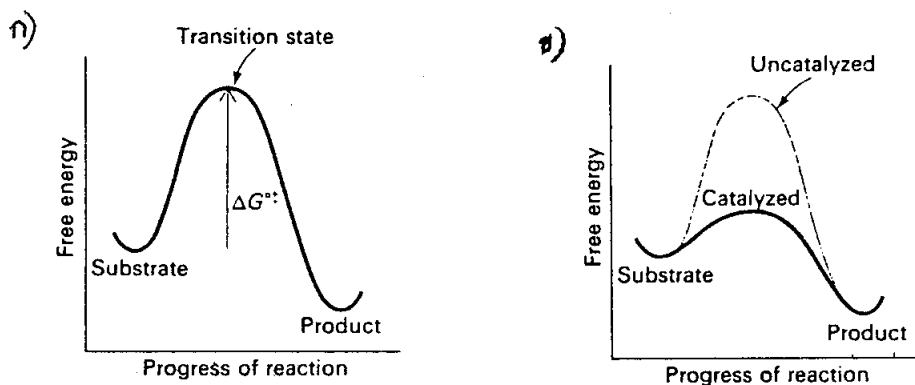


## บทที่ 4 เอนไซม์

เอนไซม์เป็นตัวเร่งอินทรีย์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ในขบวนการเมตาบอลิซึมอย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพเหนือกว่าตัวเร่งทางเคมีธรรมดาทั่ว ๆ ไป เช่น การไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครส วิธีทางเคมีต้องใช้กรดไฮโดรคลอริก และให้ความร้อนด้วยจึงจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส แต่ถ้าใช้เอนไซม์ invertase (sucrase) ปฏิกิริยาจะเกิดเร็วกว่ามากและไม่ต้องการให้ความร้อนเลยจนชนิดเดียว การไฮโดรไลซิสของเอนไซม์นี้จำเพาะต่อน้ำตาลซูโครส ถ้ามีไดแซคคาไรด์อื่นเช่นมัลโตสหรือแลคโตสปามา เอนไซม์ invertase ไม่สามารถไฮโดรไลซ์น้ำตาลสองตัวนี้ได้ ต่างจากการใช้กรดไฮโดรคลอริก ซึ่งจะสลายพันธะไกลโคซิดิกทุกพันธะ ไม่มีความจำเพาะเป็นพิเศษแต่อย่างใด

ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้นจะเกิดผลิตภัณฑ์ได้ไว เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้น (free energy of activation) ของปฏิกิริยานั้นทำให้ปฏิกิริยาถึงสภาวะสมดุลย์ (equilibrium position) ได้เร็วขึ้นมาก โดยที่เอนไซม์มิได้เปลี่ยนแปลงสภาวะที่สมดุลย์อันนั้น



รูปที่ 4.1 ก) กราฟแสดงพลังงานอิสระของการกระตุ้น (free energy of activation),  $\Delta G^\ddagger$

ข) เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยการลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นซึ่งเป็นกำแพงพลังงาน (energy barrier) ของปฏิกิริยานั้น ๆ

เอนไซม์เป็นโมเลกุลของโปรตีน จะถูกทำลายสภาพธรรมชาติได้โดยสารเคมีและสภาวะต่าง ๆ ที่สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ทั้งนั้น จนไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้อีก

## การแบ่งประเภทเอนไซม์และการเรียกชื่อ

เอนไซม์แบ่งออกเป็น 6 ประเภท ส่วนการเรียกชื่อนั้นมี 3 แบบด้วยกันคือ แบบ Trivial name แบบ Systematic name และแบบที่ใช้ Code number ในที่นี้จะเรียกชื่อเอนไซม์ตามแบบ Trivial name ซึ่งเป็นชื่อที่เข้าใจง่ายและนิยมใช้มากกว่าทุกแบบ

**ประเภทที่ 1 : Oxidoreductases** เร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์รีดิวซ์ของสารหนึ่ง และรีดิวซ์อีกสารหนึ่ง ได้แก่ เอนไซม์

dehydrogenase

reductase ,

oxidase

peroxidase

hydroxylase

oxygenase

**ประเภทที่ 2 : Transferases** เร่งปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่ต่าง ๆ เป็นต้นว่า หมู่เมธิล หมู่ฟอร์มิล หมู่อัลดีไฮด์ หมู่คีโตน ฯลฯ จากสารหนึ่งไปยังอีกสารหนึ่ง ได้แก่ เอนไซม์

transaminase

transketolase

transaldolase

transmethylase

**ประเภทที่ 3 : Hydrolases** เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยน้ำ ได้แก่ เอนไซม์

esterase

amidase

peptidase

phosphatase

glycosidase

ครอบคลุมไปถึงเอนไซม์ penicillinase, urease, ribonuclease, papain, chymotrypsin, lysozyme

**ประเภทที่ 4 : Lyases** เร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะคู่หรือในทางย้อนกลับปฏิกิริยาการเพิ่มเข้าที่พันธะคู่ ได้แก่ เอนไซม์

decarboxylase

aldolase

hydrase หรือ hydratase หรือ dehydratase

deaminase

**ประเภทที่ 5 : Isomerases** เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลของซับสเตรท ได้แก่เอ็นไซม์

isomerase

racemase

epimerase

mutase

**ประเภทที่ 6 : Ligases** เร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะระหว่างซับสเตรทสองชนิดโดยอาศัยพลังงานจากการสลายตัวของ ATP หรือนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ นิยมเรียกเอ็นไซม์ชนิดนี้ว่า synthetase มากกว่า ligase ได้แก่เอ็นไซม์ประเภท synthetase ทั้งหมด

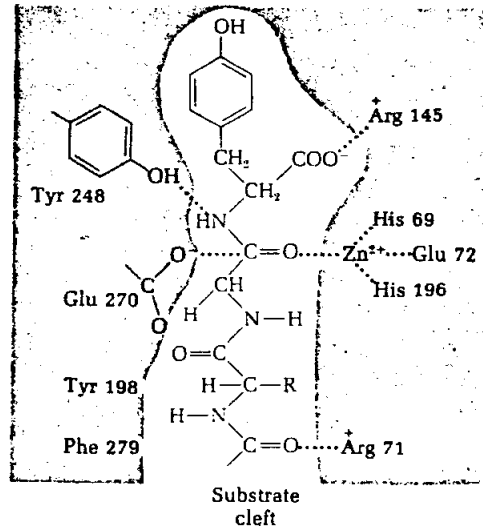
### ความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

ความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโมเลกุลซับสเตรท โครงร่างของเอ็นไซม์ และลักษณะที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์

โครงสร้างซับสเตรทจะต้องประกอบด้วยส่วนที่สำคัญสองส่วนคือ binding group ที่จะไปจับกับโมเลกุลของเอ็นไซม์ และ susceptible bond พันธะที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงตามมาโดยการกระทำของเอ็นไซม์

โครงร่างของเอ็นไซม์ (conformation of enzyme) เอ็นไซม์แต่ละชนิดมีโครงร่างเฉพาะตัว คงอยู่เป็นระเบียบและเหมือนกันทุกครั้งก่อนที่จะเข้าเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์

บริเวณเร่ง (active site หรือ substrate site หรือ catalytic site) ของเอ็นไซม์เป็นตำแหน่งบนโมเลกุลเอ็นไซม์ที่มีลักษณะเป็นแอ่งเล็ก ๆ สำหรับให้โมเลกุลซับสเตรทเข้าไปจับ การรวมตัวกันระหว่างเอ็นไซม์และซับสเตรทอาศัยแรงอย่างอ่อนช่วยยึด เช่นแรงแวนเดอร์วาลส์ พันธะไฮโดรเจน พันธะไฮโดรเจน เป็นต้น



รูปที่ 4.2 แผนภาพแสดงถึงซับสเตรทเปปไทด์  
ไปจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ carboxypeptidase

### โคแฟกเตอร์

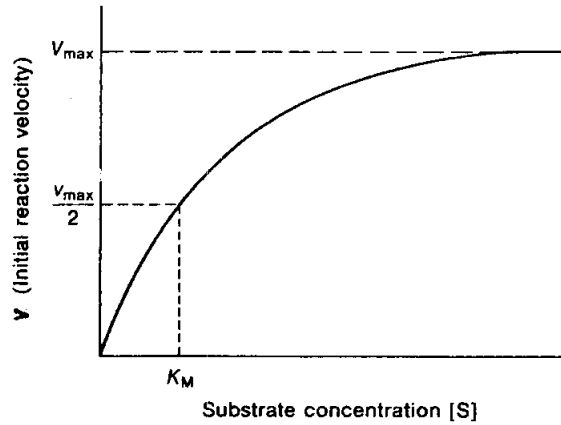
การทำงานของเอนไซม์บางชนิดต้องอาศัยโคแฟกเตอร์ในการเร่งปฏิกิริยา โคแฟกเตอร์เป็นโมเลกุลของสารอนินทรีย์หรือสารอินทรีย์ที่ไม่ใช่โปรตีน เอนไซม์ประเภทดังกล่าวจะไม่แอกติฟถ้าปราศจากโคแฟกเตอร์ เรียกเอนไซม์ที่ไม่แอกติฟนั้นว่า apoenzyme เมื่อรวมกับโคแฟกเตอร์แล้วจึงจะแอกติฟและสามารถทำงานได้ เรียกเอนไซม์ที่แอกติฟหลังจากรวมกับโคแฟกเตอร์แล้วว่า holoenzyme

โคแฟกเตอร์ที่เป็นสารอนินทรีย์ได้แก่พวกแคทไอออนของโลหะต่าง ๆ เช่น  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  ฯลฯ เป็นต้น ที่เป็นแอนไอออนก็มีบ้าง เช่น  $Cl^-$  ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ amylase โคแฟกเตอร์ที่เป็นสารอินทรีย์ได้แก่พวกโคเอนไซม์ต่าง ๆ โครงสร้างมักจะประกอบด้วยวิตามินที่ละลายน้ำได้ เช่น  $NAD^+$ , FAD, CoA~SH, biotin, lipoic acid, thiamine pyrophosphate เป็นต้น

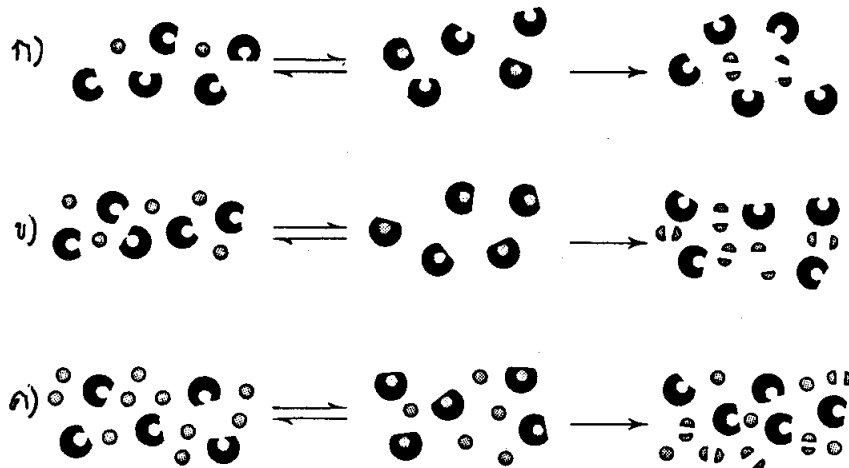
### ผลของความเข้มข้นซับสเตรทต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา (initial velocity)

ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์นั้น อัตราเร็วเริ่มต้นเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรทจนกระทั่งเมื่อถึงความเข้มข้นซับสเตรทค่าหนึ่ง อัตราเร็วจะคงที่และเป็นอัตราเร็วสูงสุด ( $V_{max}$ ) แม้ว่าเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรทให้มากขึ้นไปเพียงใดก็ตาม อัตราเร็วก็ไม่เพิ่มขึ้นกราฟระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นและความเข้มข้นซับสเตรทเป็นกราฟเส้นโค้งไฮเพอร์โบลา อาจเรียกว่า saturation curve เนื่องจากในช่วงที่กราฟขนานกับแกนอนั้นเป็นเวลาที่เอนไซม์ทุกโมเลกุลอยู่ในสภาพของ

คอมเพล็กซ์ ES เกิดความอึดตัวด้วยซับสเตรทที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซับสเตรทไม่สามารถเข้าไปจับที่บริเวณเร่งของโมเลกุลเอนไซม์ได้อีก จึงเป็นความสามารถของเอนไซม์ที่จะเร่งปฏิกิริยาด้วยอัตราเร็วสูงสุด ให้ค่า  $V_{max}$  จากจุดที่  $V = V_{max}/2$  บนแกนตั้งจะให้ค่าความเข้มข้นซับสเตรทค่าหนึ่งบนแกนนอนซึ่งมีค่าเท่ากับ  $K_m$  หรือ Michaelis-Menten Constant



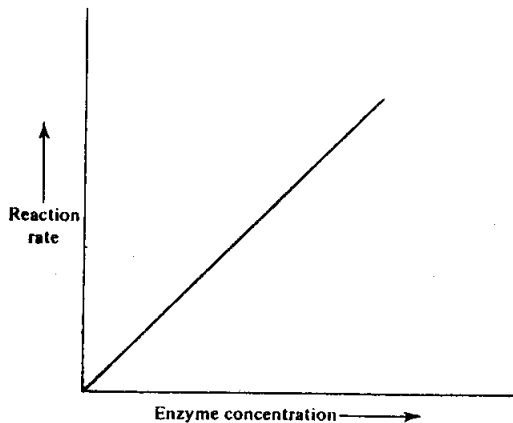
รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นซับสเตรทและอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ อาจเรียกว่ากราฟเส้นโค้งของ Michaelis-Menten หรือ saturation curve



รูปที่ 4.4 แผนภาพแสดงความเข้มข้นซับสเตรทต่าง ๆ กัน (ก) ความเข้มข้นซับสเตรทต่ำ (ข) ความเข้มข้นซับสเตรทที่พอเพียงแล้ว (ค) ความเข้มข้นซับสเตรทที่มากเกินไป สังเกตว่าให้ผลิตภัณฑ์ออกมาเท่ากับผลิตภัณฑ์ในกรณี (ข)

### ผลของความเข้มข้นเอนไซม์ต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา

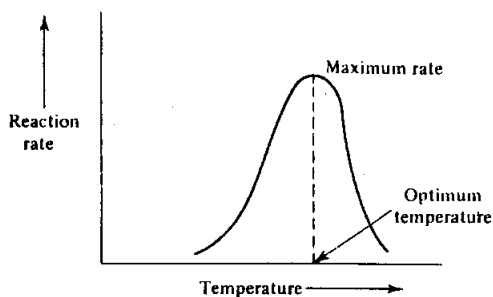
เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดหนึ่ง ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ในการเร่งปฏิกิริยานั้น ๆ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่ใช้จึงเล็กน้อยมากเมื่อเทียบกับความเข้มข้นซับสเตรท ทำให้อัตราเร็วปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเอนไซม์เสมอ



รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์ต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา

### ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาทางเคมีทั่ว ๆ ไปนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ 10°ซ อัตราเร็วจะเพิ่มขึ้นประมาณ 2-3 เท่า แต่สำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นมีขีดจำกัด อุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุดเรียกว่า optimum temperature ถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้อัตราเร็วปฏิกิริยาลดลงเนื่องจากความร้อนไปทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์จนไม่สามารถทำงานได้ดังเดิม



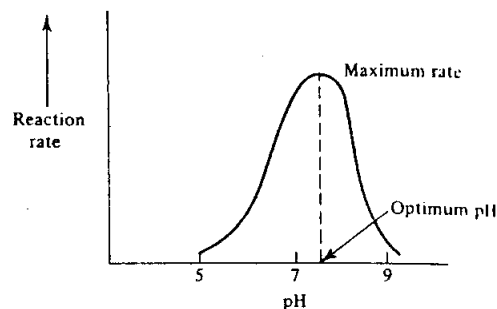
รูปที่ 4.6 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาของเอนไซม์

ความร้อนจะทำลายโครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างตติยภูมิ และโครงสร้างจตุรภูมิของเอ็นไซม์ เอ็นไซม์ของพวกสัตว์เลือดอุ่นมี optimum temperature ประมาณ 37°ซ หรือ 98°ฟ ที่อุณหภูมิ 0°ซ และ 100°ซ อัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เกือบจะเป็นศูนย์ ซึ่งจะเห็นได้จากการที่เราทำการสเตอริไลซ์เครื่องใช้ต่าง ๆ โดยการต้มของเหล่านั้นในน้ำเดือด เพื่อเป็นการทำลายสภาพธรรมชาติของเอ็นไซม์ของแบคทีเรียที่อาจจะติดมากับเครื่องใช้เหล่านั้น ๆ หรือการที่พวกสัตว์ต่าง ๆ มักจะหลบอยู่ในถิ่นฐานของตนในฤดูหนาวโดยเฉพาะเวลาที่มีหิมะตก อุณหภูมิร่างกายของสัตว์เหล่านั้นลดลงเป็นผลให้อัตราเร็วของขบวนการเมตาบอลิสมต่าง ๆ ลดตามไปด้วย สัตว์จึงมีชีวิตรอดอยู่ได้ด้วยอาหารที่สะสมไว้ตามเนื้อเยื่อ ซึ่งก็เพียงพอสำหรับวิถีเมตาบอลิสมขณะนั้นโดยมิต้องออกไปหาอาหารภายนอก

#### ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

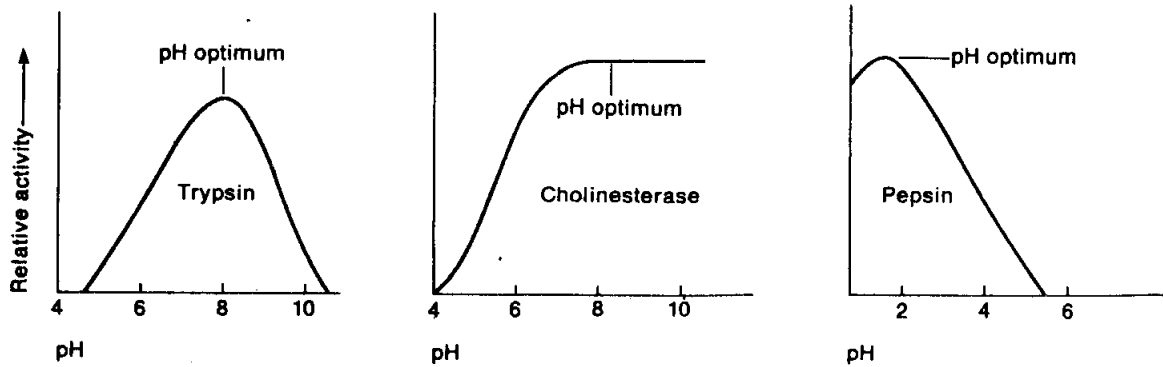
การเปลี่ยนแปลง pH จะมีผลต่อการแตกตัวของหมู่ R ที่เป็นเบสหรือแอซิดในโมเลกุลของเอ็นไซม์และซับสเตรท โดยเฉพาะถ้าหมู่ R ที่เป็นเบสหรือแอซิดนั้นอยู่ตรงบริเวณเร่งของเอ็นไซม์ การรวมตัวกันระหว่างเอ็นไซม์และซับสเตรทที่อาศัยพันธะไฮออนิกนั้นต้องการแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงกันข้าม เมื่อ pH เปลี่ยนไปประจุบนโมเลกุลเอ็นไซม์และประจุบนโมเลกุลซับสเตรทเปลี่ยนไปด้วย ทำให้สัมพรรคภาพ (affinity) ระหว่างเอ็นไซม์และซับสเตรทไม่ดีเหมือนเดิม pH ที่เปลี่ยนไปมีผลต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาด้วยเช่นกัน ถ้า pH สูงเกินไปหรือต่ำเกินไปจะทำลายสภาพธรรมชาติของโมเลกุลเอ็นไซม์

โดยทั่วไปแล้วกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และอัตราเร็วปฏิกิริยามักจะเป็นรูประฆังคว่ำ ซึ่งอาจจะสมมาตรหรือไม่สมมาตรก็ได้

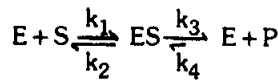


รูปที่ 4.7 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

Optimum pH ของเอนไซม์ไม่จำเป็นต้องเท่ากับ pH ภายในเซลล์หรือ pH ของร่างกาย ยกตัวอย่าง optimum pH ของเอนไซม์ pepsin ประมาณ 1-2 ก่อนข้างจะเป็นกรด ที่ pH ที่เป็นกลาง นอกจากเอนไซม์ pepsin จะไม่แอคทีฟแล้วยังจะถูกทำลายสภาพธรรมชาติโดยเร็วอีกด้วย



รูปที่ 4.8 optimum pH ของเอนไซม์ต่าง ๆ  
 จลนศาสตร์ของเอนไซม์



- เมื่อ [E] เป็นความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด
- [S] เป็นความเข้มข้นของซับสเตรท
- [ES] เป็นความเข้มข้นของคอมเพล็กซ์ ES ทั้งหมด
- [E] - [ES] เป็นความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระที่เวลาใด ๆ
- P เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

$k_1, k_2, k_3, k_4$  เป็นค่าคงที่ของอัตราเร็ว (rate constant) ในแต่ละขั้นตอน

(1) อัตราเร็วในการเกิดคอมเพล็กซ์ ES หรือ  $\frac{d}{dt} [ES] = k_1 [E] - [ES] [S]$  ค่า  $k_4$  น้อยมาก

ตัดทิ้งได้

(2) อัตราเร็วในการสลายตัวของคอมเพล็กซ์ ES หรือ  $-\frac{d}{dt} [ES] = (k_2 + k_3) [ES]$

ที่ steady state ความเข้มข้นของคอมเพล็กซ์ ES ไม่เปลี่ยนแปลง หรือ  $\frac{d}{dt} [ES] = 0$  นั้นเอง.

หมายความว่าสมการ (1) = สมการ (2)

$$k_1 [E] - [ES] [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E] [S] - [ES] [S]}{[ES]}$$



$$\text{เมื่อ } K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} - [S]$$

$$K_m + [S] = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$(3.) \quad [ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]}$$

$$(4.) \quad v = k_3[ES]$$

$$(5.) \quad [ES] = \frac{v}{k_3}$$

นำ (5) ไปแทนค่าใน (3)

$$(6.) \quad \frac{v}{k_3} = \frac{[E][S]}{K_m + [S]}$$

จากสมการ (4) ได้ว่า

$$(7.) \quad v_{\max} = k_3[E]$$

$[ES] = [E]$  หมายความว่าเอ็นไซม์ทุกโมเลกุลอยู่ในสภาพคอมเพล็กซ์ ES หมด บริเวณ  
เร่งของเอ็นไซม์ทุกโมเลกุลอิมตัวด้วยซับสเตรท ทำให้เอ็นไซม์มีอัตราเร็วของปฏิกิริยาขณะอิมตัวนี้  
เป็นอัตราเร็วสูงสุด

$$(6) \quad \frac{v}{k_3} \cdot \frac{1}{v_{\max}} = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \cdot \frac{1}{k_3[E]}$$

$$(7) \quad \frac{v}{v_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

สมการของ  
Michaelis-Menten

เมื่อ  $v$  = อัตราเร็วปฏิกิริยา

$v_{\max}$  = อัตราเร็วสูงสุด

$[S]$  = ความเข้มข้นซับสเตรท

$K_m$  = ค่าคงที่ Michaelis-Menten =  $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

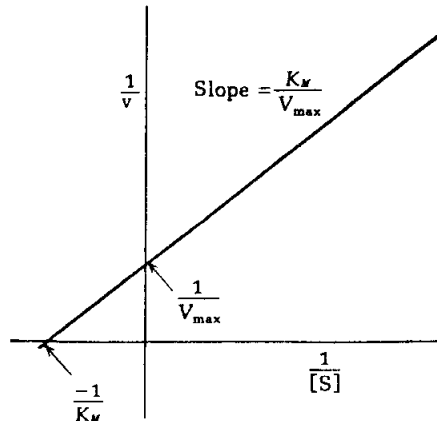
เมื่อนำสมการของ Michaelis-Menten มากลับเศษเป็นส่วนจะได้สมการของ Lineweaver

Burk คือ

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

เขียนกราฟระหว่าง  $\frac{1}{v}$  ทางแกนตั้งกับ  $\frac{1}{S}$  ทางแกนนอนจะได้กราฟเส้นตรง มีค่า slope

$$= \frac{K_m}{V_{max}} \text{ จุดตัดทางแกนตั้งคือ } \frac{1}{V_{max}} \text{ และจุดตัดทางแกนนอนคือ } -\frac{1}{K_m}$$



รูปที่ 4.9 กราฟของ Lineweaver-Burk

กราฟของ Lineweaver-Burk ให้ค่าพารามิเตอร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ถูกต้องและแน่นอนกว่ากราฟไฮเปอร์โบลิกของ Michaelis-Menten นอกจากนี้ยังใช้ศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบต่าง ๆ อีกด้วย

$K_m$  หรือค่าคงที่ Michaelis-Menten เป็นค่าพารามิเตอร์ที่ใช้บอกสัมพรรคภาพของการรวมตัวระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรท ค่า  $K_m$  ต่ำแสดงว่าสัมพรรคภาพการรวมตัวสูง E กับ S จับกันเป็นคอมเพล็กซ์ ES ได้ดี ค่า  $K_m$  สูงแสดงว่าสัมพรรคภาพการรวมตัวต่ำ E และ S มีแนวโน้มที่จะอยู่ในรูปเอนไซม์อิสระ E และซับสเตรท S มากกว่า ที่จะจับกันเป็นคอมเพล็กซ์ ES  $K_m$  นี้ มีหน่วยเป็นโมลาร์หรือมิลลิโมลาร์เช่นเดียวกับความเข้มข้นซับสเตรท

$V_{max}$  เป็นค่าที่บอกอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา มีหน่วยเป็นไมโครโมล/นาที

$K_m$  และ  $V_{max}$  เป็นค่าคงที่ที่สภาวะหนึ่ง ๆ เท่านั้น ค่านี้อาจเปลี่ยนไปถ้าเปลี่ยนซับสเตรท, pH และอุณหภูมิ

#### การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition)

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 แบบคือ

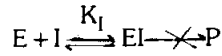
1. การยับยั้งชนิดทวนกลับได้ (reversible inhibition) แบ่งย่อยเป็น
  - 1.1 การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition)
  - 1.2 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด un-competitive

1.3 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive

2. การยับยั้งแบบถาวร ทวนกลับไม่ได้ (irreversible inhibition)

การยับยั้งแบบแข่งขัน

ตัวยับยั้ง (inhibitor) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายซับสเตรท จะแก่งแย่งกับซับสเตรทในการเข้าไปจับที่บริเวณเร่งเดียวกันของเอนไซม์ ถ้าซับสเตรทเข้าไปจับที่บริเวณเร่งนั้นแล้วตัวยับยั้งจะเข้าไปจับไม่ได้ หรือถ้าตัวยับยั้งเข้าไปจับที่บริเวณเร่งนั้นแล้วซับสเตรทก็จะเข้าไปจับไม่ได้เช่นกัน การยับยั้งชนิดนี้คอมเพล็กซ์ EI ไม่สามารถแตกตัวให้ผลิตผลออกมา



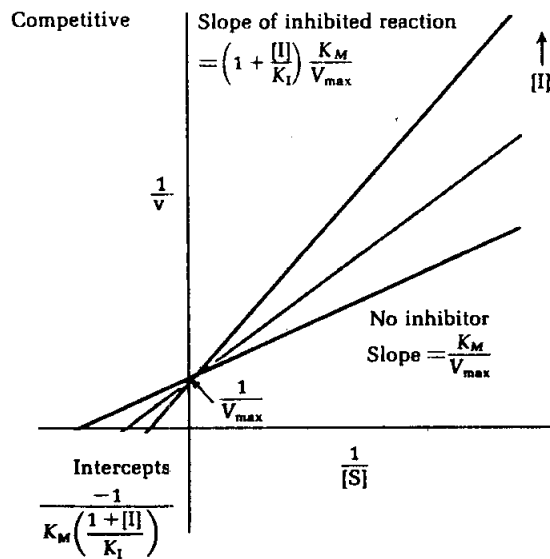
$K_I$  = ค่าคงที่ของตัวยับยั้ง (inhibitor constant)

ขนาดการยับยั้ง (degree of inhibition) ที่เกิดขึ้น ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ

$\frac{\text{ความเข้มข้นตัวยับยั้ง}}{\text{ความเข้มข้นของซับสเตรท}}$ ,  $K_I$  และ  $K_M$  การยับยั้งที่ทวนกลับ (reverse inhibition) ได้โดยการ

เพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรท

ผลการยับยั้งทำให้ค่า  $K_M$  สูงขึ้นแต่  $V_{max}$  คงเดิม แสดงว่าตัวยับยั้งจะไปลดสัมพรรคภาพระหว่างเอนไซม์และซับสเตรท



รูปที่ 4.10 กราฟของ Lineweaver-Burk แสดงการยับยั้งแบบแข่งขัน

ตัวอย่างตัวยับยั้งประเภทนี้ได้แก่

1. สารโคคาร์บอกซิลเลท เช่น malonate, oxaloacetate (OAA), oxalate และ glutarate เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันในปฏิกิริยาของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ซึ่งมี succinate เป็นซับสเตรท

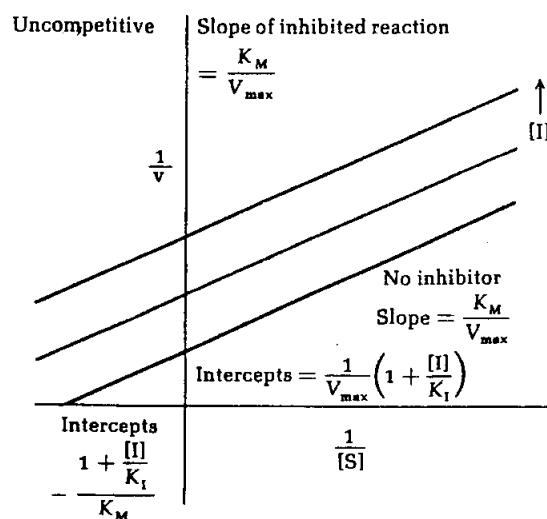
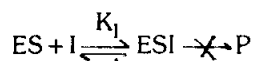
2. Muscarine เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันในปฏิกิริยาของเอนไซม์ acetylcholine esterase ซึ่งมี acetylcholine เป็นซับสเตรท

3. Fluorocitrate เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันในปฏิกิริยาของเอนไซม์ aconitase ซึ่งมี citrate เป็นซับสเตรท

4. EtOH เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันในปฏิกิริยาของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ซึ่งมี MeOH หรือ ethylene glycol เป็นซับสเตรท เป็นต้น

การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด Un-Competitive

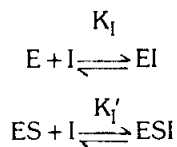
ตัวยับยั้งชนิดนี้จะจับกับคอมเพล็กซ์ ES ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเกิดผลิตภัณฑ์ออกมา การยับยั้งแบบนี้มีผลให้ค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ต่างก็ลดลง



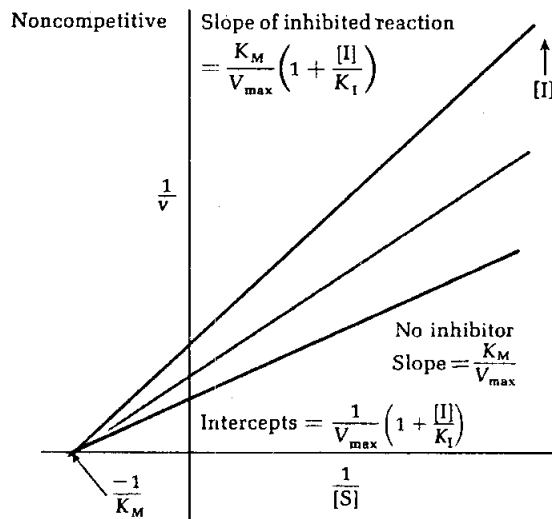
รูปที่ 4.11 กราฟของ Lineweaver-Burk แสดงการยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด Un-Competitive

**การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive**

ตัวยับยั้งจับกับเอ็นไซม์อิสระหรือคอมเพล็กซ์ ES ตรงตำแหน่งที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง ในกรณีนี้  $K_i$  และ  $K$  อาจจะเท่ากันหรือไม่เท่าก็ได้



การยับยั้งแบบนี้เกิดผลิตภัณฑ์ด้วยอัตราเร็วที่ช้ากว่าปกติ ไม่สามารถทวนกลับการยับยั้งนี้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรท

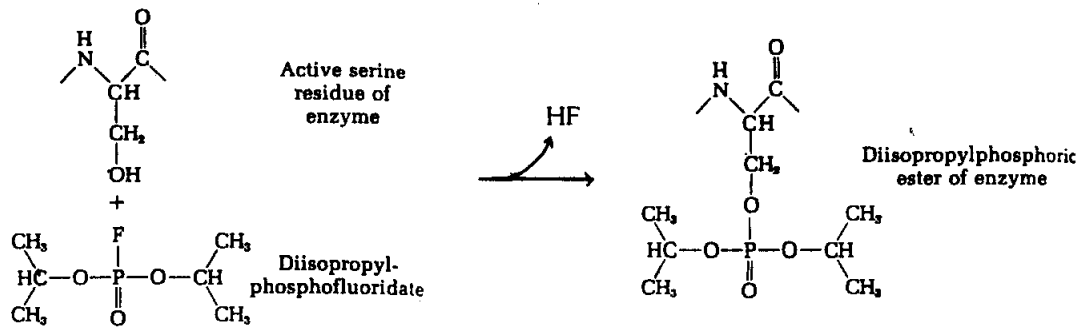


**รูปที่ 4.12** กราฟของ Lineweaver-Burk แสดงการยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive

ตัวอย่างของตัวยับยั้งประเภทนี้ ได้แก่ EDTA (ethylenediaminetetraacetate) สารหนู ไอออนของโลหะหนักเช่น  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $CN^-$  และ  $CO$  เป็นต้น

**การยับยั้งแบบถาวร**

ตัวยับยั้งประเภทนี้จะจับกับเอ็นไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ ทำให้โมเลกุลของเอ็นไซม์ไม่แอคทีฟเป็นการยับยั้งแบบถาวร ตัวอย่างเช่น สาร diisopropyl phosphofluoridate จับกับเอ็นไซม์ที่มีกรดอะมิโนเซอร์ริโนอยู่ที่บริเวณเร่ง ทำให้เอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาไม่ได้อีกต่อไป



รูปที่ 4.18 ปฏิกิริยาระหว่าง diisopropyl phosphofluoridate กับกรดอะมิโนเซอร์รีน ที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์

ตารางที่ 4.1 เอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่มีกรดอะมิโนเซอร์รีนอยู่ตรงบริเวณเร่งของเอ็นไซม์นั้น ๆ

Chymotrypsin	-Gly-Asp- <u>Ser</u> -Gly-Gly-
Trypsin	-Gly-Asp- <u>Ser</u> -Gly-Pro-
Thrombin	-Asp- <u>Ser</u> -Gly-
Elastase	-Gly-Asp- <u>Ser</u> -Gly-
Phosphoglucomutase	-Thr-Ala- <u>Ser</u> -His-Asp-
Phosphorylase	-Glu-Ile- <u>Ser</u> -Val-Arg-

ตัวอย่างของตัวยับยั้งอื่น ๆ เช่น สารประกอบ organophosphorous ทั้งหลายและ thiol alkylating agent เช่น iodoacetate iodoacetamide สารสองตัวนี้ทำปฏิกิริยากับหมู่ไทออลตรงบริเวณเร่งของเอ็นไซม์

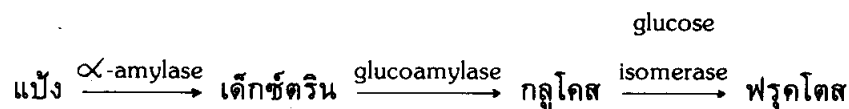
ตารางที่ 4.2 สารพิษต่าง ๆ ที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์หรือโปรตีน

สารพิษ	เอ็นไซม์หรือโปรตีนที่ถูกยับยั้ง
Cyanide	cytochrome oxidase
	catalase
Fluoride	enolase
Sulfide	phenolase
Arsenate	Phosphotransacetylase

Botulinum toxin	ยับยั้งการหลั่งสาร acetylcholine จากปลายประสาท
Carbon monoxide	รวมตัวกับฮีโมโกลบินในเลือด ยับยั้งการขนส่งออกซิเจน
Cholera toxin	ยับยั้งขั้นตอนการควบคุมการสังเคราะห์ c-AMP ทำให้ผลิต c-AMP ออกมามากเกินไป

### เอ็นไซม์ในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหาร

ปัจจุบันเอ็นไซม์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในขบวนการทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหารและสิ่งบริโภค เช่น ในการผลิตน้ำหวาน น้ำเชื่อม น้ำผลไม้ ผลไม้กระป๋อง เครื่องดื่มที่บรรจุก๊าซ ฯลฯ โรงงานที่ผลิตจะใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นสารให้ความหวาน เนื่องจากฟรุคโตสมีรสหวานกว่าซูโครสและกลูโคส ขบวนการผลิตอาศัยเอ็นไซม์สามชนิดด้วยกัน ดังนี้คือ



เริ่มต้นด้วยการย่อยแป้งให้โมเลกุลเล็กลงก่อนโดยใช้เอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเด็กซ์ตริน จากนั้นไฮโดรไลซ์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสโดยเอ็นไซม์ glucoamylase และเปลี่ยนต่อไปเป็นไอซอเมอร์ของกลูโคสคือฟรุคโตสโดยใช้เอ็นไซม์ glucose isomerase ขบวนการนี้สามารถผลิตน้ำหวานที่มีฟรุคโตสมากได้เป็นปริมาณมากกว่าพันล้านปอนด์ในแต่ละปี

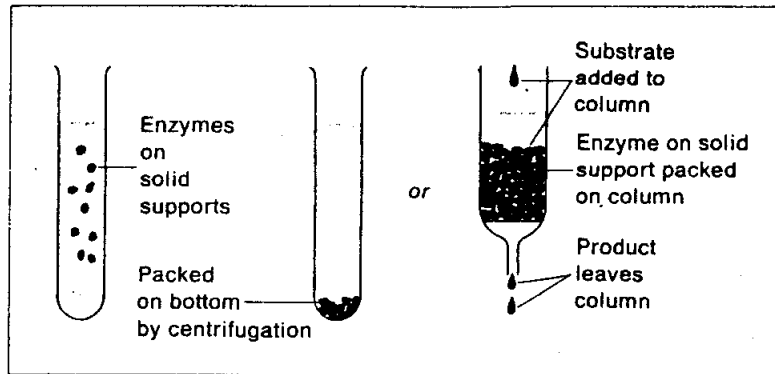
ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง จะใช้เอ็นไซม์ rennin สกัดจากกระเพาะอาหารลูกวัว (calf stomach) หรือสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ในการตกตะกอนโปรตีนเคซีนออกจากร้านนมก่อนที่จะนำไปผ่านกรรมวิธีอย่างอื่นต่อไป

การตกผลึกน้ำตาลซูโครสออกจากน้ำเชื่อมที่ได้จากหัวผักกาด (beet sugar syrup) มักจะมีปัญหาเกี่ยวกับไตรแซคคาไรด์ราฟิโนส (raffinose) ปนมาซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ โดยเฉพาะหัวผักกาดที่เก็บไว้ในที่มีอากาศหนาวปริมาณราฟิโนสจะเพิ่มสูงขึ้น มีการใช้เอ็นไซม์  $\alpha$ -galactosidase เปลี่ยนน้ำตาลราฟิโนสในน้ำเชื่อมนั้นไปเป็นน้ำตาลกาแลคโตสและซูโครส

การผลิตกาแฟหรือน้ำผลไม้หรือเหล้าองุ่น จำเป็นต้องใช้เอ็นไซม์ประเภท pectinolytic enzymes ในการย่อยโพลีแซคคาไรด์ที่ปนมาในรูป polyuronide (โพลีเมอร์ของ uronic acid) เพื่อป้องกันมิให้น้ำผลไม้ขุ่นหรือขจัดสิ่งที่ไม่ต้องการในกาแฟออกไป

การใช้เอ็นไซม์ในอุตสาหกรรมนี้ จะต้องมียุทธวิธีที่จะนำเอ็นไซม์กลับมาใช้ได้อีกหลาย ๆ ครั้ง ตลอดจนหาทางป้องกันมิให้เอ็นไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ความพยายามในการที่จะแก้ปัญหาดังกล่าวก็โดยการเติมสารที่จะไปเชื่อมโยง

และช่วยยึดโมเลกุลเอ็นไซม์ไว้ให้อยู่ในแบบแผนของโมเลกุลที่ถูกต้องและแข็งแรงกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติ เป็นการยึดอายุการทำงานของเอ็นไซม์ วิธีการที่จะนำเอาเอ็นไซม์กลับมาใช้อีก ก็โดยการนำเอ็นไซม์ไปจับกับอนุภาคขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำ อนุภาคนี้อาจทำหน้าที่เป็น solid support เมื่อนำเอ็นไซม์นี้ไปทำปฏิกิริยากับซับสเตรทแล้วสามารถนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกอนุภาคที่มีเอ็นไซม์นั้นออกมาจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ หรืออาจจะนำอนุภาคที่มีเอ็นไซม์นั้นมาบรรจุลงในคอลัมน์ (column) แล้วผ่านซับสเตรทลงไป คอยเก็บผลิตภัณฑ์ที่ออกไปจากคอลัมน์ก็ได้เช่นกัน



รูปที่ 4.14 วิธีการนำเอ็นไซม์กลับมาใช้ได้ อีก โดยการนำเอ็นไซม์ไปจับกับอนุภาคขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำ เพื่อให้เป็น solid support

ในอนาคตมีแนวโน้มที่จะนำเอ็นไซม์มาใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางออกไปยิ่งขึ้นอีก ลองมาพิจารณาในสิ่งที่จะเป็นไปได้กล่าวคือ ถ้าหากมีการเตรียมเอ็นไซม์ cellulase ที่มีเสถียรภาพพอมนุษย์จะสามารถย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสสารที่ให้พลังงานแก่สิ่งมีชีวิต กากเซลลูโลสที่ไม่มีประโยชน์ในรูปของเศษกระดาษ ฟ้าย ไม้ ไบโม่ไบโอบัก กากพืชผักทางเกษตรกรรม ฯลฯ ซึ่งมีอยู่มากมายในขณะนี้ จะกลายเป็นสิ่งที่มีคุณค่าขึ้นมาทันที น้ำตาลกลูโคสที่คาดว่าจะได้นั้น เมื่อนำไปผ่านกรรมวิธีการหมักให้เป็นเอธานอลสามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิง กลูโคส 12.8 ปอนด์จะให้แอลกอฮอล์ประมาณ 1 แกลลอน นับว่าเป็นการแก้ปัญหาทั้งทางด้านพลังงานและด้านการกำจัดเศษของที่จะทิ้ง

#### การหาแอกติวิตีของเอ็นไซม์ (Enzyme assays)

ห้องทดลองตามโรงพยาบาลต่าง ๆ จะต้องมีการประจำคือ การตรวจตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อของคนไข้เป็นจำนวนมาก เพื่อหาปริมาณเอ็นไซม์ในตัวอย่างเหล่านั้นแล้วนำไปวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง ในการสกัดเอ็นไซม์และการทำให้บริสุทธิ์ก็เช่นกัน เมื่อเสร็จสิ้นแต่ละขั้นตอนของการทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์ จะต้องตรวจสอบหาปริมาณเอ็นไซม์ว่ามีมากน้อยเพียงใด การหา



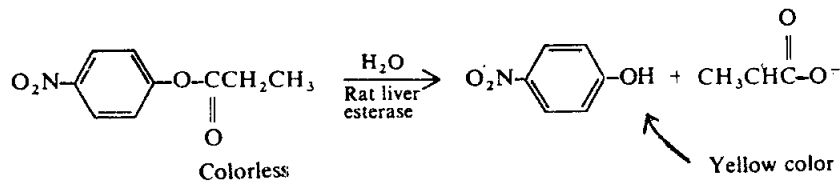
ปริมาณเอนไซม์กระทำได้โดยการหาแอกติวิตีของเอนไซม์ซึ่งค่านี้ขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ที่แอกติฟ

ก่อนที่จะหาแอกติวิตี จำเป็นที่จะต้องรู้เกี่ยวกับสิ่งต่อไปนี้

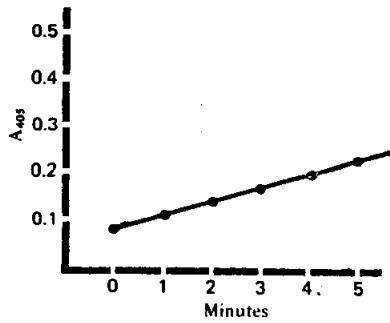
1. Stoichiometry ของปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้น ๆ
2. โคแฟกเตอร์ที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยา
3. สัมพรรคภาพระหว่างเอนไซม์และซับสเตรท ( $K_m$ )
4. Optimum pH
5. Optimum temperature
6. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณซับสเตรทที่หายไปหรือปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น

การหาแอกติวิตีนั้นจะใช้ความเข้มข้นซับสเตรทและความเข้มข้นโคแฟกเตอร์ค่อนข้างสูงเพื่อให้อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์เพียงอย่างเดียว การวัดแอกติวิตีโดยการติดตามปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นจะให้ค่าถูกต้องกว่าการติดตามปริมาณซับสเตรทที่หายไป การวัดแอกติวิตีจะยิ่งสะดวกถ้าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นสารมีสีหรือสามารถดูดแสงได้ในช่วง UV เครื่องมือที่ใช้คือสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

ตัวอย่างเช่นการหาแอกติวิตีของเอนไซม์ esterase จากตับหนู



ซับสเตรทเป็นเอสเทอร์ที่ไม่มีสี ถูกไฮโดรไลซ์ตรงตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ให้ผลิตภัณฑ์เป็น propionic acid และ p-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง ติดตามแอกติวิตีโดยวัดการดูดแสงที่เพิ่มขึ้นที่ 405 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างการดูดแสงที่ 405 นาโนเมตร ( $A_{405}$ ) ทางแกนตั้งกับเวลาทางแกนนอน จะได้กราฟเส้นตรง จากกราฟนี้คำนวณหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้ ( $\Delta A_{405}/\text{นาที}$ )



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงการหาแอกติวิตีของเอ็นไซม์ esterase จากตับหนู

การหาแอกติวิตีแต่ละครั้ง ควรจะบ่งความเข้มข้นของสารตั้งต้นสถานะที่ใช้ในการทดลองไว้ให้ชัดเจน นั่นคือต้องบอกความเข้มข้นซับสเตรท ความเข้มข้นเอ็นไซม์ ความเข้มข้นโคแฟกเตอร์ อุณหภูมิและ pH

เอ็นไซม์ 1 ยูนิต (one international unit) หมายถึงปริมาณเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาทีที่สภาวะจำกัดอันหนึ่ง

Specific activity มีหน่วยเป็น ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน หรือไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้นจะมีค่า specific activity สูงขึ้น

Yield (percent) ของขั้นตอนแรกในวิธีการทำให้บริสุทธิ์คิดเป็น 100% ส่วน yield ของขั้นตอนต่อไปคิดจาก

$$\frac{\text{ปริมาณยูนิตทั้งหมดของขั้นตอนนั้น}}{\text{ปริมาณยูนิตทั้งหมดของขั้นตอนแรก}} \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{เช่น yield ของขั้นตอนที่ 2 ในตารางที่ 4.3} &= \frac{4800}{5000} \times 100 \\ &= 96\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ของขั้นตอนที่ 3 ในตารางที่ 4.3} &= \frac{2730}{5000} \times 100 \\ &= 54.6\% \\ &= 55\% \end{aligned}$$

เอ็นไซม์ยิ่งบริสุทธิ์ขึ้นเท่าใด percent yield ที่ได้ก็ยิ่งน้อยลง

ตารางที่ 4.8 ตัวอย่างขั้นตอนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์

Step	Protein			Enzyme		
	Volume of Fraction (ml)	Conc. (mg/ml)	Total Amount (mg)	Conc. (units/ml)	Total Amount (units)	Purification Factor (Fold)
Crude cell-free extract	1000	12	12,000	5	5000	"1.00"
<i>Heat step: 50°C for 5 min, then remove denatured protein</i>						
	1000	8	8,000	4.8	4800	1.44
<i>Ammonium sulfate precipitation: 30-50% saturation fraction</i>						
	250	3	750	11.0	2730	8.83
<i>Ion-exchange chromatography: DEAE-Sephadex: elution via pH gradient. Fractions 50-60, 5 ml each, pooled, dialyzed, and concentrated</i>						
	25	9	225	88	2200	44
<i>Ion exchange chromatography: DEAE-Sephadex: elution via KCl gradient. Fractions 21-31, 2 ml each, pooled and concentrated</i>						
	5	7	35	364	1820	36.4
<i>Gel filtration: BioGel P-100. Fractions 30-40, 1 ml each, pooled</i>						
	10	0.92	9.2	170	1700	34
<i>Hydroxyl apatite chromatography: elution via phosphate buffer gradient. Fractions 15-18, 1 ml each, pooled</i>						
	4	0.75	3	375	1500	30
						1200

Purification factor เป็นตัวเลขที่บอกว่าในขั้นตอนนั้น ๆ เอ็นไซม์บริสุทธิ์ขึ้นเป็นกี่เท่า  
ของความบริสุทธิ์ในขั้นตอนแรก คัดจาก

$\frac{\text{specific activity ของขั้นตอนนั้น}}$

$\text{specific activity ของขั้นตอนแรก}$

โดยถือว่า purification factor ของขั้นตอนแรกเท่ากับ 1

$$\text{เช่น purification factor ของขั้นตอนที่ 2 ในตารางที่ 4.3} = \frac{0.6}{0.416}$$

$$= 1.44$$

$$\text{purification factor ของขั้นตอนที่ 3 ในตารางที่ 4.3} = \frac{3.67}{0.416}$$

$$= 8.83$$

#### การทดลอง

##### การทดลองที่ 4.1 การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

หลักการ ปฏิกิริยาการสลายตัวของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  ไปเป็นน้ำและออกซิเจนอาจจะใช้ตัวเร่งอินทรีย์ colloidal platinum หรือตัวเร่งอินทรีย์เอ็นไซม์ catalase การทดลองนี้จะเปรียบเทียบการเร่งทั้งสองวิธีที่กล่าวมา ติดตามอัตราเร็วการสลายตัวของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  โดยการไตเตรทกับ potassium permanganate ใช้  $\text{Mn}^{+2}$  เป็นตัวเร่งในการไตเตรทนี้

สารเคมี  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM

\*sodium หรือ potassium phosphate buffer 50 mM pH 7.2

สารละลายเอ็นไซม์ catalase 0.2 ไมโครกรัม/มล.

Colloidal platinum 20 ไมโครกรัม/มล.

HCl 5 mM

$\text{MnCl}_2$  0.1 mM

สารละลายมาตรฐาน  $\text{KMnO}_4$  2 mM

KCN 10 mM (ระวัง สารนี้เป็นพิษ ห้ามเปิดขวดโดยใช้ปากดูด)

บิวเรตต์ 25 มล.

อ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C

อ่างน้ำแข็ง

**วิธีการ** เตรียมหลอดทดลอง 5 หลอด แต่ละหลอดประกอบด้วยสารต่อไปนี้คือ

น้ำ 3 มล.

phosphate buffer 50 mM, pH 7.2 1 มล.

ตัวเร่ง catalase หรือ colloidal platinum 1 มล.

นำทั้ง 5 หลอดที่มีของผสมเหล่านี้ไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37° เป็นเวลา 5 นาที เริ่มต้นปฏิกิริยาการเร่งด้วยการเติม  $H_2O_2$  5 มล. ทุกหลอด หยิบหลอดทดลองที่หนึ่ง, สอง, สาม, สี่, และห้าออกจากอ่างน้ำอุณหภูมิ 37° เมื่อเวลาผ่านไป 3, 6, 9, 12 และ 15 นาทีตามลำดับ รีบเติม 5 mM HCl 5 มล. ทุก ๆ หลอดทันทีที่หยิบหลอดนั้น ๆ ออกจากอ่าง เพื่อเป็นการหยุดยั้งแอคติวิตีของตัวเร่ง นำทุกหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 2 mM  $KMnO_4$

ก่อนการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 2 mM  $KMnO_4$  ให้หยด 0.1M  $MnCl_2$  ลงไป 2 หยดแล้วไตเตรทจนกระทั่งเป็นสีชมพูจาง เนื่องจาก  $H_2O_2$  ไม่ค่อยเสถียรจะสลายตัวได้เองบ้าง (spontaneously break down) ถึงแม้ไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยาก็ตาม ดังนั้นในการทดลองจึงต้องมีหลอดเปรียบเทียบซึ่งมีแต่น้ำ, บัฟเฟอร์,  $H_2O_2$  ด้วย ตัวเลขที่ได้จากการไตเตรทเมื่อห้กลับตัวเลขของหลอดเปรียบเทียบออกแล้วนำไปเขียนกราฟหาอัตราเร็วการสลายตัวของ  $H_2O_2$  ของทั้งสองวิธี (หาจากค่า slope) ให้บอกเป็นหน่วยของไมโครโมล  $H_2O_2$  ที่สลายไป/นาที/มิลลิกรัมตัวเร่งและหน่วยของไมโครโมล  $H_2O_2$  ที่หายไป/นาที/ไมโครโมลตัวเร่ง เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเร่งของเอ็นไซม์ catalase และ colloidal platinum

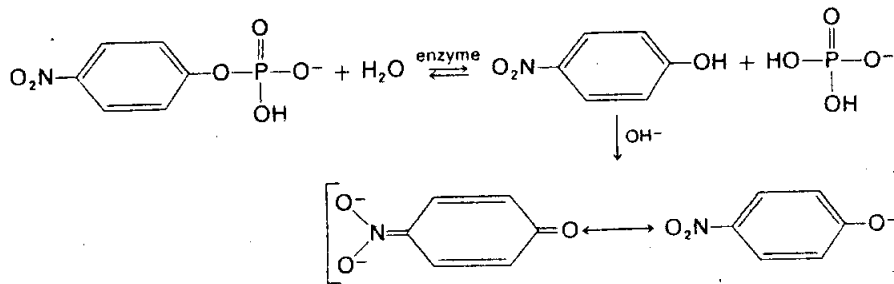
กำหนดให้ น้ำหนักอะตอม platinum = 195

น้ำหนักโมเลกุล catalase = 25,000

ทำการทดลองซ้ำเช่นเดิมกับตัวเร่งทั้งสองชนิด แต่ครั้งนี้ใส่ 10 mM KCN 1 มล. แทนปริมาณน้ำ 1 มล. วิจัยผลที่เกิดขึ้น

**การทดลองที่ 4.2** ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส p-nitrophenyl phosphate โดยเอ็นไซม์ alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1)

**หลักการ** เอ็นไซม์ alkaline phosphatase พบมากในกระดูก ไต ตับ และลำไส้เล็ก ทำปฏิกิริยากับฟอสฟอริคเอสเทอร์ให้ฟอสเฟตอินทรีย์ optimum pH ประมาณ 9-10 การทดลองนี้ p-nitrophenyl phosphate เป็นซับสเตรทไม่มีสี เมื่อถูกไฮโดรไลซ์โดยเอ็นไซม์ในสภาวะที่เป็นต่างได้ผลิตภัณฑ์ p-nitrophenol สีเหลือง นำไปวัดการดูดแสงที่ 405 นาโนเมตร



**สารเคมี** \*sodium carbonate-bicarbonate buffer 0.1 M pH 10.0

สารละลายของซับสเตรท p-nitrophenyl phosphate 5 mM ในบัฟเฟอร์ ควรเตรียมใช้ใหม่ ๆ

\*สารละลายมาตรฐาน p-nitrophenol 50  $\mu\text{M}$

ซีรัม

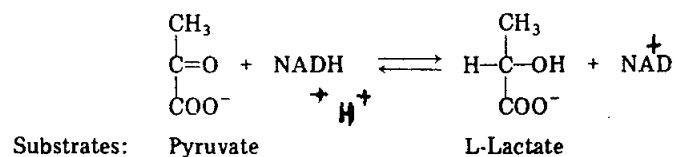
เครื่องมือวัดการดูดแสงสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

**วิธีการ** ผสม carbonate-bicarbonate buffer 0.8 มล. กับสารละลายซับสเตรท 2 มล. ให้เข้ากันดี ที่เวลาศูนย์ (zero time) เติมซีรัม 0.2 มล. ติดตามแอกติวิตีของเอ็นไซม์โดยวัดการดูดแสงของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาต่าง ๆ กัน (นาที) หลอดเปรียบเทียบเติม 0.2 มล. บัฟเฟอร์แทน 0.2 มล. ซีรัม ใช้หลอดเปรียบเทียบนี้ในการปรับสเกลของเครื่องมือให้เป็นศูนย์ (set zero) เมื่ออ่านค่าการดูดแสงที่ 405 นาโนเมตรแล้วนำไปแปรค่าเป็นไมโครโมลของ p-nitrophenol จากกราฟมาตรฐาน เขียนกราฟแสดงแอกติวิตีของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ในซีรัมระหว่างไมโครโมลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับเวลา อ่านค่า slope แล้วบอกแอกติวิตีเอ็นไซม์เป็นยูนิต/มล. ซีรัม

กราฟมาตรฐาน : เตรียมสารละลายมาตรฐาน p-nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน นำไปวัดการดูดแสงที่ 405 นาโนเมตร ใช้บัฟเฟอร์ในการปรับสเกลให้เป็นศูนย์ เขียนกราฟระหว่างการดูดแสงและปริมาณสารเป็นไมโครโมล

**การทดลองที่ 4.3** โคเอ็นไซม์ Nicotinamide adenine dinucleotide ในปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ lactate dehydrogenase (L-lactate :  $\text{NAD}^+$  oxidoreductase, EC 1.1.1.27)

**หลักการ** ปฏิกิริยาออกซิเดชันในทางชีววิทยามักจะมีการดึงไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุล ซับสเตรทแล้วส่งต่อไปให้โคเอ็นไซม์  $\text{NAD}^+$  ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นไม่ได้ถ้าขาดโคเอ็นไซม์ถึงแม้ว่าจะมีทั้งเอ็นไซม์และซับสเตรทพร้อมอยู่แล้วก็ตาม



pyruvate ถูกรีดิวซ์เป็น lactate โดยเอ็นไซม์ lactate dehydrogenase มีโคเอ็นไซม์คือ reduced nicotinamide adenine dinucleotide เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นลงแล้วปริมาณ pyruvate ส่วนที่เหลือจะเข้าทำปฏิกิริยากับ 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNP) ที่เติมลงไปให้ผลิตภัณฑ์ hydrazone ที่มีสี นำไปวัดการดูดแสงที่ 510 นาโนเมตร ก็จะทราบถึงปริมาณ pyruvate ที่เปลี่ยนไปเป็น lactate

**สารเคมี** sodium phosphate buffer 0.1 M pH 7.4

\*sodium pyruvate 100 ไมโครกรัม/มล.

reduced nicotinamide adenine dinucleotide 10 มิลลิกรัม/มล. ของบัฟเฟอร์ เตรียมใช้ใหม่ ๆ

\*2, 4- dinitrophenylhydrazine 2 mM,

NaOH 0.4 M

เอ็นไซม์ lactate dehydrogenase อาจจะใช้เอ็นไซม์ในซีรัมหรือเอ็นไซม์จากกล้ามเนื้อกระต่าย

อ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C

เครื่องมือวัดการดูดแสงสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

**วิธีการ** เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอดดังต่อไปนี้

	หลอด 1	หลอด 2	หลอดเปรียบเทียบ (B, blank)	หลอดควบคุม (C, control)
ซีบัสเตอร์ท pyruvate (มล.)	1	1	—	1
phosphate buffer (มล.)	—	0.1	1.1	0.2
รีดิวซ์โคเอ็นไซม์ (มล.)	0.1	—	—	—

นำทุกหลอดไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C เมื่ออุณหภูมิภายในหลอดทดลองเท่ากับ 37°C โดยประมาณ เติมเอ็นไซม์ 0.1 มล. ลงในสามหลอดแรก ยกเว้นหลอดควบคุม ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำนั้น 15 นาที เติม 2, 4-DNP ลงไปในทุกหลอด ๆ ละ 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติม NaOH 10 มล. เพื่อให้เกิดสี หลังจากนั้น 10 นาที นำไปวัดการดูดแสงที่ 510 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นในการปรับสเกลให้เป็นศูนย์

ปริมาณ pyruvate ที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ lactate ภายในเวลา 15 นาที

$$= \frac{\text{ค่าการดูดแสง (หลอด C-หลอด 1 หรือหลอด 2)}}{\text{ค่าการดูดแสง (หลอด C-หลอด B)}} \times 100 \text{ ไมโครกรัม}$$

**การทดลองที่ 4.4** การกระตุ้นเอ็นไซม์ alkaline phosphatase จากลำไส้เล็กลูกวัวโดยแมกนีเซียมไอออน





sodium oxalate 3 mM ใน phosphate buffer

sodium oxamate 15 mM ใน phosphate buffer

อ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C

เครื่องมือวัดการดูดแสงสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ต้องเป็นเครื่องมือที่มี thermostatically-heated cell housing)

**วิธีการ** เตรียมหลอดทดลองซึ่งประกอบด้วยสารละลายต่อไปนี้

สารละลาย	มิลลิลิตร
phosphate buffer	2.5
NADH	0.1
เอ็นไซม์ lactate dehydrogenase ที่เจือจางแล้ว	0.3

นำหลอดไปแช่ไว้ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เติม sodium pyruvate ซึ่งแช่ไว้ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C เช่นกันลงไป 0.1 มล. แล้วรีบเทสารละลายทั้งหมดใส่ลงในคิวเวตต์ (cuvette) นำไปวัดการดูดแสงที่ 340 นาโนเมตร เจือจางเอ็นไซม์จนกระทั่งได้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ทำให้การดูดแสงเปลี่ยนไป 0.05-0.10 ภายในเวลา 1 นาที

การวัดค่าคงที่ Michaelis-Menten,  $K_m$  : เจือจางสารละลาย sodium pyruvate ลงไป 10 เท่า แล้วทำการทดลองเหมือนตอนแรกโดยใช้ปริมาตรซับสเตรตต่าง ๆ กันแต่อยู่ในช่วง 0.1-1.0 มล. เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยา ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 3 มล. โดยการเปลี่ยนปริมาตรบัฟเฟอร์ เขียนกราฟระหว่างการดูดแสงที่ 340 นาโนเมตรกับเวลา หาแอกติวิตีของเอ็นไซม์โดยการอ่านค่า slope เป็น  $\Delta A_{340}/\text{นาที}$  (การดูดแสงที่เปลี่ยนไปภายในเวลา 1 นาที)

ค่าสัมประสิทธิ์ molar extinction ของ NADH ที่ 340 นาโนเมตร,  $E_{1\text{cm}}^{1\text{M}} = 6.22 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  หมายความว่าสารละลายความเข้มข้น 1 โมล/ลิตรในคิวเวตต์ 1 ซม. ให้ค่าการดูดแสง =  $6.22 \times 10^3$  หรืออาจพูดได้ว่าสารละลายความเข้มข้น 1 ไมโครโมล/มล. ให้ค่าการดูดแสง = 6.22

ค่าการดูดแสง 6.22 นี้เนื่องมาจาก NADH 1 ไมโครโมล/มล. แต่ปริมาตรทั้งหมด 3 มล. ดังนั้นค่าการดูดแสง 6.22 จึงเนื่องมาจาก NADH 3 ไมโครโมล

$$\begin{aligned} \text{ค่าการดูดแสง 6.22 เนื่องมาจาก NADH} &= 3 && \text{ไมโครโมล} \\ \text{ค่าการดูดแสง } \Delta A_{340}/\text{นาที} \text{ เนื่องมาจาก} &= \frac{3}{6.22} \times \Delta A_{340} && \frac{\text{ไมโครโมล}}{\text{นาที}} \\ \therefore \text{แอกติวิตีเอ็นไซม์} &= \frac{3}{6.22} \times \Delta A_{340} && \frac{\text{ไมโครโมล}}{\text{นาที}} \\ \text{ปริมาตรเอ็นไซม์ที่ใช้} &= 0.3 \text{ มล.} \end{aligned}$$

∴ แอคติวิตีเอ็นไซม์

$$= \frac{3}{6.22} \times \Delta A_{340} \times \frac{1}{0.3}$$
$$= \Delta A_{340} \times 1.61 \frac{\text{ไมโครโมล/นาที}}{\text{มล.}}$$

แต่ละความเข้มข้นของ sodium pyruvate จะให้ค่าแอกติวิตีแต่ละค่า นำไปเขียนกราฟของ Michaelis-Menten ระหว่าง V กับ S และเขียนกราฟของ Lineweaver-Burk ระหว่าง  $\frac{1}{V}$  กับ  $\frac{1}{S}$  หาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  จากกราฟนี้

ผลจากการยับยั้ง : ทำการทดลองใหม่อีกครั้งหนึ่งแต่คราวนี้ใส่ 0.1 มล. ของตัวยับยั้งลงไปด้วย ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 3 มล. โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของบัฟเฟอร์ คำนวณหาแอกติวิตีของเอ็นไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของซับสเตรทเมื่อมีตัวยับยั้งอยู่ด้วย นำไปเขียนกราฟของ Lineweaver-Burk ระหว่าง  $\frac{1}{V}$  กับ  $\frac{1}{S}$  เพื่อแสดงการยับยั้ง หาค่า  $K_m$ ,  $V_{max}$  แล้วเปรียบเทียบกับค่าที่ได้เมื่อไม่มีตัวยับยั้ง ให้ออกว่าการยับยั้งของสารสองตัวนี้เป็นการยับยั้งแบบใด คำนวณหาค่าคงที่ของตัวยับยั้ง ( $K_i$ ) ในทั้งสองกรณีด้วย

การทดลองที่ 4.6 การหา optimum temperature ของเอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase

หลักการ เอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคซิดิกแบบ  $\times 1-4$  ของโมเลกุลแป้ง ให้ผลิตผลเป็นน้ำตาลที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ น้ำตาลนี้สามารถรีดิวซ์ 3, 5-dinitrosalicylate reagent ที่เติมลงไปเป็น 3-amino-5-nitrosalicylate ที่มีสี นำไปวัดการดูดแสงที่ 540 นาโนเมตร

นักศึกษาแต่ละหมู่ทำการทดลองนี้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

สารเคมี sodium หรือ potassium phosphate buffer 0.1 M pH 6.7

\* สารละลายแป้งในบัฟเฟอร์ 5 มิลลิกรัม/มล.

NaCl 10 กรัม/ลิตร

เอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase เจือจางให้พอเหมาะ

NaOH 2 M

\* sodium potassium tartrate

\* 3, 5-dinitrosalicylate

\* 3, 5-dinitrosalicylate reagent

อ่างน้ำอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

เครื่องมือวัดการดูดแสงสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการ เตรียมหลอดทดลองที่มีสารละลายต่อไปนี้ไว้ 8 หลอด

สารละลายแป้ง 2.5 มล.

Phosphate buffer 1.0 มล.

NaCl 0.5 มล.

นำทุกหลอดไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิที่ต้องการจะศึกษาเป็นเวลา 10 นาที เติมเอ็นไซม์ ซึ่งแช่ไว้ที่อุณหภูมิเดียวกันนี้ลงไป 0.5 มล. ในหลอดทดลอง 7 หลอด ส่วนหลอดที่ 8 เติมน้ำ 0.5 มล. เพื่อเป็นหลอดเปรียบเทียบ (blank) ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 นาที หยุดยั้งปฏิกิริยาเอ็นไซม์ไว้แค่นั้นโดยการเติม 2 M NaOH 0.5 มล. ลงในหลอด 1 ถึงหลอด 7 ตามเวลาที่บ่งไว้ แล้วเติม 3, 5-dinitrosalicylate reagent 0.5 มล. ลงในทุกหลอดตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำเดือด 5 นาทีทำให้เย็นก่อนนำไปอ่านค่าการดูดแสงที่ 540 นาโนเมตร ทั้งนี้เนื่องจากค่าการดูดแสงขึ้นกับอุณหภูมิ

เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดแสงที่อ่านได้กับระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยา หาแอกติวิตีของเอ็นไซม์ที่อุณหภูมินั้น ๆ เพื่อความสะดวกให้บอกเป็น  $\Delta A_{340}/\text{นาที}$  นำข้อมูลเกี่ยวกับแอกติวิตีของเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันจากนักศึกษาหมู่อื่นมาเขียนกราฟระหว่างแอกติวิตีของเอ็นไซม์กับอุณหภูมิ จากกราฟให้บอก optimum temperature ของเอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase

**การทดลองที่ 4.7** การหา optimum pH ของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase และเอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase  
หลักการ ดูหน้า 139-140

**สารเคมี** เหมือนการทดลองที่ 4.2 และการทดลองที่ 4.6 ตามลำดับ

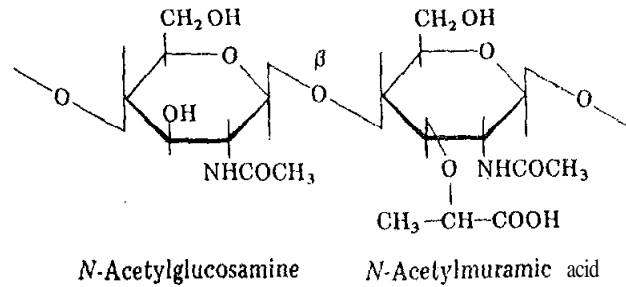
sodium carbonate-bicarbonate buffer 0.1 M ที่ pH 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 และ 11.0 สำหรับเอ็นไซม์ alkaline phosphatase sodium หรือ potassium phosphate buffer 0.1 M ที่ pH 5.8, 6.0, 6.4, 6.8, 7.0, 7.5 และ 8.0 สำหรับเอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase

**วิธีการ** การหา optimum pH ของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ให้ทำเหมือนการทดลองที่ 4.2 แต่เปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้ pH ต่าง ๆ กันไปตั้งกำหนดให้ไว้ข้างบนนำค่าแอกติวิตีของเอ็นไซม์ที่ pH ต่าง ๆ กันไปเขียนกราฟระหว่างแอกติวิตีกับ pH จากกราฟนี้ให้บอก optimum pH ของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase

การหา optimum pH ของเอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase ทำเหมือนการทดลองที่ 4.6 เปลี่ยน pH ของบัฟเฟอร์ให้ต่างออกไปตั้งกำหนดให้ เขียนกราฟระหว่างแอกติวิตีของเอ็นไซม์กับ pH เพื่อหาค่า optimum pH ของเอ็นไซม์  $\alpha$ -amylase

**การทดลองที่ 4.8** การสกัดเอ็นไซม์ muramidase (mucopeptide N-acetyl muramyl hydrolase, EC 3.2.1.17) จากไข่ขาว

หลักการ เอ็นไซม์ muramidase มีชื่อเรียกแบบเก่าว่า lysozyme เป็นโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ (14,300) isoelectric point 10.5 เอ็นไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกแบบ  $\beta$  1-4 ระหว่าง N-acetylmuramic acid กับ N-acetylglucosamine ในโมเลกุลมิวโคพัสตีเปปไทด์ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จะเห็นได้จากการที่นำเอ็นไซม์นี้ไปผสมกับสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่แช่แข็ง (suspension of freeze dried bacteria) เมื่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นความขุ่นของสารแขวนลอยแบคทีเรียจะลดน้อยลง ติดตามการไฮโดรไลซิสนี้โดยอ่านค่าการดูดแสงที่ 450 นาโนเมตร



### สารเคมี ไข่ไก่

ผ้ามีสลิน

HCl 0.1 M และ 1.0 M

ใยแก้ว

น้ำเกลือในบัฟเฟอร์ (0.5 M NaCl ใน 0.5 M Tris-EDTA pH 8.2)

CM-cellulose สำหรับเป็น cation exchange resin

sodium carbonate-bicarbonate buffer 0.2 M pH 10.5

NaCl

acetic acid 1 mM

สารละลายมาตรฐานอัลบูมิน 1 มิลลิกรัม/มล.

sodium หรือ potassium phosphate buffer 0.1 M pH 7.0

สารแขวนลอยของแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* ที่แช่แข็ง 0.3 มิลลิกรัม/มล.

ของ phosphate buffer เตรียมใช้ใหม่ ๆ

เครื่องมือวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

อ่างน้ำอุณหภูมิ 25°C หรือ 37°C

เครื่องมือเก็บแฟรคชันของเอ็นไซม์ (fraction collector)

สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV VIS)

**วิธีการ** การหาแอกติวิตีของเอ็นไซม์ muramidase : ปิเปตต์สารแขวนลอยแบคทีเรียที่ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำอุณหภูมิจำกัด 37°C 2.8 มล. (เขย่าก่อนปิเปตต์) ใส่ลงในคิวเวตต์ เติมนเอ็นไซม์ 0.2 มล. ผสมให้เข้ากันดีและวัดการดูดแสงที่ลดลงที่ 450 นาโนเมตร หาแอกติวิตีของเอ็นไซม์จากกราฟ ให้บอกเป็นไมโครกรัมแบคทีเรียที่ถูกไฮโดรไลซ์ภายใน 1 นาที

**การหาปริมาณโปรตีน** : เตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin โดยวัดการดูดแสงที่ 280 นาโนเมตรเมื่อใช้อัลบูมินความเข้มข้นต่าง ๆ กันแต่อยู่ภายในช่วง 1 มิลลิกรัม/มล. การทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอนจะต้องหาปริมาณโปรตีน ซึ่งก็ใช้วิธีการวัดค่าการดูดแสงที่ 280 นาโนเมตรเช่นกันแล้วแปรค่าเป็นปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

**การทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์** : การทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอนจะต้องบันทึกผลในลักษณะที่เป็นตาราง (ตารางที่ 4.3 หน้า 151) ซึ่งประกอบด้วยค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ปริมาตรที่ได้ในแต่ละขั้นตอน (มล.)
2. ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม/มล.)
3. ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มล.×ปริมาตร)
4. ความเข้มข้นเอ็นไซม์ (ยูนิต/มล.)
5. ปริมาณเอ็นไซม์ (ยูนิต/มล.×ปริมาตร)
6. specific activity (ยูนิต/ปริมาณโปรตีนเป็นมิลลิกรัม)
7. purification factor  $\left( \frac{\text{specific activity ขั้นตอนนั้น}}{\text{specific activity ขั้นตอนแรก}} \right)$
8. percent yield  $\left( \frac{\text{ยูนิตเอ็นไซม์ขั้นตอนนั้น}}{\text{ยูนิตเอ็นไซม์ขั้นตอนแรก}} \times 100 \right)$

### 1. การสกัดเอ็นไซม์

ใช้เฉพาะไข่ขาวที่ได้มาจากไข่ไก่ 3 ฟอง กรองไข่ขาวนั้นด้วยผ้ามีสลิน เมื่อได้ฟิลเตรท (filtrate) ประมาณ 50 มล. ผสมกับน้ำ 100 มล. คนให้ทั่วแต่ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศเพราะจะทำให้เอ็นไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ แบ่งมา 2 มล. แช่ไว้ในน้ำแข็งเพื่อทำการหาแอกติวิตีของเอ็นไซม์และปริมาณโปรตีน

### 2. การตกตะกอน

ฟิลเตรทที่เหลือนำมาปรับ pH ให้เป็น 7.5 โดยการเติม 1 M และ 0.1 M HCl อย่างช้า ๆ ระวังอย่าให้ pH ต่ำกว่าที่ต้องการ กรองโปรตีนที่ตกตะกอนออกโดยผ่านกรวยกรองซึ่งมีใยแก้ว เติมน้ำเกลือในบัฟเฟอร์ลงในฟิลเตรทปริมาตรที่คำนวณแล้วว่าความเข้มข้น NaCl ในบัฟเฟอร์เป็น 0.05 M และความเข้มข้นของ tris-EDTA เป็น 0.05 M, pH เป็น 8.2 หลังจากเติมบัฟเฟอร์แล้ว (ปรับ pH ให้เป็น 8.2 ถ้าจำเป็น) จดบันทึกปริมาตรไว้ แบ่งมา 2 มล. แช่น้ำแข็งไว้เพื่อทำการหา

แอกติวิตีของเอ็นไซม์และปริมาณโปรตีน

### 3. การเตรียม CM-cellulose ไว้สำหรับบรรจุลงในคอลัมน์โครมาโตกราฟี

แช่ CM-cellulose 10 กรัมด้วยน้ำเกลือในบัฟเฟอร์ที่เจือจางลงไป 10 เท่า คนเบา ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปบรรจุในคอลัมน์

ผ่านสารละลายเอ็นไซม์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ลงไปในคอลัมน์ ตามด้วยสารละลายเจือจางของน้ำเกลือในบัฟเฟอร์อีก 50 มล. ก่อนที่จะทำการชะด้วย 0.2 M sodium carbonate-bicarbonate buffer เก็บแฟรคชันต่าง ๆ ของเอ็นไซม์ที่ออกจากคอลัมน์แฟรคชันละ 10 มล. โดยเครื่องมือ fraction collector

หาปริมาณโปรตีนและปริมาณเอ็นไซม์ในแต่ละแฟรคชันแล้วเขียน elution profiles

### 4. การตกผลึก

เอ็นไซม์ muramidase เป็นบิลิคโปรตีนจะตกผลึกเป็นเกลือคลอไรด์, ไอโอไดด์, คาร์บอเนต ฯลฯ ได้ ภายใต้สภาวะที่พอเหมาะผลึกจะตกออกมาอย่างช้า ๆ และให้ yield มากที่สุดหลังจาก 3-4 วันผ่านไป

เมื่อรวบรวมแฟรคชันที่มีเอ็นไซม์เข้าด้วยกันแล้ว ปรับ pH เป็น 10.5 แล้วค่อย ๆ เติมน้ำ NaCl ลงไปคำนวณว่าความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 M NaCl ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 3-4 วัน เมื่อได้ผลึกแล้ว เท supernatant ออกไปทำการหมუნเหียงเพื่อให้ผลึกที่เกิดขึ้นตกลงมาให้หมด ละลายผลึกด้วย 1 มล. ของ 0.1 M acetic acid หมუნเหียงเอาส่วนที่ไม่ละลายทิ้งไป หาปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอ็นไซม์ตลอดจนค่าต่าง ๆ ดังในตารางที่ 4.3 หน้า 151.จนครบ ถ้ามีเวลาพอควรจะหาน้ำหนักโมเลกุลของเอ็นไซม์โดยใช้เทคนิคของ gel filtration ด้วย

---

### การเตรียมสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. sodium หรือ potassium phosphate buffer 50 mM pH 7.2 :

เตรียม 100 mM NaOH (หรือ 100 mM KOH) กับ 100 mM sodium dihydrogen phosphate (หรือ 100 mM potassium dihydrogen phosphate) เติมน้ำ 100 mM NaOH ลงไปใน 50 มล. ของ 100 mM sodium dihydrogen phosphate จนกระทั่ง pH เป็น 7.2 ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

#### 2. sodium carbonate-bicarbonate buffer. 0.1 M pH 10.0 :

เติมน้ำ 49 มล. ของ 0.1 M sodium bicarbonate ลงในโวลูมเมตริกฟลาสค์ขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วย 0.1 M sodium carbonate

3. สารละลายมาตรฐาน p-nitrophenol 50  $\mu$ M :  
ละลาย 69.6 มิลลิกรัมของ p-nitrophenol ใน sodium carbonate-bicarbonate buffer 0.1 M pH 10.0 ให้เป็น 100 มล. เจือจาง 100 เท่า ในเวลาจะใช้ เตรียมใช้ใหม่ ๆ
4. สารละลาย sodium pyruvate 100 ไมโครกรัม/มล. :  
ละลายสาร 0.5 กรัม ใน sodium phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 ให้เป็น 100 มล. เวลาจะใช้ให้ทำการเจือจางลงไป 50 เท่าด้วยบัฟเฟอร์
5. 2, 4-dinitrophenylhydrazine 2 mM :  
ละลายสาร 40 มิลลิกรัม ใน HCl เข้มข้น 9 มล. ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำ
6. สารละลายแป้งในบัฟเฟอร์ 5 มิลลิกรัม/มล. :  
ผสมแป้ง (soluble starch) 5 กรัมกับ sodium หรือ potassium phosphate buffer 0.1 M pH 6.7 ปริมาตร 50 มล. จนเป็นแป้งเหนียว เติมบัฟเฟอร์ที่ต้มเดือดลงไป 500 มล. ต้มต่อไปอีก 1 นาที ทำให้เย็นลงปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยบัฟเฟอร์
7. sodium potassium tartrate :  
ละลายสาร 300 กรัมในน้ำ 500 มล.
8. 3, 5-dinitrosalicylate :  
ละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid 10 กรัม ใน 200 มล. ของ 2 M NaOH
9. 3, 5-dinitrosalicylate reagent :  
ผสมสารละลาย sodium potassium tartrate กับ 3, 5-dinitrosalicylate ที่เตรียมไว้ทั้งหมด ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำ

### คำถามท้ายบท

1. ให้คำนิยามหรือคำจำกัดความของคำต่อไปนี้

เอนไซม์	optimum pH
apoenzyme	optimum temperature
holoenzyme	บริเวณควบคุม
enzyme specificity	บริเวณเร่ง
โคเอนไซม์	ตัวยับยั้ง

2. เอ็นไซม์มีคุณสมบัติอะไรที่แตกต่างไปจากตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีธรรมดา?
3. เอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่สมดุลใช้หรือไม่?
4. ทำไมเอ็นไซม์จึงเป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะมากกว่าตัวเร่งอนินทรีย์อื่น ๆ
5. เพราะเหตุใดสัตว์จึงย่อยอาหารประเภทแป้งได้แต่ย่อยเซลลูโลสไม่ได้?
6. อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างไวตามินและโคเอ็นไซม์
7. ชื่อเต็มของโคเอ็นไซม์  $NAD^+$  และ  $FAD$  คืออะไร?



8. อธิบายสั้น ๆ เกี่ยวกับแฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์
  
9. ท่านจะทราบได้อย่างไรว่าตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้น ๆ เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันหรือแบบไม่แข่งขันชนิด *non-competitive*?
  
10. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีกี่แบบ? อะไรบ้าง? อธิบายสั้น ๆ พอเข้าใจ
  
11. pH ในกระเพาะอาหารของผู้ใหญ่ประมาณ 1.5-2.0 แต่ pH ในกระเพาะอาหารเด็กทารกค่อนข้างจะเป็นกลาง ให้เปรียบเทียบปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์ *pepsin* ในกระเพาะอาหารของผู้ใหญ่และเด็ก
  
12. การย่อยลิปิดโดยเอนไซม์ *lipase* ในกระเพาะอาหารของผู้ใหญ่จะเป็นเช่นไร? ถ้าเอนไซม์ *lipase* แอคติฟที่ pH ค่อนข้างเป็นกลาง
  
13. ยางมะละกอทำให้เนื้อนุ่มเปื่อยได้อย่างไร?

14. เพราะเหตุใดจึงไม่ใช้สับประรดสดในการทำของหวานประเภทวุ้นที่ทำจากแผ่นเจลาติน (gelatin)

15. การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับ pH จากข้อมูลที่ได้มาแสดงให้เห็น degree of sensitivity ต่อการเปลี่ยนแปลง pH ของเอนไซม์ชนิดหนึ่ง จงหาค่า optimum pH ของเอนไซม์ชนิดนี้

เอนไซม์ยูนิต	24.8	33.0	66.7	56.2	41.3	27.5
pH	7.2	7.6	8.0	8.6	8.8	9.0

16. ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน  $I_1, I_2, I_3$  ความเข้มข้นเท่ากัน แต่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ต่างกัน ค่าคงที่ของตัวยับยั้งเป็นดังนี้

$$K_{I_1} = 0.1 \text{ mM}$$

$$K_{I_2} = 0.01 \text{ mM}$$

$$K_{I_3} = 1.0 \text{ mM}$$

อยากทราบว่าตัวยับยั้งใดที่มีผลการยับยั้งมากที่สุดและน้อยสุด?

17. อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเปลี่ยน  $A \rightarrow B$  โดยเอนไซม์เป็นดังนี้

[A]	อัตราเร็ว (ยูนิต/นาที)
$2 \times 10^{-4}$	0.16
$1 \times 10^{-3}$	0.25
$2 \times 10^{-2}$	0.5
$8 \times 10^{-2}$	0.5

ให้หาอัตราเร็วเริ่มต้นเมื่อ A เท่ากับ 5 mM ( $5 \times 10^{-3}M$ )

(คำตอบ : 0.42 ยูนิต/นาที)

18. ข้อมูลของการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ชนิดหนึ่ง

[S]	อัตราเร็ว (ยูนิต/นาที)
$1 \times 10^{-3}$	0.33
$4 \times 10^{-4}$	0.222
$2 \times 10^{-3}$	0.4

เขียนกราฟของ Lineweaver-Burk และหาค่า  $K_m$ ,  $V_{max}$

(คำตอบ :  $K_m = 5 \times 10^{-4}$  ;  $V_{max} = 0.5$  ยูนิต/นาที)

19. ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ซับซ้อนความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นดังนี้

[S]	อัตราเร็ว (ไมโครโมล/นาที)	
	ไม่มีตัวยับยั้ง	มีตัวยับยั้ง
$1.0 \times 10^{-4}$	56	36
$2.0 \times 10^{-4}$	86	60
$5.0 \times 10^{-4}$	126	102
$7.5 \times 10^{-4}$	148	126

การยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้เป็นแบบแข่งขันหรือแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive?

(คำตอบ : การยับยั้งแบบแข่งขัน)

20. ผลทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อมีตัวยับยั้งเป็นดังในตาราง

[S] M	อัตราเร็ว (ไมโครโมล/นาที)	
	ไม่มีตัวยับยั้ง	ตัวยับยั้ง $2 \times 10^{-3}$ M
$0.3 \times 10^{-5}$	10.4	4.1
$0.5 \times 10^{-5}$	14.5	6.4
$1.0 \times 10^{-5}$	22.5	11.3
$3.0 \times 10^{-5}$	33.8	22.6
$9.0 \times 10^{-5}$	40.5	33.8

ก) ให้หาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  เมื่อไม่มีตัวยับยั้งและเมื่อมีตัวยับยั้ง

ข) บอกชนิดการยับยั้งที่เกิดขึ้น

ค) หาค่าคงที่ของตัวยับยั้ง,  $K_i$

คำตอบ: ก)  $K_m$   $1.1 \times 10^{-5}M$ ,  $V_{max}$  47.6 ไมโครโมล/นาที เมื่อไม่มีตัวยับยั้ง ;  $K_m$   
 $3.1 \times 10^{-5}M$ ,  $V_{max}$  เหมือนเดิมเมื่อมีตัวยับยั้ง

ข) การยับยั้งแบบแข่งขัน

ค)  $1.1 \times 10^{-3}M$

