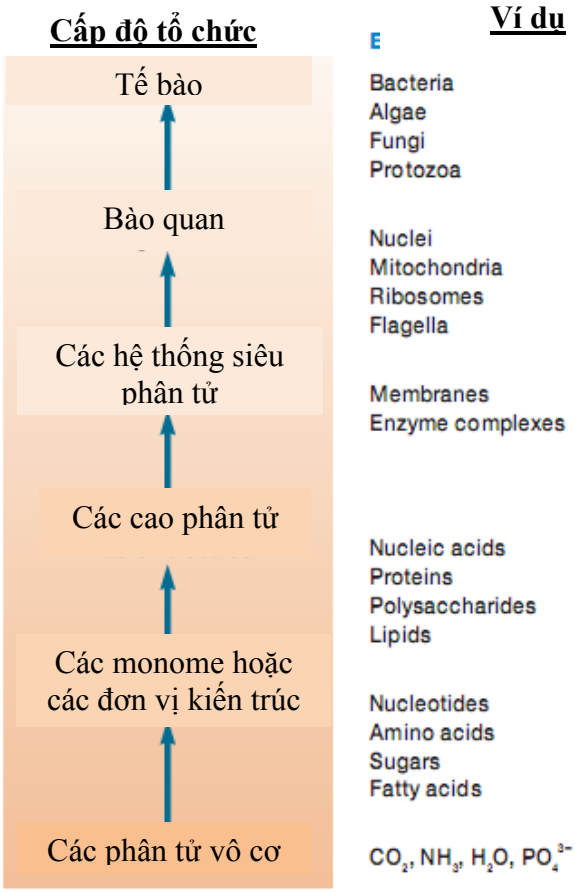
Chương 18
SỬ DỤNG NĂNG LƯỢNG TRONG SINH TỔNG HỢP Ở VI SINH VẬT

Biên soạn : Nguyễn Đình Quyến, Nguyễn Lân Dũng

Như trên dã nói vi sinh vật có thể thu nhận năng lượng qua nhiều con đường. Phần lớn năng lượng này được dùng cho sinh tổng hợp hoặc đồng hoá. Trong quá trình sinh tổng hợp vi sinh vật bắt đầu với các tiền chất đơn giản như các phân tử vô cơ và các monome và kiến trúc nên các phân tử ngày càng phức tạp hơn cho tới khi xuất hiện các bào quan và các tế bào mới (*Hình 18.1*). Mỗi tế bào vi sinh vật phải sản xuất ra nhiều loại phân tử khác nhau; tuy nhiên, trong chương này chỉ có thể giới thiệu việc tổng hợp những thành phần tế bào quan trọng nhất.



Hình 18.1: Kiến trúc của các tế bào

Sinh tổng hợp của các thành phần tế bào nhân nguyên thủy và nhân thật. Sinh tổng hợp được tổ chức ở các cấp độ ngày càng phức tạp hơn. (Theo Prescott và cs, 2005)

Vì đồng hoá là tạo ra một trật tự và mỗi tế bào được sắp xếp ở mức độ cao, cực kỳ phức tạp, do đó sinh tổng hợp đòi hỏi nhiều năng lượng. Điều này dễ nhận thấy khi ta xem xét năng lực sinh tổng hợp của tế bào *E. coli* đang sinh trưởng nhanh (bảng 18.1). Mặc dù hầu hết ATP dành cho sinh tổng hợp được dùng cho tổng hợp protein, nhưng ATP cũng được dùng cho tổng hợp các thành phần khác của tế bào.

Bảng 18.1: Sinh tổng hợp ở E. coli (Theo: Prescott và cs, 2005)

Thành phần tế bào	Số phân tử/tế bào[a]	Các phân tử được tổng hợp/giây	Các phân tử ATP cần/giây cho tổng hợp
DNA	1[b]	0,00083	60.000
RNA	15.000	12,5	75.000
Polysaccarid	39.000	32,5	65.000
Lipid	15.000.000	12.500	87.000
Protein	1.700.000	1.400	2.120.000

a/ Tính cho 1 tế bào có thể tích 2,25 μm^3, trọng lượng $1x10^{-12}$ g, trọng lượng khô $2,5x10^{-13}$ g và chu trình phân bào là 20 phút.

b/ Chú ý: vi khuẩn có thể chứa nhiều bản sao của ADN genom.

Năng lượng tự do cần cho sinh tổng hợp trong các tế bào trưởng thành có kích thước ổn định vì các phân tử của tế bào liên tục bị phân giải và được tổng hợp lại trong một quá trình được gọi là vòng quay (turnover). Các tế bào không bao giờ chi nhau ở từng thời điểm khác nhau. Mặc dù vòng quay của các thành phần tế bào là liên tục nhưng trao đổi chất vẫn được điều hoà cẩn thận sao cho tốc độ sinh tổng hợp nói chung, được cân bằng với tốc tộ phân giải. ả goài năng lượng dùng cho quay vòng các phân tử nhiều tế bào không sinh trưởng cũng sử dụng năng lượng để tổng hợp các enzyme và các chất khác giải phóng vào môi trường.

18.1. CÁC NGUYÊN TẮC ĐIỀU CHỈNH SINH TỔNG HỢP

Trao đổi chất trong sinh tổng hợp tuân theo một số nguyên tắc chung, 6 trong số các nguyên tắc này được tóm tắt dưới đây:

1. Mỗi tế bào vi sinh vật chứa một lượng lớn các protein, acid nucleic và polisaccaride. Tất cả đều là các cao phân tử tức là các polime gồm các đơn vị nhỏ hơn liên kết với nhau. Việc kiến trúc các phân tử lớn, phức tạp từ một vài đơn vị cấu trúc đơn giản hoặc monome tiết kiệm được nhiều dự trữ di truyền, nguyên liệu cho sinh tổng hợp và năng lượng. Ta hãy xem xét tổng hợp protein để hiểu rõ vấn đề này. Các protein, bất kể có kích thước, hình dạng hoặc chức năng như thế nào, đều được tạo thành chỉ bởi 20 amino acid thông thường nối với nhau nhờ liên kết peptide. Các protein khác nhau đơn giản chỉ là do có thứ tự amino acid khác nhau nhưng không phải là các amino acid mới và khác. Giả dụ, nếu các protein được tạo thành không phải bằng 20 mà bằng 40 amino acid khác nhau, tế bào sẽ phải cần các enzyme để sản xuất ra các amino acid nhiều gấp đôi (hoặc phải nhận được các acid bổ sung từ thức ăn). Các enzyme bổ sung đòi hỏi phải có các gen và tế bào lại phải đầu tư thêm nguyên liệu và năng lượng cho việc tổng hợp các gen, các enzyme và các amino acid bổ sung này. Rõ ràng, việc sử dụng một vài monome nối với nhau bởi một liên kết cộng hoá trị duy nhất khiến cho việc tổng hợp các cao phân tử trở thành một quá trình rất có hiệu quả. Hầu như tất cả các cấu trúc tế bào đều được kiến trúc chủ yếu bởi khoảng 30 tiền chất nhỏ.

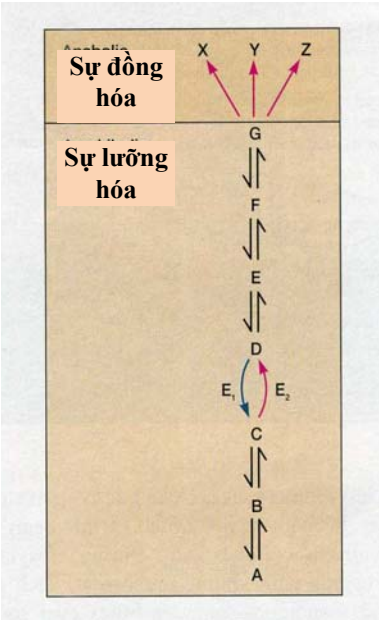
2. Tế bào thường tiết kiệm các nguyên vật liệu và năng lượng bằng cách sử dụng các enzyme dùng cho cả dị hoá và đồng hoá. Chẳng hạn, hầu hết các enzyme đường phân đều tham gia tổng hợp và phân giải glucose se.

3. Mặc dù nhiều enzyme trong các con đường lưỡng hoá hoạt động trong cả phân giải và tổng hợp nhưng một số bước lại được xúc tác bởi hai enzyme khác nhau: một xúc tác phản ứng theo hướng phân giải và một theo hướng tổng hợp (Hình 18.2). Vì vậy, các con đường dị hoá và đồng hoá không bao giờ chi nhau mặc dù có nhiều enzyme chung. Việc sử dụng các enzyme riêng rẽ theo hai hướng ở một bước đơn độc cho phép điều chỉnh dị hoá và đồng hoá một cách độc lập. Cần nhớ rằng việc điều chỉnh đồng hoá hơi khác với điều chỉnh dị hoá. Cả hai con đường đều có thể điều chỉnh được bởi sản phẩm cuối cùng cũng như bởi nồng độ ATP, ADP, AMP và ẩ AD^+. Tuy nhiên, trong các con đường đồng hoá việc điều chỉnh bởi sản phẩm cuối cùng, nói chung, có vai trò quan trọng hơn.

4. Để tổng hợp các phân tử một cách hiệu quả các con đường đồng hoá phải hoạt động không thuận nghịch theo hướng sinh tổng hợp. Tế bào có thể thực hiện điều này bằng cách liên kết một số phản ứng sinh tổng hợp với sự phân giải ATP

và các nucleoside triphosphate khác. Khi hai quá trình này được liên kết năng lượng tự do thoát ra trong sự phân giải nucleoside triphosphate sẽ hướng dẫn phản ứng sinh tổng hợp hoàn thành.

5.Ở các vi sinh vật nhân thật các con đường sinh tổng hợp thường diễn ra bên trong các khoang tế bào khác với các con đường phân giải tương ứng. Chẳng hạn, sinh tổng hợp acid béo gặp trong tế bào chất trong khi sự oxy hoá acid béo được thực hiện bên trong ti thể. Sự phân khoang tạo điều kiện cho các con đường hoạt động đồng thời không phụ thuộc vào nhau.



Hình 18.2: Một con đường sinh tổng hợp giả thuyết.

Các con đường liên kết G với X, Y và Z hoàn toàn là đồng hóa vì chúng chỉ được dùng để tổng hợp các sản phẩm cuối cùng. Con đường từ A đến G là lưỡng hóa, nghĩa là có cả chức năng dị hóa và đồng hóa. Hầu hết các phản ứng được dùng trong cả 2 vai trò; tuy nhiên, sự chuyển hóa qua lại của C và D được xúc tác bởi 2 enzyme riêng biệt, E_1 (dị hóa) và E_2 (đồng hóa). (Nguồn Prescott và cs, 2005)

6.Cuối cùng, các con đường đồng hoá và dị hoá thường sử dụng các cofactor khác nhau. Các phản ứng oxy hoá trong phân giải, nói chung, sản ra ẩ ADH là một cơ chất cho vận chuyển electron. Trái lại, khi một chất cho electron là cần cho sinh tổng hợp thì ẩ ADPH chứ không phải ẩ ADH thường đảm nhiệm chức năng này. Trao đổi chất của acid béo cung cấp ví dụ thứ hai. Các phân tử acyl-CoA của acid béo bị oxy hoá để sản ra năng lượng trong khi tổng hợp acid béo có sự tham gia của các tioeste của protein mang nhánh acyl.

Sau khi các cao phân tử đã được kiến trúc từ các tiền chất đơn giản hơn chúng sẽ được tập hợp thành các cấu trúc lớn hơn, phức tạp hơn như các hệ thống siêu phân tử và các bào quan (*Hình 18.1*). Các cao phân tử thường chứa thông tin cần thiết để tạo thành một cách ngẫu nhiên trong một quá trình gọi là tự tập hợp. Chẳng hạn, riboxom là những tập hợp lớn gồm nhiều protein và các phân tử acid ribonucleic nhưng chúng được tạo thành nhờ sự tập hợp của các thành phần không cần có sự tham gia của các yếu tố bổ sung.

18.2. CỐ ĐỊNH QUANG HỢP CO_2

Mặc dù hầu hết vi sinh vật có thể cố định CO_2 ít nhất là trong các phản ứng bổ sung tuy nhiên chỉ các cơ thể tự dưỡng mới có khả năng sử dụng CO_2 làm nguồn carbon duy nhất hoặc chủ yếu. Sự khử và cố định CO_2 đòi hỏi nhiều năng lượng. Các cơ thể tự dưỡng thường thu năng lượng nhờ sự hấp thu ánh sáng trong quang hợp nhưng một số nhận được năng lượng từ phản ứng oxy hoá các chất cho electron vô cơ khử. Sự cố định CO_2 tự dưỡng có ý nghĩa quyết định đối với sự sống trên trái đất vì nó cung cấp chất hữu cơ cho các cơ thể dị dưỡng.

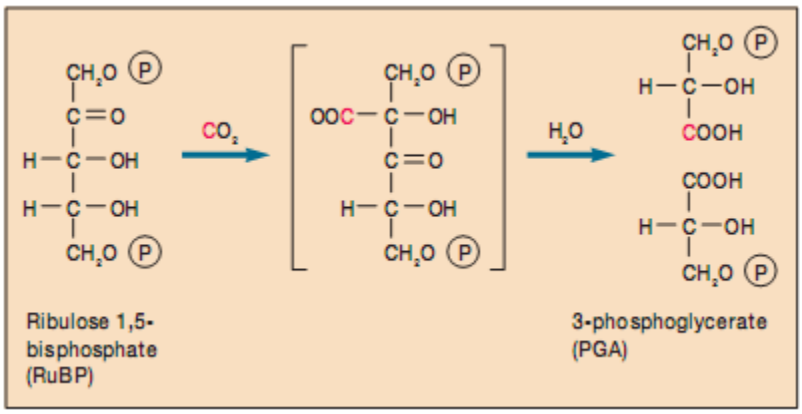
Vi sinh vật có thể cố định CO_2 hoặc chuyển phân tử vô cơ này thành carbon hữu cơ và đồng hoá nó theo ba con đường chủ yếu. Hầu như tất cả các vi sinh vật tự dưỡng đều cố định CO_2 qua con đường trao đổi chất đặc biệt được gọi là chu trình Calvin (cũng gọi là chu trình Calvin-Benson hoặc chu trình pentose-phosphate khử). Mặc dù hoạt động trong các cơ thể quang hợp có nhân thật và hầu hết cơ thể quang hợp có nhân nguyên thuỷ nhưng chu trình Calvin lại vắng mặt ở *Archaea* (Cổ khuẩn), một số vi khuẩn kỵ khí bắt buộc và một số vi khuẩn hiếu khí. ả hững vi khuẩn này thường sử dụng một trong hai con đường khác. Một số archaea (*Thermoproteus*, *Sulfolobus*) và các vi khuẩn *Chlorobium* và *Desulfobacter* sử dụng con đường acid tricarboxylic khử. Ở các vi khuẩn sinh metan, vi khuẩn khử sulfate và các vi khuẩn sinh acetate (các vi khuẩn tạo thành acetate từ CO_2 trong quá trình lên men) lại tồn tại con đường Acetyl-CoA.

Chu trình Calvin gặp trong chất nền (stroma) của lục lạp của các vi sinh vật nhân thật tự dưỡng. Vi khuẩn lam, một số vi khuẩn nitrate hoá và các thiobacilli chứa các thể vùi, đa diện gọi là cacboxysom. Cacboxysom chứa enzyme ribulo-1,5-bisphosphate carboxylase, có thể là vị trí cố định CO_2 hoặc vị trí dự trữ carboxylase và các protein khác. Có thể chia chu trình Calvin thành 3 pha:

carboxyl hoá, khử và tái sản. Sơ đồ chung của chu trình được giới thiệu ở *hình 18.4*.

18.2.1. Pha carboxyl hoá (carboxylation phase)

Sự cố định CO_2 được xúc tác bởi enzyme ribulo-1,5-bisphosphate-carboxylase hoặc oxygenase (rubisco) (*Hình 18.3*) xúc tác việc gắn CO_2 vào ribulo-1,5-bisphosphate (RuBP) tạo thành 2 phân tử 3-phosphorus-glycerat (PGA).



Hình 18.3: Phản ứng ribulo-1,5-bisphosphate carboxylase

Enzyme xúc tác bổ sung CO_2 vào ribulo-1,5-bisphosphate tạo thành 1 chất trung gian không bền, sau đó chất này bị phân giải thành 2 phân tử 3-phosphorusglycerat. (Theo: Prescott và cs, 2005)

18.2.2. Pha khử (reduction phase)

Tiếp theo, PGA bị khử thành glyceraldehyde-3-phosphate. Sự khử được xúc tác bởi 2 enzyme, thực chất là sự đảo nghịch một phần của con đường đường phân mặc dù glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase khác với enzyme đường phân trong việc sử dụng ẩ ADP^+ thay cho ẩ AD^+ (*hình 18.4*).

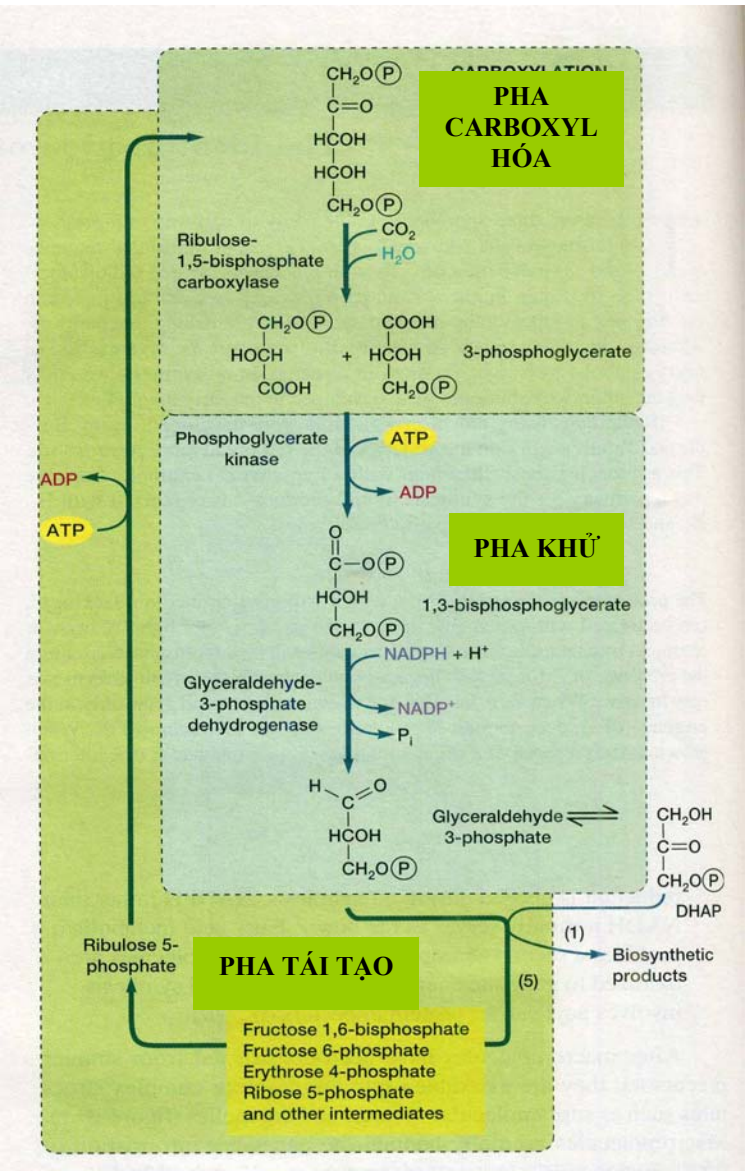
18.2.3. Pha tái sinh (regeneration phase)

Trong pha này RuBP được tái sản và sản ra các hidrat-carbon như glyceraldehyde-3-phosphate, fructose za và glucose (Hình 18.4). Phần này của chu trình chi với con đường pentose-phosphate và bao gồm các phản ứng của trans-ketolase và transaldolase. Chu trình được hoàn thành khi phosphorusribulokinase tái tạo RuBP.Để tổng hợp fructose -6-phosphate hoặc glucose -6-phosphate từ CO_2 chu trình phải hoạt động 6 lần để sản ra hexose cần thiết và tái tạo 6 phân tử RuBP.

$$6RuBP + 6CO2 \rightarrow 12PGA \rightarrow 6RuBP + Fructose\text{ -}6\text{-}P$$

Việc cố định một CO_2 thành chất hữu cơ cần 3ATP và 2ẩ ADPH. Glucose được tạo thành từ CO_2 theo phương trình sau:

$$6CO_2 + 18ATP + 12\text{ẩ } ADPH + 12H^+ + 12H_2O \rightarrow glucose + 18ADP + 18Pi + 12\text{ẩ } ADP^+$$



Hình 18.4: Chu trình Calvin

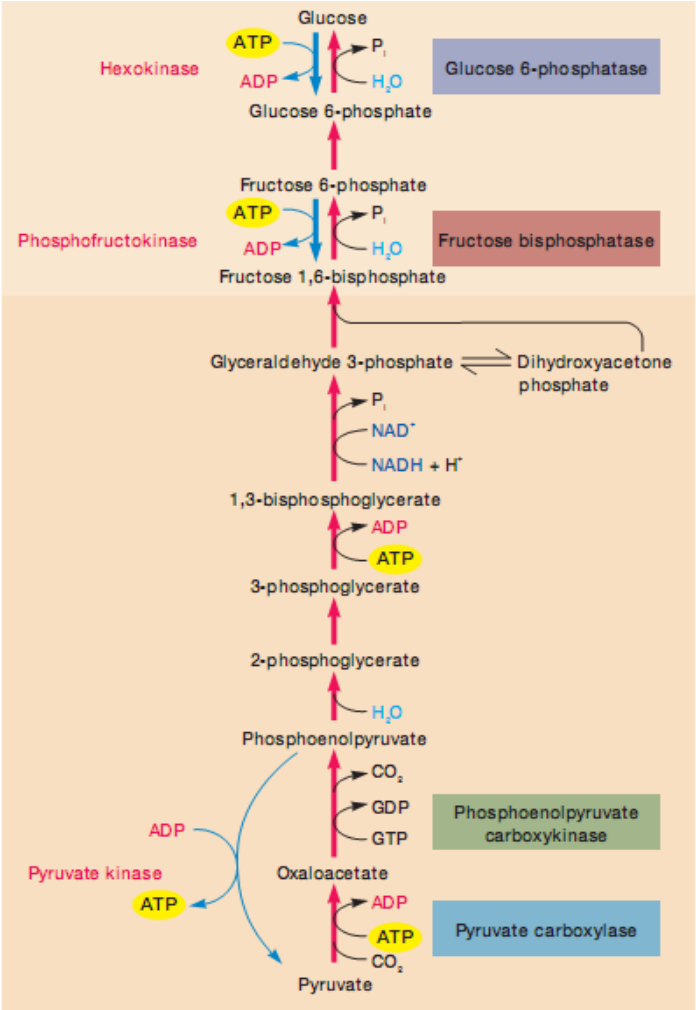
Trên đây là sơ đồ vắn tắt của chu trình chỉ với các pha carboxyl hóa và khử được trình bày chi tiết. 3 ribulo-1,5-bisphosphate được carboxyl hóa tạo thành sáu 3-phosphorusglycerat trong pha carboxyl hóa. Các chất này được chuyển hóa thành 6 glycerat-3-phosphate rồi có thể thành dihydroxyacetone phosphate (DHAP) 5 trong số 6 triose (glyceraldehyde phosphate và

dihydroxyacetone phosphate) được dùng để tạo lại 3 ribulo-1,5-bisphosphate trong pha tái sản. Triose còn lại được dùng trong sinh tổng hợp. Những con số trong ngoặc đơn ở bên phải phía dưới chỉ ra dòng carbon này. (Theo: Prescott và cs, 2005)

ATP và ẩ ADPH được cung cấp bởi các phản ứng sáng quang hợp hay bởi sự oxy hoá các phân tử vô cơ ở các vi khuẩn hoá tự dưỡng. Sau đó các đường tạo thành trong chu trình Calvin có thể được dùng để tổng hợp các phân tử cần thiết khác.

18.3. TỔNG HỢP CÁC ĐƯỜNG VÀ POLISACCHARIDE

ẩ hiều vi sinh vật không có khả năng quang hợp và là các cơ thể dị dưỡng phải tổng hợp đường từ các phân tử hữu cơ khử thay cho từ CO_2.



Hình 18.5: Sự tái tạo đường

Con đường tái tạo đường gặp ở nhiều vi sinh vật. Tên của 4 enzyme gặp trong đường phân được đóng khung. Các bước đường phân cũng được biểu thị để so sánh.(Theo: Prescott và cs, 2005)

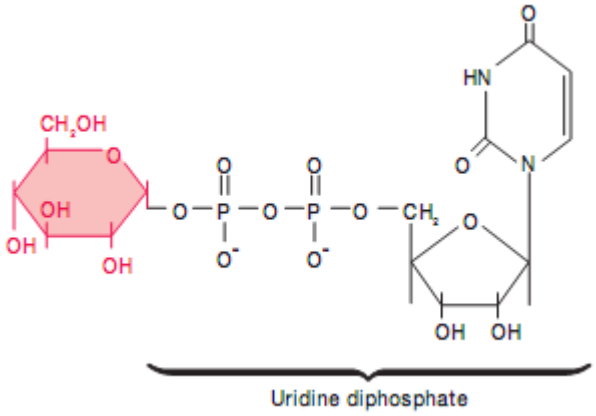
Việc tổng hợp glucose từ các tiền chất không phải hidrat carbon được gọi là sự tái tạo đường (glucose neogenesis). Mặc dù con đường tái tạo đường không chi con đường đường phân nhưng chúng có 7 enzyme chung (*Hình 18.5*).

Ba bước đường phân sau đây là không thuận nghịch trong tế bào: 1) Chuyển hoá phosphorusenolPyruvate thành pyruvate; 2) tạo thành fructose -1,6-bisphosphate từ fructose -6-phosphate và 3) phosphoryl hoá glucose. Các bước này phải đi vòng khi con đường hoạt động theo hướng sinh tổng hợp. Chẳng hạn, sự tạo thành fructose -1,6-bisphosphate bởi phosphorusfructose kinase được đảo nghịch bởi enzyme fructose -bisphosphatease, enzyme này loại bỏ nhờ thuỷ phân một phosphate từ fructose -bisphosphate. Thông thường ít nhất hai enzyme tham gia vào việc chuyển hoá pyruvate thành phosphorusenol pyruvate (đảo nghịch bước pyruvate kinase).

Từ *hình 18.5* có thể thấy con đường tổng hợp fructose za tương tự như con đường tổng hợp glucose se. Một khi glucose và fructose za đã được tạo thành các đường phổ biến khác cũng được sản sinh. Chẳng hạn, mannose được hình thành trực tiếp từ fructose za qua một sự sắp xếp lại đơn giản:

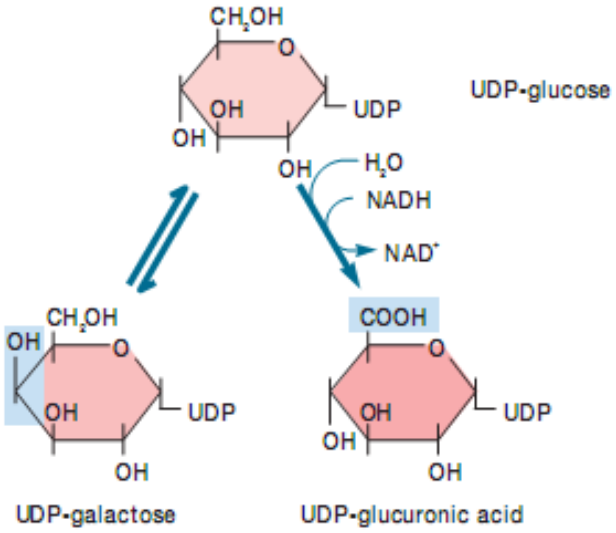
Fructose -6-phosphate $\rightleftharpoons$ Mannose-6-phosphate

Một số đường được tổng hợp trong khi liên kết với một nucleoside diphosphate. Đường nucleoside diphosphate quan trọng nhất là uridine diphosphate glucose (UDPG). Glucose được hoạt hoá nhờ gắn với pyrophosphate của uridine diphosphate qua phản ứng với uridine triphosphate (Hình 18.6).



Hình 18.6: Uridine diphosphate glucose (*Theo: Prescott và cs, 2005*)

Phần UDP của HDPG được các enzyme nhận ra và mang glucose đi khắp tế bào dùng tham gia vào các phản ứng hệt như ADP mang phosphate ở dạng ATP. UDP-galactose được tổng hợp từ UDPG qua việc sắp xếp lại của một nhóm hydroxyl. Một enzyme khác xúc tác việc tổng hợp UDP - acid glucuronic qua việc oxy hoá UDPG (*hình 18.7*).



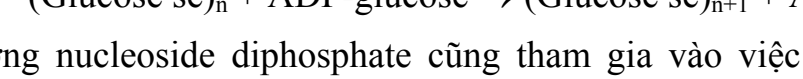
Hình 18.7: Uridine diphosphate galactose và tổng hợp glucuronate

Trên hình là việc tổng hợp UDP-galactose và UDP-acid glucuronic từ UDP-glucose se. (Theo: Prescott và cs, 2005)

Các đường nucleoside diphosphate cũng đóng vai trò chủ chốt trong việc tổng hợp các polisaccaride như tinh bột và glycogen. Cũng lại ở đây, sinh tổng hợp

không đơn giản chỉ là sự đảo ngược trực tiếp của phân giải. Sự phân giải glycogen và tinh bột diễn ra qua sự thuỷ phân để tạo thành các đường tự do hay qua việc gắn thêm nhánh phosphate vào các polime này để sản ra glucose -1-phosphate. Các đường nucleoside diphosphate không tham gia vào quá trình trên. Trái lại trong việc tổng hợp glycogen và tinh bột ở vi khuẩn và tảo adenosine diphosphate glucose được tạo thành từ glucose -1-phosphate và sau đó chuyển glucose vào cuối chuỗi glycogen và chuỗi tinh bột:

$$\text{ATP} + \text{Glucose -1-phosphate} \rightarrow \text{ADP-glucose} + \text{PPi}$$



$$(\text{Glucose se})_n + \text{ADP-glucose} \rightarrow (\text{Glucose se})_{n+1} + \text{ADP}$$

Các đường nucleoside diphosphate cũng tham gia vào việc tổng hợp các phân tử phức tạp như thành tế bào vi khuẩn.

18.4. SỰ ĐỒNG HÓA PHOSPHORUS, LƯU HUỲNH (SULFUR) VÀ NITƠ (NITROGEN) VÔ CƠ

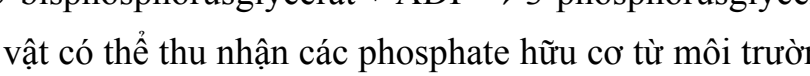
ẩ goài carbon và oxy vi sinh vật cũng cần một lượng phosphorus, sulfur và nitrogen cho sinh tổng hợp. Mỗi nguyên tố nói trên được đồng hoá hoặc được cố định thành các phân tử hữu cơ qua các con đường khác nhau.

18.4.1. Sự đồng hoá phosphorus

Phosphorus gặp trong các acid nucleic, protein, phospholipid, ATP và các coenzyme như ẩ ADP. ẩ guồn phosphorus phổ biến nhất là các este của phosphate vô cơ và phosphate hữu cơ. Phosphate vô cơ được cố định qua việc tạo thành ATP thông qua một trong ba con đường: 1) quang phosphoryl hoá; 2) phosphoryl hoá oxy hoá và 3) phosphoryl hoá ở mức độ cơ chất.

Đường phân cung cấp một ví dụ của con đường thứ ba. Phosphate được gắn với glyceraldehyde-3-phosphate tạo thành 1,3-bisphosphorusglycerat, sau đó chất này được dùng để tổng hợp ATP.

$$\text{Glyceraldehyde-3-phosphate} + \text{Pi} + \text{ẩ AD}^+ \rightarrow \text{1,3-bisphosphorusglycerat} + \text{ẩ ADH} + \text{H}^+$$



$$\text{1,3-bisphosphorusglycerat} + \text{ADP} \rightarrow \text{3-phosphorusglycerat} + \text{ATP}$$

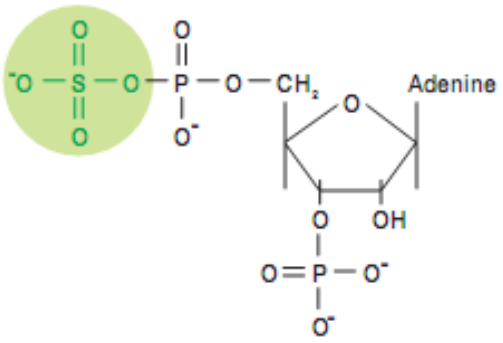
Vi sinh vật có thể thu nhận các phosphate hữu cơ từ môi trường bao quanh ở dạng hoà tan hay dạng hạt. Các este của phosphate hữu cơ thường bị thuỷ phân bởi các phosphatease và tách ra phosphate vô cơ. Vi khuẩn gram âm chứa các

phosphatease trong khoang chu chất nằm giữa thành tế bào và màng sinh chất;vì vậy sau khi được giải phóng phosphate được hấp thu trực tiếp qua màng. Động vật nguyên sinh, trái lại, có thể sử dụng trực tiếp các phosphate hữu cơ sau khi ăn hoặc thuỷ phân chúng trong lyzosom và tiêu thụ phosphate.

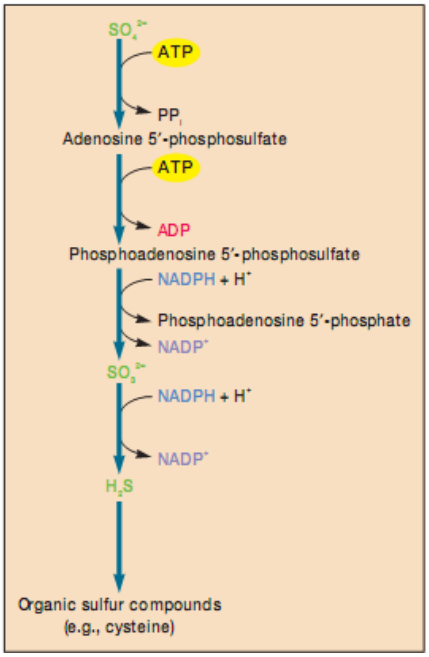
18.4.2. Sự đồng hoá sulfur

Sulfur cần cho việc tổng hợp amino acid (cystein và methionine) và một số coenzyme (coenzyme A, tiamine-pyrophosphate và biotin) và có thể thu được từ hai nguồn. ẩ hiều vi sinh vật sử dụng cystein và methionine dẫn xuất từ các nguồn bên ngoài hoặc từ dự trữ amino acid nội bào. ẩ goài ra, sulfate có thể cung cấp sulfur cho sinh tổng hợp. ẩ guyên tử sulfur trong sulfate oxy hoá hơn nguyên tử sulfur trong cystein và các phân tử hữu cơ khác, do đó sulfate phải bị khử trước khi có thể được đồng hoá. Quá trình này được gọi là sự khử sulfate đồng hoá để phân biệt với sự khử sulfate dị hoá diễn ra khi sulfate tác dụng như chất nhận electron trong hô hấp kỵ khí.

Sự khử sulfate đồng hoá đòi hỏi phải hoạt hoá sulfate qua việc tạo thành phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (*Hình 18.8*) tiếp theo là sự khử sulfate. Đây là một quá trình phức tạp (*Hình 18.9*) trong đó sulfate trước hết bị khử thành sulfit (SO_3^{2-}) sau đó thành H_2S. Cystein có thể được tổng hợp từ sulfua hydro qua hai con đường.



Hình 18.8: Phosphorusadenosin 5'-phosphorussulfate (PAPS). Theo: Prescott và cs, 2005)



Hình 18.9: Con đường khử sulfate (Theo: Prescott và cs, 2005)

ả ấm có thể kết hợp H_2S với serine tạo thành cystein nhưng nhiều vi khuẩn lại gắn H_2S với O-Acetylserine (quá trình 1 và 2, lần lượt)

(1) H_2S + Serine →Cystein + H_2O

(2) Serine $\xrightarrow{\text{Acetyl-CoA}}$ O-Acetylserine $\xrightarrow{H_2S}$ Cystein + Acetat

Một khi được tạo thành cystein có thể được dùng để tổng hợp các hợp chất hữu cơ khác có chứa sulfur.

18.4.3. Sự đồng hoá nitrogen

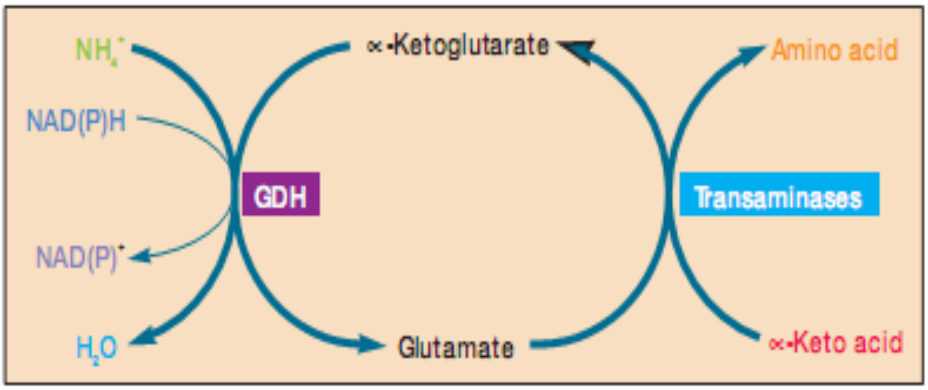
Do là thành phần chủ yếu của các protein, acid nucleic, coenzyme và nhiều thành phần khác nên năng lực đồng hoá nitrogen của tế bào là cực kỳ quan trọng. Mặc dù khí quyển giàu khí nitrogen nhưng chỉ một số ít vi khuẩn có thể khử khí này và sử dụng làm nguồn nitrogen. Còn hầu hết vi sinh vật có khả năng đồng hoá ammonia hoặc nitrate.

Sự đồng hoá ammonia

ả itrogen của ammonia có thể được chuyển hoá thành chất hữu cơ tương đối dễ dàng và trực tiếp vì nitrogen ở đây gặp trong trạng thái khử hơn các dạng khác

của nitrogen vô cơ. Một số vi sinh vật tổng hợp amino acid alanine trong một phản ứng amine hoá khử xúc tác bởi alanine-dehydrogenase:

$$\text{Pyruvate} + \text{ả } H_4^+ + \text{ả ADH (ả ADPH)} + H^+ \text{ alanine} \rightleftharpoons \quad + \text{ả } AD^+(\text{ả } ADP^+) + H_2O$$



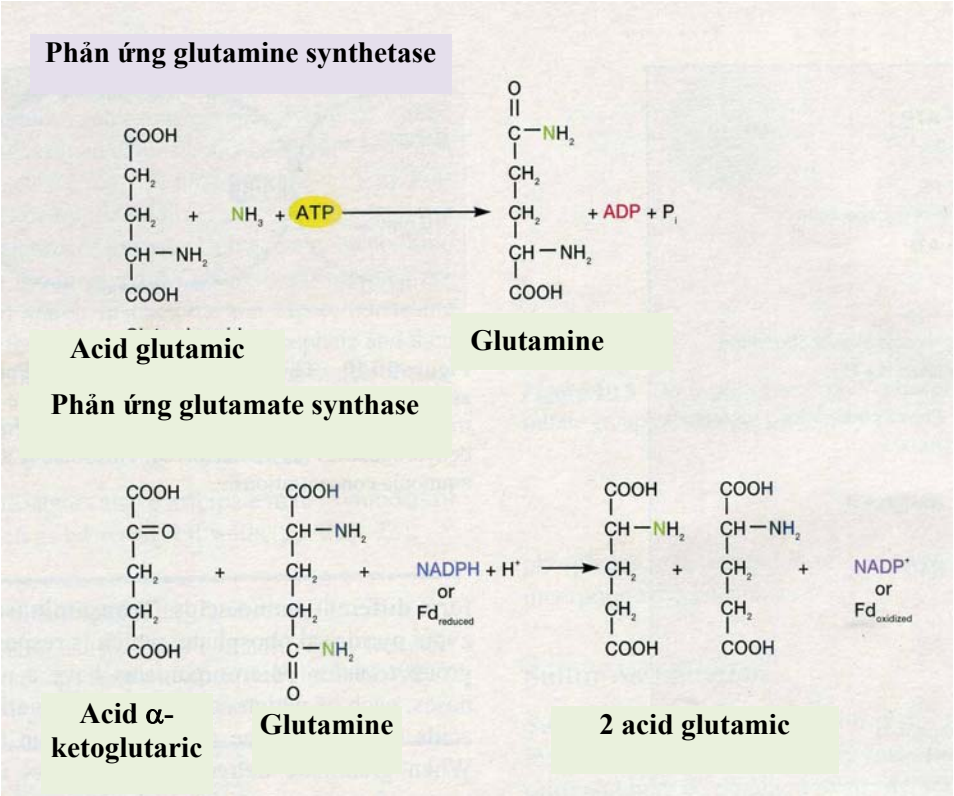
Hình 18.10: Con đường đồng hóa ammonia. Sự đồng hóa ammonia nhờ glutamate.dehydrogenase (GDH) và transaminease. Các GDH phụ thuộc NADP hoặc NAD có thể tham gia vào đây. Con đường này hoạt động mạnh nhất ở những nồng độ ammonia cao (Theo Prescott và cs, 2005)

Con đường chủ yếu đồng hoá ammonia là tạo thành glutamate từ α-ketoglutarate (một chất trung gian của chu trình TCA). ả hiều vi khuẩn và nấm sử dụng glutamate-dehydrogenase khi nồng độ ammonia cao:

$$\alpha\text{-ketoglutarate} + \text{ả } H_4^+ + \text{ả ADPH (ả ADH)} + H^+ \rightleftharpoons \text{Glutamate} + \text{ả } ADP^+(\text{ả } AD^+) + H_2O$$

Việc sử dụng ả ADPH và ả ADH (tác nhân khử) trong tổng hợp glutamate thay đổi tuỳ theo loài.

Một khi alanine hoặc glutamate đã được tổng hợp nhóm α-amine mới được tạo thành có thể được chuyển sang các bộ khung carbon khác thông qua các phản ứng chuyển amine, từ đó sẽ xuất hiện các amino acid khác. Các transaminease chứa coenzyme pyridoxal phosphate có chức năng chuyển nhóm amine. Vi sinh vật có một số transaminease, mỗi enzyme này xúc tác việc tạo thành một số amino acid bằng cách sử dụng cùng một amino acid làm chất cho nhóm amine. Khi glutamate-dehydrogenase hoạt động phối hợp với các transaminease ammonia có thể được chuyển thành nhiều amino acid (*hình 18.10*).

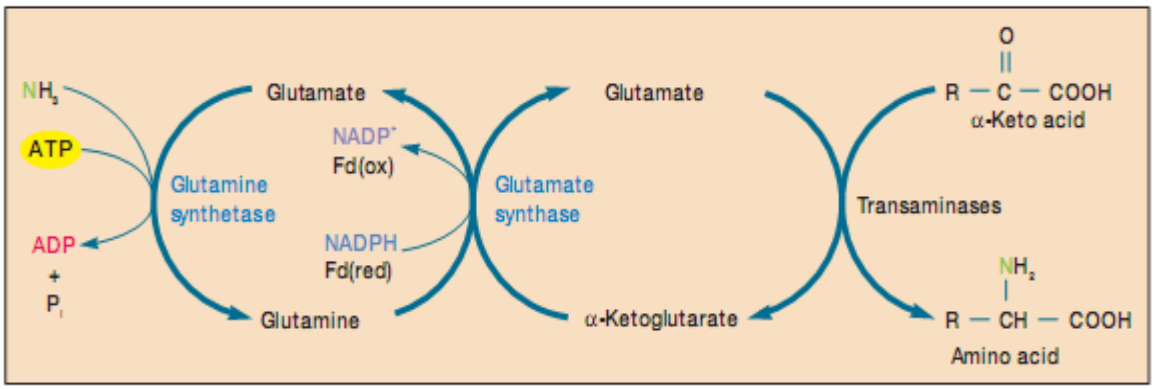


Hình 18.11: Glutamine synthetase và glutamate synthase

Các phản ứng do 2 enzyme này xúc tác tham gia vào việc đồng hóa ammonia. Một số glutamate synthetase sử dụng NADPH là nguồn electron, số khác lại sử dụng ferredoxin khử (Fd). (Nguồn Prescott và cs, 2005)

Con đường thứ hai dùng đồng hoá ammonia bao gồm 2 enzyme tác dụng theo thứ tự, đó là glutamine synthetase và glutamate-synthase (*hình 18.11*). Ammonia được dùng để tổng hợp glutamine từ glutamate, sau đó nitrogen amit của glutamine được chuyển đến α-ketoglutarate để tạo thành một phân tử glutamate mới. Vì glutamate tác dụng như một chất cho amine trong các phản ứng của transaminease nên ammonia có thể được dùng để tổng hợp tất cả các amino acid thông thường khi có mặt các transaminease thích hợp (*hình 18.12*).

Cả ATP và một nguồn các electron như ẩ ADPH hay ferredoxin khử đều cần. Con đường này gặp ở *E. coli*, *B. megaterium* và nhiều vi khuẩn khác. Hai enzyme tác dụng theo thứ tự hoạt động rất hiệu quả ở các nồng độ ammonia thấp khác với con đường glutamate dehydrogenase. ẩ hư đã nói ở trên glutamine synthetase được điều hoà chặt chẽ nhờ sự cải biến cộng hoá trị thuận nghịch và các effector dị lập thể.



Hình 18.12: Cố định ammonia nhờ glutamine synthetase và glutamate synthase

Con đường này hoạt động có hiệu quả ở những nồng độ ammonia thấp. (Theo: Prescott và cs, 2005)

Sự khử nitrate đồng hoá

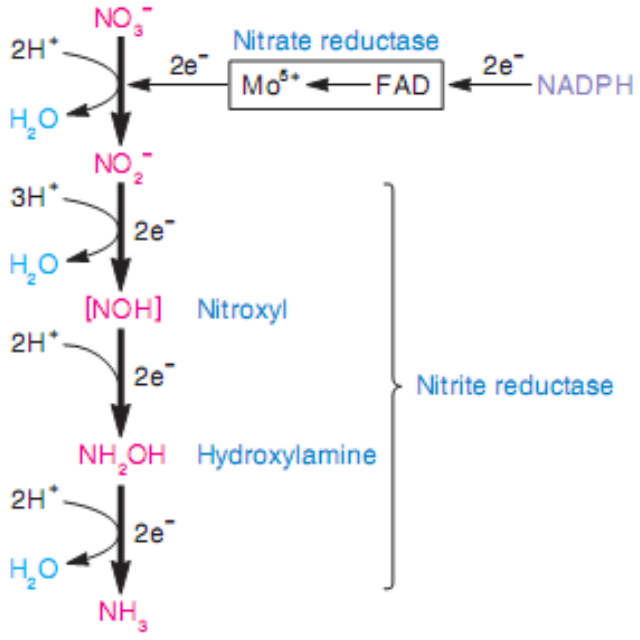
ẩ itrogen trong nitrate (ẩ O_3^-) ở trạng thái oxy hoá hơn nhiều so với nitrogen trong ammonia. ẩ itrate trước hết phải bị khử thành ammonia trước khi nitrogen có thể được chuyển hoá thành một dạng hữu cơ. Sự khử này của nitrate được gọi là khử nitrate đồng hoá. Quá trình này khác với quá trình diễn ra trong hô hấp kỵ khí và khử nitrate dị hoá. Trong sự khử nitrate đồng hoá nitrate được chuyển thành chất hữu cơ và không tham gia vào việc sản sinh năng lượng. Khử nitrate đồng hoá gặp phổ biến ở vi khuẩn, nấm và tảo.

Quá trình nói trên diễn ra trong tế bào chất ở vi khuẩn.

Bước thứ nhất trong đồng hoá nitrate là khử nitrate thành nitrite xúc tác bởi nitrate reductase là enzyme chứa FAD và molipden (Hình 18.13), ẩ ADPH là nguồn electron:

$$\text{ẩ } O_3^- + \text{ẩ ADPH} + H^+ \rightarrow \text{ẩ } O_2^- + \text{ẩ } ADP^+ + H_2O$$

Sau đó, nitrite bị khử thành ammonia thông qua một số lần bổ sung 2 electron được xúc tác bởi nitrite reductase và có thể cả các enzyme khác. Hydroxylamine có thể là một chất trung gian. Tiếp theo ammonia được chuyển hoá thành các amino acid nhờ các con đường đã mô tả.



Hình 18.13: Khử nitrate đồng hóa

Con đường này gặp ở các vi khuẩn có thể khử và đồng hóa nitrogen của nitrate. Theo: Prescott và cs, 2005)

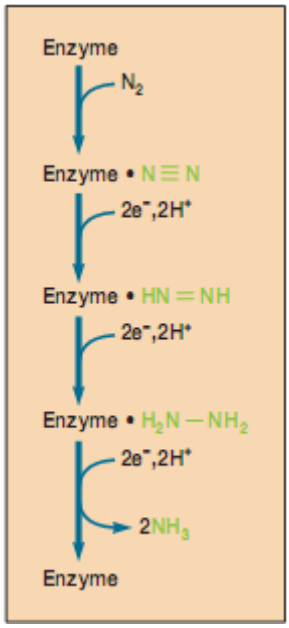
18.4.4. Sự cố định Nitrogen (Nitrogen fixation)

Sự khử khí nitrogen của khí quyển được gọi là sự cố định nitrogen. Vì nồng độ của ammonia và nitrate thường thấp, hơn nữa chỉ một số vi khuẩn có khả năng trên (các tế bào nhân thật hoàn toàn không thể thực hiện được cố định ẩ $_2$) nên tốc độ của quá trình này trong nhiều hoàn cảnh, hạn chế sinh trưởng của thực vật. Cố định nitrogen gặp ở: 1) các vi khuẩn sống tự do (ví dụ: *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Clostridium* và *Methanococcus*); 2) các vi khuẩn cộng sinh với thực vật như các cây họ Đậu (*Rhizobium*), cây phi lao (xạ khuẩn *Frankia*) và bèo dâu (vi khuẩn lam *Anabaena azollae*) và 3) các vi khuẩn lam (*Nostoc* và *Anabaena*).

Sự khử nitrogen thành ammonia được xúc tác bởi enzyme nitrogenase. Mặc dù các chất trung gian gắn vào enzyme ta còn chưa rõ nhưng có lẽ nitrogen bị khử qua một số lần bổ sung 2 electron như Hình 18.14 mô tả. Sự khử nitrogen phân tử thành ammonia phát nhiệt mạnh nhưng phản ứng có năng lượng hoạt hoá cao do nitrogen phân tử là một khí trơ với một liên kết ba giữa hai nguyên tử nitrogen.

Vì vậy, sự khử nitrogen là tốn kém và tiêu thụ nhiều ATP. Ít nhất 8 electron và 16ATP, cứ 4ATP là cần cho một cặp electron.

$$ẩ_2 + 8H^+ + 8e + 16ATP \rightarrow 2ẩ H_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$



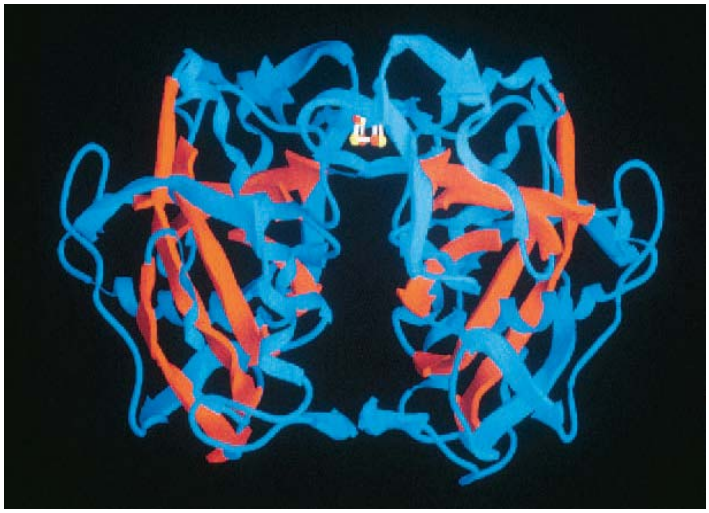
Hình 18.14: Khử nitrogen. Giả thuyết khử nitrogen nhờ nitrogenase. (Theo: Prescott và cs, 2005)

Các electron bắt nguồn từ ferredoxin đã bị khử bởi một số con đường, chẳng hạn qua quang hợp ở vi khuẩn lam, qua các quá trình hô hấp ở các vi khuẩn cố định nitrogen hiếu khí hoặc qua lên men ở các vi khuẩn kỵ khí. Ví dụ, *Clostridium pasteurianum* (một vi khuẩn kỵ khí) khử ferredoxin trong quá trình oxy hoá Pyruvate, trong khi *Azotobacter* (một vi khuẩn hiếu khí) lại sử dụng electron từ ẩ ADPH để khử ferredoxin.

ẩ itrogenase là một phức hệ gồm 2 protein chủ yếu: một protein MoFe (hay nitrogenase, MW 220.000) liên kết với 1-2 protein Fe (hay nitrogenase reductase, MW 64.000). Protein MoFe chứa 2 nguyên tử molipden và 28-32 nguyên tử sắt; protein Fe chứa 4 nguyên tử sắt hình 18.15). Fe và Mo của protein MoFe được chứa bên trong một cofactor gọi là FeMo-co và sự khử ẩ $_2$ diễn ra ở cofactor này.

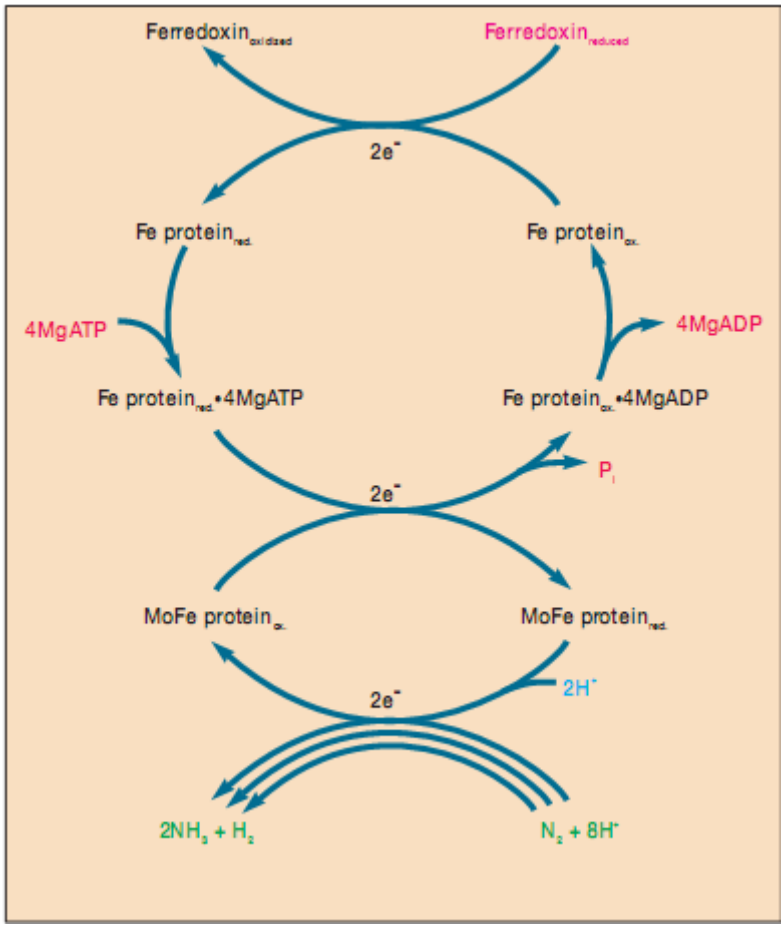
Trước hết protein Fe bị khử bởi ferredoxin sau đó nó liên kết ATP (*hình18.16*). Sự liên kết ATP làm thay đổi hình thể của protein Fe và hạ thấp thế

khử của protein này (từ 100mV đến ~ 400 mV) tạo điều kiện cho protein Fe khử protein MoFe. ATP bị thuỷ phân khi diễn ra sự chuyền electron này. Cuối cùng, protein MoFe khử chuyền các electron tới nitrogen nguyên tử.



Hình 18.15: Cấu trúc của protein Fe ở nitrogenase (Theo: Prescott và cs, 2005)

Một số vi khuẩn chứa enzyme hidrogenase oxi hóa H_2 thành H_2O và liên kết phản ứng này với việc tạo thành ATP hay với việc khử ferredoxin (Fd) hoặc flavodoxin (Fld) rồi các chất này lại có thể chuyển electron cho protein Fe. ẩ itrogenase rất mẫn cảm với O_2 và phải được bảo vệ sao cho khỏi bị bất hoạt bởi O_2 bên trong tế bào. Ở nhiều vi khuẩn lam sự bảo vệ này được thực hiện nhờ một cấu trúc đặc biệt gọi là dị bào nang (heterocyst), có vách dày, chỉ chứa hệ quang I (dùng tổng hợp ATP nhưng không tạo thành O_2). ẩ itrogenase cố định ẩ $_2$ bên trong dị bào nang và nhận được saccarose từ các tế bào lân cận sau đó truyền nitrogen cố định được cho các tế bào trên. Ở các vi khuẩn hiếu khí, cố định ẩ $_2$ như *Azotobacter* nitrogenase được bảo vệ nhờ: (1) Lớp vỏ nhày bao quanh tế bào cản trở sự khuếch tán của O_2 vào tế bào; (2) Vận tốc hô hấp cao nhờ đó O_2 bị loại bỏ nhanh; (3) ẩ itrogenase được kết hợp với một protein đặc biệt nhờ đó không bị bất hoạt bởi O_2. ẩ ốt rễ của các cây đậu thuộc họ Leguminosae tạo thành một protein màu đỏ gọi là leghemoglobin có khả năng liên kết O_2 tự do đủ cho quá trình hô hấp tạo thành ATP nhưng không kìm hãm hoạt tính của nitrogenase của vi khuẩn *Rhizobium*.

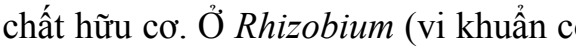


Hình 18.16: Cơ chế tác dụng của nitrogenase. Quá trình di chuyển của 2 electron từ ferredoxin tới nitrogen được lặp lại 3 lần để khử N_2 thành 2 phân tử ammonia. Cân bằng ở phía dưới bao gồm cả việc khử proton thành H_2. (Theo: Prescott và cs, 2005)

Đáng chú ý, ở đây có sự cộng sinh di truyền giữa hai cơ thể: cây tổng hợp phần protein còn vi khuẩn tổng hợp nhóm hem. Tổng hợp nitrogenase không những bị kìm hãm bởi O_2 nhưng cũng bởi các hợp chất nitrogen vô cơ và hữu cơ. Khi thiếu nguồn năng lượng ADP được tích lũy lại và ức chế hoạt tính của enzyme. Điều này làm tăng cái giá của sự khử ẩ $_2$. Theo tính toán để cố định được 1 mg ẩ *Clostridium pasteurianum* phải tiêu thụ 1g C hữu cơ trong glucose khi đó vi khuẩn hiếu khí *Azotobacter chroococcum* thậm chí cần tới 30g.

Trong điều kiện đất thiếu Mo một số vi khuẩn có thể tổng hợp 2 loại nitrogenase khác: chứa Va (vanadi) Fe hay chỉ chứa Fe. Các cofactor tương tự FeMo-co gặp trong cả 2 nitrogenase nói trên nghĩa là FeVa-co (trong nitrogenase vanadi) và 1 nhóm Fe-S (tương tự FeMo-co và FeVa-co) nhưng thiếu cả Mo và Va (trong nitrogenase sắt)

Sự khử nitrogen thành ẩ H_3 diễn ra qua ba bước, mỗi bước cần 2 electron (*hình 18.14 và 18.16*). ẩ hư vậy 6 electron sẽ được chuyển và cần tổng cộng 12ATP đối với một phân tử nitrogen bị khử. Tuy nhiên trên thực tế quá trình thường tiêu thụ ít nhất 8 electron và 16ATP vì nitrogenase cũng khử các proton thành H_2. Hydro phản ứng với diamine (Hẩ = ẩ H) tạo thành nitrogen và hydro. Chu trình vô ích này sản ra một phần ẩ $_2$ ngay trong điều kiện thuận lợi khiến cho việc cố định nitrogen trở nên tốn kém hơn. Các vi khuẩn cố định nitrogen cộng sinh có thể tiêu thụ tới 20% ATP do cây chủ sản ra ẩ itrogenase có thể khử một số phân tử chứa liên kết ba (như Acetylen, xianit và azit)



$$HC \equiv CH + 2H^+ + 2e \rightarrow H_2C = CH_2$$

Tốc độ khử Acetylen thành etilen được dùng để đánh giá hoạt tính nitrogenase.

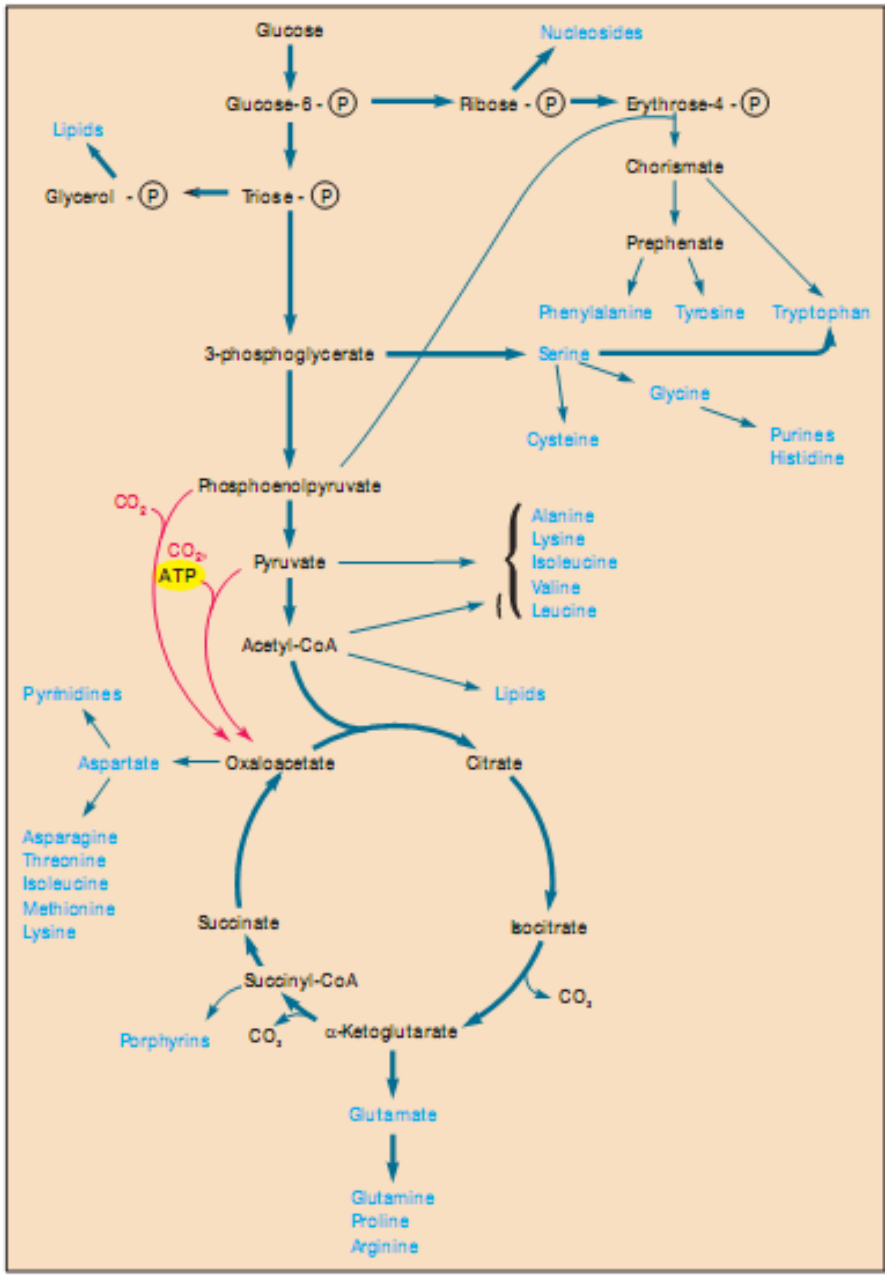
Một khi nitrogen phân tử đã bị khử thành ammonia, ammonia có thể được chuyển thành các chất hữu cơ. Ở *Rhizobium* (vi khuẩn cố định nitrogen cộng sinh), có lẽ ammonia khuếch tán khỏi tế bào vi khuẩn và được đồng hoá bởi các tế bào của cây đậu bao quanh. Việc đồng hoá ammonia có lẽ chủ yếu là tổng hợp glutamine bởi hệ thống glutamine synthetase - glutamate synthase (Hình 18.11). Tuy nhiên, allantoin và acid allantoic (các dẫn xuất của Purine) cũng được tổng hợp và được dùng cho việc vận chuyển nitrogen tới các phân tử khác của cây.

18.5. TỔNG HỢP CÁC AMINO ACID

Vi sinh vật thay đổi về các nguồn nitrogen được sử dụng nhưng hầu hết có thể đồng hoá một vài loại nitrogen vô cơ nhờ các con đường đã mô tả. Việc tổng hợp amino acid cũng đòi hỏi sự kiến trúc nên các bộ khung carbon thích hợp và thông thường đây là một quá trình phức tạp bao gồm nhiều bước. Do nhu cầu bảo tồn nitrogen, carbon và năng lượng nên các con đường tổng hợp acid amine, nói chung, được điều hoà chặt chẽ bởi các cơ chế dị lập thể và cơ chế kìm hãm bởi sản phẩm cuối cùng.

E. coli, tảo và hầu hết thực vật có khả năng tổng hợp tất cả amino acid từ các tiền chất. Các sinh vật khác kể cả người không có khả năng tổng hợp một số amino acid không thay thế và phải thu được chúng trong thức ăn. Một số vi khuẩn lactic như *Lactobacillus* hoàn toàn không tổng hợp được một amino acid nào và phải thu nhận chúng nhờ phân giải protein trong môi trường.Trong mục này không thể trình

bày chi tiết con đường sinh tổng hợp của từng amino acid mà chỉ giới thiệu khái quát về sinh tổng hợp amino acid.

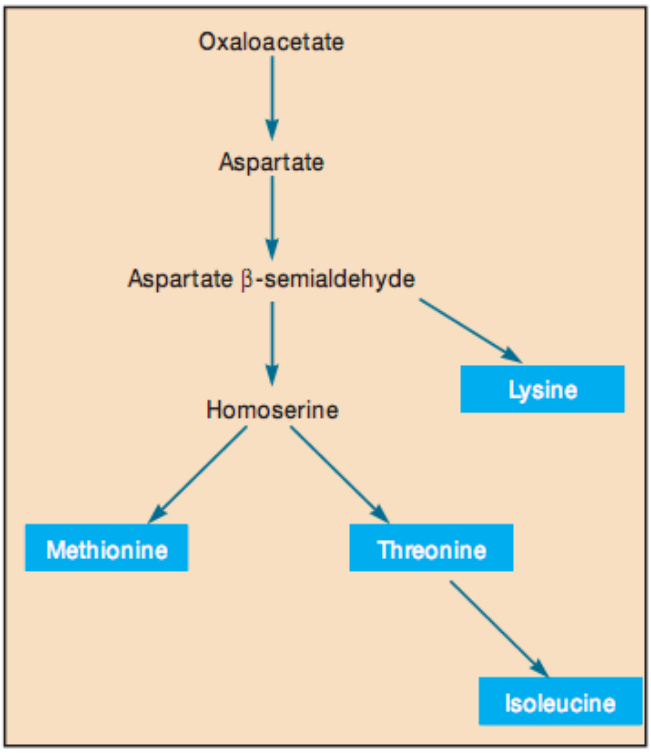


Hình 18.17: Tổ chức của sự đồng hóa

Các sản phẩm sinh tổng hợp dẫn xuất từ các chất trung gian của con đường lưỡng hóa. Chú ý 2 phản ứng cố định CO_2 bổ sung chủ yếu. (Theo: Prescott và cs, 2005)

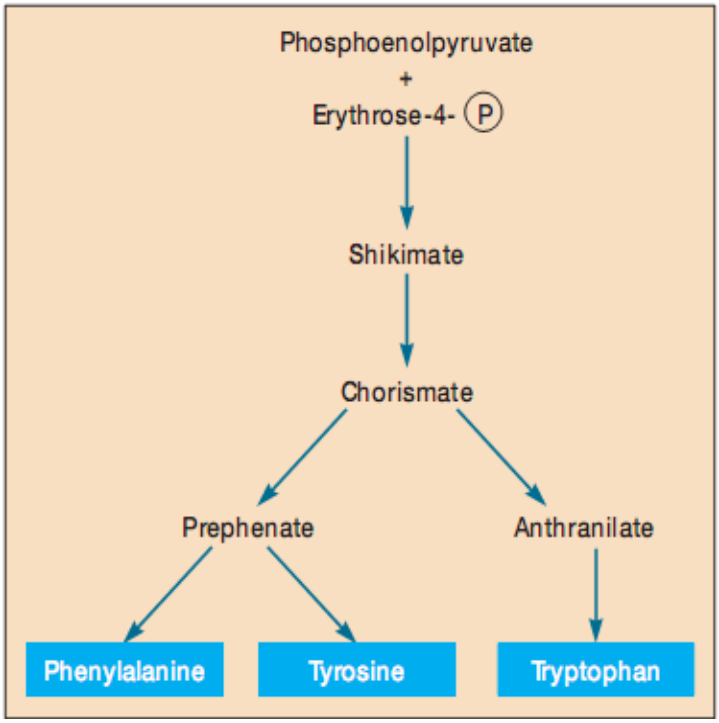
Hình 18.17 mô tả quan hệ của con đường sinh tổng hợp amino acid với các con đường lưỡng hoá. Bộ khung của amino acid bắt nguồn từ Acetyl-CoA và các chất trung gian của chu trình TCA, đường phân và con đường pentose-phosphate.

Để cho hiệu quả và kinh tế nhất các tiền chất dùng cho sinh tổng hợp amino acid được cung cấp chỉ từ một vài con đường lưỡng hoá chủ yếu. Thứ tự dẫn đến các amino acid riêng rẽ phân nhánh từ các con đường trung tâm này. Alanine, aspartat và glutamate được được tổng hợp nhờ sự chuyển amine lần lượt, trực tiếp từ Pyruvate, Oxaloacetatee và α-ketoglutarate.



Hình 18.18: Con đường phân nhánh của tổng hợp amino acid. Các con đường dẫn tới methionine, threonine, izoleucine và lysine. Mặc dù 1 số mũi tên biểu thị 1 bước tuy nhiên hầu hết những sự chuyển hóa qua lại đều đòi hỏi sự tham gia của 1 số enzyme. (Theo: Prescott và cs, 2005)

Hầu hết các con đường sinh tổng hợp đều phức tạp hơn và các chất trung gian quen thuộc thường được dùng trong sinh tổng hợp của các họ amino acid có liên quan nhằm mục đích tiết kiệm hơn. Chẳng hạn, lysine, threonine, izoleucine và methionine đều được tổng hợp từ oxaloacetatee từ một con đường đồng hoá phân nhánh (Hình 18.18). Con đường sinh tổng hợp các amino acid thơm phenylalanine, tyrosine và tryptophan cũng có chung nhiều chất trung gian (*Hình 18.19*).



Hình 18.19: Tổng hợp các amino acid thơm (phenylalanine, tyrosine, tryptophan). Chú ý: hầu hết các mũi tên đều biểu thị trên 1 phản ứng enzyme. (Theo: Prescott và cs, 2005)

18.6. CÁC PHẢN ỨNG BỔ SUNG

Khi xem xét *hình 18.17* ta thấy các chất trung gian của chu trình TCA được dùng trong sinh tổng hợp các pyrimidine và nhiều acid amine. Trên thực tế, các chức năng sinh tổng hợp của chu trình này quan trọng đến mức hầu hết chu trình hoạt động kỵ khí để cung cấp các tiền chất sinh tổng hợp mặc dù ẩ ADH là không cần thiết cho việc vận chuyển electron và phosphoryl hoá trong sự vắng mặt của O_2. Do đó chu trình TCA có vai trò đáng kể trong việc cung cấp carbon cho sinh tổng hợp và các chất trung gian của chu trình có thể bị cạn kiệt nếu tế bào không có biện pháp duy trì chúng. Tuy nhiên vi sinh vật có các phản ứng hoàn lại các chất trung gian của chu trình giúp cho chu trình TCA có thể hoạt động liên tục khi sinh tổng hợp đang diễn ra mạnh mẽ. Các phản ứng thay thế các chất trung gian của chu trình được gọi là các phản ứng bổ sung (anaplerotic reactions).

Hầu hết vi sinh vật có thể thay thế các chất trung gian của chu trình TCA bằng cố định CO_2, trong đó CO_2 được chuyển hoá thành carbon hữu cơ và được

đồng hoá. Cần phân biệt là, các phản ứng bổ sung không đảm nhiệm cùng chức năng như con đường cố định CO_2 cung cấp carbon cần thiết ở các cơ thể tự dưỡng. Cố định CO_2 ở các cơ thể tự dưỡng cung cấp hầu hết hoặc toàn bộ carbon cần cho sinh trưởng. Các phản ứng bổ sung cố định CO_2 chỉ nhằm thay thế các chất trung gian và duy trì cân bằng trao đổi chất. Thường thường CO_2 được gắn vào một phân tử chất nhận (Pyruvate hoặc phosphorusenolPyruvate) để tạo thành chất trung gian của chu trình là Oxaloacetatee (Hinh 18.17). *Arthrobacter globiformis* và nấm men sử dụng Pyruvate-carboxylase xúc tác phản ứng này.

$$\text{Pyruvate} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \xrightarrow{\text{Biotin}} \text{Oxaloacetatee} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

Enzyme trên cần cofactor là biotin và sử dụng năng lượng của ATP để liên kết CO_2 vào Pyruvate. Biotin thường là cofactor của các enzyme xúc tác phản ứng carboxyl hoá. Do có chức năng quan trọng như vậy nên biotin là yếu tố sinh trưởng cần thiết đối với nhiều loài vi sinh vật. Các vi sinh vật khác như *E. coli*, *Salmonella typhimurium* lại sử dụng enzyme phosphoenolpyruvate-carboxylase xúc tác phản ứng dưới đây:

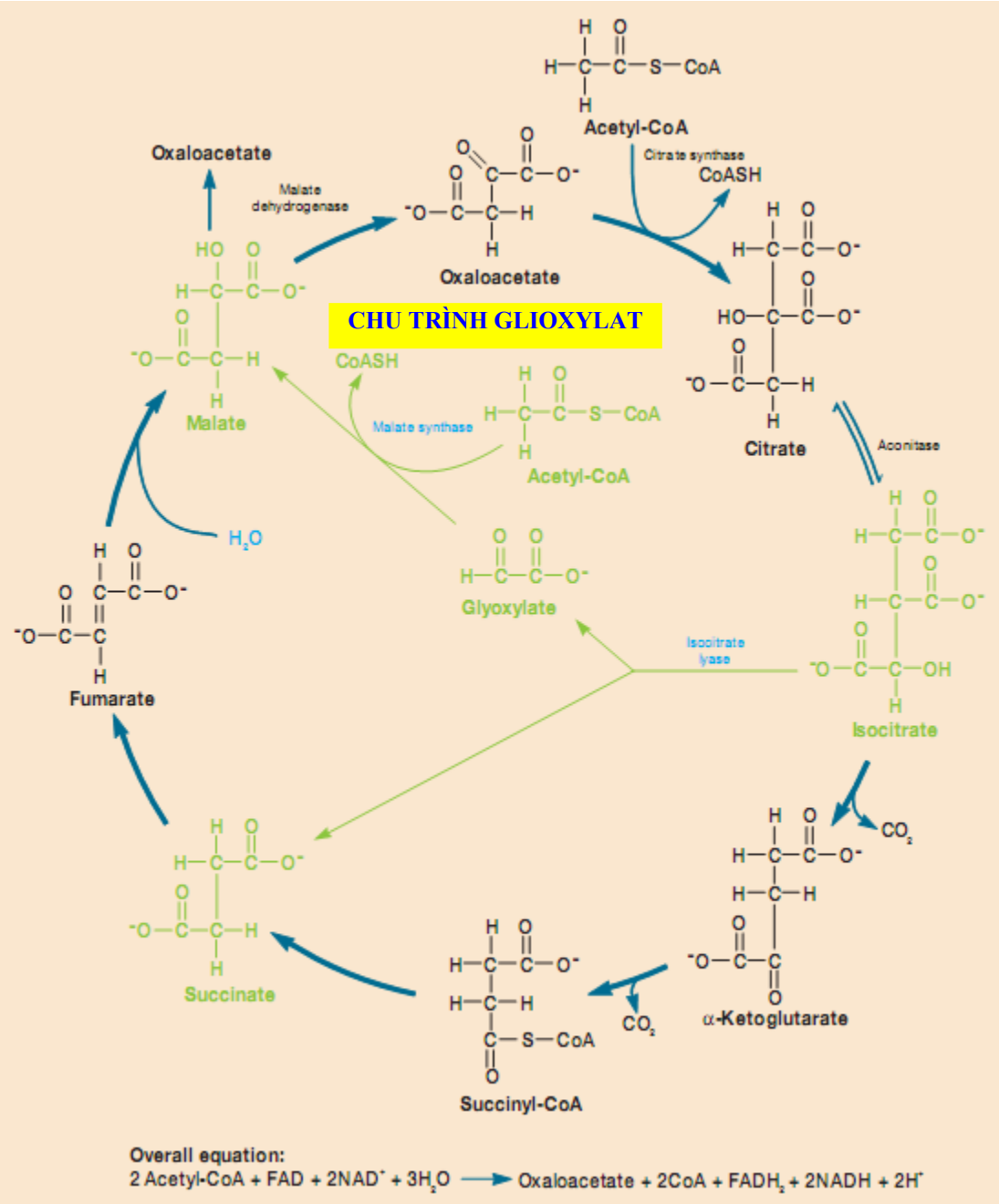
$$\text{Phosphoenolpyruvate} + CO_2 \rightarrow \text{Oxaloacetatee} + \text{Pi}$$

Một số vi khuẩn, tảo, nấm và động vật nguyên sinh có thể sinh trưởng với nguồn carbon duy nhất là acetate bằng cách sử dụng acetate để tổng hợp các chất trung gian của chu trình TCA trong chu trình glioxylat (*Hình 18.20*). Chu trình được thực hiện nhờ hai enzyme đặc biệt - Izocitrate liase và malat synthase - xúc tác các phản ứng sau:

$$\text{Izocitrate} \xrightarrow{\text{izoxitrat lyaza}} \text{Succinat} + \text{Glioxylat}$$

$$\text{Glioxylat} + \text{Acetyl-CoA} \xrightarrow{\text{malat sin taza}} \text{Malat} + \text{CoA}$$

Chu trình glioxylat, thực ra là một chu trình TCA cải biến. Hai phản ứng loại carboxyl của chu trình TCA (bước Izocitrate dehydrogenase và α-ketoglutarate dehydrogenase) được bỏ qua giúp cho việc chuyển hoá Acetyl-CoA để tạo thành Oxaloacetatee mà không để mất carbon của Acetyl-CoA như CO_2. Theo cách này, acetate và bất kỳ các phân tử nào được chuyển hoá thành acetate đều có thể đóng góp carbon vào chu trình và giúp cho sinh trưởng của vi sinh vật.



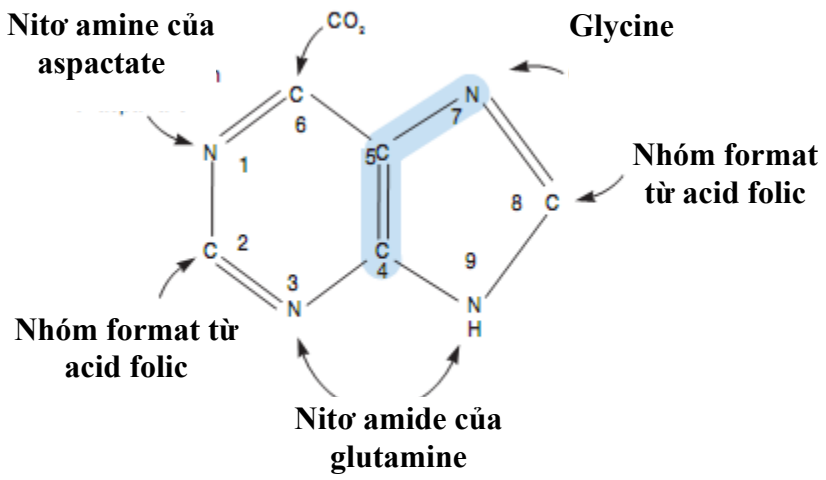
Hình 18.20: Chu trình glioxylat. Chú ý: các enzyme của chu trình TCA ở phần dưới được bỏ qua. (Theo: Prescott và cs, 2005)

18.7. TỔNG HỢP CÁC PURINE, PYRIMIDIN VÀ NUCLEOTIDE

Sinh tổng hợp của purine và pyrimidine là sống còn cho mọi tế bào vì các phân tử này được dùng để tổng hợp ATP, một số cofactor, acid ribonucleic (ARả), acid deoxyribonucleic (ADả) và các thành phần quan trọng khác của tế bào. Hầu

hết vi sinh vật có thể tổng hợp các Purine và pyrimidine cho bản thân vì các chất này có vai trò quyết định đối với chức năng của tế bào.

Purine và pyrimidine là các bazơ nitrogen vòng chứa một số nối đôi và có các đặc tính thơm rõ rệt. Purine gồm 2 vòng nối với nhau, còn pyrimidine chỉ có một vòng (*hình 18.21 và 18.23*). Trong vi sinh vật thường gặp các purine adenin và guanin và các pyrimidine uracyl, xitozin và thymine. Một base purine hoặc pyrimidine nối với một đường pentose (ribose hoặc deoxyribose) là một nucleoside. Một nucleotide là một nucleoside nối với một hoặc trên một nhóm phosphate liên kết với đường.



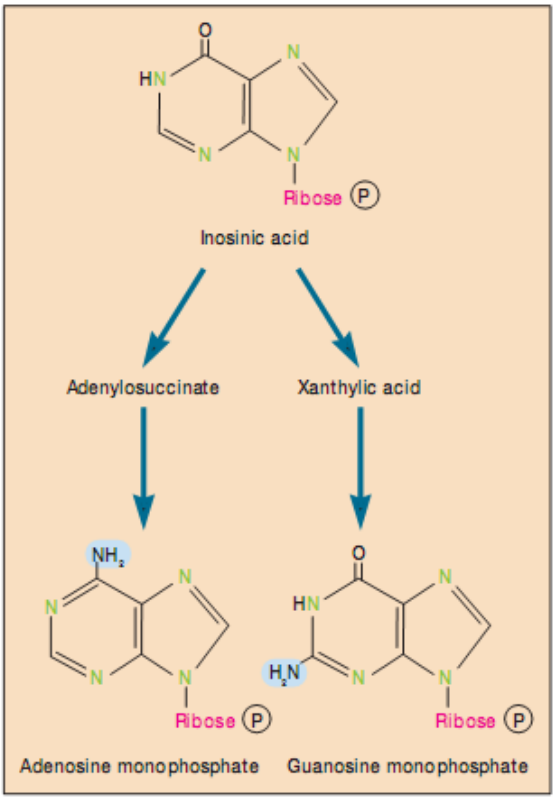
Hình 18.21: Sinh tổng hợp Purine.

Chú ý sự chỉ dẫn các nguồn N và C của bộ khung Purine. (Theo: Prescott và cs, 2005)

18.7.1. Sinh tổng hợp Purine

Con đường sinh tổng hợp các purine là một thứ tự phức tạp gồm 11 bước trong đó 7 phân tử khác nhau góp phần vào bộ khung purine cuối cùng (*Hình 18.21*). Vì con đường mở đầu với ribo-5-phosphate và bộ khung purine được kiến trúc trên đường này nên sản phẩm purine đầu tiên của con đường là nucleotide acid inosinic chứ không phải là một base purine tự do. Trong sinh tổng hợp của purine cofactor acid folic đóng vai trò rất quan trọng. Các dẫn xuất của acid folic đóng góp carbon 2 và 8 vào bộ khung purine. Trên thực tế, thuốc sulfonamide kìm hãm sinh trưởng của vi khuẩn là do ức chế tổng hợp acid folic. Điều này sẽ ảnh hưởng đến sinh tổng hợp của purine và các quá trình khác cần acid folic.

Một khi acid inosinic đã được tạo thành, các con đường tương đối ngắn sẽ tổng hợp adenosine monophosphate và guanosine monophosphate (Hình 18.22) và sản ra nucleoside diphosphate và triphosphate bằng cách chuyển phosphate từ ATP. ADẩ chứa deoxyribonucleotide (ribose thiếu một nhóm hydroxyl trên C_2) thay cho ribonucleotide gặp trong ARẩ . Các deoxyribonucleotide xuất hiện từ sự khử của các nucleoside diphosphate hoặc nucleoside triphosphate qua hai con đường khác nhau. Một số vi sinh vật khử triphosphate nhờ hệ thống cần cofactor vitamine B_{12}. Số khác, như *E. coli*, lại khử ribose trong nucleoside diphosphate. Cả hai hệ thống đều sử dụng một protein nhỏ chứa S gọi là thioredoxin làm tác nhân khử.



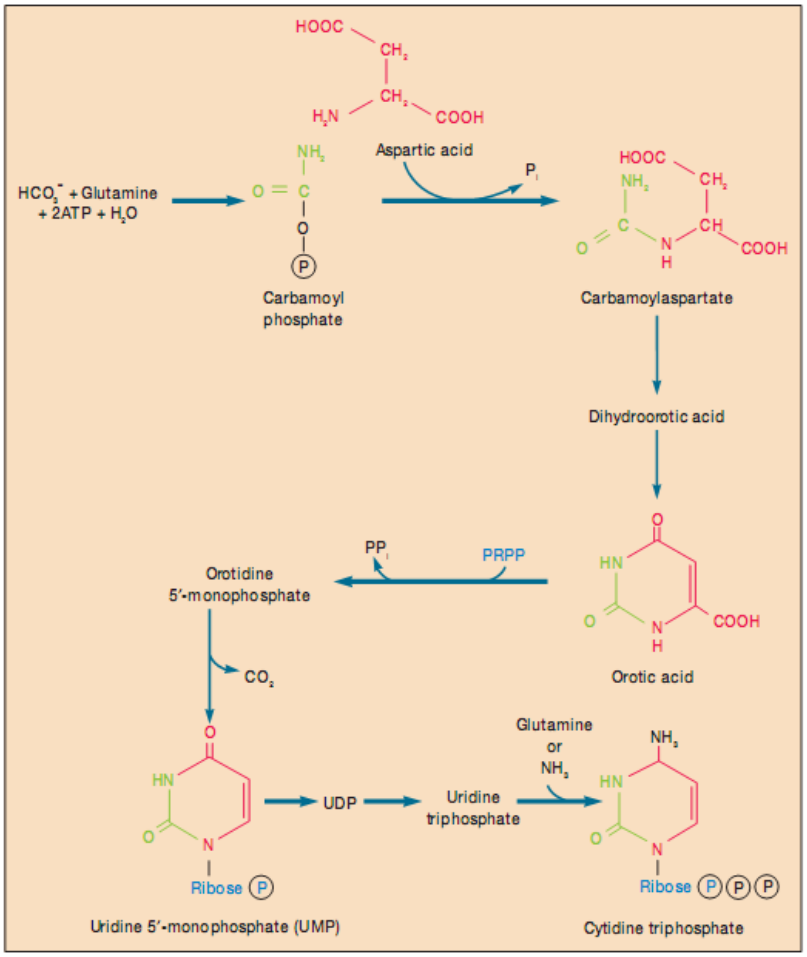
Hình 18.22. Sinh tổng hợp adenosine monophosoahte và Guanosine Monophosphatee

18.7.2. Sinh tổng hợp pyrimidine

Sinh tổng hợp pyrimidine mở đầu với acid aspartic và cacbamoyl-phosphate (một phân tử cao năng được tổng hợp từ CO_2 và ammonia) (*Hình 18.23*).

Aspartate-cacbamoyltransferase xúc tác việc ngưng tụ hai cơ chất này để tạo thành cacbamoyl-aspartat, sau đó chất này được chuyển thành sản phẩm pyrimidine đầu tiên đó là acid orotic.

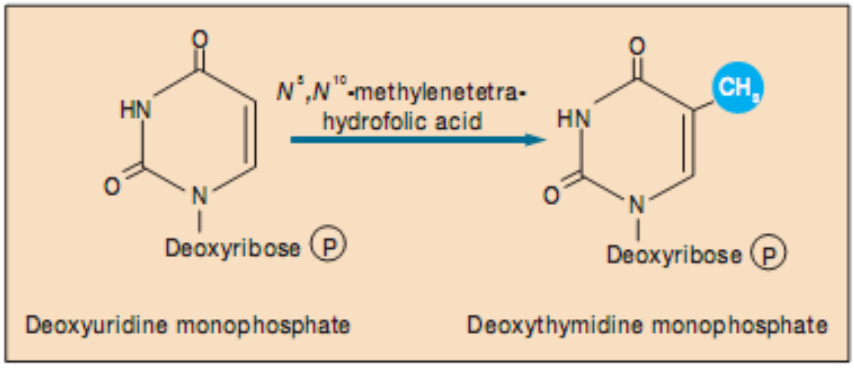
Sau khi bộ khung pyrimidine được tổng hợp, một nucleotide sẽ được tạo thành bằng cách thêm vào ribo-5-phosphate nhờ tác dụng của chất trung gian cao năng 5-phosphorusribosyl-1-pyrophosphate. Do đó việc kiến trúc vòng pyrimidine được hoàn thành trước khi ribose được thêm vào trái với việc tổng hợp vòng Purine bắt đầu với ribo-5-phosphate. Việc loại carboxyl hoá của orotidine monophosphate sản ra uridine monophosphate và cuối cùng uridine triphosphate và cytidine triphosphate.



Hình 18.23: Tổng hợp pyrimidine.

PRPP là acid 5-phosphorusribose 1- pyrophosphorusric, chất cung cấp chuỗi ribo-5-phosphate. Phần dẫn xuất từ cacbamoylphosphate được in đậm. (Theo: Prescott và cs, 2005)

Pyrimidine thứ ba phổ biến là thymine - một thành phần của ADẩ . Ribose trong các nucleotide pyrimidine bị khử theo cùng cách như trong các nucleotide purine. Sau đó deoxyuridine monophosphate được methyl hoá với dẫn xuất của acid folic để tạo thành deoxythymidine monophosphate (*Hình 18.24*).



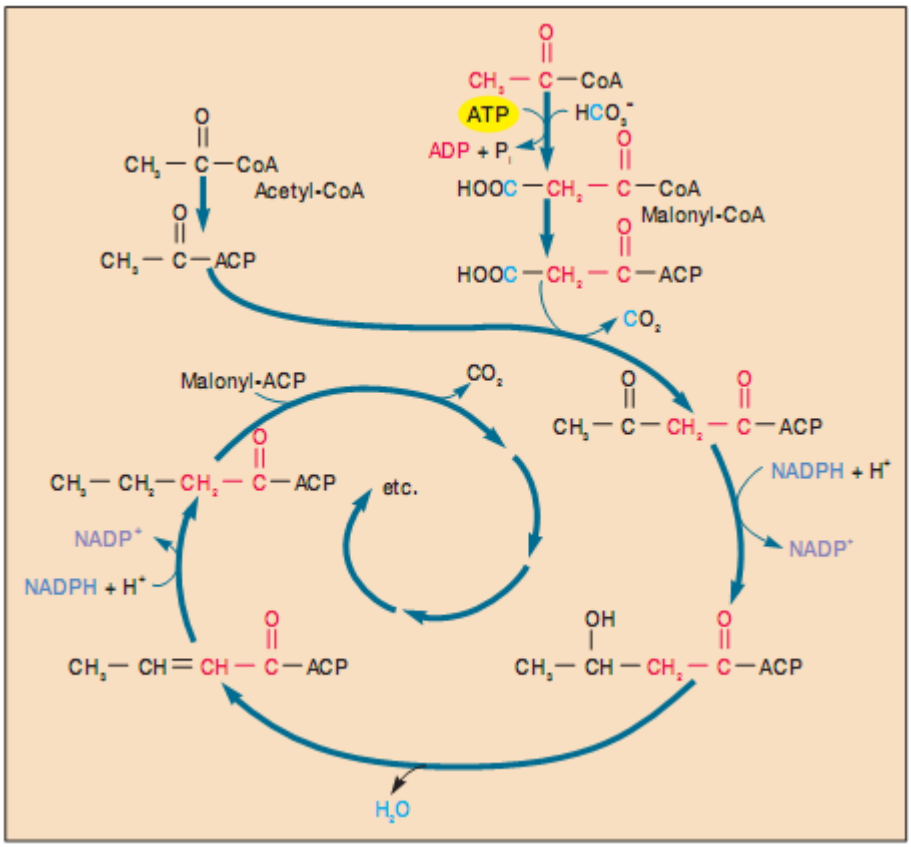
Hình 18.24: Tổng hợp deoxythymidine monophosphate. Chú ý: deoxythymidine khác với deoxyuridine ở chỗ có thêm nhóm methyl. (Theo: Prescott và cs, 2005)

18.8. TỔNG HỢP LIPID

Vi sinh vật chứa nhiều lipid đặc biệt là ở màng tế bào. Lipid thường chứa các acid béo hoặc dẫn xuất của acid béo. Acid béo là các acid monocarboxylic với các chuỗi alkyl dài thường có một số chẵn carbon (chiều dài trung bình là 18 carbon). Một số có thể là chưa bão hoà nghĩa là có một hoặc trên một nối đôi. Hầu hết acid béo của vi sinh vật là chuỗi thẳng nhưng có một số phân nhánh. Các vi khuẩn gram âm thường có các acid béo cyclopropan (tức là các acid béo chứa một hoặc trên một các vòng cyclopropan trong chuỗi).

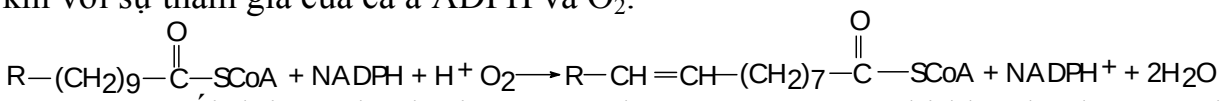
Việc tổng hợp các acid béo được xúc tác bởi phức hệ synthetase acid béo với Acetyl-CoA và malonyl-CoA như cơ chất và ẩ ADPH như chất cho electron. Malonyl-CoA dẫn xuất từ sự carboxyl hoá của Acetyl-CoA với sự tiêu thụ ATP. Việc tổng hợp diễn ra sau khi acetate và malonat đã được chuyển từ CoA đến nhóm sulfihidril của protein mang acyl (ACP, acyl carrier) là một protein nhỏ mang chuỗi acid béo đang sinh trưởng trong tổng hợp. Ở mỗi thời điểm synthetase lại thêm 2 carbon vào đầu carboxyl của chuỗi acid béo đang sinh trưởng trong một quá trình gồm hai chặng (*Hình 18.25*). Trước hết, malonyl-ACP phản ứng với acyl-

ACP acid béo để sản ra CO_2 và một acyl-ACP acid béo có 2 carbon dài hơn. Việc mất đi CO_2 hướng cho phản ứng hoàn thành. Ở đây ATP được dùng để bổ sung CO_2 vào Acetyl-CoA tạo thành malonyl-CoA. Cũng CO_2 như vậy mất đi khi malonyl-ACP chuyền các carbon cho chuỗi. Do đó CO_2 là cần thiết cho tổng hợp acid béo nhưng không phải luôn luôn được cố định. Trên thực tế, một số vi sinh vật cần CO_2 để sinh trưởng tốt nhưng chúng vẫn có thể sinh trưởng thuận lợi khi không có CO_2 mà có mặt một acid béo như acid oleic (một acid béo 18 carbon không bão hoà). Trong chặng thứ hai của tổng hợp nhóm α-keto xuất hiện từ phản ứng ngưng tụ ban đầu bị loại đi trong một quá trình ba bước bao gồm hai sự khử và một sự loại nước. Sau đó acid béo sẵn sàng cho việc bổ sung thêm 2 nguyên tử carbon nữa.

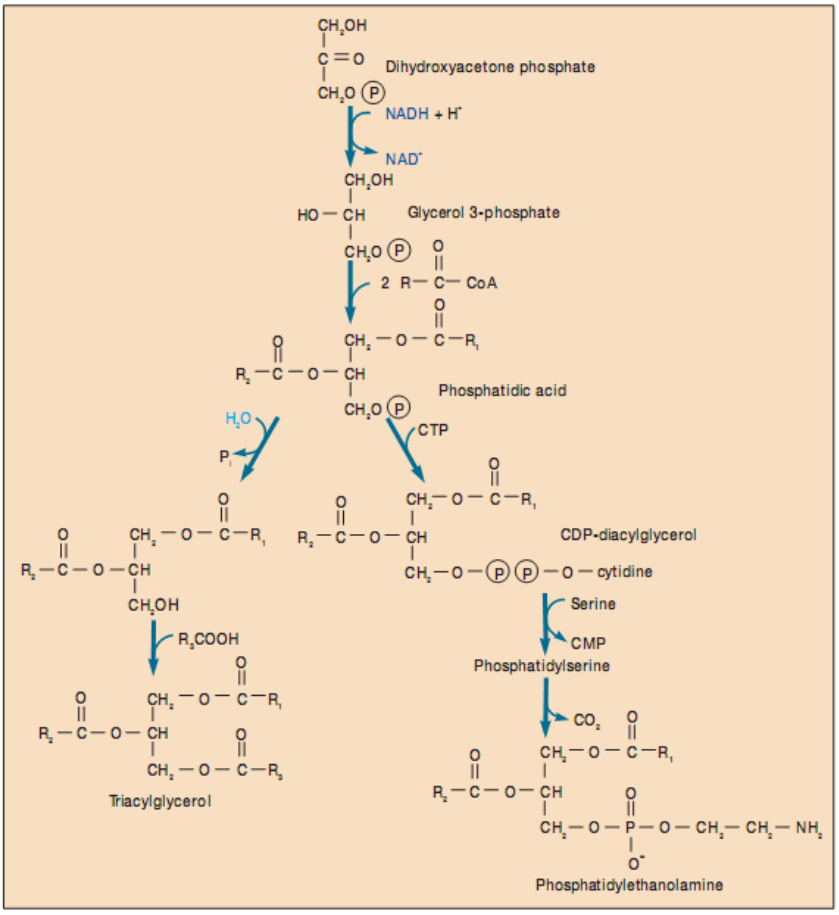


Hình 18.25: Tổng hợp acid béo. Chu trình được lặp lại cho tới khi chiều dài chuỗi thực sự đã đạt được. ACP = acyl carrier protein (protein mang acyl). (Theo: Prescott và cs, 2005)

Các acid béo không bão hoà được tổng hợp theo hai con đường. Các tế bào nhân thật và vi khuẩn hiếu khí như *Bacillus megaterium* sử dụng con đường hiếu khí với sự tham gia của cả ẩ ADPH và O_2.



Một nối đôi tạo thành giữa các carbon 9 và 10 và O_2 bị khử thành nước nhờ các electron do cả acid béo và ẩ ADPH cung cấp. Các vi khuẩn kỵ khí và một số vi khuẩn hiếu khí tạo ra các nối đôi trong quá trình tổng hợp acid béo bằng cách loại nước các acid béo hydroxy. Oxy không cần cho việc tổng hợp nối đôi theo cách này. Con đường kỵ khí hoạt động ở một số vi khuẩn gram âm quen thuộc (ví dụ: *E. coli* và *Salmonella typhimurium*), vi khuẩn gram dương (ví dụ: *Lactobacillus plantarum* và *Clostridium pasteurianum*) và vi khuẩn lam.



Hình 18.26: Tổng hợp triacylglycerol và phospholipid.

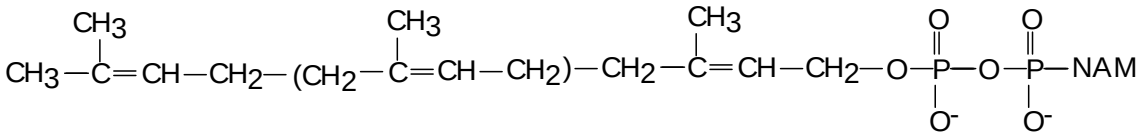
(Theo: Prescott và cs, 2005)

Các vi sinh vật nhân thật thường dự trữ carbon và năng lượng ở dạng triacylglycerol, glycerol được este hoá với 3 acid béo. Glycerol xuất hiện từ sự khử dihydroxyacetone phosphate (là chất trung gian của đường phân) thành glycerol-3-phosphate, sau đó glycerol-3-phosphate được este hoá với 2 acid béo để cho acid phosphateidic (*Hình 18.26*). Phosphate bị thuỷ phân khỏi acid phosphateidic tạo thành diacylglycerol và acid béo thứ ba được gắn vào để sản ra một triacylglycerol.

Phospholipid là thành phần chủ yếu của màng tế bào nhân thật và hầu hết tế bào nhân nguyên thuỷ. Tổng hợp phospholipid cũng thường diễn ra theo con đường của acid phosphateidic. Một chất mang đặc biệt-cytidine diphosphate (XDP)-đóng vai trò tương tự vai trò của các chất mang của uridine và adenosine diphosphate trong sinh tổng hợp hidrat carbon. Chẳng hạn, vi khuẩn tổng hợp phosphateidinetanolamine (một thành phần chủ yếu của màng tế bào) qua việc tạo thành XDP - diacylglycerol đầu tiên (*Hình 18.26*). Sau đó dẫn xuất XDP này phản ứng với serine để tạo thành phospholipid phosphateidilserine và qua việc loại carboxyl sẽ xuất hiện phosphateidinetanolamine. Theo cách này, một lipid màng, phức tạp được tạo nên từ các sản phẩm của đường phân, sinh tổng hợp acid béo và sinh tổng hợp acid amine.

18.9. TỔNG HỢP PEPTIDOGLYCAN

Hầu hết thành tế bào vi khuẩn chứa một phân tử lớn, phức tạp bao gồm các chuỗi polisaccaride dài tạo thành bởi các nhánh luân phiên acid ẩ -Acetylmuramic (ẩ AM) và ẩ -Acetylglucose semin (ẩ AG). Gắn vào các nhánh ẩ AM là các chuỗi pentapeptide. Các chuỗi polisaccaride được liên kết với nhau bởi các pentapeptide hay bởi các cầu nối gian - peptide phức tạp của peptidoglycan, dĩ nhiên, càng đòi hỏi một quá trình sinh tổng hợp phức tạp, đặc biệt còn vì các phản ứng tổng hợp diễn ra ở cả bên trong và bên ngoài màng tế bào. Tổng hợp peptidoglycan là một quá trình nhiều bước và đã được nghiên cứu chi tiết ở vi khuẩn gram dương *Staphylococcus aureus*. Ở đây có sự tham gia của hai chất mang là uridine diphosphate (UDP) và bactoprenol (*Hình 18.27*). Bactoprenol là một alcohol 55 carbon gắn vào ẩ AM bởi một nhóm pyrophosphate và vận chuyển các thành phần của peptidoglycan qua màng kỵ nước.



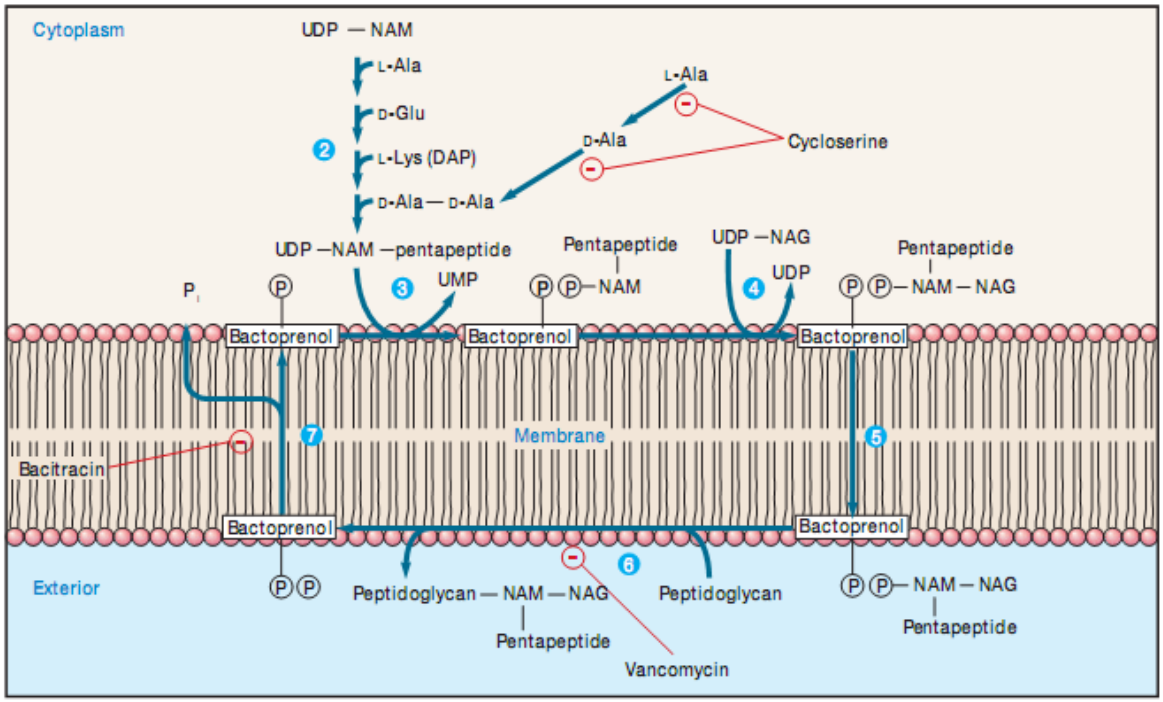
Hình 18.27: Bactoprenol pyrophosphate. Chú ý: Chất này được gắn vào NAM. (Theo: Prescott và cs, 2005)

Tổng hợp peptidoglycan (Hình 18.28 và 18.29) diễn ra qua 8 bước:

1.Các dẫn xuất UDP của acid ả .Acetylmuramic và ả -Acetylglucosamine được tổng hợp trong tế bào chất.

2. Các amino acid lần lượt được thêm vào UDP-ả AM tạo thành chuỗi pentapeptide (2 D-alanine tận cùng được thêm vào ở dạng dipeptide). ả ăng lượng của ATP được dùng để sản ra các liên kết peptide nhưng không có sự tham gia của tRả A và riboxom.

3.



HHình 18.28: Tổng hợp peptidoglycan. Chú ý: pentapeptide chứa L-lysine ở peptidoglycan của S. aureus và acid diamineopimelic (DAP) ở peptidoglycan của E. coli. Tác dụng kìm hãm của bacidraxin, xicloserine và vancomixin được chỉ rõ. Các con số tương ứng với 6 trong 8 bước nói trong bài. Bước 8 được mô tả ở hình 18. 29. (Theo: Prescott và cs, 2005)

4.ả AM-pentapeptide được chuyển từ UDP sang phosphate của bactoprenol ở bề mặt của màng.

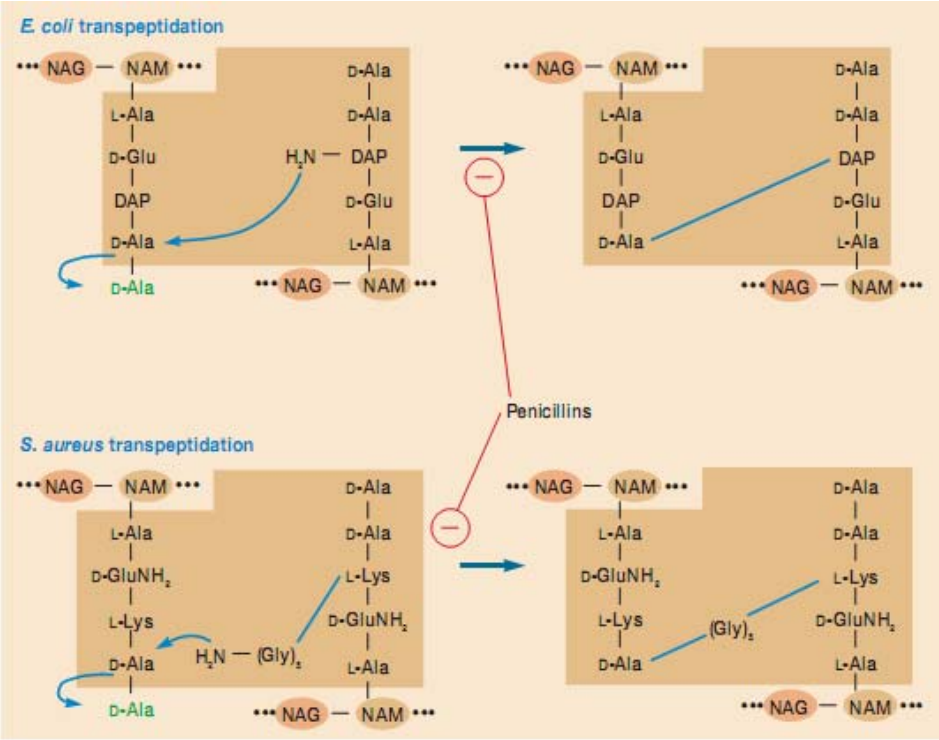
5. UDP-ả AG bổ sung ả AG vào ả AM-pentapeptide tạo thành đơn vị lặp lại của peptidoglycan. ả ếu một cầu nối pentaglycine là cần thiết các glycine sẽ được

thêm vào bằng cách sử dụng các phân tử glycyl-tRả A đặc biệt nhưng không cần riboxom.

6.Sau khi đã hoàn thành đơn vị lặp lại của peptidoglycan ả AM-ả AG được chuyển qua màng đến bề mặt bên ngoài nhờ chất mang bactoprenol pyrophosphate. Đơn vị peptidoglycan được gắn vào đầu đang sinh trưởng của một chuỗi peptidoglycan kéo dài chuỗi một đơn vị lặp lại.

7.Chất mang bactoprenol trở lại bên trong màng. Trong quá trình này một phosphate được tách ra để cho bactoprenol phosphate giờ lại có thể nhận một ả AM-pentapeptide khác.

8. Cuối cùng, các liên kết peptide chéo giữa các chuỗi peptidoglycan được tạo thành nhờ phản ứng chuyển peptide (Hình 18.29). Ở *E. coli* nhóm amineo tự do của acid diamineopimelic liên kết với D-alanine gần tận cùng tách ra nhánh D-alanine tận cùng. ATP được dùng để tạo thành liên kết peptide tận cùng bên trong màng. Khi sự chuyển peptide diễn ra bên ngoài năng lượng của ATP là không cần nữa. Quá trình như vậy cũng được thực hiện khi có sự tham gia của một cầu nối; chỉ nhóm phản ứng với D-alanine gần tận cùng là khác.



Hình 18.29: Chuyển peptide

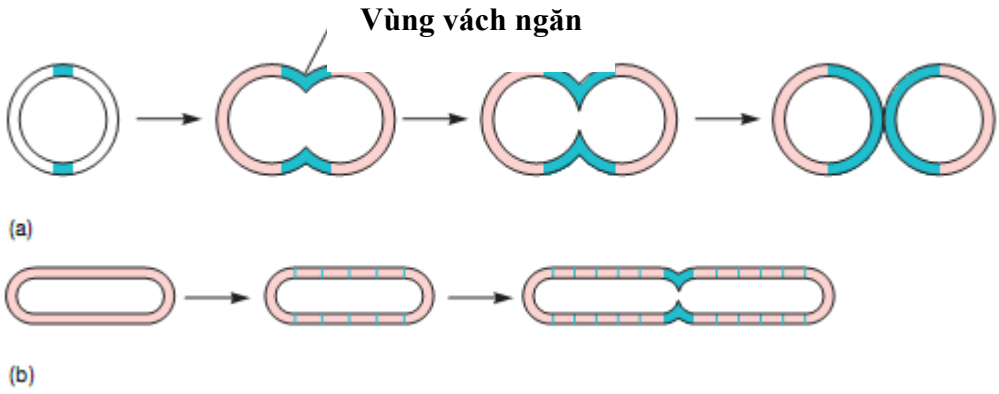
Các phản ứng chuyển peptide trong việc tạo thành peptidoglycan ở E. coli và S. aureus. (Theo: Prescott và cs, 2005)

Tổng hợp peptidoglycan rất mẫn cảm với các tác nhân kháng khuẩn. Sự kìm hãm bất kỳ bước nào trong tổng hợp đều làm cho thành tế bào bị yếu đi và có thể dẫn đến phá vỡ tế bào do thẩm thấu. ả hiều chất kháng sinh ảnh hưởng đến tổng hợp peptidoglycan. Chẳng hạn, penixilin kìm hãm phản ứng chuyển peptide (*Hình 18.29*) và bacitraxin ức chế việc loại phosphate khỏi bactoprenol pyrophosphate.

18.10. CÁC KIỂU TỔNG HỢP THÀNH TẾ BÀO

Để sinh trưởng và phân chia được thuận lợi tế bào vi khuẩn phải bổ sung peptidoglycan mới vào thành tế bào của mình một cách chính xác và có điều hoà cẩn thận trong khi vẫn duy trì được hình dạng và tính nguyên vẹn của thành nếu phải tồn tại ở điều kiện áp suất thẩm thấu cao. Vì peptidoglycan của thành là một mạng lưới khổng lồ duy nhất nên vi khuẩn đang sinh trưởng phải có khả năng phân giải lưới sao cho đủ để cung cấp các đầu nhận dùng lắp vào các đơn vị peptidoglycan mới. Sự phân giải peptidoglycan hạn chế này được xúc tác bởi enzyme gọi là autolyzin, trong đó một số autolyzin tác dụng lên các chuỗi polisaccaride, số khác thuỷ phân các liên kết chéo peptide. Các chất kìm hãm autolyzin điều hoà chặt chẽ hoạt tính của các enzyme này.

Mặc dù vị trí và sự phân bố của hoạt tính tổng hợp thành tế bào thay đổi tuỳ theo loài nhưng có lẽ tồn tại hai kiểu phổ biến (*Hình 18.30*) sau đây.



Hình 18.30: Các kiểu tổng hợp thành

Trong hình là các kiểu tổng hợp thành tế bào ở các vi khuẩn đang sinh trưởng và phân chia (a) Các streptococci và một số cocci khác gram dương. (b) Tổng hợp ở các vi khuẩn hình que (E. coli, Salmonella, Bacillus). (Theo: Prescott và cs, 2005)

ẩ hiều cầu khuẩn Gram dương (*Enterococcus faecalis* và *Streptococcus*) chỉ có một tới một vài vùng sinh trưởng. Vùng sinh trưởng chính thường ở vị trí tạo thành vách ngang và các nửa tế bào mới được tổng hợp giáp lưng nhau. Kiểu tổng hợp thứ hai gặp ở các trực khuẩn *E. coli*, *Salmonella* và *Bacillus*. Tổng hợp peptidoglycan mạnh mẽ diễn ra ở vị trí tạo thành vách ngăn ngang như trên nhưng các vị trí sinh trưởng cũng nằm rải rác dọc theo phần hình trụ của trực khuẩn. Do đó sinh trưởng được phân bố ở trực khuẩn tràn lan hơn ở cầu khuẩn. Việc tổng hợp phải kéo dài các tế bào hình que cũng như phân cắt chúng. Có lẽ điều này giải thích cho những sự khác nhau trong kiểu sinh trưởng của thành.