GS.TSKH. PHẠM THỊ TRÂN CHÂU
PGS.TS. PHAN TUẤN NGHĨA

Công nghệ SINH HỌC

TẬP BA

ENZYME và ỨNG DỤNG

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

GS.TSKH. PHẠM THỊ TRÂN CHÂU
PGS.TS. PHAN TUẤN NGHĨA

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TẬP BA

ENZYME VÀ ỨNG DỤNG

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

LỜI MỞ ĐẦU

Các quá trình hóa học xảy ra trong hệ thống sống là những phản ứng có hiệu quả cao nhất. Đó là nhờ tác dụng xúc tác của enzyme (E). Enzyme là những chất xúc tác sinh học (là protein hay acid nucleic), có đầy đủ tính chất của chất xúc tác, ngoài ra còn có những tính chất ưu việt hơn như: có hiệu suất xúc tác rất cao ở điều kiện nhiệt độ và áp suất bình thường, có tính đặc hiệu cao. Các tính chất này vẫn được bảo tồn khi tách enzyme ra khỏi hệ thống sống, hoạt động trong điều kiện *invitro*. Vì vậy, enzyme ngày càng được sử dụng rộng rãi trong thực tế, với quy mô ngày càng lớn, dẫn đến việc hình thành và phát triển ngành công nghệ sản xuất enzyme, và công nghệ sản xuất các thiết bị có cấu tử enzyme như các biosensor, thận nhân tạo và cả các biochip. Việc sử dụng enzyme trong thực tế không chỉ có ý nghĩa về kinh tế mà còn giải quyết được nhiều vấn đề xã hội, các vấn đề bức xúc về môi trường.

Để khai thác, sử dụng enzyme có hiệu quả, cần có những hiểu biết nhất định về enzyme.

Sách nhằm giới thiệu với bạn đọc những kiến thức cơ bản, cũng như những kiến thức nâng cao khác trong nghiên cứu và ứng dụng enzyme; một số phương pháp truyền thống và hiện đại để xác định hoạt độ, tách, tinh sạch, nghiên cứu tính chất enzyme. Sách còn giới thiệu tóm tắt về phương hướng nghiên cứu enzyme, acid ribonucleic có hoạt tính xúc tác (ribozyme), một trong những thành tựu quan trọng nhất của sinh học trong nửa cuối thế kỷ XX.

Các nội dung trên được trình bày trong 9 chương:

Chương 1. Lược sử phát triển enzyme học.

Chương 2. Các phương pháp nghiên cứu enzyme.

Chương 3. Cấu trúc phân tử enzyme.

Chương 4. Tính đặc hiệu của enzyme.

Chương 5. Các chất xúc tác.

Chương 6. Các yếu tố ảnh hưởng đến vận tốc phản ứng enzyme.

Chương 7. Công nghệ ADN tái tổ hợp.

Chương 8. Ứng dụng enzyme.

Chương 9. Enzyme không tan.

Ngoài ra, còn có phần Phụ lục, trong đó có bảng phân loại, mã số, tên, tên hệ thống, mã số của một số E thường gặp đã được ghi trong bảng "Enzyme Nomenclature" 1992 để giúp sinh viên, học viên sau đại học, những người nghiên cứu về enzyme tra cứu.

Các chương 1, 3, 4, 5, 6, 8 và 9 và phần Phụ lục do *GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu* biên soạn.

Các chương 2 và 7 do *PGS. TS. Phan Tuấn Nghĩa* biên soạn.

Trong khuôn khổ có hạn của sách, và để phục vụ nhiều đối tượng khác nhau, nên chúng tôi không thể giới thiệu quá sâu về các nội dung đã đề cập.

Trong điều kiện hội nhập quốc tế ngày càng phát triển, để tiện việc tra cứu, tìm dữ liệu trên mạng, chúng tôi không phiên âm tên các chất hóa học mà giữ nguyên tiếng Anh, là ngôn ngữ khoa học phổ biến, rất mong được bạn đọc thông cảm.

Sách đã kế thừa, bổ sung và phát triển nhiều nội dung trong giáo trình chuyên đề "Enzyme học" do chúng tôi biên soạn và giảng dạy nhiều năm cho sinh viên năm cuối chuyên ngành Hóa sinh, Công nghệ Sinh học của Khoa Sinh học, Trường đại học Tổng hợp Hà Nội trước đây và Trường đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội ngày nay. Chúng tôi hy vọng sách sẽ phục vụ được đông đảo các sinh viên, học viên cao học và nghiên cứu sinh, thuộc nhiều chuyên ngành liên quan và đông đảo bạn đọc quan tâm đến các chất xúc tác kỳ diệu này.

Các tác giả xin chân thành cám ơn những ý kiến đóng góp của bạn đọc để chúng tôi có thể bổ sung, sửa chữa và hoàn thiện hơn trong các lần in tiếp theo.

Hà Nội, ngày 19 tháng 8 năm 2006

Thay mặt các tác giả

Chủ biên

GS.TSKH. **Phạm Thị Trân Châu**

BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

ADN	Acid deoxiribonucleic
Amp^R	Ampicilline
ARN	Acid ribonucleic
BAC	Nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (bacterial artificial chromosome)
CoE	Coenzyme
CM	Carboxyl methyl
DEAE	Diethylaminoethyl
E	Enzyme
EDTA	Acid ethilen diamin tetraaxetic (ethylen diamin tetraacetic acid)
FAD	Flavin-adenine dinucleotide (dạng oxy hóa)
$FADH_2$	Flavin-adenine dinucleotide (dạng khử)
IAA	Iodoacetic acid
LDH	Lactate dehydrogenas
MCS	Vùng nhân dòng đa điểm cắt (multiple cloning sequence)
NAD^+	Nicotinamide-adenine dinucleotide (dạng oxy hóa)
NADH	Nicotinamide-adenine dinucleotide (dạng khử)
$NADP^+$	Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (dạng oxy hóa)
NADPH	Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (dạng khử)
NST	Nhiễm sắc thể
PAGE	Điện di trên gel polyacrylamide
PCR	Phản ứng chuỗi polymerase (polymerase chain reaction)
PEP	Phosphoenolpyruvate
PMSF	Phenyl methylsulfonyl fluoride
QAE	Quaternary aminoethyl
SDS	sodium dodecyl sulfate
SP	Sulfopropyl
Tet^R	Tetracycline
TPCK	Tosyl-phenylalanyl chloromethyl ketone
YAC	Nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (yeast artificial chromosome)

MỤC LỤC

Chương 5. CÁC CHẤT XÚC TÁC, BẬC PHẢN ỨNG

Chương 6. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN VẬN TỐC PHẢN ỨNG ENZYME

Chương 9. ENZYME KHÔNG TAN

Chương 1

LƯỢC SỬ PHÁT TRIỂN ENZYME HỌC

Enzyme (E)** là những protein có khả năng xúc tác cho các phản ứng hoá học với mức độ đặc hiệu khác nhau ở nhiệt độ tương đối thấp.* E có trong tất cả các tế bào sống, là các *chất xúc tác sinh học.* E có đầy đủ các tính chất của chất xúc tác, nhưng E có *hiệu suất xúc tác lớn* hơn tất cả các chất xúc tác hữu cơ và vô cơ khác. E không những có thể xúc tác cho các phản ứng xảy ra trong cơ thể sống, mà sau khi tách khỏi hệ thống sống, ở những điều kiện nhất định chúng vẫn giữ được hoạt tính xúc tác. Các chất tham gia trong phản ứng do E xúc tác gọi là ***cơ chất của E, ký hiệu là S.E có *tính đặc hiệu cao,* nghĩa là mỗi E chỉ tác dụng trên một hay một số S nhất định, xúc tác cho một kiểu phản ứng nhất định tạo thành một hay một số sản phẩm nhất định. Ngày nay người ta đã có thể tổng hợp E bằng phương pháp hoá học, các E này gọi là *synzyme.* Các kháng thể có hoạt tính xúc tác gọi là *abzyme. Acid ribonucleic có hoạt tính xúc tác gọi là ribozyme.* Như vậy, có thể nói một cách khái quát, *E là những chất phân tử lớn tồn tại trong tự nhiên, hay được tổng hợp có khả năng xúc tác cho một hay nhiều phản ứng với mức độ đặc hiệu khác nhau ở nhiệt độ và áp suất bình thường.*

Từ nhiều thập kỷ trước, E đã được sử dụng trong công nghiệp chế biến nhưng mới chỉ có tính chất kinh nghiệm thuần túy. Công nghệ E ra đời là một bước phát triển ứng dụng của E. Ngày nay, việc nghiên cứu E đã bước vào một giai đoạn mới, một giai đoạn có sự tích hợp với nhiều ngành khác nhau như Hóa học Protein, Lý sinh phân tử, Sinh học phân tử v.v..., do đó có được những hiểu biết đầy đủ hơn về tính chất hóa học, cấu trúc, động học và tiềm năng ứng dụng lớn của E. Công nghệ E ngày nay không chỉ khai thác E vốn có trong hệ thống sống mà còn thiết kế định hướng những phân tử E có tính chất ưu việt hơn dạng tự nhiên nhằm sản xuất E ở quy mô lớn, giá thành ngày càng giảm, hiệu quả ứng dụng ngày càng cao.

Sử dụng E trong sản xuất sẽ nâng cao chất lượng, hạ giá thành sản phẩm, cải thiện lao động, giảm ô nhiêm môi trường. Cùng với sự phát triển của khoa học cũng như E học, việc ứng dụng E ngày càng mở rộng, phát triển ở tầm cao hơn, không chỉ trong các lĩnh vực truyền thống mà cả trong nhiều lĩnh vực mới tạo ra các sản phẩm mới.

1.1. LƯỢC SỬ NGHIÊN CỨU E VÀ SỰ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ E

1.1.1. Trước thế kỷ XVII

Việc sử dụng E có tính chất kinh nghiệm thuần túy.

Người cổ xưa đã biết dùng vi sinh vật như là nguồn E trong các quá trình lên men như: làm rượu vang, sản xuất dấm, làm bánh mỳ. Người ta cũng đã tìm thấy các tài liệu viết từ xưa về vấn đề này ở Babylon, Roma, Hylạp, Egypt, Trung Quốc, Ấn Độ.

1.1.2. Thế kỷ XVII đến nửa đầu thế kỷ XVIII: Đã đề ra được khái niệm lên men.

Vanhemon (Vanhemont) người Hà Lan, lần đầu tiên đã quan sát được hiện tượng tạo thành chất khí khác không khí trong quá trình lên men.

1659, Silvius lần đầu tiên nêu lên rằng, về cơ bản, tất cả các quá trình sống đều là những quá trình hóa học.

1.1.3. Nửa cuối thế kỷ XVIII: Đã có những thí nghiệm đầu tiên về E.

Ví dụ: Công trình nghiên cứu khả năng tiêu hóa thịt trong dạ dày. Công trình này do Reaumur (người Pháp) bắt đầu và sau đó được Spallanzani (người Ý) mở rộng (năm 1729-1799). Các tác giả đã cho thịt vào ống kim loại, đưa vào dạ dày nhiều động vật khác nhau, kể cả người, và thấy rằng thịt bị tiêu hóa. Sau đó Spallanzani đã thí nghiệm thành công việc tiêu hóa thịt invitro, từ đó Spallanzani đã giải thích rằng, trong dịch dạ dày có một thành phần hoạt động đặc biệt có khả năng tiêu hóa thịt. Ông cũng chứng minh rằng, quá trình tiêu hóa này phụ thuộc vào nhiệt độ và thời gian tiêu hóa, phụ thuộc lượng dịch dạ dày. Ông cũng nhận thấy dịch dạ dày khi ở ngoài cơ thể thì không bền, khả năng tiêu hóa thịt của nó giảm dần theo thời gian. Thời bấy giờ, những kết quả này là khá mới mẻ, thú vị và được nhiều người quan tâm. Năm 1836, Schwann đã gọi chất làm tiêu hóa thịt này là pepsin (pepxin).

Từ năm 1800, người ta cũng đã cho rằng, trong ruột có một E phân giải protein khác. Sau đó Kuhne đã đặt tên E đó là trypsin.

Protease thực vật được sử dụng khá sớm, từ năm 1700, người dân ở các đảo Thái Bình Dương đã biết dùng quả đu đủ để làm mềm thịt và chữa bệnh chốc lở (ringworm).

Các kết quả nghiên cứu này đã kích thích việc nghiên cứu có hệ thống các E tiêu hóa vào thế kỷ XIX.

1.1.4. Nửa đầu thế kỷ XIX: Người ta đã tách được một số chế phẩm từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau có tác dụng thủy phân các chất tương ứng, và bắt đầu tách được các chất tạo nên quá trình lên men.

Mở đầu là công trình nghiên cứu của Kiêcgôp (người Nga, 1814), chứng minh nước chiết từ hạt lúa mạch nảy mầm có tác dụng chuyển hóa tinh bột thành đường ở nhiệt độ từ 40°C – 60°C. Năm 1833, Payen và Perso (Pháp) thêm cồn vào dịch chiết này, thu được kết tủa có khả năng phân giải tinh bột thành đường, đặt tên là *diastase* (xuất phát từ tiếng Hy Lạp, *diastatic,* có nghĩa là phân giải, đó là *amylase*). Tiếp theo, Leuchs (1851) đã phát hiện nước bọt cũng có khả năng phân giải tinh bột thành đường. Từ đó người ta đã chia E thành 2 loại: E có tổ chức (hoạt động thông qua hoạt động sống của tế bào vi sinh vật) gọi là *ferment* và E không có

tổ chức gọi là *E*. Sự phân biệt này đã bị bác bỏ sau khi Buchner thí nghiệm thành công việc lên men bằng dịch chiết vô bào từ nấm men.

Sau công trình này, người ta cũng đã tách được nhiều E khác ở dạng kết tủa.

1.1.5. Nửa cuối thế kỷ thứ XIX: Đã tinh sạch được một số E và nghiên cứu một số tính chất cơ bản của E.

Ví dụ: Người ta đã biết dùng phương pháp hấp phụ lựa chọn để tinh sạch E, xác định đặc tính tác dụng thuận nghịch của E (Danhilepski 1862); đã xác định tính tác dụng đặc hiệu của E (Fisher 1984), tác dụng làm bền của cơ chất đối với E.

Trong thời kỳ này cũng đã có thông báo ban đầu về *cơ chế tác dụng* của E: Wurtz (1880) đã chỉ ra rằng, papain tạo thành hợp chất không tan với fibrin trước khi thủy phân nó.

1.1.6. Nửa đầu thế kỷ XX: Đã phát hiện được CoE (Harden và Young, 1906); xác định ảnh hưởng pH đến hoạt độ E (Sorensen, 1909); nghiên cứu động học phản ứng E (Bayliss, 1919); kết tinh được E và xác định được bản chất hóa học của E là protein; xác định được một số hệ thống E xúc tác cho quá trình đường phân (Embden, Meyerhoff và Parnas, 1933); chu trình acid tricacboxilic (Krebs, Knop và Martius, 1937).

Việc *xác định cấu trúc phân tử E* là vấn đề có tính chất cốt lõi để làm sáng tỏ nhiều vấn đề trong nghiên cứu E. *E đầu tiên được kết tinh là urease* (James Sumner, 1926). Sumner đã chỉ rõ rằng, tinh thể urease bao gồm protein, khi hòa tan trong dung môi sẽ có hoạt tính E. Điều này đã khẳng định được thành phần protein của E. Công trình này mở đầu cho một giai đoạn mới, một bước ngoặt quan trọng trong lịch sử nghiên cứu E. Trong vòng *20 năm sau đã có đến 130 E được kết tinh*. Việc thu nhận E ở dạng tinh thể có ý nghĩa quan trọng ở chỗ: nó cho phép sử dụng nhiễu xạ tia X để nghiên cứu cấu trúc phân tử E.

1.1.7. Những thành tựu chính về nghiên cứu E và công nghệ E trong nửa cuối thế kỷ XX

- Đã áp dụng thành công các phương pháp hiện đại trong nghiên cứu E: *hoàn thiện phương pháp xác định cấu trúc bậc I* phân tử E; nghiên cứu *liên quan giữa cấu trúc và chức năng của phân tử.*

– Lần đầu tiên đã công bố bảng *phân loại* và cách *gọi tên E* một cách có hệ thống.

– Phát hiện các *restrictase (E giới hạn).*

– *Tổng hợp hóa học E.* Ribonuclease là E đầu tiên được tổng hợp (1968) bằng hai phương pháp khác nhau: kết hợp lần lượt từng amino acid với nhau (nhóm Merifield) hoặc tổng hợp các đoạn peptide ngắn, sau đó nối chúng lại với nhau (nhóm Hirsman).

Đến nay người ta đã tổng hợp được E từ nguyên liệu ban đầu là các chất phân tử thấp như các cyclodextrin (bao gồm 6 đến 10 gốc D-glucose, đầu nối đuôi tạo thành vòng), sau đó gắn thêm các nhóm chức trong trung tâm hoạt động của E. Với phương pháp này đã tổng hợp nhân tạo E có hoạt tính phân giải ester giống chymotrypsin nhưng có độ bền lớn hơn. Một E khác có hoạt tính chuyển vị nhóm amin cũng được tổng hợp từ cyclodextrin kết hợp với CoE pyridoxal.

Các E được tổng hợp nhân tạo gọi là *synzyme*.

– Thành tựu khác là *thiết kế E có hoạt tính hay tính đặc hiệu mới* bằng cách ghép một E vào một bộ khung cấu trúc khác. Ví dụ: Bằng kỹ thuật này đã biến một protein xúc tác cho phản ứng chuyển hóa tương hỗ giữa dạng *cis* và dạng *trans* của liên kết peptide nối với gốc amino acid proline thành E xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptide được tạo thành với nhóm amin của proline (Xaa-Pro). Hướng nghiên cứu này đang được phát triển để thiết kế các E có đặc tính mong muốn, đáp ứng yêu cầu ứng dụng trong thực tế.

– Phát hiện *reverse transcriptase (transcriptase ngược)*.

– Phát hiện được một số phân tử sinh học thuộc các nhóm chất có hoạt tính sinh học khác cũng có hoạt tính xúc tác như E: các *kháng thể*, các *ribozyme*.

+ ***Abzyme*** là các kháng thể có hoạt tính xúc tác.

Từ năm 1969, Williám Jencks đã đề cập đến đặc tính xúc tác của kháng thể.

Năm 1986, Richard Lerner và Peter Schultz đã chỉ ra rằng, có thể tạo được các kháng thể có hoạt tính xúc tác. Bằng chứng thực nghiệm là: khi sử dụng N-alkylporphyrin làm kháng nguyên, người ta đã tạo được một kháng thể có hoạt tính xúc tác giống như E ferrochelatase, xúc tác cho phản ứng đưa Fe^{2+} vào vòng porphyrin để tạo thành vòng Hem (trong hemoglobin, catalase và một số E khác). Hoạt độ xúc tác của abzyme này kém ferrochelatase 10 lần, nhưng nhanh hơn tốc độ phản ứng khi không có chất xúc tác 2500 lần. Người ta cũng đã có những bằng chứng thực nghiệm cho thấy các abzyme có thể xúc tác cho nhiều kiểu phản ứng khác nhau như: *thủy phân ester, thủy phân và tạo thành amid, chuyển vị ester, decarboxyl hóa, oxy hóa.*

Các abzyme cũng giống như nhiều E khác, có tính đặc hiệu lập thể cao, vì vậy chúng có thể *hỗ trợ đáng kể cho việc tổng hợp hóa học các phân tử hữu cơ phức tạp*, nhằm tạo các phân tử có đặc tính hóa học lập thể mong muốn. Thành tựu này đã được áp dụng thành công từ những năm 1991. Phân tích cấu trúc của abzyme xúc tác phản ứng thủy phân ester của amino acid bằng tia X, cho thấy trung tâm hoạt động (TTHĐ) của nó có chứa các gốc serine và histidine, hố oxyanion tương tự như TTHĐ của các serine- protease.

+ ***Ribozyme:*** Năm 1981, hai nhóm nhà khoa học là Tom R.Cech và Sidney Altman tiến hành nghiên cứu độc lập đã phát hiện được một số ARN có hoạt tính xúc tác, đặt tên là *ribozyme* (xuất phát từ các tên *ribo- và E*). Như vậy ARN có thể thực hiện được đồng thời cả hai chức năng quan trọng của sự sống là: 1) *chứa và truyền thông tin di truyền;* 2) *xúc tác*. Việc phát hiện hoạt tính xúc tác của ARN có ý nghĩa to lớn, mở ra một kỷ nguyên mới, làm thay đổi quan niệm hiện nay về sự tiến hóa phân tử, đặt lại vấn đề về nguồn gốc sự sống. Phải chăng ARN xuất hiện đầu tiên, trước ARN và protein? Vấn đề "con gà có trước hay quả trứng có trước" lại được đặt ra.

Trong mấy năm gần đây đã có nhiều công trình nghiên cứu cấu trúc và chức năng của nhiều ribozyme, xác định được cấu trúc không gian chi tiết, cách cuộn phân tử của một số ribozyme. Nghiên cứu cơ chế phản ứng xúc tác của các ribozyme cho thấy tất cả chúng đều xúc tác cho phản ứng cắt, nối các đoạn của phân tử ARN

bằng phản ứng chuyển vị ester phosphate, chuyển vị phosphoryl hoặc thủy phân các nhóm phosphate. Tuy nhiên cũng còn nhiều vấn đề về cơ chế xúc tác của chúng vẫn chưa được biết rõ.

Các ribozyme có kích thước rất khác nhau, một số có kích thước bé, chỉ bao gồm khoảng 50 đến 150 nucleotide, một số khác (nhóm intron I, II và ribonuclease P) có kích thước lớn hơn, khoảng vài trăm nucleotide và có cấu trúc phức tạp hơn. Hai loại này cũng khác nhau về cơ chế xúc tác cho phản ứng cắt, nối các đoạn của phân tử ARN.

Việc phát hiện các ribozyme còn có ý nghĩa lớn về mặt thực tiễn, nó mở ra triển vọng mới trong việc tạo các loại thuốc mới có tính đặc hiệu cao, có thể phân cắt và làm bất hoạt ARN virus hoặc các ARN tham gia trong quá trình gây bệnh. Với các phát hiện đó, các tác giả có công phát hiện ribozyme đã được nhận giải thưởng Nobel vào năm 1989.

– Đã hình thành ngành "*Công nghệ sản xuất E*", sản xuất các chế phẩm "*E không tan*" và sử dụng chúng trong thực tế.

– Tạo được các *E tái tổ hợp* và *thiết kế các E có tính năng mới.*

– Thành tựu lớn khác là đã *tạo được mô hình của một số hệ thống E gắn với màng*, đó là bước mở đầu để mô hình hóa hệ thống sống.

1.2. PHƯƠNG HƯỚNG NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ E HIỆN NAY VÀ TRONG TƯƠNG LAI

Nghiên cứu, áp dụng các kỹ thuật, công nghệ mới, hiện đại để:

– Sàng lọc, tuyển chọn hoặc tạo nguồn nguyên liệu giàu E (sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp) mong muốn.

– Thu nhận chế phẩm E với hiệu suất, hoạt độ và độ bền cao, giá thành ngày càng thấp.

– Nghiên cứu liên quan giữa cấu trúc và chức năng của phân tử, cơ chế điều hòa của phân tử E và hệ thống E.

– Phát triển nghiên cứu tổng thể bộ protein/E (*proteomics*), sinh học E trong tổng thể của hệ thống sống: sự phân bố, quan hệ tương tác, quá trình trao đổi, tác dụng, chức năng sinh lý, các dạng tồn tại của chúng trong hệ thống sống.

– Mô hình hóa phân tử, hệ thống E trong tế bào và cơ thể sống.

– Cải biến định hướng phân tử E, thiết kế các phân tử E mới với những đặc tính mong muốn và có hiệu quả sử dụng cao trong thực tế.

– Phát triển nghiên cứu proteome góp phần giải thích cơ chế các quá trình bệnh lý ở mức độ phân tử.

– Mở rộng phạm vi ứng dụng E trong thực tế.

– Nghiên cứu tạo các chip E.

1.3. Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA VIỆC PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ E

– Tạo được các chế phẩm E với quy mô lớn, đáp ứng nhu cầu sử dụng chúng trong thực tế.

– Tạo ra các *thuốc mới* có tác dụng đặc trị cao để điều trị các bệnh, kể cả các bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS v.v...

– Phát triển công nghệ E có thể hạ giá thành chế phẩm E, tạo điều kiện để mở rộng sử dụng E trong thực tế, sẽ cải tiến được quy trình sản xuất, cải thiện điều kiện lao động, nâng cao chất lượng sản phẩm, giảm ô nhiễm môi trường.

1.4. PHÂN LOẠI VÀ ĐẶT TÊN E (CÓ BẢN CHẤT PROTEIN)

Từ năm 1961, Hội Hóa Sinh quốc tế đã thống nhất phân loại các E thành 6 lớp chính dựa vào kiểu phản ứng do E xúc tác, đánh số từ 1 đến 6:

1) Oxidoreductase: Xúc tác cho phản ứng oxy hóa – khử.

2) Transpherase: Xúc tác cho phản ứng chuyển vị.

3) Hydrolase: Xúc tác cho phản ứng thủy phân.

4) Lyase : Xúc tác cho phản ứng cắt đứt liên kết tạo thành 2 phân tử nhưng *không cần H_2O;* hoặc *loại H_2O* tạo thành nối đôi, hoặc *kết hợp* phân tử H_2O vào nối đôi.

5) Isomerase: Xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa.

6) Lygase: Xúc tác cho phản ứng kết hợp 2 phân tử kèm theo cắt đứt liên kết giàu năng lượng của ATP hoặc các nucleoside triphosphate khác.

Mỗi lớp lại chia thành nhiều tổ, mỗi tổ lại chia thành nhiều nhóm. Do đó, trong bảng phân loại E, trước tên E thường có 4 số: số thứ nhất chỉ lớp, số thứ hai chỉ tổ, số thứ ba chỉ nhóm và số thứ tư chỉ E. Khi ghi tên một E nào, thường để trong ngoặc đơn mã số của E trong bảng phân loại (gồm 4 số) thêm tiếp đầu ngữ "E.C."(Enzyme Commision).

Để đặt tên E, lấy tên cơ chất hoặc các cơ chất, thêm tiếp vĩ ngữ "*-ase*".

Ví dụ: Một E xúc tác cho phản ứng chuyển vị nhóm amin có *tên hệ thống* là *L-alanine: 2- oxoglutarate aminotranspherase* (E.C.2.6.1.2.), E này xúc tác cho phản ứng sau:

(L- alanine) + (2- oxogllutarate) = pyruvate + (L- glutamate).

Mã số của E chỉ rõ E thuộc lớp 2 (transpherase), tổ 6 (chuyển nhóm chứa N), nhóm 1 (chuyển nhóm amin từ chất cho là amino acid đến chất nhận thường là 2-oxoacid). Như vậy ta thấy tên hệ thống mô tả rõ ràng phản ứng do E xúc tác và cơ chất của nó. Tuy nhiên tên hệ thống thường dài, vì vậy để thuận tiện hơn, đối với các E đã cótên quen dùng từ trước (*tên thường dùng*) vẫn có thể sử dụng nếu không gây hiểu lầm về cơ chế phản ứng do E xúc tác. Ví dụ trong trường hợp này, tên thường dùng là *"alanine transaminase"*.

Trong các chương tiếp theo, chúng tôi chỉ tập trung giới thiệu về các E có bản chất protein, vì chúng đã được sản xuất và ứng dụng rộng rãi trong thực tế, còn các E có bản chất là ARN (ribozyme) sẽ không đề cập đến.

Chương 2

CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ENZYME

2.1. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ E

Để nghiên cứu và phát triển các ứng dụng của E trong thực tế, trước hết cần nắm vững các nguyên tắc và phương pháp phát hiện, phương pháp xác định hoạt độ E, các yếu tố ảnh hưởng đến tính chất và hoạt độ xúc tác của E, cũng như các biện pháp tinh sạch E.

2.1.1. Nguyên tắc chung của các phương pháp xác định hoạt độ E

Các phản ứng do E xúc tác có thể được khái quát và đơn giản hoá bằng phương trình phản ứng chung dưới đây:

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons ES^* \rightleftharpoons E + P$$

Trong phương trình phản ứng trên, E là enzyme; S là cơ chất (substrate); ES là phức chất hình thành giữa E và cơ chất; ES* là phức chất giữa E với cơ chất, trong đó cơ chất đã được biến đổi thành dạng gần như sản phẩm của phản ứng; P là sản phẩm của phản ứng.

Có thể xác định được hoạt độ E bằng cách phân tích sự biến đổi theo thời gian trong những điều kiện phản ứng xác định của: i) cơ chất còn lại, hoặc ii) sản phẩm tạo thành, hoặc iii) cả cơ chất và sản phẩm.

Tuỳ theo các đặc trưng của phản ứng, sự tiện lợi của phương pháp phân tích, yêu cầu về độ chính xác của phép đo cũng như điều kiện của phòng thí nghiệm mà có thể lựa chọn cách xác định nào là thích hợp nhất. Tuy vậy, cách đáng tin cậy nhất trong mọi trường hợp là xác định sản phẩm tạo thành theo thời gian, bởi vì có các trường hợp, hoạt độ E cần xác định có thể rất thấp, sự chuyển hoá cơ chất vốn phải có ở mức bão hoà có thể xảy ra nhưng rất khó đo được một cách chính xác. Khi đó, sự xuất hiện của sản phẩm phản ứng được xác định bằng những cách đo đặc hiệu, cho phép khẳng định sự có mặt của E một cách tin cậy.

2.1.2. Các đơn vị đo hoạt động xúc tác của E

Để tiêu chuẩn hóa việc biểu diễn mức độ hoạt động xúc tác của E (định lượng E), theo quy ước quốc tế, sử dụng các đơn vị sau:

– Đơn vị IU (***International unit):*** *Một đơn vị* IU *là hoạt độ của một E ở các điều kiện tiêu chuẩn thích hợp, xúc tác cho phản ứng chuyển hoá một* ***μmol cơ chất*** *trong* ***một phút****.*

$$1\ IU = 1\mu M \text{ cơ chất/phút} = (10^{-6} M/\ 60 \text{ giây})$$

– Đơn vị **Katal** (viết tắt là (viết tắt là **kat**): *Một đơn vị kat là lượng E xúc tác cho phản ứng chuyển hoá một **mol cơ chất** trong **một giây** ở các điều kiện phân tích* (đơn vị kcat ít được dùng).

1 kat = 1 M/giây

Như vậy:

1 IU = (1/60) x 10^{-6} kat

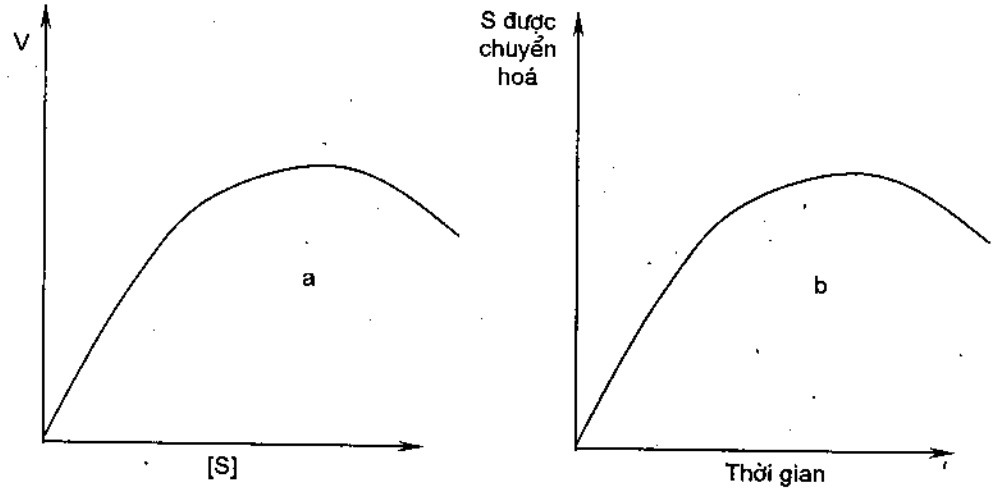
= 16,66 nkcat

1 kcat = 60 x 10^{6} IU

2.1.3. Hoạt độ riêng (specific activity), là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá độ sạch của chế phẩm E. *Hoạt độ riêng của E được tính bằng số đơn vị hoạt độ E trên một đơn vị khối lượng (miligam hay gam) protein*. Trong quá trình tinh sạch E, sau mỗi bước tinh sạch, các protein không phải là E quan tâm bị loại đi, nên lượng protein tổng số bị giảm dần, nếu hoạt độ tổng số của E không thay đổi nhiều, hoạt độ riêng sẽ tăng lên, chế phẩm có độ sạch cao hơn. Cùng với quá trình tinh sạch, khi hoạt độ riêng không tăng lên nữa, tức là chế phẩm đã có độ tinh khiết rất cao, nếu có lẫn các protein khác cũng chỉ là lượng rất nhỏ, không đáng kể.

2.1.4. Điều kiện phản ứng khi tiến hành xác định hoạt độ E

Để đánh giá chính xác về hoạt độ E, việc xác định hoạt độ cần phải tuân theo những nguyên tắc thống nhất. Đó là: Trong phản ứng xác định hoạt độ E, cần phải sử dụng *cơ chất và cofactor ở mức dư thừa* (nếu E cần cofactor) và *thời gian xác định càng ngắn càng tốt* (gần với vận tốc đầu phản ứng), là lúc hoạt độ của E ít bị ảnh hưởng của các yếu tố khác xảy ra trong quá trình phản ứng (xem mục 6.2.1). Trong hầu hết các trường hợp, khi tiến hành xác định hoạt độ của một E nào đó, cần phải lựa chọn các điều kiện sao cho có được *sự biến đổi tuyến tính* giữa nồng độ E, thời gian phản ứng và mức độ chuyển hoá cơ chất (trong giới hạn nồng độ cơ chất đã lựa chọn).



Hình 2.1. Sơ đồ minh hoạ sự phụ thuộc mức độ biến đổi cơ chất vào nồng độ cơ chất (a) và thời gian phản ứng (b)

Hình 2.1 (a và b) minh họa về tốc độ chuyển hoá cơ chất phụ thuộc vào nồng độ cơ chất (S) và vào thời gian (t) của phản ứng. Ngoài ra, một số E bị ức chế bởi cơ chất ở nồng độ quá cao, hoặc có thể bị giảm hoạt độ nhanh chóng theo thời gian ở nhiệt độ phân tích. Vì vậy, phản ứng phân tích chỉ nên thực hiện trong một khoảng thời gian nhất định và nồng độ E và cơ chất thích hợp.

2.1.5. Các phương pháp xác định hoạt độ E

Để phân tích hoạt độ E có thể tiến hành bằng một trong hai cách là phân tích liên tục và phân tích gián đoạn.

a) Phân tích liên tục là phương pháp đo cơ chất bị biến đổi hay sản phẩm tạo thành một cách liên tục theo thời gian, ví dụ như cách đo hoạt độ của NADH oxidase (NOX) qua phản ứng:

$NADH + H^+ + O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O_2$ *(do enzyme NOX sinh H_2O_2 xúc tác)*

$2NADH + 2H^+ + O_2 \rightarrow 2NAD^+ + 2H_2O$ *(do enzyme NOX sinh H_2O xúc tác)*

Dựa vào sự hấp thụ ánh sáng của NADH ở bước sóng 340nm, người ta có thể tiến hành phản ứng trong một cuvet và đo sự biến đổi của NADH bằng quang phổ kế theo thời gian ngay từ khi bổ sung E vào dung dịch phản ứng có chứa sẵn cơ chất, hay bổ sung cơ chất vào hỗn hợp phản ứng đã chứa sẵn E. Phương pháp đo liên tục thường hay áp dụng khi không có chất, hay cách làm ngừng phản ứng thích hợp, hoặc được áp dụng với một số E dễ bị mất hoạt tính xúc tác ở điều kiện phân tích. Ngoài ra, các phương pháp phân tích liên tục còn được dùng phổ biến với các nghiên cứu động học E. Tuy nhiên, yêu cầu đối với thiết bị đo là phải có bộ phận ổn nhiệt để phản ứng có thể được thực hiện ở các nhiệt độ mong muốn. Đây cũng là một hạn chế của phương pháp. Ngoài ra, do phải theo dõi sự biến đổi của chất phản ứng một cách liên tục nên khó có thể thực hiện phân tích hoạt độ của nhiều mẫu E trong cùng một lúc.

b) Phân tích gián đoạn là phương pháp cho E tác dụng với cơ chất sau một khoảng thời gian nhất định thì làm ngừng phản ứng E bằng cách thích hợp và sau đó đo lượng cơ chất còn lại hoặc sản phẩm tạo thành. Đây là cách được sử dụng phổ biến nhất trong các phân tích hoạt độ E hiện nay.

Để làm ngừng phản ứng E có thể dùng các tác nhân làm bất hoạt E như nhiệt độ cao, thay đổi pH (bổ sung acid hoặc kiềm), dùng chất tạo phức hay tách E ra khỏi hỗn hợp phản ứng v.v... Phương pháp này khắc phục được những hạn chế của phương pháp đo liên tục, phản ứng có thể tiến hành trong tủ ấm hay bể ổn nhiệt, có thể tiến hành một lúc nhiều mẫu... Tuy vậy, vấn đề là phải tìm ra cách làm ngừng phản ứng thích hợp.

Dựa trên nguyên tắc xác định hoạt độ E, bằng cách đo liên tục hay gián đoạn, hoạt độ E có thể được xác định theo một hay một số phương pháp chính sau đây:

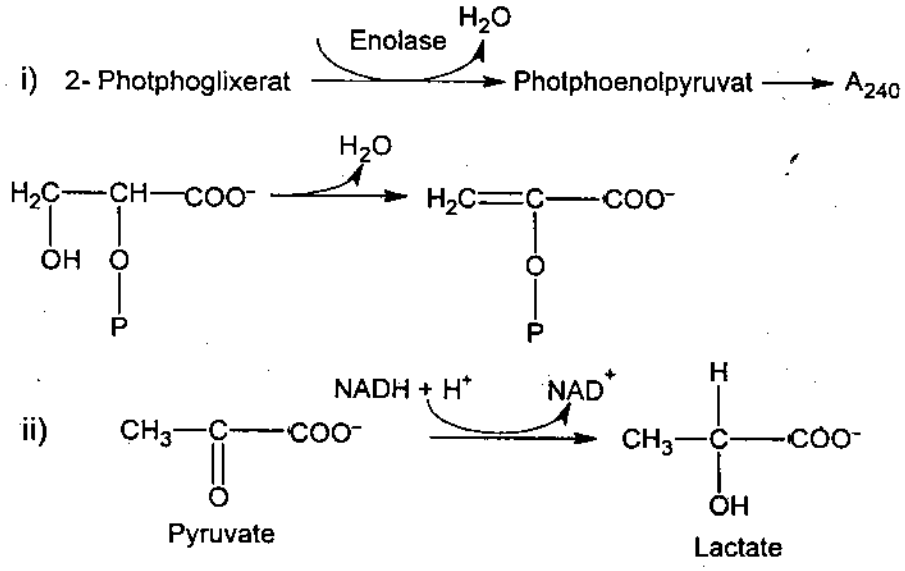
– *Phương pháp đo độ nhớt:* Sử dụng nhớt kế để đo sự biến đổi độ nhớt của dung dịch phản ứng. Phương pháp được áp dụng với các E mà cơ chất có độ nhớt cao hơn hẳn so với sản phẩm, thường là các cơ chất có khối lượng phân tử lớn như acid nucleic, protein, cellulose...

– *Phương pháp phân cực kế:* Sử dụng khi cơ chất và sản phẩm có khả năng làm quay mặt phẳng ánh sáng phân cực và có góc quay riêng khác nhau, ví dụ cho phản ứng phân giải saccharose bởi β-fructofuranosidase. Saccharose có độ quay mặt phẳng ánh sáng phân cực là +65°, còn với glucose là +52,5°, trong khi của fructoz là -92,4°. Chính vì vậy sản phẩm tạo thành sẽ làm giảm mức độ quay mặt phẳng ánh sáng phân cực, từ phải sang trái.

– *Phương pháp đo áp suất hay áp kế:* Chỉ dùng với các phản ứng E có sự tiêu hao hay sinh khí, ví dụ như các phản ứng oxy hoá, decarboxyl hoá, loại amin hoá. Phản ứng sinh hay tiêu hao khí có thể trực tiếp hay gián tiếp. Ví dụ lipid với sự xúc tác của lipase tạo ra glycerol và các acid béo, các acid béo khi có mặt của $NaHCO_3$ sẽ tạo ra CO_2 hay phản ứng loại amin do sự tác dụng của các amino acid với HNO_2 tạo ra N_2 bay ra. Tương tự, catalase xúc tác cho phản ứng phân huỷ H_2O_2 để tạo thành H_2O đồng thời giải phóng oxy phân tử (O_2).

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + O_2$$

– *Phương pháp quang phổ kế:* Được sử dụng rất phổ biến, dựa trên khả năng hấp thụ ánh sáng ở các bước sóng xác định của cơ chất, hoặc sản phẩm phản ứng. Ví dụ: Với enolase có thể đo sản phẩm phosphoenolpyruvat (PEP) tạo thành bằng cách đo độ hấp thụ của PEP ở bước sóng 240nm. Còn với E lactate dehydrogenase xúc tác cho phản ứng khử pyruvate thành lactate thì có thể đo sự biến đổi của NADH qua sự hấp thụ ở bước sóng 340nm.



– *Phương pháp chuẩn độ:* Dùng cho các phản ứng E có sự hình thành acid hoặc base. Phương pháp yêu cầu giữ pH môi trường cố định, lượng kiềm hoặc acid chuẩn dùng để chuẩn độ theo thời gian phản ánh hoạt độ E.

– *Phương pháp sắc ký:* Sử dụng sắc ký để phân tách sản phẩm phản ứng, ví dụ như tách amino acid sau khi cho hai E aminotranspherase lên cơ chất hay protease

tác dụng lên cơ chất và sau đó định lượng các amino acid thu được. Đây là phương pháp tốn thời gian nên ít được sử dụng.

– *Phương pháp hoá học:* Dùng các phản ứng hoá học để định lượng cơ chất mất đi hay lượng sản phẩm tạo thành. Thông thường phải chọn phản ứng tạo nên các phức chất màu có độ hấp thụ ánh sáng cực đại ở vùng nào đó để từ đó định lượng hợp chất này. Ví dụ trong phản ứng thuỷ phân tinh bột bởi α-amylase:

$$\text{Tinh bột} \xrightarrow{\alpha\text{- amylase}} \text{Dextrin}$$

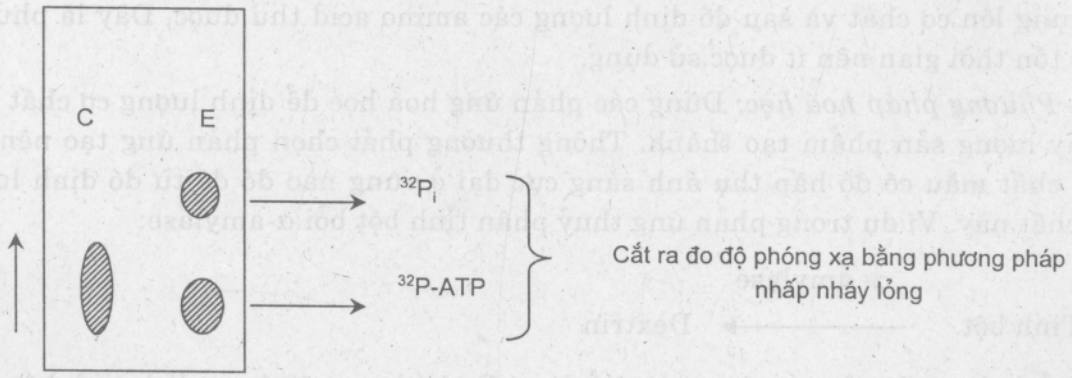
Để đo hoạt độ của amylase, có thể dùng I_2 tác dụng với dung dịch tinh bột, sau đó đo cường độ màu xanh tím tạo thành để đánh giá lượng cơ chất còn lại,hay dùng phản ứng (màu) đặc trưng để xác định, các dextrin tạo thành có tính khử.

Phương pháp định lượng cơ chất còn lại hay sản phẩm tạo thành có thể đơn giản là sự đo cơ chất còn lại, hay sản phẩm phản ứng tạo thành một cách trực tiếp như cách đo hoạt độ của lactate dehydrogenase (LDH) (i). Tuy vậy trong nhiều trường hợp, có thể phải đo cơ chất còn lại hay sản phẩm tạo thành một cách gián tiếp, và do đó phép đo phức tạp hơn. Ví dụ để đo hoạt độ của pyruvatekinase, ngoài cách đo phosphoenol pyruvate (PEP) hay ADP còn lại (mà không phải lúc nào cũng dễ thực hiện), người ta có thể đo pyruvate tạo thành thông qua sự ghép nối phản ứng với sự xúc tác của LDH cùng với việc bổ sung NADH (ii).

$$\text{i) Pyruvate} \xrightarrow{\text{NADH} + \text{H}^+ \;\; \text{LHD} \;\; \text{NAD}^+} \text{Lactate}$$

$$\text{ii) PEP + ADP} \xrightarrow{\text{Pyruvat kinase}} \text{Pyruvate} \xrightarrow{\text{NADH} + \text{H}^+ \;\; \text{LDH} \;\; \text{NAD}^+} \text{Lactate}$$

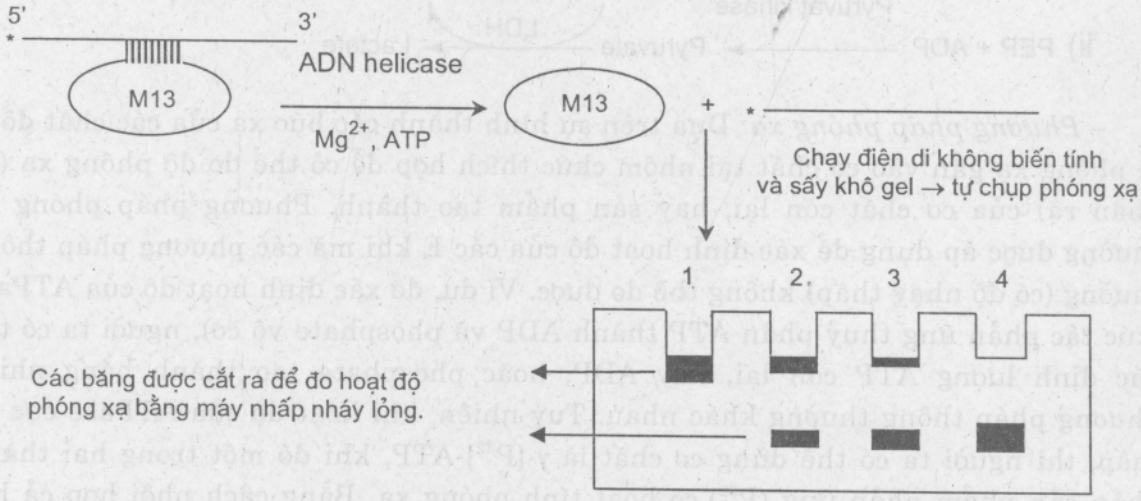
– *Phương pháp phóng xạ:* Dựa trên sự hình thành các bức xạ của các chất đồng vị phóng xạ gắn vào cơ chất tại nhóm chức thích hợp để có thể đo độ phóng xạ (sự phân rã) của cơ chất còn lại, hay sản phẩm tạo thành. Phương pháp phóng xạ thường được áp dụng để xác định hoạt độ của các E khi mà các phương pháp thông thường (có độ nhạy thấp) không thể đo được. Ví dụ, để xác định hoạt độ của ATPase (xúc tác phản ứng thuỷ phân ATP thành ADP và phosphate vô cơ), người ta có thể xác định lượng ATP còn lại, hay ADP, hoặc phosphate tạo thành bằng nhiều phương pháp thông thường khác nhau. Tuy nhiên, khi hoạt độ của ATPase cực kỳ thấp, thì người ta có thể dùng cơ chất là γ-[P^{32}]-ATP, khi đó một trong hai thành phần sản phẩm phản ứng (P^{32}) có hoạt tính phóng xạ. Bằng cách phối hợp cả hai phương pháp: sắc ký bản mỏng để tách riêng γ-[P^{32}]-ATP và gốc phosphate (P^{32}) được giải phóng ra từ cơ chất; đo độ phóng xạ bằng máy nhấp nháy lỏng để tính ra hoạt độ E (hình 2.2).



Hình 2.2. Sơ đồ minh họa cách xác định hoạt độ E bằng phương pháp sắc ký phối hợp với phương pháp phóng xạ

Hỗn hợp phản ứng E với cơ chất γ-[P^{32}]-ATP được chấm lên bản sắc ký, sau khi chạy sắc ký (theo chiều mũi tên) có sự phân chia giữa cơ chất (chạy chậm và sản phẩm ^{32}Pi (chạy nhanh), bằng kỹ thuật phát hiện vị trí có phóng xạ, gel phần đó được cắt ra, hoạt độ phóng xạ được đo bằng máy nhấp nháy lỏng.

Người ta cũng có thể kết hợp phương pháp điện di với phương pháp phóng xạ để xác định hoạt độ E. Ví dụ, để đo hoạt độ của E mở xoắn ADN của ADN helicase, người ta thiết kế một oligo có đánh dấu phóng xạ ở đầu 5'. Phần giữa của oligo này ghép cặp bổ sung với một ADN mạch vòng như là ADN của thực khuẩn thể M13 dạng sợi đơn (hình 2.3), ở hai đầu của oligo là không có sự ghép cặp bổ sung và tạo nên dạng chĩa ba sao chép thường rất cần cho các helicase khác nhau. Trong môi trường có Mg^{2+} và ATP, E sẽ mở xoắn cơ chất và giải phóng ra M13 dạng sợi đơn và oligo có đánh dấu phóng xạ. Bằng phương pháp điện di không biến tính, dựa vào sự khác nhau về độ di động điện di, người ta có thể dễ dàng phân tách oligo có phóng xạ ra khỏi M13 không phóng xạ và cơ chất có phóng xạ còn lại. Các phần gel có hoạt tính phóng xạ sau đó được cắt ra và đo trên máy đếm nhấp nháy lỏng. Từ kết quả đo được người ta sẽ tính ra lượng cơ chất còn lại cũng như lượng sản phẩm tạo thành.



Hình 2.3. Sơ đồ phân tích hoạt độ E ADN helicase với cơ chất ADN gắn đồng vị phóng xạ ^{32}P (*).

Giếng 1: mẫu không có E hoặc E đã bị bất hoạt; Giếng 2: mẫu E ở nồng độ thấp; Giếng 3: mẫu E ở nồng độ cao hơn và Giếng 4: mẫu có E nhưng cơ chất đã được xử lý nhiệt để tách thành dạng oligo và ADN mạch vòng riêng rẽ.

- *Phương pháp huỳnh quang:* Phương pháp dựa trên sự phát quang của một số hợp chất dưới tác dụng của một nguồn sáng kích thích đặc trưng. Mức độ phát huỳnh quang sẽ đo được nhờ máy huỳnh quang kế. Đây cũng là một phương pháp có độ nhạy cao, cho phép phát hiện hoạt độ E ở mức độ thấp.

Bên cạnh những phương pháp phân tích hoạt độ có tính chất định lượng vừa nêu trên, trong nghiên cứu E, rất nhiều trường hợp các phân tích định tính hay bán định lượng cũng được sử dụng để nhanh chóng phát hiện hay bước đầu khẳng định sự có mặt của E. Ví dụ, để phát hiện catalase, người ta chỉ cần bổ sung một lượng cơ chất H_2O_2 và xem bọt khí hình thành (do O_2 được giải phóng). Thường được dùng hơn trong nhận biết và bán định lượng hoạt độ E là phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa đệm và cơ chất (như tinh bột với amylase, casein với protease...), sau đó nhuộm màu (iod nhuộm với tinh bột, xanh coomassie hay amido đen với casein...) để phát hiện hay đánh giá hoạt độ E qua vòng phân giải cơ chất. Ở mức cần khẳng định chắc chắn hơn bản chất của phản ứng có phải là do E xúc tác hay không, người ta có thể xử lý nhiệt (đun cách thuỷ ít phút). Phần lớn các E có bản chất protein (hay ARN) đều bị mất hay giảm phần lớn hoạt tính xúc tác sau khi bị xử lý ở nhiệt độ cao. Trong một số trường hợp có thể dùng các chất ức chế đặc hiệu để giúp khẳng định sự có mặt của E trong mẫu phân tích (như azid natri ức chế đặc hiệu catalase, phenyl methyl sulphonyl fluorid-PMSF ức chế đặc hiệu các protease serine...).

2.1.6. Một số lưu ý khi xác định hoạt độ hay thực hiện phản ứng E

a) Khi xác định hoạt độ E cần chọn điều kiện pH và nhiệt độ phân tích ở vùng thích hợp. Đối với những E lần đầu tiên được nghiên cứu, pH trung tính và nhiệt độ 30°C-37°C có thể được lựa chọn để thử nghiệm. Tuy vậy, có nhiều E chỉ hoạt động ở một dải nhiệt độ và pH hẹp và không thuộc vùng lựa chọn sơ bộ ban đầu, khi đó cần có những điều chỉnh thích hợp để phát hiện và đo được hoạt độ của E.

b) Bên cạnh pH và nhiệt độ, cũng cần lưu ý đến cơ chất, thành phần đệm, lực ion hay nồng độ muối, các chất làm bền như Ca^{2+}, glycerol, albumin huyết thanh bò (BSA) hay một số chất khác. Ví dụ, nhiều E sao chép ADN rất cần ion Mg^{2+} nhưng một số lại chỉ hoạt động khi có Mn^{2+}. Sự có mặt của NaCl hay KCl ở nồng độ vài chục milimol/l trong đệm phân tích là không ảnh hưởng đến hoạt độ của hầu hết E, thậm chí rất cần thiết với một số E. Tuy vậy, có một số E lại nhạy cảm với muối NaCl nhưng không phải với KCl, hay ngược lại. Việc bổ sung Ca^{2+} là cần thiết cho việc làm bền nhiều E, nhất là các E proteolytic hay amylolitic.

c) Các phân tích hoạt độ E phải thực hiện ở một giá trị pH ổn định, vì vậy phải dùng một loại đệm hay hệ thống đệm nào đó. Nồng độ đệm thường dùng là 20-50 mM. Tuy vậy, với các phản ứng sinh acid, base (ví dụ urease xúc tác cho phản ứng sinh kiềm: urea $\rightarrow CO_2 + NH_3$) thì phải dùng đệm ở nồng độ cao hơn để tránh sự thay đổi pH trong quá trình phân tích. Một số đệm (như đệm phosphate) có thể làm kết tủa một số yếu tố cần thiết cho hoạt động của E như Ca^{2+}, Zn^{2+}, vì vậy phải lựa chọn loại đệm thích hợp cho phân tích.

d) Trong phân tích hoạt độ E, cơ chất và sản phẩm, đệm đều phải đạt cùng nhiệt độ phân tích khi tiếp xúc với nhau để bắt đầu phản ứng. Với các phân tích đồng thời nhiều mẫu, thời gian bắt đầu và kết thúc phản ứng của tất cả các mẫu phải được duy trì như nhau.

e) Phải luôn luôn có mẫu kiểm tra thích hợp để tránh sai số. Ví dụ, để xác định hoạt độ proteolytic của một mẫu dịch chiết nào đó thông qua việc đánh giá mức độ thuỷ phân casein và sau đó xác định mức độ thuỷ phân cơ chất nhờ vào tính chất hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 280nm (A_{280}) của các amino acid thơm tạo thành. Trong thí nghiệm này, lượng amino acid thơm cũng có thể có mặt trong chính dịch chiết hay có mặt ngay trong dung dịch cơ chất ban đầu. Thậm chí, đệm phân tích cũng có thể tạo ra số đọc nhất định ở A_{280}. Khi đó cách đánh giá chỉ có thể thực hiện được khi có mẫu kiểm tra với E được bất hoạt trước khi cho tác dụng với cơ chất. Hiệu số đọc A_{280} giữa mẫu thí nghiệm và kiểm tra phản ánh hoạt độ E.

f) Phải lựa chọn phương pháp làm ngừng phản ứng thích hợp. Trong một số trường hợp, cách làm ngừng phản ứng E có thể làm biến đổi cơ chất hay sản phẩm phản ứng cần đo. Ví dụ, việc bổ sung acid sẽ làm phân huỷ NADH/NADPH, hay việc bổ sung kiềm sẽ làm phân huỷ $NAD^+/NADP^+$. Trong nhiều trường hợp khác, chất làm ngừng phản ứng có thể can thiệp quá mạnh vào phép định lượng sản phẩm phản ứng E, ví dụ như chất làm ngừng phản ứng có cùng bước sóng hấp thụ ánh sáng cần đo với chất phản ứng, hay ức chế phản ứng tạo màu tiếp theo của phân tích.

Tóm lại, việc xác định hoạt độ của E chỉ cho số liệu tin cậy khi chọn được phương pháp thích hợp và có các bước tiến hành đúng.

2.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH E

2.2.1. Các điều cần lưu ý khi tách chiết và tinh sạch E

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

Trong sản xuất chế phẩm E thì việc giữ được hoạt tính E là một trong những yêu cầu hàng đầu. Thông thường qua mỗi bước tinh sạch thì một phần E cũng như hoạt độ của chế phẩm bị mất đi, giá thành cao lên do chi phí về thiết bị, nguyên liệu, công sức và do mất hoạt độ. Với E 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 E ở dạng thô.

Để hạn chế tối đa sự giảm hoạt độ E trong quá trình tinh sạch thì thường cần chọn dung dịch chiết rút E thích hợp, vừa cho hiệu suất chiết xuất E cao, vừa không làm biến tính E. Các bước tinh sạch thường được tiến hành ở nhiệt độ thấp (khoảng 4°C hoặc thấp hơn, tùy yếu tố gây kết tủa) để vừa hạn chế sự biến tính E cũng như tác dụng phân giải của các E proteolytic có mặt trong dịch chiết. Đối với nhiều E, có thể bổ sung các chất ức chế của E proteolytic vào dịch chiết để hạn chế sự thuỷ phân

đối với các E quan tâm. Các E proteolytic được phân thành 4 lớp là: i) protease serine, ii) protease cystein (hay protease thiol/sulfhydryl), iii) protease acid (protease aspartyl/glutamyl) và iv) protease chứa kim loại. Trên cơ sở của 4 lớp protease này, người ta cũng chia các chất ức chế của các E này theo 4 lớp tương ứng. Tuy vậy, do sự phổ biến của hai loại protease serine và protease cystein, nên việc bổ sung vào dịch chiết protein/E các chất ức chế của hai loại protease này là phổ biến. Trong một số trường hợp, đối với các E nhạy cảm với các phân cắt proteolytic, thì cả 4 loại chất ức chế đều được sử dụng. Bảng 2 là danh mục và nồng độ của chất ức chế E proteolytic thường được dùng trong các nghiên cứu tách, tinh sạch protein/E.

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 (β-mercaptoethanol hay dithiothreitol 1-5mM...), xây dựng quy trình tinh sạch đơn giản ít bước nhất cũng là những cách để hạn chế sự giảm hoạt độ của E. Đối với một số E 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 E bền ở pH thấp.

2.2.2. Thu nhận chế phẩm E thô

Ngoài trừ một số trường hợp E quan tâm là enzyme ngoại bào từ vi sinh vật (E được tiết vào môi trường trong quá trình nuôi cấy tế bào) và các E ngoại bào từ các dịch của động vật và thực vật, các trường hợp còn lại, bước đầu tiên trong nghiên cứu E là phải thu nhận *dịch chiết E* từ nguyên liệu. Để thu dịch chiết mô hoặc tế bào chứa E, trước hết phải phá vỡ tế bào. Có nhiều cách để phá vỡ như dùng siêu âm, dùng E (lysozyme, mutanolizin), máy nén, sốc nhiệt (làm đông đá-tan đá liên tục), nghiền với cát thuỷ tinh, hay kết hợp tác dụng va đập trong môi trường có cát thuỷ tinh...

Chế phẩm thu được ở các bước ban đầu này thường chứa rất nhiều protein và các hợp chất không mong muốn, nồng độ E quan tâm thấp.

Dịch chiết có thể được cô đặc ở nhiệt độ thấp để làm tăng nồng độ E, hoặc được bổ sung tác nhân gây kết tủa protein/E để loại bỏ một số chất không mong muốn, sau đó hoà tan E trong một thể tích nhỏ dung dịch đệm thích hợp.

Bảng 2. Một số chất ức chế E proteolytic thường dùng trong tách chiết, tinh sạch protein/E

Chất ức chế	Nồng độ và thời gian hiệu quả	Dung môi pha dung dịch gốc và nồng độ chất ức chế	Điều kiện và thời gian bảo quản ở dạng dung dịch gốc	E proteolytic bị ức chế
Phenyl methyl sulphonyl fluorid (PMSF)	0,1-1mM, vài giờ	100mM trong ethanol hoặc isopropanol	2-3 tháng ở nhiệt độ phòng	Protease serine
Leupeptin	10-100μM	10mM trong H_2O	1 tuần ở 4°C, hoặc 1 tháng ở –20°C	Protease kiểu trypsin và một số protease cystein
Acid iodoacetic hay iodoaxetat (IAA)	10-100μM, vài giờ	100mM trong H_2O	Chỉ chuẩn bị trước khi dùng	Protease cystein
Ethylen diamin tetraacetic acid (EDTA)	1-2mM, lâu dài	500mM, pH 8,0	6- 12 tháng ở nhiệt độ phòng	Protease chứa kim loại (trừ loại chứa Ca^{2+} thì phải dùng EGTA)
Pepstatin A	1 μM, vài giờ	1mM trong tanol	3-4 tháng ở - 20°C	Một số protease acid

Để kết tủa protein cho mục đích tinh sạch, người ta thường dùng dung môi hữu cơ như ethanol hay aceton hoặc muối trung tính. Các dung môi hữu cơ khi thêm vào dung dịch nước sẽ làm giảm hằng số điện môi của dung dịch, do đó làm thay đổi tính tan của protein và dẫn đến làm kết tủa protein. Nồng độ của các dung môi gây kết tủa protein thường từ 80% (V/V) trở lên. Sự kết tủa có thể có tính chọn lọc một phần, nghĩa là các protein khác nhau có thể được kết tủa bằng các nồng độ khác nhau của dung môi. Dung môi hữu cơ sau đó có thể được loại bằng cách cho bay hơi trong chân không, hay thậm chí trong không khí.

Để kết tủa E từ dịch chiết thô, người ta cũng có thể dùng một số muối trung tính, thường dùng nhất là ammonium sulfatese, do muối này có mức độ hoà tan rất cao trong nước (có thể đạt tới 720g/l, ở nhiệt độ 25^{0}C), ít làm mất hoạt tính E, thậm chí còn có tác dụng làm bền E. Một ưu điểm nữa của muối ammonium sulfate là khả năng kết tủa chọn lọc protein, do đó sẽ loại bỏ được nhiều protein không mong muốn trong dịch chiết. Lưu ý khi sử dụng muối ammonium sulfate là phải bổ sung vào dung dịch E một cách từ từ, kết hợp khuấy đều để tránh khả năng tăng quá nhanh cục bộ của nồng độ muối, làm mất đi tính kết tủa chọn lọc của nó, thậm chí có thể làm biến tính một số E kém bền. Hạn chế của phương pháp sử dụng ammonium sulfate chính là mất nhiều thời gian, do nồng độ ammonium sulfate cao nên tỷ trọng của dung môi lớn, để kết tủa được các protein cần phải ly tâm ở tốc độ cao và ở nhiệt độ thấp, sau đó cần loại muối khỏi chế phẩm khi chuyển sang bước tinh sạch tiếp theo.

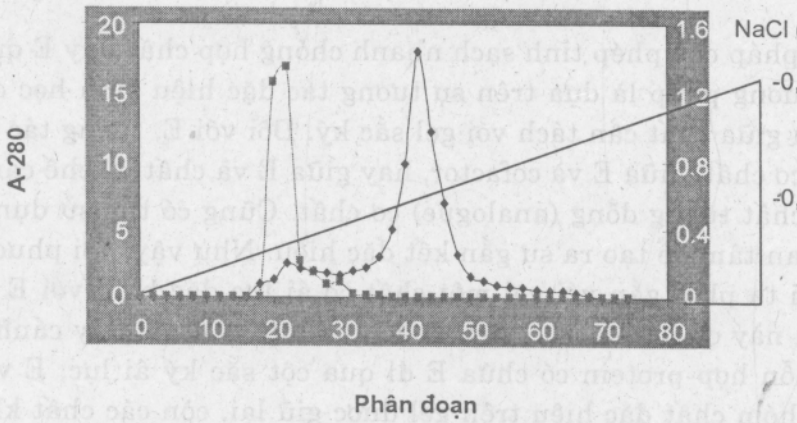
2.2.3. Tách từng phần và tinh sạch E

Để tách từng phần và tiến tới tinh sạch hoàn toàn E người ta phải dùng đến nhiều phương pháp khác nhau. Rất ít khi, với một bước hay một phương pháp duy nhất mà có thể thu được chế phẩm E tinh khiết. Tuỳ theo nguồn cho E, loại E, mục đích sử dụng E và những điều kiện sẵn có trong phòng thí nghiệm mà người ta có thể sử dụng phương pháp này hay phương pháp khác, cũng như trong các phương pháp lựa chọn thì cần sử dụng chúng theo một trật tự nào đó để có thể cho kết quả tốt nhất. Dưới đây là các phương pháp thường dùng nhất để tinh sạch E.

a) Sắc ký trao đổi ion

Có hai loại gel trao đổi ion là : trao đổi anion (anionit) và trao đổi cation (cationit). Gel trao đổi ion được tổng hợp bằng cách gắn một nhóm chức tích điện dương như DEAE (diethylaminoethyl), QAE (quaternary aminoethyl), hoặc tích điện âm như CM (carboxyl methyl), SP (sulphopropyl) lên chất nền cellulose, sephadex hay sepharose... Tuỳ thuộc nhóm chức tích điện gì mà chúng sẽ có ion trao đổi tích điện trái dấu với nhóm chức. Trong trường hợp nhóm chức là DEAE- thì ion trao đổi tích điện âm (–), còn với nhóm chức CM hay SP thì ion trao đổi tích điện dương (+). Sắc ký trao đổi ion thường được dùng ở bước tinh sạch ban đầu để sơ bộ phân chia các protein khác nhau do sự khác nhau về độ tích điện. Tuỳ theo pH

của môi trường sắc ký mà protein sẽ tích điện dương hay âm, khi được cho lên cột trao đổi ion, chúng sẽ thay thế ion trao đổi của gel nếu các phân tử mẫu có cùng điện tích với ion trao đổi. Ái lực liên kết giữa các protein/E với gel trao đổi ion phụ thuộc mức độ tích điện của các phân tử mẫu và chúng được đẩy hay rửa chiết (eluted) ra khỏi gel nhờ vào sự thay đổi nồng độ muối hay pH của môi trường. Việc lựa chọn pH của môi trường sắc ký trao đổi ion cho phép protein hay E cần tinh sạch gắn với gel hay không gắn. Đây là một nghệ thuật để loại bỏ nhiều protein mong muốn có trong hỗn hợp. Phương pháp sắc ký trao đổi ion còn được dùng để thu nhỏ thể tích của mẫu nghiên cứu. Điều này là rất hữu ích khi việc kết tủa các protein bằng các dung môi hữu cơ hay bằng ammonium sulfate có những bất tiện. Hình 2.4 là ví dụ về việc sử dụng cột sắc ký qua DEAE-cellulose để tách chế phẩm NADH oxidase của vi khuẩn *Streptococcus mutans* GS-5. Kết quả cho thấy đỉnh protein chính không có hoạt tính NADH oxidase, trong khi đó, đỉnh hoạt độ lại thuộc về các phân đoạn có hàm lượng protein rất thấp. Đây là một dạng kết quả rất mong muốn, vì cho phép loại bỏ một lượng lớn các protein không có hoạt tính qua bước này.



Hình 2.4. Sắc ký qua cột trao đổi ion DEAE- cellulose (DE-52) chế phẩm E–NADH oxidase của Streptococcus mutans GS-5

(■): Protein, (◆): hoạt độ NADH oxidase, (-): NaCl

b) Sắc ký lọc gel hay còn gọi là sắc ký lọc rây phân tử

Nguyên tắc của phương pháp là dựa vào mức độ dịch chuyển khác nhau của các phân tử có kích thước khác nhau trong hệ thống mạng lưới phân tử của gel sắc ký. Gel thường dùng là sephadex, sepharose. Ký hiệu của các gel này (sephadex G-10, G-15, G-25, G-50, G-100... hay sepharose 4B, 6B...) nói lên sự khác nhau về kích thước của mạng lưới rây phân tử của gel. Chỉ số càng nhỏ thì kích thước mắt lưới (lỗ) gel càng nhỏ. Các phân tử mẫu khi đi qua một hệ thống các hạt gel, nếu có kích thước nhỏ hơn kích thước của lỗ gel thì có thể chui vào trong các hạt gel và do đó thời gian đi qua cột gel sẽ lâu hơn các phân tử có kích thước lớn chỉ đi được vào khoảng trống giữa các hạt gel. Theo nguyên tắc này, khi cho một hỗn hợp các phân tử có kích thước khác nhau đi qua cột gel thì các phân tử có kích thước lớn sẽ chui

ra trước, còn các phân tử có kích thước nhỏ sẽ chui ra sau. Nhờ vậy, phương pháp cho phép phân chia các đại phân tử khác nhau về khối lượng hay kích thước phân tử. Phương pháp sắc ký lọc gel không áp dụng được với lượng thể tích mẫu lớn, vì vậy ít được dùng cho bước tinh sạch ban đầu. Tuy vậy, nếu lượng mẫu được cô đặc lại thành thể tích nhỏ thì vẫn có thể dùng được phương pháp lọc gel.

c) Ly tâm siêu tốc

Phương pháp cho phép phân chia các hợp chất khác nhau về khối lượng và kích thước phân tử, liên quan đến tỷ trọng của chúng trong dung dịch. Tuy nhiên nguyên tắc của phương pháp là dựa trên sự phân bố trong trường lực ly tâm của các chất theo tỷ trọng. Để phân chia các hợp chất có tỷ trọng khác nhau, người ta tạo ra một gradient nồng độ của chất nền, thường là glycerol hay saccharose. Mẫu được cho lên bề mặt của gradient (nồng độ cao nhất ở đáy và thấp nhất ở bề mặt), sau khi ly tâm ở tốc độ cao một thời gian đủ dài, mẫu sẽ di chuyển vào trong gradient chất nền và tạo thành những vùng riêng biệt tuỳ thuộc vào tỷ trọng của chúng. Sau khi ly tâm, mẫu được hút ra nhẹ nhàng theo từng lớp, hoặc đục lỗ nhỏ ở dưới đáy ống ly tâm để lấy mẫu ra theo từng phân lớp.

d) Sắc ký ái lực

Đây là phương pháp cho phép tinh sạch nhanh chóng hợp chất hay E quan tâm. Nguyên tắc của phương pháp là dựa trên sự tương tác đặc hiệu sinh học để tạo ra sự gắn kết đặc hiệu giữa chất cần tách với gel sắc ký. Đối với E, tương tác đặc hiệu chính là giữa E và cơ chất, giữa E và cofactor, hay giữa E và chất ức chế cạnh tranh hay giữa E và các chất tương đồng (analogue) cơ chất. Cũng có thể sử dụng kháng thể của chính E quan tâm để tạo ra sự gắn kết đặc hiệu. Như vậy, với phương pháp sắc ký ái lực, người ta phải gắn với gel một chất có ái lực đặc hiệu với E như vừa nêu. Quá trình gắn này có thể là trực tiếp, hoặc qua một cầu nối hay cánh tay đòn (spacer). Khi cho hỗn hợp protein có chứa E đi qua cột sắc ký ái lực, E và những chất có ái lực với nhóm chất đặc hiệu trên gel được giữ lại, còn các chất khác sẽ đi qua. E sau đó được tách ra bằng cách thay đổi nồng độ muối, pH môi trường hay dùng một chất cạnh tranh đặc hiệu E. Ngày nay, sắc ký ái lực đang được dùng rất phổ biến cho việc tinh sạch E và các hợp chất sinh học khác. Tuy vậy, không phải lúc nào cũng dễ dàng sử dụng kỹ thuật này, khó khăn chính là do không tìm được chất gắn thích hợp.

e) Điện di chế phẩm hay điện di không biến tính

Phương pháp cho phép tách riêng các chất bằng điện di không biến tính, các protein được tách riêng dựa trên sự khác nhau cả về độ tích điện và về khối lượng phân tử. Khả năng tách riêng các chất rất cao, tuy vậy hạn chế của phương pháp là khó đưa lên quy mô lớn.

2.2.4. Phương pháp kiểm tra độ sạch của chế phẩm E

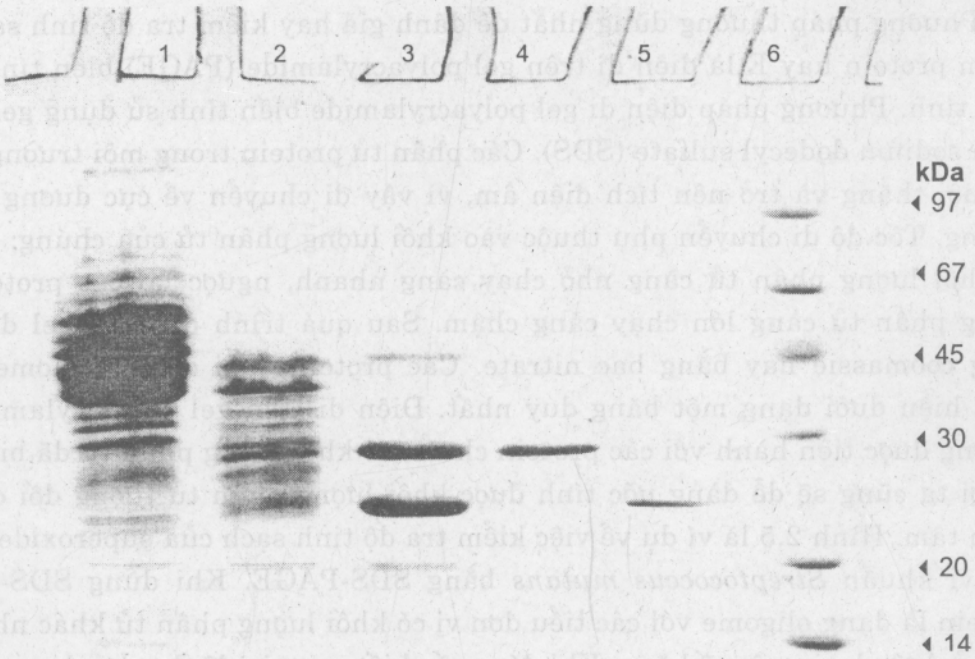
Trong quá trình tinh sạch E, việc kiểm tra độ tinh sạch của chế phẩm là yêu cầu bắt buộc.

Phương pháp thường dùng nhất để đánh giá hay kiểm tra độ tinh sạch của chế phẩm protein hay E là điện di trên gel polyacrylamide (PAGE) biến tính và không biến tính. Phương pháp điện di gel polyacrylamide biến tính sử dụng gel và đệm có chứa sodium dodecyl sulfate (SDS). Các phân tử protein trong môi trường có SDS sẽ bị duỗi thẳng và trở nên tích điện âm, vì vậy di chuyển về cực dương trong điện trường. Tốc độ di chuyển phụ thuộc vào khối lượng phân tử của chúng; các protein có khối lượng phân tử càng nhỏ chạy càng nhanh, ngược lại các protein có khối lượng phân tử càng lớn chạy càng chậm. Sau quá trình điện di, gel được nhuộm bằng coomassie hay bằng bạc nitrate. Các protein dưới dạng monome tinh sạch xuất hiện dưới dạng một băng duy nhất. Điện di trên gel polyacrylamide có SDS thường được tiến hành với các protein chuẩn có khối lượng phân tử đã biết, nhờ vậy người ta cũng sẽ dễ dàng ước tính được khối lượng phân tử tương đối của protein quan tâm. Hình 2.5 là ví dụ về việc kiểm tra độ tinh sạch của superoxide dismutase của vi khuẩn *Streptococcus mutans* bằng SDS-PAGE. Khi dùng SDS-PAGE, các protein là dạng oligome với các tiểu đơn vị có khối lượng phân tử khác nhau sẽ xuất hiện ở dưới dạng một số băng. Khi đó muốn biết protein đã được tinh sạch hay chưa thì phải dùng thêm một số phương pháp khác.

Để đánh giá độ sạch với các protein thuộc loại oligome dị phân (hetesooligomer), người ta có thể dùng phối hợp phương pháp điện di với sắc ký lọc gel. Khi sắc ký trong điều kiện duy trì trạng thái tự nhiên của protein (không chứa chất khử như β-mercaptoethanol hay dithiothreitol), các protein tinh sạch chỉ cho một đỉnh sắc ký dạng cân đối. Bằng sắc ký lọc gel, người ta cũng xác định được khối lượng phân tử tự nhiên của protein. Kết hợp số liệu về khối lượng phân tử tự nhiên qua sắc ký lọc gel và khối lượng phân tử của các băng protein trên SDS-PAGE, người ta có thể suy ra số tiểu đơn vị cấu thành của protein tự nhiên.

Trong rất nhiều trường hợp, để khẳng định chắc chắn băng protein tinh sạch trên điện di đồ có phải là E hay protein quan tâm hay không, người ta phải dùng đến phương pháp điện di gel hoạt tính, nghĩa là băng protein đó phải là băng có hoạt tính E quan tâm.

Cách điện di gel hoạt tính thường dùng là: đồng trùng hợp cơ chất trong gel polyacrylamisde, sau khi điện di, rửa gel bằng một số dung dịch thích hợp, sau đó ủ gel với dung dịch cơ chất dưới các điều kiện phản ứng thích hợp. Băng protein nếu có hoạt tính sẽ chuyển cơ chất thành sản phẩm có màu khác với màu của nền gel chứa cơ chất, nhờ đó dễ dàng nhận ra băng hoạt tính E. Ví dụ, với protease, cơ chất là casein, sau đó cho nhuộm gel với coomassie thì vị trí có E sẽ không có màu (do E phân giải cơ chất), tạo thành vệt sáng trên nền gel có cơ chất nhuộm màu xanh. Khó khăn chính của phương pháp này là đối với nhiều E không dễ dàng tìm ra cơ chất thích hợp, hoặc điều kiện phản ứng trên gel không phải dễ dàng như trong ống nghiệm.



Hình 2.5. Điện di trên gel polyacrylamide có SDS chế phẩm superoxide dismutase (SOD) của Streptococcus mutans GS-5

Từ 1-6 tương ứng: dịch chiết tế bào; dịch chiết tế bào sau xử lý nhiệt; chế phẩm SOD sau khi qua cột DEAE-cellulose; protein lẫn không hoạt tính; SOD tinh sạch; các protein chuẩn.

Ngày nay, việc nhận dạng các protein hay E thu được có thể dễ dàng được thực hiện bằng kỹ thuật phân tích khối phổ (mass spectrometry-MS). Với hệ thống phân tích này, các protein được phân cắt bằng một protease đặc hiệu (thường dùng là trypsin) thành các mảnh peptide nhỏ, sau đó được đưa vào hệ thống phân tích khối phổ. Thông qua hệ thống này, phổ các đỉnh peptide được xác định khối lượng phân tử chính xác, và bằng cách so sánh với khối phổ của các protein trong ngân hàng dữ liệu protein quốc tế, protein cần phân tích sẽ được nhận dạng.

Độ sạch của chế phẩm E còn có thể đánh giá qua một số cách khác như qua hoạt độ riêng. Chế phẩm E tinh sạch là chế phẩm có hoạt độ riêng cao nhất (không tăng lên nữa theo quá trình tinh sạch). Chế phẩm E tinh sạch thường có đường cong về pH tối thích, nhiệt độ tối thích với một đỉnh duy nhất và có sự biến thiên đều. Mặc dầu vậy, rất nhiều chế phẩm E sau rất nhiều bước tinh sạch vẫn có thể lẫn tạp chất ở dạng vết như trypsin lẫn chymotrypsin, nhiều protein lẫn nuclease, ADN v.v... Trong trường hợp này, người ta phải dùng những biện pháp cực kỳ nhạy để phát hiện và dùng những phương pháp ức chế đặc hiệu để loại bỏ hoạt tính của protein lẫn, ví dụ: dùng tozil phenilalanil cloromethil keton (TPCK) để loại bỏ hoạt tính hay bất hoạt chymotrypsin trong chế phẩm trypsin; dùng bước axetil hoá để loại nuclease trong một số chế phẩm protein hay E khác.

Chương 3

CẤU TRÚC PHÂN TỬ ENZYME

3.1. THÀNH PHẦN CẤU TẠO

Các E là những protein được cấu tạo từ 20 L- αamino acid (nói đúng hơn là từ 19 amino acid (a.a) và imino acid prolin, bảng 3.1). Các a.a kết hợp với nhau qua *liên kết peptid* (-CO-NH-) được tạo thành do phản ứng kết hợp giữa nhóm α-carboxyl của a.a đứng trước với nhóm α-amin của a.a tiếp theo, loại đi một phân tử nước. Theo cách kết hợp này, các liên kết peptid nằm trên một mạch thẳng không phân nhánh, có hai đầu tận cùng gọi là *"đầu N"* (có nhóm α-amin tự do của a.a thứ nhất), ký hiệu bằng dấu "+",và *"đầu C"* (có nhóm α- carboxyl tự do của a.a cuối cùng), ký hiệu bằng dấu "–". Đánh số thứ tự các gốc a.a trong phân tử bắt đầu từ "đầu N". Trong một số trường hợp, đầu N và đầu C có thể kết hợp với nhau, phân tử có cấu trúc vòng.

Giống như các protein khác, các E có thể là protein đơn giản, gọi là E một thành phần, hoặc là protein phức tạp gọi là *E hai thành phần* hay *holoenzyme (holoE)*. Phân tử holoE bao gồm 2 phần: phần protein gọi là *apoenzyme (ApoE)*, phần không phải protein gọi là *coenzyme (CoE)*. CoE có vai trò quan trọng để thực hiện chức năng xúc tác, loại bỏ CoE mất hoạt tính xúc tác. Trong một số trường hợp, chỉ riêng CoE cũng có thể là chất xúc tác nhưng không hiệu quả bằng khi kết hợp với ApoE. Cùng một CoE khi kết hợp với các ApoE khác nhau tạo thành các holoE khác nhau, xúc tác cho các quá trình chuyển hóa các chất khác nhau nhưng giống nhau về kiểu phản ứng. CoE còn có vai trò làm bền E.

ApoE có vai trò quan trọng đối với tính đặc hiệu của E và làm tăng hiệu quả xúc tác của CoE. CoE thường là các dẫn xuất của các vitamin hòa tan trong nước (bảng 3.2). Vì vậy, khi thiếu một vitamin nào đó sẽ ảnh hưởng đến hoạt độ của E tương ứng trong tế bào, vi phạm quá trình trao đổi chất trong cơ thể, gây nên những bệnh đặc trưng. Nhiều kim loại cũng có vai trò quan trọng đối với hoạt tính xúc tác của E một thành phần và holoE, các kim loại này cũng được gọi là *cofactor*.

Bảng 3.1. Tên, cách viết tắt ba chữ và một chữ của các amino acid là thành phần cấu tạo của E

Ký hiệu 1 chữ	Viết tắt 3 chữ	Tên amino acid	
		Thường dùng	Theo danh pháp hóa học
A	Ala	Alanin (Alanine)	α – aminopropionic
B	Asx	Asparagin, aspactat	
C	Cys	Xistein (Cysteine)	α – amino – β – izopropionic (α – amino – β – isopropionic)

D	Asp	Aspactat (Aspactate)	α–aminoxucxinic (α–aminosuccinic)
E	Glu	Glutamat (Glutamate)	α–aminoglutarat (α–aminoglutarate)
F	Phe	Phenilalanin (Phenylalanine)	α–amino –β – phenylpropionic (α–amino –β – phenylpropionic)
G	Gly	Glixin (Glycine)	α–aminoaxetic (α–aminoacetic)
H	His	Histidin (Histidine)	α–amino – β – imidazol propionic (α–amino – β – imidazolepropionic)
I	Ile	Izolơxin (Isoleucine)	α–amino – β – metilvaleric (α–amino – β – methylvaleric)
K	Lys	Lizin (Lysine)	α, ε –diaminocaproic
L	Leu	Lơxin (Leucine)	α–aminoizocaproic (α–aminoisocaproic)
M	Met	Metionin (Methionine)	α–amino – γ – metiltiobutiric (α–amino – γ – methylthiobutyric)
N	Asn	Asparagin (Asparagine)	amit của aspactat (amide của aspactate)
P	Pro	Prolin (Proline)	α–pirolidin cacboxilic (α–pyrrolidine carboxylic acid)
Q	Gln	Glutamin (Glutamine)	amit của glutamat
R	Arg	Acginin (Arginine)	α–amino – ε – guanidin valeric (α–amino – ε – guanidinevaleric)
S	Ser	Xerin (Serine)	α–amino hidroxipropionic (α–amino hidroxipropionic)
T	Thr	Treonin (Threonine)	α–amino – β – hidroxibutiric (α–amino – β – hydroxybutyric)
V	Val	Valin (Valine)	α–amino - izovaleric (α–amino - isovaleric)
Y	Tyr	Tirozin (Tyrosine)	α–amino hidroxiphenylpropionic (α–amino hydroxyphenylpropionie)
W	Trp	Triptophan (Tryptophane)	α–amino – β – indolyl propionic (α–amino – β – indolyl propionic)

Bảng 3.2. Một số ví dụ các coenzyme có chứa vitamin

Coenzyme	Vitamin
1. Oxidoreductase	
- Nicotinamide nucleotide (NAD^+, $NADP^+$)	niacin (nicotinamide hoặc a. nicotinic, vitamin PP hoặc B_5)
$NAD^+ \xrightleftharpoons{+2H} NADP + H^+$	
$NADP^+ \xrightleftharpoons{+2H} NADPH + H^+$	
NAD^+ = nicotinamide adenin dinucleotide	
$NADP^+$ = nicotinamide adenin dinucleotide phosphate	
- Flavin nucleotide (FMM, FAD)	vitamin B_2
$FMN \xrightleftharpoons{+2H} FMNH_2$	
hoặc FAD $\rightleftharpoons FMDH_2$	
FMN = flavin mononucleotide	
FAD = flavin adenine dinucleotide	

2. Coenzyme A (CoA.SH) — vitamin B_3 (acid pantothenic)

Ví dụ: phản ứng chuyển vị acyl:

$$R\,CO_2H + HS.CoA \rightleftharpoons \underset{\text{acyl - CoA}}{RCO - S\,CoA}$$

Nhóm acyl sẽ được chuyển cho hợp chất khác

Thiamine pyrophosphate (TPP) — vitamin B_1 (thianin)

Ví dụ: coenzyme của pyruvate decarboxylase

Pyridoxal phosphate (pyridoxal 5'-phosphate) — vitamin B_6 (pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine)

Ví dụ: coenzyme của aminotranspherase, decarboxylase các α - amin.

3.2. CÁC BẬC CẤU TRÚC CỦA PHÂN TỬ

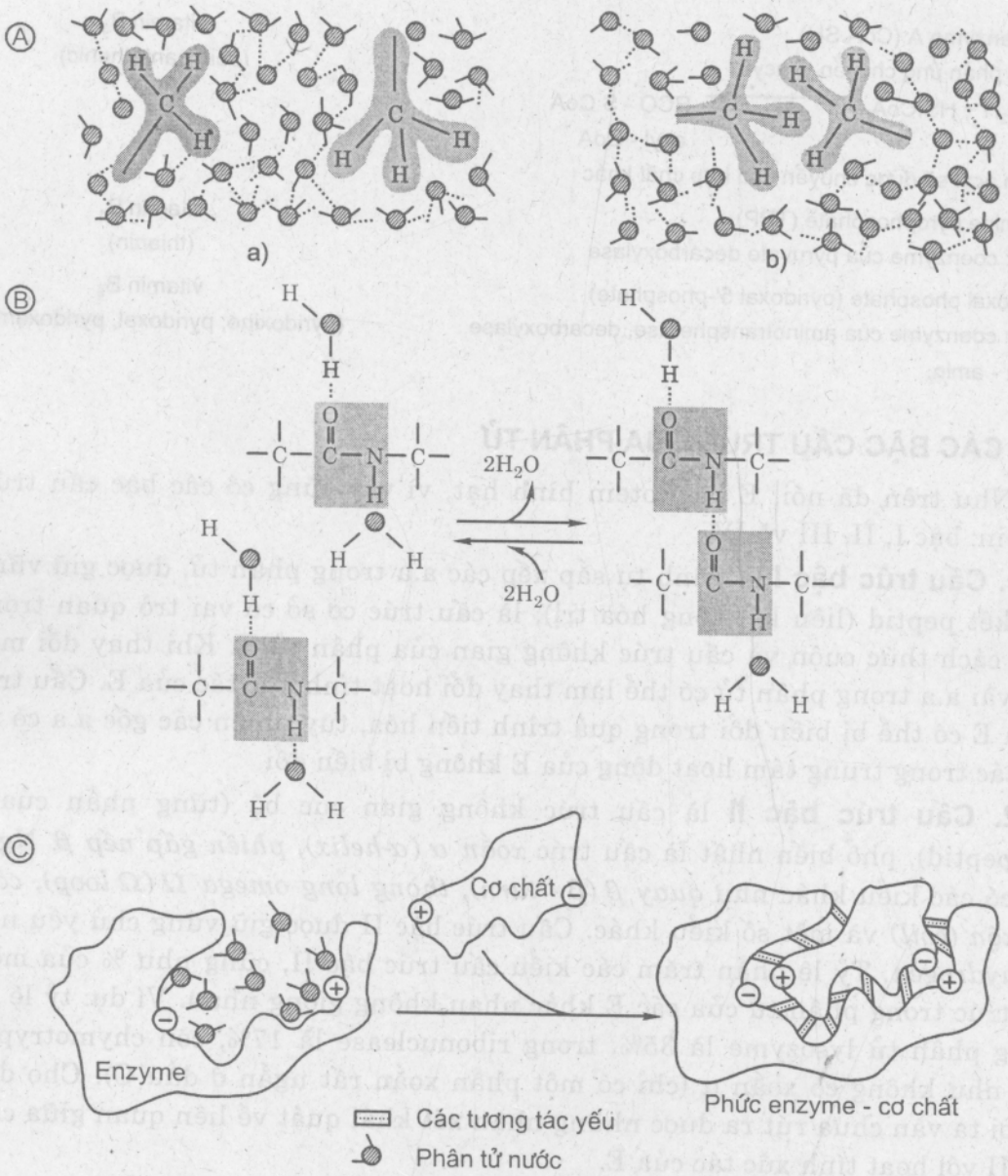
Như trên đã nói, E là protein hình hạt, vì vậy cũng có các bậc cấu trúc như protein: bậc I, II, III và IV.

3.2.1. Cấu trúc bậc I là trình tự sắp xếp các a.a trong phân tử, được giữ vững nhờ liên kết peptid (liên kết cộng hóa trị), là cấu trúc cơ sở có vai trò quan trọng xác định cách thức cuộn và cấu trúc không gian của phân tử E. Khi thay đổi một hay một vài a.a trong phân tử có thể làm thay đổi hoạt tính xúc tác của E. Cấu trúc bậc I của E có thể bị biến đổi trong quá trình tiến hóa, tuy nhiên các gốc a.a có vai trò xúc tác trong trung tâm hoạt động của E không bị biến đổi.

3.2.2. Cấu trúc bậc II là cấu trúc không gian cục bộ (từng phần của chuỗi polypeptid), phổ biến nhất là cấu trúc *xoắn α (α-helix), phiến gấp nếp β*. Ngoài ra, còn có các kiểu khác như *quay β (β - turn), thòng lọng omega Ω (Ω loop), cấu trúc lộn xộn (coil)* và một số kiểu khác. Cấu trúc bậc II được giữ vững chủ yếu nhờ *liên kết hydrogen*. Tỷ lệ phần trăm các kiểu cấu trúc bậc II, cũng như % của một kiểu cấu trúc trong phân tử của các E khác nhau không giống nhau. Ví dụ: tỷ lệ xoắn α trong phân tử lysozyme là 35%, trong ribonuclease là 17%, còn chymotrypsin thì hầu như không có xoắn α (chỉ có một phần xoắn rất ngắn ở đầu C). Cho đến nay người ta vẫn chưa rút ra được những nhận xét khái quát về liên quan giữa cấu trúc bậc II với hoạt tính xúc tác của E.

3.2.3. Cấu trúc bậc III là dạng cuộn lại trong không gian của toàn chuỗi polypeptide, tạo thành hình dạng chung của một chuỗi polypeptide. Khi tạo thành cấu trúc bậc III, các gốc ở xa nhau trong chuỗi polypeptide có thể được xích lại gần nhau hơn trong không gian, tương tác với nhau. Đặc tính cấu trúc cũng như độ bền của cấu trúc bậc III chủ yếu nhờ các tương tác yếu: *liên kết hydrogen, tương tác ion giữa các nhóm tích điện trái dấu, tương tác Van der Waals, tương tác kỵ nước giữa các nhóm không phân cực*.

Liên kết hydrogen được tạo thành theo kiểu A-H.....B-, trong đó hydrogen kết hợp với A bằng liên kết cộng hóa trị, đồng thời tạo thành liên kết yếu với B khi khoảng cách giữa A và B vào khoảng 0,3nm. Liên kết hydrogen được tạo thành giữa *hydrogen* của các nhóm -NH- hoặc -OH với oxygen của các nhóm -OH hoặc - C= O (Hình 3.1).



Hình 3.1. Sơ đồ minh hoạ tương tác kỵ nước (A), liên kết hydrogen (B) và liên kết ion (C) trong môi trường nước

A. Sơ đồ minh hoạ tương tác kỵ nước (A).

B. Liên kết hydrogen trong cấu trúc xoắn và phiến gấp nếp β của phân tử E/ protein.

Liên kết này bền khi khoảng cách giữa O và N là 0,28-0,30nm; các nguyên tử O....H-N nằm thẳng hàng.

C. Liên kết ion.

Tương tác tĩnh điện xảy ra giữa mỗi cặp ion tích điện trái dấu, ví dụ giữa giữa gốc R của lysine và gốc R của glutamic acid. Tương tác này thường gặp trong vùng kỵ nước của phân tử protein.

Tương tác Van der Waals: Khi các phân tử, hoặc nhóm nguyên tử tiếp xúc gần nhau, giữa 2 nguyên tử không kết hợp với nhau có một khoảng cách nhất định, gọi là khoảng cách Van der Waals, ở đó lực hấp dẫn và lực đẩy giữa chúng bằng nhau. Tương tác này chỉ xảy ra ở những khoảng cách rất gần, khi các phân tử hoặc nhóm nguyên tử tiếp xúc gần nhau, là lực hấp dẫn yếu giữa nhân tích điện dương của một nguyên tử và các điện tử tích điện âm của một nguyên tử khác. Đối với các nguyên tử trong phân tử protein, khoảng

cách này là bé hơn 0,4nm. Các liên kết yếu được tạo thành do hiệu quả lưỡng cực (dipole effect) đôi khi cũng gọi là liên kết Van der Waals. Tương tác này yếu và ít đặc hiệu hơn tương tác tĩnh điện và liên kết hydrogen. Vai trò của tương tác này thể hiện rõ khi nhiều nguyên tử của cơ chất có thể đồng thời tiếp cận với nhiều nguyên tử của E. Vì vậy, mặc dù 1 tương tác Van der Waals không có tính đặc hiệu nhưng tính đặc hiệu sẽ tăng lên đáng kể nếu có điều kiện để đồng thời tạo thành nhiều tương tác Van der Waals.

Tương tác kỵ nước không được tạo thành do tương tác trực tiếp giữa các nguyên tử, là tương tác không phân cực giữa các nhóm không phân cực. Trong phân tử E/protein, các gốc R của một số amino acid như Val, Leu, Ile, Phe, Trp là những gốc không phân cực, không thể tạo thành liên kết hydrogen, khi ở gần nhau có khuynh hướng tiến gần nhau hơn đẩy phân tử nước ra ngoài (hình 3.1A,a).

Mỗi liên kết/tương tác nêu trên tuy yếu nhưng vì rất nhiều nên tổng của chúng là rất lớn để giữ vững cấu trúc bậc III. Các tương tác yếu có thể được tạo thành hay bị cắt đứt nhanh chóng, làm cho dạng không gian của phân tử linh động, có *tính mềm dẻo*; có thể thay đổi theo điều kiện, hoặc khi tiếp xúc với cơ chất, là đặc tính *rất quan trọng đối với hoạt tính xúc tác của E*. Đối với các E có các gốc cysteine, sự tạo thành các cầu disulfide giữa các gốc cysteine ở xa nhau trong chuỗi polypeptide làm cho chuỗi bị cuộn lại đáng kể, có vai trò quan trọng đối với việc tạo thành cấu trúc bậc III.

Sử dụng các phương pháp hiện đại như phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phương pháp phân tích tinh thể E bằng tia X (X-ray crystallography) đã xác định được cấu trúc bậc III của vài chục nghìn protein/E. Kết quả nghiên cứu cho thấy *hầu hết các phân tử E có dạng hình hạt* (globular proteins). Trong quá trình cuộn chuỗi polypeptid, phần lớn các gốc R của các a.a kỵ nước (Leu, Ile, Phe v.v...) quay vào phía trong tạo thành "lõi" kỵ nước, ngược lại, các gốc R của các a.a ưa nước quay ra ngoài, ở trên bề mặt phân tử.

Trường hợp có các gốc định vị theo cách ngược lại, các gốc này thường có *vai trò đặc thù* đối với hoạt tính xúc tác của E:

– Các nhóm phân cực ở bên trong phân tử E thường tạo thành liên kết hydrogen (liên kết H) với nhau, hoặc tạo liên kết H với các phân tử nước, góp phần làm tăng tính không phân cực của phần lõi phân tử. Mặc dù các liên kết H này không có vai trò quan trọng về mặt năng lượng của cấu trúc cuộn, nhưng chúng có vai trò đối với việc tạo thành *cấu trúc cuộn đặc thù chính xác*.

– Các gốc R không phân cực định vị trên bề mặt phân tử E có thể có vai trò đặc biệt như: tương tác với phần không phân cực của cơ chất, hoặc với màng tế bào.

Phần lớn các E/protein có khối lượng phân tử lớn, chuỗi polypeptide của nó thường có một số đoạn cuộn lại thành dạng hạt, giống như chuỗi hạt trai cuộn lại, trong đó các hạt trai là các ***domain.*** Như vậy, *domain là phần chuỗi polypeptide có cấu trúc bậc II tự cuộn lại một cách độc lập thành dạng **hạt rắn đặc***, có đường kính vào khoảng 25A^0. Các domain nối với nhau qua các đoạn peptide của chuỗi. Domain bao gồm 2 hay nhiều lớp các đơn vị cấu trúc bậc II. Dựa vào thành phần cấu trúc bậc II trong domain, có thể phân loại domain như sau: *domain α* chỉ bao gồm cấu trúc xoắn α; *domain β* chỉ bao gồm các phiến β; *domain α/β* bao gồm cả

cấu trúc α và cấu trúc β. Khi bị thủy phân dưới tác dụng của protease, các domain tách riêng khỏi phân tử nhưng cấu trúc và hoạt tính của chúng không bị ảnh hưởng nhiều.

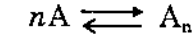
Mỗi domain trong phân tử E thường có chức năng đặc thù riêng đối với hoạt động xúc tác của E. Trung tâm kết hợp với chất phân tử bé thường *ở trong khe* giữa các domain.

*Các phân tử E chỉ bao gồm 1 chuỗi polypeptide, gọi là các **E monomer***. Các E monomer chỉ chiếm tỷ lệ nhỏ trong số các E đã biết, và hầu hết đều xúc tác cho phản ứng thủy phân. Khối lượng phân tử của chúng vào khoảng 13 – 35kD.

3.2.4. Cấu trúc bậc IV

Các protein/E bao gồm 2 hay nhiều chuỗi polypeptide (đã có cấu trúc bậc III) kết hợp với nhau nhờ các tương tác phi cộng hóa trị (non-covalent interactions). Mỗi chuỗi polypeptide thành viên gọi là *phần dưới đơn vị (subunit)*. Các phần dưới đơn vị (pdđv) có thể hoàn toàn giống nhau hoặc khác nhau. Các E có cấu trúc bậc IV gọi là các ***E oligomer***, tùy theo số lượng các pdđv trong phân tử mà có các tên tương ứng là **dimer** (gồm 2 pdđv), **tetramer** (4 pdđv), **hexamer** (6 pdđv) hoặc **polymer** (nhiều pdđv). Nói chung, số pdđv trong phân tử của nhiều E oligomer là số chẵn, sắp xếp đối xứng trong phân tử theo các cách đặc trưng riêng, từ kiểu đối xứng đơn giản đến kiểu đối xứng ba chiều phức tạp. Tuy nhiên cũng có một số E có số pdđv là số lẻ, ví dụ phospho-2-keto-3-deoxygluconate aldolase của *Pseudomonas putida*, chloramphenicol acetyl-transpherase của *E.coli*, và ornithine carbamoyltranspherase của *Bacillus subtilis* là các E trimer (gồm 3 pdđv).

Cuối cùng, cũng cần nhớ rằng có một số E oligomer có thể bao gồm số pdđv không xác định. Ví dụ: glutamate dehydrogenase từ gan bò có đơn vị cấu tạo cơ sở có hoạt tính xúc tác gồm 6 chuỗi polypeptide, M_r là 336kD (ký hiệu là A), có thể tập hợp lại thành phân tử lớn hơn, có M_r 2 x 10^6:



$$nA \rightleftharpoons A_n$$

Một ví dụ khác là acetyl-CoA carboxylase có thể tập hợp thành các sợi lớn. Do đó khi đề cập đến cấu trúc bậc IV của các E này, nên nêu rõ điều kiện tồn tại của chúng.

Các pdđv của E có cấu trúc bậc IV có thể hoàn toàn giống nhau hoặc khác nhau về cấu trúc và chức năng đối với hoạt động xúc tác của E. Trong một số E có sự phân hóa chức năng rõ rệt, một số pdđv có chức năng xúc tác, một số khác có chức năng điều hòa.

Phần lớn các E đã biết là các E oligomer có khối lượng phân tử lớn hơn 35kD. Các E oligomer *được điều hòa nhanh, chính xác và đa dạng hơn* các E monomer. Trong những điều kiện xác định, các E oligomer có thể phân ly thành các pdđv, hoạt độ E bị giảm hoặc có thể mất hoàn toàn. Ở những điều kiện thích hợp chúng lại có thể tái kết hợp tạo thành phân tử E hoạt động. Nhờ sử dụng các phương pháp nghiên cứu hiện đại đã nhận được hình dạng của nhiều protein và E. Hình 3.2 cho thấy hình dạng phân tử của các E khác nhau khá phong phú.

Thermolysin

Phospholipase A_2

HIV- 1 Protease

β - Lactamase

Pepsin

Ribonuclease α

Subtilisin Carlsberg: Eglin C

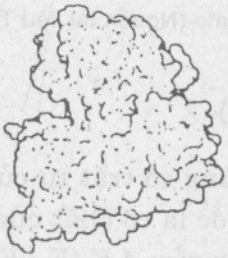
Lysozyme

Carboxypeptidase A

β - Trypsin: Pancrealic Trypsin Inhibitor

Adenylate Kinase

Carbonic Anhydrase

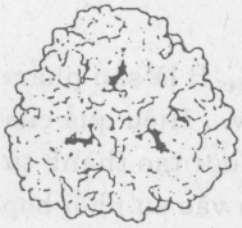


Aconitase

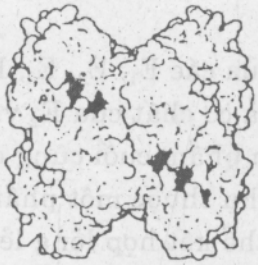
Phosphoglycerate Kinase

Dihydrofolate Reductase

Cytochrome $P\text{-}450_{cam}$



Chloramphenicol Acetyltransferase

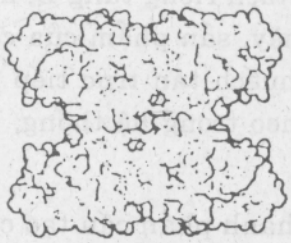


Phosphofructokinase

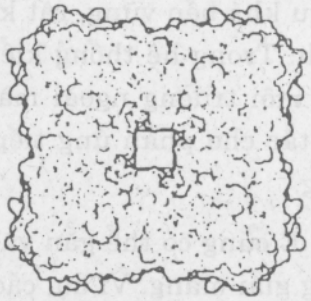
Alcohol Dehydrogenase

D-Gtyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase

Citrate Synthase

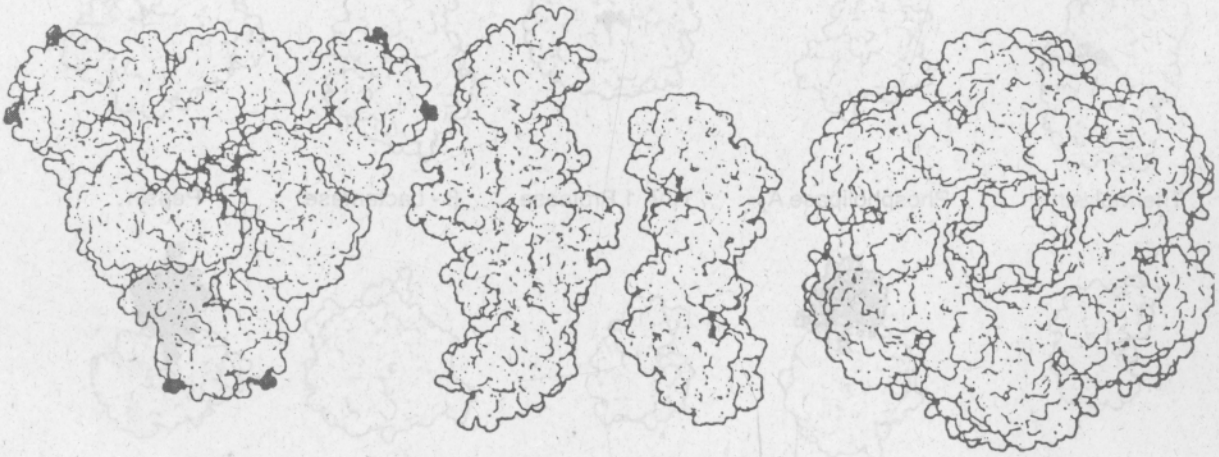


Phosphoglycerate Mutase



Glycolate Oxidase

Malate Dehydrogenase.



Aspartate Carbamoyltransterase | Tryptophan Synthetase | Tyrosyl-tRNA Synthetase | Glutamine Synthatase

Hình 3.2. Hình dạng một số enzyme (Nguồn tài liệu TIBS-1993)

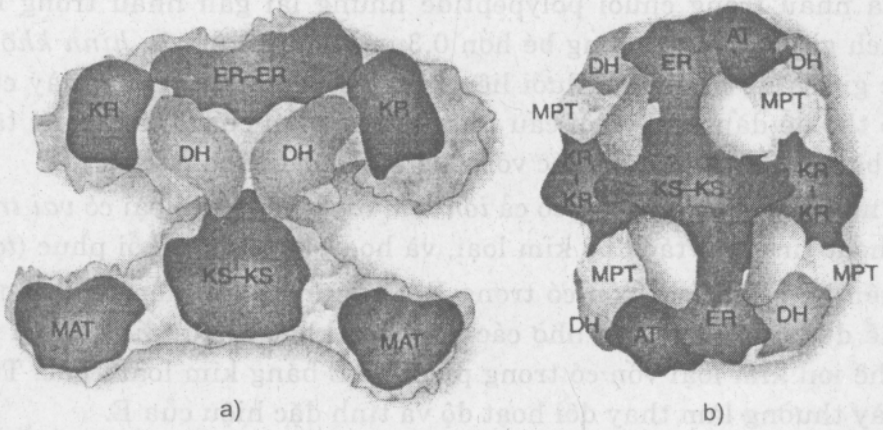
3.3. HỆ THỐNG NHIỀU E (MULTIENZYME)

Bao gồm các E xúc tác cho dãy phản ứng có trật tự của một quá trình trao đổi chất xác định, sản phẩm của phản ứng trước là cơ chất của E xúc tác cho phản ứng kế tiếp. Có thể biểu diễn hệ thống phản ứng gồm 4 E (E_1, E_2, E_3, E_4) như sau:

$$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D \xrightarrow{E_4} E$$

Trong phản ứng trên A, B, C, D, là cơ chất của các E_1, E_2, E_3, E_4. B là sản phẩm của phản ứng đầu tiên do E_1 xúc tác nhưng lại là cơ chất của E_2 v.v... Hiệu quả của dãy phản ứng này được đánh giá bằng lượng sản phẩm cuối cùng được tạo thành từ cơ chất ban đầu A, tốc độ chuyển hóa A đến E phụ thuộc một phần vào sự phối hợp giữa 4 E này. Các E trong hệ thống nhiều E có thể kết hợp lỏng lẻo, hoặc có thể kết hợp với nhau khá bền tạo thành *phức hợp nhiều E* giống như một protein có nhiều hoạt tính E. Ví dụ, phức hợp E sinh tổng hợp acid béo bao gồm 7 E khác nhau (hình 3.3) liên kết với nhau khá bền vững, rất khó tách riêng từng E, khi bị tách rời nhau chúng mất hoạt tính. Trong hệ thống kiểu này, sản phẩm của các phản ứng trung gian không tách ra môi trường ngoài mà khuếch tán trực tiếp từ phản ứng trước đến phân tử E xúc tác cho phản ứng tiếp theo trong hệ thống, làm tăng hiệu quả hoạt động của chúng.

Hệ thống nhiều E cũng có thể gắn vào thành phần cấu tạo của tế bào và chỉ có thể tách ra khi dung giải màng. Ví dụ, các E của chuỗi hô hấp xúc tác cho quá trình chuyển điện tử từ cơ chất đến oxy, gắn chặt vào màng trong ty thể.



Hình 3.3. Mô hình cấu trúc tinh thể phức hợp các E xúc tác cho quá trình sinh tổng hợp acid béo

(Nguồn tài liệu: Nature Chemical Bioloy, 2006, Vol.2, N^5, pp 233.)

a) Phức hợp E ở động vật có vú nhìn nghiêng: chiều cao 210A^0, chiều ngang 180A^0, dày 90A^0 (có một số E không thấy được) ; b) Phức hợp E ở nấm (fungi) nhìn nghiêng: chiều cao 260A^0, chiều rộng 230A^0. Mặc dù 2 phức hệ E cùng xúc tác cho quá trình sinh tổng hợp acid béo nhưng sự sắp xếp của các E trong phức hợp thay đổi tùy cơ thể, vì vậy dạng cấu trúc chung của phức hợp có khác nhau: ở hình a) có dạng chữ X phẳng.

Phức hợp gồm 7 E: **AT**, acetyl transpherase; **ER**, enoyl reductase; **KS**, 3-ketoacyl synthase; **KR**, β-ketoacyl reductase; **DH**, dehydratase; **MAT**, malonyl-CoA-/acetyl-CoA-ACP-transacylase; và **MPT**, malonyl/palmitoyltranspherase.

3.4. TRUNG TÂM HOẠT ĐỘNG CỦA E

3.4.1. Đặc điểm chung

Mặc dù toàn bộ phân tử E có vai trò quan trọng đối với hoạt tính xúc tác của E, tuy nhiên có *một phần nhỏ của phân tử E kết hợp với cơ chất, tham gia trực tiếp trong việc tạo thành, hoặc cắt đứt các liên kết của phần phân tử cơ chất bị chuyển hóa, tạo thành sản phẩm phản ứng, gọi là trung tâm hoạt động (TTHĐ) của E*. Kết quả nghiên cứu TTHĐ của nhiều E có thể rút ra một số nhận xét chung như sau:

– TTHĐ chỉ chiếm một tỷ lệ thể tích tương đối bé trong phân tử, nằm trong "túi" (pocket) hoặc trong "*khe*" (cleft), ở gần hoặc trên bề mặt phân tử.

– TTHĐ bao gồm: Các nhóm chức khác nhau của mạch bên (gốc R) của các a.a trong phân tử, phân tử H_2O liên kết, các nhóm chức của CoE (các E 2 thành phần).

Các nhóm chức của a.a thường gặp trong TTHĐ là: nhóm *SH* của Cys; nhóm *amin* ở đầu N hoặc nhóm ε- amin của Lys; nhóm *carboxyl* của Asp, Glu; nhóm *–OH* của Ser, Thr, Tyr; vòng *imidazol* của His; vòng *indole* của Trp; nhóm *guanilic* của Arg. Khi các nhóm này bị bao vây, E mất hoạt động. Biết được các nhóm chức trong TTHĐ, khi sử dụng E cần tránh các chất có thể phản ứng với chúng. Ví dụ: Đối với các E có nhóm –SH tham gia trong phản ứng xúc tác, cần loại bỏ các chất oxy hóa khỏi môi trường phản ứng.

Các nhóm chức trong TTHĐ của E có thể có vai trò khác nhau: *kết hợp* hoặc *xúc tác;* các gốc khác không có các vai trò xúc tác, hoặc kết hợp thì có vai trò đối với tính đặc hiệu của E.

– TTHĐ có *cấu hình không gian xác định*, các nhóm chức của a.a trong TTHĐ

có thể ở xa nhau trong chuỗi polypeptide nhưng lại gần nhau trong không gian. Khoảng cách giữa chúng thường bé hơn 0,3nm, tạo thành *cấu hình không gian xác định,* được giữ vững nhờ mạng lưới liên kết hydrogen. Mạng lưới này cũng 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.

Trong nhiều trường hợp còn có cả *ion kim loại*, nếu kim loại có *vai trò xúc tác*, E sẽ bị mất hoạt tính khi tách bỏ kim loại, và hoạt độ sẽ được hồi phục (*tái hoạt hóa)* sau khi thêm ion kim loại vốn có trong E. Ở những điều kiện thích hợp, một số E cũng có thể được tái hoạt hóa nhờ các kim loại khác nhau, điều đó có nghĩa là, có thể thay thế ion kim loại vốn có trong phân tử E bằng kim loại khác. Tuy nhiên sự thay đổi này thường làm thay đổi hoạt độ và tính đặc hiệu của E.

Các kim loại thường gặp trong trung tâm hoạt động của E là: Fe, Co, Mn, Zn, Cu v.v... Các kim loại này có thể kết hợp trực tiếp với các a.a, hoặc ở trong thành phần của CoE. Ngoài vai trò xúc tác, một số kim loại, đặc biệt là *Ca thường có vai trò làm bền cấu trúc không gian phân tử E.* Vì vậy khi sử dụng các E trong thực tế, *cần lưu ý để bổ sung Ca vào môi trường*, đặc biệt là khi tiến hành ở nhiệt độ cao.

– Sự tương ứng về cấu hình không gian giữa TTHĐ và cơ chất được hình thành trong quá trình E tiếp xúc với cơ chất (xem mục 4.2; hình 4.3).

– Tương tác giữa E và S là những *tương tác yếu,* dễ dàng bị cắt đứt trong quá trình phản ứng để giải phóng E và sản phẩm phản ứng.

–TTHĐ của các E có cấu trúc bậc IV có thể định vị ở một pdđv, hoặc ở trên các pdđv khác nhau (bao gồm các nhóm chức của các pdđv), do đó khi phân ly thành các pdđv, hoạt độ của E bị giảm hoặc mất hoàn toàn.

E allosteric (E dị lập thể hoặc E điều hòa): Trong phân tử các E này, ngoài TTHĐ còn có một hay một số vị trí khác có thể kết hợp với các chất khác, gọi là *trung tâm allosteric* (trung tâm dị lập thể hay trung tâm điều hòa). Các chất kết hợp vào các trung tâm này (nhưng không bị chuyển hóa) gọi là các *chất điều hòa allosteric*. Khi các chất này kết hợp với E cũng làm thay đổi cấu hình không gian của phân tử E, của TTHĐ, do đó làm thay đổi hoạt độ xúc tác của E. Nếu làm tăng hoạt độ, gọi là chất *điều hòa dương*; nếu làm giảm hoạt độ, gọi là *chất điều hòa âm*. Cơ chất có thể thực hiện chức năng của chất điều hòa - điều hòa *homotropic (đồng hợp)*; nếu chất điều hòa có cấu trúc khác cơ chất - *điều hòa heterotropic (dị hợp)*. Thông thường các E allosteric được điều hòa theo kiểu hỗn hợp, vừa là homotropic và heterotropic. *Hầu hết các E allosteric là các protein có cấu trúc bậc IV.*

3.4.2. Phương pháp nghiên cứu trung tâm hoạt động của E

Phương pháp nhận biết các nhóm chức trong trung tâm hoạt động có vai trò quan trọng đối với hoạt tính xúc tác của E

a) Dùng các chất kìm hãm (I) đặc hiệu (xem thêm mục 6.3.6.2)

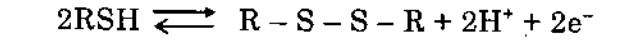
Sử dụng các chất có khả năng phản ứng đặc hiệu với một trong các nhóm chức thường gặp trong TTHĐ của E: Tiến hành xử lý E với các chất này trước khi thêm cơ chất, theo dõi sự biến đổi hoạt độ của E. Nếu hoạt độ E bị giảm mạnh hay mất

hoàn toàn, chứng tỏ nhóm ấy có vai trò quan trọng đối với hoạt độ xúc tác của E. Các chất kìm hãm đặc hiệu thường dùng là:

– DFP để nhận biết các E serine.

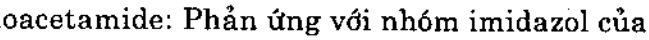
– EDTA để nhận biết các E kim loại hoá trị II (Zn^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}v.v...). Tuy nhiên ở đây cần phân biệt rõ kim loại có vai trò làm bền cấu trúc không gian phân tử E hay có vai trò xúc tác. Để xác định vai trò xúc tác của các kim loại, cần tiến hành thí nghiệm tái hoạt hoá.

– Các hợp chất hữu cơ của Hg như p-chloro-mercury benzoate, hay $HgCl_2$ để nhận biết nhóm –SH:



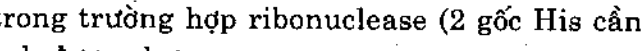
$$RSH + R' - Hg - X = R - S - Hg - R' + HX$$

Người ta cũng có thể dùng $HgCl_2$ để định lượng nhóm SH. Các ion kim loại khác như Hg^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+} cũng có thể phản ứng với – SH:

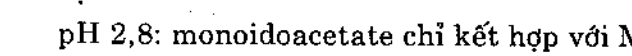


$$RSH + Me^{+} = RS - Me + H^{+}$$

Quá trình làm bất hoạt E bởi các ion kim loại có thể được tái hoạt hóa khi thêm các chất chứa nhóm –SH. Các chất oxy hóa như: H_2O_2, iodobenzoate, iodoferricyanide, các disulfide cũng làm bất hoạt các E-thiol do phản ứng trao đổi thiol – disulfide:



$$2RSH \rightleftharpoons R - S - S - R + 2H^{+} + 2e^{-}$$



$$R-S-S-R + R_1S \rightleftharpoons RS - SR_1 + RS^{-}$$

– Iodoacetamide: Phản ứng với nhóm imidazol của histidin.

Tuy nhiên, khả năng phản ứng với các nhóm chức có thể thay đổi tùy pH môi trường, trong trường hợp ribonuclease (2 gốc His cần cho hoạt động xúc tác của E) đã xác định được như sau:

pH 2,8: monoidoacetate chỉ kết hợp với Met.

pH 5,5: monoidoacetate chỉ kết hợp với His.

pH 8,3: monoidoacetate chỉ kết hợp với Lys.

Điều đó chứng tỏ khả năng phản ứng của các nhóm chức phụ thuộc vào mức độ ion hóa của chúng, hoặc trạng thái ion hóa của các nhóm bên cạnh.

Nếu sử dụng bromoaxetic ở pH = 7, nó chỉ phản ứng với một gốc His và làm mất 90% hoạt độ E.

Khả năng phản ứng của các nhóm chức trong TTHĐ còn phụ thuộc vào ảnh hưởng của các nhóm xung quanh, vì vậy cùng một nhóm chức trong phân tử có thể có vai trò khác nhau đối với hoạt động xúc tác của E. Điều này thấy rõ nhất đối với các gốc Ser trong các E- serine.

b) Phương pháp đánh dấu bằng cơ chất đặc hiệu hoặc CoE

Phương pháp này có phức tạp và khó khăn hơn vì phức ES dễ bị phân ly nhưng đến nay cũng đã đạt được kết quả trong một số trường hợp như:

– Phosphoserine của phosphoglucomutase trong phản ứng vận chuyển phospho.

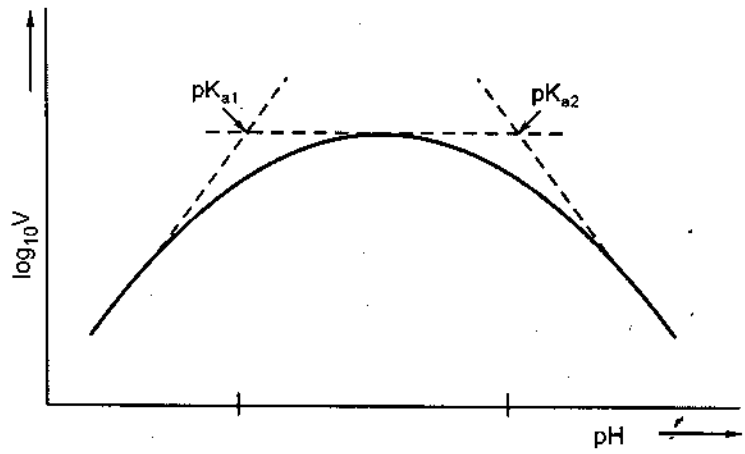
– Sản phẩm trung gian của triosophosphatdehydrogenase.

– Sản phẩm trung gian của chymotrypsin với cơ chất của nó.

c) Nghiên cứu ảnh hưởng của sự thay đổi pH đến tốc độ cực đại (V) của phản ứng

Lập đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của $\log_{10}V$ với sự biến đổi pH, từ đó xác định trị số pK_a (K_a: hằng số ion hóa; $pK_a = -\log K_a$) bằng đồ thị (hình 3.4), đối chiếu với trị số pK_a của các gốc R của các a.a tự do để phán đoán các nhóm chức trong TTHĐ. Tuy nhiên cũng cần lưu ý rằng, trị số pK_a của gốc R của một a.a khi ở trạng thái liên kết trong phân tử E chịu ảnh hưởng của các gốc a.a khác ở xung quanh. Vì vậy, pK_a của nó khác với khi ở dạng tự do, có khi khác đến 4 đơn vị pH. Vì vậy, để có được kết quả chính xác cần kết hợp với các phương pháp khác. Ví dụ: Khi sử dụng phương pháp này để xác định các nhóm chức trong TTHĐ của một số E thủy phân, đã tìm thấy trị số pK_a vào khoảng từ 6,1 đến 7,6, tức là trùng với trị số pK_a của nhóm imidazol của His tự do. Khi sử dụng các phản ứng hóa học đặc trưng cũng phát hiện được nhóm imidazol, từ đó kết luận His thường tham gia trong TTHĐ của các E thủy phân.

Tuy nhiên nếu các giá trị pK_{a1} và pK_{a2} nhận được theo hình 3.4, chỉ khác nhau ít hơn 1,5 đơn vị pH, thì sự ion hóa của các nhóm không phải là độc lập, và các giá trị pK_a cần phải được hiệu chỉnh để nhận được các giá trị đúng.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của pH đến V của phản ứng E khi có 2 nhóm ion hóa tham gia vào hoạt động xúc tác của E
(Đường vạch liền là đại diện cho số liệu của kết quả thực nghiệm)

Người ta cũng có thể lập đường cong biểu diễn sự phụ thuộc giữa $\log_{10}K_m$ theo pH để xác định các nhóm chức trong TTHĐ, nhưng phức tạp hơn.

Để nghiên cứu *cấu trúc không gian* của trung tâm hoạt động, thường sử dụng các *phương pháp NMR, nhiễu xạ tia X, v.v...*

3.5. CẤU TRÚC MỘT SỐ E

Các E là những protein hình hạt nhưng cấu trúc không gian của E khá đa dạng (hình 3.5). Sau đây sẽ giới thiệu cấu trúc của một số E oligomeric.

3.5.1. Aspatate carbamoyl transpherase (ACTase)

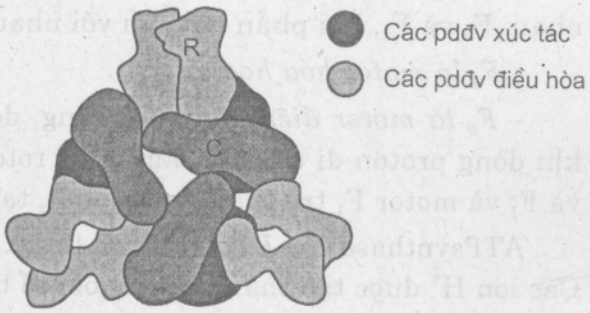
E này xúc tác cho phản ứng đầu tiên của quá trình sinh tổng hợp pyrimidine ở *E.coli:*

L- Aspartate + Carbamoylphosphate → N-Carbamoyl-L- Aspartate + Orthophosphate

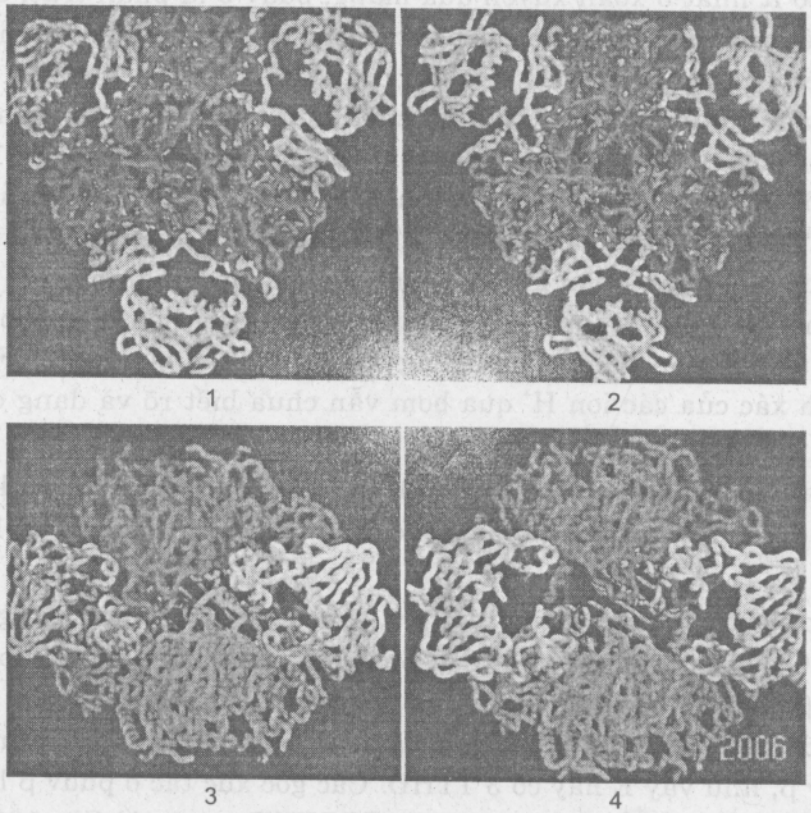
ACTase là E có cấu trúc bậc IV, bao gồm:

– Hai pđđv xúc tác, mỗi pđđv có 3 chuỗi polypeptide, mỗi chuỗi có 2 domain,1 domain kết hợp với Asp, domain khác kết hợp với carbamoylphosphate. Trung tâm hoạt động nằm giữa 2 domain.

– Ba pđđv điều hoà, mỗi pđđv có 2 chuỗi polipeptide, một đơn vị có domain kết hợp với kẽm (zinc domain, kết hợp 1 nguyên tử Zn), có vai trò cấu trúc, và trung tâm kết hợp với chất điều hòa ATP hoặc CTP (ATP và CTP cạnh tranh nhau để kết hợp vào trung tâm này, tuỳ theo tỷ lệ nồng độ chúng trong tế bào). CTP là chất điều hoà âm; ATP là chất điều hoà dương. Ở *E.coli* hoạt độ của nó được điều hoà để trả lời với nhu cầu pyrimindine.



Hình 3.5a. Mô hình cấu trúc minh hoạ sự sắp xếp của các pđđv trong phân tử ATCase (A)

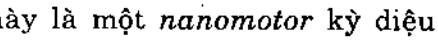


Hình 3.5b. Cấu trúc của ATCase nghiên cứu bằng tia X (Nguồn tài liệu D. Voet và J.G.Voet, 2004, tr.467)

(1), (2) nhìn từ trên xuống; (3), (4) nhìn nghiêng. (1) và (3) E ở trạng thái có ái lực thấp với cơ chất (dạng T). (2) và (4) dạng cấu trúc của E có ái lực cao với cơ chất (dạng R). Hai dạng T và R chuyển hoá tương hỗ. Trên hình màu, các dải màu đậm là các pđđv xúc tác; các dải màu nhạt, sáng là pđđv điều hoà.

3.5.2. ATP-synthase

Xúc tác cho phản ứng tổng hợp ATP từ ADP và phosphate vô cơ kèm theo chuyển vị proton:



$$ADP + P_v \rightleftharpoons ATP$$

P_v: phosphate vô cơ.

E này là một *nanomotor* kỳ diệu gồm 2 motor quay sử dụng nhiên liệu khác nhau: F_0 và F_1, hai phần này nối với nhau qua phần cổ (hình 3.6).

– *F_1 là motor hóa học.*

– *F_0 là motor điện* gắn vào màng, động lực quay là dòng các H^+ đi qua màng, khi dòng proton đi qua F_0, làm quay rotor, khi rotor quay nó quay trục nối giữa F_0 và F_1 và motor F_1 trở thành máy phát, tạo thành ATP khi quay.

ATPsynthase của *E.coli* có kích thước như sau: F_1= 100Å, F_0= 50Å, phần cổ = 45Å. Các ion H^+ được tạo thành bên ngoài tế bào do các quá trình phân giải thức ăn, nhờ phần F_0 của ATPsynthase được đưa vào bên trong tế bào trong quá trình quay rotor.

– F_0 gắn vào màng, được tạo thành từ 3 loại pđđv khác nhau ký hiệu là a, b, c với số lượng của mỗi loại theo thứ tự tương ứng là 1, 2, 10 -12 ($F_0 = a_1,b_2,c_{10\text{-}12}$). Phần dưới đơn vị a có ít nhất 5 xoắn xuyên qua màng; pđđv b là phần trục, có vai trò giữ vững và liên kết các phần; rotor là các pđđv c gồm 12 protein hoàn toàn giống nhau. Có nhiều ý kiến cho rằng 12 pđđv c là các proteolipid, được cuộn như trâm cài tóc với 2 xoắn xuyên qua màng, được nối với một loop ngắn quay về phía tế bào chất của màng. Mỗi một protein là một bơm ion, các gốc Asp-61 và Arg-210 có vai trò quan trọng đối với việc chuyển vị proton. Gốc Arg-210 (ở vào khoảng giữa của màng), đẩy H^+ đến gốc Asp-61 trên rotor. Gốc Asp tích điện âm, nhưng vì nó bị màng lipid bao xung quanh nên không thuận lợi cho việc nhận proton. Vì thế, rotor chỉ quay khi nó kết hợp với ion H^+ trở thành dạng trung hòa điện. Loại bỏ Asp-61 làm mất hoạt tính E. Ion H^+ đi theo đường vòng phức tạp qua motor F_0. Tuy nhiên đường đi chính xác của các ion H^+ qua bơm vẫn chưa biết rõ và đang được tiếp tục nghiên cứu.

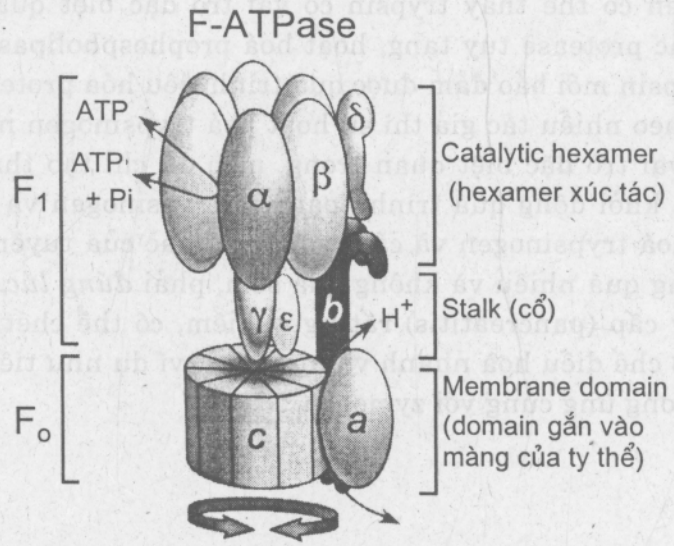
– F_1 ở phía ngoài màng, được tạo thành từ 5 loại pđđv khác nhau ký hiệu là: α, β, γ (phần cổ), δ, ε; số lượng của mỗi loại theo thứ tự tương ứng là 3, 3, 1, 1, 1 (có thể biểu diễn F_1 là α_3, β_3, γ_1, δ_1, ε_1).

Các pđđv α, β có cấu trúc tương tự nhau, sắp xếp xen kẽ nhau xung quanh phần xoắn α ở đầu C của pđđv γ. Mỗi pđđv α, β có 3 domain khác nhau: domain ở vùng đầu N có ống β gồm 6 nhánh; domain đầu C của pđđv α có 7 bó xoắn, còn ở pđđv β có 6 bó xoắn; domain trung tâm bao gồm cả xoắn α và phiến β tạo thành trung tâm xúc tác ở pđđv β, như vậy E này có 3 TTHĐ. Các gốc xúc tác ở pđđv β là Lys-155 và Thr-156. Trình tự bảo tồn ở vùng xúc tác là GERXXE, trong đó Glu-181, Arg-182 và Glu-185 là những gốc bảo tồn.

Khi F_1 vận hành như một máy phát, nó sử dụng lực của chuyển động quay để tạo thành ATP, còn khi nó vận hành như một motor, nó phân cắt ATP để quay trục

theo hướng ngược lại. Quá trình tổng hợp ATP có 2 giai đoạn khó hơn các giai đoạn khác, đó là khi kết hợp với ADP và giai đoạn cuối cùng là giải phóng ATP. Vấn đề này được giải quyết nhờ sự biến đổi dạng không gian của 3 pddv β. Khi trục quay đẩy các pddv này qua 3 dạng không gian khác nhau: *dạng T* (βT), kết hợp với ATP; *dạng D hoặc L* (βD hoặc βL), kết hợp với ADP; *dạng O* (βO hoặc βE), không kết hợp với nucleotide. Khi ATP đi vào vùng này sẽ tách khỏi E.

Các kết quả nghiên cứu cho phép dự đoán khi pddv β thay đổi dạng không gian, pddv γ sẽ thay đổi vị trí tương đối của nó một cách liên tục bên trong hexamer $\alpha_3\beta_3$, nhờ sự tự quay của nó trong hexamer $\alpha_3\beta_3$.



Hình 3.6. Mô hình cấu trúc của ATPsynthase ty thể

Phần F_1 ở phía ngoài màng là hexamer có vai trò xúc tác $\alpha_3\beta_3$; phần cổ (stalk); phần F_0 gắn vào màng (Nguồn tài liệu: IUBMB life, 58: 319, 2006)

3.6. PROENZYME (ZYMOGEN)

Nhiều E được tổng hợp ở dạng chưa có hoạt tính xúc tác, gọi là *proE* hay *zymogen* (tiền E), sau đó mới chuyển thành E. Quá trình chuyển hoá proE thành E gọi là *quá trình hoạt hoá* zymogen. Quá trình này có một số đặc điểm chung như sau:

– Phần lớn là quá trình *thuỷ phân giới hạn* (limited proteolyis) protein do protease xúc tác, cắt đứt một hay một số liên kết peptide ở gần đầu N của phân tử zymogen. Đoạn peptide được tạo thành có thể bị loại ra ngoài, hoặc vẫn gắn với phần còn lại của phân tử nhờ các cầu disulfide (ví dụ: chymotrypsin). Quá trình hoạt hoá có thể là tự xúc tác hay do các protease khác xúc tác (bảng 3.3).

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

– Hiệu suất hoạt hoá zymogen phụ thuộc vào điều kiện hoạt hoá như: nồng độ zymogen, E xúc tác cho quá trình hoạt hoá và nồng độ của nó, nhiệt độ, pH và một số yếu tố khác.

Bảng 3.3. Một số ví dụ về các protease xúc tác cho quá trình hoạt hoá một số zymogen của tuyến tuỵ và dạ dày

Zymogen	Enzyme	Enzyme xúc tác cho quá trình hoạt hóa
Pepsinogen[a]	Pepsin	Pepsin
Chymotripsinogen	Chymotrypsin	Trypsin, chymotripsin
Trypsinogen	Trypsin	Trypsin, enteropeptidase
Procarboxipeptidaz	Carboxipeptidase	Trypsin
Proelastase	Elastase	Trypsin

Ghi chú: [(a)] được tổng hợp ở dạ dày, các enzyme khác được tổng hợp ở tụy.

Qua bảng trên có thể thấy trypsin có vai trò đặc biệt quan trọng trong quá trình hoạt hoá các protease tuỵ tạng, hoạt hoá prophospholipase A_2 ở tá tràng. Do đó phải có đủ trypsin mới bảo đảm được quá trình tiêu hóa protein nhờ các protease của tuyến tuỵ. Theo nhiều tác giả thì sự hoạt hoá trypsinogen nhờ enteropeptidase của tá tràng có vai trò đặc biệt quan trọng, mặc dù chỉ tạo thành một lượng nhỏ trypsin nhưng sẽ khởi động quá trình hoạt hoá trypsinogen và các zymogen khác. Quá trình hoạt hoá trypsinogen và các zymogen khác của tuyến tụy phải bảo đảm đủ nhu cầu, không quá nhiều và không quá sớm, phải *đúng lúc*. Nếu không, có thể bị bệnh viêm tuỵ cấp (pancreatitis) rất nguy hiểm, có thể chết. Tuy nhiên, cơ thể cũng có một số cơ chế điều hoà nhanh và hiệu quả, ví dụ như tiết các chất kìm hãm đặc hiệu các E tương ứng cùng với zymogen.

Chương 4

TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA ENZYME

4.1. KHÁI NIỆM

Mỗi E chỉ xúc tác cho sự chuyển hóa một hay một số chất nhất định theo một kiểu phản ứng nhất định. Đặc tính tác dụng lựa chọn cao này gọi là *tính đặc hiệu* hay *tính chuyên hóa* (specificity) của E. Tính tác dụng đặc hiệu cao của E là một trong 3 đặc tính ưu việt của E so với các chất xúc tác vô cơ và hữu cơ khác. Mức độ đặc hiệu của các E khác nhau không giống nhau, người ta thường phân biệt thành các mức như sau:

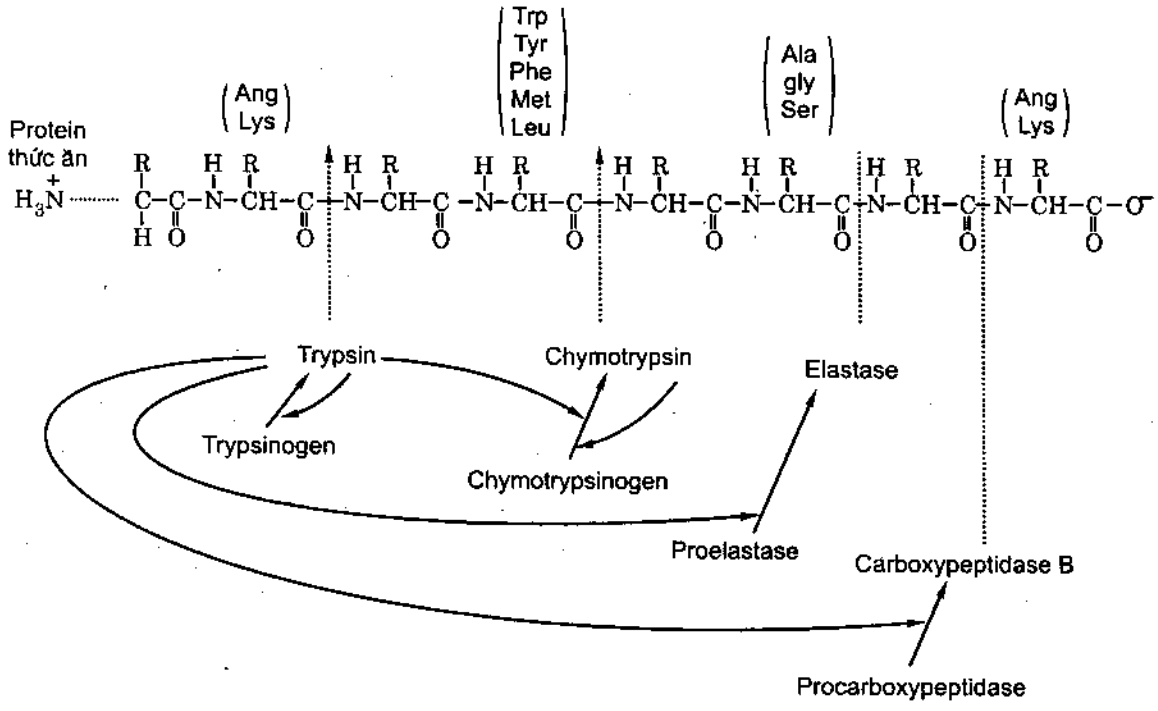
– Đặc hiệu tuyệt đối hoặc gần như tuyệt đối: E chỉ xúc tác cho sự chuyển hóa một chất nhất định (hoặc một cặp cơ chất nhất định trong phản ứng hai cơ chất) theo một phản ứng xác định tạo thành các sản phẩm xác định. Ví dụ: urease hầu như chỉ xúc tác cho phản ứng thủy phân urea tạo thành khí carbonic và amoniac. E này cũng có tác dụng đối với hydroxy urea (có cấu trúc rất gần urea) nhưng với vận tốc thấp hơn 120 lần so với khi thủy phân urea. Một số E khác như arginase, glucose oxidase cũng được xếp vào loại E có tính đặc hiệu tuyệt đối. Các E có tính đặc hiệu tuyệt đối được sử dụng để *định lượng chính xác cơ chất* của chúng.

– Đặc hiệu nhóm: Các E thuộc nhóm này chỉ tác dụng với những chất có cùng một kiểu cấu trúc phân tử, một kiểu liên kết, và chúng có những đòi hỏi xác định đối với nhóm nguyên tử ở liên kết chịu tác dụng. Ví dụ: maltase chỉ xúc tác 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.

– 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 thủy phân liên kết ester, một số peptidase thủy phân liên kết peptide v.v... Các E này có thể tác dụng đối với nhiều cơ chất khác nhau, chỉ cần có chứa các liên kết tương ứng.

Các E có tính đặc hiệu thấp thường là những E *xúc tác cho phản ứng phân giải thức ăn*, do có tính đặc hiệu thấp nên E sẽ phân giải được nhiều loại cơ chất khác nhau. Mặt khác, để nâng cao hiệu quả phân giải nên sử dụng hỗn hợp các E cùng nhóm nhưng có tính đặc hiệu khác nhau. Ví dụ: các protease tuy cùng có tác dụng thủy phân liên kết peptide nhưng có tính đặc hiệu khác nhau (hình 4.1). Vì vậy, để thủy phân triệt để protein, người ta thường dùng hỗn hợp các protease có tính đặc hiệu khác nhau.

Các *E xúc tác cho các quá trình tổng hợp rất ít khi có tính đặc hiệu thấp.*



Hình 4.1. Sơ đồ minh hoạ tính đặc hiệu của các protease tuyến tụy và vai trò quan trọng của trypsin đối với quá trình hoạt hoá các zymogen của tuyến tụy

Các amino acid ghi trong ngoặc đơn: chỉ gốc R thuộc về các a.a này

- - - - - - - - → : Vị trí liên kết enzyme tác dụng.

——————→ : Quá trình hoạt hóa proenzyme (zymogen) do trypsin xúc tác

Phần lớn các E có *tính đặc hiệu hóa học lập thể (stereochemical specficity)*, nghĩa là E chỉ tác dụng với một trong 2 dạng đồng phân không gian của các chất. Các E trong cơ thể người và động vật thường chỉ tác dụng với các L- amino acid, do đó nếu đưa vào cơ thể hỗn hợp amino acid được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học (có cả 2 dạng D- và L-amino acid với tỷ lệ bằng nhau) thì cơ thể người và động vật chỉ sử dụng được một nửa lượng amino acid này.

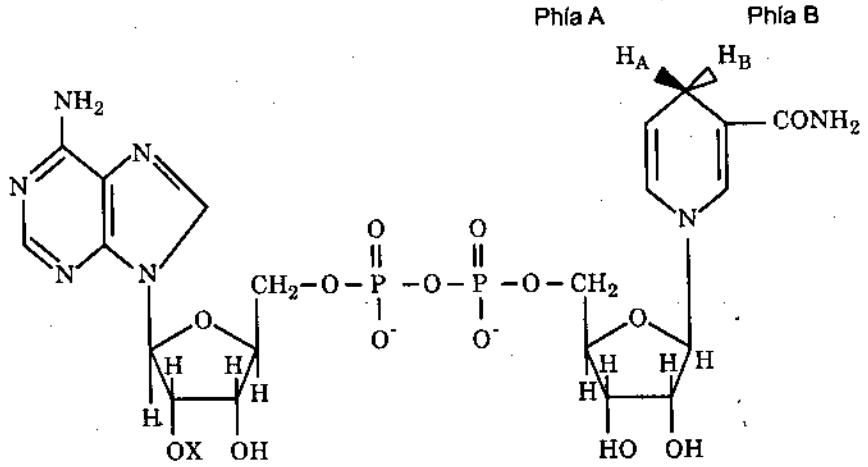
Tuy nhiên, trong tự nhiên cũng có các E xúc tác cho phản ứng chuyển hóa tương hỗ giữa các cặp đồng phân tương ứng, là các *racemase* và *epimerase*. *Racemase* xúc tác cho phản ứng chuyển hóa tương hỗ *giữa dạng D- và dạng L-* ; *epimerase* xúc tác cho phản ứng chuyển hóa tương hỗ giữa 2 đồng phân *α- và β-*. Các E này có vai trò quan trọng ở chỗ nó tăng hiệu quả sử dụng các chất dinh dưỡng như các amino acid, các đường đơn được sản xuất bằng phương pháp hóa học. Vì vậy các E này *có ý nghĩa lớn trong công nghiệp hoá học.*

Đối với một số E, tính đặc hiệu còn thể hiện khá tinh vi, có thể *phân biệt hai gốc đối xứng trong phân tử hoàn toàn giống nhau về mặt hóa học.* Ví dụ: hai nhóm $-CH_2OH$ ở vị trí 1 và vị trí 3 trong phân tử glycerol, hoặc hai nhóm $-CH_2$-COOH trong phân tử acid citric.

Glycerol Acid citric

Glycerol kinase (EC 2.7.1.30) xúc tác cho phản ứng chuyển vị gốc phosphate từ ATP đến glycerol, dùng phương pháp đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ C^{14} đã xác nhận rằng gốc phosphate chỉ được chuyển đến nhóm $-CH_2OH$ ở vị trí thứ 3, tạo thành glycerol-3-phosphate.

Nhiều dehydrogenase cũng thuộc loại có *tính đặc hiệu hóa học lập thể* khá cao, có thể phân biệt được hai phía của vòng pyridine của CoE nicotinamide (NAD^+, $NADP^+$) trong phản ứng chuyển vị H. Các dehydrogenase xúc tác cho phản ứng chuyển H từ cơ chất đến vị trí số 4 của vòng, nhưng H này có thể được chuyển về hai phía khác nhau của vòng: *phía A* hoặc *phía B* tùy theo E (hình 4.2).



Hình 4.2. Tính đặc hiệu lập thể của các E cần NAD^+ hoặc $NADP^+$
NAD^+, X = H ; $NADP^+$, X =phosphate.

Một số ví dụ về các E có tính đặc hiệu lập thể đối với 2 phía vòng của NAD^+ hoặc $NADP^+$:

Các dehydrogenase đặc hiệu phía A: alcohol dehydrogenase (NAD^+), lactate dehydrogenase (NAD^+), malate dehydrogenase (NAD^+), cytocrome b_5 reductase (NAD^+).

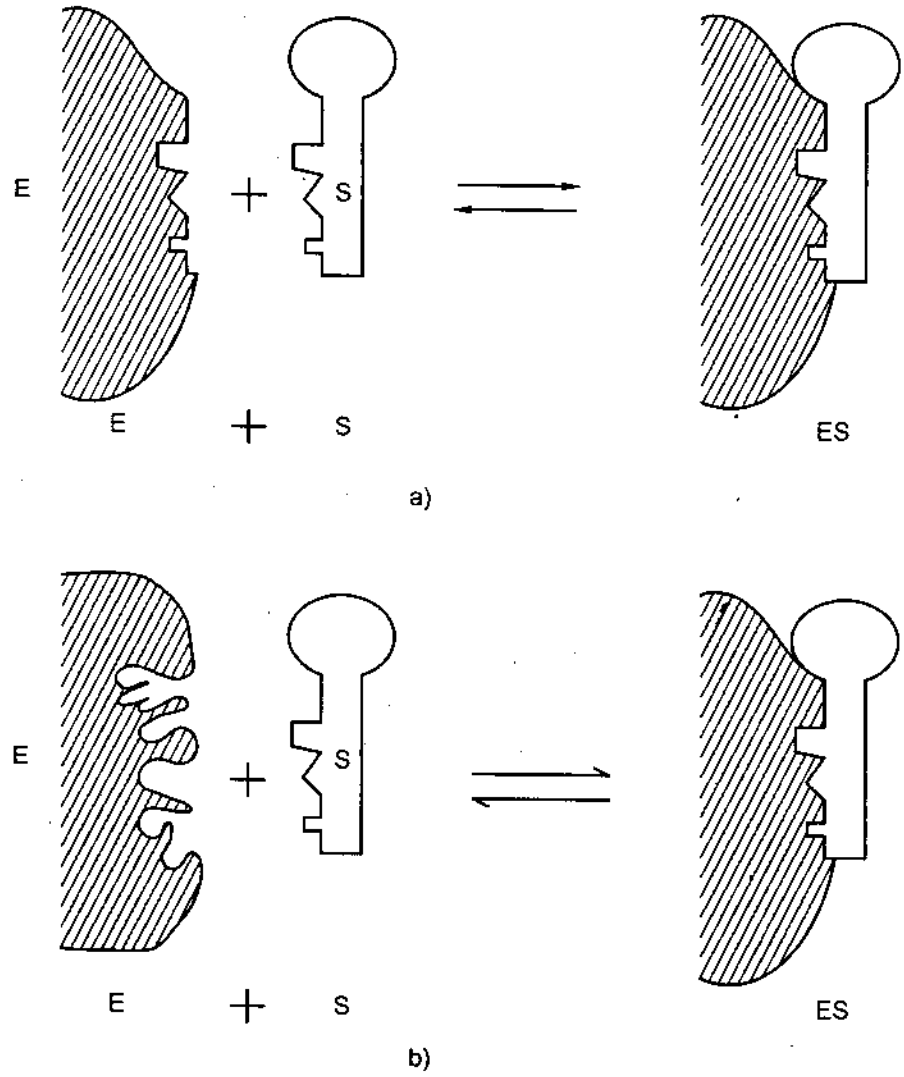
Các dehydrogenase đặc hiệu phía B: glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD^+), glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (NAD^+), glucose dehydrogenase (NAD^+), glucose 6-phosphate dehydrogenase ($NADP^+$).

Tính đặc hiệu cao của E có ý nghĩa quan trọng đối với cơ thể sống, bảo đảm các quá trình trao đổi chất thực hiện được chính xác, đặc biệt là quá trình sao chép ADN và sinh tổng hợp protein. Người ta đã biết, quá trình sao chép ADN *in vivo* do ADN- polymerase xúc tác, tỷ lệ sai sót rất thấp, chỉ có một lỗi trong 10^{10} nucleotide được tổng hợp, đó là nhờ E này nhận biết được các base, nếu có base nào không đúng, sẽ bị thủy phân loại bỏ nhờ hoạt độ 3' – 5' exonuclease của trung tâm ở xa trung tâm polymerase.

Tính đặc hiệu cao của E còn có ý nghĩa đặc biệt quan trọng đối với việc sử dụng chúng trong thực tế.

4.2. NGUYÊN TẮC LỰC XÚC TÁC VÀ GIẢI THÍCH TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA E

Emil Fischer (1984) đề ra giả thuyết là giữa E và cơ chất (S) của nó có sự tương ứng giống như "*ổ khóa* và *chìa khóa*" (hình 4.3a). Theo thuyết này sự tương ứng về cấu trúc của TTHĐ của E và S là sẵn có và giữ cố định trong quá trình E kết hợp với S. Thuyết này giải thích được tính đặc hiệu của E nên đã được thừa nhận trong nhiều năm, nhưng *không phù hợp với đặc tính cấu trúc không gian mềm dẻo (flexibility) của phân tử protein.*



Hình 4.2. Sơ đồ minh họa sự tương ứng về cấu trúc giữa E và S

a) Theo thuyết E. Fischer: Sự tương ứng là sẵn có.
b) Theo thuyết Koshland: Sự tương ứng về cấu trúc giữa E và S được hình thành trong quá trình tiếp xúc giữa E và S.

Sử dụng các phương pháp hiện đại trong nghiên cứu cho thấy *có sự sai khác về cấu trúc không gian của E dạng tự do và E ở trong phức ES*. Điều đó chứng tỏ khi kết hợp với S có thể làm thay đổi cấu trúc không gian của E. Điều này có thể giải thích là do khi E kết hợp với S, tạo thành các liên kết giữa TTHĐ của E với các phần tương ứng của S, do đó làm thay đổi các liên kết sẵn có giữa các nhóm trong TTHĐ, dẫn đến sự thay đổi cấu trúc không gian. Mặt khác, khi cơ chất kết hợp vào TTHĐ, nó có thể đẩy các phân tử nước ra ngoài, làm tăng tính kỵ nước của vùng này. Năm 1958, Koshland đã đề ra giả thuyết "*khớp cảm ứng*", theo đó trong quá trình E kết hợp với S sẽ làm thay đổi cấu trúc không gian, kết quả là tạo nên sự tương ứng về cấu trúc giữa E và S. Nói cách khác, *S đã cảm ứng sự thay đổi vị trí của các nhóm chức của E sẽ tham gia trong phản ứng (các nhóm chức của TTHĐ) để tạo thành một cấu trúc khớp vừa với S* (hình 4.3b) *và bao xung quanh phân tử S*. Có tác giả đã ví sự khớp cảm ứng này cũng giống như giữa *bàn tay* (S) và *găng tay* (TTHĐ), bàn tay có hình dạng không thay đổi, khi xỏ tay vào găng tay, làm cho hình dạng của nó thay đổi và khít với bàn tay.

Như vậy, cả hai thuyết này đều thống nhất giải thích tính đặc hiệu của E là do có sự tương ứng cấu trúc không gian giữa TTHĐ của E với cấu trúc của S. Sự sai khác cơ bản là: theo thuyết của Fischer thì cấu trúc không gian TTHĐ của E đã sẵn có ở E tự do, không thay đổi khi kết hợp với S; còn theo thuyết Koshland thì trong phân tử E tự do, tuy có các nhóm chức để hình thành TTHĐ nhưng chúng có thể ở cách xa nhau trong phân tử E tự do, chỉ khi tiếp xúc với S mới được tạo thành cấu hình không gian đúng để thực hiện phản ứng xúc tác. Đối với phản ứng có 2 cơ chất, nếu thiếu một cơ chất thì sự cảm ứng không gian cũng không đầy đủ nên tốc độ phản ứng giảm rõ rệt.

Theo thuyết tiếp xúc cảm ứng, các chất có cấu trúc tương tự với S có thể cảm ứng sự thay đổi dạng không gian của E, nhưng sự cảm ứng này không làm cho các nhóm chức sắp xếp đúng vị trí cần thiết để chuyển hóa nó, nên sẽ không tạo thành sản phẩm. Vận dụng thuyết này cũng giải thích được tác dụng của các chất kìm hãm, các chất điều hòa allosteric.

4.3. CÁC LOẠI LIÊN KẾT ĐƯỢC TẠO THÀNH GIỮA E VÀ S TRONG PHỨC ES

Nhiều bằng chứng thực nghiệm đã xác định rằng, sự tạo thành phức ES là giai đoạn đầu tiên của phản ứng do E xúc tác. Trong một số trường hợp, người ta đã tách được phức ES hoặc quan sát được phức này dưới kính hiển vi điện tử. Tuy nhiên phức ES rất không bền, chỉ tồn tại trong thời gian rất ngắn và nhanh chóng chuyển hóa thành sản phẩm, giải phóng E tự do. E lại kết hợp với phân tử S khác và tiếp tục như trên.

Các loại liên kết giữa E và S thường gặp trong phức ES là: tương tác tĩnh điện, liên kết hydrogen, tương tác Van der Waals, tương tác kỵ nước. Khi tạo thành mỗi một tương tác yếu giải phóng một ít năng lượng tự do, gọi là *năng lượng liên kết* (NLLK). NLLK tuy bé nhưng do có rất nhiều liên kết giữa E và S nên tổng năng lượng được giải phóng sẽ là đáng kể. Đó là nguồn năng lượng tự do chủ yếu E dùng

để làm giảm năng lượng hoạt hoá phản ứng. Theo Haldane (1930), NLLK được dùng để vặn vẹo phân tử S, làm yếu các liên kết của nó theo hướng tạo điều kiện thuận lợi cho các bước tiếp theo, do đó làm giảm năng lượng hoạt hoá của phản ứng. NLLK cung cấp năng lượng cần thiết để E thực hiện chức năng xúc tác một cách đặc hiệu. Nhiều bằng chứng thực nghiệm cho thấy, sự ăn khớp về cấu hình không gian của S ở trạng thái chuyển tiếp (TTCT) với TTHĐ của E là cơ sở đầu tiên của tính đặc hiệu và lực xúc tác của E.

Hai nguyên tắc cơ sở để giải thích đặc trưng xúc tác của E là: 1) lực xúc tác của E xét cho cùng là nhận được từ NLLK, 2) các tương tác yếu giữa E và S được tạo thành tối ưu ở *trạng thái chuyển tiếp* (*transition state*). TTCT không phải là một loại chất hoá học, mà đơn giản là một trạng thái thoáng qua của phân tử, ở đó các sự kiện như bẻ gãy, tạo thành liên kết đã đạt đến đúng lúc. Thời gian của trạng thái này rất ngắn, khoảng 10^{-13} giây.

Các nghiên cứu với pepsin và nhiều E khác cho phép giả thiết tính đặc hiệu cơ chất của E chủ yếu được xác định bởi cấu trúc của S ở TTCT hơn là ở trạng thái nền (ground state). TTHĐ của E không tương tác với S ở trạng thái nền mà là ở *trạng thái chuyển tiếp (TTCT)*. Điều này đã được chứng minh bằng cách thiết kế các chất kìm hãm (I) có cấu trúc giống với TTCT của S, và đã xác định được là E kết hợp với I bền hơn so với S. Các tương tác yếu giữa E và S được tạo thành thuận lợi nhất ở TTCT.

Xác định tính đặc hiệu của E có thể lựa chọn được cơ chế ưa thích nhất của E. Để lượng hoá tính đặc hiệu của E đối với các S khác nhau, người ta đã dùng tỷ lệ $\mathbf{k_{cat}}/K_m$. k_{cat} *(turnover number, hoạt độ phân tử): là số lượng lớn nhất phân tử S có thể được chuyển hoá bởi 1 phân tử E trong 1 đơn vị thời gian (thường là giây), ở điều kiện E được bão hòa cơ chất.* K_m là nồng độ cơ chất mà ở đó vận tốc phản ứng bằng một nửa vận tốc cực đại (xem mục 6.2.3). Ví dụ: tỷ lệ k_{cat}/K_m của fumarate hydratase (E.C. 4.2.1.2) đối với các cơ chất fumarate, fluorofumarate, chlorofumarate, và bromofumarate theo thứ tự là: $1,6 \times 10^8$, $9,8 \times 10^7$, $2,0 \times 10^5$, và $2,5 \times 10^4$ s^{-1} (mol dm^{-3}), điều đó chứng tỏ E này có tính đặc hiệu cao đối với 2 cơ chất đầu.

Chương 5

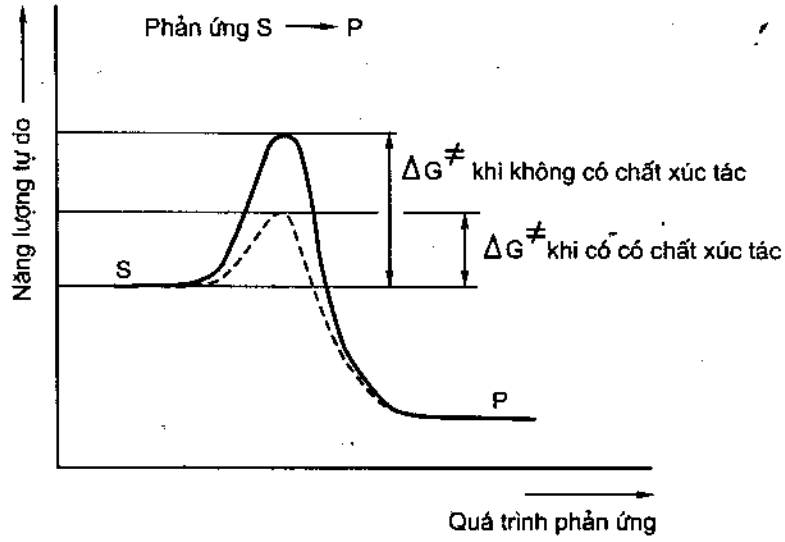
CÁC CHẤT XÚC TÁC, BẬC PHẢN ỨNG

5.1. NĂNG LƯỢNG HOẠT HÓA

Phản ứng giữa các phân tử chỉ có thể xảy ra khi chúng tiếp xúc với nhau, vì vậy các yếu tố làm tăng sự va chạm giữa các phân tử như: nồng độ cao của các chất phản ứng, nhiệt độ cao, sẽ làm tăng tốc độ phản ứng.

Tuy nhiên không phải mọi sự va chạm giữa các chất tham gia phản ứng đều dẫn đến phản ứng, mà còn cần có sự tương ứng về lập thể giữa các nhóm phản ứng, và đủ điều kiện về mặt năng lượng.

– Để phản ứng có thể xảy ra, các phân tử va chạm phải có đủ năng lượng để vượt qua rào cản năng lượng, gọi là *năng lượng hoạt hóa* (energy of activation) $\Delta G^{\neq}$. Đường biểu diễn sự biến đổi năng lượng của quá trình phản ứng để tạo thành sản phẩm (hình 5.1) cho thấy, năng lượng hoạt hóa của phản ứng không có chất xúc tác cao hơn khi có chất xúc tác. Điểm cao nhất trên đường biểu diễn năng lượng này ký hiệu là *trạng thái chuyển tiếp. NLHH là sự sai khác giữa mức năng lượng của trạng thái cơ bản và trạng thái chuyển tiếp*. Hình 5.1 cũng cho thấy phản ứng *có hay không có chất xúc tác mức năng lượng tự do của trạng thái ban đầu và trạng thái cuối cùng là giống nhau*. Tốc độ phản ứng phản ảnh NLHH, NLHH càng cao, tốc độ phản ứng càng chậm.



Hình 5.1. So sánh năng lượng hoạt hóa ($\Delta G^{\neq}$) phản ứng khi có (-----) và không có (——) chất xúc tác.
Năng lượng tự do (G): Một phân tử ở một trạng thái bền vững có một lượng năng lượng tự do (NLTD) đặc trưng.

Sự thay đổi *NLTD chuẩn* (ΔG^0) ở những điều kiện chuẩn: T = 298°K, áp suất riêng phần của mỗi khí là 1atm hoặc 101,3kPa, nồng độ chất hòa tan là *1M*. ($\Delta G^{0'}$) sự thay đổi NLTD ở điều kiện pH 7, vì trong hệ thống sống nồng độ H^+ còn xa với nồng độ 1M.

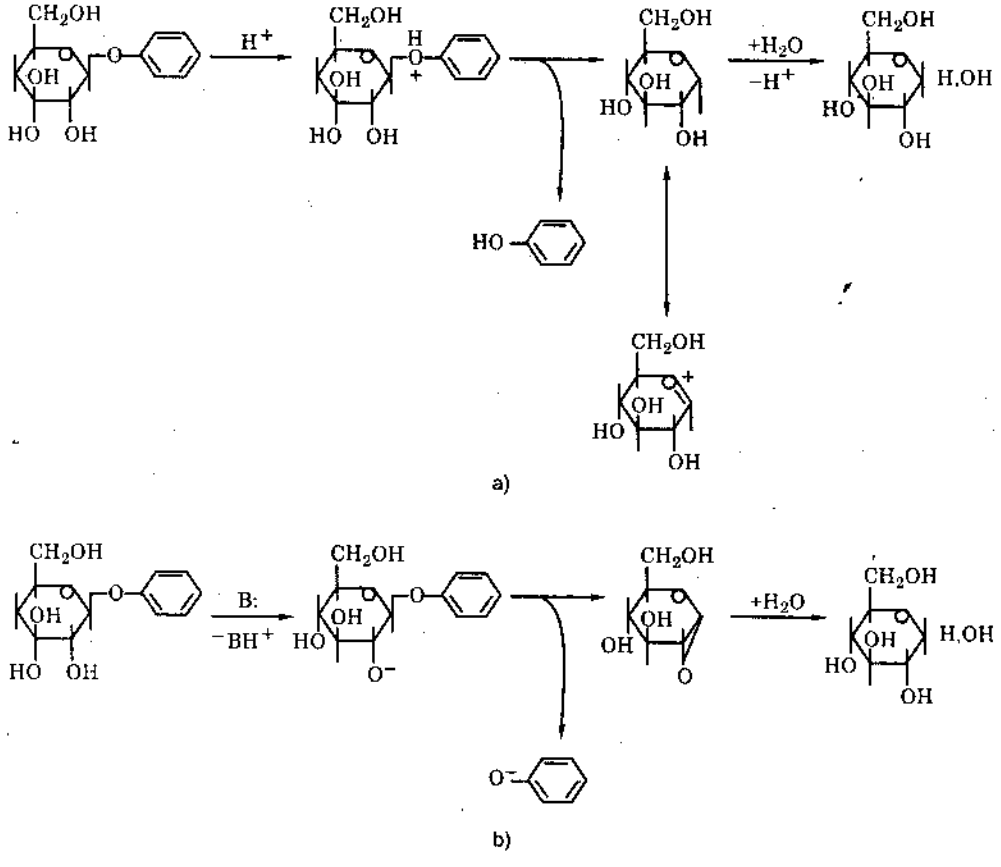
$\Delta G^{\neq}$ là sự sai khác giữa mức năng lượng của trạng cơ bản và trạng thái chuyển tiếp. $\Delta G^{0'}$ trên hình 5.1 là sự thay đổi NLTD khi S → P.

Bước giới hạn tốc độ: Khi một phản ứng tiến hành qua nhiều phản ứng trung gian thì vận tốc chung của phản ứng được xác định bởi *bước (hoặc các bước) có năng lượng hoạt hóa cao nhất*. Bước giới hạn tốc độ có thể thay đổi tùy điều kiện phản ứng.

5.2. CÁC CHẤT XÚC TÁC

Các chất xúc tác làm tăng vận tốc phản ứng, không bị biến đổi sau khi phản ứng kết thúc, không có mặt trong thành phần sản phẩm phản ứng. Trong phần lớn trường hợp, các chất xúc tác làm tăng vận tốc phản ứng bằng cách làm giảm NLHH. Tốc độ phản ứng phản ảnh NLHH, NLHH càng cao, tốc độ phản ứng càng chậm.

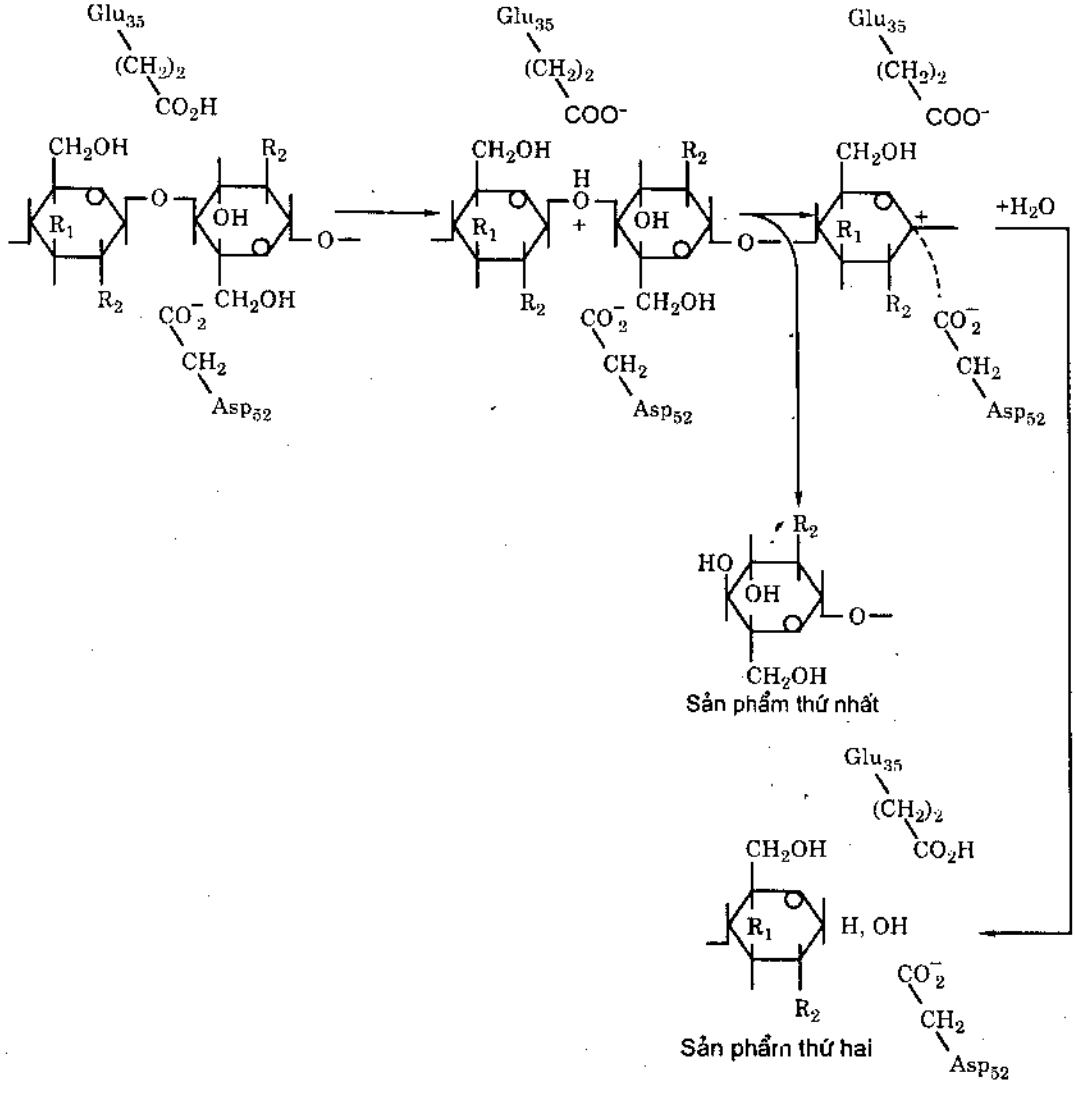
5.2.1. Xúc tác acid-base (acid-base catalyis)



Hình 5.2. Các phản ứng thủy phân β-D-glucopyranosid
a) acid xúc tác; b) base xúc tác.

Các chất xúc tác thường là các acid hoặc các base, các acid thực hiện chức năng xúc tác bằng cách cho proton, còn các base thì ngược lại xúc tác bằng cách lấy proton của cơ chất. Ví dụ phản ứng thủy phân β-D-glucopyranosid (hình 5.2.a), H^+ proton hóa oxy glucosid sau đó tách phenol ra, tạo thành carbon tích điện dương, phân tử nước tấn công vào carbon cation này và tạo thành glucose. Các base cũng có thể xúc tác cho phản ứng này nhưng theo cách khác: tách proton của nhóm OH ở C_2, tạo thành $-O^-$, gốc này tấn công vào C_1 tạo thành oxirane (epoxide) đồng thời tách phenol, sau đó oxirane kết hợp với H_2O tạo thành glucose (hình 5.2b).

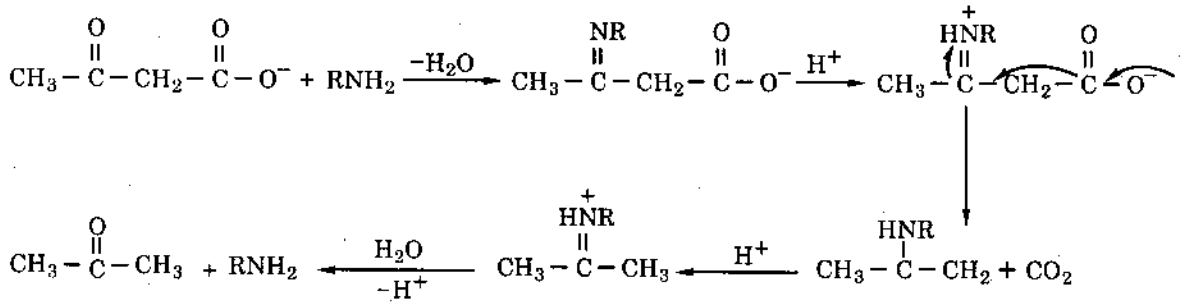
Xúc tác acid-base theo cách trên cũng xảy ra trong phản ứng thủy phân oligosaccharide do lysozyme xúc tác. Nhóm carboxyl của Glu-35 cho oxy glucoside của cơ chất một proton tạo điều kiện thuận lợi để cắt đứt liên kết –C-O-, và tạo thành carboncation, carbon này lại được làm bền nhờ nhóm carboxyl trong gốc R của Asp-52 ở bên cạnh (hình 5.3).



Hình 5.3. Cơ chế phản ứng xúc tác của Lysozyme các gốc Glu-35 và Asp-52 ở trong trung tâm kết hợp cơ chất của E

5.2.2. Xúc tác cộng hóa trị (intermediate formation)

Ví dụ phản ứng decarboxyl hóa acetoacetate được xúc tác bởi các amin bậc một bằng cách tạo thành và phân giải nhanh imine (base Schiff), hình 5.4.



Hình 5.4. Quá trình decarboxyl hóa acetoacetate do các amine bậc một xúc tác

Ngoài ra, phản ứng do E xúc tác còn có những đặc điểm khác như:

– Tương tác giữa các gốc trong TTHĐ tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo thành, hoặc cắt đứt các liên kết trong quá trình phản ứng.

– TTHĐ được định vị trong khe của phân tử, có các gốc không phân cực, có thể tạo điều kiện thuận lợi cho các phản ứng không hoặc khó xảy ra trong môi trường nước.

– Cơ chất kết hợp với E bằng nhiều liên kết nên bị vặn vẹo và dễ bị chuyển hóa.

5.3. BẬC PHẢN ỨNG

5.3.1. Phản ứng bậc một (first- order reaction)

Vận tốc phản ứng tỷ lệ với nồng độ của một chất phản ứng. Như vậy đối với phản ứng bậc một S → P xảy ra ở điều kiện áp suất và nhiệt độ không đổi, trong dung dịch loãng, vận tốc phản ứng v ở thời gian t sẽ là:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = +\frac{d[P]}{dt} = k[A]$$

trong đó: k là hằng số tốc độ phản ứng;

[A]: nồng độ của chất A ở thời gian t;

[P]: nồng độ của sản phẩm ở thời gian t.

$-\frac{d[A]}{dt}$ = tốc độ giảm [A];

$+\frac{d[P]}{dt}$ = tốc độ tăng [P]

5.3.2. Phản ứng bậc hai (second-order reaction)

Vận tốc phản ứng tỷ lệ với nồng độ của 2 chất phản ứng hoặc tỷ lệ với bình

phương nồng độ của một chất phản ứng. Ví dụ: phản ứng bậc hai A + B→ P xảy ra ở nhiệt độ và áp suất không đổi, trong dung dịch loãng, vận tốc phản ứng là:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} + \frac{d[P]}{dt} = k[A][B]$$

Đối với phản ứng bậc hai theo kiểu 2A→P,

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = +\frac{d[P]}{dt} = k[A]^2$$

Trong một số trường hợp nhất định, phản ứng bao gồm 2 chất phản ứng nhưng một chất có nồng độ rất cao (ví dụ như nước, do nồng độ của nó quá thừa, có thể xem là không thay đổi trong quá trình phản ứng) nên có thể xem là phản ứng *một cơ chất giả (pseudo single-reactant).*

5.3.3. Phản ứng bậc zero (zero-order reaction)

Vận tốc phản ứng không phụ thuộc vào nồng độ của bất kỳ chất phản ứng nào.

Chương 6

CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN VẬN TỐC PHẢN ỨNG ENZYME

Phản ứng do E xúc tác phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: nồng độ E, đặc tính và nồng độ của S, nhiệt độ, pH môi trường phản ứng, các ion kim loại, các chất vô cơ và hữu cơ khác (có tác dụng kìm hãm hay hoạt hoá E). Các yếu tố hoá lý không chỉ ảnh hưởng đến phản ứng E theo kiểu như đối với các phản ứng hoá học bình thường, mà còn ảnh hưởng đến *cấu trúc không gian, độ bền cấu trúc không gian, độ tích điện* của phân tử E, làm thay đổi hoạt độ xúc tác của nó.

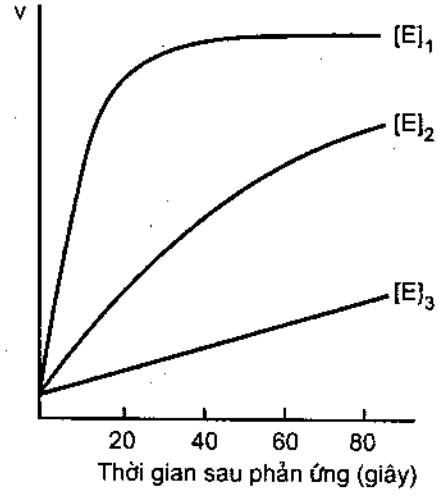
Sau đây sẽ giới thiệu tóm tắt ảnh hưởng của một số yếu tố đã nêu.

6.1. ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ E ([E])

Nói chung, trong điều kiện thừa cơ chất, tốc độ phản ứng phụ thuộc tuyến tính vào [E]:v = k[E]

v: vận tốc phản ứng ; [E]: nồng độ E.

Có trường hợp khi nồng độ E quá lớn, tốc độ phản ứng tăng chậm (hình 6.1).



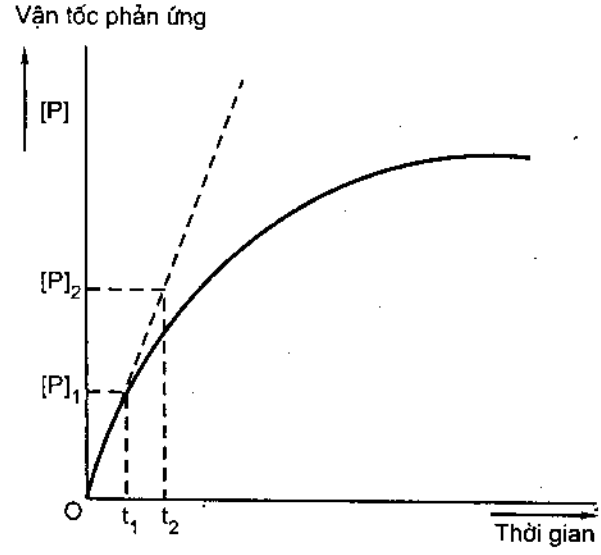
Hình 6.1. Ảnh hưởng nồng độ E đến vận tốc phản ứng
$[E_1] > [E_2] > [E_3]$

Nồng độ E quá lớn, chỉ sau khoảng thời gian rất ngắn, vận tốc phản ứng đã không đổi theo thời gian. Theo đồ thị này 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 E trước khi xác định hoạt độ E hoặc nghiên cứu động học phản ứng E.

6.2. ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CƠ CHẤT

6.2.1 Phương trình Henri và Michaelis – Menten

Henri (1903), Michaelis và Menten (1913) đã đưa ra phương trình biểu diễn mối liên hệ giữa vận tốc phản ứng với nồng độ cơ chất (S) giống nhau. Tuy nhiên khác với Henri, Michaelis và Menten đã tiến hành nhiều thí nghiệm và nhấn mạnh đến tầm quan trọng của *vận tốc đầu* v_0 (hình 6.2) của phản ứng chứ không phải là vận tốc (v) như Henri đã nêu.



Hình 6.2. Xác định vận tốc đầu phản ứng (v_0) bằng đồ thị

Lập đồ thị biểu diễn vận tốc phản ứng (sự tăng nồng độ sản phẩm) theo thời gian, vẽ đường tiếp tuyến của đồ thị, độ dốc của đường này là v_0.

$$v_o = \frac{[P]_2 - [P]_1}{t_2 - t_1}$$

Xét đến trường hợp đơn giản nhất, phản ứng chỉ có một cơ chất S, E xúc tác tạo thành một sản phẩm P (và E là E monomer, chỉ có một trung tâm kết hợp với S, chỉ tạo thành một phức chất trung gian ES):

$$S \longrightarrow P$$

Nếu chỉ xét đến vận tốc đầu (v_0) phản ứng, là lúc mà nồng độ sản phẩm chưa đáng kể và sự tạo thành ES từ sản phẩm (E + P) có thể bỏ qua, phản ứng xảy ra như sau:

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E+P \qquad (6.1)$$

Phức ES gọi là phức Míchaelis – Menten.

Michaelis – Menten giả định rằng *cân bằng* giữa E, cơ chất, và phức E cơ chất *được thiết lập ngay lập tức và duy trì* trong quá trình phản ứng, còn phản ứng phân

giải ES thành sản phẩm là quá chậm ($k_{-1} >> k_2$) không ảnh hưởng đến cân bằng, do đó hằng số cân bằng của giai đoạn đầu tiên (K_s) cũng là hằng số phân ly ES:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (6.2)$$

[E] là nồng độ E tự do, $[E_0]$ là nồng độ E ban đầu, $[ES] = [E_0] - [E]$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{[S] + K_s} \quad (6.3)$$

[S] là nồng độ cơ chất tự do khi phản ứng đạt đến cân bằng, cũng được xem là bằng nồng độ cơ chất ban đầu, vì nồng độ cơ chất trong phản ứng luôn lớn gấp nhiều lần nồng độ E, do đó có thể bỏ qua lượng S ở trong phức ES.

Vận tốc chuyển hoá ES thành sản phẩm phản ứng chi phối vận tốc chung của toàn bộ phản ứng: $v_0 = k_2[ES]$.

Vận tốc phản ứng đạt cực đại (V) khi toàn bộ E ban đầu đều kết hợp với S tạo thành phức ES, do đó $V = k_2[E_0]$. Như vậy:

$$\frac{v_0}{V} = \frac{[ES]}{E_0}$$

Thay [ES] từ phương trình (6.3) sẽ nhận được phương trình biểu diễn liên hệ giữa v_0 và [S] như sau:

$$V_0 = \frac{V[S]}{K_s + [S]} \quad (6.4)$$

Phương trình này chưa thể khái quát hết được các phản ứng E vì giả định cân bằng mà Michaelis – Menten đề ra *không sử dụng được cho các phản ứng E xảy ra với vận tốc đủ nhanh.*

6.2.2. Giả định trạng thái dừng (steady-state)

G. E.Briggs và John B.S. Haldane (1925) lần đầu tiên đã đề ra giả định ***trạng thái dừng*** có tính chất khái quát hơn. Theo giả định này, ở thời điểm đạt được trạng thái dừng (nồng độ ES không đổi), *vận tốc phản ứng tạo thành phức ES bằng vận tốc phân giải nó, bao gồm cả phản ứng phân giải ES tạo thành E và S, và phản ứng phân giải ES tạo thành P và E.* Các nghiên cứu với những phản ứng nhanh cho thấy giả định trạng thái dừng theo Briggs và Haldane phù hợp đối với phần lớn phản ứng do E xúc tác ở những điều kiện đã nêu. Trạng thái dừng thường được thiết lập trong vòng vài phần nghìn giây khi phản ứng bắt đầu và duy trì trong vài phút trước khi xảy ra phản ứng ngược tạo thành ES từ P và E. Phương trình biểu diễn trạng thái dừng như sau:

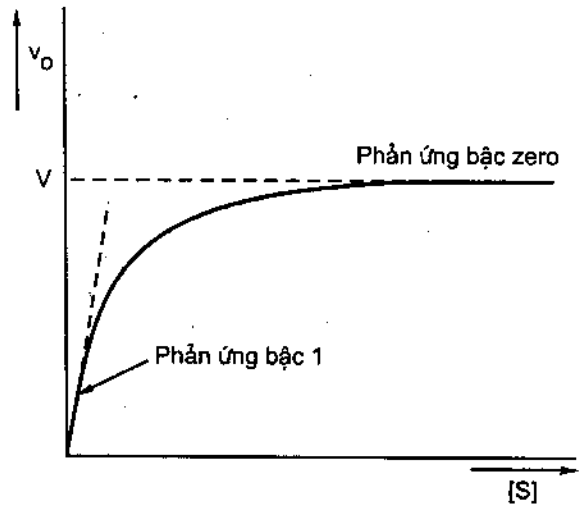
$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = [ES](k_{-1} + k_2)$$

Ký hiệu $K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$. Như vậy, $K_m = K_s + \frac{k_2}{k_1}$

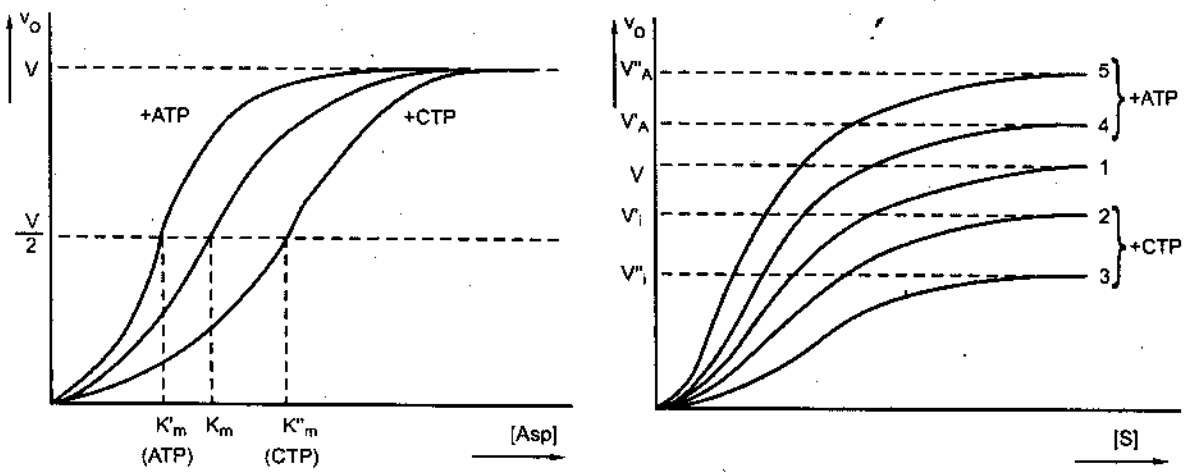
• Lập luận như trên, thay $K_s = K_m$ ta có: $v_0 = \dfrac{V[S]}{K_m + [S]} = \dfrac{V}{\dfrac{K_m}{[S]} + 1}$ (6.5)

Đây là phương trình Michaelis – Menten đã được Briggs – Haldane hoàn thiện. Có thể thấy phương trình (6.5) và (6.4) hoàn toàn giống nhau, chỉ khác về định nghĩa hằng số K, phương trình 6.5 vẫn gọi là phương trình Michaelis – Menten, hằng số $\mathbf{K_m}$ **gọi là hằng số Michaelis – Menten**, *giả định cân bằng của Michaelis – Menten được xem như là một trường hợp riêng (khi $k_{-1} >> k_2$) của giả định trạng thái dừng.*

Đồ thị biểu diễn phương trình (6.5) có dạng hyperbola vuông góc (hình 6.3).



Hình 6.3. Dạng chung của đường biểu diễn sự phụ thuộc của v_0 vào nồng độ cơ chất (ở một nồng độ E xác định)



Hình 6.4. Đường biểu diễn sự phụ thuộc của v_0 vào nồng độ cơ chất đối với E allosteric aspartate carbamoyltranspherase (ACT), (Eallosteric kiểu "K").

E này xúc tác cho phản ứng:

Carbamoyl phosphate + L-aspartate $\rightleftharpoons$ orthophosphate + N-carbamoyl- Asp.

1- không có chất điều hòa; 2, 3- có chất điều hòa âm CTP; 4, 5- có chất điều hòa dương ATP

6.2.3. Ý nghĩa của phương trình Michaelis – Menten ở dạng ban đầu cũng như dạng do Briggs – Haldane hoàn thiện là ở *tính phổ biến* của nó. Phương trình này không chỉ đúng trong trường hợp đơn giản như đã nêu trên (6.1), mà cũng áp dụng được đối với cả các trường hợp khác như: - phản ứng *nhiều cơ chất*, hoặc E có *hơn một trung tâm kết hợp* với cơ chất, hay phản ứng tạo thành *2 phức chất trung gian* (không chỉ ES mà còn thêm phức trung gian giữa E và P, phức EP). Trong trường hợp thứ nhất, chỉ thay đổi nồng độ một cơ chất, còn nồng độ các cơ chất khác thì giữ cố định; trường hợp thứ hai, cần phải giả sử không có tương tác giữa các trung tâm kết hợp; trường hợp thứ ba, bước chuyển từ ES thành EP là bước giới hạn tốc độ phản ứng.

Đối với các E allosteric, đường biểu diễn không có dạng hyperbola vuông góc như ở hình 6.3, mà ***có dạng gần như chữ S** (dạng sigmoid,* hình 6.4). Aspartate carbamoyltranspherase (E.C. 2.1.3.2) là E allosteric kiểu K (khi chất điều hoà kết hợp với E chỉ làm thay đổi K_m mà không ảnh hưởng đến V, xem mục 3.4.1).

Từ phương trình (6.5) có thể thấy, nếu $[S] = K_m$, $v_0 = V/2$. Nói cách khác, ***K_m** là nồng độ cơ chất mà ở đó vận tốc đầu phản ứng bằng một nửa vận tốc cực đại*. Vì vậy ***đơn vị đo K_m cũng là đơn vị đo nồng độ cơ chất*** như: M (mol), hay gram, % (nếu chưa biết khối lượng phân tử S, ví dụ các chất polymer phân tử lớn như tinh bột, protein...). Ở những điều kiện xác định về nhiệt độ, pH v.v... V thay đổi theo nồng độ E có mặt, còn trị số K_m thì không phụ thuộc nồng độ E, mà là đặc trưng cho từng E đối với mỗi cơ chất. Các phản ứng E mà k_1 và k_{-1} lớn hơn k_2 nhiều, K_m tương đương với K_s, K_m cũng phản ánh ái lực của E và S: K_m bé, ái lực của E với S lớn, và ngược lại. Vì vậy, việc *xác định trị số K_m có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu E.*

Trị số K_m của nhiều E nằm trong khoảng $10^{-2} – 10^{-6}$ mol l^{-1} (M l^{-1}, M dm^{-3}).

Trị số k_{cat} (turnover number, xem mục 4.3) của nhiều E vào khoảng từ 10 – 10^6/giây (10 – 10^6 s^{-1}); đối với cơ chất sinh lý k_{cat} của hầu hết E vào khoảng từ 1 – 10^4 s^{-1}. Một số E có k_{cat} cao như carbonic anhydrase, xúc tác cho phản ứng: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$, ở nồng độ E là 10^{-6}M, nó xúc tác cho phản ứng kết hợp CO_2 và H_2O tạo thành 0,4M H_2CO_3 trong 1 giây ở điều kiện bão hòa cơ chất, như vậy k_{cat} là 4×10^5 s^{-1} ($0,4/10^{-6} = 4 \times 10^5$).

Vận tốc cực đại $V = k_{cat}[E]$.

Tỷ lệ k_{cat}/K_m là ***hiệu năng xúc tác (catalytic effiency)*** của E, cũng được dùng để so sánh tính đặc hiệu của E đối với các cơ chất khác nhau (xem 4.2).

Vận tốc phản ứng (v, v_0, V) được biểu diễn theo nhiều cách khác nhau: *đơn vị* (units) hoặc *katal* (xem 2.1.2).

Điều đáng lưu ý là các hằng số động học ở trạng thái dừng được xác định trong các thí nghiệm *invitro:* ở pH và nhiệt độ thích hợp cho hoạt động của E, sử dụng E ở dạng tinh sạch v.v... Trong điều kiện *invitro*, ở tế bào sống, nhiều E cùng đồng thời hoạt động trong một vi môi trường, ở pH sinh lý, không phải là tối thích đối với mọi E; nhiệt độ trong cơ thể, nồng độ E cũng có thể khác với

nhiệt độ trong thí nghiệm *invitro*. Ngoài ra, một số yếu tố quan trọng khác của tế bào sống không có trong điều kiện thí nghiệm *invitro* (ví dụ như màng) nhưng có thể có ảnh hưởng đến hoạt động E. Vì vậy, mặc dù các nghiên cứu động học có giá trị đối với việc nghiên cứu và ứng dụng E trong thực tế, nhưng cần nhớ rằng những đặc tính của E nhận được từ các thí nghiệm *invitro* không hoàn toàn giống với trong cơ thể sống.

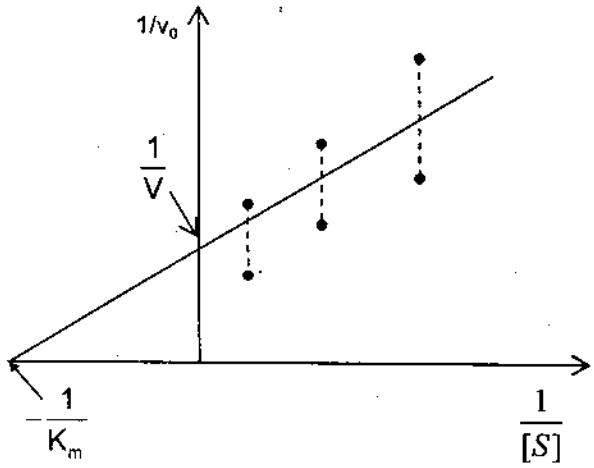
6.2.4. Xác định K_m và V

Các tham số K_m, V *đặc trưng cho tính đặc hiệu của một E đối với một S, đồng thời cũng cho biết vai trò của E trong trao đổi chất*, vì vậy đã có nhiều công trình nghiên cứu tìm phương pháp để có thể xác định nhanh và chính xác các tham số này.

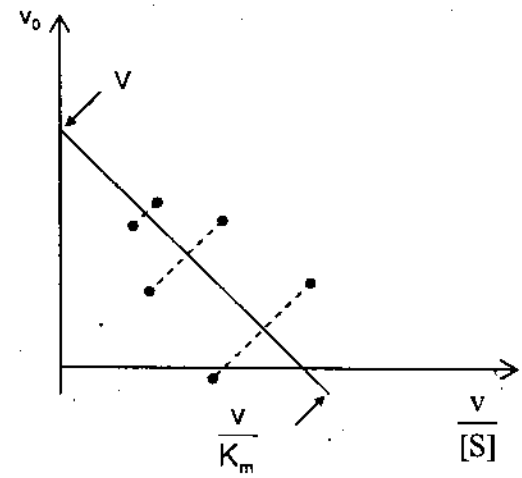
Đồ thị ở hình 6.3 cho thấy có thể xác định được K_m và V bằng cách làm nhiều thí nghiệm với các [S] khác nhau, đo v_0 tương ứng với mỗi nồng độ, và vẽ đồ thị. Tuy nhiên cần phải làm rất nhiều thí nghiệm với nhiều [S] khác nhau, mới có thể vẽ đúng được đoạn uốn cong của đường biểu diễn và tiếp cận được V, và thực tế cũng rất khó xác định được V. Như vậy cũng khó xác định được đúng K_m bằng đồ thị. Vì vậy nhiều tác giả đã sắp xếp lại các số hạng của phương trình Michaelis- Menten để nhận được các phương trình có đường biểu diễn thẳng, để có thể xác định K_m và V được thuận lợi, chính xác hơn với số lượng thí nghiệm ít hơn. Sau đây sẽ giới thiệu 4 dạng phương trình được dùng phổ biến (bảng 6.1).

Bảng 6.1. Các phương trình của Lineweaver – Burk (6.6), Eadie- Hofstee (6.7), Hanes (6.8), Eisenthal-Bowden (6.9)

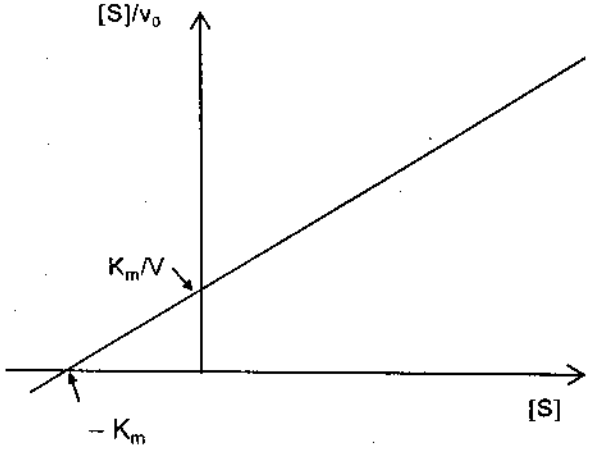
STT p/t	Tác giả	Phương trình	TT	TH	Cắt ở TT	Cắt ở TH	Độ dốc
6.6	Lineweaver - Burk	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$	$\frac{1}{v}$	$\frac{1}{[S]}$	$\frac{1}{V}$	$-\frac{1}{K_m}$	$\frac{K_m}{V}$
6.7	Eadie – Hofstee	$v = -K_m\frac{v}{[S]} + V$	v	$\frac{v}{[S]}$	V	$\frac{V}{K_m}$	$-K_m$
6.8	Hanes – Wilkinson	$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V}[S] + \frac{K_m}{V}$	$\frac{[S]}{v}$	[S]	$\frac{K_m}{V}$	$-K_m$	$\frac{1}{V}$
6.9	Eisenthal – Cornish Bowden	$V = v + \frac{v}{[S]}K_m$	v	-[S]	Các đường nối với S_1-v_1, S_2-v_2, S_n-v_n giao nhau ở một điểm có tung độ là V và hoành độ là K_m		



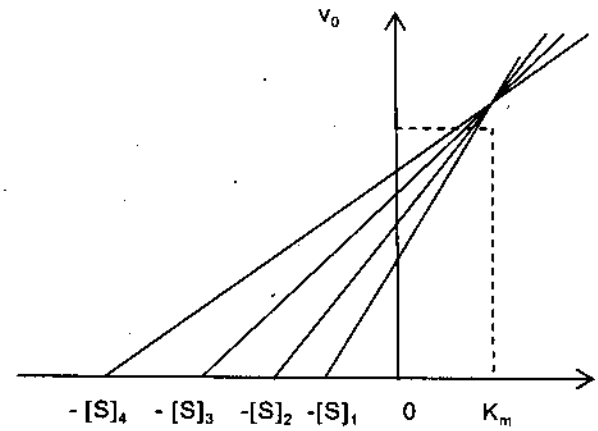
Hình 6.5. Đồ thị Lineawever-Burk



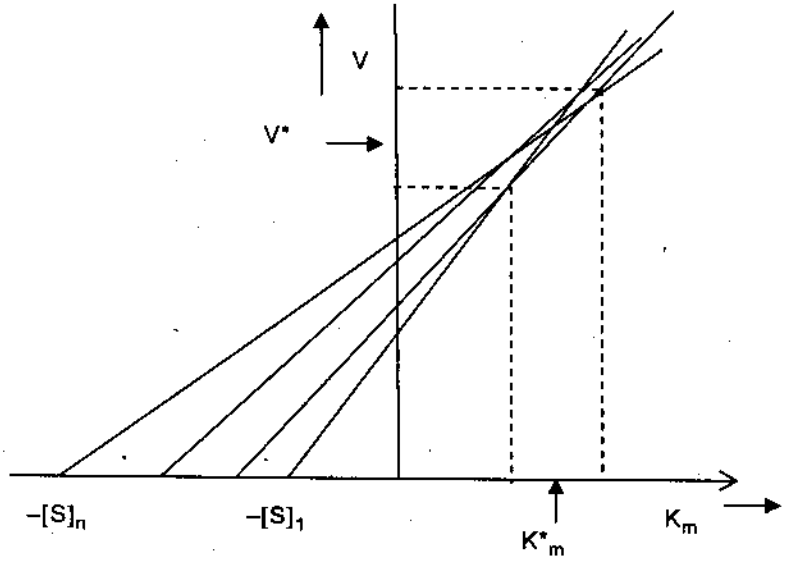
6.6. Đồ thị Eadie-Hofstee



Hình 6.7. Đồ thị Hanes



Hình 6.8a. Đồ thị Eisenthal-Cornish-Bowden



Hình 6.8b. Đồ thị Eisenthal-Cornish-Bowden

V* ước tính gần đúng nhất giá trị của V; K_m* ước tính gần đúng nhất giá trị của K_m

– Phương trình Lineweaver – Burk (1934) (6.6): Dùng cách đơn giản nhất là lấy số nghịch đảo của phương trình Michaelis- Menten (6.5), nhận được phương trình có dạng y = ax + b, đường biểu diễn của nó là đường thẳng (hình 6.5), cắt trục tung ở điểm 1/V và cắt trục hoành ở điểm – $1/K_m$, từ đó dễ dàng tính được K_m và V. Với phương pháp này có thể xác định với các nồng độ cơ chất bất kỳ, gần với [S] bão hoà. Phương trình Lineweaver – Burk cho đến nay vẫn *được dùng khá phổ biến* vì có thể nhận được các dẫn liệu thực nghiệm tốt với nhiều nồng độ cơ chất khác nhau. Tuy nhiên cũng có một số ý kiến phê phán như sau: *sự phân bố sai số không đồng đều* ở các vùng nồng độ cơ chất khác nhau, ở vùng nồng độ S thấp, sai số v_0 bé nên sai số của 1/V lớn, điểm khởi đầu của đường biểu diễn không rõ ràng.

– Phương trình Eadie- Hofstee (6.7): Nhân hai vế của phương trình Lineweaver – Burk với v_0 V, nhận được phương trình có đường biểu diễn thẳng, dễ dàng xác định được K_m và V (hình 6.6), và sự phân bố sai số đồng đều hơn.

– Phương trình Hanes (6.8): Nhân hai vế của phương trình Lineweaver – Burk với [S], đồ thị biểu diễn phương trình này cũng có dạng thẳng (hình 6.7).

– Đồ thị Eisenthal và Cornish-Bowden (6.9) (1974). Các tác giả này đã sử dụng phương pháp *hoàn toàn khác với các phương pháp đã nêu*, lập trục toạ độ, trong đó trục tung là V, trục hoành là K_m (hình 6.8), nhưng vẫn căn cứ vào phương trình Michaelis – Menten (6.5). Dạng nghịch đảo của phương trình 6.5 (ở nồng độ E cố định) có dạng như sau:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V[S]}$$

$$\frac{V}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{[S]} \text{ do đó ta có: } V = v_0 + \frac{v}{[S]} K_m \qquad (6.9)$$

Trong trường hợp v_0, [S] không đổi, trục toạ độ của V đối K_m (trục tung là V, trục hoành là K_m) là đường thẳng. Khi $K_m = 0$, $V = v_0$ và khi V = 0, $K_m = -[S]$. Vì vậy, với mỗi một cặp v_0 ứng với một nồng độ S, có thể vẽ một đường thẳng bằng cách ghi trị số v_0 trên trục V (trục tung) và –[S] trên trục K_m (trục hoành). Ở cùng một nồng độ E, nếu không có sai số thực nghiệm thì khi kéo dài các đường này về phía bên phải, chúng sẽ cắt nhau ở một điểm, có hoành độ là K_m và tung độ là V (hình 6.8a). Tuy nhiên do các sai số thực nghiệm nên thường nhận được một số điểm giao nhau của các đường này. Vì vậy để xác định K_m và V chính xác hơn, nên lấy số trung bình của các trị số K_m và V nhận được tương ứng với các điểm cắt đó (hình 6.8b, K^*, V^*).

Phương pháp này có ưu điểm là xác định được ngay K_m và V trên đồ thị mà không cần phải tính. Điểm yếu của phương trình này là không thuận lợi khi sử dụng cho các phản ứng nhiều cơ chất.

– Hệ thức Haldane đối với các phản ứng thuận nghịch:

Theo giả định của mô hình Michaelis-Menten (6.2.1), các phản ứng theo chiều ngược có thể bỏ qua nhưng nhiều phản ứng do E xúc tác trong tế bào có tính thuận nghịch cao, do đó việc so sánh động học của phản ứng thuận và phản ứng nghịch có ý nghĩa quan trọng. Xét trường hợp đơn giản nhất, phản ứng chỉ có một cơ chất tạo

thành một sản phẩm $S \rightleftarrows P$, tạo thành một phức trung gian theo chiều thuận là ES, và phức trung gian theo chiều ngược là EP: $S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES/EP \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} P + E$

Ở một nồng độ E xác định, phương trình Michaelis - Menten của phản ứng thuận và phản ứng nghịch như sau:

$$v_t = \frac{V^s[S]}{K_m^s + [S]}; \text{ và } v_n = \frac{V^p[S]}{K_m^p + [P_0]}$$

$$K_m^s = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; K_m^p = \frac{k_{-1} + k_2}{k_2} \quad (6.10)$$

$$V^s = k_2[E_0] \quad V^p = k_{-1}[E_0] \quad (6.11)$$

$$\frac{V^s}{V^p} = \frac{k_2}{k_{-1}} \quad (6.12)$$

trong đó v_t, V^s là vận tốc đầu và vận tốc cực đại của phản ứng thuận; v_n, V^P là vận tốc đầu và vận tốc cực đại của phản ứng nghịch; cũng tương tự như vậy, $K^s{}_m$, K^p m là hằng số cân bằng của phản ứng thuận và phản ứng nghịch (theo thứ tự tương ứng).

Khi cân bằng, vận tốc phản ứng thuận bằng vận tốc phản ứng nghịch, ta có:

$$\frac{[ES]}{E} = \frac{k_1}{k_{-1}}[S]_{cb} = \frac{k_{-2}}{k_2}[P]_{cb} \quad (6.13)$$

($[S]_{cb}$ và $[P]_{cb}$ là nồng độ cơ chất và nồng độ sản phẩm khi phản ứng cân bằng)

Như vậy, hằng số cân bằng của toàn phản ứng (từ $S \rightarrow P$) là K_{cb} sẽ là:

$$K_{cb} = \frac{[P]_{cb}}{[S]_{cb}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} \quad (6.14)$$

Theo phương trình (6.10): $\frac{K_m^p}{K_m^s} = \frac{k_1}{k_{-2}}$ (6.15)

Thay các tỷ lệ của các hằng số cân bằng từ các phương trình (6.12) và (6.15) vào phương trình (6.14) sẽ có:

$$k_{cb} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = \frac{V_s K_m^p}{V_p K_m^s} \quad (6.16)$$

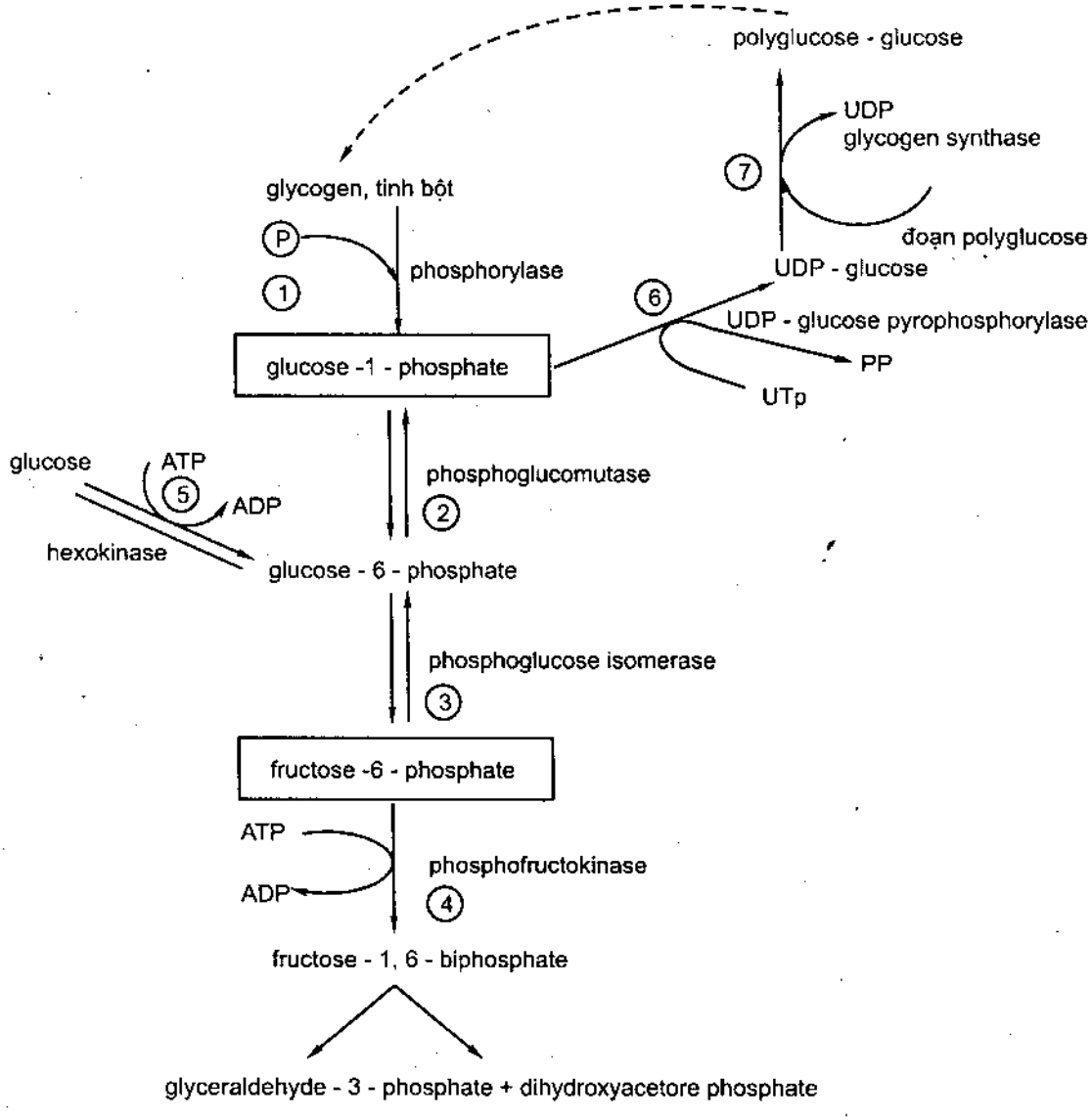
Phương trình (6.16) là hệ thức Haldane. Hệ thức này cho thấy *các tham số động học của phản ứng E thuận nghịch không độc lập với nhau, mà có quan hệ với nhau qua hằng số cân bằng của phản ứng tổng thể.*

Tuy nhiên cũng cần nhớ rằng *các số liệu động học không thể minh họa được rõ ràng cơ chế phản ứng.* Việc đo động học trạng thái dừng chỉ có thể mô tả hiện tượng xúc tác của E nhưng chưa xác định được bản chất của các chất trung gian. Để phát hiện các chất trung gian phải dùng các phương pháp khác như phân tích khối phổ.

6.2.5. Ý nghĩa của K_m đối với con đường chuyển hoá các chất trong cơ thể sống

Trong hệ thống sống, một chất có thể được chuyển hoá theo các con đường khác nhau, đi vào các quá trình trao đổi chất (TĐC) khác nhau tuỳ thuộc nhiều yếu tố,

trong đó có K_m. Trị số K_m của E xúc tác cho phản ứng đầu tiên của mỗi con đường TĐC là một trong các yếu tố quyết định một chất sẽ bị chuyển hoá theo hướng nào. Ví dụ: các hexose-phosphate (HP) như glucose-6-phosphate (G-6-P), glucose-1-phosphate (G-1-P), fructose-6-phosphate (F-6-P) trong tế bào có thể chuyển hoá tương hỗ lẫn nhau để đi vào quá trình đường phân (glycolyis), hay được sử dụng để tổng hợp glycogen (hình 6.9). Trong số các E xúc tác cho các phản ứng đã ghi trên hình, K_m của phosphofructokinase (PFKase) đối với F-6-P bé hơn nhiều so với K_m của E xúc tác cho phản ứng đầu tiên (phản ứng 6, hình 6.9) sử dụng G-1-P để tổng hợp glycogen. Do đó, ở hầu hết các nồng độ của HP, PFKase được bão hoà cơ chất lớn hơn các E xúc tác cho quá trình tổng hợp glycogen nên phần lớn HP được sử dụng cho quá trình đường phân. Khi nồng độ HP cao, PFKase đã hoàn toàn bão hoà cơ chất, các HP được sử dụng theo hướng tổng hợp glycogen.



Hình 6.9. Các E tham gia vào giai đoạn chuẩn bị của quá trình đường phân (glycolysis). K_m của PFK- ase đối với F-6-P bé

Trị số K_m của các iso E đối với cùng một cơ chất cũng có thể khác nhau, điều này có ý nghĩa trong quá trình TĐC. Ví dụ: *hexokinase* (cũng gọi là *glucokinase* E.C. 2.7.1.2) xúc tác cho phản ứng 5 (hình 6.9) có các iso E I, II, III, IV, trong đó K_m của iso E IV đối với glucose cao (≅10mmol dm^{-3}), còn các dạng khác I-III có K_m thấp hơn (khoảng 40μmol dm^{-3}). Vì vậy, khi nồng độ glucose trong máu ở mức bình thường, các iso E I-III hoạt động với tốc độ cực đại, còn iso E IV chỉ làm việc với 25% vận tốc cực đại của nó. Sau khi ăn carbohydrate, mức độ glucose trong máu tăng lên đến khoảng 9,5mmol dm^{-3}, hoạt động của iso E IV mới tăng đến 50% vận tốc cực đại của nó. Như vậy iso E IV chỉ làm việc khi thừa glucose, để chuyển hoá nó thành G-6-P bắt đầu chuyển theo hướng tổng hợp thành dạng dự trữ glycogen.

Người ta cũng phát hiện được sự sai khác về mức độ hoạt động của hexokinase (% V của nó) của *mô cơ* giữa các loài động vật khác nhau: ở phần lớn động vật có vú E chỉ hoạt động với vận tốc bằng 28% V; ở mô cơ bay của ong và chim ruồi, ở mức 74 và 98% V.

Trong cơ thể, nhiều phản ứng của quá trình TĐC là những phản ứng thuận nghịch, chiều hướng của phản ứng tuỳ thuộc vào nồng độ của cơ chất và sản phẩm của phản ứng trong tế bào. Nhưng nói chung, hình như *K_m của phản ứng theo chiều TĐC quan trọng thường bé hơn K_m của phản ứng theo chiều ngược lại.*

6.3. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT KÌM HÃM (INHIBITOR)

Các chất kìm hãm (I), cũng gọi là chất ức chế, là những chất làm giảm tốc độ phản ứng do E xúc tác. Các chất này có bản chất hoá học rất khác nhau, có thể là các ion, các chất vô cơ hay hữu cơ, có thể là cơ chất hay là sản phẩm của phản ứng E. Các chất này có thể tác dụng theo nhiều cách khác nhau như: *đặc hiệu* hoặc *không đặc hiệu*, có thể kìm hãm *thuận nghịch* hay *không thuận nghịch* (*inactivator*). Các chất I thuận nghịch kết hợp với E theo cách thuận nghịch, hoạt độ của E có thể được hồi phục sau khi làm giảm nồng độ của I bằng cách thẩm tích hay pha loãng. Tác dụng kìm hãm của I không thuận nghịch không bị loại bỏ khi thẩm tích. Tuy nhiên ranh giới giữa hai loại này cũng không phải là tuyệt đối, cũng có khi có thể loại bỏ chất I không thuận nghịch bằng cách đưa một chất khác vào, hoặc có khi I kết hợp với E rất chặt và tách khỏi E rất chậm.

Sau đây chúng ta chỉ xét đến *các chất kìm hãm **thuận nghịch**, kìm hãm E bằng cách kết hợp với nó và làm ảnh hưởng đến sự kết hợp của E với S*, tức là ảnh hưởng đến hoạt độ phân tử của nó. Xem xét ***trường hợp đơn giản nhất*** như đã nêu ở (5.2), phản ứng do E monomer xúc tác, chỉ có một cơ chất S và tạo thành một sản phẩm P, ***tuân theo phương trình Michaelis- Menten***.

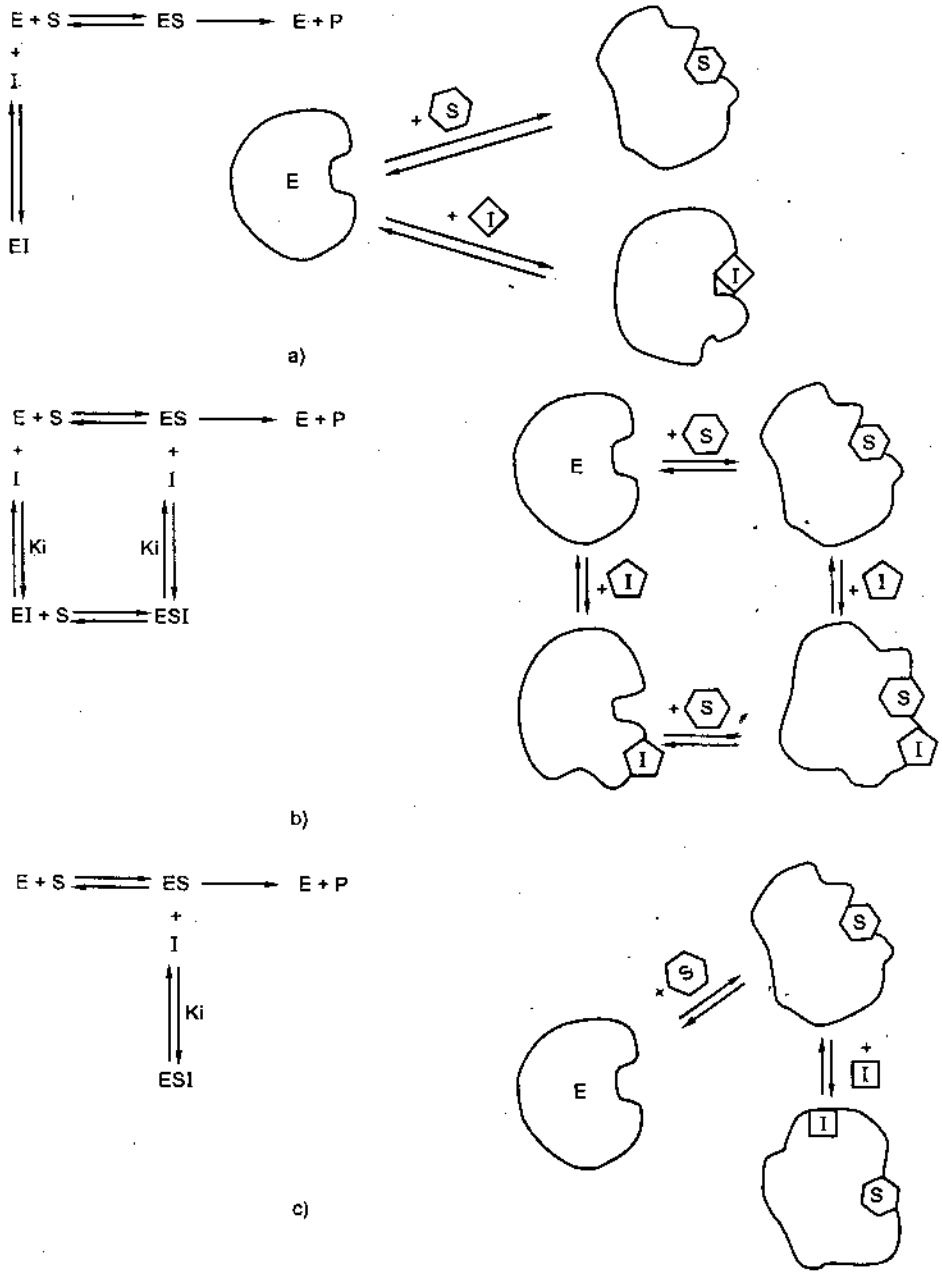
Các I này có thể tác dụng theo các kiểu khác nhau, người ta thường phân biệt thành các kiểu sau: cạnh tranh (một phần hay toàn phần), không cạnh tranh, phi cạnh tranh. Sau đây sẽ giới thiệu chi tiết hơn về các kiểu này.

6.3.1. Các chất kìm hãm cạnh tranh

6.3.1.1. Khái niệm

Các I này có cấu trúc tương tự với cấu trúc của cơ chất bình thường của E, do đó

nó cảm ứng sự hình thành TTHĐ của E theo cách giống với S và *cạnh tranh với S* để kết hợp vào TTHĐ của E, nhưng khác với S ở chỗ nó không bị chuyển hoá bởi E (hình 6.10). Ví dụ: ***I cạnh tranh*** của ***succinate dehydrogenase*** (E.C. 1.3.99.1, xúc tác cho phản ứng chuyển hóa succinate thành fumarate) là ***malonate*** ($^-OOC–CH_2–COO^-$) có cấu trúc rất giống với succinic acid ($^-OOC–CH_2–CH_2COO^-$), chỉ ít hơn một nhóm $–CH_2–$ nên không bị chuyển hóa bởi E. Điều này củng cố cho giả thuyết là trung tâm kết hợp của E có 2 nhóm tích điện dương được sắp xếp ở các vị trí thích hợp để kết hợp với 2 nhóm carboxylate của cơ chất hoặc của chất kìm hãm.



Hình 6.10. Sơ đồ minh hoạ các kiểu kìm hãm

a) Kìm hãm cạnh tranh; b) Kìm hãm không cạnh tranh; c) Kìm hãm phi cạnh tranh

6.31.2. Ảnh hưởng của I cạnh tranh đến v_0 theo phương trình Michaelis-Menten, ở trạng thái dừng.

Trên hình 6.10a, gọi K_i là hằng số phân ly của phản ứng giữa E và I, và cân bằng được thiết lập nhanh chóng, ta có:

$$K_i = \frac{k_{-i}}{k_i} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

K_i là hằng số kìm hãm. K_i càng lớn, phức chất càng dễ phân ly, ái lực giữa E và I thấp và ngược lại. Tính v_0 của phản ứng theo cách giống như ở mục (6.2.1) chỉ khác là ở đây có thêm phức EI:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI]$$

E ở trong phức EI không thể phản ứng với S. *Chất I cạnh tranh tác dụng theo cách làm giảm nồng độ E có thể kết hợp với S.*Tính theo cách tương tự như ở mục (6.2.2), thay vào phương trình $[E_0] = [E] + [ES] + [EI]$:

$$[E] = \frac{K_m[ES]}{[S]} \tag{6.17}$$

$$[EI] = \frac{[E][I]}{K_i} = \frac{K_m[ES][I]}{[S]K_i} \tag{6.18}$$

Chúng ta đã biết:

$$\frac{v_0}{V} = \frac{[ES]}{E_0} \rightarrow v_0 = \frac{V[ES]}{E_0} \tag{6.19}$$

$$v_0 = \frac{V}{\frac{K_m}{[S]}\left[1 + \frac{[I]K_i}{K_i}\right] + 1} \tag{6.20}$$

đặt

$$K_p = K_m\left[1 + \frac{[I]}{K_i}\right] \tag{6.21}$$

sẽ có

$$\mathbf{v_0 = \frac{V}{\frac{K_p}{[S]} + 1}} \tag{6.22}$$

Đối chiếu với phương trình Michaelis-Menten, trạng thái dừng (6.5) ta thấy có dạng hoàn toàn giống nhau, chỉ khác là K_m biểu kiến tăng lên $(1 + [I]/ K_i)$ lần. Như vậy, đối với ***kiểu kìm hãm cạnh tranh V không thay đổi, K_m biểu kiến (K_p) tăng lên (1 + [I] / K_i lần).*** Khi Kp = [S], $v_0 = V/2$, K_i bằng nồng độ của chất I cạnh tranh mà ở đó K_m tăng lên 2 lần (hay Km bằng 1/2 K_p). Phương trình Lineawever – Burk khi có chất kìm hãm cạnh tranh sẽ là:

$$\mathbf{\frac{1}{v_0} = \frac{K_p}{V}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}} \tag{6.23}$$

Đường biểu diễn phương trình Lineawever và Burk khi có I cạnh tranh trên hình 6.11 cắt trục hoành ở điểm -1/ K_p, cắt trục tung ở điểm 1/V.

Phương trình 6.20, cho thấy khi [S] >> [I] thì $\frac{K_m}{[S]}\frac{[I]}{K_i} \rightarrow 0$

Điều này xác nhận *đặc điểm của kiểu kìm hãm cạnh tranh là có thể bị loại trừ khi nồng độ cơ chất đủ lớn hơn nồng độ chất kìm hãm.* Do I và S có khuynh hướng cạnh tranh, đẩy nhau ra khỏi TTHĐ của E nên mức độ kìm hãm của các I cạnh tranh phụ thuộc vào tương quan nồng độ của I và S, ái lực tương đối của I và S đối với E.

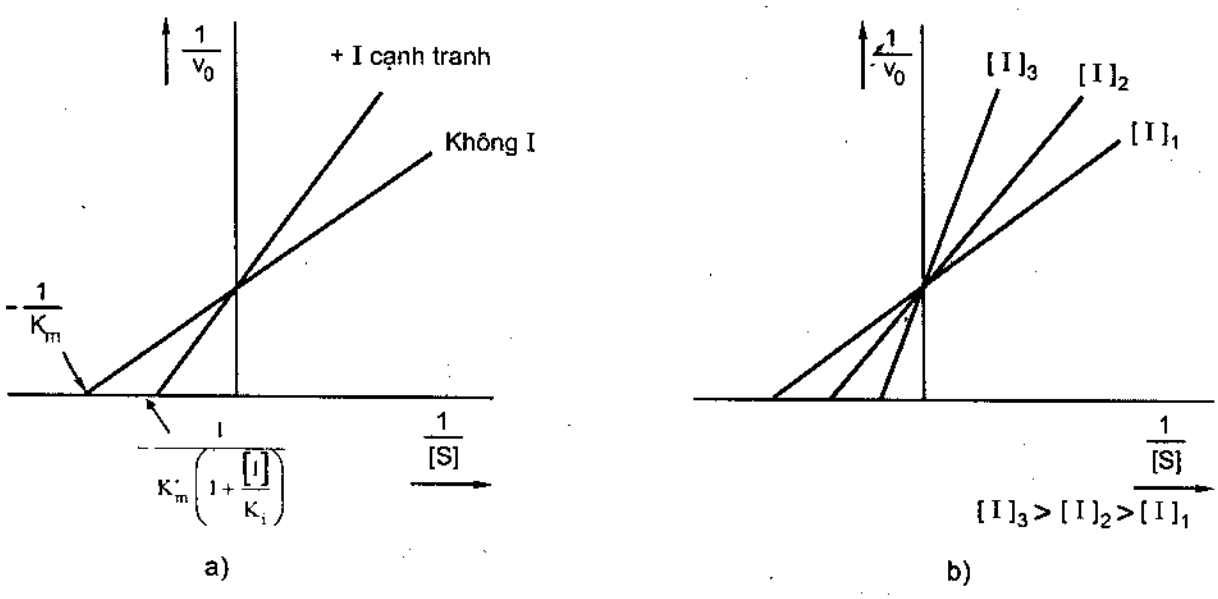
Cũng cần lưu ý rằng, trong trường hợp E kết hợp với I ở trung tâm khác với trung tâm kết hợp với S, nhưng sau khi E đã kết hợp với S sẽ làm thay đổi cấu trúc không gian làm cho E không thể kết hợp với I, nghĩa là I chỉ kết hợp với E chứ không kết hợp với ES, cũng sẽ nhận được phương trình (6.20) và (6.22). Vì vậy, *đặc điểm quan trọng của kiểu kìm hãm cạnh tranh là khi có I, vẽ đồ thị Lineawever và Burk chỉ K_m thay đổi còn V không đổi.*

6.3.1.3. Xác định K_i của I cạnh tranh

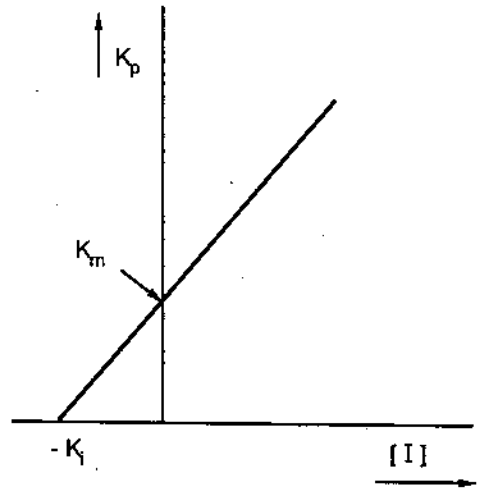
– Phương trình (6.21): $K_p = K_m(1 + [I] / K_i)$ hay:

$$K_p = \frac{K_m}{K_i}[I] + K_m$$

Trị số K_p có thể xác định được bằng đồ thị, lập đồ thị K_p đối [I] (K_p ở trục tung, [I] ở trục hoành), nhận được đường biểu diễn thẳng, điểm cắt trục hoành (khi K_p bằng 0) là $-K_i$ (hình 6.12).



Hình 6.11. Đồ thị Lineawever-Burk khi có I cạnh tranh (a), với các nồng độ I khác nhau (b)



Hình 6.12. Đồ thị biểu diễn K_p đối [I] khi có I cạnh tranh để xác định K_i

6.3.1.4. Ứng dụng các chất kìm hãm cạnh tranh

Có thể sử dụng các I cạnh tranh để: *nghiên cứu TTHĐ* cũng như *cơ chế xúc tác của E, con đường trao đổi chất*. Mặt khác cũng có thể sử dụng các I cạnh tranh trong *điều trị bệnh*.

Ví dụ:

– ***Krebs*** và cộng sự đã sử dụng chất I cạnh tranh của succinate dehydrogenase để nghiên cứu chu trình tricarboxylic acid.

– *Sulphanilamide* (H_2N–⬡–SO_2NH_2) là I cạnh tranh của các E vi khuẩn tham gia trong quá trình sinh tổng hợp CoE tetrahydrofolate từ p-aminobenzoic (H_2N–⬡–CO_2H), được sử dụng để ***hạn chế sự sinh trưởng của vi khuẩn*** và ít độc hại đối với người.

– *Methotrexate* (*amethopterin*) có cấu trúc tương tự *dihydrofolate*, là I cạnh tranh của *dihydrofolate reductase* (E.C. 1.5.1.3). E này xúc tác cho phản ứng khử dihydrofolate thành tetrahydrofolate, một cofactor quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp dTMP, nguyên liệu để tổng hợp ADN. Các tế bào phân giải nhanh như tế bào ung thư nhạy với methotrexate hơn tế bào bình thường, do đó khi uống methotrexate, sẽ giết tế bào ung thư và không có phản ứng phụ.

6.3.2. Các chất kìm hãm không cạnh tranh (non- competitive inhibition)

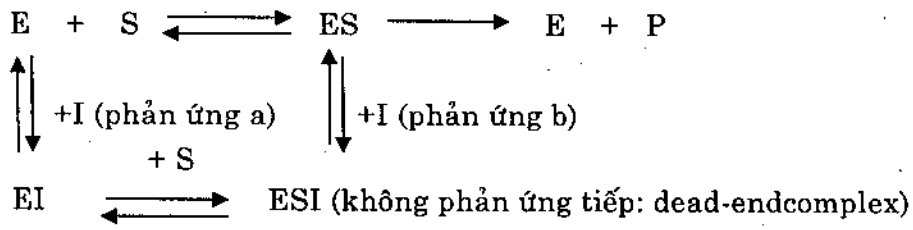
6.3.2.1. Khái niệm

I không cạnh tranh kết hợp với E ở vị trí khác với vị trí kết hợp của S tạo thành phức ESI không bị chuyển hoá tiếp (deadl-end complex).

Do đó E có thể đồng thời kết hợp cả I và S (hình 6.10b). Như vậy S và I không cạnh tranh với nhau để kết hợp với E và cũng không thể loại trừ tác dụng kìm hãm bằng cách tăng nồng độ S. Mặc dù I không cạnh tranh kết hợp ở vị trí khác nhưng sẽ làm thay đổi cấu trúc không gian theo hướng không thuận lợi cho hoạt động xúc tác của E làm giảm vận tốc phản ứng.

6.3.2.2. Ảnh hưởng của I không cạnh tranh đến v_0

Xét trường hợp đơn giản nhất: kìm hãm không cạnh tranh tuân theo phương trình Michaelis-Menten và khi S kết hợp với E không ảnh hưởng đến sự kết hợp với I và ngược lại. Khi phản ứng chỉ có một S, tạo thành một sản phẩm, theo phương trình ở hình 6.10b ta có:



Theo giả định trên, hằng số kìm hãm K_i của phản ứng (a) và phản ứng (b) là hoàn toàn giống nhau, do đó:

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

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

Nồng độ E ban đầu là [Eo] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]

[E] nồng độ E tự do khi phản ứng đạt đến cân bằng.

Thay [EI], [ESI] từ các phương trình trên sẽ có:

$$[E] = \frac{K_m[ES]}{[S]}; \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_i}; \quad [ESI] = \frac{[ES][I]}{K_i}$$

$$[E_0] = \frac{K_m[ES]}{[S]} + [ES] + \frac{[ES][I]}{K_i} + \frac{K_m[ES]}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i}$$

Như đã lập luận ở mục (6.2.1):

$$V_0 = \frac{V[ES]}{[E_0]}, \text{ do đó:}$$

$$V_0 = \frac{V}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{K_m}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i}} \qquad (6.24)$$

$$V_0 = \frac{V}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[I]}{K_i}\left[1 + \frac{K_m}{[S]}\right]}$$

Đặt $\frac{K_m}{[S]}+1$ làm thừa số chung

$$V_0 = \frac{V}{\left[\frac{K_m}{[S]}+1\right]\left[1+\frac{[I]}{K_i}\right]}$$

Ký hiệu $$V_{kct} = \frac{V}{1+\frac{[I]}{K_i}}$$

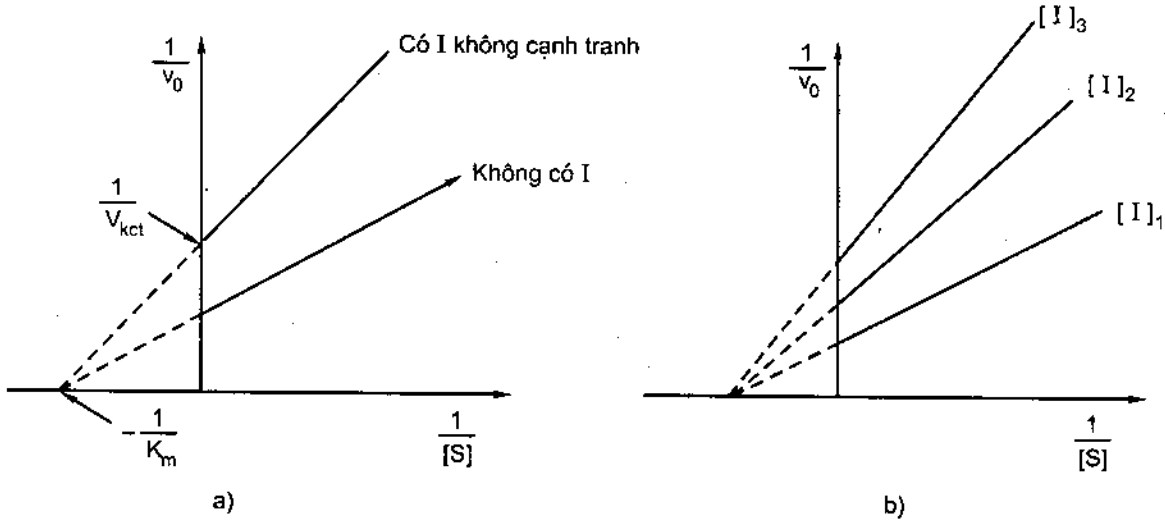
$$\mathbf{V_0 = \frac{V_{kct}}{\frac{[K_m]}{[S]}+1}} \qquad \textbf{(6.25)}$$

Phương trình hoàn toàn giống phương trình Michaelis-Menten nhưng V bị giảm $\left[1+\frac{[I]}{K_i}\right]$ lần.

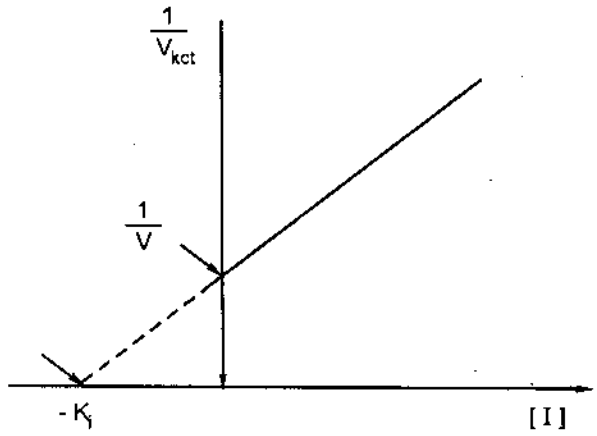
Tóm lại, trong trường hợp kìm hãm *không cạnh tranh (non-competitive inhibition)* theo mô hình đơn giản nhất, *tốc độ cực đại V bị giảm còn K_m không thay đổi.* Biểu diễn theo phương trình Lineawerer-Burk ta có:

$$\mathbf{\frac{1}{v_0} = \frac{K_m 1}{V_{kct}[S]} + \frac{1}{V_{kct}}} \qquad \textbf{(6.26)}$$

Đường biểu diễn của phương trình (6.26) thẳng, cắt trục tung ở điểm $1/V_{kct}$ và cắt trục hoành ở điểm $-1/K_m$ (giống như khi không có chất kìm hãm) (hình 6.13).



Hình 6.13. Ảnh hưởng của I không cạnh tranh đến đồ thị Lineawever– Burk khi không có (a) và có I không cạnh tranh (b), với các nồng độ I khác nhau, $[I]_3 > [I]_2 > [I]_1$



Hình 6.14. Xác định K_i bằng đồ thị (I không cạnh tranh)

Phương trình (6.24) và 6.25) cũng có thể được thiết lập xuất phát từ giả định I kết hợp với E không ảnh hưởng đến việc kết hợp với S. Nói cách khác hằng số cân bằng của phản ứng $E + S \rightleftharpoons ES$ và hằng số cân bằng của phản ứng $EI + S \rightleftharpoons EIS$ bằng nhau, ($K_{SI} = K_m$). Cũng lập luận tương tự như trên, ta có:

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

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

$$[ESI] = \frac{[EI][S]}{K_{SI}} = \frac{K_m[ES]}{[S]} \; \frac{[I]}{K_i} \cdot \frac{[S]}{K_{SI}}$$ như trên đã giả định $K_{SI} = K_m$

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

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$= \frac{K_m[ES]}{[S]} + [ES] + \frac{K_m[ES][I]}{[S]K_i} + [ES]\frac{[I]}{K_i}$$

$$v_0 = \frac{V[ES]}{[E_0]}$$

$$v_0 = \frac{V}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{K_m}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i}}$$

Phương trình hoàn toàn giống với phương trình (6.24), tiếp tục thực hiện như trên sẽ được phương trình (6.26).

6.3.2.3. Xác định K_i của I không cạnh tranh

Trong phương trình trên ta đã đặt

$$V_{kct} = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

do đó $\frac{1}{V_{kct}} \frac{1}{V}\left[1 + \frac{[I]}{K_i}\right]$

Lập trục toạ độ: $\frac{1}{V_{kct}}$ đối [I] (trục tung là $\frac{1}{V_{kct}}$, trục hoành là [I]), đường biểu diễn là đường thẳng, cắt trục tung ở $\frac{1}{V}$, cắt trục hoành ở $-K_i$ (hình 6.14):

Từ phương trình trên khi $\frac{1}{V_{kct}} = 0$, $\frac{1}{V}\frac{[I]}{K_i} = -\frac{1}{V}$

$[I] = -K_i$ (điểm cắt trục hoành);

khi $[I] = 0$, $\frac{1}{V_{kct}} = \frac{1}{V}$ (điểm cắt trục tung)

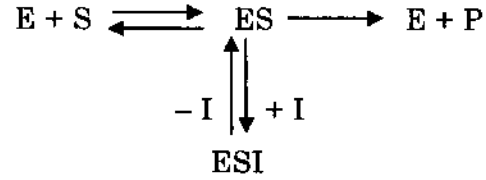
6.3.3. Kìm hãm phi cạnh tranh (uncompetitive inhibition)

6.3.3.1 Khái niệm

Các chất I phi cạnh tranh *chỉ kết hợp với phức E-cơ chất (ES)* và không kết hợp với E tự do. Trong trường hợp này, có thể là khi E kết hợp với S làm thay đổi dạng không gian của phân tử, tạo thành trung tâm kết hợp với I. Như vậy, I sẽ không bao giờ cạnh tranh với S để kết hợp vào vị trí của S trong phân tử E, nên không thể loại bỏ tác dụng kìm hãm bằng cách tăng nồng độ cơ chất.

6.3.3.2. Ảnh hưởng của I phi cạnh tranh đến v_0

Xét trường hợp đơn giản nhất, ở trạng thái dừng, phương trình động học như sau:



$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]};\ K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$[E] = \frac{K_m[ES]}{[S]};\ [ESI] = \frac{[ES][I]}{K_i}$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [ESI]$$

$$= \frac{K_m[ES]}{[S]} + [ES] + \frac{[ES][I]}{K_i};\ v_0 = \frac{V[ES]}{[E_0]}$$

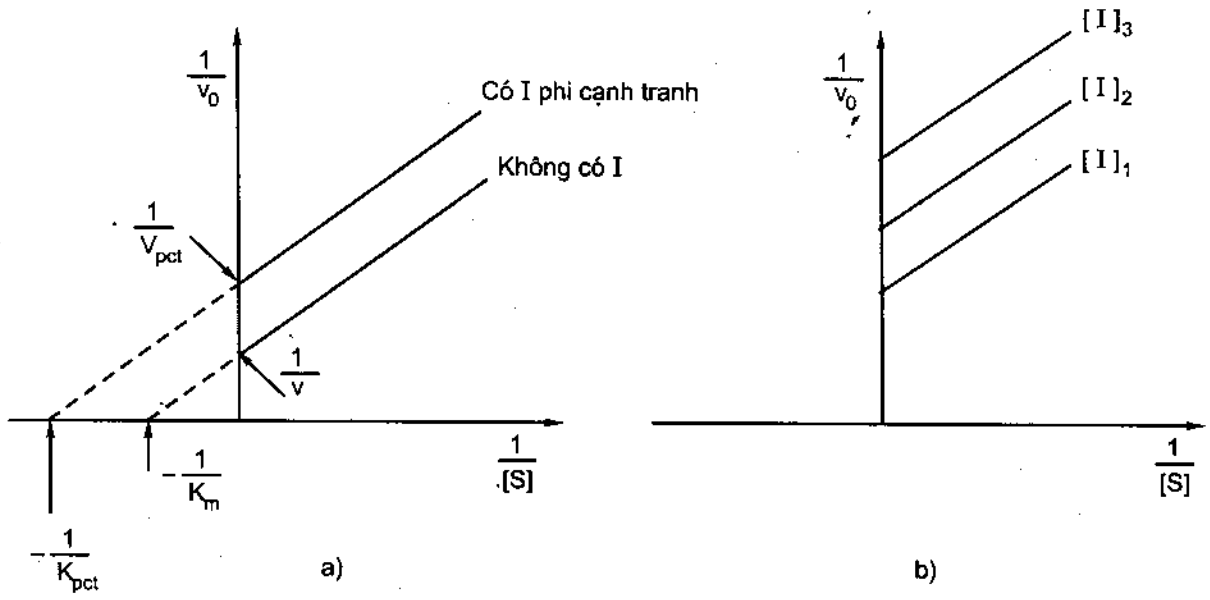
$$\rightarrow v = \frac{V}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

chia cho $\left[1 + \frac{[I]}{K_i}\right]$, ký hiệu $V_{pct} = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$; $K_{pct} = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$

$$V_0 = \frac{V_{pct}}{\frac{K_{pct}}{[S]} + 1} \quad \textbf{(6.27)}$$

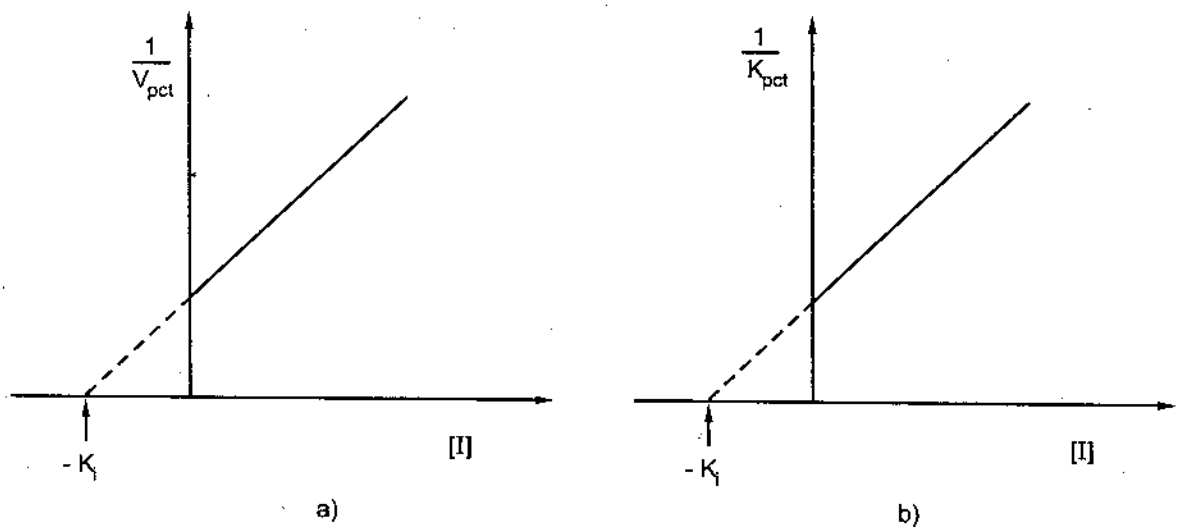
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_{pct}}{V_{pct}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{pct}} \quad \textbf{(6.28)}$$

Phương trình có đường biểu diễn thẳng, vì K_m và V đều giảm giống nhau, nên đường biểu diễn ***song song với đường biểu diễn khi không có I*** (hình 6.15). Đây là một đặc điểm quan trọng để xác định kiểu kìm hãm phi cạnh tranh. Để xác định K_i, lập đồ thị $\frac{1}{V_{pct}}$ hoặc $\frac{1}{K_{pct}}$ đối [I], nhận được đường biểu diễn thẳng, cắt trục hoành ở điểm $-K_i$ (hình 6.16).



Hình 6.15. Đồ thị Lineawever - Burk khi không có và có I phi cạnh tranh (a), ở các nồng độ I khác nhau (b)

($[I]_3 > [I]_2 > [I]_1$)



Hình 6.16. Lập đồ thị để xác định K_i của I phi cạnh tranh

a) $\frac{1}{V_{pct}}$ đối [I]; b) $\frac{1}{K_{pct}}$ đối [I]

Nói chung, các I phi cạnh tranh ít gặp đối với các phản ứng một cơ chất, nhưng quan trọng đối với phản ứng E nhiều cơ chất, có thể giúp làm sáng tỏ cơ chế phản ứng E.

6.3.4. Kiểu kìm hãm hỗn hợp

Ngoài các kiểu kìm hãm đã nêu, có những trường hợp kìm hãm thể hiện ở mô hình động học không đặc trưng cho một trong 3 kiểu kìm hãm đã nêu, mà có *tính chất trung gian giữa hai kiểu*. Ví dụ: *cạnh tranh – không cạnh tranh, hoặc không cạnh tranh – phi cạnh tranh,* gọi là kìm hãm hỗn hợp (mixed inhibition). Sau đây sẽ xem xét cụ thể, trong trường hợp I có thể kết hợp với E tạo thành EI hoặc kết hợp với ES tạo thành ESI, nhưng khác với ở mục 6.3.2.2 (I không cạnh tranh), ở đây hằng số cân bằng của hai phản ứng này khác nhau, (trường hợp I không cạnh tranh đã giả sử hằng số của hai phản ứng K_i và K_{si} bằng nhau). Cũng lập luận tương tự như ở mục (6.3.2.2), cuối cùng sẽ nhận được phương trình có dạng hoàn toàn giống với phương trình Michaelis - Menten, nhưng V và K_m biểu kiến đã thay đổi. V giảm $(1 + [I]/K_{si})$ lần, ký hiệu là V_{hh}; K_m cũng thay đổi, ký hiệu là K_{hh}.

$$K_{hh} = K_m \frac{\left[1+\frac{[I]}{K_i}\right]}{\left[1+\frac{[I]}{K_{si}}\right]}; \quad V_{hh} = \frac{V}{\left[1+\frac{[I]}{K_{si}}\right]}$$

Phương trình Michaelis – Menten khi có chất kìm hãm kiểu hỗn hợp sẽ là:

$$V_0 = \frac{V_{hh}[I]}{K_{si} + [S]} \qquad \textbf{(6.29)}$$

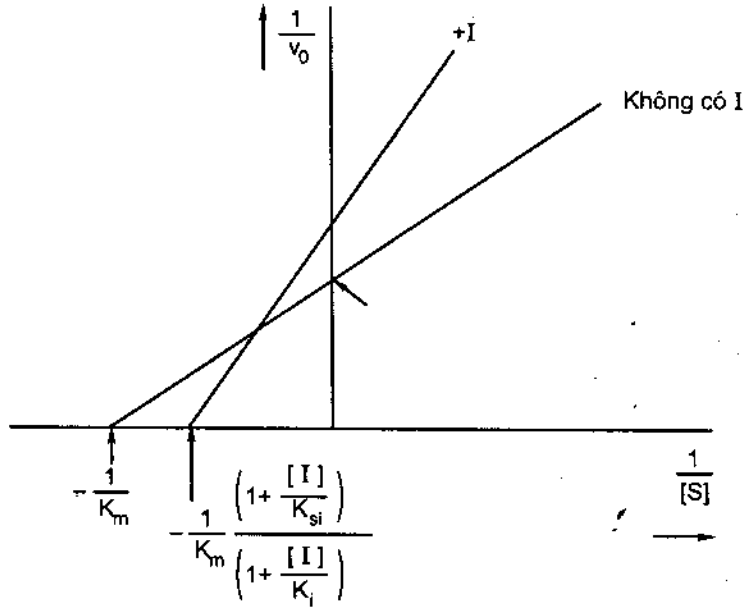
Do đó, phương trình Lineawever –Burk như sau:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_{hh}}{V_{hh}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{hh}} \qquad \textbf{(6.30)}$$

Như vậy, trong trường hợp này, I làm thay đổi cả K_m và V. Tương quan giữa các tham số này như sau:

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

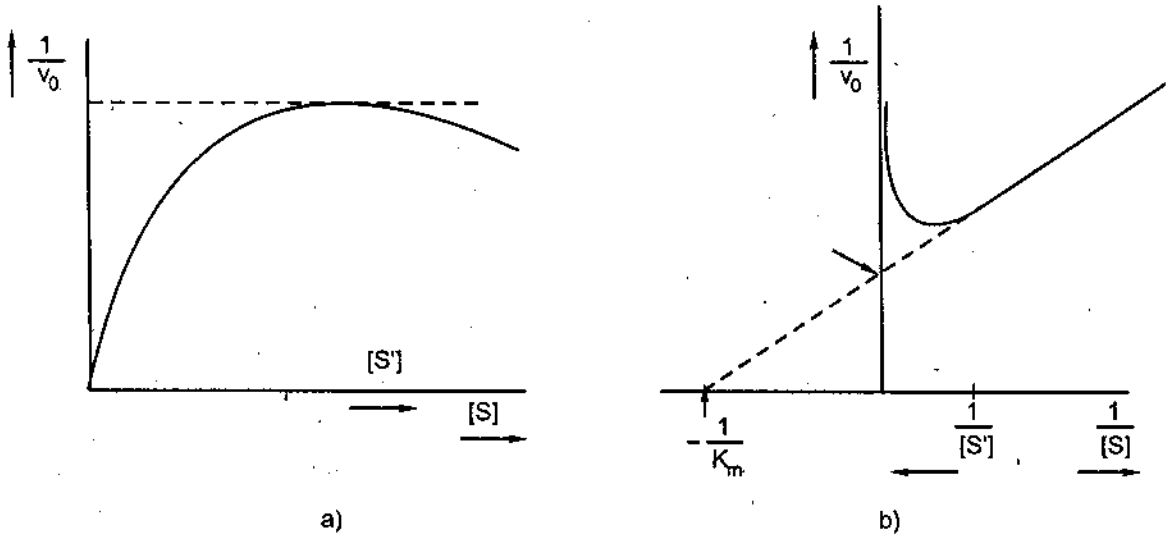
Lập đồ thị $1/v_0$ đối 1/[S] của phương trình (6.30) theo Lineawever – Burk, nhận được đường biểu diễn thẳng, nhưng điểm cắt với đường biểu diễn khi không có chất I không nằm trên trục tung, cũng không ở trên trục hoành (hình 6.17).



Hình 6.17. Đồ thị Lineawever – Burk khi có chất kìm hãm kiểu hỗn hợp

6.3.5. Kìm hãm do nồng độ cơ chất quá cao (thừa cơ chất)

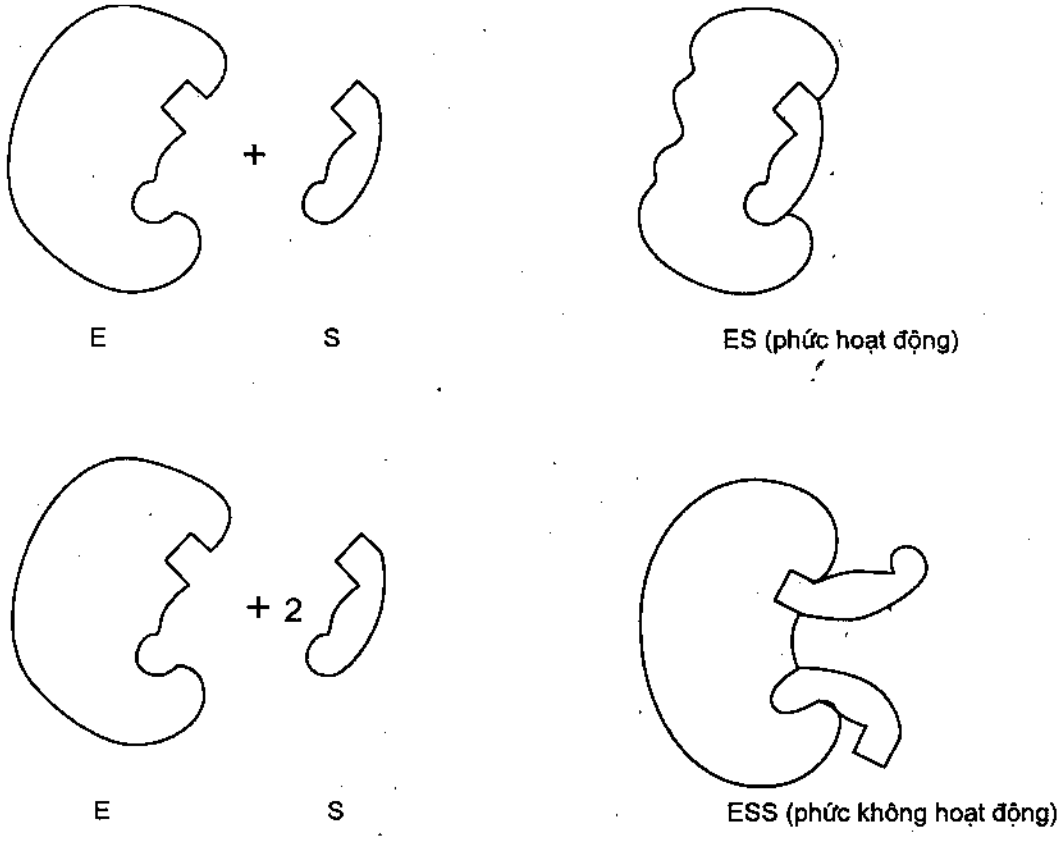
Như trên đã nói (mục 6.2.2), v_0 tăng khi tăng nồng độ cơ chất, đến một nồng độ giới hạn nào đó của S, v_0 đạt cực đại (V), nếu tiếp tục tăng nồng độ cơ chất, có khi vận tốc phản ứng lại giảm xuống thấp hơn V. Đồ thị biểu diễn phương trình Michaelis – Menten, Lineawever – Burk khi có hiện tượng kìm hãm do nồng độ cơ chất quá cao có dạng như ở hình 6.18. Giải thích hiện tượng này có nhiều giả thuyết khác nhau. Ví dụ có thể do nồng độ cơ chất quá cao tạo rào cản không gian gây khó khăn cho tương tác đúng giữa E và S (ví dụ caseine đối với protease của *Bacillus pumilus*); hoặc có thể do S kết hợp không đúng cách, tạo thành phức ESS không hoạt động (hình 6.19). (Ví dụ phản ứng do succinate dehydrogenase xúc tác (hình 6.20)).



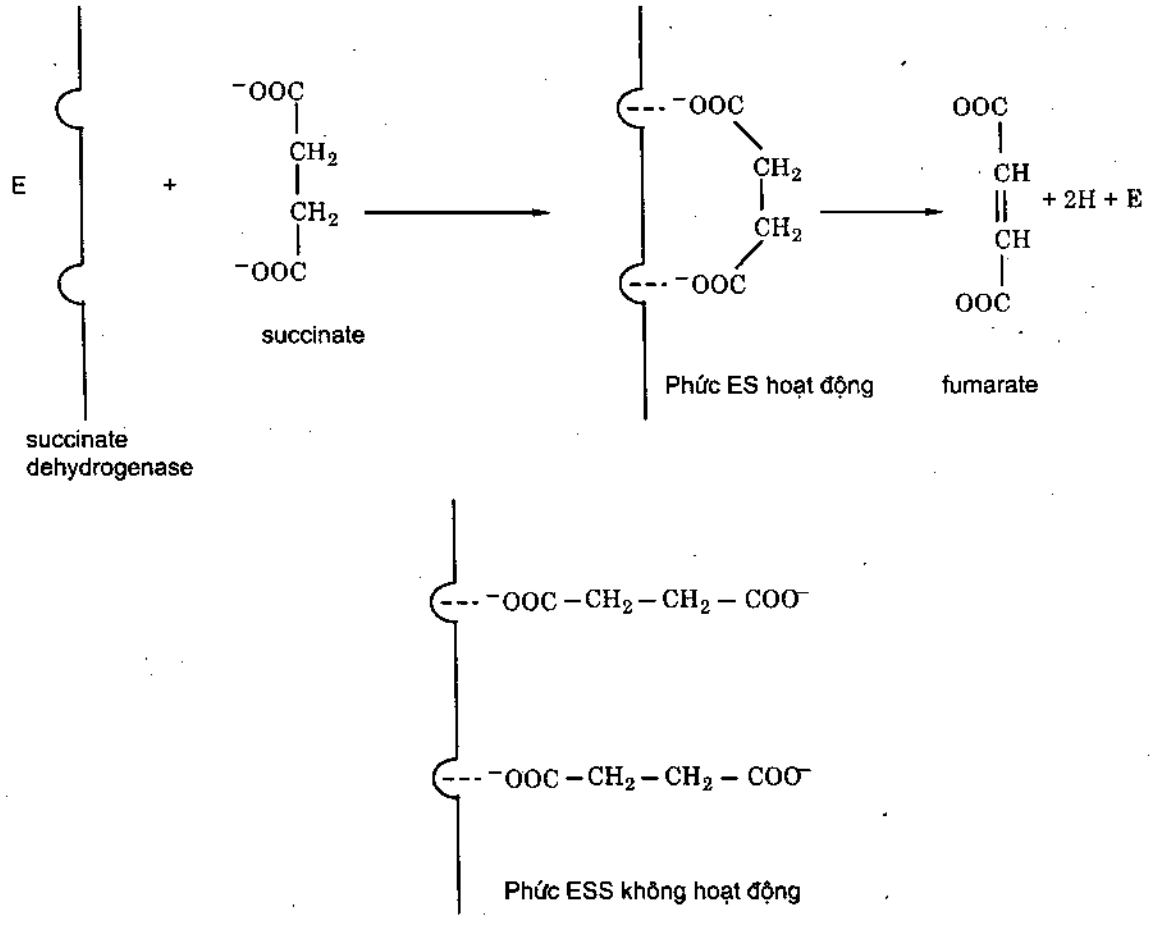
Hình 6.18. Ảnh hưởng của nồng độ cơ chất quá cao đến đồ thị Michaelis - Menten (a) và đồ thị Lineawever – Burk (b). Đường (——) nhận được các số liệu thực nghiệm

(a): từ nồng độ S' trở lên đường biểu diễn đi xuống.

(b): khi nồng độ S tăng, 1/[S] giảm (tiến về gần trục tung), v_0 giảm, do đó $1/v_0$ tăng, vì vậy ở đoạn gần trục tung có điểm uốn cong và tăng lên cao.



Hình 6.19. Mô hình kìm hãm do thừa cơ chất (tạo phức ESS)



Hình 6.20. Đồ thị biểu diễn tác dụng kìm hãm succinate dehydrogenase do thừa cơ chất

Một ví dụ khác: fructose biphosphatase (EC 3.1.3.11) xúc tác cho phản ứng:

D- fructose – 1,6-biphosphate + $H_2O \rightleftarrows$ D- fructose-6-phosphate + (FBP) orthophosphate

Khi nồng độ FBP lớn hơn 0,1mmol dm^{-3}, đường biểu diễn có dạng như ở hình 6.20. Cơ chế giả thuyết cho trường hợp này là: E có 2 trung tâm kết hợp (TTKH) cơ chất có ái lực khác nhau với S. Khi nồng độ FBP thấp, nó kết hợp vào trung tâm thứ nhất (có ái lực với S cao hơn) tạo thành phức ES, đồ thị Lineawever-Burk có dạng bình thường (đoạn thẳng trên hình 6.18b). Ở các nồng độ FBP cao hơn, nó sẽ kết hợp vào TTKH thứ hai, có ái lực thấp tạo thành phức ESS, và được giả thiết là sẽ kìm hãm phản ứng xúc tác ở trung tâm thứ nhất (phức ES). Hiện tượng này tương tự trường hợp phi cạnh tranh (mục 6.3.3), phân tử S thứ hai kết hợp với ES có vai trò như là I phi cạnh tranh. Thay I bằng S vào phương trình 6.27 (phương trình Michaelis- Menten khi có I phi cạnh tranh) sẽ được phương trình sau:

$$v_0 = \frac{\dfrac{V}{\left[1+\dfrac{[S]}{K_i}\right]}[S]}{[S]+\dfrac{K_m}{\left[1+\dfrac{[S]}{K_i}\right]}}$$

K_i ở đây là hằng số của phản ứng kết hợp phân tử S thứ hai vào ES để tạo thành ESS không hoạt động. Nhân vế bên phải của phương trình với $(1 + [S]/K_i)$, sẽ được:

$$v_0 = \frac{V[S]}{[S]\left[1+\dfrac{[S]}{K_i}\right]+K_m} = \frac{V}{1+\dfrac{[S]}{K_i}+\dfrac{K_m}{[S]}} \qquad (6.31)$$

Phương trình này có đường biểu diễn như ở hình 6.18a. Ở các nồng độ của S rất thấp, $[S]/K_i$ có thể bỏ qua, ta có phương trình Michaelis - Menten, ($v_0 = V/1+ K_m/[S]$), phương trình Lineawever - Burk bình thường.

6.3.6. Kìm hãm không thuận nghịch (irriversible inhibition)

6.3.6.1. Đặc điểm chung

Các I không thuận nghịch kết hợp với E tạo thành phức EI không hoạt động, không bị phân ly hoặc rất khó bị phân ly, bị phân ly với vận tốc không đáng kể.

$E + I \rightarrow EI$

Các I này kìm hãm E theo các cách khác nhau như: làm biến tính không thuận nghịch protein enzyme, hoặc bao vây TTKH cơ chất của E, hoặc phản ứng *đặc hiệu không thuận nghịch* với các nhóm chức trong TTHĐ của E làm hỏng TTHĐ của E.

Đặc điểm quan trọng của kiểu kìm hãm này là mức độ kìm hãm tăng theo thời gian tác dụng cho đến khi toàn bộ các phân tử E, hoặc I của phản ứng đã ở trong phức EI. Nếu nồng độ I quá lớn so với nồng độ E, làm mất hoàn toàn hoạt độ xúc tác. Như vậy, I không thuận nghịch làm giảm nồng độ E tham gia phản ứng xúc tác. Giả sử nồng độ I ban đầu (I_0) không cao, nồng độ E còn lại tự do (không kết hợp với I) sẽ là $[E_0] - [I_0]$ ($[E_0]$ là nồng độ E ban đầu). Sau khi phản ứng giữa E và I đã kết thúc, nếu thêm S vào, phản ứng tuân theo phương trình Michaelis - Menten, nhưng V bị giảm, còn K_m không thay đổi.

Khi không có chất kìm hãm, $V = k_{cat}[E_0]$

Có I không thuận nghịch, $V_{ktn} = k_{cat}([E_0] - [I_0])$

Như vậy ta thấy V bị giảm, do đó có thể liên tưởng đến kiểu kìm hãm không cạnh tranh, tuy nhiên trong phương trình trên không có K_i (khác với trường hợp I không

cạnh tranh), nhiều thí nghiệm cố gắng xác định K_i nhưng đến nay vẫn không thành công. Điều quan trọng cần nhớ là: kìm hãm không cạnh tranh là thuận nghịch.

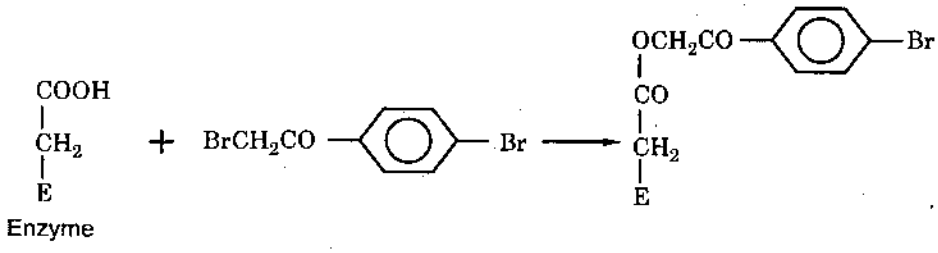
6.3.6.2. *Các chất kìm hãm không thuận nghịch, đặc hiệu và ứng dụng để nhận biết các nhóm chức trong TTHĐ của E (xem thêm mục 3.4; 2.1)*

a) Nguyên tắc: Xử lý E với các chất có khả năng phản ứng không thuận nghịch, đặc hiệu với một hay một số nhóm chức có trong gốc R của các a.a (nhóm –COOH của Asp, Glu; –OH của Ser, Tyr ; –SH của Cys; $–NH_2$ của Lys ; vòng imidazol của His v.v...). Nếu E mất hoạt động, có thể dự đoán a.a ấy là ở trong TTHĐ (active center) của E. Tuy nhiên cũng cần phân biệt xem nó có vai trò *xúc tác (active site)* hay vai trò *kết hợp (binding site)*. Các gốc trong trung tâm xúc tác (TTXT) kết hợp trực tiếp với liên kết của S bị chuyển hoá; các gốc trong trung tâm kết hợp (TTKH) có vai trò tương tự như dây neo buộc cơ chất với E hoặc cố định các gốc a.a của TTHĐ ở những vị trí không gian đúng, để bảo đảm hoạt độ xúc tác của E. Do đó nếu chất kìm hãm kết hợp với các gốc của TTKH cũng làm mất hoạt tính xúc tác do làm thay đổi cấu trúc không gian của TTHĐ. Để phân biệt TTXT và TTKH, có thể tiến hành theo cách sau: thực hiện phản ứng với I không thuận nghịch trong điều kiện thừa cơ chất, hoặc thừa chất kìm hãm cạnh tranh, các chất này sẽ bảo vệ TTHĐ và các gốc a.a lân cận.

Nếu E mất hoàn toàn hoạt độ xúc tác khi xử lý với I phản ứng đặc hiệu với nhóm chức của a.a trong điều kiện không có S (hoặc I cạnh tranh), và giữ nguyên hoạt độ khi thừa S (hoặc I cạnh tranh), thì a.a ấy ở trong TTXT của E. Còn nếu I phản ứng với a.a trong TTKH thì hoạt độ của E không mất hoàn toàn mà còn lại một phần. Sau đây sẽ giới thiệu một số phản ứng của các I đặc hiệu không thuận nghịch thường dùng để phát hiện các a.a trong TTHĐ của E.

– Phản ứng với nhóm **cacboxyl** trong gốc R của acid **aspartic, glutamic**

+ p-bromomophenaxil bromit (p-bromophenacyl bromide) sẽ phản ứng với nhóm carboxyl trong gốc R của Asp và Glu tạo thành ester.

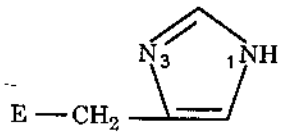


Erlanger và các tác giả khác (1966) đã phát hiện được p-bromophenacyl bromide kìm hãm pepsin theo phản ứng trên, nhưng tác dụng kìm hãm bị mất khi có thừa cơ chất, điều đó chứng tỏ Asp ở trong TTHĐ của pepsin và có vai trò xúc tác.

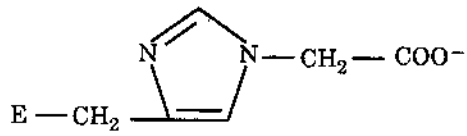
+ Aminomethanesulphonic acid và carbodiimide (RN= C= N–R) phản ứng với tất cả các nhóm carboxyl có trong phân tử E.

Lin và Koshland (1969) đã xử lý lysozyme với chất này và thấy rằng E bị mất hoàn toàn hoạt độ. Tuy nhiên khi có cơ chất, gốc Asp-52 được bảo vệ, chỉ mất 50% hoạt độ, do đó có thể dự đoán Asp-52 ở trong TTHĐ có vai trò xúc tác.

– Phản ứng với vòng **imidazole** của **histidine:**

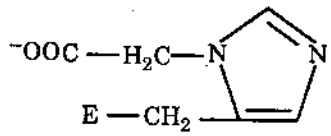


Histindin
+
ICH_2COOH



N_1-carboxymethylhistindin

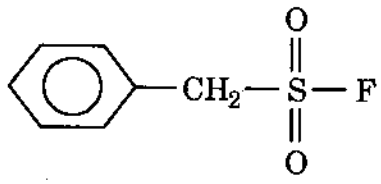
Histindin
+
ICH_2COOH



N_3-carboxymethylhistindin

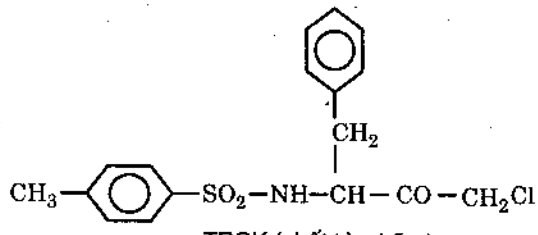
Nếu E mất hoạt động sau khi xử lý với iodoacetic acid, có thể dự đoán His tham gia trong TTHĐ của E. Sử dụng phản ứng này đã phát hiện được His-12 và His-119 trong TTHĐ của ribonuclease (Crestfield, Stein và Moore, 1963). Hơn nữa còn phát hiện được là 2 gốc His này ở gần nhau trong TTHĐ của E (vì chỉ một trong 2 gốc này trong một phân tử bị alkyl hoá chứ không bị alkyl hoá đồng thời).

+ *Phenylmethylsulfonyl fluoride* hoặc *Phenylmethansulfonyl fluoride (PMSF).* Chất này sulfonyl hoá gốc His trong TTHĐ của trypsin và chymotrypsin, là chất kìm hãm không thuận nghịch của các I này. Chất này có độc tính cao nhưng còn ít độc hơn DFP. PMSF không hoà tan và không bền trong nước. Do đó hoà tan trước trong dung môi khác như dioxan. PMSF không kìm hãm cholinesterase:

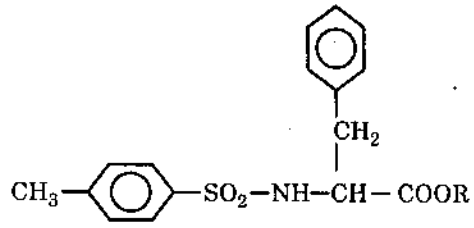


+ *Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)* (chất kìm hãm chymotrypsin): TPCK có cấu trúc gần giống với cơ chất este của chymotrypsin là ester tosyl – L – phenylalanine, nó tác dụng như là chất kìm hãm không thuận nghịch của chymotrypsin bằng cách alkyl hoá gốc His-57, tạo điều kiện để hình thành liên kết C–N giữa chất kìm hãm với vòng imidazol của His-57.

+ Sử dụng các chất kìm hãm không thuận nghịch *DFP* và *TPCK* đã xác định được Ser-195 và His-57 ở trong TTHĐ của chymotrypsin.



TPCK (chất kìm hãm)



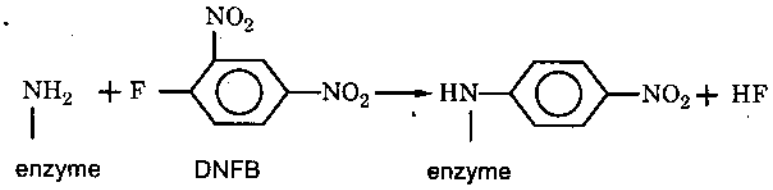
estertosyl - L - phenylalanine (cơ chất)

Tuy nhiên TPCK lại không kìm hãm một protease serine khác là trypsin, do hai E này khác nhau về vị trí kết hợp với cơ chất, tính đặc hiệu. Trypsin thuỷ phân liên kết trong đó có nhóm –CO– của Lys hay Arg, do đó nó bị kìm hãm bởi tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), TLCK alkyl hoá gốc His của trypsin.

TPCK và TLCK được sử dụng trong nghiên cứu trình tự protein, vì đòi hỏi E có độ sạch rất cao, nhưng rất khó loại hoàn toàn trypsin khỏi chế phẩm chymotrypsin và ngược lại. Các chế phẩm trypsin thường có thể lẫn chymotrypsin và ngược lại, do đó muốn loại chymotrypsin khỏi chế phẩm trypsin thì dùng TPCK và ngược lại thì dùng TLCK.

– Phản ứng với **nhóm amin của lysine:**

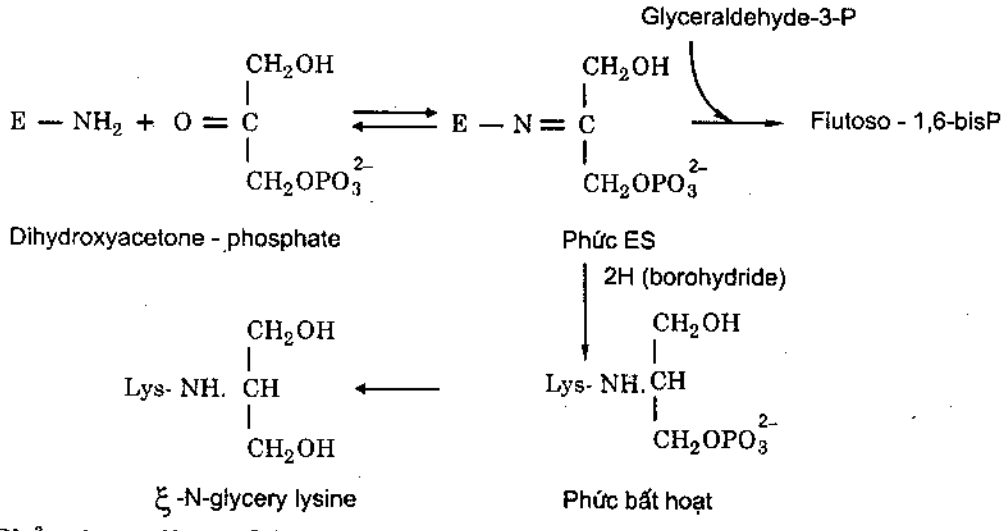
+ Để phát hiện gốc Lys sử dụng *dinitrofluorobenzene (DNFB*, cũng có tên là fluorodinitrobenzene), chất này phản ứng với nhóm amin tự do:



Sử dụng DNFB đã phát hiện được Lys-41 trong TTHĐ của ribonuclease, có vai trò xúc tác.

+ *Muối kim loại của borohydride (MBH₄)*. M là kim loại kiềm, một chất khử mạnh.

Horecker và cộng sự đã sử dụng sodium borohydride nghiên cứu của TTKH của fructoso-biphosphate aldolase, đã phát hiện được cơ chất dihydroxyacetone phosphate kết hợp với nhóm ξ của gốc Lys trong phân tử E qua liên kết –N=CH– (base Schif). Phản ứng như sau:



– Phản ứng với **methionine:**

Met có thể bị alkyl hoá hoặc *quang oxy hoá (photo – oxydation)* giống như một số a.à khác, vì vậy cần lựa chọn điều kiện thí nghiệm mới xác định được chính xác.

Koshland và cộng sự (1962) đã thực hiện thành công phản ứng quang oxy hoá chỉ 1 gốc Met của chymotrypsin (Met-192) làm giảm một phần hoạt độ E giống như khi alkyl hoá gốc Met này. Từ đó các tác giả kết luận Met-192 có trong TTHĐ của E nhưng có thể có vai trò tham gia trong việc kết hợp với cơ chất chứ không có vai trò xúc tác.

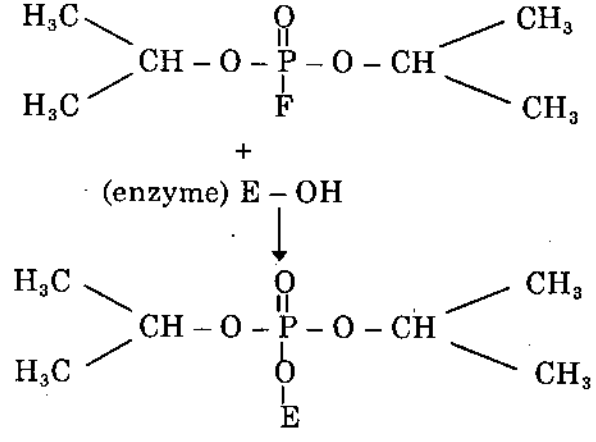
– Phản ứng với nhóm **–OH của serine:**

Chất kìm hãm đặc hiệu các serin-E (nhóm –OH của Ser tham gia trong TTHĐ, có vai trò xúc tác) là các hợp chất phospho hữu cơ. Chất thường dùng nhất là:

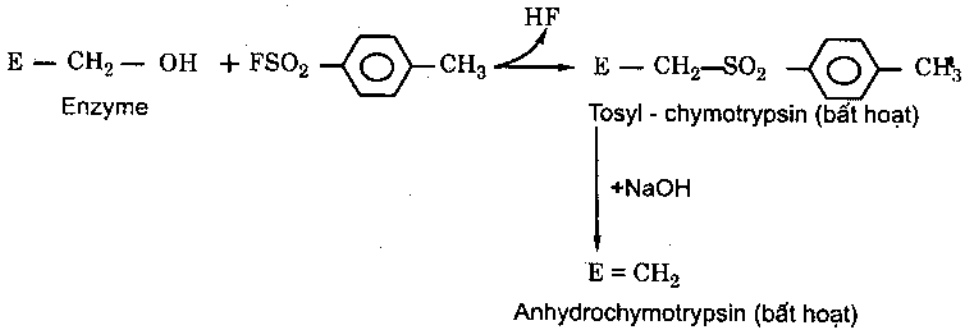
+ Diisopropy fluorophossphate (diisopropylfluorophosphonate) viết tắt là *DIPF* hay *DFP*. Chất này kìm hãm các cholinesterase và các protease serine bằng cách phosphoryl hoá gốc Ser trong TTHĐ của E.

DFP là chất độc thần kinh vì nó kìm hãm một trong các E quan trọng đối với hoạt động của thần kinh là acetylcholinesterase.

DFP phản ứng đặc hiệu với Ser có vai trò xúc tác trong TTHĐ của E chứ không phải với bất kỳ gốc Ser nào trong phân tử. Phản ứng này khá đặc hiệu, vì vậy nếu E bị kìm hãm bởi DFP có thể kết luận là serin – E. Sự sai khác về khả năng phản ứng của các gốc Ser trong phân tử đối với DFP có thể do vi môi trường (các gốc amino acid ở vùng TTHĐ) của E.



+ Các dẫn xuất tosyl (CH_3– C_6H_4– SO_2^-) phản ứng với gốc Ser trong TTHĐ:



Koshland và cộng sự (1963) đã sử dụng phản ứng này để khoá Ser- trong TTHĐ của chymotrypsino.

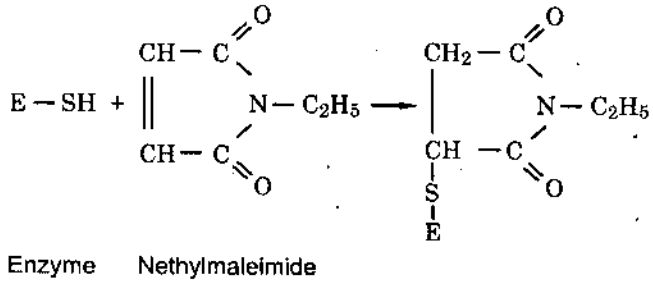
– Phản ứng với **nhóm –SH (thiol):**

+ Iodoacetate, iodoacetamide:

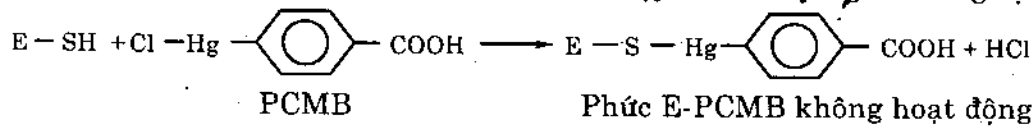
$E - SH + ICH_2 - CONH_2 \rightarrow E - S - CH_2 - CONH_2 + HI + E$

Sử dụng iodoacetamide đã phát hiện được Cys-25 trong TTHĐ của papain.

+ N-ethylmaleimide:



+ p-chloromercuribenzoate (PCMB) và các hợp chất thuỷ ngân tương tự khác:



Cần lưu ý là các hợp chất chứa Hg phản ứng với nhóm – SH nhưng không đặc hiệu, do đó cần tiếp tục sử dụng các phản ứng khác.

– Phản ứng với **tyrosine:**

Vallee và cộng sự (1963) đã dùng phản ứng *iodin hoá* hoặc *nitrate hoá* vòng benzen hoặc *acyl hoá* nhóm –OH phenolic của tyrosine trong phân tử carboxylase A, E bị mất hoạt tính xúc tác, từ đó đã phát hiện được Tyr – 248 ở trong TTHĐ của E, có vai trò xúc tác.

– Phản ứng với **tryptophan:**

Dùng phản ứng quang oxy hoá các gốc Trp trong lysozyme làm bất hoạt E, do đó dự đoán Trp có trong TTHĐ của E.

– Xác định các a.a E, tham gia trong TTHĐ bằng cách sử dụng các *protease* để *thuỷ phân giới hạn* phân tử E.

Một số ví dụ:

+ Sử dụng *carboxypeptidase* tách gốc tyrosine đầu C khỏi phân tử fructose – biphosphate aldolase làm giảm hoạt độ cho phép giả thiết gốc Tyr đầu C có vai trò kết hợp với nhóm 6-phosphate của cơ chất này.

+ Sử dụng *Subtilisin* (protease kiềm của Bacillus) cắt phân tử ribonuclease thành 2 phần gọi là S-peptide (gồm 20 gốc a.a đầu tiên của E) và phần còn lại của phân tử ký hiệu là S-protein (gồm 104 gốc a.a của phân tử E). Cả 2 phần S-peptide cũng như S-protein đều mất hoạt tính xúc tác. Tuy nhiên nếu trộn lẫn 2 đoạn này với tỷ lệ bằng nhau, E hồi phục hoàn toàn hoạt độ (Richards và cộng sự, 1959). Điều này góp phần khẳng định các kết quả nghiên cứu TTHĐ của ribonuclease cho rằng các gốc His 12, Lys-41 và His-119 là cần thiết cho hoạt động xúc tác của E, trong đó 2 gốc His tham gia quá trình xúc tác, với vai trò là chất cho và chất nhận proton). Thuỷ phân loại bỏ đoạn S-peptide (có chứa His-12) TTHĐ bị phá vỡ, do đó cả 2 phần đều mất hoạt tính.

6.4. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ION KIM LOẠI

6.4.1. Đặc điểm chung

Các ion kim loại có thể kìm hãm (inhibit) hay hoạt hóa (activate) E. Các ion kim loại nặng, ở nồng độ gây biến tính protein, có tác dụng kìm hãm không thuận nghịch E. *Tác dụng của ion kim loại phụ thuộc nhiều vào nồng độ của chúng,* mức độ hoạt hóa chỉ tăng theo nồng độ ion kim loại ở những nồng độ thấp trong một giới hạn xác định, khi vượt quá ngưỡng nồng độ này, lại có tác dụng kìm hãm E. Giới hạn nồng độ có tác dụng hoạt hóa E của mỗi ion kim loại có thể khác nhau, vì vậy ở cùng một nồng độ, cùng điều kiện phản ứng, đối với một E, 2 ion có thể có tác dụng trái ngược nhau, trước đây thường gọi là *tác dụng đối kháng* giữa các ion. Hiện tượng này thường xảy ra giữa các ion cùng hóa trị.

Dưới tác dụng của các ion kim loại có thể làm thay đổi pH thích hợp của E. Mặt khác, tác dụng của ion kim loại cũng có thể thay đổi tùy theo cơ chất, pH tác dụng của E.

Tác dụng hoạt hóa của ion kim loại cũng có tính đặc hiệu, mỗi ion kim loại thường hoạt hóa các E xúc tác cho một kiểu phản ứng nhất định, tuy nhiên mức độ đặc hiệu cũng thay đổi tùy ion. Ví dụ: Mg^{2+} hoạt hóa các phosphatase, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} thường hoạt hóa các peptide hydrolase v.v...

Các ion kim loại có thể liên kết trực tiếp với các gốc a.a của phân tử E hoặc là thành phần cấu tạo của phân tử CoE (vòng hem của catalase, peroxydase v.v...). Sau đây sẽ xét đến trường hợp ion kim loại kết hợp với a.a của phân tử E và hoạt hóa E với tính chất là cofactor (có vai trò xúc tác), hoặc có vai trò làm bền cấu trúc không gian phân tử E.

6.4.2. Độ bền liên kết với E và cách tác dụng

Nhiều nghiên cứu cho rằng khoảng một phần ba số E đã biết đều cần kim loại cho hoạt động xúc tác của chúng. Các kim loại có thể có vai trò khác nhau đối với

hoạt động xúc tác của E: vai trò **cấu trúc** ***hoặc trực tiếp tham gia*** **xúc tác** ***theo các cách khác nhau***. Có thể phân thành hai loại theo độ bền liên kết giữa chúng với E:

– Các ion ***kết hợp chặt*** với E, tạo thành các ***metalloE***. Trong quá trình tinh sạch, ion kim loại vẫn còn kết hợp với E. Các ion thường gặp trong các metalloE là: Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}.

– Các ion có trong dung dịch *liên kết lỏng lẻo* với E, có vai trò kích thích (activate), làm tăng hoạt độ của E, do đó khi thêm các ion này vào E tinh sạch sẽ làm tăng hoạt độ của nó. Thuộc loại này, thường gặp là các ion kim loại kiềm hay kiềm thổ như Na^+, K^+, Mg^{2+} hay Ca^{2+}.

Để phân biệt 2 loại này, có thể dùng chất tạo phức càng cua EDTA để tách kim loại khỏi E, sau đó thêm ion kim loại vào, hoạt độ E được hồi phục (reactivated), có thể dự đoán đó là metalloE chứa ion có tác dụng tái hoạt hóa. Tuy nhiên mức độ tái hoạt hóa phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: điều kiện làm bất hoạt, tái hoạt hóa, và đặc biệt là nồng độ ion kim loại. Để xác định chính xác ion kim loại trong phân tử metalloE, cần sử dụng các phương pháp như: quang phổ hấp thụ nguyên tử, cộng hưởng từ hạt nhân, cộng hưởng từ điện tử v.v...

Tuy nhiên cũng cần nhớ rằng nhiều khi khó phân biệt ranh giới rõ ràng giữa metalloE với ion kim loại có tác dụng hoạt hóa.

Các ion kim loại có thể tác dụng theo các cách sau:

+ Làm *cầu nối giữa E và cơ chất* (Mildvan, 1970): Các ion kim loại kết hợp với E để tạo điều kiện thuận lợi cho E kết hợp với S tạo thành phức E-M-S; hoặc kết hợp với S, hoạt hóa nó, định hướng đúng đắn tạo thành *cơ chất thực*, có thể kết hợp với E, tạo thành phức kiểu E-S-M. Có thể tiến hành thí nghiệm để phân biệt hai vai trò này như sau: xử lý E với ion kim loại trước khi cho tác dụng với cơ chất, hoặc xử lý S với ion kim loại trước khi thêm E, xem trường hợp nào làm tăng hoạt độ của E để kết luận cách tác dụng của ion kim loại.

– Làm trung gian cho các phản ứng oxy hóa khử bằng cách thay đổi trạng thái oxy hóa của ion.

– Làm bền dạng cấu trúc không gian hoạt động của phân tử E nhờ các tương tác tĩnh điện, thường gặp nhất là Ca^{2+}.

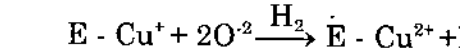
Cũng cần lưu ý rằng một ion kim loại có thể tác dụng theo một vài cách đã nêu.

6.4.3. Một số ví dụ

6.4.3.1. MetalloE (xem thêm mục 3.4.1.): Ion kim loại tham gia trong phản ứng xúc tác. Ví dụ: *carboxypeptidase A, một metalloE chứa* một nguyên tử *Zn*, xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptide ở đầu C của polypeptide hay protein, có tính đặc hiệu đối với gốc R của a.a đầu C (bảng 6.2). Các nghiên cứu cho thấy TTHĐ của E này có chứa Zn^{2+} liên kết phối trí với các gốc His-69, Glu-72, His-196 và H_2O, đồng thời cũng kết hợp với phần phân tử cơ chất và với "túi" kỵ nước của E (phần kết hợp với gốc R của a.a đầu C của cơ chất). Trong quá trình phản ứng, oxy của liên kết peptide bị thủy phân, thay thế phân tử nước đã kết hợp với Zn^{2+}, tạo điều kiện thuận lợi để cắt đứt liên kết peptide.

6.4.3.2. Hai ion khác nhau, cùng hoá trị trong một E có vai trò khác nhau

Superoxid dismutase (SD) là metalloE chứa Cu, xúc tác cho phản ứng:



$$4O^{-2} + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2$$

SD của hồng cầu bò chứa 2 ion Cu^{2+} và 2 ion Zn^{2+}, trong đó các ion Zn^{2+} chủ yếu có vai trò cấu trúc còn các ion Cu^{2+} tham gia vào phản ứng xúc tác như sau:

$$E - Cu^{2+} + 2O^{-2} \longrightarrow E - Cu^{+} + O_2$$

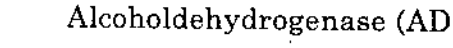
$$E - Cu^{+} + 2O^{-2} \xrightarrow{H_2} E - Cu^{2+} + H_2O_2$$

Bảng 6.2. Tính đặc hiệu của một số carboxypeptidase

E	Amino acid đầu C$(a.a)_n$
Carboxypeptidase A (tụy bò)	$(a.a)_n \neq$ Arg, Lys, Pro;$(a.a)_{n-1} \neq$ Pro
Carboxypeptidase B (tụy bò)	$(a.a)_n =$ Arg, Lys;$(a.a)_{n-1} \neq$ Pro
Carboxypeptidase C (lá chanh)	bất kỳ a.a nào ở đầu C cũng được
Carboxypeptidase Y (nấm men)	bất kỳ a.a nào nhưng tác dụng chậm hơn nếu $(a.a)_{n-1}$ là Gly

6.4.3.3. Hai ion của một kim loại trong một phân tử E nhưng có vai trò khác nhau

Alcoholdehydrogenase (ADH) là một holoE, có CoE NAD^+xúc tác cho phản ứng:



$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \leftrightarrows CH_3CHO + NADH + H^+$$

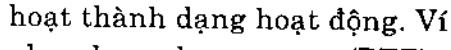
ADH của gan ngựa là một dimer, mỗi monomer có một tâm kết hợp với NAD^+ và 2 tâm kết hợp với 2 ion Zn^{2+}, 2 ion này có vai trò khác nhau, chỉ một ion trực tiếp tham gia vào hoạt động xúc tác của E. Ion Zn^{2+} tác dụng như chất xúc tác tĩnh điện, làm bền trạng thái chuyển tiếp tích điện âm, chuyển ion hydride đến NAD^+ tạo thành NADH. Đối với phản ứng ngược, Zn^{2+} tác dụng như chất xúc tác ái điện tử thúc đẩy phân cực hóa nhóm carbonyl của cơ chất, tạo thuận lợi cho H tách khỏi NADH. Ví dụ này cho thấy tác dụng của ion kim loại khá phong phú, cùng một ion, trong một E nhưng có thể tác dụng theo các cách khác nhau.

6.4.3.4. Tác dụng hoạt hóa

Ion K^+ *hoạt hóa nhiều E* đặc biệt là các E xúc tác cho phản ứng chuyển vị, hoặc loại nhóm phosphate bằng cách kết hợp với các nhóm tích điện âm của E ở dạng bất hoạt thành dạng hoạt động. Ví dụ *pyruvate kinase* xúc tác cho phản ứng chuyển hóa phosphoenol pyruvate (PEP) thành pyruvate của mô cơ cần các cation kim loại kiềm và Mn^{2+} (hoặc Mg^{2+}). Các ion này kết hợp vào TTHĐ của E. Các nghiên cứu cho thấy nhóm carboxyl của *cơ chất PEP kết hợp với E-K^+* (E đã được kết hợp với K^+). Mn^{2+} kết hợp với E tạo thành *phức E-Mn^{2+} làm thay đổi dạng không gian tạo điều kiện thuận lợi để tạo thành phức hoạt động E-Mn^{2+} - PEP.*

6.4.3.5. Định hướng không gian đúng

Ví dụ Zn^{2+} đối với carbonate anhydrase. E này xúc tác cho phản ứng:



$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

TTHĐ của E có các gốc His-64, Glu-106, Thr-199. Phân tử H_2O phân cực kết

hợp với ion Zn^{2+}, ion hóa. Ion OH^- kết hợp với Zn^{2+} tấn công nucleophil vào CO_2 đã kết hợp trong phân tử E ở vị trí bên cạnh, chuyển hóa nó thành HCO_3^-. Có thể nói Zn^{2+} khởi đầu quá trình hình thành mạng lưới liên kết H giữa các gốc trong TTHĐ, định hướng nhóm OH^- tạo thành cấu hình không gian thích hợp để thực hiện tấn công nucleophil vào cơ chất CO_2.

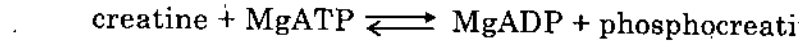
6.4.3.6. Làm bền cấu trúc không gian cần thiết cho hoạt động xúc tác, làm cầu nối giữa E và S:

Ca^{2+} và Mg^{2+}: hai ion này trao đổi với nhau, được vận chuyển theo hướng trái ngược nhau trong tế bào.

– Ion Ca^{2+} có vai trò giữ vững cấu trúc cần thiết cho hoạt động xúc tác của nhiều E ngoại bào.

– Các E nội bào cần Mg^{2+} cho hoạt động xúc tác, trong nhiều trường hợp có thể thay thế bằng Mn^{2+} (Mn^{2+} cũng gặp trong metalloE, ví dụ arginase).

Nhiều nghiên cứu cho thấy các *cation hóa trị 2* thường có trong phức E-S-M, ion kim loại có vai trò cầu nối (cầu kim loại) giữa E và S. Ví dụ: các kinase như creatine kinase của mô cơ. Cơ chất của E này là creatine và ATP, nhưng ATP phải kết hợp với Mg, mới là cơ chất thực của E:



creatine + MgATP $\rightleftharpoons$ MgADP + phosphocreatine + H^+

Mg^{2+} kết hợp với các nhóm α- và β- phosphate, còn nhóm γ- phosphate (nhóm phosphate tận cùng) sẽ được chuyển đến creatine (Cohn và cộng sự). Ion kim loại trong phức có thể hỗ trợ để cắt đứt liên kết pyrophosphate bằng cách kéo các điện tử khỏi gốc β-phosphate.

6.5. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ANION

Nhiều anion có tác dụng hoạt hóa E, ví dụ kinh điển nhất là ảnh hưởng của anion Cl^- đến hoạt độ của α-amylase động vật. Tác dụng hoạt hóa của Cl^- lớn đến mức có thể xem là chất hoạt hóa tự nhiên của α-amylase. Các anion hóa trị 1 khác như Br^-, F^-, NO_3^-, cũng có tác dụng hoạt hóa α-amylase. Một số anion khác như SO_4^{2-}, PO_4^{3-} có tác dụng hoạt hóa fumarate hydratase. Khi có mặt các anion có thể làm thay đổi pH thích hợp của E về phía kiềm.

6.6. CÁC CHẤT HOẠT HÓA KHÁC

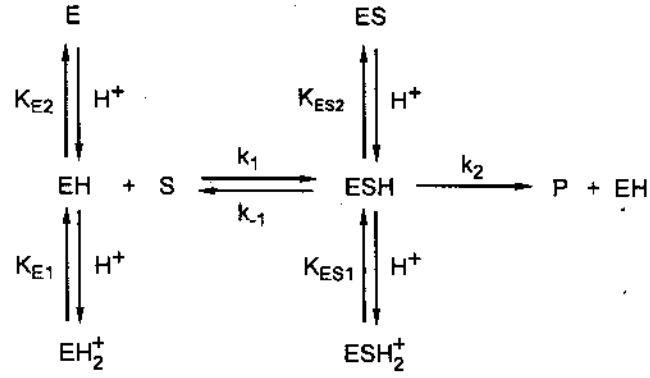
Một số chất có thể làm tăng hoạt độ E bằng cách gián tiếp hay trực tiếp. Gọi là gián tiếp nếu tác dụng hoạt hóa là do loại trừ chất kìm hãm khỏi hỗn hợp phản ứng, hoặc không tác dụng trực tiếp với phân tử E. Một số chất có tác dụng hoạt hóa trực tiếp như: acid ascorbic, a. lipoic, glutation dạng khử, có thể trực tiếp tham gia phản ứng kết hợp và loại thuận nghịch hydro nên chúng có thể hoạt hóa các E xúc tác cho phản ứng oxyhóa khử. Các chất hoạt hóa trực tiếp thường tác dụng vào TTHĐ của E hoặc làm biến đổi cấu hình phân tử E theo hướng có lợi cho hoạt động xúc tác. Ví dụ: glutation dạng khử có tác dụng khử cầu –S–S– thành nhóm – SH tự do, vì vậy nó là chất hoạt hóa phổ biến của nhiều E cần nhóm – SH cho hoạt động xúc tác của nó.

6.7. ẢNH HƯỞNG CỦA pH ĐẾN PHẢN ỨNG ENZYME

6.7.1. pH hoạt động thích hợp của E

Hoạt độ của E phụ thuộc vào pH môi trường, đó là vì pH ảnh hưởng đến trạng thái ion hóa các gốc R của các gốc a.a trong phân tử E, ion hóa các nhóm chức trong trung tâm hoạt động, ion hóa cơ chất, do đó ảnh hưởng đến cả hai tham số động học K_m và V, ảnh hưởng đến vận tốc phản ứng. Đường biểu diễn vận tốc đầu của nhiều phản ứng E ở các pH khác nhau có dạng hình chuông hẹp cân đối (hình 6.22a), có đỉnh chuông ứng với pH trung tính. Như vậy *pH thích hợp* (pH_{opt}) *của phần lớn E vào khoảng 7*. Tuy nhiên cũng có một số E có pH_{opt} rất thấp (pepsin, protease acid của vi sinh vật, hình 6.22b), hoặc khá cao như subtilisin (protease kiềm của *Bacillus*, hình 6.22c), hoặc ít thay đổi trong một khoảng pH xác định (hình 6.22d. 22e).

Đồ thị trên hình 6.22a phản ảnh sự ion hóa của một số gốc a.a nhất định ở trạng thái ion hóa đặc biệt đối với hoạt động xúc tác của E. Trong trường hợp đơn giản nhất, phản ứng chỉ có một cơ chất và không có phản ứng ngược (P + EH để tạo thành ESH), có thể biểu diễn ảnh hưởng của pH như sau:



Giả định chỉ có EH và ESH là dạng hoạt động (có hoạt tính xúc tác).

Phương trình Michaelis-Menten đối với mô hình trên như sau:

$$v_0 = \frac{V'[S]}{K'_m + [S]} \qquad (6.32)$$

$$V' = V/f_2;\ K'_m = K_m(f_1/f_2)$$

$$f_1 = \frac{[H^+]}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{H^+};\ f_2 = \frac{[H^+]}{K_{ES1}} + 1 + \frac{K_{ES2}}{[H^+]}$$

V và K_m liên quan với các dạng hoạt động E, EH, ESH. Do f_1 và f_2 phụ thuộc vào $[H^+]$ (phụ thuộc pH) nên v_0 thay đổi theo pH với dạng như hình 6.22a.

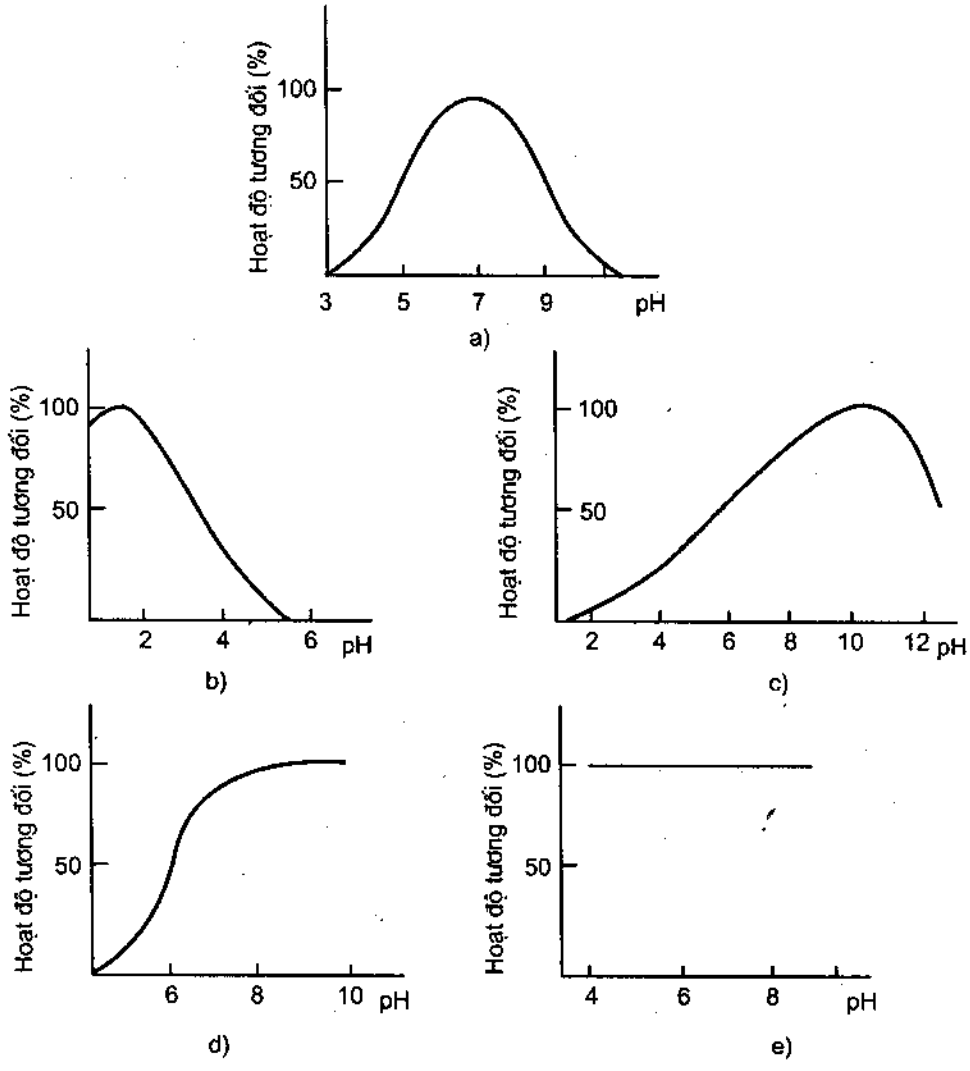
Cũng cần lưu ý là pH_{opt} của một E còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như: đặc tính và nồng độ cơ chất, dung dịch đệm, nhiệt độ phản ứng v.v... Đối với một số phản ứng thuận nghịch, pH ảnh hưởng khác nhau đến phản ứng thuận và phản ứng nghịch. Ví dụ: lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) xúc tác cho phản ứng:

$$CH_3CHOHCOO^- + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3COCOO^- + NADH + H^+$$

Lactate — Pyruvate

Phản ứng theo chiều tạo thành pyruvate thực hiện tốt nhất ở pH 10; còn phản ứng theo chiều tạo thành lactate lại là 7. Do đó pH cũng là yếu tố quan trọng điều hòa hoạt độ E trong tế bào sống.

Tuy nhiên cũng cần lưu ý là pH_{opt} của E ở điều kiện *invitro* không hẳn là pH_{opt} của nó ở điều kiện *invivo*.



Hình 6.22. Ảnh hưởng của pH môi trường phản ứng đến phản ứng E

a) Đường biểu diễn chung đối với nhiều E; b) Pepsin ; c) Subtilisin của *Bacillus pumilus*; d) Cholinesterase; e) Papain với cơ chất benzoylarginylamide.

6.7.2. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của E (độ bền pH)

Độ bền của phân tử E cũng phụ thuộc vào trạng thái ion hóa của phân tử, phần lớn E bền trong khoảng 5 < pH < 9. Đối với các protease có khả năng tự phân giải (autolysis) cao như trypsin rất không bền ở pH hoạt động thích hợp của nó (7,6 đến 8,1), vì vậy E thường được pha trong dung dịch HCl loãng có pH = 3, ngay trước khi dùng mới pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp.

Việc xác định độ bền pH của E có ý nghĩa quan trọng trong quá trình thu nhận chế phẩm E, tinh sạch và nghiên cứu E. Để xác định độ bền pH của E, tiến hành giữ E trong các dung dịch đệm có pH khác nhau trong thời gian xác định, sau đó chỉnh về cùng pH giống nhau (pH thích hợp để xác định hoạt độ của nó) trước khi tiến hành xác định hoạt độ.

Bản chất hóa học của thành phần dung dịch đệm cũng ảnh hưởng đến độ bền, hoạt độ xúc tác của E, vì vậy tùy mục đích nghiên cứu, khi xác định độ bền pH của E, có thể sử dụng cùng một loại dung dịch đệm có dải pH rộng từ 2- 12, hoặc sử dụng các loại dung dịch đệm khác nhau cho từng vùng pH.

6.8. ẢNH HƯỞNG CỦA NHIỆT ĐỘ

6.8.1. Nhiệt độ hoạt động thích hợp của E

Do bản chất hóa học của E là protein nên khác với các phản ứng hóa học, vận tốc phản ứng do E xúc tác chỉ tăng lên khi tăng nhiệt độ trong một giới hạn nhất định, chưa ảnh hưởng đến cấu trúc của E.

Đại lượng đặc trưng cho ảnh hưởng của nhiệt độ đến vận tốc phản ứng là hệ số Q_{10}, là tỷ lệ của vận tốc phản ứng ở một nhiệt độ nào đó so với vận tốc phản ứng ở nhiệt độ thấp hơn 10^0C.

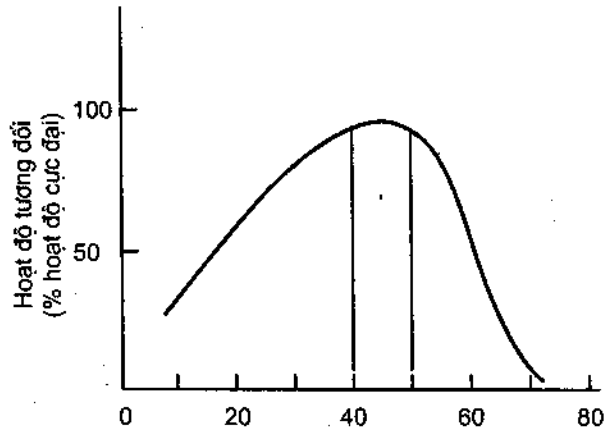
$$Q_{10} = \frac{k_{t+10}}{k_t}$$

Hệ số này càng lớn, phản ứng càng khó xảy ra ở nhiệt độ bình thường.

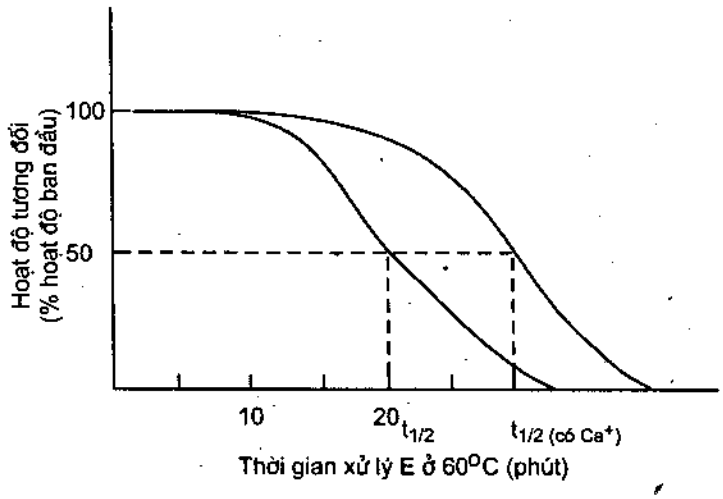
Hệ số Q_{10} của nhiều phản ứng hóa học vào khoảng 2-4, tương ứng với năng lượng hoạt hóa khoảng 50 – 100kJ mol^{-1}, của phần lớn phản ứng E là bằng 2. Ở một số loài sinh vật thích nghi với điều kiện lạnh, các E của chúng có hệ số Q_{10} vào khoảng 1, điều đó chứng tỏ các phản ứng của quá trình trao đổi chất trong cơ thể chúng không bị giảm mạnh khi nhiệt độ thay đổi.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến vận tốc phản ứng E cho thấy *nhiệt độ hoạt động thích hợp (t_{opt})* của nhiều E vào khoảng 40 – 50^0C (hình 6.23), trên 50^0C hoạt độ thường bị giảm mạnh do làm hỏng cấu trúc phân tử E. Các E có nguồn gốc thực vật và một số E vi sinh vật có t_{opt} cao hơn. Nói đến t_{opt} của một E chỉ có nghĩa là *ở điều kiện xác định* ấy, E có *hoạt độ cao nhất*, vì hoạt độ của E còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như thời gian xác định hoạt động, pH v.v... Tuy nhiên khi nghiên cứu sử dụng E, trong từng trường hợp cụ thể, cần phải xác định t_{opt} của E ở những điều kiện cụ thể ấy để sử dụng chúng có hiệu quả cao hơn.

Ở nhiệt độ thấp dưới 0^0C, hoạt độ E bị giảm nhiều, nhưng lại có thể được hồi phục khi đưa về nhiệt độ bình thường, vì vậy, các cây "khô" không lá tưởng chừng đã chết qua mùa đông lại có thể nảy lộc, đâm chồi nhanh chóng khi mùa xuân đến.



Hình 6.23. Đường biểu diễn ảnh hưởng nhiệt độ đến vận tốc phản ứng E



Hình 6.24. Đường biểu diễn độ bền nhiệt của E khi không có (a) và có Ca^{2+}
(đối với các E cần Ca^{2+} làm bền: thời gian xử lý ở 60°C còn lại 50% hoạt độ ban đầu)

6.8.2. Ảnh hưởng nhiệt độ đến độ bền của E (độ bền nhiệt)

Hình 6.23 cho thấy ở nhiệt độ vào khoảng 70°C, phần lớn E bị mất hoàn toàn hoạt động, gọi là *nhiệt độ tới hạn*. Tuy nhiên một số E của các vi khuẩn ưa nhiệt vẫn hoạt động ở nhiệt độ 90°C hoặc cao hơn. Ở nhiệt độ tới hạn, E bị biến tính, hiếm khi được hồi phục hoạt động trở lại.

Nghiên cứu cấu trúc phân tử của các E có độ bền nhiệt cao cho thấy các a.a kỵ nước trong phân tử của chúng chiếm tỷ lệ cao hơn so với các E khác, có lẽ vì vậy mà phần *lõi* của phân tử rắn đặc hơn.

6.8.2.1. Chỉ số độ bền nhiệt của phân tử E (I_a) được tính theo công thức sau:

$I_A = X_A + aX_V + b(X_{ILe} + X_L)$

X_A: hàm lượng Ala tính bằng % khối lượng phân tử protein E.

X_V: hàm lượng Val tính bằng % khối lượng phân tử protein E.

X_{ILe}, X_L: hàm lượng Ile, Leu tính bằng % khối lượng phân tử E.

a = 2,9 ± 0,1; b = 3,9 ± 0,1

E có chỉ số I_A cao bền với nhiệt hơn. Ví dụ:

E	Chỉ số I_A dạng không bền	Chỉ số I_A dạng bền
Glyceraldehyd 3 phosphate dehydrogenase	89	103
Lactate dehydrogenase	88	98

6.8.2.2. Một số biện pháp làm tăng độ bền nhiệt của E

– Làm giảm cấu trúc không cuộn (unfolding) trong phân tử bằng cách thay thế một số gốc a.a trong phân tử. Ví dụ: đối với lysozyme của bacteriophage T_4 (phân tử có 164 a.a), thay Cys -54 bằng Thr, thay các gốc Ile_3, Ile_9, Thr_{21}, Thr_{142}, Leu_{164} bằng Cys làm tăng cấu trúc cuộn trong phân tử, làm tăng độ bền của nó.

– Làm giảm số gốc Gly, tăng số gốc Pro.

– Làm bền cấu trúc xoắn α.

– Đối với một số E có thể tìm cách thay đổi lõi kỵ nước.

– Thêm các chất làm tăng độ bền nhiệt: Ca^{2+} (hình 6.24), các chất tạo dung dịch có độ nhớt cao như saccharose, glycerol v.v... Cơ chất, coE cũng có tác dụng làm tăng độ bền nhiệt của E.

Đối với một số E (trypsin, protease của *Bacillus pumilus*) Ca^{2+} gần như là ion bắt buộc phải luôn có mặt cùng với E mới giữ được hoạt động xúc tác của nó. Vì vậy khi xác định hoạt độ, tái hoạt hóa (đối với các metallo E) hoặc tinh sạch các E này cần bổ sung Ca^{2+} với nồng độ thích hợp.

Các cầu muối giữa các phần dưới đơn vị của các E có cấu trúc bậc 4 cũng có thể làm tăng độ bền nhiệt của E, ví dụ trường hợp của glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Phần lớn E thường bền ở nhiệt độ dưới 0^0C, tuy nhiên khi bảo quản E, đặc biệt là dung dịch E thường chỉ giữ ở 4^0C, tránh để dung dịch E bị đông đá rồi làm tan đá nhiều lần, E sẽ bị mất hoạt động, do bị phá vỡ cấu trúc.

6.8.2.3. Xác định độ bền nhiệt của E: thường xử lý E ở 60^0C, sau các khoảng thời gian xác định, lấy mẫu *làm lạnh nhanh chóng* trong nước đá, sau đó các mẫu được đưa về cùng nhiệt độ, tiến hành xác định hoạt độ E của tất cả các mẫu ở cùng một nhiệt độ.

Để đánh giá và so sánh độ bền nhiệt của các E khác nhau, người ta thường xác định $t_{1/2}$, *là thời gian xử lý ở 60^0C làm mất 50% hoạt độ ban đầu, tính bằng phút.* Ví dụ: so sánh độ bền nhiệt của tyrosinase từ *Neurospora crasa* khi thay gốc Asn-201 bằng Asp, $t_{1/2}$ của nó tăng từ 4 phút lên 70 phút.

Chương 7

CÔNG NGHỆ ADN TÁI TỔ HỢP VÀ CÔNG NGHỆ ENZYME

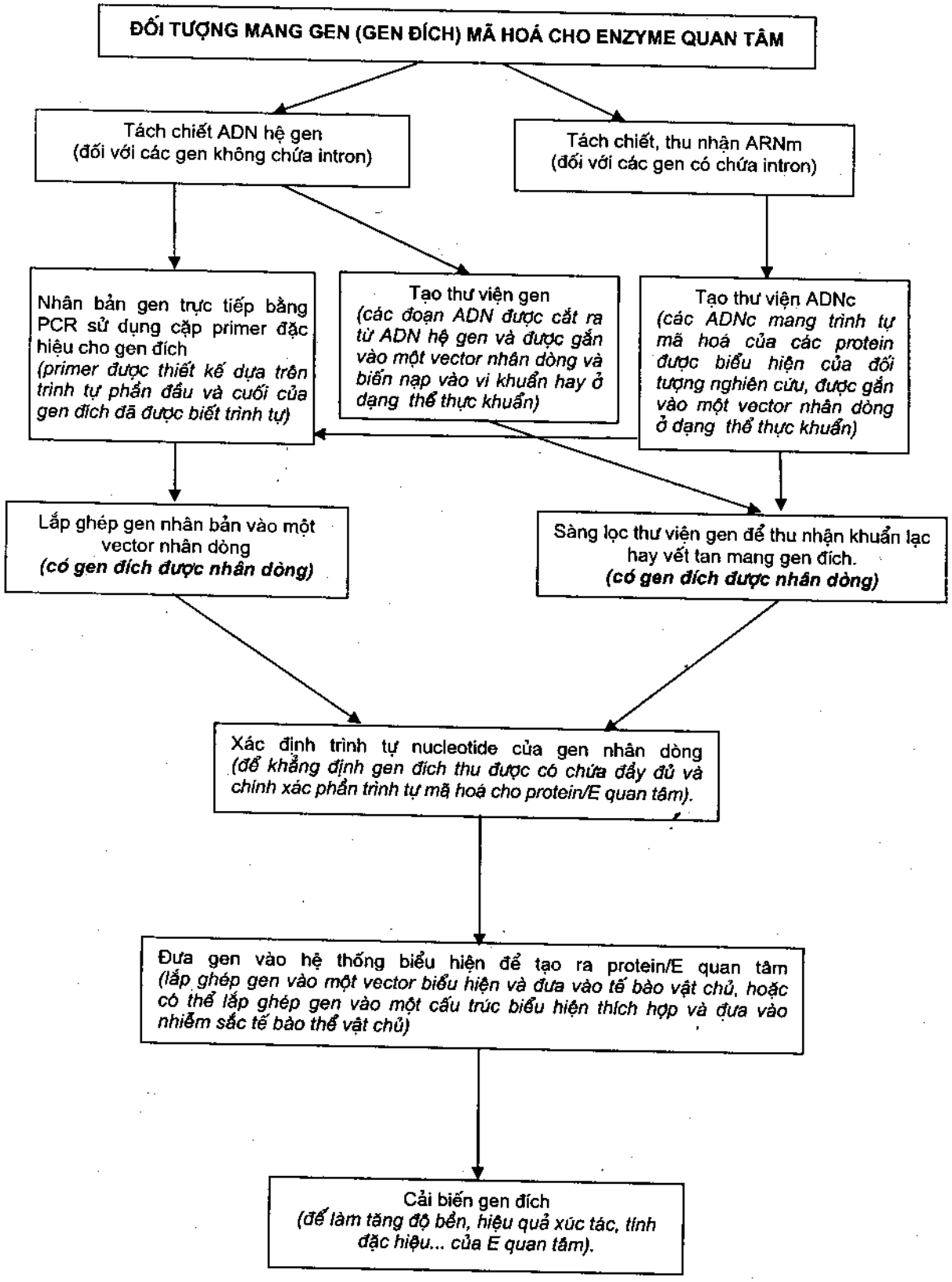
7.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÔNG NGHỆ ADN TÁI TỔ HỢP

Công nghệ ADN tái tổ hợp (hay còn được gọi bằng các thuật ngữ khác nhau như là kỹ thuật di truyền, kỹ nghệ gen) là công nghệ sử dụng các nguyên lý của thao tác gen để tạo ra các cấu trúc ADN tái tổ hợp từ các nguồn ADN khác nhau, thường là sự kết hợp giữa ADN hay gen ngoại lai (còn được gọi là gen đích) với ADN hệ gen của vật chủ và biểu hiện được gen đó thành sản phẩm protein có hoạt tính trong cơ thể vật chủ.

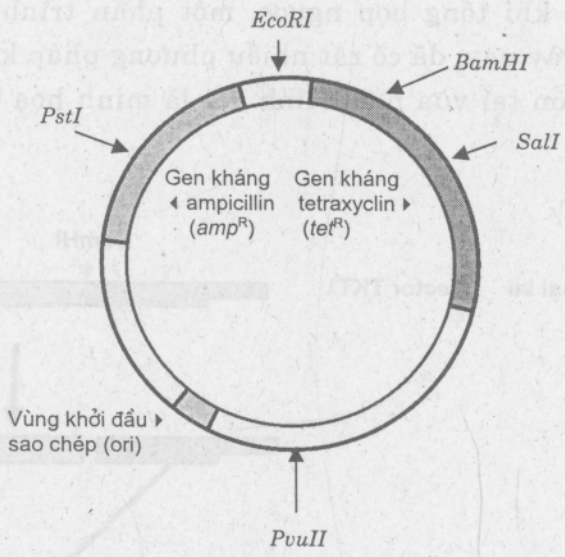
Đối với công nghệ E thì ADN tái tổ hợp được ứng dụng chủ yếu để sản xuất các E tái tổ hợp trong các hệ thống sinh vật thích hợp. Hình 7.1 là minh hoạ các bước tổng quát của việc ứng dụng của công nghệ này trong việc sản xuất E tái tổ hợp.

Bước đầu tiên trong quá trình này là phải nhân dòng được gen ngoại lai hay gen đích (mã hoá cho protein hay E quan tâm) từ nguồn mang gen.

Nhân dòng gen là kỹ thuật đưa gen quan tâm vào một vector (gọi là vector nhân dòng) để tạo ra một vector tái tổ hợp, nhờ đó gen có thể được duy trì và dễ dàng nhân lên cùng vector trong tế bào vật chủ. Vector nhận dòng gen là một cấu trúc ADN mạch vòng có thể bắt nguồn từ một loại plasmid của vi khuẩn hay nấm men, hay cũng có thể được bắt nguồn từ thực khuẩn thể hay là dạng nhiễm sắc thể nhân tạo như nhiễm sắc thể của vi khuẩn (bacterial artificial chromosome-BAC) hay của nấm men (yeast artificial chromosome-YAC)... Các vector nhân dòng gen có một số đặc điểm chung về mặt cấu trúc. *Thứ nhất*, vector phải có vùng khởi đầu sao chép để có thể được nhân lên trong tế bào vật chủ. *Thứ hai*, vector phải có vùng nhân dòng đa điểm cắt (multiple cloning sequence-MCS) là vùng có chứa điểm cắt một lần của các E giới hạn để tiếp nhận các gen ngoại lai. Thứ ba, vector phải chứa các dấu chuẩn chọn lọc như mang gen kháng kháng sinh hay gen mã hoá cho E có khả năng chuyển đổi cơ chất thành sản phẩm có màu hoặc phát huỳnh quang... để dễ dàng được nhận ra khi có mặt trong tế bào. Hình 7.2 là sơ đồ cấu trúc của vector pBR322, một vector nhân dòng được dùng phổ biến trong kỹ nghệ gen của những năm 1980. Vector sau khi được gắn với gen ngoại lai, được biến nạp vào tế bào vi khuẩn (thường là *E. coli*) để gen được nhân lên. Việc đưa vào tế bào vi khuẩn còn là một bước cần thiết để sàng lọc hay khẳng định vector tái tổ hợp có mang đúng gen quan tâm hay không.



Hình 7.1. Sơ đồ các bước cơ bản của việc sản xuất E tái tổ hợp



Hình 7.2. Sơ đồ cấu tạo của vector nhân dòng pBR322

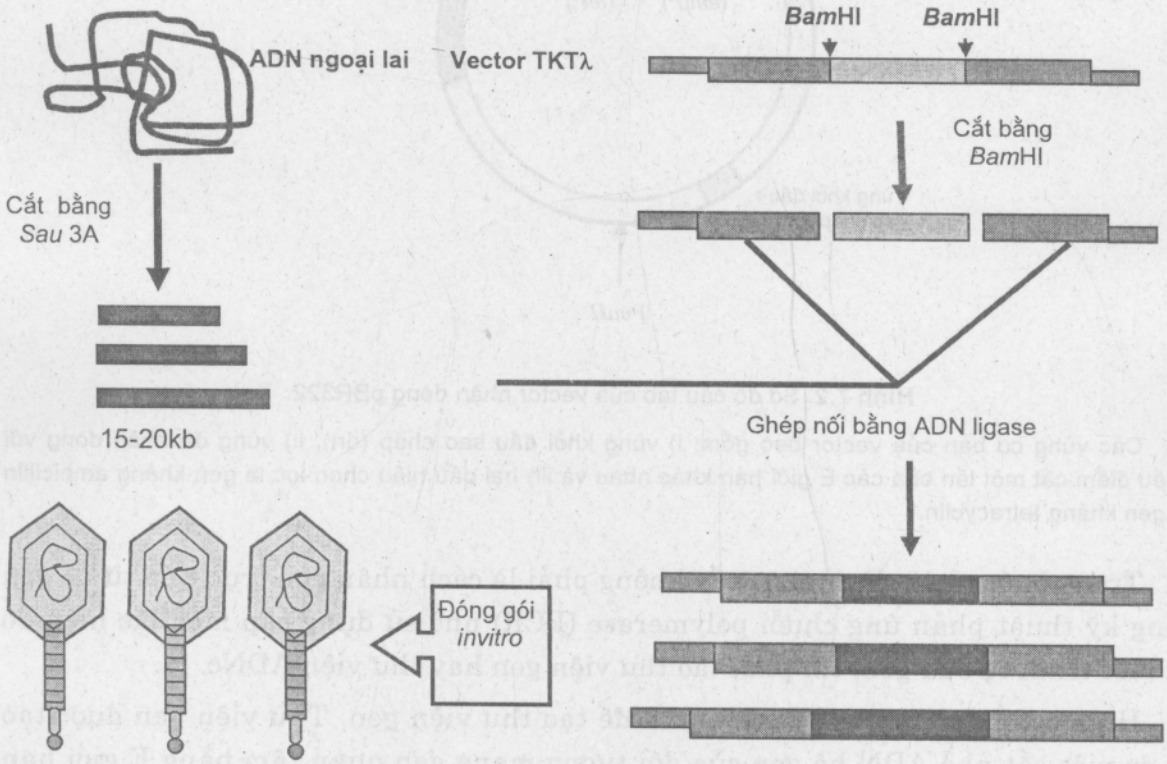
Các vùng cơ bản của vector bao gồm: i) vùng khởi đầu sao chép (ori), ii) vùng đa nhân dòng với nhiều điểm cắt một lần của các E giới hạn khác nhau và iii) hai dấu hiệu chọn lọc là gen kháng ampicillin và gen kháng tetracyclin.

Trong bước nhân dòng gen, nếu không phải là cách nhân gen trực tiếp từ hệ gen bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase (PCR) nhờ sử dụng cặp mồi đặc hiệu do đã biết trình tự của gen, thì phải tạo thư viện gen hay thư viện ADNc.

Hình 7.3 minh hoạ các bước chính để tạo thư viện gen. Thư viện gen được tạo ra do việc cắt nhỏ ADN hệ gen của đối tượng mang gen quan tâm bằng E giới hạn và sau đó ghép vào một vector nhân dòng thành dạng vector tái tổ hợp. Vì vậy thư viện gen là tập hợp của các vector tái tổ hợp mang các đoạn ADN khác nhau của hệ gen, trong đó có gen quan tâm. Theo cách này, gen quan tâm có thể nằm trọn trong một vector tái tổ hợp nhưng cũng có thể nằm ở một số vector khác nhau, và khi mỗi vector này đi vào một tế bào vi khuẩn để được nhân lên, thì điều đó có nghĩa là có một số khuẩn lạc hay vết tan (với vector thực khuẩn thể) mang gen quan tâm.

Thư viện ADNc được tạo ra từ việc tách ARNm tổng số của đối tượng quan tâm, sau đó tổng hợp ngược thành ADN (nên được gọi là ADN bổ sung hay ADNc) nhờ E sao chép ngược reverse transcriptase. Các ADNc sau đó được ghép vào vector nhân dòng để đưa vào vi khuẩn. Việc xuất phát từ ARNm có nghĩa là tách được các gen hoạt động. Hơn thế nữa, tách ARNm cho phép thu được phần trình tự mã hoá trực tiếp cho protein, các phần không mã hoá (intron) của gen nếu có thì đã được hệ thống hiệu chỉnh ARN (spliceosome) của tế bào loại bỏ. Tương tự như thư viện gen, thư viện ADNc trong một số trường hợp có thể chỉ chứa một

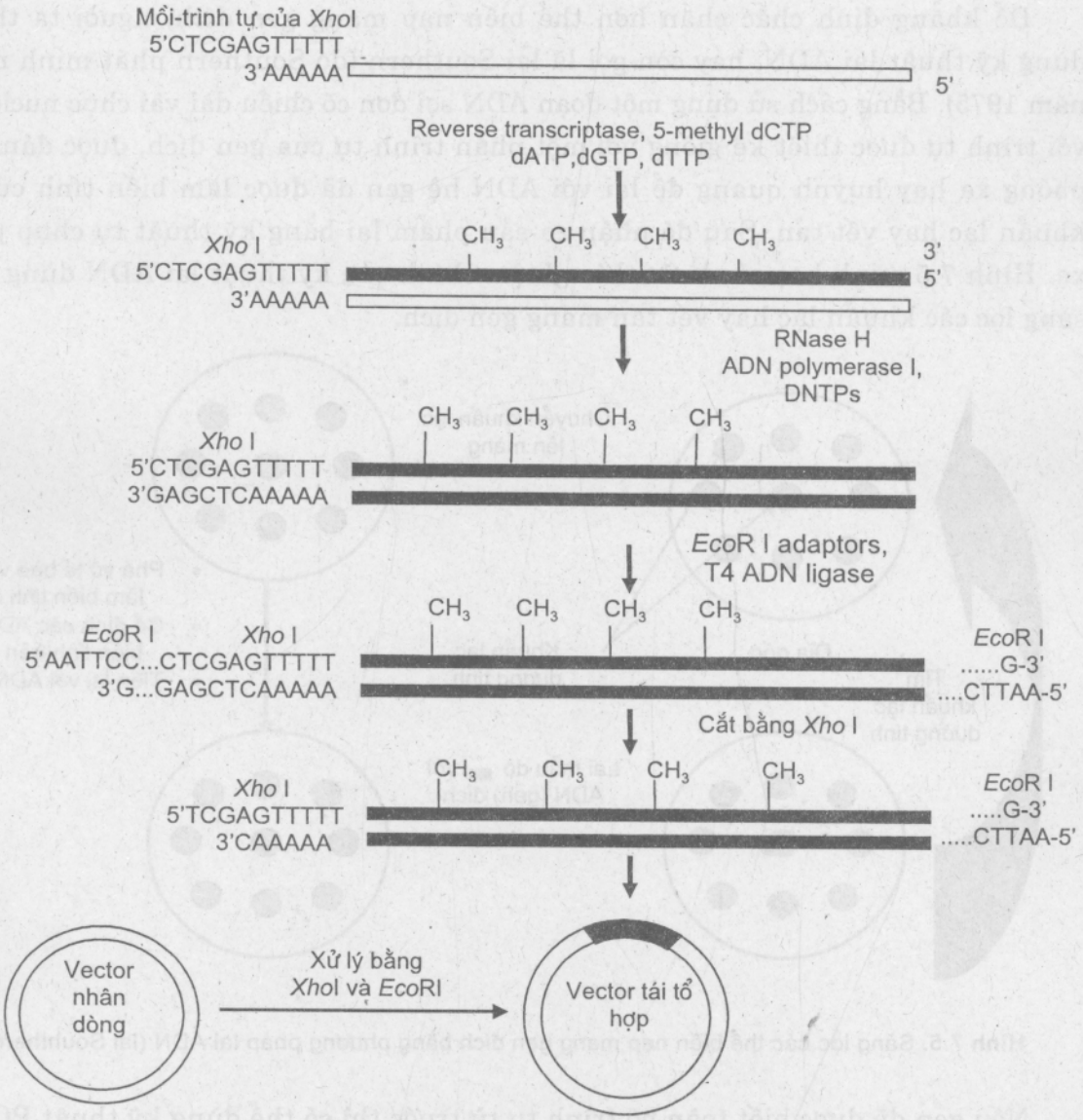
phần gen quan tâm, do khi tổng hợp ngược, một phần trình tự của ARNm đã không được tổng hợp. Ngày nay, đã có rất nhiều phương pháp khác nhau cho phép khắc phục được những tồn tại vừa nêu. Hình 7.4 là minh hoạ các bước cơ bản để tạo thư viện ADNc.



Hình 7.3. Sơ đồ tạo thư viện gen, sử dụng vector thực khuẩn thể λ

ADN hệ gen mang gen đích được cắt bằng E *Sau*3A (/GATC), sau đó phân chia để thu các đoạn ADN có kích thước từ 15-20kb. Vector thực khuẩn thể được cắt bằng *Bam*HI (G/GATCC) để loại đi đoạn ADN (có tên gọi là cắt bỏ/gắn vào) vốn không ảnh hưởng đến sự xâm nhiễm của thể virus trong *E. coli*. Các đoạn gen có các đầu dính tương thích với vector được nối vào vector nhờ ADN ligase, sau đó cho đóng gói để hình thành thể virus mang các đoạn gen của đối tượng quan tâm. Mỗi thể virus khi cho nhiễm *E. coli* sẽ tạo ra một loại vết tan.

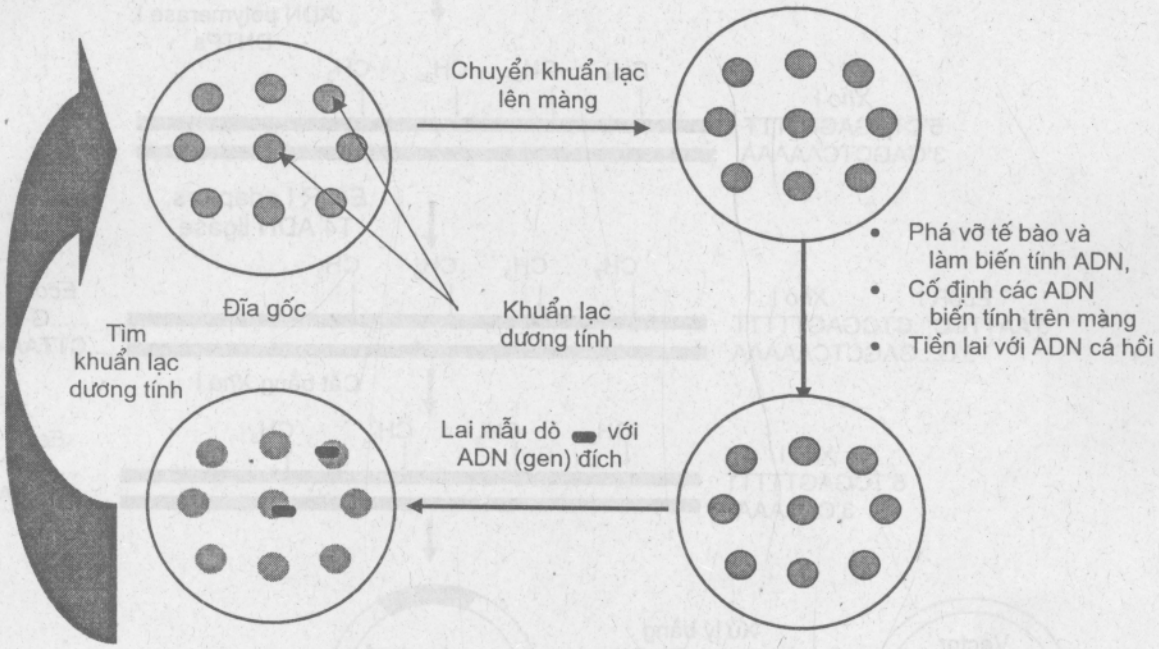
ARN thông tin được tách ra, với một oligodT gắn với phần trình tự của *Xho*I ở đầu cho phép tổng hợp sợi ADNc thứ nhất, RNase H loại bỏ sợi ARNm, RNAse H phân cắt sợi ARN thông tin, tạo các đoạn mồi để ADN polymerase I tổng hợp sợi ADNc thứ hai. Trình tự *Eco*RI được đưa vào hai đầu nhưng khi xử lý bằng cả *Xho*I và *Eco*RI thì tạo ra hai loại đầu dính khác nhau (của *Xho*I và *Eco*RI) nhờ đó cho phép đưa đúng chiều và đúng vị trí vào vector đã được xử lý bằng cùng hai E này. □: ARNm; ■: ADN.



Hình 7.4. Sơ đồ các bước tạo thư viện ADNc

Việc sàng lọc thư viện gen hay thư viện ADNc có thể được thực hiện qua một số bước và bằng các phương pháp khác nhau. Nếu gen được đưa vào plasmid và biến nạp vào vi khuẩn, thì bước đầu tiên để có thể nhận ra các thể biến nạp là nhờ các dấu hiệu chọn lọc. Thể mang gen do đưa vào plasmid có gen kháng kháng sinh (như gen kháng ampicillin- amp^R) nên khuẩn lạc phải sống được trên môi trường có chứa ampicillin. Gen đưa vào vùng đa nhân dòng và mã hoá cho một dấu hiệu chọn lọc thứ hai (ví dụ như kháng tetracyclin hay gen mã hoá cho E α-galactozidase thuỷ phân lactose/X-gal) thì thể mang gen ngoài việc kháng lại kháng sinh thứ nhất phải nhạy với kháng sinh thứ hai, hoặc mất khả năng tổng hợp E thuỷ phân lactose/X-gal do việc chèn gen đích vào đã làm cho gen mang dấu hiệu chọn lọc không còn giữ đúng trình tự mã hoá cho protein/E ban đầu.

Để khẳng định chắc chắn hơn thể biến nạp mang gen đích, người ta thường dùng kỹ thuật lai ADN, hay còn gọi là lai Southern (do Southern phát minh ra vào năm 1975). Bằng cách sử dụng một đoạn ADN sợi đơn có chiều dài vài chục nucleotide với trình tự được thiết kế giống với một phần trình tự của gen đích, được đánh dấu phóng xạ hay huỳnh quang để lai với ADN hệ gen đã được làm biến tính của các khuẩn lạc hay vết tan. Sau đó nhận ra sản phẩm lai bằng kỹ thuật tự chụp phóng xạ. Hình 7.5 minh hoạ các bước thí nghiệm chính của kỹ thuật lai ADN dùng trong sàng lọc các khuẩn lạc hay vết tan mang gen đích.



Hình 7.5. Sàng lọc các thể biến nạp mang gen đích bằng phương pháp lai ADN (lai Souhthern)

Nếu gen đã được biết toàn bộ trình tự từ trước thì có thể dùng kỹ thuật PCR với một cặp mồi đặc hiệu để phát hiện các thể mang gen đích. Trường hợp, chưa biết trình tự gen đích thì có thể dựa trên vùng trình tự amino acid có tính bảo thủ cao của protein/E do gen mã hoá hay của các protein/E có cùng chức năng đã biết để thiết kế mẫu dò ADN dùng cho thí nghiệm lai ADN. Mẫu dò trong trường hợp này được gọi là mẫu dò suy biến, vì một số amino acid được mã hoá không chỉ bởi một bộ ba mà bởi vài bộ ba khác nhau. Khi đó mẫu dò là một tổ hợp các khả năng có thể có của các oligonucleotide cùng mã cho đoạn peptide lựa chọn.

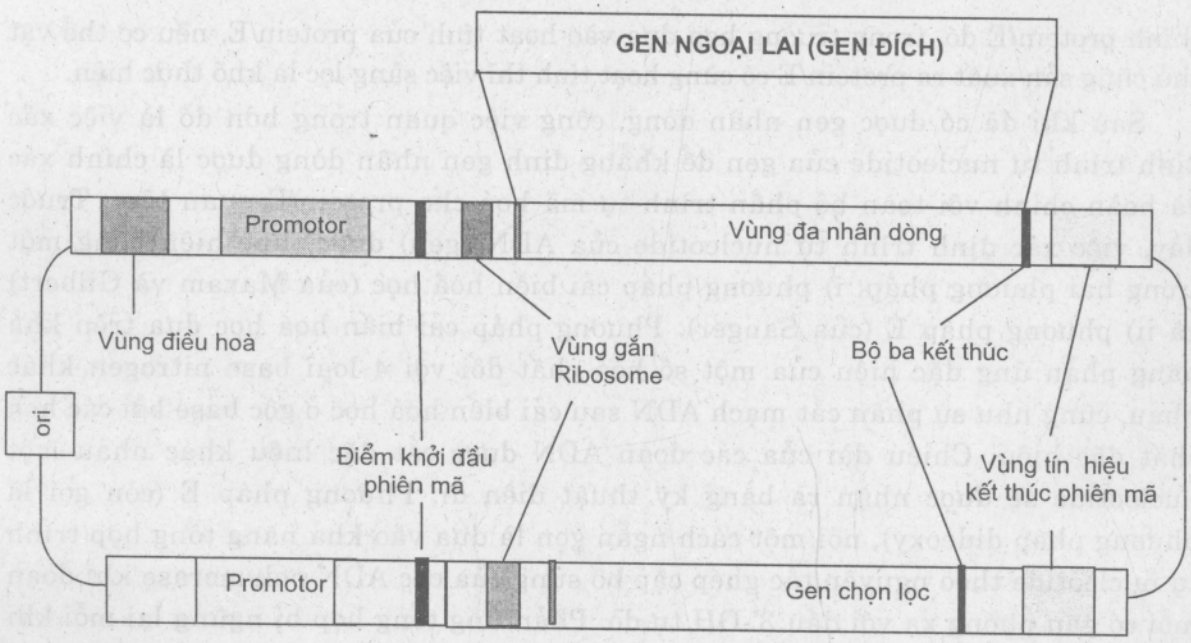
Trường hợp nếu gen đưa vào vector nhân dòng ở dạng có thể được biểu hiện thì có thể sàng lọc bằng phương pháp thẩm tách miễn dịch (Western blotting) mà nguyên tắc là dựa trên sự tương tác đặc hiệu giữa protein/E quan tâm như là kháng nguyên với kháng thể tương ứng đã được tạo ra trước đó. Ngoài ra, nếu gen được biểu hiện thành protein/E có hoạt tính thì việc sàng lọc có thể dựa trên sự xuất hiện hoạt tính của

chính protein/E đó, trong trường hợp dựa vào hoạt tính của protein/E, nếu cơ thể vật chủ cũng sản xuất ra protein/E có cùng hoạt tính thì việc sàng lọc là khó thực hiện.

Sau khi đã có được gen nhân dòng, công việc quan trọng hơn đó là việc xác định trình tự nucleotide của gen để khẳng định gen nhân dòng được là chính xác và hoàn chỉnh với toàn bộ phần trình tự mã hoá cho protein/E quan tâm. Trước đây, việc xác định trình tự nucleotide của ADN (gen) được thực hiện bằng một trong hai phương pháp: i) phương pháp cải biến hoá học (của Maxam và Gilbert) và ii) phương pháp E (của Sanger). Phương pháp cải biến hoá học dựa trên khả năng phản ứng đặc hiệu của một số hoá chất đối với 4 loại base nitrogen khác nhau, cũng như sự phân cắt mạch ADN sau cải biến hoá học ở gốc base bởi các hoá chất đặc hiệu. Chiều dài của các đoạn ADN được cắt đặc hiệu khác nhau một nucleotide sẽ được nhận ra bằng kỹ thuật điện di. Phương pháp E (còn gọi là phương pháp dideoxy), nói một cách ngắn gọn là dựa vào khả năng tổng hợp trình tự nucleotide theo nguyên tắc ghép cặp bổ sung của các ADN polymerase khi đoạn mồi có gắn phóng xạ với đầu 3'-OH tự do. Phản ứng tổng hợp bị ngừng lại mỗi khi đầu 3'-OH bị thay bằng 3'-H (do một dideoxyribonucleotide đã thay cho một deoxyribonucleotide). Còn các đoạn ADN được tổng hợp khác nhau một nucleotide sẽ được tách ra bằng kỹ thuật điện di và được hiện hình bằng kỹ thuật phóng xạ tự chụp được đọc. Ngày nay, việc xác định trình tự nucleotide của gen dễ dàng được thực hiện bằng việc sử dụng các bộ kit phản ứng chuyên dụng, các điểm dừng lại tương ứng với vị trí của từng nucletotide được phát hiện nhờ sử dụng các dideoxyribonucleotide gắn chất phát huỳnh quang đặc trưng cho A, C, G hay C và được đọc ra bằng các hệ thống phân tích trình tự nucleotide tự động.

Công việc tiếp theo là phải thiết kế gen vào một hệ thống biểu hiện thích hợp trong tế bào vật chủ. Gen muốn được biểu hiện phải được gắn vào một hệ thống biểu hiện thích hợp mà chủ yếu là phải có promotor thích hợp để gen được phiên mã trong tế bào vật chủ, phải có chứa vùng gắn ribosome, trình tự khởi đầu cũng như kết thúc của quá trình phiên mã và dịch mã thích hợp đối với tế bào vật chủ (hình 7.6). Ngoài ra, để gen được biểu hiện thành protein và phải có hoạt tính, trong nhiều trường hợp phải lưu ý đến việc tối ưu hoá mã bộ ba (đối với các bộ ba cùng mã hoá cho một amino acid) của gen ngoại lai, các khả năng cải biến sau dịch mã của tế bào vật chủ cũng như độc tính của protein đó với tế bào và độ bền/thời gian tồn tại của protein trọng tế bào.

Bằng công nghệ ADN tái tổ hợp gen mã hoá cho protein/E quan tâm có thể được đưa vào hệ thống vector có promotor khỏe, được thiết kế nhiều bản sao gen trên cùng một vector hay có thể được đưa xen vào nhiễm sắc thể tế bào vật chủ nhờ đó cho phép làm tăng hiệu suất sản phẩm. Ngoài ra, cũng bằng nguyên lý của thao tác gen, người ta có thể gắn gen quan tâm với các đoạn ADN mã hoá cho một protein làm bền hay một peptid tín hiệu để sản phẩm (dạng protein dung hợp) được tiết ra bên ngoài môi trường, tạo điều kiện thuận lợi cho việc thu nhận, tinh sạch. Việc loại bỏ protein đi kèm có thể được thực hiện nhờ gắn xen một trình tự nhận biết và phân cắt đặc hiệu của protease như yếu tố X_a hay của thrombin.



Hình 7.6. Sơ đồ cấu trúc của một vector biểu hiện gen với các vùng khởi đầu sao chép (ori), promotor, vùng gắn ribosome, bộ ba mở đầu (ATG), vùng đa nhân dòng để tiếp nhận gen đích, bộ ba kết thúc (TAA/ TAG/TGA), vùng kết thúc phiên mã, ngoài ra còn có gen chọn lọc.

7.2. SẢN XUẤT CÁC E TÁI TỔ HỢP

Sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp có thể cho phép: i) chủ động về nguồn nguyên liệu cung cấp E ban đầu, ii) nâng cao hiệu suất sản xuất, chất lượng E, iii) dễ dàng công nghệ hoá quá trình sản xuất và nhờ đó, iv) giảm được giá thành sản phẩm.

Một công việc rất cần thiết trong việc khởi đầu công nghệ sản xuất một E nào đó là phải điều tra các nguồn E tự nhiên, đặc biệt là các E với những đặc tính mới, ưu việt.

Hầu hết các E (do bản chất là protein hay ARN) là nhạy cảm với các yếu tố môi trường. Tuy nhiên, cũng có một số ít E tỏ ra bền với các/một số yếu tố môi trường như nhiệt độ, acid/kiềm hay có những hoạt tính đặc biệt hơn các E có cùng hoạt tính khác.

Các nghiên cứu khác nhau cho thấy hầu hết E tách được từ các vi sinh vật sống ở suối nước nóng thường tỏ ra bền với nhiệt hơn nhiều so với các E cùng loại nhưng tách ra từ các cơ thể khác. Ví dụ, Taq ADN polymerase tách ra từ vi khuẩn *Thermus aquaticus*, hay một số protease, ligase tách được từ các vi sinh vật sống ở các suối nước nóng có nhiệt độ cao tỏ ra rất bền với nhiệt và hoạt động tối thích ở nhiệt độ 60-80°C. Các E proteolytic tách từ dạ dày (pepsin, rennin) bền với tác dụng của acid và hoạt động tốt nhất ở pH acid.

Việc tìm ra các amylase có khả năng thuỷ phân tinh bột sống có thể dùng cho quá trình thuỷ phân tinh bột không phải hồ hoá trong sản xuất fructose hay sản xuất alcohol.

Phát hiện ra các protease có tính đặc hiệu cao kiểu tương tự yếu tố X_a của quá trình đông máu (GlyGlySerIleGluGly/ArgValHisLeu) hay các endonuclease giới hạn

có trình tự phân cắt và nhận biết mới luôn luôn là sự đóng góp quan trọng cho sự phát triển nhanh chóng của lĩnh vực công nghệ sinh học phân tử.

Vấn đề khó khăn là ở chỗ, các E có độ bền cao hay những tính chất đặc biệt thường không phải dễ thu nhận một lượng lớn, vì các sinh vật chứa E này đòi hỏi điều kiện sinh trưởng, phát triển đặc biệt, hoặc hàm lượng E quá thấp. Công nghệ ADN tái tổ hợp là cách giải quyết chủ động những khó khăn vừa nêu. Ngày nay, rất nhiều E (đại diện cho tất cả 6 lớp E) đã được sản xuất bằng công nghệ ADN tái tổ hợp, trong đó phải kể đến hầu hết các E giới hạn và các E khác dùng trong công nghệ gen.

Để sản xuất E tái tổ hợp, các nhà nghiên cứu phải tách được gen mã hoá cho E quan tâm và thiết lập được hệ thống biểu hiện E đó. Tuy nhiên, ngay cả khi E được biểu hiện thì không có nghĩa là công việc của nhà công nghệ đã kết thúc mà tiếp theo là phải cải tiến hệ thống biểu hiện để E được sản xuất nhiều hơn, theo một cơ chế có thể điều hoà đơn giản. Trong các cải tiến biểu hiện thì trước hết cần tập trung để giải quyết những khâu:

– Hiệu suất sản xuất E cao.

– Quá trình tinh sạch được đơn giản.

– E có độ bền và hiệu quả xúc tác cao.

– Có thể đưa vào sản xuất ở quy mô công nghiệp.

7.3. CẢI BIẾN CÁC E BẰNG CÁC KỸ THUẬT GÂY ĐỘT BIẾN ĐỊNH VỊ

Đột biến định vị là cách gây các đột biến vào những vị trí xác định trên phân tử ADN nhằm thay thế một hay một số gốc amino acid trong phân tử protein/E.

Xét về lý thuyết thì người ta có thể biến đổi trực tiếp các phân tử protein/E. Tuy vậy, tạo các biến đổi hoá học trên phân tử protein là công việc khó khăn, không đặc hiệu và phải làm lặp lại với từng lô chế phẩm mới. Chính vì vậy, làm biến đổi các gốc amino acid trên protein/E nhưng bắt đầu ở mức độ ADN là cách tốt nhất cho phép khắc phục được những khó khăn và hạn chế vừa nêu.

Bằng phương pháp gây đột biến định vị có thể:

– Thay đổi hằng số xúc tác K_m của E và cơ chất, tốc độ phản ứng cực đại V_{max} cũng như hiệu quả xúc tác chung V_{max}/K_m.

– Thay đổi độ bền của E với nhiệt độ, pH hay các tác nhân gây biến tính.

– Nâng cao hiệu quả xúc tác của E trong dung môi không phải là H_2O.

– Cải tiến E hoạt động không cần đến cofactor.

– Nâng cao tính đặc hiệu giữa E và cơ chất bằng cách cải tiến vùng gắn kết giữa E và cơ chất.

– Làm tăng tính kháng của E với tác dụng của protease tế bào.

– Làm thay đổi khả năng điều hoà dị không gian, do vậy có thể làm giảm sự ức chế ngược của chất trao đổi.

Cơ sở nghiên cứu gây đột biến định vị là các hiểu biết về sự liên quan giữa cấu trúc và chức năng của protein/E. Đột biến có thể là thay thế một gốc amino acid này bằng một gốc amino acid khác, hay có thể là sự loại bỏ một vài gốc amino acid trong phân tử E.

Việc tạo đột biến định vị theo cách thay đổi gốc amino acid trong rất nhiều trường hợp chỉ cần thay đổi một nucleotide, bởi vì trình tự mã hoá của một số amino acid khác nhau chỉ khác nhau về một gốc base nitơ, ví dụ như giữa Glu (CAA, CAG) và Lys (AAA, AAG), hay giữa Ser (AGU, AGC) và Cys (UGU, UGC).

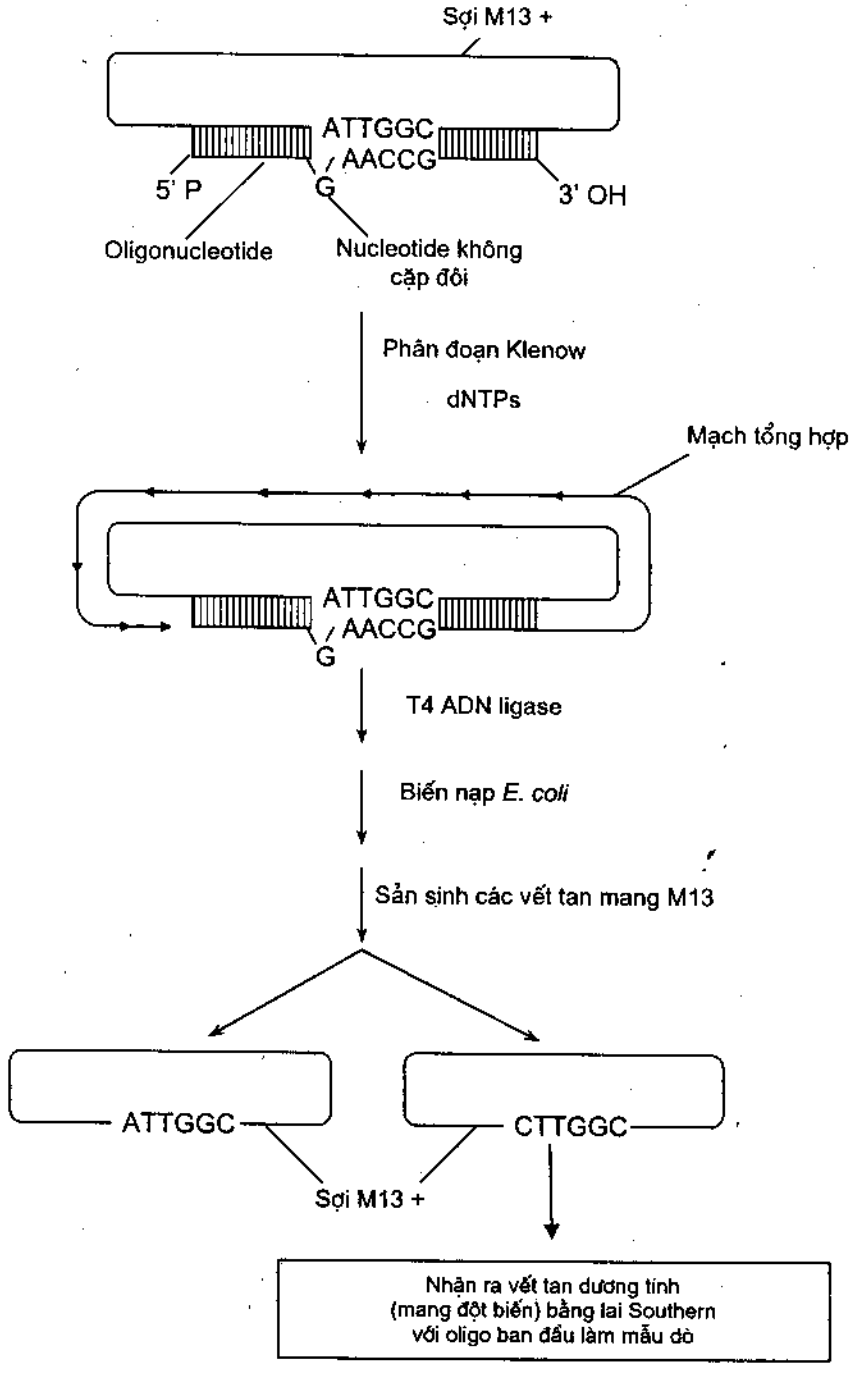
Vấn đề khó khăn là ở chỗ không phải người ta đã biết được một cách đầy đủ những thay đổi về cấu trúc nào thì sẽ dẫn đến những thay đổi cụ thể nào về tính chất hay chức năng của từng protein hay E quan tâm. Chính vì vậy, bên cạnh các hiểu biết về tương quan cấu trúc-chức năng của protein, người ta dùng phương pháp gây biến đổi định vị các gốc amino acid trong phân tử protein để tìm hiểu những thay đổi đi kèm về tính chất và chức năng của chúng. Nói cách khác, đột biến định vị cũng là cơ sở để nghiên cứu mối quan hệ giữa cấu trúc và chức năng. Bằng cách "thử và sai", người ta cũng sẽ hiểu hơn về vai trò của các amino acid, các loại liên kết, cấu trúc đối với chức năng xúc tác của E. Dưới đây là một số phương pháp gây đột biến định vị.

7.3.1. Phương pháp dùng oligo mang một nucleotide không ghép cặp thông qua ADN thực khuẩn thể M13

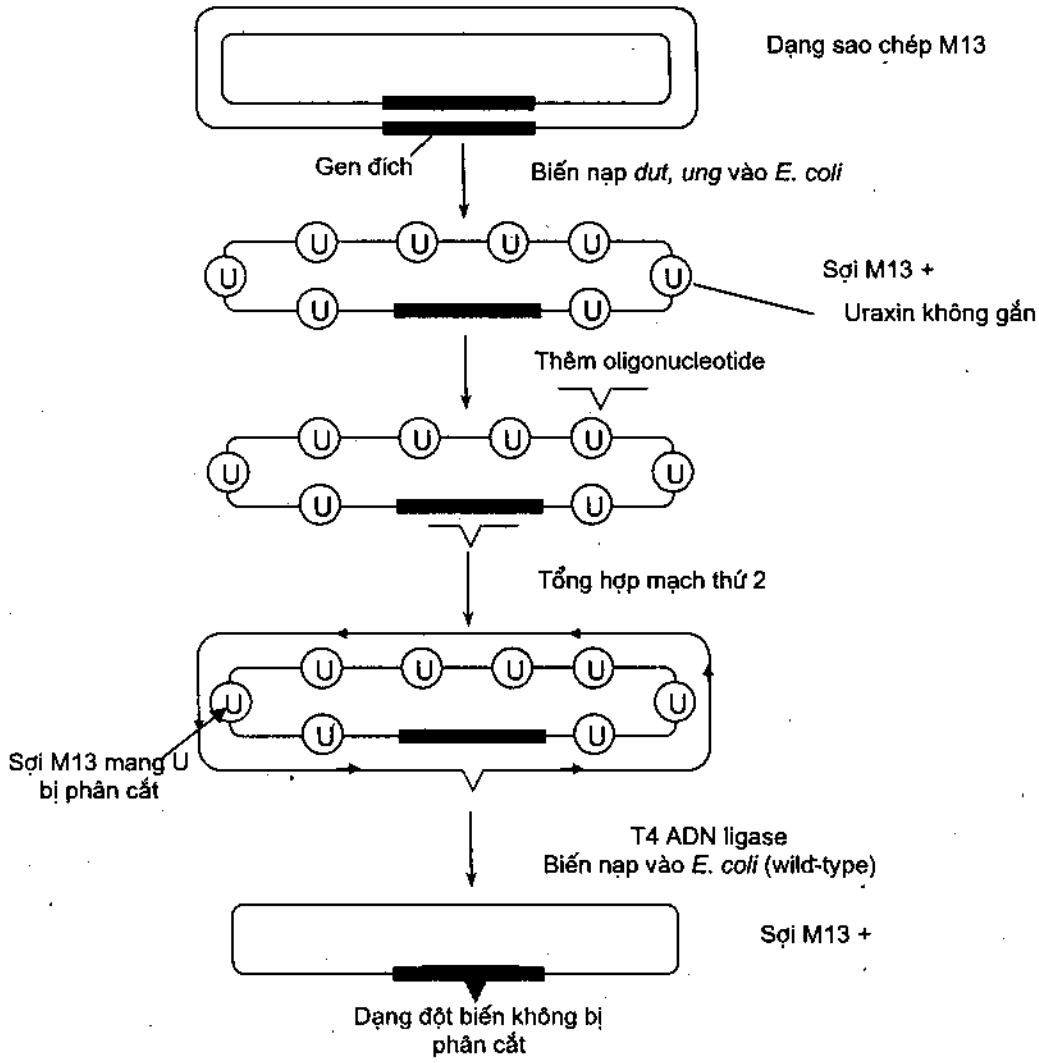
Hình 7.7 minh hoạ quá trình tạo đột biến định vị sử dụng ADN sợi đơn (+) của thực khuẩn thể M13. Sợi M13+ mang gen đích cần gây đột biến được cho gắn với một oligo bổ sung nhưng mang nucleotide không ghép cặp. Khi bổ sung các dNTPs và phân đoạn Klenow (của ADN polymerase I từ *E. coli* nhưng không còn hoạt tính 5'- exonuclease) thì mạch bổ sung được tổng hợp có mang một điểm không ghép cặp với sợi gốc. T4 ADN ligase được sử dụng để gắn chỗ hở. Sau đó sản phẩm được biến nạp vào *E. coli*, thực khuẩn thể M13 được nhân lên trong tế bào và tạo ra các vết tan. Dùng chính oligo ban đầu có đánh dấu phóng xạ để sàng lọc các vết tan bằng kỹ thuật lai Southern ở điều kiện lai rất khắt khe để tìm ra vết tan dương tính có mang đột biến. Trong ví dụ trên đây, ATT ban đầu mã hoá cho Ile được thay bằng CTT mã hoá cho Leu.

Theo lý thuyết sẽ có 50% số khuẩn lạc là dương tính, nhưng trên thực tế thì tỷ lệ các khuẩn lạc dương tính chỉ chiếm khoảng 1-5%, điều này gây khó khăn cho việc sàng lọc các thể đột biến. Để khắc phục trở ngại trên, người ta đã phát triển phương pháp làm giàu đột biến. Cách làm là dựa vào chủng *E. coli* bị đột biến về gen dUTPase (*dut*) và gen Uracil-N-glicosylase (*ung*) (hình 7.8). Khi gen dUTPase bị đột biến thì hàm lượng dUTP trong tế bào cao hơn bình thường và trong quá trình tổng hợp ADN sẽ có khoảng 1% gốc dTMP bị thay thế bởi dUMP. Thông thường khi có hiện tượng này thì Uracil-N-glicosylase sẽ cắt bỏ các gốc uraxin ra khỏi sợi ADN để lại các vị trí không mang base, và AP nuclease sẽ phân cắt sợi ADN ở các vị trí này, một số E sửa chữa sai sót khác được huy động để tổng hợp lại đoạn bị phân cắt. Tuy vậy, khi gen *ung* cũng bị tổn thương nên đột biến (thay thế dTMP bằng dUMP) không bị loại bỏ. Bằng cách này người ta tạo ra M13+ có mang một số gốc dUMP. Sau đó tiến hành đưa đột biến vào gen đích trong sợi M13+ bằng cách tương tự như ở hình 7.7. Sau khi tổng hợp được sợi ADN kép thì người ta biến nạp vào chủng *E.*

coli mới có cả hai gen *dut* và *ung* hoạt động bình thường. Trong tế bào *E. coli*, do hai gen *dut* và *ung* hoạt động bình thường nên sợi M13+ có mang dUTP sẽ bị phân cắt và chỉ có sợi mới tổng hợp được sao chép, bằng cách này có thể làm tăng hiệu quả chọn lọc các thể đột biến lên một cách rất đáng kể.



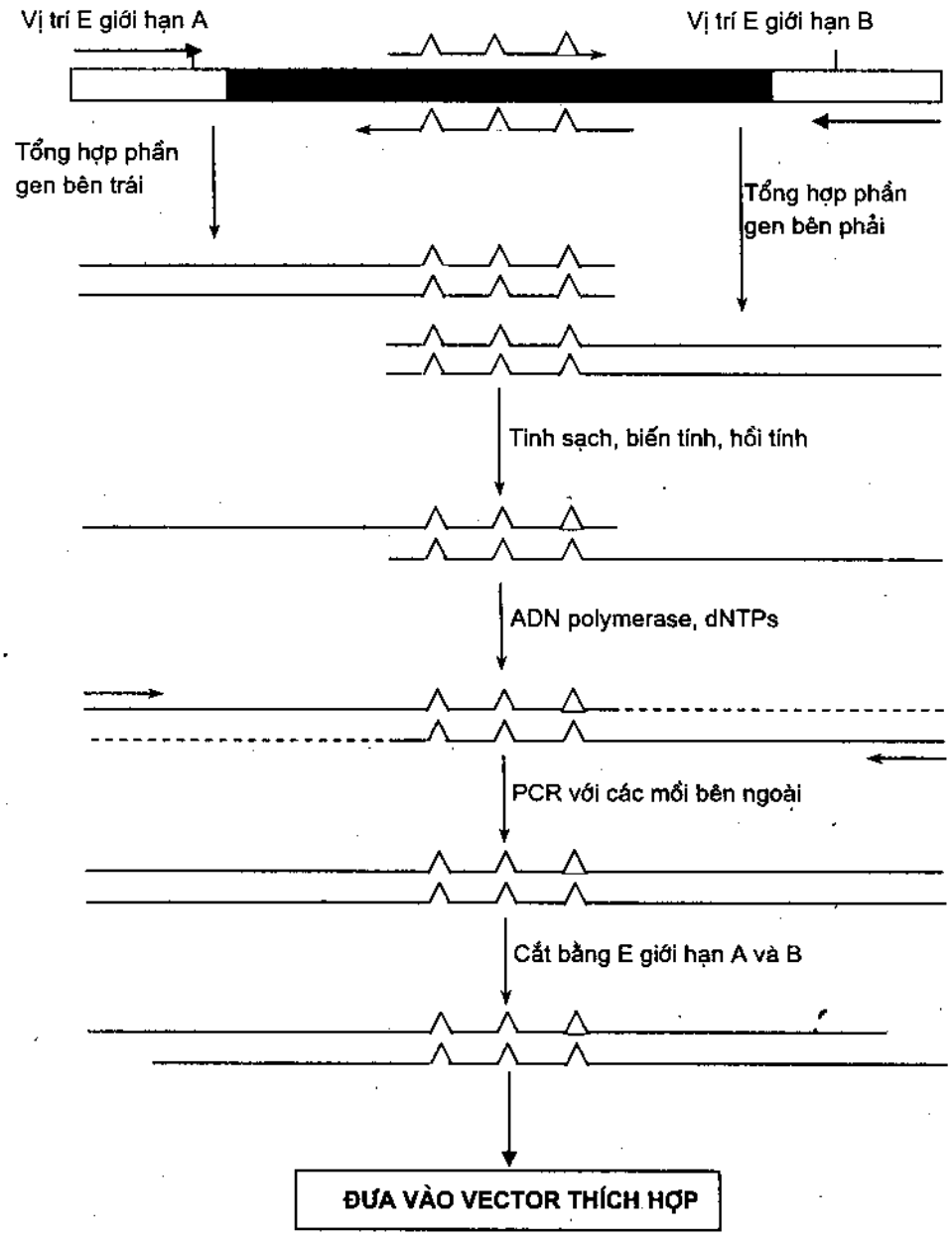
Hình 7.7. Đưa đột biến điểm vào gen thông qua ADN thực khuẩn thể M13+ và một oligo có một nucleotide (nt) không bắt cặp và tổng hợp gen bằng ADN polymerase. *(Phỏng theo Glick và Pasternak, 2003).*



Hình 7.8. Làm giàu đột biến điểm ở M13+ mang gen đích thông qua chủng *E. coli* chứa đột biến gen mã hoá của enzym dUTPase (*dut*) và Uracil-N-glicosylase (*ung*). *(Phỏng theo Glick và Pasternak, 2003).*

7.3.2. Tạo đột biến định vị bằng oligo thông qua phản ứng PCR

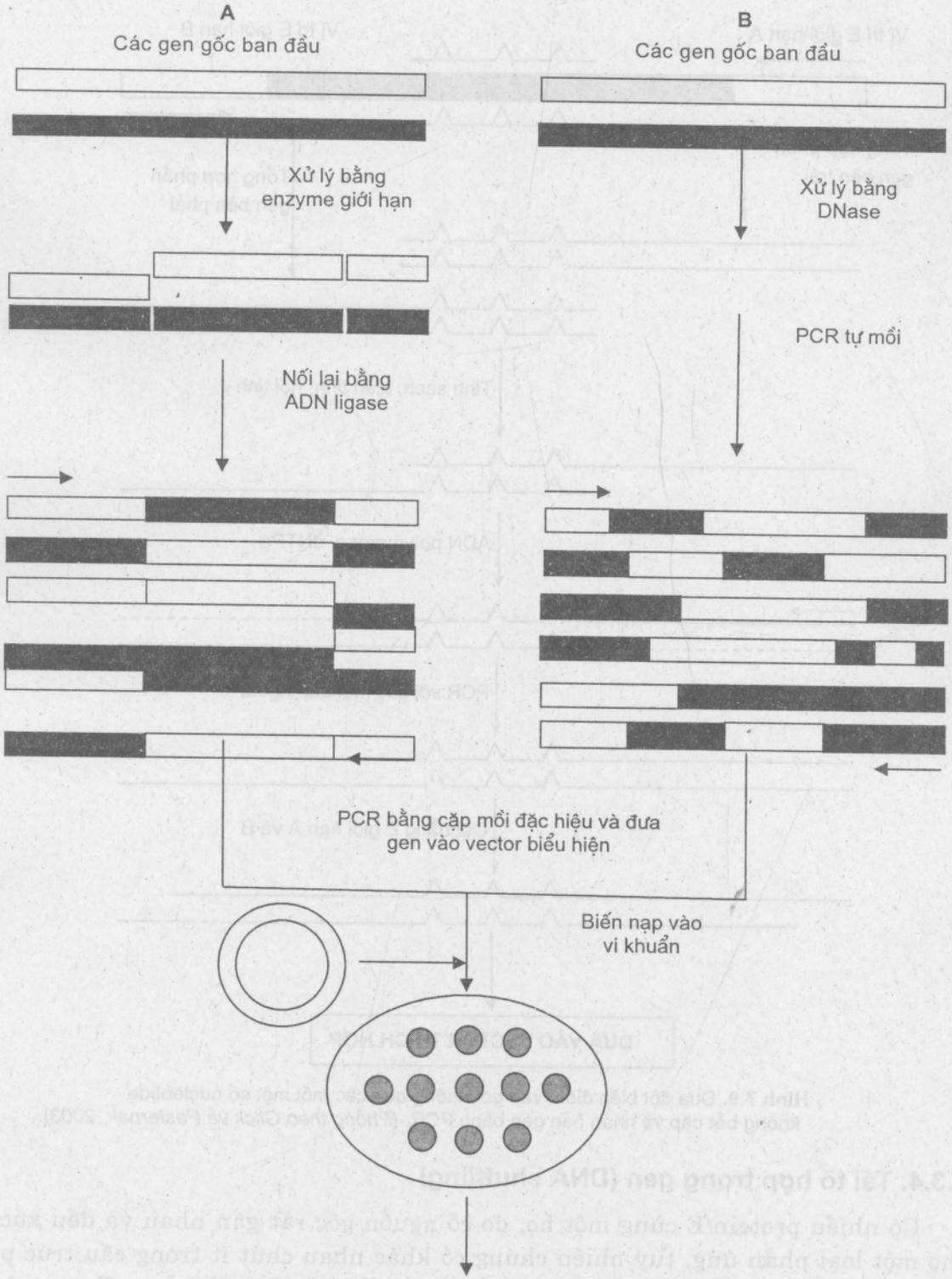
Cách tạo đột biến bằng oligo và PCR thông qua việc sử dụng hai cặp mồi mang đột biến để nhân gen đích thành hai phần (hình 7.9). Hai điểm cắt của 2 E giới hạn được đưa vào hai đầu của gen. Phần gen ở vùng cần tạo đột biến được nhân bản lên ở cả hai phản ứng, nghĩa là có sự gối lên nhau ở vùng này. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch, trộn với nhau, cho biến tính và hồi tính để hai đoạn gen lai với nhau ở phần trùng lặp ban đầu. Sử dụng dNTPs và T4 ADN polymerase hay phân đoạn Klenow để tổng hợp thành dạng sợi đôi hoàn chỉnh và sau đó dùng ADN này làm khuôn để nhân bản toàn bộ gen lên bằng PCR với cặp mồi có mang điểm cắt của hai E giới hạn chặn ở hai đầu gen. Sản phẩm PCR sau đó được cắt bằng 2 E giới hạn này và đưa vào vector biểu hiện thích hợp.



Hình 7.9. Đưa đột biến điểm vào gen thông qua các mồi một số nucleotide không bắt cặp và nhân bản gen bằng PCR. *(Phỏng theo Glick và Pasternak, 2003).*

7.3.4. Tái tổ hợp trong gen (DNA shuffling)

Có nhiều protein/E cùng một họ, do có nguồn gốc rất gần nhau và đều xúc tác cho một loại phản ứng, tuy nhiên chúng có khác nhau chút ít trong cấu trúc phân tử và vì vậy có khác nhau ít nhiều về hiệu quả xúc tác, độ bền... Trong những trường hợp này, người ta có thể tạo ra những E cải biến với những đặc điểm độc đáo mà không một phân tử E ban đầu nào có được bằng cách tách ADN hay ADNc mã hoá cho các protein này và tái kết hợp các phần khác nhau của chúng thành những gen dạng lai. Kỹ thuật này được gọi là tái tổ hợp trong gen (DNA shuffling).



Hình 7.10. Sơ đồ các bước tạo enzyme cải biến bằng kỹ thuật tái tổ hợp trong gen
A: Sử dụng E giới hạn để xử lý các gen gốc, sau đó nối lại tạo gen lai bằng ADN ligase,
B: Sử dụng DNase I để xử lý các gen gốc, sau đó tạo các gen lai bằng PCR tự mồi.

Cách làm đơn giản nhất đối với kỹ thuật này là cho các gen gốc vào cùng một hỗn hợp, tiến hành cắt các gen bằng E giới hạn, sau đó nối lại bằng ADN ligase. Khi đó sẽ xảy ra sự tái tổ hợp ngẫu nhiên giữa các đoạn ADN có nguồn gốc từ các gen khác nhau. Nếu có hai gen gốc ban đầu, và trên mỗi gen có 3 điểm cắt của E giới hạn thì băng kỹ thuật này cho phép tạo ra 14 tổ hợp gen mới (không kể hai gen gốc ban đầu (hình 7.10A).

Cách thứ hai là người ta xử lý các gen gốc bằng DNase I, E này tạo những điểm cắt ngẫu nhiên trên các phân tử ADN. Sau đó người ta sử dụng kỹ thuật PCR tự mồi. Trong môi trường có ADN polymerase bền nhiệt, dNTPs, với các chế độ nhiệt biến tính và hồi tính các đoạn ADN của các gen gốc khác nhau nhưng do sự tương đồng chủ yếu trong trình tự nên sẽ kết hợp với nhau. Những phần nhô ra sẽ được tổng hợp thành dạng đầu bằng qua bước kéo dài chuỗi bởi ADN polymerase. Sau một loạt chu kỳ, tất cả các đoạn đều có kích thước như gen gốc ban đầu, còn trình tự nucleotide của các đoạn là sự tái tổ hợp ngẫu nhiên của các đoạn gen gốc (hình 7.10B).

Sau khi có được các gen lai, người ta dùng PCR với cặp mồi đặc hiệu với trình tự của hai đầu gen, có thể gắn thêm phần trình tự của E giới hạn mới để nhân bản các gen và đưa vào vector biểu hiện. Bằng cách sử dụng một kỹ thuật sàng lọc với các ngưỡng cần đạt về hoạt độ hay độ bền mà người ta có thể chọn ra được những gen lai mã hoá cho các E với những tính chất, hoạt tính được cải thiện. Gen lai sau đó được xác định trình tự để biết được trong gen đã có những thay đổi nào cũng như nhờ đó sẽ hiểu thêm được vai trò của những thay đổi đó đối với sự biến đổi về cấu trúc và chức năng, hoạt tính của phân tử E.

Bên cạnh các kỹ thuật vừa nêu, nhiều cách gây đột biến định vị khác cũng đã được phát triển cho phép đưa các đột biến điểm hay thậm chí đột biến thêm đoạn và mất đoạn vào trong gen đích. Bằng những phương pháp này, người ta đã tạo ra nhiều protein/E với hoạt tính, độ bền được cải thiện, đồng thời làm sáng tỏ thêm vai trò của các gốc amino acid khác nhau trong chức năng của protein.

Ví dụ, subtilisine từ một số vi khuẩn Gram (+) là một E được dùng nhiều trong bột giặt. E cần cofactor là Ca^{2+}. Thực tế môi trường trong bột giặt chứa nhiều chất tạo phức với ion kim loại, do đó làm mất hoạt tính E. Bằng cách gây đột biến loại bỏ các amino acid từ 75 - 83 là vùng gắn Ca^{2+}, E vẫn giữ được cấu hình tương tự dạng tự nhiên và vẫn giữ được hoạt tính xúc tác. Tương tự, khi thay thế một số gốc amino acid trong phân tử của E này như Ser-3 → Cys-3, Gln-205 → Cys-205... đã làm tăng đáng kể độ bền của E.

Ví dụ thứ hai về ứng dụng của kỹ thuật gây đột biến định vị là việc làm tăng hiệu suất xúc tác của E với trường hợp E Tirosine–ARNvc synthetase xúc tác cho phản ứng gắn Tyr vào $tARN^{tyr}$ với ATP là chất cho năng lượng.

Khi cấu trúc không gian của E được nghiên cứu, người ta tiến hành thay thế Thr-51 trong trung tâm hoạt động của Tyrosine–ARNvc synthetase bằng một amino acid khác là Ala, Pro đã làm thay đổi cả K_{cat} và K_m.

Dạng E	K_{cat} (S^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}^*/K_m (S^{-1}, M^{-1})
Thr - 51 (dạng dại)	4,7	2,5	1,880

Ala - 51 (dạng ĐB)	4,0	1,2	3,300
Pro – 51 (dạng ĐD)	1,8	0,019	94,74

Một ví dụ nữa về việc gây đột biến định vị là trường hợp E DNase I dùng trong điều trị bệnh xơ hoá nang (cystic fybrosis). Bệnh nhân bị bệnh này nhạy cảm với sự tấn công của vi khuẩn và khi sử dụng các kháng sinh, các vi khuẩn chết, giải phóng ra ADN tích tụ ở dạng dịch nhầy gây tắc tuyến ruột và các phế quản trong phổi, gây cực kỳ khó thở. Việc sử dụng chế phẩm thuốc DNase I dưới dạng thuốc xịt cho phép làm thông các tắc nghẽn này, giúp cho bệnh nhân thở được dễ dàng hơn. Tác dụng của thuốc là nhờ DNase I phân giải các ADN tích tụ. Tuy vậy, hạn chế của liệu pháp là E bị ức chế cạnh tranh bởi actin do các tế bào bạch cầu chết giải phóng ra. Ái lực kết hợp giữa actin với DNase I rất cao. Thông qua các nghiên cứu về cấu trúc của phân tử DNase I và sự tương tác của nó với actin, người ta đã tiến hành gây đột biến định vị thay thế gốc Ala-144 bằng Arg-144 hoặc thay gốc Tyr-65 bằng Arg-65, nhờ đó đã giảm ái lực của actin với E xuống 10.000 lần, ngoài ra các E đột biến kháng actin lại có hoạt tính phân giải ADN cao gấp 50 lần dạng ban đầu.

Điều cần lưu ý khi gây đột biến định vị để cải biến các E là việc làm tăng độ bền với nhiệt của E thường làm giảm tính mềm dẻo chung và do vậy E có thể bị giảm hoạt tính xúc tác.

Chương 8

ỨNG DỤNG ENZYME

E có những đặc tính ưu việt hơn các chất xúc tác khác như:

– Có hiệu quả xúc tác cao, có thể làm tăng vận tốc phản ứng lên 10^5 - 10^{12} lần so với khi không có chất xúc tác.

– Có thể hoạt động ở điều kiện nhiệt độ và áp suất bình thường (nhiệt độ 20-40^{0}C, pH từ 5-8).

– Có tính đặc hiệu cao, tính đặc hiệu lập thể v.v...

– Nhiều E không bị mất hoạt tính trong dung môi hữu cơ.

Do đó sử dụng E sẽ đem lại hiệu quả kinh tế lớn, không gây ảnh hưởng xấu đến môi trường.

Có thể sử dụng E theo 2 cách:

1) Không tách E khỏi nguyên liệu, điều chỉnh các yếu tố vật lý, hoá học thích hợp cho hoạt động của E sẵn có để chuyển hoá cơ chất sẵn có trong nguyên liệu. Cách này được dùng từ rất lâu, dễ thực hiện, nhưng phạm vi ứng dụng bị giới hạn.

2) Tách E khỏi nguyên liệu, sản xuất các chế phẩm E có độ sạch khác nhau để sử dụng trên nhiều đối tượng khác nhau, vào nhiều lĩnh vực khác nhau.

Theo cách này, E được ứng dụng rộng rãi hơn, nhưng cần *phát triển ngành công nghệ sản xuất E, và tìm biện pháp để giảm giá thành chế phẩm E*. Để giải quyết vấn đề này, cần tìm *nguồn nguyên liệu thích hợp, rẻ tiền hoặc tìm biện pháp để có thể sử dụng E lặp lại nhiều lần (E không tan), sử dụng các biện pháp công nghệ sinh học*.

E đã và đang được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như:

– Nghiên cứu khoa học, nghiên cứu cấu trúc phân tử.

– Phân tích các chất, xác định chính xác hàm lượng các chất.

– Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và các ngành công nghiệp khác.

– Ứng dụng trong y, dược.

8.1. SỬ DỤNG E TRONG PHÂN TÍCH CÁC CHẤT

– Yêu cầu: các E phải có độ sạch cao, tính đặc hiệu cao.

– Phạm vi ứng dụng và một số ví dụ.

8.1.1. Sử dụng E để nghiên cứu cấu trúc protein, TTHĐ của E (xem 6.3.6.1, tr.85)

– Sử dụng các protease có tính đặc hiệu cao như trypsin, để *nghiên cứu cấu trúc*

phân tử protein, vai trò của cấu trúc bậc I đối với hoạt tính sinh học của phân tử protein, E.

8.1.2. Sử dụng E như các hóa chất để phân tích, định lượng các chất

– Có thể xác định các chất đặc biệt với *hàm lượng rất thấp*, lẫn với các chất khác tương tự về mặt hóa học mà với phương pháp hóa học khó lòng phân biệt chúng để có thể xác định chính xác với độ nhạy cao.

– Có thể *phân tích các chất không bền*, sử dụng E để phân tích có thể tiến hành ở những điều kiện nhẹ nhàng về pH (gần trung tính), nhiệt độ (gần nhiệt độ phòng).

Có thể sử dụng E để định lượng cơ chất, coE, các chất hoạt hóa, các chất kìm hãm E.

8.1.2.1. Những nguyên tắc chung khi sử dụng E để phân tích các chất

Xác định cơ chất của E: Thông qua việc xác định sản phẩm được tạo thành dưới tác dụng của E. Do đó phải tạo điều kiện thế nào để toàn bộ cơ chất được chuyển hóa thành sản phẩm, và có sự phụ thuộc tuyến tính giữa vận tốc đầu phản ứng với nồng độ chất cần phân tích, cụ thể như sau:

– Nồng độ E phải đủ cao.

– Nồng độ cơ chất đủ thấp để bảo đảm phản ứng tiến hành là phản ứng bậc 1, chỉ phụ thuộc vào nồng độ cơ chất cần xác định. Khi cần thiết phải thử với các nồng độ cơ chất khác nhau để lựa chọn nồng độ thích hợp đạt được yêu cầu phân tích.

* Nếu sử dụng E cần CoE thì nồng độ CoE phải đủ lớn để bảo đảm không làm thay đổi đặc tính của phản ứng bậc 1.

* Phải bảo đảm sản phẩm phản ứng (hoặc đồng sản phẩm phản ứng, ví dụ NADPH, NADH đối với các phản ứng trong đó $NADP^+$ hoặc NAD^+ là cơ chất hoặc cofactor) phải hoàn toàn không có mặt khi phản ứng chưa bắt đầu. Nếu như vậy thì phản ứng chỉ phụ thuộc vào nồng độ cơ chất ban đầu (ví dụ NAD^+, $NADP^+$) mà ta cần phân tích, và có thể đo trực tiếp sản phẩm được tạo thành (đo độ hấp thụ của NADH ở 340nm, vì NAD^+ hoặc $NADP^+$ không hấp thụ ở bước sóng này) để tính nồng độ cơ chất ban đầu.

Nói chung, việc sử dụng E để định lượng cơ chất của nó được tiến hành thuận lợi khi sản phẩm của phản ứng có thể được định lượng dễ dàng.

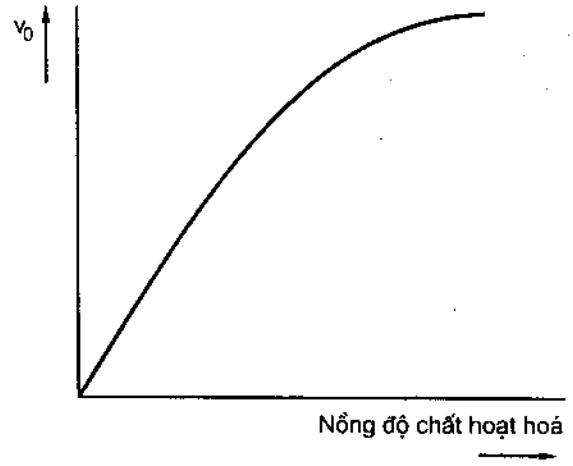
8.1.2.2. Một số ví dụ

– *Xác định cơ chất* sử dụng amylase (sau đó kết hợp với thủy phân bằng acid) để định lượng tinh bột sẽ cho *kết quả chính xác hơn* khi dùng acid (vì một số polysaccharid khác như hemicellulose cũng bị thủy phân bởi acid ở các điều kiện giống với tinh bột).

– *Xác định CoE,* vì CoE có vai trò như là đồng cơ chất nên có thể định lượng CoE theo cách hoàn toàn giống như định lượng cơ chất.

– *Xác định chất hoạt hóa E:* Có thể sử dụng E để định lượng chất hoạt hóa của nó trong trường hợp có sự phụ thuộc tuyến tính giữa vận tốc đầu phản ứng với một

khoảng nồng độ thấp của chất hoạt hóa, ở các nồng độ E, cơ chất và nồng độ CoE giữ cố định khi tiến hành phản ứng. Ở nồng độ chất hoạt hóa cao, toàn bộ phân tử E được hoạt hóa, vận tốc đầu phản ứng (v_0) đạt cực đại (hình 8.1). Lập đồ thị chuẩn biểu diễn ảnh hưởng của chất hoạt hóa đến v_0, từ đó tính nồng độ của chất hoạt hóa trong dung dịch phân tích.



Hình 8.1. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của v_0 vào nồng độ chất hoạt hóa. Nồng độ E, S và CoE (nếu có) giữ cố định

Dựa vào hình 8.1 ta thấy nên pha loãng dung dịch có chứa chất hoạt hóa cần phân tích sao cho v_0 nằm trong phần thẳng của đường biểu diễn để có được kết quả phân tích chính xác.

Ví dụ: Mn^{2+} là chất hoạt hóa *isocitrate dehydrogenase*, sử dụng E này có thể xác định chính *xác hàm lượng* Mn^{2+} ở nồng độ rất thấp.

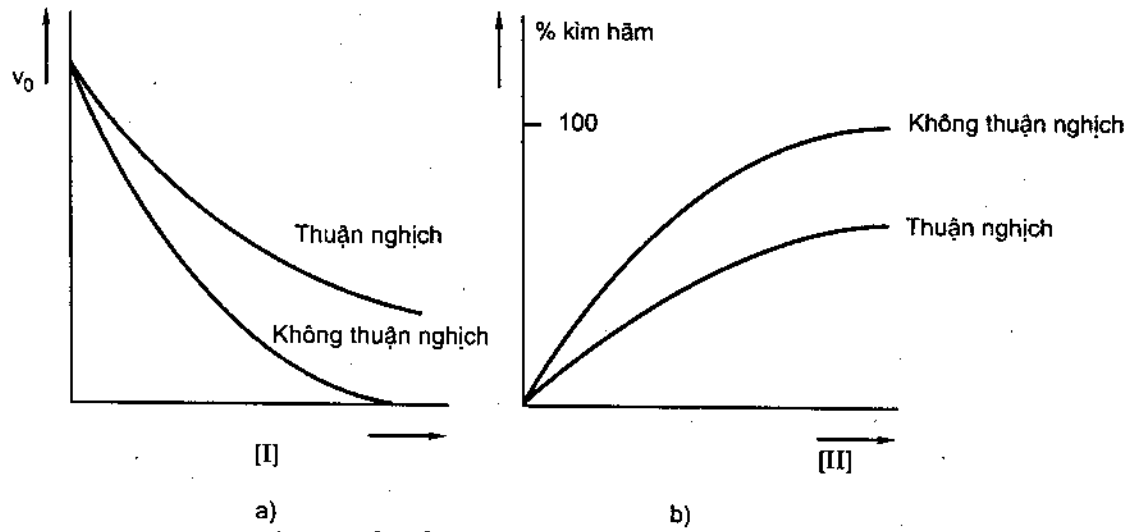
– *Xác định các chất kìm hãm E,* tiến hành xác định ở những điều kiện đã nêu giống như khi xác định chất hoạt hoá, lập đồ thị chuẩn với các nồng độ I khác nhau. Tiến hành xác định chất kìm hãm (I) trong dung dịch nghiên cứu, đối chiếu với đồ thị chuẩn và tính hàm lượng I trong mẫu nghiên cứu. Có thể lập đồ thị chuẩn theo 2 cách: v_0 đối [I] (hình 8.2a), hoặc tính % bị kìm hãm theo sự tăng [I] (hình 8.2b).

Đôi khi người ta cũng dùng I_{50} để biểu diễn nồng độ chất kìm hãm làm giảm 50% hoạt độ ở những điều kiện xác định.

Ví dụ: Sử dụng carboxyl esterase của gan để định lượng fluoride trong dung dịch có lượng lớn phosphate (vì phosphate ảnh hưởng đến việc xác định chính xác fluoride khi dùng phương pháp hóa học).

Nếu E bị kìm hãm đặc hiệu, nhạy với một chất nào đó, có thể dùng E để phát hiện hoặc định lượng chất ấy. Ví dụ *sử dụng acetylcholinesterase để phát hiện dư lượng thuốc trừ sâu nhóm phospho hữu cơ, các chất độc thần kinh v.v...*

Do E có thể bị kìm hãm hoặc hoạt hóa bởi nhiều chất khác như ion kim loại v.v... do đó khi sử dụng E để định lượng các chất cần phải lưu ý đến các chất này mới có kết quả chính xác được.



Hình 8.2. Lập đồ thị chuẩn để xác định chất kìm hãm E trong dung dịch nghiên cứu

a) v_0 đối [I]; b) % hoạt độ bị kìm hãm ở các [I] khác nhau =

$$= \frac{v_0 - v_{0i}}{v_0} \times 100$$

v_0 vận tốc đầu phản ứng không có I, v_{0i} vận tốc đầu phản ứng khi có I, xác định ở cùng điều kiện giống nhau. Đồ thị trên cũng cho thấy, khi sử dụng E để định lượng các chất kìm hãm, cần pha loãng dung dịch sao cho có được sự phụ thuộc tuyến tính giữa vận tốc đầu với nồng độ chất kìm hãm (đoạn đầu của đường biểu diễn).

Các I không thuận nghịch, theo định nghĩa sẽ làm mất hoàn toàn (kìm hãm 100%) hoạt độ E khi nồng độ của nó đủ lớn, còn đối với chất I thuận nghịch thì dù nồng độ cao bao nhiêu cũng không thể kìm hãm 100% được.

8.2. SỬ DỤNG E TRONG PHÂN TÍCH THỰC PHẨM

Có tài liệu cho rằng, từ giữa thế kỷ thứ XIX đã bắt đầu sử dụng E để phân tích thực phẩm, nhưng thực ra việc xây dựng thành các phương pháp như hiện nay mới được bắt đầu cách đây 20 đến 25 năm. Lý do: chỉ từ thời gian này mới có được E tinh sạch đạt yêu cầu để sử dụng trong phân tích.

Sử dụng E trong phân tích thực phẩm cho phép *xác định chính xác hàm lượng các chất* trong nguyên liệu ban đầu và sản phẩm cuối cùng trong quá trình sản xuất, đánh giá *tính trung thực* trong sản xuất thực phẩm, *sự biến đổi chất lượng* thực phẩm trong quá trình chế biến, bảo quản để lựa chọn điều kiện tối ưu. Do những ưu điểm của phương pháp sử dụng E trong phân tích thực phẩm nên ngày nay nhiều nước, các ủy ban quốc tế đã dùng trong quá trình thanh tra thực phẩm. Do độ nhạy của các phản ứng E cao, thường có thể phát hiện chính xác lượng nhỏ các chất, vì vậy có thể dùng để *phát hiện các thành phần không được phép thêm vào hoặc thay thế trong quá trình sản xuất một thực phẩm nào đó.* Một số ví dụ:

8.2.1. Xác định một số saccharide phổ biến trong thực phẩm

Saccharide như các đường, tinh bột có vai trò lớn về giá trị năng lượng của thực phẩm, hơn nữa hàm lượng của các đường khác nhau trong sản phẩm có thể là chỉ tiêu xác định tính trung thực của sản phẩm. Tùy từng loại thực phẩm có các tiêu chuẩn về hàm lượng, loại đường dùng trong chế biến, vì vậy thường được quan tâm

xác định khi phân tích nhiều loại thực phẩm khác nhau. Sau đây là một số ví dụ về việc sử dụng E trong phân tích thực phẩm.

– Sử dụng *hexokinase* (E.C. 2.7.1.1):

+ Để phân tích *D-glucose*, phản ứng như sau:

$$\text{D-glucose} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Hexokinase}]{} \text{ADP} + \text{glucose-6-phosphate} \quad (8.1)$$

$$\text{glucose-6-phosphate} + \text{NADP}^+ \xrightarrow[\text{Glucose-6-phosphate dehydrogenase}]{} \text{D-gluconate-6-phosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \quad (8.2)$$

Một số E khác như glucose dehydrogenase hoặc phương pháp dùng glucose oxidase – peroxidase hiện nay không dùng vì không đặc hiệu hoặc bị các chất khử trong mẫu ảnh hưởng đến độ chính xác của phương pháp.

(Như trên đã nói, NADH hoặc NADPH hấp thụ ở bước sóng 340nm còn dạng oxy hóa của chúng thì không (hình 8.3), vì vậy trong trường hợp có thể, thường thực hiện phản ứng tạo thành các chất này để việc xác định được nhanh, chính xác, dễ dàng hơn).

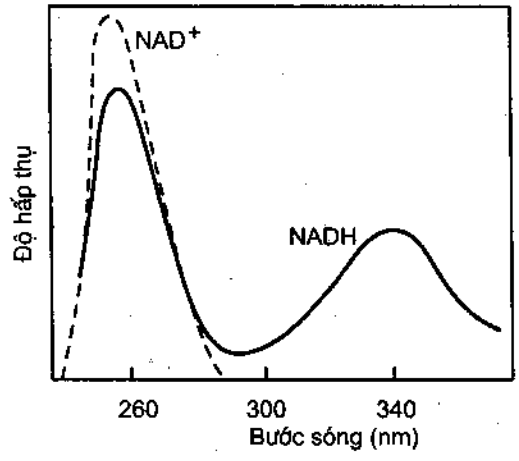
+ Hexokinase cũng có thể dùng để xác định *fructose* theo phản ứng sau:

$$\text{D-fructose} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{hexokinase}]{} \text{ADP} + \text{fructose-6-phosphate} \quad (8.3)$$

$$\text{fructose-6-phosphate} \xrightarrow[\text{glucose phosphate isomerase}]{} \text{glucose-6-phosphate} \quad (8.4)$$

Các phương pháp trên thường được dùng để phát hiện glucose, fructose trong *rượu vang* hay *dịch hoa quả* đã được quy định là không được thêm các đường này vào.

+ Các phương pháp trên cũng có thể dùng để xác định *sucrose* bằng cách dùng β-fructosidase để thủy phân nó thành D-glucose và D-fructose và tiếp tục xác định như trên. Tuy nhiên nếu trong dung dịch có lượng glucose quá cao có thể ảnh hưởng đến độ chính xác khi phân tích fructose và sucrose trong mẫu có chứa đồng thời cả 3 loại đường này. Do đó cần dùng glucose oxidase và catalase để loại glucose.



Hình 8.3. Phổ hấp thụ của NAD^+ và NADH

– Sử dụng *galactose dehydrogenase* (GDH) để xác định *galactose*:

$$\text{D-galactose} + NAD^+ \xrightarrow{GDH} \text{acid D-galactonic} + NADH + H^+ \quad (8.5)$$

– Sử dụng *β-galactosidase* để xác định *lactose*, phản ứng như sau:

$$\text{lactose} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{-galactosidase}} \text{D-galactose} + \text{D-glucose} \quad (8.6)$$

Định lượng D-galactose theo (8.5) sẽ tính được lactose. Trong tự nhiên, ngoài sữa, rất ít mẫu chứa D-galactose vì vậy có thể xác định đường này một cách chính xác. Lactose là chỉ thị của các sản phẩm chứa sữa, là thành phần quan trọng trong thức ăn của trẻ sơ sinh, vì vậy thường tiến hành xác định đường này đối với các loại sản phẩm sữa cho trẻ em, sôcôla, bánh ngọt v.v...

– Sử dụng *α-galactosidase* để phát hiện *raffinose:*

Raffinose là trisaccharide, có nhiều trong củ cải đường, người ta thường phải theo dõi hàm lượng raffinose trong quá trình sản xuất đường từ củ cải đường.

Dưới tác dụng của α-galactosidase, raffinose bị thủy phân tạo thành D-galactose và sucrose. Các đường này được xác định như trên (8.1, 8.4, 8.5).

Raffinose cũng có nhiều trong đậu tương, bột đậu tương có thể chứa đến 10% đường này, do đó khi thêm đậu tương vào thực phẩm, có thể xác định gián tiếp thông qua xác định raffinose.

– Sử dụng *amyloglucosidase* (AMG) để xác định *tinh bột*:

Xác định tinh bột có ý nghĩa quan trọng trong phân tích thực phẩm, đã được quan tâm từ hơn 100 năm nay. Về nguyên tắc, tất cả các phương pháp đều thủy phân tinh bột thành glucose. Xác định glucose và tính được lượng tinh bột. Thủy phân bằng acid sẽ không chính xác vì các oligomer, oligosaccharide đều bị thủy phân, hơn nữa có thể có nhiều phản ứng không mong muốn khác.

Amylase trước đây cũng được dùng nhưng cũng không thích hợp vì sẽ thủy phân không hoàn toàn tinh bột. Do đó hiện nay thường dùng AMG, tuy nhiên E này cũng thủy phân cả maltose và oligosaccharide khác. Vì vậy, để xác định chính xác cần có những điều kiện nhất định như: tinh bột phải xử lý nhiệt trong nồi khử trùng, phải loại bỏ các oligosaccharide bằng hỗn hợp methanol-nước (tinh bột không bị tan trong hỗn hợp này).

Việc xác định chính xác hàm lượng tinh bột có ý nghĩa trong đánh giá chất lượng nguyên liệu, sản phẩm.

8.2.2. Xác định một số acid hữu cơ phổ biến

Các acid hữu cơ là sản phẩm của nhiều quá trình trao đổi chất, vì vậy chúng có thể là những *chỉ thị* của các quá trình *lên men*, và có ảnh hưởng đáng kể đến *mùi vị thực phẩm*. Các phương pháp sử dụng E để phân tích acid hữu cơ là: ngoài việc dùng E tác dụng lên cơ chất acid hữu cơ đặc hiệu của nó, có thể *kết hợp thêm một E khác* để tách hay chuyển hóa tiếp sản phẩm, nhằm làm cho phản ứng thực hiện được triệt để hơn (bảng 8.6).

Bảng 8.1. Tóm tắt các E được dùng để phân tích các acid hữu cơ

Acid cần phân tích	E dùng để phân tích	E thứ hai
A. aspartic	Glutamate oxaloacetate transpherase (GOT)	L-malate dehydrogenase
A. formic	Formate dehydrogenase	
A. gluconic	Gluconate kinase	6-phosphogluconate dehydrogenase
A. 3-hydroxybutyric	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	
A. L-lactic	L-lactate dehydrogenase	Glutamate pyruvate transpherase GPT)
A. pyruvic	L-Lactate dehydrogenase	
A. citric	Citrate(pro-35)lyase	
A. isocitric	Isocitratedehydrogenase	
A. succinic	Succinyl-CoA synthetase	Pyruvate kinase
A. malic	L-malate dehydrogenase	Glutamate oxaloacetate dehydrogenase
A. oxalic	Oxalate decarboxylase	

Sau đây sẽ giới thiệu *chi tiết thêm* một số phương pháp đã nêu trong bảng 8.1 và *ý nghĩa thực tế* của việc xác định các acid này *trong phân tích thực phẩm*.

8.2.2.1. Acid citric: là chất chủ yếu trong trao đổi chất, có nhiều trong thực vật và cũng có trong sữa, vì vậy thường xác định acid citric trong các sản phẩm từ quả, từ thực vật, bánh mì, phomate, các sản phẩm thịt, đồ uống, rượu vang, chè v.v...

Để xác định acid citric có thể sử dụng kết hợp *E citrate (pro-35)-lyase* và *L-malate dehydrogenase (L- MDH).*

$$\text{Citrate} \xrightarrow{\textit{citrate (pro-35)lyase}} \text{Oxaloacetate} + \text{Acetate} \quad (8.7)$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\textit{L- MDH}} \text{L-malate} + \text{NAD}^+ \quad (8.8)$$

Acid *oxaloacetic* có thể bị decarboxyl hóa thành acid *pyruvic* (theo con đường hóa học hoặc do oxaloacetate decarboxylase lẫn trong chế phẩm *citrate lyase*), có thể xác định pyruvate bằng L-lactate dehydrogenase (L-LDH), phản ứng như sau:

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\textit{L-LDH}} \text{L-lactate} + \text{NAD}^+ \quad (8.9)$$

8.2.2.2. Acid formic: là sản phẩm trao đổi cuối cùng của vi khuẩn và nấm, nó cũng thường được dùng để *bảo quản nhiều thực phẩm*. Tuy nhiên khi sử dụng các chất này *phải tuân theo các quy định của luật pháp*, vì vậy việc xác định chính xác hàm lượng của nó trong thực phẩm có ý nghĩa quan trọng. Có thể dùng *formate dehydrogenase* để xác định theo phản ứng sau:

$$\text{Formate} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{hydrogen carbonate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (8.10)$$

8.2.2.3. Acid gluconic: Dùng gluconate kinase (GK) và 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH) để xác định.

$$\text{D-gluconate} + \text{ATP} \xrightarrow{GK} \text{D-gluconate-6-phosphate} + \text{ADP} \quad (8.11)$$

$$\text{D-gluconate 6-phosphate} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{6\text{-}PGDH} \text{D-ribulose5-phosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2 \quad (8.12)$$

Acid gluconic được tạo thành khi oxy hóa nhóm aldehyd của glucose. δ-gluconolactone được dùng như là *chỉ tiêu xác định độ chín của xúc xích.*

8.2.2.4. Acid glutamic: Dùng glutamate dehydrogenase (GluDH) để định lượng:

$$\text{L-glutamate} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{GluDH} \alpha\text{-oxoglutarate} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+ \quad (8.13)$$

Để định lượng và tăng độ nhạy của phản ứng, thường sử dụng thêm Diaphorase (E.C.1.8.1.4), phản ứng như sau:

$$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{INT} \xrightarrow{Diaphorase} \text{NAD}^+ + \text{Formazan} \quad (8.14)$$

INT = iodonitrotetrazolium chloride.

Phản ứng màu này rất nhạy, do đó cần phải loại hết các chất khử trong mẫu trước khi xác định mới có kết quả chính xác.

8.2.2.5. Acid 3-hydroxybutyric: Xác định acid này có ý nghĩa đối với trứng, *3-hydroxybutyrate trong trứng là chỉ thị của trứng đã thụ tinh và đã ấp hơn 6 ngày.* E được dùng để xác định là *3-hydroxybutyrate dehydrogenase* (3-HBDH).

$$\text{D-3-hydroxybutyrate} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{3\text{-}HBDH} \text{Acetoacetate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (8.15)$$

8.2.2.6. Acid isocitric: là sản phẩm trung gian của chu trình tricarboxylic, tỷ lệ giữa acid isocitric và acid citric trong quả là không đổi, nhưng acid isocitric rất đắt, vì vậy phân tích acid này trong dịch quả sẽ cho biết *có trộn thêm acid citric vào dịch quả* hay không. Để định lượng acid isocitric, dùng *isocitrate dehydrogenase* (IDH):

$$\text{D-isocitrate} + \text{NADP} \xrightarrow{IDH} \alpha\text{-oxoglutarate} + \text{NADPH} + \text{CO}_2 + \text{H}^+ \quad (8.16)$$

8.2.2.7. Acid pyruvic: là sản phẩm trung gian quan trọng của quá trình trao đổi chất. Trong đánh giá *chất lượng sữa* trước và sau khi khử trùng, xác định acid pyruvic cũng được dùng như là một cách để tính lượng vi sinh vật. Để xác định acid này, dùng *L-lactate dehydrogenase* (L-LDH):

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH}^+ + \text{H}^+ \xrightarrow{L\text{-}LDH} \text{L-lactate} + \text{NAD}^+ \quad (8.17)$$

8.2.2.8. Acid succinic: Dùng kết hợp 2 E là succinyl-CoA synthetase và pyruvate kinase

Phản ứng thực hiện như sau:

$$\text{Succinate} + \text{ITP} + \text{CoA} \xrightarrow{\textit{Succinyl-CoA synthetase}} \text{IDP} + \text{Succinyl-CoA} + P_v$$

$$\text{IDP} + \text{PEP} \xrightarrow{\textit{Pyruvate kinase}} \text{ITP} + \text{Pyruvate}$$

IDP = inosine 5'- diphosphate;
ITP = inosine 5'- triphosphate;
PEP = phosphoenolpyruvate.

8.2.3. Sử dụng E để xác định các thành phần khác trong thực phẩm

Một số thành phần khác của thực phẩm có thể ảnh hưởng đến chất lượng thực phẩm nói chung, hoặc thức ăn cho người ăn kiêng, hoặc phản ảnh độ ô nhiễm, độ tươi của thực phẩm cũng cần được xác định. Để phân tích chính xác, nhiều phương pháp phân tích bằng E đã được sử dụng, có thể tóm tắt trong bảng 8.2.

Bảng 8.2. Tóm tắt các E đã được sử dụng để phân tích một số thành phần khác của thực phẩm

Chất cần phân tích	E dùng để phân tích	Ghi chú
Ethanol	*Alcohol dehydrogenase*	– Kiểm tra các loại nước uống có cồn để xem có đúng loại theo quy định không. – Nếu các sản phẩm làm từ quả có ethanol chứng tỏ nguyên liệu bị hỏng hoặc do có nấm men.
Glycerol	*Glycerol kinase*, sau đó dùng *pyruvate kinase* để chuyển hóa ADP được tạo thành, và dùng tiếp *L-lactate dehydrogenase*	Xác định glycerol trong rượu vang, có thể góp phần kiểm tra xem rượu có bị trộn thêm glycerol không.
Sorbitol	*Sorbitol dehydrogenase*, (phản ứng không thật đặc hiệu), sau đó xác định fructose tạo thành theo các phản ứng (8.3), (8.4), và (8.2); hoặc kết hợp với phản ứng (8.14).	Sorbitol và xylitol dùng để thay thế đường trong thực phẩm cho người bị tiểu đường.
Xylitol	*Sorbitol dehydrogenase*, tiếp theo sử dụng phản ứng (8.14),	Hiệu số giữa các kết quả xác định fructose qua hai phương pháp là lượng xylitol.
Cholesterol	*Cholesterol oxidase*, sau đó dùng *catalase* để chuyển hóa tiếp H_2O_2 được tạo thành (thêm methanol) và xác định formaldehyde được tạo thành	– Sự lắng đọng cholesterol trong mạch máu làm tắc nghẽn động mạch. Lòng đỏ trứng, mỡ động vật giàu cholesterol. – Để xác định lượng trứng trong thực phẩm. – Xác định cholesterol trong thực phẩm có mỡ động vật.
Nitrate	*Nitrate reductase* (mới được dùng từ năm 1986)	Nitrate là chất có hại vì là tiền chất của nitric và nitrosamine. Phân có thể là nguyên nhân gây nhiễm nitrate cho nước, thực phẩm.
Sulfite	*Sulfite oxydase*, sau đó dùng tiếp NADH peroxidase để chuyển hóa H_2O_2 tạo thành.	– Sulfite thường dùng để bảo quản thực phẩm, nông sản, làm bất hoạt nhiều E, ngăn ngừa tạo màu nâu. – Nồng độ quá cao có hại.
Urea	*Urease* (có tính đặc hiệu rất cao)	– Urea là sản phẩm cuối cùng của quá trình trao đổi protein, được tiết qua thận. – Đối tượng cần phân tích là các sản phẩm thịt và sữa. – Hàm lượng urea trong nước thải, nước bể bơi là chỉ thị về nồng độ nước tiểu trong các nước này.

8.3. SỬ DỤNG E TRONG TỔNG HỢP HỮU CƠ

Sử dụng các *E thủy phân xúc tác cho phản ứng ngược*. Sở dĩ các E này được sử dụng rộng rãi vì dễ sử dụng, không cần CoE, và thường chịu được các dung môi hữu cơ. Ví dụ:

– Sử dụng các lipase, esterase và protease trong các phản ứng acyl hóa (regioselective acylation) các hợp chất có nhiều nhóm –OH như saccharide, glycerol, steroide, hoặc alcaloide.

– Sử dụng E để tách riêng các dạng đồng phân quang học nhận được bằng con đường tổng hợp hóa học: dạng cis- và trans-, D- và L- v.v... Các dạng này thường nhận được với tỷ lệ bằng nhau nhưng cơ thể chỉ sử dụng được một trong 2 dạng.

– Sử dụng các *carbonyl reductase:* sử dụng các CoE NADH hoặc NADPH để khử đối xứng các nhóm carbonyl, tạo thành các vật liệu quan trọng để tổng hợp các sản phẩm tự nhiên khác nhau.

– Sử dụng các *aldolase* để *tạo các liên kết C – C mới*. Đến nay đã biết hơn 20 aldolase, có thể thực hiện các phản ứng giống với các phản ứng ngưng tụ aldol khi không có E. Sử dụng aldolase có thể tổng hợp được nhiều monosaccharide tự nhiên và không tự nhiên.

Ví dụ có thể dùng 4 E: phytase (E.C. 3.1.3.8), glycerol phosphate oxidase (E.C.1.1.3.21), catalase (E.C.1.11.1.6) và đặc biệt quan trọng là fructose 1,6-bisphosphatate aldolase để tổng hợp 5-deoxy-5-ethyl-D-xylulose từ glycerol.

– Sử dụng *glycosyl transpherase* (Gl-T) hoặc *exo* - và *endo-glycosyl hydrolase* (glycosidase) để tổng hợp các *olygosaccharide và glycoprotein*. Dùng Gl-T đòi hỏi cơ chất đắt tiền nhưng nhận được các sản phẩm tinh về hóa học lập thể với hiệu suất cao. Sử dụng glycosidase thuận lợi hơn vì chỉ cần các glycoside đơn giản làm chất cho monosaccharide, nhưng sản phẩm được tạo thành không thuần khiết về mặt hóa học lập thể và hiệu suất cũng không thật cao.

Ví dụ: đã dùng *α-fucosidase* (E.C. 3.2.1.51) từ gan lợn để tổng hợp *α-fucoside*, và *sialidase* (E.C. 3.2.1.18) của *Vibrio cholera* để tổng hợp *α-sialoside*.

Cũng có thể kết hợp sử dụng *glycosidase* và *transpherase* với các cơ chất thích hợp để tổng hợp các *trisaccharide,* ví dụ sử dụng *β-galactosidase* và *α-(2,3)-sialyltranspherase* để tổng hợp *sialyl trisaccharide*.

Người ta cũng đã dùng hệ thống nhiều E để tổng hợp một vài oligo- saccharide ở quy mô lớn.

– Một số E cũng được sử dụng để *loại bỏ các nhóm bảo vệ* đầu N hoặc đầu C khỏi sản phẩm trong các kỹ thuật tổng hợp hóa học các lipopeptide và glycophosphopeptide.

– Một lĩnh vực mới khá quan trọng trong hóa sinh hữu cơ (bioorganic chemistry) sẽ phát triển mạnh còn chưa được chú ý nhiều là việc *sử dụng E để nối các đoạn peptide* với nhau. Ví dụ: sử dụng domain thioesterase của tyrocidine synthetase để vòng hóa peptide tạo thành các antibiotic tyrocidine A và gramicidin S; sử dụng α-chymotrypsin để nối các đoạn peptide lớn tạo thành trình tự hoạt động của protein Ht31 (human thyroid anchoring protein Ht31).

Tóm lại việc sử dụng E trong tổng hợp hữu cơ đang có nhiều triển vọng, giải quyết được nhiều khó khăn, hạn chế khi sử dụng phương pháp hóa học.

8.4. SỬ DỤNG E TRONG CÔNG NGHIỆP

Có thể nói từ 1970, E mới được tách khỏi tế bào và được sử dụng trong các quá trình sản xuất công nghiệp. Hiện tại có ít nhất là khoảng hơn 60 E đã được thương mại hóa, phần lớn các E này là các E ngoại bào. Trong số các *E công nghiệp* có gần *ba phần tư là các E thủy phân,* thuộc lớp 3 (hydrolase), rồi đến các E thuộc lớp 1 (oxidoreductase) khoảng 20%. Các E được ứng dụng nhiều thường có liên quan đến quá trình trao đổi saccharide và thủy phân protein. Các E thuộc lớp 6 hầu như chưa được sử dụng trong công nghiệp.

Nguồn *nguyên liệu chính* để sản xuất E dùng trong công nghiệp là *vi khuẩn và nấm*, mặc dù một số E của thực vật vẫn được dùng, hiện tại đã bắt đầu nghiên cứu *áp dụng phương pháp nuôi cấy mô* để có thể sản xuất ở quy mô lớn các E động vật và thực vật.

8.4.1. Ứng dụng E thuộc các lớp khác nhau trong các lĩnh vực kỹ thuật

(bảng 8.3, riêng các E lớp 3, hydrolase chỉ giới thiệu tóm tắt trong bảng 8.4).

Bảng 8.3. Các E thuộc các lớp khác nhau đã được ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau.

Lớp E, E, mã số	Lĩnh vực ứng dụng	Chức năng
1.Oxidoreductase Glucose oxidase 1.1.3.4	– Sản xuất bánh nướng. – Sản xuất bia. – Chế biến sữa. – CN dệt. – Áp dụng CN mới.	– Tăng lực của gluten. – Cải thiện thời gian sử dụng. – Bảo quản sữa. – Tẩy trắng gián tiếp. – Thuốc đánh răng.
Hexose oxidase 1.1.3.5	– Sản xuất bánh nướng.	Tăng lực của gluten.
Lacase 1.10.3.2	– CN dệt. – CN sản xuất giấy – Áp dụng CN mới.	– Làm trắng giấy. – Xử lý gỗ.
Catalase 1.11.1.6	– Sản xuất bia. – Chế biến sữa. – CN dệt.	– Kéo dài thời gian sử dụng. – Bảo quản sữa. – Loại peroxide hydrogen.
Peroxidase Lactoperoxidase 1.11.1.7	– CN bánh nướng. – Chế biến sữa.	– Cải thiện bột nhão để làm bánh. – Bảo quản sữa.
Lipoxygenase 1.13.11.12	CN bánh nướng.	Làm trắng bánh mỳ.
2. Transpherase Transglutaminase 2.3.2.13 Dextransucrase 2.4.1.5	– Chế biến sữa. – Sản xuất bia.	– Cải thiện cấu tạo sữa chua. – Sản xuất bia isomaltose-oligosaccharide.
3. Lyase α-acetolacetate decarboxylase 4.1.1.5	Sản xuất bia.	Loại diacetyl để tăng hương.
Pectatelyase 4.2.2.2	CN dệt.	Làm sạch sợi.
Pectinlyase 4.2.2.10	Sản xuất dịch quả.	Bóc vỏ quả chanh.
5. Isomerase Xyloisomerase 5.3.1.5	Nghiền ướt hạt.	Sản xuất fructose.

Bảng 8.4. Một số ví dụ các E thủy phân (lớp 3, hydrolase) được dùng nhiều trong một số ngành công nghiệp

STT	Enzyme	Nguồn	Tác dụng
1	α - amylase 3.2.1.1	*Bacillus amyloliquifaciens* *B. licheniformis* *B. subtilis* *Aspergillus oryzae*	Thủy phân liên kết α-1, 4 glucoside. Dùng để làm loãng tinh bột, làm giảm độ nhớt của tinh bột.
2	β-amylase 3.2.1.2	*Bacillus polymyxa* *B. circulans* Lúa mạch nảy mầm	Sản xuất maltose.
3	Glucoamylase 3.2.1.3	*Aspergillus niger* *Rhizopus* sp.	Sản xuất glucose.
4	Pulunase 3.2.1.41	*Bacillus* sp. *Aerobacter aerogens* *Klebsiella* sp.	Thủy phân liên kết α-1, 6 glucoside của tinh bột.
5	Gluco-isomerase 5.3.1.18	*Bacillus coagulans* *B. stearothermophilus* *Streptomyces* sp. *Arthrobater*	Sản xuất dịch fructose đậm đặc từ glucose.
6	β-galactosidase (lactase) 3.2.1.23	*Bacillus coagulandsStreptomyces* sp. *Saccharomyces* sp. *Aspergillus* sp.	Thủy phân lactose của sữa tạo thành glucose và galactose.
7	Invertase 3.2.1.26	*Saccharomyces* sp.	Thủy phân saccharose thành glucose và fructose.
8	Cellulase 3.2.1.4 và Hemicellulase	*Trichoderma* sp. *Spototrichum cellulophilum* *Actinomyces* sp. *Aromonas* sp. *Aspergillus niger*	Thủy phân các nguyên liệu chứa cellulose.
9	Pectinase 3.2.1.15 (polygalacturonase)	*Aspergillus niger* *Fusarium* sp.	Thủy phân pectin, sử dụng trong sản xuất nước quả, rượu vang, trích ly dược liệu, chăn nuôi.
10	Protease (3.4.21-	*Bacillus amyloliquefaciens* *B. subtilis* *Streptomyces* sp. *Aspergillus oryzae* Một số nguyên liệu động vật, thực vật.	Thủy phân protein, được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp bột giặt, rượu, bia, bánh mì, làm mềm thịt v.v...

8.4.2. Sử dụng E trong công nghiệp chế biến thực phẩm

Sau đây sẽ giới thiệu tóm tắt một số ví dụ sử dụng E trong một số ngành công nghiệp thực phẩm (bảng 8.5).

Bảng 8.5. Một số ví dụ về các ứng dụng E trong các ngành sản xuất thực phẩm

Ngành sản xuất thực phẩm	E sử dụng	Ghi chú
Bánh nướng	*α-amilase, xylanase, protease, lipase*, và một số *oxidoreductase* (glucose oxidase, hexose oxidase, lipoxygenase, thiol oxidase, peroxidase, polyphenol oxidase), *transglutaminase.*	Các E nhằm đảm bảo chất lượng bột nhão dùng làm bánh, cải thiện mùi vị và màu sắc của sản phẩm .
Chế biến quả và SX dịch quả	Các *E phân giải thành tế bào*: pectinlyase, pectin methylesterase, polygalacturonase, arabanase, các hemicellulase, các amylase acid của nấm mốc và glucoamylase	Các E này đều tách từ *Aspergillus.* – Sử dụng các pectinase làm tăng chất lượng, năng suất, tạo được nhiều loại sản phẩm mới từ quả, kéo dài thời gian bảo quản, giữ màu bền.
Làm phomat (chế biến sữa)	- Các E làm đông sữa, chủ yếu là *các asparticprotease như: chymosin, mucorpepsin, endo thiapepsin.* Ngoài ra còn dùng *lipase, lysozyme*	Lipase, lysozyme cũng có vai trò làm chín phomat, tăng hương vị, chất lượng phomat.
Chế biến sữa	*β- galactosidase* thủy phân lactose trong sữa thành glucose và galactose. Hai đường này có độ ngọt lớn hơn lactose.	– Sản xuất sữa không có lactose cho những người thiếu lactase bẩm sinh. – Làm tăng độ ngọt của các loại nước uống từ sữa, sữa chua.
Chế biến cá, sản xuất nước mắm	Các protease thực vật: *bromelain, ficin, papain*	– Việc dùng trong công nghiệp còn hạn chế. – Loại da cá, loại màng, làm sạch trứng cá, làm mềm thịt mực. – Rút ngắn thời gian sản xuất nước mắm có thể xuống 5 -6 lần (chỉ còn 2 tháng).
Sản xuất nước chấm từ đậu tương	*Endo-* và *exoprotease:pronase E* (gồm protease, amino - và carboxypeptidase), *aspartyl-protease, papain, bromelain, neutrase*, protease acid và trung tính của *A.oryzae* (*protease nấm*), *flavoE* (exo- và endopeptidase của *A. oryzae)*	Làm tăng hương của nước chấm, rút ngắn thời gian "chín" các dịch lên men 30 -50 %.
Sản xuất bột trứng	– *Glucose oxidase, catalase* – *Lipase* và *phospholipase*	– Loại glucose của lòng trắng trứng để tránh phản ứng Maillard. – Cải thiện tính chất nhũ tương của lòng đỏ trứng, bền và chịu nhiệt hơn.

(detergent)

Từ khoảng năm 1913, ở Đức, E đầu tiên được sử dụng trong các chất tẩy có chứa E là *trypsin* tách từ tụy lợn. Tuy nhiên do độ bền và hoạt độ của E này cũng chỉ ở mức vừa phải nên cũng không hấp dẫn lắm. Đến năm 1963, khi hãng Novo sản xuất được *protease* chịu kiềm bán ra thị trường, có tên là Alcalase, việc sản xuất các chất tẩy có chứa E mới được phát triển, nhưng cũng chỉ ở quy mô nhỏ. Hai cơ sở sản xuất nhỏ ở Thụy Sĩ (BIO-40) và Hà Lan (Biotex) là những đơn vị đi tiên phong trong việc sử dụng alcalase để giặt các đồ dùng có các vết máu ở bệnh viện và ở các lò mổ.

Đến năm 1965, có thêm một chế phẩm protease kiềm khác có tên là Maxatase được đưa vào thị trường. Trong vòng 5 năm, ở Châu Âu đã có hơn 50% bột giặt dùng cho gia đình thuộc loại có chứa protease; ở Mỹ có thấp hơn, loại bột giặt này chỉ chiếm 15%.

Tuy nhiên sau đó, vào khoảng năm 1970 - 1980, người ta đã phát hiện có một số vấn đề về an toàn và vệ sinh công nghiệp khi sản xuất và sử dụng bột giặt có E nên việc sản xuất loại bột giặt này không tăng nhanh nữa. Sau những cải tiến, đưa E vào trong các bao nang nhỏ (capsule) có thể tan trong nước, giải quyết được các vấn đề vệ sinh công nghiệp, việc sản xuất loại bột giặt E mới được hồi phục dần.

Khoảng đầu những năm 1970, lần đầu tiên *α- amylase* chịu kiềm, chịu nhiệt cũng được bổ sung vào các chất tẩy.

1980 – 1990, ngành công nghiệp giặt có nhiều cải tiến, một số protease mới có các tính chất phù hợp cũng được sử dụng. Ngoài ra, các *cellulase* (celluzyme, novozyme), cũng lần đầu tiên được sử dụng để làm sạch và loại màu. Sử dụng các kỹ thuật di truyền và kỹ nghệ protein (protein engineering) người ta cũng đã thiết kế và sản xuất được các E có những đặc tính thích hợp để sử dụng trong bột giặt và đạt được yêu cầu về mặt kinh tế để bổ sung vào bột giặt. Ví dụ, các protease có tác dụng tẩy trắng (Maxapem, Genencor), *lipase* (Lipolase, Novozyme) lần đầu tiên được đưa vào bột giặt trong thời gian này. Cùng với những đổi mới, cải tiến trong công nghiệp giặt, đã có nhiều E có các tính chất mới được sản xuất để đáp ứng được các yêu cầu này. Tính đến năm 2002, đã có một số hãng sản xuất các loại E có đặc tính khác nhau dùng cho bột giặt như: 5 loại chế phẩm protease trung tính, kiềm; 3 chế phẩm amylase; lipase, cellulase và hemicellulase (bảng 8.6).

Lượng E thêm vào bột giặt cũng rất khác nhau tùy theo loại bột giặt, có thể từ dưới 1% cho đến 6%. Nói chung, thành phần hóa học của vết bẩn rất phức tạp, có thể là protein, tinh bột, dầu/mỡ, các loại chất màu tự nhiên hay tổng hợp khác nhau, hoặc cũng có thể là sản phẩm oxy hóa, sản phẩm keo tụ của chúng v.v..., vì vậy để tẩy sạch cần dùng nhiều biện pháp khác nhau.

Bảng 8.6. Một số ví dụ về các E đã được thương mại hóa dùng trong công nghiệp sản xuất các chất tẩy

E (tên thương mại)	Nguồn E	pH sử dụng	Khoảng nhiệt độ sử dụng (°C)
Protease (Novozymes)			
– Alcalase	*Bacillus* species.	6 - 10	10 - 80
– Esperase	*Bacillus* species.	7 - 12	10 - 80
– Everlase	GM *Bacilus* spp(*)	8 - 11	15 - 80
– Savinase	GM *Bacilus* spp	8 - 11	15 - 70
– Durazym	GM *Bacilus* spp	8 - 11	15 - 75
Amylase (Novozymes)			
– Termamyl	GM *Bacillus* sp.	6 - 11	25 - 100
– Duramyl	GM *Bacillus* sp	6- 10	25 - 100
– Natalase	GM *Bacillus* sp	5 -10	10 - 60
– Fungamyl	*Aspergillus* sp.	4 - 7	15 - 60
Lipase			
Lipolase (từ nấm *Thermomyces lanuginosus)*	GM *Aspergillus oryzae*	> 8	< 20°Cđộ ẩm vải khoảng .25 - 35 %
Cellulase (Novozyme)			
– Celluzyme (các loại khác nhau: CBH 1, CBH 2, EG I, EG II, EG III, EG V và EG VI).	*Thermomyces lanuginosus*	4 -10	25 - 70
– Carezyme (EG V)	*Thermomyces lanuginosus*	5 - 10,5	25 - 70
– Endolase (EG II)	*Thermomyces lanuginosus*	5 - 9	25 - 70
Mannanase			
Mannanase (E trong sản phẩm này là *hemicellulase*, 33kD) phân giải các pectin trung tính như kẹo gôm.	GM *Bac. licheniformis*	10 8	50 (ở pH 10) 40 (ở pH 8)

(*) GM Bacilus spp: genetically modified Bacillus spp.

Cơ chế chung tác dụng làm sạch vết bẩn của E là phân giải chất bẩn thành các đoạn, các phần có khối lượng phân tử thấp hơn, dễ hòa tan hơn. Ví dụ protease, amylase, lipase có thể thủy phân các vết bẩn protein, tinh bột, dầu/mỡ (ngay cả khi nó ở dạng rắn) ở nhiệt độ thấp hơn 40°C. Đối với các chất bẩn phân tử bé bám vào áo quần bằng vải sợi, có thể dùng cellulase, E sẽ loại phần sợi cellulose mảnh ở trên bề mặt đã bị bẩn khỏi bề mặt sợi vải.

Các E được dùng để bổ sung vào các chất tẩy cần có một số đặc tính sau:

– Có tính đặc hiệu rộng rãi.

– Giữ được hoạt động trong khoảng pH từ 7 – 11, nhiệt độ từ 4 - 60°C, vì các loại xà phòng, chất tẩy có pH thay đổi từ trung tính đến kiềm mạnh.

– Phải hoạt động được trong môi trường có các thành phần khác của chất tẩy (chất hoạt động bề mặt, các protease v.v...) khi bảo quản cũng như khi sử dụng các chất này (trong dung dịch).

– Sản xuất các chất tẩy dùng trong nhà như nước rửa bát (rửa bằng tay, dùng cho máy rửa bát tự động).

Trong số các protease, các protease kiềm của *Bacillus* (*subtilisin*) có nhiều tính chất rất thích hợp để bổ sung vào các chất tẩy: bền trong môi trường có các chất tẩy hóa học, có tính đặc hiệu rộng, hoạt động mạnh ở pH kiềm, có khả năng sản xuất ở quy mô công nghiệp. Các E này cũng đã được cải thiện một số tính chất (tăng độ bền) bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Để sử dụng có hiệu quả một E nào đó đưa vào chất tẩy, cần tiến hành nhiều thử nghiệm với các loại vết bẩn "mẫu" khác nhau, các dạng khác nhau (lỏng, rắn, dạng tự nhiên hay bị oxy hóa v.v...) của cùng một loại chất bẩn, tính chất nguyên liệu (vải sợi hay tơ lụa, sợi tổng hợp v.v...) cần tẩy sạch để đánh giá hiệu quả, đánh giá hoạt độ và độ bền của E ở những điều kiện thực tế khi sử dụng chất tẩy (pH, nhiệt độ, thời gian, đặc biệt là độ pha loãng để xác định lượng E cần bổ sung sao cho khi pha loãng chất tẩy, E vẫn ở nồng độ thích hợp còn có tác dụng tẩy sạch, và cũng không quá thừa).

Các nghiên cứu sản xuất các E bổ sung vào các chất tẩy được tiếp tục theo các hướng sau:

– Giảm giá thành chế phẩm E.

– Tạo các E không hoặc ít có tác dụng gây dị ứng.

– Nghiên cứu mở rộng sản xuất các *hydrolase mới* có khả năng phân giải nhiều loại chất bẩn khác nhau như các E phân giải xylan, pectin, dextran để loại bỏ những vết bẩn đặc biệt.

– Nghiên cứu sản xuất và sử dụng các *oxidoreductase* như: peroxidase, lipoxygenase v.v...

– Đưa E vào các chất tẩy dùng trong nhà như: nước rửa bát, nước tẩy nhà vệ sinh v.v... (việc sản xuất các nước rửa bát có E mới được bắt đầu từ những năm 1990 đang được nghiên cứu để sản xuất các loại E phù hợp với chất tẩy dùng cho máy rửa bát tự động, để làm giảm nhẹ lao động trong nhà).

8.4.4. Sử dụng E trong sản xuất sợi, vải

Trong quá trình sản xuất sợi tự nhiên thường gồm các công đoạn chính như: tách sợi khỏi nguyên liệu, làm sạch sợi, làm trắng, nhuộm màu (để dệt vải màu),

một số công đoạn đặc biệt để sản xuất vải bò may áo quần jeans (nhuộm màu indigo với độ tương phản thích hợp, tạo được cảm giác vải cũ mài mòn nhưng phải giữ được độ bền của sợi v.v...).

Từ vài nghìn năm trước, người ta đã biết ngâm vỏ cây có sợi để thu sợi thực vật. Thực chất của quá trình này là nhờ hoạt động của E trong vi sinh vật. Đến giữa thế kỷ thứ XIX, người ta đã biết sử dụng E để tẩy hồ vải nhưng ở dạng dung dịch nước có chứa lúa mạch, đến năm 1912 mới biết dùng amylase vào mục đích này.

Tuy nhiên, khi phát triển sản xuất sợi, vải ở quy mô công nghiệp, thường phải dùng lượng lớn các hóa chất như NaOH, NaOCl, peroxide v.v... và giữa các công đoạn cần dùng lượng lớn nước để làm sạch hóa chất, ở một số công đoạn còn phải thực hiện ở nhiệt độ cao, tiêu tốn nhiều năng lượng.

Sử dụng hóa chất còn làm ảnh hưởng đến độ bền của sợi, vải, tơ.

Với sự phát triển công nghệ E, có thể sản xuất nhiều E ở quy mô công nghiệp với lượng lớn, từ năm 1990, việc sử dụng E trong sản xuất sợi ngày càng được quan tâm phát triển, nhất là trong quá trình chế biến sợi tự nhiên.

Các E thường được sử dụng (hoặc đang nghiên cứu để sử dụng) vào các công đoạn sau:

a) Phân giải các tạp chất (pectin, sáp và các chất béo, protein và các thành phần khác) có trong lớp bao ngoài sợi bông, tơ và các sợi tự nhiên khác, tạo thành các sản phẩm phân tử thấp dễ hòa tan, tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách sợi khỏi nguyên liệu.

b) Tẩy hồ sợi bông, sợi tơ tằm và các loại sợi khác được hồ bằng tinh bột, gelatin hoặc bằng các chất kết dính khác.

c) Làm trắng sợi, loại bỏ peroxide thừa trước khi nhuộm màu.

Cho đến nay, theo thống kê của W.Aehle, các E đã được dùng hoặc đang trong giai đoạn nghiên cứu để ứng dụng trong công nghiệp chế biến sợi, cho thấy phần lớn là các E thủy phân (lớp 3, hydrolase), và chỉ có một vài E thuộc lớp oxidoreductase (lớp 1), bảng 8.7. Các E thuộc lớp 3 chủ yếu được dùng ở công đoạn a và b; Các E lớp 1 chủ yếu để loại bỏ peroxide thừa trên sợi trước khi nhuộm màu, hoặc để loại chất màu, làm trắng sợi. Nhiều trường hợp dùng phối hợp các E khác nhau đem lại hiệu quả lớn.

Những ưu điểm của việc sử dụng E thay cho các chất hóa học để sản xuất và xử lý sợi là:

– Làm giảm ô nhiễm môi trường, nên được xem là *công nghệ thân thiện môi trường*.

– Không làm ảnh hưởng đến cấu trúc và độ bền của sợi cellulose (do E có tính tác dụng đặc hiệu cao).

– Giảm tiêu thụ năng lượng, giảm lượng nước sử dụng.

Bảng 8.7. Các E được dùng trong quá trình sản xuất sợi, vải

Lớp E, E, (mã số)	Cơ chất	Mục tiêu sử dụng và lợi ích
1.*Oxidoreductase*		
– Glucose oxidase (1.1.3.4)	– Glucose	– Làm trắng, cải thiện độ trắng
– Lacase (1.10.3.2)	– Chất trung gian (mediator), chất màu indigo.	– Làm trắng, phân giải và oxy hóa chất màu.
– Catalase (1.11.1.6)	– Peroxide hydrogen	– Loại peroxide, làm trắng.
3. *Hydrolase*		
– α- amylase (3.2.1.1)	– Amylose	– Tẩy hồ sợi, vải (tinh bột thường được dùng để hồ nhiều loại vải kể cả các loại poly (vinyl alcohol) và poly (vinyl pyrolidone), sử dụng α- amylase của *Bac subtilis* là thích hợp nhất.
– Cácpectinase: polygalacturonase (endo-3.2.1.15, exo-3.2.1.67).	– Pectin	– Làm sạch sợi, loại bỏ pectin có trong lớp bao tế bào sợi thực vật.
– Endo-1,4-β-mananase (3.2.1.78).	– Hemicellulose	– Phá vỡ độ bền của lớp bao xung quanh sợi thực vật.
– Endo-1,4-β-xylanase (3.2.1.8).	– Lignin	– Chế biến sợi đay, phân giải lignin, cải thiện độ trắng.
– Cellulase (3.2.1.4)	– Cellulose	– Làm bóng sợi, loại các sợi xù xì, giữ vải nhìn luôn mới.
– Các protease (3.4.21 – 25)		– Giúp việc mài vải bò.
	– Protein	– Làm sạch len, loại các mảng bám, loại chất keo trên sợi tơ.

Sau đây sẽ nêu chi tiết thêm tác dụng của một số E đã ghi trong bảng 8.7.

– Dùng *catalase để loại peroxide*: sau khi làm trắng sợi, trước khi nhuộm màu, phải loại hết peroxide thừa để tránh oxy hóa chất màu. Theo phương pháp truyền thống phải dùng rất nhiều nước hoặc thêm chất khử, *catalase* sẽ thủy phân nhanh chóng peroxide thừa thành oxygen và nước. Sử dụng công nghệ này, theo tính toán cụ thể của một nhà máy (so với công nghệ truyền thống), đã làm giảm: tiêu thụ năng lượng khoảng 24%, nước 50%, thời gian xử lý 33%, tiêu tốn hóa chất 83%.

– Sử dụng *lacase* và *mediator*: năm 2001 đã đưa vào thị trường quy trình sử dụng E mới là lacase và mediator để tẩy màu indigo trong sản xuất vải bò. Trong quy trình này, chất màu indigo đã bám vào sợi hoặc ở trong nước đều bị oxy hóa thành sản phẩm không màu và hòa tan. So với quy trình dùng các chất hóa học, việc sử dụng E này đem lại lợi ích rõ rệt: tạo ra vải bò hoàn thiện hơn về màu sắc, độ mài mòn nhưng giữ được độ bền tối đa của sợi vải.

– Sử dụng *protease* để loại chất keo bao quanh sợi tơ. Sợi tơ có đường kính vào khoảng 10 - 14 micromet, bao gồm 2 filament fibroin được bao quanh bởi protein *sericin*. Hàm lượng sericin vào khoảng 17 - 25% khối lượng tơ. Do sericin nên khi sờ vào sợi tơ thấy có phần gồ ghề, xơ cứng. Vì vậy sau khi loại bỏ sericin, sợi tơ sẽ mềm mại và bóng.

Về thành phần cấu tạo, fibroin và sericin có cấu trúc khác nhau: fibroin có chứa

các đoạn lặp lại gồm 6 amino acid Ser-Gly-Ala- Gly-Ala-Gly, chứa lượng lớn glycine (44 mol%), rồi đến alanine (29 mol%), còn serine chỉ có12 mol%; ngược lại, sericin lại chứa nhiều serine nhất, đến 37 mol%, glycine chỉ có 15 mol% và acid aspartic cũng chiếm 15 mol%. Chính sự sai khác này cho phép sử dụng protease để loại sericin mà ít hoặc không ảnh hưởng đến cấu trúc fibroin của tơ (vì E có tính đặc hiệu cao, có thể phân giải protein này mà không phân giải hoặc tác dụng rất ít đối với protein khác). Nói chung, protease hoạt động trong môi trường kiềm sẽ phân giải sericin tốt hơn. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy dùng các E tương tự trypsin, papain, hoặc pepsin không cho kết quả mong muốn. Một số nghiên cứu thử phối hợp protease và lipase cho thấy có kết quả tốt hơn. Việc sử dụng protease để loại keo tơ mới được áp dụng ở Trung Quốc.

Ở Việt Nam chúng tôi và một số tác giả khác cũng đã thử dùng protease của dứa (bromelain) để xử lý kén khi ươm tơ, kết quả cho thấy việc kéo tơ được dễ dàng hơn (do E phân giải lớp keo ngoài sợi tơ), có thể tiến hành kéo tơ ở nhiệt độ thấp hơn, độ dài sợi tơ tăng đáng kể.

Nhìn chung việc sử dụng E trong sản xuất sợi, vải mới chỉ tập trung vào sợi tự nhiên, tuy nhiên có một số nghiên cứu cho thấy, cũng có thể sử dụng E trong sản xuất sợi tổng hợp như sợi polyester và nylon. Năm 1998, đã có công bố về tác dụng của E đối với sợi tổng hợp: *lipase* làm tăng tính chất hấp thụ và độ thấm nước của sợi polyester; tác dụng của *protease* đối với oligomernylon; *nitrilase* (E.C. 3.5.5.1 và 3.5.5.7) hoặc *nitrile hydratase* (E.C. 4.2.1.84)/*nitrile amidase* (E.C.3.5.1.4) đối với sợi và hạt polyacrylonitrile. Các E này làm thay đổi bề mặt sợi acrylic làm tăng hiệu quả nhuộm màu sợi. Các kết quả trên cho thấy tiềm năng sử dụng công nghệ E trong sản xuất sợi tổng hợp, sẽ tạo được *công nghệ thân thiện môi trường* trong sản xuất sợi tổng hợp.

E cũng có thể được sử dụng để xử lý nước thải ở các nhà máy sản xuất sợi, vải. Nước thải của các nhà máy này có chứa tinh bột, poly (vinyl alcohol); và đặc biệt là các chất màu rất khó loại bỏ khi dùng các phương pháp xử lý nước thải thông thường. Các chất màu azo khi thải vào môi trường, có thể tạo thành các amin thơm rất độc hại.

8.4.5. Sử dụng E trong công nghiệp sản xuất bột giấy và giấy

Quá trình sản xuất giấy và bột giấy gồm 3 công đoạn chủ yếu: nghiền bột, tẩy trắng và xeo giấy. Theo quy trình truyền thống, sử dụng các hóa chất phải thực hiện ở những điều kiện khắc nghiệt: pH cao hoặc thấp, và nhiệt độ cao, vừa tiêu tốn năng lượng và ảnh hưởng xấu đến môi trường. Vì vậy từ những năm 1980, đã có nhiều nghiên cứu và ứng dụng E vào ngành công nghiệp giấy, và đến những năm 1990 việc ứng dụng ở quy mô công nghiệp phát triển mạnh, năm 2002, việc sử dụng xylanase để tẩy trắng ở quy mô công nghiệp đã phát triển nhanh chóng. Các E khác nhau đã được sử dụng (bảng 8.8) chủ yếu ở công đoạn tạo bột giấy và tẩy trắng, tẩy mực trên giấy (trong quá trình tái chế giấy). Điều quan trọng để mở rộng việc sử dụng E trong công nghiệp sản xuất giấy là giá thành chế phẩm E phải phù hợp với quy mô công nghiệp để bảo đảm lợi ích kinh tế.

Bảng 8.8. Tác dụng của các E trong quá trình sản xuất bột giấy và giấy

Enzyme	(Cơ chất). Tác dụng	Lợi ích kỹ thuật
Cellobiohydrolase	(cellulose). – Làm nhỏ sợi.	– Tiết kiệm năng lượng. – Làm tăng độ mềm dẻo của sợi.
Endoglucanase, Các *cellulase*	(cellulose). – Phản trùng hợp.	– Làm tăng khả năng loại mực của giấy.
Endoxylanase, endomannanase	(xylan). – Phản trùng hợp, giảm độ bền keo tụ.	– Tăng khả năng tách lignin.
Acetyl glucomannan-esterase	(glucomannan). – Giảm độ hòa tan của glucomannan.	– Tăng hiệu suất bột giấy, tăng tính bền.
Polygalacturonase, galactanase	(pectin). – Phản trùng hợp.	–Tiết kiệm năng lượng trong quá trình tước vỏ. – Giảm lượng cation cần thiết trong quá trình sản xuất giấy. – Tăng khả năng tách lignin.
Laccase	(lignin). – Trùng hợp hóa.	– Trùng hợp hóa lignan.
Laccase mediator Mn^{2+}*-peroxidase*	(lignin). – Phản trùng hợp hóa.	– Tăng độ sáng màu.
Lipase	(các chất khác). – Tăng tính ưa nước của sợi.	– Tăng tính bền.

Sử dụng E để loại mực là vấn đề có tiềm năng ứng dụng lớn nhất trong sản xuất bột giấy và giấy, hiện cũng đã được sử dụng. Có thể dùng các E thủy phân saccharide như cellulase, hemicellulase, hoặc pectinase để tách các phần tử mực khỏi bề mặt sợi giấy, hoặc dùng E để thủy phân chất mang phần tử mực.

8.5. SỬ DỤNG E TRONG NÔNG NGHIỆP

Việc ứng dụng E trong nông nghiệp, chủ yếu là trong chăn nuôi để *tăng hiệu suất sử dụng thức ăn, sản xuất thức ăn dễ tiêu hóa* cho động vật, đặc biệt là động vật còn non để tăng hiệu quả sử dụng thức ăn. Có hai cách sử dụng: trộn E vào thức ăn trước khi dùng, hoặc xử lý thức ăn với E để chuyển thành dạng dễ tiêu hóa rồi mới cho động vật ăn. Cách thứ nhất dễ thực hiện nhưng cần phải chọn các E có thể hoạt động được trong ống tiêu hóa của động vật, hiệu quả sử dụng E không cao. Cách thứ hai cho hiệu quả cao hơn vì có thể tạo điều kiện thích hợp để E hoạt động mạnh nhất, khai thác tối đa tác dụng của E.

Thành phần thức ăn của nhiều động vật chủ yếu là ngũ cốc, có bổ sung các nguyên liệu giàu protein như đậu tương, và/hoặc nguyên liệu giàu lipid. Nhiều thức ăn thực vật có chứa khoảng 30% là cellulose, hemicellulose, pectin là những chất

mà nhiều động vật không hấp thụ được. Mặc dù trong hệ tiêu hóa của động vật cũng có các E phân giải các chất dinh dưỡng trong thức ăn (tinh bột, protein, lipid) nhưng thường không đủ để tiêu hóa toàn bộ thức ăn. Ví dụ, người ta đã tính được là lợn không thể tiêu hóa một phần năm khẩu phần ăn hàng ngày. Hơn nữa trong một số nguyên liệu (đậu, đặc biệt là đậu tương) còn có các chất kháng dinh dưỡng. Sử dụng E trong chăn nuôi đem lại những lợi ích sau:

– Phân giải các chất kháng dinh dưỡng có trong nguyên liệu, làm cho việc tiêu hóa thức ăn tốt hơn.

– Phân giải các thành phần cấu trúc của ngũ cốc, do đó các chất dinh dưỡng dễ tách ra hơn, làm tăng hệ số sử dụng thức ăn.

–Phân giải các chất dinh dưỡng ở dạng polymer phân tử lớn thành các sản phẩm phân tử thấp dễ tiêu hóa, dễ hấp thụ, tăng hiệu quả hấp thụ thức ăn. Điều này đặc biệt có lợi đối với động vật còn non.

– Giảm ô nhiễm môi trường.

Việc sử dụng E phục vụ chăn nuôi được bắt đầu ở Liên Xô từ những năm 1970, chủ yếu là các chế phẩm E thô (chưa tinh sạch hoặc được tinh sạch khoảng 3 – 10 lần) từ vi sinh vật với các tên khác nhau như: amilorizin, glucoavamorin, có chứa đến 5 E thủy phân khác nhau (amylase, dextrinase, maltase, glucoamylase và protease). Các chế phẩm E thường được sử dụng để chuẩn bị thức ăn cho lợn, động vật có sừng và chim. Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng cellulase để phân giải cellulose không chỉ có tác dụng chuyển hóa nó thành dạng có thể hấp thụ được mà còn có ảnh hưởng tốt đến việc sử dụng protein và năng lượng của khẩu phần. Ví dụ: thêm chế phẩm subtilase vào khẩu phần ăn của lợn làm tăng trọng cao hơn đối chứng từ 15- 20%; đối với gà cũng có thể làm tăng trọng từ 10 – 13%; đối với cá, một số nghiên cứu cho thấy có thể sử dụng chế phẩm E để nuôi và vỗ béo cá chép, cá hồi.

Vào những năm 1980, ở Phần Lan đã sử dụng β- glucanase bổ sung vào thức ăn là lúa mạch để chăn nuôi gia cầm, và được xem là sử dụng E ở quy mô lớn nhất trong chăn nuôi. Ở cộng đồng Châu Âu, việc sử dụng E trong chăn nuôi khá nhiều, chủ yếu là nuôi gia cầm với thức ăn có chứa E.

Cho đến nay, các E được dùng nhiều và cho hiệu quả cao là các *E phân giải polysaccharide khác tinh bột* (pentosan) của lúa mỳ, lúa mạch, yến mạch. Các chất này được xem là các chất kháng dinh dưỡng, vì khi ở dạng hòa tan nó làm tăng độ dính trong ruột non của động vật, do đó làm giảm mức độ và tốc độ tiêu hóa các chất dinh dưỡng. Do đó vào khoảng năm 2003, các E được chú ý sử dụng là *xylanase* (phân giải arabinoxylan của các thức ăn lúa mỳ), và *β- glucanase* để thủy phân β- glucan của lúa mạch.

– Thử nghiệm của một số tác giả cho thấy, khi thêm *xylanase* của *Trichderma* vào thức ăn chế biến từ lúa mỳ cho lợn con theo tỷ lệ 5000 đơn vị cho 1kg thức ăn, làm tăng khối lượng lợn so với đối chứng (cùng thức ăn nhưng không thêm E) là 17%, tỷ lệ lượng thức ăn tiêu tốn/ khối lượng thu được ở mẫu đối chứng là 2,05 trong khi ở mẫu có bổ sung E chỉ có 1,71.

– Sử dụng *β- glucanase* trong thức ăn động vật trong nhiều năm đã cho thấy

đem lại lợi ích rõ rệt, đặc biệt, đối với lợn và gia cầm khi sử dụng thức ăn có chứa từ 30% trở lên là lúa mạch. Ví dụ đối với gà giò, đã làm tăng trọng hơn đối chứng (không thêm E) khoảng 10%, giảm tỷ lệ tiêu thụ thức ăn cho 1kg tăng trọng.

Ngoài 2 E kể trên, *phytase, protease, amylase* cũng đang được sử dụng.

+ *Phytase* có tác dụng thủy phân acid phytic (*myo*-inositol hexakis-dihydrogenphosphate), là dạng dự trữ phospho trong nhiều loại ngũ cốc và đậu được dùng làm thức ăn cho động vật. Tỷ lệ phospho trong acid phytic/phospho tổng số của đậu tương là 60%, ở ngô là 72% và ở lúa mỳ là 77%. Các động vật dạ dày đơn chỉ tiêu hóa một phần nhỏ acid phytic, còn phần lớn bài tiết ra ngoài, gây ô nhiễm phosphophytate trong môi trường.

Sản phẩm được tạo thành dưới tác dụng của *phytase* là phospho (rất cần thiết cho động vật, khi thiếu phospho, động vật chán ăn, do đó sút cân, giảm sinh sản), và *myo*- inositol (thành phần cấu tạo của glycerophospholipid, là thành phần lipid chủ yếu của màng sinh học).

Acid phytic cũng có tác dụng bao vây potasium, calcium, đồng, kẽm và magnesium, do đó nó cũng được xem là chất kháng dinh dưỡng.

Vì vậy sử dụng phytase, một mặt làm tăng giá trị dinh dưỡng của thức ăn, giảm tác dụng kháng dinh dưỡng của acid phytic, mặt khác còn làm giảm ô nhiễm môi trường.

+ *Protease,* có tác dụng thủy phân protein thành các peptide phân tử thấp, dễ tiêu hóa, thường được sử dụng cùng với các E khác. Các E này có tác dụng thủy phân các chất kháng dinh dưỡng có bản chất protein như lectin, các protein kìm hãm protease thường có nhiều trong các loại đậu, đặc biệt là đậu tương.

+ *α-amylase,* thủy phân tinh bột, thường được sử dụng cùng với các E khác để chuẩn bị thức ăn (chủ yếu là ngô) cho gia cầm, cho lợn con ở giai đoạn cai sữa.

Trong tương lai, để phát triển và mở rộng ứng dụng E phục vụ chăn nuôi, cần lựa chọn các E có độ bền cao ở các điều kiện sản xuất thức ăn cho động vật, bền với các thành phần thường có trong thức ăn của động vật. Cần tiếp tục nghiên cứu lựa chọn các E để sử dụng thích hợp có hiệu quả cao đối với từng loại thức ăn, và tìm nồng độ phytase tối thích để sử dụng cho các thức ăn từ ngô.

Cho đến nay, các E được sử dụng trong chăn nuôi thường được tách từ vi sinh vật hoặc nấm mốc, một hướng nghiên cứu đang được lưu ý là tìm cách đưa các gen của các E này vào thực vật để biểu hiện trong chính các thực vật dùng làm thức ăn cho động vật. Nếu thành công sẽ làm giảm giá thành so với phương pháp hiện nay. Với mục đích này, người ta đã bắt đầu nghiên cứu đưa gen phytase vào cây đậu tương, lúa mỳ, thuốc lá, alfalfa, và cây cải dầu. Tuy nhiên việc này cũng có thể gặp khó khăn do liên quan đến cây biến đổi gen,

8.6. SỬ DỤNG E TRONG MỘT SỐ LĨNH VỰC MỚI

Từ khoảng năm 1990 bắt đầu nghiên cứu sử dụng E một số lĩnh vực mới như: mỹ phẩm, bảo quản, hồi phục lại pH môi trường, xử lý vỏ cây bần, dầu mỏ, xử lý nước thải v.v... (bảng 8.9).

Bảng 8.9. Tóm tắt các lĩnh vực mới của việc nghiên cứu ứng dụng E

Lĩnh vực ứng dụng enzyme	Enzyme được dùng	Tác dụng, lợi ích, triển vọng, ghi chú
Mỹ phẩm:		
Nhuộm tóc	Oxydase, peroxydase, tyrosinase.	E sẽ tạo H_2O_2 tại chỗ, với nồng độ vừa đủ, không phải dùng H_2O_2 ở nồng độ cao (có thể làm hại tóc), điều kiện nhuộm tóc dịu hơn, có thể thực hiện ở pH trung tính. Patent về lĩnh vực này đã có từ 1917, đến năm 1960 mới được sử dụng, tuy nhiên trên thị trường cũng chưa có các sản phẩm nhuộm tóc bằng E vì giá thành còn cao. Từ năm 1999, trung bình mỗi năm có khoảng 40 patent liên quan đến việc sử dụng E để nhuộm tóc, điều này hứa hẹn sẽ sớm đưa sản phẩm ra thị trường.
Tạo sóng cho tóc	– Disulfide isomerase (sắp xếp lại các cầu – S–S–); – Glutathione sulfhydryl oxidase (oxy hóa trở lại các cầu –S–S–).	*Thay thế acid thioglycolic* khử cầu disulfide trong keratin của tóc để phá cấu trúc tự nhiên của tóc, *thay thế* H_2O_2 để oxy hóa các nhóm – SH tạo các cầu –S–S– mới, khác với dạng tự nhiên.
Chăm sóc da	Protease thực vật (papain của đu đủ, bromelain của dứa), từ 1990 dùng protease vi khuẩn.	Các E này có tác dụng thủy phân giới hạn các tế bào biểu bì, được sử dụng để lột nhẹ da mặt làm cho da mịn hơn.
Thuốc đánh răng và nước súc miệng	– Glucose oxidase. – Amyloglucosidase, protease.	– Chống vi khuẩn tạo cao răng, gây mục xương răng, viêm lợi. E này oxy hóa glucose, tạo thành gluconolactone và H_2O_2. Peroxidase của nước bọt sử dụng H_2O_2 tạo thành hypothiocyanite là chất kháng khuẩn mạnh. – Thủy phân và loại bỏ tinh bột, protein của thức ăn còn lại trong răng. Papain đã được sử dụng cùng với acid citric trong sản phẩm làm trắng răng. – Các E thủy phân cũng được dùng trong dung dịch để làm sạch răng giả, các E oxy hóa khử cũng được dùng để tẩy trắng răng giả.
Khai thác dầu mỏ	Mannanase bền nhiệt.	Thủy phân mannan (được dùng trong dung dịch khoan dầu), có tiềm năng ứng dụng để điều chỉnh độ nhớt của dịch khoan, tăng tổng thu nhập của mỗi giếng dầu.
Xử lý nước thải	Catalase.	Loại bỏ H_2O_2 trong nước thải nhanh và có hiệu quả nhất.

8.7. SỬ DỤNG E TRONG Y, DƯỢC

Từ khoảng giữa năm 1950, việc xác định hoạt độ E, sử dụng E tinh sạch trong lâm sàng đã được tăng dần. Từ năm 1954, đã phát hiện được rằng chỉ một thời gian ngắn sau khi bị nhồi máu cơ tim, hoạt độ của aspartate aminotranspherase (E.C.2.6.1.1) tăng, Từ đó kích thích việc nghiên cứu để sử dụng hoạt độ E của máu làm *chỉ thị về sự phá hỏng mô* để chẩn đoán bệnh.

Có thể tóm tắt một số khía cạnh của việc nghiên cứu, sử dụng E trong Y, Dược như sau:

– Xác định hoạt độ E để chẩn đoán bệnh, lựa chọn các E làm chỉ thị để có thể phát hiện sớm bệnh, theo dõi diễn biến bệnh trong quá trình điều trị. Vấn đề chính ở đây là lựa chọn E đặc hiệu của mô. Trong một số trường hợp, cũng có thể sử dụng sự sai khác của phổ isoenzyme đặc trưng giữa mô và huyết thanh, ví dụ: phổ isoenzyme lactate dehydrogenase.

– Sử dụng E, các chất kìm hãm đặc hiệu E làm thuốc để điều trị bệnh.

8.7.1. Xác định hoạt độ E phục vụ chẩn đoán bệnh

Các E được lựa chọn để xác định hoạt độ phục vụ chẩn đoán bệnh cần phải thỏa mãn một số điều kiện sau:

– Có trong máu, nước giải, hoặc có trong một số mô có dịch (màng phổi, màng bụng, dạ dày, tá tràng, ống não tủy v.v...).

– E có thể được xác định hoạt độ dễ dàng, phương pháp xác định dễ dàng tự động hóa.

– Có sự sai khác rõ ràng về hoạt độ E giữa trạng thái bình thường và bệnh lý.

– E cũng cần có độ bền tương đối, đáp ứng được yêu cầu thời gian bảo quản mẫu trước khi phân tích.

Để xác định hoạt độ các E trong máu phục vụ chẩn đoán bệnh, cần phân biệt:

+ Các E có chức năng bình thường trong huyết tương (các E xúc tác cho quá trình đông máu, hoạt hóa thành phần complement của máu, và trao đổi lipoprotein).

+ Các E không đặc hiệu của huyết tương, là các E không có chức năng đặc hiệu trong huyết tương, trong máu có thể không có cơ chất, hoặc CoE của chúng. Các E này thường do các mô tiết ra (amylase, lipase, phosphatase và các E liên quan đến quá trình trao đổi chất của tế bào), chỉ có một lượng rất ít trong máu. Khi hàm lượng của chúng trong huyết tương tăng lên đột ngột (có thể tăng lên đến hàng nghìn lần) chứng tỏ có thể có sự phá hủy một phần các mô tương ứng có vai trò tổng hợp đặc hiệu các E ấy. Hiện tượng tăng nhanh chóng phần lớn các E ngoại bào của mô trong huyết thanh người bệnh chứng tỏ các E này là được tiết ra từ mô bệnh. Tuy nhiên cũng còn có thể do một số yếu tố khác (tốc độ thay thế tế bào tăng, việc xử lý qua thận bị giảm v.v...). Cũng cần lưu ý là sự định vị của E trong tế bào, thời gian bán sống của mỗi E cũng ảnh hưởng đến việc tiết E vào máu khi mô bị phá hủy, các E của ty thể bị tách ra chậm hơn các E của bào tương.

Điều cần lưu ý là không thể chỉ căn cứ vào hoạt độ E để chẩn đoán bệnh mà còn cần kết hợp với các triệu chứng lâm sàng khác.

8.7.2. Sử dụng E trong điều trị bệnh

Ba lĩnh vực được sử dụng nhiều nhất là:

– Thay thế các E bị khiếm khuyết hay bị thiếu do các bệnh di truyền.

– Thay thế các E bị thiếu hụt, hoặc chỉ có với lượng ít hơn bình thường do cơ quan tổng hợp nó bị bệnh.

– Để tạo nên một hiệu quả sinh học đặc hiệu nào đó tùy thuộc vào hoạt tính xúc tác của E.

Ngoài ra, một số E cũng được dùng với tính chất bổ trợ, phối hợp với các phương pháp điều trị khác, hoặc để loại bỏ các chất độc, các chất không mong muốn khỏi máu hoặc mô. Ví dụ: sử dụng bromelain (protease của dứa) để phân giải hoại tử bỏng cho kết quả tốt (công trình phối hợp nghiên cứu giữa chúng tôi và Viện Bỏng quốc gia Việt Nam).

Phần lớn các E được dùng là hydrolase, một số oxidoreductase, transpherase, và lyase.

8.7.2.1. Các yêu cầu đối với chế phẩm E dùng trong điều trị

– Phải được đưa đến đúng chỗ cần thiết trong mô và cơ quan.

– Các E phải giữ được hoạt độ xúc tác tốt trong các điều kiện tại nơi mà nó được đưa đến. Ví dụ các điều kiện về cơ chất/coenzyme, thế oxy hóa khử, pH, các chất kìm hãm v.v... Các điều kiện này cần biết đầy đủ trước khi đưa E vào.

– Các E phải đủ bền để đảm bảo mức độ hoạt động đáp ứng yêu cầu trong khoảng thời gian cần thiết.

– E có độ hòa tan tốt để có thể dễ tiếp cận vào nơi cần tác dụng, có thể sử dụng ở dạng uống, tiêm.

– E có độ sạch cao để tránh các phản ứng phụ do các tạp chất gây ra.

Ngoài ra, E cũng phải đáp ứng các yêu cầu được quy định đối với mọi loại thuốc như:

– An toàn, hiệu quả điều trị phải lớn hơn các phản ứng bất lợi, đặc biệt là các vấn đề phức tạp về miễn dịch.

– Hiệu quả điều trị được xác định thông qua các thí nghiệm lâm sàng theo quy định của Nhà nước.

– E được chuẩn bị ở dạng thuận lợi cho việc sử dụng.

8.7.2.2. Những hạn chế của việc sử dụng các thuốc E/protein

a) Không bền, dễ bị biến tính dưới tác dụng nhiệt, pH acid hay kiềm mạnh, các chất gây biến tính, sự phân giải sinh học, tác dụng phân hủy của các E trong tế bào và cơ thể sống, phản ứng loại bỏ các protein lạ của cơ thể.

b) Có thể bị làm bất hoạt bởi các chất kìm hãm vốn có trong hệ thống sống.

c) Bề mặt phân tử của các E hòa tan có tính ưa nước, do đó không đi qua màng sinh học.

d) Tính thấm của màng tế bào cũng là một trở ngại, vì vậy cho đến nay, các E được sử dụng có hiệu quả đều là những thuốc E có tác dụng bên ngoài tế bào, có tác dụng tức thời để loại bỏ các chất độc hoặc xử lý các rối loạn trong máu.

e) Tính chất miễn dịch (immunogenecity): Các protein không phải của người đều là protein "lạ" đối với cơ thể sẽ bị đào thải. Khi tiêm E vào máu, nó sẽ cảm ứng tạo thành kháng thể, vì vậy gây trở ngại cho việc sử dụng lặp lại nhiều lần thuốc E.

Trong một số trường hợp cho thấy khi sử dụng các E tái tổ hợp, phản ứng miễn dịch thấp hơn, lý do được nêu là có thể do chế phẩm E có độ sạch cao hơn.

Tác dụng gây dị ứng có thể xảy ra khi xông bột E, đặc biệt là các protease.

f) Giá thành cao, kiểm tra chất lượng của sản phẩm cuối cùng cũng có những khó khăn.

8.7.2.3. Những ưu điểm khi sử dụng E trong điều trị

– Phản ứng phụ có hại ít hơn khi dùng các thuốc tổng hợp hóa học phân tử thấp.

– Có tính đặc hiệu cao.

8.7.2.4. Những thách thức cần vượt qua để phát triển các thuốc E

– Làm tăng độ bền của E: Có thể bằng cách gắn E vào polyethylene glycol; tạo liên kết chéo (cross-link) bằng phương pháp hóa học; bọc E trong các nang polymer, hoặc trong các lyposome nhân tạo v.v...

– Loại bỏ tính miễn dịch bằng cách thay đổi hoặc che phủ phần bề mặt phân tử E mà hệ thống miễn dịch của cơ thể có thể nhận biết.

– Tìm cách để có thể đưa được E đến đúng tế bào/mô cần đưa E vào. Có thể thực hiện được điều này theo các cách sau:

+ Thay đổi các gốc đường được nhận biết bởi các hepatocyte receptor.

+ Dung hợp di truyền với "targetingdevices" như các peptid hoặc các đoạn kháng thể nhận biết.

+ Cải thiện tính thấm vào mô bằng cách làm giảm kích thước phân tử hoặc nối với một trình tự làm trung gian cho việc thấm qua màng.

8.7.2.5. Hiện trạng của việc sử dụng E trong điều trị

Cho đến nay có khoảng 60 E đã được dùng trong điều trị có trên thị trường, hoặc đang ở giai đoạn thử nghiệm lâm sàng. Trong số các E này có:

– Hơn 50 E thuộc lớp hydrolase (lớp 3, các E thủy phân);

– Chỉ có 2 E thuộc lớp oxidoreductase (lớp 1): *urate oxidase* tự nhiên và tái tổ hợp, *superoxide dismutase* tự nhiên và tái tổ hợp;

– 1 E của lớp transpherase (lớp 2) là yếu tố đông máu XIIIa (E.C.2.3.13), có tên hệ thống là *protein-glutamine: amine γ-glutamyltranspherase*, còn có tên khác là fibrinoligase, transglutaminase.

– 1 E thuộc lớp lyase (lớp 4) là *uroporphyrinogen-1-synthase* tái tổ hợp (E.C.4.3.1.8), có tên hệ thống là porphobilinogen ammonia-lyase.

a) Các E oxidoreductase. Các E oxidoreductase (lớp 1) điều trị bệnh *gout*, thừa acid uric, bệnh viêm khớp, polyarthritis, asthma, ngăn ngừa bronchopulmonary dysplasia.

– Urate oxidase (E.C.1.7.3.3), xúc tác cho phản ứng oxy hóa acid uric thành allantoin có độ hòa tan lớn hơn. E tách từ *Asp. flavus* đã được dùng ở Pháp, Ý từ nhiều năm trước đây để điều trị bệnh thừa acid uric ở các bệnh nhân có nguy cơ tumor lysis syndrom (TLS). TLS dẫn đến lắng đọng acid uric và intraluminal tubular

obstruction, thừa phosphate (hyperphosphatemia), thiếu calcium (hypocalcemia), có thể làm rối loạn chức năng thận và nhiều cơ quan khác, đe dọa sự sống. E tách từ *Asp. flavus* cũng có những hạn chế và phức tạp, do đó đã sản xuất E này bằng phương pháp tái tổ hợp, biểu hiện trong *Saccharomyces cerevisiae*, chế phẩm E có độ tinh sạch khá cao, đã được phép đưa vào thị trường Châu Âu năm 2001, và trong thị trường Mỹ năm 2002, chế phẩm gây dị ứng thấp hơn E của *Asp. flavus*.

– Superoxide dismutase (E.C.1.15.1.1), có tên hệ thống là *Superoxide: Superoxide oxidoreductase,* xúc tác cho phản ứng:

$O_2^- + O_2^- + 2\,H^+ = O_2 + H_2O_2$

Các ion superoxide cũng như peroxide hydrogen là khởi đầu cho việc tạo thành các loại oxygen có khả năng phản ứng cao (reactive oxygen species, ROS), có thể phá hủy tế bào và mô. *Superoxide dismutase* (SD) loại tác dụng độc của ROS. Năm 1960, người ta đã tách được SD từ gan bò, được dùng như thuốc chống viêm từ năm 1980 và đã được chứng minh là có tác dụng điều trị bệnh ostheoarthritis, chronic polyarthritis, radiation cystitis. Người ta cũng đang tiến hành thử nghiệm lâm sàng một chế phẩm SD tái tổ hợp của người, biểu hiện ở *E.coli* hoặc nấm men để điều trị amylotrophic lateral sclerosis, bronchopulmonary displasia trong premature neonate và respiratory distress syndrom. Để kéo dài thời gian lưu lại của E trong máu, người ta cũng đã thử gắn E này với polyethylene glycol và thấy cho kết quả tốt, hiện đang tiếp tục thử nghiệm lâm sàng.

b) Transpherase: E duy nhất của lớp này được dùng trong điều trị là yếu tố đông máu XIII, tồn tại trong máu ở dạng proenzyme, vào giai đoạn cuối cùng của quá trình đông máu, nó được hoạt hóa nhờ thrombin, tạo thành dạng hoạt động là yếu tố XIIIa (transglutaminase) xúc tác cho sự tạo thành liên kết chéo của các monomer fibrin bằng cách tạo thành liên kết ε-(γ-glutamyl) lysin giữa các phân tử.

c) Hydrolase: Phần lớn các ***E thủy phân*** (lớp 3) đã được dùng trong điều trị, tập trung chủ yếu vào một số lĩnh vực sau:

– Hỗ trợ tiêu hóa: *pepsin* của dạ dày lợn; *trypsin, chymotrypsin* và *amylase* tụy tạng lợn, hoặc chế phẩm hỗn hợp các E này và *lipase* có tên là *pancreatin* của lợn hoặc bò; *papain* (đu đủ), *bromelain* (dứa).

– Phân giải các mô hoại tử, xử lý vết thương: *trypsin, chymotrypsin; plasmin* của huyết tương bò hoặc người; *papain* (của đu đủ), *bromelain* (của dứa); *collagenase* (từ *Clostridium histolyticum*).

– *Loại các cục máu đông*: *streptokinase* hoặc *urokinase* (E.C.3.4.21.73), là yếu tố hoạt hóa plasminogen) tái tổ hợp; *ancrod* (E.C.3.4.21.74), là protease serine từ nọc rắn (*Calloselasma* (Agkistrodon) *rhodostoma*) v.v... điều trị bệnh nhồi máu cơ tim cấp tính.

Các E được dùng trong điều trị rối loạn đông máu là rất quan trọng nhưng khá phức tạp, từ năm 1996, EU, và sau đó đến năm 1999, Mỹ đã cho phép dùng yếu tố VIIa tái tổ hợp trong điều trị bệnh ưa chảy máu (hemophilia A).

Ngoài ra các E cũng được sử dụng chữa nhiều bệnh khác như:

– *Lysozyme* của lòng trắng trứng (có tác dụng như các chất kháng khuẩn), chữa các bệnh nhiễm khuẩn.

– Oryzin (*protease kiềm* của *Asperillus* sp.), bromelain, *serrapeptase* hay *serralysin (protease kiềm* của *Serratia E15)* được sử dụng trong điều trị viêm.

– Các E điều trị ung thư:

+ *Asparaginase* trong điều trị ung thư: Asparaginase (3.5.1.1) xúc tác cho phản ứng sau: L- asparagine + H_2O = L- aspartate + NH_3

Các tế bào ung thư đòi hỏi chất dinh dưỡng asparagine, asparaginase (Asn-ase) phân giải asparagine làm giảm nồng độ của nó trong máu, do đó kìm hãm sự tăng trưởng của tế bào ung thư.

E này khá phổ biến ở thực vật, động vật và đặc biệt là vi sinh vật, tuy nhiên có lẽ E tách từ người sẽ là lý tưởng nhất vì sẽ giảm được phản ứng miễn dịch của cơ thể như khi dùng E vi sinh vật. Tuy nhiên, với nguồn này lại không đáp ứng được nhu cầu về lượng, trong tương lai, có thể dùng công nghệ ADN tái tổ hợp để sản xuất Asn-ase của người. Các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hiệu quả sử dụng Asn-ase tăng cao khi sử dụng phối hợp với các hóa chất điều trị khác.

+ Một số E khác như: glutaminase, serine dehydratase, arginase, phenylalanine ammonia-lyase, và leucine dehydrogenase cũng đang được thử nghiệm để có thể dùng làm thuốc chữa ung thư.

8.7.2.6. Hình thức sử dụng E: tùy mục đích điều trị: uống, đắp trực tiếp vào vết thương hoặc đưa vào máu, hoặc có thể sử dụng trong các thiết bị phụ trợ ngoài cơ thể.

– Các E hỗ trợ tiêu hóa thường được dùng theo đường *uống*, đối với các E có thể bị phá hủy dưới tác dụng acid hoặc pepsin của dạ dày, người ta thường bọc E trong các nang và E sẽ được giải phóng ở môi trường pH kiềm của tá tràng.

– Các E dùng để loại mủ máu và mô hoại tử của vết thương, vết loét, vết bỏng, hoặc có tác dụng làm liền sẹo, thường dùng *tại chỗ*, có phối hợp với các chất kháng sinh. E thường dùng ở dạng thuốc mỡ, hoặc dạng dung dịch tẩm vào vải khô, có thể tẩm một lần hoặc nhỏ giọt liên tục trong một thời gian nhất định. Sử dụng E dạng bột không thuận lợi vì E khó đi vào được các khe nhỏ của vết thương. Khi sử dụng các protease cũng cần lưu ý là, một số E có thể gây dị ứng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phối hợp với Viện bỏng quốc gia cho thấy, sử dụng bromelain từ chồi ngọn dứa đã tinh sạch một phần để đắp vào vết thương bỏng đã làm rụng hoại tử nhanh, giảm dịch xuất tiết, rút ngắn thời gian điều trị.

– Các E được sử dụng để loại, hoặc chuyển hóa các chất trao đổi độc hại trong máu, không nhất thiết phải đưa vào máu mà có thể được sử dụng trong các thiết bị phụ trợ ở bên ngoài cơ thể. Ví dụ: ở người bị bệnh thận, khi thận không thực hiện được chức năng bình thường, để loại các chất trao đổi độc hại khỏi cơ thể, có thể dùng hệ thống lọc nhân tạo ngoài cơ thể, trong đó có sử dụng một số E ở dạng không tan

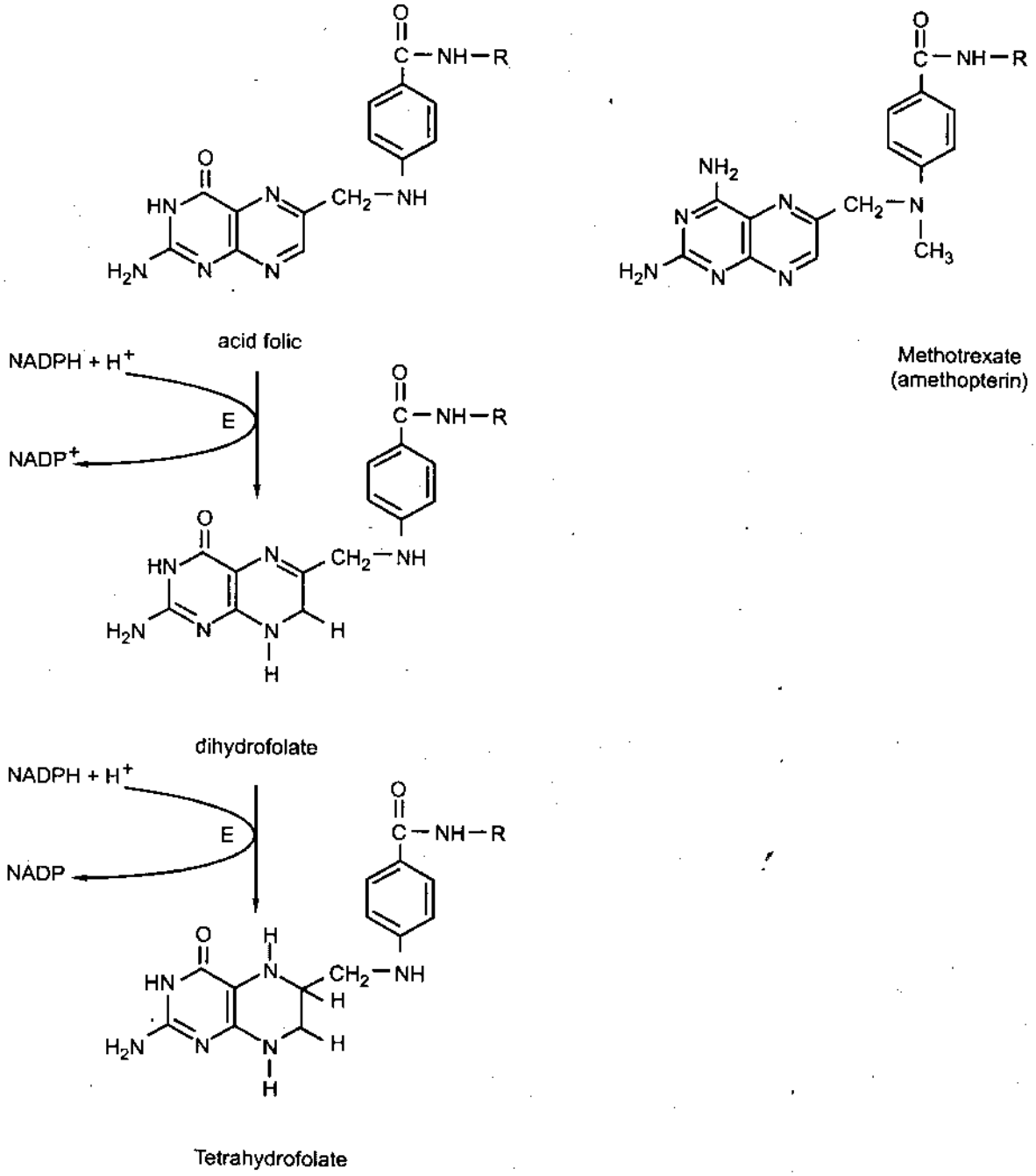
(xem chương 9) như: *urease* để loại urea, *bilirubin oxidase* để loại bilirubin, *asparaginase* để loại asparagine.

– Hoạt hóa các tiền chất thuốc (pro-drug): Cách này được dùng để điều trị ung thư. Các thuốc có tác dụng điều trị ung thư thường có tác dụng kìm hãm một số giai đoạn của quá trình trao đổi chất. Các tiền chất thuốc là những thuốc đã được thay đổi hóa học sao cho không có tác dụng trong suốt chặng đường đi đến tế bào, hoặc mô đích (nơi mà nó sẽ phải thể hiện chức năng điều trị), và khi đến nơi cần điều trị, nó sẽ được hoạt hóa. Ví dụ: methotrexate, có cấu trúc tương tự acid folic (hình 8.4), là chất kìm hãm cạnh tranh của *dihydrofolate reductase,* là E xúc tác cho quá trình chuyển hóa dihydrofolate tạo thành tetrahydrofolate (cofactor quan trọng để tổng hợp dTMP, tiền chất của ADN). Vì vậy nó có tác dụng rất độc đối với các tế bào phân chia nhanh nhất như các tế bào ung thư. Nếu đưa được chất này đến đúng các tế bào ung thư, và chỉ hoạt động tại chỗ, thì có thể sử dụng ở nồng độ cao, hiệu quả điều trị sẽ rất lớn mà không ảnh hưởng đến các tế bào bình thường. Điều này có thể thực hiện bằng cách kết hợp thuốc với một chất nào đó, biến nó thành dạng "trơ", dùng E có thể hoạt hóa pro-drug tại vị trí đích. E có thể tìm đến đích nhờ kháng thể có thể nhận biết trung tâm kháng nguyên đặc hiệu ở tế bào ung thư (hình 8.5). Các E được sử dụng vào mục đích này phải tương đối bền và có thể giải phóng thuốc với vận tốc thích hợp để tế bào ung thư có thể tiếp nhận. Một số ví dụ về các E được dùng để hoạt hóa pro-drug được trình bày trên bảng 8.10. Qua bảng này cho thấy các E này là các E thủy phân (lớp 3, hydrolase).

Bảng 8.10. Một số ví dụ về các E được sử dụng để hoạt hóa pro-drug
(Dựa theo tài liệu của N.C. Price)

Enzyme hoạt hóa pro-drug (mã số E)	Tiền chất thuốc (Pro-drug)	Thuốc
Carboxypeptidase A (3.4.17.1)	Methotrexate α-phenylalanine	Methotrexate
Alkaline phosphatase (3.1.3.1)	Etoposide phosphate	Etoposide
Carboxypeptidase G_2 (3.4.17.11)	p-N-bis(2-Chloroethyl)aminobenzoyl glutamic acid	Benzoic acid mustard
Alkaline phosphatase (3.1.3.1)	Mitomycin phosphate	Mitomycin
β-glucuronidase (3.2.1.31)	Aniline mustard glucuronide	Anilin mustard
Cytosine deaminase (3.5.4.1)	5- Fluorocytosine	5-fluorouracil
Amino peptidase (3.4.11)	2-(L-α-aminoacyl) methotrexate	Methotrexate

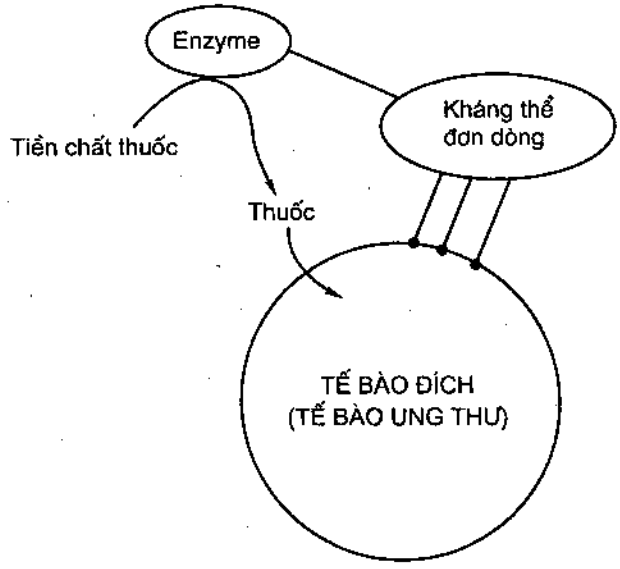
Cũng có thể sử dụng các E hoạt hóa pro-drug theo một cách khác: gắn gen của E vào vector virus, đưa vào tế bào ung thư, E sẽ được biểu hiện tại tế bào ung thư và hoạt hóa pro-drug.



Hình 8.4. Cấu trúc của Methotrexate, chất kìm hãm cạnh tranh của dihydrofolate reductase (DHFR).

E = DHFR, cả hai phản ứng đều do E này xúc tác.

R = – CH(COO⁻) — CH_2 – CH_2COO^-



Hình 8.5. Mô hình biểu diễn sự gắn kết E-kháng thể đơn dòng-tiền chất thuốc để đưa thuốc đến tác dụng tại chỗ tế bào ung thư

8.7.2.7. Sử dụng E để điều trị bệnh di truyền bẩm sinh do thiếu hụt E

Cho đến nay người ta đã xác định nhiều bệnh khiếm khuyết di truyền, trong đó có thiếu E tương ứng dẫn đến những sai sót trong trao đổi chất (bảng 8.11).

Bảng 8.11. Một số ví dụ những sai sót bẩm sinh trong trao đổi chất do thiếu hụt E[a]

Sai sót bẩm sinh	Enzyme bị thiếu hụt (mã số của E)	Tần số gặp (1 trong X)
Alcaptonuria (Ancapton-niệu)	Homogentisase 1,2-dioxygenase (1.13.11.5)	$10^5 – 10^6$
Phenyketonuria (Acid phenylpyruvic niệu)	Phenylalanine 4-monooxygenase (1.14.16.1)	10 000 – 20 000
Galactosemia (Galactose- huyết)	Galactose 1-phosphate uridylyltransferase (2.7.7.10)	35 000 – 60 000
Glycogen storage disease type Ia	Glucoso 6- phosphatase (3.1.3.9)	100 000
Glycogen storage disease type V	Muscle glycogen phosphorylase (2.4.1.1)	$\approx 10^6$
Pentosuria (pentose - niệu)	L-xylulose reductase (1.1.1.9)	2 500 Ashkenasi Jews
Fructosuria (fructose –niệu)	Fructokinase (2.7.1.4)	130 000
Butyrylcholinesterase deficiency	Butyrylcholinesterase (3.1.1.8)	3 000 Caucasians
Acatalasaemia (thiếu catalase huyết)	Catalase (1.11.1.6)	25 000 – 250.000
Hypophosphatasia (giảm hoạt độ phosphatase)	Alkaline phosphatase (3.1.3.1)	$\approx 10^5$

[a] Dựa theo *Scriver et al.*, 1995, có bổ sung mã số E để dễ hình dung phản ứng.

X: là số ghi ở các dòng phía dưới của cột này.

Do thiếu E nên cơ chất của các E này không được chuyển hóa, do đó sẽ có một lượng lớn các chất này ngoài tế bào. Để chẩn đoán sơ bộ, có thể xác định các sản phẩm trung gian trao đổi chất trong huyết tương, trong nước giải, hoặc cũng có thể xác định hoạt độ E trong mô (ví dụ trong gan, nhưng cũng chưa thể kết luận chắc chắn được). Mức độ thiếu hụt E có thể khác nhau (tùy theo kiểu sai sót di truyền). Sự thiếu hụt một E nào đó thể hiện ở sự giảm hoạt độ tổng số của E ấy so với ở cơ thể bình thường tương ứng, điều này thường là do thiếu gen tổng hợp E ấy, nhưng cũng có thể là do những đột biến làm thay đổi cấu trúc phân tử của E theo hướng không có lợi cho hoạt động của nó.

Để điều trị bệnh này có nhiều cách: i) điều trị gen (đưa gen khiếm khuyết vào cơ thể); ii) đơn giản nhất là thông qua việc điều chỉnh thức ăn, không có hoặc có rất ít cơ chất của E bị thiếu hụt; iii) bổ sung E vào cơ thể. Cách cuối cùng này sẽ rất có hiệu quả nếu đưa được E đến đúng đích, nơi mà nó thực hiện chức năng trong cơ thể bình thường. Đối với các E tiêu hóa của dạ dày và ruột có thể thực hiện dễ dàng. Ví dụ: đối với bệnh nhân thiếu *lactase* (β- galactosidase, E phân giải lactose của sữa) không thể sử dụng sữa làm thức ăn, có thể khắc phục bằng cách: loại sữa, sản phẩm sữa khỏi thức ăn của bệnh nhân; hoặc có thể bổ sung chế phẩm *lactase* của vi sinh vật để nó tiêu hóa lactose như ở cơ thể bình thường.

Đối với các E của các mô, vì E là protein phân tử lớn nên nó không thể được hấp thụ qua vách ống tiêu hóa; còn nếu đưa vào máu, thì các E không phải của người, nó sẽ nhanh chóng bị làm bất hoạt bởi kháng thể. Để giải quyết những trở ngại đã nêu, có thể đưa E vào cơ thể theo các cách sau:

– Trong một số trường hợp có thể gắn thêm gốc đường vào phân tử E (đặc biệt là các đường của lysosome) trước khi đưa vào cơ thể, có thể làm tăng khả năng E được đưa đến đích.

– Giữ E trong các màng nhân tạo thích hợp, gọi là *liposome* (xem chương E không tan) rồi đưa vào máu, các liposome (chứa E) trong máu sẽ được các tế bào tiếp nhận.

Cùng với sự phát triển của công nghệ ADN tái tổ hợp, cho phép sản xuất được lượng lớn các E của người, việc ứng dụng E trong điều trị bệnh sẽ ngày càng được mở rộng và có hiệu quả cao hơn.

Chương 9

ENZYME KHÔNG TAN

9.1. KHÁI NIỆM

Các E không tan là những E bị giữ, hoặc được cố định trong một vùng, một khoang nhất định, không bị hòa tan trong các điều kiện bình thường, vẫn giữ được hoạt động xúc tác, có thể sử dụng liên tục và lặp lại nhiều lần. Các chất dùng để gắn hoặc giữ E thường được gọi là chất mang (carrier) hay giá thể (support).

Như vậy nếu có thể gắn các E xúc tác cho một dãy các phản ứng theo đúng trật tự của nó (hệ thống nhiều E, multienzyme) sẽ nhận được hệ thống E không tan xúc tác cho một dãy phản ứng chuyển hóa từ cơ chất đến sản phẩm cuối cùng (ví dụ: từ đường thành rượu qua quá trình đường phân). Do đặc tính không bị hòa tan mà vẫn giữ được hoạt độ xúc tác, ưu điểm nổi bật của E ở dạng không tan so với khi ở dạng hòa tan là: có thể *sử dụng lặp lại nhiều lần một lượng E xác định,* do đó làm *giảm đáng kể giá thành chế phẩm E,* và có thể sử dụng liên tục trong các hệ thống dòng chảy.

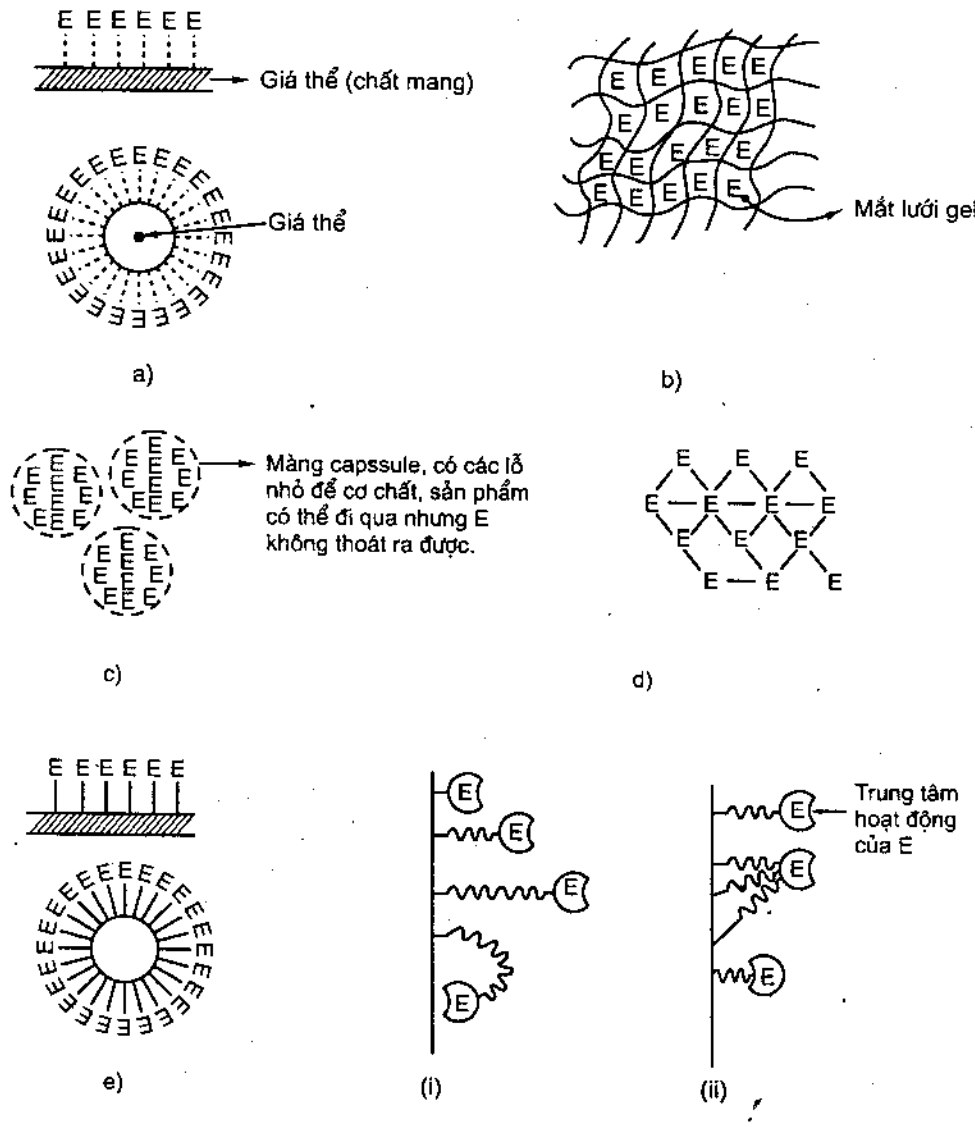
Ngoài ra, E không tan có độ bền với các yếu tố hóa lý lớn hơn khi ở dạng hòa tan.

Ngoài E, người ta cũng tạo các tế bào, cơ quan tử của tế bào, tế bào vi sinh vật ở dạng không tan để sử dụng trong các quá trình sinh học.

Trong tế bào sống, có nhiều E gắn với màng của tế bào, hoặc cơ quan tử của tế bào (các E gắn với màng hoặc matrix của ty thể), một số E xúc tác cho quá trình oxy hóa khử, ATPase v.v..., đó cũng là dạng E không tan.

9.2. PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN CHẾ PHẨM E KHÔNG TAN

Có thể sử dụng các phương pháp như: hấp phụ, đưa vào trong mạng lưới của gel (bẫy E trong các lỗ nhỏ của các gel được trùng hợp), bọc trong các nang nhỏ (capsule), liên kết hóa trị với giá thể không tan, tạo các liên kết chéo giữa các phân tử E (hình 9.1). Điều quan trọng là phải lựa chọn được những điều kiện thích hợp sao cho gắn được nhiều E nhất (tính trên một đơn vị diện tích, hoặc một đơn vị khối lượng), E ít bị thôi ra khỏi chất mang, ít ảnh hưởng đến hoạt độ E nhất. Sau đây sẽ mô tả chi tiết thêm về các phương pháp này.



Hình 9.1. Sơ đồ minh họa các chế phẩm E không tan được sản xuất theo các phương pháp khác nhau
a) Hấp phụ; b) Nhốt E trong các lỗ gel; c) Bọc E trong các nang (capsule);
d) Tạo liên kết chéo giữa các phân tử E; e) Gắn E vào chất mang bằng liên kết cộng hóa trị (–).
(i). E kết hợp với chất mang khi không qua hoặc qua spacer(∿∿) có chiều dài khác nhau;
(ii). Spacer có thể kết hợp với trung tâm hoạt động của E làm bất hoạt E.

9.2.1. Hấp phụ (adsorption). E được gắn với giá thể *không phải bằng liên kết cộng hóa trị, mà được hấp phụ vật lý trên bề mặt giá thể.*

Phương pháp này được sử dụng sớm hơn cả, từ năm 1916, người ta đã cho invertase (saccharase, 3.1.2.26) của nấm men hấp phụ trên than mà vẫn giữ được hoạt tính thủy phân đường (sucrose).

Phương pháp này *dễ* thực hiện nhất, và thường *ít ảnh hưởng đến hoạt độ* của E. Tuy nhiên, E cũng *dễ bị rửa trôi* trong quá trình sử dụng lặp lại nhiều lần. Mức độ giữ E trên chất mang, phụ thuộc nhiều vào pH, lực ion. Khi muốn tách E khỏi chất mang có thể sử dụng dung dịch có lực ion lớn.

Các giá thể được dùng để hấp phụ có dung tích hấp phụ lớn như:

– Cellulose và các dẫn xuất của nó như diethylaminoethyl (DEAE) hoặc carboxymethyl (CM) cellulose;

– Dextran và các dẫn xuất dextran: DEAE - và CM-dextran;

– Hydroxylapatite, calcium phosphate.

Trong thực tế, để hạ giá thành, cũng có thể dùng các nguyên liệu thô hơn như đất sét, alumina, bentonite, than, mạt cưa hoặc bột giấy, v.v... (đã xử lý để loại các tạp chất có thể kìm hãm E). Trong quá trình sử dụng mạt cưa hay đất sét cũng nhận thấy khả năng hấp phụ E phụ thuộc nhiều vào loại gỗ, loại đất sét, kích thước của chúng, phương pháp xử lý. Đối với đất sét còn cần lưu ý chuẩn bị dạng hạt như thế nào để dòng cơ chất có thể đi qua mà không bị nghẽn.

9.2.2. Liên kết ion giữa E và chất mang

Từ năm 1956, Mitz đã tiến hành gắn *catalase* vào DEAE-cellulose qua liên kết ion. Do phương pháp khá đơn giản, nên cũng đã được sử dụng để tạo các chế phẩm không tan của nhiều E khác. Các chất trao đổi ion khác như CM-cellulose và các dẫn xuất khác của cellulose. Sephadex cũng như các nhựa trao đổi ion khác cũng có thể được dùng trong phương pháp này. Độ bền liên kết giữa E với chất mang phụ thuộc vào pH, loại dung dịch đệm và lực ion. Thay đổi các yếu tố này có thể thu lại E, chất mang mà không làm biến đổi tính chất và cấu trúc của nó.

9.2.3. Giữ E trong gel (entrapment)

Từ năm 1963, Bernfeld và Wan đã mô tả phương pháp nhốt (entrapment) các E (trypsin, papain, amylase và ribonuclease) trong gel polyacrylamide.

– Ưu điểm của phương pháp này là không kết hợp trực tiếp E vào giá thể hay chất mang, mà có thể hình dung như là E bị *bẫy* trong các mắt lưới của lưới (hình 9.1b), nên *cấu trúc của E không bị biến đổi nhiều*.

– Hạn chế của phương pháp:

+ Các cơ chất phân tử lớn (protein, acid nucleic) không đi qua màng được, vì vậy đối với các E như protease, nuclease không dùng phương pháp này.

+ Trong một số trường hợp, kích thước của các mắt lưới cũng khó điều chỉnh thật đồng nhất, do đó E cũng có thể thoát ra một phần.

+ Một số gốc tự do được tạo thành trong quá trình trùng hợp có thể kìm hãm E.

Vì vậy, cần lựa chọn điều kiện về pH, nhiệt độ và các điều kiện khác của quá trình trùng hợp sao cho ít ảnh hưởng đến hoạt động của E, kích thước các mắt lưới (nơi giữ E) đủ bé để E khó bị thoát ra ngoài khi sử dụng, nhưng cũng phải đủ lớn để cơ chất có thể khuếch tán vào đến E, và sản phẩm được tạo thành có thể khuếch tán ra khỏi mắt lưới.

– Để chuẩn bị chế phẩm theo phương pháp này, có thể thực hiện theo các cách sau:

+ Đưa E vào gel bằng cách trùng hợp gel trong dung dịch có E ở nồng độ cao, việc trùng hợp nhờ tác dụng của các hóa chất (gel polyacrylamide, polymer tự nhiên như alginate, gel κ-carrageenan); nhờ bức xạ (gel polyvinyl alcohol, pyrrolidone); hoặc nhờ ánh sáng (polyethylen glycol dimetacrylate).

+ Đưa E vào các sợi: Cho hỗn hợp có chứa các thành phần để trùng hợp và E đi qua mắt lưới, sẽ tạo được các sợi có gắn E; hoặc cũng có thể cho dung dịch E đi qua sợi rỗng, sợi có lỗ, tạo điều kiện thuận lợi để gắn E vào.

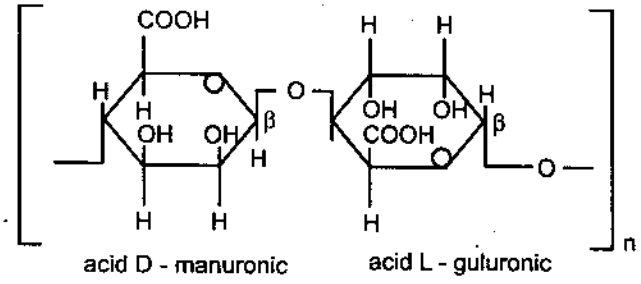
Để thực hiện phương pháp này có hiệu quả, cần nắm vững các điều kiện trùng hợp để có thể dễ dàng đạt được gel đúng theo yêu cầu.

Các chất có thể dùng để tạo gel trong phương pháp này là các chất có cấu tạo mắt lưới như: gelatin, alginate (polysaccharide của tảo), agarose, polyacrylamide, hoặc các prepolymer tổng hợp.

Tùy mục đích sử dụng, có thể cắt gel (đã được trùng hợp có chứa E) thành từng lớp mỏng, từng mẫu nhỏ hay từng hạt (gel đã được loại nước và nghiền thành hạt) để làm tăng bề mặt tiếp xúc của E trong gel với cơ chất trong dung dịch. Sau đây sẽ nêu chi tiết hơn về một số các chất được sử dụng trong phương pháp này.

9.2.3.1. Alginate để tạo chế phẩm calcium-alginate-E không tan

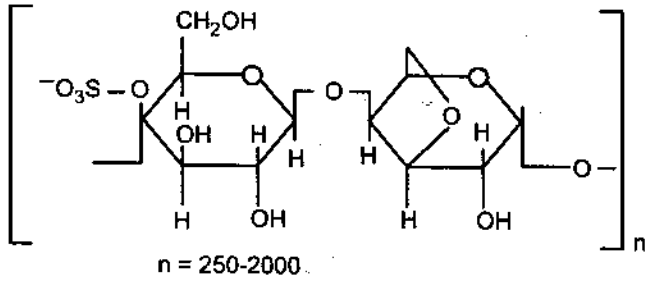
Alginate (acid alginic) là acid polyuronic tách từ rong biển, bao gồm các đơn vị cấu tạo của các acid D- mannuronic và L- guluronic kết hợp với nhau bằng liên kết β- 1,4:



Muối natri của alginate (sodium alginate) là chất hòa tan trong nước, do đó có thể trộn với E trong dung dịch, sau đó thêm từng giọt dung dịch calcium chloride sẽ tạo thành gel calcium alginat không tan có chứa E. Phương pháp này được dùng khá rộng rãi vì khá đơn giản và alginate cũng dễ tìm.

9.2.3.2. κ-carrageenan, tạo gel κ-carrageenan-E không tan

κ-carrageenan là hỗn hợp các polysaccharide tương tự agar-agar, tách từ tảo đỏ, hòa tan trong nước hoặc trong dung dịch muối, có khoảng 4-5% carragenin, là polysaccharide có chứa galactose và galactose sulfate:

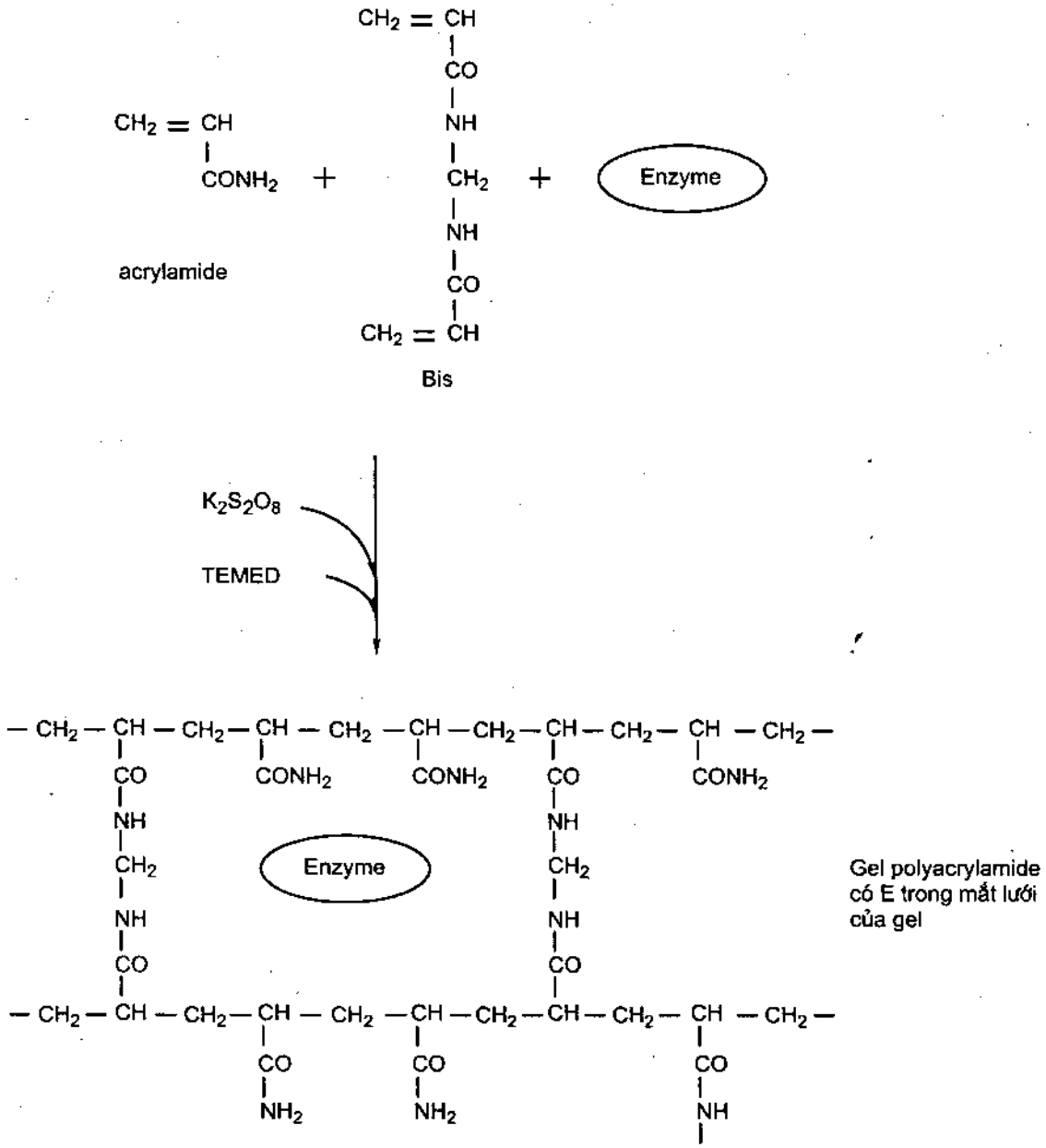


Nguyên tắc: thêm từ từ dung dịch chất tạo gel (potasium chloride, hoặc các cation khác như ammonium, calcium, aluminum) vào dung dịch muối κ-carrageenan có

chứa E, sẽ nhận được chế phẩm E không tan. Glutaraldehyde và hexamethylenediamine có tác dụng làm cho gel cứng hơn và E được giữ trong gel bền hơn. Theo Chibata và cộng sự, κ-carrageenan là nguyên liệu tốt để cố định tế bào vi sinh vật dùng trong công nghiệp sản xuất nhiều chất khác nhau.

9.2.3.3. Polyacrylamide, tạo gel polyacrylamide-E không tan

Tiến hành trùng hợp các monomer acrylamide và N,N'-methylenebisacrylamide (Bis) trong dung dịch có chứa E, và một số yếu tố cần thiết cho quá trình trùng hợp (TEMED, potassium persulfate, hình 9.2):



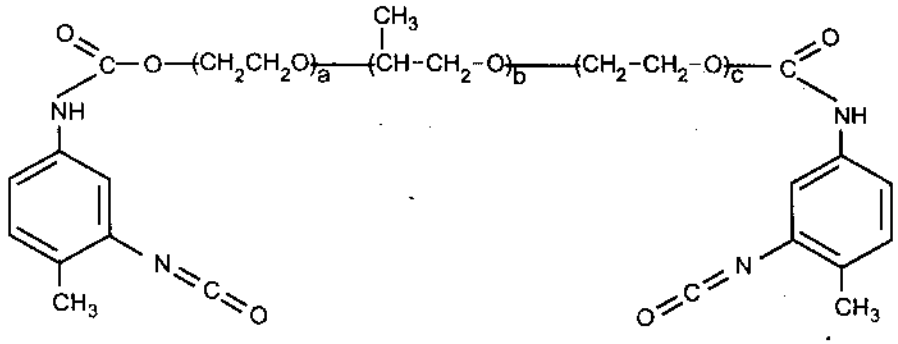
Hình 9.2. Các phản ứng trùng hợp gel polyacrylamide từ các monomer trong dung dịch có E để tạo chế phẩm E không tan (E bị nhốt trong các mắt lưới)
TEMED: N,N,N',N'- tetramethylenediamine.

Trong một số trường hợp, các monomer cũng có thể làm giảm hoạt độ E.

9.2.3.4. Các tiền polymer (prepolymer) tổng hợp để tạo các polymer tổng hợp-E không tan

– Quá trình trùng hợp được thực hiện nhờ ánh sáng (photo-cross-linkable resin prepolymer): Chuẩn bị dung dịch có prepolymer, E và chất làm tăng độ nhạy thích hợp như benzoylethylether, chiếu tia UV bước sóng dài (long-wave-length UV light, khoảng 360nm) trong vài phút, sẽ tạo thành liên kết chéo giữa các prepolymer, gel được hình thành, nhốt E trong các lỗ gel. Phương pháp này đã được sử dụng để cố định tế bào nấm men sản xuất ethanol ở quy mô pilot.

Các prepolymer được dùng có chứa các đoạn có tính chất ưa nước hay kỵ nước, tùy thuộc chiều dài của các đoạn này, do đó có thể điều chỉnh tính ưa nước hay kỵ nước của chúng đơn giản hơn. Ví dụ prepolymer urethane:



Prepolymer urethane

Khi thay đổi tỷ lệ giữa polyethylenglycol và polypropylenglycol sẽ thay đổi cân bằng tính ưa nước của gel. Khi trộn prepolymer urethane lỏng với dung dịch nước của E, các prepolymer phản ứng với nhau, tạo thành các liên kết urea nối các phân tử với nhau, giải phóng dioxyde carbon, E bị nhốt trong các mắt lưới của gel.

– Sử dụng prepolymer tổng hợp có các ưu điểm sau:

+ Chất tiền polymer (prepolymer) không chứa monomer, nên loại trừ được ảnh hưởng của chúng đến phân tử E.

+ Có thể tạo các gel có kích thước của các mắt lưới theo yêu cầu bằng cách sử dụng các prepolymer có chiều dài mạch thích hợp.

+ Có thể tạo gel có các tính chất hóa lý thích hợp (ví dụ cân bằng giữa tính ưa nước - kỵ nước) một cách dễ dàng bằng cách tiến hành các thí nghiệm lựa chọn các prepolymer thích hợp trước khi sử dụng để trùng hợp với E.

9.2.4. Bọc E trong các nang nhỏ (microcapsule)

Phương pháp này lần đầu tiên đã được Chang công bố vào năm 1964, tác giả đã đưa carbonic anhydrase (E.C.4.2.1.1) vào trong các capsule. Sau đó, năm 1971,

Gregoriadis đã tạo được các liposome chứa amyloglucosidase (E.C.3.2.1.3). Cả 2 chế phẩm đã được sử dụng trong điều trị.

E có thể được bọc bằng các loại màng khác nhau, tạo thành các dạng khác nhau. Có thể phân biệt các kiểu sau:

– *Microcapsule:* Màng dùng để bọc E là màng bán thấm (có các lỗ nhỏ để các chất phân tử thấp có thể đi qua nhưng E không đi ra được) tổng hợp.

– *Liposome:* Màng lỏng, được tạo thành từ các phospholipid, các liposome chứa E thường được dùng trong y tế hoặc trong mỹ phẩm.

– Các *sợi có các lỗ rỗng* (hollow- fiber).

Phương pháp này có thể xem là hầu như *không làm ảnh hưởng đến cấu trúc* của phân tử E, và có thể đồng thời *bọc nhiều E xúc tác cho một dãy phản ứng trong cùng một túi* (nhưng cần tránh các protease, vì chúng có thể phân giải các E) để thực hiện một quá trình trao đổi chất qua nhiều phản ứng liên tục như trong hệ thống sống. Các chất thường dùng để bọc E là polyamide hoặc nitrocellulose. Người ta cũng có thể tạo các chế phẩm E không tan ở dạng liposome. Tiến hành như sau: hòa tan các *amphipatic lipid* (lipide có chứa đầu ưa nước và đầu kỵ nước), như phosphatidyl choline và cholesterol trong chloroform, tráng thành lớp mỏng trên thành của một bình quay; thêm dung dịch E trong nước, làm sao để có thể nhanh chóng phân tán đều E, sẽ tạo thành các liposome ở dạng màng lipid bọc các giọt nước. Do đó có một số E được giữ bên trong liposome, còn một số khác còn lại sẽ kết hợp vào màng liposome.

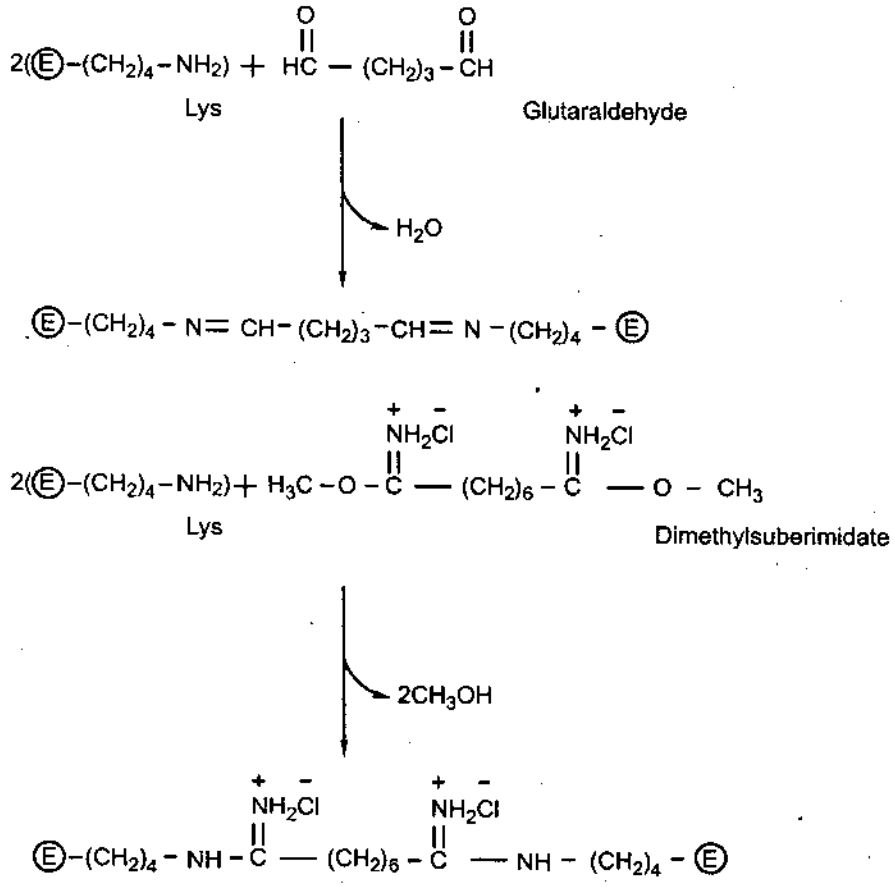
9.2.5. Tạo liên kết chéo (cross-linking) giữa các phân tử E

Năm 1964, Quiocho và Richards đã mô tả phương pháp tạo liên kết chéo giữa carboxypeptidase A với glutaraldehyde.

Phương pháp này *hoàn toàn không dùng chất mang*, mà thường dùng các chất có nhóm chức năng kép (bifunctional reagent), có 2 nhóm chức ở hai đầu hoàn toàn giống nhau, phản ứng với các nhóm chức của các phân tử E khác nhau, tạo các liên kết chéo giữa chúng, "khâu" các phân tử E lại với nhau thành các phần tử có kích thước lớn hơn, không tan, có thể tách khỏi dung dịch bằng cách ly tâm hay lọc.

Các chất thường được dùng vào mục đích này là glutaraldehyde, và một số chất khác như dimethylsuberimidate (hình 9.3) v.v..., phản ứng với nhóm amine; hoặc một số chất phản ứng với nhóm carboxyl (–COOH), nhóm thiol (–SH), trong đó glutaraldehyde được dùng phổ biến nhất.

Hạn chế của phương pháp này là trong quá trình tạo liên kết chéo giữa các phân tử E, có thể phá hỏng cấu trúc của E, làm giảm hoạt độ của nó. Vì vậy, cần lựa chọn điều kiện phản ứng, chất tham gia tạo liên kết chéo sao cho hoạt độ E bị giảm ít nhất. Để tăng độ bền của chế phẩm, có thể sử dụng thêm protein không có hoạt tính xúc tác như albumin huyết thanh bò. Nói chung phương pháp tạo liên kết chéo ít được dùng vì không đáp ứng được yêu cầu của nhiều quá trình kỹ thuật trong sản xuất.



Hình 9.3. Sử dụng glutaraldehyde, dimethylsuberimidate để tạo liên kết chéo giữa các phân tử E

9.2.6. Gắn E vào chất mang rắn bằng liên kết cộng hóa trị

Vào năm 1953, Grubhofer và Schleith đã tạo được các chế phẩm không tan của một số E như carboxypeptidase, diastase, pepsin, và ribonuclease bằng cách tạo liên kết cộng hóa trị giữa E với polyaminostyrene đã được diazot hóa. Có thể nói, thành công này đã mở đầu cho việc sử dụng E trong thực tế.

9.2.6.1. Những ưu điểm của phương pháp

– Có thể tạo các chế phẩm có độ bền cao, có thể sử dụng trong nhiều quá trình sản xuất ở quy mô lớn, trong hệ thống dòng chảy.

– Do E gắn trên bề mặt chất mang nên dễ tiếp xúc với cơ chất.

9.2.6.2. Những hạn chế của phương pháp

– Cấu trúc của E có thể bị thay đổi một phần trong quá trình gắn với chất mang, làm giảm hoạt độ xúc tác.

– Do liên kết chặt giữa E với chất mang, có thể làm giảm sự di chuyển tự do của E, và từ đó cũng làm giảm hoạt độ của nó.

– Việc tìm được các điều kiện thích hợp cho quá trình sản xuất chế phẩm không tan theo phương pháp này cũng có nhiều khó khăn.

Tuy nhiên, cho đến nay, người ta cũng đã có nhiều biện pháp để khắc phục những nhược điểm đã nêu (xem 9.2.6.5).

9.2.6.3. Những đặc tính cần có của các chất mang

– Bề mặt chất mang phải tương thích với E.

– Phải có các nhóm có khả năng phản ứng với các nhóm chức của protein (các nhóm amin, carboxyl, hydroxyl, và cả nhóm thiol).

– Có dung tích kết hợp cao.

– Chất mang phải có tính "trơ" đối với thành phần phản ứng.

– Chất mang phải bền trong điều kiện quá trình phản ứng liên tục kéo dài.

Độ bền của chế phẩm còn tùy thuộc tính chất hóa lý của chất mang và phương pháp gắn E.

9.2.6.4. Các nguyên liệu thường dùng làm chất mang

– Các chất vô cơ: thủy tinh, aluminum oxyde, gốm (ceramic).

– Các polymer tổng hợp (polyamide, polystyrene, polyacrylate, polyacrylamide, polyester v.v...

– Các polymer của saccharide và dẫn xuất của chúng: agarose, dextran, chitin, cellulose; hay một số protein như collagen, gelatin, albumin (thường được dùng ở quy mô phòng thí nghiệm). Các chất này có bề mặt phân tử ưa nước, lại có nhiều nhóm hydroxyl, có thể dễ dàng tạo thành liên kết cộng hóa trị với E.

9.2.6.5. Cầu nối (spacer) giữa E và chất mang

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi kết hợp trực tiếp E vào chất mang có thể có ảnh hưởng xấu đến hoạt độ E, một phần là do chất mang có thể cản trở về mặt không gian đối với việc tiếp xúc giữa E và cơ chất. Vì vậy thường dùng spacer có vai trò như là cầu nối giữa E và chất mang, có thể ví như tay đòn đưa E ra xa chất mang hơn, làm cho E có thể hoạt động trong phạm vi môi trường rộng hơn, dễ tiếp xúc với cơ chất hơn (hình 9.1e.i).

Khoảng cách giữa E và chất mang cũng có vai trò quan trọng, khi có spacer, khoảng cách giữa E và chất mang khoảng 1nm. Vấn đề là phải làm thế nào để chọn được *chiều dài spacer thích hợp*, vừa bảo đảm độ linh động của E và cũng không quá dài, nếu quá dài E lại có thể bị quay lại gần chất mang hơn (hình 9.1e.ii). Đối với các spacer có các nhóm methyl, việc điều chỉnh độ dài của nó có thể thực hiện bằng cách tăng hay giảm số nhóm methyl (– CH_2–) trong phân tử của nó: nếu muốn tránh tương tác không có lợi của chất mang, dùng spacer dài hơn; nếu muốn E gần với chất mang hơn thì rút ngắn chiều dài của spacer.

Ngoài chiều dài, để thực hiện có kết quả phương pháp này còn cần lưu ý đến *kiểu liên kết* giữa E và chất mang, *trình tự kết hợp* (spacer kết hợp với E trước rồi mới kết hợp với chất mang hay ngược lại).

9.2.6.6. Phương pháp gắn E vào chất mang bằng liên kết cộng hóa trị

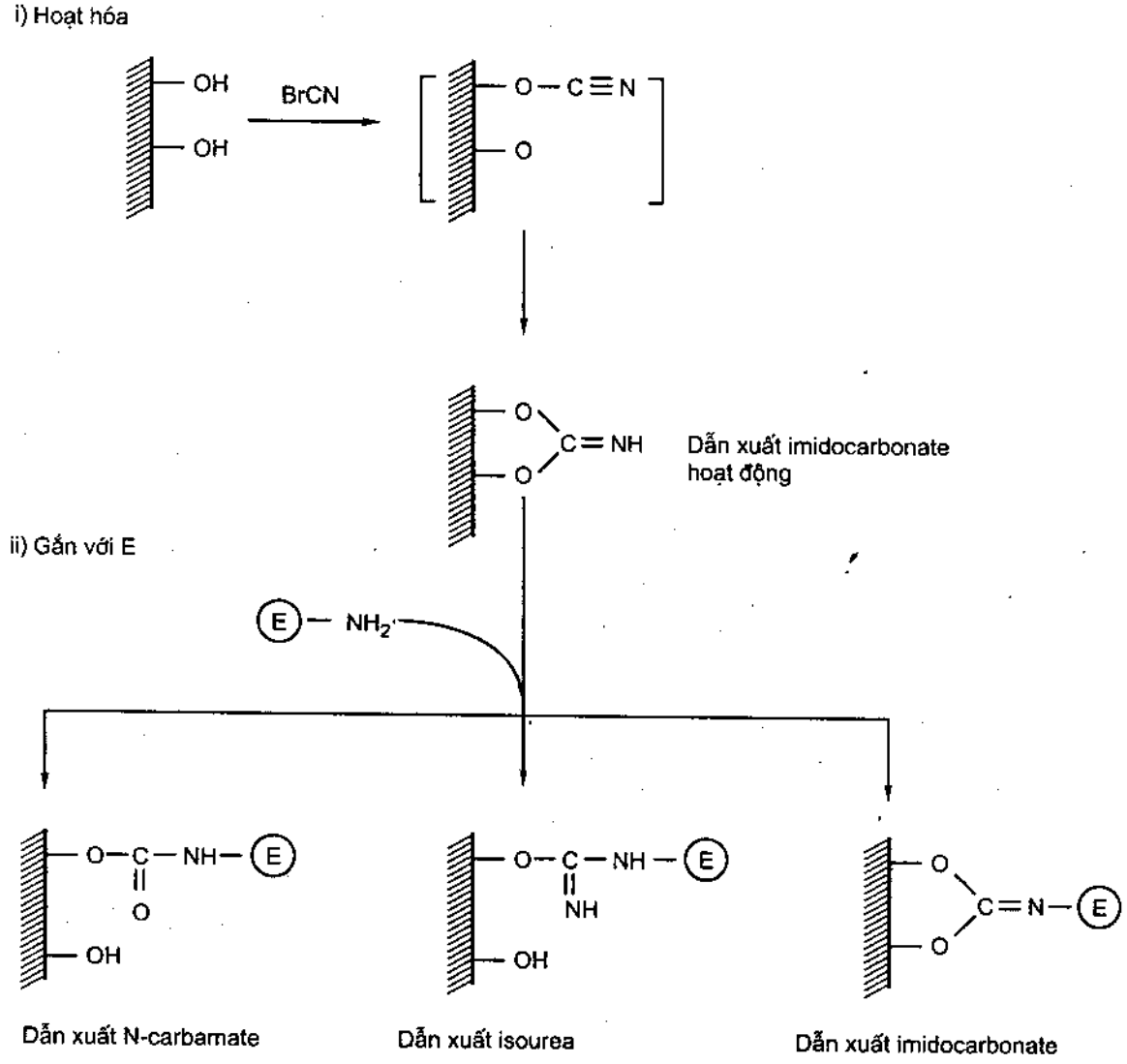
Trong nhiều trường hợp thường tiến hành qua 2 giai đoạn chính:

– Xử lý, hoạt hóa chất mang trước khi gắn E.

– Gắn E vào chất mang đã được hoạt hóa.

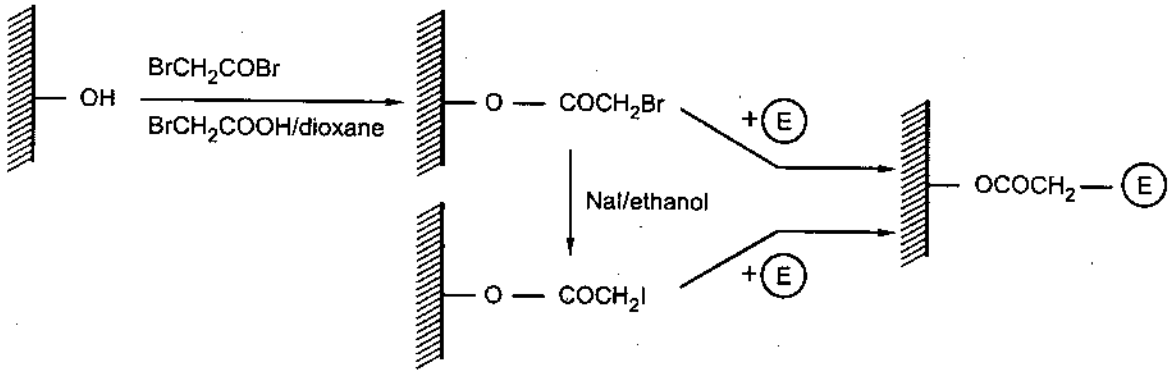
Một số phương pháp thường dùng để hoạt hóa chất mang như: dùng cyanogen bromide, diazot hóa (diazotation), azide acid, các chất ngưng tụ (condensing reagent) v.v... Sau đây sẽ trình bày một số ví dụ.

a) Cyanogen bromide (BrCN) được sử dụng phổ biến để hoạt hóa các chất mang có nhiều nhóm hydroxyl như các polysaccharide, các hạt thủy tinh, gốm. Sơ đồ phản ứng quá trình này được trình bày trên hình 9.4.



Hình 9.4. Sơ đồ phản ứng hoạt hóa chất mang bằng BrCN, gắn E vào chất mang đã hoạt hóa

b) Phương pháp alkyl hóa các nhóm trên chất mang làm cho nó dễ dàng phản ứng với các nhóm amino, nhóm hydroxyl phenolic, nhóm sulfhydryl của phân tử E. Các dẫn xuất halogen của acetyl cellulose, dẫn xuất triazinyl của cellulose hay các chất trao đổi ion khác đã được dùng trong phương pháp này.

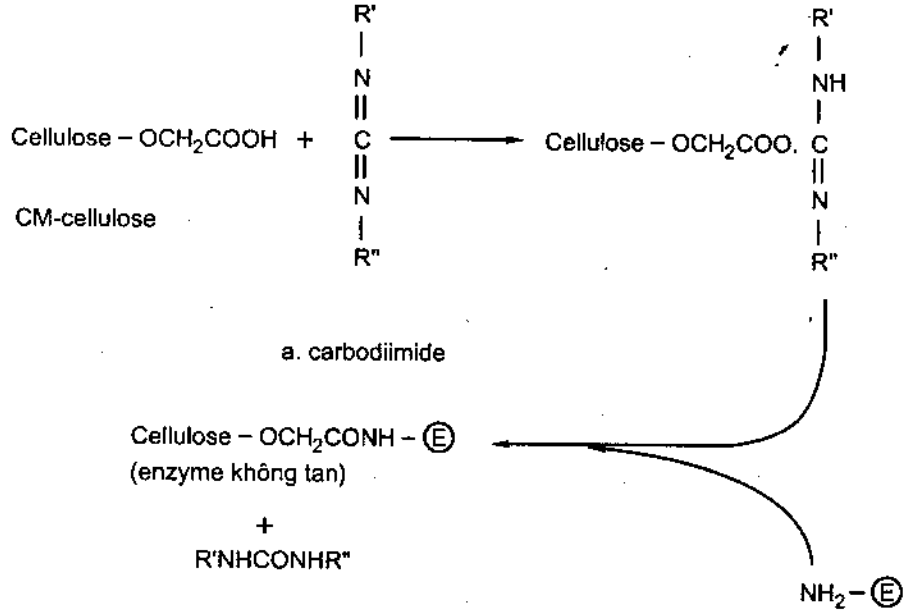


c) Tạo cầu disulphide giữa E và chất mang

Đối với các E có nhóm sulfydryl không có vai trò quan trọng đối với hoạt động xúc tác của E, có thể dùng các chất mang có nhóm sulfydryl để tạo cầu disulphide với E. Phản ứng này có tính thuận nghịch, có thể dễ dàng tách E khỏi chất mang (nếu hoạt độ của nó bị giảm), để tái tạo chế phẩm, chỉ cần thêm chất khử vào.

d) Dùng các hóa chất ngưng tụ (condensing reagent)

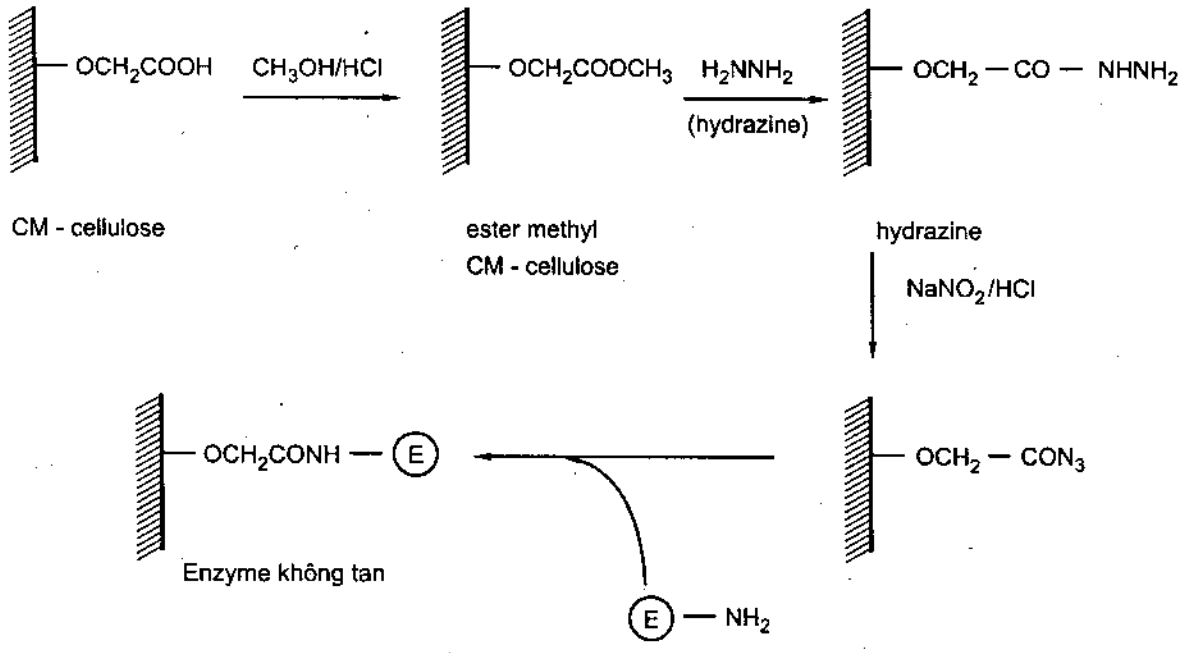
Ví dụ, sử dụng carbodiimide làm yếu tố ngưng tụ để tạo thành liên kết peptide giữa các nhóm carboxyl hoặc nhóm amino của chất mang, với các nhóm amino và các nhóm carboxyl của E. Phương pháp này được sử dụng đối với chất mang cellulose (hình 9.5).



Hình 9.5. Sơ đồ các phản ứng tạo thành liên kết peptide giữa E và chất mang CM-cellulose khi sử dụng acid carbodiimide làm yếu tố ngưng tụ

e) Tạo liên kết peptide bằng phương pháp azide acid

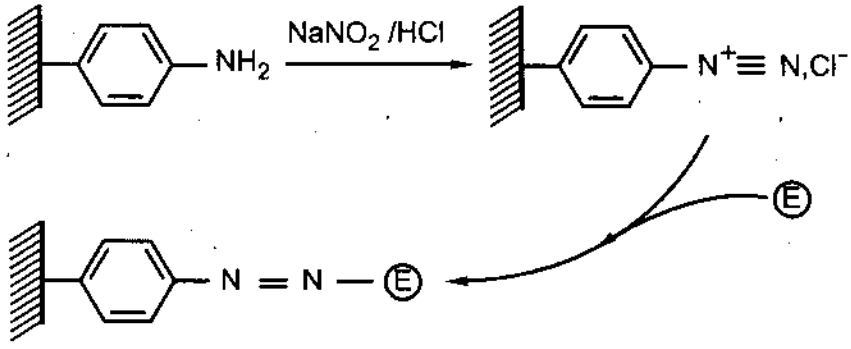
Phương pháp này được dùng trong hóa tổng hợp peptide. Ví dụ, sử dụng chất mang là CM-cellulose, phản ứng tiến hành như sau (hình 9.6).



Hình 9.6. Sơ đồ phản ứng tạo liên kết peptide giữa E và chất mang bằng phương pháp azide acid

f) Phương pháp diazot hóa

Phương pháp này được sử dụng đối với các chất mang có các nhóm amino thơm, nhóm amin của nó được diazot hóa bằng acid nitrous, tạo thành dẫn xuất diazonium. Dẫn xuất này phản ứng với E tạo thành E không tan. Ví dụ: dùng chất mang là 4-aminobenzyl cellulose, phản ứng tiến hành như ở hình 9.7.



Hình 9.7. Phản ứng diazot hóa chất mang 4-aminobenzoyl cellulose để tạo chế phẩm E không tan bằng liên kết cộng hóa trị

g) Cố định E trên bột thủy tinh bằng liên kết cộng hóa trị

Chất mang bột thủy tinh có nhiều ưu điểm như chịu được các điều kiện khắc nghiệt, có cấu trúc bền vững, vì vậy rất thuận tiện để sử dụng trong công nghiệp.

Hạn chế chính của loại chất mang này là có tính "trơ" về hóa học. Vì vậy để có thể sử dụng chúng có hiệu quả, cần phải gắn thêm các nhóm phản ứng vào bề mặt của nó. Có thể trình bày tóm tắt quá trình gắn E vào bề mặt bột thủy tinh không có lỗ (nonporous glass) như trên hình 9.8.

Chuẩn bị bột thủy tinh, hạt có đường kính khoảng 1mm, quá trình gắn E được thực hiện qua 5 bước chính như sau:

1) Hoạt hóa bề mặt thủy tinh bằng phản ứng với silane để đưa nhóm amin vào.

2) Phản ứng tiếp với p-nitrobenzoylchloride, nhóm nitro của vòng thơm sẽ được chuyển hóa tiếp bằng các phản ứng khác.

3) Khử nhóm nitro thành nhóm amino.

4) Cho tác dụng với acid nitrous, nhóm amino chuyển thành cation diazonium.

5) Nhóm diazonium sẽ kết hợp với gốc tyrosine trong phân tử E.

h) Cố định E vào polyamide (ví dụ nylon) bằng liên kết cộng hóa trị

Nylon là polyamide kỹ thuật quan trọng nhất, là polymer mạch dài được tạo thành do phản ứng ngưng tụ với lượng tương đương của acid adipic và hexanediamine (polyhexamethylene adipamide, nylon 6,6,6,6-polyamide, số 6 có nghĩa là mỗi thành phần của phản ứng ngưng tụ, acid và amine đều góp vào 6 nguyên tử carbon).

$$n\ HOOC\text{-}(CH_2)_4\text{-}COOH + n\ H_2N\text{-}(CH_2)_6\text{-}NH_2 \longrightarrow [\text{-}NH\text{-}CO\text{-}(CH_2)_4\text{-}CO\text{-}NH\text{-}(CH_2)_6\text{-}]_n$$

Ưu điểm của nylon là bền dưới tác dụng của vi sinh vật, và cũng có tính ưa nước ở mức độ nhất định. Vì vậy, có thể sử dụng nylon để bọc E (tạo capsule), hoặc có thể dùng để hấp phụ E, nhưng khó tạo được liên kết cộng hóa trị giữa E và nylon vì nó chỉ có 2 nhóm ở hai đầu phân tử là có thể phản ứng với E.

Để tăng số nhóm có khả năng kết hợp với E, cần thủy phân một số liên kết amide trong polymer (nhưng phải không phá hỏng cấu trúc polymer) để tạo thành các nhóm amino và carboxyl tự do có thể kết hợp với E.

i) Cố định E vào các nhóm amin sau khi thủy phân một phần polyamide

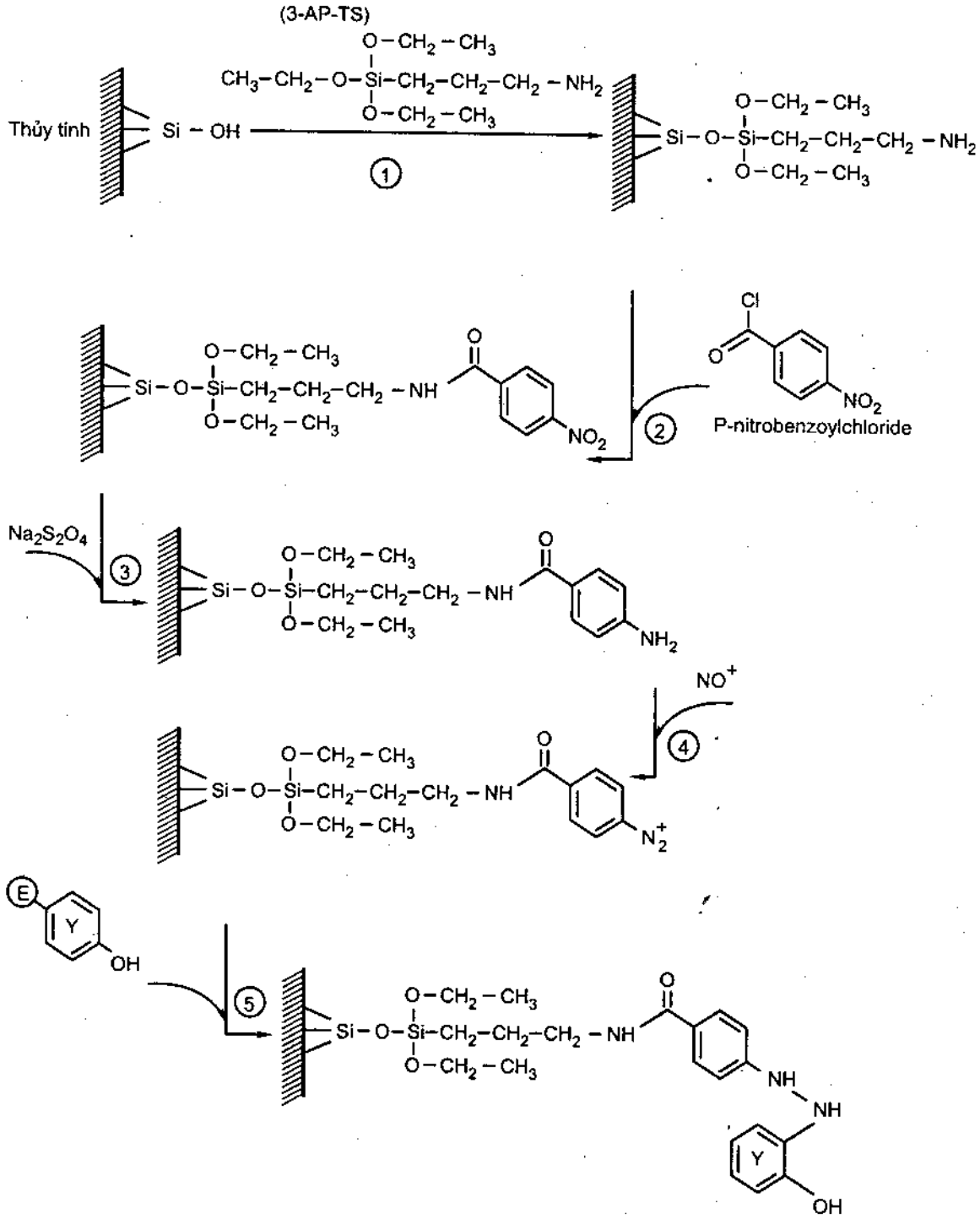
Quá trình này gồm 4 bước:

1) Xử lý polymer để làm tăng diện tích bề mặt và tăng khả năng tiếp xúc với nước.

2) Cắt đứt một số liên kết amide.

3) Hoạt hóa các nhóm amin hoặc nhóm carboxyl tự do.

4) Gắn E vào polyamide đã được hoạt hóa.



Hình 9.8. Các giai đoạn hoạt hóa và gắn E vào bề mặt thủy tinh (không có lỗ)
3-AP-TS = 3-aminopropyl-triethoxysilane; Y = gốc tyrosine của E

Chi tiết các bước này như sau:

1) Xử lý polymer: Chuẩn bị khoảng 10 mẫu polyamid tổng hợp có kích thước $2cm^2$, nhúng vào hỗn hợp 18,6% (w/w) $CaCl_2$ và 18,6% (w/w) nước trong methanol đựng trong

bình quay đáy tròn. Lắp bình vào máy quay (không có chân không) ở 50°C. Sau đó rửa các mẫu polymer cẩn thận bằng nước trên phễu lọc hút.

2) Cắt đứt một số liên kết amide: Nhúng các mẫu polyamide đã rửa sạch trong dung dịch HCl 3,65M và quay 40 phút trong máy quay (không có chân không) ở 50°C. Rửa kỹ các mẫu nylon (trên máy lọc hút) bằng nước, sau đó rửa bằng dung dịch đệm borate 0,2M, pH 8,5.

Cũng có thể cắt đứt liên kết amide theo cách khác: Các mẫu polyamide đã khô, sau khi nhúng trong methanol, giữ trong 12 giờ ở 70°C trong 25ml *N,N*-dimethyl-1,3-propanediamine, rửa kỹ với nước trên phễu lọc hút.

3) Hoạt hóa các nhóm amine tự do: Cho các mẫu polyamide đã xử lý như trên vào bình quay trong 25ml dung dịch 5% (w/v) glutaraldehyde trong dung dịch đệm borate 0,2M pH 8,5, cho máy quay 15 phút ở 20°C. Loại bỏ glutaraldehyde thừa bằng cách rửa trên phễu lọc hút với dung dịch potassium phosphate 0,1M, pH 7,5.

4) Gắn E: Ngay sau khi đã rửa sạch, nhúng các mẫu polyamide vào dung dịch E (0,2- 0,5mg/ml trong dung dịch potassium phosphate 0,1M, pH 7,5), giữ 3 giờ ở 4°C.

Loại bỏ phần E còn thừa (không gắn vào chất mang) bằng cách rửa nhiều lần với dung dịch NaCl 0,5M trong dung dịch potassium phosphate 0,1M, pH 7,5. Sau đó giảm nồng độ muối bằng cách rửa với dung dịch potassium phosphate 0,1M, pH 7,5. Chế phẩm giữ trong dung dịch potassium phosphate 0,1M, pH 7,5 ở 4°C.

Nếu cần bảo quản lâu, có thể rửa nhanh với nước và làm khô ở điều kiện bình thường (đối với một số E có thể không bền trong điều kiện này).

Nếu muốn gắn E vào nhóm carboxyl, sau khi đã cắt đứt một số liên kết amide, cần bao vây nhóm amino bằng cách xử lý với dung dịch sodium nitrite 1% (w/v) trong HCl 0,5M đã làm lạnh trong nước đá, tiếp tục giữ trong dung dịch này 20 phút ở 40°C.

Hoạt hóa nhóm carboxyl tự do: Ngâm các mẫu nylon đã xử lý như trên 4 giờ ở 10°C trong dung dịch hexanediamine 1% (w/v) và dung dịch dicyclohexylcarbodiimide 1% (w/v) trong dichloroomethane. Loại hexanediamine thừa bằng cách rửa với dichloroomethane, acetone, và nước đã làm lạnh trong đá, mỗi loại 10ml. Quá trình hoạt hóa được hoàn thành sau khi ngâm 20 phút trong 10ml dung dịch sodium nitrite 1% (w/v) trong HCl 0,5M ở 0°C. Rửa lại bằng 10ml HCl 1mM đã làm lạnh trong đá.

Tiến hành gắn E và bảo quản như trên.

Tóm lại:

Để tạo chế phẩm E không tan có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau, nhiều chất mang khác nhau. Trong số các phương pháp đã nêu, phương pháp hấp phụ được sử dụng sớm nhất. Việc sử dụng E không tan trong thực tế mới được bắt đầu từ năm 1953 (sau khi cố định E bằng liên kết cộng hóa trị). Các phương pháp khác mới được phát triển từ khoảng năm 1956 trở về sau. Đến năm 1969, lần đầu tiên sử dụng E không tan ở quy mô công nghiệp để sản xuất L-amino acid.

– Mỗi phương pháp có những ưu điểm, những hạn chế nhất định.

– Trong những phương pháp đã nêu, các phương pháp cố định E bằng liên kết

chéo, liên kết cộng hóa trị, cần đặc biệt lưu ý sao cho chất mang không kết hợp với các nhóm trong trung tâm hoạt động của E.

– Cần chú ý cải tiến phương pháp cố định, giảm bớt sự cản trở không gian của chất mang đối với phản ứng E.

– Để tạo được chế phẩm E không tan có hiệu quả kinh tế, cần thăm dò bằng thực nghiệm để lựa chọn chất mang, phương pháp và điều kiện cố định E cho từng trường hợp cụ thể.

Trong các phương pháp trên, phương pháp đưa E vào liposome hoặc trong capsule thường được sử dụng để sản xuất các chế phẩm không tan phục vụ y tế (xem mục 8.7.2.6).

9.3. PHÂN TÍCH CHẾ PHẨM E KHÔNG TAN

Khi cố định E trên chất mang, cũng như trong quá trình bảo quản và sử dụng chế phẩm, để biết được có bao nhiêu, còn bao nhiêu E trên chất mang, hoạt độ của nó biến đổi ra sao, cần tiến hành xác định protein, xác định hoạt độ của chế phẩm. Do E đã được cố định với chất mang, vì vậy cần có phương pháp thích hợp mới nhận được kết quả chích xác.

Việc xác định tính chất của các E không tan trước khi đưa ra ứng dụng còn cần thiết vì ở một số nước (như Cộng đồng Châu Âu) đòi hỏi phải mô tả đầy đủ các tính chất của chế phẩm.

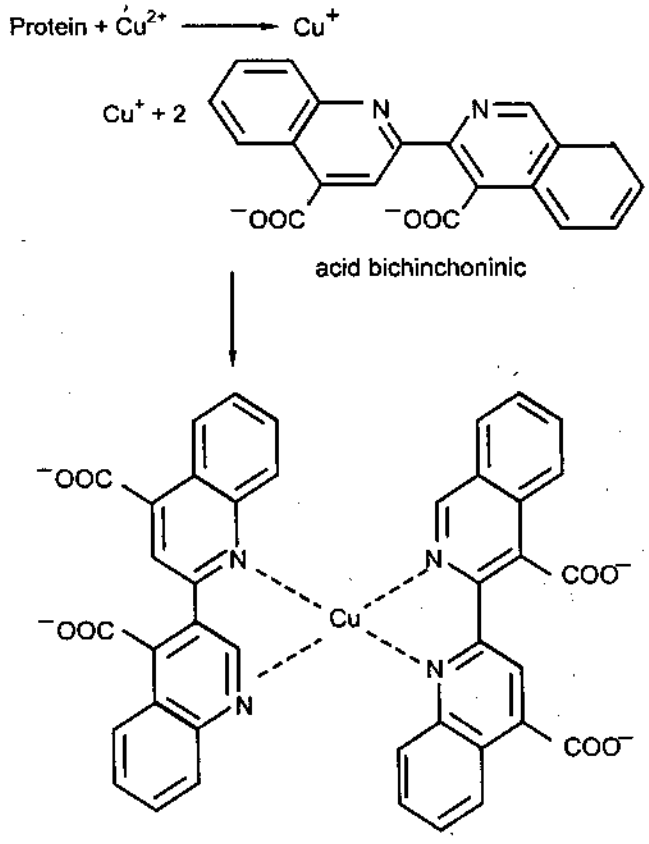
9.3.1. Xác định protein

Có nhiều phương pháp khác nhau nhưng nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp sử dụng acid bicinchoninic (BCA) cho kết quả tốt hơn cả.

Phương pháp này cũng dựa trên nguyên tắc của phản ứng biuret với liên kết peptide. Cụ thể là: các ion Cu^{2+} bị protein khử đến Cu^{+} trong dung dịch kiềm, Cu^{+} kết hợp với với 2 phân tử BCA tạo thành phức màu đỏ tía (purple) (hình 9.9). Phản ứng có độ nhạy cao hơn phản ứng biuret nhiều lần: độ nhạy của phản ứng biuret là 0,1 - 0,8mg trong khi phương pháp BCA có độ nhạy < 10μg, và cũng không quá nhạy đối với các detergent ở nồng độ cao.

Các chất có thể ảnh hưởng không tốt đến phản ứng là: EDTA (≤ 100mM), DTT (≤ 1mM), Tris (< 0,25M), ammonium sulfate (≤ 20%), và các chất có thể khử ion Cu^{2+} như glucose.

Khi xác định, lấy một mẫu E không tan có khối lượng xác định cho vào 1ml dung dịch thuốc thử C và giữ ở 37°C, lắc nhẹ, trước khi so màu cần loại bỏ phần không tan.



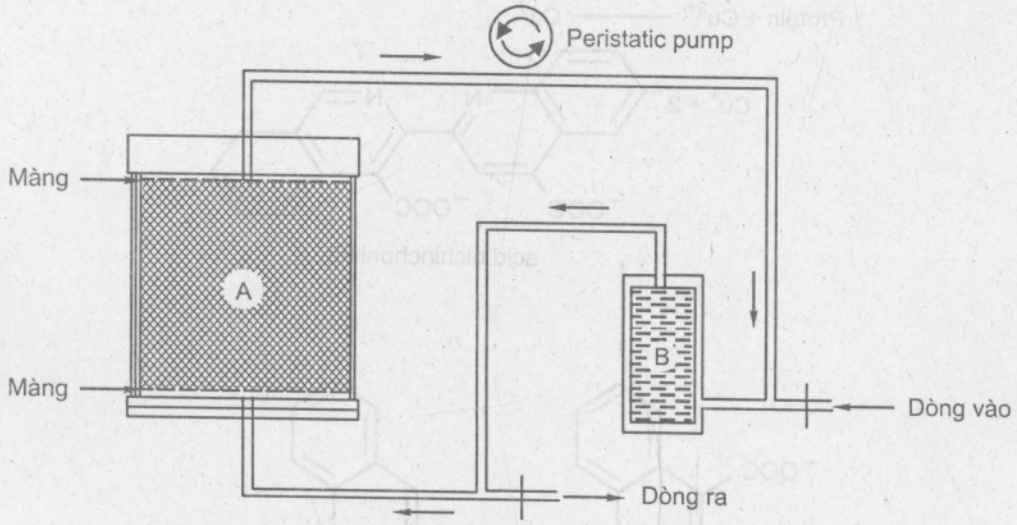
Hình 9.9. Phức chất của Cu^+ với acid bichinconinic (theo Smith và cộng sự, 1985)

9.3.2. Xác định hoạt độ của E không tan

Việc xác định hoạt độ của E không tan có nhiều khó khăn. Đối với các E có thể xác định bằng phương pháp quang học. Lấy một lượng xác định E không tan, cho vào bình phản ứng cùng với dung dịch đệm, cơ chất, cofactor, giữ ở nhiệt độ xác định, hỗn hợp phải khuấy liên tục. Để đo vận tốc phản ứng, nếu chất mang E đủ nặng, dễ lắng, có thể dừng nhanh phản ứng, gạn lấy phần trong, đo độ hấp thụ quang học, sau khi đo phải cho dung dịch vào lại bình phản ứng để giữ cho thể tích hỗn hợp phản ứng không thay đổi. Trường hợp chất mang không dễ lắng, có thể lọc hay ly tâm, nhưng phải làm thật nhanh, sau khi đo phải cho cả dịch trong và cặn trở lại bình phản ứng. Như vậy sẽ nhận được các giá trị ở các thời gian khác nhau. Để tính toán, tốt hơn cả là tính trên khối lượng khô, hoặc bề mặt tiếp xúc của chế phẩm.

Để đo liên tục phản ứng E, có thể dùng thiết bị chuyên dụng (hình 9.10).

Hỗn hợp phản ứng được bơm liên tục vào bình phản ứng trong vòng tuần hoàn khép kín, dịch sau khi đi qua cuvette để đo mật độ quang học.



Hình 9.10. Bình phản ứng E để đo vận tốc phản ứng E không tan
A- Bình phản ứng chứa E không tan, ở mặt trên và dưới đáy có màng (- - - -) cho dung dịch có cơ chất hoặc sản phẩm đi qua; B- Dòng cuvette cho phép đo tự động mật độ quang học.

9.4. TÍNH CHẤT CỦA CHẾ PHẨM E KHÔNG TAN (so sánh với tính chất của E khi ở dạng hòa tan)

Khi E được cố định trên chất mang, hoạt động của nó bị giới hạn trong một vi môi trường nhất định, nên có những tính chất khác hơn so với khi ở dạng tự do trong dung dịch (dạng hòa tan). Tính chất của E không tan còn phụ thuộc vào phương pháp cố định và bản chất của chất mang. Cụ thể như sau:

9.4.1. Hoạt độ riêng (số đơn vị hoạt động tính trên mg hay g protein enzyme): thấp hơn ở dạng hòa tan, có thể do:

– Bị cản trở không gian so với khi ở dạng tự do, ảnh hưởng đến sự khuếch tán tự do của cơ chất đến E.

– Sự tiếp xúc với cơ chất bị giới hạn, trong trường hợp E bị giữ trong các mắt lưới của gel, hoặc bị bọc trong các capsule.

– Bị thay đổi cấu trúc không gian sau khi kết hợp với chất mang bằng liên kết cộng hóa trị, hoặc tạo liên kết chéo giữa các phân tử E.

– Bị kìm hãm hoặc bị biến tính một phần dưới tác dụng của một số yếu tố khác nhau trong quá trình cố định E.

9.4.2. Hằng số K_m biểu kiến có thể thay đổi do ảnh hưởng trường tĩnh điện của chất mang

– Nếu chất mang tích điện ngược dấu với cơ chất, nó sẽ có khuynh hướng kéo cơ chất lại gần, làm cho nồng độ cơ chất ở vi môi trường xung quanh E cao hơn nồng độ cơ chất trong dung dịch, do đó K_m biểu kiến giảm (K_m là nồng độ cơ chất để v_0 đạt

được một nửa V). Ví dụ: khi sử dụng cơ chất tích điện dương benzoyl-L- arginine ethyl ester, K_m biểu kiến của chế phẩm không tan ficin-CM-cellulose (cố định bằng liên kết cộng hóa trị), có K_m biểu kiến bé hơn K_m của E tự do 10 lần. Đó là do chất mang CM-cellulose có các nhóm carboxyl tích điện âm.

– Nếu cơ chất tích điện cùng dấu với chất mang, thì K_m biểu kiến sẽ tăng, do có khuynh hướng đẩy cơ chất ra xa, nên nồng độ cơ chất ở vi môi trường hoạt động của E sẽ thấp hơn nồng độ cơ chất trong dung dịch. Ví dụ, *creatine kinase* cố định trên CM-cellulose có K_m biểu kiến lớn hơn K_m của E ở dạng tự do 10 lần, khi sử dụng cơ chất là ATP và creatinine (tích điện âm).

Tuy nhiên nếu lực ion cao, ảnh hưởng không rõ.

– Các yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến K_m và V là: sự khuếch tán của cơ chất đến E, có thể không đồng đều giữa lớp gần sát chất mang và các vùng khác; sự khuếch tán của sản phẩm, đặc biệt đối với các E nhạy với sự kìm hãm của sản phẩm.

Do nhiều nguyên nhân đã nêu, K_m biểu kiến của E không tan thường cao hơn của E ở dạng hòa tan. Khi tăng nồng độ cơ chất, vận tốc khuếch tán của cơ chất đến E cũng sẽ tăng đến một giới hạn nhất định. Nếu giới hạn này đạt được trước khi E được bão hòa hoàn toàn với cơ chất thì *V biểu kiến* của E không tan sẽ bé hơn khi ở dạng hòa tan.

9.4.3. Độ bền của E không tan

Độ bền của E không tan có thể không thay đổi, tăng lên hoặc bị giảm tùy thuộc vào khuynh hướng ảnh hưởng vi môi trường của E đối với sự biến tính. Trong nhiều trường hợp, độ bền của E không tan thường lớn hơn khi ở dạng hòa tan. Ví dụ: Quá trình tự phân giải (autodigestion) của các protease, khi E được cố định vào chất mang, cản trở sự tiếp xúc giữa các phân tử với nhau, do đó quá trình autolyse bị giảm. E không tan cũng làm cản trở tác dụng của protease đối với E, làm giảm mức độ bị bất hoạt bởi các protease (nếu có).

9.4.4. pH thích hợp của E có thể thay đổi, nhất là đối với các chất mang tích điện, có thể thay đổi đến 2 đơn vị pH. Theo nhiều tác giả, nếu chất mang tích điện âm, pH thích hợp của E cố định trên chất mang sẽ dịch chuyển về phía kiềm; ngược lại, nếu chất mang là cation, pH thích hợp dịch về phía acid. Có thể giải thích theo cách tương tự như đối với cơ chất. Nếu lực ion lớn, không nhận thấy có hiện tượng trên, vì ion muối cản trở trường điện của chất mang.

9.5. SỬ DỤNG E KHÔNG TAN

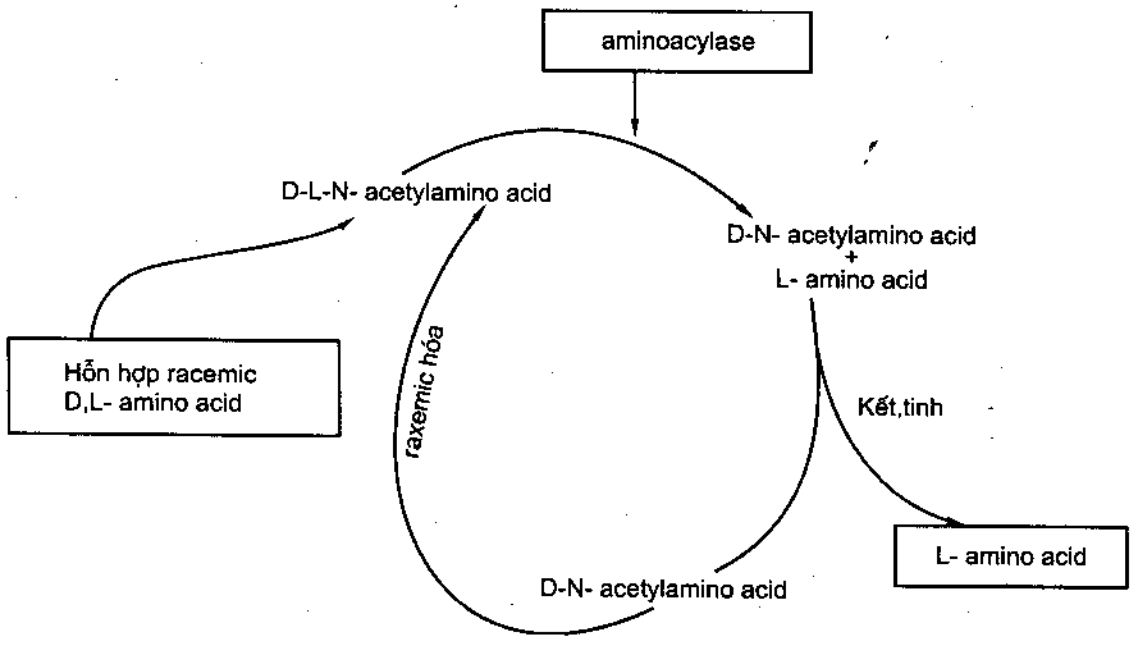
Một số chế phẩm E không tan đã được sử dụng ở quy mô công nghiệp có hiệu quả để sản xuất một số chất như: các L-amino acid, glucose, fructose, aspartam (chất

ngọt không phải đường, dùng cho những người ăn kiêng), kháng sinh bán tổng hợp và một số chất khác.

Aspartam (*N*-L-α-aspartyl-L-phenylalanine-methyl ester), được phát hiện năm 1969, có độ ngọt gấp 200 lần đường ăn (sucrose), được tạo thành từ phenylalanine và aspartate, nhưng α-aspartam có vị ngọt, còn β-aspartam lại có vị đắng. Người ta đã sử dụng thermolysin (E.C.3.4.24.27), trong môi trường nước, E này xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptide, nhưng nếu bảo vệ nhóm amine của L-aspartate (*N*-benzyloxycarbonyl-L-aspartate), và khóa nhóm carboxyl của Phe (L-phenylalanine methyl ester), nó sẽ xúc tác cho phản ứng ngược: tổng hợp liên kết peptide, tạo thành aspartam ở dạng muối kết tinh, D-phenylalanine methyl ester còn lại trong dung dịch, racemize hóa thành dạng L và được tái sử dụng như trên.

9.5.1. Sản xuất L-amino acid và một số chất khác

Năm 1969, Chibata và cộng sự (Nhật Bản) đã lần đầu tiên sử dụng chế phẩm E không tan ở quy mô công nghiệp. Các tác giả đã sử dụng *aminoacylase*-DEAE-cellulose để sản xuất các L-amino acid từ hỗn hợp racemic (có cả dạng D- và dạng L-) của amino acid. Phương pháp này dựa vào tính đặc hiệu của aminoacylase đối với L-amino acid đã acetyl hóa (L-*N*-acetylated amino acid), và sự sai khác về tính tan giữa các amino acid tự do và các dẫn xuất N-acetyl hóa của chúng, do đó có thể tách riêng tinh thể L-amino acid và dẫn xuất D-*N*-acetyl amino acid (hình 9.11).



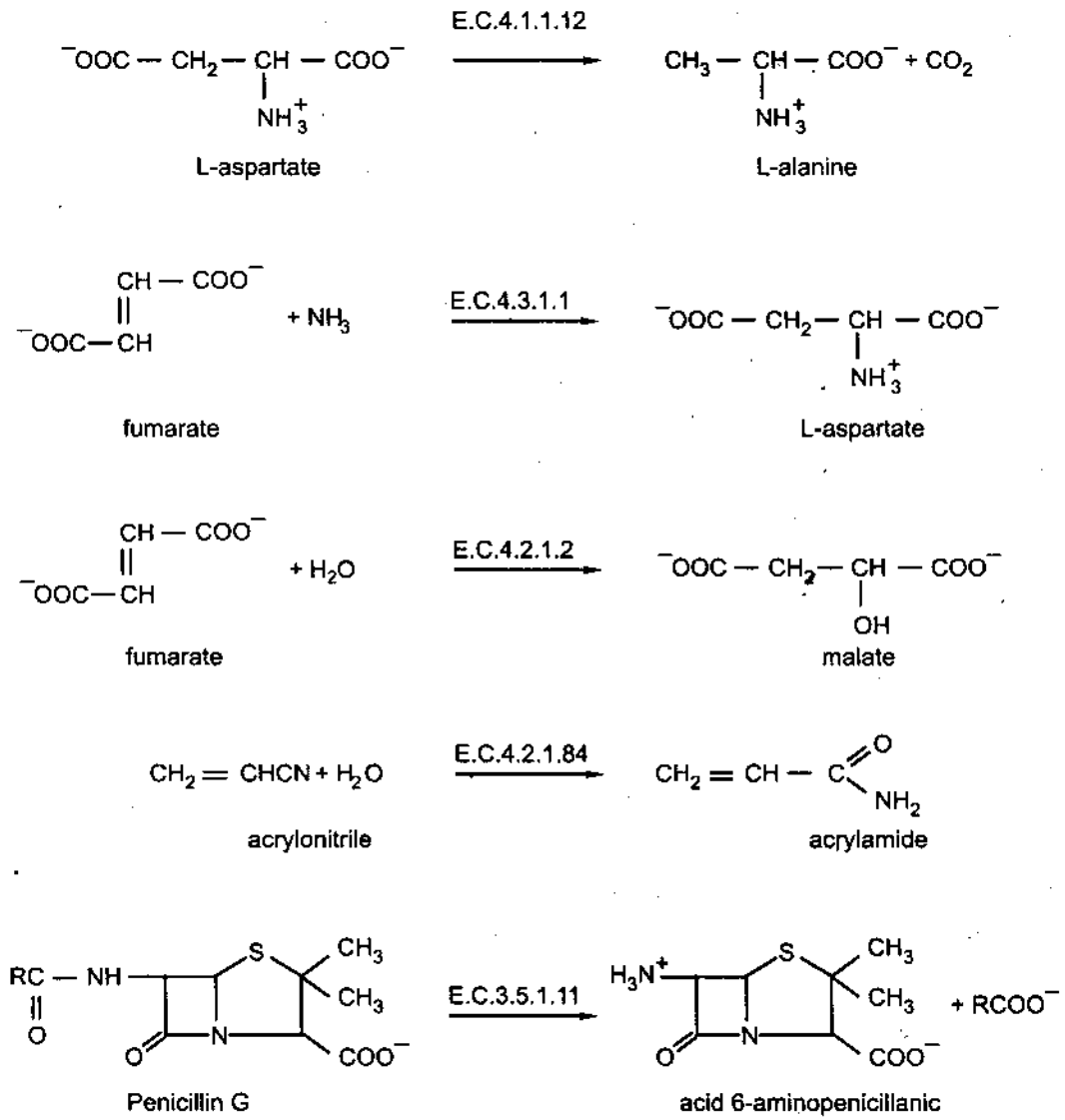
Hình 9.11. Sử dụng aminoacylase để sản xuất L-amino acid từ hỗn hợp racemic của amino acid

Quá trình sản xuất L-amino acid có ý nghĩa kinh tế lớn nếu lưu ý rằng, mỗi năm sản xuất 50 triệu kg D-, L-amino acid bằng phương pháp tổng hợp hóa học, nhưng cơ thể sống chỉ sử dụng được dạng L-amino acid, tức là chỉ sử dụng được khoảng một nửa lượng này.

Các chế phẩm không tan của aminoacylase tách từ nấm mốc, cố định trên DEAE-Sephadex đã được sử dụng để sản xuất nhiều L-amino acid khác nhau:

L-alanine, L-isoleucine, L-methionine, L-phenylalanine, L-tryptophan và L-valine.

Có thể sử dụng phương pháp đưa E vào gel polyacrylamide, hoặc cố định các tế bào vi sinh vật giàu các E tương ứng để sản xuất nhiều chất khác nhau (hình 9.12) như:



Hình 9.12

– *L-alanine* từ L-aspartate (L-aspartate 4-decarboxylase, E.C.4.1.1.12).

– *L-aspartate* từ fumarate (L-aspartate ammonia-lyase, E.C.4.3.1.1, còn gọi là aspartase). Hiện tại đã dùng gel κ- cacarageenan thay cho gel polyacrylamide để cố định tế bào *E. coli* có hoạt độ aspartase cao để sản xuất L-aspartate từ fumarate, làm cứng gel bằng glutaraldehyde và hexamethylenediamine, làm tăng độ bền của chế phẩm, tăng thời gian bán sống của chế phẩm từ 120 ngày lên 680 ngày.

– *L-malate* từ fumarate (fumarate hydratase, E.C.4.2.1.2).

– *Acrylamide* từ acrylonitrile (nitrile hydratase, E.C.4.2.1.84). Acrylamide được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất nhiều polymer khác nhau như các loại chất kết dính và các loại sơn.

– *Acid 6-aminopenicillanic* (6-APA) từ penicillin G (penicillin amidase, E.C.3.5.1.11).

APA là tiền chất quan trọng được sử dụng để sản xuất các chất kháng sinh bán tổng hợp họ β- lactam hoạt động cao (methicillin, oxacillin, carbenicillin, và ampicillin).

Năm 2000, E.Katchalski-Katzir và D.M.Kraemer đã dùng chất mang là Eupegit C, là một polymer dạng hạt có các nhóm chức epoxide hoạt động để gắn *penicillin G amidase* bằng liên kết cộng hóa trị. Chế phẩm E không tan này có thể dùng lặp lại 600 lần. Phản ứng thực hiện trên quy mô công nghiệp ở nhiệt độ 30 - 40^{0}C và pH 7,5 - 8,0. Tỷ lệ chuyển hóa trong điều kiện này rất tốt, đạt 98%.

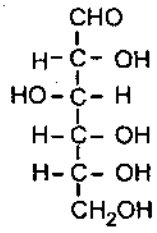
– *Sản xuất prednisolone* (thuốc điều trị thấp khớp): Sử dụng hai E không tan là steroid 11β-monooxygenase và Δ'- dehydrogenase. Hai E này xúc tác cho quá trình chuyển hóa 11-deoxycortisol, một tiền chất tương đối rẻ, thành prednisolone, có tác dụng điều trị cao.

– *Thủy phân lactose:* Trong quá trình sản xuất phomat, sau khi làm đông sữa, lactose còn lại trong phần dịch, dùng β-galactosidase không tan để thủy phân lactose thành galactose và glucose. Như vậy, tận dụng được phụ phẩm của quá trình làm phomat để sản xuất đường, đặc biệt là cho những người bị thiếu β-galactosidase bẩm sinh.

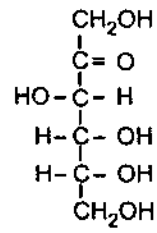
9.5.2. Sản xuất dịch fructose nồng độ cao từ bột ngô (HFCS)

Trong các loại đường làm thực phẩm, fructose có độ ngọt cao nhất, cùng một lượng như nhau, độ ngọt của fructose gấp 2,5 lần glucose, hơn 1,7 lần đường ăn (sucrose). Do đó, dùng fructose làm chất tạo ngọt sẽ kinh tế hơn, và cũng được xem là an toàn hơn đối với sức khỏe. Vì vậy, từ năm 1974, Thompson và cộng sự đã cố định *glucose isomerase* trên DEAE-cellulose để chuyển hóa glucose thành fructose, quy trình này vẫn được sử dụng.

Nhiều năm nay đã sử dụng E không tan để sản xuất HFCS, mỗi năm khoảng 5 triệu tấn. Khi sử dụng *glucoamylase và glucose isomerase* không tan trong hệ thống phản ứng liên tục, giá thành của E chỉ chiếm 0,28% giá thành sản phẩm cuối cùng. Giá thành sản phẩm sản xuất theo phương pháp này chỉ bằng một phần mười khi sử dụng E ở dạng tự nhiên (dạng hòa tan).



D-glucose



D-gluctose

Quá trình sản xuất HFCS qua nhiều bước khác nhau, trong đó có sử dụng α-amylase để thuỷ phân tinh bột thành dextrin, glucoamylase (E.C.3.2.1.3) thủy phân dextrin thành glucose, glucoisomerase (D-xyloisomerase E.C.5.3.1.5) xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa D-glucose thành D-fructose.

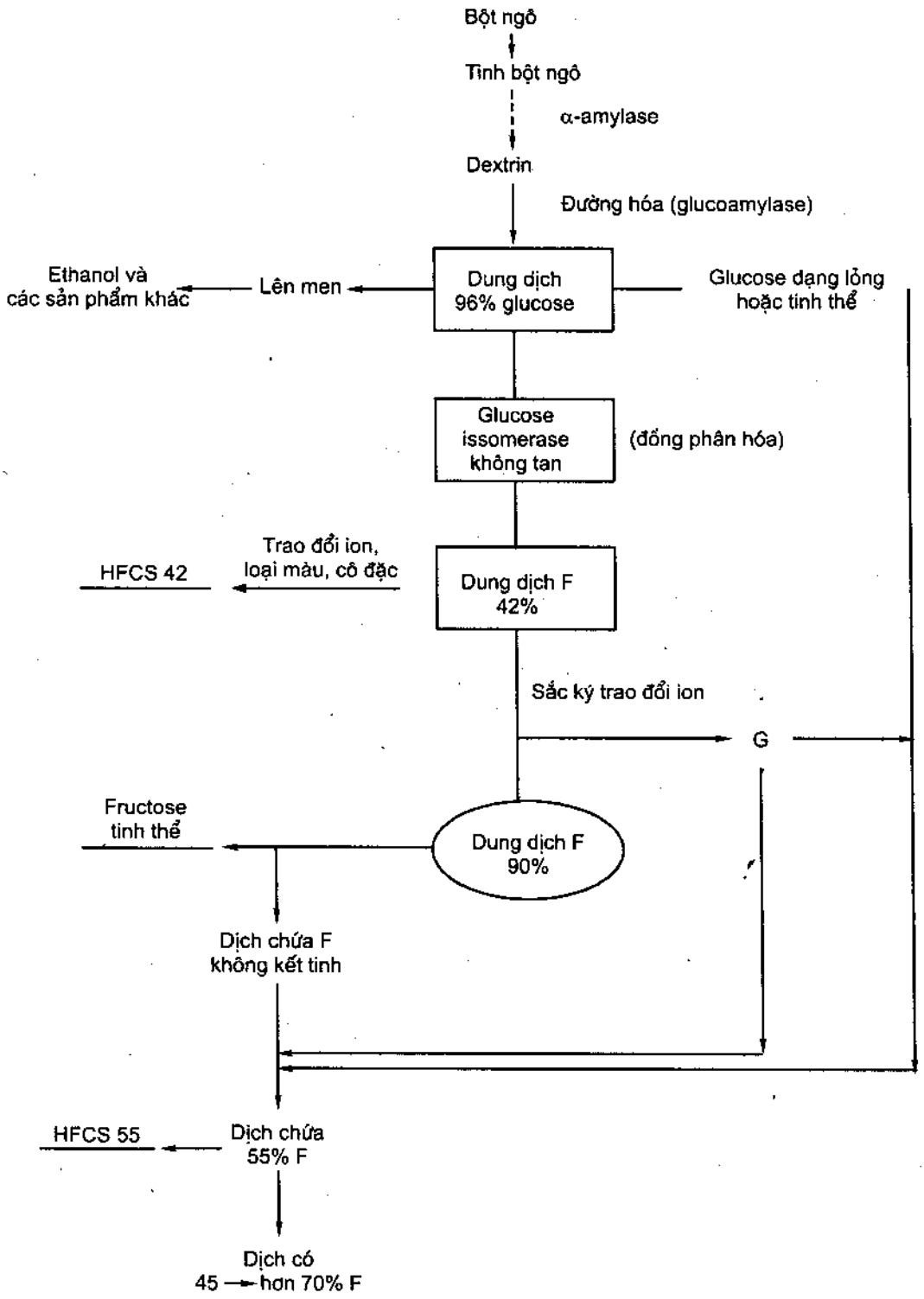
(Tên glucoisomerase là tên gọi cũ có từ khoảng hơn 40 năm trước, hiện đã đưa ra khỏi bảng phân loại E. Phản ứng này được xúc tác bởi D-xyloisomerase (E.C.5.3.1.5), E này có ái lực với xylose cao hơn glucose. Tuy nhiên tất cả các xyloisomerase xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa D-xylose thành D-xylulose đều xúc tác cho phản ứng đồng phân hóa D-glucose thành D-fructose. Các E này được ứng dụng trong công nghiệp để đồng phân hóa glucose nên dùng tên glucoisomerase). Phản ứng đồng phân hóa D-glucose thành D-fructose cũng được xúc tác bởi một E khác là glucose-6-phosphate isomerase (E.C.5.3.1.9) khi có arsenate.

Trước đây (khoảng năm 1970), ở Mỹ dùng 6 loại chế phẩm glucoisomerase gắn với các chất mang khác nhau, theo các phương pháp khác nhau, đến năm 2002, ở Mỹ chỉ dùng 4 chế phẩm không tan của glucoisomerase tách từ *Streptomycés*. Hai chế phẩm ở dạng hạt, cố định bằng tương tác tĩnh điện với chất mang tích điện (DEAE-cellulose và chất mang làm từ silic dioxyde (silica-based material); hai chế phẩm khác là chế phẩm không tan của tế bào *Streptomyces* cố định bằng liên kết chéo đồng hóa trị nhờ glutaraldehyde.

Kết quả phản ứng đồng phân hóa tạo thành 42 -45% fructose, 50 -53% glucose và 5% các sản phẩm khác.

Bình phản ứng thường là những cột lớn đặt trên nền nhà có khoan lỗ, dung dịch glucose qua cột trao đổi ion (đưa từ phía dưới cột lên), pH 7,5 – 7,8, có 1,5mM Mg^{2+}, và khoảng 2mM HSO_3^-, nhiệt độ từ 50 – 65°C, thích hợp nhất là 58°C. Chế phẩm tương đối bền, có thể dùng được 12 tháng để sản xuất nhiều tấn fructose. Có thể nói, đến năm 2003 đã hoàn thiện được quy trình công nghệ, làm giảm đáng kể giá thành sản phẩm.

Dung dịch có 42% fructose có thể được xử lý bằng nhiều cách khác nhau như cho qua than hoạt tính, cột trao đổi ion để tách glucose và các sản phẩm khác, đun cho bay hơi bớt nước (hình 9.13), tạo thành một số dạng sản phẩm có hàm lượng fructose khác nhau: 55%,70%, 90% hoặc fructose tinh thể. Nếu giữ ở dạng dịch fructose, cần điều chỉnh pH đến khoảng 4 – 5 để tránh tạo thành các sản phẩm phụ hoặc chất màu, ở điều kiện này, tránh được tác dụng của vi sinh vật.



Hình 9.13. Sơ đồ các bước chính của quá trình sản xuất HFCS từ tinh bột ngô
F: fructose; G: glucose

9.5.3. Dùng trong các thiết bị cảm biến sinh học (biosensor) để phân tích các chất (xem mục 9.8)

Ví dụ: Phân tích đường trong máu. Sử dụng chế phẩm glucose dehydrogenase (GDH) cố định trong ống nylon, do đó có thể tái sử dụng nhiều lần, với 0,18mg E có thể sử dụng cho 1500 lần phân tích glucose.

GDH của *Bacillus cereus* được sử dụng vào mục đích này vì nó có tính đặc hiệu cao, chỉ oxy hóa D-glucose. Phản ứng xảy ra như sau:

D-Glucose + NAD^+ ↔ D-glucono-δ-lactone + NADH + H^+

Lượng NADH tạo thành được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 340nm, từ đó tính lượng glucose.

9.5.4. Dùng làm thành phần cấu tạo của thận nhân tạo để loại urea và các chất thải khác khỏi cơ thể của người bị bệnh thận

Trong thận nhân tạo có các E không tan: urease, glutamate dehydrogenase, alcoholdehydrogenase. Quá trình được thực hiện như sau: urea trong máu của bệnh nhân được đưa vào thận nhân tạo nhờ thẩm tích (haemodialyis), urease phân giải urea thành CO_2 và NH_4^+, loại NH_4^+ bằng nhựa trao đổi ion hoặc glutamate dehydrogenase, phối hợp với alcholdehydrogenase để quay vòng CoE trước khi dịch được đưa trở lại vào máu.

9.6. NHỮNG LỢI ÍCH CHÍNH CỦA VIỆC SỬ DỤNG E KHÔNG TAN (so với E ở dạng hòa tan)

– Có thể sử dụng lặp lại nhiều lần một lượng E xác định.

– Dễ dàng thực hiện quá trình phản ứng liên tục (xem 9.7).

– Có thể dễ dàng thực hiện các phản ứng kế tiếp nhau của một quá trình phản ứng bằng cách bố trí các bình phản ứng E không tan theo đúng trật tự của quá trình, sản phẩm của phản ứng trước được đưa vào bình phản ứng tiếp theo.

– Nếu pH thích hợp của các E này khác nhau, vẫn có thể tìm được điều kiện để các E đều có thể hoạt động tốt.

– Dễ dàng ngừng phản ứng một cách đơn giản, mà không cần sử dụng các yếu tố hóa, lý nào khác.

– Sản phẩm được tách khỏi E, do đó tránh được tác dụng kìm hãm của nó đối với E, và cũng làm cho phản ứng dễ dàng chuyển dịch về phía tạo thành sản phẩm.

– Có thể thiết lập mô hình để nghiên cứu các E liên kết với các màng trong hệ thống sống, nghiên cứu ảnh hưởng của vi môi trường lipid đối với hoạt động của các E gắn trong màng. Hiểu biết các vấn đề này giúp ích cho việc mô hình hóa hệ thống sống.

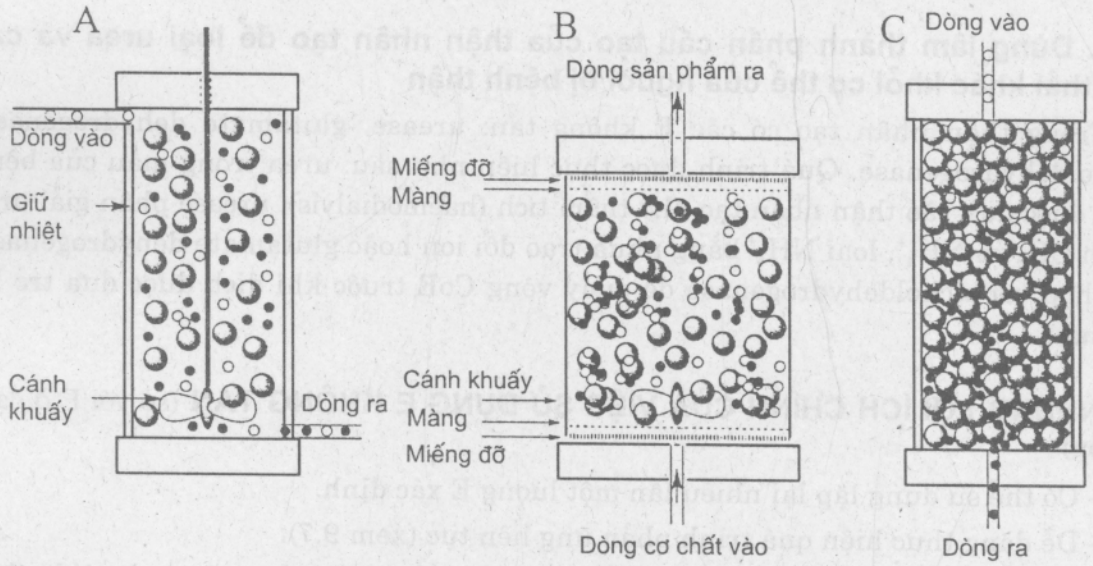
9.7. BÌNH PHẢN ỨNG E

Để sử dụng các chế phẩm E không tan, tùy theo yêu cầu, có thể sử dụng các kiểu bình khác nhau (hình 9.14), kiểu solid-bed reactor (SBR) được dùng phổ biến. Hầu

hết các dạng chế phẩm E không tan đều có thể sử dụng kiểu bình phản ứng này. Kiểu SBR cho phép thực hiện quá trình phản ứng liên tục, dòng cơ chất đi vào, dòng sản phẩm đi ra. Dòng cơ chất có thể đưa vào ở phía trên cột (hình 9.14C), nhưng cũng có thể đưa từ phía dưới lên (hình 9.14B). Điều quan trọng là cần lựa chọn điều kiện phản ứng thích hợp sao cho khi cơ chất đi qua bình phản ứng, bị chuyển hóa hoàn toàn thành sản phẩm (trong dòng đi ra chỉ có sản phẩm).

Đối với bình phản ứng này cần có hệ thống để giữ cho nhiệt độ đồng đều ở tất cả các phần của cột, ở bên trong cũng như ở phần sát với thành cột.

Trong quá trình phản ứng, có thể có một số tạp chất sẽ bị hấp phụ trên chất mang E, do đó thỉnh thoảng phải tái sinh cột.



Hình 9.14. Một số kiểu bình phản ứng E (theo Biss wanger H.)

A- Bình là một thùng chứa có cánh khuấy (stirred-tank reactor, batch reactor).

B- Bình phản ứng có 2 lớp màng lọc (membrane reactor) ở trên và ở phía dưới, để giữ chế phẩm E lại, chỉ cho sản phẩm và cơ chất đi qua. Để trộn đều, lắp thêm cánh khuấy.

C- Bình phản ứng có dạng như các cột dùng trong sắc ký cột (solid-bed reactor, packed bed reactor).

O : enzyme; ○ : cơ chất; ● : sản phẩm

9.8. BIOSENSOR (CẢM BIẾN SINH HỌC)

9.8.1. Khái niệm. Biosensor là thiết bị sử dụng các phản ứng hoá sinh đặc hiệu, được thực hiện nhờ các E, các hệ thống miễn dịch, các mô, các cơ quan hay các tế bào, để phát hiện các hợp chất hóa học, nhờ các tín hiệu điện, nhiệt hoặc quang (*theo Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*).

– Biosensor bao gồm:

+ Thành phần sinh học (thường là E, kháng thể).

+ Bộ phận chuyển đổi tín hiệu (signal transducer), có thể là: chuyển đổi quang (optical transducer); chuyển đổi khối (mass transducer); chuyển đổi nhiệt (thermal transducer); chuyển đổi điện (electrical transducer).

Trong phần lớn trường hợp, thành phần sinh học của biosensor được cố định trên bề mặt của transducer.

– Có thể phân biệt một số loại biosensor như sau:

+ ISFET (ion-sensitive field-effect transitor)-based devices (thiết bị dựa trên cơ sở transitor hiệu ứng trường chọn lọc ion), ISFET cũng là chữ viết tắt của ion-selective field-effect transitor, dùng lớp màng chọn lọc ion.

FET: field efect transitor; MOSFET: metal oxyde semiconductor FET; ENFET hay EnzFET: enzyme linked field effect transitor.

+ Cảm biến vật lý (physical sensor), bao gồm cảm biến khối lượng (*mass sensor*) và cảm biến nhiệt (*thermal sensor*).

+ Điện cực enzyme (enzyme electrode).

+ Cảm biến sinh học các tế bào cố định (immobilized cell biosensor).

+ Cảm biến miễn dịch (immunosensor).

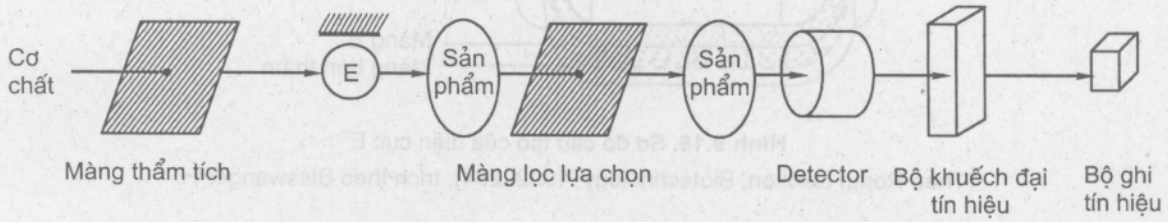
+ Cảm biến sinh học quang học (optical biosensor).

Trong biosensor, các quá trình thực hiện theo trình tự sau: chất cần phân tích trong môi trường khuếch tán vào trong, tương tác với thành phần sinh học của biosensor, bị chuyển hóa thành sản phẩm, tạo ra một tín hiệu, tín hiệu sẽ được khuếch đại nhờ bộ phận khuếch đại, và được một thiết bị xử lý và ghi lại.

9.8.2. Những đặc trưng chính, quan trọng cần lưu ý khi sử dụng biosensor

– Tính lựa chọn cao: Do tính đặc hiệu cao của E đối với cơ chất, sản phẩm, chất kìm hãm, chất hoạt hóa v.v... tính chọn lọc của detector đối với các tham số hóa – lý. Khi detector đo trực tiếp sản phẩm phản ứng E, để tăng tính chọn lọc, đặt thêm một *màng lọc* chọn lựa giữa phản ứng E và detector (hình 9.15).

+ Độ nhạy: Đáp ứng của biosensor không phải luôn tuyến tính với tất cả các nồng độ cơ chất, do đó cần xác định vùng nồng độ cơ chất cho kết quả xác định chính xác nhất. Điều này phụ thuộc vào kiểu detector, đặc biệt là giới hạn phát hiện của nó, tính chất khuếch tán của hệ thống phản ứng E.



Hình 9.15. Sơ đồ các phần chính của biosensor

+ Độ bền: Đây cũng là trở ngại chính khi sử dụng biosensor.

– Khi sử dụng, thành phần sinh học của nó dễ bị thoát ra khỏi thiết bị, có khi chỉ sau vài phút, trong khi yêu cầu sử dụng có thể là vài ngày hay vài tuần.

– Khó bảo quản, dễ bị hỏng, ngay cả khi không dùng và bảo quản trong tủ lạnh hay tủ lạnh sâu.

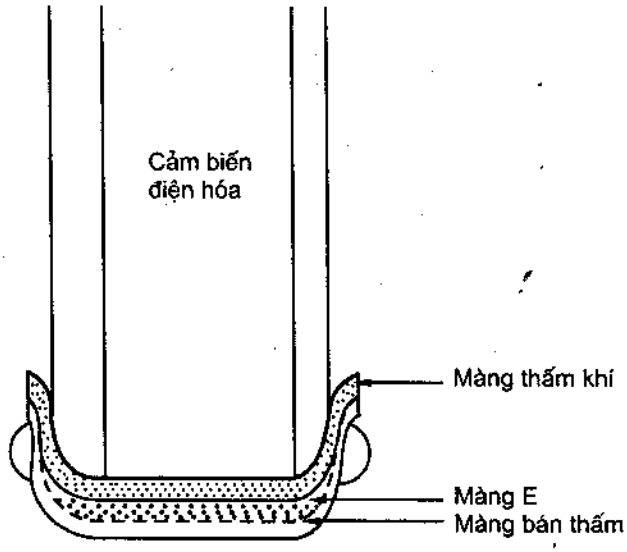
Do đó cần tìm phương pháp thích hợp để cố định E bền lâu trong biosensor, và tăng độ bền của E để giữ được hoạt độ E trong quá trình bảo quản và sử dụng.

Sau đây sẽ giới thiệu chi tiết hơn về điện cực enzyme.

9.8.3. Biosensor điện cực enzyme (enzyme electrode biosensos), cũng gọi là điện cực E không tan (immobilized enzyme electrode)

9.8.3.1. Nguyên tắc cấu tạo và hoạt động: Thành phần cấu tạo sinh học của điện cực này là E, được cố định trên bề mặt của điện cực, đáp ứng với nồng độ của một trong các cơ chất, hoặc các sản phẩm của phản ứng do E xúc tác.

E có thể là một lớp gel (E không tan giữ trong gel) mỏng bao xung quanh cảm biến điện hóa hoặc tiếp xúc với cảm biến này nhờ màng thấm chọn lọc (hình 9.16). Cơ chất đi qua lớp gel hay qua màng chọn lọc, tiếp xúc với E và chuyển hóa thành sản phẩm. Ví dụ: Phản ứng oxy hóa khử các chất do oxidoreductase xúc tác, các *điện tử* của phản ứng được vận chuyển từ chất phản ứng đến điện cực, tạo ra tín hiệu điện. Tín hiệu điện có thể được phát hiện bằng cách đo dòng điện (*amperometric biosensor*), hoặc đo điện thế (*potentiometric biosensor).*



Hình 9.16. Sơ đồ cấu tạo của điện cực E
(Theo Romp Lexikon, Biotechnology, 1992: 254), trích theo Bisswanger H.

Để việc vận chuyển điện tử đến điện cực được thuận lợi, người ta thường dùng một chất trung gian bao ngoài điện cực. Các chất được sử dụng vào mục đích này có thể là ferrocenes, các "kim loại hữu cơ" (các chất hữu cơ dẫn điện).

– Amperometric biosensor (AMB): Cảm biến đo sự sai khác *dòng điện* nhờ điện thế đặt giữa phần nhạy cảm của điện cực thí nghiệm (working electrode) và điện cực so sánh (reference electrode). Ở điện thế được đặt vào, một phân tử trong phản ứng E

(cơ chất hay sản phẩm) có thể chuyển đổi điện tử với bề mặt điện cực, và bị oxy hóa hay bị khử. Dòng đi qua điện cực phản ảnh nồng độ của phân tử này, sự thay đổi dòng đo được tỷ lệ tuyến tính với nồng độ cơ chất của E.

Với điện cực này, có thể thêm các chất có vai trò trung gian oxy hóa khử như ferricyanide hay một vài chất khác.

– Potentiometric biosensor (PMB): Đo sự sai khác điện thế giữa dung dịch mẫu trong lớp giữ E và dung dịch ở bên trong điện cực. Điện thế tỷ lệ với logarithm của nồng độ chất phân tích. PMB là điện cực chọn lọc ion kết hợp với điện cực so sánh thích hợp, kiểm tra nồng độ NH_4^+, CN^-, S^{2-}. Điện cực chọn lọc ion được dùng phổ biến nhất là điện cực nhạy với H^+, được sử dụng để đo pH.

9.8.3.2. Một số phương pháp chuẩn bị điện cực E

– *Hấp phụ vật lý E trên điện cực*, cách này dễ thực hiện nhờ tương tác tĩnh điện hay tương tác kỵ nước giữa E và bề mặt điện cực, nhưng E có thể dễ dàng bị "bong" ra.

– Cố định E trong gel, tạo thành lớp mỏng bao quanh điện cực. Phương pháp này chỉ thích hợp để sử dụng cho việc phân tích các chất phân tử thấp, vì chúng có thể khuếch tán qua các mắt lưới của gel. Đối với các gel không dẫn điện như gel polyacrylamide, để việc vận chuyển điện tử được dễ dàng hơn, đưa thêm graphite (than chì) và ferrocene vào gel (Lange và cộng sự, 1985).

– Cố định E vào bề mặt cảm biến bằng liên kết cộng hóa trị. Ví dụ cố định E vào nylon qua gốc lysine, dùng spacer là glutaraldehyde cũng đã được sử dụng đối với nhiều E. Cố định E theo cách này, điện cực E hoạt động được lâu hơn, nhưng có thể ảnh hưởng đến hoạt độ E.

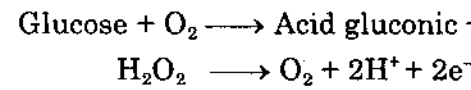
– Đặt điện cực trong *túi nhỏ* làm bằng màng thấm chọn lọc, chỉ cho chất cần phân tích đi qua, E cũng được giữ trong túi này.

9.8.3.3. Một số ví dụ về ứng dụng điện cực E để phân tích các chất

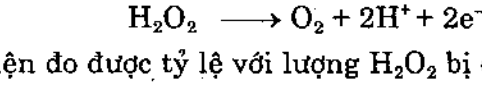
Điện cực E được sử dụng để xác định nồng độ nhiều chất khác nhau như: glucose, một số acid hữu cơ (acid acetic, acid pyruvic, acid lactic, acid formic v.v...), amino acid, các lipid, penicillin, và alcohol v.v... Trong số các biosensor ứng dụng trong lâm sàng, glucose biosensor được ứng dụng rộng rãi nhất để xác định glucose trong máu.

a) Xác định glucose, dùng glucose biosensor

Hicks và Updike (1967) đã cố định glucose oxidase (GOD) trong gel polyacrylamide tạo thành màng mỏng bao quanh điện cực oxygen, tạo được thiết bị để phân tích D-glucose nhạy, đặc hiệu và thuận tiện.



$$\text{Glucose} + O_2 \longrightarrow \text{Acid gluconic} + H_2O_2$$



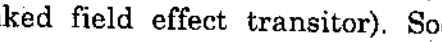
$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

Dòng điện đo được tỷ lệ với lượng H_2O_2 bị oxy hóa, do đó tỷ lệ với nồng độ glucose trong dung dịch.

Glucose oxidase là một flavoenzyme (có CoE là FAD), khi oxy hóa glucose thành acid gluconic, coenzyme FAD của nó bị khử thành $FADH_2$, có thể sử dụng chất trung

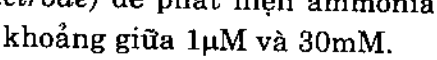
gian (như ferricyanide) thay cho oxygen để oxy hóa $FADH_2$ tái tạo FAD, giải phóng $2H^+$ và $2e^-$.

b) Xác định urea trong máu hoặc trong nước tiểu



$$NH_2CONH_2 + 2H_2O + H^+ \longrightarrow HCO_3^- + 2(NH_4^+)$$

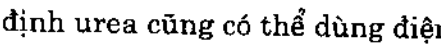
dùng điện cực lựa chọn ion ammonium (ammonium-selective electrode), sẽ phát hiện được ion ammonium. Loại điện cực này gọi là enzyme FET (EnzFET, hoặc EFNET = enzyme linked field effect transitor). Sodium và potassium cản trở việc đo ion ammonium, vì vậy, dùng các điện cực chọn lọc khí đo hiệu thế (*potentiometric gas-selective electrode*) để phát hiện ammonia tạo thành sẽ tốt hơn. Điện cực này có độ nhạy trong khoảng giữa 1μM và 30mM.



$$NH_4^+ \longrightarrow NH_3 + H^+$$

Để xác định urea cũng có thể dùng điện cực được bao ngoài bằng lớp mỏng urease không tan.

c) Xác định ethanol và các alcohol bậc một khác, dùng alcohol oxidase (AO, E.C.1.1.3.13) cố định trên điện cực, phản ứng sử dụng O_2 và tạo thành H_2O_2:



$$\text{alcohol bậc một} + O_2 \longrightarrow \text{aldehyde} + H_2O_2$$

$$\underset{\text{(ethanol)}}{CH_3CH_2OH} + O_2 \longrightarrow \underset{\text{(acetaldehyde)}}{CH_3CHO} + H_2O_2$$

Dùng điện cực đo biến đổi dòng điện (AMB) để xác định lượng oxygen được sử dụng hoặc H_2O_2 được tạo thành. Độ nhạy của phương pháp khi xác định glucose trong máu, vào khoảng giữa 0,4 và 50mg trong 100ml.

d) Sử dụng điện cực E để xác định các chất khác cũng có độ nhạy khá cao

Chất cần phân tích	Enzym không tan trong điện cực	Độ nhạy
Acid lactic (trong huyết thanh)	Lactate dehydrogenase	1μM đến 5mM
Acid uric	Uricase	10μM đến 100mM
Acid oxalic (trong nước tiểu)	Oxalate decarboxylase hoặc oxalate oxidase	0,2 đến 10mM
Creatinine (trong huyết thanh)	Creatinine deiminase	1 – 100mg/100ml
Cholesterol (trong huyết tương)	Cholesterol oxidase	1μM đến 8mM
Acid ascorbic (trong dịch quả)	Ascorbate oxidase	4μM đến 0,7mM
Acetylcholine	Acetylcholine esterase	1μM đến 10μM

Việc phát triển nghiên cứu, ứng dụng E không tan còn liên quan đến phát triển các "biochip", cố định hoặc xây dựng các phân tử sinh học (ADN, protein/enzyme) trên các "chip" rất bé để dùng trong nhiều ngành công nghệ tiên tiến.

Tóm lại, có thể thấy E đã được ứng dụng và còn có tiềm năng ứng dụng lớn trong các lĩnh vực khác nhau, trong đó có nhiều lĩnh vực quan trọng phục vụ việc chăm sóc sức khỏe, sắc đẹp và các ngành kinh tế quan trọng khác của đất nước. Những thành tựu trong nghiên cứu E không tan, chế tạo các E-biosensor đã làm tăng hiệu quả và mở rộng phạm vi ứng dụng của E trong thực tế ở quy mô ngày càng lớn.

Do những tính chất ưu việt của E so với các chất xúc tác khác, nên việc sử dụng E trong thực tế thường đem lại hiệu quả về nhiều mặt: kinh tế, xã hội, cải thiện điều kiện lao động, giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Có thể nói không quá rằng, sự phát triển các quy trình công nghiệp có sử dụng E là một hướng phát triển của nền công nghiệp tiên tiến trong tương lai, khi mà nguồn năng lượng, nguồn nước ngày càng bị cạn kiệt. Để đáp ứng yêu cầu này, cần phát triển việc sản xuất chế phẩm E, công nghệ tinh sạch E ở quy mô công nghiệp, đây là những ngành mà nước ta còn chưa hình thành. Để cạnh tranh được trong môi trường hội nhập quốc tế, cần quan tâm đầu tư nhiều hơn nữa để xây dựng và phát triển ngành công nghệ E ở nước ta.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1

PHÂN LOẠI E (LỚP, TỔ, NHÓM) MÃ SỐ, TÊN THƯỜNG DÙNG, TÊN HỆ THỐNG CỦA MỘT SỐ E THƯỜNG GẶP

1. Oxidoreductases (các E xúc tác cho phản ứng oxy hóa - khử)

1.1. Acting on the CH -OH group of donors (tác dụng với nhóm - CH-OH của chất cho)

1.1.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (với chất nhận là NAD^+ hoặc $NADP^+$)

1.1.1.1. Alcohol dehydrogenase, alcohol: NAD^+ oxidoreductase

1.1.1.27. L-Lactate dehydrogenase, (S)-lactate: NAD^+ oxidoreductase

1.1.1.28. D-Lactate dehydrogenase, (R)-lactate: NAD^+ oxidoreductase

1.1.1.29. Glycerate dehydrogenase, (R)-glycerate: NAD^+ oxidoreductase

1.1.1.37. Malate dehydrogenase, (S)-malate:NAD^+ oxidoreductase

1.1.1.38. Malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) 'malic enzyme', (S)-malate:NAD^+ oxidoreductase

1.1.1.41. Isocitrate dehydrogenase (NAD^+), isocitrate:NAD^+ oxidoreductase

1.1.1.42. Isocitrate dehydrogenase ($NADP^+$), isocitrate:$NADP^+$ oxidoreductase (decarboxylating)

1.1.1.44. 6-phosphogluconate dehydrogenase, 6-phospho-D-gluconate:$NADP^+$ 2-oxidoreductase

1.1.1.47. Glucose 1-dehydrogenase, P-D-glucose:$NAD(P)^+$ 1-oxidoreductase

1.1.1.49. Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, D-glucose-6-phosphate:$NADP^+$ 1-oxidoreductase, *Zwischenferment*

1.1.2. With a cytochrome as acceptor (với chất nhận là cytochrome)

1.1.2.3. L-Lactate dehydrogenase (cytochrome), *(S)*-lactate: ferricytochrome-c_2 oxidoreductase

1.1.3. With oxygen as acceptor (với chất nhận là oxygen)

1.1.3.4. Glucose oxidase, β-D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase

1.1.3.5. Hexose oxidase, D-hexose:oxygen 1-oxidoreductase

1.1.3.22. Xanthine oxidase, xanthine:oxygen oxidoreductase

1.1.4. With a disulfide as acceptor (với chất nhận là disulfide)

1.1.5. With a quinone or similar compound as acceptor (với chất nhận là quinone hoặc các chất họ hàng)

1.1.99. With other acceptors (các chất nhận khác)

1.2. Acting on the aldehyde or oxo group of donors (tác dụng với nhóm aldehyde hoặc nhóm oxo của chất cho)

1.2.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (chất nhận là NAD^+ hoặc $NADP^+$)

1.2.1.2. Formate dehydrogenase, formate:NAD^+ oxidoreductase

1.2.1.3. Aldehyde dehydrogenase (NAD^+), aldehyde:NAD^+ oxidoreductase

1.2.1.12. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating), D-glyceraldehyde-3-phosphate:NAD^+ oxidoreductase

1.2.2. With a cytochrome as acceptor (chất nhận là cytochrome)

1.2.2.2. Pyruvate dehydrogenase (cytochrome), pyruvate:ferricytochrome-b_1 oxidoreductase

1.2.3. With oxygen as acceptor (chất nhận là oxygen)

1.2.3.3. Pyruvate oxidase, pyruvate:oxygen 2-oxidoreductase (phosphorylating)

1.2.3.4. Oxalate oxidase, oxalate:oxyn oxidoreductase

1.2.4. With a disulfide as acceptor (chất nhận là disulfide)

1.2.4.1. Pyruvate dehydrogenase (lipoamide), pyruvate:lipoamide 2-oxidoreductase (decarboxylating and acceptor-acetylating)

1.2.4.2. Oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide), 2-oxoglutarate:lipoamide 2-oxidoreductase . (decarboxylating and acceptor-succinylating)

1.2.4.4. 3-Methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (lipoamide), branched chain α-keto acid dehydrogenase, 3-methyl-2-oxobutanoate:lipoamide 2-oxidoreductase (decarboxylating and acceptor- 2-methylpropanylating)

1.2.7. With an iron-sulfur protein as acceptor (chất nhận là protein Fe-sulfur)

1.2.7.1. Pyruvate synthase, pyruvate:ferredoxin 2-oxidoreductase (CoA-acetylating)

1.2.99. With other acceptors (các chất nhận khác)

1.2.99.2. Carbon-monoxide dehydrogenase, carbon-monoxide:(acceptor oxidoreductase)

1.3. Acting on the CH-CH group of donors (tác dụng với nhóm CH-CH của chất cho)

1.3.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (chất nhận là NAD^+ hoặc $NADP^+$)

1.3.1.6. Fumarate reductase (NADH), succinate:NAD^+ oxidoreductase

1.3.1.8. Acyl-CoA dehydrogenase ($NADP^+$), acyl-CoA:$NADP^+$ 2-oxidoreductase

1.3.2. With a cytochrome as acceptor (chất nhận là cytochrome)

1.3.3. With oxygen as acceptor (chất nhận là oxygen)

1.3.5. With a quinone or related compound as acceptor (chất nhận là quinone và các chất họ hàng)

1.3.5.1. Succinate dehydrogenase (ubiquinone), succinate:ubiquinone oxidoreductase

1.3.7. With an iron-sulfur protein as acceptor (chất nhận là protein có Fe-sulfur)

1.3.99. With other acceptors (các chất nhận khác)

1.3.99.3. Acyl-CoA dehydrogenase, acyl-CoA:acceptor 2,3-oxidoreductase

1.4. Acting on the CH-NH_2 group of donors (tác dụng với nhóm CH-NH_2 của chất cho)

1.4.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (với NAD^+ hoặc $NADP^+$ là chất nhận)

1.4.1.1. Alanine dehydrogenase, L-alanine:NAD^+ oxidoreductase (deaminating)

1.4.1.2. Glutamate dehydrogenase, L-glutamate:NAD^+ oxidoreductase (deaminating)

1.4.1.14. Glutamate synthase (NADH), L-glutamate:NAD^+ oxidoreductase (transaminating)

1.4.2. With a cytochrome as acceptor (với chất nhận là cytochrome)

1.4.3. With oxygen as acceptor (với chất nhận là oxygen)

1.4.3.2. L-Amino-acid oxidase, L-amino-acid:oxygen oxidoreductase (deaminating)

1.4.3.4. Amine oxidase (flavin-containing), amine:oxygen oxidoreductase (deaminating) (flavin-containing)

1.4.3.6. Amine oxidase (copper-containing), amine:oxygen oxidoreductase (deaminating) (copper-containing)

1.4.4. With a disulfide as acceptor (với chất nhận là disulfide)

1.4.4.2. Glycine dehydrogenase, glycine:lipoylprotein oxidoreductase (decarboxylating and acceptor aminomethylating)

1.4.7. With an iron-sulfur protein as acceptor (với chất nhận là protein có Fe-sulfur)

1.4.99. With other acceptors (với các chất nhận khác)

1.5. Acting on the CH-NH group of donors (tác dụng với nhóm CH-NH của chất cho)

1.5.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (với NAD^+ hoặc $NADP^+$ là chất nhận)

1.5.1.3. Dihydrofolate reductase, 5,6,7,8-tetrahydrofolate:$NADP^+$ oxidoreductase

1.5.3. With oxygen as acceptor (với chất nhận là oxygen)

1.5.3.11. Polyamine oxidase, *N1*-acetylspermidine:oxygen oxidoreductase

1.5.4. With a disulfide as acceptor (với chất nhận là disulfide)

1.5.5. With a quinone or similar compound as acceptor (với chất nhận là quinone hoặc các chất tương tự)

1.5.99. With other acceptors (với các chất nhận khác)

1.6. Acting on NADH or NADPH (tác dụng với NADH hoặc NADPH)

1.6.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (với chất nhận là NAD^+ hoặc $NADP^+$)

1.6.2. With a heme protein as acceptor (chất nhận là protein chứa heme)

1.6.2.2. Cytochrome-b_5 reductase, NADH-ferricytochrome-b_5 oxidoreductase

1.6.4. With a disulfide as acceptor (với chất nhận là disulfide)

1.6.4.2. Glutathione reductase (NADPH) NADPH:oxidized-glutathione oxidoreductase

1.6.4.5. Thioredoxin reductase (NADPH), NADPH:oxidized thioredoxin oxidoreductase

1.6.5. With a quinone or similar compound as acceptor (chất nhận là quinone hoặc các chất tương tự)

1.6.5.3. NADH dehydrogenase (ubiquinone), NADH:ubiquinone oxidoreductase

1.6.6. With a nitrogenous group as acceptor (chất nhận là nhóm có nitrogenous)

1.6.6.1. Nitrate reductase (NADH), NADH:nitrate oxidoreductase

1.6.8. With a flavin as acceptor (chất nhận là flavin)

1.6.99. With other acceptors (với các chất nhận khác)

1.6.99.3 NADH dehydrogenase, NADH:(acceptor) oxidoreductase

1.7. Acting on other nitrogenous compounds as donors (tác dụng với các hợp chất khác chứa nitrogen của chất cho)

1.7.2. Witit a cytochrome as acceptor (với chất nhận là cytochrome)

1.7.3. With oxygen as acceptor (với chất nhận là oxygen)

1.7.7. With an iron-sulfur protein as acceptor (với chất nhận là protein có Fe-sulfur)

1.7.5. With a quinone or similar compound as acceptor (với chất nhận là quinone hoặc chất tương tự)

1.7.99. With other acceptors (với các chất nhận khác)

1.7.99.3. Nitrite reductase, nitric-oxide:(acceptor) oxidoreductase

1.7.99.4. Nitrate reductase, nitrite:(acceptor) oxidoreductase

1.8 Acting on a sulfur group of donors (tác dụng với nhóm sulfur của chất cho)

1.8.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (với chất nhận là NAD^+ hoặc $NADP^+$)

1.8.1.4. Dihydrolipoamide dehydrogenase, diaphorase, dihydrolipoamide:NAD^+ oxidoreductase

1.8.2. With a cytochrome as acceptor (với chất nhận là cytochrome)

1.8.2.1. Sulfite reductase, sulfite:ferricytochrome-*c* oxidoreductase

1.8.3. With oxygen as acceptor (với chất nhận là oxygen)

1.8.3.3. Glutathione oxidase, glutathione:oxygen oxidoreductase

1.8.4. With a disulfide as acceptor (với chất nhận là disulfide)

1.8.4.2. Protein-disulfide reductase (glutathione), glutathone:protein-disulfide oxidoreductase

1.8.5. With a quinone or similar compound as acceptor (với chất nhận là quinone hoặc chất tương tự)

1.8.7. With an iron-sulfur protein as acceptor (với chất nhận là protein có Fe-sulfur)

1.8.99. With other acceptors (với các chất nhận khác)

1.9. Acting on heme group of donors (tác dụng với nhóm heme của chất cho)

1.9.3. With oxygen as acceptor (với chất nhận là oxygen)

1.9.6. With a nitrogenous group as acceptor (với nhóm nitrogen là chất nhận)

1.9.99. With other acceptors (với các chất nhận khác)

1.10. Acting on diphenols and related substances as donors (tác dụng với chất cho là diphenols và chất tương tự)

1.10.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (với chất nhận là NAD^+ hoặc $NADP^+$)

1.10.2. With a heme protein as acceptor (với chất nhận là protein chứa heme)

1.10.3. With oxygen as acceptor (với chất nhận là oxygen)

1.10.3.2. Laccase, benzenediol:oxygen oxidoreductase

1.10.3.3. L-Ascorbate oxidase, L-ascorbate:oxygen oxidoreductase

1.10.99. With other acceptor (với các chất nhận khác)

1.11. Acting on a peroxide as acceptor (tác dụng với chất nhận peroxide)

1.11.1.1. NADH peroxidase, NADH:hydrogen-peroxide oxidoreductase

1.11.1.6. Catalase, hydrogen-peroxide:hydrogen-peroxide oxidoreductase

1.11.1.7. Peroxidase, donor:hydrogen-peroxide oxidoreductase

1.11.1.9. Glutathione peroxidase, glutathione:hydrogen-peroxide oxidoreductase

1.12. Acting on hydrogen as donor (tác dụng với hydrogen là chất cho)

1.12.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (với chất nhận là NAD^+ hoặc $NADP^+$)

1.12.2. With a cytochrome as acceptor (với chất nhận là cytochrome)

1.12.99. With other acceptors (với các chất nhận khác)

1.13. Acting on single donors with incorporation of molecular oxygen (oxigenases, tác dụng với các chất cho đơn cùng với oxygen)

1.13.11. With incorporation of two atoms of oxygen (cùng với 2 nguyên tử oxygen)

1.13.11.1. Catechol 1,2-dioxygenase, catechol:oxygen 1,2 oxidoreductase

1.13.11.12. Lipoxygenase, linoleate:oxygen 13-oxidoreductase

1.13.12. With incorporation of one atom of oxygen (với 1 nguyên tử oxygen) (internal monooxygenases or internal mixed-function oxygenases)

1.13.12.4. Lactate 2-monooxygenase, (*S*)-lactate:oxygen 2-oxidoreductase

1.13.99. Miscellaneous (với các kiểu khác)

1.14. Acting on paired donors with incorporation of molecular oxygen (tác dụng với 2 chất cho cùng với oxygen)

1.14.11. With 2-oxoglutarate as one donor and incorporation of one atom each of oxygen into both donors (2-oxoglutarate là một chất cho, cùng với một nguyên tử oxygen)

1.14.12. With NADH or NADPH as one donor and incorporation of two atoms of oxygen into one donor (NADH hoặc NADPH là một chất cho, cùng với 2 nguyên tử oxygen là chất cho thứ hai)

1.14.12.1. Anthranilate 1,2-dioxygenase (deaminating, decarboxylating) anthranilate, NAD(P)H:oxygen oxidoreductase (1,2-hydroxylating, deaminating, decarboxylating)

1.14.13. With NADH or NADPH as one donor and incorporation of one atom of oxygen (NADH hoặc NADPH là một chất cho, cùng với 1 nguyên tử oxygen)

1.1.4.13.17. Cholesterol 7α-monooxygenase, cholesterol, NADPH:oxygen oxidoreductase (7α-hydroxylating)

1.14.14. With reduced flavin of flavoprotein as one donor and incorporation of one atom of oxygen (flavin khử hoặc flavoprotein khử là một chất cho, cùng với 1 nguyên tử oxygen)

1.14.14.1. Unspecific monooxygenase, microsomal P-450, substrate, reduced-flavoprotein:oxygen oxidoreductase (RH-hydroxylating or-epoxidizing)

1.14.15. With a reduced iron-sulfur protein as one donor and incorporation of one atom of oxygen (protein Fe-sulfur là một chất cho, cùng với 1 nguyên tử oxygen)

1.14.15.4. Steroid 11β-monooxygenase, steroid, reduced-adrenal-ferredoxin:oxygen oxidoreductase (11β-hydroxylating)

1.14.16. With reduced pteridine as one donor and incorporation of one atom of oxygen (pteridine khử là một chất cho, cùng với 1 nguyên tử oxygen)

1.14.16.4. Tryptophan 5-monooxygenase, L-tryptophan, tetrahydro-biopterin: oxygen oxidoreductase (5-hydroxylating)

1.14.17. With ascorbate as one donor and incorporation of one atom of oxygen (ascorbate là một chất cho, cùng với 1 nguyên tử oxygen)

1.14.17.1. Dopamine 11β-monooxygenase, 3,4-dihydroxyphenethylamine, ascorbate:oxygen oxidoreductase (β-hydroxylating)

1.14.99. Miscellaneous (các kiểu khác)

1.14.99.5. Stearoyl-CoA desaturase, stearoyl-CoA, hydrogenase-donor:oxygen oxidoreductase

1.15. Acting on superoxide radicals as acceptor (tác dụng với các gốc superoxide làm chất nhận)

1.15.1.1. Superoxide dismutas, superoxide:superoxide oxidoreductase

1.16. Oxidizing metal ions (oxy hoá các ion kim loại)

1.16.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor (với NAD^+ hoặc $NADP^+$ là chất nhận)

1.16.1.1. Mercury(II) reductase, Hg: $NADP^+$ oxidoreductase

1.16.3. With oxygen as acceptor (với chất nhận là oxygen)

1.16.3.1. Ferroxidase, Fe(II):oxygen oxidoreductase

1.17. Acting on CH_2 groups (tác dụng với nhóm CH_2)

1.17.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor

1.17.3. With oxygen as acceptor

1.17.4. With a disulfide as acceptor

1.17.99. With other acceptors

1.18. Acting on reduced ferredoxin as donor (tác dụng với chất cho là ferredoxin khử)

1.18.1. With NAD^+ or $NADP^+$ as acceptor

1.18.1.2. Ferredoxin-$NADP^+$ reductase, ferredoxin-$NADP^+$ oxidoreductase

1.18.6. With dinitrogen as acceptor

1.18.6.1. Nitrogenase, reduced ferrecloxin:dinitrogen oxidoreductase (ATP-hydrolyzing)

1.18.99. With H^+ as acceptor

1.18.99.1. Hydrogenase, ferredoxin: H^+ oxidoreductase

1.19. Acting on reduced flavodoxin as donor (tác dụng với chất cho flavodoxin khử)

1.19.6. With dinitrogen as acceptor

1.19.6.1. Nitrogenase (flavodoxin), reduced flavodoxin:dinitrogen oxidoreductase (ATP-hydrolyzing)

1.97. Other oxidoreductases

1.97.1.3. Sulfur reductase, (donor):sulfur oxidoreductase

2. Transferases (các E xúc tác cho phản ứng chuyển vị)

2.1. Transferring one-carbon groups (chuyển nhóm 1 carbon)

2.1.1. Methyltransferases

2.1.1.23. Protein-arginine N-methyltransferase, protein methylase 1, *S*-adenosyl-L-methionine:protein- L-arginine *N*-methyltransferase

2.1.1.29. t-RNA (cytosine-5-)-methyltransferase, S-adenosyl-L-methionine:tRNA (cytosine-5-)-methyltransferase

2.1.2. Hydroxymethyl-, formyl-, and related transferases

2.1.2.1. Glycine hydroxymethyltransferase, 5,10-methylenetetrahydro-folate: glycine hydroxymethyltransferase

2.1.3. Carboxyl-and carbamoyltransferases

2.1.3.2. Aspartate carbamoyltransferase, carbamoylphosphate: L-aspartate carbamoyltransferase

2.1.4. Amindinotransferases

2.1.4.1. Glycine amindinotransferase, L-arginine:glycine amidinotransferase

2.2. Transferring aldehyde and ketone residues (chuyển các gốc aldehyde và ketone)

2.2.1.1. Transketolase, sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycoaldehydetransferase

2.2.1.2. Transaldolase, sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glyceronetransferase

2.3. Acyltransferases (các E xúc tác phản ứng chuyển vị nhóm acyl)

2.3.1. Acyltransferases

2.3.1.8. Phosphate acetyltransferase (phosphotransacetylase), acetyl-CoA:orthophosphate acetyltransferase

2.3.1.12. Dihydrolipoamide S-acetyltransferase, acetyl-CoA:dihydrolipoamide *S*-acetyltransferase

2.3.1.61. Dihydrolipoamide *S*-succinyltransferase, succinyl-CoA:dihydrolipoamide S-succinyltransferase

2.3.1.85. Fatty acid synthase, acyl-CoA:malonyl-CoA *C*-acyltransferase (decarboxylating, oxoacyl- and enoyl-reducing, and thioester-hydrolyzing)

2.3.1.85. Fatty acyl-CoA synthase (yeast fatty acid synthase), acyl-CoA:malonyl-CoA *C*-acyltransferase (decarboxylating, oxoacyl-, and enoyl-reducing)

2.3.2. Aminoacyltransferases

2.3.2.6. Leucyltransferase, L-leucyl-tRNA:protein leucyltransferase

2.4. Glycosyltransferases (các E xúc tác phản ứng chuyển vị glycosyl)

2.4.1. Hexosyltransferases

2.4.1.1. Phosphorylase, 1,4-α-D-glucan:orthophosphate α-D-glucosyltransferase

2.4.1.11. Glycogen (starch) synthase, UDP glucose:glycogen 4-α-D-glucosyltransferase

2.4.1.18. 1,4-α-glucan branching enzyme, 1,4-α-D-glucan: 1,4-α-D-glucan 6-α-D-(1,4-α-D-glucano)-transferase

2.4.2. Pentosyltransferases

2.4.2.1. Purine-nucleoside phosphorylase, pyrimidine-nucleoside: orthophosphate α-D-ribosyltransferase

2.4.2.2. Pyrimidine-nucleoside phosphorylase, pyrimidine-nucleoside: orthophosphate α-D-ribosyltransferase

2.4.99. Transferring other glycosyl groups

2.5. Transferring alkyl or aryl groups other than methyl groups (chuyển vị các nhóm alkyl hoặc aryl khác với nhóm methyl)

2.5.1.6. Methionine adenosyltransferase, ATP:L-methionine *S*-adenosyltransferas

2.6. Transferring nitrogenous groups (chuyển vị các nhóm nitrogen)

2.6.1. Transaminases

2.6.1.2. Alanine transaminase, L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase

2.6.3. Oximinotransferases

2.6.99. Transferring other nitrogenous groups

2.7. Transferring phosphorus-containing groups (chuyển vị các nhóm chứa phospho)

2.7.1. Phosphotransferases with an alcohol group as acceptor

2.7.1.1. Hexokinase, ATP:D-hexose 6-phosphotransferase

2.7.1.2. Glucokinase, ATP:D-glucose 6-phosphotransferase

2.7.1.11. 6-Phosphofructokinase, ATP:D-fructose- 6 -phosphate 1-phosphotransferase

2.7.1.37. Protein kinase, ATP:protein phosphotransferase

2.7.1.38. Phosphorylase kinase, ATP:D-phosphorylase-b phosphotransferase

2.7.1.40. Pyruvate kinase, ATP:pyruvate 2-*O*-phosphotransferase

2.7.2. Phosphotransferases with a carboxyl group as acceptor

2.7.2.1. Acetate kinase, ATP:acetate phosphotransferase

2.7.3. Phosphotransferases with a nitrogenous group as acceptor

2.7.3.2. Creatine kinase, ATP:creatine *N*-phosphotransferase

2.7.4. Phosphotransferases with a phosphate group as acceptor

2.7.4.3. Adenylate kinase (myokinase), ATP:AMP phosphotransferase

2.7.4.6. Nucleoside-diphosphate kinase ATP:nucleoside-diphosphate phosphotransferase

2.7.6. Diphosphotransferases

2.7.6.1. Ribose phosphate pyrophosphokinase, ATP:D-ribose-5-phosphate pyrophosphotransferase

2.7.7. Nucleotydyltransferases

2.7.7.2. FMN adenylyltransferase, ATP:FMN adenylyltransferase

2.7.7.48. RNA-directed RNA polymerase, nucleoside-triphosphate:RNA nucleotidyltrransferase (RNA-directed)

2.7.7.49. RNA-directed DNA polymerase, deoxynucleoside-triphosphate:DNA deoxynucleotidyltransferase (RNA-directed)

2.7.8. Transferases for other substitnuted phosphate groups

2.7.9. Phosphotransferases with paired acceptors

2.8. Transferring sulfur-containing groups (chuyển vị các nhóm chứa sulfur)

2.8.1. Sulfurtransferases

2.8.2. Sulfotransferases

2.8.3. CoA-transferases

2.8.3.3. Malonate CoA-transferase, acetyl-CoA:malonate CoA-transferases

3. Hydrolases (các E xúc tác cho phản ứng thuỷ phân)

3.1. Acting on ester bonds (thuỷ phân liên kết ester)

3.1.1. Carboxylic ester hydrolases

3.1.1.3. Triacylglycerol lipase (lipase), triacylglycerol acylhydrolase

3.1.1.4. Phospholipase A_2, phosphatidylcholine 2-acylhydrolase

3.1.1.7. Acetylcholine esterase, acetylcholine acetylhydrolase

3.1.1.8. Choline esterase, acylcholine acylhydrolase

3.1.2. Thiolester hydrolases

3.1.2.2. Palmitoyl-CoA hydrolase

3.1.3. Phosphoric monoester hydrolases

3.1.3.1. Alkaline phosphatase, orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (alkaline optimum)

3.1.3.2. Acid phosphatase, orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (acid optimum)

3.1.4. Phosphoric diester hydrolases

3.1.4.1. Phosphodiesterase I, oligonucleate 5'-nucleotido-hydrolase

3.1.4.3. Phospholipase C, phosphatidylcholine cholinephosphohydrolase

3.1.5. Triphosphoric monoester hydrolases

3.1.6. Sulfuric ester hydrolases

3.1.6.1. Arylsulfatase, aryl-sulfate sulfohydrolase

3.1.7. Diphosphoric monoester hydrolases

3.1.8. Phosphoric triester hydrolases

3.1.11. Exodeoxyribonucleases producing 5' -phosphomonoesters

3.1.11.1. Exodeoxyribonuclease I

3.1.13. Exoribonucleases producing 5' -phosphomonoesters

3.1.11.1. Exoribonuclease II

3.1.14. Exoribonucleases producing other than 5' -phosphomonoesters

3.1.15. Exonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5' -phosphomonoesters

3.1.16. Exonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing other than 5' -phosphomonoesters

3.1.21. Endodeoxyribonucleases producing 5' -phosphomonoesters

3.1.21.1. Deoxyribonuclease I

3.1.22. Endodeoxyribonucleases producing other than 5' -phosphomonoesters

3.1.22.1 Deoxyribonuclease II

3.1.25. Site-specific endodeoxyribonucleases specific for altered bases

3.1.26. Endoribonucleases producing 5' -phosphomonoesters

3.1.27. Endoribonucleases producing other than 5'-phosphomonoesters

3.1.30. Endonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5' -phosphomonoesters

3.1.31. Endonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing other than 5' -phosphomonoesters

3.2. Glycosidases (thuỷ phân liên kết glycoside)

3.2.1. Hydrolyzing O-glycosyl compounds

3.2.1.1. α-Amylase, 1,4-α-D-glucan glucanohydrolase

3.2.1.2. β-Amylase, 1,4-α-D-glucan maltohydrolase

3.2.1.4. Cellulase, 1,4-(1,3;1,4)-β-D-glucan 4-glucanohydrolase

3.2.1.17. Lysozyme, peptidoglucan *N*-acetylmuramoylhydrolase

3.2.1.20. α-Glucosidase, α-D-glucoside glucohydrolase

3.2.1.23. β-Galactosidase, β-D-galactoside galactohydrolase

3.2.1.26. β-D-fructosefuranoside fructohydrolase, β-fructofuranosidase, invertase, invertin, saccharase, sucrase

3.2.1.108. Lactase, lactose galactohydrolase

3.2.2. Hydrolyzing *N*-glycosyl compounds

3.2.2.1. Purine nucleosidase, *N*-D-ribosylpurine ribohydrolase

3.2.3. Hydrolyzing *S*-glycosyl compounds

3.2.3.1 Thioglucosidase, thioglucoside glucohydrolase

3.3. Acting on ether bonds (thuỷ phân các liên kết khác)

3.3.1. Thioether hydrolases

3.3.2. Ether hydrolases

3.3.2.3. Epoxide hydrolases

3.4. Acting on peptide bonds (peptidases) (thuỷ phân liên kết peptide)

3.4.11. Aminopeptidases

3.4.11.1. Leucyl aminopeptidase

3.4.13. Dipeptidases

3.4.13.6. Cys-Gly dipeptidase

3.4.14. Dipeptidyl peptidases and tripeptidyl peptidases

3.4.15. Peptidyl dipeptidases

3.4.16. Serine-type carboxypeptidases

3.4.16.1. Serine-type carboxypeptidase

3.4.17. Metallocarboxypeptidases

3.4.17.1. Carboxypeptidase A

3.4.18. Cysteine-type carboxypeptidases

3.4.18.1. Cysteine-type carboxypeptidase

3.4.19. Omega peptidases

3.4.19.1. Acylaminoacyl peptidase

3.4.21. Serine endopeptidases

3.4.21.1. Chymotrypsin

3.4.21.4. Trypsin

3.4.21.5. Thrombin

3.4.21.62. Subtilisin

3.4.22. Cysteine endopeptidases

3.4.22.1. Cathepsin B

3.4.22.2. Papain

3.4.22.17. Calpain

3.4.23. Aspartic endopeptidases

3.4.23.1. Pepsin A

3.4.22.15. Renin

3.4.24. Metalloendopeptidases

3.4.24.3. Microbial collagenase

3.4.24.27. Thermolysin

3.4.99. Endopeptidases of unknown catalytic mechanism

3.4.99.46. Multicatalytic endopeptidase complex (proteasome)

3.5. Acting on carbon-nitrogen bonds other than peptide bonds (thuỷ phân các liên kết C-N khác liên kết peptide)

3.5.1. In linear amides

3.5.1.1. Asparaginase, L-asparagine amidohydrolase

3.5.1.4. Amidase, acylase; acylamine amidohydrolase

3.5.1.5. Urease, urea amidohydrolase

3.5.1.35. D-Glutaminase, D-glutamine amidohydrolase

3.5.2. In cyclic amides

3.5.2.3. Dihydroorotase, carbamoylaspartic dehydrase

3.5.3. In linear amidines

3.5.3.1. Arginase, L-arginine amidinohydrolase

3.5.4. In cyclic amidines

3.5.4.1. Cytosine deaminase, cytosine aminohydrolase

3.5.5. In nitriles

3.5.5.1. Nitrilase, nitrile aminohydrolase

3.5.99. In other compounds

3.5.99.1 Riboflavinase, riboflavin hydrolase

3.6. Acting on acid anhydrides (thuỷ phân liên kết anhydride acid)

3.6.1. In phosphorus-containing anhydrides

3.6.1.5. Apyrase, ATP diphosphohydrolase

3.6.2. In sulfonyl-containing anhydrides

3.6.2.1. Adenylylsufatase, adenylylsulfate sulfohydrolase

3.7. Acting on carbon-carbon bonds (thuỷ phân liên kết C-C)

3.7.1. In ketonic substances

3.7.1.1. Oxaloacetase, oxaloacetate acetylhydrolase

3.8. Acting on halide bonds (thuỷ phân liên kết halide hữu cơ)

3.8.1. In C-halide compounds

3.8.1.1. Alkylhalidase, alkyl-halide halidohydrolase

3.9. Acting on phosphorus-nitrogen bonds (thuỷ phân liên kết P-N)

3.9.1.1. Phosphoamidase, phosphamide hydrolase

3.10. Acting on sulfur-nitrogen bonds (thuỷ phân liên kết S-N)

3.10.1.2. Cyclamate sulfohydrolase, cyclohexylsulfamate sulfohydrolase

3.11. Acting on carbon-phosphorus bonds (thuỷ phân liên kết C-P)

3.11.1.1. Phosphonoacetaldehyde hydrolase, 2-oxoethylphosphonate phosphonohydrolase

3.12. Acting on sulfur-sulfur bonds (thuỷ phân liên kết S-S)

3.12.1.1. Trithionate hydrolase, trithionate thiosulfohydrolase

4. Lyases (các E phân giải không có nước tham gia)

4.1. Carbon-carbon lyases (cắt đứt liên kết C-C)

4.1.1. Carboxy lyases

4.1.1.1. Pyruvate decarboxylase, 2 -oxo-acid carboxylyase

4.1.1.17. Ornithine decarboxylase, L-ornithine carboxylyase

4.1.2. Aldehyde lyases

4.1.2.5. Threonine aldolase, L-threonine acetaldehyde lyase

4.1.2.9. Phosphoketolase, D-xylulose-5-phosphate D-glyceraldehyde-3 -phosphate lyase (phosphate-acetylating)

4.1.3. Oxo-acid lyases

4.1.3.1. Isocitrate lyase, isocitrate glyoxylate lyase

4.1.3.2. Malate synthase, L-malate glyoxylate lyase

4.1.3.7. Citrate (*si*)-synthase (condensing enzyme), citrate oxaloacetate lyase

4.1.3.27. Anthranilate synthase, chorismate pyruvate lyase (amino-accepting)

4.1.99. Other carbon-carbon lyases

4.1.99.1. Tryptophanase, L-tryptophan indole lyase

4.2. Carbon-oxygen lyases (cắt đứt liên kết C-O)

4.2.1. Hydrolyases

4.2.1.1. Carbonate dehydratase, carbonic anhydrase, carbonate hydrolyase

4.2.1.2. Fumarate hydratase, fumarase, (*S*)-malate hydrolyase

4.2.1.3. Aconitate hydratase, aconitase, citrate(isocitrate) hydrolyase

4.2.1.20. Tryptophan synthase, L-serine hydrolyase (adding indole glycerol phosphate)

4.2.2. Acting on polysaccharides

4.2.2.1. Hyaluronate lyase, hyaluronidase, hyaluronate lyase

4.2.99. Other carbon-oxygen lyases

4.2.99.2. Threonine synthase, O-phospho-L-homoserine phospholyase (adding water)

4.3. Carbon-nitrogen lyases (cắt đứt liên kết C-N)

4.3.1. Ammonia lyases

4.3.1.1 Aspartate ammonia lyase, aspartase, L-aspartate ammonia lyase

4.3.2. Amindine lyases

4.3.2.1. Argininosuccinate lyase, argininosuccinase, *N*-(L-argininosuccinate) arginine lyase

4.3.3. Amide lyases

4.3.99. Other carbon-nitrogen lyases

4.3.99.1. Cyanate lyase, cyanate C-N lyase

4.4. Carbon-sulfur lyases (cắt đứt liên kết C-S)

4.4.1.2. Homocysteine desulfhydrase, L-homocysteine hydrogen lyase (deaminating)

4.5. Carbon-halide lyases (cắt đứt liên kết C-halogen)

4.5.1.1. DTT-dehydrochlorinase, 1,1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane chloride lyase

4.6. Phosphorus-oxygen lyases (cắt đứt liên kết P-O)

4.6.1.1. Adenylate cyclase, ATP-pyrophosphate lyase

4.99. Other lyases (các lyases khác)

4.99.1.1. Ferrochelatase, protoheme ferro lyase

5. Isomerases (các E đồng phân hoá)

5.1. Racemases and epimerases

5.1.1. Acting on amino acids and derivatives

5.1.1.1. Alanine racemase

5.1.2. Acting on hydroxy acids and derivatives

5.1.2.1. Lactate racemase

5.1.3. Acting on carbohydrates and derivatives

5.1.3.1. Ribulose-phosphate 3-epimerase, D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase

5.1.99. Acting on other compounds

5.1.99.1. Methylmalonyl-CoA epimerase, 2-methyl-3-oxopropanoyl-CoA 2-epimerase

5.2. *cis-trans*-isomerases

5.2.1.3. Retinal isomerase, all-*trans*-retinal 11-*cis-trans*-isomerase

5.3. Intramolecular oxidoreductases

5.3.1. Interconverting aldoses and ketoses

5.3.1.1. Triosephosphate isomerase, D-glyceraldehyde-3-phosphate ketol isomerase

5.3.1.5. Xylose isomerase, D-xylose ketol isomerase

5.3.2. Interconverting keto and enol groups

5.3.2.1. Phenylpyruvate tautomerase, phenylpyruvate keto-enol isomerase

5.3.3. Transposing C=C bonds

5.3.3.1. Steroid Δ-isomerase, 3-oxosteroid Δ5-Δ4-isomerase

5.3.4. Transposing S-S bonds

5.3.4.1. Protein disulfide isomerase

5.3.99. Other intramolecular oxidoreductases

5.3.99.7. Styrene-oxide isomerase (epoxide-cleaving)

5.4. Intramolecular transferases (mutases) (chuyển vị nội phân tử)

5.4.1. Transferring acyl groups

5.4.1.1. Lysolecithin acylmutase

5.4.2. Phosphotransferases (phosphomutases)

5.4.2.2. Phosphoglucomutase, α-D-glucose 1,6-phosphomutase

5.4.3. Transferring amino groups

5.4.3.2. Lysine 2,3-aminomutase 1-lysine 2,3-aminomutase

5.4.99. Transferring other groups

5.4.99.5. Chorismate mutase, chorismate pyruvate mutase

5.5. Intramolecular lyases (phân cắt nội phân tử)

5.5.1.1. Muconate cycloisomerase, 2,5-dihydro-5-oxofuran-2-acetate lyase (decyclizing)

5.99. Other isomerases

5.99.1.2 DNA topoisomerase

6. Ligases (các E tổng hợp)

6.1. Forming carbon-oxygen bonds (tạo thành liên kết C-O)

6.1.1. Ligases forming aminoacyl-tRNA and related compounds

6.1.1.1. Tyrosine-tRNA ligase, tyrosyl-tRNA synthetase

6.2. Forming carbon-sulfur bonds (tạo thành liên kết C-S)

6.2.1. Acid-thiol ligases

6.2.1.1. Acetate-CoA ligase, acetate:CoA ligase (AMP-forming)

6.3. Forming carbon-nitrogen bonds (tạo liên kết C-N)

6.3.1. Acid-ammonia (or amine) ligases (amide synthases)

6.3.1.2. Glutamate-ammonia ligase, glutamine synthetase, L-glutamate:ammonia ligase (ADP-forming)

6.3.2. Acid-amino-acid ligases (peptide synthases)

6.3.2.3. Glutathione synthase, γ-L-glutamyl-L-cysteine:glycine ligase (ADP-forming)

6.3.3. Cyclo ligases

6.3.4. Other carbon-nitrogen ligases

6.3.4.1. GMP synthase, xanthosine-5'-phosphate:ammonia ligase (AMP-forming)

6.3.5. Carbon-nitrogen ligases with glutamine as amido N-donor

6.3.5.2. GMP synthase (glutamine-hydrolyzing)

6.4. Forming carbon-carbon bonds (tạo liên kết C-C)

6.4.1.1. Pyruvate carboxylase, pyruvate:carbondioxide ligase (ADP-forming)

6.4.1.2. Acetyl-CoA carboxylase, acetyl-CoA:carbondioxide ligase (ADP-forming)

6.5. Forming phosphoric ester bonds (tạo liên kết ester phosphoric)

6.5.1.1. DNA ligase (ATP), poly (deoxyribonucleotide):poly-(deoxyribonucleotide) ligase (AMP-forming)

Phụ lục 2

CHUẨN BỊ CÁC DUNG DỊCH CÓ ĐỘ BÃO HOÀ AMMONIUM SULFATE KHÁC NHAU ĐỂ KẾT TỦA E/PROTEIN

– Dòng S2: Ghi độ bão hoà ammonium sulfate cần đạt

– Cột S1 (bên trái) ghi độ bão hoà ammonium sulfate sẵn có trong dung dịch

– Các số ghi trong bảng là lượng ammonium sulfate cần thêm vào để đạt được độ bão hoà ghi ở dòng S2, ở 0^0C.

(Theo green và Hughes, 1955, Brewer và cộng sự 1977)

S1 \ S2	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	67	70	75	80	85	90	95	100
0	53	80	106	134	164	187	194	226	258	291	326	361	398	421	436	476	516	559	603	650	697
5	27	56	79	108	137	162	166	197	229	262	296	331	368	390	405	444	484	526	570	615	662
10		28	53	81	109	133	139	169	200	233	266	301	337	358	374	412	452	493	536	581	627
15			26	54	82	87	111	141	172	204	237	271	316	327	343	381	420	460	503	547	592
20				27	55	75	83	113	143	175	207	241	276	296	312	349	387	427	469	512	557
25					27	46	56	84	115	146	179	211	245	264	280	317	355	395	436	488	522
30						17	28	56	86	117	148	181	214	233	249	285	323	362	402	445	488
33							11	40	70	101	133	166	200	214	235	271	309	347	387	429	472
35								28	57	87	118	151	184	201	218	254	291	329	369	410	453
40									29	58	89	120	153	170	182	212	258	296	335	376	418
45										29	59	90	123	138	156	190	226	263	302	342	383
50											30	60	92	107	125	159	194	230	268	308	348
55												30	61	76	93	127	161	197	235	273	313
60													31	44	62	95	129	164	201	239	279
65														13	31	63	97	132	168	205	244
67															19	52	85	120	156	194	233
70																32	65	99	134	171	209
75																	32	66	101	137	174
80																		33	67	103	139
85																			34	68	105
90																				34	70
95																					35

Phụ lục 3

CÁC QUY ĐỊNH VỀ AN TOÀN TRONG SẢN XUẤT VÀ SỬ DỤNG ENZYME

1. Ảnh hưởng bất lợi có thể có trong sản xuất và sử dụng E

Mặc dù chưa có những bằng chứng khoa học về tác dụng độc của E, nhưng trong một số trường hợp, đối với một số người cũng có thể gây kích ứng da hay dị ứng hô hấp.

– Dị ứng da: Các protease có thể gây kích ứng da sau khi tiếp xúc với các E này trong thời gian dài. Sự kích thích da càng tăng khi độ ẩm cao, đặc biệt ở tay, chân, mắt.

– Dị ứng phổi: Nói chung khi hít phải protein lạ (như E) ở dạng hạt bụi nhỏ có trong không khí hoặc ở dạng aerosol (dạng hạt sương nhỏ có E/protein) thường gây dị ứng hô hấp hoặc hen dị ứng. Khi hít phải E/protein, cơ thể nhận biết được vật lạ, sẽ tạo các triệu chứng lâm sàng như chảy nước mắt, nước mũi, ho, thắt ngực, khó thở, bị hen. Các triệu chứng trên sẽ mất sau vài giờ hoặc vài ngày ngừng tiếp xúc với E.

2. Nội dung cần kiểm tra về an toàn

Cần kiểm tra các tiêu chí sau: dạng chế phẩm, kỹ thuật, các điều kiện thực tế nơi sản xuất, các phương tiện bảo hộ lao động.

– Dạng chế phẩm: Các chế phẩm E có thể ở cả dạng lỏng, hạt hay bột. Đối với những người nhạy cảm với các protein lạ, cả 3 dạng đều có thể ảnh hưởng, tuy nhiên cần lưu ý đến dạng bột. Dạng bột dễ phát tán vào không khí, do đó phải giám sát chặt chẽ nơi sản xuất, đóng gói và phải sử dụng các phương tiện bảo hộ lao động như găng tay, kính đeo mắt, và có hệ thống thông hơi cục bộ.

– Kiểm tra kỹ thuật: Cần kiểm tra dụng cụ, thiết bị dùng trong sản xuất, phải đảm bảo không để thoát E ra ngoài. Đặc biệt cần lưu ý đến thiết bị để thêm E vào trong quá trình sản xuất, nơi vận chuyển nguyên liệu, cho E vào container.

– Kiểm tra nơi làm việc: Vấn đề an toàn trong môi trường làm việc: những người làm việc phải được thông tin đầy đủ về những tác hại có thể có đối với sức khoẻ, nhận biết được những dấu hiệu không bình thường đối với sức khoẻ, việc cần thiết phải sử dụng trang bị bảo hộ lao động.

– Phải theo dõi, thường xuyên đánh giá môi trường làm việc. Một số nước như Úc, Argentina, Canada, Đan Mạch, Hà Lan, Anh có quy định về giới hạn lượng subtilsin (protease kiềm của Bacillus) trong không khí, phải bé hơn 60ng/m^3, theo dõi trong một khoảng không gian lớn trong vòng 60 phút.

– Giám sát y tế: Theo dõi sức khoẻ công nhân để phát hiện kịp thời những dấu hiệu không tốt đối với sức khoẻ.

3. Những quy định về an toàn sản phẩm

Tuỳ mục đích sử dụng E, và tuỳ từng nước. Những quy định về sử dụng E trong chế biến thực phẩm, đặc biệt là khi sử dụng như phụ gia thực phẩm là phức tạp nhất, và chặt chẽ hơn khi sử dụng E trong các quá trình công nghiệp khác.

Đối với các E tách từ các cơ thể biến đổi di truyền (GMO), còn có thêm các quy định bổ sung khác. Ví dụ: mô tả cách thiết kế gen, trong sản phẩm phải không có GMO, không có ADN. Độ sạch của chế phẩm E dùng trong thực phẩm cũng được quy định nghiêm ngặt. Ví dụ: Luật của Pháp quy định về hàm lượng các chất, vi sinh vật, kim loại nặng trong chế phẩm như sau:

Cadmium, Mercury (thuỷ ngân)	**< 0,5mg/kg**
Arsenic	< 3mg/kg
Chì	< 10mg/kg
Aflatoxins	< 0,005mg/kg
Vi sinh vật tổng số	< 50 000/g
Samonela	không có trong 25g
Coliforms	< 30/g
Staphylococcus aureus	không có trong 1g
Hoạt tính kháng sinh	không có

Quy trình đánh giá, quy định việc đăng ký, phê chuẩn, cấp phép, cơ quan chịu trách nhiệm về các vấn đề ở các nước cũng khác nhau. Trong bảng sau đây sẽ giới thiệu một số địa chỉ tra cứu có liên quan đến các vấn đề an toàn E sử dụng trong thực phẩm.

Nước	Địa chỉ truy cập
Anh	http://www.doh.gov.uk/ http://www.defra.gov.uk/ http://www.foodstandards.gov.uk/ http://www.foodstandards.gov.uk/committees/cot/summary.html
Nhật	http://www.mhlw.go.jp/englis/topics/food/index.html
Mỹ	http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-noti.html http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/foodadd.html http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-enzy.html
Canada	http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/english/publications/acts_and_regulations/food_and_acts/c-tables.pdf
Australia và New Zealand	http://www.anzfa.gov.au/foodstandards/ http://www.anzfa.gov.au/foodstandards/foodstandards codecontents/standard13/standard133.cfm

Các địa chỉ truy cập về các quy định liên quan đến an toàn E sử dụng trong chăn nuôi:

EU	http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/index_en.html
Mỹ	http://www.aafco.org/
Canada	http://www.inspection.gc.ca/english/anima/tradmem/trindxe.html

Các địa chỉ truy cập về các E tách từ các vi sinh vật tái tổ hợp:

http://www.access.gpo/nara/cfr/waisidx_00/40cfrv23_00.html

http://www.epa.gov/biotech_rule/index.html

http://www.ec.gc.ca/cceb1/nsd/eng/index_e.html

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Aehle Wolgang, 2004. *Enzyme in industry*. Wiley - VCH Verlag GmbH and Co.KgaA.
2. Balasubramanian, D., Bryce, CFA, Dharmalingam, K., Green, J.A., Jayaraman, K. 2004. *Concepts in Biotechnology*, Sangam Books Ltd, London.
3. Bisswanger, H. 2004. *Practical Enzymology*. Wiley - VCH.
4. Chaplin, M. and Bucke, C. 1990. *E technology*. Cambridge University Press.
5. Copeland, R.A. 2000. *Es: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Wiley - VCH.
6. Creighton, T.E. 1997. *Protein Function*.
7. OIRL PRESS.Doonan, S. 2002. *Peptides and Proteins*. Wiley - Interscience RS.C.
8. Engel, P.C. 1996. *Enzymology*. Bios Scientific Publishers Ltd. and Academic Press, Inc.
9. Glick, B.R. and Pasternak, J.J. 2003. *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd Edition. ASM Press, Washington D.C.
10. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Lân Dũng, 1982. *Enzym Vi sinh vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
11. Moses, V., Moses, S., 1995. *Exploiting Biotechnology*. Harwood Academic Publishers.
12. Nguyễn Hữu Chấn, 1995. *Enzym và xúc tác sinh học*. NXB Y học.
13. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty, 1978. *Một số phương pháp nghiên cứu Vi sinh vật học*, Tập III. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
14. Palmer, T. 2003. *Es: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*. Horwood Publishing Ltd. International Publishers. England.
15. Price N.C., Stevens, L., 1999. *Fundamentals of Enzymology*. 3rd Edition. Oxford University Press.
16. Rifkin, J., 1998. *The Biotech Century*. P.Tarcher/Putnam.
17. Scopes, K. 1994. Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Edition. Narosa Publishing House. New Delhi Madras Bombay Calcutta.

18. Voet, D., Voet J.G., 2004. *Biochemistry*. 3rd Edition, John Wiley and Sons, Inc.

19. Walker, J.M. 1996. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa New Jersey.

20. Walsh, G. and Headon, D.R. 1994. *Protein Biotechnology*. John Willey and Sons Ltd.

21. Webb, E.C, 1992 (prepare for NC-IUBMB). *Enzyme Nomenclature*. Academic Press, Inc.

Chịu trách nhiệm xuất bản:
Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập NGUYỄN QUÝ THAO

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung:
Chủ tịch HĐQT kiêm Giám đốc Công ty cổ phần Sách ĐH-DN
TRẦN NHẬT TÂN

Biên tập và sửa bản in:
NGUYỄN HỒNG ÁNH
Trình bày bìa:
HOÀNG MẠNH DỨA
Chế bản:
ĐINH XUÂN DŨNG

CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Tập ba: Enzyme và ứng dụng
Mã số : 7K663M6–DAI

In 1000 bản khổ 19cm x 27cm Tại Công ty In - Thương mại TTXVN
Giấy phép xuất bản số: 10 - 2006/CXB/161-2018/GD
Do cục xuất bản cấp , In xong và nộp lưu chiểu tháng 9 - 2006

CÔNG TY CỔ PHẦN SÁCH ĐẠI HỌC - DẠY NGHỀ
HEVOBCO
Địa chỉ : 25 Hàn Thuyên, Hà Nội

TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO
CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

1. Đất ngập nước	GS. Lê Văn Khoa
2. Động vật học có xương sống	GS. TS. Lê Vũ Khôi
3. Sinh thái học côn trùng	PGS. TS. Phạm Bình Quyền
4. Cơ sở hoá sinh	PGS. TS. Trịnh Lê Hùng
5. Tài nguyên nước Việt Nam	Nguyễn Thanh Sơn
6. Virut học	PGS. TS. Phạm Văn Ty
7. Bộ sách về công nghệ sinh học	
Tập một : Sinh học phân tử và tế bào - Cơ sở khoa học của công nghệ sinh học	PGS. TS. Nguyễn Như Hiền
Tập hai : Công nghệ tế bào động vật và thực vật	GS. TS. Vũ Văn Vụ PGS. TS. Nguyễn Mộng Hùng
Tập ba : Enzym và ứng dụng	GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu PGS. TS. Phan Tuấn Nghĩa
Tập bốn : Công nghệ di truyền	TS. Trịnh Đình Đạt
Tập năm : Công nghệ sinh học vi sinh và công nghệ môi trường	PGS. TS. Phạm Văn Ty TS. Vũ Nguyên Thành
8. Cơ sở lý thuyết và kỹ thuật sản xuất thực phẩm	TS. Nguyễn Xuân Phương TSKH. Nguyễn Văn Thoa
9. Di truyền học	Đỗ Lê Thăng
10. Sinh học tế bào	PGS. TS. Nguyễn Như Hiền
11. Sinh học phân tử tế bào và ứng dụng	TS. Võ Thị Thương Lan

Bạn đọc có thể tìm mua tại các Công ty Sách và Thiết bị trường học ở địa phương hoặc các cửa hàng sách của Nhà xuất bản Giáo dục :
25 Hàn Thuyên, 187B Giảng Võ, 23 Tràng Tiền - Hà Nội
15 Nguyễn Chí Thanh - TP. Đà Nẵng
240 Trần Bình Trọng, Quận 5 - TP. Hồ Chí Minh

Giá: 28.000 đ

công nghệ sinh học 13
1 007022 800082
28.000 VNĐ

8 934980 693063