บทที่ 1
เอ็นไซม์

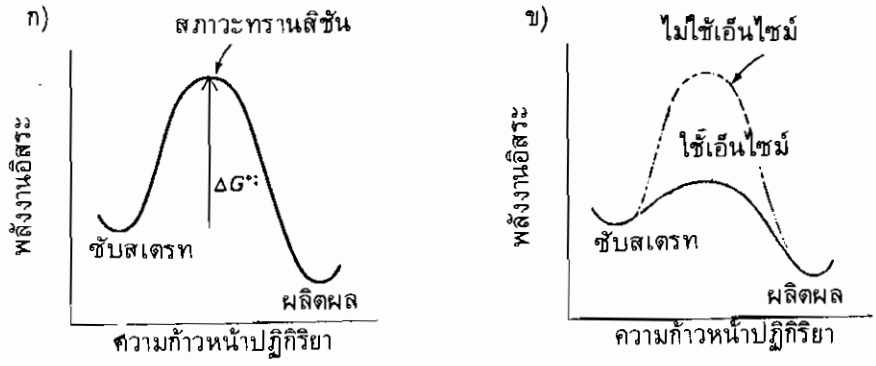
วัตถุประสงค์ เมื่อนักศึกษาเรียนจบบทนี้แล้ว ควรจะมีความสามารถในการ

1. จำแนกประเภทของเอ็นไซม์พร้อมการเรียกชื่อ
2. อธิบายความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์
3. เขียนกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์บางชนิด
4. บอกลักษณะการทำงานของโคแฟคเตอร์ และเขียนกลไกการช่วยเร่งปฏิกิริยาของโคเอ็นไซม์บางตัว
5. อธิบายถึงสภาวะต่าง ๆ ที่มีผลต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์
6. อธิบายจลนศาสตร์ของเอ็นไซม์ สมการและพารามิเตอร์ที่สำคัญ ตลอดจนการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ประเภทต่าง ๆ
7. แบ่งประเภทของเอ็นไซม์ควบคุมและบอกกลไกการควบคุมของเอ็นไซม์เหล่านั้น
8. ยกตัวอย่างเอ็นไซม์ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม

บทนำ

คำว่า "เอ็นไซม์" ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1878 โดย Friedrich Wilhelm Kuhn หมายถึงสารที่สามารถเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้นได้ ปฏิกิริยาในระบบต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตจะเกิดขึ้นได้ยากถ้าหากขาดเอ็นไซม์ เอ็นไซม์เป็นตัวเร่งที่เป็นโปรตีนจำเพาะ คุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของเอ็นไซม์ก็คือประสิทธิภาพการเร่งที่สูงมากและมีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยา ที่ว่าประสิทธิภาพสูงก็เพราะว่าปริมาณเพียงเล็กน้อย สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เป็นล้านเท่าหรือมากกว่าเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาทางเคมีที่มิได้ใช้เอ็นไซม์ ตัวอย่างเช่น เอ็นไซม์ carbonic anhydrase ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน CO_2 กับ H_2O เป็นกรดคาร์บอนิค (H_2CO_3) เอ็นไซม์สามารถเปลี่ยน 10^5 โมเลกุล CO_2 ภายในเวลา 1 วินาที จัดว่าเป็นเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดตัวหนึ่ง เอ็นไซม์มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยา ในที่นี้รวมถึงความจำเพาะต่อซับสเตรท (substrate) และความจำเพาะต่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เอ็นไซม์อาจใช้ซับสเตรทได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งจัดว่าเอ็นไซม์นั้นมีความจำเพาะแบบ absolute specificity ถ้าเอ็นไซม์สามารถใช้ซับสเตรท ตลอดจนสารอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันหรือสารอื่นที่โครงสร้างสัมพันธ์กันได้ จัดว่าเอ็นไซม์นั้นมี broad specificity ตัวอย่างเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะสูงมากคือ เอ็นไซม์ DNA polymerase I จะเลือกเอาดีออกซี-ไรโบนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องเข้าไปต่อเป็นสาย DNA ความผิดพลาดมีโอกาสเกิดขึ้นได้ไม่ถึงหนึ่งในล้าน

เมื่อเอ็นไซม์รวมตัวกับซับสเตรทจะมีวิถีทางทำให้ได้ผลิตผลโดยการลดกำแพงพลังงานการกระตุ้น (activation barrier หรือ energy barrier) ของปฏิกิริยานั้น ๆ (รูปที่ 1-1) การที่สารใดสารหนึ่งจะกลายเป็นผลิตผลได้จะต้องผ่านสภาวะทรานสิชัน (transition state) ณ จุดนี้พลังงานจะสูงกว่า ณ จุดซับสเตรทหรือ ณ จุดผลิตผล ความแตกต่างของพลังงานระหว่างสภาวะทรานสิชันกับจุดซับสเตรท เรียกว่าพลังงานอิสระการกระตุ้น (free energy of activation) อัตราเร็วปฏิกิริยาจะแปรตามสัดส่วนของโมเลกุลที่มีพลังงานเท่ากับหรือสูงกว่าพลังงานอิสระการกระตุ้น สัดส่วนของโมเลกุลเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นถ้าเพิ่มอุณหภูมิ



รูปที่ 1-1 ก) กราฟแสดงพลังงานอิสระการกระตุ้น ($\Delta G^{o\ddagger}$)
ข) เอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยการลดพลังงานอิสระการกระตุ้น

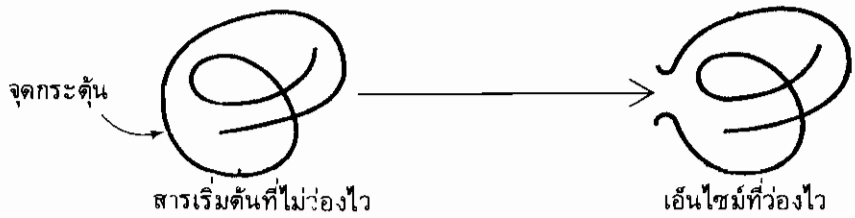
การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์มิได้เปลี่ยนแปลงภาวะที่จุดสมดุล เพียงแต่ทำให้ปฏิกิริยาไปถึงภาวะสมดุลเร็วขึ้นกว่าปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอ็นไซม์ ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนสาร A เป็นสาร B เมื่อไม่มีเอ็นไซม์อัตราเร็วปฏิกิริยาไปข้างหน้าหรือ k_F เท่ากับ 10^{-4} วินาที$^{-1}$ อัตราเร็วปฏิกิริยาย้อนกลับหรือ k_R เท่ากับ 10^{-6} วินาที$^{-1}$ หาค่าคงที่ของสมดุล (equilibrium constant) ได้เท่ากับ 100

$$A \underset{10^{-6}\ \mathrm{sec}^{-1}}{\overset{10^{-4}\ \mathrm{sec}^{-1}}{\rightleftharpoons}} B$$

$$K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_F}{k_R} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

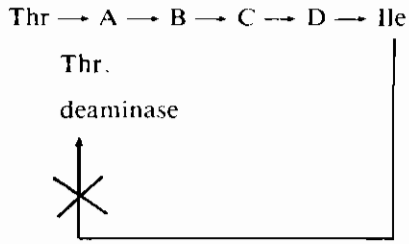
ที่ภาวะสมดุลความเข้มข้นของสาร B จะเป็น 100 เท่าของความเข้มข้นของสาร A เสมอ ไม่ว่าจะใช้เอ็นไซม์หรือไม่ก็ตาม ถ้าไม่ใช้เอ็นไซม์อาจต้องใช้เวลาหลายชั่วโมงในขณะที่ใช้เอ็นไซม์อาจกินเวลาไม่ถึงหนึ่งวินาทีที่จะไปถึงภาวะสมดุลนั้น

การควบคุมแอคติวิตีของเอ็นไซม์มีได้หลายแบบ เอ็นไซม์บางชนิดเช่น เอ็นไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาในรูปสารเริ่มต้นที่ไม่ว่องไว จะถูกกระตุ้นให้ว่องไวในเวลาและสถานที่ที่เหมาะสมในภายหลัง ได้แก่ เอ็นไซม์ trypsin ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาในรูปทริปซิโนเจน (trypsinogen) ที่ตับอ่อน ได้รับการกระตุ้นให้ว่องไวที่ลำไส้เล็กโดยการสลายพันธะเปปไทด์ สารเริ่มต้นที่ไม่ว่องไวของเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนทั้งหลาย รวมเรียกว่าไซโมเจน (zymogens)



การดัดแปลงพันธะโควาเลนท์ (covalent modification) ที่ตำแหน่งจำเพาะภายในโมเลกุลของเอ็นไซม์ เป็นการควบคุมแอคติวิตีของเอ็นไซม์อีกแบบหนึ่ง ตัวอย่างเช่น เอ็นไซม์ glycogen synthetase และเอ็นไซม์ glycogen phosphorylase เอ็นไซม์ทั้งสองจะว่องไวหรือไม่ขึ้นอยู่กับว่าตรงตำแหน่งเซอรีนจำเพาะภายในโมเลกุลเอ็นไซม์ มีการสร้างหรือการสลายพันธะโควาเลนท์โดยเอ็นไซม์อื่นอย่างใดหรือไม่ (ดูหัวข้อ 1.7.1)

ถ้าเป็นอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์จะมีการควบคุมแบบที่เรียกว่า allosteric interaction พบได้ในวิถีการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เช่น วิถีการสังเคราะห์ไอโซลูซีนในแบคทีเรีย ธริโอนีนเปลี่ยนเป็นไอโซลูซีนโดยใช้ปฏิกิริยาห้าขั้นตอน ขั้นตอนแรกเร่งปฏิกิริยาโดยอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์ threonine deaminase เอ็นไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดยผลิตผลคือไอโซลูซีน ถ้าความเข้มข้นของไอโซลูซีนมากเกินไป โดยที่ไอโซลูซีนจะไปจับที่บริเวณควบคุม (allosteric site) ของเอ็นไซม์ threonine deaminase แบบผันกลับได้ (reversible binding) ทำให้เกิดการยับยั้งแบบป้อนกลับ (feedback inhibition) ไปที่เอ็นไซม์ตัวแรกของวิถีการสังเคราะห์ เมื่อความเข้มข้นของไอโซลูซีนเข้าสู่ระดับปกติ เอ็นไซม์ threonine deaminase จะว่องไวขึ้นมาและสังเคราะห์ไอโซลูซีนได้ใหม่อีก



นอกจากการควบคุมทั้งสามแบบที่ได้กล่าวมาแล้ว ฮอร์โมนก็สามารถควบคุมแอคติวิตีของเอ็นไซม์เช่นกัน (ดูรายละเอียดบทที่ 16)

1.1 การแบ่งประเภทของเอ็นไซม์และการเรียกชื่อของเอ็นไซม์

เอ็นไซม์แบ่งออกเป็น 6 ประเภท ส่วนการเรียกชื่อเอ็นไซม์มี 3 วิธี คือ 1) การเรียกชื่อแบบ trivial name บอกถึงซับสเตรท ชนิดของปฏิกิริยาและคำลงท้ายเป็น -ase 2) การเรียกชื่อแบบ systematic name จะบอกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น 3) การเรียกชื่อแบบใช้รหัสเป็นตัวเลข 4 ตัว (code number) เช่น เอ็นไซม์ที่มีรหัส EC 1.1.1.1 คือ เอ็นไซม์ alcohol dehydrogenase EC ย่อมาจาก Enzyme Commission ตัวเลขตัวแรกเป็น 1 หมายถึง เอ็นไซม์ประเภทที่หนึ่ง ถ้าตัวเลขหลักแรกเป็น 2 หมายถึง เอ็นไซม์ประเภทที่สอง (รายละเอียดของตัวเลขอีกสามหลักจะไม่ขอกล่าวไว้ในที่นี้) การเรียกชื่อแบบที่ 3 นี้เป็นการเรียกแบบสากล เหมาะสำหรับการเขียนรายงานการวิจัย บทคัดย่อ บทความต่าง ๆ เป็นต้น

ประเภทที่ 1: oxidoreductase **หรือ** dehydrogenase

เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันระหว่างซับสเตรทสองชนิดในกระบวนการต่าง ๆ อาทิเช่น การหายใจ (respiration) การหมัก (fermentation) มีการดึงไฮโดรเจนอะตอมและอิเลคตรอนออกจากอัลกอฮอล์หรือแอมีน (amine) ไปให้ NAD^+ หรือ $NADP^+$ หรือ FAD ซึ่งเป็นโคเอ็นไซม์ ตัวอย่างเช่น

$$C_2H_5OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + NADH + H^+$$

เอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยานี้ มีชื่อตามการเรียกแต่ละแบบ คือ

1. แบบ trivial name เรียก alcohol dehydrogenase (alc. DH)
2. แบบ systematic name เรียก alcohol : NAD^+ oxidoreductase
3. แบบการใช้รหัส คือ EC 1.1.1.1

เอ็นไซม์ประเภทนี้รวมไปถึง oxidase, oxygenase, peroxidase, reductase และ hydroxylase

ประเภทที่ 2: transferase

เร่งปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่ต่าง ๆ เช่น หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟตหรือโมโนแซคคาไรด์ หรือสายโอลิโกแซคคาไรด์ ฯลฯ เป็นต้น จากซับสเตรทหนึ่งไปยังอีกซับสเตรทหนึ่งตัวอย่างเช่น

$$\text{glucose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$$

เอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยานี้ มีชื่อตามการเรียกแต่ละแบบคือ

1. แบบ trivial name เรียก hexokinase

2. แบบ systematic name เรียก ATP : D-hexose-6-phosphotransferase

3. แบบการใช้รหัส คือ EC 2.7.1.1

เอ็นไซม์ประเภทนี้รวมไปถึง transketolase, transaldolase และ transmethylase

ประเภทที่ 3: hydrolase

เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำตัวอย่างเช่น

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-N(CH_3)_3 + H_2O \longrightarrow CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-OH + HO-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

อะเซทิลโคลีน โคลีน

เอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยานี้ มีชื่อตามการเรียกแต่ละแบบคือ

1. แบบ trivial name เรียก acetylcholine esterase

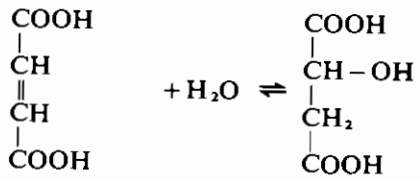
2. แบบ systematic name เรียก acetylcholine acetyl hydrolase

3. แบบการใช้รหัส คือ EC 3.1.1.8

เอ็นไซม์ประเภทนี้มีอยู่มากที่ไม่ลงท้ายเป็น hydrolase เป็นต้นว่า glycosidase, penicillinase, ribonuclease, urease, asparaginase, papain, chymotrypsin, lysozyme, phosphatase, peptidase และ amidase เป็นต้น

ประเภทที่ 4: lyase

เร่งปฏิกิริยาการเพิ่มเข้า (addition) และปฏิกิริยาการขจัดออก (elimination) ที่พันธะคู่ ตัวอย่างเช่น



กรดฟิวมาริค กรดมาลิค

เอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยานี้ มีชื่อตามการเรียกแต่ละแบบ คือ

1. แบบ trivial name เรียก fumarase
2. แบบ systematic name เรียก malate hydrolyase
3. แบบการใช้รหัส คือ EC 4.2.1.2

เอ็นไซม์ประเภทนี้ครอบคลุมไปถึงเอ็นไซม์พวก decarboxylase, deaminase, aldolase, dehydratase และ hydratase

ประเภทที่ 5: isomerase

เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลของไอซอมเมอร์ต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น

L-อะลานีน ⇌ D-อะลานีน

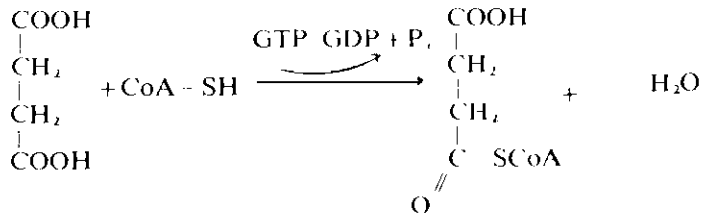
เอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยานี้ มีชื่อตามการเรียกแต่ละแบบ คือ

1. แบบ trivial name เรียก alanine racemase
2. แบบ systematic name เรียก L-alanine : D-alanine racemase
3. แบบการใช้รหัส คือ EC 5.1.1.1

เอ็นไซม์ประเภทนี้รวมถึงเอ็นไซม์ mutase, epimerase และ isomerase

ประเภทที่ 6: ligase **หรือ** synthetase

เร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะระหว่างคาร์บอน-คาร์บอน คาร์บอน-ออกซิเจน คาร์บอน-ไนโตรเจน คาร์บอน-ซัลเฟอร์ โดยอาศัยพลังงานจากการไฮโดรไลซ์ ATP หรือนิวคลีโอไทด์อื่น ๆ ตัวอย่างเช่น



กรดซัคซินิค ซัคซินิลโคเอ

เอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยานี้ มีชื่อตามการเรียกแต่ละแบบ คือ

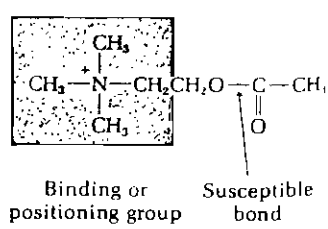
1. แบบ trivial name เรียก succinate thiokinase
2. แบบ systematic name เรียก succinate : CoA ligase
3. แบบการใช้รหัส คือ EC 6.2.1.4

1.2 ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

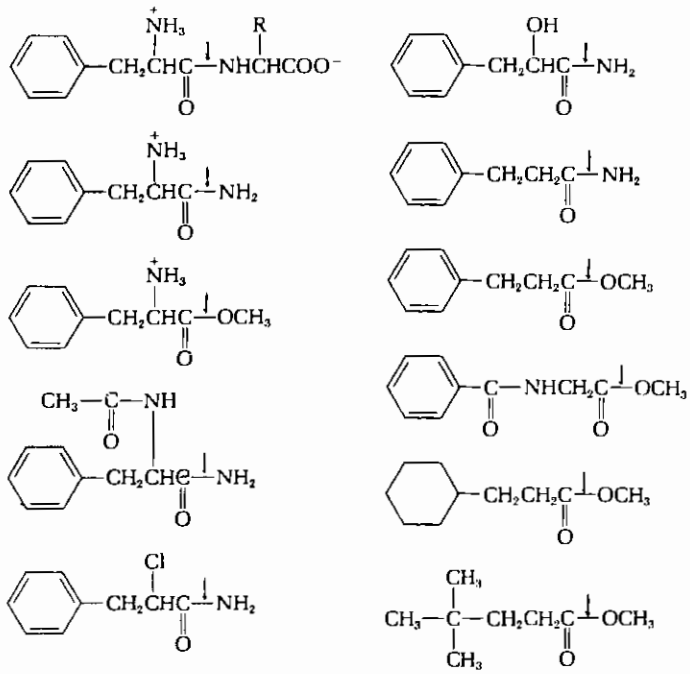
ดังได้กล่าวแล้วว่าความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ รวมถึงความจำเพาะต่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นและต่อซับสเตรท ทั้งหมดนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างซับสเตรท คอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์ และลักษณะที่บริเวณเร่ง (active site หรือ catalytic site) ของเอ็นไซม์แต่ละชนิด

1.2.1 โครงสร้างซับสเตรท

ซับสเตรทใด ๆ ก็ตามจะต้องมีส่วนที่สำคัญภายในโมเลกุลสองส่วน ส่วนแรกคือหมู่ที่จะไปยึดจับกับเอ็นไซม์ (binding group) ส่วนที่สองคือพันธะที่จะเกิดปฏิกิริยาตามมาโดยการกระทำของเอ็นไซม์ (susceptible bond). ตัวอย่างเช่น อะเซทิลโคลีนเป็นซับสเตรทของเอ็นไซม์ acetylcholine esterase หมู่ที่จะไปยึดจับกับเอ็นไซม์คือหมู่ควาเทอนารีแอมโมเนียม (quarternary ammonium) พันธะเอสเทอร์คือพันธะที่จะถูกย่อยสลายด้วยน้ำโดยเอ็นไซม์ ทำให้อะเซทิลโคลีนกลายเป็นโคลีน และกรดอะเซติค

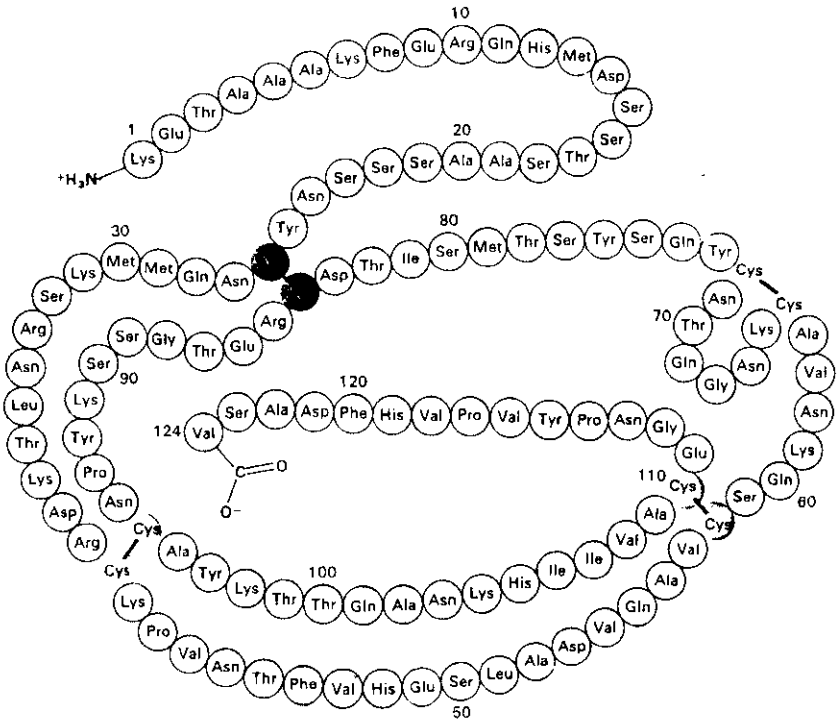


โครงสร้างซับสเตรทของเอ็นไซม์ chymotrypsin นั้น หมู่ที่จะไปจับกับเอ็นไซม์คือหมู่แอซิลที่มักจะมีวงแหวนอะโรมาติคอยู่ตรงปลาย พันธะที่จะเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายคือพันธะแอมีดหรือพันธะเอสเทอร์

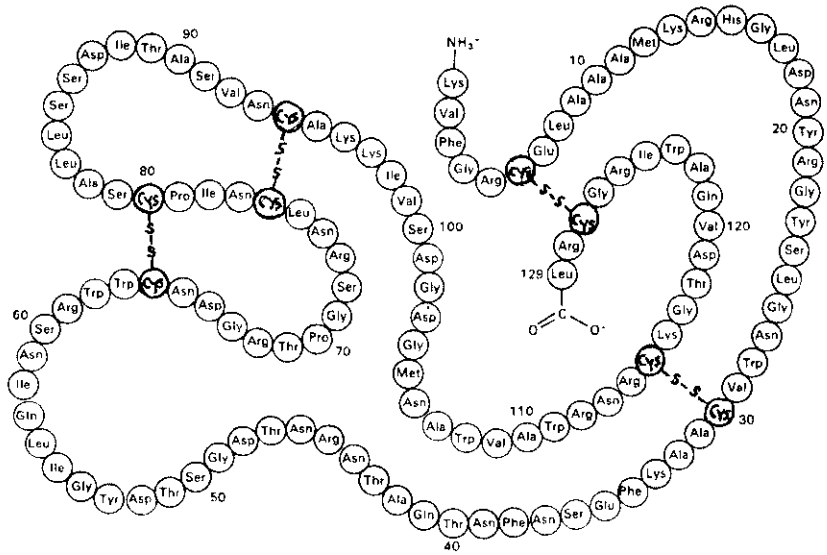


1.2.2 คอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์

โปรตีนที่จะทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ได้ต้องไม่ใช่สายโปรตีนที่เหยียดยาวเป็นเส้นตรง แต่ทว่ามีการคดงอที่จำเพาะ (specific folding) เพื่อให้ได้คอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมในการรวมตัวกับซับสเตรท และเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตผลในที่สุด เอ็นไซม์แต่ละชนิดมีคอนฟอร์เมชันที่เฉพาะตัว ทุกครั้งที่จะเร่งปฏิกิริยาจะต้องคดงอให้มีคอนฟอร์เมชันแบบเดิมนี้ทุกครั้ง (รูปที่ 1-2 และ 1-3)



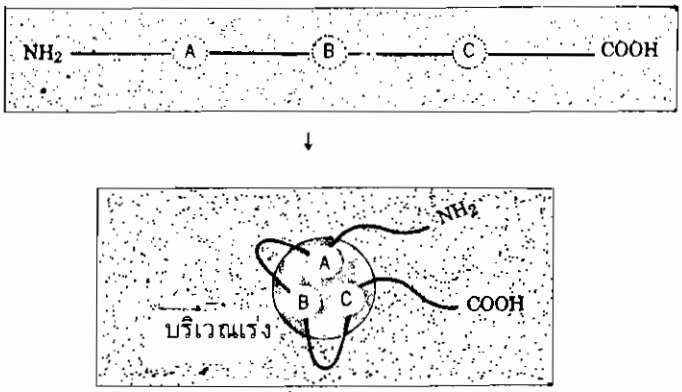
รูปที่ 1-2 คอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์ ribonuclease ในวัว พร้อมกับการเรียงตัวของกรดอะมิโน



รูปที่ 1-3 คอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์ lysozyme ในไข่ขาวของไข่ไก่ พร้อมกับการเรียงตัวของกรดอะมิโน

1.2.3 ลักษณะที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์

บริเวณเร่ง (active site หรือ catalytic site, รูปที่ 1-4) เป็นบริเวณที่มีการรวมกันของหมู่ R ของกรดอะมิโนซึ่งอยู่ในเปปไทด์สายเดียวกันหรือต่างสายก็ได้ หมู่ R เหล่านั้นมาอยู่ใกล้กันเนื่องจากเอ็นไซม์มีการคดงออย่างจำเพาะเพื่อให้มีคอนฟอร์เมชันพร้อมที่จะเร่งปฏิกิริยาได้ ซับสเตรทจะเข้าไปจับที่บริเวณเร่งนี้ กรดอะมิโนใดในโมเลกุลเอ็นไซม์ที่หมู่ R เข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับซับสเตรท เรียกกรดอะมิโนนั้นว่าหน่วยเร่ง (catalytic residue)



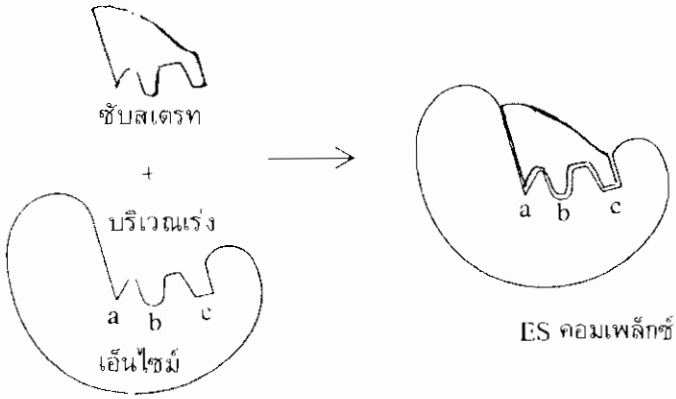
รูปที่ 1-4 แผนภาพแสดงบริเวณเร่งของเอ็นไซม์ซึ่งเกิดจากหน่วยเร่ง A, B, C เข้ามาอยู่ใกล้กัน

ตัวอย่างเช่น เอ็นไซม์ chymotrypsin มี his_{57} และ ser_{195} เป็นหน่วยเร่ง เอ็นไซม์ lysozyme มี glu_{35} และ asp_{52} เป็นหน่วยเร่ง ส่วนเอ็นไซม์ carboxypeptidase A มีหน่วยเร่งอยู่ที่ glu_{270} และ tyr_{248}

บริเวณเร่งมีลักษณะเป็นแอ่ง (cleft) เล็ก ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตรเอ็นไซม์ทั้งโมเลกุล มีสามมิติ มิได้เป็นจุด เป็นเส้นหรือเป็นระนาบ การจัดตัวของอะตอมต่าง ๆ ที่บริเวณเร่งมีผลอย่างมากต่อการรวมตัวระหว่างเอ็นไซม์และซับสเตรท

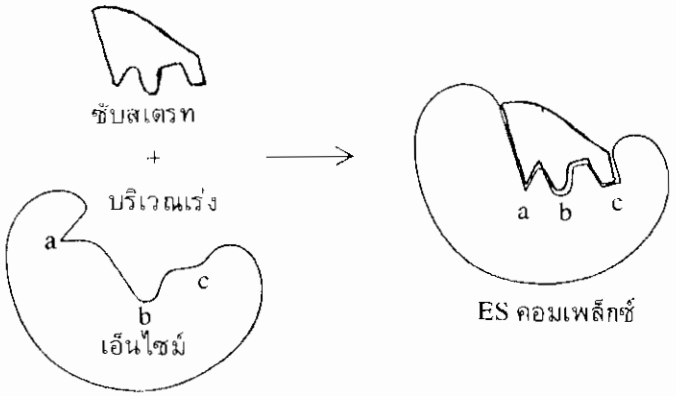
ทฤษฎีที่อธิบายถึงการรวมตัวระหว่างเอ็นไซม์และซับสเตรทตรงบริเวณเร่ง มี 2 ทฤษฎีคือ

1. **ทฤษฎีลูกกุญแจและแม่กุญแจ** (lock and key theory) ของ Emil Fischer (1890) อธิบายถึงความแข็งแกร่ง (rigidity) ที่บริเวณเร่ง ซับสเตรทจะต้องมีโครงสร้างและรูปร่างที่เข้ากันได้กับลักษณะสามมิติที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์ ซับสเตรทเปรียบเสมือนลูกกุญแจ บริเวณเร่งเปรียบเสมือนแม่กุญแจ สารที่ไม่ใช่ซับสเตรทจะไม่สามารถเข้าไปจับที่บริเวณเร่งนี้ (รูปที่ 1-5)



รูปที่ 1-5 แผนภาพอธิบายทฤษฎีลูกกุญแจและแม่กุญแจ

2. **ทฤษฎีการชักนำ** (Induced-fit theory) ของ Daniel Koshland ตั้งขึ้นเมื่อไม่นานมานี้ กล่าวว่าที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์มีความยืดหยุ่น (flexibility) สามารถเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันให้เข้ากันกับซับสเตรทได้หลังจากที่ซับสเตรทเข้าไปจับแล้ว ทฤษฎีนี้สามารถอธิบายได้ว่าเหตุใดสารบางตัวที่มีโครงสร้างคล้ายซับสเตรทจึงสามารถจับกับเอ็นไซม์ได้แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากคอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์ยังไม่เหมาะสมพอที่จะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดขึ้นได้ (รูปที่ 1-6)



รูปที่ 1-6 แผนภาพอธิบายทฤษฎีการชักนำ

ปฏิกิริยาที่ใช้เอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง จะเกิดขึ้นเร็วกว่าปฏิกิริยาเคมีธรรมดาถึง $10^{8} - 10^{20}$ เท่า แฟคเตอร์ที่มีผลทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์สูงขึ้นมากคือ

1. การวางตัวในตำแหน่งที่ถูกต้องของโมเลกุลซับสเตรท ซับสเตรทต้องเข้ามาอยู่ใกล้ (proximity) และหมุนตัวในทิศทางที่เหมาะสม (orientation) เข้าหาหน่วยเร่งของโมเลกุลเอ็นไซม์ จะได้เข้าสู่สภาวะทรานสิชันง่ายขึ้น ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น

2. เมื่อมีการรวมตัวระหว่างเอ็นไซม์กับซับสเตรท เป็นเอ็นไซม์-ซับสเตรท-คอมเพล็กซ์ คอมเพล็กซ์นี้จะต้องไม่อยู่ตัว (unstable) เพื่อที่จะสลายกลายเป็นผลิตผลได้ไว

3. บริเวณเร่งของเอ็นไซม์บางชนิดจะมีหมู่ที่ให้โปรตอนหรือหมู่ที่สามารถรับโปรตอน เป็นการช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้เร็ว เนื่องจากมีการเร่งปฏิกิริยาเนื่องจากความเป็นกรด ความเป็นเบส (acid-base catalysis) เข้ามาช่วยด้วยอีกแรงหนึ่ง

4. เมื่อซับสเตรทเข้าไปจับที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์แล้ว ทำให้คอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์เปลี่ยนไป เกิดความเครียด (strain) และการบิดเบี้ยว (distortion) ภายในโมเลกุลเอ็นไซม์และซับสเตรท เข้าสู่สภาวะทรานสิชันได้เร็ว ปฏิกิริยาก็เกิดเร็วตามไปด้วย

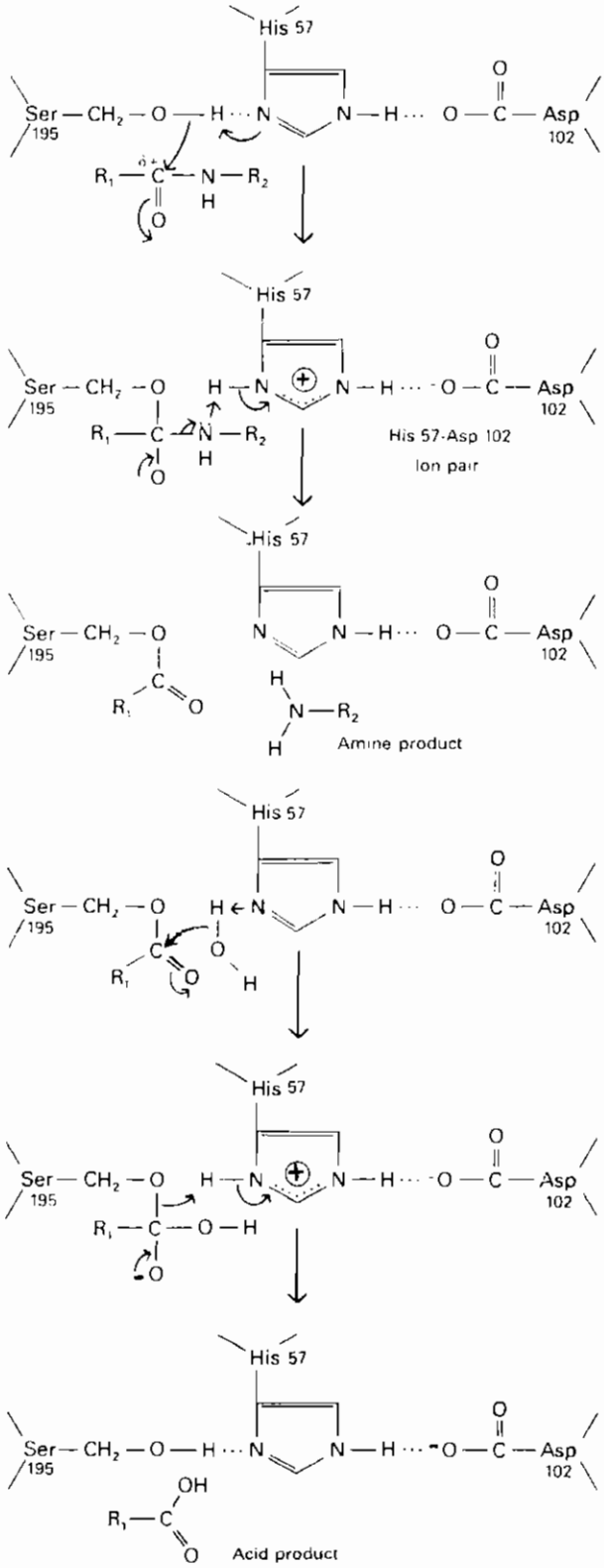
1.3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาตรงบริเวณเร่งของเอ็นไซม์บางชนิด

ในที่นี้จะยกตัวอย่างกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ 4 ชนิด คือ

1. เอ็นไซม์ chymotrypsin
2. เอ็นไซม์ carboxypeptidase A
3. เอ็นไซม์ lysozyme
4. เอ็นไซม์ thiolase

1.3.1 เอ็นไซม์ chymotrypsin

เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะแอมีด (พันธะเปปไทด์) และพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ his_{57}, ser_{195} และ asp_{102} เป็นหน่วยเร่งปฏิกิริยา แบ่งเป็นปฏิกิริยาอะซิเลชันของโมเลกุลเอ็นไซม์ ให้ผลิตผลแรกเป็นแอมีน จากนั้นเป็นปฏิกิริยาดีอะซิเลชัน (deacylation) ให้ผลิตผลเป็นกรดตามมาทีหลัง (รูปที่ 1-7)



รูปที่ 1-7 กลไกการย่อยสลายด้วยน้ำของเอ็นไซม์chymotrypsin

ขั้นตอนที่ 1 ออกซิเจนอะตอมของ ser_{195} เป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่ดี จะไปทำปฏิกิริยา nucleophilic attack เข้าที่คาร์บอนิลคาร์บอนอะตอมของพันธะเปปไทด์ของซับสเตรท

ขั้นตอนที่ 2 ได้สภาวะทรานสิชันแบบเตทตระฮีดรัล (tetrahedral)

ขั้นตอนที่ 3 ให้ผลิตผลตัวแรกเป็นแอมีน และแอซิลเอ็นไซม์อินเตอร์มิเดียท

ขั้นตอนที่ 4 ออกซิเจนอะตอมของน้ำเป็นนิวคลีโอไฟล์ ไปทำปฏิกิริยา nucleophilic attack ที่คาร์บอนิลคาร์บอนของหมู่แอซิลของแอซิลเอ็นไซม์อินเตอร์มิเดียท

ขั้นตอนที่ 5 ให้สภาวะทรานสิชันแบบเตทตระฮีดรัลอีกครั้งหนึ่ง

ขั้นตอนที่ 6 ได้ผลิตผลตัวที่สองเป็นกรด และเอ็นไซม์เป็นอิสระกลับมาดามเดิม

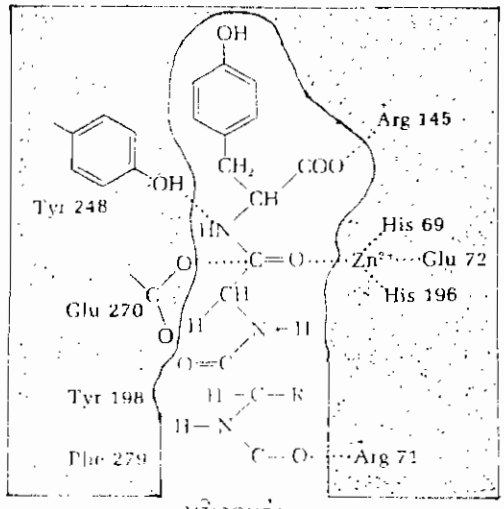
1.3.2 เอ็นไซม์ carboxypeptidase A

เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีนจากทางด้าน C_t เข้ามาทีละพันธะ (รูปที่ 1-8) จัดเป็น exopeptidase เอ็นไซม์จะว่องไวยิ่งขึ้นถ้าปลาย C_t เป็นกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติค เอ็นไซม์ carboxypeptidase A มี glu_{270}, arg_{145} และ tyr_{248} เป็นหน่วยเร่ง และมี Zn^{+2} เป็นโคแฟคเตอร์

arg_{145} มีประจุบวกจึงช่วยยึดหมู่คาร์บอกซิเลททางปลาย C_t ของซับสเตรทไว้ด้วยพันธะไอออนิค Zn^{+2}เป็นโคแฟคเตอร์คีเลท (chelate) อยู่กับ glu_{72}, his_{69} และ his_{196} Zn^{+2} ส่งผลให้คาร์บอนิลคาร์บอนของพันธะเปปไทด์ทาง C_t เป็นบวกมากขึ้น ทำให้หมู่คาร์บอกซิเลทของ glu_{270} เข้าไปทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนิลคาร์บอนได้ดี

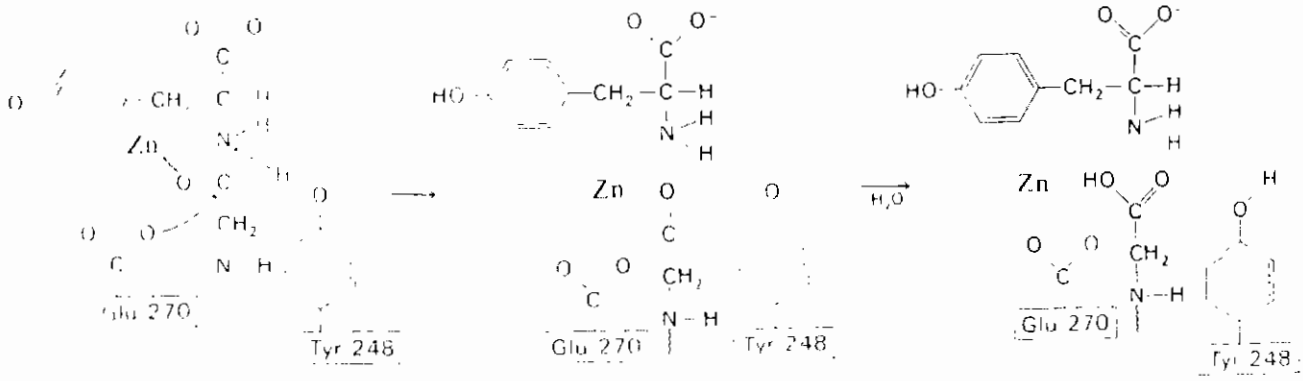
เมื่อได้ผลิตผลเป็นกรดอะมิโนอิสระซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวที่อยู่ทางปลาย C_t ซับสเตรทจะสร้างพันธะแอนฮัยดรายด์ (anhydride) อยู่กับ glu_{270} ก่อนที่จะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำ หลังจากการไฮโดรไลซ์ glu_{270} จะกลับเป็นอิสระอีกครั้งหนึ่ง สายเปปไทด์ที่เป็นซับสเตรทจะมีความยาวสั้นลงไปหนึ่งหน่วยกรดอะมิโน ให้ C_t อันใหม่ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวถัดเข้ามา พร้อมที่จะเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ต่อไปอีกเรื่อย ๆ ทีละพันธะ จนกระทั่งหมดความยาวเปปไทด์

ก)



บริเวณเร่ง

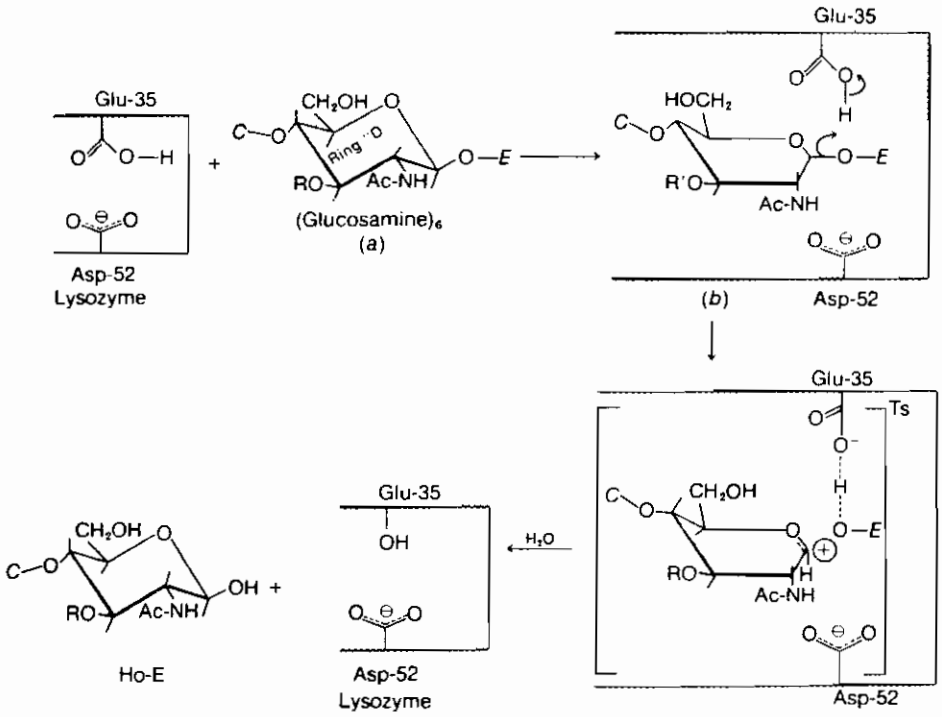
ข)



รูปที่ 1-8 ก) การวางตัวของซับสเตรทเปปไทด์ ตรงบริเวณเร่งของเอ็นไซม์carboxypeptidase A
ข) กลไกการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ทางปลาย C, โดยเอ็นไซม์carboxypeptidase A

1.3.3 เอ็นไซม์ lysozyme

เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิคของคาร์โบไฮเดรท มีฤทธิ์เทียบเท่ายาปฏิชีวนะเพราะเอ็นไซม์นี้สามารถย่อยสลายสารมิวโคโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ของพวกแบคทีเรียได้ เอ็นไซม์นี้มีหน่วยเร่งอยู่ที่ glu_{35} และ asp_{52} ซับสเตรทเป็นโพลีแซคคาไรด์แต่วางตัวเต็มที่ในบริเวณเร่งได้เพียงแค่เฮกซาแซคคาไรด์ (hexasaccharide) ปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิคเกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลตัวที่ 4 และน้ำตาลตัวที่ 5 (รูปที่ 1-9)



รูปที่ 1-9 กลไกการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิคของคาร์โบไฮเดรทโดยเอ็นไซม์ lysozyme ในรูปซับสเตรทคือ N-อะเซทิลกลูโคซามีน วงแหวน D คือน้ำตาลตัวที่ 4 วงแหวน E คือน้ำตาลตัวที่ 5

หน่วยเร่ง glu_{35} และ asp_{52} ต่างก็เป็นกรดอะมิโนประเภทแอซิดิคและมีหมู่คาร์บอกซิลิคที่สายโซ่ข้าง แต่ asp_{52} จะแตกตัวเป็นคาร์บอกซิเลทแอนไอออนในขณะที่ glu_{35} ไม่แตกตัว ทั้งนี้เนื่องจากอยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน เมื่อซับสเตรทซึ่งมีคอนฟอร์เมชันแบบเก้าอี้ (chair conformation) เข้าไปจับกับ lysozyme ตรงบริเวณเร่งแล้ว ก่อนที่พันธะไกลโคซิดิคระหว่างวงแหวน D และวงแหวน E จะแตกออก จะเกิดความเครียด (strain) และการบิดเบี้ยว (distortion) ภายในโมเลกุลวงแหวน D เปลี่ยนคอนฟอร์เมชันจากรูปเก้าอี้ไปเป็น half-chair ที่สภาวะทรานสิชันจะเกิด acid-catalysis ของ glu_{35} ทำให้พันธะไกลโคซิดิคแตกออก C_1 ของวงแหวน D จะเป็น carbonium ion ซึ่งจะมีแรงดึงดูดจากประจุลบของ asp_{52} จากนั้นหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำจะเข้าไปทำปฏิกิริยาตรง carbonium ion ให้น้ำตาลที่เป็นวงแหวน D และวงแหวน E การที่วงแหวน D และวงแหวน E แตกออกจากกัน ทำให้คอนฟอร์เมชันของน้ำตาลกลับสู่รูปแบบเก้าอี้ซึ่งเป็นรูปแบบที่อยู่ตัว เป็นการขจัดความเครียดและการบิดเบี้ยวให้หมดไป

ลักษณะเด่นของปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอ็นไซม์ lysozyme คือ

1. เกิดความเครียดและความบิดเบี้ยวภายในโมเลกุลของซับสเตรท เปลี่ยนคอนฟอร์-เมชันแบบเก้าอี้ไปเป็นแบบ half-chair ก่อนที่จะมีการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิค

2. มี acid-catalysis ของ glu_{35} ซึ่งอยู่ห่างจากออกซิเจนของพันธะไกลโคซิดิคเพียง 3 อังสตรอม ทำให้พันธะไกลโคซิดิคแตกออก

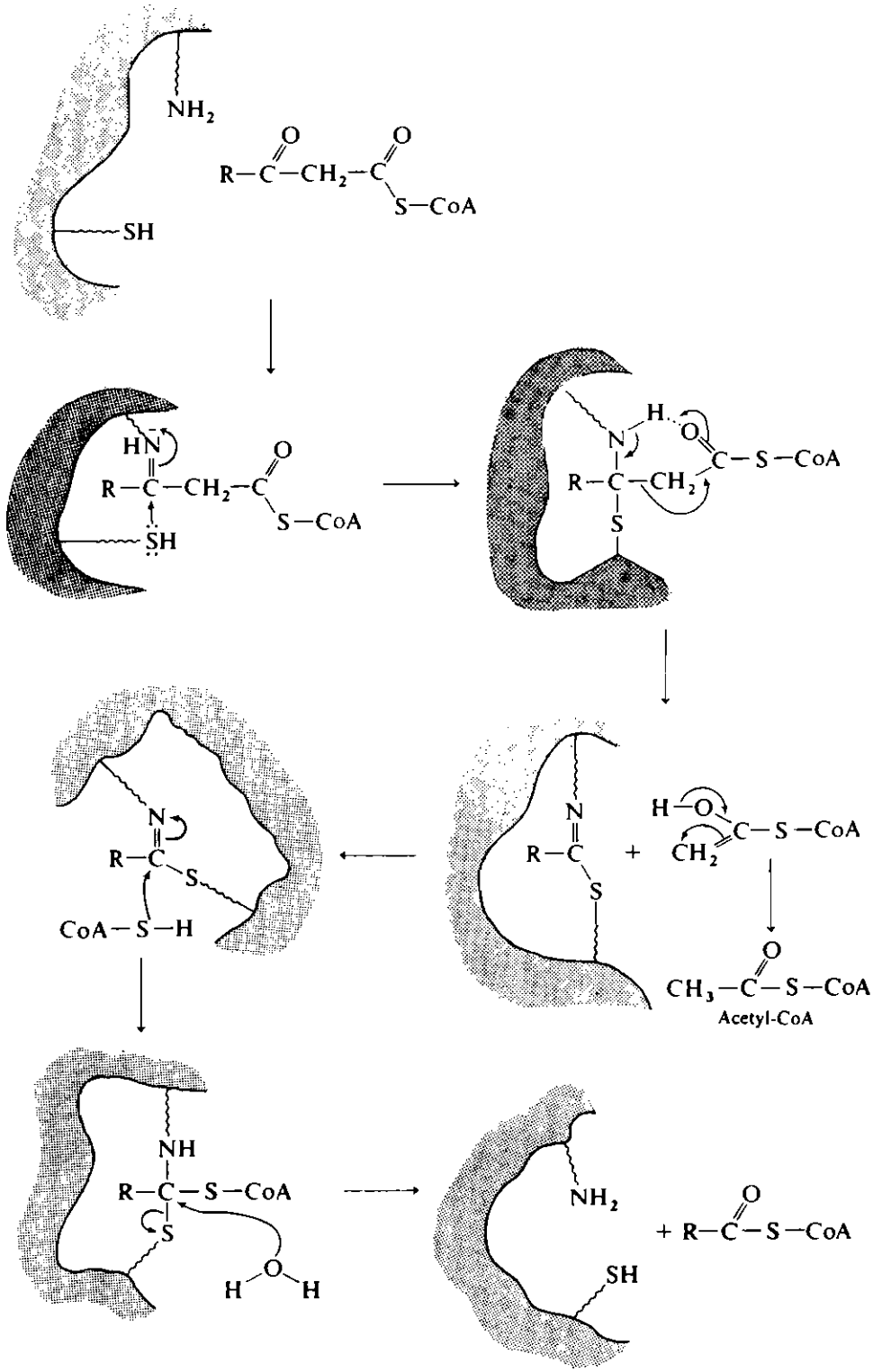
3. มีแรงช่วยยึดซับสเตรทกับเอ็นไซม์ คือแรงดึงดูดจากพันธะไอออนิคระหว่างคาร์-บอกซิเลทแอนไอออนของ asp_{52} กับ carbonium ion ของซับสเตรท

1.3.4 เอ็นไซม์ thiolase (acetyl CoA acyltransferase)

เร่งปฏิกิริยาการตัดคาร์บอน 2 อะตอมออกจากโมเลกุลคีโตแอซิลโคเอ ให้ผลิตผลเป็นอะเซทิลโคเอและคีโตแอซิลโคเอที่จำนวนคาร์บอนลดลงไป 2 อะตอม เอ็นไซม์ thiolase เร่งปฏิกิริยาสุดท้ายของกระบวนการเบต้าออกซิเดชันของกรดไขมัน มีหน่วยเร่งอยู่ที่ cys และ lys จำเพาะ (รูปที่ 1-10)

3 – คีโตแอซิลโคเอ+ โคเอ็นไซม์เอ ⇌ อะเซทิลโคเอ+ แอซิลโคเอ

ขั้นตอนแรกมีการสร้าง Schiff base ระหว่างหมู่คีโตของซับสเตรทคีโตแอซิลโคเอกับหมู่อะมิโนของเอ็นไซม์ จากนั้นซัลเฟอร์ของหมู่ซัลฟไฮดริลจะเข้าทำปฏิกิริยากับเมธินิลคาร์บอนของ Schiff base ให้ผลิตผลตัวแรกคืออะเซทิลโคเอ แล้วโคเอ็นไซม์เอซึ่งเป็นซับสเตรทตัวที่สองจึงใช้ซัลเฟอร์อะตอมเข้าทำปฏิกิริยาต่อไป ขั้นตอนสุดท้ายโมเลกุลน้ำทำให้หมู่ซัลฟไฮดริลและหมู่อะมิโนของหน่วยเร่ง cys และ lys กลับเป็นอิสระดังเดิม ได้ผลิตผลเป็นแอซิลโคเอซึ่งมีจำนวนคาร์บอนลดลงไป 2 อะตอม



รูปที่ 1-10 กลไกการตัดสายไฮโดรคาร์บอนของเอ็นไซม์ thiolase

1.4 โคแฟคเตอร์

เป็นโมเลกุลสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ที่เอ็นไซม์บางชนิดต้องการเวลาทำการเร่งปฏิกิริยา โคแฟคเตอร์มิใช่โมเลกุลโปรตีน โคแฟคเตอร์อาจทำหน้าที่เป็นซับสเตรทตัวที่สอง รับหรือให้หมู่ที่สำคัญต่าง ๆ หรืออาจไปมีผลต่อคอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์ ทำให้เอ็นไซม์รวมตัวกับซับสเตรทได้ดียิ่งขึ้น การทำงานของเอ็นไซม์บางชนิดไม่ต้องการโคแฟคเตอร์ แต่เอ็นไซม์บางชนิดก็ต้องการโคแฟคเตอร์ เอ็นไซม์ประเภทหลังนี้ถ้ายังไม่รวมกับโคแฟคเตอร์ เอ็นไซม์จะไม่ว่องไวเรียกอะโปเอ็นไซม์ (apoenzyme) ต่อเมื่อรวมตัวกับโคแฟคเตอร์แล้วเอ็นไซม์จึงจะว่องไว เรียก โฮโลเอ็นไซม์ (holoenzyme)

โคแฟคเตอร์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1.4.1 ประเภทสารอนินทรีย์ ได้แก่พวกโลหะต่าง ๆ โดยมากเป็นแคทไอออน (ตารางที่ 1-1) เช่น Zn^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2}, K^{+}, Na^{+} และอื่น ๆ เป็นต้น โคแฟคเตอร์ที่เป็นแอนไอออนพบบ้างเล็กน้อย

1.4.2 ประเภทสารอินทรีย์ มักจะเรียกโคแฟคเตอร์ที่เป็นสารอินทรีย์นี้ว่าโคเอ็นไซม์ โคเอ็นไซม์ส่วนใหญ่สังเคราะห์มาจากวิตามินที่ละลายน้ำได้ (water-soluble vitamin) ดังนั้นร่างกายคนเราซึ่งสังเคราะห์วิตามินเองไม่ได้ จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับวิตามินจากอาหารที่รับประทานเข้าไปในปริมาณเพียงเล็กน้อยต่อวันก็เพียงพอแล้วแต่ขาดเลยไม่ได้ พืชหรือแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์วิตามินได้เอง โคเอ็นไซม์ที่สำคัญและควรทราบถึงกลไกการช่วยเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยา ได้แก่ NAD^{+}, FAD, โคเอ็นไซม์เอ, ไบโอติน, ไธอะมินไพโรฟอสเฟต (TPP) และไพริดอกซาลฟอสเฟต (PLP)

1.4.2.1 นิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^{+})

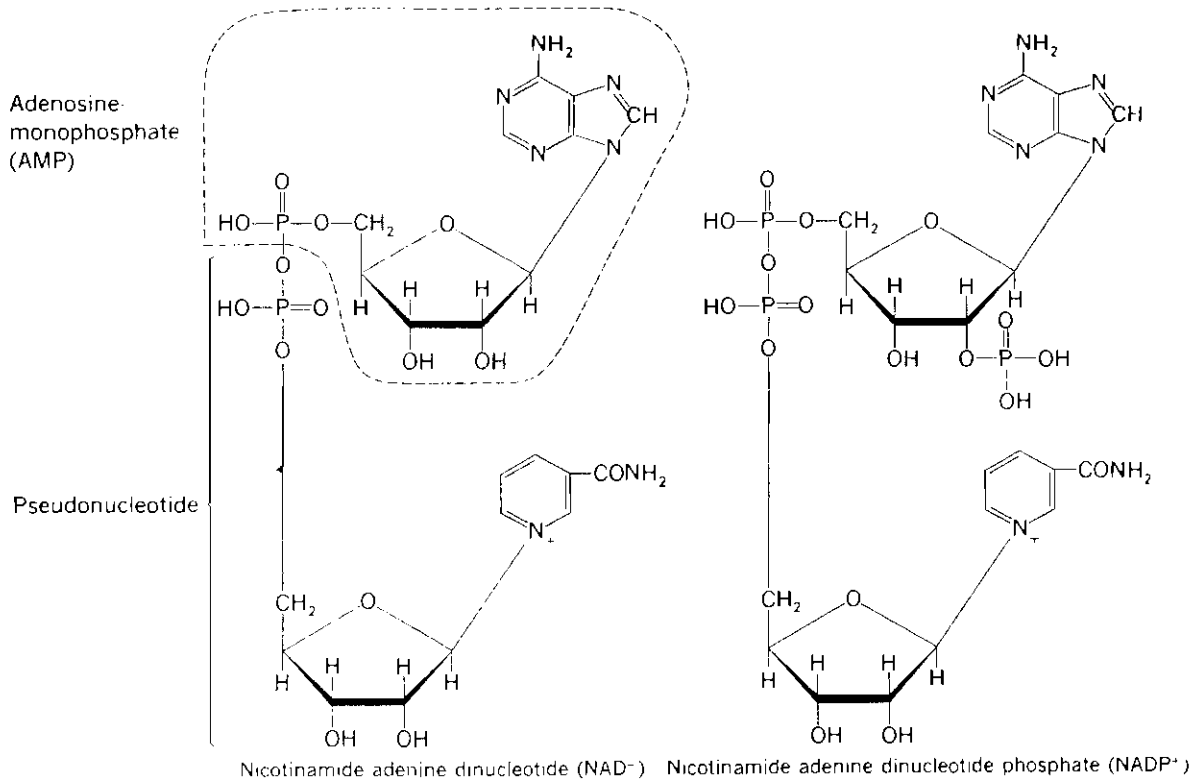
NAD^{+} หรือ $NADP^{+}$ (รูปที่ 1-11) เป็นโคเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์ประเภท dehydrogenase ทำหน้าที่รับไฮโดรเจนอะตอมแล้วกลายเป็น NADH และ NADPH ตามลำดับ เราสามารถติดตามปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ประเภทนี้โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของโคเอ็นไซม์ ตัวอย่างเช่น

$$CH_3CH_2OH + NAD^{+} \rightleftharpoons CH_3CHO + NADH + H^{+}$$

ตารางที่ 1-1 เอ็นไซม์บางชนิดที่มีแคทไอออนอยู่ในโครงสร้างหรือต้องการแคทไอออนเป็นโคแฟคเตอร์

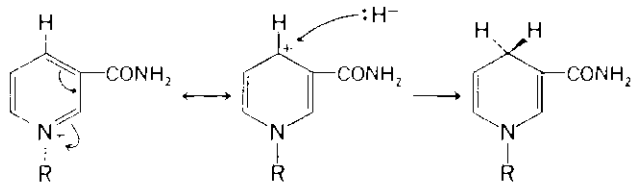
แคทไอออน	เอ็นไซม์
Zn^{+2}	alcohol dehydrogenase
	carboxypeptidase
	carbonic anhydrase
Mg^{+2}	phosphohydrolases
	phosphotransferases
Mn^{+2}	arginase
	phosphotransferases
Fe^{+3} หรือ Fe^{+2}	cytochromes
	peroxidase
	catalase
	ferridoxin
Cu^{+2} หรือ Cu^{+}	tyrosinase
	cytochrome oxidase
K^{+}	pyruvate kinase
Na^{+}	ATPase
	(ต้องการ Mg^{+2} ด้วย)

ปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอ็นไซม์ alcohol dehydrogenase การติดตามปฏิกิริยาของเอ็นไซม์จะดูจากการดูดกลืนแสงของ NADH ที่เพิ่มขึ้นที่ 340 นาโนเมตร เพราะ NAD^{+} ซึ่งเป็นรูปแบบออกซิไดซ์ของโคเอ็นไซม์จะดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ไม่มีการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร



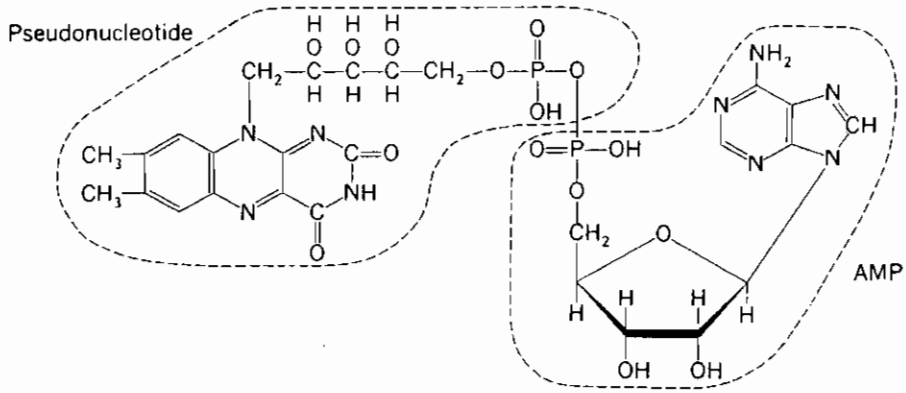
รูปที่ 1-11 โครงสร้าง NAD⁺ และ NADP⁺ นิโคตินามายด์เป็นส่วนที่มาจากวิตามินที่ละลายน้ำคือ ไนอะซิน (niacin) หรือกรดนิโคตินิค(nicotinic acid)

เมื่อเอ็นไซม์ dehydrogenase เร่งปฏิกิริยาการดึงไฮโดรเจนสองอะตอมออกจากโมเลกุลซับสเตรท (2 อิเลคตรอน, 2 โปรตอน) จะส่งต่อไปให้โมเลกุล NAD^+ แต่ส่งในสภาพไฮดรายด์-ไอออน (hydride ion) ซึ่งเป็นไฮโดรเจนหนึ่งอะตอมกับอีกหนึ่งอิเลคตรอนเข้าที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของวงแหวนไพริดีน ที่เหลืออีกหนึ่งโปรตอน (H^+) อยู่ในสารละลาย



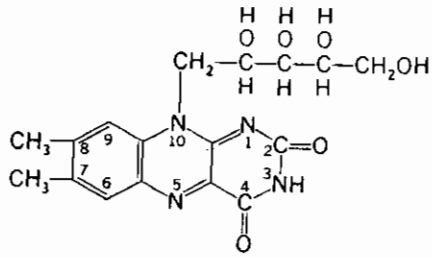
1.4.2.2 ฟลาวีนอะดินีนไดนิวคลีโอไทด์ (Flavine adenine dinucleotide, FAD)

ก)



Flavin adenine dinucleotide (FAD)

ข)

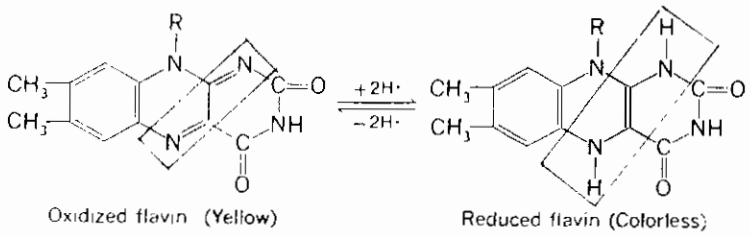


Riboflavin

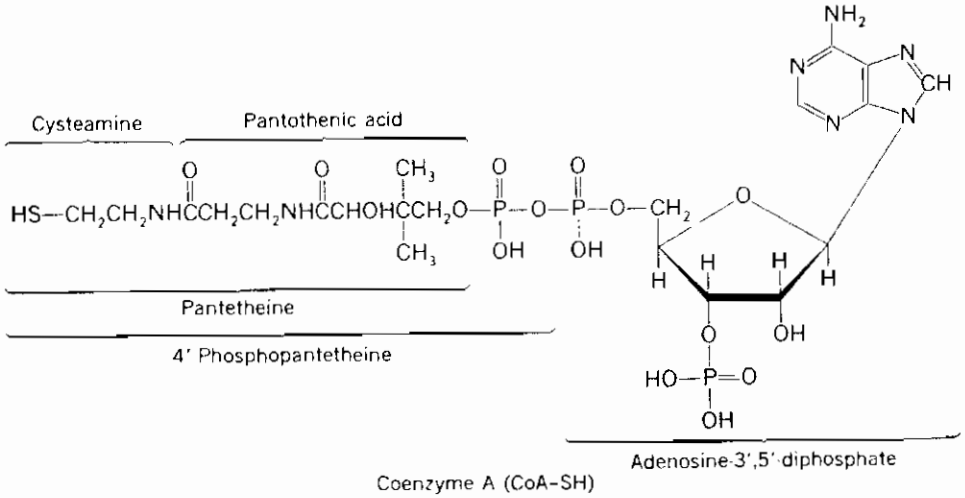
รูปที่ 1-12 ก) โครงสร้างFAD สังเคราะห์มาจากไรโบฟลาวีนหรือวิตามิน บี$_2$
ข) โครงสร้างไรโบฟลาวีน ประกอบด้วยระนาบของวงisoalloxazine และน้ำตาลribitol

FAD เป็นโคเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์ประเภท dehydrogenase เช่นกัน (รูปที่ 1-12) ทำหน้าที่รับไฮโดรเจนอะตอมแล้วกลายเป็น $FADH_2$ เอ็นไซม์ dehydrogenase จะใช้โคเอ็นไซม์ NAD^+ หรือ FAD ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอ็นไซม์นั้น ๆ รูปแบบออกซิไดซ์ของโคเอ็นไซม์ คือ FAD จะมีสีเหลือง เมื่อถูกรีดิวซ์จะใช้ $FADH_2$ ซึ่งมีสีขาว การติดตามปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ dehydrogenase ที่ใช้ FAD เป็นโคเอ็นไซม์ ดูจากการดูดกลืนแสงของ FAD ที่ลดลงที่ 450 นาโนเมตร

เมื่อเอ็นไซม์ dehydrogenase ที่ใช้ FAD เป็นโคเอ็นไซม์ เร่งปฏิกิริยาการดึงไฮโดรเจนสองอะตอมออกจากโมเลกุลซับสเตรท จะส่งต่อให้กับ FAD FADจะถูกรีดิวซ์ตรงตำแหน่ง N_1 และ N_5 ของวง isoalloxazine

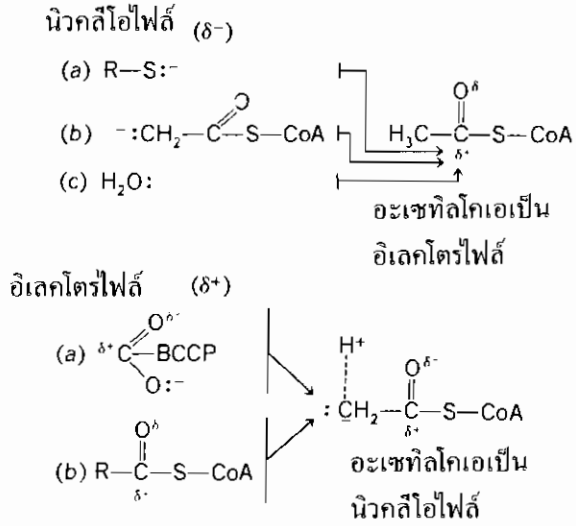


1.4.2.3 โคเอ็นไซม์เอ (Coenzyme A หรือ CoA หรือ CoA-SH)

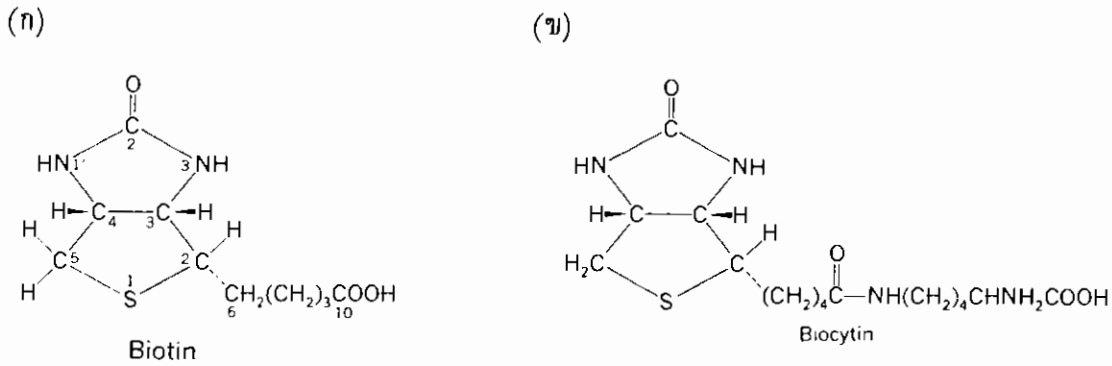


รูปที่ 1-13 โครงสร้างโคเอ็นไซม์เอ

โคเอ็นไซม์เอ (รูปที่ 1-13) เป็นโคเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาหมู่แอซิล เรียกว่า แอซิลโคเอ็นไซม์เอหรือแอซิลโคเอ จัดเป็นไธโอเอสเทอร์ (thioester) ซึ่งจะแสดงคุณสมบัติเป็นทั้งอิเลคโตรไฟล์ (electrophile) และนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ได้ในโมเลกุลเดียวกัน โดยที่คาร์บอนิลคาร์บอนอะตอมเป็นอิเลคโตรไฟล์ และ α-คาร์บอนอะตอมซึ่งอยู่ติดกับคาร์บอนิลคาร์บอนอะตอมเป็นนิวคลีโอไฟล์ แอซิลโคเอที่โมเลกุลเล็ก เช่น อะเซทิลโคเอ มีหมู่ R เป็นหมู่เมทิล ก็มีคุณสมบัติดังกล่าวเช่นกัน



1.4.2.4 ไบโอติน (Biotin)



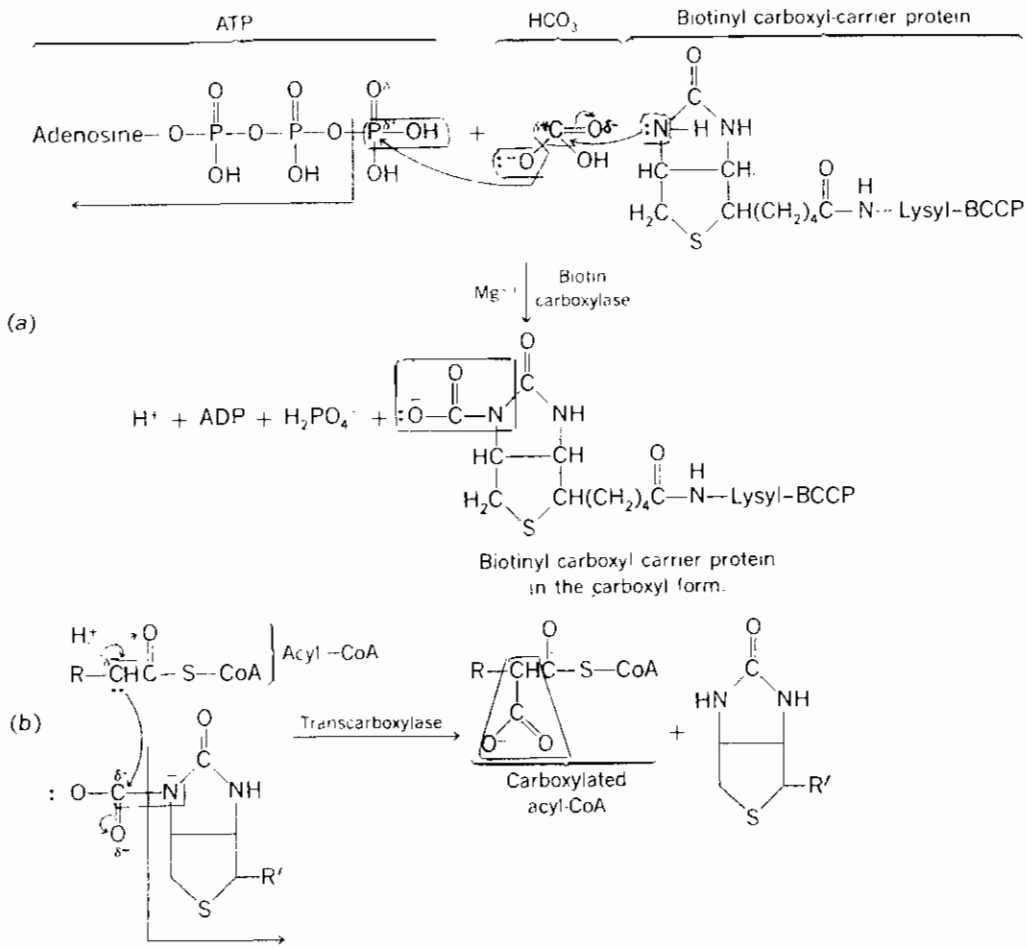
รูปที่ 1-14 ก) โครงสร้างไบโอติน ข) โครงสร้างไบโอซัยติน

ไบโอติน (รูปที่ 1-14) เป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้ มักจะเกาะอยู่กับโปรตีนจำเพาะ รวมเรียกไบโอซัยติน (biocytin) โดยใช้หมู่คาร์บอกซิลิคของไบโอตินทำปฏิกิริยากับหมู่ Σ-อะมิโนของไลซีนจำเพาะของโปรตีนเป็นพันธะแอมีด ไบโอซัยตินทำหน้าที่เป็นโคเอ็นไซม์เกี่ยวข้องกับการโยกย้ายหมู่คาร์บอกซิลในปฏิกิริยา α-คาร์บอกซิเลชันของเอ็นไซม์

ตัวอย่างกลไกการโยกย้ายหมู่คาร์บอกซิลโดยไบโอติน คือปฏิกิริยาการเติมคาร์บอนให้แก่อะเซทิลโคเอเพื่อเป็นมาโลนิลโคเอ (malonly CoA) ใน E. Coli

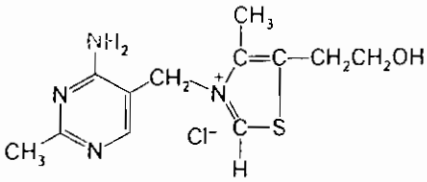
(a) $ATP + HCO_3^- + BCCP \underset{\text{Biotin carboxylase}}{\overset{Mg^{++}}{\rightleftharpoons}} ADP + Pi + BCCP{-}CO_2^-$

(b) $BCCP{-}CO_2^- + \text{Acetyl CoA} \underset{\text{Trans-carboxylase}}{\rightleftharpoons} BCCP + \text{Malonyl CoA}$



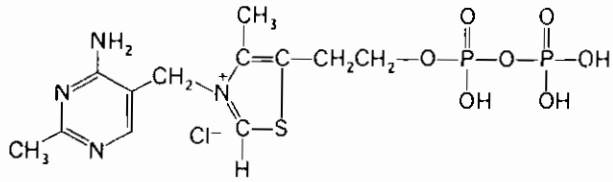
1.4.2.5 ไธอะมินไพโรฟอสเฟต (Thiamin pyrophosphate, TPP)

ก)



Thiamin

ข)

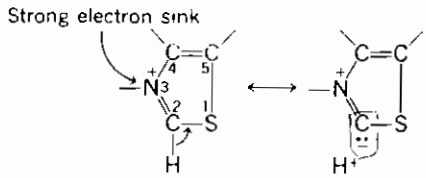


Thiamin pyrophosphate
(cocarboxylase)

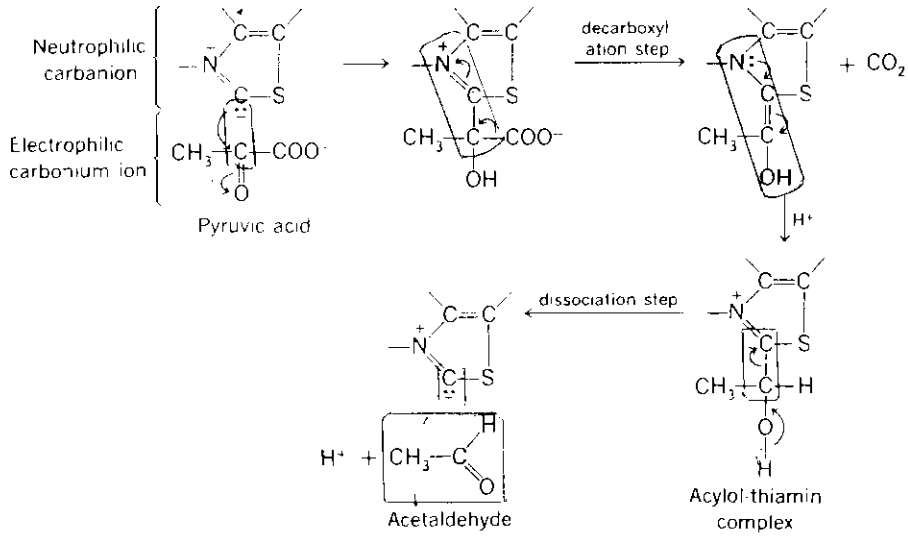
รูปที่ 1-15 ก) โครงสร้างไธอะมินหรือวิตามินบี$_1$

ข) โครงสร้างไธอะมินไพโรฟอสเฟต (TPP)

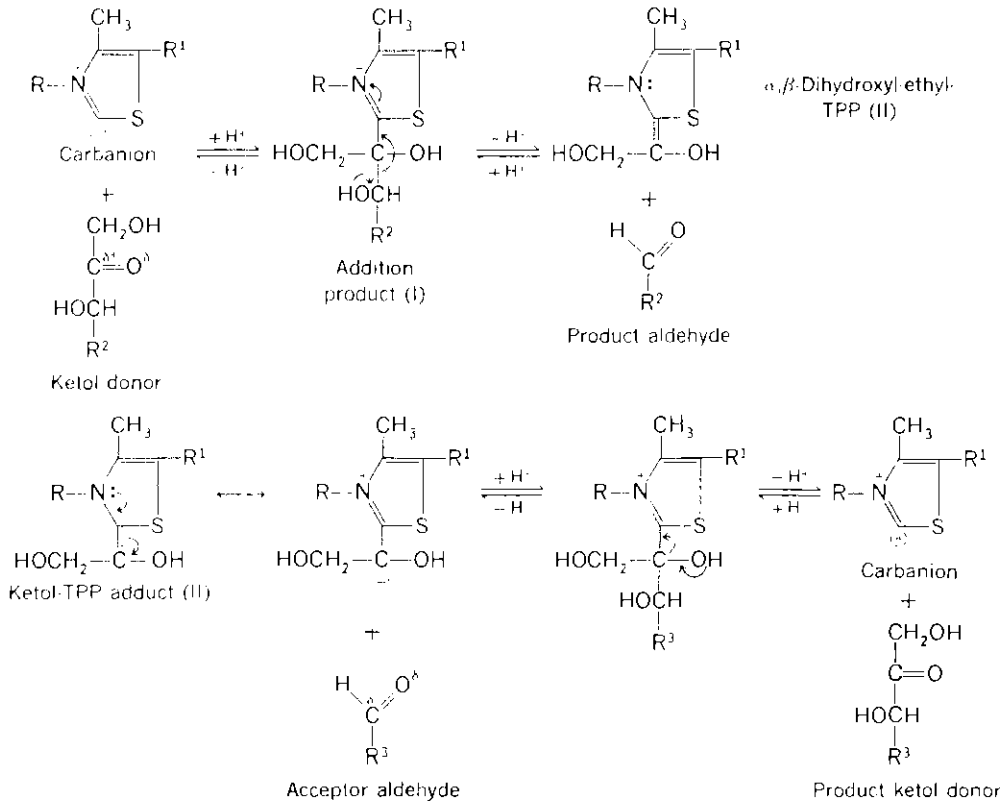
ไธอะมินหรือวิตามินบี$_1$ ละลายน้ำได้ เวลาทำหน้าที่เป็นโคเอ็นไซม์อยู่ในรูป TPP หมู่ที่ว่องไวคือ C_2 ของวงแหวน thiazole จะเป็น carbanion เนื่องจากไฮโดรเจนตรง C_2 เป็นแอซิดิคไฮโดรเจน พร้อมที่จะแตกตัวออกเป็น H^+ carbanionหรือ TPP^- ที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่เป็นโคเอ็นไซม์ที่แท้จริง



ตัวอย่างเอ็นไซม์ที่มี TPP^- เป็นโคเอ็นไซม์ ได้แก่ เอ็นไซม์ pyruvate decarboxylase transketolase เป็นต้น ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันโดยเอ็นไซม์แรกนั้น TPP^- จะไปทำปฏิกิริยากับคาร์บอนิลคาร์บอนของไพรูเวท ให้ผลิตผลเป็น CO_2 และอะเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde)

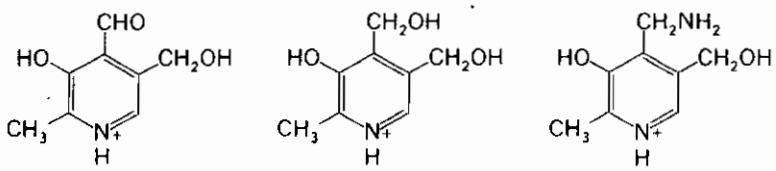


ในปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ transketolase TPP^- จะไปทำปฏิกิริยากับหมู่คีโตของน้ำตาลคีโตส แล้วโยกย้ายคาร์บอนสองอะตอมจากคีโตสไปให้อัลโดส พบปฏิกิริยานี้ได้ในวิถีเปนโตส (ดูหัวข้อ 7.1)



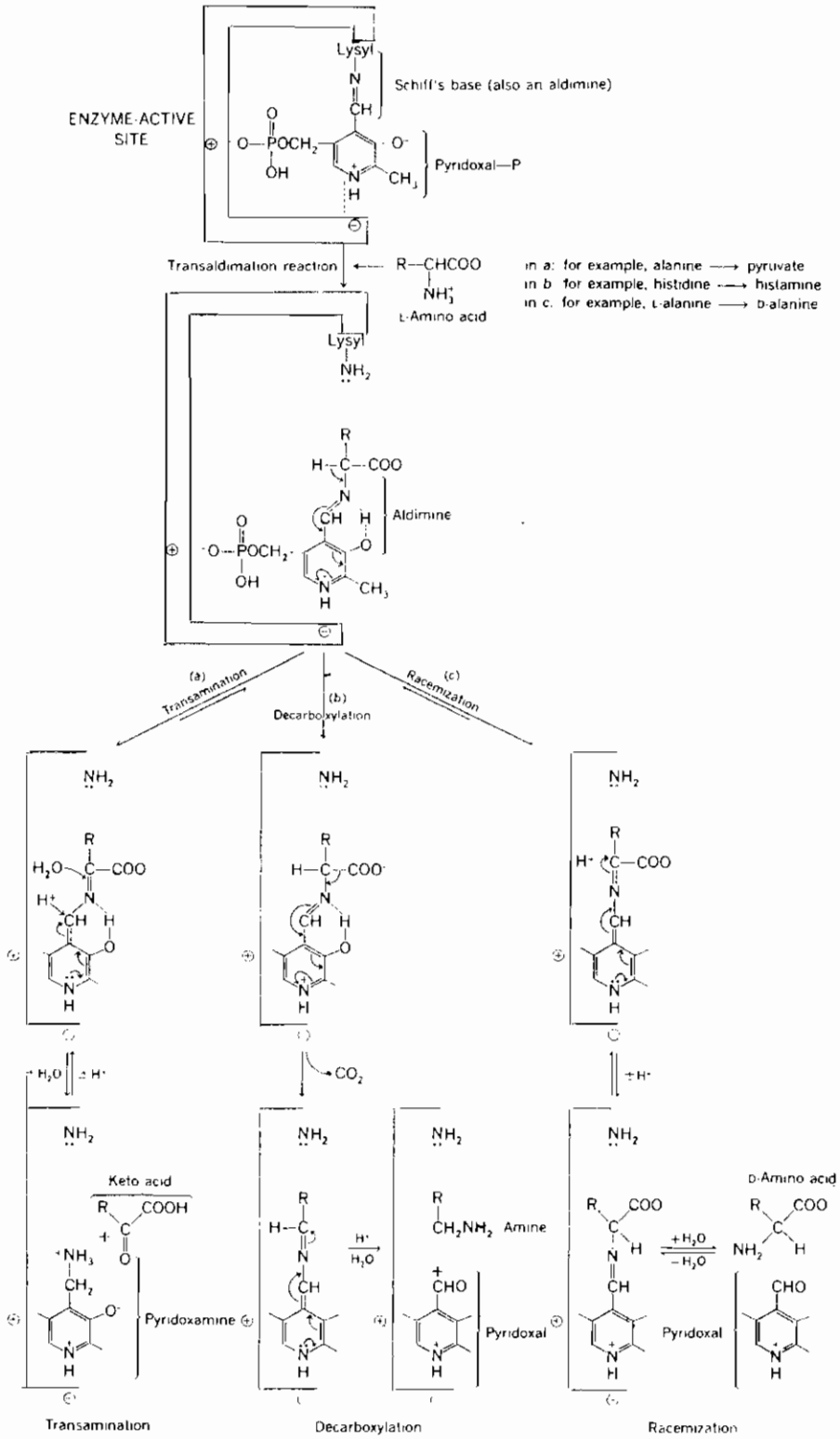
1.4.2.6 ไพริดอกซาลฟอสเฟต (Pyridoxal phosphate, PLP)

กลุ่มของวิตามินบี6 ประกอบด้วยไพริดอกซาล (pyridoxal), ไพริดอกซีน หรือไพริดอกซอล (pyridoxine or pyridoxol) และไพริดอกซามีน (pyridoxamine)



Pyridoxal Pyridoxine or pyridoxol Pyridoxamine

ไพริดอกซาลฟอสเฟตหรือ PLP เป็นวิตามินที่อยู่ในรูปโคเอ็นไซม์ ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญหลายอย่างของกรดอะมิโน เช่น ปฏิกิริยาทรานซ์อะมิเนชัน (transamination) ปฏิกิริยาราซิไมเซชัน (racemization) และปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน เป็นต้น โดยที่ PLP จะจับกับหมู่ Σ-อะมิโนของไลซีนจำเพาะของเอ็นไซม์ในรูป Schiff base เมื่อซับสเตรทคือกรดอะมิโนเข้ามาใกล้กรดอะมิโนจะจับกับ PLP เป็น Schiff base แทน ถ้าเป็นเอ็นไซม์ transaminase จะเร่งปฏิกิริยาทรานซ์อะมิเนชัน เช่น การเปลี่ยนอะลานีนไปเป็นไพรูเวท ถ้าเป็นเอ็นไซม์ decarboxylase เร่งปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน เช่น การเปลี่ยนฮีสทิดีนเป็นฮีสตามีน ถ้าเป็นเอ็นไซม์ racemase เร่งปฏิกิริยาราซิไมเซชัน เช่น การเปลี่ยน L-อะลานีนไปเป็น D-อะลานีน เหล่านี้ล้วนแต่ใช้ PLP เป็นโคเอ็นไซม์ทั้งสิ้น


ENZYME-ACTIVE SITE
Lysyl
Schiff's base (also an aldimine)
Pyridoxal—P
Transaldimation reaction
L-Amino acid
in a: for example, alanine ⟶ pyruvate
in b: for example, histidine ⟶ histamine
in c: for example, L-alanine ⟶ D-alanine
Aldimine
(a) Transamination
(b) Decarboxylation
(c) Racemization
Keto acid
Pyridoxamine
Amine
Pyridoxal
D-Amino acid
Transamination
Decarboxylation
Racemization

1.5 ผลของความเข้มข้นของซับสเตรท ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ ความเป็นกรดเป็นด่าง และอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

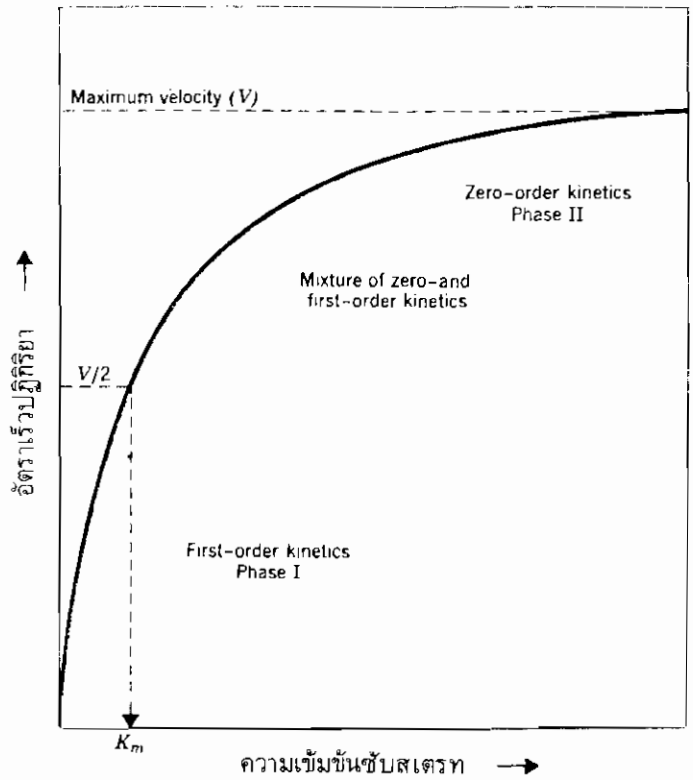
1.5.1 ผลของความเข้มข้นของซับสเตรท

Michaelis อธิบายไว้ว่าปฏิกิริยาการเร่งของเอ็นไซม์ขณะที่ความเข้มข้นเอ็นไซม์คงที่ ความเข้มข้นซับสเตรทแปรเปลี่ยนไปเรื่อยจะเป็นปฏิกิริยาแบบไดเฟสิค (diphasic) คือมีสองเฟส (รูปที่ 1-16) เฟสแรกเป็นเฟสที่ความเข้มข้นซับสเตรทค่อนข้างต่ำ บริเวณเร่งของโมเลกุลเอ็นไซม์ยังไม่อิ่มตัวด้วยซับสเตรท ดังนั้นถ้าเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรท โมเลกุลซับสเตรทจะไปจับที่บริเวณเร่งของโมเลกุลเอ็นไซม์ได้มากขึ้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มสูงขึ้นด้วย เฟสนี้อัตราเร็วของปฏิกิริยาแปรตามความเข้มข้นซับสเตรทจัดเป็นจลนศาสตร์ (kinetic) แบบ first order

เฟสที่สองเป็นเฟสที่ซับสเตรทมีความเข้มข้นสูง บริเวณเร่งของโมเลกุลเอ็นไซม์ทุกโมเลกุลอิ่มตัวไปด้วยซับสเตรท เอ็นไซม์จะทำงานด้วยความสามารถสูงสุดถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรท ก็ไม่มีบริเวณเร่งที่ว่างที่จะให้ซับสเตรทเข้าไปจับ ดังนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรทมากขึ้นเพียงใดก็ตาม หรือพูดอีกนัยหนึ่งคืออัตราเร็วปฏิกิริยาไม่ขึ้นกับความเข้มข้นซับสเตรท จัดเป็นจลนศาสตร์แบบ zero order

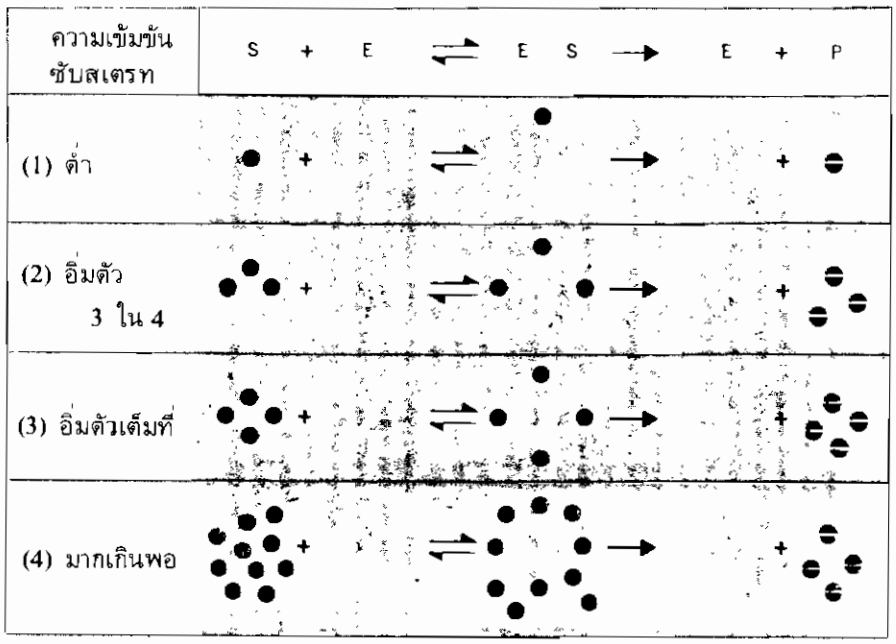
เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นซับสเตรททางแกนนอนและอัตราเร็วปฏิกิริยาทางแกนตั้งจะได้กราฟไฮเปอร์โบลาซึ่งเรียกว่ากราฟเส้นโค้งของ Michaelis-Menten (Michaelis-Menten curve) แสดงให้เห็นเฟสที่หนึ่งที่อัตราเร็วปฏิกิริยาแปรตามความเข้มข้นซับสเตรท ช่วงตรงกลางกราฟจะเริ่มโค้งเข้าหาแกนนอน เป็นช่วงที่มีการผสมคือมีทั้งจลนศาสตร์แบบ first order และ zero order จากนั้นกราฟจะขนานกับแกนนอนเป็นเฟสที่สองมีจลนศาสตร์แบบ zero order อัตราเร็วปฏิกิริยาไม่แปรตามความเข้มข้นซับสเตรท อัตราเร็วสูงสุดที่ได้ คือ ค่า V_{max} จากจุดบนกราฟเส้นโค้งที่ให้ค่า $V = V_{max}/2$ จะให้ค่าความเข้มข้นซับสเตรทค่าหนึ่งบนแกนนอนเรียกว่าค่า K_M ซึ่งเป็นค่าคงที่ Michaelis-Menten (Michaelis-Menten constant)

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นซับสเตรทและความอิ่มตัวที่บริเวณเร่งของโมเลกุลเอ็นไซม์ อาจแสดงเป็นแผนภาพได้ (รูปที่ 1-17) ให้สังเกตกรณีที่ 3 และที่ 4 จะให้ผลิตผลเท่า



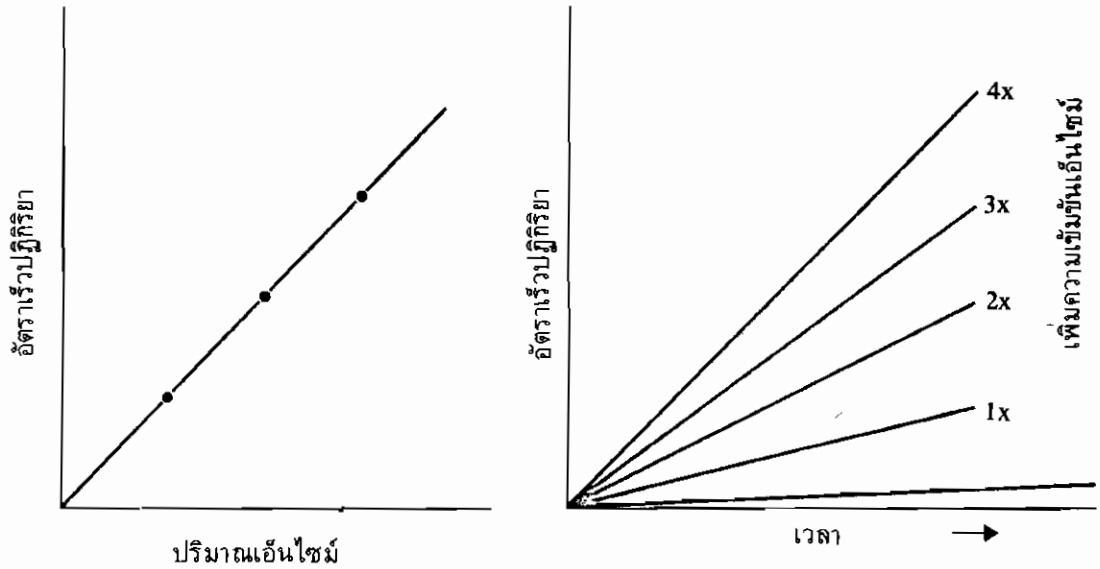
รูปที่ 1-16 ผลของความเข้มข้นซับสเตรทต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา (เมื่อความเข้มข้นเอ็นไซม์คงที่)

กัน ถึงแม้ในกรณีที่ 4 ความเข้มข้นของซับสเตรทจะมากเกินพอก็ตาม



รูปที่ 1-17 แผนภาพแสดงผลของความเข้มข้นซับสเตรทต่อความอิ่มตัวที่บริเวณเร่งของโมเลกุลเอ็นไซม์

1.5.2 ผลของความเข้มข้นของเอ็นไซม์



รูปที่ 1-18 ผลของความเข้มข้นเอ็นไซม์ต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา (เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทมากเกินพอ)

อัตราเร็วปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอ็นไซม์ (รูปที่ 1-18)

1.5.3 ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

เนื่องจากเอ็นไซม์ทุกชนิดเป็นโปรตีนซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีประจุ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง pH จึงมีผลต่อสถานะของไอออนที่หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิลิค และหมู่ R ที่แตกตัวได้ในโมเลกุลของเอ็นไซม์ (ตารางที่ 1-2) สถานะไอออนที่เปลี่ยนไปนี้ส่งผลกระทบต่อคอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์ ตลอดจนโครงสร้างสามมิติของบริเวณเร่งด้วย ยกตัวอย่างการรวมตัวของเอ็นไซม์ (E) กับซับสเตรท (S) ซึ่งอาศัยแรงดึงดูดแบบไอออนิค

ก) $E^- + S^+ \xrightarrow{\text{pH ต่ำ}} E + S^+$

$E^- + S^+ \xrightarrow{\text{pH สูง}} E^- + S$

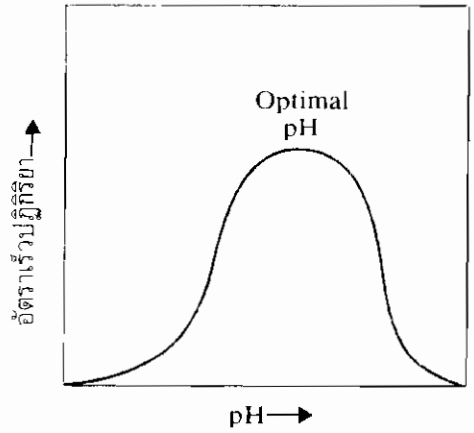
ข) $E^+ + S^- \xrightarrow{\text{pH ต่ำ}} E^+ + S$

$E^+ + S^- \xrightarrow{\text{pH สูง}} E + S^-$

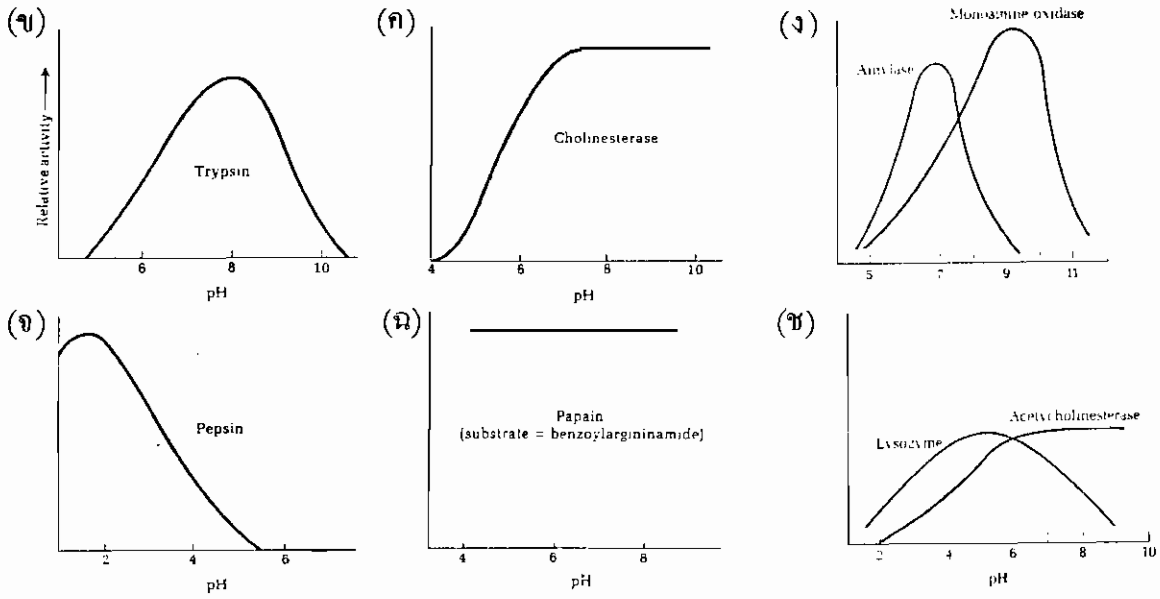
ข้อ ก) ให้เอ็นไซม์มีประจุลบ จะรวมตัวกับซับสเตรทที่มีประจุบวก ข้อ ข) ให้เอ็นไซม์มีประจุบวก จะรวมตัวกับซับสเตรทที่มีประจุลบ การเปลี่ยนแปลง pH ทำให้ประจุบนโมเลกุลเอ็นไซม์และซับสเตรทเปลี่ยนไป จึงมีผลต่อแรงดึงดูดแบบไอออนิคหรือการรวมตัวระหว่างเอ็นไซม์กับซับสเตรท บางครั้ง pH ที่ต่ำหรือสูงจนเกินไปอาจทำให้เอ็นไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติไปได้

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ทั่ว ๆ ไปกับ pH มักจะเป็นกราฟรูประฆังคว่ำที่สมมาตรหรือไม่สมมาตรก็ได้ (รูปที่ 1-19) pH ที่ให้อัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุดเรียกว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดหรือ Optimum pH pH ที่สูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้อัตราเร็วปฏิกิริยาลดลง ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดเป็นค่าเฉพาะของแต่ละเอ็นไซม์ (รูปที่ 1-19) ไม่จำเป็นต้องเป็น pH ที่เป็นกลาง และไม่จำเป็นต้องเท่ากับ pH ภายในเซลล์ที่เอ็นไซม์นั้นอยู่ ซึ่งจะเป็นการควบคุมแอคติวิตีของเซลล์ไปด้วยในตัว

ก)



รูปที่ 1-19 ก) ผลของ pH ต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ทั่ว ๆ ไป
ข-ช) ผลของ pH ต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ต่าง ๆ



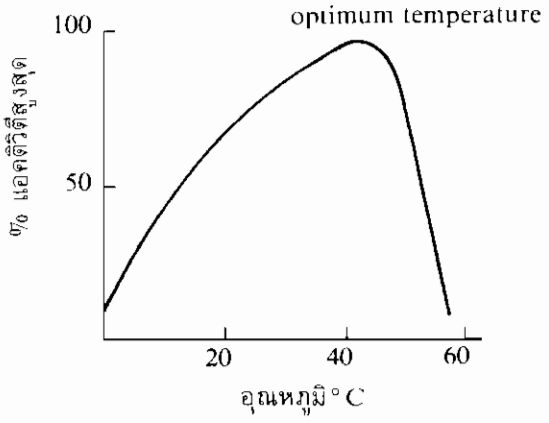
ตารางที่ 1-2 ค่า pK_a ของหมู่R ที่แตกตัวได้ในโมเลกุลเอ็นไซม์

หมู่ R ที่แตกตัวได้	pK_a(25° C)
หมู่ α-คาร์บอกซิลิค (C_1)	3.0 – 3.2
หมู่ γ-, δ-คาร์บอกซิลิค (asp, glu)	3.0 – 4.7
หมู่ฟีนอลิค-OH (tyr)	9.8 – 10.4
หมู่ซัลฟไฮดริล (cys)	8.3 – 8.6
หมู่อิมิดาซอล (his)	5.6 – 7.0
หมู่ α-แอมโมเนีย (N_1)	7.6 – 8.4
หมู่ Σ-แอมโมเนีย (lys)	9.4 – 10.6
หมู่กวานิดิเนียม (arg)	11.6 – 12.6

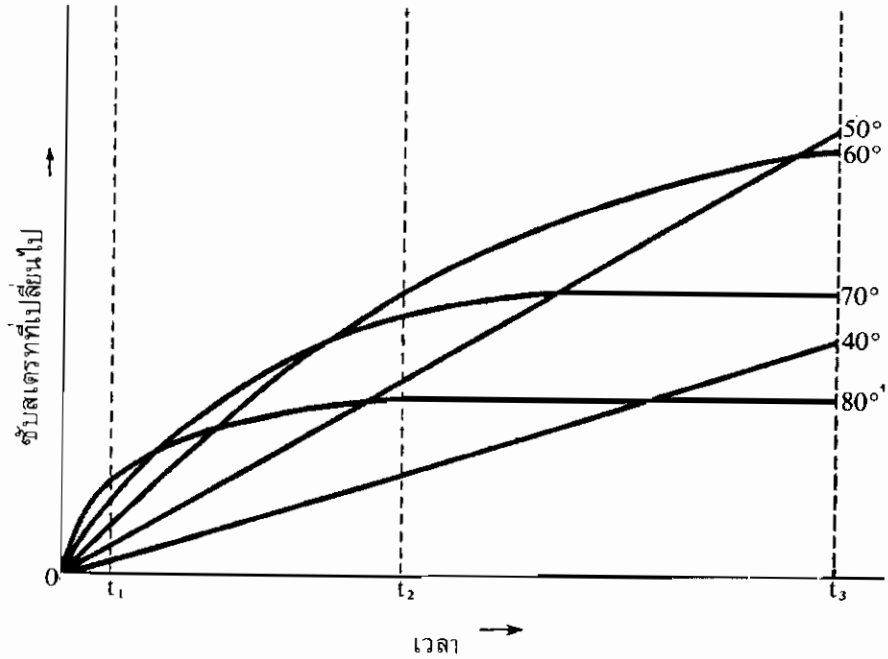
1.5.4 ผลของอุณหภูมิ

การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์โดยการเพิ่มอุณหภูมินั้นกระทำได้ในช่วงที่มีขีดจำกัดเท่านั้น เนื่องจากเอ็นไซม์เป็นโปรตีนอาจเสียสภาพธรรมชาติของโมเลกุลไปได้ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป เอ็นไซม์แต่ละชนิดทนทานต่อความร้อนได้แตกต่างกัน เอ็นไซม์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายสภาพธรรมชาติเมื่ออุณหภูมิประมาณ 50-60°C ยกเว้นเอ็นไซม์ของแบคทีเรียประเภท thermophilic ที่สามารถทนต่อความร้อนได้ถึง 85°C เอ็นไซม์แต่ละชนิดมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเร่งปฏิกิริยาหรือ optimum temperature (รูปที่ 1-20) เช่นเดียวกันกับค่า pH ที่เหมาะสมที่สุด

จากรูปที่ 1-21 จะเห็นว่าเมื่ออุณหภูมิ 40°C หรือ 50°C ปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ยังดำเนินไปได้ตามปรกติ ปริมาณซับสเตรทที่ถูกเปลี่ยนแปลงไปยังเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในลักษณะกราฟเส้นตรง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 60°, 70°, หรือ 80°C กราฟจะเป็นเส้นตรงในช่วงแรกแค่นั้น เมื่อเวลานานขึ้นกราฟจะเป็นเส้นโค้งเข้าหาแกนนอน กราฟช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ 80°C จะสั้นกว่าที่ 70°C และกราฟช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ 70°C จะสั้นกว่าที่ 60°C การที่กราฟเป็นเส้นตรงในช่วงแรกแสดงว่าเอ็นไซม์ยังเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตผลได้ เมื่อกราฟเป็นเส้นโค้งแสดงว่าโมเลกุลเอ็นไซม์เริ่มเสียสภาพธรรมชาติ จึงเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตผลได้น้อยลง จนกระทั่งปริมาณซับสเตรทที่ถูกเปลี่ยนไปนั้นคงที่ไม่เพิ่มขึ้นต่อไปอีก กราฟนี้แสดงให้ทราบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดจะอยู่ในช่วง 50-60°C



รูปที่ 1-20 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา



รูปที่ 1-21 การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

1.6 จลนศาสตร์ (kinetic) ของเอ็นไซม์

1.6.1 การพิสูจน์สมการของ Michaelis-Menten

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

เมื่อ k_1, k_2, k_3, k_4 เป็นค่าคงที่อัตราเร็ว (rate constant) ของแต่ละขั้นตอน

[E] เป็นความเข้มข้นของเอ็นไซม์ทั้งหมด

[S] เป็นความเข้มข้นของซับสเตรททั้งหมด

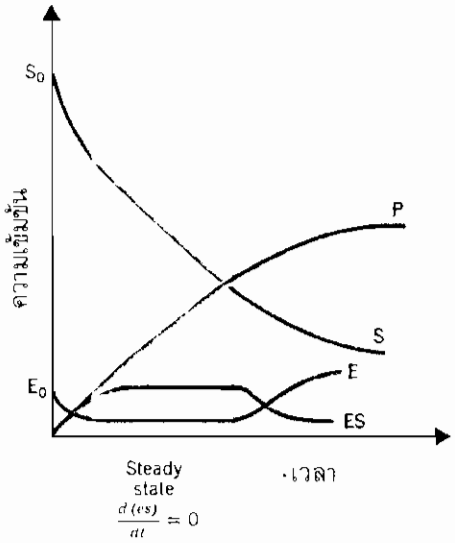
[ES] เป็นความเข้มข้นของ ES คอมเพล็กซ์ทั้งหมด

[E]–[ES] เป็นความเข้มข้นของเอ็นไซม์อิสระที่เวลาใด ๆ

[P] เป็นผลิตผลที่เกิดขึ้น

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

② อัตราเร็วในการสลายตัวของ [ES] หรือ $\frac{-d}{dt}[ES] = (k_2+k_3)[ES]$ ที่สถานะคงตัว (steady state) [ES] ไม่เปลี่ยนแปลง หรือ $\frac{d}{dt}[ES] = 0$ หมายความว่า ① = ②



ดังนั้น $k_1\{[E]-[ES]\}[S] = (k_2+k_3)[ES]$

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

เมื่อ $\frac{k_2+k_3}{k_1} = K_M$ หรือค่าคงที่ Michaelis-Menten

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

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

③ ..... $$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M+[S]}$$

④ ..... $$V = k_3[ES]$$

⑤ ..... $$[ES] = V/k_3$$

⑥.....(มาจากนำ ⑤ แทนค่าใน ③) $V/k_3 = \frac{[E][S]}{K_M + [S]}$

⑦.....(จากสมการ ④) $V_{max} = k_3[E]$

(ในกรณีที่ [ES] = [E] จะให้ค่า V เป็น V_{max} เนื่องจากว่าเอ็นไซม์ทุกโมเลกุลอยู่ในสภาพ ES หมด อิ่มตัวด้วยซับสเตรท ไม่มีเอ็นไซม์อิสระเหลืออยู่เลย เอ็นไซม์จะมีอัตราเร็วสูงสุด ณ จุดนี้)

$$\frac{⑥}{⑦} \quad \frac{V}{k_3 \cdot V_{max}} = \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \cdot \frac{1}{k_3[E]}$$

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$\boxed{V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}}$$

สมการที่ได้นี้คือ สมการของ Michaelis-Menten

เมื่อ V = อัตราเร็วปฏิกิริยา

V_{max} = อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา

K_M = ค่าคงที่ Michaelis-Menten

$[S]$ = ความเข้มข้นซับสเตรท

จากสมการของ Michaelis-Menten $V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$ สามารถนำไปเปรียบเทียบกับกราฟเส้นโค้งของ Michaelis-Menten ได้ในกรณีต่อไปนี้คือ

1) เมื่อความเข้มข้นซับสเตรทต่ำ ให้ถือว่า [S] มีค่าน้อยมาก

ดังนั้น $V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M}$

$$V = k[S]$$

$$V \propto S$$

หมายความว่าอัตราเร็วปฏิกิริยาจะแปรตามความเข้มข้นซับสเตรทเมื่อเวลาที่ซับสเตรทมีความเข้มข้นต่ำ เปรียบได้กับเฟส I ที่เป็น first order ในกราฟเส้นโค้ง Michaelis-Menten

2) เมื่อความเข้มข้นซับสเตรทสูงขึ้น ทำให้ค่า K_M น้อยมากเมื่อเทียบกับ S จึงให้ตัดค่า K_M ทิ้ง

$$\text{ดังนั้น} \quad V = \frac{V_{max}[S]}{[S]}$$

$$V = v_{max}$$

หมายความว่าอัตราเร็วปฏิกิริยาเมื่อซับสเตรทมีความเข้มข้นสูงจะเป็นอัตราเร็วสูงสุด เปรียบได้กับเฟส II ที่เป็น zero order ในกราฟเส้นโค้ง Michaelis-Menten

3) เมื่อความเข้มข้นซับสเตรทมีค่าเท่ากับ K_M

$$\text{ดังนั้น} \quad V = \frac{V_{max}[S]}{2[S]}$$

$$V = \frac{V_{max}}{2}$$

หมายความว่าอัตราเร็วปฏิกิริยาจะเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด

$$\text{จากที่} \quad K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

ในกรณีที่ ES คอมเพล็กซ์แตกตัวให้ผลิตผลช้ามาก หรือค่า k_3 น้อยมาก ทำให้ตัดค่า k_3 ทิ้งได้

$$K_M = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

เมื่อค่า K_M ต่ำแสดงว่า [ES] มีค่ามาก เอ็นไซม์มีแนวโน้มที่จะอยู่ในรูป ES คอมเพล็กซ์มากกว่ารูปเอ็นไซม์อิสระ หมายถึงว่าเอ็นไซม์จะรวมตัวกับซับสเตรทได้ดี หรือเอ็นไซม์มีสัมพรรคภาพ (affinity) สูงต่อซับสเตรท

เมื่อค่า K_M สูงแสดงว่าเอ็นไซม์มีแนวโน้มจะอยู่ในรูปอิสระมากกว่ารูป ES คอมเพล็กซ์ หรือเอ็นไซม์มีสัมพรรคภาพต่ำต่อซับสเตรทนั่นเอง

1.6.2 การเปลี่ยนสมการของ Michaelis-Menten ไปเป็นสมการของ Lineweaver-Burk และสมการของ Eadie-Hofstee

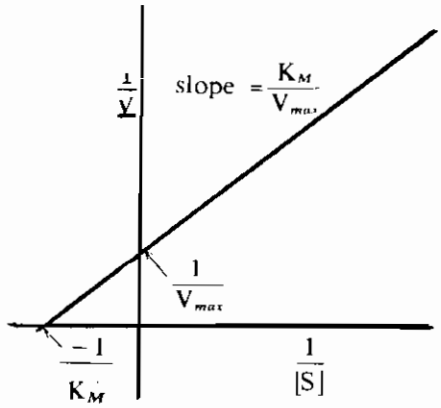
1.6.2.1 สมการของ lineweavaer-Burk จากสมการของ Michaelis-Menten ที่ว่า

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

ให้กลับเศษเป็นส่วนก็จะได้สมการของ Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

เมื่อนำไปเขียนกราฟระหว่าง $\frac{1}{V}$ ซึ่งเป็นแกนตั้ง กับ $\frac{1}{[S]}$ ซึ่งเป็นแกนนอน จะได้กราฟเส้นตรงมีค่าความชัน (slope)= $\frac{K_M}{V_{max}}$ จุดตัดทางแกนตั้ง $= \frac{1}{V_{max}}$ จุดตัดทางแกนนอน = $\frac{-1}{K_M}$ กราฟนี้เรียกว่ากราฟของ Lineweaver-Burk (หรือ double-reciprocal plot)



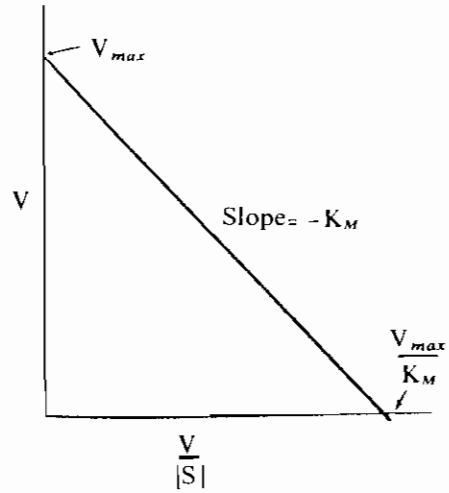
1.6.2.2 สมการของ Eadie-Hofstee จากสมการของ Lineweaver-Burk ให้คูณ $V \cdot V_{max}$ เข้าไปทั้งสองข้าง จะได้สมการของ Eadie-Hofstee

$$\frac{1}{V} \cdot V \cdot V_{max} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} V \cdot V_{max} + \frac{1}{V_{max}} V \cdot V_{max}$$

$$V_{max} = \frac{K_M V}{[S]} + V$$

$$\boxed{V = -K_M \frac{V}{[S]} + V_{max}}$$

เมื่อนำไปเขียนกราฟระหว่าง V ซึ่งเป็นแกนตั้ง กับ V/[S] ซึ่งเป็นแกนนอนจะได้กราฟเส้นตรง มีค่าความชัน = $-K_M$ จุดตัดทางแกนตั้ง = V_{max} จุดตัดทางแกนนอน = V_{max}/K_M กราฟที่ได้เรียกว่า กราฟของ Eadie-Hofstee



การเปลี่ยนสมการของ Michaelis-Menten ซึ่งให้กราฟแบบไฮเปอร์โบลาไปเป็นสมการของ Lineweaver-Burk และสมการของ Eadie-Hofstee ซึ่งให้กราฟเส้นตรงจะทำให้หาค่าพารามิเตอร์ K_M และ V_{max} ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น อีกทั้งกราฟเส้นตรงของ Lineweaver-Burk ยังใช้ศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ได้อีกด้วย

1.6.3 พารามิเตอร์ K_M และ V_{max}

1.6.3.1 ค่าคงที่ Michaelis-Menten หรือ K_M (ตารางที่ 1-3) เป็นค่าที่บอกถึงสัมพรรคภาพของการรวมตัวระหว่างเอ็นไซม์กับซับสเตรทว่าเป็นไปได้ดีเพียงใด ถ้าค่า K_M ต่ำ แสดงว่าการรวมตัวเป็นไปด้วยดีมีสัมพรรคภาพสูง (high affinity) ถ้าค่า K_M สูง แสดงว่าการรวมตัวไม่ค่อยดีมีสัมพรรคภาพต่ำ (low affinity) K_M มีหน่วยเหมือนกับความเข้มข้นซับสเตรท

ตารางที่ 1-3 ค่าคงที่ K_M ของเอ็นไซม์บางชนิด

เอ็นไซม์	ซับสเตรท	K_M
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5×10^{-3} M
Lysozyme	Hexa-N-acetylglucosamine	6×10^{-6} M
β-Galactosidase	Lactose	4×10^{-3} M
Threonine deaminase	Threonine	5×10^{-3} M
Carbonic anhydrase	CO_2	8×10^{-3} M
Penicillinase	Benzylpenicillin	5×10^{-5} M
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	4×10^{-4} M
	HCO_3^-	1×10^{-3} M
	ATP	6×10^{-5} M
Arginine-tRNA synthetase	Arginine	3×10^{-6} M
	tRNA	4×10^{-7} M
	ATP	3×10^{-4} M

จากปฏิกิริยา

$$\text{sugar} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Mg}^{2+}]{\text{hexokinase}} \text{sugar phosphate} + \text{ADP}$$

glucose	allose	mannose
^1CHO $H-{}^2C-OH$ $HO-{}^3C-H$ $H-{}^4C-OH$ $H-{}^5C-OH$ $^6CH_2OH$	^1CHO $H-{}^2C-OH$ $H-{}^3C-OH$ $H-{}^4C-OH$ $H-{}^5C-OH$ $^6CH_2OH$	^1CHO $HO-{}^2C-H$ $HO-{}^3C-H$ $H-{}^4C-OH$ $H-{}^5C-OH$ $^6CH_2OH$
$K_M = 8 \times 10^{-6}$ M	$K_M = 8 \times 10^{-3}$ M $= 8000 \times 10^{-6}$ M	$K_M = 5 \times 10^{-6}$ M

พบว่าค่า K_M ของเอ็นไซม์ hexokinase (HK) ต่อซับสเตรทกลูโคสและแมนโนสไม่ต่างกันมากนัก โครงสร้างของน้ำตาลสองตัวนี้แตกต่างกันเฉพาะตรง C_2 เท่านั้น จึงเป็นการแสดงว่าการจัดตัวของ H, OH ที่ C_2 ยังไม่วิกฤต (critical) ต่อแอคติวิตีของเอ็นไซม์เท่าใดนัก เมื่อพิจารณาค่า K_M ของเอ็นไซม์ต่อกลูโคสและอัลโลสจะเห็นว่าแตกต่างกันมาก โครงสร้างน้ำตาลกลูโคสและอัลโลสแตกต่างเฉพาะการจัดตัวของ H, OH ที่ C_3 จึงแสดงว่าการจัดตัวของ C_3 นี้วิกฤตต่อแอคติวิตีของเอ็นไซม์ hexokinase มาก

เมื่อเปรียบเทียบสัมพรรคภาพของเอ็นไซม์ต่อซับสเตรททั้งสาม ปรากฏว่าสัมพรรคภาพต่อน้ำตาลแมนโนสสูงสุด รองลงไปคือน้ำตาลกลูโคส และสุดท้ายคือน้ำตาลอัลโลส

1.6.3.2 V_{max} (maximum velocity) เป็นค่าที่บอกอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา มีหน่วยเป็นไมโครโมลผลิตผลที่เกิดขึ้น (หรือไมโครโมลซับสเตรทที่หายไป) ต่อหนึ่งหน่วยเวลาซึ่งอาจเป็นนาทีหรือวินาที

ค่า molecular activity เดิมเรียกว่า turnover number เป็นค่าที่บอกอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาเมื่อใช้ปริมาณเอ็นไซม์หนึ่งโมล หน่วยเป็นเวลา$^{-1}$ อาจเป็นนาที$^{-1}$ หรือวินาที$^{-1}$ (ตารางที่ 1-4)

ค่า catalytic center activity เป็นค่า molecular activity ของเอ็นไซม์ที่คิดต่อบริเวณเร่ง 1 แห่ง หน่วยเป็นเวลา$^{-1}$ เช่นกัน

ตัวอย่าง การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ carbonic anhydrase

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

ที่อุณหภูมิ 25-37°C pH 7.0 ปรากฏว่าเอ็นไซม์ carbonic anhydrase 1 ไมโครกรัมให้ค่า V_{max} 1.2×10^{-1} โมล CO_2/นาที ถ้าเอ็นไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 3×10^4 ให้หาค่า molecular activity และ catalytic center activity โดยกำหนดให้ 1 โมเลกุลเอ็นไซม์มี 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีบริเวณเร่ง 1 แห่ง

$$\text{จำนวนโมลของเอ็นไซม์} = \frac{\text{น.น.เอ็นไซม์ที่ใช้}}{\text{น.น.โมเลกุล}}$$

$$= \frac{1 \times 10^{-6}}{3 \times 10^{4}} \text{ โมล}$$

$$\text{ค่า molecular activity หรือ turnover number} = \frac{V_{max}}{\text{จำนวนโมลของเอ็นไซม์}}$$

$$= 1.2 \times 10^{-3} \frac{\text{โมล}}{\text{นาที}} \times \frac{3 \times 10^{4}}{1 \times 10^{-6}} \text{ โมล}$$

$$= 3.6 \times 10^{7} \text{ นาที}^{-1}$$

$$\text{ค่า catalytic center activity} = \frac{3.6 \times 10^{7}}{4} \text{ นาที}^{-1}$$

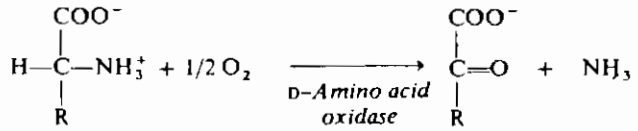
$$= 0.9 \times 10^{7} \text{ นาที}^{-1}$$

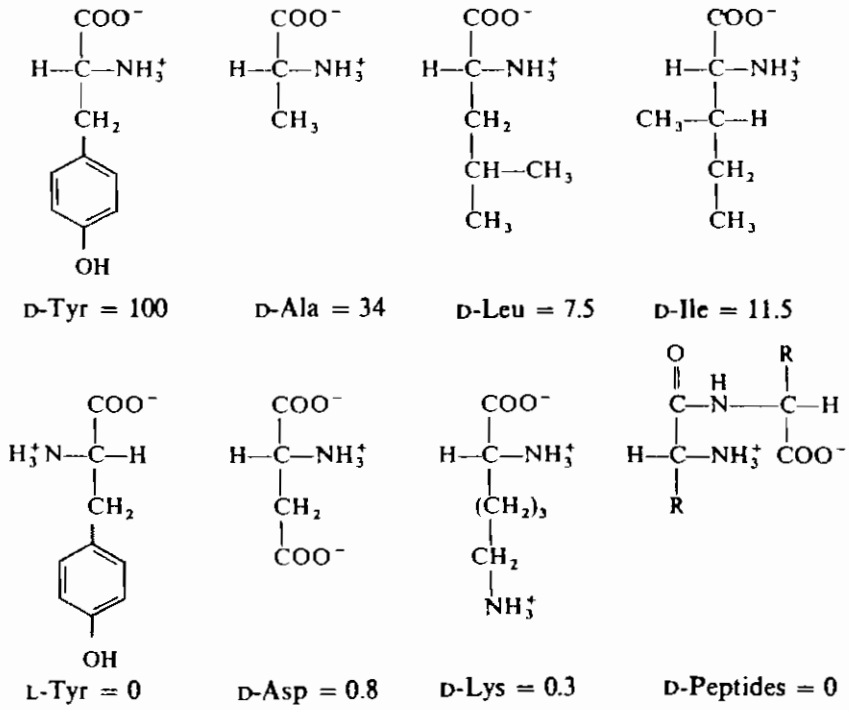
ตารางที่ 1-4 Molecular activity **ของเอ็นไซม์บางชนิด**

เอ็นไซม์	Molecular activity
Carbonic anhydrase C	36,000,000
Δ^5 – 3 – Ketosteroid isomerase	17,100,000
Catalase	5,600,000
β – Amylase	1,100,000
β – Galactosidase	12,500
Phosphoglucomutase	1,240
Succinate dehydrogenase	1,150

อัตราเร็วปฏิกิริยาจะเปลี่ยนไปถ้าหากว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซับสเตรท (รูปที่ 1-22) เอ็นไซม์ D – amino acid oxidase ให้อัตราเร็วปฏิกิริยาต่อ D – tyr เป็น 100 กรดอะมิโนอื่น ๆ เช่น D – ala, D – leu, D – ile อัตราเร็วปฏิกิริยาจะแตกต่างกันออกไป แต่ถ้าเป็น L – tyr, D – asp, D – lys หรือ D – เปปไทด์ อัตราเร็วปฏิกิริยาจะต่ำมาก

ค่าพารามิเตอร์ทั้งสอง K_M และ V_{max} เป็นค่าคงที่ที่สภาวะหนึ่งเท่านั้น ค่านี้จะเปลี่ยนไปเมื่อเปลี่ยนซับสเตรท อุณหภูมิ และ pH





รูปที่ 1-22 อัตราเร็วสัมพัทธ์ (relative rate) **ของปฏิกิริยาการเร่งโดยเอ็นไซม์** D-amino acid oxidase **วัดจากอัตราการใช้ออกซิเจน**

1.6.4 การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์

ตัวยับยั้ง (inhibitor) เป็นสารที่จะไปลดแอคติวิตีของเอ็นไซม์หรือทำให้เอ็นไซม์หยุดทำงาน โดยไปขัดขวางการเกิด ES คอมเพล็กซ์หรือการย่อยสลาย ES คอมเพล็กซ์ ตัวยับยั้งแบ่งออกเป็นสองประเภท ประเภทแรกคือตัวยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible inhibitor) ตัวยับยั้งประเภทนี้จับอยู่กับเอ็นไซม์ไม่แน่นหนามากนัก ไม่มีพันธะโควาเลนท์ระหว่างโมเลกุลเอ็นไซม์และตัวยับยั้ง สามารถแยกตัวยับยั้งประเภทนี้ออกไปได้โดยการไดอะไลซีส (dialysis) ทำให้เอ็นไซม์

มีประสิทธิภาพดังเดิม ประเภทที่สองคือตัวยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible inhibitor ตัวยับยั้งประเภทนี้จะลดหรือหยุดแอคติวิตีของเอ็นไซม์อย่างถาวร มีการสร้างพันธะโควาเลนท์เชื่อมระหว่างโมเลกุลเอ็นไซม์และตัวยับยั้ง

การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท เช่นเดียวกัน คือ

1. การยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible inhibition) ซึ่งแบ่งต่อไปได้อีกเป็น 3 แบบ
   1) การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition)
   2) การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด un-competitive
   3) การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive
2. การยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible inhibition)

1.6.4.1 การยับยั้งแบบผันกลับได้

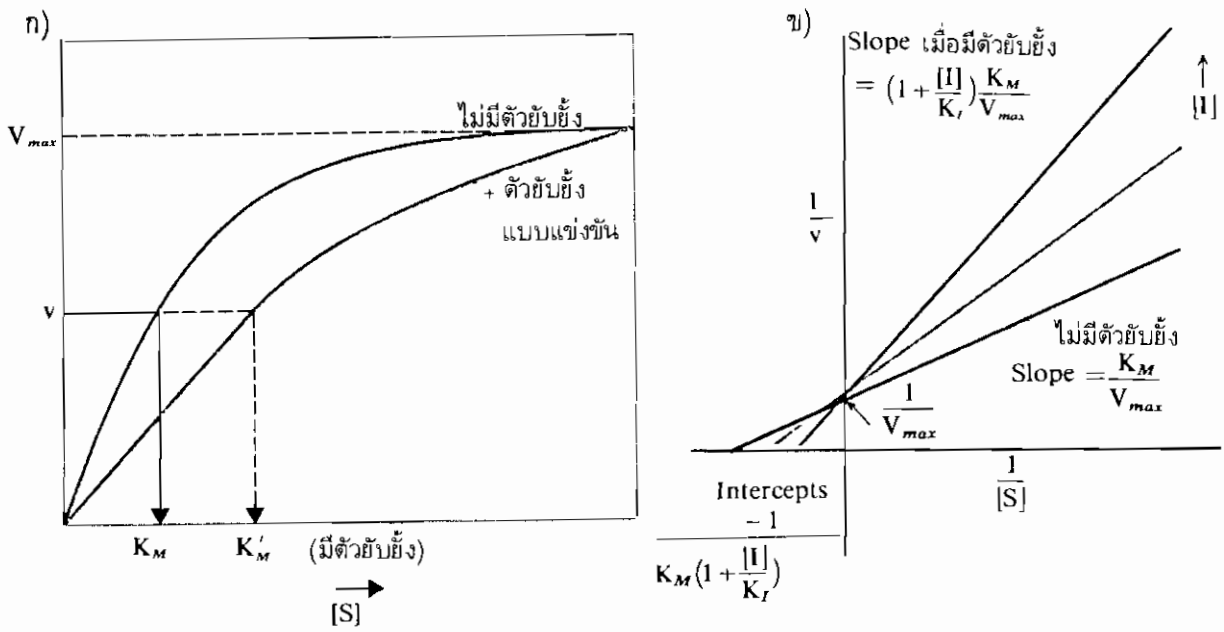
การยับยั้งแบบแข่งขัน

ตัวยับยั้งมักจะเป็นสารที่โครงสร้างคล้ายกับซับสเตรทแต่ทว่าไม่ถูกเผาผลาญหรือย่อยสลายเหมือนซับสเตรท (non-metabolizable analogs) ไปจับกับเอ็นไซม์ตรงบริเวณเร่ง ทำให้ซับสเตรทเข้าไปจับกับเอ็นไซม์ไม่ได้ เป็นการแก่งแย่งกันระหว่างซับสเตรทและตัวยับยั้งในการเข้าไปจับยังบริเวณเร่งของเอ็นไซม์ ถ้าตัวใดตัวหนึ่งเข้าไปจับแล้ว อีกตัวหนึ่งจะเข้าไปจับไม่ได้ เนื่องจากบริเวณเร่งเป็นที่แห่งเดียวกัน คอมเพล็กซ์ EI ที่เกิดขึ้นไม่ให้ผลิตผลออกมา การยับยั้ง

$$E + I \overset{K_I}{\rightleftharpoons} EI \not\rightarrow P$$

เกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ $\frac{\text{ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง}}{\text{ความเข้มข้นของซับสเตรท}}$, K_I และ K_M การยับยั้งชนิดนี้แก้ได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรท

เมื่อเกิดการยับยั้งแบบนี้ ค่า K_M ของเอ็นไซม์ที่มีต่อซับสเตรทจะสูงขึ้น แต่ V_{max} คงเดิม แสดงว่าตัวยับยั้งไปทำให้สัมพรรคภาพระหว่างเอ็นไซม์และซับสเตรทเลวลง การเกิดคอมเพล็กซ์ ES เป็นไปได้ยากขึ้น ตัวยับยั้งมิได้มีผลต่อการสลายตัวของคอมเพล็กซ์ ES แต่อย่างใด



รูปที่ 1-23 กราฟแสดงการยับยั้งแบบแข่งขัน

ก) กราฟไฮเปอร์โบลาของ Michaelis-Menten **ที่เขียนระหว่าง** V **กับ** [S] **เมื่อมีและเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง**

ข) กราฟเส้นตรงของ Lineweaver-Burk **ที่เขียนระหว่าง** $\frac{1}{V}$ **กับ** $\frac{1}{[S]}$ **ถ้าเพิ่มความเข้มข้นตัวยับยั้ง ความชันยิ่งชันมากขึ้น**

ตัวอย่างของตัวยับยั้งแบบแข่งขัน ได้แก่

1. จากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ succinate dehydrogenase

$$\begin{array}{l} CH_2-COO^{\ominus} \\ | \\ CH_2-COO^{\ominus} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{l} CH-COO^{\ominus} \\ \| \\ CH-COO^{\ominus} \end{array}$$

ซัคซิเนท ฟิวมาเรท

ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน คือสารที่มีโครงสร้างคล้ายซัคซิเนทเป็นพวกไดคาร์บอกซิเลทแอนไอออน

COO^-	COO^-	COO^-	COO^-
|	|	|	|
COO^-	CH_2	$(CH_2)_3$	CH_2
	|	|	|
	COO^-	COO^-	$C=O$
			|
			COO^-
ออกซาเลท	มาโลเนท	กลูตาเรท	ออกซาโลอะซิเตท

2. จากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ acetylcholine esterase

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3 + H_2O \longrightarrow CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-OH + HO-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

อะเซทิลโคลีน โคลีน

ตัวยับยั้งแบบแข่งขันคือ $CH_3-CH_2-\underset{\underset{OH}{|}}{CH}-\underset{\underset{CHO}{|}}{CH}-\overset{+}{N}(CH_3)_3$

มัสคารีน (muscarine)

3. จากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ alcohol dehydrogenase (alc.DH)

$$\begin{array}{l} CH_2-OH \\ | \\ CH_2-OH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CHO \\ | \\ CH_2-OH \end{array} \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow \begin{array}{l} COO^- \\ | \\ COO^- \end{array}$$

เอธิลีนกลัยคอล ออกซาเลท

ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน คือ เอธานอล จะไปแย่งเอธิลีนกลัยคอลเข้าจับที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์ alc.DH ทำให้เอธิลีนกลัยคอลไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นออกซาเลทซึ่งเป็นอันตรายร้ายแรง เอธานอลสามารถแก้พิษของเมทานอลได้โดยวิธีการเดียวกัน

4. จากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ aconitase

$$\begin{array}{l} \quad CH_2-COO^- \\ HO-\underset{|}{C}-COO^- \\ \quad CH_2-COO^- \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} \quad CH_2-COO^- \\ H-\underset{|}{C}-COO^- \\ H-\underset{|}{C}-COO^- \\ \quad OH \end{array}$$

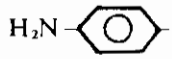
ซิเตรท ไอโซซิเตรท

ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน คือฟลูออโรซิเตรท

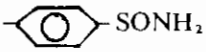
$$\begin{array}{l} \quad F \\ H-\underset{|}{C}-COO^- \\ HO-\underset{|}{C}-COO^- \\ \quad CH_2-COO^- \end{array}$$

5. จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์โคเอ็นไซม์เตทตระไฮโดรโฟเลท (FH_4) ในจุลินทรีย์ต่าง ๆ บางจำพวก

สารเริ่มต้น → → → → → → → โฟเลท → เตทตระไฮโดรโฟเลท (FH_4)



พาราอะมิโนเบนโซเอท

ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน คือ ซัลฟานิลามายด์ 

ซัลฟานิลามายด์จะยับยั้งการสังเคราะห์ขั้นตอนที่ใช้พาราอะมิโนเบนโซเอท ทำให้ไม่ได้โฟเลทและโคเอ็นไซม์เตทตระไฮโดรโฟเลท เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโคเอ็นไซม์นี้จึงทำงานไม่ได้ มีผลให้จุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ ตาย ซัลฟานิลามายด์ไม่มีผลต่อคนเพราะคนสังเคราะห์เตทตระไฮโดรโฟเลทเองไม่ได้ แต่ซัลฟานิลามายด์มีผลต่อแบคทีเรียในลำไส้ของคน

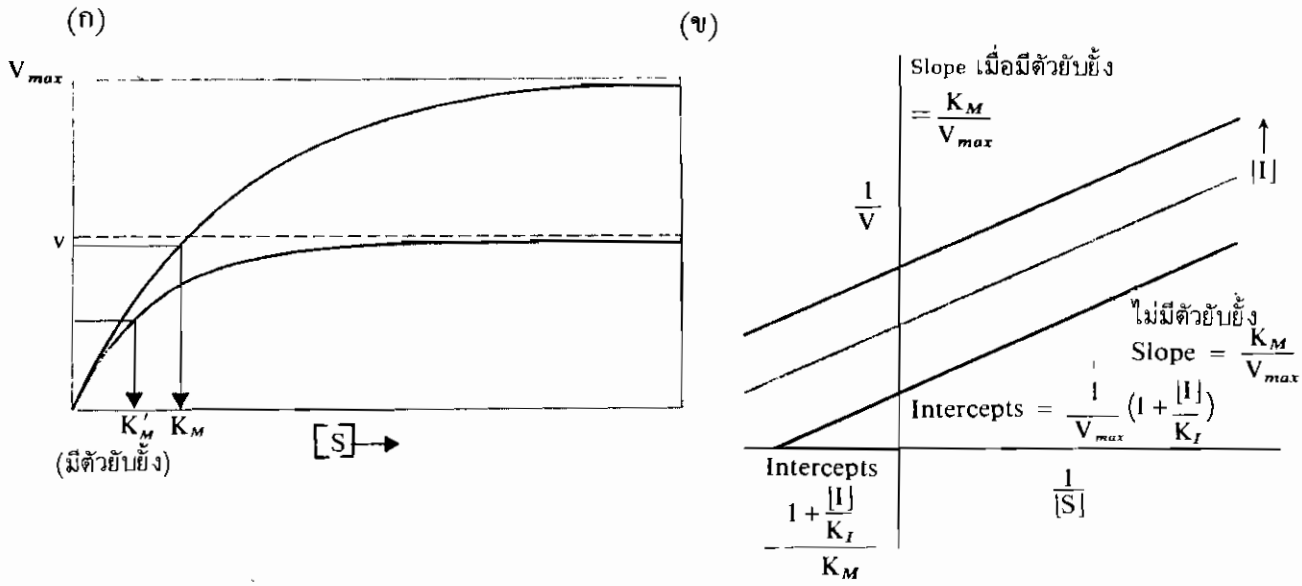
6. เอ็นไซม์ lysozyme ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นซับสเตรท ตัวยับยั้งแบบแข่งขันคือ NAG_3 (tri-N-acetylglucosamine)

การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด un-competitive

ตัวยับยั้งชนิดนี้ไม่จับกับเอ็นไซม์อิสระ แต่จะจับกับ ES คอมเพล็กซ์ซึ่งก็ไม่สามารถให้ผลิตผลออกมาได้

$$ES + I \overset{K_I}{\rightleftharpoons} ESI \not\rightarrow P$$

การยับยั้งแบบนี้ทำให้ทั้งค่า K_M และ V_{max} ลดลง จากกราฟในรูป ข) จะเห็นว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของตัวยับยั้ง เส้นกราฟก็ยิ่งจะสูงขึ้นแต่ขนานกับเส้นกราฟเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง แสดงว่าค่าความชันเท่าเดิมเท่ากับ K_M/V_{max} ไม่สามารถแก้ไขการยับยั้งแบบนี้ได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรท



รูปที่ 1-24 กราฟแสดงการยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด un-competitive

ก) **กราฟไฮเปอร์โบลาของ** Michaelis-Menten **ที่เขียนระหว่าง** V **กับ** [S] **เมื่อมีและไม่มีตัวยับยั้ง**

ข) **กราฟเส้นตรงของ** Lineweaver-Burk **ที่เขียนระหว่าง** $\frac{1}{V}$ **กับ** $\frac{1}{[S]}$ **เมื่อมีและไม่มีตัวยับยั้ง**

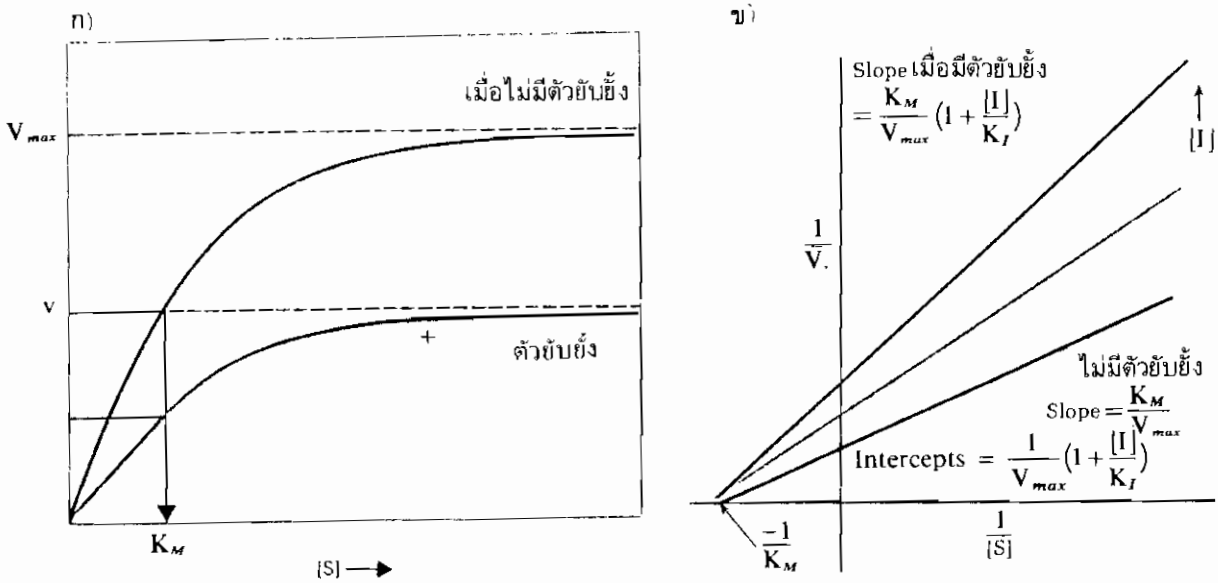
การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive

ตัวยับยั้งจะจับกับเอ็นไซม์อิสระหรือ ES คอมเพล็กซ์ ตรงตำแหน่งอื่นที่มิใช่บริเวณแร่ง

$$E + I \overset{K_I}{\rightleftharpoons} EI$$

$$ES + I \overset{K'_I}{\rightleftharpoons} ESI$$

การยับยั้งแบบนี้ทำให้เกิดผลิตผลได้ช้า นั่นคือ V_{max} ลดลง แต่ค่า K_M คงที่ไม่เปลี่ยนแปลง ไม่สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรท



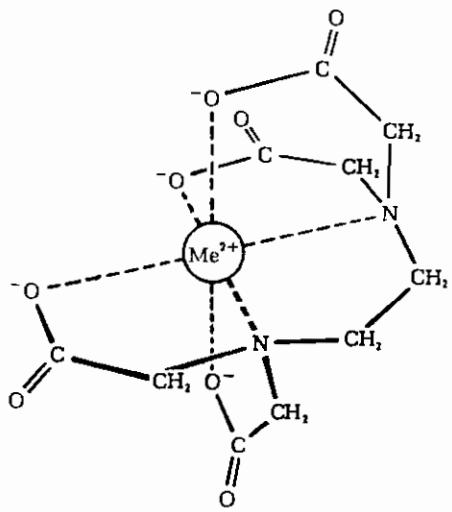
รูปที่ 1-25 กราฟแสดงการยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive

ก) กราฟไฮเปอร์โบลาของ Michaelis-Menten **ที่เขียนระหว่าง** V **กับ** [S] **เมื่อมีและเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง**

ข) กราฟเส้นตรงของ Lineweaver-Burk **ที่เขียนระหว่าง** $\frac{1}{V}$ **กับ** $\frac{1}{[S]}$ **เมื่อมีและเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง**

ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive นี้ มักจะได้แก่พวกรีเอเจนต์ที่สามารถจับแบบผันกลับได้กับเอ็นไซม์ตรงตำแหน่งที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง แต่เป็นหมู่ฟังก์ชันนัลที่ช่วยค้ำจุนคอนฟอร์เมชันของโมเลกุลเอ็นไซม์ เช่น เอ็นไซม์ที่มีหมู่ –SH มักจะถูกยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive โดยพวกไอออนโลหะหนัก

เอ็นไซม์บางชนิดที่ต้องการแคทไอออนเป็นโคแฟคเตอร์ มักจะถูกยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive โดยสารที่สามารถจับแคทไอออนเหล่านั้นไว้ได้ เช่น EDTA (ethylenediamine tetraacetate) เป็นต้น ทำให้เอ็นไซม์นั้น ๆ ทำงานไม่ได้ตามปรกติ (รูปที่ 1-26) ส่วนตัวยับยั้งอื่น ๆ ได้แก่ ไซยาไนด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ ปรอท ตะกั่ว และสารหนู เป็นต้น



รูปที่ 1-26 การจับแคทไอออนของโลหะหนักโดย EDTA

1.6.4.2 การยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้

ตัวยับยั้งประเภทนี้จับกับโมเลกุลเอ็นไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์อย่างแน่นหนาและถาวร แยกออกจากเอ็นไซม์ยากมาก ทำให้เอ็นไซม์หมดความว่องไว ตัวอย่างของตัวยับยั้งเหล่านี้ได้แก่

1. ตัวยับยั้งที่ทำปฏิกิริยากับเซอรีนเอ็นไซม์

เซอรีนเอ็นไซม์ (serine enzyme) หมายถึง เอ็นไซม์ที่มีเซอรีนจำเพาะเป็นหน่วยเร่ง อาทิเช่น เอ็นไซม์ chymotrypsin, trypsin, acetylcholine csterase, phosphoglucomutase, phosphorylase เป็นต้น ตัวยับยั้ง เช่น DIPF หรือสารออร์กาโนฟอสฟอรัสอื่น ๆ จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของเซอรีนจำเพาะ

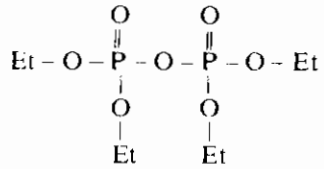
$$E-CH_2OH + (CH_3)_2-CH-O-\underset{\underset{F}{|}}{\overset{\overset{O}{\|}}{P}}-O-CH-(CH_3)_2 \longrightarrow E-CH_2-O-\underset{\underset{O-CH(CH_3)_2}{|}}{\overset{\overset{O}{\|}}{P}}-O-CH(CH_3)_2$$

diisopropyl phosphofluoridate
(DIPF or DFP)

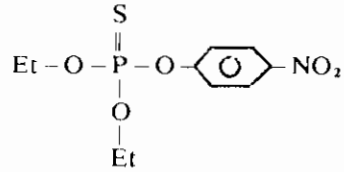
sarin $(CH_3)_2CH-O-\underset{\underset{CH_3}{|}}{\overset{\overset{O}{\|}}{P}}-F$

tabun $C_2H_5-O-\underset{\underset{N(CH_3)_2}{|}}{\overset{\overset{O}{\|}}{P}}-CN$

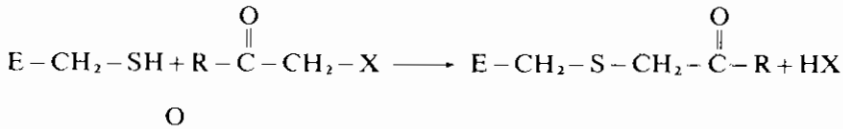
tetraethyl pyrophosphate



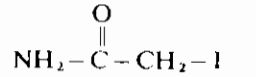
parathion



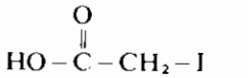
2. ตัวยับยั้งที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ –SH ของเอ็นไซม์



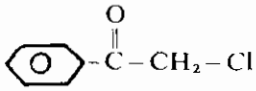
ได้แก่



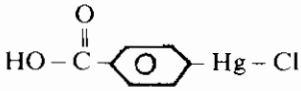
iodoacetamide



iodoacetic acid



chloroacetophenone



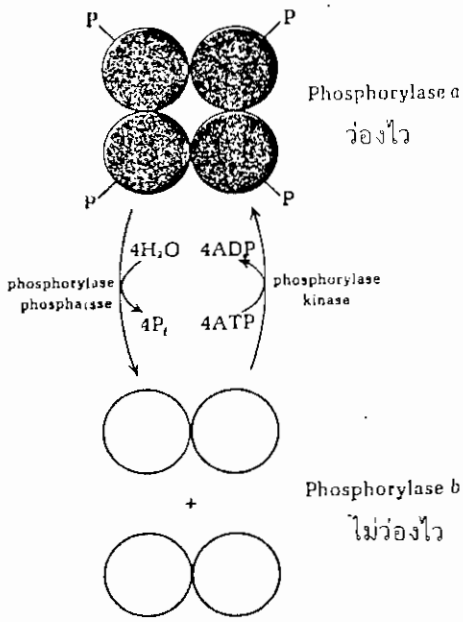
p – chloromercurobenzoic acid

1.7 เอ็นไซม์ควบคุม (regulatory enzyme)

เป็นเอ็นไซม์ที่คอยควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึม แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

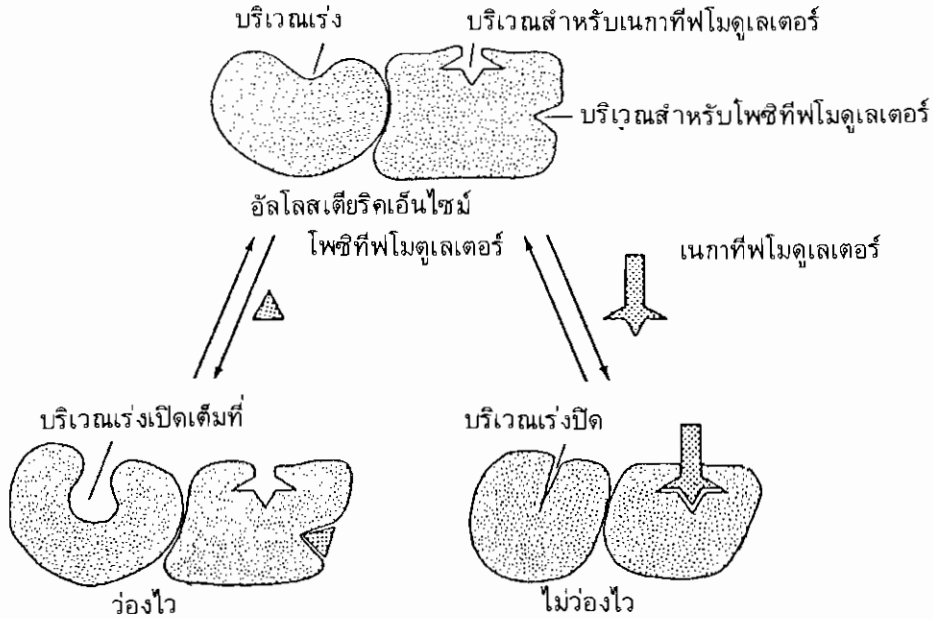
1.7.1 Covalently modulated regulatory enzyme

เอ็นไซม์ควบคุมประเภทนี้จะว่องไวหรือไม่ว่องไว ขึ้นอยู่กับว่ามีการเปลี่ยนแปลงพันธะโควาเลนท์ที่หมู่จำเพาะภายในโมเลกุลเอ็นไซม์โดยเอ็นไซม์อื่นหรือไม่ ตัวอย่างคือ เอ็นไซม์ glycogen phosphorylase จะว่องไว ถ้าเอ็นไซม์ phosphorylase kinase เร่งปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชันเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับเซอรีนจำเพาะภายในเอ็นไซม์ glycogen phosphorylase ซึ่งมีผลทำให้เอ็นไซม์ว่องไวและทำหน้าที่ย่อยสลายไกลโคเจนต่อไป แต่ถ้ามีเอ็นไซม์ phosphorylase phosphatase มาไฮโดรไลซ์หมู่ฟอสเฟตตรงเซอรีนจำเพาะนั้นออกไป ก็จะทำให้เอ็นไซม์ glycogen phosphorylase หมดความว่องไว



1.7.2 อัลโลสเตียริคเอ็นไซม์ (allosteric enzyme)

เป็นเอ็นไซม์ที่แอคติวิตีเปลี่ยนแปลงไปได้ ถ้าหากว่ามีโมเลกุลจำเพาะไปจับแบบผันกลับได้ที่บริเวณควบคุม (allosteric site) อัลโลสเตียริคเอ็นไซม์มักจะเป็นเอ็นไซม์ที่อยู่ตอนต้นวิถีเมตาบอลิซึมต่าง ๆ

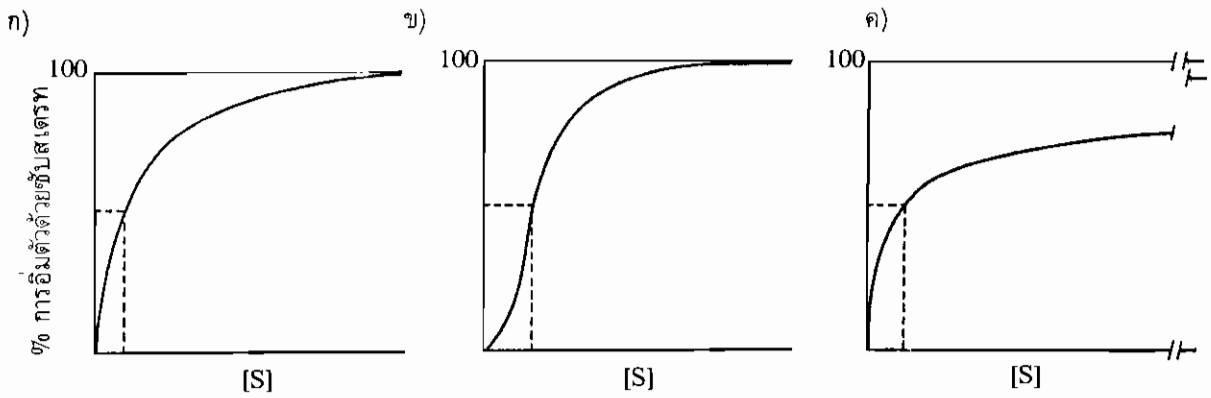


อัลโลสเตียริคเอ็นไซม์จะมีหน่วยย่อย (subunit) สองประเภท คือหน่วยย่อยเร่งปฏิกิริยา (catalytic subunit) และหน่วยย่อยควบคุม (allosteric subunit) ซับสเตรทจะเข้าไปจับที่บริเวณเร่งของหน่วยย่อยเร่งปฏิกิริยา ส่วนโมเลกุลจำเพาะหรือโมดูเลเตอร์ (modulator) จะเข้าไปจับที่บริเวณควบคุมของหน่วยย่อยควบคุม โมดูเลเตอร์ใดที่ไปจับบริเวณควบคุมแล้วมีผลทำให้แอคติวิตีของเอ็นไซม์เพิ่มสูงขึ้น เรียกว่าโพซิทีฟโมดูเลเตอร์ โมดูเลเตอร์ใดที่ไปจับบริเวณควบคุมแล้วมีผลทำให้แอคติวิตีของเอ็นไซม์ลดต่ำลง เรียกว่าเนกาทีฟโมดูเลเตอร์

โมเลกุลอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์มักจะประกอบด้วยหน่วยย่อยต่าง ๆ มากกว่าหนึ่งหน่วย ดังนั้นการทำงานของเอ็นไซม์ประเภทนี้จึงขึ้นอยู่กับโครงสร้างจตุรภูมิ (quarternary structure) ซึ่งมีได้หลายแบบ ความอยู่ตัวของแต่ละแบบขึ้นอยู่กับโมดูเลเตอร์ด้วย หน่วยย่อยต่าง ๆ มีการทำงานเป็นขั้นเป็นตอน เมื่อหน่วยย่อยแรกรวมกับซับสเตรทโมเลกุลแรกแล้ว จะมีการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันไปในทางที่ทำให้หน่วยย่อยที่สองซึ่งอยู่ข้างเคียงสามารถจับกับซับสเตรทโมเลกุลที่สองดีขึ้นหรือเลวลงกว่าเดิมได้ ถ้าเป็นไปในทางที่ดีขึ้นกว่าเดิม จัดว่ามีความร่วมมือกันในทางโพซิทีฟ (positive cooperativity) ถ้าการรวมตัวระหว่างหน่วยย่อยที่สองและซับสเตรทโมเลกุลที่สองเป็นไปในทางที่เลวลงกว่าตอนแรก จัดว่ามีความร่วมมือกันในทางเนกาทีฟ (negative cooperativity) ความร่วมมือดังกล่าวเกิดขึ้นทีละขั้นตอนมิได้เกิดพร้อมกันไป กลไกการเกิดความร่วมมือกันของหน่วยย่อย สามารถอธิบายโดยใช้ sequential model ของ D.E.Koshland หรือ symmetry model ของ J.Monod และคณะ ซึ่งจะไม่ขอกล่าวรายละเอียด

รูปที่ 1-27 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างกราฟของ Michaelis-Menten ที่เป็นของเอ็นไซม์ธรรมดา กราฟซิกมอยด์ (sigmoid) ของเอ็นไซม์ที่มีความร่วมมือกันในทางโพซิทีฟ และกราฟของเอ็นไซม์ที่มีความร่วมมือกันในทางเนกาทีฟ ซึ่งลักษณะกราฟคล้ายไฮเปอร์โบลาแต่แบนกว่า สำหรับกราฟซิกมอยด์นั้นถ้ามีความชันมาก แสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรทเพียงเล็กน้อยจะเพิ่มอัตราเร็วปฏิกิริยาได้มาก

ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือการจับออกซิเจนของไมโอกลอบินเป็นไปตามแบบของเอ็นไซม์ธรรมดา การจับออกซิเจนของฮีโมกลอบินเป็นไปตามแบบอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์ที่มีความร่วมมือกันในทางโพซิทีฟ (รูปที่ 1-28)

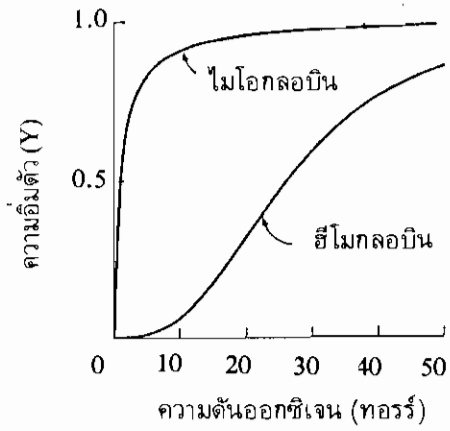


รูปที่ 1-27 กราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวด้วยซับสเตรทกับความเข้มข้นของซับสเตรท

ก) กราฟของเอ็นไซม์ธรรมดา

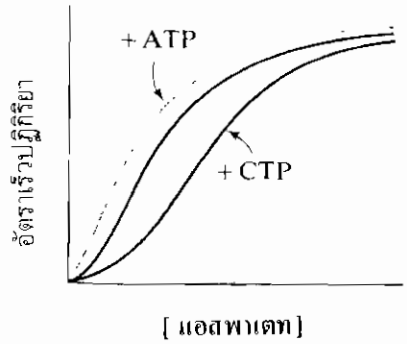
ข) กราฟของอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์ที่มีความร่วมมือกันในทางโพซิทีฟ

ค) กราฟของอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์ที่มีความร่วมมือกันในทางเนกาทีฟ



รูปที่ 1-28 Oxygen dissociation curve **ของไมโอกลอบินและฮีโมกลอบิน แกนตั้งเป็นความอิ่มตัว แกนนอนเป็นความดันของออกซิเจน**

เอ็นไซม์ aspartate transcarbamoylase เป็นอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์ตัวหนึ่ง มี ATP เป็นโพซิทีฟโมดูเลเตอร์ CTP เป็นเนกาทีฟโมดูเลเตอร์ (รูปที่ 1-29)

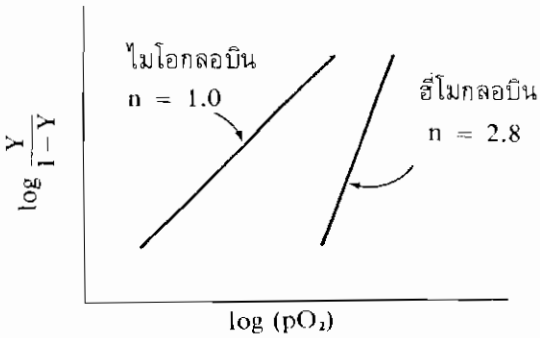


รูปที่ 1-29 กราฟซิกมอยด์ของเอ็นไซม์ aspartate transcarbamoylase
ATP เป็นโพซิทีฟโมดูเลเตอร์ CTP เป็นเนกาทีฟโมดูเลเตอร์

กราฟซิกมอยด์สามารถเปลี่ยนไปเป็นความสัมพันธ์แบบเส้นตรงได้ นั่นคือเปลี่ยนไปเป็นสมการของ Hill

$$\log \frac{V}{V_{max} - V} = n \log [S] - \log k_{diss}$$

เมื่อนำไปเขียนกราฟระหว่าง $\log \frac{V}{V_{max} - V}$ กับ $\log [S]$ จะได้กราฟเส้นตรง มีค่าความชันหรือค่าสัมประสิทธิ์ของ Hill (Hill coefficient) เท่ากับ n ถ้า $n > 1$ หมายถึงมีความร่วมมือกันในทางโพซิทีฟ ถ้า $n < 1$ หมายถึงมีความร่วมมือกันในทางเนกาทีฟ ถ้า $n = 1$ แสดงว่าไม่มีความร่วมมือ



รูปที่ 1-30 กราฟของ Hill แสดงการจับออกซิเจนของไมโอกลอบินและฮีโมกลอบิน ให้ค่า n = 1.0 และ 2.8 ตามลำดับ

1.8 ประโยชน์ของเอ็นไซม์ทางด้านอุตสาหกรรม

เอ็นไซม์มีประโยชน์มากทางด้านอุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหารและสิ่งบริโภคต่าง ๆ เอ็นไซม์จะย่อยสารโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้ง โปรตีน ฯลฯ ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กลง การย่อยสลายของเอ็นไซม์เฉพาะที่ ไม่เหมือนการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่างซึ่งจะย่อยสลายหมด การหยุดยั้งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ก็ทำได้ง่าย เพียงแต่ให้ความร้อนไปทำลายสภาพธรรมชาติของเอ็นไซม์ และเอ็นไซม์ส่วนใหญ่ก็มิได้เป็นพิษหรืออันตรายต่อผู้ผลิตและผู้ใช้

ตารางที่ 1-5 เอ็นไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

เอ็นไซม์	อุตสาหกรรม	การย่อยสลาย
amylase	การผลิตเบียร์	ย่อยคาร์โบไฮเดรทในธัญพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบ
	สิ่งทอ	ย่อยแป้งออกจากเนื้อผ้าก่อนนำไปย้อมสีผ้า
	การทำขนมปัง	ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล แล้วอาศัยยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็น CO_2 ทำให้ขนมปังฟูและมีสีสันที่ดี
	การทำกระดาษ	ย่อยแป้งให้มีความหนืดน้อยลง
	การทำน้ำเชื่อม	ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล
lactase	การทำไอศกรีม	ป้องกันการตกผลึกของแลคโตสในไอศกรีม
Protease ได้แก่		
papain	การผลิตเบียร์	ทำลายโปรตีน-แทนนินคอมเพล็กซ์ในเบียร์ ทำให้เบียร์ไม่ขุ่น
	เกี่ยวกับเนื้อสัตว์	ทำให้เนื้อนุ่มและไม่เหนียว
	ด้านเภสัชกรรม	ผสมในยาสีฟันผงเพื่อขจัดคราบโปรตีนที่ฟัน
pepsin	ด้านเภสัชกรรม	เป็นยาช่วยย่อยในกระเพาะอาหาร
trypsin	อาหาร	ย่อยสลายโปรตีนในอาหารเด็กอ่อน
rennin	ทำเนยแข็ง	ตกตะกอนโปรตีนคาเซอีนจากน้ำนม
subtilisin, alcalase	ผงซักฟอก	ขจัดคราบโปรตีนที่ติดเสื้อผ้า
protease จากแบคทีเรีย	เครื่องหนัง	ขจัดเส้นผมหรือขน โดยไม่ทำลายผมหรือขน หรือหนังสัตว์นั้น ๆ

เอ็นไซม์	อุตสาหกรรม	การย่อยสลาย
bromelain	เกี่ยวกับเนื้อสัตว์	ทำให้เนื้อนุ่มและไม่เหนียว
glucose- -oxidase	อาหาร	ขจัดกลูโคสหรือออกซิเจนออกจากอาหาร
catalase	อาหาร	ขจัด H_2O_2 ออกจากอาหาร โดยใช้ร่วมกับ glucose oxidase
cellulase	การทำน้ำผลไม้	ย่อยกากเซลลูโลส ทำให้น้ำผลไม้ใส
pectinase	การทำน้ำผลไม้	ช่วยย่อยเปคติน ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ในพืช ทำให้น้ำ-ผลไม้ เช่นน้ำองุ่น น้ำแอปเปิลใสน่าบริโภค

บทสรุป

เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพการทำงานที่สูงมากและมีการเร่งปฏิกิริยาที่จำเพาะ การควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์อาจเริ่มตั้งแต่การสังเคราะห์เอ็นไซม์ในรูปแบบที่ยังไม่ว่องไว แล้วกระตุ้นให้ว่องไวในภายหลัง ส่วนเอ็นไซม์ที่สังเคราะห์แล้วอาจจะถูกควบคุมโดยการเปลี่ยน-แปลงพันธะโควาเลนท์ภายในโมเลกุลเอ็นไซม์ ควบคุมโดย allosteric interaction หรือควบคุมโดยฮอร์โมน เอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาด้วยการลดพลังงานการกระตุ้นของปฏิกิริยานั้น ๆ ทำให้ไปถึงสภาวะสมดุลได้เร็วขึ้น แต่ก็มิได้เปลี่ยนแปลงสภาวะสมดุลของปฏิกิริยา

เอ็นไซม์แบ่งเป็น 6 ประเภทคือ oxidoreductase หรือ dehydrogenase, transferase, hydrolase, lyase, isomerase และ ligase ส่วนการเรียกชื่อมี 3 แบบ แบบ trivial name แบบ systematic name และแบบการใช้รหัสเป็นตัวเลข ความจำเพาะในการทำงานของเอ็นไซม์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างซับสเตรท คอนฟอร์เมชันที่จำเพาะของเอ็นไซม์ และลักษณะที่บริเวณเร่งของแต่ละเอ็นไซม์ ทฤษฎีที่อธิบายถึงการรวมตัวระหว่างซับสเตรทและเอ็นไซม์ตรงบริเวณเร่งคือ ทฤษฎีลูกกุญแจและแม่กุญแจ และทฤษฎีการชักนำให้เหมาะสม

เอ็นไซม์ chymotrypsin มี his_{57} ser_{195} และ asp_{102} เป็นหน่วยเร่ง เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์หรือพันธะแอมีดด้วยน้ำ ช่วงแรกเป็นปฏิกิริยาอะซิเลชัน ช่วงหลังเป็นปฏิกิริยาดีอะซิเลชัน เอ็นไซม์ carboxypeptidase A มี glu_{270} และ tyr_{248} เป็นหน่วยเร่ง มี Zn^{+2} เป็นโคแฟคเตอร์ เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ทางปลาย C_t ด้วยน้ำ เข้ามายังภายในสายเปปไทด์ทีละพันธะ เอ็นไซม์ lysozyme มีหน่วยเร่งอยู่ที่ glu_{35} และ asp_{52} ย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิคของคาร์โบไฮเดรท โดยย่อยพันธะดังกล่าวระหว่างน้ำตาลตัวที่ 4 และน้ำตาลตัวที่ 5 ในจำนวนน้ำตาลทั้งหมดหกตัว ที่สามารถเข้าไปวางตัวอยู่ตรงบริเวณเร่งได้ กลไกการเร่งปฏิกิริยาของ lysozyme มี acid catalysis ของ glu_{35} มีการบิดเบี้ยวและความเครียดเกิดขึ้นในโมเลกุลน้ำตาลก่อนที่พันธะไกลโคซิดิคจะแตกออก เอ็นไซม์ acetyl CoA acyltransferase มี cys และ lys เป็นหน่วยเร่ง เร่งปฏิกิริยาการตัดสายไฮโดรคาร์บอนของคีโตแอซิลโคเอ ออกไปทีละสองคาร์บอนตรงตำแหน่งเบต้าคาร์บอน ให้ผลิตผลเป็นอะเซทิลโคเอและคีโตแอซิลโคเอที่คาร์บอนลดลงไปสองอะตอม

โคแฟคเตอร์แบ่งออกเป็นสองประเภท คือ สารอนินทรีย์ได้แก่พวกโลหะต่าง ๆ และสารอินทรีย์ที่มิใช่โปรตีนซึ่งมักจะเรียกกันว่าโคเอ็นไซม์ โคแฟคเตอร์ทำหน้าที่ช่วยการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์บางชนิด NAD^+และ FAD เป็นโคเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์ประเภท dehydro-

genase แต่กลไกการรับไฮโดรเจนแตกต่างกันออกไป โคเอ็นไซม์เอทำหน้าที่เป็นตัวพาหมู่แอซิล ที่มีคุณสมบัติเป็นทั้งอิเลคโตรไฟล์และนิวคลีโอไฟล์ ไบโอตินมักจะจับกับโปรตีนเรียกว่าไบโอซัยติน เป็นโคเอ็นไซม์ที่เป็นตัวพาหมู่คาร์บอกซิล ไธอะมินไพโรฟอสเฟตในรูป carbanion หรือ TPP^- เป็นโคเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์ประเภท decarboxylase, transketolase และ α-keto acid dehydrogenase ไพริดอกซาลฟอสเฟตหรือ PLP เป็นโคเอ็นไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาทรานซ์อะมิเนชัน ดีคาร์บอกซิเลชัน และราซิไมเซชันของกรดอะมิโน

ผลของความเข้มข้นซับสเตรทต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ จะให้กราฟเป็นไฮเปอร์โบลา เรียกว่ากราฟของ Michaelis-Menten แบ่งเป็นสองเฟส เฟสแรกเป็นเฟสที่ซับสเตรทความเข้มข้นต่ำ อัตราเร็วปฏิกิริยาแปรตามความเข้มข้นซับสเตรท เป็นจลนศาสตร์แบบ first order เฟสที่สองซับสเตรทความเข้มข้นสูง อัตราเร็วปฏิกิริยาไม่ได้แปรตามความเข้มข้นซับสเตรท จัดเป็นจลนศาสตร์แบบ zero order ผลของความเข้มข้นเอ็นไซม์ต่ออัตราเร็วปฏิกิริยาในขณะที่มีซับสเตรทมากเกินพอนั้น อัตราเร็วปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอ็นไซม์ อัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ยังขึ้นอยู่กับ pH และอุณหภูมิอีกด้วย แต่ละเอ็นไซม์ก็มี pH ที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งไม่จำเป็นว่าจะต้องเป็น pH ที่เป็นกลางหรือต้องเป็นอุณหภูมิของร่างกาย pH ที่เป็นกรดหรือด่างมากเกินไปหรืออุณหภูมิที่สูงเกินไป อาจทำลายสภาพธรรมชาติของเอ็นไซม์ได้

จากสมการของ Michaelis-Menten ที่ว่า $V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$ สามารถเปลี่ยนไปเป็นสมการของ Lineweaver-Burk คือ $\frac{1}{V} = \frac{K_M \cdot 1}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$ และเปลี่ยนเป็นสมการของ Eadie-Hofstee ได้คือ $V = -K_M \cdot \frac{V}{[S]} + V_{max}$ K_M และ V_{max} เป็นพารามิเตอร์สำคัญที่บอกถึงสัมพรรคภาพการรวมตัวระหว่างซับสเตรทกับเอ็นไซม์และบอกอัตราเร็วปฏิกิริยาตามลำดับ molecular activity เป็นค่าที่บอกอัตราเร็วสูงสุดต่อหนึ่งโมลของเอ็นไซม์ ส่วนค่า catalytic center activity เป็นค่าที่บอก molecular activity ต่อบริเวณเร่งหนึ่งแห่ง การยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์แบ่งออกเป็นการยับยั้งแบบผันกลับได้และแบบผันกลับไม่ได้ การยับยั้งแบบผันกลับได้นั้นไม่มีการสร้างพันธะโควาเลนท์ระหว่างเอ็นไซม์และตัวยับยั้ง แบ่งต่อไปได้อีกสามแบบ แบบแรกการยับยั้งแบบแข่งขันซึ่งมีตัวยับยั้งที่โครงสร้างคล้ายซับสเตรทไปแย่งจับเข้าที่บริเวณเร่ง แต่จะไม่ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตผล การยับยั้งชนิดนี้ทำให้เอ็นไซม์มีค่า K_M ต่อซับสเตรทสูงขึ้นแต่ค่า V_{max} คงเดิม การยับยั้งนี้แก้ได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรท แบบที่สองการยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด un-competitive ตัว

ยับยั้งจะจับกับ ES คอมเพล็กซ์ ยังผลให้ค่า K_M และค่า V_{max} ลดลง ไม่ให้ผลิตผลออกมา แบบที่สามการยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive ตัวยับยั้งจับกับเอ็นไซม์อิสระ หรือ ES คอมเพล็กซ์ก็ได้ ให้ผลิตผลด้วยอัตราที่ช้าลงไป นั่นคือ V_{max} ลดลง แต่ค่า K_M คงเดิม ส่วนการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้นั้น ตัวยับยั้งจะสร้างพันธะโควาเลนท์กับเอ็นไซม์ ทำให้เอ็มไซม์หมดความว่องไว

เอ็นไซม์ควบคุมแบ่งออกเป็นสองประเภท ประเภทแรกคือ covalently modulated regulatory enzyme เป็นเอ็นไซม์ที่จะว่องไวหรือไม่ ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงพันธะโควาเลนท์ที่ตำแหน่งจำเพาะภายในโมเลกุลเอ็นไซม์โดยเอ็นไซม์อื่นอีกต่อหนึ่ง ประเภทที่สองคืออัลโลสเตียริคเอ็นไซม์ เป็นเอ็นไซม์ควบคุมที่มักอยู่ตอนต้นของวิถีเมตาบอลิซึมต่าง ๆ แอคติวิตีขึ้นอยู่กับโมดูเลเตอร์ ถ้ามีโพซิทีฟโมดูเลเตอร์ไปจับที่บริเวณควบคุม ทำให้แอคติวิตีเอ็นไซม์สูงขึ้น แต่ถ้ามีเนกาทีฟโมดูเลเตอร์ไปจับยังบริเวณควบคุม จะทำให้แอคติวิตีเอ็นไซม์ลดลง การทำงานของแต่ละหน่วยย่อยของอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์มีความร่วมมือซึ่งกันและกันและเป็นไปทีละขั้นตอน อาจร่วมมือกันในทางโพซิทีฟซึ่งจะให้กราฟซิกมอยด์ หรือร่วมมือกันในทางเนกาทีฟซึ่งจะให้กราฟไฮเปอร์โบลาที่ค่อนข้างแบนกว่ากราฟของ Michaelis-Menten สมการของ Hill จะแสดงความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรง ให้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Hill เท่ากับค่าความชัน (n) ถ้า $n > 1$ แสดงถึงความร่วมมือในทางโพซิทีฟ ถ้า $n < 1$ แสดงถึงความร่วมมือกันในทางเนกาทีฟ ถ้า $n = 1$ แสดงว่าไม่มีความร่วมมือกัน

คำถามท้ายบท

1. บอกคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของเอ็นไซม์
2. การควบคุมแอคติวิตีของเอ็นไซม์เป็นไปในลักษณะใดบ้าง
3. เอ็นไซม์แบ่งออกเป็นกี่ประเภท อะไรบ้าง แต่ละประเภทเร่งปฏิกิริยาอะไร
4. ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ขึ้นอยู่กับอะไร
5. โครงสร้างซับสเตรทโดยทั่วไปจะต้องประกอบด้วยอะไรบ้าง
6. คอนฟอร์เมชันของเอ็นไซม์หมายถึงอะไร
7. อธิบายความหมายของคำว่า "บริเวณเร่ง" และ "หน่วยเร่ง" ของเอ็นไซม์ พร้อมกับวาดภาพประกอบ
8. ทฤษฎีลูกกุญแจและแม่กุญแจของ E.Fischer ทฤษฎีการชักนำของ D.Koshland อธิบายถึงการรวมตัวระหว่างเอ็นไซม์และซับสเตรทไว้อย่างไร
9. ให้บอกแฟคเตอร์ที่มีผลทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์สูงขึ้นมาก
10. เขียนกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ต่อไปนี้ พร้อมอธิบายรายละเอียด

    เอ็นไซม์ chymotrypsin

    เอ็นไซม์ carboxypeptidase A

    เอ็นไซม์ lysozyme

    เอ็นไซม์ thiolase

11. โคแฟคเตอร์เหมือนกับโคเอ็นไซม์หรือไม่ เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอ็นไซม์อย่างไร
12. NAD^+ และ FAD เป็นโคเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์ประเภทใด ใช้ทดแทนกันได้หรือไม่
13. เขียนกลไกการรับไฮโดรเจนอะตอมของ NAD^+
14. α-คาร์บอนและคาร์บอนิลคาร์บอนในโครงสร้างของแอซิลโคเอมีคุณสมบัติพิเศษอย่างใด
15. ไบโอซัยตินเป็นโคเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาใด
16. โคเอ็นไซม์ใดสังเคราะห์มาจากวิตามินบี, โคเอ็นไซม์ใดสังเคราะห์มาจากวิตามินบี$_2$
17. เขียนโครงสร้าง TPP carbanion อย่างย่อ และยกตัวอย่างปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ที่มี TPP^- เป็นโคเอ็นไซม์
18. PLP เป็นโคเอ็นไซม์ในปฏิกิริยาใดของกรดอะมิโน
19. เขียนกราฟเส้นโค้งของ Michaelis-Menten พร้อมคำอธิบาย
20. ผลของความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่อปฏิกิริยาเป็นอย่างไร

21. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ทั่ว ๆ ไปกับ pH และกราฟลักษณะเดียวกันนี้ของเอ็นไซม์ pepsin และเอ็นไซม์ papain
22. pH ที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) ของเอ็นไซม์จำเป็นต้องเป็นกลาง หรือต้องเท่ากับ pH ภายในเซลล์หรือไม่
23. เขียนกราฟแสดงผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา
24. เขียนสมการของ Michaelis-Menten
25. เราใช้หลักอะไรในการพิจารณาถ้าค่า K_M ต่ำ แสดงว่าเอ็นไซม์มีสัมพรรคภาพสูงต่อซับสเตรท หรือถ้าค่า K_M สูงแสดงว่าเอ็นไซม์มีสัมพรรคภาพต่ำต่อซับสเตรท
26. เขียนกราฟของ Lineweaver-Burk และกราฟของ Eadie-Hofstee
27. ค่าคงที่ Michaelis-Menten หรือ K_M และค่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาหรือ V_{max} บอกถึงอะไร แต่ละค่ามีหน่วยเป็นอย่างไร
28. ค่า molecular activity และค่า catalytic center activity สัมพันธ์กับค่า V_{max} อย่างไร
29. กราฟของ Lineweaver-Burk ที่แสดงการยับยั้งแบบแข่งขัน จะมีจุดตัดของกราฟร่วมกัน ณ จุดใด จุดตัดนั้นอยู่บนแกนตั้งหรือแกนนอน
30. กราฟของ Lineweaver-Burk ที่ให้ค่าความชัน (slope) ของกราฟเท่ากันทุกเส้น แสดงถึงการยับยั้งแบบใด
31. ยกตัวอย่างการยับยั้งแบบแข่งขันพร้อมปฏิกิริยาที่ถูกยับยั้งมา 2 ชนิด
32. EDTA จัดเป็นตัวยับยั้งประเภทใด
33. การยับยั้งแบบแข่งขันที่เกิดขึ้น มีผลเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ K_M หรือ V_{max} หรือไม่
34. ถ้าตัวยับยั้งทำให้ค่า V_{max} ของเอ็นไซม์ลดลง แต่ค่า K_M คงที่ ตัวยับยั้งนั้นจัดอยู่ในประเภทใด
35. ยกตัวอย่างตัวยับยั้งที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้มา 2 ชื่อ
36. เอ็นไซม์ควบคุมแบ่งออกเป็นกี่ชนิด อะไรบ้าง
37. โพซิทีฟโมดูเลเตอร์และเนกาทีฟโมดูเลเตอร์ของอัลโลสเตียริคเอ็นไซม์คืออะไร
38. อธิบายความหมายของคำว่า "ความร่วมมือกันในทางโพซิทีฟ" (positive cooperativity) และคำว่า "ความร่วมมือกันในทางเนกาทีฟ" (negative cooperativity)
39. Oxygen dissociation curve ของฮีโมกลอบินและไมโอกลอบินเปรียบเทียบให้เห็นการทำงานของเอ็นไซม์อย่างไร
40. ค่า n หรือค่าสัมประสิทธิ์ของ Hill บอกถึงอะไร
41. เราจะได้ข้อมูลอะไรจากกราฟของ Lineweaver-Burk เมื่อกำหนดให้ในสิ่งต่อไปนี้

ก) 1/V เป็นศูนย์เมื่อ 1/[S] = −40 ลิตร·โมล$^{-1}$

ข) 1/V เป็นศูนย์เมื่อ $\frac{1}{[S]} \times 10^{-2}$ = −2.5 ลิตร·โมล$^{-1}$

ค) 1/V เป็นศูนย์เมื่อ $\frac{1}{[S]} \times 10^{-3}$ = −3.3 ลิตร·โมล$^{-1}$ เมื่อมี ADP และไม่มี ADP

ง) $\frac{1}{[S]}$ เป็นศูนย์เมื่อ $\frac{1}{V}$ = 3.0×10^{5} นาที·โมล$^{-1}$

จ) $\frac{1}{[S]}$ เป็นศูนย์เมื่อ $\frac{1}{V} \times 10^{-5}$ = 3.0 นาที·โมล$^{-1}$

ฉ) $\frac{1}{[S]}$ เป็นศูนย์เมื่อ $\frac{1}{V} \times 10^{-3}$ = 5.0 นาที·โมล$^{-1}$ และค่าความชัน = 120 นาที·ลิตร$^{-1}$

42. ถ้าอัตราเร็วปฏิกิริยามีหน่วยเป็นไมโครโมล นาที$^{-1}$ ความเข้มข้นของซับสเตรทมีหน่วยเป็นมิลลิโมล·ลิตร$^{-1}$ หน่วยของแกน 1/V, 1/[S], [S]/V, V/[S] จะเป็นอะไร

43. กราฟระหว่าง V กับ V/[S] เราจะได้ข้อมูลอะไรจากสิ่งต่อไปนี้

ก) ค่าความชัน = -2.3×10^{-3} โมล·ลิตร$^{-1}$

ข) เมื่อ V เป็นศูนย์ และ V/[S] 60 ลิตร·นาที$^{-1}$

ค) เมื่อ V/[S] เป็นศูนย์ และ V = 4.6 โมล·นาที$^{-1}$

44. เอ็นไซม์ชนิดหนึ่งเร่งปฏิกิริยาไอซอมเมอไรเซชันเปลี่ยนซับสเตรท S ไปเป็นผลิตผล P โดยใช้เอ็นไซม์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 125,000 ไป 2.5 มิลลิกรัม ปรากฏผลว่าเอ็นไซม์ให้ค่า K_M 3×10^{-3} โมลาร์ และค่า V_{max} 275 ไมโครโมล·นาที$^{-1}$ ให้หาค่า molecular activity ของเอ็นไซม์นี้

45. จากกราฟของ Lineweaver-Burk ให้ค่า 1/V = 25 ชั่วโมง·โมล$^{-1}$ เมื่อ 1/[S] เป็นศูนย์ และเมื่อ 1/V เป็นศูนย์ค่า 1/[S] = -1.3×10^{2} ลิตร·โมล$^{-1}$ ให้หาค่า K_M และ V_{max}

46. ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดเบต้าคีโต (β-keto acid) ที่ความเข้มข้นของซับสเตรทต่าง ๆ วัดเป็นอัตราการให้ CO_2 ดังในตาราง คำนวณหาค่า K_M และ V_{max} ของเอ็นไซม์

โมล CO_2/2 นาที	ความเข้มข้นกรดคีโต (มิลลิโมลาร์)
0.588	2.500
0.500	1.000
0.417	0.714

0.370	0.526
0.256	0.250

47. เอ็นไซม์ glycosidase เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสไกลโคซายด์ไปเป็นน้ำตาลที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์นั้น แอคติวิตีถูกยับยั้งด้วยกรด ความเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นที่วัดได้เมื่อใช้ปริมาณเอ็นไซม์คงที่ ความเข้มข้นของไกลโคซายด์และตัวยับยั้งเป็นตัวแปร ปรากฏดังในตารางข้างล่างนี้ ให้หาค่า K, K_M และ V_{max}

ตัวยับยั้ง (มิลลิโมลาร์)	ไกลโคซายด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ (ไมโครโมล/2 นาที) [S] = 6.25 (มิลลิโมลาร์)	[S] = 0.862 (มิลลิโมลาร์)	[S] = 0.424 (มิลลิโมลาร์)
0.0	0.625	0.455	0.340
1.0	0.488	0.352	0.265
2.0	0.400	0.289	0.217
3.0	0.399	0.244	0.184
4.0	0.294	0.213	0.159

48. ให้หาความสัมพันธ์ระหว่าง K_M และ S เมื่อเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาเป็น 80% ของ V_{max}

49. เอ็นไซม์ transaminase เร่งปฏิกิริยา

กลูตาเมท+ ออกซาโลอะซิเตท ⟶ α-คีโตกลูตาเรท+ แอสพาเตท

โดยมี PLP เป็นโคเอ็นไซม์ ให้หาค่า K_M ของอะโปเอ็นไซม์-โคเอ็นไซม์คอมเพล็กซ์จากข้อมูลที่ให้มา เมื่อความเข้มข้นของกลูตาเมทและออกซาโลอะซิเตทคงที่

มิลลิกรัมกลูตาเมทที่หายไป/นาที	0.17	0.27	0.43	0.65	0.73	0.78	0.79	0.81
PLP ที่ใส่ลงไป (มิลลิโมลาร์)	0.30	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	10.00

50. ซาลิซัยเลท (Salicylates) ยับยั้งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ glutamate dehydrogenase ดังนี้

ซับสเตรท (มิลลิโมลาร์)	มิลลิกรัมผลิตผล/นาที	
	ไม่มีซาลิซัยเลท	เมื่อมีซาลิซัยเลท
1.5	0.21	0.08
2.0	0.25	0.10
3.0	0.28	0.12
4.0	0.33	0.13
8.0	0.44	0.16
16.0	0.40	0.18

ก) การยับยั้งเนื่องจากซาลิซัยเลท เป็นการยับยั้งแบบใด กำหนดความเข้มข้นซาลิซัยเลท 40 มิลลิโมลาร์

ข) หาค่า K_M ของเอ็นไซม์

ค) หาค่า K_I ซึ่งเป็นค่าคงที่การแตกตัว (dissociation constant) ของ EI คอมเพล็กซ์

เฉลยคำตอบข้อ 41-ข้อ 50

41. ก) $K_M = 2.5 \times 10^{-2}$ โมลาร์

ข) $K_M = 4 \times 10^{-3}$ โมลาร์

ค) $K_M = 3 \times 10^{-4}$ โมลาร์, ADP ไม่ใช่ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน

ง) $V_{max} = 3.3 \times 10^{-6}$ โมล·นาที$^{-1}$

จ) $V_{max} = 3.3 \times 10^{-6}$ โมล·นาที$^{-1}$

ฉ) $V_{max} = 2 \times 10^{-4}$ โมล·นาที$^{-1}$, $K_M = 2.4 \times 10^{-2}$ โมลาร์

42. 1/V หน่วยเป็นนาที·ไมโครโมล$^{-1}$

1/[S] หน่วยเป็นลิตร·มิลลิโมล$^{-1}$

[S]/V หน่วยเป็นนาที·ลิตร$^{-1} \times 10^{3}$

V/[S] หน่วยเป็นลิตร·นาที$^{-1} \times 10^{-3}$

43. ก) $K_M = 2.3 \times 10^{-3}$ โมลาร์

ข) $V_{max}/K_M = 60$ ลิตร·นาที$^{-1}$

ค) $V_{max} = 4.6$ มิลลิโมล·นาที$^{-1}$

44. Molecular activity $= 1.38 \times 10^{4}$ นาที$^{-1}$

45. $V_{max} = 0.04$ โมล·ชั่วโมง$^{-1}$

$K_M = 7.7 \times 10^{-3}$ โมล·ลิตร$^{-1}$

46. $V_{max} = 0.35$ ไมโครโมล·นาที$^{-1}$

$K_M = 4.3 \times 10^{-4}$ โมลาร์

47. $K_M = 3.4 \times 10^{-3}$ โมลาร์

$K_M = 4.0 \times 10^{-4}$ โมลาร์

$V_{max} = 0.34 \times 10^{-6}$ โมล·นาที$^{-1}$

48. $[S] = 4 K_M$

49. $K_M = 1.86 \times 10^{-6}$ โมลาร์

50. ก) การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด non-competitive

ข) $K_M = 2.44$ มิลลิโมลาร์

ค) $K_I = 24.8$ มิลลิโมลาร์