

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT**



GIÁO TRÌNH

# **ENZYME**

**GS.TS. MAI XUÂN LUƠNG**

**2005**

**MỤC LỤC**

<b>MỤC LỤC .....</b>	- 1 -
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	- 3 -
<b>I. BẢN CHẤT PROTEIN CỦA ENZYME .....</b>	- 4 -
<b>II. DANH PHÁP VÀ PHÂN LOẠI ENZYME.....</b>	- 6 -
<b>III. ĐỘNG HỌC CỦA CÁC PHẢN ỨNG ENZYME .....</b>	- 8 -
<b>IV. NHỮNG TÍNH CHẤT ĐẶC TRƯNG CỦA XÚC TÁC SINH HỌC .....</b>	- 12 -
1. Enzyme thể hiện tính đặc hiệu cao đối với cơ chất của chúng.....	- 12 -
2. Xúc tác enzyme dẫn đến sự hình thành một phức hệ trung gian giữa enzyme và cơ chất. ....	- 12 -
3. Trung tâm của enzyme tương tác đặc hiệu với cơ chất được gọi là trung tâm hoạt động. ....	- 12 -
4. Enzyme làm giảm năng lượng hoạt hóa cần thiết cho một phản ứng.....	- 13 -
5. Một số enzyme tham gia điều hòa tốc độ phản ứng.....	- 14 -
6. Một số enzyme là multienzyme hay phức hệ đa chức năng. ....	- 15 -
7. Động học của phản ứng enzyme hai cơ chất. ....	- 15 -
8. Ảnh hưởng của pH .....	- 16 -
9. Ảnh hưởng của nhiệt độ. ....	- 18 -
<b>V. ỦC CHẾ ENZYME.....</b>	- 19 -
1. Ủc chế cạnh tranh (competitive inhibition).....	- 19 -
2. Ủc chế không cạnh tranh kiểu thứ I (noncompetitive inhibition).....	- 22 -
3. Ủc chế không cạnh tranh kiểu thứ II (uncompetitive inhibition). ....	- 23 -
<b>VI. CÁC CHẤT ỦC CHẾ TRAO ĐỔI CHẤT- ANTIMETABOLITE .....</b>	- 24 -
<b>VII. HỆ THỐNG MULTIZYME VÀ VAI TRÒ CỦA ENZYME ĐIỀU HÒA ...</b>	26 -
<b>VIII. HỆ THỐNG CASCADE - BIẾN ĐỔI ĐỒNG HÓA TRỊ. ....</b>	- 29 -
<b>IX. HOẠT HÓA ENZYME. ....</b>	- 31 -
<b>X. TƯƠNG TÁC PROTEIN - PROTEIN.....</b>	- 32 -
<b>XI. TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA ENZYME ĐỐI VỚI CƠ CHẤT.....</b>	- 33 -
<b>XII. CƠ CHẾ TĂNG TỐC ĐỘ CÁC PHẢN ỨNG HÓA HỌC NHỜ ENZYME... 36 -</b>	
1. Tăng tốc độ phản ứng và tính đặc hiệu cơ chất.....	- 36 -
2. Sự phù hợp cảm ứng và xúc tác enzyme. ....	- 38 -
3. Cơ chế tiếp cận. ....	- 38 -
4. Gây mất ổn định (Destabilization). ....	- 40 -
5. Xúc tác acid-base phối hợp. ....	- 41 -
<b>XIII. ISOENZYME.....</b>	- 46 -
<b>XIV. CÁC NHÓM ENZYME.....</b>	- 47 -
1. Enzyme oxy hóa - khử. ....	- 47 -
2. Transferase. ....	- 53 -
3. Hydrolase.....	- 55 -
4. Liase. ....	- 57 -
5. Isomerase.....	- 58 -
6. Ligase (synthetase). ....	- 59 -

XV. TÁCH CHIẾT VÀ TINH CHẾ ENZYME .....	- 60 -
XVI. SỬ DỤNG ENZYME TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC .....	- 65 -
XVII. ENZYME CỐ ĐỊNH .....	- 68 -
1. Ý nghĩa của enzyme cố định.....	- 68 -
2. Các phương pháp điều chế enzyme cố định.....	- 68 -
3. Một số đặc tính của enzyme cố định.....	- 74 -
4. Ứng dụng của enzyme cố định.....	- 75 -

## MỞ ĐẦU

Enzyme là các chất xúc tác của các hệ thống sinh học. Chúng có khả năng xúc tác đặc biệt, thường là mạnh hơn nhiều so với các chất xúc tác tổng hợp. Tác dụng xúc tác của chúng mang tính đặc hiệu cao đối với cơ chất, làm tăng đáng kể tốc độ các phản ứng hóa học xảy ra trong môi trường nước ở điều kiện nhiệt độ và pH êm dịu.

Enzyme là một trong các chìa khóa để hiểu biết quá trình hoạt động sống của tế bào. Hoạt động trong những trật tự có tính tổ chức cao, chúng xúc tác hàng trăm phản ứng theo trật tự xác định trong các con đường trao đổi chất mà nhờ đó các chất dinh dưỡng bị phân hủy, năng lượng hóa học được lưu giữ và biến đổi, các đại phân tử sinh học được tạo ra từ các chất tiền thân đơn giản. Một số enzyme tham gia trong quá trình trao đổi chất là những enzyme điều hòa, chịu trách nhiệm đối với các tín hiệu trao đổi chất khác nhau bằng cách thay đổi hoạt tính xúc tác của chúng một cách thích hợp. Thông qua hoạt động của các enzyme điều hòa các hệ thống enzyme phối hợp chặt chẽ với nhau để tạo ra mối quan hệ hài hòa giữa các hoạt tính trao đổi chất cần thiết cho việc duy trì sự sống.

Nghiên cứu enzyme còn có ý nghĩa thực tiễn rất quan trọng. Đối với một số bệnh, đặc biệt là các rối loạn mang tính di truyền, có thể là do thiếu hay mất hẳn một hoặc một số enzyme trong các mô. Các điều kiện không bình thường cũng có thể xuất hiện do hoạt tính dư thừa của một số enzyme đặc hiệu. Xác định hoạt tính của một số enzyme xác định trong huyết tương, hồng cầu hoặc trong các mô là rất quan trọng trong việc chẩn đoán bệnh. Enzyme đã trở thành các công cụ thực tế quan trọng không nhữ.ng trong y học mà cả trong công nghệ hóa học, trong chế biến thức ăn và trong nông nghiệp. Enzyme có vai trò thậm chí trong hoạt động hàng ngày của gia đình, ví dụ như trong việc lau chùi chổi bẩn hoặc trong công việc chế biến thức ăn.

## I. BẢN CHẤT PROTEIN CỦA ENZYME.

Phần lớn lịch sử hoá sinh học là lịch sử nghiên cứu enzyme. Các chất xúc tác sinh học lần đầu tiên được phát hiện và mô tả vào những năm 1800 trong các nghiên cứu về tiêu hóa thịt bằng các chất tiết của dạ dày và sự biến đổi tinh bột thành đường bởi nước bọt và bởi các dịch chiết thực vật khác nhau. Trong những năm 1850 Louis Pasteur kết luận rằng quá trình lên men đường thành rượu bởi nấm men được xúc tác bởi “ferment”. Ông cho rằng những men này, mà sau đó được gọi là *enzyme*, là những chất không tách rời khỏi cấu trúc của tế bào nấm men sống, một quan điểm tồn tại trong nhiều năm. Cho đến năm 1897 Eduard Buchner đã xác định rằng các dịch chiết nấm men có thể lên men đường thành rượu ngay cả khi chúng được tách khỏi cấu trúc của tế bào nấm men. Phát hiện này đã thúc đẩy các nhà sinh hóa tìm cách tách chiết nhiều enzyme khác nhau và nghiên cứu hoạt tính xúc tác của chúng.

Công trình tách chiết và tinh chế urease của James Sumner năm 1926 đã thúc đẩy các nghiên cứu đầu tiên tính chất của các enzyme đặc hiệu. Sumner đã phát hiện được rằng các tinh thể urease được cấu tạo hoàn toàn từ protein và từ đó ông cho rằng tất cả enzyme là protein. Ý tưởng này qua các ví dụ khác đã tiếp tục được tranh cãi thêm nhiều năm sau đó. Chỉ đến những năm cuối của thập kỷ 1930, sau khi John Northrop và các cộng tác viên của ông kết tinh được pepsin và trypsin và cũng xác định được chúng cũng là protein thì quan niệm của Sumner về enzyme mới được công nhận rộng rãi.

Ngày nay hoá sinh học đã xác định được rằng tất cả enzyme là protein. Hoạt tính xúc tác của chúng phụ thuộc vào tính nguyên vẹn của cấu trúc nguyên thủy của protein. Nếu một enzyme bị biến tính hoặc bị phân ly thành các phần dưới đơn vị thì hoạt tính xúc tác của nó thường bị mất. Khi một enzyme bị phân giải thành aminoacid thì hoạt tính xúc tác của nó hoàn toàn không còn. Như vậy, cấu trúc bậc một, bậc hai, bậc ba và bậc bốn của protein enzyme là những yếu tố rất quan trọng đối với hoạt tính xúc tác của chúng.

Enzyme, cũng như các protein khác, có trọng lượng phân tử từ khoảng 12.000 đến hơn 1.000.000. Một số enzyme không cần các nhóm hóa học không phải aminoacid cho hoạt tính xúc tác của mình. Một số khác cần có các nhóm bổ sung gọi là *cofactor* (bảng 1) Những cofactor này có thể là một hoặc một số ion kim loại như  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , hoặc  $Zn^{2+}$  hoặc một phân tử hữu cơ hay hữu cơ chứa lim loại phức tạp được gọi là *coenzyme* (bảng 2). Một số enzyme đòi hỏi cả coenzyme và một vài ion kim loại cho hoạt tính của mình. Một coenzyme hoặc ion kim loại liên kết cộng hóa trị với protein enzyme được gọi là *nhóm thêm* hay *nhóm prosthetic*. Một enzyme trọn vẹn

có hoạt tính xúc tác cùng với coenzyme và (hoặc) ion kim loại hợp lại được gọi là *holoenzyme*. Phần protein của loại enzyme này được gọi là *apoenzyme* hay *apoprotein*. Coenzyme hoạt động như vật mang các nhóm chức đặc hiệu. Nhiều vitamin và các chất hữu cơ với hàm lượng nhỏ có trong thức ăn là các chất tiền thân của coenzyme.

Bảng 1. Một số enzyme có chứa hoặc cần các nguyên tố vô cơ để làm cofactor.

<i>Cofactor</i>	<i>Enzyme</i>
Fe <sup>2+</sup> hoặc Fe <sup>3+</sup>	Cytochrome Oxydase Catalase, Peroxydase
Cu <sup>2+</sup>	Cytochrome Oxydase
Zn <sup>2+</sup>	Carbonic Anhydrase, Alcohol Dehydrogenase
Mg <sup>2+</sup>	Hexokinase, Glucoso-6-phosphatase, Pyruvate Kinase
Mn <sup>2+</sup>	Arginase, Ribonucleotide reductase
K <sup>+</sup>	Pyruvate kinase
Ni <sup>2+</sup>	Urease
Mo	Dinitrogenase
Se	Glutathione peroxidase

Bảng 2. Một số coenzyme làm vật trung chuyển các nguyên tử hoặc các nhóm nguyên tử đặc hiệu..

<b>COENZYME</b>	<i>Nhóm được vận chuyển</i>	<i>Chất tiền thân trong thức ăn của động vật có vú</i>
<i>Thiamine pyrophosphate</i>	<i>Aldehyde</i>	<i>Thiamine (Vitamine B<sub>1</sub>)</i>
<i>Flavine adenine dinucleotide</i>	<i>Điện tử</i>	<i>Riboflavine (Vitamine B<sub>2</sub>)</i>
<i>Nicotinamide dinucleotide</i>	<i>Điện tử</i>	<i>Nicotinic acid (Niacin)</i>
<i>Coenzyme A</i>	<i>Nhóm acyl</i>	<i>Acid pantothenic</i>
<i>Pyridoxal phosphate</i>	<i>Nhóm amine</i>	<i>Pyridoxine (Vitamine B<sub>6</sub>)</i>
<i>5'-Deoxyadenosylcobalamin (Coenzyme B<sub>12</sub>)</i>	<i>Các nguyên tử H và nhóm alkyl</i>	<i>Vitamine B<sub>12</sub></i>

<u>Biocytin</u>	$CO_2$	<u>Biotin</u>
<u>Tetrahydrofolate</u>	<i>Nhóm một carbon</i>	<i>Folate</i>
<u>Acid lipoic</u>	<i>Điện tử và nhóm acyl</i>	<i>Không cần có trong thức ăn</i>

## II. DANH PHÁP VÀ PHÂN LOẠI ENZYME

Tên gọi của enzyme thường là tên gọi của cơ chất hay của kiểu phản ứng mà nó xúc tác cộng với đuôi “ase”, ví dụ *urease*, *hydrolase* v.v... Ngoài ra còn có những tên gọi truyền thống theo thói quen, không cho thấy bản chất hóa học của phản ứng do enzyme xúc tác, ví dụ *pepsin*, *trypsin* ... cả hai kiểu gọi tên nêu trên đều thiếu chính xác.

Để khắc phục tình trạng đó, Hội Hóa sinh học quốc tế đề nghị sử dụng một hệ thống danh pháp và phân loại trên cơ sở bản chất của phản ứng được xúc tác. Theo hệ thống này toàn bộ enzyme được gọi tên theo bản chất của phản ứng được xúc tác và bản chất của các chất cho, chất nhận trong phản ứng và được chia thành 6 nhóm lớn; mỗi nhóm lớn này lại được chia thành nhiều phân nhóm; mỗi phân nhóm này lại được chia thành nhiều phân nhóm nhỏ hơn, trong đó bao gồm những enzyme có cơ chất tác dụng giống nhau. Mỗi nhóm, mỗi phân nhóm và mỗi enzyme được ký hiệu bằng một mã số đặc trưng gồm tương ứng một, hai, ba hoặc bốn con số cách nhau bằng các dấu chấm.

Tên gọi của 6 nhóm enzyme và các phân nhóm quan trọng được giới thiệu trong bảng 3 cùng với bản chất của các phản ứng được xúc tác.

Các phân nhóm nhỏ hơn thuộc mỗi phân nhóm trong bảng 3 được ký hiệu bằng những mã số gồm 2 hoặc 3 con số. Ví dụ phân nhóm thứ nhất của enzyme nhóm 1 (ký hiệu là phân nhóm 1.1) có ba phân nhóm nhỏ đầu tiên là 1.1.1, 1.1.2 và 1.1.3 đặc trưng cho các trường hợp mà chất nhận điện tử là NAD, NADP và cytochrome.

Mã số của mỗi enzyme gồm 4 con số, ví dụ:

- 1.1.1.29 – Glycerophosphate dehydrogenase; 2.7.1.1 – Hexokinase
- 3.2.1.20 –  $\alpha$ -Glucosidase; 4.1.1.1 – Pyruvate decarboxylase;
- 5.3.1.1 – Triosophosphate isomerase; 6.3.1.2 – Glutamin synthetase

Bảng 3. Danh mục mã số của 6 nhóm enzyme và các phân nhóm chính của chúng

Nhóm	Phân nhóm	Phản ứng được xúc tác
------	-----------	-----------------------

1. Oxydoreductase	1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6	Hydrogen hóa và dehydrogen hóa =CH-OH =C=O -CH=CH- -CH-NH <sub>2</sub> =CH-NH- NADH, NADPH
2. Transferase	2.1 2.2 2.3 2.4 2.5 2.6 2.7 2.8	Vận chuyển các nhóm chức Các gốc 1 carbon Nhóm aldehyde hoặc cetone Acyl Liên kết glycoside Nhóm methylalkyl hoặc aryl Nhóm chứa nitơ Nhóm chứa phosphore Nhóm chứa lưu huỳnh
3. Hydrolase	3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6	Các phản ứng thủy phân Ester Glycoside Eter Peptide Các liên kết C-N khác Các anhydrit acid
4. Liase	4.1 4.2 4.3	Tạo liên kết đôi =C=C= =C=O =C=N-
5. Isomerase	5.1 5.2 5.3 5.4	Đồng phân hóa Rasemase và epimerase Xis-trans-isomerase Oxy hóa nội phân tử Transferase nội phân tử
6. Ligase	6.1 6.2 6.3 6.4	Tạo ra liên kết nhờ ATP -C=O ≡C-S- =C=N- ≡C-C≡

Khi tên hệ thống của enzyme quá dài hoặc sử dụng không thuận tiện, người ta có thể dùng tên gọi thông dụng của chúng, ví dụ tên hệ thống của enzyme xúc tác phản ứng  $\text{ATP} + \text{D-Glucose} \longrightarrow \text{ADP} + \text{D-Glucoso-6-phosphate}$

là ATP:glucose phosphotransferase; tên gọi này cho thấy enzyme xúc tác sự vận chuyển nhóm phosphate từ ATP đến glucose. Mã số của enzyme là 2.7.1.1: số 2 cho biết enzyme thuộc nhóm thứ 2; con số 7 cho biết enzyme thuộc phân nhóm phosphotransferase; số 1 tiếp theo cho biết chất nhận

nhóm phosphate là nhó  $-OH$ ; Số 1 cuối cùng cho biết chất nhận nhóm phosphate là D-glucose. Khi tên hệ thống của enzyme quá dài có thể dùng tên thông dụng của nó, trong trường hợp này có thể gọi tên enzyme là hesokinase

### III. ĐÔNG HỌC CỦA CÁC PHẢN ỨNG ENZYME.

Bất kỳ phản ứng hóa học nào, ví dụ phản ứng  $A \longrightarrow P$ , sở dĩ xảy ra được là nhờ một phần năng lượng trong số các phân tử A chứa năng lượng lớn hơn số phân tử còn lại, làm cho chúng tồn tại ở trạng thái hoạt động. Ở trạng thái này dễ dàng phá vỡ một liên kết hóa học hoặc tạo ra một liên kết mới để làm xuất hiện sản phẩm P. Năng lượng cần để chuyển toàn bộ số phân tử của một mol vật chất ở điều kiện nhất định sang trạng thái kích động được gọi là *năng lượng hoạt hóa*. Năng lượng này cần thiết để chuyển các phân tử tham gia phản ứng sang một trạng thái trung gian giàu năng lượng tương ứng với đỉnh của hàng rào hoạt hóa (hình 1). Tốc độ của phản ứng tỉ lệ với nồng độ của phân tử ở trạng thái trung gian này.

Năng lượng hoạt hóa được đo bằng năng lượng cần thiết để chuyển các phân tử lên trạng thái hoạt động. Chất xúc tác làm giảm năng lượng hoạt hóa vốn cần để phản ứng có thể xảy ra tự phát. Bảng 4 cho biết năng lượng hoạt hóa đối với một số phản ứng. Phản ứng phân hủy peroxide hydro đòi hỏi 18.000 KCal/mol nhưng sẽ giảm xuống còn 11.700 khi có platin xúc tác và còn giảm thấp hơn nữa khi chất xúc tác là enzyme catalase. Rõ ràng, catalase có hiệu quả hơn nhiều so với chất xúc tác vô cơ đối với phản ứng này. Trên thực tế catalase có hiệu quả đến mức chỉ cần một giá trị năng lượng hoạt hóa rất nhỏ cho phản ứng. Vì vậy mà phân giải  $H_2O_2$  bằng catalase xảy ra hầu như ngay tức khắc với tốc độ nhanh nhất trong số các phản ứng enzyme đã biết. Bảng 4. còn cho thấy các enzyme khác cũng giảm năng lượng hoạt hóa xuống mức thấp hơn đáng kể so với các chất xúc tác vô cơ. Vì lý do đó mà các phản ứng enzyme có thể xảy ra với tốc độ cao ở điều kiện nhiệt độ sinh lý.

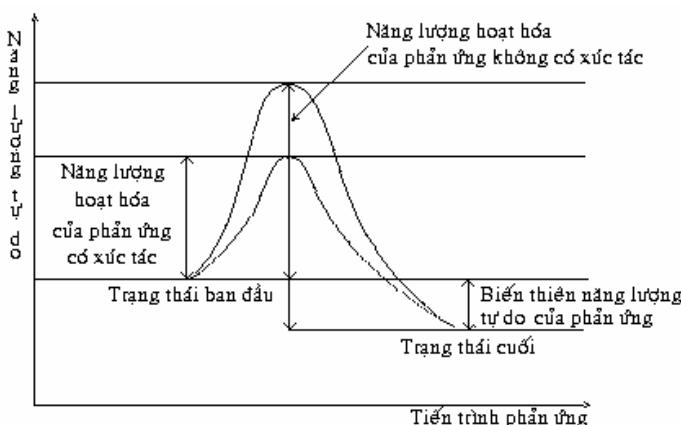
Bảng 4. Năng lượng hoạt hóa đối với các phản ứng  
xúc tác bằng enzyme và bằng các chất xúc tác khác.

Phản ứng	Chất xúc tác	$E_a$ (Kcal/mol)
Phân giải peroxide hydro	không	18.000
	platin	11.700
	catalase	< 2.000
Thủy phân ethyl butyrate	ion hydro	16.800
	ion hydroxyl	10.200
	lipase tuyến tụy	4.500

Thủy phân casein	ion hydro trypsin	20.600 12.000
Thủy phân saccharose	ion hydro invertase nấm men	25.000 8.000 -10.000
Thủy phân $\beta$ -methylglucoside	ion hydro $\beta$ - glucosidase	32.600 12.200

Khi tăng nhiệt độ năng lượng chuyển động nhiệt của phân tử tăng lên, làm cho số phân tử có khả năng đạt trạng thái trung gian tăng lên. Vì thế khi tăng nhiệt độ lên  $10^{\circ}$ , tốc độ của phản ứng hóa học tăng lên khoảng hai lần ( $Q_{10} = 2$ ).

Khác với tác dụng của nhiệt độ, chất xúc tác làm tăng tốc độ của phản ứng bằng cách làm giảm năng lượng hoạt hóa.



**Hình 1. Biến thiên năng lượng tự do trong các phản ứng hóa học.**

Sự kết hợp giữa chất phản ứng và chất xúc tác làm xuất hiện trạng thái trung gian mới với mức năng lượng hoạt hóa thấp hơn. Khi sản phẩm hình thành, chất xúc tác lại được giải phóng ở trạng thái tự do.

Các phản ứng enzyme cũng tuân theo những nguyên tắc chung của động học các phản ứng hóa học. Tuy nhiên, chúng còn có những đặc điểm riêng. Một trong những đặc điểm đó là hiện tượng *bão hòa cơ chất*. Ở nồng độ cơ chất thấp tốc độ của phản ứng enzyme tỉ lệ thuận với nồng độ cơ chất.

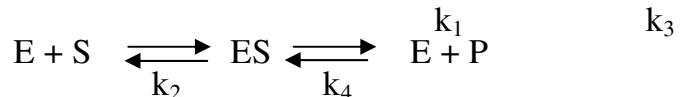
Nhưng nếu tiếp tục tăng nồng độ cơ chất thì tốc độ phản ứng tăng chậm dần, và khi nồng độ cơ chất đạt một giá trị nào đó, tốc độ của phản ứng không tăng nữa. Trong những điều kiện đó nồng độ enzyme là yếu tố quyết định tốc độ phản ứng.

Mặc dù hiện tượng bão hòa cơ chất đặc trưng cho mọi enzyme, nhưng giá trị cụ thể của nồng độ cơ chất là giá trị đặc trưng. Thông qua nghiên cứu vấn đề này ông Leonor Michaelis (1857-1949) và bà Maud Menten (1879-1960) đã đề xuất vào năm 1913 một phương trình diễn tả tốc độ các phản

ứng enzyme và nêu lên một số lý thuyết chung về động học của quá trình này. Thuyết này về sau đã được Briggs và Haldans phát triển thêm.

Các tác giả trên nhận thấy rằng trong các phản ứng enzyme trước tiên enzyme E tạo ra phức hệ ES với cơ chất S. Sau đó ES sẽ được phân giải thành sản phẩm P và enzyme E tự do.

Theo định luật khối lượng, quá trình đó có thể được mô tả như sau:



trong đó  $k_1$  là hằng số tốc độ phản ứng hình thành ES từ E và S;  $k_2$  là hằng số tốc độ phản ứng phân giải ES thành E và S;  $k_3$  là hằng số tốc độ phản ứng phân giải ES thành E và P;  $k_4$  là hằng số tốc độ phản ứng hình thành ES từ E và P.

Ở trạng thái cân bằng tốc độ hình thành ES bằng tốc độ phân giải phức hệ này:

$$k_1[E][S] - k_2[ES] = k_3[ES] - k_4[E][P].$$

Biến đổi phương trình này, ta có:

$$[ES](k_2+k_3) = [E](k_4[P] + k_1[S])$$

$$\frac{[ES]}{[E]} = \frac{k_4[P] + k_1[S]}{k_2 + k_3} = \frac{k_4[P]}{k_2 + k_3} + \frac{k_1[S]}{k_2 + k_3}$$

Do ở các giai đoạn đầu của phản ứng giá trị của  $[P]$  vô cùng nhỏ nên có thể giản lược phương trình trên như sau:

$$\frac{[ES]}{[E]} = \frac{k_1[S]}{k_2 + k_3}$$

Đặt  $[E]_t$  là hàm lượng enzyme tổng số và  $K_m = k_2 + k_3 / k_1$ , ta có:

$$\frac{[E]}{[ES]} = \frac{[E]_t - [ES]}{[ES]} = \frac{[E]}{[ES]} - 1 = \frac{K_m}{[S]}$$

Tốc độ ban đầu v của phản ứng enzyme tỉ lệ thuận với hàm lượng enzyme hoạt động, hay ES], nên ta có thể viết:

$$v = k_3[ES]$$

Nếu nồng độ cơ chất rất lớn, làm cho hầu hết enzyme trong hệ thống đều tồn tại ở trạng thái ES, thì tốc độ phản ứng enzyme sẽ đạt giá trị tối đa V, và tốc độ tối đa đó sẽ bằng:

$$V = k_3[E]_t$$

Do đó:

$$\frac{[E]}{[ES]} = \frac{V}{v} = \frac{K_m}{[S]} + 1$$

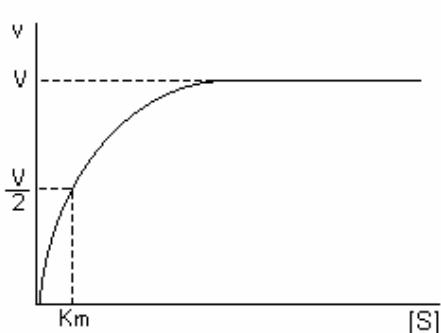
Nhân hai vế cho  $[S]$  và biến đổi phương trình, ta có:

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$$

Đây chính là phương trình Michaelis-Menten và  $K_m$  được gọi là hằng số Michaelis.

Ý nghĩa thực tiễn của hằng số Michaelis là ở chỗ nó chính là giá trị của nồng độ cơ chất khi tốc độ phản ứng bằng  $\frac{1}{2}$  tốc độ tối đa. Thay  $V$  và  $v$  bằng các con số tương ứng 1 và 0,5 vào phương trình trên, ta sẽ thấy rõ điều đó. Như vậy,  $K_m$  được đo bằng đơn vị nồng độ, tức mol/l.

Hằng số Michaelis là một hằng số rất quan trọng. Nó xác định ái lực của enzyme với cơ chất.  $K_m$  càng nhỏ thì ái lực này càng lớn, tốc độ phản ứng càng cao vì tốc độ tối đa  $V$  đạt ở giá trị nồng độ cơ chất càng thấp.



**Hình 2. Đường biểu diễn phương trình Michaelis-Menten**

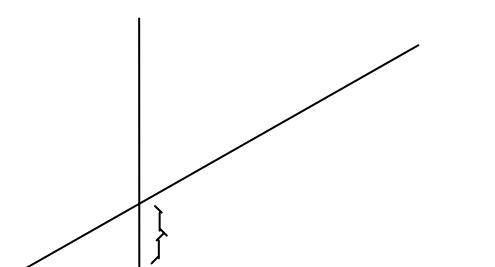
Trên cơ sở phương trình Michaelis-Menten, bằng cách xây dựng đường biểu diễn sự phụ thuộc của  $v$  vào  $[S]$  và bằng đồ thị đó xác định tốc độ tối đa  $V$  ta có thể tìm thấy giá trị của  $[S]$ , ở đó  $v = V/2$ , tức giá trị của  $K_m$  (hình 2).

Tuy nhiên, bằng cách này khó xác định  $v$  một cách chính xác. Để khắc phục nhược điểm đó, người ta sử dụng đường biểu diễn Lineweaver-Burk. Hai tác giả

này biến đổi phương trình Michaelis-Menten thành dạng:

$$\frac{1}{v} = K_m/V \times 1/[S] + 1/V$$

Ưu điểm của phương trình này là ở chỗ giữa các đại lượng  $1/v$  và  $1/[S]$  có mối liên hệ tỉ lệ thuận (hình 3).



**Hình 3. Đường biểu diễn phương trình Lineweaver-**

Qua đường biểu diễn này ta có thể thấy rằng  $\frac{\text{tang ABO}}{\text{BO}} = K_m/V$  và  $\text{BO} = 1/K_m$ .

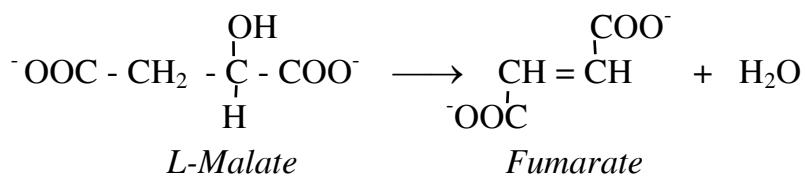
Phương trình này còn cho phép tìm hiểu nhiều khía cạnh quan

trọng liên quan đến tác dụng của các chất ức chế hoạt tính của enzyme.

## IV. NHỮNG TÍNH CHẤT ĐẶC TRƯNG CỦA XÚC TÁC SINH HỌC

### 1. Enzyme thể hiện tính đặc hiệu cao đối với cơ chất của chúng.

Một số enzyme chỉ xúc tác một phản ứng chuyển hóa một cơ chất. Ví dụ fumarase chỉ xúc tác phản ứng chuyển hóa giữa fumarate và malate:



Cả maleat - đồng phân dạng cis của fumarat - và D-malat đều không thể là cơ chất của fumarase. Các Enzyme khác có tính đặc hiệu rộng hơn. Ví dụ mỗi enzyme thủy phân protein trong bảng 2.4 có tính đặc hiệu với các liên kết peptide vốn hình thành bởi các aminoacid khác nhau, đồng thời cũng thể hiện tính đặc hiệu lập thể, chỉ thủy phân các liên kết peptide hình thành bởi các L- chử không phải các D-aminoacid. Tuy nhiên cũng có những enzyme có tính đặc hiệu rộng hơn, ví dụ một số enzyme thủy phân protein cũng có thể thủy phân cả các liên kết ester và tyoester.

### 2. Xúc tác enzyme dẫn đến sự hình thành một phức hệ trung gian giữa enzyme và cơ chất.

Sự hình thành các phức hệ enzyme-cơ chất như những chất trung gian trong các phản ứng enzyme đã được phát hiện bằng những biện pháp khác nhau, bao gồm phân tích động học, sử dụng các thuốc thử đặc hiệu đối với gốc R để tạo ra các biến đổi hóa học, ức chế enzyme bằng các hợp chất đặc hiệu tương tác với trung tâm hoạt động, phát hiện quang phổ hấp thụ đặc hiệu khi enzyme tác dụng với cơ chất, dùng tia X phát hiện cấu trúc tinh thể của enzyme kết hợp với các hợp chất tương tự về mặt cấu trúc với cơ chất...

### 3. Trung tâm của enzyme tương tác đặc hiệu với cơ chất được gọi là trung tâm hoạt động.

Hình dạng của một số enzyme cho phép một số nhóm R xác định trong chuỗi polypeptide được nằm cạnh nhau một cách rất đặc hiệu để tạo ra các trung tâm hoạt động. Cấu trúc không gian tại trung tâm hoạt động không chỉ xác định hợp chất nào có thể phù hợp về mặt lập thể đối với trung tâm

mà còn quy định bản chất của các biến cố tiếp theo để làm cho cơ chất biến hóa thành sản phẩm. Sự kết hợp của cơ chất với trung tâm hoạt động có thể được thực hiện thông qua sự hình thành các liên kết không đồng hóa trị đặc hiệu và trong một vài trường hợp, cả liên kết đồng hóa trị. Khi liên kết tại trung tâm, cơ chất được đặt gần sát với các nhóm đặc hiệu của enzyme, gây ra sự mất ổn định của một số liên kết nhất định trong cơ chất, do đó làm cho chúng trở nên hoạt động hơn về mặt hóa học.

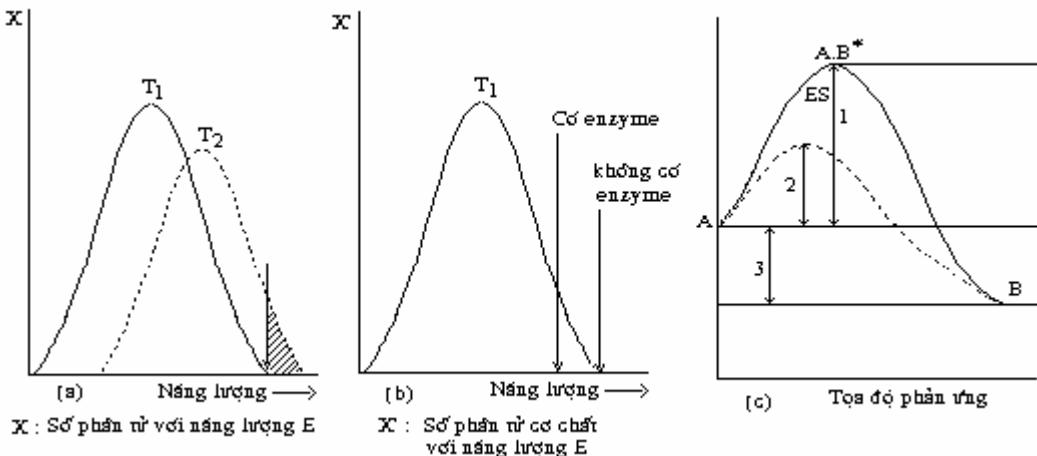
#### 4. Enzyme làm giảm năng lượng hoạt hóa cần thiết cho một phản ứng.

Ở nhiệt độ không đổi, một tập đoàn các phân tử có một động năng phân bố giữa các phân tử như mô tả một cách khái quát trong hình 4a. Ở nhiệt độ  $T_1$  tập đoàn các phân tử không có đủ năng lượng để thực hiện một phản ứng hóa học đặc hiệu nào đó, nhưng nếu nhiệt độ được nâng lên đến  $T_2$  thì sự phân bố năng lượng thay đổi theo. Tại  $T_2$  bây giờ có đủ năng lượng để nâng số va chạm giữa các phân tử, làm cho một phản ứng hóa học có thể xảy ra. Như vậy, khi nhiệt độ được nâng lên từ  $T_1$  đến  $T_2$  việc tăng tốc độ phản ứng chủ yếu là kết quả của việc tăng số phân tử được hoạt hóa, tức bộ phận có được năng lượng cần thiết cho sự hoạt hóa .

Hình 3c cho thấy bức tranh đơn giản về mặt năng lượng của một tập đoàn các phân tử trong quá trình phản ứng A  $\rightarrow$  B.

Khi phản ứng xảy ra, có đủ số phân tử với mức năng lượng cần thiết để trao đổi năng lượng và tham gia trạng thái trung chuyển, tại đó chúng phân hủy thành sản phẩm. Năng lượng cần để đạt trạng thái trung chuyển, hay trạng thái hoạt hóa là năng lượng hoạt hóa ( $E_a$ ). Để một phản ứng có thể xảy ra, mức năng lượng của các chất phản ứng phải lớn hơn của sản phẩm. Tổng biến thiên năng lượng của phản ứng là mức hênh lệch giữa các mức năng lượng của A và của B.

Enzyme, cũng như mọi chất xúc tác, làm tăng tốc độ của các phản ứng hóa học bằng cách làm giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng đặc hiệu như ta có thể thấy trong các hình 4b và 4c.



Hình 4. (a) Phân bố động năng của một tập đoàn phân tử ở nhiệt độ  $T_1$  và  $T_2$  cao hơn. Mũi tên chỉ mức năng lượng tối thiểu cần thiết để các phân tử tham gia phản ứng. Tại  $T_1$  phản ứng không xảy ra, nhưng ở  $T_2$  phản ứng được thực hiện. (b) Động năng của tập đoàn các phân tử cơ chất ở nhiệt độ  $T_1$  các mũi tên chỉ các mức năng lượng cần thiết để xảy ra phản ứng khi vắng mặt và khi có mặt enzyme. Cần chú ý rằng khi không có enzyme thì phản ứng không xảy ra, còn khi có mặt enzyme phản ứng có thể được thực hiện mà không cần thay đổi nhiệt độ. (c) Biến thiên năng lượng của phản ứng không có enzyme xúc tác và có enzyme xúc tác A → B. Trong phản ứng không có enzyme xúc tác, mức năng lượng của A cần được nâng lên đủ để hoạt hóa các phân tử của A và đưa chúng lên trạng thái trung chuyển  $A, B^*$ , tại đó nó có thể phản ứng với B. Năng lượng cần để mang các phân tử lên trạng thái trung chuyển được gọi là năng lượng hoạt hóa  $E_a$ . Mức chênh lệch giữa các mức năng lượng của A và của  $A, B^*$  được chỉ bằng số 1. Trong phản ứng có xúc tác  $E_a$  cần để tạo ra các phức hợp hoạt động ES được chỉ bằng số 2 thấp hơn nhiều so với số 1 của quá trình không xúc tác. Sự chênh lệch giữa các mức năng lượng giữa A và B (số 3) là như nhau trong cả 2 phản ứng có xúc tác cũng như không có xúc tác.

### 5. Một số enzyme tham gia điều hòa tốc độ phản ứng.

Đa số cơ thể không thay đổi tốc độ của các phản ứng trao đổi chất khi nhiệt độ biến đổi. Vì vậy các phản ứng xúc tác cần làm cho quá trình xảy ra đủ nhanh ở nhiệt độ của cơ thể. Hơn nữa, nếu các phản ứng sinh học xảy ra không có xúc tác thì không thể kiểm tra được tốc độ của chúng.

Hàng loạt các cơ chế điều hòa được sử dụng để điều hòa quá trình trao đổi chất. Một số hoạt động ở mức độ của bản thân enzyme. Một chất có tác dụng làm tăng hoặc giảm tốc độ của một phản ứng enzyme, bằng cách tác động trực tiếp lên enzyme xúc tác được gọi là chất hiệu ứng (effector). Các chất hiệu ứng thể hiện tác dụng của chúng bằng cách làm thay đổi cấu trúc

của enzyme sao cho chỉ gây ảnh hưởng đến tốc độ phản ứng. Cơ chế điều hòa của enzyme sẽ được xem xét sau.

### **6. Một số enzyme là multienzyme hay phức hệ đa chức năng.**

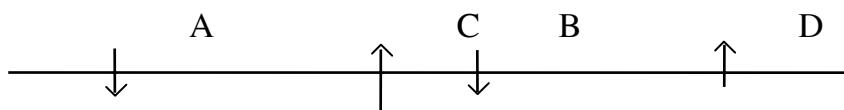
Các phức hệ multienzyme có trọng lượng phân tử lớn thường chứa từ ba enzyme khác nhau trở lên kết hợp chặt chẽ với nhau bằng cách tương tác không đồng hóa trị và chỉ có thể phân ly trong các điều kiện làm phá vỡ các liên kết không đồng hóa trị. Mỗi enzyme trong phức hệ xúc tác một phản ứng riêng biệt nhưng cùng với các enzyme khác của phức hệ xúc tác một phản ứng tổng thể duy nhất. Pyruvat dehydrogenase là một ví dụ về phức hệ multi-enzyme. Các enzyme khác nằm trong các phức hệ đa chức năng (multifunctional complex), trong đó hai hay nhiều hơn các enzyme riêng biệt chứa trong những khu vực riêng của một chuỗi polypeptide duy nhất. Mỗi khu vực riêng đó xúc tác một bước của một phản ứng tổng thể duy nhất do phức hệ đa chức năng xúc tác. Synthetase acid béo là một ví dụ cho loại phức hệ này.

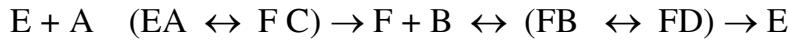
### **7. Động học của phản ứng enzyme hai cơ chất.**

Đa số enzyme có nhiều hơn một cơ chất và xúc tác các phản ứng có dạng  $A + B \leftrightarrow C + D$ . Các phản ứng này dẫn đến sự hình thành các phức hệ enzyme - cơ chất giống như các phản ứng một cơ chất và động học của chúng có thể được dùng để thu nhận  $K_m$  đối với mỗi cơ chất được đo bằng phân tích đồ thi (theo các phương trình 11 - 13) của tốc độ ban đầu khi thay đổi nồng độ của cơ chất này và giữ nguyên nồng độ bão hòa của cơ chất kia.

Phương trình động học của phản ứng hai cơ chất tương tự như phương trình tốc độ Michelis - Menten cho phép hiểu một cách sâu sắc cơ chế chung của các phản ứng loại này và xác định giá trị của các hằng số động học như  $K_m$  và  $V_{max}$ . Những phương trình này rất phức tạp nên không thể đề cập đến ở đây. Tuy nhiên, sẽ rất bổ ích nếu xem xét các cơ chế cơ bản của các phản ứng hai cơ chất bao gồm hai cơ chế khác nhau là cơ chế thay thế kép (double displacement mechanism) và cơ chế liên tục (sequential mechanism).

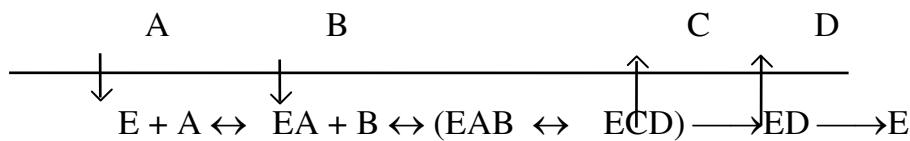
Trong cơ chế thay thế kép đối với phản ứng  $A + B \leftrightarrow C + D$ , một cơ chất (A) gắn với enzyme để tạo ra phức hệ EA. E và A sau đó phản ứng để tạo ra phức hệ mới FC và sau đó một sản phẩm (C) được giải phóng để tạo ra phức hệ trung gian enzyme - cơ chất F khác với E. Sản phẩm trung gian F sau đó phản ứng với cơ chất thứ hai (B) để tạo ra phức hệ enzyme - cơ chất FB. Phức hệ này sẽ tạo ra sản phẩm thứ hai D và khôi phục enzyme E. Cơ chế này có thể được mô tả một cách khái quát ở dạng sơ đồ sau đây:



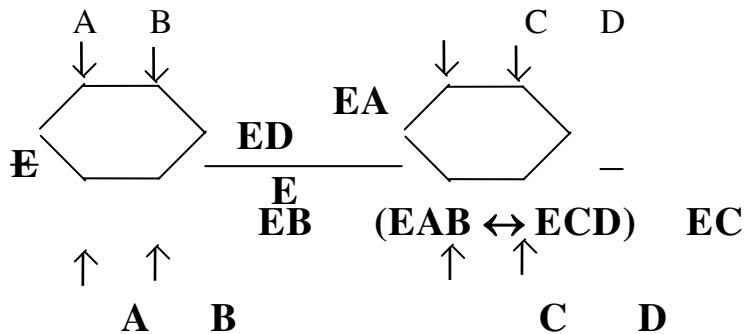


A, B, C, D là chất phản ứng và sản phẩm, E là enzyme, F là dạng trung gian của enzyme. Cơ chế này còn được gọi là cơ chế ping-pong. Phản ứng chuyển amin-hóa bằng enzyme glutamic-aspartic aminotransferase là một ví dụ về cơ chế này.

Cơ chế liên tục có hai loại: loại trật tự và loại tùy tiện. Ngược với cơ chế ping-pong, trong cơ chế liên tục tất cả các cơ chất có thể kết hợp để tạo ra một phức hệ ba thành phần trước khi sản phẩm hình thành. Các phản ứng loại trật tự có thể được mô tả ở dạng sơ đồ sau đây:



Các phản ứng xúc tác bởi phosphofructokinase và glycealdehyde-3-phosphate dehydrogenase là những ví dụ về kiểu phản ứng trật tự của cơ chế liên tục. Trong các trường hợp khác, E mang các trung tâm kết hợp đối với cả A và B và tốc độ phản ứng không bị ảnh hưởng bởi A hoặc B được gắn trước vào trung tâm dành cho chúng. Vì vậy, cơ chế này được gọi là cơ chế tùy tiện. Nếu cũng không có một trật tự "thích hợp" cho sự giải phóng các sản phẩm C và D sau khi các phức hệ ba thành phần EAB biến thành ECD, thì cơ chế tùy tiện có thể được mô tả như sau:



Ví dụ về cơ chế tùy tiện là các phản ứng xúc tác bởi các enzyme UDP-galactose:N-Acetylgalactosamine galactosyl transferase và creatine kinase.

Các cơ chế động học phức tạp hơn lôi cuốn ba và thậm chí bốn cơ chất tham gia phản ứng. Chúng có thể thuộc cơ chế liên tục hoặc cơ chế ping-pong hoặc là sự phối hợp của cả hai cơ chế.

### 8. Ảnh hưởng của pH

pH ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ phản ứng. Nhiều phản ứng enzyme có tốc độ nhanh nhất ở một giá trị pH được gọi là pH tối thích, trong khi các phản ứng enzyme khác có tốc độ như nhau trong một phạm vi các giá trị pH

xác định. Bảng 5 cho thấy pH tối thích đối với một số enzyme. Một số yếu tố có ảnh hưởng đến pH tối thích bao gồm các gốc acid tại trung tâm hoạt động.

Nếu một enzyme đòi hỏi một nhóm acide protein hóa cho hoạt động của mình thì enzyme đó có thể có hoạt tính cao nhất tại các giá trị pH thấp hơn pK của nhóm đó, ngược lại, nếu cần dạng phân ly của một acide thì hoạt tính cao nhất sẽ thể hiện tại các giá trị pH cao hơn pK của nhóm đó. Thông thường có hai nhóm acide phân ly trở lên tham gia tại trung tâm hoạt động và đường cong hoạt tính theo pH sẽ phản ánh sự phụ thuộc vào mỗi nhóm. Trên thực tế, nghiên cứu ảnh hưởng của pH đối với tốc độ phản ứng có thể giúp xác định các nhóm acid tại trung tâm hoạt động, mặc dù cũng cần cả những thông tin khác.

Bảng 5. pH tối thích của một số enzyme thủy phân.

Enzyme	Cơ chất	pH <sub>opt</sub>
Pepsin	Albumin trứng	1,5
	casein	1,8
	Hemoglobin	2,2
	Benzylloxycarboxylglutamyltyrosine	4,0
$\alpha$ -Glucosidase	$\alpha$ -Metylglucoside	5,4
	Maltose	7,0
Urease	Urea	6,4-6,9
Trypsin	Protein	7,8
$\alpha$ -Amylase tuyến tụy	Tinh bột	6,7-7,2
$\beta$ -Amylase mầm lúa mạch	Tinh bột	7,8
Carboxypeptidase	Các chất khác nhau	7,5
Phosphatase kiềm huyết tương	2-Glycerophosphate	9-10
Phosphatase acid huyết tương	2-Glycerophosphate	4,5-5,0
Arginase	Arginine	9,5-9-9

Một số cơ chất là những acide yếu hoặc chứa những thành phần ion và pH tối thích có thể phản ánh thực trạng là enzyme cần ở dạng ion hay dạng không phải ion.Thêm vào đó tốc độ phản ứng thường giảm rất nhanh khi pH giảm thấp hay quá cao có thể cho thấy enzyme bị biến tính hay bị phân ly một cofactor quan trọng nào đó.

### 9. Ảnh hưởng của nhiệt độ.

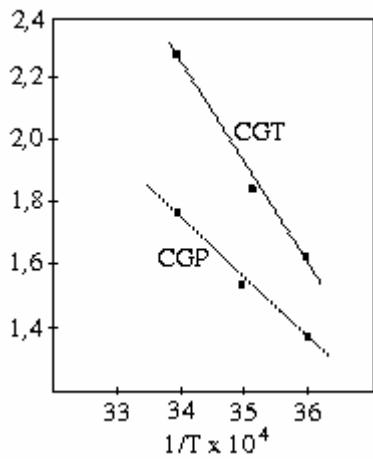
Hằng số cân bằng của mọi phản ứng hóa học cũng như tốc độ của phản ứng phụ thuộc rất nhiều vào nhiệt độ. Các phản ứng enzyme cũng không phải là ngoại lệ. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hằng số cân bằng của một phản ứng hóa học được mô tả bằng phương trình van't Hoff:

$$2,3 \log K = C - \frac{\Delta H}{RT}$$

Trong đó  $\Delta H$  là nhiệt lượng của phản ứng tính bằng calo/mol, R là hằng số khí bằng 1,98 cal/mol/°C và T là nhiệt độ tuyệt đối. C là một hằng số hợp nhất (integration constant). Từ phương trình này có thể thấy đồ thị của  $\log K$  đổi với  $1/T$  là một đường thẳng. Độ nghiêng của đường thẳng này là  $\Delta H / 2,3R$ . Ảnh hưởng của nhiệt độ lên tốc độ của một phản ứng được mô tả bằng phương trình Arrhenius:

$$2,3 \log K = B - \frac{E_a}{RT}$$

Phương trình này cũng có dạng như phương trình (19) nhưng mô tả quan hệ của hằng số tốc độ k của phản ứng với T, R,  $E_a$  (năng lượng hoạt hóa tính bằng calo/mol) và hằng số B biểu hiện định lượng tần số va chạm và yêu cầu định hướng đặc hiệu giữa các phân tử va chạm.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hằng số tốc độ  $k_2$  của các phản ứng thủy phân benzyloxycarbonyl-glycylphenylalanin (CGP) và benzyloxycarbonyl-glycyltryptophan (CGT) bằng carboxypeptidase tinh thể. Các số liệu ghi nhận bằng đồ thị ở dạng  $\log k_2$  đổi với giá trị nghịch đảo của nhiệt độ tuyệt đối ( $1/T$ ). Năng lượng hoạt hóa biểu kiến  $E_a$  bằng 9.900 cal/mol đối với CGT và 9.600

đối với CGP.

Hình 5 cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ lên hằng số tốc độ  $k_2$  của phản ứng thủy phân hai cơ chất bởi carboxypeptidase. Đây là một đồ thị Arrhenius điển hình đối với một phản ứng enzyme vốn cho thấy  $\log k_2$  thay đổi tỷ lệ thuận với  $1/T$  trong phạm vi từ 5 đến 25°C và cho thấy  $E_a$  có thể được xác định từ độ nghiêng của đường thẳng.

Đối với các phản ứng enzyme, tốc độ phản ứng tăng theo nhiệt độ cho đến khi đạt được tốc độ tối đa, nhưng nhiệt độ cao hơn mức tối đa sẽ làm giảm tốc độ phản ứng do enzyme bị biến tính.

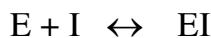
## V. ÚC CHẾ ENZYME

Tốc độ của các phản ứng enzyme bị giảm bởi tác dụng của các chất ức chế đặc hiệu, tức những chất kết hợp với enzyme và ngăn cản enzyme kết hợp một cách bình thường với cơ chất. Tính độc của nhiều chất như HCN và H<sub>2</sub>S là do tác dụng của chúng như một chất ức chế enzyme. Nhiều loại thuốc cũng có tác dụng ức chế các enzyme đặc hiệu. Do đó, hiểu biết các chất ức chế enzyme là một điều rất quan trọng để hiểu tác dụng của thuốc và các chất độc. Hơn nữa thông tin về bản thân enzyme cũng thu được bằng cách nghiên cứu các chất ức chế enzyme.

Có ba kiểu ức chế thuận nghịch mang các đặc điểm động học khác nhau. Đó là một kiểu ức chế cạnh tranh (competitive inhibition) và hai kiểu ức chế không cạnh tranh (noncompetitive và uncompetitive inhibition).

### 1. Úc chế cạnh tranh (competitive inhibition).

Các chất ức chế cạnh tranh có thể kết hợp thuận nghịch với trung tâm hoạt động của enzyme và cạnh tranh với cơ chất để giành lấy trung tâm hoạt động. Khi trung tâm hoạt động đã bị chất ức chế chiếm giữ, nó không thể kết hợp với cơ chất. Sự kết hợp của chất ức chế cạnh tranh I với enzyme E có thể được mô tả giống như sự kết hợp giữa enzyme và cơ chất, mặc dù chất ức chế không chuyển hóa thành sản phẩm:

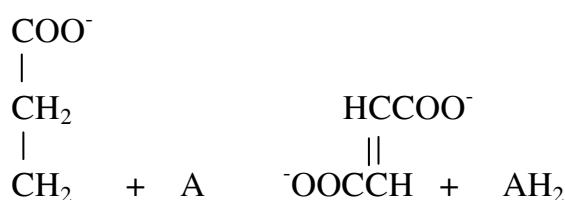


Hằng số phâ.n ly K<sub>i</sub> của phức hệ EI là:

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

Vì sự hình thành EI phụ thuộc vào [I] cũng như sự hình thành ES phụ thuộc vào [S] nên tốc độ thực tế của phản ứng ức chế cạnh tranh hoàn toàn phụ thuộc vào nồng độ tương đối của S và I tại một nồng độ xác định của E.

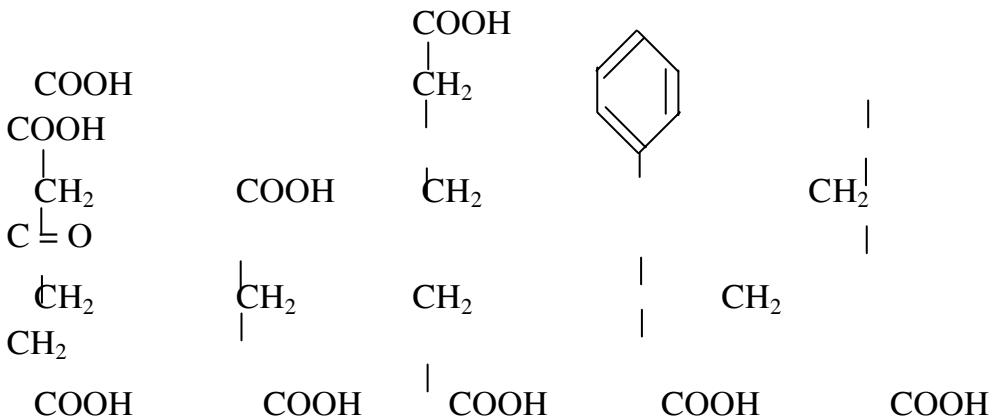
Một trong những ví dụ điển hình nhất của ức chế cạnh tranh là ảnh hưởng của acid malonic đối với enzyme succinate dehydrogenase xúc tác phản ứng sau đây khi có một chất nhận hydro A thích hợp :





Succinate Chất nhận Fumarate Chất nhận ở dạng khử

Nhiều hợp chất với cấu trúc giống với acid succinic là những chất ức chế cạnh tranh của loại enzyme dehydrogenase này, bao gồm:



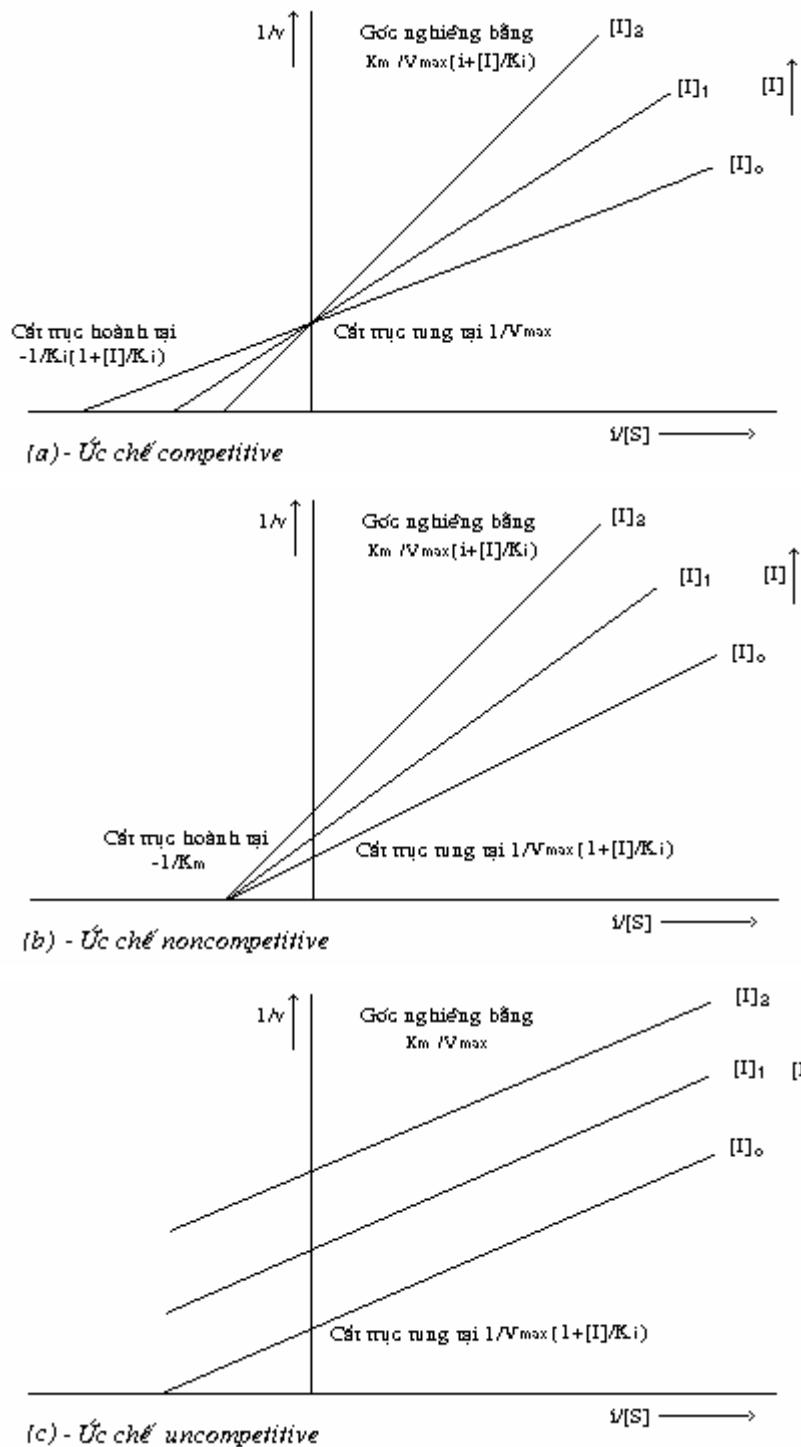
Oxalate Malonate Glutarate Phenylpropionate Oxaloacetate

Mạnh nhất trong số các chất ức chế này là acid malonic. Khi tỷ lệ  $[I]/[S] = 1/50$ , enzyme đã bị ức chế 50%. Tăng nồng độ của cơ chất khi  $[I]$  không đổi, sẽ làm giảm mức độ ức chế, và ngược lại, giảm nồng độ cơ chất sẽ làm tăng mức độ ức chế. Nếu acid succinic và acid malonic gắn với các trung tâm khác nhau của enzyme thì không thể giải thích được vì sao chúng cạnh tranh với nhau. Vì chúng cạnh tranh nên có thể kết luận rằng chúng kết hợp với enzyme tại cùng một chỗ, đó là trung tâm hoạt động. Cấu trúc của mỗi chất ức chế cạnh tranh giống với cơ chất tại một số khía cạnh nào đó.

Các chất ức chế cạnh tranh có thể được nhận biết bằng đặc điểm động học qua hiệu ứng của nồng độ chất ức chế đối với quan hệ giữa  $v$  và  $[S]$  như minh họa bằng đồ thị của phương trình Lineweaver-Burk. Tác dụng của ức chế cạnh tranh tuân theo phương trình sau đây với sự tham gia của  $K_i$  - hằng số phân ly của EI:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right] - \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Đặc điểm của ức chế competitive là có cùng điểm cắt trực tung ( $1/V_{max}$ ) như phản ứng không ức chế nhưng độ nghiêng thì khác với phản ứng không ức chế bởi giá trị  $1 + [I]/K_i$ . Đồ thị trong hình 6a cho thấy rõ khi nồng độ của  $S$  cao thì phản ứng ít bị ức chế, ngược lại khi nồng độ của  $S$  giảm thì mức độ ức chế tăng lên cùng với các giá trị  $[I]/[S]$  và  $K_i$ .

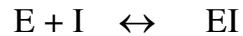


Hình 6. Đồ thị đảo ngược kép mô tả các kiểu ức chế phản ứng enzyme:

(a): ức chế competitive, (b): ức chế noncompetitive, (c): ức chế uncompetitive.  $K_m$  và  $V_{max}$  được xác định từ độ dốc và các điểm cắt của các phản ứng không ức chế, còn  $K_i$  - từ độ dốc và/hoặc chỗ cắt của các phản ứng bị ức chế.

## 2. Úc chế không cạnh tranh kiểu thứ I (noncompetitive inhibition).

Trong trường hợp này không có mối quan hệ giữa mức độ ức chế với nồng độ cơ chất. Úc chế chỉ phụ thuộc vào nồng độ của chất ức chế. Trái ngược với ức chế cạnh tranh, người ta cho rằng sự hình thành EI xảy ra tại nơi không phải để enzyme gắn với cơ chất.



Cả EI và ESI đều là những phức hệ không hoạt động. Có hai hằng số phân ly:

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

$$\text{và } K_i^{ESI} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Phương trình đảo ngược kép đối với kiểu ức chế không cạnh tranh này là:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \left[ 1 + \frac{[I]}{[K_i]} \right] \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right]$$

Phương trình ức chế cạnh tranh kiểu thứ nhất trên đây và đường biểu diễn của nó trình bày trong hình 6b. Cả độ nghiêng và điểm cắt đều khác với trường hợp không ức chế bởi giá trị  $1+[I]/K_i$ . Các chất ức chế noncompetitive không phản ứng tại trung tâm hoạt động mà tại một nơi nào đó trên phân tử enzyme dẫn đến sự biến đổi đáng kể hình dạng của enzyme để ngăn cản trung tâm hoạt động kết hợp một cách bình thường với cơ chất. Ví dụ về ức chế noncompetitive là các kim loại nặng như  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  vốn tương tác thuận nghịch với các nhóm thiol của enzyme hoặc các yếu tố tạo phức chelat mà hiệu ứng ức chế là do chúng kết hợp với các ion kim loại mà rất cần để thể hiện hoạt tính xúc tác.

Nhiều hợp chất kết hợp không thuận nghịch với enzyme và tạo ra các dẫn xuất đồng hóa trị tại trung tâm hoạt động hay tại một bộ phận khác của phân tử không tham gia trực tiếp trong tương tác enzyme-cơ chất. Đây không phải là ức chế noncompetitive với ý nghĩa chặt chẽ vì chúng ức chế enzyme một cách không thuận nghịch. Ví dụ papain chứa một nhóm thiol duy nhất tại trung tâm hoạt động, nó phản ứng rất nhanh chóng với iodoacetate để tạo ra nhóm S-carboxymethylcysteine. Mức độ ức chế papain bởi chất ức chế này tỷ lệ thuận với mức độ S-carboxymethyl-hóa. Iodacetate cũng ức chế

một số enzyme có chứa nhóm thiol không phải tại trung tâm hoạt động mà làm suy yếu hoạt tính xúc tác do làm biến đổi cấu trúc của phân tử enzyme.

### 3. Ức chế không cạnh tranh kiểu thứ II (uncompetitive inhibition).

Kiểu ức chế này xảy ra khi một chất ức chế chỉ kết hợp thuận nghịch với phức hệ ES để tạo ra ESI mà sau đó không thể tạo ra sản phẩm (các chất ức chế noncompetitive có thể kết hợp cả với enzyme tự do và với phức hệ ES), như vậy:

$$\frac{K_i}{V} = \frac{[ESI]}{[ES][I]}$$

Và phương trình đảo ngược kép sẽ là

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} \times \left[ \frac{1}{V_{max}} + \frac{[I]}{K_i} \right]$$

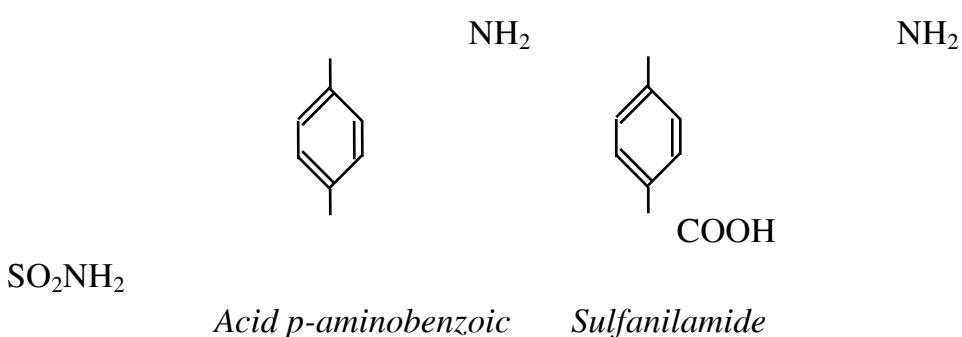
Đồ thị của phương trình này (hình 6c) cho thấy kiểu ức chế này dẫn đến sự thay đổi đặc trưng điểm cắt trực tung nhưng không thay đổi độ nghiêng của đồ thị so với trường hợp không ức chế. Cũng như ức chế noncompetitive, kiểu ức chế uncompetitive không thể đảo ngược bằng cách tăng nồng độ cơ chất. Kiểu ức chế này thường tìm thấy trong các phản ứng enzyme với hai cơ chất trở lên.

## VI. CÁC CHẤT ỨC CHẾ TRAO ĐỔI CHẤT- ANTIMETABOLITE

Chất trao đổi (metabolite) là những hợp chất hình thành trong các quá trình trao đổi chất bình thường của cơ thể, còn các chất chống trao đổi (antimetabolite) là những chất có cấu trúc giống với một chất trao đổi nào đó và, khi có mặt trong cơ thể, chúng ức chế việc sử dụng chất trao đổi đó. Các chất antimetabolite ức chế sinh trưởng và đôi khi có thể giết chết cơ thể, mặc dù tác dụng ức chế sinh trưởng có thể được khắc phục bằng cách cung cấp chất trao đổi cần thiết. Antimetabolite đã được sử dụng để xác định các chất trao đổi quan trọng, hay các yếu tố sinh trưởng, đặc biệt đối với vi sinh vật. Tuy nhiên, sự quan tâm hiện nay đối với antimetabolite thường với mục đích sử dụng chúng như những chất ức chế sinh trưởng đối với các vi sinh vật gây bệnh và tế bào ung thư. Như vậy, nếu một antimetabolite được phát hiện có khả năng ức chế sinh trưởng của vi sinh vật gây bệnh mà không ảnh hưởng đáng kể đến trao đổi chất của sinh vật chủ thì nó có thể được xem xét để sử dụng như một chất kháng sinh (antibiotic). Tương tự, nếu nó ức chế sinh trưởng của tế bào ung thư với mức độ lớn hơn là ức chế sinh trưởng của các mô chủ thì nó có thể trở thành một loại thuốc trị ung thư (antitumor agent) có hiệu quả.

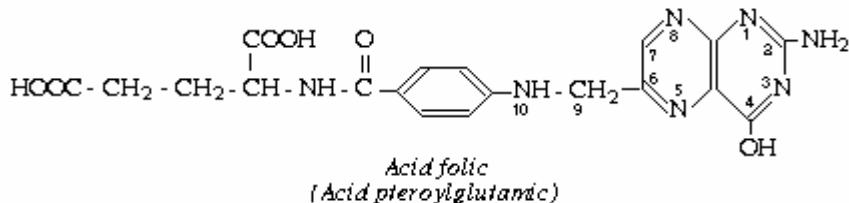
Nhiều antimetabolite là những chất ức chế các enzyme đặc hiệu. Do đó, hiểu biết những enzyme này sẽ giúp tạo ra các antimetabolite, mặc dù nhiều chất kháng sinh và kháng ung thư đã được phát hiện theo phương pháp kinh nghiệm. Để giải thích cách tác dụng đặc hiệu của antimetabolite lên enzyme, ta sẽ xem xét ở đây cơ chế tác dụng của một nhóm chất kháng sinh gọi là "thuốc sulfa"

Việc nghiên cứu antimetabolit bắt đầu được đặc biệt chú ý khi phát hiện được rằng sự ức chế sinh trưởng của vi khuẩn bởi sulfanilamide bị ngăn cản mang tính cạnh tranh bởi một yếu tố sinh trưởng là acid *p*-aminobenzoid. Sự giống nhau về mặt cấu trúc của hai chất là rất rõ, và hiện tượng này cũng giống như trường hợp ức chế cạnh tranh của enzyme.



Thực vậy, acid p-aminobenzoic có thể khắc phục mang tính cạnh tranh tác dụng ức chế của tất cả các sulfonamide có cấu trúc  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{NHR}$ , ví dụ sylfaguanidine, sulfathiazol, sulfapyridine và sulfadiazine.

Những cơ thể vốn cần acid p-aminobenzoic (PABA) cho sinh trưởng sử dụng nó để tổng hợp acid folic. Sinh trưởng của những cơ thể này bị ức chế bởi các loại sulfonamide và sự ức chế này có thể bị đảo ngược bởi PABA. Những cơ thể vốn cần acid folic để sinh trưởng và không thể sử dụng PABA thì không bị ức chế bởi sulfonamide. Như vậy, sulfonamide ức chế (các) phản ứng enzyme dẫn đến dẫn đến tổng hợp acid folic từ acid *p*-aminobenzoic và các chất tiền thân khác. Có lẽ sử dụng các loại sulfonamide để chống nhiễm khuẩn ở người một cách có hiệu quả là do cơ thể người cần acid folic nhưng không tổng hợp acid này từ PABA. Như vậy, sulfonamide ngăn cản phản ứng trao đổi cần thiết đối với vi khuẩn mà không ảnh hưởng đến trao đổi chất của cơ thể chủ vốn không tổng hợp acid folic từ PABA.



Một số chất đối kháng của acid folic cũng đã được sử dụng ở mức độ nhất định để điều trị bệnh bạch cầu và các bệnh ung thư khác. Ví dụ acid 4-amino-pteroylglutamic (aminopterin) ức chế sinh trưởng của một số loại ung thư.

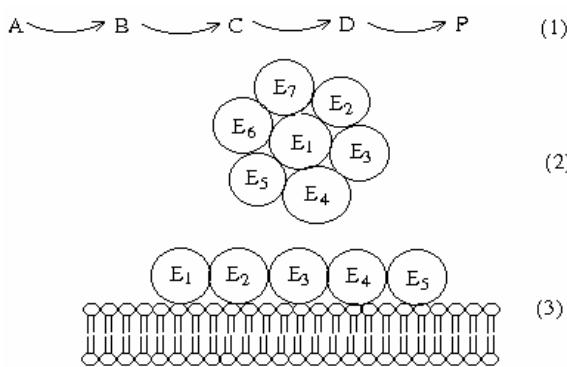
## VII. HỆ THỐNG MULTIENZYM VÀ VAI TRÒ CỦA ENZYME ĐIỀU HÒA.

Trong tế bào nhiều enzyme hoạt động đồng thời, trong đó sản phẩm của phản ứng trước là cơ chất của phản ứng sau. Ví dụ quá trình biến đổi glucose thành acid lactic được thực hiện bằng một trật tự các phản ứng tạo thành quá trình glycolis. Trong các hệ thống multienzyme này sản phẩm của phản ứng trước là cơ chất của phản ứng sau. Trong mỗi hệ thống multienzyme thông thường có một enzyme chịu trách nhiệm chi phối tốc độ của toàn bộ hệ thống, được gọi là *enzyme điều hòa*. Tùy thuộc vào mức độ phức tạp, những hệ thống multienzyme (hay đa enzyme) này được chia làm 3 loại (hình 7):

1/ Các enzyme cá biệt hòa tan trong tế bào chất và hoạt động độc lập nhau. Các phân tử cơ chất có kích thước nhỏ, dễ khuếch tán, có thể tìm thấy nhanh chóng con đường từ enzyme này sang enzyme khác (1);

2/ Các enzyme của hệ thống kết hợp nhau thành một phức hệ hoạt động phối hợp nhau. Đó là trường hợp hệ enzyme tổng hợp acid béo của nấm men. Hệ thống này gồm 7 enzyme kết hợp chặt chẽ với nhau. Nếu tách rời nhau, tất cả đều bị mất hoạt tính;

3/ Có mức độ tổ chức cao nhất là những hệ thống enzyme liên kết với các cấu trúc trên phân tử của tế bào. Đó là trường hợp đối với hệ enzyme của chuỗi vận chuyển điện tử trong ti thể.



Mỗi enzyme cá biệt gắn vào lớp màng trong của ti thể, vừa làm nhiệm vụ xúc tác, vừa đóng vai trò như một yếu tố cấu trúc của màng.

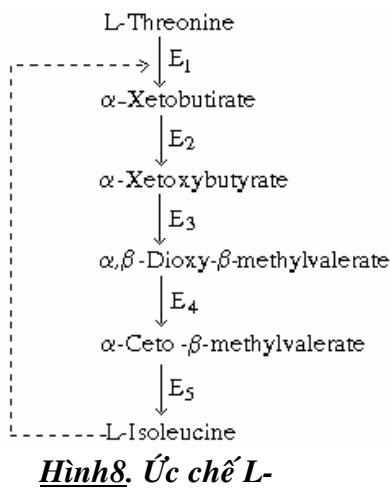
Trong những hệ thống multienzyme này tốc độ của một phản ứng nào đó thường xác định tốc độ của toàn bộ

hệ thống, trong đó yếu tố hạn chế có thể là nồng độ enzyme hoặc nồng độ cơ chất.

Hoạt tính của enzyme điều hòa được điều chỉnh thông qua thông qua các kiểu phân tử tín hiệu khác nhau vốn là các chất trao đổi phân tử nhỏ hoặc các cofactor. Có hai loại enzyme điều hòa tham gia trong các con đường trao đổi chất khác nhau. Loại thứ nhất là các *enzyme allosteric hay dị lập thể*. Chúng hoạt động thông qua các *liên kết không đồng hóa* với các chất trao

đổi làm nhiệm vụ điều hòa gọi là *modulator*. Chữ “allosteric” tiếng Hy lạp có nghĩa là “cấu hình khác”. Enzyme allosteric là những enzyme có cấu hình khác khi liên kết với các modulator. Loại enzyme điều hòa thứ hai bao gồm những enzyme được điều hòa bằng cách *liên kết đồng hóa thuận nghịch* với modulator. Cả hai loại enzyme điều hòa này được cấu tạo từ các phân dưới đơn vị, và trong một số trường hợp có các trung tâm điều hòa và trung tâm hoạt động nằm trên các phân dưới đơn vị khác nhau.

Ít nhất còn hai cơ chế khác để điều hòa hoạt tính của enzyme.. Một số enzyme được kích thích hoặc bị ức chế bởi các protein kiểm tra riêng biệt khi những protein này gắn với enzyme và ảnh hưởng đến hoạt tính của chúng. Một số enzyme khác được hoạt hóa bằng tác động thuỷ phân không thuận nghịch đặc biệt đối với phân tử enzyme. Các ví dụ quan trọng về hai cơ chế này có thể tìm thấy trong các quá trình sinh lý như tiêu hóa, nghẽn máu, hoạt động của hormone ...



**Hình 8. Úc chế L-threonine desaminase bởi**

Trong một số hệ thống multienzyme điều hòa bị ức chế đặc hiệu bởi các sản phẩm cuối cùng của chuỗi phản ứng khi hàm lượng của sản phẩm đó vượt quá nhu cầu của tế bào. Khi phản ứng của enzyme điều hòa thấp các enzyme tiếp theo cũng sẽ giảm tốc độ hoạt động do cơ chất của chúng bị giảm, do đó làm giảm số lượng sản phẩm của toàn bộ hệ thống multienzyme. Kiểu điều hòa này được gọi là *điều hòa theo nguyên tắc liên hệ ngược*.

Ví dụ điển hình về kiểu điều hòa này là điều hòa hoạt động của hệ thống multienzyme, trong đó L-threonine chuyển hóa thành L-isoleucine bao gồm 5 phản ứng (hình 8).

Enzyme E<sub>1</sub> (threonine desaminase) bị ức chế bởi sản phẩm cuối cùng L-isoleucine, mặc dù nó không phải là chất cạnh tranh với L-threonine. Tất cả những aminoacid giống nó đều không gây hiệu ứng này. Rõ ràng là khi trong hệ thống tích lũy quá nhiều L-isoleucine, vượt quá mức cho phép nào đó, thì enzyme đầu tiên của hệ thống sẽ bị ức chế.

Chất trao đổi gây tác dụng ức chế enzyme điều hòa được gọi là *effector âm tính*, hay *modulator âm tính*. Cũng có trường hợp enzyme điều hòa nằm ở điểm phân nhánh của các dãy phản ứng. Enzyme điều hòa có thể là đơn vị,

nếu chỉ chịu tác dụng của một effector, hoặc đa trị nếu chịu tác dụng của từ hai effector trở lên. Các effector có thể là các sản phẩm cuối cùng của những trật tự phản ứng liên quan nhau. Nhờ đặc điểm này một số hệ thống multienzyme có thể có chung một hệ thống điều hòa.

Enzyme điều hòa có thể chịu tác dụng của effector dương tính. Thông thường, effector dương tính là cơ chất của chính enzyme điều hòa.

Có những trường hợp enzyme điều hòa chịu tác động đồng thời của một hoặc một số effector âm tính và một hoặc một số effector dương tính, trong đó mỗi effector kết hợp với bề mặt enzyme tại một vị trí rất đặc trưng.

Phần lớn enzyme điều hòa trong điều kiện tế bào là những enzyme xúc tác các phản ứng không thuận nghịch.

Sự tồn tại của enzyme điều hòa là một trong những thể hiện của nguyên tắc tiết kiệm tối đa của tế bào.

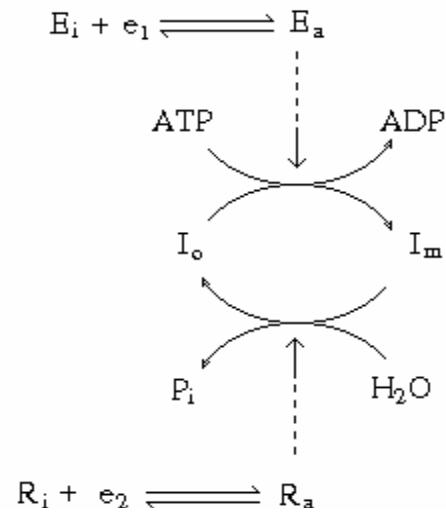
### VIII. HỆ THỐNG CASCADE - BIẾN ĐỔI ĐỒNG HÓA TRỊ.

Điều hòa hoạt tính enzyme còn có thể được thực hiện bằng cách biến đổi enzyme theo chu trình kín giữa dạng biến đổi đồng hóa trị và dạng không biến đổi. Sự biến đổi có tính chu kỳ này được thực hiện nhờ các enzyme biến hóa (converter enzymes), chúng cùng với các enzyme bị biến đổi và không bị biến đổi và các chất hiệu ứng của chúng tạo thành một hệ thống cascade.

Một enzyme bị biến đổi đồng hóa trị có thể trở nên hoạt động hơn so với dạng không biến đổi, hoặc hai dạng có thể có cách phản ứng khác nhau với các chất gây hiệu ứng.

Hệ thống cascade đơn giản nhất là hệ thống đơn chu kỳ (monocycle) và hoạt động của nó được mô tả trong hình 9 đối với một enzyme giả thuyết vốn biến đổi đồng hóa trị bằng cách phosphoryl-hóa. Quá trình biến đổi được bắt đầu khi enzyme biến hóa  $E_i$  ở dạng không hoạt động được hoạt hóa nhờ một chất cảm ứng dị lập thể đặc hiệu  $e_1$  thành dạng hoạt động  $E_a$ . Enzyme chưa bị biến đổi  $I_0$  sau đó bị phosphoryl hóa bởi  $E_a$  trong một phản ứng phụ thuộc ATP để biến thành enzyme bị biến đổi  $I_m$  và ADP. Quá trình này có tính thuận nghịch vì một enzyme biến hóa thứ hai  $R_a$  ở dạng hoạt động, vốn được hình thành nhờ sự hoạt hóa dạng không hoạt động  $R_i$  và chất hiệu ứng dị lập thể  $e_2$ , sẽ diphosphoryl hóa  $I_m$  để tạo lại  $I_0$  và  $P_i$ . Các hệ thống cascade đơn chu kỳ khác nhau có thể kết hợp với nhau để tạo ra các hệ thống bi-, tri-, và multicascade mà với độ nhạy cao đối với nồng độ của chất hiệu ứng có thể điều hòa một cách tinh vi dòng cơ chất và sản phẩm xuyên qua mạng lưới các con đường trao đổi chất.

Các hệ thống casade có khả năng điều hòa tốc độ phản ứng bằng nhiều cách: 1/ chúng cung cấp tín hiệu khuyếch đại, tức là chỉ một lượng nhỏ enzyme biến hóa ( $E_a$  hay  $R_a$ ) tạo ra được một lượng lớn enzyme biến đổi ( $I_m$ ) hoặc enzyme không biến đổi. 2/ Chúng có thể điều chỉnh mức độ tối đa mà  $I_m$  có thể đạt được với số lượng bão hòa của  $e_1$ . 3/ Chúng có thể điều chỉnh mức độ nhạy cảm của sự biến đổi đối với những thay đổi nồng độ của chất cảm ứng. 4/ Chúng được sử dụng như những hệ thống hợp nhất (integration systems) cảm nhận được những biến đổi rất nhỏ của nồng độ nội bào của các chất trao đổi và điều chỉnh nồng độ của  $I_0$  và  $I_m$  cho thích hợp. 5/ Chúng là những hệ thống linh hoạt có khả năng thực hiện các kiểu đáp ứng khác nhau đối với các kích thích thích dị lập thể. 6/ Chúng là bộ khuếch đại tốc độ đáp ứng ở mức mili-giây đối với những biến đổi của nồng độ các chất trao đổi trong tế bào.



và  $e_2$  với các enzyme biến hóa không hoạt động tương ứng  $E_i$  và  $R_i$ .  $E_a$  và  $R_a$  xúc tác các phản ứng phosphoryl-hóa và dephosphoryl hóa  $I_o$  và  $I_m$ .

Phosphoryl hóa các nhóm hydroxyl của serine, threonine hoặc tyrosine trong các enzyme xảy ra trong nhiều hệ thống cascade; hơn 20 enzyme được biết là những enzyme chịu phosphoryl hóa thuận nghịch bởi hệ thống tương tự như đã mô tả trong hình 9. Mỗi hệ thống này sử dụng ATP nhằm cung cấp năng lượng để duy trì lượng enzyme biến đổi tương hổ thích hợp vốn cần để điều hòa tốc độ phản ứng. Những quá trình rất khác nhau như sinh tổng hợp và phân giải glycogen, sinh tổng hợp cholesterol, chuyển hóa aminoacid đều được điều hòa theo kiểu này.

Một số hệ thống cascade được điều hòa bởi các kiểu biến đổi đồng hóa trị khác với phosphoryl-hóa. Ví dụ glutamine synthetase của *E. coli* hoạt động trong một hệ thống cascade kéo theo nucleotide hóa các enzyme hoặc các protein điều hòa chúng bằng phản ứng với ATP hoặc UTP.

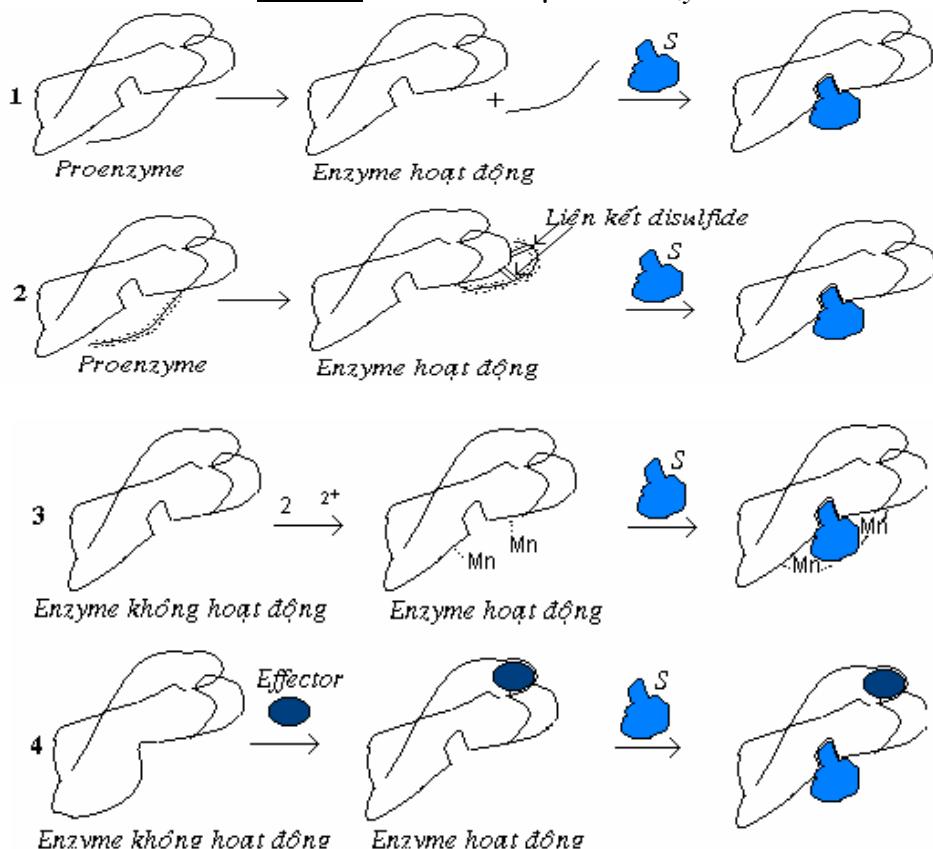
Hình 9. Sơ đồ hoạt động của hệ thống cascade đơn chu kỳ cho phép phosphoryl hóa enzyme không biến đổi  $I_o$  thành dạng phosphoryl-hóa  $I_m$  dưới ảnh hưởng của các enzyme biến hóa  $E_a$  và  $R_a$  vốn được hình thành nhờ tương tác với các chất cảm ứng  $e_1$  và  $e_2$

## IX. HOẠT HÓA ENZYME.

Nhiều enzyme để thể hiện hoạt tính của mình, cần phải có sự hỗ trợ của các yếu tố khác nhau, trong đó mỗi enzyme được hoạt hóa bằng một con đường nhất định. Bốn kiểu hoạt hóa khác nhau được mô tả trong hình 10.

Một số enzyme, ví dụ pepsinogen, trypsinogen ... được hoạt hóa bằng cách cắt bỏ một đoạn oligopeptide khỏi phân tử proenzyme (1);

Hình 4. Các kiểu hoạt hóa enzyme

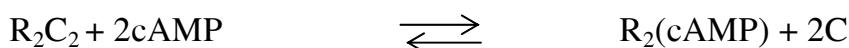


Hình 10. Các kiểu hoạt hóa enzyme

Một số enzyme khác được hoạt hóa bằng cách hình thành cầu disulfide, ví dụ ribonuclease (2), hoặc bằng cách tạo phức với ion kim loại (3). Kiểu hoạt hóa thứ tư đặc trưng cho các enzyme dị lập thể, được thực hiện bằng cách thay đổi cấu hình không gian của enzyme nhờ một effector dương tính đặc hiệu (4).

## X. TƯƠNG TÁC PROTEIN - PROTEIN.

Các enzyme dị lập thể thực hiện việc kiểm tra các phản ứng enzyme bằng cách tương tác phối hợp giữa các phần dưới đơn vị. Các enzyme khác, ví dụ proteinkinase tồn tại ở dạng không hoạt động do các tương tác protein - protein giữa các phần dưới đơn vị của chúng. Proteinkinase của cơ vân tồn tại ở dạng một holoenzyme không hoạt động với cấu trúc dưới đơn vị  $R_2C_2$ , trong đó R là phần dưới đơn vị điều hoà, còn C là phần dưới đơn vị xúc tác. Kinase là một enzyme biến hóa và được hoạt hóa bởi cAMP như sau:

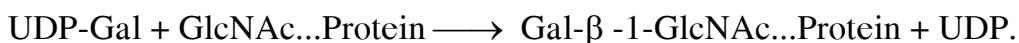


Sự kết hợp của cAMP với R đã giải phóng C để có thể xúc tác phản ứng phosphoroyl-hóa hàng loạt các enzyme trong các hệ thống cascade.

Một ví dụ khác của tương tác protein - protein trong điều hòa hoạt tính enzyme trường hợp đối với lactose synthetase - enzyme có nhiệm vụ tổng hợp lactose trong tuyến sữa của động vật có vú. Lactose synthetase xúc tác phản ứng:



Enzyme synthetase này cần enzyme UDP-galactose:N-acetylglucosamine galactosyl transferase vốn có mặt trong nhiều mô không phải tuyến sữa và tham gia vào việc tổng hợp các nhóm prosthetic có bản chất oligosaccharide của một số glycoprotein, ví dụ:

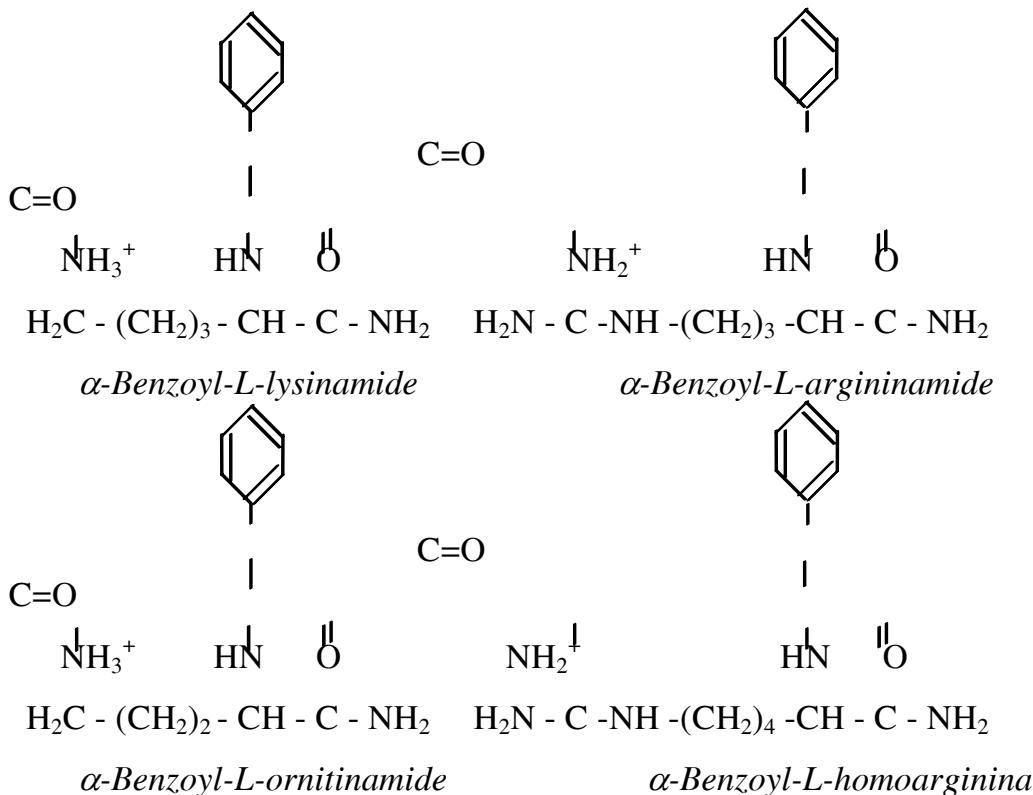


Trong tế bào tuyến sữa của động vật có vú galactosyl transferase liên kết trên màng tương tác với một protein hòa tan là  $\alpha$ -lactalbumin để tạo ra lactose synthase, enzyme xúc tác tổng hợp lactose. Trong tương tác  $\alpha$ -lactalbumin với galactosyl-transferase tính đặc hiệu cơ chất của transferase được biến đổi sao cho glucose trở thành chất nhận cơ chất. Glucose là một chất nhận rất yếu ( $K_m = 1 \rightarrow 2M$ ) đối với transferase này, song, khi có mặt  $\alpha$ -lactalbumin, nó trở thành một chất nhận rất tốt. ( $K_m = 10 \rightarrow 13M$ ).

## XI. TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA ENZYME ĐỐI VỚI CƠ CHẤT.

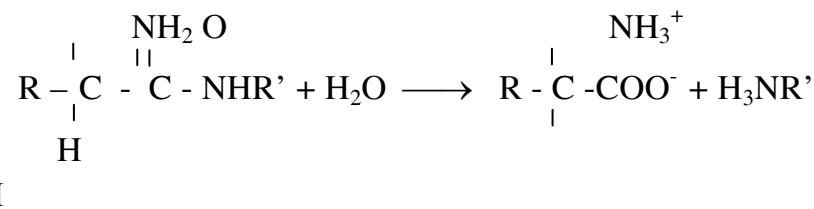
Enzyme khác một cách rõ rệt với các chất xúc tác hóa học khác ở tính đặc hiệu cơ chất và hiệu quả xúc tác. Phần lớn enzyme chỉ có một số ít các cơ chất tự nhiên để được biến hóa thành sản phẩm đơn giản với hiệu quả rất cao. Cấu trúc độc đáo của trung tâm hoạt động của enzyme quy định tính đặc hiệu này và không chỉ cho phép kết hợp một cách thuận lợi với cơ chất đặc hiệu mà còn loại trừ khả năng liên kết không thích hợp của nhiều chất không phải là cơ chất của enzyme. Mức độ đặc hiệu cao này được duy trì cùng với tốc độ phản ứng nhanh gấp  $10^6$  -  $10^{12}$  lần so với các phản ứng tự phát không xúc tác.

Nhiều enzyme có tính đặc hiệu tuyệt đối đối với một cơ chất duy nhất. Đó là trường hợp của suxinate dehydrogenase và fumarase. Các enzyme khác có tính đặc hiệu rộng hơn, ví dụ trypsin thủy phân tất cả các liên kết peptide, amide và ester hình thành với sự tham gia của lysine hoặc arginine. Mặc dù có thể thủy phân các kiểu liên kết khác nhau, trypsin có tính đặc hiệu một cách nghiêm ngặt với các nhóm R của lysine và arginine. Ví dụ, các dẫn xuất  $\alpha$ -N-benzoylamide của homoarginine và ornitine không phải là cơ chất, trong khi đó các dẫn xuất này của arginine và lysine lại bị thủy phân rất nhanh chóng thành  $\alpha$ -N-benzoylaminacid và  $\text{NH}_3^+$ . Sở dĩ như vậy là vì homoarginine chứa một nhóm  $-\text{CH}_2-$  nhiều hơn trong gốc R của nó so với arginine, còn ornitine lại chứa một nhóm  $-\text{CH}_2-$  ít hơn so với lysine.



Các nghiên cứu tinh thể cho thấy rằng tính đặc hiệu này gắn liền với phản ứng của nhóm cation của cơ chất với nhóm  $\text{COO}^-$  của acid aspartic tại trung tâm hoạt động. Sự đổi chỗ của nhóm cation do tăng hoặc giảm một nhóm  $-\text{CH}_2-$  đã ngăn cản sự liên kết của cơ chất và do đó không cho phép enzyme thực hiện phản ứng deamine-hóa.

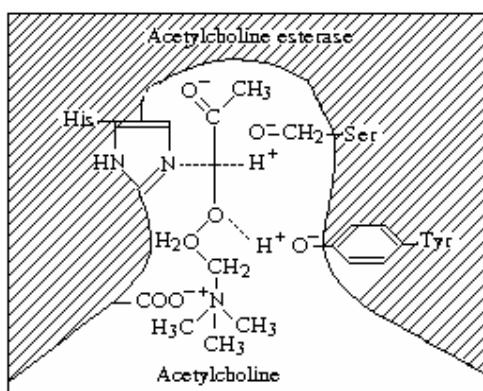
Các enzyme khác phản ứng với các hợp chất khác nhau và có tính đặc hiệu tương đối rộng. Leucine aminopeptidase là một ví dụ. Enzyme này thủy phân nhiều amide của  $\alpha$ -L-aminoacid và dipeptide với tốc độ khác nhau trong các phản ứng có dạng như sau:



trong đó R là gốc aminoacid còn R' là nguyên tử hydro (trong amide) hay một gốc aminoacid khác (trong dipeptide). Mỗi cơ chất cần có một nhóm amine không bị thay thế và một nguyên tử hydro tại carbon nằm cạnh liên kết amide hoặc peptide nhạy cảm. Gốc aminoacid NH<sub>2</sub>-tận cùng phải có cấu hình L, trừ glycine vốn cũng chỉ rất ít khi tham gia trong việc tạo ra cơ chất cho enzyme này.

Tính đặc hiệu của các enzyme nói trên cho thấy rằng kích thước, hình dạng và bản chất hóa học của các nhóm trên cơ chất xác định tốc độ mà cơ chất chịu sự tác động của enzyme. Những dữ kiện có được ngày nay cho phép nghĩ rằng trong việc hình thành sự kết hợp mang tính bổ sung giữa cơ chất với trung tâm hoạt động của enzyme có thể có sự tham gia của các tương tác kỵ nước, tĩnh điện cũng như liên kết hydro. Trong một số trường hợp các chất trung gian đồng hóa trị cũng có thể hình thành một cách tạm thời trong các phức hệ enzyme-cơ chất. Như vậy, tất cả các nhóm của cơ chất được lắp đặt một cách sít sao vào trung tâm hoạt động sao cho mỗi nhóm nằm một cách chính xác bên cạnh các nhóm bổ sung sao cho mỗi nhóm nằm một cách chính xác bên cạnh nhóm bổ sung trong trung tâm hoạt động. Mục đích chính của chúng ta là hiểu được bằng cách nào kiểu liên kết đặc hiệu như vậy cuối cùng dẫn đến sự biến đổi hóa học đi đôi với việc gắn cơ chất tại trung tâm hoạt động của enzyme. Tuy nhiên, trước khi xem xét những cơ chế này, cần phải tìm hiểu các cơ chế của việc thúc đẩy nhanh tốc độ của các phản ứng enzyme.

Có hai cơ sở cấu trúc quan trọng xác định tính đặc hiệu của enzyme đối với cơ chất. Đó là:



**Hình 11.** *Sự phù hợp về cấu trúc giữa enzyme và cơ chất*

1/ Cơ chất cần chứa kiểu liên kết hóa học đặc trưng mà enzyme có thể công phá;

2/ Bên cạnh yếu tố thứ nhất, cơ chất còn chứa một hoặc một số nhóm chức có khả năng kết hợp với enzyme bằng cách nào đó để định hướng cơ chất tại trung tâm hoạt động, tức trung tâm phản ứng, của enzyme. Ví dụ điển hình là trường hợp acetylcholine esterase phân giải liên kết ester giữa choline và gốc acetyl (hình 11). Khả năng của enzyme phân giải liên kết ester phụ thuộc cả vào sự tồn tại của các gốc serine, tyrosine và histidine vốn trực tiếp tham gia quá trình phản ứng, cũng như vào sự có mặt của nhóm  $\text{COO}^-$  để liên kết tĩnh điện với  $\text{N}^+$  của cơ chất.

## XII. CƠ CHẾ TĂNG TỐC ĐỘ CÁC PHẢN ỨNG HÓA HỌC NHỜ ENZYME.

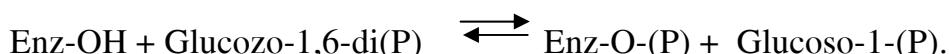
Enzyme làm giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng và bằng cách đó tăng tốc độ của phản ứng. Kiểu tăng tốc độ này cần được giải thích bằng lời lẽ của các phản ứng hóa học xảy ra khi cơ chất tương tác với enzyme. Các cơ chế này rõ ràng có quan hệ với những cơ chế xác định tính đặc hiệu cơ chất.

### 1. Tăng tốc độ phản ứng và tính đặc hiệu cơ chất.

Các kiểu phản ứng hóa học xảy ra trong quá trình xúc tác của enzyme cũng tương tự như trong các phản ứng hóa học hữu cơ. Tuy nhiên, khía cạnh đặc hiệu của tác dụng enzyme là tính đặc hiệu cơ chất và tính chất của nhiều enzyme cho thấy rằng năng lượng liên kết đặc hiệu của các tương tác nhiều thành phần vốn xảy ra giữa các nhóm bổ sung trong cơ chất và trong trung tâm hoạt động được sử dụng để cung cấp động lực cho xúc tác đóng góp một phần quan trọng trong việc giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng, và như vậy làm cho tốc độ của tất cả các phản ứng enzyme tăng lên đáng kể. Điều này được biểu thị ở nhiều enzyme, nhưng gây ấn tượng nhất là ở phosphoglucomutase xúc tác phản ứng thuận nghịch sau đây:



Phản ứng này chỉ xảy ra khi có mặt  $Mg^{2+}$  và glucoso-1,6-diphosphate; dạng trung gian enzyme phosphoryl-hóa được hình thành, trong đó nhóm phosphate trên gốc serine duy nhất của enzyme trao đổi với các cơ chất và với glucoso-1,6-diphosphate:

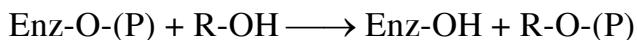


Bảng 6. *Tốc độ tương đối của phosphoryl-hóa một số chất bởi phosphoglucomutase.*

Cơ chất (ROH)	Tốc độ tương ứng đới*	Cơ chất (ROH)	Tốc độ tương ứng đới*
HOH	1		$2 \times 10^5$
	580		$4,4 \times 10^5$
	$1,7 \times 10^5$		$1,4 \times 10^6$
	$7 \times 10^4$		$4,4 \times 10^7$
	$3 \times 10^4$		$9 \times 10^5$
	$2 \times 10^9$		$3 \times 10^{10}$

\* Tốc độ phosphoroyl-hóa của nước được xem là bằng 1 để so sánh với tốc độ phospho-ryl hóa của các chất khác. Hằng số tốc độ bậc 1 của phản ứng phosphoroyl-hóa nước là  $3,2 \times 10^{-8} /s$  ở  $30^\circ C$  và pH 7,5.

Khi phản ứng lặp lại, một trong các ester phosphate của glucose có thể biến thành dạng kia. Enzyme phosphoryl-hóa bền trong môi trường nước, nhưng phản ứng với hàng loạt các chất có cấu trúc chung R-OH theo phản ứng



So sánh tốc độ phosphoroyl-hóa các cơ chất khác nhau trong bảng 6 cho phép phát hiện mối quan hệ lý thú giữa sự liên kết cơ chất và hiệu quả xúc tác. Chuyển nhóm phosphate của enzyme cho nước (thủy phân enzyme phosphate) xảy ra rất chậm, với tốc độ chỉ khoảng 60 lần phản ứng thủy phân enzyme serine phosphate khi không có enzyme xúc tác. Ngược lại, phosphite và xyloso-1-phosphate mà cả hai đều không phải là cơ chất lại tăng tốc độ vận chuyển phosphate cho nước tương ứng  $580$  và  $1,7 \times 10^5$  lần. Điều này cho thấy rằng khả năng phản ứng của nhóm phosphoryl của enzyme được nâng lên đáng kể bởi các chất mà về mặt cấu trúc tương tự với cơ chất và có thể gắn tại trung tâm hoạt động; phosphite gắn tại trung tâm dành cho phosphate, còn xylose tại trung tâm dành cho đường. Qua bảng 6 ta có thể thấy xylose được phosphoroyl-hóa bởi phosphoryl-enzyme nhanh hơn  $7 \times 10^4$  lần so với phosphoryl-hóa nước, còn khi có mặt phosphite nó được phosphoroyl-hóa thành xyloso-1-phosphate nhanh hơn phosphoryl-hóa nước

đến  $2 \times 10^9$  lần và nhanh hơn phosphorribosyl-hóá cơ chất tự nhiên là glucoso-1-phosphate 15 lần. Cuối cùng, một số monophosphodiol mạch thẳng, trong đó có nhóm hydroxyl ở cách nhóm phosphoryl 4 nguyên tử carbon cũng hoàn toàn có thể bị phosphorribosyl-hóá bởi enzyme này với tốc độ khoảng  $10^5$  -  $10^7$  lần nhanh hơn phosphorribosyl-hóá nước. Như vậy, việc liên kết tại trung tâm phosphate và trung tâm đường bởi các hợp chất với cấu trúc thích hợp dẫn đến giảm đáng kể năng lượng hoạt hóa của các phản ứng phosphorribosyl-hóá bởi phospho-glucomutase. Các số liệu trong bảng 6 hoàn toàn ủng hộ quan điểm cho rằng các lực mạnh liên quan với sự kết hợp của cơ chất với trung tâm hoạt động cũng được lôi cuốn vào các biến cố hóa học dẫn đến nâng cao đáng kể tốc độ biến hóa của cơ chất.

Với khái niệm này chúng ta có thể xem xét các kiểu cơ chế tham gia vào việc đẩy nhanh tốc độ của các phản ứng enzyme và phụ thuộc vào năng lượng liên kết của cơ chất với enzyme.

## **2. Sự phù hợp cảm ứng và xúc tác enzyme.**

Người ta cho rằng nhiều enzyme khi không có mặt cơ chất tồn tại ở dạng không hoạt động và không phải tất cả các nhóm trong trung tâm hoạt động đều định hướng đúng trong không gian để tương tác với các nhóm bổ sung của cơ chất. Tuy nhiên, sự kết hợp của cơ chất đặc hiệu sẽ dẫn đến sự biến đổi hình dạng trong enzyme, trong đó các nhóm của trung tâm hoạt động xê dịch đến các vị trí cần thiết để sự xúc tác có thể được thực hiện.

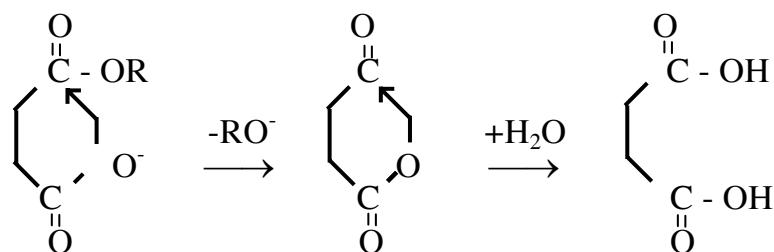
Những biến đổi hình dạng được cảm ứng bởi cơ chất như vậy được gọi là sự phù hợp cảm ứng của tác dụng enzyme. Nó đã được minh họa trong hình 1.6. Nhiều dẫn chứng về hiệu ứng này đã được ghi nhận khi so sánh cấu trúc enzyme bằng phương pháp so sánh cấu trúc tinh thể bằng tia X trong các trường hợp có mặt và vắng mặt chất ức chế, ví dụ đối với carboxypeptidase A và lysozyme.Thêm vào đó, tính chất của enzyme trong dung dịch cũng cho thấy những khác biệt về hình dạng khi có mặt và vắng mặt cơ chất. Ví dụ, một số enzyme mất khả năng phản ứng với kháng thể đặc hiệu của chúng khi có mặt cơ chất, còn một số enzyme khác thì cho thấy sự khác biệt về hằng số lắng. Nói chung, người ta công nhận rằng sự phù hợp cảm ứng có thể làm thay đổi tốc độ của một số phản ứng enzyme nhưng trên quy mô tăng tốc toàn bộ thì có mức độ thấp hơn các cơ chế khác.

## **3. Cơ chế tiếp cận.**

Con đường rõ nhất để enzyme nâng cao tốc độ của một phản ứng hai phân tử (bimolecular reaction) là kéo hai chất phản ứng lại gần nhau trong trung tâm hoạt động. Các phân tử phản ứng được định hướng một cách đúng đắn và được tiếp cận với nhau làm cho nồng độ hiệu lực trở nên lớn hơn nhiều so với trong dung dịch loảng. Do các lực liên kết mạnh và đa dạng

giữa cơ chất và cấu trúc của trung tâm hoạt động, enzyme có thể làm tăng khả năng để hai cơ chất có thể đến với nhau để thực hiện phản ứng và biến một cách có hiệu quả phản ứng hai phân tử thành phản ứng một phân tử (nội phân tử). Hiệu ứng này có nhiều tên gọi khác nhau nhưng đều với ý nghĩa là sự tiếp cận.

Hiệu ứng tiếp cận có thể được minh họa một cách rõ rệt nhất bằng mô hình phản ứng nội phân tử và hiệu ứng của cấu trúc lên tốc độ. Bảng 7 giới thiệu cấu trúc của một số ester p-bromophenyl của succinate và glutarate và tốc độ tương đối của các phản ứng thủy phân chúng so với tốc độ của phản ứng hai phân tử thủy phân p-bromophenylacetate với sự xúc tác của acetate. Mỗi chất bị thủy phân bằng tấn công nucleophil nội phân tử của nhóm carbonyl bên cạnh theo phương trình phản ứng tổng quát sau đây.



Những ester có cấu trúc cứng hơn tăng khả năng để nhóm carboxyl tấn công được định hướng một cách thích hợp và tiếp cận hơn với liên kết ester và vì vậy chúng bị phân hủy nhanh hơn những ester có khả năng quay tự do hơn và cấu trúc ít cứng hơn.

Nhiều hợp chất loại này có các góc liên kết căng thẳng và có thể xem chúng giống như những lò xo mà mức độ căng thẳng của chúng có thể làm giảm một phần khi chúng tham gia trạng thái chuyển tiếp. Từ các dẫn liệu về tốc độ này có thể xác định được rằng nồng độ Hiệu lực của các nhóm carboxyl xung quanh các nhóm ester có thể cao đến  $10^5$  -  $10^8$  M. Đó là nồng độ không thể có về mặt vật lý, song nó cho phép minh họa tính ưu việt của phản ứng nội phân tử đối với phản ứng giữa các phân tử và cho thấy việc mang các chất phản ứng lại gần nhau tại trung tâm hoạt động cho phép tăng tốc độ phản ứng nhanh đến mức nào.

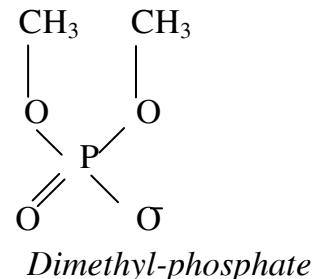
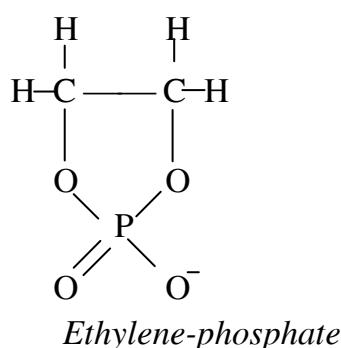
Bảng 7. Cấu trúc và tốc độ tương đối ( $V_r$ ) của các phản ứng thủy phân các ester monophenyl của các ion acid dicarboxylic.

Cấu trúc *	$V_T$	Cấu trúc *	$V_T$
$H_3COO^-$	1,0		
	$\sim 1 \times 10^3$		$\sim 1 \times 10^7$
$R' \begin{array}{c}   \\ \diagdown \quad \diagup \\   \\ R' \end{array} \begin{array}{c}   \\ \diagup \quad \diagdown \\   \\ COO- \end{array}$	$3 \times 10^3 \#$ $1,3 \times 10^6$		$\sim 5 \times 10^7$
	$\sim 2,2 \times 10^5$		

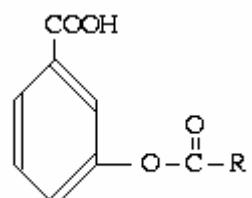
\*  $R = p-Br-C_6H_4-$ ; # tốc độ phụ thuộc vào bán kính của  $R$

#### 4. Gây mất ổn định (Destabilization).

Một giả thuyết tương đối cũ về xúc tác enzyme cho thấy rằng sự liên kết của trung tâm hoạt động làm cho các liên kết bị căng, biến dạng hoặc mất ổn định nên dễ bị đứt khi hình thành một sản phẩm hoặc phức hệ trung gian mà trong đó các liên kết bị tác động trở nên kém bền vững hơn so với trong chất phản ứng ban đầu. Ví dụ minh họa cho giả thuyết này là phản ứng do base xúc tác khi thủy phân ethylene-phosphate xảy ra nhanh gấp  $10^7$  lần so với khi thủy phân dimethyl-phosphate.



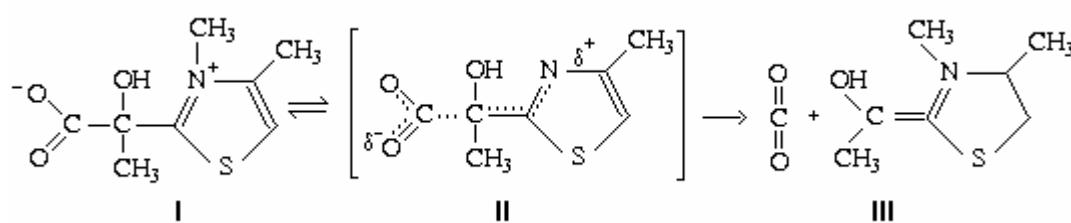
Giả thuyết về tính căng này có vẻ là một cách giải thích hấp dẫn đối với xúc tác enzyme. Một trong những ví dụ thiết thực là tính chất của esterase của gan. Để thủy phân một loạt các ester của acid *m*-hydroxy-benzoic,  $K_m$  hầu như không phụ thuộc vào chiều dài của chuỗi  $R$ , trong khi đó  $V_{max}$  tăng lên một số bậc khi chiều dài của chuỗi tăng. Vì liên kết chịu sự thủy phân là như nhau trong mỗi trường hợp, nên có thể suy ra rằng tăng năng lượng liên kết của các ester mạch dài làm giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng, tức là năng lượng của liên kết chặt hơn của gốc



Ester của acid *m*-hydroxybenzoic

hydrocarbon được bù đắp bởi sức căng được cảm ứng trong phần chứa nhómacyl của phân tử.

Sự gây mất ổn định cơ chất cũng có thể xảy ra khi các cơ chất tích điện ở dạng hòa tan, tức khi kết hợp với trung tâm hoạt động, những cơ chất này có thể được chuyển từ môi trường nước vào môi trường tương đối kỵ nước trong trung tâm hoạt động, nhờ đó cho phép có sự gia tốc lớn. Mô hình phản ứng dùng để minh họa hiệu ứng này là phản ứng decarboxyl-hóa một dẫn xuất của pyruvate và một đồng dạng của thiaminepyrophosphate xảy ra như sau:



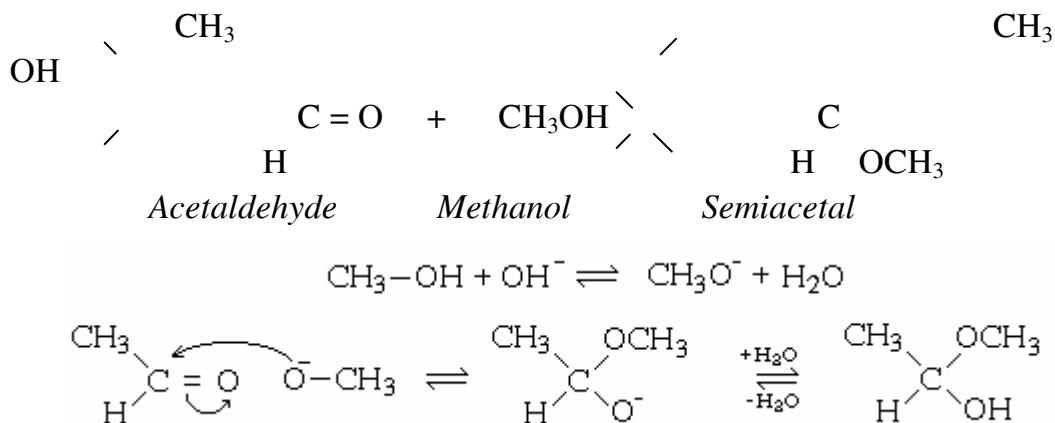
Dẫn xuất này (I) tương đối ổn định trong nước và phản ứng decarboxyl-hóa xảy ra chậm, nhưng trong ethanol nó bị decarboxyl-hóa  $10^4$ - $10^5$  lần nhanh hơn để tạo ra CO<sub>2</sub> và dẫn xuất III.

Người ta cho ra cho rằng tốc độ decarboxyl-hóa tăng lên là do ở trạng thái trung gian giả định (II) điện tích khu vực bị giảm so với trong dân xuất I. Đây là một dân chứng cho thấy rằng kiểu nâng tốc độ này có thể xảy ra đối với pyruvate decarboxylase mà cofactor là thiamine pyrophosphate vì cofactor này có thể nằm tại khu vực có tính kỳ nước tương đối của enzyme.

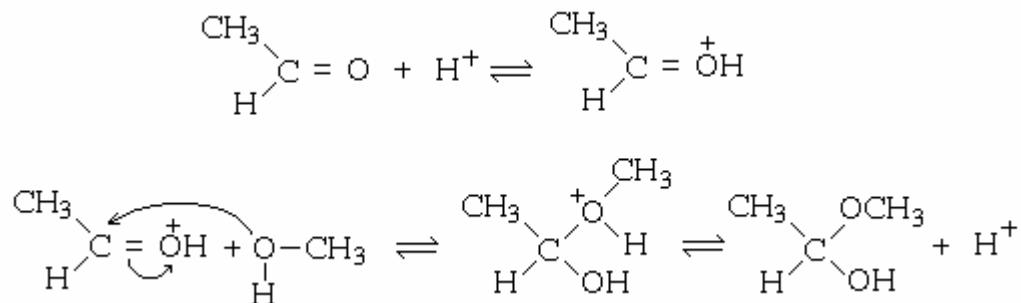
## 5. Xúc tác acid-base phối hợp.

Có nhiều phản ứng xúc tác bằng acid hoặc bằng base trong hóa hữu cơ, ví dụ sự hình thành semiacetal được xúc tác bởi acid hoặc base.

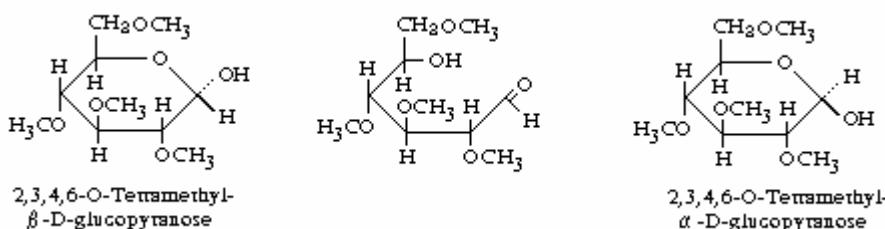
Base OH<sup>-</sup> thúc đẩy sự hình thành semiacetal như sau:



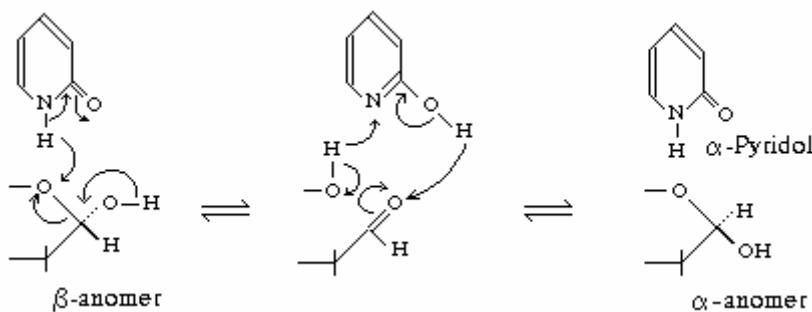
Xúc tác bằng acid dẫn đến hình thành muối oxonium để sau đó tiếp tục phản ứng với alcohol:



Những dẫn chứng có được hiện nay cho phép giả thiết rằng nhiều nhóm trong trung tâm hoạt động của enzyme có thể thực hiện xúc tác theo kiểu acid hay base đối với các nhóm khác nhau trong cơ chất và bằng cách đó tham gia đẩy nhanh tốc độ phản ứng. Xúc tác phối hợp acid-base đặc biệt có hiệu quả và một ví dụ minh họa là phản ứng chuyển quay của tetramethyl-glucose xảy ra như sau:



Acid và base đều xúc tác cho sự chuyển quay. Chẳng hạn, khi một trong hai dạng anomer hòa tan trong benzen và thêm vào hỗn hợp của phenol và pyridine thì quá trình chuyển quay xảy ra rất nhanh. Động học của sự chuyển quay cho thấy rằng tốc độ phụ thuộc vào nồng độ của phenol và pyridine cũng như của tetramethylglucose. Điều đó cho phép giả thiết rằng phenol và pyridine hoạt động như các chất xúc tác acid và base một cách đồng thời. Hơn thế nữa, nếu các nhóm chức năng của phenol và pyridine cùng nằm trong một phân tử duy nhất, ví dụ như trong  $\alpha$ -pyridon ( $\alpha$ -hydroxypyridine) thì sẽ có được một chất xúc tác có hiệu quả cao hơn nhiều, mặc dù thậm chí các nhóm xúc tác trong  $\alpha$ -pyridon là những acid và base yếu hơn nhiều so với phenol và pyridine. Người ta cho rằng  $\alpha$ -pyridon thể hiện tác dụng xúc tác như sau:



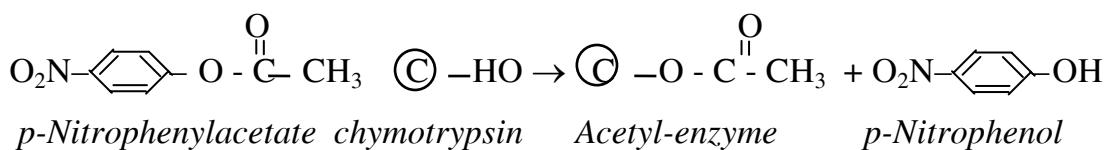
Như vậy, hydro trên nitơ của pyridine (một acid) cho proton, còn oxy của nhóm carbonyl (một base) nhận proton khi vòng pyranose của  $\beta$ -anomer bị mở.

Nitơ của pyridine nhận proton từ sản phẩm trung gian có cấu trúc mở, trong khi đó nhóm hydroxyl phenol cho proton khi vòng đóng lại để tạo ra dạng  $\alpha$ -anomer.

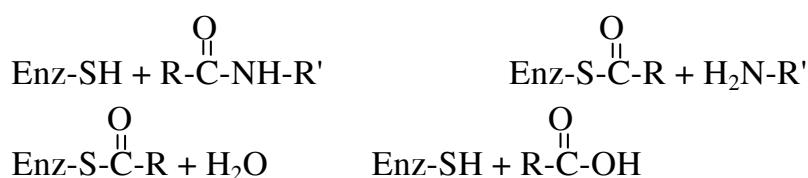
Kiểu xúc tác acid-base phối hợp này xảy ra trong các cơ chế xúc tác của một số enzyme, trong đó có ribonuclease. Rất ít có khả năng là kiểu xúc tác này làm tăng tốc độ phản ứng cao hơn bậc 10 hoặc bậc 100, nhưng cùng với các cơ chế khác nó đóng góp vào việc nâng cao tốc độ của các phản ứng enzyme.

Nhiều gốc R của aminoacid hoạt động như kiểu xúc tác phối hợp acid-base trong enzyme, bao gồm các gốc acid glutamic, acid aspartic, histidine, lysine, tyrosine và cysteine. Ở dạng proton-hóa chúng là những chất xúc tác acid, còn ở dạng không proton-hóa chúng là những chất xúc tác base. Rõ ràng là hiệu quả của các gốc R trong việc xúc tác sẽ phụ thuộc vào pK của mỗi nhóm chức năng và pH mà tại đó xảy ra phản ứng enzyme.

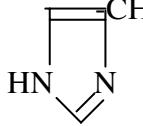
Bảng 8 giới thiệu một số enzyme mà trong quá trình xúc tác tạo ra các phức hệ enzyme-cơ chất trung gian liên kết đồng hóa trị Thông thường những chất trung gian này hoàn toàn có thể được xác định. Ví dụ, phức hệ acetyl-chymotrypsin hình thành trong quá trình thủy phân *p*-nitrophenylacetate bằng chymotrypsin là một chất bền với pH acid và đã được thu nhận ở dạng chế phẩm.



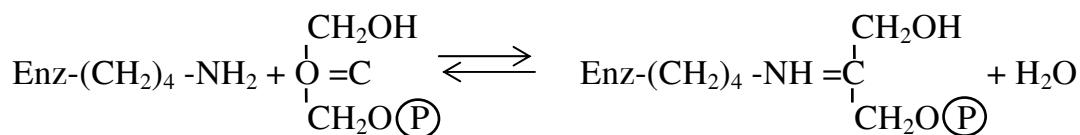
Các nhóm thiol của cystein trong các enzyme thủy phân protein papain và ficin cũng tham gia tạo các chất trung gian đồng hóa trị với cơ chất. Thioester gắn với enzyme được hình thành cùng với nhóm carboxyl của liên kết peptide như sau:



Bảng 8. Một số enzyme mà trong cơ chế xúc tác có sự hình thành sản phẩm trung gian enzyme-cơ chất liên kết đồng hóa tri.

Loại enzyme	Nhóm phản ứng	Kiểu sp. trung gian đồng hóa trị
Chymotrypsin, trypsin, subtilisin, elastase, thrombin, plasmin, acetylcholin esterase	HO-CH <sub>2</sub> -CH Serine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \text{Acyl ester} \end{array}$
Phosphoglucomutase, phosphatase kiềm	HO-CH <sub>2</sub> -CH Serine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \backslash \\ \text{O}^- \\ \text{Phosphoryl ester} \end{array}$
Papain, ficin, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	HS-CH <sub>2</sub> -CH Cystein	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \text{Acyl thioester} \end{array}$
Suxinic thiokinase, glucoso-6-phosphatase	 Histidine	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \mid \\ -\text{O}-\text{P}-\text{N} \\ \backslash \\ \text{O}^- \\ \text{Phosphoimidasole} \end{array}$
Aldolase, transaldolase, pyridoxalphosphate enzyme	NH <sub>2</sub> -[CH <sub>2</sub> ] <sub>4</sub> -CH Lysine	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\   \\ \text{R}-\text{C}=\text{N}-[\text{CH}_2]_4-\text{CH} \\ \backslash \\ \text{Base Schiff} \end{array}$

Một dạng liên kết đồng hóa trị khác giữa enzyme và cơ chất là trường hợp hình thành base schiff (aldimine) giữa các hợp chất carbonyl với nhóm  $\epsilon$ -amine của lysine trong một số enzyme. Ví dụ, khi dihydroxyacetone phosphate được ủ với aldolase mà không có mặt glyceraldehyde-3-phosphate thì phản ứng sau đây sẽ xảy ra:



Tính ưu việt chủ yếu của sự hình thành các chất trung gian đồng hóa tri enzyme-cơ chất là ở chỗ chúng làm tăng xác suất để một phản ứng xác

định có thể được thực hiện. Một chất trung gian liên kết đồng hóa trị với enzyme buộc cơ chất bị giam hãm chặt chẽ bên trong trung tâm hoạt động và có thể được đặt vào tư thế thuận lợi hơn cho phản ứng kế tiếp với các nhóm thích hợp tại trung tâm để hoàn thành phản ứng. Mức độ thúc đẩy tốc độ bằng cách tạo ra các chất trung gian đồng hóa trị có thể khá lớn, ví dụ đối với aldolase, song trong các trường hợp khác nó có thể không lớn hơn mức  $10^2$  -  $10^3$ .

### XIII. ISOENZYME

Nhiều enzyme trong cùng một cơ thể, thậm chí trong cùng một tế bào, tồn tại ở nhiều dạng phân tử khác nhau. Những dạng phân tử đó của cùng một enzyme được gọi là *isoenzyme*. Chúng thường được tách khỏi nhau một cách dễ dàng bằng phương pháp điện di.

Ví dụ lactate dehydrogenase trong các mô của chuột bạch có 5 dạng isoenzyme mà ngày nay đã tách được ở dạng tinh khiết. Chúng đều xúc tác cho một phản ứng như nhau, song giá trị  $K_m$  của chúng rất khác nhau. Cả 5 dạng này đều có trọng lượng phân tử vào khoảng 134.000 và chứa 4 chuỗi polypeptide (trọng lượng phân tử của một chuỗi là 33.500).

5 isoenzyme là 5 kiểu phối hợp khác nhau của hai loại chuỗi polypeptide – chuỗi M và chuỗi H. Một isoenzyme chiếm ưu thế trong cơ được cấu tạo từ 4 chuỗi M giống hệt nhau (ký hiệu là  $M_4$ ). Isoenzyme thứ hai chiếm ưu thế trong tim, ký hiệu là  $H_4$ , được hình thành từ 4 chuỗi H. Ba isoenzyme còn lại, ký hiệu là  $M_3H$ ,  $M_2H_2$  và  $MH_3$ . Người ta đã tách riêng được các chuỗi M và H. Ở trạng thái này chúng không còn khả năng xúc tác. Hai loại chuỗi có thành phần và trật tự aminoacid khác nhau. Khi trộn trong ống nghiệm hai loại chuỗi với tỉ lệ tương ứng các kiểu isoenzyme khác nhau sẽ tự động xuất hiện.

Sự tổng hợp các chuỗi M và H được mã hóa bởi hai gen khác nhau. Như vậy, tỉ lệ tương đối của chúng trong mỗi loại isoenzyme được kiểm tra ở mức độ gen và có thể biến đổi trong quá trình phát triển của phôi.

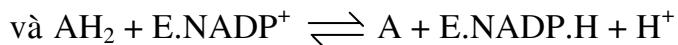
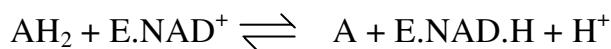
Việc nghiên cứu isoenzyme có ý nghĩa rất quan trọng đối với việc tìm hiểu cơ sở phân tử của sự phân hóa tế bào và phát sinh cơ quan. Người ta cho rằng không những enzyme mà nhiều loại protein cũng tồn tại trong tế bào ở các dạng khác nhau, phân biệt nhau bởi tỉ lệ giữa các chuỗi polypeptide vốn được mã hóa bởi các gen khác nhau.

## XIV. CÁC NHÓM ENZYME

### 1. Enzyme oxy hóa - khử.

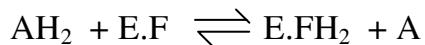
Trong các phản ứng oxy-hóa - khử sinh học điện tử từ cơ chất được vận chuyển đến oxy không khí theo từng bước trên cơ sở giảm dần thế khử tiêu chuẩn. Mỗi enzyme oxy hóa - khử hoạt động nhờ sự phối hợp của một nhóm chức năng gọi là cofactor hoặc coenzyme.

Mặc dù có hàng trăm loại enzyme oxy hóa - khử khác nhau tham gia trong các quá trình oxy-hóa sinh học, song chỉ có một số rất ít các cofactor hoặc coenzyme làm nhiệm vụ nhận hoặc nhường điện tử giữa cơ chất và sản phẩm. Ví dụ, người ta đã phát hiện được trên 250 enzyme đều sử dụng các coenzyme nicotinamide nucleotide ( $\text{NAD}^+$  hoặc  $\text{NADP}^+$ ) làm chất nhận điện tử. Chúng xúc tác cho các phản ứng có dạng dưới đây:

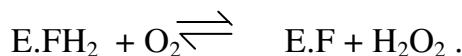


Thế khử của cơ chất ( $\text{AH}_2$ ) được chuyển cho  $\text{NAD.H}$  (hoặc  $\text{NADP.H}$ ) để sau đó sẽ tham gia trong các quá trình oxy hóa - khử khác.

Một số dehydrogenase khác sử dụng các flavine nucleotide (F) làm coenzyme và xúc tác các phản ứng có dạng tổng quát sau đây:



Enzyme ở dạng khử ( $\text{E.FH}_2$ ) có thể vận chuyển điện tử và proton của nó cho các chất khác (ví dụ trong quá trình phosphoryl hóa oxy-hóa) hoặc cho  $\text{O}_2$  để tạo ra  $\text{H}_2\text{O}_2$ :

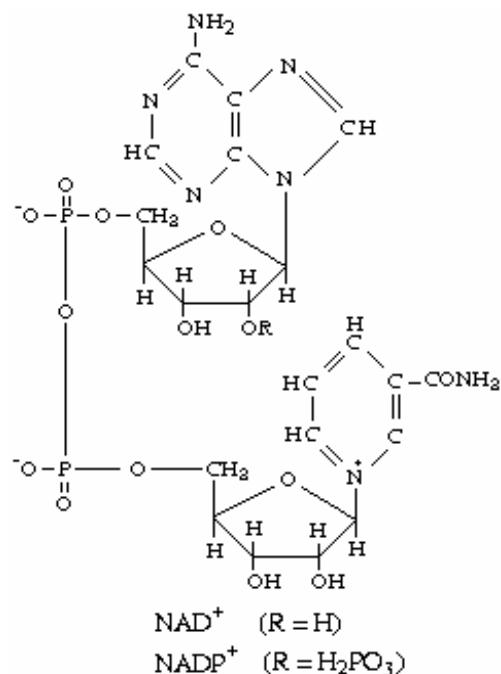


Xúc tác cho các phản ứng loại này là các enzyme thuộc nhóm oxydase. Cofactor của các enzyme loại này có thể là các ion kim loại như  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  hoặc các hợp chất hữu cơ tương đối phức tạp mà chúng ta sẽ xét đến sau.

Các enzyme oxy hóa - khử của chuỗi vận chuyển điện tử trong ty thể và trong lục lạp cũng có cofactor là kim loại ( $\text{Fe}$ ,  $\text{Cu}$ ,  $\text{Mo}$ ...), heme hoặc các hợp chất hữu cơ chứa sắt và lưu huỳnh.

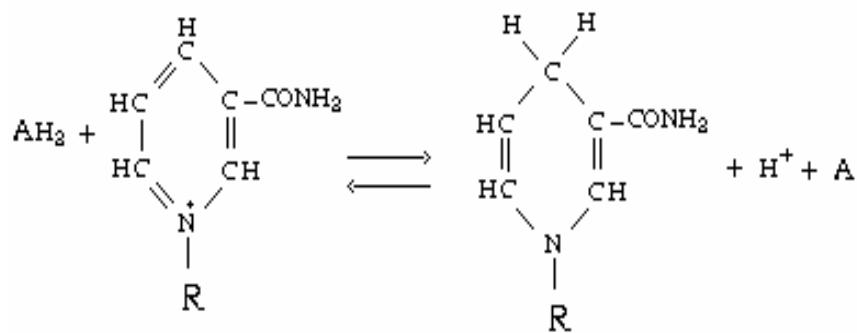
Thông thường chỉ có một nhóm chức năng của một enzyme oxy hóa - khử kết hợp với một chuỗi polypeptide để tạo ra một đơn vị hoạt động. Tuy nhiên, nhiều enzyme chứa một tập hợp các nhóm chức năng, bao gồm flavin nucleotide, các nhóm chứa sắt và lưu huỳnh, các nhóm heme và cả kim loại để tạo nên một chuỗi vận chuyển điện tử với chiều dài và mức độ phức tạp khác nhau để đáp ứng các nhu cầu đặc biệt của trao đổi chất.

a/ *Dehydrogenase phụ thuộc pyridine*. Dehydrogenase phụ thuộc pyridine là nhóm enzyme oxy hóa - khử mà coenzyme là một trong các dẫn xuất của pyridine. hai coenzyme phổ biến nhất của nhóm dehydrogenase này là nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) và nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). Công thức cấu tạo của chúng được giới thiệu trong hình 12.



Hình 12. Công thức cấu tạo của  $\text{NAD}^+$  và  $\text{NADP}^+$

Nhóm dehydrogenase này làm nhiệm vụ vận chuyển thuận nghịch từng đôi đương lượng khử (đôi điện tử hoặc đôi điện tử cùng với đôi proton) từ cơ chất  $\text{AH}_2$  đến dạng oxy hóa của coenzyme ( $\text{NAD}^+$  hay  $\text{NADP}^+$ ). Một trong hai đương lượng đó ở dạng hydro nằm trong pyridine nucleotide khử ( $\text{NAD.H}$  hay  $\text{NADP.H}$ ), còn đương lượng kia - ở dạng điện tử. Nguyên tử hydro thứ hai sau khi tách khỏi cơ chất được chuyển vào môi trường ở dạng ion  $\text{H}^+$  tự do (hình 13).



NAD<sup>+</sup> (hay NADP<sup>+</sup>)                    NADH (hay NADP.H)

Hình 13. Phản ứng dehydrogenase phụ thuộc pyridine.

Những dehydrogenase liên quan với NAD chủ yếu tham gia quá trình hô hấp tức quá trình vận chuyển điện tử từ cơ chất đến oxy. Trong khi đó, các enzyme liên quan với NADP chủ yếu tham gia vận chuyển điện tử từ cơ chất tham gia phản ứng dị hóa đến các phản ứng khử của quá trình sinh tổng hợp. Vì vậy, phần lớn NAD được phát hiện trong ty thể, còn đa số NADP thì nằm trong phần hòa tan của tế bào chất.

Đa số dehydrogenase phụ thuộc pyridine chỉ đặc hiệu với NAD hay chỉ đặc hiệu với NADP. Tuy nhiên có một số dehydrogenase (ví dụ glutamate dehydrogenase) có thể sử dụng cả hai coenzyme này. Trong bảng 9 giới thiệu một số dehydrogenase phụ thuộc pyridine và giá trị E<sup>o</sup> của đôi cơ chất chịu tác dụng của chúng.

Chiều hướng của phản ứng và thành phần cân bằng của hệ thống oxy hóa - khử do nhóm enzyme phụ thuộc pyridine xúc tác có thể dự đoán trên cơ sở thế khử tiêu chuẩn của đôi NADH-NAD<sup>+</sup> (hay NADP.H-NADP<sup>+</sup>) mà E<sub>o</sub>' của chúng bằng -0,32V.

Nếu quá trình oxy hóa - khử được thực hiện trong điều kiện tiêu chuẩn thì hệ thống có giá trị âm của thế khử tiêu chuẩn cao hơn so với NAD và NADP, sẽ có xu hướng nhường điện tử cho dạng oxy-hóa của những coenzyme này, còn những hệ thống có giá trị dương của thế khử tiêu chuẩn lớn hơn sẽ có xu hướng nhận điện tử từ NADH hay NADPH.

Bảng 9. Thể khử tiêu chuẩn của một số hệ thống dehydro-genase phụ thuộc pyridin.

Hệ thống	$E_o'$ của đôi cơ chất, (V)
<i>Phụ thuộc NAD</i>	
Isocitrate dehydrogenase	- 0,38
D-β-oxybutyrate dehydrogenase	- 0,32
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	- 0,29
Dihydrolipoil dehydrogenase	- 0,24
Alcohol dehydrogenase	- 0,20
Lactate dehydrogenase	- 0,19
L-malate dehydrogenase	- 0,17
<i>Phụ thuộc NADP</i>	
Isocitrate dehydrogenase	- 0,38
Glucoso-6-phosphate dehydrogenase	- 0,32
<i>Phụ thuộc NAD hoặc NADP</i>	
L-glutamate dehydrogenase	- 0,14

Nhiều enzyme thuộc nhóm dehydrogenase phụ thuộc pyridine thường tồn tại ở một số dạng isoenzyme khác nhau, trong đó các cấu trúc dưới đơn vị phối hợp theo các tỷ lệ khác nhau. Ví dụ điển hình là trường hợp của lactate dehydrogenase. Enzyme này chứa hai loại phần dưới đơn vị ký hiệu là H và M. Trong tế bào đã phát hiện 5 loại isoenzyme với 5 kiểu phối hợp khác nhau giữa hai loại phần dưới đơn vị này. Do có cấu trúc dưới đơn vị khác nhau, nên mỗi dạng isoenzyme cũng phân biệt nhau bởi các giá trị  $K_m$  và  $V_{max}$  đặc trưng trong quan hệ với mỗi loại cơ chất và đóng các vai trò khác nhau trong quá trình trao đổi chất.

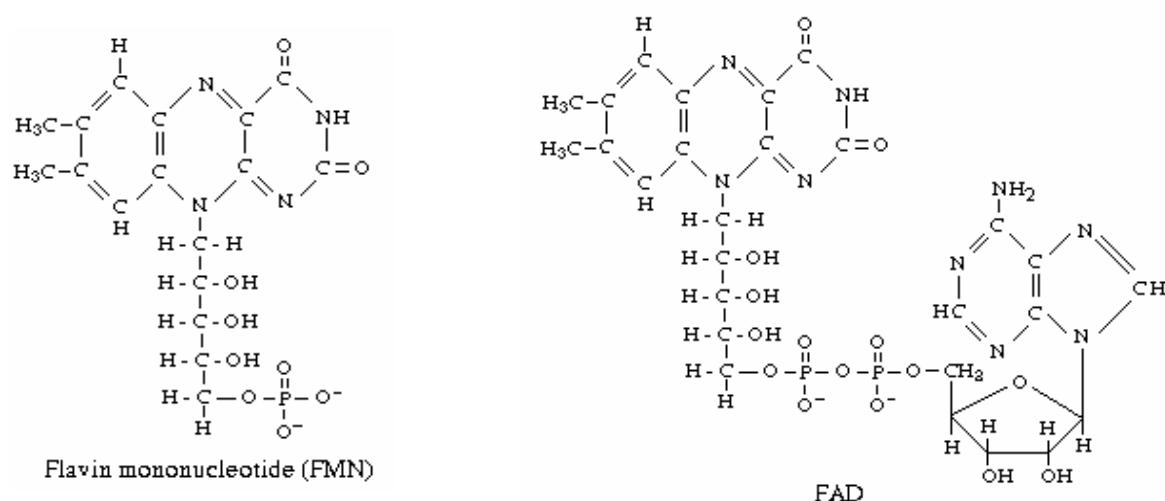
NAD không chỉ đóng vai trò như một coenzyme trong các phản ứng oxy hóa - khử mà còn có thể tham gia trao đổi chất tế bào với các chức năng khác. Ví dụ, nó là một yếu tố không thể thiếu được trong phản ứng do ADN ligase của E. coli xúc tác. Trong phản ứng này NAD bị phân hủy thành AMP và nicotinamide mononucleotide (NMN) để cung cấp năng lượng cho sự hình thành liên kết phosphodiester giữa hai đoạn polydeoxyribonucleotide mà ADN ligase có nhiệm vụ phải nối lại.

#### b/ Dehydrogenase phụ thuộc flavin.

Dehydrogenase phụ thuộc flavin (hay còn gọi là flavoprotein) là những enzyme mà coenzyme là riboflavin-5'-phosphate (flavin mononucleotide, FMN) hoặc flavin adenine dinucleotide (FAD) mà cấu trúc của chúng được giới thiệu trong hình 14. Sự kết hợp của coenzyme với apoenzyme trong các

enzyme khác nhau được thực hiện bằng các kiểu liên kết khác nhau - liên kết đồng hóa trị hoặc liên kết không đồng hóa trị. Tuy nhiên, ngay trong các trường hợp liên kết không đồng hóa trị thì sự kết hợp giữa coenzyme và apoenzyme vẫn luôn luôn chặt chẽ hơn so với các enzyme phụ thuộc pyridine. Ngoài ra, các enzyme flavine còn có thể chứa một hoặc vài ion kim loại, phức hệ sắt-lưu huỳnh hoặc heme để gây nên những biến đổi đáng kể trong hoạt tính xúc tác của chúng.

Thuộc nhóm flavoprotein quan trọng nhất là những enzyme sau đây:



Hình 14. Công thức cấu tạo của FMN và của FAD.

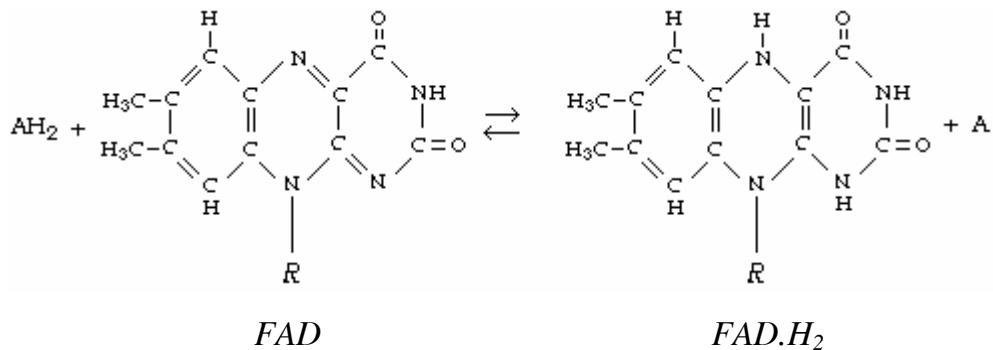
- *NAD.H dehydrogenase*: xúc tác sự vận chuyển điện tử từ NAD.H đến một chất nhận nào đó chưa được xác định, có thể là một protein chứa sắt nào đó trong chuỗi hô hấp.

- *Succinate dehydrogenase*: xúc tác phản ứng oxy-hóa acid suxinic thành acid fumaric.

- *Dihydrolipoyl dehydrogenase* của hệ thống pyruvate dehydro-genase và  $\alpha$ -cetoglutarate dehydrogenase.

- Các *flavoprotein* xúc tác giai đoạn đầu của quá trình  $\beta$ -oxy-hóa acid béo.

Bộ phận hoạt động của phân tử FAD và FMN tham gia trong phản ứng là vòng isoalloxasine của riboflavin. Phản ứng được thực hiện bằng cách vận chuyển trực tiếp đôi nguyên tử hydro từ cơ chất đến FAD hoặc FMN để tạo ra dạng khử của coenzyme, tức FAD.H<sub>2</sub> hoặc FMN.H<sub>2</sub> (hình 15)



Hình 15. Phản ứng dehydrogenase phụ thuộc flavin

Trong tế bào chất nhện điện tử từ dehydrogenase phụ thuộc flavin thường là một số enzyme thuộc nhóm cytochrome.

#### c/ Cytochrome.

Cytochrome là một nhóm protein chứa sắt có cấu tạo tương tự như hemoglobin, tham gia trong quá trình vận chuyển điện tử trong hô hấp cũng như trong quang hợp. Trong quá trình hô hấp cytochrome đảm nhận việc vận chuyển điện tử từ các enzyme flavin đến oxy không khí; trong quang hợp cytochrome tham gia trong vận chuyển điện tử ở pha sáng.

Cytochrome giống hemoglobin và myoglobin ở chỗ nhóm thêm của chúng là các hợp chất porphyrin chứa sắt. Trong quá trình xúc tác xảy ra sự biến hóa thuận nghịch giữa  $\text{Fe}^{3+}$  và  $\text{Fe}^{2+}$ . Cytochrome đứng cuối cùng trong chuỗi hô hấp có khả năng khử trực tiếp oxy phân tử thành  $\text{O}_2^-$ , vì vậy nó thường được gọi là cytochrome oxydase.

Cytochrome được tìm thấy trong mọi cơ thể hiếu khí. Hơn thế nữa, hàm lượng của chúng trong các cơ quan khác nhau có quan hệ chặt chẽ với hoạt động hô hấp của các cơ quan đó. Ví dụ, cơ tim rất giàu cytochrome, nhưng trong gan, thận, não và đặc biệt là da, phổi hàm lượng cytochrome rất thấp.

Các cytochrome khác nhau được phân biệt trên cơ sở quang phổ hấp thụ và được ký hiệu bằng các chữ cái a, b, c hoặc bằng cách ghi chú kèm theo giá trị của bước sóng hấp thụ cực đại. (bảng 10). Trong ty thể của thực vật và động vật bậc cao đã tìm thấy hàng loạt cytochrome khác nhau: cytochrome a, cytochrome a<sub>3</sub>, cytochrome b, cytochrome b<sub>2</sub>, cytochrome c và cytochrome o. Hàng loạt cytochrome khác cũng được tìm thấy trong thành phần của chuỗi vận chuyển điện tử trong thylacoid của lục lạp.

**Bảng 10.** Tính chất của một số cytochrome của động vật có vú.

Cytochrome	Đỉnh hấp thụ của các dạng khử			$E_o$ (mV)
	$\lambda$ , nm	$\lambda$ , nm	$\lambda$ , nm	
a <sub>3</sub>	600	...	445	+200
a	605	517	414	+340
c	550	521	416	+260
c <sub>1</sub>	554	523	418	+225
b	563	530	430	+30
b <sub>1</sub>	565	535, 528	430	-30 (+245)
b <sub>5</sub>	557	527	423	+0,03

Cytochrome thực hiện việc vận chuyển điện tử với sự tham gia trực tiếp của nguyên tử sắt trong thành phần của nhóm heme nằm tại trung tâm hoạt động của mỗi cytochrome. Nhóm prosthetic của hầu hết các cytochrome, trừ cytochrome a và cytochrome a<sub>3</sub>, đều là phức hệ giữa protoporphyrin IX với sắt như trong hemoglobin. Trong ty thể, các điện tử bắt nguồn từ dạng khử của các enzyme dehydrogenase phụ thuộc NAD hoặc flavoprotein được nguyên tử sắt trong thành phần của heme của một cytochrome tiếp nhận để sau đó lại được chuyển cho một nguyên tử sắt của một cytochrome khác. Trật tự của chuỗi vận chuyển này sẽ được đề cập đến sau.

Đa số cytochrome gắn khá chặt với màng. Nhiều cytochrome phối hợp chặt chẽ với nhau và với các yếu tố vận chuyển điện tử khác, tạo nên các cấu trúc gồm nhiều phần dưới đơn vị để không những thực hiện chức năng vận chuyển điện tử, mà còn tham gia vào hoạt động bơm proton để tạo ra gradient proton vốn cần cho việc tổng hợp ATP trong quá trình phosphoryl hóa oxy hóa.

## 2. Transferase.

Nhóm enzyme transferase có mã số bằng 2, được chia thành 8 phân nhóm sau đây:

- 2.1. – enzyme xúc tác vận chuyển các nhóm một carbon (methyl, carbocyl, formyl);
- 2.2. – enzyme vận chuyển các gốc aldehyde và cetone;
- 2.3. – Các acyltransferase vận chuyển các gốc acid, ví dụ gốc acetyl hoặc suxinyloxy HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-;
- 2.4. – Các enzyme thuộc nhóm glycosyltransferase;
- 2.5. – Các transferase vận chuyển các chức rượu;
- 2.6. – Các transferase vận chuyển các nhóm chứa nitơ (amin, amide, oximine)
- 2.7. – Các transferase vận chuyển các nhóm chứa phosphore;
- 2.8. – Các transferase vận chuyển các nhóm chứa lưu huỳnh.

Mỗi phân nhóm này tùy thuộc vào bản chất hóa học của nhóm được vận chuyển lại được chia thành các phân nhóm nhỏ hơn.

Cần lưu ý rằng các phân nhóm transferase khác nhau có các coenzyme khác nhau. Ví dụ các aminotransferase có coenzyme là pyridoxalphosphate. Khi vận chuyển các nhóm một carbon đến glycine enzyme là một pteroptotein, còn các enzyme vận chuyển các gốc đường thì coenzyme là các nucleotide. Như vậy, mặc dù nhóm transferase tập hợp các enzyme vận chuyển một nhóm hóa học nào đó từ phân tử này đến phân tử khác nhưng phụ thuộc vào bản chất hóa học của nhóm được vận chuyển mà bản chất hóa học của coenzyme là hoàn toàn khác nhau.

Trong bảng 11 giới thiệu một số ví dụ về nhóm enzyme này.

Bảng 11. Các enzyme phổ biến thuộc nhóm transferase

Mã số	Tên hệ thống	Tên thường dùng	phản ứng
2.2.1.1	Sedoheptuloso-7-phosphate:glyceraldehyde-3-phosphate glycolaldehyde transferase	Transketolase	Sedoheptuloso-7-phosphate + D-Glyceraldehyde-3-phosphate = D-riboso-5-phosphate + D-Xyluloso-5-phosphate.
2.4.1.1	1,4- $\alpha$ -D-Glucan:orthophosphate- $\alpha$ -D-glucosyltransferase	Phosphorylase	(1,4-- $\alpha$ -D-glucosyl) <sub>n</sub> + orthophosphate = (1,4-- $\alpha$ -D-glucosyl) <sub>n-1</sub> + (1,4-- $\alpha$ -D-glucoso-1-phosphate
2.4.1.1 3	UDPGlucose:D-fructose 2- $\alpha$ -D-glucosyltransferase	Sacchrososyntase	UDP-glucose + D-Fructose = UDP + Saccharose
2.6.1.1	L-Aspartate:2-cetyoglutarate aminotransferase	Aspartate aminotransferase	L-Aspartate + 2-cetoglutarate = Oxaloglutarate + L-Glutamate
2.6.1.5	L-Tyrosine:2-cetoglutarate aminotransferase	Tyrosinotransferase	L-Tyrosine + 2-cetoglutarate = 4-hydroxyphenylpyruvate = L-glutamate
2.7.1.1	ATP : D-Hexoso-6-phosphotransferase	Hexokinase	ATP + D-Hexose = ADP + D-Hexoso-6-phosphate

Trancetolase vốn có hoạt tính rất cao trong nấm men và cây xanh, xúc tác các phản ứng vận chuyển gốc aldehyde glycolic từ sedoheptuloso-7-phosphate đến D-glyceraldehyde-3-phosphate để tạo ra D-riboso-5-phosphate và D-xyluloso-5-phosphate.

Như vậy, tranxetolase đóng vai trò rất quan trọng trong trao đổi chất, xúc tác sự chuyển hóa tương hỗ giữa các monosacharide.

Phosphorylase xúc tác sự vận chuyển các nhóm glycosyl giữa các polyglycoside khác nhau (ví dụ tinh bột hoặc glycogen) và phosphate vô cơ theo phương trình ghi trong bảng 11.

Phosphorylase trong các mô động vật là các enzyme phân giải, trong khi đó các enzyme tương ứng nguồn gốc thực vật có khả năng tổng hợp tinh bột.

Enzyme tiếp theo trong bảng 11 là saccharosyntase. Đại diện của nhóm enzyme này hoạt động với sự tham gia của các nucleoside diphosphate.

Aspartate aminotransferase là một đại diện của phân nhóm aminotransferase, xúc tác phản ứng vận chuyển nhóm amin từ acid asparagine đến acid  $\alpha$ -cetoglutaric.

Tyrosinoaminotransferase có tính đặc hiệu khá rộng với hàng loạt aminoacid. Ví dụ nó có thể xúc tác phản ứng chuyển amin hóa giữa acid  $\alpha$ -acetoglutaric và phenylalanine, giữa 3,4-dioxyphenylalanine và tryptophane.

Hexokinase xúc tác phản ứng phosphoryl hóa glucose, mannose và fructose tại nguyên tử carbon thứ 6.

### **3. Hydrolase.**

Tính chất chung của nhóm enzyme này là xúc tác các phản ứng thủy phân tức phân giải các hợp chất phức tạp với sự tham gia của nước thành những hợp chất đơn giản hơn.

Hydrolase được chia thành 11 phân nhóm:

- 3.1: Enzyme phân giải các liên kết ester;
- 3.2: Enzyme phân giải các liên kết glycoside;
- 3.3: Enzyme phân giải các liên kết eter;
- 3.4: Enzyme phân giải các liên kết peptide;
- 3.5: Enzyme phân giải các liên kết C-N không phải peptide, ví dụ các amide;
- 3.6: Enzyme phân giải các liên kết anhydride acid;
- 3.7: Enzyme phân giải các liên kết C-C;
- 3.8: Enzyme phân giải các liên kết haloid – rượu;
- 3.9: Enzyme phân giải các liên kết P-N;
- 3.10: Enzyme phân giải các liên kết S-N;
- 3.11: Enzyme phân giải các liên kết C-P.

Chúng ta hãy xem xét một số hydrolase quan trọng nhất.

- Triacylglycerol-lipase – enzyme xúc tác các phản ứng thủy phân triacylglycerin, mã số 3.1.1.3. Tên thường gọi là lipase.

Nhóm 3.1.1.3 tập hợp các enzyme lipase khác nhau. Ví dụ lipase của hạt thầu dầu không tan trong nước, có  $pH_{opt}$  4,7-5,0. Nó không những xúc tác phản ứng phân giải triacylglycerin mà xúc tác cả phản ứng ngược – tổng hợp triacylglycerine từ glycerine và acid béo. Lipase tuy tan trong nước, có  $pH_{opt}$  trong vùng kiềm yếu. Các loại lipase khác, ví dụ lipase vi sinh vật và lipase trong phôi lúa mạch, khác với lipase hạt thầu dầu ở chỗ tan trong nước có  $pH_{opt}$  trong vùng kiềm yếu với pH bằng 8.

Đại diện cho phân nhóm 3.2 là các enzyme:

- $\alpha$ -Amilase (3.2.1.1) chứa trong nước bột, hạt thóc nẩy mầm, tuyển tụy, nấm mốc và vi khuẩn. Nó phân giải tinh bột thành các dextrim và một lượng nhỏ đường maltose.

-  $\beta$ -Amylase (3.2.1.2) phân giải tinh bột chủ yếu thành đường maltose và một ít destrin phân tử lớn.

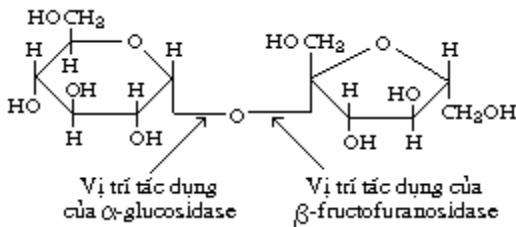
- Exo-1,4-D-glucoamylase (3.2.1.3) với tên thường gọi là glucoamylase phân giải tinh bột thành đường glucose và một ít dextrim.

$\alpha$  và  $\beta$ -amylase khác nhau về  $pH_{opt}$  và khả năng chịu nhiệt:  $\beta$ -amylase hoạt động trong điều kiện pH acid hơn và chịu nhiệt tốt hơn so với  $\alpha$ -amylase.

Chế phẩm exo-1,4-glucoamylase được thu nhận từ nấm mốc. Vì nó phân giải tinh bột thành glucose nên trở thành một enzyme được đặc biệt quan tâm vì nhờ nó có thể thu nhận chế phẩm glucose mà không cần sử dụng phương pháp thủy phân bằng acid. Glucoamylase thường được thu nhận từ nấm *Aspergillus niger*, *Aspergillus usamii*, *Rhisopusniveus*.  $pH_{opt}$  của nó nằm trong khoảng 4,5-4,7. Mặc dù glucoamylase có thể thủy phân các liên kết  $\alpha$ -D-(1-4),  $\alpha$ -D-(1-6) và  $\alpha$ -D-(1-3) glycoside nhưng thủy phân các liên kết  $\alpha$ -D-(1-4) xảy ra nhanh hơn nhiều.

-  $\beta$ -D-Fructofuranosidase (3.2.1.26) với tên thường gọi là invertase hay saccharase phân giải saccharose thành glucose và fructose, có nhiều trong nấm men vốn được dùng để thu nhận chế phẩm enzyme này. Ngoài  $\beta$ -D-Fructofuranosidase, saccharose còn được thủy phân bởi  $\alpha$ -D-glucosidase (3.2.1.20):

$\beta$ -D-Fructofuranosidase Thủy phân cả rafinose và methyl  $\beta$ -D-fructofuranoside nhưng với tốc độ chậm hơn.



Trong số các enzyme thủy phân polycacharise còn có cellulase (3.2.1.4) thủy phân cellulose thành disaccharide cellobiose.  $pH_{opt}$  của enzyme này nằm trong khoảng 5,0-5,4.

- Thuộc nhóm hydrolase còn cần phải kể đến các enzyme phân giải protein, tức peptid-hydrolase (3.4).

phản ứng cơ bản do phân nhóm enzyme này xúc tác là phân giải liên kết peptide.

Phân nhóm enzyme này rất được quan tâm do ý nghĩa thực tế của chúng, đặc biệt là khả năng sử dụng chúng trong nền kinh tế quốc dân.

#### 4. Liase.

Nhóm liase bao gồm 7 phân nhóm sau đây:

4.1 – Bao gồm các enzyme xúc tác các phản ứng cắt các liên kết giữa các nguyên tử carbon;

4.2 - Bao gồm các enzyme xúc tác các phản ứng cắt các liên kết giữa các nguyên tử carbon và oxy;

4.3 - Bao gồm các enzyme xúc tác các phản ứng cắt các liên kết giữa các nguyên tử carbon và nitơ;

4.4 - Bao gồm các enzyme xúc tác các phản ứng cắt các liên kết giữa các nguyên tử carbon và lưu huỳnh;

4.5 - Bao gồm các enzyme xúc tác các phản ứng cắt các liên kết giữa các nguyên tử carbon và haloid;

4.6. Bao gồm các enzyme xúc tác các phản ứng cắt các liên kết giữa các nguyên tử phospho và oxy;

4.99 – Các liase khác.

Bảng 12 giới thiệu một số enzyme quan trọng thuộc 3 phân nhóm đầu.

Bảng 12. Một số enzyme thuộc nhóm liase

Mã số	Tên enzyme	Phản ứng
-------	------------	----------

4.1.1.1	Pyruvate decarbocylase	$2\text{-Oxyacid} = \text{Aldehyde} + \text{CO}_2$
4.1.1.15	Glutamate decarbocylase	$\text{L-Glutamate} = 4\text{-Aminobutyrate} + \text{CO}_2$
4.1.1.39	Ribulosodiphosphate carbocylase	$\text{D-Ribuloso-1,5-diphosphate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = 2,3\text{-phospho-D-glycerate}$
4.1.2.13	Fructosodiphosphate aldolase	$\text{D-Fructoso-1,6-diphosphate} = \text{D-Dioxyacetonephosphate} + \text{D-Glyceraldehyde-3-phosphate}$
4.2.1.2	Fumarate hydratase (Fumarase)	$\text{L-Malate} = \text{Fumarate} + \text{H}_2\text{O}$
4.3.1.1	Aspartate-ammoniac liase (Aspartase)	$\text{L-Aspartate} = \text{Fumarate} + \text{NH}_3$

## **5. Isomerase.**

Nhóm Isomerase bao gồm 6 phân nhóm:

- 5.1: Rasemase và epymerase;
- 5.2: Cis-trans-isomerase
- 5.3: Oxydoreductase nốt phân tử;
- 5.4: Transferase nốt phân tử;
- 5.5: Liase nội phân tử;
- 5.99: Các isomerase khác.

Thuộc phân nhóm 5.1 gồm có các enzyme xúc tác quá trình đồng phân hóa aminoacid (5.1.1), glucid và các dẫn xuất của chúng (5.1.2). Đại diện điển hình của phân nhóm này là alaninerasemase (5.1.1.1) xúc tác quá trình chuyển hóa tương hối giữa L- và D-alanine, lactaterasemase (5.1.2.1) xúc tác quá trình chuywển hóa tương hối giữa L- và D-acid lactic và UDP-glucose-4epimerase (5.1.3.2) xúc tác quá trình chuywển hóa tương hối giữa UDP-glucose và UDP-galactose.

Đại diện cho phân nhóm 5.2 là maleinate isomerase (5.2.1.1) xúc tác sự chuyển hóa tương hối giữa acid fumaric và acid maleic.

Đại diện cho phân nhóm 5.3 là triosophosphate isomerase (5.3.1.1) xúc tác sự chuyển hóa tương hối giữa D-glyceraldehyde-3-phosphate và dioxyacetophosphate.

Phân nhóm thứ tư bao gồm các enzyme xúc tác các phản ứng transferase nội phân tử. Trong số các đại diện của nhóm này có thể kể đến methylaspartatemutase và S-methylmalonyl-CoA-mutase:

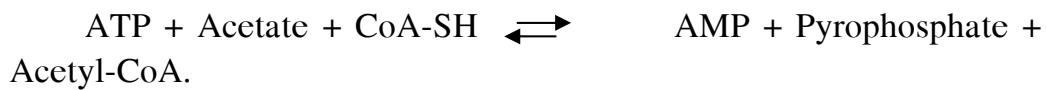
### **6. Ligase (synthetase).**

Nhóm này được chia làm 5 phân nhóm:

- 6.1: Ligase tạo các liên kết C-O;
- 6.2: Ligase tạo các liên kết C-S;
- 6.3: Ligase tạo các liên kết C-N;
- 6.4: Ligase tạo các liên kết C-C;
- 6.5: Ligase tạo các liên kết phosphodiester.

Thuộc phân nhóm 6.1 là tất cả các enzyme aminoacyl-tARNsyntase.

Thuộc phân nhóm 6.2 có 13 enzyme xúc tác sự dung nạp các acyl khác nhau, ví dụ acetyl hoặc suxinylo vào coenzme α, ví dụ acetyl-CoA-synthetase (6.2.1.1) xúc tác phản ứng:

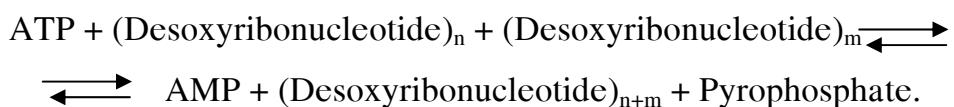


Như ta đã biết, acetyl-CoA tham gia tổng hợp rất nhiều hợp chất khác nhau, trong đó có steroid và polyisoprenoid.

Phân nhóm 6.3 gồm có 5 nhóm enzyme, đại diện là asparagine synthetase (6.3.1.1) và glutamine synthetase (6.3.1.2), xúc tác các phản ứng tổng hợp asparagine và glutamine từ các aminoacid dicarboxylic tương ứng với sự tham gia của ATP.

Phân nhóm 6.4 gồm 5 loại carboxylase chứa biotin, xúc tác với sự tham gia của ATP và CO<sub>2</sub> các phản ứng carboxyl hóa các acid hữu cơ khác nhau. Ví dụ pyruvate carboxylase (6.4.1.1) xúc tác phản ứng thuận nghịch giữa pyruvate và oxaloacetate.

Phân nhóm 6.5 có 2 enzyme xúc tác sự khôi phục các liên kết phosphodiester bị phá vỡ trong acid nucleic, ví dụ enzyme polydesoxyribonucleotide synthetase (ATP), mã số 6.5.1.1, xúc tác phản ứng:



## XV. TÁCH CHIẾT VÀ TINH CHẾ ENZYME.

Làm thế nào để tách chiết và sau đó tinh chế enzyme từ một vật liệu sinh học? Giai đoạn đầu của quá trình tách chiết enzyme là thu nhận dịch chiết từ một vật liệu sinh học nghiền nát sơ bô nào đó – bột, mầm thóc, hạt nẩy mầm, một mô động vật nào đó, một sinh khối vi khuẩn hoặc nấm ... Trong dịch chiết này đương nhiên có chứa protein và enzyme.

Trong việc nghiên cứu enzyme người ta thường hay sử dụng dịch nghiền nát đồng thể. Để thu nhận loại dịch này khỏi vật liệu sinh học được rửa sạch và nghiền trong cối hoặc trong một thiết bị chuyên dụng có tên gọi là máy nghiền. Trong khi nghiên cứu người ta thêm nước hoặc dung dịch đậm đặc kính nghiền nát để giúp phá vỡ tế bào. Sản phẩm thu được sau khi nghiên được gọi chung là dịch đồng thể. Trong khối dịch này chứa các mảnh tế bào, nhân, lục lạp của lá, ty thể và các bộ phận khác của tế bào như sắc tố, protein hòa tan v.v...

Nghiền nát tế bào trong nước hoặc trong dung dịch đậm còn có thể được thực hiện bằng cách tác động lên chúng bằng siêu âm trong một thiết bị đặc biệt gọi là máy nghiền siêu âm. Phương pháp này ngày nay được sử dụng rất rộng rãi, đặc biệt, để phá vỡ tế bào vi khuẩn. Tuy nhiên khi sử dụng thiết bị này cần phải chọn chế độ làm việc sao cho enzyme không bị mất hoạt tính.

Dịch nghiền tế bào sau đó có thể được ly tâm phân đoạn ở các tốc độ tăng dần khác nhau. Ví dụ, có thể bắt đầu ly tâm ở 1500 g, tức ở gia tốc cao hơn gia tốc của trọng lực 1500 lần. Sau khi tách được các tiểu phần lắng đọng xuống đáy ống nghiệm lại tiếp tục ly tâm ở 20.000 g, 40.000 g v.v...

Ở 1500 g chloroplast rẽ lắng xuống đáy, ở 20.000 g đến phiến lắng đọng của ty thể; ở 40.000 g hoặc gia tốc cao hơn sẽ lắng đọng những hạt nhỏ hơn. Để giữ cho các cơ quan tử của tế bào (ty thể, nhân v.v... ) cò nguyên vẹn khi nghiên tế bào thực vật để ly tâm thường cần thêm vào khối vật liệu cần nghiên 5 – 8% saccharose.

Nếu dùng cách này để tách khỏi vật liệu một phân đoạn cấu trúc dưới tế bào nào đó (lục lạp, ty thể v.v...) thì enzyme chứa trong chúng có thể còn nằm trong phân đoạn đó ở dạng liên kết. Để tách chiết từ chúng và chuyển những enzyme đó sang dạng dung dịch thì cần phải phá vỡ các cấu trúc dưới tế bào đó. Để làm công việc này người ta thường dùng các chất tẩy rửa detergent vốn là những chất có hoạt tính bề mặt rất cao. Nếu được thêm vào dịch nghiên sinh khối một lượng rất nhỏ chúng sẽ làm phá vỡ các cấu trúc tế bào và dưới tế bào. Thường hay dùng nhất là twin (tên thương mại của hỗn hợp sorbit và các acid béo phân tử lớn) hay desoxycholate.

Một phương pháp khác thường dùng để tách chiết enzyme khỏi các cấu trúc dưới tế bào là liên tục làm đóng băng và cho tan băng phân đoạn cấu trúc dưới tế bào cần nghiên cứu và sau đó tiến hành ly tâm phân đoạn.

Để thu nhận các enzyme trong các dịch chiết hoặc từ các phân đoạn dưới tế bào có thể dùng nước, dung dịch đệm, dung dịch muối (ví dụ NaCl 10%) hỗn hợp glycerine với nước (ví dụ 40% glycerine và 60% nước) hoặc dung môi hữu cơ (ví dụ acetone).

Để tách chiết nhiều enzyme người ta còn dùng “bột acetone”. Những nét cơ bản của phương pháp này như sau: khi nghiên một mẫu vật nào đó, ví dụ hạt nẩy mầm, cho thêm vào dịch nghiên vài lần acetone lạnh để loại bỏ các chất có bản chất lipid, một số chất nhựa, chất có màu. Sau khi để khô thu được một loại bột đồng nhất. sau khi chiết xuất bằng dung dịch đệm hoặc bằng một dung môi nào đó sẽ thu được dịch chiết chứa các enzyme quan tâm. Đáng tiếc là phương pháp này không sử dụng được cho tất cả enzyme vì một số enzyme bị mất hoạt tính trong acetone

Làm thế nào tách được một enzyme mà ta quan tâm từ dịch chiết bằng nước hoặc bằng dung dịch muối? Có nhiều phương pháp khác nhau để thực hiện công việc này.

Cổ điển nhất là phương pháp kết tủa protein enzyme amylase từ mầm lúa mạch bằng ethanol hoặc acetone đã được A. Payen và J. Perco thực hiện từ đầu thế kỷ 20. Phương pháp này ngày nay được sử dụng khá rộng rãi. đặc biệt là để thu nhận enzyme từ nấm mốc. Ví dụ, một số công ty của Nhật sản xuất chế phẩm amylase từ nấm mốc Aspergillus oryzae như sau: nuôi trồng Aspergillus oryzae trong môi trường dinh dưỡng có thành phần xác định. Sau đó sinh khối nấm được tách khỏi môi trường được nghiên và chiết xuất và từ dịch chiết này tiến hành kết tủa enzyme bằng ethanol với nồng độ xác định. Đương nhiên, bằng phương pháp này trong chế phẩm enzyme thu nhận được không chỉ có amylase mà có cả nhiều enzyme và protein khác.

Điểm yếu cơ bản của phương pháp này là không phải mọi enzyme đều chịu đựng được việc xử lý bằng ethanol và acetone. Một số trong chúng sẽ bị biến tính và mất hoạt tính. Để tránh thiếu sót này cần phải thực hiện việc kết tủa enzyme từ dung dịch bằng các dung môi hữu cơ ở nhiệt độ thấp, gần với nhiệt độ đóng băng của hỗn hợp dung môi và nước.

Bên cạnh phương pháp kết tủa enzyme bằng các dung môi hữu cơ, để thu nhận các chế phẩm enzyme khác nhau người ta còn sử dụng phương pháp diêm tích. Phương pháp này được sử dụng khá rộng rãi trong công tác nghiên cứu khoa học để thu nhận các chế phẩm enzyme có hoạt tính cao. Phương pháp diêm tích hay dùng nhất là sử dụng sulfate ammon  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , thêm

vào dung dịch nghiên cứu với liều lượng tăng dần. Dung dịch chứa enzyme trước tiên được thêm vào sulfate ammon, ví dụ đến 20% mức bão hòa toàn phần. Khi đó một phần protein và enzyme nào đó sẽ kết tủa. Tách tủa bằng ly tâm và nghiên cứu hoạt tính enzyme trong tủa đó. Dung dịch tiếp tục được thêm sulfate ammon, ví dụ đến 40% mức bão hòa toàn phần. Lại tách tủa bằng ly tâm và nghiên cứu sự tồn tại của hoạt tính enzyme. Phần dung dịch còng lại sau khi ly tâm lại tiếp tục được bổ sung sulfate ammon đến 60% mức bão hòa toàn phần và lại tiếp tục ly tâm để thu nhận enzyme như mô tả ở trên. Như vậy, có thể thu được hàng loạt phân đoạn protein để nghiên cứu sự tồn tại của enzyme này hoặc khác trong chúng.

Một phương pháp tách chiết và tinh chế enzyme rất quan trọng là phương pháp hấp phụ chọn lọc từ dung dịch. Nội dung của phương pháp này là dung dịch chứa enzyme được hấp phụ bởi một chất hấp phụ xác định, ví dụ hydroxide nhôm. Phương pháp hấp phụ chọn lọc được sử dụng rất rộng rãi trong công nghiệp enzyme để tách và tinh chế amylase từ nấm và vi khuẩn. Trong công việc này chất hấp phụ thường được sử dụng là tinh bột vốn là một chất hấp phụ đặc hiệu đối với enzyme này. Ngoài ra trong enzyme học còn sử dụng hàng loạt chất hấp phụ khác thích hợp với từng loại enzyme.

Một phương pháp rất tốt dùng để tách enzyme là phương pháp lọc gen. Thường hay được sử dụng nhất trong phương pháp này là sephadex. Đó là một loại dẫn xuất của dextran – một loại polysaccharide phân tử lớn của một số loài vi sinh vật Leuconostoc sinh trưởng và phát triển trong môi trường có saccharose. Phân tử dextran được cấu tạo từ các chuỗi, trong đó các gốc glucose nối với nhau bằng liên kết glycoside 1 : 6. Trong lượng phân tử của dextran đạt đến một triệu hoặc cao hơn. Sephadex được thu nhận từ dextran bằng phương pháp xử lý hóa học để tạo ra các liên kết ngang, làm cho sản phẩm không hòa tan trong nước nhưng có thể trương phồng trong nước.

Sử dụng sephadex trong việc tách chiết protein và enzyme dựa trên cơ sở như sau. Ví dụ ta có một cột sắc ký chứa sephadex. Cho vào cột một hỗn hợp gồm hai chất có trọng lượng phân tử khác nhau, ví dụ muối và protein. Khi lọc qua cột gel sephadex các chất phân tử nhỏ sẽ di chuyển từ từ qua các lỗ xốp của sephadex, còn các chất có trọng lượng phân tử lớn hơn, mà trong trường hợp này là protein, sẽ nhanh chóng chảy xuyên qua các khe hở giữa các hạt sephadex. Như vậy, có thể tách được hai chất với trọng lượng phân tử khác nhau.

Nếu sau đó tiến hành rửa cột bằng chính dung dịch đệm dùng trước đó thì sẽ lấy ra được chất còn giữ lại trong cột, trong trường hợp này là muối, đồng thời khôi phục hoạt động của cột sephadex. Vì cơ sở của phương pháp

tách chiết này là sự khác nhau về trọng lượng phân tử nên phương pháp lọc gen còn được thường gọi là phương pháp rây phân tử.

Ngày nay trên thế giới người ta đã sản xuất nhiều loại sephadex với kích thước hạt và độ phân nhánh khác nhau và do đó có khả năng tách chiết khác nhau. Những sản phẩm này được ký hiệu bằng các con số: G-10, G-25, G-50, G-75, G-100, G-200 v.v... Ví dụ dùng cột sắc ký chứa sephadex G-75 có thể tách được các protein với trọng lượng phân tử 3-70.000; nếu chứa sephadex G-100 có thể tách được các protein với trọng lượng phân tử 4-150.000, còn nếu chứa sephadex G-200 thì có thể tách được các protein với trọng lượng phân tử 5-800.000.

Để tách chiết và tinh chế enzyme ngày nay sử dụng rất phổ biến phương pháp điện di trên các loại gel khác nhau – polyacrylamide, agarose, tinh bột v.v... bão hòa dung dịch đệm. Sử dụng gel ngoài khả năng loại bỏ ảnh hưởng của tác dụng đối lưu còn cho phép tách protein không những theo diện tích mà theo cả trọng lượng và hình dáng phân tử.

Trong việc tách chiết và tinh chế enzyme Trên thế giới sử dụng ngày càng phổ biến phương pháp sắc ký hấp phụ enzyme trên cột chứa các chất hấp phụ chọn lọc đối với từng loại enzyme. Phương pháp này đặc biệt có giá trị trong việc tinh chế enzyme. Ví dụ bằng phương pháp này đã tinh chế enzyme L-asparaginase với hoạt tính cao gấp 25-30 lần so với các phương pháp tinh chế khác. Phương pháp sắc ký hấp phụ enzyme và protein nói chung đang mở ra nhiều con đường mới để hoàn thiện công nghệ hóa sinh và công nghệ hóa học và tạo ra các phương pháp tự động hóa mới trong các phân tích sinh hóa.

Trong việc tách chiết và tinh chế enzyme nhiệt độ thấp có ý nghĩa rất quan trọng. Ở nhiệt độ bình thường của phòng thí nghiệm nhiều enzyme bị biến tính và mất một phần hoặc toàn bộ hoạt tính. Vì vậy cần làm việc với enzyme bằng các thiết bị đặt trong phòng lạnh.

Ngày nay đại bộ phận enzyme đều được thu nhận ở dạng tinh thể. Đối với những chế phẩm này cần phải bảo quản ở nhiệt độ thấp, tốt hơn hết là ở nhiệt độ đóng băng.

Các dung dịch enzyme tinh khiết hoặc các chế phẩm enzyme ở dạng tinh thể có thể được sấy khô bằng các phương pháp khác nhau. Trong nhiều trường hợp có thể dùng phương pháp sấy khô chân không với sự có mặt của các chất hút nước nào đó, mà tốt nhất là  $P_2O_5$ . Nhưng tốt hơn cả là phương pháp sấy lạnh, sấy ở trạng thái đóng băng. Bằng phương pháp này protein và enzyme giữ rất tốt tính chất vốn có của chúng.

Cho đến nay không có phương pháp tách và tinh chế chung cho các enzyme. Để tách và tinh chế một enzyme nào đó cần biết lựa chọn và phối hợp một cách có hiệu quả nhất các biện pháp khác nhau.

## XVI. SỬ DỤNG ENZYME TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC.

Các chế phẩm enzyme ngày càng có nhiều ý nghĩa trong công nghệ sinh học. Chúng được sử dụng không những trong các sản xuất sinh hóa truyền thống như làm bánh mỳ, làm bia, sản xuất rượu và các loại nước hoa quả mà cả trong các lĩnh vực công nghệ hóa sinh và vi sinh học. Các chế phẩm enzyme được sử dụng rất rộng rãi trong các nghiên cứu sinh học với tư cách là các hóa chất dùng để định lượng các hợp chất khác nhau như glucose, urea v.v... Sự ứng dụng ngày càng rộng rãi những kiến thức này đã được ghi nhận trong lĩnh vực y học.

Lần đầu tiên năm 1884 các chế phẩm enzyme đã được nhà khoa học Nhật bản Takaminhe sử dụng ở quy mô công nghiệp. Ông đã dùng amylase của nấm mốc Aspergilus oryzae để đường hóa tinh bột. Công trình này đã có tác dụng thúc đẩy sự phát triển nhanh chóng của enzyme học ứng dụng. Ngày nay hàng loạt các công ty ở Nhật, Hoa Kỳ, Anh, Pháp và nhiều nước khác đã sản xuất các chế phẩm enzyme với độ tinh khiết cao để sử dụng trong công nghiệp, nông nghiệp, trong thực tiễn phân tích và y học.

Ta sẽ xem xét một vài ví dụ về ứng dụng các chế phẩm enzyme trong thực tiễn.

Trong công nghiệp sản xuất bánh mỳ thêm một lượng nhỏ  $\alpha$ -amylase (0,002-0,003% trong lượng bột) thu nhận từ *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus awamori* sẽ làm tăng đáng kể hương thơm và vị ngon của bánh mỳ, làm cho bánh nở đều và màu của bánh thêm đậm đà. Làm tăng hương vị của bánh là kết quả của quá trình tăng cường tạo melanoidin dưới tác dụng của  $\alpha$ -amylase, làm cho các hợp chất carbonyl bay hơi giúp bánh có mùi thơm tăng lên đáng kể.

Các enzyme phân giải tinh bột được sử dụng rộng rãi trong việc đường hóa tinh bột khoai tây, hạt ngũ cốc để sản xuất rượu. Từ thời xa xưa người ta sử dụng bột mầm đại mạch để làm nguồn amylase, tuy nhiên mầm đại mạch có thể được thay thế bằng nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Việc thay thế này đã thúc đẩy nghề sản xuất rượu.

Một số loại protease, như papain, pepsin cũng được sử dụng rộng rãi trong công nghệ sản xuất bia để ngăn ngừa hiện tượng bia bị đục (đặc biệt khi bảo quản bia trong điều kiện lạnh) do hiện tượng có tên gọi là lắng tủa protein-tannin gây ra.

Các enzyme phân giải protein cũng được sử dụng trong việc làm mềm thịt. Thịt thường giữ độ cứng khá lâu sau khi con vật bị giết. Để cho thịt có được độ mềm cần thiết, thường phải xử lý trong điều kiện lạnh  $0\pm 2^\circ$  từ 10

đến 14 ngày. Trong điều kiện bảo quản như vậy cũng chỉ có 14-17% số thịt được đánh giá là thịt loại I. Một điều kiện quan trọng nhất để làm xuất hiện những chất lượng cần thiết của thịt là làm phân giải một phần protein của thịt dưới tác dụng của các enzyme proteinase.

Ngày nay papain và các enzyme proteolitic nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật được dùng phổ biến trong việc xử lý thịt bảo quản, chủ yếu bằng 3 phương pháp sau đây: 1/ ngâm trong dung dịch enzyme; 2/ bôi bột làm mềm thịt có chứa enzyme cùng với mì chính, muối ăn, tinh bột v.v.; 3/ Bơm dung dịch enzyme vào mô thịt.

Enzyme proteolitic được sử dụng có kết quả trong công nghệ thuộc da và làm mềm da nguyên liệu. Sử dụng enzyme làm tăng đáng kể chất lượng của len và làm nhanh quá trình xử lý.

Quá trình sản xuất da, đặc biệt là quá trình làm mềm da nguyên liệu, hoàn toàn dựa trên việc sử dụng enzyme nguồn gốc động vật, thực vật hoặc vi sinh vật. Đặc biệt sử dụng khá rộng rãi pancreatin – chế phẩm thô của các enzyme proteolitic của tuyến tụy. Người ta cũng sử dụng các enzyme nguồn gốc thực vật (papain) và enzyme proteolitic thu từ nấm mốc (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus*) và vi khuẩn (*Bacillus mesentericus*).

Trong công nghiệp sản xuất nước trái cây thường sử dụng các enzyme phân giải pectin. Chúng làm tăng đáng kể mức thu hoạch sản phẩm (8-15%), giảm độ nhớt và làm cho nước trái cây trong hơn.

Trong công nghệ sản xuất bánh kẹo thường dùng  $\beta$ -fructofuranosidase. Vấn đề là ở chỗ đường saccharose rất dễ bị kết tinh, ảnh hưởng xấu đến chất lượng sản phẩm. Dưới tác dụng của  $\beta$ -fructofuranosidase saccharose bị phân giải, do đó ngăn cản quá trình kết tinh của saccharose.

Nhiều kinh nghiệm của các nhà sản xuất cho thấy các chế phẩm cellulase thu từ nấm mốc trong đó có chứa hemicellulase có thể sử dụng có hiệu quả trong việc chế biến thức ăn gia súc, làm tăng đáng kể độ hấp thụ của thức ăn, giúp tăng trọng lượng gia súc, giúp cho gà đẻ nhiều. Với sự hỗ trợ của các chế phẩm enzyme cellulase phối hợp tương tự các nhà sản xuất đã thành công trong việc tăng sản phẩm tinh bột từ các nguyên liệu giàu tinh bột, tăng sản phẩm agar-agar từ các nguyên liệu tảo biển, tăng lượng nước trái cây từ cam và các loại trái cây khác.

Việc nghiên cứu ứng dụng enzyme trong y học cũng ngày càng thu được nhiều kết quả. Trong các phòng thí nghiệm y học người ta sử dụng các loại dehydrogenase khác nhau để làm các thuốc thử đặc biệt, ví dụ dùng lactate dehydrogenase để xác định acid pyruvic và acid lactic, sử dụng

alcohol dehydrogenase để xác định ethanol v.v... Các bộ chế phẩm enzyme có chứa alcoholdehydrogenase được sử dụng ở một số nước để xác định lượng cồn trong máu của lái xe.

Đã nhiều năm trôi qua kể từ khi glucosooxydase được sử dụng rộng rãi trong y học để xác định glucose trong nước tiểu và trong máu.

Một lĩnh vực khác của việc ứng dụng glucosooxydase là sử dụng nó để loại bỏ glucose từ các sản phẩm thức ăn phải bảo quản trong điều kiện khô. Ví dụ, sự tồn tại glucose trong trứng sẽ dẫn đến tình trạng bột trứng chế tạo từ loại trứng này có mùi và vị khó chịu. Đó là do glucose khi sấy khô và bảo quản ở nhiệt độ cao dễ tác dụng với các nhóm amine tự do của aminoacid và protein. bột sữa sẽ bị đen và tạo ra hàng loạt các chất có mùi vị khó chịu. Vì vậy trước khi sấy khô nguyên liệu trứng cần được loại bỏ glucose bằng cách xử lý glucosooxydase để sản phẩm bột trứng được bền vững trong quá trình bảo quản.

Ở Mỹ người ta sử dụng glucosooxydase để loại bỏ oxy khỏi đồ hộp và nhiều loại nước giải khát khác nhau, ví dụ bia.

## XVII. ENZYME CỐ ĐỊNH.

### 1. Ý nghĩa của enzyme cố định.

Trong những năm cuối của thế kỷ 20 bắt đầu phổ biến kỹ thuật cố định enzyme. Enzyme hòa tan sau khi sử dụng thường lẫn vào cùng với sản phẩm không tách ra được. Nếu tách ra thì enzyme bị mất hoạt tính, vì vậy với một lượng enzyme nhất định chỉ có thể sử dụng được một lần.

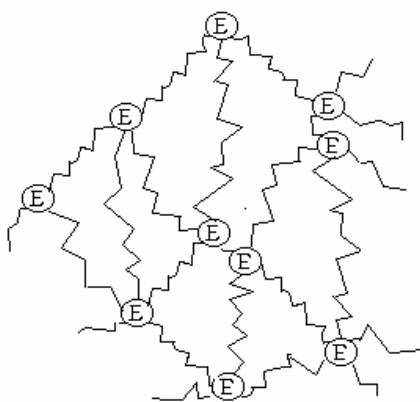
Sử dụng enzyme cố định có một số ưu điểm sau:

- Một lượng enzyme có thể sử dụng lặp đi lặp lại được nhiều lần trong một thời gian dài;
- Enzyme không lẫn vào trong sản phẩm, do đó tránh được ảnh hưởng không tốt đến chất lượng sản phẩm;
- Dùng enzyme cố định có thể dừng nhanh chóng phản ứng khi cần thiết bằng cách tách nó ra khỏi cơ chất.

### 2. Các phương pháp điều chế enzyme cố định.

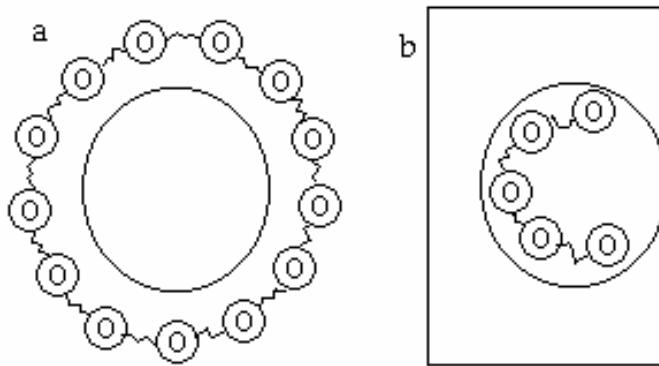
Theo kỹ thuật chế tạo enzyme cố định, enzyme được gắn vào một vật mang nào đó. Những vật mang như vậy có thể là cellulose và các dãy xuất của nó, các hạt kính xốp, gel polyacrylamide, sephadex, collodium, tinh bột, các loại allumosilicate và oxide kim loại... Về nguyên tắc, có 3 phương pháp điều chế các enzyme cố định:

- Gắn bằng liên kết đồng hóa trị phân tử enzyme vào chất mang không hòa tan hoặc gắn các enzyme với nhau để tạo nên đại phân tử không hòa tan (hình 16);



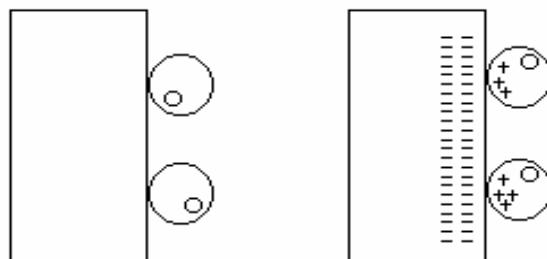
Hình 16. Sơ đồ điều chế enzyme cố định bằng cách đính mạch ngang nhờ các tác nhân lưỡng chức hoặc đa chức.

- Đính enzyme lên bề mặt chất mang hoặc vào trong lòng khuôn gel có kích thước lỗ khá nhỏ đủ để giữ enzyme, còn để các chất khác qua lại tự do (Hình 17);



Hình 17. Hấp thụ enzyme trên bề mặt chất mang (a) và trong lòng chất mang (b)

- Hấp phụ enzyme lên trên các chất mang không hòa tan có mang hoặc không mang điện tích (Hình 18).



Hình 18. Sơ đồ hấp phụ enzyme trên chất mang không có và có điện tích.

a/ Phương pháp gắn enzyme bằng liên kết đồng hóa trị.

Đa số enzyme cố định thu được bằng phương pháp này. Với phương pháp này có thể thu enzyme cố định bằng hai cách.

- Kết hợp phân tử protein enzyme vào chất mang không hòa tan.

Các chất mang để gắn enzyme phải thỏa mãn những yêu cầu sau:

- Có độ hòa tan thấp và bền vững đối với các tác động cơ học và hóa học;
- Không gây tác động kìm hãm đến hoạt tính enzyme;
- Không hấp phụ phi chọn lọc đối với các protein khác;
- Chất mang tốt hơn cả là có tính hao nước, vì chất mang kỵ nước có thể gây tác dụng ức chế enzyme đã liên kết;

- Việc gắn enzyme sẽ có hiệu quả hơn khi điện tích của enzyme và của chất mang có dấu ngược nhau.

**Các chất mang loại này thường là polypeptide, các dẫn xuất của cellulose và dextran (DEAE-cellulose, CM-cellulose, DEAE-sephadex, CM, sephadex), agarose và các polimer tổng hợp khác như polyacrylamide, polystyrol, polyamide và các chất vô cơ như silicagen, bentonit, hydroxide nhôm v.v...**

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

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

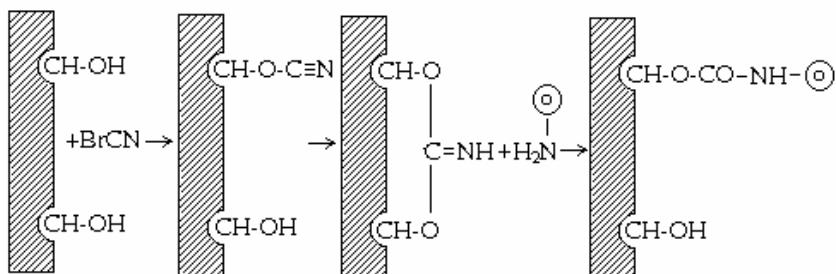
Chất mang vô cơ thường rất bền với nhiệt, cơ học, với dung môi hữu cơ và với các vi sinh vật, nhất là không bị biến đổi cấu hình của khuôn khi thay đổi tính chất của môi trường chung quanh. Nhiều dẫn liệu cho thấy rằng enzyme đính với khuôn vô cơ khi bảo quản thường bền vững hơn enzyme gắn với khuôn polymer hữu cơ.

Tham gia tạo thành các liên kết đồng hóa trị có thể có các nhóm chức của phân tử protein enzyme như nhóm  $\beta$ - và  $\gamma$ -carboxyl  $-COOH$  của acid asparagine và acid glutamic, nhóm  $\epsilon-NH_2$  của lysine, nhóm  $\beta-SH$  của cysteine, vòng phenol của tyrosine, nhân imidasol của histidine, các nhóm OH của serine, threonine, nhóm guanidine của arginine và imidasol của tryptophan.

Quá trình kết hợp enzyme sẽ xảy ra một cách trực tiếp khi chất mang có chứa các nhóm chức có khả năng liên kết trực tiếp nói trên trong phân tử protein enzyme. Ví dụ gốc anhydride maleic liên kết với nhóm  $\epsilon-NH_2$  của lysine.

Trong các trường hợp khác sự liên kết giữa chất mang và protein enzyme chỉ xảy ra sau khi chất mang đã được hoạt hóa.

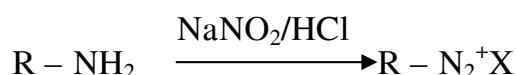
Việc hoạt hóa sơ bộ chất mang có thể được thực hiện bằng nhiều cách. Ví dụ, các nhóm hydroxyl của dextran hoặc các polyoside khác có thể được hoạt hóa bằng bromur cyan (BrCN). Sau đó chất mang đã được hoạt hóa mới liên kết với enzyme (hình 19).



Hình 19. Gắn enzyme với vật mang đã được hoạt hóa bằng bromur cyan ( $\text{BrCN}$ ).

Các chất mang có chứa nhóm amin như aminobenzoylcellulose, polyaminostyrol có thể được hoạt hóa bằng phản ứng diazo.

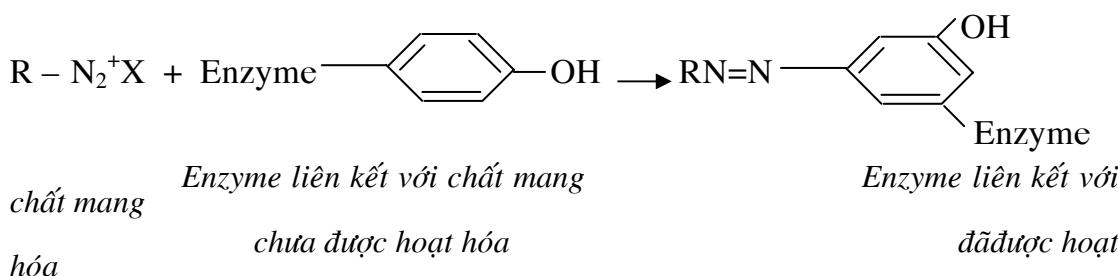
Ví dụ, polyaminostyrol trước hết được diazo hóa bằng natri nitrit trong môi trường acid thành muối diazo, sau đó mới kết hợp với enzyme:



*R: Gốc alkyl, aryl*

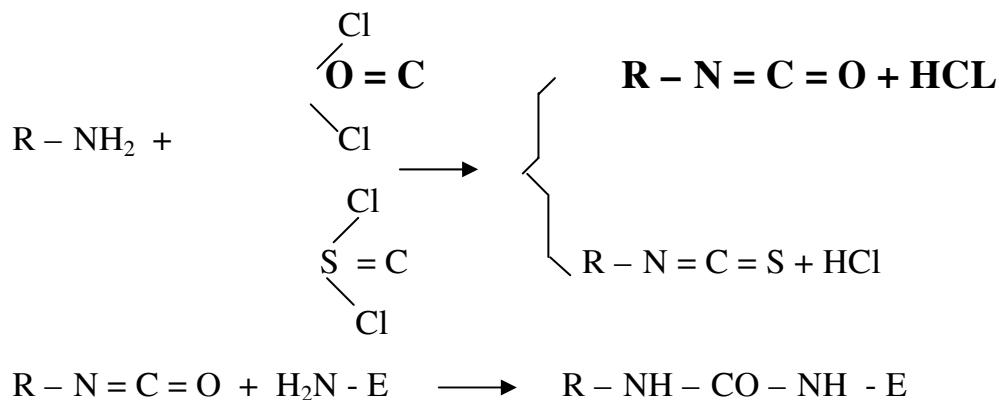
### *Muối diazo của chất mang*

### *X: Gốc acid*



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

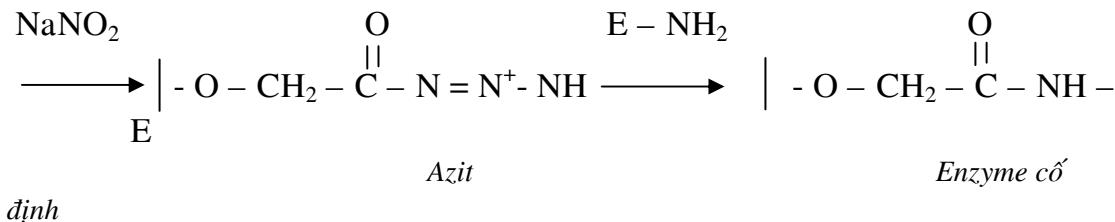
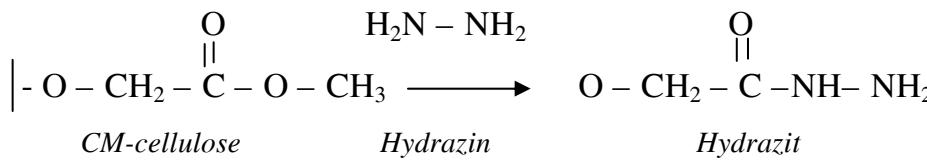
Nếu chất mang có chứa nhóm amin có thể hoạt hóa bằng cách cho tác dụng với phosgen hoặc tiophosgen để tạo thành dẫn xuất isosianat hoặc izothyosianat. Các nhóm isosianat hoặc izothyosianat ở pH trung tính sẽ liên kết dễ dàng với nhóm  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> của lysine.



Bằng phương pháp này người ta đã điều chế được các dẫn xuất enzyme cố định như trypsin, chymotrypsin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -amylase, glucoamylase.

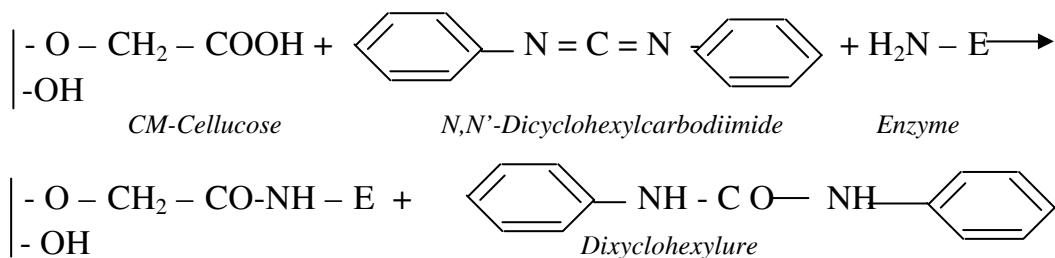
Nếu chất mang có chứa nhóm  $-COOH$  như CM-cellulose hoặc nhựa tổng hợp thì cần được hoạt hóa trước khi gắn kết với enzyme bằng các phương pháp azit, carbodiimit.

- Hoạt hóa bằng phương pháp azit:



**Các enzyme như trypsin, DNA-ase, chymotrypsin, bromelin đã được cố định bằng phương pháp này.**

- Hoạt hóa bằng phương pháp carbodiimide:



Vì phản ứng xảy ra trong môi trường acid yếu ( $\text{pH}=5$ ) nên phương pháp này đặc biệt thuận lợi đối với các enzyme có tính acid như pepsin.

- Kết hợp đồng hóa trị giữa các phân tử enzyme với chất mang.

Cố định enzyme bằng cách liên kết đồng hóa trị được thực hiện bằng nhiều cách khác nhau:

1/ Liên kết đồng hóa trị được tạo ra giữa các nhóm phản ứng của vật mang và enzyme; trong một số trường hợp vật mang cần được hoạt hóa sơ bộ;

2/ Các phân tử enzyme sau khi được hấp phụ trên chất mang hoặc nằm trong lòng phân tử chất mang liên kết với nhau nhờ tính lưỡng chức hoặc tính đa chức của chất phản ứng.

Người ta thường dùng aldehyde glutaric để gắn các nhóm amin của lysine ở các phân tử enzyme. Ví dụ, trypsin cố định trypsin được điều chế bành cách dùng aldehyde glutaric 2% để liên kết các phân tử enzyme và gắn chúng vào aminoethylcellulose.

b/ Phương pháp “gói” enzyme trong khuôn gel.

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

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

Sau đây là một số phương pháp “gói” enzyme.

- Các gel có thể được hình thành từ các polymer tổng hợp như acrylamide, hydroxyethyl-2-metacrylate, tạo phức càng cua bằng ethyleneglycol-dimetacrylate, polyvinyl, polyuretan.

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

Alginate và caraghenan lấy từ rong biển thường có khả năng tạo gel rất tốt và rất thuận lợi để bao gói các enzyme hoặc tế bào nguyên vẹn.

- Các enzyme cũng có thể bị “nhốt” trong các lỗ nhỏ của các sợi tổng hợp.

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

Một nhũ tương của cellulose triacetate trong methylene chlorua và enzyme trong dung dịch đậm có chứa glycerol được ép qua một khuôn lọc dưới áp suất nitơ. Các sợi đi ra khỏi khuôn được nhúng vào một cái bể đóng tụ có chứa toluel, sau đó được làm khô trong chân không.

Các sợi này bền với acid yếu hoặc kiềm yếu, lực ion cao và chịu được một số dung môi hữu cơ. Tuy nhiên phương pháp này chỉ thích hợp đối với những enzyme khó bị mất hoạt tính trong các dung môi không hòa lẫn với nước.

- Phương pháp gói enzyme trong các bao vi thể (microcapsul).

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

Có nhiều phương pháp gói enzyme trong microcapsul. Sau đây là một trong các phương pháp đó. Cho một dung dịch loãng chứa enzyme và một

monomer ưa nước trong một dung môi hữu cơ không hòa lẫn trong nước để tạo nhũ tương, sau đó thêm một monomer kỵ nước để gây phản ứng trùng hợp tạo ra một màng bao quanh những giọt lỏng nhỏ. Thường phải thêm vào một tác nhân hoạt động bề mặt để làm bền nhũ tương cũng như để điều chỉnh các capsul có kích thước mong muốn từ 1 đến 100 µm.

- Phương pháp tiềnl polymer để gói các chất xúc tác sinh học.

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

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

Dưới đây là một ví dụ về phương pháp tiềnl polymer. Đó là phương pháp tạo liên kết chéo giữa các tiềnl polymer bằng cách chiếu tia cực tím để gói enzyme.

Khi chiếu tia cực tím gần lên dung dịch có chứa chất tiềnl polymer và enzyme thì sẽ tạo ra các liên kết chéo giữa các gốc của tiềnl polymer và một gel được hình thành bao lấy enzyme. Sư gói enzyme bằng phương pháp này có thể tiến hành ở điều kiện nhẹ nhàng, tránh được các thay đổi pH quá kiềm hoặc quá acid, thời gian lại rất nhanh, chỉ trong vòng từ 3-5 phút. Với phương pháp này có thể gói enzyme, tế bào vi sinh vật hoặc các bào quan.

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

Với phương pháp này enzyme được hấp phụ trên các chất có hoạt tính bề mặt như than hoạt tính, cellulose, tinh bột, dextran, collagen, albumin, agarose, chitin, polyacrylamide, nilon, polystyrol v.v...và một số nhựa trao đổi ion, silicagen, thủy tinh.

Trong trường hợp chất mang không có lỗ enzyme được đính vào chất mang thành từng lớp trên bề mặt; khi chất mang có lỗ thì các phân tử enzyme sẽ xâm nhập vào trong các lỗ.

### **3. Một số đặc tính của enzyme cố định.**

Việc cố định làm thay đổi đáng kể nhiều tính chất của enzyme như độ bền, tính đặc hiệu, đặc điểm động học. Thông thường việc cố định làm tăng

đáng kể độ bền của enzyme. Ví dụ, cố định protease làm tăng độ bền với nhiệt gấp chục nghìn lần.

Sau khi được cố định không những độ bền với nhiệt của enzyme tăng lên mà phạm vi nhiệt độ tối thích của enzyme cũng được mở rộng. Nhiệt độ cao làm cho enzyme bị biến tính, cấu trúc bậc ba của enzyme bị phá vỡ và enzyme bị mất hoạt tính. Khi enzyme được cố định nhờ nhiều liên kết gắn với chất mang quá trình biến tính sẽ bị ngăn cản, làm cho enzyme chịu được nhiệt độ cao.

Trong trường hợp đối với các enzyme thủy phân protein, ví dụ papain và trypsin sự cố định làm ngăn cản một phần hoặc hoàn toàn hiện tượng tự phân. Điều này rất có ý nghĩa thực tế vì nó giúp làm tăng thời gian làm việc của enzyme.

Sự biến đổi đặc điểm động học của enzyme do việc cố định gây ra có thể được minh họa qua ví dụ đối với enzyme glutamate dehydrogenase: đối với enzyme cố định trên màng collagen hằng số Michaelis dành cho acid glutamic tăng 6 lần, tác dụng hoạt hóa của ADP cũng tăng lên đáng kể.

Một trong các nguyên nhân làm biến đổi tính chất của enzyme khi chúng được cố định là sự thay đổi của phản ứng môi trường. Enzyme thường được cố định trên các chất mang có điện tích. Ví dụ một chất trao đổi anion mang điện tích âm được bao quanh bởi một môi trường giàu proton, và vì thế pH trong các lớp nằm kế sát với enzyme được cố định sẽ thấp hơn so với pH của môi trường dung dịch. Điều đó làm cho đường cong phụ thuộc pH của hoạt tính enzyme cố định trên các chất mang anionit, cationit và trung tính sẽ khác nhau.

#### 4. Ứng dụng của enzyme cố định.

##### *a/ Trong công nghiệp.*

- Từ năm 1969 Wilson đã xây dựng thành công một xưởng thực nghiệm để sản xuất liên tục glucose bằng glucoamylase cố định;
- Từ 1971 người ta đã thành công trong việc dùng chymotrypsin cố định trên carboxymethylcellulose để làm động tụ sữa thay cho renin đắt tiền;
- Enzyme racemase cố định đã được sử dụng để chuyển toàn bộ D-aminoacid thành L- aminoacid tương ứng, làm tăng giá trị dinh dưỡng của sản phẩm lên gấp đôi.
- Làm trong nước trái cây bằng cách xử lý enzyme phân giải pectin hay thủy phân protein trong bia bằng protease hoàn toàn có thể được thực hiện trong các cột chứa các enzyme cố định tương ứng.

- Cố định enzyme glucoisomerase trong cột hoàn toàn có hiệu quả đối với việc ngăn ngừa sự chuyển hóa glucose thành fructose, làm cho độ ngọt của nước giải khát bị giảm. Nhờ cố định enzyme glucoisomerase việc thu nhận xirô gluco-fructose ngày nay đã trở thành một quy trình công nghiệp quan trọng và phổ biến. Độ chịu nhiệt cao của enzyme này cho phép thực hiện quá trình sản xuất ở nhiệt độ 60-70°, làm giảm đáng kể khả năng nhiễm khuẩn của thiết bị enzyme.

b/ Trong y học.

- Urease gắn trong vi tiếu cầu đã được sử dụng có hiệu quả để loại trừ urea của máu trong thận nhân tạo;
- Vi tiếu cầu chứa catalase đã có thể thay thế một cách có hiệu quả số catalase bị thiếu trong cơ.
- Đưa vi tiếu cầu có gắn enzyme L-asparaginase vào cơ thể có khả năng ức chế sự phát triển của một số u ác tính vì sự phát triển của những u này phụ thuộc vào sự có mặt của L-asparagin.

c/ Trong phân tích hóa sinh.

Glucoamylase gắn đồng hóa trị với polystyrol được dùng để xác định tự động glucose;

Điện cực urease cố định dùng để xác định tự động urea trên dòng liên tục;

Điện cực alcoholoxydoreductase cố định được dùng để xác định methanol, ethanol trong dung dịch nước.

Cố định enzyme tạo ra khả năng nghiên cứu hàng loạt các vấn đề lý thuyết của enzyme học. Ví dụ cố định enzyme có thể được sử dụng để ngăn cản sự phôi hợp ngẫu nhiên của các phần dưới đơn vị của các enzyme oligomer. Sử dụng việc cố định có thể giải quyết vấn đề liệu một enzyme ở dạng các phần dưới đơn vị có hoạt tính hay không. Nếu các phần dưới đơn vị ở trạng thái cố định có hoạt tính thì qua so sánh hoạt tính của enzyme với hoạt tính của các oligomer cố định sẽ thu được những thông tin có giá trị về vai trò của sự tương tác giữa các phần dưới đơn vị trong việc thực hiện chức năng của enzyme.

Ngày nay ta biết rõ rằng phần lớn enzyme nội bào hoạt động trong môi trường tương tự như gel hoặc chúng được “gói” trong màng ti thể, lục lạp hoặc các cơ quan tử khác. Vì vậy, các enzyme cố định có thể là mô hình tốt để nghiên cứu hoạt động của enzyme.

Kỹ thuật cố định không chỉ dùng cho các chế phẩm enzyme mà có thể dùng cho các tế bào vi sinh vật nguyên vẹn. Để cố định các tế bào vi sinh vật

người ta thường dùng gel polyacrylamide, cellulose, caraganine và các vật liệu khác. Đáng lưu ý là trong nhiều trường hợp hoạt tính enzyme của các tế bào cố định cao hơn nhiều so với các enzyme tự do. Các tế bào cố định thậm chí có thể thực hiện được các quá trình sinh hóa tinh vi và phức tạp. Ví dụ các tế bào *Rhisobium lupini* của nốt sần cây lupin vàng giữ được rất lâu hoạt tính cố định đậm của chúng.