

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA ĐÀ NẴNG



TIẾN SĨ:
BÙI XUÂN ĐÔNG

GIÁO TRÌNH
CÔNG NGHỆ ENZYME

MỤC LỤC

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

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

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

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

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

Tailieu.vn

LỜI NÓI ĐẦU

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

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

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

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

các quá trình và thiết bị công nghệ sinh học.

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

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

TÁC GIẢ

Tailieu.vn

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

1.1. BẢN CHẤT HÓA HỌC CỦA ENZYME

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

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

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

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

- + Enzyme có thể tham gia hàng loạt phản ứng trong chuỗi phản ứng sinh hóa để giải phóng hoàn toàn năng lượng hóa học có trong vật chất.
- + Enzyme có thể tham gia những phản ứng độc lập nhờ khả năng chuyển hóa rất cao.
- + Enzyme có thể tạo ra những phản ứng dây chuyền. Khi đó sản phẩm phản ứng đầu sẽ là nguyên liệu hay cơ chất cho những phản ứng tiếp theo.
- + Trong các phản ứng enzyme, sự tiêu hao năng lượng thường rất ít.
- + Enzyme luôn được tổng hợp trong tế bào sinh vật. Số lượng enzyme rất lớn và luôn luôn tương ứng với số lượng các phản ứng xảy ra trong cơ thể. Các phản ứng xảy ra trong cơ thể luôn luôn có sự tham gia xúc tác bởi enzyme.
- + Có nhiều enzyme không bị mất đi sau phản ứng. Ngày nay, các nhà khoa học đã tìm ra trên 1000 loại enzyme khác nhau có trong tế bào sinh vật, số lượng này rất nhỏ so với số lượng có thật trong mỗi tế bào. Trong hơn 1000 loại enzyme đã biết, loài người mới thu nhận và kết tinh được khoảng 200 loại.

1.1.1. Bản chất protein của enzyme

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

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

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

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

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

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

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

1.1.2. Lịch sử nghiên cứu chứng minh enzyme là protein

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

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

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

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

1.2. THÀNH PHẦN CẤU TẠO CỦA ENZYME

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. TRUNG TÂM HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME

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

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

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

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

Các nhóm chức của axit amin thường gặp trong TTHĐ là

- + Nhóm sulthydryl (-SH) của xystein
- + Nhóm amin (-NH₂) đầu N hoặc ε-amin của lysine
- + Nhóm cacboxyl (-COOH) của axit aspartic và glutamic
- + Nhóm hydroxyl (-OH) của serin, treonin và tyrosin
- + Vùng indol của tryptophan, vùng imidazol của histidin và nhóm guanilic của arginin

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

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

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

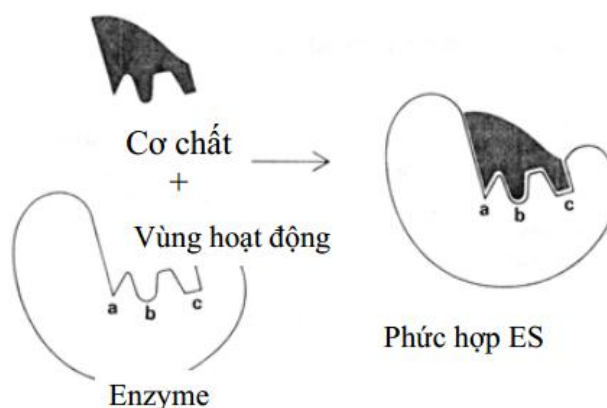
- TTHĐ của enzyme có cấu trúc bậc IV có thể nằm trên một phần dưới đơn vị, hoặc bao gồm các nhóm chức thuộc các phần tiểu đơn vị khác nhau. Trong trường hợp thứ hai khi enzyme bị phân ly, cấu trúc không gian của TTHĐ bị phá hủy làm mất hoạt tính xúc tác của nó.

Dưới đây là một số mô hình TTHĐ của enzyme

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

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

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



Hình 1.1: Mô hình TTHĐ của enzyme E. Fisher

1.3.2. Mô hình Koshland – Mô hình hiện đại

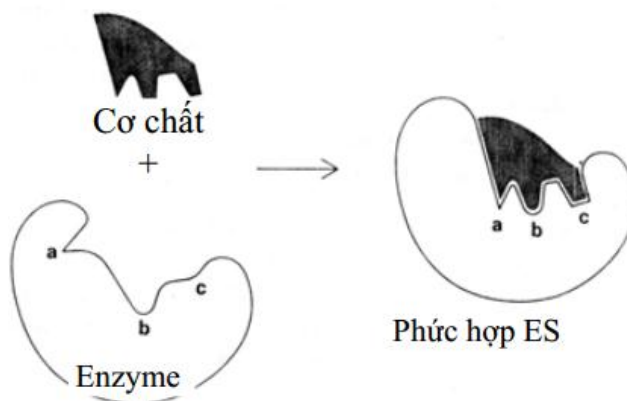
- Ngày nay đã có nhiều dẫn liệu thực nghiệm chứng minh cấu trúc không gian của enzyme cũng như protein không cứng mà mềm dẻo, linh động (hình 1.2).

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

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

***Chú ý:**

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



Hình 1.2: Mô hình TTHĐ của enzyme theo Koshland

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

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

1.4. TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA ENZYME

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

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

1.4.1. Đặc hiệu cơ chất

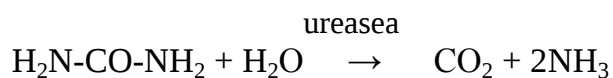
Cơ chất là chất có khả năng kết hợp vào TTHĐ của enzyme và bị chuyển hóa dưới tác dụng của enzyme. Mức độ đặc hiệu của enzyme không giống nhau người ta phân biệt thành các mức sau:

1.4.1.1. Đặc hiệu tuyệt đối:

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

nào khác.

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



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

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

1.4.1.2.Đặc hiệu tương đối:

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

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

a) Đặc hiệu nhóm

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

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

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

b) Đặc hiệu liên kết

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

1.4.2. Đặc hiệu quang học

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

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

dạng khác.

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

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

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

1.4.3. Đặc hiệu phản ứng

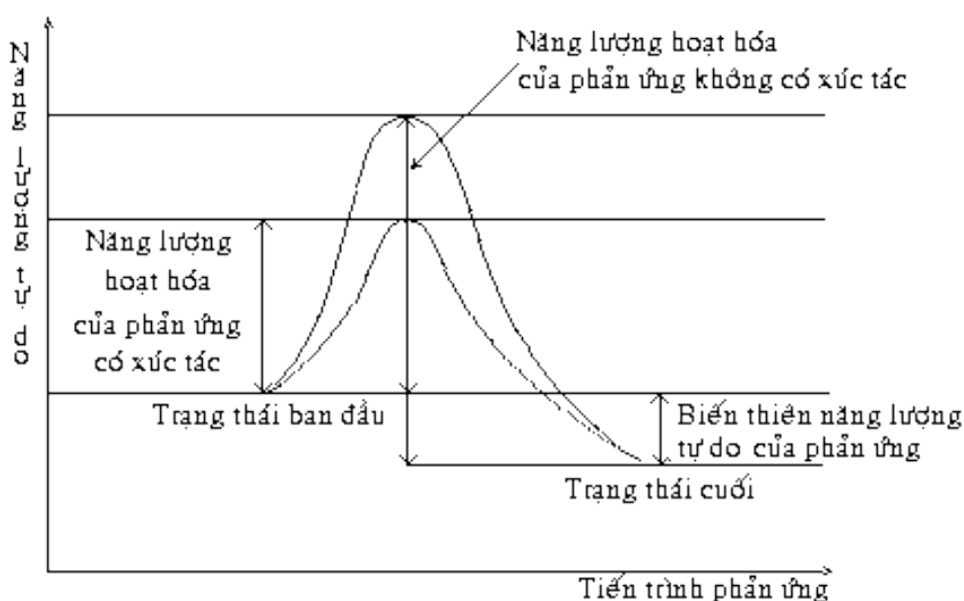
Mỗi enzyme chỉ có thể xúc tác cho một trong các kiểu phản ứng chuyển hóa một cơ chất nhất định.

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

1.5. CƠ CHẾ TÁC DỤNG CỦA ENZYME

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

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



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

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

đẩy vận tốc phản ứng hóa học.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

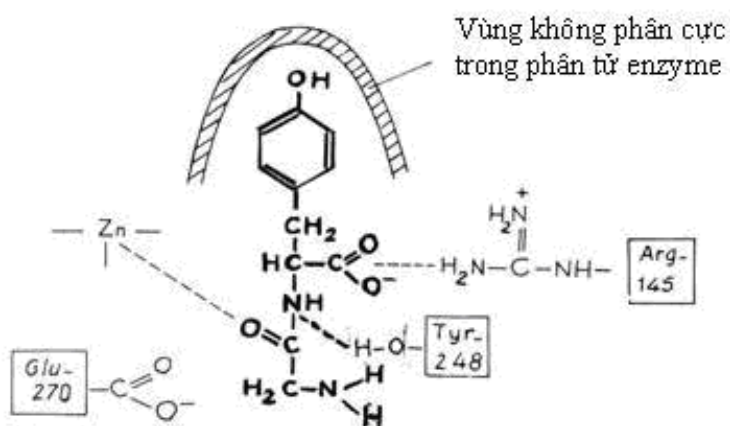
Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) thuộc nhóm peptidhydrolase, xúc tác cho sự thủy phân liên kết peptid, phản ứng xảy ra với vận tốc lớn nếu amino acid đầu C là amino acid thơm, enzyme này cũng thủy phân liên kết este.

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

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

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

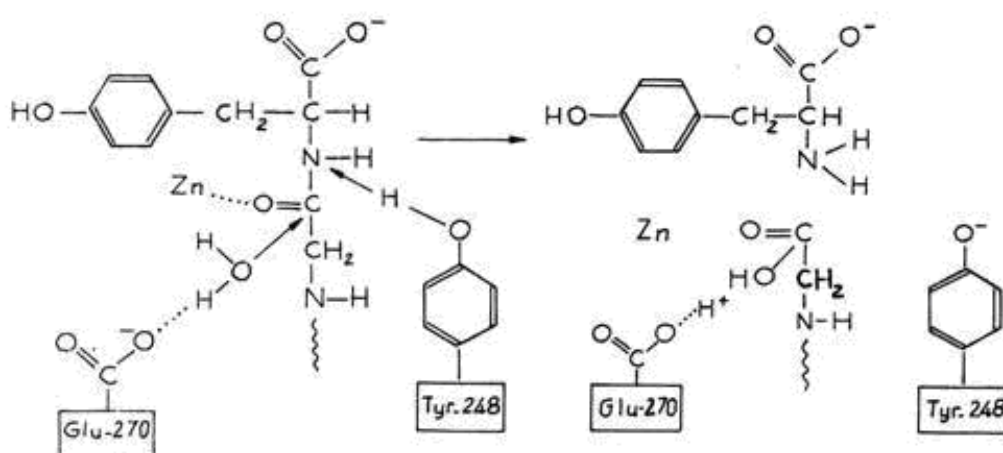
- Tạo thành phức ES: Khi tiếp xúc với cơ chất, các nhóm trong trung tâm hoạt động của enzyme thay đổi vị trí trong không gian. Nhóm guanidin của Arg - 145 cũng như nhóm carboxyl của Glu - 270 dịch chuyển 2Å, nhóm hydroxyl của Tyr - 248 dịch chuyển 12Å từ chỗ gần trên bề mặt phân tử chuyển vào trong đến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



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

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

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



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

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

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

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

1.6. CÁCH GỌI TÊN VÀ PHÂN LOẠI ENZYME

1.6.1. Cách gọi tên enzyme