การทดลองที่ 10 เอนไซม์

อ.ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ที่เป็นโปรตีนทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์ให้เกิดขึ้นในสภาวะที่อุณหภูมิไม่สูง (37°ซ) และพีเอชที่เป็นกลาง ดังนั้นเอนไซม์ได้ชื่อว่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biological catalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) หมายถึงสารที่สามารถเร่งปฏิกิริยาให้ดำเนินไปได้เร็วขึ้น โดยที่ตัวมันเองไม่ถูกเปลี่ยนแปลงเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลง การทำงานของตัวเร่งปฏิกิริยาคือ การไปลดค่าพลังงานอิสระของการกระตุ้น

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีลักษณะเด่น คือ มีความจำเพาะทางปฏิกิริยาโดยเร่งปฏิกิริยาได้เพียงแบบเดียวและมีความจำเพาะต่อสับสเตรท ลักษณะทั้งสองมีประโยชน์ในการจำแนกเอนไซม์ออก เป็น 6 จำพวกใหญ่ตามลักษณะของปฏิกิริยา และแบ่งเป็นหมู่ย่อย ๆละเอียดลงไปอีก โดยรายละเอียดทั้งหมดระบุแทนด้วยเลขรหัส เช่น EC.3.2.1.1 คือ เอนไซม์ 1, 4-α-D-glucan glucano hydrolase หรือ α-amylase

การทำงานของเอนไซม์หาได้โดยวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา ซึ่งอาจทำโดยวัดความเข้มข้นของสับสเตรท หรือของผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อนำผลที่ได้ไปเขียนกราฟจะได้เส้นกราฟในช่วงแรกเป็นเส้นตรงซึ่งแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ในช่วงหลังการเพิ่มของผลิตภัณฑ์หรือการลดลงของสับสเตรทจะค่อย ๆ ช้าลง ดังนั้นการวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ต้องใช้ช่วงแรกของกราฟที่เป็นเส้นตรงซึ่งเรียกว่า อัตราความเร็วเริ่มต้น (initial rate) อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเตรท พีเอช อุณหภูมิ และปริมาณเอนไซม์ บางชนิดอาจต้องอาศัยโคแฟคเตอร์ ซึ่งอาจเป็นไอออนของโลหะหรือต้องอาศัยโคเอนไซม์ นอกจากนี้การทำงานยังอาจถูกยับยั้งด้วยสารเคมีบางชนิดทั้งในลักษณะการยับยั้งแบบทวนกลับไม่ได้และแบบทวนกลับได้

การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาเอนไซม์ไดแอสเทส (diastase) ซึ่งเป็นแอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) ชนิดหนึ่งและเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ทั้งคู่จัดอยู่ในเอนไซม์จำพวกไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งการทำงานย่อยสลายสับสเตรทต้องอาศัยน้ำเข้าร่วมในปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไดแอสเทส คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก แอลฟา-1, 4 ในแป้งโดยมีน้ำเข้าร่วมด้วยได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นเด็กซ์ทริน มอลโทไตรโอส มอลโทส และกลูโคส ดังเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\textbf{Starch} + H_2O \xrightarrow{\alpha\text{ - amylase}} \textbf{dextrin + maltotriose + maltose + glucose}$$

ส่วนปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ยูรีเอส คือปฏิกิริยาการย่อยพันธะเอไมด์ในโครงสร้างของยูเรีย และได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการ

$$H_2NCONH_2 + H_2O \xrightarrow{\text{urease}} 2\ NH_3 + CO_2$$

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองที่ 10.1 – 10.3

1. น้ำแป้ง (0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์)
2. สารละลายไอโอดีน (0.005 กรัมเปอร์เซ็นต์ไอโอดีน ใน0.05 กรัมเปอร์เซ็นต์โปตัสเซียมไอโอไดด์)
3. สารละลายเอนไซม์ไดแอสเทส (0.1 กรัมเปอร์เซ็นต์)
4. กรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์
5. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0
6. Universal buffer พีเอช 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0

การทดลองที่ 10.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

วิธีทดลอง

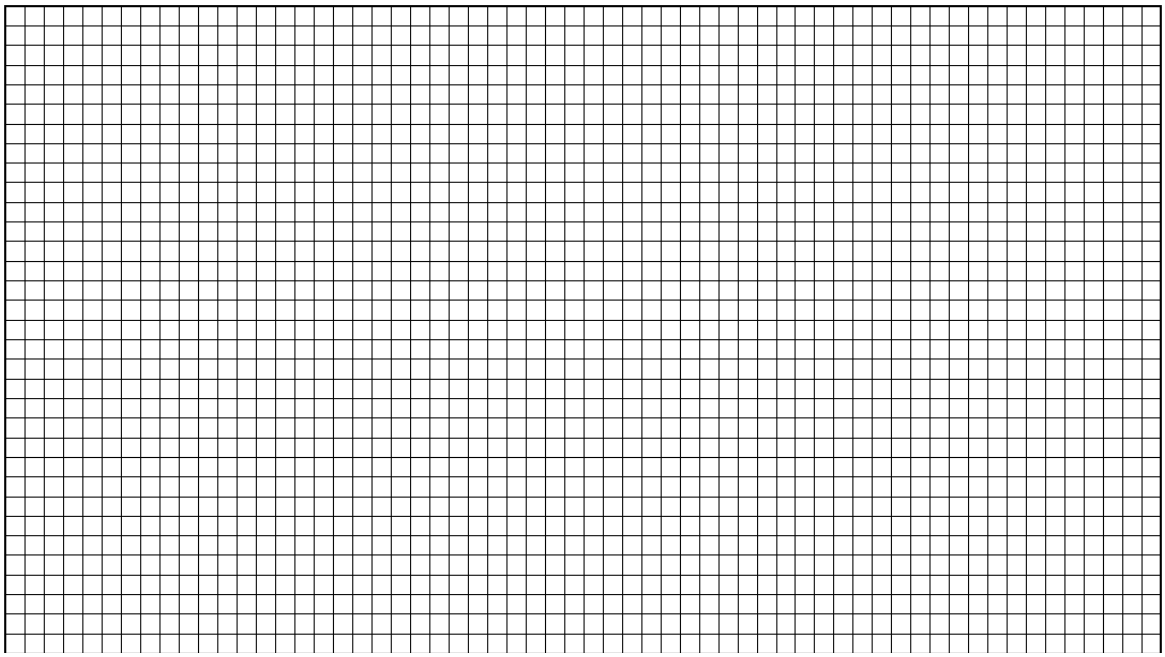
1. ปิเปตสารละลายที่ใช้ลงในหลอดทดลอง 10 หลอดดังตารางข้างล่างนี้ แล้วผสมให้เข้ากัน และ **<u>จับเวลาทันทีหลังการเติมสารละลายเอนไซม์ไดแอสเทสหรือน้ำกลั่น แล้วให้ปฏิกิริยาของแต่ละหลอดเกิดขึ้นเป็นเวลา 10 นาทีพอดี</u>**

สารละลายที่เติม		หลอดที่									
		P4		P5		P6		P7		P8	
		A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2
น้ำแป้ง (มิลลิลิตร)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Universal buffer	พีเอช 4.0 (มิลลิลิตร)	5	5	–	–	–	–	–	–	–	–
	พีเอช 5.0 (มิลลิลิตร)	–	–	5	5	–	–	–	–	–	–
	พีเอช 6.0 (มิลลิลิตร)	–	–	–	–	5	5	–	–	–	–
	พีเอช 7.0 (มิลลิลิตร)	–	–	–	–	–	–	5	5	–	–
	พีเอช 8.0 (มิลลิลิตร)	–	–	–	–	–	–	–	–	5	5
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)		0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–
สารละลายเอนไซม์ไดแอสเทส (มิลลิลิตร)		–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5

2. เมื่อปฏิกิริยาของหลอดใดเกิดขึ้นครบเวลา 10 นาทีพอดี ให้ปิเปตดูดสารละลายออกมาจากหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่มี 5 มิลลิลิตรของ 0.1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกอยู่ ผสมให้เข้ากัน
3. ดูดสารละลายในข้อ 2 ออกมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่มี 5 มิลลิลิตรของสารละลายไอโอดีนอยู่ ผสมให้เข้ากัน
4. วัดค่าการดูดแสงทุกหลอดที่ 620 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายไอโอดีนในการตั้ง 100% T
5. คำนวณหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่พีเอชต่าง ๆเป็นค่าการดูดแสงที่ลดลงใน 1 นาที (ΔA/นาที) แล้วเขียนกราฟระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยา (แกน Y) และพีเอช (แกน X) (วิธีการคำนวณและแก้ไขผลการทดลองอยู่ท้ายการทดลองที่ 10.3)
6. หาข้อสรุปว่าเอนไซม์ไดแอสเทสทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชใด

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 10.1

	พีเอช 4.0	พีเอช 5.0	พีเอช 6.0	พีเอช 7.0	พีเอช 8.0
ค่าการดูดแสงที่ 620 นาโนเมตร ของหลอดที่ไม่มีการย่อยแป้ง (A_1)					
ค่าการดูดแสงที่ 620 นาโนเมตร ของหลอดที่มีการย่อยแป้ง (A_2)					
$A_1 - A_2$					
อัตราเร็วของปฏิกิริยา (ΔA/นาที)					



รูปที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ของอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไดแอสเทสที่พีเอชต่าง ๆ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 9.1

การทดลองที่ 10.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายที่ใช้ลงในหลอดทดลอง 10 หลอดดังตารางข้างล่างนี้ แล้วทำการทดลองตามที่ระบุไว้ในตารางกับแต่ละหลอด

สารละลายที่เติม	**หลอดที่**									
	T4		TX		T40		T60		T90	
	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2
น้ำแป้ง (มิลลิลิตร)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 (มิลลิลิตร)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
ผสมให้เข้ากันแล้วนำหลอดไปไว้ที่อุณหภูมิ	4 °ซ (แช่น้ำแข็ง)		อุณหภูมิห้อง		40 °ซ		60 °ซ		90°ซ (ในอ่างน้ำอุ่น)	
	<u>ตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาทีที่อุณหภูมินั้น</u> แล้วเติม									
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–
สารละลายเอนไซม์ไดแอสเทส (มิลลิลิตร)	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5
	เมื่อเติมสารละลายเอนไซม์หรือน้ำกลั่นแล้ว **<u>ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิเดิม จับเวลาทันทีหลังการเติมให้ปฏิกิริยาของแต่ละหลอดเกิดขึ้นครบ 10 นาทีพอดี</u>**									

2. เมื่อปฏิกิริยาของหลอดใดเกิดขึ้นครบเวลา 10 นาทีพอดี ให้ปิเปตดูดสารละลายออกมาจากหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่มี 5 มิลลิลิตรของ 0.1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกอยู่ ผสมให้เข้ากัน

3. ดูดสารละลายในข้อ 2 ออกมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่มี 5 มิลลิลิตรของสารละลายไอโอดีนอยู่ ผสมให้เข้ากัน

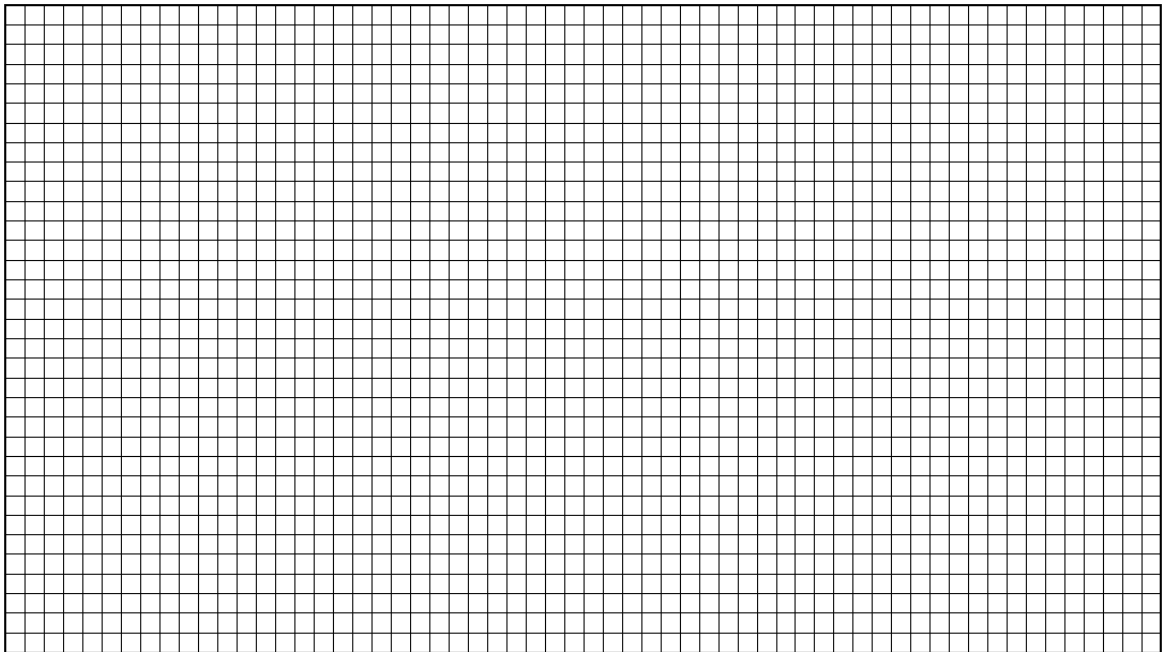
4. วัดค่าการดูดแสงทุกหลอดที่ 620 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายไอโอดีนในการตั้ง 100% T

5. คำนวณหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็น ΔA/นาที แล้วเขียนกราฟระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยา (แกน Y) กับอุณหภูมิ (แกน X) (วิธีการคำนวณและแก้ไขผลการทดลองอยู่ท้ายการทดลองที่ 10.3)

6. หาข้อสรุปว่าเอนไซม์ไอแอสเทสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิใด

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 10.2

	อุณหภูมิ (°ซ)				
	4	อุณหภูมิห้อง ( )	40	60	90
ค่าการดูดแสงที่ 620 นาโนเมตรของหลอดที่ไม่มีการย่อยแป้ง (A_1)					
ค่าการดูดแสงที่ 620 นาโนเมตรของหลอดที่มีการย่อยแป้ง (A_2)					
$A_1 - A_2$					
อัตราเร็วของปฏิกิริยา (ΔA/นาที)					



รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ของอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไดแอสเทสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 9.2

การทดลองที่ 10.3 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายที่ใช้ลงในหลอดทดลอง 10 หลอดดังตารางข้างล่างนี้ แล้วทำการทดลองตามที่ระบุไว้ในตารางกับแต่ละหลอด

สารละลายที่เติม	หลอดที่									
	S4		SX		S40		S60		S90	
	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–
สารละลายเอนไซม์ไดแอสเทส (มิลลิลิตร)	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5	–	0.5
นำหลอดแต่ละคู่ (A_1และA_2) ไปไว้ที่อุณหภูมิที่กำหนดไว้	4 °ซ (แช่น้ำแข็ง)		อุณหภูมิห้อง		40 °ซ		60 °ซ		90°ซ (ในอ่างน้ำอุ่น)	
	<u>ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาทีพอดีที่อุณหภูมินั้น</u> แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดขึ้นจากอุณหภูมินั้น มาอุ่นหรือทำให้เย็นลงให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง (อาจนำไปแช่ในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำที่มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง) แล้วเติม									
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 (มิลลิลิตร)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	เมื่อเติมน้ำแป้งในขั้นต่อไปแล้ว **<u>ให้จับเวลาทันทีหลังการเติม</u>** **<u>ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง</u>** **<u>ให้ปฏิกิริยาของแต่ละหลอดเกิดขึ้นครบ 10 นาทีพอดี</u>**									
น้ำแป้ง (มิลลิลิตร)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

2. เมื่อปฏิกิริยาของหลอดใดเกิดขึ้นครบเวลา 10 นาทีพอดี ให้ปิเปตดูดสารละลายออกมาจากหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่มี 5 มิลลิลิตรของ 0.1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกอยู่ ผสมให้เข้ากัน

3. ดูดสารละลายในข้อ 2 ออกมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่มี 5 มิลลิลิตรของสารละลายไอโอดีนอยู่ ผสมให้เข้ากัน

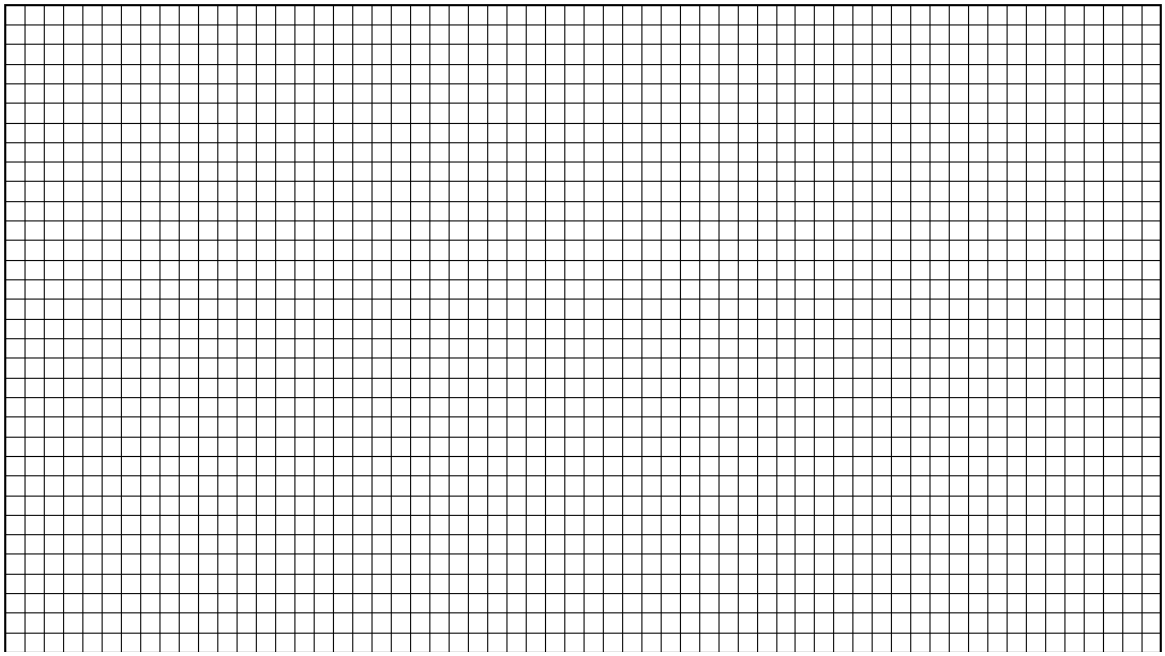
4. วัดค่าการดูดแสงที่ 620 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายไอโอดีนในการตั้ง 100 %T

5. คำนวณหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาของแต่ละหลอดเป็น ΔA/นาที(วิธีการคำนวณและแก้ไขผลการทดลองอยู่ท้ายการทดลองที่ 10.3) และหาเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ของแต่ละอุณหภูมิ โดยให้อุณหภูมิที่มีค่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดมีเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 100 %

6. เขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ (แกน Y) และอุณหภูมิ (แกน X)

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 10.3

	อุณหภูมิ (°ซ)				
	4	อุณหภูมิห้อง ( )	40	60	90
ค่าการดูดแสงที่ 620 นาโนเมตร ของหลอดที่ไม่มีการย่อยแป้ง (A_1)					
ค่าการดูดแสงที่ 620 นาโนเมตร ของหลอดที่มีการย่อยแป้ง (A_2)					
$A_1 - A_2$					
อัตราเร็วของปฏิกิริยา (ΔA/นาที)					
เปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์					



รูปที่ 3 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 10.3

การคำนวณ

1. การคำนวณหาอัตราเร็วของปฏิกิริยา จะต้องทราบ
   ค่า A ของหลอดที่ไม่มีการย่อยแป้งเกิดขึ้น ซึ่งทำโดยใส่น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ = A_1
   ค่า A ของหลอดที่มีการย่อยแป้งเกิดขึ้น = A_2
   อัตราเร็วของปฏิกิริยา = $\frac{A_1 - A_2}{\text{เวลาที่ให้เกิดปฏิกิริยา (นาที)}}$

2. หากหลอดใดวัดค่าการดูดแสงได้เกิน 1 ให้เจือจางด้วยสารละลายไอโอดีนเท่าตัว ค่าการดูดแสงที่อ่านได้ในภายหลังจะต้องคูณด้วยจำนวนเท่าที่ได้เจือจางไป

3. หากหลอดใดมีการย่อยแป้งจนหมด ซึ่งไม่เกิดสีเมื่อเติมลงในสารละลายไอโอดีน ให้ทำการเจือจางสารละลายเอนไซม์แล้วทำการทดลองใหม่อีกครั้ง และค่า ΔA/นาที ที่คำนวณได้จะต้องคูณกลับด้วยจำนวนเท่าที่ได้เจือจางสารละลายเอนไซม์ไป

การทดลองที่ 10.4 ผลของตัวยับยั้งต่อปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ยูรีเอส

สารเคมีที่ใช้

1. สารละลายยูเรีย 1.2% (1.2 กรัมยูเรียในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)
2. สารละลายไทโอยูเรีย 1.5% (1.5 กรัมไทโอยูเรียในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)
3. สารละลายผสมยูเรียและไทโอยูเรีย (1.2 กรัมยูเรียและ 1.5 กรัมไทโอยูเรียในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)
4. สารละลายเอนไซม์ยูรีเอส
5. สารละลายฟีนอลฟ์ธาลีนใน 95% เอธานอล

วิธีทดลอง

1. เติมสารละลายที่ใช้ลงในหลอดทดลอง 3 หลอดดังตารางข้างล่างนี้ แล้วผสมให้เข้ากัน

สารละลายที่เติม	หลอดที่		
	1	2	3
สารละลายยูเรีย (มิลลิลิตร)	2	–	–
สารละลายไทโอยูเรีย (มิลลิลิตร)	–	2	–
สารละลายผสมยูเรียและไทโอยูเรีย (มิลลิลิตร)	–	–	2
สารละลายเอนไซม์ยูรีเอส (มิลลิลิตร)	0.5	0.5	0.5
เติมสารละลายฟีนอลฟ์ธาลีน (หยด)	2	2	2

2. ให้ปฏิกิริยาในแต่ละหลอดเกิดขึ้นเป็นเวลา 5 นาทีพอดี แล้วสังเกตสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 หลอดบันทึกผลไว้

3. หลังจากนั้นให้นำหลอดที่ 3 ที่มีสารละลายผสมยูเรียและไทโอยูเรียเป็นสับสเตรทมาเติมสารละลายยูเรียเพิ่มทีละ 5 หยด แล้วสังเกตสีของสารละลายเมื่อเวลาผ่านไป 3 นาทีว่าเข้มขึ้นเรื่อย ๆ หรือไม่ และเข้ม

เท่าหลอดที่มีสีเข้มที่สุดหรือไม่ หากสียังไม่เข้มเท่า ให้ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้งๆ ละ 5 หยด สังเกตสีทุกครั้ง บันทึกสีในการเติมครั้งสุดท้ายลงในตารางบันทึกผลการทดลอง

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 10.4

หลอดที่	สับสเตรทที่ใช้	สีของสารละลายหลังเกิดปฏิกิริยา และความเข้มของสีเมื่อเทียบกับหลอดที่มีความเข้มสุด
1	ยูเรีย	
2	ไทโอยูเรีย	
3	ยูเรียและไทโอยูเรีย	
	ยูเรียและไทโอยูเรีย (หลอดที่ 3) หลังครบเวลา 5 นาทีแล้วเติมยูเรียเพิ่มเรื่อยๆ	

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 10.4

คำถาม

1. จงสรุปสมบัติของเอนไซม์ไดแอสเทสจากผลที่ได้จากการทดลองที่ 10.1 – 10.3

2. จงเขียนโครงสร้างของยูเรียและไทโอยูเรีย

3. ฟีนอลฟ์ธาลีนที่ใช้ในการทดลองที่ 10.4 ทำหน้าที่อะไร จงอธิบาย

4. สารอะไรที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งในการทดลองนี้ และการยับยั้งนี้เป็นลักษณะการยับยั้งแบบใด ทราบได้อย่างไร

5. เส้นกราฟของลักษณะการยับยั้งที่ระบุไว้ในข้อ 4 มีลักษณะอย่างไรเมื่อเทียบกับเมื่อไม่มีการยับยั้ง จงวาดเส้นกราฟทั้งสอง (ไม่มีการยับยั้งและมีการยับยั้ง) ลงในรูปกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของสับสเตรท