

www.mientayvn.com

Dịch tiếng anh chuyên ngành khoa học tự nhiên và kỹ thuật.

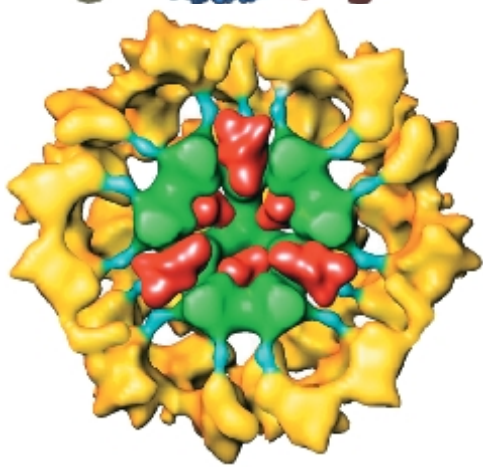
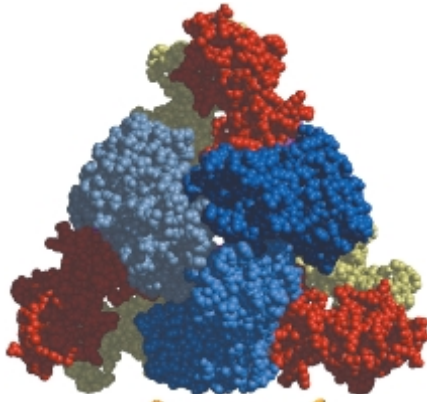
Dịch các bài giảng trong chương trình học liệu mở của học viện MIT, Yale.

Tìm và dịch tài liệu phục vụ cho sinh viên làm seminar, luận văn.

Tại sao mọi thứ đều miễn phí và chuyên nghiệp ???

Trao i tr c tuy n t i:

www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



Lời nói đầu

Trong cơ thể sống, hầu như không có một quá trình hóa học nào lại không có liên quan mật thiết đến các quá trình sinh học do các enzyme xúc tác. Có thể nói rằng sự sống gắn liền với enzyme.

Ngoài một nhóm nhỏ phân tử RNA có hoạt tính xúc tác, các enzyme đều có bản chất protein; chúng bảo đảm cho các quá trình chuyển hóa các chất trong cơ thể sống tiến hành với tốc độ nhịp nhàng, cân đối, theo những chiều hướng xác định.

Enzyme học (Enzymology) là một môn học có vị trí then chốt trong hóa sinh đang phát triển mạnh mẽ và xâm nhập vào rất nhiều ngành khoa học, đặc biệt thu hút sự chú ý của các nhà sinh học và sinh y học vì những hiểu biết cơ bản về enzyme có liên quan mật thiết đến sinh học phân tử và y học phân tử và là những kiến thức cơ bản rất quan trọng của sinh học và sinh y học.

Giáo trình nhằm cung cấp cho sinh viên các ngành, chuyên ngành liên quan đến sinh học trong Đại học Huế những kiến thức cơ bản về enzyme - chất xúc tác sinh học.

Cuốn sách được biên soạn theo chương trình giáo dục đại học đã được Đại học Huế phê duyệt, bởi tập thể tác giả trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Sách này cũng có thể dùng làm tài liệu tham khảo cho sinh viên các trường khác, những người chuẩn bị thi tuyển sau đại học cũng như các cán bộ nghiên cứu liên quan.

Các tác giả xin cảm ơn những đồng nghiệp đã góp nhiều ý kiến bổ ích trong quá trình biên soạn. Đặc biệt các tác giả xin chân thành cảm ơn GS.TSKH Lê Doãn Diên-Giám đốc Trung tâm Tư vấn Đầu tư Nghiên cứu phát triển Nông thôn Việt Nam (INCEDA), Chủ tịch Hội Hóa sinh Việt Nam đã nhận phản biện và cho rất nhiều những lời khuyên quý báu nhằm hoàn thiện giáo trình.

Với thời gian biên soạn và kinh nghiệm còn hạn chế, cuốn sách còn chưa thật đầy đủ và chắc chắn không thể tránh khỏi nhiều thiếu sót. Chúng tôi rất mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp của các bạn đồng nghiệp, sinh viên và bạn đọc để lần xuất bản sau sẽ được hoàn thiện hơn.

Thay mặt các tác giả
Chủ biên
PGS.TS. Đỗ Quý Hai

Mục lục

	Trang
Lời nói đầu	3
Chương 1 Mở đầu	7
1.1. Định nghĩa enzyme	7
1.2. Lược sử nghiên cứu enzyme	7
1.2.1. Giai đoạn 1	7
1.2.2. Giai đoạn 2	8
1.2.3. Giai đoạn 3	9
1.2.4. Giai đoạn 4	12
1.3. Phương hướng nghiên cứu enzyme	14
1.4. Những vấn đề cần đề cập khi nghiên cứu enzyme	16
1.5. Vấn đề nghiên cứu enzyme ở nước ta	17
Tài liệu tham khảo	18
Chương 2 Phương pháp nghiên cứu enzyme	19
2.1. Những nguyên tắc chung khi nghiên cứu enzyme	19
2.2. Tách và làm sạch (tinh chế) enzyme	21
2.2.1. Chọn nguồn nguyên liệu	21
2.2.2. Chiết rút enzyme	26
2.2.3. Các phương pháp tách từng phần protein enzyme	28
2.2.4. Kết tinh protein enzyme	38
2.2.5. Đánh giá tính đồng thể của protein enzyme	39
2.3. Hoạt độ enzyme	41
2.3.1. Phương pháp xác định hoạt độ enzyme	41
2.3.2. Đơn vị hoạt độ enzyme	41
Tài liệu tham khảo	4
	43
Chương 3 Cách gọi tên và phân loại enzyme	44
3.1. Cách gọi tên enzyme	44
3.2. Phân loại enzyme	44

3.2.1.	Các lớp enzyme	44
3.2.2.	Các phản ứng enzyme	46
	Tài liệu tham khảo	51
Chương 4	Cấu trúc phân tử enzyme	52
4.1.	Bản chất hóa học của enzyme	52
4.2.	Thành phần cấu tạo của enzyme	53
4.3.	Cấu trúc bậc 4 của enzyme	54
4.4.	Trung tâm hoạt động của enzyme	56
4.5.	Phương pháp thăm dò và phát hiện các nhóm chức năng trong trung tâm hoạt động của enzyme	57
4.5.1.	Phương pháp dùng chất ức chế	58
4.5.2.	Phương pháp đánh dấu bằng cơ chất đặc hiệu hoặc coenzyme	59
4.5.3.	Xác định trị số pK của các nhóm hoạt động	60
4.5.4.	Nghiên cứu cấu trúc phân tử	60
4.6.	Các dạng phân tử của enzyme	61
4.7.	Phức hợp multienzyme	62
	Tài liệu tham khảo	63
Chương 5	Tính đặc hiệu của enzyme	64
5.1.	Khái niệm chung	64
5.2.	Các hình thức đặc hiệu	64
5.2.1.	Đặc hiệu kiểu phản ứng	64
5.2.2.	Đặc hiệu cơ chất	64
	Tài liệu tham khảo	68
Chương 6	Cơ chế tác dụng của enzyme	69
6.1.	Cơ chế của phản ứng có xúc tác nói chung	69
6.2.	Cơ chế của xúc tác enzyme	69
	Tài liệu tham khảo	73

Chương 7	Động học Enzyme	74
7.1.	Ý nghĩa của việc nghiên cứu động học enzyme	74
7.2.	Động học các phản ứng enzyme	74
7.2.1.	Ảnh hưởng của nồng độ enzyme	74
7.2.2.	Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất [S]	75
7.2.3.	Ảnh hưởng của chất kìm hãm (inhibitor)	79
7.2.4.	Ảnh hưởng của chất hoạt hóa (activator)	9
7.2.5.	Ảnh hưởng của nhiệt độ	87
7.2.6.	Ảnh hưởng của pH	88
7.2.7	Các yếu tố khác	89
	Tài liệu tham khảo	91
Chương 8	Sinh học enzyme	92
8.1	Sự phân bố enzyme trong tế bào	92
8.2	Điều hòa hoạt độ và số lượng của enzyme trong tế bào	94
8.2.1	Điều hòa hoạt độ enzyme	94
8.2.2	Điều hòa sinh tổng hợp enzyme	101
	Tài liệu tham khảo	108
Chương 9	Công nghệ enzyme và ứng dụng	109
9.1.	Công nghệ enzyme	109
9.1.1.	Enzyme với công nghệ sinh học	109
9.1.2.	Công nghệ sản xuất enzyme	109
9.2.	Ứng dụng	111
9.2.1.	Ứng dụng trong y dược	111
9.2.2.	Ứng dụng trong hóa học	112
9.2.3.	Ứng dụng trong công nghiệp	113
	Tài liệu tham khảo	116

Chương 1

Mở đầu

1.1. Định nghĩa enzyme

Trong cơ thể sống (các tế bào) luôn luôn xảy ra quá trình trao đổi chất. Sự trao đổi chất ngừng thì sự sống không còn tồn tại. Quá trình trao đổi của một chất là tập hợp các quy luật của rất nhiều các phản ứng hóa học khác nhau. Các phản ứng hóa học phức tạp này có liên quan chặt chẽ với nhau và điều chỉnh lẫn nhau. Enzyme là các hợp chất protein xúc tác cho các phản ứng hóa học đó. Chúng có khả năng xúc tác đặc hiệu các phản ứng hóa học nhất định và đảm bảo cho các phản ứng xảy ra theo một chiều hướng nhất định với tốc độ nhịp nhàng trong cơ thể sống.

Chúng có trong hầu hết các loại tế bào của cơ thể sống. Chính do những tác nhân xúc tác có nguồn gốc sinh học nên enzyme còn được gọi là các chất xúc tác sinh học (biocatalysators) nhằm để phân biệt với các chất xúc tác hóa học.

Enzyme học là khoa học nghiên cứu những chất xúc tác sinh học có bản chất protein. Hay nói cách khác, enzyme học là khoa học nghiên cứu những tính chất chung, điều kiện, cơ chế tác dụng và tính đặc hiệu của các enzyme.

1.2. Lược sử nghiên cứu enzyme

Do enzyme học được coi như cột sống của hóa sinh học nên phần lớn các nghiên cứu hóa sinh từ trước đến nay đều liên quan nhiều đến enzyme.

Về sự phát triển của học thuyết enzyme, có thể chia thành 4 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: trước thế kỷ thứ XVII
- Giai đoạn 2: từ thế kỷ XVII đến nửa đầu thế kỷ XIX
- Giai đoạn 3: từ giữa thế kỷ XIX đến 30 năm đầu của thế kỷ XX
- Giai đoạn 4: từ những năm 30 của thế kỷ XX đến nay.

1.2.1. Giai đoạn 1

Trước thế kỷ XVII người ta đã biết sử dụng các quá trình enzyme trong đời sống song chỉ có tính chất kinh nghiệm thực tế và thông qua hoạt động của vi sinh vật. Đó là các quá trình lên men rượu, muối dưa, làm tương và nước chấm... Ở thời kỳ này người ta chưa hiểu về bản chất enzyme và các quá trình lên men.

1.2.2. Giai đoạn 2

Ở giai đoạn này các nhà bác học đã tiến hành tìm hiểu bản chất của các quá trình lên men. Thời kỳ này đã khái quát hiện tượng lên men như là hiện tượng phổ biến trong sự sống và enzyme là yếu tố gây nên sự chuyển hóa các chất trong quá trình lên men.

Vào những năm 1600 của thế kỷ XVII, Van Helmont là người đầu tiên cố gắng đi sâu tìm hiểu bản chất của quá trình lên men. Van Helmont đã nhận thấy thực chất của sự tiêu hóa là sự chuyển hóa hóa học của thức ăn và giải thích cơ chế của nó với sự so sánh nó với quá trình lên men rượu. Danh từ ferment (từ chữ Latinh fermentatio - sự lên men) được Van Helmont dùng để chỉ tác nhân gây ra sự chuyển biến các chất trong quá trình lên men rượu.

Vào nửa cuối thế kỷ thứ XVIII, nhà tự nhiên học người Pháp là Réaumur cũng đã nghiên cứu bản chất của sự tiêu hóa. Nhà tự nhiên học này đã cho chim quạ đen nuốt những miếng thịt đặt sẵn trong ống kim loại có thành đã được đục sẵn và buộc vào dây thép. Sau vài giờ đã không thấy gì ở trong ống. Hiện tượng này đã thúc đẩy sự nghiên cứu thành phần dịch tiêu hóa để tìm hiểu khả năng tiêu hóa của dịch dạ dày. Sau thí nghiệm này một thời gian, vào năm 1783, nhà bác học người Ý là Spalanzani đã lặp lại thí nghiệm bằng cách lấy dịch dạ dày trộn với thịt mới và thấy có hiện tượng hòa tan xảy ra.

Vào đầu thế kỷ XIX, các nhà nghiên cứu đã tách được các chất gây ra quá trình lên men. Năm 1814 Kirchoff, viện sĩ Saint Peterburg đã phát hiện nước chiết của mầm đại mạch có khả năng chuyển hóa tinh bột thành đường ở nhiệt độ thường. Đây là công trình đầu tiên thu được chế phẩm amylase ở dạng dung dịch và lịch sử enzyme học thực sự được xem như bắt đầu từ đây.

Mười chín năm sau (năm 1833), hai nhà khoa học người Pháp là Payen và Pessoz đã chứng minh chất có hoạt động phân giải tinh bột thành đường có thể tách được ở dạng bột. Thí nghiệm được tiến hành bằng cách cho etanol vào dịch chiết của lúa đại mạch nảy mầm thì thấy xuất hiện kết tủa. Kết tủa được hình thành này có khả năng chuyển hóa tinh bột và nếu đun kết tủa này sẽ mất tác dụng chuyển hóa. Danh từ diastase (từ chữ Latinh diastasis - phân cắt) là do Payen và Persoz dùng để gọi enzyme amylase lúc bấy giờ.

Tiếp đó người ta cũng đã tìm ra và tách được nhiều enzyme khác như enzyme phân giải protein của dịch tiêu hóa trong dạ dày như Pepsin (Emberle và Shwan) - những nhà khoa học người Đức, năm 1836)...

Sau đó, lý thuyết xúc tác đã ra đời. Năm 1835, nhà khoa học Berzelius có quan điểm cho rằng tăng tốc độ phản ứng là hiện tượng xúc tác. Đây là một quan điểm đúng. Song thật đáng tiếc là nhà khoa học này đã coi các chất xúc tác này hoạt động được là do "lực sống" không theo sự điều khiển của con người. Đây là quan điểm duy tâm, siêu hình đã làm trì trệ sự phát triển của khoa học nhất là ảnh hưởng sâu sắc đến sự phát triển của ngành enzyme học.

1.2.3. Giai đoạn 3

Giai đoạn từ giữa thế kỷ XIX đến 30 năm đầu của thế kỷ XX. Ở giai đoạn này một số lượng rất lớn các enzyme ở dạng hòa tan đã được tách chiết.

Trong thời kỳ này, có hai trường phái đấu tranh với nhau: đó là trường phái Pasteur - nhà bác học vĩ đại người Pháp và trường phái Liebig - nhà bác học nổi tiếng người Đức.

* Trường phái Pasteur:

Năm 1856 Pasteur đã đề cập đến bản chất của quá trình lên men. Ông cho rằng không thể tách các enzyme khỏi tế bào. Tác dụng và tính chất của enzyme gắn liền với sự sống của tế bào và quá trình lên men rượu là kết quả hoạt động sống của tế bào nấm men chứ không phải là kết quả của tác dụng của enzyme. Ông đã tiến hành thí nghiệm và nhận thấy nếu một dung dịch hữu cơ, ví dụ dung dịch glucose để trong bình đã khử trùng thì không xảy ra quá trình lên men rượu. Chính vì suy nghĩ ấy, Pasteur đã chia các enzyme thành 2 loại: "enzyme có tổ chức" và "enzyme không có tổ chức".

Theo ông, các "enzyme có tổ chức" là những enzyme không thể tách khỏi tế bào, khi tách chúng sẽ bị mất tác dụng xúc tác như các enzyme của các tế bào nấm men thực hiện quá trình lên men rượu; còn các "enzyme không có tổ chức" là các enzyme có thể thực hiện tính xúc tác của nó ngoài cơ thể như các enzyme có trong dịch tiêu hóa (ví dụ Pepsin ở trong dạ dày, amylase ở trong tuyến nước bọt, trong mầm thóc...)

Quan điểm sai lầm này của Pasteur đã thống trị ngành enzyme học trong một thời gian dài. Năm 1878 Kuhne đã đề nghị dùng danh từ "ferment" (từ tiếng Latinh: fermentatio = lên men) để gọi các "enzyme có

tổ chức" và đã gọi các chất chiết có tác dụng xúc tác cho phản ứng hóa học là các enzyme (từ chữ Hy Lạp: en = bên trong, zyme = men rượu, tức là "ở trong nấm men" để gọi các enzyme "không có tổ chức". Danh từ enzyme được xuất phát từ đây.

* Trường phái Liebig:

Chống lại quan điểm trên của Pasteur, Liebig (trước đó có cả Berzelius) cho rằng có thể không có hoạt động của các tế bào vi sinh vật cũng có quá trình lên men. Điều đó có nghĩa là ông coi enzyme như là một chất hóa học gây nên hiệu quả tương tự như các chất xúc tác, tác dụng cả ở trong và ngoài tế bào, không phụ thuộc vào hoạt động sống của vi sinh vật.

Nhưng năm 1871 Liebig thất bại vì thực nghiệm không chứng minh được quan điểm trên của mình. Các thí nghiệm được tiến hành bằng cách lấy dịch chiết từ tế bào nấm men đã nghiền nát đều không có tác dụng gây lên men rượu. Cũng vào năm 1871 Manatxein là một bác sĩ người Nga đã dùng cát thạch anh nghiền các tế bào nấm men và thu được dịch chiết không chứa tế bào có khả năng biến đổi đường thành rượu. Nhưng những quan sát này đã không được ai chú ý tới. Chính vì vậy, quan điểm siêu hình của Pasteur đã hạn chế khá nhiều sự phát triển của ngành enzyme học. Đến năm 1897, H. Büchner - một nhà khoa học người Đức đã nhận được dịch chiết nấm men bằng cách phân huỷ tế bào hoàn toàn hơn. Trong thí nghiệm này, các tế bào nấm men được nghiền nát hoàn toàn cùng với bột thủy tinh, sau đó được ép bằng áp suất cao. Dịch chiết thu được không chứa tế bào vẫn có khả năng gây ra quá trình lên men (chuyển hóa glucose thành rượu). Điều đó chứng tỏ quá trình lên men rượu không phải là kết quả của hoạt động sống của tế bào nấm men mà là kết quả tác dụng của các enzyme vốn có trong các tế bào. Do đó, quan điểm sai lầm về enzyme "có tổ chức" và enzyme "không có tổ chức" mà thực chất là về bản chất của enzyme đến lúc này mới hoàn toàn bị đánh đổ, mở ra một thời kỳ phát triển mới của ngành enzyme học. Cũng từ đó đã không có sự phân biệt về nội dung giữa thuật ngữ "ferment" và "enzyme". Có thể nói rằng, công trình của Büchner đã đánh dấu một bước ngoặt quan trọng trong lịch sử phát triển của enzyme học. Sau đó, nhiều loại enzyme trong cơ thể sống đã được tìm ra. Vì vậy việc phân loại và gọi tên các enzyme một cách thống nhất càng cần thiết. Năm 1883, Dujcło, nhà bác học Pháp đã đề ra nguyên tắc phân loại enzyme theo cơ chất (substrate) do chúng biến đổi và thêm đuôi tận cùng "ase" vào. Ví dụ enzyme phân giải tinh bột (amilun) là amylase. Tuy vậy, trong thực tế còn tồn tại nhiều ngoại lệ về thuật ngữ, ví dụ những tên gọi enzyme pepsin, trypsin, catalase trước đây vẫn được dùng.

Ở thời kỳ này, dựa vào thành tựu của hóa học, đặc biệt là hóa lý và hóa keo, các nhà khoa học đã hướng vào việc nghiên cứu các tính chất hóa và lý học của enzyme cũng như hoàn thiện các phương pháp làm thuần khiết enzyme.

Giai đoạn quan trọng nhất trong thời kỳ này là các công trình của nhà bác học vĩ đại người Đức E. Fisher. Ông đã đặt nền móng cho những khái niệm hiện đại về tính đặc hiệu của enzyme, về sự tương tác không gian giữa enzyme và cơ chất. Giả thuyết nổi tiếng của ông là giữa enzyme và cơ chất kết hợp với nhau như "ổ khóa với chìa khóa". Rồi những nghiên cứu của Bach và Palladin về các enzyme ôxy hóa khử đã tạo nên cơ sở cho việc xây dựng học thuyết ôxy hóa khử sinh học. Trong thời gian này người ta cũng đã phát hiện ra được tính tác dụng thuận nghịch của enzyme (Danilewski, 1894), các coenzyme cũng đã được phát hiện (Harden và Young, 1906). Họ là những người đã khám phá ra rằng, dịch chiết tế bào nấm men chứa hai loại chất cần thiết cho quá trình lên men là "zymase" và "cozymase". Họ nhận thấy dịch chiết tế bào nấm men mất hoạt tính xúc tác nếu bị thẩm tích hoặc bị đun lên đến 50°C. Nhưng dịch chiết đã bị thẩm tích không hoạt động sẽ hoạt động khi được trộn với dịch đã bị đun nóng không hoạt động. Như vậy hoạt độ phụ thuộc vào sự có mặt của hai loại chất: thành phần không bền với nhiệt (heat - labile); không có thể thẩm tích được (được gọi là zymase) và một phân đoạn bền với nhiệt (heat - stable), có thể thẩm tích được (được gọi là cozymase). Ngày nay chúng ta biết rằng "zymase" bao gồm tất cả enzyme, còn "cozymase" bao gồm các ion kim loại, ATP, ADP và các coenzyme như NAD⁺. Thời gian này người ta cũng đã hiểu biết được tác dụng kìm hãm và hoạt hóa của một số enzyme (Sorensen 1909). Vào đầu thế kỷ XX, đã phát sinh ra cơ sở động học trong tác động của enzyme dựa vào những nghiên cứu của nhà bác học Anh là Brown và nhà bác học Pháp là Henri. Đến năm 1913, Michaelis và Menten đã phát triển các công trình trên và nêu lên thuyết động học của sự xúc tác enzyme.

Sau đại chiến thế giới lần thứ nhất nhà bác học nổi tiếng người Đức là Willstatter đã có rất nhiều cống hiến trong việc tìm hiểu bản chất hóa học của enzyme. Đó là công trình khoa học 5 năm của ông và các cộng sự (1922) nhằm làm thuần khiết enzyme bằng phương pháp hấp thụ chọn lọc. Qua đó từ nhận xét thấy là ở những giai đoạn cuối của quá trình làm thuần khiết enzyme, thường bị mất đi những chất chưa được biết nào đó do, đó enzyme bị mất tính xúc tác, đã cho phép Willstatter nêu lên lần đầu tiên giả thuyết về enzyme hai cấu tử (enzyme hai thành phần). Nhóm hoạt động (coenzyme, coferment, agon) chỉ có khả năng xúc tác khi kết hợp với

phần protein đặc hiệu (apoferment, apoenzyme, feron = protein) nó xác định các đặc tính của enzyme và đóng vai trò chủ đạo trong việc thể hiện tác dụng xúc tác của enzyme. Willstatter đã coi feron (protein) là chất trợ chứ có tác dụng gì. Agon là chất được hấp phụ trên chất này. Và vào năm 1926, trong một dịp thuyết trình, ông đã cho rằng enzyme không thuộc một trong các hợp chất đã biết, tức là enzyme không phải là protein, không phải là glucid, mà chúng là những "chất đặc biệt". Đó chính là quan niệm sai lầm của Willstatter. Ông là người đã tìm ra được nhiều phương pháp làm sạch enzyme cũng như làm sáng tỏ nhiều tính chất đặc hiệu enzyme. Nhưng mục đích chính là làm sáng tỏ bản chất hóa học của enzyme thì ông lại không đạt được.

Ngày nay người ta quan niệm nếu là enzyme hai thành phần thì phần coenzyme quy định kiểu phản ứng và chịu trách nhiệm làm bền. Còn apoenzyme quy định tính đặc hiệu của enzyme cũng như tăng hiệu suất xúc tác.

Coenzyme + apoenzyme = (holo) enzyme = (enzyme hoàn chỉnh)

Cofement + apoferment = (holo) ferment

Coenzyme chỉ dùng để chỉ phần không phải protein của enzyme trong trường hợp khi nó dễ tách khỏi phần apoenzyme khi cho thẩm tích qua màng bán thấm và có thể tồn tại độc lập. Phần không phải protein của enzyme được gọi là nhóm ngoại hay nhóm "prostetic" khi nó liên kết chặt chẽ với phần protein của enzyme.

1.2.4. Giai đoạn 4

Bản chất hóa học của enzyme chỉ được xác định đúng đắn từ sau khi kết tinh được enzyme. Năm 1926 nhà hóa sinh Mỹ trẻ tuổi Sumner (39 tuổi) đã thành công trong việc chứng minh protein được kết tinh từ hạt đậu tương là chất giống enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân urê. Đây cũng chính là enzyme đầu tiên được kết tinh. Bốn năm sau (1930) ở Mỹ Northrop đã tách được pepsin ở dạng tinh thể, và vào năm 1931 Northrop và Kunitz cũng đã tách được trypsin ở dạng tinh thể.

Trong thời kỳ này J.B.S Hardane đã viết quyển "Enzymes". Mặc dù lúc đó bản chất phân tử của Enzyme hầu như vẫn còn là bí mật, nhưng tác giả đã đưa ra dự đoán tuyệt vời về vai trò của các tương tác và liên kết yếu giữa enzyme và cơ chất trong cơ chế hoạt động của enzyme. Điều này vẫn giữ nguyên tính thời sự trong thời đại của chúng ta.

Các công trình của Sumner và Northrop đã mở ra một chương mới trong lịch sử phát triển của enzyme học hiện đại. Những kết quả đạt được đã cho phép xác định được một cách dứt khoát bản chất hóa học của enzyme là protein. Phải nói rằng bản chất hóa học của phần lớn enzyme là protein và định nghĩa có tính chất kinh điển về Enzyme phải xem lại từ sau phát hiện của T. R. Cech năm 1981. Cech đã phát hiện một RNA có hoạt tính xúc tác như enzyme và gọi là ribozyme (xuất phát từ các tên ribose và enzyme). Ribozyme xúc tác cho quá trình chuyển hóa tiền chất. RNA thông tin (pre - m RNA) thành m-RNA. Do đó enzyme không nhất thiết phải là protein! Đây là một phát minh có ý nghĩa rất lớn. Tác giả của phát minh này được giải Nobel năm 1989. Cho đến nay khoảng 100 ribozyme đã được biết. Có thể nói rằng, những công trình đã nói ở trên đã mở màn cho giai đoạn thứ tư của lịch sử phát triển enzyme học kéo dài cho đến hiện nay.

Từ giữa thế kỷ thứ XX, nhất là thời gian gần đây enzyme học phát triển rất mạnh. Nhờ ứng dụng các phương pháp mới, hiện đại như: điện di, sắc ký, quang phổ, đồng vị phóng xạ... đã cho phép nghiên cứu cấu trúc cũng như cơ chế tác dụng của nhiều enzyme, cơ chế của quá trình sinh tổng hợp enzyme và sự điều hòa hoạt động của enzyme trong tế bào.

Người ta đã xác định được cấu tạo của coenzyme. Đã xác định được mối liên hệ của enzyme và các vitamin (nhiều vitamin là thành phần cấu tạo của coenzyme và phần lớn các vitamin tan trong nước là thành phần cấu tạo của các coenzyme).

Người ta cũng đã xác định được các enzyme xúc tác cho các quá trình trao đổi chất như: hệ thống enzyme đường phân, Embden - Meyerhof - Parnas năm 1933, hệ thống enzyme của chu trình Krebs - Szent Gyorgy năm 1937 (chu trình citric acid), chu trình ornithin trong trao đổi chất của protein năm 1932 (Krebs - Henseleit). Nhờ những phương pháp mới trong việc tách và làm sạch enzyme, người ta đã xác định được vai trò rất quan trọng của kim loại trong sự xúc tác của enzyme và tác dụng hoạt hóa của chúng. Đã xác định được sự phân bố của các enzyme trong tế bào. Đã nghiên cứu cơ chế tác dụng cũng như cấu tạo các protein enzyme. Bằng phương pháp Rhengen, người ta đã nghiên cứu cấu trúc của của phân tử enzyme, như cấu trúc của ribonuclease (1960, Stein).

Trong vòng hơn 40 năm trở lại đây đã nghiên cứu các enzyme sinh tổng hợp như nucleotide phosphorylase (Greenberg Marago, 1955), DNA - polymerase (Kornberg, 1956), RNA - polymerase (Spiegelman, Hurwitz,

1958 - 1961) và các nghiên cứu về điều hòa sinh tổng hợp protein - enzyme của Jacob, Monod (1961).

Từ năm 1961 đã phát hiện ra isoenzyme trong cơ thể là enzyme xúc tác có thể tồn tại dưới nhiều dạng khác nhau, xúc tác trong cùng một cơ thể, cho một phản ứng, có sai khác một số tính chất như độ di động điện di.

Năm 1969 người ta đã tổng hợp được enzyme đầu tiên là ribonuclease (Denkewalter và Hirschmann, Gutte và Merrifield). Đây là enzyme gồm 124 amino acid, bền với nhiệt, có thể đun nóng lên 80°C với thời gian ngắn.

Có thể tổng hợp enzyme bằng hai phương pháp khác nhau:

- Tổng hợp từng peptid riêng biệt rồi sau đó nối lại với nhau.

- Dùng chất giá (polymer): cắm lên trên này một gốc amino acid, sau đó cắm tiếp 123 gốc amino acid khác. Việc tổng hợp này đã thành công trong 3 tuần bao gồm 11931 giai đoạn, 369 phản ứng. Đã nêu lên được một phương pháp mới về tổng hợp enzyme. Ở đây người ta đã dùng phương pháp tự động hóa, khi được 124 gốc amino acid thì chuỗi polypeptid tự tách ra. Điều này cho thấy mỗi khi chuỗi polypeptid đã được lựa chọn theo một trật tự đúng đắn thì có thể tự uốn cong trong không gian. Đây chính là khả năng tự tổ chức

Những thành tựu nghiên cứu cơ bản về enzyme là cơ sở để phát triển các nghiên cứu ứng dụng enzyme trong thực tế.

Trong mấy chục năm cuối của thế kỷ XX và đầu thế kỷ XXI, người ta đã chú ý nghiên cứu việc ứng dụng enzyme. Người ta đã tận dụng các nguyên liệu giàu enzyme để tách enzyme, dùng chế phẩm enzyme này để chế biến các nguyên liệu khác nhau hoặc sử dụng vào mục đích khác nhau. Ở nhiều nước đã hình thành ngành công nghệ enzyme, hàng năm đã sản xuất hàng trăm tấn chế phẩm enzyme để phục vụ cho các ngành sản xuất khác nhau và cho y học.

1.3. Phương hướng nghiên cứu enzyme

Ngành enzyme học đã trải qua một thời kỳ phát triển khá dài. Nhờ những phương pháp vật lý, hóa học, con người đã đạt được những thành tựu rực rỡ trong việc nghiên cứu bản chất của enzyme. Kể từ khi các nhà khoa học đổ xô vào việc tìm kiếm bản chất của enzyme; từ suy nghĩ cho rằng sự xúc tác là do "lực sống" (Berzelius, 1835) qua việc coi enzyme chỉ hoạt động được khi còn ở trong cơ thể sống (Pasteur, 1856) đến việc khẳng định một cách dứt khoát bản chất hóa học của enzyme là protein (Sumner, Northrop (1926, 1930) và đến gần đây với phát hiện RNA có

hoạt tính xúc tác của enzyme và được gọi là ribosyme (Cech, 1981) và xem enzyme không nhất thiết phải là protein, chứng tỏ sự phát triển đầy sôi động của ngành enzyme học. Có thể nói enzyme học là một môn học có vị trí then chốt trong hóa sinh. Môn học này đang phát triển mạnh mẽ và xâm nhập vào rất nhiều ngành khoa học, nó đang là đối tượng nghiên cứu của các nhà hóa lý, hóa sinh, lý sinh... và đặc biệt thu hút sự chú ý của các nhà sinh học và sinh y học vì những hiểu biết cơ bản về enzyme cũng như về sự xúc tác sinh học có liên quan mật thiết với sinh học phân tử và y học phân tử là những kiến thức cơ bản rất quan trọng của sinh học và sinh y học.

Bởi vậy, hiện nay hướng nghiên cứu và phạm vi của những vấn đề enzyme học có thể được tóm tắt như sau:

1) Với mục đích xác định cấu trúc phân tử của chúng, người ta đang cố gắng hoàn thiện những phương pháp tách và tinh chế enzyme. Nhờ vậy có thể nhận được các chế phẩm enzyme có độ tinh khiết cao để có thể dùng cho việc nghiên cứu những tính chất cơ bản và có thể sử dụng trong y học.

Các phương pháp có thể tiến hành là:

- Sắc ký ái lực: Để giữ lại chất cần thiết và cho sang quá trình phản hấp phụ.

- Sắc ký hấp phụ lựa chọn: Được tiến hành ở trên cellulose, sephadex.

2) Nghiên cứu điều kiện và tốc độ tác động của các enzyme cũng như ảnh hưởng của các yếu tố vật lý và hóa học đối với hoạt động của enzyme.

3) Làm sáng tỏ bản chất của quá trình xúc tác của enzyme và cơ chế tác dụng của nó. Ở đây cần xem xét mối liên quan giữa cấu trúc và chức năng của protein enzyme có khả năng xúc tác (ví dụ trong một số trường hợp xem trung tâm hoạt động của enzyme ở chỗ nào để tổng hợp ở phần đảm bảo chức năng của nó: papain ở trung tâm hoạt động của enzyme có nhóm SH ở 1/3 phân tử, vì vậy chỉ cần tổng hợp 1/3 phân tử enzyme là đủ cho mục đích của mình.

4) Nghiên cứu sinh học enzyme. Điều đó có nghĩa là phải tìm hiểu sự tạo thành enzyme trong tế bào sống, tác dụng điều chỉnh hoạt động của enzyme, vai trò của chúng trong việc thực hiện các chức năng sinh lý khác nhau ở cơ thể sống. Cần phải xem sự phân bố của enzyme trong tế bào, qua đó thấy được mối liên hệ giữa chức năng và cấu tạo giữa các thành phần tế bào. Ngoài ra cũng cần nghiên cứu mối quan hệ hợp tác giữa các enzyme trong tế bào để xem quy luật tác dụng của enzyme. Đồng thời

cũng cần nghiên cứu sự tiến hóa của enzyme liên quan với sự phát sinh và tiến hóa của sự sống.

5) Nghiên cứu tính đặc hiệu của các enzyme.

6) Nghiên cứu cải tiến phương pháp và kỹ thuật thực nghiệm mới của hóa lý, sinh học vào nghiên cứu enzyme để thúc đẩy sự phát triển của enzyme học.

7) Nghiên cứu enzyme ứng dụng trong thực tế nhằm mục đích hạ giá thành, tăng độ bền của chế phẩm. Đó chính là mục đích cuối cùng của enzyme học. Để thực hiện được mục đích này, cần phải có hướng giải quyết:

- Cải tạo nguồn nguyên liệu vi sinh vật là nguồn nguyên liệu tốt.
- Chọn phương pháp tách.
- Dùng lặp lại (enzyme không tan)

Từ năm 1950 đã có nhiều công trình nghiên cứu tạo các chế phẩm enzyme không tan bằng cách gắn enzyme vào các chất không hòa tan như thủy tinh, cellulose, nilon... Nhờ ở dạng không tan nên có thể sử dụng lặp lại nhiều lần một lượng enzyme xác định, vì vậy nâng cao hiệu quả sử dụng enzyme. (Ví dụ trong công nghiệp dệt chế phẩm amylase của các vi khuẩn *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. diastaticus*, *Bac. amylosolvans*... có tính ưu việt là chịu nhiệt độ cao, dùng trong rũ hồ vải (tẩy lớp hồ bột trên vải, tạo điều kiện tốt, dễ dàng khi nhuộm, tẩy vải sau này, nhưng để tận dụng tiếp thì người ta liên kết với bột thủy tinh để tạo thành các chế phẩm enzyme không tan).

Việc ứng dụng enzyme amylase (α - amylase và glucoamylase) đã đem lại những thay đổi cơ bản trong kỹ thuật sản xuất đường tinh bột. So với phương pháp acid, phương pháp thủy phân bằng enzyme có những ưu điểm hơn hẳn, lượng glucose thu được cao hơn (5 - 10%), cho phép loại trừ khả năng tạo thành các sản phẩm phụ có vị đắng, yêu cầu về thiết bị đơn giản, kết quả cho phép thu được glucose với hiệu suất cao, chất lượng tốt và giá thành rẻ hơn.

1.4. Những vấn đề cần đề cập khi nghiên cứu enzyme

Thông thường khi nghiên cứu enzyme người ta thường xác định độ bền của chế phẩm enzyme. Muốn vậy, cần xem xét những điểm sau đây:

1) Tính chất phân tử protein enzyme

Trước hết phải xem đến tính chất lí học. Đó là hình dạng phân tử điểm đẳng điện, độ bền của enzyme với pH, nhiệt độ.

Kể đến phải xem tính chất hóa học của phân tử enzyme. Đó chính là cấu trúc phân tử enzyme.

2) Tính chất xúc tác của phân tử enzyme. Ở đây phải xem bản chất của phản ứng, tính đặc hiệu của enzyme.

Phải chú ý đến cấu tạo của trung tâm hoạt động cũng như mối liên quan giữa cấu trúc và chức năng của nó.

Tính chất của enzyme: đó chính là các tính chất động học của enzyme.

3) Tính chất sinh học của enzyme

Đó chính là sự phân bố của enzyme trong tế bào, sự sinh tổng hợp protein enzyme cũng như ảnh hưởng của sự thiếu hụt enzyme ở trong cơ thể sống.

Ngoài ra ở đây cần chú ý đến mối liên hệ giữa enzyme nghiên cứu và các enzyme khác, các tính chất miễn dịch cũng như tạo thành hiện tượng cảm ứng enzyme.

1.5. Vấn đề nghiên cứu enzyme ở nước ta

Hầu như mọi phản ứng hoá học trong cơ thể sống đều cần phải có vai trò xúc tác của enzyme - chất xúc tác sinh học. Chính vì vậy, các nghiên cứu về enzyme đã thu hút sự quan tâm của các cán bộ hoá sinh học, sinh học thực nghiệm và nhiều nhà nghiên cứu ở các lĩnh vực liên quan khác. Các nghiên cứu nhằm theo hướng tách, tinh sạch enzyme, tạo các chế phẩm có độ sạch khác nhau, nghiên cứu cấu trúc, mối liên quan giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học của enzyme, khả năng ứng dụng enzyme trong thực tế. Nghiên cứu về công nghệ enzyme đã được tiến hành bởi nhiều tác giả như sử dụng phủ tạng của lò mổ để sản xuất pancrease, pepsin, trypsin... sử dụng mầm mại để sản xuất amylase. Đã có những thử nghiệm công nghệ như sản xuất amino acid từ nhộng tằm bằng protease, bột protein thịt bằng bromelain từ đọt dứa, lên men rượu bằng enzyme cố định trên cột. Cũng đã có những nghiên cứu sử dụng peroxydase, cyt-P₄₅₀ trong chế tạo biosensor và thuốc phát hiện chất độc... Trong lĩnh vực y dược, việc nghiên cứu sâu về cơ chế tác dụng của một số enzyme nhằm mục đích kiến tạo nên một số thuốc dùng điều trị một số bệnh đặc biệt là tạo ra một số chế phẩm thuốc chống suy dinh dưỡng ở trẻ em, đồng thời đã tiến hành sản xuất đại trà. Đây là một đóng góp rất thiết thực và kịp thời trong việc phòng chống suy dinh dưỡng ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hữu Chấn, 1983. Enzyme và xúc tác Sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng, 2000. Hóa sinh học. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
3. Đỗ Ngọc Liên, Phạm Thị Trân Châu, 1972. Enzyme I, II. Đại học Tổng hợp, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyền, 1998. Giáo trình sinh hóa hiện đại. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
5. Nguyễn Xuân Thắng, Đào Kim Chi, Phạm Quang Tùng, Nguyễn Văn Đồng, 2004. Hóa sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
6. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lân Dũng, 1982. Enzyme vi sinh vật. Nxb KH&KT, Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú (chủ biên), Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên, 2000. Hóa sinh Công nghiệp, Nxb KH&KT, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Bermeyer H. U, Bermeyer J. and Grasel M. (editors). 1983. Methods of enzymatic analysis. Vol II. Verlag chemie Weinheim.
2. Lehninger A. L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004.
3. Pelmont J., 1993. Enzymes. Presses universitaires de grenobe.
4. Stryer L., 1981. Biochemistry. W.H.Freeman and company. San Francisco.
5. Biochemical information, 1973. Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica

Chương 2

Phương pháp nghiên cứu enzyme

Có hai loại phương pháp dùng để nghiên cứu các phản ứng enzyme. Một trong hai phương pháp đó là lựa chọn các mẫu sau những thời gian nhất định và đo sự biến đổi của phản ứng enzyme. Qua hàng loạt điểm riêng biệt nhận được sẽ xây dựng được đường biểu diễn của các bước phản ứng. Phương pháp khác là tiến hành quan sát bản thân hỗn hợp phản ứng theo tiến trình xảy ra và có thể xây dựng được một số lớn những thay đổi, hoặc dựa vào các phương pháp tự động để ghi lại. Chúng ta sẽ nhận được những đường biểu diễn liên tục các bước phát triển của phản ứng enzyme.

Ở phương pháp đầu, người ta thường đo nồng độ cơ chất hoặc nồng độ sản phẩm của phản ứng. Nếu phản ứng tăng thì cả hai cách vừa nêu ở trên có thể được sử dụng để đo hoạt động của enzyme.

Trong mỗi trường hợp xác định tốc độ, người ta phải nhận được ít nhất là 3 điểm: một điểm ở thời điểm không, điểm thứ hai ở khoảng thời gian nhất định đã trôi qua, điểm thứ 3 ở khoảng thời gian lớn gấp hai lần khoảng trước. Từ đó có thể kiểm tra được sự đúng đắn của phản ứng enzyme trong khoảng thời gian quan sát.

Nói chung, phần lớn các phương pháp được sử dụng để nghiên cứu các phản ứng enzyme là loại phương pháp nghiên cứu liên tục vì nó được mọi người ưa dùng hơn.

2.1. Những nguyên tắc chung khi nghiên cứu enzyme

Như phần đầu đã nói đến, enzyme là những chất xúc tác sinh học có bản chất protein và rất không ổn định. Trong những điều kiện bất lợi, chúng rất không bền, có thể dễ dàng bị biến tính (denaturation) và bị mất hoạt độ. Do đó, khi làm việc với enzyme, phải luôn luôn chú ý tránh những điều kiện dễ làm mất hoạt độ của nó. Thông thường phần lớn các enzyme hoạt động được ở vùng pH trung tính hoặc gần như trung tính ($\text{pH} = 7 \pm 2$). Vì vậy các yếu tố acid mạnh, kiềm mạnh dễ gây biến tính enzyme.

Những ion kim loại nặng như chì, đồng, thủy ngân... và các điều kiện về nhiệt độ cao cũng thường làm mất hoạt độ enzyme. Đặc biệt là khi tách và làm sạch enzyme, cần tiến hành ở nhiệt độ thấp. Nhiệt độ thường

dùng cho các công việc này thông thường từ 0°C đến 5°C. Đối với các enzyme không bền, các công đoạn làm sạch có thể được tiến hành ở nhiệt độ thấp hơn (từ - 5°C đến - 20°C). Trong các trường hợp này, người ta hay sử dụng các hỗn hợp lạnh như nước đá với CO₂ hoặc nước đá với muối NaCl, hoặc thậm chí người ta dùng cả hỗn hợp nước đá với sulfuric acid đậm đặc... Ví dụ về một số hỗn hợp làm lạnh đã được trình bày trên bảng 2.1.

Bảng 2.1. Hỗn hợp làm lạnh

Thành phần hỗn hợp	Tỷ lệ	Nhiệt độ đạt được
Nước đá: muối	100:33 (3:1)	- 21,3°C
Nước đá: H ₂ SO ₄ đậm đặc	100: 25 (4:1)	- 20,0°C

Như trên đã nói, nhiều enzyme bị mất hoạt tính ở các dung dịch có pH < 5 hoặc pH > 9, tuy rằng có một số ngoại lệ như pepsin bền trong acid. Do đó, tùy thuộc mỗi loại enzyme, song nên chú ý tránh pH quá acid hoặc quá kiềm. Khi điều chỉnh pH của dung dịch đệm có chứa enzyme cần phải thêm từ từ và rất thận trọng các acid hoặc kiềm. Và khi thêm hóa chất để điều chỉnh pH thì nên tiến hành ở 0°C. Khi làm việc với enzyme cũng cần chú ý tránh tạo bọt vì nhiều enzyme bị biến tính (mất hoạt tính) ở mặt phân cách hai pha nước và khí. Để tránh việc tạo bọt có thể xảy ra, người ta thường rót dung dịch enzyme theo thành ống thủy tinh và không được lắc. Có khi việc tách từng phần enzyme bằng bọt để làm mất hoạt tính enzyme. Vì vậy, để khắc phục tình trạng này, người ta thường thêm ammonium sulfate dưới dạng dung dịch bão hòa của nó.

Trong khi xử lý các mẫu thí nghiệm như cắt, thái, xay nhỏ các mẫu thực vật và động vật (ví dụ lá cây, thịt, các cơ quan nội tạng...) không dùng các dụng cụ dao kéo dụng cụ xay đã han rỉ để tránh tác dụng của các ion kim loại nặng như (Cu, Pb, Fe...) mà dùng dụng cụ inox..

Khi dùng các dung môi hữu cơ như aceton, alcol để kết tủa enzyme cần tiến hành ở nhiệt độ thấp. Tách kết tủa enzyme bằng cách ly tâm lạnh tốt hơn lọc lạnh vì tiến hành nhanh hơn. Ở một số trường hợp, khi tách và làm sạch enzyme có hiện tượng giảm dần hoạt độ, vì vậy cần phải làm thí nghiệm nhanh. Tốt nhất là thực hiện thí nghiệm liên tục, không ngắt quãng. Ví dụ tách chiết các enzyme chống oxy hóa (antioxidant enzyme) ở ty thể trong vòng 6h và đo luôn nếu không thì mất hoạt tính. Còn ở micrososome thì tiến trình có thể kéo dài hơn vẫn

không ảnh hưởng đến hoạt độ các enzyme chống oxy hóa và các enzyme oxy hóa khử.

Một điều cần chú ý nữa là trong khi tiến hành xác định hoạt độ của các enzyme, nếu đã xác định trong khoảng nhiệt độ nào thì tất cả các thành phần của hỗn hợp phản ứng phải được giữ ở nhiệt độ ấy. Lúc này nhất thiết phải dùng máy ổn nhiệt (thermostate). Khi hỗn hợp phản ứng đã đạt được nhiệt độ cần thiết thì mới tiến hành đo. pH trong quá trình này cũng phải được giữ ổn định bằng dung dịch đệm và phải đảm bảo độ chính xác của pH: những phản ứng tạo acid thì phải thêm kiềm vào và ngược lại. Để đảm bảo kết quả tin cậy, tránh sai số nhiều, phải lấy thật chính xác lượng dịch enzyme. Người ta thường dùng loại pipette không chia độ hoặc sau này dùng các loại micropipette. Trong khi thí nghiệm cần chú ý tránh đánh rơi enzyme vào dung dịch nghiên cứu. Ví dụ đang làm thí nghiệm với amylase chẳng hạn thì không nói chuyện nhiều. Khi đã có chế phẩm enzyme, cần bảo quản chúng ở nhiệt độ thấp. Một số enzyme ổn định ở dung dịch đậm đặc của ammonium sulfate. Trong trường hợp này, người ta giữ các kết tủa ở dạng huyền phù trong dung dịch ammoni sulphate bão hòa và lấy chế phẩm ra bằng cách ly tâm. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, việc sấy khô chế phẩm enzyme sẽ làm mất hoạt độ enzyme hoàn toàn. Nhưng ở điều kiện chân không nếu sấy khô ở nhiệt độ thấp hoặc dùng phương pháp đông khô (lyophilization) thì có thể duy trì được hoạt động bình thường của chúng.

2.2. Tách và làm sạch (tinh chế) enzyme

2.2.1. Chọn nguồn nguyên liệu

Enzyme là những chất xúc tác sinh học, có nhiều trong cơ thể sống. Việc điều chế chúng bằng phương pháp hóa học với số lượng lớn là việc làm rất khó khăn và đây tốn kém nếu không muốn nói là điều không tưởng, nên người ta thường thu nhận chúng từ các nguồn sinh học. Mặc dù enzyme có trong tất cả các cơ quan, mô của động vật thực vật cũng như trong tế bào vi sinh vật, song việc tách enzyme đáp ứng yêu cầu về mặt kinh tế chỉ có thể tiến hành khi nguyên liệu có chứa một lượng lớn enzyme cũng như cho phép thu được enzyme với hiệu suất cao và dễ dàng tinh chế chúng. Việc phân bố của enzyme trong tế bào cũng không đồng đều, trong một loại tế bào cũng có thể có nhiều enzyme này song không có enzyme khác. Lượng enzyme lại thay đổi tùy theo giai đoạn sinh trưởng phát triển

của sinh vật và tùy theo loài nên chúng ta phải chọn nguồn nguyên liệu thích hợp cho việc chiết rút và tinh chế enzyme. 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 nhầy dạ dày, tim... dùng để tách enzyme rất thuận lợi. Dịch tụy tạng có chứa amylase, lipase, protease, ribonuclease và một số enzyme khác.

Từ ngăn tư của dạ dày bê nghé người ta có thể thu nhận chế phẩm renin để làm đông sữa trong sản xuất fomat. Người ta cũng sản xuất pepsin từ dạ dày động vật. Nhưng khác với pepsin, renin có khả năng đông tụ sữa cao mà không thủy phân sâu sắc casein. Renin là chế phẩm enzyme có giá trị lớn trong công nghiệp.

Ở thực vật: thông thường enzyme hay có mặt ở các cơ quan dự trữ như hạt, củ, quả. Cơ quan dự trữ giàu chất gì thì nhiều enzyme chuyển hóa chất ấy. Ví dụ trong hạt cây thầu dầu có nhiều lipase, trong hạt đậu tương có nhiều enzyme urease.

Thóc nảy mầm chứa nhiều α - amylase, ở củ khoai lang lại có nhiều β - amylase. Người ta đã thu được một số chế phẩm enzyme thủy phân như papain, bromelain, fixin từ thực vật bậc cao. Papain thu được từ mẩu nhựa đu đủ xanh, bromelain thu được từ các bộ phận (lá, thân, quả) cây dứa, còn fixin được tách từ dịch ép thân và lá cây Ficus.

Qua các nguồn nguyên liệu động, thực vật chính có thể từ đó chiết xuất các chế phẩm enzyme, chúng ta thấy rằng hai nguồn nguyên liệu này không thể dùng để sản xuất các chế phẩm enzyme với quy mô lớn bởi các nhược điểm sau đây:

- Chu kỳ sinh trưởng của chúng dài
- Nguồn nguyên liệu này không cải tạo được.
- Nhiều nguyên liệu dùng làm thực phẩm (dùng để ăn) không thể dùng làm nguyên liệu để sản xuất với quy mô lớn các chế phẩm enzyme nhằm thỏa mãn các nhu cầu của nền kinh tế quốc dân. Dùng vi sinh vật làm nguồn nguyên liệu để sản xuất các chế phẩm enzyme có nhiều ưu điểm nổi bật và có tính chất độc đáo vượt xa so với nguồn nguyên liệu từ động vật, thực vật, cũng như sẽ khắc phục được mọi khó khăn và hạn chế ở trên.

Trước hết vi sinh vật là nguồn nguyên liệu vô tận để sản xuất enzyme với số lượng lớn. Đây cũng là nguồn nguyên liệu mà con người

chủ động tạo ra được. Chu kỳ sinh trưởng của vi sinh vật ngắn (từ 16 - 100 giờ) vì vậy có thể nuôi cấy hàng trăm lần trong năm.

Enzyme vi sinh vật có hoạt tính rất mạnh, vượt xa các sinh vật khác. Vì vậy chỉ cần một lượng nhỏ enzyme có thể chuyển hóa một lượng lớn cơ chất. Số liệu tính toán cho biết, trong vòng 24 giờ, vi sinh vật có khả năng chuyển hóa một lượng thức ăn gấp 30 - 40 lần so với trọng lượng cơ thể chúng. Trong khi đó, hệ enzyme của con lợn trên 50 kg chỉ có thể chuyển hóa được vài kg thức ăn trong ngày.

Hệ enzyme vi sinh vật vô cùng phong phú. Vi sinh vật có khả năng tổng hợp nhiều loại enzyme khác nhau, trong đó có những enzyme ở động, thực vật không tổng hợp được. Ví dụ cellulase, raxemase...Phần lớn các thức ăn để nuôi vi sinh vật lại dễ kiếm và giá rẻ. Nhiều vi sinh vật cho enzyme thường có khả năng phát triển trên các môi trường đơn giản, giá rẻ, dễ kiếm như các phế liệu của các ngành sản xuất. Hơn nữa, có thể dùng những nguyên liệu không phải thực phẩm, những dung dịch muối vô cơ để nuôi vi sinh vật. Vì vậy dùng vi sinh vật làm nguồn thu enzyme sẽ mang lại giá thành rẻ, thời gian nhanh và hiệu quả kinh tế cao.

Vi sinh vật sinh sản phát triển với tốc độ cực kỳ nhanh chóng, khối lượng lại nhỏ, kích thước bé, nhưng tỷ lệ enzyme trong tế bào tương đối lớn nên quy trình sản xuất chế phẩm enzyme khá dễ dàng, hiệu suất thu hồi cao. Lượng enzyme có thể được sản xuất ra trong một thời gian ngắn. Đối với một số trường hợp có thể dùng 100% sinh khối vi sinh vật làm nguồn enzyme.

Vi sinh vật rất nhạy cảm đối với tác động của môi trường, thành phần dinh dưỡng nuôi chúng cũng như một số tác nhân lý hóa, cơ học khác. Do đó có thể thay đổi những điều kiện nuôi cấy để chọn giống tạo những chủng đột biến cho ta hàm lượng enzyme đáng kể với hoạt tính xúc tác cao. Có thể nói rằng, nhờ nguồn enzyme vi sinh vật, người ta có thể điều khiển sự tổng hợp enzyme dễ dàng hơn các nguồn nguyên liệu khác để tăng lượng enzyme được tổng hợp hoặc tổng hợp định hướng enzyme. Tuy vậy trong quá trình chọn nguồn nguyên liệu từ vi sinh vật, cần lưu ý một số vi sinh vật có khả năng sinh độc tố để có biện pháp xử lý thích hợp. Nói chung các vi sinh vật luôn được sử dụng làm nguồn nguyên liệu tách enzyme cần phải thỏa mãn các điều kiện sau:

- Khả năng tổng hợp enzyme mạnh trong một thời gian ngắn.
- Dễ tách enzyme và không sinh độc tố.

Có một điều lí thú là: trong điều kiện bình thường, vi sinh vật chỉ tổng hợp ra một lượng enzyme vừa đủ cho hoạt động sinh lý cơ thể của chúng (thường được gọi là sự tổng hợp enzyme "bản thể"). Nếu khi tăng hàm lượng một số chất hoặc thêm một số chất mới vào môi trường nuôi cấy, đặc biệt là cơ chất của enzyme, thì sự tổng hợp enzyme tương ứng tăng lên một cách đáng kể, khác thường có khi còn tổng hợp enzyme mới: hiện tượng trên gọi là sự cảm ứng sinh tổng hợp enzyme. Chất gây nên sự cảm ứng sinh tổng hợp gọi là chất cảm ứng. Sự tổng hợp một lượng đáng kể enzyme gọi là siêu tổng hợp enzyme.

Để thu được nguồn enzyme dồi dào từ vi sinh vật, cần phải nuôi cấy chúng. Có hai phương pháp nuôi cấy vi sinh vật để thu enzyme: phương pháp nuôi cấy bề mặt và phương pháp nuôi cấy bề sâu hay là phương pháp nổi và phương pháp chìm.

Trong phương pháp nuôi cấy bề mặt, người ta cho vi sinh vật phát triển và bao phủ trên bề mặt các hoạt chất dinh dưỡng rắn, đã được làm ẩm, dùng làm môi trường (cám gạo, cám nếp, cám mì, bắp xay nhỏ...). Để môi trường xốp người ta trộn thêm một lượng nhỏ mật cua... Sau khi nuôi đủ thời gian để vi sinh vật tổng hợp enzyme môi trường được sấy nhẹ, nghiền nhỏ. Chế phẩm thu được ở dạng rắn - thô. Muốn có chế phẩm tinh khiết phải qua giai đoạn tách và tinh chế enzyme.

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. Nguyên liệu chính và phổ biến là dịch đường glucose, fructose, maltose, saccharose... dịch thủy phân cellulose, tinh bột... Nguồn nitơ hữu cơ thường dùng là nước chiết bắp, chiết malt, dịch tự phân nấm men. Cần chọn pH phù hợp với chủng vi sinh vật và sự tổng hợp enzyme theo mong muốn. Sau khi nuôi, ta thu được canh trường lỏng - dạng thô.

Để làm tăng lượng enzyme ở vi sinh vật chúng ta cần chú ý tuyển lựa và chọn giống các chủng vi sinh vật có hoạt tính enzyme cao, tổng hợp được enzyme cần thiết và với số lượng nhiều. Các chủng được phân lập theo phương pháp thông thường chỉ tổng hợp một lượng nhỏ enzyme (enzyme bản thể), do đó cần tiến hành gây đột biến bằng các phương pháp sinh học, lý, hóa học... để tạo chủng có khả năng siêu tổng hợp enzyme. Vi sinh vật sau khi được tuyển chọn, cần được nhân giống và nuôi trong điều kiện tối ưu để chúng sinh trưởng tốt, tổng hợp nhiều enzyme.

Ngoài ra cần phải chọn môi trường vì thành phần môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng trực tiếp đến sự sinh trưởng và tổng hợp enzyme của vi sinh vật. 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 enzyme.

Đặc biệt lưu ý là để tăng sự tổng hợp enzyme người ta thường dựa vào hiện tượng cảm ứng. Vì 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 kim toả của chất kìm hãm nhằm bảo đảm khả năng sinh tổng hợp enzyme đã cho không bị cản trở. Chất cảm ứng tổng hợp enzyme cho thêm vào môi trường nuôi thường là cơ chất tương ứng của enzyme cần tổng hợp.

Ví dụ: Muốn tách α - amylase ở nấm mốc (*Asp. Oryzae*), người ta cho vào môi trường nuôi cấy tinh bột, maltose, isomaltose, oligosaccharid... có chứa liên kết α - 1,6 glucozid. Muốn tách pectinase ở *Asp. Niger*, người ta cho thêm vào môi trường pectin. Đối với hemicellulase thì chất cảm ứng là hemicellulose; còn đối với proteinase chất cảm ứng có hiệu lực là protein, bột đậu nành, lông, sừng nghiền nhỏ (ở *Actinomyces fradiae*). Chất cảm ứng cũng có thể là những chất giống cơ chất và những sản phẩm thủy phân của chúng. Ví dụ: thay cho protein thì peptid và thay cho tinh bột thì erithrodextrin đều có tác dụng cảm ứng.

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đối với môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ nuôi cấy thông thường từ 25 - 30°C. Trị số pH ban đầu của môi trường (chủ yếu ở môi trường nước) cũng có thể gây ảnh hưởng nào đó đến sự tạo thành enzyme, nhưng khi đó cũng cần tính đến khả năng biến đổi nhanh chóng chỉ số đó bởi vi sinh vật. Thông thường đối với α - amylase, pH tối ưu cho sự sinh tổng hợp (pH = 7 - 8) khác với pH tối ưu cho hoạt động của nó (pH = 4,7 - 4,9). Các enzyme đường hóa khác của nấm mốc như glucoamylase thì pH tối ưu cho sự sinh tổng hợp và cho hoạt động là chung nhau (4,5 - 5,0). Độ thông khí cũng rất cần thiết cho việc sinh tổng hợp enzyme. Vì vậy ở môi trường bề mặt người ta thường thêm chất xốp như trấu vào, còn ở môi trường bề sâu (môi trường dịch thể), thì người ta thường lắc (nếu enzyme cần lắc thì việc này cực kỳ quan trọng). Độ ẩm cũng rất quan trọng (chỉ có tác dụng ở nuôi cấy bề mặt), phụ thuộc vào thành phần môi trường bề mặt.

Một điều cần nói thêm nữa là enzyme thường chứa ở các tế bào sinh vật gọi là các enzyme trong tế bào (intracellular), nhưng nó cũng có

thể được các sinh vật tiết ra môi trường sống. Đó là các enzyme ngoài tế bào (extracellular). Enzyme vi sinh vật thường chiết là enzyme ngoại bào.

2.2.2. Chiết rút enzyme

Muốn tìm hiểu toàn bộ hoạt động sống của cơ thể sinh vật, chúng ta phải biết bản chất của những biến đổi hóa học xảy ra trong từng mô tế bào. Điều đó chỉ thực hiện được khi chúng ta tách được các tế bào ra khỏi các mô và chiết rút cũng như làm sạch các enzyme chứa trong chúng. Từ các dạng enzyme tinh khiết thu được chúng ta có thể nghiên cứu sâu sắc cơ chế tác dụng, tính đặc hiệu trong hoạt động xúc tác của chúng. Tùy theo những đặc tính riêng biệt của từng loại enzyme mà lựa chọn phương pháp làm sạch cho thích hợp. Trong quá trình tinh chế enzyme, mặc dầu trình tự và các thủ thuật ở các bước có thể thay đổi, song vẫn có những nguyên tắc chung.

Như chúng ta đã biết, trong cơ thể sinh vật, enzyme có trong tế bào chất và các cấu tử (nhân, microsomes, ty thể, lysosomes...) của tế bào. Tế bào được bao bọc bằng một lớp màng. Lớp màng này ở vi khuẩn đôi khi rất bền và dày. Người ta còn thấy nhiều enzyme liên kết rất chặt chẽ với các cấu tử của tế bào.

Các phân tử enzyme không có khả năng đi qua màng của tế bào và màng của các cấu tử của tế bào. Do đó để có thể chiết rút các enzyme nội bào, bước đầu tiên là phải phá vỡ cấu trúc của các tế bào có chứa enzyme và chuyển chúng vào dung dịch.

Có thể phá vỡ cấu trúc của các tế bào bằng các biện pháp cơ học như nghiền với bột thủy tinh hoặc cát thạch anh, làm đồng hóa bằng thiết bị đồng hóa (homogenizator). Thiết bị có chày thủy tinh gắn với một motor quay và có thể điều chỉnh được tốc độ quay theo yêu cầu. Các tế bào giữa chày thủy tinh và thành cối sẽ bị phá hủy. Để việc phá vỡ có hiệu quả ở mô thực vật, trước khi nghiền người ta thường thái nhỏ mẫu để vào ngăn đá hoặc cho trương nước (ví dụ như đối với mẫu hạt khô). Còn ở các mô của động vật như gan hoặc thận, khi chiết enzyme người ta cần cắt bỏ các mô liên kết.

Muốn tách được các enzyme trong các cấu tử của tế bào, người ta còn phải dùng các yếu tố vật lý và hóa học khác nhau như sóng siêu âm, dùng các dung môi hữu cơ như butanol, acetone, glycerin, ethyl acetate... và chất detergent. Các hóa chất có tác dụng tốt cho việc phá vỡ các cấu tử của tế bào vì trong các cơ quan này thường chứa mỡ.

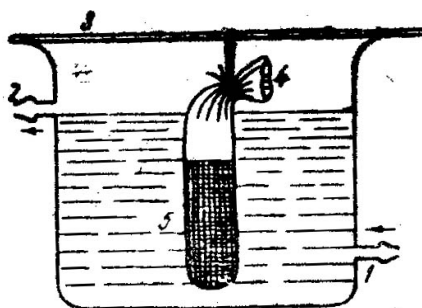
Sau khi đã phá vỡ các cấu trúc của tế bào, enzyme được chiết bằng nước cất, bằng các dung dịch đệm thích hợp hoặc các dung dịch muối trung tính.

Có một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết rút cần lưu ý. Trước hết đó là nhiệt độ. Để tránh mất hoạt tính hoặc thậm chí vô hoạt, cần chiết rút và tiến hành kết tủa enzyme ở nhiệt độ thấp (từ 3 đến 5°C). Các thao tác phải nhanh. Một số chất điện ly làm tăng quá trình chiết rút enzyme như NaCl, ZnCl₂, CaCl₂. Tác dụng của chúng còn phụ thuộc vào phương pháp dùng khi chiết rút. Ví dụ như nếu dùng máy nung thì cả ba chất trên đều có tác dụng. Nếu chỉ để lắng thì chỉ NaCl có tác dụng. Vì vậy cần dùng chất điện ly thích hợp. Ví dụ khi chiết rút amylase, nếu cho thêm NaCl 0,1 - 0,2 % vào dung dịch chiết rút thì hiệu suất chiết rút tăng lên 30%. Người ta còn nhận thấy, nếu thêm vào dịch chiết CaCl₂ 0,2% sẽ làm cho kết tủa enzyme tốt hơn và cấu trúc của kết tủa cũng tốt hơn.

Trong quá trình chiết rút enzyme ở các đối tượng động, thực vật, có trường hợp còn có mặt chất màu làm ảnh hưởng đến việc làm sạch hoặc xác định hoạt độ enzyme. Trong trường hợp này người ta còn cho thêm vào chất khử để loại màu. Màu của hemoglobin ở hồng cầu hoặc của chlorophyll và một số chất màu khác ở lá có thể bị loại trừ bởi hỗn hợp ethanol, chloroform với tỷ lệ thích hợp. Hoạt độ enzyme superoxide dismutase (SOD) - một enzyme chống oxy hóa có thể xác định sau khi đã loại màu khỏi dịch chiết enzyme. Ở các mẫu từ động vật có sắc tố melanin màu nâu. Người ta thường loại màu trên cột nhựa trao đổi ion bằng cách cho dịch enzyme qua cột hoặc lọc. Khi qua cột, chất màu bị giữ lại và enzyme không bị giữ. Ví dụ người ta hay dùng DEAE - cellulose (Diethylamino ethyl - cellulose) hoặc than hoạt tính. Trong quá trình này phải chú ý kiểm tra pH. Sau khi loại màu cần kiểm tra lại hoạt độ của enzyme.

Trong dịch chiết, ngoài enzyme còn có các protein cấu trúc, các chất cao phân tử khác nhau như polysaccharid nucleic acid, các chất có phân tử nhỏ như đường monose, các chất lipid, muối khoáng... Để loại chúng phải sử dụng phối hợp nhiều biện pháp khác nhau.

Để loại bỏ muối khoáng và các loại đường... là các tạp chất có phân tử lượng thấp, người ta thường dùng phương pháp thẩm tích (dialysis) đối nước hay đối các dung dịch đệm loãng hoặc bằng cách lọc qua gel sephadex. Cách làm thẩm tích như sau: cho dung dịch enzyme vào túi colodion hoặc cellophane (thông thường người ta dùng cellophane tốt hơn), sau đó đặt cả túi vào nước cất hoặc dung dịch đệm pha loãng (như đệm phosphate có pH = 7, nồng độ 0,01M chẳng hạn). Màng cellophane là màng bán thấm, có kích thước lỗ cho các chất có phân tử nhỏ xuyên và đi qua vào các dung dịch đệm loãng theo định luật khuếch tán. Còn lại trong màng là các chất protein có phân tử lớn. (Hình 2.1)



Hình 2.1. Thẩm tích để loại muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trong kết tủa protein

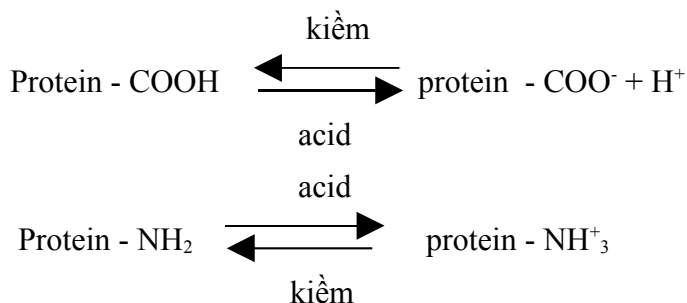
Để loại bỏ các protein tạp (protein cấu trúc, protein trợ) và các chất có phân tử lượng cao khác người ta hay dùng kết hợp các phương pháp khác nhau: phương pháp biến tính chọn lọc nhờ tác dụng của nhiệt độ hoặc pH của môi trường, phương pháp kết tủa phân đoạn bằng muối trung tính hoặc các dung môi hữu 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 hoặc pH của môi trường chỉ dùng đối với trường hợp các enzyme bền với nhiệt hoặc bền với acid.

Thủ thuật được tiến hành như sau: dịch enzyme được giữ ở 50 - 70°C hay ở pH = 5 trong một thời gian xác định. Protein bị biến tính được loại bỏ bằng cách lọc hoặc ly tâm

2.2.3. Các phương pháp tách từng phân protein enzyme

Protein là các chất lưỡng tính, vì vậy trong các dung dịch acid và kiềm chúng sẽ bị phân ly như sau:



Ở một chỉ số pH xác định, mỗi phân tử protein có một điện tích tổng số nào đấy mà độ lớn của nó phụ thuộc vào số lượng các nhóm tích điện dương và tích điện âm. Kết quả là ở chỉ số nồng độ ion hydro cố định, các protein khác nhau trong hỗn hợp sẽ có tổng điện tích khác nhau.

Nhiều phương pháp dùng để tách các hỗn hợp protein đều dựa vào đặc tính này. Các phân tử protein mang điện tích tổng số (dương hoặc âm) cùng dấu đẩy nhau ra xa nên dễ tan vào dung dịch. Mỗi một protein có một trị số pH nhất định mà ở đó tổng số điện tích âm và điện tích dương trong phân tử bằng không. Trị số pH đó gọi là điểm đẳng điện. Ở điểm đẳng điện, độ hòa tan của protein là thấp nhất, protein rất dễ bị kết tủa. Dựa vào tính chất này, người ta có thể tách từng phần các protein enzyme trong hỗn hợp...

Ở các phương pháp tách từng phần này, người ta có thể sử dụng phương pháp kết tủa thuận nghịch bằng muối hoặc các dung môi hữu cơ, phương pháp sắc ký cột.

Nói chung để đạt kết quả tốt, người ta thường phối hợp hai phương pháp với nhau.

2.2.3.1. Dùng muối $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ để tách enzyme

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 enzyme ở một nồng độ muối (tính theo phần % nồng độ bão hòa) xác định được dùng phổ biến để loại bỏ bước đầu protein tạp của các dịch enzyme. Các loại muối có thể được dùng là $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, $\text{Na}_2 \text{SO}_4$, MgSO_4 ... người ta đã nhận thấy muối $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ là tốt nhất vì nó không làm hại mà làm ổn định (làm bền) hầu hết các loại enzyme. Loại muối này lại rẻ và phổ biến. Độ hòa tan của nó lại rất lớn (bão hòa 767g/l ở 25°C). Ngoài ra nồng độ $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ cần thiết để kết tủa enzyme khác nhau thì khác nhau nhiều. Ví dụ: Protease của nấm mốc dễ bị kết tủa ở 70% của $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ bão hòa hoàn toàn, còn amylase của mầm lúa bị kết tủa ở 50% độ bão hòa của dung dịch muối này. Điều đó nói lên tính kết tủa lựa chọn của $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ cao hơn các muối khác.

Thường dùng hai dạng bột hoặc bão hòa

- *Khi dùng bột:*

Người ta cho từng ít một vào dịch chiết enzyme. Cách cho cũng ảnh hưởng lớn đến lượng kết tủa ban đầu của enzyme. Khi cho muối vào dịch chiết cần phải có máy khuấy từ để đảm bảo sự hòa tan của muối.

- *Khi dùng dung dịch bão hòa:*

Trong nhiều sách về phương pháp nghiên cứu người ta đưa ra bảng tính số lượng muối cần thiết để pha các dung dịch có độ bão hòa khác nhau ở những nhiệt độ nhất định. Khái niệm về số phần trăm của độ bão

hòa hoàn toàn đã được đề cập đến. Như ví dụ trên đã nói, enzyme có thể bị kết tủa ở 50% (0,5) hoặc 70% (0,7) của độ bão hòa hoàn toàn của $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Khi cho dung dịch $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ vào dịch chiết enzyme thì nồng độ $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ không tăng đột ngột.

Sau khi kết tủa xong người ta thường để lắng khoảng 2h hoặc để qua đêm, mục đích là tạo kết tủa hoàn toàn (ở phương pháp dùng dung môi hữu cơ thì không cần để lâu). Kết tủa được lấy ra bằng cách ly tâm hoặc lọc qua phễu Buckner. Khi hòa tan kết tủa lại người ta thường thêm ion Ca^{++} làm bền (CaCl_2 hoặc $\text{Ca}(\text{COOH})_2$).

Ở giai đoạn loại muối, người ta dùng phương pháp thẩm tích như đã được trình bày ở phần trước. Thời gian thẩm tích thường là 24 - 28h, nước thay càng nhiều càng nhanh càng tốt.

Có thể loại muối bằng cách lọc qua gel sephadex G25 là dẫn suất của dextran. Ưu thế của phương pháp này là tiến hành với thời gian ngắn (khoảng 30'), nên không làm mất hoạt độ enzyme. Muối có trọng lượng phân tử bé bị giữ lại, các enzyme có trọng lượng phân tử lớn xuống trước (xem phương pháp lọc gel 2.2.3.4.a)

Giai đoạn tiếp theo là làm đông khô thành bột trắng. Chuyển trạng thái từ dịch nước đá sang trạng thái khí mà không qua trạng thái lỏng.

Để tiện lợi người ta đưa ra công thức cách tính lượng $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ cho vào dung dịch đã có độ bão hòa cho trước (S_1) để đạt đến một độ bão hòa cần thiết (S_2)

Tùy theo trạng thái $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ cho thêm vào dung dịch chiết enzyme, mà có công thức tính toán khác nhau.

- Đối với $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ở dạng bột

$$x \text{ (g)} = \frac{0,515 \times V (S_2 - S_1)}{1 - 0,272 S_2}$$

Trong đó V là thể tích dung dịch S_1 , S_2 là độ bão hòa cho trước và độ bão hòa cần đạt ví dụ $S_1 = 0,5$ và $S_2 = 0,7$ chẳng hạn.

Người ta cũng có thể dùng bản đồ toán (nomogram) để chiếu và xác định được lượng $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ thêm vào để dung dịch enzyme đạt được

một độ bão hòa nhất định. Hoặc có thể đổi chiều ở bảng có sẵn. Lượng $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ đưa vào để dung dịch có độ bão hòa nhất định có khác nhau tùy thuộc nhiệt độ thí nghiệm.

- Đối với $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ở dạng dung dịch bão hòa. Thể tích (tính theo ml) của dung dịch bão hòa cần cho vào 100ml dung dịch có độ bão hòa ban đầu S_1 để đạt đến một độ bão hòa S_2 cần thiết được tính theo công thức sau:

$$V \text{ (ml)} = \frac{100 (S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

2.2.3.2. Dùng dung môi hữu cơ

Phương pháp này được tiến hành dựa trên cơ sở: độ hòa tan của protein phụ thuộc vào sự tương tác của các nhóm tích điện trong phân tử protein với các phân tử nước.

Sự tương tác đó (còn gọi là sự hydrate hóa) sẽ bị giảm xuống khi thêm vào dung dịch enzyme các dung môi hữu cơ. Dung môi hữu cơ thường dùng là ethanol, isopropanol, acetone hoặc hỗn hợp các loại rượu.

Ở phương pháp này cũng chú ý tiến hành ở nhiệt độ thấp (từ 5°C trở xuống). Dùng dung môi hữu cơ có thể tiến hành tách phân đoạn dưới 0°C và có thể đến -20°C , như vậy nó có tác dụng tốt đến độ ổn định của protein enzyme.

Khi đã có kết tủa, chú ý lấy nhanh kết tủa ra khỏi dung môi bằng cách dùng máy li tâm. Phương pháp này có lợi thế là không cần loại muối, nhưng có nhược điểm là hay có màu.

2.2.3.3. Dùng nhiệt

Cũng có thể dùng nhiệt để loại bỏ các protein enzyme tủa ra khỏi dịch chiết enzyme. Tuy vậy phương pháp này ít được dùng vì hiếm enzyme bền với nhiệt.

2.2.3.4. Các kỹ thuật sắc ký cột

Dịch chiết enzyme đã được loại bỏ phần lớn các protein tủa nhưng vẫn chưa đảm bảo độ đồng nhất cần thiết. Do đó dịch chiết enzyme được

tiếp tục làm sạch bằng phương pháp sắc ký cột. Phương pháp sắc ký (chromatography) là do hai chữ "chroma" là màu sắc và "grapho" là viết, nghĩa là "viết bằng màu". Thuở ban đầu, người ta đã sử dụng phương pháp sắc ký để tách các chất màu và chỉ sau này người ta mới áp dụng cho việc tách các chất không màu.

a. Phương pháp dùng chất rây phân tử (lọc gel - gel filtration)

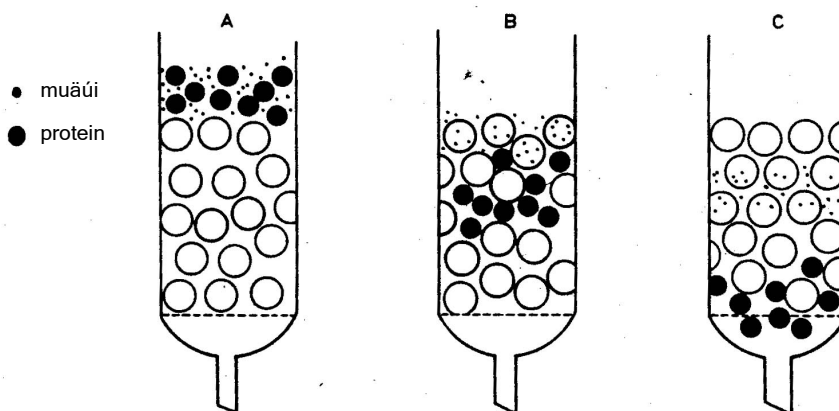
Cơ sở của phương pháp lọc gel là dựa vào sự khác nhau về kích thước hình dạng và phân tử lượng của enzyme có trong hỗn hợp để tách chúng ra.

Để đảm bảo cho việc tách enzyme được tốt, chất rây phân tử phải là chất trơ, không phản ứng với protein enzyme. Chất này cũng không hòa tan và tương đối bền với các yếu tố về cơ học cũng như sinh học. Ngoài ra chất được sử dụng cho mục đích lọc phân tử phải là chất không có tính đàn hồi (không co) và phải là chất ưa nước (hydrophil).

Gel sephadex là chất thoả mãn các yếu tố trên. Sephadex là chế phẩm dextran do các loài vi sinh vật khác nhau là *Leuconostoc* tạo ra khi chúng được nuôi cấy trên môi trường chứa saccharose. Trọng lượng phân tử của dextran có thể đạt tới hàng triệu và lớn hơn. Phân tử dextran bao gồm các chuỗi do các gốc glucose tạo thành các liên kết glucosid 1,6. Sephadex nhận từ dextran bằng cách xử lý hóa học (do tác dụng của epichlorhidrin) để tạo ra các lưới phân nhánh có liên kết ngang gọi là "sàng phân tử" và chất này trở thành không tan trong nước. Số liên kết ngang tạo ra càng nhiều, kích thước của lỗ sàng phân tử càng nhỏ.

Phương pháp lọc trên sephadex được tiến hành như sau: cho sephadex vào cột thủy tinh dài và cân bằng bằng dung dịch đệm có pH nhất định. Sau đó cho dung dịch enzyme lên cột. Khi lọc và chiết bằng dung môi thích hợp, các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ (ở đây là các muối) sẽ khuếch tán chậm chạp qua các lỗ nhỏ của các hạt Sephadex bị trương phồng, còn chất có trọng lượng phân tử lớn hơn (ở trường hợp này là protein enzyme) không có khả năng đi vào mà lách nhanh qua các hạt sephadex và sẽ rơi xuống trước, sẽ được chiết nhanh ra khỏi cột (Hình 2.2. và hình 2.3.). Vì vậy ta có thể tách được chất có trọng lượng phân tử cao hơn ra khỏi chất có phân tử lượng nhỏ. Hãng Sephadex (Pharmacia) của Thụy Điển đã tung ra thị trường các loại sephadex có kích thước khác

nhau có ký hiệu từ G10 đến G200. Số ký hiệu nhằm chỉ ra mức độ nhận (hút) nước của chúng. Ví dụ G10 để chỉ khi trương phòng thì 1g gel khô nhận 1ml nước (1ml/g)

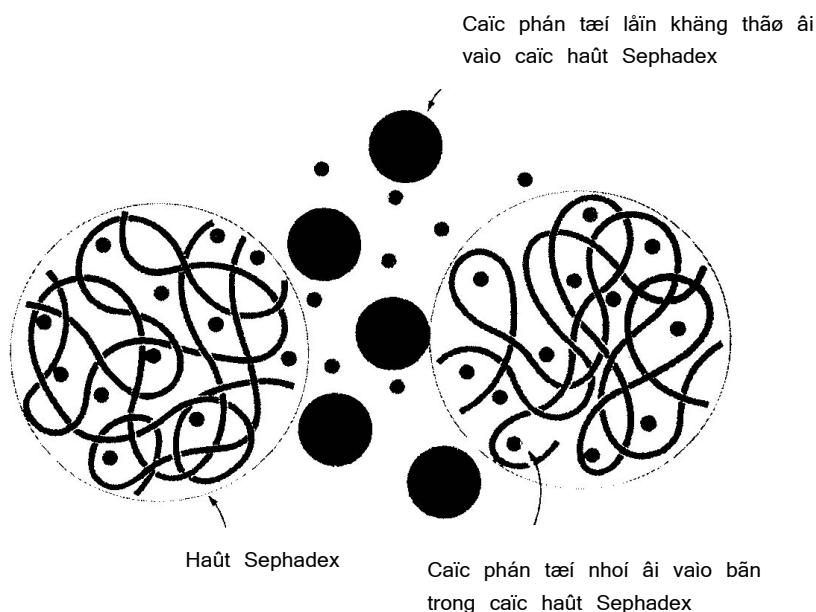


Hình 2.2. Hoạt động của lọc phân tử sephadex

Các sephadex có ký hiệu khác nhau từ G10 đến G200 phục vụ trong việc lọc phân tử cho phép các chất có trọng lượng phân tử khác nhau lọt vào ở các ngưỡng sau đây:

Các loại sephadex	Trọng lượng phân tử
G. 10	0 - 700
G. 15	0 - 1.500
G. 25 hạt tinh (F) hạt thô (C)	100 - 5000
G. 50 hạt tinh (F) hạt thô (C)	1500 - 30.000
G. 75	3.000 - 70.000
G. 100	4.000 - 150.000
G. 150	5.000 - 400.000
G. 200	5.000 - 800.000

Các gel lọc phân tử được sản xuất trong 4 cỡ hạt cùng trong một vòng lọc phân tử: hạt thô (coarse), hạt trung bình (medium), hạt mịn (fine), hạt siêu mịn, rất mịn (superfine).



Hình 2.3. Tách các phân tử theo kích thước bằng sắc ký lọc gel

Sự chênh lệch nhiều vì phân tử lượng của các enzyme (12700 - 1.000.000) cho phép nghĩ rằng để tách và làm sạch enzyme, phương pháp lọc gel sephadex là phương pháp có nhiều triển vọng. Nơi có ít liên kết ngang tách chất có trọng lượng phân tử lớn và ngược lại. Người ta còn sử dụng sephadex để loại muối thay cho quá trình thẩm tích.

Cùng nhóm chất rây phân tử có nguồn gốc polysaccharid, là chế phẩm dextran như sephadex (pharmacia) còn có Molselect (Reanal) - là sản phẩm của Hungary được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu.

Có thể dùng để làm cô đặc các chất có trọng lượng phân tử lớn như protein, peptid, loại muối khỏi protein enzyme (dùng nhanh hơn so với thẩm tích), lọc gel tách theo trọng lượng phân tử (như protein huyết thanh) hoặc tách các sản phẩm protein được hình thành dưới tác dụng của enzyme phân cắt (như γ - G - globulin bị cắt bởi papain).

Các Molselect cũng có ký hiệu từ G10 đến G200 phục vụ trong việc lọc phân tử cho phép các chất có trọng lượng phân tử khác nhau lọt vào ở các ngưỡng sau đây:

Các loại Molselect	Trọng lượng phân tử
G - 10	<700
G - 15	<1500
G - 25	100 - 5000
G - 50	500 - 10.000
G - 75	1.000 - 50.000
G - 100	1.000 - 100.000
G - 200	1.000 - 200.000

Ngoài nhóm chất rây phân tử là chế phẩm dextran còn có nhóm chất rây phân tử là chế phẩm gel acrylamide bao gồm Biogel (Bio - Rad) và Acrilex (Reanal). Acrilex gel là loại copolime, sản phẩm của Hungary được tạo ra từ acrylamide và N, N' - methylen – bis - acrylamide. Các acrilex gel có ký hiệu từ P - 2 đến P -300 dùng để tách các chất có trọng lượng phân tử trong ngưỡng từ 100 đến 300.000. Có thể sử dụng ở vùng pH từ 2 – 11. Chất thứ ba là agarose loại sulphate. Hay phổ biến là loại sepharose (pharmacia). Người ta thường dùng chất này để tách các phân tử có trọng lượng lớn hơn 10^6 .

Tóm lại bằng phương pháp lọc phân tử người ta có thể tách các chất có trọng lượng phân tử khác nhau có trong hỗn hợp (như polymer, polysaccharid, nucleic acid, protein) ra. Người ta có thể dùng kỹ thuật này để loại muối thay cho quá trình thẩm tích. Và hơn thế nữa, trong quá trình tinh chế protein enzyme, chúng còn được sử dụng để cô đặc dung dịch protein enzyme. Việc sắc ký, lọc phân tử protein hoặc chiết xuất protein thường thu được dung dịch loãng, nếu không cô đặc dung dịch để cho phù hợp đối với các nghiên cứu tiếp theo thì không dùng được. Molselect G - 25 rất thích hợp cho việc cô đặc các dung dịch loãng của các chất có trọng lượng phân tử lớn như protein, peptid. Bằng cách trộn với dung dịch protein loãng, Molselect sẽ nhận nước và chất có trọng lượng phân tử nhỏ, như vậy dung dịch protein được cô đặc mà không có sự thay đổi về pH và lực ion của nó.

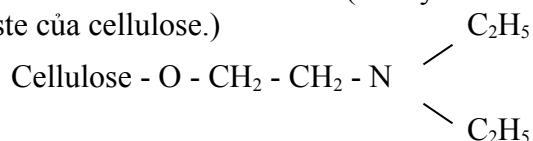
b. Phương pháp sắc ký trao đổi ion

Phương pháp sắc ký trao đổi ion dựa vào sự khác nhau về điện tích tổng số của các protein enzyme. Hay nói cách khác, phương pháp này được dựa trên cơ sở của phản ứng trao đổi ion giữa protein được tan trong nước hoặc dung dịch đệm loãng và các tác nhân trao đổi ion. Tác nhân (hay nguyên liệu) trao đổi ion có thể là chất nhựa có tích nhóm sinh ion hoặc là chất ionit. Đây là những chất giá đỡ, không tan trong nước, có bản chất là cellulose hoặc chất gel dextran có lưới phân nhánh (Sephadex, Molselect) hoặc là chất nhựa polystirol. Chất giá thể này thường kết hợp với các nhóm ion hóa. Các chất trao đổi ion có chất giá là cellulose, sephadex, molselect thông thường được dùng để tách protein enzyme, còn các chất trao đổi ion có chất giá là polystirol (ví dụ như Dowex, Amberlite) chỉ dùng để tách các peptid có trọng lượng phân tử nhỏ hơn.

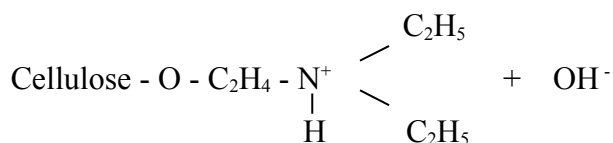
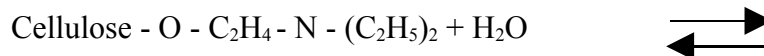
* Các chất trao đổi ion có chất giá cellulose

Cationit CM - cellulose (carboxylmetyl - cellulose) - là một dẫn xuất este của cellulose. Cellulose - O - CH₂ - COOH. Khi phân li cho ra COO⁻. Đây là chất trao đổi cation. Trên những cationit, thì các protein kiềm có thừa những nhóm amin và những nhóm kiềm khác được hấp phụ. Sự hấp phụ trên các cationit được tiến hành với những dung dịch loãng ở pH 1,5 - 6,5. (Các protein kiềm có chứa các amino acid diamino - mono carboxylic như lys, Arg, His)

Anionit DEAE - cellulose (diethylamino - ethyl - cellulose) là dẫn xuất este của cellulose.)



Trong H₂O nó được phân ly:



Đây là chất trao đổi anion

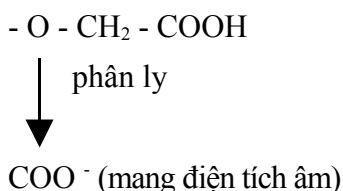
Các anionit được áp dụng để phân tích các protein acid có thừa những nhóm carboxyl tự do. Sự hấp phụ protein trên những ionit như vậy

được tiến hành với những dung dịch đệm có lực ion thấp (0,005 - 0,1M) ở pH 7,5 - 8,5, (các protein acid có chứa các amino acid monoamin).

Trong hỗn hợp chất ionit với dung dịch đệm có độ pH tương ứng, các chất ionit đã nói ở trên trở nên tích điện,. Vì vậy trên bề mặt lớp chất giá sẽ hình thành một lớp điện tích có dấu phụ thuộc vào kiểu nhóm chức hóa học của nó. Nếu thêm protein - enzyme vào dung dịch đệm thì các phân tử enzyme mang điện tích sẽ bị các nhóm tích điện trái dấu của chất trao đổi ion kéo lại. Khi dùng một dung dịch đệm để phân hấp phụ có pH khác hoặc khi thêm một loại ion khác có lực ion lớn hơn thì phân tử protein enzyme sẽ bị đẩy ra khỏi chất trao đổi ion. Khi tiến hành phân hấp phụ, thường người ta thêm vào các ion Na^+ và Cl^- trong NaCl có nồng độ tăng dần theo bậc thang hay theo gradient.

Các phân tử protein enzyme nào có điện tích tổng số nhỏ thì sẽ bị đẩy ra trước do lực liên kết với chất trao đổi ion yếu. Còn những protein enzyme nào có liên kết với ionit lớn hơn thì sẽ bị đẩy ra bằng một lực ion của muối lớn hơn. Như vậy, bằng cách này, chúng ta có thể tách được từng phần các loại protein enzyme. Việc tách từng phần có lựa chọn tốt nhất là khi tăng dần nồng độ các ion thay thế. Nhờ nồng độ ion của muối tăng dần (gradient) người ta có thể rút ra từ cột các loại protein enzyme khác nhau. Có thể thu nhận dịch chiết enzyme protein sau khi qua cột bằng máy thu phân đoạn tự động. Theo thứ tự từng phần dịch thu được, người ta tiến hành định lượng protein theo các phương pháp Lowry hay phương pháp đo quang phổ và xác định hoạt độ của enzyme. Ngoài việc dùng muối NaCl cho các ion Na^+ và Cl^- , người ta có thể dùng các loại muối khác như KCl , Na_3PO_4 .

Nếu chất giá là sephadex thì chúng ta có chất trao đổi ion sephadex. Đó là các loại DEAE - sephadex và CM - sephadex. Ưu điểm của loại này là vừa tách được protein enzyme về kích thước và về điện tích tổng số của các protein enzyme. Trường hợp CM - sephadex trên chất giá sephadex có gắn nhóm COO^-



Đây là chất trao đổi cation.

c. Phương pháp dùng chất hấp phụ

Nhiều protein và enzyme gắn một cách chọn lọc vào các chất hấp phụ nhất định như silicagel, bentonite, γ - aluminium hydroxid, hydroxyapatite và nhờ vậy, chúng có thể được làm sạch với hiệu suất cao.

Phương pháp hấp phụ chọn lọc - hấp phụ trong thể tích (thêm chất hấp phụ trực tiếp vào dịch enzyme) hoặc trên cột (sắc ký hấp phụ) được dùng phổ biến trong việc tách và làm sạch enzyme. Chất hấp phụ chủ yếu thường được dùng là hydroxyapatite cho hiệu quả phân tách đặc biệt cao. Hấp phụ chọn lọc enzyme có thể thực hiện bằng một trong hai cách : chất hấp phụ hoặc hấp phụ protein tạp hoặc hấp phụ enzyme. Quá trình hấp phụ thường được tiến hành ở 0°C. Bằng cách thay đổi độ pH hoặc lực ion của dung môi thích hợp, các enzyme được hấp phụ có thể được chiết khỏi chất hấp phụ.

d. Phương pháp dùng chất hấp phụ đặc hiệu sinh học hay là phương pháp sắc ký ái lực (affinity chromatography)

Cơ sở của phương pháp này là người ta gắn những phân tử (chất) vào chất mang (chất giá) rắn bằng liên kết cộng hóa trị mà protein enzyme cần tách sẽ tương tác đặc hiệu với nó. Những chất đó có thể là cơ chất (Substrate) hoặc chất ức chế (inhibitor) cạnh tranh. Hay nói cách khác dùng chất chỉ có khả năng liên kết đặc hiệu với một enzyme hoặc protein mà người ta nghiên cứu.

Chất mang thể rắn có thể là bất kỳ một loại nào phục vụ cho lọc gel như sephadex, nhưng người ta hay sử dụng nhất là gel sepharose.

Ở trên cột chứa cơ chất cố định ở pH và lực ion phù hợp, chỉ có enzyme nào có khả năng chuyển hóa cơ chất mới gắn vào, các protein khác thì chảy xuống cột. Bằng cách thay đổi pH và lực ion phù hợp hoặc có thể bằng cách thêm cơ chất đã được hòa tan vào thì có thể tách được enzyme khỏi cột ở trạng thái sạch.

2.2.4. Kết tinh protein enzyme

Đây là phương pháp đặc hiệu tốt nhất để tách từng phân protein enzyme ở giai đoạn tinh chế cuối cùng.

Khi protein enzyme đã được làm tinh khiết hoàn toàn, trong những trường hợp riêng biệt, người ta có thể tiến hành kết tinh chúng. Một điều cần chú ý là protein enzyme ở trạng thái tinh thể không thể được coi là bằng chứng về sự tinh khiết. Các tinh thể protein enzyme kết tinh lần đầu đôi khi có độ sạch không vượt quá 50% và có thể chứa các protein enzyme khác. Người ta thường tiến hành kết tinh protein enzyme trong dung dịch

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Quá trình kết tinh có thể tiến hành từ từ kéo dài vài ngày thậm chí hàng tuần nếu muốn nhận được các tinh thể tốt. Thông thường là thêm muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vào dung dịch protein enzyme khá đậm đặc cho đến khi làm vẩn đục nhẹ nhàng dung dịch. Sau đó đặt dung dịch vào một nơi, đồng thời tăng rất từ từ nồng độ muối trong dung dịch. Có thể tiến hành tăng nồng độ muối theo nhiều cách, thêm dung dịch muối đậm đặc hơn vào dung dịch protein enzyme theo từng giọt, thêm muối qua màng bán thấm hoặc có thể cho bay hơi chậm chạp dung dịch protein enzyme. Trong quá trình kết tinh có thể thay đổi chỉ số pH hoặc nhiệt độ. Để kết tinh protein enzyme được dễ dàng, ở những giai đoạn trước đó, người ta thường tách từng phần các protein enzyme bằng các dung môi hữu cơ. Điều này có lẽ liên quan đến việc các chất có bản chất lipid bị loại ra khỏi dung dịch protein enzyme tạo điều kiện tốt cho quá trình kết tinh.

2.2.5. Đánh giá tính đồng thể của protein enzyme

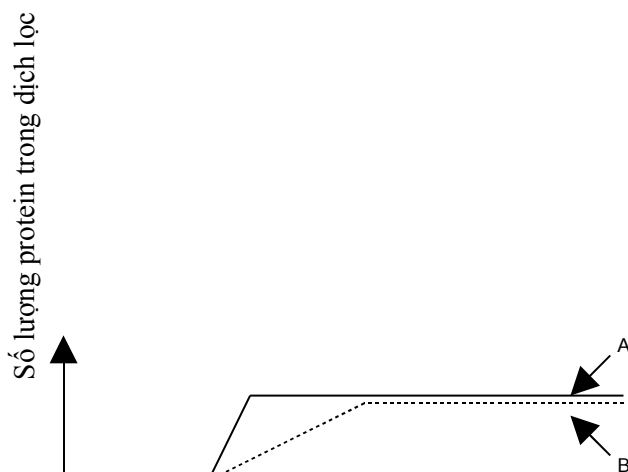
Khi đã nhận được một protein enzyme ở trạng thái kết tinh, người ta phải thử lại mức độ tinh khiết hay tính đồng thể của nó. Độ đồng thể của chế phẩm protein enzyme phải được kiểm tra bằng một số phương pháp dựa trên những nguyên lý khác nhau. Trong một số trường hợp protein enzyme được coi là đồng thể khi ly tâm, nhưng lại có thể phân chia thành một số isoenzyme bằng phương pháp điện di trên gel. Chính vì vậy, nếu dùng nhiều loại phương pháp khác nhau để kiểm tra độ sạch của protein mà kết quả đều cho là đồng thể thì protein đó có thể được công nhận là tinh khiết. Những phương pháp để kiểm tra tính đồng thể hay dùng là xây dựng đồ thị về độ hòa tan, điện di và siêu ly tâm.

- Phương pháp kiểm tra tính đồng thể (hoặc còn gọi là tính đồng nhất) của protein đơn giản và nhạy nhất là xây dựng đường biểu diễn về độ hòa tan.

Cách làm như sau: Trong hàng loạt mẫu dùng một thể tích không đổi một loại dung môi (nước hoặc dung dịch muối) lắc với những số lượng enzyme khác nhau. Sau đó lọc và xác định số protein trong dịch lọc. Cuối cùng xây dựng đường đồ thị.

Trong những loại mẫu đầu, tất cả các protein thêm vào bị hòa tan và số lượng protein thêm vào bằng số lượng protein có trong dịch lọc hay dịch ly tâm. Kết quả nhận được biểu diễn là một đường thẳng. Sau đó dung dịch đạt được bão hòa. Nếu protein đem hòa tan là tinh khiết nghĩa là đồng nhất thì khi thêm protein trong dịch lọc sẽ không tăng lên và đường biểu diễn có một điểm uốn.

Nếu trong mẫu có một protein thứ hai thì sau khi đạt được độ bão hòa đối với protein ít hòa tan hơn, loại protein thứ hai còn có thể hòa tan được nữa.



Hình 2.4. Đường biểu diễn độ hòa tan protein

Kết quả là có một điểm bão hòa thứ hai và đường biểu diễn có hai điểm uốn. Nếu dịch chiết (hỗn hợp) có nhiều protein enzyme thì sẽ có nhiều điểm uốn. Phương pháp này được Northrop và Kuhnz sử dụng rất có kết quả. Nay vẫn còn ứng dụng nhiều. B: Hỗn hợp 2 protein

- Phương pháp thứ hai để xác định độ đồng thể của protein enzyme là phương pháp điện di. Phương pháp điện di là ứng dụng tính chất lưỡng tính của protein, dựa trên cơ sở dịch chuyển của các tiểu phần chế phẩm protein enzyme mang điện trong điện trường. Dem chế phẩm protein enzyme điện di ở pH và lực ion nhất định. Nếu trên điện di đồ có một đỉnh thì chứng tỏ protein enzyme đó là đơn thể. Nếu có hai đỉnh chứng tỏ có hai protein enzyme trong chế phẩm đó.

- Phương pháp siêu ly tâm:

Đây cũng là phương pháp rất quan trọng để xác định tính đồng thể của protein enzyme. Phương pháp được thực hiện như sau:

Dùng lực ly tâm rất lớn bằng cách tăng số vòng quay ly tâm lên hàng nghìn, hàng vạn vòng trong một phút. Với tốc độ ly tâm rất lớn, người ta có thể tách ra được các phân tử enzyme có trọng lượng phân tử khác nhau.

Tốc độ kết tủa của protein enzyme trong máy siêu ly tâm được xác định bằng trọng lượng phân tử của nó. Khi dừng quay thì các phân tử protein lại khuếch tán vào dung dịch. Bởi vậy, cần phải quan sát tốc độ lắng trong quá trình siêu ly tâm. Chính vì vậy, trong cốc siêu ly tâm, người ta gắn một thiết bị quang học đặc biệt, vẽ các đường ánh sáng của kết quả phân tích lên một màn. Nếu trong dung dịch có một loại protein enzyme (có một trọng lượng phân tử) thì trên màn sáng sẽ cho đường đồ thị có một đỉnh. Nếu làm việc với hai protein enzyme thì sẽ có hai đỉnh v.v...

2.3. Hoạt độ enzyme

2.3.1. Phương pháp xác định hoạt độ enzyme

Khác với trong hóa học phân tích bình thường, trong enzyme học, người ta không định lượng enzyme một cách trực tiếp mà thường xác định gián tiếp thông qua xác định độ hoạt động (còn gọi là hoạt độ) của enzyme. Trong phản ứng có enzyme xúc tác, sự hoạt động của enzyme được biểu hiện bằng cách 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 enzyme thông qua xác định cơ chất bị mất đi hay lượng sản phẩm được tạo thành trong phản ứng.

Để xác định hoạt độ của enzyme ở các dịch chiết hoặc ở chế phẩm người ta thường dùng các phương pháp vật lý hoặc hóa học. Các phương pháp, so màu, đo khí, đo độ phân cực, đo độ nhớt, chuẩn độ... được dùng phổ biến trong nghiên cứu định lượng các phản ứng enzyme.

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 enzyme xác định.
2. Đo thời gian cần thiết để thu được một lượng biến thiên nhất định của cơ chất hay sản phẩm với một nồng độ enzyme nhất định.
3. Chọn nồng độ enzyme như thế nào để trong một thời gian nhất định thu được sự biến thiên nhất định về cơ chất hay sản phẩm.

2.3.2. Đơn vị hoạt độ enzyme

Hội nghị quốc tế về hóa sinh enzyme đã đưa ra khái niệm đơn vị enzyme quốc tế (hoặc đơn vị enzyme tiêu chuẩn) vào năm 1961.

Đơn vị hoạt độ enzyme (U) là lượng enzyme có khả năng xúc tác làm chuyển hóa 1 micromole (1 μ mol) cơ chất sau một phút ở điều kiện tiêu chuẩn.

1 U = 1 μ mol cơ chất (10^{-6} mol)/ phút.

Từ năm 1972 người ta lại đưa thêm khái niệm Katal (Kat)

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

$$1 \text{ Kat} = 6.10^7 \text{ U}$$

$$\text{Và } 1 \text{ U} = \frac{1}{60} \text{ microkatal}$$

Đối với chế phẩm enzyme, ngoài việc xác định mức độ hoạt động còn cần phải đánh giá độ sạch của nó. Đại lượng đặc trưng cho độ sạch của chế phẩm enzyme là hoạt độ riêng.

- Hoạt độ riêng của một chế phẩm enzyme là số đơn vị enzyme/ 1mg protein (U/mg) cũng có thể 1g chế phẩm hoặc 1 ml dung dịch enzyme. Thông thường hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Lowry. Khi đã biết khối lượng phân tử của enzyme thì có thể tính hoạt độ phân tử.

- Hoạt độ phân tử là số phân tử cơ chất được chuyển hóa bởi một phân tử enzyme trong một đơn vị thời gian.

Hoạt độ phân tử lớn (còn gọi là con số chuyển hóa hoặc con số vòng: turnover number) có nghĩa là phản ứng được xúc tác xảy ra rất nhanh. Như vậy, hoạt độ phân tử chính là khả năng xúc tác: hoạt độ phân tử càng cao thì khả năng xúc tác càng lớn. Ví dụ người ta đã xác định được hoạt độ phân tử cao của một số enzyme tinh khiết như catalase ($5,6 \times 10^6$) acetyl - cholinesterase ($3,0 \times 10^6$), β -amylase ($1,2 \times 10^6$).

Cũng cần chú ý rằng trong một số trường hợp định nghĩa về đơn vị hoạt độ enzyme ở trên không thể áp dụng được. Nếu cần thiết chúng ta sẽ đưa ra các điều kiện thí nghiệm tương đối hoặc định nghĩa của các đơn vị khác. Ở nơi có nhiều hơn một mối liên kết của phân tử cơ chất bị tấn công thì một đơn vị hoạt độ enzyme là lượng enzyme có khả năng xúc tác làm chuyển hóa một micro - đương lượng của nhóm liên quan sau 1 phút ở điều kiện xác định. Ở nơi có hai phân tử giống nhau phản ứng với nhau thì 1 đơn vị hoạt độ là lượng enzyme xúc tác cho sự chuyển hóa của 2 μ mol cơ chất sau 1 phút.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hữu Chấn, 1983. Enzyme và xúc tác Sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng, 2000. Hóa sinh học. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
3. Đỗ Ngọc Liên, Phạm Thị Trân Châu, 1972. Enzyme I, II. Đại học Tổng hợp, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyền, 1998. Giáo trình sinh hóa hiện đại. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
5. Nguyễn Xuân Thắng, Đào Kim Chi, Phạm Quang Tùng, Nguyễn Văn Đồng, 2004. Hóa sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
6. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lân Dũng, 1982. Enzyme vi sinh vật. Nxb KH&KT, Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú (chủ biên), Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên, 2000. Hóa sinh Công nghiệp, Nxb KH&KT, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Bermeyer H. U, Bermeyer J. and Grasel M. (editors). 1983. Methods of enzymatic analysis. Vol II. Verlag chemie Weinheim.
2. Lehninger A. L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004.
3. Pelmont J., 1993. Enzymes. Presses universitaires de grenobe.
4. Stryer L., 1981. Biochemistry. W.H.Freeman and company. San Francisco.
5. Biochemical information, 1973. Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica.

Chương 3

Cách gọi tên và phân loại enzyme

3.1. Cách gọi tên enzyme

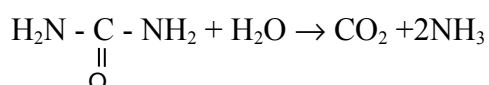
Trong thời gian đầu khi ngành enzyme học chưa phát triển, người ta thường gọi tên enzyme một cách tùy tiện, tùy theo tác giả. Ví dụ như các tên pepsin, trypsin, chimotrypsin hiện nay vẫn được dùng gọi là tên thường dùng.

Sau đó, người ta thường gọi tên enzyme bằng cách lấy tên cơ chất đặc hiệu của enzyme cộng thêm đuôi từ “ase”.

Ví dụ urease là enzyme tác dụng vào ure, proteinase là enzyme tác dụng vào protein, lipase là enzyme tác dụng vào lipid, amylase là enzyme tác dụng vào tinh bột (amidon).

Đối với các nhóm enzyme cùng xúc tác một loại phản ứng, người ta lấy tên của phản ứng enzyme thêm đuôi từ “ase”, ví dụ những enzyme xúc tác sự oxy hóa được gọi là oxydase, những enzyme khử hydrogen được gọi là dehydrogenase ...

Tên gọi đầy đủ, chính xác theo quy ước quốc tế - tên gọi hệ thống của enzyme được gọi theo tên cơ chất đặc hiệu của nó cùng với tên của kiểu phản ứng mà nó xúc tác, cộng thêm đuôi “ase”, ví dụ enzyme xúc tác cho sự thủy phân ure (carbamid):



có tên hệ thống là Carbamid - amidohydrodase (Tên thường dùng là urease)

3.2. Phân loại enzyme

Mục đích của phân loại enzyme là để nhấn mạnh một cách chính xác và tổng quát, mối quan hệ và những điều giống nhau của một loại enzyme.

3.2.1. Các lớp enzyme

Tiểu ban về enzyme (The enzyme Commission. EC) được tổ chức bởi Hội hóa sinh quốc tế (The international Union of Biochemistry, IUB)

đã đưa ra cách phân loại thống nhất dựa trên các loại phản ứng và cơ chế phản ứng. Theo cách phân loại này thì enzyme được chia ra làm sáu lớp lớn đánh số từ 1 đến 6. Các số thứ tự này là cố định cho mỗi lớp.

Sáu lớp enzyme theo phân loại quốc tế gồm có:

1. *Oxydoreductase*: Các enzyme xúc tác cho phản ứng oxy hóa - khử.

Trong nhóm này có tất cả các enzyme có các tên thông thường đã biết như dehydrogenase, oxydase, cytochromreductase và peroxydase. Trong các phản ứng do chúng xúc tác xảy ra sự vận chuyển hydrogen, sự chuyển electron, sự oxy hóa bởi oxy phân tử, bởi hydrogen peroxide hoặc bởi các chất oxy hóa khác.

2. *Transferase*: Các enzyme xúc tác cho phản ứng chuyển vị.

Các transferase do bản chất của những gốc mà chúng vận chuyển có thể tham gia vào các quá trình trao đổi chất rất khác nhau. Trong lớp transferase bên cạnh transaminase và methyltransferase còn có các kinase khác nhau (xúc tác chủ yếu cho sự vận chuyển của gốc phosphate từ hợp chất cao năng tới chất khác, một phần lớn các enzyme trước kia gọi là mutase và một vài loại synthetase, ví dụ các enzyme tổng hợp DNA và RNA).

3. *Hydrolase*: Các enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân.

Trong lớp này có các enzyme phân giải este (ví dụ lipid), glucozid, amid, peptid, protein.

4. *Lyase*: Các enzyme xúc tác cho phản ứng phân cắt không cần nước, loại nước tạo thành nối đôi hoặc kết hợp phân tử nước vào nối đôi.

Thuộc vào lớp này có các enzyme được gọi là hydratase, aldolase, decarboxylase cũng như một số desaminase.

5. *Isomerase*: Các enzyme xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa.

Tính cho đến cùng thì chúng xúc tác cho những phản ứng chuyển các nhóm khác nhau bên trong phân tử. Trong lớp này không những có những enzyme chuyển hóa các đồng phân hình học và đồng phân quang học (như alaninracemase) mà cả các enzyme xúc tác cho các phản ứng ví dụ sự chuyển hóa aldose thành cetose (glucosophosphate isomerase, trước kia gọi là phosphohexoisomerase) hoặc biến đổi vị trí của liên kết este bên trong phân tử (ví dụ phosphoglucomutase)

6. *Ligase*: Các enzyme xúc tác cho phản ứng tổng hợp có sử dụng liên kết giàu năng lượng ATP. v.v...

Ở đây cần chú ý thêm là các enzyme phân cắt được phân loại với tên “lyase”. Nếu cân bằng chuyển dịch về phía tổng hợp thì enzyme đó cũng có thể được gọi là “synthase”. Ngược lại chúng ta gọi các enzyme xúc tác cho phản ứng kết hợp 2 phân tử có sự tham gia của ATP hoặc các nucleotide triphosphate tương tự hoặc có sử dụng mỗi liên kết giàu năng lượng là synthetase. Tên gọi theo hệ thống phân loại của lớp này là “ligase” để tránh sự đối tráo với tên “synthase” đã nói ở trên.

Mỗi lớp (class) lại được chia thành nhiều lớp phụ (sub-class) và phân lớp phụ (sub-sub-class), rồi sau đó thứ tự của enzyme trong phân lớp phụ (cũng có tài liệu phân chia theo: loại (lớp), tổ, nhóm và thứ tự enzyme).

Như vậy, mỗi enzyme trong hệ thống được phân loại và đặt tên theo mã 4 chữ số biểu thị phản ứng xúc tác: con số đầu chỉ lớp, số thứ hai chỉ lớp phụ, số thứ ba chỉ phân lớp phụ, số thứ tư chỉ rõ số bậc thứ tự của enzyme.

Ví dụ, enzyme xúc tác cho phản ứng:



có tên gọi là alcohol dehydrogenase (ADH), tên quốc tế theo khóa phân loại là: Alcohol: NAD oxydoreductase, EC 1.1.1.1

Trong đó, mã số 1 đầu tiên biểu thị tên lớp enzyme là oxydoreductase (lớp 1); mã số 1 thứ hai biểu thị lớp phụ 1: tác dụng lên nhóm CH - OH của các chất cho; mã số 1 thứ ba biểu thị phân lớp phụ 1: chất nhận là NAD hay NADP và mã số 1 cuối cùng chỉ số thứ tự của enzyme.

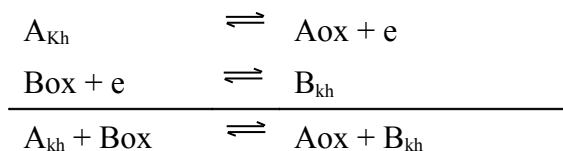
Như vậy, trong cách gọi hệ thống của enzyme ADH trên có tên của cơ chất và của coenzyme cũng như tên của quá trình chuyển hóa hóa học được xúc tác với tận cùng “ase”. Sau tên của enzyme là số của nó theo danh sách các enzyme do tiểu ban về enzyme đề ra (enzyme commission, EC).

3.2.2. Các phản ứng enzyme

3.2.2.1. Lớp enzyme oxydoreductase

Lớp enzyme này gồm 14 lớp phụ, xúc tác cho các phản ứng oxy hóa khử. Phản ứng oxy hóa tương ứng với sự tách điện tử ra khỏi cơ chất, phản ứng khử là phản ứng thu nhận điện tử và thường đi kèm với nhau.

Quá trình tổng quát có thể biểu thị như sau:



Trong đó A_{Kh} là cơ chất A ở dạng khử, A_{Ox} là cơ chất A ở dạng oxy hóa, e là điện tử, B_{Ox} là cơ chất B ở dạng oxy hóa, B_{Kh} là cơ chất B ở dạng khử.

Các enzyme thuộc lớp này là những enzyme 2 thành phần có các coenzyme như NAD^+ , NADP^+ , FMN, FAD, hem... Ngoài kiểu phân loại chính thức theo quy ước quốc tế, thông thường người ta phân biệt các enzyme lớp này thành các lớp phụ như dehydrogenase, oxydase, oxygenase và peroxydase.

- Dehydrogenase: xúc tác cho phản ứng tách H trực tiếp từ cơ chất và chuyển đến NAD^+ , NADP^+ , FMN, FAD.

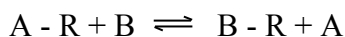
- Oxydase: Xúc tác cho quá trình chuyển điện tử đến oxy do đó hoạt hóa oxy làm cho nó có khả năng kết hợp với proton có trong môi trường.

- Oxygenase: 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: oxygenase và hydroxylase. Oxygenase xúc tác cho phản ứng kết hợp toàn bộ phân tử oxy còn hydroxylase chỉ kết hợp một nửa phân tử oxy (thường ở dạng OH) vào hợp chất hữu cơ.

- Peroxydase: các peroxydase điển hình và catalase có coenzyme là hem, xúc tác cho phản ứng oxy hóa các chất hữu cơ khi có H_2O_2 .

3.2.2.2. Lớp enzyme transferase

Lớp này gồm tám lớp phụ. Các enzyme lớp này cũng là những protein phức tạp, bản chất hóa học của các coenzyme rất khác nhau, tùy theo bản chất của nhóm được chuyển vị. Đây là lớp các enzyme chuyển nhóm (không phải hydrogen) giữa hai cơ chất, từ cơ chất A sang cơ chất B.



Trong đó $A - R$ là cơ chất A có mang nhóm R, $B - R$ là cơ chất B có mang nhóm R.

Các enzyme này xúc tác sự vận chuyển các nhóm monocarbon, nhóm alkyl, nhóm glucosyl, các nhóm có phosphore, các nhóm chứa lưu huỳnh.

- Acyltransferase: Các enzyme này xúc tác cho phản ứng chuyển nhóm acyl thường là thông qua coenzyme A, tạo thành phức CoAS ~ acyl.

- Glucosyltransferase: xúc tác cho phản ứng vận chuyển gốc đường (hexose, pentose) từ chất cho đến các chất nhận khác nhau, thường gặp nhất là nhóm OH của một gốc saccharide khác hoặc các gốc phosphate, nguyên tử N của nhân dị vòng.

Thuộc lớp phụ này còn có các enzyme phosphorylase, là các enzyme vận chuyển glucosyl đến gốc phosphate hoặc từ gốc phosphate đi.

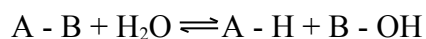
Aminotransferase: các enzyme này có coenzyme là pyridoxal phosphate xúc tác cho phản ứng chuyển vị nhóm amin. Các phản ứng quan trọng như chuyển thuận nghịch nhóm amin của amino acid đến α - cetoacid.

- Phosphotransferase: Hầu hết các phản ứng chuyển gốc phosphoryl thường có ATP tham gia với tính chất là chất cho, gốc phosphate được chuyển từ ATP (hoặc có thể là NTP khác) đến nhóm hydroxyl của alcol hoặc saccharide. Các enzyme này thường có tiếp vĩ "Kinase" (ví dụ như hexokinase)

Thuộc phosphotransferase còn có phosphomutase, xúc tác cho phản ứng chuyển phosphate nội phân tử.

3.2.2.3. Lớp enzyme hydrolase

Lớp enzyme này bao gồm 10 lớp phụ, xúc tác cho phản ứng thủy phân, phản ứng này làm đứt liên kết đồng hóa trị giữa hai nguyên tử của phân tử cơ chất gắn các phần tử của phân tử H_2O vào các hóa trị được tạo nên do sự đứt liên kết kể trên. Có thể được biểu thị như sau:



Trong đó A - B là phân tử cơ chất.

Các phản ứng do enzyme lớp này xúc tác luôn có nước tham gia. Đặc điểm khác là các hydrolase thường không cần coenzyme cho hoạt động xúc tác của chúng. Một số hydrolase phổ biến có vai trò quan trọng đối với quá trình tiêu hóa như amylase, peptide hydrolase, lipase...

- Amylase xúc tác cho quá trình thủy phân tinh bột, glycogen và các polysaccharide tương tự. Có 3 loại amylase khác nhau về tính đặc hiệu tác dụng đối với liên kết glucoside và một số tính chất khác.

α - amylase phân giải các liên kết 1,4 - glucoside ở giữa chuỗi mạch polysaccharide, vì vậy cũng gọi là "endo - amylase" tạo thành các dextrin phân tử thấp.

β - amylase xúc tác phản ứng thủy phân liên kết 1,4 - glucoside kể từ đầu không khử tạo thành chủ yếu là maltose và dextrin phân tử lớn.

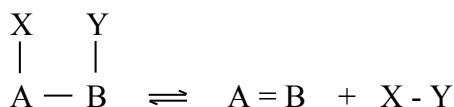
Glucoamylase xúc tác cho phản ứng thủy phân các liên kết 1,4 - 1,6 -glucoside bắt đầu từ đầu không khử của chuỗi polysaccharide. Sản phẩm chủ yếu được tạo thành dưới tác dụng của enzyme này là glucose và dextrin.

- Peptide hydrolase xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptide tạo thành peptide phân tử thấp, amino acid. Các peptide hydrolase khác nhau có tính đặc hiệu khác nhau đối với liên kết peptide. Một số enzyme phân giải các liên kết peptide ở giữa chuỗi mạch polypeptide gọi là endo peptide hydrolase hay proteinase (pepsine, trypsin, chymotrypsin...); một số khác lại thủy phân các liên kết ở đầu mút của chuỗi mạch, gọi là exo peptide hydrolase hay peptidase.

- Lipase xúc tác cho phản ứng thủy phân triglycerid tạo thành các acid béo tự do và glycerol (thủy phân lần lượt từng liên kết este)

3.2.2.4. Lớp enzyme lyase

Lớp enzyme này gồm 5 lớp phụ, xúc tác cho việc phân giải tách ra khỏi cơ chất một nhóm nào đó cùng với việc tạo thành liên kết đôi hoặc kết hợp với các nối đôi. Có thể biểu thị như sau:



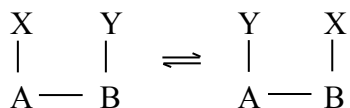
Lớp này có những enzyme tác động vào các liên kết C - C, C - O, C - N, C - S, C - Halogen

Pyruvat decarboxylase xúc tác cho phản ứng loại CO_2 khỏi phân tử pyruvic acid, tạo thành aldehyde tương ứng là acetaldehyde. Coenzyme của nó là thiamine pyrophosphate. Enzyme này có mối quan hệ chặt chẽ với pyruvat dehydrogenase.

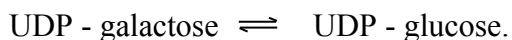
Fumarathydratase xúc tác cho phản ứng tách thuận nghịch phân tử H_2O khỏi malic acid, tạo thành fumaric acid (có một nối đôi)

3.2.2.5. Lớp enzyme isomerase

Lớp enzyme gồm 5 lớp phụ, xúc tác cho sự biến đổi lẫn nhau của các loại đồng phân quang học, đồng phân hình học hay đồng phân vị trí. Trong quá trình này có sự sắp xếp lại trong phân tử cơ chất. Có thể biểu thị như sau:



UDP - glucose - 4 - epimerase xúc tác cho sự chuyển hóa tương hỗ phức tạp giữa galactose và glucose, tức là làm xoay nhóm OH xung quanh nguyên tử carbon ở vị trí thứ tư của đường galactose. Enzyme có coenzyme NAD^+ , xúc tác cho phản ứng:



D - glucose - 6 - phosphate - cetoisomerase xúc tác cho phản ứng chuyển hóa lẫn nhau giữa D - glucose - 6 - (P) và fructose - 6 - (P)

3.2.2.6. Lớp enzyme ligase

Lớp enzyme này xúc tác cho những phản ứng kết hợp hai phân tử với nhau nhờ năng lượng của một liên kết giàu năng lượng trong ATP hay một hợp chất tương tự và thường kèm theo sự loại bỏ các phân tử của một phân tử nước. Thuộc về lớp enzyme này có 4 lớp phụ và chúng thường tạo nên các liên kết C - O, C - S, C - N, C - C.

Các enzyme ligase xúc tác cho việc tạo thành aminoacyl - tRNA từ amino acid và tRNA ở giai đoạn đầu tiên trong sự sinh tổng hợp protein. Ngoài ra chúng còn xúc tác cho sự sinh tổng hợp amino acid, tạo ra những dẫn chất acyl - CoA...

Pyruvatcarboxylase xúc tác cho phản ứng carboxyl hóa acid pyruvic acid tạo thành oxaloacetic acid. Enzyme này có chứa nhóm phụ là biotin, cần acetyl - CoA và Mg^{++} cho phản ứng xúc tác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hữu Chấn, 1983. Enzyme và xúc tác Sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng, 2000. Hóa sinh học. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
3. Đỗ Ngọc Liên, Phạm Thị Trân Châu, 1972. Enzyme I, II. Đại học Tổng hợp, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyền, 1998. Giáo trình sinh hóa hiện đại. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
5. Nguyễn Xuân Thắng, Đào Kim Chi, Phạm Quang Tùng, Nguyễn Văn Đồng, 2004. Hóa sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
6. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lân Dũng, 1982. Enzyme vi sinh vật. Nxb KH&KT, Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú (chủ biên), Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẫn, Lê Doãn Diên, 2000. Hóa sinh Công nghiệp, Nxb KH&KT, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Bermeyer H. U, Bermeyer J. and Grasel M. (editors). 1983. Methods of enzymatic analysis. Vol II. Verlag chemie Weinheim.
2. Lehninger A. L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004.
3. Pelmont J., 1993. Enzymes. Presses universitaires de grenobe.
4. Stryer L., 1981. Biochemistry. W.H.Freeman and company. San Francisco.
5. Biochemical information, 1973. Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica.

Chương 4

Cấu trúc phân tử enzyme

Enzyme có khả năng và hiệu lực xúc tác rất lớn, có tính đặc hiệu rất cao. Để đảm bảo cho chức năng của enzyme là chất xúc tác sinh học, cấu trúc của enzyme phải rất tinh vi và phức tạp.

4.1. Bản chất hóa học của enzyme

Từ gần một thế kỷ trước đây, các nhà khoa học đã đổ xô vào việc xác định bản chất hóa học của enzyme. Cho đến nay, có thể nói rằng, ngoài nhóm nhỏ phân tử RNA có hoạt tính xúc tác, tuyệt đại đa số enzyme có bản chất là protein và sự thể hiện hoạt tính xúc tác phụ thuộc vào cấu trúc bậc 1, 2, 3 và 4 của phân tử protein và trạng thái tự nhiên của chúng. Thực tế là bản chất hóa học của enzyme chỉ được xác định đúng đắn từ sau khi kết tinh được enzyme. enzyme đầu tiên nhận được ở dạng tinh thể là urease của đậu tương (Sumner, 1926), tiếp theo là pepsin và trypsin (Northrop và Kunitz, 1930, 1931). Sau đó những tác giả khác cũng đã kết tinh được một số enzyme khác và có đủ bằng chứng xác nhận các tinh thể protein nhận được chính là các enzyme.

Kết quả nghiên cứu tính chất hóa lý của enzyme đã cho thấy enzyme có tất cả các thuộc tính hóa học của các chất protein về hình dạng phân tử: đa số enzyme có dạng hình cầu (dạng hạt). Tỷ lệ giữa trục dài và trục ngắn của phân tử vào khoảng 1 - 2 hoặc 4 - 6.

Về khối lượng phân tử: các enzyme có khối lượng phân tử lớn, thay đổi rất rộng từ 12000 dalton đến 1.000.000 dalton hoặc lớn hơn.

Ví dụ ribonuclease có khối lượng phân tử là 12700, glutamat dehydrogenase có khối lượng phân tử là 1.000.000. Đa số enzyme có khối lượng phân tử từ 20.000 đến 90.000 hoặc vài trăm nghìn.

Do kích thước phân tử lớn, các enzyme không đi qua được màng bán thấm. Enzyme tan trong nước, khi tan tạo thành dung dịch keo; chúng cũng tan trong dung dịch muối loãng, glycerin và các dung môi hữu cơ có cực khác. Enzyme không bền và dễ dàng bị biến tính dưới tác dụng của nhiệt độ cao. Enzyme bị biến tính thì mất khả năng xúc tác. Mức độ giảm hoạt tính của enzyme tương ứng với mức độ biến tính của protein trong chế phẩm. Kiềm, acid mạnh, kim loại nặng cũng làm cho enzyme biến tính. Cũng như protein, enzyme cũng có tính chất lưỡng tính.

4.2. Thành phần cấu tạo của enzyme

Cũng như protein, enzyme có thể là protein đơn giản hoặc protein phức tạp. Trên cơ sở đó, người ta thường phân enzyme thành hai nhóm: enzyme một thành phần (enzyme một cấu tử) và enzyme hai thành phần (enzyme hai cấu tử). Trường hợp enzyme là một protein đơn giản gọi là enzyme một thành phần. Trường hợp enzyme là một protein phức tạp nghĩa là ngoài protein đơn giản còn có một nhóm ngoại nào đó không phải protein gọi là enzyme hai thành phần.

Phần protein của enzyme hai thành phần được gọi là apoprotein hay apoenzyme, còn phần không phải protein gọi là nhóm ngoại hoặc coenzyme. Phần không phải protein thường là những chất hữu cơ đặc hiệu có thể gắn chặt vào phần protein hoặc có thể chỉ liên kết lỏng lẻo và có thể tách khỏi phần protein khi cho thẩm tích qua màng. Coenzyme là phần không phải protein của enzyme trong trường hợp khi nó dễ tách khỏi phần apoenzyme khi cho thẩm tích qua màng bán thấm và có thể tồn tại độc lập. Phần không phải protein của enzyme được gọi là nhóm ngoại hay nhóm prosthetic, khi nó liên kết chặt chẽ với phần protein của enzyme bằng liên kết đồng hóa trị. Một phức hợp hoàn chỉnh gồm cả apoenzyme và coenzyme được gọi là holoenzyme. Một coenzyme khi kết hợp với các apoenzyme tạo thành các holoenzyme khác nhau xúc tác cho quá trình chuyển hóa các chất khác nhau nhưng giống nhau về kiểu phản ứng. Coenzyme trực tiếp tham gia phản ứng xúc tác, giữ vai trò quyết định kiểu phản ứng mà enzyme xúc tác và làm tăng độ bền của apoenzyme đối với các yếu tố gây biến tính. Còn apoenzyme có tác dụng nâng cao hoạt tính xúc tác của coenzyme và quyết định tính đặc hiệu của enzyme. Các coenzyme thường là các dẫn xuất của các vitamin hòa tan trong nước. Cần chú ý là sự phân biệt coenzyme và nhóm ngoại chỉ là tương đối, vì khó có thể có một tiêu chuẩn thật rành mạch để phân biệt “liên kết chặt chẽ” và “liên kết không chặt chẽ”, nhất là trong những năm gần đây, người ta đã chứng minh rằng, nhiều coenzyme cũng kết hợp vào apoenzyme của chúng bằng liên kết đồng hóa trị. Do đó, ngày nay người ta ít chú ý đến sự phân biệt coenzyme và nhóm ngoại. Ngoài ra, trong thành phần cấu tạo, rất nhiều enzyme có chứa kim loại. Thuộc loại enzyme hai thành phần gồm có hầu hết các enzyme của các lớp 1, 2, 4, 5, 6. Các enzyme thủy phân (lớp 3) thường là enzyme một thành phần có chứa ion kim loại hoặc đòi hỏi ion kim loại làm cofactor (đồng yếu tố).

4.3. Cấu trúc bậc 4 của enzyme

Trong nhiều trường hợp, các chuỗi polypeptide có cấu trúc bậc ba có thể kết hợp với nhau tạo thành phân tử enzyme có cấu trúc bậc bốn. Như vậy cấu trúc bậc bốn là cách sắp xếp đặc trưng trong không gian của các chuỗi polypeptide riêng biệt trong phân tử enzyme. Đến nay người ta đã xác định rằng số lớn các enzyme trong tế bào đều có cấu trúc bậc bốn. Các enzyme có cấu trúc bậc bốn là enzyme oligomer và polymer do nhiều đơn vị nhỏ cấu tạo nên, mỗi đơn vị nhỏ là do một chuỗi polypeptide. Các đơn vị nhỏ trong một phân tử enzyme có thể giống nhau, nhưng cũng có thể khác nhau về cấu tạo và chức năng, hoặc cũng có thể một số giống nhau, một số khác nhau. Những enzyme do nhiều đơn vị nhỏ cấu tạo nên còn được gọi là các enzyme polymer và các đơn vị nhỏ được gọi là protomer (các đơn vị nhỏ còn được gọi là các mảnh hoặc tiểu phần dưới đơn vị)

So với các enzyme monomer, các enzyme có cấu trúc bậc bốn có những điểm sai khác sau đây:

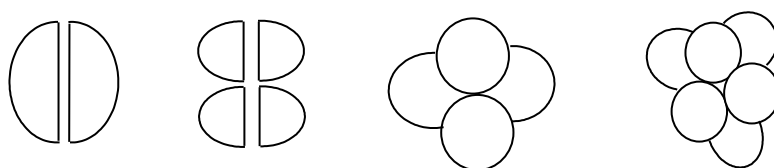
- Có trọng lượng phân tử tương đối lớn, vào khoảng hơn 100.000
- Phân tử thường chứa một vài trung tâm hoạt động, có khi có đến 3,4 trung tâm hoạt động.
- Khả năng tương tác của một trung tâm hoạt động với cơ chất sẽ phụ thuộc vào trạng thái chức năng của các trung tâm hoạt động khác. Trong một số trường hợp, mỗi tiểu phần có một trung tâm hoạt động nhưng sự tương tác giữa các tiểu phần sẽ ảnh hưởng đến cấu hình không gian của trung tâm hoạt động trên mỗi tiểu phần, do đó ảnh hưởng đến hoạt động xúc tác của enzyme. Trong một số trường hợp khác, các nhóm định chức của trung tâm hoạt động lại nằm trên các tiểu phần khác nhau, do đó hoạt động của enzyme chỉ thể hiện khi có sự kết hợp đúng đắn giữa các tiểu phần. Như vậy, enzyme có cấu trúc bậc bốn có tính tổ chức của một hệ thống hợp tác cao.
- Là điều kiện cần thiết để xuất hiện tính chất allosteric của enzyme. Cần nói thêm rằng, enzyme allosteric (enzyme dị lập thể, dị không gian) là enzyme mà chất trao đổi có thể làm ảnh hưởng (ức chế hoặc hoạt hóa) lên tác dụng của chúng. Hình như hiện tượng dị lập thể (allosteric) bắt đầu xảy ra trước hết ở các enzyme được xây dựng nên từ một số tiểu đơn vị vì hiệu ứng dị lập thể có ảnh hưởng đến độ bền của liên kết giữa các tiểu đơn vị này (xem thêm ở phần enzyme dị lập thể).

- Gồm các tiểu phần dưới đơn vị: Đa số các enzyme có cấu trúc bậc bốn chứa từ 2 - 4 protomer, một số enzyme khác chứa từ 6 - 8 protomer. Ví dụ enzyme catalase có trọng lượng phân tử 252.000, chứa 6 mảnh dưới đơn vị, mỗi mảnh có phân tử lượng là 42.000.

Một số enzyme chứa đến 12 protomer ví dụ như arginine carboxylase, oxaloacetate carboxylase.

- Sự sắp xếp của các mảnh dưới đơn vị trong phân tử enzyme thường có tính chất đối xứng cao.

Có 4 kiểu chính, được biểu thị ở hình dưới đây.



Hình 4.1. Sự sắp xếp của các tiểu phần trong enzyme có cấu trúc bậc bốn

- Các tiểu phần tương tác với nhau bằng các kiểu liên kết khác nhau. Trong đa số trường hợp nhờ tương tác kỵ nước, liên kết hydrogen, một số trường hợp khác nhờ liên kết disulfide (ví dụ glucoseoxydase của *Asp.niger*) hoặc cầu polypeptide (ví dụ như ở enzyme leucin-s-RNA-synthetase). Cầu polypeptide này có vai trò quan trọng với tính đặc hiệu của enzyme, khi mất nó sẽ thay đổi tính chất phản ứng.

Cần lưu ý là độ bền của tương tác giữa các tiểu phần phụ thuộc vào kiểu liên kết giữa chúng. Vì vậy, dưới tác dụng của các hóa chất khác nhau, các enzyme có thể bị phân ly thuận nghịch thành các mảnh dưới đơn vị. Ví dụ liên kết hydrogen bị phá vỡ dưới tác dụng của urê, clorua guanidin chloride nồng độ cao; tương tác kỵ nước bị phá vỡ dưới tác dụng của một số dung môi hữu cơ như dioxan, ethylen clorhydrin v.v... và muối trung hoà ở nồng độ rất cao.

Độ bền cấu trúc bậc bốn của phân tử enzyme phụ thuộc vào tỷ lệ giữa tổng số thể tích các gốc acid kỵ nước (V_K) với tổng số thể tích các gốc amino acid ưa nước (V_U) trong phân tử enzyme. Nếu $V_K/V_U > 1$, cấu tạo bậc bốn của phân tử khá bền vững; ngược lại nếu $V_K/V_U < 1$, không tạo thành cấu trúc bậc bốn hoặc nếu có thì cũng không bền vững. Ví dụ, cytochrome C, ribonuclease dễ dàng tạo thành cấu trúc oligomer, những cấu trúc này dễ dàng bị phân ly ngay cả khi lọc qua gel sephadex. Tuy nhiên tỷ lệ V_K/V_U của các enzyme có cấu trúc bậc bốn không phải luôn

luôn lớn hơn tỷ số V_K/V_{ur} của các enzyme monomer, trái lại trong một số trường hợp có thể bằng hoặc bé hơn. Ví dụ enzyme polymer phosphorylase b có tỷ lệ V_K/V_{ur} giống với α - chymotrypsine (1,04) và nhỏ hơn tỷ lệ V_K/V_{ur} của lysozyme. (1,08)

Sự hình thành cấu trúc bậc bốn là bước đầu tiên trên con đường hình thành các hệ thống tổ chức cấu trúc dưới tế bào.

4.4. Trung tâm hoạt động của enzyme

Toàn bộ cấu trúc không gian của phân tử enzyme có vai trò quan trọng đối với hoạt tính xúc tác của enzyme. Tuy nhiên, hoạt động của enzyme liên hệ trực tiếp với một phần xác định trong phân tử enzyme. Trung tâm hoạt động của enzyme là phần của phân tử enzyme trực tiếp kết hợp với cơ chất, tham gia trực tiếp trong việc tạo thành và chuyển hóa phức chất trung gian giữa enzyme và cơ chất để tạo thành sản phẩm phản ứng. Trung tâm hoạt động bao gồm nhiều nhóm chức năng khác nhau của amino acid, phân tử nước liên kết và nhiều khi có cả cofactor hữu cơ (coenzyme) và vô cơ.

Ở các enzyme một thành phần, trung tâm hoạt động thường bao gồm một tổ hợp các nhóm chức năng của amino acid không tham gia tạo thành trục chính của sợi polypeptide. Ví dụ nhóm - SH của cysteine - OH của serine, threonine và tyrosine, ϵ - NH_2 của lysine, -COOH của glutamic acid, aspartic, vòng imidazol của histidine, indol của tryptophan, nhóm guanidin của arginine.

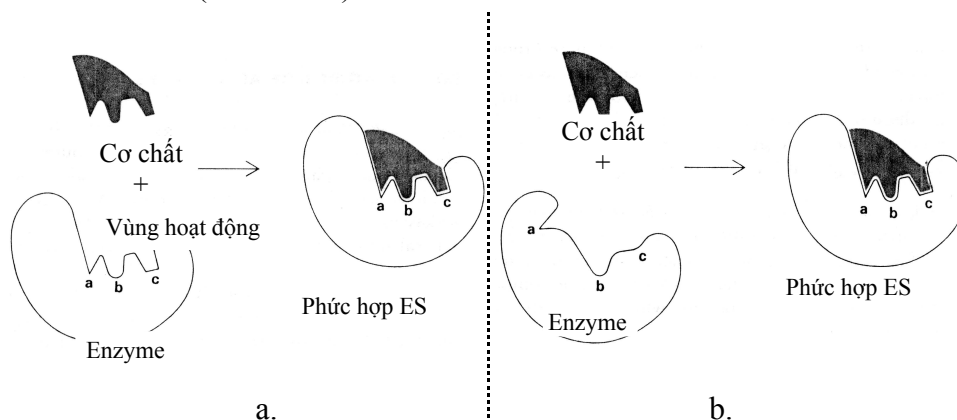
Các nhóm này có thể ở xa nhau trong mạch polypeptide nhưng lại gần nhau trong không gian, được định hướng xác định trong không gian cách nhau những khoảng cách nhất định sao cho chúng có thể tương tác với nhau trong quá trình xúc tác.

Ví dụ: trung tâm hoạt động của α - chymotrypsin bao gồm nhóm hydroxyl của Ser - 195, imidazol của His - 57 và nhóm carboxyl của Asp - 102. Các gốc này ở khá xa nhau trong chuỗi polypeptide nhưng giữa các nhóm chức năng của chúng chỉ cách nhau từ 2,8 - 3,0 Å.

Trung tâm hoạt động của các enzyme hai thành phần thường bao gồm nhóm ngoại (vitamin, ion kim loại ...) và các nhóm chức năng của các amino acid ở phần apoenzyme.

Sự tương ứng về cấu hình không gian giữa trung tâm hoạt động và cơ chất được hình thành trong quá trình enzyme tiếp xúc với cơ chất.

Theo quan niệm của Fisher thì trung tâm hoạt động của enzyme đã được hình thành sẵn với một cấu tạo nhất định chỉ cho phép cơ chất có cấu tạo tương ứng kết hợp vào. Do đó có thể ví sự tương ứng đó như “ổ khóa với chìa khóa”(Hình 4.2.a).



Hình 4.2 Mô hình Fisher (a) và mô hình Koshland (b)

Thuyết này tuy cũng giải thích được một số hiện tượng nhưng không giải thích thỏa đáng được nhiều kết quả thu được trong thực nghiệm. Vì vậy, Koshland đã đưa ra một giả thuyết khác hấp dẫn và tế nhị hơn. Theo thuyết này thì đặc điểm của vùng trung tâm hoạt động là rất mềm dẻo và linh hoạt, các nhóm chức năng của trung tâm hoạt động của enzyme tự do chưa ở tư thế sẵn sàng hoạt động, khi tiếp xúc với cơ chất, các nhóm chức năng ở trong phần trung tâm hoạt động của phân tử enzyme thay đổi vị trí trong không gian, tạo thành hình thể khớp với hình thể của cơ chất (Hình 4.2.b). Cũng vì vậy, người ta gọi mô hình này là mô hình “tiếp xúc cảm ứng” hoặc “khớp cảm ứng”.

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 enzyme và sản phẩm phản ứng.

Trung tâm hoạt động của các enzyme có cấu trúc bậc 4 có thể nằm trên một phần dưới đơn vị hoặc bao gồm các nhóm chức năng thuộc các phần dưới đơn vị khác nhau.

4.5. Phương pháp thăm dò và phát hiện các nhóm chức năng trong trung tâm hoạt động của enzyme

Đây là việc khó khăn và phức tạp, phải sử dụng hàng loạt phương pháp khác nhau. Khi xác định được vai trò quan trọng của một nhóm nào đó đối với hoạt tính enzyme, chưa có nghĩa là nhóm đó thuộc trung tâm

hoạt động của enzyme, bởi vì có nhiều nhóm chức năng chỉ làm nhiệm vụ duy trì cấu trúc không gian hoạt động cho phân tử enzyme.

Muốn thăm dò, phát hiện và xác định các nhóm chức năng của phân tử enzyme, người ta thường dùng các phương pháp vật lý, hóa học, xác định hằng số ion hóa của các nhóm chức năng và tốt nhất là kết hợp với việc nghiên cứu cấu trúc phân tử của enzyme và của trung tâm hoạt động.

Các phương pháp vật lý có khả năng phá hủy một cách đặc hiệu các nhóm chức năng của enzyme thường không nhiều, vì khó có thể chọn được các tác nhân chỉ phá hủy một số nhóm hóa học nhất định mà lại không làm ảnh hưởng đến toàn bộ cấu trúc của phân tử enzyme. Chính vì vậy, thông thường người ta khóa, phá hủy, hoặc đánh dấu các nhóm chức năng đó bằng các thuốc thử hóa học như chất ức chế đặc hiệu, cơ chất hoặc coenzyme .

4.5.1. Phương pháp dùng chất ức chế

Tùy trường hợp có thể dùng các chất ức chế đặc hiệu khác nhau, ví dụ:

- Đối với một số enzyme oxy hóa khử có nhóm hoạt động là ion sắt người ta dùng xyanua (cyanide CN) để phát hiện vai trò của ion sắt đối với hoạt tính của enzyme vì CN kết hợp với ion sắt làm cho enzyme mất khả năng vận chuyển điện tử. Ví dụ CN ức chế enzyme cytochromoxydase.

- Một số enzyme cần có ion kim loại tham gia vào quá trình xúc tác hoặc để giữ ổn định cấu trúc phân tử enzyme. Để thăm dò phát hiện đặc tính cần kim loại của chúng, người ta dùng chất kết hợp kim loại như EDTA (Ethylene diamine tetraacetate) hoặc orthophenantrolin... Nếu là enzyme cần kim loại thì sẽ mất hoạt tính.

- Để thăm dò vai trò nhóm - S - CH₃ của methionine đối với hoạt tính của enzyme thì oxy hóa nhóm này thành sunfoxit tương ứng: $\begin{matrix} \text{S} - \text{CH}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix}$ và enzyme sẽ mất khả năng xúc tác.

- Vai trò của nhóm - SH của Cysteine đối với hoạt động của enzyme được xác định bằng cách cho phản ứng với muối kim loại nặng hoặc dẫn chất của chúng ví dụ PCMB (parachloromercuri - benzoate) hoặc cho phản ứng với iodoacetate.

Dưới tác dụng của các chất đã nêu, nhóm SH của enzyme sẽ bị khóa và enzyme mất hoạt động.

- Để phát hiện nhóm imidazol của Histidine đối với hoạt tính của enzyme người ta phá hủy nhóm này bằng phương pháp oxy hóa quang học

với sự có mặt của xanh metylen hoặc cho phản ứng với iodoacetate. Khi nhóm chức này bị phá hủy hoặc bị khóa thì enzyme đều mất hoạt tính.

- Để tìm hiểu vai trò của nhóm ϵ - NH_2 của lysine có thể cho phản ứng với fluordinitro benzen (FDNB) để tạo thành dinitrophenyl (DNP) màu vàng. FDNB phản ứng với các nhánh bên của amino acid khác như imidazol, phenol, thiol thì tạo ra dẫn chất DNP không màu.

Cũng có thể ức chế nhóm ϵ - NH_2 bằng cách cho phản ứng với những yếu tố oxy hóa.

- Vai trò của nhóm - OH của serine đối với hoạt tính của enzyme được thăm dò bằng cách cho tác dụng với chất ức chế đặc hiệu là diisopropylfluor-phosphate (DFP). DFP sẽ khóa nhóm - OH của serine và enzyme mất hoạt tính.

Trong một số trường hợp các nhóm chức năng tham gia vào cơ chế xúc tác có thể được phát hiện dễ dàng hơn so với các nhóm hóa học khác cùng loại, đó là nhờ khả năng phản ứng đã tăng lên do vị trí đặc biệt của chúng trong phân tử enzyme.

4.5.2. Phương pháp đánh dấu bằng cơ chất đặc hiệu hoặc coenzyme

- Nhiều người cho rằng dùng cơ chất đặc hiệu để đánh dấu các nhóm chức năng là hợp lý nhất song cũng gặp nhiều khó khăn và phức hợp được tạo thành thường không vững bền (phức hợp enzyme - cơ chất dễ dàng bị phân ly ngược chiều, phức hợp enzyme - sản phẩm của phản ứng cũng phân ly với tốc độ cao). Tuy vậy, bằng phương pháp thực nghiệm khôn khéo người ta đã tách được các sản phẩm trung gian của phản ứng kết hợp với enzyme bằng liên kết đồng hóa trị vững bền. Ví dụ như người ta đã tách được phosphoserine đánh dấu trong trường hợp của phosphoglucosemutase ở quá trình phản ứng vận chuyển phosphore, hoặc phức hợp enzyme với sản phẩm trung gian của triosephosphate dehydrogenase.

- Phương pháp đánh dấu bằng coenzyme cũng được sử dụng và có giá trị trong một số trường hợp. Như người ta đã nghiên cứu trung tâm hoạt động của cytochrome C bằng cách dùng coenzyme heme làm chất đánh dấu cũng như dùng pyridoxal phosphate làm chất đánh dấu để nghiên cứu một số enzyme cần coenzyme này làm yếu tố phối hợp.

Cần lưu ý là chỉ có thể dùng coenzyme, cơ chất hay chất giống cơ chất để đánh dấu những nhóm chức năng trong trung tâm hoạt động của enzyme khi nào liên kết hóa học giữa chất đánh dấu với những nhóm này

đủ vững bền hoặc được biến thành những liên kết vững bền bằng phương pháp thích hợp. Mặt khác, khi cơ chất hoặc coenzyme kết hợp với enzyme đã làm cho enzyme không bị ức chế bởi các thuốc thử đặc hiệu có thể do enzyme hoặc cơ chất đã kết hợp với các nhóm chức năng, hoặc cũng có thể làm ngăn cách một cách đặc hiệu giữa các nhóm chức năng của enzyme và thuốc thử. Như vậy, ở các trường hợp đã nêu, các nhóm chức năng đều được kết luận bằng cách suy luận gián tiếp chứ không phải bằng các kết quả thực nghiệm trực tiếp.

4.5.3. Xác định trị số pK của các nhóm hoạt động

Enzyme là một phân tử protein đặc hiệu có nhiều nhóm hóa học có thể bị ion hóa, nên enzyme có thể tồn tại dưới nhiều trạng thái ion hóa khác nhau; nhưng thường chỉ có một dạng ion của phân tử enzyme có khả năng thể hiện hoạt tính xúc tác, trong đó chính trạng thái ion hóa của các nhóm hoạt động của enzyme có liên quan trực tiếp đến quá trình xúc tác.

Trạng thái ion hóa của các nhóm khác không có liên quan trực tiếp đến cơ chế xúc tác của enzyme thường không ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme.

Trạng thái ion hóa của enzyme, của cơ chất và của phức hợp enzyme-cơ chất chịu ảnh hưởng trực tiếp của pH của môi trường phản ứng. Do đó nghiên cứu ảnh hưởng của pH đối với hoạt tính enzyme có thể tìm được trị số pK của nhóm hoạt động của enzyme ($K =$ hằng số ion hóa, $pK = -\log K$), Với trị số của pK có thể suy đoán các nhóm hoạt động của enzyme.

Cũng cần chú ý rằng, phương pháp xác định trị số pK chỉ là những chỉ dẫn sơ bộ và cần phải phối hợp với nhiều phương pháp khác.

4.5.4. Nghiên cứu cấu trúc phân tử

Các phương pháp hóa học đặc hiệu hoặc xác định trị số pK chỉ là những thông tin cần thiết để suy đoán và chưa đủ để chứng minh về vai trò của các nhóm hoạt động. Vì vậy cần phải nghiên cứu cấu tạo hóa học và cấu trúc không gian của phân tử enzyme và đặc biệt là của trung tâm hoạt động. Bằng cách cắt bỏ dần các gốc amino acid của phân tử enzyme người ta đã chứng minh hoạt độ enzyme chỉ phụ thuộc vào một số bộ phận nhất định của phân tử enzyme. Ví dụ papain là enzyme thủy phân protein, khi bị cắt bỏ 2/3 số gốc amino acid vẫn còn hoạt động, trung tâm hoạt động nằm ở đầu nhóm - COOH.

4.6. Các dạng phân tử của enzyme

Trong cấu trúc phân tử của enzyme, tính chất tinh vi và phức tạp không chỉ giới hạn ở phạm vi từng phân tử, từ thành phần cấu tạo và các bậc cấu trúc cho đến cấu tạo của trung tâm hoạt động cùng với vai trò của các nhóm chức năng mà còn thể hiện ở tính đa dạng của các phân tử enzyme. Tính đa dạng của nhiều enzyme khác nhau đã được phát hiện ở các cơ thể sống khác nhau từ người, động vật, thực vật đến vi sinh vật. Người ta thấy rằng có những enzyme xúc tác cùng một phản ứng hóa học và có cùng tính đặc hiệu cơ chất nhưng có nguồn gốc khác nhau nên thể hiện nhiều tính chất khác nhau. Aldolase có nguồn gốc từ nấm men có nhiều tính chất khác với aldolase của mô động vật; pepsin, trypsin, chymotrypsin, xanthin - oxydase và lysozyme cũng có những dạng phân tử khác nhau. Nhiều enzyme tương tự nhau thu được từ cùng một loại mô nhưng của những loài khác nhau cũng có những tính chất khác biệt nhau: α - amylase của dịch nước bọt và dịch tụy của người thì giống nhau, nhưng chúng khác với α - amylase thu được từ tụy lợn về độ hòa tan, về pH thích hợp và một số tính chất khác. Những enzyme có nguồn gốc từ những mô khác nhau của cùng một loài, tuy xúc tác cùng một loại phản ứng hóa học, nhưng khác nhau rất rõ rệt về tính đặc hiệu cơ chất như trường hợp của những cholinesterase. Các enzyme xúc tác những phản ứng chuyên hóa giống nhau trong các tế bào của nhiều mô khác nhau có tính chất đặc hiệu cơ quan, ví dụ lactat dehydrogenase của cơ tim và cơ xương khác nhau rõ rệt về tốc độ di chuyển điện di và nhiều tính chất khác. Ngay trong một mô hay một cơ quan, cũng tồn tại những dạng phân tử khác nhau: trong cơ tim ít nhất cũng có hai dạng phân tử của lactat dehydrogenase có tốc độ di chuyển điện di khác nhau, từ nấm men có thể tách ra được bốn dạng phân tử của phosphoglyceraldehyde dehydrogenase. Trong một tế bào, một enzyme nào đó cũng có thể có những dạng phân tử khác nhau tồn tại trong các bộ phận khác nhau của tế bào, ví dụ aspartat aminotransferase có dạng phân tử trong ty lạp thể khác với dạng phân tử của enzyme này ở bào tương.

Như vậy, tính đa dạng của các phân tử enzyme có thể thể hiện ở nhiều mức độ, từ các loài khác nhau đến các mô hay cơ quan khác nhau của cùng một cơ thể và ngay cả các bộ phận khác nhau của cùng một tế bào. Các dạng phân tử khác nhau của cùng một enzyme, tuy cùng có chức năng xúc tác một phản ứng hóa học giống nhau nhưng vì cấu trúc phân tử của chúng đều ít nhiều có khác nhau, do đó chúng có những tính chất khác nhau về hóa học, vật lý, miễn dịch ... thậm chí ngay cả động học và tính đặc hiệu của phản ứng enzyme.

Theo kiến nghị chính thức của ủy ban thường trực về enzyme của Hội Hóa sinh Quốc tế, danh từ isoenzyme được dùng để chỉ những dạng phân tử khác nhau của một enzyme tồn tại trong một loài; ngoài danh từ này, danh từ isozyme cũng được quen dùng.

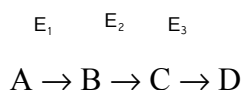
Theo một số tác giả, khi phân loại các dạng phân tử khác nhau của enzyme, phải phân biệt giữa isoenzyme và heteroenzyme. Danh từ isoenzyme chỉ dành cho những dạng phân tử của một enzyme có nguồn gốc từ cùng một cơ quan và mô cũng như phải có cùng hoạt động xúc tác như nhau; danh từ heteroenzyme dành cho những dạng phân tử cùng có hoạt động xúc tác giống nhau nhưng có thể có nguồn gốc từ các cơ quan hoặc loài khác nhau.

Trong các enzyme đa dạng đã trình bày, các isoenzyme lactat dehydrogenase được nghiên cứu đặc biệt kỹ do chúng có ý nghĩa về mặt chẩn đoán bệnh. Chúng có 5 dạng phân tử tetrame có cùng trọng lượng phân tử như nhau có thể phân chia được riêng rẽ bằng điện di thành các cấu tử rất khác nhau.

4.7. Phức hợp multienzyme

Trong cơ thể sống, ngoài các enzyme polyme - những enzyme có cấu trúc bậc bốn, do nhiều đơn vị nhỏ cấu tạo nên; còn tồn tại hệ thống nhiều enzyme hay còn gọi là hệ thống multienzyme. Đó là những hệ thống gồm các enzyme có liên quan với nhau, xúc tác cho dây chuyền phản ứng của một quá trình trao đổi xác định, trong đó sản phẩm của phản ứng do enzyme trước xúc tác là cơ chất của enzyme xúc tác cho phản ứng tiếp theo.

Có thể minh họa hệ thống gồm 3 enzyme E_1 , E_2 , E_3 xúc tác cho dây chuyền phản ứng như sau:



Trong sơ đồ này, A là cơ chất của E_1 , B là sản phẩm của phản ứng do E_1 xúc tác nhưng lại là cơ chất của E_2 v.v...

Các hệ thống nhiều enzyme trong tế bào có mức độ tổ chức phức tạp khác nhau. Các enzyme trong hệ thống nhiều enzyme có thể tồn tại riêng rẽ ở dạng hòa tan, không liên kết với nhau hoặc có thể kết tụ với nhau, liên kết với nhau khá bền tạo thành phức hợp nhiều enzyme khi tách riêng khỏi phức hợp enzyme, sẽ mất hoạt tính xúc tác. Ngoài ra, một số hệ thống

enzyme có thể liên kết với thành phần cấu tạo của tế bào như màng ribosome. Các enzyme của chuỗi hô hấp xúc tác cho quá trình chuyển điện tử từ cơ chất đến oxy, được gắn chặt vào màng trong của ty thể và thực chất là một phần cấu trúc của ty thể. Người ta đã gặp các phức hợp multienzyme trong nhiều quá trình chuyển hóa: quá trình khử carboxyl oxy hóa của pyruvic acid tạo thành acetyl coenzyme A, quá trình tổng hợp acid béo ngoài ty thể ở nấm men, loài có vú, loài chim..., quá trình tổng hợp những peptide có hoạt tính kháng sinh như gramicidine và tyrocidin, quá trình tổng hợp tryptophan v.v...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hữu Chấn, 1983. Enzyme và xúc tác Sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng, 2000. Hóa sinh học. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
3. Đỗ Ngọc Liên, Phạm Thị Trân Châu, 1972. Enzyme I, II. Đại học Tổng hợp, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyền, 1998. Giáo trình sinh hóa hiện đại. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
5. Nguyễn Xuân Thắng, Đào Kim Chi, Phạm Quang Tùng, Nguyễn Văn Đồng, 2004. Hóa sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
6. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lân Dũng, 1982. Enzyme vi sinh vật. Nxb KH&KT, Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú (chủ biên), Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên, 2000. Hóa sinh Công nghiệp, Nxb KH&KT, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Bermeyer H. U, Bermeyer J. and Grasel M. (editors). 1983. Methods of enzymatic analysis. Vol II. Verlag chemie Weinheim.
2. Lehninger A. L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004.
3. Pelmont J., 1993. Enzymes. Presses universitaires de grenobe.
4. Stryer L., 1981. Biochemistry. W.H.Freeman and company. San Francisco.
5. Biochemical information, 1973. Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica.

Chương 5

Tính đặc hiệu của enzyme

5.1. Khái niệm chung

Do cấu trúc lý hóa đặc biệt của phân tử enzyme và đặc biệt là của trung tâm hoạt động mà enzyme có tính đặc hiệu rất cao so với những chất xúc tác thông thường khác. Mỗi enzyme chỉ có khả năng xúc tác cho sự chuyển hóa một hay một số chất nhất định theo một kiểu phản ứng nhất định. Đặc tính tác dụng lựa chọn cao này gọi là tính đặc hiệu hoặc tính chuyên hóa của enzyme. Tính đặc hiệu là một trong những đặc tính cơ bản quan trọng nhất của enzyme.

5.2. Các hình thức đặc hiệu

Có thể phân biệt hai kiểu đặc hiệu: đặc hiệu kiểu phản ứng và đặc hiệu cơ chất.

5.2.1. Đặc hiệu kiểu phản ứng

Phần nhiều mỗi enzyme đều có tính đặc hiệu với một loại phản ứng nhất định. Những chất có khả năng xảy ra nhiều loại phản ứng hóa học thì mỗi loại phản ứng ấy phải do một enzyme đặc hiệu xúc tác. Ví dụ, amino acid có khả năng xảy ra phản ứng khử carboxyl, phản ứng khử amin bằng cách oxy hóa và phản ứng vận chuyển nhóm amin, vì vậy mỗi phản ứng ấy cần có một enzyme đặc hiệu tương ứng xúc tác theo thứ tự là decarboxylase, aminoacid oxydase và aminotransferase.

5.2.2. Đặc hiệu cơ chất

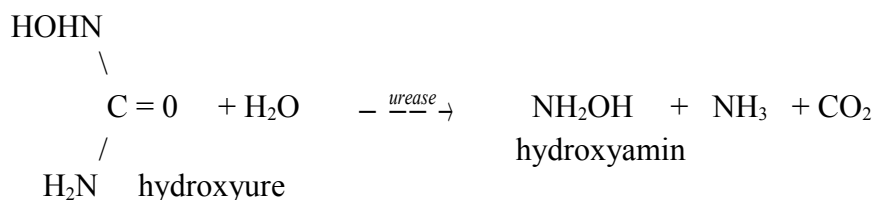
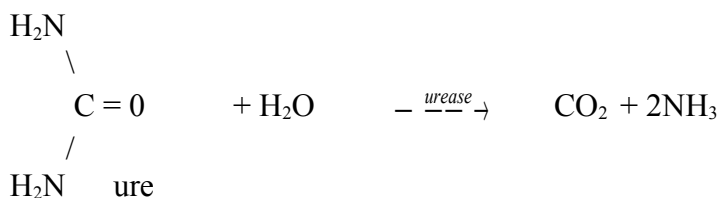
Mỗi enzyme chỉ xúc tác cho sự chuyển hóa một hoặc một số chất nhất định. Mức độ đặc hiệu cơ chất của các enzyme khác nhau không giống nhau, người ta thường phân biệt thành các mức như sau:

- Đặc hiệu tuyệt đối

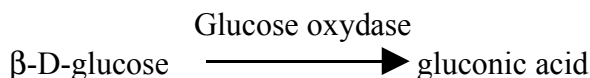
Một số enzyme hầu như chỉ xúc tác cho phản ứng chuyển hóa một cơ chất xác định và chỉ xúc tác cho phản ứng ấy mà thôi.

Ví dụ: Urease, arginase, glucoseoxydase v.v... Đối với các enzyme này, ngoài các cơ chất đặc hiệu của chúng là ure, arginine, β - D - Glucose (theo thứ tự tương ứng) chúng cũng có thể phân giải một vài chất khác nhưng với vận tốc thấp hơn nhiều. Chẳng hạn như urease, ngoài ure nó

còn có thể phân giải hydroxyure nhưng với tốc độ thấp hơn 120 lần. Như vậy urease có thể xúc tác cho hai phản ứng sau:



Đối với trường hợp glucose oxydase: enzyme này có trong các loại nấm mốc, có khả năng oxy hóa đặc hiệu β -D-glucose thành gluconic acid



Enzyme này có khả năng phân giải 10 cơ chất song với khả năng nhỏ hơn nhiều.

Ví dụ: nếu coi tốc độ oxy hóa tương đối acid β -D-glucose là 100% thì α -D-glucose chỉ bằng 0,64 % (ngoài ra maltose 0,19%, D.galactose 0,14%).

Hình như trong trường hợp đặc hiệu tuyệt đối, cấu trúc trung tâm hoạt động của enzyme tương ứng rất chặt chẽ với cấu trúc của cơ chất đến mức chỉ một sai khác nhỏ về cấu trúc của cơ chất cũng đủ làm cho enzyme không xúc tác được.

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

- Đặc hiệu nhóm tuyệt đối

Các enzyme này chỉ tác dụng lên những chất có cùng một kiểu cấu trúc phân tử, một kiểu liên kết và có những yêu cầu xác định đối với nhóm nguyên tử ở phần liên kết chịu tác dụng. Ví dụ: maltase thuộc nhóm α -glucosidase chỉ xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết glucoside được tạo thành từ nhóm OH glucoside của α -glucose với nhóm OH của một monose khác.

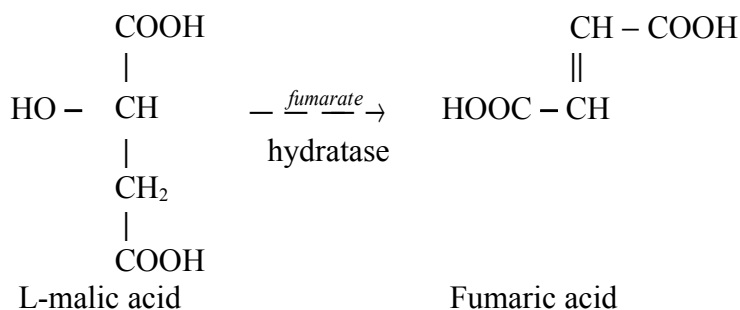
- Đặc hiệu nhóm tương đối

Mức độ đặc hiệu của các enzyme thuộc nhóm này kém hơn nhóm trên. Enzyme 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 lipase có khả năng thủy phân được tất cả các mối liên kết este. Aminopeptidase có thể xúc tác thủy phân nhiều peptid

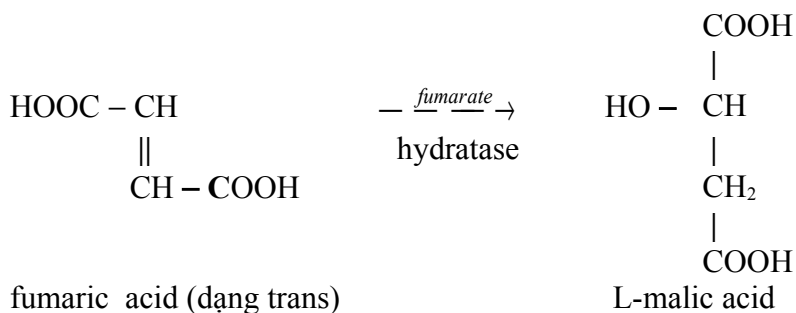
- Đặc hiệu quang học (đặc hiệu lập thể)

Hầu như tất cả các enzyme đều có tính đặc hiệu không gian rất chặt chẽ, nghĩa là enzyme chỉ tác dụng với một trong hai dạng đồng phân không gian của cơ chất.

Enzyme chỉ tác dụng với một trong hai dạng đồng phân quang học của các chất. Ví dụ phản ứng khử nước của malic acid để tạo thành fumaric acid dưới tác dụng của fumarathyratase chỉ xảy ra đối với L - malic acid mà không tác dụng lên D - malic acid :



Enzyme cũng thể hiện tính đặc hiệu lên một dạng đồng phân hình học cis hoặc trans. Ví dụ: enzyme fumarathyratase chỉ tác dụng lên dạng trans của fumaric acid mà không tác dụng lên dạng cis để tạo thành L - malic acid :



Trong tự nhiên cũng có các enzyme xúc tác cho phản ứng chuyển hóa tương hỗ giữa các cặp đồng phân không gian tương ứng. Ví dụ, lactatracemase của vi khuẩn xúc tác cho phản ứng chuyển hóa lẫn nhau giữa D và L – lactic acid, aldo - 1 - epimerase xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa α - D - glucose thành β - D - Glucose, maleinat cis - trans isomerase của vi khuẩn xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa giữa maleic acid (dạng cis) và fumaric acid (dạng trans)v.v... Các enzyme 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.

Enzyme còn có khả năng phân biệt được 2 gốc đối xứng trong phân tử giống nhau hoàn toàn về mặt hóa học. Ví dụ, hai nhóm - CH₂OH trong phân tử glycerin, glycerophosphatkinase xúc tác cho phản ứng chuyển vị gốc phosphate từ ATP đến C₃ của glycerin (chứ không phải C₁).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hữu Chấn, 1983. Enzyme và xúc tác Sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng, 2000. Hóa sinh học. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
3. Đỗ Ngọc Liên, Phạm Thị Trân Châu, 1972. Enzyme I, II. Đại học Tổng hợp, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyền, 1998. Giáo trình sinh hóa hiện đại. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
5. Nguyễn Xuân Thắng, Đào Kim Chi, Phạm Quang Tùng, Nguyễn Văn Đồng, 2004. Hóa sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
6. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lân Dũng, 1982. Enzyme vi sinh vật. Nxb KH&KT, Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú (chủ biên), Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên, 2000. Hóa sinh Công nghiệp, Nxb KH&KT, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Bermeyer H. U, Bermeyer J. and Grasel M. (editors). 1983. Methods of enzymatic analysis. Vol II. Verlag chemie Weinheim.
2. Lehninger A. L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004.
3. Pelmont J., 1993. Enzymes. Presses universitaires de grenobe.
4. Stryer L., 1981. Biochemistry. W.H.Freeman and company. San Francisco.
5. Biochemical information, 1973. Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica.

Chương 6

Cơ chế tác dụng của enzyme

6.1. Cơ chế của phản ứng có xúc tác nói chung

Vận tốc phản ứng hóa học được xác định bởi giá trị năng lượng hoạt hóa tức là mức năng lượng các chất tham gia phản ứng phải đạt được để cắt đứt liên kết cần thiết và hình thành các liên kết mới. Năng lượng hoạt hóa càng lớn thì vận tốc phản ứng càng chậm và ngược lại. Do làm giảm năng lượng hoạt hóa phản ứng, các chất xúc tác có tác dụng thúc đẩy vận tốc phản ứng hóa học.

Ví dụ, bột platin là một chất xúc tác hóa học được sử dụng rộng rãi. Vì các chất tham gia phản ứng trên bề mặt platin đều được chuyển sang trạng thái có khả năng phản ứng cao hơn. Do vậy năng lượng hoạt hóa sẽ nhỏ hơn và tốc độ phản ứng sẽ cao hơn.

Như vậy, trong các phản ứng có xúc tác, chất xúc tác làm giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng hóa học, có nghĩa là nó chỉ tham gia vào các phản ứng trung gian mà không đóng vai trò là chất tham gia phản ứng. Sau phản ứng, chất xúc tác lại phục hồi về trạng thái ban đầu để tiếp tục xúc tác.

6.2. Cơ chế của xúc tác enzyme

Hầu như tất cả các biến đổi hóa sinh trong tế bào và cơ thể sống đều được xúc tác bởi enzyme ở pH trung tính, nhiệt độ và áp suất bình thường trong khi đa số các chất xúc tác hóa học khác lại chỉ xúc tác ở nhiệt độ và áp suất cao.

Chính nhờ việc tạo được môi trường đặc hiệu (bởi trung tâm hoạt động của enzyme liên kết với cơ chất) có lợi nhất về mặt năng lượng để thực hiện phản ứng mà enzyme có được những khả năng đặc biệt đã nêu trên.

Trong phản ứng có sự xúc tác của enzyme, nhờ sự tạo thành phức hợp trung gian enzyme - cơ chất mà cơ chất được hoạt hóa. Khi cơ chất kết hợp vào enzyme, 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 là 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 enzyme 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 platin thì năng lượng hoạt hóa là 11,7 Kcal/mol, còn nếu có enzyme catalase xúc tác thì năng lượng hoạt hóa chỉ còn 5,5 Kcal/mol.

Nhiều dẫn liệu thực nghiệm đã cho thấy quá trình tạo thành phức hợp enzyme cơ chất và sự biến đổi phức hợp này thành sản phẩm, giải phóng enzyme tự do thường trải qua ba giai đoạn theo sơ đồ sau.



[Trong đó E là enzyme, S là cơ chất (Substrate), ES là phức hợp enzyme - cơ chất, P là sản phẩm (Product)]

- *Giai đoạn thứ nhất*: enzyme kết hợp với cơ chất bằng liên kết yếu tạo thành phức hợp enzyme - cơ chất (ES) không bền, phản ứng 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 enzyme được giải phóng ra dưới dạng tự do.

Các loại liên kết chủ yếu được tạo thành giữa E và S trong phức hợp ES là: tương tác tĩnh điện, liên kết hydrogen, 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.

Với phương pháp nghiên cứu bằng tia X và phương pháp hóa học người ta đã làm sáng tỏ cách thức gắn cơ chất và cơ chế hoạt động của một số enzyme như lysozyme, chymotrypsin, carboxypeptidase A v.v... Sau đây sẽ giới thiệu chi tiết hơn cơ chế phản ứng của carboxypeptidase A.

Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) thuộc nhóm peptidhydrolase, xúc tác cho sự thủy phân liên kết peptid, phản ứng xảy ra với vận tốc lớn nếu amino acid đầu C là amino acid thơm. enzyme này cũng thủy phân liên kết este.

Carboxypeptidase 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 enzyme. Khi thay thế Zn bằng các kim loại hóa trị hai khác làm thay đổi hoạt độ và có thể cả

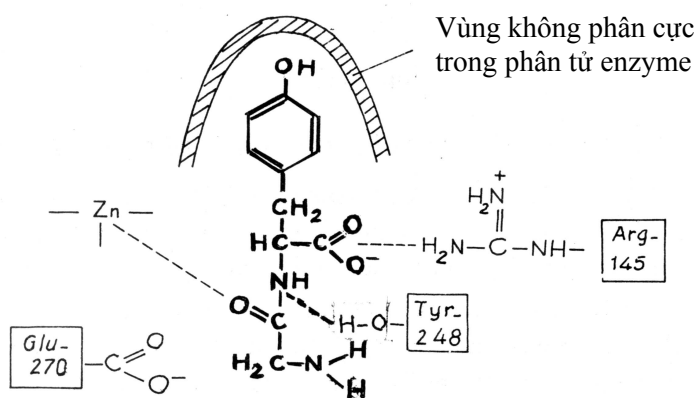
tính đặc hiệu của enzyme. Trong phân tử enzyme, Zn ở gần bề mặt phân tử, tương tác với gốc His - 69, His - 196 và Glu - 72.

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

Cơ chế phản ứng xúc tác của Carboxypeptidase A được xác định trên cơ sở kết quả nghiên cứu phản ứng của nó với dipeptid glycylytyrosine. Quá trình phân giải liên kết peptid có thể được phân thành các bước sau:

- Tạo thành phức ES: Khi tiếp xúc với cơ chất, các nhóm trong trung tâm hoạt động của enzyme thay đổi vị trí trong không gian. Nhóm guanidin của Arg - 145 cũng như nhóm carboxyl của Glu - 270 dịch chuyển 2Å, nhóm hydroxyl của Tyr - 248 dịch chuyển 12Å từ chỗ gần trên bề mặt phân tử chuyển vào trong đến vùng gần với liên kết peptid của cơ chất.

Tương tác giữa các nhóm chức của trung tâm hoạt động với glycylytyrosine như sau: (Hình 6.1)



Hình 6.1. Sơ đồ biểu diễn tương tác giữa glycylytyrosine với các nhóm chức năng trong trung tâm hoạt động của carboxypeptidase A

(cơ chất viết nét đậm)

- Nhóm carboxyl tự do của cơ chất kết hợp với nhóm tích điện dương của Arg - 145 của enzyme qua liên kết ion.

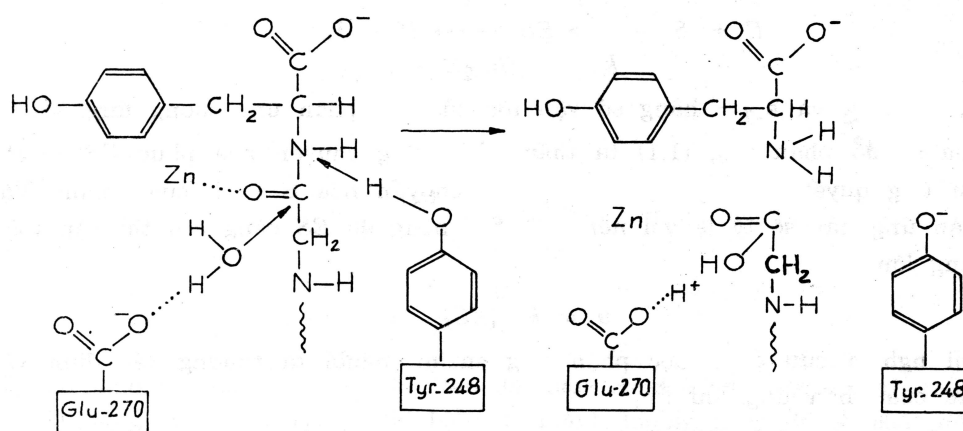
- Nhóm NH trong liên kết peptide của cơ chất tạo thành liên kết hydrogen với nhóm - OH của Tyr - 248.

- Oxy trong nhóm - CO - của liên kết peptide tương tác với Zn, còn carbon trong nhóm - CO - này tương tác với nhóm carboxyl của Glu - 270 qua phân tử nước.

- Cắt đứt liên kết giải phóng sản phẩm.

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

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 peptide của cơ chất), liên kết peptid bị kéo căng ra và bị đứt. Gốc Tyr - 248 nhường hydrogen cho nhóm NH trong liên kết peptid cho cơ chất, giải phóng sản phẩm đầu tiên là tyrosine của cơ chất và acyl - enzyme (hình 6.2).



Hình 6.2. Cơ chế phản ứng xúc tác của carboxypeptidase A

Sau khi liên kết peptide bị cắt đứt, trạng thái ion hóa của các nhóm acid và base bị biến đổi tương ứng với pH môi trường, Tyr - 248 kết hợp với proton, trở về trạng thái ban đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hữu Chấn, 1983. Enzyme và xúc tác Sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng, 2000. Hóa sinh học. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
3. Đỗ Ngọc Liên, Phạm Thị Trân Châu, 1972. Enzyme I, II. Đại học Tổng hợp, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyền, 1998. Giáo trình sinh hóa hiện đại. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
5. Nguyễn Xuân Thắng, Đào Kim Chi, Phạm Quang Tùng, Nguyễn Văn Đồng, 2004. Hóa sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
6. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lâm Dũng, 1982. Enzyme vi sinh vật. Nxb KH&KT, Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú (chủ biên), Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên, 2000. Hóa sinh Công nghiệp, Nxb KH&KT, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Bermeyer H. U, Bermeyer J. and Grasel M. (editors). 1983. Methods of enzymatic analysis. Vol II. Verlag chemie Weinheim.
2. Lehninger A. L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004.
3. Pelmont J., 1993. Enzymes. Presses universitaires de grenobe.
4. Stryer L., 1981. Biochemistry. W.H.Freeman and company. San Francisco.
5. Biochemical information, 1973. Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica.

Chương 7

Động học Enzyme

7.1. Ý nghĩa của việc nghiên cứu động học enzyme

Nghiên cứu động học enzyme là nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố: nồng độ cơ chất, enzyme, pH môi trường, nhiệt độ, các chất kìm hãm... đến tốc độ phản ứng do enzyme xúc tác. Việc nghiên cứu động học enzyme sẽ cho ta biết được các vấn đề sau đây:

- Có thể biết được cơ chế phân tử của sự tác động của enzyme.
- Cho phép ta hiểu biết được mối quan hệ về mặt lượng của quá trình enzyme.
- Thấy được vai trò quan trọng cả về mặt lý luận lẫn thực tiễn: khi lựa chọn các đơn vị hoạt động enzyme người ta cần phải biết những điều kiện tốt nhất đối với hoạt động của enzyme, cũng như cần phải biết được các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của chúng.

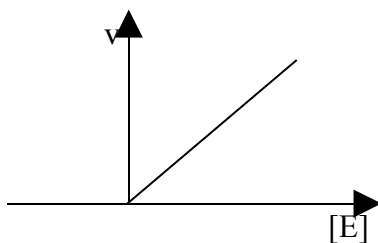
- Là điều kiện cần thiết để thực hiện tốt các bước tinh chế enzyme, vì người ta cần phải kiểm tra về mặt lượng bằng cách xác định có hệ thống hoạt động của chế phẩm enzyme trong các giai đoạn tinh chế.

7.2. Động học các phản ứng enzyme

7.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme

Trong điều kiện dư thừa cơ chất, nghĩa là $[S] \gg [E]$ thì tốc độ phản ứng phụ thuộc vào $[S]$, $v = K[E]$ có dạng $y = ax$. Nhờ đó người ta đã đo $[E]$ bằng cách đo vận tốc phản ứng do enzyme đó xúc tác.

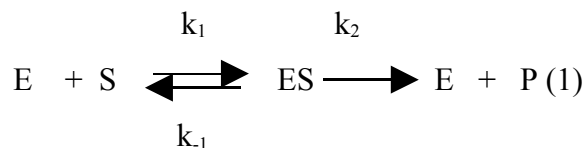
Có nhiều trường hợp trong môi trường có chứa chất kìm hãm hay hoạt hóa thì vận tốc phản ứng do enzyme xúc tác không phụ thuộc tuyến tính với $[E]$ đó.



Hình 7.1. Sự phụ thuộc của vận tốc phản ứng vào $[E]$

7.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất [S]

Ta khảo sát trường hợp đơn giản nhất: chỉ một cơ chất



Gọi v_1 là vận tốc của phản ứng tạo thành phức chất ES.

Gọi v_{-1} là vận tốc của phản ứng tạo phân ly phức chất ES tạo thành E và S.

Gọi v_2 là vận tốc của phản ứng tạo thành E và P (sản phẩm).

$$v_1 = k_1[E][S]$$

$$v_{-1} = k_{-1}[ES]$$

$$v_2 = k_2[ES]$$

Khi hệ thống đạt trạng thái cân bằng ta có:

$$k_{-1}[ES] + k_2[ES] = k_1[E][S]$$

$$(k_{-1} + k_2)[ES] = k_1[E][S] \quad (2)$$

Gọi E_0 là nồng độ ban đầu:

$$[E_0] = [E] + [ES] \Rightarrow [E] = [E_0] - [ES] \quad (3)$$

Thay trị số [E] từ (3) vào (2) ta có:

$$(k_{-1} + k_2)[ES] = k_1([E_0] - [ES])[S]$$

$$k_1[E_0][S]$$

$$[ES] = \frac{\quad}{\quad}$$

$$k_{-1} + k_2 + k_1[S]$$

Nếu đặt $K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$

(K_m : gọi là hằng số Michalis Menten)

Ta có: $[ES] = [E_0][S] / (K_m + [S])$

Mặt khác vận tốc phản ứng tạo thành sản phẩm P là:

$$V = k_2[ES]$$

Thay [ES] bằng giá trị ở trên ta thu được:

$$v = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Qua đây ta thấy nồng độ enzyme càng cao thì vận tốc phản ứng enzyme càng lớn. Vận tốc đạt cực đại khi toàn bộ enzyme liên kết với cơ chất, nghĩa là:

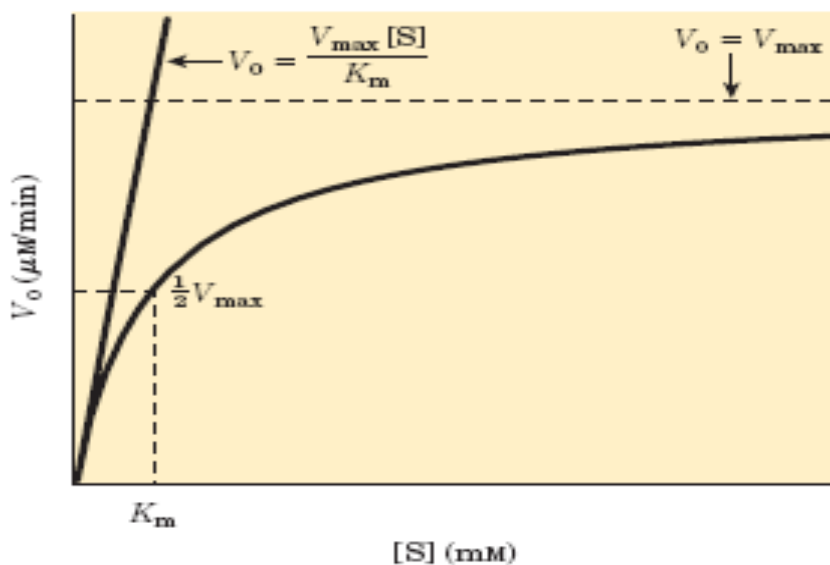
$$V_{\max} = k_2[E_0]$$

Thay vào phương trình (4) ta được:

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

Phương trình (5) gọi là phương trình Michelis Menten

K_m gọi là hằng số Michelis Menten đặc trưng cho mỗi enzyme. K_m đặc trưng cho ái lực của enzyme với cơ chất, K_m có trị số càng nhỏ thì ái lực của enzyme với cơ chất càng lớn, nghĩa là vận tốc của phản ứng do enzyme xúc tác càng lớn.



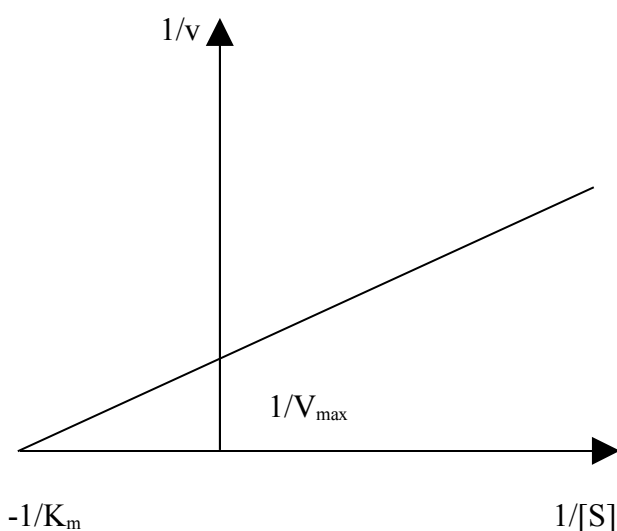
Hình 7.2. Biến thiên vận tốc phản ứng theo nồng độ cơ chất

Khi tăng $[S]$ thì v phản ứng tăng, tăng $[S]$ đến một giá trị nào đó thì v đạt đến giá trị v_{\max} và sẽ không tăng nữa nếu ta vẫn tiếp tục tăng $[S]$.

Khi $K_m = [S]$ thì $v_0 = 1/2 V_{\max}$

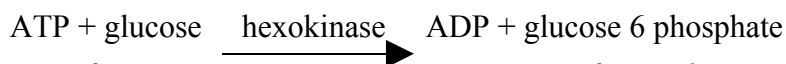
Năm 1934. Lineweaver và Burk, trên cơ sở của phương trình (5) đã nghịch đảo để biến thành dạng đường thẳng $y = ax+b$, nó có ý nghĩa lớn đối với việc nghiên cứu kim hãm enzyme.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



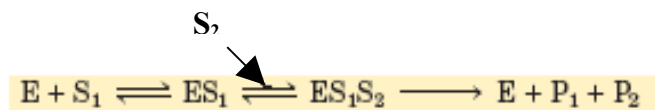
Hình 7.3. Sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng vào nồng độ cơ chất theo Lineweaver-Burk

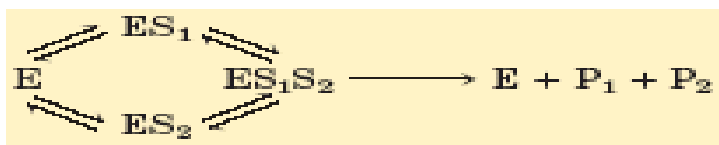
Trong nhiều phản ứng do enzyme xúc tác có 2 hay nhiều cơ chất, ví dụ hexokinase xúc tác phản ứng:



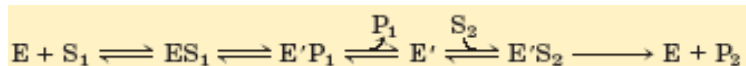
Cơ chế enzyme xúc tác cho phản ứng 2 cơ chất có thể như sau:

a/ Cơ chế tạo phức 3 thành phần





b/ Cơ chế không tạo phức 3 thành phần



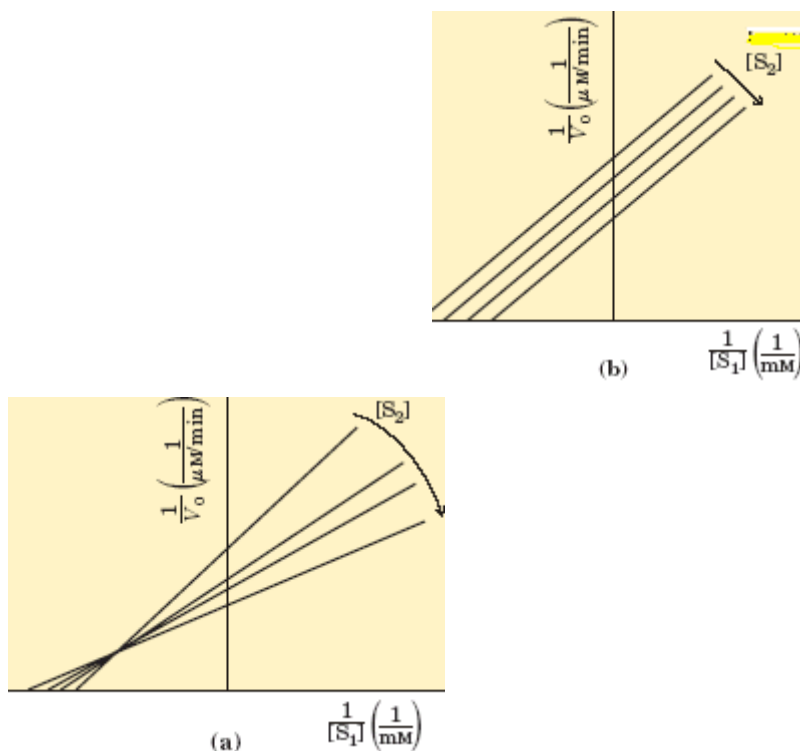
Đây là trường hợp cơ chất thứ 2 (S₂) chỉ kết hợp vào enzyme (ở trạng thái E') sau khi P₁ được tạo thành.

Vận tốc của phản ứng trong trường hợp này có thể được phân biệt qua hằng số Michaelis-Menten đối với mỗi cơ chất. Qua nghiên cứu động học cho thấy:

Enzyme	Cơ chất	K _m (mM)
Hexokinase (Não)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO ₃ ⁻	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosylglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2.5
β-Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

Phản ứng 2 cơ chất (bisubstrate) thường vận chuyển 1 nguyên tử hay 1 nhóm chức từ cơ chất này đến cơ chất khác.

Khi cho S₂ không đổi, đường biểu diễn tốc độ trong cả hai trường hợp



(a): tạo phức 3 thành phần (b): không tạo phức 3 thành phần

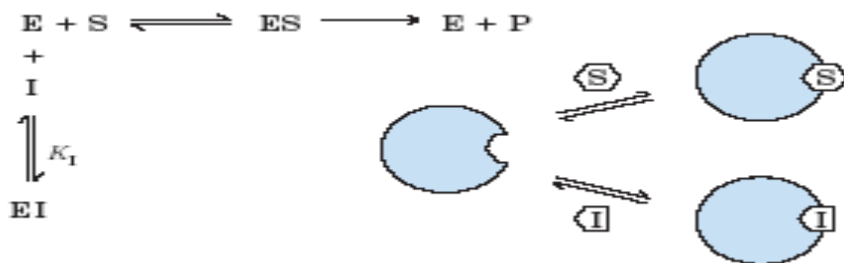
7.2.3. Ảnh hưởng của chất kìm hãm (inhibitor)

Là chất có tác dụng làm giảm hoạt độ hay làm enzyme không còn khả năng xúc tác biến cơ chất thành sản phẩm. Nó có thể là chất kìm hãm thuận nghịch hay bất thuận nghịch.

Kìm hãm thuận nghịch (reversible inhibition) có thể là cạnh tranh (competitive), phi cạnh tranh (uncompetitive) hay hỗn tạp (mixed).

* Cách 1: Kìm hãm cạnh tranh (Competitive inhibition)

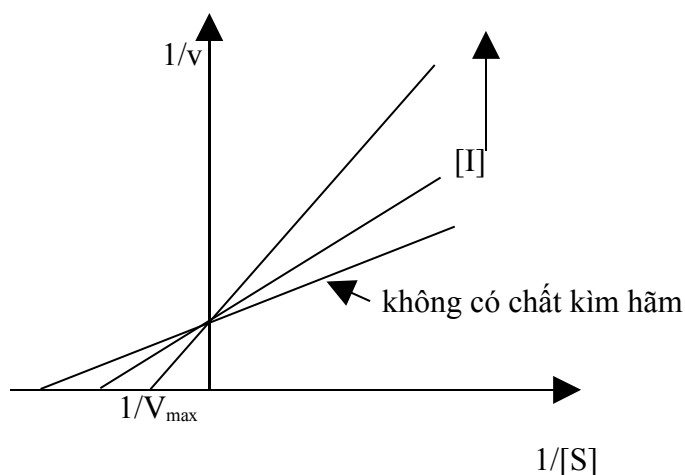
Trong trường hợp kìm hãm cạnh tranh là cơ chất và chất kìm hãm đều tác dụng lên trung tâm hoạt động của enzyme, Chất kìm hãm chiếm chỗ của cơ chất ở enzyme.



Hình 7.4. Kiểu kìm hãm cạnh tranh (competitive inhibition)

Khi cơ chất dư thừa, nồng độ chất kìm hãm thấp thì có thể loại bỏ tác dụng của chất kìm hãm, còn nồng độ cơ chất thấp và nồng độ chất kìm hãm cao thì lại có tác dụng kìm hãm hoàn toàn.

$$1/v = (\alpha K_m / V_{\max}) 1/S + 1/V_{\max} \quad \alpha = 1 + [I]/K_I$$



Hình 7.5. Sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng vào nồng độ cơ chất theo Lineweaver - Burk khi có kìm hãm cạnh tranh

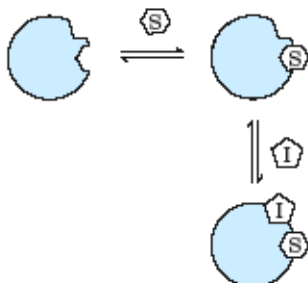
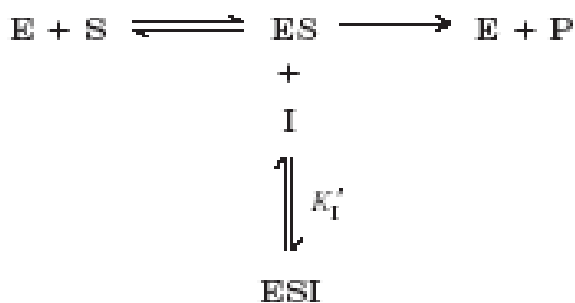
Người ta thấy kìm hãm như vậy phần lớn giữa chất kìm hãm và cơ chất có sự tương đồng về mặt hóa học. ví dụ: malic acid có cấu trúc gần giống với succinic acid nên kìm hãm cạnh tranh enzyme succinatdehydrogenase, là enzyme xúc tác cho sự biến đổi succinic acid thành fumaric acid.

Trường hợp đặc biệt của kìm hãm cạnh tranh là kìm hãm bằng sản phẩm. Trường hợp này xảy ra khi một sản phẩm phản ứng tác dụng trở lại enzyme và chiếm vị trí hoạt động ở phân tử enzyme.

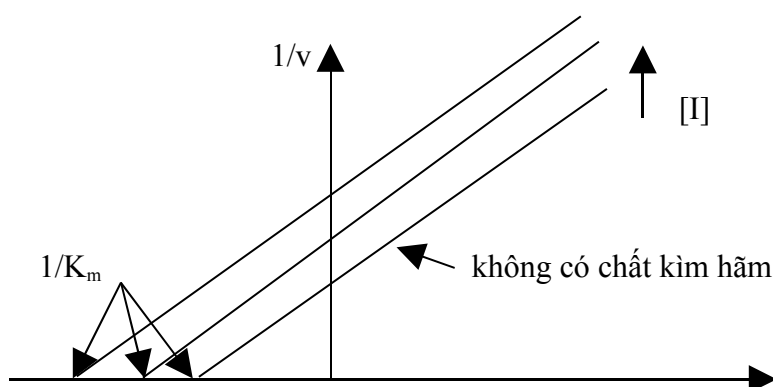
Đường thẳng có chất kìm hãm thì có độ xiên lớn hơn và cắt trục tung ở một điểm là $1/V_{max}$

* Cách 2: Kìm hãm phi cạnh tranh (Uncompetitive inhibition)

Đặc trưng của kiểu kìm hãm này là chất kìm hãm chỉ liên kết với phức hợp ES, mà không liên kết với enzyme tự do.



$$1/v = (K_m/V_{max})1/[S] + \alpha'/V_{max}$$

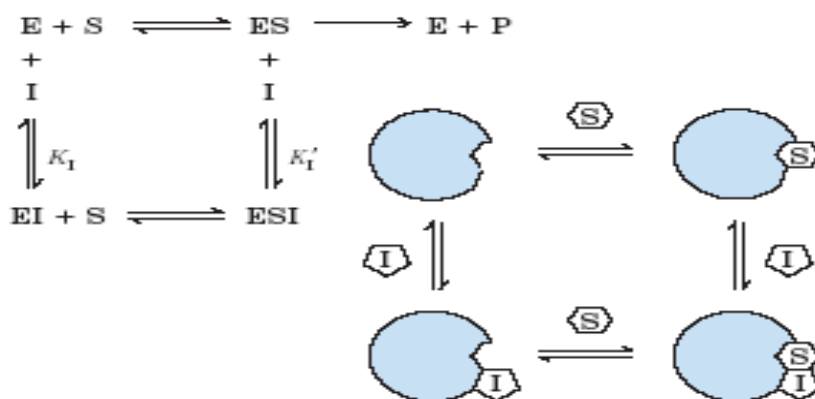


1/[S]

Hình 7.6. Sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng vào nồng độ cơ chất theo Lineweaver - Burk khi có kim hãm phi cạnh tranh

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'} \quad K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

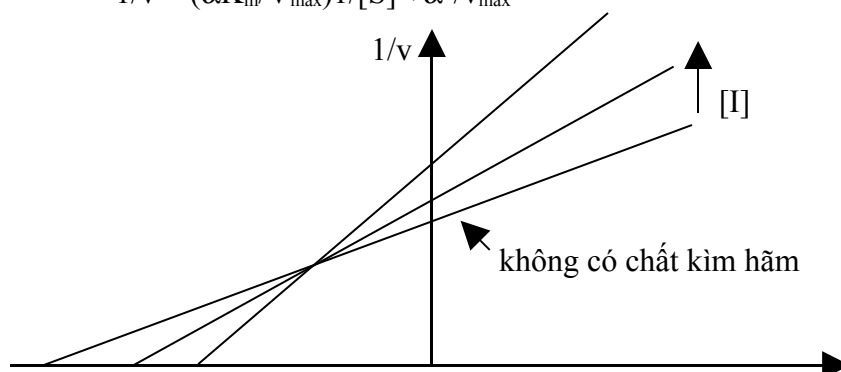
* Cách 3: Kim hãm hỗn tạp (Mixed inhibition)



Trong đó, chất kim hãm không những liên kết với enzyme tự do mà còn liên kết với cả phức hợp ES tạo thành phức hợp EIS không tạo được sản phẩm P. Hiện tượng kim hãm chỉ phụ thuộc vào nồng độ chất kim hãm. Tốc độ cực đại đo được khi không có mặt chất kim hãm là cao hơn khi có mặt chất kim hãm. Giá trị K_m thay đổi không giống như trong trường hợp cạnh tranh.

Tương tự như trên ta có phương trình :

$$1/v = (\alpha K_m / V_{\max}) 1/[S] + \alpha' / V_{\max}$$



$$1/[S]$$

Hình 7.7. Sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng vào nồng độ cơ chất theo Lineweaver - Burk khi có kim hãm hỗn tạp

Các giá trị α , α' được định nghĩa như trên. Trường hợp $\alpha = \alpha'$ gọi là không cạnh tranh (noncompetitive).

Bảng 7.1. Ảnh hưởng của kiểu kim hãm lên V_{max} và K_m

	Cạnh tranh (Competitive)	Phi cạnh tranh (Uncompetitive)	Hỗn tạp (Mixed)	Không cạnh tranh (Noncompetitive)
V_{max}	không ảnh hưởng	giảm	giảm	giảm
K_m	tăng	giảm	tăng	không ảnh hưởng

Trường hợp kim hãm enzyme bằng nồng độ cao của cơ chất gọi là “kim hãm cơ chất” như kim hãm urease khi nồng độ ure cao, ngoài ra còn có các enzyme khác như lactatdehydrogenase, carbonxypeptidase, lipase, pyrophosphatase, photphofructokinase (đối với ATP). Nguyên nhân của những hiện tượng này còn chưa được biết rõ. Đó có thể là:

+ Tồn tại nhiều trung tâm liên kết với cơ chất bằng các ái lực khác nhau. Khi nồng độ cơ chất thấp thì enzyme có thể chỉ liên kết với một phân tử cơ chất, còn khi ở nồng độ cơ chất cao nó liên kết với nhiều cơ chất dẫn đến hình thành phức hợp ES không hoạt động.

+ Cơ chất cũng có thể được liên kết nhờ những vị trí đặc biệt của enzyme. Đó là một nhóm enzyme quan trọng (enzyme dị lập thể) bên cạnh trung tâm xúc tác còn có trung tâm điều chỉnh.

+ Cơ chất có thể liên kết với một chất hoạt hóa và bằng cách này nó tách khỏi E.

+ Cơ chất có thể choán chỗ (ngăn cản) một cofactor hay một coenzyme.

+ Cơ chất có thể ảnh hưởng đến ion lực của môi trường và qua đó làm mất đi tính chuyên hóa của enzyme.

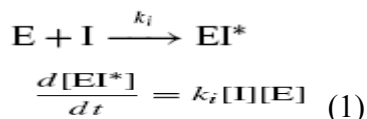
Kim hãm bất thuận nghịch (irreversible inhibition)

Nhiều trường hợp, chất kim hãm có tác dụng bất thuận nghịch. Đôi khi khó để phân biệt giữa thuận nghịch và bất thuận nghịch vì chất kim

hãm bất thuận nghịch có thể hiểu như chất kìm hãm thuận nghịch không cạnh tranh (noncompetitive).

Nhìn chung hiệu quả kìm hãm phụ thuộc các yếu tố: nồng độ chất kìm hãm, nồng độ enzyme, thời gian tác dụng. Sau đây ta xét các cơ chế tương tác bất thuận nghịch trong điều kiện nồng độ $[I] \gg [E]$.

1/ Trường hợp 1



$$[E_T] = [E] + [EI^*] \quad (2)$$

Từ (2) suy ra $[E]$ thế vào (1), đồng thời thay $[I]$ bằng $[I_0]$:

$$\frac{d[EI^*]}{dt} = k_i [I_0][E_T - EI^*] = k' [E_T - EI^*]$$

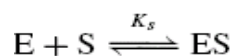
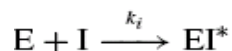
Trong đó $k' = k_i [I_0]$

Lấy tích phân ta được

$$\int_0^{EI^*} \frac{d[EI^*]}{[E_T - EI^*]} = k' \int_0^t dt$$

Bằng cách lấy tích phân phương trình tốc độ, có thể nhận được biểu thức mô tả sự biến đổi nồng độ chất phản ứng hay sản phẩm theo thời gian. Điều này cực kì hữu dụng trong việc xác định hằng số tốc độ và bậc phản ứng.

2/ Trường hợp 2



$$\frac{d[EI^*]}{dt} = k_i [E][I]$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$[E_T] = [E] + [EI^*] + [ES]$$

Mặt khác:

$$[E] = \frac{[ES] \cdot K_s}{[S]}$$

Nồng độ enzyme tự do sẽ là:

$$[E] = \frac{[E_T - EI^*] \cdot K_s}{K_s + [S]}$$

Thay vào trên và đồng thời thay [I] bằng [I₀] :

$$\frac{d[EI^*]}{dt} = k_i [I_0] \frac{[E_T - EI^*] \cdot K_s}{K_s + [S]} = k' [E_T - EI^*]$$

Trong đó

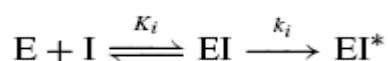
$$k' = \frac{k_i K_s}{K_s + [S]} [I_0]$$

Tương tự như trên ta có:

$$\int_0^{EI^*} \frac{d[EI^*]}{[E_T - EI^*]} = k' \int_0^t dt$$

3/ Trường hợp 3

Enzyme và I nhanh chóng tương tác tạo phức thuận nghịch ES, sau đó tiếp tục tạo phức bất thuận nghịch



$$\frac{d[EI^*]}{dt} = k_i [EI]$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$[E_T] = [E] + [EI] + [EI^*]$$

Thay [E] vào trên ta được

$$[EI] = \frac{[E_T - EI^*]}{1 + K_i/[I_0]}$$

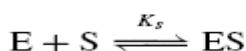
Và

$$\frac{d[\text{EI}^*]}{dt} = k_i \frac{[\text{E}_T - \text{EI}^*]}{1 + K_i/[\text{I}_0]} = k'[\text{E}_T - \text{EI}^*]$$

$$k' = \frac{k_i}{1 + K_i/[\text{I}_0]} = \frac{k_i[\text{I}_0]}{K_i + [\text{I}_0]}$$

$$\int_0^{\text{EI}^*} \frac{d[\text{EI}^*]}{[\text{E}_T - \text{EI}^*]} = k' \int_0^t dt$$

4/ Trường hợp 4



$$\frac{d[\text{EI}^*]}{dt} = k_i[\text{EI}]$$

$$K_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} \quad K_s = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]}$$

$$[\text{E}_T] = [\text{E}] + [\text{EI}] + [\text{EI}^*] + [\text{ES}]$$

$$[\text{EI}] = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{K_i} = \frac{[\text{E}_T - \text{EI} - \text{EI}^* - \text{ES}][\text{I}]}{K_i} = \frac{[\text{E}_T - \text{EI}^* - \text{ES}]}{1 + K_i/[\text{I}_0]}$$

$$[\text{E}] = [\text{ES}] \frac{K_s}{[\text{S}]} = [\text{EI}] \frac{K_i}{[\text{I}]}$$

$$[\text{ES}] = [\text{EI}] \frac{K_i[\text{S}]}{K_s[\text{I}]}$$

$$[\text{EI}] = \frac{[\text{E}_T - \text{EI}^*]}{1 + K_i/[\text{I}_0](1 + [\text{S}]/K_s)}$$

$$\frac{d[\text{EI}^*]}{dt} = k_i[\text{EI}] = \frac{k_i}{1 + K_i/[\text{I}_0](1 + [\text{S}]/K_s)}[\text{E}_T - \text{EI}^*] = k'[\text{E}_T - \text{EI}^*]$$

$$k' = \frac{k_i}{1 + K_i/[I_0](1 + [S]/K_S)} = \frac{k_i[I_0]}{K_i(1 + [S]/K_S) + [I_0]}$$

$$\int_0^{EI^*} \frac{d[EI^*]}{[E_T - EI^*]} = k' \int_0^t dt$$

7.2.4. Ảnh hưởng của chất hoạt hóa (activator)

Là chất làm tăng khả năng xúc tác chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm. Thông thường là những cation kim loại hay những hợp chất hữu cơ như các vitamin tan trong nước.

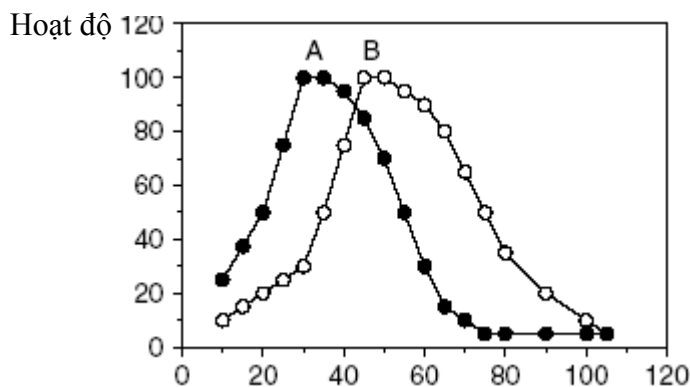
Ví dụ: Mg^{++} hoạt hóa các enzyme mà cơ chất đã được phosphoryl hóa như pyrophosphatase (cơ chất là pyrophosphate), adenosintriphosphatase (cơ chất là ATP). Các cation kim loại có thể có tính đặc hiệu, tính đối kháng và tác dụng còn tùy thuộc vào nồng độ.

Tính chất hoạt hóa của các cation kim loại:

- + Mỗi cation kim loại hoạt hóa cho một kiểu phản ứng nhất định.
- + Cation kim loại có tính đặc hiệu tương đối hay tuyệt đối.
- + Cation kim loại có thể có sự đối kháng ion.
- + Phụ thuộc nồng độ cation kim loại .
- + Cation kim loại làm thay đổi pH tối thích.
- + Phụ thuộc bản chất cation kim loại.

7.2.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Ta có thể tăng vận tốc của một phản ứng hóa học bằng cách tăng nhiệt độ môi trường, hiện tượng này tuân theo quy luật Vant -Hoff. Điều này có nghĩa khi tăng nhiệt độ lên $10^{\circ}C$ thì tốc độ phản ứng tăng lên 2 lần.



Nhiệt độ(C)

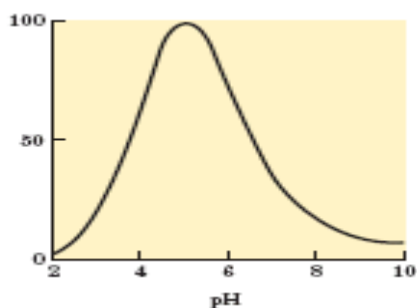
Hình 7.8. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt độ enzyme

Đối với phản ứng do enzyme xúc tác cũng có thể áp dụng được quy luật này nhưng chỉ trong một phạm vi nhất định, vì bản chất enzyme là protein. Khi ta tăng nhiệt độ lên trên 40-50°C xảy ra quá trình phá hủy chất xúc tác. Sau nhiệt độ tối thích tốc độ phản ứng do enzyme xúc tác sẽ giảm. Nhờ tồn tại nhiệt độ tối ưu người ta phân biệt phản ứng hóa sinh với các phản ứng vô cơ thông thường.

Mỗi enzyme có một nhiệt độ tối thích khác nhau, phần lớn phụ thuộc nguồn cung cấp enzyme, thông thường ở trong khoảng từ 40-60°C, cũng có enzyme có nhiệt độ tối thích rất cao như những enzyme của những chủng ưa nhiệt.

7.2.6. Ảnh hưởng của pH

Sự phân li khác nhau của một phân tử protein ở các giá trị pH khác nhau làm thay đổi tính chất của trung tâm liên kết cơ chất và hoạt động ở phân tử enzyme, dẫn đến giá trị xúc tác khác nhau phụ thuộc vào giá trị pH. Như đã biết mỗi enzyme có một pH tối thích, mỗi enzyme có đường biểu diễn ảnh hưởng pH lên vận tốc của phản ứng do enzyme xúc tác có dạng như hình 7.9:



Hình 7.9. Ảnh hưởng pH lên hoạt độ enzyme

Ảnh hưởng của giá trị pH đến tác dụng enzyme có thể do các cơ sở sau:

a/ Enzyme có sự thay đổi không thuận nghịch ở phạm vi pH cực hẹp.

b/ Ở hai sườn của pH tối thích có thể xảy ra sự phân ly nhóm prosthetic hay coenzyme.

c/ Làm thay đổi mức ion hóa hay phân ly cơ chất.

d/ Làm thay đổi mức ion hóa nhóm chức nhất định trên phân tử enzyme dẫn đến làm thay đổi ái lực liên kết của enzyme với cơ chất và thay đổi hoạt tính cực đại.

Nhờ xác định V_{max} và K_m phụ thuộc giá trị pH cho phép nhận định lại bản chất của các nhóm tham gia vào liên kết cơ chất và quá trình tự xúc tác.

7.2.7. Các yếu tố khác

+ Ánh sáng: Có ảnh hưởng khác nhau đến từng loại enzyme, các bước sóng khác nhau có ảnh hưởng khác nhau, thường ánh sáng trắng có tác động mạnh nhất, ánh sáng đỏ có tác động yếu nhất.

Ánh sáng vùng tử ngoại cũng có thể gây nên những bất lợi, enzyme ở trạng thái dung dịch bền hơn khi được kết tinh ở dạng tinh thể, nồng độ enzyme trong dung dịch càng thấp thì càng kém bền, tác động của tia tử ngoại sẽ tăng lên khi nhiệt độ. Ví dụ: dưới tác động của tia tử ngoại ở nhiệt độ cao, enzyme amylase nhanh chóng mất hoạt tính.

+ Sự chiếu điện: Điện chiếu với cường độ càng cao thì tác động phá hủy càng mạnh. Tác động sẽ mạnh hơn đối với dịch enzyme có nồng độ thấp. Có thể do tạo thành những gốc tự do, từ đó tấn công vào phản ứng enzyme.

+ Sóng siêu âm: Tác động rất khác nhau đối với từng loại enzyme, có enzyme bị mất hoạt tính, có enzyme lại không chịu ảnh hưởng.

* Nhận xét chung:

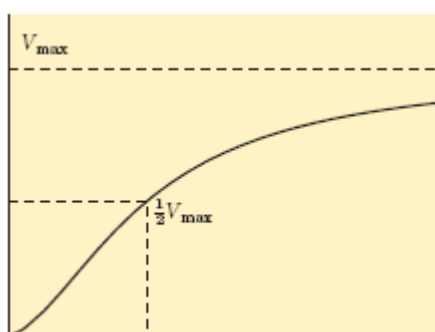
Độ bền phụ thuộc vào trạng thái của tồn tại enzyme, càng tinh khiết thì enzyme càng kém bền, dịch càng loãng thì độ bền càng kém, tác động của một số ion kim loại trong dịch với nồng độ khoảng $10^{-3}M$ như Ca^{++} làm tăng tính bền.

Enzyme allosteric (dị lập thể, dị không gian)

Cho đến nay, người ta mô tả enzyme mà hoạt tính enzyme phụ thuộc nồng độ cơ chất không có dạng hyperbol mà có dạng sigmoid là enzyme dị lập thể (hình 7.10).

Đối với enzyme này, khi nồng độ cơ chất thấp thì tốc độ phản ứng tăng chậm, sau đó tiếp tục tăng nồng độ thì tốc độ nhanh chóng đạt giá trị cực đại.

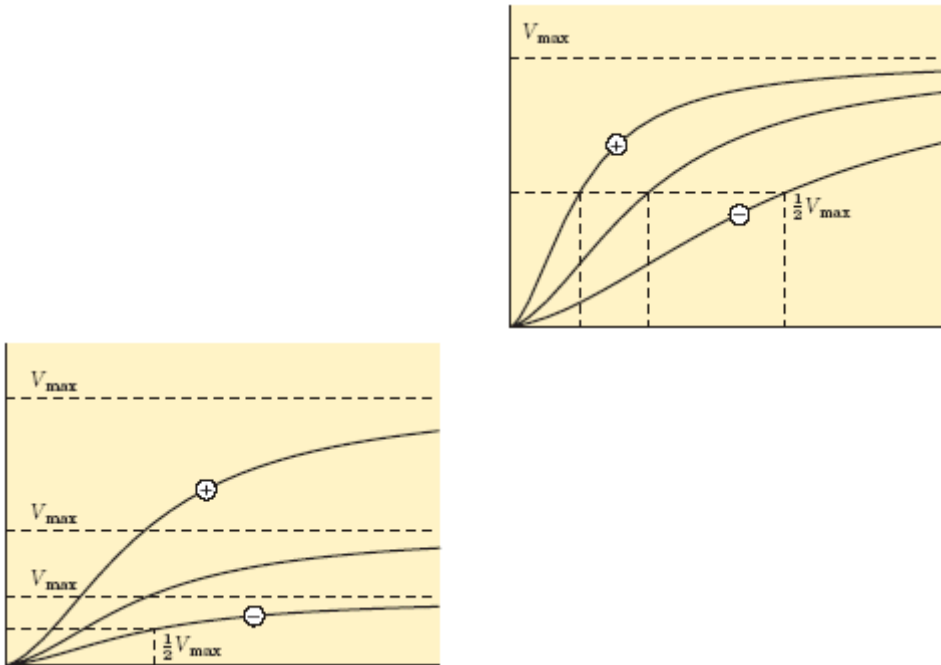
Như ta đã biết, enzyme tuân theo động học Michaelis-Menten thì 1 hay nhiều cơ chất cũng chỉ liên kết vào 1 vị trí trên phân tử enzyme, điều này sẽ dẫn đến enzyme bão hòa cơ chất. Còn enzyme có đường cong tốc độ sigmoid chỉ xuất hiện khi enzyme là một oligomer, nên có thể liên kết với nhiều phân tử cơ chất. Điều này có nghĩa là trên enzyme dị lập thể có nhiều trung tâm liên kết, mỗi monomer có 1 trung tâm liên kết.



Hình 7.10. Biến thiên vận tốc phản ứng theo nồng độ cơ chất

Người ta cho rằng, trong trường hợp này có tính hợp tác giữa các vị trí liên kết cơ chất trong phân tử enzyme oligomer.

Các enzyme oligomer này được Monod gọi là enzyme dị lập thể (allosteric). Đường cong tốc độ sigmoid có thể bị chất điều hòa (modulator) đẩy về phía trái hay phải. Chất điều hòa dương tức làm tăng ái lực của enzyme allosteric với cơ chất, ngược lại là chất điều hòa âm. Các chất điều hòa có thể làm ảnh hưởng khác nhau đến các thông số động học, làm thay đổi giá trị riêng lẻ một trong hai giá trị K_m hay V_{max} .



Hình 7.11. Minh họa khi có modulator

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Phạm Thị Trân Châu, Trần thi Áng. 1999. Hoá sinh học, NXB Giáo dục, Hà Nội.
2. Đỗ Quý Hai. 2004. Chuyên đề enzyme, Tài liệu lưu hành nội bộ Trường ĐHKH Huế.
3. Trần Thanh Phong. 2004. Chuyên đề enzyme, Tài liệu lưu hành nội bộ Trường ĐHKH Huế.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Bergmeyer H. U. 1968. Methods of enzymatic analysis, translated from the third German edition, Academic Press, New York.
2. Copeland R. A. 2000. Enzymes, copyright by Wiley-VCH, Inc.
3. Gilbert H. F. 1992. Basic concepts in biochemistry, Copyright by the McGraw- Hill companies, Inc.
4. Lehninger A. L. 2004. Principles of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman.

Chương 8

Sinh học enzyme

8.1. Sự phân bố enzyme trong tế bào

Như đã trình bày ở phần trước, enzyme có trong tất cả các cơ thể động vật, thực vật và vi sinh vật. Tuy vậy, sự phân bố enzyme không đồng đều giữa các loài, các tế bào mô và cơ quan khác nhau. Người ta thấy có những enzyme tồn tại hầu hết ở mọi mô mọi tế bào: Như các enzyme xúc tác cho quá trình đường phân, sinh tổng hợp protein, nucleic acid. Một số enzyme khác chỉ có trong một số cơ quan riêng biệt, ví dụ như pepsin chỉ có trong dạ dày. Đó là enzyme đặc biệt, đặc trưng cho một mô. Mặt khác, cùng một enzyme có trong các mô khác nhau hoặc thậm chí ở các bộ phận khác nhau của cùng một loại tế bào cũng có thể khác nhau về lượng và có khi cả về chất.

Hàm lượng enzyme trong một mô hoặc một cơ quan nhất định còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác như: Giai đoạn sinh trưởng và phát triển, trạng thái sinh lý của tế bào, các yếu tố bên ngoài v.v...

Mỗi loại cấu trúc dưới tế bào của cơ thể bậc cao như nhân tế bào, ty lạp thể, lysosome, hệ thống lưới nội chất nguyên sinh với các hạt ribosome... đều có cấu trúc và chức năng riêng với những hệ enzyme đặc hiệu. Những enzyme này hoặc hoà tan trong dịch lỏng, hoặc gắn chặt vào các màng của các cấu trúc đó. Do cấu trúc đặc biệt như vậy của tế bào, enzyme được phân bố thành từng ngăn đặc hiệu. Sự khu trú và sắp đặt các enzyme một cách hợp lý trong các cấu trúc của tế bào đã làm cho các phản ứng enzyme có tính chất định hướng, có phối hợp tác dụng với nhau và tạo ra những hệ thống phản ứng dây chuyền liên tục, nhịp nhàng và ăn khớp với nhau.

Trong nhân tế bào có thể thấy các enzyme thuộc các nhóm khác nhau xúc tác cho các quá trình khác nhau. Đó là các enzyme nicotinic-mono-nucleotide adenylyl transferase, 5'-nucleotidase, NAD(P) nucleosidase, arginase, ATP-ase và một số enzyme khác. Nói chung trong nhân chứa nhiều enzyme liên quan đến quá trình trao đổi nucleotide, trong đó các enzyme tham gia các quá trình trao đổi các hợp chất có tính chất “chìa khóa”. Những enzyme trong nhân tế bào thường có mặt với lượng rất nhỏ. Việc nghiên cứu những enzyme này thường gặp nhiều khó khăn vì

trong quá trình trao đổi chất, một số enzyme có thể thoát ra hoặc hấp thu vào nhân tế bào.

Trong ty thể có chứa hầu hết các hệ enzyme có liên quan đến quá trình chuyển hóa năng lượng và cũng được coi là những “nhà máy cung cấp năng lượng”. Trong các hệ enzyme của ty thể, trước hết phải kể đến hệ enzyme của chuỗi hô hấp tế bào và của quá trình phosphoryl hóa tạo ATP. Mặc dầu người ta có phát hiện cytochrome ở ngoài ty thể, nhưng oxydase thì chỉ thấy trong ty thể. Ngoài những enzyme kể trên, trong ty thể còn có hệ enzyme cyclophorase bao gồm toàn bộ các enzyme của chu trình Krebs. Cũng có thể tìm thấy một số enzyme của chu trình này trong bào tương như isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase... nhưng hệ thống enzyme hoàn chỉnh của chu trình này thì chỉ tìm thấy trong ty thể. Ngoài ra, người ta cũng tìm thấy các hệ enzyme kéo dài acid béo, các hệ enzyme phân giải acid béo và nhiều enzyme khác trong ty thể. Cách sắp đặt các hệ enzyme kể trên trong ty thể có liên quan chặt chẽ với nhau để đảm bảo cho các quá trình chuyển hóa phối hợp nhịp nhàng với nhau.

Trong lysosome có thể phát hiện nhiều enzyme loại thủy phân (hydrolase) có tác dụng phá vỡ nhiều loại phân tử lớn như nucleic acid, protein, chất béo và nhiều loại phân tử lớn khác như mucopolysaccharide... thành những phân tử nhỏ có khả năng được chuyển hóa dưới tác dụng của các enzyme của ty thể. Bình thường enzyme được bọc kín trong màng lipoprotein của lysosome và do đó không có tác dụng với các chất trong bào tương. Khi màng lysosome bị vỡ hoặc bị tổn thương, các hệ enzyme của nó được giải phóng ra, sẽ làm tiêu hủy cả tế bào.

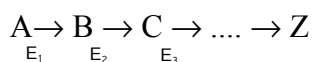
Các hạt ribosome dính trên hệ thống lưới nội chất nguyên sinh, là nơi xảy ra quá trình sinh tổng hợp protein, do đó có các hệ enzyme của quá trình sinh tổng hợp protein.

Bào tương là phần lỏng của tế bào có chứa rất nhiều loại enzyme, có tất cả các enzyme xúc tác cho quá trình đường phân hay cho các quá trình phân giải glucose. Nhiều công trình nghiên cứu đã chứng minh rằng quá trình đường phân xảy ra chủ yếu ở bào tương. Nhiều enzyme của quá trình này có thể dính ở màng ngoài của hệ thống lưới nội chất nguyên sinh, có những enzyme gắn sâu vào màng của hệ thống này. Sản phẩm pyruvate của quá trình đường phân được vận chuyển qua màng vào ty thể để tiếp tục khử cacboxyl bằng cách oxy hóa thành acetyl CoA tham gia vào chu trình Krebs.

Các cấu trúc màng trong tế bào có tính thẩm chọn lọc, nhiều chất chuyển hóa không qua được màng của ty lạp thể, ví dụ như oxaloacetate, isocitrate, NADH + H⁺, NADPH + H⁺. Chính tính thẩm chọn lọc này đã làm tăng thêm tính đặc hiệu của các ngăn trong tế bào. Cũng cần lưu ý rằng, trong tế bào sống nguyên vẹn, enzyme thường chưa hoạt động tới mức tối đa và những điều kiện trong cơ thể cũng chưa phải là những điều kiện thích hợp nhất cho sự hoạt động của enzyme. Đây chính là những điều kiện quan trọng giúp cho cơ thể điều hoà các quá trình chuyển hóa.

8.2. Điều hòa hoạt độ và số lượng của enzyme trong tế bào

Như chúng ta đã biết, các bộ phận của tế bào hoạt động rất nhịp nhàng, bảo đảm hoạt động sống bình thường của tế bào. Trong tế bào có hàng nghìn phản ứng khác nhau tạo nên toàn bộ quá trình chuyển hóa của một chất cụ thể (để tạo nên một sản phẩm nào đó) gồm một chuỗi các phản ứng do nhiều enzyme (một hệ thống enzyme) xúc tác:



Theo sơ đồ của chuỗi phản ứng trên thì để chất A có thể biến thành sản phẩm cuối cùng là chất Z phải nhờ hệ thống nhiều enzyme E₁, E₂, E₃... xúc tác các phản ứng kế tiếp nhau. Chất Z luôn luôn được sản xuất với số lượng phù hợp với nhu cầu của tế bào: khi thiếu, dây chuyền phản ứng tăng lên, khi thừa, dây chuyền phản ứng tự động giảm. Thực tế mỗi một quá trình xảy ra theo đúng nhu cầu của tế bào không quá thừa ngay cả trong điều kiện dinh dưỡng đầy đủ. Những hiện tượng đó có thể được giải thích bằng hai cơ chế: điều hòa hoạt độ của chính phân tử enzyme trong chuỗi phản ứng (bản thân enzyme đó hoạt động bình thường hay giảm hoạt động do bị ức chế) và điều hòa sinh tổng hợp các enzyme (số lượng các enzyme được sản xuất ra ít hay nhiều)

Những quá trình này có liên quan mật thiết với nhau và điều chỉnh lẫn nhau.

8.2.1. Điều hòa hoạt độ enzyme

Trong tế bào, nhiều loại enzyme thường không sử dụng hết khả năng xúc tác của chúng. Các điều kiện bình thường trong tế bào không phải là những điều kiện để enzyme có thể biểu hiện hoạt động tối đa, vì cần phải duy trì một dự trữ năng lực của enzyme để làm tăng tốc độ của quá trình chuyển hóa khi có nhu cầu cần thiết của tế bào. Như vậy trong tế bào có những tác nhân điều hòa hoạt độ của enzyme và tạo ra khả năng biến đổi

thích ứng của các quá trình chuyển các enzyme trong một chuỗi phản ứng không có sự đồng đều về trị số hoạt độ.

Những tác nhân hoặc yếu tố ảnh hưởng của môi trường nội bào có thể chia thành ba loại chính. Loại thứ nhất là các yếu tố không đặc hiệu của môi trường phản ứng như pH, thế năng oxy hóa khử, lực ion, nhiệt độ... Loại thứ hai là các hợp chất có tác dụng đặc hiệu với trung tâm hoạt động do sự phù hợp về cấu trúc không gian. Đó là các chất tham gia phản ứng enzyme như cơ chất, coenzyme, các chất vận chuyển trung gian hoặc là các chất hoạt hóa hay chất ức chế enzyme. Loại thứ ba là các hợp chất có tác dụng đặc hiệu nhưng không tham gia về mặt hóa học vào phản ứng do enzyme đó xúc tác và thường không giống về mặt không gian với các chất tham gia phản ứng. Đó là các chất có tác dụng dị lập thể thuộc về nhóm này, bao gồm các sản phẩm cuối cùng của một số chuỗi chuyển hóa (đặc biệt là hệ thống đồng hóa) một số chất chuyển hóa khác và cũng có thể cả một số hormone.

Ở đây ta xét đến sự điều hòa hoạt độ enzyme theo các cơ chế dị lập thể (allosteric) và cơ chế thay đổi cân bằng giữa hai dạng hoạt động và không hoạt động của enzyme. Điều hòa theo cơ chế dị lập thể được thực hiện khi sản phẩm chuyển hóa cuối cùng của một dãy phản ứng hóa học xúc tác bởi nhiều enzyme có thể tác dụng hoạt hóa hay ức chế lên enzyme xúc tác phản ứng đầu tiên là một enzyme dị lập thể.

Enzyme dị lập thể (allosteric enzyme) có tên gọi từ tiếng Hi Lạp là allos có nghĩa là khác và stereos có nghĩa lập thể, không gian. Đó là những enzyme có tác dụng điều chỉnh đặc hiệu trên những vị trí then chốt của mạng lưới chuyển hóa, đặc biệt là những quá trình sinh tổng hợp. Trong phân tử của enzyme dị lập thể ngoài trung tâm hoạt động làm chức năng xúc tác, còn có một số vị trí khác có thể tương tác với các chất khác gọi là trung tâm allosteric (trung tâm điều hòa, trung tâm dị lập thể, trung tâm dị trung gian). Các chất kết hợp vào các trung tâm này gọi là các chất điều hòa allosteric (chất điều hòa dị lập thể). Enzyme dị lập thể thay đổi hoạt độ xúc tác thông qua sự hay đổi cấu hình không gian của phân tử enzyme, của trung tâm hoạt động khi gắn với các chất điều hòa dị lập thể. Nếu làm tăng hoạt độ gọi là chất điều hòa dương; nếu làm giảm hoạt độ gọi là các chất điều hòa âm. Các chất điều hòa này kết hợp với enzyme nhưng không bị chuyển hóa dưới tác dụng của enzyme mà nó kết hợp.

Enzyme dị lập thể thường là những enzyme có cấu trúc bậc bốn, do các đơn vị nhỏ cấu tạo nên; trong phân tử thường có 2 hay một số trung tâm hoạt động, có thể kết hợp với 2 hay một số phân tử cơ chất. Cơ chất

có thể thực hiện chức năng của chất điều hòa - điều hòa homotropic (đồng hợp, đồng hướng). Các chất điều hòa có cấu trúc khác cơ chất - điều hòa heterotropic (dị hợp, dị hướng). Tuy nhiên phần lớn các enzyme dị lập thể thuộc kiểu hỗn hợp đồng và dị hợp nghĩa là hoạt động của chúng có thể được điều hòa nhờ cơ chất và các chất trao đổi khác.

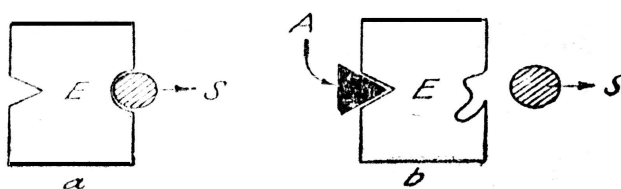
Trong cơ chế điều hòa enzyme thường nói đến hiện tượng ức chế ngược (feed back inhibition). Cơ chế của sự ức chế ngược chính là một loại cơ chế điều hòa dị lập thể mà thông thường sản phẩm cuối cùng của quá trình phản ứng là chất điều hòa dị lập thể âm. Do đó hiện tượng ức chế ngược được gọi là ức chế dị lập thể. Khi enzyme cần có tác dụng hoạt hóa của một chất điều hòa dương để chuyển thành dạng enzyme hoạt động thì hiện tượng đó được gọi là sự hoạt hóa dị lập thể. Ức chế dị lập thể là nguyên tắc rất phổ biến đối với các quá trình chuyển hóa và có các đặc điểm sau đây:

- Cơ chế ức chế ngược xảy ra ở các chuỗi phản ứng dẫn đến sự tổng hợp một chất nào đó (chất này được dùng để tổng hợp các đại phân tử: ví dụ các amino acid isoleucine và histidine được dùng để tổng hợp protein, nucleotide được dùng để tổng hợp nucleic acid)

- Sản phẩm cuối cùng có tác dụng ức chế dị lập thể.

- Sản phẩm cuối cùng thường chỉ tác dụng đặc hiệu và trực tiếp lên enzyme đầu tiên là enzyme dị lập thể.

- Sản phẩm cuối cùng (chất ức chế ngược) có cấu trúc hóa học khác với cơ chất của phản ứng mà nó ức chế, vì vậy tác dụng ức chế của nó không phải do cạnh tranh với cơ chất đó, mà do nó làm thay đổi cấu dạng không gian của enzyme khiến enzyme không tiếp nhận được cơ chất. (Hình 8.1)

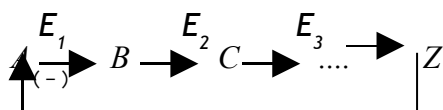


Hình 8.1. Hiệu ứng dị lập thể âm

a. Enzyme (E) tiếp nhận cơ chất (S)

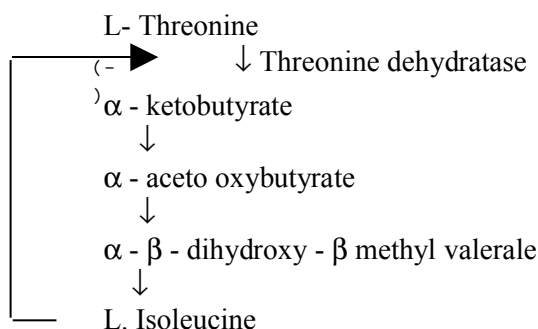
b. Yếu tố dị lập thể A gắn vào trung tâm dị lập thể, cấu trúc enzyme (trung tâm hoạt động của enzyme) thay đổi và không tiếp nhận được cơ chất; hoạt độ giảm.

Cơ chế ức chế ngược có thể được biểu thị theo sơ đồ sau:



Như vậy, mỗi khi sản phẩm cuối cùng Z được tổng hợp tăng lên vượt quá nhu cầu của tế bào thì nó ức chế enzyme đầu tiên E_1 khiến cho phản ứng đầu tiên $A \rightarrow B$ giảm đi và do đó, mặc dù các enzyme sau là E_2, E_3, \dots không bị ức chế (vẫn có khả năng hoạt động bình thường), nhưng chúng không có các cơ chất B, C... để chuyển hóa, kết quả là toàn chuỗi phản ứng bị giảm sút, sự tổng hợp sản phẩm cuối cùng Z giảm đi. Khi tế bào thiếu chất Z, enzyme E_1 không bị ức chế nên phản ứng đầu tiên lại xảy ra và cả chuỗi phản ứng cũng vậy: kết quả là sự tổng hợp các chất Z tăng lên đáp ứng nhu cầu của tế bào.

Ví dụ, ở E.Coli isoleucine là sản phẩm chuyển hóa cuối cùng của chuỗi phản ứng chuyển hóa của threonine; phản ứng đầu tiên của chuỗi phản ứng do enzyme dị lập thể threonine dehydratase xúc tác, khi lượng isoleucine tăng cao (do được tổng hợp nhiều) thì nó ức chế enzyme của phản ứng đầu tiên đó theo cơ chế dị lập thể (hình 8.2)



Hình 8.2: Sự ức chế threonine dehydratase bởi Isoleucine theo cơ chế ức chế ngược, (-): ức chế.

Ở quá trình sinh tổng hợp amino acid thường xảy ra cơ chế này. Ở trường hợp sinh tổng hợp nucleotide pyrimidine cytidin triphosphate (CTP) cũng tương tự như trên. Aspartate transcarbamoylase (thường được viết tắt là ATC - ase và có tên quốc tế là aspartate carbamoyltransferase) của E.Coli xúc tác cho phản ứng chuyển vị carbamoyl từ carbamoylphosphate đến aspartic acid là phản ứng đầu tiên trong quá trình tổng hợp CTP. Chính CTP là sản

phẩm cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp, là chất điều hòa âm đặc hiệu của ATC - ase, CDP và CMP không có tác dụng với enzyme này. ATC có chất điều hòa dương là ATP hoặc AMP, chất này làm đảo ngược tác dụng ức chế của CTP. Kết quả nghiên cứu cho thấy enzyme có trọng lượng phân tử (TLPT) là 300.000 nhưng có thể phân ly thành hai đơn vị xúc tác như nhau và ba đơn vị điều hòa như nhau. Mỗi một đơn vị xúc tác có TLPT khoảng 100.000 và do ba chuỗi polypeptide tạo nên, mỗi chuỗi có TLPL 33.000 được gọi là chuỗi C. Mỗi đơn vị xúc tác có ba trung tâm xúc tác, mỗi đơn vị điều hòa có hai chuỗi polypeptide được gọi là chuỗi R có TLPT 17.000 và có một nguyên tử Zn^{2+} kết hợp vào mỗi chuỗi R. Mỗi đơn vị điều hòa có thể kết hợp hai phân tử chất điều hòa CTP, mỗi chuỗi một R.

Khi phân tử enzyme bị phân ly, các đơn vị xúc tác tách khỏi các đơn vị điều hòa, hoạt độ xúc tác của enzyme vẫn còn nhưng enzyme không bị kìm hãm bởi CTP. CTP chỉ có tác dụng kìm hãm phản ứng enzyme khi nào có sự kết hợp giữa các đơn vị xúc tác với các đơn vị điều hòa thành phân tử enzyme đầy đủ.

Hiện tượng này được giải thích là do lúc ấy sự kết hợp của CTP vào đơn vị điều hòa sẽ kéo theo sự biến đổi dạng không gian của đơn vị xúc tác cũng như của toàn bộ phân tử enzyme theo hướng không có lợi cho hoạt độ xúc tác, do đó làm giảm hoạt độ enzyme. Như vậy, sự tổng hợp nên sản phẩm cuối cùng được điều hòa một cách hoàn toàn tự động dựa trên sự ức chế hoặc giải ức chế đối với enzyme có sẵn trong tế bào. Đó là cơ chế điều hòa nhanh vì nó tác động trực tiếp trên hoạt độ của enzyme. Cơ chế điều hòa ức chế ngược rất có lợi đối với tế bào vì nó làm ngừng sự sản xuất thừa các sản phẩm cuối cùng, do đó tiết kiệm được năng lượng và các nguyên liệu dùng để tổng hợp nên sản phẩm đó.

Trong việc điều hòa hoạt động enzyme theo cơ chế thay đổi cân bằng giữa hai dạng enzyme hoạt động và không hoạt động, trước hết phải kể đến quá trình hoạt hóa zymogen.

Phần lớn các enzyme được tổng hợp trong cơ thể thành những phân tử enzyme có hoạt tính, nhưng có những enzyme như các protease của tụy tạng, dạ dày cũng như các protease xúc tác cho quá trình đông máu thường được tổng hợp nên qua một dạng trung gian chưa có hoạt tính xúc tác gọi là zymogen hoặc proenzyme. Đó là những tiền chất để tạo thành enzyme, chứ không phải là enzyme thực sự. Những chất này không có hoạt tính, phải trải qua một quá trình biến đổi, sắp xếp lại cấu trúc phân tử mới trở thành enzyme hoạt động được. Quá trình chuyển hóa pro-enzyme thành enzyme gọi là quá trình hoạt hóa, được thực hiện nhờ sự tự xúc tác hoặc

do các enzyme khác xúc tác. Quá trình hoạt hóa zymogen có một số đặc điểm chung như sau:

- Là quá trình thủy phân giới hạn protein (limited proteolysis), cắt đứt một số liên kết peptide ở gần đầu N của phân tử zymogen. Đoạn peptide được tạo thành có thể bị loại ra hoặc vẫn gắn với phần còn lại của phân tử nhờ các cầu disulfide.

- Khi liên kết peptide bị cắt đứt thường làm thay đổi cấu hình không gian của phân tử theo hướng có lợi cho hoạt động xúc tác, tạo thành phân tử enzyme.

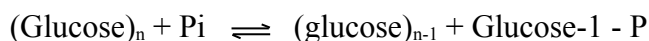
- Hiệu suất hoạt hóa zymogen phụ thuộc vào điều kiện hoạt hóa, nồng độ zymogen, bản chất và nồng độ của enzyme xúc tác cho quá trình hoạt hóa, nhiệt độ, pH và một số yếu tố khác.

Ở người và nhiều loài động vật có vú, các enzyme thủy phân protein (protease) trong ống tiêu hóa đều được tổng hợp ra dưới dạng tiền chất của enzyme. Ví dụ pepsinogen do những tế bào chính của tuyến dạ dày tổng hợp nên và là tiền chất của pepsin, chymotrysinogen và trypsinogen của tuyến tụy theo thứ tự là tiền chất của chymotrysin và trypsin. Các chất này đều chỉ được hoạt hóa thành dạng enzyme hoạt động sau khi đã tiết vào lòng ống tiêu hóa. Pepsinogen được hoạt hóa thành trypsin dưới tác dụng của chính trypsin hoặc enterokinase, còn chymotrysinogen được hoạt hóa dưới tác dụng của trypsin và chymotrysin.

Hiện tượng tổng hợp ra các zymogen có một ý nghĩa sinh học quan trọng. Có thể nói rằng, các protease trong ống tiêu hóa được tổng hợp qua giai đoạn trung gian như vậy chính là một cơ chế tự bảo vệ của cơ thể. Vì nếu không như vậy thì chính các tuyến đã tổng hợp nên các loại enzyme này sẽ bị tiêu hủy bởi chính những enzyme do chúng tổng hợp nên.

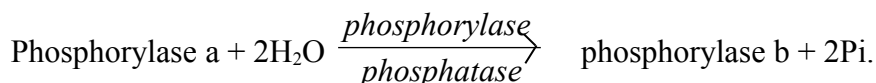
Hoạt độ enzyme cũng được điều hòa nhờ sự biến đổi lẫn nhau giữa các dạng hoạt động và không hoạt động qua những thay đổi đồng hóa trị về cấu trúc phân tử của chúng.

Ví dụ enzyme glycogen phosphorylase ở mô cơ và gan được điều hòa hoạt độ bằng cách gắn thêm (hoặc lấy đi) nhóm phosphate. Enzyme này xúc tác phản ứng bẻ gãy phân tử polysaccharide glycogen thành những glucose-1 - phosphate.

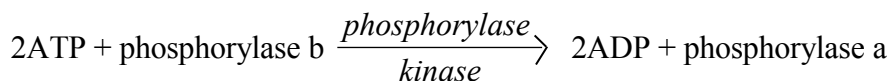


Enzyme này tồn tại dưới hai dạng là phosphorylase a (dạng hoạt động) và phosphorylase b (dạng không hoạt động). Phosphorylase a là một

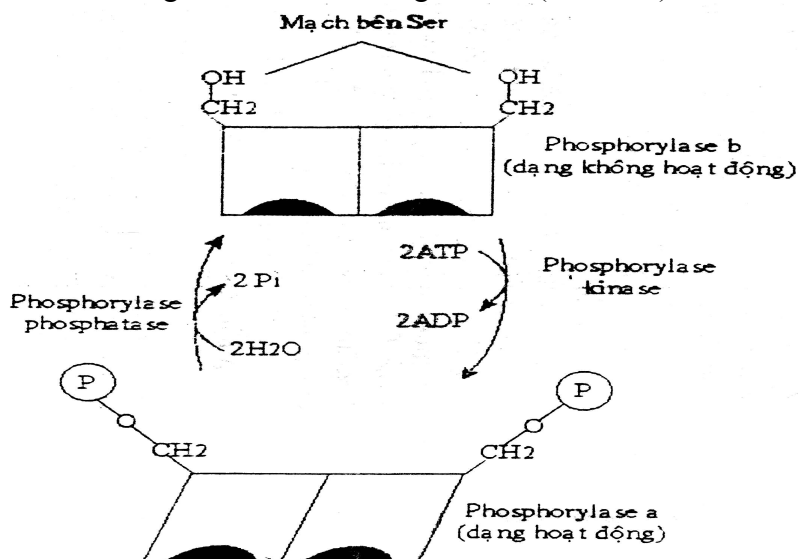
protein oligomer với hai đơn vị cấu tạo, mỗi đơn vị có một gốc serine được phosphoryl hóa ở nhóm hydroxyl. Những nhóm phosphate này là cần thiết cho hoạt động xúc tác của enzyme và có thể chịu phản ứng thủy phân bởi enzyme phosphorylase - phosphatase.



Các nhóm phosphate bị loại bỏ đã làm cho phosphorylase a trở thành phosphorylase b. Các phân tử enzyme này hoạt động rất kém hoặc không hoạt động trong quá trình cắt glycogen so với phosphorylase a. Những phân tử phosphorylase b không hoạt động này có thể được tái hoạt hóa trở thành phosphorylase a có hoạt tính cao, dưới tác dụng của phosphorylase-kinase. Phản ứng enzyme này xúc tác sự phosphoryl hóa các gốc serine của phosphorylase nhờ các phân tử ATP.



Như vậy, quá trình điều hòa hoạt độ của glycogen phosphorylase được thực hiện bằng cách biến đổi đồng hóa trị. (Hình 8.3)



Hình: 8.3. Điều hòa enzyme phosphorylase nhờ quá trình phosphoryl hóa

Cùng với kiểu điều hòa dị lập thể bởi các enzyme dị lập thể, các enzyme điều hòa đồng hóa trị đáp ứng với những sự biến đổi về trạng thái chuyển hóa của một tế bào hoặc mô trong những thời gian tương đối ngắn:

những enzyme dị lập thể, tính bằng giây, còn những enzyme điều hòa đồng hóa trị thường tính bằng phút.

8.2.2. Điều hòa sinh tổng hợp enzyme

Như trên đã nói, hiệu ứng dị lập thể âm (ức chế ngược) và hiệu ứng dị lập thể dương (hoạt hóa enzyme dị lập thể) có tác dụng to lớn trong việc điều hòa nhanh chóng các quá trình chuyển hóa trong tế bào và cơ thể. Nhưng khi có sự thay đổi lớn về số lượng và chất chuyển hóa (ví dụ một chất nào đó được sản xuất hoặc giảm sút quá nhiều, sự tăng thêm hay rút bớt rõ rệt chất dinh dưỡng ở môi trường nuôi cấy...) thì hiệu ứng dị lập thể không đủ đáp ứng. Có cơ chế thứ hai phối hợp: cơ chế điều hòa sinh tổng hợp enzyme. Đây là cơ chế chậm vì phải qua nhiều khâu trung gian (tác động lên hoạt động của gen và qua đó lên sự tổng hợp protein - enzyme). Cơ chế này chậm song rất kinh tế: tiết kiệm được nguyên liệu để tổng hợp protein - enzyme. Trong cơ thể thường tồn tại hai loại enzyme, loại thứ nhất là enzyme thường trực hay enzyme cơ cấu (constitutive enzymes), là những enzyme tham gia thành phần cơ bản của hoạt động tế bào, gồm tất cả các loại enzyme xúc tác quá trình chuyển hóa của tế bào và lúc nào cũng có trong tế bào, loại thứ hai là enzyme cảm ứng (inductive - enzyme) bình thường có lượng rất ít, không đáng kể, chúng sẽ được tăng lên nhanh chóng khi đưa vào môi trường chất xác định.

Điều hòa sinh tổng hợp enzyme được thực hiện theo kiểu cảm ứng và kim hãm và được biết nhiều ở hệ thống procaryote (tế bào vi khuẩn và thực khuẩn thể). Bộ gen của một vi khuẩn bao gồm nhiễm sắc thể độc nhất gồm 3,8 triệu đôi nucleotide có khả năng mã hóa hơn 3000 protein khác nhau trong trường hợp của E.Coli.

Các vi sinh vật thường thích nghi dễ dàng đối với những biến đổi trong thành phần của môi trường dinh dưỡng nhờ hiện tượng tổng hợp cảm ứng của enzyme. Khi xuất hiện trong môi trường một cơ chất mới (đối với những môi trường tương đối nghèo), không chứa những chất dinh dưỡng thông thường, (ví dụ như glucose) thì sự tinh tổng hợp enzyme trong tế bào tăng lên nhanh chóng đột ngột do hiện tượng cảm ứng, (gọi là sự tổng hợp cảm ứng). Với số lượng enzyme được tăng lên, cơ chất mới này sẽ được biến hóa nhanh chóng thành một dạng dễ đồng hóa hơn. Chẳng hạn khi cho thêm tryptophan vào môi trường nuôi cấy E.Coli thì enzyme D-serindeaminase được tổng hợp tăng lên 200 lần, trong khi đó hàm lượng của L-serindeaminase chỉ tăng 4 lần, còn L-threonindeaminase thì không thay đổi. Khi thêm L.threonine cũng vào môi trường ấy, sự tổng hợp L-threonindeaminase chiếm ưu thế. Cần chú ý, các enzyme có chức

năng phân giải (dị hóa) thường là các enzyme cảm ứng. Sự cảm ứng chỉ thấy ở các môi trường không chứa nguồn carbon dễ đồng hóa hơn: ngay cả khi sự cảm ứng đã bắt đầu, ta vẫn có thể ngăn cản hiện tượng này bằng cách cho thêm glucose vào môi trường, người ta gọi là hiệu ứng glucose. Như vậy, sự cảm ứng của các enzyme là một cơ chế dự bị để bảo đảm cho sự chuyển hóa của tế bào có thể thực hiện được một cách bình thường khi có những thay đổi không thuận lợi trong thành phần của môi trường. Sự cảm ứng có tính đa hướng và tính hợp đồng, đặc điểm này được thể hiện ở chỗ: một chất cảm ứng có thể cùng một lúc gây ra sự tổng hợp cảm ứng của một vài enzyme. Chẳng hạn chất cảm ứng β -galactosidolactose hoặc các chất tương tự của nó) ngoài khả năng gây ra sự tổng hợp cảm ứng enzyme β -galactosidase còn đồng thời gây ra sự tổng hợp cảm ứng hai chất xúc tác nữa là galactosidpermease (có tác dụng chuyển cơ chất qua màng tế bào) và galactosidtransferase; cả ba loại protein-enzyme này được tổng hợp cảm ứng song song, với tỷ lệ không thay đổi. Nói cách khác, sự tổng hợp cảm ứng ba protein-enzyme này được thực hiện có tính chất hợp đồng về số lượng.

Ngoài hiện tượng cảm ứng vừa nói trên, người ta còn phát hiện ra hiện tượng kìm hãm sự tổng hợp enzyme khi thêm các chất chuyển hóa nhất định vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Khi cho thêm vào môi trường một nồng độ valine tương đối cao, sẽ làm ngừng sự tổng hợp các enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp amino acid này. Nồng độ các enzyme hiện có sẽ giảm đi vì chúng bị pha loãng và bị thoái hóa dần trong quần thể các tế bào đang mọc. Nếu thêm các amino acid khác như methionine, tryptophan, arginine... cũng như một số bazơ nitơ như uracyl, cytosin, adenin, guanin cũng gây ra sự kìm hãm chọn lọc như trên. Như vậy các enzyme làm chức năng tổng hợp (đồng hóa) thường bị kìm hãm, mặc dù có một số trường hợp enzyme phân giải (dị hóa), ví dụ như phosphatase kiềm cũng bị kìm hãm như trên. Hiện tượng kìm hãm cũng có tính chất đa hướng, khi cho thêm vào môi trường một chất chuyển hóa gây kìm hãm, thì sự tổng hợp tất cả các enzyme trong hệ thống tổng hợp tương ứng đều bị ngừng lại đồng thời mức độ kìm hãm sự tổng hợp của tất cả các enzyme sinh tổng hợp ra nó, bắt đầu từ N-acetylglutamatoreductase: histidine kìm hãm tất cả các enzyme tổng hợp ra nó từ phosphoribosyl-ATP-pyrophosphorylase: uracil và cytosine kìm hãm tất cả hệ thống enzyme tổng hợp ra chúng bắt đầu từ aspartat carbamyl transferase. Do đó ta thấy rằng, những giới hạn của một đơn vị điều hòa di truyền thường trùng với các giới hạn của hệ thống enzyme. Điều đó xác nhận lại một lần nữa về quan niệm cho rằng hệ thống enzyme là một đơn vị chức năng của sự chuyển hóa.

Hiện tượng kim hãm chỉ xảy ra với nồng độ khá cao của các chất kim hãm, khi nồng độ giảm xuống thì sự tổng hợp các enzyme tương ứng lại được phục hồi, đó là sự giải kim hãm. Ta có thể nói rằng, số lượng của các enzyme trong hệ thống được kiểm tra một cách thuận nghịch bằng nồng độ của sản phẩm cuối cùng của chúng, đồng thời đặc điểm của sự điều chỉnh này là sự liên hệ ngược âm tính. Sự tăng nồng độ sản phẩm sẽ kim hãm sự tổng hợp các enzyme này. Nhờ có cơ chế này, các tế bào tránh được sự tiêu phí các nguyên liệu tạo năng lượng và tạo hình dùng cho sự tổng hợp các enzyme, khi mà các sản phẩm tương ứng đã có đủ trong môi trường.

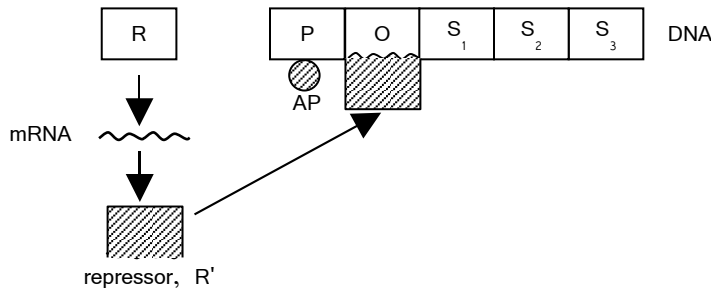
Hiện tượng giải kim hãm, giống như hiện tượng cảm ứng. Mặc dù bề ngoài đối lập nhau, nhưng hiện tượng kim hãm và hiện tượng cảm ứng có liên quan sâu sắc với nhau. Ảnh hưởng đối kháng của ornithine và arginine đối với sự tổng hợp ornithincarbamyltransferase thuộc hệ thống arginine là một chứng minh rõ ràng về tính đồng nhất này. Sản phẩm cuối cùng của hệ thống là arginine có tác dụng kim hãm sự tổng hợp enzyme này, còn cơ chất của enzyme là ornithine thì cạnh tranh với arginine, làm giảm tác dụng của arginine, do đó tạo ra hiện tượng giải kim hãm hoặc hiện tượng tổng hợp cảm ứng enzyme. Kết quả là số lượng enzyme trong tế bào được quyết định bởi tương quan các nồng độ nội bào của cơ chất và của sản phẩm của hệ thống. Trên cơ sở những hiểu biết hiện đại về cơ chế tổng hợp protein cùng với những kết quả nghiên cứu về hiện tượng cảm ứng và kim hãm trong sự tổng hợp enzyme, người ta đã xây dựng được một hệ thống quan niệm về cơ chế điều hòa tổng hợp enzyme.

Sự tổng hợp enzyme, như ta đã biết, được thực hiện trên các hạt ribosome, cấu trúc đặc hiệu của phân tử enzyme là do những mã hiệu di truyền của RNA thông tin (m-RNA) quyết định. Các mã hiệu di truyền trên m.RNA được sao chép từ phần DNA nhiễm sắc thể tương ứng (những gen cấu trúc hay cistron). Sự truyền đạt thông tin cấu trúc từ DNA đến RNA được thực hiện nhờ vai trò của DNA-RNA polymerase và chịu sự kiểm tra của các "gen điều hòa" (regulator, R). Sản phẩm của các gen này được gọi là chất kim hãm, (repressor, R'), có khả năng khóa sự truyền đạt thông tin cấu trúc từ DNA đến m.RNA. Trong sự điều hòa tổng hợp một hệ thống enzyme toàn vẹn do một nhóm gen cấu trúc chi phối, chất kim hãm không phản ứng với từng gen cấu trúc nói trên mà chỉ phản ứng với một bộ phận có vai trò quyết định trong việc truyền đạt thông tin được gọi là "gen tác động (operator, O). Gen này thường nằm ở chỗ bắt đầu của nhóm "gen cấu trúc" (Structural gene, cistron, S) cùng với các "gen cấu trúc", "gen điều hòa" và "khởi động" (promotor, P) tạo thành một đơn vị điều hòa độc lập gọi là operon. Người ta cho rằng, gen tác động là điểm mở đầu cho "việc đọc" thông tin cấu trúc của

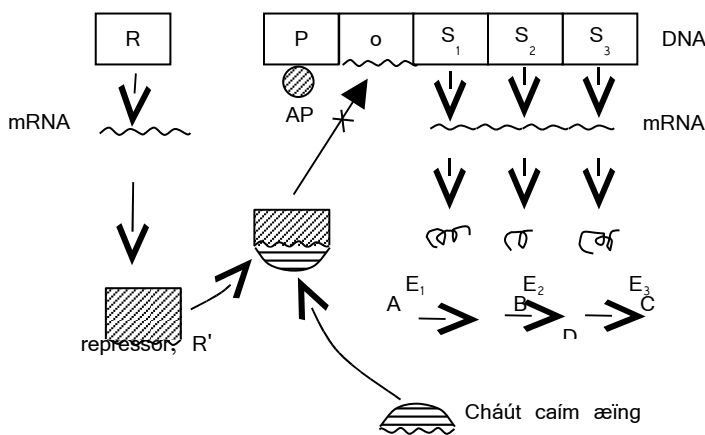
toàn operon: vì vậy khi chất kim hãm được kết hợp vào gen này sẽ có tác dụng khóa sự truyền đạt thông tin của cả operon và ức chế sự tổng hợp toàn bộ hệ thống enzyme tương ứng.

Tác dụng qua lại giữa chất kim hãm với gen tác động là tùy thuộc vào nồng độ nội bào của các chất chuyển hóa có liên quan. Trong các hệ thống enzyme cảm ứng, khi không có cơ chất, chất kim hãm sẽ trở thành hoạt động và có tác dụng khóa gen tác động, ức chế sự tổng hợp enzyme, nhưng khi có mặt cơ chất thì chất này có tác dụng làm mất hoạt tính của chất kim hãm, làm cho nó không còn tác dụng khóa gen tác động nữa và như vậy sự tổng hợp enzyme sẽ được thực hiện tức thời mạnh mẽ. Người ta gọi đó là sự tổng hợp cảm ứng của enzyme, hiện tượng này có thể được coi là một hình thức đặc biệt của sự giải kim hãm. (Hình 8.4)

a. Không có chất cảm ứng



b. Có chất cảm ứng

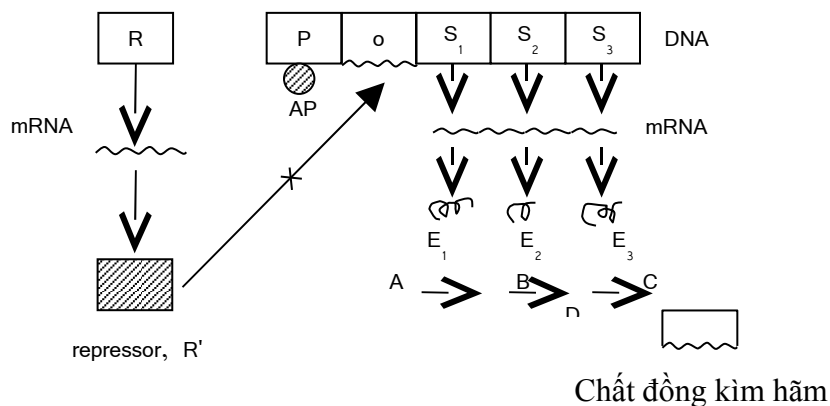


Hình 8.4. Cơ chế điều hòa cảm ứng sinh tổng hợp enzyme

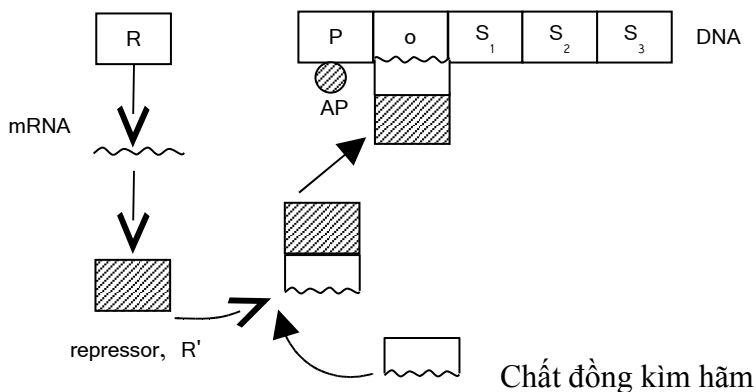
Ghi chú: A, B, C, D cơ chất và các sản phẩm của chuỗi phản ứng do enzyme E₁, E₂, E₃ xúc tác; AP: RNA polymerase. Các ký hiệu khác được giải thích ở trong bài.

Trong các hệ thống enzyme bị kim hãm chất kim hãm (sản phẩm của gen điều hòa) chỉ có khả năng khóa gen tác động khi sản phẩm cuối cùng của hệ thống các phản ứng enzyme tăng lên đến mức quá thừa, trong trường hợp này sản phẩm cuối cùng có vai trò như một chất đồng kim hãm (corepressor) (hình 8.5)

a. Không có chất đồng kim hãm (corepressor)



b. Có chất đồng kim hãm (corepressor)



Hình 8.5: Cơ chế kim hãm sinh tổng hợp enzyme bởi sản phẩm cuối cùng. (ghi chú như hình 8.4)

Khi nồng độ sản phẩm giảm xuống thấp, chất kìm hãm trở nên mất hoạt tính và tách ra khỏi gen tác động, làm cho sự truyền đạt những thông tin cấu trúc trở lại hoạt động bình thường, và như vậy sự tổng hợp enzyme được giải kìm hãm.

Người ta gọi điều hòa sinh tổng hợp enzyme theo kiểu cảm ứng và kìm hãm ở trên thuộc loại điều hòa âm tính.

Nhiều dẫn liệu thực nghiệm cho thấy các gen bảo đảm sinh tổng hợp một số enzyme cảm ứng xúc tác cho quá trình phân giải không chỉ chịu sự kiểm tra theo cơ chế cảm ứng mà còn chịu sự kiểm tra theo cơ chế khác nhờ tác dụng của AMP vòng (AMPv, cycle-AMP, c-AMP), gọi là kìm "hãm phân giải" (catabolic repression) AMPv có tác dụng kích thích quá trình sao chép mã của các operon phân giải. Hiện tượng này đã được nghiên cứu nhiều đối với operon lactose. Theo nhiều tác giả, tác dụng kích thích của AMPv đối với quá trình sao chép mã được thực hiện nhờ một protein đặc biệt làm trung gian gọi là protein nhận AMPv hay còn gọi là protein hoạt hóa gen phân giải (catabolite gene activator protein CAP). Khi AMPv kết hợp với CAP tạo thành phức hợp có tác dụng hoạt hóa promotor làm cho RNA-polymerase dễ dàng kết hợp với nó để bắt đầu quá trình sao chép mã, như vậy AMPv có tác dụng làm tăng cường quá trình sao chép.

Kiểu điều hòa operon phân giải theo cơ chế này cũng được gọi là kiểu điều hòa dương tính. Như vậy, operon lactose chịu sự điều hòa di truyền kép: điều hòa âm tính thực hiện nhờ chất cảm ứng thông qua repressor (tính chất âm thể hiện ở chỗ sự điều hòa xảy ra khi không có chất cảm ứng, repressor kết hợp với operator ngăn cản quá trình sao chép); điều hòa dương tính thực hiện bằng con đường điều hòa xác định sự tổng hợp CAP cần thiết để đảm bảo quá trình sao chép.

Trong sự điều hòa âm tính, một chất ức chế kiên kết với phân tử DNA phải bị loại ra trước khi phiên mã có thể xảy ra. Trong điều hòa dương tính, một phân tử chất tác động phải liên kết với DNA. Một hệ thống cũng có thể được điều hòa bằng cả hai cách dương tính và âm tính, trong trường hợp đó, hệ thống là "mở" khi chất điều hòa dương tính được gắn với DNA và chất điều hòa âm tính không được liên kết với DNA.

Trong hệ thống điều hòa âm tính, một chất ức chế có mặt trong tế bào và cản trở sự phiên mã. Một chất đối lập với chất ức chế phiên mã gọi là chất cảm ứng cho phép mở đầu sự phiên mã. Trong hệ thống điều hòa dương tính, một phân tử chất tác động (có thể là protein, phân tử nhỏ hay phức hợp phân tử) hoạt hóa một điểm mở đầu. Sự điều hòa dương tính và

âm tính không loại trừ lẫn nhau, vì thế ở một hệ thống, cả cơ chế điều hòa dương tính và âm tính đều được sử dụng; hai loại chất điều hòa đáp ứng được những điều kiện khác nhau có trong tế bào. Sự điều hòa dương tính và âm tính được áp dụng cho hệ thống phân giải và cho cả chu trình tổng hợp.

Trên đây là cơ chế điều chỉnh ở những tế bào vi khuẩn: ở những cơ thể bậc cao, cơ chế có những điểm khác và có phần phức tạp hơn. Một số công trình thực nghiệm đã chỉ rõ ra rằng, ở những tế bào của cơ thể bậc cao, những protein kết hợp với DNA trong nhiễm sắc thể có vai trò trong sự điều chỉnh này. Trên thực tế trong phòng thí nghiệm người ta thấy histon đóng vai trò chất ức chế trong việc sao chép thông tin di truyền. Có thể loại trừ sự ức chế này bằng cách phosphoryl hóa các histon dưới tác dụng của hai loại protein-kinase, một loại được điều chỉnh và một loại không được điều chỉnh bởi AMP vòng. Người ta cũng đã kể đến vai trò của các protein acid của chromatin, các chất này hoạt hóa sự sao chép. Các hormon steroid cũng có vai trò điều hòa trên hệ gen, ví dụ cortison làm tăng cường tổng hợp một số enzyme bằng cách tăng sự tổng hợp những mRNA tương ứng.

Sự điều chỉnh cũng xảy ra trong quá trình dịch mã. Sự điều chỉnh này tác động đến những biến đổi trên mRNA (như cộng thêm poly A, loại bỏ những mảnh không mang mã di truyền) và đến sự kết hợp mRNA trên ribosom cũng như những giai đoạn khác nhau của sự dịch mã di truyền từ mRNA sang các phân tử enzyme.

Cơ chế phân tử của các tác dụng điều hòa kể trên càng ngày càng được bổ sung chi tiết hơn. Ta có thể rút ra kết luận là: trong tế bào có những cơ chế điều chỉnh rất phức tạp và rất có hiệu quả, đảm bảo cho sự liên hệ thông tin chặt chẽ giữa bộ máy di truyền của tế bào và các quá trình chuyển hóa vật chất trong tế bào. Nhờ các cơ chế này mà nồng độ nội bào của các phân tử nhỏ có thể kiểm tra sự tổng hợp các phân tử enzyme. Nói một cách khác, các phân tử nhỏ này (cơ chất và chất chuyển hóa) có thể điều khiển cả số lượng và chất lượng của các hệ thống enzyme trong tế bào và do đó điều khiển cả đặc tính của những biến đổi chuyển hóa riêng của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hữu Chấn, 1983. Enzyme và xúc tác Sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng, 2000. Hóa sinh học. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
3. Đỗ Ngọc Liên, Phạm Thị Trân Châu, 1972. Enzyme I, II. Đại học Tổng hợp, Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Thắng, Nguyễn Đình Huyền, 1998. Giáo trình sinh hóa hiện đại. Nxb Giáo dục, Hà Nội.
5. Nguyễn Xuân Thắng, Đào Kim Chi, Phạm Quang Tùng, Nguyễn Văn Đồng, 2004. Hóa sinh học. Nxb Y học, Hà Nội.
6. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lân Dũng, 1982. Enzyme vi sinh vật. Nxb KH&KT, Hà Nội.
7. Lê Ngọc Tú (chủ biên), Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên, 2000. Hóa sinh Công nghiệp, Nxb KH&KT, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Bermeyer H. U, Bermeyer J. and Grasel M. (editors). 1983. Methods of enzymatic analysis. Vol II. Verlag chemie Weinheim.
2. Lehninger A. L., 2004. Principle of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman, 2004.
3. Pelmont J., 1993. Enzymes. Presses universitaires de grenobe.
4. Stryer L., 1981. Biochemistry. W.H.Freeman and company. San Francisco.
5. Biochemical information, 1973. Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica.

Chương 9

Công nghệ enzyme và ứng dụng

9.1. Công nghệ enzyme

9.1.1. Enzyme với công nghệ sinh học

Enzyme được xem như là một kỹ thuật quan trọng của công nghệ sinh học do có các chức năng sau:

- Enzyme là chất xúc tác cho mọi biến đổi vật chất trong công nghệ sinh học.

- Enzyme và nhiều hoạt chất sinh học khác là sản phẩm của công nghệ sinh học. Chúng có thể dùng làm công cụ mới của công nghệ sinh học, hay sử dụng trong các lĩnh vực khác .

- Enzyme được xem là thuốc thử có tính chuyên hóa cao mà không có enzyme thì các quá trình công nghệ sinh học không thể tối ưu hóa được

9.1.2. Công nghệ sản xuất enzyme

Trong sản xuất chế phẩm enzyme, cần chú ý đến những yếu tố:

9.1.2.1. Nguồn enzyme

Có thể thu nhận enzyme từ động vật như trypsin, chimotrypsin, từ thực vật như papain của đu đủ, amylase của đại mạch. Nhưng enzyme vi sinh vật là nguồn phổ biến và giá thành có ý nghĩa kinh tế nhất.

9.1.2.2. Cách thu nhận

- + Chọn đối tượng: Phải dựa vào đặc trưng sinh học của đối tượng. Đối với vi sinh vật cần chú ý đến khâu chọn giống , vấn đề di truyền giống , khả năng sinh trưởng và phát triển của giống , đặc tính sinh lí hóa sinh của giống.

- + Các phương pháp nuôi cấy:

- Môi trường nuôi cấy: Tùy chủng để chọn môi trường thích hợp, thành phần dinh dưỡng phải phù hợp với sinh trưởng phát triển, đặc biệt là các yếu tố cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp protein. Cần nắm vững cơ chế điều hòa để có những thay đổi thích nghi.

- Phương pháp nuôi cấy bề mặt; là nuôi cấy trên giá thể rắn với hàm lượng nước thấp khoảng 15-20%. Ngoài thành phần dinh dưỡng là protein, tinh bột, khoáng ...có thể trộn các chất làm xốp để thoáng khí.

Tùy chủng để khống chế nhiệt độ , pH môi trường , độ ẩm, thời gian nuôi cấy...cho đạt hiệu quả sinh tổng hợp enzyme cao nhất.

- Phương pháp nuôi cấy chìm: là nuôi cấy trong môi trường dịch thể, hàm lượng chất khô tối đa từ 25-30%, thường từ 10-15%. Ngoài protein, tinh bột, khoáng...còn có thể bổ sung kích thích tố. Cũng như trên, tùy chủng để khống chế nhiệt độ , pH môi trường, độ ẩm, thời gian nuôi cấy... cho đạt hiệu quả sinh tổng hợp enzyme cao nhất.

Với hai phương pháp trên, mỗi loại có ưu khuyết điểm riêng. Nuôi cấy bề mặt thường cho hiệu suất cao, dễ gỡ bỏ từng phần nếu bị nhiễm , nhược điểm là tốn mặt bằng nhiều, khó tự động hóa. Phương pháp nuôi cấy chìm dễ tự động hóa, phải loại bỏ hoàn toàn khi bị nhiễm.

+ Thu nhận chế phẩm enzyme:

Đối với canh trường bề mặt hay các đối tượng thực vật, có thể đồng hóa nếu cần, sau đó dùng dung dịch đệm hay nước cất để chiết rút enzyme ra khỏi canh trường bề mặt ta có dịch chiết enzyme . Đối với canh trường bề sâu chỉ cần lọc bỏ sinh khối là có dịch chiết tương tự trên.

Sau đó có thể dùng các tác nhân kết tủa thuận nghịch như aceton, ethanol, muối trung tính để có chế phẩm enzyme ở dạng sạch hơn.

Từ chế phẩm sạch này, bằng kỹ thuật điện di, lọc gel... ta có thể tách từng phần để có enzyme tinh khiết hơn. Tùy mục đích sử dụng để ta tạo ra chế phẩm thích hợp.

Để nâng cao giá trị sử dụng, hiện nay người ta thường tạo ra chế phẩm enzyme gọi là enzyme không tan.

Enzyme không tan

Hầu hết các enzyme trong cơ thể đều ở dạng liên kết với màng còn cơ chất đi qua màng để enzyme chuyển hóa nó thành sản phẩm. Trong công nghiệp thường sử dụng enzyme ở dạng hòa tan, thường chỉ sử dụng được một lần và đó là lí do để người ta tạo ra enzyme không tan.

Để tạo ra enzyme không tan có nhiều phương pháp khác nhau như phương pháp hấp phụ vật lí, phương pháp đưa enzyme vào khuôn gel, phương pháp cộng hóa trị của enzyme và chất mang.

Phương pháp hấp phụ vật lí: là phương pháp hấp phụ lên bề mặt chất mang. Chất mang như cát, than hoạt tính, bột thủy tinh... Nhược điểm của phương pháp là enzyme dễ hòa tan trở lại, độ liên kết lỏng lẻo, khi chịu tác động lực ion lớn dễ bị nhả ra.

Phương pháp đưa enzyme vào khuôn gel: enzyme dễ định vị trong gel, mạng lưới chất trùng hợp càng nhỏ enzyme sẽ được giữ chặt hơn. Đây là cách được dùng khá phổ biến.

Phương pháp cộng hóa trị của enzyme và chất mang: dựa vào ái lực giữa enzyme và chất mang để tạo phức giữa enzyme - chất mang bằng liên kết cộng hóa trị. Đây cũng là phương pháp được dùng phổ biến.

9.2. Ứng dụng

Hiện nay, việc sản xuất chế phẩm enzyme các loại đã và đang phát triển mạnh mẽ trên qui mô công nghiệp. Thực tế đã có hàng nghìn chế phẩm enzyme bán trên thị trường thế giới, các chế phẩm này đã được khai thác và tinh chế có mức độ tinh khiết theo tiêu chuẩn công nghiệp và ứng dụng. Các chế phẩm enzyme phổ biến như amylase, protease, catalase, cellulase, lipase, glucoseoxydase...

Chế phẩm enzyme không chỉ được ứng dụng trong y học mà còn được ứng dụng trong nhiều lãnh vực công nghiệp khác nhau, trong nông nghiệp, trong hóa học... **"ý nghĩa của việc sử dụng enzyme trong các lãnh vực thực tế không kém so với ý nghĩa của việc sử dụng năng lượng nguyên tử"**.

9.2.1. Ứng dụng trong y dược

Enzyme có một vị trí quan trọng trong y học. Đặc biệt là các phương pháp định lượng và định tính enzyme trong hóa học lâm sàng và phòng thí nghiệm chẩn đoán. Do đó, hiện nay trong y học đã xuất hiện lãnh vực mới gọi là chẩn đoán enzyme, có nhiệm vụ:

- Phân tích xác định nồng độ cơ chất như glucose, ure, cholesterol... với sự hỗ trợ của enzyme .
- Xác định hoạt tính xúc tác của enzyme trong mẫu sinh vật.
- Xác định nồng độ cơ chất với sự hỗ trợ của thuốc thử enzyme đánh dấu.

Dùng enzyme để định lượng các chất, phục vụ công việc xét nghiệm chẩn đoán bệnh, ví dụ dùng để kiểm tra glucose nước tiểu rất nhạy.



Urease để định lượng ure...

Dùng enzyme làm thuốc ví dụ protease làm thuốc tắc nghẽn tim mạch, tiêu mủ vết thương, làm thông đường hô hấp, chống viêm, làm thuốc tăng tiêu hóa protein, thành phần của các loại thuốc dùng trong da liễu và mỹ phẩm...

Trong y học các protease cũng được dùng để sản xuất môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy vi sinh vật sản xuất ra kháng sinh, chất kháng độc... Ngoài ra người ta còn dùng enzyme protease để cô đặc và tinh chế các huyết thanh kháng độc để chữa bệnh.

Amylase được sử dụng phối hợp với coenzyme A, cytochrom C, ATP, carboxylase để chế thuốc điều trị bệnh tim mạch, bệnh thần kinh, phối hợp với enzyme thủy phân để chữa bệnh thiếu enzyme tiêu hóa.

9.2.2. Ứng dụng trong hóa học

Cho đến nay, việc ứng dụng enzyme trong hóa học là do enzyme có cảm ứng cao đối với nhiệt độ, pH và những thay đổi khác của môi trường.

Một trong những ứng dụng chế phẩm enzyme đáng được chú ý nhất trong thời gian gần đây là dùng chất mang để gắn phức enzyme xúc tác cho phản ứng nhiều bước. Ví dụ tổng hợp glutathion, acid béo, alcaloid, sản xuất hormone... Cũng bằng cách tạo phức, người ta gắn vi sinh vật để sử dụng trong công nghệ xử lý nước thải, sản xuất alcohol, amino acid...

Trong nghiên cứu cấu trúc hóa học, người ta cũng sử dụng enzyme, ví dụ dùng protease để nghiên cứu cấu trúc protein, dùng endonuclease để nghiên cứu cấu trúc nucleic acid ...

Dùng làm thuốc thử trong hóa phân tích.

9.2.3. Ứng dụng trong công nghiệp

Việc sử dụng enzyme trong công nghiệp là đa dạng, phong phú và đã đạt được nhiều kết quả to lớn. Thử nhìn thống kê sơ bộ sau đây về các lãnh vực đã dùng protease ta có thể thấy được sự đa dạng: công nghiệp thịt, công nghiệp chế biến cá, công nghiệp chế biến sữa, công nghiệp bánh mì, bánh kẹo, công nghiệp bia, công nghiệp sản xuất sữa khô và bột trứng, công nghiệp hương phẩm và mỹ phẩm, công nghiệp dệt, công nghiệp da, công nghiệp phim ảnh, công nghiệp y học... Với amylase, đã được dùng trong sản xuất bánh mì, công nghiệp bánh kẹo, công nghiệp rượu, sản xuất bia, sản xuất mật, glucose, 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... Trong phạm vi giáo trình này chúng ta chỉ đề cập đến việc ứng dụng chế phẩm enzyme trong một số lĩnh vực.

9.2.3.1. Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm

Protease với công nghiệp thực phẩm: Việc sử dụng trong chế biến làm mềm thịt là ứng dụng có tính truyền thống. Nhân dân ta từ rất lâu đã dùng thơm để nấu canh thịt bò; dùng rau sống là chuối chát, và kết hợp thức ăn nhiều thịt; đu đủ trong chống táo bón... mà thực chất là sử dụng papain, bromelain, fixin. Người Nga còn dùng protease từ hạt đậu tương này mầm để làm mềm thịt.

Ngoài khả năng phân giải để làm mềm thịt, tạo thức ăn dễ tiêu hóa, công nghệ sản xuất các loại dịch thủy phân giàu protein đã được áp dụng một cách có hiệu quả tính năng của protease.

Enzyme là một công cụ để chế biến các phế liệu của công nghiệp thực phẩm thành thức ăn cho người và vật nuôi.

Người ta còn khai thác tính đồng tụ như của renin, pepsin vào công nghiệp thực phẩm như trong sản xuất phomat.

Pectinase với công nghiệp thực phẩm: Pectinase đã được dùng trong một số ngành công nghiệp thực phẩm sau:

- Sản xuất rượu vang.
- Sản xuất nước quả và nước uống không có rượu.
- Sản xuất các mặt hàng từ quả: quả cô đặc, mứt.
- Sản xuất nước giải khát.
- Sản xuất cà phê.

Chế phẩm pectinase được sử dụng trong sản xuất nước quả từ các nguyên liệu quả nghiền hay để làm trong nước quả ép. Bởi vì khi có pectin thì khối quả nghiền sẽ có trạng thái keo, do đó khi ép dịch quả không thoát ra được. Nhờ pectinase mà nước quả trong suốt, dễ lọc, hiệu suất tăng.

Pectinase còn góp phần chiết rút các chất màu, tanin và các chất hòa tan khác, do đó làm tăng chất lượng của thành phẩm.

Những nghiên cứu khi ép nho có xử lý bằng pectinase không những làm tăng hiệu suất mà còn làm tăng màu sắc.

Trong sản xuất mứt nhừ, mứt đông... nhờ pectinase mà dịch quả có nồng độ đậm đặc hơn.

Cellulase với công nghiệp thực phẩm: Cellulose là thành phần cơ bản của tế bào thực vật, vì vậy nó có mặt trong mọi loại rau quả cũng như trong các nguyên liệu, phế liệu của các ngành trồng trọt và lâm nghiệp. Nhưng người và động vật không có khả năng phân giải cellulose. Nó chỉ có giá trị làm tăng tiêu hóa, nhưng với lượng lớn nó trở nên vô ích hay cản trở tiêu hóa.

Chế phẩm cellulase thường dùng để:

- Tăng chất lượng thực phẩm và thức ăn gia súc.
- Tăng hiệu suất trích ly các chất từ nguyên liệu thực vật.

Ứng dụng trước tiên của cellulase đối với chế biến thực phẩm là dùng nó để tăng độ hấp thu, nâng cao phẩm chất về vị và làm mềm nhiều loại thực phẩm thực vật. Đặc biệt là đối với thức ăn cho trẻ con và nói chung chất lượng thực phẩm được tăng lên.

Một số nước đã dùng cellulase để xử lý các loại rau quả như bắp cải, hành, cà rốt, khoai tây, táo và lương thực như gạo. Người ta còn xử lý cả chè, các loại tảo biển...

Trong sản xuất bia, dưới tác dụng của cellulase hay phức hệ citase trong đó có cellulase, thành tế bào của hạt đại mạch bị phá hủy tạo điều kiện tốt cho tác động của protease và đường hóa.

Trong sản xuất agar-agar, tác dụng của chế phẩm cellulase sẽ làm tăng chất lượng agar-agar hơn so với phương pháp dùng acid để phá vỡ thành tế bào. Đặc biệt là việc sử dụng chế phẩm cellulase để tận thu các phế liệu thực vật đem thủy phân, dùng làm thức ăn gia súc và công nghệ lên men.

Những ứng dụng của cellulase trong công nghiệp thực phẩm đã có kết quả rất tốt. Tuy nhiên hạn chế lớn nhất là rất khó thu được chế phẩm có cellulase hoạt độ cao.

Amylase với công nghiệp thực phẩm: Chế phẩm amylase đã được dùng phổ biến trong một số lãnh vực của công nghiệp thực phẩm như sản xuất bánh mì, glucose, rượu, bia...

Trong sản xuất bánh mì, chế phẩm amylase đã làm thay đổi hoàn toàn chất lượng của bánh mì cả hương vị, màu sắc, độ xốp... Chế phẩm amylase sạch cho chất lượng bánh mì tốt hơn ở dạng phức hợp với protease.

Trong sản xuất bánh kẹo người ta thường dùng maltose là sản phẩm thủy phân tinh bột bằng amylase và glucose bằng glucoamylase. Chính glucoamylase, là yếu tố làm tăng hiệu suất trong sản xuất rượu.

Trong sản xuất bia, việc sử dụng amylase có trong các hạt nảy mầm thay thế malt đã góp phần đáng kể trong việc giảm giá thành.

9.2.3.2. Ứng dụng trong công nghiệp dệt

Trong công nghiệp dệt, chế phẩm amylase được dùng để rũ hồ vải trước khi tẩy trắng và nhuộm. Amylase có tác dụng làm vải mềm, có khả năng nhúng ướt, tẩy trắng và bắt màu tốt. Rũ hồ bằng enzyme không những nhanh, không hại vải, độ mao dẫn tốt mà còn đảm bảo vệ sinh, do đó tăng được năng suất lao động.

Trong sản xuất tơ tằm, người ta dùng protease để làm sạch sợi tơ. Với công đoạn xử lý bằng enzyme sau khi xử lý bằng dung dịch xà phòng sẽ giúp lụa có tính đàn hồi tốt, bắt màu đồng đều và dễ trang trí trên lụa.

9.2.3.3. Ứng dụng trong công nghiệp thuộc da

Trong công nghiệp da, enzyme protease được dùng để làm mềm da, làm sạch da, rút ngắn thời gian, tránh ô nhiễm môi trường. Việc xử lý đã được tiến hành bằng cách ngâm da trong dung dịch enzyme, hay phết dịch enzyme lên bề mặt da. Enzyme sẽ tách các chất nhờn và làm đứt một số liên kết trong phân tử collagen làm cho da mềm hơn.

Thực tế cho thấy khi xử lý da bằng chế phẩm protease từ vi sinh vật có thể rút ngắn thời gian làm mềm và tách lông xuống nhiều lần. Điều quan trọng là chất lượng lông tốt hơn khi cắt. So với phương pháp hóa học thì việc xử lý bằng enzyme có số lượng lông tăng 20-30%. Lông không cần xử lý thêm sau khi ngâm trong dịch enzyme.

9.2.4. Ứng dụng trong nông nghiệp

Có thể sử dụng các loại chế phẩm enzyme khác nhau để chuyển hóa các phế liệu, đặc biệt là các phế liệu nông nghiệp cải tạo đất phục vụ nông nghiệp.

Ở Nhật hàng năm đã sản xuất hàng vạn tấn chế phẩm cellulase các loại để dùng trong nông nghiệp. Có chế phẩm chứa cả cellulase, hemicellulase, protease và amylase.

Công nghệ này khá phổ biến ở nhiều quốc gia. Ở nước ta việc dùng enzyme vi sinh vật góp phần trong sản xuất phân hữu cơ đang được khai thác để thay thế cho phân hóa học.

Tóm lại, có thể nói rằng, việc nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm enzyme ngày càng được chú trọng ở các lĩnh vực khác nhau. Trong 20 năm cuối thế kỷ XX và các năm đầu của thế kỷ XXI các enzyme khác nhau đã được ứng dụng. Ở Việt Nam bước đầu đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng các enzyme trong chế biến nông sản, thực phẩm, nhất là trong lĩnh vực sản xuất bia, rượu, chế biến tinh bột (Viện công nghiệp thực phẩm, Viện công nghệ sinh học – công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội...). Việc nghiên cứu các enzyme phục vụ nông nghiệp, công nghiệp cũng được quan tâm và có các kết quả đáng khích lệ. Ví dụ, chế phẩm enzyme mới ra đời phục vụ nông nghiệp E2001 có tác dụng tăng độ phì nhiêu đất, tăng năng suất cây trồng. Đã có các nghiên cứu ứng dụng protease trong sản xuất rượu bia, rút ngắn thời kỳ lên men cũng như sản xuất nước mắm ngăn ngày bằng công nghệ enzyme protease. Enzyme amylase cũng được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi trong sản xuất đường bột, maltodextrin, nha glucose, siro, glucose – fructose ở quy mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Đỗ Quý Hai. 2004. Chuyên đề enzyme, Tài liệu lưu hành nội bộ Trường ĐHKH Huế.
2. Trần Thanh Phong. 2004. Chuyên đề enzyme, Tài liệu lưu hành nội bộ Trường ĐHKH Huế.
3. Trần Thanh Phong. 2005. Chuyên đề Công nghệ hóa sinh, Tài liệu lưu hành nội bộ Trường ĐHKH Huế.
4. Nguyễn Xuân Thành (chủ biên), Lê Văn Hưng, Phạm Văn Toàn. 2003. Công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và xử lý môi trường, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Lê Ngọc Tú (chủ biên), Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên, 2000. Hóa sinh Công nghiệp, Nxb KH&KT, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

1. Copeland R. A. 2000. Enzymes, copyright by Wiley-VCH, Inc.
6. Lehninger A. L. 2004. Principles of Biochemistry, 4th Edition. W.H Freeman.