

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA ĐÀ NẴNG



TIẾN SĨ:
BÙI XUÂN ĐÔNG

GIÁO TRÌNH
CÔNG NGHỆ ENZYME

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU	Error! Bookmark not defined.
CHƯƠNG 1. CẤU TẠO VÀ BẢN CHẤT HÓA HỌC CỦA ENZYME	8
1.1. BẢN CHẤT HÓA HỌC CỦA ENZYME	8
1.1.1. Bản chất protein của enzyme	8
1.1.2. Lịch sử nghiên cứu chứng minh enzyme là protein	9
1.2. THÀNH PHẦN CẤU TẠO CỦA ENZYME	9
1.3. TRUNG TÂM HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME	11
1.3.1. Mô hình TTHĐ của enzyme theo Emil Fisher (1894)	12
1.3.2. Mô hình Koshland – Mô hình hiện đại	12
1.4. TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA ENZYME	13
1.4.1. Đặc hiệu cơ chất	13
1.4.2. Đặc hiệu quang học	14
1.4.3. Đặc hiệu phản ứng	15
1.5. CƠ CHẾ TÁC DỤNG CỦA ENZYME	15
1.5.1. Enzyme làm giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng	15
1.5.2. Enzyme làm tăng tốc độ phản ứng	17
1.6. CÁCH GỌI TÊN VÀ PHÂN LOẠI ENZYME	19
1.6.1. Cách gọi tên enzyme	19
1.6.2. Cách phân loại enzyme	20
1.7. CÁC DẠNG PHÂN TỬ CỦA ENZYME (ISOZYM)	22
1.8. PHỨC HỢP ENZYME (MULTIENZYME)	22
1.9. CÁC COENZYME THƯỜNG GẶP	23
1.9.1. Coenzyme nicotinamid:	24
1.9.2. Coenzyme flavin:	25
1.9.3. Coenzyme quinon:	26
1.9.4. Coenzyme hem:	27
1.9.5. Coenzyme A (CoASH):	27
1.9.6. S. adenosin methionin:	28

1.9.7. Coenzyme lipoic (acid lipoic):	29
1.9.8. Coenzyme thiamin pyrophosphat (TPP):	29
1.9.9. Coenzyme pyridoxal phosphat:	30
1.9.10. Coenzyme biotin:	31
1.10. ĐIỀU HÒA ENZYME	31
CHƯƠNG 2: ĐỘNG HỌC ENZYME	33
2.1. Ý NGHĨA CỦA VIỆC NGHIÊN CỨU ĐỘNG HỌC ENZYME	33
2.2. ĐỘNG HỌC CÁC PHẢN ỨNG ENZYME	33
2.2.1. Sơ lược chung về động học enzyme	33
2.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến tốc độ phản ứng	35
2.3. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ ENZYME	44
2.3.1. Nguyên lý phương pháp xác định hoạt độ enzyme	44
2.3.2. Đơn vị đo hoạt độ enzyme.	45
CHƯƠNG 3: CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH VÀ TINH SẠCH ENZYME	47
3.1. NHỮNG ĐIỀU CẦN LƯU Ý KHI TÁCH CHIẾT ENZYME	47
3.2. CHỌN NGUỒN NGUYÊN LIỆU	48
3.2.1. Từ mô và cơ quan động vật	48
3.2.2. Từ thực vật	49
3.2.3. Từ vi sinh vật	49
3.3. CHIẾT RÚT ENZYME	53
3.3.1. Đối với mô tế bào thực vật	53
3.3.2. Đối với mô tế bào động vật	53
3.3.3. Đối với tế bào nấm men	53
3.3.4. Đối với tế bào vi khuẩn	54
3.4. TINH SẠCH ENZYME	55
3.4.1. Khái niệm	55
3.4.2. Các phương pháp tinh sạch enzyme	56
3.5. ĐÁNH GIÁ ĐỘ TINH SẠCH CỦA ENZYME	64
3.6. TẠO CHẾ PHẨM ENZYME	65

CHƯƠNG 4: CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME.....	68
4.1. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME TỪ VI SINH VẬT	68
4.1.1. Nguyên lý điều hoà quá trình sinh tổng hợp enzyme	68
4.1.2. Phân lập, tuyển chọn và cải tạo giống vi sinh vật	77
4.1.3. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme:	82
4.1.4. Các phương pháp nuôi cấy vi sinh vật:	89
4.1.5. Phương pháp thu nhận một số enzyme quan trọng từ VSV:.....	99
4.2. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME AMYLASE	106
4.2.1. Giới thiệu về enzyme amylase	106
4.2.2. Công nghệ sản xuất enzyme amylase môi trường rắn xốp	107
4.2.3. Công nghệ sản xuất enzyme amylase nuôi cấy bề sâu.....	112
4.3. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYME PROTEASE	115
4.3.1. Tổng quan về enzyme protease	115
4.3.2. Nguyên liệu dùng trong sản xuất protease.	119
4.3.3. Công nghệ sản xuất chế phẩm protease từ vsv nuôi cấy bề mặt.....	119
4.3.4. Công nghệ sản xuất enzyme protease từ VSV lên men chìm	120
CHƯƠNG 5: CHẾ TẠO VÀ SỬ DỤNG ENZYME CỐ ĐỊNH.....	122
5.1. TỔNG QUAN VỀ ENZYME CỐ ĐỊNH	122
5.2.1. Hấp phụ (adsorption) enzyme trên bề mặt giá thể.	123
5.2.2. Liên kết ion giữ enzyme và chất mang	125
5.2.3. Giữ enzyme trong gel (entrapment)	125
5.2.4. Bọc enzyme trong các nang nhỏ (microcapsule)	129
5.2.5. Tạo liên kết chéo (cross-linking) giữa các phân tử enzyme.....	130
5.2.6. Gắn enzyme vào chất mang rắn bằng liên kết cộng hóa trị	131
5.3. CÁC REACTOR CHỨA ENZYME CỐ ĐỊNH:	140
5.3.1. Reactor hoạt động theo chu kỳ.....	141
5.3.2. Reactor hoạt động theo kiểu dòng chảy:.....	141
5.4. SỬ DỤNG ENZYME CỐ ĐỊNH	143
5.4.1. Trong y học:	143

5.4.2. Trong công nghiệp	143
5.4.3. Sử dụng aminoacylase cố định để sản xuất axit amin.....	144
5.4.4. Sản xuất L - axit aspartic bằng enzyme asparase cố định.....	145
5.4.5. Sản xuất axit L-malic bằng enzyme fumarase cố định:	146
5.4.6. Sản xuất nhóm penixilin-axit 6 amino penicillinic (6-APA)	147
5.4.7. Thủy phân lactose bằng enzyme lactase cố định:	148
5.4.8. Ứng dụng trong công nghệ môi trường:.....	149
5.5. CHẾ TẠO VÀ SỬ DỤNG CẢM BIẾN SINH HỌC (BIOSENSOR).....	149
5.5.1. Giới thiệu cảm biến sinh học.....	150
5.5.2. Cấu tạo cơ bản của cảm biến sinh học	152
5.5.3. Nguyên lý làm việc của cảm biến sinh học.....	153
5.5.4. Phân loại cảm biến sinh học.....	154
CHƯƠNG 6: PHẠM VI ỨNG DỤNG VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ ENZYME.....	157
6.1. THÀNH TỰU CỦA NGÀNH CÔNG NGHỆ ENZYME	157
6.2. ỨNG DỤNG CỦA ENZYME	160
6.2.1. Trong hoá phân tích để định tính và định lượng một số chất.	160
6.2.2. Trong y học có thể sử dụng enzyme để chữa bệnh	161
6.2.3. Trong công nghiệp	162
6.2.4. Trong thực phẩm	162
6.2.5. Trong nông nghiệp.....	164
6.3. GIỚI THIỆU MỘT SỐ LOẠI ENZYME CHỦ YẾU	165
6.3.1. Amylase:.....	165
6.3.2. Glucoamilase.....	169
6.3.3. Oligo-1,6-glucozidase	170
6.3.4. Protease:	171
6.3.5. Pectinase.....	174
6.3.6. Hydrolase: (pectihydrolase)	174
6.3.7. Transeliminase (TE).....	176

6.3.8. Pectinase.....	177
6.3.9. Cellulase:.....	180
6.3.10. Saccharase và glucooxydase.	182
TÀI LIỆU THAM KHẢO	185

LỜI NÓI ĐẦU

Công nghệ enzyme là một trong những lĩnh vực của công nghệ sinh học hiện đại, đó là một ngành sản xuất ra các chế phẩm enzyme. Enzyme là chất xúc tác sinh học không độc hại, có hoạt lực xúc tác mạnh và có bản chất là protein, enzyme rất phổ biến trong tự nhiên, rất cần thiết cho rất nhiều quá trình hóa học trong tế bào và sinh vật sống. Sự hiểu biết về vai trò của enzyme trong tất cả cơ thể sinh vật sống trên Trái Đất, là tiền đề cơ bản cho sự phát triển khoa học về enzyme và công nghiệp sản xuất các chế phẩm enzyme.

Sản xuất chế phẩm enzyme là một trong những phương hướng chính trong định hướng phát triển công nghiệp vi sinh. Trong những năm qua sản lượng enzyme luôn tăng về khối lượng, chủng loại và lĩnh vực ứng dụng. Các chế phẩm enzyme được sử dụng trong các ngành như công nghiệp thực phẩm và công nghiệp nhẹ, mỹ phẩm, công nghiệp tẩy rửa, nông nghiệp, các nghiên cứu phân tích, dược phẩm và bảo vệ sức khỏe. Hầu như tất cả các nhà máy vi sinh đều xây dựng trên cơ sở sản xuất các chế phẩm enzyme, do vậy nhu cầu về chuyên gia kỹ thuật nắm bắt công nghệ sản xuất enzyme ngày càng tăng. Công nghiệp enzyme phát triển phụ thuộc rất nhiều không chỉ về kiến thức chuyên sâu và những nghiên cứu trong sản xuất, mà còn phụ thuộc vào sự hiểu biết và vận dụng khi giải quyết những vấn đề nghiên cứu công nghệ và phát triển sản phẩm mới trong các lĩnh vực vi sinh vật, hóa sinh, hóa lý và hóa keo, di truyền và đặc biệt là enzyme học – đây là khoa học, là tri thức cơ bản có tính nền móng trong sản xuất chế phẩm enzyme.

Ưu điểm của enzyme so với các chất xúc tác hóa học là khả năng hoạt động mạnh ở áp suất thường, ở nhiệt độ 20 đến 70⁰C và vùng pH từ 1-12. Phần lớn enzyme có tính đặc hiệu cơ chất rất mạnh, điều đó cho phép enzyme chỉ xúc tác với một cơ chất xác định trong một hỗn hợp có nhiều tạp chất, hay nói cách khác tính chọn lọc xúc tác với chỉ một loại polymer sinh học. Những điều nói trên, chứng minh công nghiệp sản xuất enzyme là một trong những ưu thế trong công nghệ sinh học.

Mục đích cơ bản của giáo trình Công nghệ enzyme là giúp sinh viên, học viên cao học làm quen với công nghệ, kỹ thuật sản xuất chế phẩm enzyme từ nguyên liệu có nguồn gốc vi sinh vật, thực vật và động vật. Trong công nghệ sản xuất enzyme sử dụng rất nhiều máy móc và thiết bị công nghệ sinh học nên để nắm bắt tốt kiến thức sinh viên cần hiểu rõ

các quá trình và thiết bị công nghệ sinh học.

Trong giáo trình này, sinh viên cũng được nhắc lại một số kiến thức về cấu trúc và động lực học enzyme. Phần cốt lõi của giáo trình nằm ở các quá trình công nghệ tách, tinh sạch, tạo chế phẩm và bảo quản enzyme, bên cạnh đó tác giả cũng nhấn mạnh tới một số loại enzyme phổ biến và phương hướng khai thác trong các lĩnh vực khác nhau.

Tác giả rất biết ơn và trân trọng tiếp thu những đóng góp ý kiến có tính phản biện của quý vị đồng nghiệp độc giả về nội dung để giáo trình ngày càng trở nên hoàn thiện hơn!

TÁC GIẢ

CHƯƠNG 1. CẤU TẠO VÀ BẢN CHẤT HÓA HỌC CỦA ENZYME

1.1. BẢN CHẤT HÓA HỌC CỦA ENZYME

Chữ «enzyme» bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp có nghĩa là chất trong nấm men.

Enzyme được các cơ thể sinh vật sinh tổng hợp nên và tham gia các phản ứng hóa học trong cơ thể. Enzyme là một chất hữu cơ, trong khi đó các chất xúc tác khác thường là vô cơ. Sau này các nhà khoa học khác đã xác định được chúng là protein.

Như vậy, enzyme là một protein có khả năng tham gia xúc tác các phản ứng trong và ngoài cơ thể.

Điểm rất đặc biệt của enzyme là chúng hoạt động trong điều kiện nhiệt độ ôn hòa giống nhiệt độ ôn hòa của cơ thể sinh vật. Trong khi đó, các chất hóa học cần có nhiệt độ cần thiết cho phản ứng. Nhiệt độ càng cao, tốc độ phản ứng xúc tác hóa học càng lớn. Ưu điểm cơ bản của enzyme khi tham gia các phản ứng sinh học có thể tóm tắt như sau:

- + Enzyme có thể tham gia hàng loạt phản ứng trong chuỗi phản ứng sinh hóa để giải phóng hoàn toàn năng lượng hóa học có trong vật chất.

- + Enzyme có thể tham gia những phản ứng độc lập nhờ khả năng chuyển hóa rất cao.

- + Enzyme có thể tạo ra những phản ứng dây chuyền. Khi đó sản phẩm phản ứng đầu sẽ là nguyên liệu hay cơ chất cho những phản ứng tiếp theo.

- + Trong các phản ứng enzyme, sự tiêu hao năng lượng thường rất ít.

- + Enzyme luôn được tổng hợp trong tế bào sinh vật. Số lượng enzyme rất lớn và luôn luôn tương ứng với số lượng các phản ứng xảy ra trong cơ thể. Các phản ứng xảy ra trong cơ thể luôn luôn có sự tham gia xúc tác bởi enzyme.

- + Có nhiều enzyme không bị mất đi sau phản ứng. Ngày nay, các nhà khoa học đã tìm ra trên 1000 loại enzyme khác nhau có trong tế bào sinh vật, số lượng này rất nhỏ so với số lượng có thật trong mỗi tế bào. Trong hơn 1000 loại enzyme đã biết, loài người mới thu nhận và kết tinh được khoảng 200 loại.

1.1.1. Bản chất protein của enzyme

Kích thước phân tử lớn (20000 – 1000 000 dalton) nên enzyme không đi qua màng bán thấm (giống đặc điểm của protein).

Enzyme hòa tan được trong các dung môi có cực (nước, muối loãng), không hòa tan trong dung môi không phân cực

Dung dịch enzyme có tính chất của dung dịch keo ưa nước.

Khi hòa tan enzyme vào nước, các phân tử nước lưỡng cực sẽ kết hợp với các nhóm ion hoặc các nhóm phân cực trong phân tử enzyme tạo thành lớp vỏ hydrate

Enzyme không bền đối với tác dụng nhiệt (mất hoạt tính ở nhiệt độ cao): Enzyme mất khả năng hoạt động dưới tác dụng của tác nhân gây biến tính protein như acid mạnh, kiềm mạnh, muối kim loại nặng.

Enzyme có tính chất lưỡng tính (trong điều kiện điện ly của môi trường có thể tồn tại ở dạng cation, anion hoặc trung hòa điện. Đây là cơ sở khoa học của phương pháp điện di xác định độ thuần khiết và tiến hành phân tách enzyme)

Kết luận: Từ những luận giải trên có thể đi đến kết luận: Bản chất hóa học của enzyme là protein.

1.1.2. Lịch sử nghiên cứu chứng minh enzyme là protein

Ban đầu người ta cho rằng chất xúc tác sinh học (enzyme) là một tổ chức có sự sống như những vi sinh vật; về sau nhận thấy những trích ly từ sự nghiền nát “con men” thu được chất trích ly cũng có khả năng xúc tác như bản thân “con men” sống. Từ đó phân biệt được hai khái niệm: fecment (con men) và enzyme (chất trích ly từ con men)

Năm 1026 Summer thu nhận được ureaza của đậu tương dưới dạng tinh thể.

Năm 1930, 1931 North và Kunitz đã tách được pepsin và tripxin

Trên đây là những bằng chứng xác nhận các tinh thể protein thu được chính là enzyme

1.2. THÀNH PHẦN CẤU TẠO CỦA ENZYME

Enzyme được cấu tạo từ các L – axit amin kết hợp với nhau bằng liên kết peptide. Khi thủy phân protein-enzyme, ta sẽ thu được các axit amin. Trong một số trường hợp, ngoài axit amin ra người ta còn thu được những thành phần khác.

- Nếu một enzyme, khi bị thủy phân, ta chỉ thu được các axit amin thì enzyme này được gọi là *enzyme đơn cấu tử* hay còn gọi là *enzyme đơn giản*.

- Nếu 1 enzyme, khi bị thủy phân, ta thu được ngoài axit amin còn các thành phần

khác thì enzyme này gọi là *enzyme đa cấu tử* hay còn gọi là *enzyme phức tạp*.

Các enzyme phức tạp, ngoài protein ra còn có các thành khác như ion kim loại, vitamin, glutation dạng khử...đa số các enzyme trong cơ thể là enzyme đa cấu tử. Trong thành phần enzyme đa cấu tử người ta phân biệt rõ các phần như sau:

+ Phần protein được gọi là *feron* hay *apoenzyme*

+ Phần không phải protein gọi là nhóm ngoại “agon”. Phần này thường là những chất hữu cơ đặc hiệu có nhiệm vụ làm cofacto kết hợp với enzyme trong quá trình xúc tác.

Chất hữu cơ đặc hiệu có thể gắn chặt vào phần apoenzyme, hoặc chỉ liên kết lỏng lẻo và có thể tách khỏi phần apoenzyme khi cho thấm tích qua màng. Chất hữu cơ đặc hiệu gắn chặt vào phần apoenzyme và đặc biệt là những trường hợp được gắn bằng liên kết cộng hóa trị, gọi là nhóm ngoại (prothetic). Còn trường hợp chất hữu cơ đặc hiệu đó có thể tách dễ dàng và xác định được hằng số phân ly của chúng thì chất hữu cơ đặc hiệu gọi là *coenzyme*. Coenzyme thường là dẫn xuất của các vitamin hòa tan trong nước. Vì vậy, khi thiếu một vitamin nào đó sẽ ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme tương ứng trong tế bào, vi phạm quá trình trao đổi chất trong cơ thể, gây nên những bệnh đặc trưng.

Một phức hợp hoàn chỉnh gồm cả apoenzyme và coenzyme được gọi là *holoenzyme*.

Tuy nhiên sự phân biệt coenzyme và nhóm ngoại chỉ là tương đối, vì khó có thể có một tiêu chuẩn thật rõ ràng nào để phân biệt gắn chặt hay không gắn chặt, hơn nữa những nghiên cứu gần đây đã thấy rằng, nhiều coenzyme cũng kết hợp với apoenzyme bằng liên kết cộng hóa trị.

Lưu ý: một số enzyme được coi là protein đơn giản như trypsin, chymotrypsin...cũng có chứa kim loại. Có ion kim loại lại là thành phần của chất hữu cơ đặc hiệu (coenzyme) như sắt (Fe) gắn với nhân porphyrin trong enzyme hệ xytocrom, catalaza, peroxidaza...Có những kim loại tuy là thành phần cấu tạo của phân tử enzyme, nhưng có thể dễ dàng tách khỏi phân tử enzyme, ví dụ: polyphenolozidaza có chứa đồng (Cu), cacbonic anhydraza có chứa kẽm (Zn)...những trường hợp này nếu mất kim loại, enzyme sẽ mất hoạt tính và hoạt tính enzyme có thể được phục hồi nếu trả lại kim loại vốn có cho enzyme đó, hoặc cung cấp cho enzyme một cation khác tương tự.

Như vậy kim loại có thể là thành phần cấu tạo phân tử enzyme, hoặc phức hợp

enzyme – cơ chất, hoặc có thể là chất cộng hợp (cofacto) trong hoạt động xúc tác của enzyme, hoặc cũng có thể vừa là thành phần cấu tạo, vừa là chất cộng hợp.

1.3. TRUNG TÂM HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME

Trong khi tham gia xúc tác, không phải toàn bộ tất cả các phần trong cấu trúc của enzyme tham gia mà chỉ có một phần giới hạn của phân tử enzyme tham gia phản ứng. Phần giới hạn tham gia phản ứng được gọi là *trung tâm hoạt động (TTHĐ)*.

Kết quả nghiên cứu TTHĐ của nhiều enzyme có thể đưa ra một số nhận xét như sau:

- TTHĐ chỉ chiếm một tỷ lệ thể tích tương đối bé trong phân tử enzyme, nằm trong “túi” hoặc trong “khe”, ở gần hoặc trên bề mặt phân tử.

- TTHĐ bao gồm nhiều nhóm chức khác nhau của axit amin, phân tử nước liên kết, trong nhiều trường hợp có cả ion kim loại, các nhóm chức của coenzyme (enzyme đa cấu tử).

Các nhóm chức của axit amin thường gặp trong TTHĐ là

+ Nhóm sulthydryl (-SH) của xystein

+ Nhóm amin (-NH₂) đầu N hoặc ε-amin của lysine

+ Nhóm cacboxyl (-COOH) của axit aspartic và glutamic

+ Nhóm hydroxyl (-OH) của serin, treonin và tyrosin

+ Vùng indol của tryptophan, vùng imidazol của histidin và nhóm guanilic của arginin

- TTHĐ có cấu trúc không gian xác định. Các nhóm chức của axit amin trong TTHĐ có thể ở xa nhau trong chuỗi polypeptid, cách nhau vài chục gốc axit amin nhưng lại gần nhau trong không gian. Giữa các nhóm chức này (và hoặc là ion kim loại, hoặc là coenzyme) được định hướng xác định trong không gian, cách nhau những khoảng cách nhất định (thường bé hơn 0,3 nm), tạo thành cấu hình không gian xác định, được giữ vững nhờ mạng lưới liên kết hydrogen. Mạng lưới này đủ linh động để có thể dễ dàng thay đổi cấu hình không gian của TTHĐ dưới tác dụng của các yếu tố bên ngoài khi tương tác với cơ chất, hoặc các chất khác.

- Sự tương tác về cấu hình không gian giữa TTHĐ và cơ chất được hình thành trong quá trình enzyme tiếp xúc với cơ chất.

- Giữa cơ chất và TTHĐ tạo thành nhiều tương tác yếu, do đó có thể dễ dàng bị cắt đứt trong quá trình phản ứng để giải phóng enzyme và sản phẩm phản ứng.

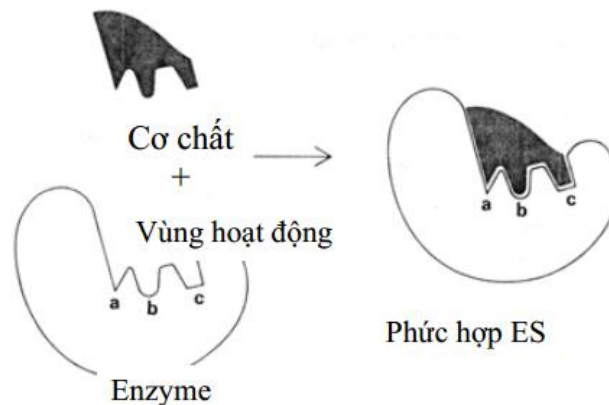
- TTHĐ của enzyme có cấu trúc bậc IV có thể nằm trên một phần dưới đơn vị, hoặc bao gồm các nhóm chức thuộc các phần tiểu đơn vị khác nhau. Trong trường hợp thứ hai khi enzyme bị phân ly, cấu trúc không gian của TTHĐ bị phá hủy làm mất hoạt tính xúc tác của nó.

Dưới đây là một số mô hình TTHĐ của enzyme

1.3.1. Mô hình TTHĐ của enzyme theo Emil Fisher (1894) – mô hình cổ điển

TTHĐ của enzyme có cấu trúc không gian tương ứng với cấu trúc của phân tử cơ chất cũng giống như sự tương ứng giữa ổ khóa và chìa khóa.

Mô hình này được các nhà khoa học thừa nhận trong thời gian dài (hình 1.1).



Hình 1.1: Mô hình TTHĐ của enzyme E. Fisher

1.3.2. Mô hình Koshland – Mô hình hiện đại

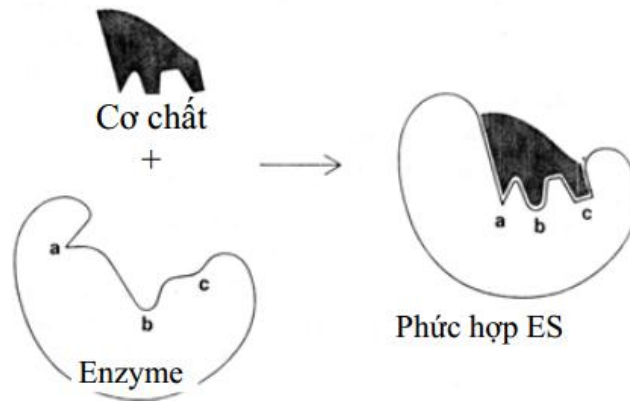
- Ngày nay đã có nhiều dẫn liệu thực nghiệm chứng minh cấu trúc không gian của enzyme cũng như protein không cứng mà mềm dẻo, linh động (hình 1.2).

- Theo quan niệm hiện nay, khi enzyme tương tác với cơ chất các nhóm chức ở phần TTHĐ của phân tử enzyme thay đổi vị trí trong không gian tạo thành hình thể khớp với hình thể của cơ chất, vì vậy gọi là sự “khớp cảm ứng”.

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

***Chú ý:**

+ Một số enzyme có trung tâm hoạt động tồn tại dưới dạng chưa được hoạt hóa gọi là “zimogon” hay proenzyme. Như vậy những enzyme này cần phải được hoạt hóa bằng cơ chế tự xúc tác hoặc bằng enzyme khác...



Hình 1.2: Mô hình TTHĐ của enzyme theo KoshlADN

+ Enzyme allosteric (enzyme lập thể, enzyme điều hòa) trong phân tử của chúng ngoài trung tâm hoạt động còn có một số vị trí khác có thể tương tác với các chất khác gọi là “trung tâm allosteric”. Các chất kết hợp vào các trung tâm này gọi là “các chất điều hòa allosteric” (chất điều hòa dị lập thể)

Ở đây, các enzyme allosteric là các protein có cấu trúc bậc 4; các enzyme allosteric được điều hòa theo kiểu hỗn hợp, vừa là homotropic và heterotropic.

1.4. TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA ENZYME

- Tính đặc hiệu của enzyme là một trong những khác biệt chủ yếu giữa enzyme với các chất xúc tác khác.

- Mỗi enzyme chỉ có khả năng xúc tác cho một hay một số chất nhất định theo một kiểu phản ứng nhất định. Sự tác dụng có tính lựa chọn cao này gọi là *tính đặc hiệu* hoặc *tính chuyên môn hóa* của enzyme.

1.4.1. Đặc hiệu cơ chất

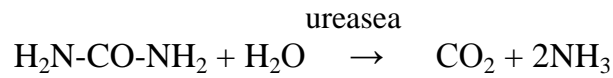
Cơ chất là chất có khả năng kết hợp vào TTHĐ của enzyme và bị chuyển hóa dưới tác dụng của enzyme. Mức độ đặc hiệu của enzyme không giống nhau người ta phân biệt thành các mức sau:

1.4.1.1. Đặc hiệu tuyệt đối:

Enzyme chỉ tác dụng trên 1 cơ chất nhất định và hầu như không có tác dụng với chất

nào khác.

Ví dụ: ureaza hầu như chỉ có tác dụng với ure, thủy phân nó thành khí cacbonic và ammoniac:



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

Ứng dụng: Enzyme có tính đặc hiệu tuyệt đối dùng để định lượng cơ chất.

1.4.1.2. Đặc hiệu tương đối:

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

Ví dụ: lipase có khả năng thủy phân được tất cả các mối liên kết este; Aminopeptitaza có thể xúc tác thủy phân nhiều peptide.

a) Đặc hiệu nhóm

Enzyme có khả năng tác dụng lên 1 kiểu liên kết hóa học nhất định với điều kiện một trong hai phân tử tham gia tạo thành liên kết phải có cấu tạo xác định.

Ví dụ: Carboxypeptitaza có khả năng phân cắt liên kết peptide gần nhóm cacboxyl tự do.

Maltase chỉ tác dụng cho phản ứng thủy phân liên kết glucoside được tạo thành từ nhóm -OH glucoside của α -D-glucose với nhóm -OH của một monose khác

b) Đặc hiệu liên kết

Mức độ đặc hiệu tương đối thấp, chỉ có tính đặc hiệu đối với liên kết bị cắt đứt nên gọi là đặc hiệu liên kết. Ví dụ: một số esterase xúc tác cho phản ứng liên kết ester, một số peptidase thủy phân liên kết peptide... Các enzyme này có thể tác dụng đối với nhiều cơ chất khác nhau, chỉ cần chứa các liên kết tương ứng.

1.4.2. Đặc hiệu quang học

Enzyme chỉ có tác dụng với một trong hai dạng đồng phân quang học của cơ chất.

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

dạng khác.

-Enzyme cũng thể hiện đặc hiệu lên 1 dạng đồng phân hình học cis hoặc trans.

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

-Enzyme còn có khả năng phân biệt được 2 gốc đối xứng trong phân tử giống nhau hoàn toàn về mặt hóa học.

1.4.3. Đặc hiệu phản ứng

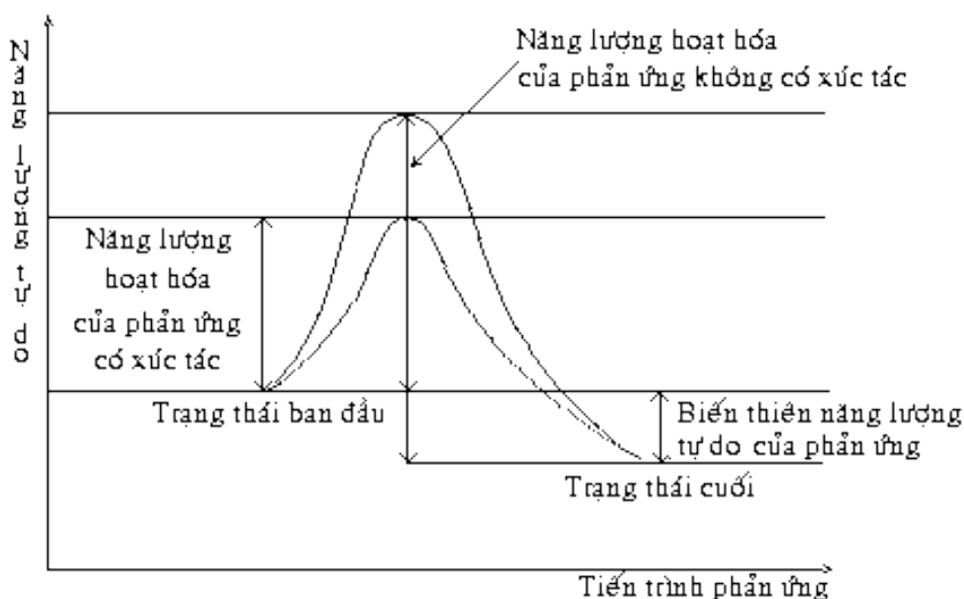
Mỗi enzyme chỉ có thể xúc tác cho một trong các kiểu phản ứng chuyển hóa một cơ chất nhất định.

Ví dụ: phản ứng oxy hóa khử, chuyển vị, thủy phân,...

1.5. CƠ CHẾ TÁC DỤNG CỦA ENZYME

1.5.1. Enzyme làm giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng

Enzyme là chất xúc tác sinh học, do đó trước tiên chúng mang đầy đủ các đặc điểm của chất xúc tác nói chung.



Hình 1.3. Biến thiên năng lượng tự do trong các phản ứng hóa học

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

đẩy vận tốc phản ứng hóa học.

Như vậy, trong các phản ứng có xúc tác, chất xúc tác *làm giảm năng lượng hoạt hóa* của phản ứng hóa học, có nghĩa là nó chỉ tham gia vào các phản ứng trung gian mà không đóng vai trò là chất tham gia phản ứng. Sau phản ứng, chất xúc tác lại phục hồi về trạng thái ban đầu để tiếp tục xúc tác (hình 1.3).

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

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

Trong phản ứng có sự xúc tác của enzyme, nhờ sự tạo thành phức hợp trung gian “enzyme - cơ chất” mà cơ chất được hoạt hóa. Khi cơ chất kết hợp vào enzyme, do kết quả của sự cực hóa, sự chuyển dịch của các electron và sự biến dạng của các liên kết tham gia trực tiếp vào phản ứng dẫn tới làm thay đổi động năng cũng như thế năng, kết quả là làm cho phân tử cơ chất trở nên hoạt động hơn, nhờ đó tham gia phản ứng dễ dàng.

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

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

Đặc điểm làm giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng enzyme có ý nghĩa rất lớn trong sinh lý của sinh vật. Đặc điểm này gắn liền với quá trình tiến hóa của sinh vật, nếu nhiệt độ cơ thể tăng sẽ làm rối loạn toàn bộ quá trình sinh lý của tế bào. Khi đó cơ thể sẽ chuyển từ trạng thái sinh lý bình thường sang trạng thái bệnh lý. Cơ thể ở trạng thái bệnh lý là kết quả của sự rối loạn các phản ứng enzyme. Chính vì thế, việc duy trì trạng thái sinh lý bình thường của tế bào hay của cơ thể đồng nghĩa với việc duy trì hoạt động hài hòa của các phản ứng enzyme.

1.5.2. Enzyme tham gia vào các phản ứng sinh hóa thường làm tăng tốc độ phản ứng

Tốc độ phản ứng tăng sẽ làm tăng mức độ chuyển hóa cơ chất. Như vậy quá trình trao đổi chất của tế bào sẽ tăng. Kết quả là tế bào sẽ tăng nhanh về số lượng và khối lượng. Như vậy, enzyme không chỉ đóng vai trò duy trì trạng thái sinh lý của tế bào mà còn đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển và sinh sản của tế bào, duy trì sự chuyển hóa vật chất trong các chu trình chuyển hóa trong thiên nhiên. Nhờ có hoạt động của enzyme mà khối lượng cơ chất được chuyển hóa trong một đơn vị thời gian trong tế bào lớn gấp hàng ngàn lần khối lượng tế bào.

Bản chất của các phản ứng enzyme là khi có sự tham gia xúc tác của các enzyme, các cơ chất sẽ được hoạt hóa mạnh, từ đó làm thay đổi tính chất hóa học của cơ chất, kết quả sau phản ứng sẽ tạo ra những sản phẩm của phản ứng. Dưới tác dụng của enzyme, cơ chất có thể có những thay đổi không chỉ về cấu trúc hóa học, mà còn thay đổi tính chất hóa học. Quá trình xúc tác của enzyme xảy ra qua 3 giai đoạn theo sơ đồ sau:



Trong đó: E là enzyme, S là cơ chất (Substrate), ES là phức hợp “enzyme - cơ chất”, P là sản phẩm (Product).

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

- *Giai đoạn thứ hai*: xảy ra sự biến đổi cơ chất dẫn tới sự kéo căng và phá vỡ các liên kết đồng hóa trị tham gia phản ứng. Kết quả là làm cho cơ chất được hoạt hóa và dễ dàng tham gia phản ứng hơn

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

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

Với phương pháp nghiên cứu bằng tia X và phương pháp hóa học người ta đã làm

sáng tỏ cách thức gắn cơ chất và cơ chế hoạt động của một số enzyme như lysozyme, chymotrypsin, carboxypeptidase A v.v... Sau đây sẽ giới thiệu chi tiết hơn cơ chế phản ứng của carboxypeptidase A.

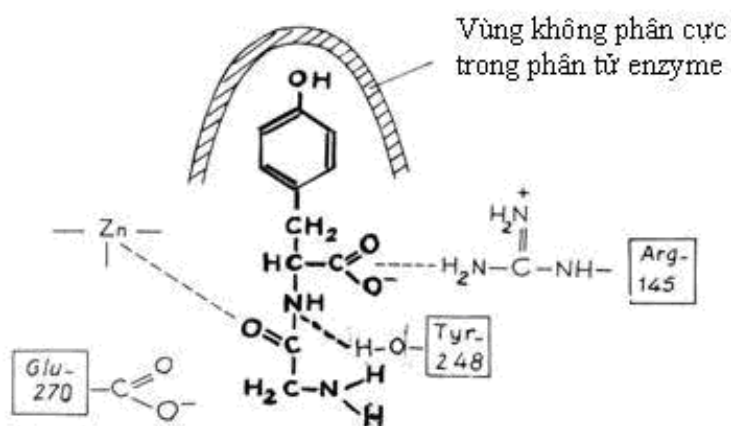
Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) thuộc nhóm peptidhydrolase, xúc tác cho sự thủy phân liên kết peptid, phản ứng xảy ra với vận tốc lớn nếu amino acid đầu C là amino acid thơm, enzyme này cũng thủy phân liên kết este.

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

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

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

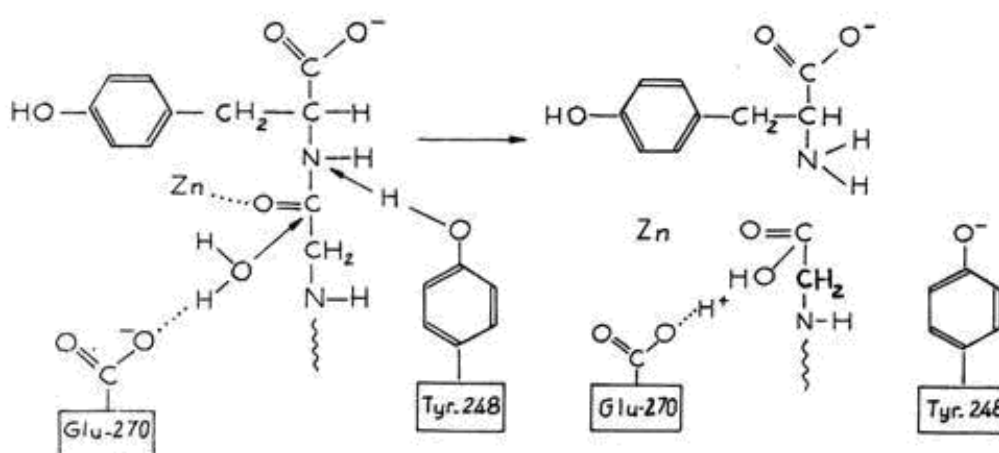
- Tạo thành phức ES: Khi tiếp xúc với cơ chất, các nhóm trong trung tâm hoạt động của enzyme thay đổi vị trí trong không gian. Nhóm guanidin của Arg - 145 cũng như nhóm carboxyl của Glu - 270 dịch chuyển 2Å, nhóm hydroxyl của Tyr - 248 dịch chuyển 12Å từ chỗ gần trên bề mặt phân tử chuyển vào trong đến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



Hình 1.4. Sơ đồ biểu diễn tương tác giữa glycylytyrosine với các nhóm chức năng trong trung tâm hoạt động của carboxypeptidase A (cơ chất viết nét đậm)

Tương tác giữa các nhóm chức của trung tâm hoạt động với glycylytyrosine như hình 1.4:

- Nhóm carboxyl tự do của cơ chất kết hợp với nhóm tích điện dương của Arg - 145 của enzyme qua liên kết ion.
- Nhóm -NH trong liên kết peptide của cơ chất tạo thành liên kết hydrogen với nhóm -OH của Tyr - 248.
- Oxy trong nhóm - CO - của liên kết peptide tương tác với Zn, còn carbon trong nhóm - CO - này tương tác với nhóm carboxyl của Glu - 270 qua phân tử nước.
- Cắt đứt liên kết giải phóng sản phẩm.



Hình 1.5. Cơ chế phản ứng xúc tác của carboxypeptidase A

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

Gốc Glu - 270 hoạt hóa phân tử nước, nhóm - OH được tạo thành tấn công trực tiếp vào nguyên tử carbon của - CO - (trong liên kết peptide của cơ chất), liên kết peptid bị kéo căng ra và bị đứt. Gốc Tyr - 248 nhường hydrogen cho nhóm NH trong liên kết peptid cho cơ chất, giải phóng sản phẩm đầu tiên là tyrosine của cơ chất và acyl - enzyme (hình 1.5).

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

1.6. CÁCH GỌI TÊN VÀ PHÂN LOẠI ENZYME

1.6.1. Cách gọi tên enzyme

1.6.1.1. Tên thông dụng

- Trước kia người ta thường gọi tên enzyme một cách tùy tiện, tùy theo tác giả.
- Các tên gọi quen dùng như pepsin, tripsin, kimotripsin,... hiện nay vẫn dùng gọi là tên thông dụng

1.6.1.2. Tên hệ thống

Theo quy ước quốc tế tên gọi hệ thống của enzyme được gọi theo tên cơ chất đặc hiệu của nó, cùng với tên của kiểu phản ứng mà nó xúc tác, cộng thêm đuôi “aza” (ase).

Tên gọi hệ thống thường gồm hai phần:

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

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

Ví dụ: tên thông dụng: ureaza; tên hệ thống sẽ là: cacbamit-amido-hydrolaza

1.6.2. Cách phân loại enzyme

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

1.6.2.1. Oxydoreductases – lớp 1

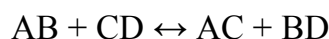
Là các enzyme xúc tác cho phản ứng oxy hóa khử

Như vậy, trong các phản ứng do chúng xúc tác xảy ra sự chuyển electron, sự vận chuyển hydro, sự oxy hóa bởi oxy phân tử, bởi peroxythyclo hoặc bởi các chất oxy hóa khác

1.6.2.2. Transpherases – lớp 2

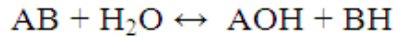
Các enzyme xúc tác cho phản ứng chuyển vị chúng thực hiện các phản ứng vận chuyển một nhóm nào đó từ chất này sang chất khác. Các transpherase do bản chất của những gốc mà chúng vận chuyển có thể tham gia vào các quá trình trao đổi chất rất khác nhau.

Phản ứng do enzyme xúc tác có dạng:

**1.6.2.3. Hydrolases – lớp 3**

Các enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân. Trong nhóm này các enzyme phân giải este (mỡ), glucosit, amit, peptite, protein

Phản ứng có dạng:



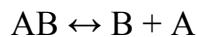
1.6.2.4. Lyases – lớp 4

Các enzyme xúc tác cho phản ứng cắt không cần nước, loại nước tạo thành liên kết đôi hoặc kết hợp với phân tử nước tạo thành liên kết đôi.

Tức là, enzyme xúc tác quá trình phân cách 1 nhóm nào đó ra khỏi hợp chất mà không có sự tham gia của nước, tức là không xảy ra sự thủy phân.

Thuộc nhóm này có các enzyme: aldolases, dehydratases, decarboxylases.

Phản ứng xúc tác có dạng:



1.6.2.5. Isomerases – lớp 5

Các enzyme xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa

Nhóm enzyme xúc tác phản ứng chuyển hóa giữa hai dạng đồng phân của một chất (như dạng đồng phân quang học L, D, đồng phân hình học cis, trans hay từ dạng aldo sang xeto).

1.6.2.6. Ligases – lớp 6

Các enzyme xúc tác cho phản ứng tổng hợp có sử dụng liên kết giàu năng lượng của ATP, v.v...

Tham gia trong các phản ứng gắn hai phân tử (nói cách khác đi là trong quá trình tổng hợp) có kèm theo sự phân giải các liên kết cao năng lượng của ATP để giải phóng AMP hoặc ADP

Sau đó, từ 6 lớp, mỗi lớp chia thành nhiều tổ

Mỗi tổ lại chia thành nhiều nhóm

Do đó, trong bảng phân loại, đứng trước tên enzyme thường có 4 con số:

+Số thứ nhất chỉ lớp

+Số thứ 2 chỉ tổ

+Số thứ 3 chỉ nhóm

+Số thứ 4 chỉ enzyme

Ví dụ: 2.6.1.1. L-aspartat

1.7. CÁC DẠNG PHÂN TỬ CỦA ENZYME (ISOZYM).

Enzyme cùng xúc tác một loại phản ứng hóa học nhưng có thể tồn tại nhiều dạng phân tử khác nhau và có một số tính chất lý, hóa, miễn dịch khác nhau. Các dạng phân tử khác nhau của một enzyme thường được gọi là isozym. Lactat dehydrogenat có phân tử lượng khoảng 130.000 do 4 đơn vị nhỏ tạo nên, mỗi đơn vị nhỏ là một chuỗi polypeptit có trọng lượng phân tử khoảng 35.000. Các chuỗi polypeptit này được sinh tổng hợp do 2 gen khác nhau ký hiệu H và M, có nguồn gốc ở tim (H) và cơ (M), được xếp thành 5 dạng phân tử:

LDH1: HHHH

LDH2: HHHM

LDH3: HHMM

LDH4: HMMM

LDH5: MMMM

Tỷ lệ của các dạng phân tử còn có thể thay đổi tùy theo tuổi tác, trạng thái sinh lý và bệnh lý.

1.8. PHỨC HỢP ENZYME (MULTIENZYME)

Trong cơ thể còn gặp phức hợp đa enzyme gồm nhiều phân tử enzyme có liên quan với nhau trong một quá trình chuyển hóa, ví dụ: quá trình khử carboxyl-oxy hóa acid pyruvic thành acetyl coenzyme A. Phức hợp enzyme của quá trình này gồm 3 loại enzyme là pyruvat dehydrogenase, transacetylase, dihydrolipoat dehydrogenase tạo thành phức hợp chứa 24 phân tử của mỗi loại enzyme.

Hệ thống kể trên là của E.coli, còn ở cơ thể bậc cao thì phức hợp này còn phức tạp hơn nhiều. Ngoài 3 enzyme kể trên, trong E.coli còn thêm pyruvat dehydrogenase phosphatase và pyruvat dehydrogenase kinase làm nhiệm vụ điều chỉnh hoạt động của hệ thống phức hợp enzyme. Khi nồng độ ATP cao, pyruvat dehydrogenase kinase sẽ gắn hai nhóm este phosphoric vào phân tử pyruvat dehydrogenase làm cho enzyme mất hoạt tính,

ngừng quá trình khử carboxyl oxy hóa acid pyruvic thành acetyl coenzyme A. Khi thiếu ATP, enzyme pyruvat dehydrogenase phosphatase sẽ thủy phân các liên kết este phosphoric, khôi phục hoạt tính phức hợp multienzyme và tăng cường quá trình đường phân ái khí. Ngoài phức hợp multienzyme kể trên còn nhiều phức hợp multienzyme trong nhiều quá trình chuyển hóa khác như quá trình khử carboxyl oxy hóa acid α -cetoglutaric, quá trình tổng hợp acid béo ngoài ty lạp thể, quá trình tổng hợp peptit có hoạt tính kháng như gramixidin, tyroxidin.

1.9. CÁC COENZYME THƯỜNG GẶP

Nhiều loại enzyme hoạt động yêu cầu có sự cộng tác của chất hữu cơ đặc hiệu gọi là coenzyme hay nhóm phụ, song nhiều trường hợp lại yêu cầu ion kim loại, những chất này có vai trò cộng tác với enzyme được gọi là cofactor. Cofactor có thể gắn chặt vào phân tử enzyme hay lỏng lẻo có thể tách ra được gọi là coenzyme. Ngày nay người ta gọi chung những chất cộng tác với enzyme là coenzyme, thường hoạt động với số lượng rất nhỏ so với số lượng của cơ chất. Sau phản ứng nhờ tác động của hệ thống enzyme khác, coenzyme trở lại trạng thái ban đầu để tiếp tục tham gia phản ứng. Coenzyme còn có tác dụng giúp cho sự duy trì, ổn định hình dạng và cấu trúc polyme đặc hiệu của enzyme. Một enzyme có thể cộng tác với nhiều enzyme như NAD^+ , $NADP^+$ có thể phối hợp với nhiều enzyme khử hydro. Ngoài các coenzyme quen thuộc, nhiều chất chuyển hóa đóng vai trò trung gian trong các quá trình chuyển hóa cũng mang những đặc tính của coenzyme; thí dụ acid ascorbic, glucose 1-6 diphosphat.

Cấu trúc của coenzyme thường là nucleotid đơn hay đôi hoặc một phần cấu tạo phân tử là cấu trúc nucleotid, một số coenzyme có nhóm hem. Coenzyme có liên quan đến nhiều loại vitamin, vitamin là thành phần cấu tạo của coenzyme. Coenzyme thường gặp nhiều là những coenzyme oxy hóa khử và vận chuyển nhóm như bảng bảng 1.1

Các coenzyme oxy hóa khử gồm 5 nhóm: nicotinamid, flavin, quinon, metaloporphyrin và nhóm sắt không gắn vào porphyrin. Các nhóm này khác nhau về thế năng oxy hóa khử, về số điện tử được vận chuyển trong quá trình chuyển dạng khử sang dạng oxy hóa. Ba nhóm đầu trao đổi ion hydro và các phản ứng do chúng xúc tác đều thuộc loại vận chuyển hydro. Hai nhóm sau chỉ trao đổi điện tử và các phản ứng do chúng xúc tác

thuộc nhiều loại khác nhau. Thế năng oxy hóa khử của loại này thay đổi rất nhiều, tùy thuộc phân tử protein và chất cộng tác gắn vào.

Bảng 1.1: Mối liên quan giữa một số vitamin với coenzyme

Loại enzyme	Coenzyme	Vitamin
Oxydareductose	Nicotinamid (NAD ⁺ , NADP ⁺)	Vitamin PP
	Flavin (FADH ₂ , FMNH ₂)	Vitamin B ₂
	Quinon Sắt hem Sắt không hem	
Transferase	Coenzyme A	Acid pantothenic (B ₅)
	S. Adenosyl methionin Acid lipoic Glutation	
	Acid tetrahydrofolic	Acid folic
	Pyridoxal phosphat	Vitamin B ₆
	Thiamin pyrophosphat	Vitamin B ₁
	Biotin Nucleosid triphosphat	Vitamin H
	Methyl cobalamin	Vitamin B ₁₂
Hydrolase Lyase	Thyamin pyrophosphat	Vitamin B ₁
Isomease	Cobamid	Vitamin B ₁₂
Ligase		

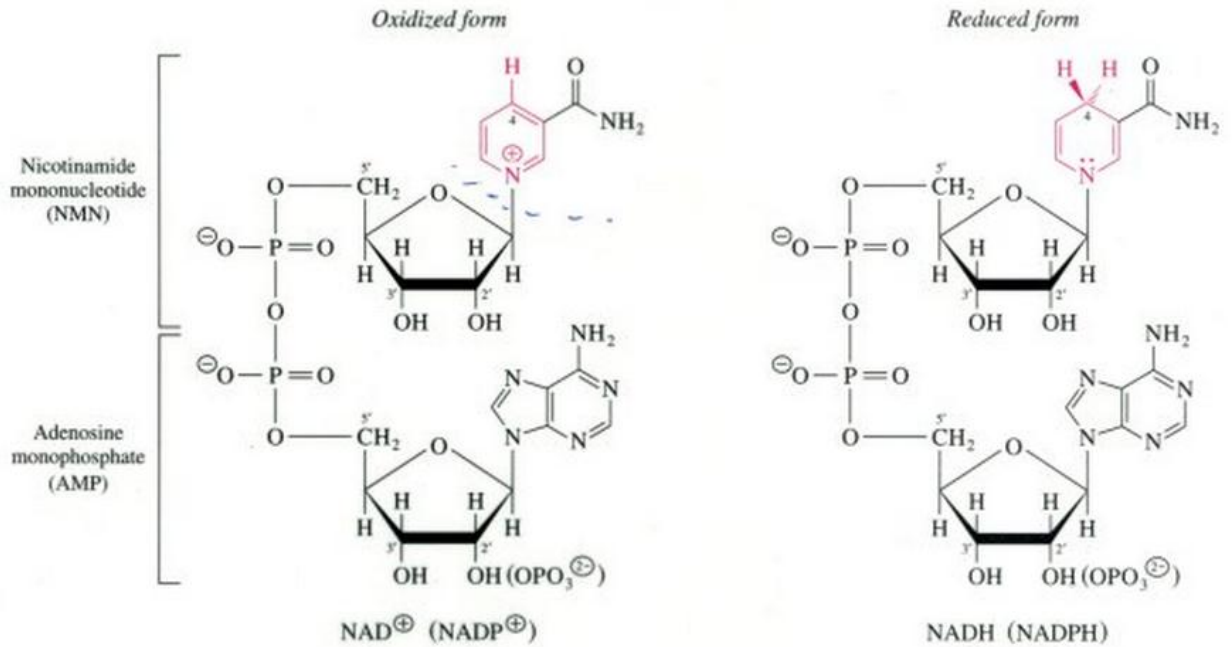
Các coenzyme vận chuyển nhóm chia làm hai nhóm chính. Nhóm thứ nhất gồm có coenzyme A, glutathion, acid lipoic và S – adenosyl – methionin. Phần hoạt động chính của các phân tử nhóm này là một nguyên tử lưu huỳnh (S), nguyên tử lưu huỳnh này có khả năng chứa muôi điện tử ở lớp điện tử ngoài cùng, có vai trò như cái túi hút điện tử, do đó làm tăng khả năng ion hóa của nguyên tử carbon (C) liên kết với nó, nhóm thứ hai gồm có biotin, thiamin pyrophosphat, pyridoxal phosphat và acid folic. Tác dụng của những chất này chủ yếu là nhờ một hệ thống liên hiệp, bao gồm một dị nguyên tử. Với tác dụng của dị nguyên tử, bộ phận phản ứng của coenzyme được ion hóa thành anion. Sự ion hóa này đã tạo ra giai đoạn mở đầu của quá trình phản ứng.

Sau đây là một số coenzyme quen thuộc:

1.9.1. Coenzyme nicotinamid:

Trong loại này thường gặp hai chất chính là nicotinamid adenin dinucleotid, viết tắt là NAD⁺ và nicotinamid adenin dinucleotid phosphat viết tắt là NADP⁺. Thành phần cấu

tạo phân tử của chúng đều có: một phân tử adenin, hai phân tử ribose và hai phân tử acid phosphoric (hình 1.6). Riêng NADP^+ có thể có một gốc phosphat thứ ba. Hai coenzyme có trong tất cả mọi tế bào; NAD^+ thường có số lượng nhiều hơn NADP^+ khoảng mười lần.



Hình 1.6: Cấu trúc coenzyme nicotinamid

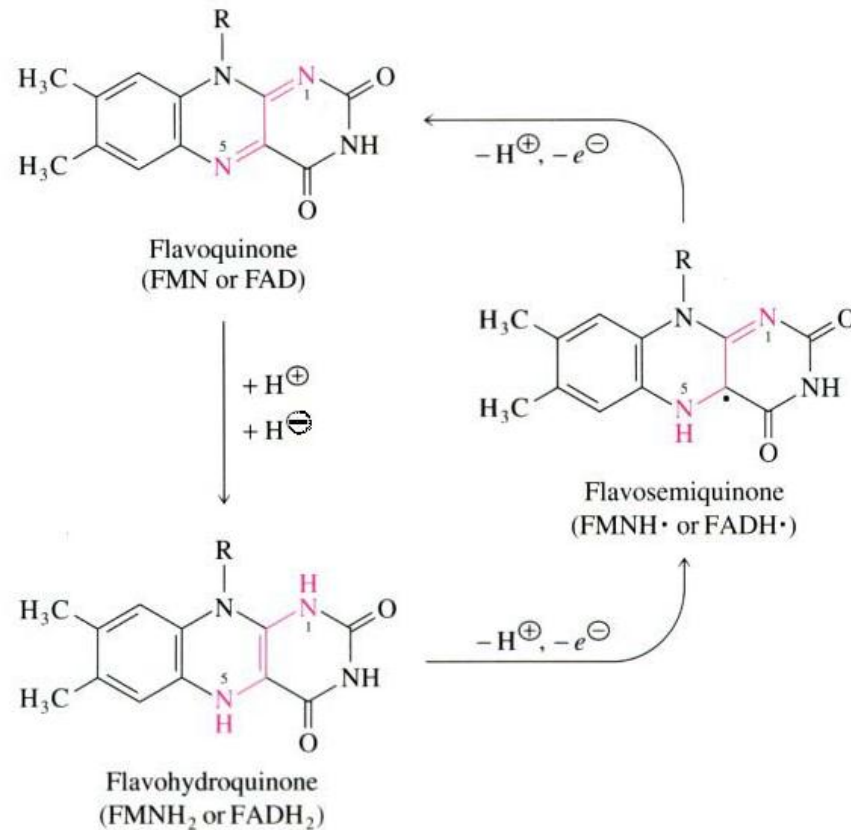
Hai coenzyme này tham gia vào những phản ứng oxy hóa – khử do các enzyme dehydrogenase xúc tác. Các enzyme này rất đặc hiệu với NAD^+ hoặc NADP^+ . Một số enzyme có thể hoạt động với cả hai coenzyme nhưng thường đặc hiệu với coenzyme này nhiều hơn so với coenzyme kia. Nói chung NAD^+ thường tham gia vào những phản ứng oxy hóa – khử để cung cấp năng lượng cho cơ thể, còn NADP^+ thường tham gia vào những phản ứng sinh tổng hợp. Các phản ứng có sự tham gia của các coenzyme này thường là những phản ứng liên quan đến liên kết đôi giữa carbon và oxy, giữa carbon và nitơ, và trong một số trường hợp giữa carbon và carbon.

Cơ chế hoạt động của hai coenzyme giống nhau. Trong quá trình oxy hóa khử, nhân nicotinamid trực tiếp tham gia phản ứng, carbon ở vị trí 4 của nhân này có khả năng nhường hoặc nhận một nguyên tử hydro, phần còn lại của coenzyme là để kết hợp vào enzyme.

1.9.2. Coenzyme flavin:

Coenzyme flavin thường gặp hai chất quen thuộc là flavin mono nucleotid (FMN)

và flavin adenin dinucleotid (FAD).



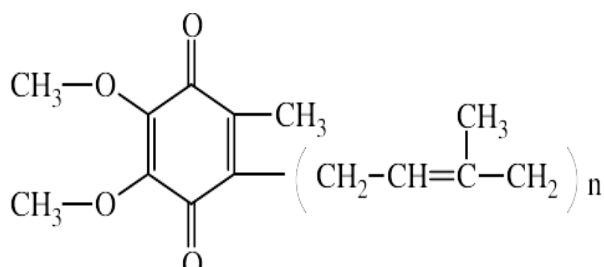
Hình 1.7: Flavin mono nucleotid (FMN) và flavin adenin dinucleotid (FAD).

Cấu tạo phân tử của hai chất này đều có nhân flavin. Chính nhân này có bộ phận trực tiếp tham gia vào phản ứng oxy hóa – khử. Các enzyme kết hợp với coenzyme flavin được gọi dưới tên chung là flavoprotein. Độ bền vững và bản chất của coenzyme flavin với các enzyme thường rất khác nhau. Trong phần lớn trường hợp, sự kết hợp này khá bền vững, chỉ có thể tách rời coenzyme ra trong môi trường acid hoặc qua phương pháp kết tủa bằng amoni sulfat. Ngoài liên kết vào tác dụng giữa carbon với một dị nguyên tử như S, O, N... các enzyme flavoprotein còn có tác dụng vào nhiều loại liên kết khác (hình 1.7).

Về cơ chế tác dụng, các tài liệu thực nghiệm chỉ ra rằng các phản ứng khử đã xảy ra qua hai bước: bước thứ nhất, một nguyên tử hydro được gắn lên N1 của flavin và làm giảm đi một liên kết đôi, nhân này mang một điện tử độc thân ở N5, điện tử này được giữ ổn định là do đặc tính cộng hưởng cao của nhân; bước thứ hai, một nguyên tử hydro nữa được kết hợp vào N5 và tạo nên coenzyme dạng khử.

1.9.3. Coenzyme quinon:

Coenzyme này được gọi là coenzyme Q hay uquinon. Trên thực tế có hàng loạt coenzyme quinon đều là dẫn xuất của benzo – quinon và đều có mạch nhánh dài gồm nhiều gốc terpen. Mạch nhánh này của mỗi chất có chiều dài khác nhau, nghĩa là có số lượng (n) gốc terpen khác nhau (hình 1.8).

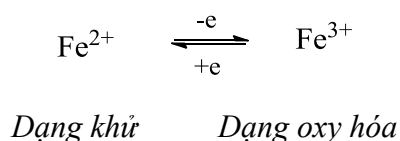


Hình 1.8: Coenzyme quinon

Coenzyme Q ở loại động vật có vú thường có mạch nhánh dài tới 10 gốc terpen, gọi là coenzyme Q10 (n = 10). Tất cả những chất này đều là những coenzyme oxy hóa khử. Nhờ có khả năng biến đổi thuận nghịch giữa dạng quinon và dạng quinol, các chất này tham gia vào quá trình oxy hóa khử giữa những dehydrogenase và cytocrom b trong chuỗi hô hấp tế bào của ty thể. Vitamin K và vitamin E cũng được xếp vào loại chất này.

1.9.4. Coenzyme hem:

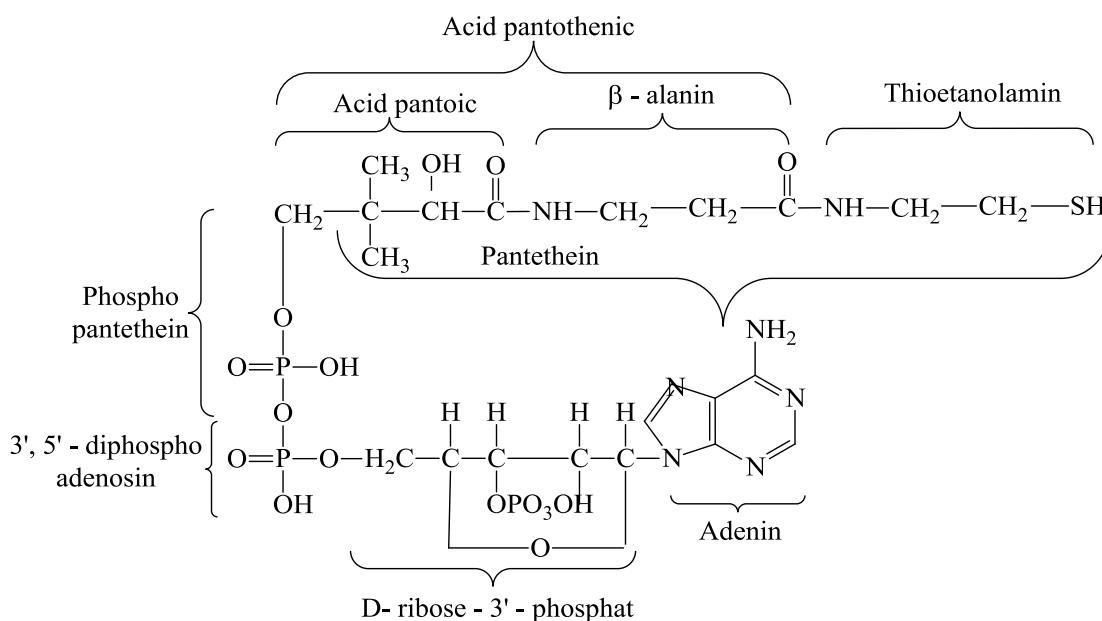
Có nhiều enzyme cần chất cộng tác là nhóm Hem. Thí dụ như hệ thống cytocrom, catalase, peroxydase và một số oxydase. Vai trò chủ yếu của các enzyme này là vận chuyển điện tử nhờ khả năng biến đổi thuận nghịch của sắt (Fe) giữa trạng thái sắt II (Fe^{2+}) và sắt III (Fe^{3+}):



1.9.5. Coenzyme A (CoASH):

Cấu tạo của coenzyme này gồm có một gốc 3', 5' diphosphoadenosin liên kết với một phân tử 4 – phosphopantethein. Phần pantethein có nhóm thiol (-SH) hoạt động. Coenzyme này làm nhiệm vụ vận chuyển nhóm acyl (gốc acid) và tham gia vào phần lớn các phản ứng ngưng tụ giữa các phân tử acetat hoặc acid béo khác để tạo ra những chuỗi carbon dài hơn (hình 1.9). Để cho các phản ứng này có thể xảy ra, acid béo phải được gắn

vào coenzyme A qua liên kết thieste giữa nhóm carboxyl của acid béo và nhóm thiol của coenzyme A. Trong dẫn chất đồng hóa trị này do tác dụng của nguyên tử lưu huỳnh (S), các điện tử được phân bố lại và do đó các nguyên tử bên cạnh dễ dàng ion hóa và tạo cho gốc acyl một hoạt tính mới, nghĩa là gốc acyl được hoạt hóa. Sự hoạt hóa này có thể xảy ra ở nhóm carbonyl (hoạt hóa đầu) hoặc ở nhóm metyl cuối cùng của gốc acid (hoạt hóa đuôi).



Hình 1.9: Cấu tạo phân tử Coenzyme A

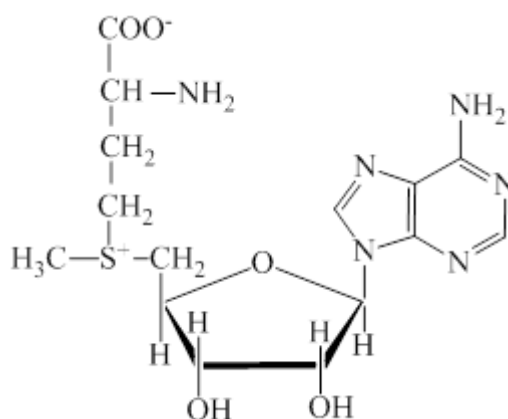
Người ta cũng đã chứng minh rằng phosphopantethein (thành phần hoạt động của coenzyme A) cũng là thành phần hoạt động của ACP (protein mang acyl) chất này được coi như một coenzyme vận chuyển nhóm acyl. Trong quá trình tổng hợp acid béo, phosphopantethein được gắn chặt vào thành phần protein qua liên kết este giữa gốc acid phosphoric của nó với gốc serin của apoprotein.

1.9.6. S. adenosin methionin:

Trong hóa sinh, metyl hóa là một phản ứng rất quan trọng và methionin là chất cung cấp nhóm methyl quan trọng nhất.

Nhóm metyl trong methionin được kết hợp bằng liên kết thioeste có thể năng vận chuyển rất thấp, vì vậy quá trình vận chuyển nhóm metyl phải qua một giai đoạn hoạt hóa trung gian bằng cách gắn một phân tử adenosin (của ATP) vào methionin. Trong dạng kết hợp này, nguyên tử lưu huỳnh (S) của methionin trở thành ion sulfonium có tác dụng hoạt

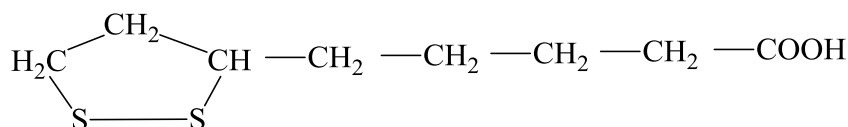
hóa nhóm methyl, chuẩn bị cho phản ứng vận chuyển nhóm methyl đến chất tiếp nhận.



Hình 1.10: Cấu tạo phân tử của S. adenosin methionin

1.9.7. Coenzyme lipoic (acid lipoic):

Cấu tạo phân tử của acid lipoic:



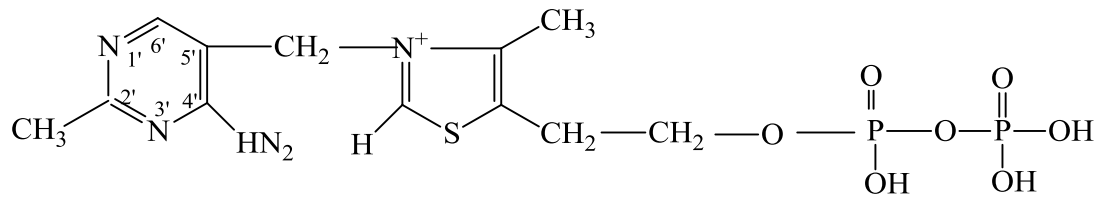
Hình 1.11: Cấu tạo phân tử của acid lipoic:

Chất này tham gia vào phản ứng khử hydro của acid pyruvic và một số ít phản ứng cùng loại. Acid lipoic được gắn chặt vào phân tử enzyme bằng liên kết amid giữa nhóm carboxyl của nó và nhóm amin tận cùng của lysin của enzyme. Phần hoạt động của coenzyme này là một liên kết disulfur (-S-S-). Liên kết này có thể mở ra hoặc kết hợp với các phân tử của một phân tử hữu cơ, một nguyên tử lưu huỳnh thứ hai liên kết với carbon. Trong phức hợp mutienzyme của quá trình khử carboxyl oxy hóa acid pyruvic, coenzyme này có vai trò phối hợp chặt chẽ với coenzyme thiamin pyrophosphat (TPP) nhóm aldehyl hoạt động (được tạo thành sau khi tách CO₂ ra khỏi acid pyruvic) được chuyển từ TPP đến coenzyme lipoic, một nguyên tử lưu huỳnh mang hydro và một nguyên tử lưu huỳnh thứ hai mang nhóm acetyl. Như vậy, acid lipoic vừa là coenzyme vận chuyển nhóm, vừa là coenzyme oxy hóa khử, nó hoạt động như một cánh tay di động của phức hợp đa enzyme này.

1.9.8. Coenzyme thiamin pyrophosphat (TPP):

Thiamin pyrophosphat đóng vai trò coenzyme trong một loạt những phản ứng phân cắt liên kết carbon – carbon ở sát nhóm carbonyl, nói chung là của acid α-cetonic. Vị trí

xúc tác chủ yếu của coenzyme này là carbon thứ hai của nhân thiazol.

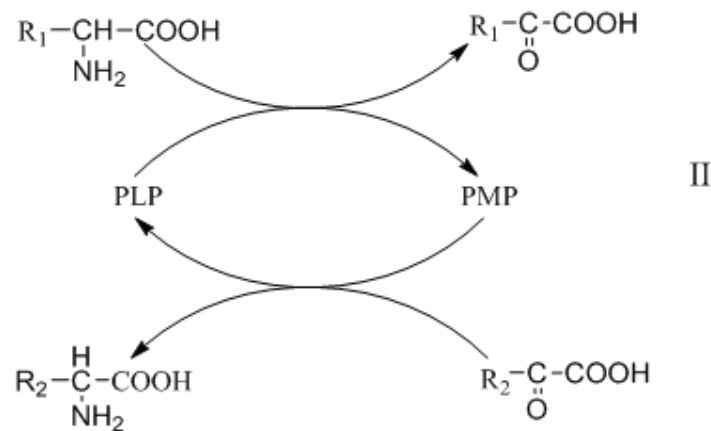
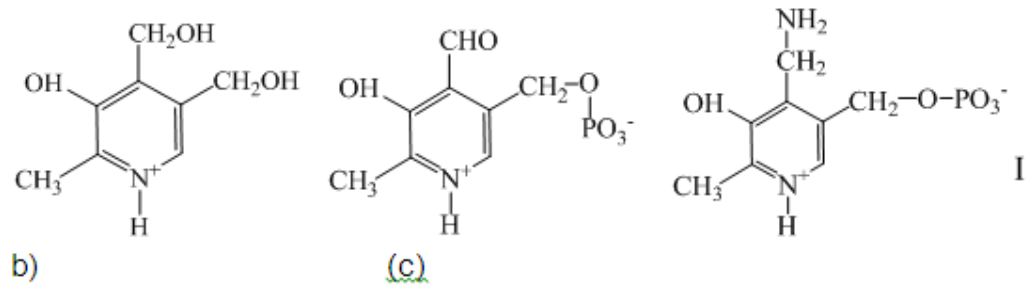


Hình 1.12: Cấu tạo phân tử của coenzyme thiamin pyrophosphat (TPP)

Vị trí này được khu trú ở giữa nguyên tử lưu huỳnh (S) và nguyên tử nitơ (N) có liên kết đôi và mang điện tích dương, nên rất dễ ion hóa thành carbanion ái nhân:

1.9.9. Coenzyme pyridoxal phosphat:

Cấu tạo phân tử của coenzyme pyridoxal phosphat:



Hình 1.13: Cấu tạo phân tử và cơ chế hoạt động của coenzyme pyridoxal phosphat

Pyridoxin = vitamin B₆

Pyridoxalphosphat, ký hiệu PLP

Pyridoxaminphosphat, ký hiệu PMP

Cơ chế vận chuyển nhóm amin của pyridoxalphosphat.

Coenzyme này là dẫn xuất phosphoryl hóa của vitamin B₆, thành phần cấu tạo có

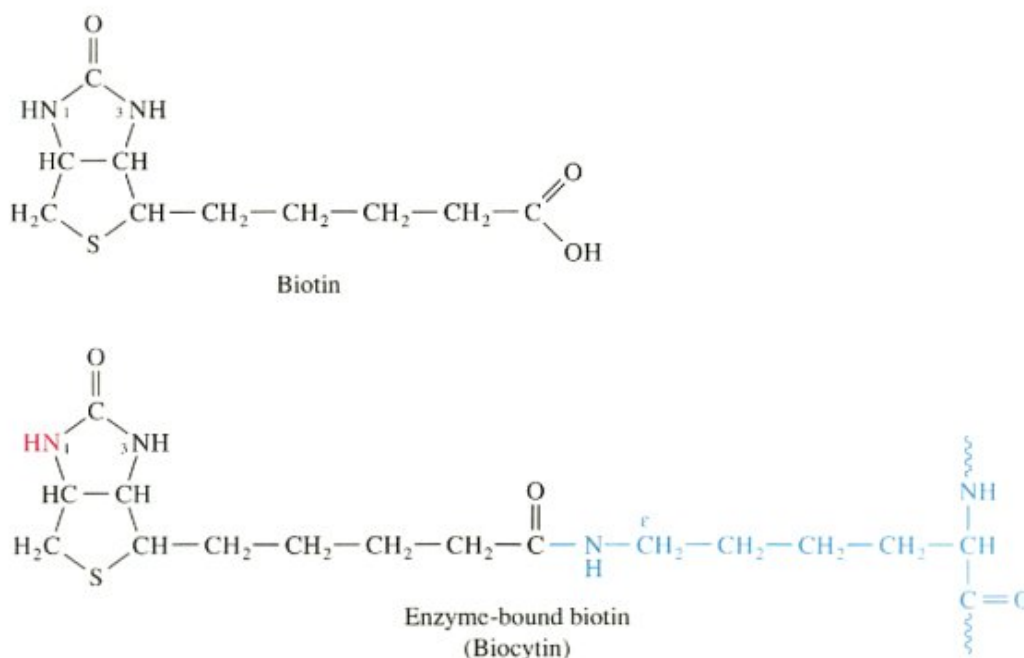
nhân pyridin mang nhóm aldehyd ở vị trí para. Nhóm này là bộ phận trực tiếp hoạt động của coenzyme. Coenzyme tham gia vào nhiều phản ứng tác động vào cấu trúc phân tử của acid amin. Tùy theo từng điều kiện cụ thể, coenzyme này tham gia vào các phản ứng vận chuyển nhóm amin, phản ứng khử carboxyl hay phản ứng cắt gốc R của acid amin.

1.9.10. Coenzyme biotin:

Thành phần cấu tạo của coenzyme này gồm một nhân dị hình tetrahydrothiophen gắn liền với một gốc ureido và một mạch bên là acid valeric. Biotin thường được kết hợp vào apoenzyme bằng liên kết giữa nhóm carboxyl của nó và nhóm $-NH_2$ của lysine của apoenzyme. Mạch bên của coenzyme cùng với lysine của apoenzyme tạo nên một mạch thẳng dài 14Å , di động rất dễ dàng trong quá trình xúc tác.

Biotin là coenzyme tham gia vào các phản ứng vận chuyển nhóm carboxyl. Quá trình này gồm hai bước: bước thứ nhất nhóm CO_2 được gắn vào N1 của biotin tạo nên carboxybiotin; bước thứ hai biotin chuyển nhóm carboxyl đến một cơ chất khác và cơ chất này được carboxyl hóa.

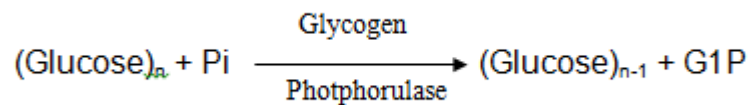
Các enzyme cộng tác với biotin có thể chia làm ba nhóm: carboxylase, decarboxylase, transcarboxylase.



Hình 1.14: Coenzyme Biotin

1.10. ĐIỀU HÒA ENZYME

Sự điều hòa enzyme trong cơ thể được điều hòa bởi nhiều yếu tố. Sự điều hòa tốc độ xúc tác bằng sự thay đổi pH trong tế bào. Tốc độ enzyme còn được điều tiết bởi nồng độ cơ chất và ion kim loại trong tế bào. Sự điều hòa đặc hiệu chủ yếu là sự điều hòa enzyme bởi hai cách cơ bản: thứ nhất, enzyme dị lập thể, hoạt tính của chúng được điều chỉnh thông qua sự kết hợp với một chất chuyển hóa trên một trung tâm khác trung tâm hoạt động gọi là trung tâm dị lập thể (allosteric), có khả năng điều chỉnh âm hay dương; thứ hai enzyme điều chỉnh đồng hóa trị. Sự biến đổi hai dạng hoạt động và không hoạt động của hai loại enzyme này là do tác động của một enzyme khác.



Enzyme này tồn tại hai dạng phosphorylase a có hoạt tính cao và phosphorylase b dạng kị hoạt động. Loại a là protein oligome với 4 đơn vị cấu tạo, mỗi đơn vị có một gốc serin được phosphoryl hóa ở nhóm hydroxyl, gốc phosphat cần thiết cho hoạt động xúc tác tối đa của enzyme và chịu ảnh hưởng thủy phân của phosphorylase phosphatase.

CHƯƠNG 2: ĐỘNG HỌC ENZYME

2.1. Ý NGHĨA CỦA VIỆC NGHIÊN CỨU ĐỘNG HỌC ENZYME

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

- Có thể biết được cơ chế phân tử của sự tác động của enzyme.
- Cho phép ta hiểu biết được mối quan hệ về mặt lượng của quá trình enzyme.
- Thấy được vai trò quan trọng cả về mặt lý luận lẫn thực tiễn, ví như khi lựa chọn các đơn vị hoạt động enzyme người ta cần phải biết những điều kiện tốt nhất đối với hoạt động của enzyme, cũng như cần phải biết được các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của chúng.
- Là điều kiện cần thiết để thực hiện tốt các bước tinh chế enzyme, vì người ta cần phải kiểm tra về mặt lượng bằng cách xác định có hệ thống hoạt động của chế phẩm enzyme trong các giai đoạn tinh chế.

2.2. ĐỘNG HỌC CÁC PHẢN ỨNG ENZYME

2.2.1. Sơ lược chung về động học enzyme

Bất kỳ phản ứng hóa học nào, ví dụ phản ứng $A \rightarrow P$, sẽ 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. 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 2.1 cho biết năng lượng hoạt hóa đối với một số phản ứng.

Theo bảng thống kê ta thấy phản ứng phân hủy peroxide hydro đòi hỏi 18.000KCal/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. 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 2.1. Năng lượng hoạt hóa đối với các phản ứng có chất xúc tác khác nhau

Phản ứng	Chất xúc tác	Ea (Kcal/mol)
Phân giải peroxide	Không	18000
	Platin	11700
	Catalase	< 2000
Thủy phân ethyl butyrate	ion hydro	16800
	ion hydroxyl	10200
	lipase tuyến tụy	4500
Thủy phân casein	ion hydro	20600
	trypsin	12 000
Thủy phân saccharose	ion hydro	25000
	invertase nấm men	8000 – 10000

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 $10^\circ C$, 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.

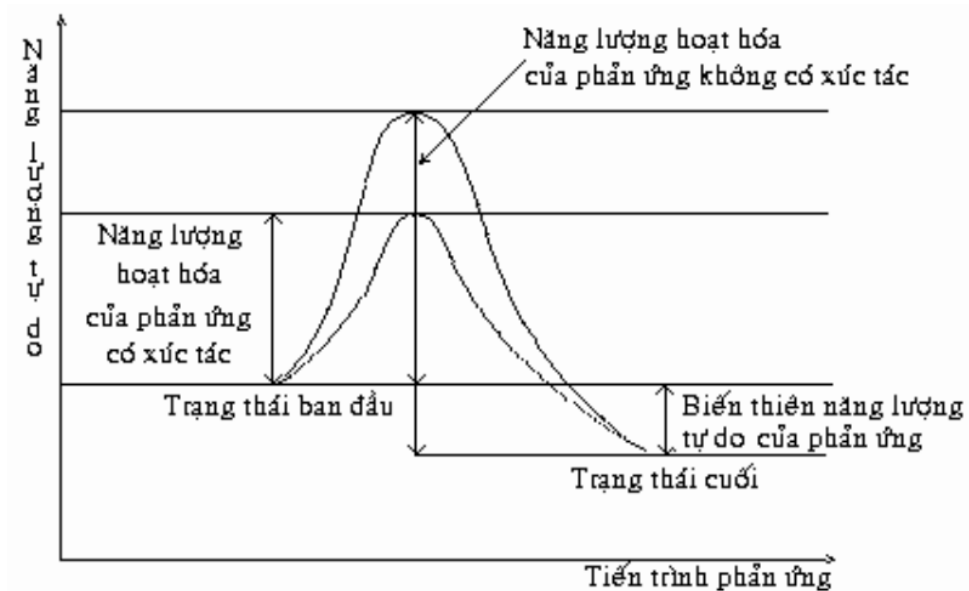
Sự kết hợp giữa chất phản ứng và chất xúc tác làm xuất hiện trạng thái trung gian mới với mức năng lượng hoạt hóa thấp hơn. Khi sản phẩm hình thành, chất xúc tác lại được giải phóng ở trạng thái tự do.

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.



Hình 2.1. Biến thiên năng lượng tự do trong phản ứng hóa học

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.

2.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến tốc độ phản ứng

2.2.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme

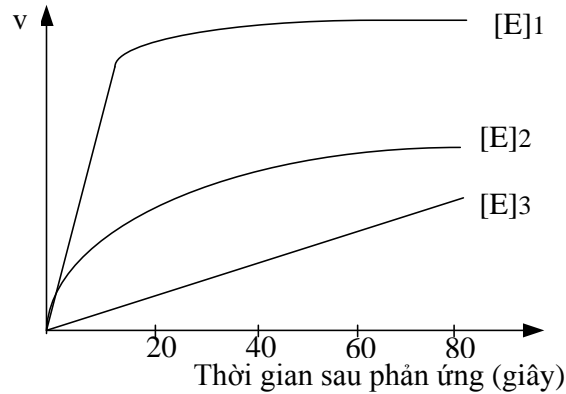
Trong điều kiện dư thừa cơ chất, nghĩa là $[S] \gg [E]$ thì tốc độ phản ứng phụ thuộc vào $[E]$, $v = K[E]$ có dạng $y=ax$. Nhờ đó người ta đã đo $[E]$ bằng cách đo vận tốc phản ứng do enzyme đó xúc tác.

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

Trong trường hợp nồng độ enzyme quá lớn, tốc độ phản ứng tăng chậm (hình 2.2)

Nồng độ enzyme quá lớn, chỉ sau khoảng thời gian rất ngắn, vận tốc phản ứng đã không đổi theo thời gian. Theo đồ thị 2.2. nên chọn nồng độ $[E]_3$, sẽ có được sự phụ thuộc

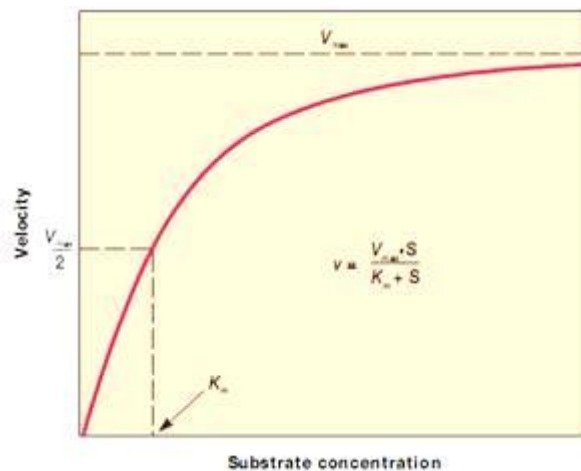
tuyến tính giữa v vào thời gian trong khoảng thời gian dài hơn, dễ dàng xác định v_0 . Do đó thường nên tiến hành lựa chọn nồng độ enzyme trước khi xác định hoạt độ cũng như nghiên cứu động học phản ứng enzyme.



Hình 2.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến tốc độ phản ứng $[E_1] > [E_2] > [E_3]$

2.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất, mô hình Michaelis - Menten

- Nếu nồng độ enzyme được giữ cố định và chỉ thay đổi nồng độ cơ chất thì đồ thị mô tả vận tốc phản ứng enzyme được biểu diễn như hình gipebol (hình 2.3).



Hình 2.3 – Sự phụ thuộc của vận tốc phản ứng (v) vào nồng độ cơ chất S

Trong đó: v_{\max} - tốc độ phản ứng max khi ở nồng độ E tối ưu cho phản ứng xảy ra; K_m – hằng số Michaelis.

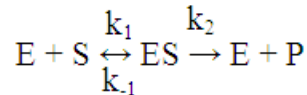
Khi tăng lượng cơ chất thì tốc độ phản ứng ban đầu tăng. Khi enzyme tác dụng hết với cơ chất, nghĩa là: xảy ra sự tạo thành phức enzyme-cơ chất ở mức lớn nhất có thể, đồng thời quan sát thấy sự tạo thành sản phẩm lớn nhất. Nếu tăng thêm nồng độ cơ chất cũng

không xảy ra sự tạo thành sản phẩm, nghĩa là vận tốc phản ứng không tăng. Trạng thái đó tương ứng với tốc độ phản ứng cao nhất (v_{\max}).

Như vậy, nồng độ enzyme là yếu tố giới hạn tạo ra sản phẩm phản ứng enzyme

Tính chất động học của phản ứng enzyme được nghiên cứu bởi hai nhà khoa học Leonon Michaelis và Maud Menten năm 1913.

Quá trình enzyme hóa có thể biểu diễn bằng phương trình sau:



Ở đây, k_1 – là hằng số vận tốc tạo thành phức enzyme – cơ chất

k_{-1} – hằng số vận tốc phản ứng nghịch, phân giải phức enzyme – cơ chất; k_2 – hằng số vận tốc phản ứng tạo ra sản phẩm của phản ứng.

$$K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

K_m – hằng số Michaelis

Vận tốc phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ phức enzyme-cơ chất [ES], còn vận tốc tạo thành [ES] phụ thuộc vào nồng độ cơ chất và nồng độ enzyme tự do. Vận tốc tạo thành và phân giải [ES] ảnh hưởng đến nồng độ [ES]

Trường hợp 1

Vận tốc phản ứng enzyme lớn nhất trong trường hợp tất cả các phân tử enzyme nằm trong phức enzyme-cơ chất, tức là $[E] = [ES]$

Sự phụ thuộc của vận tốc phản ứng enzyme vào nồng độ cơ chất được biểu diễn bằng phương trình sau:

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

(Sự rút gọn toán học của công thức này có thể tham khảo trong giáo trình Hóa lý).

Phương trình này gọi là phương trình Michaelis-Menten (1913)

Trường hợp 2

Khi vận tốc phản ứng bằng nửa vận tốc cực đại, $K_m = [S]$ (hình 7.2). Khi đó hằng số Michaelis bằng nồng độ cơ chất, khi đó vận tốc phản ứng bằng nửa vận tốc cực đại.

Phương trình Michaelis-Menten là phương trình động học phản ứng enzyme mô tả sự phụ thuộc vận tốc phản ứng enzyme vào nồng độ cơ chất.

Trường hợp 3

Nếu nồng độ cơ chất vô cùng lớn hơn K_m ($[S] \gg K_m$) thì sự tăng nồng độ cơ chất lên bằng K_m không ảnh hưởng lên tổng $(K_m + [S]) = [S]$. Khi đó vận tốc phản ứng bằng vận tốc cực đại. Ở điều kiện như vậy phản ứng có thể biểu diễn bằng phương trình bậc 1 – nghĩa là không phụ thuộc vào nồng độ cơ chất. Có thể kết luận: Vận tốc phản ứng cực đại là đại lượng không đổi, không phụ thuộc vào nồng độ cơ chất.

Trường hợp 4: $[S] \ll K_m$

Khi đó $(K_m + [S]) = K_m$ nên $v = v_{max}[S]/K_m$. Nghĩa là, trong trường hợp này tốc độ phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ cơ chất (phản ứng có phương trình bậc 1)

Ý nghĩa của mô hình Michaelis-Menten

+ v_{max} và K_m mang đặc điểm động lực học của enzyme

+ v_{max} – cho biết đặc điểm hoạt lực xúc tác của enzyme và có đơn vị đo vận tốc phản ứng enzyme là mol/lit. Nghĩa là, xác định khả năng tạo thành sản phẩm lớn nhất có thể khi ở nồng độ enzyme xác định và điều kiện thừa cơ chất.

+ K_m – quy định ái lực của enzyme với cơ chất và là đại lượng bất biến không phụ thuộc vào nồng độ enzyme.

K_m càng nhỏ thì ái lực giữa enzyme và cơ chất càng lớn khi đó vận tốc phản ứng ban đầu tăng và ngược lại, K_m càng lớn thì vận tốc ban đầu nhỏ ái lực enzyme và cơ chất càng hẹp

2.2.2.2. Ảnh hưởng của các chất kìm hãm

- Hoạt độ của enzyme có thể bị thay đổi dưới tác dụng của một số chất hóa học khác nhau

- Các chất làm giảm hoạt độ enzyme nhưng không bị chuyển hóa bởi enzyme được gọi là các chất kìm hãm hoặc các chất ức chế (inhibitor) – nên thường kí hiệu là “I”

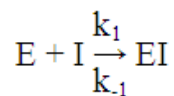
- Các chất này có thể là những ion, các phân tử vô cơ, hữu cơ kể cả protein.

- Các chất (tác nhân) gây biến tính protein là những chất kìm hãm không đặc hiệu của enzyme (biến tính không đặc hiệu protein) nên các chất gây biến tính không được gọi

là chất kìm hãm.

- Chất kìm hãm được quan tâm nghiên cứu để giải thích nguyên lý xúc tác enzyme, giúp chúng ta nhận biết vai trò của các enzyme trong quá trình chuyển hóa của cơ thể. Ví dụ, tác dụng của thuốc chữa bệnh và chất độc là các chất kìm hãm hoạt tính của các enzyme, nên khi biết được cơ chế chuyển hóa của chúng là yếu tố quan trọng trong nghiên cứu dược liệu và độc học.

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



Trong trường hợp kìm hãm không thuận nghịch, k_{-1} rất bé có thể xem như bằng 0, I kết hợp với E bằng liên kết đồng hóa trị hoặc kết hợp rất chặt chẽ đến mức khó lòng tách khỏi E, sự phân ly phức EI là rất chậm.

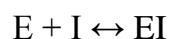
a) Kìm hãm thuận nghịch

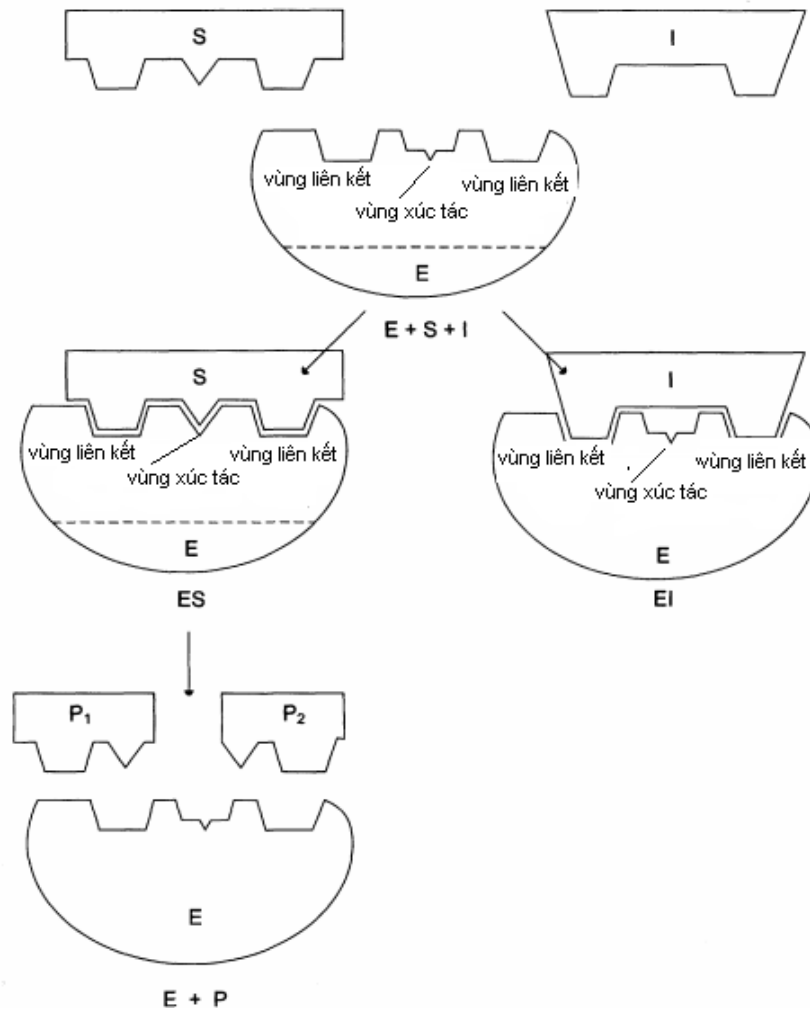
I kìm hãm thuận nghịch liên kết với E bằng liên kết đồng hóa trị yếu và ở những điều kiện xác định dễ dàng tách ra khỏi enzyme. I thuận nghịch chia ra làm: I thuận nghịch cạnh tranh và I thuận nghịch không cạnh tranh

Kìm hãm thuận nghịch cạnh tranh

Các chất I thuận nghịch liên kết với E tại trung tâm hoạt động của E tạo ra phức enzyme-cơ chất. Nó làm giảm hoạt tính của enzyme thuận nghịch. Ở đây, cấu trúc của I giống với cấu trúc của cơ chất do đó xuất hiện sự cạnh tranh giữa phân tử cơ chất và I vào trung tâm hoạt động của E. Như vậy, enzyme có thể tạo ra liên kết với cơ chất tạo ra phức ES hoặc với I tạo ra phức EI. Khi tạo ra phức enzyme-cơ chất kìm hãm (EI) sản phẩm chính của phản ứng không được tạo thành (hình 2.4).

So sánh sự kìm hãm cạnh tranh thuận nghịch bằng phương trình:





Hình 2.4. Sơ đồ I thuận nghịch án ngữ trung tâm hoạt động E

I cạnh tranh làm giảm vận tốc phản ứng hóa học. I cạnh tranh làm tăng hằng số Michaelis K_m của cơ chất trong phản ứng đó (tức là giảm ái lực của cơ chất với enzyme). Tức là, sự có mặt của I cạnh tranh cần lượng lớn cơ chất để tốc độ phản ứng đạt $\frac{1}{2} v_{max}$ (tốc độ phản ứng cực đại)

Sự gia tăng tỷ lệ nồng độ cơ chất và I giảm mức độ kìm hãm phản ứng. Khi nồng độ cơ chất rất cao thì sự kìm hãm không còn cho nên TTHĐ của tất cả enzyme sẽ tạo phức với cơ chất

Kìm hãm thuận nghịch không cạnh tranh

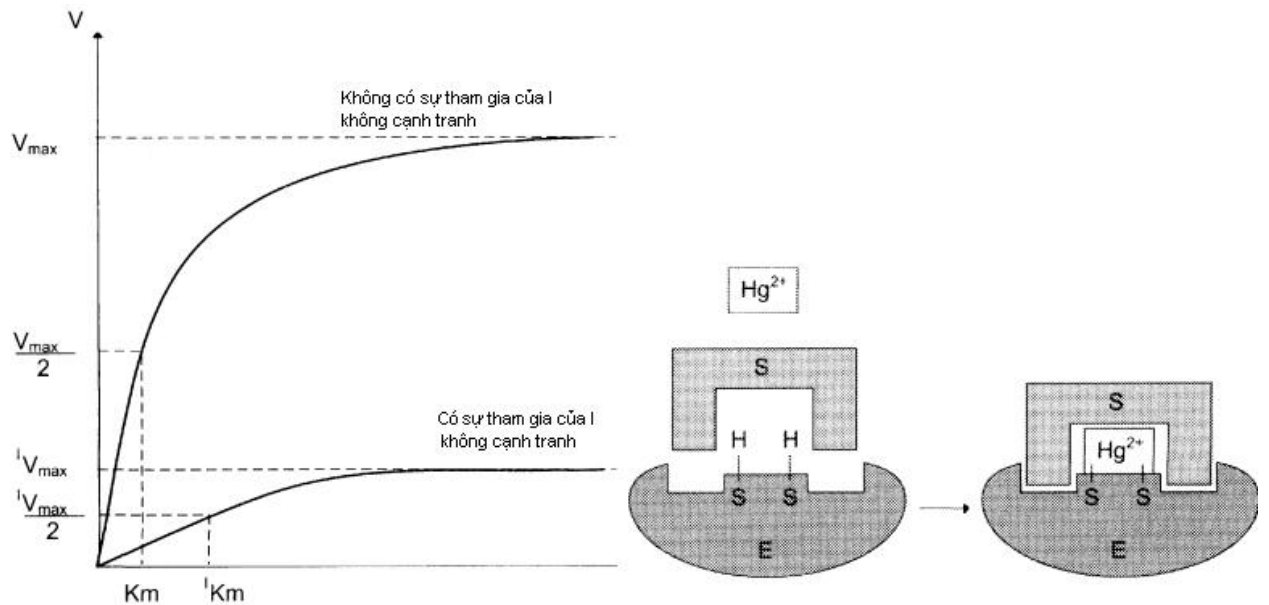
Sự kìm hãm thuận nghịch không cạnh tranh là hiện tượng kìm hãm phản ứng enzyme nhưng chất kìm hãm liên kết với enzyme ở vị trí không phải TTHĐ của enzyme. Chất kìm hãm không cạnh tranh có cấu trúc không tương tự như cơ chất.

- Chất kìm hãm không cạnh tranh có thể liên kết được với enzyme hoặc với phức ES tạo ra phức không linh hoạt.

- Sự liên kết giữa I không cạnh tranh với E làm biến đổi cấu trúc phân tử enzyme, phá vỡ sự tương tác giữa cơ chất với TTHĐ của E dẫn tới làm giảm tốc độ phản ứng enzyme.

- Loại kìm hãm này làm giảm v_{max} của phản ứng enzyme và giảm ái lực của cơ chất với enzyme, nên K_m tăng ($K'_m > K_m$)

b) Kìm hãm không thuận nghịch



Hình 2.5. Ảnh hưởng của I không cạnh tranh lên tốc độ phản ứng enzyme.

- Sự kìm hãm không thuận nghịch xuất hiện trong trường hợp tạo thành các liên kết đồng hóa trị bền vững giữa I và E. Mà thường xuất hiện trong TTHĐ của E. Kết quả là E không thể thực hiện chức năng xúc tác.

- Các chất kìm hãm không thuận nghịch thường là các ion kim loại nặng như: Hg^{2+} , Ag^+ , As^{3+} chỉ với nồng độ nhỏ có thể khóa hết các cầu sunfat của các nhóm chức ở TTHĐ. Cơ chất lúc này không thể thực hiện phản ứng hóa học (hình 2.5).

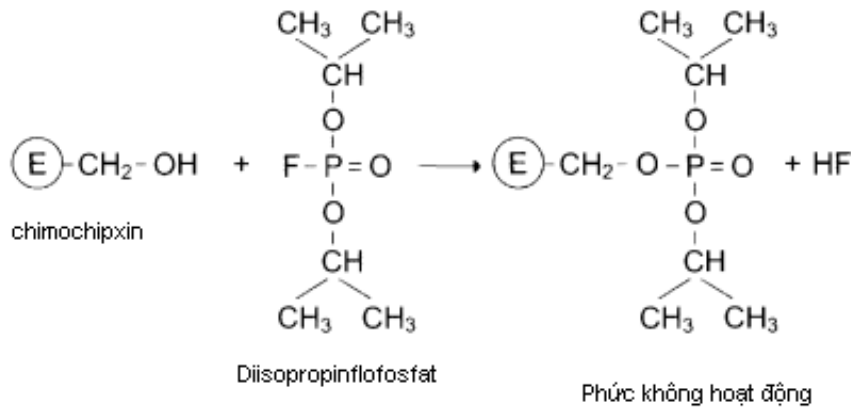
- Khi có mặt các thuốc thử trong phản ứng chức năng xúc tác được phục hồi.

- Khi nồng độ ion kim loại nặng quá cao gây biến tính phân tử protein của enzyme dẫn tới làm ngưng hoàn toàn tác dụng của enzyme.

Chất kìm hãm đặc hiệu và không đặc hiệu

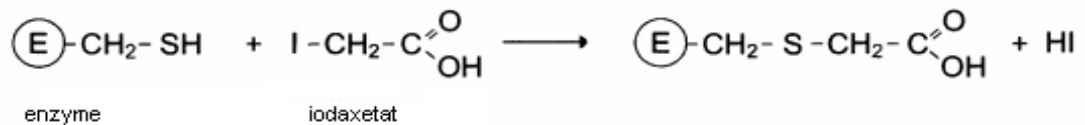
- Sử dụng các chất kìm hãm không thuận nghịch để nghiên cứu cơ chế hoạt động của enzyme thu hút nhiều nhà khoa học.

- Từ mục đích này người ta đã ứng dụng các chất để khóa các nhóm chức xác định của TTHĐ enzyme. Những chất như vậy gọi là các chất kìm hãm đặc hiệu. Ví dụ: Phản ứng kìm hãm TTHĐ của Chimo-tripxin bằng Diisopropylphosphat tạo ra phức không hoạt động Diisopropylphosphoridat (DIFF hoặc DEP).



Ngược lại, các chất kìm hãm phản ứng liên kết với mọi nhóm SH, ngoài TTHĐ enzyme thì gọi là chất I không đặc hiệu

Ví dụ: chất kìm hãm không đặc hiệu



2.2.2.3. Các chất hoạt hóa

- Chất hoạt hóa làm tăng hoạt độ xúc tác của enzyme, thường có bản chất hóa học khác nhau:

- + Các ion, anion kim loại (ô 11-15 của bảng hệ thống tuần hoàn Mendeleev)
- + Các chất hữu cơ có cấu tạo phức tạp

Nhiệm vụ của chất hoạt hóa là chuyển hydro hoặc những chất có khả năng phá vỡ một số liên kết trong phân tử tiền enzyme hoặc các chất có tác dụng phục hồi những nhóm chức trong TTHĐ của enzyme.

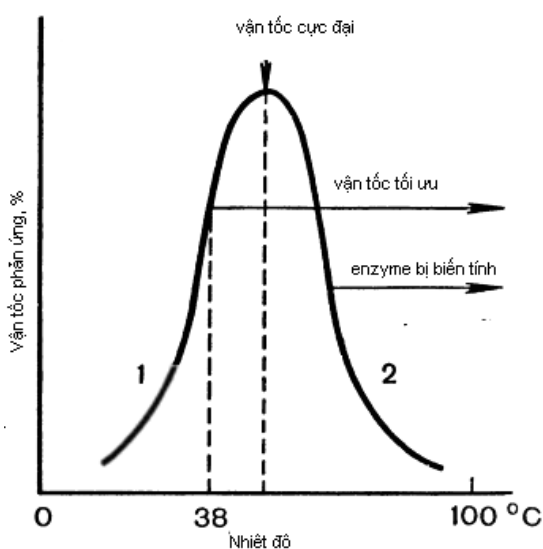
Ví dụ:

- + Tác dụng của anion Cl, Br, I đến hoạt độ của enzyme α -amylase động vật

- +Tác dụng của ion kim loại như Mn^{+2} , Zn^{+2} ,... lên hoạt độ enzyme protease
- Sử dụng vượt quá giới hạn các chất hoạt hóa có thể làm giảm hoạt độ enzyme.

2.2.2.4. Nhiệt độ

- Vận tốc phản ứng do enzyme xúc tác chỉ tăng theo nhiệt độ trong một giới hạn xác định mà ở đó phân tử enzyme vẫn còn bền chưa bị biến tính.
- Đường cong biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ đến vận tốc phản ứng của nhiều enzyme như hình 2.6



Hình 2.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tốc độ phản ứng enzyme

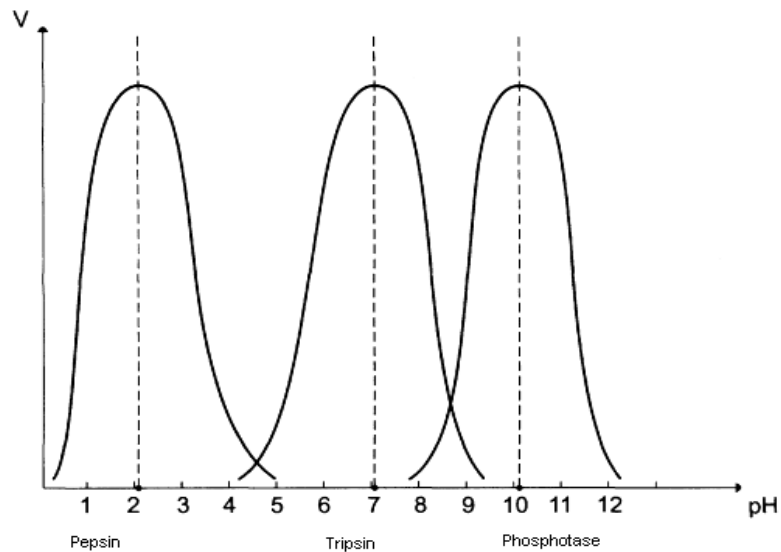
(1-vận tốc phản ứng tăng; 2 – vận tốc phản ứng giảm)

- Nhiệt độ ứng với hoạt độ enzyme cao nhất gọi là nhiệt độ tối ưu của enzyme (40÷45°C đối với enzyme từ nguồn gốc động vật và 50÷60°C đối với enzyme có nguồn gốc thực vật)
- Nhiệt độ mà enzyme mất hoàn toàn hoạt tính xúc tác gọi là nhiệt độ tới hạn, thường vào khoảng 70°C. Ở nhiệt độ tới hạn enzyme bị biến tính, ít khi có khả năng phục hồi lại được hoạt độ.
- Ở nhiệt độ nhỏ hơn 0 hoạt độ enzyme tuy bị giảm nhưng lại có thể tăng lên khi đưa về nhiệt độ bình thường.

2.2.2.5. pH môi trường

pH có ảnh hưởng lớn đến vận tốc phản ứng enzyme, mỗi enzyme chỉ hoạt động thích hợp ở một pH xác định gọi là pH hoạt động tối thích của enzyme.

- Hoạt độ enzyme phụ thuộc vào pH của dung dịch môi trường xảy ra phản ứng enzyme (hình 2.7)



Hình 2.7. Sự phụ thuộc vận tốc phản ứng enzyme vào pH môi trường

- Ảnh hưởng của pH lên hoạt độ enzyme liên quan mật thiết tới sự ion hóa của nhóm chức trong acid amin, tham gia vào TTHĐ của enzyme.

- Khi thay đổi pH khỏi trạng thái tối ưu xảy ra sự biến đổi mức độ ion hóa nhóm chức của phân tử protein. Như vậy, mỗi enzyme có 1 giá trị pH tối ưu mà ở đó hoạt độ enzyme là lớn nhất. Ngoài vùng pH tối ưu dẫn tới giảm hoạt độ enzyme (bảng 2.2).

Bảng 2.2. Giá trị pH tối ưu của một số enzyme

<i>Enzyme</i>	<i>pH tối ưu</i>
Pepsin	1,2-2,0
Piruvat-karbosidaza	4,8
Katalaza	6,8-7,0
Fumaraza	6,5
Ureaza	6,8-7,2
Tripsin	6,5-7,5
Arginaza	9,5-9,9

2.3. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ ENZYME

2.3.1. Nguyên lý phương pháp xác định hoạt độ enzyme

-Trong enzyme học, người ta không định lượng enzyme một cách trực tiếp mà thường xác định gián tiếp thông qua xác định mức độ hoạt động (hoạt độ) của enzyme.

-Về nguyên tắc có thể chia làm 3 nhóm phương pháp:

Nhóm 1: Đo lượng cơ chất bị mất đi hay lượng sản phẩm được tạo thành trong một thời gian nhất định ứng với một nồng độ enzyme xác định.

Bảng 2.3. Bảng phương pháp xác định hoạt độ enzyme

Nhóm	Các thông số cố định	Các thông số thay đổi
1	Thời gian Nồng độ enzyme	Biến thiên của S và P
2	Lượng S mất đi (hoặc P tạo thành) Nồng độ E	Thời gian
3	Thời gian Lượng S mất đi (hoặc P tạo thành)	Nồng độ E

Nhóm 2: Đo thời gian cần thiết để thu được một lượng biến thiên nhất định của cơ chất hay sản phẩm phản ứng ứng với một nồng độ enzyme nhất định.

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

2.3.2. Đơn vị đo hoạt độ enzyme.

2.3.2.1. Đơn vị UI

Đơn vị enzyme quốc tế UI: là lượng enzyme có khả năng xúc tác làm chuyển hóa được 1 micromol cơ chất sau 1 phút ở đktc.

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

2.3.2.2. Katal (Kat)

Katal là lượng enzyme có khả năng xúc tác làm chuyển hóa được 1 mol cơ chất sau 1 giây ở đktc

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

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

2.3.2.3. Hoạt độ riêng

Hoạt độ riêng của một chế phẩm enzyme là số đơn vị UI (hoặc số đơn vị Katal) ứng với 1 mililit dung dịch (nếu là dịch) hoặc 1 miligam protein (nếu là bột khô) của chế phẩm.

Ví dụ:

+một dung dịch chứa 10 UI (hoặc 166,7 nKat) trong 1 ml

+hoặc bột enzyme chứa 10 UI (hoặc 166,7 nKat) trong 1 mg protein

Nếu chế phẩm enzyme đã tinh sạch, hoạt độ được biểu thị bằng số UI (hoặc Kat)

trên 1 mg enzyme.

Tức là UI/1 mgE hoặc Kat/1mg E.

2.3.2.4. Hoạt độ riêng phân tử

Khi đã biết khối lượng phân tử của enzyme thì có thể tính hoạt độ riêng của phân tử. Hoạt độ riêng phân tử: tức là số phân tử cơ chất được chuyển hóa bởi 1 phân tử enzyme trong 1 đơn vị thời gian.

5.6.3. Một số điểm cần lưu ý khi xác định hoạt độ enzyme:

-Nồng độ cơ chất trong phản ứng phải ở trong một giới hạn thích hợp đủ thừa để bão hòa enzyme nhưng không quá cao để đến mức kìm hãm enzyme.

-Với những enzyme cần có chất hoạt hóa hoặc làm chất bền thì phải cho chất này vào enzyme trước khi cho cơ chất vào hỗn hợp phản ứng.

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

-Nhiệt độ dung để xác định hoạt độ cần phải thấp hơn nhiệt độ tối ưu của enzyme để phòng tác dụng kìm hãm enzyme do nhiệt độ cao.

-Thời gian xác định hoạt độ enzyme thường từ 5-30 phút. Trong 1 số trường hợp có thể kéo dài 24 giờ nếu hoạt độ enzyme quá thấp. Trong những trường hợp đó cần phải cho vào dung dịch các chất diệt vi sinh vật và tránh dùng những dung dịch đệm thuận lợi cho sự phát triển vi sinh vật.

CHƯƠNG 3: CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH VÀ TINH SẠCH ENZYME**3.1. NHỮNG ĐIỀU CẦN LƯU Ý KHI TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH ENZYME**

Enzyme là protein, vì vậy rất dễ mất hoạt tính sinh học khi bị tách khỏi tế bào và cơ thể. Việc mất hoạt tính có thể do nhiệt độ cao, sự thủy phân bởi các enzyme proteolytic, tác dụng của pH thấp, các chất oxy hóa hay chất khử, các chất gây biến tính, các chất ức chế thuận nghịch, do mất cofactor hay coenzyme.... Tuy nhiên, các enzyme khác nhau có thể nhạy cảm với những tác nhân trên ở các mức độ rất khác nhau.

Trong sản xuất các chế phẩm enzyme thì việc giữ được hoạt tính enzyme là một trong những yêu cầu hàng đầu. Thông thường qua mỗi bước tinh sạch thì một phần enzyme cũng như hoạt độ của chế phẩm bị mất đi, giá thành cao lên do chi phí thiết bị, nguyên liệu, công sức và do mất đi hoạt độ. Với enzyme dùng trong mục đích công nghiệp, không phải lúc nào cũng cần chế phẩm có độ tinh sạch cao, trong một số trường hợp có thể dùng chế phẩm ở dạng thô.

Để hạn chế tối đa sự giảm hoạt độ enzyme trong quá trình tinh sạch thì thường cần chọn dung dịch chiết rút enzyme thích hợp, vừa cho hiệu suất chiết xuất enzyme cao, vừa không làm biến tính enzyme. Các bước tinh sạch thường được tiến hành ở nhiệt độ thấp ($\leq 4^{\circ}\text{C}$, tùy theo yếu tố kết tủa) để hạn chế sự biến tính enzyme cũng như tác dụng phân giải của các enzyme proteolytic có mặt trong dịch chiết. Đối với nhiều enzyme, có thể bổ sung các chất ức chế của enzyme proteolytic vào dịch chiết để hạn chế sự thủy phân đối với các enzyme quan tâm. Các enzyme proteolytic được phân thành 4 lớp là:

- + protease serine
- + protease cystein
- + protease axit
- + protease chứa kim loại.

Trên cơ sở của 4 lớp protease này, người ta cũng chia các chất ức chế của các enzyme này theo 4 lớp tương ứng. Tuy vậy, do sự phổ biến của 2 loại protease serine và protease cystein, nên việc bổ sung vào dịch chiết protein enzyme các chất ức chế của hai loại protease này là phổ biến. Trong một số trường hợp, đối với các enzyme nhạy cảm với

các phân cắt proteolytic, thì cả 4 loại chất ức chế đều được sử dụng.

Bổ sung các yếu tố làm bền (như CaCl_2 , hay MgCl_2 ở nồng độ 2-5mM, glycerol 10-20%...) chất chống oxy hoá, xây dựng quy trình tinh sạch đơn giản ít bước nhất cũng là những cách để hạn chế sự giảm hoạt động của enzyme. Đối với một số enzyme bền nhiệt thì có thể dùng bước xử lý nhiệt (70-80°C, trong vòng 15-30 phút) ở ngay giai đoạn đầu để vừa hạn chế tác dụng phân cắt proteolytic, vừa loại bỏ một số protein không mong muốn khác. Tương tự, có thể dùng bước xử lý acid (đưa pH xuống 3 – 4) ở giai đoạn ban đầu đối với các enzyme bền ở pH thấp.

3.2. CHỌN NGUỒN NGUYÊN LIỆU

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

3.2.1. Từ mô và cơ quan động vật

Trong tất cả các nguyên liệu có nguồn gốc động vật thì tuyến tụy, màng nhầy dạ dày, tim... dùng để tách enzyme rất thuận lợi. Dịch tụy tạng có chứa amylase, lipase, protease, ribonuclease và một số enzyme khác.

Từ ngấn tư của dạ dày bê nghé người ta có thể thu nhận chế phẩm renin để làm đông sữa trong sản xuất fomat. Người ta cũng sản xuất pepsin từ dạ dày động vật.

Nhưng khác với pepsin, renin có khả năng đông tụ sữa cao mà không thủy phân sâu sắc casein. Renin là chế phẩm enzyme có giá trị lớn trong công nghiệp.

3.2.2. Từ thực vật

Ở thực vật: thông thường enzyme hay có mặt ở các cơ quan dự trữ như hạt, củ, quả. Cơ quan dự trữ giàu chất gì thì nhiều enzyme chuyển hóa chất ấy. Ví dụ trong hạt cây thầu dầu có nhiều lipase, trong hạt đậu tương có nhiều enzyme urease. Thóc nảy mầm chứa nhiều α -amylase, ở củ khoai lang lại có nhiều β -amylase.

Người ta đã thu được một số chế phẩm enzyme thủy phân như papain, bromelain, fixin từ thực vật bậc cao. Papain thu được từ mấu nhựa đu đủ xanh, bromelain thu được từ các bộ phận (lá, thân, quả) cây dứa, còn fixin được tách từ dịch ép thân và lá cây Ficus.

3.2.3. Từ vi sinh vật

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

- Chu kỳ sinh trưởng của chúng dài
- Nguồn nguyên liệu này không cải tạo được.
- Nhiều nguyên liệu dùng làm thực phẩm (dùng để ăn) không thể dùng làm nguyên liệu để sản xuất với quy mô lớn các chế phẩm enzyme nhằm thoả mãn các nhu cầu của nền kinh tế quốc dân.

Dùng vi sinh vật làm nguồn nguyên liệu để sản xuất các chế phẩm enzyme có nhiều ưu điểm nổi bật và có tính chất độc đáo vượt xa so với nguồn nguyên liệu từ động vật, thực vật, cũng như sẽ khắc phục được mọi khó khăn và hạn chế ở trên.

Trước hết vi sinh vật là nguồn nguyên liệu vô tận để sản xuất enzyme với số lượng lớn. Đây cũng là nguồn nguyên liệu mà con người chủ động tạo ra được. Chu kỳ sinh trưởng của vi sinh vật ngắn (từ 16 - 100 giờ) vì vậy có thể nuôi cấy hàng trăm lần trong năm.

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

Hệ enzyme vi sinh vật vô cùng phong phú. Vi sinh vật có khả năng tổng hợp nhiều loại enzyme khác nhau, trong đó có những enzyme ở động, thực vật không tổng hợp được. Ví dụ cellulase, raxemase...

Phần lớn các thức ăn để nuôi vi sinh vật lại dễ kiếm và giá rẻ. Nhiều vi sinh vật cho enzyme thường có khả năng phát triển trên các môi trường đơn giản, giá rẻ, dễ kiếm như các phế liệu của các ngành sản xuất. Hơn nữa, có thể dùng những nguyên liệu không phải thực phẩm, những dung dịch muối vô cơ để nuôi vi sinh vật. Vì vậy dùng vi sinh vật làm nguồn thu enzyme sẽ mang lại giá thành rẻ, thời gian nhanh và hiệu quả kinh tế cao.

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

Đối với một số trường hợp có thể dùng 100% sinh khối vi sinh vật làm nguồn enzyme.

Vi sinh vật rất nhạy cảm đối với tác động của môi trường, thành phần dinh dưỡng nuôi chúng cũng như một số tác nhân lý hóa, cơ học khác. Do đó có thể thay đổi những điều kiện nuôi cấy để chọn giống tạo những chủng đột biến cho ta hàm lượng enzyme đáng kể với hoạt tính xúc tác cao. Có thể nói rằng, nhờ nguồn enzyme vi sinh vật, người ta có thể điều khiển sự tổng hợp enzyme dễ dàng hơn các nguồn nguyên liệu khác để tăng lượng enzyme được tổng hợp hoặc tổng hợp định hướng enzyme.

Tuy vậy trong quá trình chọn nguồn nguyên liệu từ vi sinh vật, cần lưu ý một số vi sinh vật có khả năng sinh độc tố để có biện pháp xử lý thích hợp.

Nói chung các vi sinh vật muốn được sử dụng làm nguồn nguyên liệu tách enzyme cần phải thoả mãn các điều kiện sau:

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

Có một điều lí thú là: trong điều kiện bình thường, vi sinh vật chỉ tổng hợp ra một lượng enzyme vừa đủ cho hoạt động sinh lý cơ thể của chúng (thường được gọi là sự tổng hợp enzyme "bản thể"). Nếu khi tăng hàm lượng một số chất hoặc thêm một số chất mới

vào môi trường nuôi cấy, đặc biệt là cơ chất của enzyme, thì sự tổng hợp enzyme tương ứng tăng lên một cách đáng kể, khác thường có khi còn tổng hợp enzyme mới: hiện tượng trên gọi là sự cảm ứng sinh tổng hợp enzyme. Chất gây nên sự cảm ứng sinh tổng hợp gọi là chất cảm ứng. Sự tổng hợp một lượng đáng kể enzyme gọi là siêu tổng hợp enzyme.

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

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

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

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

Ngoài ra cần phải chọn môi trường vì thành phần môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng trực tiếp đến sự sinh trưởng và tổng hợp enzyme của vi sinh vật. Trong thành phần môi trường phải có đủ các chất đảm bảo được sự sinh trưởng bình thường của vi sinh vật

và tổng hợp enzyme.

Đặc biệt lưu ý là để tăng sự tổng hợp enzyme người ta thường dựa vào hiện tượng cảm ứng. Vì nếu như trong thành phần môi trường có các chất cảm ứng thì chất đó hay sản phẩm phân giải của nó sẽ kìm hãm hoặc làm yếu tác dụng kìm hãm của chất kìm hãm nhằm bảo đảm khả năng sinh tổng hợp enzyme đã cho không bị cản trở. Chất cảm ứng tổng hợp enzyme cho thêm vào môi trường nuôi thường là cơ chất tương ứng của enzyme cần tổng hợp. Ví dụ: Muốn tách α -amylase ở nấm mốc (*Asp. Oryzae*), người ta cho vào môi trường nuôi cấy tinh bột, maltose, isomaltose, oligosaccharid... có chứa liên kết α -1,6 glucozid. Muốn tách pectinase ở *Asp. Niger*, người ta cho thêm vào môi trường pectin. Đối với hemicellulase thì chất cảm ứng là hemicellulose; còn đối với proteinase chất cảm ứng có hiệu lực là protein, bột đậu nành, lông, sừng nghiền nhỏ (ở *Actinomyces fradiae*). Chất cảm ứng cũng có thể là những chất giống cơ chất và những sản phẩm thủy phân của chúng. Ví dụ: thay cho protein thì peptid và thay cho tinh bột thì erithrodextrin đều có tác dụng cảm ứng.

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

Một điều cần nói thêm nữa là enzyme thường chứa ở bên trong màng tế bào chất của sinh vật gọi là các enzyme nội bào (intracellular), nhưng nó cũng có thể được các sinh vật tiết ra môi trường sống, gọi là các enzyme ngoại bào (extracellular). Enzyme vi sinh vật

thường chiết là enzyme ngoại bào.

3.3. CHIẾT RÚT ENZYME

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

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

3.3.1. Đối với mô tế bào thực vật

Để việc phá vỡ có hiệu quả ở mô thực vật, trước khi nghiền người ta thường thái nhỏ mẫu để vào ngăn đá hoặc cho trương nước (ví dụ như đối với mẫu hạt khô).

Thu nhận enzyme từ tế bào thực vật tương đối khó khăn do sự hiện diện vách tế bào, không bào (vacuole) và hợp chất phenolic.

Việc phá vỡ không bào giải phóng proteases, pH dịch chiết thấp. Việc này có thể làm biến tính enzyme. Vì vậy phải chú ý sử dụng các chất ức chế protease trong suốt quá trình chiết rút.

Khi có oxygen, phenol oxidases xúc tác chuyển hợp chất phenolic thành dạng polymeric pigment có thể làm bất hoạt (inactivate) enzyme trong dịch chiết. Có thể khắc phục bằng cách bổ sung chất khử 2-mercaptoethanol hoặc bổ sung polyvinylpolypyrrolidone giúp hấp thu hợp chất phenolic.

3.3.2. Đối với mô tế bào động vật

Troước hết mô động vật được cắt nhỏ (loại bỏ mỡ và mô liên kết)

- Mô mềm đồng hóa trong thiết bị đồng hóa

- Mô cứng cần được xay nhỏ trong máy xay trước khi cho vào thiết bị đồng hóa. Sau đó tiến hành ly tâm để loại bỏ các thành phần thừa của tế bào.

3.3.3. Đối với tế bào nấm men

Một trong những khó khăn của tế bào nấm men là tế bào có chứa vách tế bào và nhiều protease. Có thể khắc phục bằng cách:

+ Tạo đột biến gây ra sự thiếu hụt một vài proteinase

+ Ngăn chặn sự tạo protease bằng cách nuôi trên môi trường không chứa cơ chất protein.

Để phá vỡ tế bào nấm men có thể sử dụng 1 trong 2 phương pháp sau:

+ *Phương pháp 1*: ủ bánh men trong toluene (6% (v/w)) và 2 mercaptoethanol (0.2 % (v/w)) ở 37°C trong 1 h tách thành phần vách tế bào, bổ sung EDTA (15 mM) tại pH 7.0 còn chứa 5 mM 2 – mercaptoethanol, ủ qua đêm để phá vỡ vách tế bào. Cuối cùng ly tâm 15 000 vòng/phút trong 30 phút.

+ *Phương pháp 2*: lắc với hạt thủy tinh (đường kính 1 mm) bổ sung thêm 1ml dịch chiết và ly tâm 2500 vòng/phút ở 10°C.

Nấm men *Pichia pastoris* hiện nay được dùng như tế bào chủ trong sản xuất enzyme tái tổ hợp. Vì nhờ vào đặc điểm của nấm men này là các recombinant protein được tiết vào môi trường cấy. Vì vậy thuận lợi hơn cho quá trình tinh sạch.

3.3.4. Đối với tế bào vi khuẩn

Các phương pháp phá vỡ tế bào thường được sử dụng để phá vỡ tế bào như:

+ Phương pháp cơ học: Nghiền bi, nghiền có chất trợ nghiền như bột thủy tinh, cát thạch anh, đồng hoá bằng thiết bị đồng hoá ở áp suất cao 55MPa

+ Phương pháp vật lý như dùng sóng siêu âm

+ Phương pháp hoá học như dùng các loại dung môi, butylic, aceton, glycerol, ethylacetate ... và chất detergent. Các hóa chất có tác dụng tốt cho việc phá vỡ các cấu tử của tế bào vì trong các cơ quan này thường chứa mỡ.

Phương pháp cơ học thường ảnh hưởng đến các thành phần tế bào. Vì vậy thường kết hợp các phương pháp hóa học với phương pháp vật lý:

- Vi khuẩn gram dương (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*): dùng enzyme lysozyme phá hủy vách tế bào, ủ với lysozyme từ trứng gà (0.2 mg/ml) ở 37°C trong 15 phút.

- Vi khuẩn gram âm (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*) rửa tế bào với detergent (0.1%(v/v) N-lauroyl-sarcosine), xử lý với sucrose (0.7 M), Tris (0.2 M), EDTA (0.04 M).

DNA có trong dịch chiết có độ nhớt cao gây khó khăn trong việc tinh sạch enzyme. Có thể xử lý bằng deoxyribonuclease 1 (10 µg/ml) hoặc với protamine (protein giàu arginine trong cấu tạo) hoặc xử lý polymer tích điện dương (polyethyleneimine).

Để chiết tách các enzyme màng, màng tế bào cần được xử lý với non-ionicdetergent như Triton hay Tween. Các detergent này ít gây ảnh hưởng lên cấu trúc protein nói chung và enzyme nói riêng. Quy tắc sử dụng detergent: 2 mg detergent dùng cho 1 mg màng tế bào.

Có một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết rút cần lưu ý:

- Trước hết đó là nhiệt độ. Để tránh mất hoạt tính hoặc thậm chí vô hoạt, cần chiết rút và tiến hành kết tủa enzyme ở nhiệt độ thấp (từ 3 đến 5°C).

- Các thao tác phải nhanh.

- Một số chất điện ly làm tăng quá trình chiết rút enzyme như NaCl, ZnCl₂, CaCl₂.

Tác dụng của chúng còn phụ thuộc vào phương pháp dùng khi chiết rút. Ví dụ như nếu dùng máy nung thì cả ba chất trên đều có tác dụng. Nếu chỉ để lắng thì chỉ NaCl có tác dụng. Vì vậy cần dùng chất điện ly thích hợp. Ví dụ khi chiết rút amylase, nếu cho thêm NaCl 0,1 - 0,2 % vào dung dịch chiết rút thì hiệu suất chiết rút tăng lên 30%. Người ta còn nhận thấy, nếu thêm vào dịch chiết CaCl₂ 0,2% sẽ làm cho kết tủa enzyme tốt hơn và cấu trúc của kết tủa cũng tốt hơn.

- Trong quá trình chiết rút enzyme ở các đối tượng động, thực vật, có trường hợp còn có mặt chất màu làm ảnh hưởng đến việc làm sạch hoặc xác định hoạt độ enzyme. Trong trường hợp này người ta còn cho thêm vào chất khử để loại màu. Màu của hemoglobin ở hồng cầu hoặc của chlorophyll và một số chất màu khác ở lá có thể bị loại trừ bởi hỗn hợp ethanol, chloroform với tỷ lệ thích hợp.

3.4. TINH SẠCH ENZYME

3.4.1. Khái niệm

Tinh sạch enzyme là việc loại protein không phải là enzyme, nước, các thành phần khác của tế bào khỏi enzyme. Công việc này hoàn toàn không dễ dàng. Do đó, việc làm sạch enzyme đòi hỏi người làm nghiên cứu về enzyme, ngoài sự hiểu biết về enzyme ra còn phải nắm vững rất nhiều thao tác kỹ thuật khác nhau để tránh gây mất tính hoạt động

của enzyme.

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

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

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

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

3.4.2. Các phương pháp tinh sạch enzyme

3.4.2.1. Phương pháp biến tính enzyme

Phương pháp này dựa trên sự tác động của nhiệt độ, pH làm biến tính các loại protein tạp. Người ta đưa nhiệt độ của dung dịch enzyme lên 50-70°C và $\text{pH} \leq 5$. Ở điều kiện này những enzyme không bền nhiệt và không chịu được pH thấp sẽ bị biến tính. Sau đó, bằng phương pháp ly tâm hoặc phương pháp lọc để loại bỏ các thành phần không phải là enzyme mà ta mong muốn.

Phương pháp này ít được sử dụng vì nó chỉ thích hợp với các enzyme chịu được axit và bền nhiệt. Ngoài ra, phương pháp này có thể được chỉnh sửa ở $\text{pH} \geq 11$ với nguyên lý tương tự khi muốn tách enzyme chịu được môi trường bazơ.

3.4.2.2. Phương pháp kết tủa enzyme

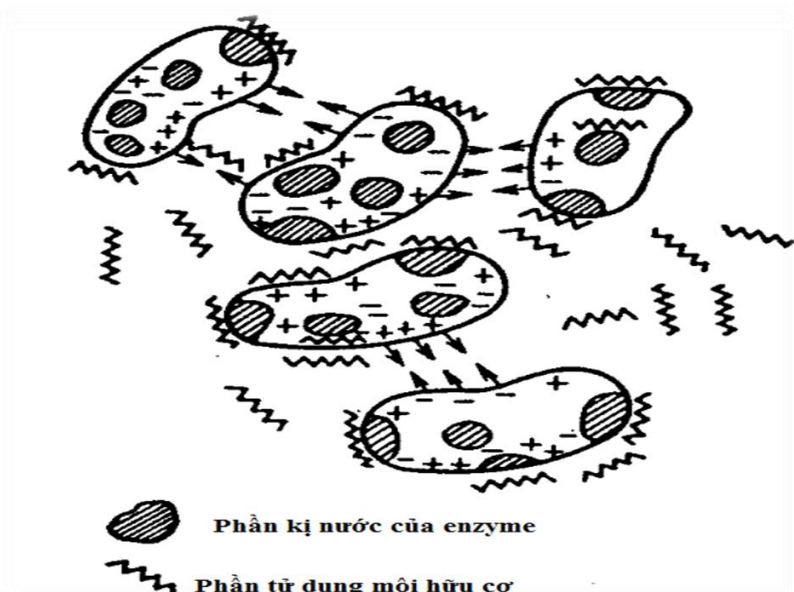
Enzyme có thể được kết tủa bằng dung môi hữu cơ hoặc muối, hoặc kết tủa tại điểm đẳng điện (pH_i).

a) Kết tủa bằng dung môi hữu cơ

Đối với enzyme có bản chất là protein cũng như các protein khác, để có thể thu được

enzyme, điều cần thiết là phải phá vỡ lớp nước liên kết xung quanh phân tử này bằng cách bổ sung vào dung dịch protein, enzyme các dung môi hoặc các hoá chất ưa nước có ái lực với nước mạnh hơn protein để lôi kéo nước ra khỏi phân tử protein đó, giúp cho protein kết tủa xuống. Ngoài ra khả năng kết tủa của protein bằng dung môi hữu cơ còn được giải thích nhờ vào việc làm giảm hằng số điện môi của dung dịch chứa enzyme, vì vậy cũng làm giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các protein mang điện tích cùng dấu nên chúng khả năng dính kết lại với nhau (hình 3.1).

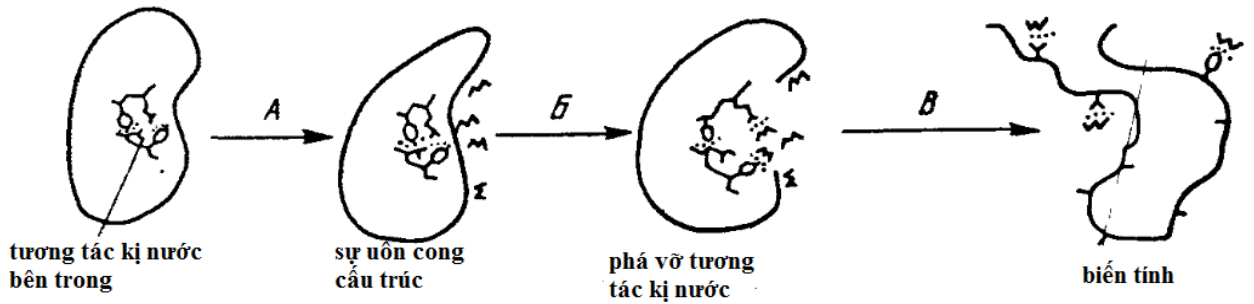
Các dung môi thường được sử dụng để kết tủa enzyme là acetone và ethanol.



Hình 3.1: Sự hợp thể của các protein và dung môi hữu cơ trong dung dịch

Heinicker và Gortner đã dùng acetone để kết tủa bromelin từ thân và trái dứa. Bromelin trong dung dịch nước rất nhạy cảm với các dung môi hữu cơ do đó để sự kết tủa đạt hiệu quả cao thường tiến hành quá trình kết tủa trong điều kiện lạnh. Như vậy, nước ép từ thân và trái dứa phải được làm lạnh ở 0-4°C và aceton tinh khiết ở 20°C. Ethanol cũng được sử dụng để kết tủa protein và hỗn hợp bromelin-ethanol cũng phải giữ ở điều kiện nhiệt độ lạnh. Sau khi thu được kết tủa, tủa bromelin phải được rửa bằng aceton và làm khô thật nhanh để bromelin không bị biến tính.

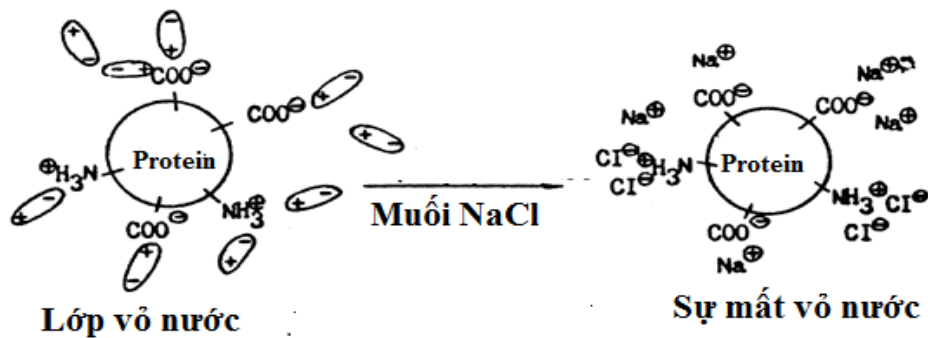
Từ những luận giải khoa học trên cho thấy protein rất dễ bị biến tính dưới tác động của nhiệt độ và dung môi hữu cơ. Cơ chế tác động của nhiệt độ và dung môi hữu cơ lên cấu trúc của protein được mô tả trên hình 3.2



Hình 3.2: Sự biến tính của protein dưới tác động của dung môi hữu cơ và nhiệt độ

b) *Kết tủa phân đoạn bằng muối:*

Phương pháp kết tủa phân đoạn bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dựa trên cơ sở sự khác nhau về khả năng kết tủa của các enzyme ở một nồng độ muối xác định (tính theo phần % nồng độ bão hòa) được dùng phổ biến để loại bỏ bước đầu protein tạp của các dịch enzyme. Các loại muối có thể được dùng là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , MgSO_4 ... người ta đã nhận thấy muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là tốt nhất vì nó không làm hại mà làm ổn định (làm bền) hầu hết các loại enzyme. Loại muối này lại rẻ và phổ biến. Độ hòa tan của nó lại rất lớn (bão hòa 767g/l ở 25°C). Ngoài ra nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cần thiết để kết tủa enzyme khác nhau thì khác nhau nhiều. Ví dụ: protease của nấm mốc dễ bị kết tủa ở 70% của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa hoàn toàn, còn amylase của mầm lúa bị kết tủa ở 50% độ bão hòa của dung dịch muối này. Điều đó nói lên tính kết tủa lựa chọn của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cao hơn các muối khác.



Hình 3.3: Sự cạnh tranh lớp áo nước của protein bởi muối NaCl

Thường dùng hai dạng bột hoặc bão hòa :

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

- Khi dùng dung dịch bão hòa: Trong nhiều sách về phương pháp nghiên cứu người ta đưa ra bảng tính số lượng muối cần thiết để pha các dung dịch có độ bão hòa khác nhau ở những nhiệt độ nhất định. Khái niệm về số phần trăm của độ bão hòa hoàn toàn đã được đề cập đến. Như ví dụ trên đã nói, enzyme có thể bị kết tủa ở 50% (0,5) hoặc 70% (0,7) của độ bão hòa hoàn toàn của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Khi cho dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vào dịch chiết enzyme thì nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ không tăng đột ngột.

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

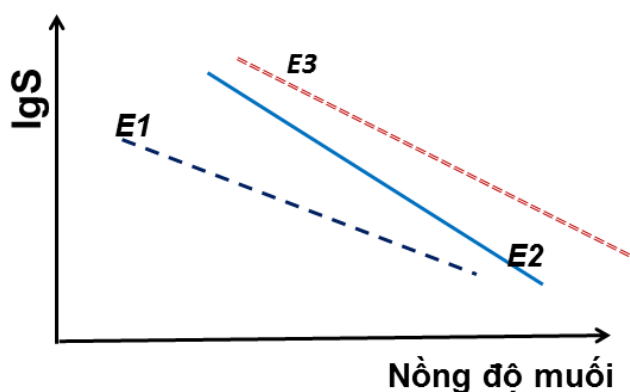
Ở giai đoạn loại muối, người ta dùng phương pháp thẩm tích. Thời gian thẩm tích thường là 24 - 28h, nước thay càng nhiều càng nhanh càng tốt.

Để giữ cho enzyme khỏi bị mất khả năng hoạt động, quá trình kết tủa phải được thực hiện ở nhiệt độ thấp (-5°C).

Độ hòa tan của protein, enzyme trong dung dịch muối được biểu diễn theo phương trình **Cohn**

$$\lg S = \lg S_0 - k_s \mu$$

Trong đó: S, S_0 : độ hòa tan của protein trong dung dịch muối và nước; k_s : hằng số muối thoát ra ngoài (salting out); μ : lực ion của dung dịch muối

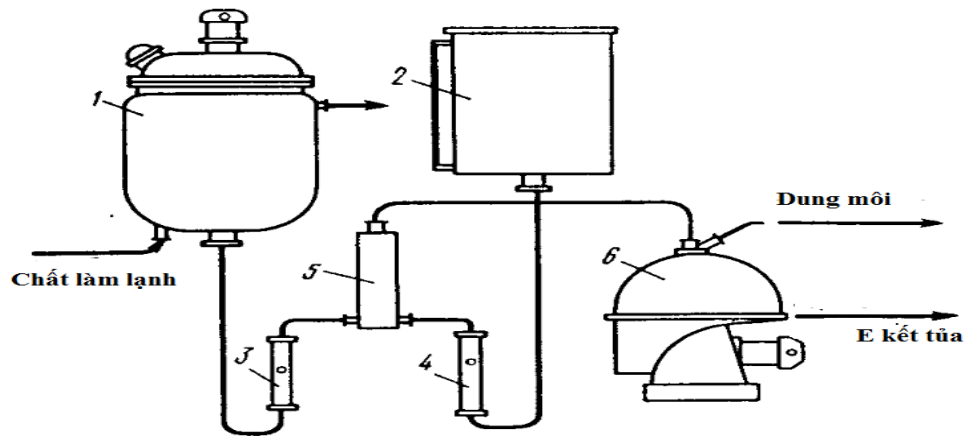


Hình 3.4: Mối liên hệ giữa nồng độ muối với khả năng kết tủa enzyme

Ý nghĩa của phương trình Cohn: Cho biết mối quan hệ giữa nồng độ muối với khả năng kết tủa enzyme (hình 3.4); khi nồng độ muối cao chúng sẽ cạnh tranh, lấy đi lớp vỏ nước của protein, các phân tử P mất vỏ hydrat sẽ tạo kết tủa. Như vậy, ở cùng một nồng độ

muối, các protein khác nhau có độ hòa tan khác nhau.

Trong công nghiệp người ta thường sử dụng tổ hợp thiết bị kết tủa enzyme như trên hình 3.5.



Hình 3.5: Sơ đồ bố trí thiết bị kết tủa enzyme liên tục bằng ethanol

1- Thùng chứa dung dịch enzyme; 2 – Thùng chứa ethanol; 3 , 4 – Lưu lượng kế kiểu con quay; 5 – Thiết bị trộn ; 6 – máy tách

c) Kết tủa enzyme ở điểm đẳng điện (pH_i)

Điểm đẳng điện (pH_i) là giá trị pH mà tại đó tổng số điện tích âm và điện tích dương của phân tử enzyme bằng 0.

Tại điểm đẳng điện phân tử enzyme trung hòa điện sẽ không chuyển dịch trong điện trường và phân tử enzyme sẽ kém bền nhất cho nên dễ kết tủa. Mỗi enzyme có một giá trị điểm đẳng điện xác định, ví như pepsin có $pH_i= 1$, amylase ($pH_i= 4,2-5,7$), urease có $pH_i=5,1$, lipase có $pH_i= 7,5, \dots$. Biết pH_i của enzyme quan tâm hoặc protein tạp có thể thực hiện kết tủa đẳng điện, sau đó lọc hoặc ly tâm để thu enzyme hoặc bỏ protein tạp.

Có thể sử dụng các dung dịch đệm để đưa pH dịch chiết về điểm đẳng điện. Phương pháp này có ưu điểm là dễ thực hiện, và có nhược điểm là chỉ thực hiện ở quy mô nhỏ, thời gian tạo điểm đẳng điện và thời gian lưu để tạo kết tủa bền vững thường làm thay đổi hoạt tính enzyme

3.4.2.3. Phương pháp hấp phụ chọn lọc

Người ta có thể cho chất hấp phụ trực tiếp vào dung dịch enzyme, hoặc cho dung dịch enzyme chảy qua một cột, trong cột có chứa chất hấp phụ. Chất hấp phụ được sử dụng rộng rãi là hydrocyapatite. Người ta có thể thực hiện một trong hai cách sau: hoặc là hấp

phụ enzyme hoặc là hấp phụ protein tạp. Để tránh làm biến tính enzyme, người ta thường thực hiện quá trình hấp phụ ở nhiệt độ 0°C. Sau khi hấp phụ, người ta lại tiến hành chiết enzyme (quá trình phản hấp phụ) bằng các dung môi thích hợp.

Để thực hiện phương pháp này người ta cho dịch enzyme chảy từ từ qua cột chất hấp phụ. Khi đó, tùy theo khả năng tương tác của chất hấp phụ với từng loại enzyme, các enzyme khác nhau sẽ được hấp phụ trên chất hấp phụ với khả năng khác nhau. Sau đó dùng các dung dịch đệm thích hợp để chiết rút enzyme ra khỏi cột.

Phương pháp hấp phụ thường dùng để làm đặc dung dịch enzyme. Có thể hấp phụ chọn lọc các enzyme theo 2 cách:

+ Hấp phụ âm tính: nếu enzyme không được hấp phụ, phương pháp xử lý này có thể xem như là dùng chất hấp phụ để tách những hợp chất tạp ra khỏi dung dịch enzyme.

+ Hấp phụ dương tính: nếu enzyme được hấp phụ, nó sẽ được tách ra khỏi những cấu tử khác trong dung dịch và sau đó được rửa giải khỏi chất hấp phụ bởi dung dịch đệm pH kiềm và các dung dịch đệm khác có khả năng rửa giải enzyme. Sau khi li tâm để loại các hợp chất không tan, dung dịch enzyme có thể thẩm tách để loại dịch đệm.

Muốn sự hấp phụ enzyme tốt nhất cần phải tuân theo những nguyên tắc chung sau đây:

- Hàm lượng protein trong dung dịch không vượt quá 1%.
- Tỷ lệ gel (trọng lượng khô) đối với protein thường là 10 : 1
- Môi trường hơi axit pH = 5 – 6.
- Nồng độ chất điện li (muối) thấp trong dung dịch. Sự tồn tại của bất kì một lượng muối nào cũng đều ảnh hưởng đến quá trình hấp phụ.

Quá trình được tiến hành tuần tự như sau:

- Cho vào dung dịch enzyme liên tiếp những lượng thích hợp gel.
- Trộn đều.
- Quay lắng.
- Thu hồi từng phần gel trước khi cho phần tiếp theo vào.

3.4.2.4. Phương pháp sắc ký

Phương pháp sắc ký trao đổi ion

Cơ sở của phương pháp là phản ứng trao đổi ion giữa protein được tan trong nước hoặc dung dịch đệm loãng và các tác nhân trao đổi ion.

Tác nhân trao đổi ion có thể là nhựa trao đổi ion hoặc các dẫn xuất este của xellulose (cacbocylmetyl cellulose – cmc; diethylaminoethylxellulose – DEAE-cellulose). Ưu điểm của phương pháp dùng DEAE là có thể cùng một lúc loại bỏ các tạp chất axit nucleic.

Có 2 loại sắc ký trao đổi ion âm và ion dương phụ thuộc vào loại điện tích của enzyme cần làm sạch. Các hạt nhựa trong pha tĩnh của cột sắc ký tích điện trái dấu với enzyme cần tách.

Để thu enzyme mong muốn tiến hành rửa giải bằng muối, thường sử dụng muối NaCl. Có thể rửa giải bằng gradient nồng độ muối hoặc tại nồng độ muối xác định. Lúc này, các ion của dung dịch rửa sẽ đẩy các enzyme ra khỏi nhựa. Khi đó, enzym nào có ái lực với nhựa kém nhất sẽ dễ bị đẩy ra khỏi nhựa nhất. Do đó, lần lượt các enzyme khác nhau sẽ được chiết ra khỏi cột theo từng phần chiết khác nhau, trong đó có phần chứa enzyme cần thu với nồng độ cao nhất.

3.4.2.5. Phương pháp sắc ký lọc gel

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

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

Sephadex là dẫn xuất của polysaccharide dextran. Trong chất này, các phân tử của chúng thường liên kết với nhau bởi các liên kết ngang nhờ tác dụng của epichlorhydrin, tạo thành “sàng phân tử”. Số lượng liên kết ngang tạo thành càng nhiều, kích thước của lỗ sàng phân tử càng nhỏ. Khi tiến hành lọc, các chất phân tử có kích thước nhỏ sẽ khuếch tán vào bên trong các hạt sephadex đã được ngâm trong dung dịch đệm, còn các phân tử có kích thước lớn hơn không có khả năng đi vào các hạt sẽ được chiết nhanh ra khỏi cột. Vậy cơ sở

của phương pháp lọc gel sephadex dựa vào sự khác nhau về kích thước, hình dáng và phân tử lượng của các chất có trong hỗn hợp.

Phương pháp này được áp dụng rộng rãi trong kỹ thuật enzyme.

3.4.2.6. Phương pháp sắc ký kỵ nước

Dựa vào các amino acid kỵ nước trong phân tử protein, các protein khác nhau thì có độ kỵ nước khác nhau. Dung dịch chứa enzyme mong muốn được hòa tan trong dung dịch có nồng độ muối cao được cho vào cột có chứa các hạt cellulose hoặc Sephadex đã được gắn các nhóm kỵ nước như phenyl hoặc Octyl. Cột sắc ký sẽ được rửa giải bằng dung dịch muối có nồng độ giảm dần.

3.4.2.7. Phương pháp tách hệ hai pha nước

Cơ sở kỹ thuật này dựa vào sự phân bố khác nhau của hỗn hợp trong dung dịch hai pha không hòa tan vào nhau. Các hệ hai pha đặc trưng bằng cách trộn các hệ dung môi vào nhau để tạo thành hai pha riêng biệt. Hệ dung môi được sử dụng trong phương pháp này có thể là polymer/polymer như: polyethylene glycol (PEG) và dextran hoặc polymer/muối như PEG và potassium phosphate, sodium sulphate, sodium phosphate,...

Các protein và mảnh vỡ tế bào có khả năng hòa tan khác nhau giữa hai pha, vì vậy phương pháp này có thể được dùng cho cả hai trường hợp: phân tách protein khỏi mảnh vỡ tế bào và phân chia các enzyme trong suốt quá trình tinh sạch protein. Hệ hai pha nước được xem là phương pháp tốt cho việc phân tách và tinh sạch các hỗn hợp, vì phân tách chất lỏng có mật độ khác nhau dễ dàng hơn phân tách các chất rắn ra khỏi các chất lỏng.

So với các phương pháp tinh sạch khác thì hệ hai pha nước có một số ưu điểm hơn như: có độ hòa tan trong nước của hai pha lớn (70-80%), đạt độ tinh sạch cao, hiệu suất cao, dễ dàng sử dụng ở quy mô lớn và đặc biệt polymer được tái sử dụng. Sự phân tách đạt hiệu quả cao tùy thuộc vào các thông số như khối lượng phân tử và điện tích của đối tượng nghiên cứu, nồng độ và khối lượng phân tử của các polymer, nhiệt độ, pH, thời gian, lực ion của hỗn hợp và sự hiện diện của các loại muối đa hóa trị như phosphate hoặc sulphate...

3.4.2.8. Các phương pháp khác

- Phương pháp dùng chất hấp phụ đặc hiệu sinh học

- Phương pháp sắc ký ái lực (affinity chromatography).

Hiện nay, chưa có một phương pháp chuẩn nào thật sự có hiệu quả trong việc làm sạch enzyme. Do đó, việc làm sạch chỉ thật sự có hiệu quả khi ta biết lựa chọn các phương pháp riêng, kết hợp với nhau, tạo ra hệ thống phương pháp nối tiếp với nhau một cách hài hòa nhất.

3.5. ĐÁNH GIÁ ĐỘ TINH SẠCH CỦA ENZYME

Để xác định xem protein được chiết tách ra có phải là enzyme tinh khiết không hay còn chứa những tạp chất protein không hoạt động, người ta sử dụng một số phương pháp chủ yếu dựa trên việc nghiên cứu những tính chất vật lý của protein.

- Làm lắng (kết tủa) dung dịch protein trong phần quay phân tích của máy siêu ly tâm: phát hiện một đỉnh của protein thì đó là protein thuần nhất. Tuy nhiên một số protein tuy khác nhau nhưng có cùng trọng lượng phân tử và có hình dạng tiểu phân (hoặc có khi có sự bù phụ của các ảnh hưởng của khối lượng và hình dạng) thì có hằng số lắng trùng nhau. Vì thế khi siêu ly tâm, chúng có thể lắng với tốc độ như nhau và cho một đỉnh chung.

- Điện di: là phương pháp vật lý có giá trị để phân tách các hỗn hợp protein, enzyme và cũng là phương pháp để xác định sự tinh khiết của các chế phẩm protein. Gần đây, phương pháp này được áp dụng ở những giai đoạn tinh chế enzyme cuối cùng.

Phương pháp này rất hiệu quả. Tuy nhiên khó mà phân biệt được những protein giống nhau về khối lượng phân tử. Dung dịch enzyme khi được điện di chỉ thấy xuất hiện vạch cân đối tại vị trí có khối lượng phân tử như dự đoán thì đó là dấu hiệu của enzyme thuần nhất. Thế nhưng khi hàm lượng những protein tạp nhỏ ($\leq 1\%$) thì khó phát hiện ra đúng.

- Xác định hoạt độ riêng, mật độ quang học riêng trong những đỉnh quang phổ đặc trưng cùng hàm lượng các nhóm ngoại đặc hiệu.

Biện pháp khá nhạy cảm để xác định mức độ thuần nhất của enzyme (cũng như protein khác) là kết hợp sự phân tích điện di không biến tính và những phản ứng miễn dịch hóa học đặc hiệu, đặc biệt điện di trên thạch.

Thường để xét độ thuần nhất của enzyme, người ta dựa trên sự so sánh những kết quả thu được từ một vài phương pháp khác nhau.

Đặc biệt, những chế phẩm enzyme càng tinh khiết thì càng dễ hỏng và khi bảo quản trong các dung dịch ở 4°C đều nhanh chóng mất hoạt tính. Vì thế, khi tái kết tinh enzyme lặp lại ta thường thấy có sự giảm hoạt độ riêng vì các tinh thể đã bị ô nhiễm bởi phần enzyme bị ức chế.

3.6. TẠO CHẾ PHẨM ENZYME

Sau khi enzyme đã được tinh sạch và cô đặc đến nồng độ thích hợp, mục tiêu tiếp theo của các nhà sản xuất là duy trì hoạt động của enzyme. Các nhà sản xuất thường sẽ đề xuất điều kiện bảo quản enzyme cũng như những ghi chú tỉ lệ hoạt động bị mất khi được bảo quản bằng các điều kiện này. Vấn đề quan trọng của cả nhà sản xuất và người sử dụng là hoạt tính của enzyme phải được duy trì trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng.

Một vài enzyme duy trì được hoạt tính của chúng trong một vài tuần thậm chí là vài tháng. Nhưng hầu hết thì nó sẽ bị mất hoạt tính rất nhanh.

Để đạt được sự ổn định, các nhà sản xuất sử dụng các chất tại ngay khu sản xuất của họ. Công thức của các chất thường được bảo mật hoặc chỉ được tiết lộ cho người sử dụng sau khi đã có thỏa thuận giữ bí mật. Chúng ta cần nhớ rằng hầu hết các enzyme công nghiệp chứa khá ít enzyme hoạt hóa (<10%w/w), phần còn lại là các protein bất hoạt, các chất ổn định, chất bảo quản, muối và dung môi.

Chìa khóa để duy trì hoạt độ của enzyme là sự duy trì hình dạng của nó, vì vậy phải ngăn cản sự dẫn ra (unfold), sự ngưng kết và sự thay đổi trong các cấu trúc có liên kết cộng hóa trị. Để làm điều này chúng ta có thể sử dụng các chất phụ gia, chỉnh sửa các liên kết cộng hóa trị hoặc cố định enzyme.

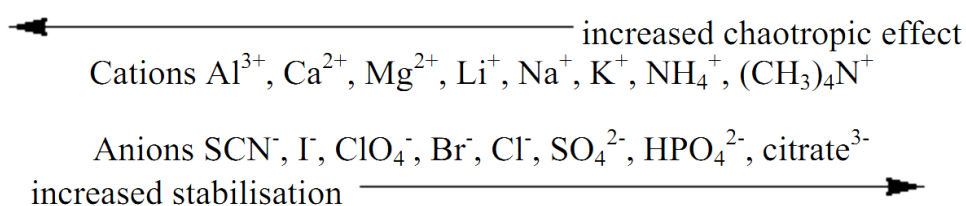
Nhìn chung, protein được ổn định hóa bằng cách tăng nồng độ của chúng và độ mạnh ion của dung dịch. Muối trung hòa sẽ cạnh tranh với protein để dành nước và liên kết với các nhóm tích điện hoặc phân cực. Điều này dẫn đến sự tương tác giữa các khu vực kỵ nước của làm cho các phân tử enzyme bị nén lại và khiến chúng ít bị dẫn ra (unfolding) do sự thay đổi nhiệt độ.

Không phải tất cả các muối đều có ảnh hưởng như nhau trong việc ổn định các tương tác kỵ nước, một vài loại muối còn làm biến tính protein bằng cách liên kết protein và phá vỡ cấu trúc của chúng. Từ đó có thể thấy rằng tại sao khi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ammonium

sulphate) và KH_2PO_4 (potassium hydrogen phosphate) là các chất ổn định enzyme rất tốt trong khi $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (sodium thiosulphate) và CaCl_2 (calcium chloride) là các làm mất ổn định enzyme.

Nhiều enzyme là được ổn định tại nồng độ thấp của các cation có thể hoặc là không cấu tạo nên trung tâm hoạt động, ví dụ như Ca^{2+} làm ổn định α -amylases và Co^{2+} làm ổn định glucose isomerase. Tại nồng độ cao (ví dụ 20% NaCl), muối có thể ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật nhờ vào áp suất thẩm thấu. Các ion thêm vào có thể bảo vệ enzyme khỏi bị oxy hóa các nhóm ví dụ như thiol bằng cách đẩy oxy hòa tan ra khỏi dung dịch.

Sự ảnh hưởng của các ion đến sự ổn định của enzyme:



Hình 3.6: Sự ảnh hưởng của các ion đến sự ổn định của enzyme

Các polyols có khối lượng phân tử thấp (ví dụ: glycerol, sorbitol, và manitol) là các chất ổn định enzyme hữu dụng, bằng cách ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật, do sự khử hoạt động (do ít nước), và bằng cách hình thành lớp màng bảo vệ để ngăn sự quá trình dẫn ra (unfolding). Glycerol có thể được để bảo vệ enzyme khỏi bị biến tính do việc hình thành các tinh thể ở nhiệt độ âm. Một vài polymer hóa nước (ví dụ: polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone and hydroxypropylcelluloses) làm ổn định enzyme bằng cách hình thành vách ngăn, theo đó các tương tác enzyme với enzyme và giữa enzyme với nước phân nào bị thay thế bởi các tương tác enzyme-polymer ít gây biến tính enzyme hơn. Chúng cũng có thể hoạt động bằng cách ổn định các tương tác kỵ nước ở bên trong enzyme. Nhiều sự thay đổi hóa học đặc hiệu của các chuỗi bên amino acid thường được sử dụng phổ biến hơn. Một ví dụ là dẫn xuất của chuỗi bên lysine trong protease với N-carboxyamino acid anhydrides. Điều này sẽ hình thành nên enzyme đã được polyamino hóa tại nhiều mức độ khác nhau và chiều dài của chuỗi bên cũng khác nhau. Dẫn xuất này sẽ làm nguy trang bản chất protein của protease và ngăn cản sự tự phân.

Enzyme thường ổn định khi ở dạng rắn hơn là trong dung dịch. Bột enzyme thường

được tạo ra bằng phương pháp đông khô. Thường chúng được trộn với các vật liệu trợ như tinh bột, lactose, carboxymethylcellulose ... để bảo vệ enzyme trong suốt quá trình sấy phun. Những vật liệu khác được thêm vào trước khi bán bao gồm cơ chất, các chất có nhóm thiols để tạo môi trường khử, kháng sinh, ester của acid benzoic như là các chất bảo quản cho dung dịch enzyme, các chất ức chế hoạt động của enzyme hoạt là các chất kết tủa kim loại.