ thu được các chế phẩm hoạt động hơn, song chưa phải là chế phẩm có độ tinh khiết cao, vì trong đó còn chứa nhiều tạp chất, còn protein chỉ mới chiếm 20 - 30%.

Những chế phẩm loại này có thể sử dụng được trong công nghiệp thực phẩm nếu như trong đó không chứa các tạp chất có hại. Các chế phẩm loại này chính là những phức hợp các enzym khác nhau được tạo ra bởi các vi sinh vật khác nhau. Thường người ta gọi tên các chế phẩm theo enzym chính chứa trong chế phẩm và cần thiết để tiến hành một quá trình kỹ thuật nhất định nào đó. Trong một số trường hợp, sự có mặt trong chế phẩm hỗn hợp một số enzym có thể sẽ gây ảnh hưởng xấu trong sản xuất. Chẳng hạn, sự có mặt proteaza hoạt động cao ở trong chế phẩm amilaza dùng cho sản xuất bánh mì là điều có hại. Vì proteaza tác dụng lên gluten của bột sẽ làm giảm độ xốp, hình dáng và chất lượng của bánh xấu đi.

Trong thực tế sản xuất, để loại trừ những enzym thứ yếu có hại cho chất lượng sản phẩm và chứa trong chế phẩm nào đó người ta có thể có các biện pháp khác nhau.

Chẳng hạn, để loại bỏ phần lớn proteaza (enzim thứ yếu) khỏi chế phẩm enzym được tách ra từ canh trường bề mặt của *Asp.oryzae* người ta dùng các phương pháp sau :

- Vô hoạt enzym proteaza trong điều kiện như thế nào mà không làm vô hoạt enzym amilaza ;

- Dựa vào độ hòa tan khác nhau trong hỗn hợp rượu nước của proteaza và amilaza : ở nồng độ rượu thấp từ 50 - 52% thì 90% proteaza bị kết tủa, còn amilaza mới kết tủa khoảng 10%. Khi nồng độ rượu đến 76% thì amilaza gần như bị kết tủa hoàn toàn. Còn khoảng 10% proteaza cùng kết tủa với amilaza trong đoạn thứ hai này ta có thể loại bỏ được bằng cách cho hấp phụ trên betonit.

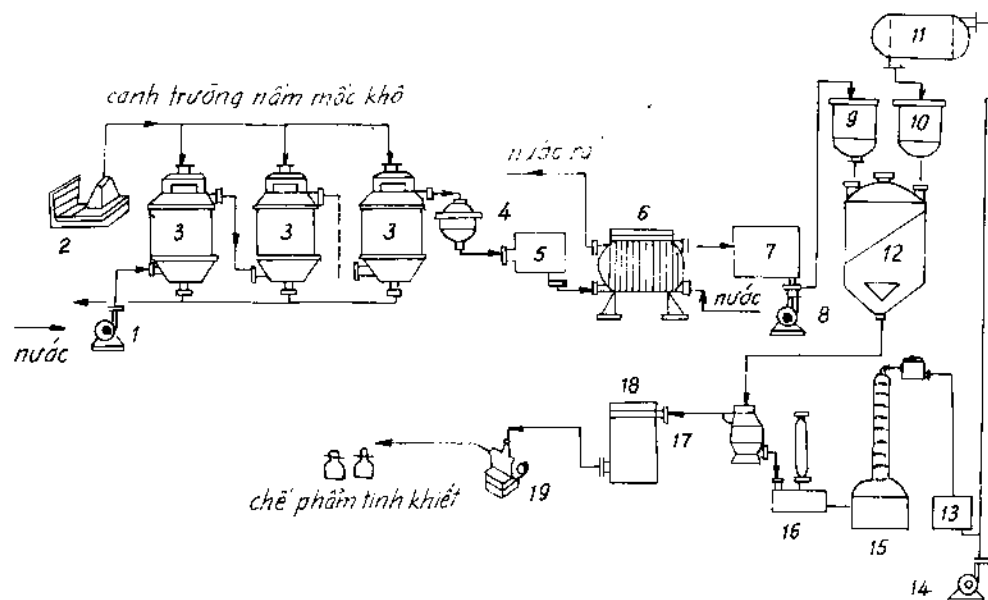
Hoặc chẳng hạn có thể dựa vào khả năng bền vững của glucoamilaza đối với môi trường axit và kiềm để khử bỏ enzym thứ yếu glucozyltransferaza chứa trong chế phẩm glucoamilaza (ứng dụng để sản xuất glucoza).

Ngoài dung môi hữu cơ, người ta còn dùng một số muối trung tính làm tác nhân kết tủa enzym. Do đó phương pháp dùng muối để kết tủa gọi là phương pháp diêm tích. Phương pháp diêm tích đặc hiệu hơn đối với tất cả protein, do đó các chế phẩm enzym thu được có hoạt độ cao hơn so với phương pháp đầu. Muối trung tính thường được dùng là amon sulfat, natri sulfat, magie sulfat, hỗn hợp phosphat mono - và dibasic, v.v. Song tốt hơn cả là amon sulfat. Vì độ hòa tan của amon sulfat cao và thực tế gần như không phụ thuộc nhiều vào nhiệt độ. Chẳng hạn, nồng độ dung dịch bão hòa của amon sulfat khi chuyển từ 25°C xuống 0°C chỉ giảm từ 4,1 M xuống 3,9M. Hơn nữa, amon sulfat không làm biến tính ngay cả những protein kém bền nhất.

Tuy nhiên trong sản xuất, dùng phương pháp này tốn rất nhiều muối (trung bình 50 - 60% thể tích dung dịch nước) và khó thu hồi lại từ nước cái. Để tiết kiệm amon sulfat thì dịch chiết cần được cô đặc sơ bộ trong nồi chân không.

Các chế phẩm enzym khô thu được bằng phương pháp kết tủa này thường chứa khá nhiều muối, nhất là khi kết tủa ở mức độ bão hòa cao. Vì vậy, những chế phẩm loại này chỉ có thể sử dụng trong các trường hợp xét ra các tạp chất muối không có ảnh hưởng gì. Trong những trường hợp khác phải loại bỏ muối ra khỏi chế phẩm bằng cách cho thẩm tích qua màng bán thấm. Muốn thế, người ta hòa tan kết tủa

enzim trong một thể tích nước tối thiểu rồi tiến hành thẩm tích. Dung dịch sau khi thẩm tích xong có thể làm khô bằng một phương pháp bất kỳ nào đó hoặc đem kết tủa bằng rượu. Các chế phẩm enzym có độ tinh khiết khá này đem sấy khô bằng phương pháp sấy thăng hoa là tốt hơn cả.



Hình 11.10. Sơ đồ kỹ thuật thu nhận chế phẩm enzym tinh khiết :

- 1 - bơm nước để chiết tán ; 2 - cân ; 3 - hệ thống chiết tán ; 4 - máy lọc ; 5 - thùng chứa dịch lọc ; 6 - máy thẩm tích ; 7 - thùng chứa dịch thẩm tích ; 8 - bơm ; 9 - thùng dung cao vi cho dịch enzym ; 10 - thùng dung cao vi cho cồn ; 11 - thùng chứa ; 12 - nồi kết tủa ; 13 - bể thu hồi cồn ; 14 - bơm ; 15 - máy chưng luyện cồn ; 16 - bể chứa cặn lẫn cồn ; 17 - máy ly tâm siêu tốc ; 18 - lò sấy ; 19 - máy nghiền

XI.3.4. Phương pháp thu các chế phẩm enzym từ canh trường bề sâu của vi sinh vật

Chúng ta đã thấy ở trên, nước lọc của canh trường bề sâu các nấm mốc thường chứa một lượng chất khô không đáng kể (1 - 3%), do đó phải cô đặc sơ bộ để giảm chi phí rượu hoặc muối khi muốn sản xuất chế phẩm enzym dạng khô. Nước lọc canh trường, thường được cô đặc bằng cách cho bốc hơi trong nồi chân không ở nhiệt độ thấp (25 - 30°C) để tránh vô hoạt enzym do nhiệt độ. Có thể cô đặc xuống khoảng 4 - 10 lần mà hoạt độ của enzym tổn thất không đáng kể. Tuy nhiên phương pháp cô đặc hiệu quả hơn cả là cho hấp phụ trên nhựa trao đổi ion hoặc các chất hoạt động bề mặt. Với phương pháp này cho phép cô đặc lại nhiều lần, vì lẽ việc rút enzym trở lại thường bằng một thể tích bé hơn thể tích ban đầu rất nhiều.

Chẳng hạn, enzym α -amilaza của nấm mốc có thể hấp phụ hoàn toàn bởi silicagel ở pH 4,7 - 4,9. Việc rút enzym ra được tiến hành bằng cách rửa với dung dịch natri phosphat có pH 8 - 8,4 hoặc dung dịch natri cacbonat 2%. Quá trình hấp phụ enzym có thể tiến hành trong điều kiện động: cho nước lọc canh trường chảy qua cột nạp đầy silicagel, cũng như trong điều kiện tĩnh: cho silicagel vào một thể tích nhất

định của nước lọc canh trường, sau đó tách silicagel ra. Để tăng dung lượng hấp phụ của silicagel, người ta phải thêm vào nước lọc canh trường 6 - 20% natri clorua. Nếu hấp phụ trong điều kiện tĩnh thì tỉ lượng silicagel phải là 5%. Hấp phụ α - amilaza bằng phương pháp này cho phép cô đặc nước lọc canh trường bề sâu xuống 8 - 10 lần. Sau khi rút enzym ra, silicagel được tái sinh lại bằng cách nung ở nhiệt độ 160 - 170°C hoặc dùng HCl 1N để xử lý sau đó rửa bằng nước cất cẩn thận. Dung lượng hấp phụ của 1g silicagel bằng 60 - 120 đơn vị α - amilaza.

Ngoài ra, cũng có thể dùng tinh bột khoai tây đã xử lý sơ bộ bằng nhiệt để hấp phụ α - amilaza của nấm mốc và vi khuẩn. Và muốn cho tinh bột hấp phụ được hoàn toàn hơn, người ta cũng phải thêm vào nước lọc canh trường 20% amon sulfat. Trong điều kiện đó, enzym proteaza và các enzym khác có trong nước lọc canh trường bề sâu của vi khuẩn sẽ không được tinh bột hấp phụ do đó có thể tách riêng những enzym này ra. α - amilaza đã được hấp phụ trên tinh bột có thể sấy khô cùng với tinh bột (không cần phải tách tinh bột ra) và sử dụng trong các quá trình kỹ thuật mà xét thấy không có ảnh hưởng gì đến chất lượng sản phẩm.

Từ nước lọc canh trường bề sâu đã được cô đặc bằng các phương pháp khác nhau, người ta có thể tách enzym ra cũng bằng những phương pháp như đối với dịch chiết từ canh trường bề mặt, nghĩa là có thể kết tủa bằng dung môi hữu cơ, bằng muối trung tính rồi sau đó đem sấy thăng hoa hay sấy phun.

Hiệu suất của các chế phẩm enzym từ canh trường bề sâu của nấm mốc và vi khuẩn sẽ phụ thuộc vào hoạt động của chúng, thành phần của môi trường và điều kiện nuôi cấy. Nhưng cho dù chủng tốt, môi trường và điều kiện nuôi cấy đều tối ưu thì lượng chế phẩm khô thu được khi kết tủa bằng rượu hay bằng muối, cũng chỉ đạt từ 1 đến 3 hay 4g trên một lít nước lọc canh trường.

Trong quá trình tách các enzym ra khỏi canh trường bề sâu, người ta có thể kèm thêm những biện pháp khác nữa (tách protein không hoạt động và các tạp chất cao phân tử) để cho các chế phẩm thu được có độ tinh khiết cao hơn. Nhất là trong điều kiện phòng thí nghiệm thì mọi biện pháp đều có thể áp dụng được miễn là đạt được mục đích chính: phân tách được phức hệ enzym hoặc loại bỏ được hoàn toàn các tạp chất đi kèm. Còn trong điều kiện sản xuất ở nhà máy thì chỉ có thể áp dụng những biện pháp và thủ thuật không làm tổn thất đáng kể các enzym. Vì vậy, những phương pháp mới phải được kiểm tra cẩn thận và có tính toán hiệu quả kinh tế.

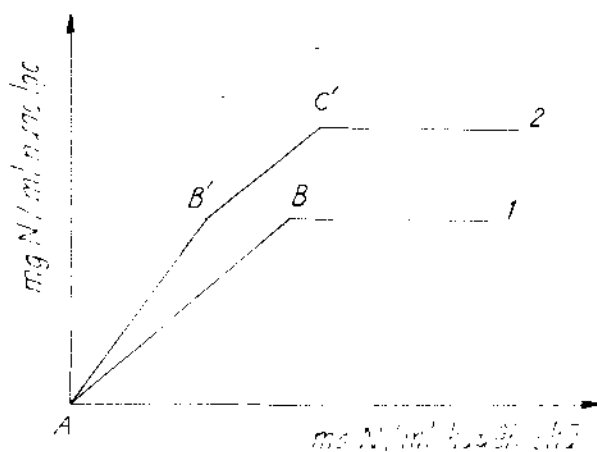
Muốn thu được các chế phẩm enzym có độ tinh khiết cao và ở dạng kết tinh, người ta phải dùng tổ hợp nhiều phương pháp khác nhau. Đôi khi người ta phải tìm những chất có khả năng tạo được với một enzym bất kỳ nào đó, một hợp chất tương tự muối và không hòa tan. Chẳng hạn hợp chất giữa α - amilaza và rivanol (Acabori, Nhật Bản). Người ta thấy rằng khi thêm vào dung dịch α - amilaza chưa sạch một ít dung dịch rivanol (1%) thì sẽ tách được α - amilaza (dưới dạng phức với rivanol) ra khỏi các protein khác. Kết quả là thu được chế phẩm có độ thuần khiết cao.

Tuy nhiên, cũng cần chú ý rằng, việc kết tinh các enzym từ dung dịch đã thuần khiết cho dù được lặp lại nhiều lần thì cũng chưa thể coi là enzym đã đông thể. Độ đông thể của chế phẩm enzym phải được tiến hành bằng một số phương pháp dựa trên những nguyên lý khác nhau. Vì trong một số trường hợp được coi là đông

thể khi ly tâm, nhưng lại có thể phân chia thành một số izoenzim (hay izozim) bằng phương pháp điện di trên gel. Có một loạt phương pháp để xác định độ đồng thể và độ tinh khiết của enzym.

Chỉ tiêu quan trọng của độ đồng thể là độ hòa tan không thay đổi. Chúng ta đều biết, trong điều kiện như nhau độ hòa tan của một protein enzym tinh khiết sẽ là không đổi và không phụ thuộc vào sự có mặt của protein enzym đó ở pha rắn. Chúng ta có thể làm như sau :

Lấy một dây ống nghiệm đựng một lượng dung môi như nhau, cho protein đồng thể vào trong các ống nghiệm với lượng tăng dần. Lắc đều và đợi cho đến khi cân bằng trong hệ thống được kiến lập. Lọc kết tủa. Xác định hàm lượng protein trong nước lọc. Về



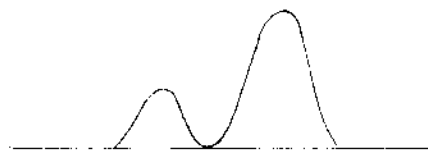
Hình 11.11. Đường biểu diễn độ hòa tan của protein enzym :
1 - enzym đơn thể ; 2 - hỗn hợp hai enzym

lọc vào lượng protein tổng số đã mang vào (h.11.11).

Đoạn AB trên đường 1 tương ứng với hệ thống một pha. Phần nằm ngang của đường 1 ứng với hệ thống hai pha của dung dịch protein enzym bão hòa - lượng protein enzym trong nước lọc không đổi và không phụ thuộc vào lượng pha rắn. Ở đồ thị 2, ta có hỗn hợp protein enzym gồm hai cấu tử. Trong trường hợp đó, thậm chí nếu dung dịch đã được bão hòa bởi một cấu tử, chúng ta vẫn sẽ có hệ thống hai pha. Nồng độ của protein hòa tan bị biến đổi khi tăng lượng protein chung mặc dầu sự biến đổi đó chậm. Trạng thái đó ứng với đoạn B'C' trên đường 2. Như vậy nếu trên đồ thị có hơn một điểm gãy chứng tỏ protein enzym chưa đồng thể.

Phương pháp thứ hai để xác định độ đồng thể của protein và enzym là phương pháp điện di. Dem chế phẩm enzym điện di ở pH và lực ion nhất định. Nếu trên điện di đó có một pic (một đỉnh) thì chứng tỏ protein enzym đó là đơn thể. Nếu có hai pic (hai đỉnh) chứng tỏ có hai enzym trong chế phẩm đó. Hình 11.12 là điện di đồ của một chế phẩm enzym chưa phải là đơn thể, mà là chứa hai enzym.

Phương pháp siêu ly tâm cũng là phương pháp rất quan trọng để xác định độ đơn thể của enzym. Nếu trên gián đo thu được hai pic thì có nghĩa là chế phẩm enzym đó là một hỗn hợp của ít ra là hai enzym khác nhau.



Hình 11.12. Điện di đồ của lactacdehydrogenaza từ tim bê

Ngoài ra, enzim là protein có hoạt tính sinh học, do đó hằng số hoạt độ cũng là tiêu chuẩn rất quan trọng để kiểm tra mức độ tinh khiết và độ đồng thể của enzim.

Nếu bằng phương pháp phân đoạn [kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] sắc ký trên cột (CM - xelluloza, DEAE - xelluloza) mà không tách ra được hai hoạt độ thì rõ ràng là một enzim nhưng có hai hoạt độ. Song hai hoạt độ cũng phải tăng lên song song theo cùng với độ tinh chế thì mới chứng tỏ là chỉ có một enzim.

Tiêu chuẩn nữa là tỉ lệ hoạt độ khi vô hoạt chế phẩm enzim bằng nhiệt độ hay bằng chất kìm hãm phải là không đổi. Chẳng hạn một chế phẩm enzim có hoạt độ A và hoạt độ B. Giả sử tỉ số của hai hoạt độ đó là 1/10. Nếu làm vô hoạt đến 50% thì tỉ số của hai hoạt độ đó phải là không đổi nếu cả hai hoạt độ là thuộc cùng một enzim.

Tiêu chuẩn nữa để chứng tỏ là chỉ có một enzim khi có hai hoạt độ là : khi có kìm hãm cạnh tranh thì bằng số K_i phải giảm :

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

Cần lưu ý rằng ba tiêu chuẩn này phải kiểm tra đồng thời.

XI.4. ỨNG DỤNG CÁC CHẾ PHẨM ENZIM

Trong khoảng hai mươi năm trở lại đây, enzim được sử dụng rất rộng rãi trong nhiều ngành khác nhau của nền kinh tế quốc dân : trong hóa học, trong y học, trong công nghiệp nhẹ và đặc biệt là trong công nghiệp thực phẩm. Do đó, ở nhiều nước trên thế giới, việc sản xuất các chế phẩm enzim đã trở thành một ngành công nghiệp lớn. Sở dĩ enzim được sử dụng phổ biến như vậy vì những lý do chính sau đây :

- Enzim có tính đặc hiệu cao, mỗi enzim chỉ tác dụng lên một chất nhất định mà không gây nên một biến đổi gì đối với các chất khác bên cạnh. Tính chất này rất quan trọng đặc biệt là khi chế biến, các nguyên liệu có nguồn gốc sinh vật, có thành phần hóa học rất phức tạp ;

- Enzim tác dụng trong điều kiện tương đối "êm dịu" và phản ứng do enzim xúc tác lại dễ dàng điều chỉnh. Đặc tính này có ý nghĩa rất quan trọng đối với việc sản xuất chế phẩm enzim xét về phương diện tiết kiệm, thiết lập qui trình kỹ thuật và tổ chức sản xuất lớn ;

- Enzim đều có nguồn gốc tự nhiên, không độc. Đặc điểm này lại càng quan trọng đối với các ngành thực phẩm và y học.

Dựa trên những đặc tính đó mà trong công nghiệp có thể hợp lý hóa hoặc rút ngắn các quá trình sản xuất, thay đổi triệt để một số qui trình kỹ thuật cũ, lập nên những qui trình kỹ thuật mới, nâng cao hiệu suất và chất lượng sản phẩm, mở rộng phạm vi sử dụng nguyên liệu, dễ dàng tổ chức sản xuất lớn, giảm nhẹ điều kiện lao động, nâng cao trình độ vệ sinh của xí nghiệp, tiết kiệm nguyên vật liệu, v.v.

Con số enzym đã biết hiện nay là hơn một nghìn, nhưng trong thực tế sản xuất chỉ mới sử dụng một số enzym thuộc nhóm hydrolaza và nhóm oxy hóa - khử. Trong công nghiệp thường sử dụng những chế phẩm enzym sau :

- amilaza ;
- proteaza ;
- pectinaza ;
- xellulaza ;
- glucooxydaza.

Dưới đây chúng ta sẽ lần lượt đi qua một số ứng dụng chủ yếu của những enzym này.

XI.4.1. Ứng dụng enzym amilaza của vi sinh vật

XI.4.1.1. Đặc điểm của nguồn amilaza từ vi sinh vật

Các enzym đường hóa do vi sinh vật tổng hợp nên, mặc dầu cùng tác dụng lên cơ chất tinh bột, nhưng lại khác nhau về tính chất, cơ chế tác dụng cũng như sản phẩm cuối cùng của sự thủy phân.

Đối với nấm mốc *Aspergillus*, trong canh trường của chúng thường có những enzym sau :

- α - amilaza (3.2.1.1, α - 1,4 - glucan- 4 - glucanhydrolaza) ;
- glucoamilaza (3.2.1.3, α - 1,4- glucanglucohydrolaza) ;
- glucozyltransferaza (2.4.1.3, α - 1,4 glucan : D- glucoza - 4- glucozyltransferaza)

Đa số chủng của loài *Aspergillus oryzae* có nhiều α - amilaza, song có rất ít glucoamilaza và glucozyltransferaza. Ở mốc đen (*A. niger*, *A. awamori*) và một số loài khác thì có tỉ lệ các enzym đó ngược lại.

α - *Amilaza*. Về cơ chế tác dụng, người ta thấy rằng α - amilaza của nấm mốc cắt đứt được tất cả các liên kết α - 1,4 - glucozyl trong mạch polysacarit, trừ điểm phân nhánh trong amilopectin, để tạo thành maltoza và dextrin giới hạn. Như vậy, chúng có khả năng chuyển 80 - 82% tinh bột thành maltoza. Một đặc điểm nữa là α - amilaza hầu như không tác dụng trên tinh bột nguyên thủy, nhưng tác dụng thủy phân hồ tinh bột thì rất nhanh.

Khi thủy phân tinh bột bằng α - amilaza thường xảy ra hai giai đoạn :

- Giai đoạn đầu : chỉ một số liên kết trong phân tử bị đứt và độ nhớt của hồ tinh bột giảm nhanh ;
- Giai đoạn thứ 2 : thủy phân các dextrin phân tử lớn vừa được tạo thành.

Tính chất đặc trưng của α - amilaza là khả năng dextrin hóa cao, do đó làm cho phản ứng màu của tinh bột với iot bị biến đổi nhanh chóng. Chính người ta dựa vào tính chất này để xác định hoạt độ của enzym một cách định tính.

α - Amilaza của *A. oryzae* có phân tử lượng khoảng 45 000, là một metaloenzim (enzim cơ kim). Hoạt độ của α - amilaza có liên quan mật thiết với sự có mặt ion canxi trong phân tử. Vì canxi được dùng để duy trì được hình thể hoạt động của enzym.

pH tối ưu của α - amilaza của nấm mốc là 4,7 - 4,9

Amilaza của vi khuẩn cũng thuộc kiểu α - amilaza, nhưng có một số tính chất khác với α - amilaza của nấm mốc. Đó là khả năng dịch hóa (hòa tan) và dextrin hóa tinh bột rất cao, còn khả năng đường hóa (tạo ra maltoza) tương đối yếu. Nhiều amilaza của vi khuẩn đặc biệt là của vi khuẩn ưa ấm, rất bền vững đối với nhiệt độ cao (90°C).

Trong canh trường của vi khuẩn thường chỉ tạo thành α - amilaza. Trong phân tử của amilaza, từ vi khuẩn cũng chứa canxi nhưng nhiều hơn. Khi có mặt ion Zn^{2+} thì phân tử ở dạng dimer.

pH tối ưu của amilaza vi khuẩn là 5,9 - 6,1.

Glucoamilaza (3.2.1.3 α - 1,4- glucanglucohydrolaza) hay cũng gọi là γ - amilaza.

Glucoamilaza cũng thường có mặt trong phức hệ enzym đường hóa, glucoamilaza có khả năng cắt đứt từng đơn vị glucoza từ đầu không khử của tinh bột. Khi thủy phân tinh bột bởi glucoamilaza bên cạnh glucoza cũng có thể tạo ra oligosacarit. Glucoamilaza cũng có thể thủy phân liên kết α - 1,6 - glucosit trong các oligo- và polysacarit. Do đó nó còn có tên gọi hệ thống là α 1,4 : 1,6 - glucan 4 : 6 glucohydrolaza. Ngoài ra glucoamilaza cũng có khả năng phân cắt glucogen, amilopectin, dextrin giới hạn, izomaltoza và maltoza đến glucoza.

Glucoamilaza của *Aspergillus* và *Rhizopus* có độ bền cao đối với nồng độ ion H^+ .

Glucosyltransferaza. Là người bạn đồng hành của glucoamilaza nhưng lại không thuộc nhóm enzym thủy phân. Enzim này xúc tác sự chuyển gốc glucoza đến phân tử maltoza, để tạo thành các oligosacarit cao có chứa liên kết α - 1,6.

β - amilaza thì không có trong phức hệ enzym đường hóa của nấm mốc.

Oligo - 1,6 - glucosidaza (3.2.1.10) hay dextrin - α - glucanhydrolaza. Enzim này cũng có tên dextrinaza và có thể phân liên kết 1,6 - glucosit trong izomaltoza, panoza và dextrin giới hạn. ... *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae* và *Aspergillus usami* chứa nhiều enzym này.

Maltaza hay α - glucosidaza hay α - D - glucositglucohydrolaza (3.2.1.20).

Enzim này có chứa trong nhiều loài nấm mốc. Về cơ chế tác dụng, thì tương tự như glucoamilaza, nghĩa là tác dụng được trên maltoza, nhưng có khác là không thủy phân được tinh bột. Maltaza còn có khả năng chuyển gốc glucoza. Nhiều tác giả khi nghiên cứu tính chất của maltaza từ canh trường bề mặt của *Asp.oryzae* đều nhận thấy rằng maltaza và glucosyltransferaza chỉ là một enzym, nhưng vừa có khả năng thủy phân maltoza vừa có khả năng chuyển gốc glucoza đến đường và rượu.

XI.4.1.2. Các ứng dụng của enzym amilaza

Tùy theo yêu cầu về chất lượng của sản phẩm và đặc tính riêng của từng nguồn amilaza, để sử dụng các chế phẩm amilaza một cách hợp lý. Chẳng hạn để ru hồ trên vải người ta thường dùng chế phẩm amilaza từ vi khuẩn, vì vi khuẩn chứa chủ yếu là α - amilaza bền đối với nhiệt độ cao (phù hợp với điều kiện nhiệt độ trong quá trình sản xuất). Ngoài ra cũng không cần thiết phải dùng chế phẩm sạch lắm. Trái lại trong sản xuất bánh mì thì không thể dùng chế phẩm amilaza của vi khuẩn vì lẽ dextrin sẽ tạo ra quá nhiều ngay cả khi nướng, do đó chất lượng bánh sẽ xấu.

Amilaza thường được sử dụng trong những lĩnh vực như trong bảng 11.3.

Bảng 11.3. Các lĩnh vực sử dụng amilaza

Lĩnh vực sử dụng	Enzim được sử dụng	
	của vi khuẩn	của nấm mốc
Sản xuất bánh mì		+
Công nghiệp bánh kẹo		+
Công nghiệp rượu		+
Sản xuất bia	+	+
Sản xuất các sản phẩm rau	+	+
Chế biến thức ăn cho trẻ con	+	+
Sản xuất các mặt hàng từ quả	+	+
Sản xuất nước ngọt	+	
Công nghiệp dệt	+	
Công nghiệp giấy		+
Y học		

a) Trong sản xuất rượu

Đối với công nghiệp rượu cồn, các enzim đường hóa có một vai trò đặc biệt quan trọng. Vài mươi năm trở lại đây chế phẩm amilaza của nấm mốc đã hoàn toàn thay thế malt. Và kết quả đã đem lại là :

- Để dành được hàng chục nghìn tấn hạt có chất lượng cao ;
- Tăng được hiệu suất rượu, do khả năng thủy phân sâu của phức hệ enzim của nấm mốc ;
- Thời gian để sản xuất chế phẩm rút xuống nhiều lần (sản xuất malt cần 7 - 8 ngày, sản xuất nấm mốc chỉ hàng chục giờ) ;
- Giảm được diện tích sản xuất, lao động và điện năng.

Chế phẩm enzim dùng trong sản xuất rượu thường ở dạng thô, không cần phải tinh chế.

Nguồn enzim thường là *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. usamii*.

Aspergillus awamori tạo được nhiều glucoamilaza hoạt động cao mà lượng chế phẩm từ *A. awamori* cần thiết để đường hóa giảm bớt đi 2 - 2,5 lần. Song chế phẩm này lại không có mặt enzim proteaza hoạt động trong môi trường axit yếu của hạt (5,5 - 6,0). Do đó người ta dùng hỗn hợp bốn phần canh trường bé mặt của *A. awamori* và một phần canh trường bé mặt của *A. oryzae* để bổ sung lẫn nhau.

Để đường hóa hoàn toàn tinh bột có trong nguyên liệu, lượng chế phẩm enzim phải chiếm khoảng 6 - 6,5% lượng tinh bột.

Ở các nhà máy rượu của Việt Nam thường dùng chế phẩm enzim từ *Aspergillus usamii* vì lẽ trong chúng cũng có chứa nhiều glucoamilaza hoạt động.

Cần chú ý rằng, trong sản xuất rượu, vai trò của glucoamilaza rất quan trọng, hơn cả α -amilaza. Vì glucoamilaza có thể đường hóa tinh bột đến cùng, còn α -amilaza thì không thể chuyển hoàn toàn tinh bột thành đường lên men được.

b) Trong sản xuất bia

Nếu như trong sản xuất rượu trước đây, malt đại mạch chỉ được dùng để làm tác nhân đường hóa (thường chiếm 7 - 9% lượng hạt đưa vào sản xuất), thì trong sản xuất bia, malt đại mạch lại là nguyên liệu chính. Điểm khác nhau nữa là mức độ sâu sắc của sự đường hóa tinh bột chứa trong nguyên liệu. Trong sản xuất rượu đòi hỏi phải thủy phân hoàn toàn tinh bột thành các đường để lên men. Ngược lại, trong sản xuất bia chỉ cần một sự đường hóa nửa vời, nghĩa là phải còn lại các dextrin để tạo cho bia có vị đặc trưng và khả năng tạo bọt.

Hiện nay ở nhiều nước trên thế giới người ta thay thế 25 - 50% malt bằng các nguyên liệu phi malt, nghĩa là bằng các hạt chưa nảy mầm như đại mạch loại hai và loại ba, ngô đã lấy hết chất béo. . . Trong trường hợp này, người ta phải dùng chế phẩm amilaza để có được mức độ đường hóa cần thiết cho chất lượng bia. Để đạt mục đích này, người ta dùng chế phẩm của *A. oryzae*. Khi dùng 50% nguyên liệu phi malt thì phải cho khoảng 1% canh trường *A. oryzae* khô và một ít axit lactic để tạo pH cần thiết cho enzym hoạt động.

Ở một số nước như Đan Mạch, Pháp, Nhật Bản, Mỹ, để đường hóa các nguyên liệu phi malt người ta thường dùng các chế phẩm amilaza của vi khuẩn. Trong trường hợp đó có thể thay thế 20 - 30% malt và đôi khi đến 80 - 90% malt bằng nguyên liệu phi malt.

Ngoài ra trong sản xuất bia, người ta còn dùng một số enzym khác để phá vỡ cấu trúc của malt và của hạt phi malt, phức hệ enzym của *Trichothecium roseum* có tác dụng đến thành tế bào của nguyên liệu do đó sẽ giải phóng ra tinh bột và làm tăng độ trích ly của nguyên liệu.

c) Trong sản xuất bánh mì

Thêm vào bột nhào 0,002 - 0,003% chế phẩm amilaza, nghĩa là khoảng 20 - 30g chế phẩm khô cho một tấn bột sẽ làm thay đổi hoàn toàn chất lượng của bánh mì : hương vị, màu sắc, thể tích riêng, độ xốp, . . . tăng lên một cách rõ rệt.

Để đạt mục đích đó, người ta dùng amilaza của nấm mốc. Vì amilaza này vượt xa amilaza của thực vật hoặc của vi khuẩn. Nhiệt độ vô hoạt của α -amilaza của nấm mốc tương đối thấp (gần 70°C) do đó có thể dùng enzym này với một liều lượng lớn mà vẫn không có hiện tượng dextrin hóa khi nướng. Hơn nữa hoạt độ của nó lại cao cho nên có thể đạt đến độ đường hóa cần thiết rất nhanh chóng, sau đó bị vô hoạt ngay. Còn amilaza của vi khuẩn có nhiệt độ vô hoạt khoảng 80 - 90°C nên chỉ có thể dùng một lượng nhỏ.

Trong sản xuất bánh mì, người ta thường dùng chế phẩm enzym từ *Aspergillus oryzae*.

Cần chú ý rằng, trong sản xuất rượu, vai trò của glucoamilaza rất quan trọng, hơn cả α -amilaza. Vì glucoamilaza có thể đường hóa tinh bột đến cùng, còn α -amilaza thì không thể chuyển hoàn toàn tinh bột thành đường lên men được.

b) Trong sản xuất bia

Nếu như trong sản xuất rượu trước đây, malt đại mạch chỉ được dùng để làm tác nhân đường hóa (thường chiếm 7 - 9% lượng hạt đưa vào sản xuất), thì trong sản xuất bia, malt đại mạch lại là nguyên liệu chính. Điểm khác nhau nữa là mức độ sâu sắc của sự đường hóa tinh bột chứa trong nguyên liệu. Trong sản xuất rượu đòi hỏi phải thủy phân hoàn toàn tinh bột thành các đường để lên men. Ngược lại, trong sản xuất bia chỉ cần một sự đường hóa nửa vời, nghĩa là phải còn lại các dextrin để tạo cho bia có vị đặc trưng và khả năng tạo bọt.

Hiện nay ở nhiều nước trên thế giới người ta thay thế 25 - 50% malt bằng các nguyên liệu phi malt, nghĩa là bằng các hạt chưa nảy mầm như đại mạch loại hai và loại ba, ngô đã lấy hết chất béo. Trong trường hợp này, người ta phải dùng chế phẩm amilaza để có được mức độ đường hóa cần thiết cho chất lượng bia. Để đạt mục đích này, người ta dùng chế phẩm của *A. oryzae*. Khi dùng 50% nguyên liệu phi malt thì phải cho khoảng 1% canh trường *A. oryzae* khô và một ít axit lactic để tạo pH cần thiết cho enzym hoạt động.

Ở một số nước như Đan Mạch, Pháp, Nhật Bản, Mỹ, để đường hóa các nguyên liệu phi malt người ta thường dùng các chế phẩm amilaza của vi khuẩn. Trong trường hợp đó có thể thay thế 20 - 30% malt và đôi khi đến 80 - 90% malt bằng nguyên liệu phi malt.

Ngoài ra trong sản xuất bia, người ta còn dùng một số enzym khác để phá vỡ cấu trúc của malt và của hạt phi malt, phức hệ enzym của *Trichothecium roseum* có tác dụng đến thành tế bào của nguyên liệu do đó sẽ giải phóng ra tinh bột và làm tăng độ trích ly của nguyên liệu.

c) Trong sản xuất bánh mì

Thêm vào bột nhào 0,002 - 0,003% chế phẩm amilaza, nghĩa là khoảng 20 - 30g chế phẩm khô cho một tấn bột sẽ làm thay đổi hoàn toàn chất lượng của bánh mì: hương vị, màu sắc, thể tích riêng, độ xốp, tăng lên một cách rõ rệt.

Để đạt mục đích đó, người ta dùng amilaza của nấm mốc. Vì amilaza này vượt xa amilaza của thực vật hoặc của vi khuẩn. Nhiệt độ vô hoạt của α -amilaza của nấm mốc tương đối thấp (gần 70°C) do đó có thể dùng enzym này với một liều lượng lớn mà vẫn không có hiện tượng dextrin hóa khi nướng. Hơn nữa hoạt độ của nó lại cao cho nên có thể đạt đến độ đường hóa cần thiết rất nhanh chóng, sau đó bị vô hoạt ngay. Còn amilaza của vi khuẩn có nhiệt độ vô hoạt khoảng 80 - 90°C nên chỉ có thể dùng một lượng nhỏ.

Trong sản xuất bánh mì, người ta thường dùng chế phẩm enzym từ *Aspergillus oryzae*.

Cần chú ý rằng chế phẩm enzym của vi sinh vật thường là một phức hệ các enzym amilaza và proteaza. Sự có mặt của proteaza sẽ làm cho chất lượng bánh bị xấu đi. Do đó hợp lý hơn cả là dùng các chế phẩm chỉ chứa amilaza

d) Trong sản xuất glucoza và mật

Chúng ta đều biết từ tinh bột có thể thu được các phẩm vật đường khác nhau.

Khi thủy phân tinh bột bằng axit cũng như bằng enzym của malt ta sẽ thu được mật, mật glucoza hay mật maltoza. Mật maltoza thường được dùng trong sản xuất bánh kẹo và trong sản xuất các sản phẩm ăn kiêng cho trẻ con và người bệnh.

Hiện nay, nhiều nước (Nhật Bản, Mỹ, Canada, ...) đã sản xuất glucoza từ tinh bột bằng enzym glucoamilaza. Song trong các chế phẩm glucoamilaza luôn luôn có cả glucozyltransferaza do đó sẽ làm giảm hiệu suất của glucoza, làm cho glucoza kết tinh và ảnh hưởng xấu đến chất lượng của thành phẩm. Vì vậy tốt hơn cả là nên chọn những chủng nấm mốc không tạo ra glucozyltransferaza (thấp phụ bằng đất sét chua) hoặc khử hoạt nó bằng axit hay kiềm (glucoamilaza bền trong một khoảng pH rộng).

Những nấm mốc chứa nhiều glucoamilaza là *A. awamori*, *Rhizopus* đặc biệt là ở *Rhizopus*. Ở Nhật Bản đã sản xuất chế phẩm glucoamilaza từ canh trường bề mặt của *Rhizopus*. Chế phẩm này có tên là Xuizim và không chứa glucozyltransferaza. Chế phẩm thu được từ nấm men *Endomycopsis* cũng chứa ít glucozyltransferaza.

Để sản xuất glucoza bằng chế phẩm glucoamilaza thì phải hồ hóa huyền phù tinh bột có nồng độ cao. Để làm giảm độ nhớt của huyền phù tinh bột trong quá trình hồ hóa người ta phải dịch hóa bằng axit vô cơ hoặc bằng amilaza của vi khuẩn. Bằng cách này có thể tăng cao được nồng độ tinh bột. Sau khi hồ hóa tinh bột xong thì làm nguội dung dịch đến 60°C và đưa pH đến 4,0 - 4,5 để tạo điều kiện hoạt động tối ưu cho glucoamilaza. Quá trình đường hóa kéo dài trong 65 - 75 giờ và tinh bột hầu như bị thủy phân hoàn toàn đến glucoza. Dung dịch glucoza thu được đem xử lý bằng than hoạt tính, cô đặc rồi cho kết tinh. Do chỗ glucoamilaza có tính đặc hiệu nên có thể dùng bột trực tiếp mà không cần phải tinh chế thành tinh bột.

e) Trong công nghiệp dệt

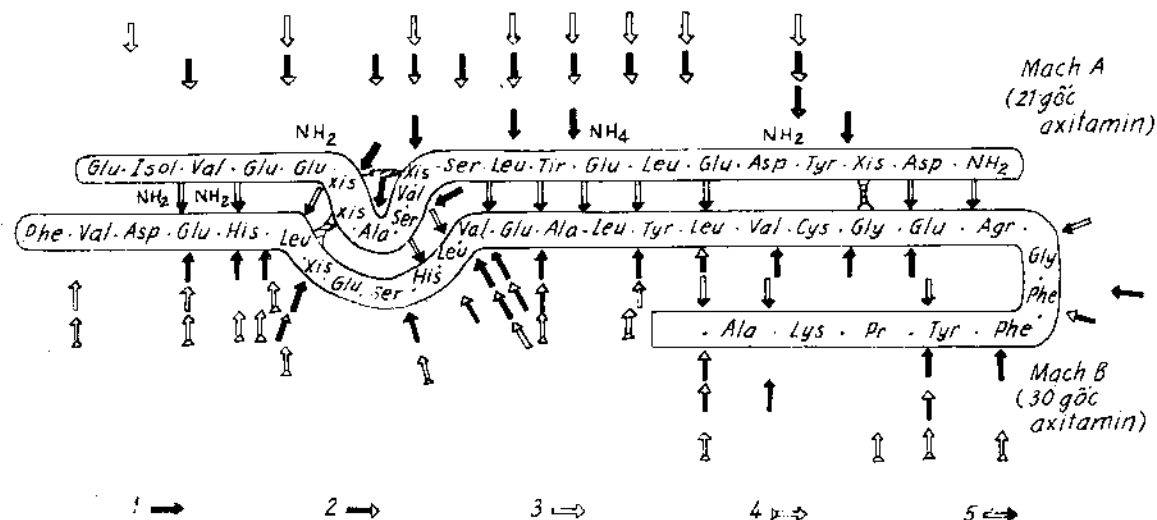
Trong công nghiệp dệt, chế phẩm amilaza được dùng để rũ hồ vải trước khi tẩy trắng và nhuộm. Chúng ta đều biết trong vải mộc thường chứa 5% tinh bột và nhiều tạp chất khác. Để làm cho vải mềm, có khả năng nhuộm ướt, tẩy trắng và bắt màu tốt thì cần phải tách tinh bột. Để rũ hồ, người ta thường dùng amilaza của vi khuẩn (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus amylosolvens*). Các chế phẩm amilaza dùng trong công nghiệp dệt đa phần là ở dạng dịch cô đặc thu được từ canh trường bề sâu của vi khuẩn. Cũng có thể dùng chế phẩm amilaza của nấm mốc. Khi rũ hồ bằng phương pháp liên tục thì lượng chế phẩm enzym tính cho mỗi lít dung dịch là 0,3 - 0,6g, nhiệt độ xử lý vải là 90°C và thời gian rũ hồ từ 5 - 15 phút.

Rũ hồ bằng enzym không những nhanh, không hại vải độ mao dẫn tốt mà còn đảm bảo vệ sinh do đó tăng được năng suất lao động.

XI.4.2. Ứng dụng của enzym proteaza của vi sinh vật

XI.4.2.1. Đặc điểm của nguồn proteaza từ vi sinh vật

Khác với proteaza của thực vật (fixin, papain, bromelin) và động vật (trypsin, pepsin, renin), proteaza của vi sinh vật là những enzym ngoại bào và có tính đặc hiệu rộng rãi (h.11.13).



Hình 11.13. Vị trí tác dụng của các proteaza ở trên insulin đã bị oxy hóa :

1- proteaza của *Penicillium cyaneofulvum* ; 2- proteaza của *Aspergillus oryzae* ; 3- proteaza của *Carica papaya* ; 4- proteaza của *Bacillus subtilis* ; 5- proteaza của *Aspergillus saitoi*

Dựa vào đặc trưng của tâm hoạt động người ta cũng có thể phân proteaza của vi sinh vật thành proteaza serin, proteaza tiol, peptidaza chứa kim loại và proteaza tác dụng trong môi trường axit.

Nếu dựa vào pH tác dụng tối ưu thì người ta chia proteaza của vi sinh vật thành proteaza axit, proteaza trung tính và proteaza kiềm.

Các chế phẩm proteaza ứng dụng trong công nghiệp đều thu được từ canh trường nấm mốc (*Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. terricola*, *A. sojae*, *A. fumigatus*), vi khuẩn (*Bacillus subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. circulans*, *Bac. thermophilus*) và xạ khuẩn (*Actinomyces griseus*, *Actinomyces fradiae*, *Actinomyces rimosus*).

Trong chế phẩm từ mốc đen (*A. niger*, *A. awamori*, *A. saitoi*, *A. usarii*, *Rhizopus javanicus*) chứa chủ yếu là các proteaza có pH tối ưu từ 2,5 - 3,0. Enzim này đã được tách ra ở trạng thái kết tinh và được gọi là aspergillopeptidaza A (3.4.4. 17). Còn trong chế phẩm từ mốc vàng (*A. oryzae*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terricola*) thì chứa các proteaza có pH tối ưu gần 6,5. Nhiều người cho rằng trong canh trường của *A. oryzae* có ít ra là ba cấu tử proteaza tác dụng ở pH 3 - 3,5, 4, - 5,1 và ở pH trung hòa. Tỷ lệ các cấu tử proteaza có thể bị thay đổi phụ thuộc vào thành phần của môi trường. Vì khi muốn nuôi trong môi trường giàu glucit thì môi trường sẽ bị axit hóa và nấm mốc sẽ tạo ra chủ yếu là proteaza tác dụng trong điều kiện

axit. Người ta cũng đã xác lập rằng tác dụng tối ưu của enzym cũng phụ thuộc vào bản chất của cơ chất. Vì lẽ cùng một enzym, nhưng khi thủy phân casein, hemoglobin và gelatin sẽ thể hiện hoạt độ cực đại ở những giá trị pH khác nhau.

Chế phẩm proteaza tinh khiết từ vi khuẩn *Bacillus* có thể thủy phân hoàn toàn nhiều protein. Chế phẩm này có tên gọi subtilizin. Khi tác dụng trên casein thì hoạt độ sẽ cực đại khi pH trung hòa.

Chế phẩm proteaza từ *Bacillus mesentericus* cũng thủy phân được các protein của động vật và thực vật đến axitamin và peptit.

Điều đáng chú ý là các chế phẩm proteaza từ những vi khuẩn này còn có khả năng làm đông sữa. Do đó trong sản xuất phomat người ta đang thay thế một phần enzym đông sữa bằng chế phẩm từ *Bacillus mesentericus* này.

Ngoài ra, một số chế phẩm proteaza của vi khuẩn còn có hoạt độ elastaza, nghĩa là chỉ có thể thủy phân các liên kết peptit kế liên bên gốc axitamin trung tính. Đây cũng là điểm khác với proteaza của nấm mốc.

XI.4.2.2. Ứng dụng của các chế phẩm proteaza

Các chế phẩm proteaza có nhiều ứng dụng rộng rãi trong các ngành khác nhau. Các lĩnh vực ứng dụng cụ thể như ở bảng 11.4.

Bảng 11.4. Các lĩnh vực sử dụng proteaza

Lĩnh vực sử dụng	Enzim được sử dụng		
	của thực vật	của nấm mốc	của vi khuẩn
Công nghiệp thịt	+	+	
Công nghiệp chế biến cá	+	+	+
Công nghiệp chế biến sữa	đông vật	+	+
Công nghiệp bánh mì và bánh kẹo		+	+
Sản xuất bia	+	+	+
Sản xuất sữa khô và bột trứng		+	
Công nghiệp hương phẩm và mỹ phẩm		+	+
Công nghiệp dệt		+	+
Công nghiệp da		+	+
Công nghiệp phim ảnh	đông vật	+	
Công nghiệp y học			

a) Trong công nghiệp thịt

Trong công nghiệp thịt, có thể sử dụng các chế phẩm proteaza để làm mềm thịt. Ngoài papain có thể dùng chế phẩm proteaza của vi sinh vật để thủy phân một phần nào đó các protein tham gia trong thành phần của thịt. Kết quả là chất lượng của các loại thịt được tăng cao, có thể chuyển thịt loại thấp thành thịt có phẩm chất cao. Không những thế, thời gian chín của thịt sẽ rút xuống nhiều lần (nếu để thịt nhiệt độ 0 - 2°C để cho tự các enzym trong thịt thủy phân thì phải mất 10 - 14 ngày).

Chế phẩm enzym để làm mềm thịt thường chứa papain hay hỗn hợp của papain với proteaza của vi sinh vật. Tùy theo tính chất của thịt mà sử dụng các chế phẩm một cách thích hợp. Chẳng hạn đối với thịt cứng thì trong chế phẩm ngoài hoạt tính proteolizơ ra phải có cả hoạt tính elastaza (nghĩa là có khả năng phân giải elastin). Chế phẩm loại này có thể thu được từ *Actinomyces fradiae*. Người ta nhận thấy rằng chế phẩm keratinaza từ *Actinomyces fradiae* này có tác dụng làm mềm thịt xấp xỉ với tandrin (là chất làm mềm thịt tốt nhất của nước ngoài). Chế phẩm proteaza từ *Aspergillus terricola* thì không có hoạt tính elastaza do đó khả năng làm mềm thịt rất yếu.

Kỹ thuật mềm thịt không phức tạp lắm. Có thể ngâm thịt trong dung dịch chứa phức hệ enzym cần thiết ở pH, nhiệt độ và nồng độ thích hợp hoặc rải lên bề mặt của thịt chất làm mềm dạng bột, trong đó có chứa enzym và chất phụ gia (thường là muối natri glutamat) hoặc là tiêm dung dịch enzym vào mô (nếu khối thịt lớn thì tiêm đồng thời mấy mũi) hoặc là đưa dung dịch enzym vào máu của động vật trước khi giết thịt.

b) Trong công nghiệp sữa

Proteaza không những có khả năng phân ly protein mà còn có khả năng làm đông tụ sữa nũa. Tính chất này của enzym cũng như của pepxin từ lâu đã được người ta sử dụng vào công nghiệp thực phẩm. Proteaza của nấm mốc và vi khuẩn cũng thể hiện khả năng đó. Tuy nhiên, tất cả proteaza của vi sinh vật đều khác với renin của động vật ở chỗ chúng không những làm đông tụ được sữa mà còn có thể thủy phân sâu casein, do đó có ảnh hưởng xấu đến chất lượng của phomat. Bởi vậy, trong quá trình làm phomat, renin vẫn chiếm một vị trí đặc biệt trong các proteaza khác. Dưới tác dụng của renin, casein của sữa sẽ đông tụ thành một khối đặc không hòa tan và thu hút vào đó hầu như toàn bộ chất béo có trong sữa. Từ đây, dưới ảnh hưởng của vi khuẩn lactic sẽ tạo thành phomat bền vững có chứa các chất dinh dưỡng quý giá hơn và có tính chất cảm quan ưu việt hơn. Hương vị của phomat sau quá trình chín có liên quan mật thiết với sự tích tụ các peptit và axitamin. Như vậy renin còn có vai trò dẫn động trong quá trình chín của phomat nũa.

Trong sản xuất phomat, người ta cố gắng tìm những chủng vi sinh vật tạo ra được enzym có tính chất tương tự renin hoặc thay thế một phần renin (25 - 50%) bằng proteaza của vi sinh vật.

Ở Nhật Bản, từ canh trường bề mặt của *Mucor*, người ta đã thu được chế phẩm proteaza dùng trong sản xuất phomat.¹

Ở một số nước khác, người ta cũng thu được chế phẩm tương tự từ nấm mốc *Acandidus* 11 hoặc từ *Bacillus mesentericus*.

c) Trong công nghiệp da

Trong công nghiệp da, proteaza của vi sinh vật cũng có tầm quan trọng trên hai quá trình: làm mềm và tách lông. Về mặt này, chế phẩm proteaza như là một phương tiện có hiệu quả để hoàn thiện kỹ thuật chế biến da.

Chúng ta đều biết chất quan trọng nhất của da là collagen. Phân tử của nó gồm những axitamin kết lại với nhau thành mạch dài. Dưới tác dụng của proteaza, các

chất nhũn bị tách ra và một số liên kết trong sợi collagen bị phá hủy. Kết quả là da thu được có độ mềm nhất định và trong quá trình thuộc da, tinh chất này lại được củng cố thêm.

Trước đây, người ta thường dùng các chế phẩm enzym thu được từ đường tiêu hóa của động vật. Hiện nay sử dụng có hiệu quả hơn cả là các chế phẩm proteaza thu được từ vi khuẩn và nấm mốc. Điểm thuận tiện là các chế phẩm proteaza dùng cho công nghiệp da chỉ cần hòa tan tốt và không chứa các tạp chất không tan là được, mà không đòi hỏi phải tinh chế cẩn thận. Chế phẩm enzym có thể dưới dạng nước chiết từ canh trường bé mặt của nấm mốc. Thường người ta cô đặc lại đến trên 50% chất khô. *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Actinomyces fradiae*, *Streptomyces griseus* và *Streptomyces rimosus* là những nguồn để thu chế phẩm proteaza.

Người ta có thể ngâm nguyên liệu da trong dung dịch enzym hoặc phết hồ enzym lên bề mặt da.

Thực tế đã chứng tỏ rằng khi xử lý nguyên liệu da bằng chế phẩm proteaza từ vi sinh vật thì có thể rút ngắn thời gian làm mềm và tách lông xuống nhiều lần. Điều quan trọng là lông được tách ra bằng phương pháp enzym, về chất lượng tốt hơn lông được cắt. Số lượng lông thu được so với phương pháp xử lý hóa học thì nhiều hơn từ 20 - 30%. Hơn nữa lông cũng không cần thiết phải xử lý thêm, vì khi ngâm trong dung dịch enzym, lông cũng được tách hết chất béo do có lipaza trong chế phẩm.

d) Trong sản xuất tư bản

Quá trình làm sạch các sợi tơ tự nhiên tương đối phức tạp và khó khăn. Chúng ta đều biết tơ là sợi ngoại bào được nhả ra bởi cặp tuyến của con tằm. Sợi tơ gồm hai sợi fibroin sơ cấp dính lại với nhau nhờ lớp vỏ bằng xerixin. Sau khi tách hết xerixin thì sẽ được sợi fibroin rất tinh khiết.

Sợi thu được khi kéo ở kén ra thường có chứa 30% xerixin. Muốn tách xerixin thì phải nấu tơ trong dung dịch xà phòng trong thời gian từ 1,5 - 2 giờ. Chỉ sau khi có sự gia công này, tơ mới bắt đầu kéo chỉ. Một lượng nhỏ xerixin nằm lại ở trên lụa sẽ làm giảm độ đàn hồi của lụa, làm cho lụa bắt màu không đồng đều và khó trang trí trên lụa. Để tách lượng xerixin còn lại đó người ta thường dùng chế phẩm proteaza từ nấm mốc và đặc biệt là từ vi khuẩn.

e) Trong hương phẩm và mỹ phẩm

Các hương mỹ phẩm thường có tác dụng hồi phục các da già và trong một chừng mực nhất định cũng có tác dụng : : trùng. Còn các enzym kiểu keratinaza thì lại có tác dụng làm mềm lông, tóc (vì phân ly được keratin). Vì vậy, hiện nay một số nước người ta đã sản xuất những loại kem có chứa enzym dùng để xoa mặt, xoa tay và cạo râu, ... Dưới tác dụng của proteaza trong kem, các biểu bì của da đã chết sẽ được tách ra, da non và mới sẽ xuất hiện trên bề mặt, đồng thời sự phát triển của lông (tóc) cũng bị chậm lại.

g) Trong công nghiệp y học

Trong công nghiệp y học, các chế phẩm proteaza cũng được sử dụng để sản xuất các môi trường dinh dưỡng hỗn hợp có protein dùng trong nuôi cấy vi khuẩn

và các vi sinh vật khác. Chẳng hạn môi trường dinh dưỡng để nuôi các vi sinh vật sản xuất ra các kháng sinh, chất kháng độc, v.v. Dĩ nhiên các protein có trong môi trường phải ở dạng dễ đồng hóa đối vi sinh vật. Do đó phải thủy phân sơ bộ các protein bằng proteaza của động vật hoặc của vi sinh vật.

Ngoài ra người ta còn dùng các chế phẩm proteaza để cô đặc và tinh chế các huyết thanh kháng độc để chữa bệnh (huyết thanh miễn dịch).

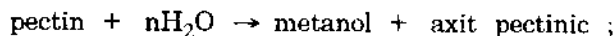
Huyết thanh kháng độc thường được ứng dụng rộng rãi để chữa các bệnh nhiễm trùng nặng và nguy hiểm, các bệnh trẻ con, v.v. Người ta thu được huyết thanh chữa bệnh này từ huyết thanh của máu động vật đã được gây miễn dịch đối với một bệnh nào đó. Trong máu của những động vật như thế có chứa chất kháng độc (kháng thể) có bản chất là protein. Chất kháng độc này trung hòa tác dụng của các vi sinh vật gây bệnh. Để thu và sử dụng các chất kháng độc, người ta lấy máu của động vật và tách huyết thanh ra. Tuy nhiên trong đó vẫn còn chứa nhiều các protein đậm làm giảm nồng độ của chất kháng độc. Do đó khi đưa vào cơ thể người chúng có thể gây ra bệnh. Để tránh hiện tượng đó người ta phải tinh chế huyết thanh khỏi các tạp chất. Dùng chế phẩm proteaza trong trường hợp này rất có hiệu quả. Vì lẽ trong những điều kiện nhất định proteaza sẽ phân hủy các protein đậm mà hầu như không ảnh hưởng đến chất kháng độc.

XI.4.3. Ứng dụng của enzym pectinaza

XI.4.3.1. Đặc điểm của hệ enzym pectinaza ở vi sinh vật

Theo quan điểm hiện đại, trong phức hệ enzym pectinaza có những enzym sau :

- Pectinesteraza (pectaza - 3.1.1.11) phân cắt liên kết este giữa metanol và nhóm cacboxyl của axit galacturonic theo sơ đồ :



- Polygalacturonaza (pectinaza 3.2.1.15) thủy phân liên kết $\alpha - 1,4 - D -$ galactozit giữa các phân tử axit galacturonic trong pectin và trong các axit polygalacturonic khác ;

- Protopectinaza tách araban và galactan khỏi protopectin để tạo thành dẫn xuất methyl của axit polygalacturonic (tức là pectin hòa tan);

- Transeliminaza phân hủy pectin bằng con đường phi thủy phân.

a) Pectinesteraza

Từ canh trường nấm mốc *A. niger*, người ta đã thu được enzym pectinesteraza ở trạng thái đông thể. Và người ta cũng đã xác lập được rằng N - axit cuối trong phân tử enzym là phenylalanin.

Pectinesteraza thủy phân liên kết este trong pectin cũng như trong các axit pectic để tạo thành metanol và axit pectinic.

Pectinesteraza của nấm mốc sẽ thủy phân trước nhất là nhóm metyleste nằm ở giữa hai nhóm cacboxyl tự do. Và enzym sẽ thủy phân lần lượt các liên kết este dọc theo phân tử pectin. Người ta cũng thấy rằng pectinesteraza của nấm mốc thủy phân pectin và các este của axit polygalacturonic sâu sắc hơn pectinesteraza của thực vật. Hoạt độ của pectinesteraza phụ thuộc nhiều vào mức độ este hóa của pectin và tỷ

lệ thuận với mức độ este hóa. Chẳng hạn, đối với tác dụng của pectinesteraza từ nấm mốc *A. niger*, cần thiết phải có pectin este hóa ở mức độ cao không ít hơn 70%.

pH tối ưu của pectinesteraza từ nguồn nấm mốc là 4,5 đến 5,5, còn của chế phẩm đã loại bỏ enzym polygalacturonaza sẽ có pH tối ưu từ 2,0 đến 6,5. Trái lại, pH tối ưu của pectinesteraza từ nguồn thực vật thượng đẳng là từ 6,0 đến 7,5 - 8.

Nhiệt độ tối ưu của pectinesteraza từ nấm mốc là 40 đến 45°C. Từ 55 đến 62°C thì enzym bị vô hoạt, trong khi đó nhiệt độ tối ưu của enzym pectinesteraza từ thực vật thượng đẳng cao hơn : từ 55 - 60°C.

Ion natri và đặc biệt là ion canxi, cũng như clorua của Na, K và Ca sẽ hoạt hóa pectinesteraza từ nấm mốc *Conithyrium diplodiella* và từ *A. niger*. Trái lại các cation hóa trị 3 và 4 (thủy ngân nitrat, chì nitrat, nhôm sulfat, và sắt clorua) sẽ kìm hãm tác dụng của pectinesteraza.

b) Polygalacturonaza

Polygalacturonaza có tên gọi hệ thống là polygalacturonitglucanhydrolaza.

Dựa vào cơ chế tác dụng, có thể chia polygalacturonaza thành ra :

- Endopolygalacturonaza phân cắt các liên kết α - 1,4 ở phía trong phân tử pectin cũng như ở phía trong phân tử axit polygalacturonic ;
- Exopolygalacturonaza có khả năng phân cắt dần dần từng phân tử axit galacturonic một, bắt đầu từ đầu không khử của mạch.

Không những thế, các endo - và exopolygalacturonaza còn thể hiện tính đặc hiệu cao hơn. Một số endo - và exopolygalacturonaza có thể tác dụng được trên pectin đã metyl hóa, do đó có tên là endo - hay exopolymethylgalacturonaza. Một số khác chỉ có khả năng phân cắt những cơ chất pectin đã mất hết nhóm metyl, nghĩa là chỉ tác dụng trên axit pectinic (axit polygalacturonic). Do đó mà có tên gọi là endo - hay exopolygalacturonaza.

Endopolygalacturonaza cũng có tên nữa là polygalacturonaza dịch hóa. Còn exopolygalacturonaza thì có tên là polygalacturonaza đường hóa.

Các sản phẩm trung gian của quá trình thủy phân pectin bởi polygalacturonaza có thể là các axit penta -, tetra -, tri - và digalacturonic.

pH tối ưu của các polygalacturonaza cũng khác nhau, phụ thuộc vào nguồn thu và cơ chất. Chẳng hạn polygalacturonaza dịch hóa (endopolygalacturonaza) khi tác dụng trên axit pectinic thì pH tối ưu nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5. Cũng enzym đó, nhưng khi tác dụng trên pectin thì lại có pH tối ưu trong khoảng 5,5 đến 6,0. Còn polygalacturonaza đường hóa khi tác dụng trên pectin thì có pH tối ưu từ 3 đến 4, nhưng khi tác dụng trên axit pectinic thì pH tối ưu cao hơn một ít : từ 4,4 đến 4,6.

Các polygalacturonaza chủ yếu bền vững ở trong vùng pH từ 4,0 - 6,0.

Polygalacturonaza đường hóa từ *A. niger* nếu được hoạt hóa bằng thủy ngân thì có thể bền vững khi pH 2,5.

Nhiệt độ tối ưu của đa số polygalacturonaza : nằm trong khoảng từ 40 - 45°C. Trong khoảng nhiệt độ đó, chúng thường bền vững, những sẽ bị vô hoạt khi ở nhiệt độ 50°C và 55 - 65°C.

Các polygalacturonaza cũng như pectinesteraza đều được hoạt hóa bởi các cation của kim loại kiềm cũng như cation amon.

c) Transeliminaza

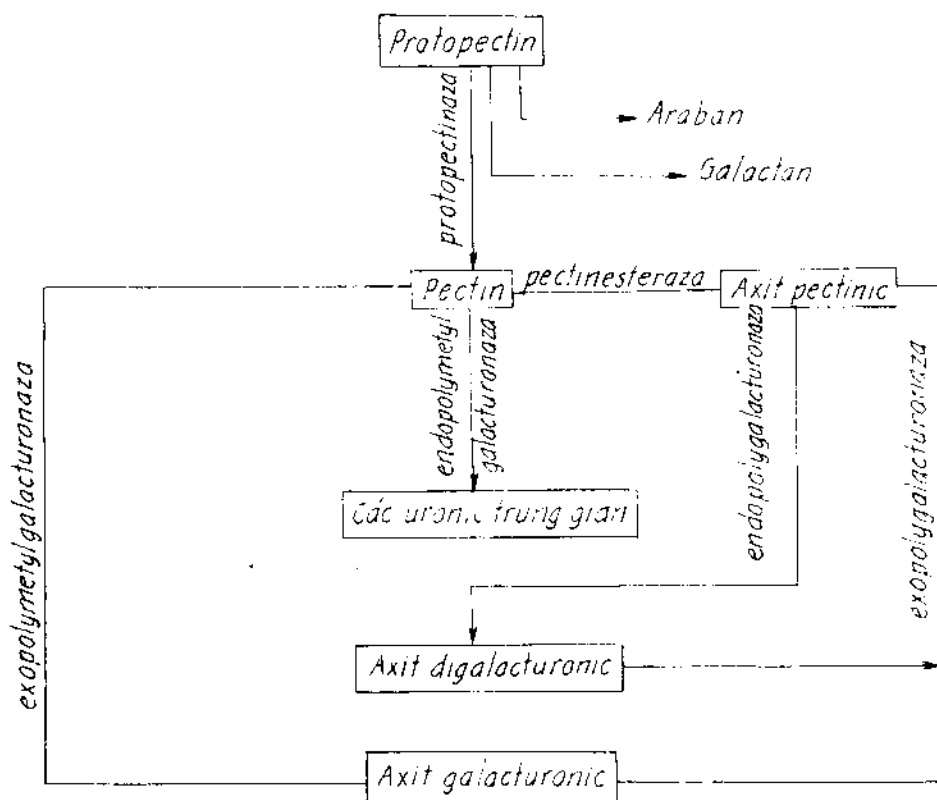
Transeliminaza có khả năng làm đứt liên kết $\alpha - 1,4$ của phân tử pectin bằng con đường khác: con đường phi thủy phân, kết quả là tạo ra các đơn phân galacturonic có chứa nối đôi (4 - deoxy - 5 - xetogalacturonic).

Transeliminaza cũng có tính đặc hiệu cao, do đó người ta phân biệt các transeliminaza sau :

- endopectintranseliminaza ;
- exopectintranseliminaza ;
- endopectinic- transeliminaza ;
- exopectinic- transeliminaza.

Transeliminaza từ những nguồn khác nhau thì có cơ chế tác dụng và các thuộc tính khác nhau. Chẳng hạn, transeliminaza từ *Bac. polymyxa* tác dụng được trên uronit cao, nhưng không tác dụng được trên axit trigalacturoic, transeliminaza từ nấm mốc hoạt động tối ưu ở pH 5,2 trái lại transeliminaza từ vi khuẩn hoạt động tối ưu ở pH từ 7,0 đến 8,5.

Mối quan hệ giữa cơ chất và các enzym có thể minh họa bằng sơ đồ trong hình 11.14.



Hình 11.14

Người ta thường thu pectinaza từ canh trường bề mặt hoặc từ canh trường bề sâu của nấm mốc. Các vi khuẩn và nấm men cũng tổng hợp được enzym này. *A. niger* chủ yếu là tổng hợp ra pectinnesteraza. *Con. diplodiella*, *Pen. citrinum* tạo ra chủ yếu là polygalacturonaza. Nấm men *Sacch. fragilis* dường như chỉ tạo ra endopolygalacturonaza. Vi khuẩn *Bac. polymyxa*, *Bac. species* lại chủ yếu là tạo ra transeliminaza.

XI.4.3.2. Ứng dụng của pectinaza

Trong sản xuất thực phẩm, người ta thường sử dụng các chế phẩm pectinaza dưới dạng tinh khiết. Người ta không dùng chế phẩm dưới dạng canh trường nấm mốc sấy khô. Tỷ lượng chế phẩm pectinaza có đặc trên lượng nguyên liệu đem chế biến vào khoảng từ 0,03 – 0,05 đến 0,10%.

Pectinaza thường được sử dụng trong các ngành công nghiệp thực phẩm sau :

- sản xuất rượu vang ;
- sản xuất nước quả và nước uống không có rượu ;
- sản xuất các mật hàng từ quả : nước quả cô đặc, mứt nhừ, mứt đông, ... ;
- sản xuất nước giải khát ;
- sản xuất cà phê và cà phê hòa tan.

Trong sản xuất rượu vang, cũng như trong sản xuất nước quả và các nước uống không rượu, đều có thể sử dụng pectinaza một cách rất hiệu quả. Nhờ tác dụng của pectinaza mà các quá trình ép, làm trong và lọc dịch quả rất dễ dàng, do đó làm tăng hiệu suất của sản phẩm. Chẳng hạn đưa pectinaza vào khâu nghiền quả, sẽ làm tăng hiệu suất nước quả sau khi ép lên tới 15 – 25%. Bởi lẽ khi có pectin thì khối quả nghiền sẽ có trạng thái keo, do đó khi ép dịch quả không thoát ra được. Nhờ pectinaza phân giải các chất pectin đi mà dịch quả trong suốt không bị vẩn đục và lọc rất dễ dàng. Không những vậy, enzym pectinaza còn góp phần chiết rút được các chất màu, tanin và những chất hòa tan nữa, do đó làm tăng thêm chất lượng của thành phẩm.

Trong sản xuất các mật hàng từ quả (mứt nhừ, mứt đông, ...) pectinaza cũng có vai trò quan trọng. Nhờ pectinaza mà có thể thu được dịch quả có nồng độ đậm đặc. Chẳng hạn như dịch táo cô đặc đến 72 độ Brix, nếu không tách các pectin tự nhiên chứa trong đó đi thì sản phẩm sẽ bị keo tụ một cách mạnh mẽ và không thể cô đặc hơn nữa. Đa số trường hợp, người ta khử pectin đi, sau đó mới lọc rồi cô đặc, nhưng đôi khi người ta cho pectinaza tác dụng trong suốt thời gian cô đặc.

Trong sản xuất cà phê, người ta dùng pectinaza để tách lớp keo ở trên bề mặt của hạt cà phê. Trước đây người ta dùng ngay vi sinh vật để làm công việc này, nhưng thường quá trình xảy ra không đồng đều và khó kiểm tra. Hiện nay người ta thường dùng các chế phẩm pectinaza

XI.4.4. Ứng dụng của enzym xellulaza

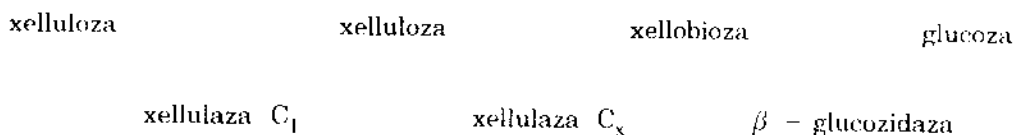
XI.4.4.1. Đặc điểm chung của xellulaza từ nguồn vi sinh vật

Xelluloza rất phổ biến trong tự nhiên. Hàng năm lượng xelluloza do thực vật tổng hợp nên là 10^{11} tấn. Nếu như sự tàn tạo ra xelluloza là do cây xanh thì sự

phân hủy xelluloza lại chủ yếu là do vi sinh vật. Do đó mà quá trình phân hủy xelluloza bằng các enzym từ vi sinh vật có một ý nghĩa lớn về lý thuyết cũng như về thực tế. Bởi lẽ do vi sinh vật phân hủy xelluloza mà hàng năm bầu khí quyển của trái đất được bổ sung đầy đủ lượng CO_2 cần thiết cho sự sống.

Như chúng ta đã thấy ở chương IV, xelluloza là polyanhydroglucoza có mức độ trùng hợp khoảng 14 000, (trong sợi bông xelluloza có mức độ trùng hợp khoảng 10 000, trong gỗ xelluloza có mức độ trùng hợp từ 600 đến 1 000) và có dạng sợi. Nhiều phân tử xelluloza liên kết lại với nhau thành chùm gọi là mixen nhờ nối cầu hydro. Mỗi mixen thường có khoảng 60 phân tử xelluloza. Sợi xelluloza không hòa tan chính là do các phân tử xelluloza sắp xếp song song và sát lại với nhau và phía ngoài được bao bằng lớp vỏ chung có chứa sáp và pectin.

Nghiên cứu cấu trúc bằng Kontgen, người ta thấy rằng trong xelluloza có xen kẽ các phần tinh thể và vô định hình. Ở những phần tinh thể, các mạch xelluloza



kết với nhau theo một trật tự đều đặn nhờ liên kết hydro nối nhóm hydroxyl thứ nhất của mạch này với nhóm hydroxyl ở cacbon thứ ba của mạch khác. Còn ở những phần vô định hình thì các mạch tập hợp lại với nhau nhờ lực Van der Waals.

Xellulaza chính là phức hệ hydrolaza gồm từ xellulaza C_1 đến xellulaza C_x và β - glucosidaza. Cơ chế tác dụng của phức hệ xellulaza như sau :

Ở giai đoạn đầu dưới ảnh hưởng của enzym C_1 , những mảnh polyanhydroglucoza có kích thước lớn được tách ra khỏi xelluloza không hòa tan ban đầu. Sau đó dưới tác dụng của enzym C_x , mảnh vừa được tạo thành sẽ bị phân ly thành các oligosacarit có độ dài khác nhau cho đến xellobioza. Người ta đã biết một số enzym C_x : một số thủy phân được polysacarit từ một đầu, số khác thủy phân được ở giữa mạch. Người ta cho rằng giữa C_1 và C_x còn có enzym C_2 thủy phân được xelluloza đã bị biến đổi, nhưng vẫn còn không hòa tan. Như vậy xellulaza C_1 tác dụng trên xelluloza nguyên thủy (ví dụ như bông), xellulaza C_2 tác dụng trên xelluloza đã bị biến hình nhưng vẫn không hòa tan (ví dụ như giấy lọc) xellulaza C_x thì tác dụng trên xellobiozơ hòa tan hoặc các dẫn xuất hòa tan (ví dụ, cacboxymetyl xelluloza), còn xellobioza thì tác dụng trên các disacarit xellobioza để tạo ra glucoza.

Phức hệ xellulaza nhiều cấu tử đã được tách ra từ nấm *Myrothecium verrucaria*. Bằng phương pháp điện di, người ta thấy phức hệ xellulaza này gồm sáu cấu tử, nhưng chỉ có ba cấu tử có khả năng thủy phân được xelluloza nguyên thủy (sợi bông) và xelluloza hòa tan. Ở nấm *Polyporus versicolor* thì phức hệ xellulaza có bốn cấu tử trong đó một là β - glucosidaza. Các enzym này khác nhau về khối lượng phân tử, về tính đặc trưng và về vận tốc tác dụng trên xelluloza. Từ nấm *Trichoderma viride*, người ta đã tách ra được phức hệ xelluloza có các cấu tử sau : hydroxellulaza có khả năng phân hủy xellulaza tinh thể để tạo thành xellobioza, endoglucanaza thì tác dụng trên các mạch xelluloza vô định hình tương đối dài, còn exoglucanaza thì thủy phân các sản phẩm tạo ra do enzym thứ nhất và thứ hai.

Các xelluloza là những glucoprotein. Gluxit thường gặp trong xelluloza là manozo.

Các xellulaza của nấm *Pen. notatum* giàu các axitamin tính axit và axitamin vòng. Axitamin có N cuối và C cuối là alanin. Thành phần axitamin của các chế phẩm II, III và IV của *Tricoderma viride* tương tự nhau và có chứa nhiều các axitamin axit và chứa ít các axitamin kiềm và axitamin chứa lưu huỳnh. Đường trung tính và glucozaamin chiếm khoảng 10 - 15% gluxit.

Tính đặc hiệu của các xellulaza trên các liên kết glucosit rất rộng rãi : chúng có thể thủy phân được xilan ($\beta - 1,4$) glucomanan ($\beta - 1,4$), lichenin ($\beta - 1,3$ và $\beta - 1,4$) polysacarit của mật ($\alpha - 1,2$), laminarin ($\beta - 1,3$), lutean ($\beta - 1,6$).

XI.4.4.2. Ứng dụng của enzym xellulaza từ vi sinh vật

Các chế phẩm xellulaza thường được sử dụng để :

a) Tăng chất lượng các sản phẩm thực phẩm và thức ăn gia súc

Chúng ta đều biết, xelluloza là hợp phần quan trọng của vỏ tế bào thực vật. Các nguyên liệu thực phẩm có nguồn gốc thực vật nếu được gia công bằng chế phẩm xellulaza sẽ được mềm ra, sẽ tăng hệ số đồng hóa và nói chung chất lượng được tăng lên. Do đó sẽ rất bổ ích khi chuẩn bị các thức ăn đặc hiệu cho trẻ con, cho người ăn kiêng cũng như khi chế biến thức ăn gia súc.

b) Tăng hiệu suất trích ly các chất khác nhau từ nguyên liệu thực vật

Protein, axitamin, vitamin từ đậu tương, thạch từ rong, tinh bột từ bã, chất thơm và chất hòa tan khi sản xuất chè xanh và cà phê hòa tan.

Chẳng hạn trong sản xuất bia dưới ảnh hưởng của phức hệ enzym xitaza (chủ yếu gồm bốn enzym xellulaza, hemixellulaza, enzym thủy phân chất gồm và enzym xellobiaza, ...) thành tế bào của hạt đại mạch bị phá hủy khiến cho các enzym proteaza và amilaza tác dụng được dễ dàng với protein và tinh bột chứa trong hạt đại mạch. Khi đó, lượng đường, dextrin và các chất hòa tan khác tăng lên, tạo điều kiện để khi gia nhiệt sau này hình thành nên các phẩm vật có màu và có mùi thơm đặc trưng của malt và của bia.

Rong biển nếu được gia công bằng chế phẩm xellulaza thì hiệu suất thạch sẽ được tăng lên.

Người ta cũng thấy, do ảnh hưởng của enzym hemixellulaza mà các chất mật, gồm, ... vốn không bị tác dụng của pectinaza cũng bị thủy phân một cách mạnh mẽ, nên kết quả là ngăn cản được sự gelatin hóa khi chế biến các dạng cà phê cô đặc.

c) Thủy phân gỗ và phế liệu gỗ

Các phế liệu này rẻ tiền và có thể dùng chế phẩm xellulaza để thủy phân thành các đường đơn giản có thể chế biến làm thức ăn gia súc.

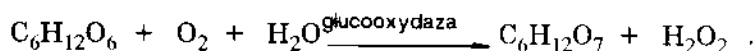
Enzim xellulaza phổ biến rộng rãi trong các nấm hiển vi và vi khuẩn.

Trong đa số trường hợp, người ta thu chế phẩm xellulaza từ canh trường bé mặt của nấm mốc *A. oryzae* và *A. awamori*.

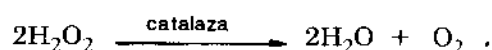
XI.4.5. Ứng dụng của enzym glucooxydaza

XI.4.5.1. Cơ chế tác dụng của enzym glucooxydaza

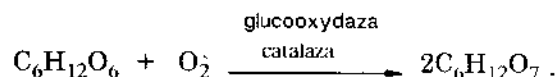
Glucooxydaza thu được từ nấm mốc, khi có mặt oxy sẽ chuyển glucoza thành axit gluconic và H_2O_2 . Glucooxydaza có tính đặc hiệu cao và chỉ oxy hóa $\beta - D -$ glucoza :



Trong chế phẩm thương mại của glucooxydaza từ nấm mốc thường có mặt cả catalaza, do đó người ta xem như trong chế phẩm có phức hệ glucooxydaza - catalaza.

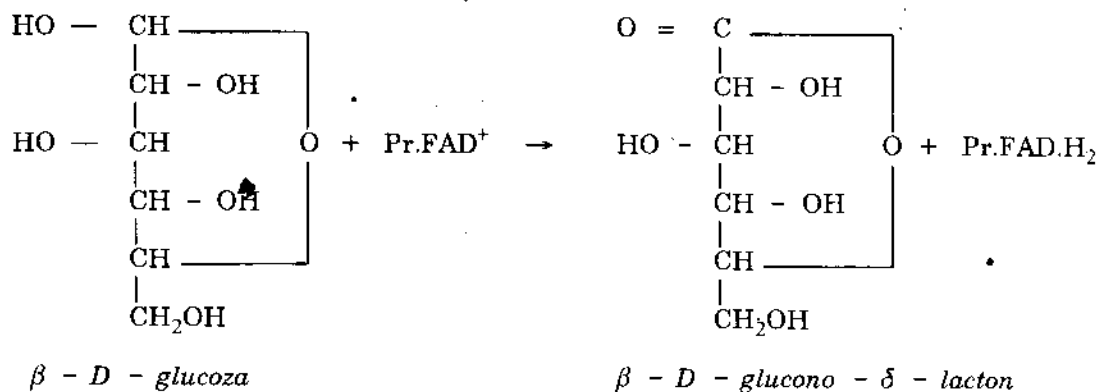


Phương trình tổng quát :

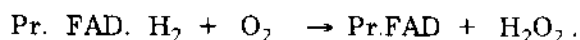


Glucooxydaza là một flavoprotein (protein phức tạp) trong đó phần protein liên kết với hai phân tử coenzim flavinadeninindinucleotit (viết tắt FAD). Cơ chế tác dụng của nó như sau :

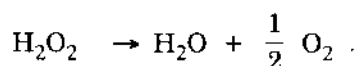
Đầu tiên, nó xúc tác sự tách hai nguyên tử hydro ở cacbon thứ nhất của glucoza để tạo thành glucono - lacton :



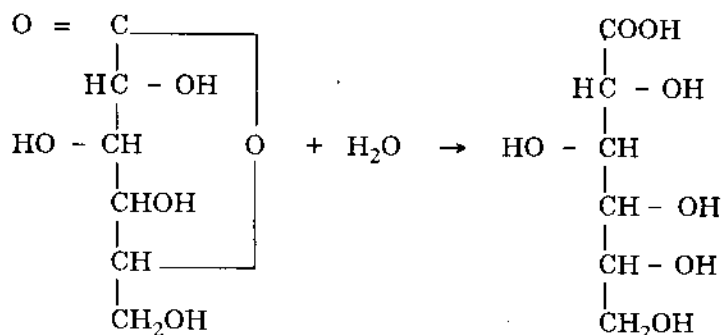
Flavin khử sẽ tác dụng với oxy của không khí để tạo thành H_2O_2 :



Đối với tế bào sống, H_2O_2 là chất độc nên sẽ bị chuyển hóa ngay thành oxy và nước :



Còn $\beta - D -$ glucono - σ - lacton sẽ kết hợp nước và phân ly một cách ngẫu nhiên thành axit gluconic :



axit gluconic

Thường người ta thu chế phẩm glucooxydaza từ nấm mốc nòi *Penicilium* và *Aspergillum* như *A. niger*, *Pen. notatum*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. vitale*.

XI.4.5.2. Ứng dụng của enzym glucooxydaza

Từ phương trình phản ứng trên, chúng ta thấy glucooxydaza có thể dùng với hai mục đích chính : để oxy hóa glucoza và để liên kết oxy. Phạm vi ứng dụng của nó khá rộng rãi. Có thể dùng chế phẩm glucooxydaza để :

- Ngăn ngừa các sản phẩm thực phẩm khỏi bị oxy hóa (tách oxy của chúng) ;
- Ngăn ngừa các sản phẩm khỏi bị biến đổi xấu đi bằng cách oxy hóa trước các glucoza có trong sản phẩm đó ;
- Làm thuốc thử trong hóa phân tích ;
- Sử dụng tính chất kháng sinh của protein của glucooxydaza trong y học.

Glucooxydaza có ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất bột trứng. Người ta thấy rằng, nếu trong bột trứng có chứa glucoza thì trong quá trình chế biến cũng như khi bảo quản, glucoza sẽ tương tác với protein và sẽ bị oxy hóa dần dần để tạo nên những phẩm vật có màu sẫm và có mùi khó chịu, làm cho chất lượng thành phẩm bị giảm sút. Trong albumin trứng thường có chứa 3% glucoza còn trong lòng đỏ trứng thì có khoảng 0,5% glucoza (so với chất khô). Vì vậy, trong sản xuất bột trứng và albumin trứng, người ta phải dùng glucooxydaza để oxy hóa trước các glucoza đó, khiến những quá trình trên không xảy ra, đồng thời cũng tăng được thời gian bảo quản các sản phẩm trứng.

Glucooxydaza cũng được dùng để liên kết các oxy có trong thành phần hoặc trên bề mặt của sản phẩm thực phẩm. Trong sản xuất bia, rượu vang, dầu béo, phomat, sữa khô và công nghiệp thịt, ..., có thể ứng dụng glucooxydaza theo phương hướng này.

Trong sản xuất bia, người ta dùng glucooxydaza để ổn định thành phần. Ở nhiệt độ phòng bia chưa được thanh trùng sẽ bị đục sau 10 - 15 ngày bảo quản do nấm mốc và vi khuẩn phát triển. Nếu cho một ít chế phẩm glucooxydaza vào bia (1 g/200 - 250 l) thì sẽ tách hết oxy có trong chất lỏng cũng như trong cả khoảng không gian tự do, kết quả là tính chất cảm quan của sản phẩm sẽ được bảo đảm trong thời gian từ 50 - 100 ngày.

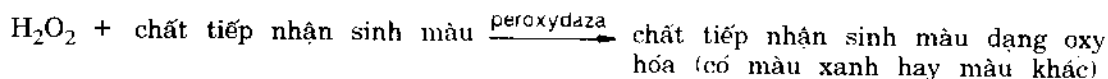
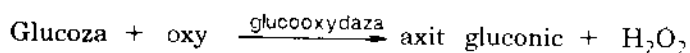
Để bảo quản các sản phẩm dạng lỏng người ta có thể hòa tan vào đó glucooxydaza cùng với một ít glucoza trước khi bao gói. Khi đó tất cả oxy dư trong sản phẩm sẽ được tách hết.

Nhờ glucooxydaza, có thể bảo vệ được nhiều sản phẩm thực phẩm khỏi bị oxy hóa ngoài bề mặt. Thịt, cà phê, phomat có thể bảo vệ khỏi bị oxy hóa bằng enzym này. Phomat được gói trong một màng đặc biệt có tẩm glucooxydaza, sẽ ngăn ngừa được sự xâm nhập của oxy, sự biến đổi do oxy hóa và sự tạo màu xám ở lớp bề mặt. Còn thịt nếu được bọc trong giấy trang kim tẩm enzym cũng sẽ bảo vệ được màu sắc tự nhiên của nó.

Gần đây, người ta chú ý đến một cách bảo quản được lâu dài (và cả vận chuyển) các vật liệu dễ bị oxy hóa ở trạng thái khô bằng "túi khử oxy". "Túi khử oxy" được chuẩn bị bằng cách cho một ít glucoza, chế phẩm glucooxydaza - catalaza và dung dịch đệm cần thiết vào trong một túi polyetylen (hay bằng vật liệu khác) chỉ để cho oxy và không khí đi qua mà không cho nước đi qua. Đoạn đặt túi vào trong hộp, thùng kín có chứa các sản phẩm cần bảo quản. Túi đó sẽ hấp thụ hoàn toàn oxy có trong hộp hoặc trong thùng, do đó vật liệu được bảo quản trong môi trường không có oxy. Sữa khô, các mặt hàng kẹo, bơ có thể bảo quản được lâu dài nhờ túi khử oxy này.

Ngoài ra ngoài ta còn dùng "túi khử oxy" này để bảo vệ các chi tiết máy tinh vi và các thiết bị khỏi bị han gỉ và ăn mòn.

Nhờ glucooxydaza có tính đặc hiệu cao (chỉ oxy hóa β - glucoza) nên người ta có thể dùng nó làm thuốc thử để xác định glucoza trong các hỗn hợp đường phức tạp và trong các hệ thống sinh học. Nguyên tắc của phương pháp dựa trên phương trình phản ứng dưới đây :



Chất tiếp nhận sinh màu có thể dùng là octotoluidin, hay octodianizin.

Phương pháp này rất có giá trị để chẩn đoán nhanh chóng một số bệnh trong y học.

Để biết lượng glucoza trong dịch sinh học một cách nhanh chóng, người ta có thể dùng giấy chỉ thị (kiểu giấy pH tẩm dung dịch hai enzym. Đoạn nhúng dài giấy vào dịch sinh học (nước tiểu) nếu có chứa glucoza thì sau 1 - 2 phút sẽ xuất hiện màu xanh.

Tài liệu tham khảo

1. Trần Thị Ân, Lê Doãn Diên, Đặng Hạnh Phúc, Nguyễn Thị Thịnh, Lê Ngọc Tú, Phạm Đình Thái. Sinh hóa đại cương. Nhà xuất bản đại học và trung học chuyên nghiệp, 1973.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng. Hóa sinh học. Nhà xuất bản giáo dục, 1992.
3. Lê Ngọc Tú, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Ngô Hữu Hợp, Đặng Thị Thu, Nguyễn Trọng Cẩn. Hóa học thực phẩm. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 1994.
4. Alais C., Linden G. Biochimie alimentaire. Masson, Paris, 1987.
5. Adler - Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier applied science Publisher, London and New York, 1986.
6. Botto B., Breton A., Fevre M., Guy P., Larpent J.P và Veau P. Moisissures utiles et nuisibles. Collection biotechnologies, Masson. Paris, 1985.
7. Cheftel J.C., Cheftel H. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Technique et documentation, Paris, 1993.
8. Cheftel J.C., Cuq J.L., Lorient D. Proteines alimentaires. Technique et documentation. Lavoisier, Paris, 1985.
9. Forgarty W.M. Microbial enzymes and biotechnology. Applied science Publisher, London, 1983.
10. Kruger J.E., Lineback D., Stauffer C.E. Enzymes and their role in cereal technology. American association of cereal chemists, Saint - Paul, 1987.
11. Lenniger A. Biochemistry. Nhà xuất bản thế giới, Moscova, 1974.
12. Leveau J.Y., Scriban R. Biotechnologie. Technique et documentation - Lavoisier, Paris, 1984.
13. Motoki M., Nio N., Takinami K. Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. Agric. Biol. Chem. 48, 1257 - 1201, 1984.
14. Pullman B. and Pullman A. Quantum biochemistry. Nhà xuất bản thế giới, Moscova, 1965.
15. Slonimski P.P. La formation des enzymes respiratoires chez la levure. Masson and co Edt., Paris, 1963.
16. Thebaudin J.Y. Caractérisation biochimique des hydrolysats et étude de leurs propriétés fonctionnelles. Thèse de docteurs - sciences, Université de Nantes, 1990.
17. Weil J.H. Biochimie générale. Masson, Paris, 1987.

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
CHƯƠNG I. ENZIM	5
I.1. Cấu tạo hóa học của enzym	5
I.2. Tính chất của enzym	9
I.3. Cơ chế tác dụng của enzym	12
I.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến vận tốc phản ứng enzym	15
I.5. Cách gọi tên và phân loại enzym	28
I.6. Phương pháp xác định độ hoạt động của enzym	32
I.7. Phương pháp tách và làm sạch enzym	34
I.8. Enzim không tan	36
CHƯƠNG II. CÁC PHẢN ỨNG ENZIM PHỔ BIẾN TRONG SẢN XUẤT THỰC PHẨM	46
II.1. Phản ứng thủy phân bởi enzym	46
II.2. Phản ứng oxy hóa - khử sinh học	52
CHƯƠNG III. PROTEIN	92
III.1. Vai trò và giá trị của protein trong dinh dưỡng và trong công nghệ thực phẩm	92
III.2. Cấu tạo phân tử protein	94
III.3. Một số tính chất quan trọng của protein	105
III.4. Phân nhóm protein	115
III.5. Các biến đổi của protein có ứng dụng vào công nghệ thực phẩm	121
III.6. Các biến đổi của protein trong quá trình sản xuất và bảo quản thực phẩm	124
CHƯƠNG IV. GLUXIT	129
IV.1. Monosacarit	130
IV.2. Polysacarit	143
IV.3. Khả năng chuyển hóa của gluxit	159
CHƯƠNG V. LIPIT	175
V.1. Lipit đơn giản	176
V.2. Lipit phức tạp	186
V.3. Khả năng chuyển hóa của lipit	194
V.4. Tổng hợp lipit	205
CHƯƠNG VI. VITAMIN	210
VI.1. Các vitamin tan trong chất béo	211
VI.2. Các vitamin tan trong nước	222
VI.3. Các loại vitamin ít nghiên cứu	243
VI.4. Vitamin và thực phẩm	246

CHƯƠNG VII. CÁC CHẤT MÀU	249
VII.1. Ý nghĩa của các chất màu trong sản xuất thực phẩm	249
VII.2. Các chất màu tự nhiên	249
VII.3. Các chất màu hình thành trong quá trình gia công kỹ thuật	259
VII.4. Một số chất màu tự nhiên và tổng hợp dùng trong thực phẩm	284
CHƯƠNG VIII. CÁC CHẤT THƠM	289
VIII.1. ý Nghĩa của các chất thơm trong sản xuất thực phẩm	289
VII.2. Vài nét về mùi	289
VIII.3. Các chất mùi tự nhiên	293
VIII.4. Các chất thơm hình thành nên trong quá trình gia công kỹ thuật	299
VIII.5. Các chất thơm tổng hợp	302
VIII.6. Các hình thơm (tổ hợp thơm)	304
CHƯƠNG IX. HÓA SINH HỌC CÁC QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN VÀ CHẾ BIẾN NGŨ CỐC	308
IX.1. Sơ lược về cấu tạo và thành phần hóa học của một số loại ngũ cốc	308
IX.2. Hoạt động sinh lý của hạt ngũ cốc và của các sản phẩm đã chế biến trong quá trình bảo quản	312
IX.3. Sự thay đổi thành phần hóa học của hạt ngũ cốc trong quá trình chế biến ra gạo và bột	319
IX.4. Những biến đổi hóa sinh trong quá trình chế biến nước nhiệt các loại hạt ngũ cốc	322
IX.5. Những biến đổi hóa sinh trong quá trình sản xuất bánh mì	325
IX.6. Những biến đổi hóa sinh của hạt gạo trong quá trình nấu	327
CHƯƠNG X. HÓA SINH HỌC CÁC QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT LÊN MEN	329
X.1. Khái niệm chung	329
X.2. Bản chất của các quá trình lên men	330
X.3. Điều kiện của các quá trình lên men	344
X.4. Các quá trình lên men	348
CHƯƠNG XI. HÓA SINH HỌC CÁC QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT VÀ SỬ DỤNG CÁC CHẾ PHẨM ENZIM	390
XI.1. Nguồn nguyên liệu để thu enzim	391
XI.2. Sinh tổng hợp enzim bằng vi sinh vật	393
XI.3. Phương pháp thu các chế phẩm enzim	409
XI.4. ứng dụng các chế phẩm enzim	422
Tài liệu tham khảo	441

LÊ NGỌC TÚ (*chủ biên*)

HÓA SINH CÔNG NGHIỆP

Chịu trách nhiệm xuất bản :

PGS, TS. TÔ DĂNG HẢI

Biên tập :

NGUYỄN KIM ANH

Vẽ bìa :

HƯƠNG LAN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

70 TRẦN HUNG ĐẠO, HÀ NỘI

6 . 6C8

KHKT – 2002

In 1000 cuốn, khổ 19 x 27cm. Tại số 2 Phạm Ngũ Lão, XN in 15.

Số XB: 1380 - 18/CXB

In xong và nộp lưu chiểu quý II năm 2002

202025



Giá: 62.000đ