

ĐỘNG HỌC CỦA QUÁ TRÌNH HOẠT HÓA CHITINASE TRONG PHẢN ỨNG THỦY PHÂN CHITIN THÀNH GLUCOSAMINE

TRẦN ĐÌNH TOẠI, NGUYỄN VĂN THIẾT, NGUYỄN BÍCH THÙY, ĐỖ TRUNG SỸ

I. MỞ ĐẦU

Chitinase (EC 3.2.1.14) là endoglycosidase, enzym thủy phân thuộc họ 18 của glycoside hydrolase, phân lớp glycosylase [1]. Chitinase được tìm thấy trong các cơ thể chứa chitin như sâu bọ cánh cứng, nấm và trong các cơ thể không chứa chitin như vi khuẩn, thực vật, động vật tiêu biểu như tôm, cua, mực. Trong các cơ thể không chứa chitin, chitinase đóng vai trò quan trọng trong việc phòng chống các loại sâu bọ côn trùng có hại và các kí sinh trùng gây gệnh cho người như nấm *Candida albicans* gây bệnh ở ruột, âm đạo, hoặc kí sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* gây bệnh sốt rét [2]. Chitinase còn làm giảm hoạt tính của virus nucleopolyhedro *Autographa californica* (AcMNPV) [3]. Chính vì có các hoạt tính sinh học nêu trên mà các chitinase là mục tiêu nghiên cứu để tạo ra các loại thuốc phòng chống các loại sinh vật có hại [4], cũng như nghiên cứu sử dụng chitinase làm kháng nguyên điều chế vaccine chống kí sinh trùng sốt rét [3].

• Trong tự nhiên, chitinase cùng với enzym β -N-acetylhexosaminidase, có thể phân hủy chitin - một biopolymer có độ bền vững rất cao. Điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc xử lí môi trường bị ô nhiễm bởi các chất thải chứa chitin khó bị phân hủy.

Ngày nay, việc điều chế glucosamine từ chitin (hoặc chitosan) làm thuốc chống đau xương khớp là một vấn đề có ý nghĩa quan trọng trong y, dược. Điều chế bằng phương pháp enzym dùng chitinase cùng với chitosanase để thủy phân chitin và chitosan thành glucosamine có nhiều ưu điểm hơn hẳn so với phương pháp hóa học [5].

Với những ý nghĩa trên, chitinase có giá trị rất lớn trong thực tế. Chính vì vậy, chúng tôi tập trung nghiên cứu enzym này để nâng cao hơn hiệu quả ứng dụng của nó. Trong chương trình nghiên cứu động học xúc tác của chitinase, một trong các enzym thủy phân, chúng tôi nghiên cứu các yếu tố gây ảnh hưởng hoạt hóa tới hoạt tính của enzym.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Dịch chiết enzym chitinase: thu hồi dịch chiết enzym từ *Pseudomonas aeruginosa* do phòng thí nghiệm của chúng tôi thực hiện theo phươn

Kkkkkkkkkkk;g pháp ghi trong tài liệu [6].

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp xác định nồng độ của chitinase:

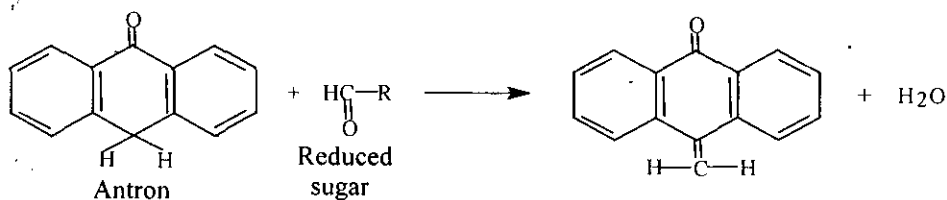
Nồng độ của enzym được định lượng qua nồng độ protein. Nồng độ protein được xác định theo phương pháp quang phổ [7], đo tại bước sóng 260 nm trên máy quang phổ tử ngoại UV-VIS Double Beam PC, LABOMED (USA).

- Phương pháp xác định hoạt tính của chitinase:

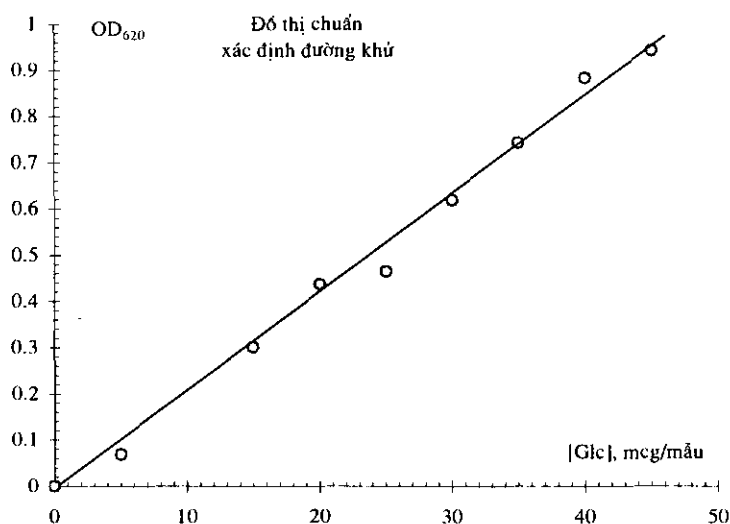
Hoạt tính của chitinase được đánh giá thông qua đường khử glucosamine, nồng độ sản phẩm của phản ứng thủy phân chitin.

Xác định glucosamine (đường khử) với antron [7]:

Nguyên lý của phương pháp: Các dẫn xuất của monosaccharide dạng furfurol tạo thành khi đun glucosamine hay đường khử nói chung với axit sulfuric đặc, phản ứng với antron và tạo thành các chất màu có cực đại hấp thụ ở bước sóng 620 nm:



Cường độ màu tỉ lệ thuận với lượng glucosamine trong phạm vi từ 10 μg đến 100 μg đường này trong mẫu. Để xác định glucosamine trong mẫu nghiên cứu cần lập đồ thị chuẩn sự phụ thuộc mật độ quang ở bước sóng 620 nm vào lượng glucosamine (hình 1).



Hình 1. Đồ thị chuẩn để xác định glucosamine

Hoá chất: Dung dịch antron 0,2%, chuẩn bị trên dung dịch H_2SO_4 95%, dung dịch được chuẩn bị vào ngày đo.

- Dung dịch chuẩn glucosamine (từ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đến 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Cách tiến hành: Đặt các ống nghiệm vào bồn đá, sau đó lần lượt cho các thành phần phản ứng vào theo trình tự sau: 2,5 ml dung dịch mẫu nghiên cứu chứa lượng đường khử tương đương với từ 10 µg đến 100 µg glucosamine, 5 ml dung dịch antron (dung dịch sử dụng 1 lần, chuẩn bị trước khi dùng). Chú ý: khi cho dung dịch antron vào phải lắc mạnh. Đun sôi cách thủy 10 phút rồi làm lạnh trong bồn đá, sau đó so màu ở bước sóng 620 nm (dung dịch của hỗn hợp phản ứng có màu xanh). Kết quả cho phép dựng đồ thị chuẩn sự phụ thuộc mật độ quang ở bước sóng 620 nm vào lượng glucosamine (hình 1).

III. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

1. Xác định các thông số động học của phản ứng thủy phân

Để xác định các thông số động học của phản ứng, tiến hành phản ứng với các nồng độ khác nhau của cơ chất (dung dịch chitin) từ 0,4g/l đến 5,0g/l. Nồng độ enzym: $[E]_0 = 2 \cdot 10^{-3}$ g/l. Các kết quả của phản ứng thủy phân được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Các thông số động học của phản ứng thủy phân

No	1	2	3	4	5	6
[S], g/l	0,40	0,50	0,80	1,25	2,00	5,00
$V_0 \cdot 10^4, (g/l) \cdot s^{-1}$	0,38	0,45	0,64	0,83	1,07	1,49

Từ các dữ kiện thực nghiệm thu được trong bảng 1, lập đồ thị theo phương pháp Lineweaver - Burk $1/V = f(1/[S])$ (hình 2). Từ đồ thị xác định:

$$V_M = 2,08 \cdot 10^{-4} (g/l) \cdot s^{-1}; k_2 = 1,04 \cdot 10^{-1} s^{-1}; K_S = 1,79 \cdot 10^{-4} (g/l).$$

2. Nghiên cứu ảnh hưởng của proflavine ([A]) tới phản ứng thủy phân chitin

Các kết quả nghiên cứu dùng proflavine làm chất hoạt hóa đối với chitinase được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. ảnh hưởng hoạt hóa của proflavine (A) tới tốc độ phản ứng thủy phân chitin (S) xúc tác bởi chitinase

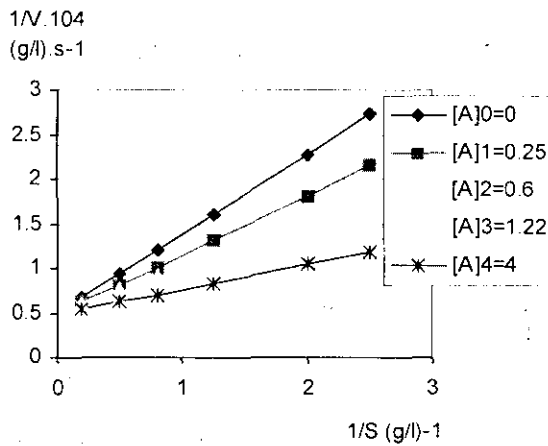
Cơ chất		$V \cdot 10^4, (g/l) \cdot s^{-1}$				
[S], (g/l)	$1/[S], (g/l)^{-1}$	$[A]_0 = 0,00$	$[A]_1 (g/l) = 0,25 \cdot 10^{-4}$	$[A]_2 (g/l) = 0,6 \cdot 10^{-4}$	$[A]_3 (g/l) = 1,22 \cdot 10^{-4}$	$[A]_4 (g/l) = 4,00 \cdot 10^{-4}$

5,00	0,2	1,49	1,62	1,69	1,79	1,85
2,00	0,5	1,07	1,24	1,32	1,49	1,60
1,25	0,8	0,83	0,99	1,11	1,25	1,42
0,8	1,25	0,64	0,77	0,88	1,03	1,20
0,5	2,0	0,45	0,56	0,68	0,80	0,96
0,4	2,5	0,38	0,47	5,88	0,69	0,84

Các số liệu trong bảng 2 cho thấy rằng proflavine làm tăng tốc độ phản ứng thủy phân. Như vậy proflavine là chất hoạt hóa đối với chitinase.

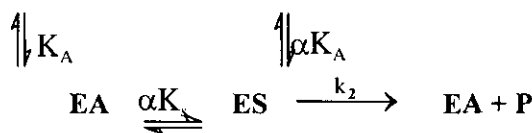
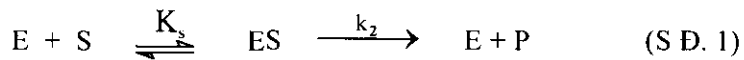
Lập đồ thị theo Phương pháp Lineweaver - Burk $1/V = f(1/[S])$ (hình1).

$$(1/V)10^{-4}, (g/l)^{-1}.s$$



Hình 2. Đồ thị để xác định V_M, K_S

Đồ thị là chùm đường thẳng cắt nhau tại một điểm trên trục tung. Điều đó cho thấy, chất hoạt hóa không gây ảnh hưởng tới V_A chỉ gây ảnh hưởng tới K_M . Như vậy, đây là hiện tượng hoạt hóa đồng lực: chất hoạt hóa, khi kết hợp với trung tâm hoạt động của enzym làm tăng ái lực của enzym đối với cơ chất ($\alpha < 1, \beta = 1$). Hiện tượng này được mô tả theo sơ đồ (S Đ.1) [8]:



Tốc độ của phản ứng được viết như sau [8]:

$$V_A = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{\alpha K_S \frac{K_A + [A]}{\alpha K_A + [A]} + [S]_0} \quad (1)$$

hoặc

$$V_A = \frac{V_M[S]_0}{K_{MA} + [S]_0} \quad (2)$$

trong đó:

$$K_{MA} = \alpha K_S \frac{K_A + [A]}{\alpha K_A + [A]} \quad (3)$$

Từ đồ thị $1/V = f(1/[S])$ (hình 1), khi $[A] = 0$ tính được V_M, K_S :

$$V_M = 2,08 \cdot 10^{-4} \text{ (g/l)}; \quad K_S = 1,79 \cdot 10^{-4} \text{ (g/l)}.$$

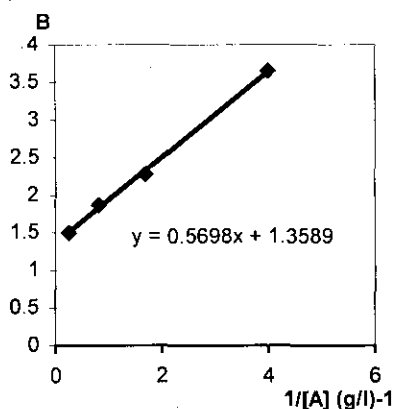
Chú ý: khi $[A] = 0$ thì K_{MA} chính là K_S . Vậy $K_{MA}([A] = 0) = 1,79 \cdot 10^{-4} \text{ g/l}$. Đồng thời, từ các giá trị $[A]$ khác nhau tính được K_{MA} phụ thuộc vào các giá trị này (bảng 3).

Bảng 3. Sự phụ thuộc K_{MA} vào nồng độ chất hoạt hoá proflavine.

$[A] \cdot 10^4, \text{ (g/l)}$	0	0,25	0,6	1,22	4
$K_{MA} \cdot 10^4, \text{ (g/l)}$	1,79	1,30	1,0	0,83	0,59

Để xác định các thông số động học khác (α, K_A) tiến hành như sau: dựa vào các kết quả K_{MA} và K_S vừa thu được, lập đồ thị $B = f(1/[A])$ (hình 3) để xác định α, K_A :

$$\text{Đặt } B = \left\{ 1 - \frac{K_{MA}}{K_S} \right\}^{-1} = \frac{1}{1-\alpha} + \frac{\alpha K_A}{1-\alpha} \frac{1}{[A]} \quad (4)$$



Hình 3. Đồ thị để xác định α, K_A

Từ đồ thị trên hình 3 xác định được: $\alpha = 0,265$; $K_A = 1,54 \cdot 10^{-4} \text{ (g/l)}$.

Trên thế giới, chitinase được bắt đầu nghiên cứu nhiều vào cuối thế kỷ trước. Tuy vậy, từ khi xuất hiện những công trình nghiên cứu đầu tiên về enzym này vào năm 1939 [9] cho tới khi được đưa vào hệ thống phân loại enzym vào năm 1961 [10], tới nay chúng tôi chưa tìm thấy công trình nào công bố về nghiên cứu hoạt hoá nâng cao hoạt tính xúc tác của enzym này. Đây cũng là lần đầu tiên nghiên cứu chitinase được thực hiện ở Việt Nam. Chúng tôi hy vọng rằng, kết quả nghiên cứu chitinase sẽ có nhiều triển vọng ứng dụng trong việc điều chế glucosamine từ chitin làm thuốc chống đau xương khớp hoặc ứng dụng trong việc khác là những vấn đề có ý nghĩa quan trọng trong y, dược.

IV. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu động học quá trình hoạt hóa chitinase xúc tác phản ứng thủy phân chitin.

Đã tính toán các hằng số động học của phản ứng:

$$V_M = 2,08.10 \text{ (g/l).s}^{-1}; k_2 = 1,04.10^{-1} \text{ (s}^{-1}); K_S = 1,79.10^{-4} \text{ (g/l)}$$

$$\alpha = 0,265; K_A = 1,54.10^{-4} \text{ (g/l)}$$

Lời cảm ơn. Đề nghị viết bằng tiếng Việt

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. B. Henrissat and A. Bairoch - New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem J.* **293** (1993) 781-788.
2. G. Vaaje-Kolstad, A. Vasella, M.G. Peter, C. Netter, D.R. Houston, B. Westereng, B. Synstad, V.G.H. Eijsink, and D.M.F. van Aalten - Interactions of a family 18 chitinase with the designed inhibitor HM508 and its degradation product, chitobiono- δ -lactone, *J. Biol. Chem.* **279** (5) (2004) 3612-3619.
3. C. J. Thomas, G.W. Gooday, L.A. King and R.D. Possee - Mutagenesis of the active site coding region of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chiA gene, *Journal of General Virology* **81** (2000) 1403-1411.
4. R. G. Boot, A. P. Bussink, M. Verhoek, P. A.J. de Boer, A. F.M. Moorman and J. M.F.G. Aerts - Marked Differences in Tissue-specific Expression of Chitinases in Mouse and Man, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **53** (10) (2005) 1283-1292.
5. Nguyễn Văn Thiết - Xây dựng quy trình công nghệ tổng hợp các chất có tác dụng viêm khớp (Glucosamine) từ vỏ tôm, Báo cáo đề tài cấp bộ của viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2005.
6. E. T. Suzanne, S. Mark, C. W. Mark, and K. Peek - Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385, *Applied and environmental microbiology*, September **67** (9) (2001) 4001-4008
7. Под общей редакцией профессора Н. П. Мешковой и академика С. Е. Северина - Практикум по биохимии. Издательство Московско Университета, (1979) 87-88; 98-99.
8. Trần Đình Toại, Nguyễn Thị Vân Hải - Động học các quá trình xúc tác sinh học, NXB KHKT Hà Nội, 2005, 200 trang.

9. L. Zechmeister and G. Túth - Chromatographic adsorption of the enzymes of emulsin which act on chitins, *Enzymologia* 7 (2005) 165-169.
10. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) Enzyme Nomenclature (1992).

SUMMARY

KINETICS OF THE CHITINASE ACTIVATION IN THE CHITIN HYDROLYSIS TO YIELD GLUCOSAMINE

Chitin is the second most abundant polysaccharide (after cellulose) found in nature. The enormous amounts of chitin produced annually in the biosphere are degraded by chitinases.

Chitinases are ubiquitous in nature, they occur in a variety of organisms from bacteria and fungi to plants and vertebrates. The enzymes are able to break down polymeric chitin to chitin oligosaccharides, and N-acetylglucosamine. Thus, chitinases have been proposed as targets for the glucosamine's production for the arthritis drug preparation.

For the comprehension of chitinase in the chitin's hydrolysis to yield glucosamine, we are studying an activation of this enzyme

The chitin hydrolysis to yield glucosamine has been activated by Proflavin.

Calculated constants of hydrolytic reaction and activation constants have been found:

$$V_M = 2,08 \cdot 10^{-4} \text{ (g/l) \cdot s}^{-1}; \quad k_2 = 1,04 \cdot 10^{-1} \cdot \text{s}^{-1};$$

$$K_s = 1,79 \cdot 10^{-4} \text{ (g/l)}; \quad \alpha = 0,265; \quad K_A = 1,54 \cdot 10^{-4} \text{ (g/l)}.$$

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 22 tháng 6 năm 2006

Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.