เอกสารคำสอน

รายวิชา 109702 เอ็นไซม์วิทยา (Enzymology)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์
สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำนำ

เอกสารคำสอนรายวิชา เอ็นไซม์วิทยาที่ผู้เขียนได้จัดทำขึ้นนี้เพื่อใช้ประกอบการเรียนการสอนรายวิชา109702 เอ็นไซม์วิทยา (Enzymology) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อหาหลักคือ ลักษณะสำคัญของเอ็นไซม์ในการเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ โครงสร้างของเอ็นไซม์ เทอร์โมไดนามิกส์ของการเร่งปฏิกิริยา อันดับของปฏิกิริยาเคมี จลนพลศาสตร์ของตัวถูกย่อยตัวเดียวและสองตัว จลนพลศาสตร์ของตัวยับยั้ง ผลของ pH และอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์และการทำงานแบบอัลโลสเตอริก รายวิชานี้ถือเป็นรายวิชาบังคับของนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ และเป็นรายวิชาเลือกของนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร และสาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นอกจากนี้เอกสารคำสอนฉบับนี้ยังสามารถใช้เป็นคู่มือประกอบการเรียนของนักศึกษาในสาขาชีวเคมีทั้งระดับปริญญาตรีและระดับบัณฑิตศึกษาของสถาบันการศึกษาอื่น ๆ อีกด้วย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์
อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
มีนาคม 2550

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าต้องขอขอบคุณสาขาวิชาชีวเคมีและสาขาวิชาเคมี สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีที่ได้ให้การสนับสนุนและร่วมมือเป็นอย่างดี และขอแสดงความขอบคุณอย่างสุดซึ้งแก่ครอบครัวของข้าพเจ้าที่เข้าใจและเป็นกำลังใจทำให้ข้าพเจ้าสามารถอุทิศเวลาเพื่อการจัดทำเอกสารคำสอนฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงในที่สุด

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ลักษณะสำคัญของเอ็นไซม์	1
1.1.1 เอ็นไซม์เป็นตัวเร่งที่มีประสิทธิภาพสูง	1
1.1.2 เอ็นไซม์มีความจำเพาะสูง	1
1.1.3 การทำงานของเอ็นไซม์สามารถถูกควบคุมได้	2
1.2 การจัดกลุ่มเอ็นไซม์	7
1.2.1 EC 1 Oxidoreductases	8
1.2.2 EC 2 Transferases	9
1.2.3 EC 3 Hydrolases	10
1.2.4 EC 4 Lyases	11
1.2.5 EC 5 Isomerases	12
1.2.6 EC 6 Ligases	13
บทที่ 2 โครงสร้างของเอ็นไซม์	15
2.1 กรดอะมิโน	15
2.1.1 กรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบของโปรตีน	15
2.1.2 สเตอริโอเคมีของกรดอะมิโน	16
2.1.3 การจัดประเภทกรดอะมิโนและคุณสมบัติ	18
2.2 การไตเตรทและการแตกตัวของกรดอะมิโน	24
2.3 โครงสร้างระดับต่าง ๆ ของเอ็นไซม์	26
2.3.1 โครงสร้างปฐมภูมิ	26
2.3.2 โครงสร้างทุติยภูมิ	28
2.3.2.1 เกลียวอัลฟา	28
2.3.2.2 บีต้าชีท	30
2.3.2.3 β-turns และ hairpin loop	32
2.3.3 โครงสร้างตติยภูมิ	32
2.3.4 โครงสร้างจตุรภูมิ	33
บทที่ 3 เทอร์โมไดนามิกส์ของการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์	35
3.1 การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระ	35
3.2 ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระกับค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยา	36
3.3 เอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาเคมีโดยไม่เปลี่ยนสมดุลของปฏิกิริยา	39
3.4 การเร่งปฏิกิริยาเคมีโดยเอ็นไซม์ลดค่าพลังงานอิสระของการกระตุ้น	40

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 อัตราเร็วและอันดับของปฏิกิริยาเคมี	46
4.1 อัตราเร็วของปฏิกิริยา	46
4.2 อันดับของปฏิกิริยาเคมี	48
4.2.1 ปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์	49
4.2.2 ปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง	50
4.2.3 ปฏิกิริยาอันดับที่สอง	53
บทที่ 5 จลนพลศาสตร์ของการเร่งปฏิกิริยาแบบมีตัวถูกย่อยตัวเดียว	56
5.1 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอ็นไซม์โดยใช้ rapid equilibrium assumption	56
5.2 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอ็นไซม์โดยใช้ steady-stead assumption	58
5.3 การวัดหาค่าทางจลนพลศาสตร์และการแปรผล	63
5.4 การหาค่า V_{max} และ K_m จากสมการเส้นตรงแบบต่าง ๆ	65
5.5 ความสำคัญของค่าทางจลนพลศาสตร์	69
5.5.1 ค่า K_m	69
5.5.2 ค่า k_{cat}	69
5.5.3 ค่า k_{cat}/K_m	70
5.6 การยับยั้งการทำงานโดยตัวถูกย่อย	71
5.7 จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาผันกลับได้	73
บทที่ 6 จลนพลศาสตร์ของการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์	76
6.1 กลไกการยับยั้งแบบผันกลับได้แบบต่าง ๆ	76
6.2 การยับยั้งแบบแข่งขัน	78
6.3 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ noncompetitive	82
6.4 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ uncompetitive	85
6.5 การยับยั้งแบบผสม	88
6.6 การยับยั้งบางส่วน	91
บทที่ 7 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์	94
7.1 ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ตามแบบจำลองของ Michaelis-Menten	94
7.2 ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ตามแบบจำลองของ Waley	99
7.3 การหาค่า pK_a ของหมู่แตกตัวสองหมู่จากกราฟระหว่างค่า pH และ activity	103
7.4 อิทธิพลของ pH และ สารละลายบัฟเฟอร์ต่อการคงสภาพของเอ็นไซม์	106
7.5 อิทธิพลอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์	107
บทที่ 8 จลนพลศาสตร์ของตัวถูกย่อยสองตัว	110
8.1 การกำหนดชื่อของปฏิกิริยา	110
8.2 ปฏิกิริยา bi uni reaction	110
8.3 ปฏิกิริยา compulsory ordered bi bi	117

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

8.4 ปฏิกิริยา ping pong bi bi 123

8.5 ปฏิกิริยา random ordered bi bi 126

8.6 การจำแนกกลไกของปฏิกิริยา bi bi โดยการศึกษาผลของการยับยั้งโดยสารผลิตภัณฑ์ 129

บทที่ 9 จลนพลศาสตร์แบบอัลโลสเตอริก 133

9.1 แบบจำลองการทำงานของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์แบบ concerted transition 133

9.2 แบบจำลองการทำงานของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์แบบ simple sequential interaction 136

9.3 ผลของความร่วมมือต่อกราฟอัตราเร็วของปฏิกิริยา 138

9.4 ผลของตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา 140

บรรณานุกรม

บทที่ 1
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับเอ็นไซม์

เอ็นไซม์ (enzyme) คือตัวเร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต เอ็นไซม์จัดเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ (biocatalyst) ที่มีประสิทธิภาพและความจำเพาะสูง ในบทนี้จะกล่าวถึงลักษณะสำคัญของเอ็นไซม์และการจัดกลุ่มของเอ็นไซม์ตามหลักของ IUBMB nomenclature

1.1 ลักษณะสำคัญของเอ็นไซม์

เอ็นไซม์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการในการเร่งปฏิกิริยา ดังนี้

1.1.1 เอ็นไซม์เป็นตัวเร่งที่มีประสิทธิภาพสูง (high catalytic power)

เอ็นไซม์ส่วนใหญ่สามารถเพิ่มอัตราการเร่งปฏิกิริยาได้อย่างน้อย 10^6 เท่าของอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวเร่ง ตารางที่ 1.1 แสดงการเพิ่มอัตราการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์เทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอ็นไซม์ จากตารางจะเห็นว่าเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพต่ำที่สุดคือ carboxylic anhydrase สามารถเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้ถึง 7.7×10^6 เท่า ขณะที่เอ็นไซม์ OMP decarboxylase สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงถึง 1.4×10^{17} เท่าของปฏิกิริยาที่ไม่ได้เร่งด้วยเอ็นไซม์

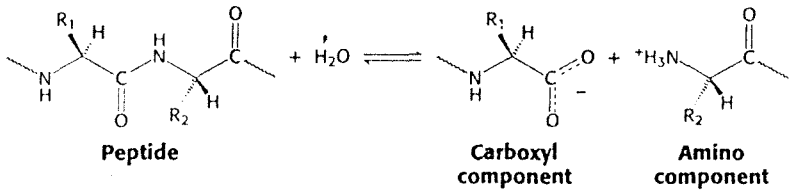
ตารางที่ 1.1 การเปรียบเทียบอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอ็นไซม์และไม่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

Enzyme	Uncatalyzed rate (k_{un} s^{-1})	Catalyzed rate (k_{cat} s^{-1})	Rate enhancement
OMP decarboxylase	2.8×10^{-16}	39	1.4×10^{17}
Staphylococcal nuclease	1.7×10^{-13}	95	5.6×10^{14}
AMP nucleosidase	1.0×10^{-11}	60	6.0×10^{12}
Carboxypeptidase	3.0×10^{-9}	578	1.9×10^{11}
Ketosteroid isomerase	1.7×10^{-7}	66,000	3.9×10^{11}
Triose phosphate isomerase	4.3×10^{-6}	4,300	1.0×10^{9}
Chorismate mutase	2.6×10^{-5}	50	1.9×10^{6}
Carbonic anhydrase	1.3×10^{-1}	1×10^{6}	7.7×10^{6}

1.1.2 เอ็นไซม์มีความจำเพาะสูง (high specificity)

เอ็นไซม์ส่วนใหญ่มีความจำเพาะสูงต่อตัวถูกย่อย เอ็นไซม์บางตัวที่สามารถใช้ตัวถูกย่อยได้มากกว่าหนึ่งตัวจะมีความจำเพาะต่อตัวถูกย่อยแต่ละตัวไม่เท่ากัน เอ็นไซม์บางชนิดมีความจำเพาะต่อตัวถูกย่อยแบบกว้าง ๆ (broad specificity) พบในเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสลาย เช่นโปรตีเอสสามารถสลายพันธะเพปไทด์ของ

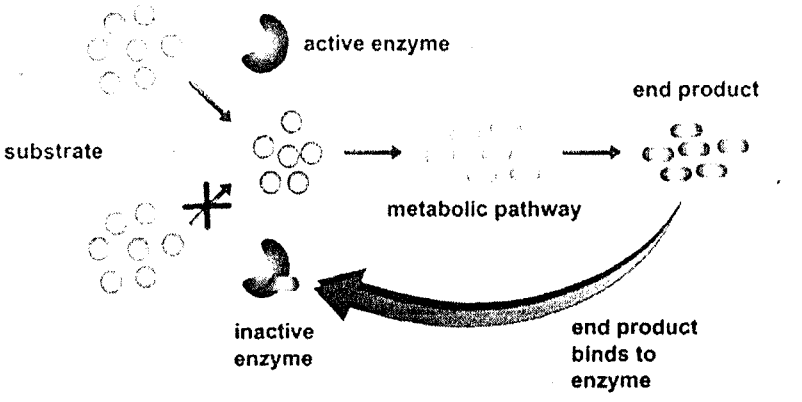
โปรตีนหลาย ๆ ชนิด เอ็นไซม์บางชนิดมีความจำเพาะกับกลุ่มของตัวถูกย่อย (group specificity) เช่น เฮกโซไคเนส (hexokinase) สามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่ฟอสโฟริล (phosphorylation) ของน้ำตาลเฮกโซสต่าง ๆ ขณะที่เอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะต่อตัวถูกย่อยสูงมาก ๆ จะพบในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ได้แก่ synthases รูปที่ 1.1 แสดงความจำเพาะของเอ็นไซม์โปรตีเอสในการสลายพันธะเพปไทด์ให้ได้องค์ประกอบสองส่วนคือ carboxyl component และ amino component



รูปที่ 1.1 ปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์โดยเอ็นไซม์โปรติเอส (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

1.1.3 การทำงานของเอ็นไซม์สามารถถูกควบคุมได้

เอ็นไซม์เกือบทั้งหมดเป็นโปรตีน เอ็นไซม์บางชนิดสามารถเร่งปฏิกิริยาอย่างเป็นอิสระ แต่ในเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาส่วนใหญ่สามารถถูกควบคุมด้วยปัจจัยต่าง ๆ โดยตัวควบคุมอาจทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น (activator) หรือตัวยับยั้ง (inhibitor) ก็ได้ ตัวอย่างเช่น การเติมหมู่ฟอสโฟริลกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ glycogen phosphorylase b ทำให้เกิดการสลายไกลโคเจนให้เป็นสารพลังงานที่ร่างกายต้องการ ตัวกระตุ้นคือฮอร์โมน glucagon หรือ epinephrin ที่ถูกหลั่งออกมาเมื่อร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ หรือเอ็นไซม์อาจถูกควบคุมโดยเอ็นไซม์อื่นแบบเป็นทอด ๆ ตัวอย่างที่รู้จักดีคือระบบการแข็งตัวของเลือด (blood clotting system) การควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์ที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือการควบคุมด้วยผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถีเมทาบอลิซึมที่มีเอ็นไซม์นั้นเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาต้น ๆ เรียกว่า *การควบคุมแบบป้อนกลับ (feedback control)*(รูปที่ 1.2)



รูปที่ 1.2 การควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์แบบ feedback inhibition (แหล่งที่มา: http://scholar.hw.ac.uk/site/biology/topic13)

นอกจากนี้การควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์อาจเกิดจากองค์ประกอบภายในเอ็นไซม์เอง เอ็นไซม์หลายชนิดจะเร่งปฏิกิริยาได้ก็ต่อเมื่อมีองค์ประกอบอื่นที่เรียกว่า ***หมู่พรอสธีติก (prosthetic group)*** ร่วมอยู่ในโครงสร้างของเอ็นไซม์ เอ็นไซม์ที่ไม่มีหมู่พรอสธีติกมาเกาะจะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เรียกสภาพของเอ็นไซม์นั้นว่า *อโปเอ็นไซม์ (apoenzyme)* ส่วนเอ็นไซม์ที่มีหมู่พรอสธีติกเกาะอยู่จะเป็นรูปที่เร่งปฏิกิริยาเรียกสภาพของเอ็นไซม์นั้นว่า *โฮโลเอ็นไซม์ (holoenzyme)*

หมู่พรอสธีติกของเอ็นไซม์มี 2 ประเภทคือ โคเอ็นไซม์ และโคแฟคเตอร์ โคเอ็นไซม์เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นอนุพันธ์ของไวตามิน ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างของโคเอ็นไซม์ที่เอ็นไซม์ต้องการในการเร่งปฏิกิริยาหลาย ๆ ชนิด

ตารางที่ 1.2 โคเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์บางชนิด (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

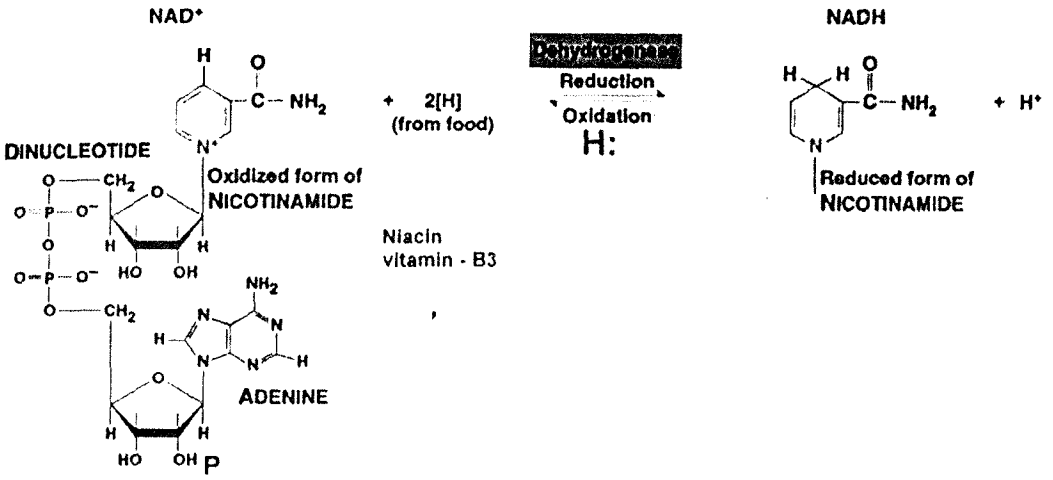
โคเอ็นไซม์	เอ็นไซม์
Thiamine pyrophosphate (TPP)	Pyruvate dehydrogenase
Flavin adenine nucleotide (FAD)	Monoamine oxidase
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)	Lactate dehydrogenase
Pyridoxal phosphate	Glycogen phosphorylase
Coenzyme A (Co A)	Acetyl CoA carboxylase
Biotin	Pyruvate carboxylase
5'-Deoxyadenosyl cobalamin	Methylmalonyl mutase
Tetrahydrofolate (THF)	Thymidylate synthase

ลักษณะของหมู่พรอสธีติกที่เป็นโคเอ็นไซม์คืออาจจับกับเอ็นไซม์แบบแน่นมากหรือจับแบบหลวม ๆ ก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของโคเอ็นไซม์ ส่วนใหญ่จะพบโคเอ็นไซม์ที่จับกับเอ็นไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ในส่วนประกอบของบริเวณเร่ง (active site) โดยโคเอ็นไซม์จะทำหน้าที่เป็นหมู่ที่เข้าเร่งปฏิกิริยากับตัวถูกย่อย ตัวอย่างเช่น เอ็นไซม์ alcohol dehydrogenase มี NAD^+ จับที่บริเวณเร่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนเอธานอลให้เป็นอะเซทาลดีไฮด์ ดังข้างล่าง

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \underset{\text{Alcohol dehydrogenase}}{\rightleftharpoons} CH_3CHO + NADH + H^+$$

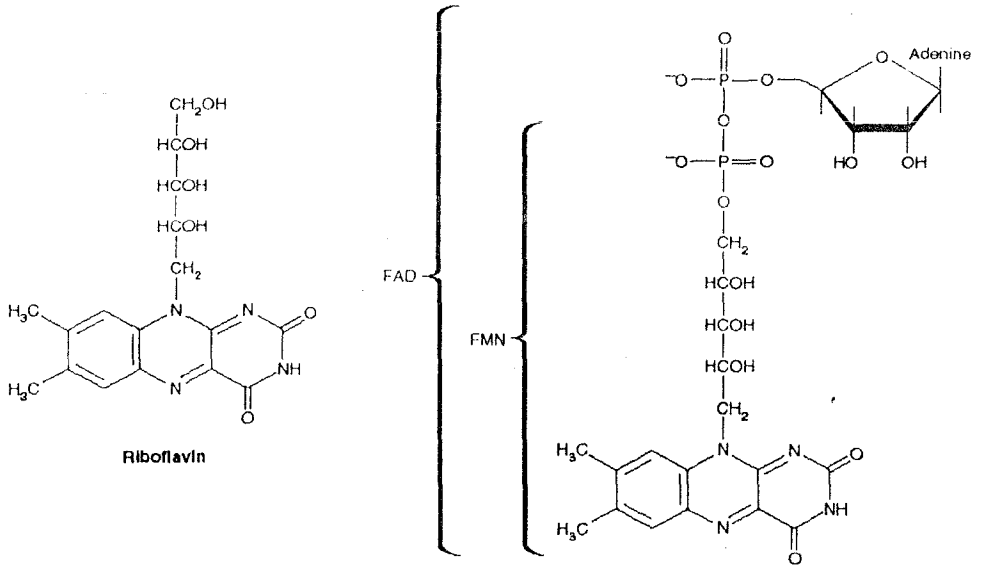
ตัวอย่างของโคเอ็นไซม์ที่สำคัญได้แก่

- Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD^+) และ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate ($NADP^+$) โคเอ็นไซม์ทั้งสองสร้างจากไวตามินบี 3 หรือ niacin เอ็นไซม์บางตัวมีความจำเพาะต่อ NAD^+ หรือ $NADP^+$ ตัวใดตัวหนึ่งเท่านั้น แต่เอ็นไซม์บางตัวสามารถใช้ทั้ง NAD^+ และ $NADP^+$ จะพบโคเอ็นไซม์ทั้งสองในเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา oxidation-reduction (รูปที่ 1.3)



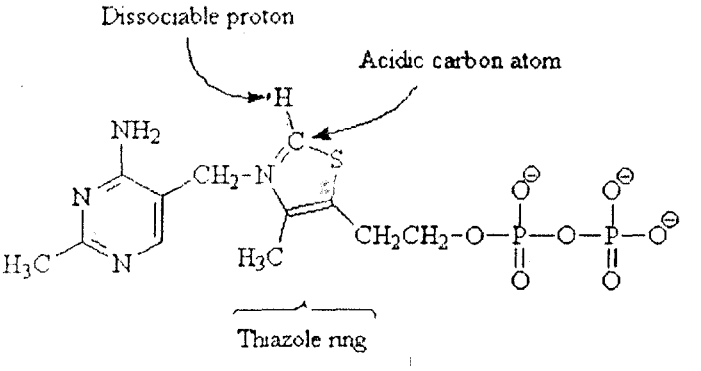
รูปที่ 1.3 โครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของ NAD^+ และ $NADP^+$ คือวงแหวน nicotinamide ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา (แหล่งที่มา: Addison Wesley Longman, Inc.)

- Flavin MonoNucleotides (FMN) และ Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) โคเอ็นไซม์ทั้งสองถูกสร้างจากไวตามินบี 2 หรือ ไรโบฟลาวิน (riboflavin) โครงสร้างของไรโบฟลาวินประกอบด้วยวงแหวนเฮทเทอโรไซคลิก (heterocycic ring) คือวงแหวนฟลาวินที่ทำหน้าที่เป็นหมู่ฟังก์ชันในการเร่งปฏิกิริยา วงแหวนนี้ต่ออยู่กับน้ำตาลไรโบส โดยโคเอ็นไซม์ FMN จะมีหมู่ฟอสเฟตเชื่อมอยู่กับหมู่ 5'-hydroxylriboflavin ส่วน FAD จะมีนิวคลีโอไทด์ adenosine มาต่อกับไรโบฟลาวินทอล (รูปที่ 1.4)



รูปที่ 1.4 โครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของ FMN และ FAD คือวงแหวน flavin ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา (แหล่งที่มา: Addison Wesley Longman, Inc.)

- Thiamine Pyrophosphate (TPP) เป็นอนุพันธ์ของไวตามิน บี1 หรือไธอามีน (Thiamine) โครงสร้างของไธอามีนประกอบด้วยวงแหวนไพริมิดีน (pyrimidine ring) และวงแหวนไธอาโซล (thiazole ring) (รูปที่ 1.5) ในเนื้อเยื่อของสัตว์มีกระดูกสันหลังจะพบ TPP เป็นโคเอ็นไซม์ของเอ็นไซม์หลายตัว เช่น pyruvate decarboxylase และ pyruvate dehydrogenase complex เป็นต้น



รูปที่ 1.5 โครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของโคเอ็นไซม์ TPP (แหล่งที่มา: http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical_Cases/vitamin%20cases/thiamin/tpp-acid.gif)

ส่วนโคแฟคเตอร์เป็นหมู่พรอสธีติกที่เป็นสารอนินทรีย์ได้แก่พวกโลหะต่าง ๆ ตัวอย่างโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์บางชนิดถูกแสดงไว้ในตารางที่1.2

ตารางที่ 1.3 โลหะที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์ต่าง ๆ (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

โลหะ	เอ็นไซม์
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase
Zn^{2+}	Carboxypeptidase
Mg^{2+}	EcoR V
Mg^{2+}	Hexokinase
Ni^{2+}	Urease
Mo	Nitrate reductase
Fe^{2+}	Glutathione peroxidase
Mn^{2+}	Superoxide dismutase
K^{+}	Propionyl CoA carboxylase

โคแฟคเตอร์ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์โดยอาจทำหน้าที่เป็นตัวเร่งประเภท Lewis acid catalyst ที่สามารถรับอิเลคตรอนคู่จากโมเลกุลอื่นได้ หรือโลหะอาจจับอยู่กับลิแกนด์ (ligand) โดยทำหน้าที่เป็น chelater ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เรียกว่า organometallic coordination complex ตัวอย่างเช่น การจับของธาตุเหล็ก (iron) กับพอร์ไฟริน (porphyrin) ทำให้เกิดสารประกอบที่เรียกว่าฮีม (heme) ที่พบในโครงสร้างของไมโอโกลบินและฮีโมโกลบิน สำหรับโลหะที่ทำหน้าที่เป็น Lewis acid catalyst จะเป็นพวก transition

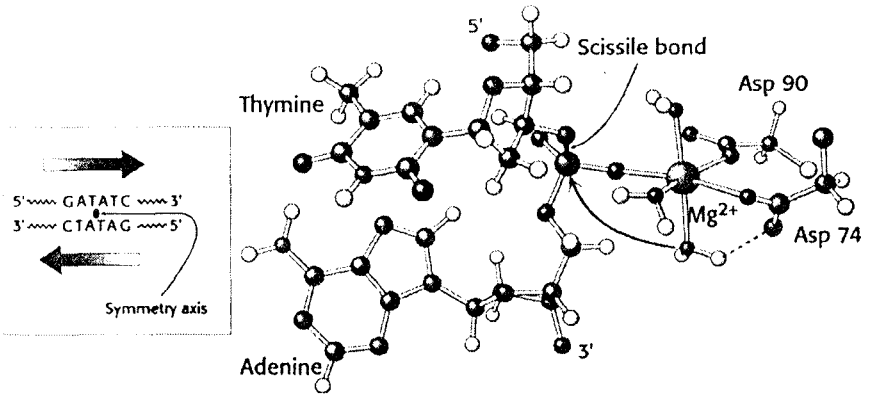
metal ได้แก่ Zn^{2+} Fe^{2+} Mn^{2+} Mg^{2+} และ Cu^{2+} เป็นต้น รูปที่ 1.5 แสดงตัวอย่างของเอ็นไซม์ carbonic anhydrase ที่มี Zn^{2+} จับอยู่ที่บริเวณเร่ง (รูปที่ 1.6)

รูปที่ 1.6 บริเวณเร่งของ carbonic anhydrase ที่มี Zn^{2+} ทำ coordinate อยู่กับ His94 His96 His119 และ H_2O (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 9, online edition)

เอ็นไซม์ carbonic anhydrase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน CO_2 เป็น H_2CO_3 ดังข้างล่าง

$$CO_2 + H_2O \underset{\text{Carbonic anhydrase}}{\rightleftharpoons} H_2CO_3$$

เอ็นไซม์ *EcoR* V เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งของเอ็นไซม์ที่ต้องการโคแฟคเตอร์ Mn^{2+} ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณจำเพาะ



รูปที่ 1.7 บริเวณเร่งของ EcoR V ที่มี Mn^{2+} ทำ coordinate อยู่กับ Asp74 Asp90 และหมู่ฟอสเฟตของเบส A:T ที่จะมีการตัดของพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 9, online edition)

หน้าที่หลักของโลหะคือการเชื่อมเอ็นไซม์กับตัวถูกย่อยเข้าด้วยกันดังแสดงในรูปที่ 1.7 นอกจากนี้ยังทำให้โครงสร้างของเอ็นไซม์อยู่ในรูปที่ทำงานได้ดีและเสถียร โคแฟคเตอร์บางตัวมีส่วนร่วมในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ของเอ็นไซม์ในกลุ่มที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (iron-containing enzymes) เช่น succinate dehydrogenase หรือ NADH dehydrogenase โดยเหล็กจะไม่ได้เป็นองค์ประกอบของฮีม และแต่ทำหน้าที่เป็น chelator ส่วนใหญ่พบว่าไปยึดอะตอมซัลเฟอร์ของกรดอะมิโน cysteine ทำให้เกิดสภาพ sulfur-bridged iron chelate

1.2 การจัดกลุ่มเอ็นไซม์ (Enzyme Nomenclature)

การจัดกลุ่มเอ็นไซม์ที่ได้รับการยอมรับเป็นสากลตามหลักของ The Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology หรือ IUBMB nomenclature (http://www.chem. qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/) เป็นการจัดกลุ่มเอ็นไซม์ตามชนิดของปฏิกิริยาที่เร่ง ซึ่งสามารแบ่งเป็น 6 กลุ่ม โดยหลักการดังกล่าวได้กำหนดรหัสประจำตัวเอ็นไซม์ที่เรียกว่า Enzyme Code number หรือ EC number ของเอ็นไซม์แต่ละตัวไว้ รหัสของเอ็นไซม์ประกอบด้วยตัวเลขสี่หลัก (n_1-n_4) ซึ่งเขียนดังนี้ (EC $n_1.n_2.n_3.n_4$) แต่ละหลักจะแยกออกจากกันโดยใช้จุด ตัวเลขหลักที่หนึ่งบ่งบอกถึงปฏิกิริยาหลักทั้ง 6 กลุ่ม ดังตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.4 การจัดกลุ่มของเอ็นไซม์ตามชนิดของการเร่งปฏิกิริยา (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

กลุ่ม	ปฏิกิริยาที่เร่ง	ตัวอย่างเอ็นไซม์
1. Oxidoreductases	ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน	Dehydrogenases เช่น lactate dehydrogenase
2. Transferases	ปฏิกิริยาการย้ายหมู่	Kinases เช่น hexokinase, NMP kinase
3. Hydrolases	ปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำ	Proteases เช่น trypsin, chymotrypsin
4. Lyases	ปฏิกิริยาการเติมหรือกำจัดหมู่โดยไม่มีน้ำเข้าร่วม	Fumarases
5. Isomerases	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไอโซเมอร์	Triose phosphate isomerase
6. Ligases	ปฏิกิริยาการเชื่อมตัวถูกย่อยสองตัวเข้าด้วยกันโดยใช้ ATP	DNA ligase, aminoacyl-tRNA synthatase

ดังนั้น เอ็นไซม์ที่มี EC code เป็น EC 1 จะอยู่ในกลุ่ม Oxidoreductases ในขณะที่เอ็นไซม์ที่มี EC code เป็น EC 2 จะอยู่ในกลุ่ม Transferases เป็นต้น

1.2.1 EC 1 Oxidoreductases

เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายไฮโดรเจนและออกซิเจนหรืออิเลคตรอนจากตัวถูกย่อยหนึ่งไปยังอีกตัวถูกย่อยหนึ่ง ส่วนตัวเลขหลักที่สองบอกถึงหมู่ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนหรืออิเลคตรอน ดังแสดงข้างล่าง

EC number	**หมู่ที่ให้ไฮโดรเจนหรืออิเลคตรอน**
EC 1.1	หมู่อัลกอฮอล์ (>CH-OH)
EC 1.2	หมู่อัลดีไฮด์หรือคีโตน (-CHO หรือ -C=O)
EC 1.3	หมู่ >CH-CH<
EC 1.4	หมู่ >CH-NH_2
EC 1.5	หมู่ >CH-NH
EC 1.6	หมู่ NADH หรือ NADPH
.	
.	
.	
EC 1.97	เป็น oxidoreductase อื่น ๆ

ส่วนตัวเลขหลักที่ 3 แสดงถึงหมู่ที่ทำหน้าที่รับโปรตอนหรืออิเลคตรอน ใช่น

EC 1.1.1 หมู่ที่รับไฮโดรเจนหรืออิเลคตรอนเป็น NAD^+ หรือ $NADP^+$

EC 1.1.2 หมู่ที่รับไฮโดรเจนหรืออิเลคตรอนเป็น cytochrome

EC 1.1.3 หมู่ที่รับไฮโดรเจนหรืออิเลคตรอนเป็น oxygen

.

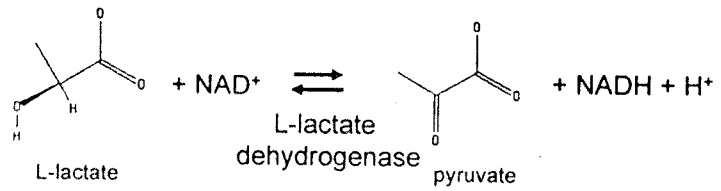
.

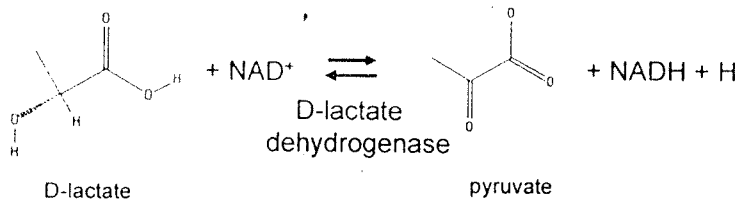
.

EC 1.1.99 หมู่ที่รับไฮโดรเจนหรืออิเลคตรอนเป็นตัวรับอื่น ๆ

ข้อสังเกต เอ็นไซม์ EC 1.2-1.97 จะใช้ตัวเลขหลักที่ 3 ร่วมกับเอ็นไซม์ EC 1.1 เช่น เอ็นไซม์ EC 1.2.1 เป็น oxidoreductase ที่มีตัวให้โปรตอนเป็นหมู่อัลกอฮอล์และมีตัวรับโปรตอนเป็น NAD^+ หรือ $NADP^+$ เป็นต้น

ส่วนตัวเลขหลักที่สี่อาจแสดงถึงความจำเพาะต่อตัวถูกย่อย เช่น L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) เอ็นไซม์นี้มีตัวถูกย่อยเป็น *L*-lactate ขณะที่ *D*-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.28) มีตัวถูกย่อยเป็น *D*-lactate (รูปที่ 1.8) ตัวเลขหลักที่สี่อาจแสดงถึงเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันแต่มีตัวรับหรือตัวให้โปรตอนต่างกัน เช่น glutamate synthase (EC 1.4.1.13) มีตัวให้โปรตอนเป็น NADPH ขณะที่ glutamate synthase (EC 1.4.1.14) มีตัวให้โปรตอนเป็น NADH หรืออาจแสดงถึงเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันแต่มีตัวควบคุมที่ต่างกัน เช่น EC 1.1.4.1 vitamin-*K*-epoxide reductase ถูกควบคุมด้วย warfarin (warfarin-sensitive) ส่วน EC 1.1.4.2 vitamin-*K*-epoxide reductase ไม่ถูกควบคุมด้วย warfarin (warfarin-insensitive) เป็นต้น





รูปที่ 1.8 แสดงความจำเพาะต่อตัวถูกย่อยของเอ็นไซม์ lactate dehydrogenase ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน lactate เป็น pyruvate (แหล่งที่มา: BRENDA enzyme database)

1.2.2 EC 2 Transferases

เอ็นไซม์กลุ่มนี้เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่จากตัวถูกย่อยหนึ่งไปยังอีกตัวถูกย่อยหนึ่งโดยหมู่ที่ถูกย้ายอาจเป็นหมู่ acyl- หมู่ alkyl- หรือ หมู่ glycosyl- เป็นต้น เอ็นไซม์ transferases แบ่งเป็น 9 กลุ่มย่อยโดยแสดงที่ตัวเลขหลักที่ 2 ของ EC number

EC 2.1 ทำการย้ายหมู่ที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนตัวเดียวเช่น หมู่ methyl- หมู่hydroxymethyl- หมู่ formyl-และหมู่ carboxyl-

EC 2.2 ทำหน้าที่ย้ายหมู่อัลดีไฮด์หรือหมู่คีโตน

EC 2.3 ทำหน้าที่ย้ายหมู่ acyl- เช่นหมู่ aminoacyl-

EC 2.4 ทำหน้าที่ย้ายหมู่ glycosyl- เช่นหมู่ pentosyl- hexosyl- และอื่น ๆ

EC 2.5 ทำหน้าที่ย้ายหมู่ alkyl- หมู่ aryl- และหมู่ methyl อื่น ๆ

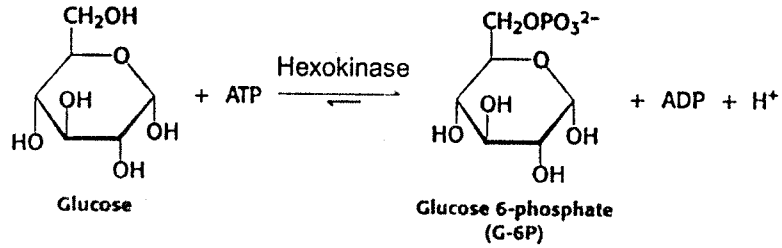
EC 2.6 ทำหน้าที่ย้ายหมู่ nitrogeneous- เอ็นไซม์ transaminases ต่าง ๆ จะอยู่ในกลุ่มนี้

EC 2.7 ทำหน้าที่ย้ายหมู่ที่มี phosphorus เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ kinases

EC 2.8 ทำหน้าที่ย้ายหมู่ที่มี sulfur เป็นองค์ประกอบ

EC 2.9 ทำหน้าที่ย้ายหมู่ selenium เรียกเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ว่า selenotransferases

ตัวเลขหลักที่ 3 ของเอ็นไซม์กลุ่มนี้แสดงถึงหมู่ที่ทำการย้าย เช่น EC 2.1.1 methyltransferases เป็นเอ็นไซม์ที่ย้ายหมู่ methyl- ส่วนตัวเลขหลักที่ 4 ส่วนใหญ่แสดงถึงความจำเพาะต่อตัวถูกย่อย เช่น EC 2.7.1.1 hexokinases เป็นเอ็นไซม์ kinases ที่ย้ายหมู่ phosphoryl จาก ATP ไปให้น้ำตาล D- hexose ดังแสดงในรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.9 การเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ hexokinases (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 16, online edition)

1.2.3 EC 3 Hydrolases

เอ็นไซม์ hydrolases กลุ่มของเอ็นไซม์ที่ใหญ่ที่สุด ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายโดยใช้น้ำเข้าร่วมปฏิกิริยา พันธะที่สลายเป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์บอนกับออกซิเจน (C-O) คาร์บอนกับไนโตรเจน (C-N) คาร์บอนกับคาร์บอน (C-C) หรือฟอตโฟรัสกับออกซิเจน (P-O) เป็นต้น เอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อตัวถูกย่อยค่อนข้างต่ำ กลุ่มที่พบมากคือ esterases glycosylases และ peptidases (รูปที่ 1.10) สามารถจัดกลุ่ม hydrolases ออกเป็น 13 กลุ่มย่อย ดังข้างล่าง

EC 3.1 สลายพันธะเอสเทอร์โดยเอ็นไซม์ esterases พันธะที่สลายได้แก่ carboxylic esters thioesters หรือ phospho mono- di- tri- esters เป็นต้น สารที่พบว่ามีพันธะเอสเทอร์ คือ ไขมัน และโพลินิวคลีโอไทด์

EC 3.2 สลายพันธะไกลโคซิดิกโดยเอ็นไซม์ glycosylases พันธะที่สลายได้แก่ O-linked N-linked และ S-linked glycosidic ที่เชื่อมน้ำตาลต่าง ๆ เข้าด้วยกัน

EC 3.3 สลายพันธะอีเทอร์ ตัวอย่างเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ epoxide hydrolases

EC 3.4 สลายพันธะเพปไทด์ ได้แก่ peptidases พันธะเพปไทด์ทำหน้าที่เชื่อมกรดอะมิโนเข้าด้วยกัน

EC 3.5 สลายพันธะ C-N ที่ไม่ใช่พันธะเพปไทด์ เช่น deformylases หรือ deacetylases เป็นต้น

EC 3.6 สลาย acid anhydrides เช่น di- tri phosphatases เป็นต้น

EC 3.7 สลายพันธะ C-C ซึ่งพันธะนี้จะพบในสารประกอบพวกคีโตน เช่น oxaloacetate หรือ cyclohexane 1,3 dione เป็นต้น

EC 3.8 สลายพันธะ halides ได้แก่ C-halides และ P-halides

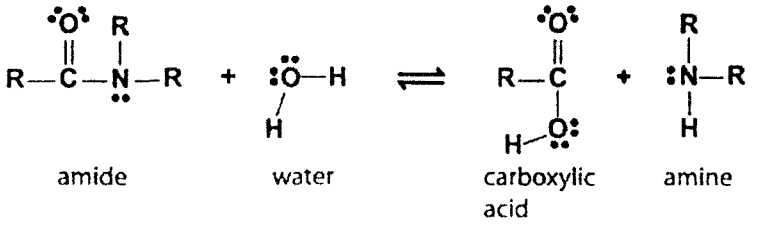
EC 3.9 สลายพันธะ P-N เช่น phosphoamidase

EC 3.10 สลายพันธะ S-N ได้แก่พวก sulfohydrolases

EC 3.11 สลายพันธะ C-P ได้แก่พวก acetaldehyde hydrolases

EC 3.12 สลายพันธะ S-S ได้แก่ thionate hydrolases

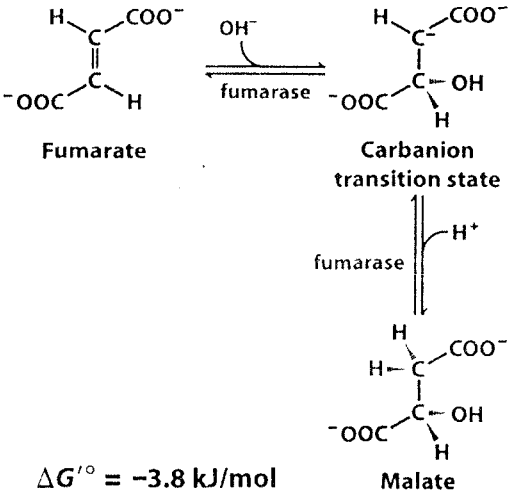
EC 3.13 สลายพันธะ C-S มี 2 เอ็นไซม์คือ UDP-sulfoquinovose synthase และ 2'-hydroxybiphenyl-2-sulfinate desulfinase



รูปที่ 1.10 การสลายพันธะเพปไทด์โดย peptidases (แหล่งที่มา: www.mpcfaculty.net/mark_bishop/chymotrypsin.htm)

1.2.4 EC 4 Lyases

Lyases เป็นเอ็นไซม์ที่สลายพันธะโดยไม่มีน้ำเข้าร่วมในปฏิกิริยาหรือไม่เกิดการสลายจากปฏิกิริยา oxidation พันธะที่สลายได้แก่ คาร์บอน-คาร์บอน (C-C) คาร์บอน-ไนโตรเจน (C-N) หรือ คาร์บอน-ออกซิเจน (C-O) เป็นต้น ข้อพิเศษของ lyases คือถ้าเป็นตัวถูกย่อยตัวเดียวปฏิกิริยาการสลายพันธะจะเป็นการกำจัดอะตอมภายในโครงสร้างของตัวถูกย่อยทำให้มีพันธะคู่ หรือวงแหวนเกิดใหม่ขึ้น ปฏิกิริยาผันกลับของเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้จะเป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (synthesis) หรือปฏิกิริยาการรวม (condensation) (รูปที่ 1.11) เอ็นไซม์ที่สำคัญคือ decarboxylases และ aldolases เอ็นไซม์ในกลุ่ม lyases มี 7 กลุ่มย่อยคือ



รูปที่ 1.11 ปฏิกิริยาผันกลับของ fumarase (แหล่งที่มา: courses.cm.utexas.edu/.../Lecture-Ch16.html)

EC 4.1 C-C lyases สลายพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอน ได้แก่ carboxylic lyases aldehyde lyases และ oxo-acid lyases ตัวอย่างเอ็นไซม์ที่รู้จักดีคือ pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1) และ fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.1.3)

EC 4.2 C-O lyases สลายพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์บอนกับออกซิเจน ในกรณีของ hydrolyases จะเป็นการกำจัดน้ำ ได้แก่ dehydratases หรือ lyases ที่สลายพันธะในสายอะมีโนไกลแคน

EC 4.3 C-N lyases สลายพันธะแล้วอาจมีการปลดปล่อยแอมโมเนียออกมาดังข้างล่าง

$$>C(-OH)-CH(-NH_2)- \longrightarrow >CH_2-CO- + NH_3$$

เอ็นไซม์ที่รู้จักได้แก่ ammonia lyases

EC 4.4 C-S lyases เป็นเอ็นไซม์ที่กำจัด H_2S หรือดัดแปลง H_2S ให้เป็นรูปอื่น

EC 4.5 C-halide lyases เอ็นไซม์ดั้งเดิมที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้จะกำจัด HCl จาก DTT

EC 4.6 P-O lyases เอ็นไซม์ในกลุ่มนี้รวม nucleotidyl cyclases เข้าไปด้วยและมีหน้าที่ตัดหมู่ diphosphate ออกจาก nucleotide triphosphate

EC 4.99 เป็น lyases กลุ่มอื่น ๆ ที่ไม่รวมอยู่ใน EC 4.1- 4.6

1.2.5 EC 5 Isomerases

เป็นกลุ่มเอ็นไซม์ที่เปลี่ยนไอโซเมอร์ของตัวถูกย่อย เช่น เปลี่ยน *L*-isomer ให้เป็น *D*-isomer หรือเปลี่ยน aldehyde ให้เป็น ketone เป็นต้น สามารถแบ่งเอ็นไซม์ isomerases เป็น 6 กลุ่มย่อย และตัวอย่างปฏิกิริยาของ isomerases แสดงในรูปที่ 1.12

EC 5.1 racemases and epimerases เป็นเอ็นไซม์ในกระบวนการ racemization หรือ epimerization ของ chiral center เอ็นไซม์นี้อาจแบ่งเป็นกลุ่มย่อยขึ้นกับชนิดของตัวถูกย่อย เช่น กรดอะมิโน (EC 5.1.1) hydrolic acids (EC 5.1.2) คาร์โบไฮเดรท หรืออนุพันธุ์ของคาร์โบไฮเดรท (EC 5.1.3) หรือสารประกอบอื่น ๆ (EC 5.1.4)

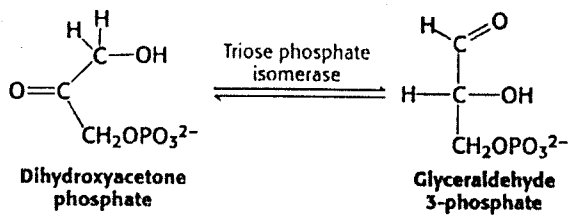
EC 5.2 *cis-trans* isomerases รับผิดชอบเกี่ยวกับการจัดเรียงตัวของอะตอมที่อยู่รอบ ๆ พันธะคู่ เช่น retinol isomerase (EC 5.2.1.7) จะเปลี่ยน cis-retinol ให้เป็น trans-retinol ในกระบวนการรับแสงของเซลล์รับแสงที่ตา

EC 5.3 intramolecular oxidoreductases ปฏิกิริยาที่เกิดเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่บริเวณหนึ่งของตัวถูกย่อยและขณะเดียวกันก็เกิดปฏิกิริยารีดักชันที่บริเวณอื่นภายในตัวถูกย่อยเดียวกัน ตัวอย่างเอ็นไซม์ที่รู้จักคือ tuatomerases

EC 5.4 intramolecular transferases รับผิดชอบเกี่ยวกับการส่งผ่านหมู่ acyl (EC 5.4.1) หมู่ phospho (EC 5.4.2) หมู่ amino (EC 5.4.3) หมู่ hydroxy (EC 5.4.4) หรือหมู่อื่น ๆ (EC 5.4.99) จากตำแหน่งหนึ่งไปยังตำแหน่งอื่นของตัวถูกย่อย

EC 5.5 Intramolecular lyases เป็นการกำจัดหมู่ผ่านปฏิกิริยาการสลายแล้วทำให้เกิดพันธะคู่บริเวณที่ถูกตัด

EC 5.6 isomerase อื่น ๆ



รูปที่ 1.12 ปฏิกิริยาของ triose phosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 16, online edition)

1.2.6 EC 6 Ligases

เอ็นไซม์ ligases เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อพันธะของตัวถูกย่อยสองตัวเข้าด้วยกันโดยมีการสลายของหมู่ diphosphate ของ ATP หรือนิวคลิโอไทด์ไตรฟอตเฟสอื่น ๆ (รูปที่ 1.13) นอกจากนี้ยังรวมกลุ่มของ synthases เข้าไปด้วย สามารถแบ่งกลุ่ม ligases ออกเป็น 6 กลุ่มย่อยตามลักษณะของพันธะที่เชื่อม

EC 6.1 เชื่อมพันธะ C-O เป็นการเติมหมู่ acyl ได้แก่เอ็นไซม์ amino acid tRNA ligases

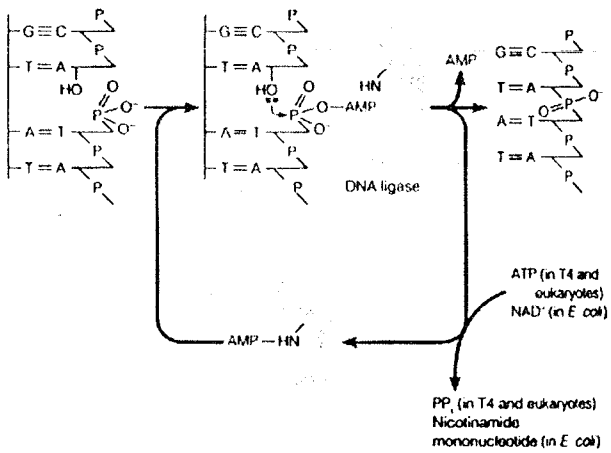
EC 6.2 เชื่อมพันธะ C-S เป็นเอ็นไซม์ที่สร้าง acyl-CoA ต่าง ๆ เช่น acyl CoA ligases

EC 6.3 เชื่อมพันธะ C-N ได้แก่พวก amide synthases peptide synthases หรือเอ็นไซม์ที่สร้างวงแหวน heterocyclicเป็นต้น

EC 6.4 เชื่อมพันธะ C-C ได้แก่พวก carboxylating enzymes หรือ biotinyl enzymes

EC 6.5 เชื่อมพันธะ phosphoric ester ได้แก่ เอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่เชื่อมสายดีเอ็นเอหรือพวกที่ทำการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่แตกหัก บางครั้งเรียก repairing enzymes

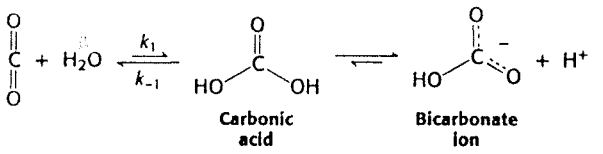
EC 6.6 เชื่อมพันธะ N-metal ได้แก่พวก chelating enzymes



รูปที่ 1.13 ปฏิกิริยาการสร้างพันธะ phosphodiester ของ DNA ligase (EC 6.5.1.2) (แหล่งที่มา: www.biochem.umd.edu/.../DNA%20Ligase.htm)

คำถามทบทวนท้ายบท

1. จงให้เหตุผลมาสามประการว่าทำไมเอ็นไซม์จึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ
2. จงอธิบายว่าทำไมเอ็นไซม์ในกลุ่ม synthases จึงมีความจำเพาะต่อตัวถูกย่อยสูงมากในขณะที่เอ็นไซม์ในกลุ่ม hydrolases จึงมีความจำเพาะต่ำต่อตัวถูกย่อย
3. โคเอ็นไซม์ต่างจากโคแฟคเตอร์อย่างไร
4. จงอธิบายบทบาทของโคแฟคเตอร์ในการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์
5. จงให้เหตุผลว่าเอ็นไซม์ปฏิกิริยาข้างล่างจัดอยู่ในกลุ่มใด



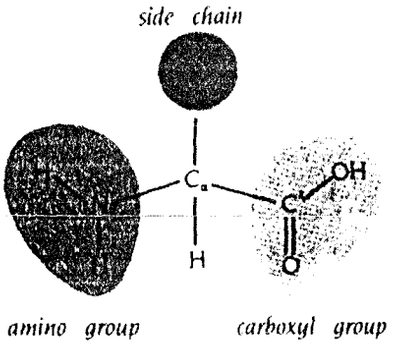
บทที่ 2
โครงสร้างของเอ็นไซม์

เอ็นไซม์เกือบทั้งหมดเป็นโปรตีน การเข้าใจโครงสร้างของโปรตีนเป็นพื้นฐานสำคัญในการเข้าใจการทำงานของเอ็นไซม์ โปรตีนเป็นสายโพลีเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมีโนมาเรียงต่อกัน โปรตีนแต่ละชนิดจะมีลำดับกรดอะมีโนที่จำเพาะออกไป เมื่อสายโพลีเพปไทด์มีการม้วนพับ (folding) และมีการจัดเรียงของอะตอมที่อยู่ห่างกันให้มาอยู่ร่วมกันเกิดเป็นโครงสร้างระดับสูงที่ทำให้โปรตีนมีหน้าที่ต่าง ๆ กัน สามารถแบ่งชนิดของโปรตีนออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ตามโครงสร้างคือ โปรตีนเส้นใย (fibrous proteins) และโปรตีนก้อนกลม (globular protein) เอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเคมีเกือบทั้งหมดเป็นโปรตีนก้อนกลม การทราบโครงสร้างของเอ็นไซม์ระดับต่าง ๆ จะทำให้สามารถเข้าใจกลไกการเร่งปฏิกิริยาการใช้ตัวถูกย่อยได้ดียิ่งขึ้น

2.1 กรดอะมีโน

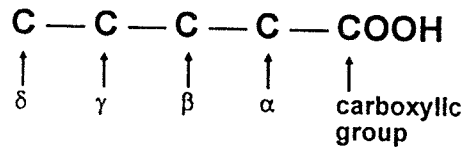
2.1.1 กรดอะมีโนเป็นองค์ประกอบของโปรตีน

โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมีโนประกอบด้วย C_α ทำพันธะโควาเลนท์อยู่กับหมู่ 4 หมู่ คือหมู่อัลฟา-คาร์บอกซิล (α-COOH) หมู่อัลฟา-อะมีโน (α-NH_2) หมู่แขนงข้างหรือหมู่ R และ อะตอมของไฮโดรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมีโน (แหล่งที่มา: ffden-2.phys.uaf.edu/.../ Intoduction.html)

หมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมีโนที่อยู่ในโครงสร้างทำให้กรดอะมีโนมีคุณสมบัติเป็นทั้งกรดและเบสในเวลาเดียวกัน เรียกโมเลกุลลักษณะนี้ว่า *amphipatic molecule* การเรียกตำแหน่งของคาร์บอนพิจารณาตามหลักเกณฑ์การกำหนดตำแหน่งของคาร์บอนในโมเลกุลอินทรีย์โดยที่ตำแหน่งของคาร์บอนที่อยู่ถัดจากปลายด้าน COOH จะเป็นตำแหน่ง α ส่วนคาร์บอนตัวถัดมาจะเป็น β- γ- และ δ-carbon ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.2

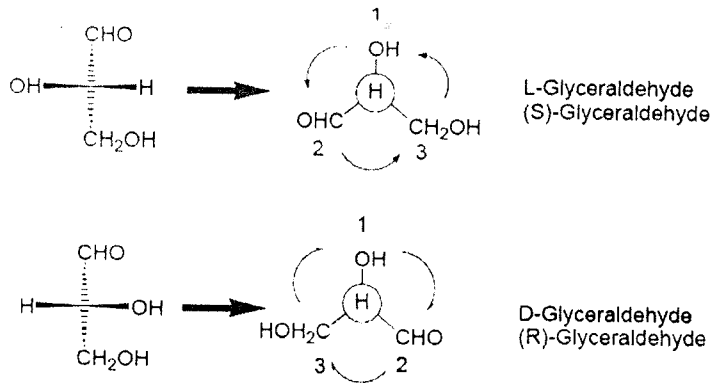


รูปที่ 2.2 การกำหนดตำแหน่งของคาร์บอนของโมเลกุลอินทรีย์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล

2.1.2 สเตอริโอเคมี (stereochemistry) ของกรดอะมิโน

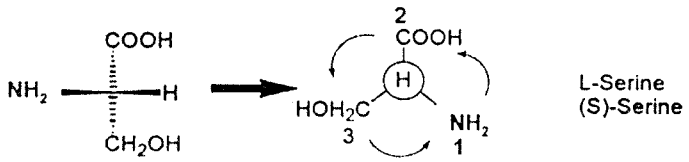
เมื่อพิจารณา C_α ของกรดอะมิโนจะเห็นว่าพันธะแต่ละพันธะของ C_α จะเชื่อมอยู่กับอะตอมหรือหมู่สี่หมู่ที่ไม่เหมือนกัน เรียกคาร์บอนลักษณะนี้ว่า *คาร์บอนที่ไม่สมมาตร (asymmetric carbon)* และเรียกโมเลกุลที่มีคาร์บอนที่ไม่สมมาตรอยู่ในโครงสร้างว่า *โมเลกุลไครัล (chiral molecule)* การจัดเรียงตัวของคาร์บอนที่ไม่สมมาตร จะให้ไอโซเมอร์สองแบบที่มีลักษณะเป็นสเตอริโอไอโซเมอร์ (stereoisomer) หรือออพทิคัลไอโซเมอร์ (optical isomer) ที่เป็นภาพกระจก (mirror image) ของกันที่ไม่สามารถทับกันได้สนิท

กรดอะมิโนทุกตัวยกเว้น ไกลซีน มีสเตอริโอไอโซเมอร์สองแบบคือแบบ L- (levorotary) และแบบ D- (dextrorotary) โมเลกุลที่เป็น L-isomer จะหมุนแสงโพลาไรซ์ไปในทิศทางที่ทวนเข็มนาฬิกา ส่วนโมเลกุลที่เป็น D-isomer จะหมุนแสงโพลาไรซ์ไปในทิศตามเข็มนาฬิกา นอกจากนี้การกำหนดสเตอริโอไอโซเมอร์ของกรดอะมิโนให้ใช้หลักการเดียวกับการกำหนดสเตอริโอไอโซเมอร์ของน้ำตาลกลีเซอรอลดีไฮด์ (glyceraldehyde) ดังรูปที่ 2.3



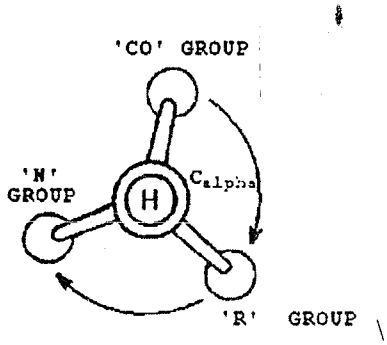
รูปที่ 2.3 การกำหนด D- และ L- isomer ของน้ำตาลกลีเซอรอลดีไฮด์ (แหล่งที่มา: www.biochem. arizona. edu/.../amino_acids.htm)

ในโมเลกุลของกลีเซอรอลดีไฮด์ กำหนดให้หมู่ OH เป็นหมู่ที่ 1 หมู่ CHO เป็นหมู่ที่ 2 และหมู่ CH_2OH เป็นหมู่ที่ 3 ถ้าการจัดเรียงตัวของหมู่ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ เป็นไปในทิศทวนเข็มนาฬิกากำหนดให้เป็น L-glyceraldehyde แต่ถ้าการจัดเรียงตัวของหมู่ที่ 1 2 และ 3 เป็นไปในทิศตามเข็มนาฬิกากำหนดให้เป็น D-glyceraldehyde ในกรณีของกรดอะมิโนให้กำหนดหมู่ NH_2 เป็นหมู่ที่ 1 หมู่ COOH เป็นหมู่ที่ 2 และหมู่ R เป็นหมู่ที่ 3 รูปที่ 2.4 แสดงการจัดเรียงตัวของหมู่ที่ 1 2 และ 3 ของกรดอะมิโน serine ไปในทิศทวนเข็มนาฬิกา จึงจัดเป็น L-serine



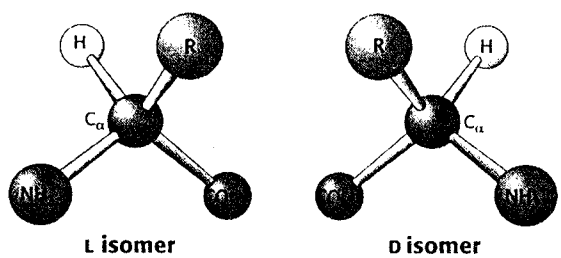
รูปที่ 2.4 การกำหนด L- isomer ของกรดอะมิโน serine (แหล่งที่มา: www.biochem. arizona. edu/.../amino_acids.htm)

หรืออีกวิธีหนึ่งคือการใช้กฎ CORN (CORN LAW) ที่เสนอโดย Richardson ในปี 1981 กำหนดทิศของการหมุน โดยพิจารณาพันธะ H-C_α อยู่ใกล้ตัวที่สุดแล้วดูการหมุนของ หมู่ 'CO' (carboxyl group) ตามด้วย หมู่ 'R' (side chain) และหมู่ 'N' (amino group) ดังรูปที่ 2.5 ถ้าเป็นไปในทิศตามเข็มนาฬิการให้จัดเป็น D-amino acid แต่ถ้าหมุนไปในทิศทวนเข็มนาฬิกาให้จัดเป็น L-amino acid



รูปที่ 2.5 การพิจารณาไอโซเมอร์ของกรดอะมิโนตามกฎ CORN (แหล่งที่มา: www.friedli.com/herbs/phytochem/proteins.html)

เรียก L-isomer และ D-isomer ของโมเลกุลที่เป็นภาพในกระจกเงาของกันที่ซ้อนทับกันไม่สนิทว่าเป็นอิแนนชิโอเมอร์กัน (รูปที่ 2.6) เช่น L-serine เป็นอิแนนชิโอเมอร์ของ D-serine เป็นต้น



รูปที่ 2.6 รูปอิแนนชิโอเมอร์ของกรดอะมิโน (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 2, online edition)

2.1.3 การจัดประเภทกรดอะมีโนและคุณสมบัติ

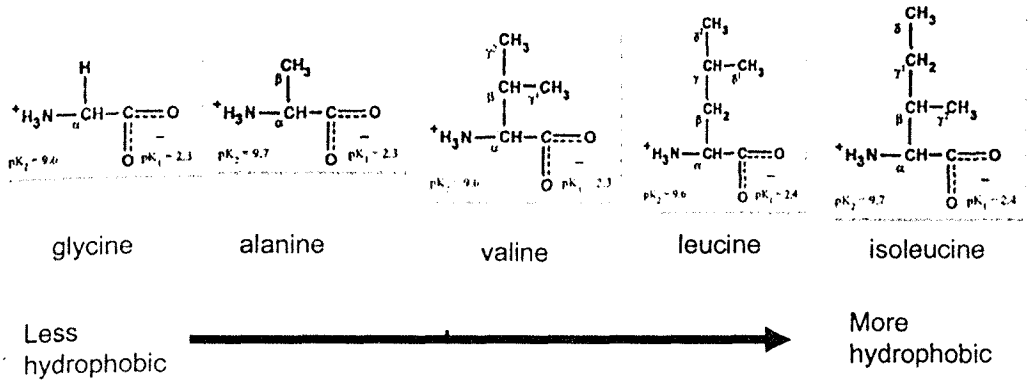
กรดอะมีโนที่พบอยู่ในธรรมชาติมีอยู่ 20 ตัว ทั้งหมดมีไอโซเมอร์แบบ L- ตารางที่ 2.1 แสดงชื่อของกรดอะมีโนที่เป็นแบบเต็มและแบบย่อสามตัวอักษรและหนึ่งตัวอักษร กรดอะมีโนจำเป็น (essential amino acid) ที่ร่างกายต้องได้รับจากสารอาหารเข้าไปมี 10 ตัวได้แก่ arginine (ต้องการในวัยทารกเท่านั้น) histidine isoleucine leucine lysine methionine phenylalanine threonine tryptophan และ valine

ตารางที่ 2.1 การเรียกชื่อกรดอะมีโนทั้ง 20 ตัว (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 2, online edition)

กรดอะมีโน	ชื่อย่อสามตัวอักษร	ชื่อย่อหนึ่งตัวอักษร	กรดอะมีโน	ชื่อย่อสามตัวอักษร	ชื่อย่อหนึ่งตัวอักษร
Alanine	Ala	A	Methionine	Met	M
Arginine	Arg	R	Phenylalanine	Phe	F
Asparagine	Asn	N	Proline	Pro	P
Aspartic acid	Asp	D	Serine	Ser	S
Cysteine	Cys	C	Threonine	Thr	T
Glutamine	Gln	Q	Tryptophan	Trp	W
Glutamic acid	Glu	E	Tyrosine	Tyr	Y
Glycine	Gly	G	Valine	Val	V
Histidine	His	H			
Isoleucine	Ile	I			
Leucine	Leu	L			
Lysine	Lys	K			

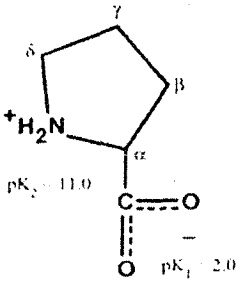
สามารถจัดกลุ่มของกรดอะมีโนทั้ง 20 ตัวออกได้เป็น 6 กลุ่ม โดยพิจารณาจากโครงสร้างและคุณสมบัติของแขนงข้างดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 กรดอะมีโนที่มีแขนงข้างเป็นสายยาวตรง (aliphatic side chain) ได้แก่ glycine alanine valine leucine และ isoleucine (รูปที่ 2.7) กรดอะมีโนตัวที่เล็กที่สุดคือ glycine จัดเป็นกรดอะมีโนตัวเดียวที่ไม่มีไอโซเมอร์ เนื่องจาก C_α ของ glycine ไม่มีความเป็นคาร์บอนไครัล คุณสมบัติของกรดอะมีโนในกลุ่มนี้คือเป็นพวกไม่มีขั้วและความไม่มีขั้วจะสูงขึ้นเมื่อแขนงข้างมีความยาวมากขึ้น เช่น leucine และ isoleucine จะมีความไม่มีขั้วมากกว่า valine และ glycine ตามลำดับ ทำให้ leucine และ isoleucine ละลายน้ำไม่ดี พบกรดอะมีโนนี้ภายในโครงสร้างของโปรตีนและทำหน้าที่เป็น hydrophobic core ที่ยึดโครงสร้างสามมิติของโปรตีนไว้



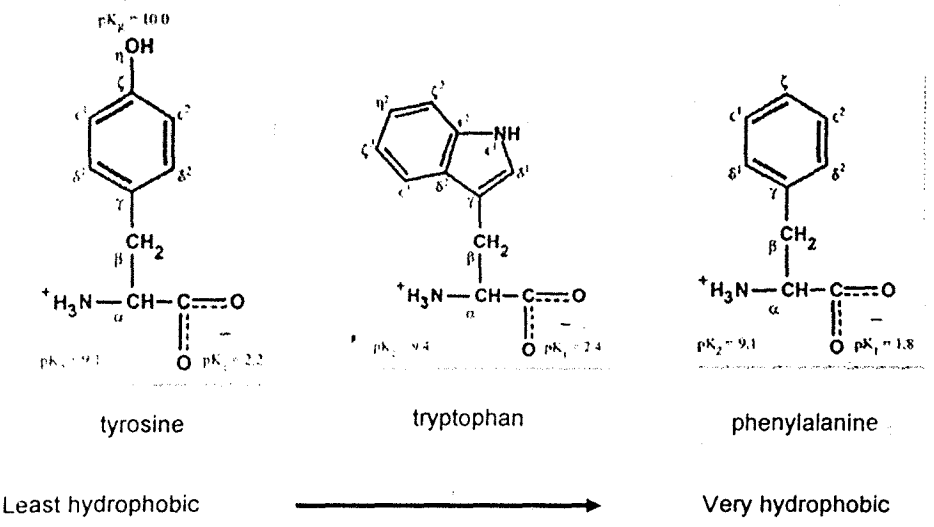
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของกรดอะมีโนที่มีแขนงข้างเป็นเส้นยาวตรง (แหล่งที่มา:http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Amino_Acids/amino_acids.htm)

กรดอะมีโน proline เป็นกรดอะมีโนอีกตัวหนึ่งที่มีแขนงข้างยาวตรง แต่หมู่ $-CH_3$ ที่ตำแหน่งเดลต้า (δ) ของ praline สร้างพันธะโควาเลนท์กับหมู่อัลฟาอะมีโนของตัวมันเองทำให้เกิดแขนงข้างแบบวงแหวนขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ทำให้ proline มีความไม่มีขั้วสูงและไม่ละลายน้ำ จะพบกรดอะมีโนตัวนี้บนบริเวณที่เกิดการพับงอของสายโพลีเพปไทด์



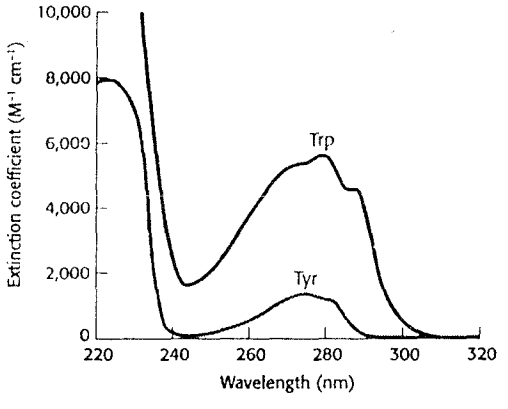
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของ proline ที่มีแขนงข้างเป็นวงแหวน (แหล่งที่มา:http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Amino_Acids/amino_acids.htm)

กลุ่มที่ 2 กรดอะมีโนที่มีแขนงข้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic side chain) ได้แก่ tyrosine tryptophan และ phenylalanine (รูปที่ 2.9) กรดอะมีโนในกลุ่มนี้มีวงแหวนอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบ โดยแขนงข้างของ tyrosine มีหมู่ OH ต่ออยู่กับวงแหวนฟีนิล (phenyl ring) ที่แตกตัวได้จึงเป็นกรดอะมีโนที่ละลายน้ำได้ดี ส่วนกรดอะมีโน tryptophan มีวงแหวนสองวงต่อกันเรียกว่า*วงแหวนอินโดล (indole ring)* ที่มีอะตอมไนโตรเจนที่สามารถให้โปรตอนได้จึงละลายน้ำได้ดีกว่า phenylalanine



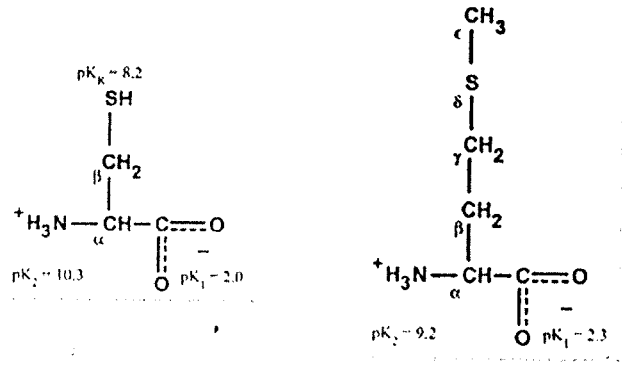
รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ proline ที่มีแขนงข้างเป็นวงแหวน (แหล่งที่มา: http://www.biochem.arizona.edu/ classes/bioc462/462a/NOTES/Amino_Acids/amino_ acids.htm)

คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของกรดอะมีโนในกลุ่มนี้คือการที่มีอิลิคตรอนไพเคลื่อนที่ (π electron delocalization) ภายในวงแหวนอะโรมาติกทำให้กรดอะมีโน tyrosine และ tryptophan สามารถดูดกลืนแสง UV ในช่วงคลื่น 280 นาโนเมตรได้ ทำให้เป็นประโยชน์ในการประมาณค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง ความสามารถในการดูดกลืนแสง UV ของ tryptophan จะสูงกว่า tyrosine ดังรูปที่ 2.10



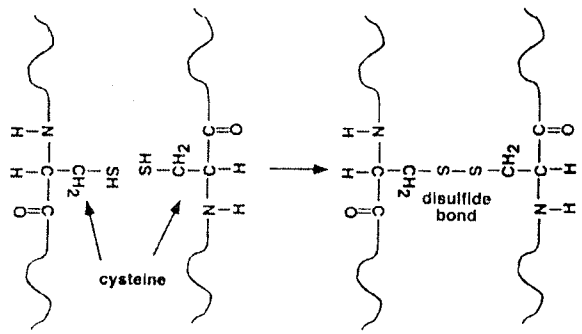
รูปที่ 2.10 การดูดแสง UV ของกรดอะมีโน tryptophan และ tyrosine (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 2, online edition)

กลุ่มที่ 3 กรดอะมีโนที่มีแขนงข้างประกอบด้วยซัลเฟอร์ (sulfur-containing side chain) มีสองตัวได้แก่ cysteine และ methionine (รูปที่ 2.11) มักพบกรดอะมีโนทั้งสองในส่วนในของโครงสร้างโปรตีนเนื่องจากกรดอะมีโน methionine มีความไม่มีขั้วสูง



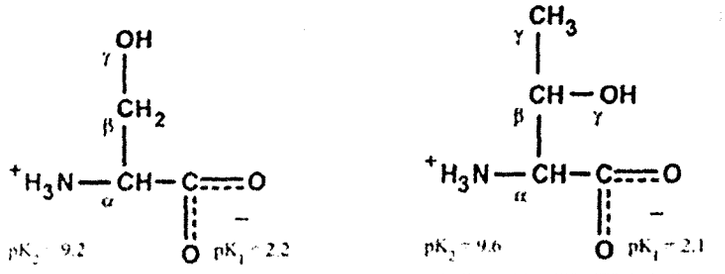
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของกรดอะมิโน cysteine และ methionine (แหล่งที่มา: http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Amino_ Acids/amino_ acids.htm)

ส่วนหมู่ thiol (-SH) ของ cysteine สามารถแตกตัวได้เป็น thiolate ion ทำให้สามารถเชื่อมกับ cysteine ตัวอื่นภายในโมเลกุลของโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์แบบ intramolecular disulfide bridge ขึ้นถ้ามี cysteine อยู่ที่ผิวของโปรตีนก็มักพบว่าสร้างพันธะไดซัลไฟด์แบบ intermolecular disulfide bridge กับ cyteine ของโพลีเพปไทด์สายอื่น เกิดเป็น cystine ขึ้น (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ของกรดอะมิโน cysteine สองตัว (แหล่งที่มา: bass.bio.uci.edu/.../lecture26/lecture7_3.html)

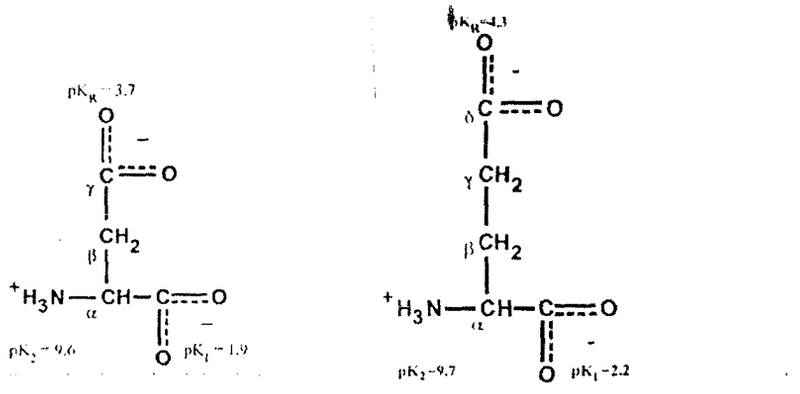
กลุ่มที่ 4 กรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นสายยาวและประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl-aliphatic side chain) ได้แก่ serine และ threonine (รูปที่ 2.13) กรดอะมิโนในกลุ่มนี้มีขั้วแต่ไม่แตกตัวที่ pH เป็นกลาง เนื่องจากหมู่ OH ของแขนงข้างมีค่า pK_a สูงมาก มีความสามารถในการละลายดี กรดอะมิโน serine จัดเป็นรูป hydroxylated ของ alanine



serine threonine

รูปที่ 2.13 โครงสร้างของกรดอะมีโน serine และ threonine (แหล่งที่มา: http://www. biochem.arizona.edu/ classes/bioc462/462a/NOTES/Amino_ Acids/amino_ acids.htm)

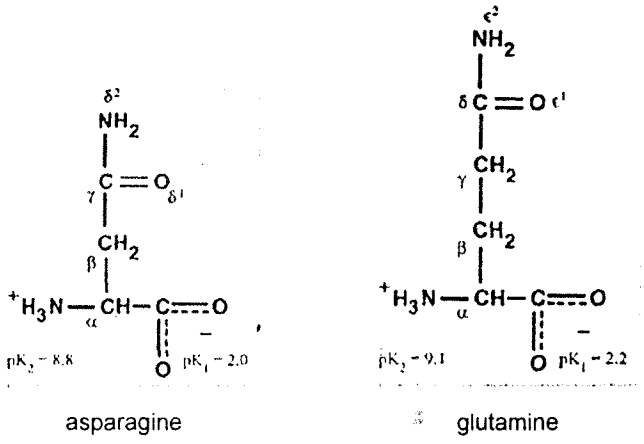
กลุ่มที่ 5 กรดอะมีโนที่มีแขนงข้างเป็นกรด (acidic side chain) ได้แก่ aspartic acid และ glutamic acid (รูปที่ 1.14) เป็นกลุ่มที่มีขั้วและแตกตัวให้ประจุสุทธิเป็นลบที่ pH เป็นกลางเนื่องจากมีแขนงข้างเป็นหมู่คาร์บอกซิล จะพบ aspartic acid และ glutamic acid ในบริเวณของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแบบ acid-base



aspartic acid glutamic acid

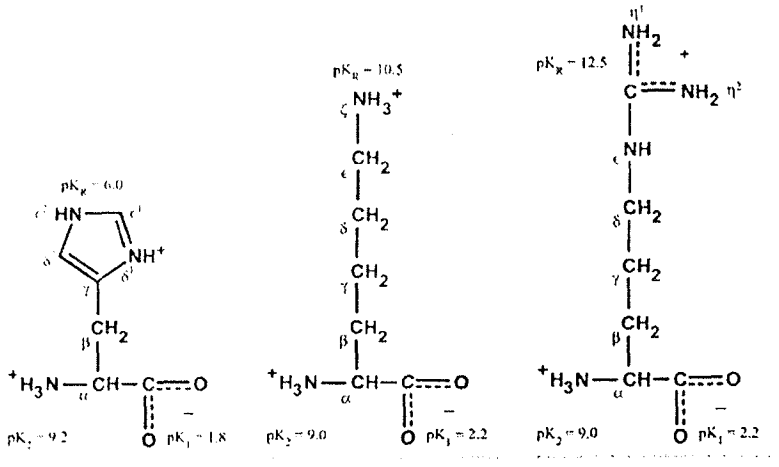
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของ aspartic acid และ glutamic acid (แหล่งที่มา: http://www. biochem.arizona.edu/ classes/bioc462/462a/NOTES/Amino_ Acids/amino_ acids.htm)

อนุพันธ์เอไมด์ของกรดสองตัวนี้คือ asparagines และ glutamine มีลักษณะมีขั้วแต่ไม่มีประจุ (รูปที่ 2.15)



รูปที่ 2.15 โครงสร้างของรูปเอไมด์ของ aspartic acid และ glutamic acid (แหล่งที่มา: http://www.biochem.arizona.edu/ classes/bioc462/462a/NOTES/Amino_ Acids/amino_ acids.htm)

กลุ่มที่ 6 กรดอะมีโนที่มีแขนงข้างเป็นเบส (basic side chain) ได้แก่ histidine lysine และ arginine (รูปที่ 2.16) กรดอะมีโน lysine และ arginine มีแขนงข้างที่มีขั้วและแตกตัวในประจุเป็นบวกที่ pH เป็นกลาง ส่วนแขนงข้างของ histidine เป็นวงแหวน imidazole ที่สามารถแตกตัวหรือไม่ก็ได้ที่ pH เป็นกลาง เนื่องจาก pK_a ของแขนงข้างมีค่าเป็น 6-6.5 ซึ่งคุณสมบัตินี้ทำให้พบ histidine อยู่ที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์หลาย ๆ ตัว เนื่องจากสภาพการแตกตัวของวงแหวน imidazole มีส่วนสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

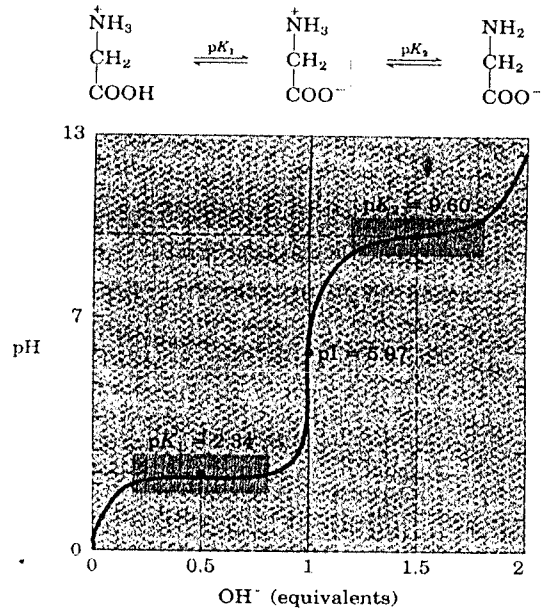


รูปที่ 2.16 โครงสร้างของ histidine lysine และ arginine (แหล่งที่มา: http://www.biochem.arizona.edu/ classes/bioc462/462a/NOTES/Amino_Acids/amino_ acids.htm)

2.2 การไตเตรทและการแตกตัวของกรดอะมีโน

กรดอะมีโนเป็นโมเลกุล amphipathic เนื่องจากมีหมู่ที่เป็นกรดคือ α-COOH และหมู่ที่เป็นเบสคือ α-NH_2 เมื่อทำการไตเตรทกรดอะมีโนด้วยด่างจะสามารถหาค่า pK_a องหมู่แตกตัวทั้งสองได้ กรดอะมีโนที่มีแขนงข้างที่แตกตัวไม่ได้จะให้กราฟการไตเตรทที่มีค่า pK_a เพียงสองค่าที่เกิดจากการแตกตัวของหมู่ α-COOH ซึ่งมีค่า pK_1 ~ 2.3 และการแตกตัวของหมู่ α-NH_2 ซึ่งมีค่า pK_2 ประมาณ 9.6 รูปที่ 2.17 แสดงสภาพการแตกตัวและกราฟการไตเตรทของไกลซีน ด้วย NaOH

เรียกรูปที่กรดอะมีโนแตกตัวแล้วให้ค่าประจุสุทธิเป็นศูนย์ว่า*รูป switterionic* ของกรดอะมีโน ที่สภาวะนี้กรดอะมีโนจะมีการละลายได้น้อยที่สุด เรียกค่า pHของสารละลายที่ให้รูปประจุสุทธิเป็นศูนย์ว่าค่า *isoelectric point* หรือค่า pI ของกรดอะมีโน เช่น ไกลซีนมีค่า pI เท่ากับ 5.97 (ดูรูปที่ 2.17)



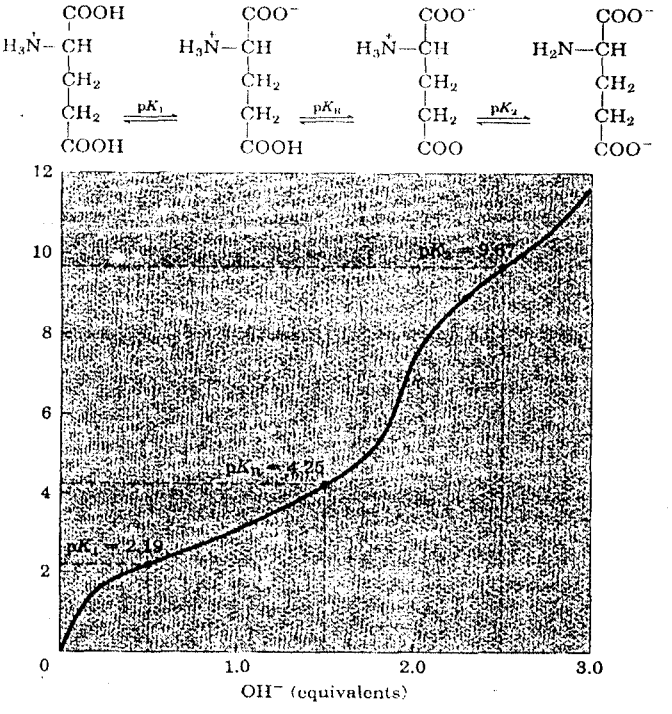
รูปที่ 2.17 การแตกตัวและการไตเตรทกรดอะมีโนไกลซีน (แหล่งที่มา: www.biochem. arizona. edu/.../amino_acids.htm)

ส่วนกรดอะมีโนที่มีแขนงข้างที่แตกตัวได้จะได้กราฟการไตเตรทที่แสดงค่า p*K*a ของการแตกตัวของหมู่สามหมู่คือ ค่า pK_1 เป็นของหมู่ α-COOH ค่า pK_2 เป็นของหมู่ α-NH_2 และค่า pK_r เป็นของหมู่ R (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 แสดงค่า pK_a ของหมู่ต่าง ๆ ของกรดอะมีโนบางตัว (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 2, online edition)

	pK_a values (25°C)		
Amino acid	α-COOH group	α-NH_3^+ group	Side chain
Alanine	2.3	9.9	
Glycine	2.4	9.8	
Phenylalanine	1.8	9.1	
Serine	2.1	9.2	
Valine	2.3	9.6	
Aspartic acid	2.0	10.0	3.9
Glutamic acid	2.2	9.7	4.3
Histidine	1.8	9.2	6.0
Cysteine	1.8	10.8	8.3
Tyrosine	2.2	9.1	10.9
Lysine	2.2	9.2	10.8
Arginine	1.8	9.0	12.5

กรดอะมีโนที่มีแขนงข้างที่เป็นกรด ได้แก่ กรดกลูตามิก และ กรดแอสพาทิก จะมีค่า $pK_r < 7$ ส่วนกรดอะมีโนที่มีแขนงข้างที่เป็นเบส ได้แก่อาร์จินีนและไลซีน จะมีค่า $pK_r > 7$ รูปที่ 2.18 แสดงการแตกตัวของกรดกลูตามิก



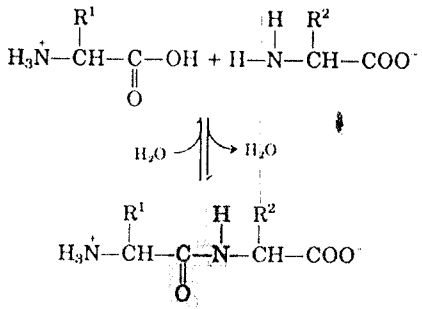
รูปที่ 2.18 การแตกตัวและการไตเตรทกรดอะมีโนกลูตามิก (แหล่งที่มา: www.biochem.arizona.edu/.../amino_acids.htm)

ค่า pK_a ของหมู่ต่าง ๆ ของกรดอะมิโนจะเป็นตัวกำหนดประจุสุทธิและค่า pI ของเอ็นไซม์และมีความสำคัญต่อการสร้างโครงสร้างระดับสูงและการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ ความสำคัญของหมู่แตกตัวต่อการทำงานของเอ็นไซม์จะขึ้นกับค่า pH ของสารละลายซึ่งจะได้กล่าวในบทจลศาสตร์ของเอ็นไซม์

2.3 โครงสร้างระดับต่าง ๆ ของเอ็นไซม์

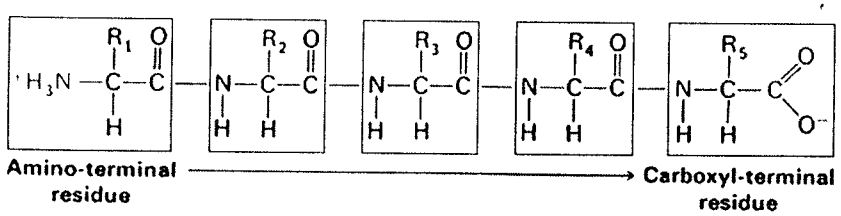
2.3.1 โครงสร้างปฐมภูมิ

เมื่อกรดอะมิโนมากกว่าสองหน่วยมาต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์จะทำให้ได้สายเพปไทด์ที่ยาวขึ้น และถ้ากรดอะมิโนหลายร้อยหน่วยมาต่อกันจะทำให้ได้สายโพลีเพปไทด์ ขั้นตอนการสร้างพันธะเพปไทด์ต้องอาศัยพลังจากการสลายของ ATP และการปลดปล่อยน้ำออกมา (รูปที่ 2.19)



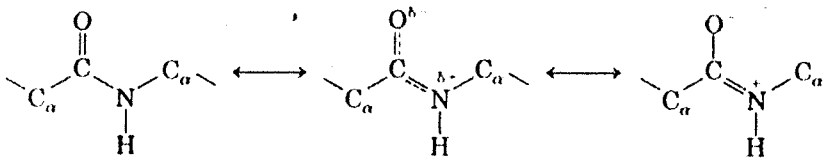
รูปที่ 2.19 การสร้างพันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโนสองตัว (แหล่งที่มา: courses.cm.utexas.edu/.../Lecture-Ch4.html)

สายโพลีเพปไทด์จะประกอบด้วยสองส่วนหลักด้วยกันคือ i) ส่วนของแกนเพปไทด์ (peptide backbone) ซึ่งเป็นหน่วยที่ซ้ำ ๆ กันของ $[>N\text{-}C_\alpha\text{-}C{=}O]_n$ และ ii) ส่วนที่เป็นแขนงข้างหรือหมู่ R ที่แสดงชนิดของกรดอะมิโนได้มีการกำหนดทิศทางของสายโพลีเพปไทด์ไว้ด้วยโดยทิศของสายเพปไทด์จะเริ่มที่ปลายด้านอะมิโนเรียกว่า amino terminal end หรือ *N*-terminus ไปยังปลายด้านคาร์บอกซิล เรียกว่า carboxyl terminal end หรือปลายด้าน *C*-terminus เรียกกรดอะมิโนตัวแรกของสายเพปไทด์ว่า *N*-terminal residue และเรียกกรดอะมิโนตัวสุดท้ายว่า *C*-terminal residue (รูปที่ 2.20)



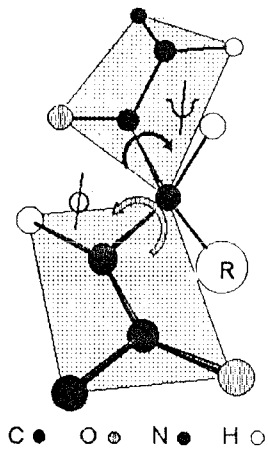
รูปที่ 2.20 โครงสร้างและทิศของสายเพปไทด์ (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 2, online edition)

บริเวณที่แสดงหน่วยเพปไทด์ (peptide unit) (รูปที่ 2.21) มีลักษณะแข็งและแบนราบเนื่องจากพันธะเพปไทด์มีคุณสมบัติกึ่งพันธะคู่มีความยาวพันธะเป็น 1.32 Å พันธะนี้แข็งแรงกว่าพันธะเดี่ยวและหมุนไม่ได้เป็นอิสระ ลักษณะกึ่งพันธะคู่ของพันธะเพปไทด์เกิดจากอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิลมีความเป็นประจุลบบางส่วนในขณะที่อะตอมไนโตรเจนของหมู่อะมีโนมีความเป็นประจุบวกบางส่วนทำให้เกิด electric dipole ปริมาณน้อย ๆ ที่สามารถส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของไพอิเลคตรอนสลับไปสลับมารอบพันธะเพปไทด์ขึ้น



รูปที่ 2.21 การเกิด resonance ของพันธะเพปไทด์ (แหล่งที่มา: courses.cm.utexas.edu/... /Lecture-Ch4.html)

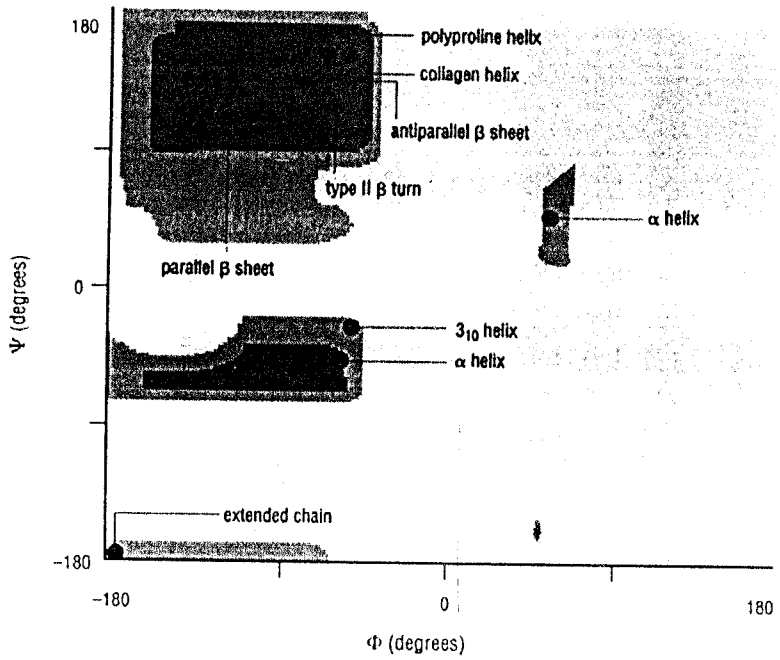
ส่วนพันธะเดี่ยวที่อยู่รอบ ๆ พันธะเพปไทด์สามารถหมุนได้เป็นอิสระ โดยเรียกมุม (torsional angle) ที่เกิดจากการหมุนของพันธะที่เชื่อมระหว่าง $>C_\alpha$-NH ว่ามุม *phi* (ϕ) และมุมที่เกิดจากการหมุนของพันธะที่เชื่อมระหว่าง $>C_\alpha$-C=O ว่ามุม *psi* (ψ) ส่วนมุมที่เกิดจากการหมุนของพันธะเพปไทด์เรียกว่ามุม *omega* (ω) ดังแสดงในรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 การหมุนของพันธะ $>C_\alpha$-NH ทำให้เกิดมุม phi (ϕ) และพันธะ $>C_\alpha$-C=O ทำให้เกิดมุม psi (ψ) (แหล่งที่มา: http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/phy456/ 456lec01.htm)

ในสายโพลีเพปไทด์แต่ละสายจะมีการหมุนพันธะเดี่ยวทั้งสองไปในทิศที่แตกต่างกัน ถ้านำมุม ϕ และψ ที่เกิดจากการหมุนของแต่ละพันธะนี้มาจุดลงบนกราฟ Ramachandran โดยให้แกนตั้งแสดงการหมุนของมุม ψ และแกนนอนแสดงการหมุนของมุม ϕ (รูปที่ 2.23) จะได้พิกัดการหมุนที่สามารถใช้ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนนั้นได้ พิกัดของมุมทั้งสองที่แสดงใน quadrant ที่ 1 จะแสดงถึงโครงสร้างสายบีต้า ส่วนพิกัดของมุมที่แสดงใน

quadrant ที่ 2 จะแสดงโครงสร้างเกลียวอัลฟาแบบเวียนซ้าย และพิกัดของมุมที่แสดงใน quadrant ที่ 3 จะแสดงโครงสร้างเกลียวอัลฟาแบบเวียนขวา เป็นต้น



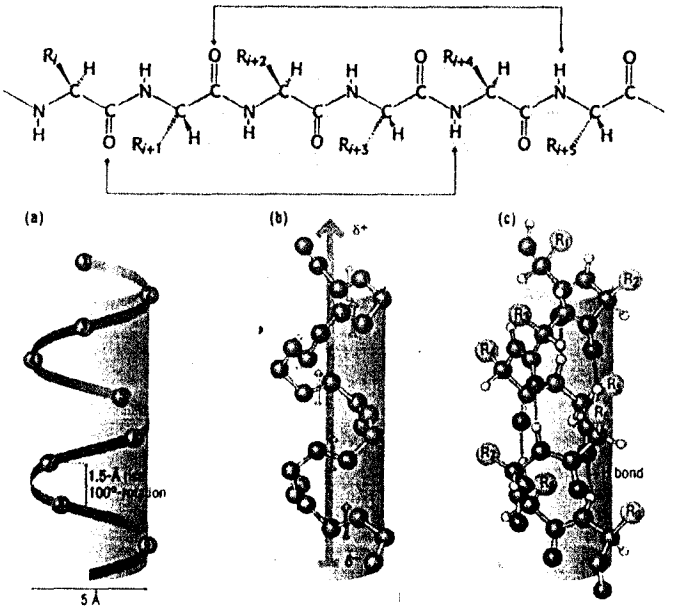
รูปที่ 2.23 พิกัดของมุม ϕ และมุม ψ บนกราฟ Ramachandran (แหล่งที่มา: Petsko GA & Ringe D, Protein Structure and Function, online edition)

2.3.2 โครงสร้างทุติยภูมิ

เมื่อแขนงข้างหรือแกนของสายโพลีเพปไทด์มีแรงกระทำแบบนอนโควาเลนท์ต่อกันจะทำให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิของโพลีเพปไทด์ เช่น เกลียวอัลฟา (α helix) สายบีต้า (β strand) ห่วง (loop) หรือ reverse turn ขึ้นได้

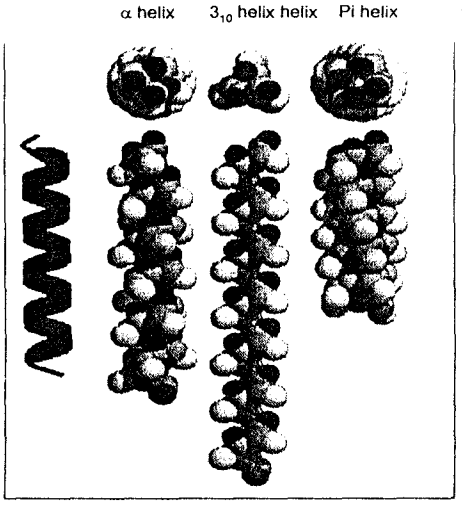
2.3.2.1 เกลียวอัลฟา

เกลียวอัลฟาพบมากในธรรมชาติ โครงสร้างนี้ทำให้สายโพลีเพปไทด์มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก เกลียวอัลฟาเกิดจากพันธะไฮโดรเจนที่ซ้ำ ๆ กันของหมู่สองหมู่ของ polypeptide backbone คือ -C=O ของกรดอะมิโนตัวที่ n ทำพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ -NH ของ กรดอะมิโนตัวที่ $n+4$ ภายในสายโพลีเพปไทดสายเดียวกัน ทำให้กรดอะมิโนตัวถัดไปมีการบิดเป็นเกลียวที่มีระยะห่างกัน 1.5 Å และมีมุม 100 ° การบิดทำให้ได้หนึ่งรอบเกลียวคือ 360 ° มีความจุเท่ากับ 3.6 กรดอะมิโน (รูปที่ 2.24) โปรตีนที่พบในธรรมชาติเกือบทั้งหมดจะเป็นเกลียววนขวาโดยมีพิกัดของมุม ϕ และψ อยู่ที่ประมาณ -60 ° โดยเกลียวอัลฟาจะมีลักษณะที่เป็น dipole มีด้านบนซึ่งเป็นปลายอะมิโนจะเป็น dipole บวกส่วนด้านล่างเกลียวเป็นปลายคาร์บอกซิลมี dipole ลบ (รูปที่ 2.24 b)



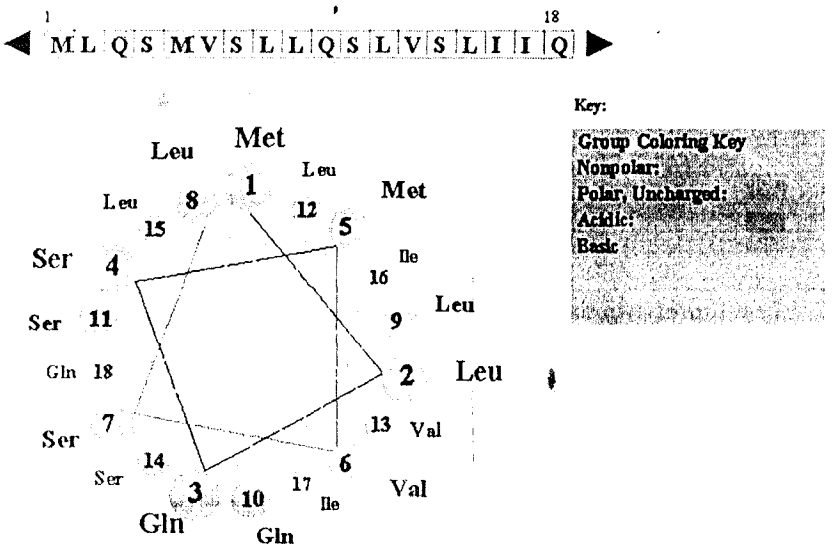
รูปที่ 2.24 การสร้างพันธะไฮโดรเจนของกรดอะมิโนตัว *n* กับ *n+4* และโครงสร้างของเกลียวอัลฟา (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 2, online edition และ Petsko GA & Ringe D, Protein Structure and Function, online edition)

นอกจากนี้ยังมีเกลียวแบบอื่นอีก 2 แบบที่ไม่พบบ่อยนักในธรรมชาติคือ *pi* helix เกิดจากจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ -C=O ของกรดอะมิโนตัวที่ *n* กับหมู่ -NH ตัวที่ *n+5* ทำให้โครงสร้าง backbone แน่นกว่า α-helix และโครงสร้าง 3_{10} helix ที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ -C=O ของกรดอะมิโนตัวที่ *n* กับหมู่ -NH ตัวที่ *n+3* ทำให้โครงสร้าง backbone ยาวกว่า α-helix ดังรูปที่ 2.25 จะพบ 3_{10} helix มากที่ปลายทั้งสองด้านของเกลียวอัลฟาเนื่องจากบริเวณนี้เป็นส่วนที่มีการเรียงตัวของ dipole ที่ไม่เหมือนเกลียวเวียนขวาปกติ



รูปที่ 2.25 โครงสร้างของ α-helix 3_{10} helix และ pi helix (แหล่งที่มา: http://alpha2.bmc.uu.se/~kenth/bioinfo/ structure/secondary/08.html)

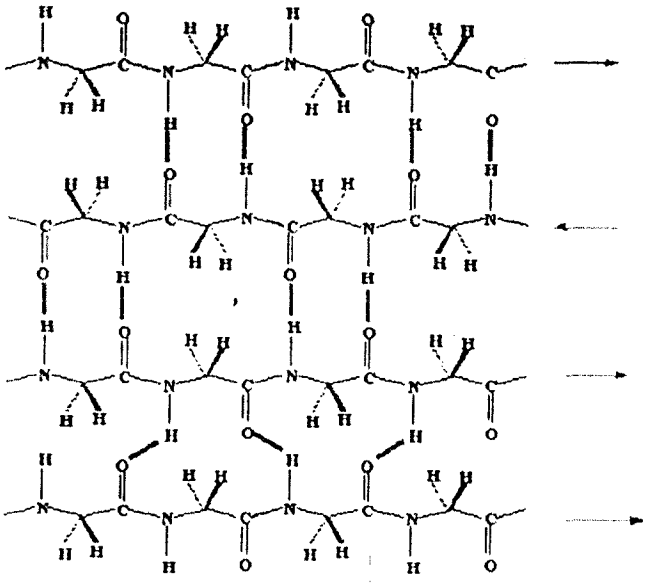
เมื่อพิจารณาโครงสร้างของทรงกระบอกของเกลียวอัลฟาจากด้านบน (top view) จะเห็นเป็นวงล้อเกลียวหรือ helical wheelที่มีหมู่แขนงข้างยื่นออกมารอบ ๆ ลักษณะสำคัญของ helical wheel คือกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว และเป็นไฮโดรโฟบิกจะจัดเรียงตัวอยู่ด้านหนึ่งส่วนกรดอะมิโนที่มีขั้วก็จะเรียงตัวอยู่ด้านตรงข้ามของทรงกระบอก ทำให้เกลียวอัลฟาเป็นโมเลกุลแบบ amphipatic ที่มี hydrophobic moment ที่ด้านทั้งสองของเกลียว ดังรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.26 โครงสร้าง helical wheel (แหล่งที่มา: http://www.bioinfo.org.cn/ lectures/index-7.html)

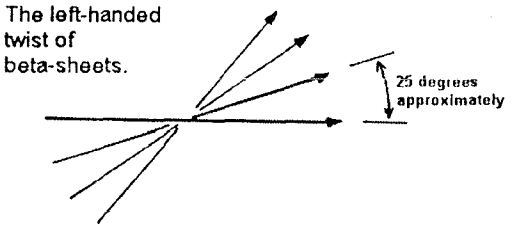
2.3.2.2 บีต้าชีท

โครงสร้างบีต้าชีทพบมากในธรรมชาติเช่นเดียวกับเกลียวอัลฟา โดยเฉลี่ยของโปรตีนก้อนกลมจะมีปริมาณของบีต้าชีทอยู่ 20-28 % สายบีต้าหลาย ๆ สายมาเรียงซ้อนกันจะทำให้เกิดโครงสร้างบีต้าชีท หรือ β-pleated sheet ที่ C_α จะมีการจัดเรียงตัวในทิศขึ้นขึ้นและลงสลับกันไป สายบีต้าจะแสดงพิกัดของมุม ϕ อยู่ในช่วง -120 $^\circ$ และ มุม ψ อยู่ในช่วง +120 $^\circ$ บนกราฟ Ramachandran โครงสร้างของสายบีต้าต่างกับเกลียวอัลฟาคือสายโพลีเพปไทด์จะกางออกเต็มที่และไม่มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนภายในส่วนที่เกิดสายบีต้า แต่มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ -C=O กับหมู่ -NH และ แรง van der Waals ระหว่างสายโพลีเพปไทด์สองสายหรือชิ้นของสายเพปไทด์สองชิ้นในทิศขนานกัน (parallel) หรือทิศสวนทางกัน (antiparallel) ก็ได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.27 โดยสายบีต้าที่เกิดในทิศขนานกันสายโพลีเพปไทด์ทั้งสองสายจะเริ่มต้นที่ปลายด้าน *N*-terminus และสิ้นสุดที่ *C*-terminus ส่วนสายบีต้าที่เกิดในทิศสวนทางกันจะมีปลายของสายโพลีเพปไทด์ด้าน *N*-terminus เชื่อมอยู่กับปลายด้าน *C*-terminus ของสายโพลีเพปไทด์สายที่สอง



รูปที่ 2.27 โครงสร้างของสายบีต้าแบบ parallel และ antiparallel (แหล่งที่มา: www.friedli. com/ herbs/phytochem/proteins.html)

สายบีต้ามักรวมกันประมาณ 4-6 สาย แต่ละสายมีระยะห่างกัน 25 Å แบบจำลองของ Pualing-Corey แสดงให้เห็นว่าแผ่นบีต้าชีทที่พบในโปรตีนโครงสร้างมีลักษณะ planar แต่สายบีต้าที่พบในโปรตีนก้อนกลมมีลักษณะบิด (twist) โดยแต่ละสายมีมุมที่บิดไปประมาณ 25 ° ดังรูปที่ 2.28

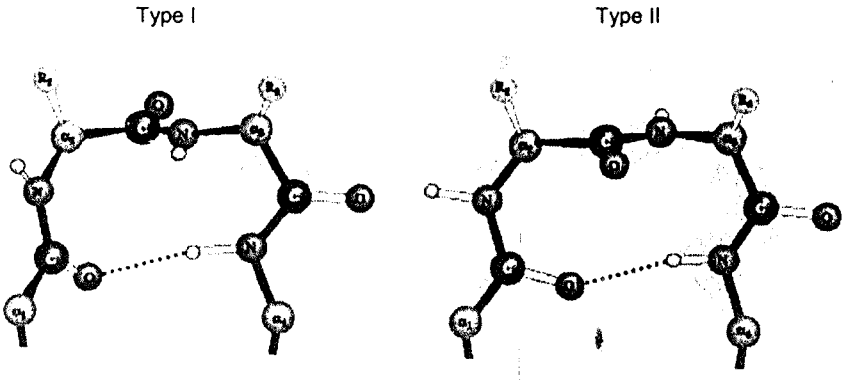


รูปที่ 2.28 การบิดของบีต้าชีท (แหล่งที่มา: http://swissmodel.expasy.org/ /course/text /chapter1.htm)

สายบีต้าที่เชื่อมกันแบบ parallel จะบิดน้อยกว่าแบบ antiparallel จะพบ แผ่นบีต้าชีทแบบ parallel ฝังอยู่ข้างในโครงสร้างของโปรตีน ส่วนแผ่นบีต้าชีทแบบ antiparalle จะพบบริเวณผิวนอก

2.3.2.3 β-turns และ hairpin loop

โปรตีนประกอบด้วยการเชื่อมกันของสายบีต้าและเกลียวอัลฟาโดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง mainchain ของหมู่ -C=O ของกรดอะมิโนตัวที่ *n* กับหมู่-NH ของกรดอะมิโนที่ *n+3* ที่ทำให้เกิด *β*-turn หรือ reverse turn ขึ้น (รูปที่ 2.29) โครงสร้างนี้ทำให้เกิดการผันกลับของสายโพลีเพปไทด์และมีส่วนสำคัญต่อการ folding ของโปรตีน สามารถแบ่ง *β*-turn ออกเป็น 2 แบบ หลักคือ Type I และ Type II ขึ้นอยู่กับมุม Ψ และมุม ϕ บนกราฟ Ramachandran กรดอะมิโนที่พบบ่อยในบริเวณนี้คือ proline และ glycine



รูปที่ 2.29 โครงสร้างของ Type I และ Type II reverse turn (แหล่งที่มา: www.friedli. com /herbs/phytochem/ proteins.html)

ส่วน hairpin loop คือ turn ขนาดใหญ่ที่ปลายของบีต้าชีทหรือเกลียวอัลฟา กรดอะมิโนที่พบมากในโครงสร้างนี้ได้แก่ aspartic acid asparagine serine proline และ glycine มักพบเป็นส่วนที่สัมผัสกับสารละลาย ห่วงที่มีโครงสร้างไม่แน่นอนและแกว่งไปแกว่งมาเรียกว่า *random coil* นอกจากห่วงจะช่วยให้สายโพลีเพปไทด์เปลี่ยนทิศทางแล้วยังทำหน้าที่สำคัญต่าง ๆ เช่น เป็นบริเวณจับของลิแกนด์ สับสตรท หรือแอนติเจน ต่าง ๆ เป็นต้น

2.3.3 โครงสร้างตติยภูมิ

โครงสร้างตติยภูมิหรือโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์เป็นโครงสร้างระดับสูงเกิดจากการที่กรดอะมิโนที่อยู่บริเวณที่บริเวณต่างๆ บนสายโพลีเพปไทด์มาอยู่รวมกันและมีการจัดเรียงตัวในลักษณะที่สามารถทำให้โปรตีนทำงานได้ ในกรณีของเอ็นไซม์กรดอะมิโนที่สำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาจะมาอยู่รวมกันที่บริเวณเร่งเพื่อทำหน้าที่จับและเร่งปฏิกิริยา อาจหาโครงสร้างระดับสูงของเอนไซมได้โดยใช้ NMR spectroscopy หรือการศึกษาทาง protein crystallography วิธีแรกสามารถใช้หาโครงสร้างของโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ๆ และให้รายละเอียดของโครงสร้างไม่สมบูรณ์เท่ากับวิธีทาง crystallography โครงสร้างของโครงสร้าง x-ray ของโปรตีนตัวแรกที่ประสบความสำเร็จเมื่อปลาย คศ. 1950 คือไมโอโกลบิน โดย John Kendrew และ ผู้ร่วมงาน

โครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์อาจประกอบด้วยเกลียวอัลฟาและสายบีต้าผสมกันด้วยสัดส่วนต่าง ๆ กันขึ้นอยู่ชนิดของเอ็นไซม์แต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น เอ็นไซม์ carbonic anhydrase เอ็นไซม์ carboxypeptidases และ

เอ็นไซม์ triose phosphate isomerase มีเปอร์เซ็นต์ของเกลียวอัลฟ่าอยู่ประมาณ 31% และสายบีต้าอยู่ประมาณ 28% (รูปที่ 2.30)

รูปที่ 2.30 โครงสร้างของเอ็นไซม์ human carbonic anhydrase ซึ่งประกอบด้วยเกลียวอัลฟ่าเชื่อมกับสายบีต้า ด้วย loop หรือ turn ที่บริเวณเร่งพบอะตอมของ Zn^{2+} มีแขนเชื่อมกับ His สามตัว (แหล่งที่มา: www.kj.uib.no/grupper/anwander/lehre_bio_e.html)

เอ็นไซม์เป็นโปรตีนก้อนกลม และกรดอะมิโนของโปรตีนก้อนกลมโดยทั่วไปจะมีการกระจายตัวตามลักษณะของความมีขั้ว กล่าวคือ กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว เช่น Val Leu Ile Met และ Phe ส่วนใหญ่จะฝังอยู่ส่วนด้านในเพื่อหลบเลี่ยงการสัมผัสกับสารละลาย กรดอะมิโนเหล่านี้จะยึดกันไว้ด้วยแรงไฮโดรโฟบิกและมีความสำคัญต่อการรักษาสภาพตติยภูมิของเอ็นไซม์ ส่วนบริเวณผิวของเอ็นไซม์จะพบกรดอะมิโนที่แตกตัวและมีขั้วเช่น Arg His Lys Asp และ Glu กรดอะมิโนเหล่านี้จะสัมผัสกับสารละลาย แต่ถ้ากรดอะมิโนที่มีขั้วฝังอยู่ด้านในของโปรตีนมักพบว่ามีบทบาทเกี่ยวกับกระบวนการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์หรือมีส่วนในการจับกับอะตอมของโลหะหนัก เช่น His ที่บริเวณเร่งของ carbonic anhydrase ทำหน้าที่จับกับอะตอมของ Zn^{2+} ส่วนกรดอะมิโนที่เป็นพวกไม่มีการแตกตัวแต่มีขั้ว เช่น Ser Thr Asn Gln Tyr และ Trp จะพบอยู่บริเวณทั้งที่บริเวณผิวหรือฝังอยู่ด้านในโครงสร้างของเอ็นไซม์ก็ได้ ในกรณีหลังจะพบกรดอะมิโนเหล่านี้ทำพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ข้างเคียง

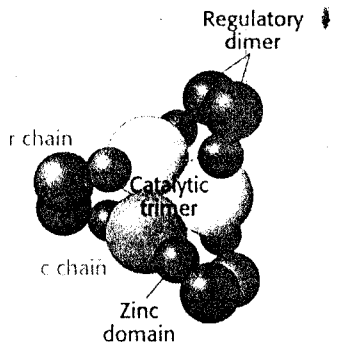
2.3.4 โครงสร้างจตุรภูมิ

โปรตีนที่มีหลายหน่วยย่อย (subunits) จะมาเชื่อมกันเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ โครงสร้างนี้จัดเป็นโครงสร้างสุดท้ายของเอ็นไซม์ ถ้าหน่วยย่อยที่ประกอบกันมีลักษณะเหมือนกันจะสร้างโปรตีนที่เป็น homomultimer แต่ถ้าหน่วยย่อยมีลักษณะต่างกันจะสร้างโปรตีนที่เป็น heteromultimer เอ็นไซม์ที่พบในธรรมชาติจำนวนมากที่ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงหน่วยย่อยของเอ็นไซม์บางตัว ((แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 3, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

เอ็นไซม์	จำนวนหน่วยย่อย
HIV protease	2
Hexokinase	2
Bacterial cytochrome oxidase	3
Lactate dehydrogenase	4
Aspartate carbamoyl transferase	12
Human cytochrome oxidase	13

เอ็นไซม์ที่มีลักษณะเป็นอัลโลสเตอริกจะมีหลายหน่วยย่อยเสมอ ซึ่งบางหน่วยย่อยอาจทำหน้าที่ควบคุมเรียกว่า regulatory subunit หน่วยย่อยดังกล่าวจะมีบริเวณที่เรียกว่า allosteric site ที่จับกับตัวควบคุม (effector) ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของหน่วยย่อยที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เรียกว่า catalytic subunit ตัวอย่างเช่น aspartate carbamoyl transferase มีหน่วยย่อยควบคุม 6 หน่วยย่อย และมีหน่วยย่อยเร่งปฏิกิริยา 6 หน่วยย่อยมาประกอบกันเป็นโครงสร้าง r_6c_6 ดังแสดงในรูปที่ 2.31



รูปที่ 2.31 โครงสร้างจตุรภูมิของ aspartate carbamoyl transferase (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 10, online edition)

การทำงานของหน่วยย่อยที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาจะมีลักษณะของความร่วมมือ (cooperativity) ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดในบทที่ 9 ต่อไป

คำถามทบทวนท้ายบท

1. จงเขียนโครงสร้างเคมีของ Trp Tyr Leu Arg His และ Phe พร้อมอธิบายคุณสมบัติที่สำคัญของกรดอะมิโนเหล่านั้น
2. เรียกค่า pH ที่ทำให้รูปของกรดอะมิโนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ว่าอะไร
3. อธิบายว่าเหตุผลว่าทำไมพันธะเพปไทด์จึงไม่ว่องไวในการทำปฏิกิริยา
4. อธิบายความสำคัญของกราฟ Ramachandran ต่อการหาโครงสร้างของเอ็นไซม์
5. โครงสร้าง loop ต่างจาก reverse turn อย่างไร
6. กรดอะมิโนที่พบมากในโครงสร้าง loop เป็นกรดอะมิโนประเภทใด
7. องค์ประกอบใดที่ทำให้เกิดโครงสร้างสามมิติของเอ็นไซม์

บทที่ 3
เทอร์โมไดนามิกส์ของการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์

3.1 การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระ

การดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมีสามารถอธิบายได้ด้วยค่าพลังงานอิสระของกิบบส์ (Gibbs free energy, G) ซึ่งจากกฎที่สองของเทอร์โมไดนามิกส์ พลังงานอิสระของกิบบส์มีความสัมพันธ์กับค่าเอนทาลปีและค่าเอนโทรปีดังแสดงข้างล่าง

$$G = H - TS \qquad (3\text{-}1)$$

เมื่อ G คือค่าพลังงานอิสระของกิบบส์
H คือค่าเอนทาลปี (enthalpy) หรือพลังงานภายในระบบ
T คืออุณหภูมิสัมบูรณ์ (K) ของระบบเมื่อมีการเติมความร้อนให้กับระบบ
S คือค่าเอนโทรปี (entropy) ที่แสดงถึงความไร้ระเบียบ ถ้าระบบใดมีความไร้ระเบียบสูง จะมีค่า S สูง

และสำหรับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิและความดันคงที่ จะได้ว่า

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (3\text{-}2)$$

พิจารณาปฏิกิริยาข้างล่าง

$$A \rightleftarrows B$$

ข้อเท็จจริง 4 ประการเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระคือ

1. ค่า ΔG ของปฏิกิริยาการขึ้นกับผลต่างของ G ของสารตั้งต้นเริ่มต้นกับค่า G ของสารผลิตภัณฑ์สุดท้าย
   เพียงอย่างเดียว หรือ $\Delta G = G_B - G_A$.

2. ค่า ΔG แสดงถึงความเป็นไปได้ของการดำเนินไปของปฏิกิริยากล่าวคือ
   - ถ้าค่า G_A มีค่ามากกว่า G_B ค่า ΔG ของปฏิกิริยาจะมีค่าติดลบ ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเปลี่ยนจาก A เป็น Bได้เอง เรียกสภาพของปฏิกิริยาว่า *"exergonic"*
   - ถ้าค่า G_A มีค่าน้อยกว่า G_B ค่า ΔG ของปฏิกิริยาจะมีค่าเป็นบวก ทำให้ปฏิกิริยานี้ไม่สามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากไม่มีความเป็นไปได้ในทางเทอร์โมไดนามิกส์ จะทำให้ปฏิกิริยา

นี้เกิดขึ้นได้ต้องมีการใส่พลังงานเข้าไป เช่นมีปฏิกิริยาควบคู่ที่มีค่า ΔG ของปฏิกิริยามีค่าติดลบมาก ๆ เรียกสภาพของปฏิกิริยาว่า *"endergonic"*

- เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปเรื่อย ๆ ปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุล (equilibrium) ค่า G_A เท่ากับค่า G_B ทำให้ค่า ΔG ของปฏิกิริยามีค่าเป็นศูนย์

3. ค่า ΔG ของปฏิกิริยาไม่ขึ้นกับวิถีหรือกลไกการเกิดปฏิกิริยา กล่าวคือถ้าปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้น A ไปเป็นสารผลิตภัณฑ์สุดท้าย B ต้องผ่านตัวกลางข้างล่าง

$$A \rightarrow A^* \rightarrow B^* \rightarrow B$$

ค่า ΔG ของปฏิกิริยาข้างบนจะมีค่าเท่ากับค่า ΔG ของปฏิกิริยา A → B คือ $\Delta G = G_B - G_A$

4. ค่า ΔG ของปฏิกิริยาไม่บ่งบอกถึงอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยา แต่อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับค่าพลังงานอิสระของการกระตุ้น (free energy of activation, $G^{\neq}$) ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับ ΔG ของปฏิกิริยาดังจะได้กล่าวต่อไป

3.2 ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระกับค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยา

พิจารณาปฏิกิริยาข้างล่าง

$$A + B \underset{k_R}{\overset{k_F}{\rightleftharpoons}} C + D$$

ค่า ΔG ของปฏิกิริยาข้างบนสามารถได้จากสูตร

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (3\text{-}3)$$

โดยที่

ΔG° คือค่าการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระมาตรฐาน (standard free-energy change)

R คือค่า gas constant มีค่าเท่ากับ 1.98×10^{-3} kcal mol^{-1} หรือ 8.315 x 10-3 kJ mol^{-1}

T คืออุณหภูมิสัมบูรณ์มีหน่วยเป็น K

[A], [B], [C] และ [D] เป็นความเข้มข้นของสารที่อยู่ในปฏิกิริยาในหน่วยโมลาร์ (molar)

ค่า ΔG° จากสมการ 3-3 เป็นค่าพลังงานอิสระที่กำหนดขึ้นที่สภาวะมาตรฐานคือที่ความเข้มข้นของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา A B C และ D เป็น 1 โมลาร์ ที่ pH ของสารละลายเท่ากับ 7 ที่ความดัน 1 บรรยากาศ (ถ้าสารที่เข้าทำปฏิกิริยามีสภาพเป็นก๊าซ) และที่อุณหภูมิ 25 °C (298 K)

ค่าพลังงานอิสระมาตรฐานของกิบบส์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาที่ pH 7.0 จะให้สัญลักษณ์เป็น $\Delta G^{\circ'}$ มีหน่วยเป็น kJ mol^{-1} หรือ kcal mol^{-1} โดยที่ 1 kJ มีค่าเท่ากับ 0.239 kcal

สมการ 3-3 มีความสำคัญเนื่องจากบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระของปฏิกิริยาที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา นอกจากนี้เราสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่สมดุล (equilibrium constant, K'_{eq}) กับค่าพลังงานอิสระของกิบบส์ได้จากสมการเดียวกัน จากข้อเท็จจริงเกี่ยวกับค่า ΔG ที่ว่าที่สภาวะสมดุลของปฏิกิริยาค่า ΔG มีค่าเป็นศูนย์ ดังนั้นเราจึงใช้ข้อมูลนี้ในการหาค่าพลังงานอิสระมาตรฐานดังนี้

ที่สมดุล

$$0 = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (3\text{-}4)$$

ดังนั้น

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (3\text{-}5)$$

กำหนดให้ค่าคงที่สมดุลภายใต้สภาวะมาตรฐานคือ

$$K'_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad (3\text{-}6)$$

แทนค่าจากสมการที่ 3-6 ลงในสมการที่ 3-5 จะได้

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K'_{eq} \qquad (3\text{-}7)$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -2.303 RT \log 10 K'_{eq} \qquad (3\text{-}8)$$

จัดรูปสมการ 3-8 ใหม่เป็น

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{o\prime}/2.303RT} \qquad (3\text{-}9)$$

แทนที่ค่า R = 8.315 x 10-3 kJ mol^{-1} deg^{-1} และ ค่า T = 298 K (เท่ากับ 25 ^{o}C) ในสมการที่ 3-9 จะได้

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{o\prime}/5.69} \qquad (3\text{-}10)$$

จากสมการที่ 3-10 ค่า $\Delta G^{o'}$ จะมีหน่วยเป็น kJ mol^{-1} ตามหน่วยของค่า R การคำนวณหาค่า $\Delta G^{o'}$ ในความสัมพันธ์กับค่า K'_{eq} สามารถแสดงได้อย่างง่าย ๆ จะเห็นว่าถ้าค่า K'_{eq} มีค่าเท่ากับ 0 ค่า $\Delta G^{o'}$ จะมีค่าเท่ากับ 0 ถ้าค่า K'_{eq} มีค่าเป็น 10^{-1} และ 10^{-2} ค่า $\Delta G^{o'}$ ที่คำนวณได้จะมีค่าเป็น +5.69 kJ mol^{-1} และ +11.42 kJ mol^{-}

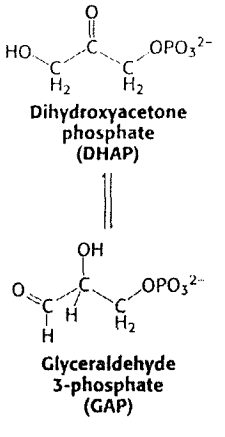
[1] แต่ถ้าค่า K'_{eq} ของปฏิกิริยามีค่าเป็น 10^1 และ 10^2 ค่า $\Delta G^{o'}$ จะมีค่าเป็น-5.69 kJ mol^{-1} และ -11.42 kJ mol^{-1} จะเห็นว่าผลต่างของค่า K'_{eq} 10 เท่าจะให้ค่า $\Delta G^{o'}$ ต่างกัน 5.69 kJ mol^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงความสัมพันธ์ของค่า $\Delta G^{o'}$ กับค่า K'_{eq} ของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 °C (แหล่งที่มา: Biochemistry, Berg JM, Tymoczko LM, and Stryer L, Chapter 8, 6th edition, W.H. Freeman company, New York)

K'_{eq}	$\Delta G^{o'}$ kJ mol^{-1}	$\Delta G^{o'}$ kcal mol^{-1}
10^{-5}	28.53	6.82
10^{-4}	22.84	5.46
10^{-3}	17.11	4.09
10^{-2}	11.42	2.73
10^{-1}	5.69	1.36
0	0	0
10	-5.69	-1.36
10^2	-11.42	-2.73
10^3	-17.11	-4.09
10^4	-22.84	-5.46
10^5	-28.53	-6.82

จากตารางถ้า K'_{eq} หรือ $\frac{[C][D]}{[A][B]}$ มีค่าน้อยกว่า 1 แสดงถึงว่าปฏิกิริยาไม่สามารถดำเนินจาก A+B ไป C+D ได้ เนื่องจากมีค่า $\Delta G^{o'}$ ของปฏิกิริยาเป็นบวก แต่ถ้า K'_{eq} หรือ $\frac{[C][D]}{[A][B]}$ มีค่ามากกว่า 1 แสดงถึงว่าปฏิกิริยาการเปลี่ยน A+B ไปเป็น C+D สามารถเกิดขึ้นได้เองเนื่องจาก $\Delta G^{o'}$ มีค่าติดลบ จะเห็นว่าปฏิกิริยาเดียวกันจะมีค่าพลังงานอิสระเป็นบวกหรือลบขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นเทียบกับความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น ซึ่งข้อมูลนี้ได้สนับสนุนข้อเท็จจริงเกี่ยวกับค่า ΔG ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในช่วงเริ่มต้นที่ว่า ΔG ของปฏิกิริยาขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา

ตัวอย่างการคำนวณหาค่า $\Delta G^{o'}$ และค่า ΔG จากปฏิกิริยาการเปลี่ยนไอโซเมอร์ของน้ำตาล dihydroxyacetone phosphate (DHAP) เป็นน้ำตาล glyceroldehyde-3-phosphate (GAP) (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 ปฏิกิริยา isomerization ของ dihydroxy acetone phosphate เป็น glyceroldehyde-3-phosphate (แหล่งที่มา: Biochemistry, Berg JM, Tymoczko LM, and Stryer L, Chapter 8, 6th edition, W.H. Freeman company, New York)
ปฏิกิริยาข้างบนเกิดขึ้นในวิถีไกลโคไลซีส ถ้าสมมติให้ที่สภาวะสมดุลอัตราส่วนระหว่าง GAP กับ DHAP เป็น 0.0475 ที่อุณหภูมิ 25 °C (298 K) และที่ pH 7.0

จากข้อมูลที่ให้ค่า K'_{eq} ของปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 0.0475 สามารถคำนวณค่า $\Delta G^{o'}$ ของปฏิกิริยาได้ดังข้างล่าง

จากสมการ 3-8

$$\Delta G^{\circ\prime} = -2.303RT \log_{10} K'_{eq}$$
$$= -2.303 \times 8.315 \times 10\text{-}3 \times 298 \times log_{10}(0.0475)$$
$$= +7.53 \text{ kJ mol}^{-1} (+1.80 \text{ kcal mol}^{-1})$$

จะเห็นว่าภายใต้สภาวะที่กำหนดให้ข้างบนปฏิกิริยาเป็น endergonic หมายความว่า DHAP จะไม่เปลี่ยนไปเป็น GAP ได้เอง ถ้าให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของ DHAP เป็น 2×10^{-4} M และความเข้มข้นเริ่มต้นของ GAP เป็น 3×10^{-6} M จะสามารถหาค่า ΔG ของปฏิกิริยาได้เป็น

$$\Delta G = 7.53 \text{ kJ mol}^{-1} + 2.303RT log_{10} \frac{3 \times 10^{-6}}{2 \times 10^{-4}}$$
$$= 7.53 \text{ kJ mol}^{-1} - 10.42 \text{ kJ mol}^{-1}$$
$$= -2.89 \text{ kJ mol}^{-1} (-0.69 \text{ kcal mol}^{-1})$$

จะเห็นว่าค่า ΔG ของปฏิกิริยามีค่าติดลบซึ่งบ่งถึงว่าปฏิกิริยาการเปลี่ยน DHAP เป็น GAP สามารถเกิดได้เอง และเป็นปฏิกิริยา exergonic

3.3 เอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาเคมีโดยไม่เปลี่ยนสมดุลของปฏิกิริยา

เราทราบว่าเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพมาก ตามหลักของเทอร์โมไดนามิกส์เอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาแต่ไม่สามารถเปลี่ยนสมดุลของปฏิกิริยา พิจารณาการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์โดยเปลี่ยนตัวถูกย่อย S ให้เป็นผลิตภัณฑ์ P รูปที่ 3-2 แสดงกราฟอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ P ในฟังก์ชันของเวลาในสภาพที่มีและไม่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง จะเห็นว่าปริมาณของ P ในปฏิกิริยาที่ไม่มีเอ็นไซม์จะถูกสร้างขึ้นอย่างช้า ๆ อย่างต่อเนื่องในขณะที่การสร้าง P ในปฏิกิริยาที่มีเอ็นไซม์จะเกิดขึ้นด้วยอัตราเร็วที่สูงมากในช่วงวินาทีแรก ๆ (ดูจากความชันของกราฟ) และแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราการเร็วของปฏิกิริยาเลยเมื่อเวลาผ่านไปเป็นชั่วโมงเมื่อปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุล โดยที่ปฏิกิริยาที่เร่งและไม่เร่งด้วยเอ็นไซม์ในท้ายที่สุดจะเข้าสู่สมดุล ณ จุดเดียวกัน นั่นคือเอ็นไซม์จะเร่งปฏิกิริยาโดยการเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาให้เข้าสู่สมดุลได้เร็วขึ้นแต่ไม่ได้มีผลต่อสมดุลสุดท้ายของปฏิกิริยา

ถ้าให้

$$S \underset{10^{-6}\,s^{-1}}{\overset{10^{-4}\,s^{-1}}{\rightleftharpoons}} P$$

โดยที่ S เป็นสารตั้งต้น และ P เป็นสารผลิตภัณฑ์
ค่า k_F เป็นค่าคงที่อัตราเร็วไปข้างหน้า (forward rate constant) และ
ค่า k_R เป็นอัตราเร็วผันกลับ (reverse rate constant)

ค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยานี้จะเท่ากับ

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} = \frac{k_F}{k_R}$$
$$= \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

จะเห็นว่าที่สมดุลความเข้มข้นของ P มากกว่าความเข้มข้นของ S อยู่ 100 เท่า ไม่ว่าปฏิกิริยานี้มีเอ็นไซม์เข้าทำปฏิกิริยาหรือไม่ กล่าวโดยสรุปคือสมดุลของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับผลต่างของพลังงานอิสระของสารตั้งต้นกับสารผลิตภัณฑ์เท่านั้น

3.4 การเร่งปฏิกิริยาเคมีโดยเอ็นไซม์ลดค่าพลังงานอิสระของการกระตุ้น

ตามที่ได้เข้าใจเป็นอย่างดีแล้วว่าผลต่างของพลังงานอิสระของการตั้งต้นกับสารผลิตภัณฑ์เป็นตัวกำหนดสมดุลของปฏิกิริยา ต่อไปจะใช้สมการของพลังงานอิสระในการอธิบายการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้น S ให้เป็นผลิตภัณฑ์ P โดยธรรมชาติปฏิกิริยาจะผ่าน transition state $S^{\neq}$ ซึ่งเป็นสภาวะที่สารตั้งต้นมีการเปลี่ยนแปลงในเชิงโมเลกุลไปแต่ยังไม่ได้อยู่ในรูปของสารผลิตภัณฑ์อย่างสมบูรณ์ ที่สภาวะนี้ค่าพลังงานอิสระของสารตัวกลางจะถูกกระตุ้นเกิดเป็น activated complex โดยพลังงานอิสระของตัวกลางนี้จะมีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบพลังงานอิสระของสารอื่นที่อยู่ในปฏิกิริยา เรียกพลังงานอิสระนี้ว่าพลังงานอิสระของการกระตุ้น (Gibb's free energy of activation, $\Delta G^{\neq}$ or E_a)

ณ transition ตัวกลางจะอยู่ในสภาพที่มีความเสถียรน้อยที่สุด สิ่งที่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลที่สภาวะนี้สามารถอธิบายได้โดยพิจารณาปฏิกิริยาข้างล่าง

$$A-B+C \rightarrow A\cdots B\cdots C \rightarrow A+B-C$$

กล่าวคือการแตกของ A-B ไปเป็น B-C เกิดผ่านสภาวะที่อิเลคตรอนที่เปลือกนอกของอะตอม A และอะตอม B ถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นทำให้พันธะโควาเลนท์ที่เชื่อมอะตอมทั้งสองเกิดการสั่นจนถึงจุดที่พร้อมจะแตกออก ทำให้อะตอม C ที่ถูกกระตุ้นเช่นเดียวกันที่อยู่ใกล้ ๆ กับโมเลกุลที่ไม่เสถียรนี้พร้อมที่จะสร้างพันธะโควาเลนท์แทน

ต่อไปพิจารณาปฏิกิริยาการเปลี่ยน S เป็น P โดยการเข้าสู่สภาวะ transition ของปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นแล้วเข้าสู่สมดุลอย่างรวดเร็ว ดังนั้นเขียนปฏิกิริยาได้ว่า

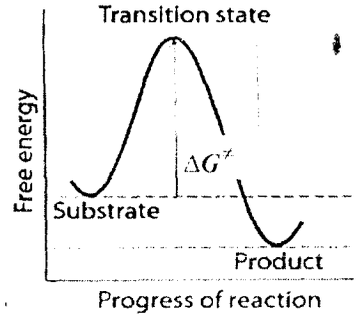
$$S \underset{}{\overset{K_{eq}}{\rightleftharpoons}} S^{\neq} \xrightarrow{k} P$$

โดยที่ K_{eq} คือค่าที่สมดุลของปฏิกิริยาในช่วงนี้และค่า k เป็นค่าคงที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เปลี่ยน $S^{\neq}$ ไปเป็น P

พิจารณาจากปฏิกิริยาข้างบนผลต่างของพลังงานอิสระของการเปลี่ยน S ไปเป็น $S^{\neq}$ จะเป็น

$$\Delta G^{\neq} = G_{S\neq} - G_s \qquad (3\text{-}11)$$

ค่า $\Delta G^{\neq}$ เป็นเหมือนพลังงานกีดขวาง (barrier energy) (รูปที่ 3.2) โดยปฏิกิริยาการสร้าง P จาก S จะเกิดขึ้นได้ดีถ้า $\Delta G^{\neq}$ มีค่าน้อย ๆ แต่ปฏิกิริยาจะเดินไปข้างหน้าได้ช้าถ้า $G^{\neq}$ มีค่าสูงมาก



รูปที่ 3.2 แสดงค่าพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาเคมี (แหล่งที่มา: Biochemistry, Berg JM, Tymoczko LM, and Stryer L, Chapter 8, 6th edition, W.H. Freeman company, New York)

ที่สมดุลของปฏิกิริยาในช่วงแรก

$$\Delta G^{\neq} = -RTln\frac{[S^{\neq}]}{[S]} \qquad (3\text{-}12)$$

ดังนั้น

$$ln\frac{[S^{\neq}]}{[S]} = -\Delta G^{\neq}/RT \qquad (3\text{-}13)$$

$$[S^{\neq}] = [S]e^{-\Delta G^{\neq}/RT} \qquad (3\text{-}14)$$

อัตราเร็วของปฏิกิริยาถูกกำหนดอัตราการสลาย S หรืออัตราการสร้าง P ในหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งอัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ $S^{\neq}$ ที่มีอยู่ในปฏิกิริยาและความสามารถในการเปลี่ยน $S^{\neq}$ ไปเป็น P

กล่าวคือ

$$\nu = \frac{-dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = k\,[S^{\neq}] \qquad (3\text{-}15)$$

ค่า k เป็นค่าคงที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยน $S^{\neq}$ เป็น P ตามกฎของ transition state ค่านี้จะมีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับการสั่นของพันธะเพื่อทำให้สารประกอบ $S^{\neq}$ แตกออก (vibrational frequency, ν) ซึ่งถือเป็นความเร็วข้ามสิ่งขวางกั้น และค่าสัมประสิทธิ์ที่สภาวะ transition (transitional coefficient, κ) ซึ่งเป็นความเป็นไปได้ของการแตกของสารประกอบที่สภาวะถูกกระตุ้น ดังนั้นค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาช่วงนี้มีค่าดังนี้

$$k = \kappa\nu \qquad (3\text{-}16)$$

ในทางทฤษฎีค่า κ ของปฏิกิริยาในสารละลายที่ดำเนินไปได้เองมีค่าอยู่ในช่วง 0-5-1.0 แต่การคำนวณค่านี้ว่ามีค่าแน่นอนเป็นเท่าใดนั้นทำได้ยาก กรณีของปฏิกิริยาเคมีส่วนใหญ่ทั้งที่มีและไม่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งจะกำหนด κ เป็น 1.0

ดังนั้น

$$k = \nu \qquad (3\text{-}17)$$

และ

$$\nu = \frac{\varepsilon}{h} = \frac{k_B T}{h} \qquad (3\text{-}18)$$

โดยที่ ν คือ vibrational frequency

k_B คือ Boltzmann constant มีค่าเท่ากับ 1.3807×10^{-28} J K^{-1}

T คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (K)

h คือ Planck's constant มีค่าเท่ากับ 6.6261×10^{-34} J .s

ค่า $\varepsilon = k_B T$ เป็นค่าพลังงานความร้อน (thermal energy) และที่อุณหภูมิ 298 K จะได้ค่า $\frac{k_B T}{h}$ มีค่าเท่ากับ 6.2×10^{12} วินาที$^{-1}$

เมื่อแทนที่ [S] จากสมการที่ 3-14 และ k = ν จากสมการที่ 3-18 ลงในสมการ 3-15 จะได้อัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่าเป็น

$$\nu = \frac{k_B T}{h}[S]e^{-\Delta G^{\neq}/RT} \qquad (3\text{-}19)$$

เรียกสมการ 3-19 ว่าสมการอัตราเร็วคงที่ของอาร์เรเนียส หรือ "***Arrhenius Equation***" ซึ่งใช้อธิบายความสัมพันธ์ของอัตราเร็วกับพลังงานอิสระของการกระตุ้นในลักษณะผกผันแบบ exponential จากสมการแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิใด ๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะลดลงหรือเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อ $\Delta G^{\neq}$ มีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

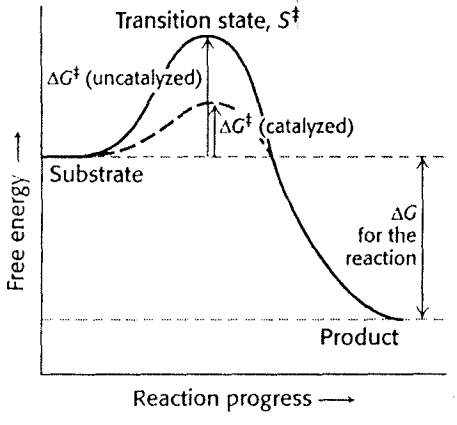
ตัวอย่าง ถ้าให้$\Delta G^{\neq}$ ของปฏิกิริยาการเปลี่ยน S ไปเป็น $S^{\neq}$ มีค่าเป็น 6.82 kcal mol^{-1} และความเข้มข้นของสารตั้งต้นเท่ากับ 1 โมลาร์ ([S] = 1 โมลาร์) ค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเป็น

$$\begin{aligned} v &= 6.2 \times 10^{12} \times 1 \times e^{-6.82//0..5905} \\ &= 6.2 \times 10^{12} \times 9.6 \times 10^{-6} \\ &= \sim 6.2 \times 10^{7}\ s^{-1} \end{aligned}$$

ถ้าลด $\Delta G^{\neq}$ ลงเป็น 5.46 kcal mol^{-1} ค่าอัตราเร็วจะมีค่าเป็น

$$\begin{aligned} v &= 6.2 \times 10^{12} \times 1 \times e^{-5.46//0.5905} \\ &= \sim 6.2 \times 10^{8}\ s^{-1} \end{aligned}$$

จะเห็นว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่าเพิ่มขึ้น 10 เท่าเมื่อผลต่างของพลังงานอิสระของการกระตุ้น ($\Delta\Delta G^{\neq}$) เป็น 1.36 kcal mol^{-1} (5.69 kJ mol^{-1}) นั่นคือถ้าค่า $\Delta G^{\neq}$ ลดลงทุก ๆ 1.36 kcal mol^{-1} จาก 6.82 kcal mol^{-1} เป็น 5.46, 4.09, 2.73 และ 1.36 kcal mol^{-1} ค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นแบบฟังก์ชัน exponential เป็น 10, 10^2, 10^3 และ 10^4 เท่าตามลำดับ ความจริงดังกล่าวใช้อธิบายว่าเอ็นไซม์เพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาอย่างมีประสิทธิภาพได้โดยไปลดค่า $\Delta G^{\neq}$ ของปฏิกิริยาดังรูปที่แสดงไว้ที่รูป 3.3



รูปที่ 3.3 เอ็นไซม์เร่งปฏิกริยาโดยการลดพลังงานอิสระของการกระตุ้น (แหล่งที่มา: Biochemistry, Berg JM, Tymoczko LM, and Stryer L, Chapter 8, 6th edition, W.H. Freeman company, New York)

การที่พลังงานอิสระของการกระตุ้นของเอ็นไซม์ลดลงหมายความว่าจำนวนโมเลกุลของ S ที่มีพลังงานมากพอที่จะเข้าสู่ transition state มีปริมาณเพิ่มขึ้นหรือมี $S^{\neq}$ มากขึ้น จาก $v = k[S^{\neq}]$ จะเห็นว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ $S^{\neq}$

นอกจากนี้ รูปที่ 3.3 แสดงด้วยว่าการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงค่า $\Delta G^{\neq}$ แต่ไม่รบกวน ΔG ของปฏิกิริยา สรุปคือค่า ΔG สุทธิของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอ็นไซม์มีค่าเท่า ΔG สุทธิของปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวเร่ง

ต่อไปพิจารณาปฏิกิริยาข้างล่างอีกครั้ง

$$S \underset{}{\overset{K^{\neq}}{\rightleftharpoons}} X^{\neq} \xrightarrow{k} P$$

สามารถกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาข้างบนได้เป็น

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k'[S] = k[X^{\neq}] \qquad (3\text{-}20)$$

ค่า k' เป็นค่าคงที่อัตราเร็วของการสร้าง $X^{\neq}$ และค่า k เป็นค่าคงที่อัตราเร็วของการสร้างผลิตภัณฑ์ P สามารถหาค่า k' ของปฏิกิริยาได้จากการแทนอัตราเร็วของปฏิกิริยาด้วยสมการที่ 3-19 และ 3-20

$$k'[S] = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^{\neq}/RT}[S] \qquad (3\text{-}21)$$

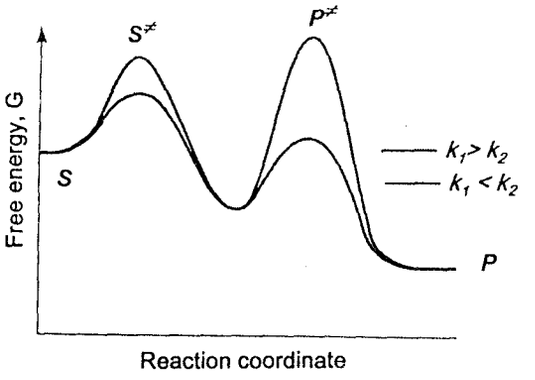
ดังนั้น

$$k' = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^{\neq}/RT} \qquad (3\text{-}22)$$

จะเห็นว่าอัตราการสร้างตัวกลาง $X^{\neq}$ จะแปรผกผันกับค่า $\Delta G^{\neq}$ แบบ exponential เช่นเดียวกัน กรณีนี้สามารถใช้สมการ 3-22 อธิบายการเกิดปฏิกิริยาที่มีวิถีของปฏิกิริยาผ่านตัวกลางมากกว่าหนึ่งตัว เช่น

$$S \xrightarrow{k_1} S^{\neq} \xrightarrow{k_2} P^{\neq} \rightarrow P$$

จากสมการ 3-22 จะได้ว่าถ้าค่า $k_1 > k_2$ ค่า $\Delta G^{\neq}$ ของการเปลี่ยน $S \rightarrow S^{\neq}$ จะมีค่าน้อยกว่าค่า $\Delta G^{\neq}$ ของการเปลี่ยน $S^{\neq} \rightarrow P$ ในทางกลับกันถ้าค่า $k_1 < k_2$ ค่า $\Delta G^{\neq}$ ของการเปลี่ยน $S \rightarrow S^{\neq}$ จะมีค่ามากกว่าค่า $\Delta G^{\neq}$ ของการเปลี่ยน $S^{\neq} \rightarrow P$ ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ความสัมพันธ์ของค่าคงที่อัตราเร็วกับค่า $\Delta G^{\neq}$ (แหล่งที่มา: Voet D & Voet GJ, Biochemistry, Chapter 14, International edition, John Wiley & Sons (Asia) PTE LTD, Singapore)

จากรูปที่ 3.4 จะเห็นว่าถ้าปฏิกิริยาหนึ่งผ่านวิถีที่มีตัวกลางมากกว่าหนึ่งตัวแล้วปฏิกิริยาช่วงที่มีอัตราเร็วน้อยกว่า (มีค่า k น้อยกว่า) เกิดจากปฏิกิริยานั้นมีค่า $\Delta G^{\neq}$ สูง ปฏิกิริยาช่วงนี้อาจดำเนินไปได้ช้าถึงช้ามากและจะเป็นช่วงที่กำหนดอัตราเร็วของอัตราเร็วของปฏิกิริยารวมหรือเป็น ***rate-limiting step*** การสร้างผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นกับขั้นตอนนี้

คำถามทบทวนท้ายบท

1. จงอธิบายความสัมพันธ์ของค่า ΔG กับอัตราเร็วของปฏิกิริยา
2. จงใช้สมการของอาร์เรเนียสแสดงให้เห็นว่าค่าคงที่ของปฏิกิริยา $S \rightleftharpoons X^{\neq} \xrightarrow{k} P$ มีความสัมพันธ์กับค่า activation energy อย่างไร
3. จากปฏิกิริยาข้างล่าง

$$A + B \underset{}{\overset{K^{\#}}{\rightleftharpoons}} X^{\#} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} P + Q$$

ให้ค่า $K^{\#}$ เป็นค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยาข้างบน
$X^{\#}$ เป็น activated complex
k' เป็นค่าคงที่อัตราเร็วของการสร้าง P และ Q

กำหนดให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็น

$$\frac{d[P]}{dt} = k[A][B] = k'[X^{\#}]$$

ให้ค่า $K^{\#} = \dfrac{X^{\#}}{[A][B]}$ และ

$$\Delta G^{\#} = -RT \ln K^{\#}$$

3.1 จงใช้ข้อมูลที่ให้ในการหาสมการอัตราเร็วในความสัมพันธ์กับค่า $\Delta G^{\#}$ และใช้สมการดังกล่าวอธิบายว่าอัตราเร็วมีความสัมพันธ์กับค่า $\Delta G^{\#}$ อย่างไร

3.2 ให้ใช้สมการข้างบนยกตัวอย่างมาอย่างชัดเจนว่าถ้าปฏิกิริยาดังกล่าวมีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง เอ็นไซม์จะช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้นได้อย่างไร

บทที่ 4
อัตราเร็วและอันดับของปฏิกิริยาเคมี

ในการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาเคมีนั้น สามารถบอกได้ว่าปฏิกิริยาเคมีดำเนินไปได้เร็วมากน้อยเท่าใดโดยการหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาหรืออัตราเร็วของปฏิกิริยา ในบทนี้จะกล่าวถึงอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งและที่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง และทำความเข้าใจถึงอันดับของปฏิกิริยาต่าง ๆ คือปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ ปฏิกิริยอันดับที่หนึ่งและปฏิกิริยาอันดับที่สอง

4.1 อัตราเร็วของปฏิกิริยา (reaction rate หรือ velocity, v)

พิจารณาปฏิกิริยาเคมีข้างล่างที่ไม่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง

$$A \xrightarrow{k} B$$

ตามกฎอัตราเร็วสามารถกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยน A เป็น B ได้โดยพิจารณาจากการลดลงของตัวถูกย่อย A ในหน่วยเวลาหรือการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ B ในหน่วยเวลา และให้ค่า k เป็นค่าคงที่อัตราเร็วของปฏิกิริยา (reaction rate constant) การสร้าง B จาก A ได้ว่า

$$v = \frac{[A]_2 - [A]_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta[A]}{\Delta t} \qquad (4\text{-}1)$$

แต่เนื่องจาก $[A]_1 > [A]_2$ ความแตกต่างของความเข้มข้นของตัวถูกย่อยจึงติดเครื่องหมายลบ หรืออัตราเร็วของปฏิกิริยาหาจากการลดลงของความเข้มข้นของ A ในหนึ่งหน่วยเวลานั่นเอง จึงได้ว่า

$$v = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t} \qquad (4\text{-}2)$$

หรืออาจหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์จาก B_1 ไปเป็น B_2 ช่วงเวลา t_1 ถึง t_2 ดังนั้น

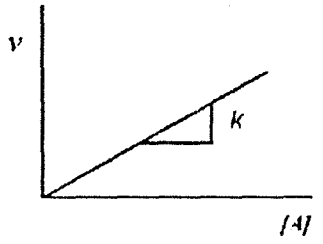
$$v = \frac{[B]_2 - [B]_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta[B]}{\Delta t} \qquad (4\text{-}3)$$

ในกรณีนี้ค่า $[B]_1 < [B]_2$ ความแตกต่างของความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ B จึงติดเครื่องหมายบวกได้เลย

หรืออาจแสดงความสัมพันธ์ของอัตราเร็วของปฏิกิริยา $A \rightarrow B$ ในเชิงของค่า k ได้ว่า

$$v = k[A] \qquad (4\text{-}4)$$

จะเห็นว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยน A ไปเป็น B แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ A ดังกราฟที่ 4.1

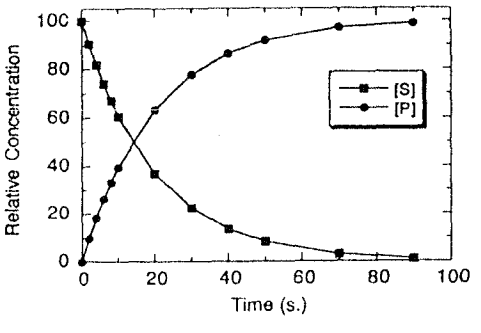


รูปที่ 4.1 กราฟระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ขึ้นกับตัวถูกย่อย A

แต่เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาเคมีข้างล่างที่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง

$$S \xrightarrow[enzyme]{k} P$$

พิจารณาการเปลี่ยน S เป็น P พบว่าที่จุดเริ่มต้นของปฏิกิริยายังไม่มีผลิตภัณฑ์ B เกิดขึ้น ความเข้มข้นของ S ที่จุดเริ่มต้นจะมีค่าเท่ากับ $[S]_0$ เมื่อเวลาผ่านไปความเข้มข้นของ P เพิ่มขึ้นในขณะที่ความเข้มข้นของ A จะลดลง ช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาช่วงเริ่มต้นจะมีการลดลงของ S และการเพิ่มของ P อย่างรวดเร็วแสดงถึงอัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่ามากแต่เมื่อเวลาผ่านไปการเปลี่ยนแปลงของ S และ P จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ แสดงถึงปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุล ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มเข้นของตัวถูกย่อย S และผลิตภัณฑ์ P ที่ขึ้นกับเวลา (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

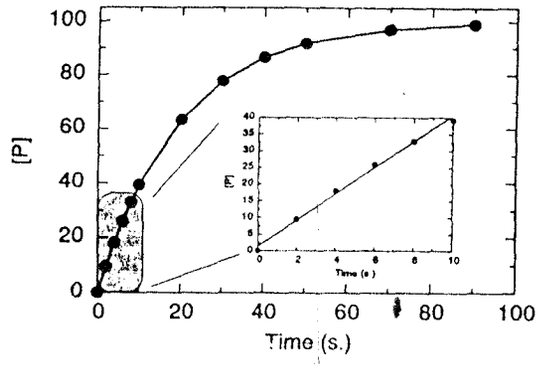
จากกราฟในรูปที่ 4.2 สามารถหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยดูจากการลดลงของตัวถูกย่อย S_1 ไปเป็น S_2 ณ ช่วงเวลา t_1 ถึง t_2 ดังนี้

$$v = \frac{[S]_2 - [S]_1}{t_2 - t_1} = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} \qquad (4\text{-}5)$$

หรืออัตราเร็วของปฏิกิริยาสามารถหาจากการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์จาก P_1 ไปเป็น P_2 ช่วงเวลา t_1 ถึง t_2 ดังนั้น

$$v = \frac{[P]_2 - [P]_1}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \qquad (4\text{-}6)$$

เรียกกราฟการลดลงของความเข้มข้นของตัวถูกย่อยหรือการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นกับเวลาในรูปที่ 4.2 ว่า *"reaction progress curve"* ถ้าพิจารณากราฟนี้อย่างละเอียดจะพบว่าที่เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย ๆ หรือในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลงของ S หรือการเพิ่มของ P จะแปรผันตรงกับเวลา และอัตราเร็วของปฏิกิริยาคือค่าความชันของกราฟนั่นเอง ดังแสดงในรูปที่ 4.3 อัตราเร็วของปฏิกิริยาในช่วงนี้ถือเป็นอัตราเร็วเริ่มต้น (initial velocity, v_o) โดยที่ v_o มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับเวลาในการทำปฏิกิริยา เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นการเปลี่ยนแปลงของ S กับ P จะให้ค่าความชันเปลี่ยนไปเรื่อย ๆ นั่นคืออัตราเร็วของปฏิกิริยาไม่แปรผันตรงกับเวลาในการทำปฏิกิริยาอีกต่อไป



รูปที่ 4.3 การหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจากค่าความชันของ reaction progress curve (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

จากสมการที่ 4-5 และ 4-6 อัตราเร็วที่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสับสตรทหรือผลิตภัณฑ์ในช่วงเวลาน้อย ๆ จนมีค่าเกือบเท่ากับศูนย์ จะเขียนอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้ว่า

$$v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \lim_{\Delta t \to 0} -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = -\frac{d[S]}{dt} \qquad (4\text{-}7)$$

หรือ

$$v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \frac{d[P]}{dt} \qquad (4\text{-}8)$$

ในการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ จะศึกษาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเป็นหลัก ส่วนอัตราเร็วของปฏิกิริยาในช่วงอื่นจะไม่ถือว่าเป็นตัวแทนของการทำงานของเอ็นไซม์อย่างเป็นอิสระ เนื่องจากเมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นเป็นเวลานาน ๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะน้อยกว่าค่าจริง ทั้งนี้เกิดจากการเสียสภาพของเอ็นไซม์ หรือเกิดการยับยั้งโดยสารผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอง หรือเกิดจากปริมาณของตัวถูกย่อยที่ลดลงจนไม่พอต่อการทำปฏิกิริยาอีกต่อไป

4.2 อันดับของปฏิกิริยาเคมี

เมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาเดียวกันที่ไม่มีเอ็นไซม์กับมีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง จะให้กราฟอัตราเร็วที่ขึ้นกับความเข้มข้นของตัวถูกย่อยไม่เหมือนกัน ตัวอย่างเช่น อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่มีตัวถูกย่อยตัวเดียวที่ไม่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง

จะแปรผันตรงกับทุกค่าความเข้มของตัวถูกย่อย ส่วนอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่งจะแปรผันตรงต่อสับเสตรทที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยน้อย ๆ เท่านั้นหลังจากนั้นอัตราเร็วจะเปลี่ยนไปเรื่อย ๆ จนไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวถูกย่อยอีกต่อไปที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยสูงมาก ๆ การเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วที่ช่วงต่าง ๆ ทำให้ปฏิกิริยามีอันดับที่เปลี่ยนไป ต่อไปจะพิจารณาอันดับของปฏิกิริยาได้จากปฏิกิริยาเคมีข้างล่าง

4.2.1 ปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ (zero-ordered reaction)

เป็นปฏิกิริยาที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของตัวเข้าทำปฏิกิริยา ดังแสดงข้างล่าง

$$A + B \rightleftarrows C + D$$

อัตราเร็วของปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ข้างบนมีค่า

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^o[B]^o$$

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

หรือ

$$d[A] = -kdt \qquad (4\text{-}9)$$

โดยที่ ค่า k เป็นค่าคงที่อัตราเร็วที่อันดับที่ศูนย์ *(zero-ordered rate constant)* มีหน่วยเป็นโมลาร์ต่อวินาที $(M\,s^{-1})$

จากอัตราเร็ว $v = k$ ที่ได้ จะเห็นว่าถ้ากราฟระหว่างค่าอัตราเร็วมีค่าเท่ากับค่าคงที่ k ซึ่งไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของตัวถูกย่อยเลย ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ก

เมื่อ integrate สมการที่ 4-9 ที่เวลา $t = 0$ ถึงเวลา $t = t$ จะได้

$$\int_{[A]_o}^{[A]} d[A] = -\int_0^t kdt$$

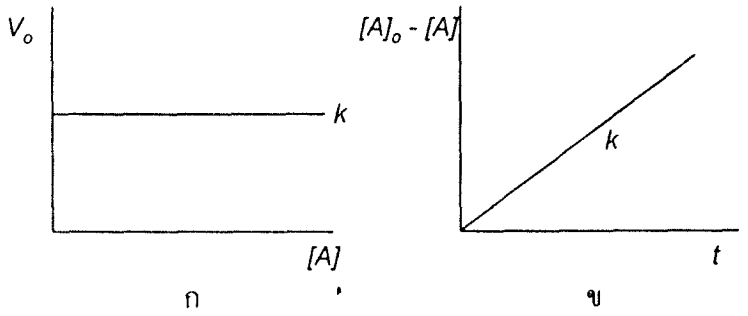
$$[A] - [A]_o = -k(t - 0)$$

$$[A] - [A]_o = -kt$$

จะได้

$$[A] = [A]_o - kt \qquad (4\text{-}10)$$

โดย $[A]_o$ และ $[A]$ เป็นความเข้มข้นเมื่อ $t = 0$ และเมื่อ $t = t$ ตามลำดับ กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $[A]_o$-$[A]$ กับเวลาจะให้ค่าความชันมีค่าเท่ากับ k ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 (ก) กราฟอัตราเร็วของปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์กับความเข้มข้นของสับเสตรท *[A]* และ (ข) กราฟระหว่าง $[A]_o$-*[A]* กับเวลา

4.2.2 ปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง (first-ordered reaction)

ถ้าปฏิกิริยา $A + B \rightleftarrows C + D$ ข้างบนเป็นปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งจะสามารถหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้เป็น

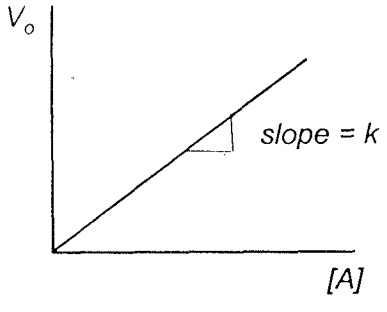
$$V = -\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]^0$$

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

หรือ

$$\frac{d[A]}{[A]} = -kdt \qquad (4\text{-}11)$$

โดยที่ ค่า *k* เป็นค่าคงที่อัตราเร็วที่อันดับที่หนึ่ง *(first-ordered rate constant)* มีหน่วยเป็นต่อวินาที (s^{-1}) จากอัตราเร็ว $= k[A]$ ที่ได้จะเห็นว่าถ้ากราฟระหว่างค่าอัตราเร็วจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของตัวถูกย่อย และค่าความชันของกราฟจะมีค่าเท่ากับค่า *k* ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นกับความเข้มเข้นของตัวถูกย่อย

เมื่อ integrate สมการที่ 4-11 ที่ $[A]_o$ ถึง *[A]* เวลา $t = 0$ ถึงเวลา $t = t$ จะได้

$$\int_{[A]_o}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -\int_0^t k dt$$

$$ln\frac{[A]}{[A]_o} = -k(t-0)$$

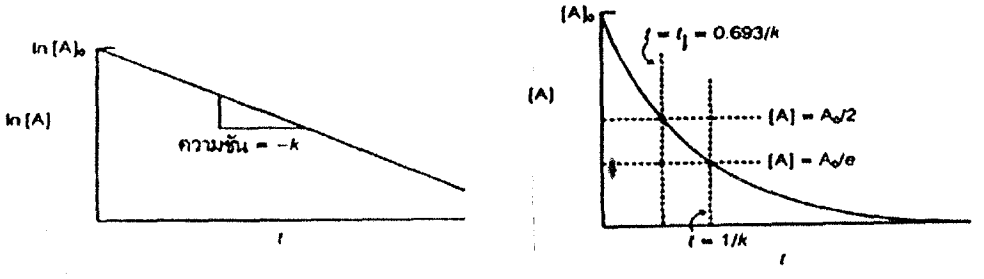
$$ln\frac{[A]}{[A]_o} = -kt$$

ดังนั้น

$$ln[A] = -kt + ln[A]_o \qquad (4\text{-}12)$$

$$[A] = [A]_o e^{-kt} \qquad (4\text{-}13)$$

สมการที่ 4-12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $ln[A]$ กับเวลาในเชิงเส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ $-k$ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ก



ก ข

รูปที่ 4.6 ก) การหาค่าคงที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln[A] กับเวลา
ข) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า [A] กับเวลา

จากสมการ 4-13 จะเห็นว่าการสลายสารตั้งต้น A จะเป็นแบบ exponential ดังแสดงในรูป 4.6 ข โดยสามารถอธิบายได้ว่าที่เวลาของการทำปฏิกิริยาเท่ากับศูนย์ความเข้มข้นของสาร A มีค่าเท่ากับ $[A]_o$ และความเข้มข้นของ A จะลดลงเรื่อย ๆ จนเป็นศูนย์ที่เวลาในการทำปฏิกิริยานานๆ และที่เวลา $t_{1/2}$ สารตั้งต้น A จะสลายไปครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเริ่มต้น นั้นคือที่ $t_{1/2}$ ค่า [A] จะเท่ากับ $[A]_o/2$ เรียกเวลา $t_{1/2}$ ว่าค่าครึ่งอายุ *(half-life)* ของปฏิกิริยา ซึ่งมีค่าเท่ากับ $0.693/k$ ดังแสดงข้างล่าง

จากสมการ

$$ln\frac{[A]}{[A]_o} = -kt$$

ที่ $t_{1/2}$

$$ln\frac{1}{2} = -kt_{1/2}$$

$$-ln\frac{1}{2} = kt_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \qquad (4\text{-}14)$$

ค่าครึ่งอายุของปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งจะขึ้นอยู่กับค่าคงที่ k เท่านั้น ตัวอย่างของปฏิกิริยาที่มีจลนพลศาสตร์แบบอันดับที่หนึ่งได้แก่การสลายของสารกัมมันตรังสีต่าง ๆ (radioactive decay reaction) เช่นการสลายของทริเทียม (tritium, ^3H) ให้ได้เป็นฮีเลียม (^3He) และอนุภาคบีต้า (β-particle) เป็นต้น ดังปฏิกิริยาข้างล่าง

$$3H^+ \rightarrow 3He^{2+} + e^- + neutrino$$

อิเลคตรอนที่ได้จากการสลายของ $3H^+$ จัดเป็นอนุภาคบีต้าที่มีพลังงานจลน์ (kinetic energy) ต่ำที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง Geiger counterได้ แต่การสลายของสารกัมมันตรังสีบางชนิด เช่น ^{32}P จะให้อิเลคตรอนที่มีพลังงานจลน์สูงที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง Geiger counter และสามารถทำลายเนื้อเยื่อได้ การสลายของสารกัมมันตรังสีชนิดต่าง ๆ ที่ปลดปล่อยอิเลคตรอนที่มีค่าพลังงานจลน์ไม่เท่ากันและค่าครึ่งอายุที่แสดงว่าสารกัมมันตรังสีนั้นใช้เวลานานเท่าใดในการสลาย ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าพลังงานของอิเลคตรอนและค่าครึ่งอายุของสารกัมมันตรังสีต่าง ๆ (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 5, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

สารกัมมตรังสี	พลังงานจลน์ (E_{avg} Mev^{-1})[1] ของอนุภาคที่ปลดปล่อย	ค่าครึ่งอายุ ($t_{1/2}$)
^3H	0.0055	12.3 ปี
^{14}C	0.050	5580 ปี
^{32}P	0.700	14.3 วัน
^{35}S	0.0492	88 วัน
^{45}Ca	0.077	165 วัน
^{131}I	0.188	8.05 วัน

[1]เป็นค่าพลังงานเฉลี่ยของอิเลคตรอนที่ถูกปล่อยออกมามีหน่วยต่อล้านอิเลคตรอนโวลท์ (million electron volt, Mev)

ปฏิกิริยาการสลายของสารกัมมันตรังสีอาจเขียนได้ดังนี้

$$-\frac{dN}{dt} = k^* N \qquad (4\text{-}15)$$

โดยที่ k^* คือค่าคงที่การสลาย (decay constant) ซึ่งเป็นค่าคงที่ของปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งมีหน่วยเป็น เวลา$^{-1}$

ดังนั้น จากสมการที่ 4-15 สามารถเขียนสมการการสลายได้เป็น

$$N = N_o e^{-k^* t} \qquad (4\text{-}16)$$

ค่าครึ่งอายุของการสลายของสารกัมมันตรังสี ($t_{1/2}$) จะมีค่าเท่ากับ $0.693/k^*$

4.2.3 ปฏิกิริยาอันดับที่สอง (second-ordered reaction)

ถ้าปฏิกิริยา $A + B \rightleftarrows C + D$ เป็นปฏิกิริยาอันดับที่สองจะสามารถหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้เป็น

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

ถ้าให้ความเข้มข้นของสาร A ที่เข้าทำปฏิกิริยามีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสาร B นั่นคือ [A] = [B] ดังนั้น สามารถพิจารณาปฏิกิริยาข้างบนเป็น

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

หรือ
$$\frac{d[A]}{[A]^2} = -kdt \qquad (4\text{-}17)$$

เมื่อ integrate สมการที่ 4-17 ที่ $[A]_o$ ถึง $[A]$ เวลา $t = 0$ ถึงเวลา $t = t$ จะได้

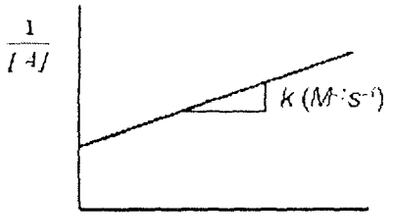
$$\int_{[A]_o}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]^2} = -\int_0^t kdt$$

$$\frac{1}{[A]_o} - \frac{1}{[A]} = -k(t-0)$$

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_o} = -kt$$

$$\frac{1}{[A]} = kt + \frac{1}{[A]_o} \qquad (4\text{-}18)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\frac{1}{[A]}$ กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรงมีค่าความชันมีค่าเท่ากับ k ซึ่งเป็นค่าคงที่อัตราเร็วอันดับที่สอง (second ordered rate constant) มีหน่วยเป็นค่อโมลาร์ค่อวินาที ($M^{-1}s^{-1}$) (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 กราฟระหว่าง $\frac{1}{[A]}$ กับเวลา t ได้เส้นตรงมีความชันเป็นค่าคงที่อัตราเร็วอันดับที่สอง *(k)*

ถ้าพิจารณาการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ข้างล่าง

$$[S]+[E]\underset{}{\overset{k}{\rightleftharpoons}}[E]+[P]$$

รูปของปฏิกิริยาการสลายตัวถูกย่อยเป็นปฏิกิริยาอันดับที่สองที่มีอัตราการสลายดังนี้

$$v=-\frac{d[S]=}{,d[t]}=k[E][S]$$

แต่ตามหลักการทำปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ของ Henri-Michaelis-Menten นักเอ็นไซม์วิทยาที่สร้างสมการอัตราเร็วที่เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไป จะใช้ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยเริ่มต้นมากกว่าความเข้มข้นของเอ็นไซม์มาก ๆ หรือ $[S]_o >> [E]$ ดังนั้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาข้างบนจะเปลี่ยนรูปไปเป็นอัตราเร็วของปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งแทนดังแสดงข้างล่าง

$$v=-\frac{d[S]}{d[t]}=k[S]$$

$$\frac{d[S]}{[S]}=-kdt$$

$$\int_{[S]_o}^{[S]} d[S]=-\int_0^t kdt$$

$$ln\frac{[S]}{[S]o}=-kt$$

$$[S]=[S]_o e^{-kt} \qquad (4\text{-}19)$$

จะเห็นว่าสมการ 4-19 เป็นรูปสมการของปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง (สมการ 4-13) เราเรียกค่าคงที่อัตราเร็วที่ได้จากการแก้ปัญหาสมการข้างบนเป็น *pseudo-first ordered rate constant* มีหน่วยเป็นต่อวินาที (s^{-1}) สมการนี้แสดงการสลายของตัวถูกย่อย โดยที่เวลา $t = 0$ ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยมีค่าเท่ากับ $[S]_o$ และที่เวลาผ่านไปความเข้มข้นของตัวถูกย่อยลดลงโดยมีฟังก์ชันผกผันแบบ exponential กับเวลา สามารถใช้สมการที่ 4-19 แสดงการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์เมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาผ่านไป โดยให้

$$[S]_o=[S]+[P]$$

$$[P]=[S]_o-[S] \qquad (4\text{-}20)$$

เมื่อแทนค่าสมการ 4-19 ลงในสมการ 4-20 จะได้ว่า

$$[P]=[S]_o-[S]_o e^{-kt}$$

$$[P]=[S]_o(1-e^{-kt}) \qquad (4\text{-}21)$$

สมการที่ 4-21 อธิบายการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ P ที่เวลาผ่านไปใน reaction progress curve โดยที่เวลา $t = 0$ จะได้ $P = 0$ และ P จะถูกสร้างขึ้นแบบ exponential เมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาผ่านไป และที่เวลาในการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นจะมีการสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงที่สุดคือที่ $[P] = [S]_o$ กล่าวโดยสรุปสมการการสลายของตัวถูกย่อยและการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ในหน่วยเวลา (สมการที่ 4-19 และ 4-21) แสดงกราฟ reaction progress curve ในรูปที่ 4.3 นั่นเอง

คำถามทบทวนท้ายบท

1. จงอธิบายความแตกต่างของ reaction progress curve ของปฏิกิริยา $A \xrightarrow{k} B$ ที่เร่งโดยเอ็นไซม์และปฏิกิริยาที่ไม่ได้เร่งด้วยเอ็นไซม์
2. อธิบายความสำคัญของ reaction progress curve ในการศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอ็นไซม์
3. จากปฏิกิริยา $A \xrightarrow{k} B$ แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาจากสมการข้างล่าง

$$[B] = [A]_o(1 - e^{-kt})$$

4. จงหาค่า k ของปฏิกิรยาดังกล่าว ถ้าปฏิกิริยานี้มีค่าครึ่งอายุเป็น 10 นาที
5. อธิบายว่าที่สภาวะใดที่จะจัดค่าคงที่อัตราเร็วของปฏิกิริยา $[S] + [E] \overset{k}{\rightleftharpoons} [E] + [P]$ เป็น pseudo first ordered rate constant และแสดงวิธี แก้ปัญหาสมการเพื่อให้ได้ค่า k จากปฏิกิริยาดังกล่าว

บทที่ 5
จลนพลศาสตร์ของการเร่งปฏิกิริยาแบบมีตัวถูกย่อยตัวเดียว

เราสามารถศึกษาการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ได้หลายวิธี เช่นการศึกษาทางสเปคโตรสโคปี การศึกษาโดยวิธี NMR และ protein crystallization และการศึกษาทางจลนพลศาสตร์ ในบทนี้จะเน้นถึงการศึกษาทางจลนพลศาตร์ที่ใช้อธิบายการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ โดยจะกล่าวถึงการหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา และการวิเคราะห์ผลของตัวแปรต่าง ๆ เช่น เวลา ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา รวมไปถึงการทำความเข้าใจเกี่ยวกับความสำคัญของค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ต่าง ๆ

5.1 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอ็นไซม์โดยใช้ rapid equilibrium assumption

จลนพลศาสตร์พื้นฐานของการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์เริ่มโดยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่เพิ่มขึ้น ในปี ค.ศ. 1902 นักเอ็นไซม์วิทยาชื่อ Brown ได้เสนอลักษณะทางจลนพลศาสตร์ของการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ผ่านการสร้างคอมเพล็กซ์ของเอ็นไซม์และสับเสตรทดังข้างล่าง

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

จากปฏิกิริยาข้างบน Brown ทำนายว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของคอมเพล็กซ์ ES โดย $v = k_2[ES]$ และถ้าให้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีค่าต่ำ ๆ จะได้ว่าอัตราการสร้าง ES จะขึ้นโดยตรงกับความเข้มข้นของ [S] น้อย ๆ ในลักษณะของปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง แต่ที่ [S] สูง ๆ เอ็นไซม์ทั้งหมดอยู่ในรูปคอมเพล็กซ์ ES ความเข้มข้นของสับเสตรทจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยา นั่นคืออัตราเร็วที่ [S] สูง ๆ จะมีค่าคงที่ กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า v กับ [S] ในช่วงนี้จะให้ความชันเป็นศูนย์ ซึ่งการทำนายนี้ได้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้

ในปี ค.ศ. 1903 นักเอ็นไซม์วิทยาชื่อ Henri ได้พิสูจน์ข้อเสนอของ Brown ในรูปของสมการทางคณิตศาสตร์ ซึ่งในเวลาต่อมาในปี ค.ศ. 1913 Michaelis และ Menten ได้ยืนยันข้อพิสูจน์ดังกล่าวจนเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง ต่อมาได้มีผู้ตั้งชื่อสมการคณิตศาสตร์ที่อธิบายเกี่ยวกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอ็นไซม์ว่า *"Henri-Michaelis-Menten equation"*

การหาสมการอัตราเร็วโดย Henri-Michaelis และ Menten มีเงื่อนไขสามประการดังนี้

1. พิจารณาจากปฏิกิริยาในช่วงแรกคือการสร้าง binary complex คือ ES จาก E + S เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้และเข้าสมดุลอย่างรวดเร็ว (rapid equilibrium)
2. การสลาย ES ไปเป็น E + P จะเกิดช้ามาก ๆ จนถือว่าค่า $k_2 \ll k_{-1}$
3. ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยเริ่มต้นมีค่ามากกว่าความเข้มข้นของเอ็นไซม์มาก นั่นคือ $[S]_o \gg [E]$ ดังนั้นความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่เหลือจากการเข้าทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์จะไม่ต่างจากความเข้มข้นของความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่จุดเริ่มต้น หรือ $[S]_f \cong [S]_o$

การแก้สมการโดยวิธี rapid equilibrium ทำได้ดังนี้คือ

จากปฏิกิริยาข้างบนเมื่อปฏิกิริยาช่วงแรกคือ $S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES$ เข้าสู่สมดุลอย่างรวดเร็ว จะได้ว่า

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] \tag{5-1}$$

$$\frac{k_{-1}}{k_1,} = \frac{[E]_f[S]}{[ES]} \tag{5-2}$$

ถ้ากำหนดให้ค่า $\frac{k_{-1}}{k_1} = K_s$ โดยที่ K_s คือค่าคงที่การแตกตัวที่สมดุล (*equilibrium dissociation constant*) โดยที่

$$K_s = \frac{[E]_f[S]}{[ES]} \tag{5-3}$$

ทำสมการ 5-3 ให้อยู่ในรูปของ ES โดยเราทราบว่า $[E]_{total} = [E]_{free} + [E]_{bound}$ ถ้าให้ $[E]_t$ เท่ากับ $[E]_{total}$ ให้ $[E]_f$ เท่ากับ $[E]_{free}$ และให้ $[ES]$ เท่ากับ $[E]_{bound}$ จะได้ว่า

$$[E]_f = [E]_t - [ES] \tag{5-4}$$

ดังนั้น

$$K_s = \frac{([E]_t - [ES])[S]}{[ES]} \tag{5-5}$$

จัดรูปสมการ 5-5 ใหม่

$$[ES] = \frac{[E]_t[S]}{K_s} - \frac{[ES][S]}{K_s}$$

$$[ES] + \frac{[ES][S]}{K_s} = \frac{[E]_t[S]}{K_s}$$

$$[ES]\frac{(1+[S])}{K_s} = \frac{[E]_t[S]}{K_s}$$

$$[ES] = \frac{[E]_t[S]/K_s}{(K_s+[S])/K_s}$$

$$[ES] = \frac{[E]_t[S]}{K_s+[S]} \tag{5-6}$$

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทของเทอร์โมไดนามิกส์ของการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอ็นไซม์ว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยรวมขึ้นกับปฏิกิริยาช่วงที่เกิดขึ้นช้าที่สุดเป็นช่วงที่กำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยารวม ดังนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยรวมจะพิจารณาจากปฏิกิริยาช่วงที่สองคือ $ES \xrightarrow{k_2} E + P$ ดังนั้น

$$v = k_2[ES] \tag{5-7}$$

ถ้าการเปลี่ยน $ES \rightarrow E + P$ ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยหลาย ๆ ปฏิกิริยาจะกำหนดให้ค่าคงที่ของปฏิกิริยาสุทธิของการสร้าง E + P จาก ES เป็นค่าคงที่ของการเร่งปฏิกิริยา (k_{cat}) แทนดังนั้นปฏิกิริยารวมจะเปลี่ยนรูปเป็น

$$E + S \underset{K_S}{\rightleftharpoons} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

ซึ่งค่า k_{cat} จัดเป็นค่าคงที่ของปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งจึงมีหน่วยเป็นเวลา$^{-1}$ ในกรณีนี้สมการที่ 5-7 จะเปลี่ยนรูปเป็น

$$v = k_{cat}[ES] \tag{5-8}$$

แทนค่า [ES] ที่หาได้จากสมการที่ 5-6 ลงในสมการที่ 5-8 จะได้

$$v = k_{cat}[E]_t \frac{[S]}{K_s + [S]} \tag{5-9}$$

จากสมการที่ 5-9 ถ้าให้ [S] มีค่าสูงมาก ๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเข้าสู่อัตราเร็วสูงสุด นั่นคือ $v = V_{max} = k_{cat}[E]_t$ เนื่องจาก

$$\lim_{[S]\to\infty} \frac{[S]}{K_s + [S]} \cong \frac{[S]}{[S]} = 1 \tag{5-10}$$

ดังนั้นสามารถเขียนสมการที่ 5-9 ให้อยู่ในรูปสุดท้ายได้ดังนี้

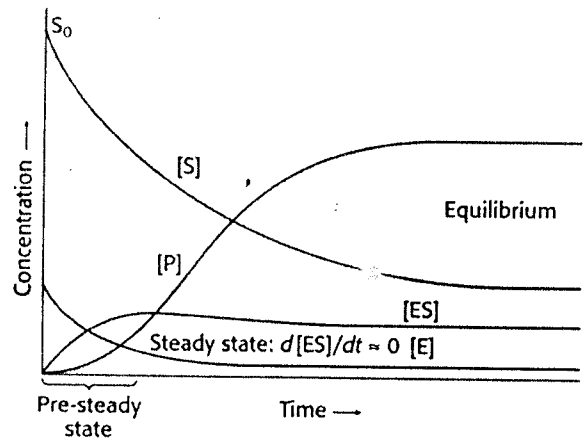
$$\boxed{v = V_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_s}{[S]}}} \tag{5-11}$$

เรียกสมการที่ 5-11 ว่า *"Henri-Michaelis-Menten equation"* ซึ่งเป็นสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่ให้กราฟ hyperbola rectangular ซึ่งจะได้กล่าวถึงการใช้สมการนี้ในการวิเคราะห์ลักษณะของกราฟที่ได้ต่อไปหลังจากที่ได้ทำแก้สมการอัตราเร็วโดยวิธี steady-state

5.2 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอ็นไซม์โดยใช้ steady-stead assumption

การหาสมการอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอ็นไซม์โดยวิธีของ Henri-Michaelis และ Menten อาศัยหลักการการเข้าสู่สมดุลอย่างรวดเร็วของการจับกันระหว่างตัวถูกย่อยและเอ็นไซม์ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาจลนพลศาสตร์แบบ rapid kinetics อย่างไรก็ตามพบว่าการหาอัตราเร็วโดยวิธี rapid equilibrium มีข้อจำกัดและไม่สามารถใช้ได้กับการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่ปฏิกิริยาส่วนใหญ่เกิดขึ้นในสภาวะที่การสร้าง

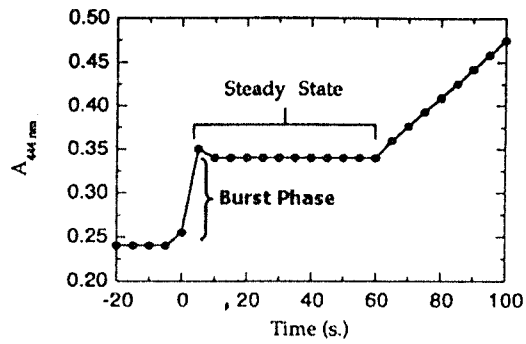
ES มีอัตราคงที่ ในปี ค.ศ. 1925 Briggs และ Haldane ได้เสนอวิธีการหาอัตราเร็วที่สภาวะ steady-state ซึ่งเป็นสภาวะที่อัตราการสร้าง ES เท่ากับอัตราการสลาย ES ดังแสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 สภาวะ steady-state ของปฏิกิริยาที่อัตราการสร้าง ES เท่ากับอัตราการสลาย ES (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

การหาสมการอัตราเร็วของ Briggs & Haldane มีเงื่อนไขดังต่อไปนี้

1. ในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยาไม่มีสารตัวกลางอื่นถูกสร้างขึ้นนอกจาก ES เท่านั้นและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ในปฏิกิริยาเป็นดังนี้ $[E]_{total} = [E]_{free} + [E]_{bound}$
2. ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่ใช้ในปฏิกิริยามีค่ามากเกินพอเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของเอ็นไซม์ นั่นคือ $[S]_o >> [E]$ ดังนั้นความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์จะไม่ต่างจากความเข้มข้นของความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่จุดเริ่มต้น หรือ $[S]_f \cong [S]_o$
3. ในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยามีการสร้าง P น้อยมาก ๆ และเป็นช่วงที่มีการสร้าง ES อย่างรวดเร็วเรียกปฏิกิริยาในช่วงนี้ว่า *"burst phase"* (รูปที่ 5.2) หลังจากปฏิกิริยาเข้าสู่สภาวะ steady-state การสร้างและการสลายของ ES จะมีอัตราเท่ากัน นั่นคือ $\frac{d[ES]}{dt} = 0$
4. การสลาย ES ที่ steady-state เกิดได้สองทิศทางคือ
   $[E] + [S] \xleftarrow[k_{-1}]{} [ES] \xrightarrow{k_2} [E] + [P]$ โดยที่ค่า k_{-1} ไม่จำเป็นต้องมากกว่า k_2 มาก ๆ ดังนั้นในการหาสมการอัตราเร็วเริ่มต้นโดยวิธีนี้ต้องพิจารณาทั้งค่า k_{-1} และ k_2



รูปที่ 5.2 การสร้าง ES ผ่านช่วง burst phase ก่อนที่ปฏิกิริยาจะเข้าสู่ steady state (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

ในการหาสมการอัตราเร็วโดยวิธี steady-state ทำได้โดยพิจารณา

อัตราการสร้าง [ES] = อัตราการสลาย [ES]

อัตราการสร้าง [ES] $= \dfrac{d[ES]}{dt} = k_1[E]_f[S]_f$

อัตราการสลาย [ES] $= -\dfrac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES]$

ดังนั้น
$$k_1[E]_f[S]_f = (k_{-1} + k_2)[ES] \qquad (5\text{-}12)$$

จัดรูปสมการ 5-12 เสียใหม่ให้อยู่ในรูปของ $[ES]$ จะได้

$$[ES] = \frac{[E]_f[S]_f}{\dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \qquad (5\text{-}13)$$

ถ้ากำหนดให้เทอมของค่าคงที่ $\dfrac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m$ โดยที่ค่า K_m เป็นค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่เรียกว่า *"Michaelis constant"* จะได้ว่า

$$[ES] = \frac{[E]_f[S]_f}{K_m} \qquad (5\text{-}14)$$

แทนที่ $[E]_f$ ด้วย $[E]_t - [ES]$ ในสมการที่ 5-14 และจัดรูปสมการใหม่โดยใช้หลักการเดียวกับการหาอัตราเร็วโดยวิธี rapid equilibrium จะได้

$$[ES] = \frac{([E]_t - [ES])[S]_f}{K_m} \qquad (5\text{-}15)$$

$$[ES] = [E]_t \frac{[S]_o}{K_m + [S]_o} \qquad (5\text{-}16)$$

กำหนดให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาการสร้าง P เป็น

$$v = k_2[ES]$$

แทนค่า [ES] จากสมการ 5-16 ลงในสมการอัตราเร็วข้างบนจะได้

$$v = k_2[E]_t \frac{[S]_o}{K_m + [S]_o} \qquad (5\text{-}17)$$

ถ้าปฏิกิริยาการสลาย ES เป็น E + P ต้องผ่านขั้นตอนย่อยหลายขั้นตอนจะได้ค่าคงที่อัตราเร็วในช่วงนี้เป็นค่า k_{cat} แทนค่า k_2 นั่นคือ

$$v = k_{cat}[E]_t \frac{[S]_o}{K_m + [S]_o} \qquad (5\text{-}18)$$

ที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยสูง ๆ จะได้ $\lim_{[S]\to\infty} \frac{[S]}{K_s + [S]} \cong \frac{[S]}{[S]} = 1$ และที่สภาวะนี้อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเข้าสู่อัตราเร็วสูงสุดหรือ

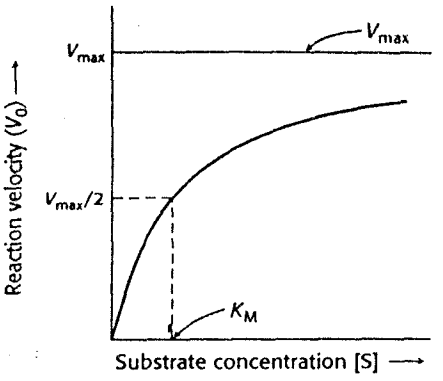
$$V_{max} = k_{cat}[E]_t \qquad (5\text{-}19)$$

ดังนั้นสมการที่ 5-18 อาจเขียนได้เป็น

$$\boxed{v = V_{max} \frac{[S]_o}{K_m + [S]_o} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]_o}}} \qquad (5\text{-}20)$$

จะเห็นได้ว่าสมการที่ 5-20 มีรูปเหมือน Henri-Michaelis-Menten equation ที่หาได้จากวิธี rapid equilibrium ยกเว้นค่าคงที่ K_s เปลี่ยนเป็นค่าคงที่ K_m ซึ่ง $K_s \neq K_m$ เรียกสมการที่ 5-20 ว่า *"Briggs & Haldane equation"* ซึ่งเป็นสมการดัดแปลงของ Michaelis-Menten equation นั่นเอง

สมการของ Michaelis-Menten เป็นสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า v กับ [S] ในเชิง hyperbolaถ้าวาดกราฟระหว่าง v_o กับ [S] ก็จะได้กราฟ hyperbola rectangular และเรียกกราฟที่ได้ว่า *Michaelis-Menten plot* ดังแสดงในรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.3 Michaelis-Menten plot (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

และเราอาจพิจารณาลักษณะของกราฟอัตราเร็วข้างบน โดยใช้ Henri-Michaelis-Menten equation ภายใต้เงื่อนไขต่างกันสามประการคือ

<u>เงื่อนไขที่ 1</u> พิจารณาอัตราเร็วที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยน้อยมาก ๆ เมื่อเทียบกับค่า K_m ([S] << K_m) จนถือว่าค่าของ $[S]_o$ ในส่วนหารมีค่าเท่ากับศูนย์ รูปของสมการจะเป็น

$$v = V_{max} \frac{[S]_o}{K_m + \cancel{[S]_o}}$$

$$v = \frac{V_{max}}{K_m}[S]_o \qquad (5\text{-}21)$$

ที่ [S] << K_m อัตราเร็วเริ่มต้นจะแปรผันโดยตรงกับ [S] ซึ่งก็คือกราฟในช่วงแรก ปฏิกิริยาในช่วงนี้จัดเป็นปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง

<u>เงื่อนไขที่ 2</u> พิจารณาอัตราเร็วที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยมากกว่าค่า K_m มาก ๆ ([S] >> K_m) จนสามารถแทนค่าของ K_m เป็นศูนย์ รูปของสมการจะเป็น

$$v = V_{max} \frac{[S]_o}{\cancel{K_m} + [S]_o}$$

$$v = V_{max} \qquad (5\text{-}22)$$

นั่นคืออัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ค่าความเข้มข้นของตัวถูกย่อยสูงมาก ๆ จะเข้าสู่อัตราเร็วสูงสุดและไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของตัวถูกย่อยอีกต่อไป จากกราฟช่วงที่อัตราเร็วเข้าสู่ค่าคงที่คือค่า V_{max} ปฏิกิริยาในช่วงนี้จัดเป็นปฏิกิริยาอันดับศูนย์

<u>เงื่อนไขที่ 3</u> พิจารณาอัตราเร็วที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยเท่ากับค่า K_m ([S] = K_m) ได้รูปของสมการเป็น

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

แทนค่า $K_m = [S]_o$

$$v = V_{max} \frac{[S]_o}{[S]_o + [S]_o}$$

$$v = \frac{V_{max}}{2}, \qquad (5\text{-}23)$$

ที่ [S] = K_m อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ค่า K_m = [S] จะมีค่าเท่ากับ $\frac{V_{max}}{2}$ นั่นคือเราสามารถกำหนดค่า K_m เป็นค่าความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่ให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด และค่า K_m มีหน่วยเดียวกับหน่วยของความเข้มข้นของตัวถูกย่อยนั่นเอง

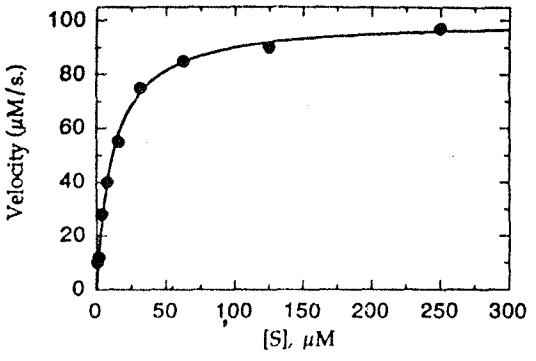
5.3 การวัดหาค่าทางจลนพลศาสตร์และการแปรผล

เราสามารถหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์(V_{max} และ K_m) ที่ได้จาก Michaelis-Menten equation ได้จากกราฟระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้น (v_o) กับความเข้มข้นของตัวถูกย่อย [S] ในการทดลองจริง ๆ ความแม่นยำในการประมาณค่า V_{max} และ K_m ขึ้นอยู่กับการเลือกช่วงความเข้มข้นของตัวถูกย่อย [S] ตัวอย่างในตารางที่ 5.1 แสดงถึงการวัดหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาในการสร้างความเข้มข้นของตัวถูกย่อยในช่วง 0-250 μM โดยวิธี two-fold dilution

ตารางที่ 5.1 การหาอัตราเร็วเริ่มต้นจากค่าความเข้มข้นของตัวถูกย่อย (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

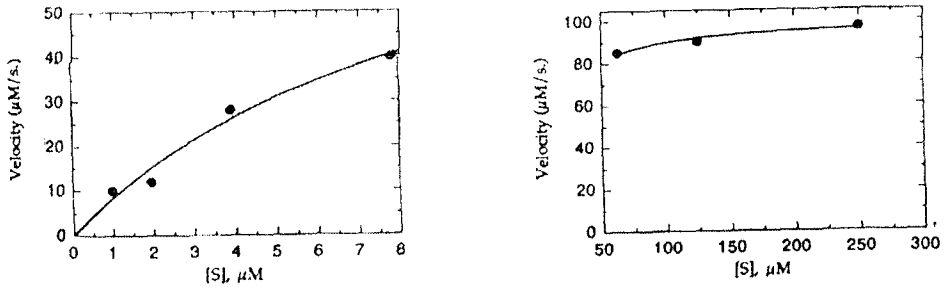
[S] (μM)	v_o (μM ของผลิตภัณฑ์ P ที่ถูกสร้างขึ้นต่อวินาที)	$1/v$ ($\mu M^{-1} s$)	$1/[S]$ (μM^{-1})
0.98	10	0.100	1.024
1.95	12	0.083	0.512
3.91	28	0.036	0.256
7.81	40	0.025	0.128
15.63	55	0.018	0.064
31.25	75	0.013	0.032
62.50	85	0.012	0.016
125.0	90	0.011	0.008
250.0	97	0.010	0.004

ข้อมูลที่ได้ในตารางที่ 5.1 สามารถสร้างกราฟระหว่างค่า v_o กับค่า [S] โดยวิธี nonlinear least-squares best fitได้ดังรูปที่ 5.4



รูปที่ 5.4 กราฟระหว่างค่า v_o กับ [S] จากข้อมูลในตารางที่ 5.1(แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

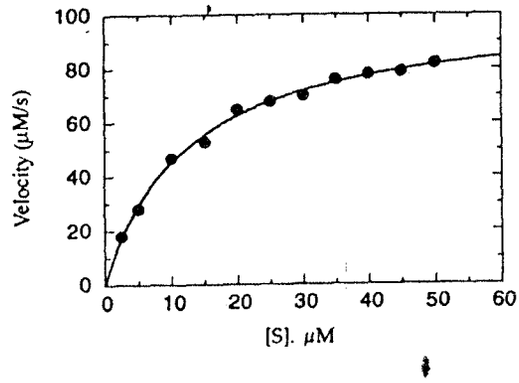
จากกราฟ non-linear ข้างบนสามารถประมาณหาค่าอัตราเร็วสูงสุดได้เป็น 100.36 μMs^{-1} และค่า K_m เป็น 11.63 μM ค่าคงที่ทั้งสองที่ได้ เกิดจากการสร้างกราฟในช่วงของตัวถูกย่อยตั้งแต่ 0-250 μM ซึ่งความแม่นยำในการประมาณค่า V_{max} และค่า K_m ขึ้นอยู่กับช่วงของตัวถูกย่อยที่เหมาะสมดังที่กล่าวไว้แล้ว ถ้าหากวัดอัตราเร็วที่ช่วงของความเข้มข้นตัวถูกย่อยต่ำ ๆ เช่นที่ 0-3.91 μM หรือ [S] << 0.33 K_m กราฟของ v_o และ [S] จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงแรกและโค้งออกเล็กน้อยแต่ไม่สามารถหาจุดอิ่มตัวของกราฟได้ดังแสดงในรูปที่ 5.5 ก การเลือกช่วงตัวถูกย่อยในช่วงนี้จะทำให้หาค่า V_{max} และค่า K_m ไม่ได้เนื่องจากค่าทั้งสองมีค่าเป็น infinite value ในทางตรงกันข้ามกราฟอัตราเร็วของปฏิกิริยามีลักษณะเป็นเส้นเกือบขนานกับแกน x มีความชันน้อยมากและมีจุดตัดบนแกน y ไม่เริ่มที่ศูนย์ดังแสดงในรูปที่ 5.5ข ถ้าเลือกช่วงความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่มีค่ามาก ๆ เช่น ที่ 60-250 μM หรือ [S] >> 5 K_m ทั้งนี้เนื่องมากจากอัตราเร็วปฏิกิริยาที่วัดได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของตัวถูกย่อยแต่มีแนวโน้มเข้าสู่อัตราเร็วสูงสุดที่ทุก ๆ จุดของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ตำแหน่งจับของเอ็นไซม์ถูกอิ่มตัวด้วยโมเลกุลของตัวถูกย่อยหมดแล้ว ทำให้ไม่สามารถหาค่า V_{max} และค่า K_m จากกราฟได้เช่นกัน



ก ข

รูปที่ 5.5 กราฟอัตราเร็วที่ได้จากการเลือกช่วง [S] ที่ไม่เหมาะสม ก) ที่ความเข้มข้นของ S น้อยเกินไป ข) ที่ความเข้มข้นของ S มากเกินไป (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

ข้อแนะนำในสำหรับช่วงของสับสเตรที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่ให้ค่าอัตราเร็วเริ่มต้นเป็น 20-80% ของค่า V_{max} หรือเท่ากับค่า [S] ที่ช่วง 0.25-5.0 K_m นั่นเอง จากข้อมูลข้างบนอาจทำการทดลองทดสอบหาค่า K_m อย่างคร่าว ๆ โดยเลือกตัวถูกย่อยช่วงกว้างที่ครอบคลุมทั้งความเข้มข้นน้อย ๆ และความเข้มข้นมาก ๆ เช่นจากข้อมูลในตารางที่ 5.1 อาจเลือกความเข้มข้น 0.4, 2.0, 10, 50 และ 250 μM โดยวิธี five-fold dilution เมื่อได้ค่า K_m คร่าว ๆ แล้วคือประมาณ 10 μM จึงทำการทดลองซ้ำโดยเลือกสับเสตรทที่ให้อยู่ในช่วง 0.25-5 K_m กราฟอัตราเร็วที่ได้จากช่วงตัวถูกย่อยดังกล่าวมีลักษณะดังรูปที่ 5.6



รูปที่ 5.6 กราฟอัตราเร็วที่ได้จากการเลือกช่วง [S] ที่ 0.25-5 K_m (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

5.4 การหาค่า V_{max} และ K_m จากสมการเส้นตรงแบบต่าง ๆ

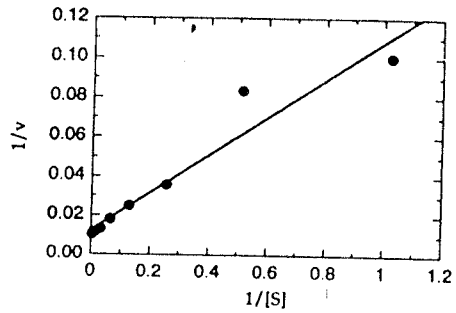
ในช่วงเริ่มต้นของการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอ็นไซม์การประมาณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์จากกราฟไฮเปอโบลิกทำได้ไม่ง่ายนักเนื่องจากยังไม่มีการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อช่วยในการคำนวณ จึงได้มีความพยายามที่จะใช้วิธีที่ง่ายขึ้นคือการสร้างสมการเส้นตรงจากสมการของ Henri Michaelis และ Menten แล้วหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์จากกราฟเส้นตรง วิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายเป็นที่รู้จักกันดีถูกพัฒนาโดย Lineweaver และ Burk ในปี ค.ศ. 1934 นักเอ็นไซม์วิทยาทั้งสองได้สร้างสมการเส้นตรงขึ้นโดยการกลับเศษเป็นส่วนหรือการทำ double reciprocal ของ Michaelis-Menten equation ดังข้างล่าง

$$v = V_{max}\left(\frac{1}{1+\frac{K_m}{[S]}}\right) \tag{5-24}$$

ทำการกลับเศษเป็นส่วนของสมการที่ 5-24 จะได้

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{max}} \tag{5-25}$$

จะเห็นว่าสมการที่ 5-25 เป็นสมการเส้นตรงเมื่อเปรียบเทียบกับสมการเส้นตรงมาตรฐาน $y = mx + b$ โดยที่ m คือค่าความชันและ b คือค่า y-intercept เรียกสมการที่ 5-25 ว่า *"Lineweaver-Burk equation"* สามารถเขียนกราฟเส้นตรงระหว่างค่า $\frac{1}{v}$ และ $\frac{1}{[S]}$ โดยกราฟให้ค่าความชันมีค่าเท่ากับ $\frac{K_m}{V_{max}}$ และค่า y-intercept มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{V_{max}}$ ดังแสดงในรูปที่ 5.7



รูปที่ 5.7 กราฟ Lineweaver-Burk ที่สร้างจากค่าของตัวถูกย่อยในช่วง 0.25-5 K_m (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

จากกราฟข้างบน สามารถหาค่า K_m ได้สองวิธี วิธีแรกโดยการหารค่าความชันของกราฟด้วยค่า y-intercep. จะได้

$$\frac{K_m / V_{max}}{1 / V_{max}} = K_m$$

วิธีที่สองหาจากการต่อกราฟไปตัดแกน x แล้วหาค่า x-intercept ที่มีค่าเท่ากับ $-\frac{1}{K_m}$ ดังข้างล่าง

$$x - intercept = -\frac{y - intercept}{slope}$$

$$-\frac{1/V_{max}}{K_m/V_{max}} = -\frac{1}{K_m}$$

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีข้อโต้แย้งว่าการหาค่า V_{max} และ K_m จากสมการของ Lineweaver-Búrk มีความแม่นยำน้อยเมื่อเทียบกับวิธีที่หาจาก nonlinear curve fit ทั้งนี้เนื่องมาจากในการทดลองที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยน้อย ๆ ให้ค่าความผิดพลาดของการทดลองสูง เมื่อค่านี้ถูกเปลี่ยนเป็นส่วนกลับจะทำให้ค่าความผิดพลาดนี้ถูกขยายและมีน้ำหนักมากขึ้นดังแสดงในรูปที่ 5.7

จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีความพยายามจากนักเอ็นไซม์วิทยาท่านอื่นที่จะสร้างสมการเส้นตรงในรูปแบบอื่น ๆ ที่สามารถใช้ในการประมาณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ได้ ทำให้เกิดกราฟหลาย ๆ แบบเช่น

Eadie-Hofstee plots เป็นกราฟเส้นตรงที่ได้จากการนำ $Km+[S]$ คูณทั้งเศษและส่วนของสมการ ของ Henri-Michaelis-Menten

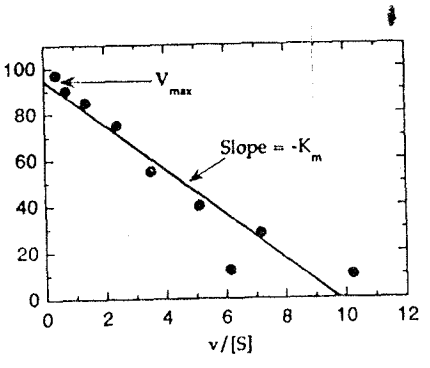
$$v(K_m+[S])=V_{max}\frac{[S]}{K_m+[S]}(K_m+[S)$$

$$v(K_m=[S])=V_{max}[S] \qquad (5\text{-}26)$$

ทำการหารสมการที่ 5-26 ทั้งสองด้านด้วย [S] แล้วจัดเรียงสมการใหม่จะได้

$$v=V_{max}-K_m\left(\frac{v}{[S]}\right) \qquad (5\text{-}27)$$

วาดกราฟระหว่างค่า v กับ $\frac{v}{[S]}$ ดังรูปที่ 5.8



รูปที่ 5.8 กราฟของ Eadie-Hofstee ที่ได้จากข้อมูลในตารางที่ 5.1 (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

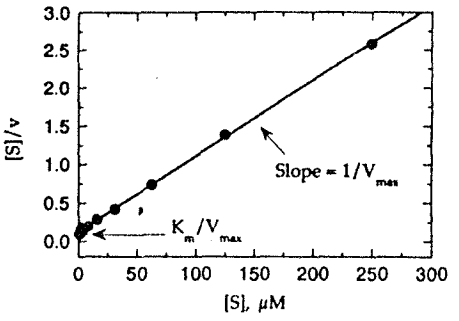
จากกราฟสามารถหา K_m ได้จากค่าความชันที่มีค่าเท่ากับ $-K_m$ และมีค่า y-intercept เท่ากับ V_{max} ค่า K_m และ V_{max} ที่ได้จะมีค่าความผิดพลาดสูงด้วยเหตุผลเช่นเดียวกับกราฟของ Lineweaver-Burk

- **Hanes-Wolff plots** เป็นกราฟเส้นตรงที่ได้จากการคูณสมการ Lineweaver-Burk ทั้งสองข้างด้วย [S] ดังข้างล่าง

$$\frac{1}{v}[S]=\left(\frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]}\right)[S]+\frac{1}{V_{max}}[S]$$

$$\frac{[S]}{v}=[S]\left(\frac{1}{V_{max}}\right)+\frac{K_m}{V_{max}} \qquad (5\text{-}28)$$

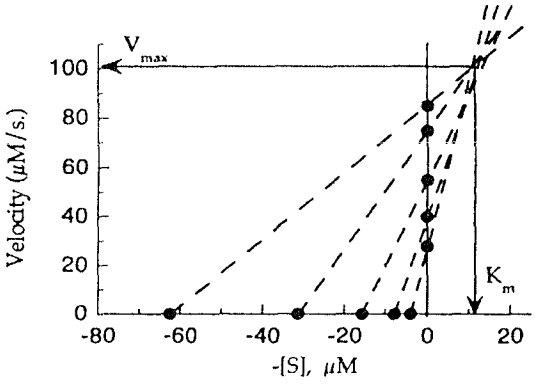
วาดกราฟระหว่างค่า $\frac{[S]}{v}$ กับ [S] ดังรูปที่ 5.9



รูปที่ 5.9 กราฟของ Hanes-Wolff ที่ได้จากข้อมูลในตารางที่ 5.1 (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

จากกราฟได้ค่าความชันมีค่าเท่ากับ $\frac{1}{V_{max}}$ ค่า Y-intercept มีค่าเท่ากับ K_m/V_{max} และค่า X-intercept มีค่าเท่ากับ $-K_m$ คการหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้โดยวิธีนี้จะมีความแม่นยำสูงสุดโดยให้ค่าความผิดพลาดน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 5.2

- **Eisenthal-Cornish-Bowden Direct Plots** เป็นกราฟที่สร้างโดยตรงจากค่าอัตราเร็วที่วัดได้จากค่า [S] แต่ละค่าโดย plot ระหว่างค่า v กับค่า $-[S]$ ดังแสดงในรูปที่ 5.10



รูปที่ 5.10 กราฟ Eisenthal-Cornish-Bowden ที่ได้จากข้อมูลในตารางที่ 5.1 (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc.,USA)

จากรูปที่ 5.10 ถ้าหาจุดตัดร่วมของเส้นกราฟอัตราเร็วแต่ละเส้นแล้วลากมาตัดแกน y จะได้ค่าบนแกน y มีค่าเท่ากับ V_{max} และถ้าลากเส้นตรงจากจุดตัดร่วมมายังแกน x จะได้ค่าบนแกน x มีค่าเท่ากับค่า K_m ค่าคงที่จลนพลศาสตร์ทั้งสองที่ได้ กราฟนี้ให้ค่าความผิดพลาดน้อยเช่นกันดังแสดงในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบค่าความแม่นยำในการประมาณค่า V_{max} และค่า K_m ที่หาได้จากวิธีต่าง ๆ (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

วิธีที่ใช้ประมาณค่าคงที่ทางจลศาสตร์	K_m (μM)	ค่าเบี่ยงเบนจากค่า K_m จริง (%)	V_{max} (μM s^{-1})	ค่าเบี่ยงเบนจากค่า V_{max} จริง (%)
ค่าจริง	12.00		100.00	
Michaelis-Menten	11.63	3.08	100.36	0.36
Lineweaver-Burk (ที่หาจากข้อมูลทั้งหมด)	7.57	36.92	79.28	20.72
Lineweaver-Burk (ที่หาจากช่วงของข้อมูลที่ [s] = 0.25-5.0 K_m	9.17	23.58	91.84	8.16
Eadie-Hofstee	9.66	19.50	94.45	5.55
Hanes-Wolff	11.84	1.33	100.97	0.97
Eisenthal-Cornish-Bowden	11.53	3.92	100.64	0.64

5.5 ความสำคัญของค่าทางจลนพลศาสตร์

5.5.1 ค่า K_m

ค่า K_m ของเอ็นไซม์จะแตกต่างกันในเอ็นไซม์แต่ละชนิด จากที่ได้กล่าวมาแล้ว ค่า K_m คือค่าความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่ให้ค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด หรืออีกนัยหนึ่งค่า K_m แสดงถึงครึ่งหนึ่งของบริเวณเร่งของเอ็นไซม์ที่ถูกใช้ไปในการจับกับตัวถูกย่อย ถ้าเอ็นไซม์หนึ่งสามารถใช้ตัวถูกย่อยได้หลายตัว ค่านี้จะบ่งบอกถึงสัมพรรคภาพของเอ็นไซม์ต่อที่มีต่อตัวถูกย่อยแต่ละตัว ถ้าค่า K_m ต่ำแสดงถึงสัมพรรคภาพต่อตัวถูกย่อยสูง นอกจากนี้ค่า K_m ยังบ่งบอกถึงความเสถียรของ ES complex อีกด้วย

5.5.2 ค่า k_{cat}

ค่า k_{cat} มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า V_{max} และปริมาณของเอ็นไซม์ โดยที่ $k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_t}$ อาจเรียกค่า k_{cat} ว่าเป็นค่า *turnover number* ของเอ็นไซม์ที่แสดงถึงความสามารถของเอ็นไซม์หนึ่งโมเลกุลในการสร้างสารผลิตภัณฑ์ในหนึ่งหน่วยเวลา ถ้าเอ็นไซม์มีค่า turnover number สูงแสดงว่าเอ็นไซม์นั้นเร่งปฏิกิริยาได้ดี ตารางที่ 5.3 แสดงตัวอย่างเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริรยาให้ค่า turnover number ต่าง ๆ จะเห็นว่า catalase เป็นเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากเนื่องจากหนึ่งโมเลกุลของเอ็นไซม์สามารถสร้าง 40 ล้านโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ได้ในเวลา 1 วินาที ขณะที่สารผลิตภัณฑ์หนึ่งโมเลกุลที่สร้างโดย lysozyme ต้องใช้เวลาถึง 2 วินาที

ตารางที่ 5.3 ค่า turnover number ของเอ็นไซม์บางชนิด (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

เอ็นไซม์	k_{cat} (sec^{-1})
Catalse	40,000,000
Carbonic anhydrase	1,000,000
Acetylcholinesterase	14,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Lysozyme	0.5

5.5.3 ค่า k_{cat}/K_m

ค่า k_{cat}/K_m แสดงถึงประสิทธิภาพโดยรวมของเอ็นไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา ค่านี้ใช้เป็นตัววัดความจำเพาะของเอ็นไซม์ต่อตัวถูกย่อยชนิดหนึ่ง ๆ ถ้า ค่า k_{cat}/K_m มีค่าสูงแสดงว่าเอ็นไซม์นั้นมีความจำเพาะต่อสับเสตรทนั้นมาก ตัวอย่างความจำเพาะของเอ็นไซม์ chymotrypsin ต่อตัวถูกย่อยหลายชนิดถูกแสดงไว้ในตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 ความจำเพาะต่อตัวถูกย่อยของ chymotrypsin (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

Amino acid in ester	Amino acid side chain	k_{cat}/K_M ($s^{-1}\,M^{-1}$)
Glycine	—H	1.3×10^{1}
Valine	—CH(CH$_3$)(CH$_3$)	2.0
Norvaline	—$CH_2CH_2CH_3$	3.6×10^{2}
Norleucine	—$CH_2CH_2CH_2CH_3$	3.0×10^{3}
Phenylalanine	—CH_2—C$_6$H$_5$	1.0×10^{5}

นอกจากนี้ยังใช้ค่า k_{cat}/K_m ในการเปรียบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาไปข้างหน้าเทียบกับปฏิกิริยาผันกลับดังข้างล่าง

จากสมการของ Michaelis-Menten ข้างล่าง

$$v = E_t k_{cat} \frac{[S]_o}{K_m + [S]_o} \qquad (5\text{-}29)$$

ที่ค่า S << K_m เช่นที่ [S] อยู่ในช่วง 0.1-1.0 K_m ค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m}[E]_t[S]_o \qquad (5\text{-}30)$$

ที่สมดุลจะเกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้า (forward reaction) ได้เท่า ๆ กับปฏิกิริยาผันกลับ (reverse reaction) ดังนั้น

$$\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_f [E]_t[S]_o = \left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_r [E]_t[S]_o \qquad (5\text{-}31)$$

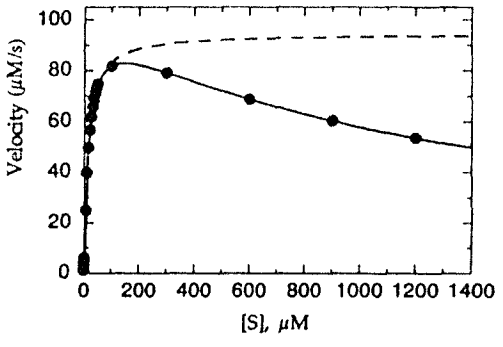
จากสมการที่ 5-31 สามารถหาค่าคงที่สมดุลได้ดังแสดงข้างล่าง

$$K_{eq} = \frac{(k_{cat}/K_m)_f}{(k_{cat}/K_m)_r} \qquad (5\text{-}32)$$

จะเห็นว่าค่าคงที่สมดุลขึ้นกับสัดส่วนของค่า ค่า k_{cat}/K_m ของปฏิกิริยาไปข้างหน้าเทียบกับค่า ค่า k_{cat}/K_mของปฏิกิริยาผันกลับ ถ้าค่า K_{eq} มีค่ามากกว่า 1 แสดงว่าเอ็นไซม์กำลังเร่งปฏิกิริยาไปข้างหน้า ถ้าค่า K_{eq} มีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่าเอ็นไซม์กำลังเร่งปฏิกิริยาผันกลับมากกว่า ถ้าค่า K_{eq} มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาไปข้างหน้าได้เท่า ๆ กับการเร่งปฏิกิริยาผันกลับ เรียกความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่สมดุลกับค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ในสมการที่ 5-32 ว่า *"Haldane relationship"*

5.6 การยับยั้งการทำงานโดยตัวถูกย่อย (substrate inhibition)

ในการทดลองหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยามักมีอุปสรรคที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยสูง ๆ และกราฟของ Michaelis-Menten จะไม่เข้าสู่ปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ตามทฤษฎีแต่จะกลับตกลงดังแสดงในรูปที่ 5.11



รูปที่ 5.11 กราฟอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยสูง ๆ (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 5, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

จากกราฟอาจแสดงผลของตัวถูกย่อยที่ความเข้มข้นสูงๆ ได้โดยที่ตัวถูกย่อยไม่ได้จับกับเอ็นไซม์อิสระอย่างเดียว แต่สามารถจับกับ ES complex เกิดเป็น ES_2 complex ขึ้นดังกลไกข้างล่าง

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

$$ES + S \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} ES_2$$

โดยที่ ES_2 เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่สามารถสลายให้ผลิตภัณฑ์ได้ จากกลไกข้างบนสามารถกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา

$$v = k_2[ES] \tag{5.33}$$

พิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ ES ได้ว่า

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m$$

$$[E] = K_m \frac{[ES]}{[S]} \tag{5.34}$$

พิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ ES_2 โดยให้ค่าการแตกตัวของ ES_2 ไปเป็น [ES] และ [S] เป็น $K' = k_{-3} / k_3$

$$[ES]_2 = \frac{k_3[S][ES]}{k_{-3}} = \frac{[S][ES]}{K'} \tag{5.35}$$

โดยที่

$$[E]_t = [E] + [ES] + [ES]_2$$

แทนค่า [E] และ $[ES]_2$ ที่ได้ลงในสมการของ $[E]_t$ ข้างบน จะได้

$$[E]_t = \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K'} \right)[ES]$$

$$[ES] = \frac{[E]_t}{\left(\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K'} \right)} \tag{5.36}$$

แทนค่าในสมการที่ 5.36 ลงในสมการอัตราเร็ว จะได้

$$v = k_2 \frac{[E]_t}{\left(\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K'} \right)}$$

$$v = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K'} \right)} \tag{5.37}$$

สมการที่ 5.37 เป็นรูปสมการ Michaelis-Menten ที่ดัดแปลงของ $[S]/K'$ หมายความว่าที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยสูง ๆ ตัวถูกย่อยทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง ในบทต่อไปจะกล่าวถึงรูปสมการการยับยั้งนี้ว่าเป็นการยับยั้งแบบ uncompetitive inhibition

5.7 จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาผันกลับได้ (reversible reaction)

ถ้าปฏิกิริยาการเปลี่ยน S ไปเป็น P เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ สามารถเขียนกลไกของปฏิกิริยาได้ดังนี้

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

ในกรณีนี้ สามารถกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจากการเพิ่มของสารผลิตภัณฑ์หรือการลดลงของตัวถูกย่อยเป็น

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P]$$

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES]$$

ภายใต้สภาวะสมดุลให้อัตราเร็วของการลดลงของ [S] มีค่าเท่ากับการเพิ่มขึ้นของ [P] นั่นคือ

$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

$$k_1[E][S] - k_{-1}[ES] = k_2[ES] - k_{-2}[E][P] \qquad (5.38)$$

เนื่องจาก $[E]_t = [E] + [ES]$ หรือ $[E] = [E]_t - [ES]$
แทนค่า [E] ลงในสมการที่ 5-38 จะได้

$$k_1([E]_t - [ES])[S] - k_{-1}[ES] = k_2[ES] - k_{-2}([E]_t - [ES])[P]$$

$$[ES] = \frac{(k_1[S] + k_{-2}[P])[E]_t}{k_1[S] + k_{-2}[P] + k_{-1} + k_2} \qquad (5\text{-}39)$$

และแทนค่า [E] ลงในสมการของ $\frac{d[P]}{dt}$ ได้ว่า

$$v = k_2[ES] - k_{-2}([E]t - [ES])[P] \qquad (5\text{-}40)$$

แทนค่า [ES] ลงในสมการที่ 5-40 จะได้

$$v = \frac{k_1k_2[S][E]_t - k_{-1}k_{-2}[P][E]_t}{k_1[S] + k_{-2}[P] + k_{-1}k_2} \qquad (5\text{-}41)$$

อัตราเร็วที่ได้จากสมการ 5-41 เป็นอัตราเร็วโดยรวมของปฏิกิริยาไปข้างหน้าและปฏิกิริยาผันกลับ แต่ถ้าพิจารณาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา $S \rightarrow P$ ที่มีการสร้าง [P] น้อย ๆ และ [S] $\approx [S]_o$ จะได้ค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาไปข้างหน้า ดังนี้

$$v_o^f = \frac{k_1 k_2 [S]_o [E]_t}{k_1 [S]_o + k_{-1} + k_2} \qquad (5\text{-}42)$$

ถ้าเอา $k_1[S]_o$ หารทั้งเศษและส่วนจะได้

$$v_o^f = \frac{k_2 [E]_t}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 [S]_o}} = \frac{V_{\max}^f}{1 + \frac{K_m^f}{[S]_o}} \qquad (5\text{-}43)$$

ในทำนองเดียวกันถ้าพิจารณาเฉพาะอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาผันกลับจาก $P \rightarrow S$ ที่มีการสร้าง S น้อย ๆ และ [P] $\approx [P]_o$ จะได้อัตราเร็วเร็วของปฏิกิริยาผันกลับดังนี้

$$v_o^r = \frac{k_{-1} k_{-2} [P]_o [E]_t}{k_{-2} [P]_o + k_{-1} + k_2} \qquad (5\text{-}44)$$

ถ้าเอา $k_{-2}[P]_o$ หารทั้งเศษและส่วนจะได้

$$v_o^r = \frac{k_{-1} [P]_o}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2} [P]_o}} = \frac{k_{-1} [P]_o}{1 + \frac{K_m^r}{[P]_o}} \qquad (5\text{-}45)$$

สมการที่ 5-43 และ 5-45 เป็นรูปของสมการ Michaelis-Menten ที่เสนอโดย Briggs & Haldane นั่นเอง

จากสมการ 5-41 ถ้าเอาค่าคงที่ $k_{-1} + k_2$ หารทั้งเศษและส่วนแล้วแทนค่า $K_m^f, V_{\max}^f, K_m^r, V_{\max}^r$ ที่ได้จากสมการ 5-43 และ 5-45 จะได้สมการอัตราเร็วสุดท้ายดังข้างล่าง

$$v = \frac{\frac{V_{\max}^f [S]}{K_m^s} - \frac{V_{\max}^r [P]}{K_m^r}}{1 + \frac{[S]}{K_m^f} + \frac{[P]}{K_m^r}} \qquad (5\text{-}46)$$

จากสมการที่ 5-46 สามารถหาความเกี่ยวข้องระหว่างค่าคงที่สมดุล (equilibrium constant, K_{eq}) กับค่าทางจลนพลศาสตร์ที่สภาวะ steady state ได้ โดยอัตราเร็วสุทธิมีค่าเท่ากับศูนย์ ที่ steady state เนื่องจากอัตราเร็วของปฏิกิริยาไปข้างหน้าเท่ากับอัตราเร็วของปฏิกิริยาผันกลับ

$$\frac{V^f_{\max}[S]}{K^s_m} - \frac{V^r_{\max}[P]}{K^r_m} = 0 \qquad (5\text{-}47)$$

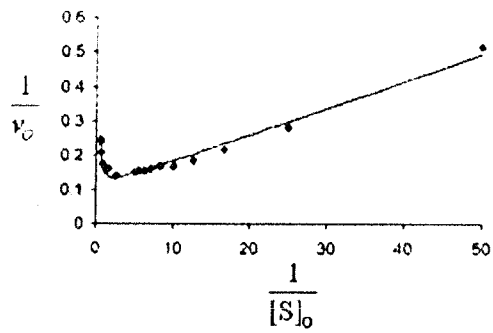
ที่สมดุล ความเข้มของ S และ P เป็น $[S]_{eq}$ และ $[S]_{eq}$ แล้วจัดเรียงสมการ 5-47 ใหม่ได้เป็น

$$\frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = \frac{V^f_{\max}K^r_m}{V^r_{\max}K^f_m} = \frac{k_1k_2}{k_{-1}k_{-2}} = K_{eq} \qquad (5\text{-}48)$$

เรียกความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{eq} กับค่าทางจลศาสตร์นี้ว่า *"Haldane relationship"*

คำถามทบทวนท้ายบท

1. จงแก้สมการอัตราเร็วของปฏิกิริยา $E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ แล้วบอกความแตกต่างของสมการที่ได้กับสมการอัตราเร็วของ Henri-Michaelis-Menten ที่ได้จากวิธี rapid equilibrium
2. ที่ [S] น้อย ๆ สมการอัตราเร็วจะเปลี่ยนไปตามปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งอย่างไร อธิบายพร้อมเขียนสมการอัตราเร็วใหม่ที่ได้
3. จงอธิบายความหมายของค่า $\frac{K_m}{k_{cat}}$ ในการบอกทิศทางของปฏิกิริยาผันกลับได้
4. ในการทดลองสามารถหาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาได้อย่างไร อธิบาย
5. ในการทดลองถ้าได้กราฟ Lineweaver-Burkมีลักษณะดังข้างล่าง จงอธิบายถึงปัญหาที่เกิดขึ้นกับอัตราเร็วของปฏิกิริยาจากการทดลองโดยใช้สมการคณิตศาตร์เป็นบทพิสูจน์



บทที่ 6
จลนพลศาสตร์ของการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์

การทำงานเอ็นไซม์สามารถถูกยับยั้งได้หลายวิธี ตัวยับยั้ง (inhibitors) อาจยับยั้งเอ็นไซม์แอคติวิตี้ด้วยกลไกที่แตกต่างกันโดยจับกับเอ็นไซม์ได้ทั้งแบบผันกลับได้ (reversible) และแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible) อาจเขียนปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์อย่างง่าย ๆ ได้ดังข้างล่าง

$$[E]+[I] \underset{K_d}{\rightleftharpoons} [EI]$$

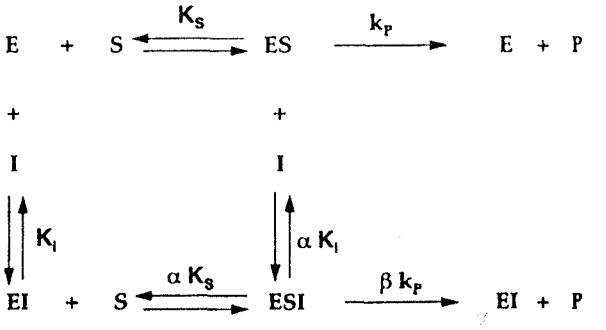
$$K_d = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

โดยที่ [E] เป็นความเข้มข้นของเอ็นไซม์
[I] เป็นความเข้มข้นของตัวยับยั้ง
[EI] เป็นความเข้มข้นของ enzyme-inhibitor complex
K_d เป็นค่า binding dissociation constant

ค่า K_d เป็นค่าคงที่การแตกตัวของการจับของโปรตีนและลิแกนด์ เช่น ฮอร์โมนจับกับตัวรับ แอนติเจนจับกับแอนติบอดี เป็นต้น ส่วนการจับของตัวยับยั้งกับเอ็นไซม์อาจใช้เทอมของค่าคงที่การยับยั้ง (inhibition constant, K_i) แทน ในบทนี้จะกล่าวถึงการยับยั้งการทำงานโดยตัวยับยั้งแบบผันกลับได้เป็นหลัก

6.1 กลไกการยับยั้งแบบผันกลับได้แบบต่าง ๆ

กลไกพื้นฐานของการยับยั้งแบบผันกลับได้แสดงให้เห็นโดยสมดุลของปฏิกิริยาที่มีเอ็นไซม์ ตัวถูกย่อยและตัวยับยั้งอยู่ด้วยกัน (รูปที่ 6.1)



รูปที่ 6.1 สมดุลของปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ ตัวถูกย่อยและตัวยับยั้ง (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 8, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

จากรูปให้ค่า K_s เป็น equilibrium dissociation constant ของการแตกของ ES complex

ค่า K_i เป็น equilibrium dissociation constant ของการแตกของ EI complex

ค่า α เป็นดัชนีบ่งชี้ผลของตัวยับยั้งต่อการจับของเอ็นไซม์กับตัวถูกย่อยหรือผลของตัวถูกย่อยต่อการจับของเอ็นไซม์กับตัวยับยั้ง

ค่า β เป็นดัชนีบ่งชี้ผลของตัวยับยั้งต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

ถ้าค่า $\beta = 0$ แสดงว่าตัวยับยั้งทำหน้าที่ยับยั้งแบบสมบูรณ์ (complete inhibition) ถ้าค่า β มีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 แสดงว่าตัวยับยั้งทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์บางส่วน (partial inhibition) และถ้าค่า $\beta = 1$ แสดงว่าสารนั้นไม่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง

จากรูปที่ 6.1 แสดงให้เห็นว่าตัวยับยั้งหรือตัวถูกย่อยมีผลต่อการจับกับเอ็นไซม์ ด้วยความสามารถที่เท่ากันคือที่ค่าคงที่ α ดังนั้นได้ค่า αK_s เท่ากับค่า αK_i

พิจารณาปฏิกิริยาควบคู่ที่เกิดการสร้าง ES complex ก่อน

$$E + S \underset{K_S}{\rightleftharpoons} ES \qquad \Delta G = RT\ln(K_s) \qquad (6\text{-}1)$$

$$ES + I \underset{\alpha K_i}{\rightleftharpoons} ESI \qquad \Delta G = RT\ln(\alpha K_i) \qquad (6\text{-}2)$$

ปฏิกิริยาสุทธิของสมการที่ 6-1 และ 6-2 คือ

$$E + S + I \rightleftharpoons ESI \qquad \Delta G = RT\ln(\alpha K_i K_s) \qquad (6\text{-}3)$$

พิจารณาปฏิกิริยาควบคู่ที่เกิดการสร้าง EI complex ก่อน

$$E + I \underset{K_i}{\rightleftharpoons} EI \qquad \Delta G = RT\ln(K_i) \qquad (6\text{-}4)$$

$$EI + S \underset{aK_S}{\rightleftharpoons} ESI \qquad \Delta G = RT\ln(aK_s) \qquad (6\text{-}5)$$

ปฏิกิริยาสุทธิของสมการที่ 6-4 และ 6-5 คือ

$$E + S + I \rightleftharpoons ESI \qquad \Delta G = RT\ln(aK_i K_s) \qquad (6\text{-}6)$$

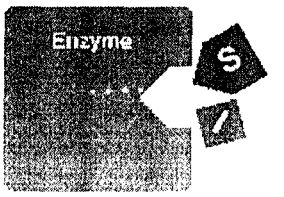
จากบทที่ 3 เราทราบว่าค่า ΔG ไม่ขึ้นอยู่กับวิถีของปฏิกิริยา (path independent) ดังนั้นปฏิกิริยาที่ 6-3 และ 6-6 ให้ค่า ΔG ค่าเดียวกัน ดังนั้น

$$RT\ln(\alpha K_i K_s) = RT\ln(aK_i K_s)$$
$$\alpha K_i K_s = aK_i K_s$$
$$\alpha = a \qquad (6\text{-}7)$$

จากสมการที่ 6-7 จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงค่า K_s โดยตัวยับยั้งมีค่าเท่ากับกับการเปลี่ยนแปลงค่า K_i โดยตัวถูกย่อย

6.2 การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition)

ตัวยับยั้งแบบแข่งขันจะแย่งจับกับตัวถูกย่อยโดยใช้บริเวณจับเดียวกับตัวถูกย่อยโดยจับกับเอ็นไซม์อิสระเท่านั้น ทำให้เกิดเป็น binary complex (EI) อย่างเดียว การจับของตัวยับยั้งนี้แสดงไว้ในรูปที่ 6.2



รูปที่ 6.2 การแย่งจับของตัวยับยั้งแบบแข่งขันกับตัวถูกย่อย (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

กลไกการจับแบบแข่งขันแสดงไว้ดังข้างล่าง

$$\begin{array}{ccccc} E + S & \underset{}{\overset{K_s}{\rightleftharpoons}} & ES & \xrightarrow{k_2} & E + P \\ + & & & & \\ I & & & & \\ \uparrow\downarrow K_i & & & & \\ EI & & & & \end{array}$$

การยับยั้งแบบแข่งขันมีค่า $\alpha = \infty$ และมีค่า $\beta = 0$ จากกลไกข้างบนเอ็นไซม์อิสระจะจับกับตัวถูกย่อยหรือตัวยับยั้งอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากตัวยับยั้งจับกับเอ็นไซม์ที่บริเวณเดียวกับตัวถูกย่อย คือที่บริเวณเร่ง ดังนั้น **โครงสร้างของตัวยับยั้งมักคล้ายกับโครงสร้างของตัวถูกย่อยหรือโครงสร้างของ transition state ของปฏิกิริยา** สามารถลดปริมาณการยับยั้งแบบแข่งขันได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสับเสตรทให้สูงมาก ๆ การหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีตัวยับยั้งแบบแข่งขันทำได้ดังนี้

ที่สภาวะสมดุล กำหนดให้อัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ

$$v_o = k_2[ES] \tag{6-8}$$

$$[E]_t = [E] + [ES] + [EI] \tag{6-9}$$

หารูปเอ็นไซม์ทั้งหมดที่มีอยู่ในปฏิกิริยาจากค่าคงที่การแตกตัวของ ES หรือ EI จะได้

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}; [EI] = \frac{[E][I]}{K_i}$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}; [ES] = \frac{[E][S]}{K_s}$$

หารสมการที่ 6-8 ด้วยสมการ 6-9 แล้วแทนค่า [EI] และ [ES] ลงไป จะได้

$$\frac{v_o}{[E]_t} = \frac{k_2 \frac{[E][S]}{K_s}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][I]}{K_i}} \qquad (6\text{-}10)$$

$$\frac{v_o}{[E]_t} = \frac{k_2 \frac{[\not{E}][S]}{K_s}}{[\not{E}] + \frac{[\not{E}][S]}{K_s} + \frac{[\not{E}][I]}{K_i}}$$

$$v_o = k_2[E]_t \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[I]}{K_i}} \qquad (6\text{-}11)$$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S] + \frac{K_s[I]}{K_i}}$$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_s(1 + \frac{[I]}{K_i})} \qquad (6\text{-}12)$$

จากสมการที่ 6-12 รูปสมการการยับยั้งแบบแข่งขันจะมีการเปลี่ยนแปลงของค่า K_s และที่สภาวะ steady state ค่า K_s จะเทียบเท่ากับค่า K_m ทำให้รูปสมการเปลี่ยนเป็น

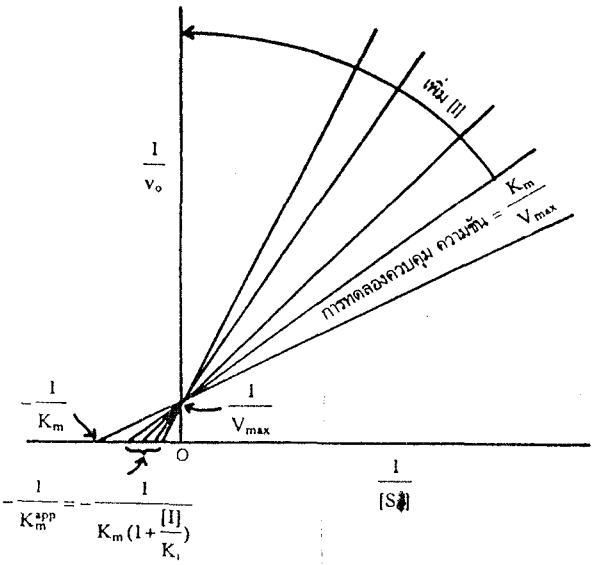
$$\boxed{v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}} \qquad (6\text{-}13)$$

จากสมการที่ 6-13 เรียกค่า K_m ที่เปลี่ยนไปมีค่าเท่ากับ $K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})$ ว่า K_m^{app}

รูปสมการ Lineweaver-Burk ของสมการที่ 6-13 จะเป็น

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{\max}}(1 + \frac{I}{K_i})\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \qquad (6\text{-}14)$$

กราฟที่แสดงการยับยั้งแบบแข่งขันที่แสดงในรูปที่ 6.3 มีจุดตัดบนแกน y มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{V_{\max}}$ ไม่ว่าค่าความเข้มข้นของตัวยับยั้งจะเปลี่ยนไปเท่าใด ส่วนค่าความชันของกราฟจะเพิ่มขึ้นมีค่าเท่ากับ $\frac{K_m^{app}}{V_{\max}} = \frac{K_m}{V_{\max}}(1+\frac{I}{K_i})$ ส่วนค่าจุดตัดบนแกน x ที่เปลี่ยนไปมีค่าเท่ากับ $\frac{1}{K_m^{app}} = \frac{1}{K_m}(1+\frac{I}{K_i})$



รูปที่ 6.3 กราฟ Lineweaver-Burk แสดงการยับยั้งแบบแข่งขัน (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

จากรูปที่ 6.3 ตัวยับยั้งแบบแข่งขันจะไม่มีผลต่ออัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาแต่จะทำให้ค่า K_m เพิ่มขึ้นและค่า slope ของกราฟเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มเข้นของตัวยับยั้งที่เพิ่มขึ้น ส่วนการหาค่า K_i ของการยับยั้งแบบแข่งขันอาจทำได้หลายวิธีเช่นการหาจากสัดส่วนของความชันของกราฟ Lineweaver-Burk ที่ค่าความเข้มข้นของตัวยับยั้งค่าใด ๆ (ในที่นี้ให้เป็น $slope_i$) กับค่าความชันของกราฟที่ไม่มีตัวยับยั้ง ($slope_0$) ดังข้างล่าง

$$\frac{slope_i}{slope_0} = 1+\frac{[I]}{K_i} \qquad (6\text{-}15)$$

จัดเรียงรูปสมการใหม่

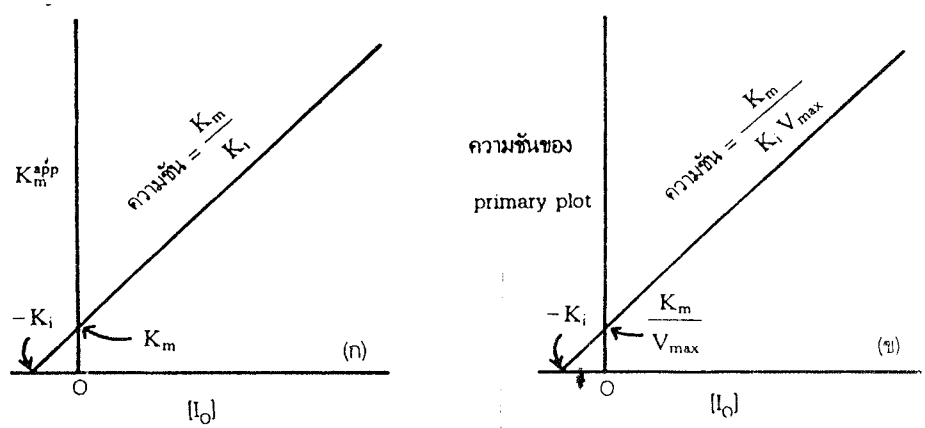
$$K_i = \frac{[I]}{(\frac{slope_i}{slope_0})-1} \qquad (6\text{-}16)$$

หรือหาจาก secondary plot ระหว่างค่า K_m^{app} กับค่า [I] จากความสัมพันธ์ที่ว่า $\frac{1}{K_m^{app}} = \frac{1}{K_m}(1+\frac{I}{K_i})$ หรือ $K_m^{app} = K_m + \frac{K_m}{K_i}[I]$ โดยกราฟที่ได้มีค่าความชันเป็น $\frac{K_m}{K_i}$ มีจุดตัดบนแกน y เป็นค่า K_m และมีจุดตัดบนแกน x มีค่าเป็น $-K_i$ ดังแสดงในรูปที่ 6.4 ก

หรือหาจากกราฟค่าความชันที่ได้จาก primary plot ในสมการที่ 6-14 กับค่า [I] นั่นคือ

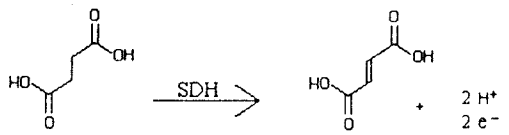
$$\text{ค่าความชัน} = \frac{K_m}{V_{\max}}\left(1+\frac{I}{K_i}\right)$$

สมการค่าความชันเป็นสมการเส้นตรงมีความชันเท่ากับ $\frac{K_m}{K_i V_{\max}}$ มีค่าจุดตัดแกน y เท่ากับ $\frac{K_m}{V_{\max}}$ และมีค่าจุดตัดบนแกน x เท่ากับ $-K_i$ (รูปที่ 6.4 ข)



รูปที่ 6.4 การหาค่า K_i ของการยับยั้งแบบแข่งขันจาก secondary plots (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

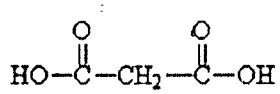
ตัวอย่างกรดมาโลนิก (malonic acid) เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเอ็นไซม์ succinnate dehydrogenase (SDH) ที่เปลี่ยน succinate เป็น fumarate ดังปฏิกิริยา oxidation-reduction ข้างล่าง



succinate fumarate

(แหล่งที่มา: http://bio.classes.ucsc.edu/bio20L/glossary/struc/succ.gif)

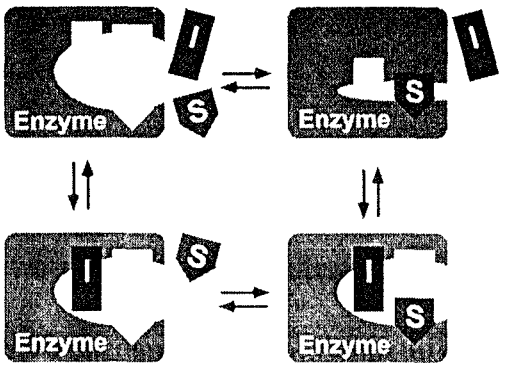
ส่วนกรดมาโลนิกมีโครงสร้างคล้ายกับ succinate (รูปที่ 6.5) ที่สามารถจับกับเอ็นไซม์ที่บริเวณเร่งได้แต่กรดมาโลนิกมีหมู่ methylene ที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา oxidation-reduction ได้เมื่อจับกับเอ็นไซม์



รูปที่ 6.5 โครงสร้างของกรดมาโลนิก (แหล่งที่มา: http://z.about.com/d/chemistry/1/0/c/1/malonic.gif)

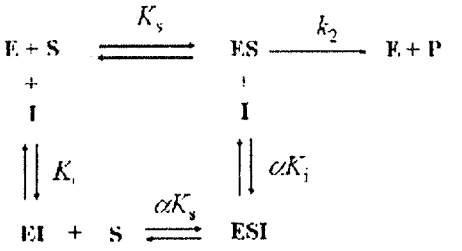
6.3 การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ noncompetitive (noncompetitive inhibition)

ตัวยับยั้งแบบ noncompetitive จะจับอยู่ที่บริเวณเร่งเช่นเดียวกับตัวถูกย่อยแต่เป็นบริเวณที่แยกต่างหากจากบริเวณจับของตัวถูกย่อย ตัวยับยั้งนี้สามารถจับได้ทั้งเอ็นไซม์อิสระและเอ็นไซม์ที่จับอยู่กับตัวถูกย่อย (ES complex) ทำให้เกิดได้ทั้ง EI binary complex และ ESI ternary complex ดังแสดงในรูปที่ 6.6



รูปที่ 6.6 การจับของตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ noncompetitive (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

เนื่องจากบริเวณจับของตัวยับยั้งอยู่คนละบริเวณกับสับเสตรทดังนั้นการจับของตัวยับยั้งไม่มีผลต่อการจับของเอ็นไซม์ต่อตัวถูกย่อย กลไกการทำงานของตัวยับยั้งอาจเขียนได้ดังนี้



การยับยั้งแบบ noncompetitive จะมีค่า $\alpha = 1$ และมีค่า $\beta = 0$ และจากกลไกข้างบนสามารถหาสมการอัตราเร็วของปฏิกิริยาการยับยั้งได้ดังนี้

กำหนดให้

$$v_o = k_2[ES] \qquad (6\text{-}17)$$

$$[E]_t = [E]+[ES]+[EI]+[ESI] \qquad (6\text{-}18)$$

จากค่า $\alpha = 1$ แสดงว่า K_i ของการแตกตัวของ EI ไปเป็น E + I มีค่าเท่ากับค่า K_i ของการแตกตัวของ ESI ไปเป็น ES + I นั่นคือ $K_i = \alpha K_i$ นั่นเอง และสามารถกำหนดรูปของเอ็นไซม์คอมเพลกซ์ [ES] [EI] และ [ESI] ได้จากค่าคงที่การแตกตัวของเอ็นไซม์ดังข้างล่าง

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}; [EI] = \frac{[E][I]}{K_i}$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}; [ES] = \frac{[E][S]}{K_s}$$

$$\alpha K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}; [ESI] = \frac{[ES][I]}{\alpha K_i} = \frac{[E][S][I]}{\alpha K_s K_i}$$

ถ้าหารสมการที่ 6-17 ด้วยสมการที่ 6-18 แล้วแทนค่ารูปของเอ็นไซม์ทั้งหมดลงไปจะได้

$$v_o = k_2[E]_t \frac{\frac{[E][S]}{K_s}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][I]}{K_i} + \frac{[E][S][I]}{\alpha K_s K_i}} \qquad (6\text{-}19)$$

$$v_o = k_2[E]_t \frac{\frac{[\cancel{E}][S]}{K_s}}{[\cancel{E}] + \frac{[\cancel{E}][S]}{K_s} + \frac{[\cancel{E}][I]}{K_i} + \frac{[\cancel{E}][S][I]}{\alpha K_s K_i}}$$

$$v_o = V_{\max} \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S][I]}{\alpha K_s K_i}} \qquad (6\text{-}20)$$

ต่อไปเอา K_s คูณทั้งเศษและส่วนของสมการที่ 6-20 จะได้

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S] + \frac{K_s}{K_i}[I] + \frac{[S][I]}{\alpha K_i}} \qquad (6\text{-}21)$$

จัดเรียงรูปสมการที่ 6-21 ใหม่

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{K_s(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S](1 + \frac{[I]}{\alpha K_i})} \qquad (6\text{-}22)$$

เนื่องจาก $\alpha K_i = K_i$ ดังนั้นสมการที่ 6-22 สามารถลดรูปเป็น

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{(K_s + [S])(1 + \frac{[I]}{K_i})} \qquad (6\text{-}23)$$

ถ้าเอา $(1+\frac{[I]}{K_i})$ หารทั้งเศษและส่วนของสมการที่ 6-23 จะได้

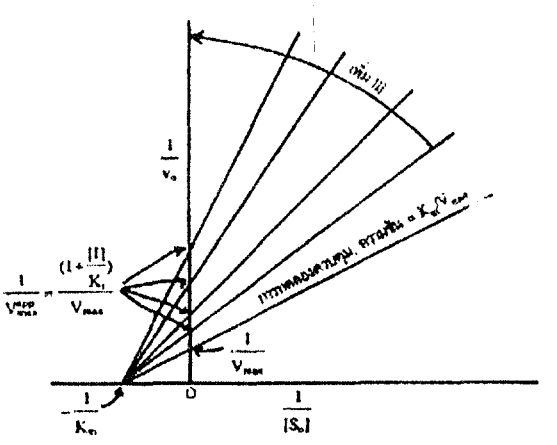
$$v_o = \frac{\frac{V_{max}}{(1+\frac{[I]}{K_i})}[S]}{K_s+[S]} \qquad (6\text{-}24)$$

สมการที่ 6-24 เป็นรูปสมการ Michaelis-Menten ของการยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ noncompetitive ที่มีค่า V_{max} เปลี่ยนไปเป็น $\frac{V_{max}}{(1+\frac{[I]}{K_i})}$ ซึ่งเรียกว่าค่า V_{max}^{app}

ถ้าทำสมการที่ 6-24 ให้เป็นสมการ Lineweaver-Burk จะได้

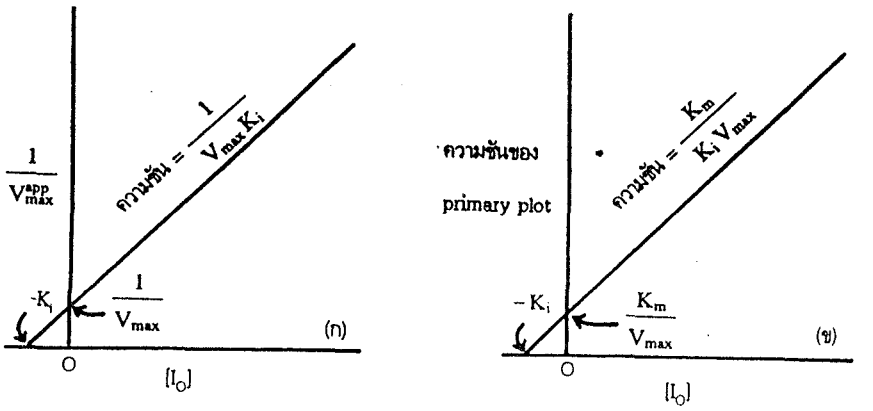
$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{max}}(1+\frac{I}{K_i})\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}(1+\frac{I}{K_i}) \qquad (6\text{-}25)$$

กราฟของสมการที่ 6-25 จะมีลักษณะดังรูปที่ 6.7



รูปที่ 6.7 กราฟ Lineweaver-Burk แสดงการยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ noncompetitive (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

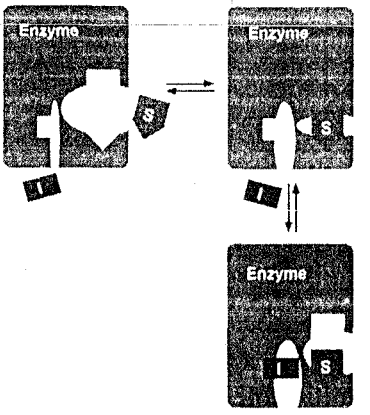
จากกราฟ ความชันของกราฟมีค่าเท่ากับ $\frac{K_m}{V_{max}}(1+[I]/K_i)$ ค่าจุดตัดบนแกน y ของกราฟมีค่าเท่ากับ $1/V_{max}^{app} = 1/V_{max}(1+[I]/K_i)$ และมีจุดตัดบนแกน x ที่ไม่ขึ้นกับค่า [I] ที่เปลี่ยนไปโดยมีค่าเดียวคือ $-1/K_m$ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งนี้ทำให้อัตราเร็วสูงสุดลดลงแต่ไม่มีผลต่อค่า K_m ของปฏิกิริยา การหาค่า K_i ของการยับยั้งก็ทำได้จาก secondary plotsระหว่างค่า $1/V_{max}^{app}$ กับ [I] หรือระหว่างค่าความชันของ primary plot กับ [I] ดังรูปที่ 6.8 ก และ ข จากกราฟทั้งสองค่าจุดตัดบนแกน x แสดงค่า - K_i



รูปที่ 6.8 การหาค่า K_i ของการยับยั้งแบบ noncompetitive จาก secondary plots (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

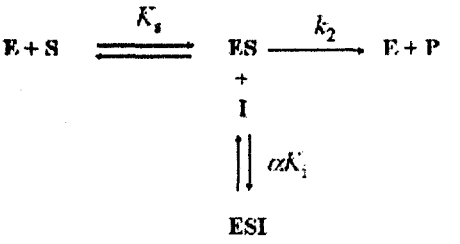
6.4 การยับยั้งแบบ uncompetitive (uncompetitive inhibition)

ตัวยับยั้งชนิดนี้มีบริเวณจับที่อื่นซึ่งไม่ใช่บริเวณเร่งและจะจับกับเอ็นไซม์ในรูป ES complex เท่านั้นจะไม่จับกับเอ็นไซม์อิสระทำให้การจับของเอ็นไซม์กับตัวยับยั้งเกิดเป็น ESI complex อย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 6.9



รูปที่ 6.9 การจับของตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ uncompetitive (แหล่งที่มา: Berg MJ, Timoczko JL and Stryer L, Biochemistry, Chapter 8, online edition)

จากรูปการจับของตัวถูกย่อยทำให้เอ็นไซม์เปลี่ยนโครงรูปจนทำให้ตัวยับยั้งที่ยู่คนละบริเวณสามารถจับเอ็นไซม์ได้ ตัวยับยั้งประเภทนี้ไม่แข่งขันกับตัวถูกย่อยในการเข้าจับกับบริเวณเร่ง และไม่สามารถลดปริมาณการยับยั้งได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสับเสตรท กลไกการทำงานของตัวยับยั้งอาจเขียนได้ดังนี้



การยับยั้งประเภทนี้ให้ค่า $\alpha << 1$ และค่า $\beta = 0$ การหาสมการอัตราเร็วของการยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ uncompetitive หาได้ดังนี้

กำหนดให้

$$v_o = k_2[ES] \qquad (6\text{-}26)$$

$$[E]_t = [E]+[ES]+[ESI] \qquad (6\text{-}27)$$

สามารถกำหนดรูปของเอ็นไซม์คอมเพลกซ์ [ES] และ [ESI] ได้จากค่าคงที่การแตกตัวของเอ็นไซม์ดังข้างล่าง

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]};[ES] = \frac{[E][S]}{K_s}$$

$$\alpha K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]};[ESI] = \frac{[ES][I]}{\alpha K_i} = \frac{[E][S][I]}{\alpha K_s K_i}$$

หารสมการที่ 6-26 ด้วยสมการที่ 6-27 แล้วแทนค่ารูปของเอ็นไซม์ลงไปจะได้

$$v_o = k_2[E]_t \frac{\frac{[E][S]}{K_s}}{[E]+\frac{[E][S]}{K_s}+\frac{[E][S][I]}{\alpha K_s K_i}} \qquad (6\text{-}28)$$

$$v_o = k_2[E]_t \frac{\frac{[E][S]}{K_s}}{[E]+\frac{[E][S]}{K_s}+\frac{[E][S][I]}{\alpha K_s K_i}}$$

$$v_o = V_{\max} \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1+\frac{[S]}{K_s}+\frac{[S][I]}{\alpha K_s K_i}} \qquad (6\text{-}29)$$

ต่อไปเอา K_s คูณทั้งเศษและส่วนของสมการที่ 6-29 จะได้

$$v_o = V_{\max}\frac{[S]}{K_s + [S] + \frac{[S][I]}{\alpha K_i}} \qquad (6\text{-}30)$$

จัดรูปสมการที่ 6-30 ใหม่จะได้

$$v_o = V_{\max}\frac{[S]}{K_s + [S](1 + \frac{[I]}{\alpha K_i})} \qquad (6\text{-}31)$$

และเอาค่า $(1+\frac{[I]}{\alpha K_i})$ หารทั้งเศษและส่วนของสมการที่ 6-31 จะได้

$$\boxed{v_o = \frac{\frac{V_{\max}}{(1+\frac{[I]}{\alpha K_i})}[S]}{\frac{K_s}{(1+\frac{[I]}{\alpha K_i})} + [S]}} \qquad (6\text{-}32)$$

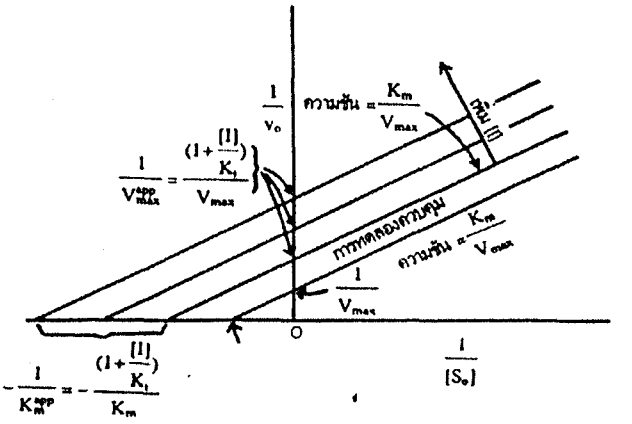
สมการที่ 6-32 เป็นรูปสมการ Michaelis-Menten ของการยับยั้งแบบ uncompetitive ที่สมดุลให้ $K_s = K_m$ จะเห็นว่าตัวยับยั้งจะไปมีผลต่อการลดลงของอัตราเร็วสูงสุดและค่า K_m ของปฏิกิริยาโดยที่ค่า

$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}}{(1+\frac{[I]}{\alpha K_i})}$ และ $K_m^{app} = \frac{K_m}{(1+\frac{[I]}{\alpha K_i})}$

ถ้าทำสมการที่ 6-32 ให้เป็นสมการ Lineweaver-Burk จะได้

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{\max}}\frac{1}{[S]} + \frac{(1+\frac{[I]}{K_i})}{V_{\max}} \qquad (6\text{-}33)$$

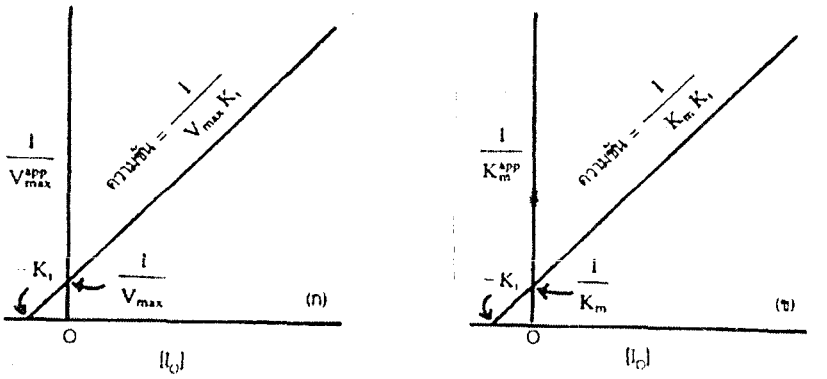
กราฟของสมการที่ 6-33 จะมีลักษณะดังรูปที่ 6.9



รูปที่ 6.9 กราฟ Lineweaver-Burk แสดงการยับยั้งแบบ uncompetitive (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

จากกราฟค่าความชันของกราฟไม่เปลี่ยนที่ความเข้มข้นของตัวยับยั้งเพิ่มขึ้นคือมีค่าเท่ากับ $\frac{K_m}{V_{\max}}$ ส่วนจุดตัดบนแกน y ของกราฟมีค่าเท่ากับ $\frac{1}{V_{\max}^{app}} = \frac{1}{V_{\max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)$ และจุดตัดบนแกน x จะ เปลี่ยนไปมีค่าเท่ากับ $-\frac{1}{K_m^{app}} = -\frac{1}{K_m}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)$ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งประเภทนี้มีผลต่อการลดลงทั้งอัตราเร็วสูงสุดและค่า K_m ของปฏิกิริยา

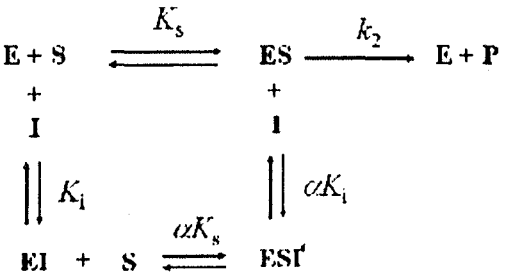
การหาค่า K_i ของการยับยั้งก็ทำได้จาก secondary plotsระหว่างค่า $1/V_{\max}^{app}$ กับค่า [I] หรือระหว่างค่า $\frac{1}{K_m^{app}}$ กับค่า [I] ดังรูปที่ 6.10 ก และ ข ตามลำดับ จากกราฟทั้งสองค่าจุดตัดบนแกน x แสดงค่า - K_i



รูปที่ 6.10 การหาค่า K_i ของการยับยั้งแบบ uncompetitive จาก secondary plots (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

6.5 การยับยั้งแบบผสม (mixed inhibition)

การยับยั้งแบบผสมมีกลไกคล้ายกับการยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ noncompetitive โดยที่มีค่า $\alpha < 1$ หรือ $\alpha > 1$ และค่า $\beta = 0$ ขณะที่ตัวยับยั้งแบบ noncompetitive จะให้ค่า $\alpha = 1$ และค่า $\beta = 0$



ในกรณีนี้ค่า αK_i จะไม่เท่ากับค่า K_i สามารถสมการอัตราเร็วเขียนได้ดังนี้

กำหนดให้

$$v_o = k_2[ES] \tag{6-34}$$

$$[E]_t = [E]+[ES]+[EI]+[ESI] \tag{6-35}$$

ที่ค่า $\alpha \neq 1$ สามารถกำหนดรูปของเอ็นไซม์คอมเพลกซ์ [ES] [EI] และ [ESI] ได้จากค่าคงที่การแตกตัวของเอ็นไซม์ดังข้างล่าง

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]};[EI] = \frac{[E][I]}{K_i}$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]};[ES] = \frac{[E][S]}{K_s}$$

$$\alpha K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]};[ESI] = \frac{[ES][I]}{\alpha K_i} = \frac{[E][S][I]}{\alpha K_s K_i}$$

ต่อไปหารสมการที่ 6-34 ด้วยสมการที่ 6-35 แล้วแทนค่ารูปของเอ็นไซม์ทั้งหมดลงไปจะได้

$$v_o = k_2[E]_t \frac{\frac{[E][S]}{K_s}}{[E]+\frac{[E][S]}{K_s}+\frac{[E][I]}{K_i}+\frac{[E][S][I]}{\alpha K_s K_i}} \tag{6-36}$$

$$v_o = k_2[E]_t \frac{\frac{[\cancel{E}][S]}{K_s}}{[\cancel{E}]+\frac{[\cancel{E}][S]}{K_s}+\frac{[\cancel{E}][I]}{K_i}+\frac{[\cancel{E}][S][I]}{\alpha K_s K_i}}$$

$$v_o = V_{\max} \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1+\frac{[S]}{K_s}+\frac{[I]}{K_i}+\frac{[S][I]}{\alpha K_s K_i}} \tag{6-37}$$

ต่อไปเอา K_s คูณทั้งเศษและส่วนของสมการที่ 6-37 จะได้

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{K_s+[S]+\frac{K_s}{K_i}[I]+\frac{[S][I]}{\alpha K_i}} \tag{6-38}$$

จัดเรียงรูปสมการที่ 6-38 ใหม่จะได้

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{K_s(1+\frac{[I]}{K_i})+[S](1+\frac{[I]}{\alpha K_i})} \tag{6-39}$$

และเอาค่า $(1+\frac{[I]}{\alpha K_i})$ หารทั้งเศษและส่วนของสมการที่ 6-39 พร้อมทั้งพิจารณาค่า $K_s = K_m$ จะได้

$$v_o = \frac{\frac{V_{max}}{1+\frac{[I]}{\alpha K_i}}[S]}{K_m\left(\frac{1+\frac{[I]}{K_i}}{1+\frac{[I]}{\alpha K_i}}\right)+[S]} \qquad (6\text{-}40)$$

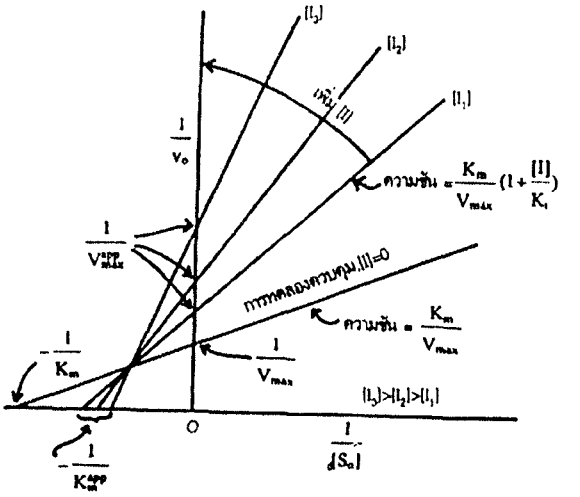
สมการที่ 6-40 เป็นรูปของสมการ Michaelis-Menten ของการยับยั้งแบบผสม จะเห็นว่าตัวยับยั้งจะไปมีผลต่อการลดทั้งอัตราเร็วสูงสุดและค่า K_m ของปฏิกิริยาโดยที่ค่า V_{max}^{app} และ ค่า K_m^{app} มีค่าดังนี้

$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{(1+\frac{[I]}{\alpha K_i})} \text{ และ } K_m^{app} = K_m\left(\frac{1+\frac{[I]}{K_i}}{1+\frac{[I]}{\alpha K_i}}\right)$$

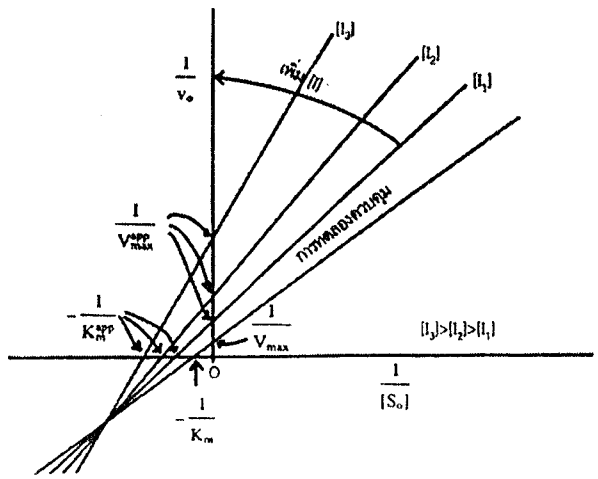
ทำสมการที่ 6-40 ให้เป็นสมการ Lineweaver-Burk จะได้

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{(1+\frac{[I]}{\alpha K_i})}{V_{max}} \qquad (6\text{-}41)$$

กราฟของสมการที่ 6-41 ที่ค่า $\alpha > 1$ (หรือ $\alpha K_i > K_i$) จะมีลักษณะจุดตัดร่วมที่อยู่หนือแกน x ดังรูปที่ 6.11 และที่ค่า $\alpha < 1$ (หรือ $\alpha K_i < K_i$) จะมีลักษณะจุดตัดร่วมที่อยู่ใต้แกน x ดังรูปที่ 6.12

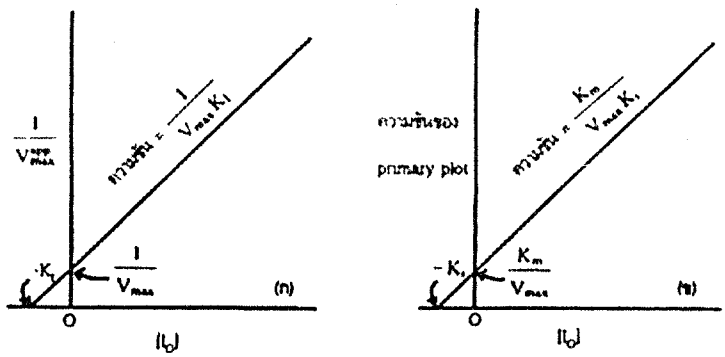


รูปที่ 6.11 กราฟ Lineweaver-Burk แสดงการยับยั้งแบบผสมที่ค่า $\alpha > 1$ (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)



รูปที่ 6.12 กราฟ Lineweaver-Burk แสดงการยับยั้งแบบผสมที่ค่า $\alpha < 1$ (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

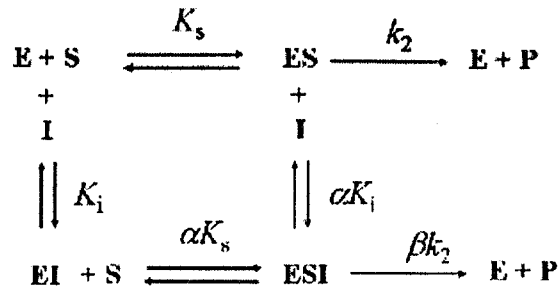
สามารถหาค่า K_i ได้จาก secondary plot ระหว่างค่าความชันของ primary plot กับค่า [I] ดังรูปที่ 6.13 ก และหาค่า αK_i ได้จาก secondary plot ระหว่างค่า $\frac{1}{V_{\max}^{app}}$ กับค่า [I] ดังรูปที่ 6.13 ข



รูปที่ 6.13 การหาค่า K_i และ αK_i ของการยับยั้งแบบผสม (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 7, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

6.6 การยับยั้งบางส่วน (partial inhibition)

ตัวยับยั้งบางตัวไม่สามารถทำให้เอ็นไซม์สูญเสียการทำงานได้อย่างสมบูรณ์ แต่เอ็นไซม์ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาสร้างผลิตภัณฑ์ได้แต่ไม่เต็มที่ เรียกตัวยับยั้งนั้นว่าเป็นตัวยับยั้งบางส่วน ในการยับยั้งประเภทนี้มีค่า $\beta \neq 0$ แต่ค่า β จะอยู่ระหว่าง 0-1 กลไกการยับยั้งอาจแสดงได้ดังข้างล่าง .



จากกลไกข้างบนสามารถเขียนอัตราเร็วของปฏิกิริยาการยับยั้งบางส่วนได้ดังนี้

$$\begin{aligned} v_o &= k_2[ES] + \beta k_2[ESI] \\ &= k_2[ES] + \beta k_2 \frac{[ES][I]}{\alpha K_i} \\ &= k_2[ES]\left(1 + \frac{\beta k_2[I]}{\alpha k_2 K_i}\right) \end{aligned} \qquad (6\text{-}42)$$

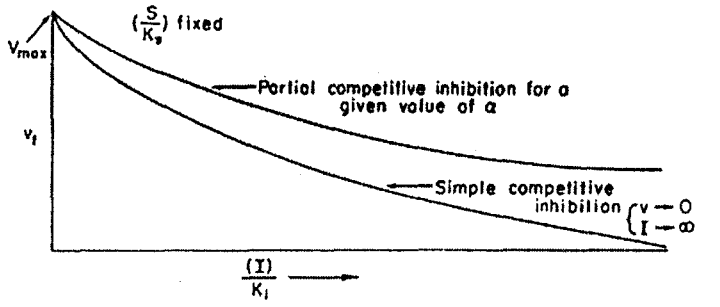
สมการ 6-42 สามารถเขียนในรูปของสมการ Michaelis-Menten ได้เป็น

$$v_o = \frac{V_{\max}\dfrac{\left(1+\dfrac{\beta[I]}{\alpha k_2 K_i}\right)}{\left(1+\dfrac{[I]}{\alpha K_i}\right)}[S]}{K_m\dfrac{\left(1+\dfrac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1+\dfrac{[I]}{\alpha K_i}\right)} + [S]} \qquad (6\text{-}43)$$

โดยที่ค่า $V_{\max}^{app} = V_{\max}\dfrac{\left(1+\dfrac{\beta[I]}{\alpha k_2 K_i}\right)}{\left(1+\dfrac{[I]}{\alpha K_i}\right)}$ และ $K_m^{app} = K_m\dfrac{\left(1+\dfrac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1+\dfrac{[I]}{\alpha K_i}\right)}$

ข้อแตกต่างในการจำแนกการยับยั้งบางส่วนจากการยับยั้งแบบสมบูรณ์คือกราฟ Lineweaver-Burk ของการยับยั้งบางส่วนจะเป็นเส้นตรงแต่ secondary plot จะไม่เป็นเส้นตรง

ถ้าวาดกราฟระหว่างค่าอัตราเร็วกับค่า $\dfrac{[I]}{K_i}$ จะแสดงการลดลงของอัตราเร็วที่ไม่ถึงจุดศูนย์ที่ค่า $[I] \to \infty$ ดังแสดงในรูปที่ 6.14



รูปที่ 6.14 แสดงผลของการยับยั้งบางส่วนต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา (แหล่งที่มา: Kuby SA, A study of enzymes: enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding, volume 1, CRC Press, Inc., USA)

แบบฝึกหัดทบทวน

เอ็นไซม์ β-galactosidase เร่งปฏิกิริยาข้างล่าง

$$pNP-\beta-D-galactoside \xrightarrow[enzyme]{} pNP+\beta-D-galactose$$

สามารถวัดหาค่า *p*NP ที่เกิดขึ้นได้ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เมื่อทำการวัดหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยานี้ที่ความเข้มข้นของตัวถูกย่อยต่าง ๆ เทียบกับอัตราเร็วเมื่อมีตัวยับยั้งตัวที่ 1 และตัวที่ 2 ให้ผลการทดลองดังตารางข้างล่าง

[S] (μM)	Velocity (μmoles/min)		
	No inhibitor	**inhibitor I (2 mM)**	**inhibitor II (100 μM)**
3	10.4	4.1	2.1
5	14.5	6.4	2.9
10	22.5	11.3	4.5
30	33.8	22.6	6.8
90	40.5	33.8	8.1

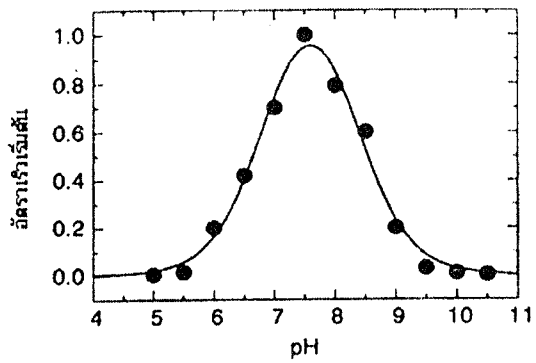
1. ให้หาค่า K_m และ V_{max} ของปฏิกิริยานี้
2. บอกชนิดของตัวยับยั้งตัวที่ 1 และตัวยับยั้งตัวที่ 2 ว่าเหมือนหรือต่างกันอย่างไร
3. เขียนสมการการยับยั้งพร้อมแสดงการหาค่า K_i ของตัวยับยั้งทั้งสองว่ามีค่าเท่าไร
4. ในสภาวะที่ไม่มีตัวยับยั้งพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงเรื่อย ๆ ที่ความเข้มข้นของ *pNP* − β − *D* − *galactoside* มากกว่า 150 μM จงแสดงให้เห็นว่าสับเสตรททำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งได้อย่างไร และบอกชนิดของการยับยั้งว่าเป็นชนิดอะไร
5. ใช้ข้อมูลใดตัดสินว่าตัวยับยั้งที่ศึกษาทำหน้าที่ยับยั้งเอ็นไซม์แบบบางส่วน

บทที่ 7
ผลของ pH และอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์

การทำงานของเอ็นไซม์ขึ้นกับ pH อยู่หลายประการเช่น ค่า pH มีผลโดยตรงกับหมู่แตกตัวที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา หรือโปรตีนสามารถทนช่วงของ pH ได้จำกัด โปรตีนส่วนใหญ่จะเสียสภาพที่ pH สูงหรือต่ำมาก ๆ หรือองค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ก็มีส่วนอย่างมากในการคงสภาพของโปรตีน ส่วนอุณหภูมมีผลโดยตรงต่อพลังงานจลน์ของเอ็นไซม์และตัวถูกข่อย นอกจากนี้เอ็นไซม์จะคงสภาพอยู่ได้ที่อุณหภูมิไม่เท่ากัน ในบทนี้จะใช้ความรู้ทางจลนพลศาสตร์หรือเทอร์โมไดนามิกส์ทำการวิเคราะห์ผลของ pH และอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาและการคงสภาพของเอ็นไซม์

7.1 ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ตามแบบจำลองของ Michaelis-Menten

เอ็นไซม์ส่วนใหญ่คงสภาพในช่วง 4-5 หน่วยของ pH และการเร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแตกตัวของหมู่แตกตัวที่บริเวณเร่งซึ่งก็ขึ้นกับค่า pK_a ของการแตกตัวและค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาณโปรตอน $[H^+]$ ที่อยู่ในสารละลายมีบทบาทต่อการทำงานของเอ็นไซม์โดยตรง กราฟอัตราเร็วของเอ็นไซม์กับค่า pH ของเอ็นไซม์ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นโค้งรูประฆังคว่ำแบบสมมาตร ดังแสดงในรูปที่ 7.1

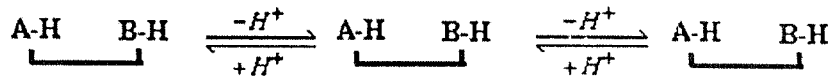


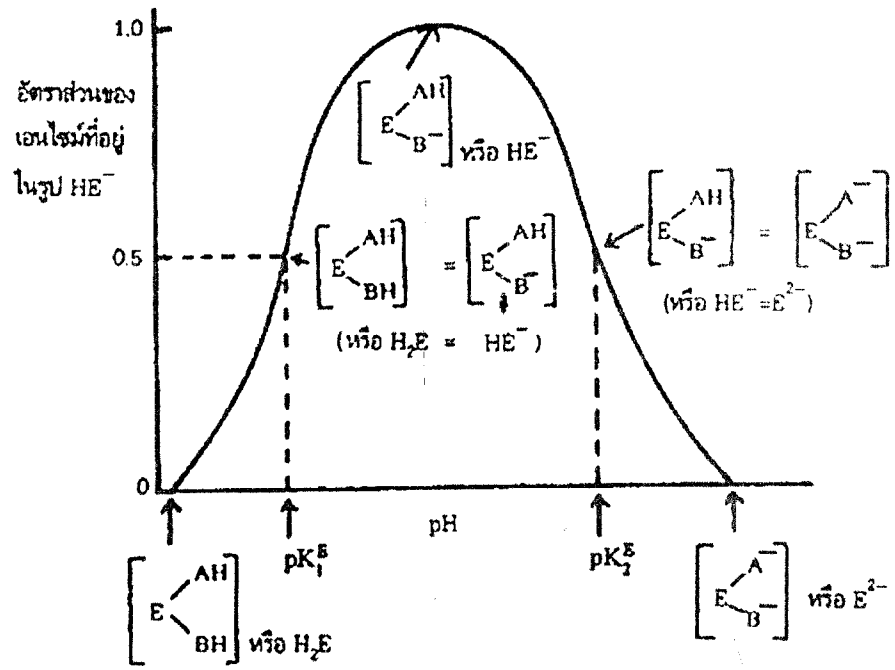
รูปที่ 7.1 ผลของ pH ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ส่วนใหญ่ (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 7, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

จากกราฟเรียกค่า pH ที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่าสูงสุดว่า *"optimum pH หรือ pH^{opt}"* ส่วนเส้นกราฟที่อยู่ที่ด้านที่มี pH ต่ำกว่า pH^{opt} แสดงอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้นน ส่วนเส้นกราฟที่ pH สูงกว่า pH^{opt} แสดงอัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น

Michaelis-Menten ได้เสนอแบบจำลองผลของ pH ต่อการทำงานของเอ็นไซม์ว่าเอ็นไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยมีหมู่แตกตัวสองหมู่ หมู่แตกตัวหมู่ที่หนึ่งทำหน้าที่เป็น conjugate acid (A-H) อยู่ในสภาพ protonated ส่วนหมู่แตกตัวหมู่ที่สองทำน้าที่เป็น conjugate base (B^-) ซึ่งอยู่ในรูป deprotonated

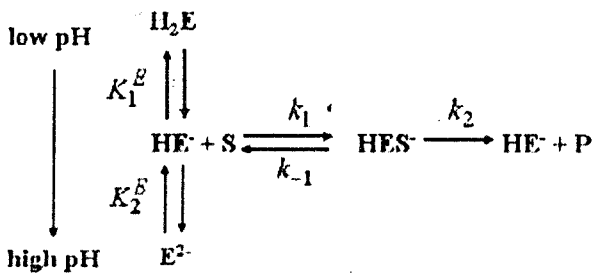
ถ้าให้ K_1^E และ K_2^E เป็นค่าคงที่การแตกตัวของกรด (acid dissociation constant) ของหมู่ BH และ AH ตามลำดับ หมู่ BH เป็นกรดแก่กว่าจะทำให้ค่า $K_1^E > K_2^E$ อาจเขียนรูปของเอ็นไซม์ได้เป็น A-H B-H หรือเขียนรูปของเอ็นไซม์ที่หมู่ทั้งสองยังไม่แตกตัวเป็น H_2E ส่วนรูป HE^- เป็นรูปของเอ็นไซม์ที่มีหมู่แตกตัวหนึ่งหมู่คือ B^- และรูปที่เอ็นไซม์มีหมู่ทั้งสองแตกตัวคือ E^{2-} การแตกตัวของเอ็นไซม์อาจแสดงได้ดังรูปที่ 7.2





รูปที่ 7.2 ผลของ pH ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ทั่ว ๆ ไป (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 8, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

กลไกข้างล่างแสดงการแตกตัวของเอ็นไซม์และการจับกันของเอ็นไซม์กับตัวถูกย่อยตามแบบจำลองของ Michaelis-Menten



กลไกนี้แสดงถึงองค์ประกอบเอ็นไซม์ที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว H_2E ที่ pH ต่ำ ๆ และเมื่อ pH ของสารละลายสูงขึ้นหมู่กรดที่แก่กว่าจะแตกตัวให้รูปของเอ็นไซม์ HE^- ที่ pH ของสารละลายมีค่าสูงมาก ๆ หมู่กรดอ่อนจะแตกตัวให้รูปของเอ็นไซม์ E^{2-} รูปของเอ็นไซม์ H_2E และ E^{2-} เป็นรูปที่เอ็นไซม์ทำงานได้น้อย ส่วนรูปของ HE^- เป็นรูปของเอ็นไซม์รูปเดียวที่ทำงานได้ดีและจับกับตัวถูกย่อยสร้างเป็น HES^- complex ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ P ได้ต่อไป

จากกลไกตามข้อเสนอของ Michaelis-Menten สามารถกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้เป็น

$$v_o = k_2[HES^-] \tag{7-1}$$

รูปของเอ็นไซม์ทั้งหมดมีสี่รูปคือ

$$[E]_t = [H_2E] + [HES^-] + [HE^-] + [E^{2-}] \tag{7-2}$$

จากค่าคงที่การแตกตัวข้างล่าง

$$K_1^E = \frac{[HE^-][H^+]}{[H_2E]}$$

$$K_2^E = \frac{[E^{2-}][H^+]}{[HE^-]}$$

$$K_m = \frac{[HE^-][S]}{[HES^-]}$$

สามารถหารูปของเอ็นไซม์ $[H_2E]$ $[HE^-]$ และ $[E^{2-}]$ ได้

$$[HE^-] = \frac{K_m[HES^-]}{[S]}$$

$$[H_2E] = \frac{[HE^-][H^+]}{K_1^E} = \frac{K_m[HES^-][H^+]}{K_1^E[S]}$$

$$[E^{2-}] = \frac{K_2^E[HE^-]}{[H^+]} = \frac{K_mK_2^E[HES^-]}{[S][H^+]}$$

ต่อไปหารสมการที่ 7-1 ด้วยสมการ 7-2 แล้วแทนค่ารูปของเอ็นไซม์แต่ละรูปลงไปจะได้

$$v_o = k_2[E]_t \frac{[HES^-]}{[HES^-] + [H_2E] + [HE^-] + [E^{2-}]} \tag{7-3}$$

$$v_o = k_2[E]_t \frac{[HES^-]}{[HES^-] + \frac{K_m[HES^-][H^+]}{K_1^E[S]} + \frac{K_m[HES^-]}{[S]} + \frac{K_m K_2^E[HES^-]}{[S][H^+]}}$$

$$v_o = k_2[E]_t \frac{[\cancel{HES^-}]}{[\cancel{HES^-}] + \frac{K_m[\cancel{HES^-}][H^+]}{K_1^E[S]} + \frac{K_m[\cancel{HES^-}]}{[S]} + \frac{K_m K_2^E[\cancel{HES^-}]}{[S][H^+]}}$$

$$v_o = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m[H^+]}{K_1^E[S]} + \frac{K_m}{[S]} + \frac{K_m K_2^E}{[S][H^+]}} \qquad (7\text{-}4)$$

เอา [S] คูณทั้งเศษและส่วนจะได้

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + \frac{K_m[H^+]}{K_1^E} + K_m + \frac{K_m K_2^E}{[H^+]}} \qquad (7\text{-}5)$$

จัดเรียงสมการใหม่ได้

$$\boxed{v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m\left(1 + \frac{[H^+]}{K_1^E} + \frac{K_2^E}{[H^+]}\right)}} \qquad (7\text{-}6)$$

สมการที่ 7-6 เป็นรูปสมการ Michaelis-Menten ที่มีการยับยั้งแบบแข่งขันโดยมีค่า K_m เปลี่ยนไปมีค่าเท่ากับ $K_m^{app} = K_m\left(1 + \frac{[H^+]}{K_1^E} + \frac{K_2^E}{[H^+]}\right)$

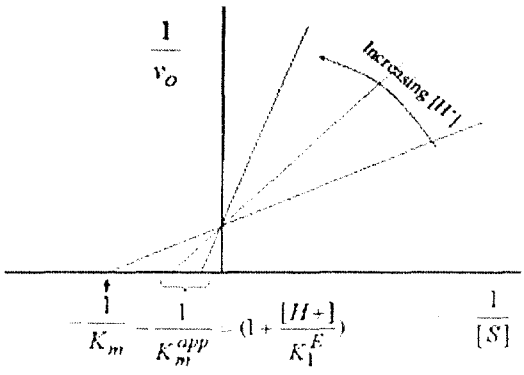
ต่อไปพิจารณาผลของ pH เป็นสองกรณีคือ

1) ที่ช่วง pH ต่ำ ๆ

จะพบว่าค่า $\frac{[H^+]}{K_1^E} >> \frac{K_2^E}{[H^+]}$ หรือ $K_1^E >> K_2^E$ รูปสมการอัตราเร็วจะเปลี่ยนรูปเป็น

$$\boxed{v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m\left(1 + \frac{[H^+]}{K_1^E}\right)}} \qquad (7\text{-}7)$$

สมการที่ 7-7 แสดงถึงการลดลงของอัตราเร็วเมื่อความเข้มข้นของโปรตอนเพิ่มขึ้นโดยโปรตอนทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันและค่า K_i ของการยับยั้งมีค่าเท่ากับ K_1^E (รูปที่ 7.3)



รูปที่ 7.3 การยับยั้งแบบแข่งขันของโปรตอนต่อการทำงานของเอ็นไซม์ที่ช่วง pH ต่ำ ๆ

2) ที่ช่วง pH สูงๆ

จะพบว่าค่า $\frac{K_2^E}{[H^+]} >> \frac{[H^+]}{K_1^E}$ หรือ $K_2^E >> K_1^E$ รูปสมการอัตราเร็วจะเปลี่ยนรูปเป็น

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m\left(1 + \frac{K_2^E}{[H^+]}\right)} \qquad (7\text{-}8)$$

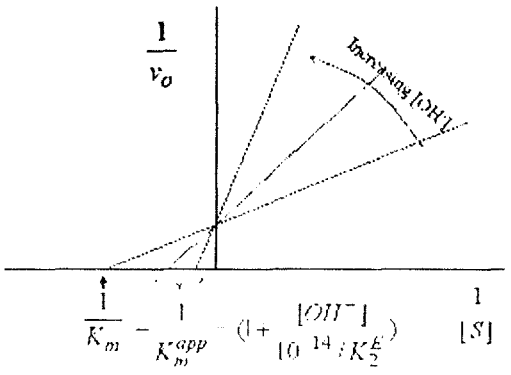
ถ้าให้ $[H^+][OH^-] = 10^{-14}$ จะได้ว่า

$$[H^+] = \frac{10^{-14}}{[OH^-]} \qquad (7\text{-}9)$$

แทนค่า $[H^+]$ จากสมการที่ 7-9 ลงในสมการที่ 7-8 จะได้

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m\left(1 + \frac{[OH^-]}{\frac{10^{-14}}{K_2^E}}\right)} \qquad (7\text{-}10)$$

สมการที่ 7-10 แสดงถึงการลดลงของอัตราเร็วเมื่อ $[OH^-]$ เพิ่มขึ้นโดย OH^- ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันและค่า K_i ของการยับยั้งมีค่าเท่ากับ $10^{-14} / K_2^E$ (รูปที่ 7.4)



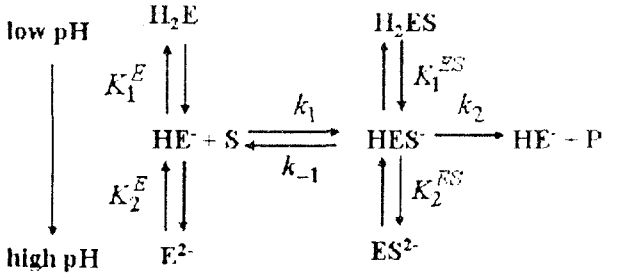
รูปที่ 7.4 การยับยั้งแบบแข่งขันของ OH^- ต่อการทำงานของเอ็นไซม์ที่ช่วง pH สูง ๆ

ถ้าพิจารณากราฟผลของ pH ต่ออัตราเร็วในรูปที่ 7.1 จะเห็นว่าที่ช่วง pH ต่ำกว่า pH^{opt} เอ็นไซม์จะทำงานได้ไม่เต็มที่เนื่องจากแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ถูกยับยั้งด้วย H^+ ส่วนที่ช่วง pH สูงกว่า pH^{opt} แอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ลดลงเนื่องจากผลของ OH^-

7.2 ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ตามแบบจำลองของ Waley

จากสมการอัตราเร็วที่ได้ (สมการที่ 7-6) พบว่า H^+ และ OH^- มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ โดยการเพิ่มค่า K_m ของเอ็นไซม์ต่อตัวถูกย่อย แต่ไอออนทั้งสองชนิดไม่ได้เปลี่ยนอัตราเร็วสูงสุดของเอ็นไซม์เลย

ในปี 1953 Waley ได้ดัดแปลงกลไกตามข้อเสนอของ Michaelis-Menten ใหม่ โดยเสนอว่านอกจากรูปของเอ็นไซม์อิสระจะแตกตัวได้แล้ว รูปของเอ็นไซม์คอมเพลกซ์ (HES^-) ก็สามารถแตกตัวได้ด้วยดังแสดงข้างล่าง



จากข้อเสนอของ Waley พบว่าที่ pH ต่ำกว่าค่า pK_a ของหมู่แตกตัวที่เป็นกรดแก่กว่า เอ็นไซม์ HES^- สามารถรวมกับโปรตอนเกิดเป็นรูปที่ไม่แตกตัวคือ H_2ES โดยมีค่าคงที่การแตกตัวเท่ากับ K_1^{ES} ในทำนองเดียวกันที่ช่วงของ pH สูงกว่าค่า pK_a ของหมู่ที่เป็นกรดอ่อน เอ็นไซม์ HES^- จะแตกตัวต่อไปให้รูปของ ES^{2-} โดยมีค่าคงที่การแตกตัวมีค่าเท่ากับ K_2^{ES}

จากกลไกของ Waley สามารถกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้เป็น

$$v_o = k_2[HES^-] \tag{7-11}$$

รูปของเอ็นไซม์ทั้งหมดมีหกรูปคือ

$$[E]_t = [H_2E]+[HES^-]+[HE^-]+[E^{2-}]+[H_2ES]+[ES^{2-}] \tag{7-12}$$

หารสมการที่ 7-11 ด้วยสมการ 7-12 แล้วทำการหารูปของเอ็นไซม์จากค่าคงที่การแตกตัวแล้วแทนค่าเอ็นไซม์แต่ละรูปโดยใช้หลักการเดียวกับการหาสมการอัตราเร็วตามข้อเสนอของ Michaelis-Menten จะได้

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S]\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{ES}}+\frac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)+K_m\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{E}}+\frac{K_2^{E}}{[H^+]}\right)} \tag{7-13}$$

หารสมการ 7-13 ทั้งเศษและส่วนด้วย $\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{ES}}+\frac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)$ จะได้

$$v_o = \frac{\frac{V_{\max}[S]}{\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{ES}}+\frac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)}}{[S]+K_m\frac{\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{E}}+\frac{K_2^{E}}{[H^+]}\right)}{\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{ES}}+\frac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)}} \tag{7-14}$$

จะเห็นว่ารูปสมการที่ 7-14 เป็นสมการอัตราเร็วของการยับยั้งแบบผสมที่มีค่าอัตราเร็วสูงสุดเปลี่ยนไปมีค่า

$$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}}{\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{ES}}+\frac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)} \tag{7-15}$$

ส่วนค่า K_m ที่เปลี่ยนไปมีค่า

$$K_m^{app} = K_m\frac{\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{E}}+\frac{K_2^{E}}{[H^+]}\right)}{\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{ES}}+\frac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)} \tag{7-16}$$

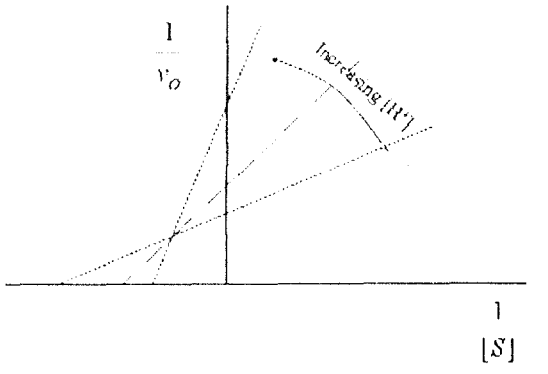
และค่า $$\frac{V_{\max}^{app}}{K_m^{app}} = \frac{V_{\max}}{K_m\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^E}+\frac{K_2^E}{[H^+]}\right)} \qquad (7\text{-}17)$$

1) ที่ช่วง pH ต่ำ ๆ

จะพบว่าค่า $\frac{[H^+]}{K_1^E} >> \frac{K_2^E}{[H^+]}$ และ $\frac{[H^+]}{K_1^{ES}} >> \frac{K_2^{ES}}{[H^+]}$ สมการอัตราเร็วเปลี่ยนรูปเป็น

$$v_o = \frac{\dfrac{V_{\max}}{\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_1^{ES}}\right)}[S]}{K_m\dfrac{\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_1^E}\right)}{\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_1^{ES}}\right)}+[S]} \qquad (7\text{-}18)$$

จากสมการที่ 7-18 ตัวโปรตอนทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบผสมที่ช่วงของ pH ต่ำ ๆ ดังแสดงในรูปที่ 7.5



รูปที่ 7.5 การยับยั้งแบบผสมของโปรตอนต่อการทำงานของเอ็นไซม์ที่ช่วง pH ต่ำ ๆ

2) ที่ช่วง pH สูงๆ

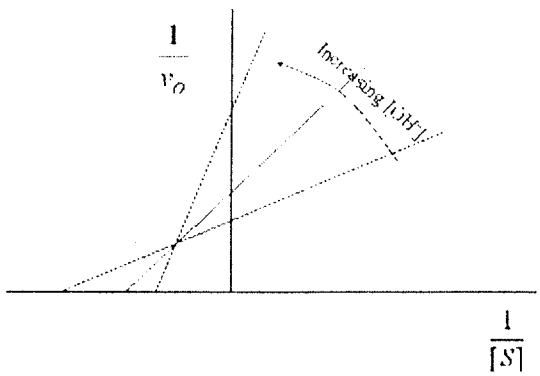
จะพบว่าค่า $\frac{K_2^E}{[H^+]} >> \frac{[H^+]}{K_1^E}$ และ $\frac{K_2^{ES}}{[H^+]} >> \frac{[H^+]}{K_1^{ES}}$ รูปสมการอัตราเร็วเปลี่ยนรูปเป็น

$$v_o = \frac{\dfrac{V_{\max}}{\left(1+\dfrac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)}[S]}{K_m\dfrac{\left(1+\dfrac{K_2^{E}}{[H^+]}\right)}{\left(1+\dfrac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)}+[S]} \qquad (7\text{-}19)$$

แทนค่า $[H^+]$ ด้วย $[H^+]=\dfrac{10^{-14}}{[OH^-]}$ ลงในสมการที่ 7-19 จะได้

$$v_o = \frac{\dfrac{V_{\max}}{\left(1+\dfrac{[OH^-]}{10^{-14}/K_2^{ES}}\right)}[S]}{K_m\dfrac{\left(1+\dfrac{[OH^-]}{10^{-14}/K_2^{E}}\right)}{\left(1+\dfrac{[OH^-]}{10^{-14}/K_2^{ES}}\right)}+[S]} \qquad (7\text{-}20)$$

สมการที่ 7-20 แสดงถึงการลดลงของอัตราเร็วเมื่อ $[OH^-]$ เพิ่มขึ้นโดย OH^- ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบผสมในช่วง pH สูง (รูปที่ 7.6)



รูปที่ 7.6 การยับยั้งแบบผสมของ OH^- ต่อการทำงานของเอ็นไซม์ที่ช่วง pH สูง ๆ

กราฟในรูปที่ 7.5 จะเป็นจริงถ้าค่า $K_1^{ES} > K_1^{E}$ และกราฟในรูปที่ 7.6จะเป็นจริงถ้าค่า $K_2^{ES} > K_2^{E}$ แต่ที่ค่า $K_1^{ES} = K_1^{E}$ และค่า $K_2^{ES} = K_2^{E}$ สมการอัตราเร็วจะลดรูปเป็น

$$v_o = \frac{\dfrac{V_{\max}[S]}{\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_1^E}+\dfrac{K_2^E}{[H^+]}\right)}}{[S]+K_m} \qquad (7\text{-}21)$$

ซึ่งในกรณีนี้ H^+ และ OH^- จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบ noncompetitive ที่ช่วง pH ต่ำและสูงตามลำดับ

7.3 การหาค่า pK_a ของหมู่แตกตัวสองหมู่จากกราฟระหว่างค่า pH และแอคติวิตี้

จากสมการอัตราเร็วตามข้อเสนอของ Waley แสดงให้เห็นว่าค่าคงที่การแตกตัว K_1^{ES} และ K_2^{ES} มีผลต่อค่า $V_{\max}^{app}$ ของปฏิกิริยา ส่วนค่าคงที่การแตกตัว K_1^E และ K_2^E มีผลต่อค่า $\frac{V_{\max}^{app}}{K_m^{app}}$ ของปฏิกิริยา

ถ้าพิจารณาที่ pH ต่ำ ๆ จะได้ว่า $K_1^{ES} >> K_2^{ES}$ ในกรณีนี้ $V_{\max}^{app}$ จะขึ้นอยู่กับค่า K_1^{ES} เป็นหลักทำให้สมการของ $V_{\max}^{app}$ (สมการที่ 7-13) เปลี่ยนรูปเป็น

$$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}}{\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_1^{ES}}\right)} \qquad (7\text{-}22)$$

ในกรณีที่ K_1^{ES} และ K_2^{ES} มีค่าห่างกันมากกว่า 3 หน่วยขึ้นไปค่า $V_{\max}$ ของปฏิกิริยาจะมีค่าเท่าอัตราเร็วสูงสุดที่ optimum pH เรียกอัตราเร็วสูงสุดนี้ว่า $V_{\max}^{opt}$ และสามารถเขียนสมการที่ 7-22 ใหม่ได้เป็น

$$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}^{opt}}{\left(1+\dfrac{[H^+]_1}{K_1^{ES}}\right)} \qquad (7\text{-}23)$$

จากสมการที่ 7-23 พิจารณาปฏิกิริยาที่ $V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}^{opt}}{2}$ จะได้

$$\frac{V_{\max}^{app}}{V_{\max}^{opt}} = \frac{1}{\left(1+\dfrac{[H^+]_1}{K_1^{ES}}\right)} = \frac{1}{2}$$

$$1+\frac{[H^+]_1}{K_1^{ES}} = 2$$

$$[H^+]_1 = K_1^{ES}$$

$$pH_{\ 1} = pK_1^{ES}$$

ค่า pK_1^{ES} เป็นของหมู่แตกตัวที่เป็นกรดแก่กว่า (BH) สามารถหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $V_{\max}^{app}$ กับ pH ในช่วงของกราฟขาขึ้นก่อนถึงค่า optimum pH โดยที่ค่า pK_1^{ES} จะอยู่ที่ค่า pH ที่ให้ค่า $V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}^{opt}}{2}$ (รูปที่ 7.7)

ถ้าพิจารณาที่ pH สูง ๆ จะได้ว่า $K_2^{ES} >> K_1^{ES}$ ในกรณีนี้ $V_{\max}^{app}$ จะขึ้นอยู่กับค่า K_2^{ES} เป็นหลักทำให้สมการของ $V_{\max}^{app}$ (สมการที่ 7-15) เปลี่ยนรูปเป็น

$$V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}^{opt}}{\left(1 + \frac{K_2^{ES}}{[H^+]_2}\right)} \qquad (7\text{-}24)$$

จากสมการที่ 7-24 พิจารณาปฏิกิริยาที่ $V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}^{opt}}{2}$ จะได้

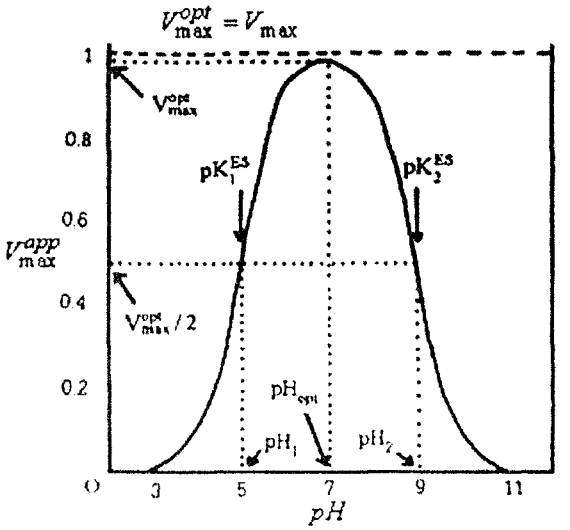
$$\frac{V_{\max}^{app}}{V_{\max}^{opt}} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_2^{ES}}{[H^+]_2}\right)} = \frac{1}{2}$$

$$1 + \frac{K_2^{ES}}{[H^+]_2} = 2$$

$$[H^+]_2 = K_2^{ES}$$

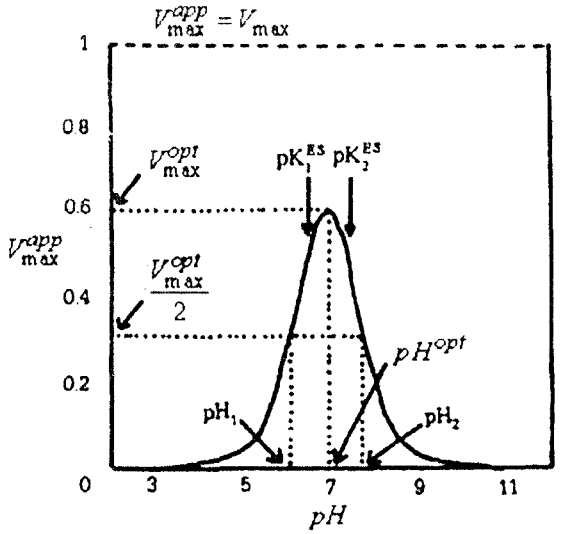
$$pH_2 = pK_2^{ES}$$

ค่า pK_2^{ES} เป็นของหมู่แตกตัวที่เป็นกรดแก่กว่า (AH) สามารถหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $V_{\max}^{app}$ กับ pH ในช่วงของกราฟขาลงหลังจากค่า optimum pH โดยที่ค่า pK_2^{ES} จะอยู่ที่ค่า pH ที่ให้ค่า $V_{\max}^{app} = \frac{V_{\max}^{opt}}{2}$ เช่นเดียวกัน (รูปที่ 7.7)



รูปที่ 7.7 การหาค่า pK_1^{ES} และ pK_2^{ES} จากกราฟระหว่าง V_{max}^{app} กับ pH ที่ค่า pK_1^{ES} และ pK_2^{ES} ห่างกันอย่างน้อยสามหน่วย (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 8, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

ดังที่กล่าวมาแล้วค่า pK_1^{ES} และ pK_2^{ES} ที่หาได้จากกราฟที่ 7.7 มีค่าห่างกันอย่างน้อยสามหน่วยจะทำให้ค่า $V_{max}^{app} = V_{max}^{opt}$ แต่ถ้า pK_1^{ES} ห่างกับ pK_2^{ES} มีค่าห่างกันน้อยกว่าสามหน่วยจะทำให้ให้ค่า $V_{max}^{opt} < V_{max}^{app}$ ในกรณีนี้ค่า pK_1^{ES} และ pK_2^{ES} จะหาจากค่า $\frac{V_{max}^{opt}}{2}$ ดังแสดงในรูปที่ 7.8



รูปที่ 7.8 การหาค่า pK_1^{ES} และ pK_2^{ES} จากกราฟระหว่าง V_{max}^{app} กับ pH ที่ค่า pK_1^{ES} และ pK_2^{ES} ห่างกันน้อยกว่าสามหน่วย (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 8, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ) ในทำนองเดียวกันสามารถหาค่า pK_1^E และ pK_2^E ได้จากกราฟระหว่างค่า $\frac{V_{max}^{app}}{K_m^{app}}$ กับค่า pH จากสมการที่ 7-17

จะเห็นว่าค่าทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ H^+ และ OH^-ของสารละลายแล้ว กราฟอัตราเร็วกับค่า pH ยังบ่งชี้ถึงชนิดของหมู่แตกตัวที่มีส่วนในการเร่งปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามต้องให้ความระมัดระวังในการตีความหมายของหมู่แตกตัวเนื่องจากการกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งไม่ได้อยู่เป็นอิสระแต่จะอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันซึ่งมีผลต่อค่า pK_a ของกรดอะมิโนนั้น ๆ โดยพบว่าค่า pK_a ของหมู่แตกตัวที่เป็นกรดจะมีค่าสูงขึ้นถ้าอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความไม่มีขั้วสูง ในขณะที่ค่า pK_a ของหมู่แตกตัวที่เป็นเบสจะมีค่าลดลง ดังแสดงในตารางที่ 7.1

ตารางที่ 7.1' ตัวอย่างของกรดอะมิโนที่แตกตัวให้ค่า pK_a ที่แตกต่างกันในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 7, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

แขนงข้าง	ค่า pK_a ของ		
	กรดอะมิโนอิสระ	กรดอะมิโนที่ฝังอยู่ในเอ็นไซม์	เอ็นไซม์
Glu	3.9	6.5	Lysozyme
His	6.8	3.4	Papain
His	6.8	5.2	Ribonuclease
Cys	8.3	4.0	Papain
Lys	10.8	5.9	Acetoacetate dehydrogenase

7.4 อิทธิพลของ pH และ สารละลายบัฟเฟอร์ต่อการคงสภาพของเอ็นไซม์

นอกจาก pH จะมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาแล้วยังมีผลโดยตรงต่อการคงสภาพของเอ็นไซม์ เอ็นไซม์ส่วนใหญ่ทนสภาพของ pH ในช่วงกว้างตั้งแต่ 4-10 เอ็นไซม์บางตัวอาจเสียสภาพได้ง่ายภายใต้สภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายบ่อย ๆ ในการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ควรเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากข้อเท็จจริงที่ว่าบัฟเฟอร์สามารถรักษาสภาพบัฟเฟอร์ได้ดีที่ค่า pH ไม่เกิน ±1 ของค่า pK_a ของชนิดของบัฟเฟอร์นั้น ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์ที่รักษาสภาพบัฟเฟอร์ได้ดีคือที่ช่วง 0.05-0.1 M หรือที่ค่า ionic strength ของสารละลายมีค่าเป็น 0.1-0.2 M นอกจากนี้ช่วงอุณภูมิตั้งแต่ 4-37°C จะมีผลต่อการเปลี่ยนค่า pK_a ของบัฟเฟอร์อย่างมาก ควรเลือกบัฟเฟอร์ที่เปลี่ยนค่า pK_a น้อย ๆ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ โดยพิจารณาจากค่า $\Delta pK_a / \Delta^o C$ ที่ค่าน้อย ๆ (ตารางที่ 7.2) และควรเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อให้ได้ค่า pH ที่อุณหภูมิที่ต้องการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ นอกจากนี้องค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ก็มีผลเช่นกัน ตัวอย่าง imidazole อาจไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์บางกลุ่มได้

ตารางที่ 7.2 แสดงชนิดของบัพเฟอร์ที่ใช้มากในการศึกษาเอ็นไซม์ (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 7, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

ชนิดของบัพเฟอร์	pK_a ที่ 25°C	$\Delta pK_a / \Delta^o C$
MES	6.15	-0.011
PIPES	6.80	-0.0085
Imidazole	7.00	-0.020
MOPS	7.20	-0.013
TES	7.50	-0.020
HEPES	7.55	-0.014
HEPPS	8.00	-0.015
Tricine	8.15	-0.021
Tris	8.30	-0.031
CHES	9.50	-0.029
CAPS	10.40	-0.032

7.5 อิทธิพลอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิทำให้โมเลกุลของตัวถูกย่อยมีพลังงานมากพอที่จะเปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะกระตุ้น การเพิ่มอุณหภูมิให้กับปฏิกิริยาเปรียบเสมือนการใส่พลังงานให้กับระบบทำให้เกิดการสั่นของโมเลกุลของทั้งเอ็นไซม์และตัวถูกย่อย ทำให้สารทั้งสองสามารถมีเกิดปฏิสัมพันธ์ต่อกันได้ง่ายขึ้น

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อพลังงานจลน์ของโมเลกุล จาก *Arrhenius equation* ข้างล่าง จะเห็นว่าอุณหภูมิเกี่ยวข้องโดยตรงกับค่า activation energy ($\Delta G^{\neq}$)

$$v = \frac{k_B T}{h}[S]e^{-\Delta G^{\neq} / RT} \qquad \textit{Arrhenius equation}$$

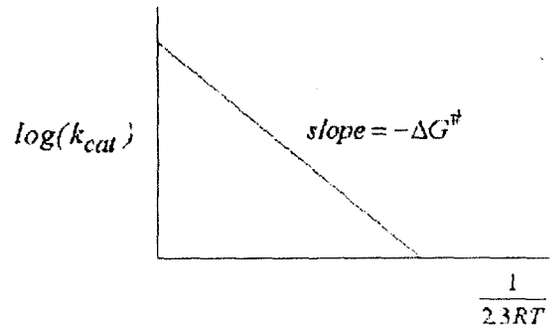
ในทำนองเดียวกันอุณหภูมิโดยตรงต่อ catalytic rate constant (k_{cat}) ของปฏิกิริยาดังสมการข้างล่าง

$$k_{cat} = [A]e^{-\Delta G^{\#} / RT} \tag{7.25}$$

สามารถทำสมการนี้ให้อยู่ในรูป logarithmic จะได้สมการเส้นตรงข้างล่าง

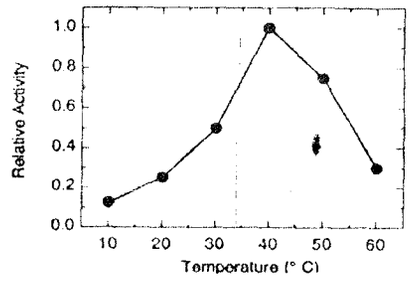
$$log(k_{cat}) = -\frac{\Delta G^{\#}}{2.3RT} + log(A) \tag{7.26}$$

โดยที่ R เป็น ideal gas constant มีค่าเท่ากับ 1.98 x 10^{-3} kcal mol^{-1} ถ้า plot กราฟระหว่าง log (k_{cat}) กับ ½.3RT จะได้ค่าความชันของกราฟมีค่าติดลบซึ่งความชันนี้คือค่า $\Delta G^{\neq}$ บ่งบอกถึงการเพิ่มของอุณหภูมิช่วยเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยไปลดค่า activation energy นั่นเอง (รูปที่ 7.9)



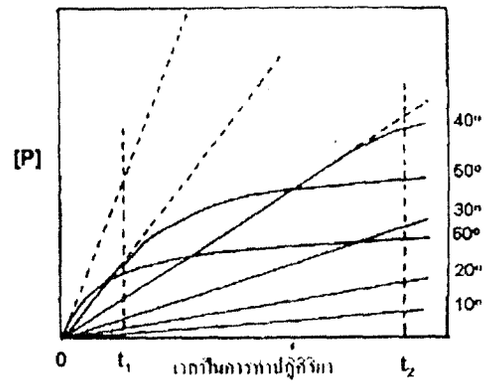
รูปที่ 7.9 Arrhenius plot ระหว่าง log (k_{cat}) กับ 1/2.3RT

ในแง่ของการทำงานของเอ็นไซม์ อุณหภูมิมีผลต่อเสถียรภาพและโครงรูปของเอ็นไซม์ เอ็นไซม์ส่วนใหญ่ทนอุณหภูมิได้ในช่วงจำกัด กราฟในรูปที่ 7.10 แสดงการผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์ส่วนใหญ่



รูปที่ 7.10 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอ็นไซม์โดยทั่ว ๆ ไป (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 7, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

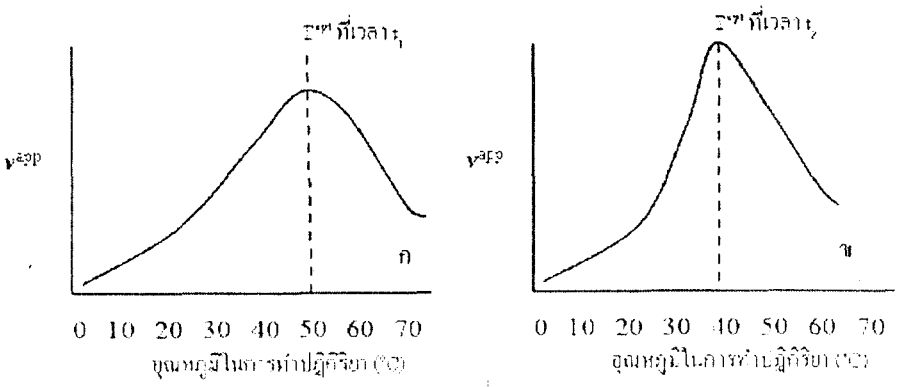
เรียกอุณหภูมิที่เอ็นไซม์ที่ทำให้ได้อัตราเร็วสูงสุดของการเร่งปฏิกิริยาว่า *optimum temperature* (T^{opt}) ในการศึกษาทางเอ็นไซม์ค่า T^{opt} จะขึ้นอยู่กับเวลาในการทำงานปฏิกิริยา (incubation time) กล่าวคือที่เวลาในการทำปฏิกิริยาต่างกันจะให้ T^{opt} ของเอ็นไซม์ที่มีค่าไม่เท่ากัน



รูปที่ 7.11 ผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อการทำงานของเอ็นไซม์ (แหล่งที่มา: พัชรา วีระกะลัส, เอ็นไซม์, บทที่ 8, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ)

จากรูปที่ 7.11 ที่ incubation time เท่ากับ t_1 อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาจะอยู่ที่อุณหภูมิ 50°C แต่ถ้า incubation time เท่ากับ t_2 อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาจะอยู่ที่ 40°C

กราฟระหว่างอัตราเร็วกับอุณหภูมิที่เวลา t_1 แสดงดังรูปที่ 7.12 ก และกราฟระหว่างอัตราเร็วระหว่างอุณหภูมิที่เวลา t_2 แสดงได้ดังรูปที่ 7.12 ข ในการหาค่า T^{opt} จึงควรระบุเวลาในการทำปฏิกิริยาด้วย



รูปที่ 7.12 ค่า optimum temperature ของเอ็นไซม์ ที่ขึ้นกับกับเวลาในการทำปฏิกิริยา ก) ที่ incubation time เท่ากับ t_1 และ ข) ที่ incubation time เท่ากับ t_2

คำถามทบทวนท้ายบท

1. จงแสดงให้เห็นว่าที่ pH ต่ำ ๆ โปรตอนทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันตามทฤษฎีของ Michaelis Menten
2. พิสูจน์ทฤษฎีของ Waley ที่ว่าโปรตอนทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบผสม
3. จากสมการอัตราเร็วข้างล่าง จงเสนอวิธีหาค่า pK_1^{ES} และ pK_2^{ES} ของเอ็นไซม์

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S]\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{ES}}+\frac{K_2^{ES}}{[H^+]}\right)+K_m\left(1+\frac{[H^+]}{K_1^{E}}+\frac{K_2^{E}}{[H^+]}\right)}$$

4. pH มีผลต่อค่า catalytic efficiency ของเอ็นไซม์อย่างไร อธิบาย พร้อมยกตัวอย่างประกอบ
5. อธิบายผลของอุณหภูมิในการเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา

บทที่ 8
จลนพลศาสตร์ของตัวถูกย่อยสองตัว

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับตัวถูกย่อยอย่างน้อยสองตัว จึงมีความจำเป็นที่จะต้องกล่าวถึงจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเหล่านี้ ในบทนี้จะเน้นเฉพาะปฏิกิริยาที่มีตัวถูกย่อยสองตัวเป็นหลัก ส่วนปฏิกิริยาที่มีตัวถูกย่อยมากกว่าสองตัวที่มีจลนพลศาสตร์ที่ซับซ้อนมากขึ้นจะอยู่นอกเหนือเนื้อหาของรายวิชานี้

8.1 การกำหนดชื่อของปฏิกิริยา

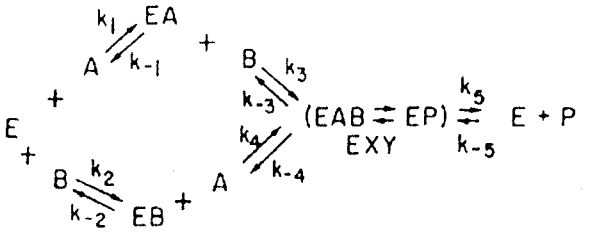
เราได้จัดประเภทของปฏิกิริยาตามอันดับของปฏิกิริยามาแล้วดังที่กล่าวในบทที่ 4 ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของตัวถูกย่อย มากกว่าหนึ่งตัวจะจัดประเภทของปฏิกิริยาตามจำนวนของตัวถูกย่อยและสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ตามหลักของ Cleland สามารถแบ่งเรียกชนิดของปฏิกิริยาได้ดังตารางที่ 8.1

ตารางที่ 8.1 การเรียกชื่อปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอ็นไซม์ตามหลักของ Cleland (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter 11, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

ปฏิกิริยา	ชื่อ
$A \rightarrow P$	Uni uni
$A + B \rightarrow P$	Bi uni
$A + B \rightarrow P + Q$	Bi bi
$A + B + C \rightarrow P + Q$	Ter bi
$A + B + C \rightarrow P + Q + R$	Ter ter

8.2 ปฏิกิริยา Bi uni reaction

ปฏิกิริยาที่มีตัวถูกย่อยสองตัวที่สร้างผลิตภัณฑ์หนึ่งตัว (bi uni reaction) มีกลไกดังข้างล่าง



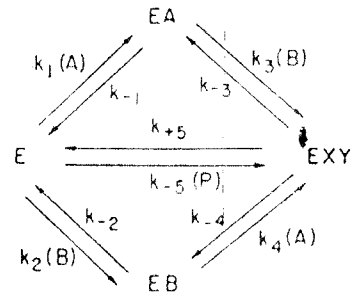
แผนภาพที่ 1

เรียกกลไกข้างบนว่า random ordered bi uni reaction โดยเอ็นไซม์สามารถจะเข้าทำปฏิกิริยากับ A ก่อนหรือ B ก่อนก็ได้ด้วยโอกาสเท่า ๆ กัน กลไกนี้จะสร้าง binary complex สองชนิดคือ EA และ EB และสร้าง tertiary complex หนึ่งชนิดคือ EXY

ในการหาสมการอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีตัวถูกย่อยสองตัวจะใช้แผนภาพของ King & Altman (King-Altman schematic method) โดยมีหลักการดังนี้

1. ให้ n เป็นรูปของเอ็นไซม์ที่มีอยู่ในปฏิกิริยาทั้งหมดในปฏิกิริยา สำหรับปฏิกิริยา bi uni ข้างบนจะมีเอ็นไซม์ n = 4 รูปคือ E EA EB และ EXY

2. เขียนแผนภาพปิดแสดงปฏิกิริยาผันกลับโดยให้รูปของเอ็นไซม์ทั้งสี่อยู่ที่มุมแต่ละมุมของแผนภาพ และแสดงปฏิกิริยาผันกลับที่เชื่อมระหว่างเอ็นไซม์แต่ละรูปโดยมีค่าคงที่อัตราเร็วและความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่เกี่ยวข้องกำกับ ดังแสดงในแผนภาพที่ 2 อาจเรียกแผนภาพดังกล่าวว่า *"King-Altman basic figure"*



แผนภาพที่ 2

3. กำหนดรูปความเข้มข้นของเอ็นไซม์แต่ละรูป (EX_i)เทียบกับความเข้มข้นทั้งหมดของเอ็นไซม์ (E_t) เสมอ

โดยที่ $$\frac{\sum(numerator)}{\sum(denominator)} = \frac{[EX]_i}{[E]_t}$$

4. คำนวณหาความเป็นไปได้ในการเกิด interconversion pattern ที่แสดงจำนวนเส้นเปิดที่มีค่า n-1 ที่ชี้เข้าสู่เอ็นไซม์แต่ละรูปได้จากสมการข้างล่าง เส้นดังกล่าวแสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์รูปนั้น ๆ

$$ {}_mC_{n-1} = \frac{5!}{(4-1)!(5-4+1)!} = \frac{5!}{(3)!(2)!} = 10 \qquad (8\text{-}1) $$

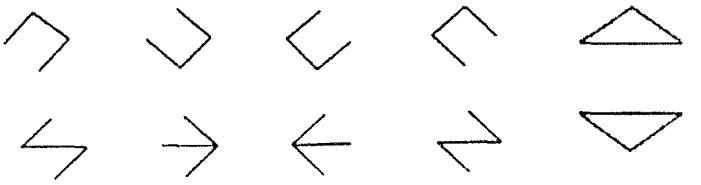
โดยที่

${}_mC_{n-1}$ คือจำนวนของเส้นที่ n-1 ที่ชี้เข้าหาเอ็นไซม์แต่ละรูป (interconversion patterns)

m คือจำนวนของปฏิกิริยาผันกลับ

n คือรูปของเอ็นไซม์ที่มีอยู่ในปฏิกิริยา

จากแผนภาพข้างบนจะได้จำนวน interconversion pattern ทั้งหมด 10 patterns ซึ่งแต่ละ pattern จะมีเส้นวิ่งเข้าหาเอ็นไซม์แต่ละรูปมีค่าเท่ากับ n-1 = 4-1 = 3 เส้น ดังแสดงข้างล่าง



แผนภาพที่ 3

5. จาก pattern ทั้งหมด เลือกเฉพาะ pattern ที่เป็น pattern เปิดเท่านั้น ส่วน pattern ปิด (closed loop) จะถูกตัดออกไป สามารถคำนวณหา pattern ปิดของแต่ละ closed loop ทำได้โดยใช้สูตรข้างล่าง

$$_{m-r}C_{n-1-r} = \frac{(m-r)!}{(n-1-r)!(m-n+1)!}$$

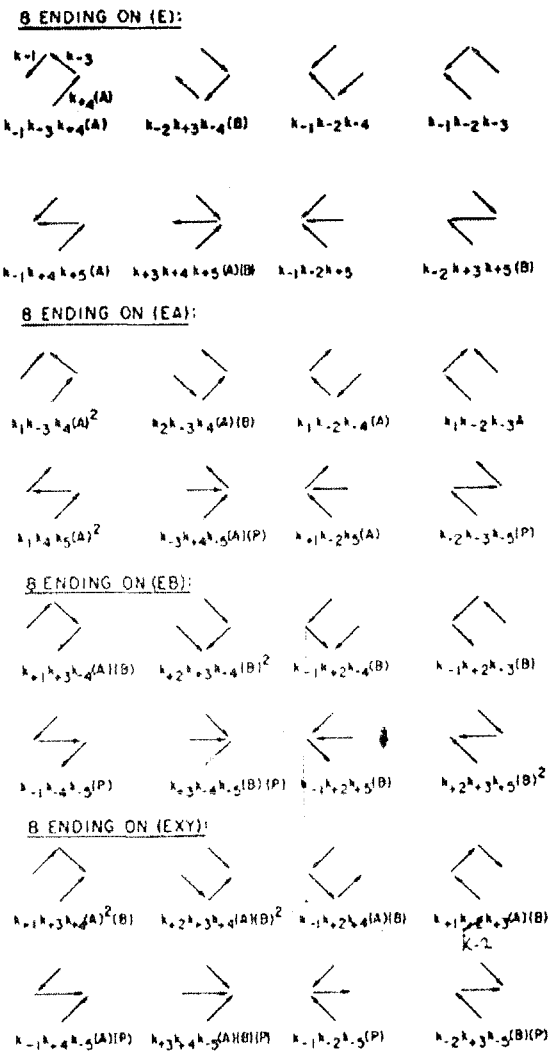
โดยที่ค่า r คือจำนวนเส้นที่สร้างเป็น closed loop แต่ละอันในที่นี้ค่า r มีค่าเท่ากับ 3

จากแผนภาพที่ 2 คำนวณหา pattern ของแต่ละ closed loop ได้

$$_{5-3}C_{4-1-3} = \frac{(5-3)!}{(4-1-3)!(5-4+1)!} = \frac{2!}{0!2!} = 1 \qquad (8\text{-}2)$$

ดังนั้นจำนวน pattern ของ 2 closed loops จะมีค่าเท่ากับ $2 \times 1 = 2$ patterns ดังนั้น pattern เปิดจะมีค่าเท่ากับ 10-2 = 8 patterns เท่านั้น

6. เอ็นไซม์แต่ละรูป ($\frac{[EX]_i}{[E]_t}$)มี pattern เปิด 8 patterns ดังนั้นเอ็นไซม์ทั้งหมด 4 รูปจะสร้าง pattern ทั้งหมด 32 patterns ดังแผนภาพที่ 4



แผนภาพที่ 4

7. ค่าคงที่ของแต่ละ pattern เท่ากับผลคูณของค่าคงที่อัตราเร็วและความเข้มข้นของตัวถูกย่อยที่เกี่ยวข้องกับ pattern นั้น และค่าคงที่ของเอ็นไซม์แต่ละรูปจะเท่ากับผลรวมของค่าคงที่ได้จาก 8 patterns ดังนี้

$$\frac{(E)}{E_t} = \frac{\left(k_{-1}k_{-3}k_{+4}(A)\right)+\left(k_{-2}k_{+3}k_{-4}(B)\right)+\left(k_{-1}k_{-2}k_{-4}\right)+\left(k_{-1}k_{-2}k_{-3}\right)+}{\left(k_{-1}k_{+4}k_{+5}(A)\right)+\left(k_{+3}k_{+4}k_{+5}(A)(B)\right)+\left(k_{-1}k_{-2}k_{+5}\right)+\left(k_{-2}k_{+3}k_{+5}(B)\right)}$$

$$\frac{(EA)}{E_t} = \frac{\left(k_1k_{-3}k_4(A)^2\right)+\left(k_2k_{-3}k_4(A)(B)\right)+\left(k_1k_{-2}k_{-4}(A)\right)+\left(k_1k_{-2}k_{-3}(A)\right)+}{\left(k_1k_4k_5(A)^2\right)+\left(k_3k_4k_5(A)(B)\right)+\left(k_1k_{-2}k_5(A)\right)+\left(k_{-2}k_{-3}k_{-5}(P)\right)}$$

$$\frac{(EB)}{E_t} = \frac{(k_1k_3k_{-4}(A)(B)) + (k_2k_3k_{-4}(B)^2) + (k_{-1}k_2k_{-4}(B)) + (k_{-1}k_2k_{-3}(B)) + (k_{-1}k_{-4}k_{-5}(P)) + (k_3k_{-4}k_{-5}(B)(P)) + (k_{-1}k_2k_5(B)) + (k_2k_3k_5(B)^2)}{}$$

$$\frac{(EXY)}{E_t} = \frac{(k_1k_3k_4(A)^2(B)) + (k_2k_3k_4(A)(B)^2) + (k_{-1}k_2k_4(A)(B)) + (k_1k_{-2}k_3(A)(B)) + (k_{-1}k_4k_{-5}(A)(P)) + (k_3k_4k_{-5}(A)(B)(P)) + (k_{-1}k_{-2}k_{-5}(P)) + (k_{-2}k_3k_{-5}(B)(P))}{}$$

เมื่อหารูปของเอ็นไซม์ได้แล้ว ต่อไปกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจาก

$$v = \frac{dP}{dt} = k_{+5}(EXY) - k_{-5}(E)(P) \qquad (8\text{-}3)$$

หารสมการที่ 8-3 ด้วย รูปของเอ็นไซม์ในปฏิกิริยามี 4 รูปคือ $\frac{E_t}{E_t} = \frac{(E)+(EA)+(EB)+(EXY)}{E_t}$ ดังข้างล่าง

$$v = \frac{(k_{+5}(EXY) - k_{-5}(E)(P))E_t}{(E)+(EA)+(EB)+(EXY)} \qquad (8\text{-}4)$$

เอา E_t คูณทั้งเศษและส่วนของสมการที่ 8-4 ได้

$$v = \frac{\left(k_{+5}\frac{(EXY)}{E_t} - k_{-5}\frac{(E)(P)}{E_t}\right)E_t}{\frac{(E)}{E_t} + \frac{(EA)}{E_t} + \frac{(EB)}{E_t} + \frac{(EXY)}{E_t}} \qquad (8\text{-}5)$$

แทนค่ารูปของเอ็นไซม์ที่ได้จากการหาโดยวิธีของ King-Altman ลงในสมการที่ 8-5 แล้วให้แทนค่าคงที่ของ nominator และ denominator ที่ติดเทอมของตัวถูกย่อย (A) (B) และผลิตภัณฑ์ (P) ด้วยค่าคงที่ K ดังสมการที่ 8-6

$$\frac{v}{E_t} = \frac{(K_1(A)(B) + K_2(A)^2(B) + K_3(A)(B)^2 - K_4(P) - K_5(A)(P) - K_6(B)(P))}{K_7 + K_8(A) + K_9(B) + K_{10}(A)(B) + K_{11}(A)^2 + K_{12}(B)^2 + K_{13}(A)^2(B) + K_{14}(A)(B)^2 + K_{15}(P) + K_{16}(A)(P) + K_{17}(B)(P) + K_{18}(A)(B)(P)} \qquad (8\text{-}6)$$

โดยที่ค่าคงที่ K_1-K_{18} แสดงไว้ในข้างล่าง

$K_1 = k_{+1}k_{-2}k_{+3}k_{+5} + k_{-1}k_{+2}k_{+4}k_{+5}$; $K_2 = k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{+5}$; $K_3 = k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+5}$;

$K_4 = k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5}$; $K_5 = k_{-1}k_{-3}k_{+4}k_{-5}$; $K_6 = k_{-2}k_{+3}k_{-4}k_{-5}$;

$K_7 = k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_{+5}$; $K_8 = k_{+1}k_{-2}k_{-3} + k_{+1}k_{-2}k_{-4} + k_{+1}k_{-2}k_{+5}$

$+ k_{-1}k_{-3}k_{+4} + k_{-1}k_{+4}k_{+5}$; $K_9 = k_{-1}k_{+2}k_{-3} + k_{-1}k_{+2}k_{-4} + k_{-1}k_{+2}k_{+5}$

$+ k_{-2}k_{+3}k_{-4} + k_{-2}k_{+3}k_{+5}$; $K_{10} = k_{+1}k_{-2}k_{+3} + k_{-1}k_{+2}k_{+4} + k_{+1}k_{+3}k_{-4}$

$+ k_{+2}k_{-3}k_{+4} + k_{+3}k_{+4}k_{+5}$; $K_{11} = k_{+1}k_{-3}k_{+4} + k_{+1}k_{+4}k_{+5}$; $K_{12} = k_{+2}k_{+3}k_{-4}$

$+ k_{+2}k_{+3}k_{+5}$; $K_{13} = k_{+1}k_{+3}k_{+4}$; $K_{14} = k_{+2}k_{+3}k_{+4}$; $K_{15} = k_{-1}k_{-2}k_{-5}$

$+ k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}$; $K_{16} = k_{-1}k_{+4}k_{-5} + k_{-3}k_{+4}k_{-5}$; $K_{17} = k_{-2}k_{+3}k_{-5}$

$+ k_{+3}k_{-4}k_{-5}$; $K_{18} = k_{+3}k_{+4}k_{-5}$

ถ้าพิจารณาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาไปข้างหน้า (v_o^f) ในสภาวะที่เกิด P น้อยมาก ๆ จนถือว่าค่า P = 0 รูปสมการที่ 8-6 จะลดรูปเป็น

$$\frac{v_o^f}{E_t} = \frac{\left(K_1(A)(B) + K_2(A)^2(B) + K_3(A)(B)^2\right)}{K_7 + K_8(A) + K_9(B) + K_{10}(A)(B) + K_{11}(A)^2 + K_{12}(B)^2 + K_{13}(A)^2(B) + K_{14}(A)(B)^2} \qquad (8\text{-}7)$$

จากแผนภาพที่ 1 ถ้าให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในทิศที่สร้าง $E + A \rightarrow EA + B \rightarrow EAB(EXY)$ เป็นหลัก ส่วนปฏิกิริยาด้าน $E + B \rightarrow EB \rightarrow EAB$ เกิดขึ้นน้อยจนถือว่าค่า $k_4 \rightarrow 0$ ของสมการที่ 8-6 ที่ติดค่า k_4 ถูกตัดทิ้งได้แก่

$$K_1 \rightarrow k_1k_{-2}k_3k_5 = K_1'$$
$$K_2 \rightarrow 0$$
$$K_3 \rightarrow 0$$
$$K_8 \rightarrow k_1k_{-2}k_{-3} + k_1k_{-2}k_{-4} + k_1k_{-2}k_5 = K_8'$$
$$K_{10} \rightarrow k_1k_{-2}k_3 + k_1k_3k_{-4} = K_{10}'$$
$$K_{11} \rightarrow 0$$
$$K_13 \rightarrow 0$$
$$K_{14} \rightarrow 0$$

สมการอัตราเร็วเริ่มต้นไปข้างหน้าจะเปลี่ยนเป็น

$$\frac{v_o^f}{E_t} = \frac{K_1'(A)(B)}{K_7 + K_8'(A) + K_9(B) + K_{10}'(A)(B) + K_{12}(B)^2} \qquad (8\text{-}8)$$

ที่ fixed (B) และ varied (A) จะได้

$$\frac{v_o^f}{E_t} = \frac{\delta_1(A)}{\delta_2 + \delta_3(A)} \qquad (8\text{-}9)$$

$$\delta_1 = K_1'(B)$$

โดยที่ $\delta_2 = K_7 + K_9(B) + K_{12}(B)^2$

$$\delta_3 = K_8' + K_{10}'(B)$$

หารสมการที่ 8-9 ด้วย δ_3 ทั้งเศษและส่วนจะได้

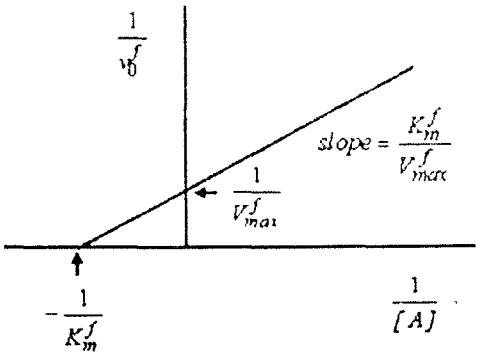
$$\frac{v_o^f}{E_t} = \frac{(\delta_1/\delta 3)(A)}{(\delta 2/\delta 3) + (A)} \qquad (8\text{-}10)$$

รูปสมการนี้เป็นสมการ Michaelis-Menten ที่มีค่า

$$V_{max}^f = (\delta_1/\delta 3)E_t = \frac{K_1'(B)E_t}{K_8' + K_{10}'(B)}$$

$$K_m^f = \delta_2/\delta_3 = \frac{K_7 + K_9(B) + K_{12}(B)^2}{K_8' + K_{10}'(B)}$$

กราฟระหว่าง $\frac{1}{v_0^f}$ กับ $\frac{1}{[A]}$ ที่ fixed (B) จะเป็นเส้นตรงมีจุดตัดบนแกน y มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{V_{max}^f}$ และมีค่าความชันเท่ากับ $\frac{K_m^f}{V_{max}^f}$ ค่าจุดตัดบนแกน x มีค่าเท่ากับ $-\frac{1}{K_m^f}$ ดังแสดงในรูปที่ 8.1



รูปที่ 8.1 กราฟระหว่าง $\frac{1}{v_0^f}$ กับ $\frac{1}{[A]}$ ที่ fixed (B) ของปฏิกิริยา bi uni

ส่วนสมการอัตราเร็วที่ fixed (A) แต่ varied (B) จะไม่สมการรูป Michaelis-Menten เนื่องจากมีเทอม $K_{12}(B)^2$ ติดอยู่

ถ้าพิจารณาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาผันกลับ (v_o^r) ที่ A และ B = 0 รูปของสมการที่ 8-6 จะลดรูปเป็น

$$\frac{v_o^r}{E_t} = \frac{K_4(P)}{K_7 + K_{15}(P)} \tag{8-11}$$

หารสมการที่ 8-11 ทั้งเศษและส่วนด้วย K_{15} จะได้

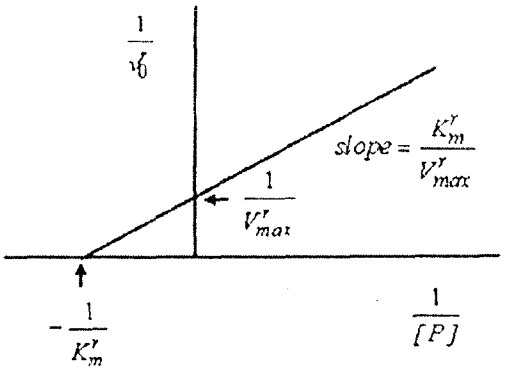
$$\frac{v_o^r}{E_t} = \frac{\left(\frac{K_4}{K_{15}}\right)(P)}{\left(\frac{K_7}{K_{15}}\right) + (P)} \tag{8-12}$$

สมการนี้เป็นสมการ Michaelis-Menten ที่มีค่า

$$V_{max}^r = \frac{K_4}{K_{15}} = \frac{\left(k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5}\right)E_t}{\left(k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}\right)} \tag{8-13}$$

$$K_m^r = \frac{K_7}{K_{15}} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_{-5}}{k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}} \tag{8-14}$$

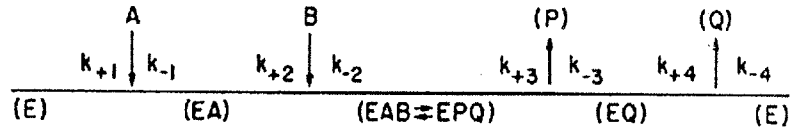
กราฟระหว่าง $\frac{1}{v_0^r}$ กับ $\frac{1}{[P]}$ จะเป็นเส้นตรงมีจุดตัดบนแกน y มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{V_{max}^r}$ และมีค่าความชันเท่ากับ $\frac{K_m^r}{V_{max}^r}$ ค่าจุดตัดบนแกน x มีค่าเท่ากับ $-\frac{1}{K_m^r}$ ดังแสดงในรูปที่ 8.2



รูปที่ 8.2 กราฟระหว่าง $\frac{1}{v_0^r}$ กับ $\frac{1}{[P]}$ ของปฏิกิริยา bi uni

8.3 ปฏิกิริยา compulsory ordered bi bi

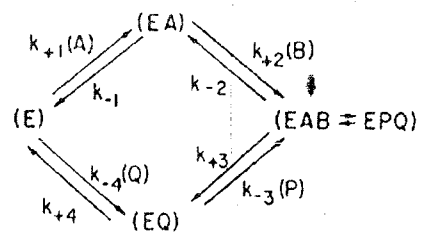
สำหรับปฏิกิริยาที่มีตัวถูกย่อยสองตัวที่สร้างผลิตภัณฑ์สองตัวที่มีกลไกแบบ compulsory ordered bi bi หรือ sequential ordered bi bi แสดงเป็นแผนภาพของ Cleland ได้ดังข้างล่าง



แผนภาพที่ 5

กลไกของปฏิกิริยา compulsory ordered bi bi เกิดขึ้นในลักษณะที่เลือกให้ตัวถูกย่อยตัวใดตัวหนึ่งเข้าทำปฏิกิริยาก่อนเท่านั้น จากแผนภาพคือตัวถูกย่อย A ทำให้ได้เป็น binary complex คือ EA หลังจากนั้นตัวถูกย่อย B จะเข้าสร้างเป็น $EAB \rightleftharpoons EPQ$ tertiary complex ซึ่งจะแตกให้ผลิตภัณฑ์ตัวแรกคือ P หลังจานั้น EQ complex แตกออกได้เป็น E+Q

การหาสมการอัตราเร็วทำได้โดยใช้ King-Altman basic figure ดังแผนภาพที่ 6

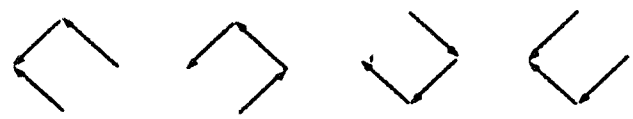


แผนภาพที่ 6

จากแผนภาพปิดของ King & Altman พบว่ามีเอ็นไซม์อยู่ทั้งหมด 4 รูป (n = 4) มีจำนวนของปฏิกิริยาผันกลับ 4 ปฏิกิริยา (m = 4) ดังนั้น introversion patterns ที่มีจำนวนเส้น (n -1 = 4-1 =3) ที่ชี้เข้าหาเอ็นไซม์แต่ละรูปมีค่าเท่ากับ 4 patterns คือ

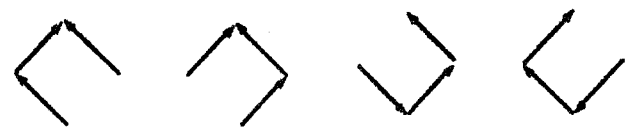
$$ {}_mC_{n-1} = \frac{4!}{(4-1)!(4-4+1)!} = \frac{4!}{3!1!} = 4 $$

โดยที่ pattern ทั้งสี่เป็น pattern เปิด เนื่องจากมีเอ็นไซม์ทั้งหมดอยู่ 4 รูป ดังนั้นจะมีจำนวน pattern ทั้งหมดเป็น 4 x 4 =!6 patterns และใช้หลักการเดียวกันกับกลไก bi uni หาค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์แต่ละรูปจะได้



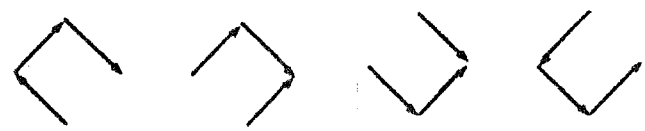
แผนภาพที่ 7

$$\frac{(E)}{E_t} = \frac{k_4k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}(P) + k_2k_3k_4(B) + k_3k_4k_{-1}}{deno\,min\,ator}$$



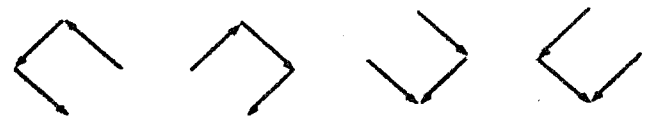
แผนภาพที่ 8

$$\frac{(EA)}{E_t} = \frac{k_1k_4k_{-2}(A) + k_1k_{-2}k_{-3}(A)(P) + k_{-2}k_{-3}k_{-4}(Q)(P) + k_1k_3k_4(A)}{deno\,min\,ator}$$



แผนภาพที่ 9

$$\frac{(EAB + EPQ)}{E_t} = \frac{k_1k_2k_4(A)(B) + k_1k_2k_{-3}(A)(B)(P) + k_2k_{-3}k_{-4}(B)(P)(Q) + k_{-1}k_{-3}k_{-4}(P)(Q)}{deno\,min\,ator}$$



แผนภาพที่ 10

$$\frac{(EQ)}{E_t} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-4}(Q) + k_1k_2k_3(A)(B) + k_2k_3k_{-4}(B)(Q) + k_3k_{-1}k_{-4}(Q)}{deno\,min\,ator}$$

ต่อไปกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา และรูปของเอ็นไซม์จะได้

$$v = \frac{[k_1(E)(A) - k_{-1}(EA)}{[(E) + (EA) + (EAB \quad EPQ) + (EQ)]} E_t \tag{8-15}$$

$$\frac{v}{E_t} = \frac{[k_1k_2k_3k_4(E)(A) - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}(P)(Q)]}{\begin{aligned} &k_4k_{-1}(k_{-2}+k_3) + k_1k_4(k_{-2}+k_3)(A) + k_2k_3k_4(B) + k_{-1}k_{-2}k_{-3}(P) \\ &+k_{-1}k_{-4}(k_{-2}+k_3)(Q) + k_1k_2(k_3+k_4)(A)(B) + k_1k_{-2}k_{-3}(A)(P) \\ &+k_{-3}k_{-4}(k_{-1}+k_{-2})(P)(Q) + k_2k_3k_{-4}(B)(Q) + k_1k_2k_{-3}(A)(B)(P) \\ &+k_2k_{-3}k_{-4}(B)(P)(Q) \end{aligned}} \tag{8-16}$$

ต่อไปใช้ระบบ shorthand nomenclature หรือ "The theorell-Chance mechnisms" กำหนดให้เทอมค่าคงที่ที่ติดค่าเข้มข้นของ numerator เป็น num และของ denominator เป็น coefficients ส่วนค่าคงที่ที่ไม่ติดค่าความเข้มข้นเป็น constant จะได้

$$\frac{v}{E_t}=\frac{[num_1(E)(A)-num_2(P)(Q)]}{\begin{aligned}&constant+coef_A(A)+coef_B(B)+coef_p(P)\\&+coef_q(Q)+coef_{AB}(A)(B)+coef_{AP}(A)(P)\\&+coef_{PQ}(P)(Q)+coef_{BQ}(B)(Q)+coef_{ABP}(A)(B)(P)\\&+coef_{BPQ}(B)(P)(Q)\end{aligned}} \qquad (8\text{-}17)$$

คูณ numerator และ denominator ของสมการ 8-17 ด้วย

$$\frac{(num_2)}{(coef_{AB})(coef_{PQ})}=\frac{k-1k-2k-3k-4}{[k_1k_2(k_3+k_4)][k_{-3}k_4(k_{-1}+k_{-2})]}$$

คูณ (P)(Q) ของ numerator และ (P),(Q), (PQ),(AP) และ (BPQ) ของ denominator ด้วย $\frac{num_1}{num_1}$ จะได้

$$v=\frac{\left(\frac{num_1num_2(A)(B)}{coef_{AB}coef_{PQ}}-\frac{num_2num_2(P)(Q)}{coef_{AB}coef_{PQ}}\left(\frac{num_1}{num_1}\right)\right)}{\begin{aligned}&constant\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}+coef_A(A)\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}+coef_B(B)\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}\\&+coef_P(P)\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}\left(\frac{num_1}{num_1}\right)+coef_Q(Q)\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}\left(\frac{num_1}{num_1}\right)\\&+coef_{AB}(A)(B)\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}+coef_{AP}(A)(P)\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}\left(\frac{num_1}{num_1}\right)\\&+coef_{ABP}(A)(B)(P)\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}+coef_{BPQ}(B)(P)(Q)\frac{num_2}{coef_{AB}coef_{PQ}}\left(\frac{num_1}{num_1}\right)\end{aligned}} \qquad (8\text{-}18)$$

และกำหนดให้ค่าคงที่ทางจลสาสตร์มีค่าดังนี้

$$K_{mA}=\frac{coef_B}{coef_{AB}};K_{mB}=\frac{coef_A}{coef_{AB}};K_{ia}=\frac{coef_P}{coef_{AP}}=\frac{constant}{coef_A}=\frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$K_{ib}=\frac{coef_{PQ}}{coef_{BPQ}}=\frac{k_{-1}+k_{-2}}{k_2};K_{mP}=\frac{coef_Q}{coef_{PQ}};K_{mQ}=\frac{coef_P}{coef_{PQ}}$$

$$K_{ip}=\frac{coef_{AB}}{coef_{ABP}}=\frac{k_3+k_4}{k_{-3}};K_{iq}=\frac{coef_B}{coef_{BQ}}=\frac{constant}{coef_Q}=\frac{k_4}{k-4}$$

$$V^f_{max}=\frac{num_1}{coef_{AB}};V^r_{max}=\frac{num_2}{coef_{PQ}};K_{eq}=\frac{num_1}{num_2}$$

โดยที่ค่า K_{mA}, K_{mB}, K_{mP} และ K_{mQ} คือค่า Michaelis constants ส่วนค่า K_{ia}, K_{ib}, K_{ip} และ K_{iq} คือ ค่า product inhibition constants

จากกลไกของ compulsory ordered bi bi จะเห็นว่าค่าคงที่ที่มีอยู่จริงในสมการอัตราเริ่มต้นคือค่า K_{ia} และ K_{iq} เท่านั้น

แทนค่าคงที่จลศาตร์ข้างบนลงในสมการที่ 8-18 จะได้

$$v = \frac{\left[V^f_{max}V^r_{max}(A)(B) - V^f_{max}V^r_{max}\frac{1}{K_{eq}}(P)(Q)\right]}{K_{mB}K_{ia}V^r_{max} + K_{mB}V^r_{max}(A) + K_{mA}V^r_{max}(B) + V^f_{max}\frac{K_{mQ}}{K_{eq}}(P) + V^f_{max}\frac{K_{mP}}{K_{eq}}(Q)} \quad (8\text{-}19)$$

$$+V^r_{max}(A)(B) + \frac{V^f_{max}K_{mQ}}{K_{eq}K_{ia}}(A)(P) + \frac{V^f_{max}}{K_{eq}}(P)(Q) + \frac{V^r_{max}K_{mA}}{K_{iq}}(B)(Q)$$

$$+\frac{V^r_{max}}{K_{ip}}(A)(B)(P) + \frac{V^r_{max}}{K_{ib}K_{eq}}(B)(P)(Q)$$

ใช้ความสัมพันธ์ของ Haldane equation ข้างล่าง

$$K_{eq} = \frac{V^r_{max}}{V^f_{max}}\frac{K_{mP}}{K_{mB}}\frac{K_{iq}}{K_{ia}}$$

และจัดเรียงรูปสมการใหม่และหารสมการที่ 8-19 ด้วย V^r_{max} จะได้สมการอัตราเร็วไปข้างหน้าที่สภาวะ steady state

$$v^f = \frac{V^f_{max}\left[(A)(B) - \frac{1}{K_{eq}}(P)(Q)\right]}{K_{mB}K_{ia} + K_{mB}(A) + K_{mA}(B) + \frac{K_{mQ}K_{iq}K_{mB}}{K_{iq}K_{mP}}(P) + \frac{K_{ia}K_{mB}}{K_{iq}}(Q)} \quad (8\text{-}20)$$

$$+(A)(B) + \frac{K_{mB}K_{mQ}}{K_{mP}K_{iq}}(A)(P) + \frac{K_{ia}K_{mB}}{K_{mP}K_{iq}}(P)(Q) + \frac{K_{mA}}{K_{iq}}(B)(Q)$$

$$+\frac{(A)(B)(P)}{K_{ip}} + \frac{K_{mB}K_{ia}}{K_{mP}K_{iq}K_{ib}}(B)(P)(Q)$$

และถ้าหารสมการที่ 8-19 ด้วย $\frac{V^f_{max}}{K_{eq}}$ จะได้

$$v=\frac{V^r_{max}K_{eq}\left[(A)(B)-\frac{(P)(Q)}{K_{eq}}\right]}{\frac{V^r_{max}}{V^f_{max}}K_{ia}K_{mB}K_{eq}+\frac{V^r_{max}}{V^f_{max}}K_{mB}K_{eq}(A)+\frac{V^r_{max}}{V^f_{max}}K_{mA}K_{eq}(B)+K_{mQ}(P)+K_{mP}(Q)+\frac{V^r_{max}}{V^f_{max}}K_{eq}(A)(B)+\frac{K_{mQ}}{K_{ia}}(A)(P)+(P)(Q)+\frac{V^r_{max}}{V^f_{max}}\frac{K_{mA}K_{eq}}{K_{iq}}(B)(Q)+\frac{V^r_{max}}{V^f_{max}}K_{eq}(A)(B)(P)+\frac{(B)(P)(Q)}{K_{ib}}} \quad (8\text{-}21)$$

และสมการอัตราเร็วของปฏิกิริยาผันกลับที่สภาวะ steady state จะเป็น

$$-v=v^r\frac{V^r_{max}K_{eq}\left[\frac{(P)(Q)}{K_{eq}}-(A)(B)\right]}{denominator} \quad (8\text{-}22)$$

จากสมการอัตราเร็วไปข้างหน้าที่ 8-20 สามารถหาอัตราเร็วไปข้างหน้าเริ่มต้นได้ที่การสร้างผลิตภัณฑ์น้อย ๆ หรือที่ P = Q = 0 จะได้

$$v^f_o=\frac{V^f_{max}(A)(B)}{K_{mB}K_{ia}+K_{mB}(A)+K_{mA}(B)+(A)(B)} \quad (8\text{-}23)$$

เอา (A)(B) หารทั้งเศษและส่วนจะได้

$$\boxed{v^f_o=\frac{V^f_{max}}{\frac{K_{mB}K_{ia}}{(A)(B)}+\frac{K_{mB}}{(B)}+\frac{K_{mA}}{(A)}+1}} \quad (8\text{-}24)$$

สมการที่ 8-24 เป็นสมการอัตราเร็วเริ่มต้นรูปสุดท้ายของปฏิกิริยา compulsory ordered bi bi รูป reciprocal ของสมการที่ 8-24 ที่

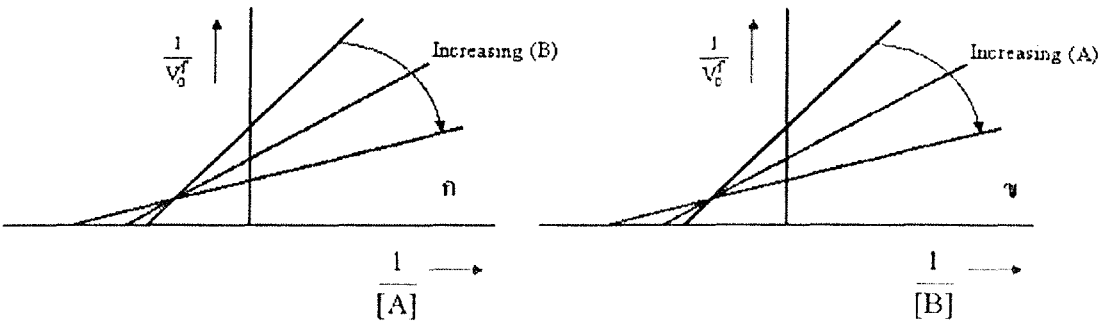
1) fixed A และ varied B

$$\frac{1}{V^f_o}=\frac{K_{mA}}{V^f_{max}}\left(1+\frac{K_{ia}}{K_{mA}}\frac{K_{mB}}{(B)}\right)\frac{1}{(A)}+\frac{1}{V^f_{max}}\left(1+\frac{K_{mB}}{(B)}\right) \quad (8\text{-}25)$$

2) fixed A และ varied B

$$\frac{1}{V^f_o}=\frac{K_{mB}}{V^f_{max}}\left(1+\frac{K_{ia}}{(A)}\right)\frac{1}{(B)}+\frac{1}{V^f_{max}}\left(1+\frac{K_{mA}}{(A)}\right) \quad (8\text{-}26)$$

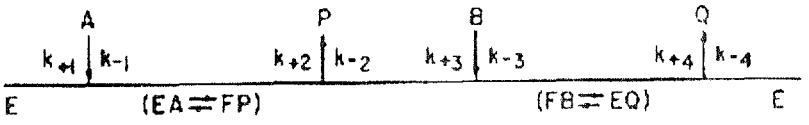
สมการที่ 8-25 เป็นสมการการยับยั้งแบบผสมด้วยสับเสตรท B ที่ varied (A) และสมการที่ 8-26 เป็นการยับยั้งแบบผสมด้วยตัวถูกย่อย A ที่ varied (B) ดังแสดงในรูปที่ 8.3 ก และ ข ตามลำดับ



รูปที่ 8.3 กราฟระหว่าง (ก) $\frac{1}{v_o^f}$ และ $\frac{1}{(A)}$ และ (ข) $\frac{1}{v_o^f}$ และ $\frac{1}{(B)}$ ที่ $K_{iB}>>K_{mA}$ ของ compulsory ordered bi bi (แหล่งที่มา: Kuby SA, A study of enzymes: enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding, volume 1, chapter 2, CRC Press, Inc., USA)

8.4 ปฏิกิริยา ping pong bi bi

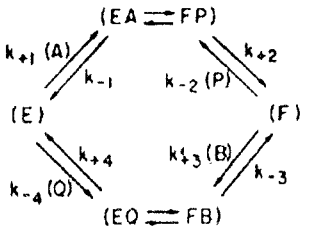
สำหรับปฏิกิริยาที่มีตัวถูกย่อยสองตัวที่สร้างผลิตภัณฑ์สองตัวที่มีกลไกแบบ ping pong bi bi แสดงเป็นแผนภาพของ Cleland ได้ดังข้างล่าง



แผนภาพที่ 11

กลไกของปฏิกิริยา ping pong bi bi เกิดขึ้นในลักษณะที่เลือกให้ตัวถูกย่อยตัวที่หนึ่งมาทำปฏิกิริยาได้เป็น EA complex ซึ่งเปลี่ยนโครงรูปต่อไปเป็น FP แล้วผลิตภัณฑ์ P หลุดออก ส่วนเอ็นไซม์ในรูป F จะจับตัวถูกย่อยตัวที่สองคือ B สร้างเป็น FB แล้วเปลี่ยนโครงรูปเป็น EQ ซึ่งผลิตภัณฑ์ Q จะหลุดออกในที่สุด กลไกแบบนี้จะไม่มีการสร้าง ternary complex เลย เอ็นไซม์ที่ใช้กลไกแบบนี้ได้แก่ transaminases

การหาสมการอัตราเร็วทำได้โดยใช้ King-Altman basic figure ดังแผนภาพที่ 12



แผนภาพที่ 12

จากแผนภาพปิดของ King & Altman พบว่ามีเอ็นไซม์อยู่ทั้งหมด 4 รูป ซึ่งเอ็นไซม์แต่ละรูปจะมี pattern เปิดที่ประกอบด้วยเส้นสามเส้นได้ 4 patterns ดังรูป

แผนภาพที่ 13

จาก interconversion patterns ข้างบนสามารถเขียนรูปของเอ็นไซม์ได้เป็น

$$\frac{(E)}{E_t} = \frac{k_4k_{-1}k_{-2}(P) + k_2k_3k_4(B) + k_3k_4k_{-1}(B) + k_{-1}k_{-2}k_{-3}(P)}{denominator} \tag{8-27}$$

$$\frac{(EA + FP)}{E_t} = \frac{k_1k_4k_{-2}(A)(P) + k_{-2}k_{-3}k_{-4}(P)(Q) + k_1k_3k_4(A)(B) + k_1k_{-2}k_{-3}(A)(P)}{denominator} \tag{8-28}$$

$$\frac{(F)}{E_t} = \frac{k_1k_2k_4(A) + k_2k_{-3}k_{-4}(Q) + k_{-1}k_{-3}k_{-4}(Q) + k_1k_2k_{-3}(A)}{denominator} \tag{8-29}$$

$$\frac{(FB + EQ)}{E_t} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-4}(P)(Q) + k_2k_3k_{-4}(B)(Q) + k_3k_{-1}k_{-4}(B)(Q) + k_1k_2k_3(A)(B)}{denominator} \tag{8-30}$$

กำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็น

$$v_o = k_1(E)(A) - k_{-1}(EA + EP) \tag{8-31}$$

แทนค่ารูปเอ็นไซม์ตามหลักการเดิม ได้เป็น

$$v = \frac{[k_1k_2k_3k_4(A)(B) - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}(P)(Q)]E_t}{\begin{array}{l} k_1k_2(k_{-3} + k_4)(A) + k_3k_4(k_2 + k_{-1})(B) + k_{-1}k_{-2}(k_{-3} + k4)(P) \\ +k-3k-4(k-1+k2)(Q) + k1k3(k2+k4)(A)(B) + k1k-2(k-3+k4)(A)(P) \\ +k-2k-4(k-1+k-3)(P)(Q) + k3k-4(k-1+k2)(B)(Q) \end{array}} \tag{8-32}$$

จะเห็นว่าสมการที่ 8-32 เป็นสมการลดรูปของสมการอัตราเร็วของปฏิกิริยาแบบ compulsory ordered bi bi เนื่องจาก denominator มีเทอมของ constant, (A)(B)(P) และ (B)(P)(Q) ติดอยู่

คูณทั้ง numerator และ denominator ด้วย $\frac{(num_2)}{(coef_{AB})(coef_{PQ})}$ และคูณ (P),(Q), (PQ) และ (AP) ด้วย $\frac{num_1}{num_1}$ จะได้

$$v=\frac{V^f_{max}V^r_{max}\left[(A)(B)-\frac{(P)(Q)}{K_{eq}}\right]}{K_{mB}V^r_{max}(A)+K_{mA}V^r_{max}(B)+V^f_{max}\frac{K_{mQ}}{K_{eq}}(P)+V^f_{max}\frac{K_{mP}}{K_{eq}}(Q)} \qquad (8\text{-}33)$$
$$+V^r_{max}(A)(B)+\frac{V^f_{max}K_{mQ}}{K_{eq}K_{ia}}(A)(P)+\frac{V^f_{max}}{K_{eq}}(P)(Q)+\frac{V^r_{max}K_{mA}}{K_{iq}}(B)(Q)$$

โดยที่ค่า K_{mS}, K_{ia} และ K_{iq} มีค่าเท่ากับของปฏิกิริยา ordered bi bi ส่วนค่าที่แตกต่างคือ

$$K_{ib}=\frac{coef_Q}{coef_{BQ}}=\frac{k_{-3}}{k_3};Ki_p=\frac{coefA}{coefAP}=\frac{k_2}{k_{-2}}$$

และกำหนดให้ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์มีค่าดังนี้

$$K_{mA}=\frac{coef_B}{coef_{AB}};K_{mB}=\frac{coef_A}{coef_{AB}};K_{ia}=\frac{coef_P}{coef_{AP}}=\frac{constant}{coef_A}=\frac{k_{-1}}{k_1};$$
$$K_{mP}=\frac{coef_Q}{coef_{PQ}};K_{mQ}=\frac{coef_P}{coef_{PQ}};K_{iq}=\frac{coef_B}{coef_{BQ}}=\frac{constant}{coef_Q}=\frac{k_4}{k-4}$$
$$V^f_{max}=\frac{num_1}{coef_{AB}};V^r_{max}=\frac{num_2}{coef_{PQ}};K_{eq}=\frac{num_1}{num_2}$$

อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาไปข้างหน้าที่ P = Q = 0 มีค่าเท่ากับ

$$v^f_o=\frac{V^f_{max}(A)(B)}{K_{mB}(A)+K_{mA}(B)+(A)(B)} \qquad (8\text{-}34)$$

เอา (A)(B) หารทั้งเศษและส่วนจะได้

$$\boxed{v^f_o=\frac{V^f_{max}}{\frac{K_{mB}}{(B)}+\frac{K_{mA}}{(A)}+1}} \qquad (8\text{-}35)$$

สมการที่ 8-35 เป็นสมการอัตราเร็วเริ่มต้นรูปสุดท้ายของปฏิกิริยา ping pong bi bi รูป reciprocal ของสมการที่ 8-35 ที่

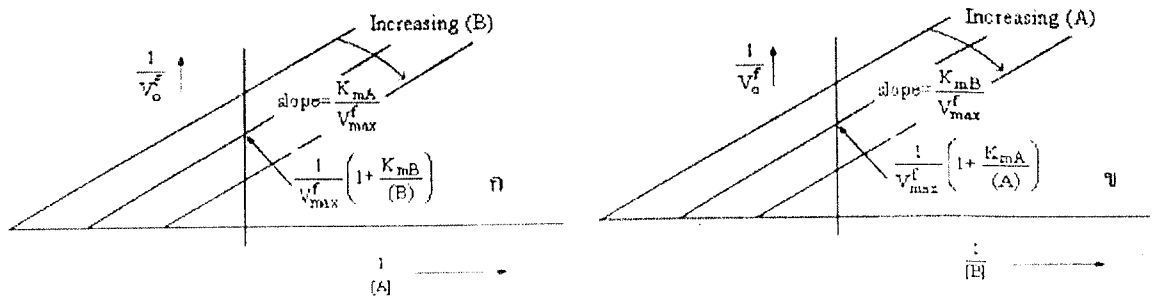
1) fixed A และ varied B

$$\frac{1}{V^f_o}=\frac{K_{mA}}{V^f_{max}}\frac{1}{(A)}+\frac{1}{V^f_{max}}\left(1+\frac{K_{mB}}{(B)}\right) \qquad (8\text{-}36)$$

2) fixed A และ varied B

$$\frac{1}{V^f_o}=\frac{K_{mB}}{V^f_{max}}\frac{1}{(A)}+\frac{1}{V^f_{max}}\left(1+\frac{K_{mB}}{(A)}\right) \qquad (8\text{-}37)$$

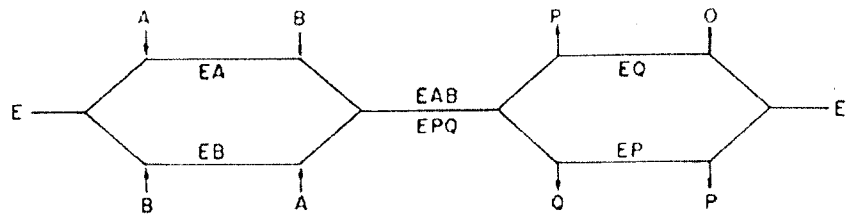
สมการที่ 8-36 และสมการที่ 8-37 เป็นสมการการยับยั้งแบบ uncompetitive ด้วยสับเสตรท B ที่ varied (A) และด้วยตัวถูกย่อย A ที่ varied (B) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 8.4 ก และ ข ตามลำดับ



รูปที่ 8.4 กราฟระหว่าง (ก) $\frac{1}{v_o^f}$ และ $\frac{1}{(A)}$ และ (ข) $\frac{1}{v_o^f}$ และ $\frac{1}{(B)}$ ของกลไก ping pong bi bi (แหล่งที่มา: Kuby SA, A study of enzymes: enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding, volume 1, chapter 2, CRC Press, Inc., USA)

8.5 ปฏิกิริยา random ordered bi bi

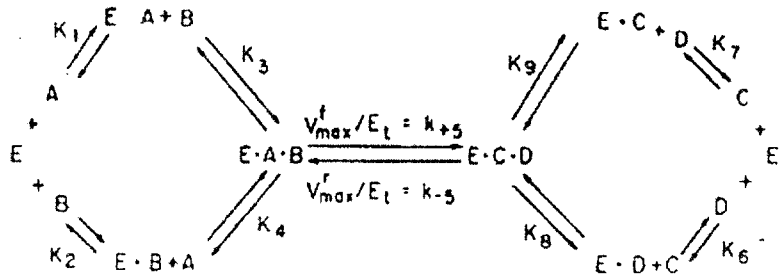
สำหรับปฏิกิริยาที่มีตัวถูกย่อยสองตัวที่สร้างผลิตภัณฑ์สองตัวที่มีกลไกแบบ random orderd bi bi แสดงเป็นแผนภาพของ Cleland ได้ดังข้างล่าง



แผนภาพที่ 14

กลไกแบบนี้จะเกิดการเข้าจับของตัวถูกย่อย Aหรือ B ก่อนก็ได้และจะสร้างผลิตภัณฑ์ P หรือ Q ก่อนก็ได้ ตัวอย่างเอ็นไซม์ที่ใช้กลไกแบบนี้คือ liver alcohol dehydrogenase หรือ glucose 6-phosphate dehydrogenase และเอ็นไซม์ในกลุ่ม aldolases

การหาสมการอัตราเร็วของกลไก random ordered bi bi สามารถใช้แผนภาพของ Kuby แสดงดังข้างล่าง



แผนภาพที่ 15

จากสมมาตรของกลไกจะได้ $K_1K_3 = K_2K_4$ และ $K_7K_9 = K_6K_8$

รูปของเอ็นไซม์ทั้งหมดคือ

$$E_t = E + EA + EB + EAB \tag{8-38}$$

ทำรูปของเอ็นไซม์ทั้งหมดให้อยู่ในรูป (EAB) จากจากคงที่การแตกตัวของเอ็นไซม์แต่ละรูป

$$K_1 = \frac{(E)(A)}{(EA)}; K_2 = \frac{(E)(B)}{(EB)}; K_3 = \frac{(EA)(B)}{(EAB)}; K_4 = \frac{(EB)(A)}{(EAB)}$$

ต่อไปจัดรูปเอ็นไซม์ให้อยู่ในรูป

$$E_t = [1 + \frac{K_4}{(A)} + \frac{K_3}{(B)} + \frac{K_1K_3}{(A)(B)}](EAB)$$

$$(EAB) = \frac{E_t}{[1 + \frac{K_4}{(A)} + \frac{K_3}{(B)} + \frac{K_1K_3}{(A)(B)}]}$$

กำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็น

$$v_o^f = k_5(EAB) \tag{8-39}$$

แทนค่า (EAB) ลงไปในสมการ 8-39

$$v_o^f = \frac{E_t k_5}{[1 + \frac{K_4}{(A)} + \frac{K_3}{(B)} + \frac{K_1K_3}{(A)(B)}]}$$

$$v_o^f = \frac{V_{\max}}{[1 + \frac{K_4}{(A)} + \frac{K_3}{(B)} + \frac{K_1K_3}{(A)(B)}]} \tag{8-40}$$

ถ้าให้ $K_1 \simeq K_4 = \overline{K}_A$ สมการที่ 8-40 สามารถเขียนได้เป็น
$K_2 \simeq K_3 = \overline{K}_B$

$$v_o^f = \frac{V_{\max}}{[1+\frac{\overline{K}_A}{(A)}+\frac{\overline{K}_B}{(B)}+\frac{\overline{K}_A\overline{K}_B}{(A)(B)}]} \qquad (8\text{-}41)$$

สมการที่ 8-41 เป็นสมการอัตราเร็วเริ่มต้นรูปสุดท้ายของปฏิกิริยา random ordered bi bi รูป reciprocal ของสมการที่ 8-41 ที่

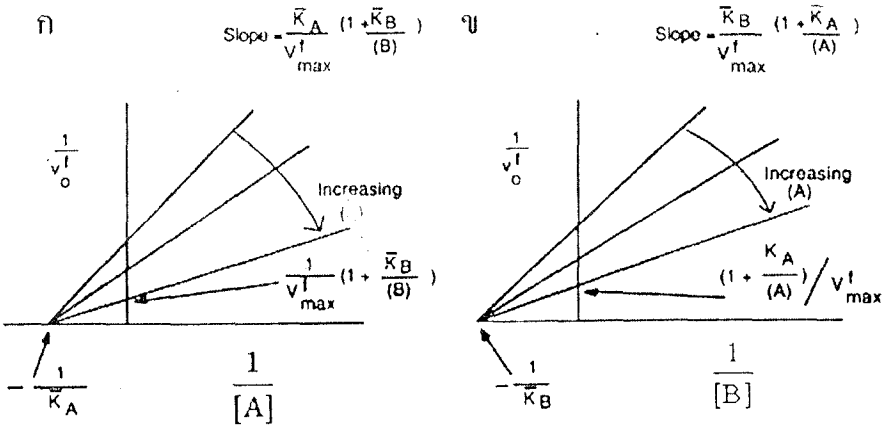
1) fixed A และ varied B

$$\frac{1}{V_o^f} = \frac{\overline{K}_A}{V_{max}^f}\left(1+\frac{\overline{K}_B}{(B)}\right)\frac{1}{(A)}+\frac{1}{V_{max}^f}\left(1+\frac{\overline{K}_B}{(B)}\right) \qquad (8\text{-}42)$$

2) fixed A และ varied B

$$\frac{1}{V_o^f} = \frac{\overline{K}_B}{V_{max}^f}\left(1+\frac{\overline{K}_A}{(A)}\right)\frac{1}{(B)}+\frac{1}{V_{max}^f}\left(1+\frac{\overline{K}_A}{(A)}\right) \qquad (8\text{-}43)$$

สมการที่ 8-40 และสมการที่ 8-43 เป็นสมการการยับยั้งแบบ noncompetitive ด้วยสับเสตรท B ที่ varied (A) และด้วยตัวถูกย่อย A ที่ varied (B) ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 8.5 ก และ ข ตามลำดับ



รูปที่ 8.5 กราฟระหว่าง (ก) $\frac{1}{v_o^f}$ และ $\frac{1}{(A)}$ และ (ข) $\frac{1}{v_o^f}$ และ $\frac{1}{(B)}$ ของกลไก random ordered bi bi

(แหล่งที่มา: Kuby SA, A study of enzymes: enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding, volume 1, Chapter 2, CRC Press, Inc., USA)

8.6 การจำแนกกลไกของปฏิกิริยา bi bi โดยการศึกษาผลของการยับยั้งโดยสารผลิตภัณฑ์ (product inhibition)

จากสมการอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา bi bi อาจสามารถแยกกลไกของปฏิกิริยาได้โดยดูผลของการยับยั้งของ fixed substrate ต่อ varied substrate ในกรณีของ compulsory ordered bi bi ถ้าให้ $K_{ia} = K_{mA}$ จะทำให้สมการที่ 8-25 และ 8-26 เปลี่ยนรูปเป็นการยับยั้งแบบ noncompetitive ซึ่งเหมือนกับกลไกของ random ordered bi bi ทำให้มีความยากลำบากในการจำแนกกลไกทั้งสองออกจากกัน การศึกษาผลของการยับยั้งด้วยสารผลิตภัณฑ์ทำให้จำแนกกลไกทั้งหมดออกจากกันได้

พิจารณาปฏิกิริยา compulsory ordered bi bi

หารสมการอัตราเร็ว 8-20 ด้วย V^r_{max} จะได้

1) ที่ $P \neq 0$ แต่ $Q = 0$

$$v^f = \frac{V^f_{max}(A)(B)}{K_{mB}K_{ia} + K_{mB}(A) + K_{mA}(B) + \frac{V^f_{max}}{V^r_{max}}\frac{K_{mQ}}{K_{eq}}(P) + (A)(B) + \frac{V^f_{max}}{V^r_{max}}\frac{K_{mQ}}{K_{ia}K_{eq}}(A)(P) + \frac{(A)(B)(P)}{K_{ip}}} \quad (8\text{-}44)$$

จัดรูปสมการให้โดยใช้ความสัมพันธ์จาก Haldane equation ที่ว่า $K_{eq} = \frac{V^f_{\max} K_{iq} K_{mP}}{V^r_{\max} K_{ia} K_{mB}}$ จะได้รูป reciprocal ของสมการเป็น

$$\frac{V^f}{V^f_{\max}} = \frac{1}{1 + \frac{K_{ia}K_{mB}}{(A)(B)} + \frac{K_{mB}}{(B)} + \frac{K_{mA}}{(A)} + \frac{K_{mQ}K_{mB}K_{ia}(P)}{K_{iq}K_{mP}(A)(B)} + \frac{K_{mQ}K_{mB}(P)}{K_{iq}K_{mP}(B)} + \frac{(P)}{K_{ip}}} \quad (8\text{-}45)$$

1.1) ที่ fixed B และ P แต่ varied A

1.1.1.) ที่ปฏิกิริยาไม่อิ่มตัวด้วย B (B << 100 K_{mB}) ได้สมการการยับยั้งโดย P ***แบบ mixed***

$$\frac{1}{V^f} = \frac{K_{mA}}{V^f_{\max}}\left[1 + \frac{K_{ia}K_{mB}}{K_{mA}(B)}\left(1 + \frac{K_{mQ}(P)}{K_{iq}K_{mP}}\right)\right]\frac{1}{(A)} + \frac{1}{V^f_{\max}}\left[1 + \frac{K_{mB}}{(B)}\left(1 + \frac{K_{mQ}(P)}{K_{iq}K_{mP}}\right) + \frac{(P)}{K_{ip}}\right] \quad (8\text{-}46)$$

1.1.2) ที่ปฏิกิริยาอิ่มตัวด้วย B (B = 100 K_{mB}) จะได้ $\frac{K_{mB}}{(B)} \simeq 0$ ได้สมการการยับยั้งโดย P ***แบบ uncompetitive***

$$\frac{1}{V^f} = \frac{K_{mA}}{V^f_{\max}}\frac{1}{(A)} + \frac{1}{V^f_{\max}}\left[1 + \frac{(P)}{K_{ip}}\right] \quad (8\text{-}47)$$

1.2) ที่ fixed A และ P แต่ varied B

1.1.1.) ที่ปฏิกิริยาไม่อิ่มตัวด้วย A (A << 100 K_{mA}) ได้สมการการยับยั้งโดย P *แบบ* ***mixed***

$$\frac{1}{V^f} = \frac{K_{mB}}{V^f_{\max}}\left(1+\frac{K_{mQ}(P)}{K_{iq}K_{mP}}\right)\left(1+\frac{K_{ia}}{(A)}\right)\frac{1}{(B)} + \frac{1}{V^f_{\max}}\left[1+\frac{K_{mA}}{(A)}+\frac{(P)}{K_{ip}}\right] \qquad (8\text{-}48)$$

1.1.2) ที่ปฏิกิริยาอิ่มตัวด้วย A (A = 100 K_{mA}) จะได้ $\frac{K_{mA}}{(A)} \simeq 0$ ได้สมการการยับยั้งโดย P *แบบ* ***mixed***

$$\frac{1}{V^f} = \frac{K_{mB}}{V^f_{\max}}\left(1+\frac{K_{mQ}(P)}{K_{iq}K_{mP}}\right)\frac{1}{(B)} + \frac{1}{V^f_{\max}}\left[1+\frac{(P)}{K_{ip}}\right] \qquad (8\text{-}49)$$

2) ที่ $Q \neq 0$ แต่ $P = 0$

$$v^f = \frac{V^f_{max}(A)(B)}{K_{mB}K_{ia} + K_{mB}(A) + K_{mA}(B) + \frac{V^f_{max}}{V^r_{max}}\frac{K_{mP}}{K_{eq}}(Q) + (A)(B) + \frac{K_{mA}}{K_{ip}}(B)(Q)} \qquad (8\text{-}50)$$

จัดรูปสมการให้โดยใช้ความสัมพันธ์จาก Haldane equation ที่ว่า $K_{eq} = \frac{V^f_{\max}K_{iq}K_{mP}}{V^r_{\max}K_{ia}K_{mB}}$ จะได้รูป reciprocal ของสมการเป็น

$$\frac{V^f}{V^f_{\max}} = \frac{1}{1+\frac{K_{ia}K_{mB}}{(A)(B)}+\frac{K_{mB}}{(B)}+\frac{K_{mA}}{(A)}+\frac{K_{mB}K_{ia}(Q)}{K_{iq}(A)(B)}+\frac{K_{mA}(Q)}{K_{iq}(A)}} \qquad (8\text{-}51)$$

1.1) ที่ fixed B และ Q แต่ varied A

1.1.1.) ที่ปฏิกิริยาไม่อิ่มตัวด้วย B (B << 100 K_{mB}) ได้สมการการยับยั้งโดย Q *แบบ* ***competitive***

$$\frac{1}{V^f} = \frac{K_{mA}}{V^f_{\max}}\left(1+\frac{(Q)}{K_{iq}}\right)\left(1+\frac{K_{ia}K_{mB}}{K_{mA}(B)}\right)\frac{1}{(A)} + \frac{1}{V^f_{\max}}\left(1+\frac{K_{mB}}{(B)}\right) \qquad (8\text{-}52)$$

1.1.2) ที่ปฏิกิริยาอิ่มตัวด้วย B (B = 100 K_{mB}) จะได้ $\frac{K_{mB}}{(B)} \simeq 0$ ได้สมการการยับยั้งโดย Q *แบบ* ***competitive***

$$\frac{1}{V^f} = \frac{K_{mA}}{V^f_{\max}}\left(1+\frac{(Q)}{K_{iq}}\right)\frac{1}{(A)} + \frac{1}{V^f_{\max}} \qquad (8\text{-}53)$$

1.2) ที่ fixed A และ Q แต่ varied B

1.1.1.) ที่ปฏิกิริยาไม่อิ่มตัวด้วย A (A << 100 K_{mA}) ได้สมการการยับยั้งโดย Q *แบบ* ***mixed***

$$\frac{1}{V^f} = \frac{K_{mB}}{V^f_{\max}}\left(1+\frac{K_{ia}}{(A)}\right)\left(1+\frac{(Q)}{K_{iq}}\right)\frac{1}{(B)} + \frac{1}{V^f_{\max}}\left(1+\frac{K_{mA}}{(A)}\right)\left(1+\frac{(Q)}{K_{iq}}\right) \qquad (8\text{-}54)$$

1.1.2) ที่ปฏิกิริยาอิ่มตัวด้วย A (A = 100 K_{mA}) จะได้ $\frac{K_{mA}}{(A)} \simeq 0$ จะได้ว่า Q *ไม่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง* (no inhibition)

$$\frac{1}{V^f} = \frac{K_{mB}}{V^f_{\max}}\frac{1}{(B)} + \frac{1}{V^f_{\max}} \qquad (8\text{-}55)$$

สามารถใช้หลักการเดียวกันในการศึกษาผลของการยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์ P และ Q ในการระบุชนิดของปฏิกิริยา ping pong bi bi และ random ordered bi bi ดังแสดงในตารางที่ 8.2

ตารางที่ 8.2 แบบแผนการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา $A + B \rightleftharpoons P + Q$ (แหล่งที่มา: Kuby SA, A study of enzymes: enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding, volume 1, chapter 3, CRC Press, Inc., USA)

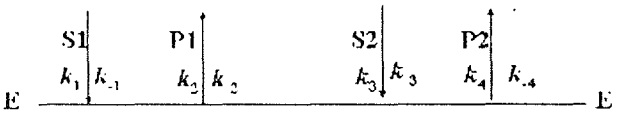
กลไก	ความเข้มข้นของ varied substrate	ความเข้มข้นของ fixed substrate	ผลของการยับยั้งโดย	
			P	Q
Random ordered bi bi -rapid equilibrium	A	B (ไม่อิ่มตัว)	competitive	competitive
		B (อิ่มตัว)	none	none
	B	A (ไม่อิ่มตัว)	competitive	competitive
		A (อิ่มตัว)	none	none
Compulsory ordered bi bi	A	B (ไม่อิ่มตัว)	mixed	competitive
		B (อิ่มตัว)	uncompetitive	competitive
	B	A (ไม่อิ่มตัว)	mixed	mixed
		A (อิ่มตัว)	mixed	none
Ping pong bi bi	A	B (ไม่อิ่มตัว)	mixed	competitive
		B (อิ่มตัว)	none	competitive
	B	A (ไม่อิ่มตัว)	competitive	mixed
		A (อิ่มตัว)	competitive	none

คำถามทบทวนท้ายบท

1. จงเขียนแผนภาพของ Cleland แสดง compulsory ordered ter ter และ random ordered ter ter reaction
2. กำหนดให้ เอ็นไซม์หนึ่ง เร่งปฏิกิริยา

$$S1 + S2 \rightleftharpoons P1 + P2$$

โดยมีแผนภาพของ Cleland ดังข้างล่าง



2.1 เขียน basic King-Altman figure จากตารางข้างบน

2.2 คำนวณจำนวน interconversion patterns ที่มีจำนวนเส้น เท่ากับ n-1

2.3 หาค่าคงที่ที่เกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์แต่ละรูป

2.4 ถ้าให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นข้างล่าง

$$v = \frac{[k_1k_2k_3k_4(S1)(S2) - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}(P1)(P2)]E_t}{\begin{array}{l} k_1k_2(k_{-3}+k_4)(S1) + k_3k_4(k_2+k_{-1})(S2) + k_{-1}k_{-2}(k_{-3}+k4)(P1) \\ +k-3k-4(k-1+k2)(P2) + k1k3(k2+k4)(S1)(S2) + k1k-2(k-3+k4)(S1)(P1) \\ +k-2k-4(k-1+k-3)(P1)(P2) + k3k-4(k-1+k2)(S2)(P2) \end{array}}$$

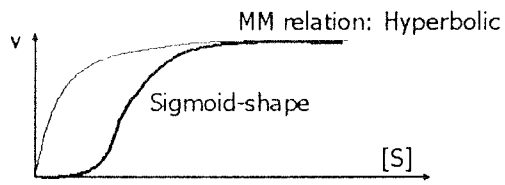
2.5 หาสมการอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาไปข้างหน้าและปฏิกิริยาย้อนกลับ

บทที่ 9

จลนพลศาสตร์แบบอัลโลสเตอริก

ในบทที่ 5 ได้กล่าวถึงการทำงานของเอ็นไซม์ที่มีจลนพลศาสตร์ตามหลักของ Henri-Michaelis-Menten ในบทนี้จะกล่าวถึงเอ็นไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีจลนพลศาสตร์ต่างออกไปคืออัลโลสเตอริกเอ็นไซม์ (allosteric enzyme) ตัวอย่างของโปรตีนที่ไม่ใช่เอ็นไซม์ที่มีจลนพลศาสตร์แบบอัลโลสเตอริกที่เข้าใจเป็นอย่างดีคือ ฮีโมโกลบิน ลักษณะที่สำคัญของการทำงานแบบอัลโลสเตอริกคือ

1. เอ็นไซม์ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย (multi-subunits)
2. เอ็นไซม์มีบริเวณควบคุม (regulatory site หรือ alloteric site) ที่แยกต่างหากจากบริเวณเร่ง (active site)
3. โมเลกุลควบคุม (regulatory molecule) เมื่อจับกับบริเวณควบคุมจะไปมีผลในการกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์
4. การทำงานของเอ็นไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาเกิดผ่านการเปลี่ยนโครงรูป (conformational change) ทำให้เกิดความร่วมมือ (cooperativity) ในการทำงานของหน่วยย่อยขึ้น
5. เนื่องจากมีคุณสมบัติของความร่วมมือ ดังนั้นการเพิ่มของความเข้มข้นของสับแสตรทเพียงเล็กน้อยก็ทำให้เกิดผลกระทบต่อแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์อย่างมากมายได้
6. จลนพลศาสตร์ของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์จะให้กราฟอัตราเร็วที่มีลักษณะเป็น sigmoidal curve (S-shape) แทนกราฟ hyperbolic ดังแสดงในรูปที่ 9.1



รูปที่ 9.1 แสดงจลนพลศาสตร์แบบ Michaelis-Menten และแบบ allosteric

จากรูปที่ 9.1 ที่ช่วง [S] น้อยมาก ๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่าเป็นศูนย์หรือน้อยมาก ๆ แสดงถึงการ delay ในการเร่งปฏิกิริยา แต่เมื่อ [S] เพิ่มขึ้นที่ค่า ๆ หนึ่งอัตราเร็วจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแสดงถึงความร่วมมือในการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

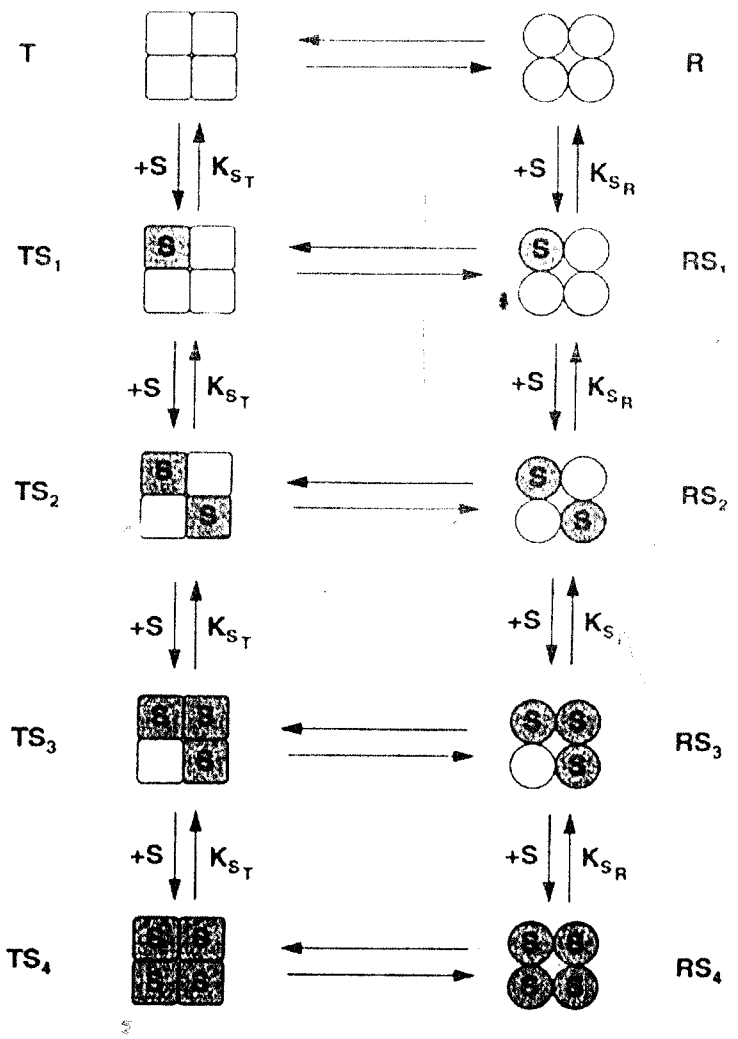
9.1 แบบจำลองการทำงานของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์แบบ concerted transition

แบบจำลอง *"Concerted transition* หรือ *Symmetry model"* ถูกเสนอโดย Monod Wyman และ Changeux ในปี 1965 บางครั้งเรียกแบบจำลองนี้ว่า *"The MWC model"* ได้รับการยอมรับกันทั่วไปในการอธิบายการทำงานของฮีโมโกลบิน แบบจำลองนี้เสนอว่า

1. โปรตีนประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน (protomers) มาจัดเรียงตัวในลักษณะสมมาตรและแต่ละหน่วยย่อยมีบริเวณจับกับตัวถูกย่อยหนึ่งบริเวณ

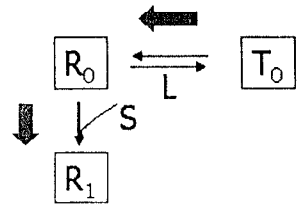
2. หน่วยย่อยมีโครงรูปได้สองรูปคือ "Taut หรือTense, T" ซึ่งมีสัมพรรคภาพต่อตัวถูกย่อยน้อย ส่วนรูป "Relax, R" มีสัมพรรคภาพต่อตัวถูกย่อยสูง
3. ณ สมดุล หน่วยย่อยอาจอยู่ได้ทั้งสองรูปคือ TT หรือ RR
4. การเปลี่ยนโครงรูปเกิดแบบ transition ในลักษณะสมมาตรเสมอและที่สมดุลหน่วยย่อยมีโครงรูปเดียวกันเสมอจะไม่มีหน่วยย่อยผสม TR

แบบจำลองของ Monod และผู้ร่วมงาน (รูปที่ 9.2) แสดงให้เห็นว่าสัมพรรคภาพในการจับของเอ็นไซม์ (affinity of binding) กับตัวถูกย่อยขึ้นอยู่กับโครงรูปของเอ็นไซม์ และการจับของตัวถูกย่อยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนสมดุลไปเพื่อทำให้เอ็นไซม์อยู่ในโครงรูปที่จับกับตัวถูกย่อยได้ดี (รูป R)



รูปที่ 9.2 แผนภาพการจับของหน่วยย่อยของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์กับตัวถูกย่อยตาม symmetry model (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter12, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

แบบจำลองนี้แสดงถึงการทำงานของเอ็นไซม์แบบความร่วมมือเชิงบวกของการที่การจับของตัวถูกย่อยหนึ่งหน่วยย่อยสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนทุกหน่วยย่อยให้อยู่ในรูปที่ชอบกับตัวถูกย่อยสูง (รูปที่ 9.3)

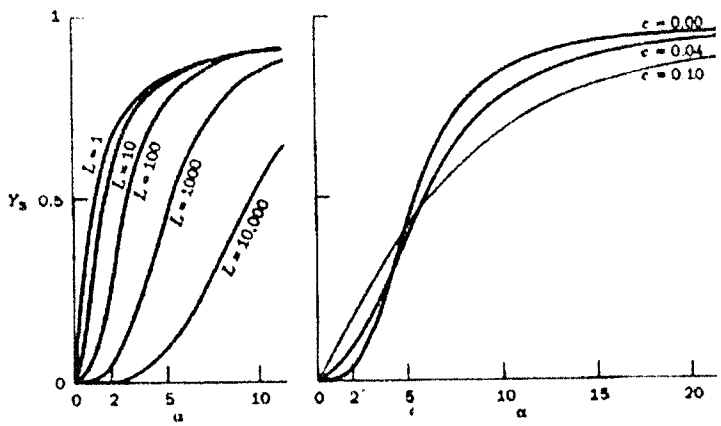


รูปที่ 9.3 การเปลี่ยนสมดุลของปฏิกิริยาของเอ็นไซม์จากรูปที่จับเอ็นไซม์ได้ต่ำ (T) ไปยังรูปที่จับกับตัวถูกย่อยได้สูง (T)

สำหรับเอ็นไซม์สี่หน่วยย่อยมจะมีรูปเป็น R_0 –R_4 และ T_0-T_4 โดยที่ตัวเลข 0-4 แสดงถึงจำนวนของตัวถูกย่อยที่จับอยู่กับเอ็นไซม์ นั่นคือ R_0 และ T_0 เป็นรูปที่ไม่มีตัวถูกย่อยจับส่วน R_4 และ T_4 เป็นรูปมีตัวถูกย่อยจับอยู่ทุกหน่วยย่อย จากรูปให้ค่า L เป็นค่าคงที่อัลโลสเตอริก (allosteric constant) มีค่าเท่ากับ

$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]} \qquad (9\text{-}1)$$

และให้ค่า K_S เป็นค่าคงที่การแตกตัวของการจับของตัวถูกย่อยกับเอ็นไซม์ (dissociation constant of binding) ดังนั้นค่า K_{ST} คือค่าคงที่การแตกตัวของการจับที่สภาวะ T และ ค่า K_{SR} คือค่าคงที่การแตกตัวของการจับที่สภาวะ R เรียกอัตราส่วนของ $\frac{K_{SR}}{K_{ST}} = c$ ว่า "The nonexclusive binding coefficient" แสดงสัมพรรคภาพของตัวถูกย่อยต่อรูป T หรือ R ถ้าค่า L มีค่ามากแสดงว่ากราฟจะมีลักษณะเป็น sigmoidal มากขึ้นแสดงว่าที่สมดุลมีรูป T_0 เสถียร แต่ถ้า c มีค่าน้อยจะแสดงถึงเอ็นไซม์มีความร่วมมือสูง (high cooperativity) (รูปที่ 9.4)



รูปที่ 9.4 ผลของ allosteric constant และ the nonexclusive coefficient ต่อการทำงานของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์ (แหล่งที่มา: Voet D and Voet J, Biochemistry, Chapter10, Wiley International edition, John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd, Singapore)

รูปสมการอัตราเร็วของ dimeric enzyme ตามแบบจำลอง MWC เขียนได้ดังนี้

$$v = \frac{V_{\max}\dfrac{[S]}{K_s}\left(1+\dfrac{[S]}{K_s}\right)}{L+\left(1+\dfrac{[S]}{K_s}\right)^2} \qquad (9\text{-}2)$$

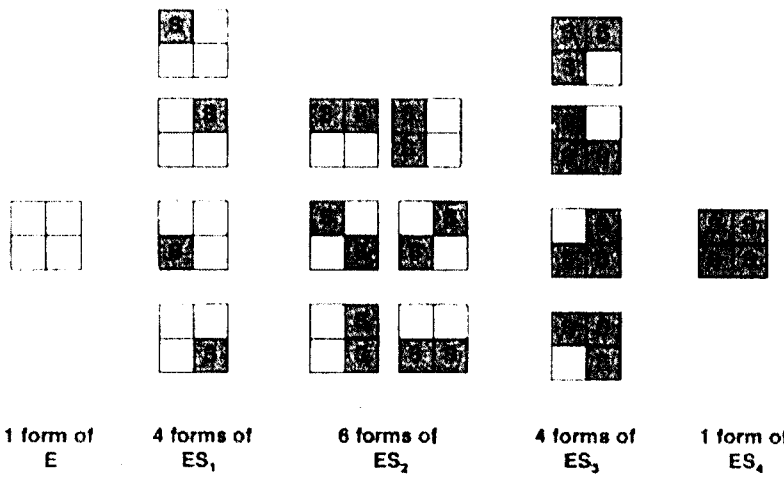
สำหรับเอ็นไซม์ที่มีจำนวนบริเวณจับกับตัวถูกย่อยเท่ากับ h อาจเขียนรูปสมการได้ดังนี้

$$v = \frac{V_{\max}\dfrac{[S]}{K_s}\left(1+\dfrac{[S]}{K_s}\right)^{h-1}}{L+\left(1+\dfrac{[S]}{K_s}\right)^{h}} \qquad (9\text{-}3)$$

แบบจำลอง MWC มีประโยชน์ในการอธิบายการจับแบบมีความร่วมมือเชิงบวกแต่ไม่สามารถใช้อธิบายการทำงานของเอ็นไซม์ที่มีความร่วมมือในเชิงลบได้ จึงได้มีการเสนอแบบจำลองที่ครอบคลุมขึ้นซึ่งเสนอโดย Koshland และผู้ร่วมงาน

9.2 แบบจำลองการทำงานของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์แบบ simple sequential interaction

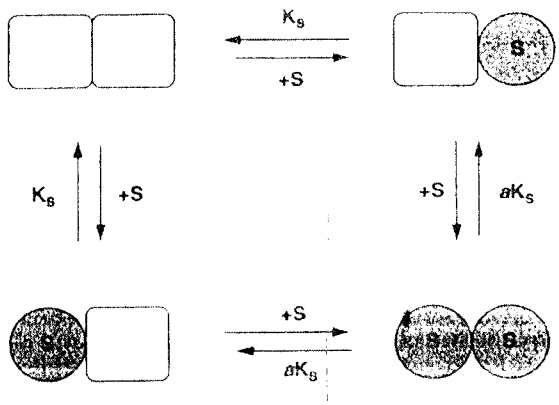
ถ้าเอ็นไซม์ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยและมีบริเวณจับกับตัวถูกย่อยหลายบริเวณ (multiple substrate binding sites) และทุกบริเวณจับกับตัวถูกย่อยด้วยลักษณะที่เหมือน ๆ กัน จะสามารถกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาได้คล้าย ๆ กับอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีบริเวณเร่งบริเวณเดียว ตัวอย่างเอ็นไซม์ที่ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อย (tetrameric subunits) แต่ละหน่วยย่อยมีโอกาสการจับกับตัวถูกย่อยได้เท่า ๆ กัน ดังแสดงในรูปที่ 9.5



รูปที่ 9.5 แผนภาพแสดงโอกาสที่หน่วยย่อยของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์จะจับกับตัวถูกย่อย (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter12, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

ต่อมาในปี 1966 Koshland Nemethy และ Filmer ได้เสนอแบบจำลองการทำงานของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์ที่เรียกว่า *"Simple sequential interaction model"* หรือบางครั้งเรียกว่า *"The KNF model"* โดยมีหลักการดังนี้

1. หน่วยย่อยเริ่มต้นที่ไม่มีตัวถูกย่อยเข้าจับจะไม่ทำงานหรืออยู่ในรูป TT
2. เมื่อตัวถูกย่อยเข้าจับกับหน่วยย่อยที่หนึ่งจะเหนี่ยวนำ (induce fit) ให้หน่วยย่อยนั้นเปลี่ยนโครงรูป ทำให้เกิดหน่วยย่อยแบบผสม (hybrid, TR)
3. หน่วยย่อยที่จับกับตัวถูกย่อย (R) จะเปลี่ยนสัมพรรคภาพในการจับของหน่วยย่อยที่อยู่ถัดไปทำให้ตัวถูกย่อยตัวที่สองเข้าจับได้ดีขึ้น ทำให้เกิดรูป RR (รูปที่ 9.6)



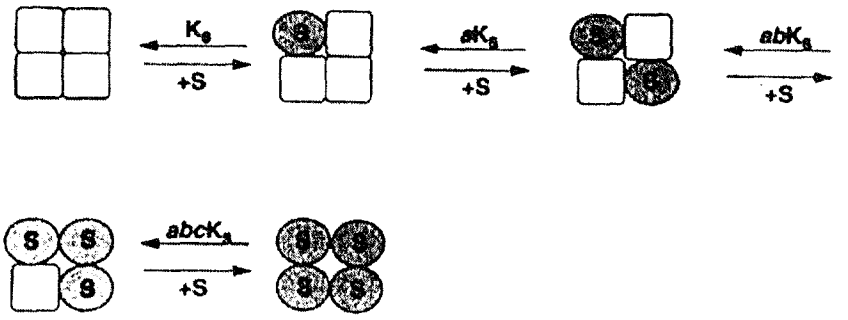
รูปที่ 9.6 แผนภาพแสดงสมดุลของการจับของตัวถูกย่อยของเอ็นไซม์ที่มีสองหน่วยย่อยตามแบบจำลองของ Koshland (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter12, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

จากรูปที่ 9.6 ค่า K_s เป็นค่าคงที่การแตกตัวของการจับของตัวถูกย่อยตัวที่หนึ่ง ส่วนค่า a เป็นแฟกเตอร์ที่ดัดแปลงค่า K_s เมื่อมีการจับกันของหน่วยย่อยที่สอง ถ้าค่า a < 1 แสดงว่ามีการเหนี่ยวนำให้เกิดความร่วมมือในเชิงบวก (positive cooperativity)

สามารถกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ได้ว่า

$$v = \frac{V_{\max}\left(\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{aK_s}\right)}{1 + \frac{2[S]}{Ks} + \frac{[S]^2}{aK_s^2}} \qquad (9\text{-}4)$$

ถ้าเอ็นไซม์ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อยการทำงานของเอ็นไซม์จะแสดงได้ในรูปที่ 9.7



รูปที่ 9.7 แผนภาพแสดงสมดุลของการจับของตัวถูกย่อยของเอ็นไซม์ที่มีสี่หน่วยย่อยตาม Simple sequential model (แหล่งที่มา: Copeland RA, Enzyme, Chapter12, 2nd edition, A John Wiley & Sons, Inc., USA)

สมการ 9-1 จะถูกดัดแปลงไปเป็น

$$v = \frac{V_{\max}\left(\frac{[S]}{K_s} + \frac{3[S]^2}{aK_s^2} + \frac{3[S]^3}{a^2bK_s^3} + \frac{[S]^4}{a^3b^2cK_s^4}\right)}{1 + \frac{4[S]}{Ks} + \frac{6[S]^2}{aK_s^2} + \frac{4[S]^3}{a^2bK_s^2} + \frac{[S]^4}{a^3b^2cK_s^4}} \qquad (9\text{-}5)$$

โดยให้ a, b และ c เป็นแฟคเตอร์ที่ดัดแปลงค่า K_S เมื่อมีการจับกันของหน่วยย่อยที่สอง สาม และสี่ตามลำดับ

9.3 ผลของความร่วมมือต่อกราฟอัตราเร็วของปฏิกิริยา

จากสมการอัตราเร็วของเอ็นไซม์สี่หน่วยย่อย ตามแบบจำลองของ Koshland ถ้าพิจารณาสภาวะของเอ็นไซม์ที่มีความร่วมมือสูงมาก ๆ จนความเข้มข้นของรูปของเอ็นไซม์ที่ไม่อิ่มตัวด้วยตัวถูกย่อย มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับรูปของเอ็นไซม์ที่อิ่มตัวด้วยตัวถูกย่อย สมการที่ 9-5 จะลดรูปเป็น

$$v = \frac{V_{\max}[S]^4}{K' + [S]^4} \qquad (9\text{-}6)$$

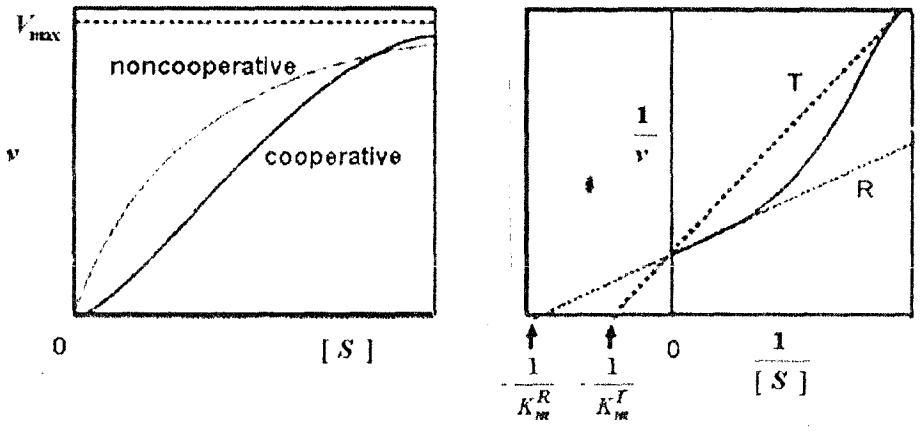
เมื่อให้ค่า $K' = a^3b^2cK_s^4$ สมการที่ 9-6 เป็นสมการสำหรับเอ็นไซม์สี่หน่วยย่อย ถ้าเอ็นไซม์มีหลายหน่วยย่อย และมีจำนวนของบริเวณจับกับสับเสตรทเป็น h สามารถเขียนสมการอัตราเร็วในรูปทั่ว ๆ ไปได้ว่า

$$\boxed{v = \frac{V_{\max}[S]^h}{K' + [S]^h}} \qquad (9\text{-}7)$$

เรียกสมการที่ 9-7 ว่า *"Hill equation"* ในกรณีที่ปฏิกิริยามีความร่วมมือปานกลาง (moderate cooperativity) จำนวนของหน่วยย่อยของเอ็นไซม์ที่ไม่อิ่มตัวด้วยสับเสตรทจะมีผลมาก ดังนั้นค่า h อาจไม่ใช่

ค่าที่แสดงจำนวนของบริเวณจับทั้งหมดและอาจไม่ใช่เลขจำนวนเต็มก็ได้ ในกรณีนี้จะใช้ค่า "*apparent h*, h_H" แทน

ถ้าเขียนกราฟระหว่าง v กับ [S] จะได้กราฟ sigmoidal ดังรูปที่ 9.8 ก และกราฟสมการส่วนกลับระหว่าง $1/v$ กับ $1/[S]$ ไม่เป็นกราฟเส้นตรงแต่มีลักษณะโค้งขึ้นมีความชันไม่คงที่ ถ้าลากเส้นตรงให้สัมผัสเส้นกราฟด้านที่มีความชันน้อยซึ่งเป็นตัวแทนของเอ็นไซม์รูป R จะได้จุดตัดของเส้นสัมผัสบนแกน x มีค่าเท่ากับ $-\frac{1}{K_m^R}$ และถ้าลากเส้นตรงให้สัมผัสเส้นกราฟเส้นกราฟด้านที่มีความชันมากซึ่งเป็นตัวแทนของเอ็นไซม์รูป T จะได้จุดตัดของเส้นสัมผัสบนแกน x มีค่าเท่ากับ $-\frac{1}{K_m^T}$ ดังรูปที่ 9.8 ข

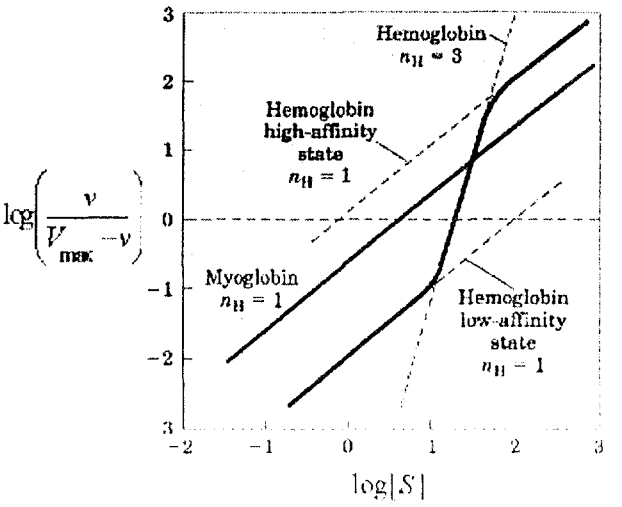


รูปที่ 9.8 กราฟอัลโลสเตอริกระหว่าง v กับ [S] (ก) และกราฟสมการส่วนกลับระหว่าง $1/v$ กับ $1/[S]$ (ข)

ถ้าเปลี่ยนสมการที่ 9-7 ให้อยู่ในรูป logarithmic จะได้รูปของสมการเส้นตรงข้างล่าง

$$\log\left(\frac{v}{V_{\max}-v}\right) = h_H \log[S] - \log[K'] \qquad (9\text{-}8)$$

ถ้าวาดกราฟระหว่าง $\log\left(\frac{v}{V_{\max}-v}\right)$ กับ $\log[S]$ จะเป็นดังรูปที่ 9.9



รูปที่ 9.9 Hill plot ของฮีโมโกลบินจับกับ O_2 (แหล่งที่มา: http://courses.cm.utexas.edu /jrobertus/ch339k/overheads-1/ch7_Hill-plot.jpg)

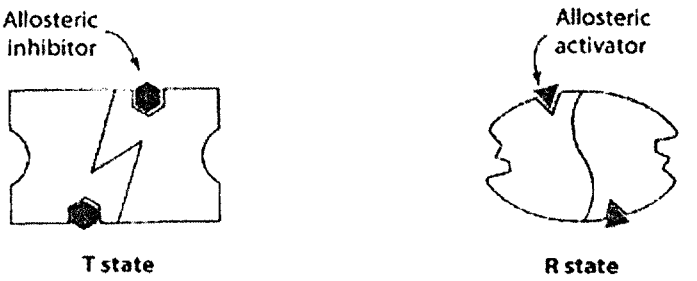
เรียกกราฟดังกล่าวว่า "Hill plot" และเรียกค่าความชัน h_H ว่า *"Hill coefficient"* ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความร่วมมือในการจับกับตัวถูกย่อยของเอ็นไซม์ โดยที่ถ้า

- $h_H = 1$ แสดงว่าเอ็นไซม์ไม่มีความร่วมมือในการจับตัวถูกย่อยระหว่างหน่วยย่อย (ไม่เป็นอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์)
- $h_H > 1$ แสดงว่าเอ็นไซม์มีความร่วมมือในการจับตัวถูกย่อยในเชิงบวก
- $h_H < 1$ แสดงว่าเอ็นไซม์มีความร่วมมือในการจับตัวถูกย่อยในเชิงลบ

9.4 ผลของตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

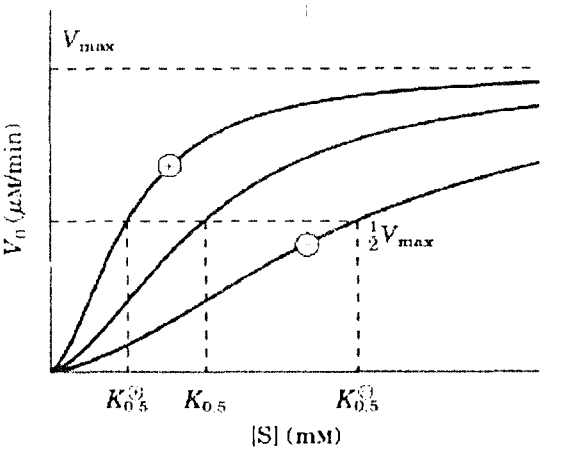
โมเลกุลควบคุมอาจกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ถ้าตัวควบคุมจับที่บริเวณควบคุม (regulatory site หรือ allosteric site) ซึ่งเป็นบริเวณที่แยกจากบริเวณเร่งจะเรียกโมเลกุลนั้นว่า*เป็น "heterotropic effectors"* แต่กรณีของตัวถูกย่อยที่จับที่บริเวณเร่งแล้วเหนี่ยวนำให้เอ็นไซม์ทำงานแบบอัลโลสเตอริกเรียกตัวถูกย่อยว่าเป็น *"homotropic effectors"*

ในส่วนนี้จะกล่าวเฉพาะผลของ heterotropic effectors ต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ตัวกระตุ้น (activator) เมื่อจับกับ allosteric siteของเอ็นไซม์รูป RR แล้วทำให้เอ็นไซม์รูป RR เสถียร ในขณะที่ตัวยับยั้ง (inhibitor) เมื่อจับกับ allosteric site ของเอ็นไซม์รูป TT ทำให้เอ็นไซม์รูป TT เสถียร ดังแสดงในรูปที่ 9.10



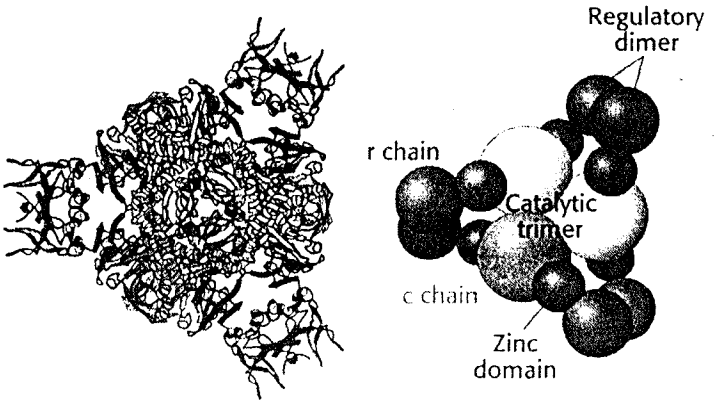
รูปที่ 9.10 การจับของตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งกับอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์ (แหล่งที่มา: Berg JM, Tymoczko JL, and Stryer L, Biochemistry, Chapter 10, online edition)

ถ้าพิจารณากราฟระหว่าง v กับ[S] จะพบว่าตัวกระตุ้นจะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาและทำให้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่อัตราเร็วเท่ากับ $\frac{1}{2}V_{\max}$ หรือค่า $K_{0.5}$ มีค่าลดลง ส่วนตัวกระตุ้นจะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาและทำให้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่อัตราเร็วเท่ากับ $\frac{1}{2}V_{\max}$ หรือค่า $K_{0.5}$ มีค่าลดลง ส่วนตัวยับยั้งจะลดอัตราเร็วของปฏิกิริยาและทำให้ค่าคงที่ $K_{0.5}$ มีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 9.11



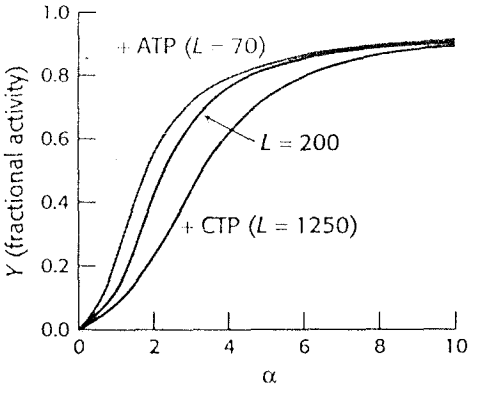
รูปที่ 9.11 ผลของตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งกับอัตราเร็วของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์ (แหล่งที่มา: Berg JM, Tymoczko JL, and Stryer L, Biochemistry, Chapter 10, online edition)

Aspartate transcarbamoylase (ATCase) เป็นตัวอย่างของอัลโลสเตอริกเอ็นไซม์ที่ทราบกลไกและโครงสร้างดี เอ็นไซม์นี้ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อยที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาและอีก 6 หน่วยย่อยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุม (c_6r_6) (รูปที่ 9.12)



รูปที่ 9.12.โครงสร้างหลายหน่วยย่อยของ ATCase (แหล่งที่มา: Berg JM, Tymoczko JL, and Stryer L, Biochemistry, Chapter 10, online edition)

จากการศึกษาพบว่า CTP ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งของเอ็นไซม์นี้ โดยไปทำให้ รูป T ของเอ็นไซม์นี้เปลี่ยนไปเป็น R ได้ยาก ส่วน ATP ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นโดยไปจับกับรูป Rของเอ็นไซม์ทำให้เอ็นไซม์จับกับตัวถูกย่อย (Aspartate) ได้ดีขึ้นดังแสดงในรูปที่ 9.13

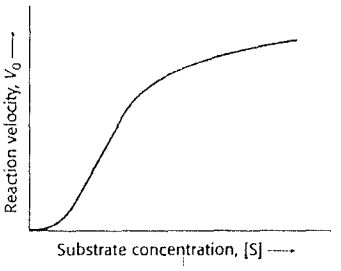


รูปที่ 9.13 ผลของการยับยั้งการทำงานของ ATCase ด้วย CTP และการกระตุ้นด้วย ATP (แหล่งที่มา: Berg JM, Tymoczko JL, and Stryer L, Biochemistry, Chapter 10, online edition)

จากกราฟจะเห็นว่าตัวกระตุ้นจะเปลี่ยนสมดุลของปฏิกิริยาโดยไปลดค่าคงที่ L ทำให้ปฏิกิริยามีลักษณะเหมือนปฏิกิริยาตามกฎของ Michaelis-Menten มากขึ้น ส่วนตัวยับยั้งไปเพิ่มค่าคงที่ L ทำให้ปฏิกิริยามีลักษณะเป็น sigmoidal มากขึ้น

คำถามทบทวนท้ายบท

1. จงอธิบายแบบจำลองการทำงานของเอ็นไซม์แบบ symmetry model
2. ตามข้อเสนอแบบ simple sequential interaction การจับของตัวถูกย่อยโมเลกุลแรกกับหน่วยย่อยที่หนึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าคงที่การแตกตัวของกาจับของตัวถูกย่อยกับหน่วยย่อยอื่น ๆ อย่างไร
3. ใช้กราฟ sigmoidal ข้างล่างวิเคราะห์รูปของเอ็นไซม์ที่มีสองหน่วยย่อยที่ สภาวะ 2 สภาวะคือ 1) ที่ [S] ต่ำๆ และ 2) ที่ [S] สูง ๆ



4. การจับกับของ allosteric activator มีผลกระทบต่อค่า allosteric constant ของเอ็นไซม์อย่างไร อธิบาย
5. สมการข้างล่างสามารถกำหนดความเป็น cooperativity ของเอ็นไซม์ได้อย่างไร

$$\log\left(\frac{v}{V_{\max} - v}\right) = h_{II} \log[S] - \log[K']$$

บรรณานุกรม

พัชรา วีระกะลัส, "เอ็นไซม์", พิมพ์ครั้งที่ 2 (ฉบับแก้ไขปรับปรุง), สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 2543

Berg J.M, Timoczko J.L. and Stryer L., "Biochemistry", W.H. Freeman and Co., New York, online edition, c2002.

Berg J.M., Tymoczko L.M. and Stryer L., "Biochemistry", W.H. Freeman and Co., New York, 6th edition, 2006.

Copeland R.A., "Enzyme", A John Wiley & Sons, Inc., USA, 2nd edition, 2000.

Kuby S.A., "A study of enzymes: enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding", CRC Press, Inc., USA, volume 1, 1990.

Petsko G.A. and Ringe D., "Protein Structure and Function", Blackwell Publishing Ltd., UK, online edition, 2004.

Price N.C. and Stevens L., "Fundamentals of Enzymology", Oxford University Press, UK, 3rd edition, 1999.

Voet D. and Voet G.J., "Biochemistry", John Wiley & Sons (Asia) Pte, Ltd., Singapore, Wiley International edition, 2004.