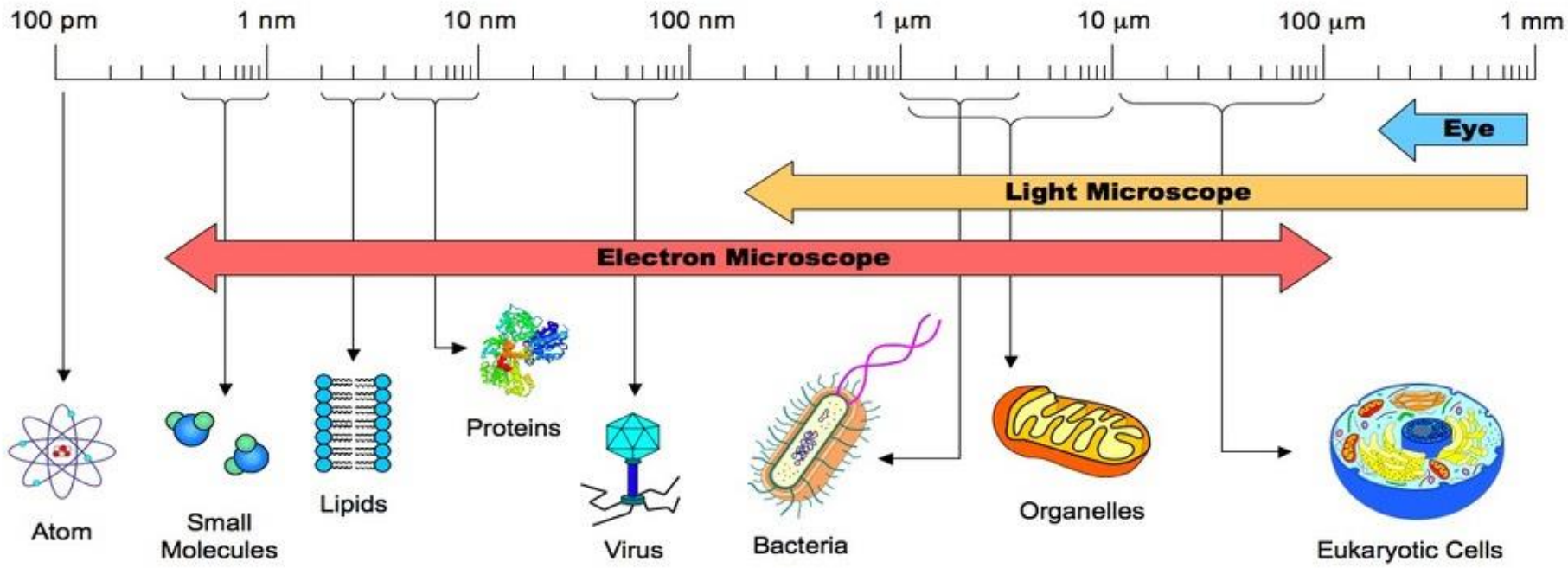
คม 320 ชีวเคมีเบื้องต้น

ภาคเรียน 1 ปีการศึกษา 2565



https://sites.google.com/site/dnarnabasics/sizes

อ. กัญญา บุตราช

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ห้อง 3401 อาคารจุฬาภรณ์ kanya@mju.ac.th Kanya Buttaraj

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

แบบแสดงรายละเอียดการสอนและผลการสอนรายวิชา

ประกอบการประกันคุณภาพการศึกษา ภาคการศึกษาที่ 1 ปีการศึกษา 2565

รหัสวิชา คม 320 **ชื่อรายวิชา** ชีวเคมีเบื้องต้น **จำนวนหน่วยกิต** 3 (3-0-6)

หมวดวิชา/สาขาวิชาที่รายวิชาสังกัด เคมี

อาจารย์ผู้สอน ผศ.ดร. ชุติมา คงจรูญ ผศ.ดร. อนรรฆอร ศรีไสยเพชร อาจารย์กัญญา บุตราช และ อ. ดร. เอกวิทย์ ตรีเนตร

กลุ่ม 1 จันทร์ พฤหัส 13-14.30 น. **ห้อง 3102 กลุ่ม 1** อังคาร ศุกร์ 8-9.30 น. **ห้อง 1108**

ผู้ประสานงานรายวิชา ผศ.ดร. ชุติมา คงจรูญ

คำอธิบายรายวิชา

องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งมีชีวิต บัฟเฟอร์ โครงสร้างทางเคมี และหน้าที่ทางชีวภาพของสารชีวโมเลกุล คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนและโปรตีน ลิพิด กรดนิวคลีอิก การทำงานของเอนไซม์ โคเอนไซม์ และวิตามิน หลักการเมตาบอลิซึม และเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ลิพิด กรดนิวคลีอิก โปรตีน กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

วัตถุประสงค์รายวิชา

1. เพื่อให้นักศึกษามีความรู้พื้นฐานชีวเคมี

2. เพื่อให้นักศึกษาสามารถเชื่อมโยงและบูรณาการความรู้ที่ได้เรียนในรายวิชากับเนื้อหาในสาขาวิชาที่ตนเองศึกษา

รายละเอียดการสอนของเนื้อหาวิชา

หัวข้อ	จำนวนชั่วโมง	วัน/เดือน/ปี กลุ่ม 1	วัน/เดือน/ปี กลุ่ม 2	ผู้สอน	หมายเหตุ
ภาคบรรยาย					
1. โปรตีนและเอนไซม์ การสร้างและการสลาย	11.25	4 7 11 **14** 18 21 25 **28** ก.ค. (ครึ่งแรก)	5 8 12 **15** 19 22 26 **29** ก.ค. (ครึ่งแรก)	อาจารย์กัญญา บุตราช	14 15 28 19 ก.ค. ตรงกับวันหยุดนัดเรียนกับอาจารย์ผู้สอน
2. คาร์โบไฮเดรต การสร้างและการสลาย	11.25	**28** ก.ค. (ครึ่งหลัง) 1 4 8 11 15 **18** 22 ส.ค.	**29** ก.ค. (ครึ่งหลัง) 2 5 9 **12** 16 19 23 ส.ค.	ผศ.ดร. ชุติมา คงจรูญ	29 ก.ค. และ 12 ส.ค. ตรงกับวันหยุด 18 ส.ค. ตรงกับสัปดาห์วัยวิทยาศาสตร์นัดเรียนกับอาจารย์ผู้สอน

3. ลิปิดและวิตามิน การสร้างและการสลาย	11.25	25 ส.ค.	26 ส.ค.	ผศ.ดร. อนรรฆอร ศรีไสยเพชร	
สอบกลางภาคตามตารางมหาวิทยาลัย 29 ส.ค.-4 ก.ย. 2565					
3. ลิปิดและวิตามิน การสร้างและการสลาย (ต่อ)		5 8 12 15 19 22 26 ก.ย.(ครึ่งแรก)	6 9 13 16 20 23 27 ก.ย. (ครึ่งแรก)	ผศ.ดร. อนรรฆอร ศรีไสยเพชร	
4. กรดนิวคลีอิค การสร้างและการสลาย	11.25	26 ก.ย. (ครึ่งหลัง) 29 ก.ย. 3 6 10 **13** 17 20 ต.ค.	26 ก.ย. (ครึ่งหลัง) 30 ส.ค. 4 7 11 **14** 18 21 ก.ย.	อ. ดร. เอกวิทย์ ตรีเนตร	13 14 ก.ย. ตรงกับวันหยุดนัดเรียนกับอาจารย์ผู้สอน

1. โปรตีนและเอนไซม์

ภาคเรียน 1 ปีการศึกษา 2565

```
Human  MAPKKPEPKKEAAKPAPAPAPAPAPAPAPEAPKEPAFDPKSVKIDFTA 50
Mouse  .P.........T....A.P...ASA..E.L****KDS..........S. 46
Rat    .P.........T....V.A...PAP..E.L****RDS..........S. 46

Human  DQIEEFKEAFSLFDRTPTGEMKITYGQCGDVLRALGQNPTNAEVLRVLGK 100
Mouse  ..................................................  96
Rat    ..................................................  96

Human  PKPEEMNVKMLDFETFLPILQHISRNKEQGTYEDFVEGLRVFDKESNGTV 150
Mouse  ......SS.T....M...................................  146
Rat    ......SS.T....M...................................  146

Human  MGAELRHVLATLGEKMTEAEVEQLLAGQEDANGCINYEAFVKHIMSG    197
Mouse  ................S........S..................I...    193
Rat    ................S........T..................V...    193
```

อ. กัญญา บุตราช

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ห้อง 3401 อาคารจุฬาภรณ์ kanya@mju.ac.th Kanya Buttaraj

โปรตีน

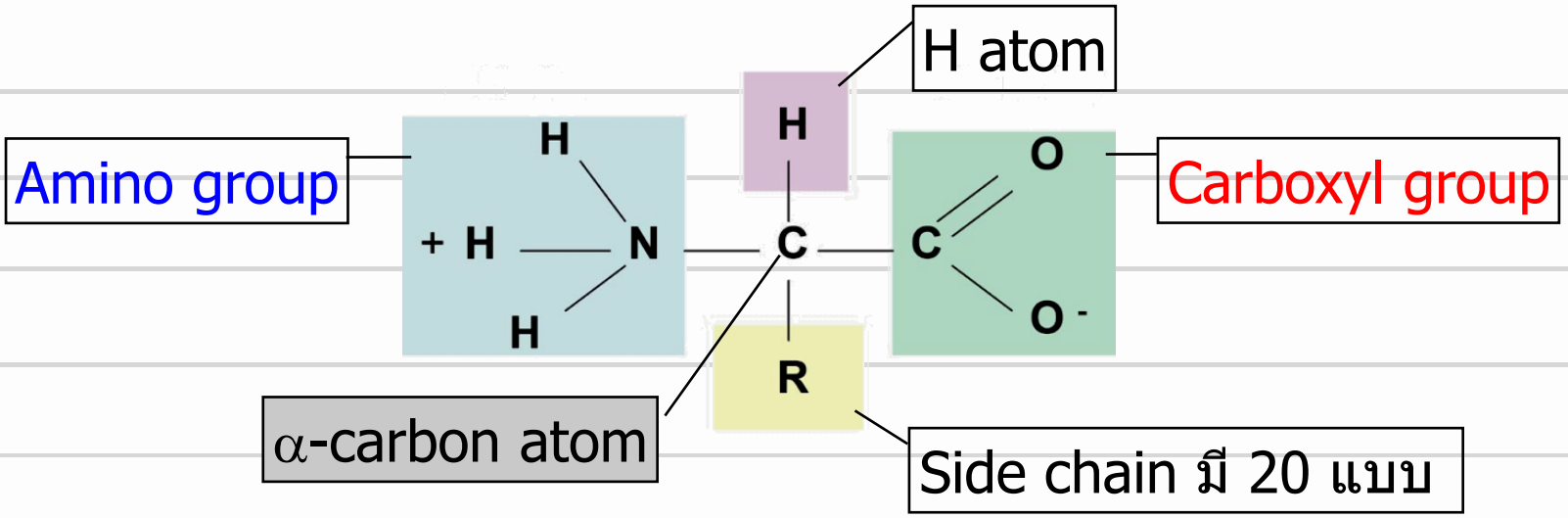
เรื่อง	หน้า
1. กรดอะมิโน	7
2. คุณสมบัติของกรดอะมิโน	12
3. โครงสร้างของโปรตีน	19
4. คุณสมบัติของโปรตีน	39
5. หน้าที่ของโปรตีน	44
6. เทคโนโลยีของโปรตีน	51

กรดอะมิโน

โปรตีนในธรรมชาติประกอบด้วยกรดอะมิโนพื้นฐาน (basic amino acids) 20 ชนิด โดยโครงสร้างของกรดอะมิโนประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมกลาง หรือ α-carbon atom จับกับ 4 ส่วนประกอบ ดังนี้

- Carboxyl group -COOH
- Amino group $-NH_2$
- H atom -H
- Side chain -R (20 รูปแบบ)

กรดอะมิโน



รูป 1 โครงสร้างของแอลฟา-อะมิโน แอซิด (α-amino acid)

ดัดแปลงจาก : http://www.proprofs.com/flashcards/cardshowall.php?title=biological-molecules-aqa-proteins

Side chain ที่แตกต่างกัน 20 แบบ เป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของกรดอะมิโน จึงแบ่งกรดอะมิโนเป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติของ side chain ดังตาราง 1

ตาราง 1 โครงสร้างโมเลกุลของกรดอะมิโนพื้นฐานทั้ง 20 ชนิด

1. Nonpolar amino acids
กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) มี 9 ชนิด

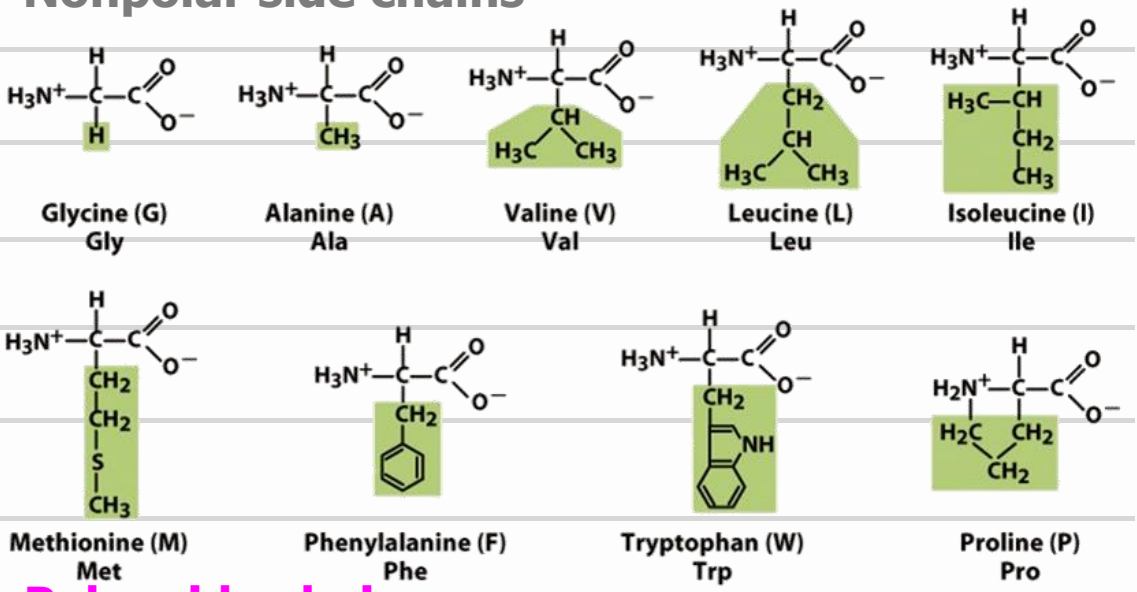
2. Polar amino acids
กรดอะมิโนที่มีขั้ว ไม่แตกตัวเป็นประจุ ชอบน้ำมี 6 ชนิด

3. Charged amino acids
กรดอะมิโนที่แตกตัวเป็นประจุ มี 5 ชนิด

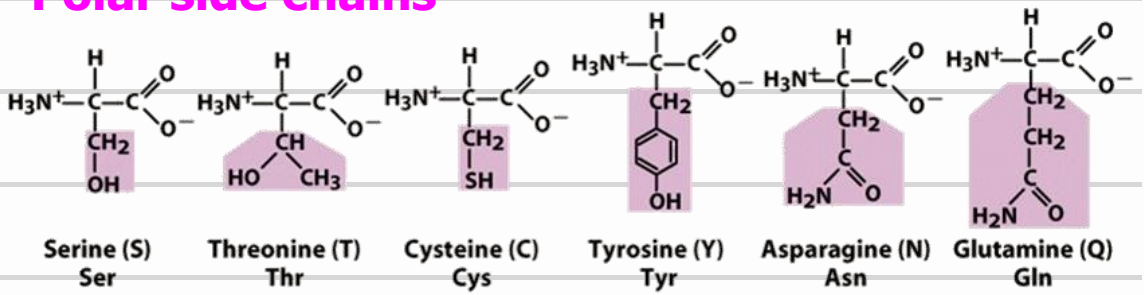
Acidic amino acids (-)
Basic amino acids (+)

ดัดแปลงจาก:
http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/aminoacids01.jpg

--Nonpolar side chains----------



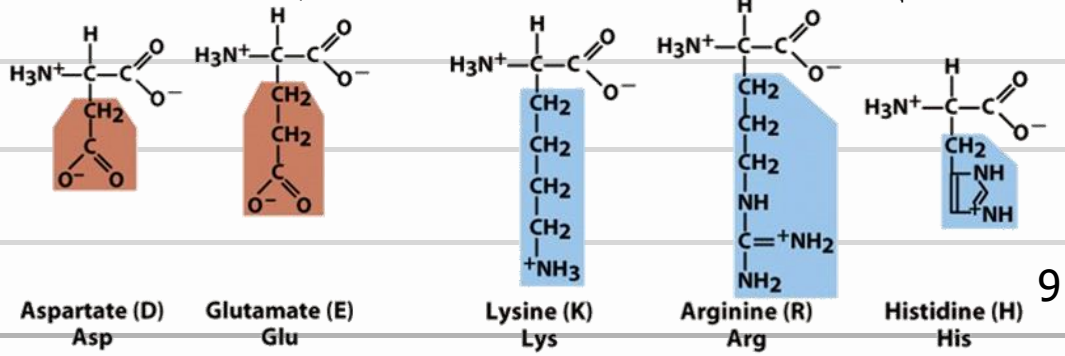
--Polar side chains----------



--Charged side chains----------

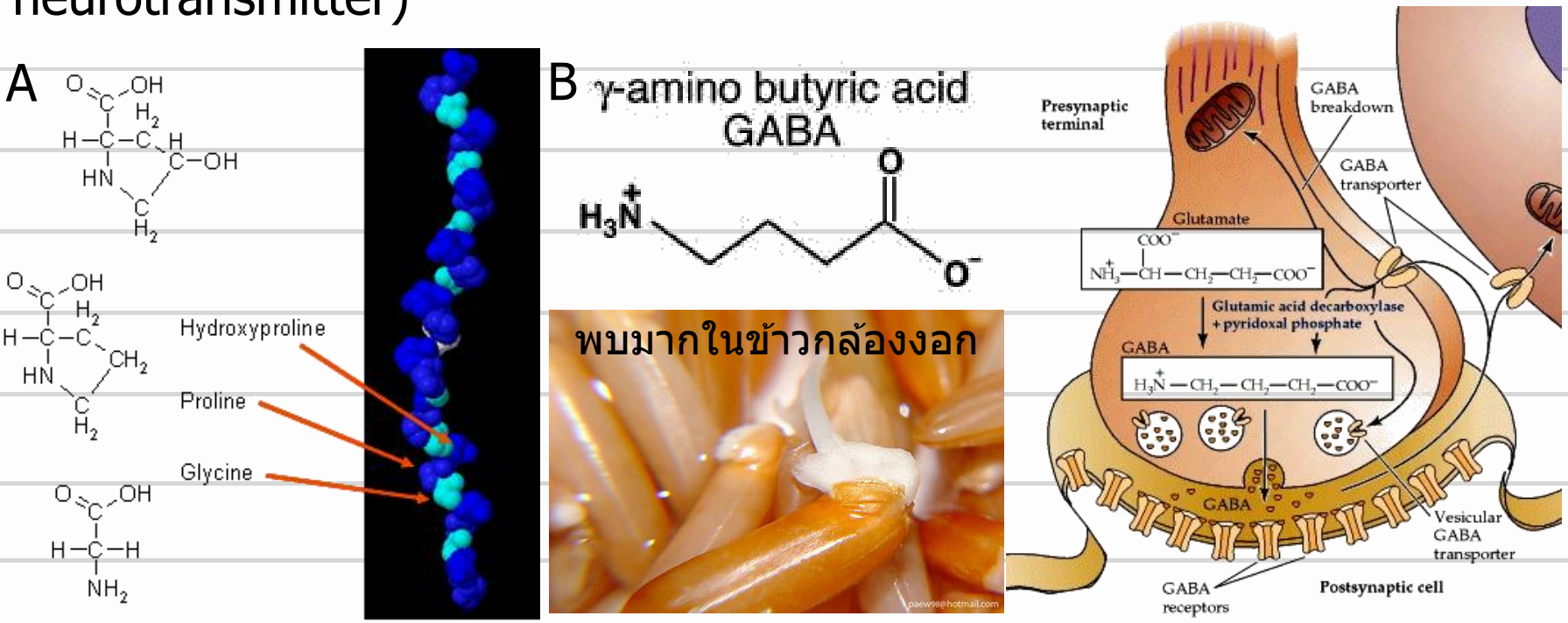
Acid : Side chain ติดประจุ -

Base : Side chain ติดประจุ -



กรดอะมิโน

นอกจากนี้ยังพบนอนโปรตีโนเจนิก อะมิโน แอซิด (nonproteinogenic amino acid) ซึ่งอาจเป็นองค์ประกอบของโปรตีนหรือไม่ก็ได้ เช่น ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) และแกมมา-อะมิโนบิวไทริก แอซิด (γ-amino butyric acid; GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อกระแสประสาทแบบยับยั้ง (inhibitory neurotransmitter)



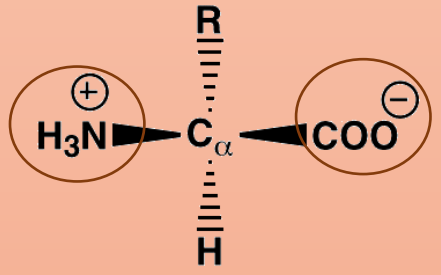
รูป 2 โครงสร้างของไฮดรอกซีโพรลีน (A) และแกมมา-อะมิโน บิวไทริก แอซิด (B)

ที่มา : https:/.../Collagen+-+B-+rgam, www.getnutri.com/gaba.html, www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=n...

กรดอะมิโน

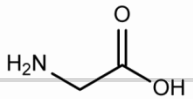
แบบฝึกหัด 1: โครงสร้างกรดอะมิโน

กาเครื่องหมาย ☑ หลังโครงสร้างที่เป็นกรดอะมิโน ☒ หลังโครงสร้างที่ไม่เป็นกรดอะมิโน และระบุชนิดของกรดอะมิโน (α, β, หรือ γ) ด้วย

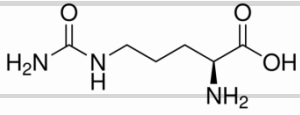


ถ้ามี NH_3^+ และ COO^- เป็นกรดอะมิโน

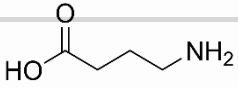
NH_3^+ และ COO^- จับกับ C_α เป็น α–amino acid



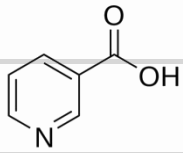
☑ α-Amino acid



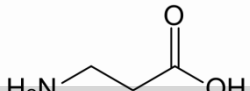
☑ α-Amino acid



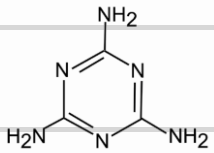
☑ γ-Amino acid



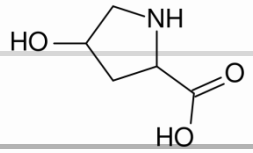
☒ –



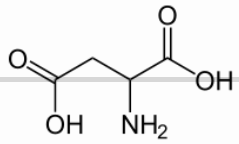
☑ β-Amino acid



☒ –



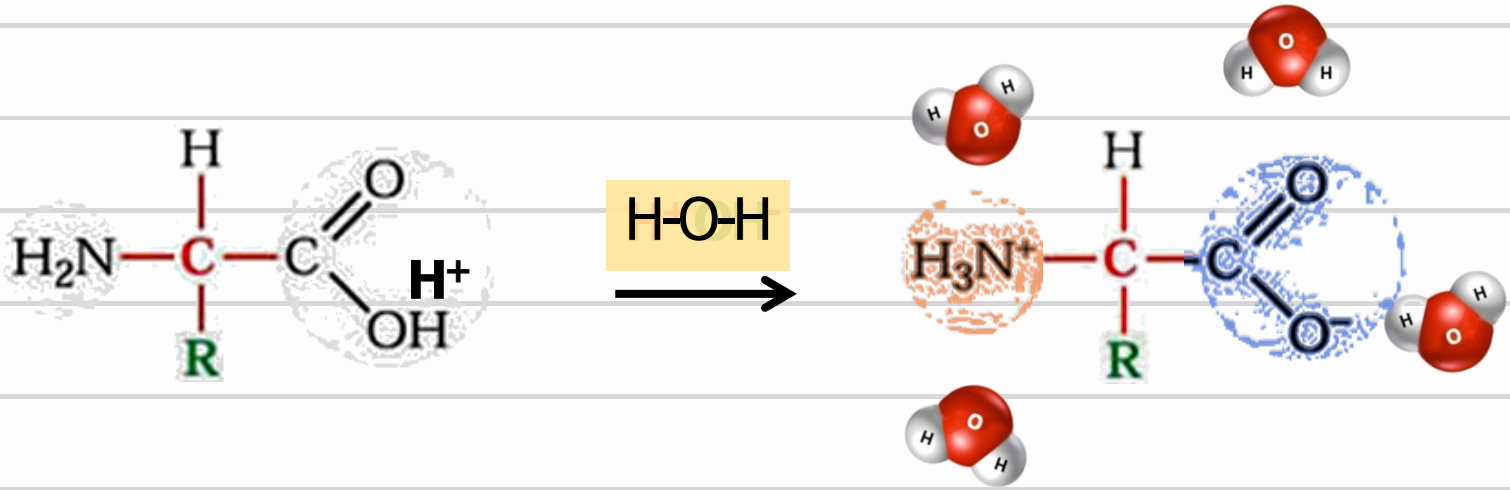
☑ α-Amino acid



☑ α-Amino acid

คุณสมบัติของกรดอะมิโน

1. ความสามารถในการละลาย (Solubility) เมื่อพิจารณาโครงสร้าง โดยรวมจะเห็นว่ากรดอะมิโนละลายน้ำได้ แล้วเกิดเป็น zwitterion หรือ dipolar ion โดย



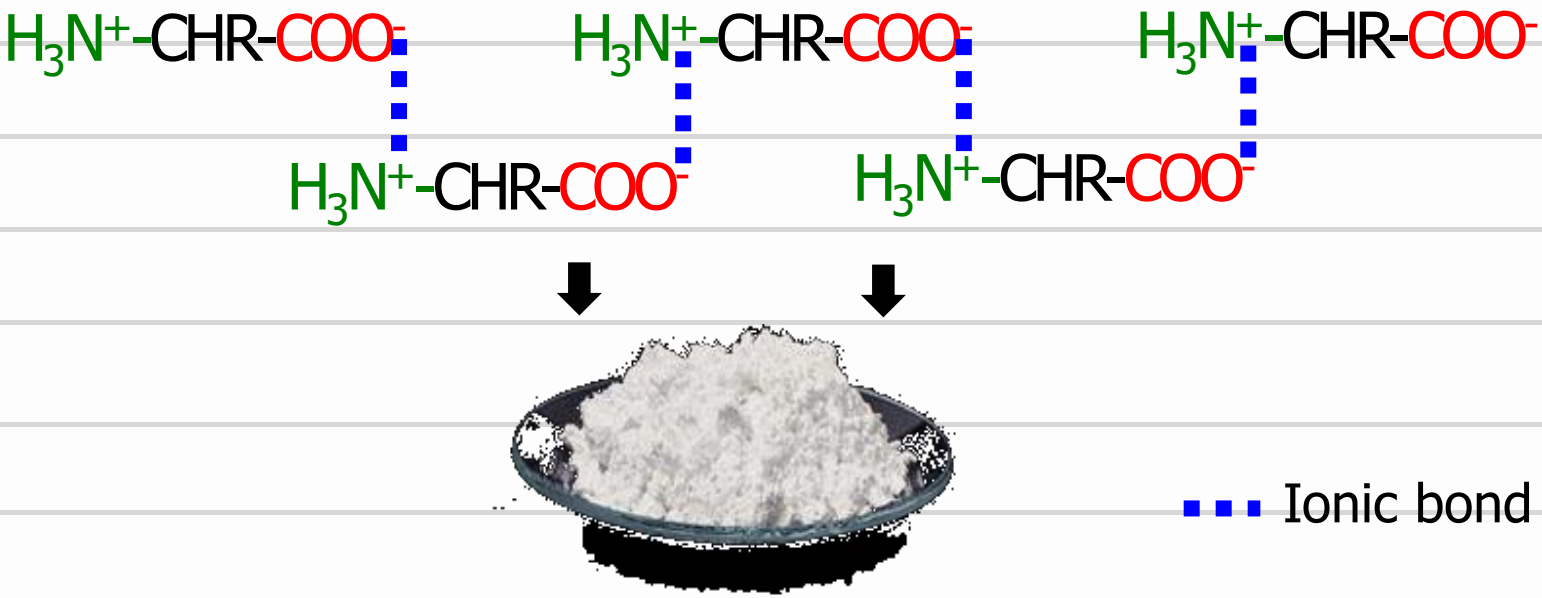
$-NH_2$ เปลี่ยนเป็น $-NH_3^+$ -COOH เปลี่ยนเป็น $-COO^-$

รูป 3 กรดอะมิโนละลายน้ำแล้วเปลี่ยนไปอยู่ในรูป zwitterion ที่มีน้ำล้อมรอบได้ดี

ดัดแปลงจาก : http://pruebabqexp.hostzi.com/EstructPROT.html

คุณสมบัติของกรดอะมิโน

2. จุดหลอมเหลว (Melting point, T_m) พบว่าผลึกของกรดอะมิโนที่ตกจากสภาพ zwitterion ที่ pH เป็นกลางจะมี จุดหลอมเหลวสูงกว่า 200 °C เพราะโมเลกุลยึดกันด้วยพันธะไอออนิก (ionic bond) การจะทำลายพันธะนี้ต้องใช้อุณหภูมิสูง

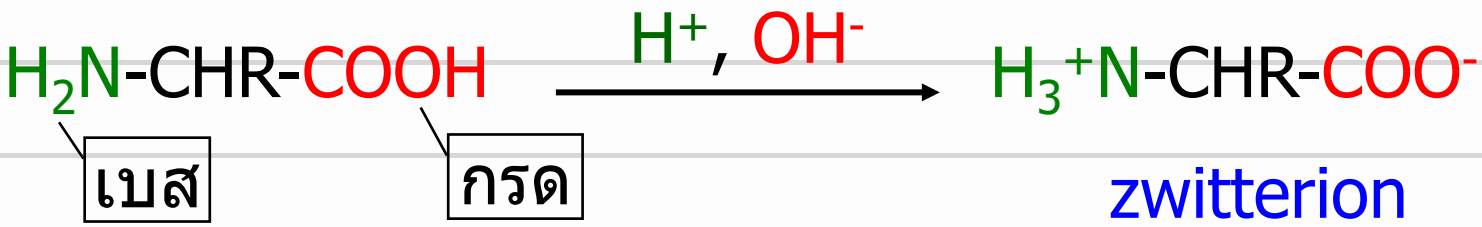


รูป 4 การจับกันด้วยพันธะไอออนิกของ zwitterion ทำให้กรดอะมิโนมีจุดหลอมเหลวสูง

ที่มา: http://www.chemicalsuppliersdelhi.com/glycine-powder-2039171.html

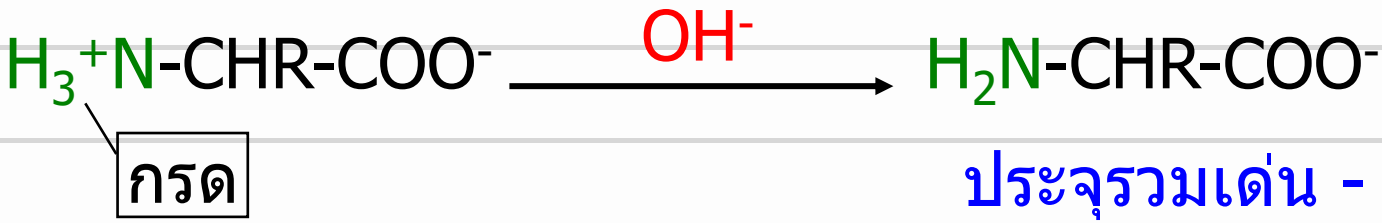
คุณสมบัติของกรดอะมิโน

3. ความเป็นกรดเบส (Acid-base properties) เมื่อละลายน้ำหมู่ –COOH และหมู่ $–NH_2$ ของกรดอะมิโนจะแสดงความเป็นกรดและเบส แล้วเปลี่ยนไปอยู่ในรูป zwitterion ซึ่งเป็นกลางทางไฟฟ้า (ประจุรวมเป็น 0) ดังสมการ



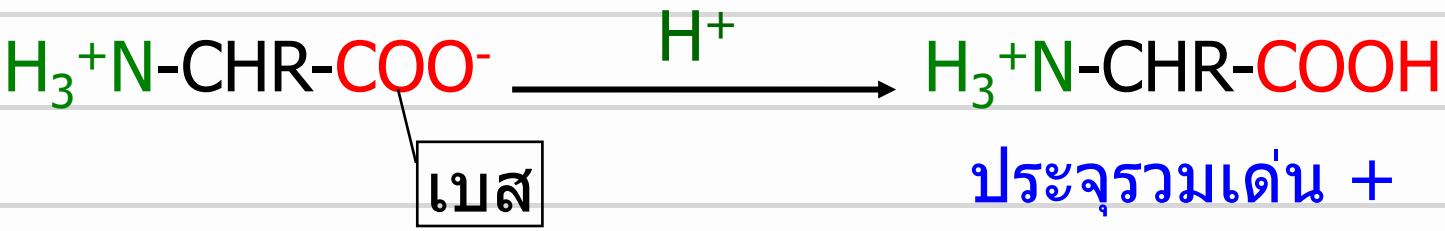
zwitterion ยังสามารถแสดงความเป็นกรด-เบสได้อีกดังนี้

แสดงความเป็นกรด หมู่ NH_3^+ จะทำหน้าที่นี้โดยแตกตัวให้ H^+

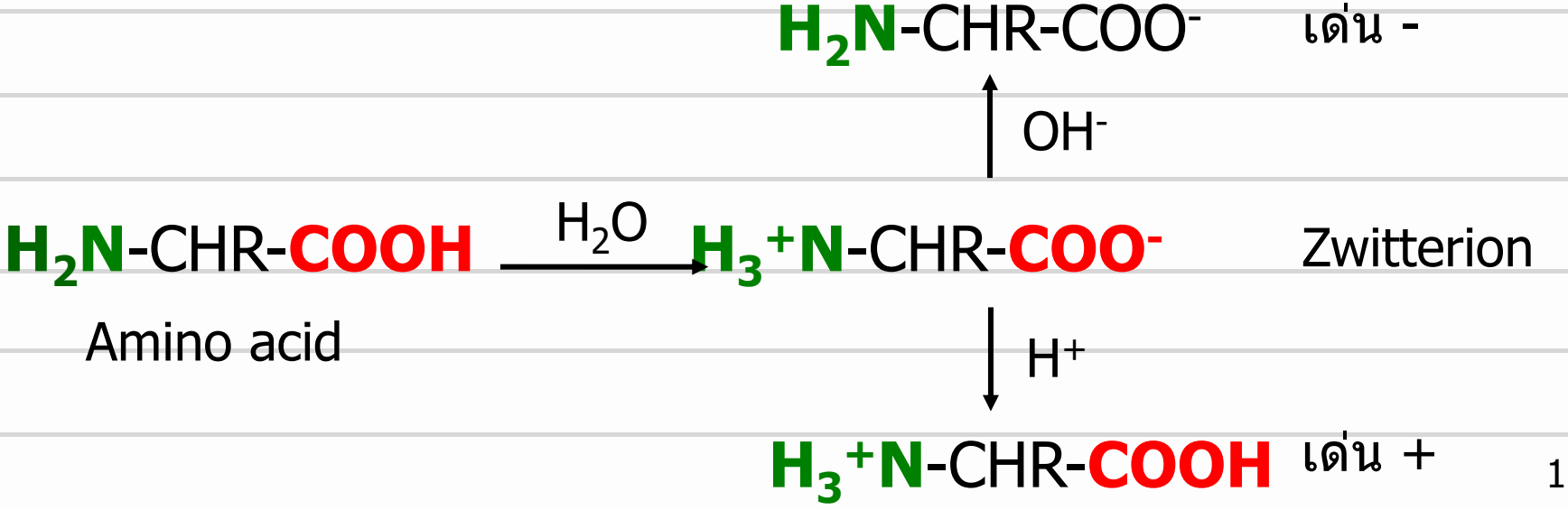


คุณสมบัติของกรดอะมิโน

แสดงความเป็นเบส หมู่ COO^- จะทำหน้าที่นี้โดยรับ H^+



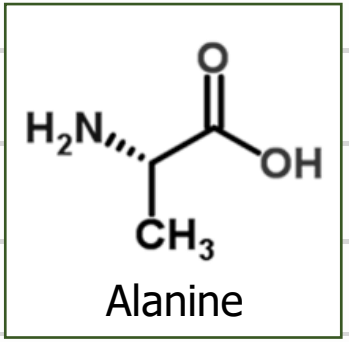
ซึ่งอาจสรุปการแตกตัวแสดงความเป็นกรด-เบสทุกขั้นตอนได้ดังนี้



คุณสมบัติของกรดอะมิโน

แบบฝึกหัด 2: ประจุและการแตกตัวของกรดอะมิโน

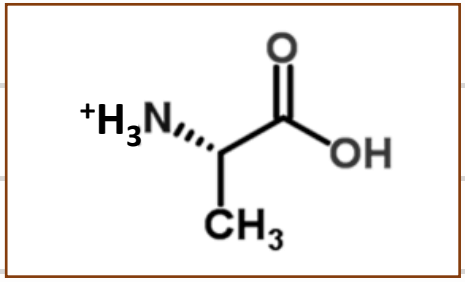
กำหนดโครงสร้าง alanine ดังแสดง เมื่อละลายในน้ำวัด pH ได้ 6.2



Alanine

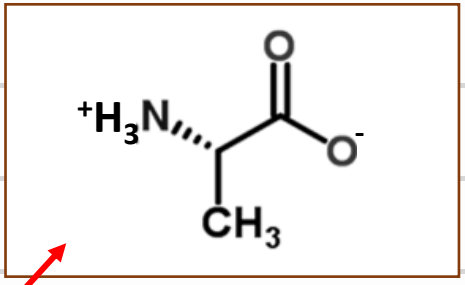
1. วาดโครงสร้าง alanine ที่ pH 6.2
2. ถ้าปรับ pH ของสารละลายเป็น 1 และ 10 วาดโครงสร้าง alanine ที่ pH ดังกล่าว

pH = 1



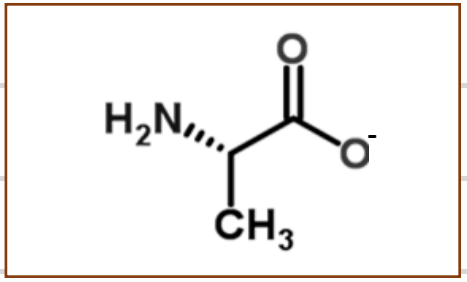
ประจุเด่น..... บวก

pH = 6.2



ประจุ..... เป็นศูนย์

pH = 10

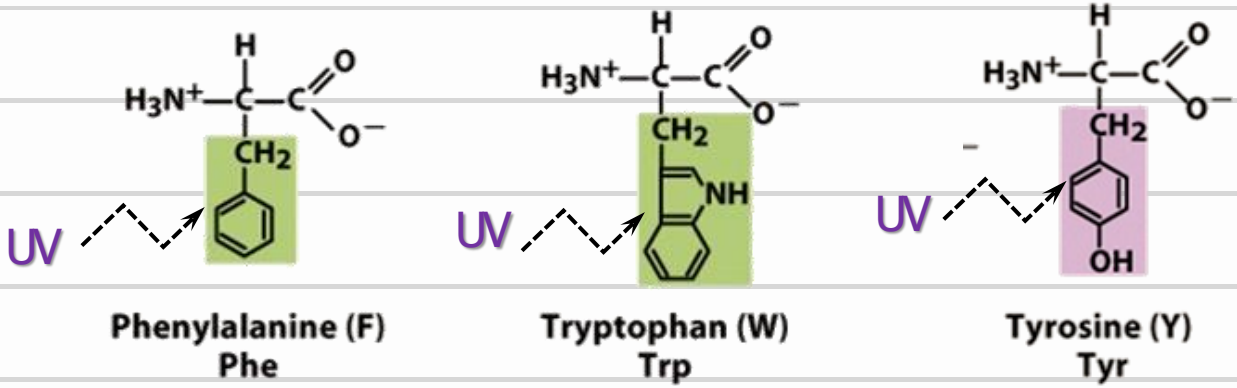


ประจุเด่น..... ลบ

3. โครงสร้างใดคือ zwitterion ของกรดอะมิโน alanine (ชี้ที่โครงสร้างเลย)

คุณสมบัติของกรดอะมิโน

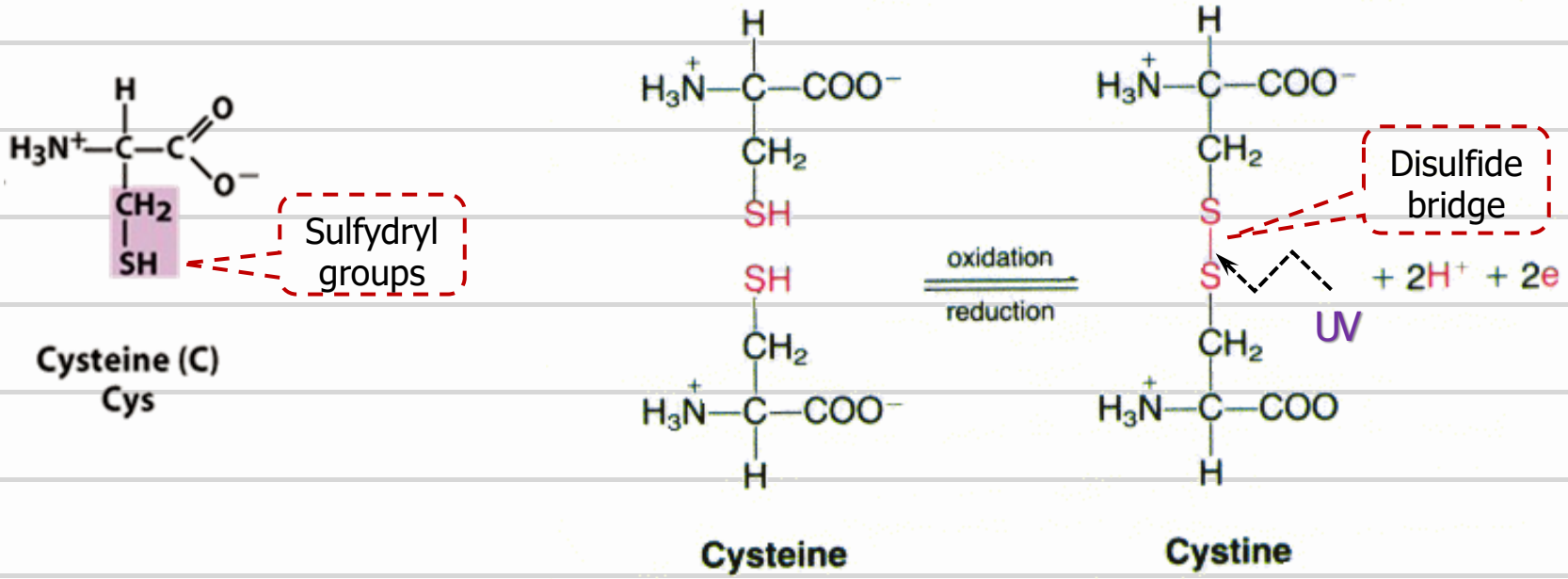
4. การดูดกลืนแสง (Optical density) มีกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ phenylalanine tryptophan และ tyrosine ที่สามารถดูดกลืนรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 280 nm ได้ เพราะมี side chain R ที่เป็น aromatic ring



รูป 5 แสดง side chain R ที่เป็น aromatic ring ของกรดอะมิโน 3 ชนิด

คุณสมบัติของกรดอะมิโน

นอกจากนี้กรดอะมิโน cysteine 2 โมเลกุล สามารถเกิดพันธะกันแล้วได้กรดอะมิโน cystine ที่สามารถดูดกลืนรังสี UV ที่ 240 nm ได้ โดยตำแหน่งที่ดูดกลืนแสงคือ disulfide bridge

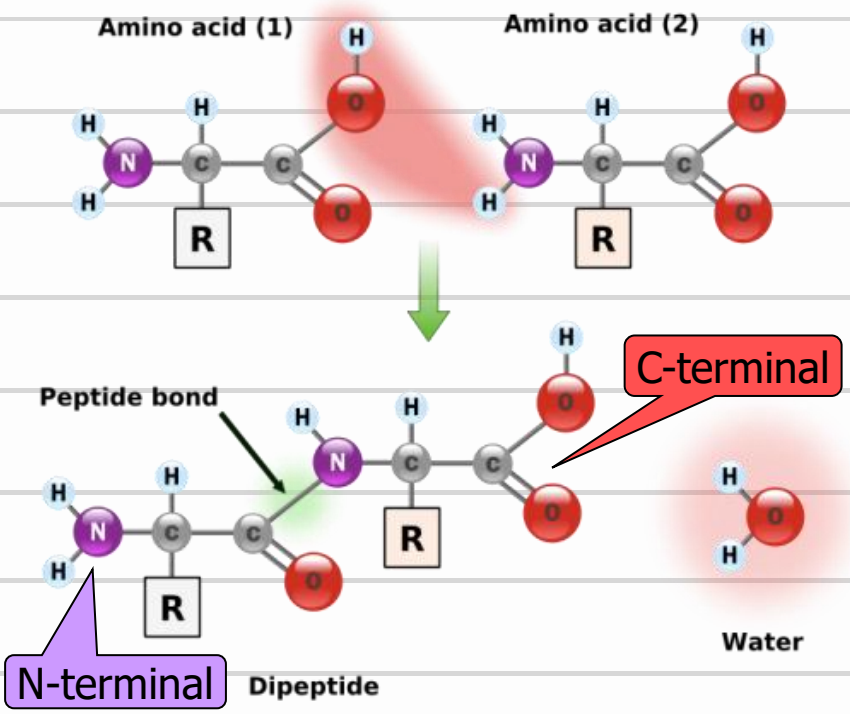


รูป 6 พันธะไดซัลไฟด์ที่สามารถดูดกลืนแสง UV ได้

ที่มา : www.cs.stedwards.edu

โครงสร้างของโปรตีน

โปรตีนเกิดจากกรดอะมิโนที่มาเชื่อมโยงกันเป็นสายยาวด้วย **พันธะเปปไทด์** (peptide bond) ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ โดยพันธะเปปไทด์เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่ carboxyl (-COOH) ของกรดอะมิโนโมเลกุลแรกกับหมู่ amino ($-NH_2$) ของกรดอะมิโนโมเลกุลถัดไป



Dipeptide : กรดอะมิโน 2 โมเลกุล

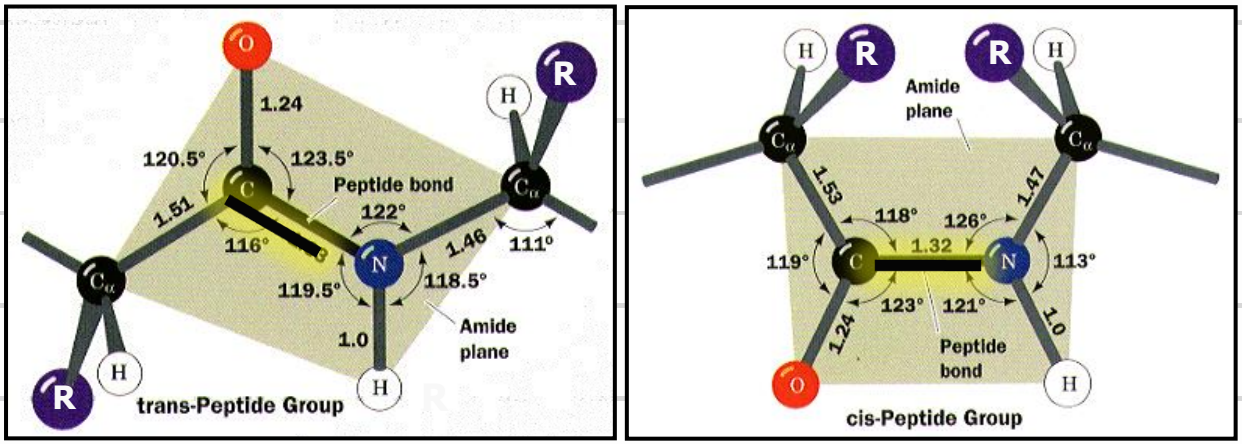
Oligopeptide : กรดอะมิโน ≤ 50

Polypeptide : กรดอะมิโน 100 ถึง 800

(Protein) (MW : 10,000-80,000)

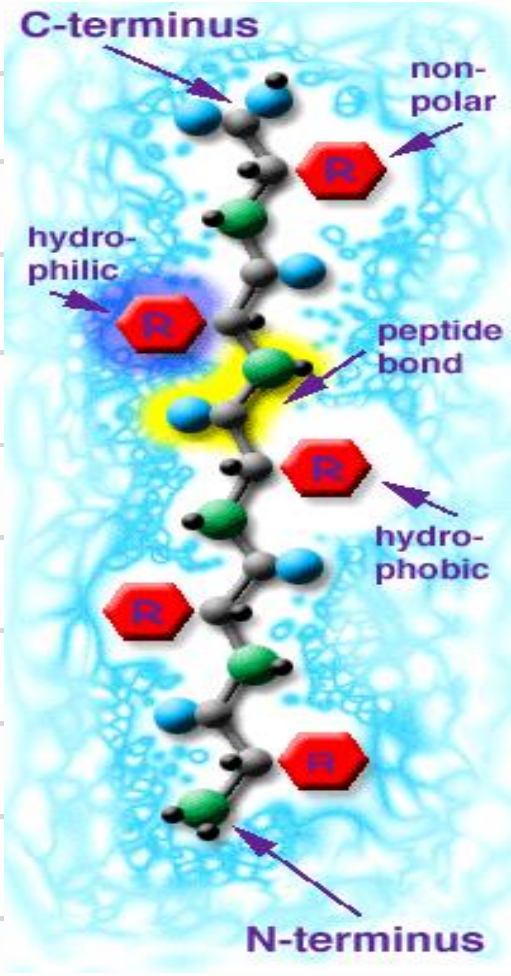
รูป 7 พันธะเปปไทด์ ที่มา :www.mcat45.com/content/protein

โครงสร้างของโปรตีน



รูป 8 โครงสร้างโปรตีน แสดงพันธะเปปไทด์แบบทรานส์ และแบบซีส

ที่มา : www.nd.edu, www.brooklyn.cuny.edu/.../C4b_proteinShape.html



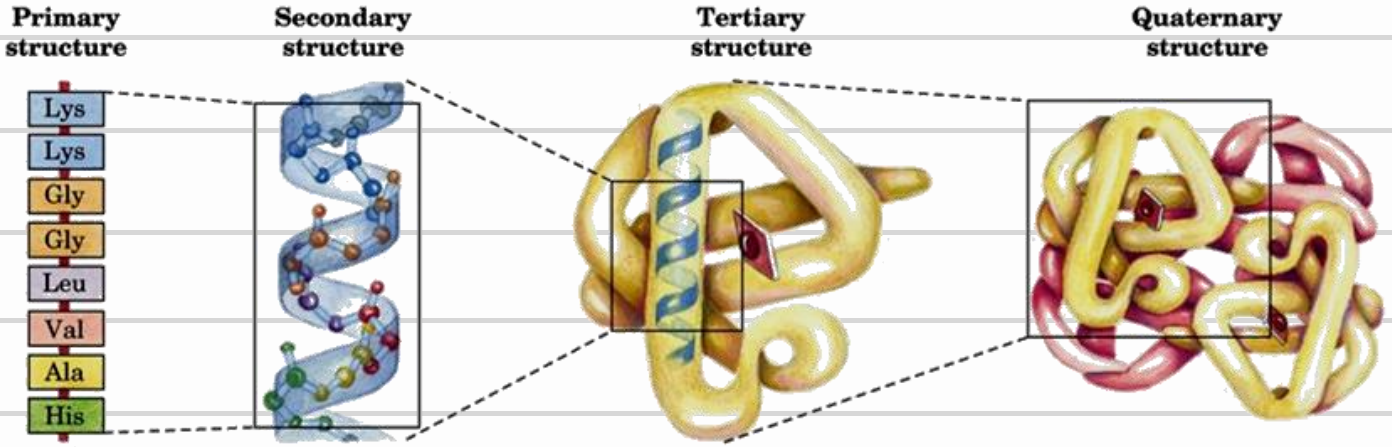
รูป 9 โครงสร้างโปรตีนแบบทรานส์ซึ่งกรดอะมิโนหันหมู่R สลับข้างกันตลอดเส้นโปรตีน

โครงสร้างของโปรตีน

โปรตีนแต่ละชนิดต่างกันในแง่**ลำดับ** (sequence) ของกรดอะมิโนและ**จำนวน**ของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ จากการใช้เทคนิค X-ray crystallography ศึกษาโครงสร้างของโปรตีน พบว่าโปรตีนมีโครงสร้างสลับซับซ้อนแต่แน่นอนจึงทำหน้าที่ทางชีวภาพของมันได้

แบ่งโครงสร้างซับซ้อนของโปรตีนเป็น 4 ระดับ

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure) ลำดับของกรดอะมิโน
2. โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) แรงระหว่างกรดอะมิโนข้างเคียง
3. โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) การขดเป็นก้อน 3 มิติของเปปไทด์
4. โครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure) การจัดเรียงของเปปไทด์หลายโมเลกุล



รูป 10โครงสร้างสลับซับซ้อนทั้ง 4 ระดับของโปรตีน

โครงสร้างของโปรตีน

1. โครงสร้างปฐมภูมิ เป็นโครงสร้างระดับแรก พิจารณาว่าโปรตีนแต่ละชนิดมีลำดับกรดอะมิโนเป็นอย่างไร จาก N-terminal ถึง C-terminal

```
1.  Methionylalanylthreonylserylarginylglycylalanylserylarginylcysteinylproly-
2.  larginylaspartylisoleucylalanylasparaginylvalylmethionylglutaminylarginyl-
3.  leucylglutaminylaspartylglutamylglutaminylglutamylisoleucylvalylglutaminy-
4.  llysylarginylthreonylphenylalanylthreonyllysyltryptophylisoleucylasparagi-
5.  nylserylhistidylleucylalanyllysylarginyllysylprolylprolylmethionylvalylva-
6.  lylaspartylaspartylleucylphenylalanylglutamylaspartylmethionyllysylaspart-
7.  ylglycylvalyllysylleucylleucylalanylleucylleucylglutamylvalylleucylserylg-
8.  lycylglutaminyllysylleucylprolylcysteinylglutamylglutaminylglycylarginyla-
9.  rginylmethionyllysylarginylisoleucylhistidylalanylvalylalanylasparaginyli-
10. soleucylglycylthreonylalanylleucyllysylphenylalanylleucylglutamylglycylar-
11. ginyllysylisoleucyllysylleucylvalylasparaginylisoleucylasparaginylserylth-
12. reonylaspartylisoleucylalanylaspartylglycylarginylprolylserylisoleucylval-
13. ylleucylglycylleucylmethionyltryptophylthreonylisoleucylisoleucylleucylty-
14. rosylphenylalanylglutaminylisoleucylglutamylglutamylleucylthreonylserylas-
15. paginylleucylprolylglutaminylleucylglutaminylserylleucylserylserylseryl-
```

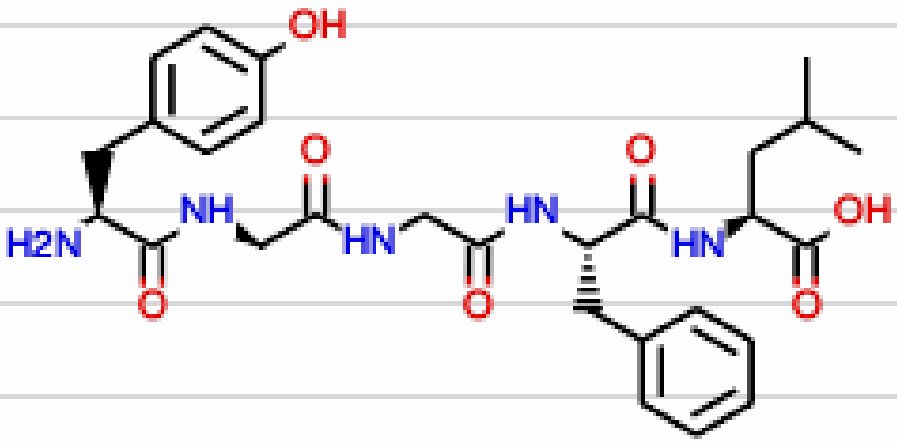
รูป 11 โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน Titin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่รู้จักกันในขณะนี้

https://gizmodo.com/the-longest-word-in-english-takes-3-5-hours-to-pronounc-5962401

โครงสร้างของโปรตีน

ตัวอย่าง โครงสร้างเปปไทด์ ชนิดของเปปไทด์ การเรียกชื่อ สัญลักษณ์ของเปปไทด์

ลิวซีนเอ็นเคฟฟาลิน (Leucine enkephalin)



รูป 12 โครงสร้างลิวซีนเอ็นเคฟฟาลิน

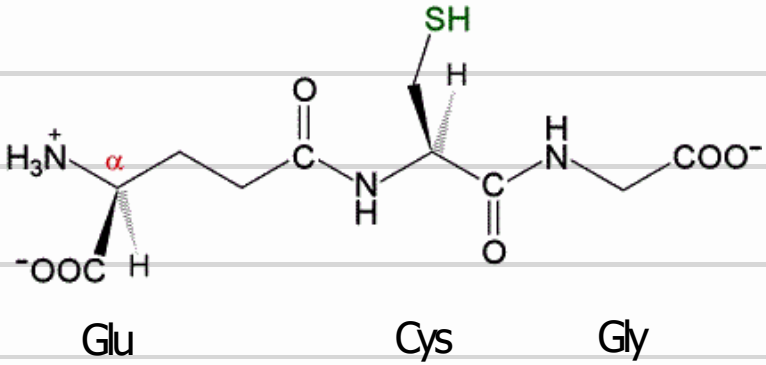
ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/DADLE

- ชนิดของเปปไทด์: เพนตะเปปไทด์
- การเรียกชื่อ: ไทโรซิลไกลซิลไกลซิลฟีนิลอะลานิลลิวซีน
- สัญลักษณ์: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
- สัญลักษณ์ (ย่อ): YGGFL
- หน้าที่: ยับยั้งความเจ็บปวด

https://me.me/i/serious-facts-emotional-tears-contain-leucine-enkephalin-a-natural-painkiller-14202824

โครงสร้างของโปรตีน

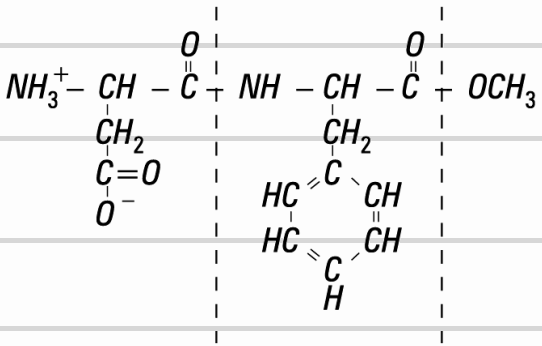
กลูตาไทโอน (Glutathione)



รูป 13 โครงสร้างกลูตาไทโอน

- ชนิดเปปไทด์: ไตรเปปไทด์
- ชื่อเปปไทด์: กลูตามิลซิสเตอิลกลัยซีน
- สัญลักษณ์: Glu
  └ Cys-Gly
- หน้าที่: สารต้านอนุมูลอิสระ

แอสพาร์เทม (Aspartame)



รูป 14 โครงสร้างแอสพาร์เทม

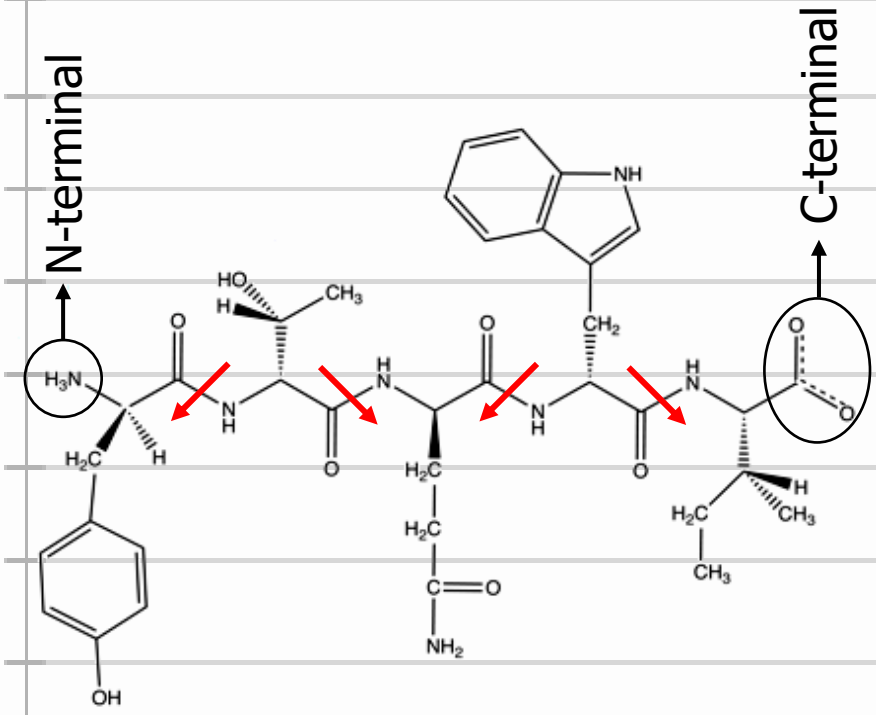
- ชนิดเปปไทด์: ไดเปปไทด์ (เมทิลเอสเทอร์)
- ชื่อเปปไทด์: แอสพาร์ติลฟีนิลอะลานีน เมทิลเอสเทอร์
- สัญลักษณ์: Asp-Phe-OMe
- หน้าที่: สารให้ความหวาน

ที่มา: http://f.ptcdn.info/329/018/000/1398696282-732837-o.jpg, http://www.coolswop.com/item/detail/188913

โครงสร้างของโปรตีน

แบบฝึกหัด 3: โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน (1)

โครงสร้าง peptide ต่อไปนี้ เติมคำลงในช่องว่าง



รูป 15 โครงสร้าง oligopeptide

➡ ชนิดของเปปไทด์ Pentapeptide

มีกรดอะมิโนกี่ 5 โมเลกุล

มีพันธะเปปไทด์กี่ 4 พันธะ

➡ ระบุตำแหน่ง N- และ C-terminal

➡ ชื่อทางเคมี

Tyrosylthreonylglutaminyl

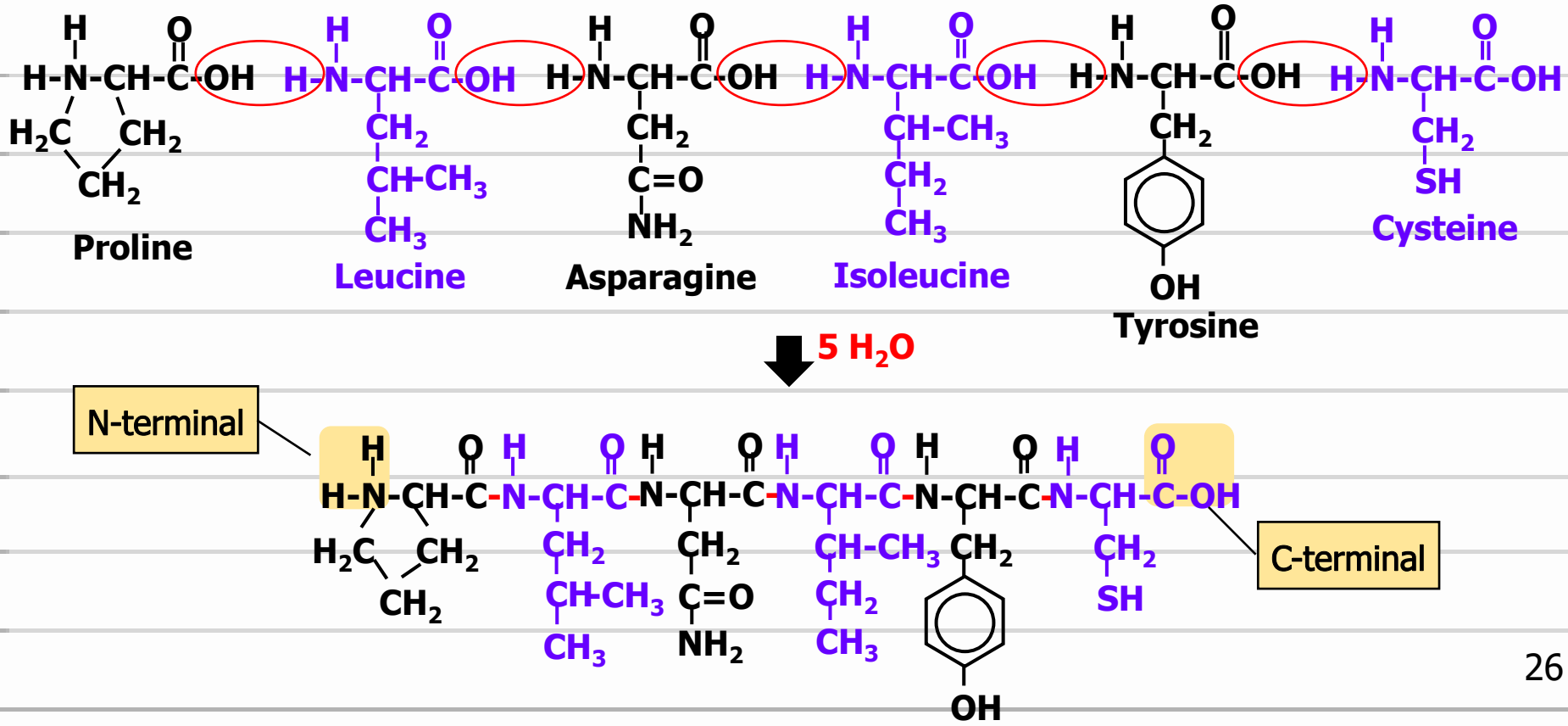
tryptophanylisoleucine

โครงสร้างของโปรตีน

แบบฝึกหัด 4: โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน (2)

เขียนโครงสร้างโมเลกุลของ hexapeptide ที่มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้

Pro-Leu-Asn-Ile-Tyr-Cys พร้อมทั้งชี้ให้เห็นพันธะเปปไทด์ N- และ C-terminal



โครงสร้างของโปรตีน

แบบฝึกหัด 5: โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน (3)

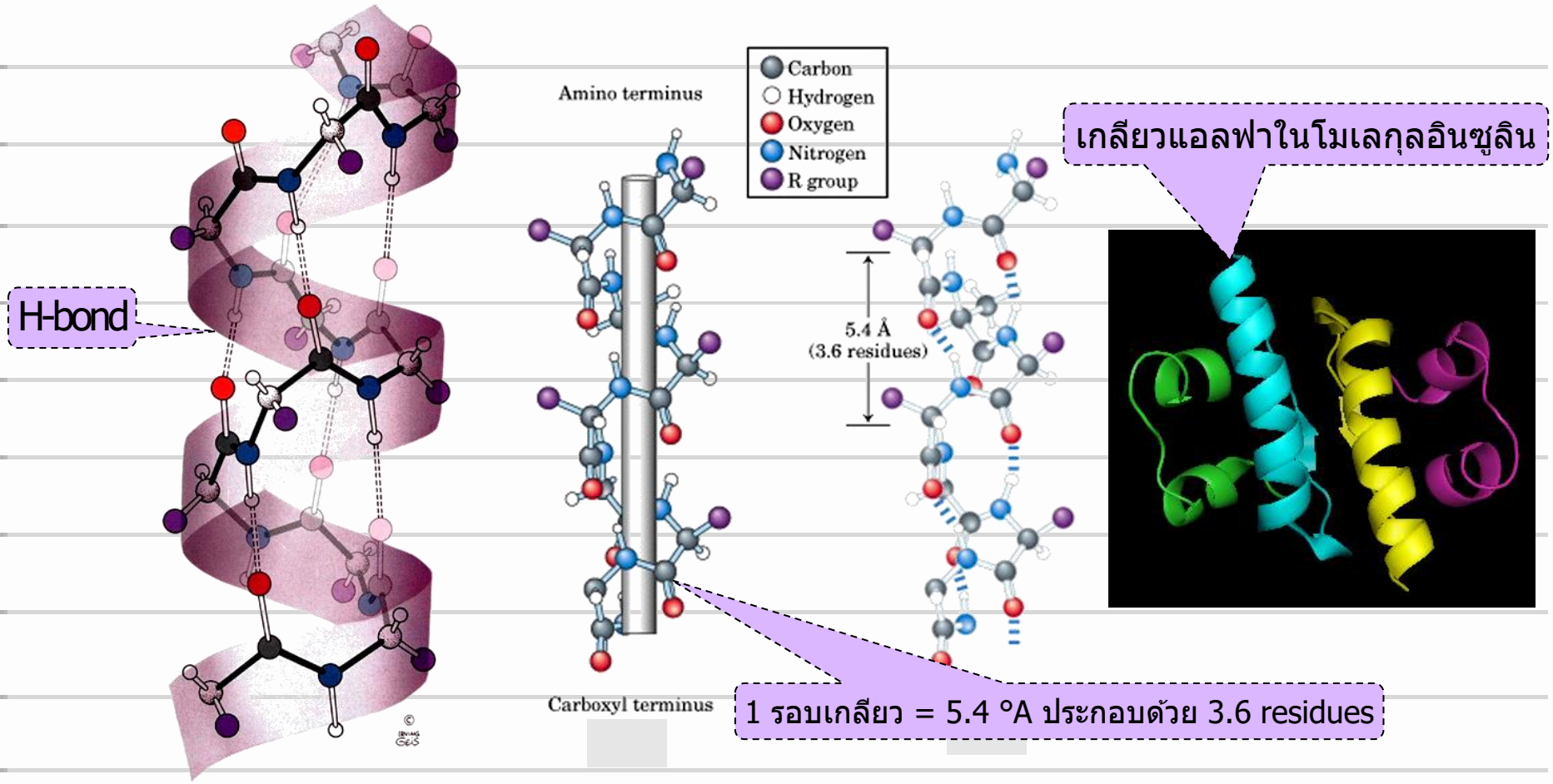
เขียนโครงสร้างที่สมบูรณ์ของ Oxytocin ซึ่งเป็น nonapeptide ที่มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Gly-Leu-Pro-Cys-Asn-Gln-Ile-Tyr-Cys
ชี้ให้เห็นพันธะเปปไทด์ N- และ C-terminal ด้วย

โครงสร้างของโปรตีน

2. โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) โครงสร้างระดับนี้พิจารณาว่าสาย polypeptide มีการจัดโครงรูปเป็นอย่างไร ปัจจัยที่มีส่วนทำให้เกิดโครงสร้างระดับนี้คือ H-bond ภายใน หรือระหว่างสาย polypeptide

เกลียวแอลฟา (α-Helix) เกิดจาก H-bond ระหว่างหมู่ –COOH กับหมู่ $-NH_2$ ที่อยู่ไกลออกไปบน polypeptide สายเดียวกัน ทำให้เกิดลักษณะแท่งของโปรตีน

โครงสร้างของโปรตีน



รูป 16 โครงสร้างแบบเกลียวแอลฟาของโปรตีน

ที่มา :courses.cm.utexas.edu/.../ch339k/overheads-1.htm, www.che.wsu.edu/~ntracy/work.htm

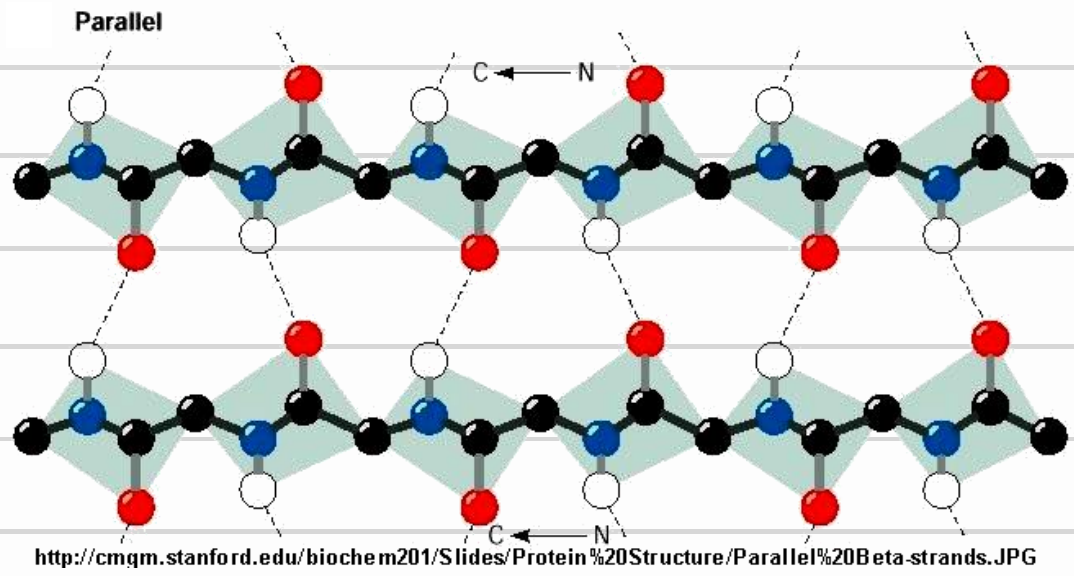
โครงสร้างของโปรตีน

แผ่นพลีทเบต้า (β-Pleated sheet) เกิดจาก H-bond ระหว่างหมู่ –COOH กับหมู่ $–NH_2$ บน polypeptide ต่างสายกัน ทำให้ polypeptide หลายสายมาเรียงขนานกันเกิดแผ่นที่พับเป็นคลื่นของโปรตีน แผ่นพลีทเบต้ามี 2 แบบ

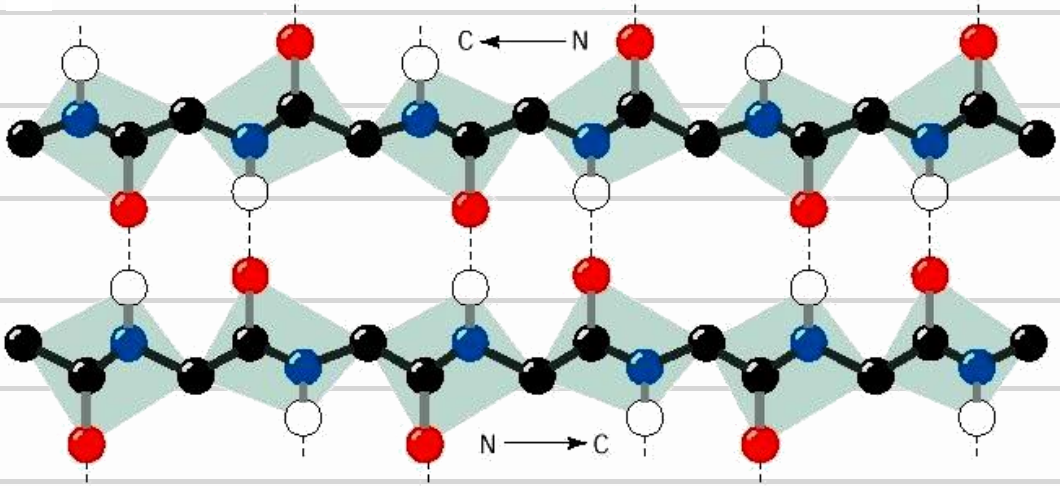
Parallel β-pleated sheet สาย polypeptide ทั้งหมดเรียงขนานโดยหัน N-terminal และ C-terminal ไปทางเดียวกัน

Anti-parallel β-pleated sheet สาย polypeptide ทั้งหมดเรียงขนานโดยหัน N-terminal และ C-terminal สลับกัน

โครงสร้างของโปรตีน



http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Slides/Protein%20Structure/Parallel%20Beta-strands.JPG



http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Slides/Protein%20Structure/Anti_parallel%20Beta-Strands.JPG

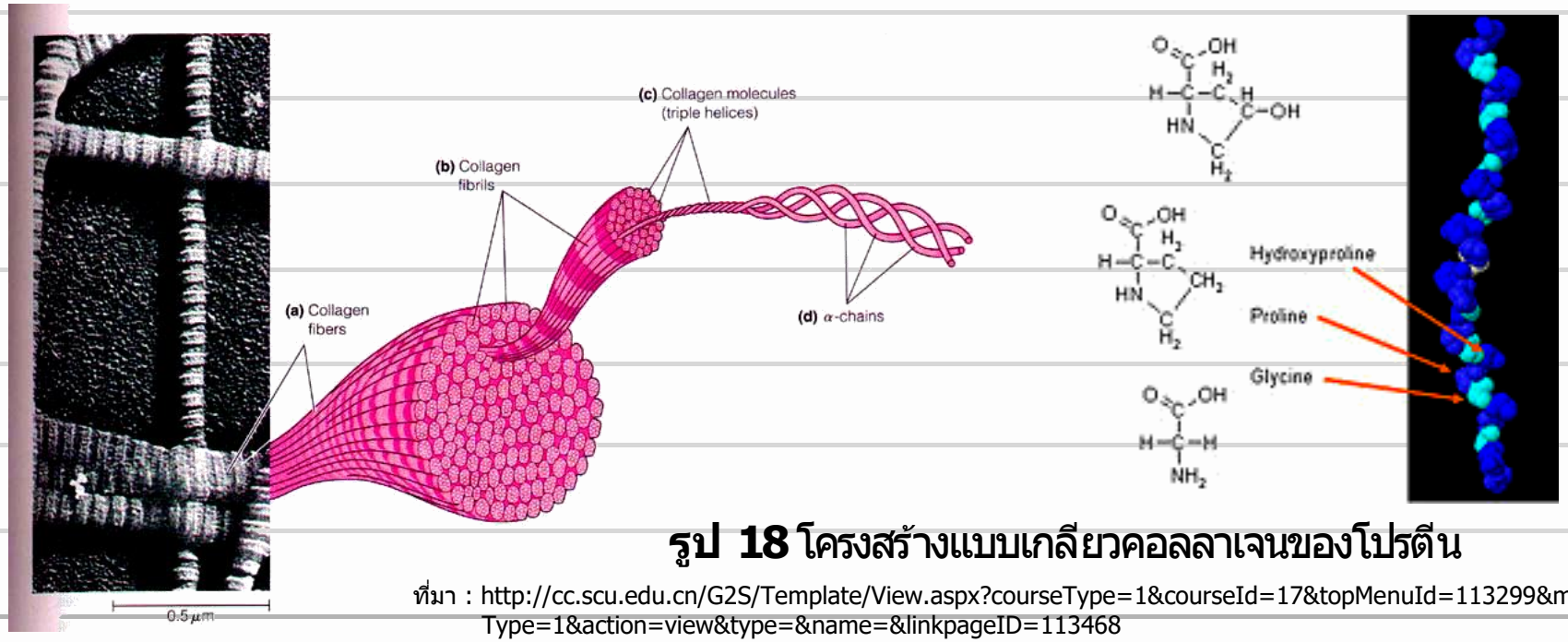
แผ่นพลีทเบต้าในโมเลกุลโปรตีน

โครงสร้างแบบ anti parallel ให้ความแข็งแรงมากกว่ากว่า เพราะ H-bond เป็นระเบียบกว่า

รูป 17 โครงสร้างแบบแผ่นพลีทเบต้าของโปรตีน

โครงสร้างของโปรตีน

เกลียวคอลลาเจน (Collagen helix) เกิดจากสาย polypeptide 3 สาย พันกันเป็นเกลียวเวียนขวาแน่นคล้ายเชือก โดยแต่ละสายเป็นเกลียวแอลฟาอยู่ก่อน โครงสร้างแบบนี้ทำให้เกิดโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นยาว เหนียว ยืด-หดได้



รูป 18 โครงสร้างแบบเกลียวคอลลาเจนของโปรตีน

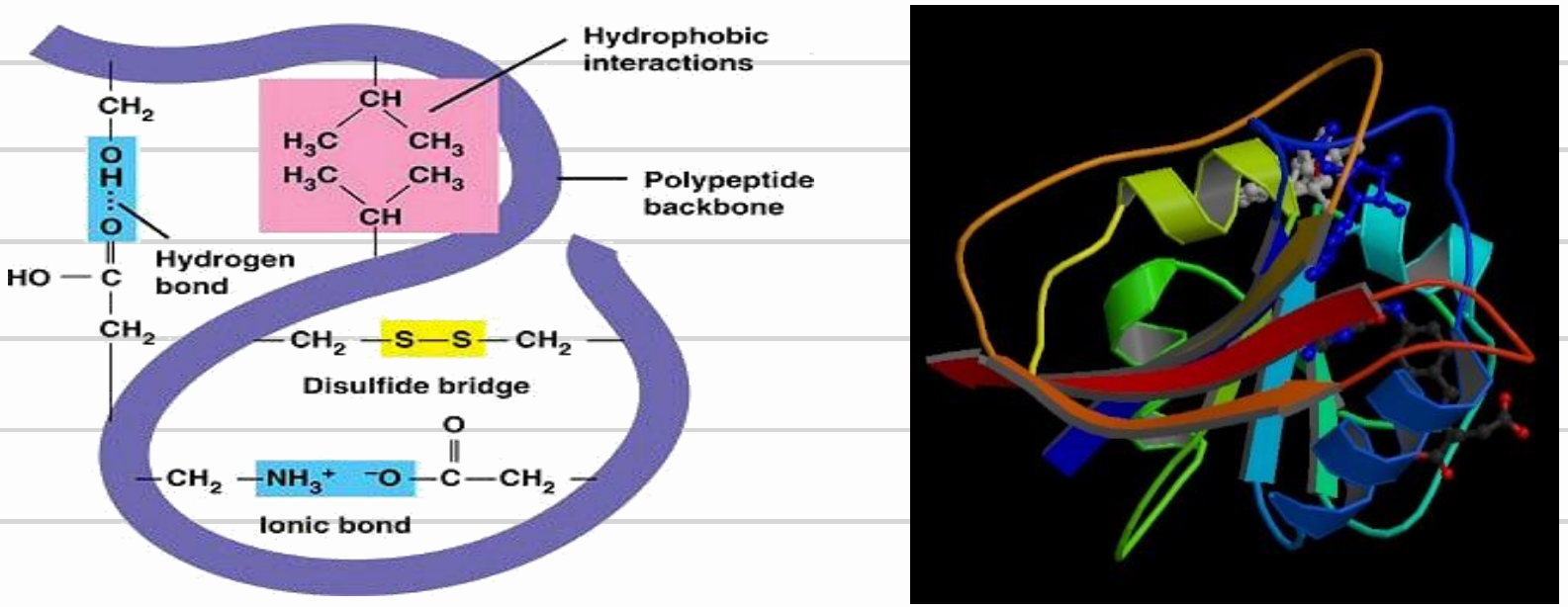
ที่มา : http://cc.scu.edu.cn/G2S/Template/View.aspx?courseType=1&courseId=17&topMenuId=113299&menuType=1&action=view&type=&name=&linkpageID=113468

โครงสร้างของโปรตีน

3. โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) เป็นโครงสร้างระดับที่พิจารณาว่าสาย polypeptide มีการขดหรือม้วนตัวทำให้ได้โครงรูปกลม ปัจจัยที่มีส่วนทำให้เกิดโครงสร้างระดับนี้คือ แรงระหว่าง side chain R โดยเฉพาะพันธะระหว่าง sulfydryl group ของกรดอะมิโน cysteine (disulfide bridge)

โครงสร้างระดับนี้ถูกทำลายได้โดยความร้อนซึ่งทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (denature) และไม่สามารถทำหน้าที่ทางชีวภาพได้

โครงสร้างของโปรตีน



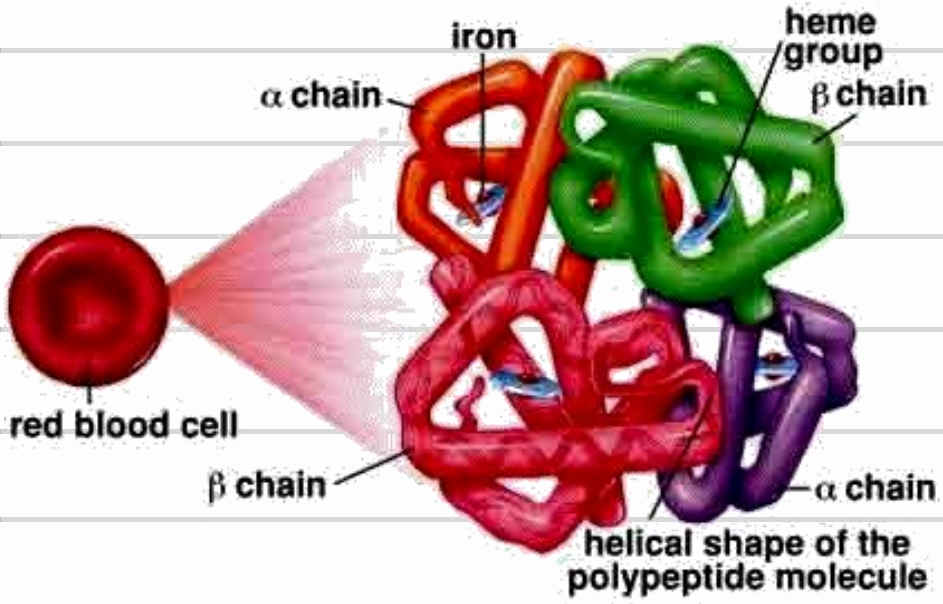
รูป 19 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน

ที่มา :kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/biology.html, www.chemguide.co.uk/.../proteinstruct.html

โครงสร้างระดับตติยภูมิสามารถถูกทำลายได้โดยความร้อน พันธะสำคัญที่แตกออก แล้วทำให้โปรตีนเสียรูปร่างใน 3 มิติ คือ disulfide bridge เรียกลักษณะนี้ว่าการเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ซึ่งโปตีนจะไม่สามารถทำหน้าที่ทางชีวภาพได้อีก

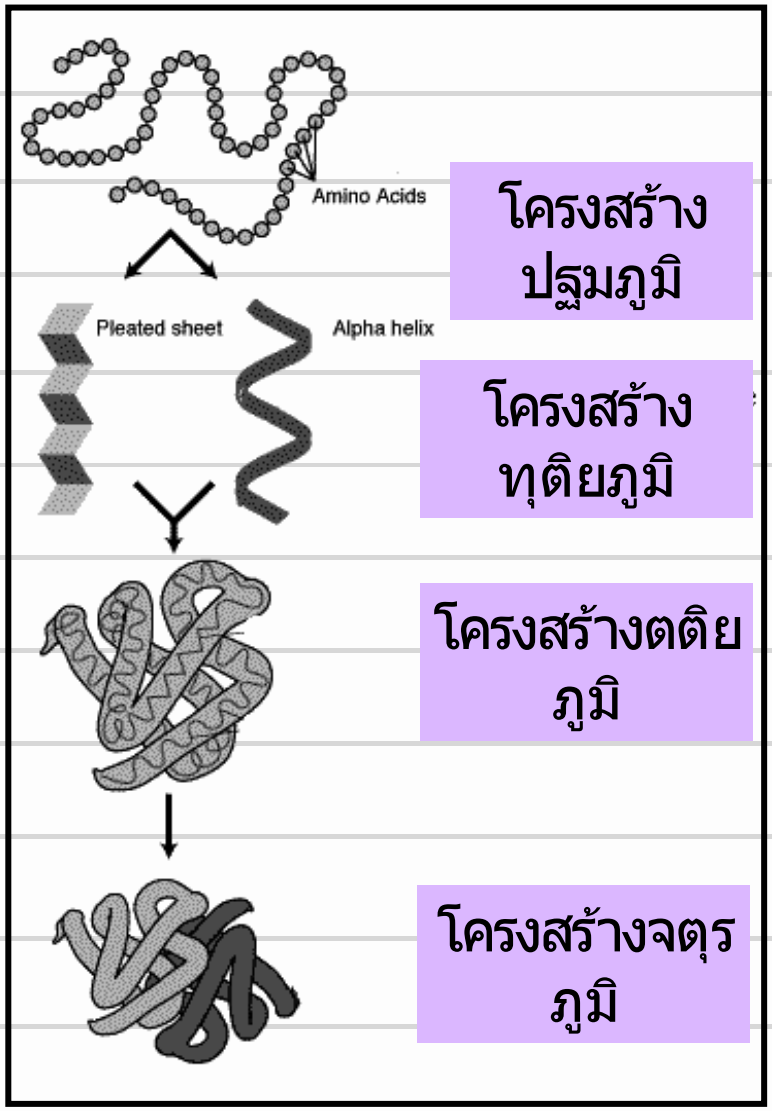
โครงสร้างของโปรตีน

4. โครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure) เป็นโครงสร้างระดับที่พิจารณา polypeptide หลายๆ ก้อนมาเกิดพันธะกัน เพื่อทำหน้าที่ทางชีวภาพ เรียกแต่ละก้อนว่า หน่วยย่อย (subunit)



รูป 20 โครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีน

ที่มา :www.bloodless.it/



รูป 21 โครงสร้างทั้ง 4 ระดับของโปรตีน

ที่มา :www.contexo.info/DNA_Basics/Protein_Structure.htm

โครงสร้างของโปรตีน

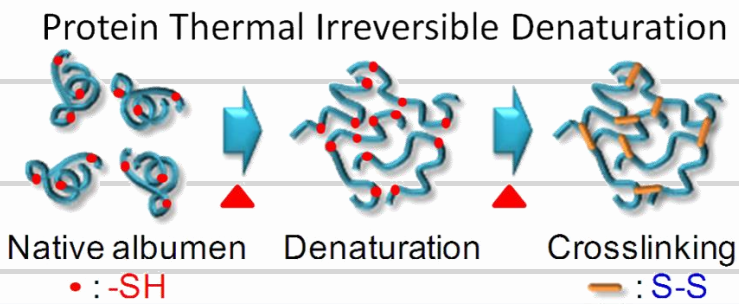
เมื่อโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ สิ่งที่เปลี่ยนแปลงคือ

- รูปร่างเปลี่ยน (เพราะโครงสร้างระดับ 4°, 3°, 2° ถูกทำลาย)
- สูญเสียหน้าที่ทางชีวภาพ

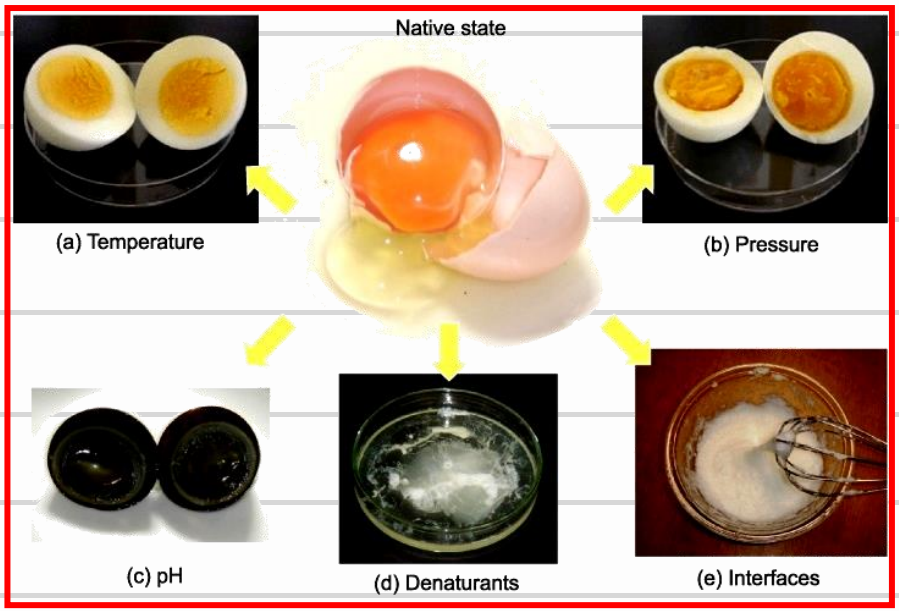
นอกจากความร้อน กรดแก่/เบสแก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ ความดัน หรือแม้กระทั่งแรงกลบางชนิด ก็สามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติได้

(a) ที่มา: http://spie.org/x86653.xml, http://ej.iop.org/images/0953-8984/24/50/503101/Full/cm427692f1_online.jpg

(b)



รูป 22 การเสียความสามารถในการละลายน้ำ (a) และการทำลาย disulfide bond (•) โดยความร้อน (▲) ของโปรตีน albumin

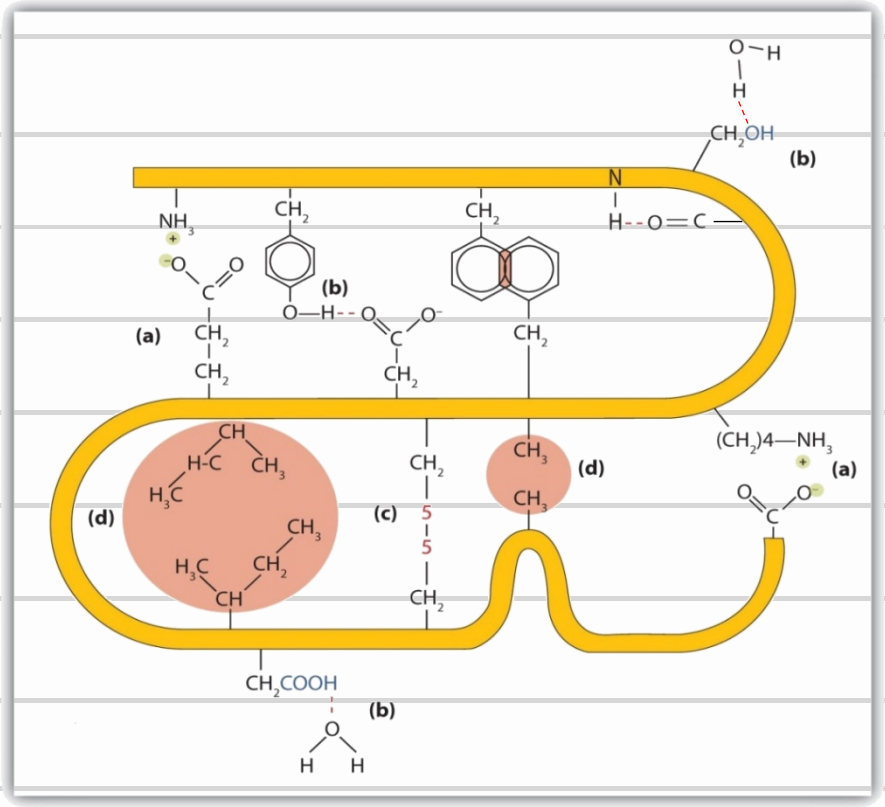


รูป 23 การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน albumin จากปัจจัยต่าง ๆ

โครงสร้างของโปรตีน

แบบฝึกหัด 6: โครงสร้าง 3D ของโปรตีน (1)

ระบุชนิดของพันธะระหว่าง side chain R ของโปรตีนก้อนกลม ต่อไปนี้



(a) ..... พันธะไอออนิก .....

(b) ..... พันธะไฮโดรเจน .....

(c) ..... พันธะไดซัลไฟด์ .....

(d) ..... แรงระหว่างหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ .....

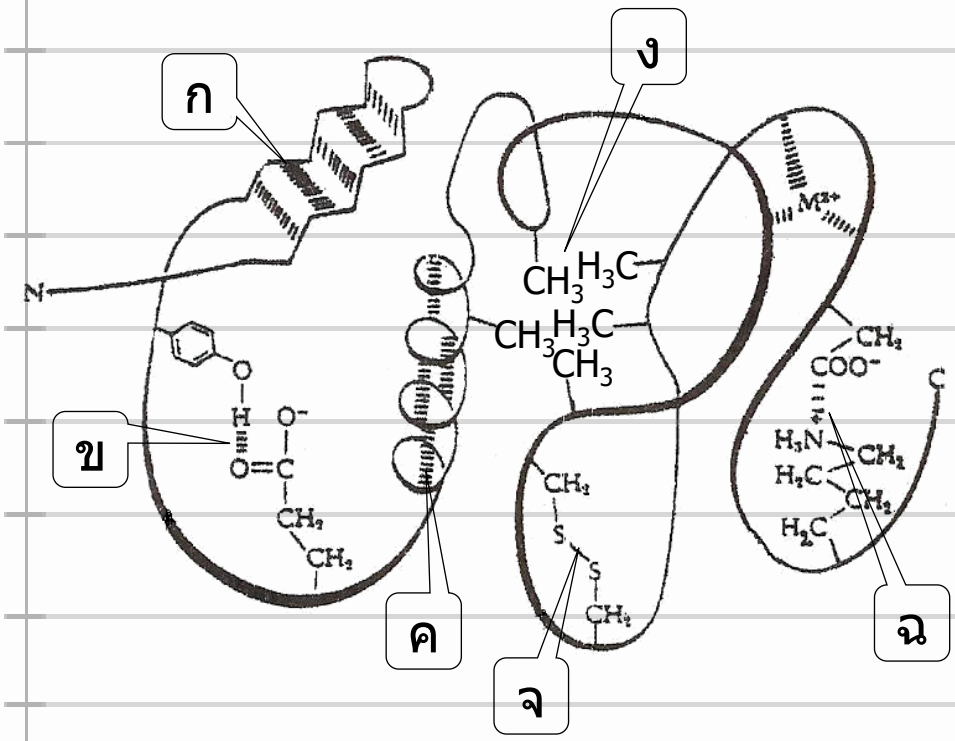
รูป 24 พันธะต่าง ๆ ในการเกิดโครงสร้างสามมิติของโปรตีน

ที่มา: http://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/s21-04-proteins.html

โครงสร้างของโปรตีน

แบบฝึกหัด 7: โครงสร้าง 3D ของโปรตีน (2)

ระบุชนิดพันธะเคมี และระดับโครงสร้างที่ตำแหน่ง ก.-ฉ. ของโปรตีนก้อนกลม ต่อไปนี้



	พันธะเคมี	ระดับโครงสร้าง
ตำแหน่ง ก.	พันธะไฮโดรเจน	ทุติยภูมิ
ตำแหน่ง ข.	พันธะไฮโดรเจน	ตติยภูมิ
ตำแหน่ง ค.	พันธะไฮโดรเจน	ทุติยภูมิ
ตำแหน่ง ง.	แรงระหว่างหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ	ตติยภูมิ
ตำแหน่ง จ.	พันธะไดซัลไฟด์	ตติยภูมิ
ตำแหน่ง ฉ.	พันธะไอออนิก	ตติยภูมิ

รูป 25 พันธะต่าง ๆ ในการเกิดโปรตีนก้อนกลม

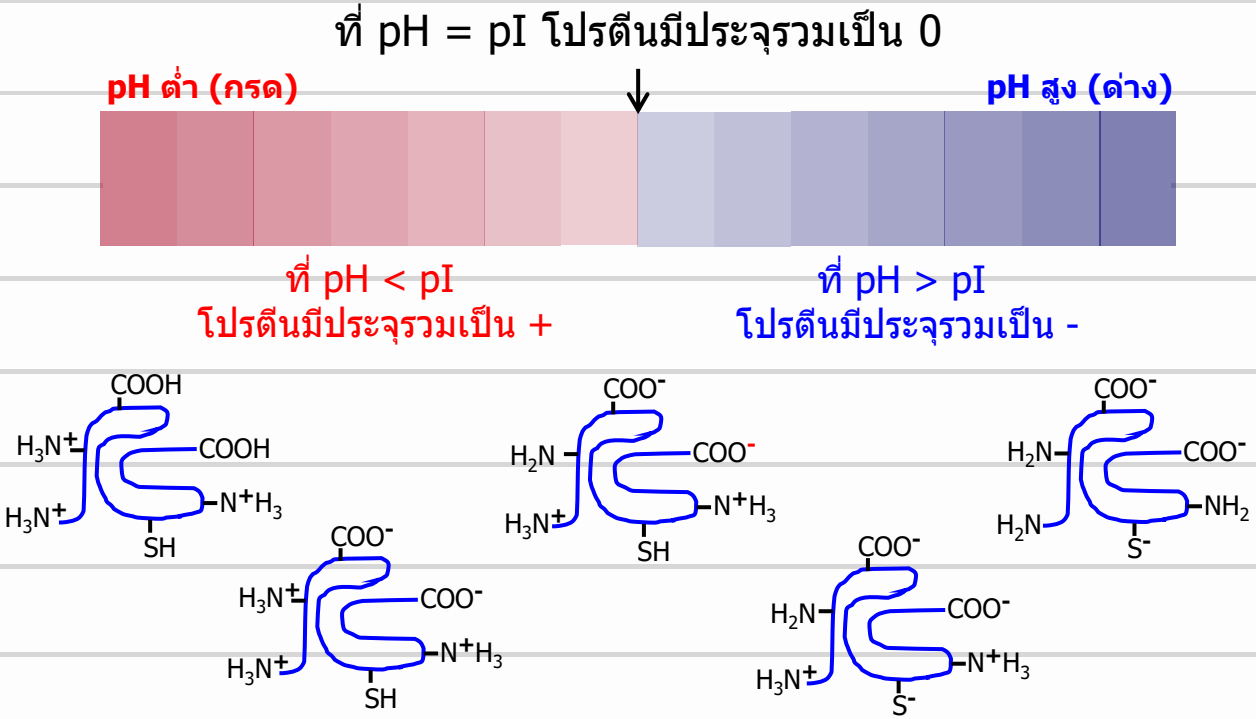
คุณสมบัติของโปรตีน

1. ประจุรวมของโปรตีนขึ้นกับ pH ของสารละลายที่โปรตีนละลายอยู่ โดย

ที่ pH < pI โปรตีนมีประจุรวมเป็น +

ที่ pH = pI โปรตีนมีประจุรวมเป็น 0

ที่ pH > pI โปรตีนมีประจุรวมเป็น -



รูป 26 ประจุสุทธิของโปรตีนซึ่งเป็นบวกเมื่อ pH ลดลง และเป็นลบเมื่อ pH เพิ่มขึ้น

ดัดแปลงจาก http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/CHEM240pub/L11-index.cfm

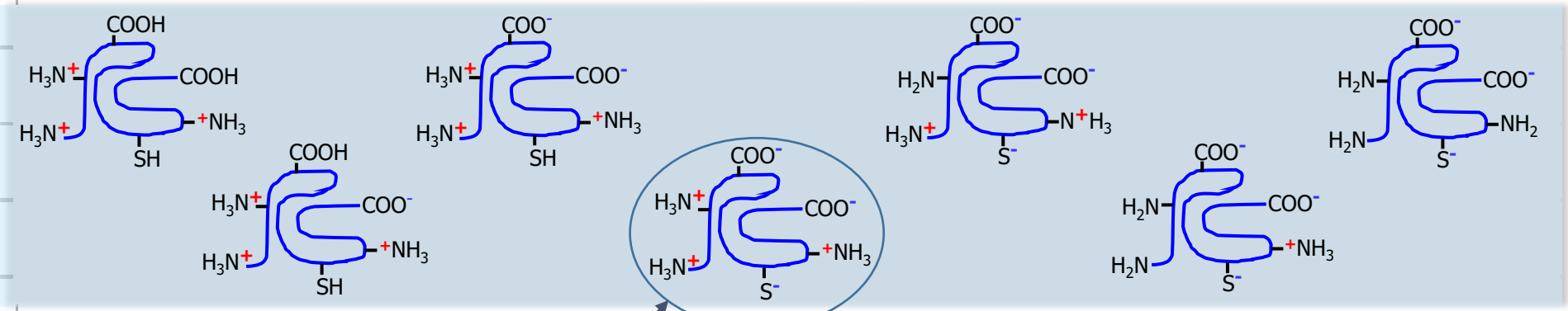
คุณสมบัติของโปรตีน

แบบฝึกหัด 8: ประจุของโปรตีน

โปรตีนโมเลกุลหนึ่งแตกตัวเป็นประจุจากค่า pH ต่ำไปยังค่า pH สูงดังรูปแบบต่อไปนี้

1. เติมสภาพประจุของโปรตีนที่ pH ต่างๆ

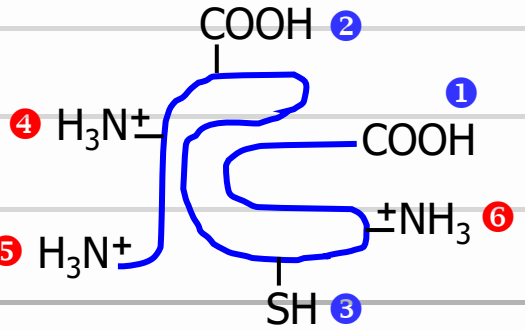
pH ต่ำ (กรด) ⟶ **pH กลาง** ⟶ **pH สูง (ด่าง)**



ประจุ +3 ประจุ +2 ประจุ +1 ประจุ 0 ประจุ -1 ประจุ -2 ประจุ -3

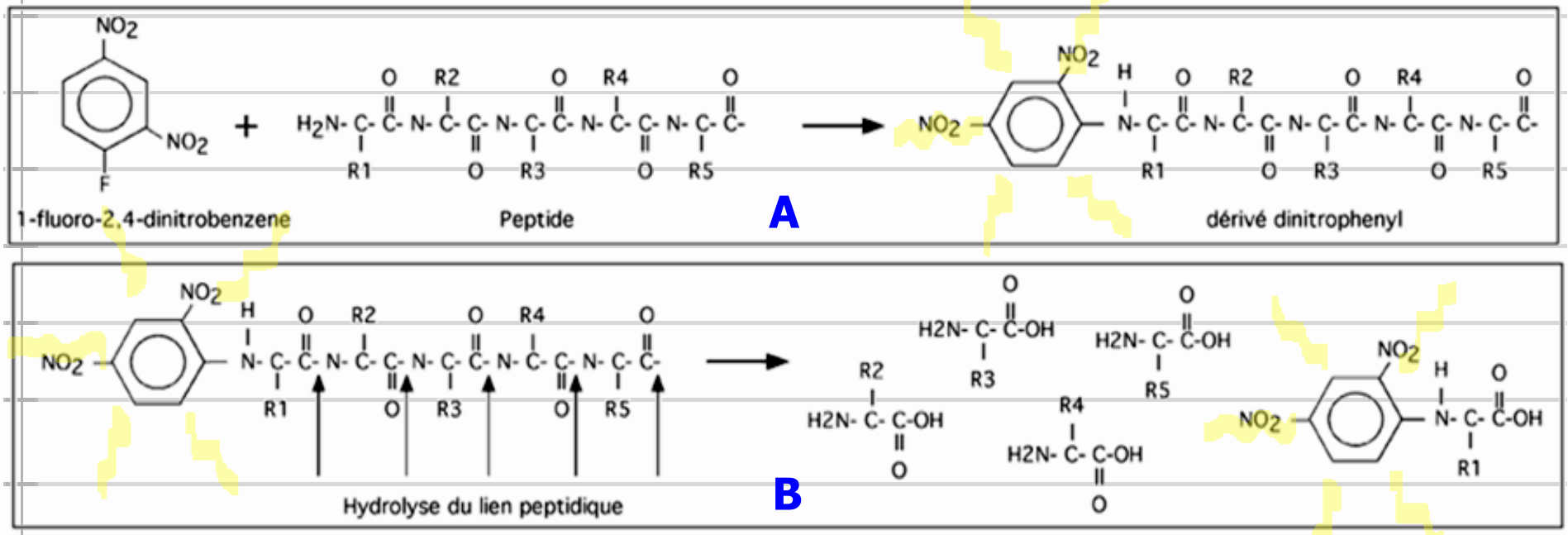
2. โครงสร้างใดคือ zwitterion (วงกลมรอบโครงสร้าง)

3. ใส่เลข 1 – 6 เพื่อระบุลำดับการแตกตัวของหมู่ต่าง ๆ



คุณสมบัติของโปรตีน

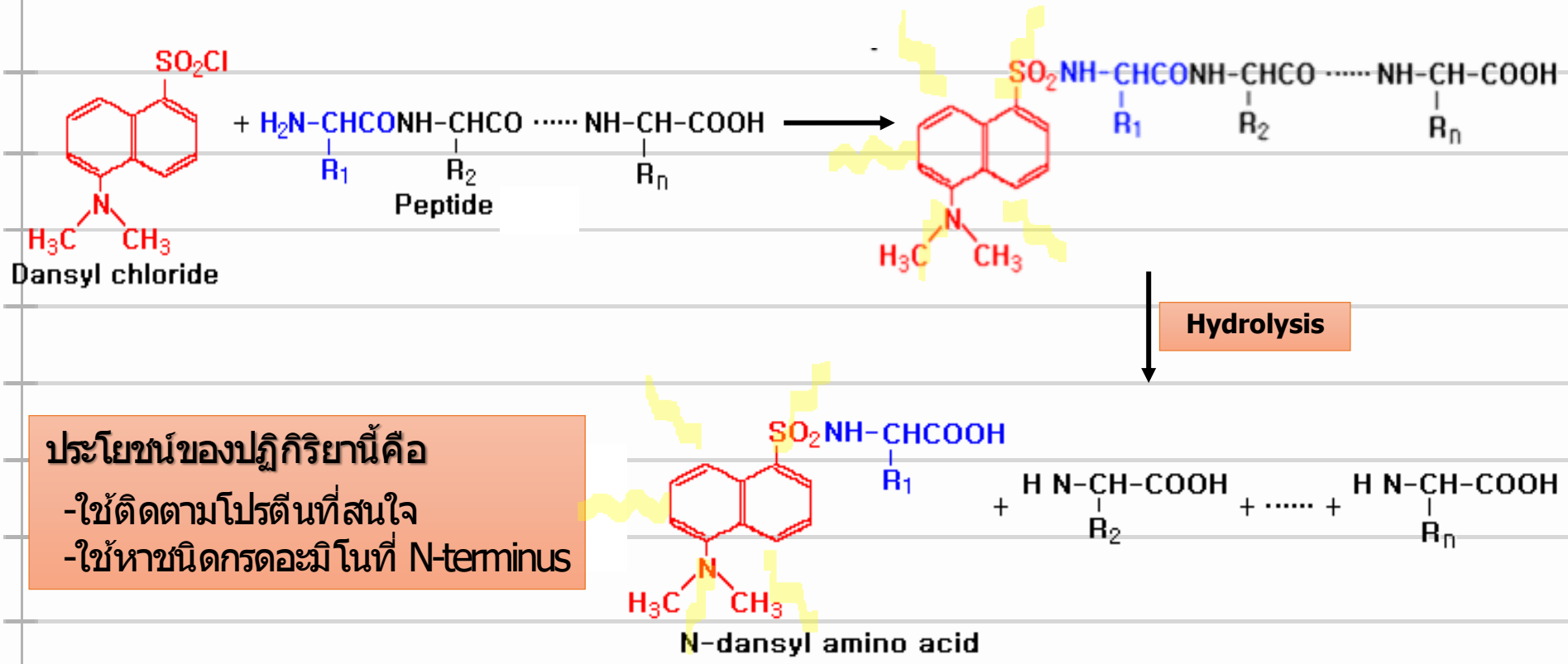
2. ทำปฏิกิริยากับ 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) เกิดสารประกอบเรืองแสง โดย FDNB จะเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่อะมิโนที่ N-terminal ของโปรตีน ดังรูป ซึ่งประโยชน์ปฏิกิริยานี้คือ ใช้ติดตามโปรตีนที่สนใจ และใช้หาชนิดกรดอะมิโนที่ N-terminus



รูป 27 ปฏิกิริยาของเปปไทด์กับ FDNB (A) และเมื่อไฮโดรไลซ์จะได้กรดอะมิโนโมเลกุลแรกเรืองแสง (B)

คุณสมบัติของโปรตีน

3. ทำปฏิกิริยากับ dansyl chloride โปรตีนสามารถเกิดสารประกอบเรืองแสงกับ dansyl chloride ซึ่งสารจะเข้าที่ N-terminal ของโปรตีน



ประโยชน์ของปฏิกิริยานี้คือ

-ใช้ติดตามโปรตีนที่สนใจ

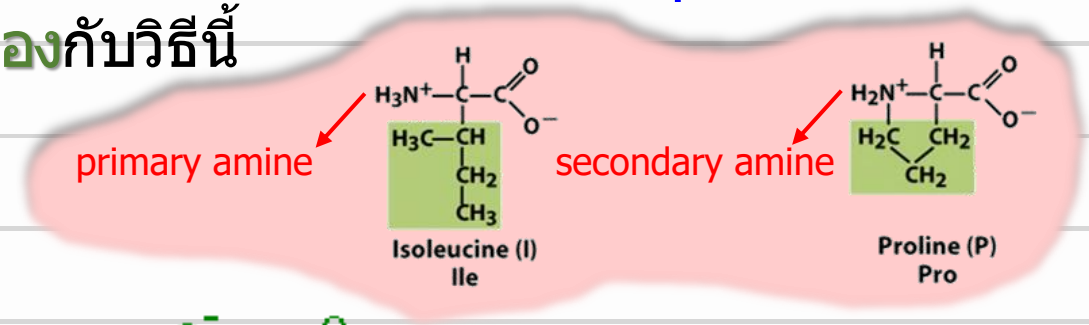
-ใช้หาชนิดกรดอะมิโนที่ N-terminus

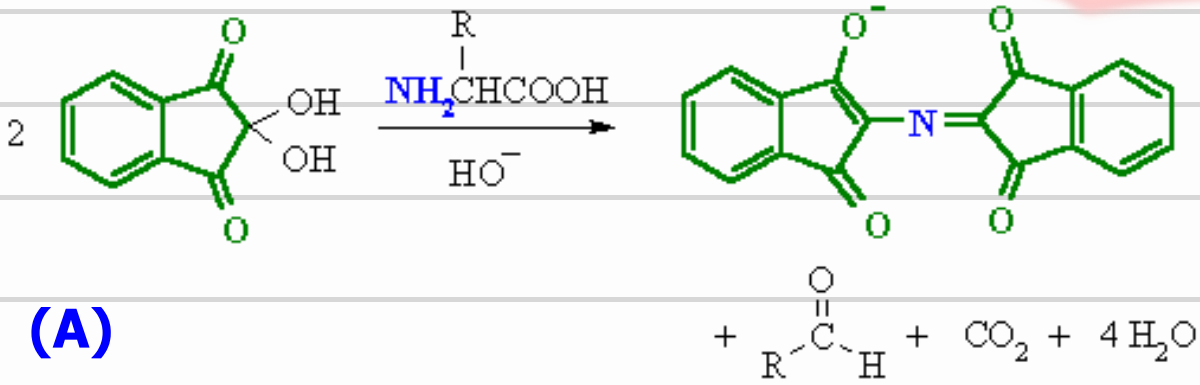
รูป 28 ปฏิกิริยาของเปปไทด์กับแดนซิลคลอไรด์ และเมื่อไฮโดรไลซ์จะได้กรดอะมิโนโมเลกุลแรกเรืองแสง

ที่มา :daekil.cafe24.com/bio/bc3-3.htm

คุณสมบัติของโปรตีน

4. ทำปฏิกิริยากับ ninhydrin โดยหมู่ α-amino ของโปรตีนสามารถทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินได้สารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงน้ำเงิน และ CO_2, H_2O, aldehyde สารประกอบที่มีสีเฉพาะตัวดังกล่าวใช้ในการพิสูจน์หลักฐาน (ตรวจรอยนิ้วมือ) ของตำรวจได้ มีข้อยกเว้นคือ กรดอะมิโน proline ซึ่งเป็น secondary amine จะให้สีส้มเหลืองกับวิธีนี้





(A)

(B)

รูป 29 ปฏิกิริยาของแอลฟา-อะมิโนกับนินไฮดริน (A) และสีม่วงน้ำเงินจากการสเปรย์นินไฮดรินลงบนลอยนิ้วมือ (B)

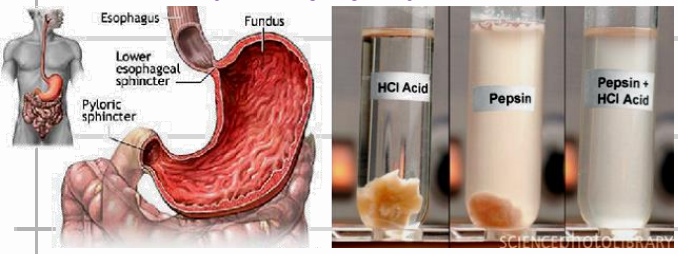
ที่มา :www.chem.ucalgary.ca/.../Ch27/ch27-3-3.html, www.ok.gov/.../index.html

หน้าที่ของโปรตีน

1. โปรตีนเร่งปฏิกิริยา (Enzymes)

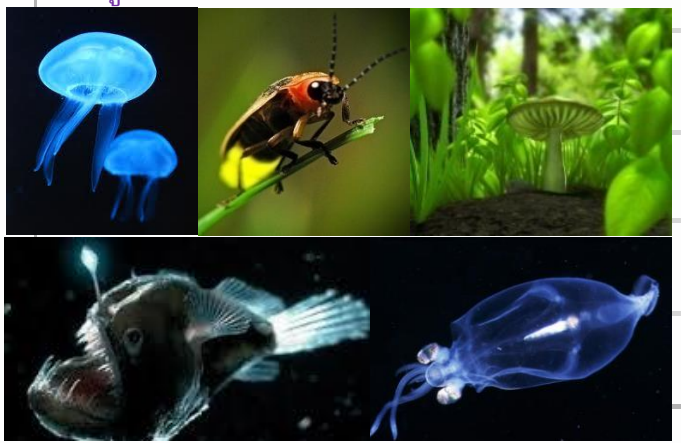
เร่งปฏิกิริยาในร่างกายของสิ่งมีชีวิต เช่น

1.1 เปปซินย่อยโปรตีน



1.2 ไทโรซิเนสเร่งการสร้างสีผิว

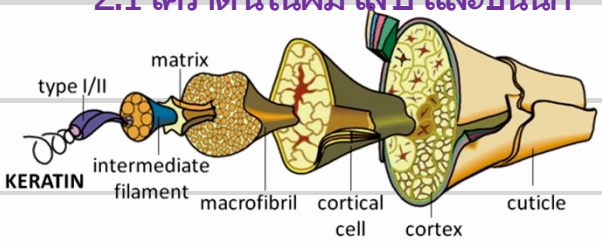
1.3 ลูซิเฟอเรสเร่งการเกิด bioluminescent



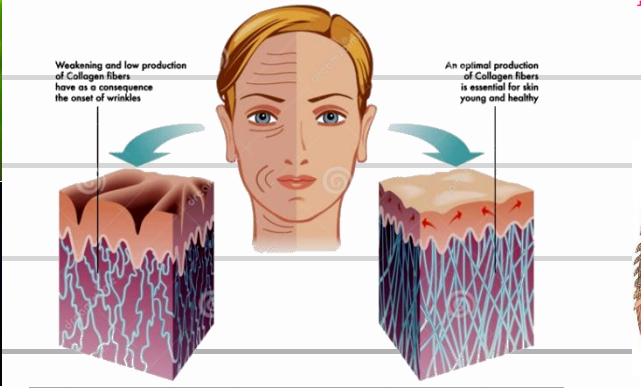
2. โปรตีนโครงสร้าง (Structural proteins)

เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของร่างกาย เช่น

2.1 เคราตินในผม เล็บ และขนนก



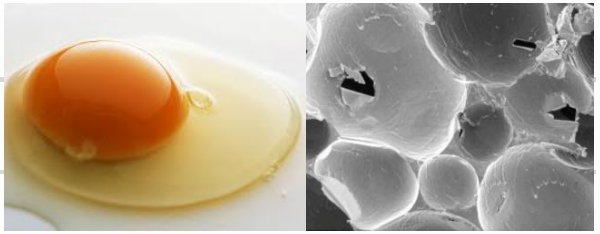
2.2 คอลลาเจนและอิลาสตินใต้ชั้นผิวหนัง



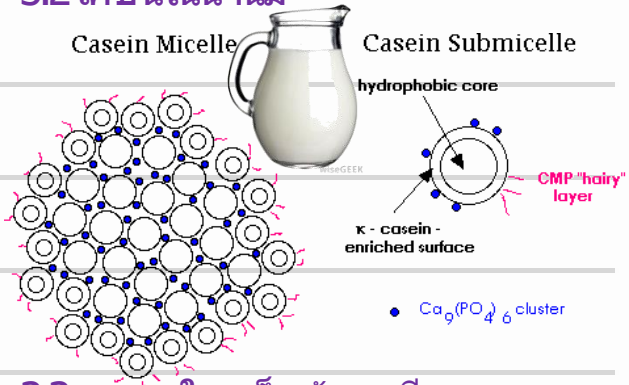
3. โปรตีนสะสม (Storage proteins)

คลังอาหาร รูปแบบการเก็บสาจำเป็นของร่างกาย เช่น

3.1 โอวัลบูมินในไข่ขาว



3.2 เคซีนในน้ำนม



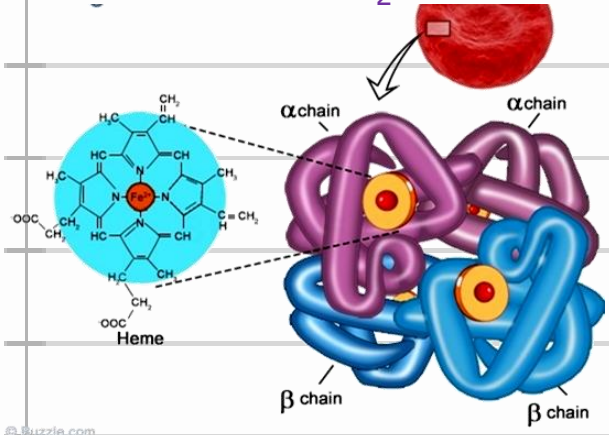
3.3 กลูเต็นในเมล็ดข้าวสาลี

หน้าที่ของโปรตีน

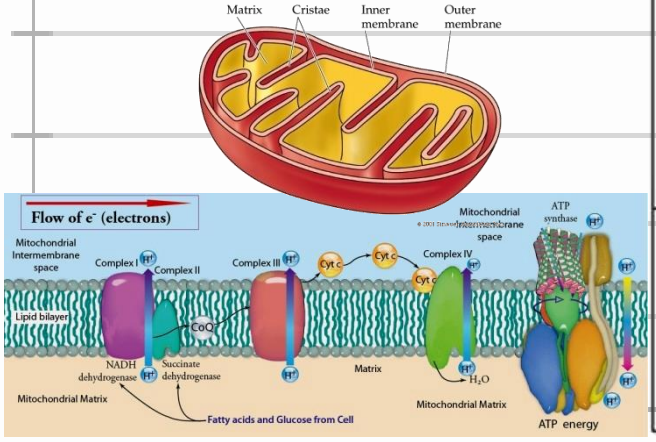
4. โปรตีนขนส่ง (Transport proteins)

ลำเลียงก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และสารอื่นๆ เช่น

4.1 ฮีโมโกลบิน ขนส่ง O_2 ในเลือด



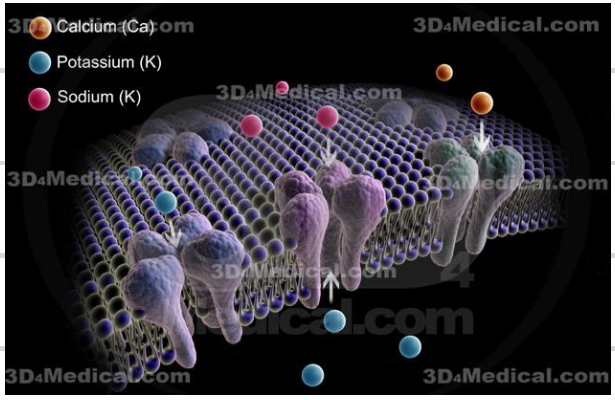
4.2 ไซโตโครม ขนส่ง e^- ในไมโตคอนเดรีย



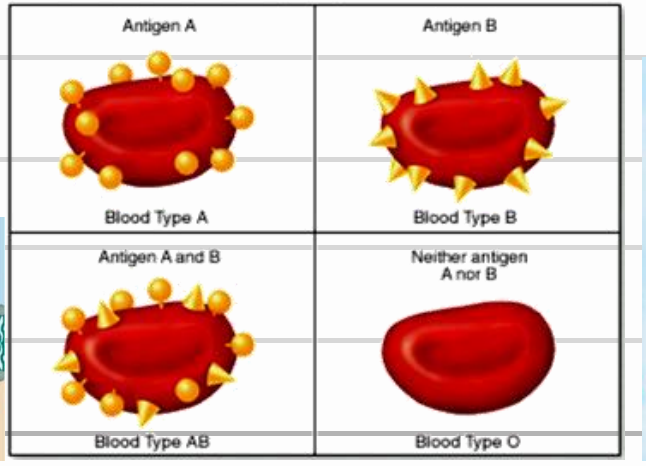
5. โปรตีนต้อนรับ (Receptor proteins)

จับกับโมเลกุลเฉพาะ และทำให้เซลล์เกิดเปลี่ยนแปลงที่เหมาะสม เช่น

5.1 Ion channels ที่เยื่อหุ้มเซลล์



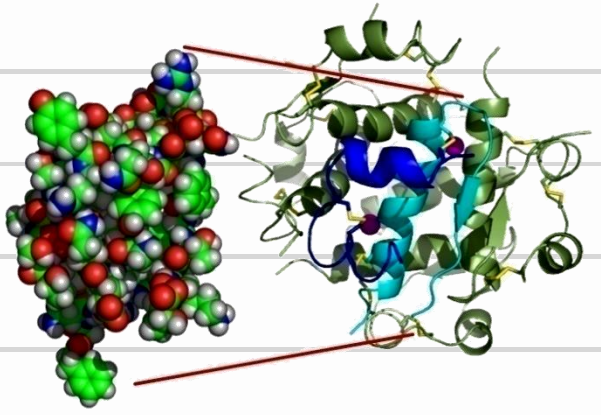
5.2 Antigen A, B บนผิว RBC



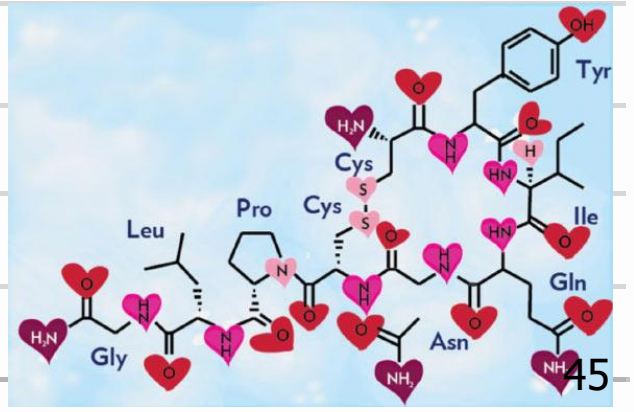
6. โปรตีนควบคุม (Regulatory proteins)

ฮอร์โมนควบคุมกระบวนการของร่างกาย เช่น

6.1 อินซูลิน ควบคุมระดับน้ำตาล



6.2 ออกซิโทซิน ฮอร์โมนแห่งความผูกพัน

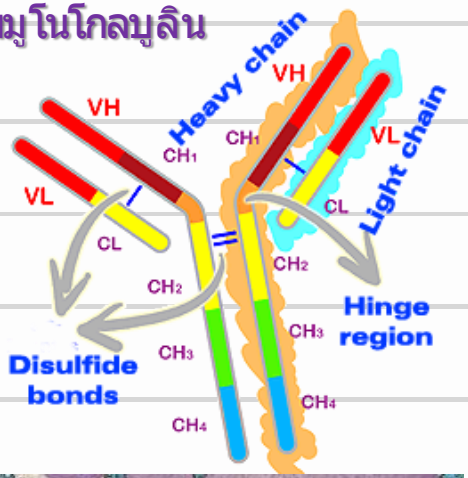


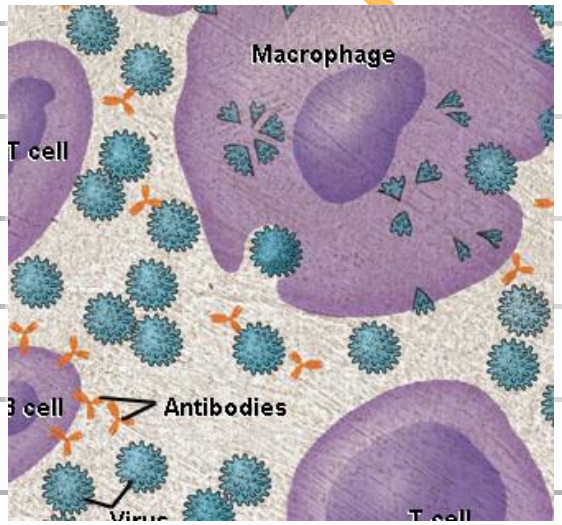
หน้าที่ของโปรตีน

7. โปรตีนป้องกัน (Protective proteins)

ช่วยจดจำ และกำจัดสิ่งแปลกปลอม เป็นภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย เช่น

7.1 อิมมูโนโกลบูลิน





8. โปรตีนพิษ (Toxins)

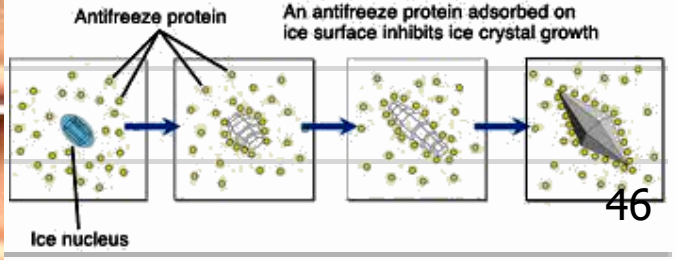
สร้างขึ้น และขับออกนอกเซลล์เพื่อป้องกันศัตรู เช่น

8.1 พิษงู

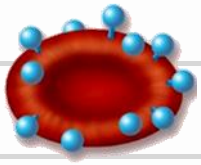
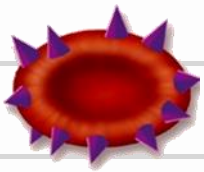
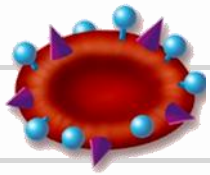
8.2 Clostridium botulinum toxin

9. หน้าที่อื่นๆ โปรตีนต้านการเยือกแข็ง

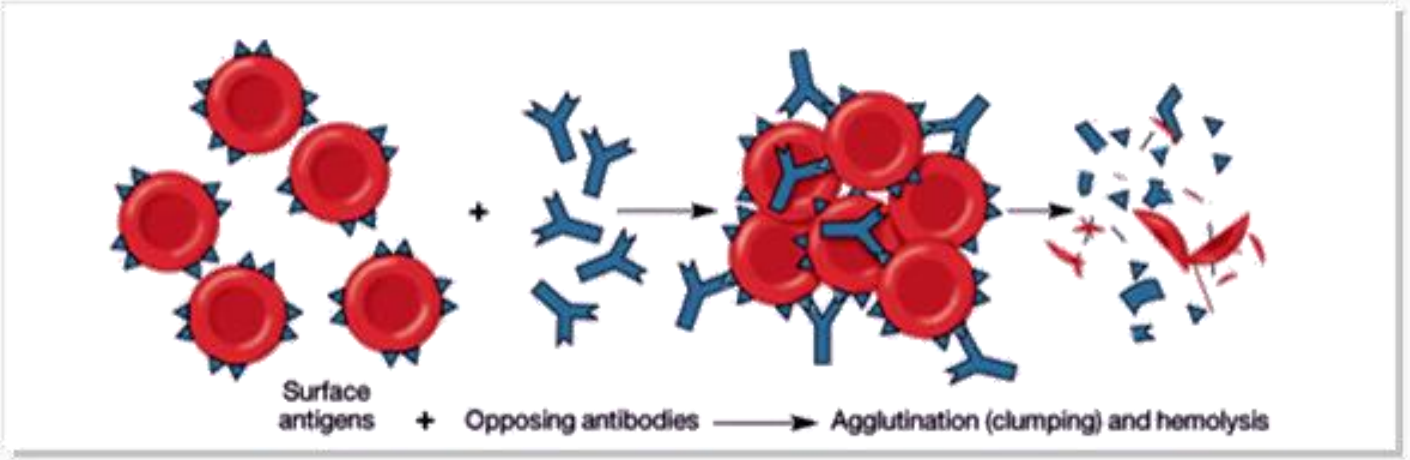
เลือดของสัตว์ขั้วโลกไม่แข็งตัว ทำให้มีชีวิตได้ใน อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง



หมู่เลือด ABO

	หมู่ A	หมู่ B	หมู่ AB	หมู่ O
Antigen บนผิวเม็ดเลือด				
	Antigen A	Antigen B	Antigen A และ B	ไม่มี Antigen
Antibody ในน้ำเลือด				
	Anti-B antibody	Anti-A antibody	ไม่มี antibody	Anti-B และ Anti-B antibody

รูป 30 ลักษณะแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง และแอนติบอดีในน้ำเลือดของคนหมู่เลือดต่างๆ



รูป 31 เมื่อแอนติเจน B บนผิวเม็ดเลือดจับกับแอนติบอดี anti-B ในน้ำเลือดจะเกิดการตกตะกอน และสลายเม็ดเลือด

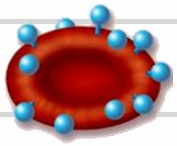
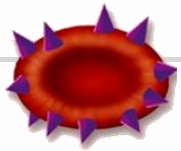
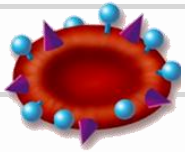
ดัดแปลงจาก: http://www.biologycorner.com/anatomy/blood/images/bloodtypes.jpg

หมู่เลือด ABO

แบบฝึกหัด 9 : หน้าที่ของโปรตีน (1)

นำหลักการที่ antigen จับกับ antibody แล้วทำให้เลือดตกตะกอน/ย่อยสลาย มาใช้ทดสอบหมู่เลือด ABO ได้

ถ้าหยดสารละลาย antibody ชนิดต่างๆ ลงบนหยดเลือดแล้วได้ผลดังนี้

	anti-A antibody	anti-B antibody	anti-A+B antibody	แอนติเจนบนผิว RBC	หมู่เลือดของคนทั้ง 4
ควบคุม					
นาย ก.					หมู่ หมู่ A
นาย ข.					หมู่ หมู่ B
นาย ค.					หมู่ หมู่ AB
นาย ง.					หมู่ หมู่ O

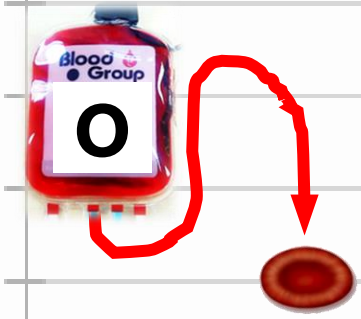
หมู่เลือด ABO

แบบฝึกหัด 10 : หน้าที่ของโปรตีน (2)

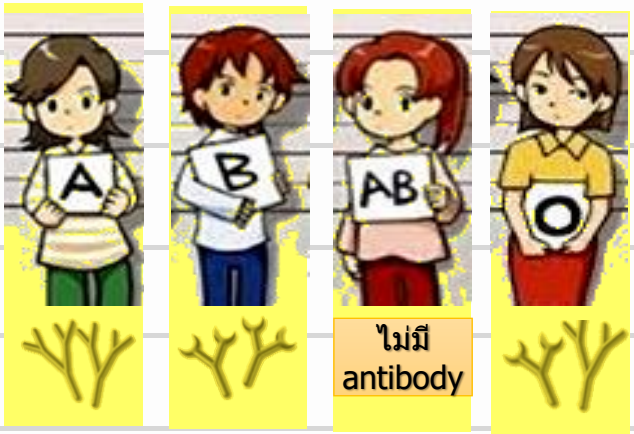
คนหมู่เลือด O ให้เลือดกับคนหมู่เลือดใด และรับเลือดจากคนหมู่เลือดใดได้บ้าง เพราะ?

1. กรณีให้เลือด

พิจารณา **antigen** ของเม็ดเลือด **O**



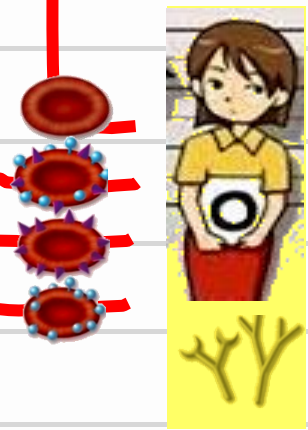
ต้องไม่จับกับ **antibody** ใน**น้ำเลือดของผู้รับ**เพราะจะทำให้เกิดลิ่มเลือด และย่อยสลายจนเป็นอันตรายต่อผู้รับ



2. กรณีรับเลือด

พิจารณา **antigen** ของเม็ด**เลือดอื่น**ทุกหมู่

ต้องไม่จับกับ antibody ในน้ำเลือดของ O เพราะจะทำให้เกิดลิ่มเลือด และย่อยสลายจนเป็นอันตราย



∴ O ให้เลือดกับ A, B, AB และ O ได้

∴ O รับเลือดจาก O เท่านั้น

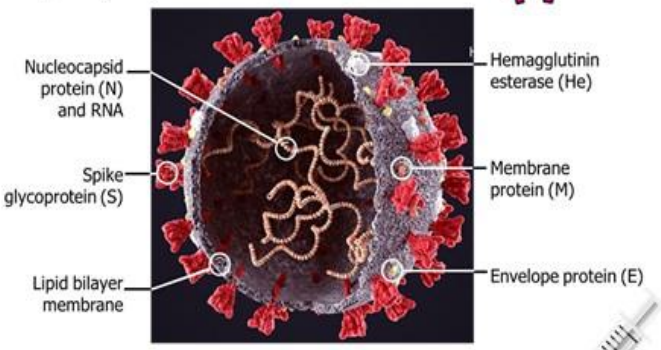
Spike protein โปรตีนหนามของไวรัส COVID-19

มารู้จักวัคซีนโควิด-19 กันเถอะ

Coronavirus สายพันธุ์ใหม่ 2019 สาเหตุ

โรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจแบบรุนแรง --(COVID-19)-

- Enveloped virus - ลักษณะกลมหรือรูปไข่
- ∅ 120 - 160 nm - Single stranded **RNA**
- โปรตีนหนาม **(S : Spike)** ยึดเกาะกับตัวรับ (Receptor) บนผิวเซลล์เมื่อเข้าโจมตี



อาการของ COVID-19

ไม่ได้เกิดกับระบบทางเดินหายใจเท่านั้น

การผลิตวัคซีน COVID-19 โฟกัสที่การสร้าง แอนติบอดีสำหรับเข้าจับโปรตีนหนามบนผิวเซลล์ไวรัส

วัคซีนไวรัสทั้งหมด (Whole Virus Vaccine)

วัคซีนเชื้อตายกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดย

- ใช้เซลล์ไวรัสที่ตายแล้ว
- ไม่ก่อให้เกิดโรค
- ใช้เวลาผลิตนาน – เลี้ยงเซลล์
- อาจต้องใช้วัคซีน 2 หรือ 3 โดส

วัคซีนหน่วยย่อยโปรตีน (Protein Subunit Vaccine)

กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดย

- ใช้โปรตีนหนามบนผิวเซลล์ไวรัส
- ลดความเสี่ยงของผลข้างเคียง
- การตอบสนองของภูมิคุ้มกันอาจต่ำ

วัคซีนไวรัสเวคเตอร์ (Viral Vector Vaccine)

กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดย

- ใช้ไวรัสที่ไม่อันตรายนำสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าสู่เซลล์เรา สั่งให้เซลล์สร้างโปรตีนหนาม
- คล้ายการติดเชื้อตามธรรมชาติ-กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี
- การตอบสนองของภูมิคุ้มกันสูง

วัคซีนกรดนิวคลีอิก (Nucleic Acid Vaccine)

กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดย

- ใช้สารพันธุกรรมของไวรัสเพื่อสร้าง mRNA
- mRNA สั่งให้เซลล์ของเราสร้างโปรตีนหนาม
- โปรตีนหนามที่สร้างเองจะมีปริมาณมากภูมิคุ้มกันจึงสูง
- ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิเย็นจัด -70 °C

เปรียบเทียบวัคซีน COVID-19

-เทคนิคที่ใช้-จำนวนโดส-การเก็บรักษา-

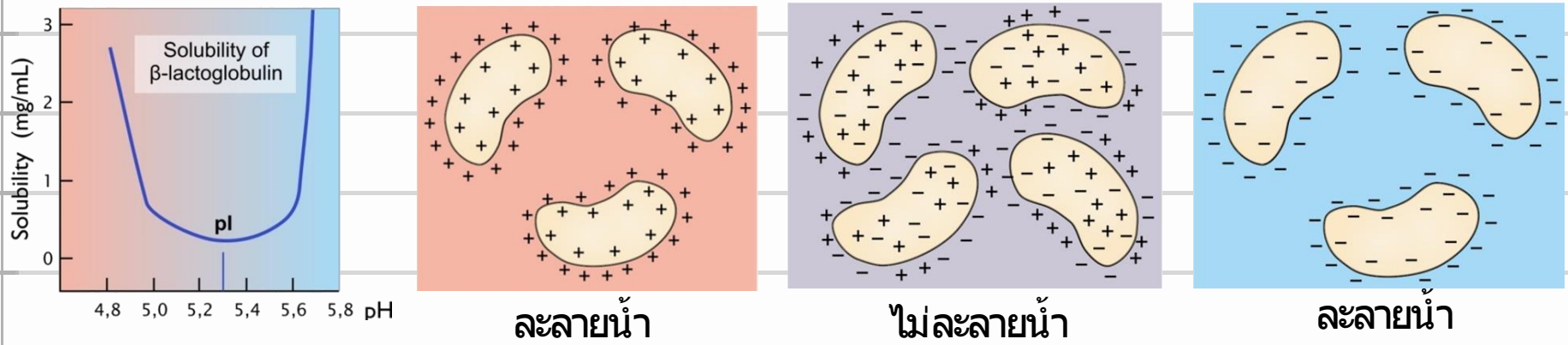
RNA		
Pfizer (BioNTech)	2	-80 to -60°C (6 months) and 2 to 8°C (for up to 5 days)
Moderna	2	-25 to -15°C (6 months) and 2 to 8°C (for 30 days)
Viral vector		
Oxford-AstraZeneca	2	2 to 8°C (6 months)
Sputnik V (Gamaleya)	2	-18.5°C (liquid form) 2 to 8°C (dry form)
Johnson & Johnson (Janssen)	1	2 to 8°C (3 months)
Inactivated virus		
CoronaVac (Sinovac)	2	2 to 8°C
Sinopharm	2	2 to 8°C
Covaxin (Bharat Biotech)	2	2 to 8°C
Protein-based		
Novavax	2	2 to 8°C

https://www.bbc.com/news/world-asia-china-56967973

เทคโนโลยีของโปรตีน

1. การแยกโปรตีนโดยลดความสามารถในการละลายน้ำ โดยเติมสารเคมีบางชนิด ซึ่งทำให้โมเลกุลของโปรตีนรวมตัวกันได้ดีขึ้น แล้วแยกออกจากน้ำ ตกตะกอนลงมา

ปรับ pH ให้เท่ากับ pI ของโปรตีน ซึ่งทำให้โปรตีนมีประจุรวมเป็น 0 และละลายน้ำได้น้อยที่สุด โปรตีนจะตกตะกอนลงมา

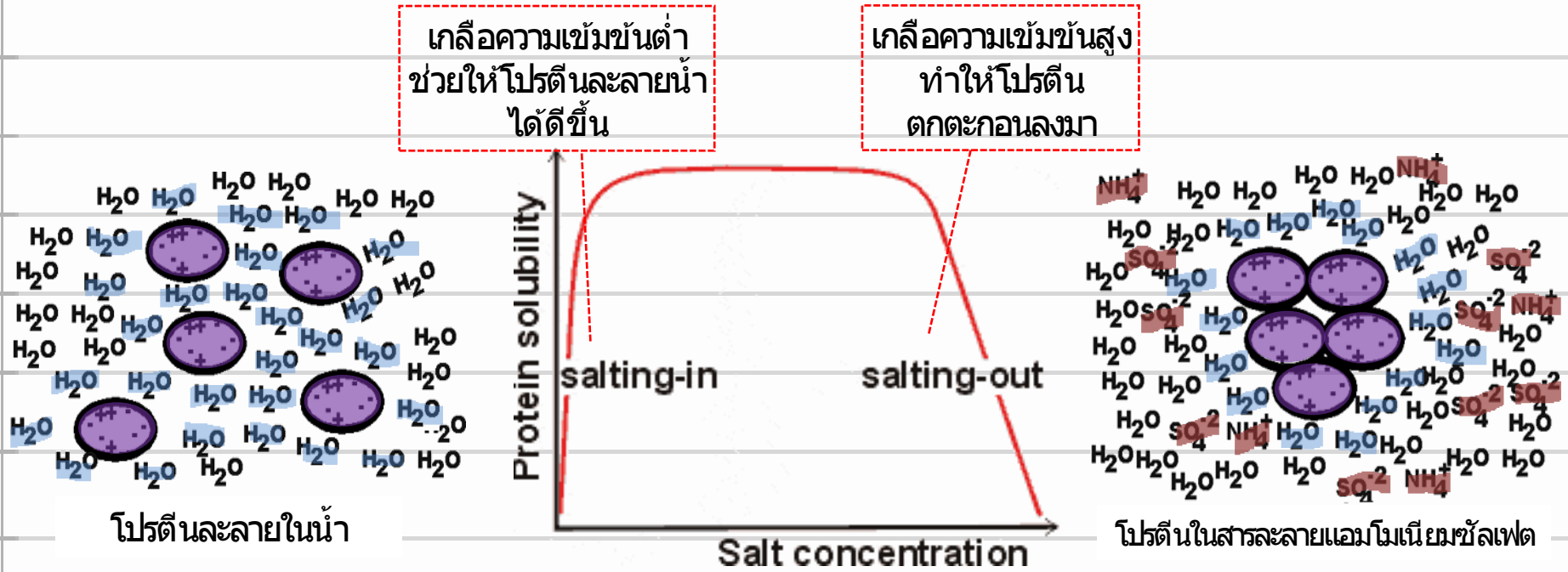


รูป 32 ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนที่ pH ต่างๆ

ดัดแปลงจาก : http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/practical_biochemistry/ch05s04.html

เทคโนโลยีของโปรตีน

เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งเป็น divalent ion ซึ่งเมื่อใช้ความเข้มข้นมากๆ จนถึงระดับอิ่มตัวจะดึงน้ำออกไป มีผลทำให้โปรตีนตกตะกอน ดังรูป



รูป 33 ผลของเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีน

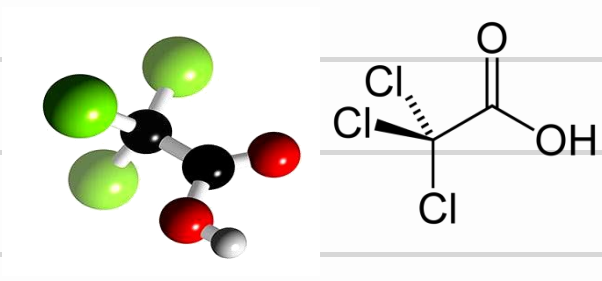
ที่มา :www.lsbu.ac.uk/water/hofmeist.html, www.bio.mtu.edu/.../lectures/lec5/482w51.htm

เทคโนโลยีของโปรตีน

เติมตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ethanol acetone มีขั้วน้อยกว่าน้ำ ไม่สามารถจับกับหมู่ที่มีประจุได้ดีเท่าน้ำ จึงสามารถตกตะกอนโปรตีนได้

เติมแอนอิออนขนาดใหญ่ เช่น trichloroacetic acid (TCA) สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ในสภาวะกรด

เติมแคทอิออนของโลหะหนัก เช่น Pb^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{2+} สามารถตกตะกอนโปรตีนทีมีประจุเด่นลบได้



ไตรคลอโรอะซีติก แอซิด (TCA)

โปรตีนที่ตกด้วย acetone

โปรตีนที่ตกด้วย lead acetate, silver nitrate, copper sulfate ในด่าง

ไข่เยี่ยวม้าปนเปื้อนตะกั่ว

รูป 34 การตกตะกอนของโปรตีนโดยใช้สารละลายชนิดต่างๆ

ที่มา: http://www.bio.iitb.ac.in/~sanjeeva/virtual_lab/Virtual_Laboratory/2DG_manual.html

เทคโนโลยีของโปรตีน

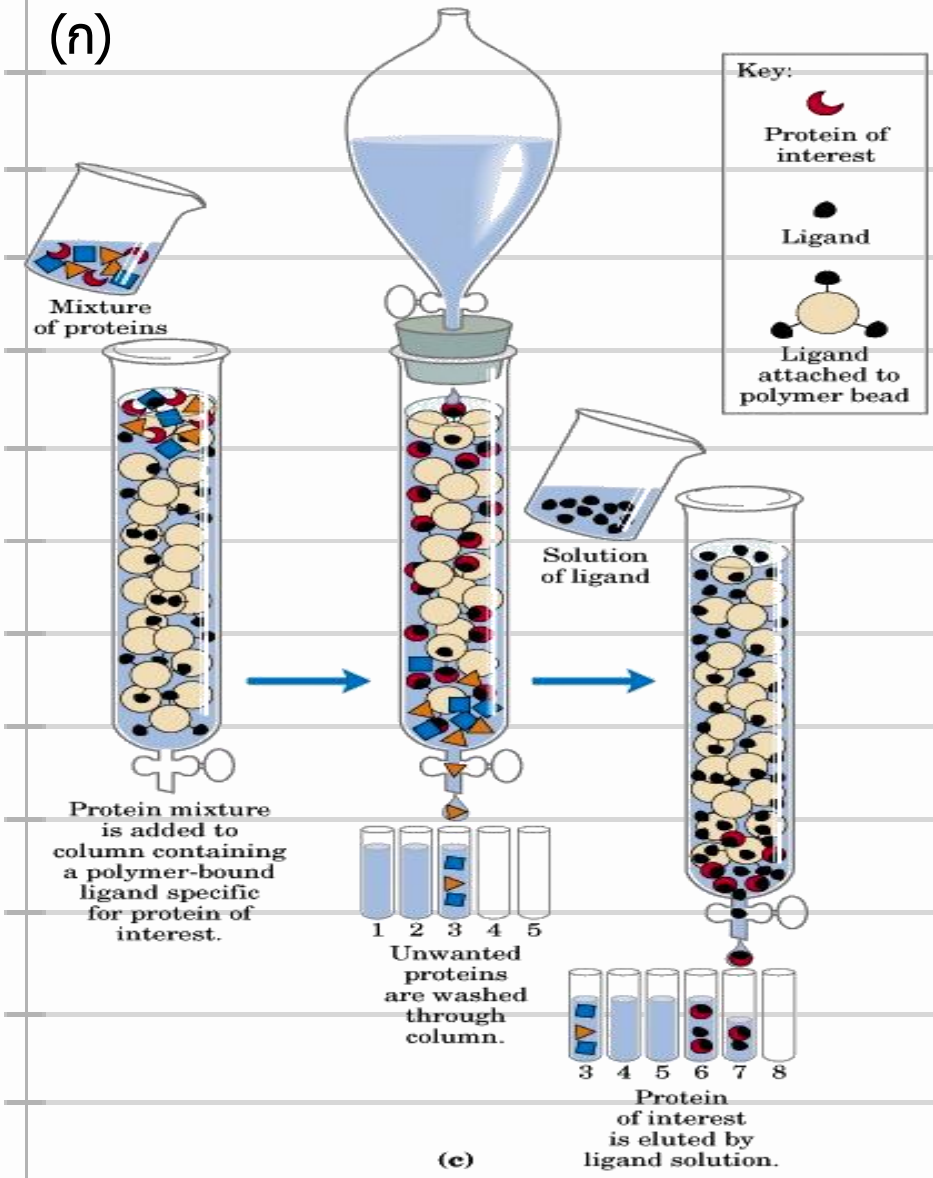
2. การแยกโปรตีนโดยอาศัยโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน โปรตีนมีการขดจนมีรูปร่างที่เฉพาะ ทำให้จับกับโมเลกุลที่มีรูปร่างจำเพาะได้ จึงใช้สมบัตินี้แยกโปรตีน

Affinity chromatography ประกอบด้วยคอลัมน์แก้ว บรรจุ polymer bead ที่จับจำเพาะกับโปรตีนที่สนใจได้เท่านั้น โปรตีนชนิดอื่นจะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อน มีเฉพาะโปรตีนที่สนใจค้างอยู่ แล้วจึงชะโปรตีนที่สนใจออกทีหลัง

Immunoblot (Western blot) ใช้ตรวจหาโปรตีนเฉพาะ (อาจเรียก antigen) โดยให้จับกับ antibody ของมัน แล้วเกิดสีขึ้น จึงสามารถมองเห็นเฉพาะแถบโปรตีนที่สนใจปรากฏขึ้น

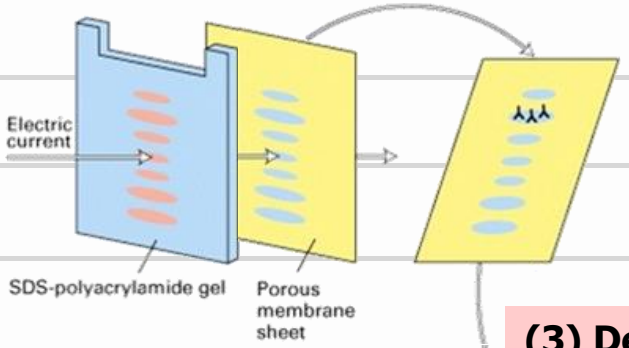
Affinity chromatography

(ก)

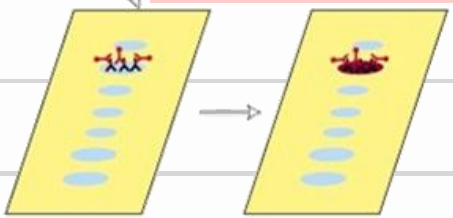


Western blot

(ข) **(1) Electrotransfer** **(2) Antibody detection**



(3) Development



1.1 แยกโปรตีนผสมในสนามไฟฟ้า (SDS-PAGE)

1.2 ถ่ายแถบโปรตีนทั้งหมดลงบน membrane

2. บ่มในสารละลายแอนติบอดี (Ab_1, Y) ล้าง Ab_1 ส่วนเกิน

3.1 บ่มในสารละลาย Ab_2 ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ (Y) ล้าง Ab_2 ส่วนเกิน

3.2 เติมสารตั้งต้นให้เอ็นไซม์ซึ่งจะเร่งให้เกิดแถบสี

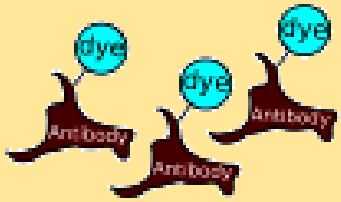
รูป 35 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย affinity chromatography (ก) และโดย westernblot (ข)

ที่มา :courses.cm.utexas.edu/.../ch339k/overheads-1.htm, www.life.umd.edu/.../bsci423/song/Lab12.html

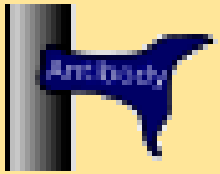
เทคโนโลยีของโปรตีน

Enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA ใช้มากในทางการแพทย์ เช่น ใช้ตรวจการตั้งครรภ์ ตรวจหาไวรัสที่อาจเป็นสาเหตุของไข้หวัดนก เป็นต้น

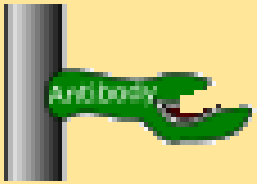
Human chorionic gonadotrophin (hCG)



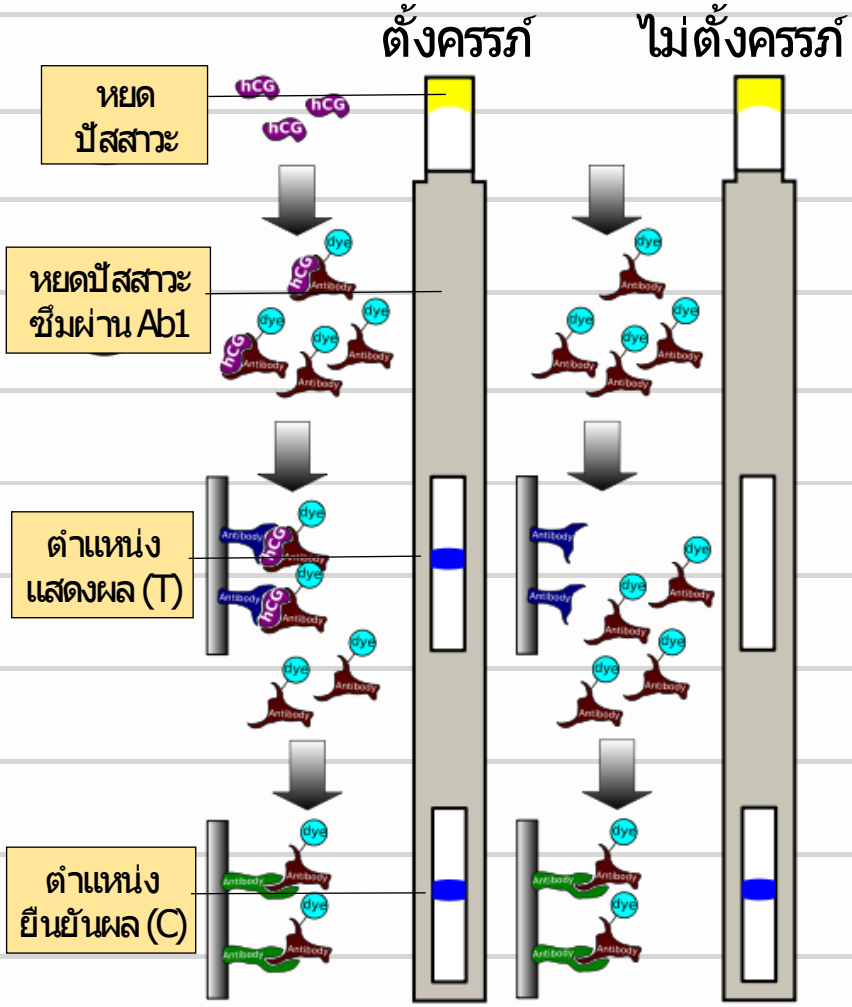
Antibody 1 จำเพาะต่อ hCG และย้อมสีไว้



Antibody 2 จำเพาะต่อ hCG อยู่ตรงตำแหน่งแสดงผล



Antibody 3 จำเพาะต่อ antibody 1 อยู่ตรงตำแหน่งยืนยัน



รูป 36 เทคนิคอิไลซาใช้ตรวจหาโปรตีนที่สนใจโดยอาศัยการจับกันของแอนติบอดีที่เฉพาะกับโปรตีนนั้น (แอนติเจน)

ดัดแปลงจาก :commons.wikimedia.org/wiki/Image:Pregnancy_te...

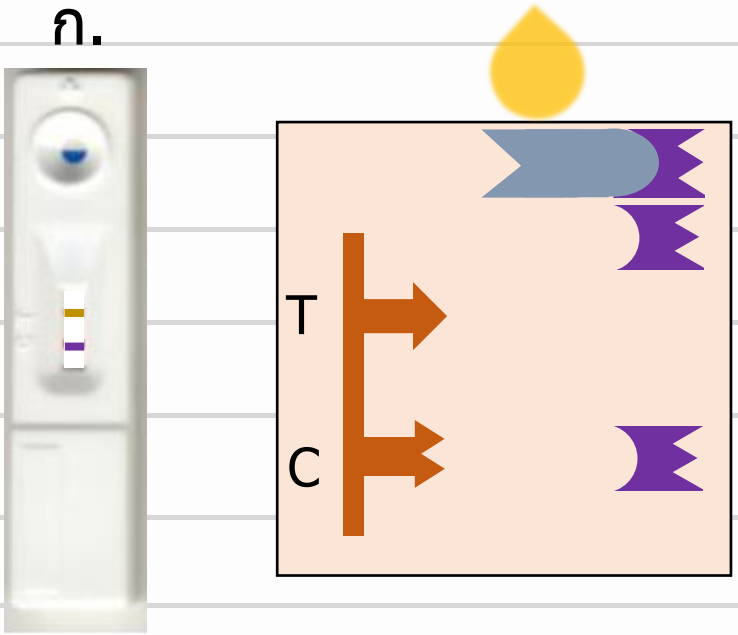
เทคโนโลยีของโปรตีน

กลไกการทำงานของชุดตรวจสอบการตั้งครรภ์อย่างง่าย

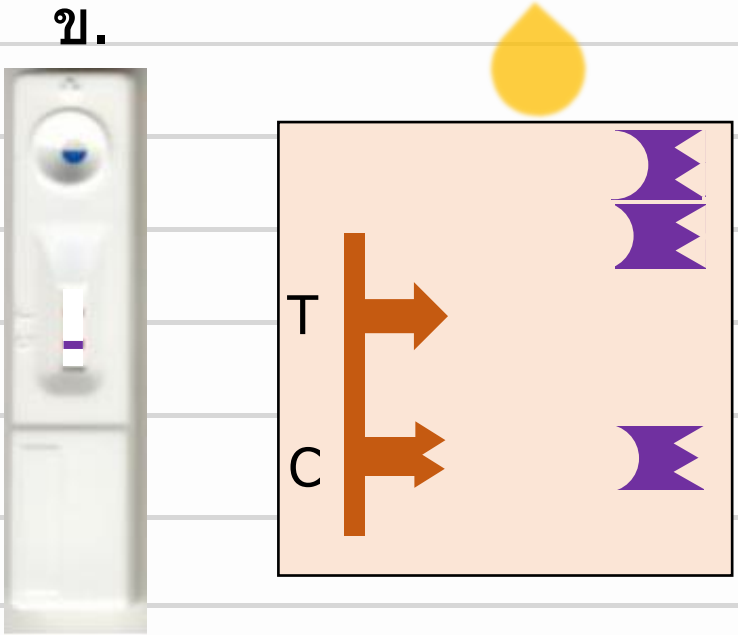
กลไกการจับกันของ antibody เมื่อผลการทดสอบเป็นแบบ ก. (ตั้งครรภ์)

กลไกการจับกันของ antibody เมื่อผลการทดสอบเป็นแบบ ข. (ไม่ตั้งครรภ์)

ก.



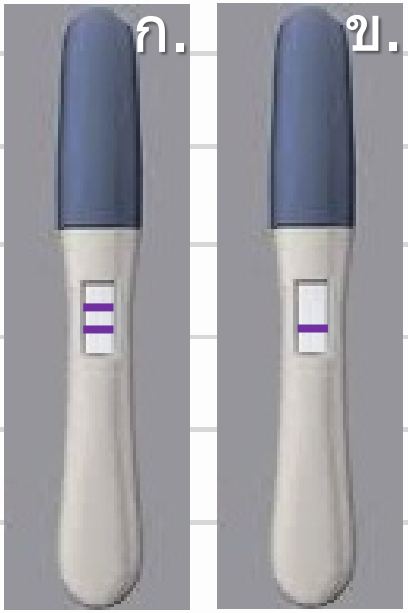
ข.



เทคโนโลยีของโปรตีน

แบบฝึกหัด 12 : ELISA

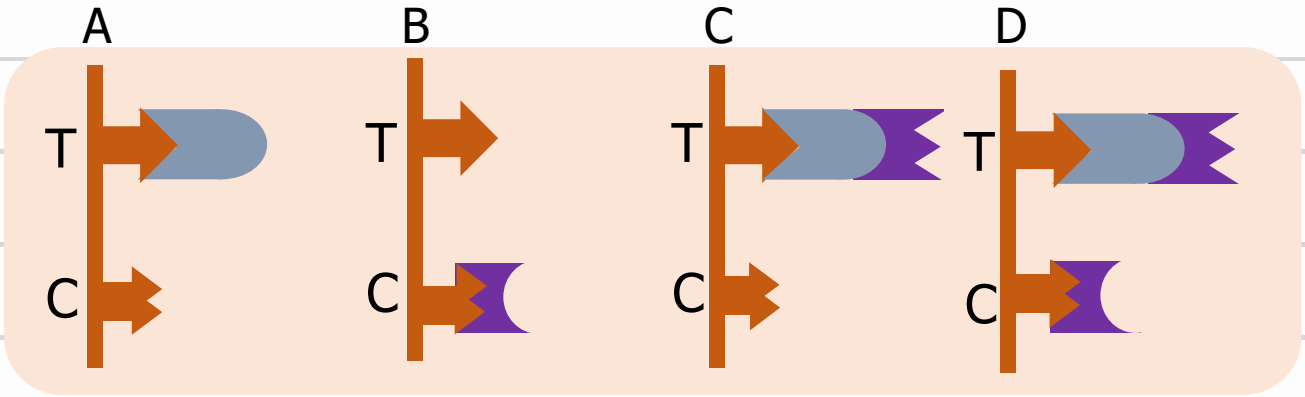
ทดสอบการตั้งครรภ์โดยใช้ชุดทดสอบอย่างง่าย ได้ผลแบบ ก. และ ข. ดังนี้



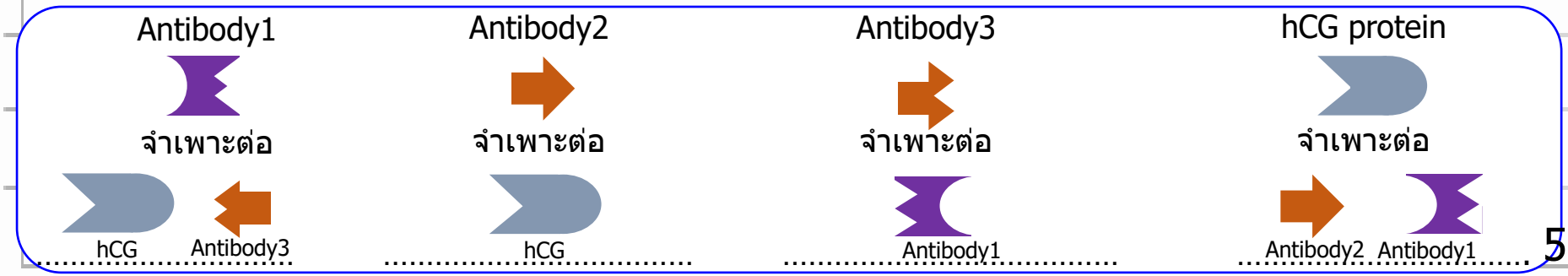
1. ผลการทดสอบ ก. แสดงว่า ตั้งครรภ์ ข. แสดงว่า ไม่ตั้งครรภ์ (ตั้งครรภ์หรือไม่)

2. การจับกันของ antibody และโปรตีนเป็นแบบใด (A B C D) เมื่อผลทดสอบเป็นดังรูป ก.

3. การจับกันของ antibody และโปรตีนเป็นแบบใด (A B C D) เมื่อผลทดสอบเป็นดังรูป ข.



4. ระบุความจำเพาะของ antibody ทั้ง 3 และของโปรตีน hCG



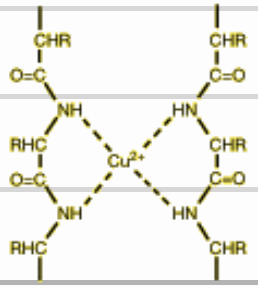
เทคโนโลยีของโปรตีน

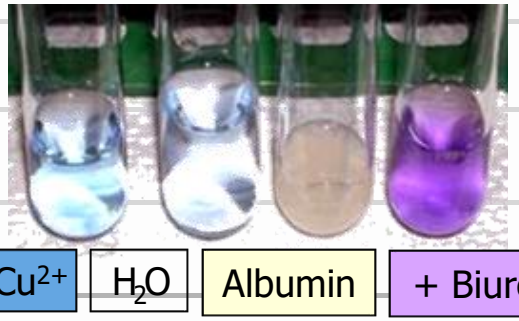
3. การหาปริมาณโปรตีน (Quantification of protein) เป็นการหาความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน หรือการหาปริมาณโปรตีนในอาหาร มีวิธีในการหาหลายแบบ เช่น

โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โปรตีนสามารถฟอร์มสีกับสารเคมีบางชนิด แล้วดูดกลืนแสงช่วง visible ได้ จึงมีหลายวิธีที่ใช้หาปริมาณโปรตีน เช่น วิธี Biuret วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm (A_{550})

วิธี Lowry วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm (A_{650})

ทั้ง Biuret และ lowry เป็นเทคนิคที่ให้โปรตีนฟอร์มสีม่วงกับ Cu^{2+} ในสภาวะด่าง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ทั้ง 2 วิธีนี้ใช้สำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีนในรูปสารละลาย





รูป 37 ปฏิกิริยาของโปรตีนกับไบยูเรท และการฟอร์มสีกับโปรตีน

ที่มา: http://www.nku.edu/~whitsonma/Bio120LSite/Bio120LReviews/Bio120LRevMolec.html

เทคโนโลยีของโปรตีน

โดยการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) เนื่องจากโปรตีนมีหมู่ $-NH_2$ เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นถ้าย่อยโปรตีนจนสมบูรณ์ N จะถูกปลดปล่อยออกมา หาปริมาณ N แล้วคำนวณเพื่อหาปริมาณโปรตีน เทคนิคนี้ชื่อ "Kjeldahl" ซึ่งเทคนิคเจลดาห์ลมีขั้นตอนคือ

การย่อยสลาย (Digestion) ย่อยโปรตีนด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น

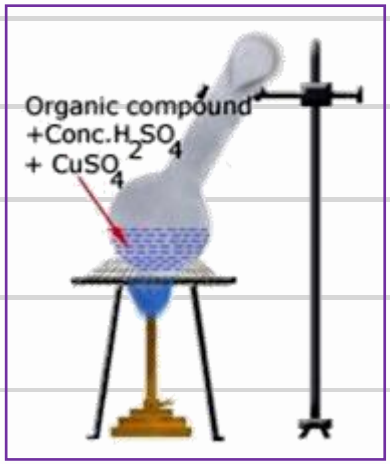
การกลั่น (Distillation) โดยกลั่นใน NaOH ทำให้เกิดก๊าซ NH_3 แล้วจึงดักจับไว้ด้วย boric acid ทำให้ได้แอมโมเนียมบอเรต

การไทเทรต (Titration) ด้วยกรด HCl เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ N

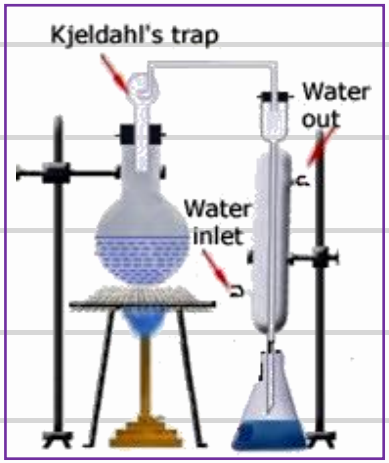
คำนวณ (Calculation) หาเปอร์เซ็นต์โปรตีน โดยคูณกับตัวเลขปัจจัย (factor) ที่เหมาะสม

เทคโนโลยีของโปรตีน

1. การย่อยสลาย



2. การกลั่น



ปฏิกิริยาการย่อยสลาย

$$\text{Organic compound} + H_2SO_4 \xrightarrow{Cu^{2+}} (NH_4)_2SO_4$$

Contain **nitrogen**

ปฏิกิริยาการกลั่น

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \xrightarrow{\Delta} Na_2SO_4 + 2H_20 + 2NH_3$$

$$NH_3 + H^+ \longrightarrow NH_4^+$$

1. การย่อยสลาย 2. การกลั่น และ 3. การไทเทรต

รูป 38 อุปกรณ์สำหรับหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาห์ล

ดัดแปลงจาก: http://www.tutorvista.com/content/chemistry/chemistry-iii/organic-compounds/quantitative-analysis.php

รูป 39 อุปกรณ์วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาห์ล แบบกึ่งอัตโนมัติ ประกอบด้วย (1) หน่วยย่อยสลาย (2)หน่วยกลั่น และหน่วยไทเทรต

ที่มา : http://www.behr-labor.com/ehtemel/neu/kjeldahl.html

ตาราง 2 ปัจจัย (Factors) สำหรับเปลี่ยน % ไนโตรเจนเป็น % โปรตีนในอาหารบางชนิด

ผลิตภัณฑ์จากสัตว์	ปัจจัย (Factors)
ไข่	6.25
เนื้อ	6.25
นม	6.38

ผลิตภัณฑ์จากพืช	ปัจจัย (Factors)
บาร์เลย์	5.83
ข้าวโพด	6.25
ลูกเดือย (Millets)	5.83
ข้าวโอ๊ต	5.83
ข้าว	5.95
ข้าวไรน์	5.83
ข้าวฟ่าง (Sorghums)	6.25
ข้าวสาลีทั้งเมล็ด (Whole wheat)	5.83
ถั่ว: Castor	5.30
Jack, lima, navy, mung	6.25
Soybean (ถั่วเหลือง)	5.71
Velvet beans	6.25
Peanuts (ถั่วลิสง)	5.46

รูป 40 แหล่งอาหารโปรตีนที่มาจากพืชและสัตว์

ที่มา : Adapted and modified from Merrill and Watt (1973)

เอนไซม์ (ENZYME)

เรื่อง	หน้า
ลักษณะสำคัญของเอนไซม์	64
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์	67
ทฤษฎีการทำงานของเอนไซม์	75
โคแฟกเตอร์	76
จลน์ศาสตร์ของเอนไซม์	79

ลักษณะสำคัญของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนก้อนกลม (globular protein)

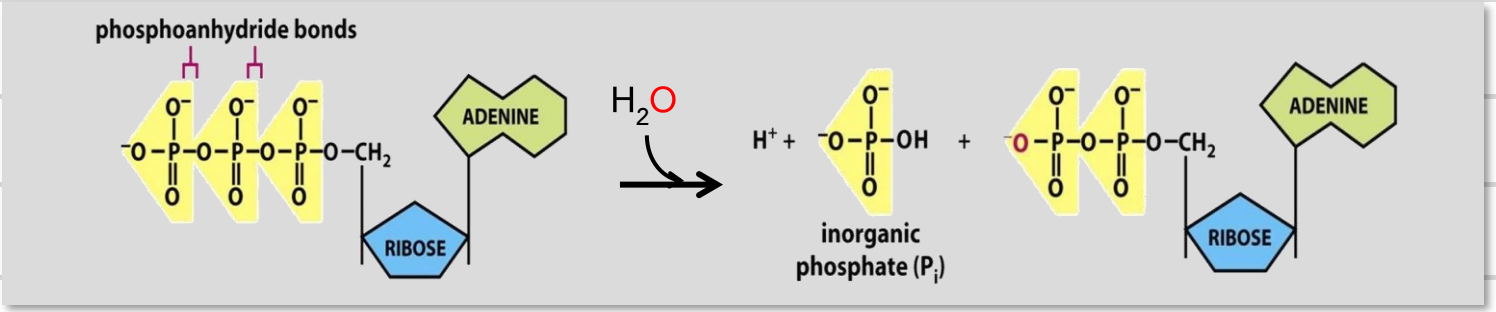
เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate) และจำเพาะต่อชนิดปฏิกิริยา

เอนไซม์เร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้ที่สภาวะเหมาะสม

- Optimal temperature 37 °C
- Optimal pH 7.5

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยทำให้มีการเปลี่ยนแปลงพลังงานทีละน้อย โดยมีโมเลกุล ATP (adenosine-5’-triphosphate) ซึ่งเป็นสารพลังงานสูงเป็นโมเลกุลเก็บและปล่อยพลังงาน

ลักษณะสำคัญของเอนไซม์



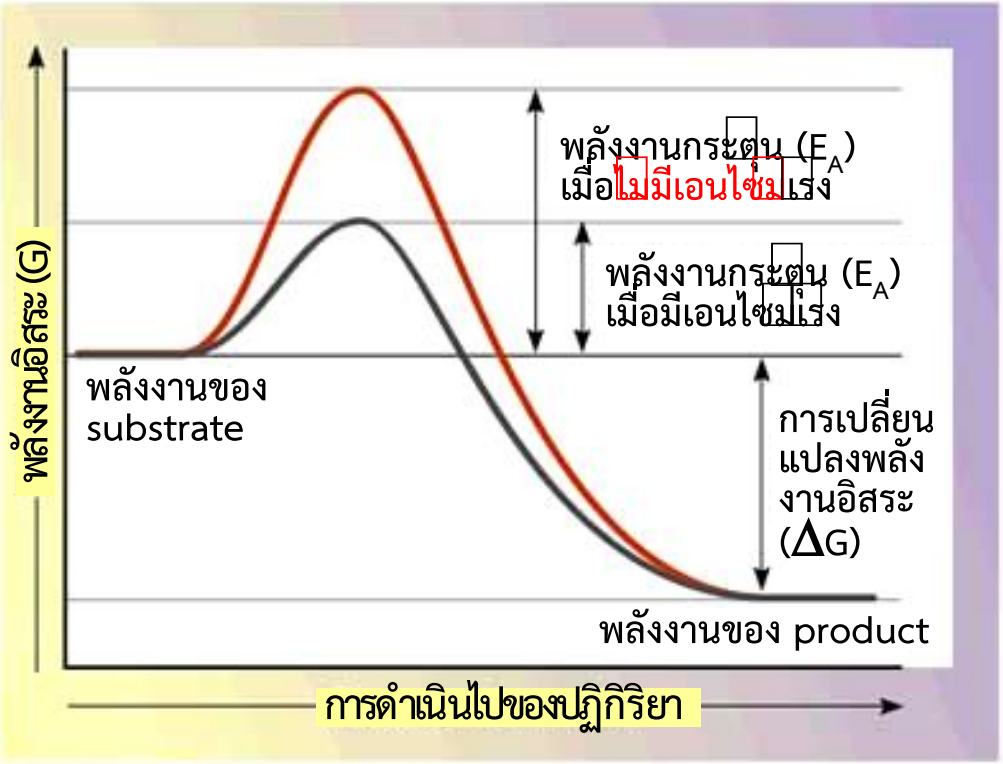
รูป 47 การเก็บและปลดปล่อยพลังงานของ ATP/ADP

ดัดแปลงจาก: https://www.studyblue.com/notes/note/n/lecture-4/deck/2171426

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ทั้ง in vivo และ in vitro

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้น (activation energy; E_a) ของระบบ

ลักษณะสำคัญของเอนไซม์



รูป 48 การเปลี่ยนแปลงพลังงานระหว่างปฏิกิริยาที่มี (—) และไม่มีเอนไซม์ (—) เป็นตัวเร่ง

ที่มา: http://redslime.typepad.com/h_ap_biology/unit-1-ap-thermodynamics-enzyme-function.html

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ ปัจจัยที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง และมีผลทำให้ความเร็วเริ่มต้น (v) ของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงด้วย ได้แก่

- ความเข้มข้นของสารตั้งต้น [S] ที่ใช้
- pH ของสารละลาย
- อุณหภูมิ (Temperature) ของสารละลาย
- ความเข้มข้นของเอนไซม์ [E] ที่ใช้

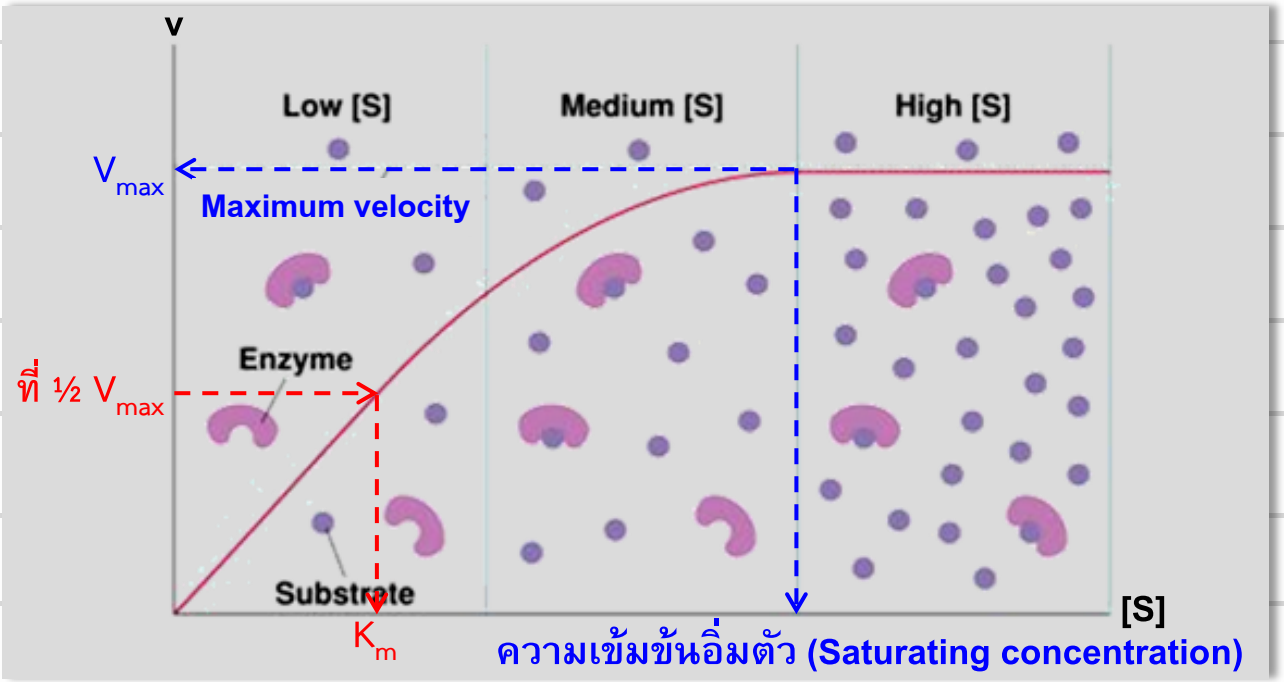
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ความเข้มข้นของสารตั้งต้น มีผลต่อ v เป็น 3 ช่วงคือ

ช่วงที่ [S] ต่ำ ถ้าเพิ่ม [S] อีก v จะเพิ่มอย่างรวดเร็ว

ช่วงที่ [S] สูงปานกลาง ถ้าเพิ่ม [S] อีก v จะเพิ่มช้าลง

ช่วงที่ [S] ถึงค่าอิ่มตัว ถ้าเพิ่ม [S] อีก v จะคงที่



รูป 49 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อความเร็วของปฏิกิริยา

ดัดแปลงจาก: http://bioserv.fiu.edu/~walterm/Fund_Sp2004/lec3_cell_metab/cell_metabolism.htm

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ที่ความเข้มข้นอิ่มตัว (saturating concentration) เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ความเร็วสูงสุด (maximum velocity; V_{max})

ที่ครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด (1/2 V_{max}) ความเข้มข้นของสารตั้งต้นเรียกว่าค่าคงที่มิเคลิส (Michaelis constant; K_m)

V_{max} และ K_m เป็นคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์แต่ละชนิด โดย

- เอนไซม์ที่ดีจะมีค่า V_{max} สูง
- เอนไซม์ที่ดีจะมีค่า K_m ต่ำ

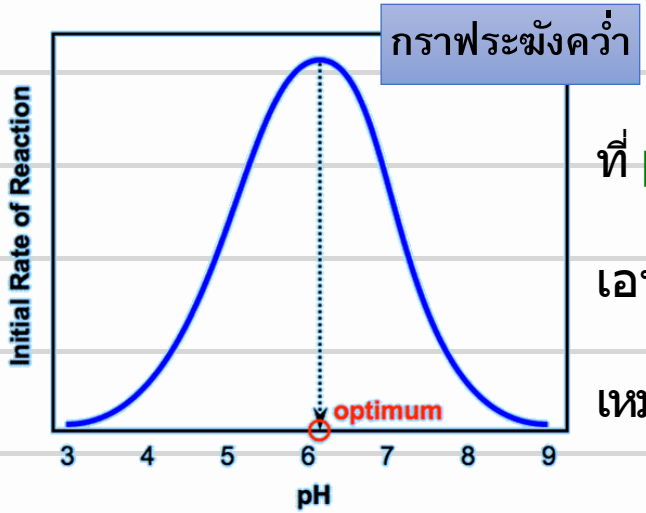
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

pH ของสารละลายมีผลต่อ v โดย

ที่ pH ต่ำ เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไม่ดี v จะต่ำ

ที่ pH กลาง เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดี v จะสูง ← Optimal pH

ที่ pH สูง เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไม่ดี v จะต่ำ



ที่ pH ต่ำ/สูง หรือสารละลายมีสภาพกรด/ด่างเกินไป

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ไม่ดีเพราะประจุของโปรตีนไม่

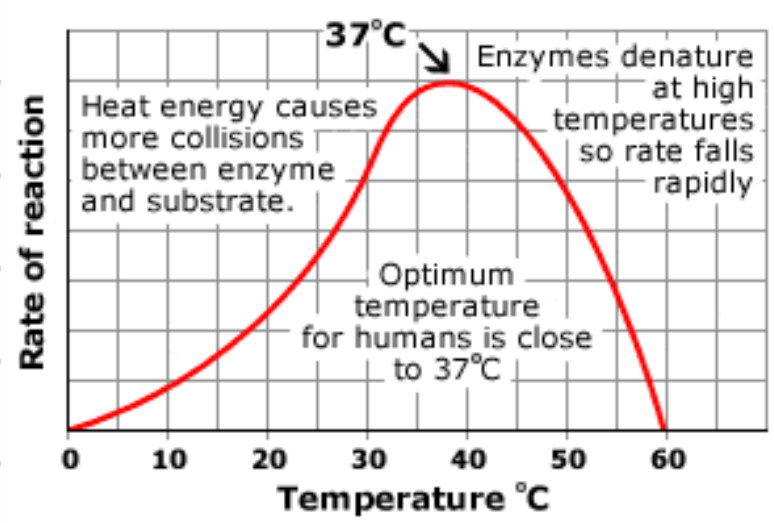
เหมาะสมทำให้เข้าจับกับ substrate ได้ไม่ดีเท่าเดิมนั่นเอง

รูป 50 ผลของ pH ต่อความเร็วของปฏิกิริยา

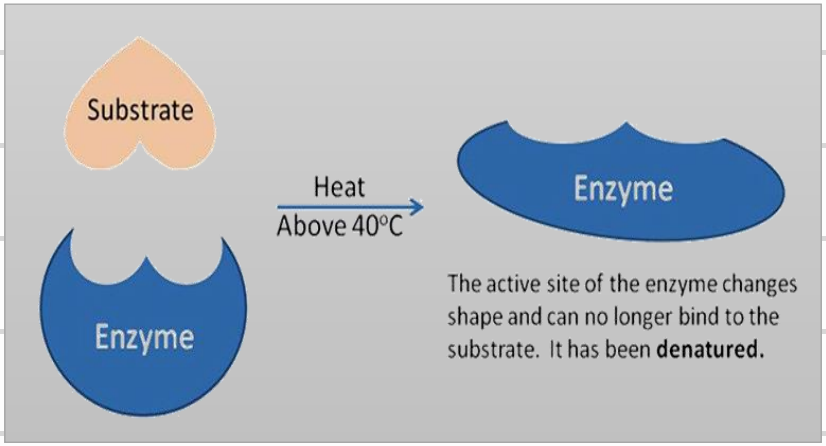
ดัดแปลงจาก: http://bioserv.fiu.edu/~walterm/Fund_Sp2004/lec3_cell_metab/cell_metabolism.htm

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

อุณหภูมิ ปกติความเร็วของปฏิกิริยาจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทั้งนี้เพราะเมื่อ T สูงขึ้นโมเลกุลต่างๆ จะมีพลังงานสูงขึ้นตาม ทำให้เกิดปฏิกิริยาง่ายขึ้น กรณีของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งอุณหภูมิมีผลดังรูป อธิบายได้ว่าที่อุณหภูมิสูงเกินไป ความเร็วของปฏิกิริยาลดลงทันทีเพราะเอนไซม์เสียสภาพ



รูป 51 ผลของอุณหภูมิต่อความเร็วของปฏิกิริยา



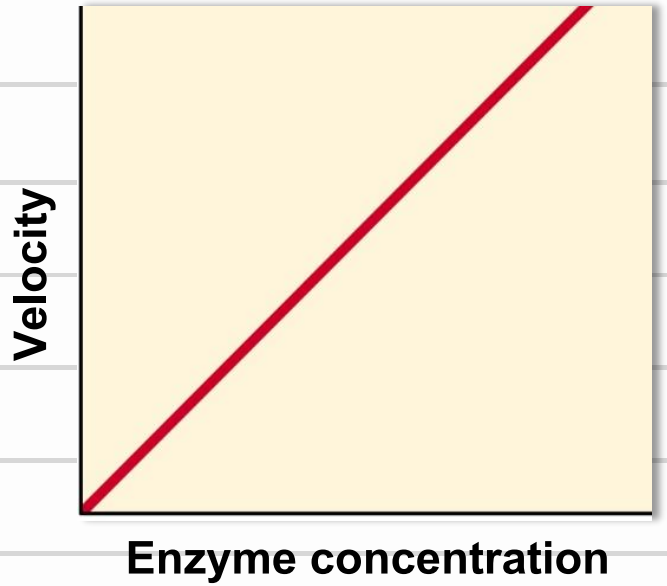
รูป 52 ที่อุณหภูมิสูงเกินไปรูปร่างของโปรตีนจะเปลี่ยนทำให้ไม่สามารถเข้าจับกับสารตั้งต้นจึงไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีก

ที่มา: https://biochemianzunited.wordpress.com/2014/03/

http://sciencelearn.org.nz/Contexts/Digestion-Chemistry/Sci-Media/Images/Denatured-enzyme

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ ที่ [S] อิ่มตัว พบว่า $v \alpha [E]$



รูป 53 ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อความเร็วของปฏิกิริยา

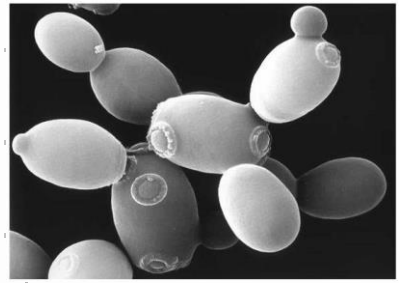
ดัดแปลงจาก: http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

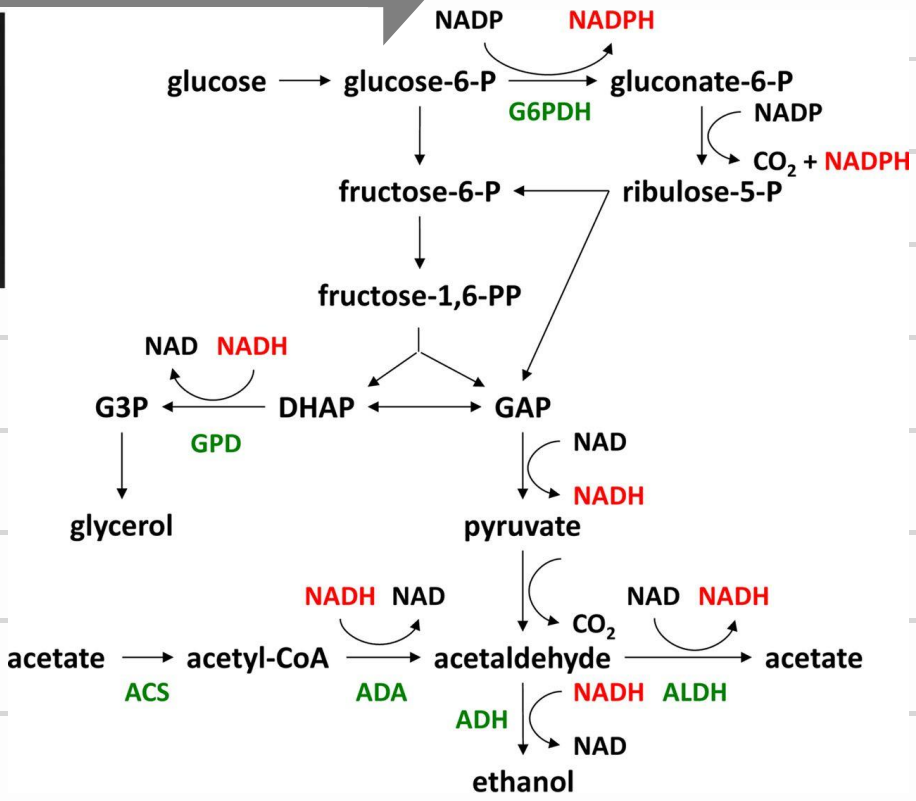
ตัวอย่าง การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้เซลล์ยีสต์และการควบคุมปัจจัยให้เหมาะสม

การใช้ยีสต์ในการหมักถือเป็นการใช้ระบบเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาล glucose/fructose ในน้ำผลไม้ให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นการผลิตเครื่องดื่มประเภทที่มีแอลกอฮอล์ สามารถสร้างรายได้ให้กับครัวเรือน และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ผลไม้ในท้องถิ่นอีกด้วย

ยีสต์ที่ใช้ Saccharomyces cerevisiae



ผลไม้ท้องถิ่นคุณภาพไม่ดี ขายไม่ได้ราคา



ขบวนการหมักที่เกิดขึ้นในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจนของยีสต์ มีเอนไซม์เกี่ยวข้องจำนวนมาก

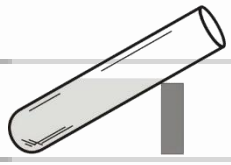
Enzymes

ACS
acetyl-CoA synthetase;
ADA
acetaldehyde dehydrogenase;
ADH
alcohol dehydrogenase;
ALDH
acetaldehyde dehydrogenase;
GPD
glycerol-3-phosphate dehydrogenase;
G6PDH
glucose-6-phosphate dehydrogenase;

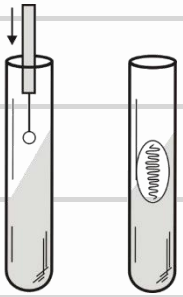
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ปรับปรุงขบวนการหมักไวน์จากลูกไหนป่า มีขั้นตอนดังนี้

เตรียมหัวเชื้อ

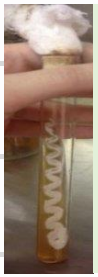


เตรียม agar slant



เขี่ยเชื้อจาก stock ลงหลอด agar slant

บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม.



S. Cerevisiae สายพันธุ์ burgundy แหล่งเอนไซม์สำหรับหมัก

เขี่ยเชื้อลงน้ำสับปะรด (ฆ่าเชื้อแล้ว)

บ่ม 24 ชม.

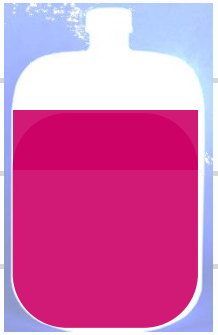
เตรียมน้ำผลไม้

ลูกไหนป่า

- ล้างสะอาด
- แกะเมล็ด
- บดละเอียด
- คั้นน้ำ

ต้มเดือด (ฆ่าเชื้อ)

ปรับความหวานเป็น 20-25%brix ด้วยน้ำเชื่อม



บรรจุลงถังหมัก

การหมักไวน์

หัวเชื้ออายุ 24 ชม.

น้ำผลไม้ปรับความหวานแล้ว

บ่มต่อ 7 วัน

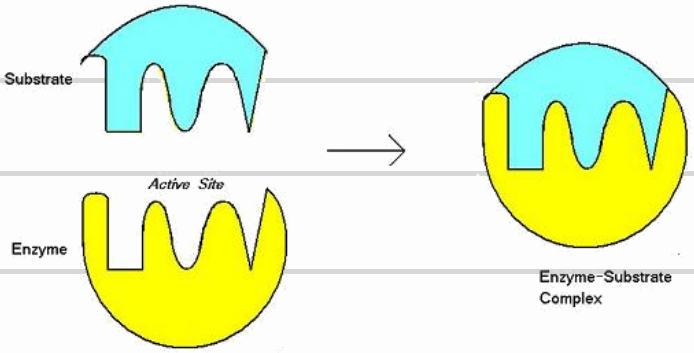
Knock เชื้อ

บรรจุขวด

จากหนังสือเชิญเป็นวิทยากรในเรื่อง "การแปลรูปผลผลิตทางการเกษตรเพื่อพัฒนาชุมชน" ลงวันที่ 8 กรกฎาคม 2562

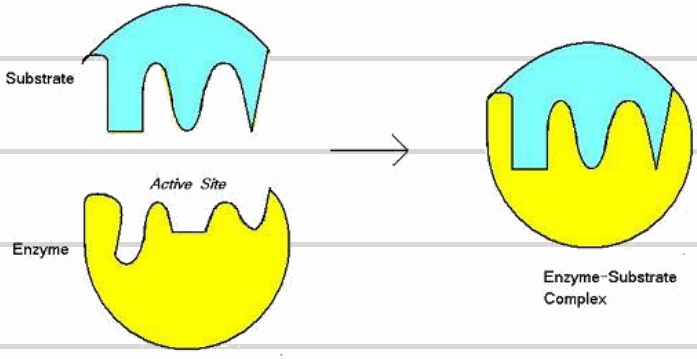
ทฤษฎีการทำงานของเอนไซม์

Lock and key theory



Lock-and-key Model.- The substrate and enzyme active site have complementary shapes

Induced fit theory

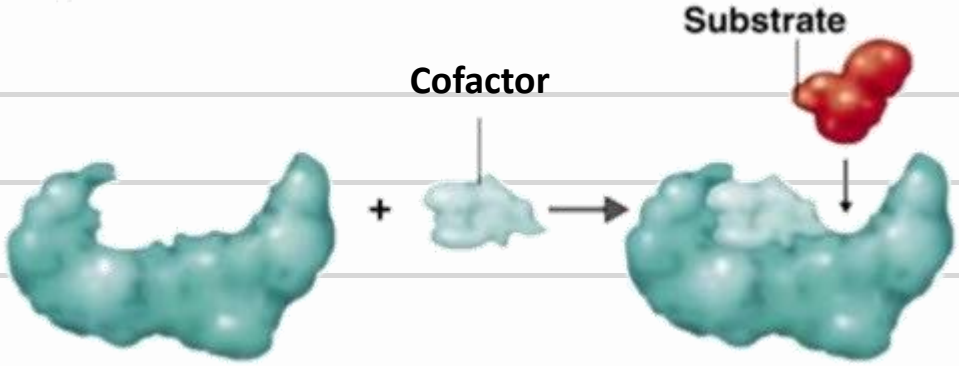


Induced-fit Model. - The enzyme active site forms a complementary shape to the substrate after binding.

รูป 54 การทำงานของเอนไซม์แบบ lock and key และ induced fit theory

ที่มา: http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme/Active_Site

โคแฟคเตอร์ (Cofactor)



Apoenzyme + Cofactor ——— Holoenzyme

(โปรตีน) (ไม่ใช่โปรตีน) (โปรตีนองค์ประกอบ)

Inactive (Active)

รูป 55 โคแฟคเตอร์เป็นโมเลกุลที่ไม่ใช่โปรตีนเมื่อเข้าจับกับเอนไซม์ทำให้แอคทีฟ

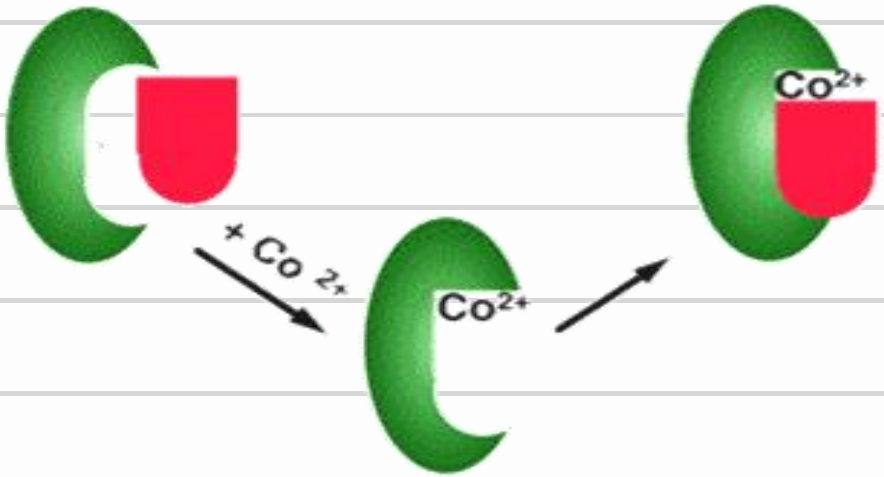
ที่มา: https://www.slideshare.net/lovnishthakur75/vitamins-as-coenzymes-different-forms-and-deficiency-disorders

แบ่งโคแฟคเตอร์เป็น 2 ชนิด

1. Metal ion 2. Coenzyme

โคแฟคเตอร์ (Cofactor)

1. Metal ion โลหะไอออนจะยึด substrate กับโมเลกุลของเอนไซม์ โดยระหว่างเร่งปฏิกิริยาโลหะไอออนไม่มีการเปลี่ยนแปลง เช่น Zn^{2+} Mg^{2+} Fe^{2+} Fe^{3+} Cu^{2+} K^{+}

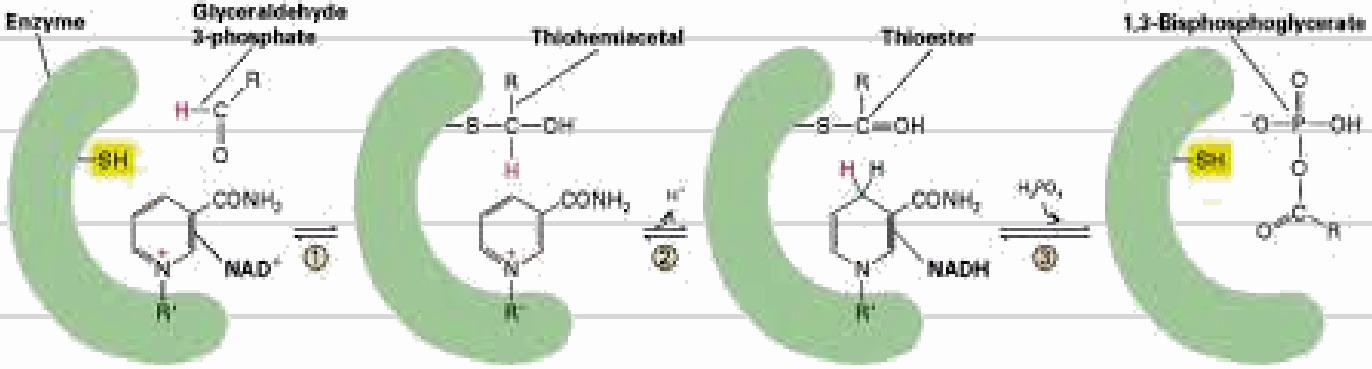


รูป 60 Co^{2+} ทำหน้าที่โคแฟคเตอร์โดยโครงสร้างไม่เปลี่ยน

ที่มา: http://html.rincondelvago.com/biocatalizadores.html

โคแฟคเตอร์ (Cofactor)

2. Coenzyme เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มาจาก soluble vitamin โคเอนไซม์เข้าร่วมในปฏิกิริยาโดยระหว่างเร่งปฏิกิริยาโครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ เช่น NADH/NAD^+, NADPH/$NADP^+$, $FADH_2$/FAD, acetyl CoA, PLP, biotin, FH_4



รูป 61 NAD^+ เปลี่ยนโครงสร้างเป็น NADH ระหว่างเร่งปฏิกิริยา

ที่มา: http://www.bioon.com/book/biology/mcb/bv.fcgi@call=bv.view..showsection&rid=mcb.figgrp.d1e70694.htm

NADH/NADPH อนุพันธุ์ของ **B2 (nicotinic acid)**

PLP อนุพันธุ์ของ **B6 (pyridoxin)**

$FADH_2$ อนุพันธุ์ของ **B3 (riboflavin)**

Biotin อนุพันธุ์ของ **B7**

Acetyl CoA อนุพันธุ์ของ **B5 (pantothenic acid)**

FH_4 อนุพันธุ์ของ **B9 (folic acid)**

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

จลนศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme kinetics) กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างความ**เข้มข้นของสาร**ต่างๆ ที่เข้าร่วมในการเกิดปฏิกิริยากับ**ความเร็วของปฏิกิริยา**

พิจารณากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ถูกเสนอโดย Michaelis-Menten

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad \ldots (1)$$

E = เอนไซม์

S = สารตั้งต้น

ES = สารประกอบของเอนไซม์กับสารตั้งต้น

P = สารผลิตภัณฑ์

k_1 = ค่าคงที่อัตราของการเกิด ES

k_2 = ค่าคงที่อัตราของการสลาย ES กลับเป็น E และ S

k_3 = ค่าคงที่อัตราของการเกิด P

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

จาก (1) อัตราเร็วของปฏิกิริยา (v) จะขึ้นอยู่กับ [ES] ซึ่งอาจเขียนความสัมพันธ์ทางคณิตศาสตร์ได้หลายแบบ เช่น $v = \frac{d[P]}{dt}$ หรือ $v = -\frac{d[S]}{dt}$ หรือ $v \propto [ES]$

$$v = k_3 [ES] \qquad \ldots (2)$$

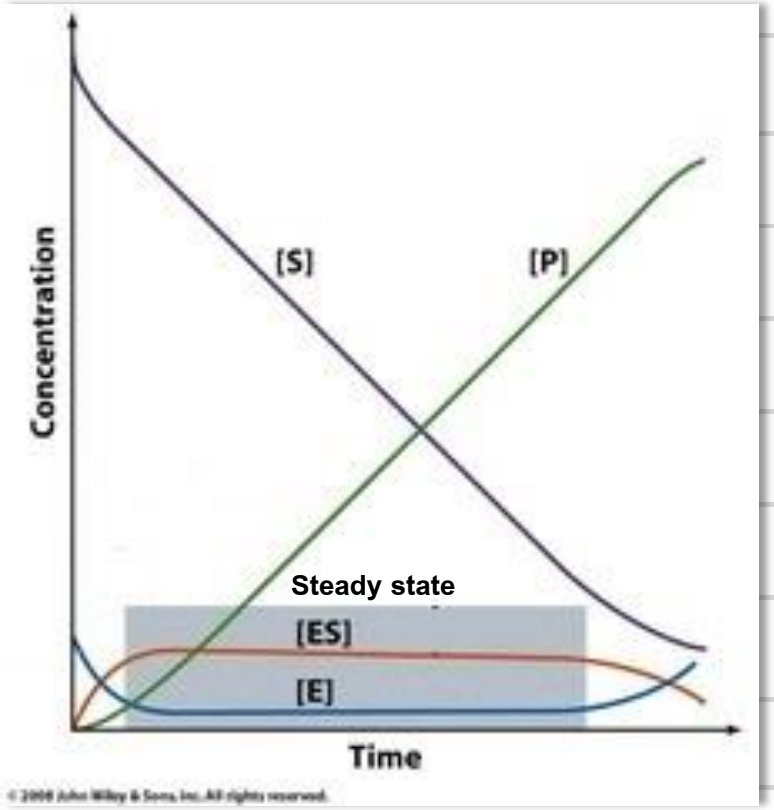
ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เราสนใจ อัตราเร็วสูงสุด (maximum velocity; V_{max}) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เมื่อเอนไซม์อิ่มตัวด้วยสารตั้งต้น หรือเอนไซม์ทุกโมเลกุลจับกับสารตั้งต้นเกิดเป็น ES ทั้งหมดนั่นเอง

ถ้าให้ $[E_0]$ เป็นความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ และถ้าเอ็นไซม์ทั้งหมดจับกับสารตั้งต้น $[E_0] = [ES]$ ดังนั้นจะได้สมการ

$$V_{max} = k_3 [E_0] \qquad \ldots (3)$$

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

จากกลไกการเร่งปฏิกิริยา (1) พิจารณาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารทุกชนิด จะได้กราฟ ซึ่งพบว่า เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปถึงระยะหนึ่งจะเข้าสู่ **สภาพคงตัว (steady state)** ซึ่งความเข้มข้นของ **ES คงที่** ทั้งนี้เนื่องจาก



อัตราการเกิด ES = อัตราการสลาย ES

ดังนั้นจะได้ว่า

$$k_1[E][S] = k_2[ES] + k_3[ES] \quad \ldots(4)$$

และเนื่องจาก $[E_0] = [E] + [ES]$ จะได้

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad \ldots(5)$$

รูป 62 Steady state ของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

ที่มา: http://quizlet.com/16984681/bchs-3304-enzyme-kinetics-ch-12-flash-cards/

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

แทนค่า (5) ลงใน (4) จะได้

$$k_1([E_0]-[ES])\,[S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

$$k_1[E_0][S] - k_1[ES][S] = k_2[ES] + k_3[ES] \qquad \ldots(6)$$

จาก (2) , (3) และ (6) จัดรูปสมการใหม่ จะได้

$$(k_2 + k_3 + k_1[S])\frac{v}{k_3} = k_1[S] - \frac{V_{max}}{k_3} \qquad \ldots(7)$$

ในที่สุดจะได้ Michaelis-Menten equation ดังนี้

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad \ldots(8)$$

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

และ **Michaelis constant** ดังนี้

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad \ldots(9)$$

โดยค่า K_m บอกถึงความสามารถในการจับกันของ E กับ S

K_m มาก หมายถึง ... E ไม่ชอบจับกับ S ...เป็น E ไม่ดี

K_m น้อย หมายถึง ... E ชอบจับกับ S ...เป็น E ที่ดี

Michaelis-Menten equation บอกถึงอัตราเร็วของปฏิกิริยา (v หรือ V_{max})

เมื่อใช้ S เข้มข้นต่าง ๆ กัน เช่น จงหา v ในเทอมของ V_{max} ถ้าใช้ [S] ค่าต่าง ๆ ดังนี้

ถ้า [S] = 0.1Km จงหา v = $\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$ แทนค่า [S] เป็น 0.1 Km $\frac{0.1K_m}{1.1K_m}$ $v = 0.091V_{max}$

ถ้า [S] = 0.5Km จงหา v = ...

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

ถ้า [S] = 1.0Km จงหา v = $\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$ แทนค่า [S] เป็น 1.0 Km $\frac{1.0K_m}{1.0K_m}$ $v = 0.5V_{max}$

ถ้า [S] = 7Km จงหา v = ...

ถ้า [S] = 20Km จงหา v = $\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$ แทนค่า [S] เป็น 20 Km $\frac{20K_m}{K_m}$ $v = 0.95V_{max}$

นอกจากนี้มีการแปลง Michaelis-Menten equation ให้ง่ายต่อการใช้งาน โดยทำให้เป็นส่วนกลับ ซึ่งในที่สุดจะได้ Lineweaver-Burk ดังความสัมพันธ์ต่อไปนี้

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad ...(10)$$

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

สมการ Lineweaver-Burk เทียบได้กับสมการเส้นตรง $Y = aX + c$ ดังนั้นถ้า plot ระหว่าง

แกน Y โดยให้เป็น $1/v$ และ แกน X โดยให้เป็น $1/[S]$

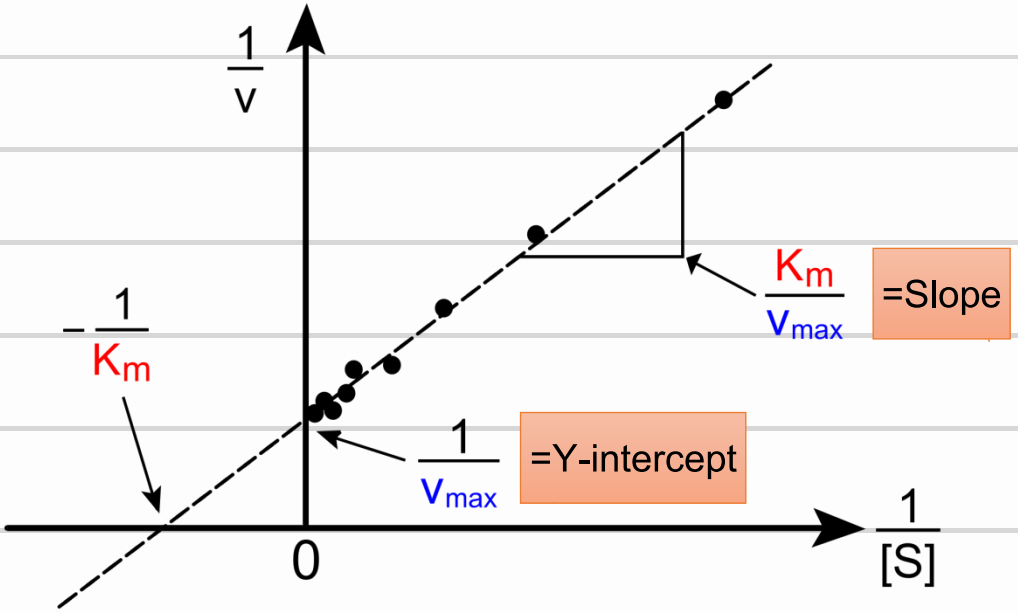
จะได้ว่า ความชันของเส้นตรง $= K_m/V_{max}$ และ จุดตัดบนแกน $Y = 1/V_{max}$ ดังนี้

Slope Y-intercept

$$Y = aX + c$$

$$1/v = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max}$$

ดังนั้นจะหาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ ได้จาก Lineweaver-Burk plot หรือ double reciprocal plot ดังรูป 65



รูป 63 Lineweaver-Burk plot หรือ double reciprocal plot

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Lineweaver%E2%80%93Burk_plot

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

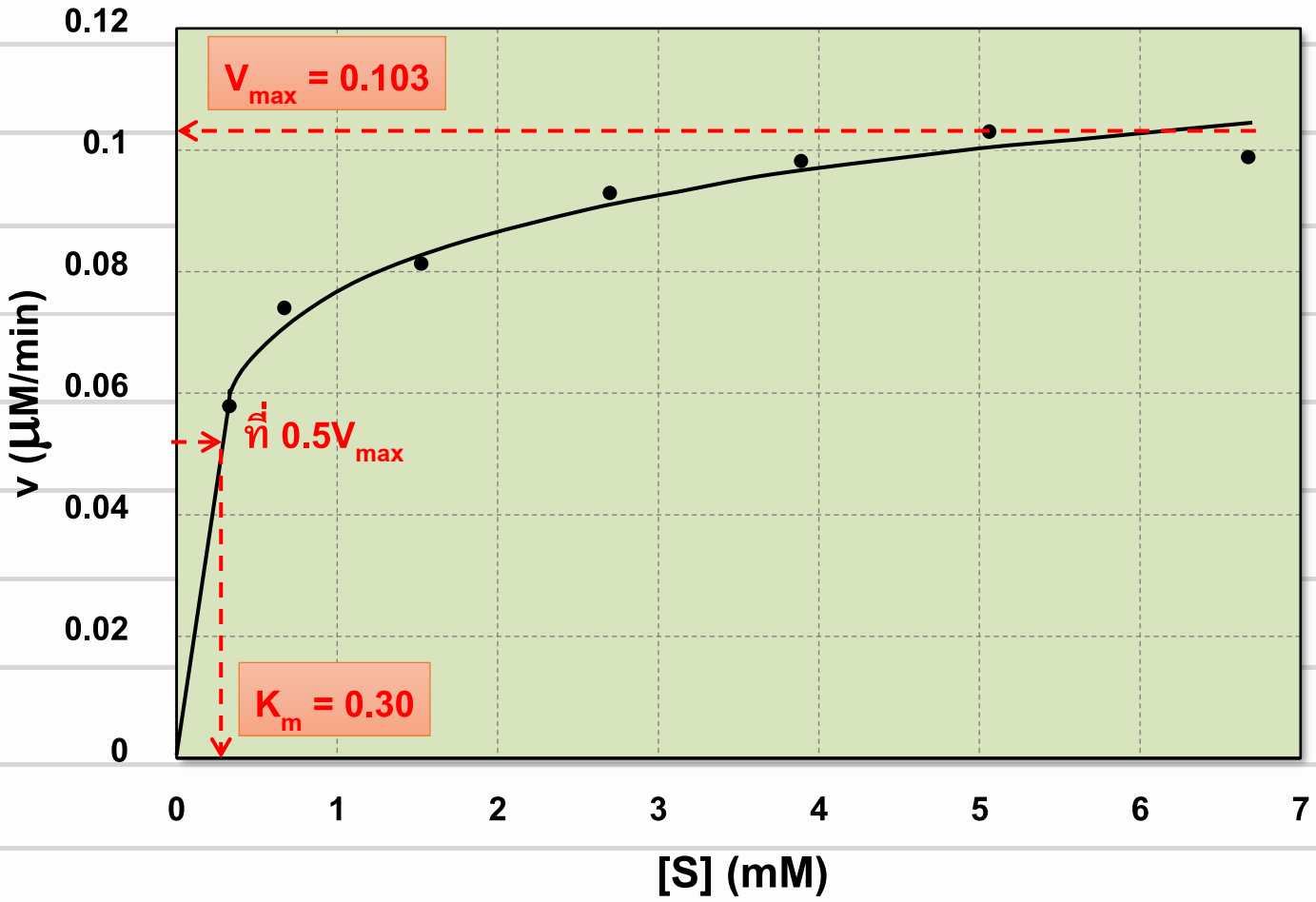
แบบฝึกหัด 12: การหาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์

เอนไซม์ tyrosinase เร่งการเปลี่ยน tyrosine ไปเป็น DOPA จงหาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์นี้ถ้าวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (v) เมื่อใช้สารตั้งต้นเข้มข้น [S] ต่างๆ ได้ดังนี้

[S] (mM)	V (μM/min)	1/[S] (mM)	1/V (μM/min)
0.338	0.058	2.96	17.24
0.676	0.074	1.48	13.51
1.521	0.081	0.66	12.35
2.705	0.093	0.37	10.75
3.888	0.098	0.26	10.20
5.071	0.103	0.20	9.71
6.671	0.099	0.15	10.10

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

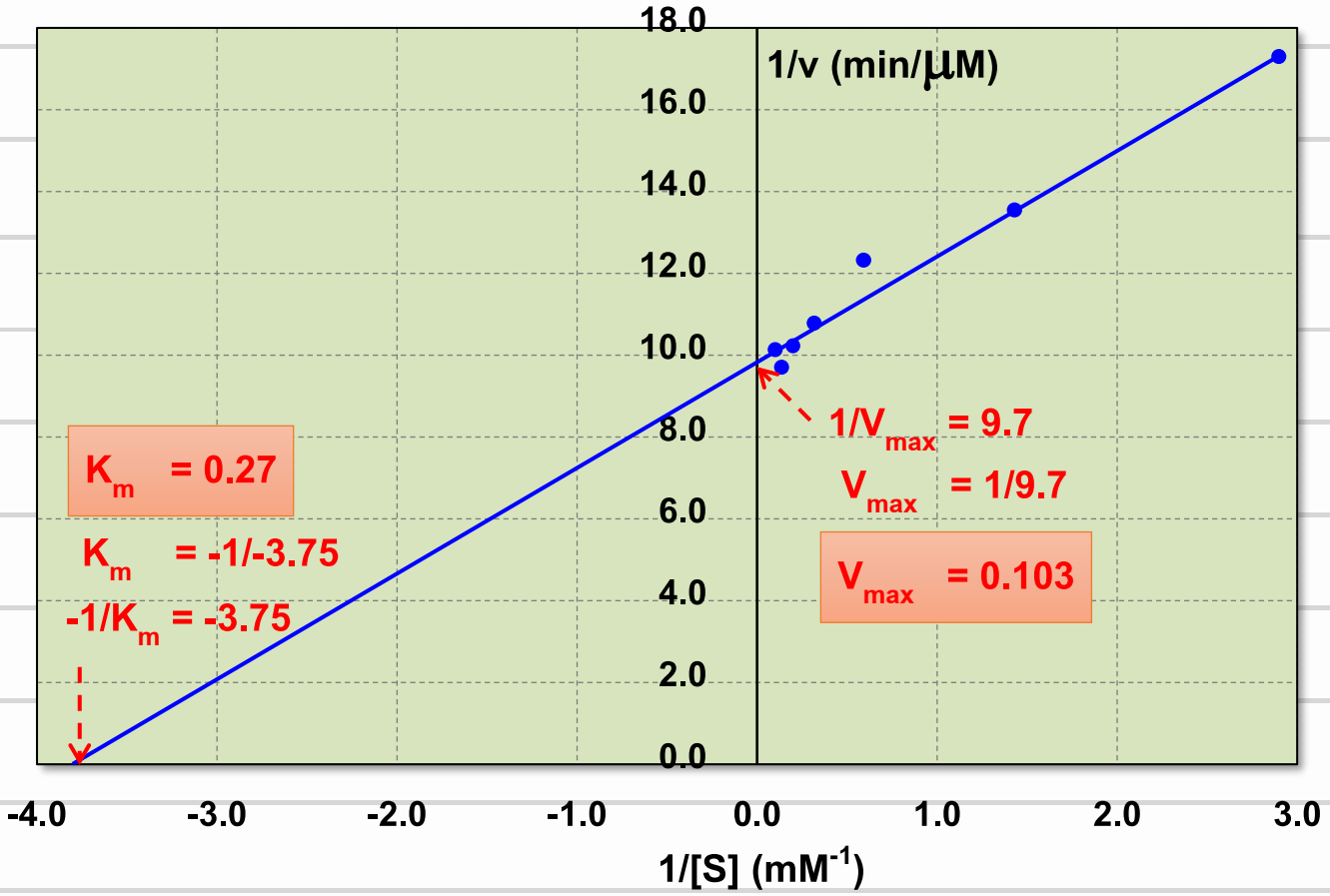
หาค่า K_m และ V_{max} จาก **Michaelis-Menten equation** ได้ดังนี้



ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้มีค่า K_m = 0.30 mM และ V_{max} = 0.103 µM/min

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

หาค่า K_m และ V_{max} จาก **Lineweaver-Burk plot** ได้ดังนี้



ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้มีค่า K_m = 0.27 mM และ V_{max} = 0.103 μM/min