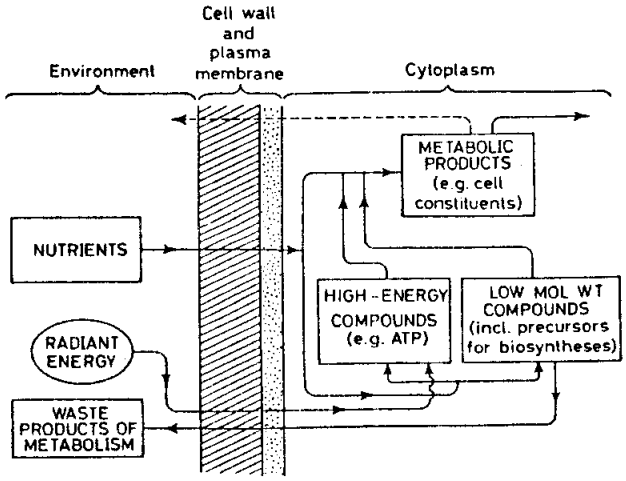
บทที่ 5
เมตาบอลิซึ่ม
(Metabolism)

เมตาบอลิซึ่มของแบคทีเรีย หมายถึงปฏิกริยาเคมีทั้งหมดที่เซลล์แบคทีเรียทำให้เกิดขึ้น โดยมีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งให้สับสเตรตหรืออาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอย่างต่อเนื่องไปหลาย ๆ ขั้นตอน ในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีดังกล่าวอาจจะมีการนำพลังงานมาใช้หรือเกิดพลังงานและสารซึ่งเป็นแหล่งสำหรับการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสับสเตรตที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องไปหลาย ๆ ขั้นตอนนี้เรียกว่า วิถีเมตาบอลิก (metabolic pathway) สารที่เป็นตัวกลางของวิถีเมตาบอลิกเรียกว่า อินเตอร์มีเดียต ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นผลิตผลของวิถี อินเตอร์มีเดียตที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้ 2 วิถีเรียกว่า แอมฟิบอลิก (amphibolic) อินเตอร์มีเดียตหรือไดอะบอลิก (diabolic) อินเตอร์มีเดียต ส่วนพรีเคอร์เซอร์หมายถึงสารที่เกิดขึ้นภายในเซลล์หรือสารที่ได้จากสภาวะแวดล้อมซึ่งเมื่อถูกเมตาบอไลส์ (metabolise) แล้วได้ผลิตผลบางชนิด เช่น สารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์

เมตาบอลิซึ่มแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ คะตาบอลิซึ่มหรือดิสซิมิเลชั่น (dissimilation) กับเอนาบอลิซึ่มหรือแอสซิมิเลชั่น (assimilation) คะตาบอลิซึ่มเป็นกระบวนการที่ทำให้อาหารโมเลกุลใหญ่เปลี่ยนแปลงไปเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ที่มีโครงสร้างง่าย ๆ แล้วได้พลังงานซึ่งส่วนใหญ่เก็บไว้ในรูป ATP โมเลกุลเล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นนี้บางชนิดจะถูกขับออกนอกเซลล์เพราะว่าเป็นผลิตผลที่เซลล์ไม่ต้องการ ในขณะที่บางชนิดถูกนำเข้าสู่กระบวนการเอนาบอลิซึ่มเพื่อเป็นพรีเคอร์เซอร์ในการสังเคราะห์สารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ (รูปที่ 5-1) ส่วนเอนาบอลิซึ่มเป็นกระบวนการที่สังเคราะห์โมเลกุลใหญ่จากโมเลกุลเล็ก ๆ โดยใช้พลังงานจากสารประกอบพลังงานสูง เช่น ATP ไปสร้างบอนด์ใหม่เพื่อเชื่อมโมเลกุลเล็ก ๆ ให้เป็นโมเลกุลใหญ่ และทำให้โคเอ็นไซม์รูปรีดิวซ์ถูกเปลี่ยนไปเป็นโคเอ็นไซม์รูปออกซิไดส์ เมตาบอลิซึ่มทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมาแล้วนี้แม้จะมีผลตรงกันข้ามและมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด แต่ขั้นตอนในการเกิดปฏิกริยาเคมีต่าง ๆ ของทั้ง 2 กระบวนการมิได้เป็นปฏิกริยาทวนกลับกันและแต่ละกระบวนการก็มีขั้นตอนในการเกิดปฏิกริยาเคมี

ต่าง ๆ โดยเฉพาะ จึงเป็นการสะดวกที่จะศึกษาคะตาบอลิซึ่มและ เอนาบอลิซึ่มแยกกัน



รูปที่ 5-1 แผนผังเมตาบอลิซึ่มของแบคทีเรีย

การควบคู่ของปฏิกริยาในวิถีเมตาบอลิก

ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ปฏิกริยาเอ็ก-เซอร์โกนิก (exergonic reaction) กับปฏิกริยาเอนเดอร์โกนิก (endergonic reaction) ปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิกเป็นปฏิกริยาเคมีที่มีค่า ΔG เป็นลบ (-) จึงเป็นปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นได้เอง โดยไม่ต้องใส่พลังงาน และหลังจากเกิดปฏิกริยาเคมีแล้วจะปล่อยพลังงานออกมา ซึ่งภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีสารเคมีมารับพลังงาน แล้วทำหน้าที่ขนส่งพลังงานที่รับไว้ไปยังปฏิกริยาเอนเดอร์โกนิก สำหรับปฏิกริยาเอนเดอร์โกนิกเป็นปฏิกริยาเคมีที่มีค่า ΔG เป็นบวก (+) จึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้เอง ต้องอาศัยพลังงานจากปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิกหรือการควบคู่ (coupling) กับปฏิ-กริยาเอ็กเซอร์โกนิก แล้วมีผลรวมของ ΔG ของปฏิกริยาทั้งหมดเป็นลบจึงจะเกิดปฏิกริยาได้

การควบคู่ของปฏิกริยาในวิถีเมตาบอลิกมี 2 แบบ คือ การควบคู่โดยตรง (direct coupling) กับการควบคู่แบบต่อเนื่อง (sequential coupling) การควบคู่โดยตรงคือ การที่ปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิคควบคู่เข้ากับปฏิกริยาเอ็นเดอร์โกนิกโดยตรง ดังรูปที่ 5-2 ปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิกที่มาควบคู่นี้เป็นปฏิกริยาเคมีที่บอนด์พลังงานสูง (มีสัญญลักษณ์เป็น ~) ของสารประกอบพลังงานสูงแตกออก ดังรูปที่ 5-3 สารประกอบพลังงานสูงที่พบในวิถีเมตาบอลิก ได้แก่ ATP อะเซ็ทติลฟอสเฟต (acetyl phosphate) 1, 3-ไดฟอสโฟกลีเซอเรต และฟอสโฟอีนอลไพรูเวต (phosphoenolpyruvate) เป็นต้น การควบคู่แบบต่อเนื่อง คือ การที่ปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิกทำให้

glucose + Pi $\longrightarrow$ glucose-6 - phosphate + H_2O (endergonic reaction)

ATP + H_2O $\longrightarrow$ ADP + P_i (exergonic reaction)

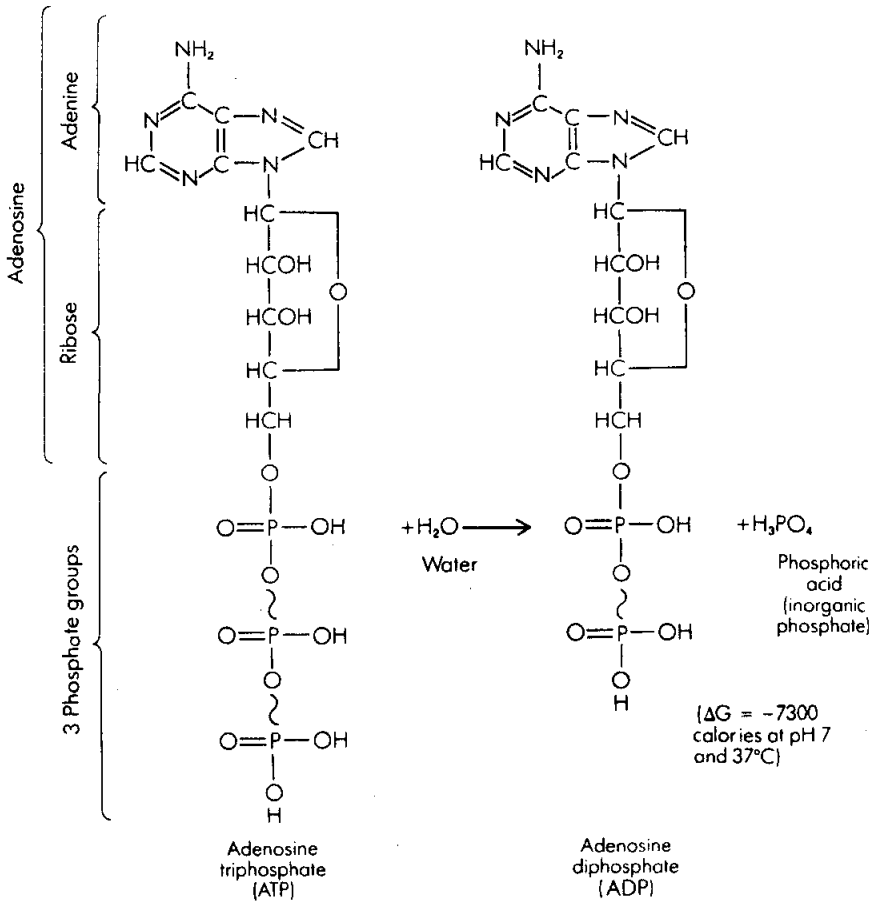
glucose + ATP $\longrightarrow$ glucose-6 - phosphate + ADP $\quad \Delta G^{o\prime} = -5100$ cal

รูปที่ 5-2 การควบคู่โดยตรงระหว่างปฏิกริยาเอ็นเดอร์โกนิกกับปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิก

ปฏิกริยาเอ็นเดอร์โกนิกต่าง ๆ ซึ่งเกิดมาก่อนและมีความสัมพันธ์กันนั้นเกิดขึ้นได้ เช่น สมมุติว่าการเปลี่ยนแปลงในวิถีเมตาบอลิกเป็นดังนี้

$$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D$$

การเปลี่ยนแปลงจาก A ไปเป็น B จาก B ไปเป็น C และจาก C ไปเป็น D มีค่า $\Delta G^{o\prime}$ เท่ากับ + 2000, + 1500 และ - 7000 คาลอรีตามลำดับ ผลรวมของ $\Delta G^{o\prime}$ ของปฏิกริยาทั้งหมดเท่ากับ - 3500 คาลอรี่ ด้วยเหตุนี้ปฏิกริยาต่าง ๆ ในวิถีเมตาบอลิกจึงเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงจาก Cไปเป็น D เกิดขึ้นได้ดีมากทำให้ไม่มี C สะสมอยู่ การเปลี่ยนแปลงจาก B ไปเป็น C จึงเกิดขึ้น และเมื่อไม่มี B สะสมอยู่ก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก A ไปเป็น B



รูปที่ 5-3 สูตรโครงสร้างของ ATP และการเกิดปฏิกริยาไฮโดรลิซิสของ ATP

การศึกษาเมตาบอลิซึ่ม

ในการศึกษาเมตาบอลิซึ่มของแบคทีเรียควรจะทำการศึกษาถึงความต้องการอาหารของแบคทีเรีย โดยตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียในลักษณะเชื้อผสมและเชื้อบริสุทธิ์ เมื่อเจริญบนอาหารที่ไม่ทราบส่วนประกอบแน่นอนและทราบส่วนประกอบแน่นอน หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาถึงวิถีเมตาบอลิกของสับสเตรตชนิดต่าง ๆ โดยใช้เซลล์แบคทีเรียหรือเอ็นไซม์ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรีย ตรวจสอบปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ในวิถีเมตาบอลิกทั้งวิถีคะตาบอลิก (catabolic pathway) และวิถีเอนาบอลิก (anabolic pathway) และศึกษาถึงวิธีการขนส่งโมเลกุลของสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ตามลำดับ

วิธีการศึกษาเมตาบอลิซึ่ม

วิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเมตาบอลิซึ่มของแบคทีเรียมี ดังนี้

1. วิเคราะห์หาปริมาณของอาหารชนิดต่าง ๆ ที่แบคทีเรียนำไปใช้และปริมาณผลิตผลชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการเมตาบอไลส์อาหาร วิธีการนี้จะได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเมตาบอลิซึ่ม คือ ทำให้ทราบชนิดและปริมาณของธาตุที่แบคทีเรียนำไปใช้เพื่อการเจริญ ประสิทธิภาพในการทำงานของเอ็นไซม์ ผลิตผลซึ่งเกิดขึ้นและผลิตผลที่สำคัญของเมตาลิซึ่ม

2. ทำให้แบคทีเรียเกิดมิวเตชั่น โดยการใช้สารที่มีกัมมันตภาพรังสี (radioactive) และสารเคมีบางชนิดทำให้เกิดข้อบกพร่องทางพันธุกรรม (genetic defect) ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์เอ็นไซม์ของแบคทีเรีย คือ ไม่สามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์บางชนิดหรือสังเคราะห์เอ็นไซม์ผิดปกติซึ่งไม่สามารถเร่งปฏิกริยาในวิถีเมตาบอลิกให้เกิดต่อไปได้ ดังนั้นจึงเกิดการสะสมอินเตอร์มีเดียตที่ไม่มีเอ็นไซม์มาเร่งให้เปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นจำนวนมาก และในที่สุดเซลล์แบคทีเรียก็จะขับอินเตอร์มีเดียตนี้ออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้ตรวจสอบได้ง่ายและทราบถึงวิถีเมตาบอลิกของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังสามารถนำแบคทีเรียที่เกิดมิวเตชั่นมาศึกษาถึงชนิดของอาหารซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญด้วย แบคทีเรียที่เกิดมิวเตชั่นซึ่งนิยมนำมาศึกษาเมตาบอลิซึ่มคือ

ออโซโทรฟ (auxotroph) หรือออโซโทรฟิคมิวแตนต์ (auxotrophic mutant) ซึ่งเป็นแบคทีเรียพวกโปรโตโทรฟ (prototroph) ที่เกิดมิวเตชั่นแล้วไม่สามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์บางชนิด

3. ใช้สารไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ตัวใดตัวหนึ่ง ทำให้วิถีเมตาบอลิกหยุดชงักหรือเกิดขึ้นต่อไปได้เพียงเล็กน้อย อินเตอร์มีเดียตซึ่งอยู่ก่อนหน้าเอ็นไซม์ที่ถูกยับยั้งก็จะเพิ่มมากขึ้นทำให้ตรวจสอบได้ง่ายและทราบถึงวิถีเมตาบอลิกของแบคทีเรีย

4. ใช้สับสเตรตซึ่งมีอะตอมของธาตุที่มีกัมมันตภาพรังสี (radioactive element) เช่น ^{14}C, ^{32}P, ^{3}H และ ^{35}S เมื่อเซลล์แบคทีเรียหรือเอ็นไซม์ทำให้สับสเตรตเกิดการเปลี่ยนแปลงไปตามวิถีเมตาบอลิก อินเตอร์มีเดียตที่เกิดขึ้นก็จะมีอะตอมของธาตุที่มีกัมมันตภาพรังสีด้วย ทำให้สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรตได้ โดยนำอินเตอร์มีเดียตต่าง ๆ ที่เกิดจากสับสเตรตนี้มาแยกบนกระดาษโครมาโตแกรม (chromatogram) แล้วนำฟิล์มถ่ายรูปมาวางบนกระดาษโครมาโตแกรม อินเตอร์มีเดียตซึ่งมีอะตอมของธาตุที่มีกัมมันตภาพรังสีก็จะเปล่งรังสี β ทำให้ฟิล์มถ่ายรูปมีจุดสีดำ วิธีการนี้เรียกว่า ราดิโอออโตกราฟฟี (radioautography) หรืออาจจะนำกระดาษโครมาโตแกรมไปกระทบตัวเปล่งแสง (scintillation) จะทำให้เกิดแสงขึ้น วัดปริมาณแสงที่เกิดขึ้น ปริมาณแสงที่วัดได้นี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอะตอมของธาตุที่มีกัมมันตภาพรังสี

5. ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยทางเมคคานิก แล้วนำไปแยกชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเซลล์โดยการปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วต่าง ๆ กัน นำชิ้นส่วนของเซลล์ที่แยกได้แต่ละส่วนมาศึกษาวิถีเมตาบอลิก โดยใช้สับสเตรตซึ่งมีอะตอมของธาตุที่มีกัมมันตภาพรังสี วิธีการนี้นอกจากจะทราบถึงวิถีเมตาบอลิกที่เกิดขึ้นแล้วยังทราบว่าวิถีเมตาบอลิกนั้นเกิดขึ้นตรงส่วนใดของเซลล์

6. ใช้สารที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงมาก ๆ กับสับสเตรตที่แบคทีเรียเมตาบอไลส์ได้ เซลล์แบคทีเรียหรือเอ็นไซม์ก็ยังคงทำให้สารนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้ตามวิถีเมตาบอลิกแต่ไม่

ตลอดวิถี ทำให้อินเตอร์มีเดียตที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงต่อไปได้สะสมเป็นจำนวนมาก จึงตรวจสอบได้ง่ายและทราบถึงวิถีเมตาบอลิกของแบคทีเรีย

การควบคุมเมตาบอลิซึ่ม

โดยทั่วไปแบคทีเรียจะควบคุมเมตาบอลิซึ่มทั้ง 2 ชนิด คือ คะตาบอลิซึ่มและเอนาบอลิซึ่มให้เกิดขึ้นในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อทำให้เซลล์เจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่อาศัยอยู่ การเกิดเมตาบอลิซึ่มต้องมีเอ็นไซม์หลาย ๆ ชนิดเป็นตัวเร่งปฏิกริยาเคมีต่าง ๆ เอ็นไซม์แต่ละชนิดจะเร่งปฏิกริยาเคมีต่างกันและเมื่อเอ็นไซม์หยุดทำงานก็ไม่มีเมตาบอลิซึ่มเกิดขึ้น ด้วยเหตุนี้การควบคุมเอ็นไซม์โดยควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์กับควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์หรือควบคุมปริมาณเอ็นไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นจึงเป็นการควบคุมเมตาบอลิซึ่มของแบคทีเรีย

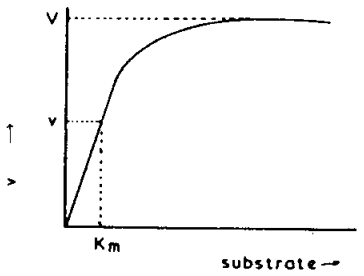
ควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์ เอ็นไซม์อาจจะถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ดีขึ้นหรือถูกยับยั้งการทำงาน โดยมีสารซึ่งเป็นตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้งไปจับกับเอ็นไซม์ มีการสังเคราะห์โปรตีโอไลติก-เอ็นไซม์ไปทำลายเอ็นไซม์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการใช้ในเมตาบอลิซึ่ม ทำให้เอ็นไซม์ไปจับกับเยื่อเซลล์หรือโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์แล้วไม่สามารถจับกับสับสเตรตได้ทำให้สับสเตรตไม่มีการเปลี่ยนแปลง การควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์ดังกล่าวมานี้ เป็นการทำให้เซลล์สามารถนำพลังงานที่ได้จากกระบวนการคะตาบอลิซึ่มไปใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด และทำให้เซลล์สามารถสังเคราะห์สารต่าง ๆ ในปริมาณที่เหมาะสมกับความต้องการของเซลล์เสมอ เช่น การยับยั้งการทำงานของอัลโลสเตริก (allosteric) เอ็นไซม์โดยผลิตผลสุดท้ายของวิถีเมตาบอลิก ดังรูปที่ 5-8 และการยับยั้งการสังเคราะห์ไลซีนจากแอสปาร์เตตโดย *Escherichia coli* เมื่อ *Escherichia coli* สังเคราะห์ไลซีนมากเกินความต้องการของเซลล์แล้ว ไลซีนซึ่งเป็นผลิตผลสุดท้ายของวิถีเมตาบอลิกก็จะไปจับกับแอสปาร์ไตไคเนส (aspartokinase) ซึ่งเป็นอัลโลสเตริกเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาแรกสุดของวิถีการสังเคราะห์ไลซีนจากแอสปาร์เตต ทำให้เอ็นไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นการสังเคราะห์ไลซีนจึงไม่เกิดขึ้น เป็นเหตุให้แบคทีเรียไม่ต้องนำพลังงานที่ได้จากกระบวนการคะตาบอลิซึ่มสารอื่น

มาใช้ในการสังเคราะห์ ขณะเดียวกันแบคทีเรียก็จะนำพลังงานนี้ไปใช้ในกิจกรรมอื่น ๆ ของเซลล์ และเมื่อไลซีนซึ่งเป็นผลิตผลสุดท้ายของวิถีเมตาบอลิกน้อยลง ไลซีนก็จะหลุดออกจากเอ็นไซม์แล้ว เกิดการสังเคราะห์ไลซีนได้ใหม่ตามความต้องการของเซลล์

ประสิทธิภาพในการทำงานของเอ็นไซม์มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกริยาต่าง ๆ คือ เมื่อเอ็นไซม์ทำงานได้ดีขึ้นอัตราเร็วของปฏิกริยาก็จะสูงขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์มีดังต่อไปนี้

1. ความเข้มข้นของสับสเตรต ถ้าสับสเตรตมีความเข้มข้นสูงขึ้นอัตราเร็วของปฏิกริยาก็จะเพิ่มขึ้น และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุด ๆ หนึ่งซึ่งเอ็นไซม์จับกับสับสเตรตหมด อัตราเร็วของปฏิกริยาจะสูงสุด หลังจากนั้นอัตราเร็วของปฏิกริยาจะไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรตอีก ดังรูปที่ 5-4 ค่า Km (Michaelis-Menten constant) เป็นค่าคงที่ในการแยกตัวออกของสารประกอบเชิงซ้อนของเอ็นไซม์กับสับสเตรตซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรต เมื่ออัตราเร็วของปฏิกริยาเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วของปฏิกริยาสูงสุด สามารถคำนวณหาค่า Km ของปฏิกริยาได้จากสมการที่ 5-1 v คืออัตราเร็วของปฏิกริยา V คืออัตราเร็วของปฏิกริยาสูงสุด S คือความเข้มข้นของสับสเตรต

$$v = V\left[\frac{S}{Km+S}\right] \qquad (5\text{-}1)$$



รูปที่ 5-4 ความเข้มข้นของสับสเตรตที่มีต่ออัตราเร็วของปฏิกริยา

2. ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ เมื่อการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรต เป็นดังนี้

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_0} E + P$$

สามารถคำนวณหาค่าอัตราเร็วของปฏิกริยา (v) และหาค่า Km (Michaelis-Menten constant) ได้จากสมการที่ 5-2 และ 5-3 ตามลำดับ S คือ สับสเตรต E คือเอ็นไซม์ k_1 คือค่าคงที่ของอัตราเร็วที่เอ็นไซม์และสับสเตรตรวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอ็นไซม์กับสับสเตรด(ES) k_0 คือค่าคงที่ของอัตราเร็วที่สารประกอบเชิงซ้อนของเอ็นไซม์กับสับสเตรดแตกตัวได้เอ็นไซม์และผลิตผล(P) k_{-1} คือค่าคงที่ของอัตราเร็วที่สารประกอบเชิงซ้อนของเอ็นไซม์กับสับสเตรดแตกตัวให้เอ็นไซม์และสับสเตรต $[E_0]$ คือความเข้มข้นของเอ็นไซม์ทั้งหมดและ [S] คือความเข้มข้นของสับสเตรต

$$v = \frac{k_0[E_0][S]}{Km + [S]} \qquad (5\text{-}2)$$

$$Km = \frac{k_0 + k_{-1}}{k_1} \qquad (5\text{-}3)$$

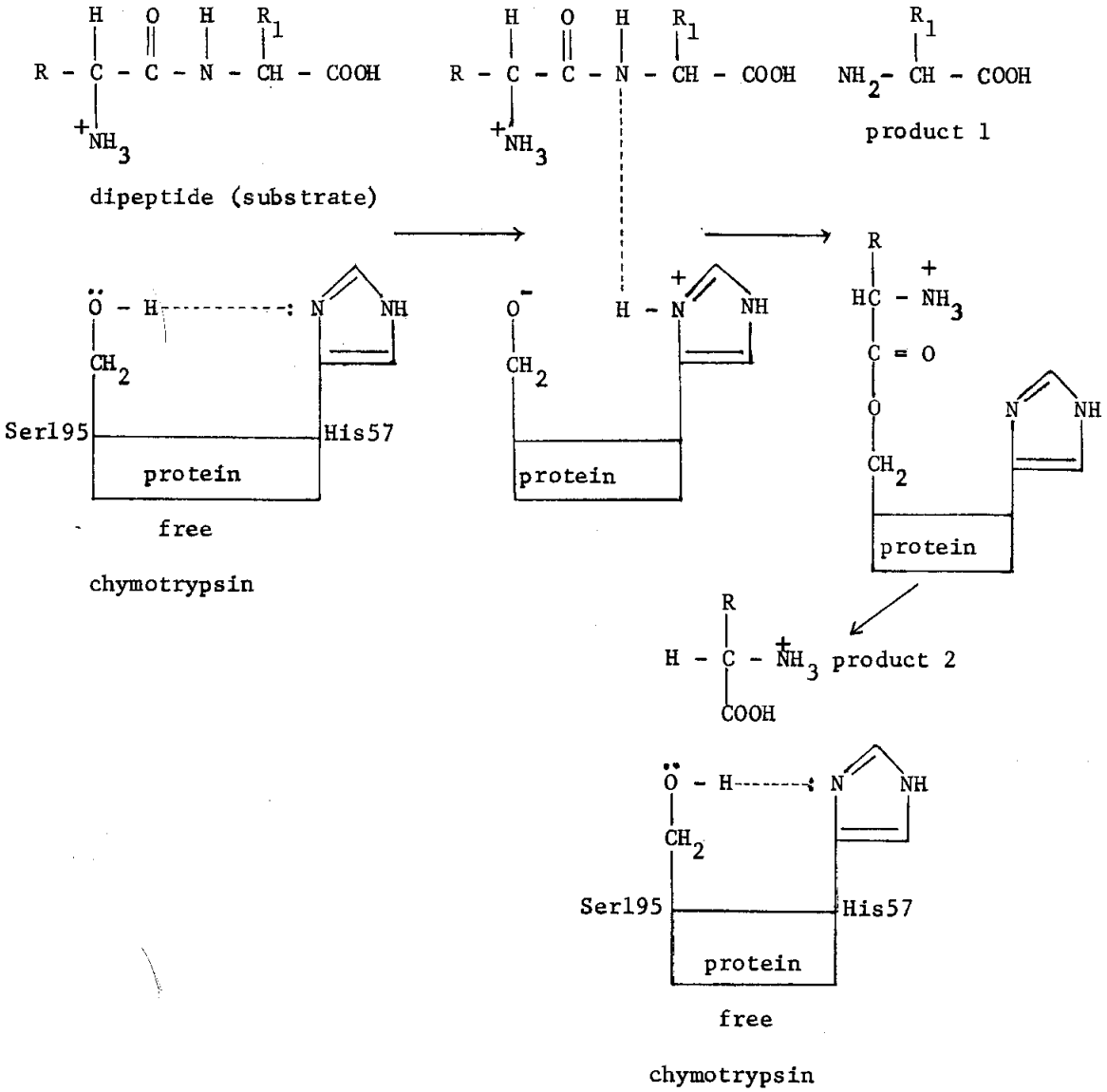
จากการที่ความเข้มข้นของเอ็นไซม์มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกริยา ดังสมการที่ 5-2 จึงมีการกำหนดว่า เอ็นไซม์ 1 หน่วย คือปริมาณเอ็นไซม์ที่เร่งให้สับสเตรต 1 ไมโครโมล (μ mole) เปลี่ยนแปลงไปในเวลา 1 นาที สำหรับความเข้มข้นของเอ็นไซม์ในสารละลายแสดงเป็นจำนวนหน่วยต่อมิลลิลิตร

3. pH เอ็นไซม์แต่ละชนิดหรือแม้แต่ชนิดเดียวกันเมื่อได้มาจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะทำงานได้ดีที่สุดในสภาวะแวดล้อมที่มีค่าของ pH ไม่เหมือนกัน และทนทานต่อ pH ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างกัน เช่น อัลฟาอะมิเลส (α-amylase) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาไฮโดรลิซิส-อัลฟา-1, 4-ไกลโคซิดิกบอนด์ (α-1, 4-glycosidic bond) ของโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จาก

Bacillus subtilis, *Bacillus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* และ *Pseudomonas saccharophila* มีค่า pH ซึ่งทำงานได้ดีที่สุดและค่า pH ที่ยังสามารถทำงานได้ต่างกัน เนื่องจากมีส่วนประกอบทางเคมีคือปริมาณโปรลีน ซีรีนและหมู่คาร์บอกซิลที่อิสระไม่เหมือนกัน การเปลี่ยนแปลง pH ในสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ เพราะว่าการเปลี่ยนแปลง pH ทำให้ไซด์เชน (side chain)ของกรดอะมิโนตรงบริเวณแอคตีบไซต์ (active site)ของโมเลกุลเอ็นไซม์ได้หรือเสียโปรตรอน แล้วทำให้ประสิทธิภาพในการที่ไซด์เชนของกรดอะมิโนตรงบริเวณแอคตีบไซต์จับกับสับสเตรตดีขึ้นหรือเลวลง ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรต เนื่องจากปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงสับสเตรตไปเป็นผลิตผลจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อสับสเตรตจับกับเอ็นไซม์ที่เหมาะสม แล้วเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งให้สับสเตรตที่จับอยู่นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น การย่อยไดเปปไทด์ (dipeptide) โดยไคโมทริพซิน (chymotrypsin)ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ประเภทโปรตีเอส(protease) ดังรูปที่ 5-5 กรดอะมิโนตรงบริเวณแอคตีบไซต์ของเอ็นไซม์นี้คือฮิสติดีน57 และซีรีน195 ซึ่งอยู่ใกล้กันและหมู่ไฮดรอกซิลของซีรีน195 จับกับหมู่ไอมีดาโซน(imidazone) ของฮิสติดีน57 เมื่อเอ็นไซม์ทำปฏิกริยากับสับสเตรต หมู่ไอมีดาโซนของฮิสติดีน57จะเป็นตัวส่งเสริมให้หมู่ไฮดรอกซิลของซีรีนทำปฏิกริยากับสับสเตรต โดยการขนส่งโปรตรอนจากซีรีน195 มายังไอมีดาโซนไนโตรเจนของฮิสติดีน57 แล้วจับกับสับสเตรตด้วยไฮโดรเจนบอนด์ หลังจากนั้นเอ็นไซม์ก็จะเป็นตัวเร่งให้สับสเตรตเปลี่ยนไปเป็นผลิตผลซึ่งเป็นกรดอะมิโน 2 ชนิด

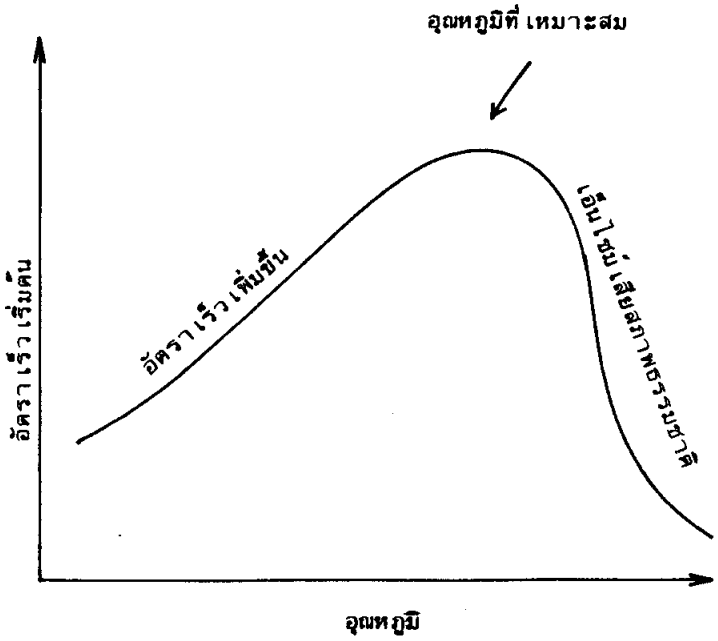
4. อุณหภูมิ เอ็นไซม์แต่ละชนิดหรือแม้แต่ชนิดเดียวกันเมื่อได้มาจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะทำงานได้ดีที่สุดในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิไม่เหมือนกัน เช่น อัลฟาอะมิเลสที่ได้จาก *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermophilus* และ *Bacillus stearothermophilus* ทำงานได้ดีที่สุดในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิประมาณ 40^{o}ซ $60\text{-}65^{o}$ซ และ 70^{o}ซ ตามลำดับ อุณหภูมิซึ่งต่ำกว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่เอ็นไซม์สามารถทำงานได้ทำให้เอ็นไซม์หยุดทำงานแต่ไม่ถูกทำลาย ส่วนอุณหภูมิซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิสูงสุดที่เอ็นไซม์สามารถทำงานได้ทำให้เอ็นไซม์ถูกทำลาย

โดยปกติเอ็นไซม์ส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ $30\text{-}50^{o}$ซ ยกเว้นเอ็นไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียพวกไซโครไฟล์ (psychrophile) และเทอร์โมไฟล์ (thermophile)



รูปที่ 5-5 การย่อยไดเปปไทด์โดยไคโมทริพซิน

จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิแตกต่างออกไป อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ดังรูปที่ 5-6

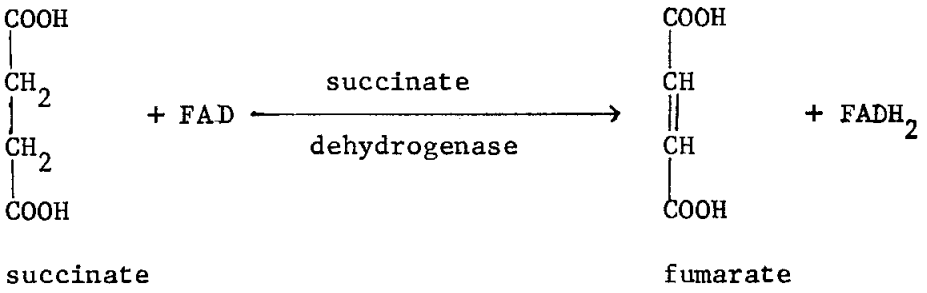


รูปที่ 5-6 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกริยา

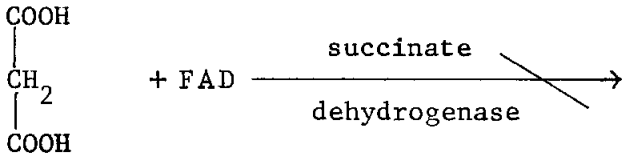
5. ตัวยับยั้ง (inhibitor) เป็นสารที่เมื่อจับกับเอ็นไซม์แล้วทำให้เอ็นไซม์นั้นทำงานผิดปกติหรือหยุดทำงาน ตัวยับยั้งนี้มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์แบบชั่วคราวหรือถาวรก็ได้ ถ้าเป็นตัวยับยั้งที่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์แบบถาวร เอ็นไซม์และตัวยับยั้งจะจับกันหนาแน่นมาก แบ่งตัวยับยั้งออกได้เป็น 2 พวก ดังนี้

5.1 ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor)หรือตัวยับยั้งที่คล้ายคลึงสับสเตรต (substrate analog inhibitor) เป็นตัวยับยั้งที่จับกับเอ็นไซม์ตรงบริเวณแอคตีบ-ไซต์และมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสับสเตรตมาก ๆ เช่น มาโลเนต (malonate) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับซัคซิเนต (succinate) จะสามารถจับกับเอ็นไซม์ซัคซิเนตดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งทำหน้าที่เร่งให้ซัคซิเนตเปลี่ยนไปเป็นฟูมาเรต (fumarate) ตรงบริเวณ

แอคตีบไซต์ แล้วทำให้เอ็นไซม์ไม่สามารถจับกับซัคซิเนตได้อีกและปฏิกริยาก็ไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ ดังรูปที่ 5-7



succinate fumarate



malonate

รูปที่ 5-7 การยับยั้งแบบแข่งขันโดยมาโลเนตซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับซัคซิเนต

การยับยั้งโดยตัวยับยั้งแบบนี้มีผลมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรต เมื่อสับสเตรตมีความเข้มข้นมากผลของการยับยั้งก็จะลดลง ซึ่งตามทฤษฎีสามารถทำให้เกิดอัตราเร็วของปฏิกริยาสูงสุดเท่าเดิม

5.2 ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) เป็นตัวยับยั้งที่จับกับเอ็นไซม์ตรงตำแหน่งอื่นซึ่งไม่ใช่ตำแหน่งที่สับสเตรตจับ หลังจากที่ตัวยับยั้งจับกับเอ็นไซม์แล้วเอ็นไซม์ยังคงจับกับสับสเตรตได้อีก เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอ็นไซม์ตัวยับยั้งและสับสเตรต (EIS complex) แต่ประสิทธิภาพในการทำงานของเอ็นไซม์หลังจากจับกับสเตรตแล้วจะลดลงหรือหมดไป สารที่เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ได้แก่ อิออนของพวกโลหะ เช่น Ag^{+}

และ Hg^{++} เป็นต้น การยับยั้งโดยตัวยับยั้งแบบนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวยับยั้งแต่เพียงอย่างเดียว การเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรตจะไม่สามารถหักล้างการยับยั้งได้ ดังนั้นอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกริยาลดลงจากเดิม

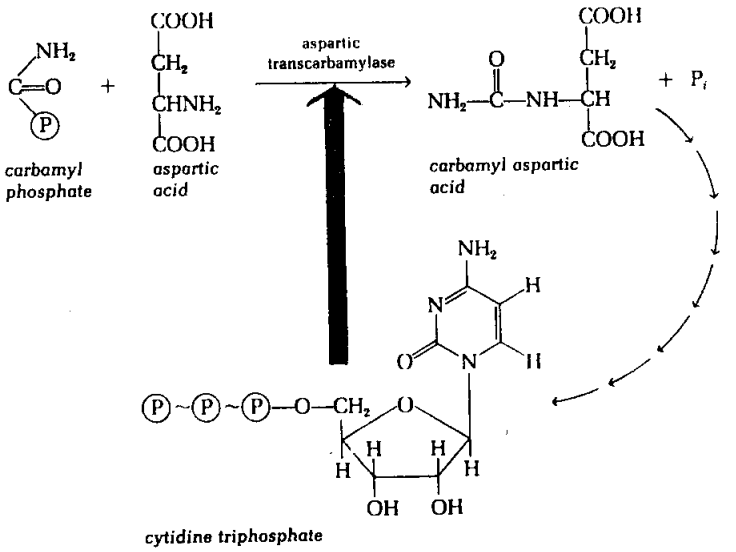
ตัวยับยั้งซึ่งมีความสำคัญที่สุดภายในเซลล์แบคทีเรีย โดยทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมให้เกิดขึ้นในอัตราเหมาะสมกับความต้องการของเซลล์คือตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน เอ็นไซม์หลายชนิดภายในเซลล์แบคทีเรียมีตำแหน่งตรงบริเวณผิวสำหรับให้สับสเตรตและตัวยับยั้งหรือตัวกระตุ้นจับแยกออกจากกัน บริเวณผิวของเอ็นไซม์ที่จับกับสับสเตรตเรียกว่า คะตาไลติกไซต์ (catalytic site) ส่วนบริเวณผิวของเอ็นไซม์ที่จับกับตัวยับยั้งหรือตัวกระตุ้นเรียกว่า อัลโลสเตริกไซต์ (allosteric site) หรือเร็กกูลาโตรีไซต์ (regulatory site) ดังนั้นจึงเรียกเอ็นไซม์นี้ว่า อัลโลสเตริกเอ็นไซม์หรือเร็กกูลาโตรีเอ็นไซม์ การทดลองที่แสดงว่าอัลโลสเตริกเอ็นไซม์มีตำแหน่งตรงบริเวณผิว 2 ตำแหน่ง หรือมากกว่า 2 ตำแหน่ง ทำได้โดยให้ความร้อนแก่เอ็นไซม์ระดับหนึ่ง พบว่าจะทำลายเฉพาะอัลโลสเตริกไซต์ส่วนคะตาไลติกไซต์ยังคงทำงานได้ตามปกติ

ตัวยับยั้งหรือตัวกระตุ้นของอัลโลสเตริกเอ็นไซม์มีโครงสร้างแตกต่างจากสับสเตรตมาก และเมื่อเข้าจับกับเอ็นไซม์ตรงบริเวณอัลโลสเตริกไซต์แล้ว ทำให้สับสเตรตไม่สามารถเปลี่ยนแปลงต่อไปได้ ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียเกิดการยับยั้งแบบนี้เมื่อมีผลิตผลที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมสะสมมากเกินต้องการ ผลิตผลที่มากเกินต้องการจะไปจับกับเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาแรกสุดของวิถีเมตาบอลิก แล้วยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ทำให้ปฏิกริยาต่าง ๆ ในวิถีเมตาบอลิกลดลง วิธียับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์แบบนี้เรียกว่าการยับยั้งแบบย้อนกลับ (feedback inhibition) เช่น สมมุติว่าสับสเตรต A มีขั้นตอนในการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

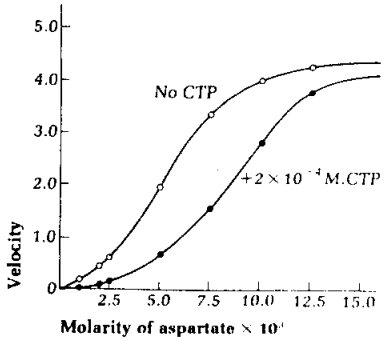
$$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D \xrightarrow{E_4} F$$

การเปลี่ยนแปลงของสับสเตรต A เมื่อมีผลิตผลสุดท้าย F สะสมอยู่มากเกินต้องการจะหยุดเนื่องจากผลิตผลสุดท้าย F ไปจับกับเอ็นไซม์ E_1 ตรงบริเวณอัลโลสเตริกไซต์ แล้วทำให้วิถีนี้ไม่เกิดขึ้น แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของ F ลดต่ำลง F ก็จะหลุดออกจากเอ็นไซม์ E_1 ทำให้วิถีนี้ดำเนินต่อไปได้ใหม่

ตัวอย่างการยับยั้งการทำงานของอัลโลสเตริกเอ็นไซม์ซึ่งควบคุมเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย ได้แก่ การสังเคราะห์พิริมิดีนของ *Escherichia coli* ผลิตผลสุดท้ายของวิถี คือ ไซติดีนไทรฟอสเฟต (cytidine triphosphate) ที่เกิดขึ้นมากเกินต้องการ จะไปจับกับแอสปาร์-เตตทรานส์คาร์บามิเลส (aspartate transcarbamylase) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาแรกสุดของวิถี แล้วยับยั้งไม่ให้เอ็นไซม์นี้เร่งให้เกิดการรวมตัวระหว่างแอสปาร์เตตและคาร์บามิล-ฟอสเฟต (carbamyl phosphate) เพื่อลดการสังเคราะห์ไซติดีนไทรฟอสเฟต ดังรูปที่ 5-8 การเพิ่มความเข้มข้นของแอสปาร์เตตจะไม่สามารถหักล้างการยับยั้งได้ ดังรูปที่ 5-9



รูปที่ 5-8 ไซติดีนไทรฟอสเฟตยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ทรานส์คาร์บามิเลส



รูปที่ 5-9 แสดงอัตราเร็วของปฏิกริยา เมื่อมีและไม่มี ไซติดีนไทรฟอสเฟต (CTP) เป็นตัวยับยั้ง

ควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์ การสังเคราะห์เอ็นไซม์ขึ้นอยู่กับยีนบน DNA ปริมาณกรดอะมิโน RNA โพลิเมอร์เรสและสารอื่น ๆ ในการสังเคราะห์เอ็นไซม์มีการถอดรหัสจาก DNA ไปยัง mRNA และในขณะเดียวกันก็มีการแปลรหัสจาก mRNA ออกมาเป็นลำดับของกรดอะมิโนในเอ็นไซม์หรือโปรตีนทันที ดังนั้นการสังเคราะห์เอ็นไซม์หรือการควบคุมปริมาณของเอ็นไซม์ภายในเซลล์แบคทีเรียจึงขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์ mRNA คือ เมื่อมีการถอดรหัสจาก DNA มากหรือมีการสังเคราะห์ mRNA มากก็จะมีการสังเคราะห์เอ็นไซม์หรือโปรตีนมากด้วย เอ็นไซม์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรกเรียกว่า เอ็นไซม์ประกอบ (constitutive enzyme) เป็นเอ็นไซม์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นในปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ไม่ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะแวดล้อมอย่างไร เช่น เอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายกลูโคสและเอ็นไซม์ที่ใช้ในวัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle) เป็นต้น ชนิดที่สองเรียกว่า เอ็นไซม์เนี่ยวนำ (induced enzyme) หรือเอ็นไซม์ปรับตัว (adaptive enzyme) เป็นเอ็นไซม์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม ดังนั้นจึงมีปริมาณมากเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อม

อย่างหนึ่งและไม่มีเลยเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมอีกอย่างหนึ่ง

ปรากฏการณ์การสังเคราะห์เอ็นไซม์ของแบคทีเรียสามารถอธิบายได้ ด้วยการใช้หลักการควบคุมการถอดรหัสซึ่งเสนอโดย Jacob และ Monad ที่เรียกว่า ทฤษฎีโอเพอรอน ตามทฤษฎีนี้ได้แบ่งยีนออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเรียกว่า ยีนโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยยีนหลายชนิดทำหน้าที่ควบคุมชนิดและลำดับของกรดอะมิโนในโมเลกุลเอ็นไซม์ กลุ่มที่สองเรียกว่า ยีนควบคุม ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนโครงสร้างไปยัง mRNA ซึ่งอาจจะเป็นการเหนี่ยวนำ (induction) ให้มีถอดรหัสของยีนโครงสร้างไปยัง mRNA หรือเป็นการกดดัน (repression) ไม่ให้มีการถอดรหัสดังกล่าวเกิดขึ้น ส่วนของ DNA ที่ประกอบด้วยยีนโครงสร้างและยีนดำเนินการ (o) ซึ่งจัดเป็นยีนควบคุมเรียกว่า โอเพอรอน (ดังรูปที่ 5-10 และ 5-11)

1. ควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์แบบเหนี่ยวนำ โอเพอรอนที่มีการศึกษารายละเอียดมากที่สุด ได้แก่ แลคโตสโอเพอรอน (lactose operon หรือ lac operon) ซึ่งเป็นกลุ่มของยีนที่มีบทบาทในการสังเคราะห์เอ็นไซม์เพื่อใช้ในการเมตาบอลิซึมแลคโตส จากการนำ *Escherichia coli* มาเพาะเลี้ยงในที่ซึ่งมีแลคโตสและไม่มีแลคโตส พบว่า เฉพาะในสภาวะแวดล้อมซึ่งมีแลคโตสเท่านั้นที่ *Escherichia coli* สามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์สำหรับเมตาบอไลส์แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ เอ็นไซม์สำหรับการเมตาลอไลส์แลคโตสที่สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) เบต้ากาแลคโตไซด์เพอร์มีเอส (β-galactoside permease) และไธโอกาแลคโตไซด์ทรานส์อะซิติเลส (thiogalactoside transacetylase) เบต้า-กาแลคโตซิเดสเป็นเอ็นไซม์ที่เร่งให้แลคโตสแตกตัวได้กลูโคสกับกาแลคโตส เบต้า-กาแลคโตไซด์เพอร์มีเอสเป็นเอ็นไซม์ที่เร่งการขนส่งแลคโตสเข้าสู่ภายในเซลล์ ส่วนไธโอกาแลคโตไซด์-ทรานส์อะซิติเลสเป็นเอ็นไซม์ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน

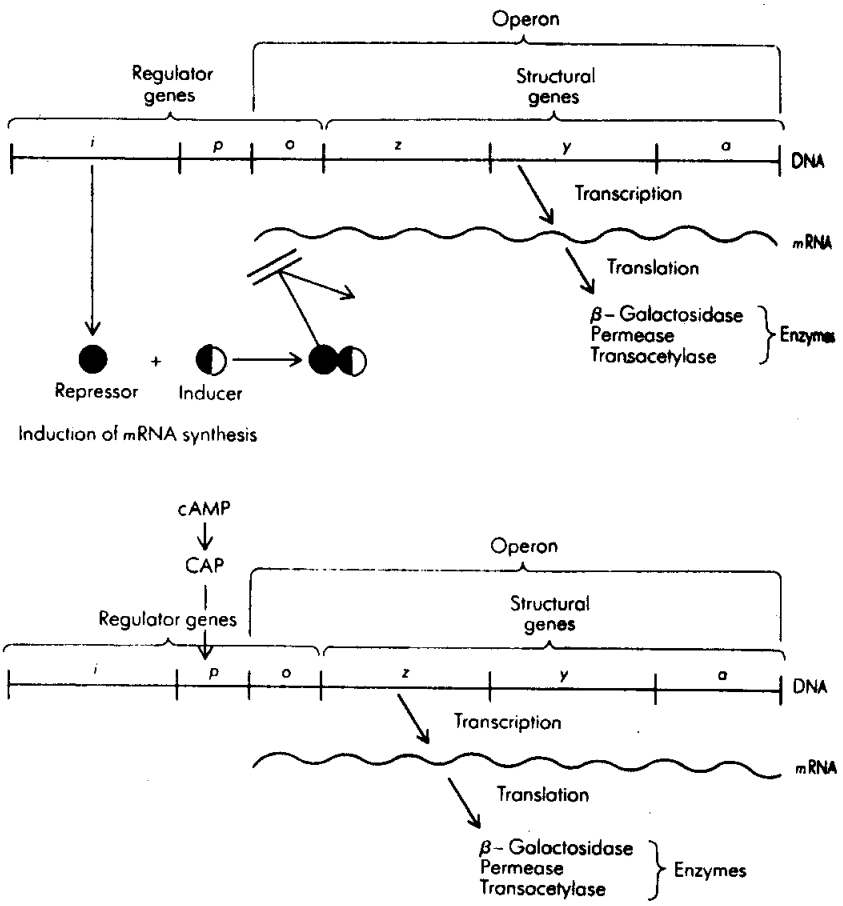
แลคโตสที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมเป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ให้ยีนโครงสร้างของแลคโตสโอเพอรอนซึ่งประกอบด้วยยีน 3 ชนิด คือ z,y และ a เกิดการถอดรหัสไปยัง mRNA แล้วเกิดการสังเคราะห์เอ็นไซม์ขึ้น ยีน z,y และ a บรรจุข้อความทางพันธุกรรมสำหรับเอ็นไซม์เบต้า-

กาแลคโตซิเดส เบต้ากาแลคโตไซด์เพอร์มีเอสและไธโอกาแลคโตไซด์ทรานส์อะซิติเลสตามลำดับ การเหนี่ยวนำโดยแลคโตสเกิดขึ้นจากการที่แลคโตสไปจับกับโปรตีนกดดันซึ่งยีนกดดัน (i) สร้างขึ้นแล้วเป็นตัวเหนี่ยวนำให้โปรตีนกดดันเปลี่ยนไปอยู่ในรูปทำงานไม่ได้ คือไม่สามารถไปจับกับยีนดำเนินการ (o) ทำให้ RNA โพลิเมอเรสไปจับกับยีนส่งเสริม (ρ) แล้วเกิดการถอดรหัสของยีนโครงสร้างคือ z,yและ a ไปยัง mRNA (รูปที่ 5-10) *Escherichia coli* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมซึ่งมีแลคโตส เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมซึ่งไม่มีแลคโตส ปริมาณเอ็นไซม์สำหรับเมตาบอไลส์แลคโตสที่มีอยู่จะค่อย ๆ ลดลง จนในที่สุดไม่มีเอ็นไซม์เหล่านี้

ในการศึกษาต่อมา พบว่า ยีนส่งเสริม (ρ) จะทำงานได้เมื่อมีตัวเร่งอยู่ด้วย ตัวเร่งในการสังเคราะห์เอ็นไซม์สำหรับเมตาบอไลส์แลคโตส คือ CAP(catabolite activating protein) และ cAMP (cyclic adenosine -3', 5'-monophosphate) สารทั้งสองตัวนี้จะจับกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ CAP และ cAMP แล้วไปจับกับยีนส่งเสริม (ρ) ทำให้ RNA โพลิเมอเรสที่จับอยู่กับยีนส่งเสริม (ρ) นั้นเร่งให้มีการถอดรหัสของยีนโครงสร้างไปยัง mRNAแล้วเกิดการสังเคราะห์เอ็นไซม์ขึ้น ดังรูปที่ 5-10

จากการที่ AMP มีบทบาททำให้ยีนส่งเสริม (ρ) ทำงานได้ กลูโคสและกาแลคโตสจึงมีผลต่อการเมตาบอไลส์แลคโตสของแบคทีเรีย ในสภาวะแวดล้อมที่มีกลูโคสกับแลคโตส หรือกาแลคโตสกับแลคโตส แบคทีเรียจะเมตาบอไลส์กลูโคสและกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน แต่ไม่สามารถเมตาบอไลส์แลคโตสได้ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียเมตาบอไลส์กลูโคสและกาแลคโตสแล้วจะได้พลังงานอิสระซึ่งแบคทีเรียจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP จึงทำให้ปริมาณ AMP ภายในเซลล์ลดลง เมื่อไม่มี AMP RNAโพลิเมอเรสก็ไม่สามารถเร่งให้เกิดการถอดรหัสของยีนโครงสร้างไปยัง mRNA ได้ ดังนั้นการสังเคราะห์เอ็นไซม์จึงไม่เกิดขึ้น

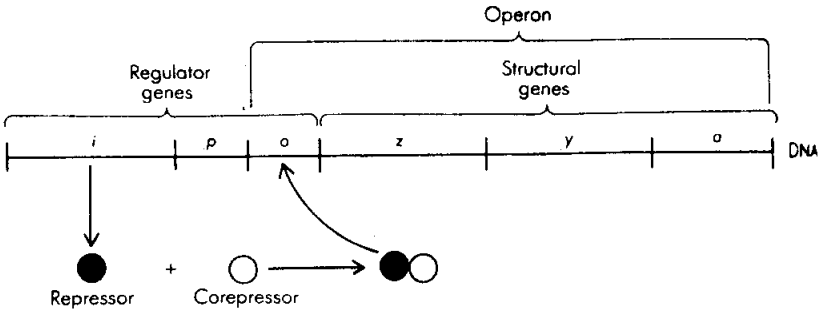
2. ควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์แบบกดดัน ในการสังเคราะห์เอ็นไซม์บางชนิดสับสเตรตที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมนอกจากจะไม่เหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เอ็นไซม์แล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวกดดันร่วม (corepressor)แล้วยับยั้งไม่ให้มีการสังเคราะห์เอ็นไซม์ขึ้น การควบคุม



รูปที่ 5-10 การสังเคราะห์เอ็นไซม์แบบเหนี่ยวนำ

การสังเคราะห์เอ็นไซม์แบบกดดันนี้ ยีนส่งเสริม (ρ) สามารถทำหน้าที่ได้โดยไม่ต้องอาศัยตัวเร่ง เช่น การเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* ในสภาวะแวดล้อมที่มีฮิสติดีนอย่างเพียงพอ ฮิสติดีนที่มีอยู่จะทำหน้าที่เป็นตัวกดดันร่วมโดยไปจับกับโปรตีนกดดันซึ่งยีนกดดัน (i) สร้างขึ้น ทำให้

ไปรตีนกดดันอยู่ในรูปทำงานได้ คือ สามารถไปจับกับยีนดำเนินการ (o) แล้วทำให้ RNA โพลิเมอเรสไม่สามารถจับกับยีนส่งเสริม (p) ด้วยเหตุนี้จึงไม่มีการถอดรหัสของยีนโครงสร้างไปยัง mRNA ดังนั้นจึงไม่มีการสังเคราะห์เอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ฮิสติดีน แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีฮิสติดีน ไปรตีนกดดันที่ยีนกดดัน (i) สร้างขึ้นอยู่ในรูปทำงานไม่ได้ คือ ไม่สามารถไปจับกับยีนดำเนินการ (o) ทำให้ RNA โพลิเมอเรสสามารถไปจับกับยีนส่งเสริม (p) แล้วเร่งให้เกิดการถอดรหัสของยีนโครงสร้างไปยัง mRNA ดังนั้นจึงมีการสังเคราะห์เอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ฮิสติดีน ดังรูปที่ 5-11



รูปที่ 5-11 การสังเคราะห์เอ็นไซม์แบบกดดัน

การจัดประเภทและการเรียกชื่อเอ็นไซม์

เอ็นไซม์เป็นโปรตีนซึ่งแต่ละชนิดมีส่วนประกอบทางเคมีโดยเฉพาะและมีความเฉพาะเจาะจงในการจับกับสับสเตรต แล้วเร่งให้สับสเตรตเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยเฉพาะ องค์ประกอบทางเคมีของโมเลกุลเอ็นไซม์อาจจะเป็นโปรตีนเพียงอย่างเดียว หรือเป็นโปรตีนกับ

สารที่ไม่ใช่โปรตีนซึ่งรวมกันเรียกว่า โฮโลเอ็นไซม์ (holoenzyme) ซึ่งส่วนที่เป็นโปรตีนเรียกว่า อะโพเอ็นไซม์ (apoenzyme) และส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนเรียกว่า โคแฟคเตอร์ (cofactor) ในการทำงานอะโพเอ็นไซม์ทำให้เอ็นไซม์มีความเฉพาะเจาะจงต่อสับสเตรตที่จะเร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และกำหนดทิศทางการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสับสเตรต ส่วนโคแฟคเตอร์ทำให้เอ็นไซม์แอคตีบหรือทำงานได้ โดยทำหน้าที่เป็นแอคตีบไซต์ คือ เป็นที่สับสเตรตมาจับ โคแฟคเตอร์อาจจะเป็นอิออนของโลหะหรือสารอินทรีย์ที่ เรียกว่า โคเอ็นไซม์

เอ็นไซม์มีคุณสมบัติเหมือนโปรตีน คือ เมื่อได้รับความร้อนสูงจะเสียสภาพธรรมชาติจนไม่สามารถทำงานได้ เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารเคมีเช่น แอลกอฮอล์และแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นสูง ๆ จะตกตะกอนและไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อเซลล์ของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ในการแยกเอ็นไซม์และทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์ยังสามารถใช้วิธีการเดียวกันกับวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนและทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การจัดประเภทเอ็นไซม์ ในการจัดประเภทเอ็นไซม์สามารถใช้ข้อมูลดังต่อไปนี้

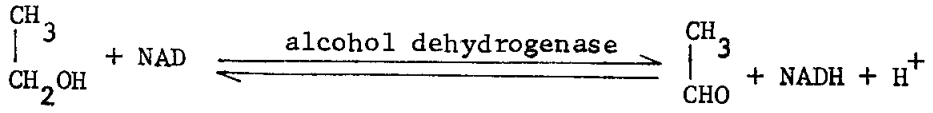
1. แหล่งที่เกิดปฏิกริยาเคมี จากการใช้แหล่งที่เกิดปฏิกริยาเคมีแบ่งเอ็นไซม์ออกได้เป็น 2 ประเภท คือ เอ็กโซเอ็นไซม์ (exoenzyme) กับเอ็นโดเอ็นไซม์ (endoenzyme) เอ็กโซเอ็นไซม์เป็นเอ็นไซม์ที่หลังจากแบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์แล้ว แบคทีเรียจะขับออกนอกผนังเซลล์เพื่อทำหน้าที่เร่งให้อาหารที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลง คือ มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ แต่ละโมเลกุลของเอ็นไซม์นี้มีแอคตีบไซต์เพียง 1 ตำแหน่ง เอ็นโดเอ็นไซม์เป็นเอ็นไซม์ที่หลังจากแบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นแล้ว ยังคงอยู่ภายในเซลล์และทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ เพื่อใช้อาหารเป็นแหล่งพลังงานและเป็นพรีเคอเซอร์สำหรับการสังเคราะห์สารซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ โดยส่วนใหญ่แต่ละโมเลกุลของเอ็นไซม์นี้มีแอคตีบไซต์มากกว่า 1 ตำแหน่ง

2. ชนิดของสับสเตรต จากการใช้ชนิดของสับสเตรตที่เอ็นไซม์เร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นหลักในการจัดประเภทของเอ็นไซม์ สามารถจัดเอ็นไซม์ออกเป็นประเภทต่าง ๆ คือ

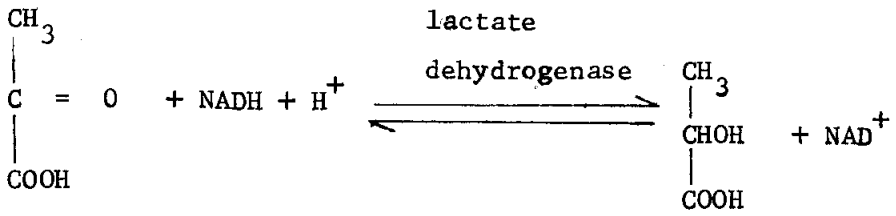
เอ็นไซม์โปรตีเนส (proteinase) ไลเปส (lipase) อะมิเลสและนิวคลีเอส (nuclease) เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งให้โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและกรดนิวคลีอิกเกิดการเปลี่ยนแปลงตามลำดับ

3. ชนิดของปฏิกริยาเคมี จากปฏิกริยาเคมีที่เอ็นไซม์เร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลง แบ่งเอ็นไซม์ออกได้เป็น 6 ประเภทดังนี้

3.1 ออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยา-ออกซิเดชั่น-รีดักชั่นโดยอาศัยโคเอ็นไซม์เป็นตัวขนส่งไฮโดรเจน เช่น แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และแลคเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ซึ่งมี NAD^+ เป็นโคเอ็นไซม์เป็นต้น (รูปที่ 5-12)



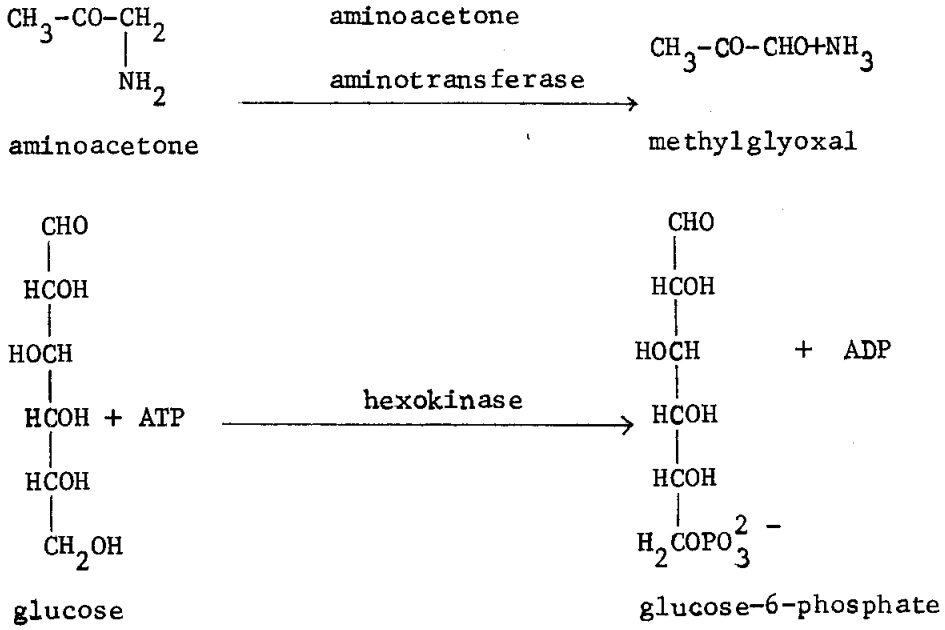
ethanol acetaldehyde



pyruvate lactate

รูปที่ 5-12 ปฏิกริยาเคมีที่มีเอ็นไซม์ออกซิโดรีดักเตสเป็นตัวเร่ง

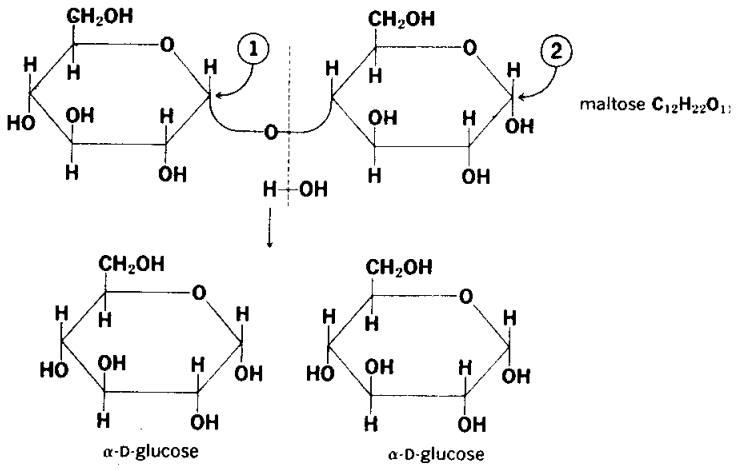
3.2 ทรานสเฟอเรส (transferase) เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการขนส่งหมู่สารจากสารหนึ่งไปยังอีกสารหนึ่ง เช่น หมู่อะมิโน คาร์บอกซิลและฟอสเฟต เป็นต้น ตัวอย่างของเอ็นไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ อะมิโนทรานสเฟอเรส (aminotransferase) ฟอสโฟริเลส (phosphorylase) และเฮ็กโซไคเนส (hexokinase) เป็นต้น (รูปที่ 5-13)



รูปที่ 5-13 ปฏิกริยาเคมีที่มีเอ็นไซม์ทรานสเฟอเรสเป็นตัวเร่ง

3.3 ไฮโดรเลส (hydrolase) เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการตัดบอนด์ระหว่างอะตอมของคาร์บอนกับอะตอมของธาตุอื่นโดยอาศัยน้ำ เช่น มอลเตส (maltase) อัลฟาอะมิเลส ซับติไลซิน (subtilisin) และทริพซิน (trypsin) เป็นต้น (รูปที่ 5-14)

3.4 ไลเอส (lyase) เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการย้ายหมู่สารออกไปจากสับสเตรตแล้วทำให้เกิดบอนด์คู่ในโมเลกุล เช่น ฟูมาเรส (fumarase) เร่งให้มาเลตเปลี่ยนไปเป็นฟูมาเรต แอสปาร์เตต แอมโมเนีย-ไลเอส (aspartate ammonia-lyase) เร่งให้แอสปาร์เตตเปลี่ยนไปเป็นฟูมาเรต หรือเป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการตัดบอนด์ระหว่างคาร์บอน

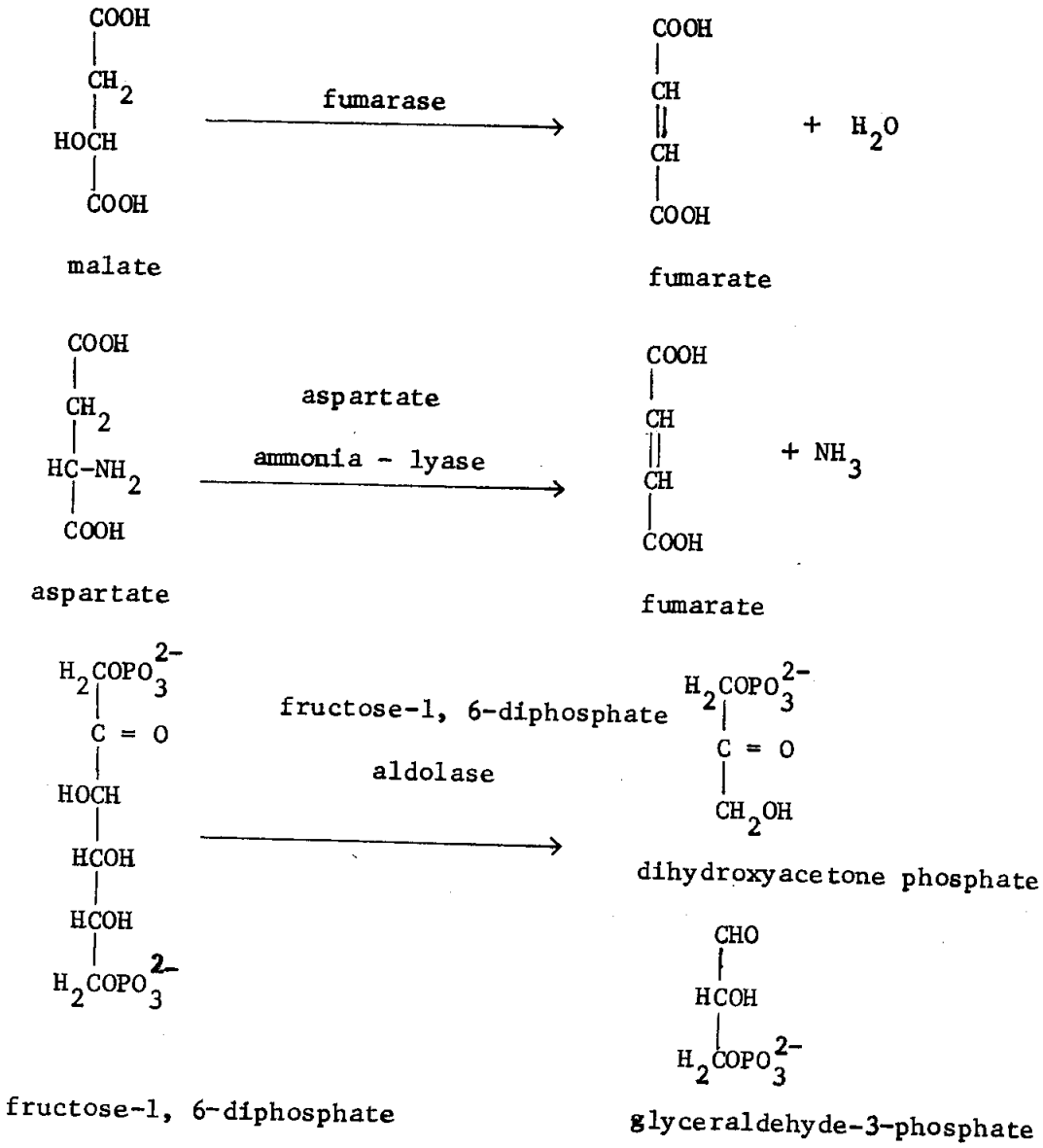


รูปที่ 5-14 ปฏิกริยาเคมีที่มีเอ็นไซม์ไฮโดรเลสเป็นตัวเร่ง

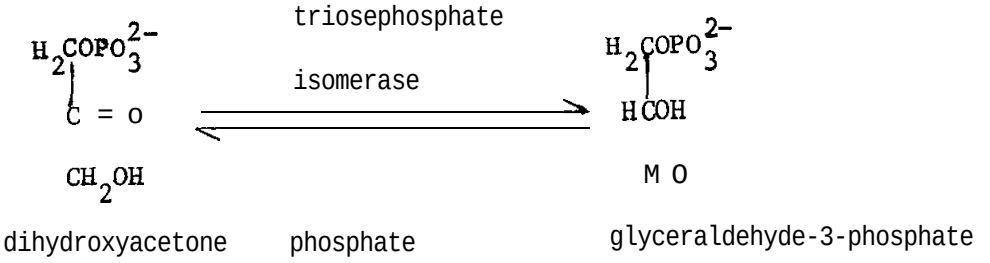
กับคาร์บอน คาร์บอนกับกำมะถันและคาร์บอนกับไนโตรเจนยกเว้นเปปไทด์บอนด์ เช่น ฟรุคโตส-1, 6-ไดฟอสเฟตอัลโดเลส (fructose-1, 6-diphosphate aldolase) เร่งให้ฟรุคโตส-1, 6-ไดฟอสเฟตแยกตัวออกเป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (dihydroxyacetone phosphate) กับกลีเซอราลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (glyceraldehyde-3-phosphate) ดังรูปที่ 5-15

3.5 ไอโซเมอเรส (isomerase) เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงระหว่างไอโซเมอร์ เช่น ไทรฟอสเฟตไอโซเมอเรส (triphosphate isomerase) เร่งให้ไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตเปลี่ยนไปเป็นกลีเซอราลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดังรูปที่ 5-16

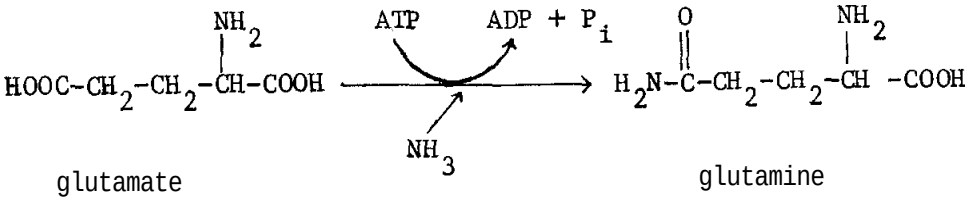
3.6 ไลเกส (ligase) เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการสร้างบอนด์ขึ้นระหว่างคาร์บอนอะตอมกับอะตอมของธาตุต่าง ๆ เช่น คาร์บอน ออกซิเจน กำมะถัน และไนโตรเจน เป็นต้น โดยอาศัยพลังงานจาก ATP ตัวอย่างของเอ็นไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ กลูตามีนซินธีเตส (glutamine synthetase) ซึ่งเร่งให้กลูตาเมตรวมตัวกับแอมโมเนียแล้วกลายเป็นกลูตามีน (glutamine) ปฏิกริยานี้ต้องใช้ ATP เป็นแหล่งพลังงาน ดังรูปที่ 5-17



รูปที่ 5-15 ปฏิกริยาเคมีที่มีเอ็นไซม์ไลเอสเป็นตัวเร่ง



รูปที่ 5-16 ปฏิกริยาเคมีที่มีเอ็นไซม์ไอโซเมอเรสเป็นตัวเร่ง



รูปที่ 5-17 ปฏิกริยาเคมีที่มีเอ็นไซม์ไลเกสเป็นตัวเร่ง

การเรียกชื่อเอ็นไซม์ การเรียกชื่อเอ็นไซม์มักเรียกชื่อตามสับสเตรตที่เอ็นไซม์เร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลง หรือตามปฏิกริยาเคมีที่เอ็นไซม์เร่งแล้วเติมคำลงท้ายว่าเอส (-ase) เช่น โปรตีเนสเป็นเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีน เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอ็นไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส (cellulose) และฟอสโฟริเลสเป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการย้ายหมู่ฟอสเฟต สำหรับกลุ่มของเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วยเอ็นไซม์มากกว่าหนึ่งชนิด แล้วทำหน้าที่เร่งให้สับสเตรตเกิดการเปลี่ยนแปลง มักเติมคำว่าระบบ เช่น ระบบซัคซิเนตออกซิเดส (succinate oxidase system) เป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยาออกซิเดชั่นของซัคซิเนต แต่มีเอ็นไซม์หลายชนิดที่เรียกชื่อโดยไม่ได้เป็นไปตามกฎเกณฑ์ดังกล่าว เช่น คะตาเลสซึ่งเร่งการสลายตัวของไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ พาเพน (papain) ซึ่งเร่งการสลายตัวของเปปไทด์บอนด์ที่อยู่ข้างในโมเลกุลของพวกโพลิเปปไทด์ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น

International Union of Biochemistry (IUB) จึงได้กำหนดระบบ IUB สำหรับเรียกชื่อเอ็นไซม์ขึ้น เอ็นไซม์แต่ละชนิดมี 3 ชื่อ คือ

1. ชื่อไทรเวียล (trivial name)หรือชื่อเรคอมเม็นเด็ต (recommended name) เป็นชื่อสามัญซึ่งมีลักษณะสั้นและนิยมใช้กันโดยทั่วไป

2. ชื่อสิชติเมติก (systematic name) เป็นชื่อที่บอกถึงสับสเตรตซึ่งมาเกี่ยวข้องและลักษณะสำคัญของปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นโดยเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง

3. รหัสหมายเลขสิชติเมติก (systematic code number) ตามระบบ IUB กำหนดให้เอ็นไซม์แต่ละชนิดมีรหัสหมายเลข 4 ตัวซึ่งเขียนย่อ ๆ ว่า EC แล้วตามด้วยหมายเลขตัวที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ หมายเลขตัวแรกเป็นเลขประเภทของเอ็นไซม์ซึ่งได้จัดแบ่งออกเป็น 6 ประเภทตามชนิดของปฏิกริยาเคมี และแต่ละประเภทมีหมายเลขดังนี้ ออกซิโดรีดักเตส ทรานส์เฟอเรส ไฮโดรเลส ไลเอส ไอโซเมอเรสและไลเกสมีหมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ หมายเลขตัวที่สองเป็นหมายเลขกลุ่มย่อยของเอ็นไซม์ซึ่งแสดงถึงชนิดของหมู่สารที่ถูกขนส่งหรือชนิดของหมู่สารที่เกิดปฏิกริยาเคมี หมายเลขตัวที่สามเป็นหมายเลขกลุ่มย่อยของเอ็นไซม์ซึ่งแสดงถึงชนิดของสารที่ทำหน้าที่รับหมู่สารซึ่งถูกขนส่งหรือแสดงถึงชนิดของหมู่สารที่เข้าร่วมปฏิกริยา หมายเลขตัวที่สี่เป็นหมายเลขเฉพาะตัวของเอ็นไซม์

ตัวอย่างการเรียกชื่อเอ็นไซม์แบบต่าง ๆ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงกลูโคสไปเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต ดังรูปที่ 5-13 เอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกริยานี้มีชื่อไทรเวียล ชื่อสิชติเมติกและรหัสหมายเลขสิชติเมติกว่า เฮ็กโซไคเนส ATP : ดี-เฮ็กโซส-6-ฟอสโฟทรานสเฟอเรส (ATP : D-hexose-6-phosphotransferase) และ EC 2.7.1.1 ตามลำดับ หมายเลขตัวแรกแสดงว่าเป็นเอ็นไซม์ประเภททรานสเฟอเรส หมายเลขตัวที่สองแสดงว่าขนส่งหมู่ฟอสเฟต หมายเลขตัวที่สามแสดงว่าแอลกอฮอล์ทำหน้าที่รับหมู่ฟอสเฟต หมายเลขตัวที่สี่แสดงว่าเป็นเอ็นไซม์เฮ็กโซไคเนส

สรุปเนื้อหาสำคัญ

1. เมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย หมายถึง ปฏิกริยาเคมีทั้งหมดที่เซลล์แบคทีเรียทำให้เกิดขึ้นโดยมีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ คะตาบอลิซึมและเอนาบอลิซึม คะตาบอลิซึมเป็นกระบวนการที่ทำให้อาหารโมเลกุลใหญ่เปลี่ยนแปลงไปเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ แล้วได้พลังงานและพรีเคอร์เซอร์สำหรับการสังเคราะห์สารซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ เอนาบอลิซึมเป็นกระบวนการใช้พลังงานเพื่อนำพรีเคอร์เซอร์มาสังเคราะห์สารซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์
2. วิถีเมตาบอลิก คือ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสับสเตรตที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องไปหลาย ๆ ขั้นตอนโดยมีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง ปฏิกริยาเคมีในวิถีเมตาบอลิกแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิกกับปฏิกริยาเอนเดอร์โกนิก ปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิกเกิดขึ้นได้เองเพราะว่ามีค่า ΔG เป็นลบ ส่วนปฏิกริยาเอนเดอร์โกนิกเกิดขึ้นเองไม่ได้เพราะว่ามีค่า ΔG เป็นบวก ดังนั้นปฏิกริยานี้เกิดขึ้นได้เมื่อมีการควบคู่กับปฏิกริยาเอ็กเซอร์โกนิกแบบการควบคู่โดยตรงหรือการควบคู่แบบต่อเนื่อง แล้วมีผลรวมของ ΔG ของปฏิกริยาทั้งหมดเป็นลบ
3. การศึกษาเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย เป็นการศึกษาถึงความต้องการอาหารสำหรับการเจริญ วิถีเมตาบอลิกของสับสเตรต ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ในวิถีเมตาบอลิกและวิธีการขนส่งโมเลกุลของสารต่าง ๆ ภายในเซลล์
4. วิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียมีดังต่อไปนี้ (ดูหัวข้อ วิธีการศึกษาเมตาบอลิซึม)
   - 4.1 วิเคราะห์หาปริมาณของอาหารชนิดต่าง ๆ ที่แบคทีเรียนำไปใช้และปริมาณผลิตผลชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการเมตาบอไลส์อาหาร
   - 4.2 ทำให้แบคทีเรียเกิดมิวเตชั่น
   - 4.3 ใช้สารไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ตัวใดตัวหนึ่ง

4.4 ใช้สับสเตรตซึ่งมีอะตอมของธาตุที่มีกัมมันตภาพรังสี

4.5 ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยทางเมคคานิก

4.6 ใช้สารที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงมาก ๆ กับสับสเตรตที่แบคทีเรียเมตาบอไลส์ได้

5. แบคทีเรียจะควบคุมเมตาบอลิซึ่มทั้ง 2 ชนิด คือ คะตาบอลิซึ่มและ เอนาบอลิซึ่มให้เกิดขึ้นในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์กับควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์หรือควบคุมปริมาณเอ็นไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้น ในการควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์แบคทีเรียอาจจะสังเคราะห์โปรตีโอไลติกเอ็นไซม์ไปทำลายเอ็นไซม์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ทำให้เอ็นไซม์ไปจับกับเยื่อเซลล์หรือโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ แล้วไม่สามารถจับกับสับสเตรตและยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์แรกสุดของวิถีเมตาบอลิกด้วยผลิตผลสุดท้ายของวิถีเมตาบอลิกซึ่งเรียกว่า การยับยั้งแบบย้อนกลับ สำหรับการควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์มี 2 แบบ คือ ควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์แบบเหนี่ยวนำกับควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์แบบกดดัน (ดูหัวข้อ การควบคุมเมตาบอลิซึ่ม)

6. เอ็นไซม์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นมี 2 ชนิด คือ เอ็นไซม์ประกอบและเอ็นไซม์เหนี่ยวนำ เอ็นไซม์ประกอบเป็นเอ็นไซม์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นในปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ไม่ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะแวดล้อมอย่างไร ส่วนเอ็นไซม์เหนี่ยวนำเป็นเอ็นไซม์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม ดังนั้นจึงมีปริมาณมากเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมอย่างหนึ่งและไม่มีเลยเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมอีกอย่างหนึ่ง

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเตรต ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ pH อุณหภูมิและตัวยับยั้ง (ดูหัวข้อ ควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์)

8. เอ็นไซม์เป็นโปรตีนที่มีความเฉพาะเจาะจงในการจับกับสับสเตรตและเร่งให้สับสเตรตเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยเฉพาะ โมเลกุลของเอ็นไซม์อาจจะเป็นโปรตีนเพียงอย่างเดียวหรือเป็นโปรตีนกับสารที่ไม่ใช่โปรตีนซึ่งรวมกันเรียกว่า โฮโลเอ็นไซม์

9. ในการจัดประเภทของเอ็นไซม์ทำได้โดยอาศัยแหล่งที่เกิดปฏิกริยาเคมี ชนิดของสับสเตรต และชนิดของปฏิกริยาเคมี

10. จากปฏิกริยาเคมีเอ็นไซม์เร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบ่งเอ็นไซม์ออกได้เป็น 6 ประเภท คือ ออกซิโดรีดักเตส ทรานสเฟอเรส ไฮโดรเลส ไลเอส ไอโซเมอเรสและไลเกส (ดูหัวข้อ การจัดประเภทเอ็นไซม์)

11. เอ็นไซม์แต่ละชนิดมี 3 ชื่อ คือ ชื่อไทรเวียล ชื่อสิชติเมติกและรหัสหมายเลขสิชติเมติก (ดูหัวข้อ การเรียกชื่อเอ็นไซม์)