



Giáo trình enzyme

Biên tập bởi:

TS. Trần Thanh Phong

Giáo trình enzyme

Biên tập bởi:

TS. Trần Thanh Phong

Các tác giả:

PGS TS Đỗ Quý Hai

Phiên bản trực tuyến:

<http://voer.edu.vn/c/c6628b9e>

MỤC LỤC

1. Enzyme-Mở đầu
 2. Phương pháp nghiên cứu enzyme
 3. Cách gọi tên và phân loại enzyme
 4. Cấu trúc phân tử enzyme
 5. Tính đặc hiệu của enzyme
 6. Cơ chế tác dụng của enzyme
 7. Động học Enzyme
 8. Sinh học enzyme
 9. Công nghệ enzyme và ứng dụng
- Tham gia đóng góp

Enzyme-Mở đầu

Định nghĩa enzyme

Trong cơ thể sống (các tế bào) luôn luôn xảy ra quá trình trao đổi chất. Sự trao đổi chất ngừng thì sự sống không còn tồn tại. Quá trình trao đổi của một chất là tập hợp các quy luật của rất nhiều các phản ứng hóa học khác nhau. Các phản ứng hóa học phức tạp này có liên quan chặt chẽ với nhau và điều chỉnh lẫn nhau. Enzyme là các hợp chất protein xúc tác cho các phản ứng hóa học đó. Chúng có khả năng xúc tác đặc hiệu các phản ứng hóa học nhất định và đảm bảo cho các phản ứng xảy ra theo một chiều hướng nhất định với tốc độ nhịp nhàng trong cơ thể sống.

Chúng có trong hầu hết các loại tế bào của cơ thể sống. Chính do những tác nhân xúc tác có nguồn gốc sinh học nên enzyme còn được gọi là các chất xúc tác sinh học (biocatalysators) nhằm để phân biệt với các chất xúc tác hóa học.

Enzyme học là khoa học nghiên cứu những chất xúc tác sinh học có bản chất protein. Hay nói cách khác, enzyme học là khoa học nghiên cứu những tính chất chung, điều kiện, cơ chế tác dụng và tính đặc hiệu của các enzyme.

Lược sử nghiên cứu enzyme

Do enzyme học được coi như cột sống của hóa sinh học nên phần lớn các nghiên cứu hóa sinh từ trước đến nay đều liên quan nhiều đến enzyme.

Về sự phát triển của học thuyết enzyme, có thể chia thành 4 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: trước thế kỷ thứ XVII
- Giai đoạn 2: từ thế kỷ XVII đến nửa đầu thế kỷ XIX
- Giai đoạn 3: từ giữa thế kỷ XIX đến 30 năm đầu của thế kỷ XX
- Giai đoạn 4: từ những năm 30 của thế kỷ XX đến nay.

Giai đoạn 1

Trước thế kỷ XVII người ta đã biết sử dụng các quá trình enzyme trong đời sống song chỉ có tính chất kinh nghiệm thực tế và thông qua hoạt động của vi sinh vật. Đó là các quá trình lên men rượu, muối dưa, làm tương và nước chấm... Ở thời kỳ này người ta chưa hiểu về bản chất enzyme và các quá trình lên men.

Giai đoạn 2

Ở giai đoạn này các nhà bác học đã tiến hành tìm hiểu bản chất của các quá trình lên men. Thời kỳ này đã khái quát hiện tượng lên men như là hiện tượng phổ biến trong sự sống và enzyme là yếu tố gây nên sự chuyển hóa các chất trong quá trình lên men.

Vào những năm 1600 của thế kỷ XVII, Van Helmont là người đầu tiên cố gắng đi sâu tìm hiểu bản chất của quá trình lên men. Van Helmont đã nhận thấy thực chất của sự tiêu hóa là sự chuyển hóa hóa học của thức ăn và giải thích cơ chế của nó với sự so sánh nó với quá trình lên men rượu. Danh từ ferment (từ chữ Latinh fermentatio - sự lên men) được Van Helmont dùng để chỉ tác nhân gây ra sự chuyển biến các chất trong quá trình lên men rượu.

Vào nửa cuối thế kỷ thứ XVIII, nhà tự nhiên học người Pháp là Réaumur cũng đã nghiên cứu bản chất của sự tiêu hóa. Nhà tự nhiên học này đã cho chim quạ đen nuốt những miếng thịt đặt sẵn trong ống kim loại có thành đã được đục sẵn và buộc vào dây thép. Sau vài giờ đã không thấy gì ở trong ống. Hiện tượng này đã thúc đẩy sự nghiên cứu thành phần dịch tiêu hóa để tìm hiểu khả năng tiêu hóa của dịch dạ dày. Sau thí nghiệm này một thời gian, vào năm 1783, nhà bác học người Ý là Spalanzani đã lặp lại thí nghiệm bằng cách lấy dịch dạ dày trộn với thịt mới và thấy có hiện tượng hòa tan xảy ra.

Vào đầu thế kỷ XIX, các nhà nghiên cứu đã tách được các chất gây ra quá trình lên men. Năm 1814 Kirchoff, viện sĩ Saint Petercburg đã phát hiện nước chiết của mầm đại mạch có khả năng chuyển hóa tinh bột thành đường ở nhiệt độ thường. Đây là công trình đầu tiên thu được chế phẩm amylase ở dạng dung dịch và lịch sử enzyme học thực sự được xem như bắt đầu từ đây.

Mười chín năm sau (năm 1833), hai nhà khoa học người Pháp là Payen và Pessoz đã chứng minh chất có hoạt động phân giải tinh bột thành đường có thể tách được ở dạng bột. Thí nghiệm được tiến hành bằng cách cho etanol vào dịch chiết của lúa đại mạch nảy mầm thì thấy xuất hiện kết tủa. Kết tủa được hình thành này có khả năng chuyển hóa tinh bột và nếu đun kết tủa này sẽ mất tác dụng chuyển hóa. Danh từ diastase (từ chữ Latinh diastasis - phân cắt) là do Payen và Persoz dùng để gọi enzyme amylase lúc bấy giờ.

Tiếp đó người ta cũng đã tìm ra và tách được nhiều enzyme khác như enzyme phân giải protein của dịch tiêu hóa trong dạ dày như Pepsin (Emberle và Shwan) - những nhà khoa học người Đức, năm 1836)...

Sau đó, lý thuyết xúc tác đã ra đời. Năm 1835, nhà khoa học Berzelius có quan điểm cho rằng tăng tốc độ phản ứng là hiện tượng xúc tác. Đây là một quan điểm đúng. Song thật đáng tiếc là nhà khoa học này đã coi các chất xúc tác này hoạt động được là do " lực

sống" không theo sự điều khiển của con người. Đây là quan điểm duy tâm, siêu hình đã làm trì trệ sự phát triển của khoa học nhất là ảnh hưởng sâu sắc đến sự phát triển của ngành enzyme học.

Giai đoạn 3

Giai đoạn từ giữa thế kỷ XIX đến 30 năm đầu của thế kỷ XX. Ở giai đoạn này một số lượng rất lớn các enzyme ở dạng hòa tan đã được tách chiết.

Trong thời kỳ này, có hai trường phái đấu tranh với nhau: đó là trường phái Pasteur - nhà bác học vĩ đại người Pháp và trường phái Liebig - nhà bác học nổi tiếng người Đức.

* Trường phái Pasteur:

Năm 1856 Pasteur đã đề cập đến bản chất của quá trình lên men. Ông cho rằng không thể tách các enzyme khỏi tế bào. Tác dụng và tính chất của enzyme gắn liền với sự sống của tế bào và quá trình lên men rượu là kết quả hoạt động sống của tế bào nấm men chứ không phải là kết quả của tác dụng của enzyme. Ông đã tiến hành thí nghiệm và nhận thấy nếu một dung dịch hữu cơ, ví dụ dung dịch glucose để trong bình đã khử trùng thì không xảy ra quá trình lên men rượu. Chính vì suy nghĩ ấy, Pasteur đã chia các enzyme thành 2 loại: "enzyme có tổ chức" và "enzyme không có tổ chức".

Theo ông, các "enzyme có tổ chức" là những enzyme không thể tách khỏi tế bào, khi tách chúng sẽ bị mất tác dụng xúc tác như các enzyme của các tế bào nấm men thực hiện quá trình lên men rượu; còn các "enzyme không có tổ chức" là các enzyme có thể thực hiện tính xúc tác của nó ngoài cơ thể như các enzyme có trong dịch tiêu hóa (ví dụ Pepsin ở trong dạ dày, amylase ở trong tuyến nước bọt, trong mầm thóc...)

Quan điểm sai lầm này của Pasteur đã thống trị ngành enzyme học trong một thời gian dài. Năm 1878 Kuhne đã đề nghị dùng danh từ "ferment" (từ tiếng Latinh: fermentatio = lên men) để gọi các "enzyme có tổ chức" và đã gọi các chất chiết có tác dụng xúc tác cho phản ứng hóa học là các enzyme (từ chữ Hy Lạp: en = bên trong, zyme = men rượu, tức là "ở trong nấm men" để gọi các enzyme "không có tổ chức". Danh từ enzyme được xuất phát từ đây.

* Trường phái Liebig:

Chống lại quan điểm trên của Pasteur, Liebig (trước đó có cả Berzelius) cho rằng có thể không có hoạt động của các tế bào vi sinh vật cũng có quá trình lên men. Điều đó có nghĩa là ông coi enzyme như là một chất hóa học gây nên hiệu quả tương tự như các chất xúc tác, tác dụng cả ở trong và ngoài tế bào, không phụ thuộc vào hoạt động sống của vi sinh vật.

Nhưng năm 1871 Liebig thất bại vì thực nghiệm không chứng minh được quan điểm trên của mình. Các thí nghiệm được tiến hành bằng cách lấy dịch chiết từ tế bào nấm men đã nghiền nát đều không có tác dụng gây lên men rượu. Cũng vào năm 1871 Manatxein là một bác sĩ người Nga đã dùng cát thạch anh nghiền các tế bào nấm men và thu được dịch chiết không chứa tế bào có khả năng biến đổi đường thành rượu. Nhưng những quan sát này đã không được ai chú ý tới. Chính vì vậy, quan điểm siêu hình của Pasteur đã hạn chế khá nhiều sự phát triển của ngành enzyme học. Đến năm 1897, H. Büchner - một nhà khoa học người Đức đã nhận được dịch chiết nấm men bằng cách phân hủy tế bào hoàn thiện hơn. Trong thí nghiệm này, các tế bào nấm men được nghiền nát hoàn toàn cùng với bột thủy tinh, sau đó được ép bằng áp suất cao. Dịch chiết thu được không chứa tế bào vẫn có khả năng gây ra quá trình lên men (chuyển hóa glucose thành rượu). Điều đó chứng tỏ quá trình lên men rượu không phải là kết quả của hoạt động sống của tế bào nấm men mà là kết quả tác dụng của các enzyme vốn có trong các tế bào. Do đó, quan điểm sai lầm về enzyme "có tổ chức" và enzyme "không có tổ chức" mà thực chất là về bản chất của enzyme đến lúc này mới hoàn toàn bị đánh đổ, mở ra một thời kỳ phát triển mới của ngành enzyme học. Cũng từ đó đã không có sự phân biệt về nội dung giữa thuật ngữ "ferment" và "enzyme". Có thể nói rằng, công trình của Büchner đã đánh dấu một bước ngoặt quan trọng trong lịch sử phát triển của enzyme học. Sau đó, nhiều loại enzyme trong cơ thể sống đã được tìm ra. Vì vậy việc phân loại và gọi tên các enzyme một cách thống nhất càng cần thiết. Năm 1883, Duyclo, nhà bác học Pháp đã đề ra nguyên tắc phân loại enzyme theo cơ chất (substrate) do chúng biến đổi và thêm đuôi tận cùng "ase" vào. Ví dụ enzyme phân giải tinh bột (amilun) là amylase. Tuy vậy, trong thực tế còn tồn tại nhiều ngoại lệ về thuật ngữ, ví dụ những tên gọi enzyme pepsin, trypsin, catalase trước đây vẫn được dùng.

Ở thời kỳ này, dựa vào thành tựu của hóa học, đặc biệt là hóa lý và hóa keo, các nhà khoa học đã hướng vào việc nghiên cứu các tính chất hóa và lý học của enzyme cũng như hoàn thiện các phương pháp làm thuần khiết enzyme.

Giai đoạn quan trọng nhất trong thời kỳ này là các công trình của nhà bác học vĩ đại người Đức E. Fisher. Ông đã đặt nền móng cho những khái niệm hiện đại về tính đặc hiệu của enzyme, về sự tương tác không gian giữa enzyme và cơ chất. Giả thuyết nổi tiếng của ông là giữa enzyme và cơ chất kết hợp với nhau như "ổ khóa với chìa khóa". Rồi những nghiên cứu của Bach và Palladin về các enzyme ôxy hóa khử đã tạo nên cơ sở cho việc xây dựng học thuyết ôxy hóa khử sinh học. Trong thời gian này người ta cũng đã phát hiện ra được tính tác dụng thuận nghịch của enzyme (Đanilepski, 1894), các coenzyme cũng đã được phát hiện (Harden và Young, 1906). Họ là những người đã khám phá ra rằng, dịch chiết tế bào nấm men chứa hai loại chất cần thiết cho quá trình lên men là "zymase" và "cozymase". Họ nhận thấy dịch chiết tế bào nấm men mất hoạt tính xúc tác nếu bị thẩm tích hoặc bị đun lên đến 50°C. Nhưng dịch chiết đã bị thẩm tích không hoạt động sẽ hoạt động khi được trộn với dịch đã bị đun nóng không hoạt động. Như vậy hoạt độ phụ thuộc vào sự có mặt của hai loại chất: thành phần không bền với nhiệt (heat - labile); không có thể thẩm tích được (được gọi là zymase) và một

phân đoạn bền với nhiệt (heat - stable), có thể thâm tích được (được gọi là cozymase). Ngày nay chúng ta biết rằng "zymase" bao gồm tất cả enzyme, còn "cozymase" bao gồm các ion kim loại, ATP, ADP và các coenzyme như NAD^+ . Thời gian này người ta cũng đã hiểu biết được tác dụng kim hãm và hoạt hóa của một số enzyme (Sorensen 1909). Vào đầu thế kỷ XX, đã phát sinh ra cơ sở động học trong tác động của enzyme dựa vào những nghiên cứu của nhà bác học Anh là Brown và nhà bác học Pháp là Henri. Đến năm 1913, Michaelis và Menten đã phát triển các công trình trên và nêu lên thuyết động học của sự xúc tác enzyme.

Sau đại chiến thế giới lần thứ nhất nhà bác học nổi tiếng người Đức là Willstatter đã có rất nhiều công hiến trong việc tìm hiểu bản chất hóa học của enzyme. Đó là công trình khoa học 5 năm của ông và các cộng sự (1922) nhằm làm thuần khiết enzyme bằng phương pháp hấp thụ chọn lọc. Qua đó từ nhận xét thấy là ở những giai đoạn cuối của quá trình làm thuần khiết enzyme, thường bị mất đi những chất chưa được biết nào đó do, đó enzyme bị mất tính xúc tác, đã cho phép Willstatter nêu lên lần đầu tiên giả thuyết về enzyme hai cấu tử (enzyme hai thành phần). Nhóm hoạt động (coenzyme, coferment, agon) chỉ có khả năng xúc tác khi kết hợp với phần protein đặc hiệu (apoferment, apoenzyme, feron = protein) nó xác định các đặc tính của enzyme và đóng vai trò chủ đạo trong việc thể hiện tác dụng xúc tác của enzyme. Willstatter đã coi feron (protein) là chất trợ chả có tác dụng gì. Agon là chất được hấp phụ trên chất này. Và vào năm 1926, trong một dịp thuyết trình, ông đã cho rằng enzyme không thuộc một trong các hợp chất đã biết, tức là enzyme không phải là protein, không phải là glucid, mà chúng là những "chất đặc biệt". Đó chính là quan niệm sai lầm của Willstatter. Ông là người đã tìm ra được nhiều phương pháp làm sạch enzyme cũng như làm sáng tỏ nhiều tính chất đặc hiệu enzyme. Nhưng mục đích chính là làm sáng tỏ bản chất hóa học của enzyme thì ông lại không đạt được.

Ngày nay người ta quan niệm nếu là enzyme hai thành phần thì phần coenzyme quy định kiểu phản ứng và chịu trách nhiệm làm bền. Còn apoenzyme quy định tính đặc hiệu của enzyme cũng như tăng hiệu suất xúc tác.

Coenzyme + apoenzyme = (holo) enzyme = (enzyme hoàn chỉnh)

Coferment + apoferment = (holo) ferment

Coenzyme chỉ dùng để chỉ phần không phải protein của enzyme trong trường hợp khi nó dễ tách khỏi phần apoenzyme khi cho thâm tích qua màng bán thấm và có thể tồn tại độc lập. Phần không phải protein của enzyme được gọi là nhóm ngoại hay nhóm "prostetic" khi nó liên kết chặt chẽ với phần protein của enzyme.

Giai đoạn 4

Bản chất hóa học của enzyme chỉ được xác định đúng đắn từ sau khi kết tinh được enzyme. Năm 1926 nhà hóa sinh Mỹ trẻ tuổi Sumner (39 tuổi) đã thành công trong việc chứng minh protein được kết tinh từ hạt đậu tương là chất giống enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân urê. Đây cũng chính là enzyme đầu tiên được kết tinh. Bốn năm sau (1930) ở Mỹ Northrop đã tách được pepsin ở dạng tinh thể, và vào năm 1931 Northrop và Kunitz cũng đã tách được trypsin ở dạng tinh thể.

Trong thời kỳ này J.B.S Hardane đã viết quyển "Enzymes". Mặc dù lúc đó bản chất phân tử của Enzyme hầu như vẫn còn là bí mật, nhưng tác giả đã đưa ra dự đoán tuyệt vời về vai trò của các tương tác và liên kết yếu giữa enzyme và cơ chất trong cơ chế hoạt động của enzyme. Điều này vẫn giữ nguyên tính thời sự trong thời đại của chúng ta.

Các công trình của Sumner và Northrop đã mở ra một chương mới trong lịch sử phát triển của enzyme học hiện đại. Những kết quả đạt được đã cho phép xác định được một cách dứt khoát bản chất hóa học của enzyme là protein. Phải nói rằng bản chất hóa học của phần lớn enzyme là protein và định nghĩa có tính chất kinh điển về Enzyme phải xem lại từ sau phát hiện của T. R. Cech năm 1981. Cech đã phát hiện một RNA có hoạt tính xúc tác như enzyme và gọi là ribozyme (xuất phát từ các tên ribose và enzyme). Ribozyme xúc tác cho quá trình chuyển hóa tiền chất. RNA thông tin (pre - m RNA) thành m-RNA. Do đó enzyme không nhất thiết phải là protein! Đây là một phát minh có ý nghĩa rất lớn. Tác giả của phát minh này được giải Nobel năm 1989. Cho đến nay khoảng 100 ribozyme đã được biết. Có thể nói rằng, những công trình đã nói ở trên đã mở màn cho giai đoạn thứ tư của lịch sử phát triển enzyme học kéo dài cho đến hiện nay.

Từ giữa thế kỷ thứ XX, nhất là thời gian gần đây enzyme học phát triển rất mạnh. Nhờ ứng dụng các phương pháp mới, hiện đại như: điện di, sắc ký, quang phổ, đồng vị phóng xạ... đã cho phép nghiên cứu cấu trúc cũng như cơ chế tác dụng của nhiều enzyme, cơ chế của quá trình sinh tổng hợp enzyme và sự điều hòa hoạt động của enzyme trong tế bào.

Người ta đã xác định được cấu tạo của coenzyme. Đã xác định được mối liên hệ của enzyme và các vitamin (nhiều vitamin là thành phần cấu tạo của coenzyme và phần lớn các vitamin tan trong nước là thành phần cấu tạo của các coenzyme).

Người ta cũng đã xác định được các enzyme xúc tác cho các quá trình trao đổi chất như: hệ thống enzyme đường phân, Embden - Meyerhof - Parnas năm 1933, hệ thống enzyme của chu trình Krebs - Szent Gyorgy năm 1937 (chu trình citric acid), chu trình ornithin trong trao đổi chất của protein năm 1932 (Krebs - Henseleit). Nhờ những phương pháp mới trong việc tách và làm sạch enzyme, người ta đã xác định được vai trò rất quan trọng của kim loại trong sự xúc tác của enzyme và tác dụng hoạt hóa của

chúng. Đã xác định được sự phân bố của các enzyme trong tế bào. Đã nghiên cứu cơ chế tác dụng cũng như cấu tạo các protein enzyme. Bằng phương pháp Rhengen, người ta đã nghiên cứu cấu trúc của của phân tử enzyme, như cấu trúc của ribonuclease (1960, Stein).

Trong vòng hơn 40 năm trở lại đây đã nghiên cứu các enzyme sinh tổng hợp như nucleotide phosphorylase (Greenberg Marago, 1955), DNA - polymerase (Kornberg, 1956), RNA - polymerase (Spiegelman, Hurwist, 1958 - 1961) và các nghiên cứu về điều hòa sinh tổng hợp protein - enzyme của Jacob, Monod (1961).

Từ năm 1961 đã phát hiện ra isoenzyme trong cơ thể là enzyme xúc tác có thể tồn tại dưới nhiều dạng khác nhau, xúc tác trong cùng một cơ thể, cho một phản ứng, có sai khác một số tính chất như độ di động điện di.

Năm 1969 người ta đã tổng hợp được enzyme đầu tiên là ribonuclease (Denkewalter và Hirschmann, Gutte và Merrifield). Đây là enzyme gồm 124 amino acid, bền với nhiệt, có thể đun nóng lên 80°C với thời gian ngắn.

Có thể tổng hợp enzyme bằng hai phương pháp khác nhau:

- Tổng hợp từng peptid riêng biệt rồi sau đó nối lại với nhau.

- Dùng chất giá (polymer): cắm lên trên này một gốc amino acid, sau đó cắm tiếp 123 gốc amino acid khác. Việc tổng hợp này đã thành công trong 3 tuần bao gồm 11931 giai đoạn, 369 phản ứng. Đã nêu lên được một phương pháp mới về tổng hợp enzyme. Ở đây người ta đã dùng phương pháp tự động hóa, khi được 124 gốc amino acid thì chuỗi polypeptid tự tách ra. Điều này cho thấy mỗi khi chuỗi polypeptid đã được lựa chọn theo một trật tự đúng đắn thì có thể tự uốn cong trong không gian. Đây chính là khả năng tự tổ chức

Những thành tựu nghiên cứu cơ bản về enzyme là cơ sở để phát triển các nghiên cứu ứng dụng enzyme trong thực tế.

Trong mấy chục năm cuối của thế kỷ XX và đầu thế kỷ XXI, người ta đã chú ý nghiên cứu việc ứng dụng enzyme. Người ta đã tận dụng các nguyên liệu giàu enzyme để tách enzyme, dùng chế phẩm enzyme này để chế biến các nguyên liệu khác nhau hoặc sử dụng vào mục đích khác nhau. Ở nhiều nước đã hình thành ngành công nghệ enzyme, hàng năm đã sản xuất hàng trăm tấn chế phẩm enzyme để phục vụ cho các ngành sản xuất khác nhau và cho y học.