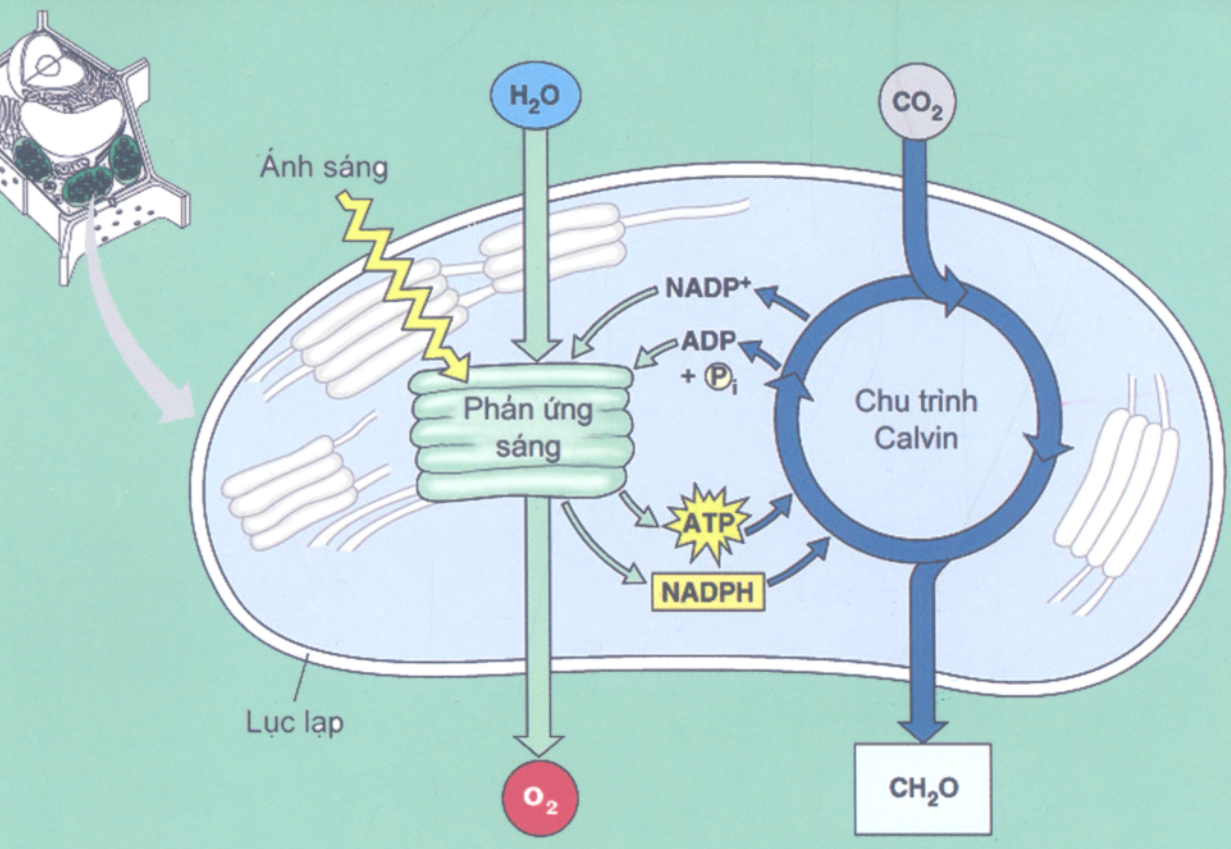
TS. TRẦN THỊ LỆ (Chủ biên) - VÕ VĂN QUANG

GIÁO TRÌNH
HÓA SINH THỰC VẬT



NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

TRẦN THỊ LỆ (chủ biên) - VÕ VĂN QUANG

Giáo trình
HÓA SINH THỰC VẬT

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
Hà Nội - 2006

LỜI NÓI ĐẦU

Cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật mà đặc biệt là công nghệ sinh học, hóa sinh học là một ngành khoa học phát triển rất nhanh chóng.

Quyển sách được biên soạn nhằm cung cấp cho sinh viên và các nhà nghiên cứu những kiến thức cơ bản về lĩnh vực Hoá sinh.

Sách in lần đầu và với khả năng, kinh nghiệm có hạn chắc không tránh khỏi thiếu sót, chúng tôi mạnh dạn cho xuất bản với mong muốn phục vụ kịp thời yêu cầu học tập của sinh viên cũng như yêu cầu nâng cao chất lượng đào tạo của ngành.

Chúng tôi rất mong được các nhà khoa học, các bạn đồng nghiệp, các sinh viên đóng góp nhiều ý kiến cho việc biên soạn lần sau đạt chất lượng tốt hơn.

Những nhận xét và ý kiến đóng góp xin gửi về Khoa Nông học, Đại học Nông Lâm Huế.

Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn GS. TSKH. Lê Doãn Diên đã sửa chữa và đóng góp nhiều ý kiến quý báu. Xin chân thành cám ơn Ban Dự án Giáo dục Đại học Huế đã giúp đỡ, tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành giáo trình này.

Xin trân trọng cảm ơn.

CÁC TÁC GIẢ

Chương I
TRAO ĐỔI CHẤT VÀ NĂNG LƯỢNG SINH HỌC

1.1. Khái niệm chung về trao đổi chất

Mỗi cơ thể sống đều tồn tại trong môi trường và liên hệ mật thiết với môi trường đó. Hiện tượng cơ thể lấy một số chất từ môi trường kiến tạo nên sinh chất của mình và thải ra ngoài những chất cặn bã được gọi là sự trao đổi chất.

Sự trao đổi chất ở giới vô sinh khác với giới hữu sinh. Ở giới vô sinh, trao đổi chất làm cho các chất hữu cơ và vô cơ bị phân huỷ. Ví dụ, đá vôi (canxi carbonate) bị xói mòn vì H_2CO_3 có trong nước tác dụng với đá vôi thành canxi bicarbonate, mỡ bị ôi hóa thành một số chất khác là do tác dụng với oxy.

Ở thế giới sinh vật, mỗi cơ thể sống luôn luôn trao đổi chất với môi trường, lấy thức ăn vào chuyển hóa thành các chất sử dụng cho cơ thể và thải ra ngoài các chất cặn bã. Quá trình đó được thực hiện là do các biến đổi hóa học liên tục xảy ra trong cơ thể. Toàn bộ các biến đổi hóa học đó được gọi là sự trao đổi chất.

Quá trình trao đổi chất gồm nhiều khâu chuyển hóa trung gian. Mỗi chuyển hóa là một mắt xích của một trong hai quá trình cơ bản: đồng hóa và dị hoá.

Đồng hóa và dị hóa là hai quá trình đối lập, nhưng lại thống nhất với nhau trong một cơ thể: chúng xảy ra đồng thời và liên quan mật thiết với nhau. Các chất được tổng hợp nên trong quá trình đồng hóa là nguyên liệu cho quá trình dị hóa (ví dụ gluxit là sản phẩm của quá trình quang hợp, là nguyên liệu cho quá trình hô hấp). Năng lượng giải phóng ra trong quá trình dị hóa được sử dụng một phần cho quá trình tổng hợp.

1.2. Năng lượng sinh học

Hệ thống sống cần năng lượng để chuyển động, lớn lên, tổng hợp các phân tử sinh học và vận chuyển ion, phân tử qua màng.

Các cơ thể lấy năng lượng từ môi trường sống và sử dụng năng lượng đó để thực hiện các quá trình sống có hiệu quả.

Để nghiên cứu năng lượng sinh học đòi hỏi phải có hiểu biết về nhiệt động học, một số định luật, nguyên lý mô tả nguồn, trao đổi nhiệt, năng lượng và vật chất trong hệ thống nghiên cứu.

Nhiệt động học cho chúng ta xác định quá trình hóa học và phản ứng có thể tự xảy ra hay không.

Mặc dù nhiệt động học là khái niệm phức tạp, nhưng nó dựa trên ba định luật tương đối đơn giản và dễ hiểu.

Một vài nguyên lý của nhiệt động học cơ bản được đưa ra trong chương này bao gồm phân tích nguồn nhiệt, sản sinh entropy, hàm năng lượng tự do và mối liên quan giữa entropy và thông tin.

Chương này cũng đề cập đến ATP và những hợp chất cao năng khác.

Khái niệm về nhiệt động học cơ bản

Bất kỳ sự quan tâm nào của nhiệt động học cũng phải phân biệt giữa hệ thống và môi trường.

Hệ thống là một phần của vũ trụ mà chúng ta quan tâm, trong khi đó môi trường là gồm tất cả những gì còn lại. Có ba trạng thái cơ bản: hệ thống cô lập, hệ thống đóng và hệ thống mở.

Hệ thống cô lập: Không có sự trao đổi chất và năng lượng với môi trường.

Hệ thống đóng: Có trao đổi năng lượng, nhưng không có trao đổi chất với môi trường.

Hệ thống mở: Có trao đổi chất và năng lượng với môi trường.

Cơ thể sống là hệ thống mở điển hình có trao đổi chất (dinh dưỡng và sản phẩm thải ra) và năng lượng (nhiệt từ trao đổi chất) với môi trường.

Định luật 1: Nhiệt, công và các dạng năng lượng khác

Trước đây trong sự phát triển của nhiệt động học người ta cho rằng nhiệt độ có thể biến đổi thành những dạng năng lượng khác và tất cả các dạng năng lượng một cách cơ bản có thể biến đổi thành một số dạng khác.

Định luật 1 nói rằng: tổng năng lượng của một hệ thống cô lập là không thay đổi.

Các nhà nhiệt động học đã mô phỏng thành một hàm toán học để nghiên cứu sự biến đổi nhiệt và sử dụng công trong những hệ thống nhiệt động học. Hàm này được gọi là năng lượng nội năng, thường ký hiệu là E hoặc U.

Năng lượng này chỉ phụ thuộc vào trạng thái hiện tại của một hệ thống và vì vậy được coi là hàm trạng thái. Năng lượng nội năng không phụ thuộc vào hệ thống xảy ra như thế nào và vì vậy không phụ thuộc vào đường hướng. Nói một cách khác là chúng ta có thể thay đổi hệ thống bằng bất cứ con đường nào và cho đến khi nào hệ thống trở về trạng thái ban đầu, năng lượng nội năng sẽ không thay đổi.

Năng lượng nội năng, E của hệ thống có thể thay đổi nếu nguồn năng lượng vào hoặc ra khỏi hệ thống ở dạng nhiệt hoặc công cho quá trình nào biến đổi một trạng thái này (1) sang một trạng thái khác (2) thay đổi năng lượng nội năng là:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = q + w \qquad (1.1)$$

q là lượng nhiệt được hệ thống hấp thụ từ môi trường

w là công thực hiện trên hệ thống do môi trường

Công cơ học được định nghĩa là sự chuyển động từ chỗ này đến chỗ khác, gây ra do sử dụng lực. Cả hai phải xảy ra công mới được thực hiện.

Ví dụ: Một tàu chở khách đã chứa đầy khách nhưng không di chuyển, theo định nghĩa nhiệt động học công không được thực hiện.

Trong hệ thống hóa sinh học và hóa học công thường liên quan với áp suất và thể tích của hệ thống. Công cơ học được xác định

$$w = -P\Delta V$$

Trong đó P là áp suất, ΔV là sự thay đổi thể tích, $\Delta V = V_2 - V_1$

Công có thể được thực hiện ở nhiều dạng: cơ học, điện, từ và hóa học. ΔE, q, w phải có cùng đơn vị: calorie (cal) và kilocalorie (kcal) được sử dụng theo truyền thống, nhưng theo đơn vị SI: Joule được đề nghị nên dùng.

Enthalpy: Hàm có nhiều tiện lợi cho hệ thống sinh học

Nếu định nghĩa công được giới hạn bởi công cơ học, trong trường hợp này ΔE chỉ là thay đổi nhiệt ở thể tích không đổi. Vì vậy nếu V không đổi, công không được thực hiện. $\Delta E = q$. Vì vậy ΔE là một định lượng rất tiện lợi trong quá trình thể tích không thay đổi. ΔE không cần thiết bằng biến đổi nhiệt. Vì lý do này các nhà hóa sinh học, hóa học đã xác định một hàm đặc biệt phù hợp cho quá trình áp suất không đổi. Nó được gọi là enthalpy, H được định nghĩa:

$$H = E + PV \qquad (1.2)$$

Nếu áp suất không thay đổi, chúng ta có:

$$\Delta H = \Delta E + P\Delta V = q + w + P\Delta V = q - P\Delta V + P\Delta V = q \qquad (1.3)$$

Rõ ràng ΔH tương đương với biến đổi nhiệt trong quá trình áp suất không đổi.

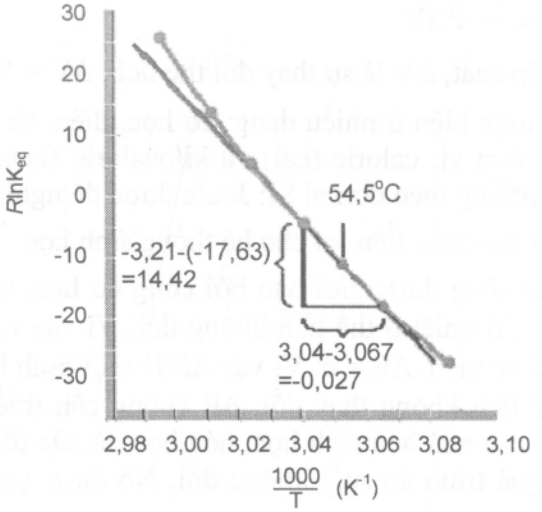
Vì các phản ứng hóa sinh thường xảy ra trong thể lỏng hoặc rắn hơn là thể khí nên thay đổi thể tích là nhỏ và enthalpy và năng lượng nội năng thường là như nhau.

Để thuận lợi khi so sánh các chỉ số nhiệt động học của các phản ứng khác nhau thì người ta xác định ở điều kiện tiêu chuẩn. Một dung dịch hoà tan ở trạng thái tiêu chuẩn, thường sử dụng đơn vị đơn giản là nồng độ 1M. Enthalpy, năng lượng nội năng và những định lượng nhiệt động học khác thường đưa ra hoặc xác định cho những điều kiện tiêu chuẩn và được ký hiệu là ΔH^0, ΔE^0...

Enthalpy thay đổi ở các quá trình hóa sinh có thể được xác định bằng việc đo nhiệt độ hấp thụ (hoặc toả ra) bằng một calorimeter.

Mặt khác, cho bất kỳ quá trình nào A ⇆ B ở trạng thái cân bằng, sự thay đổi enthalpy ở trạng thái tiêu chuẩn được xác định từ sự phụ thuộc vào nhiệt độ và hệ số cân bằng:

$$\Delta H^0 = \frac{d\,(\ln K_{eq})}{d\,(1/T)} \qquad (1.4)$$



Hình 1.1. Sự thay đổi enthapy, ΔH^0 của 1 phản ứng được xác định độ dốc của sơ đồ RlnKeq ngược với 1/T. Để minh họa phương pháp này những giá trị hai bên của 327K (54,5^{0}C) được nêu ra. Số liệu được sử dụng để tính ΔH^0 ở 54,5^{0}C

Ở đây R là hằng số khí = 8.314 J/mol K.

Ví dụ: trong sự biến tính nhiệt của protein chymotripsinogen (quá trình thuận nghịch).

Trạng thái nguyên thuỷ (N) ⇆ Trạng thái biến tính (D)

$$K_{eq} = [D] / [N]$$

John F. Brandts đo hằng số cân bằng cho sự biến tính của một số protein ở một số giá trị pH và nhiệt độ khác nhau (bảng 1.1).

Giá trị ΔH^0 có ý nghĩa gì đối với biến tính của protein? Giá trị dương của ΔH^0 biểu diễn sự bẻ gãy liên kết hydro cũng như giải phóng những nhóm ưa nước từ bên trong phân tử protein ban đầu trong quá trình biến tính, như vậy sẽ nâng năng lượng của dung dịch protein.

Bảng 1.1. Các chỉ số nhiệt động học cho sự biến tính protein

Protein (và điều kiện)	ΔH^0 kJ/mol	ΔS^0 kJ/mol.K	ΔG^0 kJ/mol	ΔG_p kJ/mol.K
Chymotrypsinogen (pH 3; 25^{0}C)	164	0,440	31	10,9
b- Lactoglobulin (5 M urea; pH 3; 25^{0}C)	-88	-0,300	2,5	9,0
Myoglobin (pH 9; 25^{0}C)	180	0,400	57	5,9
Ribonuclease (pH 2,5; 30^{0}C)	240	0,780	3,8	8,4

Định luật hai và entropy:

Định luật thứ hai của nhiệt động học được mô tả và thể hiện trong nhiều cách, bao gồm những điểm sau:

Hệ thống có xu hướng tiến từ trạng thái trật tự sang trạng thái không trật tự (tăng entropy).

Entropy của hệ thống + môi trường là không đổi bởi quá trình thuận nghịch. Entropy của hệ thống + môi trường tăng do quá trình không thuận nghịch.

Tất cả các quá trình xảy ra trong tự nhiên hướng tới trạng thái cân bằng, đó là trạng thái năng lượng nhỏ nhất.

Một số điểm của định luật 2 dẫn đến khái niệm entropy, đó là thước đo sự mất trật tự của hệ thống, trong đó trạng thái mất trật tự là trạng thái có entropy cao.

Entropy có thể được xác định theo một vài cách. Nếu W là số cách để sắp xếp thành phần của một hệ thống mà không thay đổi năng lượng nội năng hoặc enthalpy (đó là số lượng của trạng thái kính hiển vi được đưa ra ở nhiệt độ, ánh sáng và tổng vật chất). Entropy được tính:

$$S = k\ln W \qquad (1.5)$$

k là hằng số Boltzmann = $1{,}38.10^{-23}$ J/K

Định nghĩa này tiện lợi cho tính toán thống kệ, nhưng dạng phổ biến hơn liên quan entropy đến sự biến đổi nhiệt trong một quá trình là:

$$dS_{\text{thuận nghịch}} = \frac{dQ}{T} \qquad (1.6)$$

$dS_{\text{thuận nghịch}}$ là thay đổi entropy của hệ thống trong một quá trình thuận nghịch,

q là nhiệt độ được biến đổi, T là nhiệt độ ở đó sự biến đổi nhiệt xảy ra.

Định luật 3: Tại sao"0 tuyệt đối" quan trọng như vậy?

Định luật 3 của nhiệt động học nói rằng: entropy của bất kỳ chất nào hoàn toàn có trật tự, tinh thể phải tiến đến 0. Ở nhiệt độ tiến đến 0 K và T= 0 K entropy chính xác = 0. Dựa trên điều này có khả năng thiết lập một hệ thống tỷ lệ entropy tuyệt đối, số lượng

$$S = Cp\int_0^T d\ln T \qquad (1.7)$$

Cp: khả năng biến đổi nhiệt ở áp suất không đổi. Khả năng nhiệt của một chất là tổng số nhiệt của 1M có thể dự trữ khi nhiệt độ của chất đó được nâng lên 1 độ. Đối với quá trình áp suất không đổi nó được mô tả bằng toán học

$$Cp = \frac{dH}{dt} \qquad (1.8)$$

Nếu khả năng nhiệt có thể được tính ở tất cả nhiệt độ giữa 0 K và nhiệt độ nào đó, entropy tuyệt đối được tính đối với quá trình sinh học thay đổi entropy có nhiều tiện lợi hơn entropy tuyệt đối. Thay đổi entropy cho một quá trình có thể được tính nếu thay đổi enthalpy và năng lượng tự do đã biết.

Năng lượng tự do: Một giả thuyết nhưng là công cụ tiện lợi

Một câu hỏi quan trọng đối với nhà hóa học, đặc biệt đối với nhà hóa sinh học là: Phản ứng sẽ xảy ra theo hướng từ phải sang trái? Gibbs, một trong những người xây dựng nên nhiệt động học nhận thấy câu trả lời cho câu hỏi này nằm trong sự so sánh thay đổi enthalpy và thay đổi entropy ở một nhiệt độ nào đó, năng lượng tự do Gibbs được định nghĩa như sau:

$$G = H - TS \qquad (1.9)$$

Cho bất kỳ quá trình $A \leftrightarrows B$ ở nhiệt độ và áp suất không đổi.

Sự thay đổi năng lượng tự do được tính:

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S \qquad (1.10)$$

Nếu ΔG gần = 0 quá trình ở cân bằng, không đi theo hướng thuận hoặc ngược lại khi $\Delta G = 0$

$\Delta S = \Delta H/T$ và thay đổi enthalpy và entropy là cân bằng chính xác. Bất kỳ quá trình với ΔG khác 0 thực hiện tự động đến trạng thái cuối cùng có năng lượng tự do thấp. Nếu ΔG âm thì quá trình xảy ra theo hướng từ trái sang phải.

Nếu $\Delta G > 0$ phản ứng xảy ra theo hướng ngược lại (ký hiệu và giá trị của ΔG cho phép xác định quá trình sẽ xảy ra nhanh như thế nào). Nếu quá trình có ΔG âm thì quá trình tự xảy ra, nếu ΔG dương thì quá trình không tự xảy ra (hay tự xảy ra theo chiều nghịch).

Thay đổi năng lượng tự do tiêu chuẩn

Thay đổi năng lượng tự do ΔG cho bất kỳ phản ứng nào phụ thuộc vào chất tham gia phản ứng và sản phẩm phản ứng và cũng bị ảnh hưởng bởi điều kiện phản ứng kể cả nhiệt độ, áp suất, pH và nồng độ của chất phản ứng và sản phẩm.

Nếu thay đổi năng lượng tự do cho một phản ứng là nhạy cảm với điều kiện hoà tan, điều gì đặc biệt có ý nghĩa cho sự thay đổi năng lượng tự do ở trạng thái tiêu chuẩn. Để trả lời cho câu hỏi này xem xét một phản ứng giữa hai chất A và B để tạo nên sản phẩm C và D

$$A + B \rightarrow C + D \qquad (1.11)$$

Thay đổi năng lượng tự do cho nồng độ không ở trạng thái tiêu chuẩn là:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]\times[D]}{[A]\times[B]} \quad (1.12)$$

$$\frac{[C]\times[D]}{[A]\times[B]} = K_{eq}$$

Ở trạng thái cân bằng $\Delta G = 0$

Chúng ta có

$$\Delta G^0 = - RT \ln K_{eq} \quad (1.13)$$

hoặc logarit cơ số 10

$$\Delta G^0 = - 2,3\ RT/ \log_{10} K_{eq} \quad (1.14)$$

Nó được biến đổi $K_{eq} = 10^{-\Delta G/2,3\ RT}$ (1.15)

Trong bất cứ dạng nào mối liên hệ cho phép xác định thay đổi năng lượng tự do tiêu chuẩn cho bất kỳ quá trình nào nếu hằng số cân bằng được biết.

Quan trọng hơn, điều đó nói rằng cân bằng thiết lập cho một phản ứng trong dung dịch là một hàm của sự thay đổi năng lượng tự do tiêu chuẩn cho quá trình, nghĩa là ΔG^0 là cách viết khác của hằng số cân bằng.

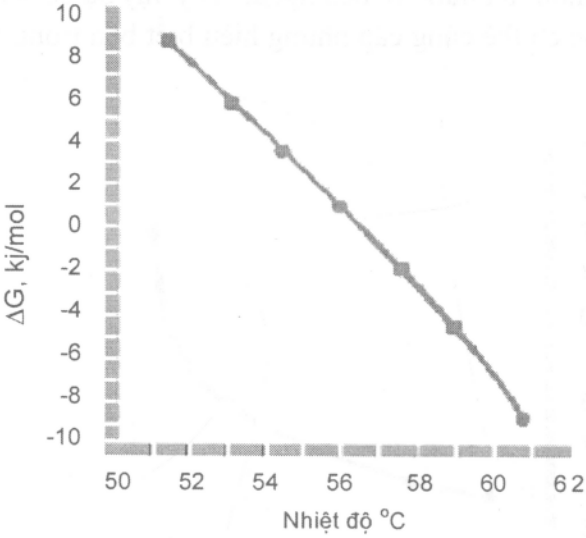
Ví dụ hằng số cân bằng xác định bởi Brandts ở một số nhiệt độ với sự biến tính của chymotrypsinogen có thể được dùng để tính sự thay đổi năng lượng tự do cho quá trình biến tính. Ví dụ hệ số cân bằng ở $54,5^0C$ là 0,27, như vậy

$$\Delta G^0 = - (8,314\ J/mol.\ K\ (327,5K)\ \ln (0,27)$$

$$\Delta G^0 = - (2,72\ kJ/mol.\ \ln (0,27)$$

$$\Delta G^0 = 3,56\ kJ/mol$$

Ký hiệu dương của ΔG^0 nghĩa là quá trình biến tính không ưu thế. Dạng gập là dạng bền của protein ở $54,5^0C$. Mặt khác độ lớn tương đối nhỏ của ΔG^0 nghĩa là dạng gập chiếm ưu thế nhỏ.



Hình 1.2 Sự phụ thuộc của ΔG^0 vào nhiệt độ trong quá trình biến tính của chymotrypsinogen ở pH = 3.

Có thể tính ΔS^0 từ ΔH^0 và ΔG^0 của sự biến tính chymotrypsin sử dụng phương trình (3.10).

$$\Delta S^0 = \frac{(\Delta G^0 - \Delta H^0)}{T} \qquad (1.16)$$

Ở 54,5^{0}C (327,5 K)

$$\Delta S^0 = -(3560 - 533{,}000 \text{ J/mol}) / 327{,}5 \text{ K}$$

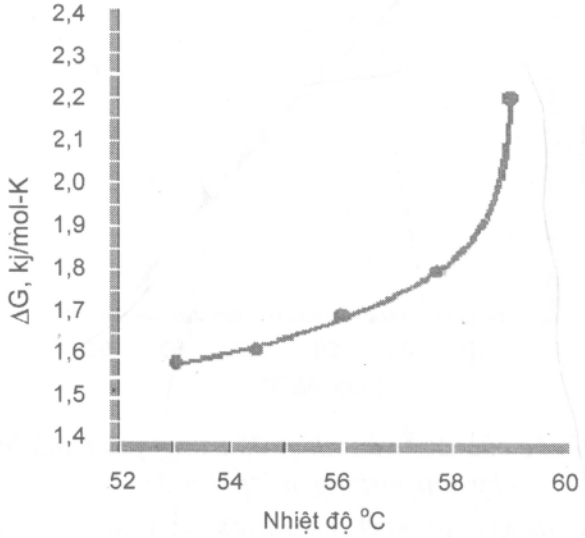
$$\Delta S^0 = 1{,}620 \text{J/mol.K}$$

Hình 1.3 biểu diễn sự phụ thuộc của ΔS^0 vào nhiệt độ biến tính của chymotrypsin ở pH = 3. Giá trị dương ΔS^0 chỉ rằng dung dịch protein đã trở nên không trật tự khi protein bị biến tính. So sánh giá trị 1,62 kJ/mol.K với giá trị ΔS^0 ở bảng 1.1 chỉ ra rằng giá trị hiện tại cho chymotrypsin ở 54,5^{0}C là hoàn toàn lớn. Ý nghĩa vật lý của chỉ số nhiệt động học cho sự biến tính của chymotrypsin sẽ rõ hơn trong phần sau.

Ý nghĩa vật lý của đặc tính nhiệt động học

Chỉ số nhiệt động học cho ta biết những hiện tượng sinh hóa gì? Cách tốt nhất để trả lời câu hỏi này là một chỉ số riêng rẽ (ví dụ ΔH hoặc ΔG) không có nhiều ý nghĩa. Một giá trị dương ΔH^0 cho sự biến tính của một protein có thể phản ánh hoặc là sự gãy các liên kết hydro trong protein hoặc

sự xuất hiện các nhóm ưa nước ra bên ngoài. Tuy vậy sự so sánh một số chỉ tiêu nhiệt động học có thể cung cấp những hiểu biết bên trong có ý nghĩa về một quá trình.



Hình 1.3 Sự phụ thuộc của ΔS^0 vào nhiệt độ trong quá trình biến tính của chymotrypsinogen

Ảnh hưởng của nồng độ đến thay đổi năng lượng tự do thực tế

Phương trình (1.12) chỉ ra rằng thay đổi năng lượng tự do đối với một phản ứng rất khác nhau so với giá trị ở trạng thái tiêu chuẩn nếu nồng độ của chất phản ứng và sản phẩm khác với nồng độ hoạt động (1M cho dung dịch).

Xem xét sự thuỷ phân của phosphocreatine:

Phosphocreatine + $H_2O \rightarrow$ Creatine + Pi

Phản ứng này toả nhiệt rất mạnh và ΔG^0 ở 37^0C là -42,8 kJ/mol

Nồng độ sinh lý của phosphocreatine, creatine và Pi thường là giữa 1 mM và 10 mM.

Giả sử nồng độ của chúng là 1 mM và sử dụng phương trình (1.12) ΔG cho thuỷ phân phosphocreatine là:

$$\Delta G = -42{,}8 \text{ kJ/M} + (8.314 \text{J/M})\,(310 \text{ K})\,\ln\frac{[0{,}001][0{,}001]}{[0{,}001]}$$

$\Delta G = -60,5$ kJ/M

Ở 37^0C sự khác nhau giữa trạng thái tiêu chuẩn và nồng độ 1 mM cho một phản ứng là khoảng -17,7 kJ/mol

Tầm quan trọng của các quá trình kết hợp trong cơ thể sống

Nhiều phản ứng cần thiết để giữ tế bào và cơ thể chống lại thế nhiệt động học theo hướng ΔG dương.

Trong đó có sự tổng hợp ATP, những phân tử cao năng khác và tạo nên gradient ion trong tất cả tế bào động vật có vú. Những quá trình này được thực hiện theo hướng bắt buộc nhiệt động học.

Khả năng tự xảy ra của nhiều quá trình gắn liền với nhau được đề cập ở phần sau của chương này. Chúng rất quan trọng trong trao đổi chất trung gian, phosphoryl hóa oxy hóa và vận chuyển qua màng.

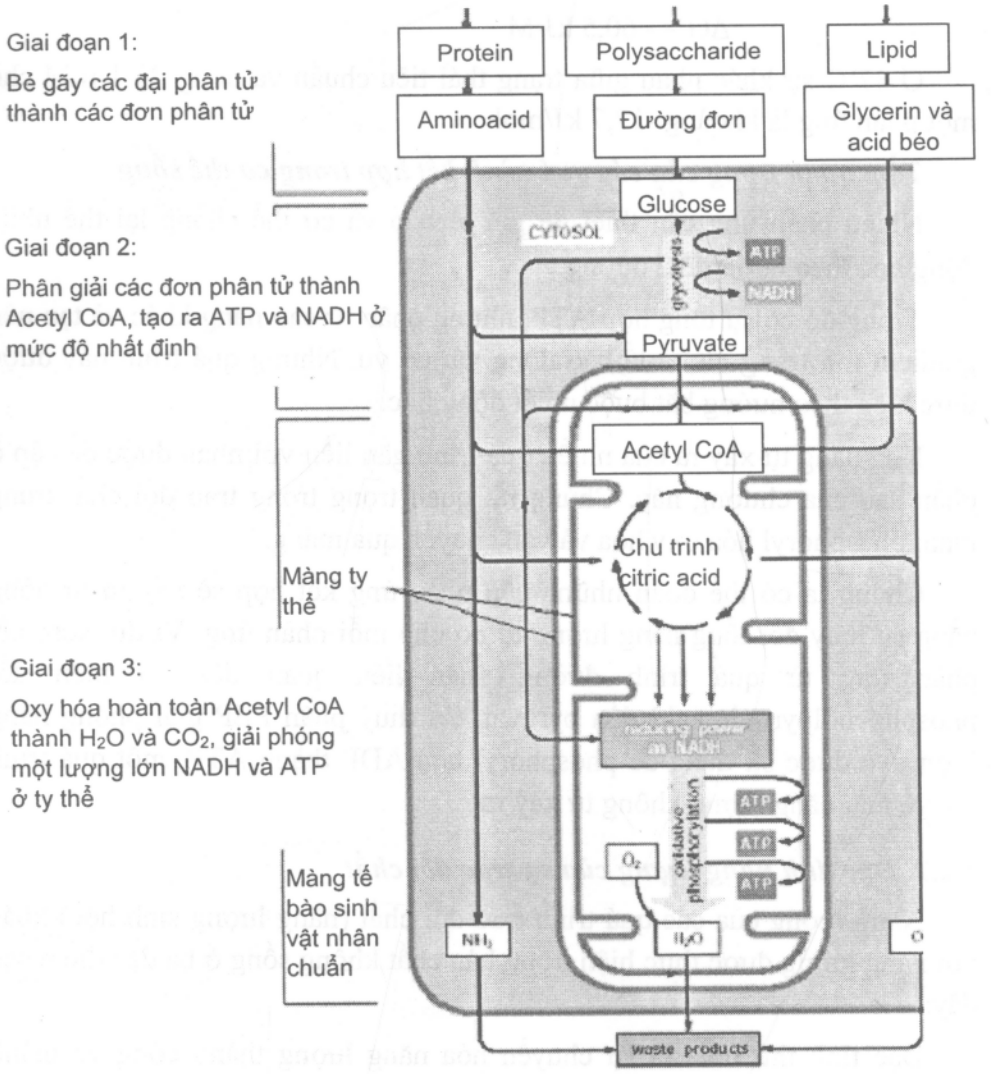
Chúng ta có thể đoán những cặp phản ứng kết hợp sẽ xảy ra tự động bằng sự thay đổi tổng năng lượng tự do cho mỗi phản ứng. Ví dụ, xem xét phản ứng từ quá trình đường phân liên quan đến sự biến đổi phosphoenolpyruvic acid đến pyruvat. Sự thuỷ phân PEP giải phóng năng lượng và được sử dụng để phosphoryl hóa ADP thành ATP, một quá trình mà về mặt năng lượng không tự xảy ra.

1.2.1. Đặc tính năng lượng của sự trao đổi chất

Năng lượng của các quá trình trao đổi chất (năng lượng sinh học) khác với năng lượng được thực hiện trong bản chất không sống ở ba đặc điểm sau đây:

Đặc tính thứ nhất là sự chuyển hóa năng lượng thành công và thành những dạng khác mà không kèm theo sự chuyển hóa sơ bộ năng lượng này thành nhiệt năng. Xuất phát từ nguyên tắc này chúng ta cần xem hệ thống sống như là một động cơ hóa động học chứ không phải là động cơ nhiệt.

Đặc tính thứ hai là việc giải phóng năng lượng trong các quá trình oxy hóa sinh học sinh ra từ từ, từng phần một, trong một chuỗi dài các quá trình kế tiếp nhau cho đến khi nào tất cả các nguyên tử hydro và cacbon đều biến thành các sản phẩm cuối cùng là CO_2 và H_2O. Ví dụ sự oxy hóa một phân tử gam đường giải phóng ra 686 kcal. Nếu năng lượng này được giải phóng ra cùng một lúc thì sẽ gây tiếng nổ và hệ thống sống không thể sử dụng toàn bộ năng lượng trong một khoảng thời gian ngắn như vậy.



Hình 1.4 Tiến trình giải phóng năng lượng hóa học trong sự trao đổi chất được chia làm 3 giai đoạn

Đặc tính thứ ba là năng lượng hóa học được giải phóng ra khi phân giải glucid, lipid và những hợp chất cao phân tử khác đều có thể được tích luỹ trong những hợp chất tích trữ năng lượng đặc thù, được gọi là hợp chất cao năng.

Tiến trình của việc giải phóng năng lượng hóa học cơ bản được chia làm 3 giai đoạn (hình 1.4):

Giai đoạn thứ nhất các hợp chất cao phân tử (tinh bột, glycogen, proteine, lipid...) bị thuỷ phân thành các chất có phân tử bé (monosaccharide, amino acid, axit béo, glycerine...). Năng lượng giải phóng ra trong giai đoạn này không đáng kể, chỉ bằng gần 1% dự trữ năng lượng tự do của các chất này được giải phóng ra dưới dạng nhiệt.

Giai đoạn thứ hai là quá trình đường phân, oxy hóa các axit béo và các amino acid. Năng lượng giải phóng ra trong giai đoạn này gần bằng 1/3 năng lượng tự do dự trữ trong các chất đó. Sản phẩm chính của giai đoạn này là acetyl-CoA, ∝-xetoglutaric acid và oxaloaxetic acid.

Giai đoạn thứ ba là oxy hóa tiếp tục các chất trên trong chu trình Krebs. Khoảng 2/3 năng lượng được giải phóng ra ở giai đoạn này.

1.2.2. Các hợp chất cao năng

Những hợp chất cao năng: Tất cả sự sống trên trái đất phụ thuộc vào năng lượng mặt trời, trong những dạng sống có một hệ thống thứ bậc về năng lượng. Một số tiếp nhận năng lượng mặt trời trực tiếp, một số khác nhận năng lượng từ nhóm trên trong những quá trình tiếp theo.

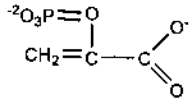
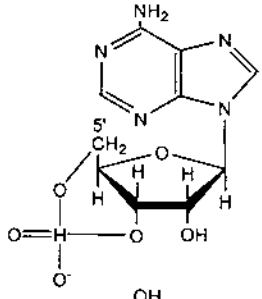
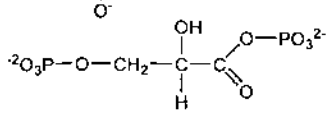
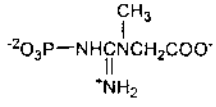
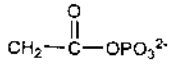
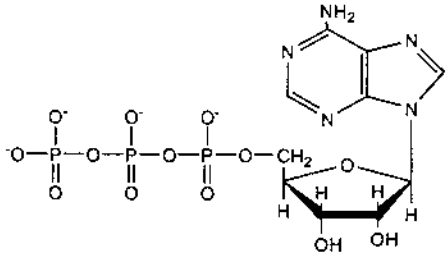
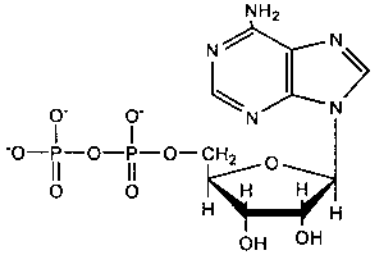
Những sinh vật hấp thu năng lượng ánh sáng trực tiếp được gọi là cơ thể tự dưỡng. Những cơ thể này dự trữ năng lượng mặt trời trong các phân tử hữu cơ khác nhau. Những sinh vật sử dụng những phân tử đó, giải phóng năng lượng dự trữ trong một loạt các phản ứng oxy hóa khử được gọi là sinh vật hóa dưỡng.

Mặc dù khác nhau cả hai loại đều có cơ chế chung về tái sinh một dạng năng lượng hóa học, năng lượng có thể được giải phóng trong những phản ứng toả nhiệt để thực hiện các quá trình sống đa dạng (cần năng lượng).

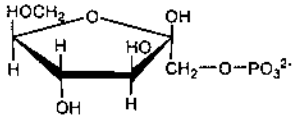
Một nhóm nhỏ các phân tử là chất trung gian chuyển năng lượng từ các phản ứng giải phóng năng lượng đến các phản ứng cần năng lượng của cơ thể. Những phân tử này là coenzyme dạng khử, những hợp chất phosphate được gọi là cao năng nếu chúng giải phóng ra năng lượng tự do có giá trị âm lớn khi thuỷ phân (ΔG^0 có giá trị âm lớn hơn -25 kJ/M).

Ở bảng 1.2 là danh sách những hợp chất cao năng quan trọng, những phân tử như phosphoric anhydric (ATP, ADP), enol phosphate (PEP), acyl phosphate (acetyl phosphate), guanidinophosphate (creatine phosphate). Cả những hợp chất thioeste, như acetyl CoA không chứa phospho nhưng giải phóng một năng lượng tự do lớn khi thuỷ phân.

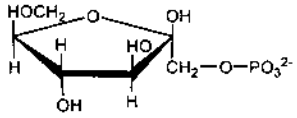
Bảng 1.2. Năng lượng tự do giải phóng khi thủy phân một số chất cao năng

Các chất ΔG^o (kJ/mol)	Công thức cấu tạo
Phosphoenolpyruvat (Pyruvate + P_i) -62,2	
3',5'-Cyclic adenosin monophosphate -50,5 (5'-AMP)	
1,3-Bisphosphoglycerate -49,6 (3-phosphoglycerate + P_i)	
Creatine phosphate -43,3 (creatine + P_i)	
Acetyl phosphate (acetate + P_i) -43,3	
Adenosine-5' triphosphate -35,7 (ADP + P_i)	
Adenosine-5' triphosphate -30,5 (ADP + P_i) (nồng độ Mg^{++} quá cao)	

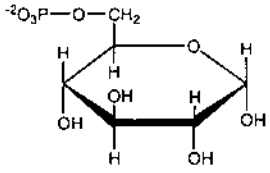
Các chất phosphate ΔG^{o} (kJ/mol) Công tức cấu tạo năng lượng thấp hơn



Glucose-1-P (glucose+ P_i) -21,0

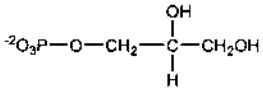


Fructose-1-P (fructose+ P_i) -16,0

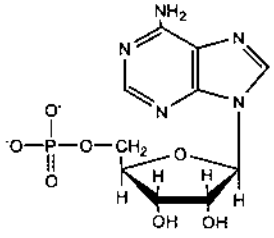


Glucose-6-P (glucose+ P_i) -13,9

Glycerol-3-P (glycerol+ P_i) -9,2



Adenosine-5' monophosphate -9,2 (adenosin + P_i)



Tổng số năng lượng chính xác giải phóng ra khi thuỷ phân phụ thuộc vào nồng độ, pH, nhiệt độ... nhưng giá trị ΔG^{0} khi thuỷ phân những hợp chất này có giá trị dương lớn hơn đáng kể so với những chất trao đổi khác.

Chúng có hai đặc điểm quan trọng:

Những chất phosphate cao năng (*high- energy phosphate compounds*) không phải là chất dự trữ năng lượng lâu dài, chúng là những chất chuyển tiếp năng lượng dự trữ, là chất mang năng lượng từ điểm này sang điểm khác, từ một hệ thống này đến một hệ thống khác.

Năng lượng hoạt hóa được cung cấp đáng kể từ ATP khi thuỷ phân nhóm γ-phosphat.

Năng lượng để làm gãy liên kết O-P_{α} thường là 200-400 kJ/M, lớn hơn đáng kể so với 30,5 kJ/M khi thuỷ phân ATP.

Các nhà hóa sinh học quan tâm nhiều đến năng lượng giải phóng thực tế.

Vai trò trung tâm của ATP trong năng lượng sinh học

ATP chứa hai pyrophosphoryl (hình 1.4). Những phân tử có liên kết anhydric, ADP, GTP, GDP và các nucleoside triphosphate khác,

nucleotide-đường như UDP-glucose và pyrophosphate vô cơ thể hiện năng lượng tự do ΔG^0 lớn khi thuỷ phân. Nguyên nhân hóa học của giá trị ΔG^0 âm lớn là do sự không bền vững của chất phản ứng do sự căng liên kết gây ra bởi sự đẩy tĩnh điện. Sự bền vững của sản phẩm phản ứng do sự ion hoá, sự cộng hưởng và những yếu tố entropy gây ra do thuỷ phân và sự ion hóa tiếp theo.

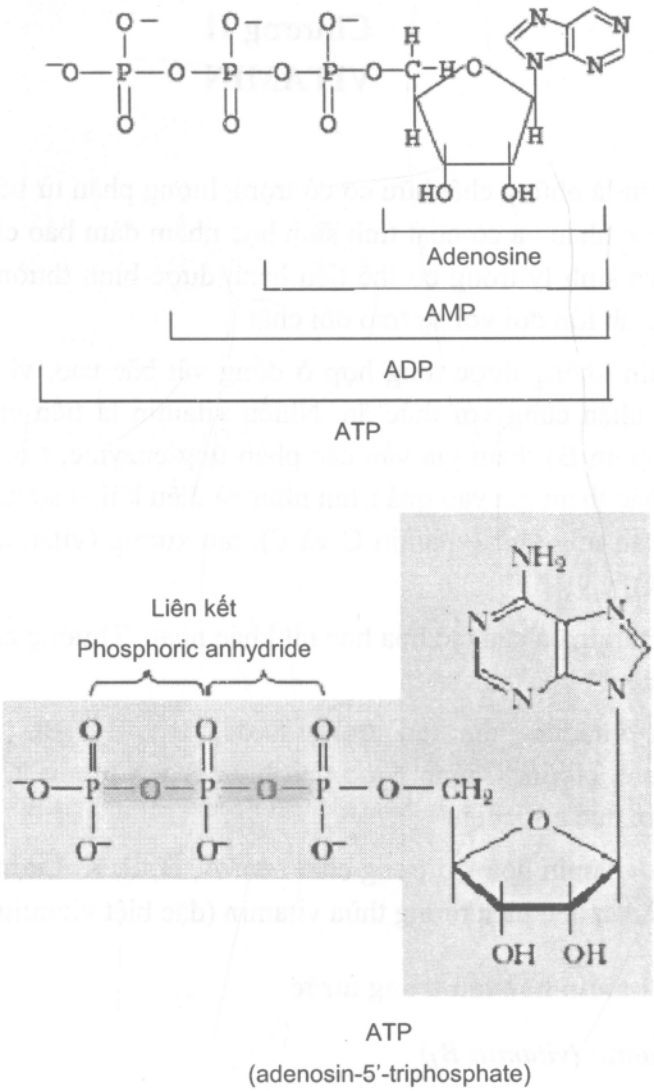
Mặc dù PEP, cyclic AMP, 1, 3 DPG, phosphocreatine, acetylphosphate và pyrophosphate đều có giá trị ΔG^0 lớn hơn, nhưng ATP là duy nhất định vị giữa các chất phosphate cao năng, (ATP được tổng hợp khi phân giải các chất hữu cơ) và các chất nhận năng lượng (khi các chất này được phosphoryl hóa để tham gia các phản ứng tiếp theo trong trao đổi chất). Nói một cách khác ATP là mắt xích nối liền hai quá trình ngược nhau, là đồng hóa và dị hoá.

Việc hình thành tất cả các hợp chất cao năng khác cũng xảy ra do sự tiêu phí năng lượng vốn tích luỹ trong ATP.

ADP có thể nhận cả phosphate và năng lượng từ các phosphate cao năng.

ATP cho cả gốc phosphate và năng lượng đối với các phân tử có năng lượng thấp. Như vậy ATP có vai trò dự trữ năng lượng cũng như tiêu hao năng lượng.

Xét về cơ chế biến đổi và chuyển hóa năng lượng trong sự phân giải ATP và các hợp chất cao năng tương tự ATP ta thấy năng lượng cần thiết để thực hiện phản ứng hóa học được giải phóng ra ở một điểm, có thể được chuyển đến một điểm khác, ở đây năng lượng được sử dụng một cách trực tiếp. Điều này có nghĩa là trong cơ thể sống không nhất thiết phải tiếp xúc với nhau bằng cách va chạm (đặc trưng cho ngoài cơ thể sống) giữa các phân tử cho và nhận năng lượng.



Hình 1.5 Chuỗi ba gốc phosphat của ATP chứa 2 liên kết pyrophosphat, cả hai liên kết này giải phóng nhiều năng lượng khi thuỷ phân

Chương II
VITAMIN

Vitamin là những chất hữu cơ có trọng lượng phân tử bé, có cấu tạo hóa học rất khác nhau và có hoạt tính sinh học nhằm đảm bảo cho các quá trình hóa sinh và sinh lý trong cơ thể tiến hành được bình thường, và do đó, có ảnh hưởng rất lớn đối với sự trao đổi chất.

Vitamin không được tổng hợp ở động vật bậc cao, vì vậy chúng phải được tiếp nhận cùng với thức ăn. Nhiều vitamin là tiền chất của cofactor (vitamin nhóm B) tham gia vào các phản ứng enzyme, trong khi đó những vitamin khác tham gia vào quá trình nhìn và điều khiển sự sao chép (vitamin A), các phản ứng khử (vitamin C và E), tạo xương (vitamin D), đông máu (vitamin K), v.v...

Các vitamin có cấu tạo hóa học rất khác nhau. Thường chúng được phân loại dựa vào độ hoà tan:

Nhóm vitamin hoà tan trong nước: B_1, B_2, B_6, B_{12}, C, folate, pantothenate, biotin. Chúng được tích luỹ chỉ với lượng ít. Lượng dư thừa được thải ra qua nước tiểu.

Nhóm vitamin hoà tan trong chất béo: A, D, E, K. Lượng dư thừa được tích lũy và dẫn đến hiện tượng thừa vitamin (đặc biệt vitamin A và E).

2.1. Các vitamin hoà tan trong nước

2.1.1. Thiamin (vitamin B_1)

Thiamin được pyrophosphoryl hóa thành coenzyme thiaminpyrophosphate (TPP), tham gia xúc tác phản ứng khử carboxyl hóa bằng cách oxy hóa và phản ứng chuyển nhóm aldehyd hoạt hoá. Phản ứng này đóng một vai trò quan trọng trong trao đổi chất.

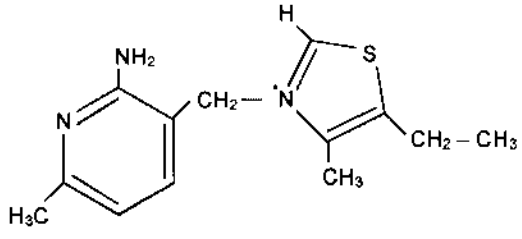
TPP là nhóm prostetic của pyruvat-dehydrogenase, pyruvat-decarboxylase, 2-oxoglutarat-dehydrogenase và transcetolase và như vậy nó tham gia vào quá trình đường phân, chu trình citrate, pentose-phosphate và Calvin.

a. Decarboxylase: xúc tác cho phản ứng loại nhóm carboxyl của pyruvic acid, α-cetoglutaric acid.
b. Transcetolase: xúc tác cho phản ứng vận chuyển glycoaldehyd (CH_2OH-CO-). Ví dụ phản ứng chuyển đoạn 2C (C_1 và C_2) của xylulose 5-phosphate đến ribose 5-phosphate tạo thành sedoheptulose 7-phosphate và glyceraldehyd-3-phosphate.

Sinh tổng hợp

Hai thành phần của thiamine là pyrimidine và thiazol được tổng hợp riêng và sau đó được kết hợp lại với nhau. Các đường hướng tổng hợp là khác nhau ở sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn.

Trong *E.coli* và *S.thyphimurium* 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazol (AIR) là tiền chất của pyrimidine. Ở *E.coli* pyruvat và D-glyceraldehyd là các tiền chất của thiazol. Chúng lắng kết thành 1-desoxy-D-xylulose, chất này được gắn các nguyên tử C 4', 4, 5, 6, 7. Nguồn gốc của C_2 và N_3 là tyrosine, nguyên tử S bắt nguồn từ cysteine. Pyrophosphatester của thành phần pyrimidine tham gia vào phản ứng gắn. Bằng một phản ứng pyrophosphoryl hóa vitamin được chuyển thành coenzyme.



Thiamin (vitamin B_1)

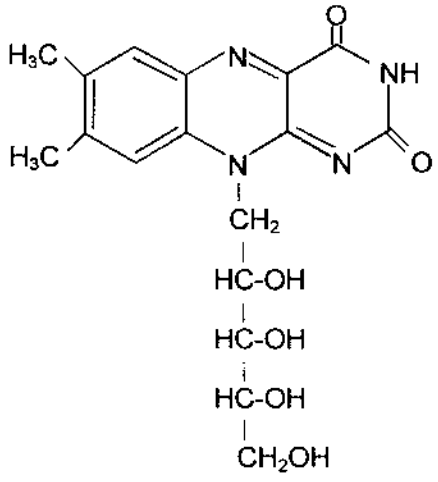
B_1 có nhiều trong cám gạo, gan, thận,... Mầm ngũ cốc và nấm men là nguồn rất giàu vitamin này.

Cơ thể người hàng ngày cần 1-1,5 mg vitamin B_1. Thiếu vitamin này ảnh hưởng đến quá trình trao đổi carbohydrate dẫn đến bệnh phù thủng, hay còn gọi là bệnh beri-beri, rối loạn thần kinh và ảnh hưởng đến chức năng của tim. B_1 chỉ bền với nhiệt trong môi trường acid, còn trong môi trường kiềm nó bị phân huỷ nhanh chóng khi đun nóng. Khi oxy hóa B_1 chuyển thành một hợp chất gọi là thiocrome phát huỳnh quang. Tính chất này được sử dụng để định lượng vitamin B_1.

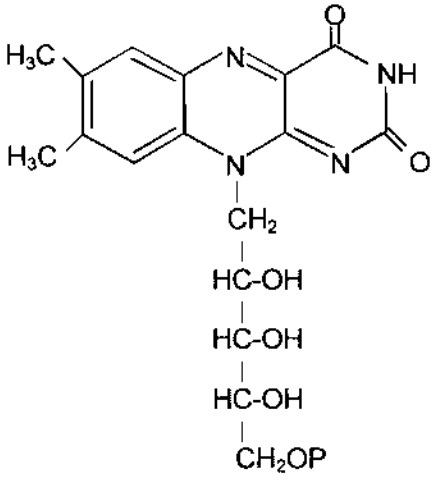
Hàm lượng B_1 trong nguyên liệu có thể thay đổi tuỳ thuộc điều kiện bảo quản và chế biến. Ví dụ: gạo xát kỹ hàm lượng B_1 bị giảm 4 lần so với ban đầu. Độ ẩm khi bảo quản nguyên liệu (thóc, gạo) càng cao, hàm lượng vitamin B_1 bị giảm càng mạnh.

2.1.2. Riboflavin (vitamin B_2)

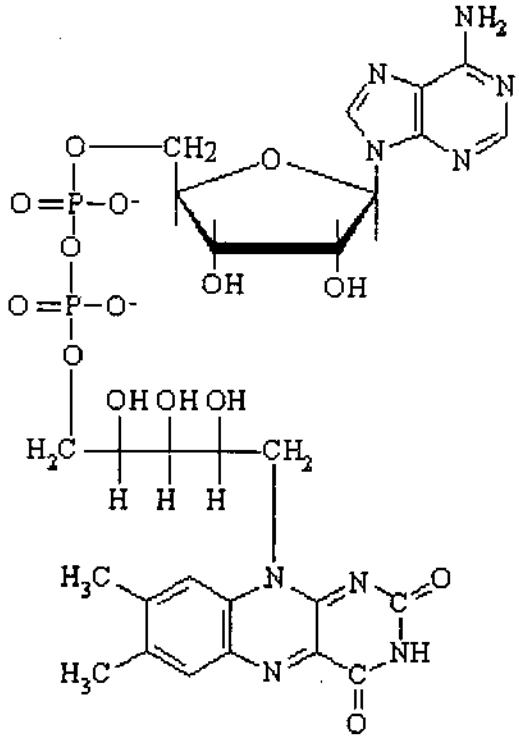
Trước kia B_2 được gọi là lactoflavin vì lần đầu tiên được tách ra từ sữa. Bên cạnh nicotinamid-nucleotide NAD^+ và $NADP^+$ flavin-nucleotide FAD và FMN là những nhóm vận chuyển hydro quan trọng. Chúng tham gia hơn 100 phản ứng oxy hóa khử. Ví dụ, quá trình khử carboxyl hóa bằng cách oxy hóa pyruvic acid, oxy hóa acid béo, khử amin hóa bằng cách oxy hóa amino acid... Coenzyme này được tạo nên từ riboflavin bằng phosphoryl hóa (FMN) và tiếp theo adenyl hóa (FAD).



Riboflavin (vitamin B_2)



Flavinmononucleotide (FMN)

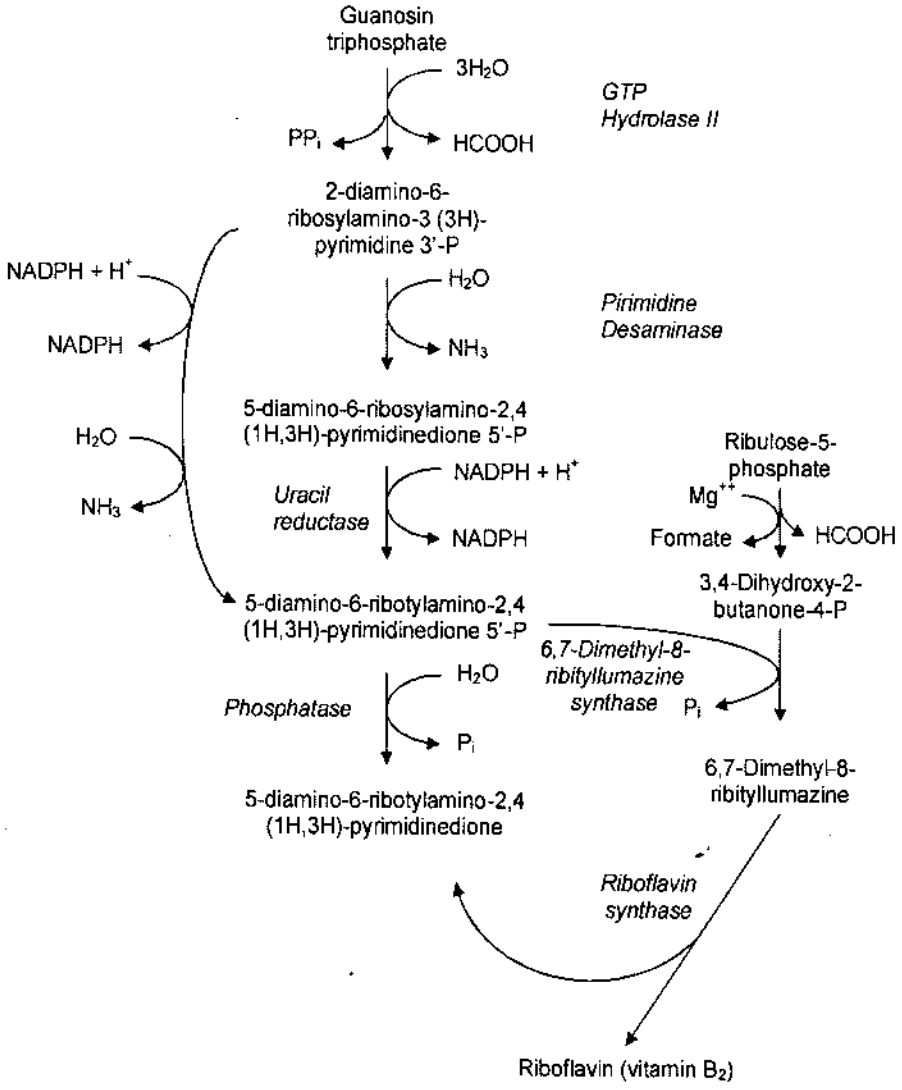


FAD

Sinh tổng hợp và biến đổi

Riboflavin được tạo nên từ GTP và ribulose-5-P trong thực vật, nấm men và nhiều vi sinh vật.

Phản ứng tổng hợp bắt đầu bằng việc mở vòng imidazol của GTP và tách ra một gốc pyrophosphate. Bằng phản ứng khử amin hoá, phản ứng khử và tách ra gốc phosphate còn lại làm xuất hiện 5-amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidindion. Phản ứng của chất này với 3,4-dihydroxy-2-butanon-4-P (chất này xuất hiện từ ribulose-5-P) tạo nên phân tử có hai vòng 6,7 dimethyl-8-ribityllumazin. Hợp chất này kết hợp với 5-amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidindion thành riboflavin. Phosphoryl hóa riboflavin tạo nên flavinmononucleotide (FMN). Bằng phản ứng adenyl hóa tiếp theo làm xuất hiện flavin-adenin-dinucleotide (FAD). Sự phosphoryl hóa riboflavin ở động vật được điều khiển chính xác bằng hormone tuyến giáp trạng.



Thiếu vitamin B_2 ảnh hưởng đến quá trình oxy hóa khử làm ảnh hưởng đến quá trình tạo năng lượng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của cơ thể. Thiếu vitamin gây ra những rối loạn về sinh trưởng và các bệnh về da. Tuy nhiên những bệnh này tương đối hiếm.

Nhu cầu vitamin B_2 hàng ngày của người lớn khoảng 1,4 - 2 mg. Sản phẩm phân giải và sản phẩm thải ra ở người là riboflavin. Các bước phân giải khác (đặc biệt ở vi khuẩn) là hydroxyl hóa các gốc methyl và làm ngắn chuỗi ribityl.

Chức năng hóa sinh

Chức năng oxy hóa khử của FMN và FAD là do vòng isoalloxazin chịu trách nhiệm. Ở một phản ứng khử hoàn toàn hai điện tử và hai proton được tiếp nhận.

Dạng oxy hóa của riboflavin là những tinh thể vàng da cam, hấp thụ ở bước sóng 370 và 450 nm. Dạng khử của nó không màu và mất tính hấp thụ ở 450 nm. Các coenzyme flavin nucleotide dạng khử cũng có thể bị oxy hóa trở lại khi có các chất nhận điện tử như xanh methylen, 2,6-diclorophenolindophenol

$FADH_2$ + xanh methylen → FAD + xanh methylen

(dạng oxy hóa màu xanh) (dạng khử không màu)

Có thể sử dụng các tính chất trên để theo dõi các phản ứng do flavin dehydrogenase xúc tác.

Tinh thể vitamin B_2 ở dạng khô tương đối bền với nhiệt hơn vitamin B_1, tuy nhiên vitamin này không bền dưới tác dụng của ánh sáng. Ngược với vitamin B_1, hàm lượng vitamin B_2 trong gạo, thịt, trứng, sữa biến đổi không nhiều trong quá trình bảo quản và chế biến.

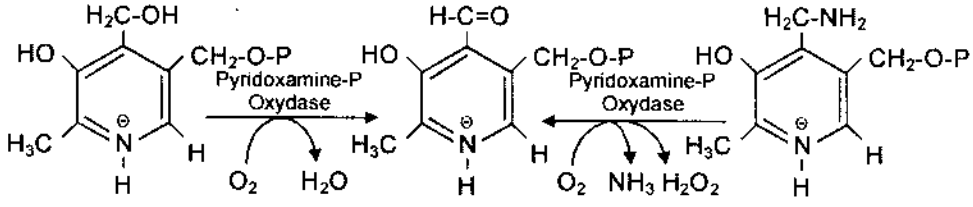
2.1.3. Pyridoxin (vitamin B_6)

Pyridoxin (pyridoxol), pyridoxal và pyridoxamine tạo nên nhóm vitamin B_6. Cả 3 dạng này dễ dàng chuyển hóa lẫn nhau. Dẫn xuất của vitamin B_6 là pyridoxalphosphate (PLP) là coenzyme của nhiều enzyme. Pyridoxal- và pyridoxamin-phosphate là coenzyme quan trọng cùng tác động ở một số lớn các phản ứng biến đổi amino acid, ví dụ ở phản ứng transaminase, decarboxylase và dehydratase. Vitamin B_6 cũng là thành phần cấu tạo của phosphorylase xúc tác cho phản ứng phân giải glycogen. Ngoài ra vitamin B_6 còn có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp NAD^+, coenzyme A... Do đó thiếu vitamin này ảnh hưởng đến nhiều quá trình trao đổi proteine, saccharide, lipid, dẫn đến rối loạn về thần kinh và trao đổi amino acid.

Sinh tổng hợp và biến đổi

Một số vi khuẩn, nấm men và thực vật tổng hợp được pyridoxine. Động vật nhai lại cũng không cần có vitamin B_6 trong thức ăn vì vi sinh vật trong ruột của chúng có thể tổng hợp vitamin này để cung cấp cho động vật chủ. Các động vật khác cần phải được cung cấp vitamin này từ bên ngoài.

Sản phẩm ngưng tụ của pyruvate và D-glyceraldehyd là 1-desoxy-D-xylulose cung cấp nguyên tử C 2', 2, 3, 4 và 4'. Erythrose 4-P được biến đổi thành 4-hydroxy-L-threonine. Hợp chất này cung cấp nguyên tử C 5', 5, 6 và N-1. Pyridoxine điều khiển quá trình tổng hợp bằng ức chế ngược. Loại hydro của pyridoxine thành pyridoxal cho đến nay chỉ được quan sát thấy trong vi khuẩn.



Ở động vật pyridoxine, pyridoxal và pyridoxamine sau khi hấp thụ được phosphoryl hóa nhờ enzyme kinase. Kinase này bị ức chế bằng sản phẩm của nó. Bằng phản ứng oxy hóa pyridoxinephosphate và pyridoxaminephosphate biến đổi thành pyridoxalphosphate. Phản ứng này cũng bị ức chế bằng sản phẩm của nó.

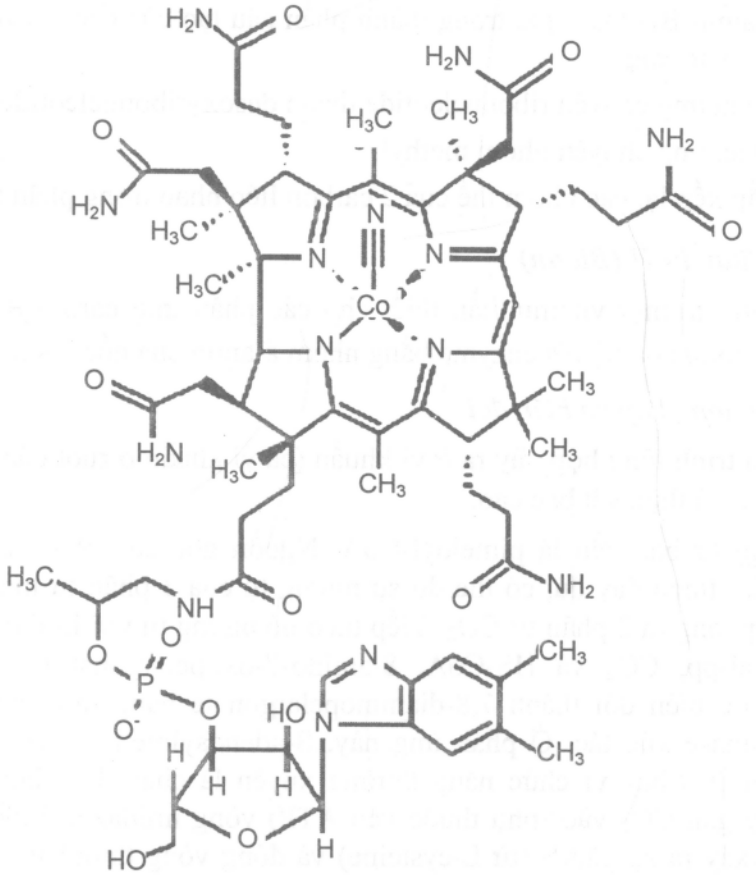
Lượng bổ sung hàng ngày cần thiết ở người lớn khoảng 2 mg. Sự phân giải bắt đầu bằng phản ứng do phosphatase xúc tác. Sự phân giải tiếp theo của vitamin này thực hiện bằng một phản ứng oxy hóa để tạo thành carbonic acid-4-pyridoxat, chất không có hoạt tính sinh học.

2.1.4. Cobalamin (vitamin B_{12})

Cobalamin là một trong những phân tử sinh học không trùng hợp lớn nhất. Nguyên tử coban ở trung tâm gắn liên hợp với 6 thành phần: Bốn thành phần là pyrrol của vòng corrin, một thành phần là nucleotide bất thường dimethylbenzimidazol và thành phần thứ sáu có thể là gốc hydroxyl (vitamin B_{12}), gốc methyl (methylcobalamin), hoặc gốc 5'-desoxyadenosyl (desoxyadenosylcobalamin, coenzyme B_{12}). Dạng vitamin B_{12} trên thị trường: thành phần thứ 6 là một gốc cyanid.

Sinh tổng hợp coenzyme và phản ứng khử vitamin

Coenzyme B_{12} được tổng hợp nhiều bước trong vi sinh vật. Bước thứ nhất giống nhau giữa hem và chlorophyll. Những phản ứng tiếp theo có nhiều biến đổi.



Cobalamin

Sau nhiều bước methyl hóa vòng porphyrin biến thành vòng corrin. Sau nhiều lần methyl hóa tiếp theo và amid hóa Co^{++} được đưa vào và được khử thành Co^{+}, rồi kết hợp với adenosine. Tiếp theo α-ribazol được gắn vào qua một cầu propionate-aminpropanol và tạo nên thành phần thứ 6 của Co. Co nằm trong phức hệ liên hợp là Co^{+++}. Ở động vật có vú nhu cầu B_{12} (ở người < 10 μg/ngày) được đáp ứng do vi khuẩn ở ruột.

Để hấp thu vitamin B_{12} từ ruột cần protein đặc hiệu (50 kDa). Nếu thiếu loại protein này sẽ dẫn đến hiện tượng thiếu vitamin B_{12} trầm trọng (thiếu máu ác tính). Để vận chuyển trong máu B_{12} liên kết với nhiều plasmglobulin khác nhau, được gọi là transcobalamin. Phần lớn B_{12} được tiếp nhận ở dạng oxy hóa (hydroxy-cobalamin, Co^{+++}). Sau hai bước phản ứng xuất hiện trở lại dạng desoxyadenosyl (coenzyme B_{12}).

Vitamin B_{12} tham gia trong thành phần cấu tạo của các enzyme xúc tác cho các phản ứng:

- Phản ứng chuyển ribonucleotide thành desoxyribonucleotide
- Phản ứng chuyển nhóm methyl
- Sắp xếp lại các nhóm thế của 2 carbon liền nhau trong phân tử.

2.1.5. Vitamin H (Biotin)

Biotin là một vitamin cần thiết cho các phản ứng carboxyl hoá, được gắn kết đồng hóa trị với enzyme bằng nhóm ε-amin của gốc lysine.

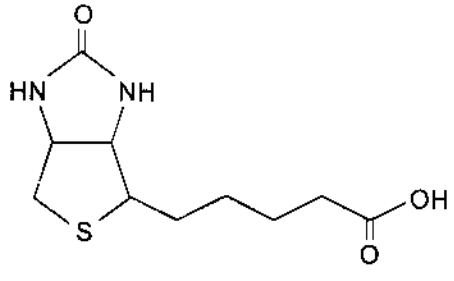
Sinh tổng hợp và biến đổi

Quá trình tổng hợp xảy ra ở vi khuẩn (cả vi khuẩn ở ruột của động vật), nấm men và thực vật bậc cao.

Phân tử ban đầu là pimeloyl-CoA. Nguồn gốc của phân tử này chưa được giải thích đầy đủ, có thể do sự ngưng tụ của 3 phân tử malonyl-CoA và giải phóng ra 2 phân tử CO_2. Tiếp theo nó ngưng tụ với L-alanine tách ra pyridoxal-pp, CO_2 và HS-CoA. 8-amino-7-oxopelargonat (7-KAP) xuất hiện được biến đổi thành 7,8-diaminopelargonate bằng một phản ứng do transaminase xúc tác. Ở phản ứng này, S-adenosylmethionine là chất cho nhóm amin (thay vì chức năng thường xuyên là chất cho nhóm methyl). Bằng sự gắn CO_2 vào (phụ thuộc vào ATP) vòng imidazol được đóng lại. Sau đó xảy ra sự gắn S (từ L-cysteine) và đóng vòng thiophan. Kết quả là tạo nên (+)-Biotin.

Sự gắn kết biotin vào enzyme tương ứng cần hoạt hóa bởi ATP, được xúc tác bằng enzyme đặc hiệu biotin-ligase.

Người lớn cần 100-200 μg/ngày. Biotin có trong nhiều thực phẩm và được tổng hợp bởi vi khuẩn đường ruột, vì vậy ít khi bị bệnh thiếu vitamin này trừ khi ăn nhiều trứng sống có nhiều avidin kết hợp rất chặt với biotin, ngăn cách việc hấp thu nó qua ruột non.



Biotin

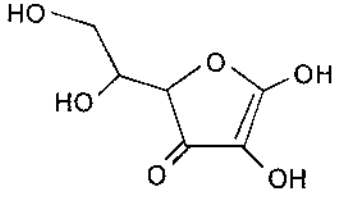
Phân giải bằng vi khuẩn

Pseudomonas có thể làm ngắn chuỗi bằng β-oxy hóa và nguyên tử C của vòng thiophan được tách ra. Gốc của vòng imidazol được thải ra ở nước tiểu. Động vật có vú chỉ có thể tách chuỗi bên và tạo nên hợp chất sulfoxid. Tuy nhiên thành phần chính của biotin được thải ra ở dạng không biến đổi.

2.1.6. Ascorbate (vitamin C)

Vitamin C tham gia vào nhiều phản ứng biến đổi chất và thường có chức năng bảo vệ.

Sinh tổng hợp và trao đổi chất



Vitamin C

Thực vật bậc cao, tảo, nấm men và phần lớn động vật có thể tổng hợp ascorbate. Một số động vật có vú (người) cũng như côn trùng, phần lớn các loài cá không có khả năng này. Ở những động vật có vú cần cung cấp vitamin C, vì thiếu enzyme L-Gu-ionolacton-oxidase.

Sinh tổng hợp ở động vật và phần lớn thực vật từ D-glucose và đi qua UDP-glucose, UDP-glucuronate, D-glucuronate, L-gulonate, L-gulonolacton và 2-dehydro-L-gulonolacton. Vitamin C là sản phẩm oxy hóa của các đường. Nó được tổng hợp từ glucose (ở động vật và thực vật), từ galactose (ở một số thực vật). Phân tử vitamin C có chứa en-điol, dễ dàng bị loại hydro tạo thành dehydroascorbic acid (cũng có hoạt tính vitamin C). Vitamin C mất hoạt tính khi vòng lacton bị thuỷ phân. Trong tự nhiên, vitamin C có thể tồn tại ở dạng liên kết với các chất khác, gọi là ascorbigen là dạng dự trữ vitamin C quan trọng. Vitamin C hoà tan tốt trong nước, dung dịch có vị acid, có tính hoạt quang và có tính khử mạnh. Ascorbic acid có khả năng khử dung dịch Fehling, $AgNO_3$. Có thể sử dụng tính chất này để định lượng ascorbic acid. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng vitamin này làm chất chống oxy hóa trong công nghiệp thực phẩm.

Ascorbate đi vào cùng thức ăn được vận chuyển đến các cơ quan khác nhau. Ở một số cơ quan sự tiếp nhận là một quá trình chủ động, được kích

thích bởi insulin. Nồng độ ascorbate cao nhất tìm thấy ở nang trên thận, não thuỳ, mắt, gan, dạ dày và não. Bệnh hoại huyết ở người được ngăn ngừa khi tiếp nhận 10mg ascorbate/ngày. Người hút thuốc và người có thai cần nhiều ascorbate hơn. Người ta khẳng định rằng, một liều lượng cao ascorbate tăng cường hệ thống miễn dịch, giảm sự mệt mỏi và nguy cơ bệnh ung thư. Tuy nhiên sự phân giải ascorbate xảy ra mạnh mẽ, vì vậy khi lượng cần hàng ngày là 50 mg thì cần đưa vào cơ thể là 1 500 mg.

Vitamin C có nhiều trong rau quả tươi, đặc biệt là các loại: cam, chanh, dưa chuột... Vitamin C tham gia trong nhiều quá trình quan trọng của cơ thể sống như:

- Quá trình hydroxyl hóa do oxygenase. Ví dụ hydroxyl hóa proline, lysine trong phân tử collagen. Thiếu vitamin C, collagen mới được tạo thành không được hydroxyl hoá, không tạo được dạng xoắn ba nên có độ bền kém, do đó da bị tổn thương và thành mạch máu mỏng manh dễ bị vỡ, gây ra bệnh hoại huyết. Vitamin C tham gia trong quá trình chuyển hóa protocollagen thành collagen nên có tác dụng làm cho vết thương chóng thành sẹo

- Vận chuyển hydro trong quá trình oxy hóa - khử ở thực vật

- Làm tăng tính đề kháng của cơ thể đối với những điều kiện không thuận lợi của môi trường ngoài, các độc tố nhiễm trùng. Ngoài ra vitamin C còn tham gia trong nhiều quá trình tổng hợp, chuyển hóa các chất khác nhau.

- Duy trì cân bằng giữa các ion Fe^{2+} /Fe^{3+}, Cu^{+} /Cu^{2+}

Phân giải và sự loại thải

Ở loài linh trưởng (primat) một phần ascorbate tồn tại trong cơ thể được thải ra ngoài ở dạng không biến đổi qua nước tiểu. Những sản phẩm loại thải khác là oxalate và dioxogulonate (xuất hiện từ dehydroascorbate bằng một phản ứng không thuận nghịch và không xúc tác). Ascorbate có thể được oxy hóa hoàn toàn thành CO_2.

2.2. Các vitamin hoà tan trong chất béo

2.2.1. Retinol (vitamin A)

Vitamin A là tên thường gọi cho rượu retinol, aldehyd retinal và retinic acid, chúng là những isoprenoide có đặc tính lipid. Chúng tồn tại ở các dạng đồng phân cis và trans khác nhau.

Sinh tổng hợp và biến đổi

Tiền chất để tổng hợp vitamin là provitamin β-carotene, sự tổng hợp chúng xảy ra trong thực vật. Động vật có thể tách carotene thành retinal, bằng một phản ứng dioxygenase (xảy ra ở trong ruột) và sử dụng nó như là vitamin.

Vitamin A được hấp thụ vào cùng với chất béo và được tích luỹ ở dạng retinylpalmitat trong gan sau khi khử và ester hoá. Để vận chuyển đến những cơ quan khác nhau ester được thuỷ phân và retinol được đưa vào máu, ở đó nó được tiếp nhận bằng một protein kết hợp đặc hiệu với retinol. Sự biến đổi giữa retinol, retinal và retinic acid được thực hiện bằng những phản ứng phụ thuộc $NADP^+$.

Carotene được đưa vào cùng với thức ăn của người có nguồn gốc trước hết là từ thực vật, trong khi retinol có nguồn gốc động vật (dầu gan cá thu). Nhu cầu hàng ngày đối với người lớn là khoảng 1 mg retinol hoặc 6 mg β-carotene. Thiếu vitamin A rất phổ biến ở nhóm dân số suy dinh dưỡng, dẫn đến chứng quáng gà, ức chế sự phát triển của xương và sự phân hóa mô biểu bì, hạn chế sự phát triển và chức năng sinh sản.

Chức năng hóa sinh

Retinic acid là một chất điều hoà sao chép. Sau khi đi qua màng tế bào phân tử này kết hợp với chất nhận đặc hiệu: all-trans-retinic acid với RAR-receptor, 9-cis retinic acid với RXR-receptor. Sau đó phức hệ retinic acid - RAR-RXR kết hợp với hormone được tạo ra từ DNA ở trong nhân.

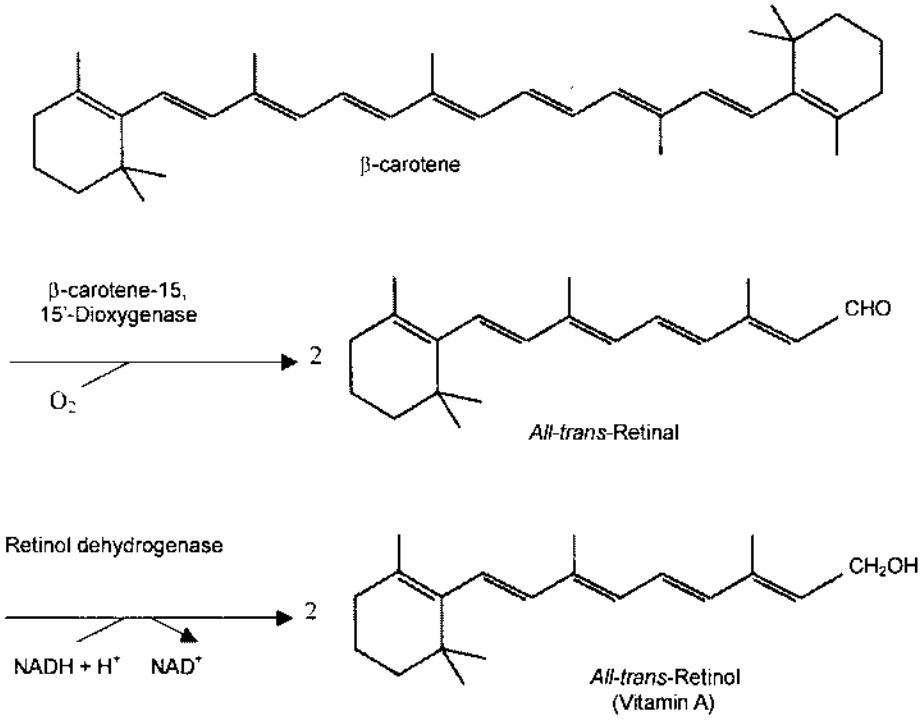
Thuộc những gen được điều khiển theo cách này là gen mã hóa cho protein kết hợp với retinol, enzyme PEP-carboxylase và apolipoprotein A_1. Retinic acid cũng tham gia vào sự điều khiển sự phát sinh phôi và phát sinh hình thái (ở liều lượng nhỏ vitamin A trong thời gian có thai là nguyên nhân gây quái thai), phát triển, phân hóa và khả năng sinh sản.

Sự biến đổi từ 11-cis thành all-cis-retinal nhờ ánh sáng là cơ sở cho quá trình nhìn ở động vật. Trong vitamin nhóm A có 2 dạng quan trọng là vitamin A_1 và A_2. Vitamin A_2 khác với A_1 ở chỗ trong vòng có thêm một nối đôi giữa C_3 và C_4. Dưới tác dụng của enzyme retinoldehydrogenase nhóm alcol của vitamin A dễ dàng bị oxy hóa đến aldehyd (all-cis-retinal, vẫn có hoạt tính vitamin A). Liên kết đôi giữa C_{11} và C_{12} của retinal có thể chuyển thành dạng cis (11-cis-retinal), 11-cis-retinal kết hợp với protein opxin tạo nên sắc tố của mắt là rodopxin. Đây là protein nhận ánh sáng

(photoreceptor protein) có trong tế bào hình que của màng lưới mắt người và động vật có vú. Tế bào này hoạt động trong ánh sáng yếu, thích nghi với bóng tối. Khi có ánh sáng, nhóm thêm của rodopxin chuyển từ dạng cis sang dạng trans nên mất khả năng kết hợp với opxin. Ngược lại trong tối sẽ tái tạo lại dạng 11-cis-retinal và rodopxin được tổng hợp trở lại, làm tăng độ nhạy cảm của mắt trong ánh sáng yếu.

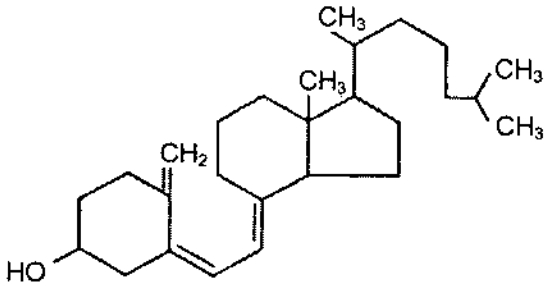
Halobacterium sử dụng sự biến đổi từ all-trans thành 13-cis-retinal nhờ ánh sáng làm động lực cho những bơm proton của chúng.

Retinylphosphate tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các glycosaminoglycane ở trong các tế bào biểu bì, ở đây nó có chức năng tương tự như dolicholphosphate. Bằng cách này nó tham gia gián tiếp vào sự toàn vẹn của màng tế bào và ty thể, ổn định biểu bì của da và của màng nhầy và giảm những rối loạn về phát triển.



2.2.2. Calciferol (vitamin D)

Ở động vật bậc cao những sản phẩm hydroxyl của vitamin D đóng một vai trò trung tâm trong trao đổi calcium.



Cholecalciferol
(Vitamin D_3)

Thực tế khái niệm "vitamin D" là gồm một nhóm các chất họ hàng, khác nhau về nguồn gốc. Nếu nói chặt chẽ thì chúng không phải là vitamin, vì da có thể tổng hợp một trong chúng (D_3) từ một steroid (7-Dehydrocholesterin, provitamin D) khi có ánh sáng tử ngoại.

Sinh tổng hợp và sự biến đổi

Các vitamin D khác nhau được tạo nên từ $\Delta^{5,7}$-steroid (sản phẩm trung gian để tổng hợp zoo-, phyto- và mycosteroid) bằng việc mở vòng B nhờ ánh sáng. Chúng chỉ khác nhau ở các mạch bên. Hai vitamin D đầu tiên sau đây là quan trọng nhất:

- Vitamin D_2 (ergocalciferol): tạo nên từ ergosterin, chất này tồn tại ở trong thực vật và nấm.
- Vitamin D_3 (cholecalciferol): tạo nên từ 7-dehydrocholesterin, chất này có trong động vật bậc cao.
- Vitamin D_4: xuất hiện từ 22-dihydroergosterin, có trong thực vật và nấm
- Vitamin D_5: tạo nên từ 7-dehydrositosterin, có trong thực vật.

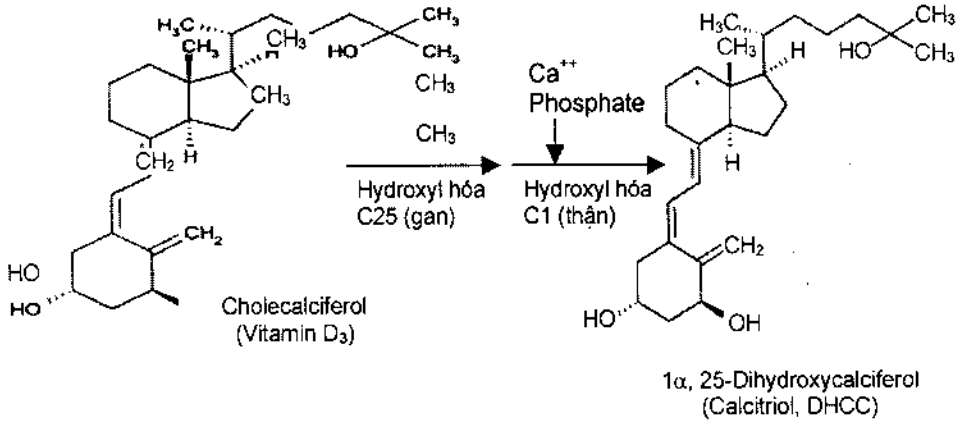
Tổng hợp nội sinh

Trong phản ứng đầu tiên khi chiếu ánh sáng tử ngoại dẫn đến sự đồng phân hóa, đồng thời với việc mở vòng B của cấu trúc sterin, làm xuất hiện provitamin D. Độ dài bước sóng thích hợp nhất cho quang phản ứng là 295 nm. Chiếu sáng với bước sóng lớn hơn sẽ tạo lumisterin, với bước sóng ngắn hơn tạo tachysterin. Ở ánh sáng mạnh hơn xuất hiện suprasterin I và II. Vitamin D được tạo nên do sự đồng phân hóa phụ thuộc vào nhiệt độ. Vitamin D đi vào máu và gắn với protein đặc hiệu (DBP: vitamin D-bindende-protein).

Đưa vào cùng với thức ăn

Mặc dù sự chiếu sáng có thể cung cấp đầy đủ lượng vitamin D, việc bổ sung thêm vẫn là điều cần thiết (ở người lớn 5 μg/ngày, trẻ em 10 μg/ngày). Sau khi hấp thụ (được hỗ trợ bởi acid mật) vitamin D được gắn với chylomikronen hoặc DBP và được vận chuyển đến gan.

Ở trong gan xảy ra sự hydroxyl hóa ở C25 bằng một enzyme phụ thuộc vào cytochrome P-450. Chất này được chuyển đến thận, ở đây xuất hiện hợp chất có hoạt tính sinh học 1α, 25-Dihydroxycalciferol (calcitriol, DHCC) do sự hydroxyl hóa tiếp theo ở vị trí C_1 của cholecalciferol.



Sự phân giải thực hiện bằng sự hydroxyl hóa và/hoặc oxy hóa nhóm hydroxyl thành nhóm carboxyl. Những hợp chất này phân cực mạnh hơn, thể hiện hoạt tính sinh học thấp, được thải ra qua phân hoặc nước tiểu.

Chức năng sinh hóa

Ở động vật có vú vitamin D (thực tế là 1α 25-Dihydroxycalciferol) điều khiển sự trao đổi calcium và phosphate.

Nó hoạt hóa trực tiếp sự hấp thu (tái hấp thụ) Ca^{++} và phosphate ở ruột, thận. Mặt khác nó giải phóng Ca^{++} từ xương cho sự điều chỉnh tạm thời mức Ca^{++} trong máu.

Hiệu quả sao chép được thực hiện bởi vitamin D-receptor. Ở đây vitamin có vai trò như một hormon. Ở trong ruột, dạ dày và xương nó kích thích sự sao chép của các gen mã hóa cho các protein gắn với calcium

(CaBP, calbindin, osteocalcin...). Những protein này tham gia vào sự tiếp nhận calcium và khoáng hóa xương.

Lĩnh vực y học: Những bệnh gắn liền với mức vitamin D không bình thường:

- Còi xương: (khoáng hóa xương thấp, phần lớn ở trẻ em) sinh ra do sự hấp thụ Ca^{++} giảm khi thiếu vitamin D, thỉnh thoảng cũng do tổng hợp không đủ calcitriol từ calciferol.
- Bệnh loãng xương: xuất hiện khi tổng hợp calcitriol bị rối loạn, do thận không hoạt động hoặc mức ostrogen thấp vì nó kích thích bước hydroxyl hoá.

2.2.3. Tocopherol (vitamin E)

Tocopherol (tocos = con cháu, pherol = sinh ra) khá phổ biến ở cây xanh, rau xà lách, hạt ngũ cốc, dầu thực vật, gan bò, lòng đỏ trứng.

Nhóm tocopherol gồm 8 hợp chất, bao gồm vòng 8 - chromanol và một chuỗi bên isoprenoide. Sản phẩm cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp là α-tocopherol (5,7,8-trimethyltocopherol), thể hiện hoạt tính sinh học cao nhất. Ở thực vật và động vật tocopherol bảo vệ lipid trước sự thiệt hại do oxy hoá.

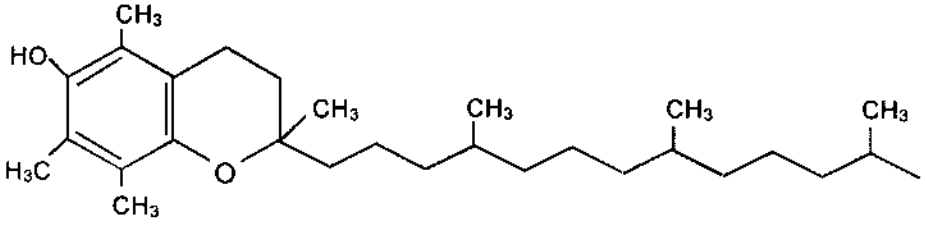
Các tocopherol phân biệt với nhau bằng số lượng và vị trí của nhóm methyl ở vòng và các liên kết đôi trong chuỗi bên. Tất cả chúng đều ưa lipid.

Tocopherol được tổng hợp ở dạng đồng nhất chỉ ở thực vật, trước hết trong lục lạp của lá. Ở động vật và thực vật nó ở màng tế bào (màng ty thể, hồng huyết cầu, và lạp thể).

Lượng bổ sung hàng ngày đối với người lớn là 8-12 mg. Cần lượng lớn hơn khi thực phẩm có chứa nhiều acid béo chưa no. Hiếm khi thấy thiếu vitamin này, ngoại trừ ở trường hợp đẻ non và rối loạn ở hấp thu lipid. Tuy nhiên trong chăn nuôi ở chế độ dinh dưỡng cung cấp không đầy đủ thì gây ra sự thoái hóa các cơ quan và vô sinh.

Chức năng hóa sinh của tocopherol là bảo vệ lipid ở màng trước phản ứng peroxid-hóa (đặc biệt acid béo có nhiều liên kết chưa no). Tocopherol là nội ether của các hydroquinon. Chúng là những chất nhận gốc và chuyển

sang trạng thái tocopheroxy (semiquinon). Đây là một gốc phản ứng yếu với thời gian bán huỷ là nhiều giờ và làm gãy các phản ứng chuỗi. Phản ứng này là thuận nghịch, có thể ascorbate thực hiện sự khử trở lại thành tocopherol. Ở đây nó bị oxy hóa thành monodehydroascorbate. Giữa hai vitamin này có sự đồng tác dụng. β-carotene cũng được coi là chất khử cho tocopherol. Ngược lại semiquinon được oxy hóa tiếp tục thành quinon, chất này dẫn đến sự mở vòng thuận nghịch.



α-Tocopherol

2.2.4. Phylloquinon và menoquinon (vitamin K)

Phylloquinon là một thành phần của hệ thống quang hóa của thực vật quang hợp. Menoquinon đóng một vai trò trong hô hấp yếm khí của vi khuẩn. Ở động vật hai hợp chất (vitamin K_1 cũng như vitamin K_2) là cofactor ở sự γ cacboxyl hóa của glutamat. Đó là monomethyl-naphtochinon với một chuỗi bên isoprenoid.

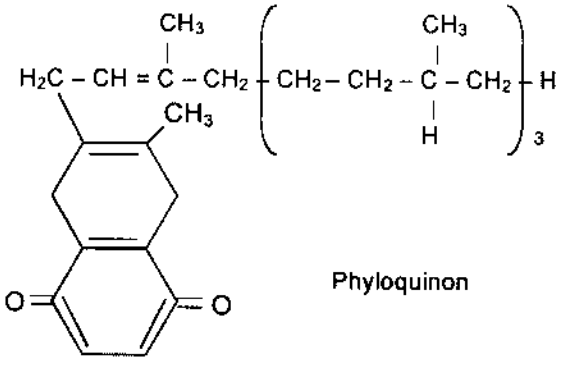
Phyllochinon và menachinon phân biệt nhau chỉ số lượng liên kết đôi và chiều dài của chuỗi bên.

Lượng tiếp nhận hàng ngày cần thiết ở người lớn 70-140 μg. Lượng này được đáp ứng bằng thức ăn và sản phẩm của vi khuẩn đường ruột. Trước khi được thải phần lớn chỉ các chuỗi bên được làm ngắn bằng oxy hoá.

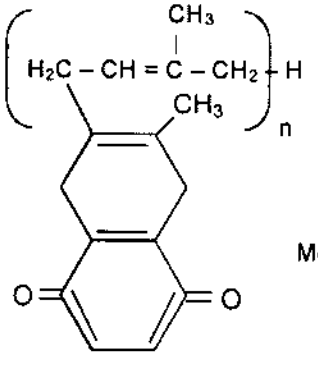
Chức năng hóa sinh

Ở động vật chúng là cofactor tạo nên γ-cacboxylglutamate trong protein xảy ra ở mạng lưới nội chất (endoplamatische reticulum) thô nhờ enzyme carboxylase. Protein tạo nên được phân giải. Quá trình biến đổi sau đó là cần thiết cho khả năng kết hợp Ca^{++} và cho sự cố định protein bằng các cầu Ca^{++} ở màng phospholipid (ví dụ ở quá trình đông máu).

Ở quá trình biến đổi protein này vitamin-K-hydroquinon tách ra một proton của glutamate, tiếp theo nó được carboxyl hoá. Đồng thời xuất hiện một vitamin K-quinon-2,3-epoxid (những chi tiết vẫn còn chưa biết). Epoxid được khử bằng quinon-epoxid-reductase gắn với dithiol thành quinon và sau đó thành hydroquinon. Dẫn xuất của cumarine có thể kìm hãm reductase, ví dụ dicumarol và warfarin có tác dụng là chất kháng đông.



Phyloquinon



Menoquinon

Chương III
ENZYME VÀ SỰ XÚC TÁC SINH HỌC

Để sống và phát triển, cơ thể sinh vật phải thường xuyên trao đổi chất và trao đổi năng lượng với môi trường bên ngoài. Các quá trình này tiến hành được là nhờ các phản ứng hóa sinh xảy ra trong cơ thể theo quy luật có tổ chức và có liên quan chặt chẽ với nhau.

Đặc điểm chung của các phản ứng này là có thể xảy ra một cách đặc hiệu, dễ dàng với vận tốc lớn ở ngay trong điều kiện môi trường sinh lý và nhiệt độ của cơ thể. Sở dĩ các phản ứng tiến hành trong cơ thể có những đặc điểm trên chính là nhờ các chất xúc tác đặc biệt có khả năng làm tăng vận tốc phản ứng lên gấp bội, đó là các chất xúc tác sinh học.

Enzyme là chất xúc tác sinh học có bản chất protein làm nhiệm vụ xúc tác cho các phản ứng hóa sinh xảy ra trong cơ thể sinh vật.

Enzyme tồn tại trong tất cả các tế bào sống của động vật, thực vật, vi sinh vật. Các phản ứng do enzyme xúc tác có thể xảy ra ở ngay trong cơ thể sống hoặc ở ngoài cơ thể. Hiện nay đã tách được rất nhiều enzyme khác nhau từ nguồn động vật, thực vật, đặc biệt là từ vi sinh vật, trong đó có nhiều loại đã được thu nhận với độ thuần khiết cao. Xúc tác enzyme có nhiều ưu điểm hơn hẳn xúc tác thông thường như cường lực xúc tác lớn, tính đặc hiệu cao, không độc, có thể tác dụng trong điều kiện nhẹ nhàng, đơn giản. Hơn nữa có thể sản xuất enzyme từ các nguyên liệu giá rẻ nhưng đem lại hiệu quả kinh tế cao, nhờ vậy việc ứng dụng enzyme rộng rãi trong các ngành công nghiệp nhẹ, công nghiệp thực phẩm, nông nghiệp, y học và nghiên cứu khoa học đã nhanh chóng có những bước tiến dài và ngày càng có nhiều triển vọng tốt đẹp.

I. KHÁI NIỆM VỀ SỰ XÚC TÁC NÓI CHUNG

Tốc độ phản ứng hóa học được xác định bởi giá trị năng lượng hoạt hóa tức là năng lượng các chất tham gia phản ứng phải đạt được trên mức năng lượng bình thường của chúng để cắt đứt các liên kết cần thiết và hình thành các liên kết mới. Năng lượng hoạt hóa các phản ứng nào đó càng lớn thì tốc độ phản ứng càng chậm và ngược lại.

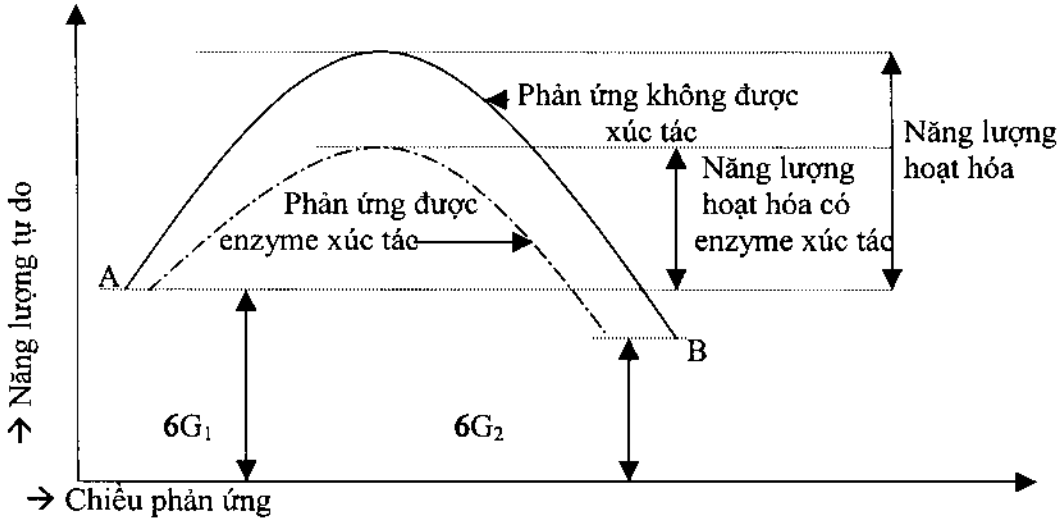
Việc đưa một số chất nào đó vào trong hệ thống vốn có tác dụng làm tăng tốc độ phản ứng hóa học được gọi là sự xúc tác. Trong quá trình xúc tác, các chất xúc tác đã làm giảm năng lượng hoạt hóa của phản ứng hóa học. Năng lượng cần để xảy ra sự va chạm có hiệu lực dẫn đến phản ứng hóa học được gọi là năng lượng hoạt hóa.

Trong quá trình xúc tác, các chất xúc tác chỉ tham gia vào các phản ứng trung gian sau đó chúng lại được phục hồi nhanh chóng, chất xúc tác không đóng vai trò như những chất tham gia phản ứng.

Tốc độ các phản ứng thuận nghịch cũng được các chất xúc tác làm tăng theo cả hai chiều.

Điều đó nói lên rằng: chất xúc tác không quyết định chiều hướng của phản ứng, chúng chỉ thúc đẩy cho phản ứng đạt đến cân bằng một cách nhanh chóng.

Ảnh hưởng của chất xúc tác là làm giảm năng lượng hoạt hóa. Trong đồ thị sau: A là chất phản ứng, B là sản phẩm của phản ứng.



II. ENZYME LÀ CHẤT XÚC TÁC SINH HỌC

Những luận cứ sau đây đã chứng minh bản chất xúc tác của enzyme:

a) Cũng như các chất xúc tác nói chung, enzyme làm tăng nhanh tốc độ phản ứng. Enzyme không quyết định chiều hướng của phản ứng.

b) Enzyme không đóng vai trò là chất tham gia phản ứng trong phương trình phản ứng. Trong quá trình xúc tác, lượng enzyme không thay đổi.

c) Cũng như mọi chất xúc tác khác, enzyme làm giảm năng lượng hoạt hóa cần thiết của các phản ứng hóa học. Nói cách khác năng lượng hoạt hóa phản ứng được giảm đi nhiều khi có sự xúc tác của enzyme.

III. BẢN CHẤT HÓA HỌC CỦA ENZYME

3.1. Enzyme là những chất xúc tác có bản chất protein

Trong sự phát triển của hóa sinh học, bước nhảy vọt đã đạt được khi người ta thực hiện thành công việc tách rút các chất xúc tác sinh học ra khỏi tế bào và nghiên cứu tính chất của chúng, lúc đó người ta nhận biết rằng enzyme có bản chất protein. Năm 1926, Sumner là người đầu tiên thu được urease ở dạng kết tinh. Cho đến nay đã có khoảng hơn 150 enzyme được rút ra ở dạng tinh khiết. Trong số các enzyme đó, một số đã được biết trọn vẹn về cấu trúc bậc I như ribonuclease, trypsin, chymotrypsin, ...

Ngày nay người ta xác nhận rằng, các enzyme chính là nhóm protein quan trọng. Chúng được hình thành trong tế bào như các protein đơn giản (enzyme một thành phần) hoặc như các protein phức tạp (enzyme hai thành phần). Trong số các enzyme thì đa số là enzyme hai thành phần.

Dạng hoạt động của enzyme hai thành phần bao gồm phần protein và phần không có bản chất protein gọi là nhóm prostetic (nhóm ngoại, nhóm ghép, ...)

Enzyme một thành phần là các protein đơn giản thực hiện chức năng xúc tác. Ví dụ: Ribonuclease A và một số enzyme thủy phân protein và một số enzyme khác.

3.2. Các nhóm ghép, các coenzyme

Bên cạnh phần protein thì enzyme hai thành phần còn chứa phần không có bản chất protein. Người ta gọi phần không phải protein cần thiết bắt buộc đối với hoạt động của enzyme là nhóm ghép (nhóm ngoại, nhóm thêm, yếu tố phụ, ...) và phần protein vốn liên kết với nhóm đó là apoenzyme, phức hợp của hai thành phần trên là holoenzyme (enzyme hai thành phần).

Trong trường hợp nhóm ghép là những chất hữu cơ có trọng lượng phân tử bé được liên kết với phần protein thì nhóm ghép được gọi là coenzyme. Theo cách đó thì:

$$\text{Apoenzyme} + \text{Coenzyme} \rightleftharpoons \text{Holoenzyme}$$

Nếu đứng riêng rẽ thì cả coenzyme cũng như apoenzyme đều không có khả năng xúc tác. Chỉ có lúc nào 2 phần này kết hợp với nhau thì hoạt tính xúc tác của enzyme mới thể hiện.

Bản chất hóa học của coenzyme rất khác nhau:

- Một số loại này chính là các vitamin. Sự liên quan về chức năng giữa các vitamin và các coenzyme được giới thiệu ở bảng sau:

Coenzyme	Chức năng	Vitamin tương ứng
NAD, NADP	- Chuyển H^+ và e^-	PP
FAD. FMN	- Chuyển H^+ và e^-	B_2
Coenzyme A	- Vận chuyển gốc acyl - Phân giải háo khí và tổng hợp acid béo	Pantotenic acid (B_3)
Thiaminpyro(P)	- Khử carboxyl hóa - Chuyển nhóm aldehyd	Thiamine(B_1)
Pyridoxal(P)	- Chuyển amine hóa - Khử carboxyl hóa	Pyridoxine(B_6)

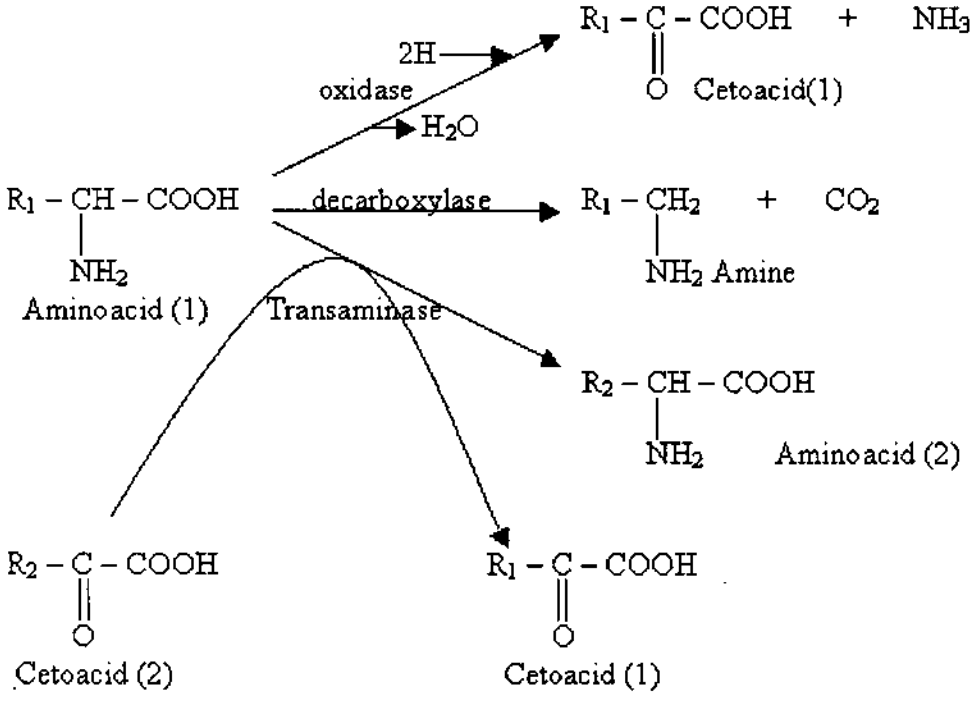
- Các ion kim loại có vai trò cần thiết bắt buộc cho sự hoạt động của enzyme. Các ion (cation) có chức năng giống với các coenzyme.

Người ta gọi các ion kim loại đó là các coenzyme đơn giản. Các enzyme cần ion kim loại cho việc thực hiện chức năng của mình được gọi là metalloenzyme. Chức năng của các ion kim loại nói chung phần nhiều là chúng tạo ra các phức hợp kiểu chelate giữa một nhóm nhất định nào đó của cơ chất và enzyme. Trước tiên các cation tạo phức "ion kim loại – cơ chất", sau đó phức hợp này mới phản ứng với enzyme. Các ion Ca, Cu, Mg, Mn, Mo, Zn, ... đều là những ion tham gia trong sự hoạt động của các enzyme.

3.3. Tính đặc hiệu của enzyme

Khả năng xúc tác với tính đặc hiệu cao là một trong những đặc tính cơ bản và quan trọng nhất của enzyme. Tính đặc hiệu của enzyme thể hiện ở chỗ: enzyme chỉ xúc tác cho một trong vô số những chuyển hóa có thể có được đối với các chất. Có hai loại đặc hiệu cơ bản đó là đặc hiệu phản ứng và đặc hiệu cơ chất.

* ***Tính đặc hiệu phản ứng***: được thể hiện ở chỗ enzyme chỉ có khả năng lựa chọn một dạng phản ứng trong số các phản ứng và xúc tác cho phản ứng đó. Điều đó thấy rõ trong ví dụ sau đây:



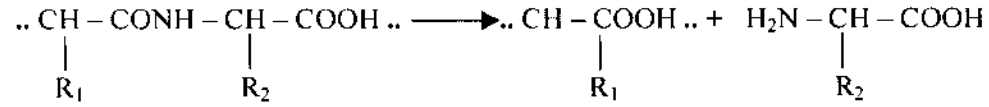
Dưới tác dụng của oxidase, aminoacid bị khử amine hóa bằng cách oxy hóa để tạo ra cetoacid và NH_3. Với sự có mặt của oxidase, một phản ứng khác khử carboxyl hóa lại không thể xảy ra. Việc xúc tác này đòi hỏi phải có enzyme khác, đó là decarboxylase. Cũng như vậy, phản ứng chuyển amine hóa đòi hỏi phải có transaminase.

* ***Tính đặc hiệu cơ chất***: Enzyme có thể lựa chọn đối với các chất tham gia phản ứng. Không phải mọi cơ chất có khả năng phản ứng đều được enzyme "tiếp nhận" như nhau.

Mỗi enzyme chỉ chuyên xúc tác cho một hoặc một vài cơ chất nhất định và mức độ đặc hiệu của nó tùy thuộc vào từng loại enzyme. Có 3 mức độ đặc hiệu cơ chất chủ yếu:

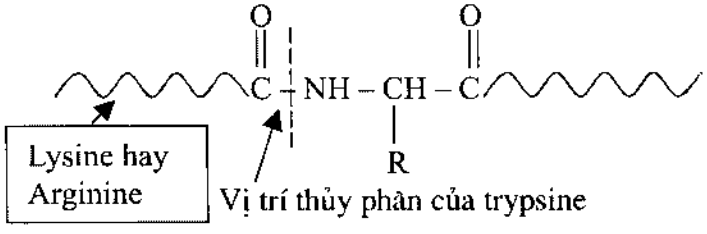
a) *Đặc hiệu tương đối*: Enzyme chỉ có thể tác dụng lên một kiểu liên kết hóa học nhất định mà không phụ thuộc vào các nhóm hóa học nằm ở hai bên liên kết. Ví dụ các esterase có thể tác dụng lên hàng loạt các ester của phosphoric acid.

b) *Đặc hiệu nhóm*: biểu hiện là enzyme chỉ có thể tác dụng lên một kiểu liên kết hóa học nhất định và một trong hai nhóm nằm ở hai bên liên kết cũng phải có cấu tạo nhất định. Ví dụ carboxylpeptidase có khả năng phân hủy liên kết peptide gần nhóm –COOH tự do, nghĩa là liên kết peptide ở cuối mạch polypeptide, ...

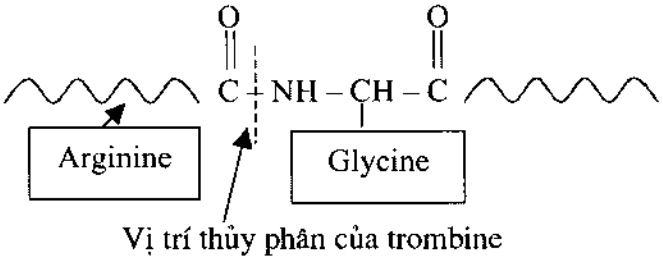


c) *Đặc hiệu tuyệt đối*: Enzyme chỉ tác dụng lên một kiểu liên kết nhất định và các nhóm hóa học ở hai bên liên kết cũng phải xác định.

Ví dụ: Enzyme trypsine thủy phân các liên kết peptide giữa lysine hoặc arginine với bất cứ aminoacid nào. Sản phẩm là những đoạn peptide có lysine hoặc arginine chứa nhóm COOH tự do ở phía tận cùng của peptide.



- Enzyme Trombine còn có tính đặc hiệu cao hơn trypsine: nó chỉ thủy phân liên kết peptide ở phía carboxyl của gốc arginine nào có gốc glycine đứng liền kề sau nó:



* Ngoài các tính đặc hiệu trên nhiều enzyme còn biểu hiện rất cao về *tính đặc hiệu hóa học lập thể (Đặc hiệu quang học)*: Enzyme chỉ tác dụng lên những dạng đồng phân lập thể nào đó của các chất hữu cơ.

Ví dụ: Enzyme L-lactatdehydrogenase chỉ tác dụng lên L-lactic acid mà không tác dụng lên D-Lactic acid. Muốn tác dụng lên D-Lactic acid phải có enzyme D-lactatdehydrogenase.

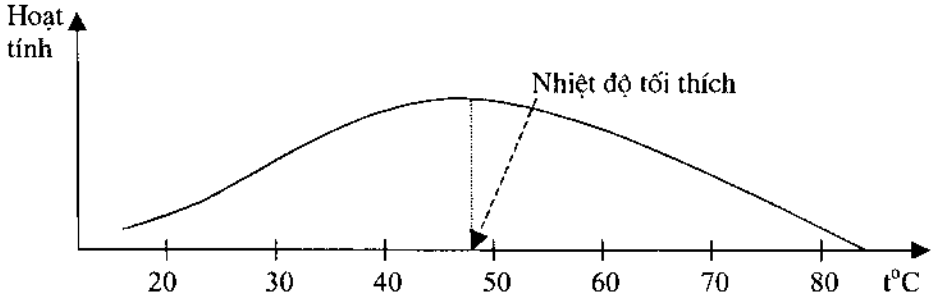
IV. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI HOẠT TÍNH XÚC TÁC CỦA ENZYME

4.1. Nhiệt độ

Trong phạm vi lý học, tốc độ của phản ứng tăng lên cùng với sự tăng của nhiệt độ. Nhưng khi vượt quá phạm vi nào đó, các phản ứng được enzyme xúc tác bị ảnh hưởng do sự biến tính của phân tử protein-enzyme. Kết quả này phụ thuộc vào nhiệt độ tối thích của enzyme, là nhiệt độ mà tại đó tốc độ phản ứng enzyme đạt cực đại.

Mỗi enzyme có nhiệt độ tối thích khác nhau. Sự khác nhau này tùy thuộc vào nguồn gốc của các enzyme, tùy theo từng điều kiện hoặc từng sự khác nhau về tính nhạy cảm với nhiệt độ của phân tử protein-enzyme.

Đa số enzyme mất hoạt tính xúc tác ở nhiệt độ cao(>80°C), trừ papain, myokinase có thể tồn tại ở 100°C.



4.2. Ảnh hưởng của pH

Mỗi enzyme đều có trị số pH tối thích nào đó đối với hoạt tính của chúng. Ở ngoài phạm vi của trị số này hoạt tính của enzyme đều bị giảm thấp.

Trị số pH tối thích của một số enzyme như sau:

Enzyme	pH tối thích
Pepsine	1,5 – 2,5
Amylase(mạch nha)	4,6 – 5,0
Amylase(nước bọt)	6,8 – 7,2
Trypsine	7,8 – 9,5
Arginase	9,8
Catalase	6,8 – 7,0
Peroxidase	6,0

Những nguyên nhân sau đây có thể dẫn tới sự phụ thuộc vào pH của enzyme:

a) Nếu trong số các nhóm bên tham gia trực tiếp trong sự hoạt động của enzyme chứa nhóm có khả năng phân ly.

b) pH đã ảnh hưởng tới các nhóm phân ly khác của protein-enzyme vốn có tác dụng trong việc duy trì cấu hình có hoạt tính của enzyme.

c) Sự thay đổi pH của môi trường có thể ảnh hưởng tới các nhóm phân ly của cơ chất hay của coenzyme vốn được kết hợp với enzyme.

4.3. Ảnh hưởng của chất hoạt hóa và chất kìm hãm enzyme

Những chất nào có khả năng làm tăng hoạt tính xúc tác của enzyme thì được gọi là chất hoạt hóa enzyme. Các chất đó thường là các ion kim loại như: K^+, Na^+, Mg^{+2}, Ca^{+2}, Co^{+2}, Zn^{+2}, Mn^{+2}, ...

Ví dụ: Mg^{+2} làm tăng hoạt tính phosphatase

Ca^{+2} làm tăng hoạt tính lypase.

Sự hoạt động của các enzyme đều có thể bị kìm hãm bởi các tác động gây biến tính protein. Người ta phân biệt các hình thức kìm hãm enzyme và phân biệt các chất kìm hãm enzyme như sau:

a) *Chất kìm hãm chung*: các chất này kìm hãm hoạt tính xúc tác của tất cả các enzyme. Các chất này là các muối kim loại nặng, chất tannin.

b) *Chất kìm hãm riêng*: có tác dụng kìm hãm một hay một nhóm enzyme có cấu tạo gần giống nhau. Ví dụ: các chất chứa nhóm – CN kìm hãm enzyme hô hấp.

4.4. Nồng độ cơ chất và nồng độ enzyme

Khi môi trường có đầy đủ cơ chất thì tốc độ phản ứng tỷ lệ thuận với lượng enzyme. Khi nồng độ cơ chất thấp, không đủ để lôi kéo tất cả lượng enzyme vào phản ứng thì tốc độ phản ứng tăng tỷ lệ thuận với nồng độ cơ chất. Tốc độ phản ứng đạt tối đa khi tất cả enzyme đều kết hợp vào cơ chất.

V. CƠ CHẾ XÚC TÁC CỦA ENZYME

Khi đặt vấn đề nghiên cứu về cơ chế xúc tác của enzyme người ta xuất phát từ giả thiết cho rằng trong các phản ứng được enzyme xúc tác, phức tạm thời "Enzyme – Cơ chất" được tạo thành. Quá trình này gồm 3 giai đoạn:

$$E + S \xrightarrow[1]{} ES \xrightarrow[2]{} ES^{*} \xrightarrow[3]{} E + P$$

Ở giai đoạn 1 phản ứng xảy ra tương đối nhanh, cơ chất (S) được liên kết với enzyme (E) nhờ các liên kết yếu. Lúc này sự liên kết không gian giữa các phân tử cơ chất và enzyme chưa đủ hiệu quả đối với sự xúc tác của enzyme.

Ở giai đoạn tiếp theo xảy ra sự biến đổi của cơ chất (S) có liên quan tới việc phá vỡ hay hình thành các liên kết cộng hóa trị. Ở giai đoạn này, cơ chất được hoạt hóa (một hoặc vài phức chất ES chuyển tiếp được hoạt hóa). Ở đây, cấu trúc bậc 3 của enzyme luôn biến đổi tạo khả năng tiếp xúc giữa các nhóm hoạt động của enzyme với cơ chất đang biến đổi.

Enzyme đã làm biến đổi phần tử cơ chất làm cho các liên kết bên trong phân tử trở nên "lỏng lẻo" hơn, do đó chỉ cần một lượng năng lượng nhỏ cũng đủ làm cho cơ chất biến thành các sản phẩm (P) khác nhau.

Người ta đã chứng minh rằng trong khi hình thành phức chất ES có 2 quá trình đồng thời xảy ra nhanh chóng, đó là:

a) Sự thay đổi mật độ điện tử gây nên sự phân cực hóa các liên kết.

b) Sự biến dạng về mặt hóa học của các liên kết "kéo căng" trong phân tử cơ chất.

Cả hai yếu tố này (sự biến hình và sự phân cực hóa các liên kết đồng hóa trị) đều làm tăng thế năng nhiệt động học của các liên kết này, nghĩa là xúc tiến việc vượt qua "hàng rào" năng lượng hoạt hóa của quá trình chuyển tiếp phức "Enzyme-Cơ chất".

VI. ĐỘNG HỌC CỦA PHẢN ỨNG ENZYME

6.1. Động học của phản ứng enzyme trong trường hợp không có chất kìm hãm

6.1.1. Ở giai đoạn: E + S → ES

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES$$

K_{+1}: hằng số vận tốc của phản ứng thuận.

K_{-1}: hằng số vận tốc của phản ứng nghịch.

Gọi V_1 là tốc độ phản ứng thuận.

V_{-1} là tốc độ phản ứng nghịch.

[E]: nồng độ enzyme.

[S]: nồng độ cơ chất.

Ta có: $V_1 = K_{+1}([E].[S])$

$$V_{-1} = K_{-1}[ES] \quad (1)$$

Khi phản ứng đạt đến cân bằng (enzyme phản ứng hết với cơ chất) thì $V_1 = V_{-1}$ nghĩa là:

$$K_{+1}([E].[S]) = K_{-1}[ES]$$

từ đó ta có: $$\frac{K_{-1}}{K_{+1}} = \frac{[E]\cdot[S]}{[ES]}$$

Nếu gọi K_s là hằng số cân bằng các phản ứng bậc I, ta có:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \rightarrow K_s = \frac{K_{-1}}{K_{+1}} \quad (2)$$

* Nếu K_s có giá trị lớn thì K_{-1} sẽ lớn và K_{+1} sẽ nhỏ. Từ đó ta thấy phức hợp ES dễ phân giải thành các chất S và E. Phản ứng enzyme tiến hành chậm.

* Nếu K_s có giá trị nhỏ thì tốc độ tạo ES sẽ nhanh đồng thời phản ứng enzyme cũng tiến hành nhanh. Vậy nếu K_s càng nhỏ thì nồng độ ES càng cao.

Ở giai đoạn 1 ta đã tính được: $$K_s = \frac{[E]\cdot[S]}{[ES]}$$

Hay viết dưới dạng khác là: $$[E]\,[S] = K_s[ES] \quad (3)$$

Nếu gọi $[E_o]$ là nồng độ chung của enzyme trước khi bắt đầu tham gia phản ứng.

[E]: nồng độ enzyme ở dạng tự do (không tạo phức hợp)

[ES]: nồng độ của phức hệ ES.

thì nồng độ enzyme không tạo phức hợp (ở dạng tự do) là:

$$[E] = [E_o] - [ES] \quad (4)$$

Thay vào phương trình (3), ta có:

$$([E_o] - [ES]).\ [S] = K_s.\ [ES]$$

Triển khai:

$$[E_o]\ [S] - [ES]\ [S] = K_s.\ [ES] \text{ hay là:}$$

$$K_s\ [ES] + [ES]\ [S] = [E_o]\ [S] \text{ hay là:}$$

$$[ES](K_s + [S]) = [E_o]\ [S]$$

Từ đó

$$[ES] = [E_o]\ \frac{[S]}{K_s + [S]} \rightarrow \frac{[ES]}{[E_o]} = \frac{[S]}{K_s + [S]} \qquad (5)$$

Như vậy, nồng độ [ES] càng lớn thì tốc độ phản ứng enzyme càng lớn (vì K_s lúc đó sẽ nhỏ). Tốc độ sẽ đạt tới tối đa khi nồng độ phức hệ [ES] bằng nồng độ enzyme ban đầu $[E_o]$ ($[ES] = [E_o]$) nghĩa là khi tất cả enzyme đều được kết hợp với cơ chất thì phản ứng enzyme là tối đa.

Từ đó có thể lập thành tỉ lệ: $\frac{V}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E_o]}$

V: tốc độ phản ứng enzyme (ở giai đoạn đầu)

V_{max}: tốc độ tối đa.

Từ phương trình (5) ta đã có: $\frac{[ES]}{[E_o]} = \frac{[S]}{K_s + [S]}$

Vậy $\frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s + [S]}$

Từ đó: $V = V_{max}\frac{[S]}{K_s + [S]}$

Đây là phương trình Michaelis và Menten (1913) dùng để tính tốc độ phản ứng enzyme từ E + S → ES.

Nếu $K_s = [S]$ thì $V = \frac{1}{2}V_{max}$

6.1.2. Ở giai đoạn: $ES^* \rightarrow E + P$

Khi đó ta có tốc độ tạo ES là: $V_{+1} = K_{+1}([E]\ [S])$

Tốc độ phân li ES theo phản ứng nghịch $V_{-1} = K_{-1}[ES]$

Tính tốc độ phân giải phức hệ ES để tạo E + P, hằng số tốc độ này bằng K_{+2}

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{K_{-2}}{\overset{K_{+2}}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Khi nồng độ cơ chất [S] cao hơn nhiều so với nồng độ [E] thì sẽ đạt nhanh chóng trạng thái cân bằng giữa sự hình thành ES và sự phân giải phức hệ ES đó.

Như vậy, ở giai đoạn này ta có:

$$K_{-1}[ES] + K_{+2}[ES] = K_{+1}[E][S]$$

Tốc độ phân giải phức hệ ES → E + S | **Tốc độ phân giải phức hệ ES → E + P** | **Tốc độ tạo phức hệ ES**

Hay là: $(K_{-1} + K_{+2}).[ES] = K_{+1}[E][S]$ (6)

Từ phương trình (4): $[E] = [E_o] - [ES]$

Thay vào phương trình (6), ta có:

$$(K_{-1} + K_{+2}).[ES] = K_{+1}([E_o] - [ES]).[S]$$

từ đó:

$$\frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} = \frac{([E_o] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{[E_o][S] - [ES][S]}{[ES]}$$

Đặt $\frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} = K_m \rightarrow K_m = \frac{[E_o][S] - [ES][S]}{[ES]}$

K_m được gọi là hằng số Michaelis (đo bằng mol/lit) (tính theo khi mà sự tạo [ES] và phân li [ES] bằng nhau)

$$K_m[ES] = [E_o][S] - [ES][S]$$

$$K_m[ES] + [ES][S] = [E_o][S]$$

$$[ES](K_m + [S]) = [E_o][S]$$

$$[ES] = \frac{[E_o][S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

Mặt khác tốc độ phản ứng tính theo sự hình thành sản phẩm P từ [ES] bằng:

$$V = K_{+2}[ES]$$

từ đó: $$[ES] = \frac{V}{K_{+2}}$$

Thay vào (7) ta có: $$\frac{V}{K_{+2}} = \frac{[E_o][S]}{K_m + [S]}$$

Vậy $$V = \frac{K_{+2}.[E_o][S]}{K_m + [S]} \qquad (8)$$

Phương trình này cho phép tính được sự phụ thuộc tốc độ phản ứng vào nồng độ của enzyme và cơ chất.

V đạt cực đại khi $[ES] = [E_o]$ nghĩa là khi E được kết hợp hoàn toàn với S.

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E_0]}$$ từ phương trình 7 ta có: $$ES = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]}$$

Vậy $$\frac{V}{V_{max}} = \frac{1}{[E_0]} \cdot \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Từ đó: $$\boxed{V = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}}$$

Đây là phương trình Michaelis và Menten dùng để tính tốc độ phản ứng từ $ES^* \rightarrow E + P$

* Vậy $$V = \frac{1}{2}.V_{max} \text{ thì } K_m = [S]$$

Lúc đó hằng số Michaelis được đo bằng mol/lít

So sánh giá trị K_m và K_s ta thấy:

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}$$

mà $$K_s = \frac{K_{-1}}{K_{+1}}$$

Vậy $K_m = K_s + \frac{K_{+2}}{K_{+1}}$

Khi $K_{+2} = K_{+1}$ thì $K_m = K_s + 1$

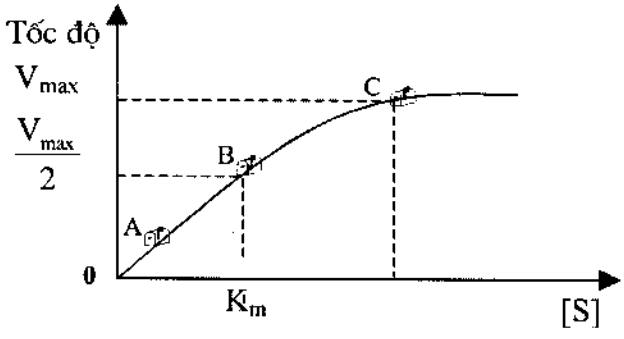
Từ phương trình (8) $V = V_{max}.\frac{[S]}{K_m + [S]}$ có thể viết dưới dạng

Phương trình:

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

Theo phương trình này thì khi [S] tăng thì tốc độ phản ứng tăng. Nhưng khi nồng độ cơ chất [S] tăng đến một mức độ nào đó thì đạt tới giá trị tốc độ cực đại: $V = V_{max}$. Sau đó thì V không tăng theo nồng độ cơ chất [S] vì V đã luôn luôn $= V_{max}$.

Đó là phương trình biểu diễn sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng với nồng độ cơ chất. Có thể biểu diễn bằng dạng hiperbol:



Có thể giải thích của đường biểu diễn dạng hiperbol như sau: Trong phản ứng có enzyme xúc tác số phân tử cơ chất lớn hơn số phân tử enzyme rất nhiều (S>E). Cơ chất chỉ được chuyển hóa khi tạo thành phức hệ enzyme. Do đó tốc độ phản ứng phụ thuộc vào nồng độ phức hệ [ES].

Nồng độ [ES] ở 3 điểm A, B, C không giống nhau. Ở điểm A và B còn vài phân tử enzyme chưa kết hợp với cơ chất, do đó nếu tăng hay giảm nồng độ cơ chất [S] sẽ làm tăng hay giảm sự va chạm giữa E và S nghĩa là làm tăng hay giảm nồng độ [ES] và sẽ ảnh hưởng tới tốc độ phản ứng và tốc độ là hàm số của nồng độ cơ chất [S].

Tới điểm C tất cả phân tử enzyme đã kết hợp với S nên khi tăng nồng độ cơ chất có thể làm tăng dần sự va chạm giữa E và S nhưng không làm tăng tốc độ phản ứng.

Vì không còn enzyme tự do để có thể gắn thêm vào cơ chất và tốc độ đạt được đã là cực đại.

Ở điểm B đúng $\frac{1}{2}$ số phân tử enzyme đã kết hợp với cơ chất, tốc độ ở đó = $\frac{1}{2}V_{max}$ và nồng độ cơ chất tương ứng với điểm B bằng hằng số K_m.

Từ phương trình Michaelis Menten

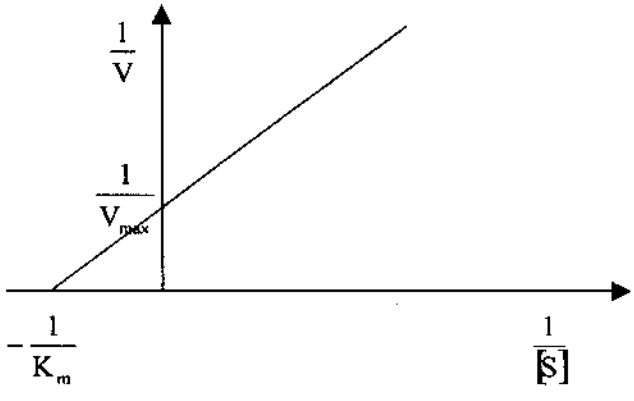
$$\boxed{V = V_{max}.\frac{[S]}{K_m + [S]}}$$

Nếu $V = \frac{1}{2}V_{max}$ thì $K_m = [S]$. Như vậy nghĩa là hằng số Michaelis bằng nồng độ của cơ chất khi mà tốc độ phản ứng bằng $\frac{1}{2}V_{max}$.

* Phương trình Michaelis cũng có thể viết dưới dạng khác theo đề nghị của Lineweaver và Burk (1934) bằng cách lấy số nghịch đảo:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}.[S]} \rightarrow \quad \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}}.\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Phương trình có dạng y = ax + b và đường biểu diễn có dạng đường thẳng như sau:



Qua đồ thị có thể xác định được V_{max} và K_m.

6.2. Động học của các phản ứng enzyme trong trường hợp có chất kìm hãm

Trong trường hợp có chất kìm hãm cạnh tranh hay không cạnh tranh thì giá trị V của phản ứng sẽ bao gồm cả hằng số K_i (K_i là hằng số phân li của phức hợp enzyme-chất kìm hãm EI hay còn gọi là hằng số kìm hãm).

Hằng số K_i được tính nhờ phương trình sau:

$$E + I \underset{K_{i-1}}{\overset{K_{i+1}}{\rightleftharpoons}} EI$$

$$K_i = \frac{K_{i-1}}{K_{i+1}} = \frac{[E]\cdot[I]}{[EI]}$$

* *Các chất kìm hãm cạnh tranh*: là các chất thường có cấu tạo gần giống với cơ chất. Các chất kìm hãm cạnh tranh có tính đặc hiệu rất cao, nghĩa là chỉ kìm hãm một enzyme riêng biệt.

Ví dụ: Malonic acid là chất kìm hãm cạnh tranh của enzyme succinat-dehydrogenase vì nó có cấu tạo gần giống succinic acid.

$CH_2 - COOH$	$CH_2 - COOH$
|	|
COOH	$CH_2 - COOH$
Malonic acid	Succinic acid

Khi tăng nồng độ cơ chất thì mất kìm hãm cạnh tranh.

* *Các chất kìm hãm không cạnh tranh*: là các chất có tác dụng kìm hãm hoạt động của enzyme bằng cách gắn vào các vị trí khác với các vị trí gắn cơ chất của enzyme. Trong trường hợp này chỉ làm giảm V cực đại của phản ứng chứ không ảnh hưởng gì đến hằng số K_m.

Ví dụ: Các ion kim loại nặng Ag^+; Hg^+; Trichloroacetic acid.

6.2.1. Động học của phản ứng enzyme trong trường hợp có chất kìm hãm cạnh tranh

Việc tính toán V_i sẽ phức tạp hơn vì ta có đồng thời với quá trình gắn E với cơ chất, còn có cả quá trình gắn E vào chất kìm hãm I.

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_{+2}} E + P$$

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_{+2}} E + P$$

$$E + I \underset{K_{i-1}}{\overset{K_{i+1}}{\rightleftharpoons}} EI$$

Bằng cách tính toán như trên ta có:

$$V_i = \frac{V_{i\,max}.[S]}{K_m + [S] + \left(\frac{K_m}{K_i}.[I]\right)}$$

Phương trình này giống phương trình Michaelis nhưng có thêm $\frac{K_m}{K_i}.[I]$ để phản ánh quá trình kìm hãm bởi các chất kìm hãm cạnh tranh.

* Cũng có thể tính V_i bằng cách:

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_{i\,max}}.\left(K_m + \frac{K_m.[I]}{K_i}\right).\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{i\,max}}$$

6.2.2. Động học của phản ứng enzyme trong trường hợp có chất kìm hãm không cạnh tranh

Trong trường hợp này người ta thấy rằng chất kìm hãm không cạnh tranh có thể gắn vào enzyme tự do và cả vào phức hệ ES theo các phản ứng sau:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_{+2}} E + P$$

$$E + I \underset{K_{i-1}}{\overset{K_{i+1}}{\rightleftharpoons}} EI$$

$$ES + I \underset{K_{i-2}}{\overset{K_{i+2}}{\rightleftharpoons}} IES$$

$$EI + S \underset{K_{i-3}}{\overset{K_{i+3}}{\rightleftharpoons}} IES$$

Cách tính phức tạp hơn:

- Giả thiết rằng K_{+2} rất nhỏ so với K_{+1} và K_{-2}, và phức hợp IES không tạo thành sản phẩm tương ứng và các hằng số cân bằng có giá trị như nhau (tương ứng với các phản ứng ghi trên), bằng cách tính như trên sẽ có:

$$V_i = \frac{K_{+2}.[E_o][S]}{(K_s + [S]).\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

hoặc tính theo dạng khác:

$$\frac{1}{V_i} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)\left(\frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}.\frac{1}{[S]}\right)$$

Khi so sánh tốc độ phản ứng không bị kìm hãm với tốc độ phản ứng có chất kìm hãm không cạnh tranh người ta thu được tỉ lệ sau:

$$\frac{V_o}{V_i} = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

V_o là tốc độ ban đầu của phản ứng enzyme không có chất kìm hãm.

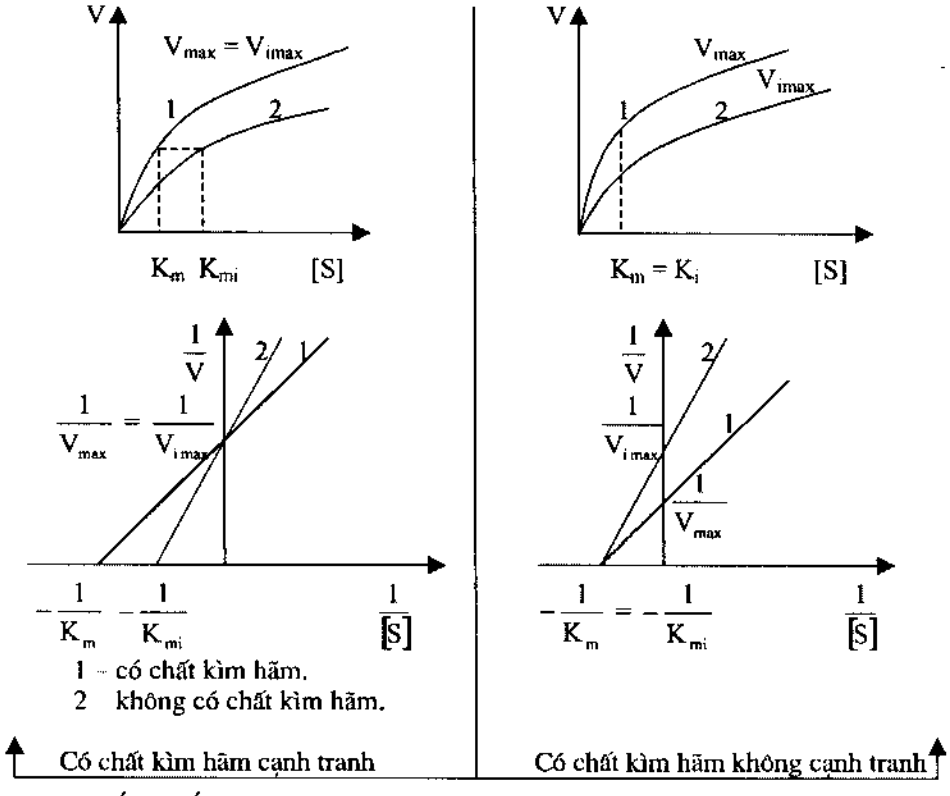
$$V_o = \frac{K_{+2}.[E_o][S]}{K_s + [S]} \text{ từ} \qquad (8)$$

Ở đây K_s thay vào chỗ của K_m vì K_{+2} rất nhỏ so với K_{-1} nghĩa là $K_m = K_s$. Như vậy có thể thấy rằng: Sự biến đổi tương đối của hoạt tính enzyme có chất kìm hãm không cạnh tranh chỉ phụ thuộc vào nồng độ của chất kìm hãm mà không phụ thuộc vào nồng độ của cơ chất [S].

* Đối với chất kìm hãm cạnh tranh thì tỉ lệ $\frac{V_o}{V_i}$ có dạng:

$\frac{V_o}{V_i} = 1 + \frac{K_m/K_i}{K_m + [S]}[I]$ từ phương trình này ta thấy sự biến đổi của hoạt tính enzyme khi có chất kìm hãm cạnh tranh phụ thuộc cả vào nồng độ cơ chất và nồng độ chất kìm hãm.

Có thể biểu diễn tốc độ phản ứng enzyme trong trường hợp có chất kìm hãm cạnh tranh và không cạnh tranh bằng đồ thị:



Tóm tắt: (Tất cả những phương trình sau đây chỉ dùng cho trường hợp khi 1 cơ chất tham gia vào phản ứng)

	Không có chất kìm hãm	Có chất kìm hãm cạnh tranh	Có chất kìm hãm không cạnh tranh
Phương trình	$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$	$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_{imax}} \cdot \left(K_m + \frac{K_m.[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{imax}}$	$\frac{1}{V_i} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \left(\frac{1}{V_{imax}} + \frac{K_m}{V_{imax}} + \frac{1}{[S]}\right)$
Đoạn thẳng trên trục tung tại điểm $\frac{1}{V_{max}}$	$\frac{1}{V_{max}}$	$\frac{1}{V_{max}}$	$\frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$

Đoạn thẳng cắt trên trục hoành tại điểm $\frac{1}{[S]}$	$-\frac{1}{K_m}$	$-\frac{1}{K_m\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)}$	$-\frac{1}{K_m}$

VII. CÁCH GỌI TÊN VÀ PHÂN LOẠI ENZYME

Trong thời gian cơ chế tác dụng của enzyme chưa được nêu ra, người ta đã đặt cho một số enzyme những tên riêng biệt như pepsine, trypsine, chymotrypsine, papaine, bromeline, ...

Khi con số các enzyme được biết ngày càng nhiều tên enzyme được gọi theo nguyên tắc sau đây: Tên enzyme = tên cơ chất mà enzyme xúc tác + loại phản ứng mà enzyme xúc tác + tiếp vị ngữ "ase".

Ví dụ:

$$\text{Ascorbic acid} + \tfrac{1}{2}O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{Ascorbat-}} \text{Dehydroascorbic acid} + H_2O$$

$$\begin{array}{l} CH_2-COOH \\ | \\ CH_2-COOH \\ \text{Succinic acid} \end{array} + FAD \xrightarrow[\text{dehydrogenase}]{\text{Succinat-}} \begin{array}{l} CH-COOH \\ \| \\ CH-COOH \\ \text{Fumaric acid} \end{array} + FAD.H_2$$

Việc phân loại enzyme là công việc khó khăn vì số enzyme mà cơ chế xúc tác của nó được hiểu biết một cách tường tận không nhiều.

Việc phân loại enzyme được dựa theo nguyên tắc là: lấy cơ sở kiểu phản ứng do enzyme xúc tác mà Hiệp hội Hóa sinh Quốc tế đã đề xuất năm 1964. Năm 1973 hệ thống phân loại này lại tiếp tục được hoàn thiện bởi Ủy ban danh pháp Hóa sinh thuộc Hiệp hội hóa học cơ bản và ứng dụng Quốc tế (IUPAC). Trên cơ sở đó tất cả các enzyme được phân chia thành 6 nhóm chủ yếu sau:

1. Oxydoreductase
2. Transferase
3. Hydrolase
4. Lyase
5. Isomerase
6. Synthetase (Ligase)

Các số thập phân trên bảng phân loại có ý nghĩa như sau:

- Số thứ nhất chỉ nhóm chính (Ví dụ nhóm 2: transferase)

- Số thứ hai qui định một số đặc tính của phản ứng (Ví dụ: 2.1 cho biết enzyme vận chuyển gốc 1 carbon)

- Số tiếp theo cho biết chi tiết hơn (Ví dụ 2.1.1: có nghĩa là enzyme vận chuyển nhóm methyl...)

Tuy nhiên cho đến nay các tên gọi truyền thống của enzyme vẫn còn được sử dụng.

VIII. CÁC NHÓM ENZYME RIÊNG BIỆT

8.1. Oxydoreductase (các enzyme oxy hóa khử)

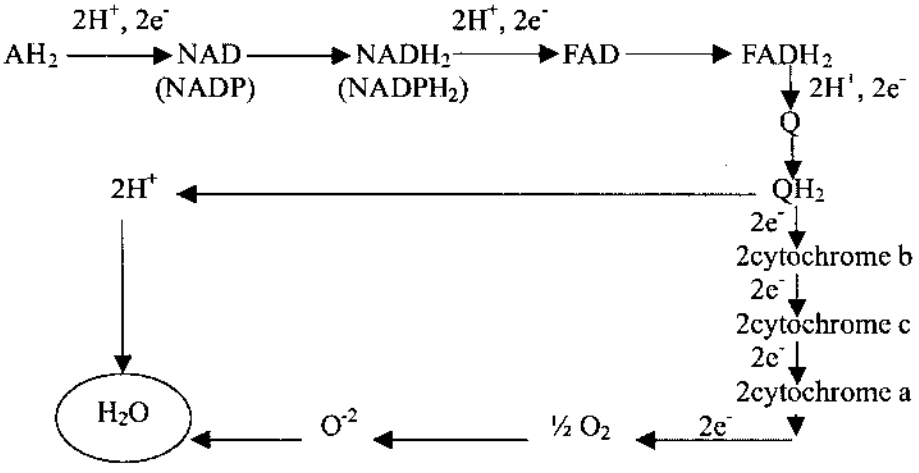
Các enzyme nhóm này làm nhiệm vụ xúc tác cho các phản ứng oxy hóa khử. Chúng chuyển vận H^+ hay các điện tử và xúc tác cho sự oxy hóa sinh học. Các enzyme này có vai trò to lớn trong quá trình hô hấp và trao đổi năng lượng trong cơ thể. Sơ đồ tổng quát của các phản ứng được xúc tác bởi oxydoreductase như sau:

$$AH_2 + B \underset{\text{oxydoreductase}}{\rightleftarrows} A + BH_2$$

Trong đó AH_2 là cơ chất; B là chất nhận H nào đó, có thể là O_2.

Trong tế bào oxydoreductase tạo nên các hệ thống (được gọi là chuỗi enzyme oxy hóa khử), trong đó việc vận chuyển các nguyên tử hydro (H^+ và e^-) qua nhiều giai đoạn, từ cơ chất đến chất nhận cuối cùng là O_2. Kết quả là các nguyên tử hydro được vận chuyển đến O_2 và sẽ tạo thành H_2O.

Sơ đồ hệ thống enzyme hô hấp và việc vận chuyển H^+ và e^- được trình bày tổng quát sau đây:



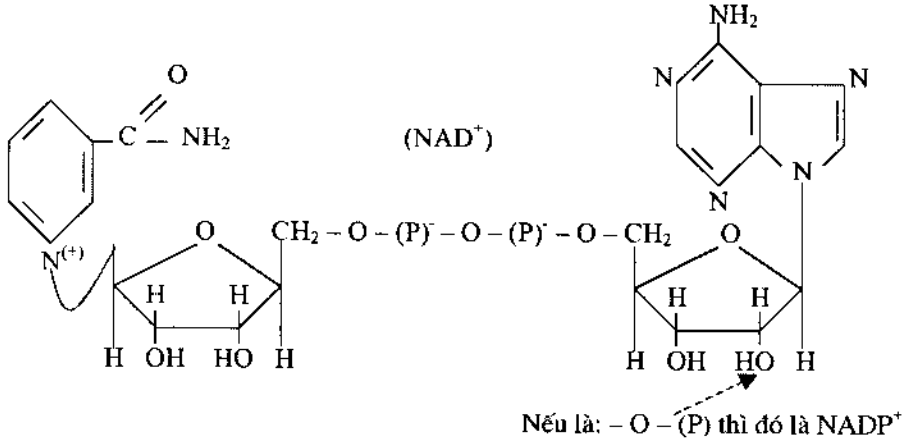
Tùy theo khả năng của oxydoreductase chuyển H_2 vừa lấy được từ cơ chất (AH_2) đến O_2 của không khí, người ta chia oxydoreductase thành hai phân nhóm:

- Dehydrogenase háo khí (oxidase)

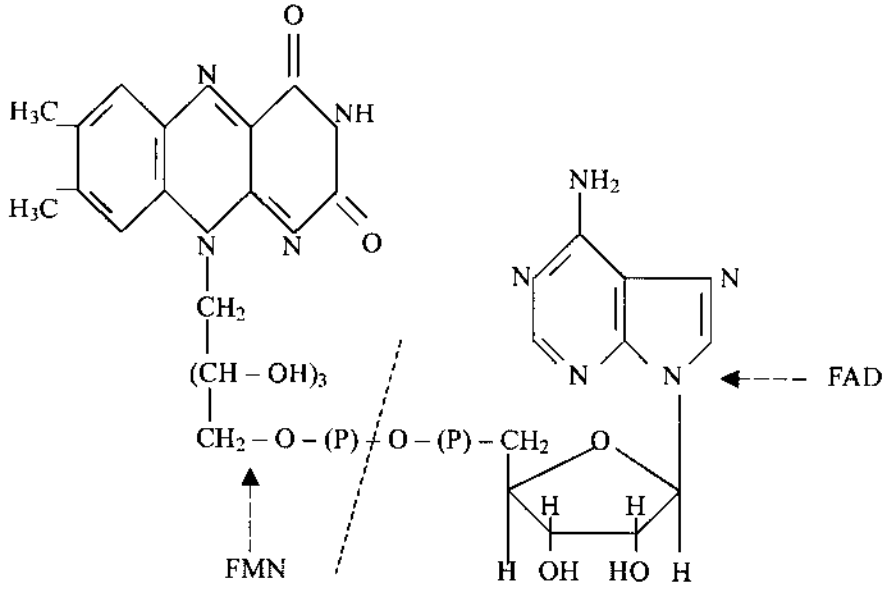
- Dehydrogenase yếm khí.

a) ***Dehydrogenase yếm khí***: là những enzyme không có khả năng vận chuyển H^+ và e^- từ cơ chất oxy hóa đến trực tiếp cho O_2 của không khí, mà chúng sẽ chuyển H^+ và e^- đó cho các chất vận chuyển trung gian khác.

Nhóm ghép của dehydrogenase yếm khí là dẫn xuất của vitamin PP (B_5) đó là NAD và NADP.

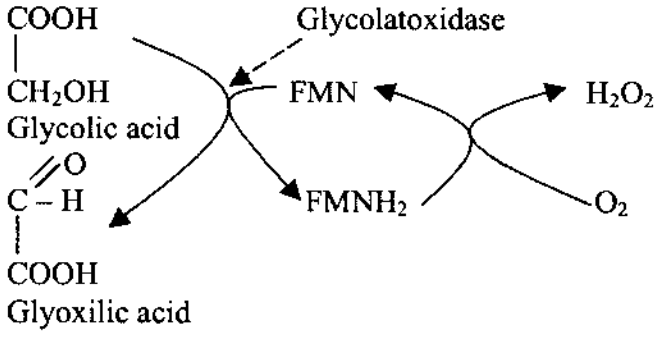


b) ***Dehydrogenase háo khí***: là những enzyme có khả năng vận chuyển H^+ và e^- đến trực tiếp cho O_2 của không khí. Chúng cũng là những enzyme hai thành phần. Nhóm ghép của chúng là dẫn xuất của vitamin B_2 (Riboflavin) đó là FMN và FAD.



Các enzyme chứa FMN, FAD thường không oxy hóa trực tiếp cơ chất mà chúng lấy H_2 từ $NADH_2$ (hoặc từ $NADPH_2$) rồi chuyển điện tử cho hệ cytochrome.

Đa số enzyme chứa FMN khi tác dụng trực tiếp với O_2 không khí sẽ tạo thành H_2O_2. Ví dụ: enzyme glycolatoxidase xúc tác cho phản ứng oxy hóa glycolic acid theo sơ đồ sau:



8.2. Nhóm transferase (các enzyme vận chuyển)

Các enzyme nhóm này làm nhiệm vụ vận chuyển các nhóm hóa học từ hợp chất này sang hợp chất khác mà không làm thay đổi hóa trị của các nguyên tố.

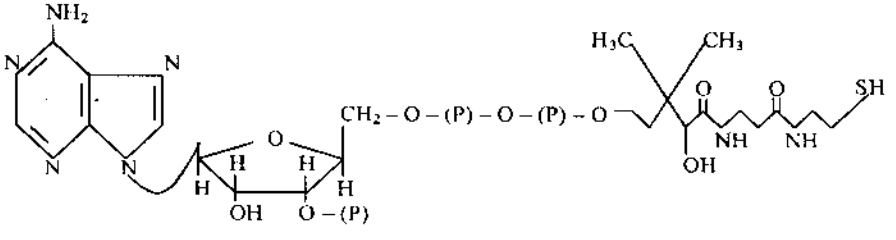
Sơ đồ tổng quát:

$$Ax + B \underset{\text{transferase}}{\rightleftharpoons} A + Bx$$

x: là nhóm được vận chuyển.

Tùy thuộc vào x mà ta có các tên enzyme vận chuyển khác nhau.

Ví dụ: Acyltransferase: x là gốc các acid béo trong đó có gốc acetic acid. Đây là enzyme hai thành phần trong đó nhóm hoạt động là HS-CoA có cấu tạo như sau:



- Glycozyltransferase: nếu x là gốc glycozyl.
- Aminotransferase: nếu x là nhóm amin (– NH_2).
- Methyltransferase: nếu x là nhóm (CH_3).
- Aldotransferase: nếu x là nhóm aldehyd.
- Cetotransferase: nếu x là nhóm cetone.
- Phosphotransferase: nếu x là gốc H_3PO_4.

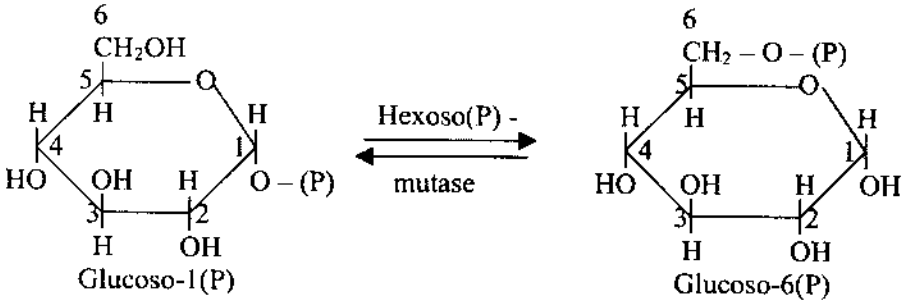
Enzyme này còn có tên là:

a) ***Kinase***: nếu xúc tác cho phản ứng chuyển gốc H_3PO_4 mà ATP là nhóm hoạt động của enzyme này. *Ví dụ*:

$$\text{Glycerine} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Kinase}]{} \text{Glycerol(P)} + \text{ADP}$$

b) ***Mutase***: là enzyme vận chuyển gốc H_3PO_4 trong nội tại phân tử của 1 chất.

Ví dụ: Enzyme hexoso(P)-mutase xúc tác cho phản ứng sau:



8.3. Nhóm hydrolase (các enzyme thủy phân)

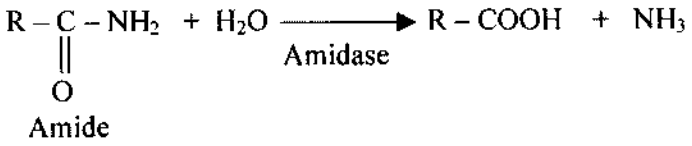
Các enzyme nhóm này xúc tác cho các phản ứng thủy phân.

Sơ đồ tổng quát:

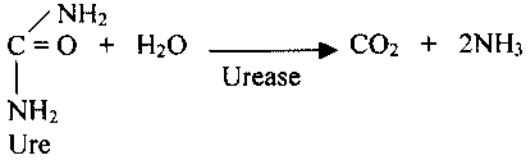
$$R_1 - R_2 + H_2O \xrightarrow[\text{Hydrolase}]{} R_1 - H + R_2 - OH$$

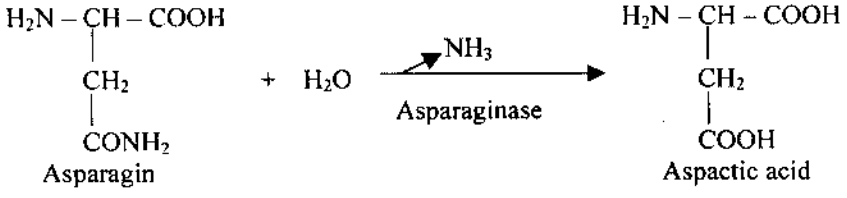
Dựa vào liên kết giữa R_1 và R_2 mà ta có tên các enzyme thủy phân khác nhau:

- Peptidase: Thủy phân liên kết peptide.
- Glycosidase: Thủy phân liên kết glycoside.
- Esterase: Thủy phân liên kết ester.
- Amidase: Thủy phân amide.



Ví dụ:

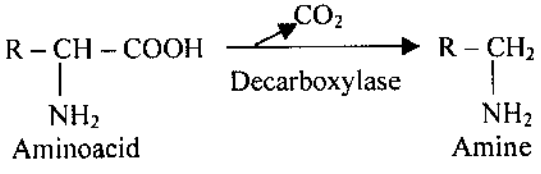




8.4. Nhóm liase (các enzyme phân cắt)

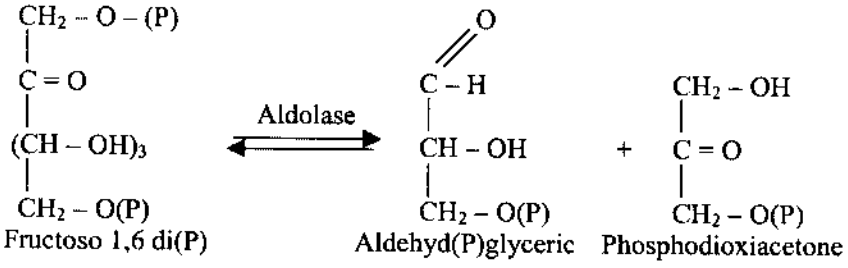
Enzyme nhóm này phân cắt một nhóm nào đó ra khỏi một hợp chất mà không có sự tham gia của H_2O. Có trường hợp kết quả của phản ứng là tạo liên kết đôi.

Ví dụ: * Decarboxylase: xúc tác cho phản ứng sau:

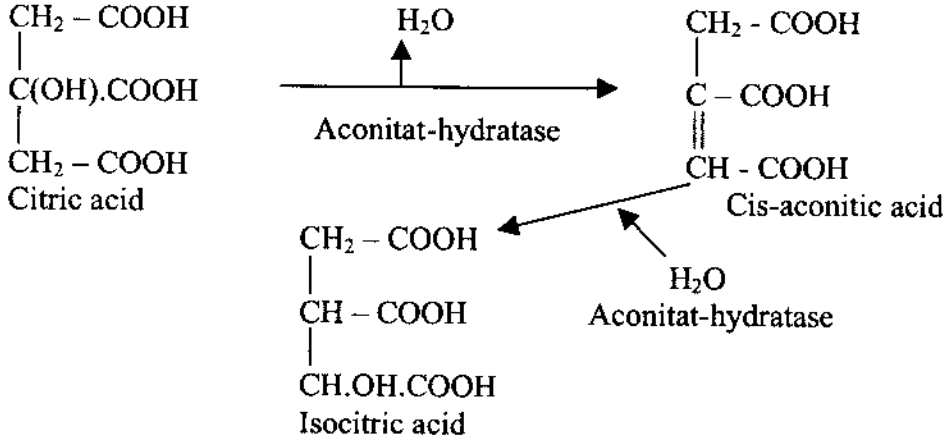


* Aldolase: xúc tác cho phản ứng thuận nghịch sau:

Fructosodi(P) ⇌ Aldehyd(P)glyceric + Phosphodioxiacetone



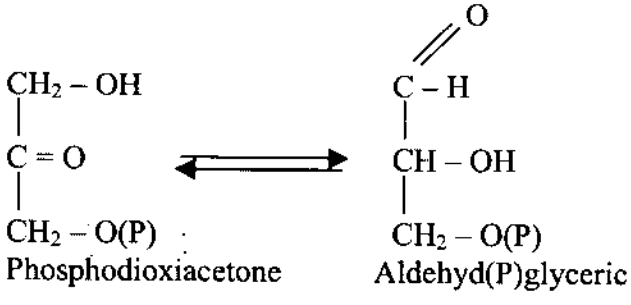
* Hydratase (hydroliase): gồm các enzyme xúc tác cho phản ứng loại trừ và kết hợp H_2O.



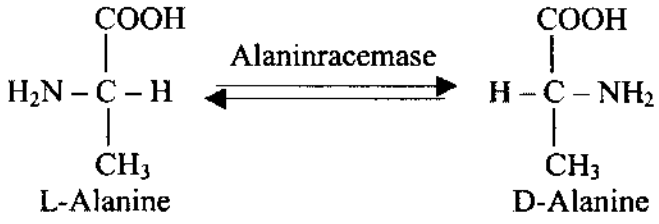
8.5. Nhóm isomerase (các enzyme đồng phân hóa)

Các enzyme nhóm này xúc tác cho phản ứng chuyển hóa các chất hữu cơ thành đồng phân của chúng. Ví dụ chuyển hóa giữa dạng cetone và dạng aldehyd. Giữa dạng L và dạng D ...

Ví dụ: Enzyme trioso(P)isomerase xúc tác cho phản ứng sau:

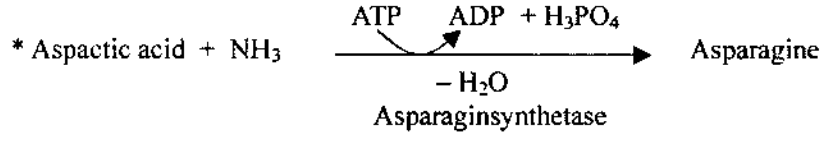


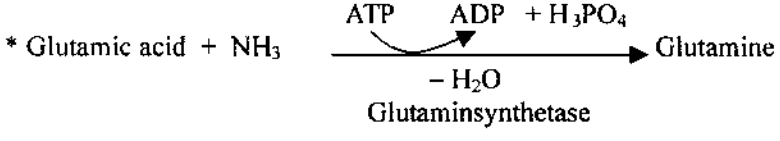
Enzyme alaninracemase xúc tác cho phản ứng biến đổi L-alanine thành D-alanine và ngược lại.

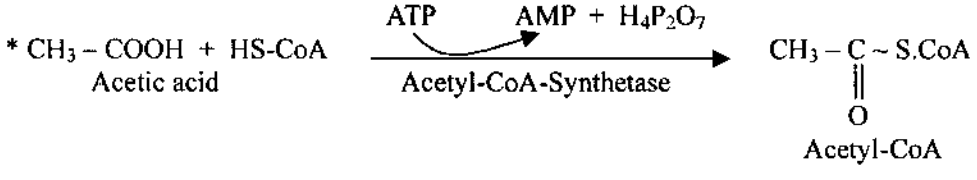


8.6. Nhóm synthetase (các enzyme tổng hợp)

Các enzyme nhóm này xúc tác cho các phản ứng tổng hợp các chất hữu cơ. Nhóm này chỉ xúc tác khi có mặt của ATP và các hợp chất cao năng khác. Vì các phản ứng tổng hợp đòi hỏi phải cung cấp nhiều năng lượng. Một số ví dụ sau đây:







Chương IV
CARBOHYDRATE VÀ SỰ TRAO ĐỔI CARBOHYDRATE TRONG CƠ THỂ THỰC VẬT

4.1. Cấu tạo, tính chất và vai trò của carbohydrate

Carbohydrate là nhóm chất hữu cơ phổ biến khá rộng rãi trong cơ thể sinh vật. Nhìn chung hàm lượng carbohydrate ở thực vật cao hơn ở động vật. Ở thực vật carbohydrate tập trung chủ yếu ở thành tế bào, mô nâng đỡ và mô dự trữ. Tuy nhiên hàm lượng carbohydrate thay đổi tuỳ theo loài, giai đoạn sinh trưởng, phát triển. Trong cơ thể người và động vật carbohydrate tập trung chủ yếu trong gan.

Thực vật xanh có khả năng sử dụng năng lượng ánh sáng để tổng hợp carbohydrate từ CO_2 và H_2O. Carbohydrate thực vật là nguồn dinh dưỡng quan trọng của người và động vật.

Trong cơ thể sống carbohydrate giữ nhiều vai trò quan trọng như:

- Cung cấp năng lượng cho cơ thể, carbohydrate đảm bảo khoảng 60% năng lượng cho các quá trình sống.
- Có vai trò cấu trúc, tạo hình (ví dụ: cellulose, peptidglican...)
- Có vai trò bảo vệ (mucopolysaccharide)
- Góp phần bảo đảm tương tác đặc hiệu của tế bào (polysaccharide trên màng tế bào hồng cầu, thành tế bào một số vi sinh vật).

Dựa vào cấu tạo, tính chất carbohydrate được chia làm hai nhóm lớn: monosaccharide và polysaccharide.

4.2. Các monosaccharide

Monosaccharide là các aldehyd hoặc ketone có chứa một hoặc nhiều nhóm hydroxyl. Số lượng carbon trong phân tử monosaccharide ít nhất là 3, đó là glyceraldehyd và dihydroxyacetone. Chúng có công thức như sau:

O H C HO–CH CH₂OH L-glyceraldehyd	O H C HC–OH CH₂OH D-glyceraldehyd	CH₂OH C = O CH₂OH Dihydroxyaketone

Glyceraldehyd có chứa 1 cacbon bất đối (C*), có hai đồng phân D và L, còn dihydroxyaketone không chứa carbon bất đối. Số đồng phân lập thể của monosaccharide tính theo công thức $X = 2^n$ (n là số C* trong phân tử).

Nếu số cacbon trong phân tử monosaccharide là 4, 5, 6 hoặc 7 chúng có tên gọi tương ứng là tetrose, pentose, hexose và heptose. Công thức cấu tạo của một số monosaccharide thường gặp được trình bày ở dưới đây:

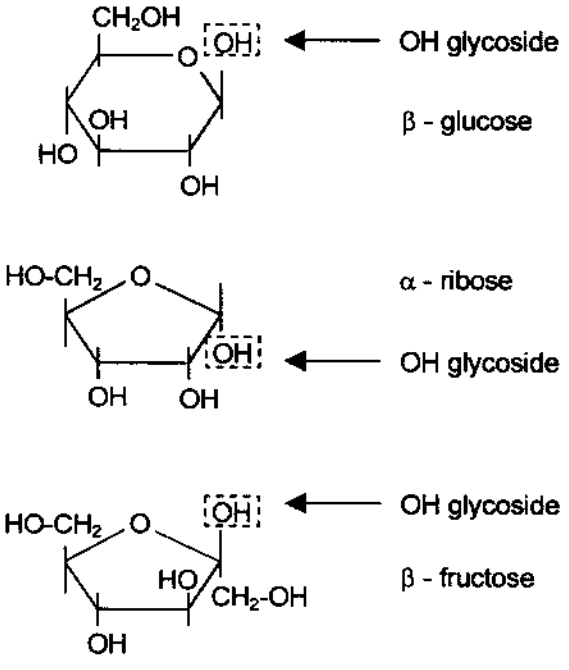
CHO | HCOH | HCOH | CH_2OH D-Erythrose	CHO | HCOH | HCOH | HCOH | CH_2OH D-Ribose	CH_2OH | C = O | HC-OH | HCOH | CH_2OH D-Ribulose	CH_2OH | C = O | HO-CH | HCOH | CH_2OH D-Xilulose

CHO | HCOH | HOCH | HCOH | HCOH | CH_2OH D-Glucose	CH_2OH | C = O | HO-CH | HCOH | HCOH | CH_2OH D-Fructose	CH_2OH | C = O | HO-CH | HCOH | HCOH | HCOH | CH_2OH D-Sedoheptulose

Khi đánh số thứ tự các nguyên tử carbon trong phân tử monosaccharide, bắt đầu từ carbon của nhóm carbonyl của aldose, hoặc carbon ở đầu gần nhóm carbonyl của các ketose.

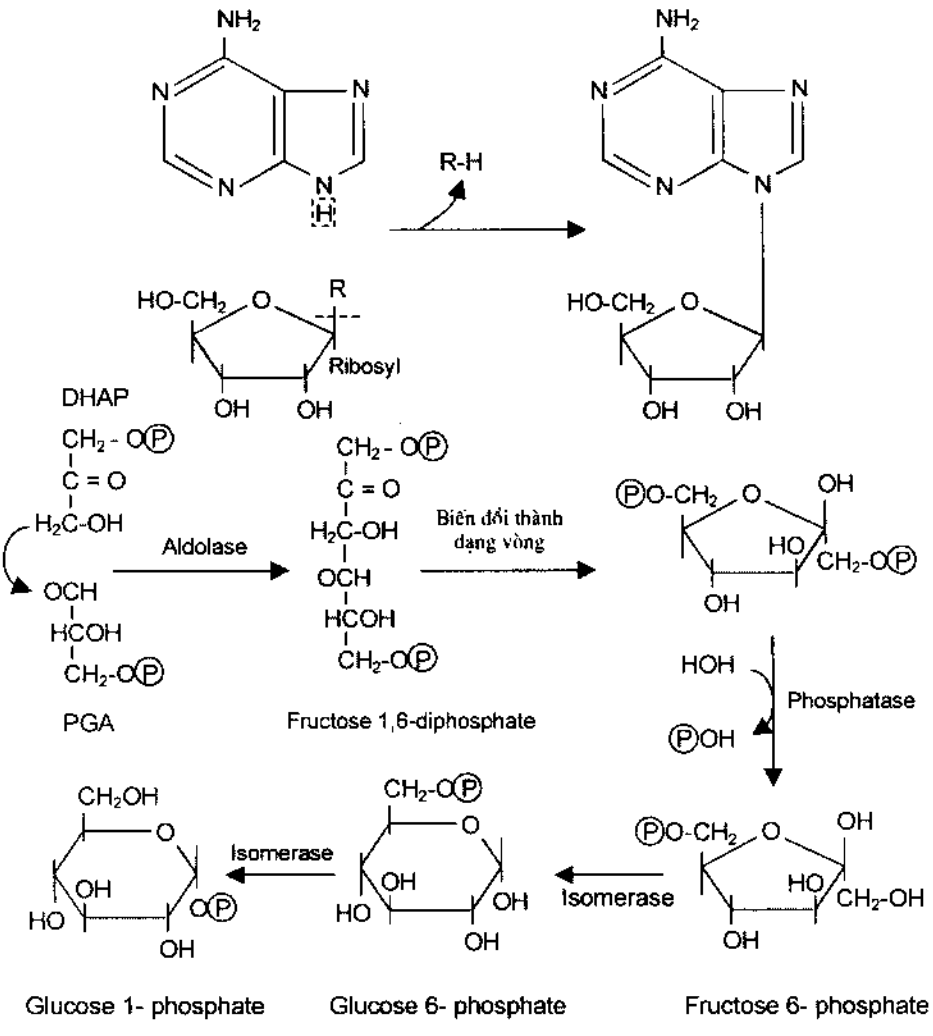
Căn cứ vào vị trí của H và OH ở carbon bất đối mang số thứ tự lớn nhất (carbon bất đối ở xa nhóm carbonyl) giống với D hoặc L-glyceraldehyd để xếp monosaccharide đó vào dạng D hoặc L. Các monosaccharide có khả năng làm quay mặt phẳng ánh sáng phân cực về bên phải (ký hiệu dấu +) hoặc bên trái (ký hiệu dấu -).

Trong hóa sinh học, đường 6C và 5C có ý nghĩa lớn. Một số đường ví dụ 1,6 fructosediphosphate và đường ribose đã được nêu ở trên. Hexose và pentose có thể tồn tại ở dạng thẳng hoặc vòng. Theo đề nghị của Harworth phân tử đường được viết ở dạng vòng. Ở đây người ta tưởng tượng một mặt phẳng nằm ngang có 6 hoặc 5 góc, ở những góc của nó sắp xếp ở phía trên hoặc phía dưới những chuỗi bên vuông góc với mặt phẳng. Ở dạng vòng xuất hiện một nhóm hydroxyl glycoside, nhóm này có khả năng phản ứng cao, dễ dàng tạo liên kết glycoside và có tính khử.



Nhóm hydroxyl glycoside là đặc trưng của đường khử, nhóm này có thể ở phía dưới hoặc phía trên mặt bằng phân tử. Nếu nó nằm phía dưới thì người ta gọi là dạng α, ví dụ α-glucose, nếu ở phía trên thì được gọi là dạng β. Glucose tồn tại chủ yếu ở dạng 6 cạnh (pyranose), fructose và pentose ở dạng vòng 5 cạnh (furanose).

Một liên kết glycoside xuất hiện khi ở một phân tử nguyên tử H được thay thế bằng một gốc đường (glycosyl), ví dụ ở adenine được thay thế bởi 1 ribosyl (gốc đường của ribose).



Hình 4.1. Tổng hợp hexosephosphate từ triosephosphate

Trong trường hợp này nguyên tử N nối với 2 thành phần, vì vậy người ta gọi N-glycoside. Tương tự như vậy S-glycoside và O-glycoside cũng được tạo nên. Trong trường hợp thứ nhất nguyên tử H của một nhóm SH, trong trường hợp thứ hai nguyên tử H của một nhóm OH được thay thế bởi một gốc glycosyl.

Tính chất chung của các monosaccharide

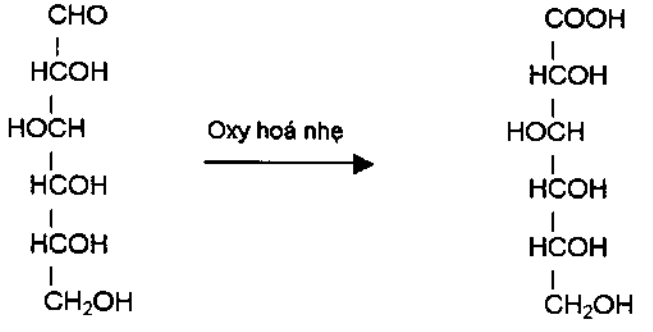
Các monosaccharide là những chất không màu, phần lớn có vị ngọt. Chúng hoà tan tốt trong nước, không tan trong dung môi hữu cơ không phân cực, tan trong dung dịch ethanol 80%.

Tính chất lý học đặc trưng của monosaccharide là tính hoạt quang của chúng, nghĩa là có khả năng làm quay mặt phẳng của ánh sáng phân cực sang phải hoặc sang trái. Có thể đo được góc quay này bằng máy phân cực kế.

Hoá tính quan trọng của monosaccharide là những tính chất của nhóm chức aldehyd hoặc ketone, điển hình là tính khử.

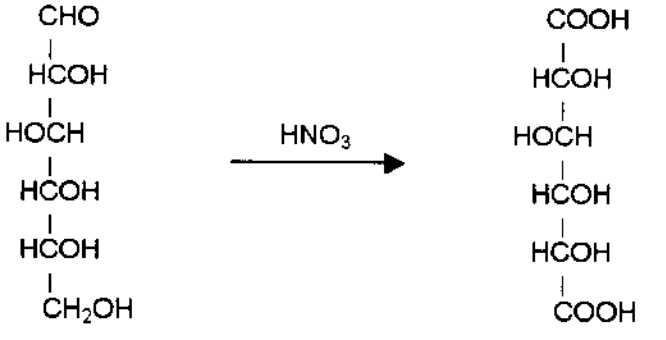
a) Tuỳ điều kiện oxy hóa monosaccharide bị oxy hóa thành các acid khác nhau

- Khi oxy hóa nhẹ bằng dung dịch clo, brom, iod trong môi trường kiềm, hoặc dung dịch kiềm của các ion kim loại, nhóm chức aldehyd của monosaccharide bị oxy hoá. Ion kim loại bị khử thành dạng có hóa trị thấp hơn hoặc đến kim loại tự do (ví dụ $Cu^{2+} \rightarrow Cu^{+1}$, $Ag^{+} \rightarrow Ag^{0}$).



D-glucose D-gluconic acid

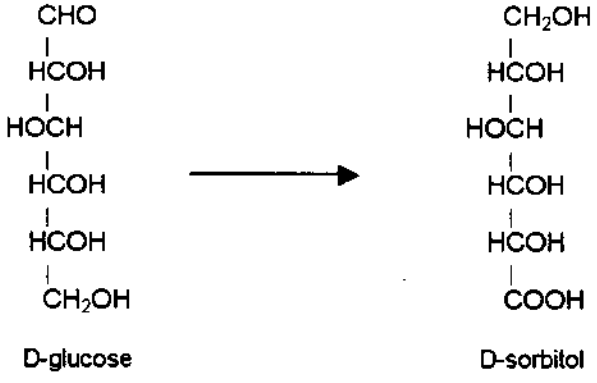
Khi chất oxy hóa là HNO_3 đặc, cả hai nhóm aldehyd và alcohol bậc 1 của monosaccharide đều bị oxy hóa tạo thành acid chứa 2 nhóm carboxyl gọi là saccharic acid:



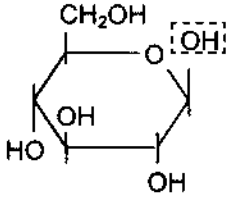
D-glucose Saccharic acid

b) Dưới tác dụng của các chất khử nhóm carbonyl của monosaccharide bị khử tạo thành các polyol tương ứng

Để tiến hành phản ứng khử có thể dùng dòng khí hydro có chất xúc tác là kim loại (hỗn hợp Hg và Na). Ví dụ khi bị khử fructose tạo thành 2 polyol đồng phân là sorbitol và mannitol. Sorbitol cũng là sản phẩm của phản ứng khử glucose.



Trong cơ thể sinh vật, glucose có thể bị khử tạo thành polyol vòng gọi là inosite, ví dụ mezoinosite là yếu tố sinh trưởng của các mô thực vật nuôi cấy. Estephosphoric của nó (fitin) là nguồn dự trữ phospho trong hạt.



c) Phản ứng tạo este thường xảy ra với nhóm alcohol bậc 1, OH glycosite của monosaccharide. Các este phosphat của monosaccharide là những sản phẩm trung gian quan trọng nhất của nhiều quá trình trao đổi chất trong cơ thể sinh vật.

d) Phản ứng của nhóm OH glycosite tạo thành các hợp chất glycoside

Nhóm OH glycoside có thể phản ứng với rượu tạo thành este tương ứng gọi là glycosite. Tuỳ theo vị trí của nhóm OH này mà α- hoặc β-glycoside được tạo thành. Trong phân tử glycoside, phần không phải carbonhydrate được gọi là aglicon.

Có thể phân biệt các kiểu liên kết glycosite khác nhau:

- Liên kết O-glycoside: (G-C-O-A) gốc aglicon (A) kết hợp với carbonhydrate (G) qua O. Liên kết O-glycoside là dạng liên kết của đi-, tri-, oligo- và polysaccharide.

- Liên kết S-glycoside: (G-C-S-A) gốc aglicon (A) kết hợp với carbonhydrate (G) qua S

- Liên kết N-glycoside: (G-C-N-A) gốc aglicon (A) kết hợp với gluxit (G) qua N

- Liên kết C-glycoside: (G-C-C-A) gốc aglicon (A) kết hợp với carbonhydrate (G) qua C

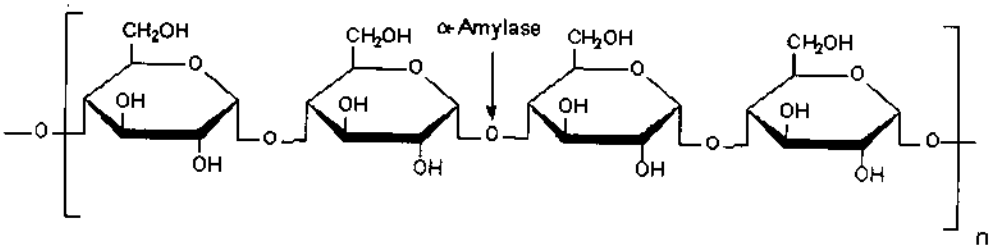
Liên kết glycoside không bền với acid, tương đối bền với kiềm. Dưới tác dụng của acid hoặc các enzyme tương ứng, glycoside bị thuỷ phân tạo thành monosaccharide và aglicon.

4.3. Các polysaccharide

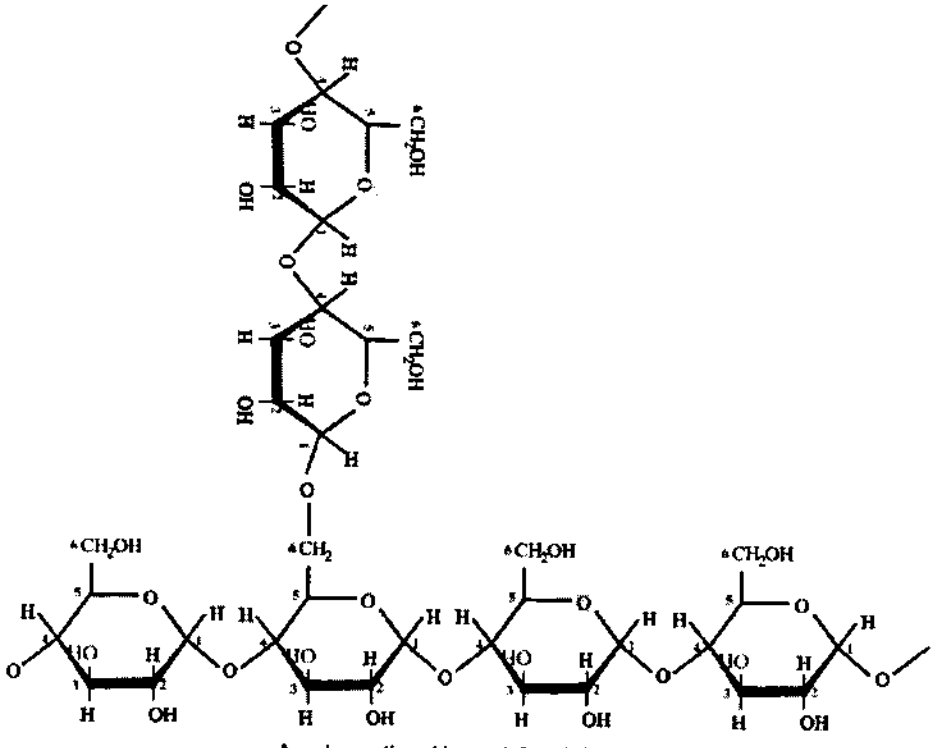
Polysaccharide do nhiều gốc monosaccharide kết hợp với nhau, có khối lượng phân tử lớn, do đó polysaccharide không có tính khử. Các monosaccharide có thể thuộc một loại hay nhiều loại khác nhau. Các liên kết glycoside trong phân tử polysaccharide có thể là α- hoặc β-glycoside. Tên polysaccharide dựa theo tên của monosaccharide cấu tạo nên nó nhưng đổi đuôi "ose" thành đuôi "an". Ví dụ D-glucane, D-fructane, D-galactane. Sau đây chỉ đề cập chi tiết hơn một số polysaccharide phổ biến và quan trọng.

Tinh bột là polysaccharide dự trữ thực vật phổ biến nhất, là một hỗn hợp của amylose và amylopectin, trong đó amylopectin chiếm khoảng 80%. Amylose là một chuỗi không phân nhánh gồm nhiều gốc glucose. Có khoảng 200-300 gốc glucose kết hợp với nhau theo kiểu α-glycoside. Liên kết luôn luôn nằm giữa C_1 và C_4. Ngược lại amylopectin là chuỗi phân nhánh. Sự phân nhánh là do liên kết glycoside giữa C_1 và C_6. Amylopectin được tạo thành từ amylose. Gốc amylose (khoảng 40 gốc glucose) được gắn kết với một chuỗi amylose khác bằng liên kết α -1-6-glycoside. Người ta cho rằng chuỗi amylose dài và cả những chuỗi amylopectin ngắn hơn có cấu tạo xoắn.

Cơ quan dự trữ tinh bột là vô sắc lạp (amyloplast), tương tự như lục lạp và phát triển từ tiền lục lạp. Cơ quan chứa tế bào dự trữ (hạt ngũ cốc, củ khoai tây) gồm các vô sắc lạp xếp sít nhau.

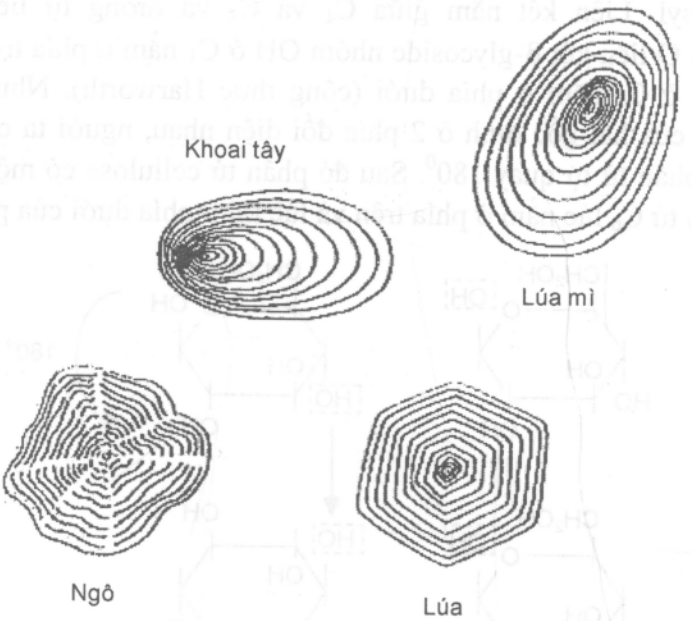


Amylose



Amylopectin với sự phân nhánh 1,6

Tinh bột được tích luỹ trong vô sắc lạp và lục lạp ở dạng hạt tinh bột và tạo nên vị trí tinh bột tập trung. Cấu trúc này đối với từng loại thực vật là khác nhau như ở hình 4.2. Người ta có thể nhận dạng hạt tinh bột có nguồn gốc từ các loài thực vật khác nhau. Ở những vị trí tinh bột tập trung thể hiện sự kết hợp của các hạt tinh bột dày hơn hoặc thưa hơn. Sự kết hợp dày hơn thể hiện vào ban ngày, thưa hơn vào ban đêm. Tinh bột có nhiều trong các loại quả và củ khác nhau, như trong hạt ngũ cốc (60-70 %), trong củ khoai tây (15-20%).



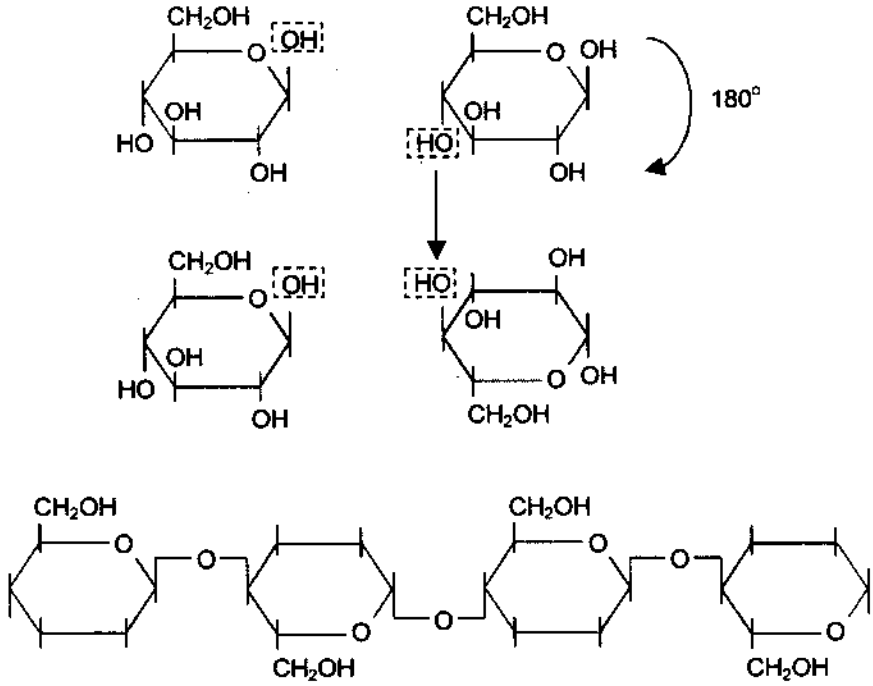
Hình 4.2 Cấu trúc của các hạt tinh bột khác nhau

Trong lục lạp tinh bột chỉ được tích luỹ tạm thời và thực ra chỉ khi hoạt động quang hợp mạnh, vào ban ngày. Ban đêm những hạt tinh bột được phân giải thành các monosacaride, đặc biệt là các triose và được đi ra khỏi lục lạp.

Glycogen là một chuỗi mạch nhánh, đại phân tử được tạo nên từ nhiều gốc glucose. Glycogen (tinh bột của gan) là carbohydrate dự trữ của động vật bậc cao. Nó tồn tại chủ yếu ở trong gan và trong mô cơ. Nồng độ glycogen ở trong gan cao hơn ở trong mô cơ, tuy nhiên vì trọng lượng của mô cơ lớn hơn trọng lượng của gan nên mô cơ có nồng độ glycogen tổng số cao hơn ở gan. Glycogen nằm trong tế bào chất ở dạng hạt nhỏ, có đường kính 10-40 nm. Sự tổng hợp glycogen thực hiện từ UDP-glucose. Nó là chất cho gốc glycosyl đối với enzyme tổng hợp glycogensynthetase. Glycogen ở trong gan chịu trách nhiệm điều khiển nồng độ đường trong máu. Nồng độ đường trong máu nằm giữa 4,5-7mM. Khi cung cấp đường qua thức ăn thì glucose trong máu được tổng hợp thành glycogen, khi cần glucose, ví dụ hoạt động của cơ thì glucose được giải phóng từ glycogen.

Cellulose là một thành phần quan trọng của thành tế bào thực vật. Ở thành tế bào sơ cấp nó chiếm khoảng 30%, ở tế bào già thành phần này còn cao hơn. Cellulose là một glucan, một polysaccharide, được tạo nên từ các

gốc glycosyl. Liên kết nằm giữa C_1 và C_4 và tương tự liên kết trong cellobiose. Ở liên kết β-glycoside nhóm OH ở C_1 nằm ở phía trên, trong khi nhóm OH ở C_4 nằm ở phía dưới (công thức Harworth). Như vậy những nhóm OH của hai gốc đính ở 2 phía đối diện nhau, người ta cho rằng mặt bằng của phân tử tự quay 180^0. Sau đó phân tử cellulose có một hình dạng, mà nguyên tử C_6 lúc nằm ở phía trên và lúc thì ở phía dưới của phân tử.



Cellulose (một đoạn cắt)

Có khoảng 36 chuỗi cellulose riêng biệt kết hợp với nhau thành 1 vi sợi, ở đây các chuỗi liên kết với nhau bằng liên kết hydro. Các vi sợi này có những vùng kết tinh và ở dạng này enzyme khó có thể tác động. Những vi sợi kết hợp lại thành sợi, và bó sợi, như ở bông vải là dạng sợi tinh khiết. Chất cho glucosyl là UDP-glucose. Enzyme, cellulose synthetase, có ở gian bào.

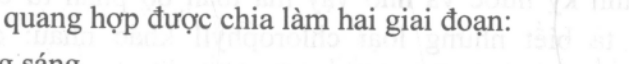
4.4. Hoá sinh quang hợp

4.4.1. Pha sáng trong quang hợp

Trong thế giới sinh vật thì quang hợp là một quá trình cơ bản. Thông qua quang hợp mà năng lượng của ánh sáng mặt trời chiếu xuống được biến

thành năng lượng hóa học. Hầu hết sinh vật của hành tinh chúng ta sống trực tiếp hoặc gián tiếp nhờ năng lượng ánh sáng mặt trời. Như vậy năng lượng được tích luỹ là ở dạng năng lượng hóa học.

Phản ứng tổng quát của quá trình quang hợp thường được biểu diễn bằng phương trình sau, mặc dù nó thể hiện không hoàn toàn đầy đủ.



$$6CO_2 + 6H_2O + \text{Năng lượng} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

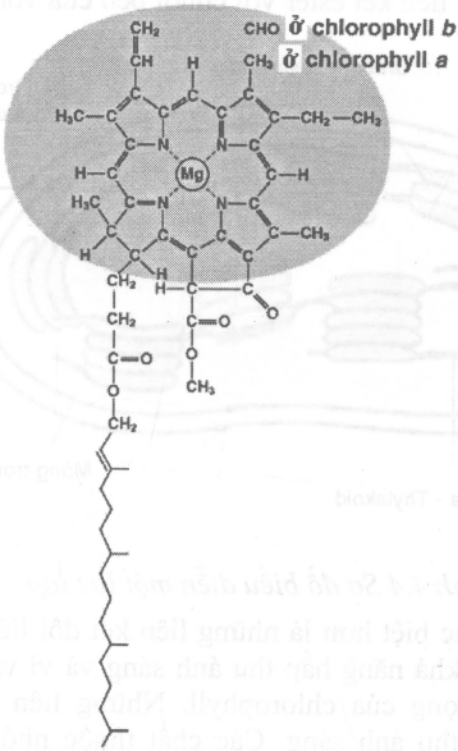
Ở quá trình quang hợp nhờ năng lượng ánh sáng mặt trời mà đường được tạo thành và quang hợp ở thực vật đã gắn liền với việc giải phóng oxy.

Quá trình quang hợp được chia làm hai giai đoạn:

- Phản ứng sáng
- Sự đồng hóa CO_2

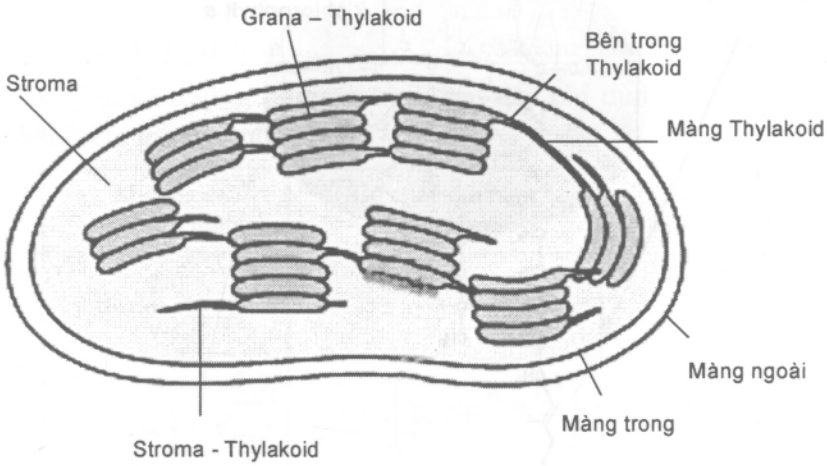
Giai đoạn thứ nhất là quá trình chuyển năng lượng ánh sáng thành năng lượng hóa học.

Giai đoạn thứ hai là tạo ra dạng năng lượng hóa học bền vững và dễ dự trữ hơn.



Hình 4.3 Cấu trúc của diệp lục a và b

Ánh sáng cần cho quá trình quang hợp được tiếp nhận bởi hai nhóm sắc tố: chlorophyll và carotenoid. Ở một số sinh vật bậc thấp hơn còn có phycobillin. Cấu trúc cơ bản của diệp lục là vòng porphyrin, được tạo nên từ 4 vòng pyrrol riêng lẻ (hình 4.3). Ở trung tâm của vòng có một nguyên tử Mg liên kết với các nguyên tử nitơ bởi hai liên kết đồng hóa trị và hai liên kết phối trị. Nguyên tử Mg có thể được tách ra khi có tác động của axit loãng. Phân tử diệp lục không chứa Mg được gọi là pheophytin cũng có một vai trò quan trọng trong phản ứng sáng quang hợp. Chuỗi bên của phân tử diệp lục có tính kỵ nước và nhờ vậy mà toàn bộ phân tử có đặc tính kỵ nước. Người ta biết những loại chlorophyll khác nhau: chlorophyll a, chlorophyll b và chlorophyll vi khuẩn. Sự khác nhau của những loại này là do sự khác nhau của các chuỗi bên. Ở chlorophyll b có nhóm aldehyde, như hình 4.3, được thay thế bằng nhóm methyl ở chlorophyll a. Điều thú vị hơn là chuỗi bên dài kỵ nước được tạo nên từ các dẫn xuất isopren. Ở chlorophyll a và b chuỗi bên là một phytol (rượu) liên kết ester với một chuỗi bên của vòng porphyrine. Ở một số vi khuẩn chlorophyll chứa một farnesol (alkohol) được liên kết ester với chuỗi bên của vòng.



Hình 4.4 Sơ đồ biểu diễn một lục lạp

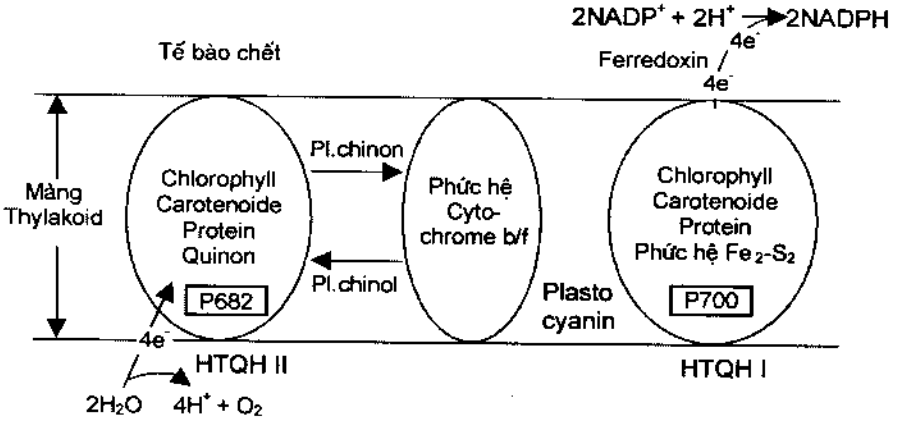
Điều có ý nghĩa đặc biệt hơn là những liên kết đôi liên hợp trong vòng porphyrine. Chúng có khả năng hấp thu ánh sáng và vì vậy những liên đôi này là yếu tố quan trọng của chlorophyll. Những liên kết liên hợp của carotenoide cũng hấp thu ánh sáng. Các chất thuộc nhóm carotenoide có màu vàng đến màu đỏ da cam, thấy rõ ở lá cây vào mùa thu, lúc này diệp lục bị phân huỷ nên không còn che phủ sắc tố carotenoid.

Để hiểu hơn về quá trình quang hợp chúng ta phải đề cập đến cơ quan mà ở đó quang hợp xảy ra, đó là lục lạp. Lục lạp có hình tròn đến hình bầu dục, có đường kính khoảng 10 μm. Nó được bao quanh bởi màng trong và màng ngoài, những màng này có ý nghĩa đối với việc đi vào và đi ra của các chất. Màng trong của lục lạp được tạo nên từ hệ thống màng kéo dãn, ở một số vị trí có dạng xếp chồng lên nhau.

Những màng này xuất hiện dưới kính hiển vi điện tử như những túi dẹt. Vì vậy người ta gọi chúng là thylacoid. Màng thylacoid bao quanh một không gian bên trong gọi là cơ chất của lạp thể và tạo nên sự ngăn cách giữa bên trong thylacoid với môi trường ngoài. Sự phân cách giữa bên trong thylacoid với stroma là cần thiết cho phản ứng sáng của quang hợp. Ở một số vị trí có nhiều thylacoid xếp lên nhau thành chồng rất dày. Chúng xuất hiện dưới kính hiển vi như những hạt (grana), vì vậy người ta gọi chúng là grana-thylacoid. Chúng được nối kết với những thylacoid riêng lẻ như màng kép xuyên qua cơ chất lục lạp. Chúng được gọi là stroma-thylacoid (hình 4.4).

Màng thylacoid là nơi mà ánh sáng được tiếp nhận bởi các sắc tố đã mô tả ở trên và nhờ các hệ thống oxy hóa khử khác nhau mà năng lượng ánh sáng mặt trời được biến đổi thành năng lượng hóa học và thẩm thấu. Quá trình này phức tạp và chưa được giải thích chi tiết.

Màng thylacoid chứa ba cấu thành siêu phân tử, chúng chiếm toàn bộ bề rộng của màng và là thành phần quan trọng của chuỗi vận chuyển điện tử trong quang hợp. Ba phức hệ đó là hệ thống quang hóa I, hệ thống quang hóa II và phức hệ cytochrome b/f (hình 4.5).

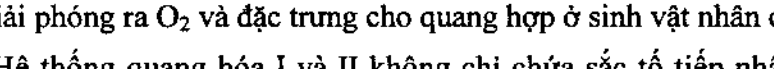


Hình 4.5 Các phức hệ vận chuyển quan trọng nhất của màng thylacoid: Hệ thống quang hóa II (HTQHII), phức hệ cytochrome b/f, hệ thống quang hóa I (HTQHI)

Hệ thống quang hóa là vị trí chứa các sắc tố hấp thụ ánh sáng (những anten). Hệ thống quang hóa I chứa ít nhất là 13 loại protein khác nhau, khoảng 200 phân tử diệp lục, một số lượng carotenoid chưa biết và ba phức hệ Fe-S. Những polypeptide kết hợp và định hướng các phân tử chlorophyll và carotenoid.

Hệ thống quang hóa II chứa ít nhất 11 phân tử polypeptide khác nhau, khoảng 200 phân tử diệp lục a và 100 phân tử diệp lục b, hai phân tử pheophytin, quinon, 4 Mn cũng như Ca và chlorid. Cả hai hệ thống tiếp nhận ánh sáng và chuyển hóa chúng trong sự vận chuyển điện tử.

Hệ thống quang hóa II còn có nhiệm vụ là tách điện tử ra từ H_2O, như vậy là oxy hóa H_2O. Sự oxy hóa này là quá trình phức tạp, gồm 4 bước (mỗi bước $1e^-$ được vận chuyển và ở đây có sự tham gia của Mn với sự thay đổi hóa trị).

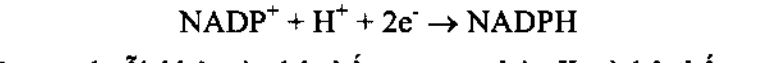


$$2H_2O \rightarrow 4e^- + 4H^+ + O_2.$$

Quá trình tách nước trong quang hợp được gọi là quang phân ly nước, nó giải phóng ra O_2 và đặc trưng cho quang hợp ở sinh vật nhân chuẩn.

Hệ thống quang hóa I và II không chỉ chứa sắc tố tiếp nhận ánh sáng mà mỗi hệ thống còn chứa một phân tử diệp lục hoàn toàn đặc biệt thể hiện ở vị trí của nó, phân tử diệp lục này khi tiếp nhận ánh sáng có khả năng bắn ra 1 điện tử. Quá trình này như là sự khởi đầu cho sự vận chuyển điện tử trong quang hợp. Phân tử diệp lục đặc biệt của hệ thống quang hóa I hấp thu cực đại ánh sáng có bước sóng 700 nm. Vì vậy gọi là P700 (Pigment 700) và phân tử diệp lục đặc biệt của hệ thống quang hóa II hấp thu cực đại ở 682 nm.

Để bắn ra 1 điện tử thì phân tử diệp lục cần năng lượng. Năng lượng được hấp thụ ở dạng năng lượng ánh sáng từ những sắc tố khác (chlorophyll và carotenoid) của mỗi hệ thống quang hóa và được chuyển đến P682 cũng như P700 qua sự cộng hưởng điện tử. Bằng cách này hai hệ thống quang hóa tạo ra một sự vận chuyển điện tử khi có ánh sáng, sự vận chuyển điện tử này đi từ H_2O như là nguồn điện tử, qua hệ thống quang hóa II, plastochinone, phức hệ cytochrom b/f, plastocianin đến hệ thống quang hóa I và cuối cùng đến $NADP^+$ và nó được khử thành NADPH.



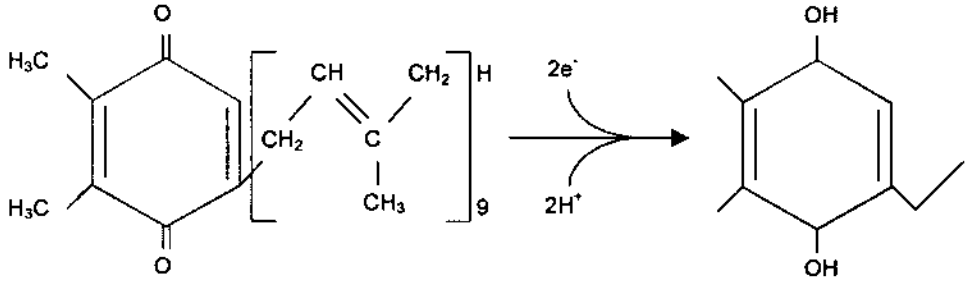
$$NADP^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADPH$$

Trong chuỗi khử này hệ thống quang hóa II và hệ thống quang hóa I khởi động kế tiếp nhau. Plastochinone cũng như phức hệ cytochrome b/f và

plastocyanin có chức năng vận chuyển e^- giữa hai hệ thống quang hóa này vì chúng định vị ở những vị trí khác nhau. Sự vận chuyển e^- đã làm cho năng lượng ánh sáng được biến đổi thành năng lượng hóa học, ở dạng khử NADPH (1 mol NADPH = 220 kJ).

Thành viên vận chuyển điện tử cơ bản ở trong chuỗi vận chuyển là phức cytochrome b/f, cũng là protein có heme là nhóm prostetic, và vận chuyển điện tử là do sự thay đổi hóa trị của Fe. Bên cạnh phức cytochrome b/f là plastocyanin, một protein chứa Cu (protein màu xanh) vận chuyển điện tử giữa phức cytochrome b/f và hệ thống quang hóa I. Sự vận chuyển này có thể là do sự thay đổi hóa trị của Cu. Hệ thống plastochinon-plastochinol vận chuyển H từ hệ thống quang hóa II đến phức cytochrome b/f. Khoảng cách vận chuyển ở đây lớn hơn. Nó khuếch tán trong "vùng đuôi" của lớp màng kép lipid. Thành phần màng chứa nhiều acid béo chưa no thì sự khuếch tán của plastochinone dễ dàng hơn.

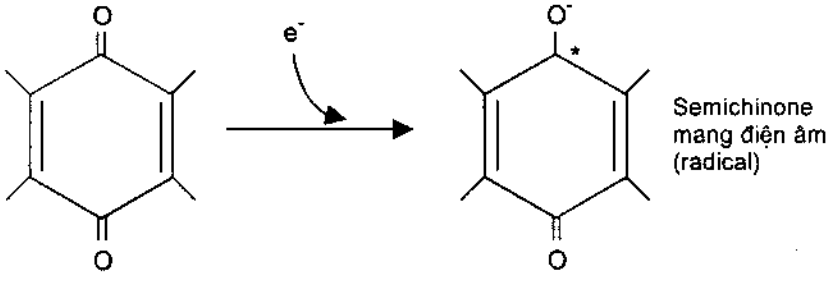
Sau đây là phân tử plastochinone và sự khử nó thành plastochinol (plastohydrochinone). Đặc tính kỵ nước của phân tử là do các nhóm CH_3 và chuỗi bên dài với 9 gốc isopren. Phản ứng khử vòng chinone thực hiện qua sự tiếp nhận của $2e^-$ và $2H^+$ và vòng quinone chuyển sang một hệ thống liên kết đôi của bensoide.



Plastochinone Plastochinol

Hệ thống plastochinone/plastochinol vận chuyển H giữa hệ thống quang hóa II và phức hệ cytochrome b/f. Phức hệ dạng oxy hoá-plastochinon gắn vào hệ thống quang hóa II để trước hết nhận $2e^-$ và tạo thành semichinone (dạng anion) và sau đó nhận $2H^+$ của hệ thống quang hóa II để tạo thành dạng khử plastochinol. Sau đó nó tách ra khỏi hệ thống quang hóa II và khuếch tán đến phức hệ cytochrome b/f. Đến đây nó bị oxy hóa khi nhường $2e^-$ và $2H^+$, tạo nên plastochinone và lại khuếch tán về hệ thống quang II (hình 4.5).

Chức năng cơ bản của hai hệ thống quang hóa là hấp thu ánh sáng và tập trung năng lượng của chúng đến P682 và P700, rồi dẫn đến quá trình quang hoá, thực chất là bắn ra $1e^-$. Chức năng của 2 hệ thống tương tự nhau, tuy nhiên những quá trình chi tiết ở hai hệ thống khác nhau, và về chi tiết cũng chưa được giải thích hết. Sự nhường 1 điện tử của P682 làm xuất hiện một chất oxy hóa rất mạnh (phân tử có khả năng oxy hóa chất khác) có thế năng khoảng 1200 mV. P682 ở dạng oxy hóa (P^+682) có khả năng oxy hóa H_2O, nghĩa là tách e- ra khỏi H_2O. Giai đoạn quan trọng ở quá trình này là sự tiếp nhận e^- từ P682 bắn ra.



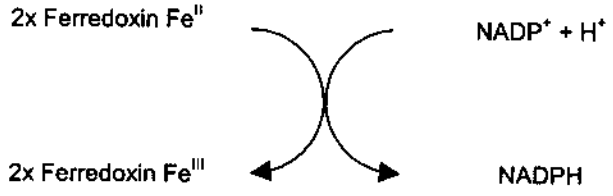
Ngày nay người ta cho rằng, chất nhận điện tử bắn ra đó là những hợp chất chinone. Ở đây chinone được khử thành bán chinone (semichinone mang điện tích âm). Semichinone là 1 radical, tiếp tục phản ứng nhanh, có thể chuyển e^- của nó đến plastochinone. Dạng semichinone được khử để tạo thành plastochinone.

Pheophytin cũng tham gia vào sự vận chuyển e^-. Điện tử được bắn ra từ P682 có thể không được tiếp nhận ngay, dưới tác dụng của ánh sáng đã tạo nên rất nhanh "lỗ hổng điện tử" của P682. Dạng oxy hóa của P682 (P^+682) tồn tại rất ngắn với thời gian khoảng 10^{-12}giây.

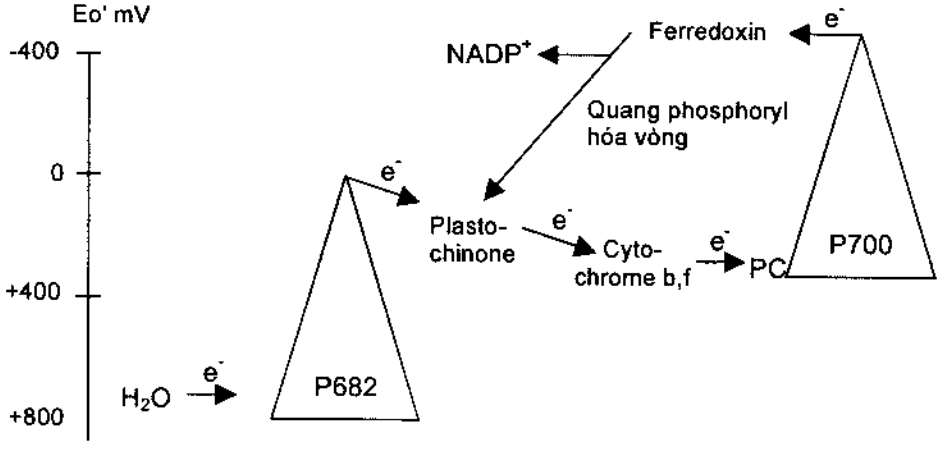
Nhờ có hệ thống quang hóa II, dưới tác dụng của ánh sáng $1e^-$ từ H_2O có thế năng oxy hóa khử cao (thế năng oxy hóa khử tiêu chuẩn là +800 mV) được chuyển đến plastochinone có thế oxy hóa khử thấp (thế khử tiêu chuẩn 100 mV). Như vậy khả năng khử của e^- được tăng lên rất nhiều.

Trong hệ thống quang hóa I e^- được bắn ra từ P700 được tiếp nhận bởi 1 phức hệ Fe-S. Nó chuyển e^- này tiếp tục đến ferredoxin ở dạng hoà tan nằm trong stroma của lạp thể. Ở đây cũng thực hiện một "phản ứng ngược chiều" của e^- nghĩa là điện tử được chuyển đến nơi có điện thế âm lớn hơn, một quá

trình cần năng lượng, được thực hiện nhờ ánh sáng mặt trời tiếp nhận được. Thế khử tiêu chuẩn của P700 nằm khoảng +400 mV, của ferredoxin khoảng - 400 mV. Năng lượng được nâng lên rõ rệt nhờ hệ thống quang hóa I. Ferredoxin khử được tạo nên là một chất khử mạnh, có khả năng khử $NADP^+$.

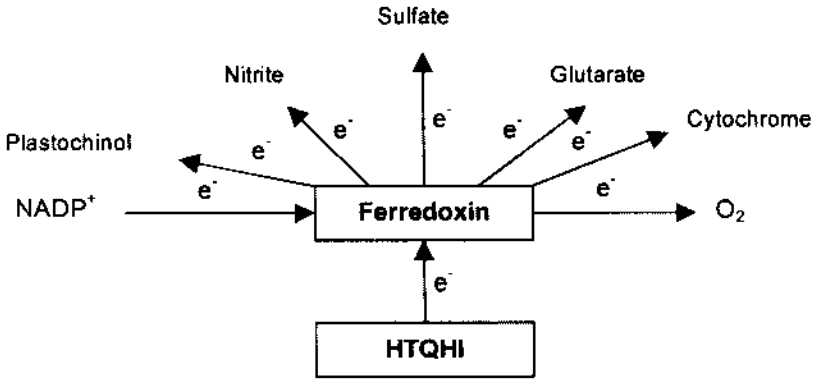


Ở hình 4.6 đã đưa ra sơ đồ được gọi là sơ đồ Z, chỉ ra hai sự nâng năng lượng được thực hiện từ hệ thống quang hóa I và II trong chuỗi vận chuyển e của quang hợp. Ở đây e- của H_2O được chuyển đến $NADP^+$ để tạo nên NADPH là một chất khử mạnh cần cho nhiều quá trình tổng hợp.



Hình 4.6 Sơ đồ Z biểu diễn sự vận chuyển điện tử từ điện thế dương đến điện thế âm, sự vận chuyển năng lượng thực hiện qua P682 và P700

Ferredoxin là một chất khử mạnh, có khả năng khử nhiều chất, được chỉ ra ở hình 4.7. Ngoài ra $NADP^+$ còn có ý nghĩa đặc biệt trong việc khử nitrite, sulfate và glutarate. Phản ứng khử nitrite và sulfate là một bước quan trọng trong sự đồng hóa các ion vô cơ. Vì vậy phản ứng sáng của quang hợp không chỉ là sự đồng hóa CO_2 mà còn đồng hóa cả N và S.



Hình 4.7 Những khả năng phản ứng của ferredoxin

Trong hình 4.6 đã chỉ ra từ ferredoxin e^- không những có thể được chuyển đến NADP-reductase mà còn trở về plastochinone. Như vậy tạo nên một dòng điện tử khép kín. Ở đây điện tử lại đi qua cytochrome f và plastocyanin để trở về lại P700 và từ đây lại nhờ năng lượng ánh sáng được đưa đến ferredoxin. Dòng điện tử khép kín này cũng tạo nên sự phân tách proton và nhờ vậy mà tổng hợp ATP, dòng điện tử khép kín này được gọi là quang phosphoryl hóa vòng.

Quang phosphoryl hóa vòng chỉ "sản xuất" ATP, quang phosphoryl hóa không vòng tạo nên ATP và NADPH. Bằng cách này quá trình quang hợp có thể tự phù hợp với nhu cầu ATP và NADPH. Quá trình tổng hợp tinh bột chủ yếu cần ATP, trong khi tổng hợp acid béo cần tương đối nhiều NADPH. Để đồng hóa CO_2, cần ATP và NADPH theo tỷ lệ 3:2.

Ferredoxin cũng có thể chuyển e^- của nó đến O_2 (hình 4.7). Sau đó H_2O xuất hiện, vì O_2 bị khử lập tức phản ứng với H^+ trong môi trường nước.

$$1/2O_2 + 2e^- \rightarrow O^{2-}$$

$$O^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O$$

Phản ứng này có nghĩa là tiêu hao e^- và triệt tiêu gradient H^+. Vì vậy nó làm quang phosphoryl hóa tách rời sự vận chuyển e^-.

Tổng kết chuyển hóa năng lượng quang hợp người ta cho rằng 4 mol proton ánh sáng đỏ cần cho việc vận chuyển 2 mol e^- và ở quá trình quang hợp chuỗi vận chuyển e^- tạo nên 1 mol ATP và 1 mol NADPH.

Tổng quát năng lượng của quá trình quang hợp

Đầu vào:

4 Einstein (= mol proton) $\rightarrow 710 \times 10^3$J

Đầu ra:

1 mol NADPH $\rightarrow 220 \times 10^3$J

1 mol ATP $\rightarrow 32 \times 10^3$J

Hiệu suất: 35,5 % 252×10^3J

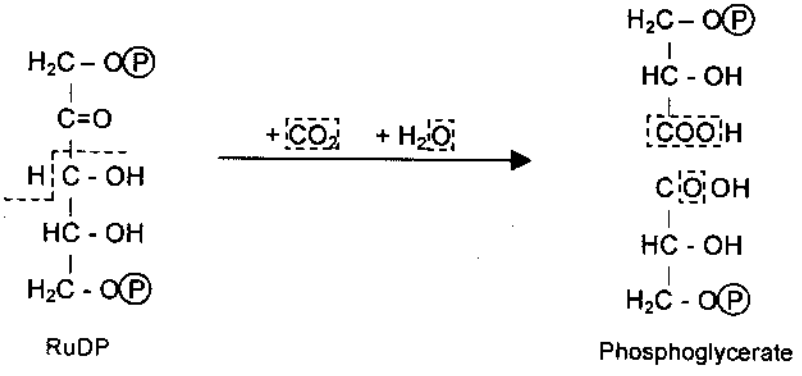
Như vậy khoảng 35% năng lượng ánh sáng hấp thu được chuyển sang dạng năng lượng hóa học.

4.4.2 Pha tối trong quang hợp (chu trình Calvin)

Sự kết hợp CO_2 vào một chất nhận hữu cơ (sự đồng hóa CO_2) là một trong những quá trình sinh học quan trọng nhất. Nhờ quá trình này mà cacbon vô cơ được đưa vào thế giới sống. Phản ứng được xúc tác bởi enzyme ribulosediphosphate-carboxylase (RuDP-carboxylase), enzyme này có nhiều trong lá xanh và nó chiếm khoảng 30-50% protein hoà tan trong lá. Enzyme gồm 8 tiểu đơn vị lớn và 8 tiểu đơn vị nhỏ, trong đó chỉ có các tiểu đơn vị lớn có hoạt tính xúc tác, các tiểu đơn vị nhỏ có chức năng điều khiển. Thú vị hơn là thông tin di truyền của các tiểu đơn vị lớn định vị ở trên DNA của lạp thể (DNA là chất mang gen).

Để xúc tác enzyme cần những điều kiện hoàn toàn xác định, đó là giá trị pH (pH 8,3-8,6) và nồng độ Mg^{2+} tương đối cao. Cả hai đều bị tác động bởi sự vận chuyển e^- qua màng thylacoid. Vì vậy enzyme chỉ hoạt động trong điều kiện chiếu sáng. Phản ứng này giải phóng nhiệt ($\Delta G^{01} = -40 \times 10^3$J) và tương ứng với phương trình sau:

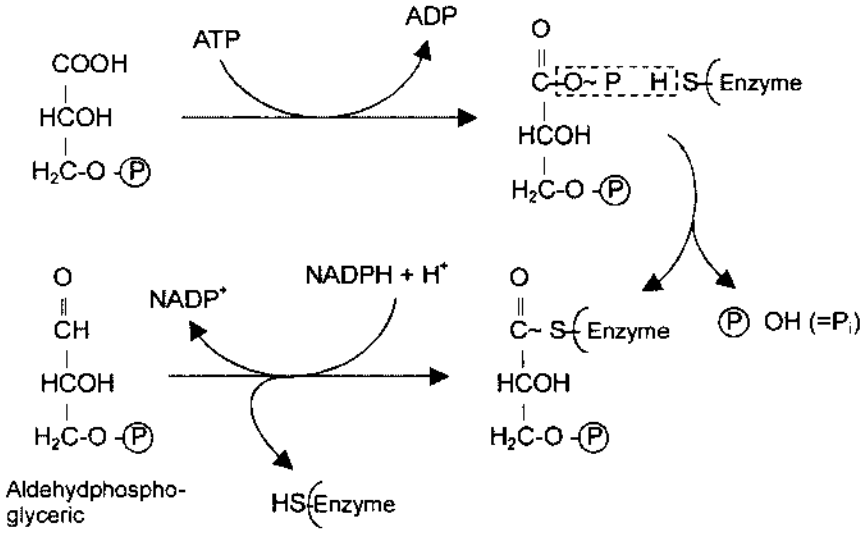
RuDP + CO_2 + H_2O $\rightarrow$ 2 phosphoglyceric acid.



Người ta cho rằng carboxyl hóa ribulosediphosphate (RuDP) dẫn đến tạo thành một hợp chất trung gian có 6 nguyên tử C với enzyme, sau đó được tách ra thành hai phân tử phosphoglyceric acid. Như sơ đồ trên CO_2 được tiếp nhận có mặt trong phosphoglyceric acid "phía trên" và O từ phân tử H_2O được tiếp nhận thì ở trong phosphoglyceric acid "phía dưới".

Một thời gian dài người ta đánh giá thấp hoạt động của enzyme này vì khi phân lập enzyme thường mất hoạt tính. Khó khăn nữa là CO_2 không những là cơ chất mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến xúc tác. Ngày nay người ta biết hoạt tính của enzyme được đặc trưng bởi hệ số K_m (CO_2) từ 10-20μm là đủ để sự đồng hóa CO_2 xảy ra trong tự nhiên.

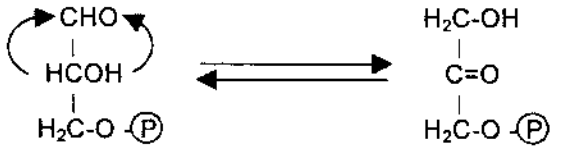
Sản phẩm carboxyl hoá, phosphoglyceric acid được khử để tạo thành aldehydphosphoglyceric. Quá trình này thu năng lượng, cần ATP và NADPH. Cả hai coenzyme tồn tại ở stroma của lục lạp nhờ phản ứng sáng. Khi không có ánh sáng, nồng độ ATP và NADPH thấp thì phản ứng xảy ra ngược lại, nghĩa là aldehydphosphoglyceric bị oxy hóa thành phosphoglyceric acid. Phản ứng khử phosphoglyceric acid tạo ra sản phẩm trung gian là 1,3 diphosphoglyceric acid. Ở quá trình này bên cạnh ATP và NADPH còn có một SH-enzyme-photphoglycerate-dehydrogenase tham gia, được biểu diễn ở sơ đồ sau:



Aldehydphosphoglyceric là đường đầu tiên xuất hiện ở quá trình đồng hóa CO_2. Nó dễ dàng chuyển sang dạng đồng phân phosphodioxyaketone

(PDOA). Cân bằng phản ứng nghiêng mạnh về phía phosphodioxyaketone (PDOA) và khoảng 90% triosophosphate nằm ở dạng PDOA.

Để có sự đồng hóa CO_2 liên tục thì chất nhận CO_2, RuDP phải được tạo nên ở một nồng độ nhất định. Đường 3C được tạo ra là aldehydphosphoglyceric và phosphodioxyaketone được biến đổi một phần thành RuDP. Trình tự phản ứng là một quá trình khép kín. Sự đồng hóa CO_2 và biến đổi của triosephosphate được giải thích bởi Calvin và cộng sự của ông. Vì vậy chu trình này được gọi là chu trình Calvin hoặc là chu trình khử pentosophosphate vì sự biến đổi từ phosphoglyceric acid thành aldehydphosphoglyceric là phản ứng khử.

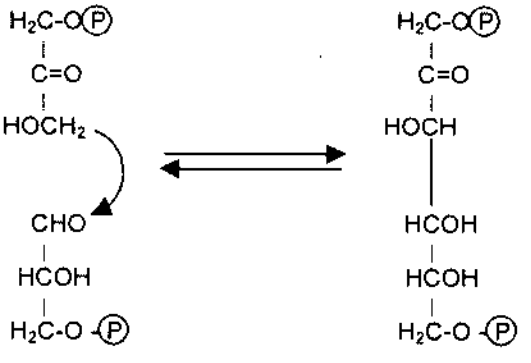


Aldehydphospho-glyceric (aldose) — Phosphodioxy-aceton (cetose)

Có ba loại phản ứng đặc trưng cho chu trình Calvin:

- Phản ứng phosphatase
- Phản ứng aldolase
- Phản ứng transcetolase

Phản ứng phosphatase đã được đề cập ở chương enzyme. Những enzyme aldolase có thể gắn kết một aldose với một cetose, ví dụ aldehydphosphoglyceric và photphodioxyacetone. Phản ứng này chỉ có một sự biến đổi nhỏ về năng lượng, đây là phản ứng thuận nghịch, nó được biểu diễn như sau:

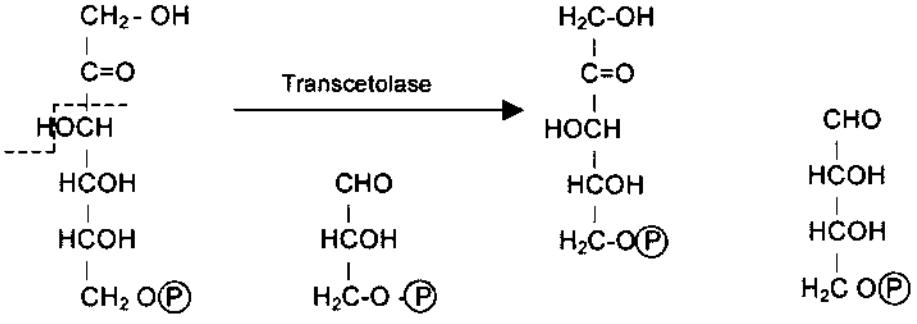


Phosphodioxy aceton (cetose) + Aldehydphosphoglyceric (aldose)
→ Fructose 1,6 diphosphate

Ở phản ứng transcetolase 2C của cetose được chuyển lên một aldose (ví dụ aldehydphosphoglyceric).

Bằng cách tương tự 2C của fructosemonophosphate được chuyển lên aldehydphosphoglyceric, tạo thành một pentosephosphate và một tetrosephosphate.

Chu trình Calvin bắt đầu với một phản ứng aldolase (hình 4.8). Khi tồn tại nhiều triosephosphate thì aldehydphosphoglyceric phản ứng với phosphodioxyacetone để tạo nên fructose1,6 diphosphate.



Bằng cách này đường 6C đầu tiên được tạo nên. Từ fructose 1,6 diphosphate một phosphate được tách ra nhờ enzyme phosphatase, làm xuất hiện fructosemonophotphate. Fructosemonophosphate cùng với một aldehydphosphoglyceric khác được biến đổi thành một đường có 4C (erythrosephosphate) và một đường có 5C (xylulosephosphate) bằng phản ứng transcetolase. Erythrosephosphate phản ứng với một triosephosphate bằng phản ứng aldolase tạo thành một đường có 7C (sedoheptulosediphosphate). Từ đây một phosphate được tách ra nhờ enzyme phosphatase tạo nên sedoheptulosephosphate. Sedoheptulo-sephosphate phản ứng với một triosephosphate khác nhờ enzyme transcetolase để tạo thành hai đường có 5C là xylulosephosphate và ribosephosphate.

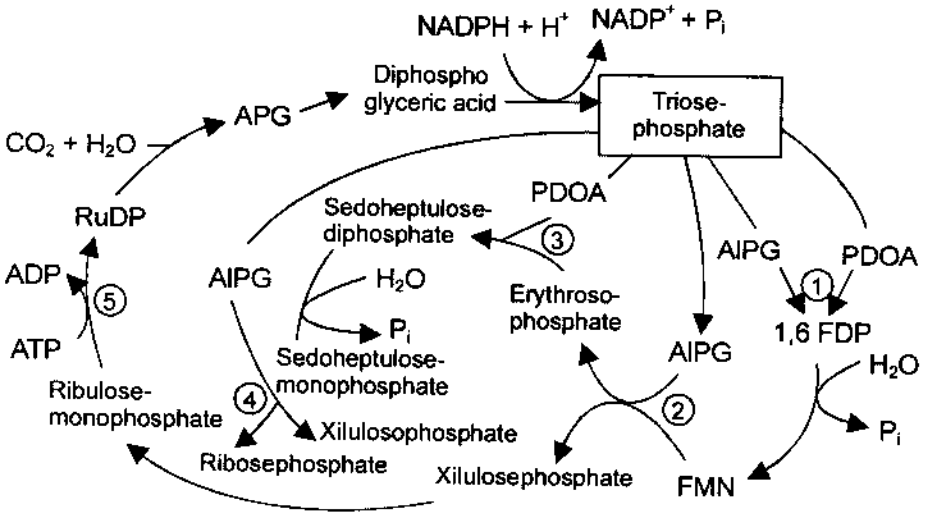
Trong phản ứng tổng quát thì cần 5 đường triosephosphate để tạo nên 3 đường pentosephosphate, trong đó 1 ribosephosphate và 2 xylulosephosphate. Ba đường pentosephosphate được biến đổi sang dạng đồng phân của nó là ribulosephosphate, đường này được photphoryl hóa

nhờ ATP để tạo thành ribulosediphosphate. Nhờ vậy mà chất nhận CO_2 được tái tạo.

Ba phân tử ribulosodiphosphate có thể kết hợp với 3 phân tử CO_2 và như vậy sẽ tạo nên 6 phân tử triosephosphate. Ở đây 5 phân tử triosephosphate cần để tái tạo nên 3 phân tử ribulosediphosphate. Một phân tử triosephosphate còn lại cho mục đích tổng hợp. Tương ứng có phương trình như sau:

$$3CO_2 + 9\ ATP + 6NADPH \rightarrow 1\ triosephosphate + 9\ ADP + 6NADP^+$$

Từ phương trình trên ta thấy để khử một phân tử phosphoglyceric acid cần 1 ATP và 1 NADPH. Để tạo nên 1 phân tử ribulosediphosphate từ ribulosephosphate thì cần thêm một phân tử ATP. Chu trình tổng quát cần 3 ATP và 2 phân tử NADPH cho cố định 1 phân tử CO_2. Với quá trình quang phosphoryl hóa vòng thì hệ thống sẽ tạo được nhiều phân tử ATP hơn NADPH, nghĩa là tỷ lệ yêu cầu theo lý thuyết ATP/ NADPH phù hợp là 3/2.

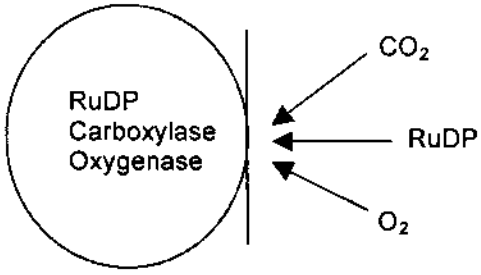


Hình 4.8 Chu trình Calvin, PGA: phosphoglyceric acid, PDOA: phosphodioxyacetone, FMP: fructosemonophosphate, FDP: fructosediphosphate

4.4.3 Hô hấp sáng- Chu trình Glycolate

Cây xanh khi có ánh sáng còn tiếp nhận O_2 và giải phóng CO_2. Hô hấp phụ này được gọi là hô hấp sáng. Sự tiếp nhận O_2 có thể do nhiều quá trình ví dụ ferredoxin tham gia vào quang hợp chuyển e^- của nó trực tiếp đến O_2, như vậy H_2O xuất hiện (hình 4.7).

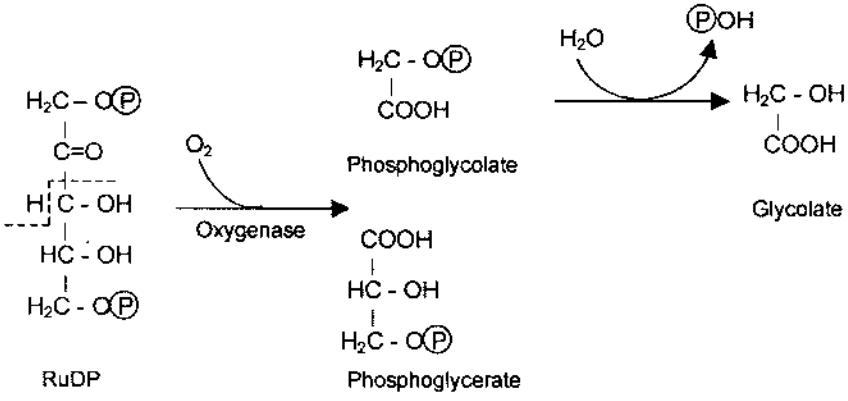
Warburg đã chỉ ra rằng O_2 ức chế sự đồng hóa CO_2. Enzyme xúc tác cho đồng hóa CO_2 là ribulosediphosphate-carboxylase thể hiện không những hoạt tính carboxylase mà còn hoạt tính oxygenase. Sự thể hiện hoạt tính nào là phụ thuộc vào nồng độ CO_2 và nồng độ O_2. CO_2 ức chế oxygenase, O_2 ức chế carboxylase. Carboxyl hóa và oxy hóa có cùng trung tâm hoạt hoá, là gốc lysine. Những điều kiện như là Mg^{2+} kích thích carboxyl hóa và giá trị pH cao kích thích sự oxy hoá.



Hình 4.9 Sự cạnh tranh giữa CO_2 và O_2 vào cùng một vị trí của enzyme ribulosephosphate-carboxylase-oxygenase

Cuối cùng thì cả hai phản ứng có cùng cơ chất, đó là ribulosediphosphate. Sự cạnh tranh giữa O_2 và CO_2 với phân tử enzyme được minh họa ở hình 4.9.

Sự cạnh tranh của CO_2 và O_2 ở cùng một vị trí của enzyme tạo ra sự liên quan với quá trình quang hợp. Khi cường độ quang hợp cao thì nồng độ O_2 ở trong tế bào mesophyll tăng lên do quá trình quang phân ly nước, trong khi sự đồng hóa CO_2 thì nồng độ CO_2 giảm. Những điều kiện này thuận lợi cho phản ứng oxy hoá. Như vậy những điều kiện thuận lợi cho quang hợp như nhiệt độ thích hợp, cường độ ánh sáng mạnh kích thích sự oxy hóa ribulosediphosphate. Phản ứng được biểu diễn như sau:

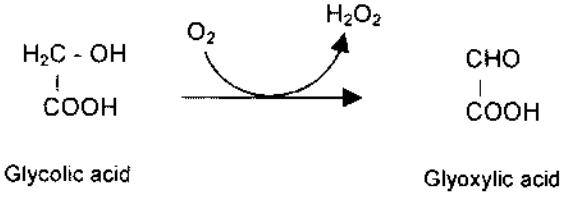


Ở đây phân tử O_2 được tách ra làm 2 nguyên tử: một nguyên tử gắn với gốc 2C (phosphoglycolate), nguyên tử oxy khác gắn với gốc có 3C.

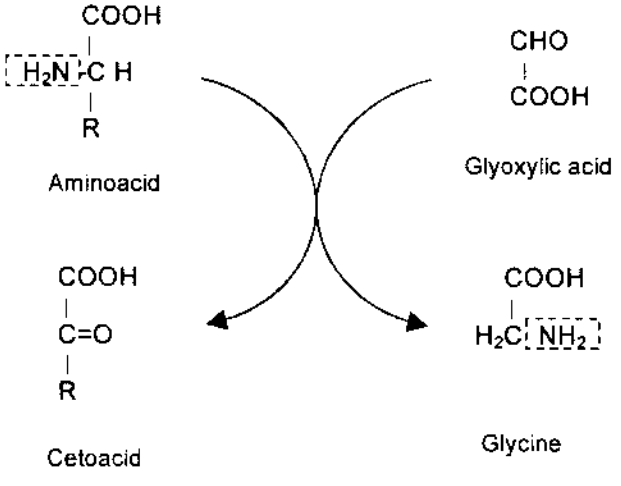
Phosphoglycolic acid là dẫn xuất của acetic acid. Bằng phản ứng phosphatase từ phosphoglycolic acid, glycolic acid sẽ được tạo thành.

Sự oxy hóa ribulosediphosphate tạo nên chu trình glyoxylate, đây là những phản ứng quan trọng của quang hô hấp. Phản ứng tạo thành phosphoglycolate và phản ứng khử phosphoryl hóa của nó được xúc tác bởi enzyme phosphatase xảy ra ở trong cơ chất của lục lạp. Hoạt tính của glycolate-phosphatase được kích thích bởi nồng độ Mg^{2+} và độ pH cao và đây là những điều kiện thuận lợi cho quang hợp.

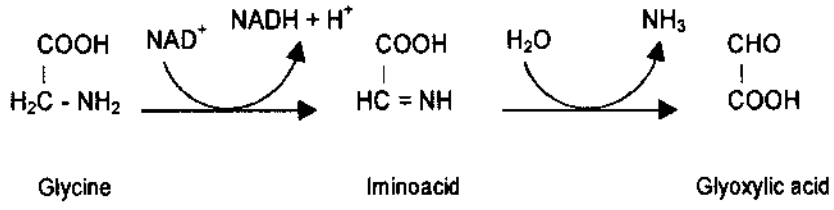
Glycolate từ lục lạp đi đến peroxisome là vi cơ quan tử nằm sát cạnh lục lạp, được bao bọc bởi màng và chứa các enzyme khác nhau như transaminase, oxidase và catalase.



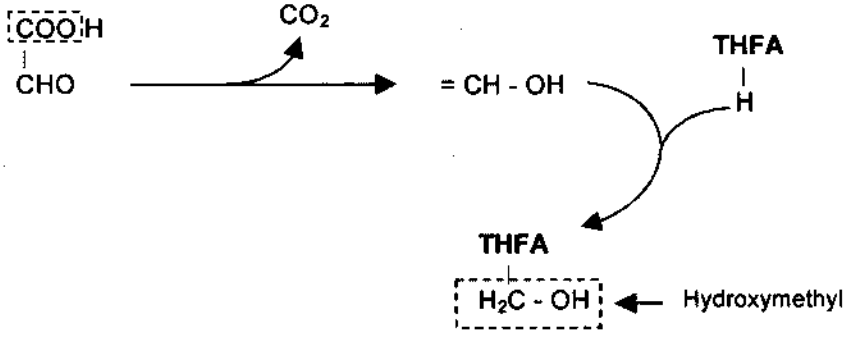
Trong peroxisome glycolate bị oxy hóa để tạo thành glyoxilic acid nhờ một oxidase. H_2O_2 xuất hiện được phân giải thành $H_2O + 1/2\ O_2$ và glyoxilic acid bị biến đổi thành một amino acid, là glycine nhờ một transaminase. Transaminase sẽ được đề cập kỹ hơn ở chương proteine, ở đây chỉ nêu lên nguyên lý của nó là nhóm amin của một amino acid được chuyển lên một nhóm ceto hoặc nhóm aldehyd. Amino acid trở thành cetoacid.



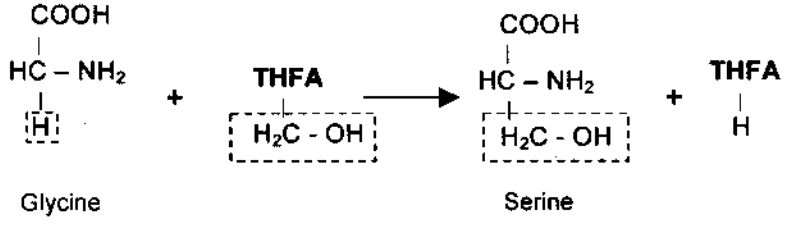
Glycine đi từ peroxisome vào ty thể, là cơ quan tử mà trong đó hô hấp xảy ra. Glycine bị oxy hóa dưới tác dụng của NAD^+ và sau đó bị khử amin hóa (giải phóng NH_3), xuất hiện lại glyoxylic acid.



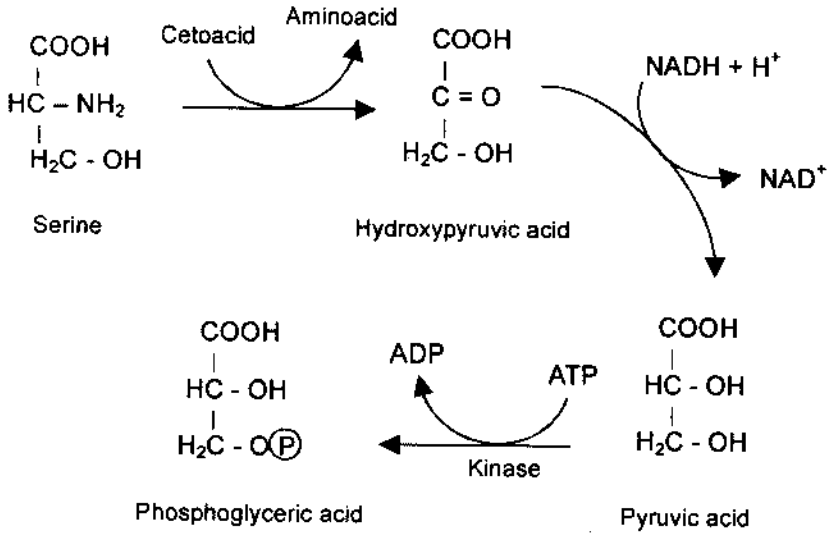
NADH tạo ra ở phản ứng khử và là cơ chất cho chuỗi enzyme hô hấp. Glyoxilic acid bị khử cacboxyl hóa và phản ứng với gốc = CH-OH tự do.



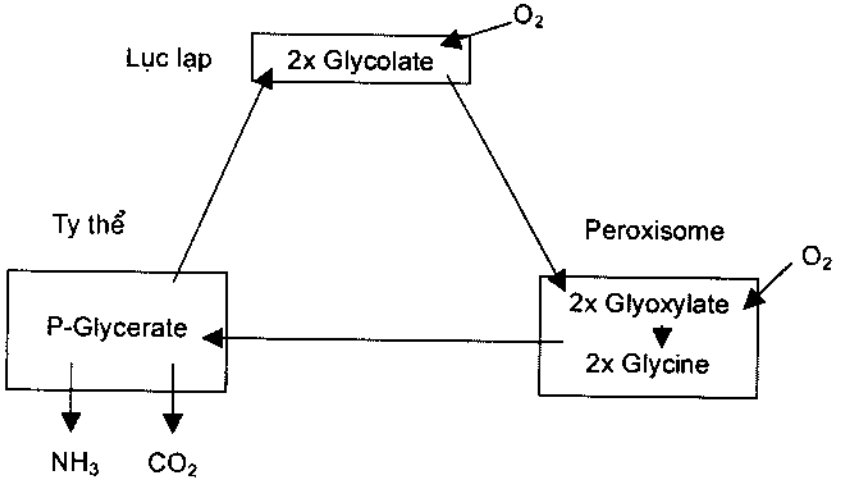
Tetrahydrofolic acid (THFA) kết hợp với một gốc hydroxylmethyl, gốc này được chuyển đến một glycine, tạo nên aminoacid là serin và THFA lại trở về trạng thái ban đầu của nó.



Serine bị khử amin hóa để tạo nên hydroxylpyruvate và chất này có thể được biến đổi thành phosphoglyceric acid bằng phản ứng khử và phản ứng phosphoryl hóa.



Phản ứng cần 1 NADH. Phosphoglyceric acid là một chất trao đổi của chu trình Calvin. Chất này lại đi vào lục lạp và ở đó nó được sử dụng để tạo nên triosephosphat. Như hình 4.10 chỉ ra, chu trình glyoxylate xảy ra trong các cơ quan tử khác nhau. Tổng quát là cứ hai phân tử glycolate được sử dụng để tổng hợp nên một phân tử phosphoglyceric acid.



Hình 4.10 Những chất trao đổi quan trọng của chu trình glycoxylate ở các cơ quan tử khác nhau

Chu trình glyoxilate có mối liên hệ chặt chẽ với chu trình Calvin qua ribulosediphosphate-carboxylase-oxygenase. Tổng quát của chu trình

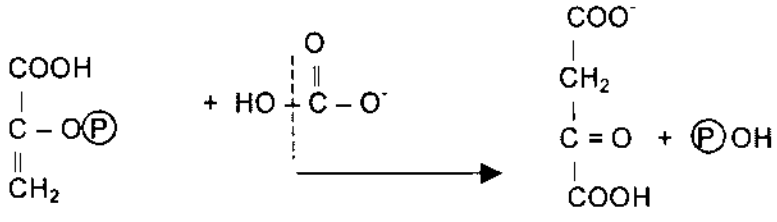
glyoxilate là ở 2 vị trí O_2 được tiếp nhận (phản ứng oxygenase và phản ứng oxidase) và CO_2 và NH_3 được giải phóng ra. Như vậy chu trình glyoxilate phân giải C và N hữu cơ. Ý nghĩa sinh lý của sự phân giải này vẫn chưa được giải thích rõ ràng.

Quang hô hấp bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố ngoại cảnh. Những yếu tố kích thích quang hợp như cường độ chiếu sáng cao, nhiệt độ thích hợp làm tiêu hao nhiều CO_2 trong mô lá và sản sinh nhiều O_2 do quang phân ly nước làm cho hô hấp sáng xảy ra mạnh mẽ. CO_2 và NH_3 giải phóng ra trong hô hấp sáng lại được đồng hoá. Đặc biệt là NH_3.

Chất kìm hãm tự nhiên của chu trình glyoxilate là glutamate, aspactate và glyoxylate. Ở những thực vật C4 hô hấp sáng không có ý nghĩa. Ở đây có thể do cơ chế đồng hóa CO_2 đặc biệt mà nồng độ CO_2 tương đối cao ở trong lục lạp, vì vậy mà hoạt tính oxygenase của ribulosediphosphat-carboxylase-oxygenase không thể hiện.

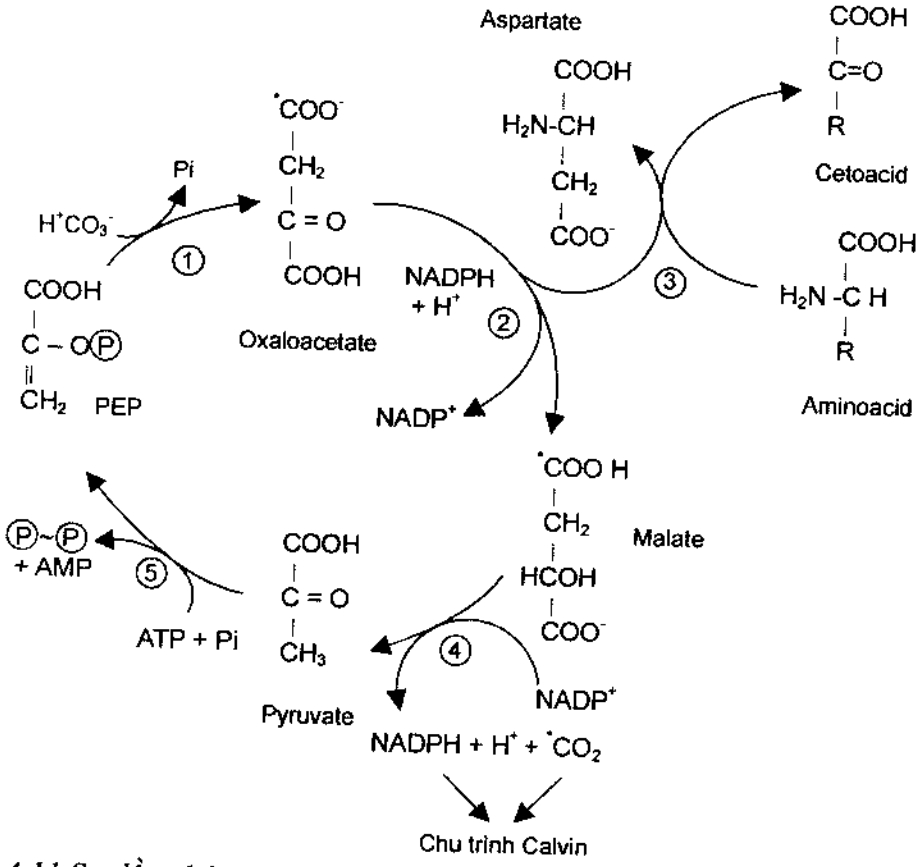
4.4.4. Chu trình Hatch và Slack

Ribulosediphosphate không phải là chất nhận CO_2 duy nhất cho phản ứng đầu tiên của sự đồng hóa CO_2. Ở một số loài thực vật, đặc biệt ở loài cây họ cỏ nhiệt đới (ngô, cao lương, mía) chất nhận CO_2 là phosphoenolpyruvate (PEP). Quá trình bắt đầu bằng phản ứng kết hợp HCO_3^- vào PEP. Bằng cách này nhờ enzyme PEP-carboxylase, một hợp chất 4C- oxaloaxetic acid, được tạo thành.



PEP Oxaloacetate

Như đã chỉ ra ở sơ đồ, HCO_3^- được tách ra thành 1 gốc hydroxyl và 1 gốc carboxyl. Gốc hydroxyl phản ứng với gốc phosphoryl của PEP để tạo nên phosphate vô cơ (H_3PO_4). Gốc carboxyl kết hợp với chất có 3C (PEP) để tạo nên chất có 4C (oxaloaxetic acid).



Hình 4.11 Sự đồng hóa CO_2 theo chu trình C_4 nhờ enzyme PEP-carboxylase

Phản ứng này giải phóng năng lượng, vì liên kết cao năng trong PEP được phân giải. Oxaloaxetic acid được tạo nên (anion = oxalacetate) sau đó tiếp tục bị khử để tạo thành malate hoặc bị amin hóa để tạo thành aspartate. Vì những phản ứng này chứa những hợp chất có 4C, nên sự đồng hóa CO_2 nhờ PEP-carboxylase được gọi là chu trình C_4. Những loài thực vật mà đồng hóa CO_2 đầu tiên bằng con đường này, được gọi là thực vật C_4 ngược với thực vật C_3, là những cây đồng hóa trực tiếp CO_2 qua chu trình Calvin. Trình tự phản ứng của chu trình C_4 được chỉ ra ở hình 4.11.

Phản ứng 1: HCO_3^- được kết hợp với PEP tạo thành oxaloacetate. Phản ứng này được xúc tác bởi enzyme PEP-carboxylase.

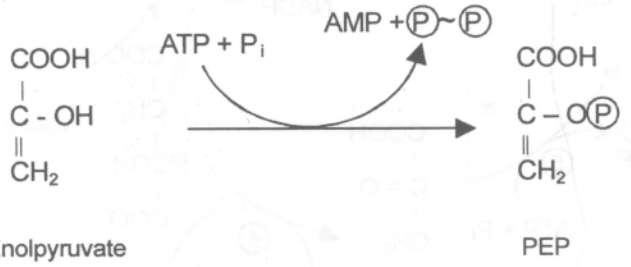
Phản ứng 2: Oxaloacetate bị khử tạo thành malate nhờ NADPH

Phản ứng 3: Oxaloacetate được biến đổi thành aspartate bằng phản ứng chuyển amin hoá.

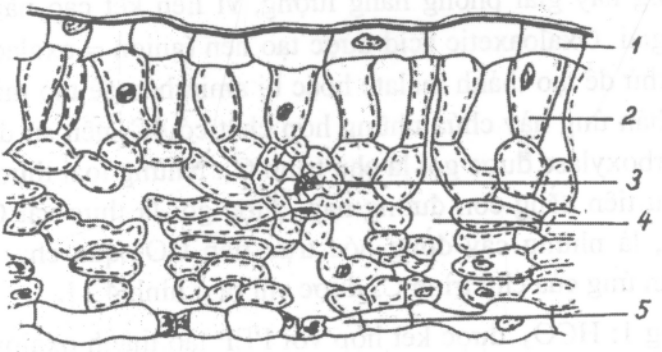
Phản ứng 4: Nhờ các malatenzyme mà malate bị khử carboxyl hóa và oxy hóa để tạo nên pyruvate. CO_2 được giải phóng ra do khử cacboxyl hóa được đưa đến chu trình Calvin.

Phản ứng 5: Pyruvate được biến đổi trở lại thành PEP bằng phản ứng khử carboxyl hoá. Phản ứng cần ATP và photphate vô cơ.

ATP được tách ra thành AMP và pyrophosphate. Phản ứng này có một giá trị âm ΔG^{01} cao, nên phản ứng xảy ra nhanh nên chất nhận CO_2 là PEP được tạo ra nhiều. Enzyme xúc tác gọi là pyruvate-phosphat-dikinase, gắn vào enolpyruvate theo phản ứng dưới đây:



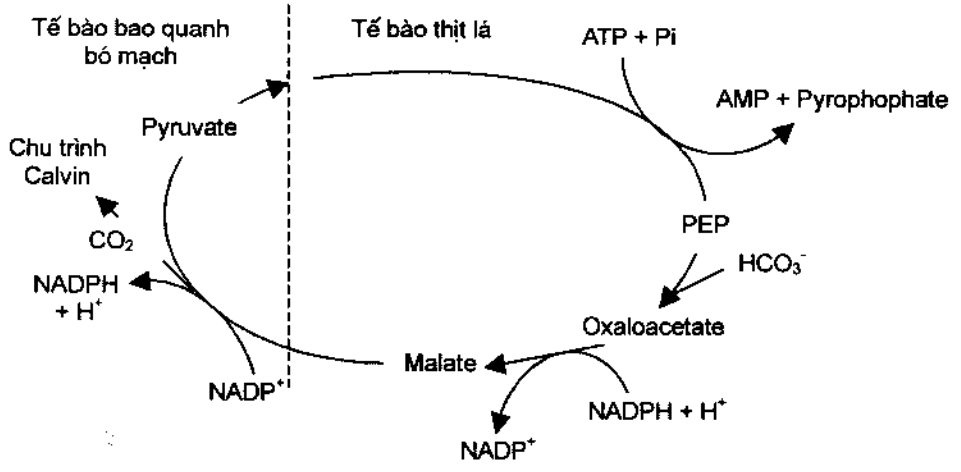
Trao đổi CO_2 của thực vật C_4 được hiểu khi người ta chia ra những quá trình riêng lẻ ở những mô lá khác nhau và nhận biết ở những vị trí của tế bào. Phần lớn những thực vật C_4 có kiểu giải phẫu Kranz đặc trưng, một khái niệm đã được Haberlandt (1904) đề nghị. Ở đây là những tế bào xanh bao quanh bó mạch ở dạng xoắn kép xếp sát xung quanh những tế bào bó mạch, trong khi đó những tế bào mesophyll nhỏ hơn sắp xếp lỏng lẻo hơn (hình 4.12).



Hình 4.12. Sự sắp xếp của các tế bào thịt lá và các tế bào bó mạch ở cấu trúc Kranz của thực vật C_4

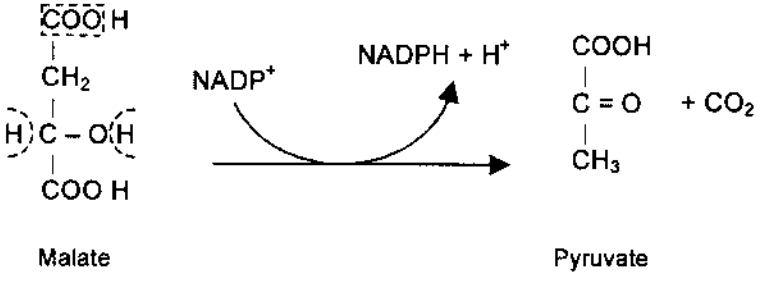
1. Biểu bì trên, 2. Tế bào mô giậu chứa lục lạp, 3. Mạch dẫn, 4. Khoang trống gian bào, 5. Biểu bì dưới với khí khổng.

Trong những tế bào mesophyll CO_2 được đồng hóa nhờ PEP-carboxylase và oxaloacetate được tạo ra bị biến đổi thành malate hoặc aspartate. Những tế bào mesophyll của thực vật C_4 không chứa RuDP-carboxylase. Sản phẩm đồng hóa là malate và aspartate, ở loài này là malate và loài kia là aspartate, được vận chuyển qua gian bào đến các tế bào bao quanh bó mạch. Ở đây chúng được khử carboxyl hoá. Pyruvate xuất hiện lại trở về tế bào mesophyll. Quá trình này xảy ra ở hai loại tế bào và được chỉ ra ở hình 4.13.



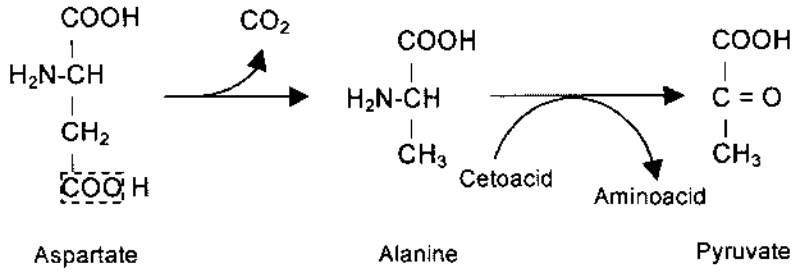
Hình 4.13. Sự tổng hợp PEP, phản ứng carboxyl hoá, phản ứng khử oxaloacetate ở tế bào thịt lá, sự khử carboxyl hóa và chu trình Calvin xảy ra ở tế bào bó mạch

Ở loại cây "malate" pyruvate được tạo nên trực tiếp từ malate bằng cách khử carboxyl hóa oxy hoá.



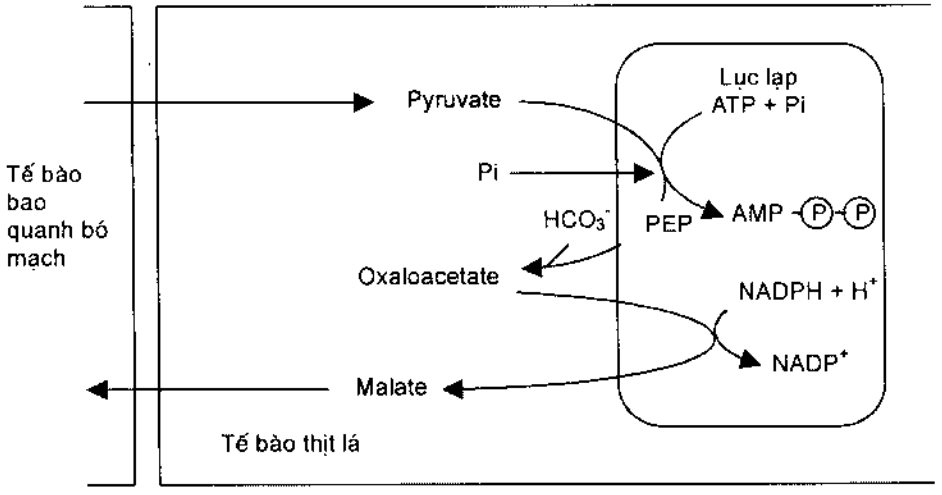
Ở phản ứng do malat-enzyme xúc tác bên cạnh CO_2 còn tạo nên NADPH, là chất cần trong chu trình Calvin. Với malate không những các nguyên tử C mà còn cả chất khử được vận chuyển đến chu trình Calvin. Ở loại cây "aspartate" aspartate được khử carboxyl hóa để tạo thành alanine. Alanine được biến đổi thành pyruvate nhờ phản ứng chuyển amin hoá. Phản

ứng chuyển amin hóa xảy ra trong tế bào chất của tế bào thịt lá. Alanine được vận chuyển từ tế bào bao quanh bó mạch trở về tế bào thịt lá.



Sự phân chia các phản ứng riêng lẻ ở tế bào chất và lục lạp của tế bào thịt lá tương ứng với tỷ lệ năng lượng. Sự phân chia này được giải thích trong hình 4.14.

Pyruvate được đưa vào tế bào thịt lá phải chui vào lục lạp của tế bào này, vì ở đây có mặt của enzyme pyruvat-phosphate-dikinase và ATP, ATP này được tạo ra từ quang hợp. PEP tạo nên trong lục lạp được vận chuyển ra tế bào chất bằng sự trao đổi với phosphat vô cơ. Ở đây PEP cùng với CO_2 là cơ chất của enzyme PEP-carboxylase. Oxaloacetate được tạo ra đi vào lục lạp rồi bị khử thành malate nhờ NADPH. ATP và NADPH được tạo ra trong lục lạp là nhờ quá trình quang hợp.



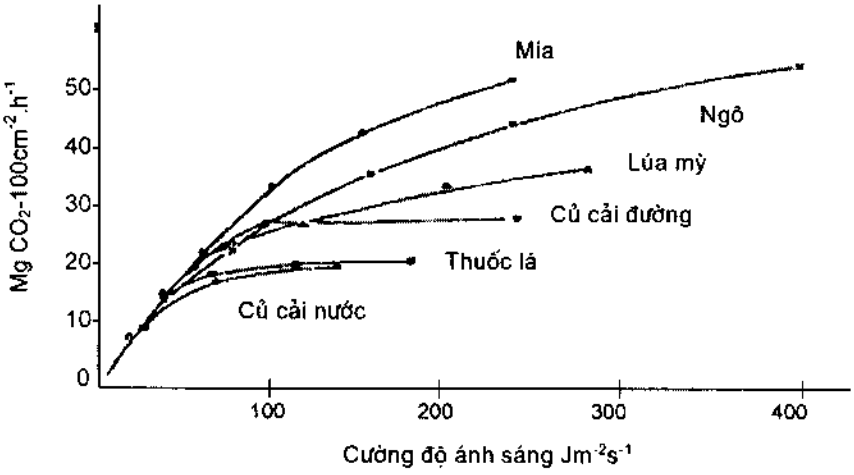
Hình 4.14. Sự vận chuyển năng lượng và carbon giữa lục lạp và tế bào chất của tế bào thịt lá ở thực vật C_4

Malate sau đó được vận chuyển đến tế bào bao quanh bó mạch. Tế bào thịt lá và tế bào bao quanh bó mạch chứa những lục lạp có hình thái khác

nhau: Lục lạp của tế bào bao quanh bó mạch lớn hơn và không có grana và tích luỹ tinh bột. Lục lạp của tế bào thịt lá nhỏ hơn và luôn luôn chứa grana.

Ưu điểm của sự đồng hóa CO_2 ở thực vật C_4 là enzyme PEP-carboxylase có trong tế bào chất tiếp nhận CO_2 có trong mô lá và CO_2 từ quá trình hô hấp tốt hơn sự tiếp nhận CO_2 ở thực vật C_3, vì ở thực vật C_3 CO_2 trước hết phải chui vào lục lạp. Tương ứng điểm bù CO_2 của thực vật C_4 cơ bản là thấp hơn ở thực vật C_3, nằm trong khoảng 0,5-1µl/LCO_2, điểm bù CO_2 của thực vật C_3 nằm trong khoảng 3-5 µl/LCO_2. Điểm bù quang hợp là nồng độ CO_2 mà ở đó không có sự tích luỹ chất hữu cơ. Thực vật C_4 có khả năng giảm nồng độ CO_2 ở trong mô lá mạnh hơn thực vật C_3. Vì vậy chúng có khả năng sử dụng CO_2 trong không khí có hiệu quả hơn.

Hơn nữa nồng độ CO_2 cao được tạo ra trong tế bào bao quanh bó mạch nhờ quá trình khử cacboxyl hoá. Nhờ vậy mà điểm bão hoà CO_2 của RuDP-carboxylase gần đạt được và hoạt tính oxygenase của enzyme bị ức chế. Vì vậy thực vật C_4 có khả năng sử dụng tốt ánh sáng có cường độ cao. Vì lý do này mà ở chúng thực tế không có điểm bão hoà ánh sáng. Đặc điểm này được thể hiện trên hình 4.15. Ở đây đường cong đồng hóa CO_2 của hai cây trồng C_4 là mía và ngô tăng cao hơn đường cong của thực vật C_3.



Hình 4.15 Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến sự đồng hóa CO_2 ở một số cây trồng

Tuy nhiên thực vật C_4 cần nhiều năng lượng cho sự đồng hóa CO_2, vì chu trình C_4 khởi động trước chu trình Calvin cần cho sự kết hợp 1 phân tử CO_2 hai phản ứng phosphoryl hóa (tạo nên hai liên kết cao năng) để tổng hợp nên ATP từ AMP theo phương trình sau:

AMP + ATP → 2ADP

2 ADP + 2 phosphate → 2ATP (quang phosphoryl hoá)

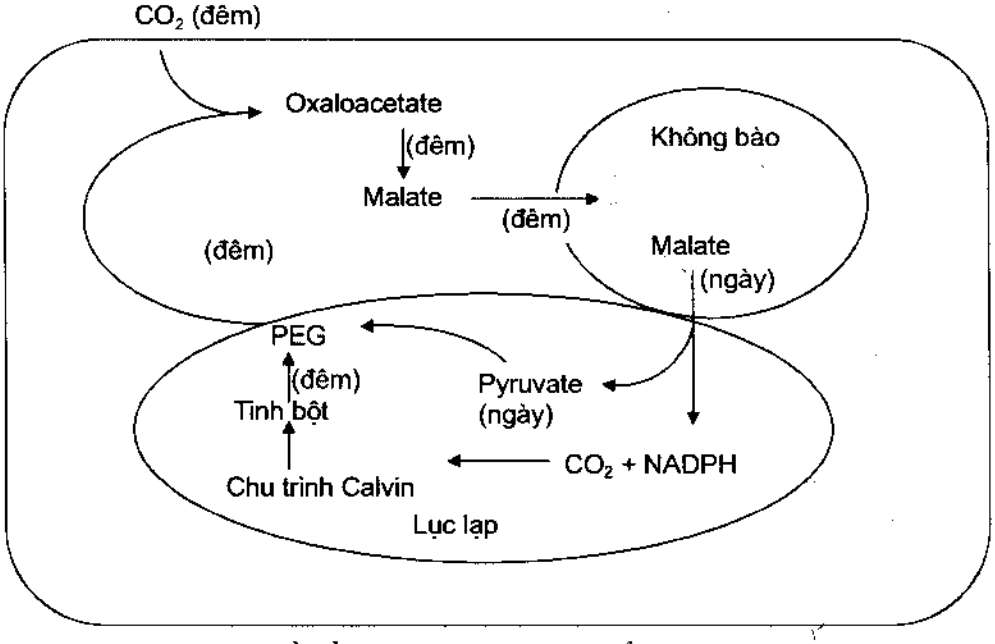
Tổng quát: AMP + 2 phosphate → 2ATP

Phần lớn những thực vật C_4 có nguồn gốc từ những vùng có cường độ ánh sáng mạnh, vì vậy ATP được tạo nên nhiều nhờ quang phosphoryl hoá. Đối với sự đồng hóa CO_2 thì cường độ ánh sáng là yếu tố ít hạn chế hơn so với nồng độ CO_2. Điều đó cũng dễ hiểu là trong quá trình tiến hóa một số loài thực vật phát triển cơ chế đồng hóa CO_2 trong những điều kiện thời tiết đặc biệt. Do sự thích nghi này mà enzyme pyruvate-phosphate-dikinase mẫn cảm với nhiệt độ thấp. Ví dụ ở điều kiện khí hậu Trung châu Âu mùa xuân thể hiện sự ngừng phát triển và vàng lá ngô, trong khi đó các loài ngũ cốc khác (lúa mỳ, lúa mạch, yến mạch, kiều mạch) phát triển tốt, là do sự mẫn cảm của enzyme pyruvate-phosphate-dikinase với nhiệt độ thấp. Khi thời tiết ấm lên thì ngô bắt đầu phát triển với tốc độ nhanh, vượt nhiều so với thực vật C_3. Tốc độ phát triển nhanh là do sự đồng hóa CO_2 có hiệu quả, và do ở thực vật C_4 sự mất mát sản phẩm đồng hóa do hô hấp sáng thấp hơn ở thực vật C_3.

Cấu tạo giải phẫu kiểu Kranz của tế bào lá cũng có một ý nghĩa đối với trao đổi nước. Những tế bào xếp sát bó mạch có sự trao đổi khí thấp hơn và nhờ vậy sự mất nước do thoát hơi nước cũng ít hơn. Điều này giải thích tại sao thực vật C_4 có nhu cầu nước tương đối thấp hơn.

*4.4.5. Quang hợp theo chu trình CAM (*Crassulaceae *Acid Metabolism)*

Các loài thực vật khác nhau của họ *Crassulaceae* và những đại diện của *Agavaceae*, *Bromeliaceae*, *Cactaceae*, *Euphobiaceae*, *Liliaceae* và *Orchideaceae* có khả năng tiếp nhận CO_2 vào ban đêm nhờ khí khổng mở và ban ngày thì khí khổng đóng lại để tránh sự mất nước. Trái với đa số các loài thực vật khác, khí khổng đóng lại ban đêm và mở ban ngày, khả năng này gắn liền với sự trao đổi acid và CO_2 đặc biệt, trước hết được nghiên cứu ở loài *Crassulaceae*. Những thực vật có hình thức trao đổi này được gọi thực vật "CAM".



Hình 4.16. Sơ đồ đồng hóa CO_2 và trao đổi acid ở thực vật CAM

Nguyên lý của sự trao đổi chất đặc biệt này được minh họa trong hình 4.16. Ban đêm CO_2 được tiếp nhận nhờ khí khổng mở, enzyme PEP-carboxylase carboxyl hóa PEP để tạo thành oxaloaxetate. Chất này được khử để tạo thành malate. Sau đó malate được dự trữ ở trong không bào. Ở đây nồng độ malate có thể lên đến 100-200 mM, đặc biệt nồng độ này cao trong những giờ đầu buổi sáng. Ban ngày khi khí khổng đóng, malate ở trong không bào được huy động vào lục lạp và ở đấy nó được khử carboxyl hoá. CO_2 tự do và NADPH tạo ra đi vào chu trình Calvin. Bên cạnh đó sự đồng hóa CO_2 được cung cấp bởi ATP và NADPH được tạo ra từ quang hợp. Sản phẩm đồng hóa này một phần được biến đổi thành tinh bột, tích luỹ trong lục lạp. Ban đêm một phần tinh bột này được phân giải để tạo thành PEP, là chất tiếp nhận CO_2 trong tế bào chất. Ở sự khử carboxyl hóa oxy hóa pyruvate được tạo thành từ malate, sau đó pyruvate được biến đổi thành PEP nhờ enzyme pyruvate-phosphate-kinase. Bên cạnh malate và oxaloaxetate thì aspartate, glutamate, alanine, glycine bằng phản ứng chuyển amin hóa tạo nên những sản phẩm trung gian gắn liền với sự trao đổi chất của thực vật "CAM".

Sự tích luỹ malate trong không bào là một quá trình chủ động, được điều khiển bởi sức trương của không bào. Thế nước của cây điều khiển sự

đóng mở khí khổng. Người ta phân biệt những thực vật "CAM" bắt buộc và không bắt buộc. Thực vật "CAM" không bắt buộc chỉ thực hiện theo chu trình "CAM" khi thiếu nước, đặc biệt là trong điều kiện ngày dài.

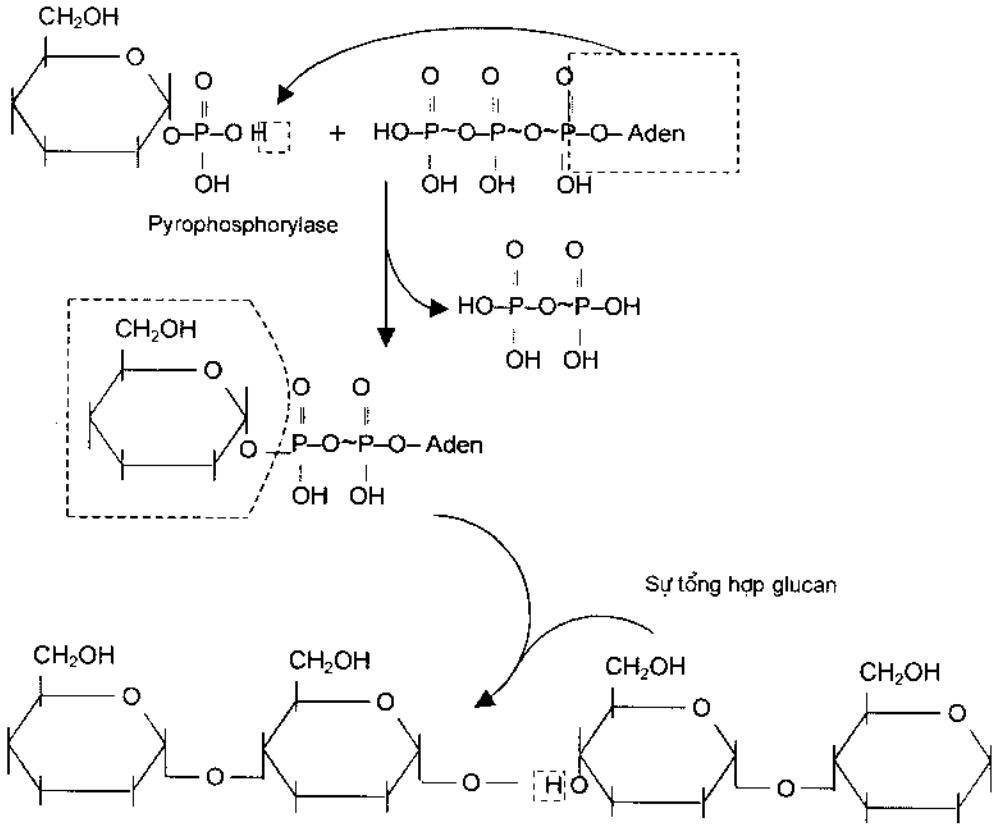
Khí khổng đóng ban ngày thì sự mất nước giảm rất đáng kể, nhờ vậy mà thực vật có khả năng vượt qua được thời kỳ khô hạn. Ở một thế nước trong đất là 2200 kPa, vượt xa điểm héo của các cây trồng khác, nhưng trong các mô của loại cây này vẫn duy trì được thế nước từ 500-1000 kPa.

4.4.6. Tổng hợp carbohydrate

Với một số phản ứng tương đối đơn giản thực vật có khả năng tổng hợp các hexosephosphate khác nhau, là những nguyên liệu cần thiết cho tổng hợp oligo- và polysaccharide.

Nguyên lý sinh tổng hợp là tạo nên liên kết glycoside trước hết được giải thích bởi Leloir. Nguyên lý này được chỉ ra ở ví dụ tổng hợp glucan (polysaccharide của glucose) (hình 4.17). Ở phản ứng này có hai enzyme tham gia: ADP-glucopyrophosphorylase và glucan- hoặc ADP-gluco-α-glucan-4α-glucosyltransferase. Enzyme ADP- glucopyrophosphorylase hoạt hóa glucose1-phosphate nhờ ATP, với sự tách ra pyrophosphate xuất hiện dạng glucose hoạt hoá, đó là ADP-glucose. Ở phản ứng này nguyên tử H của nhóm phosphoryl được thay thế bằng nhóm acyl của adenosinemonophosphate. Acyl tương ứng gọi là adenyl. Sau đó dạng glucosyl hoạt hóa được chuyển lên chuỗi glucan và thay thế nguyên tử H của nhóm OH ở vị trí C_4 (xem công thức). Như vậy xuất hiện một liên kết glycoside giữa C_1 của glucosyl mới đi vào và C_4 của glucosyl ở chuỗi glucan. Liên kết nằm ở phía dưới của mặt phẳng glucose và đó là liên kết glycosidic. Theo nguyên tắc này một chuỗi dài của các gốc glucosyl được tạo thành.

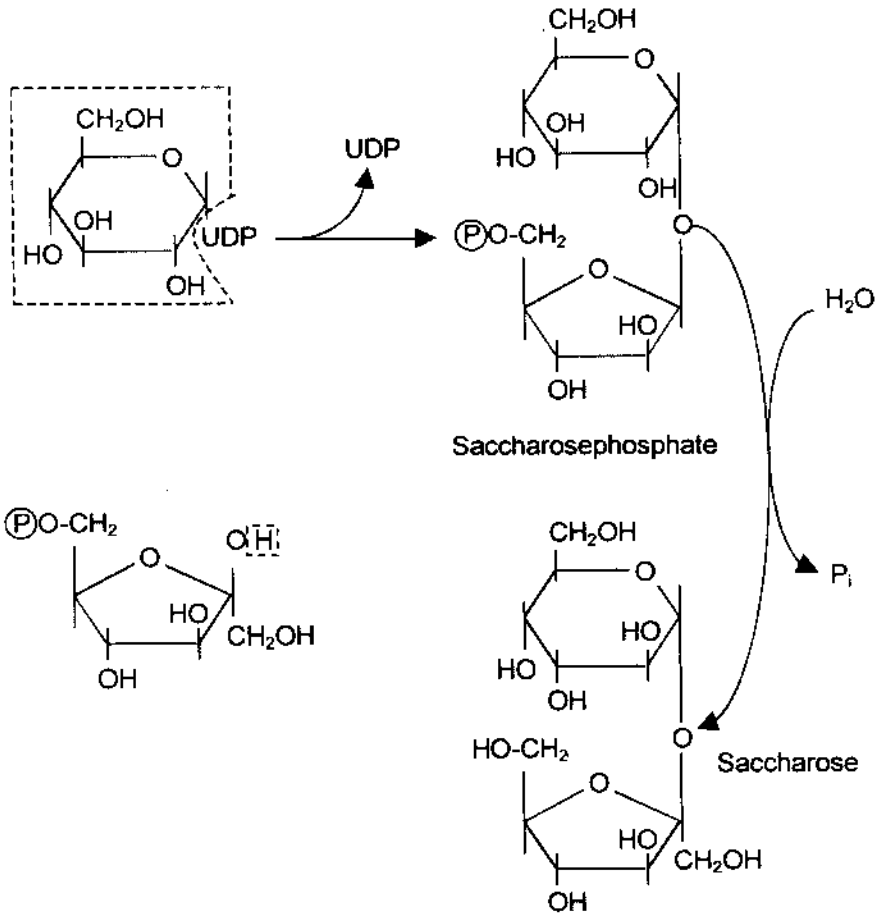
Chuỗi kéo dài theo hướng $C_1 \rightarrow C_4$. Sự tổng hợp polysaccharide phần lớn bắt đầu bằng một phân tử mồi (primer), ở đây glycosyl đầu tiên được đính vào. Ở sự tổng hợp tinh bột và glycogen thì primer là 1 glycoprotein. Glucosyl là gốc đường của glucose, fructosyl của fructose, ribosyl của ribose.



Hình 4.17. Tổng hợp ADP-glucose nhờ enzyme ADP-glucose-pyrophosphorylase và sự chuyển glucosyl lên một chuỗi glucan

Bên cạnh tinh bột, saccharose là sản phẩm quan trọng khác của quá trình quang hợp. Triosephosphate được tạo nên từ chu trình Calvin đi từ lục lạp ra tế bào chất, để biến đổi thành UDP-Glucose, Fructose 6-P và sau đó thành saccharose 6-P nhờ enzyme saccharose-P- synthase. Cuối cùng phosphate được tách ra bằng enzyme saccharose-P-phosphatase.

Điều khiển enzyme saccharose-synthase thực hiện ở bước fructose-1,6-disphosphate bởi nồng độ của fructose 2,6-P_2 (xem gluconeogenese). Một vị trí điều khiển khác là saccharose-P-synthase được hoạt hóa bởi cơ chất glucose 1-P và bị ức chế bằng phosphate vô cơ. Ngoài ra hoạt tính của enzyme giảm xuống do quá trình phosphoryl hóa và tăng lên do sự khử phosphoryl hóa (tương tự như glycogen-synthase). Nồng độ saccharose lại điều khiển sự tổng hợp tinh bột.



Hình 4.18. Sự tổng hợp saccharosephosphate và saccharose

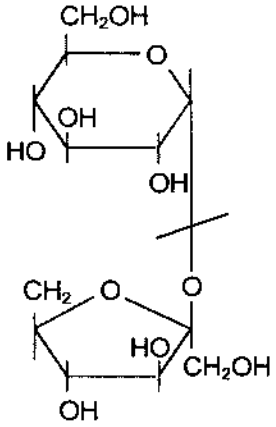
Saccharose vừa là một dạng carbonhydrate vận chuyển vừa là tiền chất của tinh bột (trong tế bào, nằm cách ra khỏi vị trí quang hợp) và của cellulose. Enzyme saccharose-synthase có tác dụng thuận nghịch tạo nên nucleosid - đường cần thiết.

Saccharose + UDP = UDP-D-Glucose + Fructose

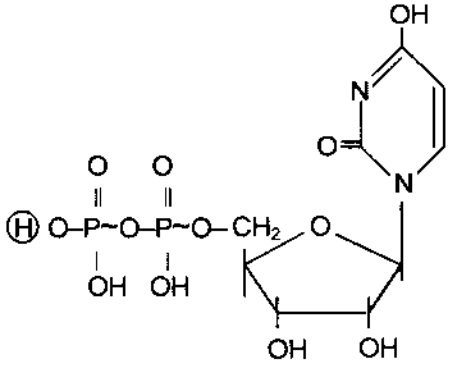
Tương tự ATP là coenzyme của ADP-pyrophotphorylase ở quá trình tổng hợp tinh bột, UTP cung cấp năng lượng cho sự tổng hợp saccharose, glycogen và cellulose. Ở đây UDP-pyrophosphorylase xúc tác tổng hợp UDP-glucose từ glucose1-phosphate và UTP. Ở sự tổng hợp saccharose một glycosyl được vận chuyển từ UDP-glucose đến 1 fructosephosphate để tạo nên saccharosephosphate, từ chất này saccharose và phosphate vô cơ được tách ra. Sự tổng hợp saccharose sau khi đồng hóa CO_2 cũng như sự tạo nên

saccharose từ tinh bột ở trong hạt nảy mầm được thực hiện theo con đường này (hình 4.18). Enzyme xúc tác cho phản ứng này là saccharosephosphat synthetase. Hướng phản ứng dịch về phía saccharosephosphate cũng như saccharose, vì sự tạo ra phosphate nhờ phosphatase, là một quá trình thuận lợi về nhiệt động học. Không nên nhầm lẫn giữa enzyme saccharosephosphatsynthetase với enzyme saccharosesynthetase. Enzyme saccharosesynthetase chỉ tổng hợp saccharose trong những trường hợp ngoại lệ. Chức năng quan trọng của nó là tạo nên UDP-glucose từ saccharose và UDP theo phương trình phản ứng sau:

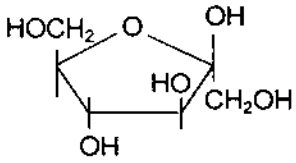
Saccharose + UDP ⇔ UDP-glucose + fructose



Saccharose

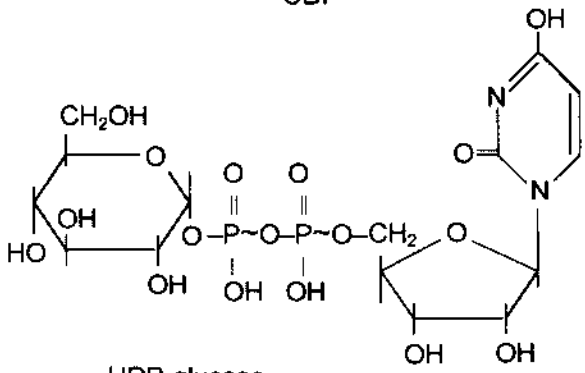


UDP



Fructose

+



UDP-glucose

Cân bằng phương trình này dịch về phía tạo UDP-glucose. Enzyme này là saccharose: UDP-glycosyltransferase, đóng vai trò quan trọng ở trong mô sinh trưởng và trong những cơ quan dự trữ đang lớn (củ, hạt) mà ở đó saccharose được chuyển đến để tổng hợp UDP-glucose. Sau đó UDP-

glucose được sử dụng chủ yếu cho việc tổng hợp các chất của thành tế bào, như cellulose.

Cơ chế phản ứng của saccharose: UDP-glycosyltransferase được thể hiện ở sơ đồ trên.

Những polysaccharide đã mô tả trên có chứa nhiều nhóm OH, nên phân tử có đặc tính ưa nước và có khả năng tạo nên các cầu hydro. Các nhóm acid, carboxyl, nhóm sulfate làm cho phân tử có tính acid. Trong điều kiện pH sinh lý (pH 5,5-7,5) các proton được tách ra, vì vậy các đại phân tử mang nhiều nhóm anion, nên tích điện âm và có khả năng kết hợp với các chất tích điện dương, ví dụ nhóm amin đã bị proton hóa để tạo liên kết ion.

4.5. Hoá sinh hô hấp

4.5.1. Định nghĩa hô hấp

Hô hấp là quá trình phân giải, oxy hóa các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các sản phẩm cuối cùng là CO_2 và H_2O, đồng thời giải phóng năng lượng cần thiết cho cơ thể sống.

Phương trình tổng quát của hô hấp:

$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ + Năng lượng

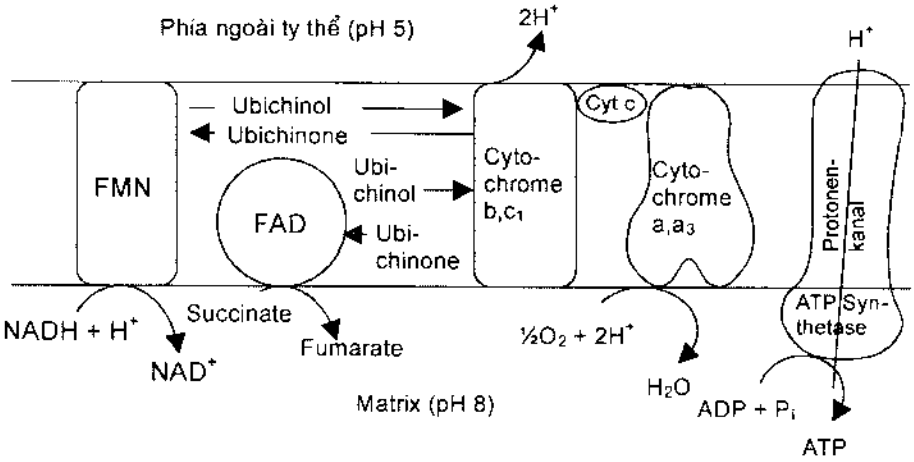
Về bản chất hô hấp là quá trình oxy hóa sinh học được thực hiện bằng sự tách các nguyên tử hydro ra khỏi cơ chất và vận chuyển nó (H^+ và e^-) đến những chất nhận khác nhau, chất nhận cuối cùng là O_2. Hô hấp xảy ra ở hai vị trí khác nhau trong tế bào. Giai đoạn thứ nhất xảy ra ở tế bào chất (quá trình đường phân), hoặc bên trong ty thể (chu trình Krebs), là sự tách hydro ra khỏi cơ chất và chuyển nó đến NAD và/hoặc FAD để tạo nên $NADH_2$ và $FADH_2$. Ở giai đoạn thứ hai $NADH_2$ và $FADH_2$ bị oxy hoá, đó là quá trình chuyển H^+ và e^- cho các chất nhận trung gian và cuối cùng đến O_2. Quá trình này xảy ra ở màng trong của ty thể. Kết quả của quá trình này tạo ra các phân tử ATP và H_2O.

Hô hấp háo khí:

Đặc tính của hô hấp háo khí là giải phóng CO_2 và tiếp nhận O_2. Hô hấp yếm khí theo định nghĩa trước đây là giải phóng CO_2 trong điều kiện không có O_2. Hoá sinh học định nghĩa hô hấp yếm khí là sự phân giải carbohydrate qua quá trình đường phân và tiếp theo là sự lên men rượu. Toàn bộ quá trình

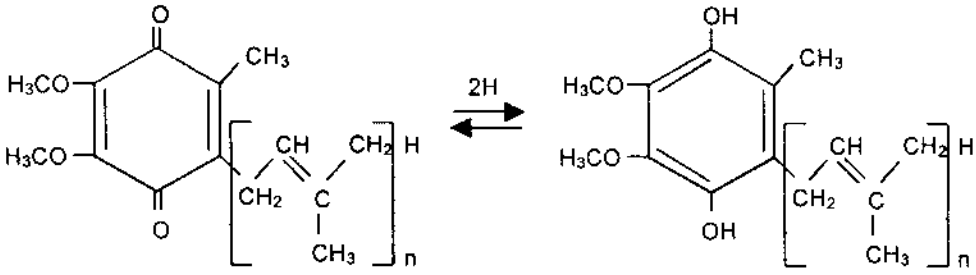
này không cần O_2, CO_2 được giải phóng ra trong quá trình lên men bằng sự khử carboxyl hóa pyruvate.

Hô hấp háo khí xảy ra trong ty thể. Khi quá trình quang hợp và hô hấp háo khí được giải thích càng chi tiết thì sự giống nhau giữa chúng như là "máy biến đổi năng lượng" càng nhiều. Ở quá trình quang hợp người ta biết matrix chứa những enzyme của chu trình Calvin, ở hô hấp matrix của ty thể chứa những enzyme của chu trình Krebs. Hệ thống oxy hóa khử của quang hợp (chuỗi vận chuyển e^- trong quang hợp) định vị ở màng thylacoid của lục lạp, hệ thống oxy hóa khử của hô hấp định vị trên màng trong của ty thể. Sự giống nhau giữa hai "máy biến đổi năng lượng" đến là ngạc nhiên.



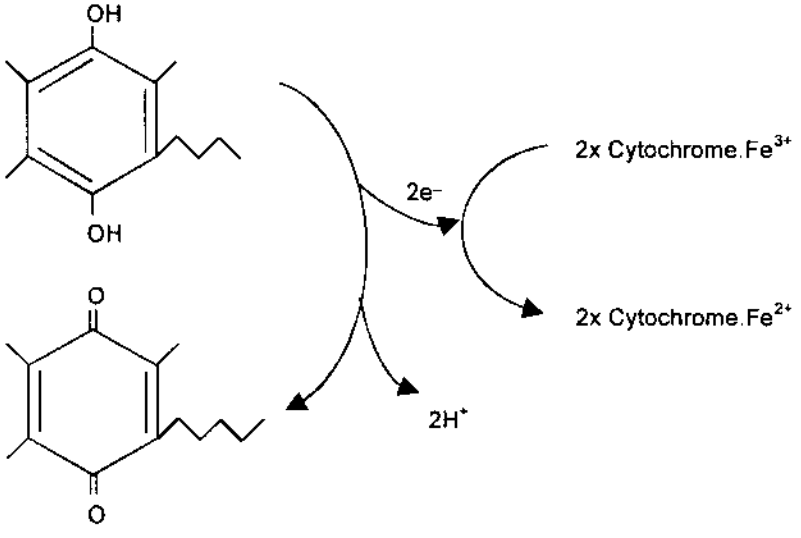
Hình 4.19. Chuỗi vận chuyển e^- của hô hấp với những hệ thống oxy hóa khử quan trọng và các phức hệ vận chuyển ở màng

Chuỗi vận chuyển e^- trong hô hấp, và sự định vị của chúng trong màng trong của ty thể, được giải thích ở hình 4.19. Chuỗi vận chuyển e^- gồm có 4 phức hệ protein vận chuyển của màng và hai phức hệ protein nhỏ hơn, cuccinate dehydrogenase (FAD) và cytochrome. Ngoài ra còn có ubichinol/ubichinone trong chuỗi vận chuyển. Chất khử tương ứng là NADH và $FADH_2$, cả hai đều được tạo ra trong chu trình Krebs, được đi vào chuỗi hô hấp qua phức hệ FMN-protein cũng như qua phức hệ FAD-protein. Hai phức hệ vận chuyển H của nó đến ubichinone và khử nó thành ubichinol. Hệ thống ubichinone/ ubchinol và hệ thống plastochinone/plastochinol có cấu tạo và chức năng rất giống nhau (xem sơ đồ trang sau).



Ubichinone Ubichinol

Ubichinone/ ubichinol có khả năng khuếch tán rất nhanh vào màng nhờ đặc tính ưa lipid của nó. Hệ số khuếch tán nằm $10^{-8}cm^2/sec$. Ubichinol khử phức hệ cytochrome b, c_1, ở đây dẫn đến sự tách H thành H^+ và e^-.



Điện tử được tiếp nhận bởi phức hệ cytochrome b, c_1, trong khi đó H^+ được thải ra ở phía ngoài màng. Phức hệ cytochrome b, c_1, còn được gọi cytochrome c-reductase, vì nó khử cytochrome c, điện tử của nó được chuyển cho cytochrome c. Đây cũng là 1 phức protein nhỏ hơn, có thể khuếch tán dễ dàng ra phía màng ngoài. Nó chuyển e^- đến phức hệ cytochrome a, còn được gọi là cytochrome c-oxidase, vì nó oxy hóa cytochrome c. Phức hệ cytochrome a là thành viên cuối cùng của chuỗi vận chuyển e^-. Nó chuyển e^- đến O_2, rồi phản ứng với H^+ của hệ thống để tạo H_2O. O_2 trong chuỗi hô hấp có nhiệm vụ tiếp nhận e^- cuối cùng.

Chuỗi hô hấp trong hình 4.19 đã làm rõ sự vận chuyển H và e^- qua các thành viên của chuỗi dẫn đến sự chênh lệch proton của màng. Sự khác biệt này xuất hiện ở sự khử của phức hệ cytochrom b, c_1 bởi ubichinol. Và sự oxy hóa NADH ở phức hệ FMN và sự khử O_2 ở phức cytochrome a đã làm cho matrix kiềm, vì nó làm giảm H^+, người ta có thể nhận biết trên hình 4.19.

Bằng cách này mà 1 thế điện hóa được tạo nên. Matrix tích điện âm và có một nồng độ H^+ thấp (pH 8), ngoài màng tích điện dương và có nồng độ H^+ tương đối cao. Sự chênh lệch thế năng giữa 2 màng có độ lớn là 200mV. Năng lượng của điện thế hóa học này được sử dụng để tổng hợp ATP. Bốn phức hệ vận chuyển màng có chứa ATP-synthetase (ATPase). Proton đi qua các kênh vận chuyển của phức hệ vận chuyển từ ngoài màng vào matrix, "thực hiện" tổng hợp ATP tương tự như trong quang hợp.

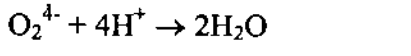
Trước khi giải thích năng lượng của chuỗi hô hấp, cần nói rõ hơn hệ thống oxy hóa khử.

- Phức hệ FMN, NADH-dehydrogenase gồm ít nhất 26 polypeptide khác nhau, chứa FMN ở trung tâm phản ứng và có khoảng 20 nguyên tử Fe và S linh động/ FMN. Trọng lượng phân tử của phức hệ là 850 kDa.

- Phức hệ FAD là cuccinate dehydrogenase, chứa FAD và phức Fe-S hóa trị 2 và 4 ở trung tâm phản ứng.

- Phức hệ cytochrome b, c_1 chứa cytochrome c_1 và 2 loại cytochrome b, ít nhất có 8 chuỗi polypeptide và 1 phức Fe-S có hóa trị 2. Antimycin là 1 chất kìm hãm phức hệ cytochrome b, c_1, nó làm ngừng sự vận chuyển e^- giữa cytochrome b và cytochrome c_1.

Cytochrome a, a_3, còn được gọi cytochrome c-oxidase gồm 7 chuỗi polypeptide khác nhau. Nó tiếp nhận từ cytochrome c 4 e^- và chuyển chúng đến một phân tử O_2. Ở sự vận chuyển này có sự tham gia của heme trong cytochrome a_3, cytochrome a và nguyên tử Cu. Oxy dạng khử (O_2^{4-}) phản ứng với $4H^+$ có nguồn gốc từ nước để tạo H_2O.



$$O_2^{4-} + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$$

Phản ứng oxy hóa khử cuối cùng của chuỗi hô hấp này được gọi là "sự oxy hóa cuối cùng". Phản ứng này sử dụng khoảng 90% nhu cầu O_2 của tế bào. Sự oxy hóa này bị ức chế bởi CO_2, cyanid và acid. Những chất này kết hợp với heme và phong toả sự kết hợp của hem với O_2, vì vậy chúng là chất độc đối với hô hấp. Phức hệ vận chuyển màng, chứa ATP-synthetase gồm nhiều chuỗi polypeptide khác nhau, trong đó chứa một kênh proton, thực

hiện sự vận chuyển H^+ từ phía màng này sang phía màng khác. ATP-synthetase này rất giống ATP-synthetase ở trong màng thylacoid của lục lạp và ATP- synthetase của vi khuẩn.

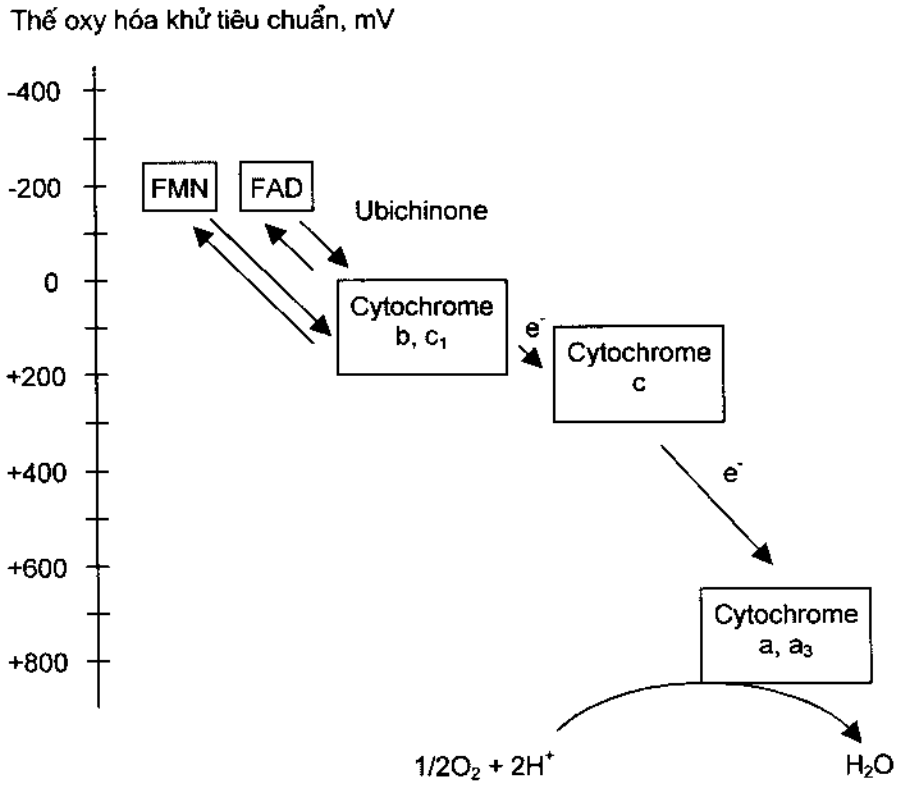
Sự vận chuyển e^- trong chuỗi hô hấp là "sự vận chuyển thuận chiều", theo thế oxy hóa khử tiêu chuẩn, như trong hình 4.20. Năng lượng giải phóng ra ở đây được biến đổi thành năng lượng thẩm thấu, thể hiện ở sự chênh lệch nồng độ H (gradient H^+). Sự chênh lệch nồng độ H^+ ở hai phía của màng đã tạo nên một thế điện hoá, mà độ lớn của nó được tính theo phương trình sau đây:

$$P = -59\ \Delta pH + \Delta\varphi$$

P = lực

ΔpH = Grandient H^+

$\Delta\varphi$ = sự khác nhau về điện tích giữa 2 màng



Hình 4.20. Sự vận chuyển e- trong chuỗi hô hấp phụ thuộc vào thế oxy hóa khử tiêu chuẩn

Phương trình này ứng với một nhiệt độ nhất định, mô tả "lực di chuyển proton" nghĩa là lực để đẩy một H^+ từ phía màng có nồng độ H^+ cao (phía ngoài màng) đến phía khác của màng với nồng độ H^+ thấp (matrix). Lực này được biểu diễn mV là sự chênh lệch điện thế, ở đây 1 đơn vị pH tương ứng với 59 mV, vì vậy nó là hệ số của phương trình. "Lực di chuyển proton" phải đủ lớn, mới tổng hợp được ATP. Vậy bao nhiêu H^+ phải đi vào matrix, mới tổng hợp được 1 ATP? Người ta cho rằng sự chênh lệch thế (lực từ ΔpH và $\Delta\varphi$, xem phương trình dưới đây) là 220 mV ở sự vận chuyển 1 mol H^+ từ màng ngoài đến matrix thì năng lượng tự do giải phóng ra là 21.3kJ. Khi 2H từ NADH trong chuỗi hô hấp được đưa vào, nó tách ra $5H^+$ (có thể rút ra từ hình 4.19). Ba H^+ cần trong matrix, hai H^+ được đi ra ngoài màng. Khi 5 mol H^+ trở về matrix, tạo ra 5 x 21,3 = 106.5 kJ năng lượng tự do với điều kiện chênh lệch thế là 220 mV. Giả sử năng lượng này đủ để tổng hợp 3 mol ATP, vì ΔG^0 của 1 liên kết cao năng trong ATP là 30kJ. Hai nguyên tử H đi vào chuỗi enzyme hô hấp qua phức hệ FMN, cần ở sự oxy hóa cuối cùng $1/2O_2$. Ở thế năng 220 mV có thể tổng hợp từ 2H (từ NADH) 3 ATP với sự tiêu hao 1/2 O_2. Như vậy tỷ lệ P/O là 3, đó là số phân tử ATP được tổng hợp/nguyên tử O. Tuy nhiên giá trị thu được từ thực nghiệm chênh lệch nhiều so với tỷ lệ P/O này. Điều này dễ hiểu vì tỷ lệ chỉ đúng khi chênh lệch thế là 220 mV. Khi tính toán năng lượng biến đổi người ta cho rằng cơ chất hô hấp NADH + H^+ tạo ra 3ATP, cơ chất là $FADH_2$ là 2ATP. Tuy nhiên tỷ lệ P/O với NADH và $FADH_2$ theo giải thích trên có thể lệch nhiều so với giá trị thực tế. Sự chênh lệch này còn do năng lượng tự do để tổng hợp ATP được tính trong điều kiện tiêu chuẩn, mà trong thực tế phần lớn các trường hợp không phải trong điều kiện này. Năng lượng cần cho tổng hợp ATP hướng về trạng thái cân bằng phản ứng:

$$ADP + Pi \Leftrightarrow ATP$$

Tỷ lệ ATP/ADP điều khiển hô hấp rất hiệu quả và có ý nghĩa. Ở nồng độ ADP cao, tương ứng với sự thiếu ATP thì ATP được tạo nên nhiều và nhanh với tiêu hao năng lượng ít, ngược lại với nồng độ ATP cao thì sự tổng hợp ATP cần nhiều năng lượng. Đây là sự thích nghi với nhu cầu năng lượng. Khi ATP được sử dụng nhiều cho các quá trình sinh trưởng (tổng hợp protein, nucleic acid) hoặc cho lao động cơ bắp, thì cường độ hô hấp

tăng lên, lúc này nồng độ ATP thấp và ADP cao. Trong giai đoạn cơ bắp ít hoạt động nồng độ ATP cao, tương ứng với cường độ hô hấp thấp.

Ở nồng độ ATP cao phản ứng tổng hợp ATP có thể theo chiều ngược lại. Ở đây ATP được tách thành ADP, Pi và nhờ năng lượng giải phóng ra mà H^+ được bơm ra phía ngoài màng. ATP-synthetase trở thành một bơm proton. Vì lý do này người ta gọi ATP-synthetase ngược cũng là ATPase. Thực tế là các bơm proton rất phổ biến trong tự nhiên. Ngược với ATP-synthetase trong chuỗi hô hấp, ATP-synthetase có trong màng thylacoid không thể tách ATP.

Hô hấp được chia làm hai loại: Hô hấp yếm khí và hô hấp háo khí. Cả hai kiểu hô hấp này đều có một quá trình chung đó là quá trình đường phân.

4.5.2. Đường phân, sự lên men rượu và lên men lactic

Nhờ những enzyme thuỷ phân đã kể ở trên mà chuỗi carbohydrate dự trữ được biến đổi thành hexose, nếu không phải là glucose hoặc fructose, thì chúng cũng dễ dàng biến đổi thành hai dạng monosaccharide này. Glucose và fructose là những cơ chất trực tiếp của quá trình đường phân (glycolyse).

Glycolyse có nghĩa là phân giải đường. Các phản ứng được giải thích bởi Gustav Embden và Otto Mayerhof. Vì vậy quá trình này được gọi là sơ đồ phản ứng Embden- Mayerhof. Sơ đồ này gồm sự phân giải đường và polysaccharide yếm khí cho đến pyruvate. Những enzyme của quá trình này có mặt ở tế bào chất. Nhờ tác dụng của phosphorylase, glucose1-phosphate được tách ra, là cơ chất trực tiếp của quá trình đường phân. Chuỗi phản ứng gồm những phản ứng riêng lẻ như sau:

1. Từ chuỗi amylose nhờ phosphorylase mà tạo thành glucose1-phosphate.

2. Glucose1-phosphate được biến đổi thành glucose-6-phosphate nhờ isomerase.

3. Glucose-6-phosphate được biến đổi thành fructose-6-phosphate nhờ enzyme isomerase.

4. Fructose-6-phosphate được phosphoryl hóa nhờ ATP và enzyme phosphofructokinase tạo thành fructose-1,6-diphosphate

5. Từ fructose-1,6-diphosphate nhờ enzyme aldolase mà aldehydphosphoglyceric và phosphodioxyacetone được tạo thành.

Khi aldehydphosphoglyceric (AlPG) được sử dụng trong các phản ứng tiếp theo thì chất này lại được tạo thành từ phosphodioxyacetone (PDOA). Ở trạng thái cân bằng có hơn 90% là ở dạng PDOA.

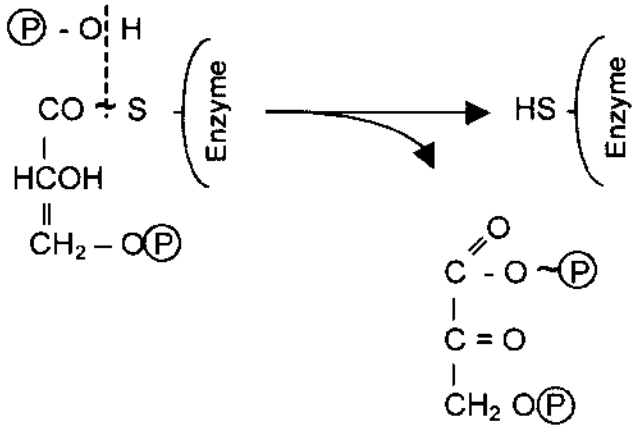
6. Aldehydphosphoglyceric (triosephotphate) được kết hợp với một HS-enzyme. Phức hệ HS-Enzyme này còn kết hợp với NAD^+

7. Bằng việc nhường 2H cho NAD^+, AlPG được oxy hóa thành phosphoglyceric acid. Sự thay đổi trong phân tử làm cho nhóm acyl giàu năng lượng được gắn vào S của phức hệ enzyme.

8. NADH gắn vào phức SH-Enzyme được oxy hoá, trong đó H và e^- của nó được chuyển lên một NAD^+ tự do.

9. Nhờ gốc phosphate vô cơ mà phosphoglycerinacyl được tách ra khỏi phức hệ. Ở đây nhóm SH lại xuất hiện khi tạo thành 1,3 phosphoglyceric acid.

Ở quá trình này phosphoric acid (P-OH) được tách ra 1 nguyên tử H và 1 gốc P-O- (xem sơ đồ). Gốc P-O- được gắn kết vào acyl của phosphoglyceric acid, trong khi H được kết hợp với nguyên tử S của enzyme. Enzyme lại trở lại trạng thái ban đầu.



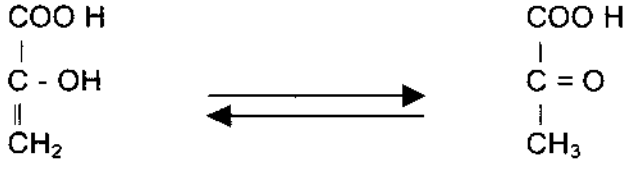
10. Nhóm phosphoryl mang nhiều năng lượng của 1,3 diphosphoglyceric acid được chuyển đến ADP, tổng hợp nên ATP.

11. 3-phosphoglyceric acid được biến đổi thành 2-phosphoglyceric acid nhờ enzyme isomerase

12. Nhờ enzyme hydratase H_2O được tách ra từ 2-phosphoglyceric acid. Phosphoenolpyruvate được tạo thành. Cấu trúc phân tử của liên kết này tạo nên nhóm phosphoryl giàu năng lượng.

13. Nhóm phosphoryl của phosphoenolpyruvate được chuyển đến ADP. ATP được tổng hợp.

14. Enolpyruvate ở trạng thái cân bằng với dạng ceto của pyruvic acid (sơ đồ).



Enolpyruvate Pyruvate

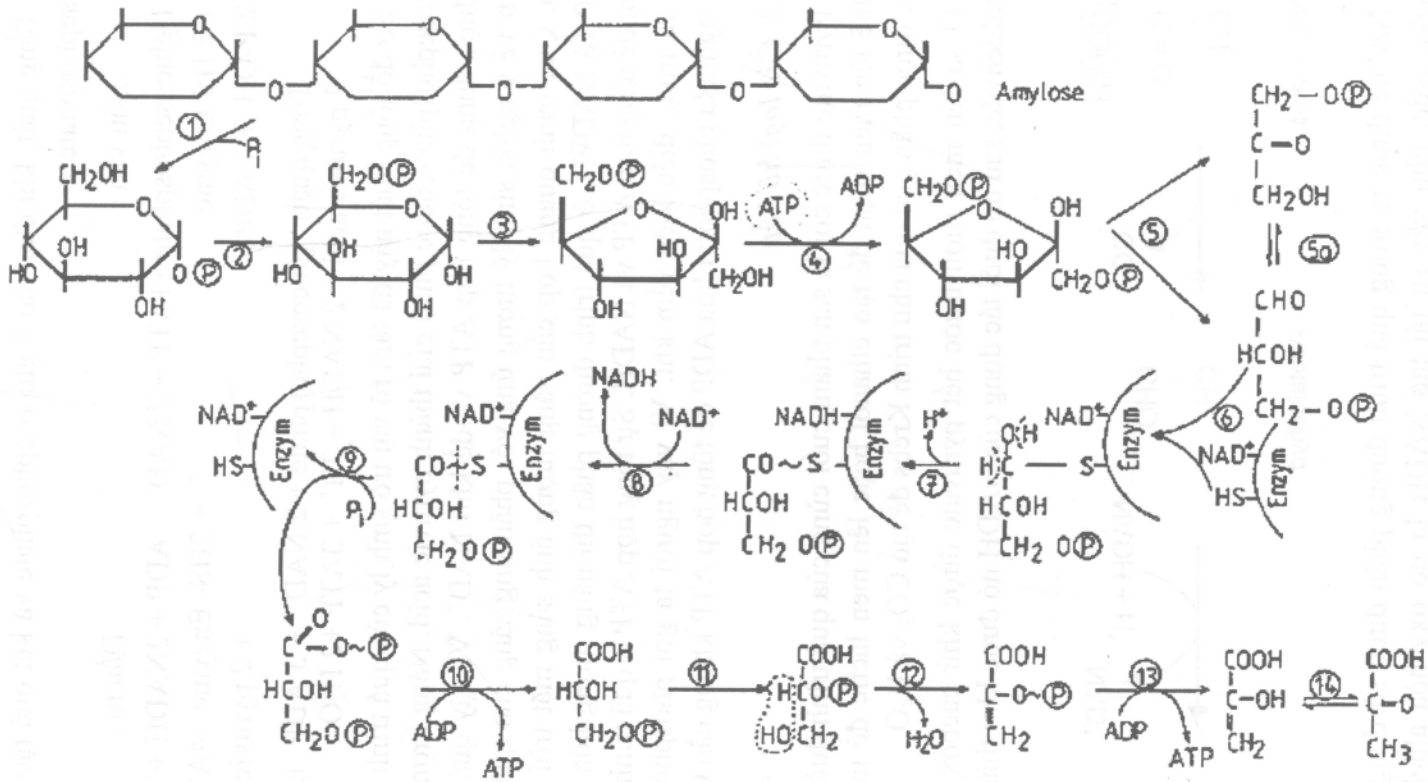
Hexose (glucose, fructose) cũng như triose (aldehydglyceric) được phosphoryl hóa nhờ kinase, trước khi chúng tham gia vào phản ứng của quá trình đường phân.

Toàn bộ quá trình đường phân được chia làm 3 giai đoạn:

1. Các carbohydrate được biến đổi thành triosephosphate do sự oxy hóa đường.

2. Triosephosphate được biến đổi do sự oxy hóa thành các acid hữu cơ (glycerate).

3. Phosphoglycerate được biến đổi thành pyruvate. Với sự giải phóng ra năng lượng tự do, ATP được tổng hợp.



Hình 4.21. Quá trình đường phân

Tổng quát: khi đưa vào 1 glucosephosphate và kết quả tạo ra 2 phân tử triosephosphate:

Đầu vào	Đầu ra
1 glucosephosphate +1ATP + 2 NAD^+	ADP + 2NADH + $2H^+$
+ 2 HS-Enzyme	+ 2HS- Enzyme +4ATP +$2H_2O$
2 P-OH + 4 ADP	+ 2 pyruvic acid

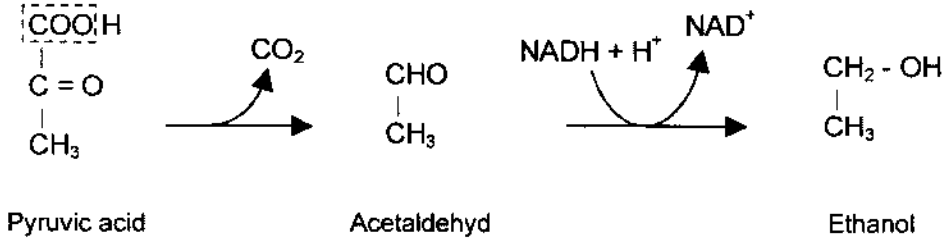
Tổng quát: glucosephosphate + 2 NAD^+ + 3 ADP + 2 P-OH → 2 pyruvic acid + 2 NADH + $2H^+$ + 3ATP +2 H_2O

Sơ đồ tổng quát này đã làm rõ vai trò sinh lý của quá trình đường phân: hexosephosphate được phân giải thành pyruvic acid. Năng lượng giải phóng ra được dùng để tổng hợp ATP và để khử NAD^+. Vì vậy quá trình đường phân về ý nghĩa sinh lý tương ứng với phản ứng sáng của quá trình quang hợp. Quá trình quang hợp cần năng lượng ánh sáng mặt trời để tổng hợp ATP và NADPH, ở quá trình đường phân thì năng lượng hóa học được sử dụng để tổng hợp ATP và NADH. Sự tổng hợp ATP ở quá trình đường phân xảy ra trong điều kiện yếm khí. Vì vậy người ta gọi phosphoryl hóa yếm khí, nghĩa là phosphoryl hóa ADP để tổng hợp ATP không cần O_2.

4.5.3. Các loại hô hấp

Pyruvate được coi là sản phẩm cuối cùng của quá trình đường phân. Nó có thể lên men rượu để tạo ethanol hoặc lên men lactic để tạo lactic acid hoặc được phân giải qua chu trình Krebs để tạo CO_2 và H_2O.

Ở sự lên men rượu trước hết pyruvate được khử cacboxyl hóa thành acetaldehyde, sau đó dưới tác dụng của NADH nó được khử thành ethanol.



NADH được ra trong quá trình đường phân được sử dụng để oxy hóa acetaldehyde, như vậy sự tái tạo NADH là do oxy hóa aldehydphospho-glyceric (phản ứng 8 đường phân) cung cấp cho phản ứng này.

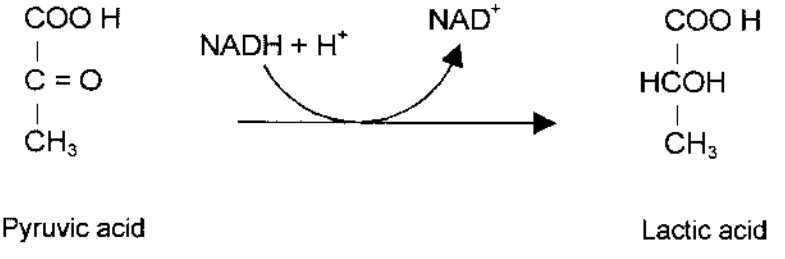
Quá trình lên men rượu gồm quá trình đường phân từ carbohydrate cho đến pyruvic acid, từ chất này đến acetaldehyde và ethanol là sản phẩm cuối cùng. Đường hexose (glucose, fructose) là nguyên liệu ban đầu của quá trình lên men, tổng quát được biểu diễn như sau:

1 Hexose + 2ATP → fructose-1,6-diphosphate
Fructose-1,6-diphosphate → 2 aldehydphosphoglyceric
2 aldehydphosphoglyceric + 2 NAD^+ → 2 pyruvic acid + 4ATP +2NADH
2 pyruvic acid + 2 NADH → 2 ethanol + 2 NAD^+ + 2 CO_2
Cuối cùng: 1 hexose → 2 ethanol + 2 CO_2 + 2 ATP

Nhiều cơ quan như rễ của thực vật bậc cao, có khả năng thực hiện sự lên men rượu trong điều kiện yếm khí. Đối với công nghệ quan trọng là *Saccharomyces cerevisiae*, là một loài men kỵ khí không bắt buộc, nghĩa là nó có thể phát triển trong điều kiện có hoặc không có O_2. Khi không có O_2 sự phân giải glucose xảy ra nhanh hơn. Người ta gọi hiệu ứng này là hiệu ứng Pasteur. Pasteur đã phát hiện ra rằng, sự phân giải đường trong điều kiện yếm khí xảy ra 7 lần nhanh hơn so với điều kiện háo khí. Ngày nay chúng ta biết rằng, hiệu ứng này là do sự điều khiển biến đổi cấu trúc (biến cấu) của enzyme fructosephosphatkinase. Ở sự phân giải háo khí thì ATP được tạo ra tương đối nhiều, và khi nồng độ ATP cao, nó ức chế hoạt tính của fructosephosphatkinase làm cho sự đi vào của glucosephosphat bị giảm xuống. Ngược lại khi phân giải đường trong điều kiện yếm khí, nồng độ AMP cao, nó kích thích hoạt tính của fructosephosphatkinase. ADP được tạo ra ở nhiều phản ứng do kinase xúc tác, được biến đổi thành ATP và AMP như sau:

$$2\ ADP \rightarrow ATP + AMP$$

Lên men lactic cũng gồm quá trình biến đổi từ carbohydrate đến pyruvate, chất này được khử để tạo thành lactic acid nhờ NADH được tạo ra trong quá trình đường phân.



Quá trình này được tổng quát như sau:

1 glucose → 2 lactic acid + 2 ATP

Những vi khuẩn lactic quan trọng thuộc những chủng loại sau:

Streptococcus không mẫn cảm với O_2

Lactobacillus không mẫn cảm với O_2

Clostridium yếm khí nghiêm ngặt

Vi khuẩn *streptococus* và *lactobacillus* không mẫn cảm với O_2, nghĩa là chúng có enzyme superoxiddismutase, có khả năng làm mất độc tính của gốc O_2. *Streptococcus* và *lactobacillus* có khả năng sử dụng O_2 nhưng không phải cho sự phân giải háo khí (hô hấp), vì chúng không có khả năng tổng hợp heme. Chúng không có cytochrome, là thành phần quan trọng của hô hấp. *Clostridium* sống nghiêm ngặt trong điều kiện yếm khí, nên O_2 là chất độc đối với chúng. *Clostridium botulinum* tổng hợp được chất độc tự nhiên mạnh nhất là botulinus-toxin. Một lượng rất nhỏ 0,03 ng/kg trọng lượng cơ thể đã gây chết.

Hầu hết vi khuẩn lactic không mẫn cảm với nhiệt độ và pH thấp. Ở quá trình lên men lactic nhanh thì pH môi trường giảm nhanh và vì nhiều vi sinh vật mẫn cảm với độ pH thấp, ví dụ vi khuẩn gây thối, nên chúng không có cơ hội cạnh tranh với vi khuẩn lactic, nhờ vậy mà nông sản được bảo vệ.

Khi sản xuất thức ăn chua thì sự gây chua nhanh nhờ vi khuẩn lactic là một điều kiện cơ bản cho thành công của lên men lactic và bảo quản. Lên men chủ yếu là nhờ *lactobacillus plantarum,* loại vi khuẩn sống trên lá cây và bằng cách nào đó mà được đưa vào cùng với nông sản. Để lên men lactic nhanh điều quan trọng là thực vật có đủ carbohydrate, đặc biệt là saccharose. Những bắp cải trắng đã già thoả mãn điều kiện này. Thực phẩm xanh, non thì hàm lượng carbohydrate ít, và cây thức ăn giàu đạm thì sự lên men lactic xảy ra chậm, pH chỉ được giảm rất ít và những vi khuẩn khác, như vi khuẩn butyric có thể phân giải thực phẩm xanh. Việc cho thêm mật vào có thể hạn chế nhược điểm trên, vì mật chứa nhiều saccharose và raffinose, những chất này sau khi thuỷ phân được phân giải nhanh bởi vi khuẩn lactic. Ngô chín sữa là nguyên liệu lên men lý tưởng, vì trong quả của nó chứa nhiều carbohydrate dễ phân giải.

Khi sản xuất phomat sự lên men lactic cũng có ý nghĩa quan trọng. Sữa chua được gây ra phần lớn là do *streptococcus lactis* và *streptococcus cremonis.* pH thấp dẫn đến sự kết tủa protein (sữa đặc lại), được gọi là phomat trắng. Phomat này không những chứa protein mà còn cả chất béo

sữa. Phomat này là nguyên liệu để sản xuất các loại phomat khác nhau. Để sản xuất phomat cần có sự tham gia của các vi khuẩn lactic, *streptococus*, *lactobacillus*, chúng không những tạo nên lactic acid mà còn thuỷ phân protein, nghĩa là phân giải thành peptide và aminoacid. Trong phomat lactic acid còn có chức năng bảo quản.

Nguyên lý của sự phophoryl hóa yếm khí được nghiên cứu kỹ. Như ở hình 4.21 phân tử cơ chất được biến đổi cho đến nhóm phosphoryl của nó ở dạng liên kết giàu năng lượng. Nhóm phosphoryl này được chuyển đến ADP, tổng hợp ATP. Vì vậy người ta gọi sự phosphoryl hóa này là phosphoryl hóa cơ chất.

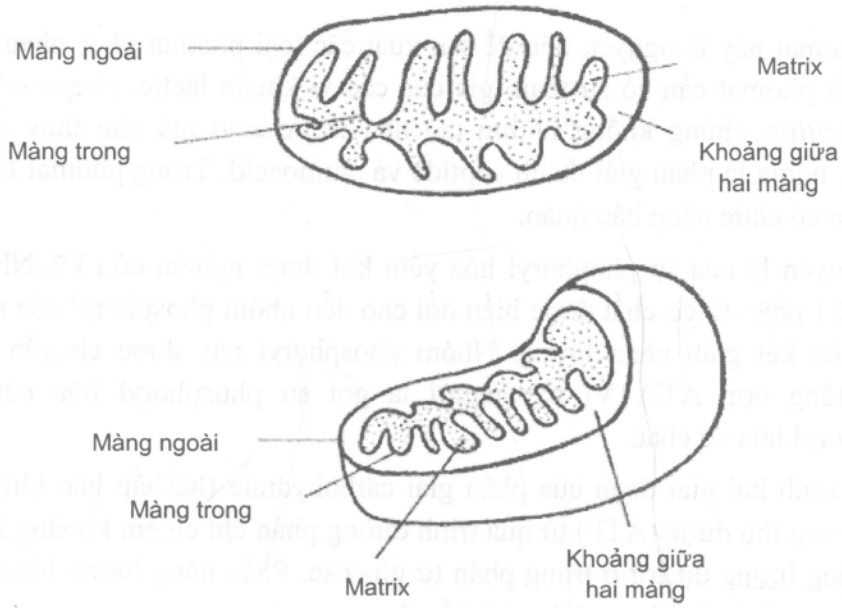
So sánh hai giai đoạn của phân giải carbohydrate (hô hấp háo khí) thì năng lượng thu được (ATP) từ quá trình đường phân chỉ chiếm khoảng 20% tổng năng lượng dự trữ ở trong phân tử glucose. Phần năng lượng lớn nhất được tạo ra sẽ ở giai đoạn phân giải tiếp theo.

Quá trình đường phân được điều khiển bởi enzyme fructosephosphatkinase (phản ứng 4 trong sơ đồ). Đó cũng là enzyme quan trọng của quá trình đường phân. Enzyme có 4 tiểu đơn vị, bị ức chế theo cơ chế "tác động biến cấu" bởi ATP và citrate, ngược lại được hoạt hóa bởi AMP. Vì vậy tỷ lệ AMP/ATP cao kích thích và tỷ lệ ATP/AMP cao thì ức chế hoạt tính của enzyme. Cơ chế này rất có ý nghĩa, vì khi trong hệ thống có nhiều ATP thì không cần tổng hợp qua quá trình đường phân. Ngược lại khi tỷ lệ AMP/ATP cao biểu hiện sự thiếu ATP, xảy ra sự tổng hợp ATP. Nồng độ citrate cao sẽ cung cấp đầy đủ cơ chất cho chu trình Krebs. Quá trình đường phân cung cấp sản phẩm cho chu trình Krebs, nên sự điều khiển quá trình đường phân qua hiệu quả biến cấu của citrate đến fructosephosphatkinase là một cơ chế rất có ý nghĩa.

4.5.4. Hô hấp háo khí (chu trình Krebs)

Chu trình tricarboxylic, hay là chu trình Krebs được giải thích bởi Hans Krebs, và Schueler Otto Warburg. Nhờ phát minh này mà Krebs nhận được giải thưởng Nobel vào năm 1953.

Chu trình này xảy ra ở trong ty thể. Cơ quan tử này có thể so sánh được với lục lạp, thực ra nó nhỏ hơn lục lạp (đường kính 0,5-1μm), tuy nhiên về cấu tạo và chức năng chúng tương tự nhau (hình 4.22).



Hình 4.22. Sơ đồ cấu tạo của ty thể: hình phía trên là sơ đồ cắt ngang qua ty thể, hình phía dưới là cắt một phần ty thể

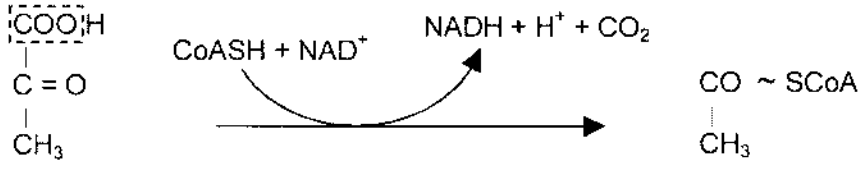
Người ta cho rằng cũng như ở lục lạp, các ty thể đã xuất hiện trước đây khoảng 10^9 năm trong những cơ thể độc lập, trong quá trình tiến hóa chúng được sinh vật nhân chuẩn "bắt" và hoà nhập. Những tế bào có sự biến đổi năng lượng lớn chứa nhiều ty thể, như tế bào mô cơ hoặc tế bào gan, chúng có hơn 1000 ty thể trong một tế bào. Ty thể xuất hiện dưới kính hiển vi là những hạt nhỏ hoặc sợi.

Tuy nhiên, dưới kính hiển vi điện tử, ty thể được bao bọc bởi màng ngoài và màng trong là một hệ thống màng kéo dãn với sự uốn cong vào phía trong. Nhờ cấu trúc này mà màng trong có diện tích bề mặt lớn hơn màng ngoài khoảng 5 lần. Màng ngoài cho những phân tử có trọng lượng lớn (đến 10.000 Da) thấm qua, vì màng này chứa những protein như là những kênh vận chuyển. Màng trong khó thấm qua hơn và vận chuyển các chất có tính chọn lọc. Màng trong bao quanh stroma, trong stroma chứa các enzyme của chu trình Krebs và enzyme phân giải chất béo (hình 4.22). Ngược lại trên màng trong ty thể có các enzyme và hệ thống oxy hoá. Ở đây tương tự như lục lạp, chuỗi vận chuyển e^- định vị trên màng thylacoid và các enzyme của chu trình Calvin trong matrix.

Cơ chất của chu trình Krebs, pyruvate là sản phẩm của quá trình đường phân. Nó được vận chuyển từ tế bào chất qua màng trong ty thể đến stroma và ở đây nó được khử carboxyl hóa oxy hóa nhờ enzyme pyruvate dehydrogenase. Pyruvate dehydrogenase là một ví dụ về đa enzyme, gồm một phức hệ chứa carboxylase, transacetylase và dehydrogenase. Ngoài ra còn có các nhóm prostetic là thyaminpyrophosphate, liponic acid, coenzyme NAD^+ và Coenzyme A. Sau đây là các bước cụ thể của chu trình Krebs (hình 4.23). Pyruvate bị khử carboxyl hóa oxy hóa trước khi đi vào chu trình.

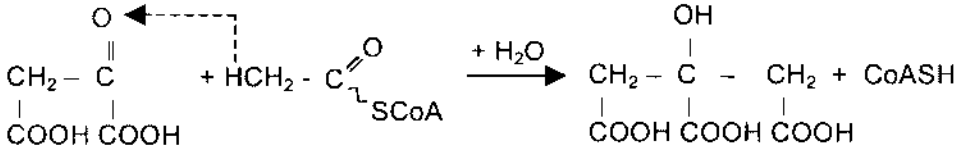
Tương tự quá trình đường phân chu trình Krebs là một ví dụ nói lên rằng trong cơ thể sống các phản ứng phân giải các chất chứa nhiều năng lượng thực hiện theo từng bước. Ở mỗi chu trình Krebs lấy vào một phân tử acetyl CoA.

1. Pyruvic acid được chuyển thành acetyl CoA bằng phản ứng khử carboxyl hóa oxy hoá. Ở phản ứng oxy hóa năng lượng giải phóng ra được liên kết trong NADH và trong liên kết cao năng của acetyl-CoA.



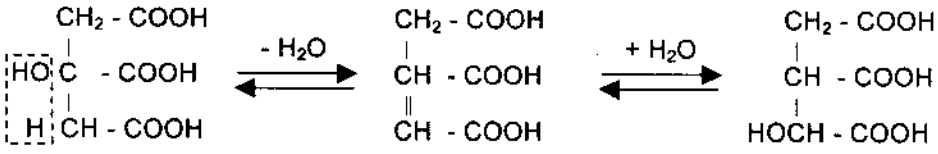
Pyruvic acid — Acetyl - CoA

2. Năng lượng chứa trong liên kết cao năng của acetyl-CoA đủ để gắn acetate vào oxaloacetate tạo thành citrate.



Oxaloacetic acid — Citric acid

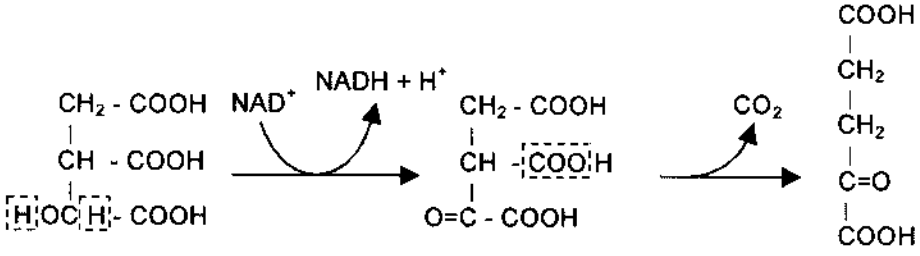
3. Qua sự ngưng tụ này một phân tử có 6 nguyên tử C được tạo nên. Phản ứng được xúc tác bởi enzyme citrate synthetase. Bằng phản ứng 3 và 4, citric acid được biến đổi thành isocitric acid qua aconitic acid.



Citric acid Aconitic acid Isocitric acid

4. Dưới tác dụng của aconitase (hydratase) xảy ra sự kết hợp với nước.

Ở trạng thái cân bằng citric acid chiếm 91%, aconitic acid 3% và isocitric acid 6%.

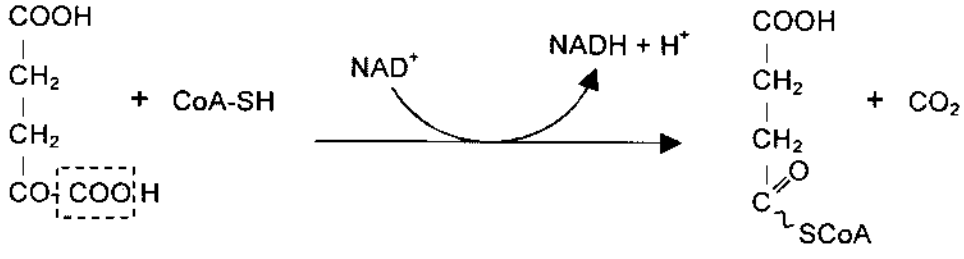


Isocitric acid Oxalosuccinic acid α-cetoglutaric acid

5. Ở hình 4.23, phản ứng 5 và 6 được thực hiện bởi enzyme isocitrate dehydrogenase. Trước hết isocitric acid được oxy hóa thành oxalosuccinic acid và sau đó được khử carboxyl hóa thành axit α- cetoglutaric acid.

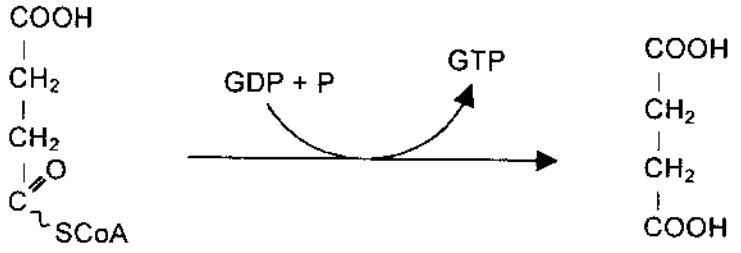
6. Có hai dạng isocitrate dehydrogenase, một dạng chứa NAD^+ và một dạng chứa $NADP^+$. Ở ty thể isocitrate dehydrogenase dạng NAD^+ quan trọng hơn.

7. Bằng phản ứng khử carboxyl hóa oxy hóa α- cetoglutaric acid được biến đổi thành succinyl-CoA. Enzyme xúc tác là một phức hệ α-cetoglutarate dehydrogenase. Phản ứng và enzyme tương tự sự khử carboxyl hóa oxy hóa pyruvic acid.



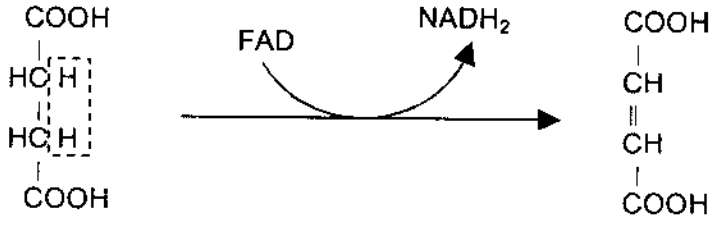
Succinyl-CoA

8. Từ succinyl-CoA, succinic acid được tạo thành. Liên kết giàu năng lượng của succinyl-CoA được bẻ gãy, năng lượng giải phóng ra dùng để tổng hợp guanosintriphosphate (GTP) từ guanosindiphosphate (GDP) và phosphate vô cơ. Trong cơ thể thực vật GTP được tạo thành tương tự như ATP.



Succinyl-CoA Succinic acid

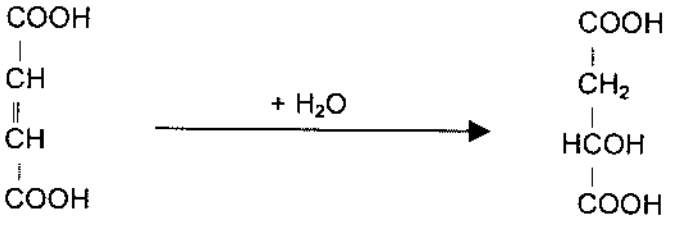
9. Dưới tác dụng của FAD succcinate bị oxy hóa để tạo thành fumarate.



Succinic acid Fumaric acid

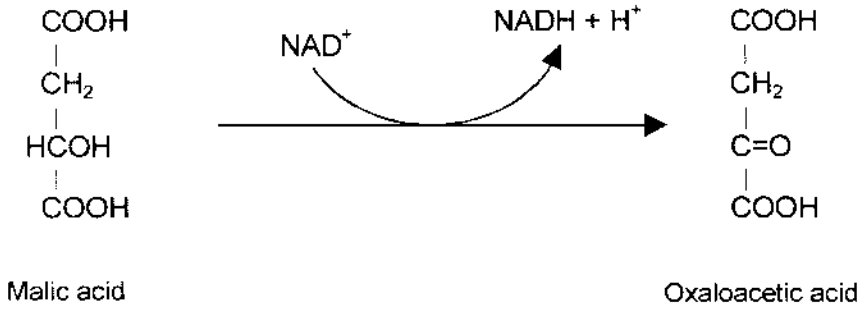
Enzyme này là một flavoprotein, có nhóm prostetic là FAD được gọi là succinate dehydrogenase. Ở sự oxy hóa succinate thành fumarate năng lượng giải phóng không đủ để khử NAD^+. Tuy nhiên nó đủ để khử FAD (xem thế khử tiêu chuẩn).

10. Dưới tác dụng của H_2O, fumarate biến thành malate



Fumaric acid Malic acid

11. Malate dehydrogenase khử malate thành oxaloacetate, là chất khởi đầu của 1 chu trình mới.

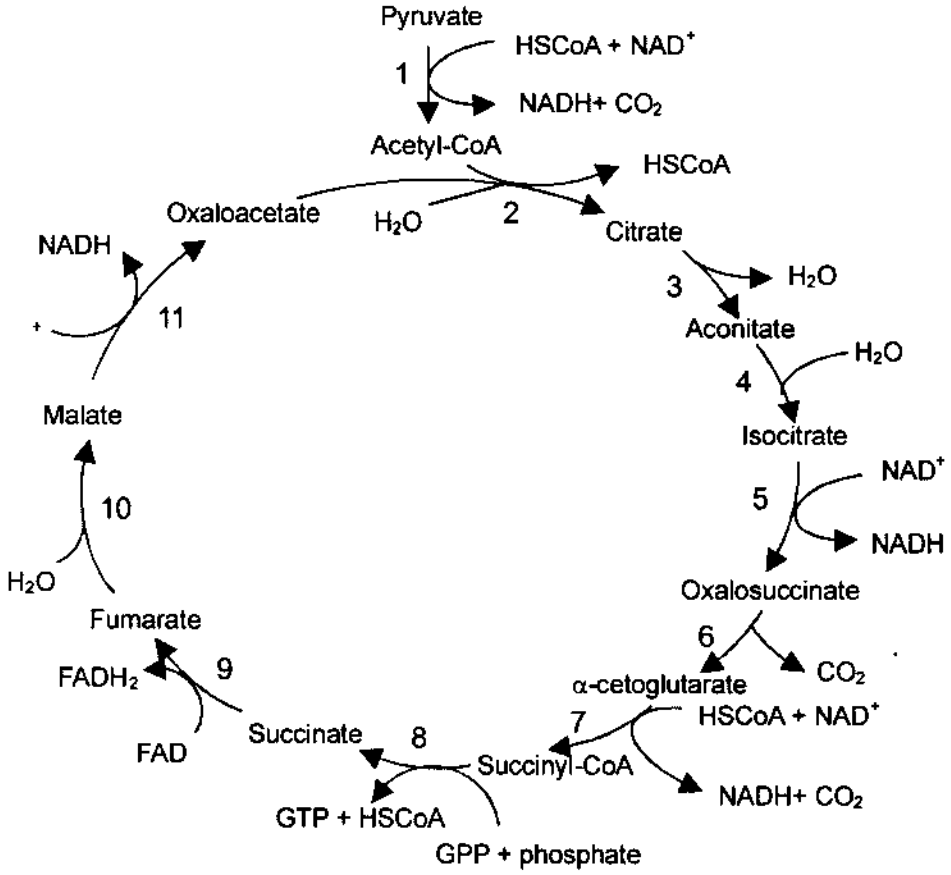


Những phản ứng cơ bản trong chu trình Krebs là sự khử carboxyl hóa và phản ứng oxy hoá. Nếu tính phản ứng từ pyruvate đến acetyl-CoA vào chu trình Krebs thì có 3 vị trí khác nhau CO_2 được giải phóng (phản ứng 1,6,7) và 5 vị trí khác nhau cơ chất bị oxy hóa (phản ứng 1,5,7,9 và 11). Ở những phản ứng oxy hóa luôn luôn có 1 coenzyme (NAD^+) hoặc 1 nhóm prostetic (FAD) tham gia. Chúng chuyển thành dạng khử bằng phản ứng oxy hoá. Năng lượng được giải phóng ra do sự oxy hóa cơ chất được sử dụng cho việc khử coenzyme cũng như prostetic. Quan trọng là năng lượng ở phản ứng 8 được dùng để tổng hợp 1 phân tử GTP, tương đương với 1 ATP, vì GTP có thể phản ứng với ADP như sau:

$$GTP + ADP \rightarrow ATP + GDP$$

Trong chu trình (hình 4.23) CO_2 được tách ra nhưng O_2 không được tiếp nhận vào. Nguyên tử O có trong CO_2 không phải là oxy cho hô hấp. Ý nghĩa của chu trình Krebs là tạo ra các coenzyme khử (NADH, $FADH_2$), những chất khử này bị oxy hóa trong chuỗi enzyme hô hấp. Ngoài ra các acid khác nhau của chu trình còn tham gia vào những quá trình trao đổi chất khác.

Qua chu trình Krebs chuỗi carbon từ carbohydrate được đi vào trao đổi lipid và protein.

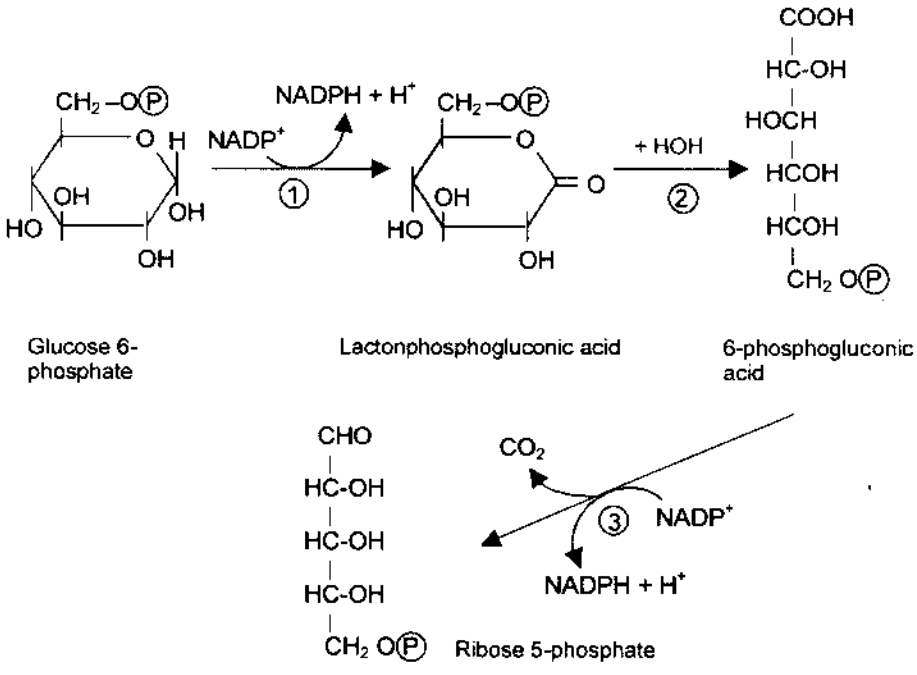


Hình 4.23. Chu trình Krebs

4.5.5. Chu trình pentosophoptphate- oxy hóa trực tiếp glucose

Bên cạnh quá trình đường phân trong tế bào chất còn xảy ra một con đường khác, gọi là chu trình pentosephotphate và quá trình phản ứng có phần tương tự chu trình Calvin. Phản ứng bắt đầu với việc oxy hóa glucose-6-phosphate, vì vậy gọi là oxy hóa trực tiếp glucose. Enzyme xúc tác cho phản ứng đầu tiên là glucose-6-phosphate-dehydrogenase, được Otto Warburg phát hiện năm 1931. Các bước oxy hóa được chỉ ra trong hình 4.24.

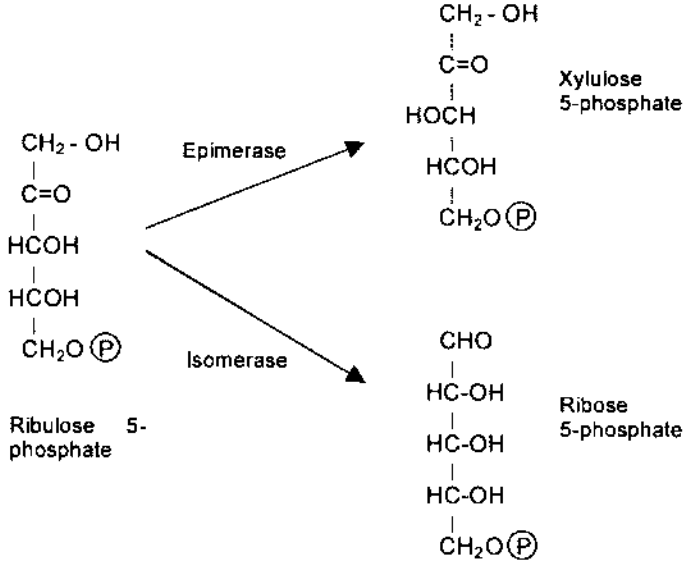
- Phản ứng 1: Từ glucose-6-phosphate 2 nguyên tử H đính ở C_1 được tách ra nhờ enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase, xuất hiện dạng lactone. Glucose-6-phosphate dehydrogenase đặc hiệu đối với $NADP^+$. Ái lực của nó đối với $NADP^+$ cao hơn 1000 lần so với NAD^+.



Hình 4.24. Sự oxy hóa trực tiếp glucose trong chu trình pentosephosphate

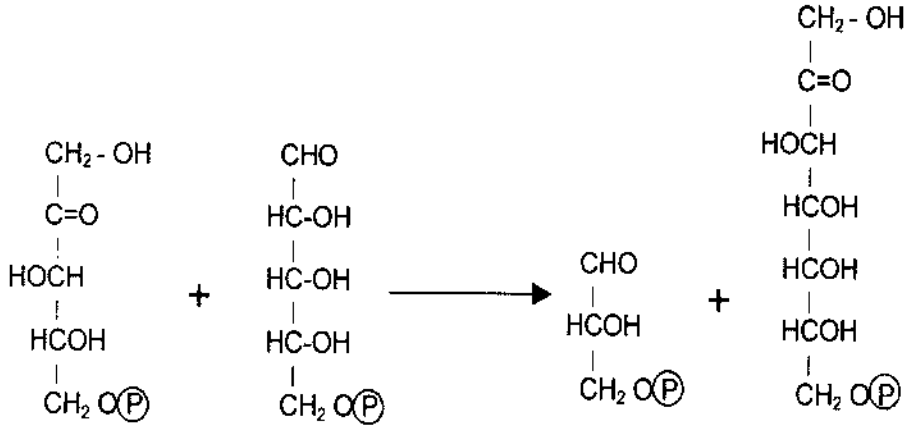
- Phản ứng 2: Dạng lactone được thuỷ phân, tạo nên 6 phosphogluconic acid.

- Phản ứng 3: 6-phosphogluconate được khử carboxyl hóa oxy hoá. Enzyme xúc tác là 6-phosphogluconate dehydrogenase.



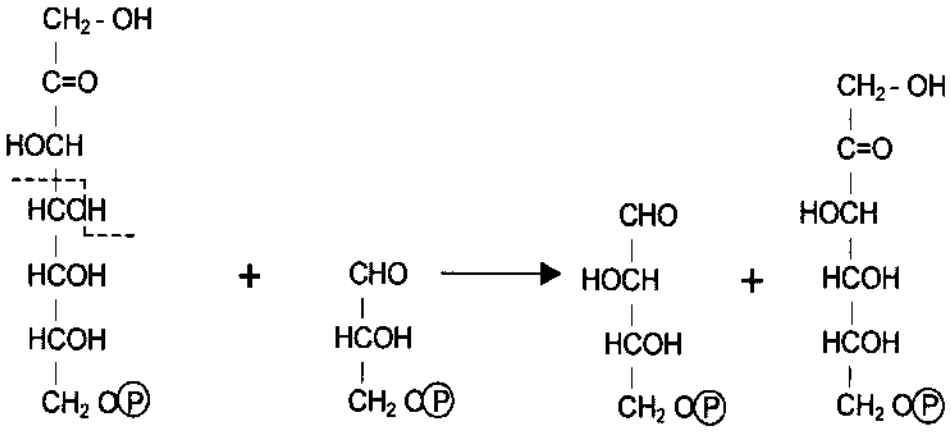
Trong chu trình có 2 vị trí (phản ứng 1 và 3) $NADP^+$ được khử. NADPH được tạo ra có thể sử dụng cho phản ứng tổng hợp, ví dụ tổng hợp các acid béo. Ribulose-1-phosphate không phải là sản phẩm cuối cùng của chuỗi phản ứng này. Nó được biến đổi dễ dàng thành các dạng đồng phân như ribose-5-phosphate hoặc xylulose-5-phosphate.

Chu trình pentosephosphate cung cấp nguyên liệu cho các quá trình tổng hợp khác. Ribose-5-phosphate tham gia tổng hợp nucleotide, nucleic acid và nhiều enzyme. Xylulose-5-phosphate và ribose-5-phosphate nhờ phản ứng transcetolase tạo nên sedoheptulosephosphate và aldehydphosphoglycic.



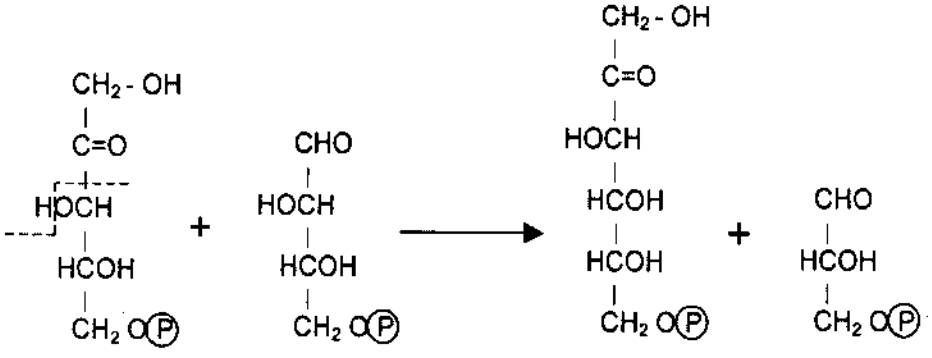
Xylulose 5-phosphate | Ribose 5-phosphate | Aldehydphospho-glyceric | Sedoheptulose 7-phosphate

Transcetolase vận chuyển 2 nguyên tử C từ đường ceto đến aldose, nhóm prostetic của chúng là thiaminpyrophosphate, ở vòng thiazol của nó đường ceto được kết hợp vào khi bắt đầu phản ứng. Sedoheptulosephosphate phản ứng với aldehydphosphoglyceric trong một phản ứng transcetolase để tạo thành erythrose-4-phosphate. Ở phản ứng này 3 nguyên tử C được vận chuyển đến aldehydphosphoglyceric.



Sedoheptulose 7-phosphate | Aldehydphospho-glyceric | Erythrose 4-phosphate | Fructose 6-phosphate

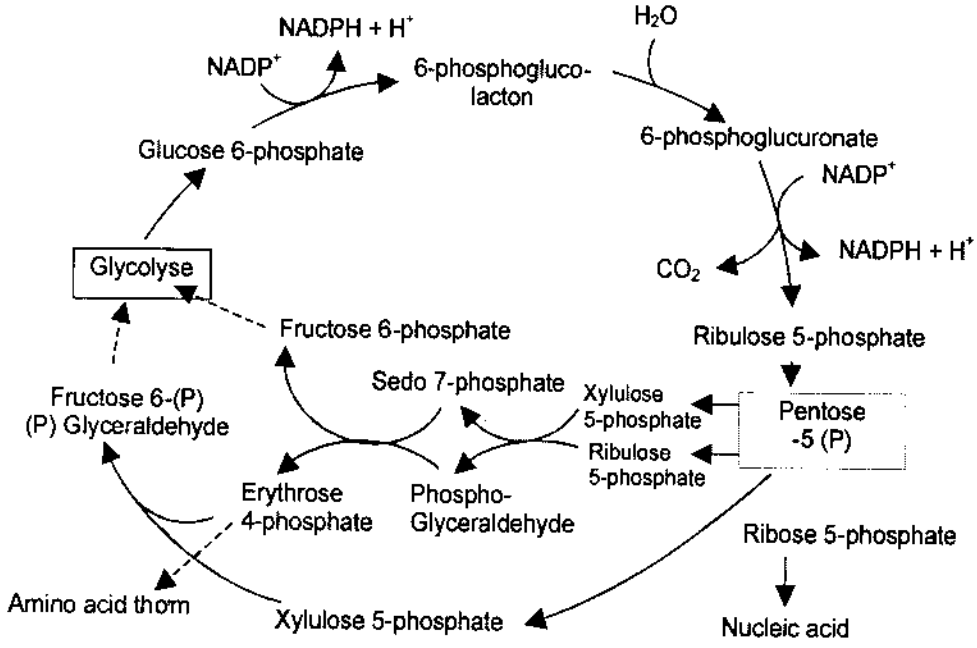
Fructose-6-photphate là chất trao đổi của quá trình đường phân, có thể đi vào các quá trình khác. Erythrose-4-phosphate phản ứng với xylulose-5-photphate để tạo thành fructose-6-photphate và aldehydphosphoglyceric.



Xylulose 5-phosphate | Erythrose 4-phosphate | Fructose 6-phosphate | Aldehydphospho-glyceric

Phản ứng này cũng vận chuyển 2C (transcetolase). Hai sản phẩm của phản ứng là chất trao đổi của quá trình đường phân, có thể được phân giải tiếp tục trong qua trình này.

Toàn bộ các phản ứng của chu trình pentosephosphate được biểu diễn trong hình 4.25.



Hình 4.25. Chu trình pentosephosphate

Các bước oxy hóa khử đầu tiên đã dẫn đến 2 vị trí khử $NADP^+$ thành NADPH. Dạng khử của coenzyme cần cho phản ứng tổng hợp và ở đó một H được đi vào cấu tạo một chất hữu cơ. NADPH đóng vai trò quan trọng trong tổng hợp chất béo. Những tế bào trong đó acid béo được tổng hợp nhiều thì trao đổi chất theo chu trình pentosephotphate xảy ra mạnh mẽ, ví dụ trong các mô tuyến của động vật bú sữa. Ribulose-5-photphate là tiền chất của ribose-5-photphate, là thành phần của nhiều nucleotide và nucleic acid. Đặc biệt những mô sinh trưởng, tổng hợp nucleic acid thường xuyên cần ribosephosphate, ở đây trình tự phản ứng của chu trình cho đến ribulose-5-photphate thực hiện với tốc độ lớn. Erythrose-4-photphate là tiền chất của các aminoacid thơm (phenylalanine, tyrosine) được sử dụng để tổng hợp protein đặc biệt trong các mô sinh trưởng. Khi có nhu cầu lớn về NADPH thì phản ứng xảy ra với tốc độ lớn. Từ 6C của một phân tử glucose thì 5C đi vào quá trình đường phân. Chu trình pentosephotphate có khả năng thích nghi với nhu cầu sinh lý, tương tự chu trình Krebs cung cấp cho các con đường trao đổi chất khác nhau với chuỗi carbon hữu cơ và chất khử tương ứng.

Chương V
LIPID VÀ SỰ TRAO ĐỔI LIPID TRONG CƠ THỂ THỰC VẬT

Lipid là nhóm chất hữu cơ có các đặc tính hóa lý giống nhau, chúng không tan trong nước, chỉ tan trong các dung môi hữu cơ như ether, cloroform, benzene, acetone,... Không phải tất cả lipid đều hòa tan như nhau trong các dung môi hữu cơ nói trên mà mỗi lipid hòa tan trong dung môi hữu cơ tương ứng của mình, nhờ đặc tính này người ta có thể phân tích riêng từng loại lipid. Về mặt hóa học lipid là những ester giữa rượu và acid béo, điển hình là triacylglycerid.

$$\begin{array}{l} CH_2 - O - CO - R_1 \\ \\ CH - O - CO - R_2 \\ \\ CH_2 - O - CO - R_3 \end{array}$$

R_1, R_2, R_3 có thể giống nhau, có thể khác nhau, có thể bão hòa hoặc chưa bão hòa.

Ngoài rượu và các acid béo, ở các lipid phức tạp (lipoid), trong phân tử của chúng còn chứa các dẫn xuất có phospho, nitơ, ...

Vai trò của lipid:

- Là chất dự trữ năng lượng, khi oxy hóa một gam lipid có thể thu được 9,3 Kcal.

- Lipid cấu tử của tế bào chất là thành phần cấu tạo của tế bào và chứa trong tế bào với số lượng ổn định. Lipid là thành phần cấu trúc của màng tế bào, màng ty thể, lạp thể, ... Trong màng sinh học lipid ở trạng thái kết hợp với protein tạo thành hợp chất lipoproteid. Chính nhờ hợp chất này đã tạo cho màng sinh học có được tính thẩm thấu chọn lọc.

- Lipid dưới da động vật có tác dụng gối đệm và giữ ấm cho cơ thể.

- Lipid là dung môi cho nhiều vitamin quan trọng (như A, D, E, K).

- Đối với loài động vật ngủ đông, động vật di cư, các loại sâu kén, lipid còn là nguồn cung cấp nước, vì khi oxy hóa lipid cho một lượng nước sinh ra.

- Các hạt cây trồng khác nhau có hàm lượng lipid khác nhau.

Ví dụ: đậu tương (20 - 30%); gạo (2,2%); ngô (4,9%); lúa mì (1,9%); cao lương (3,9%); lạc (44 - 56%); thầu dầu (50 - 60%).

I. CẤU TẠO VÀ TÍNH CHẤT CỦA LIPID

1.1. Cấu tạo

Dầu, mỡ được tổng hợp ở các cơ thể sống và tùy theo nguồn gốc mà chúng được phân ra dầu thực vật và mỡ động vật.

Glycerine là một rượu có 3 chức, do đó có thể hình thành mono, di– hay triester. Các ester này được biết từ lâu với các tên mono, di– và triacylglycerid. Dầu, mỡ có nguồn gốc tự nhiên luôn là hỗn hợp các triacylglycerid.

Các acid béo của dầu, mỡ có nguồn gốc tự nhiên đều có số nguyên tử carbon chẵn. Bởi vì các acid béo đều được tổng hợp từ các đơn vị 2C (gốc acetyl).

Bên cạnh các acid béo bão hòa, một số acid béo không bão hòa đã được tìm thấy trong dầu, mỡ. Sau đây là một số *acid béo bão hòa* thường gặp:

- Caproic acid (6C): $CH_3 – (CH_2)_4 – COOH$
- Caprilic acid (8C): $CH_3 – (CH_2)_6 – COOH$
- Caprinic acid (10C): $CH_3 – (CH_2)_8 – COOH$
- Lauric acid (12C): $CH_3 – (CH_2)_{10} – COOH$
- Miristic acid (14C): $CH_3 – (CH_2)_{12} – COOH$
- Panmitic acid (16C): $CH_3 – (CH_2)_{14} – COOH$
- Stearic acid (18C): $CH_3 – (CH_2)_{16} – COOH$
- Arachidic acid (20C): $CH_3 – (CH_2)_{18} – COOH$

* Các *acid béo chưa bão hòa* thường gặp là:

- Oleic acid: $CH_3 – (CH_2)_7 – CH = CH – (CH_2)_7 – COOH$
- Linoleic acid:

$$CH_3 – (CH_2)_3 - [CH_2 – CH = CH]_2 – (CH_2)_7 – COOH$$

- Linolenic acid: $CH_3 – [CH_2 – CH = CH]_3 – (CH_2)_7 – COOH$
- Eruxic acid: $CH_3 – (CH_2)_7 – CH = CH – (CH_2)_{11} – COOH$

1.2. Tính chất

a. Nhiệt độ nóng chảy: Tùy thuộc vào lượng acid béo bão hòa hay chưa bão hòa chiếm ưu thế trong thành phần của dầu mỡ mà nhiệt độ nóng chảy khác nhau.

Nếu trong thành phần của dầu, mỡ có nhiều acid béo bão hòa thì nhiệt độ nóng chảy cao, nếu nhiều acid béo chưa bão hòa thì nhiệt độ nóng chảy thấp và ở trạng thái lỏng. Đa số dầu thực vật ở dạng lỏng ở nhiệt độ thường.

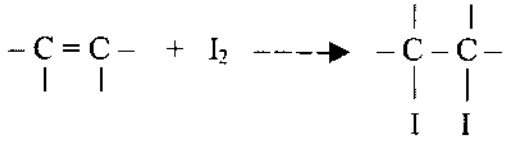
b. Chỉ số acid: là lượng mg KOH cần thiết để trung hòa các acid béo tự do có trong 1 gam dầu, mỡ. Chỉ số acid càng cao thì lượng acid béo tự do càng nhiều. Chất béo để lâu ngày, không bảo quản cẩn thận sẽ có nhiều acid béo tự do. Chỉ số này cho ta biết được chất lượng của chất béo.

c. Chỉ số xà phòng hóa: là lượng mg KOH cần thiết để trung hòa các acid béo tự do và các acid béo kết hợp với glycerine khi xà phòng hóa 1 gam chất béo. Chỉ số này đặc trưng cho phân tử lượng trung bình của glyceride có trong dầu, mỡ.

d. Chỉ số iod: là số gam iod có thể kết hợp với 100 gam dầu, mỡ.

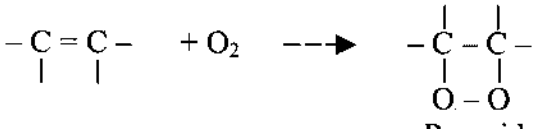
Chỉ số này dùng để mô tả mức độ không bão hòa của các acid béo có trong thành phần dầu, mỡ. Chỉ số iod càng cao thì dầu mỡ càng loãng, chúng càng bị oxy hóa nhanh hơn vì các acid béo bị oxy hóa dễ nhất ở vị trí các liên kết đôi.

Sự gắn iod vào acid béo chưa bão hòa xảy ra theo sơ đồ sau:



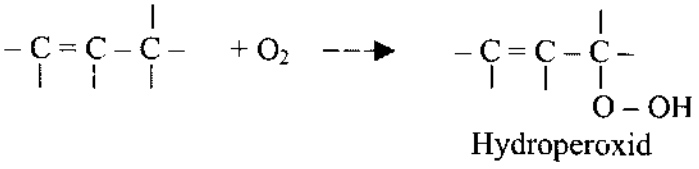
Chỉ số iod của mỡ động vật dao động trong khoảng 30 - 70; còn của dầu thực vật trong khoảng 120 - 160.

e. Sự ôi hóa dầu, mỡ: Dầu, mỡ để lâu ngày sẽ có vị hôi, đắng. Nguyên nhân là do tác dụng của O_2. Trường hợp này thường xảy ra khi dầu mỡ chứa nhiều acid béo chưa bão hòa. Oxy kết hợp vào các nối đôi của acid béo chưa bão hòa để tạo thành peroxid:



Peroxid

hoặc O_2 kết hợp với nguyên tử C ở bên cạnh liên kết đôi tạo thành hydroperoxid:



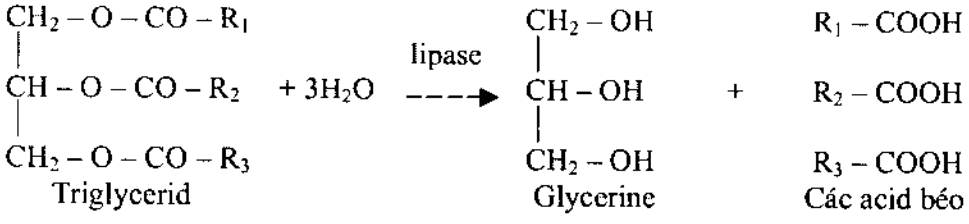
Peroxid và hydroperoxid được tạo thành lập tức bị phân giải để tạo thành aldehyd và cetone là những chất có mùi vị khó chịu.

II. SỰ PHÂN GIẢI TRIGLYCERID

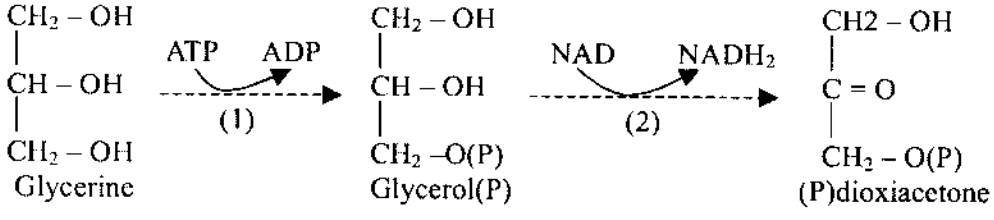
Dầu mỡ là những chất dinh dưỡng có giá trị năng lượng cao, trong hạt các cây lấy dầu vốn có ít carbohydrate thì dầu là chất dự trữ chính và chúng là nguồn năng lượng và nguồn vật liệu xây dựng cho mầm đang phát triển.

Khi phân giải dầu người ta thấy hàm lượng carbohydrate tăng lên.

2.1. Phản ứng thủy phân triglycerid



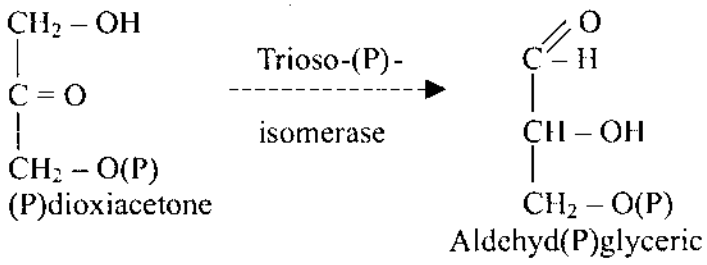
2.2. Phân giải glycerine



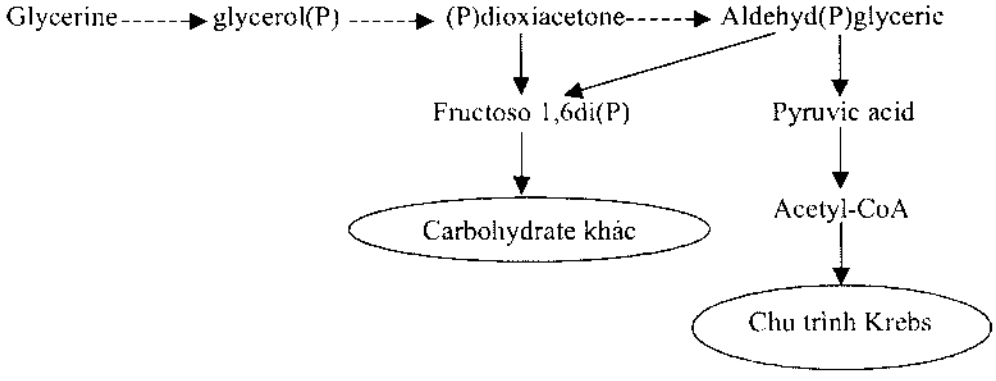
Phản ứng 1: do enzyme glycerolkinase xúc tác.

Phản ứng 2: do enzyme dehydrogenase xúc tác.

- Phosphodioxiacetone dưới tác dụng của enzyme trioso(P)-isomerase sẽ chuyển thành aldehydphosphoglyceric.



* Glycerine có quan hệ gần với carbohydrate hoặc là được sử dụng để tổng hợp fructose và carbohydrate khác hoặc bị phân giải như carbohydrate. Sau đây là sơ đồ các đường hướng trao đổi glycerine:



2.3. Phân giải acid béo

Một acid béo muốn được oxy hóa phải trải qua một số phản ứng sau:

2.3.1. Hoạt hóa acid béo: Nhờ hệ thống enzyme Acyl-CoA-Synthetase, gồm 2 bước sau:

Bước 1:

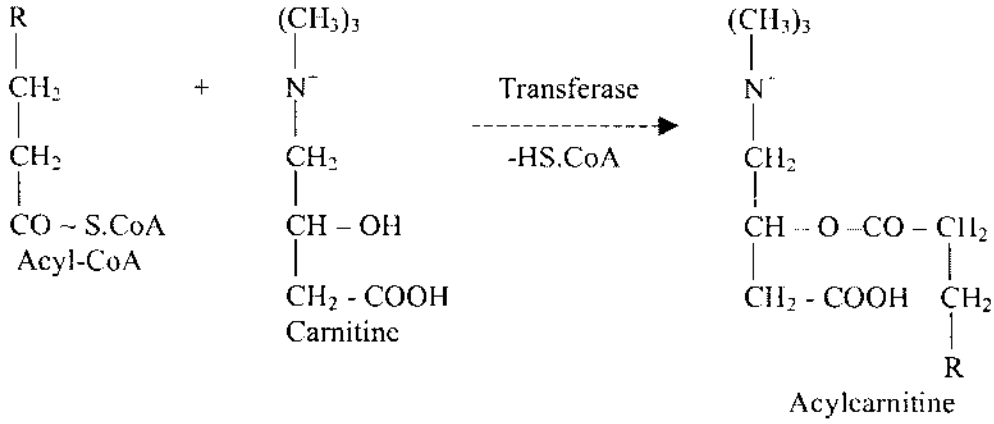
$$R - CH_2 - CH_2 - COOH + ATP \xrightarrow[-H_4P_2O_7]{} \underset{\text{Acyl-AMP}}{R - CH_2 - CH_2 - CO - AMP}$$

Bước 2:

$$\underset{\text{Acyl-AMP}}{R - (CH_2)_2 - CO - AMP} + HS\text{-}CoA \xrightarrow[\text{-AMP}]{} \underset{\text{Acyl-CoA}}{R - CH_2 - CH_2 - CO \sim S.CoA}$$

Quá trình này được thực hiện ở tế bào chất

2.3.2. Gắn Acyl-CoA vào carnitine để tạo thành acylcarnitine: Chất này đi qua màng ty thể. Trong ty thể các gốc acyl của acid béo được vận chuyển lại cho HS-CoA.

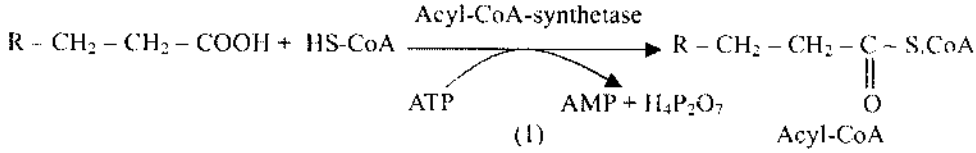


2.3.3. ***Tạo Acyl-CoA trở lại***: Quá trình này ngược lại bước gắn acyl vào carnitine. Carnitine được giải phóng và trở lại mặt ngoài của ty thể.

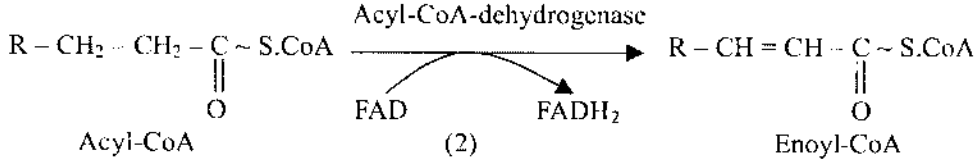
2.3.4. ***Quá trình β-oxy hóa acid béo***

Trong cơ thể sinh vật, sự oxy hóa acid béo xảy ra bằng cách oxy hóa nguyên tử carbon ở vị trí β so với nhóm carboxyl, do đó quá trình này còn được gọi là quá trình β-oxy hóa. Kết quả của sự β-oxy hóa là từng đôi nguyên tử carbon được tách ra dưới dạng acetyl-CoA và acid béo mới tạo thành có mạch carbon ngắn hơn trước 2 nguyên tử carbon. Sự oxy hóa không thể tự xảy ra, để có thể tham gia phản ứng, acid béo phải được hoạt hóa nhờ năng lượng của ATP, nhưng ở đây năng lượng chuyển từ ATP tới chất béo không thông qua con đường phosphoryl hóa như trong trường hợp oxy hóa glucose mà thông qua sự tạo thành hợp chất acyl-CoA. Quá trình β-oxi hóa được Knoop (người Đức) đưa ra 1904, quá trình này xảy ra trong gian bào ty thể.

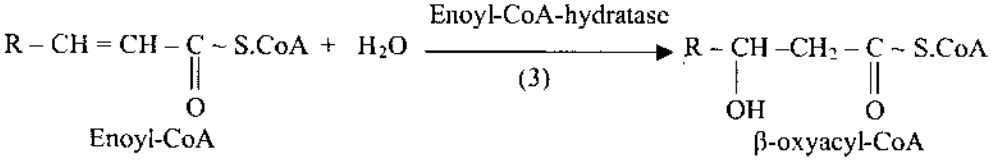
Phản ứng tổng quát của sự tạo thành acyl-CoA như sau:



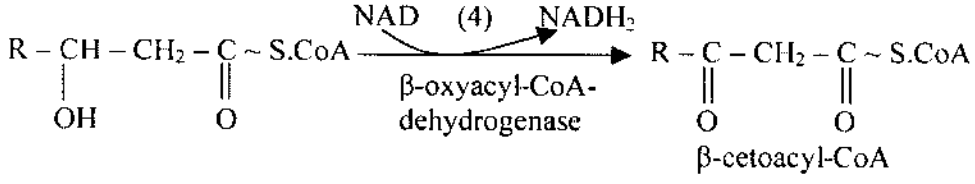
Sau đó acyl-CoA bị oxy hóa bởi enzyme acyl-CoA-dehydrogenase có nhóm hoạt động là FAD:



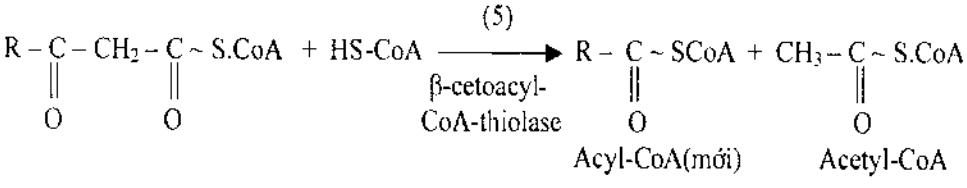
Dưới tác dụng của enzyme Enoyl-CoA-hydratase, phân tử H_2O kết hợp vào nối đôi và tạo thành β-oxyacyl-CoA:



* β-oxyacyl-CoA lại bị oxy hóa lần thứ 2 dưới tác dụng của enzyme β-oxyacyl-CoA-dehydrogenase có coenzyme là NAD để tạo thành β-cetoacyl-CoA:



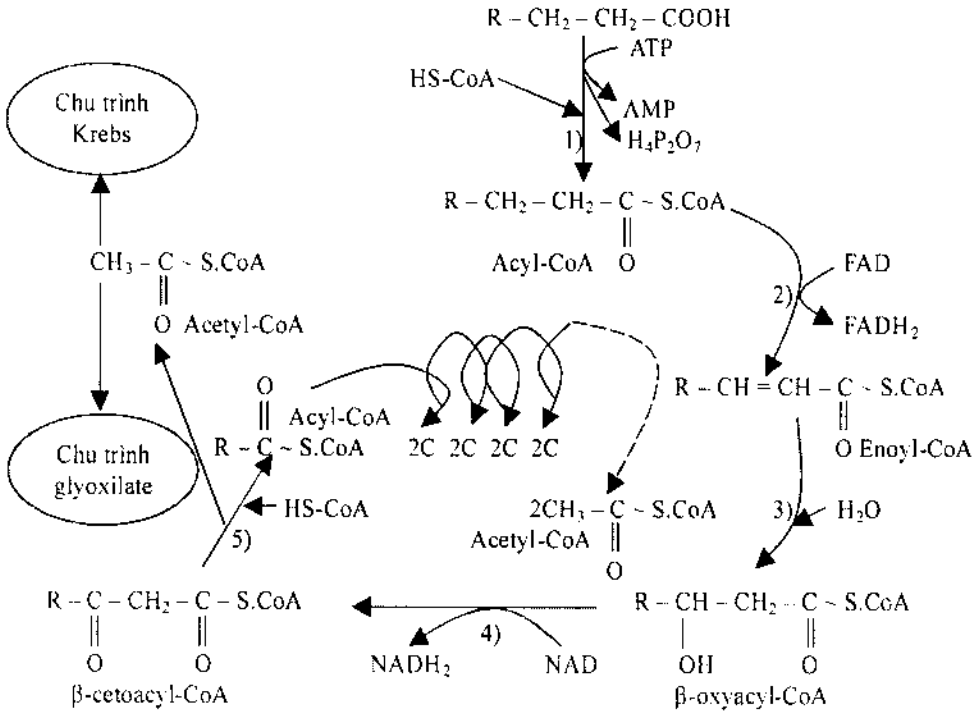
* β-cetoacyl-CoA lại phản ứng với HS-CoA để tạo thành acyl-CoA mới và acetyl-CoA dưới tác dụng của enzyme β-cetoacyl-CoA-thiolase:



Acyl-CoA mới tạo thành này chứa gốc acid béo có ít hơn acid béo ban đầu 2 nguyên tử carbon, nó lại tiếp tục tham gia các phản ứng 2, 3, 4, 5 để tạo thành acyl-CoA mới có mạch carbon ngắn hơn 2 nguyên tử carbon và tách ra một phân tử acetyl-CoA nữa và quá trình β-oxy hóa cứ tiếp tục lặp lại nhiều lần cho đến khi toàn bộ phân tử acid béo được chuyển thành các acetyl-CoA.

Sự β-oxy hóa đã được Lynen mô tả dưới mô hình xoắn ốc.

Acetyl-CoA tạo thành do kết quả của sự β-oxy hóa acid béo có thể đi vào chu trình Krebs, chu trình glyoxilate hoặc tham gia vào nhiều phản ứng khác.



Hình 5.1. Sơ đồ của sự β-oxy hóa acid béo (theo Lynen)

Hiệu quả năng lượng trong quá trình β-oxy hóa acid béo

Ví dụ β-oxy hóa hoàn toàn palmitic acid (16C) tế bào thu được nguồn năng lượng như sau: 7 vòng β-oxy hóa tạo ra $7FADH_2$, $7NADH_2$ và 8 phân tử acetyl-CoA.

$7FADH_2$ ---------▶ 7 x 2ATP = 14ATP
$7NADH_2$ ---------▶ 7 x 3ATP = 21ATP
Tổng cộng : 35ATP

Nhưng vì phải tiêu tốn 1 ATP để hoạt hóa acid béo nên số ATP tạo ra khi β-oxy hóa palmitic acid là: 35ATP – 1ATP = 34ATP.

Nếu 8 phân tử acetyl-CoA đi vào chu trình Krebs sẽ tạo ra:

8 x 12ATP = 96ATP

Tổng cộng: 34ATP + 96ATP = 130ATP.

Ta có thể áp dụng công thức tính sau:

$$A = \left[5\left(\frac{n}{2} - 1\right) - 1\right] + \left(\frac{n}{2} x 12\right)$$

---------- * -------*

(β-oxy hóa) (Krebs)

A là số phân tử ATP.

n là số nguyên tử C (n: chẵn).

III. SỰ PHÂN GIẢI CÁC ACID BÉO CHƯA BÃO HÒA

Đối với acid béo chưa bão hòa như oleic acid, linolenic acid... quá trình β-oxy hóa diễn ra bình thường, các phân tử acetyl-CoA được tách dần ra, cho tới gần liên kết đôi. Tới đây, tùy theo vị trí của liên kết đôi mà sự phân giải có thể có các đường hướng sau:

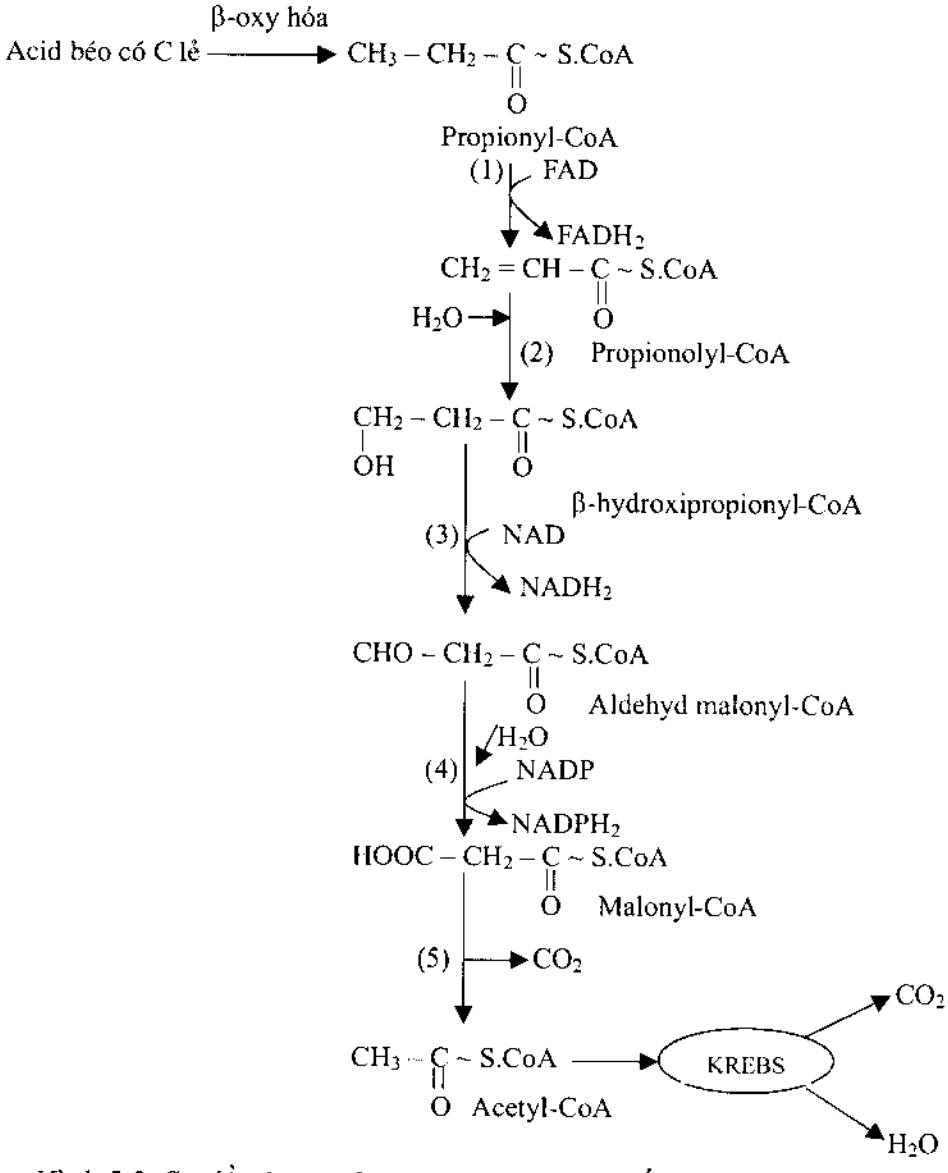
3.1. Ở những acid béo chưa bão hòa mà có liên kết đôi không ở giữa C_α và C_β thì nhờ tác dụng của enzyme isomerase đẩy liên kết đôi về đúng giữa vị trí C_α và C_β sau đó chịu sự β-oxy hóa.

Cũng có những thí nghiệm chứng minh rằng: ở những acid béo chưa bão hòa mà có liên kết đôi ở đúng vị trí giữa C_α và C_β thì nó chịu sự β-oxy hóa bình thường.

3.2. Các acid béo chưa bão hòa trước khi bị oxy hóa thì chúng chuyển thành acid bão hòa bằng cách gắn thêm H_2 và sau đó lại chịu sự β-oxy hóa như bình thường.

IV. SỰ PHÂN GIẢI CÁC ACID BÉO CÓ SỐ NGUYÊN TỬ CARBON LẺ

Sự phân giải các acid béo này vẫn tiến hành bình thường bằng sự β-oxy hóa cho đến khi hình thành $CH_3 - CH_2 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} \sim S.CoA$ (propionyl-CoA), sau đó propionyl-CoA (ở ty thể thực vật và vi sinh vật) ở giai đoạn đầu giống như sự β-oxy hóa cho đến khi hình thành β-hydroxipropionyl-CoA. Nguyên tử C_β bị oxy hóa 2 lần (chất nhận H_2 là NAD và NADP) để tạo malonyl-CoA. Từ đó malonyl-CoA bị khử carboxyl hóa để tạo acetyl-CoA. Chất này có thể đi vào chu trình Krebs hoặc đi vào chu trình glyoxilate.



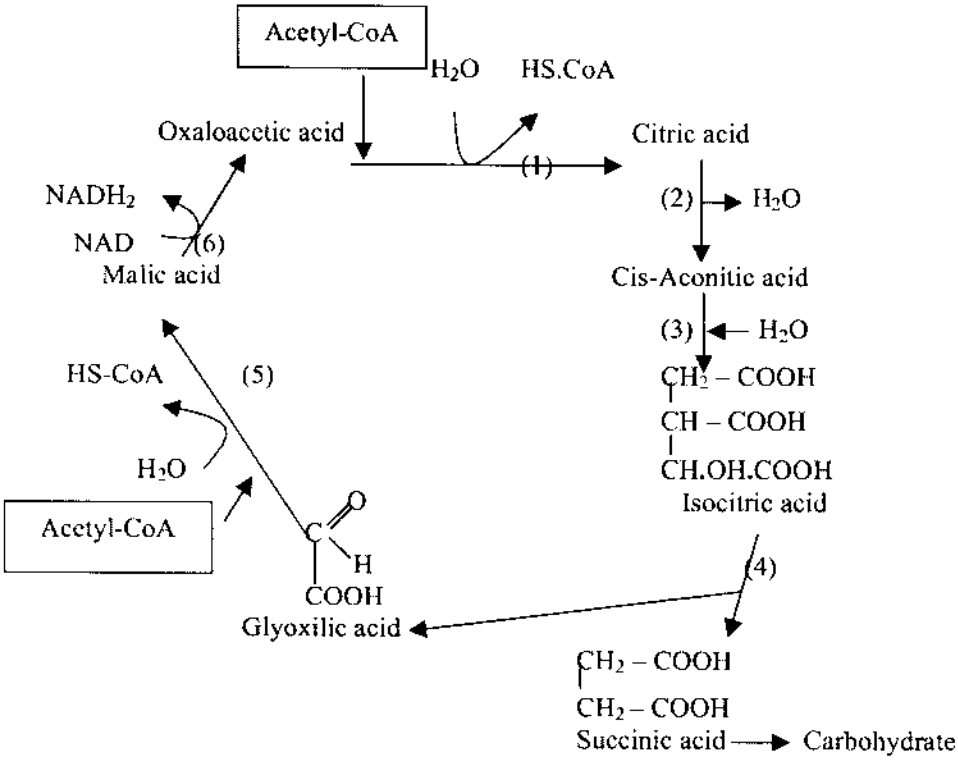
Hình 5.2. Sơ đồ của sự phân giải acid béo có số nguyên tử carbon lẻ

V. CHU TRÌNH GLYOXILATE

So với chu trình Krebs thì chu trình Glyoxilate không có ý nghĩa mấy về mặt năng lượng vì phải tiêu tốn mỗi vòng mất 2 phân tử Acetyl-CoA.

Ý nghĩa của chu trình này là sự tạo thành succinic acid, nghĩa là có sự chuyển hóa chất béo thành carbohydrate. Vì từ succinic acid sẽ hình thành nên oxaloacetic acid và theo quá trình ngược đường phân sẽ tạo nên

carbohydrate. Ngoài ra từ chu trình này sẽ hình thành glyoxilic acid. Bằng cách khử carboxyl hóa acid này sẽ chuyển thành aldehyd formic là chất tham gia vào hàng loạt quá trình trao đổi chất khác. Từ glyoxilic acid sẽ tổng hợp được glycine tham gia tạo nên protein.



Hình 5.3. Sơ đồ chu trình Glyoxilate

Phản ứng 1: Enzyme citratesynthetase xúc tác.

Phản ứng 2: Enzyme aconitate-hydratase xúc tác.

Phản ứng 3: Enzyme aconitat-hydratase xúc tác.

Phản ứng 4: Enzyme isocitrat-liase xúc tác.

Phản ứng 5: Enzyme synthetase xúc tác.

Phản ứng 6: Enzyme malatdehydrogenase xúc tác.

VI. SINH TỔNG HỢP TRIGLYCERID

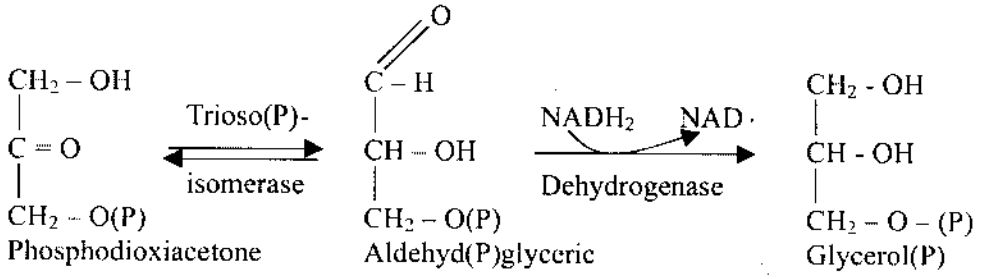
Do không tan trong nước nên dầu không thể vận chuyển được trong cây. Vì vậy ở thực vật việc tổng hợp chất béo (dầu) phải tiến hành tại chỗ trong tất cả các cơ quan của thực vật. Nguyên liệu để tổng hợp chất béo là từ

những chất hòa tan được đưa vào các cơ quan này. Dù ở động vật hay vi sinh vật, thực vật, chất béo đều được tạo thành từ carbohydrate. Trong cơ thể chất béo được tạo thành từ glycerol(P) và các acid béo, bởi vậy muốn tổng hợp được chất béo trước hết phải tổng hợp được 2 cấu tử này.

6.1. Tổng hợp glycerolphosphate

Những chất ban đầu để tạo thành glycerolphosphate là aldehyd(P)glyceric hoặc (P)dioxiacetone. Những chất này được hình thành trong quá trình quang hợp (sản phẩm của chu trình Calvin) hoặc từ sự phân giải carbohydrate mà có (ví dụ từ quá trình đường phân hoặc từ chu trình Pentoso(P)).

Cơ chế hình thành glycerol(P) như sau:



6.2. Tổng hợp acid béo theo vòng xoắn Lynen-Wakil

- Acid béo được tổng hợp từ acetyl-CoA trong tế bào chất.

- Quá trình này có sự tham gia của phức hợp multienzyme, cấu trúc của phức hợp này như sau:

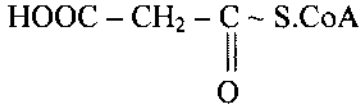
+ Ở giữa là phân tử protein-ACP (acyl-carrier-protein) không có hoạt tính enzyme, có nhiệm vụ mang nhóm acyl trong quá trình tổng hợp acid béo. ACP đầu tiên được phân lập từ *E.coli* do 77 gốc aminoacid tạo nên. ACP được coi như một cái nhân nằm chính giữa 6 phân tử enzyme của phức hợp multienzyme. ACP gắn với một phân tử pantoten (vitamin G) tạo thành một bộ phận hoạt động tương tự CoA có nhiệm vụ mang nhóm Acyl trong quá trình sinh tổng hợp acid béo. Gốc acyl trung gian được móc vào ACP qua liên kết thioester với nhóm SH của protein. Gốc phosphopantoten hoạt động được ví như "cánh tay di động" vận chuyển gốc acyl từ enzyme này đến enzyme khác.

- Phức hợp multienzyme có 2 nhóm –SH

+ Nhóm SH của ACP (SH-giữa)

+ Nhóm SH của phân tử enzyme (SH-biên)

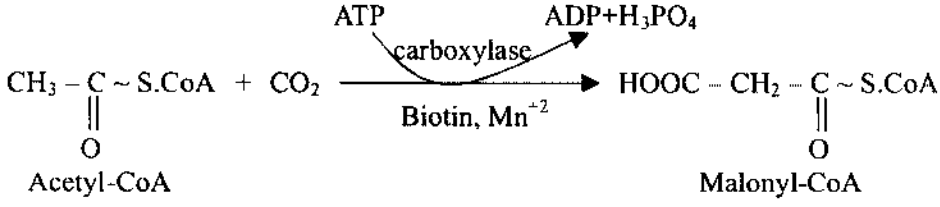
Để sinh tổng hợp acid béo cần nhiều phân tử acetyl-CoA và trừ một acetyl-CoA ban đầu đi vào ở dạng không đổi, còn tất cả những acetyl-CoA sau đó đều phải ở dưới dạng carboxyl hóa đó là malonyl-CoA.



Theo Lynen-Wakil, quá trình tổng hợp acid béo xảy ra qua 3 giai đoạn như sau:

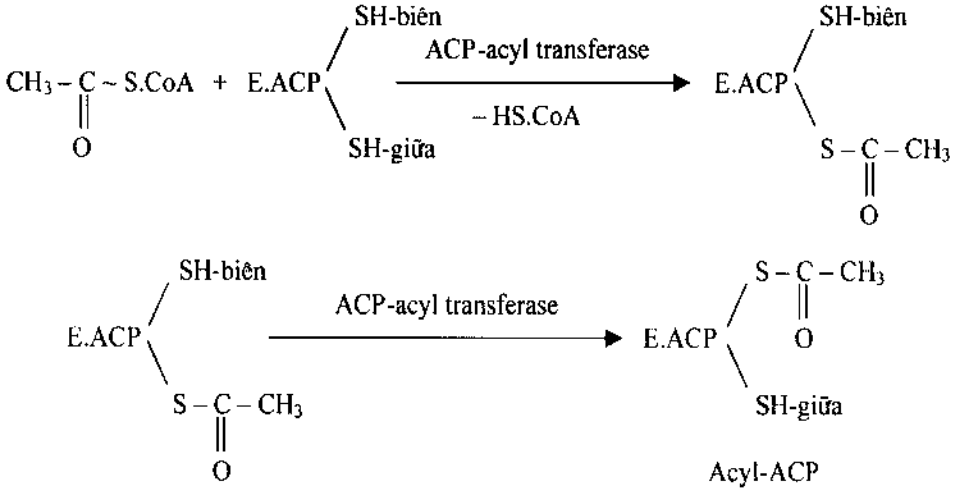
* ***Giai đoạn 1***: Hoạt hóa acetyl-CoA.

Từ acetyl-CoA tạo thành malonyl-CoA với sự tham gia xúc tác của carboxylase cùng với sự có mặt của ATP và Mn^{+2}.

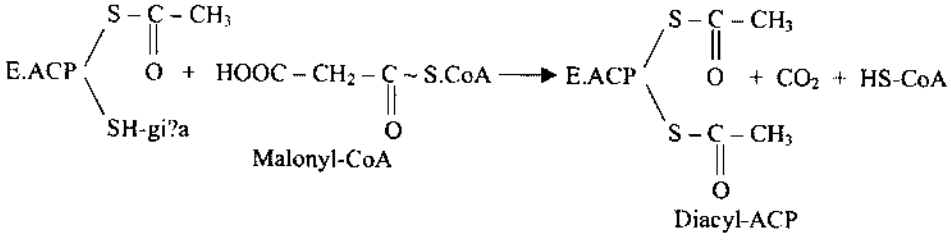


* ***Giai đoạn 2***: Kéo dài chuỗi carbon trong acid béo:

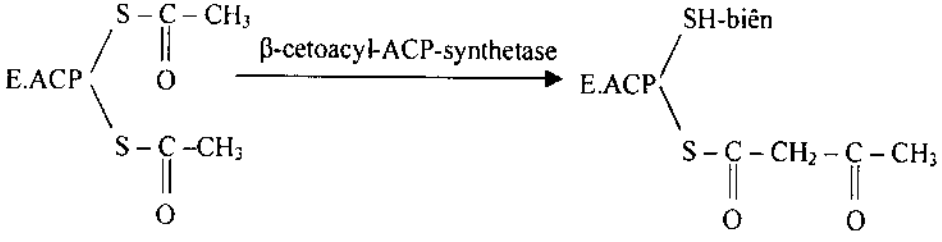
Bước 1: Gắn acetyl-CoA đầu tiên với ACP để hình thành acyl-ACP



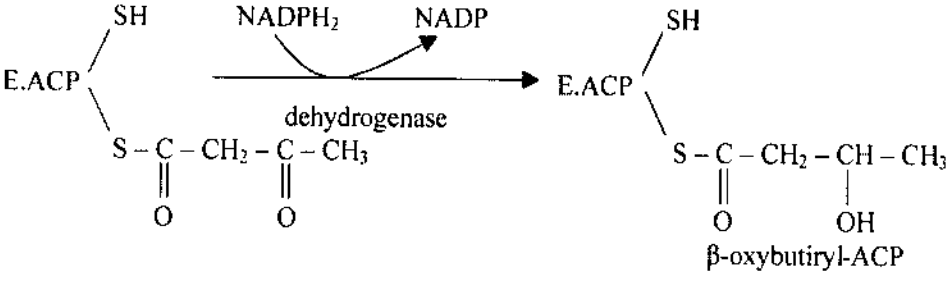
Bước 2: Acyl-ACP kết hợp với malonyl-CoA để hình thành diacyl-ACP.



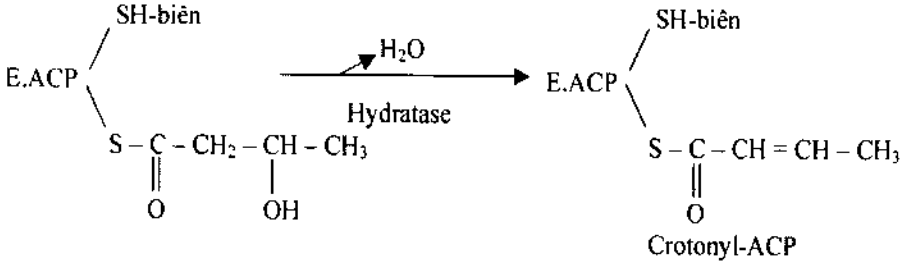
Bước 3: Ngưng tụ diacyl-ACP thành β-cetoacyl-ACP.



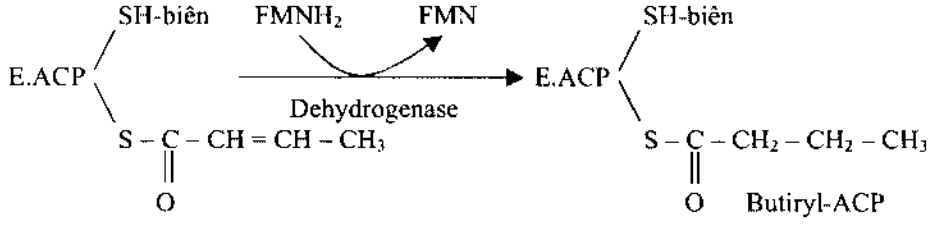
Bước 4: β-cetoacyl-ACP bị khử nhờ dehydrogenase có coenzyme là $NADPH_2$ để hình thành β-oxybutiryl-ACP.



Bước 5: Loại nước nhờ enzyme hydratase để hình thành Crotonyl-ACP.



Bước 6: Crotonyl-ACP bị khử nhờ enzyime dehydrogenase có coenzyme là $FMNH_2$ để hình thành Butiryl-ACP.

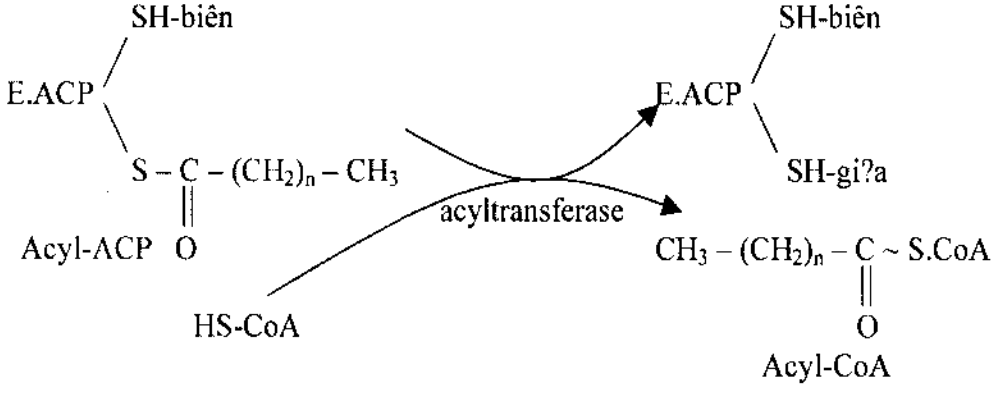


* Phản ứng hoàn nguyên của FMN:

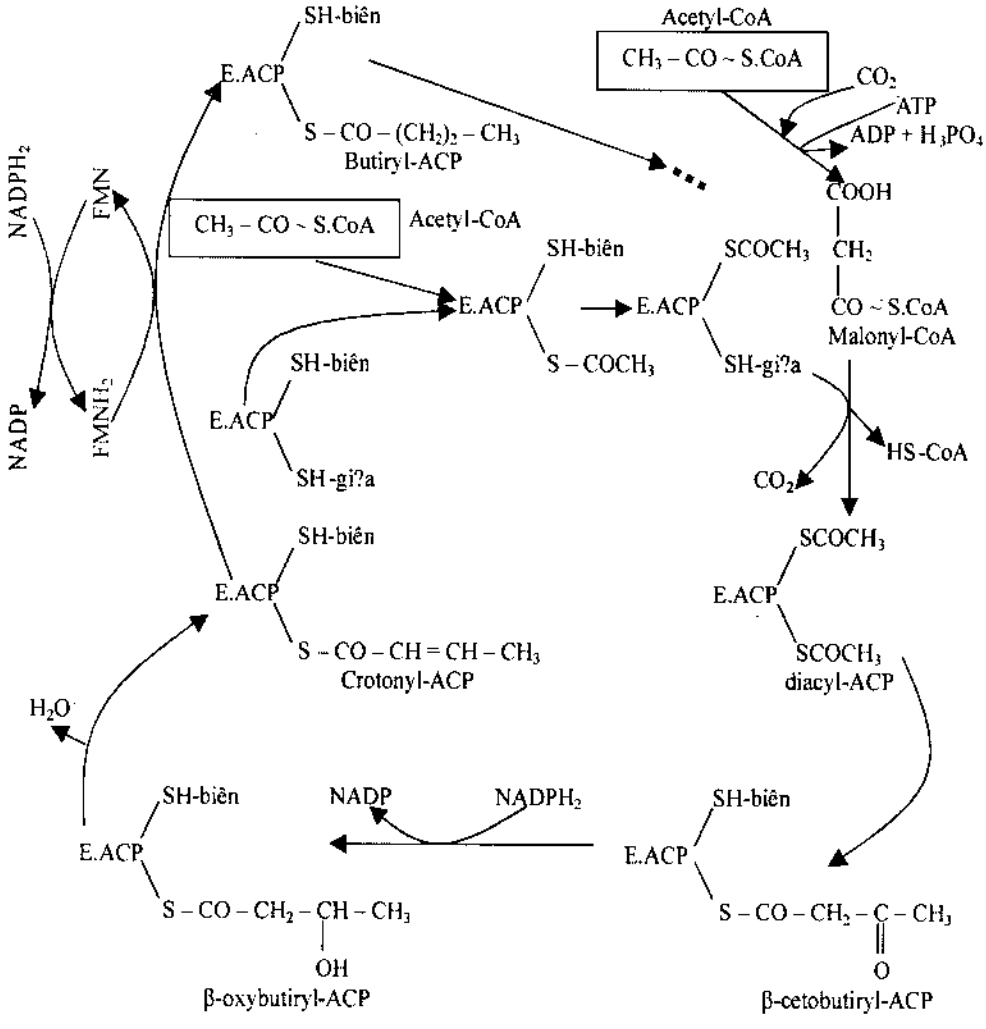
$$FMN + NADPH_2 \rightarrow FMNH_2 + NADP$$

+ Khi hình thành butiryl-ACP, quá trình lại tiếp tục nhận một phân tử malonyl-CoA và tiếp tục như trên. Mỗi vòng quay lại nối dài thêm một cặp carbon cho đến khi phân tử acid béo có đủ độ dài đáp ứng với phân tử acid béo mà tế bào cần tổng hợp.

* ***Giai đoạn 3***: Kết thúc tổng hợp acid béo: Giai đoạn này nhờ sự xúc tác của enzyme acyltransferase.

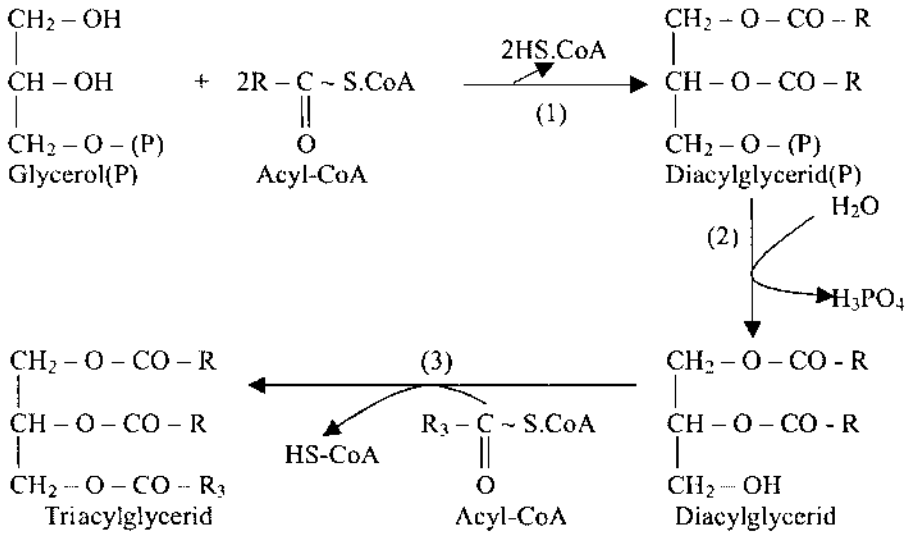


Hình 5.4. Sơ đồ sinh tổng hợp acid béo theo Lynen-Wakil



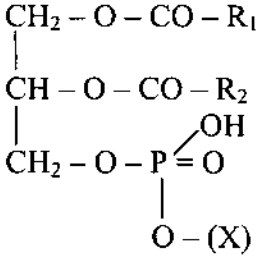
6.3. Tổng hợp triglycerid

Quá trình tổng hợp acid béo nói trên đã tạo ra các acid béo dưới dạng các dẫn xuất acyl-CoA. Trong tế bào có sẵn glycerol(P). Quá trình gắn acid béo được thực hiện từng phân tử lần lượt và tạo thành các sản phẩm mono, diacylglycerid(P) và cuối cùng mới tạo triacylglycerid.



VII. SINH TỔNG HỢP VÀ PHÂN GIẢI PHOSPHOLIPID

Phospholipid là các diglycerid liên kết với phosphoric acid bằng liên kết ester ở vị trí nhóm hydroxyl thứ 3. Sau đó gốc phosphoric acid bị ester hóa bởi rượu chứa nhóm amin (choline, ethanolamine,...). Công thức tổng quát của phospholipid như sau:



(X) – hợp chất phụ

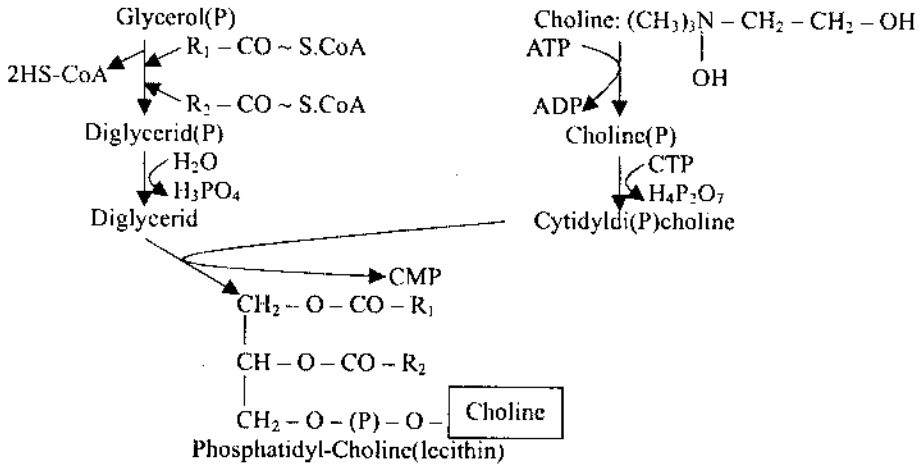
R_1; R_2 – gốc acid béo.

7.1. Sinh tổng hợp phospholipid

Nguyên liệu cần có là: glycerine, các acid béo và các hợp chất phụ (x). Quá trình tổng hợp đòi hỏi chi phí một lượng năng lượng do ATP và CTP cung cấp.

Ví dụ: Sinh tổng hợp phosphatidyl-choline (tên cũ là lecithin).

Sơ đồ sinh tổng hợp như sau:

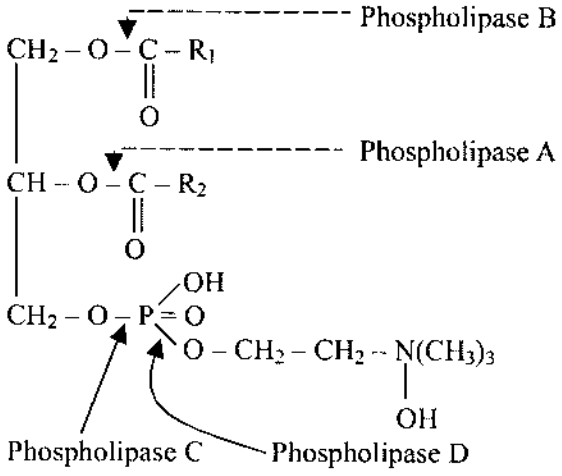


7.2. Phân giải phospholipid (Ví dụ phân giải lecithin)

Quá trình phân giải phospholipid xảy ra mạnh mẽ khi hạt nảy mầm, sự phân giải chúng bằng cách thủy phân với sự tham gia của H_2O dưới tác dụng của nhóm enzyme được gọi là phospholipase.

Đầu tiên phospholipase A xúc tác bằng cách thủy phân acid béo khỏi nguyên tử C_2 của glycerine; sau đó phospholipase B loại acid béo khỏi nguyên tử C_1 của glycerine. Phospholipase C tách phosphoryl-Choline. Còn phospholipase D thủy phân Cholinephosphate. Kết quả của sự tác dụng hợp nhất của các phospholipase là tạo thành các acid béo; glycerine tự do; H_3PO_4 và Choline.

Sơ đồ được trình bày như sau:

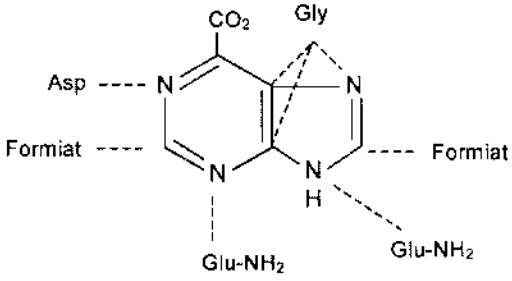


Chương VI
NUCLEIC ACID VÀ SỰ CHUYỂN HOÁ CỦA NUCLEIC ACID

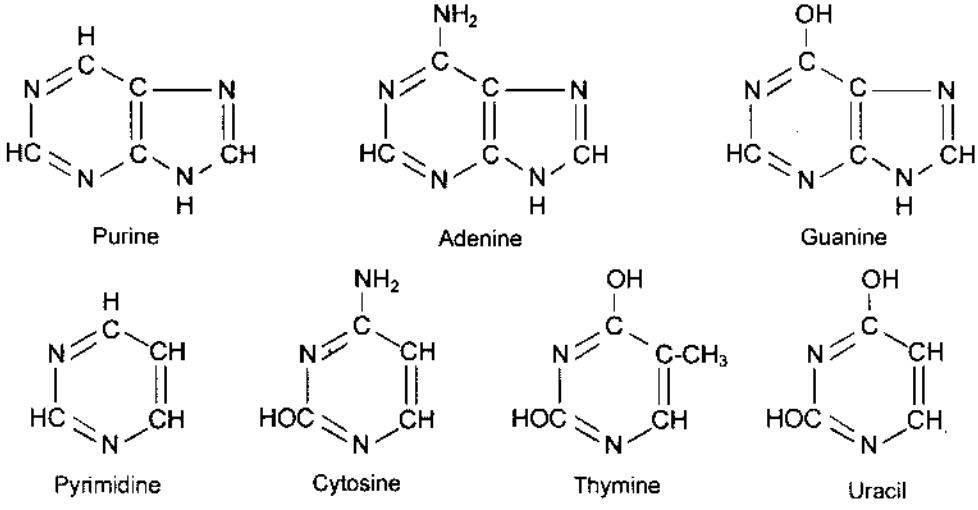
6.1. Cấu trúc của nucleic acid

Nucleic acid là những chất mang thông tin di truyền và chuyển những thông tin di truyền này đến trao đổi chất. Cấu tạo của chúng gồm nhiều đơn phân có ba thành phần: base nitơ, phosphate và ribose hoặc desoxyribose.

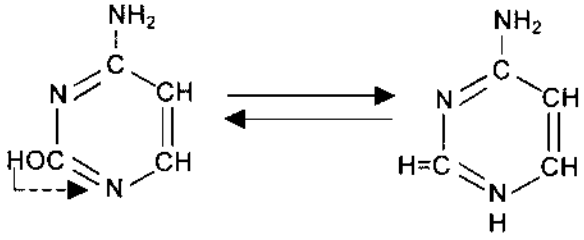
Base nitơ là dẫn xuất của pyrimidine hoặc purine. Pyrimidine được tổng hợp từ carbamylphosphate và asparagine. Purine được tổng hợp từ asparagine, glycine, glutamine, CO_2 và formiate được hoạt hóa bởi tetrahydrofolic acid.



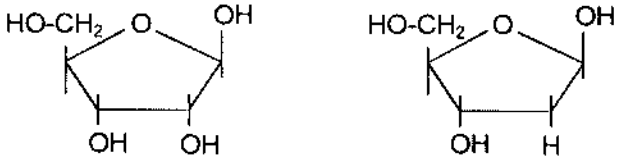
Adenine và guanine là những dẫn xuất của purine. Cytosine, thymine và uracil là dẫn xuất của pyrimidine.



Ở trạng thái cân bằng nguyên tử H của nhóm hydroxyl dịch chuyển đến nguyên tử N.



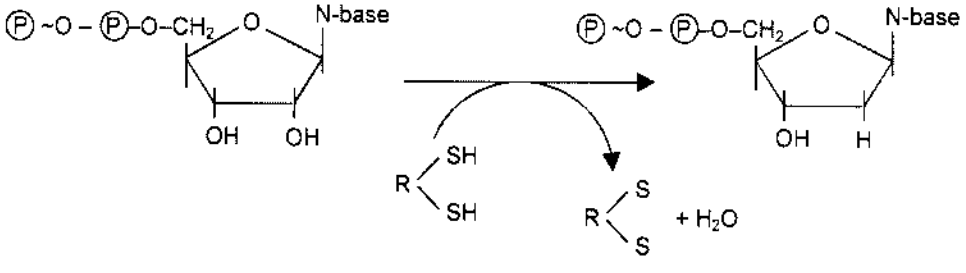
Ở dạng này nguyên tử H đứng cạnh nguyên tử N có thể tạo liên kết N-glycoside với một ribose.



Ribose Desoxyribose

Ribose là thành phần đường của ribonucleic acid (RNA). Desoxyribose là thành phần đường của desoxyribonucleic acid (DNA). Desoxyribose khác với ribose chỉ ở vị trí carbon thứ 2: ở desoxyribose có 1 nguyên tử H thay cho nhóm OH.

Desoxyribose được tạo nên từ ribose ở sinh vật nhân chuẩn bằng phản ứng khử nhờ enzyme nucleosidiphosphate-reductase, phản ứng khử được thực hiện nhờ 2 nhóm SH của enzyme. Phản ứng tổng quát được biểu diễn như sau:



Đường (ribose, desoxyribose) liên kết với base nitơ bằng liên kết glycoside. Người ta gọi chúng là nucleoside. Sự biểu diễn những base nitơ quan trọng nhất và nucleoside như sau:

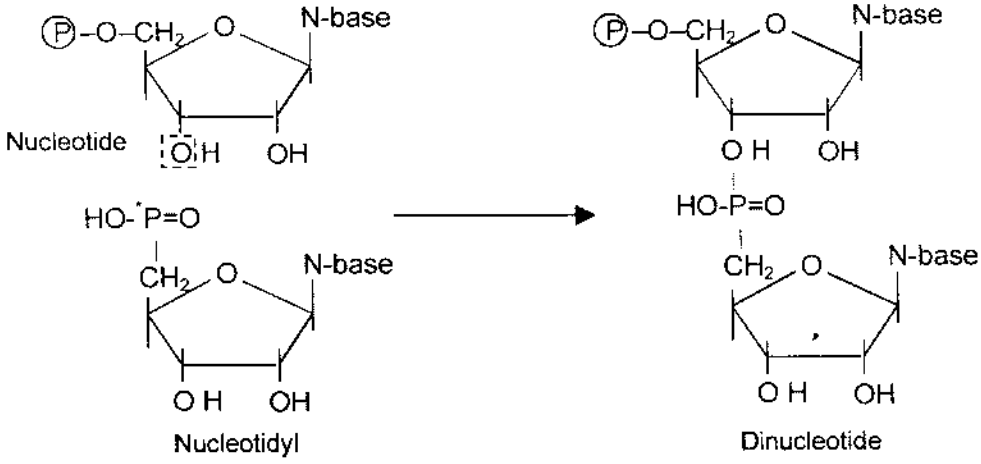
Base nitơ	Nucleoside
Adenine	Adenosine
Guanine	Guanosine
Cytosine	Cytidine
Thymine	Thymidine
Uracil	Uridine

Sự biểu diễn các nucleotide và nucleotidphosphate cũng theo quy luật này, ví dụ: thymidinmonophosphate hoặc adenosintriphosphate. Ở nucleoside nguyên tử H của nhóm OH đính ở vị trí carbon thứ 5 được thay thế bằng nhóm phosphate, như vậy ta được một nucleotide.

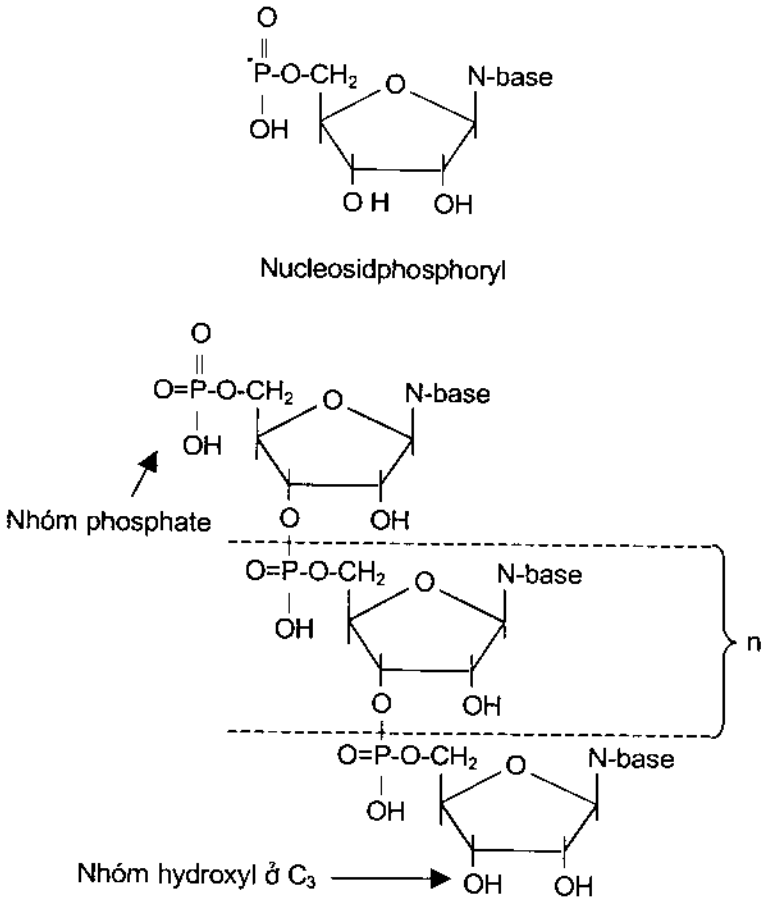
Nucleoside: Ribose- Base nitơ

Nucleotide: Phosphate - Ribose - Base nitơ

Đường liên kết với base nitơ bằng liên kết glycoside, với phosphate bằng liên kết ester. Ở nucleotide này, một nucleotide thứ 2 kết hợp vào, nghĩa là H của nhóm OH đính ở vị trí carbon thứ 3 được thay thế bằng một nucleotidyl, được biểu diễn như sau:



Nguyên tử H của nhóm hydroxyl ở vị trí C_3 của nucleotide thứ hai được thay thế bằng một "nucleotidyl" tiếp theo, nghĩa là chuỗi kéo dài theo hướng ribose ở vị trí C_3. Nucleotidyl là gốc của một nucleotide, là nucleosidphosphoryl.



Hình 6.1. Cấu tạo chung của một ribonucleic acid

Theo nguyên tắc này có thể tạo nên một chuỗi dài polynucleotid. Ở một đầu chuỗi mang nhóm phosphate và đầu kia có nhóm OH tự do của đường ribose. Ở hình 6.1 biểu diễn cấu trúc của RNA, n có độ lớn từ 10^2 đến 10^4.

Nucleic acid là một polymer, được tạo nên rất hệ thống, với một nhóm phosphate ở một đầu và một nhóm OH ở vị trí carbon thứ 3 của ribose hoặc desoxyribose ở đầu kia. Gốc phosphate của nucleic acid còn chứa một nhóm OH tự do, nhóm này có khả năng phân ly H^+. Vì vậy ở khía cạnh này phân tử có tính acid và người ta gọi là nucleic acid.

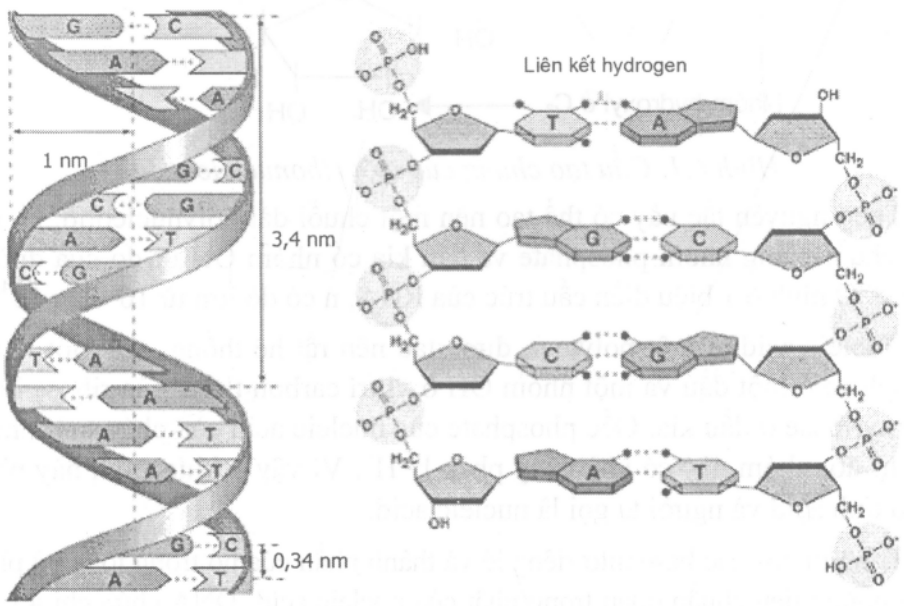
Trình tự của các base nitơ riêng lẻ và thành phần của nó trong toàn bộ phân tử là những tiêu chuẩn quan trọng nhất của nucleic acid. DNA chứa chỉ 4 base nitơ khác nhau: adenine, thymine, guanine và cytosine. Trình tự của chúng trong phân tử DNA gắn liền với toàn bộ yếu tố di truyền của sinh vật. Sinh vật

càng phát triển cao thì sợi DNA của chúng càng dài và trọng lượng càng lớn. Trọng lượng phân tử của DNA của vi sinh vật khoảng 10^9, của người khoảng 3,8. 10^{10}. Có khoảng hàng nghìn nucleotide trên một phân tử. Phân tử dài nhất đã được biết có 10^8 nucleotide, tương ứng với độ dài là 3mm.

Phân tử DNA gồm 2 sợi quấn vào nhau và chạy đối song theo hướng từ C_5 đến C_3. Những base nitơ hướng về trục helix được bảo vệ trước những ảnh hưởng bên ngoài nhờ chuỗi ribosephosphate.

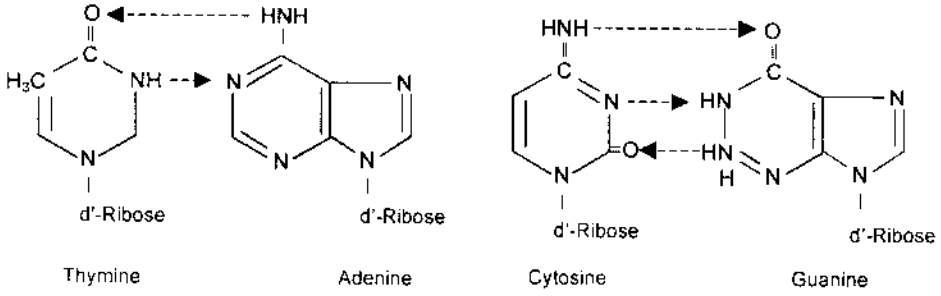
Tương tự polypeptide, các phân tử DNA có cấu trúc bậc một là trình tự các nucleotide và cấu trúc bậc hai là sự xoắn của mạch kép. Trên mỗi vòng xoắn có 10 base nitơ. Ở đây mỗi base nitơ có một base đối diện xác định. Adenine đối diện với thymine, guanine với cytosine. Sự đối diện này là do các cầu hydro được tạo nên giữa dẫn xuất pyrimidine (thymine, cytosine) và dẫn xuất purine (adenine, guanine). Adenine nối với thymine bằng 2 liên kết hydro và guanine với cytosine là 3 liên kết (hình 6.2).

Watson và Crick đưa ra mô hình DNA gồm 2 sợi bổ sung. Mô hình này có ý nghĩa đối với các quá trình sinh học cơ bản sẽ được giải thích rõ hơn dưới đây. Liên kết giữa các base bổ sung thực ra là không bền vững nhưng chúng tạo điều kiện cho sợi bổ sung có thể được tổng hợp từ một sợi riêng lẻ.

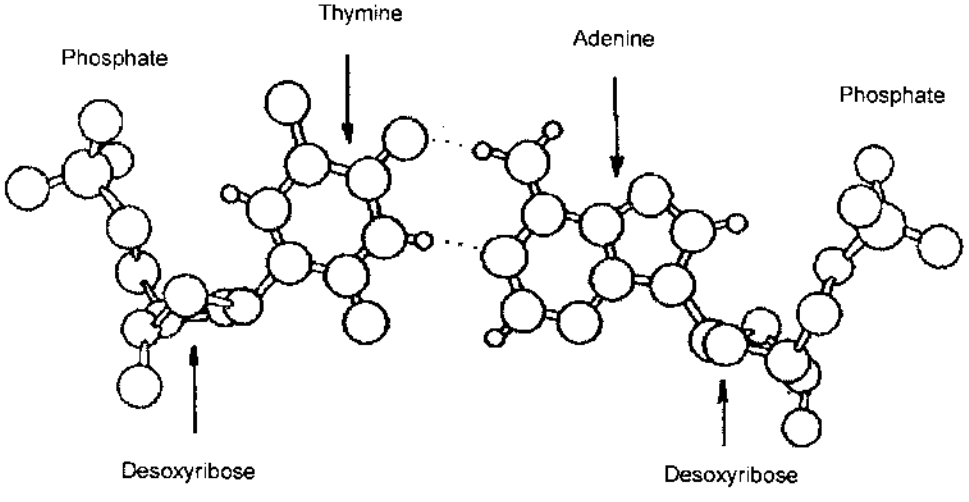


(a) Cấu trúc của DNA (b) Cấu trúc hóa học của một phần DNA

Hình 6.2. Chuỗi xoắn kép của DNA

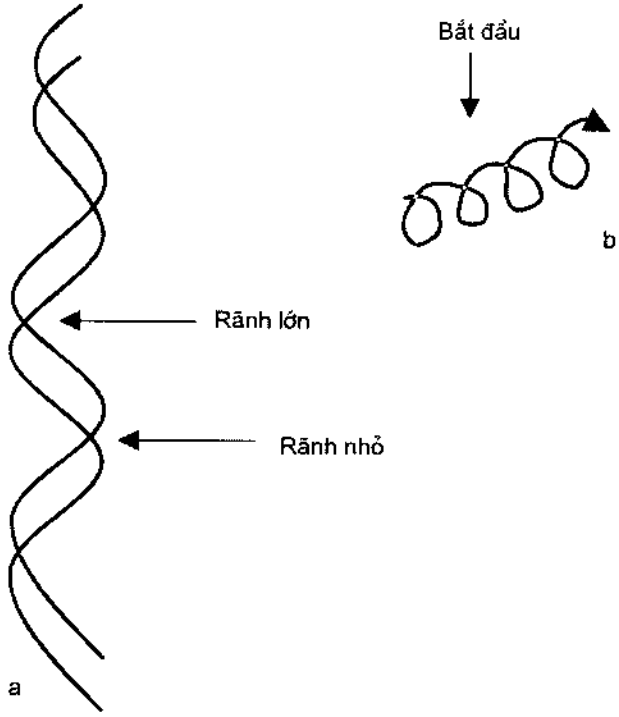


Hình 6.3. Sự cặp đôi của adenine và thymine bằng 2 liên kết hydro và của guanine và cytosine bằng 3 liên kết hydro



Hình 6.4 Sơ đồ biểu diễn cấu trúc ba chiều của desoxyribosephosphate có base nitơ là thymine và adenine

Mạch kép của DNA có đường kính khoảng 2 nm, độ dài có thể đến nhiều mm. DNA của *Escherichia coli* là một sợi có $4,2.10^6$ cặp base. Mạch kép của DNA là "tay phải" nghĩa là những vòng xoắn theo hướng quay của kim đồng hồ, tạo nên rãnh lớn và nhỏ. Rãnh lớn hay nhỏ là những điểm tác động đặc biệt của enzyme. Enzyme desoxyribonuclease I (DNAase I) kết hợp tĩnh điện ở vùng xoắn nhỏ, ở đây đặc biệt nhóm NH_2 tích điện dương của arginine và lysine của enzyme kết hợp với nhóm phosphate tích điện âm của DNA. DNAase I là enzyme thuỷ phân, có khả năng thuỷ phân để tách ra một trong hai sợi. Những enzyme endonuclease kết hìp với một trình tự xác định có 6 base nitơ, thuỷ phân hai mạch của sợi kép. Những nuclease này là những enzyme giới hạn, đóng một vai trò quan trọng trong công nghệ sinh học.



Hình 6.5. a) Mạch kép DNA với rãnh lớn và rãnh nhỏ
b) Xoắn "tay phải", mũi tên chỉ hướng xoắn theo kim đồng hồ

Dạng B-DNA có thể chuyển sang dạng A-DNA bằng sự khử nước, chúng cũng xoắn theo hướng kim đồng hồ. Những nhóm phosphate của chúng hấp thụ những phân tử nước ít hơn dạng B-DNA. Dạng A-DNA rộng hơn và ngắn hơn dạng B-DNA.

6.2. Phân loại nucleic acid

Bảng 6.1. Giới thiệu các nucleic acid

Ký hiệu	Nguồn	Trọng lượng phân tử	Số lượng nucleotide
DNA	nhân, ty thể, lạp thể	10^9-3,8 x 10^{10}	4 x 10^6-10^8
RNA			
mRNA	nhân, tế bào	10^8	4 x 10^3
rRNA	tế bào chất, ribosome	10^8	4 x 10^3
tRNA	tế bào chất	25 000	80 -100
cRNA	nhân	10^6-10^7	10^3

Ở ribonucleic acid có 4 loại khác nhau (bảng 6.1). mRNA chuyển thông tin di truyền từ DNA đến trung tâm tổng hợp protein của tế bào. Trọng lượng phân tử khoảng 10^6, bằng 1/1000 đến 1/10 000 trọng lượng của DNA, vì vậy nó có độ dài ngắn hơn. Những base nitơ quan trọng nhất là guanine, cytosine, adenine và uracil. Ngược lại DNA chứa base nitơ thymine thay cho uracil và bổ sung với adenine. mRNA được tổng hợp trong nhân và ở mức độ nhất định được tổng hợp trong ty thể và lạp thể.

rRNA là RNA ribosome, là nơi tổng hợp protein của tế bào. Thành phần ribosome gồm có các phân tử protein và các rRNA. Các rRNA có trọng lượng phân tử khoảng 10^6 Da. Bên cạnh adenine, uracil, guanine và cytosine rRNA còn chứa những base nitơ khác mà phần lớn đã được methyl hoá. Những rRNA của thực vật được methyl hóa nhiều hơn rRNA của động vật. Khoảng 80% RNA tổng số của một tế bào là rRNA, phần còn lại là tRNA, trong khi đó mRNA và cRNA chỉ chiếm một thành phần nhỏ.

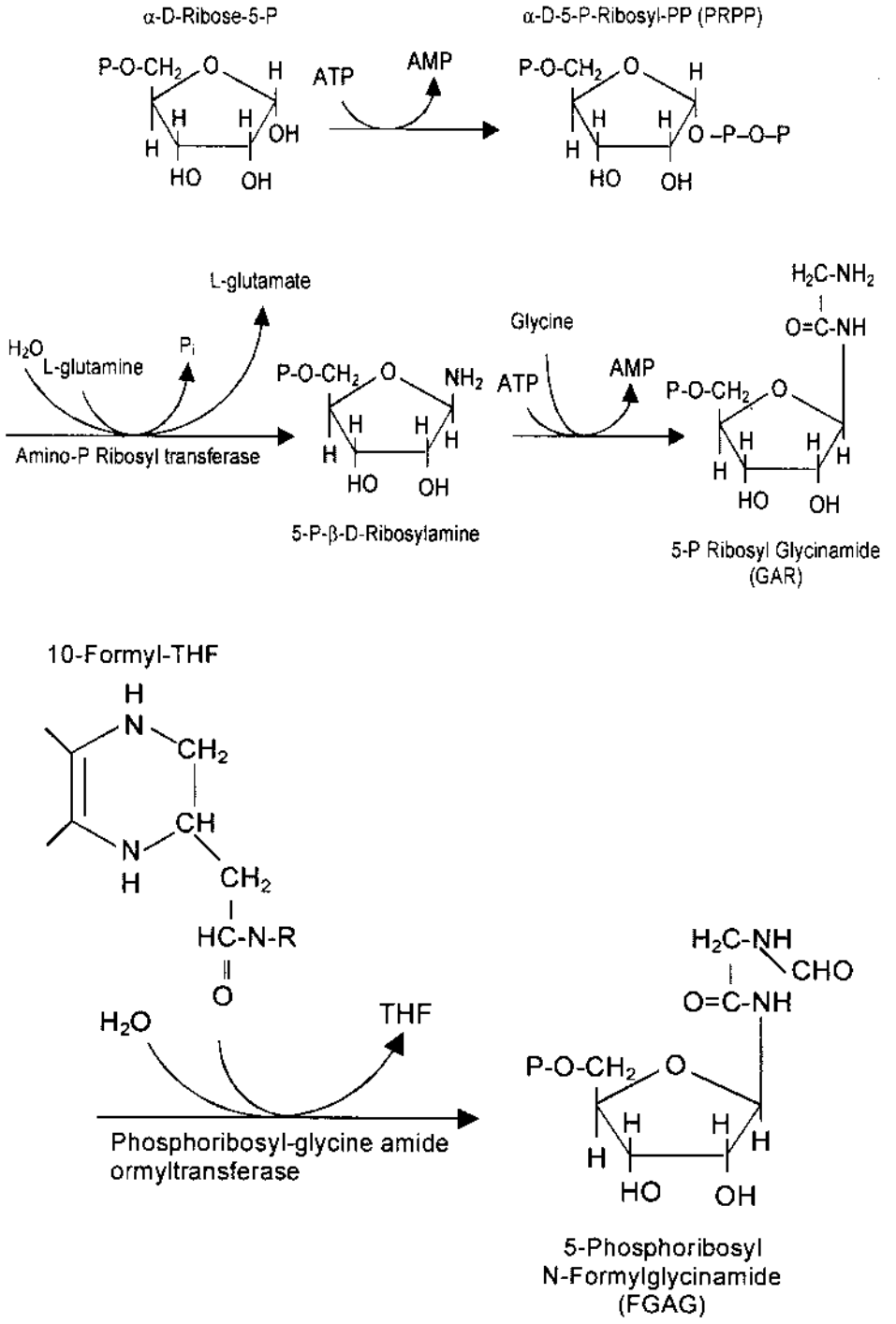
tRNA là RNA vận chuyển aminoacid đến trung tâm tổng hợp protein. tRNA chỉ có khoảng 80 nucleotide, vì vậy có trọng lượng phân tử thấp, chỉ khoảng 25 000 Da. Bên cạnh 4 base nitơ đã kể trên chúng còn chứa những base nitơ khác đã được methyl hoá. Vì lý do này mà nó không thể tồn tại ở trạng thái mạch kép hoàn chỉnh. Trong phân tử của nó có những đoạn không kết hợp với nhau, hình thành nên cấu trúc lá cỏ tam điệp (có ba nhánh), cấu trúc này rất quan trọng đối với chức năng sinh lý của chúng (hình 7.20).

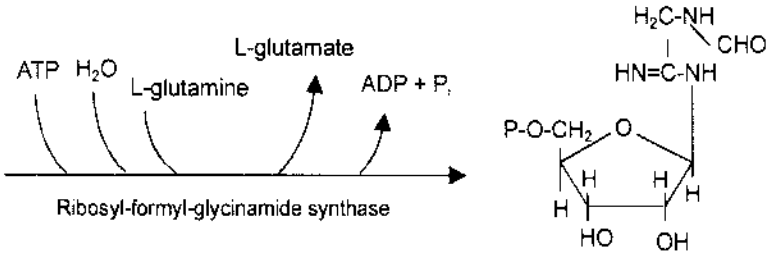
cRNA là RNA chromosome, còn gọi là hnRNA (heterogen nuclear RNA) chỉ có ở sinh vật nhân chuẩn. Đó là dạng tiền chất của các loại RNA.

6.2. Sinh tổng hợp nucleic acid

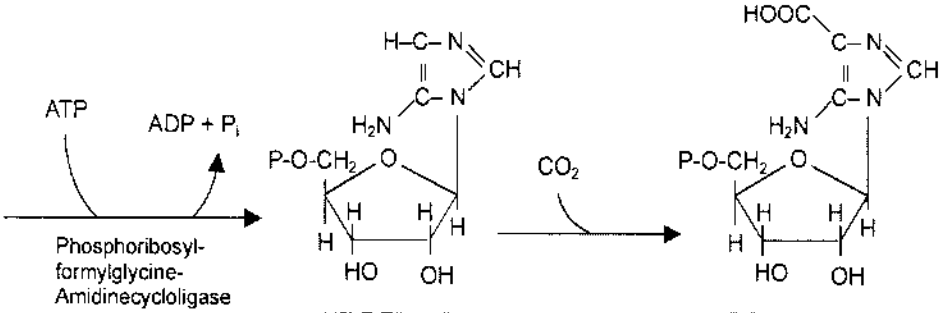
6.2.1. Sinh tổng hợp nucleotide dạng purine

Quá trình sinh tổng hợp nucleotide dạng purine được bắt đầu từ α -D-ribose 5-P, sản phẩm trung gian của chu trình pentosephosphate. Các nguyên tử của base có nguồn gốc từ những hợp chất khác nhau và được gắn lần lượt vào gốc ribose.


α-D-Ribose-5-P
α-D-5-P-Ribosyl-PP (PRPP)
ATP
AMP
L-glutamate
H2O
L-glutamine
Pi
Amino-P Ribosyl transferase
5-P-β-D-Ribosylamine
Glycine
ATP
AMP
5-P Ribosyl Glycinamide
(GAR)
10-Formyl-THF
H2O
THF
Phosphoribosyl-glycine amide
ormyltransferase
5-Phosphoribosyl
N-Formylglycinamide
(FGAG)

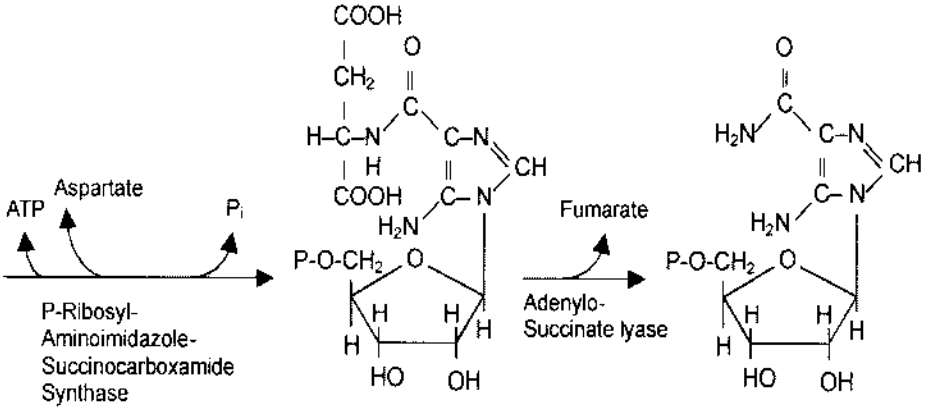


5'-Phosphoribosyl
N-Formylglycinamide
(FGAM)



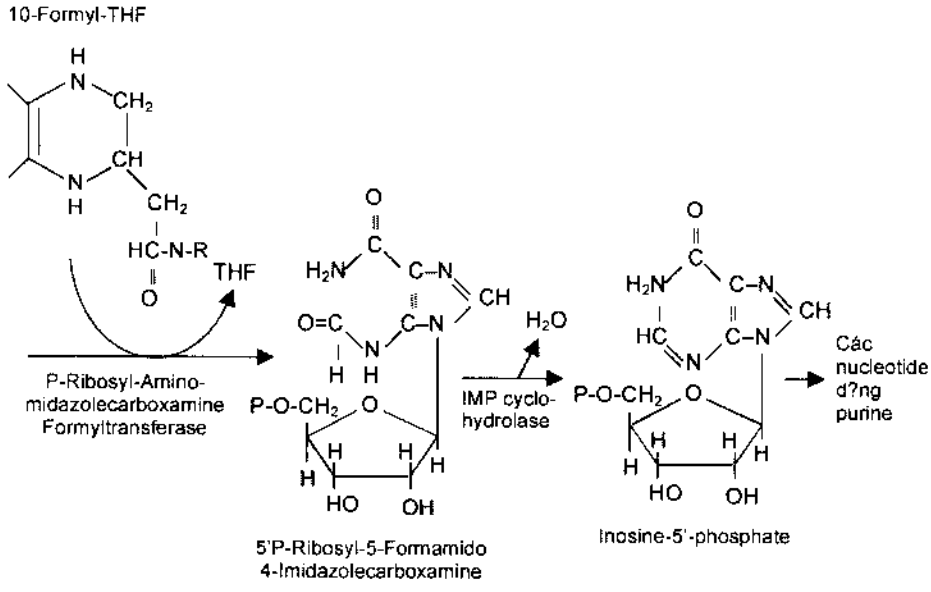
1(5'-P Ribosyl)-
5-Aminoimidazole
(AIR)

1(5'-P Ribosyl)-5-Amino-
4- Carboxymidazole



1(5'-P Ribosyl)-
5-Amino-4-(N-
Succinocarboxamide)-
Imidazole

1(5'-P Ribosyl)-
5-Imidazolecarboxamine
(AICAR)



Hình 6.6. Các phản ứng tổng hợp purine nucleotide

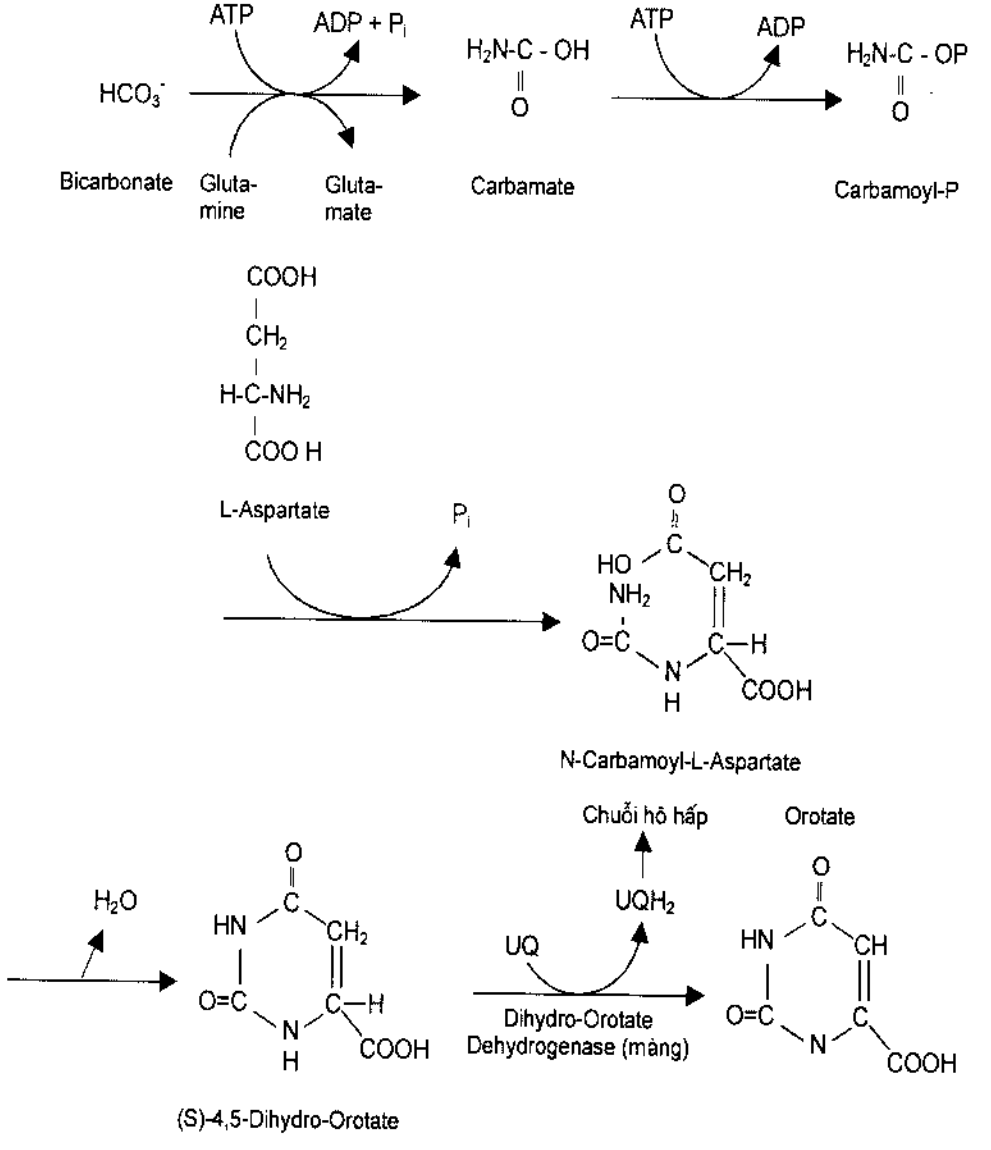
Ribose 5-P được hoạt hóa bằng việc tiếp nhận một nhóm pyrophosphate, tạo nên 5-phosphoribosyl-pyrophosphate (PRPP). Sau đó nhóm pyrophosphate này được thay thế bằng một nhóm amin có nguồn gốc từ glutamine, cho sản phẩm là 5-phosphoribosylamine. Phản ứng này được thực hiện nhờ sự thuỷ phân pyrophosphate. Đồng thời ribose ở dạng α chuyển sang dạng β. Enzyme ribose-P-pyrophosphokinase và amido-P-ribosyltransferase xúc tác cho hai phản ứng, là những điểm tiếp cận của các quá trình điều khiển.

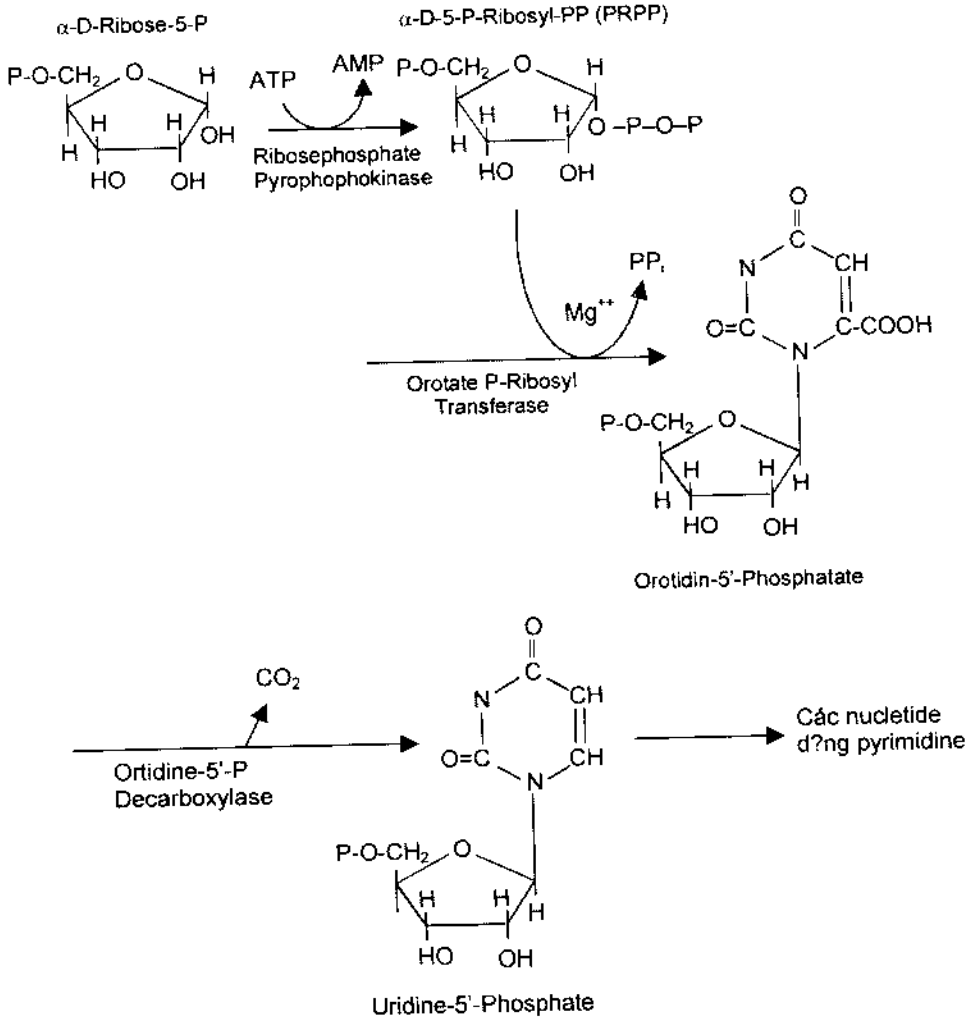
Phản ứng tiếp theo là gắn thêm glycine trực tiếp vào nhóm NH_2, được thực hiện do thuỷ phân ATP. Sau đó N^{10}-formyltetrahydrofolat gắn vào một nhóm formyl. Trong một phản ứng phụ thuộc vào ATP và glutamine nhóm oxo ở C-2 được thay thế bằng một nhóm imin. ATP cung cấp năng lượng cho việc đóng vòng và biến đổi vòng imidazol thành vòng thơm 1(5'-phosphoribosyl)-5-aminoimidazol (AIR). Một phản ứng carboxyl hóa xảy ra không có biotin, tiếp nhận CO_2 để tạo nên dẫn xuất carboxyl. Phân tử này gắn với aspartate bằng một liên kết amide. Sau đó khung aspartate-carbon được giảm trở lại, giải phóng fumarate. Aspartate đưa vào chất tạo thành 1(5'-phosphoribosyl)-5-amino-4-imidazol-carboxamid (AICAR) chỉ nhóm amine của nó. Sự formyl hóa tiếp theo bởi N^{10}-

formyltetrahydrofolate cung cấp thành phần cuối cùng của vòng 6 cạnh. Vòng được đóng lại bằng cách loại H_2O, xuất hiện inosin-5'-phosphate. IMP không tích luỹ trong tế bào, nó được biến đổi nhanh thành adenosine- và guanisine-mononucleotide.

6.2.2. Sinh tổng hợp nucleotide dạng pyrimidine

Sinh tổng hợp uridin-5'phosphate (UMP)





Hình 6.7. Sơ đồ tổng hợp uridine-5'phosphate (UMP)

Ở sự tổng hợp purine thành phần của vòng purine từng bước được gắn vào nhóm ribose, còn ở sự tổng hợp pyrimidine trước hết xuất hiện vòng base, sau đó ribose được gắn vào. Những nguyên tử của vòng được gắn vào từ aspartate và carbamylphosphate.

Ở sinh vật nhân chuẩn carbamylphosphate là một thành phần của chu trình ornithine, nhưng hai đường hướng phản ứng này xảy ra ở các vị trí khác nhau. Sự tổng hợp pyrimidine, carbamylphosphate xảy trong tế bào chất (những phản ứng tiếp theo cũng xảy ra ở đây), phản ứng tương ứng của chu trình ornithine xảy ra ở ty thể. Carbamyl-synthase tham gia vào hai quá

trình có những đặc điểm khác nhau: Synthase II tham gia vào tổng hợp pyrimidine sử dụng glutamine là nguồn nitơ và không được hoạt hóa biến cấu bởi N-acetylglutamate, synthase của chu trình ornithine phản ứng và được hoạt hóa bởi NH_3. Ở vi khuẩn chỉ có carbamyl-synthase typ II.

Phản ứng tiếp theo được xúc tác bởi enzyme aspartate-carbamyl-transferase, là bước xác định của sinh tổng hợp pyrimidine, ở đây có tác động của cơ chế điều khiển.

Bước tiếp theo là đóng vòng và giải phóng H_2O. Sự oxy hóa tiếp theo tạo thành orotate. Ở sinh vật nhân chuẩn dihydroorotate-oxidase, định vị ở phía ngoài của màng ty thể, chuyển chất khử đến chinone. Ở vi khuẩn enzyme gắn kết với màng và phản ứng với các chinone. Phản ứng với 5'-phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) dẫn đến sự kết hợp với ribose, pyrophosphate được giải phóng. Bước cuối cùng của sinh tổng hợp uridin-5-P là khử carboxyl hóa orotidine-5-P.

Pyrimidine-mononucleotide được biến đổi thành di- và triphosphate bằng sự phosphoryl hoá. Uridin-5'-triphosphate (UTP) được amine hóa bằng glutamine (ở động vật có vú) hoặc NH_4^+ (ở *E.coli*) trong một phản ứng cần ATP, tạo thành cytidin-5'-triphosphate (CTP). Phản ứng amine hóa này tương tự phản ứng biến đổi của xanthosin-5'-phosphate, tuy nhiên Pi được giải phóng thay vì pyrophosphate.

6.3. Sinh tổng hợp DNA: DNA có khả năng tự tổng hợp (tự nhân đôi)

Để cho quá trình sinh tổng hợp DNA xảy ra cần phải có các điều kiện sau đây:

- Có DNA làm khuôn

- Có 4 loại desoxyribonucleotide dưới dạng triphosphate

(Nguyên liệu cho quá trình tổng hợp DNA là những desoxynucleotidtriphosphate)

Desoxyadenosintriphosphate = d'ATP

Desoxyguanintriphosphate = d'GTP

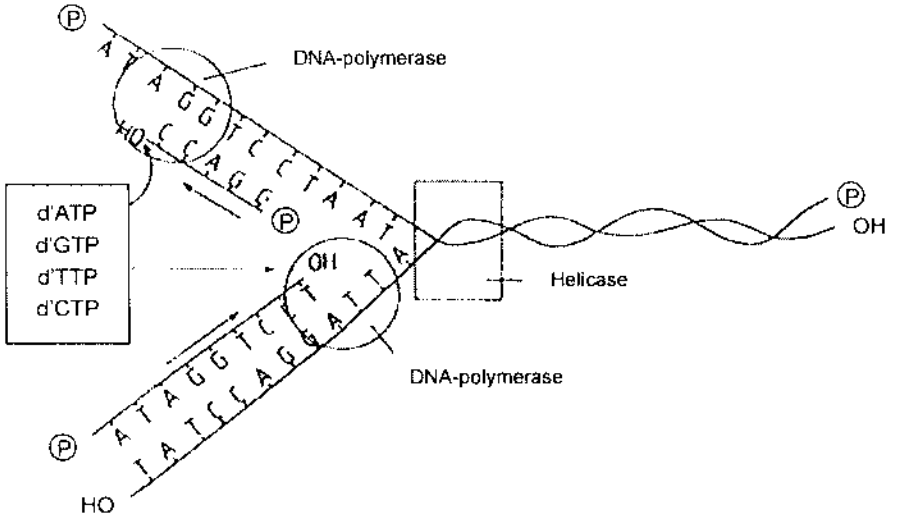
Desoxythymidintriphosphate = d'TTP

Desoxycytosintriphosphate = d'CTP

Chúng là những chất tương tự ATP, GTP, TTP và CTP và chứa desoxyribose thay cho ribose.

- Có các enzyme DNA-polymerase xúc tác

Những enzyme quan trọng nhất là DNA- polymerase, DNA-ligase và helicase. Khuôn là hai sợi của mạch xoắn kép. Sự tổng hợp bắt đầu bằng việc thuỷ phân liên kết hydro của mạch kép nhờ một enzyme nuclease, tách liên kết ester giữa ribose và gốc phosphate của hai sợi, như vậy từ vị trí này mạch kép có thể được duỗi xoắn. Về mặt năng lượng đây không phải là quá trình đơn giản vì như trên đã đề cập hai sợi được nối với nhau bằng các cầu hydro. Trong ống nghiệm người ta cắt liên kết này khi đưa nhiệt độ lên 90 ^{0}C. Để duỗi xoắn cần một phức hệ enzyme đặc biệt là helicase, là một phức hệ định vị ở chỗ chẻ ba của mạch kép và làm duỗi xoắn DNA. Ở những sinh vật khác nhau (*E.coli*, nấm men, động vật và thực vật bậc cao) người ta thấy helicase có những đặc tính khác nhau:. Về nguyên tắc cơ chế tác động của nó như sau: sợi kép được duỗi xoắn và helicase đẩy chỗ chẻ ba tiếp tục dịch chuyển. Quá trình mở xoắn thực chất vẫn chưa được giải thích cặn kẽ. Những liên kết hydro giữa các base nitơ được cắt đứt. Rất có thể một sợi DNA được cắt ra bằng thuỷ phân làm cho xoắn được mở ra, sau đó được nối lại với nhau. Toàn bộ quá trình cần năng lượng. Tuỳ theo loại helicase mà năng lượng cần là ATP hoặc các nucleosidtriphosphate khác, và các desoxynucleosidtriphosphate cũng được sử dụng để đẩy chỗ chẻ ba dịch chuyển. Nhờ có các nucleosidtriphosphate mà cấu hình của protein enzyme thay đổi do quá trình phophoryl hóa enzyme, quá trình này tương tự như co thắt cơ.



Hình 6.8. Sơ đồ biểu diễn sự sao chép. Sự mở xoắn kép nhờ helicase và sự tổng hợp DNA ở hai sợi khuôn nhờ DNA-polymerase

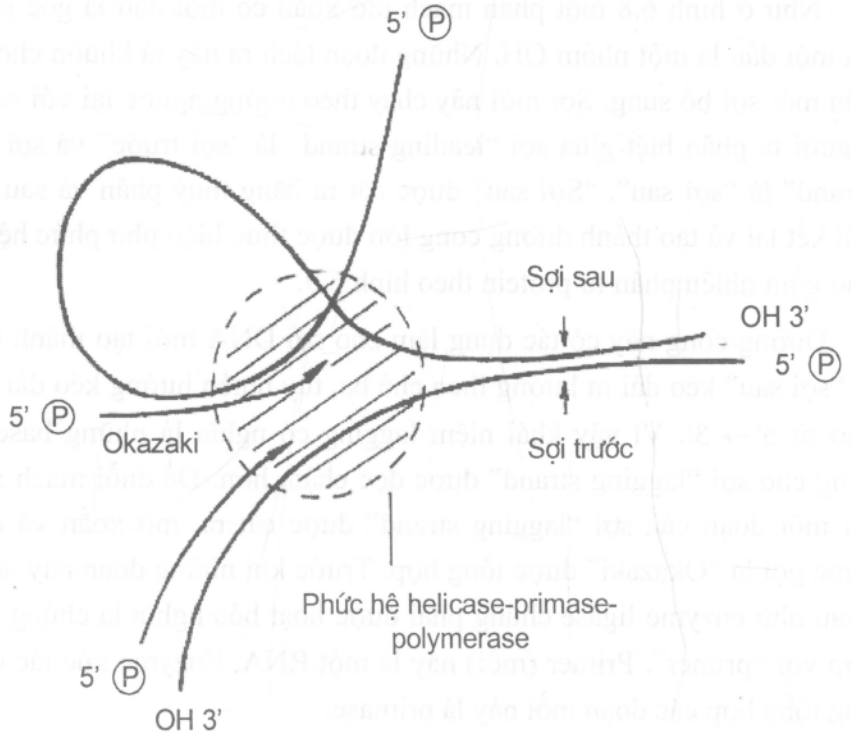
Như ở hình 6.8 một phần mạch mở xoắn có một đầu là gốc phosphate và một đầu là một nhóm OH. Những đoạn tách ra này là khuôn cho việc tạo nên một sợi bổ sung. Sợi mới này chạy theo hướng ngược lại với sợi khuôn. Người ta phân biệt giữa sợi "leading strand" là "sợi trước" và sợi "lagging strand" là "sợi sau". "Sợi sau" được cắt ra bằng thuỷ phân và sau đó được nối kết lại và tạo thành đường cong lớn được thực hiện nhờ phức hệ helicase bao gồm nhiều phân tử protein theo hình 6.9.

Đường cong này có tác dụng làm cho sợi DNA mới tạo thành từ khuôn là "sợi sau" kéo dài ra hướng theo chẻ ba, tuy nhiên hướng kéo dài vẫn đảm bảo từ 5′→ 3′. Vì vậy khái niệm lagging có nghĩa là những base nitơ bổ sung cho sợi "lagging strand" được đọc chậm hơn. Để duỗi mạch xoắn kép thì một đoạn của sợi "lagging strand" được cắt ra, mở xoắn và các đoạn được gọi là "Okazaki" được tổng hợp. Trước khi những đoạn này nối lại với nhau nhờ enzyme ligase chúng phải được hoạt hóa nghĩa là chúng được kết hợp với "primer". Primer (mồi) này là một RNA. Enzyme xúc tác cho phản ứng tổng hợp các đoạn mồi này là primase.

Phản ứng của primase xảy ra sau khi duỗi xoắn, tiếp theo là phản ứng polymerase, nghĩa là lắp ráp các nucleotide vào sợi mới và cuối cùng là phản ứng ligase. Chỗ chẻ ba chuyển dịch về phía trước theo hướng 5′→ 3′ của sợi "lagging strand". Vận tốc duỗi xoắn là 700 cặp base trong 1 giây ở nhiệt độ 30 ^{0}C.

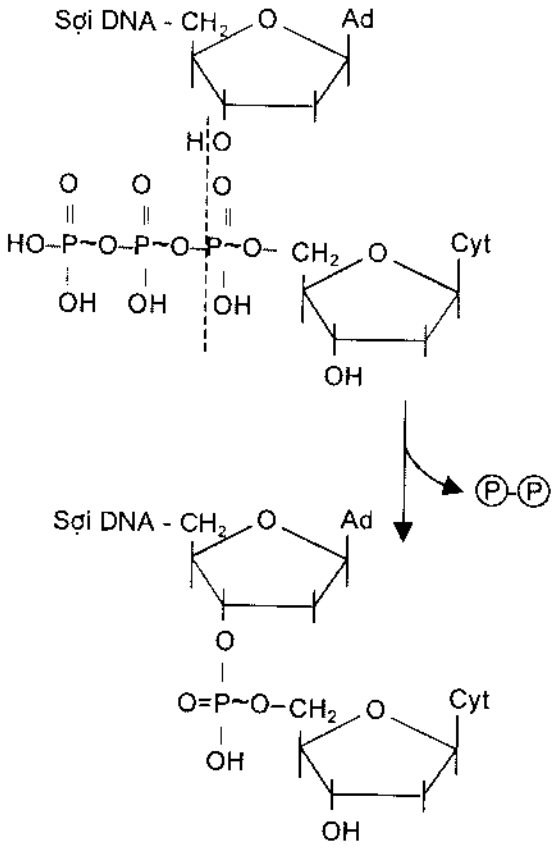
Polymerase tạo liên kết ester giữa OH ở vị trí carbon thứ 3 của sợi mới với phosphate của d′nucleosidtriphosphate mới đi vào. Ở đây pyrophosphate được tách ra và nhanh chóng được thuỷ phân để tạo photphate vô cơ.

Năng lượng cần để tạo liên kết ester chứa trong hai liên kết cao năng ở trong d′nucléotidtriphosphate. Sự kết hợp vào khuôn theo nguyên tắc bổ sung tiến hành theo cách H của nhóm OH ở vị trí carbon thứ 3 của ribose được thay thế bằng 1 d′nucleotide, chính xác hơn nhóm OH được thay thế bởi acyl của 1 d′nucleotide (nucleosidphophoryl) (xem hình 6.10). Chuỗi cũng kéo dài ở vị trí 3 theo hướng C-5→ C-3 hoặc từ gốc phosphate đến OH của vị trí carbon thứ 3.



Hình 6.9. Sợi trước và sợi sau ở phức hệ helicase-primase-polymerase

Sự kết hợp vào khuôn theo nguyên tắc bổ sung, nghĩa là thymine sẽ kết hợp với adenine, guanine kết hợp với cytosine. Bằng cách này một bản sao chính xác của sợi khuôn được tổng hợp. Nếu trong quá trình kết hợp mà bị lỗi, ví dụ hai base nitơ đối diện nhau không bổ sung tạo nên không gian mà 1 d'nucleotide mới vào không kết hợp được với nhóm OH của ribose. Polymerase có khả năng sửa chữa những lỗi này, thực chất là nó cắt nucleotide lắp sai ra và gắn nucleotide chính xác vào. Cơ chế sửa chữa quan trọng này đã làm cho tỷ lệ lỗi ở quá trình nhân đôi là rất thấp, khoảng 10^{-9}. Những lỗi trong quá trình này là những đột biến dẫn đến những rối loạn rất lớn trong trao đổi chất. Tuy nhiên nó cũng cần thiết vì tạo nên tính mềm dẻo để thích nghi với môi trường sống.



Hình 6.10. Sự kết hợp một nucleotide vào sợi DNA bằng việc tạo liên kết ester. Nucleosidphosphoryl thay thế H ở OH của d'ribose

Các đoạn sợi được tổng hợp nên dài khoảng 1000 nucleotide, được gắn kết lại nhờ ligase. Enzyme này xúc tác tạo liên kết ester giữa gốc phosphate của carbon thứ 5 và nhóm OH ở vị trí carbon thứ 3 của d'ribose. Phản ứng này gắn liền với sự phosphoryl hoá, gốc phosphate do ATP cung cấp. Những sợi mới được tổng hợp tạo xoắn với sợi khuôn, để tạo nên mạch kép. Người ta gọi sự nhân đôi này là bán bảo tồn vì trong một mạch kép mới thì một sợi có từ trước (bảo thủ) và một sợi mới tạo thành. Phân tử DNA mới tạo thành hoàn toàn giống với DNA ban đầu. Thông tin di truyền đã tăng lên gấp đôi.

Việc sao chép thông tin di truyền là một quá trình có ý nghĩa sinh học vì trình tự các base trong DNA là trình tự các chữ cái, mà với những chữ cái này thông tin di truyền được thể hiện. Trước khi tế bào phân chia

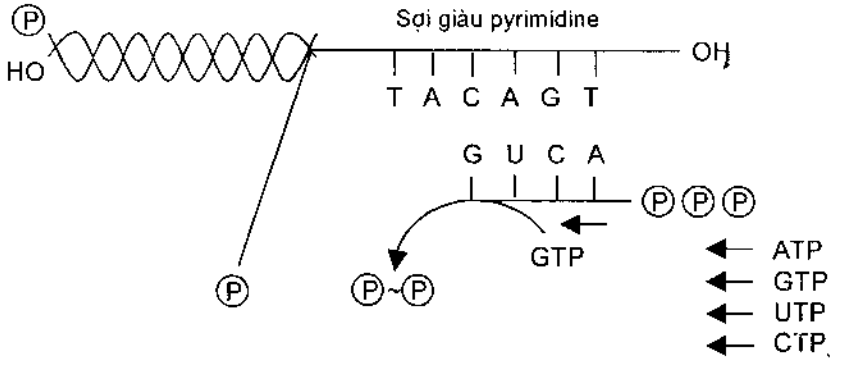
(mitose) DNA được nhân đôi, như vậy những tế bào con có hệ gen giống như tế bào mẹ.

6.4. Sinh tổng hợp RNA (sự phiên mã - transcription)

Về nguyên tắc tương tự quá trình tổng hợp DNA. Ở đây một sợi DNA là khuôn và các nucleosidtriphosphate là nguyên liệu và kết quả là một phân tử RNA được tổng hợp. Để sao chép cần một sợi DNA khuôn là sợi giàu base pyrimidine, các nucleosidtriphosphate và các enzyme, chủ yếu là RNA-polymerase. Nguyên liệu là ATP, GTP, CTP và UTP thay thế cho TTP. Nhóm OH ở vị trí C_3 của ribose được kết hợp với nucleoside tiếp theo có sự tách ra của pyrophosphate. Chuỗi cũng kéo dài ở đầu C_3 của ribose. Phản ứng do RNA-polymerase xúc tác tương tự sự tổng hợp DNA.

Năng lượng cần cho sự tổng hợp này là sự tách ra của pyrophosphate (hình 6.11) Chuỗi RNA kéo dài ngược hướng với sợi DNA khuôn. Ở sự tổng hợp này sẽ tạo nên một mạch kép tạm thời, gồm DNA và RNA.

Vì vậy người ta gọi hiện tượng này là lai, mạch kép là phân tử lai. RNA cơ bản là nhỏ hơn DNA, nên chỉ một đoạn tương đối ngắn của DNA được đọc để tổng hợp RNA. Nhờ đặc tính này mà một đoạn được đọc kế tiếp nhau bởi nhiều enzyme polymerase. RNA mới được tạo thành không chỉ là một mà có từ 30 đến 100 phân tử. RNA-polymerase trượt trên đoạn DNA và tổng hợp nên sợi RNA. Để bắt đầu và kết thúc đoạn DNA cần có những tín hiệu hóa học, những tín hiệu này cho đến nay chưa được biết nhiều. Tuy nhiên những đoạn riêng biệt của DNA thì hoàn toàn xác định, nó mang thông tin di truyền cho một phân tử RNA xác định.



Hình 6.11. Sự tổng hợp RNA ở sợi giàu pyrimidine

Nếu ở sợi khuôn DNA có lỗi, ví dụ thiếu 1 base nitơ, sẽ có một cơ chế để sửa chữa. Có những enzyme làm nhiệm vụ nhận biết những vị trí lỗi trên sợi DNA. Cơ chế này rất quan trọng, nếu không thì những thông tin "vô nghĩa" được đọc.

Ở sinh vật nhân sơ thì mRNA được đọc trực tiếp từ DNA. Ở những đoạn DNA mã hóa cho rRNA và tRNA thì trước hết tiền RNA được tổng hợp nên, sau đó chúng sẽ được biến đổi để tạo rRNA và tRNA. Sự biến đổi này chủ yếu là thay đổi các base nitơ. Một phần được methyl hoá, nghĩa là những nhóm OH được thay thế bởi các nhóm methyl. Qua đó ảnh hưởng đến khả năng tạo cầu hydro của các base nitơ. Sự methyl hóa các base nitơ xảy ra sau khi sao chép có ý nghĩa đối với cấu trúc bậc hai của rRNA và tRNA. DNA ở sinh vật nhân sơ nằm tự do trong tế bào chất và chủ yếu ở dạng vòng. Ở trong ty thể và lạp thể có chứa một lượng nhỏ DNA, DNA này tương tự DNA của sinh vật nhân sơ. Một phân tử DNA dạng vòng không có điểm bắt đầu và điểm kết thúc. Để đọc chúng phải có 1 điểm kết hợp của polymerase. Vùng bắt đầu này (initiation sites) được đặc trưng bởi một trình tự base đặc biệt. Sơ đồ dưới đây có những chữ in đậm là 4 điểm khác nhau cho sự sao chép DNA từ ty thể của ngô.

```
rrn 18  T  G  A  A  T  T  G  A  C  A  T  A  G  A  T  A  A  A  T  C  T  T
rrn 26  A  A  G  A  A  A  A  T  C  G  T  A  T  A  A  A  A  A  T  C  A  A
atp  1  A  A  A  A  G  T  A  A  C  G  T  A  T  T  A  A  A  A  A  A  C  A
atp  2  C  C  C  A  T  T  T  T  C  A  T  A  G  A  G  A  A  A  G  A  T  G
```

Ngược dòng Xuôi dòng

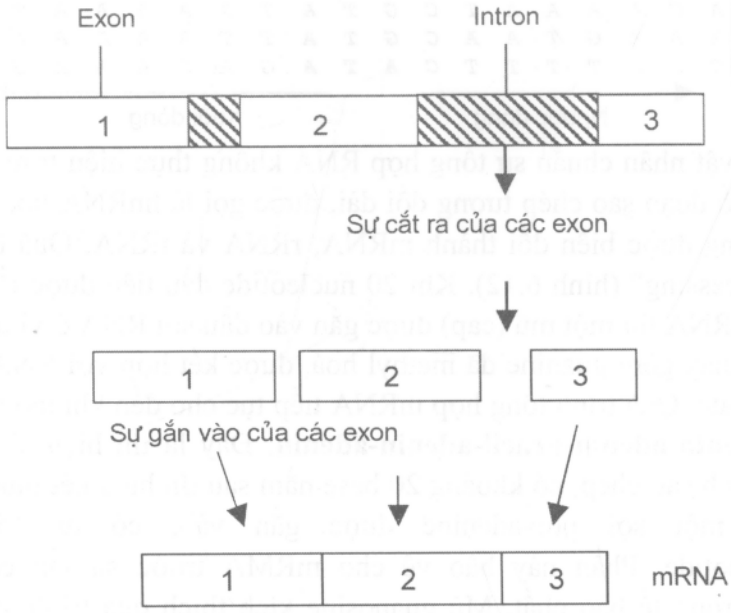
Ở sinh vật nhân chuẩn sự tổng hợp RNA không thực hiện trực tiếp trên DNA. Đa số đoạn sao chép tương đối dài, được gọi là hnRNA hoặc cRNA, sau đó chúng được biến đổi thành mRNA, rRNA và tRNA. Quá trình này gọi là "processing" (hình 6.12). Khi 20 nucleotide đầu tiên được lắp ráp để tổng hợp mRNA thì một mũ (cap) được gắn vào đầu sợi RNA ở vị trí C_5 của ribose. Mũ này gồm guanine đã methyl hoá, được kết hợp với RNA nhờ ba gốc phosphate. Quá trình tổng hợp mRNA tiếp tục cho đến khi tạo nên trình tự base **adenin-adenin-uracil-adenin-adenin**. Đây là tín hiệu cho sự kết thúc quá trình sao chép, có khoảng 20 base nằm sau tín hiệu kết thúc. Ở đầu cuối này một sợi polyadenine được gắn vào, có từ 150 -200 adenylnucleotide. Phần này bảo vệ cho mRMA trước sự tấn công của enzyme ở trong tế bào chất. Mũ guanosine kích thích quá trinh sao chép. Bản sao này chứa một số đoạn được cắt ra. Những đoạn được cắt rời lại gắn kết với nhau theo thứ tự. Bằng cách này mRNA được tổng hợp. Những trình

tự trên phân tử mRNA được gọi là "exon", những đoạn được cắt ra gọi là "intron" (hình 6.12).

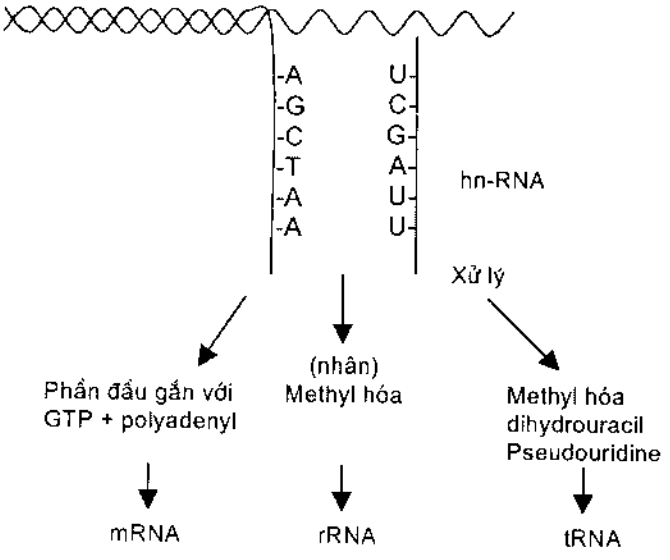
Quá trình "processing" xảy ra trực tiếp sau khi sao chép và chủ yếu là quá trình methyl hoá. Ở đây nhóm OH hoặc nhóm NH_2 của base nitơ được thay thế bởi nhóm methyl. Bằng cách này khả năng tạo cầu hydro bị hạn chế.

Quá trình "processing" của tRNA bên cạnh methyl hóa còn có những thay đổi ở các base nitơ để tạo nên các base nitơ mới như dihydrouracil và pseudouridine.

rRNA và tRNA được tổng hợp trong nhân, RNA-polymerase II xúc tác cho tổng hợp mRNA, và RNA- polymerase III cho tRNA. Hầu hết rRNA được tổng hợp ở trong hạch nhân (nucleolus) nhờ enzyme RNA polymerase I. Cả ba loại RNA đều được tổng hợp ở trong nhân tế bào và được đưa ra tế bào chất, nơi mà chúng tham gia vào quá trình tổng hợp protein. Ba loại RNA trong tế bào chất chiếm tỷ lệ như sau: rRNA chiếm 80%, tRNA chiếm 15% và mRNA chiếm 5%.



Hình 6.12. Sự cắt ra các exon từ bản sao và sự gắn lại để tạo thành sợi mRNA



Hình 6.13. Sơ đồ biểu diễn "processing" bản sao để tạo mRNA, rRNA và tRNA

6.5. Sự chuyển hóa nucleic acid

Trong quá trình trình trao đổi chất các phân tử DNA và RNA không cần thiết nữa sẽ bị phân giải dưới tác dụng của các nuclease thành các mononucleotide. Các mononucleotide có thể được dùng để tổng hợp các phân tử anucleic acid mới, hay bị phân giải tiếp tục.

Nuclease xúc tác cho sự cắt liên kết phosphodiester của DNA (DNAse) và RNA (RNAse). DNAse đóng một vai trò quan trọng trong sự tổng hợp, sửa chữa và tái tổ hợp DNA hoặc là hệ thống bảo vệ, trong đó chúng phân giải DNA ngoại lai. RNAse tham gia vào quá trình biến đổi tiền mRNA thành mRNA (RNA-processing), và điều khiển sự phiên mã do sự phân giải mRNA. Nuclease có thể tách ra các nucleotide ở đầu cuối (exonuclease) hoặc cắt ở bên trong phân tử (endonuclease).

Exodesoxyribonuclease (Exo-DNAase)

Exo-DNAse phân biệt ở hướng phân giải, trong đó cơ chất là sợi đơn hoặc sợi kép và mono- hoặc oligonucleotide (hiếm hơn) được tách ra. Một số enzyme có thể có nhiều chức năng. Tùy theo cơ chế phản ứng mà các nuclease tách ra khỏi cơ chất hoặc là gắn với cơ chất qua nhiều chu kỳ phản ứng.

Enzyme exonuclease III của *E.coli* có nhiều chức năng: cắt đặc hiệu ở những vị trí nhất định như DNA-nuclease hoặc là như 3'-phosphatase.

Endodesoxyribonuclease (Endo-DNAase)

Thường thể hiện chủ yếu đối với sợi DNA đơn và kép.

Endonuclease sửa chữa những vị trí lỗi, nhận biết DNA lỗi và cắt DNA ở một phía của vị trí lỗi để tách ra.

Một đặc tính đặc biệt khác của những enzyme này là nhận biết các trình tự base. Một ví dụ là T_4-endonuclease IV cắt đặc hiệu ở cytosine.

Enzyme cắt giới hạn (restriction endonuclease) tồn tại số lượng lớn trong vi sinh vật. Hơn 2000 loại enzyme này đã được phát hiện, chúng nhận biết trình tự có độ dài từ 4 đến 8 nucleotide trên sợi kép với độ chính xác cao.

Ribonuclease (RNAse)

Ribonuclease cũng phân biệt hoạt tính exo và endo, tác động vào những đầu cuối nhất định (exo-enzyme) hoặc những trình tự đặc hiệu (endo-enzyme). Một số nuclease cắt cả DNA cũng như RNA.

Một số phản ứng dạng RNAse được xúc tác bằng trình tự RNA (ribozyme).

Các mononucleotide bị thuỷ phân bằng các enzyme (phosphatase, nucleosidase) tạo nên các sản phẩm cuối cùng là các base purine và pyrimidine.

Các cytosine được biến đổi thành các uridine tương ứng bằng phản ứng khử amin hoá. Sự phân giải uracil và thymine bắt đầu bằng phản ứng khử liên kết đôi giữa vị trí thứ 5 và 6 và tiếp theo là sự mở vòng bằng phản ứng thuỷ phân. Sự khử amin hóa và khử carboxyl hóa tạo nên β-alanine cũng như 3-aminoisobutyrate.

Các base purine bị phân giải thành uric acid được đào thải ra ngoài cơ thể. Quá trình này điển hình cho các động vật có xương sống (người, vượn người, chim và bò sát). Đối với các động vật khác sản phẩm phân giải cuối cùng của các base purine là allantoin. Trong cơ thể allantoin bị phân giải thành urea.

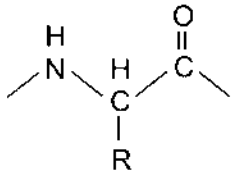
Các base pyrimidine thường bị phân giải thành urea và NH_3.

Chương VII
PROTEIN VÀ SỰ TRAO ĐỔI PROTEIN TRONG CƠ THỂ THỰC VẬT

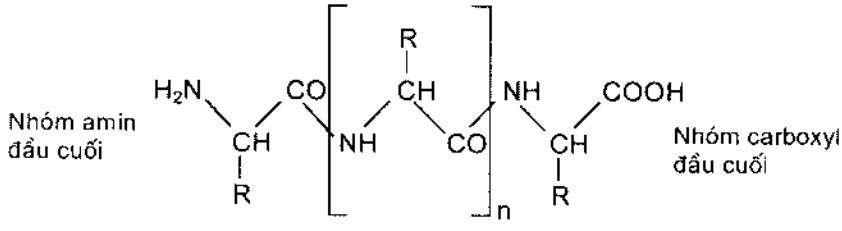
7.1. Đại cương về protein

Protein được tạo nên từ các gốc aminoacid. Các gốc này nối với nhau bằng liên kết peptide. Liên kết peptide là liên kết giữa nhóm carboxyl của một aminoacid và nhóm amin của một aminoacid tiếp theo. Trong dipeptide có hai, trong tripeptide có ba và trong oligopeptide có từ 3 cho đến 10 gốc aminoacid liên kết với nhau bằng liên kết peptide. Polypeptide chứa nhiều gốc aminoacid.

Những hợp chất gồm nhiều gốc aminoacid nối với nhau bằng liên kết peptide được gọi là polypeptide. Mỗi aminoacid chứa 3 nhóm nguyên tử (NH, CH và CO) cấu tạo nên theo sơ đồ nghiêm ngặt sau:



Ba nhóm nguyên tử này luôn lặp lại trong chuỗi polypeptide, phần còn lại của các gốc aminoacid (R) là chuỗi bên.

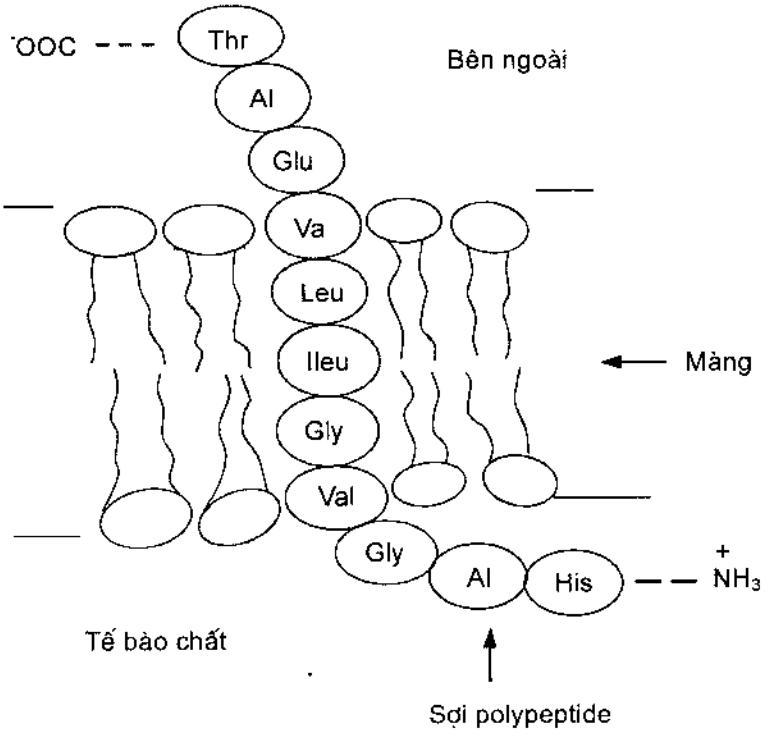


Chuỗi polypeptide

Trong các protein tự nhiên có mặt 20 loại aminoacid khác nhau. Nếu một chuỗi ngắn có 4 gốc aminoacid (tetrapeptide) thì từ đó đã có 20^4 = 160.000 khả năng, nghĩa là có 160 000 tetrapeptide khác nhau. Nếu độ dài chuỗi gồm 300 gốc aminoacid, là độ dài thường gặp đối với nhiều

polypeptide, thì người ta có một số lượng không tưởng tượng được là 10^{300} khả năng. Nhưng trong tự nhiên chỉ tồn tại một số lượng nhỏ các khả năng trên.

Như trên đã nêu, tất cả polypeptide có cùng một trình tự CO-CH-NH. Đặc tính của từng polypeptide và protein được xác định do đặc tính hóa học của các gốc aminoacid, nó có thể tích điện âm, dương, ưa nước hay kỵ nước. Trong tự nhiên, tuỳ thuộc vào trình tự và thành phần, đã tạo nên rất nhiều ái lực hóa học khác nhau, chúng có ý nghĩa lớn trong các phản ứng hóa học và đối với sự nhận biết trình tự aminoacid. Trong đó có những vùng gốc aminoacid chủ yếu là acid hoặc base, những vùng khác là những gốc aminoacid ưa nước hay kỵ nước. Những protein của màng thường có những gốc kỵ nước, những gốc hướng ra ngoài hoặc nhô vào tế bào chất là ưa nước. Sơ đồ ở hình 7.1 là một ví dụ.



Hình 7.1. Chuỗi polypeptid ở màng sinh học

7.2. Chức năng của protein

Chức năng của protein được chia ra các nhóm như sau:

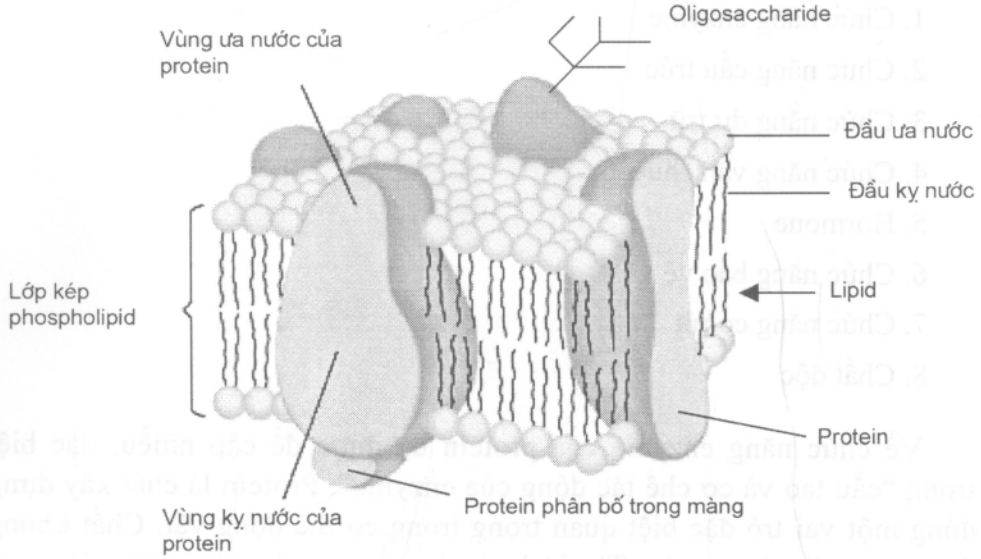
1. Chức năng enzyme
2. Chức năng cấu trúc
3. Chức năng dự trữ
4. Chức năng vận chuyển
5. Hormone
6. Chức năng bảo vệ
7. Chức năng co rút
8. Chất độc

Về chức năng enzyme của protein đã được đề cập nhiều, đặc biệt trong "cấu tạo và cơ chế tác động của enzyme". Protein là chất xây dựng đóng một vai trò đặc biệt quan trọng trong cơ thể động vật. Chất khung được tạo nên từ protein. Thuộc loại này gồm có da, tóc, sừng, lông và collagen là thành phần cơ bản của gân và có khoảng 18% tham gia vào cấu tạo của xương.

Một chức năng phổ biến khác của protein là cấu tạo nên màng sinh học.

Chức năng của màng sinh học là giới hạn những vùng trao đổi chất và tham gia vào việc vận chuyển các chất. Màng sinh học cũng có khả năng chuyển đi những tín hiệu. Protein màng cũng có thể là các enzyme. Chức năng này được thể hiện ở màng trong của ty thể và lạp thể. Màng sinh học bao gồm lớp kép lipid với những protein phân bố ở trong đó. Những thành phần lipid quan trọng nhất là phosphoglyceric, glycoglyceric, sterol và sphingolipid. Lớp kép lipid của màng sinh học là những phân tử lipid có những đuôi kỵ nước quay lại với nhau, trong khi đó những gốc đường và phosphate hướng ra phía ngoài (hình 7.2).

Ở đây thành phần glycerine là trục vuông góc với mặt phẳng của màng. Lớp kép lipid không đối xứng, nghĩa là ở hai phía của màng có những phân tử lipid khác nhau. Những phân tử protein nằm trong lớp kép lipid làm bền vững màng và nhô ra ở hai phía màng (hình 7.2). Thành phần protein nằm ở trong lớp kép lipid, có đặc tính chủ yếu là kỵ nước, thành phần protein mà nhô ra phía ngoài, có đặc tính chủ yếu là ưa nước. Sợi protein nhô ra ở phía tế bào chất thường kết hợp với một protein ngoại vi, những phân tử protein hướng về phía màng tế bào thì thường kết hợp với một chuỗi carbohydrate (hình 7.2).



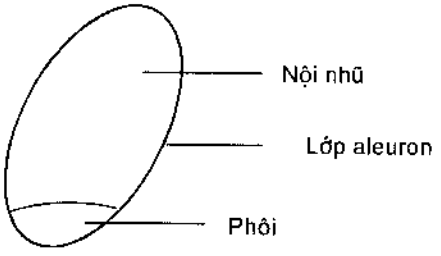
Hình 7.2. Sơ đồ biểu diễn một đoạn cắt của màng sinh học

Ở trong lớp kép lipid phân tử protein có những liên kết kỵ nước và liên kết ion. Những liên kết ion như liên kết giữa nhóm NH_3^+ của protein và của gốc phosphate của phospholipid. Những liên kết này nhạy cảm với độ pH. Vì vậy màng sinh học bị ảnh hưởng, thậm chí bị phá huỷ bởi giá trị pH thái quá. Mức độ quánh đặc nhiều hay ít của màng sinh học bị ảnh hưởng lớn bởi nhiệt độ. Ở nhiệt độ thấp màng sinh học có cấu trúc giống như tinh thể. Khi nhiệt độ tăng lên đến nhiệt độ chuyển pha, cấu trúc rắn sẽ chuyển sang cấu trúc tinh thể lỏng. Nhiệt độ chuyển pha tăng theo độ dài và độ no của acid béo. Ca^{2+} làm ổn định màng, nó liên kết với những nhóm ở phần đầu chủ yếu tích điện âm, ví dụ gốc phosphate của phospholipid. Ca^{2+} có khả năng tạo liên kết với hai nhóm tích điện âm. Vì vậy Ca^{2+} sẽ làm giảm tính thấm của màng, trong khi những ion hóa trị một, đặc biệt là H^+ làm tăng tính thấm. Tính thấm cũng bị ảnh hưởng bởi đặc tính của lipid. Thành phần steroid và những gốc acid béo no và có mạch carbon dài làm cho màng sít lại, những gốc acid béo chưa no làm cho màng lỏng lẻo ra, do vậy làm tăng tính thấm của màng.

Khi người ta nói đến tính thấm của màng chủ yếu là nói đến tính thấm của những chất ưa nước. Những chất này thấm qua màng rất ít, trong khi đó những phân tử kỵ nước có thể thấm qua hoặc khuếch tán qua màng. Hầu hết những chất trao đổi có đặc tính ưa nước, đối với chúng màng sinh học là cái

chắn đáng kể và ở đây chúng cần một cơ chế đặc biệt hơn để vận chuyển qua màng.

Protein dự trữ được tích luỹ trong mô dự trữ và khi cần sử dụng thì được huy động. Protein dự trữ điển hình ở động vật là protein trứng và sữa. Đó là protein cần thiết đối với động vật còn non, tương tự protein của hạt và quả, là nguồn dinh dưỡng đối với cây con.



Hình 7.3. Sơ đồ cắt ngang của hạt ngũ cốc

Chất lượng protein được đánh giá theo thành phần các aminoacid không thay thế. Đó là những aminoacid mà cơ thể người và động vật không có khả năng tổng hợp được. Hàm lượng các aminoacid không thay thế của các loại protein khác nhau được trình bày ở bảng 7.1 và 7.2

Bảng 7.1. Những aminoacid không thay thế đối với người

Valine	Lysine	Phenylalanine
Leucine	Methionine	Tryptophan
Isoleucine	Threonine	

Bảng 7.2. Hàm lượng aminoacid không thay thế của các loại protein khác nhau (%)

Protein trứng	51	Protein đậu tương	40
Protein sữa	50	Protein gạo	39
Protein mô cơ	47	Nấm	35
Collagen	17	Protein lúa mỳ	33
Protein lá cây	40	Protein hạt lạc	32

Những protein động vật, và protein của lá cây phần lớn là giàu aminoacid không thay thế. Protein của hạt và ngũ cốc chứa ít aminoacid không thay thế. Ở protein ngũ cốc là lysine, ở protein hạt và đậu các loại là methionine có hàm lượng thấp và nó giới hạn giá trị sinh học của những loại protein này.

Ở sự giải độc các kim loại nặng nhờ những polypeptide đơn giản theo kiểu phytochelatin có ý nghĩa quan trọng. Ví dụ polypeptide đơn giản có nguồn gốc từ glutation và có công thức chung như sau:

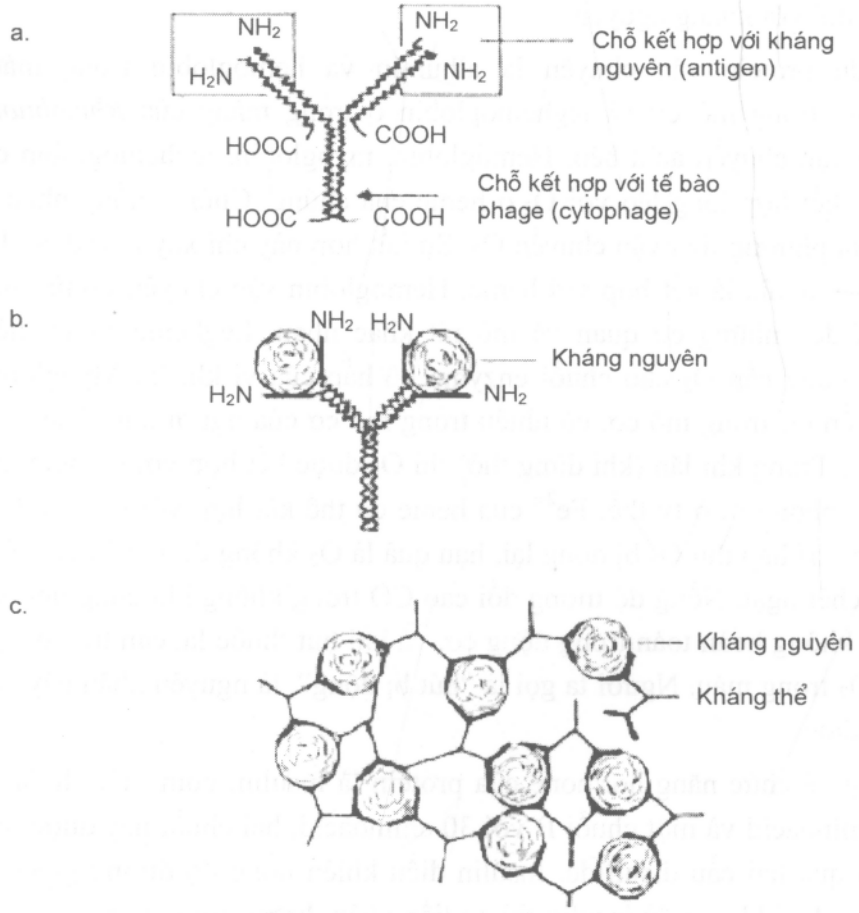
$$(\gamma\text{-glutamyl-cysteinyl})_n\text{-glycine}$$

Do có nhiều nhóm SH chúng có khả năng kết hợp chặt với các kim loại nặng, làm cho những kim loại nặng này không thể gây rối loạn trao đổi chất. Sự tổng hợp phytochelatin được kích thích bởi những kim loại nặng như Cd, Cu, Ag và Au.

Protein bảo vệ có một vai trò lớn trong sinh học miễn dịch. Động vật có xương sống có một cơ chế phức tạp, phát triển cao, với cơ chế này chúng ngăn ngừa những tác nhân vi sinh vật gây bệnh (virus, vi khuẩn, nấm, chất độc vi khuẩn). Chức năng này có phần liên quan đến đặc tính của chuỗi polypeptide. Hệ thống tự vệ toàn bộ, sinh học miễn dịch là một lĩnh vực khoa học phát triển độc lập. Một protein lạ (virus, vi khuẩn, nấm) xâm nhập vào máu hoặc vào mô thì cơ chế tự vệ được huy động rất nhanh. Protein lạ được gọi là antigen. Nó có một vùng gồm một trật tự xác định các nguyên tử, với vùng này nó kết hợp với tế bào lympho và kích thích tế bào này sản sinh ra kháng thể. Những tế bào lympho tồn tại trong hệ thống miễn dịch với số lượng 10^9 và có trên bề mặt của nó những vùng nhận, nơi mà antigen được kết hợp vào. Những vùng nhận này rất khác nhau và "phù hợp" mỗi vùng cho một antigen xác định. Những tác nhân khác nhau có những tế bào lympho xác định khác nhau với những vùng nhận phù hợp. Khi một antigen kết hợp với tế bào lympho thì nó bắt đầu sản sinh kháng thể đặc hiệu đối với tác nhân gây bệnh. Những tế bào lympho khác không được kích thích cho việc sản sinh ra kháng thể. Có sẵn một số lượng lớn các tế bào lympho khác nhau, chúng có thể tổng hợp được rất nhanh những kháng thể khác nhau khi kháng nguyên xuất hiện. Những loại kháng thể khác nhau này xác định, tồn tại với số lượng không đếm được, có thể một vài triệu, ở đây mỗi một loại có một vị trí kết hợp duy nhất đặc trưng. Khả năng lớn không thể tưởng tượng được của hệ thống miễn dịch đã làm cho protein lạ, protein của tác

nhân gây bệnh trở thành vô hại. Những kháng thể này được gọi là globulin miễn dịch. Chúng chiếm khoảng 20% protein tổng số trong máu.

Globulin miễn dịch Ig được chia làm 5 nhóm khác nhau. Tuy nhiên thành viên cơ bản Ig các nhóm đều có dạng chữ Y. Cấu trúc này gồm 2 sợi polypeptide ngắn, xác định, mỗi sợi có khoảng 220 gốc aminoacid (hình 7.4).



Hình 7.4. Sơ đồ biểu diễn kháng thể và kháng nguyên.

a) Kháng thể gồm 4 chuỗi polypeptide

b) Kháng thể kết hợp với kháng nguyên

c) Kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể

Cơ chế mà kháng thể nhận biết vị trí kháng nguyên của protein lạ là đặc biệt thú vị. Sự kết hợp giữa kháng thể và kháng nguyên là thuận nghịch và có thể so sánh với sự kết hợp giữa enzyme và cơ chất.

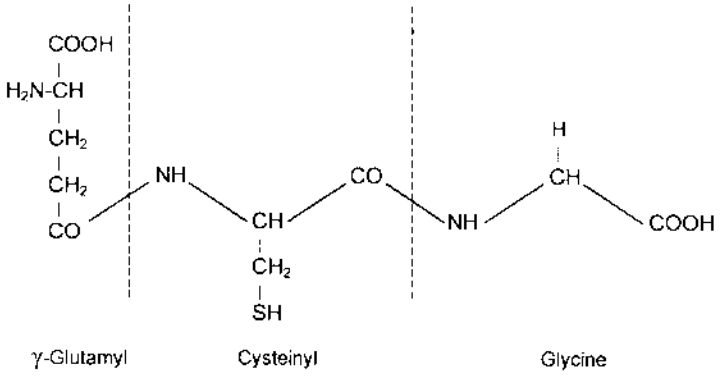
Liên kết này không phải đồng hóa trị mà là những liên kết hydro và liên kết ion. Điều đó làm rõ rằng trình tự aminoacid của vị trí kết hợp xác định tính đặc hiệu của liên kết. Từ đó rút ra rằng chuỗi polypeptide ngắn hay dài của kháng thể là một đoạn siêu biến có từ 20-30 gốc aminoacid, người ta cho rằng, trong vùng siêu biến này chứa vị trí liên kết đặc hiệu đối với kháng thể. Chỗ kết hợp thực sự chỉ gồm 5-10 aminoacid. Vị trí kết hợp rất chọn lọc đối với kháng nguyên.

Ví dụ protein vận chuyển là albumin và hemoglobin trong máu, myoglobin trong mô cơ và leghemoglobin ở trong màng của *Rhizobium*. Albumin vận chuyển acid béo. Hemoglobin, myoglobin, leghemoglobin có khả năng kết hợp lỏng lẽo với O_2 ở heme của chúng. Chúng giống nhau ở chỗ đều là phương tiện vận chuyển O_2. Sự kết hợp này chỉ xảy ra ở dạng Fe khử (Fe^{2+}), nghĩa là kết hợp với heme. Hemoglobin vận chuyển O_2 từ phổi qua máu đến những cơ quan và mô rất khác nhau. Leghemoglobin điều khiển sự cung cấp O_2 cho chuỗi enzyme hô hấp của vi khuẩn. Myoglobin vận chuyển O_2 trong mô cơ, có nhiều trong mô cơ của người lặn và là chất dự trữ O_2. Trong khi lặn (khi dừng thở) thì O_2 được kết hợp với myoglobin, được giải phóng ra ở ty thể. Fe^{2+} của heme có thể kết hợp với CN^- và CO làm cho vị trí hấp thụ O_2 bị đóng lại, hậu quả là O_2 không được vận chuyển, dẫn đến chết ngạt. Nồng độ tương đối cao CO trong không khí cũng như sự đốt cháy không hoàn toàn trong động cơ, và khi hút thuốc lá, cản trở sự vận chuyển O_2 trong máu. Người ta gọi là "hút bị động", là nguyên nhân gây hại đến sức khoẻ.

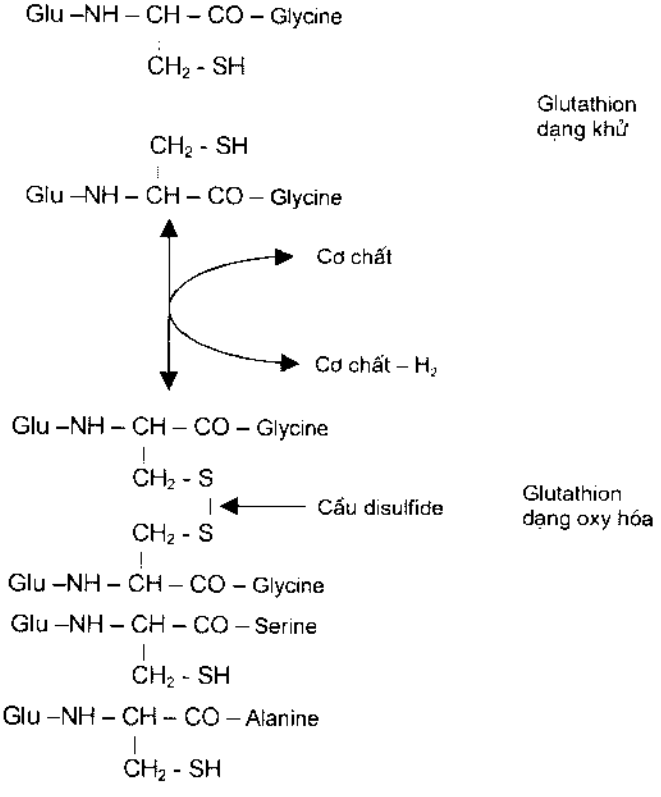
Ví dụ về chức năng hormone của protein là insulin, gồm một chuỗi A với 21 aminoacid và một chuỗi B với 30 aminoacid, hai chuỗi này được nối với nhau qua hai cầu disulfide. Insulin điều khiển nồng độ đường glucose trong máu. Khi không đủ insulin thì sự tiếp nhận đường trong tế bào bị hạn chế. Vì vậy mức đường trong máu tăng, dẫn đến sự thải đường mạnh mẽ qua nước tiểu (bệnh đái đường) và làm cho toàn bộ cơ thể suy yếu.

Một số peptide quan trọng trong tự nhiên:

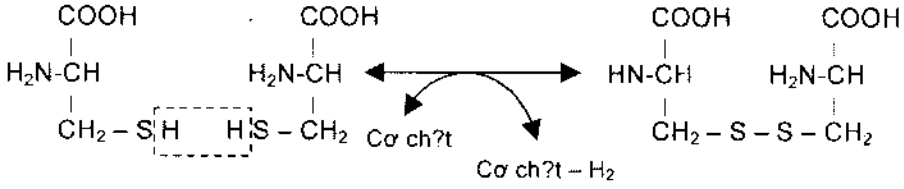
- *Glutation (tripeptide):* glutamyl-cysteinyl-alanine: là một tripeptide có chức năng sinh lý quan trọng, được tạo nên từ một gốc glutamyl, một gốc cysteine và glycine.



Hai nguyên tử glutatione có khả năng phản ứng để tách 2H tạo thành một disulfide. Đây là hệ thống đệm sulfhydryl, chức năng quan trọng nhất của nó là giữ nhóm SH của enzyme và coenzyme ở trạng thái khử. Glutathione có trong tất cả các cơ thể sống, tham gia vào nhiều phản ứng oxy hóa khử như giải độc các gốc độc. Ngoài ra trong thực vật glutathione còn là dạng dự trữ và vận chuyển lưu huỳnh ở dạng khử. Trong những loài cỏ có những tripeptide tương tự như glutatione và trong cây họ đậu một glutamyl-cysteinyl-alanine được tìm thấy.



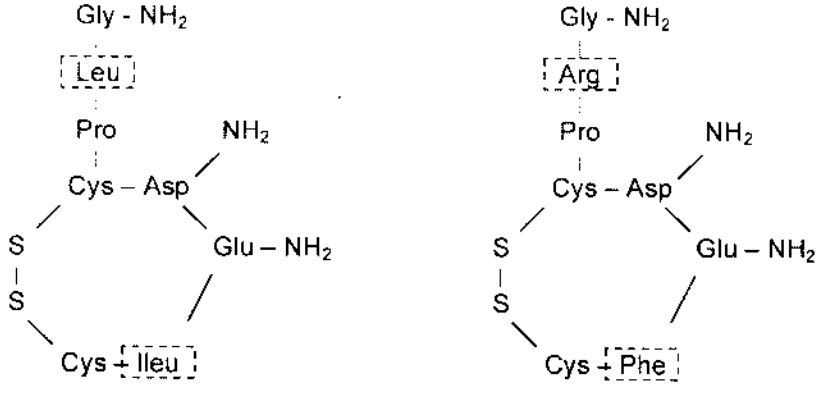
Cysteine và cystine về nguyên tắc cũng tạo nên hệ thống oxy hóa khử tương tự glutatione, biểu diễn như sau:



2x Cysteine

Cysteine

Oxytocin và vasopressin: Oxytocin và vasopressin là những oligopeptide, có cấu trúc rất giống nhau, phân tử gồm 9 gốc aminoacid khác nhau và có một cầu disulfide. Hormone oxytocin kích thích phần cơ phẳng của ruột già, bàng quang, túi mật và tử cung. Hormone vasopressin ảnh hưởng đến sự co rút của phần cơ phẳng của mạch máu và làm tăng áp huyết. Vasopressin có vai trò quan trọng trong việc làm đặc nước tiểu. Nếu nồng độ thấp thì động vật có vú thải ra một lượng lớn nước tiểu loãng, là một bệnh được gọi là bệnh tháo nhạt.



Oxytocin

Vasopressin

7.3. Các bậc cấu trúc của protein

Phần lớn các liên kết có trong chuỗi polypeptide có thể quay tự do và trục của một chuỗi polypeptide rất linh động. Tuỳ thuộc vào lực tác động mà chúng có những dạng rất khác nhau. Sự biến dạng của một chuỗi peptide, sự sắp xếp của những phần sợi, sự uốn cong và những nếp gấp có trong một chuỗi peptide, được gọi là cấu trúc.

Để thuận tiện người ta thường phân biệt cấu trúc của phân tử protein thành 4 bậc như sau: bậc I, bậc II, bậc III và bậc IV (hình 7.5)

Cấu trúc bậc I là trình tự sắp xếp các gốc aminoacid trong chuỗi polypeptide. Cấu trúc này được giữ vững nhờ liên kết peptide (liên kết cộng hóa trị).

Vì mỗi một aminoacid có gốc khác nhau, các gốc này có những đặc tính hóa học khác nhau, nên một chuỗi polypeptide ở các điều kiện khác nhau có những đặc tính hóa học rất khác nhau.

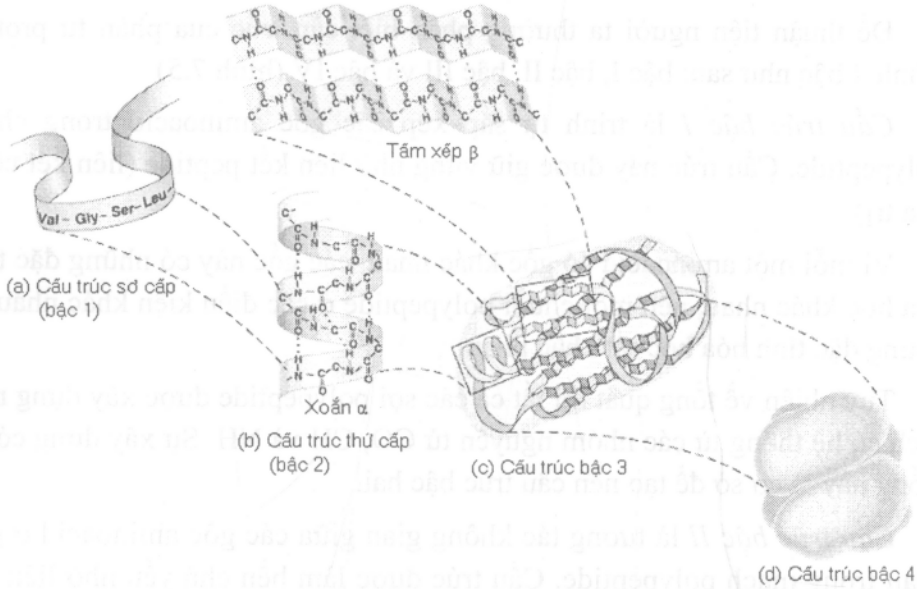
Tuy nhiên về tổng quát thì tất cả các sợi polypeptide được xây dựng một cách có hệ thống từ các nhóm nguyên tử CO, CH và NH. Sự xây dựng có hệ thống này là cơ sở để tạo nên cấu trúc bậc hai.

Cấu trúc bậc II là tương tác không gian giữa các gốc aminoacid ở gần nhau trong mạch polypeptide. Cấu trúc được làm bền chủ yếu nhờ liên kết hydro được tạo thành giữa các liên kết peptide cách nhau những khoảng xác định.

Cấu trúc bậc hai của phân tử protein: xoắn α (α-helix), tấm xếp β và xoắn collagen. Loại α-helix là sợi ở dạng xoắn ốc, quấn xung quanh một trục, mỗi vòng xoắn có 3,6 gốc aminoacid. Ở đây do nhóm CO và nhóm NH của aminoacid thứ tư trên chuỗi gần nhau, giữa hai nhóm này có thể tạo nên một cầu hydro. Các liên kết H tương đối lỏng lẽo và có thể được cắt đứt khi nhiệt độ cao. Phân tử protein mất cấu trúc bậc hai thì enzyme mất hoạt tính xúc tác.

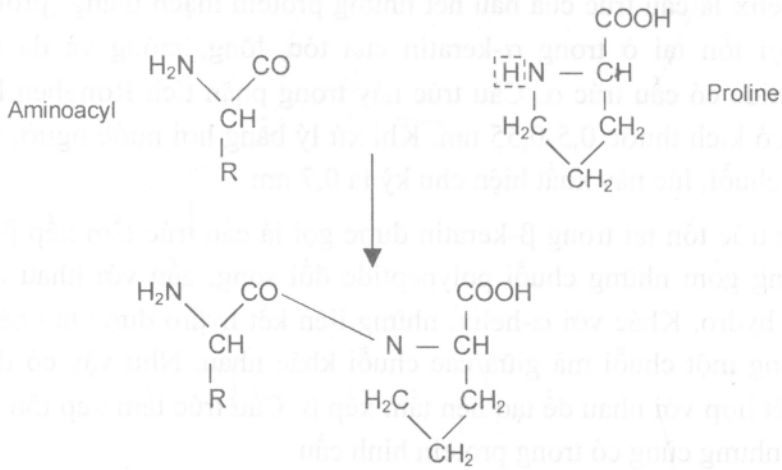
α-helix là cấu trúc của hầu hết những protein mạch thẳng (protein sợi). Dạng sợi tồn tại ở trong α-keratin của tóc, lông, móng và da từ chuỗi polypeptide có cấu trúc α. Cấu trúc này trong phân tích Rơnghen là những chu kỳ có kích thước 0,5-0,55 nm. Khi xử lý bằng hơi nước người ta có thể kéo dài chuỗi, lúc này xuất hiện chu kỳ là 0,7 nm.

Cấu trúc tồn tại trong β-keratin được gọi là cấu trúc tấm xếp β. Ở hình 7.6 chúng gồm những chuỗi polypeptide đối song, gắn với nhau bằng các liên kết hydro. Khác với α-helix, những liên kết hydro được tạo nên không phải trong một chuỗi mà giữa các chuỗi khác nhau. Như vậy có thể nhiều chuỗi kết hợp với nhau để tạo nên tấm xếp β. Cấu trúc tấm xếp tồn tại trong sợi lụa, nhưng cũng có trong protein hình cầu.

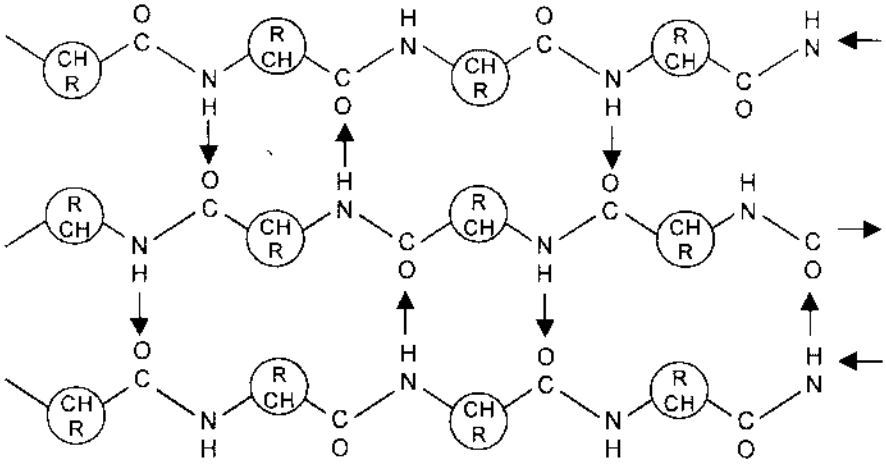


Hình 7.5. Các mức độ tổ chức của phân tử protein. Cấu trúc bậc 1, 2, 3, và 4 của phân tử protein.

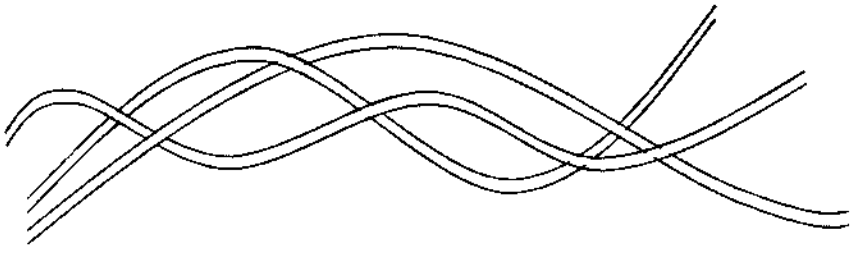
Thuộc protein thẳng còn có collagen, gồm 3 sợi polypeptide xoắn vào nhau, chúng lại kết hợp nhiều sợi lại với nhau bằng liên kết đồng hóa trị (hình 7.7). Đại phân tử này chỉ có một số cầu hydro được tạo nên, vì ngoài glycine nó được tạo nên chủ yếu từ proline và hydroproline. Khi một aminoacid đi vào để tạo liên kết peptide, trong chuỗi peptide còn lại một N là yếu tố cấu tạo chứ không phải là -NH-, trong sơ đồ dưới đây. Ở đây một H của nhóm NH được thay thế bằng một aminoacyl, nghĩa là thiếu H cho việc tạo liên kết hydro và vì lý do này mà sợi peptide không thể tự xoắn được.



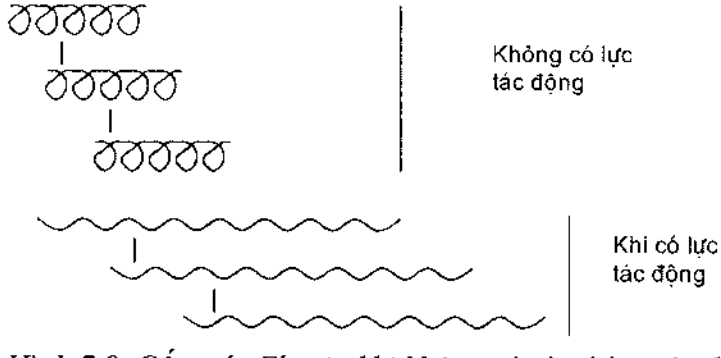
Những sợi collagen chạy song song tạo nên những bó sợi dai của gân. Collagen cũng có trong xương và trong các mô nối. Elastin là một protein, gồm những sợi protein tương đối ngắn, gắn kết với nhau nhờ liên kết đồng hóa trị (hình 7.7). Những sợi polypeptide quay theo dạng xoắn ốc, tự duỗi xoắn khi có áp lực (hình 7.8).



Hình 7.6. Những chuỗi polypeptide chạy đối song trong cấu trúc β-keratin (tấm xếp β)



Hình 7.7. Sơ đồ biểu diễn một sợi collagen bao gồm ba sợi riêng lẻ



Hình 7.8. Cấu trúc Elastin khi không có và có lực tác động

Những ví dụ trên nói lên rằng polypeptide có nhiều đặc tính và chức năng khác nhau.

Việc xác định cấu trúc bậc I của phân tử protein có ý nghĩa quan trọng:

- Là bước đầu tiên quan trọng, xác định cơ sở phân tử của hoạt tính sinh học, tính chất hoá, lý của protein.

- Là cơ sở xác định cấu trúc không gian của phân tử protein dựa vào cấu trúc không gian của các phân tử protein tương đồng.

- Cấu trúc bậc I là bản phiên dịch mã di truyền. Vì vậy cấu trúc này nói lên quan hệ họ hàng và lịch sử tiến hóa của thế giới sinh vật.

- Là yếu tố góp phần quan trọng trong nghiên cứu bệnh lý phân tử. Kết quả nghiên cứu cho thấy: khi thay đổi thứ tự aminoacid, thậm chí chỉ một gốc aminoacid trong phân tử protein có thể làm thay đổi hoạt tính sinh học, gây những bệnh đặc trưng. Ví dụ điển hình là bệnh thiếu máu hồng cầu hình lưỡi liềm, là do cấu trúc bậc I của hemoglobin thay đổi: gốc aminoacid ở vị trí thứ 6 trong chuỗi β của hemoglobin A (bình thường) bị thay thế bằng gốc aminoacid valin.

- Là cơ sở để tổng hợp nhân tạo protein bằng phương pháp hóa học hoặc bằng phương pháp công nghệ sinh học. Frederick Sanger (1953) đã đề ra phương pháp và sử dụng phương pháp này thành công để xác định trình tự sắp xếp các aminoacid trong phân tử insulin (polypeptide có hoạt tính hormone). Đến nay rất nhiều protein đã được xác định cấu trúc bậc I. Insulin là protein đầu tiên được tổng hợp bằng phương pháp hóa học vào năm 1966. Ngày nay bằng phương pháp công nghệ sinh học người ta sử dụng *E.coli* để tổng hợp insulin.

Cấu trúc bậc III là tương tác không gian giữa các gốc aminoacid ở xa nhau trong chuỗi polypeptide, là dạng cuộn lại trong không gian của toàn mạch polypeptide.

Nhiều sợi polypeptide trong cơ thể sống tồn tại không phải ở dạng thẳng mà gập khúc và qua đó mà tạo nên cấu trúc không gian ba chiều. Tuy nhiên cấu trúc này hoàn toàn xác định, chủ yếu là do trình tự các aminoacid và môi trường. Khi một chuỗi polypeptide tách ra khỏi ribosome và được thải ra trong tế bào chất như là môi trường tạo hình thì nó hình thành nên cấu trúc tự nhiên rất nhanh, đặc biệt đối với cấu trúc hình cầu, mang lại cho protein những đặc tính sinh lý quan trọng. Có thể do chuyển động nhiệt của các chuỗi polypeptide mà các nhóm của các gốc aminoacid tiếp xúc với

nhau, dẫn đến có thể kết hợp với nhau. Trong nhiều protein hình cầu có chứa các gốc cysteine, sự tạo thành các liên kết disulfide giữa các gốc cysteine ở xa nhau trong chuỗi polypeptide, làm cho mạch bị cuộn lại đáng kể. Các liên kết khác, như liên kết Val de Waal, liên kết tĩnh điện, phân cực, kỵ nước và hydro giữa các mạch bên của các gốc aminoacid đều tham gia làm bền cấu trúc bậc III, như protein hình cầu biểu diễn ở hình 7.5.

Cấu trúc hình cầu của protein được gọi là cấu trúc bậc ba, là cấu trúc của enzyme. Ở chúng một nhóm prosthetic có thể kết hợp đồng hóa trị, ví dụ heme. Nhưng những nhóm gốc aminoacid riêng lẻ cũng có thể là các nhóm hoạt động trong phản ứng enzyme. Sự hoà tan của protein được xác định ở một mức độ nhất định nhờ cấu trúc bậc ba. Ở nhiều protein hình cầu các nhóm kỵ nước định hướng vào bên trong, những nhóm ưa nước hướng ra ngoài. Những nhóm ưa nước này kết hợp với nước như là chất hoà tan bằng các cầu hydro, phức hệ này tồn tại trong dung dịch. Trình tự aminoacid của protein enzyme cùng chức năng cho biết mức độ quan hệ họ hàng của các loài. Mức độ quan hệ họ hàng càng gần, thì mức độ tương ứng về trình tự aminoacid càng lớn. Điều rất thú vị ở đây là những đoạn trình tự quan trọng nhất, ví dụ những vùng phản ứng, trong quá trình tiến hóa hầu như không thay đổi, được bảo tồn và như vậy cấu trúc bậc hai, bậc ba được duy trì.

Cấu trúc bậc IV: Cấu trúc này được hình thành ở các phân tử protein gồm 2 hay nhiều chuỗi polypeptide hình cầu. Tương tác không gian giữa các chuỗi này trong phân tử gọi là cấu trúc bậc IV. Mỗi chuỗi polypeptide này được gọi là tiểu đơn vị (subunit). Sự kết hợp giữa các phân tử này lỏng lẽo và chủ yếu là do liên kết hydro và liên kết kỵ nước. Bằng cách này hai phân tử xác định có thể kết hợp với nhau tạo thành một dimer. Một thí dụ về sự kết hợp này là hemoglobin, được tạo nên từ 2 chuỗi α với mỗi chuỗi có 141 và 2 chuỗi β với mỗi chuỗi là 146 gốc aminoacid. Đại phân tử dạng này bên cạnh protein còn là thành phần cấu tạo của nucleic acid, các ribosome. Các ribosome của sinh vật tiền nhân gồm 55 chuỗi polypeptide khác nhau và 3 phân tử nucleic acid khác nhau kết hợp lại. Nhiều virus có lớp vỏ bên ngoài, có cấu tạo từ nhiều phân tử protein xác định và bao quanh nucleic acid xoắn ốc ở bên trong. Các đại phân tử trên kết hợp với nhau tự động trong môi trường phù hợp để thành dạng tồn tại trong tự nhiên.

Đặc tính vật lý của protein phụ thuộc vào đặc tính hóa học của các gốc aminoacid ở protein hình cầu và sự gập khúc của chúng. Chiếm ưu thế trong sự kết hợp của các aminoacid có tính acid thì protein có tính acid. Chủ yếu là aminoacid có tính kiềm thì protein kiềm. Những protein có nhiều nhóm ưa nước là do những aminoacid phân cực và hydroxyacid thì có độ hoà tan lớn. Ngược lại, thành phần của gốc kỵ nước (valine, leucine, isoleucine) thì độ hoà tan của những protein này thấp.

Trọng lượng phân tử protein phụ thuộc vào độ dài của từng chuỗi polypeptide và số lượng các sợi polypeptide cấu tạo nên một phân tử protein. Bảng 7.3 chỉ ra sự khác nhau đáng kể giữa các phân tử protein riêng lẻ.

Bảng 7.3. Trọng lượng phân tử và số lượng chuỗi polypeptide của một số phân tử protein

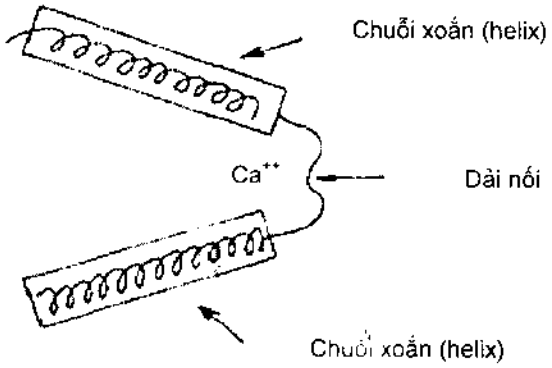
	Trọng lượng phân tử	Số lượng gốc axit amin	Số lượng chuỗi polypeptid
Insulin	5 733	51	2
Ribonuclease	12 640	124	1
Myoglobin	16 890	153	1
Hemoglobin	64 500	574	4
Glutamate dehydrogenase	10^6	8 300	40
Synthetase tổng hợp acid béo	$2,3 \times 10^6$	20 000	21

Cấu trúc của một hoặc nhiều chuỗi polypeptide có ý nghĩa quan trọng đối với độ hoà tan và chức năng của chúng. Cấu trúc protein được hiểu là sự sắp xếp của những chuỗi riêng lẻ hoặc nhiều chuỗi. Chúng phụ thuộc vào độ pH của môi trường. Protein và chuỗi polypeptide hoà tan tốt khi những nhóm ưa nước hướng ra phía ngoài, nhóm kỵ nước hướng vào bên trong. Khi một protein thay đổi cấu trúc thì những nhóm kỵ nước quay ra ngoài, protein mất khả năng hoà tan trong nước, ví dụ trường hợp kết tủa không ở dạng tinh thể của protein sữa trong môi trường chua. Acid lactic được sản sinh từ vi khuẩn, làm giảm pH, dẫn đến kết tủa protein sữa. Nhiều nhóm kỵ nước được hướng ra bên ngoài, protein mất khả năng tan trong nước. Vì vậy sự thường xuyên duy trì giá trị pH trong tế bào chất rất quan trọng, vì chỉ có

như vậy chức năng hoạt động của các enzyme trong tế bào chất mới được đảm bảo.

Bên cạnh H^+ còn có những cation khác có ý nghĩa đối với các phản ứng enzyme, ví dụ K^+. Nồng độ của nó trong tế bào chất cao hơn các loại cation khác và nằm trong khoảng 100 đến 150 mM. Nồng độ K^+ cao có ý nghĩa đối với sự tổng hợp protein.

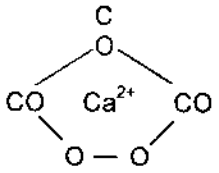
Nồng độ Ca^{2+} trong tế bào chất rất thấp, tuy nhiên nó có vai trò quan trọng đối với cấu trúc của các protein khác nhau. Calmodulin là một polypeptide kết hợp với Ca^{2+} làm cho các vùng kỵ nước được hướng ra ngoài, các vùng này kết hợp với các enzyme và hoạt hóa các enzyme như phosphodiesterase, adenylate-cyclase, photoarylase và ATPase. Bằng cách tương tự troponin C và paralbumin hoạt hóa những enzyme khác bằng việc thay đổi cấu trúc khi kết hợp với Ca^{2+}. Những Ca-protein này thay đổi phản ứng enzyme. Những liên kết thực hiện ở những vị trí hoàn toàn xác định, thực chất là helix-dải nối-helix (hình 7.9).



Hình 7.9. Sơ đồ biểu diễn liên kết Ca trong chuỗi polypeptide nối hai cấu trúc helix lại với nhau

Dạng này của một liên kết Ca tồn tại từng đôi và đặc trưng đối với calmodulin, troponin C và paralbumin. Cấu trúc này gồm một chuỗi polypeptide có 12 gốc aminoacid, trong đó 7 nhóm carboxyl có nguyên tử O kết hợp với Ca^{2+}. Cấu trúc này tương ứng với một hình tháp đôi 5 mặt, ở phía trên và phía dưới còn có một CO. Ở trung tâm cấu trúc không gian ba chiều này có nguyên tử Ca^{2+}, ở mỗi một gốc có 1 nhóm CO (hình 7.10).

Liên kết với Ca^{2+} ở trung tâm làm thay đổi cấu trúc của protein.

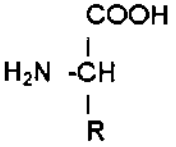


Hình 7.10. Mặt phẳng có hình 5 góc của một khối chóp đôi với Ca^{2+} ở trung tâm

Troponin C có tổng số 4 vị trí kết hợp với Ca^{2+}, trong đó 2 liên kết có ái lực mạnh và 2 liên kết có ái lực yếu. Sự bão hoà Ca^{2+} phụ thuộc vào nồng độ Ca^{2+} trong hệ thống. Cũng như vậy đối với calmodulin. Nồng độ Ca^{2+} cũng ảnh hưởng đến những quá trình enzyme bằng những Ca-protein. Vai trò quan trọng nhất của troponin C là điều khiển sự co rút của mô cơ. Paralbumin cũng có mặt trong mô cơ, có ý nghĩa đối với thư giản mô cơ. Vị trí kết hợp của nó với Ca^{2+} cũng có ái lực cao với Mg^{2+}.

7.4. Aminoacid

Phần lớn nhất của những chất nitơ hữu cơ dễ hoà tan trong thực vật là aminoacid, amide và amine. Trong trao đổi chất thì aminoacid có vai trò rất quan trọng. Chúng là vật liệu tạo nên protein. Công thức chung của aminoacid:



Công thức tổng quát của L-α-aminoacid

Nhóm amine đính ở nguyên tử C_2, theo tên cũ là nguyên tử Cα. Vì vậy người ta gọi là nhóm α-amine. Các aminoacid tồn tại chủ yếu trong tự nhiên có nhóm amine đứng ở bên trái trục, được gọi là aminoacid dạng L. Dạng D-aminoacid tồn tại chỉ riêng biệt, ví dụ trong thành tế bào vi khuẩn.

Mỗi một aminoacid ít nhất được đặc trưng bởi một nhóm carboxyl và một nhóm amine. Hơn 100 loại aminoacid khác nhau mà người ta đã biết, có khoảng 20 loại là thành phần của protein. Dưới đây là những aminoacid quan trọng và công thức hóa học của chúng. Để đơn giản và theo thói quen nhóm carboxyl của aminoacid proton hoá. Tuy nhiên ở dạng này không có aminoacid nào tồn tại, vì như đã nêu trên, khi nhóm carboxyl phân ly, thì

nhóm NH_2 phải phân ly. Proton hóa hay khử proton hóa luôn luôn phụ thuộc vào pH của môi trường.

Các aminoacid riêng biệt có những đặc tính khác nhau là do phần gốc aminoacid. Khi chiều dài chuỗi tăng thì có đặc tính kỵ nước. Protein có chứa nhiều aminoacid như valine, leucine, isoleucine có đặc tính kỵ nước là chủ yếu. Những aminoacid có tính acid trong phần gốc có nhóm carboxyl. Protein chứa nhiều aminoacid có tính acid là những protein acid. Tương tự như vậy đối với protein, chủ yếu được tạo nên từ những aminoacid có tính kiềm là những protein kiềm. Phần gốc của aminoacid có ý nghĩa quyết định đối với đặc tính của protein mà chúng tạo nên. Điều này không những có ý nghĩa đối với tính chất hóa học mà cả cấu trúc của protein.

7.4.1. Phân loại aminoacid

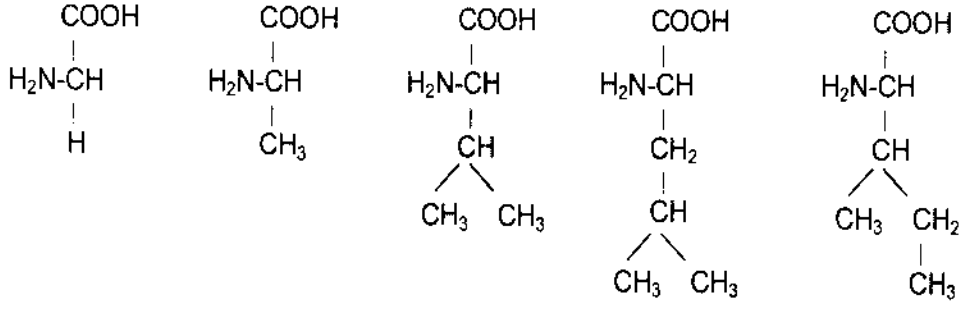
Thủy phân hoàn toàn protein, thu được chủ yếu các L-α-aminoacid. Mặc dù protein rất đa dạng nhưng hầu hết chúng đều được cấu tạo từ 20 L-α-aminoacid. Dựa vào đặc tính của mạch bên (gốc R) aminoacid được chia làm 7 nhóm chính sau đây:

1. Aminoacid trung tính mạch thẳng

Nhóm này gồm 5 aminoacid: glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine. Các aminoacid này đều có một nhóm amine và một nhóm carboxyl.

Glycine là axit amine đơn giản nhất, nhóm R của nó là nguyên tử H, là aminoacid duy nhất không chứa carbon bất đối. Bốn aminoacid còn lại có mạch bên không phân cực.

Aminoacid trung tính

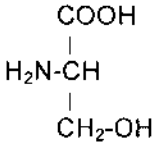


Glycine (Gly) | Alanine (Ala) | Valine (Val) | Leucine (Leu) | Isoleucine (ILeu)

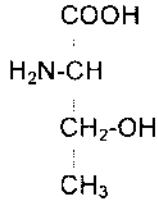
2. Các hydroxyl aminoacid mạch thẳng

Thuộc nhóm này có 2 aminoacid là serine và threonine. Chúng giống với nhóm trên ở chỗ chỉ có một nhóm amine, một nhóm carboxyl và cũng là mạch thẳng nhưng có chứa một nhóm OH.

Aminoacid có nhóm hydroxyl



Serine
(Ser)

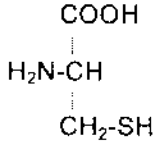


Threonine
(Thr)

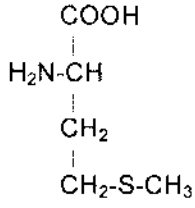
3. Aminoacid chứa lưu huỳnh mạch thẳng

Nhóm này có 2 aminoacid là cysteine và methionine. Khi oxy hóa 2 nhóm -SH của 2 phân tử cysteine tạo thành cystine có chứa cầu (-S-S-).

Aminoacid chứa lưu huỳnh



Cystein
(Cys)



Methionine
(Met)

4. Các aminoacid acid và các amide

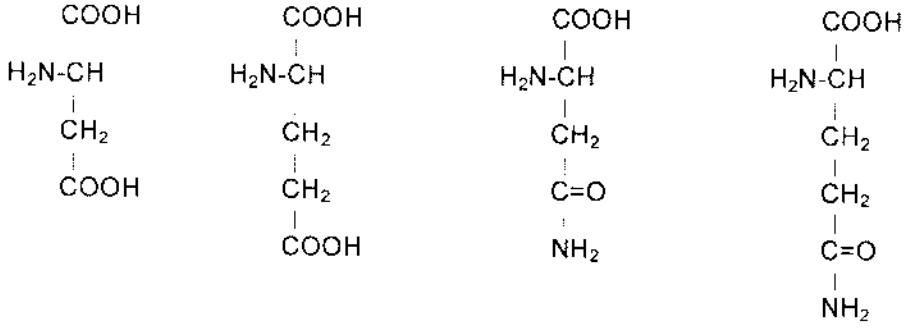
Thuộc nhóm này có aspartic acid và glutamic acid. Trong phân tử của chúng có một nhóm amine và hai nhóm carboxyl. Ở pH sinh lý (6-7) các aminoacid này tích điện âm.

Amine hóa nhóm carboxyl ở mạch bên của aspartate và glutamate tạo thành các amide tương ứng là asparagine và glutamine.

Ở sự tổng hợp glutamic acid một nhóm amine từ một chất cho được chuyển đến cetoacid. Người ta gọi quá trình này là chuyển amine hóa do enzyme transaminase xúc tác. Enzyme này có nhóm prosthetic là pyridoxalphosphate.

Aminoacid có tính acid

Các amide

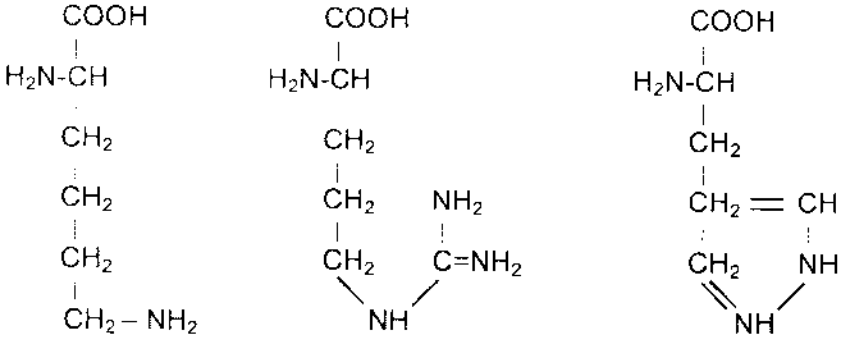


Aspartic acid (Asp) | Glutamic acid (Glu) | Asparagine ($Asp-NH_2$) | Glutamine ($Glu-NH_2$)

5. *Các aminoacid kiềm*

Trong nhóm này lysine và arginine tích điện dương (ở pH =7), còn histidine chứa nhóm imidazol có tính base yếu ở pH = 7

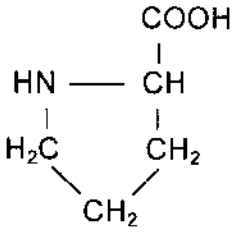
Aminoacid có tính base



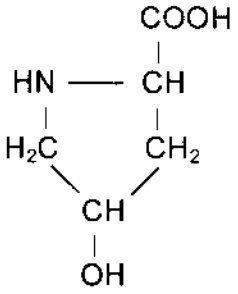
Lysine (Lys) | Arginine (Arg) | Histidine (His)

6. *Iminoacid (proline)*

Prolin khác với tất cả các aminoacid khác ở chỗ nhóm amine bậc một ở Cα kết hợp với mạch bên tạo thành vòng pyrrolidine. Do đó proline là một iminoacid chứa nhóm amine bậc 2.



Proline
(Pro)



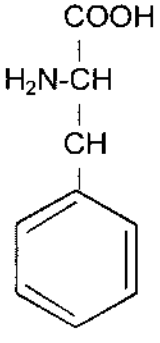
Hydroproline
(Hypro)

7. *Các aminoacid thơm và dị vòng*

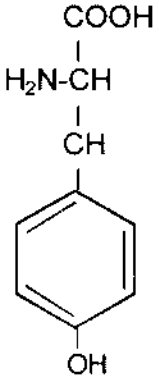
Các aminoacid thuộc nhóm này là phenylalanine, tyrosine và tryptophan. Do có chứa vòng thơm nên các aminoacid này có một số phản ứng đặc trưng.

Những aminoacid thơm là những tiền chất của nhiều alcaloid, phytohormone như indolacetic acid.

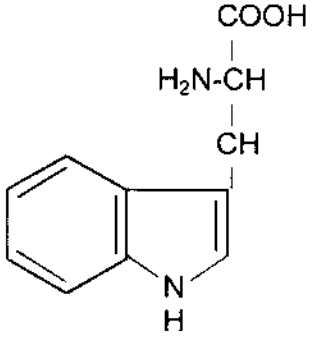
Aminoacid chứa nhân thơm



Phenylalanine
(Phe)

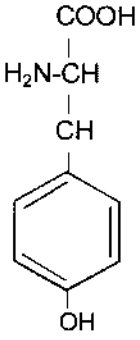


Tyrosine
(Tyr)

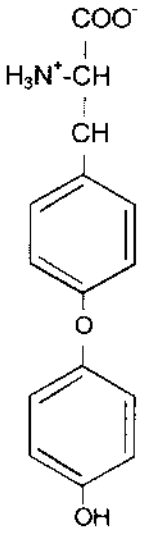


Tryptophan
(Try)

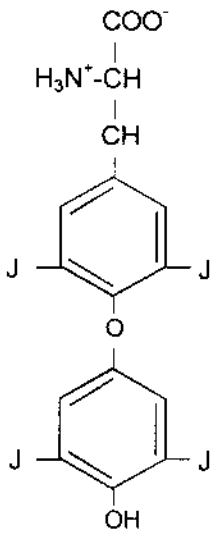
Những gốc aminoacid của histidine, lysin và cysteine là những nhóm hoạt hóa enzyme. Những aminoacid thơm tyrosin có họ hàng gần với thyronine, đây là tiền chất của hormone tuyến giáp trạng thyrocine. Thyrocine được tạo nên trong tuyến giáp trạng từ thyronin nhờ sự kết hợp với iod.



Tyrosine



Thyronin

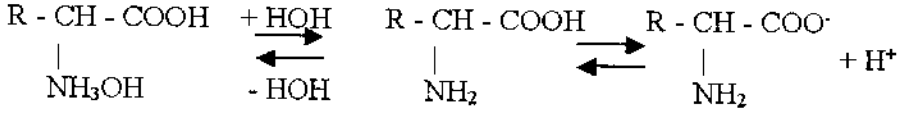


Thyrocine

7.4.2. Tính chất của aminoacid

Tính chất lưỡng tính của aminoacid

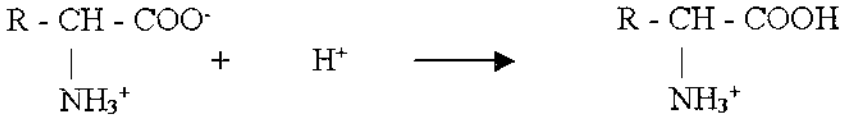
Trong cấu tạo của aminoacid vừa có nhóm amine ($-NH_2$) thể hiện tính base, vừa có nhóm carboxyl (-COOH) thể hiện tính acid, nghĩa là chúng mang tính lưỡng tính và có thể phân ly thành ion H^+ và OH^-. Trong dung dịch nước, các aminoacid có thể đồng thời phân ly như sau:



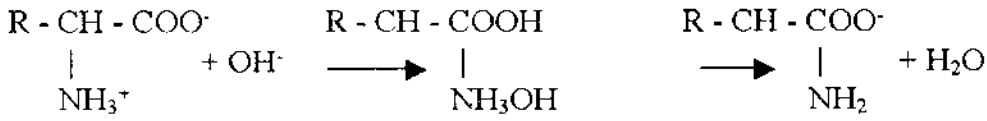
Những công trình nghiên cứu về quang phổ khuếch tán đã xác nhận rằng: phân tử aminoacid không có nhóm carboxyl tự do, cũng như không có nhóm amine tự do và chúng đều là muối nội có dạng như sau:

Do có tính lưỡng tính nên aminoacid là những chất đệm tốt. Vì aminoacid có tính lưỡng tính trong dung dịch nước nên tuỳ theo pH của dung dịch mà sự phân ly của nhóm carboxyl hoặc nhóm amine sẽ bị kìm hãm và aminoacid thể hiện tính kiềm hoặc tính acid.

Trong môi trường acid, khi nồng độ H^+ cao, sự phân ly của nhóm carboxyl sẽ bị kìm hãm và phân tử aminoacid tích điện dương, trong điện trường nó sẽ dịch chuyển về phía cực âm.



Trong môi trường kiềm, dưới tác dụng của các ion OH^- sự phân ly của nhóm amine sẽ bị kìm hãm, nhóm carboxyl sẽ bị phân ly, phân tử aminoacid tích điện tích âm và dịch chuyển về cực dương trong điện trường.



Ở điểm đẳng điện pI (isoelectric point) phân tử aminoacid trung hoà về điện và nó không dịch chuyển trong điện trường.

Tuỳ theo số nhóm carboxyl và nhóm amine trong phân tử aminoacid cũng như tuỳ theo hằng số phân ly của các nhóm này mà điểm đẳng điện pI của các aminoacid sẽ khác nhau.

Các aminoacid monoamine dicarboxylic (aspartic acid, glutamic acid) có điểm đẳng điện trong môi trường acid, các aminoacid diamine monocarboxylic (acginine, histidine, lysine) có điểm đẳng điện trong môi trường kiềm.

Bảng 7.4. Điểm đẳng điện của các aminoacid

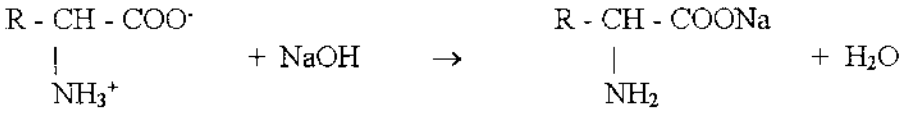
Tên aminoacid	Điểm đẳng điện (pI)	Tên aminoacid	Điểm đẳng điện (pI)
Alanine	6,00	Lysine	9,74
Arginine	10,76	Methionine	5,74
Asparagine	5,41	Hydroproline	5,83

Ứng dụng tính lưỡng tính của aminoacid

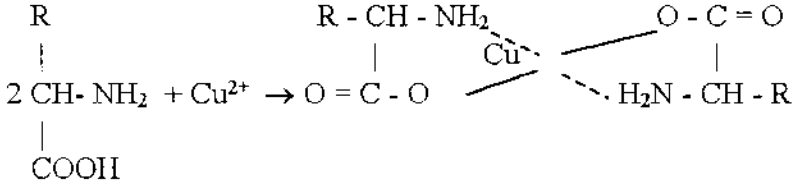
Nhờ có tính lưỡng tính mà aminoacid có vai trò là chất đệm trong tế bào và trong trao đổi khoáng của cơ thể thực vật.

Dựa vào tính chất này để định tính và định lượng các aminoacid trong dung dịch nghiên cứu bằng phương pháp điện di, sắc ký trên giấy, sắc ký cột...

Cũng do tính chất lưỡng tính mà các aminoacid có thể tạo muối nội đồng thời với acid cũng như base:

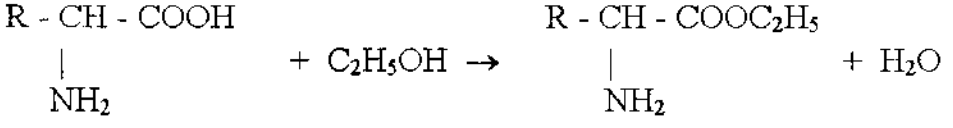


Ngoài ra phân tử aminoacid còn tạo muối nội với các ion kim loại nặng như Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+},... đặc biệt với Cu^{2+}. Cấu hình của muối phức này có thể biểu diễn như sau:



Phản ứng tạo ester

Với rượu, aminoacid có thể tạo thành ester



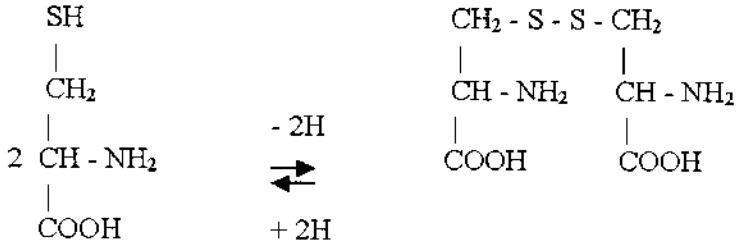
Các ester của aminoacid đều là những chất lỏng dễ bay hơi, có tính kiềm, dễ điều chế bằng phép cất chân không.

Phản ứng của gốc R

Gốc R là nhóm nguyên tử trong phân tử aminoacid vốn liên kết với nguyên tử C_α và không tham gia trong việc hình thành liên kết peptide. Bản chất hóa học của gốc đã cho phép aminoacid thực hiện nhiều phản ứng khác nhau:

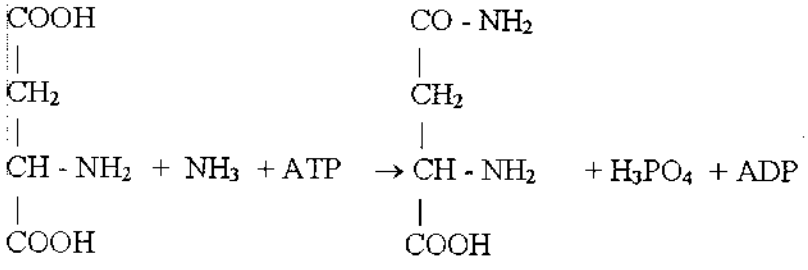
- Phản ứng tạo muối với acid, base và kim loại nặng (do nhóm $-NH_2$ và nhóm -COOH có trong gốc R) như đã trình bày ở trên.

- Phản ứng oxy hóa khử (do nhóm -SH và nhóm -S-S-)



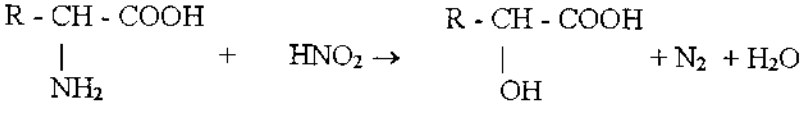
Cysteine và cystine đóng vai trò quan trọng trong việc vận chuyển e^- và H^+ của quá trình oxy hóa khử nói riêng và quá trình trao đổi chất nói chung

- Phản ứng tạo amide (do nhóm -COOH)



Phản ứng xảy ra tương tự với glutamic acid.

- Phản ứng khử amine hóa bởi HNO_2 (do nhóm $-NH_2$)



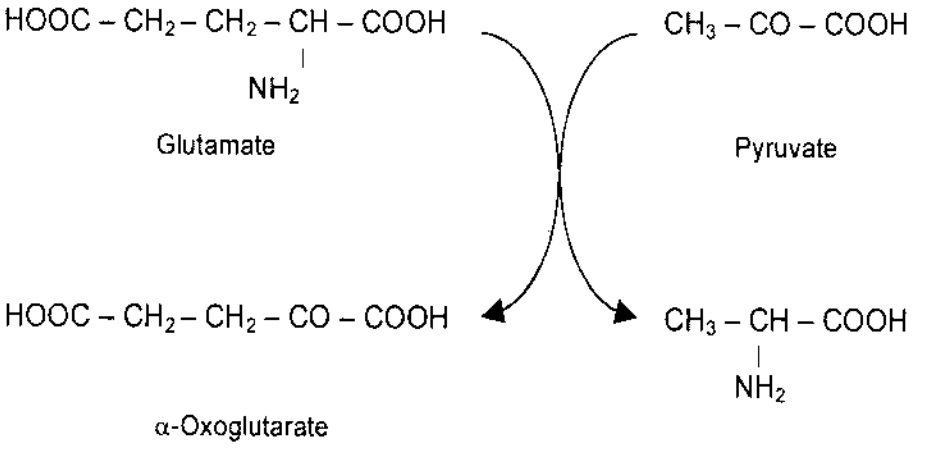
Ngoài ra vòng thơm của aminoacid tham gia phản ứng nitro hoá, halogen hóa và một số phản ứng đặc trưng của aminoacid: phản ứng với aldehyd formic, với ninhydrin...

7.5. Sinh tổng hợp aminoacid

Ở vi khuẩn và lục lạp của thực vật con đường quan trọng nhất để tổng hợp glutamate là từ 2-oxoglutarate và glutamine. Phản ứng này được xúc tác bởi enzyme glutamat-synthase.

Ở động vật glutamate xuất hiện chủ yếu bằng phản ứng chuyển amine giữa 2-oxoglutarate và aminoacid. Phản ứng này xảy ra chủ yếu ở gan, là cơ quan trung tâm của sự biến đổi aminoacid.

Ở sự chuyển amine hóa glutamate và aspartate là những chất cho nhóm NH_2. Một sự vận chuyển amine từ glutamate đến pyruvate được chỉ ra như sau:



Enzyme xúc tác là glutamat-pyruvat-aminotransferase. α-cetoglutaric acid được tạo nên lại trở thành chất nhận NH_3. Nhờ sự chuyển amine mà nhiều aminoacid được tạo thành. Những ví dụ quan trọng nhất là:

α-cetoglutaric acid → glutamic acid

oxaloacetic acid → aspartic acid

glyoxylic acid → glycine

pyruvic acid → alanine

hydroxy pyruvic acid → serine

α-ceto hydroxybutyric acid → threonine

Glutaminsemialdehyde → ornithin

Tuy nhiên không phải tất cả các aminoacid có trong tự nhiên được tổng hợp bằng con đường chuyển amine hoá. Còn có những con đường phản ứng quan trọng khác để tổng hợp nên các aminoacid. Người ta biết các con đường phản ứng tương ứng cho 5 họ aminoacid khác nhau (bảng 7.5). Ví dụ ở hình 7.12 chỉ ra con đường tổng hợp của họ glutamic acid.

1. Glutamic acid được phosphoryl hóa nhờ ATP ở nhóm δ-carboxyl để tạo thành glutamylphosphate

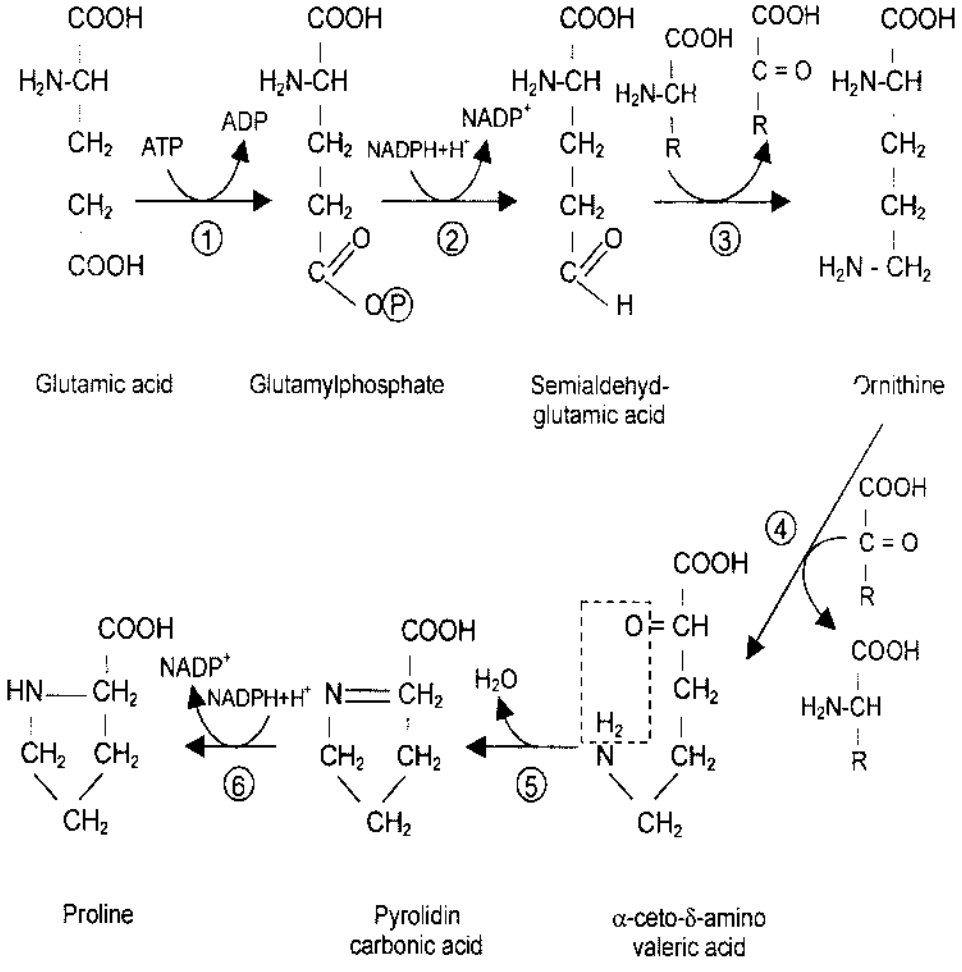
2. Chất này được khử nhờ NADPH để tạo thành aldehydglutamic acid đồng thời tách ra phosphate.

3. Chất này được amine hóa nhờ enzyme transaminase ở vị trí δ-carbon, tạo nên ornithine.

4. Chất này được khử amine hóa nhờ 1 enzyme transaminase ở vị trí α-carbon làm xuất hiện α-ceto-δ-amino-valeric acid.

5. Qua sự ngưng tụ một vòng 5 cạnh được tạo nên (pyrrolidincarbonic acid)

6. Chất này được khử thành proline nhờ NADPH.

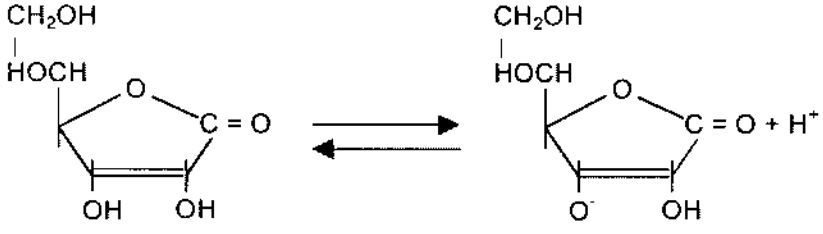


Hình 7.11. Các con đường phản ứng của họ glutamic

Bảng 7.5. Những aminoacid quan trọng nhất của các họ aminoacid

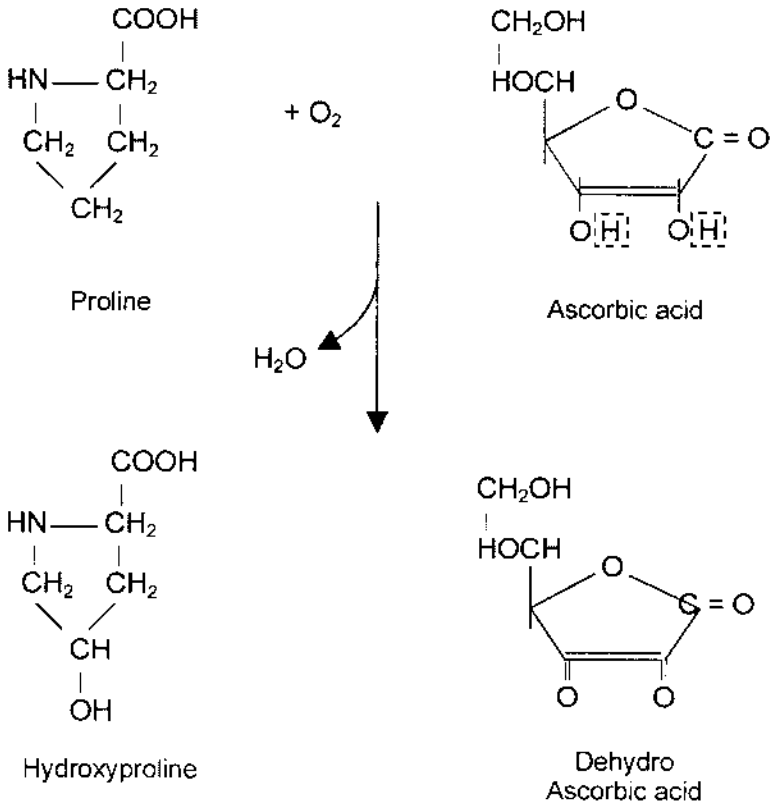
Họ glutamic	Họ aspartate	Họ pyruvate	Họ serine	Họ aminoacid thơm
Glutamate	Aspartate	Alanine	Serine	Phenylalanine
Ornithine	Lysine	Valine	Glycine	Tyrosine
Arginine	Methionine	Leucine	Cysteine	Tryptophan
Proline	Threonine			
Hydroxyproline	Isoleucine			

Arginine cũng thuộc vào họ glutamic acid có thể được tổng hợp nên từ ornithine. Hydroxyproline được tổng hợp từ proline nhờ một "oxidase có chức năng hỗn hợp". Chất cho H là ascorbic acid (vitamin C). Như sơ đồ dưới đây nhóm OH định vị ở C_3 của ascorbic acid có khả năng phân ly một H^+. Phân tử này có đặc tính acid. Giá trị pK của nó là 4,2. Ascorbic acid tham gia vào phản ứng với proline khi tách ra phân tử O_2, trong đó nó cung cấp nguyên tử H cần thiết cho sự tạo H_2O tương ứng.



Ascorbic acid Ascorbate

Sự hydroxyl hóa proline xảy ra không phải ở những phân tử proline riêng biệt, mà xảy ra sau khi phân tử proline đã tham gia cấu tạo protein. Ở dạng này hydroxylproline là thành phần quan trọng của collagen và elastin. Nếu thiếu aminoacid này sẽ dẫn đến sự rối loạn trong các mô liên kết, mô chống đỡ (xương, răng) và gân. Khi thiếu vitamin C thì việc xây dựng các mô này bị tổn thương (bệnh hoại huyết). Sự rối loạn này được giải thích là thiếu chất cho H, ascorbic acid, để tổng hợp hydroxylproline từ proline.



Proline và hydroxylproline là những aminoacid dị vòng. Ở đây nguyên tử N ở dạng NH. Mặc dù vậy người ta không gọi nó là iminoacid, vì nó thể hiện như aminoacid. Thực tế nguyên tử H bị thiếu được thay thế bởi một chất khác. Ở iminoacid có nhóm imine, ở đây nguyên tử N kết hợp với C bằng một liên kết đôi (HN=C).

Các aminoacid thơm được tổng hợp từ phosphoenolpyruvate và erythrosophosphate. Sự tổng hợp phức tạp này không nêu lên ở đây. Một sản phẩm trung gian quan trọng của quá trình này là shikimic acid.

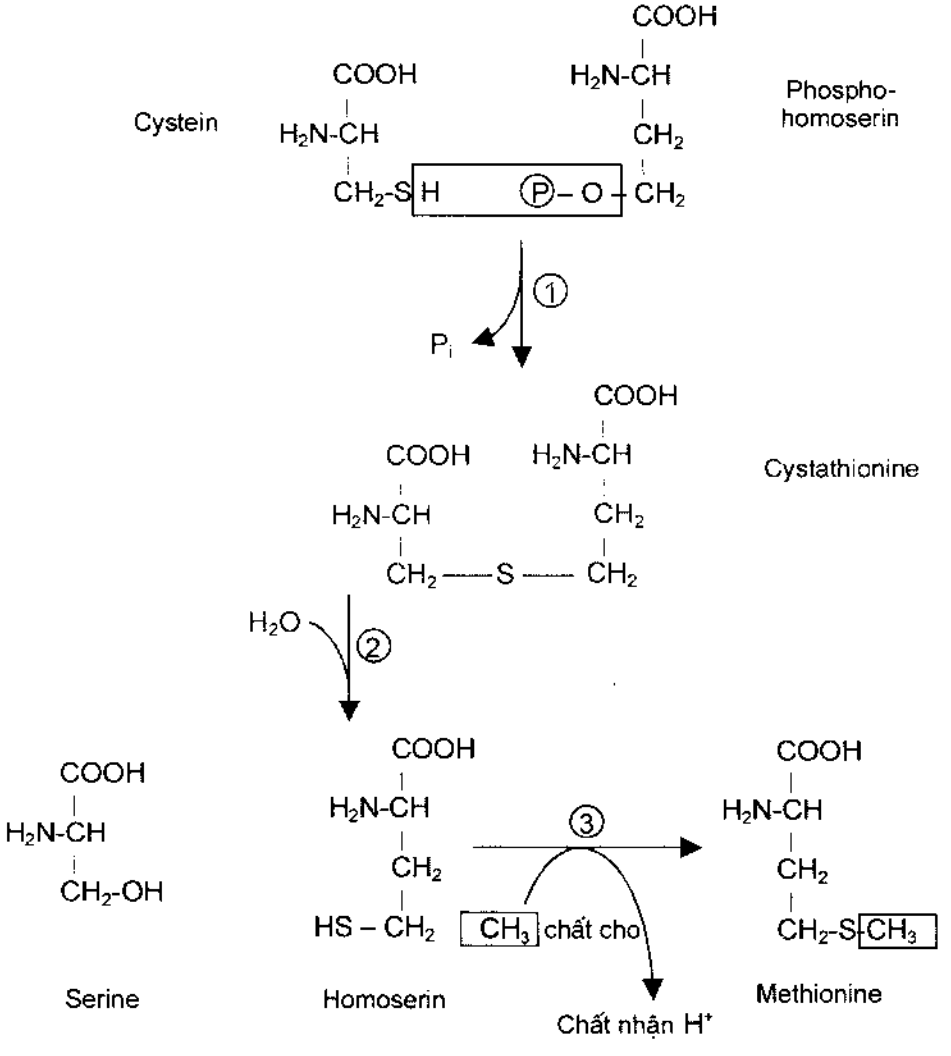
Để tổng hợp cysteine, một aminoacid chứa S, cần khử sulfate. Quá trình này chỉ xảy ra ở thực vật và các vi sinh vật khác nhau, tương tự quá trình khử nitrate, không xảy ra ở động vật.

Sản phẩm đầu tiên của sự khử sulfate là aminoacid chứa S, cysteine. Nó cung cấp S cho tổng hợp những aminoacid quan trọng chứa S khác: methionine. Quá trình phản ứng chỉ ra ở hình 7.12.

1. Phosphohomoserine, một hợp chất tương tự như serine, phản ứng với cysteine để tạo thành cystathionine và tách ra phosphate vô cơ.

2. Cystathionine được tách ra thành serine và homocysteine bằng phản ứng thuỷ phân.

3. Nhờ có chất cho nhóm CH_3 nguyên tử H của nhóm SH của homocysteine (chất này giống cysteine) được thay thế bằng một nhóm methyl. Methionine được tạo thành.



Hình 7.12. Tổng hợp methionine

7.6. Quá trình khử nitrate

Những nguyên tố cơ bản của carbohydrate và lipid là C, H và O. Ngoài ra còn có các nguyên tố S và P trong phospholipid và sulfolipid, nhưng chúng không phải là các nguyên tố cơ bản. Trong protein và nucleic acid, N là nguyên tố không thể thiếu được. Trước khi đề cập kỹ hơn trao đổi chất của chúng, chúng ta cần tìm hiểu các đại phân tử, các chất trao đổi, các chất hữu cơ có trọng lượng phân tử thấp được tạo nên từ các chất vô cơ như thế nào. Sơ đồ sau đây đưa ra 4 "đường hướng phản ứng": tổng hợp polysaccharid, lipid, protein và nucleic acid. Polysaccharid, lipid, protein và nucleic acid có khả năng tạo nên những phức hợp lớn là những thành phần của tế bào như thành tế bào, màng tế bào, enzyme và ribosome.

Thực vật và một số sinh vật tiền nhân có khả năng tổng hợp chất hữu cơ từ những chất vô cơ nghèo năng lượng. Cũng như vậy đối với sự cố định nitơ vô cơ.

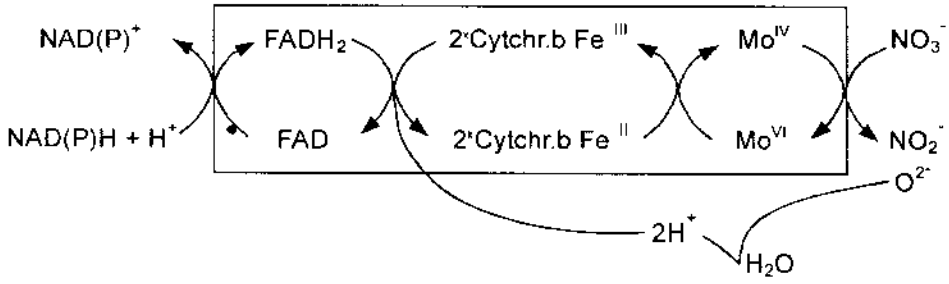
H_2O	→ Phospho-glyxerate Oxaloacetate	→ Mono-saccharide	→ Poly-saccharide	→ Thành tế bào	
CO_2	→ Acetate Malonate	→ Glycerine Acid béo	→ Lipid	→ Màng sinh học	
N_2 NH_3	→ Axit α-oxoacid	→ Aminoacid	→ Protein	→ Enzyme	→ Tế bào
NO_3^-	→ Ribose Carbamyl-phosphate	→ Nucleotide	→ Nucleic acid	→ Ribosome	
Các hợp chất vô cơ	Hợp chất trung gian	Đơn phân	Hợp chất cao phân tử	Các kết hợp đại phân tử	
MG	50 - 250	100-300	10^3 - 10^8	10^6 - 10^9	

Nitơ ở dạng NH_3, NO_3^- và một phần ở dạng N_2 có thể được đồng hoá. Sự đồng hóa trực tiếp thực chất là sự kết hợp NH_3 với một phân tử hữu cơ. Nitrate và N_2 trước hết được chuyển sang NH_3. Hai quá trình này sẽ được đề cập ở phần sau đây.

Quá trình khử nitrate và nitrite là chuyển NO_3^- thành NH_3 qua NO_2^-, được xúc tác bởi 2 enzyme khác nhau là nitratreductase và nitritreductase.

Nitratreductase là enzyme phổ biến trong vi khuẩn, nấm, thực vật bậc cao và thực vật bậc thấp. Ở những nhóm sinh vật khác nhau thì enzyme này có những đặc tính khác nhau. Chức năng chủ yếu là khử NO_3^- thành NO_2^-.

Nhóm prosthetic của enzyme này ở thực vật bậc cao là FAD, cytochrome b và Mo. Trình tự phản ứng có phần tương tự chuỗi enzyme hô hấp, được biểu diễn ở trong hình 7.13. NADH, ở một số loài sinh vật là NADPH chuyển e^- đến FAD, tạo thành $FADH_2$, sau đó điện tử này được chuyển đến cytochrome b, cytochrome b ở trạng thái khử, khử Mo^{6+} thành Mo^{4+}. Mo^{4+} có khả năng kéo một nguyên tử O của NO_3^- và khử để tạo thành NO_2^-. Oxy ở dạng khử phản ứng trực tiếp với proton để tạo thành H_2O. Trong sơ đồ $2H^+$ được giải phóng ra trong quá trình oxy hóa khử giữa $FADH_2$ và cytochrome b (hình 7.13).



Tổng quát: $NAD(P)H + H + NO_3^- \rightarrow NO_2^- + H_2O + NAD(P)^+$

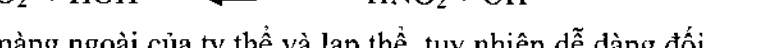
Hình 7.13. Trình tự phản ứng của nitratreductase

Enzyme này định vị trong tế bào chất và dạng khử của nó được tạo nên từ quá trình đường phân (khử aldehydphosphoglyxeric thành phosphoglyxeric acid), ở thực vật C_4 bằng sự oxy hóa malate thành oxaloacetate. Hoạt tính của enzyme nitratreductase bị ảnh hưởng mạnh bởi ánh sáng, nguyên nhân là do chất khử của nitratreductase được giải phóng trực tiếp từ lục lạp. Ở đây lục lạp tiếp nhận oxaloacetate hoặc phosphoglyxerate, trong quá trình quang hợp được khử thành malate và aldehydphosphoglyxeric. Hai chất này được đưa ra lại tế bào chất. Ở đây chúng bị oxy hóa có sự tham gia của NAD^+ để tạo thành NADH. Cơ chế này đặc biệt có ý nghĩa ở thực vật C_4, vì ở chúng một lượng đáng kể chất khử được tạo thành từ malate đi ra từ lục lạp.

Hoạt tính của enzyme nitratreductase bị ảnh hưởng bởi các chất khác nhau. Nitrate hoạt hóa mạnh mẽ, ngược lại NH_4^+ và các aminoacid kìm hãm enzyme này. Enzyme này có nửa thời gian tồn tại là một số giờ, vì vậy nó phải luôn luôn được tổng hợp mới. Sự tổng hợp này phụ thuộc vào cường độ ánh sáng.

Bên cạnh nitratreductase đồng hóa như đã nêu trên, người ta còn biết một loại nitratreductase hô hấp. Loại này có mặt chủ yếu trong vi sinh vật và được tạo nên đặc biệt trong điều kiện yếm khí. Chức năng của nó là khi không có O_2, điện tử bắt nguồn từ chuỗi enzyme hô hấp kết hợp với nguyên tử O của NO_3^-. Trong trường hợp này NO_3^- thay thế nguyên tử oxy trong chuỗi hô hấp. Nitratreductase hô hấp này gắn chặt với màng và cùng tồn tại với cytochrome, bị ức chế bởi O_2. Ngược với nitratreductase đồng hóa không kết hợp và mẫn cảm với O_2, nitratreductase hô hấp là enzyme xúc tác quá trình phản nitrate hoá. Phản nitrate hóa được hiểu là khử NO_3^- cho tới N_2O và N_2. Quá trình này xảy ra chủ yếu trong đất, nước trong điều kiện yếm khí và có vai trò quan trọng trong tự nhiên. Sự khử NO_3^- theo kiểu hô hấp tạo thành NO_2^- xảy ra trong hệ thống tiêu hóa người và động vật.

NO_2^- được tạo ra nhờ enzyme nitratreductase trong tế bào chất của tế bào thực vật là một anion của một acid yếu. Vì vậy một phần NO_2^- tạo nên được proton hóa và thể hiện ở cân bằng phương trình sau:



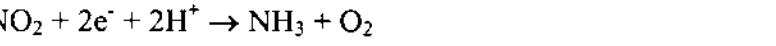
$$NO_2^- + HOH \rightleftharpoons HNO_2 + OH^-$$

NO_2^- khó đi qua màng ngoài của ty thể và lạp thể, tuy nhiên dễ dàng đối với HNO_2. Lục lạp và ty thể tiếp nhận chủ yếu HNO_2 và làm cho tế bào chất bị kiềm hoá. Sự kiềm hóa này làm tăng sự tổng hợp các anion hữu cơ.

Trong ty thể xảy ra sự khử HNO_2 thành NH_3. Enzyme nitritreductase gồm một chuỗi polypeptide với một siroheme (cùng tồn tại Fe và S) và một phức hệ 4 nguyên tử Fe-S.

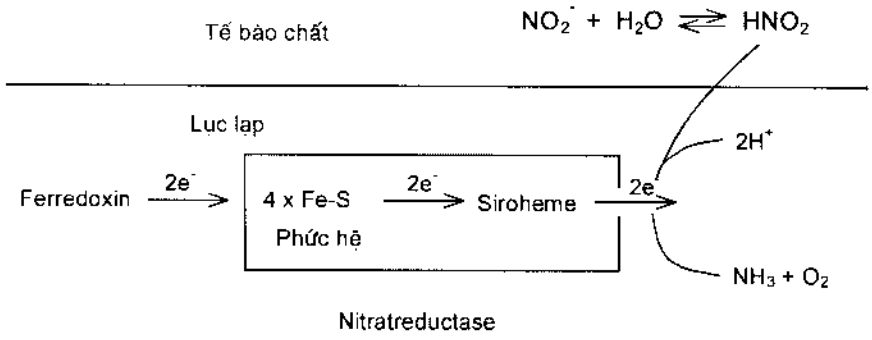
Trình tự phản ứng của nitritreductase được chỉ ra trong hình 7.14. Trong lục lạp chất khử trực tiếp là ferredoxin. Ở đây có một sự kết hợp chặt chẽ giữa quang hợp và khử nitrate.

Phản ứng xảy ra như sau:



$$HNO_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow NH_3 + O_2$$

Trong các cơ quan thực vật không có màu xanh, như rễ cây, NO_2^- cũng được khử đến NH_3. Một thời gian dài quá trình này đã không được giải thích, vì ở những bộ phận không có màu xanh, đặc biệt là rễ cây không có ferredoxin, cho đến khi những kết quả mới chỉ ra rằng, trong ty thể của rễ có một ferredoxin tương tự hệ thống oxy hóa khử có khả năng khử HNO_2 thành NH_3. Hệ thống khử này chứa chất khử là NADH hoặc NADPH.



Tổng quát: $HNO_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow NH_3 + O_2$

Hình 7.14. Trình tự phản ứng của nitratreductase

Hoạt tính của nitritreductase được kích thích bởi nitrite và nitrate. Nồng độ nitritreductase cao hơn nồng độ nitratreductase, đó là nguyên nhân tại sao khi cung cấp nhiều nitrate cho cây dẫn đến sự tích luỹ nitrate mà không tích luỹ nitrite. Sự tích luỹ nitrate xảy ra khi thực vật được bón quá nhiều nitrate hoặc khi ánh sáng cho quang hợp yếu.

Trong trường hợp ánh sáng yếu thì thiếu chất khử. Đó là nguyên nhân tại sao đối với giống rau ba lăng những giờ buổi sáng thì có nồng độ nitrate cao hơn buổi chiều. Ban đêm chủ yếu là phosphoglycerate và một ít triosephosphate đi ra khỏi lục lạp. Ban ngày thì ngược lại. Triosephosphate có khả năng khử NAD^+ thành NADH khi phân giải theo quá trình đường phân để cung cấp chất khử cho quá trình khử nitrate. Ngược lại phosphoglycerate không thể khử NAD^+ và như vậy không cung cấp NADH cho quá trình khử nitrate.

Nồng độ nitrate cao thường gặp ở trong những bộ phận sinh trưởng dinh dưỡng và ở đây có thể ảnh hưởng đến sinh lý dinh dưỡng. Đặc biệt đối với những sản phẩm thực vật được dùng để ăn sống như xà lách, bắp cải, cà rốt. Thực ra nitrate không có hại nhưng trong quá trình bảo quản vi sinh vật biến đổi thành nitrite và trong cơ thể người, đặc biệt trong tuyến nước bọt nitrate được khử thành nitrite. Trong môi trường acid tạo thành HNO_2, nó có thể được tách thành nitrosyl và hydroxyl.

$$HNO_2 = HO\text{—}N = O \rightleftarrows OH^- + NO^+$$

Cation nitrosyl (NO^+) có khả năng oxy hóa Fe^{2+} của hemoglobin bằng cách lấy đi $1e^-$ của Fe.

$$Fe^2\text{-heme} + NO^+ \rightarrow Fe^3\text{-heme} + NO$$

Hemoglobin ở dạng oxy hóa không thể kết hợp và vận chuyển O_2, dẫn đến sự ngạt thở. Hiện tượng này gặp ở người trong một số tháng đầu vì sau đó cơ thể phát triển enzyme có khả năng khử hemoglobin ở dạng oxy hoá.

7.7. Quá trình cố định nitơ phân tử

Chỉ sinh vật tiền nhân mới có khả năng cố định N_2, đó là 11 trong 47 họ vi khuẩn và 6 trong 8 họ vi khuẩn lưu huỳnh. Một số sống tự do, một số sống cộng sinh với thực vật bậc cao. Những vi sinh vật cố định đạm quan trọng nhất là:

- *Rhizobium*, sống cộng sinh với cây họ đậu.

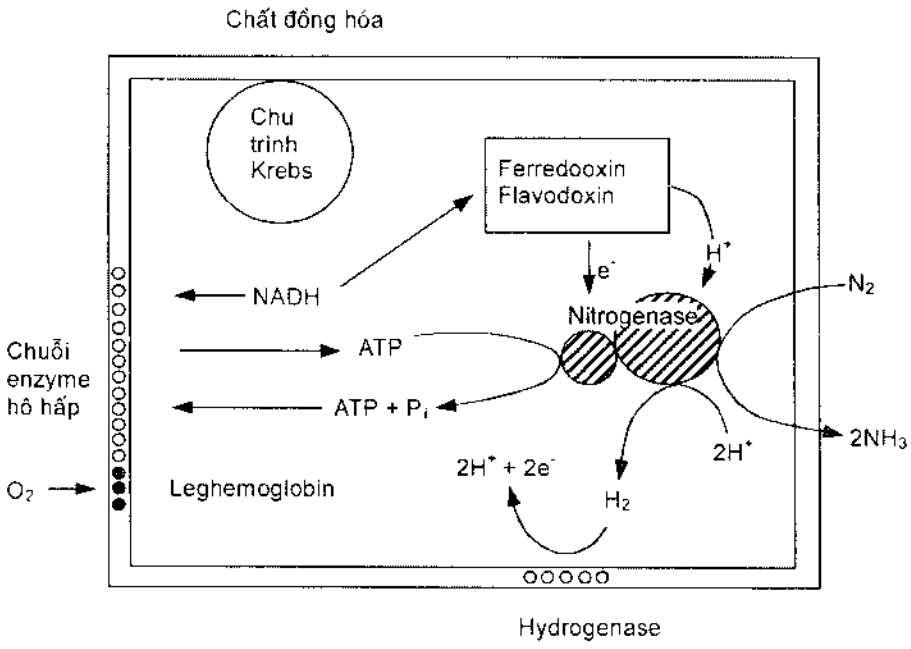
- *Bradyrhizobium*, sống cộng sinh với cây họ đậu, chúng khác với *rhizobium* ở chỗ là sinh trưởng chậm hơn.

- Loài *frankia*, vi khuẩn sống trong đất.

- Vi khuẩn lưu huỳnh heterocysten sống cộng sinh với các loài thực vật khác nhau như với bèo hoa dâu (*azolla*) ở lá.

Những loài vi sinh vật sống cộng sinh và tự do có chứa gen Nif trong hệ gen (Ni là viết tắt của Nitrogen và f là fixing). Gen này mã hóa cho enzyme nitrogenase, là một đa enzyme, xúc tác cho phản ứng cố định N_2, khử N_2 thành NH_3. Nitrogenase gồm 2 protein chứa Fe-S, protein nhỏ hơn có trọng lượng phân tử 60 kDa, chứa một chùm Fe-S có 4 nguyên tử, phân tử protein lớn hơn có trọng lượng phân tử 220 kDa và chứa nguyên tử S linh động, 36 nguyên tử Fe và 2 nguyên tử Mo. Phân tử protein nhỏ hơn có chức năng vận chuyển e^-, trong đó e^- của ferredoxin hoặc flavodoxin vận chuyển lên phức hệ Fe-Mo (hình 7.15).

Sự vận chuyển e^- này cần năng lượng, do ATP cung cấp. ATP kết hợp với protein chứa Fe qua một cầu Mg và sau đó được thuỷ phân thành ADP và Pi. Sự thuỷ phân đã làm thay đổi hình dạng của protein enzyme, e- được vận chuyển lên phức hệ Fe-Mo. Để vận chuyển $1e^-$ cần 2 ATP. Phức hệ Fe-Mo thực chất là một N_2-reductase. Phức hệ nhỏ hơn được gạch chéo là một protein chứa Fe, phức lớn hơn là protein chứa Fe/Mo, phức lớn này thực chất là dinitrogen-reductase (hình 7.15).

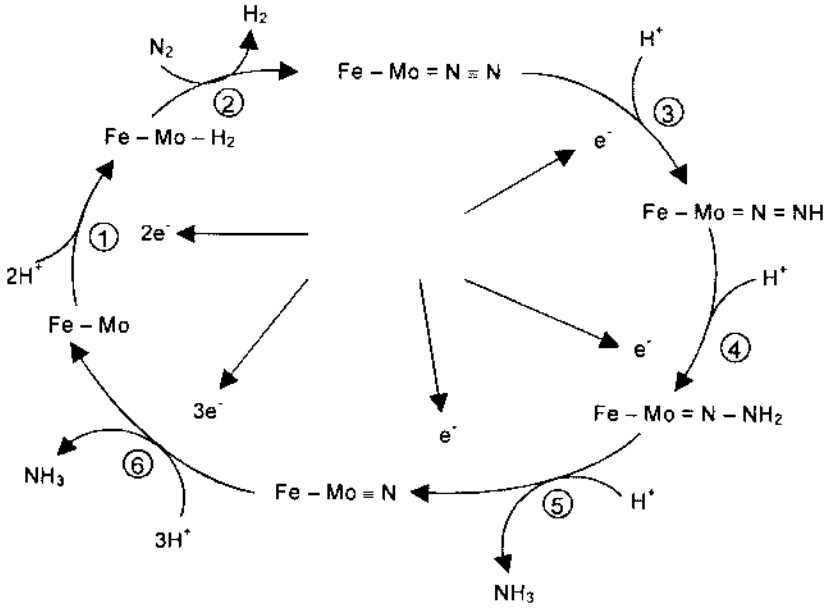


Hình 7.15. Các phản ứng xảy ra ở bacteroid của vi khuẩn rhizobium

Để vận chuyển e^- từ phức Fe/Mo đến N_2 thì sự thay đổi hóa trị Mo có một vai trò quan trọng, như ở hình 7.16.

1. $2e^-$ và $2H^+$ được kết hợp với nguyên tử Mo
2. Nguyên tử H_2 đang gắn với enzyme bị đẩy ra bởi N_2
3. N_2 được khử thành -N=N do tiếp nhận $H^+ + e^-$
4. -N=N được khử thành =N-NH_2 do tiếp nhận $H^+ + e^-$
5. =N-NH_2 được khử thành NH_3 do tiếp nhận $H^+ + e^-$, NH_3 được tách ra khỏi phức hệ enzyme
6. Nguyên tử N đang gắn với enzyme được khử thành NH_3 do tiếp nhận $3e^-$ và $3H^+$ và sau đó NH_3 được tách ra khỏi phức hệ.

Sự gắn N_2 với phức hệ Fe-Mo cần một liên kết trước đó của phức hệ này với H_2. Vì vậy kết quả là bên cạnh tạo ra NH_3 ngoài ra còn xuất hiện H_2, phân tử này có thể được tách ra thành H^+ và e^- và e^- này được đưa trở lại hệ thống (hình 7.16).



Tổng quát: $8H^+ + 8e^- + N_2 \rightarrow H_2 + 2NH_3$

Hình 7.16 Sự khử N_2 thành NH_3 ở phức hệ Fe-Mo của nitrogenase

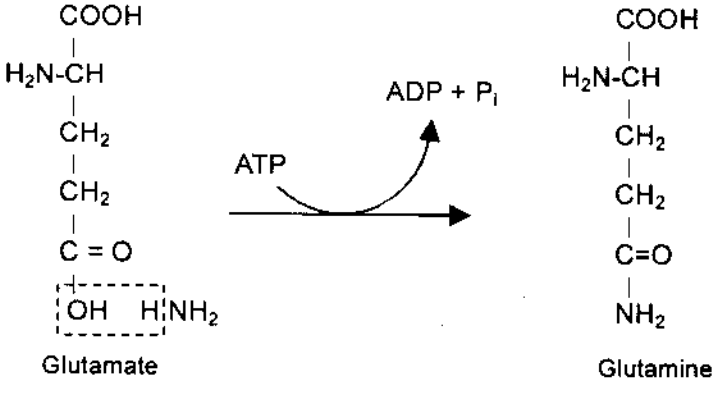
Ở *rhizobium* và *bradyrhizobium* hệ thống nitrogenase được biểu diễn ở hình 7.15, hệ thống này định vị ở bacteroid được tìm thấy trong "không bào nhiễm" của những tế bào nốt sần. Bacteroid tương tự một cơ quan và có thể so sánh với ty thể. Nó được cung cấp các hợp chất carbon hữu cơ, chủ yếu là anion hữu cơ (succinate, malate, pyruvate) bởi tế bào chất của ký chủ, những chất này được tiếp tục phân giải trong chu trình Krebs. Ở đây xuất hiện NADH, được sử dụng một phần là chất cho điện tử ferredoxin và flavodoxin, một phần được sử dụng làm nguyên liệu hô hấp. Hệ thống oxy hóa khử của chuỗi hô hấp cấu tạo nên màng. Chúng cung cấp ATP và ATP cần cho sự hoạt hóa enzyme nitrogenase. Chuỗi hô hấp được cung cấp O_2 bởi leghemoglobin. Phức hệ protein chứa heme có trong không bào nhiễm này có thể so sánh với myoglobin trong mô cơ hoặc hemoglobin trong máu. Nó cung cấp O_2 cho chuỗi enzyme hô hấp và nó kiểm soát O_2 đi vào bacteroid. Sự kiểm soát này rất quan trọng, vì enzyme này bị ức chế bởi O_2.

NH_3 được tạo nên bởi nitrogenase được đưa đến tế bào chất của tế bào chủ và ở đây được sử dụng để tổng hợp nên aminoacid. Sự tổng hợp enzyme nitrogenase được điều khiển bởi enzyme glutamate synthetase, xúc tác cho tổng hợp glutamin từ NH_3. Nếu trong hệ thống có ít NH_3 thì glutamate

synthetase kích thích tổng hợp nitrogenase, nồng độ NH_3 cao ức chế sự tổng hợp nitrogenase. Cơ chế điều khiển này rất có ý nghĩa, tuy nhiên khi cung cấp NH_3 dư thừa thì nitrogenase không được sử dụng, vì đã có đủ NH_3. Vì vậy bón phân đạm ức chế sự tạo thành nốt sần của cây họ đậu. Ở vi khuẩn *rhizobium* sống cộng sinh, NH_3 tạo thành được đưa nhanh đến tế bào chủ, nên sự tổng hợp nitrogenase hầu như không bị kìm hãm. Hơn nữa vi khuẩn trong tế bào chủ luôn được cung cấp bởi những anion hữu cơ. Đó là những nguyên nhân quan trọng nhất, tại sao sự cộng sinh vi khuẩn/cây họ đậu có tỷ lệ cố định N_2 cao. Ví dụ cây cỏ (*trifolium pratence*) sống cộng sinh với vi khuẩn trong điều kiện sinh trưởng tốt có thể cố định 300-400 kg N/ha/năm. Vi khuẩn sống tự do tỷ lệ cố định nitơ bị ảnh hưởng do sự tích luỹ NH_3 ở trong tế bào vi khuẩn và sự cung cấp không đầy đủ carbon hữu cơ. Loài vi khuẩn cố định nitơ sống tự do cần cho sự trao đổi chất của chúng những hợp chất hữu cơ dễ phân giải, như đường và các acid hữu cơ, thường có trong đất với lượng không đủ. Vì vậy khả năng cố định đạm của vi khuẩn sống tự do cơ bản là thấp. Những vi khuẩn lưu huỳnh tự dưỡng thuộc loài *anabaena*, *nostoc* và *rivularia* tự đồng hóa CO_2 bằng quang hợp và cố định N_2. Khả năng cố định N_2 bị ảnh hưởng rất nhiều khi nồng độ O_2 cao.

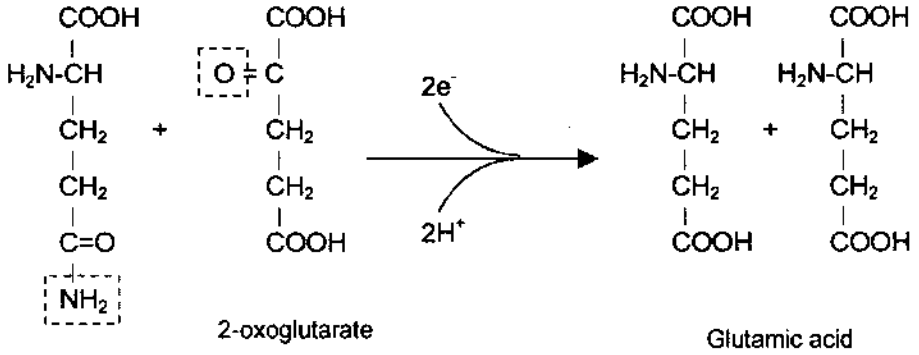
7.8. Các đường hướng biến đổi NH_3- chu trình ornithine

Sự khử nitrate-nitrite và hệ thống nitrogenase sản sinh NH_3, sau đó NH_3 kết hợp với một phân tử hữu cơ, thường là α-cetoglutaric acid hoặc glutamic acid. Xúc tác cho phản ứng gắn NH_3 này ở thực vật bậc cao và bậc thấp là glutmate synthetase (GS), enzyme này thường hoạt động trong một nhóm. Glutmate synthetase là một protein có 8 tiểu đơn vị với trọng lượng phân tử từ 350 đến 400 kDa. Người ta biết có 2 loại enzyme đồng phân, một loại có trong tế bào chất (GS1) và một loại có trong lục lạp. Phản ứng do glutmate synthetase xúc tác như sau:



Chất nhận NH_3 là glutamate. Trong phản ứng, enzyme được phosphoryl hóa (kinase) và sau đó được khử phosphoryl hóa (phosphatase). Cả hai phản ứng về tổng quan là sự thuỷ phân ATP. Sản phẩm phản ứng là glutamine, một amide. Một phân tử tương tự glutamine là asparagine, được tạo nên tương tự glutamine. Tuy nhiên nó không phải là chất nhận NH_3 quan trọng.

Vai trò trung tâm của glutmate synthetase đối với sự đồng hóa NH_3 được giải thích glutamine là chất cho nhóm NH_2 khi tổng hợp glutamate. Ở đây α-cetoglutaric acid là chất nhận, được chỉ ra như sau:



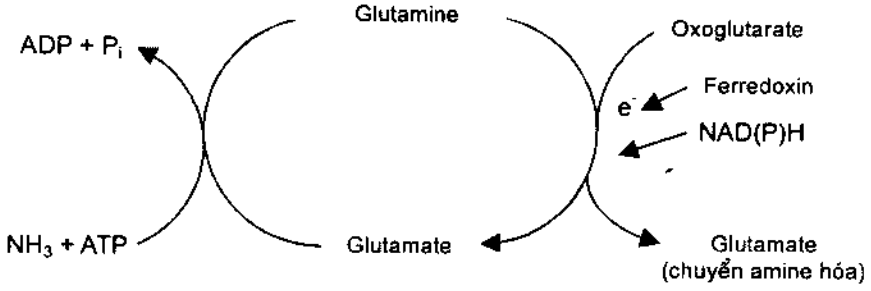
Các chất tham gia phản ứng trao đổi một nhóm NH_2 với nguyên tử O. Ở mỗi sản phẩm tạo thành thiếu một nguyên tử H, được ferredoxin hoặc NAD(P)H cung cấp. Bằng cách này từ glutamine và α-cetoglutaric acid 2 phân tử glutamate được tạo nên. Quá trình này gồm sự chuyển nhóm amine và sự khử. Phản ứng được xúc tác bởi glutamate synthetase.

Glutamate synthetase có hai loại isoenzyme có cấu tạo khác nhau. Glutamate synthetase phụ thuộc vào ferredoxin là một flavoprotein chứa Fe-S có trọng lượng phân tử 140-230 kDa, enzyme này có trong lục lạp, nhận chất khử qua ferredoxin trực tiếp từ quang hợp. Glutamate synthetase có trong tế bào chất có trọng lượng phân tử khoảng 240 kDa. Chất khử của nó là NADH (từ đường phân) hoặc NADPH (từ oxy hóa trực tiếp glucose). Cả 2 enzyme glutamate synthetase và glutamine synthetase hoạt động trong một nhóm, làm cho quá trình phản ứng thành một vòng tròn, như hình 7.17.

Tổng quát chu trình chỉ ra rằng α-cetoglutaric acid được amine hóa nhờ NH_3 với sự tiêu tốn 1 ATP và $2e^-$. α-cetoglutaric acid (oxoglutarate) có nguồn gốc từ chu trình Krebs. Sản phẩm của phản ứng là glutamate, có ý nghĩa quan trọng, vì nhờ chuyển amine hóa mà nhóm amine được chuyển đến một chất khác (cetoacid, aldehyd). Hầu hết nitơ có trong thực vật xảy ra

qua phản ứng này, một lần có trong nhóm amine của glutamate. Glutamate synthetase là một glutamine-oxoglutarate-aminotransferase, được gọi tắt là GOGAT. Vì vậy người ta gọi chu trình tổng hợp glutamate là con đường phản ứng GOGAT.

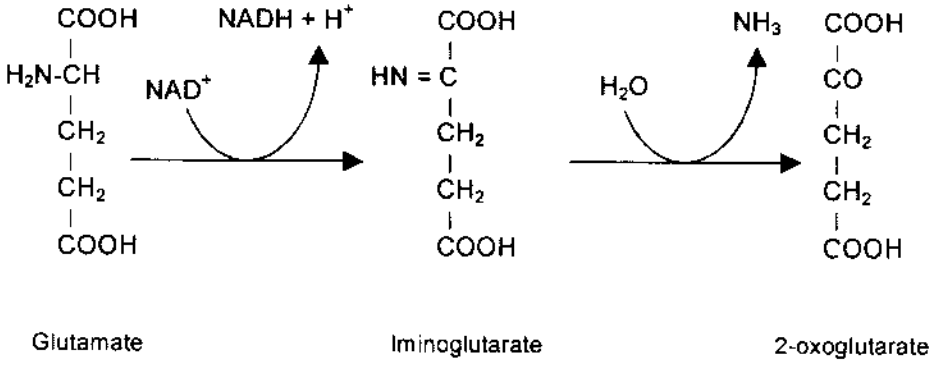
Những enzyme của chu trình tổng hợp glutamate đặc biệt có nhiều ở trong những tế bào của nốt sần. Ở đây những phân tử NH_3 được cung cấp bởi bateriod của vi khuẩn nốt sần được đồng hóa qua chu trình này. Con đường GOGAT cũng có ý nghĩa trong lục lạp của thực vật C_3. NH_3 được giải phóng ra một lượng lớn ở trong hô hấp sáng, nếu NH_3 này bay ra không khí thì đây là một sự mất mát lớn đối với thực vật. NH_3 giải phóng ra được tiếp nhận bởi chu trình tổng hợp glutamate và nitơ của nó được sử dụng lại trong trao đổi chất của thực vật ở dạng aminoacid.



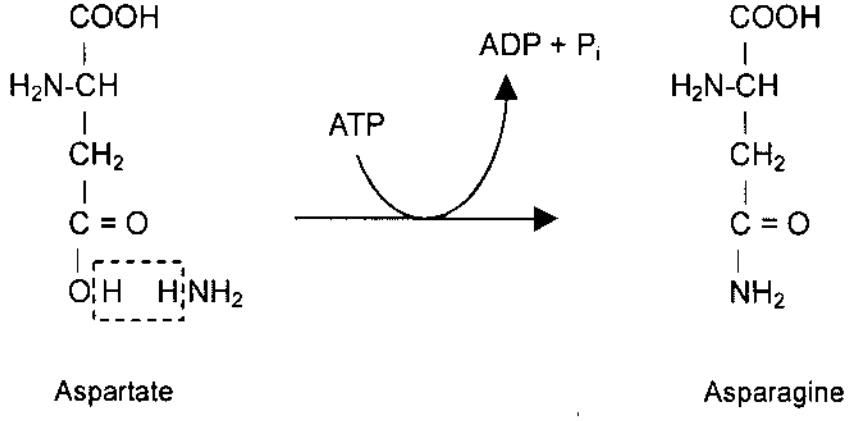
Tổng quát: $NH_3 + ATP + 2e^- + 2H^+ + Oxoglutarate$
$\rightarrow Glutamate + ADP + Pi$

Hình 7.17. Chu trình tổng hợp glutamate (con đường GOGAT)

Đã lâu người ta cho rằng enzyme glutamate dehydrogenase (GDH) cũng có ý nghĩa đối với sự đồng hóa NH_3 trong thực vật. Glutamate dehydrogenase xúc tác cho phản ứng sau:



Đây là sự khử amine hóa oxy hoá, là một quá trình giải phóng NH_3, ngược với quá trình đồng hóa NH_3. Tuy nhiên khi nồng độ NH_3 cao thì nó sẽ gây độc cho thực vật. Đối với nhiều loài vi sinh vật sự đồng hóa NH_3 nhờ GDH có ý nghĩa. Trong thực vật GDH có chủ yếu trong ty thể. NADH mà nó tạo ra có thể đi vào chuỗi hô hấp, NH_3 có thể được sử dụng cho tổng hợp asparagine nhờ enzyme asparaginsynthetase theo phương trình sau:



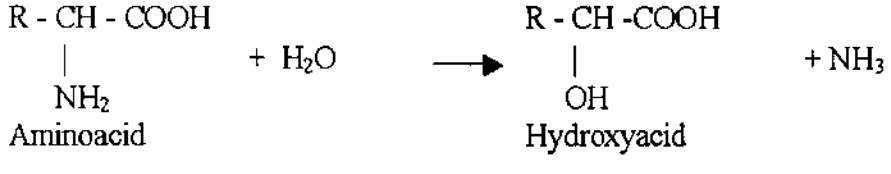
Chất nhận NH_3 là aspartate. Phản ứng này tương tự phản ứng tổng hợp glutamine. Glutamate dehydrogenase có tương đối nhiều trong mô rễ và những mô đã già. Vì vậy người ta cho rằng, ở đây nó sản sinh NH_3 và là điều kiện để tổng hợp asparagine, là dạng nitơ vận chuyển và được vận chuyển ra khỏi những mô này.

7.9. Các đường hướng tổng quát của sự biến đổi aminoacid

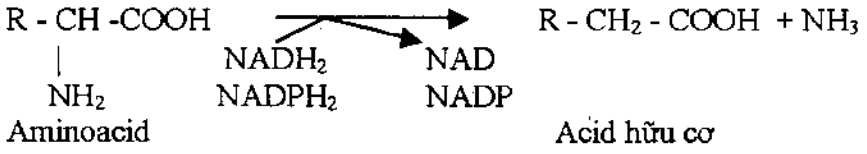
Các aminoacid về cơ bản được sử dụng để tổng hợp protein song cũng có thể chịu những sự biến đổi khác. Đó là phản ứng theo nhóm amine, carboxyl và phản ứng theo gốc R của aminoacid.

- Các phản ứng theo nhóm α-amine: là các phản ứng phân giải aminoacid thành NH_3 và các sản phẩm tương ứng theo 4 hướng cơ bản sau:

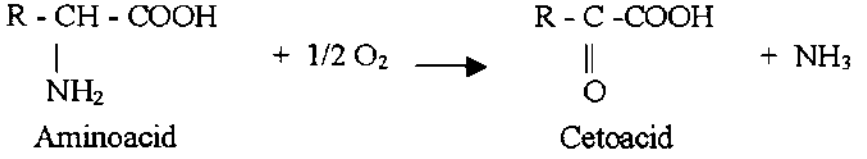
a. Khử amine hóa bằng cách thuỷ phân



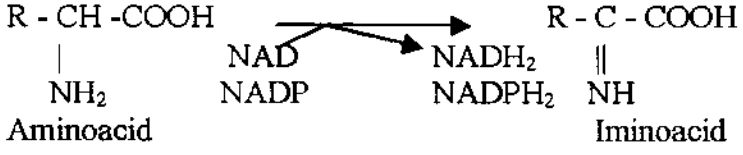
b. Khử amine hóa bằng cách khử



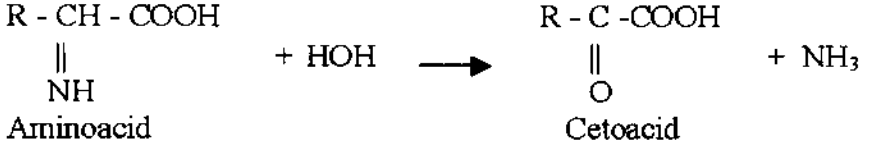
c. Khử amine hóa bằng cách oxy hoá



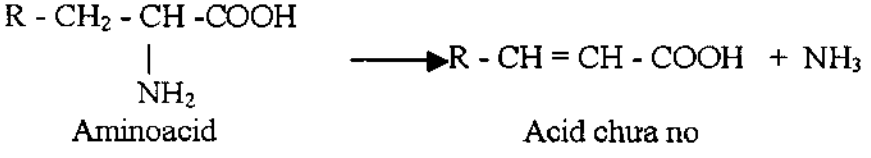
Phản ứng này tiến hành qua 2 giai đoạn: trước hết aminoacid bị loại hydro để tạo thành iminoacid tương ứng với sự tham gia của enzyme dehydrogenase



Tiếp đó iminoacid kết hợp với phân tử H_2O, NH_3 bị loại trừ và giải phóng cetoacid



d. Khử amine hóa bằng cách chuyển hóa nội phân tử

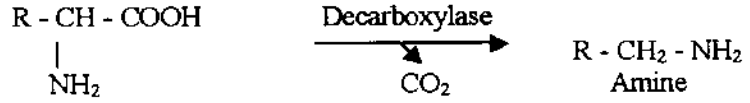


Trong các phản ứng trên thì phản ứng amine hóa bằng cách oxy hóa là phổ biến trong thực vật so với đường hướng khác. Các α-cetoacid đều là sản phẩm chủ yếu của sự khử amine hóa các aminoacid.

- Các phản ứng theo nhóm carboxyl: diễn ra chủ yếu theo hai quá trình: sự khử carboxyl hóa và sự tạo thành aminoacyl adenylate.

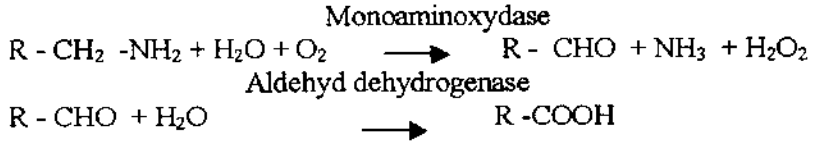
a. Quá trình khử carbocyl hóa các aminoacid

Quá trình này được thực hiện ở động vật và thực vật. Sự khử carboxyl tiến hành theo sơ đồ sau:



Sản phẩm phản ứng là các amine. Mỗi một aminoacid riêng biệt được xúc tác bởi một enzyme decarboxylase tương ứng.

Sản phẩm của sự khử carboxyl hóa các aminoacid là amine, diamine, CO_2, NH_3 và các hợp chất khác. Trừ CO_2, NH_3, tất cả các hợp chất khác đều bị phân giải tiếp tục. Nếu trong điều kiện bất lợi thì các amine và diamine tích tụ lại gây độc cho cây, trong điều kiện bình thường chúng sẽ bị oxy hóa dưới tác dụng của enzyme oxydase để tạo thành NH_3 và các aldehyd.



Các acid và aldehyd lại bị oxy hóa tiếp tục để tạo thành CO_2, H_2O và NH_3. Các sản phẩm này chính là sản phẩm cuối cùng của sự phân giải aminoacid.

b. Phản ứng theo nhóm carbocyl là quá trình tạo thành phức hợp aminoacyl-adenylate. Chi tiết cơ chế của phản ứng này trong phần sinh tổng hợp protein.

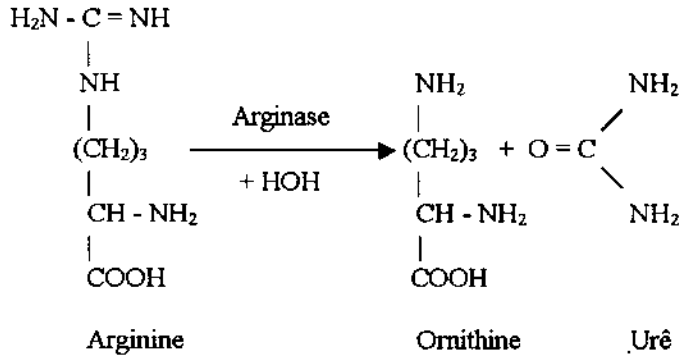
- Những chuyển hóa của phân tử aminoacid có liên quan đến gốc R trong phân tử.

Do tính muôn màu muôn vẻ của gốc R nên các phản ứng hóa học của chúng vô cùng phong phú và đa dạng. Nhiều phản ứng được thực hiện trong quá trình trao đổi aminoacid, trong đó quan trọng nhất là các phản ứng biến đổi từ một aminoacid này thành một aminoacid khác. Nhờ đường hướng này mà khả năng tổng hợp các aminoacid tăng lên rất nhiều.

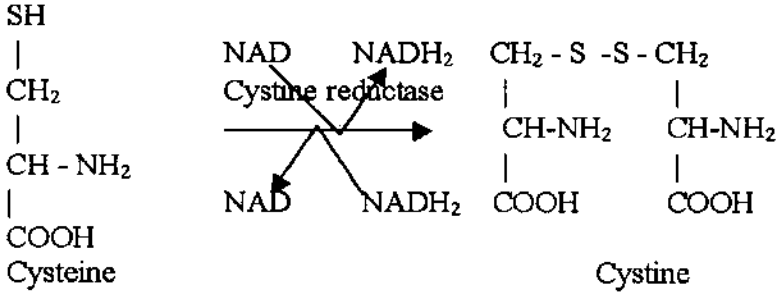
Sau đây chỉ nêu lên một số ví dụ:

Khi oxy hóa phenylalanine sẽ tạo thành tyrosine.

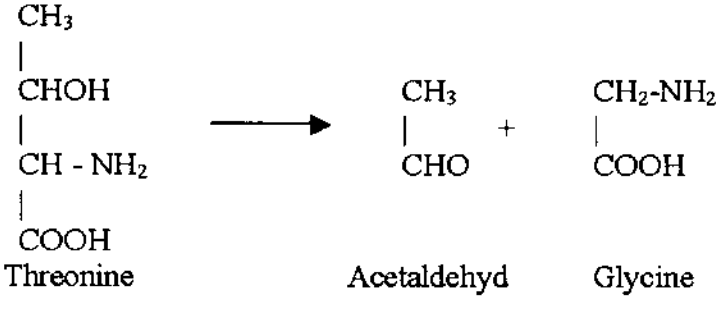
Thuỷ phân arginine thì ornithine được tạo thành và từ ornithine sẽ thu được proline hoặc glutamic acid.



Khi oxy hóa nhóm -SH của cysteine sẽ thu được cystine.

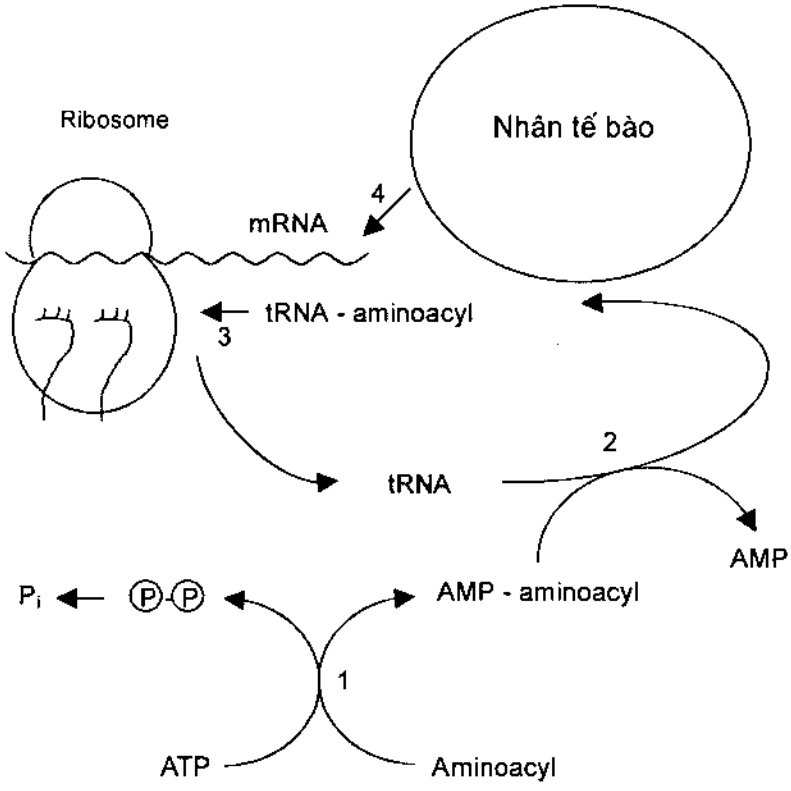


Từ threonine nếu loại trừ gốc acetaldehyd sẽ thu được glycine.



7.10. Sinh tổng hợp protein

Tham gia vào sự tổng hợp polypeptide và protein có mRNA, tRNA, rRNA, trong đó rRNA là thành phần của ribosome. Với sự tổng polypeptite thông tin di truyền được chuyển từ DNA đến polypeptide. Trước khi nghiên cứu quá trình tổng hợp protein cần phải đề cập đến từng nucleic acid và ribosome.



Hình 7.18. Sơ đồ tổng hợp protein

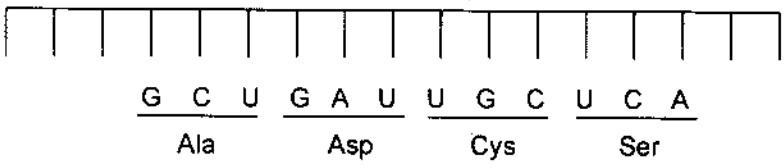
1. Nguyên liệu để tổng hợp polypeptide là các aminoacid. Để tham gia vào phản ứng chúng phải được hoạt hóa nhờ ATP, tạo nên AMP-aminoacyl.

2. Aminoacyl được chuyển lên tRNA.

3. tRNA vận chuyển aminoacyl đến ribosome. Ở đây aminoacyl tham gia tạo liên kết peptide.

4. mRNA được tổng hợp trong nhân tế bào rồi đi đến ribosome, là nơi tổng hợp polypeptide. mRNA mang thông tin cho chuỗi polypeptide, xác định trình tự của aminoacid trong chuỗi polypeptide.

Thông tin di truyền trong mRNA thể hiện ở trình tự base của chúng và 3 nucleotide đứng cạnh nhau mã hóa cho một aminoacid xác định. Các bộ ba này được gọi là codon. Dưới đây là các codon của một phần mRNA mã hóa cho alanine, aspartic acid, cysteine và serine.



Hình 7.19. Một đoạn DNA với những codon mã hóa cho alanine, aspartic acid, cysteine và serine

Bảng 7.6. Những codon trên mRNA của các aminoacid

Base thứ nhất	Base thứ hai				Base thứ ba
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term	Term	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Glu-NH_2	Arg	A
	Leu	Pro	Glu-NH_2	Arg	G
A	Ileu	Thr	Asp-NH_2	Ser	U
	Ileu	Thr	Asp-NH_2	Ser	C
	Ileu	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Term: terminal: là những codon kết thúc chuỗi polypeptide.

Ngày nay những codon mã hóa cho các aminoacid cấu tạo nên protein đã được biết. Điều rất thú vị là các mã di truyền cho tất cả mọi sinh vật từ sinh vật nhân sơ đơn giản nhất cho đến những động vật có vú là như nhau. Tuy nhiên cũng có một số ngoại lệ như ở ty thể người. Qua bảng mã di truyền ta thấy phần lớn các aminoacid được mã hóa bởi 2 codon, và các codon đó có 2 base nitơ đầu tiên giống nhau.

Ribosome được tạo nên từ rRNA và protein. Ở sự kết hợp này có sự tham gia của Mg^+. Ribosome được tạo nên từ một tiểu phần lớn và một tiểu phần nhỏ. Độ lớn của các tiểu phần được đặc trưng bởi hệ số lắng S (hệ số Svedberg).

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 \times x}$$

x là khoảng cách của trục ly tâm

ϖ = vận tốc gốc

t là thời gian

dx/dt, khoảng cách mà tiểu phần di chuyển trong đơn vị thời gian. Khoảng cách này càng dài khi tiểu phần càng nặng.

Hệ số lắng S đối với protein có độ lớn từ 1×10^{-13} đến 200×10^{-13}. Sự biến đổi đơn vị hệ số lắng của Svedberg là nhân với 10^{13}, tương ứng hệ số lắng của protein là 1-200. S càng lớn thì tiểu phần đó càng lớn (càng nặng). Bảng 7.7 chỉ hệ số lắng của các tiểu phần ribosome khác nhau và của nucleic acid.

Bảng 7.7. Hệ số lắng của các phân tử khác nhau và các kết hợp (S)

tRNA	4
mRNA	6-25
rRNA	5-23
Tiểu đơn vị nhỏ ribosome	30 (sinh vật nhân sơ)
Tiểu đơn vị lớn ribosome	50 (sinh vật nhân sơ)
Ribosome	70 (sinh vật nhân sơ)
Tiểu đơn vị nhỏ ribosome	40 (sinh vật nhân chuẩn)
Tiểu đơn vị lớn ribosome	60 (sinh vật nhân chuẩn)
Ribosome	80 (sinh vật nhân chuẩn)

Bảng 7.8. Các rRNA của ribosome của tiểu phần lớn và nhỏ của sinh vật nhân chuẩn và nhân sơ:

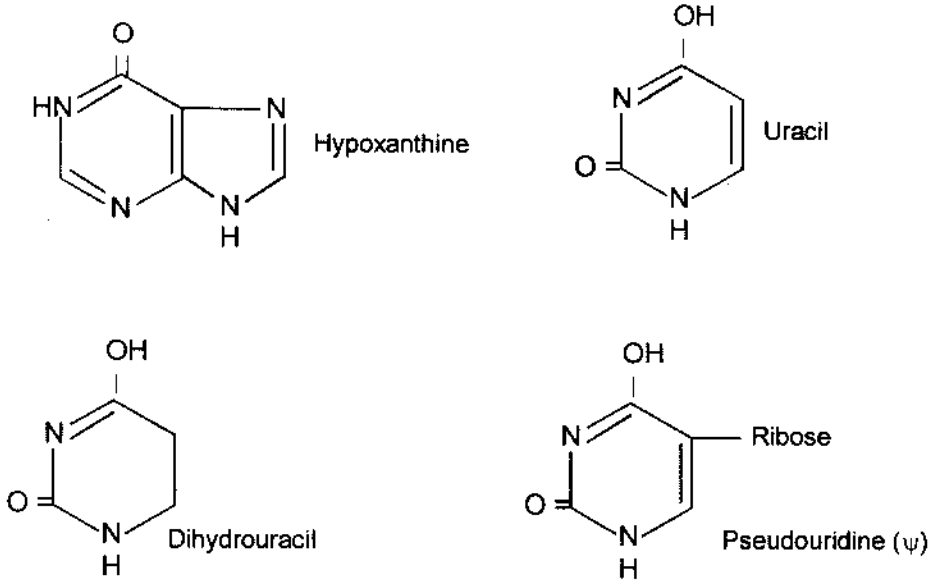
Sinh vật nhân sơ	Sinh vật nhân chuẩn
Tiểu đơn vị nhỏ 16S rRNA	Tiểu đơn vị nhỏ 18S rRNA
Tiểu đơn vị lớn 23S rRNA	Tiểu đơn vị lớn 5,8S rRNA
Tiểu đơn vị lớn 5S rRNA	Tiểu đơn vị lớn 28S rRNA
Tiểu đơn vị lớn 5S rRNA	

Bảng 7.8 cho biết độ lớn của ribosome và các tiểu đơn vị ribosome. Dựa trên đơn vị S này ta thấy ribosome của sinh vật tiền nhân nhỏ hơn sinh vật nhân chuẩn.

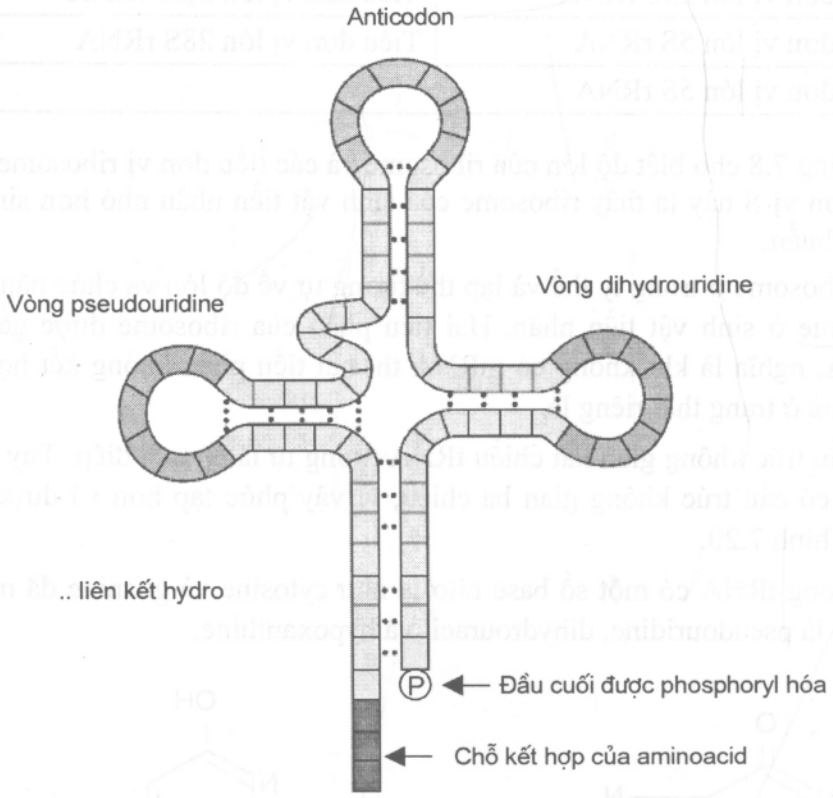
Ribosome ở trong ty thể và lạp thể tương tự về độ lớn và chức năng như ribosome ở sinh vật tiền nhân. Hai tiểu phần của ribosome được gắn với mRNA, nghĩa là khi không có mRNA thì hai tiểu phần không kết hợp với nhau mà ở trạng thái riêng lẻ.

Cấu trúc không gian hai chiều tRNA tương tự lá cỏ tam điệp. Tuy nhiên tRNA có cấu trúc không gian ba chiều, vì vậy phức tạp hơn và được biểu diễn ở hình 7.20.

Trong tRNA có một số base nitơ lạ như cytosine và guanine đã methyl hóa đó là pseudouridine, dihydrouracil và hypoxanthine.



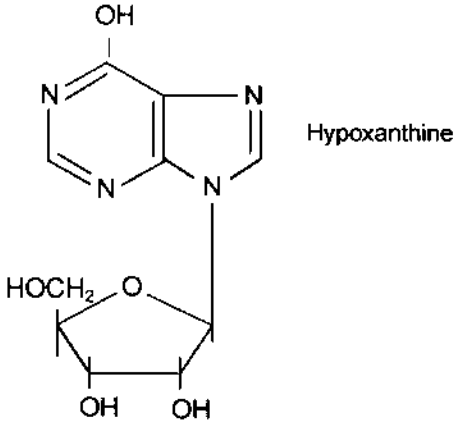
Pseudouridine liên kết với ribose không phải N-glycosid mà là C-glycosid (ở vị trí C_6 của uracil). Vì đây là những base nitơ lạ nên ở các vị trí khác nhau của tRNA không có sự cặp đôi các base. Ý nghĩa đặc biệt hơn về chức năng của tRNA là có vị trí "anticodon" và "chỗ kết hợp của aminoacyl".



Hình 7.20. Cấu trúc của tRNA với anticodon, chỗ kết hợp với aminoacyl, dihydrouridine và pseudouridine

Chỗ kết hợp của aminoacyl của tất cả các phân tử tRNA là như nhau, đó là trình tự **cytosine-cytosine-adenine**. Aminoacyl được kết hợp vào ribose của adenine. Anticodon đặc trưng cho từng loại aminoacid, là những base bổ sung cho codon ở trên mRNA. Anticodon được đọc từ phải sang trái. Đặc tính của anticodon là hai base đầu tiên đặc hiệu đối với aminoacid. Base thứ ba có thể là khác nhau, nó có thể "linh động", có nghĩa là không tạo cầu hydro với codon. Ở bảng sau anticodon C-A (codon = G-U) mã hóa cho aminoacid valine.

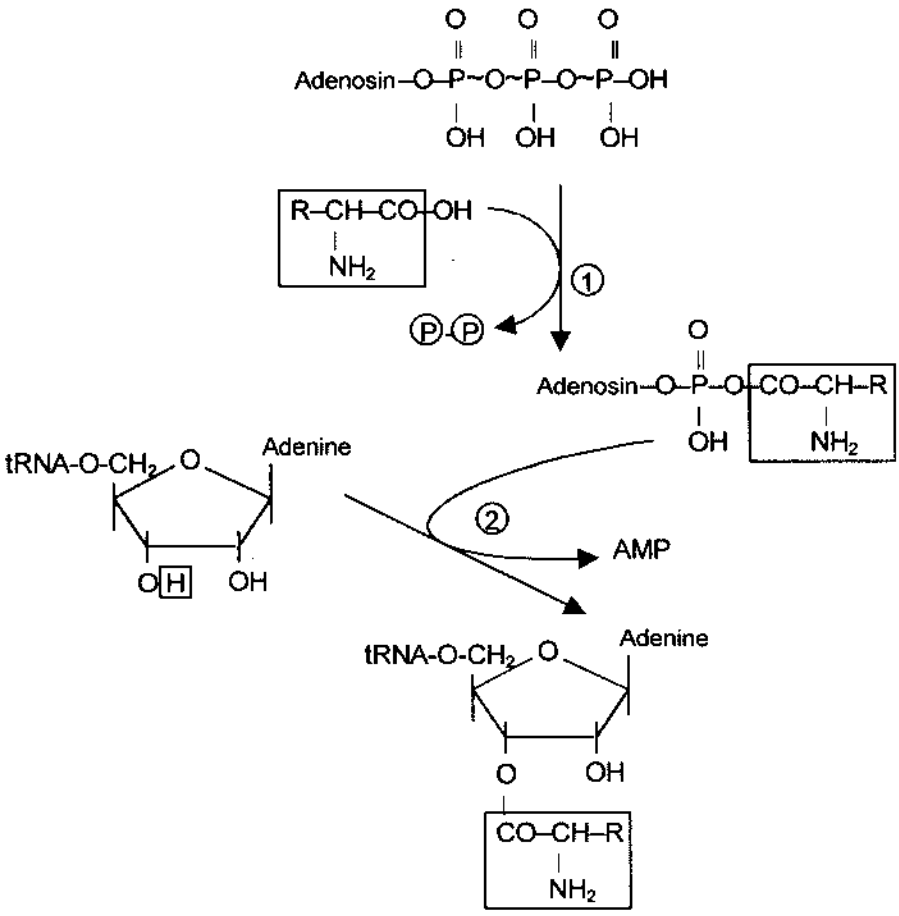
Inosine là một nucleoside được tạo nên từ hypoxanthine và ribose. Một aminoacid có nhiều tRNA đặc hiệu. Trình tự của một tRNA đặc hiệu cho một aminoacid nhất định có thể là khác nhau. Sự khác biệt trong cấu trúc bậc một của tRNA giữa nấm men và chuột đã được khẳng định.



Inosine

Trước khi aminoacid được sử dụng để tổng hợp protein chúng phải được hoạt hóa nhờ ATP, ATP kết hợp với aminoacyl và pyrophosphate được tách ra (hình 7.21).

Ở đây xuất hiện một adenosinphosphataminoacyl (aminoacid đã hoạt hoá). ATP cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình tổng hợp. Adenosinphosphataminoacyl mang gốc acyl ở ribose cuối cùng của tRNA. Nó kết hợp với aminoacyl ở vị trí carbon thứ 3 của ribose đồng thời giải phóng AMP. Như vậy aminoacyl liên kết với chất mang đặc hiệu và vận chuyển chúng đến vị trí tổng hợp protein. Toàn bộ quá trình hoạt hóa aminoacid và kết hợp aminoacyl với tRNA được xúc tác bởi một enzyme aminoacyl-tRNA-synthetase. Ribosome, mRNA và tRNA-aminoacyl tạo điều kiện cho việc tạo liên kết peptide. Theo kết quả thí nghiệm ở vi khuẩn, đặc biệt là *E.coli* thì quá trình xảy ra như sau: Tiểu đơn vị nhỏ của ribosome kết hợp với gốc phosphate của mRNA cùng với một tRNA-aminoacyl. Chúng được gọi là "phức hệ khởi đầu" và sau đó mới có khả năng kết hợp với tiểu phần lớn của ribosome, tạo ra bộ máy tổng hợp polypeptide. Tiếp theo một phân tử tRNA-aminoacyl thứ hai kết hợp với ribosome và đảm bảo tRNA-aminoacyl ở đúng vị trí của mình (hình 7.22). Vị trí chính xác là base nitơ của codon được kết hợp bổ sung với base nitơ ở anticodon.



Hình 7.21. Hoạt hóa aminoacid và sự kết hợp của aminoacyl vào tRNA

- Amino acid được hoạt hóa bằng cách gắn với tRNA riêng của nó. Quá trình này gồm 2 phản ứng, được xúc tác bởi cùng một enzyme đặc hiệu đối với mỗi amino acid, đó là các amino acid-tRNA-synthetase. Như vậy có 20 amino acid thì cũng có 20 loại enzyme khác nhau.

Trong phản ứng thứ nhất amino acid phản ứng với ATP tạo nên AMP-aminoacyl và một pyrophosphate (hình 7.22, phản ứng 1). Hợp chất được tạo nên bởi nhóm carboxyl của amino acid và một gốc phosphoric acid và gắn với enzyme nên có khả năng phản ứng cao.

Trong phản ứng thứ hai, nó sẽ phân ly, cho phép aminoacyl từ AMP-aminoacyl được vận chuyển đến tRNA. Ở đây aminoacyl thay thế H của nhóm OH ở vị trí carbon thứ 3 tạo thành aminoacyl-tRNA.

- Ở giai đoạn khởi đầu tổng hợp chuỗi polypeptide cần có hai điều kiện: Một là trên mRNA có một khu vực không mã hoá, đó là dấu hiệu kết hợp với ribosome mở đầu cho vùng mã hoá. Hai là có bộ mã khởi đầu AUG làm điểm xuất phát. Ở vi khuẩn đôi khi thấy mã khởi đầu GUG thay cho AUG.

Như ta đã biết bộ mã AUG mã hóa cho methionine. Ở vi khuẩn, người ta thấy có hai loại tRNA đối với methionine: một là tRNA nhận gốc methionine để đưa vào thành phần của chuỗi polypeptide Met-tRNA, hai là tRNA nhận gốc formyl-methionine (fMet-tRNA) có vai trò quan trọng trong việc khởi đầu tổng hợp chuỗi polypeptide. Ở sinh vật nhân sơ, nhóm amine của methionine có thể được formyl hóa bởi N^{10}-formyl-tetrahydrofolic acid, nhờ enzyme transformylase đặc hiệu. Do nhóm amine đã bị gốc formyl bao vây nên không cho phép nó tham gia vào quá trình kéo dài chuỗi, mà chỉ tham gia vào quá trình khởi đầu tổng hợp protein.

Ở sinh vật nhân sơ anticodon được định vị ở giữa của 16SrRNA. Base bổ sung kết hợp với base của codon trên mRNA ở khoảng cách từ 0,3 đến 0,4 nm, như vậy sẽ xuất hiện lực hấp dẫn Van der Waal. Bằng cách này trước hết tRNA-aminoacyl kết hợp với tiểu phần nhỏ của ribosome và thực chất là với mRNA. Phức hệ này phản ứng với "nhân tố kéo dài". Nhân tố này có trên tiểu phần lớn của ribosome.

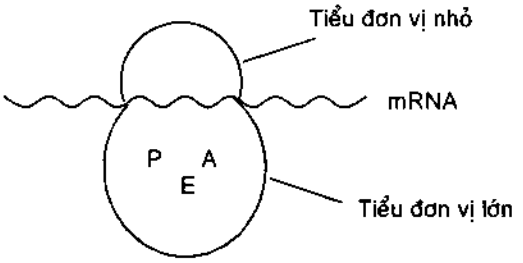
Ở sinh vật nhân sơ, ngoài các yếu tố tham gia khởi đầu tổng hợp protein như fMet-tRNA, mRNA, các tiểu đơn vị ribosome 30S và 50S, GTP, còn có 3 protein nữa là các yếu tố khởi đầu: IF_1 (M 9000), IF_2 (M 65000-80000) và IF_3 (M 29000). Kết quả của giai đoạn này là tạo thành phức hợp khởi đầu: fMet-tRNA-mRNA-ribosome 70S.

Quá trình được bắt đầu bằng sự kết hợp giữa yếu tố IF_3 với tiểu đơn vị 30S. Nhờ yếu tố này mà tiểu đơn vị 30S kết hợp với mRNA ở vị trí khởi đầu. Trong giai đoạn hai fMet-tRNA gắn với phức IF_2-GTP để tạo thành IF_2-GTP-fMet-tRNA (tổ hợp 3). Ở giai đoạn ba và bốn phức hợp IF_3-30S kết hợp với tổ hợp 3. Nhờ yếu tố IF_2 mà fMet-tRNA được đưa vào khu vực P. Người ta chưa biết chính xác vai trò của IF_1, có thể nó tham gia vào việc đổi mới chu trình bằng cách giải phóng yếu tố IF_2 ra khỏi phức hợp. Cuối cùng tiểu đơn vị 50S kết hợp với tiểu đơn vị 30S để tạo ra phức hợp ribosome 70S, đồng thời giải phóng cả 3 yếu tố khởi đầu cũng như giải phóng cả GDP và Pi.

Ở sinh vật nhân chuẩn, quá trình tổng hợp polypeptide trong tế bào chất có tRNA khởi đầu cũng mang methionine nhưng không được formyl hoá. Ở

đây cũng có các phản ứng với các yếu tố khởi đầu eIF_1, eIF_2 và eIF_3 tương tự như ở sinh vật nhân sơ.

Trên tiểu phần lớn có ba vùng quan trọng: vùng A: là nơi tRNA-aminoacyl được kết hợp, vùng P: nơi gắn tRNA-peptidyl và vùng E: thực hiện sự kéo dài chuỗi peptide (hình 7.22).



Hình 7.22. Những vùng phản ứng quan trọng của ribosome

A: vị trí gắn của tRNA-aminoacyl, P: vị trí gắn của peptidylaminoacyl

- Ở giai đoạn kéo dài chuỗi polypeptide, amino acid thứ hai (do mã tiếp theo của mRNA quy định) gắn với tRNA riêng của nó sẽ được đưa vào phức hợp khởi đầu ở vùng A. Giai đoạn này cần GTP và các yếu tố kéo dài chuỗi. Ở sinh vật nhân sơ yếu tố kéo dài là EF-T (gồm 2 bộ phận hợp thành là EF-Tu và EF-Ts). Yếu tố này ở sinh vật nhân chuẩn là eEF-1. Các yếu tố này là những protein: EF-Tu (M 43000), EF-Ts (M 74000). Chúng có vai trò đưa aminoacyl-tRNA vào vùng A của ribosome thông qua các bước sau:

EF-Tu + GTP → EF-Tu. GTP (tổ hợp hai)

EF-Tu.GTP + amonoacyl-tRNA → aminoacyl-tRNA-EF-Tu-GTP (tổ hợp ba).

Tổ hợp ba chỉ kết hợp với vùng A trong ribosome vì vùng P đã có fMet-tRNA (ở giai đoạn sau là peptidyl-tRNA) chiếm chỗ.

Đây là giai đoạn quyết định bảo đảm định hướng đúng để tạo ra liên kết peptide giữa aminoacyl-tRNA và peptidyl-tRNA.

Trước khi aminoacyl được gắn kết vào peptidyl thì nó kết hợp với GTP ở vùng E của ribosome để tạo nên một phức gồm ba yếu tố. Sau khi GTP thuỷ phân thì liên kết peptide được tạo thành. Quá trình này được xúc tác bởi enzyme peptidyltransferase, chuyển peptidyl đến tRNA-aminoacyl vừa kết hợp vào (hình 7.23). Enzyme này được cấu tạo chủ yếu từ rRNA. Phần phi protein 50S rRNA thể hiện đầy đủ hoạt tính của peptidyltransferase.

Nucleic acid có hoạt tính enzyme được gọi là ribozyme. Protein của ribosome tham gia quá trình enzyme là do sự thay đổi cấu hình. Đối với hình thể của từng thành phần ribosome ion Mg^+ có một ý nghĩa quan trọng.

Sau khi kết hợp với ribosome, GTP bị thuỷ phân đồng thời giải phóng tổ hợp EF-Tu-GDP ra khỏi ribosome. Phức hợp EF-Tu-GDP khi tác động tương hỗ với EF-Ts và GTP sẽ lại biến thành EF-Tu-GTP. Do đó nó có thể lai tương tác với aminoacyl-tRNA tiếp theo. Các nghiên cứu cho thấy số lượng yếu tố EF-Tu khoảng bằng số lượng phân tử aminoacyl-tRNA. Từ đó người ta cho rằng phần lớn các aminoacyl-tRNA là nằm trong thành phần tổ hợp ba chứ không phải ở trạng thái tự do.

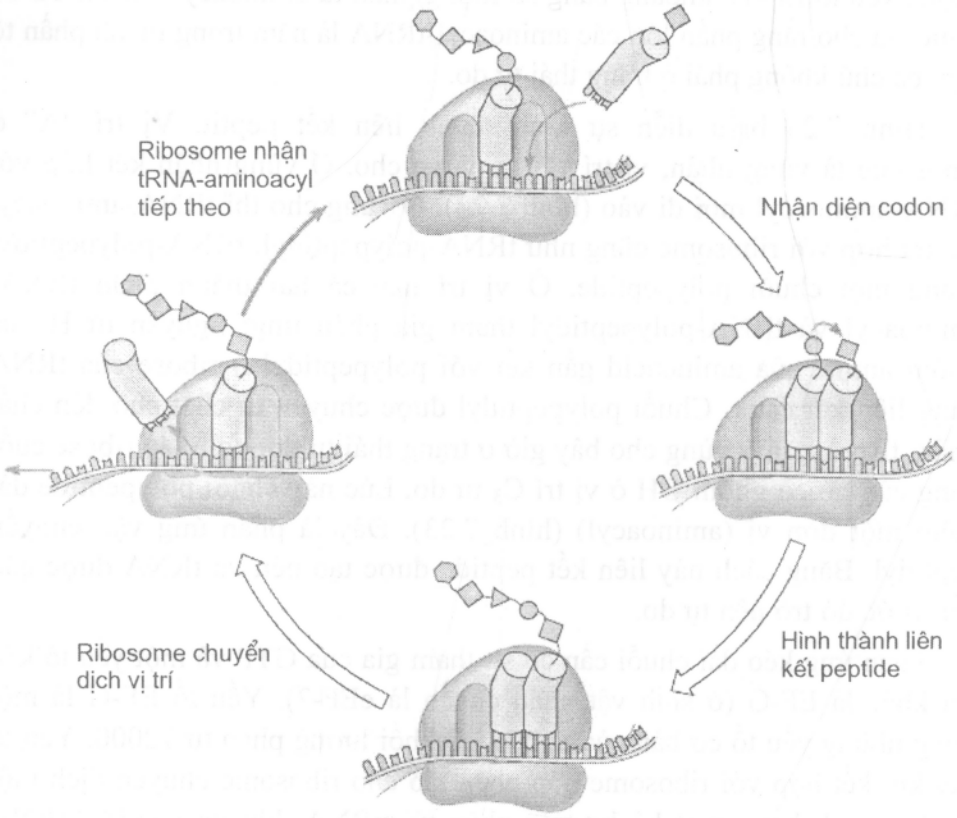
Hình 7.23 biểu diễn sự hình thành liên kết peptit. Vị trí "A" ở ribosome là vùng nhận, vị trí "P" là vùng cho. Ở vùng nhận kết hợp với tRNA-aminoacyl mới đi vào (hình 7.23). Ở vùng cho thì tRNA-aminoacyl đã kết hợp với ribosome cũng như tRNA-polypeptidyl. tRNA-polypeptidyl mang một chuỗi polypeptide. Ở vị trí này cả hai thành phần tRNA-aminoacyl và tRNA-polypeptidyl tham gia phản ứng: nguyên tử H của nhóm amine của aminoacid gắn kết với polypeptidyl ở ribose của tRNA bằng liên kết ester. Chuỗi polypeptidyl được chuyển từ chất cho đến chất nhận. tRNA gắn ở vùng cho bây giờ ở trạng thái tự do, nghĩa là ribose cuối cùng của nó có nhóm OH ở vị trí C_3 tự do. Lúc này chuỗi polypeptide dài thêm một đơn vị (aminoacyl) (hình 7.23). Đây là phản ứng vận chuyển peptidyl. Bằng cách này liên kết peptide được tạo nên và tRNA được gắn kết trước đó trở nên tự do.

Phản ứng kéo dài chuỗi cần có sự tham gia của GTP và một yếu tố kéo dài khác là EF-G (ở sinh vật nhân chuẩn là eEF-2). Yếu tố EF-G là một trong những yếu tố cơ bản của tế bào, có khối lượng phân tử 72000. Yếu tố này khi kết hợp với ribosome góp phần tạo cho ribosome chuyển dịch một khoảng cách bằng một bộ ba trên phân tử mRNA, khi đó peptidyl-tRNA chuyển từ vùng A sang vùng P.

Sau khi kết hợp ribosome dịch chuyển đến codon tiếp theo, tRNA mang aminoacid tiếp theo được kết hợp vào. Ribosome là hệ thống cơ hóa học có khả năng chuyển động tương tự như protein cơ.

- Giai đoạn kết thúc: Quá trình tổng hợp sợi polypetide kết thúc khi ở trên mRNA có một codon kết thúc xuất hiện hoặc là đã đến đầu cuối của mRNA. Những codon kết thúc là UAA, UAG và UGA. Chuỗi polypeptide tách khỏi ribosome và tự động hình thành cấu trúc bậc bốn. Sau đó

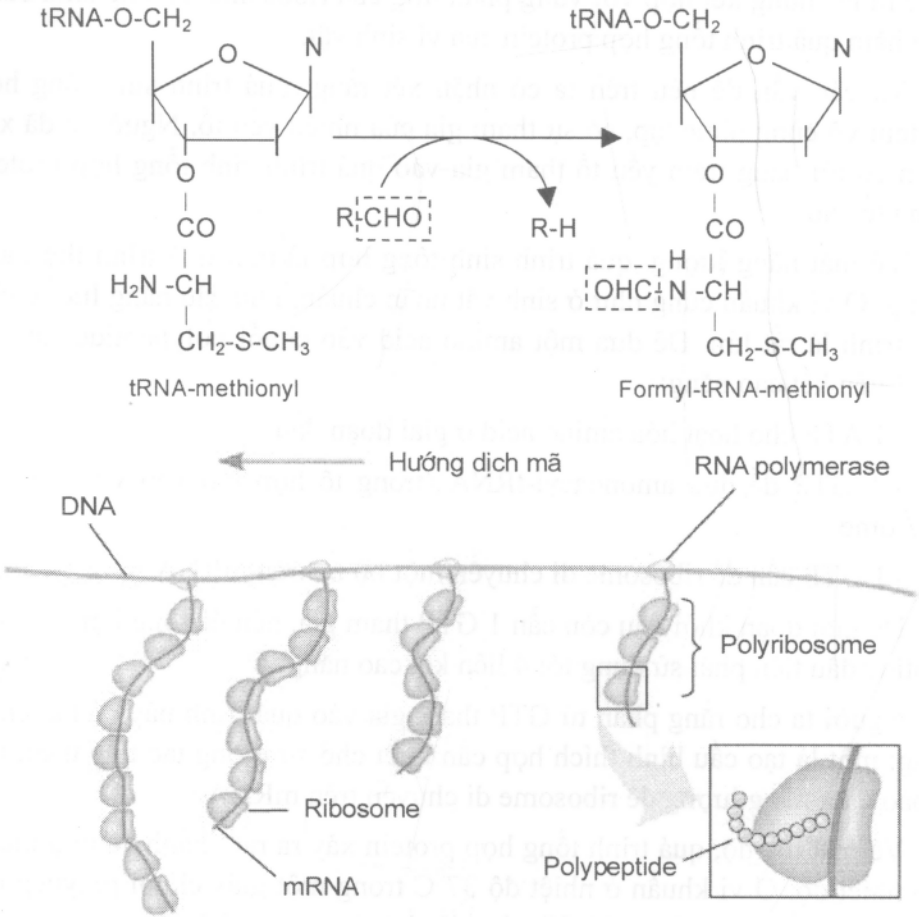
ribosome bị phân ly thành các tiểu đơn vị 30S và 50S rồi nhập vào kho dự trữ ribosome. Sự nhận biết các bộ mã kết thúc được thực hiện bởi các yếu tố kết thúc. Đó là các protein, ở sinh vật nhân sơ là RF_1 (M 4000) nhận biết bộ mã UAA và UAG và RF_2 (M 47000) nhận biết mã UAA và UGA. Ở sinh vật nhân chuẩn có một yếu tố kết thúc là eRF. Để thực hiện phản ứng giải phóng chuỗi polypeptide thì peptidyl-tRNA phải nằm ở vùng P, còn các yếu tố kết thúc tương tác với vùng A của ribosome.



Hình 7.23. Sự tổng hợp polypeptide ở ribosome

Bằng cách này hướng tổng hợp của sợi polypeptide được xác định, vì aminoacid chỉ có thể được kết hợp với nhóm carbonyl mà không kết hợp với nhóm amine. Ở sinh vật nhân chuẩn sự tổng hợp polypeptide cũng bắt đầu bằng methionine, không được formyl hoá. Methionine được formyl hóa sẽ tách ra bằng thuỷ phân khi quá trình tổng hợp polypeptide kết thúc.

Quá trình tổng hợp protein xảy ra ở ribosome của tế bào chất và ty thể, lạp thể. Chúng có hệ thống tổng hợp protein riêng và có những enzyme cần thiết cho quá trình đó. Tuy nhiên ở trong ty và lạp thể không có đủ tất cả các loại enzyme.



Hình 7.24. Các tiểu đơn vị của ribosome, polysome và mRNA xuyên qua các ribosome

Trong nhiều trường hợp một mRNA thực hiện giải mã trên nhiều ribosome, như vậy cùng một mRNA có 20 đến 40 protein được tổng hợp. Sự tập hợp một loạt ribosome trên một sợi mRNA được gọi là polysome. Ở hình 7.24 biểu diễn sự sắp xếp của các ribosome. Trên sơ đồ cho thấy những ribosome nào đã trượt xa nhất trên sợi mRNA thì sợi polypeptide được tạo nên là dài nhất.

Một số kháng sinh có thể ảnh hưởng đến quá trình sao chép và giải mã. Quá trình sao chép bị ức chế bởi actinomycin D và rifamycin. Chất thứ nhất phong toả base nitơ guanine, chất thứ hai ức chế RNA-polymerase. Quá trình giải mã bị ức chế bởi puromycin, streptomycin và chloramphenicol và thực ra là chúng kết hợp với vùng phản ứng của ribosome. Kháng sinh cũng kìm hãm quá trình tổng hợp protein của vi sinh vật.

Từ các vấn đề nêu trên ta có nhận xét rằng: quá trình sinh tổng hợp protein vô cùng phức tạp, có sự tham gia của nhiều yếu tố. Người ta đã xác nhận có tới hàng trăm yếu tố tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein trong tế bào.

Về mặt năng lượng, quá trình sinh tổng hợp là một quá trình thu năng lượng. Ở vi khuẩn cũng như ở sinh vật nhân chuẩn, nhu cầu năng lượng cho quá trình là rất lớn. Để đưa một amino acid vào chuỗi polypeptide cần chi phí 3 liên kết cao năng:

- 1 ATP cho hoạt hóa amino acid ở giai đoạn đầu.

- 1 GTP để đưa amonoacyl-tRNA (trong tổ hợp ba) vào vùng A của ribosome.

- 1 GTP cần để ribosome di chuyển một bộ ba trên mRNA.

Do giai đoạn khởi đầu còn cần 1 GTP tham gia, nên để tổng hợp liên kết peptide đầu tiên phải sử dụng tới 4 liên kết cao năng.

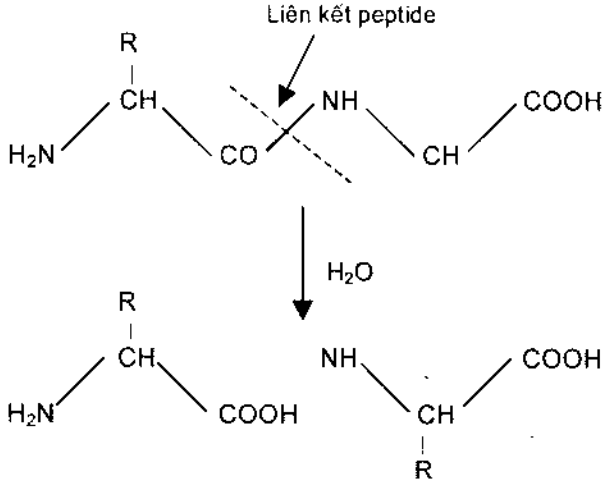
Người ta cho rằng phân tử GTP tham gia vào quá trình này có hai chức năng: một là tạo cấu hình thích hợp cần thiết cho sự tương tác tiếp theo, hai là bảo đảm năng lượng để ribosome di chuyển trên mRNA.

Về mặt tốc độ, quá trình tổng hợp protein xảy ra rất nhanh và phụ thuộc vào nhiệt độ. Ở vi khuẩn ở nhiệt độ 37^0C trong một giây chuỗi polypeptide tăng từ 12 đến 17 aminoacid. Vì vậy, để tổng hợp một phân tử protein trung bình có độ lớn 300 aminoacid mất khoảng 20 giây. Trong tế bào sinh vật nhân chuẩn, tốc độ tổng hợp chậm hơn, ví dụ trong tế bào hồng cầu lưới ở 37^0C tốc độ kéo dài chuỗi peptide là 2 aminoacid trong một giây. So với tốc độ giai đoạn kéo dài chuỗi thì giai đoạn khởi đầu và kết thúc xảy ra chậm chạp hơn.

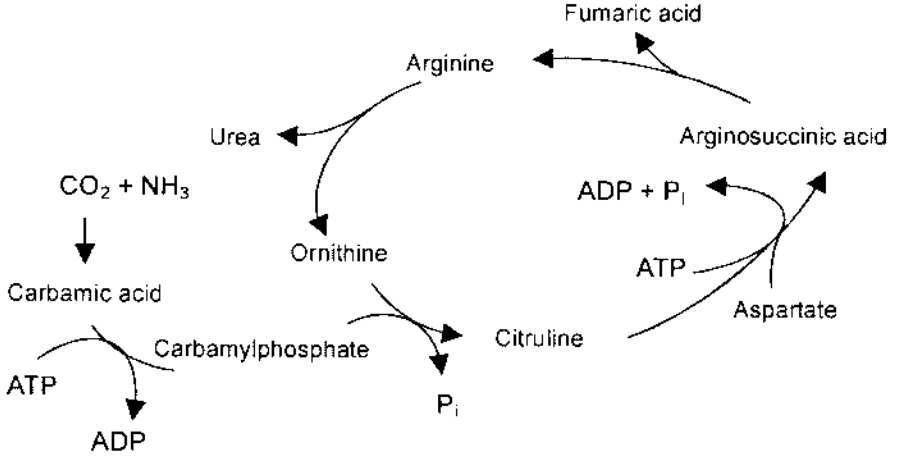
7.11. Sự phân giải các hợp chất chứa nitơ

Sự phân giải protein, như ở trong hệ tiêu hóa của động vật, ở hạt nảy mầm hoặc ở trong đất khi phân giải các hợp chất hữu cơ nhờ vi sinh vật, bắt

đầu bằng sự thuỷ phân. Các liên kết peptide bị cắt ra do các peptidase, xuất hiện các aminoacid tự do. Tuỳ thuộc vào loại peptidase mà chuỗi peptide được thuỷ phân ở giữa hoặc ở một đầu chuỗi.



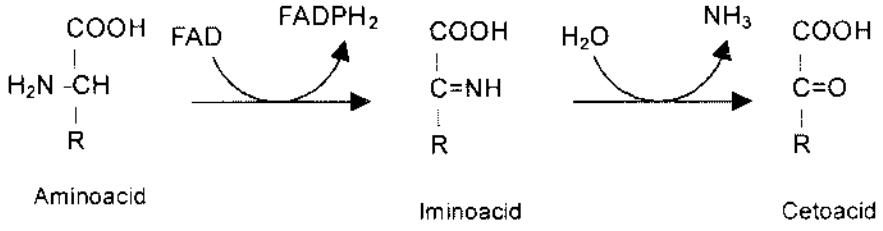
Ở quá trình nảy mầm các aminoacid được tạo ra được sử dụng để tổng hợp nên các protein mới. Sự phân giải protein nhờ vi sinh vật trong đất và trong hệ tiêu hóa được thực hiện tiếp theo là các aminoacid bị khử amine hoá, giải phóng ra NH_3. Những vi sinh vật sống trong đất có khả năng thực hiện phản ứng này vì vậy được gọi là vi sinh vật tạo amôn.



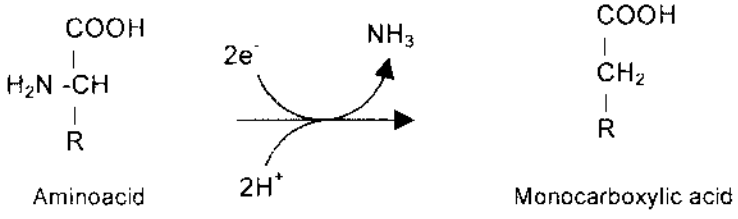
Hình 7.25. Chu trình Ornithine

Nguyên tắc của sự khử amine hóa là phản ứng oxy hóa và sự tách NH_3 (khử amine hóa oxy hoá). Ở trong động vật, đặc biệt là glutamate được sự

khử amine hóa bằng cách oxy hoá. Enzyme xúc tác cho phản ứng này là glutamate dehydrogenase. Trong điều kiện yếm khí những aminoacid bị khử amine hóa bằng phản ứng khử (xem sơ đồ), một quá trình xảy ra trong đất ngập nước, như đất lúa.

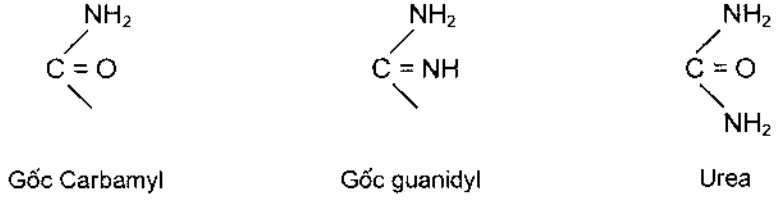


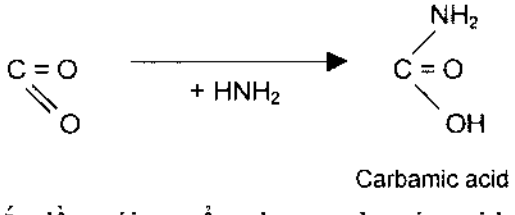
Khử amin hóa bằng cách oxy hóa



Khử amin hóa bằng cách khử

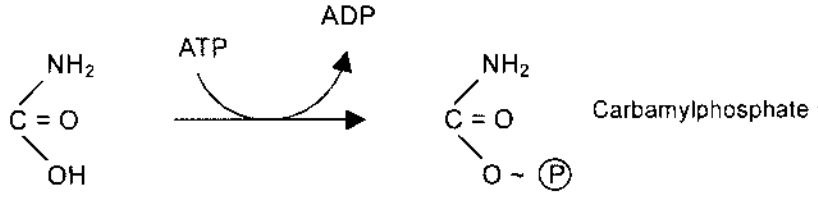
Trong cơ thể động vật có vú urea được tạo ra từ NH_3 qua chu trình được gọi là ornithine (hình 7.25). Trong chu trình này gốc carbamyl và guanidyl đóng vai trò quan trọng. Cả hai đều xuất phát từ urea, như công thức sau:



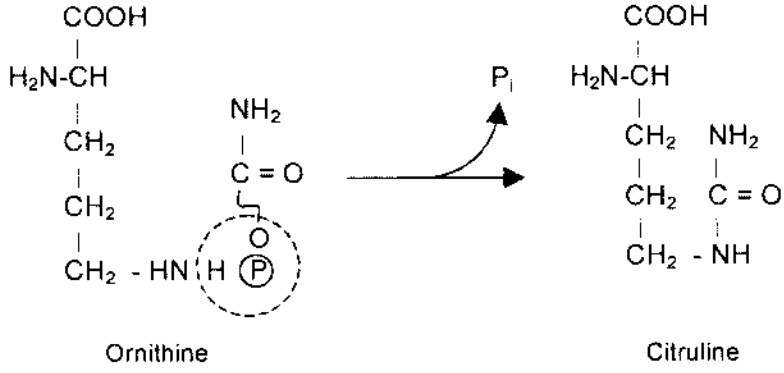


Chu trình bắt đầu với sự tổng hợp carbamic acid (xem sơ đồ). Đây là phản ứng cân bằng tự nhiên. Chất phản ứng được cung cấp do quá trình hô

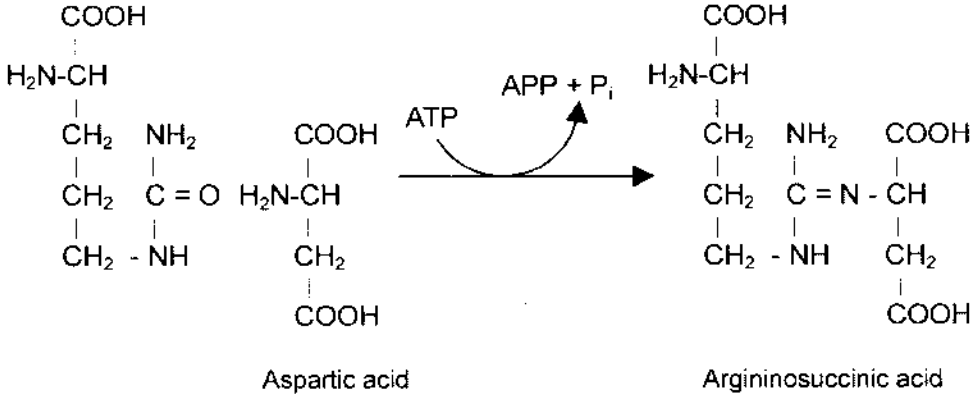
hấp (CO_2) và quá trình khử amine hóa bằng cách oxy hóa (NH_3). Carbamic acid được phosphoryl hóa nhờ ATP để tạo thành carbamylphosphate:



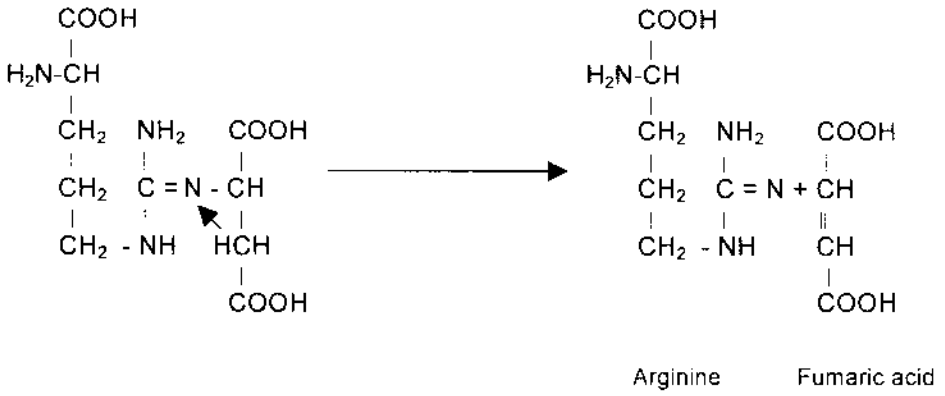
Carbamylphosphat phản ứng với ornithine để tạo citrulline và phosphate vô cơ được tách ra.



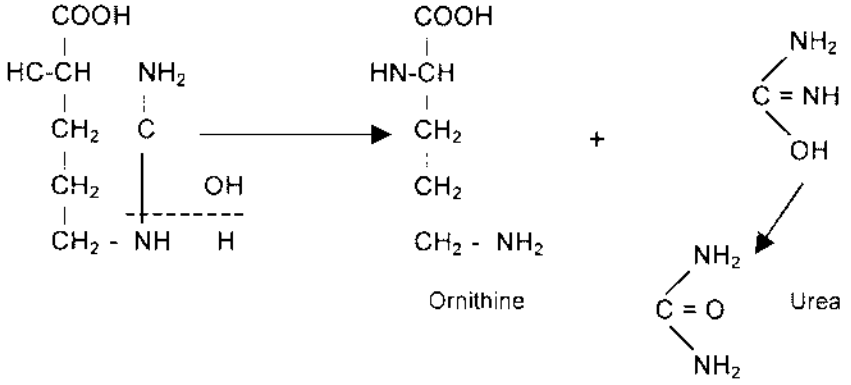
Ở đây nguyên tử H của nhóm amine cuối cùng được thay thế bằng nhóm carbamyl. Citrulline phản ứng với aspartic acid để tạo thành argininosuccinic acid. Phản ứng cần ATP.



Sự biến đổi nội phân tử chất này được tách thành arginine và fumaric acid.



Arginine là một dẫn suất của guanidyl. Nhờ arginase (hydrolase) arginine được tách ra thành ornithine và urea.

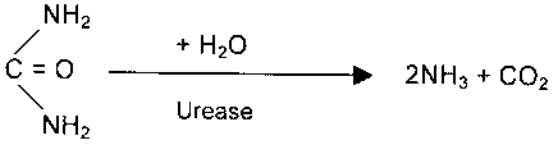


Sau khi tạo thành ornithine chu trình mới lại bắt đầu. Chất đi vào chu trình: CO_2, NH_3, asparagine và ATP. Chu trình tạo nên urea và fumaric acid. Hai nguyên tử N của urea bắt nguồn từ NH_3 và asparagine. Như vậy NH_3, dạng độc đã được biến đổi thành dạng không độc, và được thải ra cùng với nước tiểu. Fumaric acid là chất trao đổi của chu trình Krebs và cũng được tiếp tục biến đổi ở đó. Việc sử dụng ATP ở đây đã nói lên rằng, việc giải độc NH_3 cần năng lượng. Khung carbon của fumaric acid bắt nguồn từ asparagine. Như vậy một aminoacid trong quá trình phân giải của chu trình Krebs đã nối với chu trình ornithine.

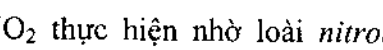
Những enzyme của chu trình ornithine phần thì định vị trong cơ chất của ty thể đó là glutamate dehydrogenase và citrullinsynthetase, những enzyme còn lại của chu trình định vị trong tế bào chất.

Trong thực vật bậc cao cũng có các enzyme của chu trình ornithine. Trong hạt nảy mầm arginase và ornithin-transcarbamylase được tìm thấy. Trong đó enzyme cuối cùng xúc tác cho phản ứng tổng hợp citrulline từ carbamylphosphate và ornithine. Vì vậy người ta cho rằng, những enzyme kể trên có vai trò quan trọng đối với việc huy động các protein dự trữ. Trong cây nho arginine là một dạng dự trữ nitơ, được tích luỹ vào mùa thu ở trong cành (gỗ).

Trong nhiều trường hợp urea được tách thành CO_2 và NH_3 trong đất nhờ urease, như vậy nitơ được bón ở dạng urea được tiếp nhận ở dạng NH_4^+ hoặc sau đó được biến đổi nhờ vi sinh vật sang dạng NO_3^-.

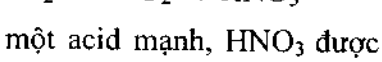


Sự biến đổi NH_3 trong đất thành NO_3^- được thực hiện nhờ vi khuẩn, chúng oxy hóa (đốt cháy) NH_3 cũng như HNO_2 để thu được năng lượng cho quá trình trao đổi chất. Những loài vi khuẩn quan trọng nhất oxy hóa NH_3 là loài *nitrosomonas*, *nitrosocystus*, *nitrospira*. Sự oxy hóa cần có O_2 tương ứng theo phương trình sau:



$$NH_3 + 3/2\ O_2 \rightarrow HNO_2 + H_2O$$

Sự oxy hóa HNO_2 thực hiện nhờ loài *nitrobacter* và tương ứng với phương trình sau:

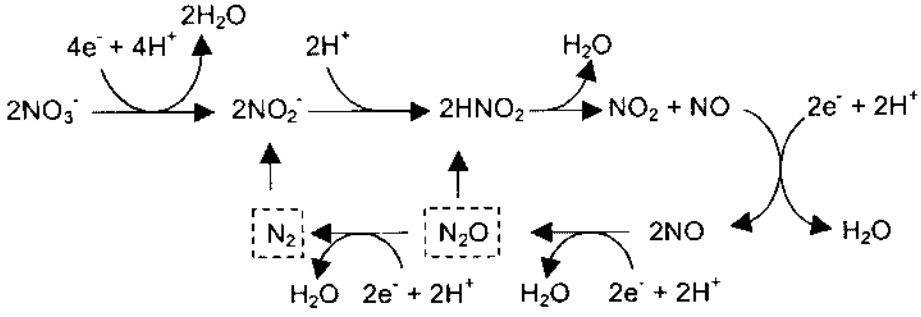


$$HNO_2 + 1/2\ O_2 \rightarrow HNO_3$$

Ở quá trình này một acid mạnh, HNO_3 được tạo thành. Đó là nguyên nhân thực tế sự phân giải các chất hữu cơ chứa nitơ làm cho đất chua. Quá trình tạo nitrite (HNO_2^-) và nitrate trong đất được gọi là quá trình nitrate hoá. Những loài vi khuẩn cần cho quá trình này có nhiều trong đất. Đất trồng thông thoáng với độ pH trung tính là điều kiện lý tưởng đối với những vi khuẩn này.

Trong điều kiện yếm khí có thể xảy ra sự khử NO_3^- (khử nitrate hô hấp hoặc là dị hoá). Quá trình này được gọi là phản nitrate hoá. Ngày nay người ta biết 23 loài khác nhau có khả năng này. Đó là *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Holobacterium*, *Pseudomonas* và *Rhizobium*.

Chúng có khả năng tạo ra những enzyme khử trong điều kiện thiếu O_2, sử dụng O trong NO_3^- cho hô hấp háo khí, là chất nhận e^- của chuỗi hô hấp. Ở quá trình này NO_3^- bị khử thành N_2O và N_2. Trong quá trình phản nitrate hóa cũng xuất hiện NO. Trình tự phản ứng được giải thích như sau:



Ở quá trình này có 4 enzyme khử tham gia: NO_3^- -Reductase, NO_2-Reductase, NO-Reductase và N_2O-Reductase. Enzyme quan trọng nhất là NO_2^--Reductase, xúc tác cho quá trình chuyển ion NO_2^- thành dạng chất khí (NO). N_2O-Reductase không có trong tất cả vi khuẩn phản nitrate hoá. Ở một số vi khuẩn quá trình này kết thúc với chuỗi phản ứng ở N_2O. Từ quá trình phản ứng rút ra rằng, sự phản nitrate hóa tạo tính kiềm, vì chúng cần H^+ ở mỗi bước của phản ứng. Sự phản nitrate hóa có một vai trò lớn trong tự nhiên. Từ hợp chất nitơ vô cơ và hữu cơ N_2 được giải phóng lại đi vào không khí. Sự phản nitrate hóa đối lập với sự đồng hóa N_2. Trong đó quá trình đầu tiên sản sinh N_2, quá trình thứ hai cần N_2. Nhờ vi khuẩn cố định đạm mà hàng năm từ 100-200 x 10^6 t N từ không khí được đưa vào đất. Bằng quá trình phản nitrate hóa mà hàng năm có khoảng 200-300 x 10^6 t N ở dạng N_2 được giải phóng ra trong không khí. N_2O được tạo ra trong quá trình phản nitrate hóa là khó khăn cho việc bảo vệ môi trường sinh thái. Đó là chất rất bền vững, bay lên tầng tĩnh khí và ở đó tham gia vào sự phân giải tầng ozon.

Chương VIII
MỐI LIÊN QUAN GIỮA CÁC CHẤT TRONG TRAO ĐỔI CHẤT

Trên đây chúng ta đã nghiên cứu sự trao đổi chất của từng hợp chất cơ bản trong cơ thể sống. Tuy nhiên sự phân chia như vậy chỉ giúp làm đơn giản hóa những vấn đề muốn trình bày. Trong thực tế giữa các chất có nhiều mối liên hệ tương hỗ. Điều đó buộc chúng ta phải nghiên cứu sự trao đổi chất của tế bào trong một tổng thể các mối liên hệ.

Thật vậy, trong cơ thể không thể tìm thấy sự trao đổi chất của một chất nào đó xảy ra tách rời với sự trao đổi của các hợp chất khác. Mối liên quan tương hỗ giữa sự trao đổi các hợp chất này thể hiện trên hai mặt cơ bản: nguyên liệu và năng lượng.

Mối liên quan về mặt nguyên liệu là khả năng chuyển hóa một chất này thành một chất khác thông qua một số sản phẩm trung gian. Ví dụ, carbohydrate có thể chuyển hóa thành aminoacid bằng cách amine hóa một số cetoacid. Ngược lại một số aminoacid có thể chuyển thành carbohydrate bằng cách loại nhóm aminoacid thành các cetoacid, rồi từ đó tổng hợp carbohydrate.

Mối liên quan về mặt năng lượng thể hiện ở chỗ: khi phân giải một hợp chất nào đó năng lượng được tích luỹ trong ATP. Nguồn ATP này được sử dụng cho các phản ứng tổng hợp. Ví dụ, ATP được tạo thành trong quá trình đường phân, quang phosphoryl hóa (quang hợp) và chủ yếu được tạo thành trong quá trình phosphoryl hóa oxy hóa (hô hấp). Sự phosphoryl hóa oxy hóa qua chu trình Krebs và chuỗi vận chuyển điện tử cho thấy rằng: bất kể acetyl-CoA có nguồn gốc từ carbohydrate, hoặc acid béo hay aminoacid cũng đều bị oxy hóa và tổng hợp ATP.

Nhờ khả năng chuyển hóa tương hỗ giữa các chất mà cơ thể sinh vật thích ứng với môi trường. Ví dụ vào mùa đông, ở cây trồng xảy ra sự chuyển hóa tinh bột thành đường và chất béo, nhờ đó khả năng chịu rét của cây trồng được nâng cao. Hoặc đối với một số động vật ngủ đông, do dự trữ lipid lớn, nên đã đảm bảo cung cấp đủ năng lượng và các chất cần thiết cho cơ thể sử dụng trong suốt thời gian dài mùa đông.

Để nghiên cứu mối liên quan này chúng ta cần xem xét sự trao đổi của từng cặp hợp chất sau:

8.1 Mối liên quan giữa carbohydrate và lipid

Carbohydrate dễ dàng chuyển thành lipid thông qua hai hợp chất trung gian là dihydroxyacetonphosphate và acetyl-CoA

↗ dihydroxyacetonphosphate → glycerolphosphate

carbohydrate → glucose

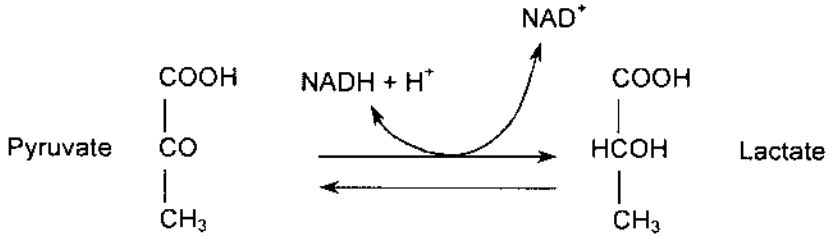
↘

glyceraldehydphosphate→ acetyl-CoA →acid béo

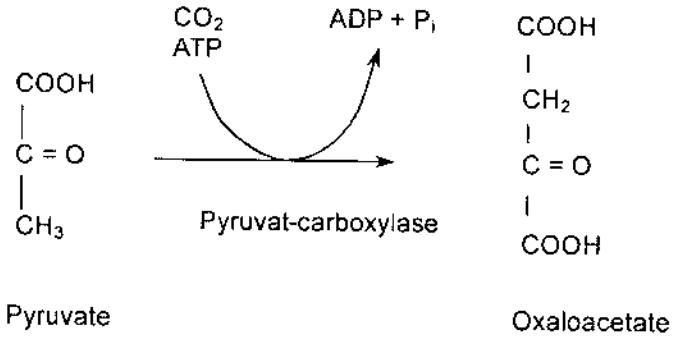
- Glycerine hoặc glyceraldehydphosphate có thể biến đổi thành fructose-1,6- diphosphate (xem chương lipid).

- Acetyl-CoA thông qua chu trình Krebs không thể tổng hợp được carbohydrate vì hai nguyên tử carbon của nó đã bị loại thành CO_2 trước khi tạo ra hợp chất oxaloacetic là chất có vai trò tổng hợp mới carbohydrate (quá trình gluconeogenese, hình 8.1).

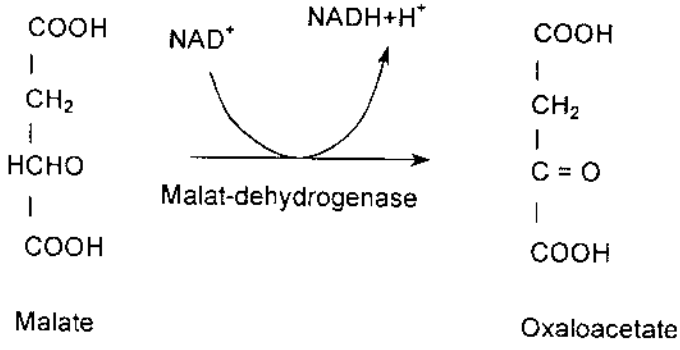
Khi mô cơ bị mệt mỏi có hiện tượng là chu trình Krebs không thể tiếp nhận tất cả các phân tử pyruvate tạo ra từ quá trình đường phân. Pyruvate được khử thành lactate, chất này được tích luỹ và khi mô cơ nghỉ ngơi chúng lại được oxy hóa thành pyruvate.



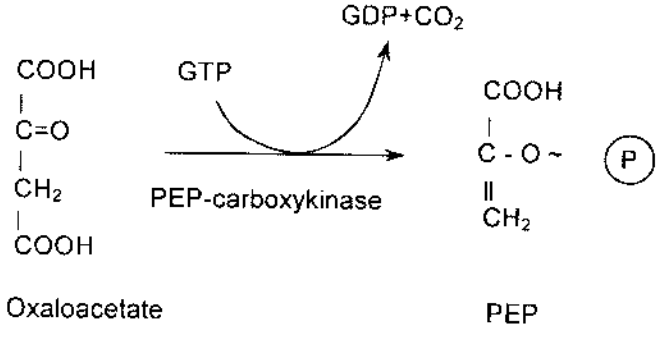
Sau đó pyruvate vào trong ty thể và được carboxyl hóa nhờ enzyme pyruvatcacboxylase tạo thành oxaloacetate. Pyruvate vào trong ty thể và có thể tham gia vào 2 đường hướng phản ứng khác nhau (hình 8.1). Nó có thể được biến đổi nhờ enzyme pyruvatdehydrogenase và sau đó đi vào chu trình Krebs. Pyruvate cũng có thể được carboxyl hóa để tạo oxaloacetate và chịu sự biến đổi theo con đường gluconeogenese. Theo đường hướng nào là tuỳ thuộc vào nồng độ acetyl-CoA, chất có khả năng hoạt hóa enzyme pyruvatcarboxylase theo cơ chế biến cấu, trong khi đó ADP lại ức chế enzyme này.



Trong tế bào chất malate được oxy hóa thành oxaloacetate nhờ NAD^+

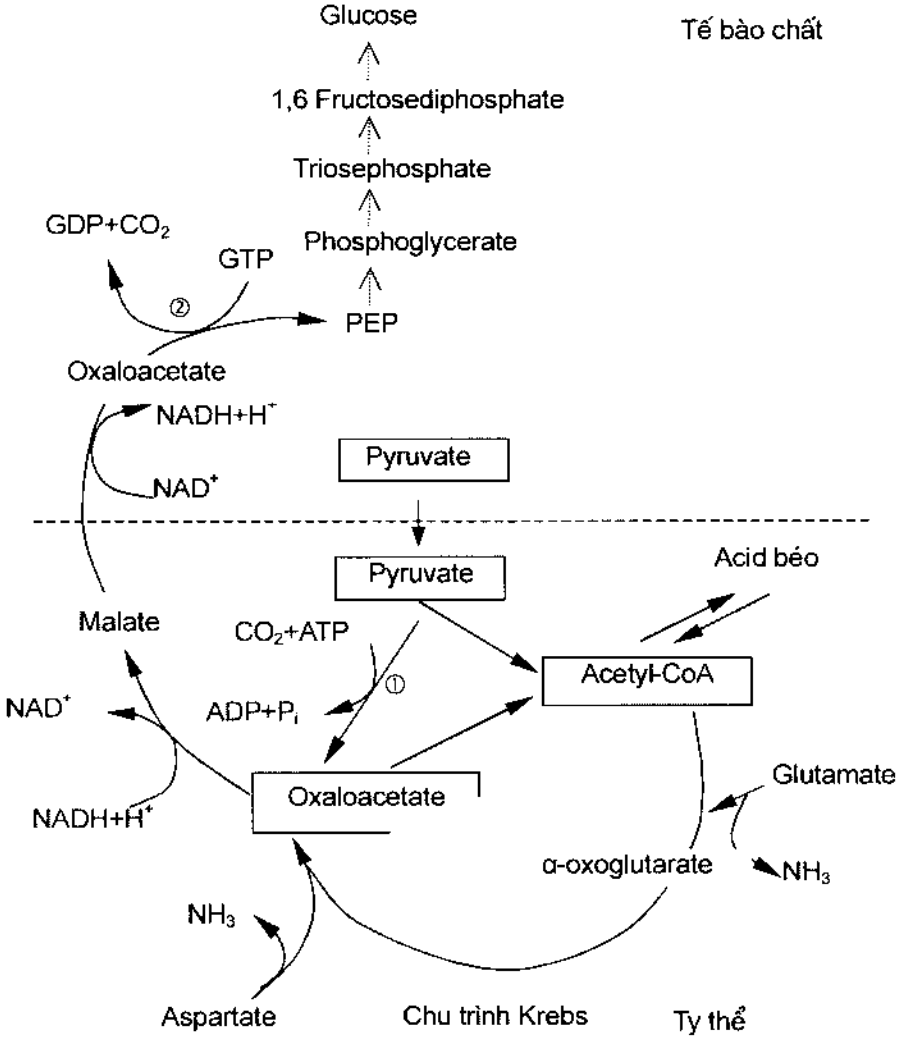


Oxaloacetate được biến đổi tiếp tục thành photphoenolpyruvate nhờ enzyme quan trọng của gluconeogenese là phosphoenolcarboxykinase. Phản ứng này gồm một phản ứng khử carboxyl hóa và một phản ứng phosphoryl (phản ứng kinase). Phản ứng cần 1GTP, tương tự ATP.



PEP là một chất được tạo ra trong quá trình đường phân. Từ chất này đi ngược lại những phản ứng riêng lẻ của quá trình đường phân cho đến fructozo-1,6-diphotphate. Chất này được khử phosphoryl hóa và đồng phân hóa cho đến glucose cũng như glucose-1-phosphate. Các nguyên tử C trong lactate được sử dụng để tổng hợp nên glucose hoặc glycogen nhờ ATP và

NADH. Sự phosphoryl hóa trực tiếp pyruvate để tạo thành PEP là không thực hiện được vì lý do năng lượng, nghĩa là mức năng lượng của pyruvate thấp hơn nhiều so với mức năng lượng của PEP. Như hình 8.1 sự biến đổi này được thực hiện qua oxaloacetate, nhằm để đi quanh "dốc đứng" giữa pyruvate và PEP. Con đường này đòi hỏi một năng lượng bổ sung, là 1 ATP cho carboxyl hóa pyruvate và 1 GTP cho tạo thành PEP. Hai nguồn năng lượng này đủ để tổng hợp PEP, liên kết cao năng của chúng giải phóng 62 kJ/mol.



Hình 8.1 Sơ đồ Gluconeogenes

Như ở trên đã nêu enzyme pyruvatcarboxylase được điều khiển theo cơ chế biến cấu. Sự điều khiển này là một cơ chế có ý nghĩa. Khi nồng độ acetyl-CoA cao thì không cần tạo acetyl-CoA bổ sung theo con đường khử carboxyl hóa bằng cách oxy hoá. Trong trường hợp này pyruvatcarboxylase được hoạt hóa nhờ acetyl-CoA và pyruvate được sử dụng để tạo oxaloacetate. Ngược lại khi nồng độ ADP cao, nghĩa là nồng độ ATP thấp thì pyruvatcarboxylase bị ức chế. Pyruvate được thực hiện khử carboxyl hóa bằng cách oxy hóa để cung cấp acetyl-CoA cho chu trình Krebs, là chu trình cùng với chuỗi enzyme hô hấp tái tạo ATP.

Ở thực vật và một số vi sinh vật có chu trình glyoxilate xảy ra ở glyoxisome, cấu trúc này chứa enzyme β-oxy hóa peroxesome. Ở đây acetyl-CoA có nguồn gốc acid béo sẽ tạo thành oxaloacetic acid, sau đó là phosphoenolpyruvate, rồi từ đó tạo glucose.

Cứ mỗi vòng chu trình glyoxilate (xem chương lipid) từ 2 phân tử acetyl-CoA tạo ra được một phân tử succinic acid. Acid này bị oxy hóa để tạo ra oxaloacetic acid. Oxaloacetic acid sẽ bị khử carboxyl hóa để biến thành phosphoenolpyruvic acid. Chất này sẽ chuyển thành glucose-6-phosphate.

Như vậy từ 4 phân tử acetyl-CoA tạo ra 2 phân tử succinic acid, sau đó 2 phân tử oxaloacetic acid. Các biến đổi tiếp theo sẽ cho ra 2 phân tử phosphoenolpyruvic acid. Cuối cùng thu được một phân tử glucose.

8.2. Mối liên quan giữa carbohydrate và protein

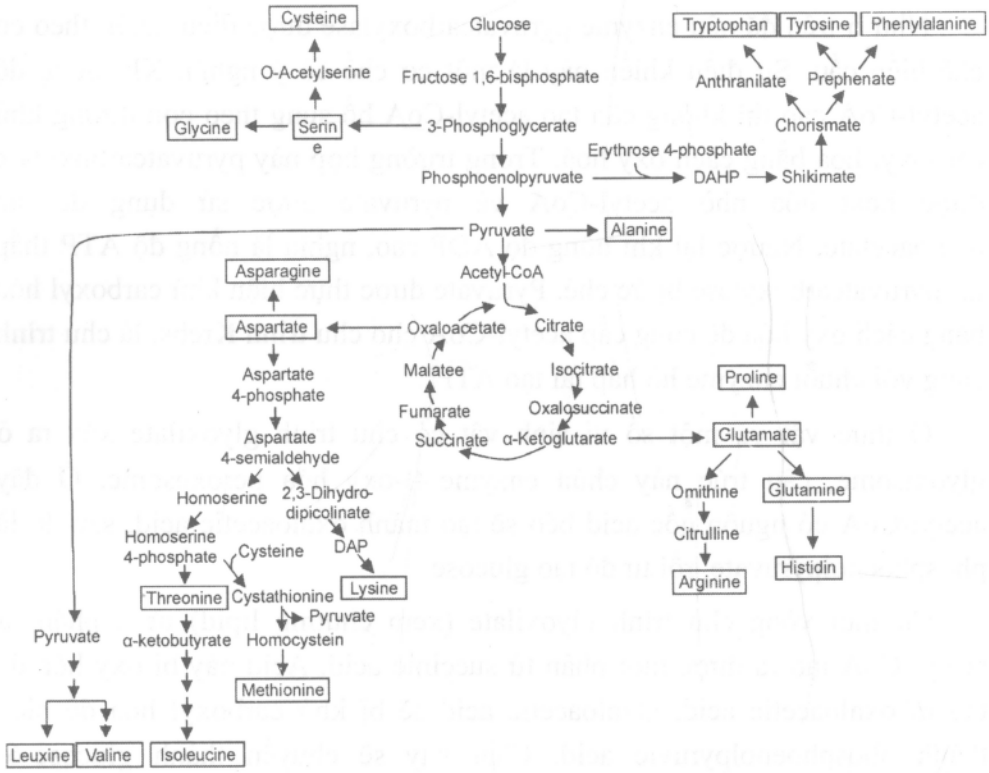
Sự phân giải carbohydrate tạo ra một số α-cetoacid, khi amine hóa chúng sẽ tạo thành các aminoacid tương ứng. Các α-cetoacid đó là:

pyruvic acid ⇔ alanine

α-cetoglutaric acid ⇔ glutamic acid

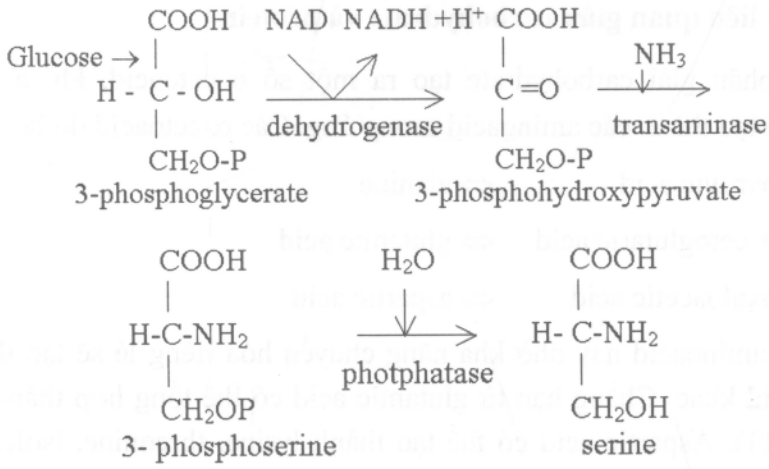
oxaloacetic acid ⇔ aspartic acid

Các aminoacid này nhờ khả năng chuyển hóa riêng lẻ sẽ tạo thành các aminoacid khác. Chẳng hạn từ glutamic acid có thể tổng hợp thành proline (hình 7.11). Aspartic acid có thể tạo thành lysine, threonine, isoleucine và methionine.



8.2. Các đường hướng tổng hợp aminoacid trong thực vật

Một sản phẩm khác của sự phân giải carbohydrate là 3-phosphoglycerate. Chất này tạo thành serine bằng cách sau:



Từ serine có thể tạo thành cysteine hoặc glycine (nhờ phản ứng loại bỏ nhóm gốc).

Ngược lại một số aminoacid (alanine, phenylalanine, tyrosine, histidine, tryptophan, serine, cysteine, glutamic acid, proline, aspartic acid) được coi là các aminoacid tạo glucose. Trong quá trình trao đổi chất các aminoacid này tạo thành pyruvic acid hoặc một hợp chất trung gian của chu trình Krebs như α-cetoglutarate, oxaloacetate. Từ oxaloacetate có thể tạo ra phosphoenolpyruvate, rồi từ đó sẽ tổng hợp nên glucose.

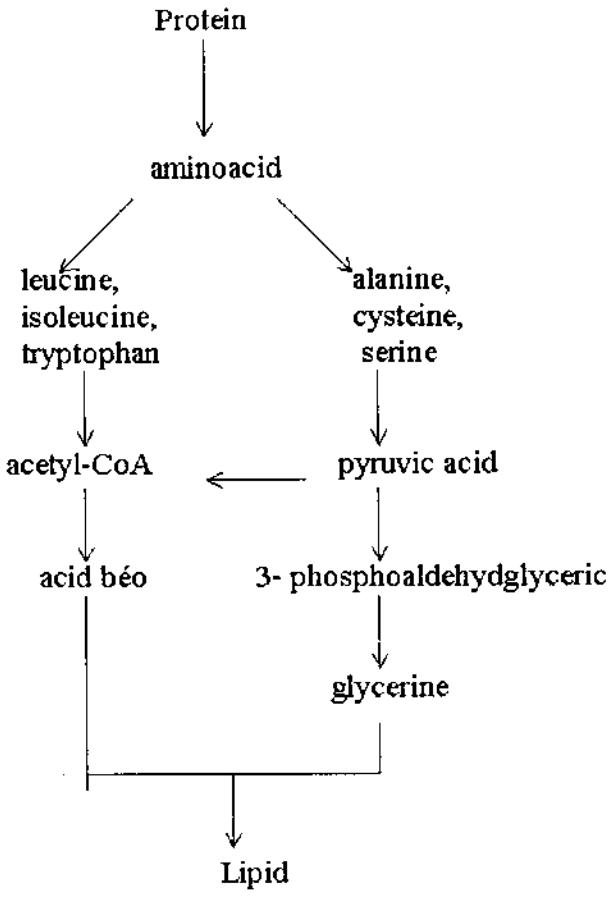
Ngoài ra giữa quá trinh dị hóa glucid (chu trình Krebs) và quá trình dị hóa aminoacid (chu trình ornithine) có những giai đoạn tạo ra những sản phẩm trung gian giống nhau, đó là aspartic acid, glutamic acid, fumaric acid. Điều đó chứng tỏ sự trao đổi carbohydrate cũng ảnh hưởng qua lại đối với sự trao đổi protein.

8.3. Mối liên quan giữa lipid và protein

Acid béo là tiền chất của một số aminoacid thông qua các quá trình sau: hoặc qua chu trình Krebs, một số aminoacid được tổng hợp từ α-cetoglutaric acid, hoặc qua chu trình glyoxilate, tạo ra oxaloacetic acid. Oxaloacetic acid bị loại carboxyl tạo thành pyruvate từ 2 chất này một số aminoacid cũng được tổng hợp (hình 8.2).

Ngược lại một số aminoacid (leucine, isoleucine, tryptophan) khi phân giải sẽ tạo thành acetyl-CoA, từ đó tổng hợp nên acid béo. Một số aminoacid khác (alanine cysteine, serine) bị phân giải thành pyruvic acid. Theo con đường tổng hợp mới glucose, pyruvic acid sẽ tạo thành 3-phosphoaldehydglyceric (ngược quá trình đường phân).

Sự chuyển hóa protein thành lipid có thể khái quát trong sơ đồ sau:


Protein
aminoacid
leucine,
isoleucine,
tryptophan
alanine,
cysteine,
serine
acetyl-CoA
pyruvic acid
acid béo
3- phosphoaldehydglyceric
glycerine
Lipid

Chương IX
CÁC CHẤT CÓ NGUỒN GỐC THỨ CẤP

Ngoài các chất carbohydrate, lipid, protein, nucleic acid, ... trong thực vật còn tồn tại những hợp chất khác nhau do quá trình trao đổi các chất nói trên tạo thành. Mặc dầu chúng chỉ chiếm một tỷ lệ rất ít trong cây, nhưng các chất này quy định tính đặc thù của sự trao đổi chất trong từng loại thực vật. Các hợp chất này được gọi là các chất có nguồn gốc thứ cấp.

Một số trong chúng ví dụ như các acid hữu cơ vừa mới được tạo thành đã được tế bào sử dụng vào các quá trình tổng hợp khác nhau, do vậy chúng không được tích lũy với lượng lớn mà là các sản phẩm trung gian của quá trình trao đổi chất.

Một số chất khác ví dụ như các hợp chất phenol, tannin, alkaloid, tinh dầu lại được tích lũy với lượng lớn, do đó có tính đặc thù về trao đổi chất.

Trong phạm vi giáo trình này, chúng tôi xin giới thiệu một số nhóm hợp chất quan trọng.

1. Tannin

Tên gọi tannin được đề xuất vào năm 1796 để ký hiệu nhóm hợp chất chứa trong một số cây vốn dùng để thuộc da động vật.

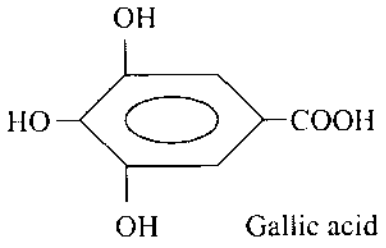
Từ "tan" có nguồn gốc từ tiếng latinh của cây sồi, vì từ vỏ cây sồi người ta thu được chất thuộc da.

Các tannin được chia thành 2 nhóm: Các tannin có thể thủy phân được và các tannin không thể thủy phân được.

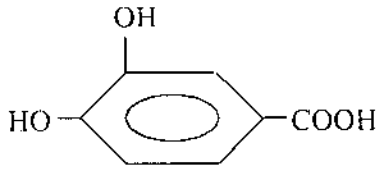
1.1. Các tannin có thể thủy phân được: Có đặc tính ester. Chúng là dẫn xuất của gallic acid và protocatechic acid. Hai gallic acid kết hợp với nhau tạo thành digallic acid. Acid này có vai trò trong việc tạo thành tannin.

1.2. ***Tannin không thể thủy phân được***: Trong thành phần có catechin và gallocatechin. Hai chất này khi phản ứng với gallic acid sẽ cho ta catechingallate và gallocatechingallate.

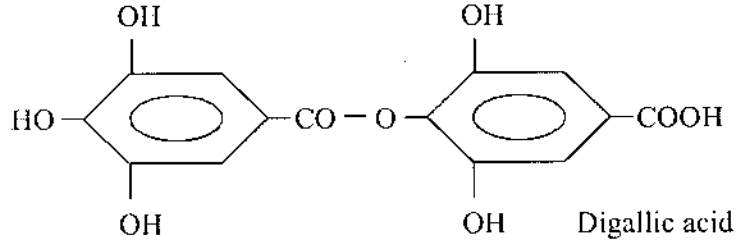
Theo Kursanov thì tannin của chè xanh có 12% gallic acid tự do, 78% catechingallate và một ít catechin tự do.



Gallic acid



Protocatechic acid



Digallic acid

2. Các acid hữu cơ

Được hình thành do quá trình trao đổi chất, chúng tham gia vào chu trình Krebs và những biến đổi trung gian khác.

Tuy nhiên một số thực vật cũng tích lũy một số acid hữu cơ khác nhau ở các cơ quan khác nhau như ở lá, quả, thân,...chính những acid này gây nên pH khác nhau của tế bào. Có 2 nhóm acid hữu cơ:

- *Nhóm dễ bay hơi*: thường có mùi hắc như acetic acid, butyric acid

- *Nhóm không bay hơi*: thường là các acid hữu cơ chứa nhóm -OH hoặc nhóm cetone như pyruvic acid, glycolic acid, oxaloacetic acid, malic acid,

Sau đây là một số acid hữu cơ quan trọng:

2.1. Citric acid: Acid này có phổ biến trong cây trồng. Trong quả các cây thuộc họ cam, quýt, citric acid là acid hữu cơ chủ yếu. Ở chanh hàm lượng citric acid đạt tới 9% trọng lượng khô. Citric acid được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và như là chất bảo quản trong truyền máu.

2.2. Malic acid (HOOC - CH_2 – CHOH - COOH): Malic acid chiếm ưu thế ở quả táo tây và quả các cây có hạt. Malic acid có ở hạt và ở lá các cây ngũ cốc, các cây đậu đỗ. Trong thuốc lá và thuốc lào, hàm lượng malic acid đạt 6,5%. Malic acid chứa nhiều ở các cây mọng nước (lá bỏng, xương rồng), cà chua, ...

Malic acid có hương vị dễ chịu, không độc đối với cơ thể người. Nó được sử dụng rộng rãi để sản xuất nước quả và bánh kẹo.

*2.3. **Oxalic acid*** (HOOC - COOH): Có phổ biến ở trong cây trồng ở dạng tự do cũng như ở dạng muối. Ở quả, oxalic acid thường có lượng rất nhỏ 0,005-0,06% nhưng trong lá một số cây như chua me, oxalic acid lại có một hàm lượng lớn.

*2.4. **Tartric acid*** (HOOC - CH(OH) - CH(OH) - COOH): Tartric acid thường có trong cây dưới dạng D-tartric acid, cũng có thể ở dạng L-tartric acid. Nó chứa nhiều trong quả nho. Tartric acid và muối kali của nó được sử dụng trong sản xuất nước quả, trong công nghiệp hóa chất và công nghiệp dệt.

3. Glycoside

Glycoside là những dẫn xuất của carbohydrate (thường là dẫn xuất của monose) với các hợp chất có bản chất hóa học rất khác nhau không phải là carbohydrate. Phần không phải carbohydrate được gọi là aglycon (aglycon có thể là rượu, các hợp chất thơm, các alkaloid, ...)

Tùy thuộc vào kiểu liên kết giữa phần carbohydrate và aglycon mà người ta chia ra các nhóm sau:

*3.1. **S-glycoside***: Aglycon kết hợp với carbohydrate qua lưu huỳnh. Ví dụ: Sinigrin ở củ cải đắng, có mùi hắc:

$$CH_2 = CH - CH_2 - NC \begin{cases} S.C_6H_{11}O_5 \\ OSO_2OK \end{cases}$$

Sinigrin

*3.2. **N-glycoside***: Aglycon kết hợp với carbohydrate qua N.

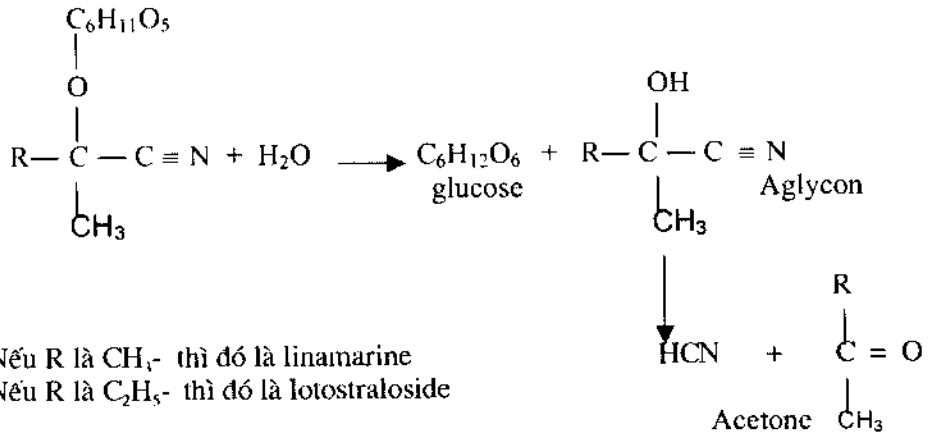
Ví dụ các nucleotide

*3.3. **C-glycoside***: Aglycon kết hợp với carbohydrate qua C.

*3.4. **O-glycoside***: Aglycon kết hợp với carbohydrate qua oxi (O), ví dụ - Solanin: rất phổ biến trong mầm khoai tây, trong thân lá khoai tây.

- Saponin: không chứa nitơ trong phân tử của chúng. Saponin có khả năng phá hủy hồng cầu, làm hoà tan hồng cầu. Saponin có nhiều ở cây *Offininalis*, hàm lượng Saponin đạt cực đại ở thời kỳ bắt đầu ra hoa và cực tiểu ở thời kỳ chín quả.

Ở sắn có loại glycoside sinh ra HCN. Đó là linamarine và lotostraloside. Các glycoside này tan trong nước. Sản phẩm của sự phân hủy này là glucose và aglycon. Phân hủy aglycon này sẽ tạo ra HCN:



Nếu R là CH_3- thì đó là linamarine
Nếu R là C_2H_5- thì đó là lotostraloside

4. Alkaloid

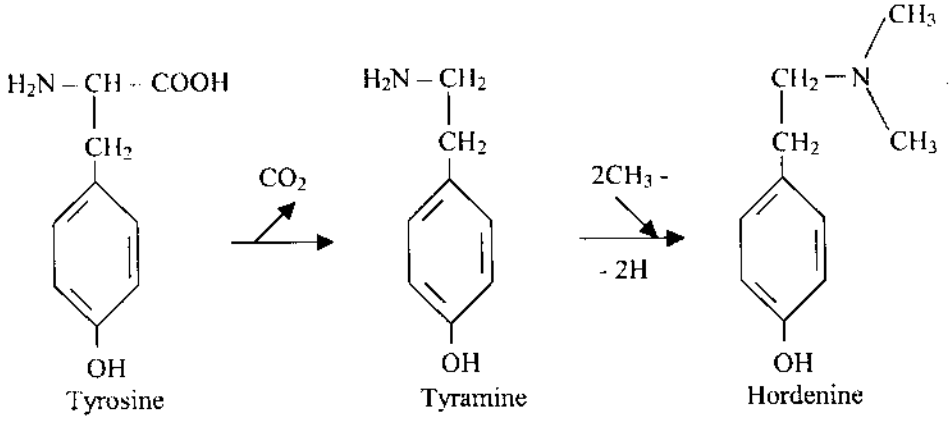
Là những chất dị vòng chứa nitơ, có đặc tính kiềm và có tác dụng sinh lý mạnh, nhiều alkaloid là những chất độc.

Đại bộ phận alkaloid tác động đến hệ thần kinh. Ở liều lượng thấp chúng có tác dụng kích thích, còn ở liều lượng cao chúng có tác dụng ức chế.

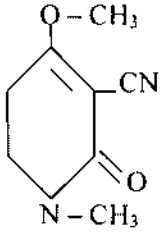
Ví dụ: Cocaine được sử dụng trong y học như là chất giảm đau tại chỗ, tác động đến những đầu cảm giác của hệ thần kinh ngoại biên. Trong quả cà độc dược chứa atropine là chất tác động mạnh đến các dây thần kinh vận động của mắt, làm cho đồng tử dãn ra.

Sau đây là một số alkaloid điển hình:

4.1. Hordenine: Có trong hạt đại mạch lúc nảy mầm với một lượng khoảng 0,2%. Tác dụng của hordenine là làm tăng huyết áp của người và động vật. Trong thực vật, hordenine được tạo thành từ aminoacid là tyrosine, theo sơ đồ sau:

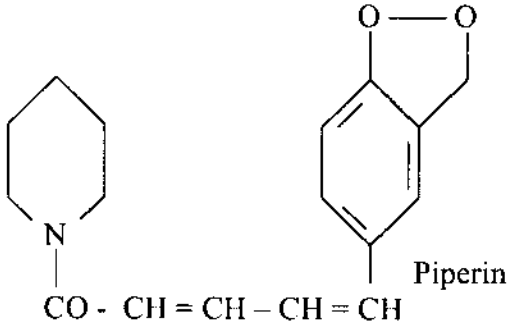


*4.2. **Ricinin***: là alkaloid có ở cây thầu dầu (trong hạt chứa khoảng 0,15%, trong lá non gần 1%). Ricinin có độc tính vì chứa nhóm CN. Do hàm lượng ricinin có nhiều trong bã khô thầu dầu (đến 0,2%) nên người ta không dùng khô dầu thầu dầu để làm thức ăn cho gia súc.



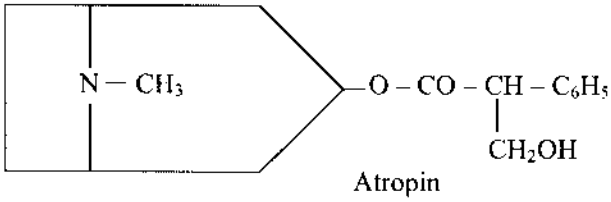
Ricinin

*4.3. **Piperin***: có nhiều trong ớt, trong hạt hồ tiêu (từ 5 - 9%). Piperin không độc, nó chỉ gây cảm giác cay nồng ở từng bộ phận.



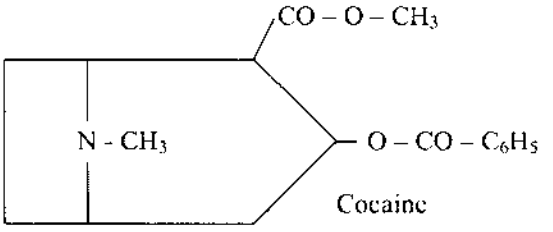
Piperin

*4.4. **Atropin***: Có nhiều trong quả cà độc dược và trong hạt cây họ cà. Atropin có tác dụng mạnh lên hệ thần kinh hoạt động của mắt. Atropin có thể được dùng làm chất giải độc khi bị ngộ độc bởi nicotin. Các liều lượng điều trị cao của atropin là 0,001-0,003 gam. Ở liều lượng cao hơn thì atropin là một chất độc.



Atropin

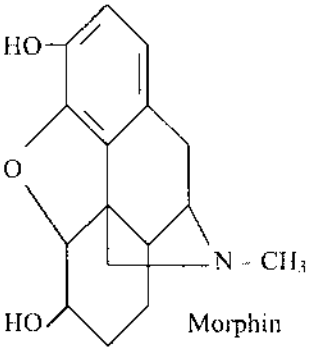
*4.5. **Cocaine***: là alkaloid chủ yếu của loại cây coca ở miền Nam Mỹ. Cây này hiện nay cũng được trồng ở Ấn Độ và trên đảo Java. Hàm lượng cocaine trong lá đạt từ 1-2%.



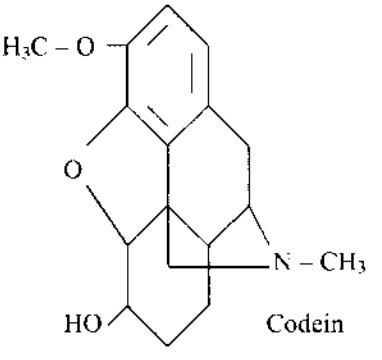
Cocaine

Cocaine làm tê liệt hệ thần kinh cảm giác và được dùng làm chất gây tê bộ phận. Ngoài ra nó cũng có tác dụng lên hệ thần kinh trung ương và gây nên cảm giác say rất đặt trưng. Khi uống nhiều lần cocaine, cơ thể sẽ quen với cocaine và sẽ bị bệnh nghiện cocaine. Liều lượng độc của cocaine đối với người làm là 0,2gam.

4.6. Morphin: Morphin và methylic ether của nó tức là codein có ý nghĩa nhất.



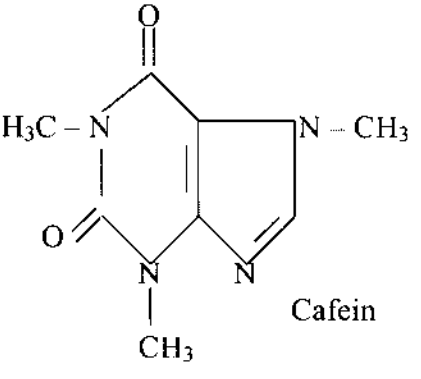
Morphin



Codein

Morphin là một chất an thần, làm giảm đau. Nó có tác dụng lên hệ thần kinh trung ương và thần kinh ngoại vi.

4.7. Cafein: Có trong hạt cà phê (1-3%), trong lá chè (đến 5%), còn có trong cacao và một số cây khác.

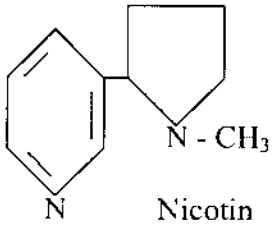


Cafein

Cafein kích thích hệ thần kinh trung ương và hoạt động của tim. Dưới tác dụng của cafein thì huyết áp sẽ cao.

Cafein có tác dụng thông tiểu. Cafein được dùng trong việc điều trị các bệnh về tim và được dùng làm thuốc lợi tiểu.

4.8. Nicotin: Trong thuốc lá (1 - 10%) trung bình 4 %. Nicotin là một chất rất độc. Nó có tác dụng mạnh lên hệ thần kinh trung ương và hệ thần kinh ngoại vi. Dưới tác dụng của nicotin xảy ra sự co mạch máu do huyết áp tăng mạnh. Con người có thể chết do tê liệt hô hấp khi uống vào một lượng khoảng 0,01 hay 0,04 gam nicotin. Vì có độc tính cao nên trong y học người ta không dùng nicotin. Tuy nhiên nó cũng được ứng dụng rộng rãi trong thú y để chống các bệnh ngoài da hoặc ứng dụng trong việc chống sâu bọ phá hoại mùa màng.



Nicotin

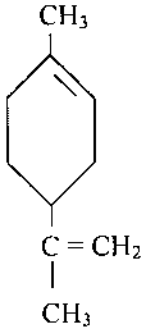
Nicotin được phát minh từ rễ. Rễ phát triển tốt thì nicotin càng nhiều. Trồng thưa, ruộng không đủ nước, ngắt ngọn sớm thì ở thuốc lá hàm lượng nicotin càng cao. Đất tốt, bón nhiều đạm, nicotin càng nhiều.

5. Terpen

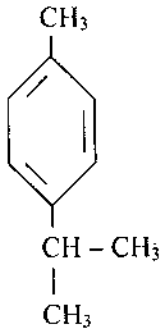
Là thành phần chủ yếu của tinh dầu. Sự có mặt của terpen quy định mùi vị của nhiều thực vật (hoa hồng, hoa nhài, lá chanh, lá sả, ...)

Một số ví dụ về terpen:

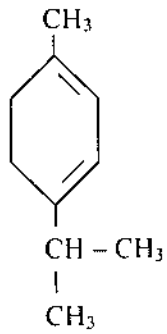
- Limonen: có trong tinh dầu thông, tinh dầu họ chanh.
- Cimol có trong dầu khuynh diệp, bạch đàn.
- Terpinene, xivestren có trong dầu thông.
- Pinen có trong dầu thông.
- Menthol: có trong dầu bạc hà



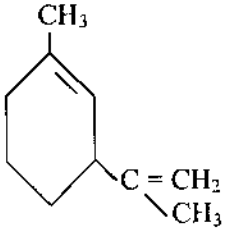
Limonen



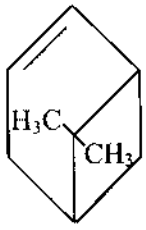
Cimol



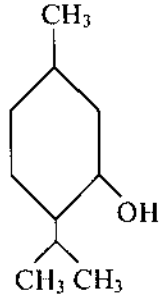
Terpinene



Xivestren



Pinen



Menthol

6. Cao su và nhựa kết (Gutta)

- Trong thực vật được tạo thành từ isopren:

$$\left(-CH_2 - \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{C}} = CH - CH_2 - \right)_n$$

n = 500 - 5000: gọi là cao su

n = 100: gọi là gutta-percha

* Cao su là hợp chất cao phân tử polyisopren được hình thành trong mủ các cây thuộc 300 tộc khác nhau. Trong số những cây này chỉ có cây cao su *Hevea Brasiliensis* được sử dụng với quy mô công nghiệp.

Mủ chứa các hạt cao su được tích lũy trong các tế bào chuyên dụng là ống nhựa. Ở cây cao su, mủ được hình thành và tích lũy trong vỏ cây và các ống nhựa vòng. Nhờ có các ống nối giữa các ống dẫn cạnh nhau trong các ống nhựa vòng mà mủ có thể chảy ra từ một vòng lớn của vỏ cây trong khi khai thác mủ.

* Nhựa kết (gutta) được hình thành trong các cây tộc *Palaquium* (*Sapotaceae*) mọc nhiều ở Malaysia. Mủ các cây này không chảy ra dễ dàng như mủ cao su, do vậy để thu hoạch mủ phải chặt cây. Điều này dẫn đến việc tiêu diệt dần nguồn nhựa kết ban đầu *Palaquium gutta*.

Nhựa kết là chất dẻo về nhiệt. Thuật ngữ chuyên môn gọi là chất nhiệt dẻo. Ở nhiệt độ dưới 65°C nó không dẻo và cứng nhưng ở nhiệt độ 65°C thì chuyển thành dạng mềm, đàn hồi nhưng vẫn chưa dẻo.

7. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật là một nhóm chất có bản chất hóa học khác nhau nhưng đều có một tác dụng điều hoà quá trình sinh trưởng, phát triển của cây và đảm bảo mối liên hệ giữa các cơ quan, bộ phận của cây.

Chất điều hoà sinh trưởng thực vật được chia ra làm 2 nhóm:

a. Các chất kích thích sinh trưởng.

b. Các chất ức chế sinh trưởng.

Hai nhóm này có tác dụng đối kháng với nhau về mặt sinh lý.

- Các chất kích thích sinh trưởng bao gồm các chất mà ở nồng độ sinh lý có tác dụng kích thích quá trình sinh trưởng của cây (gồm các nhóm chất auxin, gibberellin và cytokinin).

- Các chất ức chế sinh trưởng gây tác dụng ức chế lên quá trình sinh trưởng của cây (gồm các chất như abcisic acid (ABA), ethylene; các chất phenol, các chất làm chậm sinh trưởng, các chất diệt cỏ, ...)

* Các chất điều hoà sinh trưởng do cây tự tổng hợp gọi là chất tự nhiên, còn các chất do con người tổng hợp bằng con đường hóa học gọi là chất nhân tạo.

Bảng phân loại các chất điều hoà sinh trưởng thực vật

Chất điều hoà sinh trưởng tự nhiên	Chất điều hoà sinh trưởng nhân tạo
A. Chất kích thích sinh trưởng (Stimulator)	
1. Auxin (IAA, IAN, PAA)	Auxin nhân tạo (IBA, α-NAA; 2,4D; 2,4,5T, MCPA)
2.Gibberellin (GA_1, GA_2, GA_3,..., GA_{54})	
3. Cytokinin (Zeatin, diphenylurea)	Cytokinin nhân tạo (kinetin, BA, ...)
B. Chất ức chế sinh trưởng (Inhibitor)	
1. Abcisic acid (ABA)	Chất làm chậm sinh trưởng (CCC, MH, TIBA)
2. Ethylene	CEPA
3. Phenol	

Các danh pháp quốc tế:

IAA: β-indol acetic acid.

IAN: β-indol acetonitril.

PAA: Phenyl acetic acid.

IBA: β-indol butyric acid.

α –NAA: α-Naphtyl acetic acid.

2,4D: 2,4 dichlorophenoxyacetic acid.

2,4,5 T: 2,4,5 trichlorophenoxyacetic acid

MCPA: 4 chloro, 2 methyl phenoxyacetic acid.

ABA: Abcisic acid.

BA: Benzyladenin.

CCC: Chlorocholine chlorid.

MH: Malein hydrazide.

TIBA: Triiodobenzoic acid.

CEPA: Chloroethylenphosphoric acid

A. CÁC CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT

1. Auxin

1.1. Lịch sử phát hiện

Năm 1880, Dacwin đã phát hiện ra hiện tượng hướng quang ở thế giới thực vật.

Hướng quang là khả năng hướng về nguồn ánh sáng chiếu từ một hướng như các cây trồng ở cửa sổ luôn luôn vươn ra ngoài cửa sổ.

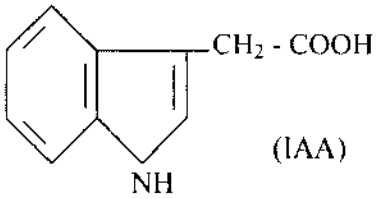
Hiện tượng hướng quang đặc biệt rõ rệt nhất đối với bao lá mầm các cây hoà thảo (Coleoptyl), vì vậy chúng là đối tượng được dùng nhiều trong việc nghiên cứu tính hướng quang ở thực vật. Nếu chiếu sáng từ một hướng đến ngọn bao lá mầm thì sẽ gây nên sự uốn cong hướng về nguồn sáng, nhưng nếu để chúng trong tối hoặc loại trừ đỉnh ngọn của bao lá mầm thì hiện tượng đó không xảy ra. Ông cho rằng đỉnh ngọn của bao lá mầm là nơi tiếp nhận kích thích của ánh sáng.

Sau đó Boyen Jensen đã phát hiện ra rằng đỉnh ngọn bị loại trừ đó nếu đặt trở lại trên bề mặt của bao lá mầm đó thì nó có khả năng gây phản ứng hướng quang bình thường như trường hợp cây nguyên vẹn. Như vậy thì một chất gây hướng quang nào đó sản sinh trong đỉnh ngọn và vận chuyển theo hướng gốc đã gây nên sự sinh trưởng khác nhau của các mô phía dưới.

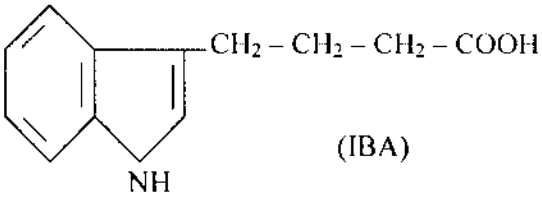
Paal (1919) đã cắt rời đỉnh bao lá mầm và đặt lại lên bề mặt cắt nhưng lệch sang một bên và để trong tối. Hiện tượng uốn cong hướng động xảy ra mạnh mẽ như trường hợp có chiếu sáng một hướng. Ông cho rằng đỉnh ngọn đã hình thành nên một chất sinh trưởng nào đấy, còn ánh sáng xác định sự phân bố của chất đó về hai phía của bao lá mầm.

Năm 1933 Kogh (Hà Lan) đã báo cáo rằng ông đã tách được auxin A và auxin B từ nước tiểu người. Ông đã công bố trọng lượng phân tử của auxin A là 328. Các chất này đã gây ra phản ứng uốn cong mạnh của bao lá mầm cây lúa mạch. Năm 1934, Kogh và Kosterman đã tách được chúng từ dịch chiết nấm men và năm 1935 đã tách được chúng từ dịch của môi trường nuôi cấy nấm Rhizopus.

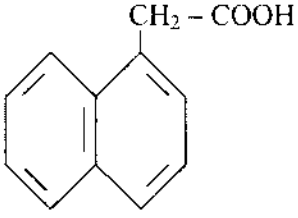
Tiếp theo người ta đã xác định bản chất hóa học của auxin. Đó chính là β-indolylacetic acid (IAA). Vì lúc đầu người ta chưa xác định được sự tồn tại của auxin trong cây nên người ta gọi chất đó là ***heteroauxin***. Những năm về sau người ta lần lượt tách được auxin từ các đại diện của thực vật thượng đẳng khác nhau và chứng minh rằng đây là một phytohormone quan trọng nhất tồn tại trong toàn bộ thế giới thực vật. Đồng thời người ta cũng đã tổng hợp được rất nhiều các hợp chất khác nhau nhưng có hoạt tính sinh lý tương tự như IAA và thậm chí nhiều chất có hoạt tính mạnh hơn nhiều so với IAA và chúng được sử dụng rộng rãi trong sản xuất nhằm điều chỉnh sinh trưởng của cây trồng có lợi cho con người. Chúng thường có dạng mạch vòng. Đó là các dẫn xuất của indol như β-indol butyric acid (IBA); β-indol propionic acid (IPA), ...Các dẫn xuất cuả naphtalen như α-naphtylacetic acid (α-NAA); β-naphtylacetic acid (β-NAA); Các dẫn xuất của chlorophenoxyaxetic acid như 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4D); 2,4,5 trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5T)



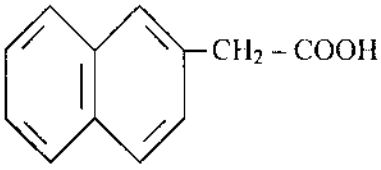
(IAA)



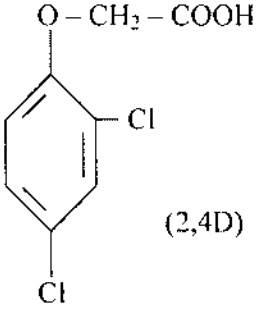
(IBA)



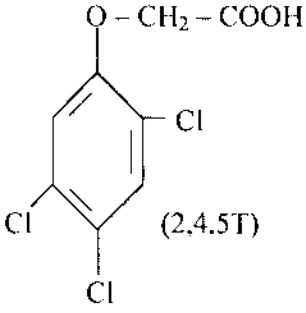
(α-NAA)



(β-NAA)



(2,4D)



(2,4,5T)

1.2. Các dạng auxin trong cây

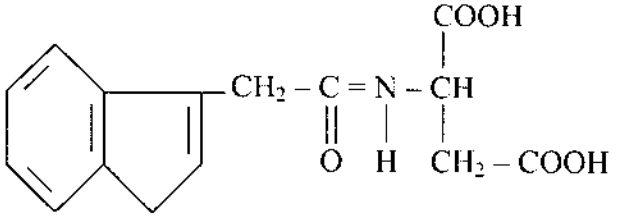
Auxin được tổng hợp chủ yếu ở đỉnh sinh trưởng ngọn, từ đó vận chuyển đến các cơ quan khác nhau theo hướng gốc. Ngoài đỉnh sinh trưởng ngọn, auxin còn được tổng hợp một phần ở các cơ quan còn non như lá non, chồi non, quả non.

Trong cây auxin tồn tại ở hai dạng: dạng tự do và dạng liên kết.

* *Auxin dạng tự do*: là dạng có hoạt tính sinh học. Chúng tồn tại ở đỉnh sinh trưởng ngọn, sau đó đến chồi bên, đầu rễ và các cơ quan non. Càng xa đỉnh sinh trưởng nồng độ auxin tự do càng giảm dần.

Dạng auxin tự do chủ yếu trong cây là IAA. Auxin tự do trong cây chiếm một tỷ lệ rất thấp. Nhiều tài liệu đã công bố hàm lượng auxin tự do trong cây chiếm khoảng 5% auxin tổng số.

* *Auxin dạng liên kết*: là dạng auxin chủ yếu trong cây. Hàm lượng của dạng liên kết này có thể chiếm trên 90% lượng auxin có trong cây. IAA có thể liên kết với rất nhiều các hợp chất khác nhau nên chúng không có hoạt tính sinh học hoặc có hoạt tính rất thấp. IAA có thể liên kết với đường; các aminoacid và amide để tạo nên các auxin liên kết như IAA-glycoside, IAA-glucan, indolacetamide, indolacetylaspartate, indolacetylglutamate, indolacetylinositol, indolacetylarabinose, ...



Indolacetylaspartate

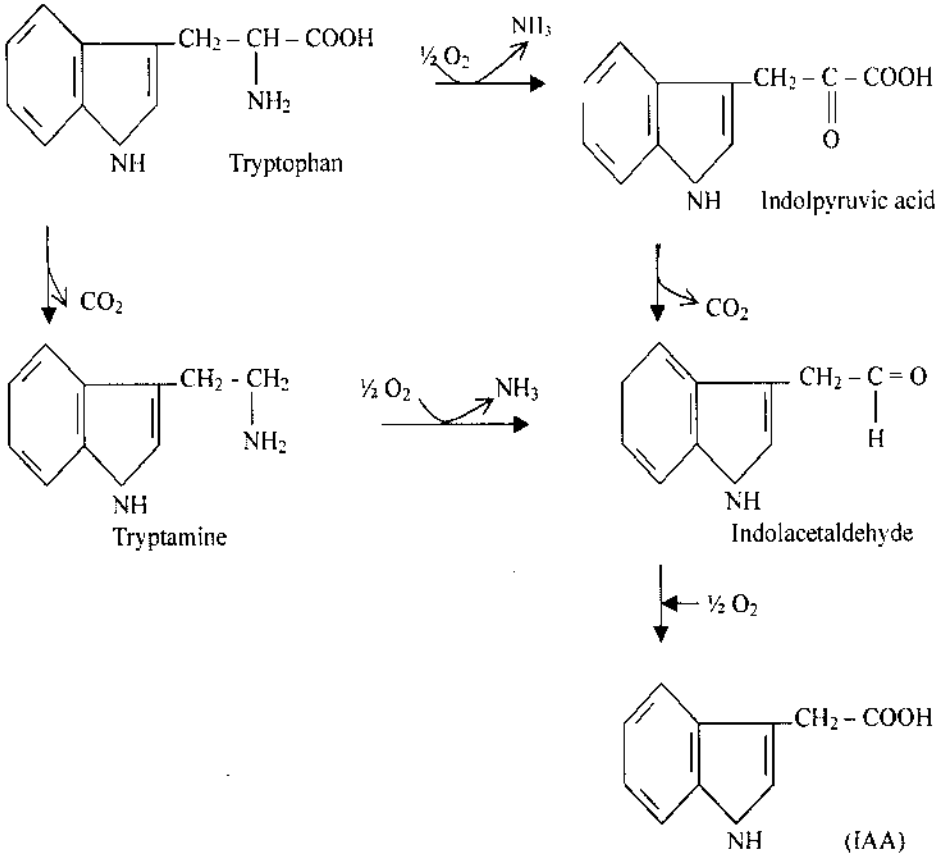
* Chức năng của auxin liên kết trong cây hết sức quan trọng. Trước hết chúng là nguồn dự trữ auxin trong cây. Sự liên kết của IAA với đường, với các aminoacid và các chất khác làm cho chúng bền vững với các tác nhân có thể làm phá hủy auxin và là phương thức tốt nhất để chống lại sự tác động của các peroxidase phân hủy auxin. Người ta đã chứng minh rằng auxin liên kết là dạng auxin vận chuyển chủ yếu trong cây. Vì vậy, sự biến đổi thuận nghịch của IAA tự do $\rightleftarrows$ IAA liên kết dưới tác nhân kích thích của môi trường góp phần điều chỉnh sự cân bằng auxin trong cây và do đó điều chỉnh quá trình sinh trưởng của cây.

1.3. Sự tổng hợp auxin trong cây

Cơ quan tổng hợp auxin là đỉnh sinh trưởng ngọn. Từ mô phân sinh đỉnh, IAA được vận chuyển xuống các cơ quan phía dưới; auxin còn được tổng hợp ít hơn ở trong các cơ quan đang sinh trưởng như lá non, quả non, rễ non, ...

Người ta đã xác nhận chất tiền thân để tổng hợp nên IAA là aminoacid tryptophan.

Sơ đồ tổng hợp auxin trong cây

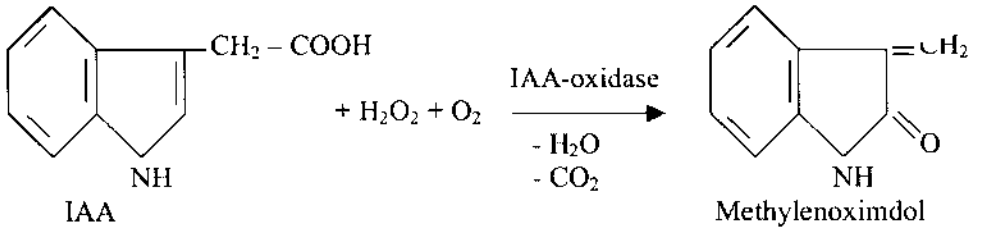


1.4. Sự phân giải auxin trong cây

Sự phân giải auxin trong cây xảy ra trong các trường hợp sau: Khi có thừa auxin do sự tổng hợp quá nhiều auxin trong cây và sau khi auxin đã gây hoạt tính sinh lý với cây xong.

Việc làm mất hoạt tính auxin có thể xảy ra bằng hai con đường: Sự oxy hóa bằng enzyme IAA-oxidase và sự quang oxy hoá.

* Sự oxy hóa bằng enzyme IAA-oxidase: Đây là enzyme oxy hóa IAA, enzyme này hoạt động rất mạnh trong hệ thống rễ thực vật để làm mất hoạt tính của IAA vận chuyển xuống đó là nơi cuối cùng. Phản ứng oxy hóa của IAA xảy ra như sau:

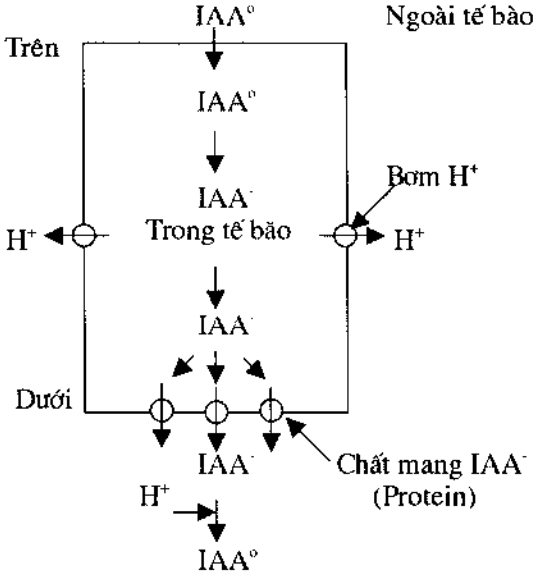


* Sự mất hoạt tính của IAA có thể xảy ra do ánh sáng. Người ta nhận thấy rằng ánh sáng tử ngoại có thể làm mất hoạt tính của IAA, bởi vì cấu trúc vòng của phân tử IAA hấp thu ánh sáng tử ngoại $\lambda = 280$ nm và gây nên sự phân giải IAA.

1.5. Sự vận chuyển của IAA trong cây

Auxin được tổng hợp trong đỉnh ngọn và từ đấy vận chuyển xuống các cơ quan phía dưới. Sự vận chuyển của auxin trong cây có tính phân cực rõ rệt, theo hướng gốc, tức là từ ngọn xuống rễ mà không vận chuyển ngược lại.

- Cơ chế của sự vận chuyển phân cực của IAA trong cây đã được người ta đưa ra một sơ đồ dựa theo thuyết hóa thẩm của Goldsmith (1977) như sau:



Theo thuyết hóa thẩm của Goldsmith thì:

- Chỉ có IAA^o không bị oxy hóa mới khuyếch tán qua màng tế bào phía trên vì IAA^o thấm qua được màng lipit.

- Bên trong tế bào, pH cao hơn vì có các bơm H^+ hoạt động, do đó IAA^o bị ion hóa thành IAA^-. Nồng độ IAA^- tăng lên và không vận chuyển ra khỏi tế bào được vì không tan được trong lipid.

- Do nồng độ của IAA^o trong tế bào giảm nên tồn tại một gradient IAA^o giữa bên ngoài và bên trong tế bào, IAA^o sẽ khuyếch tán vào tế bào.

- IAA^- được vận chuyển ra khỏi tế bào nhờ các chất mang protein đặc hiệu nằm ở màng tế bào phía dưới. Khi ra khỏi tế bào, do pH thay đổi nên $IAA^- \rightarrow IAA^o$ và tiếp tục vận chuyển sang tế bào ở dưới nó.

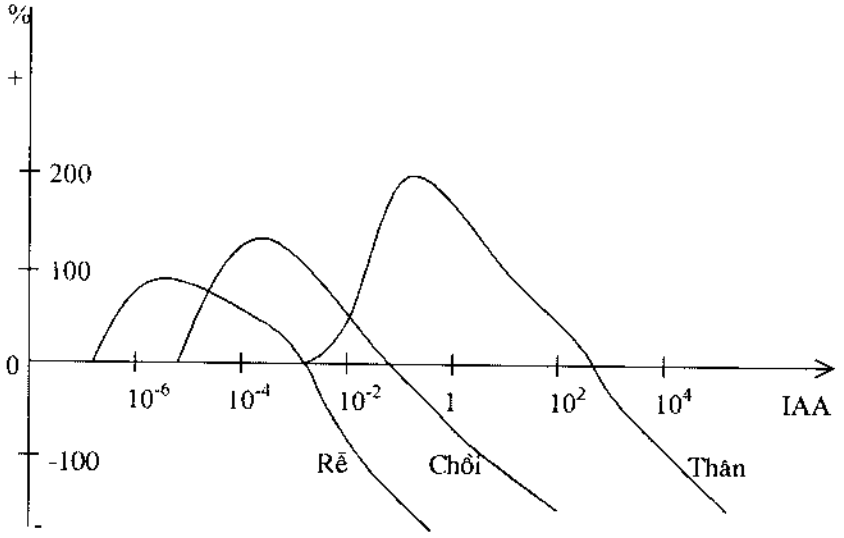
Ngoài sự vận chuyển phân cực này, bằng nguyên tử đánh dấu người ta còn xác nhận có một sự vận chuyển ngược lại (hướng ngọn) nhưng tỷ lệ thấp. Sự vận chuyển phân cực là quá trình cần năng lượng ATP, còn sự vận chuyển ngược lại là quá trình khuyếch tán.

Tốc độ vận chuyển của auxin trong cây rất thấp, khoảng 1 cm/h trong rễ và thân.

1.6. Hiệu quả sinh lý của auxin đối với cây

Các cơ quan khác nhau có hàm lượng auxin khác nhau. Hàm lượng này còn phụ thuộc vào tuổi cây, vào điều kiện ngoại cảnh. Các cơ quan còn non đang sinh trưởng có hàm lượng auxin cao hơn các cơ quan trưởng thành và cơ quan già. Tuy nhiên, phản ứng sinh trưởng của các cơ quan khác nhau phụ thuộc vào hàm lượng auxin là rất khác nhau. Nói chung thân cây cảm ứng kích thích với nồng độ auxin cao hơn chồi và rễ.

Sau đây là đồ thị minh hoạ mối quan hệ giữa nồng độ auxin và sự sinh trưởng:



a) Auxin và tính hướng quang, hướng địa:

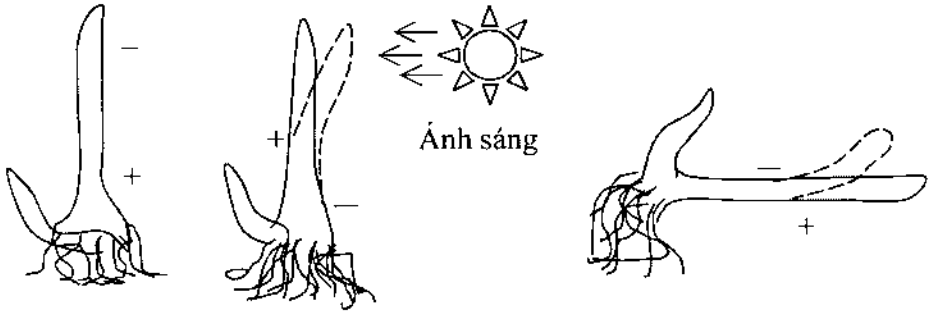
* Hướng quang (phototropism) là sự sinh trưởng của cây hướng về nguồn sáng kích thích một hướng.

* Tính hướng địa (geotropism) là phản ứng sinh trưởng của cây dưới tác động của lực hút trái đất (trọng lực).

Từ khi phát hiện ra auxin người ta đã giải thích tính hướng quang và hướng địa của cây trên cơ sở sự phân bố của auxin ở hai phía của cơ quan khác nhau dẫn đến sự sinh trưởng khác nhau ở hai phía của cơ quan và kết quả là gây nên sự uốn cong hướng động.

Cơ sở của sự phân bố của auxin khác nhau là do sự khác nhau về điện thế (điện sinh học).

Khi chiếu sáng từ một hướng thì phía khuất sáng sẽ tích điện dương và phía chiếu sáng sẽ tích điện âm. Một cơ quan nằm ngang thì mặt trên sẽ tích điện âm và mặt dưới sẽ tích điện dương. Người ta có thể đo điện thế của cơ quan trong các trường hợp đó.



Ở trong tế bào IAA thường ở dạng IAA^- và do đó mà phân bố về phía mang điện dương. Khi có ánh sáng chiếu một chiều thì auxin phân bố về phía khuất sáng và hàm lượng của IAA ở đó cao hơn gây sự sinh trưởng mạnh hơn ở phía khuất sáng và làm cho cây sinh trưởng uốn cong về phía chiếu sáng.

Trong trường hợp hướng địa thì với cơ quan nằm ngang, auxin sẽ phân bố ở phía dưới nhiều hơn, gây nên sự sinh trưởng của mặt dưới nhanh hơn mặt trên làm cho chồi ngọn sinh trưởng uốn cong lên trên. Tuy nhiên do rễ phản ứng kích thích với nồng độ auxin thấp hơn nhiều so với thân, nên nồng độ auxin cao sẽ gây ức chế và do đó mà sự sinh trưởng của mặt dưới chậm hơn mặt trên làm cho rễ đâm vào đất.

b) Hiện tượng ưu thế ngọn và auxin:

Hiện tượng ưu thế ngọn là hiện tượng phổ biến của thế giới thực vật, khi mà sự sinh trưởng của chồi ngọn, của rễ chính sẽ ức chế sự sinh trưởng của chồi bên và rễ phụ. Nếu loại trừ chồi ngọn và rễ chính thì lập tức chồi bên và rễ phụ sẽ sinh trưởng mạnh. Trong thực tế khi người ta bấm ngọn, tỉa cành, đốn cây, ... tức là đã loại bỏ sự ức chế của chồi ngọn, tạo điều kiện cho các chồi bên mọc ra mạnh mẽ. Đây là cơ sở của kỹ thuật tạo hình cho cây ăn quả, cây cảnh, cây công nghiệp và cải tạo được quần thể cây trồng.

Khi phát hiện ra auxin, người ta cho rằng auxin là tác nhân gây nên hiện tượng ưu thế ngọn. Nếu loại bỏ chồi ngọn thì lập tức chồi bên mọc ra, nhưng khi loại bỏ chồi ngọn mà xử lý IAA ở vết cắt thì chồi bên cũng không mọc lên được, tương tự như trong trường hợp có chồi ngọn tồn tại.

Có hai giả thuyết giải thích vai trò của auxin đối với hiện tượng ưu thế ngọn:

* *Giả thuyết ức chế trực tiếp của IAA*: Cho rằng chồi ngọn là nơi tổng hợp IAA và do đó nồng độ của auxin trong chồi ngọn luôn luôn cao. Trên con đường vận chuyển của IAA xuống dưới thì gây ảnh hưởng ức chế lên sự sinh trưởng của chồi bên vì phản ứng của chồi bên lên hàm lượng auxin thấp hơn chồi ngọn. Trong trường hợp cắt bỏ chồi ngọn tức là làm giảm hàm lượng IAA và do đó các chồi bên được giải phóng khỏi trạng thái ức chế.

* *Giả thuyết ức chế gián tiếp của auxin*: Cho rằng auxin không gây ảnh hưởng trực tiếp nhưng auxin gây nên sự tổng hợp một chất ức chế sinh trưởng nào đấy như ethylene chẳng hạn và đến lượt ethylene lại gây ức chế sinh trưởng của chồi bên.

Tuy nhiên dù giả thuyết nào thì cũng phải thừa nhận vai trò của auxin lên hiện tượng ưu thế ngọn.

Thực ra, hiện tượng ưu thế ngọn được điều chỉnh bởi sự cân bằng hormone của auxin/cytokinin. Auxin tăng ưu thế ngọn, ức chế chồi bên, còn cytokinin ngược lại, làm giảm ưu thế ngọn, kích thích chồi bên. Auxin được tổng hợp ở đỉnh ngọn và được vận chuyển xuống rễ, nên càng xa đỉnh ngọn thì ảnh hưởng ức chế của auxin càng yếu. Ngược lại, cytokinin được tổng hợp trong rễ và được vận chuyển từ rễ lên ngọn, nên càng xa rễ ảnh hưởng kích thích lên chồi bên càng yếu dần. Vì vậy, từ ngọn xuống gốc thì hiện tượng ưu thế ngọn càng giảm dần, chồi bên càng mọc nhiều hơn.

c) Auxin kích thích sự giãn của tế bào:

Auxin làm tăng kích thước của tế bào và do đó mà làm cho cây sinh trưởng được. Tác dụng của auxin có hai mặt: Vừa gây giãn nở thành tế bào làm cho tế bào phình to ra và vừa hoạt hóa các quá trình tổng hợp các vật chất cấu tạo nên chất nguyên sinh. Auxin kích thích sự giãn nở của tế bào theo chiều ngang mạnh hơn là chiều dọc.

d) Auxin với sự hình thành và sự phân hóa rễ:

Trong sự hình thành rễ, đặc biệt là rễ bất định, auxin có tác dụng rất đặc trưng. Vì vậy người ta xem auxin như là chất hình thành rễ.

Sự hình thành rễ bất định của cành giâm, cành chiết có thể chia ra làm 3 giai đoạn:

- Đầu tiên là sự phản phân hóa tế bào mạnh mẽ ở vùng tiền tượng tầng, trụ bì, ... nơi xuất phát của rễ bất định thành một đám tế bào lộn xộn.

- Giai đoạn tiếp theo là xuất hiện mầm rễ.

- Giai đoạn cuối cùng, rễ sinh trưởng, đâm thủng vỏ và ra ngoài thành các rễ bất định.

Ở giai đoạn đầu tiên là giai đoạn khởi xướng sự hình thành rễ cần hàm lượng auxin cao cho sự phản phân hóa tế bào. Các giai đoạn sau cần hàm lượng thấp hơn và đôi khi không cần.

Nguồn auxin có thể là nguồn nội sinh và cũng có thể bổ sung từ ngoài vào. Thường để xúc tiến quá trình hình thành rễ nhanh chóng ở cành chiết, cành giâm người ta thường xử lý auxin ngoại sinh.

Vai trò của auxin với sự hình thành rễ được chứng minh rõ trong nuôi cấy mô tế bào. Nếu chỉ có mặt của auxin trong môi trường nuôi cấy, mô chỉ phát sinh rễ mà thôi. Để tạo cây hoàn chỉnh thì cần phải có chồi nữa, tức là phải bổ sung cytokinin vào môi trường nuôi cấy.

e) Auxin với sự hình thành quả, sự sinh trưởng và tạo quả không hạt:

Hạt phấn rất giàu auxin là chất kích thích sự nảy mầm của hạt phấn và sự sinh trưởng của ống phấn. Ngoài ra núm nhụy cũng tiết ra các chất kích thích sự sinh trưởng của ống phấn và đồng thời cũng sản sinh ra các chất ức chế sự nảy mầm của hạt phấn và sự sinh trưởng của ống phấn khác loài, gây nên sự tuyệt giao giữa các loài. Khi thụ tinh xong, hợp tử sẽ phát triển thành phôi và chính phôi cũng là nguồn tổng hợp auxin mạnh mẽ rồi khuyếch tán

vào bầu kích thích sự lớn lên của bầu thành quả. Vì vậy kích thước và cả hình dạng của quả hoàn toàn phụ thuộc vào hàm lượng và sự khuyếch tán của auxin trong phôi hạt.

Hầu hết các trường hợp sự phát triển của quả chỉ xảy ra sau khi thụ tinh xong, tức là đã hình thành phôi và bắt đầu sản sinh auxin nội sinh. Nhưng cũng có trường hợp quả được hình thành không có thụ tinh và tạo nên quả không hạt.

Năm 1934, Yasuda đã thành công trong việc tạo nên quả không hạt ở bầu bí bằng cách xử lý dịch chiết của hạt phấn lên hoa. Sau đó người ta phân tích và thấy trong dịch chiết của hạt phấn có chứa nhiều auxin. Từ đó người ta đã xử lý trực tiếp auxin ngoại sinh cho hoa thì cũng có thể loại trừ sự thụ tinh và tạo nên quả không hạt vì rằng auxin đã trực tiếp khuyếch tán vào bầu, kích thích sinh trưởng của bầu thành quả không hạt.

f) Auxin và sự rụng lá, hoa, quả, ...:

Laibach (1933) đã chỉ ra rằng trong dịch chiết của hạt phấn phong lan có chứa một chất có thể kìm hãm sự rụng. Chất đó là IAA.

Trước khi rụng, có một tầng rời được hình thành ở cuống của cơ quan thực vật. Đây là một vài lớp tế bào nhu mô có thành mỏng, hoàn toàn thiếu lignin và suberin. Khi hình thành tầng rời thì có 3 trường hợp xảy ra:

- Lớp vỏ giữa của tế bào bị phân hủy, còn lớp vỏ sơ cấp vẫn giữ nguyên.
- Tất cả thành bị phân hủy.
- Tất cả tế bào bị phân hủy.

Khi nghiên cứu hàm lượng auxin liên quan đến sự hình thành tầng rời đã cho thấy rằng lá non có hàm lượng auxin cao hơn lá già, bản lá có hàm lượng auxin cao hơn cuống lá. Khi hàm lượng auxin cao sẽ ngăn sự hình thành tầng rời. Vì vậy, nếu xử lý auxin ngoại sinh sẽ làm tăng hàm lượng auxin trong lá nên có thể ngăn ngừa được sự rụng.

Thực ra sự rụng của cơ quan gây ra do sự tích lũy các chất ức chế sinh trưởng (abcisic acid, ethylene). Do đó sự cân bằng giữa auxin / (abcisic acid + ethylene) có ảnh hưởng đến điều chỉnh sự rụng ở cây.

Auxin còn ảnh hưởng đến quá trình biến đổi sinh lý, sinh hóa trong cây: Sự vận động của chất nguyên sinh, các quá trình trao đổi chất, tăng quá trình quang hợp và hô hấp, tăng quá trình vận chuyển vật chất trong cây, ...

1.7. Cơ chế tác động của auxin

Hiệu quả đặc trưng nhất của auxin chính là kích thích sự giãn của tế bào. Sự giãn của tế bào xảy ra do hai hiệu ứng: sự giãn ra của thành tế bào và sự tăng thể tích, khối lượng của chất nguyên sinh.

Khi xử lý auxin, khoảng sau 10 - 15 phút thì phản ứng sinh trưởng xảy ra. Vậy thì auxin đóng vai trò như thế nào trong sự sinh trưởng nhanh chóng như vậy?

Trước hết, chúng ta đề cập đến một hiện tượng được phát hiện từ năm 1930 là hiện tượng "sinh trưởng acid". Trong môi trường acid thì sự sinh trưởng của thực vật trở nên nhanh chóng hơn. Vậy mối quan hệ giữa hiệu quả acid và auxin lên sinh trưởng của tế bào là như thế nào? Hai ảnh hưởng đó được phân biệt với nhau là:

- Ảnh hưởng của acid là lên thành tế bào, còn ảnh hưởng của auxin là lên tế bào.

- Ảnh hưởng của acid xảy ra nhanh hơn, còn ảnh hưởng của auxin thì chậm hơn nhiều.

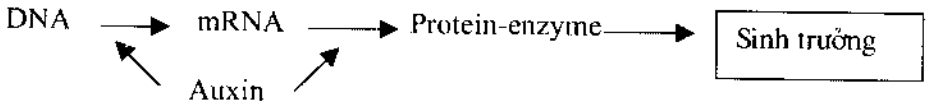
Hai ảnh hưởng đó có thể liên kết với nhau như sau: Auxin gây nên độ acid cho thành tế bào, còn acid thì gây nên độ lỏng lẻo, không bền vững của thành tế bào và chính nhờ độ lỏng lẻo đó của thành tế bào mà thành tế bào mới giãn ra được.

Cũng trong thời gian đó người ta đã phát hiện ra những bơm trao đổi chất trong chất nguyên sinh. Một trong những bơm đó là bơm ion H^+. Bơm H^+ từ chất nguyên sinh vào thành tế bào, làm giảm độ pH trong thành tế bào. IAA là tác nhân hoạt hóa bơm proton đó. Như vậy khi có mặt của IAA thì bơm proton hoạt động và độ pH của thành tế bào giảm xuống.

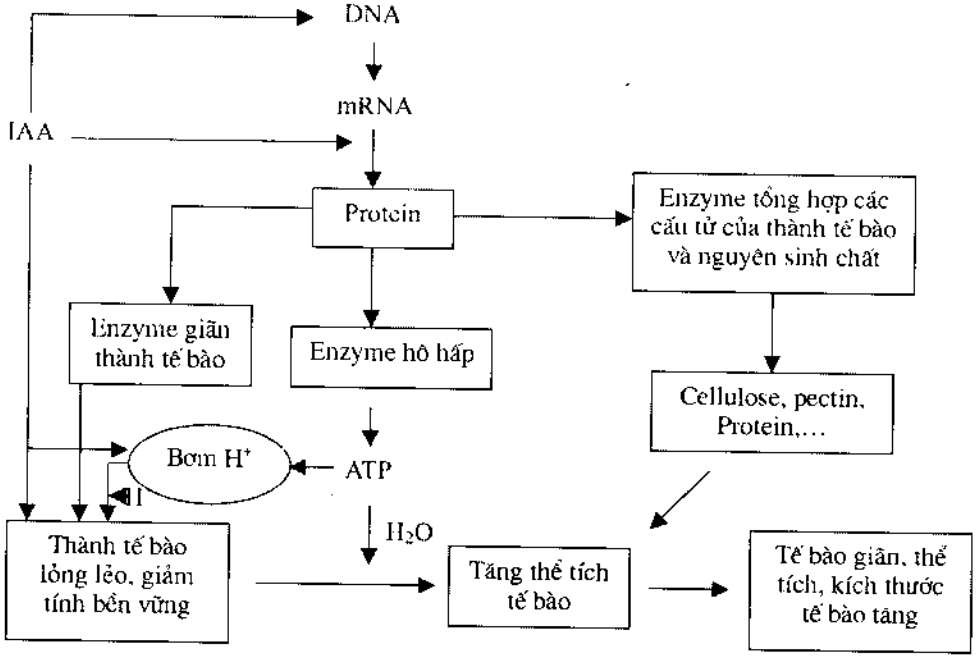
Tại sao độ pH thấp lại làm giãn thành tế bào? Để trả lời câu hỏi đó chúng ta cần xem xét cấu trúc của thành tế bào: Thành tế bào được cấu tạo từ các sợi cellulose, giữa chúng được nối với nhau bằng các cầu nối polysaccharide, tạo nên một cấu trúc rất bền vững. Để cho các sợi cellulose lỏng lẻo, tách rời nhau thì cần phải phân hủy các cầu nối polysaccharide. Enzyme phân hủy các cầu nối này là pectinmethylesterase hoạt động ở độ pH thấp (= 4) và khi hoạt động sẽ methyl hóa nhóm carbocyl và ngăn chặn sự hình thành cầu nối ion với canxi để tạo nên pectatcanxi, nên các sợi cellulose tách rời nhau, chúng có thể trượt lên nhau mà giãn ra,... Nhờ khả

năng hút nước thẩm thấu của tế bào mà tạo nên sức trương tác động lên thành tế bào, làm cho thành tế bào phải giãn nở ra.

Tuy nhiên, do tế bào tăng kích thước nhanh chóng như vậy nên cần có sự tổng hợp mới và nhanh chóng các thành phần cấu tạo nên thành tế bào cũng như chất nguyên sinh (cellulose, hemicellulose, pectin, protein, nucleic acid, ...). Ở đây, auxin đóng vai trò hoạt hóa các gen để tổng hợp nên các enzyme cần thiết cho sự tổng hợp nên các vật chất đó.



Sơ đồ về cơ chế tác động của auxin lên sự giãn của tế bào



1.8. Ứng dụng các hợp chất auxin trong trồng trọt

a) Nhân giống vô tính cây trồng:

Hiện nay có hai phương pháp xử lý auxin cho cành chiết, cành giâm:

* Phương pháp xử lý nồng độ hay phương pháp xử lý nhanh. Nồng độ auxin dao động từ 1000 đến 10000 ppm (1ppm = 0,1 mg% hoặc = $1x10^{-4}$ %

tức 0,0001% hay = 1 mg/l). Với cành giâm thì nhúng phần gốc vào dung dịch trong 3-5 giây rồi cắm vào giá thể. Còn với cành chiết thì sau khi khoanh vỏ, tẩm bông bằng dung dịch auxin đặc rồi bôi lên trên khoanh vỏ, nơi xuất hiện rễ bất định. Sau đó bó bầu bằng đất ẩm. Phương pháp này hiệu quả cao, đơn giản và hóa chất tiêu tốn ít hơn.

* Phương pháp nồng độ loãng-xử lý chậm: Nồng độ auxin từ 20 đến 200 ppm tùy thuộc vào loài và mức độ khó ra rễ của cành giâm. Đối với cành giâm, ngâm phần gốc vào dung dịch auxin trong 10 - 24 giờ rồi cắm vào giá thể. Với cành chiết thì trộn dung dịch với đất bó bầu.

Các auxin sử dụng ở đây là IBA; α-NAA; 2,4D;...trong đó hiệu quả của IBA > α-NAA > 2,4D.

b) Ứng dụng auxin tăng đậu quả, sinh trưởng của quả và tạo quả không hạt:

Sự hình thành quả là một quá trình diễn ra có liên quan đến sự thụ phấn và thụ tinh. Sự thụ phấn là quá trình mà hạt phấn rơi trên núm nhụy. Hạt phấn có chứa nhiều auxin nên khi gặp dịch núm nhụy, chúng sẽ nảy mầm, ống phấn mọc và sinh trưởng kéo dài xuống tận noãn. Ống phấn mang các tinh tử xuống thụ tinh cho tế bào trứng để tạo nên hợp tử và sau đó hợp tử sẽ phát triển thành phôi, về sau phôi phát triển thành hạt. Bầu hoa sẽ sinh trưởng thành quả.

Quả chỉ được hình thành sau khi có quá trình thụ tinh xảy ra, còn nếu không thụ tinh thì hoa sẽ bị rụng. Điều đó được giải thích rằng phôi hạt là nguồn tổng hợp nên các chất kích thích sinh trưởng trong đó có auxin. Các chất này sẽ được vận chuyển vào mô của bầu để kích thích bầu lớn lên thành quả. Vì vậy, hình dạng và kích thước của quả hoàn toàn phụ thuộc vào hàm lượng các chất nội sinh từ phôi hạt. Chính vì lý do đó mà ta có thể sử dụng auxin và gibberellin ngoại sinh để thay thế cho nguồn nội sinh.

Nếu chúng ta xử lý cho hoa chưa xảy ra thụ tinh thì auxin ngoại sinh sẽ khuyếch tán vào bầu và kích thích sự lớn lên của bầu thành quả mà không qua quá trình thụ tinh. Trong trường hợp này, quả tạo nên không qua thụ tinh và do đó sẽ không có hạt.

Một số cây trồng như cà chua, bầu bí, cam chanh,...người ta thường xử lý auxin dưới dạng α -NAA (10-20 ppm); 2,4D (5-10 ppm). Còn các cây trồng khác như nho, anh đào,.... thì xử lý gibberellin (20-50 ppm) lại có hiệu quả hơn.

c) Phòng ngừa rụng quả:

Sự rụng là do sự hình thành tầng rời ở cuống lá, cuống quả. Auxin là chất kìm hãm sự rụng. Chính vì vậy mà người ta xử lý auxin cho cây và cho quả non có thể kìm hãm sự rụng của chúng. Ví dụ như phun α-NAA (10-20 ppm) cho lá hoặc quả non có thể kéo dài thời gian tồn tại của chúng trên cây.

d) Kéo dài sự chín của quả:

Sự chín của quả được điều chỉnh bằng tỷ lệ auxin/ethylene. Muốn kìm hãm sự chín ta cần tăng hàm lượng auxin trong mô quả. Phun dung dịch auxin lên quả xanh hoặc quả sắp chín đang ở trên cây có thể kéo dài thời gian tồn tại của quả. Trước đây người ta hay sử dụng 2,4D (10-15 ppm). Hiện nay người ta sử dụng α-NAA(10-20 ppm) cũng có hiệu quả tốt mà không độc hại.

e) Diệt trừ cỏ dại:

Khi sử dụng nồng độ cao có tác dụng diệt trừ cỏ dại hại cây trồng. Các chất như 2,4D; 2,4,5T trước đây đã được sử dụng nhiều để diệt trừ cỏ dại, nhưng ngày nay người ta đã tạo ra rất nhiều chất diệt cỏ mới có hiệu quả cao mà không độc hại cho môi trường.

2. Gibberellin

2.1. Lịch sử phát hiện

Việc phát hiện ra gibberellin gắn liền với những nghiên cứu về bệnh lúa von mà các nhà khoa học Nhật Bản đã quan tâm từ lâu. Triệu chứng điển hình của bệnh là cây lúa tăng trưởng chiều cao quá mức, làm yếu cây, giảm năng suất trên 40%. Bệnh lúa von là do nấm ký sinh ở cây lúa có tên là *Gibberela fujikuroi* gây nên. Nấm này đã tiết ra một chất nào đó kích thích sự sinh trưởng chiều cao của cây lúa gây nên bệnh lý.

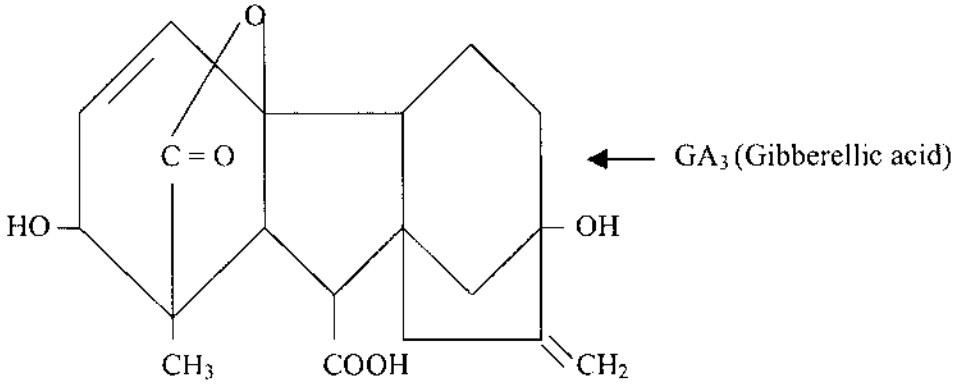
Năm 1926, Kurosawa đã thành công trong việc gây bệnh nhân tạo cho cây lúa và cây ngô. Năm 1935, Yabuta đã tách được hai hợp chất dưới dạng

tinh thể từ dịch nuôi cấy của nấm *G.fujikuroi* và ông gọi là gibberellin A và B nhưng chưa xác định được bản chất hóa học của chúng.

Năm 1955 hai nhóm nghiên cứu của Anh và Mỹ đã đồng thời nghiên cứu vấn đề này. Brian (Anh) và Stodole (Mỹ) đã xác định được công thức hóa học của chúng.

Sau đó các nhà khoa học đã chiết tách và xác định GA từ các thực vật bậc cao khác nhau và xác định gibberellin là một phytohormone quan trọng và phổ biến của toàn thế giới thực vật.

Ngày nay người ta đã xác định được trên 50 loại gibberellin khác nhau và được ký hiệu là GA_1; GA_2; GA_3, ... trong đó GA_3 (Gibberellic acid) là có hoạt tính mạnh nhất.



2.2. Sự vận chuyển của GA trong cây

Khác với auxin, gibberellin vận chuyển không phân cực trong cây: có thể theo hướng gốc hoặc hướng ngọn tùy theo nhu cầu và vị trí của cơ quan cần GA.

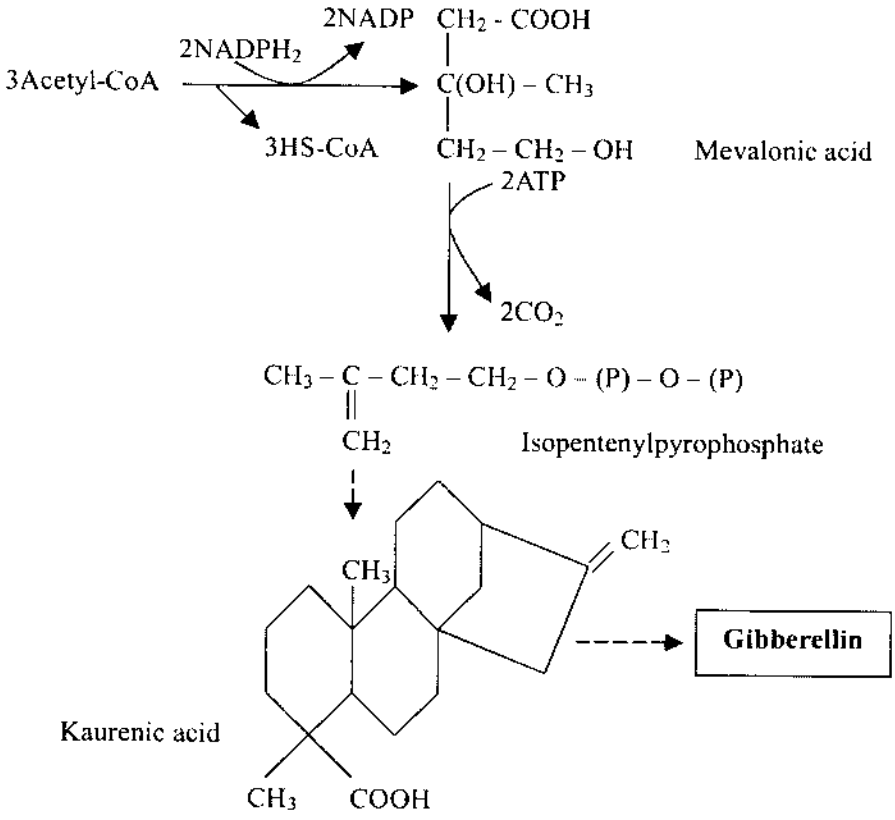
2.3. Sự tổng hợp GA

Chất tiền thân của sự tổng hợp GA là acetyl-CoA: $CH_3 - \overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C} \sim S.CoA$

Quá trình tổng hợp GA cần có sự tham gia của ATP và $NADPH_2$, cũng như sự xúc tác của Mg^{+2} và Mn^{+2}.

Quá trình tổng hợp GA xảy ra chủ yếu trong lục lạp.

Có thể tóm tắt quá trình tổng hợp GA như sau:



Quá trình tổng hợp GA được xúc tác bởi các enzyme đặc hiệu. Tồn tại một số đột biến lùn mà có thể thiếu một số gen nhất định điều khiển sự tổng hợp nên các enzyme xúc tác cho sự hình thành các chất trung gian nào đó và kết quả là GA không được hình thành, cây không thể sinh trưởng chiều cao được. Với các đột biến này, nếu xử lý GA ngoại sinh có thể lấy lại được dạng bình thường.

2.4. Hiệu quả sinh lý của GA

a) Các đột biến lùn của thực vật:

Các đột biến này do có sự sai lệch nhất định trong quá trình tổng hợp enzyme cần cho sự tổng hợp nên GA; do đó GA không được hình thành như bình thường.

b) GA với sự giãn và sự sinh trưởng của tế bào:

Cùng với auxin, GA có ảnh hưởng quan trọng lên sự giãn của tế bào. GA kích thích giãn của tế bào làm cho tế bào giãn về chiều dọc. Vì vậy mà

tế bào kéo dài rất nhanh chóng. Kết quả kích thích sự giãn của tế bào bởi GA đã làm cho cây sinh trưởng nhanh về chiều cao. Một số cây cần chiều cao như cây đay, cây gai, ... có thể sử dụng GA ngoại sinh để điều khiển chiều cao của chúng.

c) GA với sự nảy mầm:

Trong hạt, nội nhũ đóng vai trò thụ động trong quá trình nảy mầm, nó chỉ chứa chất dự trữ. Khi nảy mầm thì có các quá trình thủy phân các chất dự trữ trong chúng. Sự thủy phân này nhờ các enzyme thủy phân, trong đó amylase đóng vai trò quan trọng.

Sự hình thành nên các enzyme thủy phân này do sự hoạt hóa của GA được tổng hợp hoặc được giải phóng từ trạng thái liên kết ở trong phôi hạt. Chính vì vậy mà người ta có thể kích thích cho hạt nảy mầm bằng cách xử lý GA ngoại sinh.

Với các loại củ: Sự nảy mầm của chúng cũng được kích thích bởi GA có trong củ. Xử lý bằng GA ngoại sinh cũng phá bỏ được trạng thái ngủ nghỉ của củ.

d) GA với sự sinh trưởng và tạo quả không hạt:

Hiệu quả của GA trong trường hợp này cũng tương tự như của auxin. Vì vậy nếu xử lý GA ngoại cũng có thể thay thế được GA nội sinh trong phôi hạt và tạo nên được những quả không có hạt. Trong một số trường hợp, auxin không gây hiệu quả thì GA lại có hiệu quả tốt như trường hợp đối với nho, anh đào, táo, ...

e) GA với sự ra hoa và sự phân hóa giới tính:

Trailakhian đã xem GA là một trong hai thành phần của hormone ra hoa (florigen) trong học thuyết ra hoa của ông. Khi xử lý GA cho cây ngày dài có thể làm cho chúng ra hoa trong điều kiện ngày ngắn vì trong điều kiện ngày dài sự tổng hợp GA rất khó khăn.

- GA cũng có thể thay thế cho xử lý lạnh và làm cho cây hai năm ra hoa ngay trong năm đầu.

- GA cũng có tác dụng trong việc phân hóa cơ quan sinh sản đặc biệt là sự phân hóa giới tính đực và cái. Trong trường hợp này thì GA có tác dụng đối kháng với cytokinin, tức là kích thích sự biểu hiện và hình thành giới tính đực: kích thích sự hình thành hoa đực và ức chế sự hình thành hoa cái. Chính vì vậy người ta sử dụng GA để điều khiển số lượng hoa đực của các cây họ bầu bí.

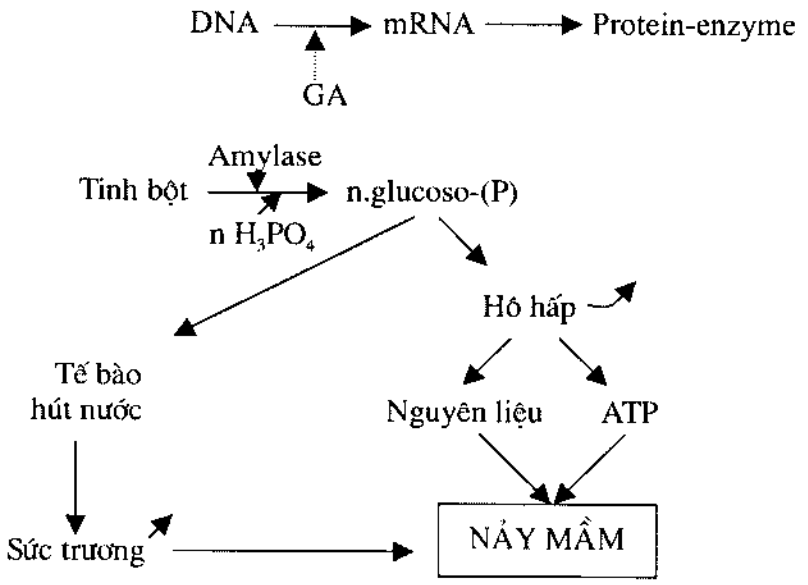
2.5. Cơ chế tác động của GA

Một trong những tác động đặc trưng của GA là làm tăng hoạt động thủy phân của hạt, củ, ... trong quá trình nảy mầm. Ví dụ như trong các hạt lúa, ngô, lúa mì, ... phôi hạt là nơi tổng hợp nên GA. GA được giải phóng ra khỏi phôi và khuyếch tán vào lớp tế bào aleuron và tại đấy, GA kích thích sự hình thành và giải phóng các enzyme thủy phân trong các tế bào aleuron. Các enzyme này khuyếch tán vào tế bào nội nhũ và tại đây chúng xúc tác cho sự thủy phân các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản cần cho quá trình nảy mầm.

GA đóng vai trò là nhân tố mở gen mà các gen này bị ức chế hoàn toàn trong quá trình ngủ nghỉ của hạt, củ. Trong quá trình ngủ nghỉ, các gen này bị bao vây bởi một loại protein gọi là histone.

GA là nhân tố hoạt hóa gen, giải phóng gen này khỏi trạng thái ức chế và do đó các enzyme thủy phân mới được hình thành.

Sơ đồ tác động của GA lên sự nảy mầm



* Sự giãn của tế bào cũng có thể do cơ chế hoạt hóa bơm H^+ của GA và gây nên hiệu ứng mềm tế bào. Sự có mặt của GA cũng gây nên sự tăng các chất hoạt động thẩm thấu và áp suất thẩm thấu của tế bào tạo điều kiện cho tế bào hút nước, sức trương tăng lên, tế bào giãn ra.

* Các tác động khác của GA như sự ra hoa, sự phân hóa giới tính: có thể được thực hiện thông qua cơ chế hoạt hóa gen của GA.

2.6. Ứng dụng của GA

a) Kích thích tăng chiều cao, tăng sinh khối:

Với cây đay, người ta phun GA (2-5 ppm) sẽ làm chiều cao cây tăng lên nhiều, tăng năng suất sợi mà chất lượng sợi đảm bảo.

Với các cây rau như bắp cải, su hào, xà lách việc xử lý GA (2-5 ppm) đã làm tăng năng suất chất xanh.

b) Tăng năng suất và tạo quả không hạt.

c) Phá bỏ sự ngủ nghỉ của hạt, củ.

Xử lý GA (2 ppm) có thể ngâm hoặc phun sẽ làm cho củ khoai tây nảy mầm nhanh.

d) Điều chỉnh giới tính:

Xử lý GA cho bầu, bí, các loại dưa, ... làm tăng tỷ lệ hoa đực. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc sản xuất hạt lai của các cây họ bầu bí. Người ta có thể biến một hàng thành cây mang hoa cái và xen một hàng là cây mang hoa đực. Chúng thụ tinh cho nhau tạo nên hạt lai.

e) Ứng dụng trong sản xuất malt bia:

Để kích thích sản xuất amylase trong công nghệ sản xuất bia người ta xử lý GA (2-5ppm) cho hạt đại mạch trong quá trình nảy mầm sẽ tăng năng suất malt và phẩm chất malt bia.

3. Cytokinin

3.1. Lịch sử phát hiện

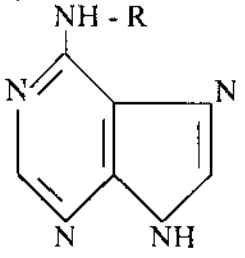
Từ 1913, Haberlandt đã chứng minh rằng: Các mô thương tổn có khả năng sinh ra một chất kích thích sinh trưởng và khuyếch tán vào mô không thương tổn kích thích sự phân chia của nó.

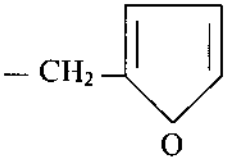
Năm 1941, Overbeek đã chứng minh là ở nước dừa có khả năng tồn tại một chất kích thích sự phân chia và phân hóa tế bào.

Năm 1955, Miller và Skoog đã tách được một hợp chất từ việc hấp mẫu DNA của tinh dịch cá mòi, chất này có khả năng kích thích sự phân chia tế bào rất mạnh trong nuôi cấy mô thuốc lá gọi là Kinetin.

Cytokinin trong cây đã được chiết tách từ 1963 (Letham và Muller) ở dạng kết tinh từ hạt ngô non gọi là Zeatin. Sau đó người ta chứng minh rằng Zeatin có mặt trong tất cả thế giới thực vật. Trước đó người ta cũng đã phát hiện ra nguồn chất giàu có trong nước dừa có hoạt tính cytokinin, đó là diphenylurea.

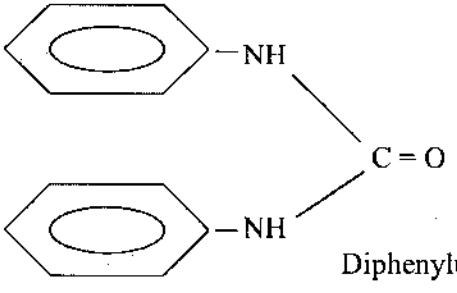
Công thức cấu tạo tổng quát của cytokinin như sau:



Nếu R là: 

thì đó là Kinetin.

Nếu R là $-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-OH$ thì đó là Zeatin.



Diphenylurea

3.2. Sự trao đổi cytokinin trong cây

Rễ là cơ quan tổng hợp cytokinin. Từ rễ cytokinin được vận chuyển lên các bộ phận trên mặt đất. Cytokinin được tổng hợp mạnh nhất là ở giai đoạn cây con. Cytokinin phân bố nhiều nhất ở những nơi có hoạt động trao đổi chất và sinh trưởng mạnh nhất. Do vậy cây nào sinh trưởng mạnh, chồi non nhiều thì hàm lượng cytokinin ở đó cao.

Cytokinin tồn tại ở trong cây dưới dạng tự do có hoạt tính sinh học và dạng liên kết không có hoạt tính hoặc hoạt tính yếu. Cytokinin có thể liên kết với đường để tạo nên glycoside. Ngoài ra cytokinin có mặt trong RNA vận chuyển cho serine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, cysteine.

Cytokinin bị phân giải nhờ hệ thống enzyme đặc hiệu và sản phẩm phân giải cuối cùng đó là urea.

3.3. Hiệu quả sinh lý của cytokinin

* Cytokinin và sự giãn nở của tế bào

* Cytokinin và sự phân hóa chồi.

* Cytokinin và sự hóa trẻ: Cytokinin là hormone hóa trẻ. Chúng có tác dụng kéo dài tuổi thọ của lá và của cơ quan, của toàn cây.

Tác dụng đặc trưng nhất của cytokinin là kìm hãm sự hóa già của lá. Khi các lá đã già thì chúng có thể rụng đi. Trong lá sự phân hủy nhanh protein trong bản lá, tách các chất phi protein, lipid, nucleic acid qua màng tế bào gân lá, cuống lá và dẫn theo sự phá hủy của lục lạp. Do vậy việc xử lý cytokinin có tác dụng kìm hãm sự phân hủy protein nên kìm hãm được sự phân hủy của diệp lục và kéo dài tuổi thọ của lá.

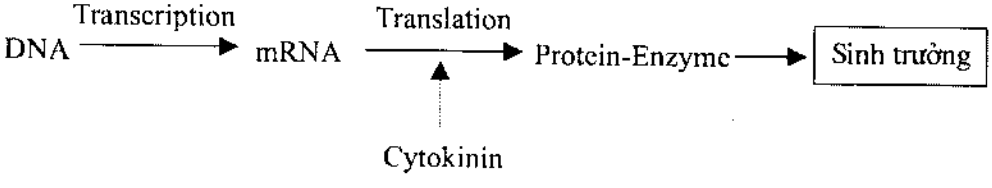
Trong thực tế nếu bộ rễ phát triển mạnh, trẻ lâu vì rễ là cơ quan tổng hợp cytokinin. Vì vậy muốn kéo dài tuổi thọ của cơ quan và của toàn cây thì cần phải điều khiển sự sinh trưởng của bộ rễ thật tốt. Ngược lại muốn rút ngắn thời gian sinh trưởng, nhanh chóng ra hoa kết quả thì phải hạn chế sinh trưởng bộ rễ, chặt bớt rễ.

* Cytokinin cũng có ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt. Vì vậy trong một số trường hợp nhất định, cytokinin có tác dụng kích thích sự nảy mầm, phá bỏ sự ngủ nghỉ của hạt, củ.

3.4. Cơ chế tác động của cytokinin

Cytokinin tác động đến sự phân chia tế bào, sự phân hóa cơ quan, sự trẻ hóa cơ quan và của toàn cây. Cơ chế tác động của cytokinin lên sự sinh trưởng của cây có thể tóm tắt như sau:

- Khi thiếu cytokinin thì tế bào không phân chia được mặc dù DNA vẫn tiếp tục được tổng hợp, nhưng mà sự tổng hợp protein không xảy ra. Vì vậy có thể cho rằng cytokinin kiểm tra sự tổng hợp protein ở giai đoạn dịch mã (translation):

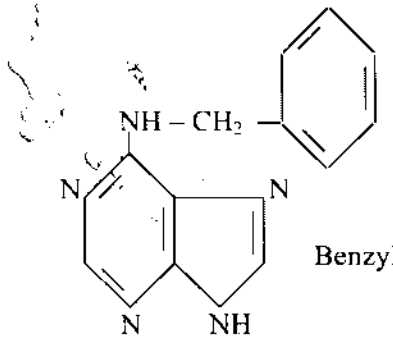


- Có thể có cơ chế thứ hai là cytokinin có mặt trong RNA vận chuyển nên nó ảnh hưởng đến sự tổng hợp protein. Cytokinin trong RNA vận chuyển ở vị trí liên kết với anticodon trên ribosome. Vì vậy chức năng điều chỉnh của cytokinin có lẽ bằng cơ chế ngăn chặn sự nhận mặt sai lầm của các codon trong quá trình tổng hợp protein.

- Hiệu ứng của cytokinin trong việc ngăn chặn sự hóa già của cây liên quan nhiều đến khả năng ngăn chặn sự phân hủy protein, nucleic acid và diệp lục.

3.5. Ứng dụng của cytokinin

Cytokinin được ứng dụng chủ yếu trong việc nuôi cấy mô tế bào thực vật. Các chất cytokinin nhân tạo như benzyladenine (BA), kinetin cũng như cytokinin tự nhiên trong nước dừa đã được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô. Việc có mặt của chúng trong môi trường quyết định sự phân chia và phân hóa chồi trong mô nuôi cấy.



Benzyladenine (BA)

B. CÁC CHẤT ỨC CHẾ SINH TRƯỞNG THỰC VẬT

1. Abcisic acid (ABA)

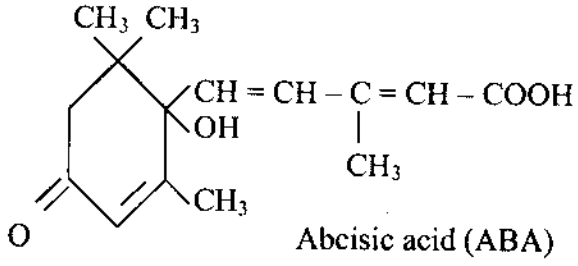
1.1. Lịch sử phát hiện

* 1961- Luc Carn (Mỹ) đã tách được một chất dưới dạng tinh thể từ quả bông già và khi xử lý lên lá bông non thì gây nên hiện tượng rụng lá và đặt tên là abcisin I.

1963 – Ohkuma và Eddicott đã tách được một chất khác từ lá bông trẻ cũng gây nên hiện tượng rụng, họ gọi là abcisin II.

Đồng thời Waring và cộng sự bằng phương pháp sắc ký đã tách được một chất ức chế từ lá cây Betula và khi xử lý cho cây đã gây nên hiện tượng ngủ nghỉ của chồi. Họ gọi chất đó là dormin.

Năm 1966 người ta đã xác định được bản chất hóa học của chất đó. Năm 1967 người ta gọi chất đó là abcisic acid (ABA).



Abcisic acid (ABA)

* ABA được tổng hợp ở hầu hết các bộ phận của cây, tích lũy nhiều nhất ở trong các cơ quan sinh sản, cơ quan dự trữ, trong các cơ quan già, cơ quan đang ngủ nghỉ.

- ABA gây nên sự rụng (lá, hoa, quả, ...), hoạt hóa sự hình thành tầng rời chủ yếu là sự hình thành các enzyme thủy phân vỏ tế bào. ABA ức chế sự sinh trưởng của chồi, của cây, gây nên sự ngủ nghỉ.

- ABA là chất đối kháng của auxin.

- ABA là hormone hóa già.

- ABA điều chỉnh sự đóng mở khí khổng: Việc phát hiện ra vai trò của ABA trong việc điều chỉnh này xuất phát từ việc phát hiện ra một đột biến héo ở cà chua. Cây cà chua luôn luôn bị héo này vì khí khổng của nó luôn luôn mở mà không đóng được. Phân tích hàm lượng của các chất trong đột biến này thì thấy thiếu ABA. Khi xử lý ABA cho nó thì khí khổng đóng lại. Đột biến này là do thiếu gen tổng hợp ABA nên ABA không hình thành được. Vai trò của ABA là ức chế sự hấp thu K^+ bởi tế bào khí khổng. Một dòng vật chất khác có liên quan đến sự đóng mở của khí khổng dưới tác động của ABA là malic acid. Acid này được giải phóng cùng với K^+ khi có mặt của ABA và tạo nên một sự thiếu hụt K^+ ở tế bào khí khổng, thiếu sức trương, tế bào mất nước và khí khổng đóng lại.

- ABA có thể xem là "hormone stress": Các điều kiện bất thuận của môi trường như hạn, úng, nóng, lạnh, mặn, sâu bệnh, ... gọi là điều kiện stress của môi trường. Khi gặp một tác nhân stress bất cứ nào thì hàm lượng ABA lập tức tăng lên rất mạnh. Đó là phản ứng thích nghi của cây chống lại các điều kiện bất thuận của môi trường. Khi gặp hạn, hàm lượng ABA trong lá tăng lên mạnh (có lẽ do sự tổng hợp mới) và do đó khí khổng đóng lại, chống được sự thoát hơi nước.

Người ta xác nhận rằng ABA được tổng hợp trong lục lạp và được giữ trong lục lạp khi tế bào đủ nước. Khi tế bào mất nước thì tính thấm của màng lục lạp tăng lên và ABA được thấm ra ngoài tế bào chất, vận chuyển vào tế bào khí khổng để gây nên sự đóng của khí khổng. Khi hết stress thì tính thấm của màng lục lạp với ABA giảm xuống và do đó ABA được dự trữ trong lục lạp. Vì vậy, ABA có vai trò nhất định trong tính chống chịu của cây đối với các điều kiện bất thuận của môi trường.

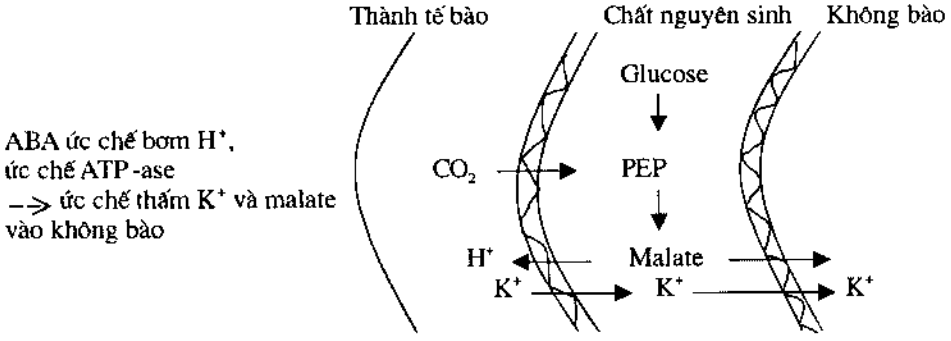
1.2. Cơ chế tác động của ABA

a) Tác động của ABA lên tính thấm của màng:

ABA làm thay đổi điện thế qua màng và do đó mà điều tiết được sự tiết ion K^+ qua màng. Cơ chế này liên quan đến sự đóng mở của khí khổng.

Cơ chế về vai trò của ABA lên sự đóng mở khí khổng như sau: Khi thiếu ABA, bơm H^+ không bị ức chế, malate và cả K^+ vận chuyển vào không bào và do đó tế bào hút nước, dẫn đến khí khổng mở.

Khi xử lý ABA, bơm H^+ bị ức chế nên H^+ không vào thành tế bào; malate và K^+ không qua màng vào không bào mà vận chuyển thụ động ra khỏi tế bào, lúc đó tế bào mất nước và khí khổng đóng lại.



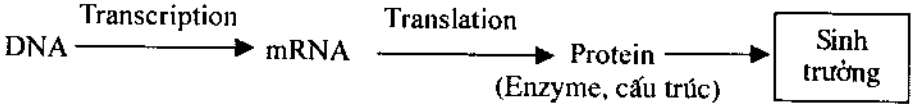
b) ABA tác động lên cơ chế tổng hợp protein và nucleic acid:

Năm 1964, Dorothy và Bonner cho rằng trong các tế bào đang ngủ nghỉ thì vật liệu di truyền (DNA) hoàn toàn bị trấn áp và quá trình tổng hợp protein không diễn ra; quá trình sinh trưởng bị ngừng trệ.

Nếu xử lý các chất đối kháng của ABA như GA chẳng hạn đã làm giảm và ức chế tác dụng của ABA lên hệ thống đó và do vậy mà quá trình sinh trưởng diễn ra.

Hiệu quả ức chế của ABA là hiệu quả đóng gen (khóa gen), do đó quá trình phiên mã (Transcription) và dịch mã (Translation) không diễn ra được.

Gibberellin (GA) sẽ làm mất tác dụng ức chế gen của ABA, làm cho các quá trình diễn ra bình thường. Có lẽ ABA tác động lên giai đoạn transcription:



1.3. Ứng dụng những hiểu biết về ABA trong trồng trọt

Trong cây ABA thường gây hiệu quả ức chế lên quá trình sinh trưởng phát triển khác nhau. Để loại bỏ tác dụng ức chế của ABA đối với cây trồng chúng ta thường sử dụng các tác nhân đối kháng với ABA để làm thay đổi sự cân bằng hormone trong cây theo hướng làm mất tác dụng của ABA:

- Để phá bỏ ngủ nghỉ, kích thích sự nảy mầm thì hoặc là làm giảm lượng ABA hoặc làm tăng gibberellin (GA) hay cả hai.

- Kìm hãm sự rụng của lá, quả bằng cách tăng hàm lượng auxin, giảm hàm lượng ABA.

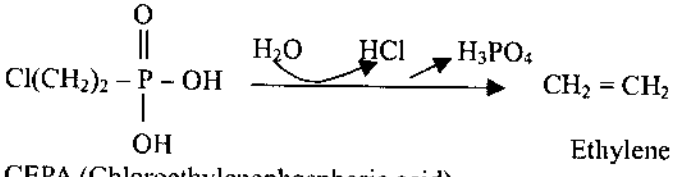
- Điều chỉnh sự hóa già: Tỷ lệ $\frac{\text{Cytokinin}}{\text{ABA}}$ quy định độ già hóa của cây.

Muốn chống sự già hóa có thể tiến hành bằng cách phun cytokinin ngoại sinh, cho cytokinin vào môi trường nuôi cấy hoặc bằng cách tăng cường sự phát triển của bộ rễ để tổng hợp nhiều cytokinin cung cấp cho các cơ quan trên mặt đất để kéo dài tuổi thọ của chúng.

2. Ethylene ($CH_2 = CH_2$)

Là sản phẩm của sự trao đổi chất, nó là một chất khí đơn giản. Ethylene kích thích sự chín của quả. Ethylene cùng tương tác với ABA gây nên sự rụng của lá, quả. Ethylene kích thích sự ra hoa của một số thực vật như kích thích cho dứa ra hoa trái vụ. Trong nghề trồng dứa việc sử dụng chất tạo ra ethylene (đó là ethrene) hoặc đất đèn (cho acetylene) đã làm cho dứa ra thêm một vụ quả.

Ethylene là một chất khí nên trong thực tế không sử dụng trực tiếp ethylene mà người ta sử dụng các chất tạo ra ethylene như CEPA:



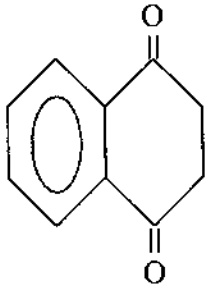
CEPA (Chloroethylenephosphoric acid)

- Trong việc phân hóa giới tính của các cây thuộc họ bầu bí thì ethylene có ảnh hưởng lên sự hình thành giới tính cái. Xử lý ethrene sẽ làm cho chúng phát triển chủ yếu hoa cái.

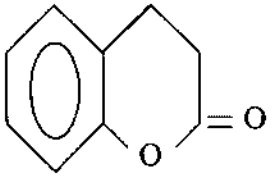
3. Các chất phenol

Là sản phẩm của sự trao đổi chất trong cây. Chúng có tác dụng ức chế hoạt động trao đổi chất và ức chế sinh trưởng. Các phenol kích thích hoạt động của enzyme phân hủy auxin; kìm hãm sự giãn của tế bào và làm cho tế bào hóa gỗ nhanh.

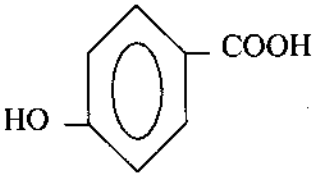
Một số phenol thường gặp như:



Urgon



Cumarin



Oxybenzoic acid

4. Các chất làm chậm sinh trưởng (Retardant)

Retardant là một nhóm chất nhân tạo, có bản chất hóa học khác nhau, chúng gây ức chế giãn của tế bào, làm cây thấp, mở rộng phiến lá, gây sự ra hoa sớm.

Một số ví dụ điển hình:

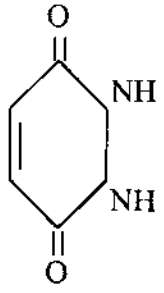
4.1. CCC (Chlorocholine chlorid):

$[(CH_3)_3N - CH_2 - CH_2 - Cl]^+ Cl^-$

- CCC là chất kháng GA, nó làm cho cây thấp đi. Làm tăng sự hình thành diệp lục. Khi xử lý CCC lên cây, tốc độ thấm vào cây rất nhanh, tồn tại vài tuần rồi bị phân hủy, mất hoạt tính.

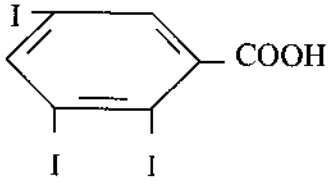
4.2. MH (Malein hydrazide)

MH là chất kháng auxin vì nó làm tăng hoạt tính enzyme phân hủy auxin, đó là IAA-oxidase



MH là chất ức chế sinh trưởng, ức chế sự nảy mầm và kéo dài thời gian ngủ nghỉ; ức chế sự sinh trưởng chồi bên của cây nên được sử dụng để ngăn chặn sự mọc chồi nách của thuốc lá, tránh được việc đánh tỉa nhánh bằng tay rất tốn công lao động.

4.3. TIBA (Triiodobenzoic acid)



TIBA cũng là chất kháng auxin, kìm hãm sự vận chuyển auxin trong cây; làm giảm sự sinh trưởng của chồi ngọn, hạn chế chiều cao, xúc tiến sự phân cành; TIBA còn xúc tiến sự ra hoa và sự hình thành củ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Kim Bảng, Đặng Hùng, Lê Khắc Thận: *Bài giảng hóa sinh*, NXBĐH và GDCN, Hà Nội, 1991.
2. Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng: *Hóa sinh học*, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, 2003
3. Lê Doãn Diên: *Hóa sinh thực vật*, NXBNN, Hà Nội, 1993.
4. Đặng Hùng, Vũ Thị Thư: *Hóa sinh học cây trồng nông nghiệp*, NXBNN, Hà Nội, 1993.
5. Nguyễn Đình Huyên, Mai Xuân Lương: *Hóa sinh học hiện đại theo sơ đồ*, NXB Y học TP HCM, 1983.
6. Nguyễn Duy Minh: *Những bài tập trắc nghiệm chọn lọc và trả lời sinh hóa*, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 2001.
7. Võ Văn Quang: *Bài giảng sinh hóa thực vật*, Đại học Nông lâm Huế, 1996.
8. Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch: *Chất điều hòa sinh trưởng đối với cây trồng*, NXBNN, 1993.
9. Hoàng Văn Tiến, Lê Khắc Thận, Lê Doãn Diên: *Sinh hóa học với cơ sở công nghệ gen*, NXBNN, Hà Nội, 1997.
10. Nguyễn Văn Uyển: *Phân bón lá và các chất kích thích sinh trưởng*, NXBNN, TP HCM, 1995.
11. BreskiW.: *Practikum z Biochemi*, Warszawa, 1971.
12. Hans - Walter Heldt: *Pflanzenbiochemie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, 1999
13. Hartmut Follmann, B.G. Teubner: *Biochemie Grundlagen und Experimente*, Stuttgart-Leipzig-Wiesbaden, 2001
14. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer: *Biochemistry*, International edition, Fifth edition, Available at www.whfreeman.com/ biochem5
15. Konnrad Mengel: *Einfuehrung in der Biochemie*, Eigenverlag, 1994
16. Lodish. Beark. Matsudaira. Kaiser. Krieger. Scott. Zipursky. Darnell: *Molecular Cell Biology*
17. Stryer L.: *Biochemistry*, NY, 1987.

MỤC LỤC

Chịu trách nhiệm xuất bản
NGUYỄN CAO DOANH
Biên tập, trình bày và sửa bản in
NGUYỄN BÍCH PHƯỢNG
Trình bày bìa
HỮU HỒNG

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
167/6 Phương Mai - Đống Đa - Hà Nội
ĐT: (04) 8524501 - 8521940 Fax: 04.5760748

CHI NHÁNH NXB NÔNG NGHIỆP
58 Nguyễn Bỉnh Khiêm - Q1 - Tp. Hồ Chí Minh
ĐT: (08) 8.299521 - 8.297157 Fax: 08.9101036

In 500 bản, khổ 17 × 25cm tại Xưởng in NXBNN. Giấy chấp nhận KHĐT số 08-2006/CXB/635-223/NN do Cục xuất bản cấp ngày 15/12/2005. In xong và nộp lưu chiểu quý I/2007.

$\frac{63-630}{NN-2006}$ - 635/223 - 06

T1 36 gt hoá sinh thực vật

GIÁO TRÌNH HÓA SINH THỰC V

Giá: 65.000đ