บทที่ 2
ธรรมชาติแห่งการเคลื่อนไหวทางเคมี
(CHEMICAL KINETIC)

เนื่องจากกิจกรรมและการเจริญเติบโตของเซลล์หรือจุลินทรีย์เป็นผลเกี่ยวเนื่องมาจากปฏิกริยาเคมีต่าง ๆ การทราบถึงธรรมชาติแห่งการเคลื่อนไหวทางเคมีหรือจลศาสตร์ทางเคมีจึงเป็นพื้นฐานในการเข้าใจถึงกิจกรรมและการเจริญเติบโตของเซลล์และจุลินทรีย์

2.1 <u>ธรรมชาติแห่งการเคลื่อนไหวทางเคมีขั้นพื้นฐาน</u>

ปฏิกริยาเคมีต่าง ๆ อาจถูกจัดแบ่งด้วยพื้นฐานของจำนวนโมเลกุลที่ต้องเข้าทำปฏิกริยากันแล้วก่อให้เกิดผลผลิตของปฏิกริยาในขั้นสุดท้าย ดังนั้นจึงอาจจัดแบ่งปฏิกริยาเคมีออกได้เป็นปฏิกริยาโมเลกุลเดียว (Monomolecular reaction) ปฏิกริยาสองโมเลกุล (Bimolecular reaction) และปฏิกริยาสามโมเลกุล (Termolecular reaction) เหล่านี้เป็นต้น นอกจากนี้ปฏิกริยาเคมียังอาจถูกจัดแบ่งด้วยพื้นฐานของธรรมชาติแห่งการเคลื่อนไหว (kinetic) ได้เป็นลำดับปฏิกริยา (reaction order) ต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีปฏิกริยาที่เรียกกันว่าปฏิกริยาลำดับที่ศูนย์ (Zero-order reaction) ปฏิกริยาลำดับที่หนึ่ง (First-order reaction) ปฏิกริยาลำดับที่สอง (Second-order reaction) และปฏิกริยาลำดับที่สาม (Third-order reaction) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับว่าอัตราความเร็วของปฏิกริยาได้รับอิทธิพลมาจากความเข้มข้นของสารปฏิกริยา (reactant) ใดภายใต้สภาวะอย่างหนึ่งที่กำหนดให้

<u>ปฏิกริยาลำดับที่หนึ่ง</u> (FIRST-ORDER REACTION) เป็นปฏิกริยาที่มีอัตราความเร็วเป็นสัดส่วนโดยตรงแน่นอนต่อความเข้มข้นของสารปฏิกริยาเดียวเท่านั้น ดังรูปที่ 2.1 ตัวอย่างคือ

$$A \longrightarrow P$$

เมื่ออัตราความเร็วของปฏิกริยาเป็น**สัดส่วน**โดยตรงแน่นอนกับอัตราการหายไปของ A (หรืออัตราการปรากฏขึ้นมาของ P) สำหรับกรณีเช่นนี้อัตราความเร็วของปฏิกริยาที่เวลาใดก็ตาม (t) จะได้ว่า

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A] \qquad 2.1$$

[A] คือความเข้มข้นเป็นโมล่า(molar) ของ A และ $-d[A]/dt$ คืออัตราความเร็วที่ความเข้มข้นของ A ลดลง ค่าสัดส่วนคงที่ k ถูกเรียกว่าค่าอัตราความเร็วคงที่ (rate constant) หรืออัตราความเร็วปฏิกริยาเฉพาะ(specific reaction rate) ค่าอัตราคงที่ของปฏิกริยาลำดับที่หนึ่งมีหน่วยหรือขนาดเป็นส่วนกลับของเวลา เช่น วินาที$^{-1}$ หรือ นาที$^{-1}$ เหล่านี้เป็นต้น

รูปแบบที่ได้จากการอินตีเกรต (integrate) ของสมการนี้ทางคณิตศาสตร์ซึ่งง่ายต่อการคิดคำนวนมากกว่าคือ

$$\ln \frac{[A_0]}{[A]} = kt \qquad 2.2$$

หรือ

$$\log_{10} \frac{[A_0]}{[A]} = \frac{kt}{2.303} \qquad 2.3$$

$[A_0]$ คือความเข้มข้นของ A ที่เวลาเริ่มต้นและ [A] คือความเข้มข้นที่เวลา t.

ในปฏิกริยาเคมีลำดับที่หนึ่งอาจคำนวนหาระยะเวลาครึ่งหนึ่ง (half-time,($t_{\frac{1}{2}}$)) คือระยะเวลาเมื่อ [A] มีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของ $[A_0]$ ได้โดยแทนค่า $[A] = \frac{1}{2}[A_0]$ และ $t = t_{\frac{1}{2}}$ ในสมการที่ 2.3 ดังนั้น

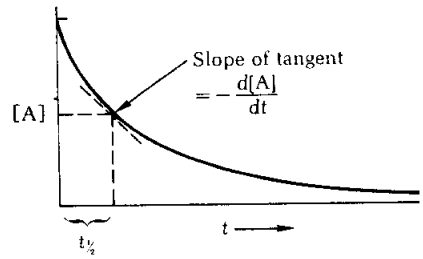
$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{k} \qquad 2.4$$

เป็นที่น่าสังเกตุว่าปฏิกริยาลำดับที่หนึ่งมีระยะเวลาครึ่งหนึ่งเป็นอิสระจากความเข้มข้นเริ่มต้นของซับสเตรต (substrate) ดังจะเห็นได้ว่าไม่มีค่า $[A_0]$ และ [A] ในสมการที่ 2.4

<u>ปฏิกริยาลำดับที่สอง</u> (SECOND-ORDER REACTION) คือปฏิกริยาซึ่งมีอัตราความเร็วเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อผลคูณของความเข้มข้นของสองสารปฏิกริยาหรือความเข้มข้นของสารปฏิกริยาเดียวยกกำลังสอง ตัวอย่างคือ $A + B \longrightarrow P$

รูปที่ 2.1

Plot of the course of a first-order reaction. The half-time ($t_{\frac{1}{2}}$) is the time required for one-half of the initial reactant to be consumed.



อัตราความเร็วของปฏิกริยาอาจถูกกำหนดได้เป็น $-(d[A]/dt)$, หรือ $-(d[B]/dt)$, หรือ $+(d[P]/dt)$, ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อผลคูณความเข้มข้นของ A และ B จึงเขียนสมการอัตราส่วนสมดุลย์ของปฏิกริยาลำดับที่สองได้เป็น

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A][B] \qquad 2.5$$

ในที่นี้ k คือค่าอัตราความเร็วคงที่ของปฏิกริยาลำดับที่สอง แต่ถ้าปฏิกริยาเป็น

$$2A \longrightarrow P$$

และอัตราความเร็วของปฏิกริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อผลคูณความเข้มข้นของสองโมเลกุลที่ทำปฏิกริยากัน จึงเขียนสมการอัตราส่วนสมดุลของปฏิกริยาลำดับที่สองได้เป็น

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A][A] = k[A]^2 \qquad 2.6$$

ค่าอัตราความเร็วคงที่ k ของปฏิกริยาลำดับที่สองมีหน่วยหรือขนาดเป็น 1/ความเข้มข้น × เวลา หรือ $M^{-1}\,sec^{-1}$. รูปแบบที่ได้จากการอินทีเกรตทางคณิตศาสตร์ของสมการที่ 2.5 คือ

$$t = \frac{2.303}{k([A_0] - [B_0])} \log_{10} \frac{[B_0][A]}{[A_0][B]} \qquad 2.7$$

MT 454 เมษ 3

$[A_0]$ และ $[B_0]$ เป็นความเข้มข้นเริ่มต้น และ $[A]$ และ $[B]$ คือความเข้มข้นที่เวลา t.

ข้อสังเกตุที่สำคัญมากคือปฏิกริยา $A + B \longrightarrow P$ ซึ่งได้ยกตัวอย่างไปแล้วนั้น ไม่จำเป็นต้องเป็นปฏิกริยาลำดับที่สองเสมอไป ภายใต้สภาวะบางอย่างปฏิกริยาสองโมเลกุลนี้ก็สามารถเป็นปฏิกริยาลำดับที่หนึ่งได้ ตัวอย่างเช่นถ้า A มีความเข้มข้นสูงมาก และ B มีความเข้มข้นต่ำมาก ปฏิกริยานี้จะเป็นปฏิกริยาลำดับที่หนึ่งโดยถือ B เป็นหลัก เนื่องจากอัตราความเร็วของปฏิกริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของสารปฏิกริยาเดียวในที่นี้คือ B เท่านั้น ดังนั้นลำดับของปฏิกริยาจึงถูกกำหนดด้วยสภาวะที่ปฏิกริยานั้นเกิดขึ้น และไม่ได้เป็นผลโดยตรงหรือโดยอัตโนมัติเนื่องจากปฏิกริยานั้นเป็นปฏิกริยาโมเลกุลเดียวหรือปฏิกริยาสองโมเลกุลหรือปฏิกริยาสามโมเลกุล

<u>ปฏิกริยาลำดับที่สาม</u>(THIRD-ORDER REACTION) เป็นปฏิกริยาที่ไม่เคยพบบ่อยนักโดยที่อัตราความเร็วเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อผลคูณความเข้มข้นของสามสารปฏิกริยา

<u>ปฏิกริยาลำดับที่ศูนย์</u>(ZERO-ORDER REACTION) เป็นปฏิกริยาที่มีอัตราความเร็วไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารปฏิกริยาใดเลย ปฏิกริยาหลายชนิดซึ่งถูกเร่งด้วยคาตาลิสต์(catalyzed reaction) เป็นปฏิกริยาลำดับที่ศูนย์ไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารปฏิกริยาใด ในกรณีเช่นนี้อัตราความเร็วของปฏิกริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคาตาลิสต์(catalyst) หรือปัจจัยบางอย่างที่ไม่ใช่โมเลกุลของสารซึ่งเข้าทำปฏิกริยากัน

อัตราความเร็วของปฏิกริยาภายใต้สภาวะบางอย่างก็ไม่จำเป็นต้องเป็นปฏิกริยาลำดับที่หนึ่งหรือที่สองอย่างแท้จริง แต่อาจเป็นลำดับปฏิกริยาผสม (Mixed-order reaction) ก็ได้

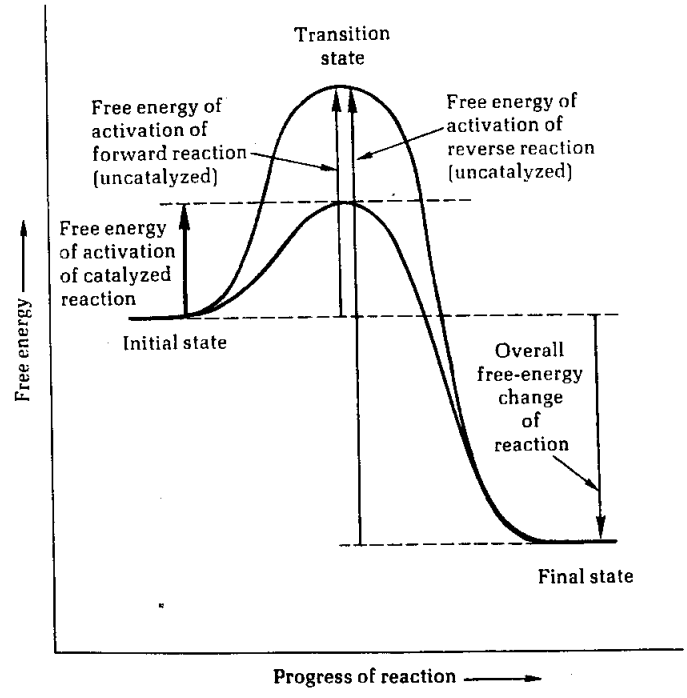
2.2 <u>การคาตาลิสต์</u> (CATALYSIS)

ปฏิกริยาเคมีเช่น $A \longrightarrow P$ เกิดขึ้นเนื่องจากประชากรโมเลกุลบางส่วนของ A ที่ซึ่งขณะนั้นมีพลังงานมากกว่าประชากรโมเลกุลส่วนอื่นและพลังงานนั้นสูงมากจน

ถึงระดับกระตุ้น(activated state) ให้เกิดหรือแตกบอนด์ทางเคมี(chemical bond) กลายเป็นผลผลิต คำว่าพลังงานกระตุ้น(activation energy) หมายถึงปริมาณพลังงานเป็นแคลอรี่(calory) ที่ต้องใช้เพื่อทำให้ทุกโมเลกุลในจำนวน 1 โมล(mole) ของสารที่อุณหภูมิซึ่งกำหนดให้อยู่ในระดับกระตุ้น

รูปที่ 2.2

Energy diagram for a chemical reaction, uncatalyzed and catalyzed.



ในปฏิกริยาเคมีทุกชนิดมีระยะแห่งการเปลี่ยนแปลงหรือระยะหัวเลี้ยวหัวต่อ (transition state) ซึ่งเป็นระยะที่โมเลกุลซึ่งจะเกิดปฏิกริยามีพลังงานอุดมสมบูรณ์ถึงจุดสูงสุดของกำแพงการกระตุ้น(activation barrier) ดังรูปที่ 2.2

$$\underset{\text{Reactant}}{A} \rightleftharpoons [\text{transition state}] \rightleftharpoons \underset{\text{Product(s)}}{P}$$

อัตราความเร็วของปฏิกริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของโมเลกุลที่อยู่ในระยะแห่ง

การเปลี่ยนแปลง การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มพลังงานและเพิ่มการเคลื่อนที่ด้วยความร้อน (thermal motion) ทำให้จำนวนโมเลกุลเข้าสู่ระยะแห่งการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น ปฏิกริยาหลายอย่างอัตราความเร็วของปฏิกริยาจะเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าในทุก ๆ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสที่เพิ่มขึ้น

คาตาลิสต์จะเร่งปฏิกริยาเคมีโดยลดพลังงานอิสระที่ต้องใช้เพื่อการกระตุ้น (free energy of activation) คาตาลิสต์มีสารรวมตัวกับสารปฏิกริยาแล้วทำให้เกิดระยะแห่งการเปลี่ยนแปลงโดยใช้พลังงานอิสระน้อยกว่าระยะแห่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในปฏิกริยาซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับคาตาลิสต์ (uncatalyzed reaction) ดังรูปที่ 2.2 เมื่อมีผลผลิตของปฏิกริยาเกิดขึ้นแล้วตัวคาตาลิสต์จะถูกปลดปล่อยให้เป็นอิสระ

2.3 <u>ธรรมชาติแห่งการเคลื่อนไหวในปฏิกริยาเคมีที่มีเอนไซม์เป็นคาตาลิสต์</u>

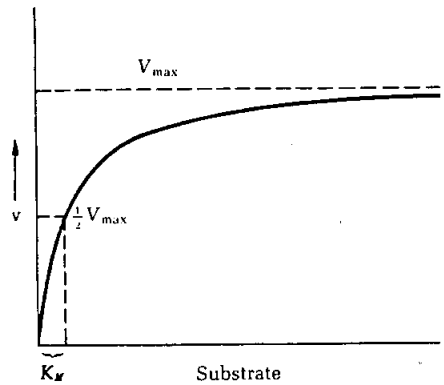
(KINETICS OF ENZYME-CATALYZED REACTION)

กฎเกณฑ์แห่งการเคลื่อนไหวของปฏิกริยาเคมีทั่วไปที่กล่าวมาข้างต้นก็สามารถนำมาใช้ได้กับปฏิกริยาที่มีเอนไซม์เป็นคาตาลิสต์ อย่างไรก็ตามปฏิกริยาที่มีเอนไซม์เป็นคาตาลิสต์ยังแสดงลักษณะที่แตกต่างซึ่งปกติมักไม่พบในปฏิกริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์เป็นคาตาลิสต์ ปรากฏการณ์นี้คือปรากฏการณ์การอิ่มตัว (saturation) ด้วยซับสเตรต ในรูปที่ 2.3 จะเห็นถึงผลของความเข้มข้นซับสเตรตต่ออัตราความเร็วของปฏิกริยาที่ใช้เอนไซม์เป็นคาตาลิสต์ $A \longrightarrow P$ ที่ความเข้มข้นต่ำของซับสเตรตความเร็วของปฏิกริยา v จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของซับสเตรตและปฏิกริยาจะเป็นปฏิกริยาลำดับที่หนึ่งโดยถือเอาซับสเตรตเป็นหลัก อย่างไรก็ตามในขณะที่ความเข้มข้นของซับสเตรตถูกทำให้สูงขึ้นอัตราความเร็วของปฏิกริยาจะลดลงไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของซับสเตรตที่เพิ่มขึ้นอีกต่อไป ในช่วงนี้ลำดับปฏิกริยาจะเป็นแบบผสมและถ้าเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตต่อไปอีกอัตราความเร็วของปฏิกริยาก็จะเข้าถึงจุดคงที่แล้วไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของซับสเตรตอีกต่อไป ที่ความเข้มข้นของซับสเตรตในช่วงนี้ปฏิกริยาจะเป็นปฏิกริยาลำดับที่ศูนย์โดยถือเอาซับสเตรตเป็นหลักและเอนไซม์จะถูกทำให้อิ่มไปด้วยซับสเตรตของตน เอนไซม์ทุกชนิดแสดงการอิ่มตัวแบบนี้เสมอแต่มีความแตกต่างกันในแง่ของความเข้มข้นซับสเตรตที่ต้องใช้

เพื่อทำให้เกิดความอิ่มตัว

รูปที่ 2.3

Effect of substrate concentration on the rate of an enzyme-catalyzed reaction.



2.3.1 MICHAELIS-MENTEN EQUATION

ผลเนื่องจากความอิ่มตัวของเอนไซม์กระตุ้นให้ L. Michaelis และ M.L. Menten ในปี 1913 ได้เสนอทฤษฎีแห่งการเคลื่อนไหวของเอนไซม์และการกระทำของเอนไซม์แล้วต่อมาจึงได้ถูกขยายความโดย G.E. Briggs และ J.B.S. Haldane ทฤษฎีนี้ตั้งอยู่บนรากฐานของการวิเคราะห์เชิงปริมาณในทุกลักษณะทางแห่งการเคลื่อนไหวและการยับยั้งเอนไซม์ เอนไซม์ E ในขั้นแรกจะทำปฏิกริยากับซับสเตรต S ได้เป็นเอนไซม์–ซับสเตรตซับซ้อน ES แล้วต่อมาในขั้นที่สองก็แตกตัวได้เป็นเอนไซม์อิสระและผลผลิต P

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

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

ปฏิกริยาทั้งสองถูกถือว่าย้อนกลับได้ k_1, k_2, k_3, และ k_4 คืออัตราความเร็วคงที่เฉพาะสำหรับปฏิกริยาต่าง ๆ ที่กำหนด

ถ้าให้ [E] แทนความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด (หมายถึงผลรวมของเอนไซม์ทั้งที่เป็นอิสระและที่เกาะติดอยู่กับซับสเตรต) [ES] คือความเข้มข้นของเอนไซม์–

-ซับสเตรตซับซ้อน และ [E] − [ES] คือความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระที่ไม่ได้รวมอยู่กับสิ่งใด [S] คือความเข้มข้นของซับสเตรตซึ่งปกติก็เข้มข้นกว่าเอนไซม์มากจนกระทั่งปริมาณของ S ที่รวมอยู่กับ E ที่ขณะใดขณะหนึ่งถูกละทิ้งได้ไม่ต้องนำมาคิดคำนวนเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของ S ทั้งหมด Briggs และ Haldane ได้สร้างสมการของ Michaelis-Menten ในอีกรูปแบบหนึ่งโดยเริ่มต้นจากการพิจารณาถึงอัตราการเกิดและการสลายตัวของ ES อัตราการเกิดของ ES จาก E + S อาจเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E] - [ES])[S] \qquad 2.8$$

อัตราการเกิดของ ES จาก E + P นั้นน้อยมากจึงไม่นำมาคิดคำนวน

ในทำนองเดียวกันอัตราการสลายตัวของ ES จะเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$\frac{-d[ES]}{dt} = k_2[ES] + k_3[ES] \qquad 2.9$$

k_1 มีหน่วยหรือขนาดเป็น 1/ความเข้มข้น × เวลา เช่น $M^{-1}\,sec^{-1}$

k_2 และ k_3 มีหน่วยหรือขนาดเป็นส่วนกลับของเวลาเช่น วินาที$^{-1}$ หรือ นาที$^{-1}$

เมื่อระบบปฏิกริยาอยู่ในภาวะมั่นคง(steady state) หรือสมดุลย์อัตราการเกิดและการสลายตัวของ ES จะเท่ากัน หรือ $\frac{d[ES]}{dt}$ และ $\frac{-d[ES]}{dt} = 0$ หรือสมการที่ 2.8 เท่ากันกับสมการที่ 2.9 ดังนั้น

$$k_1([E] - [ES])[S] = k_2[ES] + k_3[ES] \qquad 2.10$$

เมื่อจัดรูปแบบของสมการที่ 2.10 เสียใหม่จะได้ว่า

$$\frac{[S]([E] - [ES])}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M \qquad 2.11$$

ค่าคงที่รวม K_M ซึ่งใช้แทนค่า $(k_2 + k_3)/k_1$ ถูกเรียกว่า Michaelis-Menten constant ความเข้มข้นของ ES ที่ภาวะมั่นคงอาจถูกหาได้โดยเปลี่ยนรูปแบบของสมการที่ 2.11 เป็น

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \qquad 2.12$$

เนื่องจากปฏิกริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวคาตาลิสต์มีอัตราความเร็วเริ่มต้น v เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของ ES complex จึงเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$v = k_3[ES] \qquad 2.13$$

ถ้าความเข้มข้นของซับสเตรตสูงมากจนกระทั่งเอนไซม์ทั้งหมดในระบบอยู่ในสภาพ ES complex ก็จะได้ความเร็วสูงสุด V_{max} จึงเขียนเป็นสมการได้ว่า

$$V_{max} = k_3[E] \qquad 2.14$$

ซึ่ง [E] ก็คือความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด

เมื่อแทนค่า [ES] ของสมการที่ 2.13 ลงในสมการที่ 2.12 จะได้สมการคือ

$$v = k_3 \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \qquad 2.15$$

ถ้าหารสมการที่ 2.15 ด้วยสมการที่ 2.14 จะได้สมการเป็น

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{k_3 \frac{[E][S]}{K_M + [S]}}{k_3[E]} \qquad 2.16$$

หรือ

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \qquad 2.17$$

สมการที่ 2.17 ถูกเรียกว่าสมการ Michaelis-Menten equation ซึ่งแสดงความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างอัตราความเร็วของปฏิกริยาโดยเอนไซม์และความเข้มข้นของซับสเตรต [S] ถ้าได้ทราบค่าของทั้ง V_{max} และ K_M แล้ว

ความสัมพันธ์ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับจำนวนซึ่งเกิดจากสมการ Michaelis-Menten equation ในกรณีพิเศษคือเมื่อ $v = \frac{1}{2}V_{max}$ จะได้ว่า

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \qquad 2.18$$

หารสมการที่ 2.18 ด้วย V_{max} ตลอดจะได้ว่า

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \qquad 2.19$$

เมื่อจัดรูปสมการที่ 2.19 เสียใหม่จะได้ว่า

$$K_M = [S] \qquad 2.20$$

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า K_M มีค่าเท่ากันกับความเข้มข้นของซับสเตรตเมื่อทำให้ปฏิกริยามีความเร็วเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด K_M มีหน่วยหรือขนาดเช่นเดียวกันกับค่าความเข้มข้นคือ moles $liter^{-1}$

รูปที่ 2.3 แสดงว่าค่า K_M อาจถูกหาได้จากกราฟซึ่งสร้างจากตัวเลขแสดงผลความเข้มข้นของซับสเตรตต่ออัตราความเร็วปฏิกริยา ค่าของ K_M นั้นไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ ค่า K_M ของเอนไซม์บางอย่างได้แสดงไว้ในตารางที่ 2-1 เป็นที่น่าสังเกตุว่าค่าของ K_M นั้นไม่คงที่อาจเปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากโครงสร้างของซับสเตรต พีเอช(pH) และอุณหภูมิ สำหรับเอนไซม์ที่มีซับสเตรตมากกว่าหนึ่งชนิด ซับสเตรตแต่ละชนิดจะมีค่า K_M เป็นลักษณะของตน และเอนไซม์เมื่ออยู่ภายในเซลล์ก็ไม่จำเป็นจะต้องอิ่มไปด้วยซับสเตรตของตนเสมอ

ตารางที่ 2.1

K_M for some enzymes

Enzyme and substrate	K_M (mM)
Catalase	
H_2O_2	25
Hexokinase	
Glucose	0.15
Fructose	1.5
Chymotrypsin	
N-Benzoyltyrosinamide	2.5
N-Formyltyrosinamide	12.0
N-Acetyltyrosinamide 3	2
Glycyltyrosinamide	122
Carbonic anhydrase	
HCO_3^-	9.0
Glutamate dehydrogenase	
Glutamate	0.12
α-Ketoglutarate	2.0
NH_4^+	57
NAD_{ox}	0.025
NAD_{red}	0.018

อัตราความเร็วสูงสุด V_{max} สำหรับเอนไซม์ต่าง ๆ นั้นแตกต่างกันมาก และยังแตกต่างกันไปได้อีกโดยโครงสร้างของซับสเตรตดังตารางที่ 2–2 พีเอชและอุณหภูมิ

ตารางที่ 2.2

Effect of substrate structure on V_{max} for D-amino acid oxidase (Data are relative to D-alanine = 100)

Substrate	*Relative* V_{max}
D-Tyrosine	297
D-Proline	231
D-Methionine	125
D-Alanine	100
D-Valine	55
D-Histidine	9.7
Glycine	0.0

ค่า K_M ดังที่ทราบมาแล้วในสมการที่ 2.11 คือ

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

อย่างไรก็ตามในปฏิกริยาที่เกี่ยวกับเอนไซม์หลายปฏิกริยา k_1 และ k_2 อาจมีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับ k_3 ในปฏิกริยาเช่นนี้ขั้นตอนซึ่งจำกัดอัตราความเร็วของปฏิกริยาทั้งหมด คือ $ES \xrightarrow{k_3} P$ นั้นช้ามากแสดงว่า k_3 มีค่าน้อยมากจึงตัดทิ้งได้ ดังนั้นสมการที่ 2.11 จึงถูกทำให้ง่ายขึ้นได้เป็น $K_M = \frac{k_2}{k_1}$

ภายใต้สภาวะเช่นนี้อาจถือได้ว่า K_M ก็คือค่าการแตกตัวคงที่ของ ES complex และถูกแทนด้วยสัญญาลักษณ์ K_S ซึ่งก็คล้ายกันกับค่าความสมดุลย์คงที่ของสมการเคมีโดยทั่วไป คือ $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$

ถึงแม้ว่าค่า K_M และ K_S มักถูกใช้ทดแทนกันได้บ่อยครั้งก็ตาม แต่ค่า K_M ก็ไม่ควรถูกถือว่าเป็นค่าการแตกตัวคงที่ของ ES complex เสมอจนกว่าจะพิสูจน์ได้อย่างแน่นอนแล้วว่า k_3 นั้นมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับ k_1 และ k_2

สมการ Michaelis-Menten equation ถูกใช้เป็นหลักทุกอย่างในการปฏิบัติเชิงปริมาณเกี่ยวกับการกระทำโดยเอนไซม์ สิ่งปลีกย่อยจากหลักการเบื้องต้นที่กล่าวถึงมาแล้วข้างต้นนำไปสู่ความสัมพันธ์ซึ่งมีประโยชน์หลายประการ แต่ต้องเน้นหนักอยู่เสมอว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่มักแสดงพฤติการณ์เคลื่อนไหวซับซ้อนมากกว่าที่เป็นไปดังกรณีแบบอย่างซึ่งกล่าวมาแล้ว สิ่งหนึ่งก็คือสูตรต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นถูกถือเอาว่ามีเอนไซม์-ซับสเตรตซับซ้อนเพียงหนึ่งอย่างเท่านั้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้พิสูจน์แล้วว่าปฏิกริยาที่ใช้เอนไซม์เป็นคาตาลิสต์มักมีเอนไซม์-ซับสเตรตซับซ้อนเกิดขึ้นสองหรือสามอย่างเป็นลำดับดังนี้

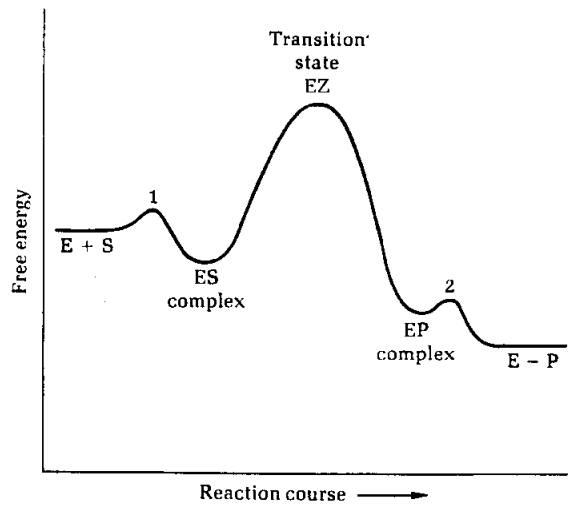
$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EZ \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$$

EZ คือสารซับซ้อนที่อยู่ในสถานะเปลี่ยนแปลงอย่างแท้จริงและ EP คือเอนไซม์-ผลผลิตซับซ้อน(ดังรูป 2-4)

นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นด้วยว่าปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ส่วนใหญ่มักมีซับสเตรตมากกว่าหนึ่งโมเลกุลและมีผลผลิตมากกว่าหนึ่งอย่าง ในปฏิกริยาที่มีสองซับสเตรตคือ S_1 และ S_2 อาจมีสามเอนไซม์-ซับสเตรตซับซ้อนคือ ES_1, ES_2, และ ES_1S_2 ถ้าปฏิกริยามีผลผลิตสองอย่างคือ P_1 และ P_2 ก็อาจมีเอนไซม์อยู่รวมกับผลผลิตเป็นสารซับซ้อนร่วมด้วยสามอย่างคือ EP_1, EP_2, และ EP_1P_2 ดังนั้นในปฏิกริยาแบบนี้จึงมีขั้นตอนระหว่างกลางเกิดขึ้นหลายขั้นตอน และแต่ละขั้นตอนก็มีอัตราความเร็วคงที่ของตน การวิเคราะห์เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของปฏิกริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยสองสารปฏิกริยาหรือมากกว่าบางครั้งก็มีความยุ่งยากซับซ้อนมากและอาจต้องใช้คอมพิวเตอร์ช่วย อย่างไรก็ตามจุดเริ่มต้นสำหรับการวิเคราะห์เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของปฏิกริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์แบบนี้ก็ยังต้องอาศัยความสัมพันธ์แบบ Michaelis-Menten relationship ดังในรายละเอียดที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

รูปที่ 2.4

Energy diagram for an enzyme-catalyzed reaction. Small energy barriers exist at points 1 and 2.



2.3.2 การเปลี่ยนแปลงสมการMICHAELIS-MENTEN EQUATION

สมการ Michaelis-Menten equation อาจถูกเปลี่ยนแปลงตามหลักพีชคณิตเพื่อให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้นจากการลากเส้นกราฟความสัมพันธ์ของตัวเลขที่ได้จากผลการทดลอง วิธีทางหนึ่งที่นิยมใช้กันมากคือการเปลี่ยนแปลงโดยกลับเศษส่วนทั้งสองข้างของสมการ Michaelis-Menten equation (สมการที่ 2.17) ได้เป็น

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}[S]/(K_M + [S])} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]} \qquad 2.21$$

แล้วจัดเรียงเสียใหม่จะได้ว่า

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \qquad 2.22$$

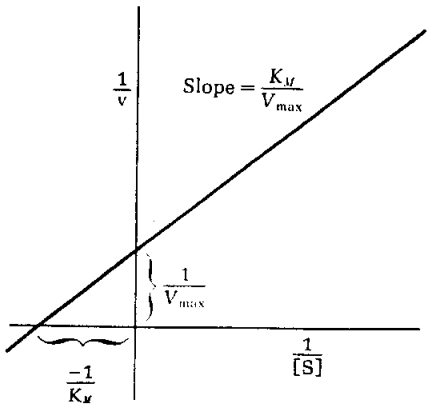
แล้วลดรูปแบบเป็น

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad 2.23$$

สมการที่ 2.23 ถูกเรียกว่า Lineweaver-Burk equation เป็นสมการเส้นตรงมีความลาดเอียงเท่ากับ K_M/V_{max} และมีจุดตัดตรงตำแหน่ง $1/V_{max}$ บนแกนของ $1/v$ ดังรูปที่ 2–5 กราฟเส้นนี้ถูกสร้างขึ้นโดยลากเส้นผ่านจุดความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/v$ กับ $1/[S]$ การสร้างเส้นกราฟจากเศษส่วนกลับสองชั้น(double-reciprocal plot) แบบนี้มีประโยชน์ในแง่ที่ช่วยให้สามารถหาค่า V_{max} ได้แม่นยำยิ่งขึ้นกว่าการสร้างเส้นกราฟจากค่าระหว่าง v กับ $[S]$ โดยตรงดังรูปที่ 2–3 ซึ่ง V_{max} ไม่อาจถูกแสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนจึงเป็นค่าที่ไม่แน่นอน จุดตัดบนแกนนอนของเส้นกราฟแบบ Lineweaver-Burk plot ก็คือ $-1/K_M$ การเขียนเส้นกราฟแบบ Lineweaver-Burk plot บังให้รายละเอียดที่มีคุณค่ามากเกี่ยวกับการยับยั้งเอนไซม์ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

รูปที่ 2.5

Lineweaver-Burk plot.



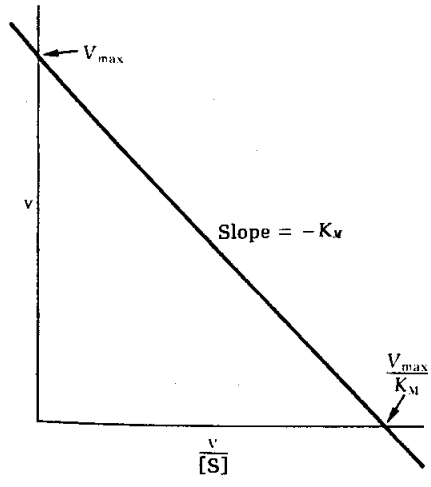
การเปลี่ยนแปลงสมการ Michaelis-Menten equation อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งมีประโยชน์คือการคูณทั้งสองข้างของสมการที่ 2.23 ด้วย V_{max} (v) แล้วจัดเรียงสมการเสียใหม่ได้เป็น

$$v = -K_M\left(\frac{v}{[S]}\right) + V_{max} \qquad 2.24$$

เมื่อลากเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า v กับ $v/[S]$ จะได้เส้นตรงดังรูปที่ 2–6 เส้นกราฟแบบนี้ถูกเรียกว่า Eadie-Hofstee plot ทำให้ทราบถึงค่าของ V_{max} และ K_M ได้โดยง่าย

รูปที่ 2.6

Eadie-Hofstee plot.



2.4 ค่าจำกัดความและหน่วยของเอนไซม์

เอนไซม์หนึ่งหน่วย(unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ซึ่งทำให้ซับสเตรตจำนวน 1 ไมโครโมล(μ mole)หรือ 10^{-6} โมลเปลี่ยนแปลงไปได้ในหนึ่งนาทีที่ 25 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะเหมาะสม

ค่าความไวเฉพาะ(specific activity)คือจำนวนเอนไซม์เป็นหน่วยในหนึ่งมิลลิกรัมของโปรตีน ค่านี้เป็นการวัดความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ซึ่งจะเพิ่มมากขึ้นในระหว่างการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และจะถึงจุดสูงสุดและคงที่เมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาพที่บริสุทธิ์

อัตราการผันเวียน(turnover number) แต่เดิมเรียกว่าความไวศูนย์กลางการคาตาลิสต์(catalytic center activity) คือจำนวนโมเลกุลของซับสเตรตที่ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปในหนึ่งหน่วยเวลาโดยเอนไซม์โมเลกุลเดียวหรือโดยตำแหน่งที่เกิดปฏิกริยา(active site) เดียวบนผิวเอนไซม์ เมื่อเอนไซม์เป็นปัจจัยเดียวในการจำกัดอัตราความเร็วปฏิกริยาเอนไซม์ carbonic anhydrase มีอัตราการผันเวียนสูงที่สุดในบรรดาเอนไซม์ต่าง ๆ ที่รู้จักคือ 36,000,000 ต่อนาทีต่อโมเลกุล

2.5 อัตราความเร็วของปฏิกริยาโดยเอนไซม์ซึ่งขึ้นอยู่กับโคแฟคเตอร์

สมการ Michaelis-Menten equation ไม่เพียงแต่ใช้แสดงความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตกับอัตราความเร็วของปฏิกริยาโดยเอนไซม์เท่านั้นยังสามารถใช้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโคแฟคเตอร์ (cofactor) หรือโคเอนไซม์ (coenzyme) กับอัตราความเร็วของปฏิกริยาในกรณีที่เอนไซม์ต้องการโคแฟคเตอร์เพื่อการทำงานได้อีกด้วยโดยมีความสมดุลย์กันดังในรูปแบบคือ

$$\underset{\text{(Inactive)}}{E + \text{coenzyme}} \rightleftharpoons \underset{\text{(Active)}}{E - \text{coenzyme}}$$

เอนไซม์–โคเอนไซม์ซับซ้อนต่อมาจะรวมตัวกับซับสเตรตได้เป็นเอนไซม์–โคเอนไซม์–ซับสเตรตซับซ้อน

$$E - \text{coenzyme} + S \rightleftharpoons S - E - \text{coenzyme}$$

ความเข้มข้นของเอนไซม์–โคเอนไซม์–ซับสเตรตซับซ้อนเป็นตัวกำหนดอัตราความเร็วของปฏิกริยาทั้งหมด จากหลักฐานการสมดุลย์เช่นนี้เอนไซม์จะแสดงปรากฏการณ์อิ่มตัวไม่เพียงแต่กับซับสเตรตเท่านั้นแต่ยังแสดงการอิ่มตัวกับโคแฟคเตอร์ของตนเองอีกด้วย

ดังนั้นนอกจากจะมีค่าคงที่ Michaelis constant (K_M) สำหรับความสัมพันธ์กับซับสเตรตโดยกำหนดเป็นเข้มข้นของซับสเตรตที่อัตราความเร็วปฏิกริยาเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราความเร็วสูงสุดที่สังเกตุได้แล้ว ยังมีค่าคงที่ Michaelis constant เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของเอนไซม์กับโคแฟคเตอร์อีกด้วย ในทำนองเดียวกันกับความสัมพันธ์กับซับสเตรตคือกำหนดเป็นความเข้มข้นของโคแฟคเตอร์ที่อัตราความเร็วเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราความเร็วปฏิกริยาสูงสุดของเอนไซม์ที่สังเกตุได้ ในการหาค่า K_M สำหรับโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์จะต้องทำให้ความเข้มข้นของซับสเตรตคงที่ที่ระดับอิ่มตัวของเอนไซม์แล้วตรวจสอบผลจากความเข้มข้นของโคแฟคเตอร์ต่ออัตราความเร็วปฏิกริยา

ตารางที่ 2–1 แสดงถึงค่า K_M ต่าง ๆ สำหรับเอนไซม์ glutamate dehydrogenase ซึ่งต้องการ NAD เป็นโคแฟคเตอร์เพื่อรับอะตอมของไฮโดรเจน ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์นี้คือ

$$\text{Glutamate} + NAD_{ox} \rightleftharpoons \alpha\text{-ketoglutarate} + NAD_{red} + NH_3$$

ซับสเตรตทั้งสองคือ glutamate และ α-ketoglutarate มีค่า K_M เป็นลักษณะเฉพาะตัวซึ่งแตกต่างกันสำหรับ NAD ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ที่อยู่ในรูปแบบออกซิไดซ์และรีดิวส์ ในกรณีนี้และปฏิกริยาโดยเอนไซม์ที่คล้ายคลึงกันนี้หลายอย่างซึ่งต้องอาศัยโคเอนไซม์ร่วมด้วยโคเอนไซม์จะมีส่วนร่วมในปฏิกริยาดังประหนึ่งว่าเป็นซับสเตรตของเอนไซม์และสามารถใช้สูตรหรือสมการแห่งการเคลื่อนไหวแบบเดียวกันได้

2.6 ผลกระทบเนื่องจากพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน การเปลี่ยนแปลงพีเอช(pH) มีผลต่อลักษณะหรือสภาพการเป็นไอออน (ionic character)ของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์โบซิล (amino and carboxyl group) บนโมเลกุลของโปรตีน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงพีเอชจึงมีผลอย่างชัดเจนต่อตำแหน่งที่ทำให้เกิดปฏิกริยา(catalytic site) บนผิวของเอนไซม์และรูปร่างลักษณะของเอนไซม์โมเลกุลซึ่งต้องคล้องจองกันกับโมเลกุลของซับสเตรต ค่าของพีเอชที่สูงหรือต่ำเกินไปจะมีผลทำให้เกิดการเสียหรือผิดธรรมชาติ(denaturation) และหยุดการทำงานของเอนไซม์โปรตีน เอนไซม์ส่วนใหญ่มีความว่องไวในการทำงานสูงสุดที่พีเอชหนึ่งเท่านั้น ดังในตารางที่ 2–3 แสดงถึงพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) สำหรับเอนไซม์ต่าง ๆ ที่พีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้จะมีผลทำให้เอนไซม์มีความว่องไวในการทำงานลดน้อยลง

ตารางที่ 2.3

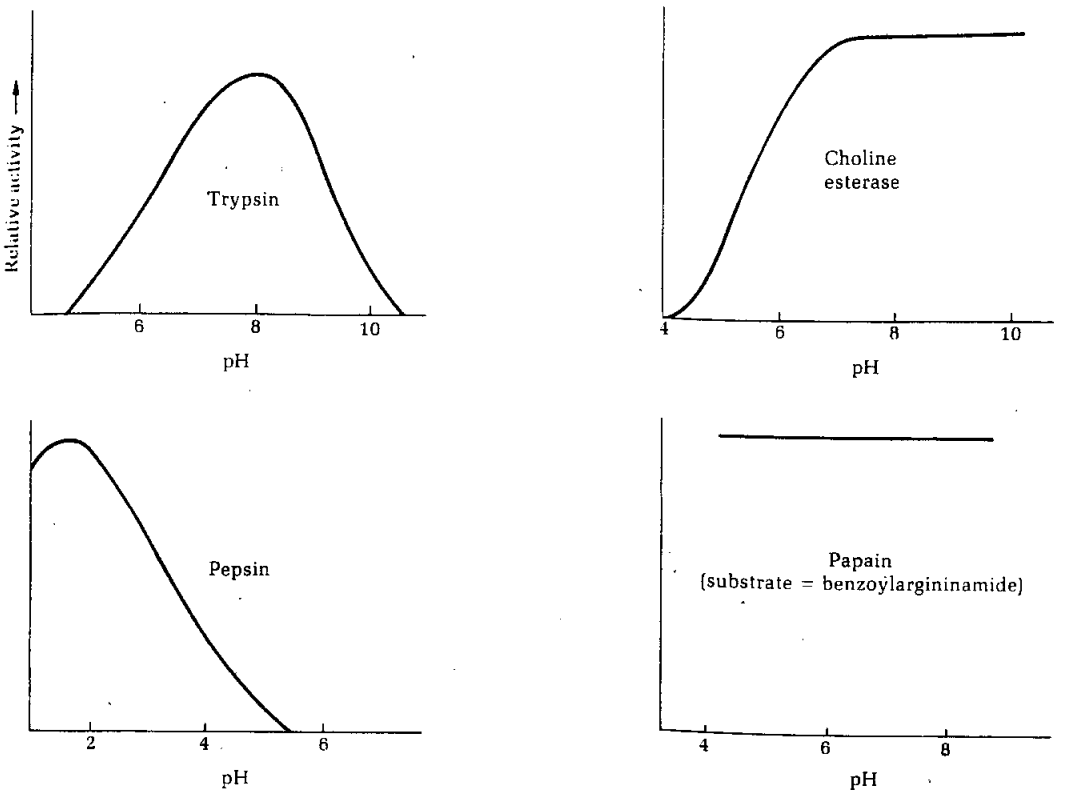
Optimum pH of some enzymes

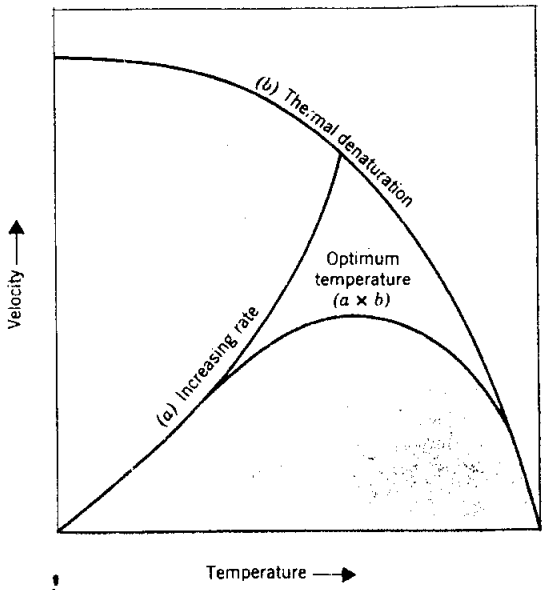
Enzyme and substrate	*Optimum pH*
Pepsin	
Egg albumin	1.5
Hemoglobin	2.2
Pyruvate carboxylase	
Pyruvate	4.8
Fumarase	
Fumarate	6.5
Malate	8.0
Catalase	
H_2O_2	7.6
Trypsin	
Benzoylargininamide	7.7
Benzoylarginine ethyl ester	7.0
Alkaline phosphatase	
Glycerol 3-phosphate	9.5
Arginase	
Arginine	9.7

เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและกิจกรรมของเอนไซม์ส่วนใหญ่มักเป็นรูประฆัง แต่สำหรับเอนไซม์บางชนิดก็เป็นเส้นตรงหรือแตกต่างไปจากนี้ ดังรูปที่ 2–7 การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์กับพีเอชปกติมักตรวจสอบเมื่อเอนไซม์อิ่มไปด้วยซับสเตรตที่พีเอชต่าง ๆ กัน ทั้งนี้เนื่องจากค่า K_M ของเอนไซม์หลายชนิดเปลี่ยนแปลงได้ด้วยพีเอช

รูปที่ 2.7

The pH-activity profiles of some enzymes.





รูปที่ 2.8

Effect of temperature on reaction rate of an enzyme-catalyzed reaction: (*a*) represents the increasing rate of a reaction as a function of temperature; (*b*) represents the decreasing rate as a function of thermal denaturation of the enzyme. The shaded area represents the combination of ($a \times b$).

พีเอชซึ่งเหมาะสมสำหรับเอนไซม์หนึ่ง ๆ นั้นไม่จำเป็นต้องเป็นพีเอชของสิ่งแวดล้อมภายในเซลล์ที่มีเอนไซม์นั้นอยู่แต่อาจเป็นพีเอชซึ่งสูงหรือต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมเล็กน้อย ความจริงเช่นนี้แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชกับกิจกรรมของเอนไซม์เป็นปัจจัยอย่างหนึ่งภายในเซลล์ที่ใช้ในการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายร้อยชนิดซึ่งตอบสนองต่อพีเอชแตกต่างกัน พีเอชภายในเซลล์ถูกถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในข่ายงานซับซ้อนของการควบคุมเมตาโบลิซึ่มทั้งหมด

2.7 ผลกระทบเนื่องจากอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกริยาเคมีปฏิกริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ก็มีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเช่นเดียวกัน เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนการผิดธรรมชาติของเอนไซม์โปรตีนโดยการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะลดประสิทธิภาพของเอนไซม์แล้วลดอัตราความเร็วปฏิกริยา อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนถึงประมาณ 45 องศาเซลเซียสจะเพิ่มอัตราความเร็วปฏิกริยาแต่ที่อุณหภูมิสูงเกินกว่า 45 องศาเซลเซียสมักเพิ่มการเสียหรือผิดธรรมชาติของเอนไซม์จนกระทั่งถึงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นต้นไปการเสียหรือผิดธรรมชาติจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและทำลายการทำหน้าที่เป็นคาตาลิสต์ของเอนไซม์โปรตีน ผลของอุณหภูมิต่ออัตราความเร็วปฏิกริยาโดยเอนไซม์ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2-8

2.8 การยับยั้งเอนไซม์

(ENZYME INHIBITION)

การศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเอนไซม์ช่วยให้ได้รายละเอียดซึ่งมีคุณค่าเกี่ยวกับความเฉพาะเจาะจงต่อซับสเตรตของเอนไซม์ ธรรมชาติของหมู่ปฏิกริยา (functional group) ที่ตำแหน่งซึ่งทำให้เกิดปฏิกริยา (catalytic site or active site) บนผิวของเอนไซม์ กลไกการทำงานของเอนไซม์ และการมีส่วนร่วมของหมู่ปฏิกริยาบางอย่างในการรักษาไว้ซึ่งรูปร่างลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โมเลกุลที่ต้องคล้องจองกันกับซับสเตรตโมเลกุล นอกจากนี้การยับยั้งเอนไซม์บางชนิดด้วยส่วนประกอบบางอย่างของเซลล์ยังถูกใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมปฏิกริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ได้อีกด้วย

การยับยั้งเอนไซม์อาจถูกแบ่งออกได้เป็นสองแบบใหญ่ ๆ คือ การยับยั้งที่กลับคืนดังเดิมไม่ได้ (irreversible inhibition)และการยับยั้งที่กลับคืนดังเดิมได้ (reversible inhibition) การยับยั้งที่กลับคืนดังเดิมไม่ได้ปกติมักเป็นการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงหมู่ปฏิกริยาของเอนไซม์หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งหมู่ดังเช่นการยับยั้งด้วยความร้อนและพีเอชเป็นต้น การยับยั้งที่กลับคืนดังเดิมได้สามารถใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์เชิงปริมาณได้โดยสมการ Michaelis-Menten equation การยับยั้งที่กลับคืนดังเดิมได้ยังอาจถูกแบ่งออกได้เป็นสองแบบคือ การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) และการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibition) การยับยั้งแบบแข่งขันอาจถูกทำให้กลับคืนดังเดิมได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรต ส่วนการยับยั้งแบบไม่แข่งขันไม่อาจถูกทำให้กลับคืนดังเดิมได้ด้วยการเพิ่มซับสเตรต

2.8.1 <u>การยับยั้งแบบแข่งขัน</u>

จากการศึกษาการยับยั้งแบบแข่งขันในกรณีต่าง ๆ อาจสรุปได้ว่าสารยับยั้งแบบแข่งขัน I จะทำปฏิกริยารวมตัวกับเอนไซม์ตรงตำแหน่งที่เอนไซม์ใช้เกาะติดกับซับสเตรตปกติได้เป็น EI complex ที่อาจกลับคืนเป็น E และ I อิสระได้ดังสมการ

$$E + I \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EI$$

อย่างไรก็ตาม EI complex ไม่อาจแตกตัวได้เป็นผลผลิตของปฏิกริยาเหมือนดังการแตกตัวของ ES complex เมื่อพิจารณาตามสูตรของ Michaelis-Menten จะได้ค่าคงที่ของสารยับยั้ง (inhibitor constant, K_I) ดังสมการ

$$K_I = \frac{k_2}{k_1}$$

ดังนั้น K_I ก็คือค่าการแตกตัวคงที่ของ enzyme-inhibitor complex

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

การยับยั้งแบบแข่งขันอาจถูกทำให้เข้าใจได้ง่ายโดยใช้ Lineweaver-Burk plot เขียนเส้นกราฟผ่านจุดความสัมพันธ์ระหว่าง 1/v กับ 1/[S] ที่ความเข้มข้น

ต่าง ๆ ของสารยับยั้ง ดังรูปที่ 2–9 ในกรณีที่เป็นการยับยั้งแบบแข่งขันอย่างแท้จริงจะได้กราฟเป็นเส้นตรงมีความลาดเอียงต่าง ๆ กันแต่มีจุดตัดร่วมกันที่แกน $1/v$ แสดงว่า V_{max} ไม่มีการเปลี่ยนแปลงถึงแม้จะมีสารยับยั้งแบบแข่งขันปรากฏอยู่และที่ความเข้มข้นใด ๆ ของสารยับยั้งแบบนี้ก็จะมีซับสเตรตที่ความเข้มข้นหนึ่งซึ่งค่อนข้างสูงสามารถทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดหรือเต็มที่ได้เสมอ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตุว่าเมื่อมีสารยับยั้งแบบแข่งขันปรากฏอยู่จะได้ค่า K_M ที่ปรากฏสูงกว่าค่า K_M ที่แท้จริงดังจะเห็นได้ว่ามีการตัดที่แกน $1/[S]$ ด้วยค่ามากขึ้น ค่าความลาดเอียงของเส้นกราฟแสดงปฏิกริยาที่ไม่ได้ถูกยับยั้งซึ่งมองเห็นได้จากรูปที่ 2–9 คือ K_M/V_{max} แต่ค่าความลาดเอียงของเส้นกราฟแสดงปฏิกริยาที่ถูกยับยั้งแบบนี้คือ K_M/V_{max} คูณด้วย $(1 + [I]/K_I)$ ค่าความลาดเอียงที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีสารยับยั้งปรากฏอยู่คือ $1 + [I]/K_I$ โดยความสัมพันธ์เช่นนี้ทำให้สามารถคำนวนหาค่า K_I ได้

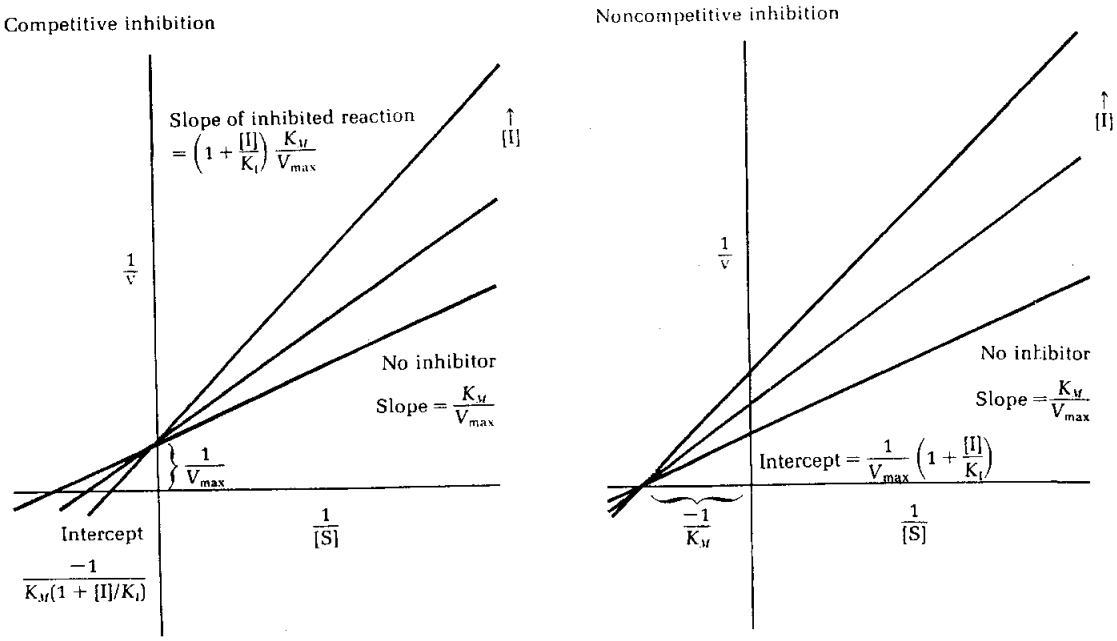
2.8.2 <u>การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน</u>

การยับยั้งแบบนี้ไม่อาจถูกทำให้กลับคืนดังเดิมได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรต ทั้งนี้เนื่องจากสารยับยั้งจับรวมตัวกับเอนไซม์ตรงตำแหน่งที่เอนไซม์ไม่ได้ใช้รับรวมตัวกับซับสเตรต สารยับยั้งอาจจับรวมตัวกับเอนไซม์อิสระหรือ ES complex หรือทั้งสองกรณีดังสมการ

$$E + I \rightleftharpoons EI$$
$$ES + I \rightleftharpoons ESI$$

ทั้ง EI และ ESI complex จะอยู่ในสภาพซึ่งเฉื่อยชา การยับยั้งแบบไม่แข่งขันก็เช่นเดียวกันอาจถูกทำให้เข้าใจได้ง่ายโดยใช้ Lineweaver Burk plot ของ $1/v$ ต่อ $1/[S]$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารยับยั้งดังรูปที่ 2–9 เส้นกราฟแสดงการยับยั้งแบบไม่แข่งขันมีความลาดเอียงแตกต่างกันและมีจุดตัดที่แกน $1/v$ แตกต่างกัน จุดตัดบนแกน $1/v$ ของเส้นกราฟสำหรับเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งจะสูงกว่าเอนไซม์ที่ไม่ถูกยับยั้งแต่เส้นกราฟทุกเส้นมีจุดตัดร่วมกันที่แกน $1/[S]$ แสดงว่า V_{max} ถูกทำให้ลดลงโดยสารยับยั้งและไม่อาจถูกทำให้กลับคืนดังเดิมได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตให้สูงขึ้นไม่ว่าจะเป็นเท่าไร

ก็ตาม แต่ค่า K_M ของเอนไซม์ไม่อาจถูกทำให้เปลี่ยนแปลงได้โดยสารยับยั้งแบบนี้ ค่าความลาดเอียงของเส้นกราฟแสดงปฏิกริยาที่ถูกยับยั้งแบบนี้ก็เช่นเดียวกันกับการยับยั้งแบบแข่งขันคือ เท่ากับ K_M/V_{max} คูณด้วย $(1 + [I]/K_I)$

รูปที่ 2.9

Lineweaver-Burk plots of competitive and noncompetitive inhibition.