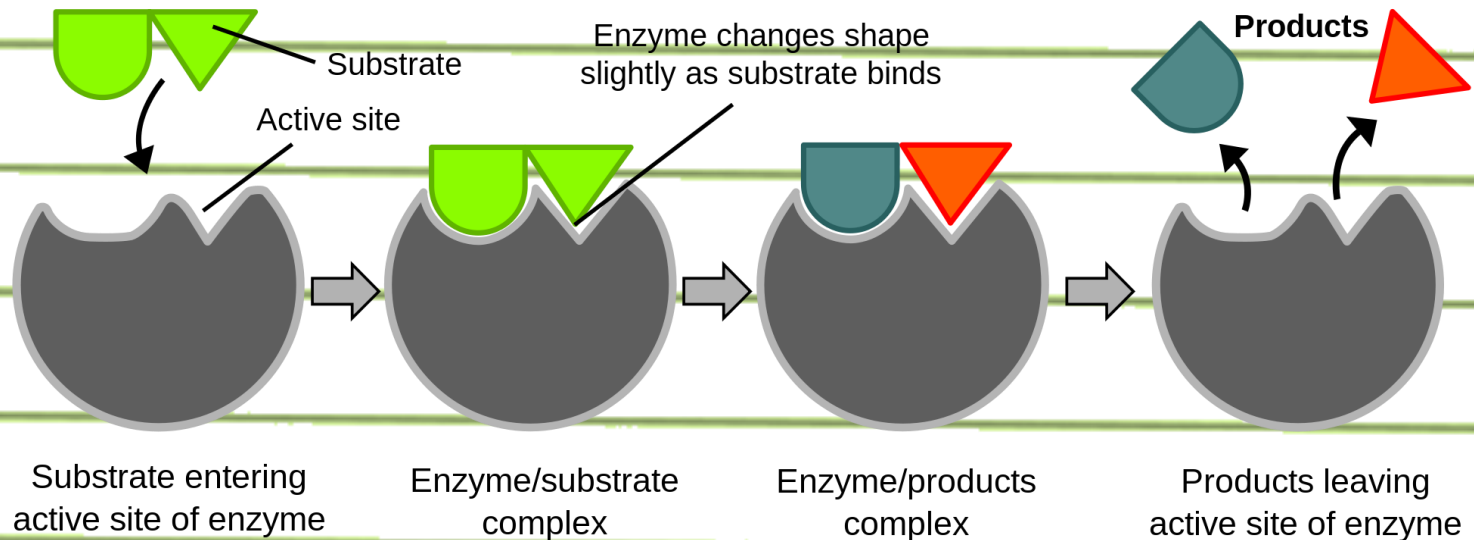


คม 323 : เอนไซม์ (Enzyme)

ภาคเรียน 1 ปีการศึกษา 2565



อ. กัญญา บุตรราช

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้



ห้อง 3403 อาคารจุฬารักษ์



CH323 Biochemistry1



Kanya Buttaraj

เอนไซม์ (ENZYME)

Topic

Page

ลักษณะสำคัญของเอนไซม์

3

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

6

ชื่อและการจัดจำพวกเอนไซม์

14

ทฤษฎีการทำงานของเอนไซม์

21

โคแฟกเตอร์

22

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

26

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

38

ลักษณะสำคัญของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนก้อนกลม (globular protein)

เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate) และจำเพาะต่อ

ชนิดปฏิกิริยา

เอนไซม์เร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้ที่สภาวะเหมาะสม

- Optimal temperature 37 °C

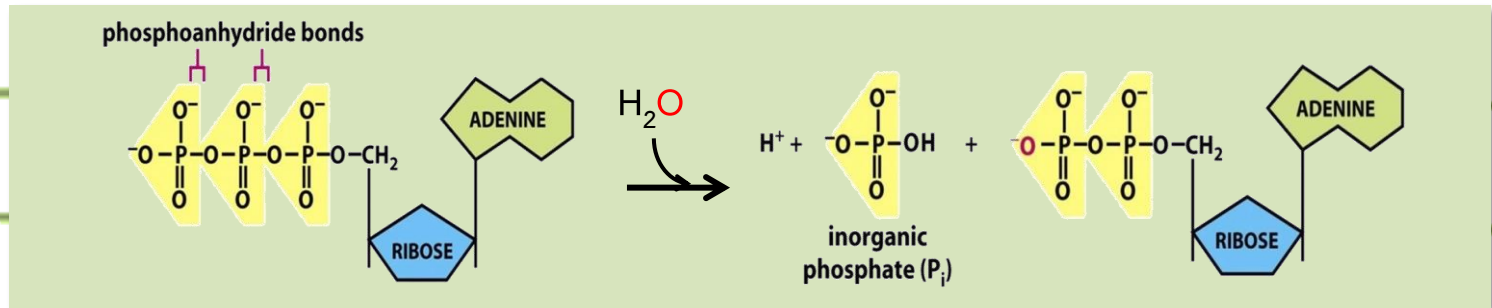
- Optimal pH 7.5

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยทำให้มีการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่ละน้อย

โดยมีโมเลกุล ATP (adenosine-5'-triphosphate) ซึ่งเป็นสารพลังงานสูงเป็น

โมเลกุลเก็บและปล่อยพลังงาน

ลักษณะสำคัญของเอนไซม์



รูป 1 การเก็บและปลดปล่อยพลังงานของ ATP/ADP

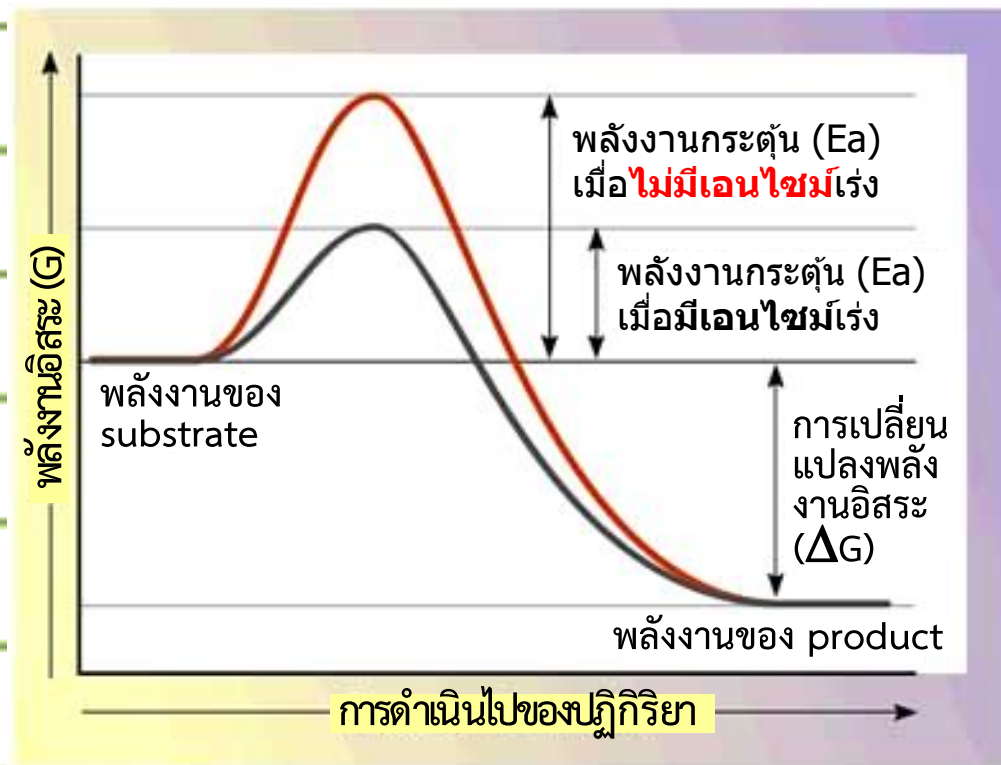
ดัดแปลงจาก: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/lecture-4/deck/2171426>

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ทั้ง **in vivo** และ **in vitro**

สมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ของเอนไซม์คือ

- เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้น (activation energy; E_a) ของระบบ
- เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยไม่ลดพลังงานของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ (product)
- เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยไม่เปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระกิบบส์ (ΔG) ของระบบ
- เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยไม่เปลี่ยนแปลงค่าคงที่สมดุลของระบบ
- เอนไซม์เร่งให้ปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลเร็วขึ้น

ลักษณะสำคัญของเอนไซม์



รูป 2 การเปลี่ยนแปลงพลังงานระหว่างปฏิกิริยาที่มี (—) และไม่มีเอนไซม์ (—) เป็นตัวเร่ง

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

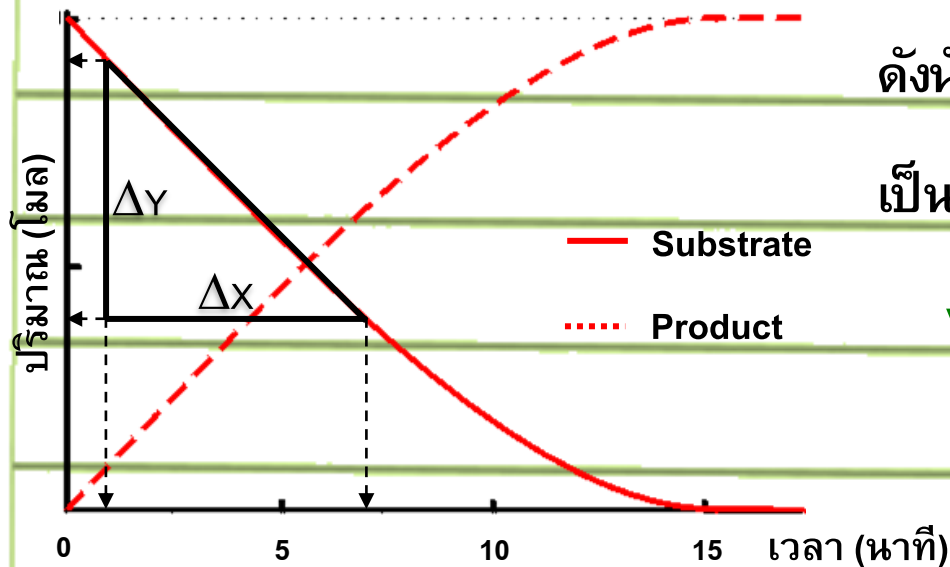
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ก่อนจะทราบว่าปัจจัยใดบ้างมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ควรทราบถึงวิธี

วัดความเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ก่อน โดยทั่วไปวัดได้จากโมเลกุล 2 ชนิด

- โมเลกุลสารตั้งต้น โดยวัดจากปริมาณที่ลดลงต่อหน่วยเวลา

- โมเลกุลสารผลิตภัณฑ์ โดยวัดจากปริมาณที่เพิ่มขึ้นต่อหน่วยเวลา



ดังนั้นจะใช้ความเร็วเริ่มต้น (initial velocity; v)

เป็นตัวแทน ความเร็วของปฏิกิริยาทั้งหมด

$v = \frac{\text{ปริมาณ S ที่ลดลง}}{\text{เวลา}}$

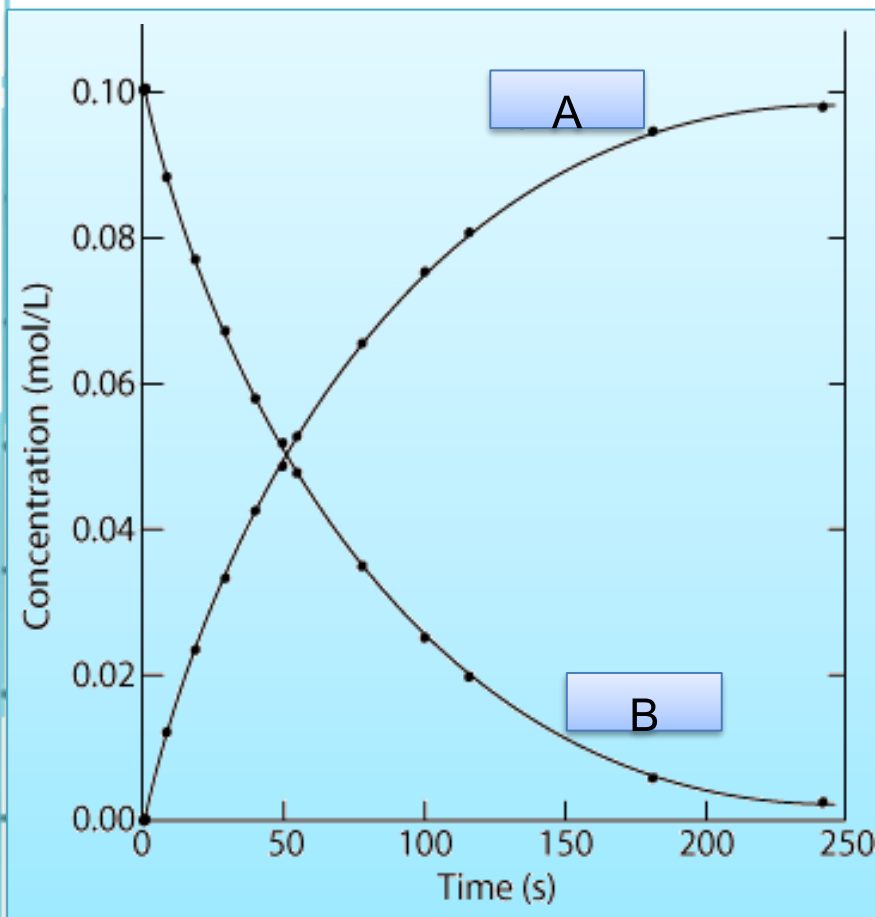
$$v = \frac{\Delta Y}{\Delta X}$$

$v = \dots? \dots$ โมล/นาที

รูป 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ S และ P ระหว่างปฏิกิริยา

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

แบบฝึกหัด 1 จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร A และ B กับเวลา



ตอบคำถาม

1. สาร A คือ สารตั้งต้น หรือ ผลิตภัณฑ์
2. สาร B คือ สารตั้งต้น หรือ ผลิตภัณฑ์
3. หาคความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ ปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้ความเร็วเริ่มต้น (v) ของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลง ซึ่งได้แก่

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

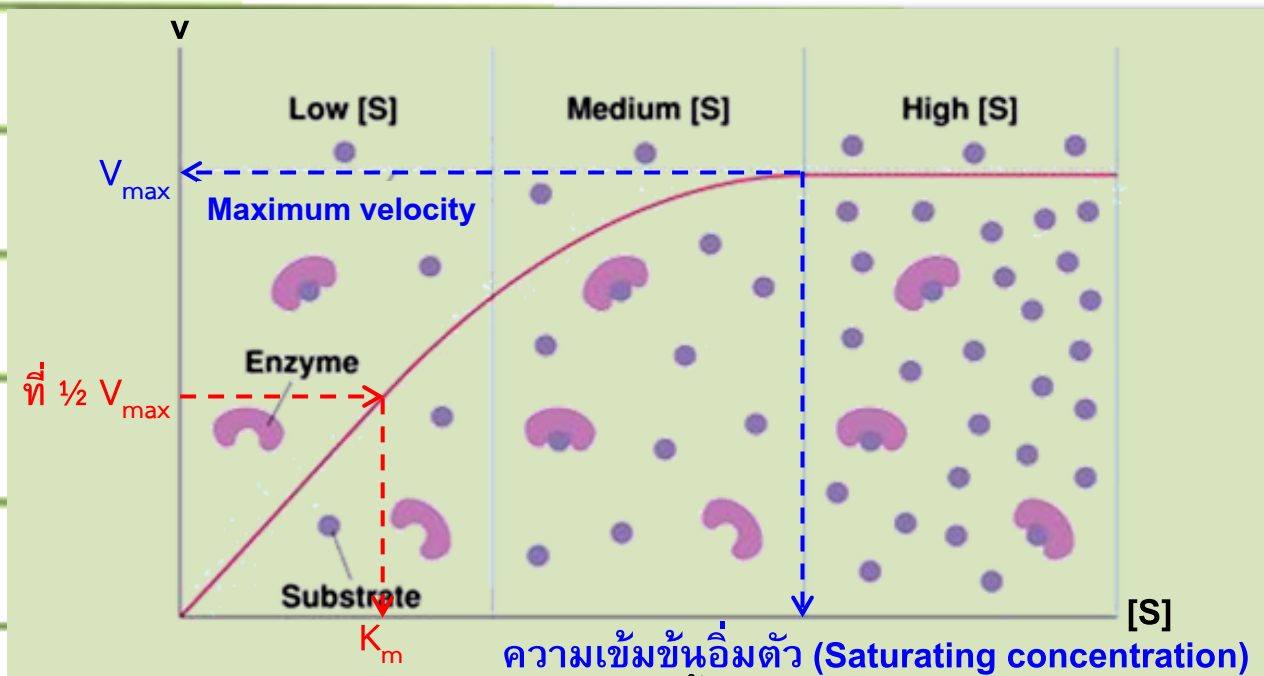
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

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 4 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อความเร็วของปฏิกิริยา

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ที่ความเข้มข้นอิ่มตัว (saturating concentration) เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา

ได้ความเร็วสูงสุด (maximum velocity; V_{max})

ที่ครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด ($1/2 V_{max}$) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

เรียกว่าค่าคงที่มิเคลิส (Michaelis constant; K_m)

V_{max} และ K_m เป็นคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์แต่ละชนิด โดย

- เอนไซม์ที่ดีจะมีค่า V_{max} สูง

- เอนไซม์ที่ดีจะมีค่า K_m ต่ำ

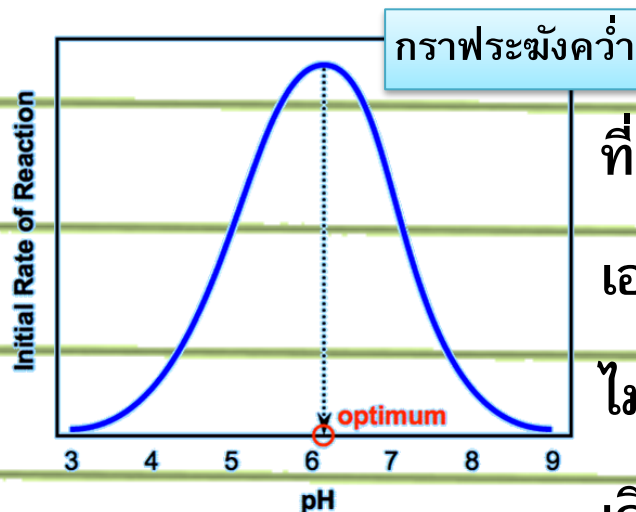
ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

pH ของสารละลายมีผลต่อ v โดย

ที่ **pH ต่ำ** เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา**ไม่ดี** v จะต่ำ

ที่ **pH กลาง** เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา**ได้ดี** v จะสูง ← Optimal pH

ที่ **pH สูง** เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา**ไม่ดี** v จะต่ำ



ที่ **pH ต่ำ/สูง** หรือสารละลายมี**สภาพกรด/ด่าง**เกินไป
เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ไม่ดีเพราะประจุของโปรตีน
ไม่เหมาะสมทำให้เข้าจับกับ substrate ได้ไม่ดีเท่า

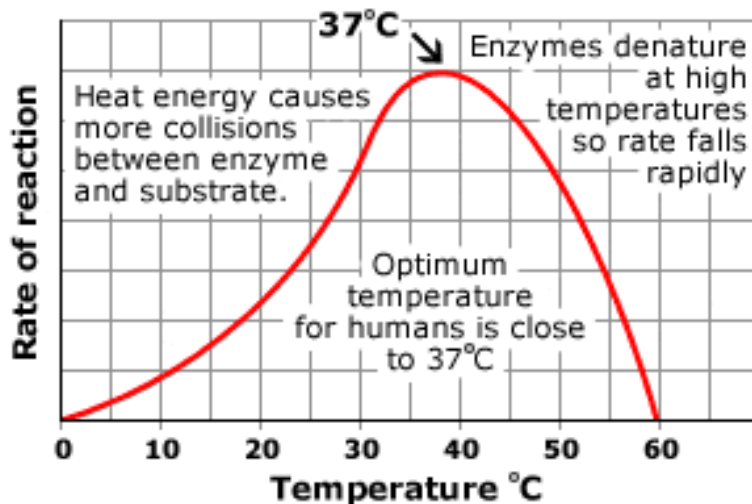
เดิมนั่นเอง

รูป 5 ผลของ pH ต่อความเร็วของปฏิกิริยา

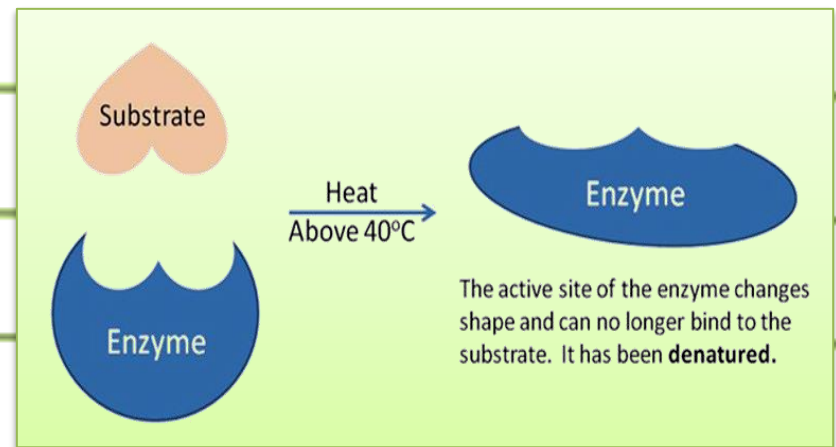
ดัดแปลงจาก: http://bioserv.fiu.edu/~walterm/Fund_Sp2004/lec3_cell_metab/cell_metabolism.htm

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

อุณหภูมิ ปกติความเร็วของปฏิกิริยาจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทั้งนี้เพราะเมื่อ T สูงขึ้นโมเลกุลต่าง ๆ จะมีพลังงานสูงขึ้นตาม ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น กรณีของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งอุณหภูมิมีผลดังรูป อธิบายได้ว่าที่**อุณหภูมิสูงเกินไป** ความเร็วของปฏิกิริยาลดลง**ทันที** เพราะเอนไซม์**เสียสภาพธรรมชาติ (denature)**



รูป 6 ผลของอุณหภูมิต่อความเร็วของปฏิกิริยา

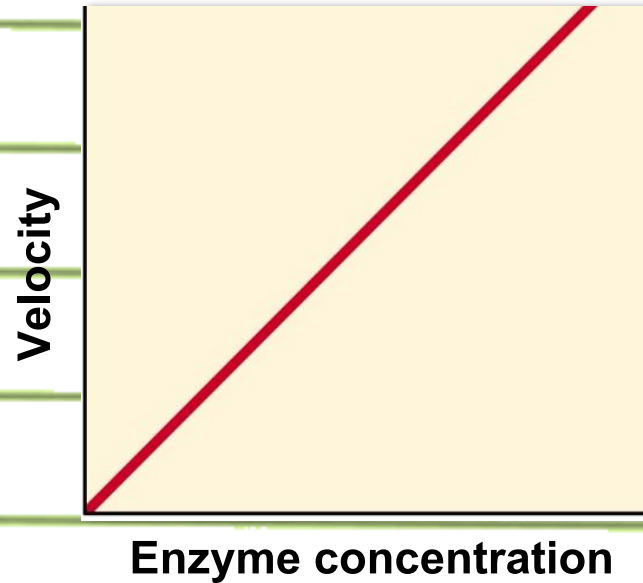


รูป 7 ที่อุณหภูมิสูงเกินไปรูปร่างของโปรตีนจะเปลี่ยนทำให้ไม่สามารถเข้าจับกับสารตั้งต้นจึงไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีก

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

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

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



รูป 8 ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อความเร็วของปฏิกิริยา

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

ชื่อและการจัดพวกเอนไซม์

ชื่อของเอนไซม์จะลงท้ายด้วยคำว่า เอส (ase) เช่น

- ทริปซิน (Trypsin)

ไม่บอกชนิด reaction

- เปปซิน (Pepsin)

ไม่ลงท้ายชื่อด้วย "ase"

- คะตะเลส (Catalase)

ลงท้ายชื่อด้วย "ase"

- ซูเครส (Sucrase)

ชื่อของ substrate
ลงท้ายด้วย "ase"

- ไพรูเวท คาร์บอกซิเลส

(Pyruvate carboxylase)

ชื่อของ substrate
และ reaction
ลงท้ายด้วย "ase"

- ไลเปส (Lipase)

ในปีค.ศ. 1992 คณะกรรมการ "International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (IUBMB) ได้กำหนดให้ตั้งชื่อเอนไซม์ตามความจำเพาะต่อปฏิกิริยาที่มันเร่ง โดยแบ่งปฏิกิริยาที่เอนไซม์เร่งเป็น 6 กลุ่ม (class) ดังตาราง

ชื่อและการจัดพวกเอนไซม์

ตาราง 1 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์

Class of Enzyme	Reaction Catalyses
1. ออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase)	ปฏิกิริยาออกซิเดชัน/รีดักชัน
2. ทรานสเฟอเรส (Transferase)	เคลื่อนย้ายหมู่ระหว่างผู้ให้ (donor) และผู้รับ (acceptor)
3. ไฮโดรเลส (Hydrolase)	ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (สลายพันธะด้วยน้ำ)
4. ไลเอส (Lyase)	สลายพันธะโดยไม่ใช้น้ำ แต่สร้างพันธะคู่ หรือปฏิกิริยาย้อนกลับ
5. ไอโซเมอเรส (Isomerase)	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนเป็นไอโซเมอร์
6. ไลเกส (Ligase)	เชื่อม 2 หมู่หรือโมเลกุล โดย ATP

ดัดแปลงจาก: <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/cellular-macromolecules/enzymes-classification.php>

ชื่อและการจัดพวกอเอนไซม์

ตาราง 2 การแบ่งกลุ่มย่อย (subclass) ของเอนไซม์

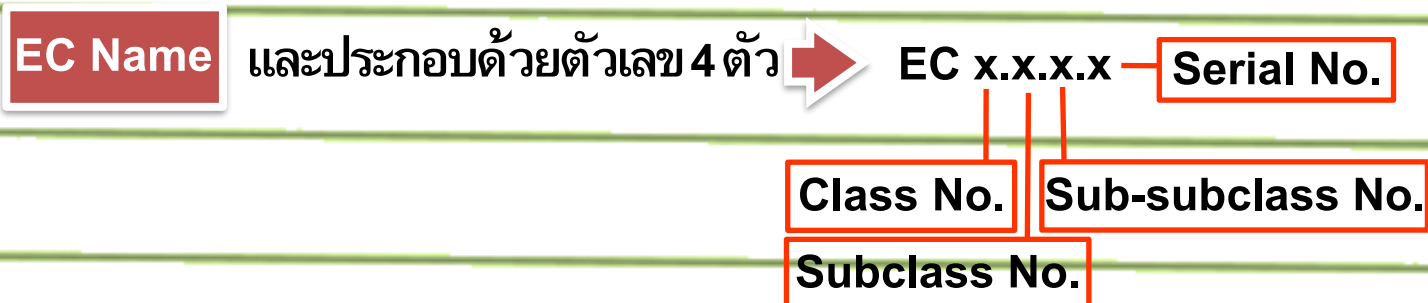
Class	Subclass	Substrate ที่เกี่ยวข้อง	Subclass	Substrate ที่เกี่ยวข้อง
1. ออกซิโดรีดักเทส	1.1	$-\text{CH}_2-\text{OH}$	1.2	$>\text{C}=\text{O}$
	1.3	$-\text{CH}=\text{CH}-$	1.4	$>\text{CH}-\text{NH}_2$
	1.5	$>\text{CH}-\text{NH}-$	1.6	$\text{NADH}+\text{H}^+$, $\text{NADPH}+\text{H}^+$
2. ทรานสเฟอเรส	2.1	$-\text{CH}_3$, $>\text{CH}_2$, $-\text{OH}$	2.2	$\text{H}-\text{C}=\text{O}$, $-\text{C}=\text{O}$
	2.3	$\text{O}=\text{C}-\text{R}$ (acyl group)	2.4	$-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$ (glycosyl group)
	2.5	alkyl group	2.6	nitrogenous group
	2.7	phosphoryl group	2.8	ส่วนที่มีอะตอมกำมะถัน
3. ไฮโดรเลส	3.1	$\text{O}=\text{C}-\text{O}-$	3.2	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5-\text{O}-\text{R}$
	3.3	$\text{R}-\text{O}-\text{R}'$	3.4	$-\text{CO}-\text{NH}-$
	3.5	$-\text{C}-\text{N}$	3.6	$\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$
4. ลิเอส	4.1	$>\text{C}=\text{C}<$	4.2	$>\text{C}=\text{O}$
	4.3	$>\text{C}=\text{N}-$	4.4	$>\text{C}=\text{S}$

ชื่อและการจัดพวกอเอนไซม์

ตาราง 2 การแบ่งกลุ่มย่อย (subclass) ของเอนไซม์ (ต่อ)

Class	Subclass	Substrate ที่เกี่ยวข้อง	Subclass	Substrate ที่เกี่ยวข้อง
5. ไฮโดรเมอเรส	5.1	L-isomer เป็น D-isomer		
	5.2	cis isomer เป็น trans isomer		
6. ไลเกส	6.1	C-O	6.2	C-S
	6.3	C-N	6.4	C-C
	6.5	phosphoric ester bond		

คณะกรรมการชุดดังกล่าวกำหนดให้เอนไซม์แต่ละชนิดมีรหัสประจำตัวเรียก



ชื่อและการจัดพวเอนไซม์

ตัวอย่าง

EC Name

EC 2.7.1.1

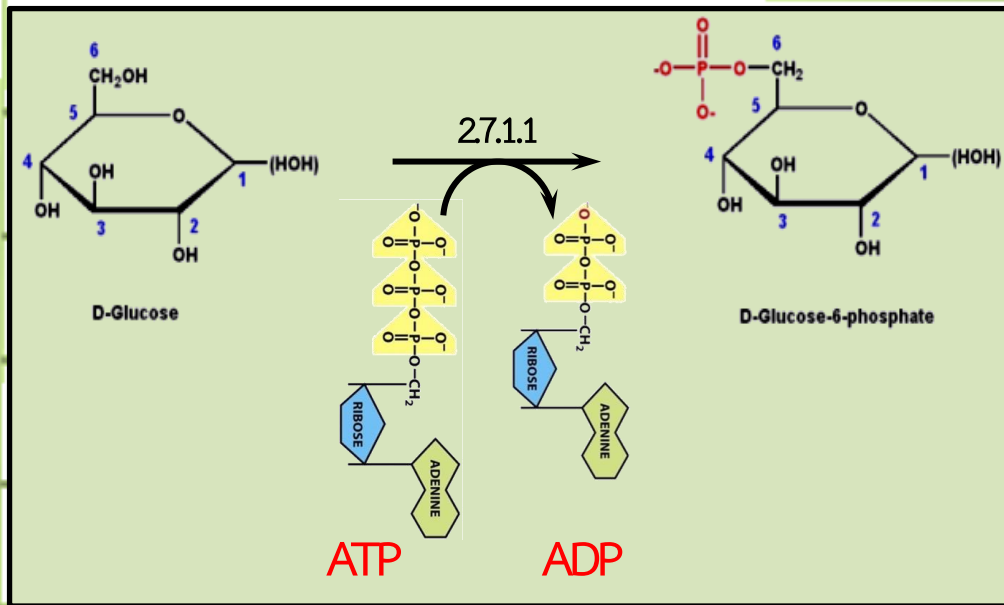
Serial No. 1 : glucose

Class No. 2 : transferase (ขนย้ายหมู่)

Sub-subclass No. 1 : -OH

Subclass No. 7 : phosphoryl group

ซึ่งเอนไซม์ 2.7.1.1 นี้เร่งปฏิกิริยาการขนย้ายหมู่ $\text{HO}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-$ ไปที่หมู่ $-\text{OH}$ ของโมเลกุล Glucose



EC 2.7.1.1 มีชื่อตามระบบว่า

ATP: glucose phosphotransferase

ชื่อสามัญว่า Glucokinase

รูป 9 ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ 2.7.1.1

ชื่อและการจัดพวเอนไซม์

แบบฝึกหัด 2 : บอกรายละเอียดของเอนไซม์ต่อไปนี้

Class No. 2 : transferase (ขนย้ายหมู่)

EC 2.7.1.11 — Serial No. 11 : D-fructose-6-phosphate

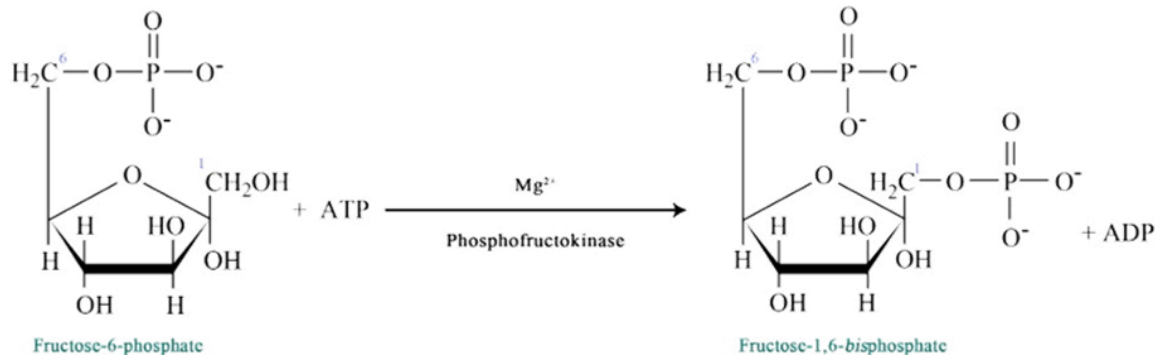
Subclass No. 7 : phosphoryl group

Sub-subclass No. 1 : -OH

1. เอนไซม์ชนิดนี้เร่งปฏิกิริยาใด.....ขนย้ายหมู่

2. เอนไซม์นี้มีชื่อสามัญว่าอย่างไร.....Phosphofructokinase

3. เขียนสมการที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยานี้



ชื่อและการจัดพวเอนไซม์

แบบฝึกหัด 3 : บอกรายละเอียดของเอนไซม์ต่อไปนี้

Subclass No. 2 :

EC 3.2.1.26

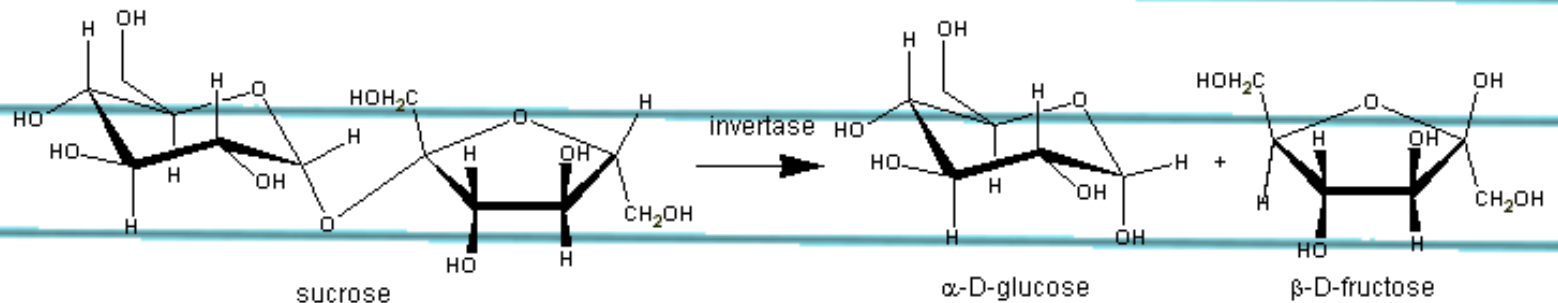
Serial No. 26 : β -D-fructose

Class No. 3 :

Sub-subclass No. 1 : C₁-O-C

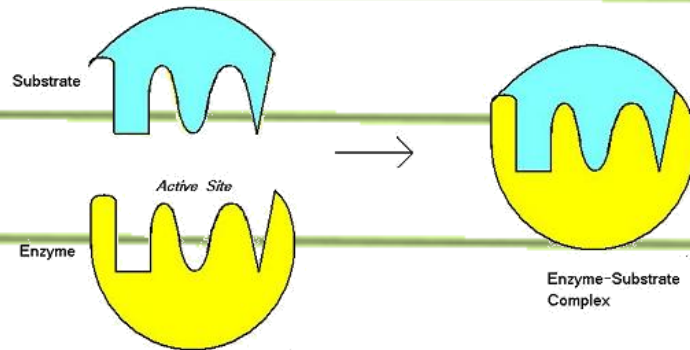
เอนไซม์นี้มีชื่อสามัญว่า Invertase หรือ Sucrase

1. เอนไซม์ชนิดนี้เร่งปฏิกิริยาใด.....
2. หมู่ที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยา.....
3. เขียนสมการที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยานี้



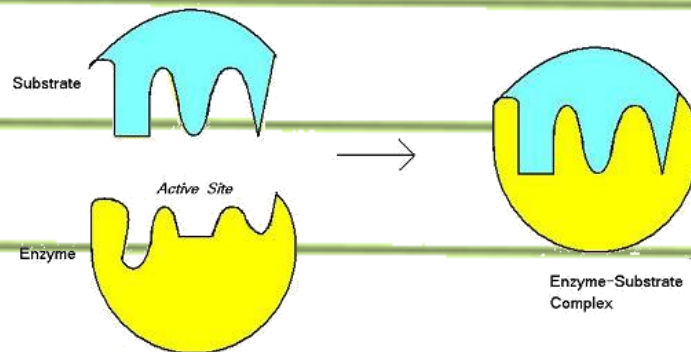
ทฤษฎีการทำงานของเอนไซม์

Lock and key theory



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

Induced fit theory

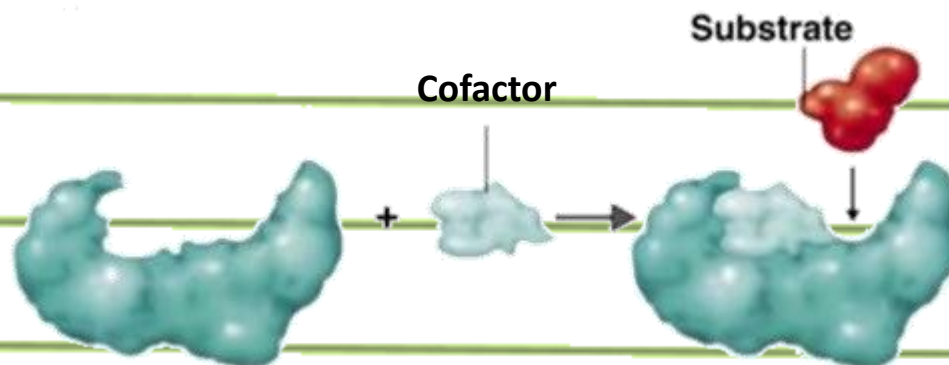


Induced-fit Model. - The enzyme active site forms a complementary shape to the substrate after binding.

รูป 10 การทำงานของเอนไซม์แบบ lock and key และ induced fit theory

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

โคแฟกเตอร์ (Cofactor)



Apoenzyme + Cofactor → Holoenzyme
(โปรตีน) (ไม่ใช่โปรตีน) (โปรตีนองค์ประกอบ)
Inactive (Active)

รูป 11 โคแฟกเตอร์เป็นโมเลกุลที่ไม่ใช่โปรตีนเมื่อเข้าจับกับเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้

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

แบ่งโคแฟกเตอร์เป็น 2 ชนิด

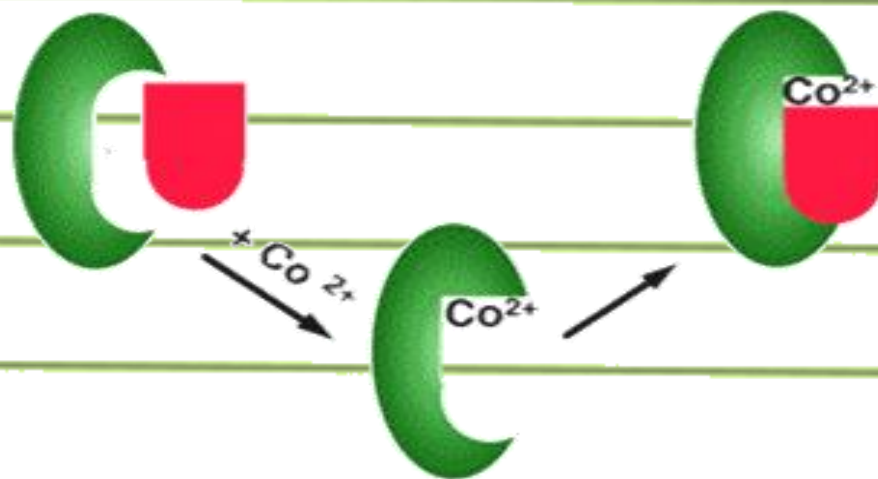
1. Metal ion

2. Coenzyme

โคแฟคเตอร์ (Cofactor)

1. **Metal ion** โลหะไอออนจะยึด substrate กับโมเลกุลของเอนไซม์ โดยระหว่างเร่งปฏิกิริยา

โลหะไอออนไม่มีการเปลี่ยนแปลง เช่น Zn^{2+} Mg^{2+} Fe^{2+} Fe^{3+} Cu^{2+} K^{+}



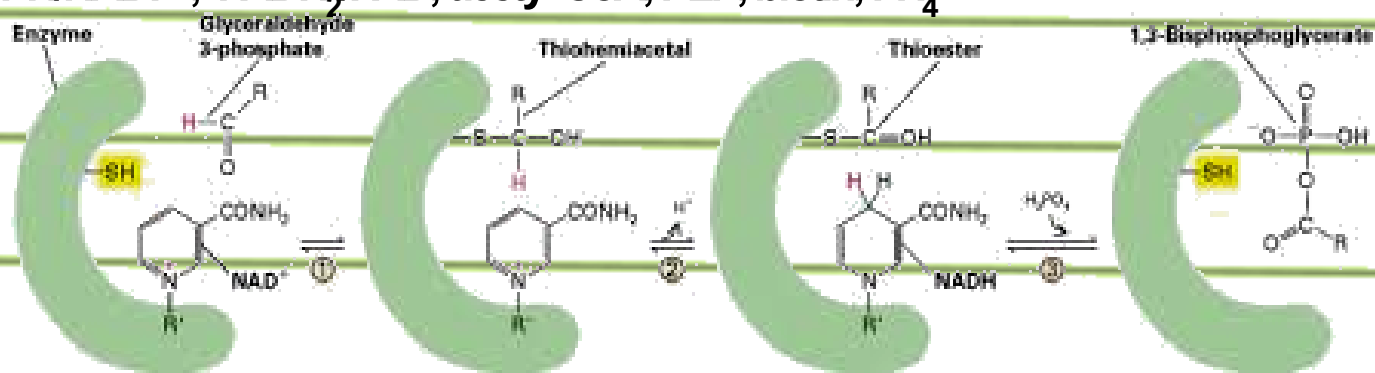
รูป 12 Co^{2+} ทำหน้าที่โคแฟคเตอร์โดยโครงสร้างไม่เปลี่ยน

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

โคแฟกเตอร์ (Cofactor)

2. Coenzyme เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มาจาก soluble vitamin โคเอนไซม์เข้าร่วมในปฏิกิริยาโดยระหว่างเร่งปฏิกิริยาโครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ เช่น NADH/NAD^+ ,

NADPH/NADP^+ , FADH_2/FAD , acetyl CoA, PLP, biotin, FH_4



รูป 13 NAD^+ เปลี่ยนโครงสร้างเป็น NADH ระหว่างเร่งปฏิกิริยา

ที่มา: <http://www.bion.com/book/biology/mcb/bv.fcgi?call=bv.view..showsection&rid=mcb.figgrp.d1e70694.htm>

NADH/NADPH อนุพันธ์ของ B2 (nicotinic acid)

PLP อนุพันธ์ของ B6 (pyridoxin)

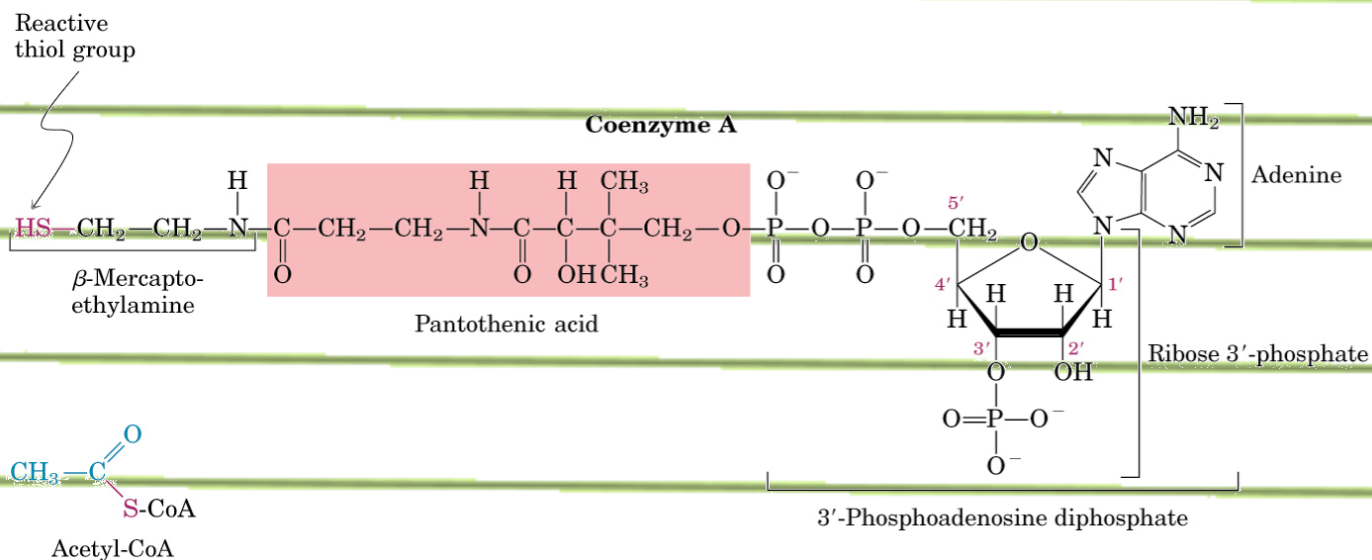
FADH_2 อนุพันธ์ของ B3 (riboflavin)

Biotin อนุพันธ์ของ B7

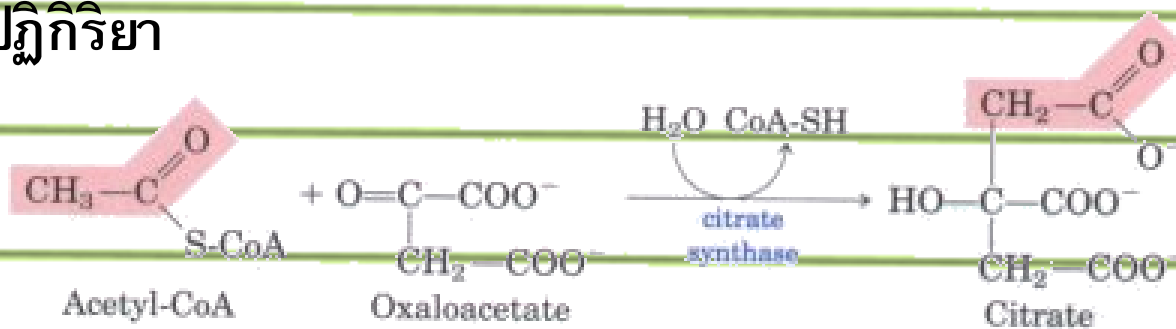
Acetyl CoA อนุพันธ์ของ B5 (pantothenic acid)

FH_4 อนุพันธ์ของ B9 (folic acid)

โคแฟกเตอร์ (Cofactor)



ตัวอย่างปฏิกิริยา



$$\Delta G^{\circ'} = -32.2 \text{ kJ/mol}$$

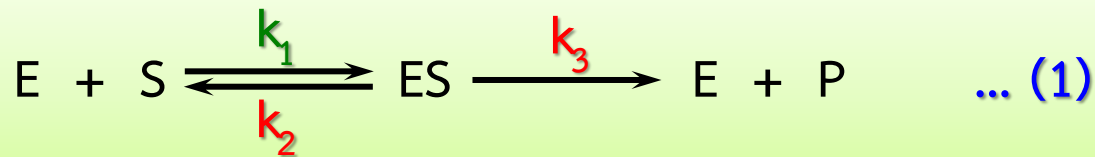
รูป 14 Coenzyme A เป็นอนุพันธ์ของวิตามิน B5 (pantothenic acid) ช่วยขนย้ายหมู่ acyl

ที่มา: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/coenzyme-a.html>

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

จลนศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme kinetics) กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่เข้าร่วมในการเกิดปฏิกิริยากับความเร็วของปฏิกิริยา

พิจารณากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ถูกเสนอโดย Michaelis-Menten



E = เอนไซม์

k_1 = ค่าคงที่อัตราของการเกิด ES

S = สารตั้งต้น

k_2 = ค่าคงที่อัตราของการสลาย ES

ES = สารประกอบของเอนไซม์กับสารตั้งต้น

กลับเป็น E และ S

P = สารผลิตภัณฑ์

k_3 = ค่าคงที่อัตราของการเกิด P

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

จาก (1) อัตราเร็วของปฏิกิริยา (v) จะขึ้นอยู่กับ $[ES]$ ซึ่งอาจเขียนความสัมพันธ์ทาง

คณิตศาสตร์ได้หลายแบบ เช่น $v = \frac{d[P]}{dt}$ หรือ $v = -\frac{d[S]}{dt}$ หรือ $v \propto [ES]$

$$v = k_3 [ES] \quad \dots (2)$$

ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เราสนใจ อัตราเร็วสูงสุด (maximum velocity; $V_{\max}$)

ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เมื่อเอนไซม์อิ่มตัวด้วยสารตั้งต้น หรือเอนไซม์ทุกโมเลกุลจับกับสารตั้ง

ต้นเกิดเป็น ES ทั้งหมดนั่นเอง

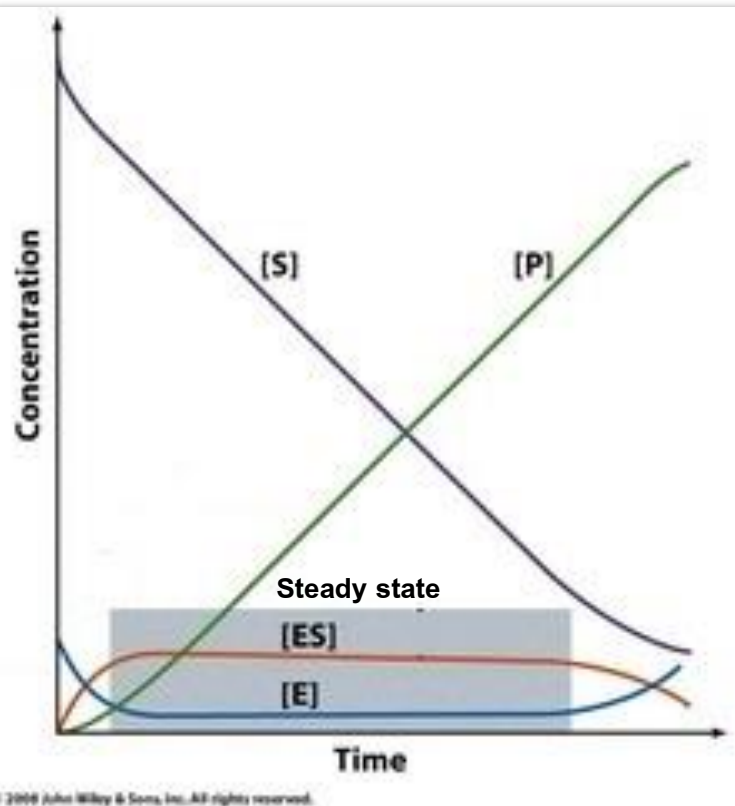
ถ้าให้ $[E_0]$ เป็นความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ และถ้าเอนไซม์ทั้งหมดจับกับ

สารตั้งต้น $[E_0] = [ES]$ ดังนั้นจะได้สมการ

$$V_{\max} = k_3 [E_0] \quad \dots (3)$$

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

จากกลไกการเร่งปฏิกิริยา (1) พิจารณาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารทุกชนิด จะได้กราฟ ซึ่งพบว่า เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปถึงระยะหนึ่งจะเข้าสู่



สภาพคงตัว (steady state) ซึ่งความเข้มข้นของ **ES คงที่** ทั้งนี้เนื่องจาก

อัตราการเกิด **ES** = อัตราการสลาย **ES**

ดังนั้นจะได้ว่า

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

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

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

รูป 15 Steady state ของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

แทนค่า (5) ลงใน (4) จะได้

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

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

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

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

ในที่สุดจะได้ **Michaelis-Menten equation** ดังนี้

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

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

และ **Michaelis constant** ดังนี้

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

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 $[S] = 0.1K_m$ จงหา $v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max} \cdot 0.1K_m}{K_m + 0.1K_m} = \frac{0.1K_m}{1.1K_m} V_{max} = 0.091V_{max}$

แทนค่า $[S]$ เป็น $0.1 K_m$

แทนค่า $[S]$ เป็น $0.1 K_m$

ถ้า $[S] = 0.5K_m$ จงหา $v = \dots\dots\dots$

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

ถ้า $[S] = 1.0K_m$ จงหา $v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$ แทนค่า $[S]$ เป็น $1.0 K_m$ $\frac{1.0K_m}{1.0K_m + 1.0K_m} = \frac{1.0K_m}{2.0K_m} = 0.5$ $v = 0.5V_{\max}$

ถ้า $[S] = 7K_m$ จงหา $v = \dots\dots\dots$

ถ้า $[S] = 20K_m$ จงหา $v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$ แทนค่า $[S]$ เป็น $20 K_m$ $\frac{20K_m}{20K_m + 1K_m} = \frac{20K_m}{21K_m} = 0.95$ $v = 0.95V_{\max}$

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

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

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

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

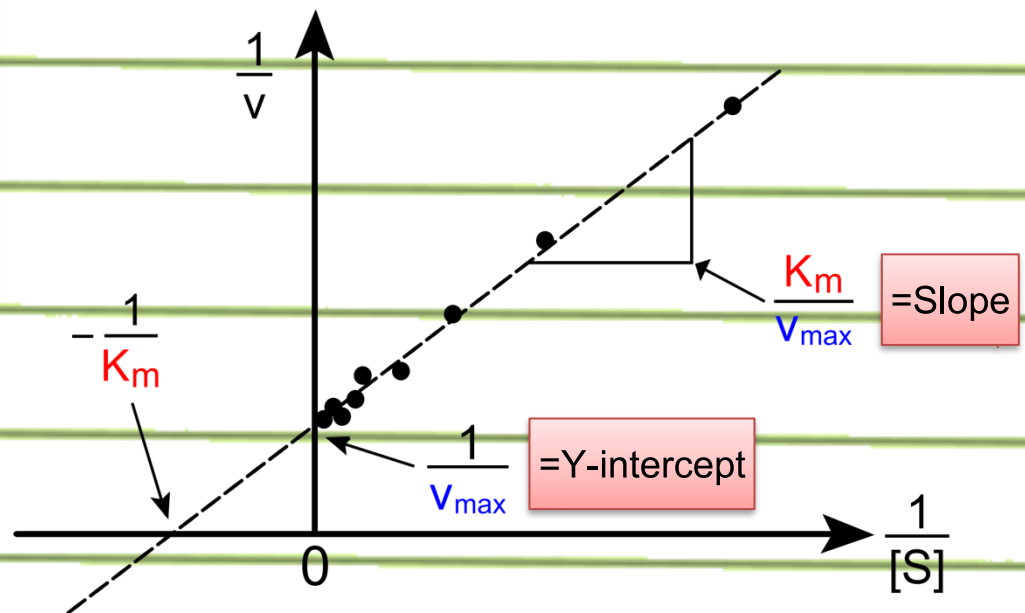
แกน **Y** โดยให้เป็น $1/v$ และ

แกน **X** โดยให้เป็น $1/[S]$

จะได้ว่า **ความชัน**ของเส้นตรง $= K_m / V_{max}$ 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} ของ
เอนไซม์ได้จาก **Lineweaver-Burk**
plot หรือ **double reciprocal plot**
ดังรูป 16



รูป 16 Lineweaver-Burk plot หรือ double reciprocal plot

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

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

แบบฝึกหัด 4: การหาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์

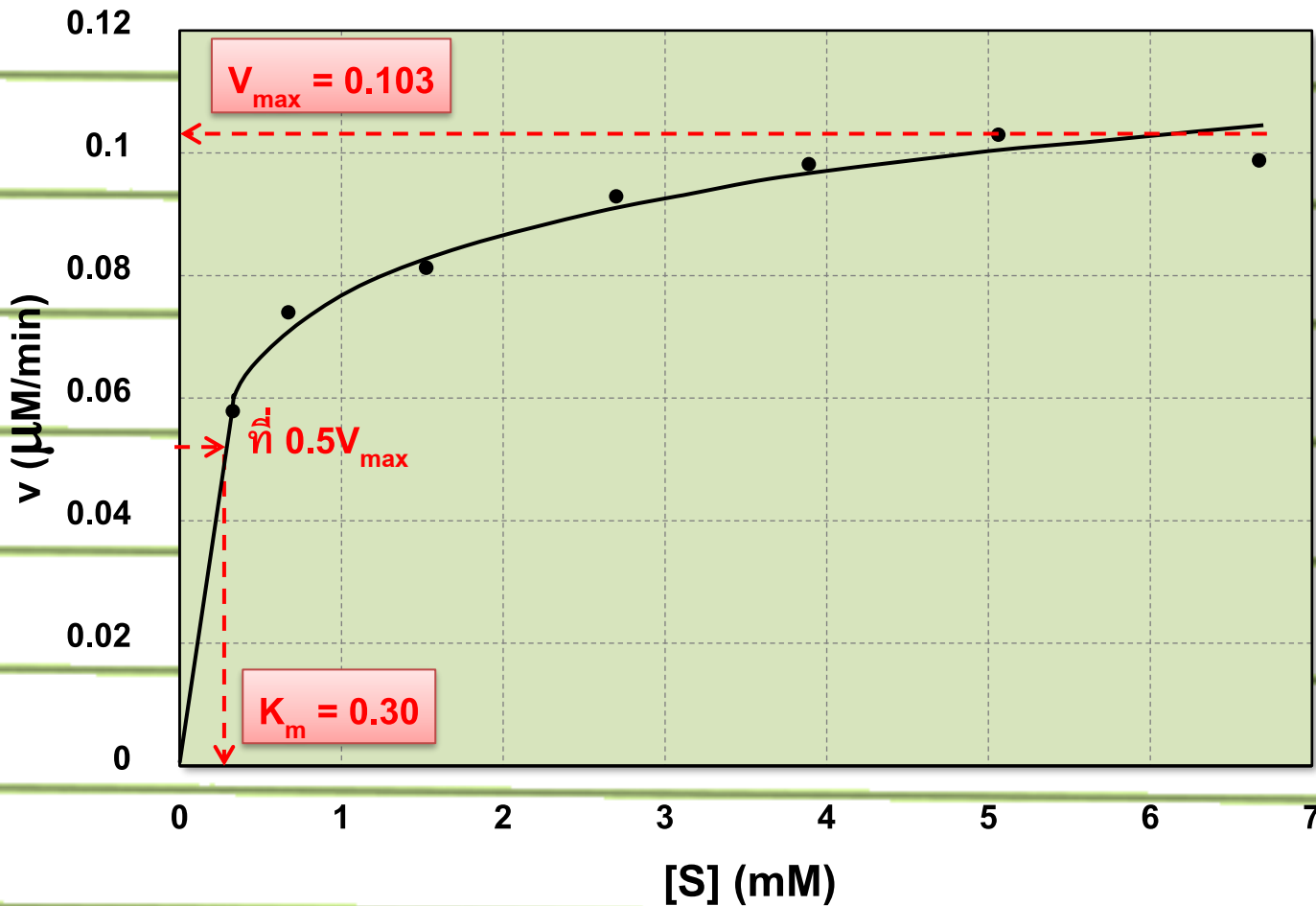
เอนไซม์ **tyrosinase** เร่งการเปลี่ยน tyrosine ไปเป็น DOPA จงหาค่า K_m และ V_{max} ของ

เอนไซม์นี้ถ้าวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา (v) เมื่อใช้สารตั้งต้นเข้มข้น $[S]$ ต่าง ๆ ได้ดังนี้

[S] (mM)	V ($\mu\text{M}/\text{min}$)	1/[S] (mM)	1/V ($\mu\text{M}/\text{min}$)
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

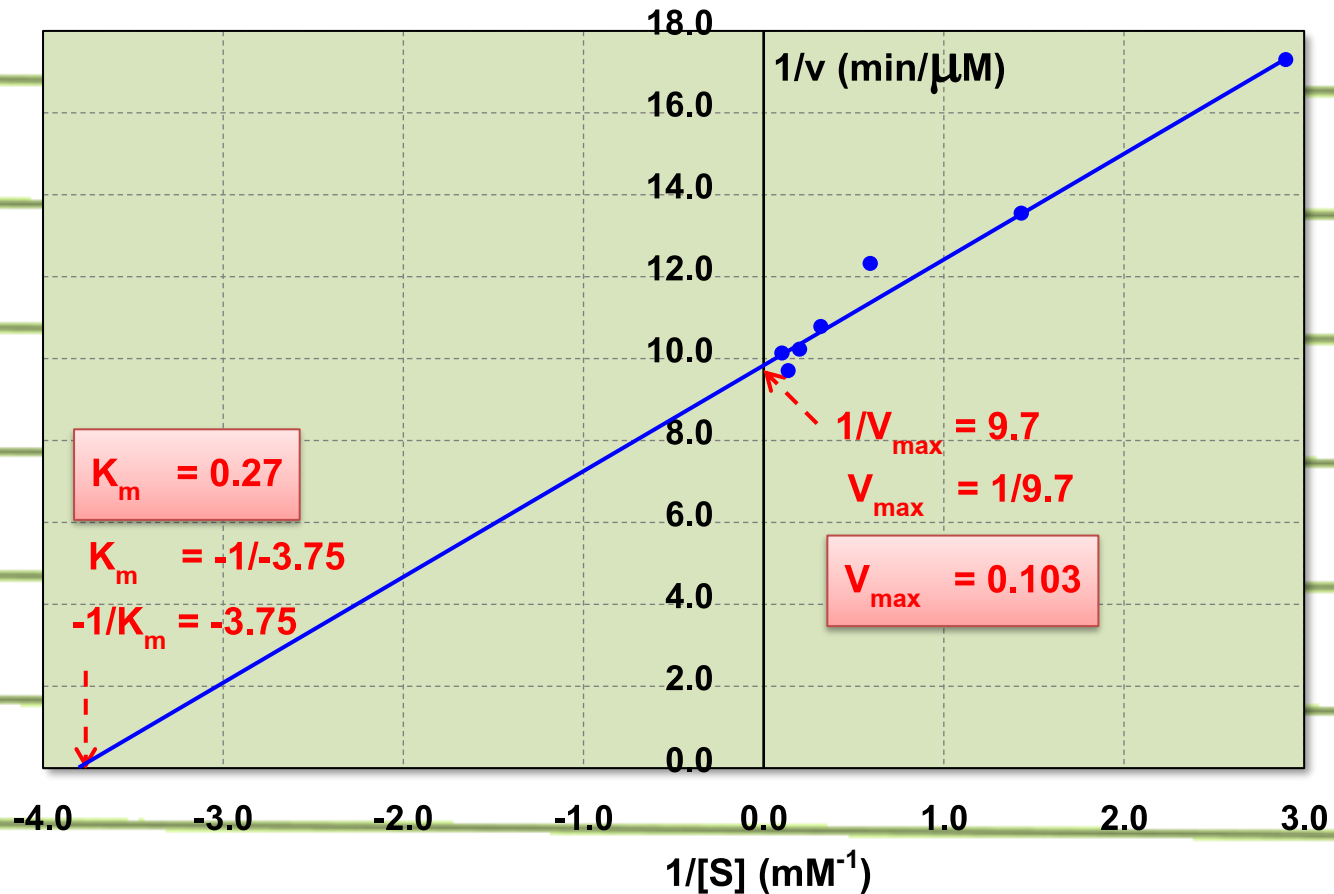
หาค่า K_m และ V_{max} จาก **Michaelis-Menten equation** ได้ดังนี้



ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้มีค่า $K_m = \underline{0.30 \text{ mM}}$ และ $V_{max} = \underline{0.103 \mu\text{M}/\text{min}}$

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

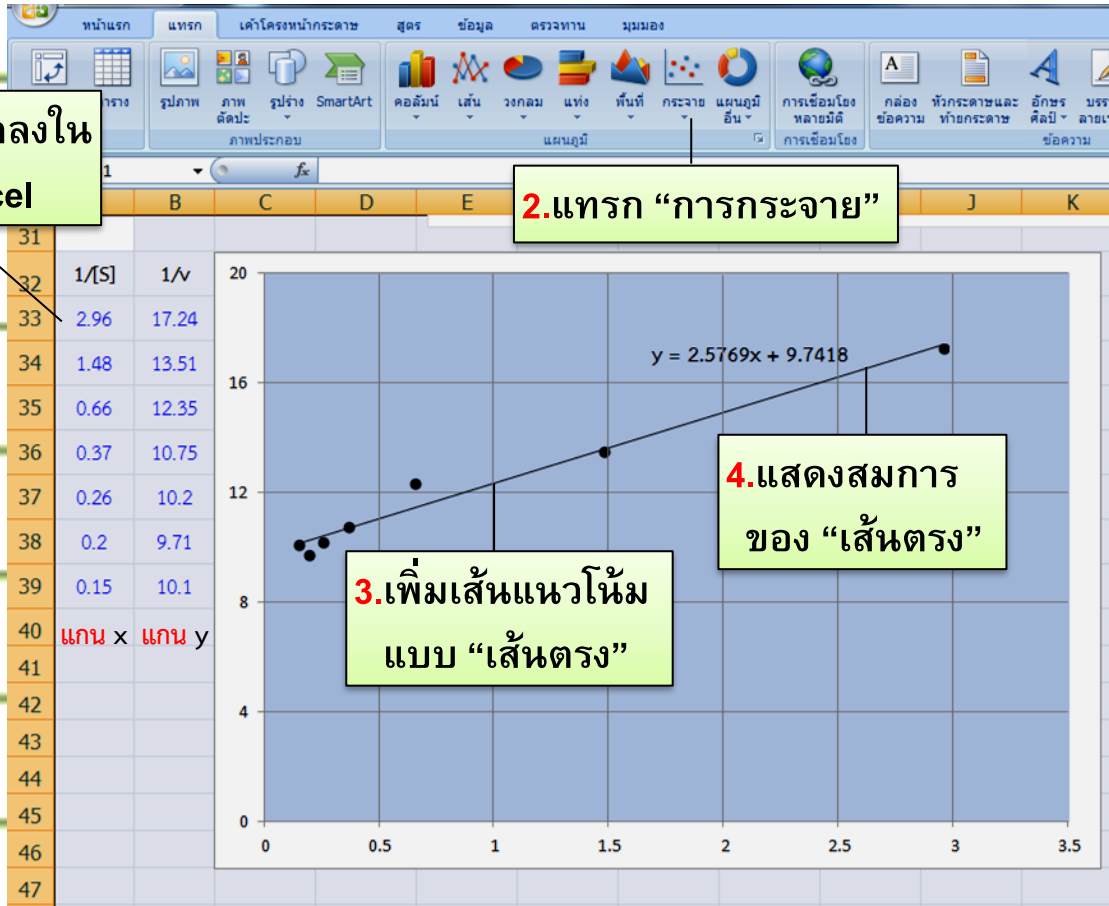
หาค่า K_m และ V_{max} จาก **Lineweaver-Burk plot** ได้ดังนี้



ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้มีค่า $K_m = \underline{0.27 \text{ mM}}$ และ $V_{max} = \underline{0.103 \mu\text{M/min}}$

จลนศาสตร์ของเอนไซม์

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



จากสมการเส้นตรง

$$Y = 2.5769x + 9.7418$$

จุดตัดบนแกน $y = 9.7418$

ดังนั้น $1/V_{max} = 9.7418$

$$V_{max} = 1/9.7418 = 0.103$$

จากสมการเส้นตรง

$$Y = 2.5769x + 9.7418$$

ถ้า $y = 0$

จะได้ $0 = 2.5769x + 9.7418$

$$x = -9.7418/2.5769 = -3.78$$

$$-1/K_m = -3.78$$

$$K_m = -1/-3.78 = 0.26$$

ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้มีค่า $K_m = 0.26 \text{ mM}$ และ $V_{max} = 0.103 \text{ } \mu\text{M/min}$

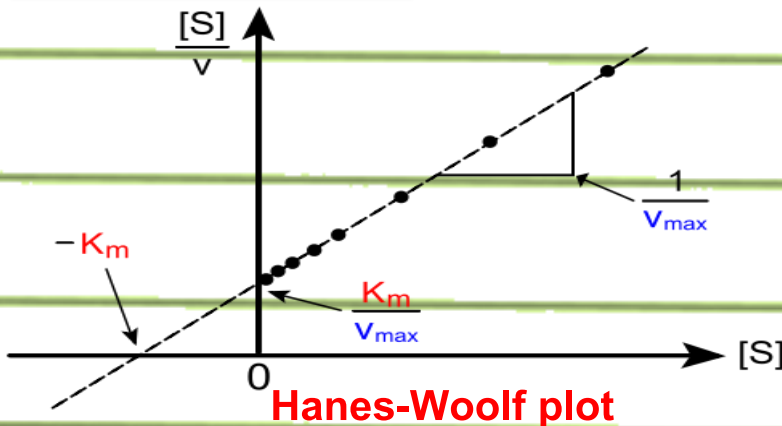
จลนศาสตร์ของเอนไซม์

นอกจากนี้อาจหาค่า K_m และ V_{max} ได้จากกราฟระหว่าง

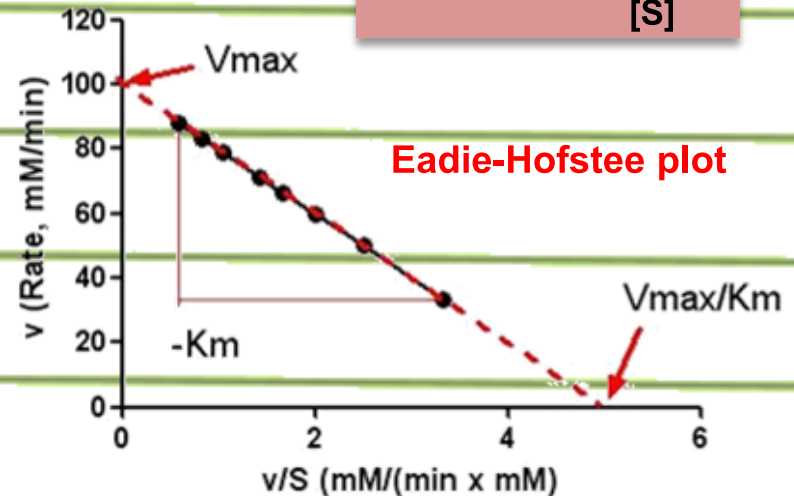
- $[S]/v$ กับ $[S]$ จาก Hanes-Woolf equation

- v กับ $v/[S]$ จาก Eadie-Hofstee equation

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



$$v = V_{max} - K_m \cdot \frac{v}{[S]}$$



รูป 17 Hanes-Woolf และ Eadie-Hofstee plot

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

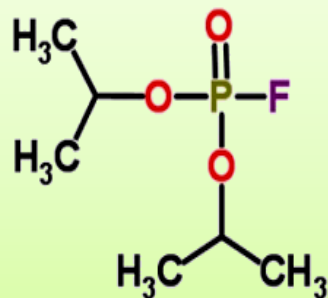
ตัวยับยั้ง (Inhibitor) มักเป็นสารโมเลกุลเล็กที่รบกวนการทำงานของเอนไซม์ ทำให้**ปฏิกิริยาช้าหรือหยุดลง** ตัวยับยั้งแบ่งเป็น 2 ประเภท

1. ตัวยับยั้งแบบทวนกลับไม่ได้ (Irreversible inhibitor) จับกับเอนไซม์

ด้วย**พันธะโควาเลนต์**ที่แข็งแรง มีผลให้เอนไซม์หยุดทำงานอย่างถาวร เช่น

Diisopropyl fluorophosphate ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่ม **organophosphate** มีฤทธิ์

เป็น nerve gas



Diisopropyl fluorophosphate

Molecular Formula	C ₆ H ₁₄ FO ₃ P
Average mass	184.146 Da
Monoisotopic mass	184.066452 Da
ChemSpider ID	5723

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

acetylcholinesterase โดยเข้า

จับกับ Ser-OH ใน active site ของ

เอนไซม์

รูป 18 โครงสร้างเคมีและข้อมูลของ DIFP

Nervous system: เป็นขบวนการส่งสัญญาณไฟฟ้าผ่าน **synapse** ทำให้เกิดการหลั่ง **neurotransmitter** ซึ่งคือโมเลกุล **acetylcholine (ACh)** เมื่อสารนี้จับกับ **โมเลกุล receptor** สัญญาณไฟฟ้าจะถูกส่งออกไป หลังจากส่งสัญญาณแล้ว **ACh** จะถูกย่อยสลายโดย **เอนไซม์ acetylcholine esterase** เพื่อป้องกันการกระตุ้นที่มากเกินไป

How Sarin nerve gas works

The use of sarin, the most likely nerve agent used in the Damascus chemical attack, is difficult to prove. To gather good evidence, UN inspectors need soil, blood or hair samples directly from the area of attack or its victims for examination in certified laboratories



SARIN: Man-made nerve gas developed during World War II. Quickly breaks down after release but minuscule amounts can persist in victims' blood for 16-26 days

SARIN FACTFILE

Appearance: Odourless, tasteless, colourless

Form: Liquid vaporises quickly into gas and spreads

Absorption: Contact with skin, inhalation or ingestion

Effects: Inhalation can cause death within 1-10 minutes of exposure

NERVE GAS ACTION

Nervous system relies on transmission of signals through nerve junctions called **synapses**

Electrical impulse

Impulse triggers release of chemical neurotransmitter, **acetylcholine (ACh)**

Enzyme breaks **ACh** down to free up receptor site – preventing over-stimulation

Sarin molecules block enzyme that breaks down ACh and so increases ACh level at receptor

Receptor molecules

ACh attaches to receptor molecule, stimulating cell to fire off impulses

Post-synaptic cell

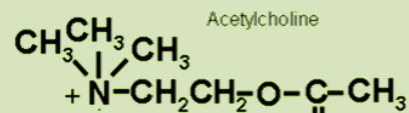
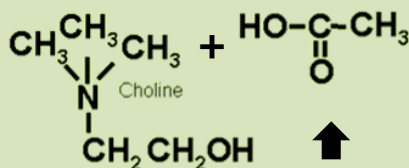
Receptor continually fires off impulses as victim rapidly loses control of vital functions

Source: Centers for Disease Control and Prevention

Picture: AP

© GRAPHIC NEWS

Sarin: เป็น nerve gas ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ **acetylcholine esterase (ACh)** ทำให้ **ACh** ไม่สลายตัว โมเลกุล **receptor** จึงยังคงส่งสัญญาณการกระตุ้นตลอดเวลา ทำให้ร่างกายสูญเสียการควบคุมในที่สุด

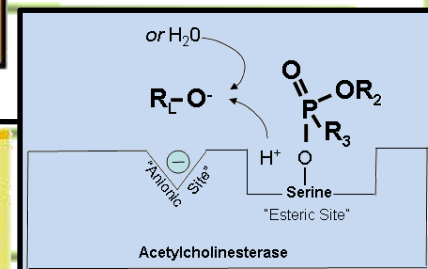


Electrostatic attraction

Anionic Site

Serine
"Esteric Site"

Acetylcholinesterase



รูป 19 กลไกการทำงานของ **acetylcholine esterase** และการยับยั้งด้วย nerve agent

<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5>, <http://seriouslyreadabook.booklikes.com/post/990092/black-cross>

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

2. ตัวยับยั้งแบบทวนกลับได้ (Reversible inhibitor) จับกับเอนไซม์

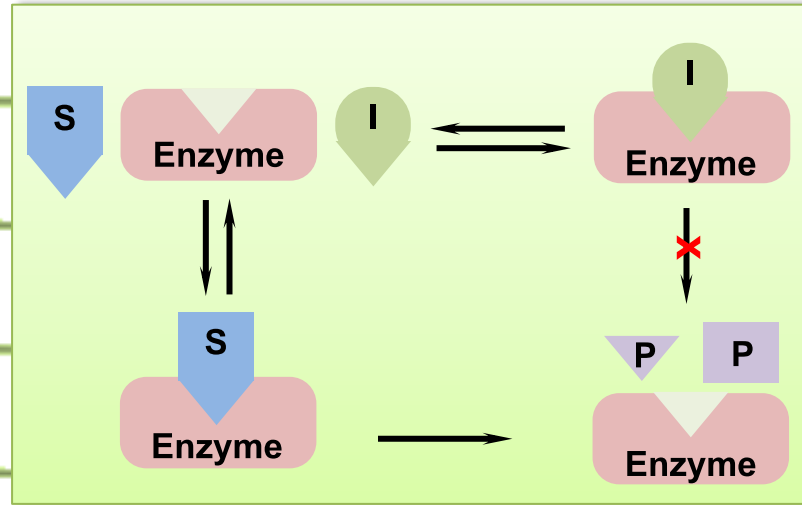
ด้วยพันธะที่ไม่แข็งแรงนักมีผลให้เอนไซม์หยุดทำงาน แต่สามารถทำให้เอนไซม์กลับมาทำงานได้อีกครั้งโดยดึงตัวยับยั้งออกไป ตัวยับยั้งแบบทวนกลับได้แบ่งเป็น 3 ชนิด

2.1 ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) เป็นตัวยับยั้งที่มีโครงสร้างคล้ายสารตั้งต้น จึงสามารถแย่งจับที่ **active site** ของเอนไซม์ได้ ดังนั้นตัวยับยั้งจะทำให้

ค่า K_m ของเอนไซม์ **สูงขึ้น** ค่า V_{max} ของเอนไซม์ **คงที่**

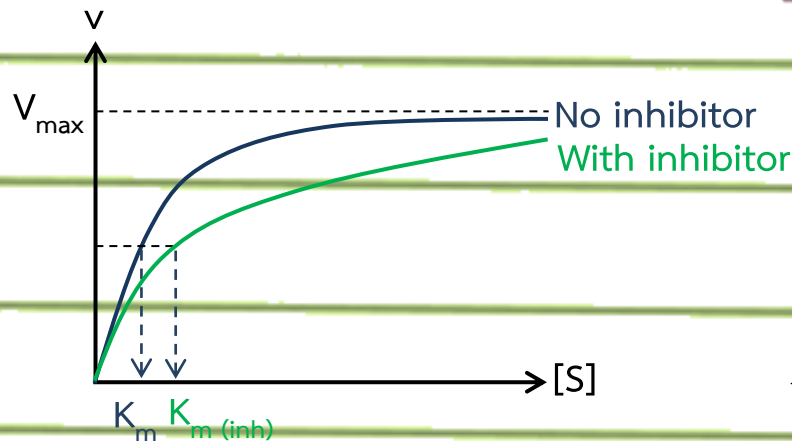
แก้ไขได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

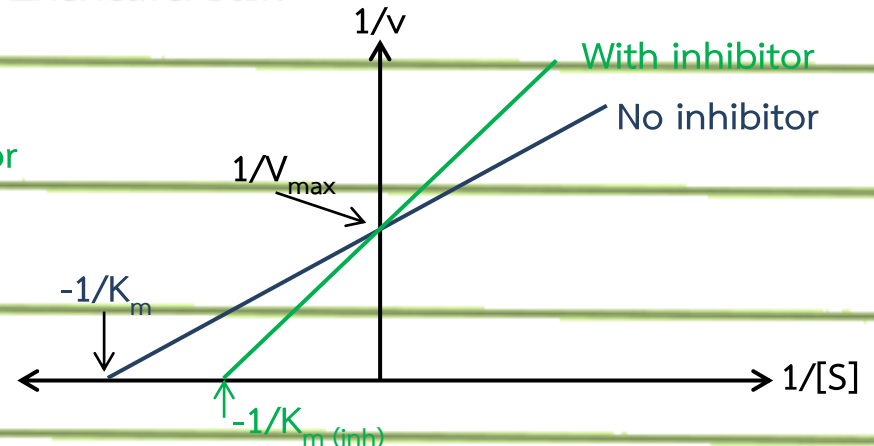


รูป 20 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาแบบแข่งขัน (competitive inhibition)

Michaelis-Menten



Lineweaver-Burk



รูป 21 การเปลี่ยนแปลงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เมื่อมีตัวยับยั้งแบบแข่งขัน

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

2.2 ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Non-competitive inhibitor) เป็นตัวยับยั้งที่มี

โครงสร้างไม่เหมือนสารตั้งต้น และเข้าจับที่ตำแหน่งอื่นของเอนไซม์ แล้วยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ถึงแม้จะมีหรือไม่มีสารตั้งต้นจับที่ active site แล้วก็ได้ ตัวยับยั้งจะทำให้

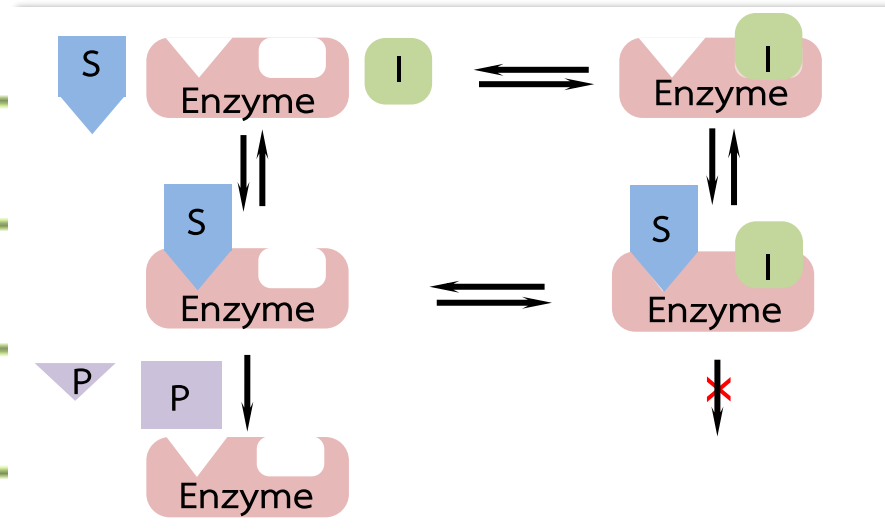
ค่า K_m ของเอนไซม์ คงที่ ค่า V_{max} ของเอนไซม์ ลดลง

2.3 ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Un-competitive inhibitor) ตัวยับยั้งชนิดนี้เข้า

จับที่ตำแหน่งอื่นของเอนไซม์ หลังจากเอนไซม์จับกับสารตั้งต้นเกิดเป็น ES แล้วเท่านั้น ดังนั้นตัวยับยั้งจะทำให้

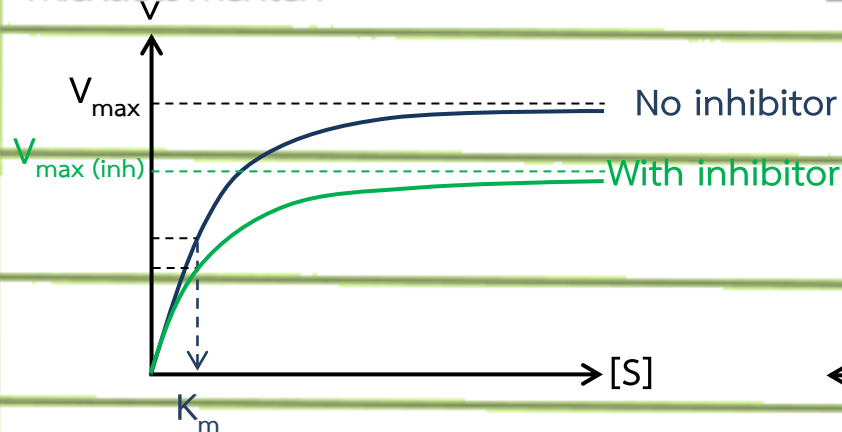
ค่า K_m ของเอนไซม์ ลดลง ค่า V_{max} ของเอนไซม์ ลดลง

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

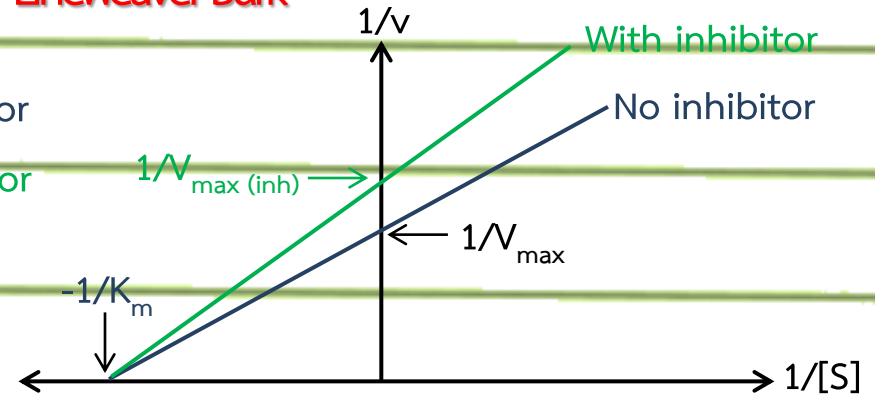


รูป 22 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาแบบไม่แข่งขัน (Non-competitive inhibition)

Michaelis-Menten

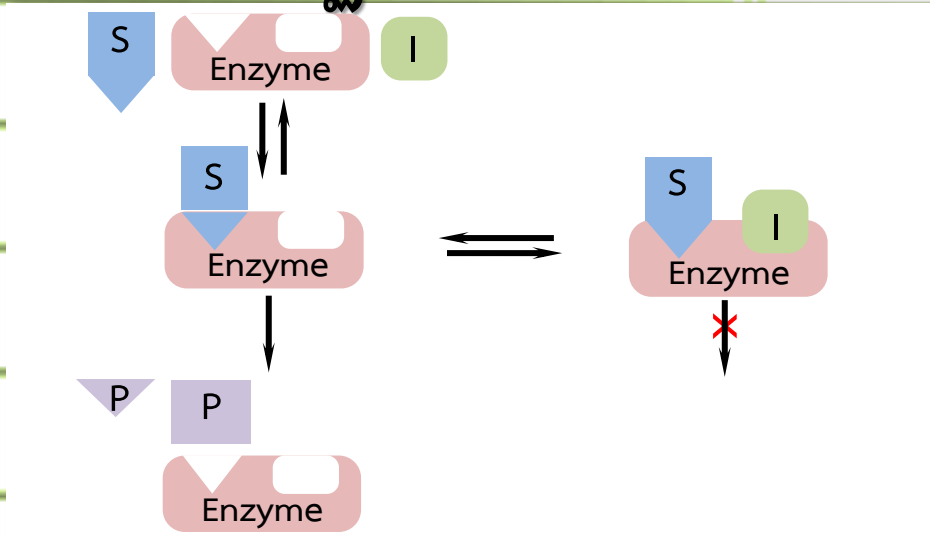


Lineweaver-Burk



รูป 23 การเปลี่ยนแปลงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เมื่อมีตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Non-competitive)

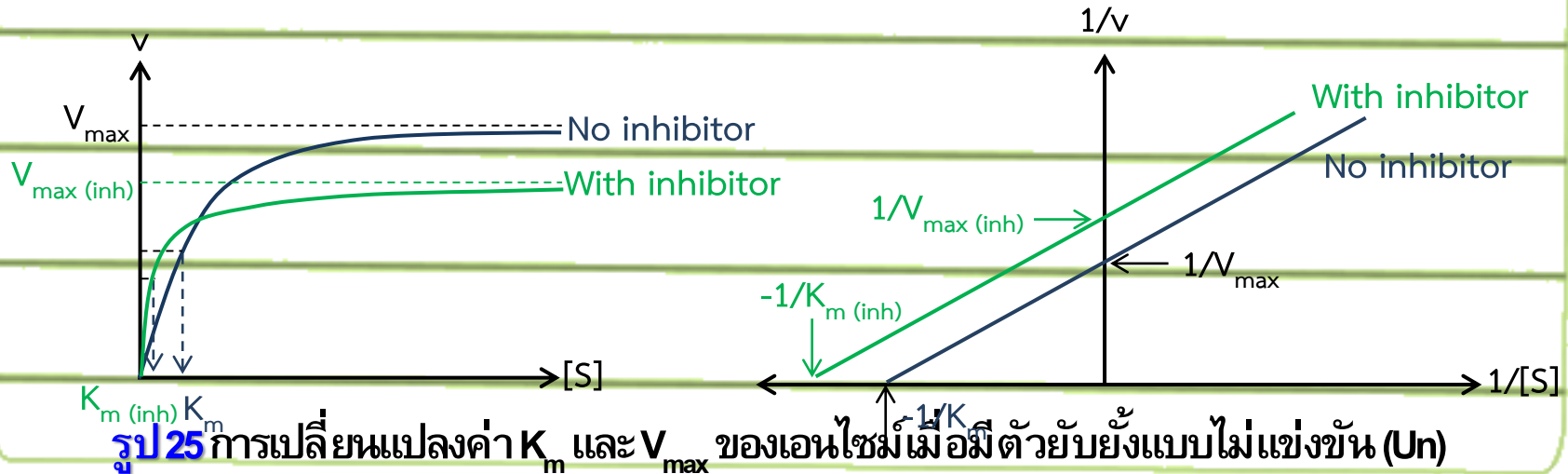
การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์



รูป 24 กลไกการยับยั้งปฏิกิริยาแบบไม่แข่งขัน (Un-competitive inhibition)

Michaelis-Menten

Lineweaver-Burk



รูป 25 การเปลี่ยนแปลงค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เมื่อมีตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Un)

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

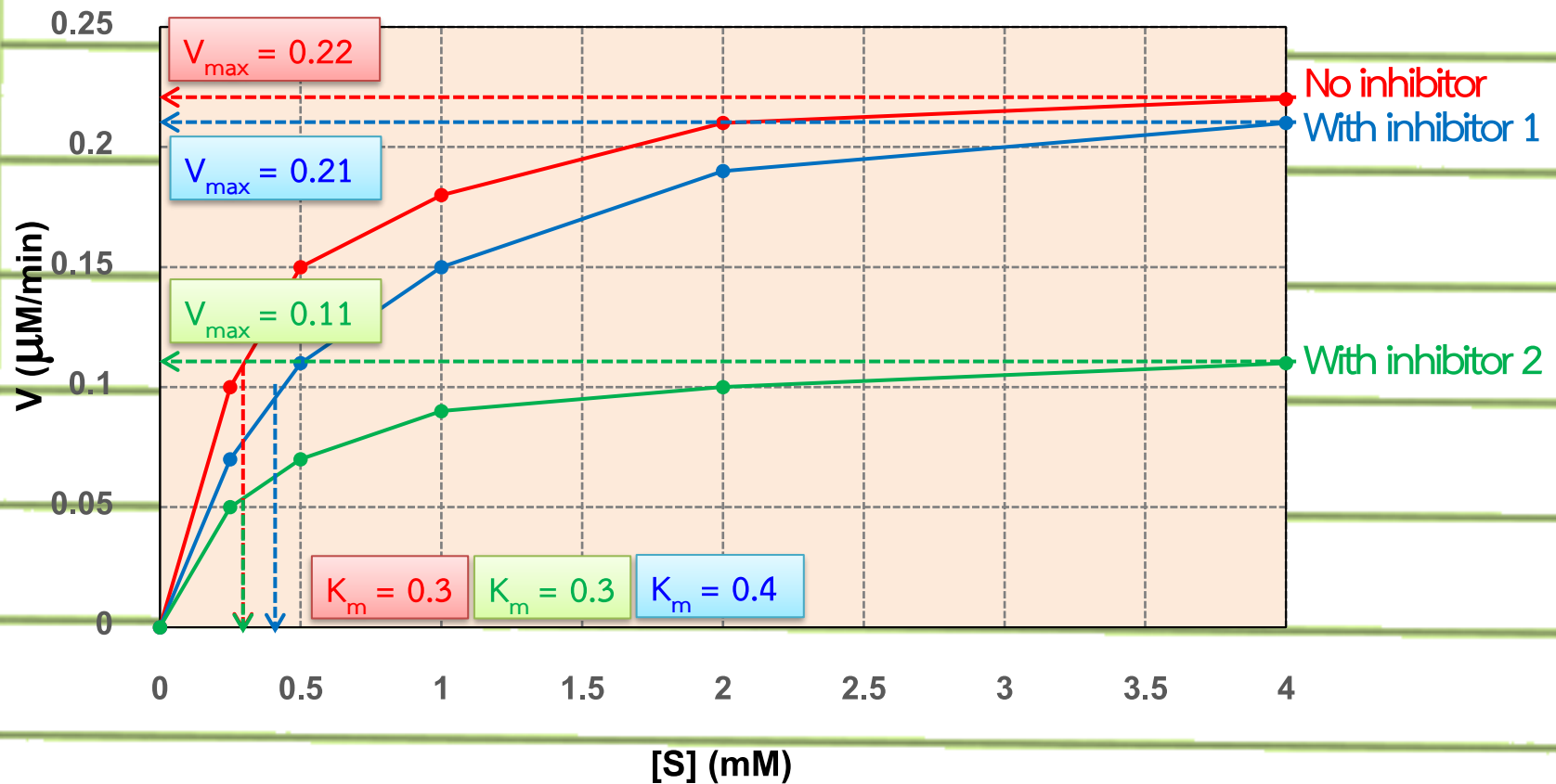
ตัวอย่าง: การใช้ค่าทางจลนศาสตร์ (K_m และ V_{max}) เพื่อระบุชนิดของตัวยับยั้งปฏิกิริยา

เอนไซม์ **succinate dehydrogenase** เร่งการเปลี่ยน succinate ไปเป็น fumarate จงใช้ค่าทางจลนศาสตร์เพื่อทำนายว่าตัวยับยั้ง 1 (**inh1**) และตัวยับยั้ง 2 (**inh2**) ของเอนไซม์นี้เป็นตัวยับยั้งแบบใด

[S] (mM)	V ($\mu\text{M}/\text{min}$)	V_{inh1} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	V_{inh2} ($\mu\text{M}/\text{min}$)
0.25	0.10	0.07	0.05
0.5	0.15	0.11	0.07
1.0	0.18	0.15	0.09
2.0	0.21	0.19	0.10
4.0	0.22	0.21	0.11

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

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



เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่า $K_m = \underline{0.30 \text{ mM}}$ และ $V_{max} = \underline{0.22 \mu\text{M}/\text{min}}$

การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

จาก **Michaelis-Menten plot** ข้างต้น

	K_m เพิ่ม		V_{max} คงที่
Inh 1 ทำให้ค่า	$K_m = \underline{0.40 \text{ mM}}$	และ	$V_{max} = \underline{0.21 \text{ } \mu\text{M/min}}$
เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่า	$K_m = \underline{0.30 \text{ mM}}$	และ	$V_{max} = \underline{0.22 \text{ } \mu\text{M/min}}$
Inh 2 ทำให้ค่า	$K_m = \underline{0.30 \text{ mM}}$	และ	$V_{max} = \underline{0.11 \text{ } \mu\text{M/min}}$
	K_m คงที่		V_{max} ลด

ดังนั้น **Inh 1** เป็นตัวยับยั้งแบบ..... **Competitive inhibitor**

Inh 2 เป็นตัวยับยั้งแบบ..... **Non-competitive inhibitor**