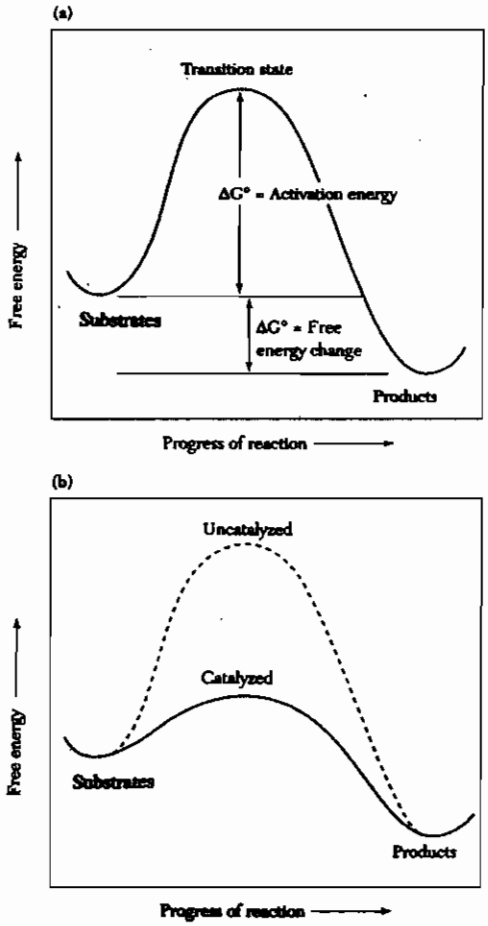
3 เอนไซม์

- ❑บทนำ
- ❑คุณสมบัติของเอนไซม์
- ❑การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์
- ❑การเรียกชื่อเอนไซม์
- ❑ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์
- ❑จลศาสตร์ของเอนไซม์
  - ประโยชน์ของค่า K_m และ V_{max}
  - วิธีการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์
  - การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
- ❑การเตรียมเอนไซม์

บทนำ

กิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่สามารถดำเนินไปได้อย่างสมบูรณ์นั้น ส่วนหนึ่งมาจากการทำงานของเอนไซม์ (enzyme; E) สารที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาทั้งการสร้างและการสลาย การเปลี่ยนแปลงนี้มีการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ เอนไซม์จึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biological catalyst) ในกระบวนการเมตาบอลิสม การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือการลดพลังงานกระตุ้น โดยไม่ทำให้สมดุลของ

ปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีอื่นๆ ดังรูปที่ 3.1 แต่การเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์มีความจำเพาะมากกว่า คือจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) และจำเพาะต่อชนิดของปฏิกิริยา (reaction specificity) รวมทั้งการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไม่รุนแรงเท่าการเร่งปฏิกิริยาเคมีทั่วไปซึ่งต้องใช้อุณหภูมิสูง หรืออยู่ในสภาพความเป็นกรดหรือเบสมาก



รูปที่ 3.1 (a) กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงพลังงานขณะเกิดปฏิกิริยา
(b) ความแตกต่างระหว่างปฏิกิริยาที่มีตัวเร่ง กับปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวเร่ง

เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลประเภทโปรตีน มีบางชนิดที่เป็นกรดนิวคลีอิกประเภทอาร์เอ็นเอที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เรียกไรโบไซม์ (ribozyme) เช่น L_{19}RNA ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสลายและการเชื่อมต่อของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ เอนไซม์ที่เป็นโปรตีนเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวหรือหลายสาย มีลักษณะโครงสร้างเป็นโปรตีนชนิดก้อนกลม มีการม้วนทบของสายเปปไทด์ในโครงสร้างระดับตติยภูมิ เกิดเป็นบริเวณเร่ง (active site) ที่เหมาะสมทั้งขนาด รูปร่าง และสภาพขั้ว ในการจับตัวกับสับสเตรท (substrate; S) ทำให้เกิดสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรท (enzyme–substrate complex; ES) ซึ่งสับสเตรทจะถูกชักนำให้เข้าสู่สภาพเปลี่ยนได้รวดเร็วขึ้น เนื่องจากว่าพลังงานกระตุ้นลดลง จากนั้นสับสเตรทในสภาพเปลี่ยนนี้มีการเปลี่ยนแปลง และแตกตัวให้ผลิตผล (product; P) หลุดไปจากเอนไซม์ ดังรูปที่ 3.2 ทั้งนี้เอนไซม์สามารถไปจับกับสับสเตรทตัวใหม่อีก และทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาให้ผลิตผลต่อไป

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$

รูปที่ 3.2 แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสับสเตรทให้ไปเป็นผลิตผล

คุณสมบัติของเอนไซม์

คุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์สรุปได้ดังนี้

1. เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อชนิดของปฏิกิริยา และเลือกทำปฏิกิริยากับสับสเตรทอย่างจำเพาะ เช่น เอนไซม์อะไมเลสย่อยเฉพาะคาร์โบไฮเดรทไม่สามารถย่อยโปรตีนได้

2. เอนไซม์เป็นสารอินทรีย์ประเภทโปรตีน มีบางชนิดเท่านั้นที่เป็นอาร์เอ็นเอ

3. เอนไซม์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และจำนวนโครงสร้างหลังจากทำปฏิกิริยาแล้ว

4. เอนไซม์ควบคุมปฏิกิริยาให้มีอัตราเร็วที่เหมาะสม

5. เอนไซม์ไปลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้สมดุลของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลง

6. เอนไซม์ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีได้ถึงแม้จะมีปริมาณน้อย

7. เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้นับล้านเท่า

8. เอนไซม์ทำงานได้ที่อุณหภูมิและ pH ที่จำกัด

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์

มนุษย์มีการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์มานานก่อนที่จะรู้จักคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยเฉพาะในด้านการผลิตอาหาร ตัวอย่างเช่น ก่อนปีคริสตศักราช มีการใช้เอนไซม์จากกระเพาะของแกะหรือแพะมาผลิตเนยแข็ง ปี ค.ศ.1783 มีการใช้เอนไซม์จากพืชมาย่อยเนื้อสัตว์ให้นุ่มขึ้น ปี ค.ศ.1814 มีการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้งและการผลิตน้ำตาล จากนั้นมีการคิดค้นและพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์เพื่อนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ จนถึงยุคหลังปี ค.ศ.1980 มีการนำเทคนิคทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (genetic engineering) มาพัฒนาการผลิตเอนไซม์ และมีการใช้วิศวกรรมโปรตีน (protein engineering) มาปรับปรุงเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติตามต้องการ ประโยชน์ของเอนไซม์มีมากมาย ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่จำเพาะ โดยสามารถจำแนกชนิดของสับสเตรทและชนิดของปฏิกิริยา เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ด้วยความเร็วสูง คือสามารถเร่งปฏิกิริยาให้เกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ประมาณ 10^8 ถึง 10^{20} เท่า และสามารถเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงที่อุณหภูมิและความดันปกติ การใช้เอนไซม์จึงให้ผลผลิตสูงและมีผลข้างเคียงต่ำ ประโยชน์ของเอนไซม์ด้านต่างๆ มีดังนี้

1. ด้านอุตสาหกรรม มีการนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร การผลิตกระดาษ เครื่องหนัง สิ่งทอ ผงซักฟอก ฟิล์ม และการผลิตอาหารสัตว์ เป็นต้น ส่วนใหญ่เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้มาจากจุลินทรีย์จากกระบวนการหมัก (fermentation) ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เอนไซม์ในการย่อยสารจากธรรมชาติ

เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะตามต้องการ เช่น การใช้กระบวนการย่อยแป้งเพื่อผลิตน้ำตาล กรดซิตริก ผงชูรส หรือยาปฏิชีวนะ การใช้เอนไซม์เพื่อดัดแปลงโครงสร้างของแป้งในการผลิตขนมอบ โดยใส่เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (alpha amylase) ลงในแป้งขนมปัง เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลมอลโตส เมื่อยีสต์ใช้น้ำตาลมอลโตสจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดลักษณะแป้ง dough ที่ดี

2. ด้านการแพทย์

2.1 เพื่อการสังเคราะห์ยา ยาแผนปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์ช่วยในการสังเคราะห์ เช่น การใช้เอนไซม์เพนนิซิลลินอะไคเลส (penicillin acylase) จากแบคทีเรีย *E. coli* ในการผลิตยาเพนนิซิลลินควบคู่กับการสังเคราะห์ทางเคมี หรือการใช้เอนไซม์ geranygeraniol-18-hydroxylase จากใบเปล้าน้อย เพื่อผลิตยาแก้โรคกระเพาะ เป็นต้น

2.2 เพื่อการวินิจฉัยโรค สามารถใช้เอนไซม์เพื่อหาระดับสารต่างๆ ในร่างกาย เช่น การใช้เอนไซม์ cholesteral esterase เพื่อหาระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด ใช้เอนไซม์ยูรีเอส (urease) เพื่อหาระดับกรดยูริก (uric acid) ใช้เอนไซม์ glucose oxidase เพื่อหาระดับน้ำตาลกลูโคส หรือการใช้เอนไซม์ glycerol-3- phosphate dehydrogenase เพื่อหาระดับของไตรกลีเซอไรด์ในเลือด เป็นต้น การวัดระดับเอนไซม์ในร่างกายยังสามารถบ่งชี้ถึงการเกิดโรคได้ เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็งพบว่ามีเอนไซม์ acid phosphatase สูงขึ้น

2.3 เพื่อการรักษาโรค สำหรับผู้ป่วยที่ตับอ่อนผิดปกติ ซึ่งมีผลต่อการผลิตน้ำย่อยที่หลั่งสู่ลำไส้เล็ก การรักษาจึงมีการให้เอนไซม์ในกลุ่มย่อยอาหารประเภทต่างๆ แก่ผู้ป่วย เช่น ไลเปส, อะไมเลส และโปรติเอส นอกจากนี้ยังสามารถใช้เอนไซม์บางชนิดเพื่อลดอาการอักเสบหรืออาการบวมได้

3. ด้านการเกษตร การใช้เอนไซม์เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ และการปรับปรุงคุณภาพผลผลิตทางการเกษตร

4. ด้านสิ่งแวดล้อม การใช้เอนไซม์ย่อยสลายสารที่ทำให้น้ำเน่าเสีย หรือใช้เอนไซม์ย่อยพลาสติกเพื่อให้พลาสติกสลายตัวได้ง่ายขึ้น

การเรียกชื่อเอนไซม์

การเรียกชื่อเอนไซม์สามารถเรียกตามชื่อสามัญที่ใช้กันทั่วไป (common name หรือ trival name) ซึ่งตั้งตามสับสเตรทที่จำเพาะ หรือตามปฏิกิริยาที่เร่ง โดยมีการเติม –ase ที่ส่วนท้าย เช่น lactatedehydrogenase, pyruvatedecarboxylase และ hexokinase เป็นต้น แต่มีเอนไซม์บางชนิดที่มีชื่อเรียกโดยไม่ได้ลงท้ายด้วย –ase เช่น papain, trypsin หรือ bromelain เป็นต้น เนื่องจากเอนไซม์ที่พบนั้นมีเป็นจำนวนมาก เพื่อให้มีความเข้าใจตรงกันคณะกรรมการนานาชาติด้านเอนไซม์ (The International Commission on Enzymes) ได้ตั้งระบบการเรียกชื่อให้เป็นสากล คือเรียกชื่อเอนไซม์ตามระบบ (systematic name) โดยแบ่งเอนไซม์ออกเป็น 6 กลุ่ม (class) ซึ่งมีหมายเลขกำกับ รูปแบบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แสดงดังรูปที่ 3.3

กลุ่มที่ 1 **Oxidoreductases** เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ รีดักชัน

กลุ่มที่ 2 **Transferases** เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายส่วนหนึ่งของสับสเตรทไปยังสับสเตรทอีกตัวหนึ่ง

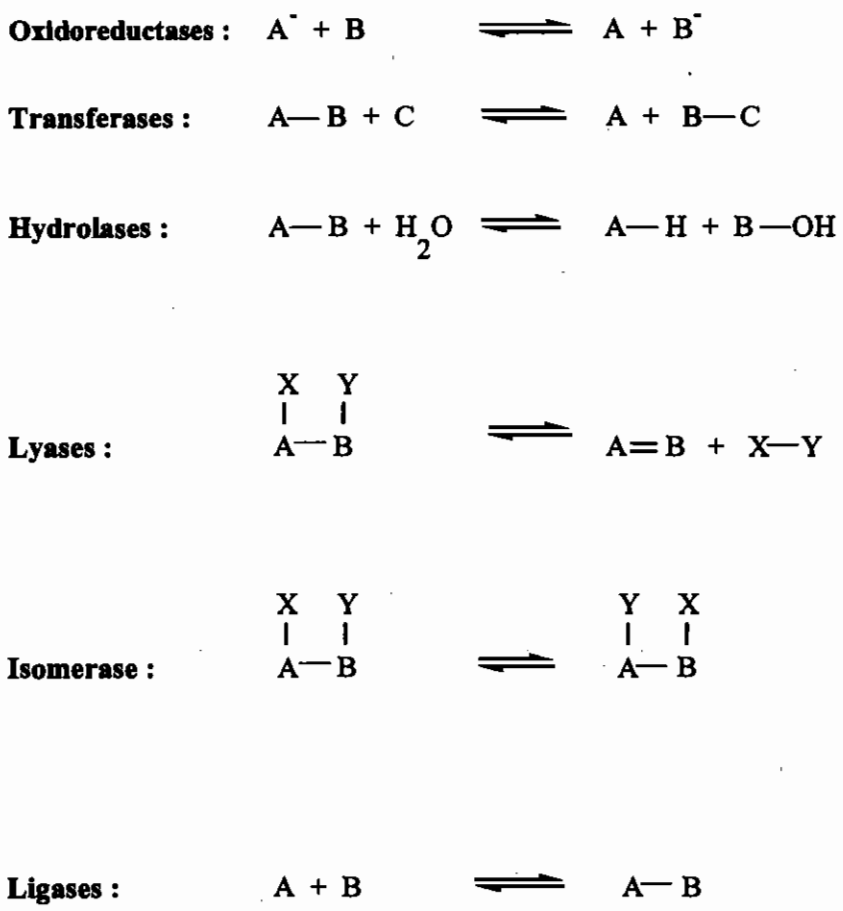
กลุ่มที่ 3 **Hydrolases** เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทด้วยน้ำ

กลุ่มที่ 4 **Lyases** เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่เข้าที่พันธะคู่ หรือเร่งปฏิกิริยาดึงเอาส่วนหนึ่งออกจากสับสเตรท แล้วทำให้เกิดพันธะคู่

กลุ่มที่ 5 **Isomerases** เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์

กลุ่มที่ 6 **Ligases หรือ Synthases** เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะ โดยการสลาย ATP

เอนไซม์แต่ละกลุ่มยังมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยๆ เพื่อบ่งบอกถึงสับสเตรทและลักษณะสำคัญของปฏิกิริยา โดยมีหมายเลขกำกับที่เป็นระบบเช่นกัน เอนไซม์แต่ละชนิดมีการเรียกชื่อตามระบบ และระบุชนิดด้วยตัวเลขที่เป็นรหัสสี่ตัวเพื่อแทนกลุ่ม (class) กลุ่มย่อย (subclass) กลุ่มภายในกลุ่มย่อย (subsubclass) และหมายเลขแสดงลำดับ (serial number) เช่น เอนไซม์ยูรีเอสมีชื่อเรียกตามระบบและระบุด้วยตัวเลข คือ urea amidohydrolase (EC 3.5.1.5) และเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสมีชื่อเรียกตามระบบ คือ 1,4-glucan 4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.1)



รูปที่ 3.3 แสดงรูปแบบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

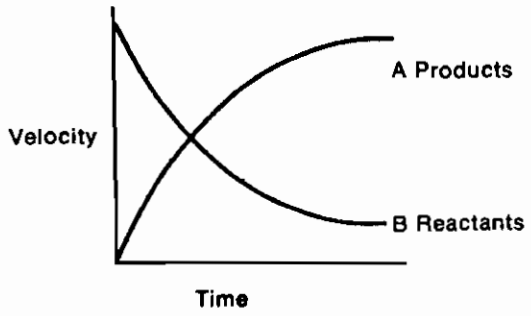
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาอัตราการทำงานของเอนไซม์โดยวิเคราะห์จากอัตราเร็วของปฏิกิริยา ซึ่งหมายถึงการลดลงของสับสเตรทต่อเวลา หรือการเพิ่มขึ้นของผลิตผลต่อเวลา

$$v = -d[S]/dt$$

$$= d[P]/dt$$

การศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ในสภาวะต่างๆ พบว่าปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ในช่วงแรกๆ จะมีการเพิ่มขึ้นของผลิตผลหรือการลดลงของสับสเตรทอย่างรวดเร็ว แต่ในระยะหลังจะค่อยๆ ช้าลง และหยุดลงในที่สุด เมื่อเขียนกราฟได้ลักษณะกราฟดังรูปที่ 3.4 ดังนั้นการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์จะศึกษาจากอัตราเร็วของปฏิกิริยาในช่วงแรกที่ให้กราฟเส้นตรง ซึ่งเรียกว่าอัตราเร็วเริ่มต้น (initial velocity; v)



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วกับเวลา

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยามีหลายประการ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ (enzyme concentration; [E]) ความเข้มข้นของสับสเตรท (substrate concentration; [S]) อุณหภูมิ (temperature) สภาพความเป็นกรด-เบส (pH) โคแฟคเตอร์ (cofactor) สารกระตุ้นปฏิกิริยา (activator) หรือสารยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitor) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาผลของปัจจัยใดปัจจัยหนึ่ง ต้องทำให้ปัจจัยอื่นๆ คงที่ การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์มีรายละเอียดดังนี้

1. ความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของสับสเตรท

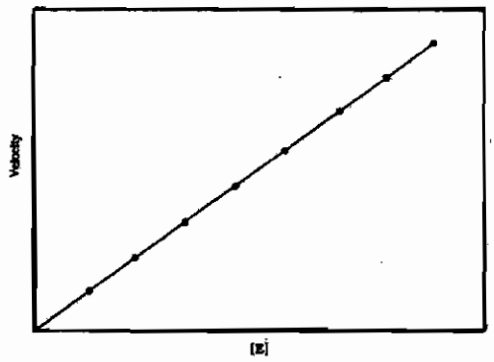
ในสภาวะที่ความเข้มข้นของเอนไซม์หรือความเข้มข้นของสับสเตรทมากขึ้น การเกิดปฏิกิริยจะเกิดด้วยอัตราเร็วที่สูงขึ้น แต่พบว่ามีลักษณะที่ต่างกัน คืออัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทคงที่ ในขณะที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง อัตราเร็วเริ่มต้นขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์นั้น เมื่อเขียนกราฟระหว่าง v กับ [E] จะได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 3.5 เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ให้คงที่ และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสับสเตรท อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรท ในลักษณะที่เมื่อเขียนกราฟระหว่าง v กับ [S] ได้กราฟไฮเพอร์โบลาดังรูปที่ 3.6

2. อุณหภูมิ

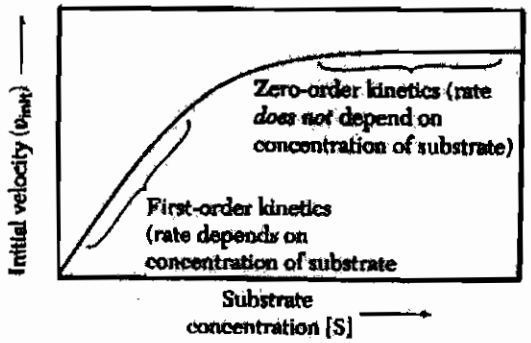
เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้โมเลกุลของสารที่เข้าทำปฏิกิริยามีพลังงานเพิ่มมากขึ้น จึงเข้าสู่สภาพเปลี่ยนได้เร็ว แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ ดังนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงลดลงอย่างรวดเร็ว ดังรูปที่ 3.7 อุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์ทำงานแล้วได้อัตราเร็วสูงสุด เรียกอุณหภูมินั้นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 20-25 $^{\circ}$C

3. pH

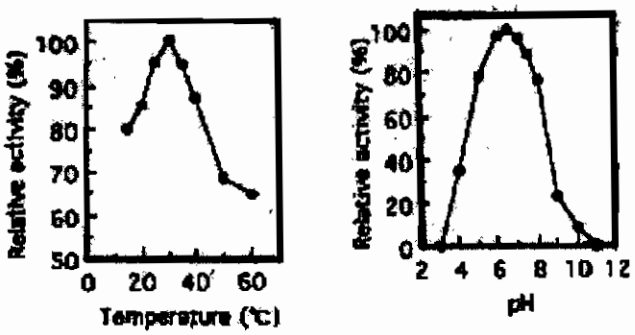
เอนไซม์แต่ละชนิดต้องการ pH ที่เหมาะสมในการทำงาน เมื่อเพิ่มหรือลด pH มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดี เนื่องจาก pH มีผลในการแตกตัวของ side chain (R-group) ในโครงสร้างของกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นโมเลกุลของโปรตีน จากการศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นและเขียนกราฟระหว่างค่า pH กับอัตราเร็วของปฏิกิริยา จะได้กราฟดังรูปที่ 3.7 pH ที่ทำให้เอนไซม์ทำงานแล้วได้อัตราเร็วสูงสุด เรียก pH นั้นว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (optimum pH) ส่วนมากเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วง pH 6.0-7.5 เช่น ไลเปสทำงานได้ดีที่ pH 7.0 ซูเครสทำงานได้ดีที่ pH 6.2 แต่มีเอนไซม์บางชนิดที่ทำงานได้ดีที่ pH เป็นกรด เช่น เปปซินทำงานได้ดีที่ pH 1.5-2.5 และเอนไซม์บางชนิดทำงานได้ดีที่ pH เป็นเบส เช่น ทริปซินทำงานได้ดีที่ pH 8.0-9.0



รูปที่ 3.5 reaction velocity และ enzyme concentration



รูปที่ 3.6 reaction velocity และ substrate concentration



รูปที่ 3.7 ผลของ (A) อุณหภูมิ และ (B) pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase

4. โคแฟคเตอร์

โคแฟคเตอร์ของเอนไซม์คือสารที่ไม่ใช่โมเลกุลของโปรตีนที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ เนื่องจากมีเอนไซม์บางชนิดที่อยู่ในรูปแบบที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยา (inactive) เมื่อมีโคแฟคเตอร์จึงทำให้เอนไซม์เปลี่ยนมาอยู่ในรูปที่ทำงานได้ (active) ดังนั้นโครงสร้างเอนไซม์บางชนิดอาจมีสารที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein) ซึ่งจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ เรียกสารที่ไม่ใช่โปรตีนนี้ว่า prosthetic groups โคแฟคเตอร์อาจเป็นไอออนของสารอนินทรีย์พวกโลหะหนัก เช่น Mg^{2+}, Zn^{2+} หรือ Cu^{2+} เป็นต้น หรือเป็นโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งเรียกว่าโคเอนไซม์ โดยทั่วไปโครงสร้างของโคเอนไซม์ประกอบด้วยวิตามินที่ละลายในน้ำ (water soluble vitamins) เช่น NAD^+, FAD, coenzymeA, deoxyadenosyl cobalamin, thiamine pyrophosphate, tetrahydrofolate และ pyridoxal phoaphate เป็นต้น โคแฟคเตอร์มักจับแน่นอยู่กับเอนไซม์ที่บริเวณจำเพาะ เรียกเอนไซม์ที่จับกับโคแฟคเตอร์ว่า holoenzyme และเรียกเอนไซม์ที่ไม่มีโคแฟคเตอร์จับอยู่ว่า apoenzyme ดังรูปที่ 3.8

$$\text{apoenzyme (inactive)} + \text{cofacter} \rightleftharpoons \text{holoenzyme (active)}$$

รูปที่ 3.8 การทำงานร่วมกันของเอนไซม์กับโคแฟคเตอร์

5. สารกระตุ้นปฏิกิริยา

สารกระตุ้นปฏิกิริยา คือสารบางชนิดที่มีผลทำให้เอนไซม์ทำงานดีขึ้น

6. สารยับยั้งปฏิกิริยา

สารยับยั้งปฏิกิริยา คือสารบางชนิดที่มีผลทำให้เอนไซม์ทำงานช้าลงหรือหยุดการทำงาน

จลศาสตร์ของเอนไซม์

จลศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetic) เป็นการศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยา และสภาวะที่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา การศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ในสภาวะที่ความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ แต่ความเข้มข้นของสับสเตรทเปลี่ยนแปลง พบว่าปฏิกิริยาในช่วงแรกๆ จะมีการเพิ่มของอัตราเร็วอย่างรวดเร็ว แต่ในระยะหลังจะค่อยๆ เพิ่มและในที่สุดจะคงที่ เมื่อเขียนกราฟระหว่าง v กับ [S] ได้กราฟไฮเพอร์โบลาดังรูปที่ 3.6 นั่นคือในช่วงที่สับสเตรทมีความเข้มข้นต่ำ เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วโดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นสับสเตรท ได้กราฟเป็นลักษณะเส้นตรง เรียกปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (first order) ในขณะที่สับสเตรทเข้มข้นมากขึ้นในระดับหนึ่ง อัตราเร็วไม่เปลี่ยนแปลง หรือกล่าวได้ว่าอัตราเร็วไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสับสเตรท เรียกปฏิกิริยาอันดับศูนย์ (zero order) ดังนั้นเมื่อสับสเตรทเข้มข้นมากจะทำให้เกิดอัตราเร็วสูงสุด (maximum velocity; V_{max})

Michaelis และ Menten อธิบายว่าเอนไซม์เมื่อจับกับสับสเตรทเกิดเป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรท (ES) ซึ่งอาจเกิดปฏิกิริยาต่อโดยให้เอนไซม์กับผลิตผล หรือเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับดังปฏิกิริยาที่ 1

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad \textbf{ปฏิกิริยาที่ 1}$$

E คือเอนไซม์อิสระ (free enzyme)

S คือสับสเตรทอิสระ (free substrate)

ES คือสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรท (enzyme–substrate complex)

P คือผลิตผล (product)

k_1, k_2, k_3 และ k_4 คือค่าคงที่ของอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate constants)

เนื่องจากปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์เกิดขึ้นในเวลาที่รวดเร็วมาก ปฏิกิริยาที่สารเชิงซ้อนเปลี่ยนไปเป็นผลิตผล มีค่าคงที่ของอัตราเร็วของปฏิกิริยา (k_3) มากกว่าค่าคงที่ของปฏิกิริยาที่ย้อนกลับ (k_4) ในอัตราส่วนที่สูง หรือเขียนปฏิกิริยาได้ดังนี้

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P \qquad \text{ปฏิกิริยาที่ 2}$$

k_{cat} คือค่าคงที่ของอัตราเร็วของปฏิกิริยาซึ่งสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรทเปลี่ยนไปเป็นผลิตผล

Michaelis – Menten เสนอสมการดังนี้

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่ v คืออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

V_{max} คืออัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา

[S] คือความเข้มข้นของสับสเตรท

K_m คือ Michaelis constant $= (k_2 + k_{cat}) / k_1$

สมการที่ 1 เรียกว่า สมการ Michaelis–Menten ใช้ในการหาค่า K_m และ V_{max} ซึ่งใช้กับปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทชนิดเดียว ปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทมากกว่าหนึ่งชนิดจะทำให้สมการมีความซับซ้อนขึ้น แต่ถ้าศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสับสเตรทตัวหนึ่งโดยให้สับสเตรทตัวอื่นอยู่ในสภาวะที่อิ่มตัว สามารถหา K_m และ V_{max} จากสมการ Michaelis–Menten ได้เช่นกัน

ค่า K_m และ V_{max} หาได้จากกราฟ Michaelis–Menten plot ที่พล็อตระหว่าง v และ [S] ดังรูปที่ 3.9 (A) เพราะจากสมการที่ 1 เมื่อ [S] มากกว่า K_m มาก จะทำให้ $v = V_{max}$ และเมื่อ $v = V_{max}/2$ จะทำให้ $[S] = K_m$

จากสมการที่ 1 เปลี่ยนเป็นส่วนกลับได้ดังนี้

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad \textbf{สมการที่ 2}$$

สมการที่ 2 จึงอยู่ในรูปแบบ $y = mx + b$ ดังนั้นสามารถหาค่า K_m และ V_{max} ได้สะดวกขึ้น โดยหาจากกราฟที่พล็อตระหว่าง $1/v$ กับ $1/[S]$ ที่เขียนบนแกน y และ x ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.9 (B) เรียกว่า Lineweaver–Burk plot หรือเรียกว่า double–reciprocal plot ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ K_m/V_{max} จุดตัดแกน x เป็น $-1/K_m$ จุดตัดแกน y เป็น $1/V_{max}$

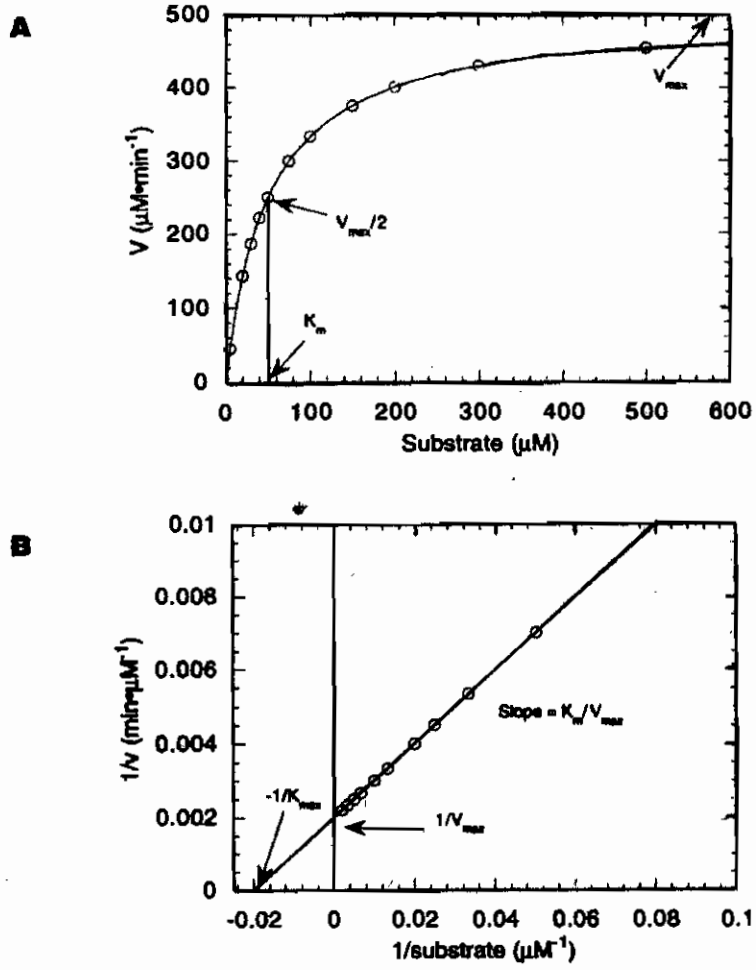
- **ประโยชน์ของค่า K_m และ V_{max}**

การศึกษาปฏิกิริยาเพื่อหาค่า K_m และ V_{max} มีประโยชน์ในการนำไปอธิบายปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ดังต่อไปนี้

1. ประโยชน์ของค่า K_m

ค่า K_m บอกความสามารถของสับสเตรทในการจับกับเอนไซม์ เอนไซม์ที่มีสับสเตรทหลายชนิด สับสเตรทที่มีค่า K_m ต่ำ สับสเตรทนั้นสามารถจับกับเอนไซม์ได้ดี ในทางตรงกันข้ามสับสเตรทที่มีค่า K_m สูง สับสเตรทจับกับเอนไซม์ได้ไม่ดี การทราบค่า K_m ทำให้ทราบว่าควรใช้สับสเตรทเข้มข้นเท่าใดที่ทำให้ปฏิกิริยาดำเนินไปได้ดี

สามารถจะใช้ค่า K_m ในการวางแผนการทดลอง เช่น เมื่อต้องการทดสอบผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา จึงเลือกความเข้มข้นของสับสเตรทที่มีค่าใกล้เคียงกับค่า K_m เพราะเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสับสเตรทเล็กน้อยจะทำให้อัตราเร็วเปลี่ยนแปลงไป ในขณะที่ถ้าต้องการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีผล



รูปที่ 3.9 แสดงวิธีการหาค่า K_m และ V_{max} จาก (A) Michaelis – Menten plot และ (B) Lineweaver – Burk plot ซึ่ง K_m = 50 μM และ V_{max} = 500 μM/min

ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา จึงใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทซึ่งสูงมาก (มากกว่าค่า K_m ประมาณ 5 ถึง 10 เท่า) เพราะทำให้ความเข้มข้นของสับสเตรทมีผลต่อปฏิกิริยาน้อย จึงพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของเอนไซม์เท่านั้น

ประโยชน์ของค่า K_m อีกกรณีหนึ่ง คือการนำค่า K_m มาวิเคราะห์ผลการทดลอง ยกตัวอย่างเช่น เมื่อทำการสกัดเอนไซม์ชนิดหนึ่งจากตับ และทำการทดลองในหลอดทดลอง หาค่า K_m ของสับสเตรทชนิดหนึ่งได้เท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ค่า K_m ของสับสเตรทในตับมีค่าเท่ากับ 5 นาโนโมลาร์ ทำให้วิเคราะห์ผลการทดลองได้ว่าอาจจะมาจากสาเหตุ 1) เอนไซม์ที่สกัดนั้นสูญเสียสภาพธรรมชาติ 2) สภาวะที่เกิดในหลอดทดลองไม่เหมือนกับที่เกิดในร่างกาย หรือ 3) สับสเตรทที่นำมาศึกษาไม่ใช่สับสเตรทที่แท้จริงของเอนไซม์นั้น

ประโยชน์ของค่า K_m ในกรณีการศึกษากระบวนการในการรักษาระดับน้ำตาลของร่างกาย โดยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ hexokinase และ glucokinase เอนไซม์ทั้งสองชนิดทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกลูโคส–6–ฟอสเฟต (glucose–6–phosphate) พบเอนไซม์ hexokinase ในเซลล์ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกาย และพบเอนไซม์ glucokinase เฉพาะในเซลล์ตับ จากการศึกษาระดับน้ำตาลในเลือดพบว่ามีความเข้มข้นประมาณ 5 มิลลิโมลาร์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกลูโคส–6–ฟอสเฟต ถ้าใช้เอนไซม์ hexokinase เร่งปฏิกิริยามีค่า K_m เท่ากับ 0.15 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่เอนไซม์ glucokinase เร่งปฏิกิริยามีค่า K_m เท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่าเมื่อมีการดึงน้ำตาลจากเลือดไปใช้ในเซลล์ทั่วไปของร่างกาย ซึ่งปฏิกิริยาในการรักษาระดับน้ำตาลในเลือด เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ hexokinase และในกรณีที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงมาก เช่น ขณะรับประทานอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรท เอนไซม์ glucokinase จากตับจะทำงานเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้อยู่ในรูปอาหารสะสม

การวิเคราะห์ทางคลินิกสามารถใช้ระดับของเอนไซม์บางชนิดเพื่อบ่งบอกถึงภาวะการเกิดโรคได้ ในเลือดประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งระดับของเอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าอยู่ในช่วงหนึ่ง การหาค่า K_m ของเอนไซม์ที่สนใจเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โรค มีประโยชน์ในการบอกถึงการสร้างหรือการถูกทำลายเอนไซม์นั้นๆ จากสภาวะปกติ

2. ประโยชน์ของค่า V_{max}

ค่า V_{max} มีความสำคัญเช่นกัน ค่า V_{max} บอกถึงอัตราเร็วของการสลายตัวของเอนไซม์ที่จับกับสับสเตรท เพื่อให้เกิดผลิตผลของปฏิกิริยา จากสมการที่ 2 k_{cat} เป็นค่าคงที่ของปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดผลิตผล และ V_{max} ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ ดังนั้น k_{cat} หาได้จากสมการที่ 3

$$v = k_{cat}[ES]$$

$$V_{max} = k_{cat}[E_t]$$

$$k_{cat} = V_{max} / [E_t] \qquad \textbf{สมการที่ 3}$$

$[E_t]$ = ความเข้มข้นรวมของเอนไซม์ (total concentration of enzyme)

เมื่อทราบค่า V_{max} และ $[E_t]$ สามารถหาค่า k_{cat} ได้ ซึ่งค่า k_{cat} หมายถึง จำนวนหมุนเวียนของเอนไซม์ (turnover number) มีค่าเท่ากับจำนวนโมเลกุลของสับสเตรทที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตผลต่อโมเลกุลของเอนไซม์ในหนึ่งหน่วยเวลา โดยการทำงานของเอนไซม์หนึ่งโมเลกุล ค่าจำนวนหมุนเวียนของเอนไซม์ใช้บอกประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์

ค่าที่ใช้บอกความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ โดยแสดงเป็นหน่วยสากล (International Units; IU หรือ Units; U) กำหนดว่า 1 หน่วยสากลของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสับสเตรทปริมาณ 1 ไมโครโมล ไปเป็นผลิตผลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ค่าจำนวนหมุนเวียนของเอนไซม์และหน่วยสากลของเอนไซม์ใช้ในกรณีที่เอนไซม์บริสุทธิ์ ถ้าเอนไซม์ไม่บริสุทธิ์นิยมใช้หน่วยแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) โดยคิดเป็นหน่วยสากลต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

- **วิธีการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์**

ความเข้มข้นของสับสเตรทซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ สามารถทำการวิเคราะห์ได้ 2 วิธี คือ

1. การวิเคราะห์ตัวอย่าง (sampling method) ทำการทดลองโดยปรับความเข้มข้นของสับสเตรท และให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่เวลาต่างๆ หยุดปฏิกิริยาด้วยสารยับยั้งปฏิกิริยา วัดผลการทดลองโดยวัดความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ หรือวัดผลิตผลที่เกิดขึ้น

2. การวัดแบบต่อเนื่อง (continuous method) เมื่อผสมเอนไซม์กับสับสเตรทเข้าด้วยกันแล้ว จึงวัดผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นขณะนั้นอย่างต่อเนื่อง โดยการวัดความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ หรือผลิตผลที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆ นับจากเริ่มต้นปฏิกิริยา

เครื่องมือที่นิยมใช้วัดการทำงานของเอนไซม์ คือเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (spectrophotometer) เครื่องมืออื่นๆ ที่ใช้ ได้แก่ โพลาริมิเตอร์ (polarimeter) หรืออิเล็กโทรด (electrode) เป็นต้น

- **การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์**

กระบวนการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นวิธีหนึ่งในการควบคุมอัตราเร็วของปฏิกิริยาในร่างกาย เอนไซม์มักตอบสนองต่อสารยับยั้ง แล้วมีผลในการจับของสับสเตรทที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ หรือมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรทไปเป็นผลิตผล

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. การยับยั้งแบบทวนกลับได้ (reversible inhibition) เมื่อเอนไซม์จับกับสารยับยั้งทำให้มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา ดังรูปที่ 3.10 แต่เอนไซม์สามารถกลับสู่สภาพเร่งปฏิกิริยาได้อีกเมื่อปรับสภาวะให้เหมาะสม หรือแยกสารยับยั้งออกไป แบ่งการยับยั้งแบบทวนกลับได้เป็น 3 ชนิด

1.1 การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) สารที่เป็นตัวยับยั้งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสับสเตรทจึงสามารถจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับสับสเตรท มีผล

ทำให้ค่า K_m ของสับสเตรทสูงกว่าที่เป็นจริง แต่ไม่มีผลต่อค่า V_{max} ดังรูปที่ 3.11 (A) และ 3.12 (A) การยับยั้งนี้ทวนกลับได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท

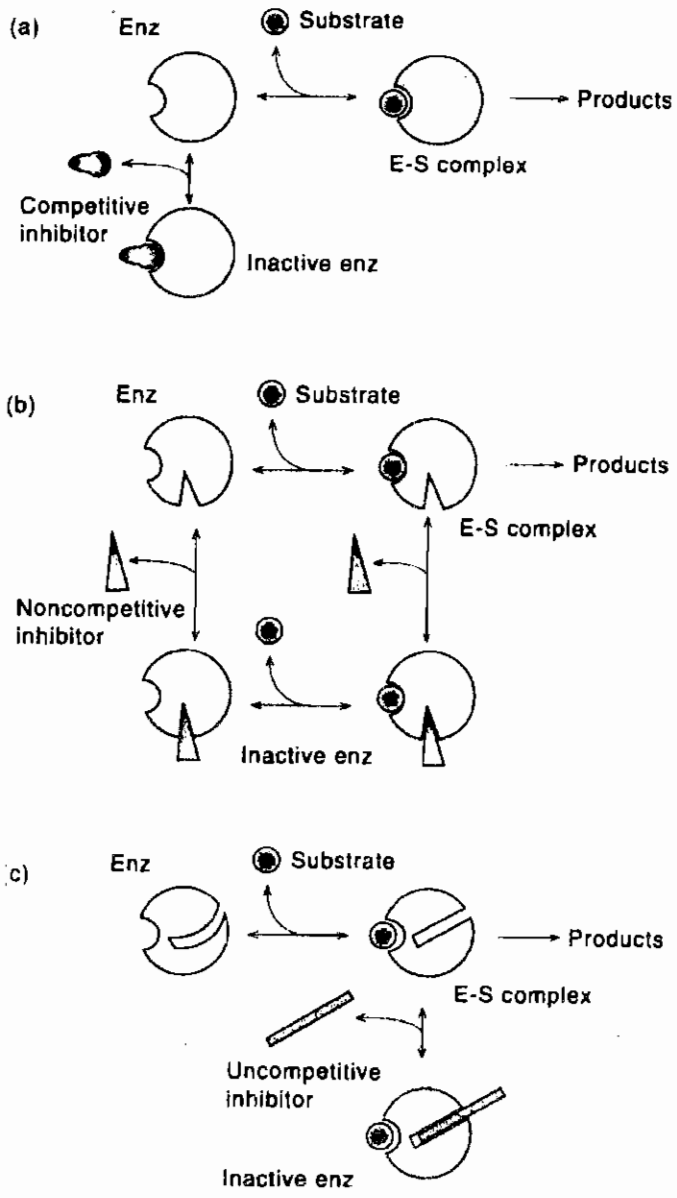
1.2 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด noncompetitive inhibition สารยับยั้งมีโครงสร้างต่างจากสับสเตรท สามารถจับกับเอนไซม์ได้ ถึงแม้ว่าจะมีสับสเตรทจับอยู่ โดยจับอยู่นอกบริเวณเร่ง จึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ V_{max} ลดลง แต่ค่า K_m ไม่เปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 3.11 (B) และ 3.12 (B) เนื่องจากสารยับยั้งจับอยู่นอกบริเวณเร่ง จึงไม่สามารถใช้การเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทในการทำให้เอนไซม์กลับสู่สภาพเดิม

1.3 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันชนิด uncompetitive inhibition สารยับยั้งจับกับสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรท ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตผล การยับยั้งแบบนี้ทำให้ค่า K_m และ V_{max} ลดลง ดังรูปที่ 3.11 (C) และ 3.12 (C)

2. การยับยั้งแบบทวนกลับไม่ได้ (irreversible inhibitor) สารยับยั้งสามารถจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ ดังตารางที่ 3.1 ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยา การยับยั้งแบบนี้มีผลต่อค่า K_m หรือ V_{max} หรือมีผลต่อทั้งสองค่า

ตารางที่ 3.1 แสดงสารยับยั้งที่จับกับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์

สารยับยั้ง	หมู่ที่อยู่บนเอนไซม์ที่จับกับสารยับยั้ง
Cyanide	Fe, Cu, Zn และโลหะทรานสิชันอื่น
p–Mercuribenzoate	Sulfhydryl
Diisopropylfluoro phosphate	Serine hydroxyl
Iodoacetate	Sulfhydryl, Imidazole, Carboxyl, Thioether

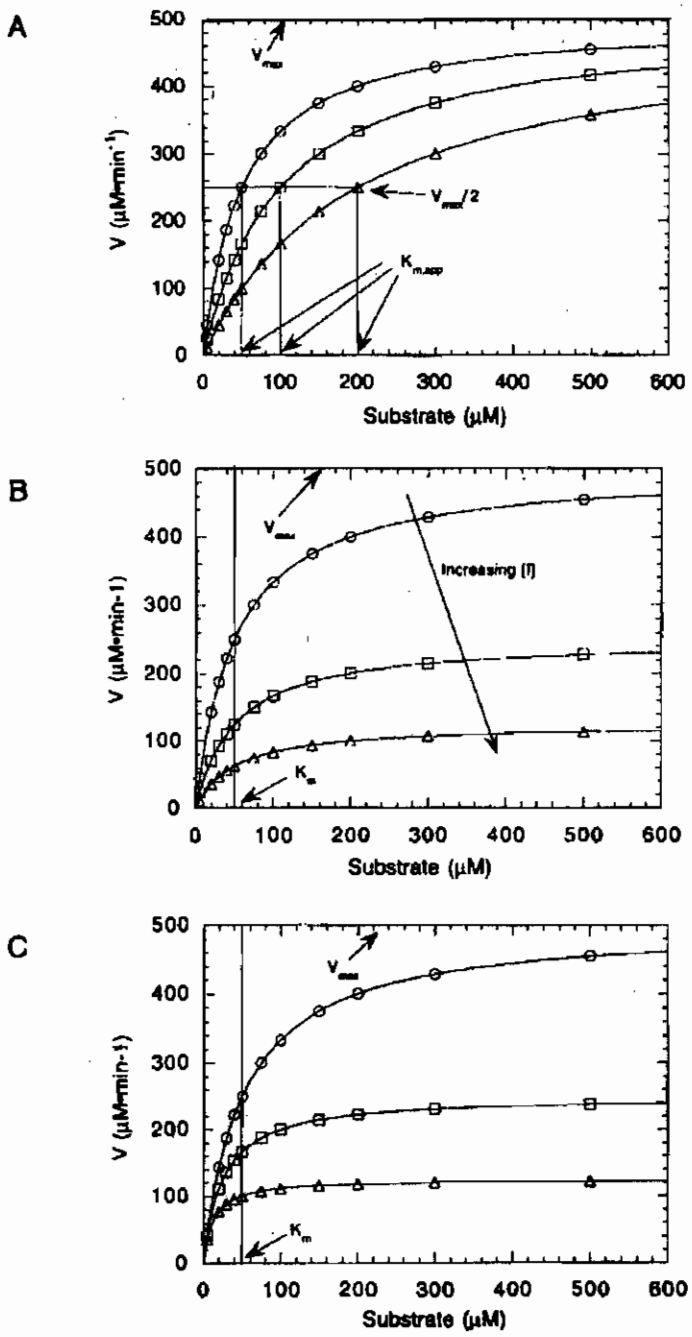


รูปที่ 3.10 โมเดลแสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

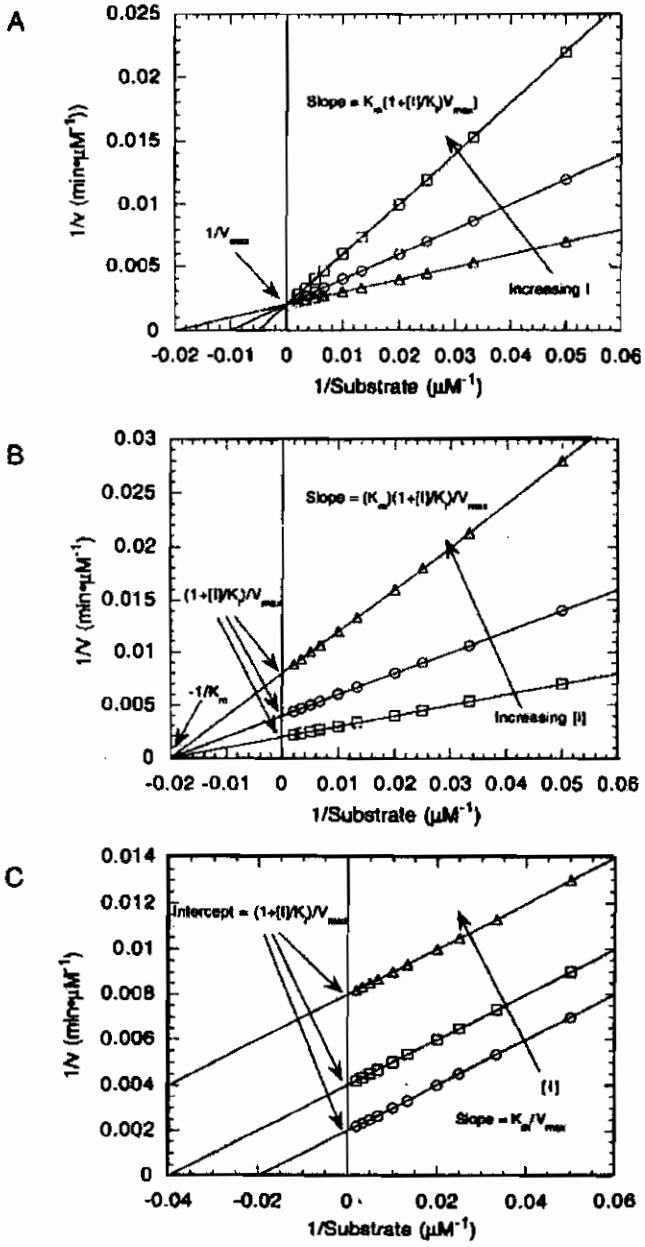
(a) แบบ competitive inhibition

(b) แบบ noncompetitve inhibition

(c) แบบ uncompetitive inhibition



รูปที่ 3.11 Michaelis–Menten plot แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบต่างๆ (A) competitive inhibition (B) noncompetitive inhibition (C) uncompetitive inhibition



รูปที่ 3.12 Lineweaver–Burk plot แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบต่างๆ (A) competitive inhibition (B) noncompetitive inhibition (C) uncompetitive inhibition

การเตรียมเอนไซม์

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ขณะที่เอนไซม์อยู่ในเซลล์ (*in vivo*) กระทำได้ยาก เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงมีการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์และเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยมีการปนเปื้อนของสารเมตาบอไลท์ (metamolites) อื่นๆ น้อยที่สุด จากนั้นศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์ในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพราะสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆได้ โดยพยายามรักษาสภาวะต่างๆ ให้ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ เช่น อุณหภูมิ, สภาพความเป็นกรดหรือด่าง (pH), สับสเตรท และโคแฟคเตอร์

การเลือกใช้วิธีในการเตรียมเอนไซม์ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ในการนำเอนไซม์ไปใช้ ทั้งนี้การเตรียมต้องอยู่บนพื้นฐานที่เอนไซม์ต้องอยู่ในสภาพธรรมชาติ ไม่สูญเสียแอคติวิตี มีสภาวะเหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาและมีปริมาณเพียงพอการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มากนั้นต้องผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอน ซึ่งต้องใช้เวลาและวัสดุสิ้นเปลืองเพิ่มขึ้นในแต่ละขั้นตอน บางกรณีไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์บริสุทธิ์มาก ถ้าในงานนั้นมีความจำเพาะของเอนไซม์ในการทำงาน ในขณะที่บางกรณีต้องการความบริสุทธิ์ของเอนไซม์สูง เช่น การศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์

ข้อควรระวังในการเตรียมเอนไซม์

1. ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายเอนไซม์ ในขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ให้เหมาะสม อุณหภูมิสูงจะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี ปกติจะเตรียมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4–10 $^{\circ}$C
2. ควบคุม pH ให้เหมาะสม โดยทั่วไปอยู่ในช่วง pH 5–9
3. ไม่ใช้สารเคมีที่รุนแรง ซึ่งมีผลทำลายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์
4. ควรใช้เวลาในการเตรียมให้น้อยที่สุด เพราะเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีตลอดเวลา
5. ไม่ควรทำให้เกิดฟองอากาศ เนื่องจากอากาศทำให้เอนไซม์เสียแอคติวิตีได้
6. ไม่ควรแช่แข็งเอนไซม์แล้วละลาย (freeze–thaw) บ่อยครั้ง ซึ่งจะทำให้เอนไซม์เสียแอคติวิตี ดังนั้นในการเก็บรักษาเอนไซม์ควรแบ่งเอนไซม์ใส่หลอดให้พอใช้ในแต่ละครั้ง แล้วแช่แข็งไว้ เมื่อใช้จึงนำมาละลายทีละหลอด

การทดลองที่ 3.1

การตรวจสอบเอนไซม์

1. การตรวจสอบเอนไซม์ protease

เอนไซม์ protease เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโน โดยเอนไซม์นี้จะเข้าสลายพันธะเปปไทด์ เอนไซม์ protease มีหมู่ที่จำเป็นในการทำงาน คือ หมู่ –SH ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเปลี่ยนเป็นพันธะไดซัลไฟด์ (–S–S–)

หมู่ –SH ถ้าจับกับไอออนของโลหะหนัก เช่น Hg^{2+} จะทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ การแก้ไขการยับยั้งปฏิกิริยาทำได้โดยการเติม EDTA ซึ่งจะไปจับกับ Hg^{2+} เอนไซม์ในกลุ่ม protease ได้แก่ papain จากยางมะละกอ และ bromelain จากผลสับปะรด ในการผลิตยาช่วยย่อย อาหารมีการใส่เอนไซม์ protease เข้าไปด้วยเพื่อช่วยย่อยโปรตีน เอนไซม์ที่ใส่ในยาช่วยย่อย อาหารในกลุ่มนี้ ได้แก่ papain หรือ pepsin

การทดลองใช้นมสดซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ protease โปรตีนชนิดหนึ่งที่พบในนม คือเคซีน (casein) ซึ่งในสภาพธรรมชาติจะอยู่ในลักษณะเป็นไมเซลล์ เมื่อพันธะเปปไทด์ของเคซีนถูกย่อยโดยเอนไซม์ protease จะทำให้ลักษณะไมเซลล์ถูกทำลาย โมเลกุลของโปรตีนจะรวมตัวกันตกตะกอนลงมา หรือทำให้นมมีลักษณะแข็งตัว

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดทดลอง

ปิเปตต์

สารเคมี

นมสด

น้ำสับปะรด ยาช่วยย่อย และแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบอื่นๆ

วิธีการทดลอง

1. เตรียมหลอดทดลองให้เท่ากับจำนวนแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ และหลอดที่จะใส่น้ำกลั่น เขียนหมายเลขหลอดทดลองกำกับไว้ จากนั้นปิเปตต์นมสดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด

2. หลอดที่ 1 ให้เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ส่วนหลอดอื่นๆ ให้เติมสารละลายที่ต้องการตรวจสอบเอนไซม์ protease ได้แก่ น้ำสับปะรด ยาช่วยย่อยและแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบอื่นๆ เช่น น้ำลาย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าสารละลายทุกหลอดให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

3. เมื่อครบกำหนดเวลา สังเกตการแข็งตัวของนมสดในแต่ละหลอด บันทึกผลการทดลองลงในตารางท้ายบท

2. การตรวจสอบเอนไซม์ α–amylase

เอนไซม์ α–amylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ α–1→4–glycosidic ในแป้งไกลโคเจน และพอลิแซคคาไรด์ ได้ผลิตผลเป็นเด็กซ์ทริน กลูโคส หรือมอลโตส การติดตามปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยทดสอบแป้งกับสารละลายไอโอดีนซึ่งให้สีน้ำเงิน เมื่อย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ α–amylase แล้ว ให้นำสารละลายไปทดสอบกับไอโอดีน และเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้น

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดทดลอง

ปิเปตต์

สารเคมี

สารละลาย 1% น้ำแป้ง

สารละลายไอโอดีน

น้ำลายและแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบอื่นๆ

วิธีการทดลอง

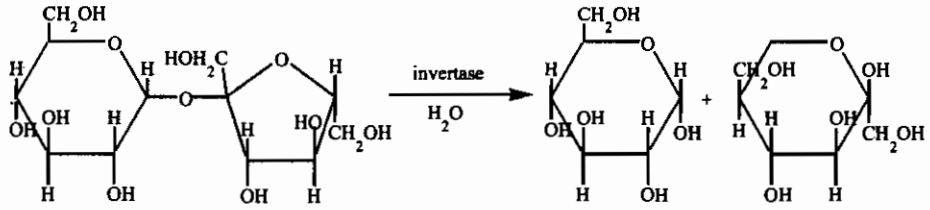
1. หลอดที่ 1 ให้ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ส่วนหลอดอื่นๆ ให้ใส่สารละลายที่ต้องการตรวจสอบเอนไซม์ α–amylase ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

2. หยดน้ำแป้งจำนวน 5 หยด ลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายเข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที

3. เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เติมสารละลายไอโอดีน 2 หยด ลงในหลอดทดลองทุกหลอด เขย่าหลอดทดลองเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลองลงในตารางท้ายบท

3. การตรวจสอบเอนไซม์ invertase

เอนไซม์ invertase หรือ sucrase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคสและฟรุคโตส ซูโครสเป็นน้ำตาลที่ไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ แต่น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ จึงสามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการทดสอบ reducing sugar เช่น benedict test



sucrose glucose fructose

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดทดลอง

ปิเปตต์

อ่างน้ำเดือด

สารเคมี

สารละลาย 1% ซูโครส

สารละลาย benedict

ยีสต์และแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบอื่นๆ

วิธีการทดลอง

1. เตรียมหลอดทดลอง 3 หลอด ปิเปตต์สารละลายใส่แต่ละหลอด ดังตาราง ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

สารเคมี	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3
1% ซูโครส (ml)	1	1	-
ยีสต์ (ml)	1	-	1
น้ำกลั่น (ml)	-	1	1

2. นำแต่ละหลอดไปทดสอบปฏิกิริยากับสารละลาย benedict โดยเติมสารละลาย benedict หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาที สังเกตว่ามีตะกอนสีส้มเกิดขึ้นหรือไม่

4. การตรวจสอบเอนไซม์ lysozyme

เอนไซม์ lysozyme หรือ muramidase พบในไข่ขาว, นม, น้ำตา และเนื้อเยื่ออื่นๆ ทั้งในสัตว์และพืช ทำหน้าที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของ N-acetylmuramic acid และคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ N-acetyl-D-glucosamine ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเอนไซม์ lysozyme ทำงานจะทำให้ความขุ่นของแบคทีเรียที่อยู่ในบัฟเฟอร์ลดลง

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดทดลอง

ปิเปตต์

สารเคมี

0.3 mg/ml แบคทีเรียใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0

ไข่ขาวและแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบอื่นๆ

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตต์เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ใน phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดจำนวน 2 หลอด

2. หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 2 เติมไข่ขาว 0.1 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงความขุ่นของแบคทีเรียทันที

5. การตรวจสอบเอนไซม์ tyrosinase

เอนไซม์ tyrosinase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสร้างเม็ดสี เช่นเมลานินหรือสารประกอบฟีนอลอื่นๆ พบในเซลล์สิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด สับสเตรทที่ใช้ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ tyrosinase เช่น tyrosine, catechol หรือ 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดทดลอง

ปิเปตต์

สารเคมี

phosphate buffer pH 7.0

5 mM DOPA ใน phosphate buffer pH 7.0

5 mM catechol ใน phosphate buffer pH 7.0

0.1 mM ascorbic acid ใน phosphate buffer pH 7.0

5 mM ascorbic acid ใน phosphate buffer pH 7.0

5 mM benzoic acid ใน phosphate buffer pH 7.0

มันฝรั่งและแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบอื่นๆ เช่น แอปเปิ้ล กล้วย

วิธีการทดลอง

1. แอคติวิตีของเอนไซม์ tyrosinase นำแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ tyrosinase มาทดสอบกับสับสเตรทคือ 5 mM DOPA โดยปิเปตต์สารที่เตรียมได้ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดละ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5 mM DOPA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร พร้อมๆ กัน เปรียบเทียบอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น และสังเกตสีของผลิตผล

2. ชนิดของสับสเตรท นำแหล่งเอนไซม์ที่เตรียมได้มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่เปลี่ยนชนิดของสับสเตรทเป็น 5 mM catechol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเปรียบเทียบสีของผลิตผลที่เกิดขึ้น

3. ผลของอุณหภูมิ นำแหล่งเอนไซม์ที่เตรียมได้ แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที นำมาทดสอบกับ 5 mM DOPA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

4. ผลของ pH นำแหล่งเอนไซม์ที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำมาเติมกรดไนตริกเข้มข้น 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทดสอบกับ 5 mM DOPA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

5. ผลของสารยับยั้งปฏิกิริยา นำแหล่งเอนไซม์ที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร โดยทำชุดละ 2 หลอด หลอดที่ 1 เติม 5 mM benzoic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และหลอดที่ 2 เติม 5 mM ascorbic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทดสอบกับ 5 mM DOPA ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

6. การตรวจสอบเอนไซม์ lactase

เอนไซม์ lactase ทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลแลคโตส น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่พบได้ในน้ำนม ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคส ร่างกายผลิตเอนไซม์ lactase มาย่อยโมเลกุลของน้ำตาลแลคโตสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของร่างกาย ร่างกายของบางคนอาจมีการผลิตเอนไซม์ lactase ได้น้อย ทำให้ไม่สามารถย่อยน้ำตาลในนมได้อย่างคนปกติ

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ lactase ใช้สับสเตรทคือ *o*-nitrophenol-D-galactoside (ONPG) ซึ่งเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้กาแลคโตส และ *o*-nitrophenol สาร *o*-nitrophenol มีสีเหลือง สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมี

0.01 M phosphate buffer

lactase suspension (1 tablet ใน 0.01 M phosphate buffer 100 ml)

20 mM *o*-nitrophenol-D-galactoside

แหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ

วิธการทดลอง

1. ปิเปตต์น้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดที่ 1 และเอนไซม์ lactase suspension ใส่หลอดทดลองหลอดที่ 2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2. ปิเปตต์สารที่ต้องการตรวจสอบเอนไซม์ lactase ใส่หลอดทดลองหลอดที่ 3 เป็นต้นไป หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร

3. ปิเปตต์สารละลาย 20 mM *o*-nitrophenol-D-galactoside ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงขณะที่บ่ม

7. การตรวจสอบเอนไซม์ cellulase

ในช่วงที่ผลไม้สุกจะมีการผลิตเอนไซม์ cellulase ปริมาณมาก เอนไซม์ cellulase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสที่ผนังเซลล์ทำให้ผลไม้มีลักษณะที่นิ่มขึ้น

การทดสอบเอนไซม์ cellulase ใช้วุ้นผสมกับ carboxymethylcellulose (CMC) ซึ่ง CMC มีโมเลกุลของเซลลูโลสอยู่ เมื่อเอนไซม์ cellulase ทำงาน จะทำให้ CMC ถูกทำลายไปด้วย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

จานแก้ว

สารเคมี

agar

carboxymethylcellulose (CMC)

Congo red

1 M NaCl

แหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ

วิธีการทดลอง

1. เตรียมเจลที่มี 1.7% agar ต้มให้ agar ละลาย ผสมกับ CMC ให้มีปริมาณเท่ากับ 0.5% เทใส่จานแก้ว ตั้งที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเป็นเจล จึงตัดเป็นช่องเล็ก

2. ใส่น้ำกลั่นลงในช่องที่ 1 และใส่แหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบลงในช่องที่เหลือแต่ละช่อง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำจานแก้วมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ช่องแต่ละช่อง เท Congo red ลงไปให้ท่วม ทิ้งไว้ 15 นาที

4. ชะจานแก้วด้วย 1 M NaCl และใส่ 1 M NaCl ให้ท่วมเจล ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตลักษณะของ CMC ที่อยู่ในเนื้อเจล

8. การตรวจสอบเอนไซม์ catalase

เอนไซม์ catalse ทำหน้าที่ย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide; H_2O_2) ได้ก๊าซออซิเจน ดังปฏิกิริยา ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นผลิตผลที่ได้จากขบวนการ oxidative metabolism ที่ร่างกายต้องกำจัดทิ้ง เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรง

$$2H_2O_2 \xrightleftharpoons{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

เอนไซม์ catalase พบในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ โดยเฉพาะพืชพบมากในส่วนที่สะสมอาหาร สามารถสกัดเอนไซม์ catalase จากมันฝรั่งได้ในปริมาณมาก

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

กระดาษกรอง

มีด

ครกกระเบื้อง

สารเคมี

1% hydrogen peroxide (บรรจุในขวดสีชา)

มันฝรั่งและแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบอื่นๆ

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตต์สารที่ต้องการตรวจสอบเอนไซม์ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร

2. ปิเปตต์ 1% hydrogen peroxide ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน สังเกตว่ามีฟองอากาศเกิดขึ้นหรือไม่

9. การตรวจสอบเอนไซม์ urease

เอนไซม์ urease หรือ urea amidohydrolase มีน้ำหนักโมเลกุล 483,000 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสยูเรียด้วยน้ำ ให้ผลิตผลคือก๊าซแอมโมเนียและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อก๊าซแอมโมเนียละลายในน้ำ และอยู่ในรูปแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ทำให้สารละลายมีสภาพเป็นด่าง

$$(NH_2)_2CO + 3\,H_2O \longrightarrow CO_2 + 2NH_4OH$$

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ urease

พบเอนไซม์ urease ในแบคทีเรีย ยีสต์ และพืชชั้นสูง ถั่วเหลืองเป็นแหล่งที่มีเอนไซม์ urease มาก ปฏิกิริยาที่ใช้ตรวจสอบเอนไซม์ urease คือปฏิกิริยาที่ทำการไฮโดรไลซ์ยูเรียได้ผลิตผลคือก๊าซแอมโมเนีย จากนั้นใช้เอนไซม์ glutamate dehydrogenase (GLDH) เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนก๊าซแอมโมเนียและ 2 α-ketoglutamate ต่อไปจนได้เป็นกลูตาเมท

$$\text{urea} + H_2O + 2H^+ \xrightarrow{\text{urease}} 2NH_4^+ + CO_2$$

$$2NH_4^+ + 2\alpha\text{-ketoglutamate} \xrightarrow{\text{glutamate dehydrogenase}} 2 \text{ glutamate} + 2NAD^+ + 2H_2O$$

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดทดลอง

ปิเปตต์

สารเคมี

0.10 M phosphate buffer, pH 7.6

0.023 M ADP

0.0072 M NADH

0.026 M α - ketoglutamate

1.8 M urea

GLDH (500 units / ml)

ถั่วเหลืองและแหล่งเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบอื่นๆ

วิธีการทดลอง

1. เตรียมหลอดทดลองใส่สารที่ต้องการตรวจสอบเอนไซม์ urease ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารต่างๆ ดังตาราง

สารที่ใช้ทดสอบ urease	ปริมาตร
0.10 M phosphate buffer, pH 7.6	2.4 ml
0.023 M ADP	0.1 ml
0.0072 M NADH	0.1 ml
0.026 M α - ketoglutamate	0.1 ml
1.8 M urea	0.1 ml
GLDH (500 units / ml)	0.1 ml

2. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 5 นาที

การเตรียมเอนไซม์จากแหล่งต่างๆ

1. น้ำสับปะรด

นำสับปะรดประมาณ 5 กรัม บดในครกกระเบื้อง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเก็บส่วนสารละลายในน้ำแข็ง สำหรับนำไปตรวจสอบเอนไซม์

2. ยาช่วยย่อย

บดยาช่วยย่อยในครกกระเบื้องให้ละเอียด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร คนสารให้ตัวยาละลายออกมา เทสารใส่หลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ปิเปตต์ส่วนสารละลายมาตรวจสอบเอนไซม์

3. น้ำลาย

บ้วนน้ำลายใส่บีกเกอร์ เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนน้ำลาย:น้ำกลั่น เท่ากับ 1:2 โดยประมาณ

4. ยีสต์ (yeast suspension)

เตรียมผงยีสต์ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1%

5. ไข่ขาว

ตอกไข่ไก่ 1 ฟอง แยกเฉพาะไข่ขาว นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เจือจางด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7 ในอัตราส่วนไข่ขาว : 0.1 M phosphate buffer pH 7 เท่ากับ 1 : 4 เก็บในน้ำแข็ง

6. มันฝรั่ง

นำมันฝรั่งประมาณ 5 กรัม ปอกเปลือกทิ้ง หั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในครกกระเบื้อง เติม 0.1 mM ascorbic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทันที บดเนื้อมันฝรั่งให้ละเอียด และเติม 0.1 mM ascorbic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการบดอีกครั้ง เทสารที่ได้ผ่านผ้าขาวบางลงสู่บีกเกอร์ เพื่อกรองเก็บแต่สารละลาย แช่สารละลายที่ได้ในน้ำแข็งตลอดเวลา

7. ผักหรือผลไม้ชนิดอื่นๆ

ทำการเตรียมเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 6 แต่เปลี่ยนแหล่งเอนไซม์เป็นจากพืชชนิดอื่นเช่น แอปเปิ้ล และกล้วย

8. ถั่วเหลือง

นำถั่วเหลือง 5 กรัม มาแช่น้ำทิ้งไว้ข้ามคืน บดด้วยครกกระเบื้อง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร บดอีกครั้ง กรองเก็บสารละลายและแช่ในน้ำแข็ง

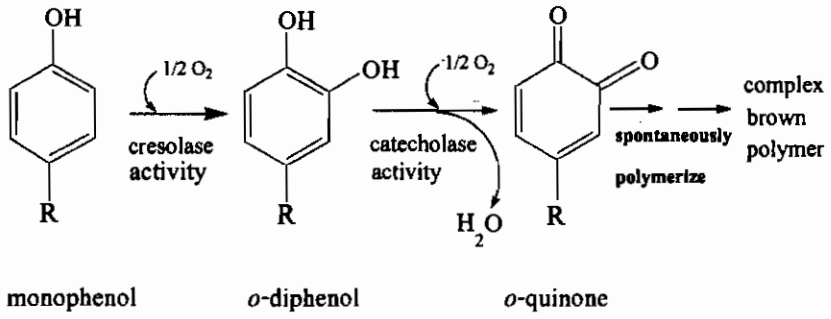
ตารางบันทึกผลการทดลอง

แหล่งเอนไซม์	protease	α-amylase	invertase	lysozyme	tyrosinase	lactase	cellulase	catalase	urease
1. น้ำสับปะรด									
2. ยาช่วยย่อย									
3. น้ำลาย									
4. ยีสต์									
5. ไข่ขาว									
6. มันฝรั่ง									
7.									
8.									
9.									
10.									
11.									
12.									

การทดลองที่ 3.2

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นชื่อสามัญ (common name) ที่เรียกกันทั่วไป เอนไซม์นี้มีชื่อเรียกอีกหลายชื่อตามสับสเตรทและปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน เช่น monophenol oxidase, polyphenol oxidase, phenolase, cresolase, catecholase หรือ monophenol monooxy genase เป็นต้น ชื่อที่เรียกตามระบบคือ monophenol, *o*-diphenol: oxygen oxidoreductase (EC 1.14.18.1) ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (copper containing enzyme) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา 2 แบบ คือ 1) เร่งปฏิกิริยา orthohydroxylation (cresolase activity หรือ monophenolase activity) โดยมีสารพวก monophenol เป็นสับสเตรท ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น *o*-diphenol และ 2) เร่งปฏิกิริยา aerobic oxidation (catecholase activity หรือ diphenolase activity) โดยสาร *o*-diphenol จะถูกเปลี่ยนไปเป็น *o*-quinone ดังรูปที่ 3.2.1



รูปที่ 3.2.1 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซมที่ใช้ในกระบวนการสร้างเม็ดสี เช่น เมลานินหรือสารประกอบฟีนอลอื่นๆ พบในเซลล์สิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดทั้งพืช สัตว์ และจุลชีพ ในพืช

ทำหน้าที่ออกซิไดซ์สารประเภทฟีนอลและเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องจนได้เมลานิน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำหน้าที่เปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ให้เป็นสาร quinone ซึ่งจะสร้างเป็นเมลานินต่อไป ทำให้เกิดสีที่บริเวณผิวหนัง เส้นผม และดวงตา เอนไซม์ไทโรซิเนสบริเวณผิวหนังเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะทำให้มีการสร้างเมลานินเพิ่มขึ้น ทำให้ผิวมีสีเข้มขึ้น (suntan)

ประโยชน์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ในพืชบางชนิดเอนไซม์นี้จะช่วยป้องกันแมลงและจุลชีพ เมื่อพืชถูกแมลงกัดกินหรือติดเชื้อ พืชจะสร้างเม็ดสีพวกเมลานินขึ้นทำให้แมลงหรือจุลชีพไม่เข้ามาทำลายอีก ในมนุษย์ทำให้เกิดเม็ดสีที่บริเวณผิวหนัง เพื่อป้องกันอันตรายจากแสงแดด นอกจากนี้มนุษย์มีการนำเอนไซม์ไทโรซิเนสมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบฟีนอลปนอยู่

ผลเสียของเอนไซม์ไทโรซิเนสในด้านการเกษตร การทำงานของไทโรซิเนสทำให้เกิดผลเสียต่อผลิตผลจำพวกผักหรือผลไม้อันเนื่องจากการถูกระทบกระเทือน เช่น เกิดแรงกระแทกขณะเก็บเกี่ยวหรือขนส่ง และการหั่นก่อนนำไปประกอบอาหาร ซึ่งแรงกระทำดังกล่าวมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในการสร้างเมลานิน ผักหรือผลไม้จึงเกิดเป็นสีน้ำตาล (browning process) ทำให้คุณภาพของอาหารลดลงและไม่น่ารับประทาน

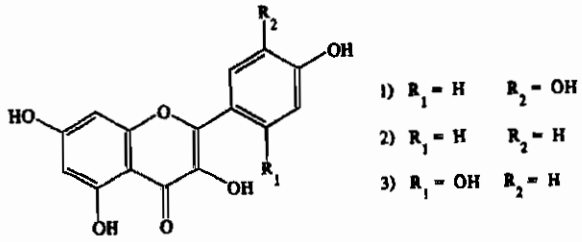
เอนไซม์ไทโรซิเนสจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันนั้น มีน้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบของกรดอะมิโน ชนิดของสับสเตรท และชนิดของโคแฟคเตอร์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดจากเห็ดชนิด *Agaricus bisporus* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 128,000 โครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 4 หน่วย (tetrameric structure; H_2L_2) มีอะตอมของทองแดง (Cu^{2+}) เป็นองค์ประกอบจำนวน 1 อะตอมต่อ 1 หน่วยย่อย บริเวณเร่งของเอนไซม์อยู่ตรงตำแหน่งที่มีอะตอมของทองแดง สับสเตรทของเอนไซม์มี 2 ชนิด คือ สารประกอบฟีนอลและออกซิเจน สารที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (activator) ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้แก่ ดีเทอร์เจนท์ที่มีประจุลบ เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งช่วยให้บริเวณเร่งของเอนไซม์เปิดออก ส่วนสารที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitor) ได้แก่ สารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรท ยกตัวอย่างเช่น benzoic acid หรือ cinnamic acid ดังรูปที่ 3.2.2

และสารอื่นๆ เช่น EDTA, 2–mercaptoethanol, ascorbic acid, quercetin, L-cysteine, thiourea, sodium chloride, sodium disulfite, sodium fluoride และสารประกอบ cyanide หรือ azide

benzoic acid cinnamic acid

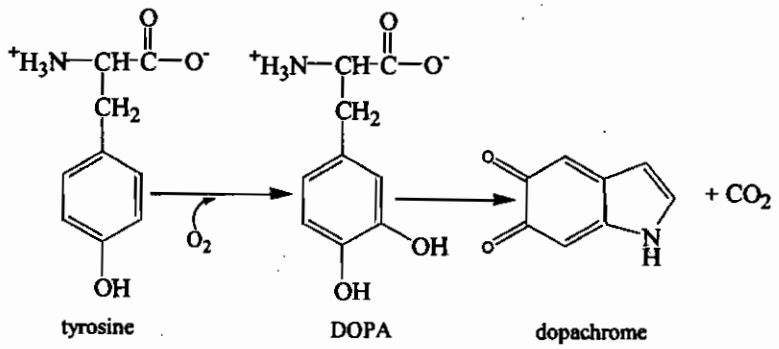
รูปที่ 3.2.2 โครงสร้างของ benzoic acid และ cinnamic acid

การศึกษาปฏิกิริยาและการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงมีประโยชน์ในด้านการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในผักหรือผลไม้ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือการใช้สารยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างเมลานินใส่ในเครื่องสำอางเพื่อลดการสร้างเมลานิน ปัจจุบันมีการใช้สารที่สกัดจากพืชบางชนิดที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสใส่ในอาหารหรือเครื่องสำอาง เพื่อให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมี เช่น การใช้วิตามินซี (ascorbic acid) จากผักหรือผลไม้ หรือสารสกัดจากพืชบางชนิด เช่น quercetin ดังรูปที่ 3.2.3 รวมทั้งสารสกัดจากหัวบุก และเปปไทด์ที่พบในน้ำผึ้ง เป็นต้น



รูปที่ 3.2.3 โครงสร้างของ quercetin และอนุพันธ์

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดจากมันฝรั่ง โดยการบดเนื้อมันฝรั่งในสารละลาย 0.1 mM ascorbic acid จากนั้นแยกเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการตกตะกอน เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน จึงตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นสูง (40–85%) แยกตะกอนโปรตีนด้วยการเซนตริฟิวจ์ และละลายเอนไซม์ด้วย phosphate buffer pH 7.0 การแยกเอนไซม์ตามวิธีข้างต้น จะได้เอนไซม์ไทโรซิเนสและโปรตีนอื่นๆ ปนมาด้วย ถ้าต้องการเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนสให้บริสุทธิ์ ต้องนำไปผ่านขั้นตอนการแยกอื่น เช่น ทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน หรือโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน การทดลองนี้เป็นการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเลือกใช้ปฏิกิริยาที่จำเพาะ สับสเตรทที่ใช้ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจใช้กรดอะมิโนไทโรซีน หรือ 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) ภายใต้สภาวะที่อิ่มตัวด้วยออกซิเจน ปฏิกิริยาต่อเนื่องที่เกิดขึ้นคือไทโรซีนเปลี่ยนไปเป็น DOPA และ DOPA เปลี่ยนไปเป็น dopachrome ดังรูปที่ 3.2.4 สามารถติดตามปฏิกิริยาโดยการวัดปริมาณ dopachrome ที่มีสีส้มซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร (λ_{max} = 475) [เอนไซม์ 1 ยูนิต คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่า A_{280} เปลี่ยนไป 0.001 ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C pH 6.5 เมื่อใช้ไทโรซีน (L-tyrosine) เป็นสับสเตรท]



รูปที่ 3.2.4 การเร่งปฏิกิริยาของไทโรซิเนสเมื่อมีไทโรซีนและ DOPA เป็นสับสเตรท

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

มันฝรั่ง 50 กรัม

มีด

ผ้าขาวบาง

แท่งแก้ว

บีกเกอร์

พาราฟิล์ม

นาฬิกาจับเวลา

หลอดเซนตริฟิวจ์

ดิวเวตต์ขนาด 3 มิลลิลิตร

เครื่องปั่นไฟฟ้า (blender)

เครื่องเซนตริฟิวจ์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

saturated ammonium sulfate

0.1 M phosphate buffer pH 7.0

5 mM L-β-3-4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0

0.1 mM ascorbic acid ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0

0.5 mM benzoic acid ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0

น้ำแข็ง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนส

1.1 ปอกเปลือกมันฝรั่งทิ้ง หั่นเนื้อฝรั่งเป็นชิ้น

1.2 เทมันฝรั่งที่หั่นแล้วใส่บีกเกอร์ที่มี 0.1 mM ascorbic acid ที่เย็น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทันที นำไปปั่นให้มันฝรั่งละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า

1.3 เทสารที่ปั่นแล้วผ่านผ้าขาวบางลงสู่บีกเกอร์ที่เย็น เพื่อกรองเก็บสารละลาย

1.4 วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ จากนั้นเติม saturated ammonium sulfate ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายที่วัดได้ นำบีกเกอร์แช่ในน้ำแข็ง คนเบา ๆ 2 นาที

1.5 แบ่งสารใส่หลอดเซนตริฟิวจ์เซนตริฟิวจ์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

1.6 เทสารละลายทิ้ง และเก็บตะกอน จากนั้นเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้ตะกอนกระจายตัว เทสารใส่บีกเกอร์แล้วใช้แท่งแก้วคน ประมาณ 2 นาที

1.7 เทสารใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ เซนตริฟิวจ์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

1.8 เก็บสารละลายส่วนบนซึ่งมีเอนไซม์ไทโรซิเนส และแช่เอนไซม์ในน้ำแข็งตลอดเวลาที่ทำการทดลอง

2. การสร้างกราฟมาตรฐาน

2.1 ปิเปตต์สารละลาย 5 mM DOPA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที (ห้ามถูกแสงเนื่องจาก dopachrome มีความไวต่อแสง)

2.2 นำสารที่ได้ในข้อ 2.1 มาทำการเจือจางตามลำดับ (serial dilution) ในอัตราส่วน 1:1 ด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จำนวน 6 หลอด

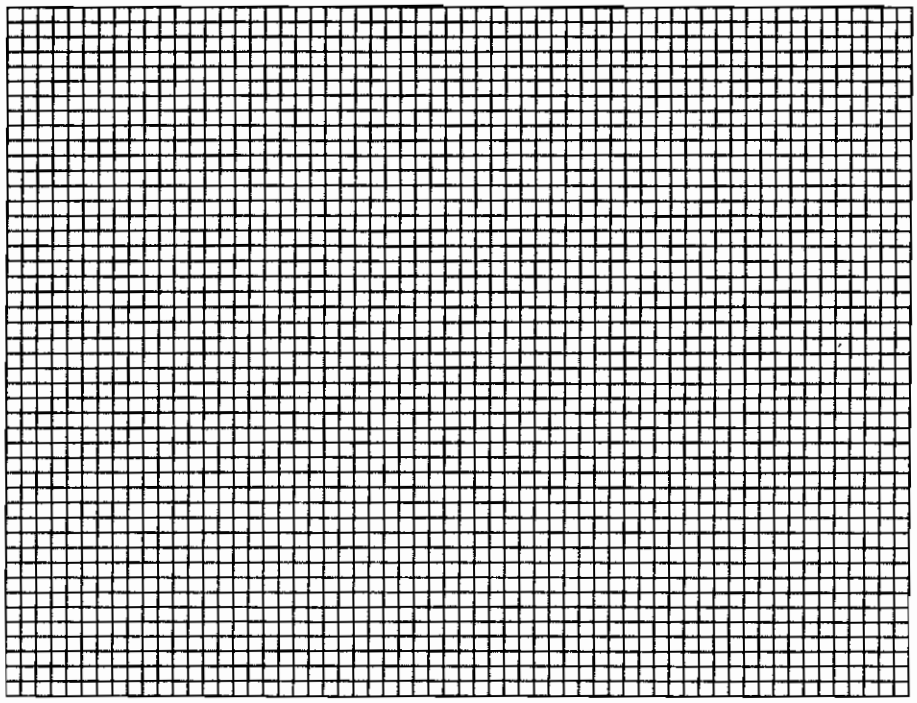
2.3 ปิเปตต์สารแต่ละหลอดปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร (A_{475}) บันทึกค่าลงในตารางที่ 3.2.1

2.4 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{475} กับปริมาณ dopachrome

ตารางที่ 3.2.1 ปริมาณ dopachrome และค่าการดูดกลืนแสง

หลอดที่	ปริมาณ dopachrome (μmole)	A_{475}
1 (สารเริ่มต้น)		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8 (blank)	phosphate buffer	0

กราฟมาตรฐาน



3. การศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.1 เตรียมสารละลายเพื่อใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ โดยปิเปตต์สารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร และเอนไซม์ไทโรซิเนสปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน เทสารละลายใส่หลอดคิวเวตต์แล้วนำไปใส่เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ให้มีค่าเป็นศูนย์

3.2 ทำการปิเปตต์สารดังตารางที่ 3.2.2 โดยหลอดชุดที่ 1 ให้ปิเปตต์สารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2.30 มิลลิลิตร และ 5 mM DOPA ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนเอนไซม์ไทโรซิเนสให้ปิเปตต์ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร แช่เอนไซม์ไว้ในน้ำแข็ง ทำการปิเปตต์สารใส่หลอดทดลองชุดอื่นๆ ในทำนองเดียวกัน

3.3 เมื่อพร้อมที่จะทำการทดลองให้เตรียมนาฬิกาจับเวลา และนำหลอดทดลองแต่ละชุดไปที่เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ โดยการทดลองชุดที่ 1 ให้เทบัฟเฟอร์ที่ผสมกับ DOPA ใส่ลงในหลอดที่มีเอนไซม์ เริ่มจับเวลาทันทีเมื่อเริ่มเทสาร ปิดพาราฟิล์มที่ปากหลอดผสมสารโดยกลับหลอดขึ้นลงประมาณ 3 ครั้ง เทสารใส่คิวเวตต์ และนำหลอดคิวเวตต์ใส่เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 30 วินาที, 60 วินาที, 90 นาที, ... เป็นเวลา 3 นาที บันทึกค่าที่ได้ลงในตารางที่ 3.2.3

3.4 หลอดทดลองชุดที่ 2 ถึงชุดที่ 5 ให้ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดที่ 1 โดยเปลี่ยนเฉพาะปริมาตรของ phosphate buffer และ DOPA ตามที่ได้เตรียมไว้แล้ว

3.5 นำข้อมูลจากในตารางที่ 3.2.3 ไปเขียนกราฟระหว่าง A_{475} กับเวลา เพื่อหาอัตราเร็วของปฏิกิริยา จะได้ส่วนของกราฟเส้นตรง ค่าความชันของกราฟนั้นๆ คืออัตราเร็วของปฏิกิริยา (v) ที่แต่ละความเข้มข้นของ DOPA ([S]) นำค่า [S] และ v ที่ได้ไปใส่ลงในตารางที่ 3.2.4 และคำนวณค่า 1/[S] และ 1/v

3.6 นำข้อมูล 1/[S] กับ 1/v ไปเขียนกราฟ โดยให้ 1/[S] อยู่ทางแกนนอน และ 1/v อยู่ทางแกนตั้ง (Lineweaver–Burk plot) จะได้กราฟเส้นตรง ให้หาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตารางที่ 3.2.2 ปริมาตรของสารละลายแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองที่ 3

สารละลาย (มิลลิลิตร)	หลอดชุดที่				
	1	2	3	4	5
0.1 M phosphate buffer pH 7.0	2.30	2.20	2.10	1.90	1.30
5 mM DOPA	0.20	0.30	0.40	0.60	1.20
tyrosinase	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

ตารางที่ 3.2.3 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{475}) ที่เวลาต่างๆ จากการทดลองที่ 3

เวลา (วินาที)	A_{475} ของหลอดชุดที่				
	1	2	3	4	5
30					
60					
90					
120					
150					
180					

ตารางที่ 3.2.4 ค่า [S], 1/[S], v และ $1/v$ ของการทดลองที่ 3

หลอดชุดที่	[S]	1/[S]	v	$1/v$
1				
2				
3				
4				
5				

K_m = ...

V_{max} = ...

4. ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

4.1 เตรียมสารละลายเพื่อใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ โดยทำการปิเปตต์สารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร และเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน เทสารละลายใส่หลอดคิวเวตต์ แล้วนำไปใส่เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ให้มีค่าเป็นศูนย์

4.2 การทดลองนี้ใช้ตัวยับยั้งคือ 0.5 mM benzoic acid โดยทำการทดลองตามตารางที่ 3.2.5 หลอดทดลองชุดที่ 1 ให้ปิเปตต์สารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร 5 mM DOPA ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร และตัวยับยั้งปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และปิเปตต์เอนไซม์ใส่หลอดทดลอง หลอดใหม่ ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร แช่ไว้ในน้ำแข็ง ทำการปิเปตต์สารใส่หลอดทดลองชุดอื่นๆ ในทำนองเดียวกัน

4.3 ทำการทดลองเพื่อหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาในสภาวะที่มีสารยับยั้ง โดยนำหลอดทดลองแต่ละชุดไปที่เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ เมื่อพร้อมที่จะจับเวลาจึงเทบัฟเฟอร์ที่ผสมกับ DOPA และ benzoic acid ใส่ลงในหลอดที่มีเอนไซม์ไทโรซิเนส เริ่มจับเวลาทันที ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงประมาณ 3 ครั้ง เทสารละลายใส่คิวเวตต์ นำหลอดคิวเวตต์ใส่เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 30 วินาที, 60 วินาที, 90 นาที, ... เป็นเวลา 3 นาที บันทึกค่าที่ได้ลงในตารางที่ 3.2.6

4.4 หลอดชุดที่ 2 ถึงหลอดชุดที่ 5 ให้ทำการทดลองเช่นเดียวกับชุดที่ 1 โดยเปลี่ยนเฉพาะปริมาตรของ phosphate buffer และ DOPA ตามที่ได้เตรียมไว้แล้ว

4.5 นำข้อมูลจากตารางที่ 3.2.6 ไปเขียนกราฟระหว่าง A_{475} กับเวลา จะได้ส่วนของกราฟเส้นตรง หาอัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่อมี 0.5 mM benzoic acid เป็นตัวยับยั้ง โดยค่าความชันของกราฟนั้นๆ คืออัตราเร็วของปฏิกิริยา (v) ที่แต่ละความเข้มข้นของ DOPA ([S]) นำค่า [S] และ v ที่ได้ไปใส่ลงในตารางที่ 3.2.7 และคำนวณค่า 1/[S] และ 1/v

4.6 นำข้อมูล 1/[S] กับ 1/v ไปเขียนกราฟ โดยให้ 1/[S] อยู่ทางแกนนอน และ 1/v อยู่ทางแกนตั้ง (Lineweaver–Burk plot) จะได้กราฟเส้นตรง ให้หาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่อมี bezoic acid เป็นตัวยับยั้ง

ตารางที่ 3.2.5 ปริมาตรของสารละลายแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองที่ 4

สารละลาย (มิลลิลิตร)	หลอดชุดที่				
	1	2	3	4	5
0.1 M phasphate buffer pH 7.0	2.00	1.90	1.80	1.60	1.00
5 mM DOPA	0.20	0.30	0.40	0.60	1.20
0.5 mM benzoic acid	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
tyrosinase	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

ตารางที่ 3.2.6 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{475}) ที่เวลาต่างๆ จากการทดลองที่ 4

เวลา (วินาที)	หลอดที่				
	1	2	3	4	5
30					
60					
90					
120					
150					
180					

ตารางที่ 3.2.7 ค่า [S], 1/[S], v และ $1/v$ จากการทดลองที่ 4

หลอดชุดที่	[S]	1/[S]	v	$1/v$
1				
2				
3				
4				
5				

K_m = ...

V_{max} = ...

5. ศึกษาผลของ pH

5.1 หลอดทดลองชุดที่ 1 ให้ปิเปตต์ 5 mM DOPA ในบัฟเฟอร์ pH 3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง และปิเปตต์เอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองอีกหลอดหนึ่ง และแช่ไว้ในน้ำแข็ง

5.2 เทสารละลาย DOPA ใส่ลงในเอนไซม์ จับเวลาทันที ปิดพาราฟิล์มที่ปากหลอด ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงประมาณ 3 ครั้ง เทสารใส่คิวเวตต์

5.3 นำคิวเวตต์ใส่ในเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ บันทึกเวลา เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้เทียบเท่ากับ dopachrome ที่เกิดขึ้นเป็น 10 ไมโครโมล (ข้อมูลจากการทดลองที่ 2)

5.4 หลอดทดลองชุดที่ 2–10 ทำการทดลองเหมือนข้อ 5.1–5.3 แต่เปลี่ยนเฉพาะ 5 mM DOPA ในบัฟเฟอร์ที่ pH อื่นๆ

5.5 บันทึกผลที่ได้ทั้งหมดลงในตารางที่ 3.2.8 และคำนวณอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (ไมโครโมล/นาที)

5.6 เขียนกราฟระหว่างอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (แกน y) และ pH (แกน x) และหา pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 3.2.8 ผลของ pH ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

หลอดทดลองชุดที่	pH	เวลา (วินาที)	ปริมาณ dopachrome (ไมโครโมล)	อัตราเร็ว (ไมโครโมล/นาที)
1	3.5		10	
2	4.0		10	
3	4.5		10	
4	5.0		10	
5	5.5		10	
6	6.0		10	
7	6.5		10	
8	7.0		10	
9	7.5		10	
10	8.0		10	

6. ผลของอุณหภูมิ

6.1 ปิเปตต์สารละลาย 5 mM DOPA ในบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองจำนวน 7 หลอด

6.2 ปิเปตต์เอนไซม์ไทโรซิเนสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองจำนวน 7 หลอด แช่ในน้ำแข็ง

6.3 การทดลองชุดที่ 1 ที่อุณหภูมิ 10 °C นำหลอดทดลองจากข้อ 1 และ 2 ใส่ภาชนะซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 10 °C

6.4 เมื่อพร้อมที่จะจับเวลาให้ใส่สารละลาย DOPA ลงในหลอดที่มีเอนไซม์ไทโรซิเนส เริ่มจับเวลาทันที ปิดปากหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์ม ผสมสารละลายโดยกลับหลอดขึ้นลง รีบเทสารใส่คิวเวตต์

6.5 นำคิวเวตต์ใส่ในเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ บันทึกเวลา เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้เทียบเท่ากับ dopachrome ที่เกิดขึ้นเป็น 10 ไมโครโมล (ข้อมูลจากการทดลองที่ 2)

6.6 หลอดทดลองชุดที่ 2–7 ทำการทดลองเหมือนข้อ 6.3-6.5 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C และ 40 °C

6.7 บันทึกผลที่ได้ทั้งหมดลงในตารางที่ 3.2.9 และคำนวณอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (ไมโครโมล/นาที)

6.8 เขียนกราฟระหว่างอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (แกน y) และอุณหภูมิ (แกน x) หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 3.2.9 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

หลอดทดลองชุดที่	อุณหภูมิ ($^{\circ}$C)	เวลา (วินาที)	ปริมาณ dopachrome (ไมโครโมล)	อัตราเร็ว (ไมโครโมล/นาที)
1	10		10	
2	15		10	
3	20		10	
4	25		10	
5	30		10	
6	35		10	
7	40		10	

คำถาม

เอนไซม์ X มีน้ำหนักโมเลกุล 48,000 สามารถเปลี่ยนสับสเตรท Y ไปเป็นผลิตผล Z สาร Y สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และสาร Z สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร จงตอบคำถามต่อไปนี้

- ความยาวคลื่นค่าใดที่สามารถทดสอบการทำงานของเอนไซม์ X ถ้าใช้ความยาวคลื่นนั้น ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มหรือลดเมื่อเวลาเปลี่ยนไป

.....

.....

- ถ้า V_{max} มีค่าเท่ากับ 60 µmol/min และใช้เอนไซม์ 0.1 mg/ml ปริมาตร 40 µl จงหาค่า turnover number

.....

.....