บทปฏิบัติการที่ 6
เอนไซม์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติขั้นพื้นฐานของเอนไซม์และปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานเอนไซม์
2. เพื่อศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ และระเบียบวิธีวัดประสิทธิภาพ หรือ activity ของเอนไซม์

ความนำ

สิ่งที่มีชีวิตทุกชนิดจำเป็นต้องมี **เอนไซม์(enzyme)** เพื่อให้ปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ภายในเซลล์เกิดขึ้นได้และทำให้เซลล์ทำหน้าที่เป็นปกติ เอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกริยาในสิ่งมีชีวิต(**blocatalyst**) ควบคุมการเปลี่ยนแปลงและการสังเคราะห์สารต่างๆ ภายในเซลล์ คุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์ คือ (1) เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ สามารถรวมกับ **cofactor** เช่น วิตามิน และ อิออน ของแร่ธาตุต่างๆ (2) เอนไซม์ละลายน้ำได้ มีลักษณะเป็น**คอลลอยด์(colloid)** เอนไซม์จะสูญเสียสภาพการทำงานเมื่อถูก ความร้อน กรด แก่ และสารโลหะหนัก (3) เอนไซม์แต่ละชนิดมีความเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของสับสเตรทหรือปฏิกิริยาที่เอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง มีปัจจัยหลายประเภทที่ยังผลทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพและจะมีผลต่อการทำลายเอนไซม์ให้หมดความสามารถในการทำงาน การวัดประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ หรือ activity ของเอนไซม์ ทำได้โดยการวัดปริมาณของ **สับสเตรท (substrate)**ที่ลดลง หรือวัดปริมาณของ **โพรดัก(product)**ที่เกิดขึ้นต่อหน่วยเวลา

ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ หรือ อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาต่างๆ สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ความเข้มข้นของสับสเตรทและเอนไซม์

เมื่อปริมาณเอนไซม์คงที่ ความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท จนถึงจุดหนึ่งที่ความเร็วของปฏิกิริยาจะคงที่ ซึ่งเป็นจุดที่เอนไซม์รวมกับสับสเตรทเป็น **ES**(enzyme-substrate)ทั้งหมด และมี **อัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด(V_{max})** ปริมาณสับสเตรทที่เพิ่มขึ้นอีกจะไม่สามารถทำให้อัตราเร็วของปฏิกริยาเพิ่มขึ้น ถ้าจะให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นในกรณีที่มีปริมาณสับสเตรทมากเกินพอ จะต้องเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้สูงขึ้น จึงจะทำให้ค่า V_{max} ซึ่งเป็นค่าที่ขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้น

2. อุณหภูมิ

การเพิ่มอุณหภูมิ มีผลต่อการเพิ่มความเร็วของปฏิกิริยาเคมีและปฏิกิริยาทำงานของเอนไซม์ ทุก 18°F (10°C)ที่เพิ่มขึ้น จะมีผลทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า การเพิ่มอุณหภูมิ จะต้องไม่สูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนถูกทำลายซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ถูกทำลายไปด้วย

3. ความเป็นกรดเป็นเบส (pH)

เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานได้ดีที่สุดในช่วง pH หนึ่งเท่านั้น ค่า pH ที่เปลี่ยนไป ทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง เอนไซม์ส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีในช่วง pH 5-7 แต่เอนไซม์บางชนิดอาจจะทำงานในช่วง pH ต่ำได้ ค่า **optimum** pH ของเอนไซม์แต่ละชนิด เป็นค่าเฉพาะซึ่งอาจจะเปลี่ยนแปลงได้บ้างขึ้นกับชนิดเอนไซม์

4. สารยับยั้งเอนไซม์

ปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ ลักษณะของการยับยั้งหรือขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดจากสารเคมี มีทั้งแบบยับยั้งชั่วคราวเปลี่ยนกลับได้ (**reversible**) และแบบยับยั้งตลอดไปเปลี่ยนกลับไม่ได้(**Irreversible**) สารที่ทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ได้เรียกว่า **สารยับยั้งเอนไซม์**(**enzyme inhibitor**) การที่เอนไซม์ทำงานไม่ได้เมื่อมีสาร inhibitor อยู่ด้วยเกิดจากสาเหตุหลายอย่าง เช่น สาร inhibitor ไปจับกับ **active site** ของเอนไซม์ที่จะไปจับกับสับสเตรททำให้เอนไซม์ไม่สามารถรวมตัวกับสับสเตรท inhibitor ไปรวมกับ **ES-complex** เป็น **ESI-complex**(enzyme-substrate-inhibitor complex) ทำให้ปฏิกิริยาไม่สามารถดำเนินต่อไปเป็นโปรดักได้ นอกจากนี้ inhibitor บางชนิดสามารถรวมกับ **E** เป็น **EI**(enzyme-inhibitor) หรือรวมกับ ES เป็น ESI ได้ทั้ง 2 แบบ

5. ความเข้มข้นของโปรดัก

ความเข้มข้นของโปรดัก(**product concentration**) คือ ปริมาณของโปรดักที่เพิ่มขึ้น ซึ่งยังผลให้ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การยับยั้งลักษณะนี้เรียกว่า **feedback inhibition** ส่วนโปรดักที่ยับยั้งเอนไซม์ คือ feedback inhibitor เอนไซม์ที่ถูกยับยั้งการทำงานเป็น **allosteric enzyme** เพราะมี **allosteric site** สำหรับสารอื่นนอกเหนือจากการมี active site ในเอนไซม์ทั่วไป ทำให้ปฏิกิริยาของ allosteric enzyme อาจจะถูกเร่ง หรือยับยั้งโดยสารเคมีชนิดอื่น

ในการทดลองนี้ใช้เอนไซม์ **catalase** เป็นตัวอย่างเพื่อการศึกษาคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์ เพราะหาได้ง่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ตับและเม็ดเลือดมีเอนไซม์ชนิดนี้อยู่มาก กลไกการทำงาน คือ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ **ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)** ดังสมการ

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

activity ของเอนไซม์ catalase หาได้โดยการวัดปริมาณ H_2O_2 ที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ เมื่อใช้ปริมาณ H_2O_2 ที่มากเกินพอในปฏิกิริยา และวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เหลือโดยการเติม $KMnO_4$ และ H_2SO_4 ซึ่งจะเกิดผลของปฏิกิริยาดังสมการ

$$2KMnO_4 + 3H_2SO_4 + 5H_2O_2 \rightarrow K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 8H_2O + 5O_2$$

วัตถุและอุปกรณ์

1. ตับสดบดละเอียดในน้ำกลั่นที่เย็นจัด
2. 0.15 M. H_2O_2
3. phosphate buffer pH 5,7 และ 9
4. 6 M. H_2SO_4
5. 0.01 M. $KMnO_4$
6. 0.2 N sodium azide
7. 0.2 N. sodium fluoride
8. น้ำแข็ง
9. หลอดทดลอง
10. ที่ตั้งหลอดทดลอง
11. pipette ขนาด 1 ml.
12. beaker ขนาด ‘500 ml.
13. thermorneter ที่ใช้วัดอุณหภูมิในช่วง 0 - 100°C
14. ดินสอเขียนแก้ว
15. tripod
16. ตะเกียง

ระเบียบวิธี

1. การทดลองที่ 1 เพื่อศึกษาผลของ pH ที่มีต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

ใช้ pipette ดูดสารละลายต่างๆ ตามที่ปรากฏในตาราง แล้วใส่ลงในหลอดทดลองตามลำดับ โดยเติมเอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย ควรเติมเอนไซม์ให้พร้อมกันในหลอดทดลองทุกหลอด

หลอดทดลอง หมายเลข	Buffer		H_2O_2	น้ำกลั่น	เอนไซม์
	pH	ml	ml	ml	ml
1	5	0.5	1.5	2.2	0.3
2	7	0.5	1.5	2.2	0.3
3	9	0.5	1.5	2.2	0.3

หลังจากเติมเอนไซม์ลงในหลอดทดลองทุกหลอดแล้ว จับเวลาให้เอนไซม์ทำงาน 5 นาที ต่อจากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 6 N. จำนวน 5 ml ลงไปในแต่ละหลอด เพื่อทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ* นำหลอดทดสอบแต่ละหลอดไปไตเตรทกับ $KMnO_4$ เพื่อหาปริมาณ H_2O_2 ที่เหลืออยู่ในหลอดทดสอบ จะทำให้ทราบได้ว่า เอนไซม์ย่อยสับสเตรทไปในปริมาณเท่าใด สังเกต **end point** ได้จากการปรากฏสีชมพูอ่อนของ $KMnO_4$** ที่หยดลงไปในหลอดทดสอบ วัดปริมาตรของ $KMnO_4$ ที่ใช้ไปในการไตเตรทของหลอดทดสอบแต่ละหลอด แล้วนำมาคำนวณหา activity ของเอนไซม์ หรือเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

2. การทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

นำ beaker ขนาด 500 ml มา 3 ใบ เติมน้ำลงไปพอประมาณแล้วปรับอุณหภูมิของน้ำในบีกเกอร์ ให้มีอุณหภูมิ 10, 30 และ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำแข็ง น้ำ และ น้ำร้อน ตาม

* ทำความเข้าใจเรื่องการสูญเสียสภาพของโปรตีน(เอนไซม์)จากการทดลองในบทปฏิบัติการที่ 5

** สารละลาย ปกติมีสีม่วงแดงเข้ม ขณะทำการไตเตรทเมื่อบิดมือเขย่าหลอดทดลอง สีม่วงแดงจะหมดไปเป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อเขย่าแล้วได้สีชมพู แสดงว่าถึง end point

ลำดับ เติมสารละลายต่างๆ ตามที่กำหนดในตาราง ลงไปในหลอดทดสอบ โดยจะต้องเติมเอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย และหลังจากที่อุณหภูมิในหลอดทดสอบถูกปรับให้อยู่ในอุณหภูมิที่ต้องการทดสอบ ด้วยการแช่หลอดทดสอบไว้ในบีกเกอร์ที่ปรับอุณหภูมิแล้วดังกล่าวข้างต้น

หลอดทดสอบ หมายเลข	อุณหภูมิ C	Buffer pH 7 ml	H_2O_2 ml	น้ำกลั่น ml	เอนไซม์ ml
1	10	0.5	1.5	2.2	0.3
2	30	0.5	1.5	2.2	0.3
3	70	0.5	1.5	2.2	0.3

เมื่อเอนไซม์ทำงานเป็นเวลา 5 นาที ให้หยุดปฏิกิริยาและหาปริมาณ H_2O_2 เหลือจากการถูกทำให้สลายตัวโดยเอนไซม์ catalase เช่นเดียวกับที่ทำให้การทดลองที่ 1

3. **การทดลองที่ 3 เพื่อศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาของสารยับยั้ง** โดยทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับการทดลองที่ 1 และ 2 แล้วเติมสารต่างๆ ตามตารางที่กำหนด

หลอดทดสอบ หมายเลข	buffer pH7 Ml	H_2O_2 Ml	น้ำกลั่น ml	sodium azide ml	sodium fluoride ml	เอนไซม์ ml
1	0.5	1.5	2.2			0.3
2	0.5	1.5		2.2		0.3
3	0.5	1.5				0.3

บันทึกผล

1. **การทดลองที่ 1** เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ catalase ที่ pH 5, 7 และ 9 โดยที่ปัจจัยอื่นมีค่าคงที่ เอนไซม์ catalase จะมีอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดในหลอดทดสอบที่มี pH 7 ค่า optimum pH ของเอนไซม์ catalase คือ 7.4

2. **การทดลองที่ 2** เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ catalase ที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 70^{0}C การทดลองที่อุณหภูมิ 30^{0}C เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุด optimun temperature สำหรับเอนไซม์ catalase คือ 37^{0}C

3. **การทดลองที่ 3** สารยับยั้ง 2 ชนิด คือ sodium azide และ sodium fluoride มีผลขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับหลอดทดสอบที่ไม่มีการเติม inhibitor sodium azide

มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ catalase ได้ดีกว่า soduium fluoride ในบริเวณและความเข้มข้นเดียวกัน

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 6

1. ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยชนิดใด การวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ทำได้อย่างไร
2. เพราะเหตุใดในการทดลองจึงบอกให้เติมเอนไซม์เป็นอันดับสุดท้าย ถ้าจะเปลี่ยนเป็นเติมสับสเตรทเป็นอับดับสุดท้าย โดยเติมเอนไซม์พร้อมสารอื่นในตอนแรกจะได้หรือไม่
3. สาร inhibitor ยับยั้ง หรือขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างไร
4. เอนไซม์ catalase พบได้มากที่สุดในเซลล์ส่วนไหนของร่างกาย สิ่งที่มีชีวิตชนิดใดบ้างที่จำเป็นต้องมีเอนไซม์ catalase

บรรณานุกรม

Bernhard, **S.** A., **1968** **The Structure and Function of Enzymes** W. A. Benjamin, Inc, New York, 324 pp.

Karlson, P., 1 **969** **Introduction to Modern Blochemlstry 3rd ed.** Academic Press, New York, pp. 95-l 19.

Stryer, L., 1981 **Blochemlstry 2nd ed.** W. H. Freeman and Company, San Francisco, pp. 103-151.

White A., P. Handler, and E. L. Smith, **1973** **Prlnclples of Blochemlstry 5th ed.** Mc Graw-Hill, Ltd., pp. 209-276.