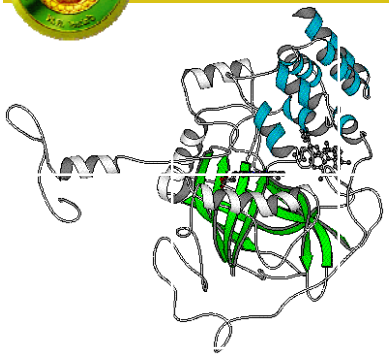
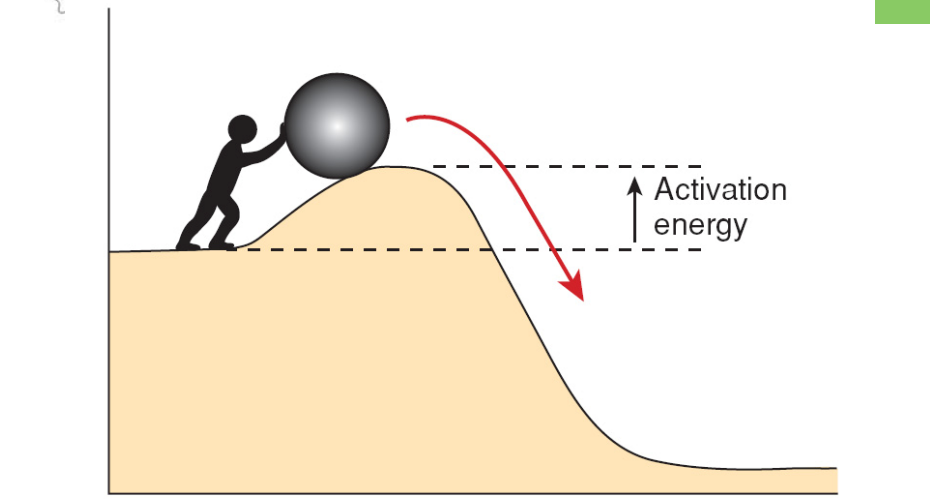


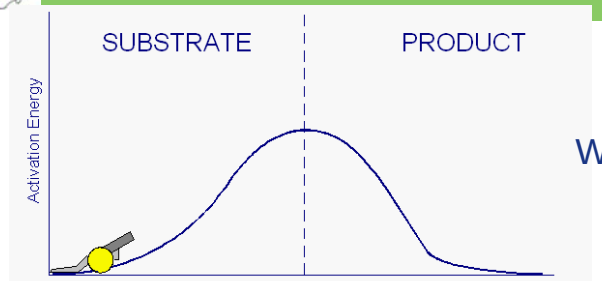
Lab. 5 Enzyme

Dr. Boonsatien Boonsoong

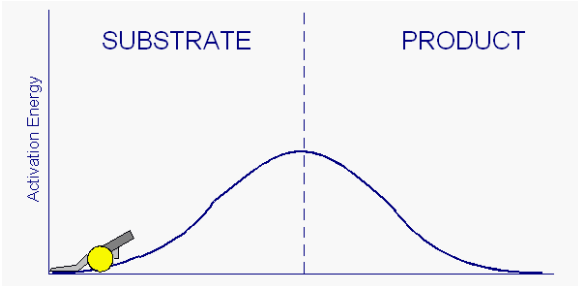
Objectives

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติ และกลไกการทำงานของเอนไซม์
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออัตราการทำงานของเอนไซม์

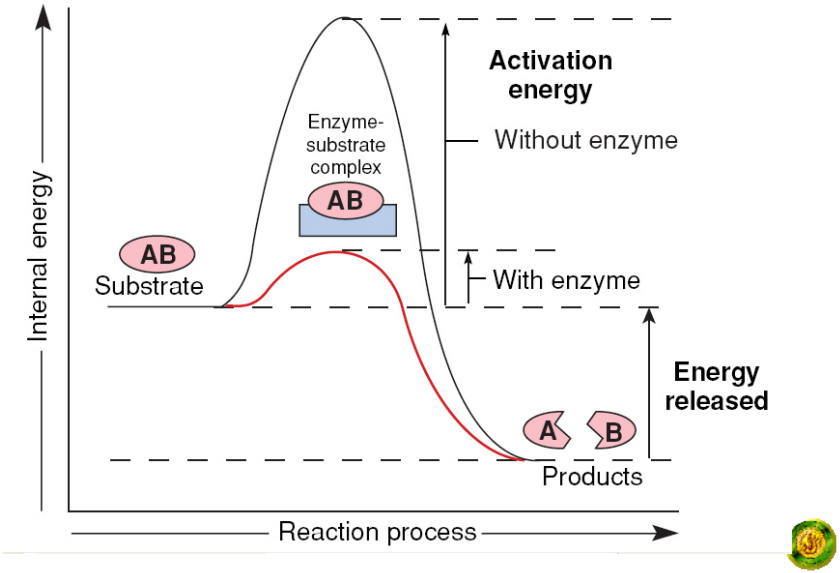


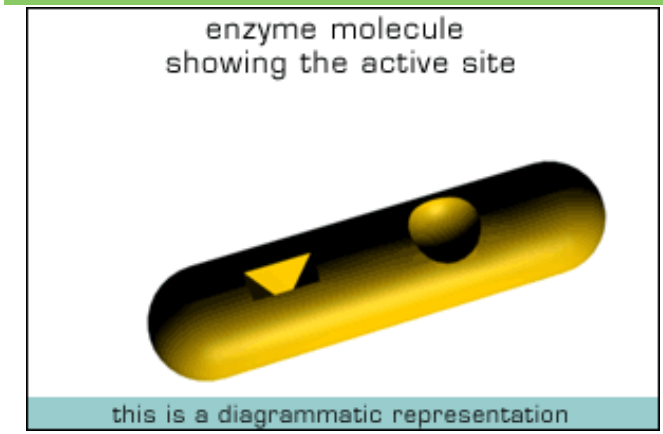


Without enzyme



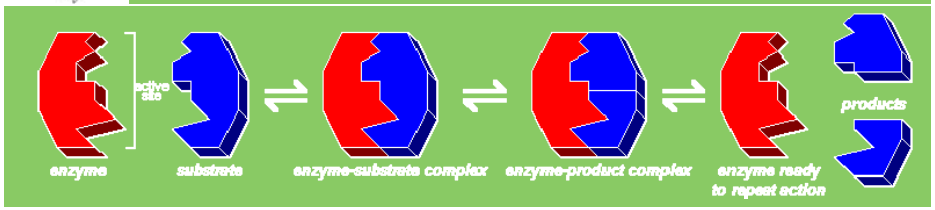
With enzyme



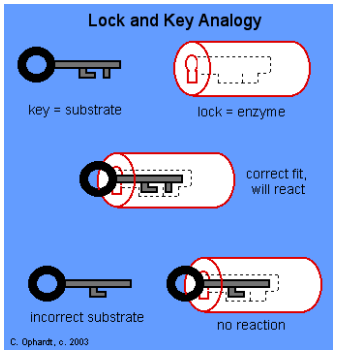


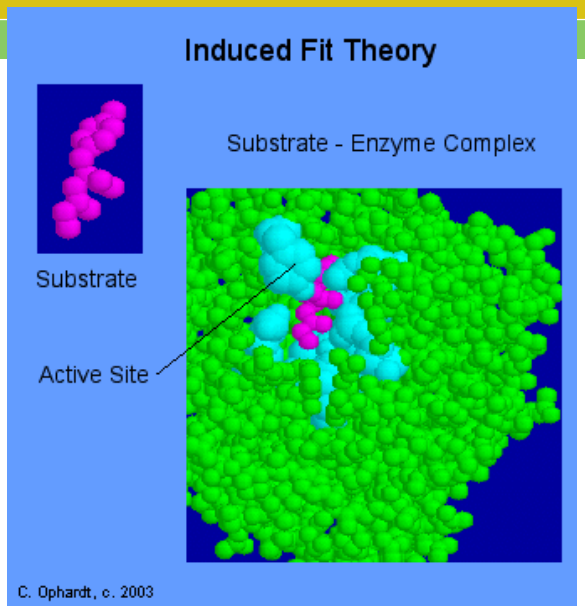
Enzyme + Substrate ----> Enzyme-substrate ----> Enzyme + Product complex

การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง enzyme และ substrate



Lock and Key theory

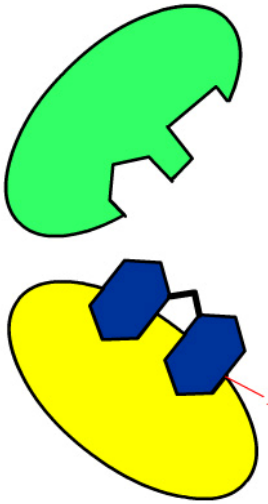




คุณสมบัติของเอนไซม์

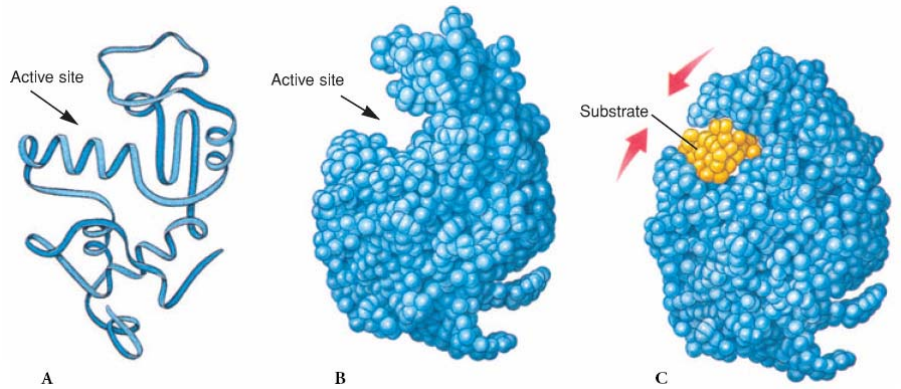
1. ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น $10^8 - 10^{20}$ เท่า และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา เอนไซม์จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง
2. สามารถเร่งปฏิกิริยาได้แม้มีจำนวนน้อย
3. มีความ specificity
4. เร่งได้โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง

Specificity



The double sugar molecule ***can*** fit into the yellow enzyme, so it can help the sugar molecule to be digested.

A perfect fit!



โครงสร้างของ enzyme

- **Apoenzyme** - ส่วนที่เป็นโปรตีน
- **Cofactor** - ส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน

- coenzyme

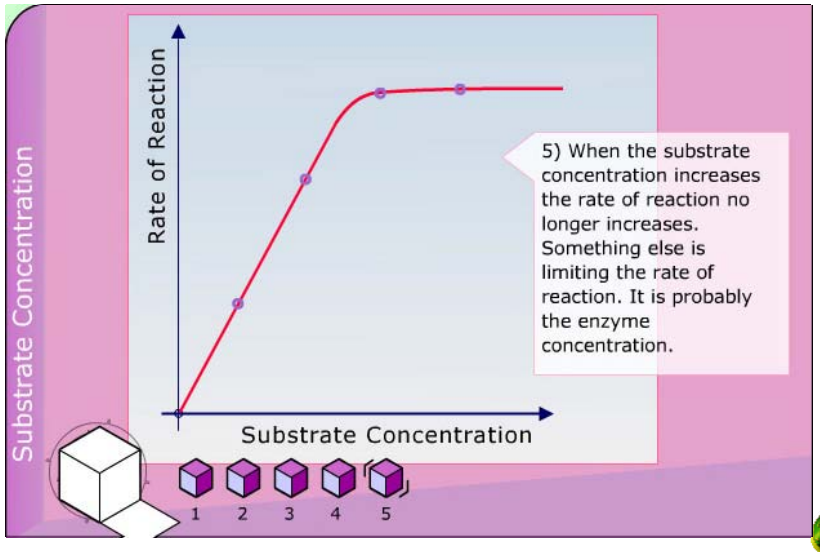
สารอินทรีย์ - Vitamin

- prosthetic group

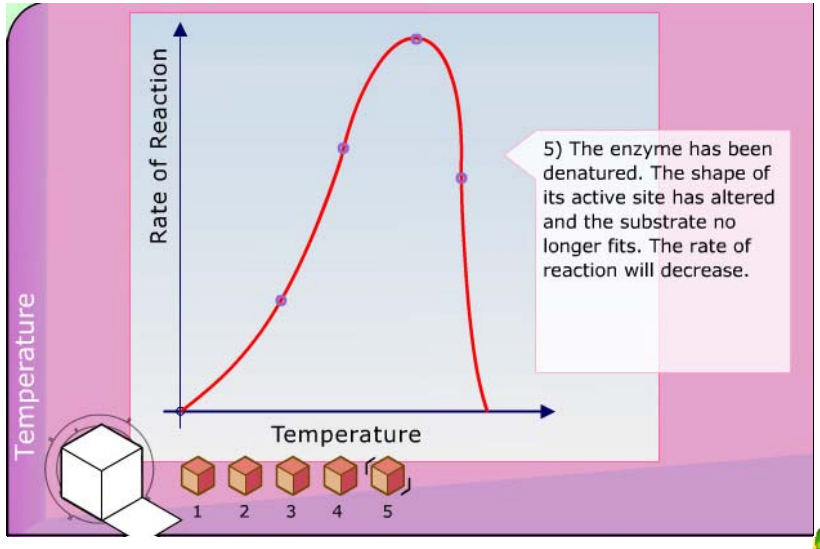
สารอนินทรีย์ - แร่ธาตุ

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

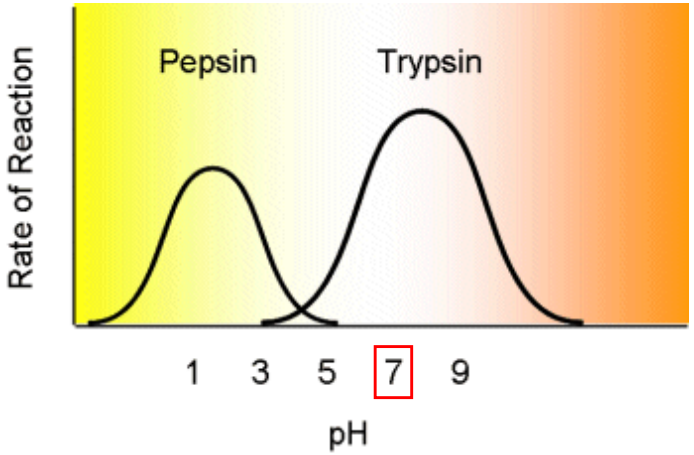
1. ความเข้มข้นของ substrate และความเข้มข้นของ enzyme



2. อุณหภูมิ (Temperature)

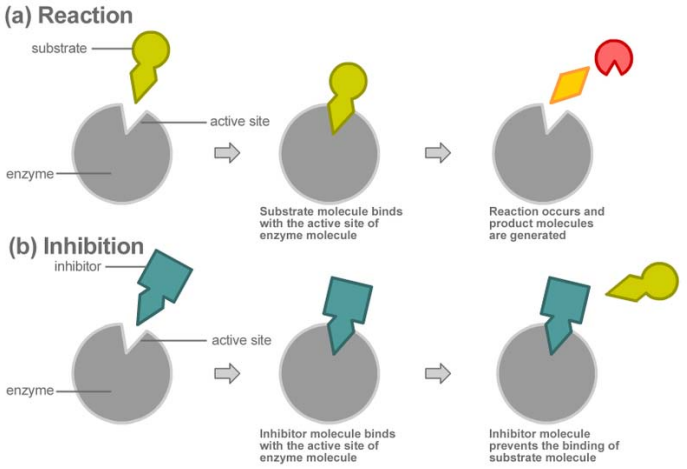


3. ความเป็นกรด-เบส (pH)

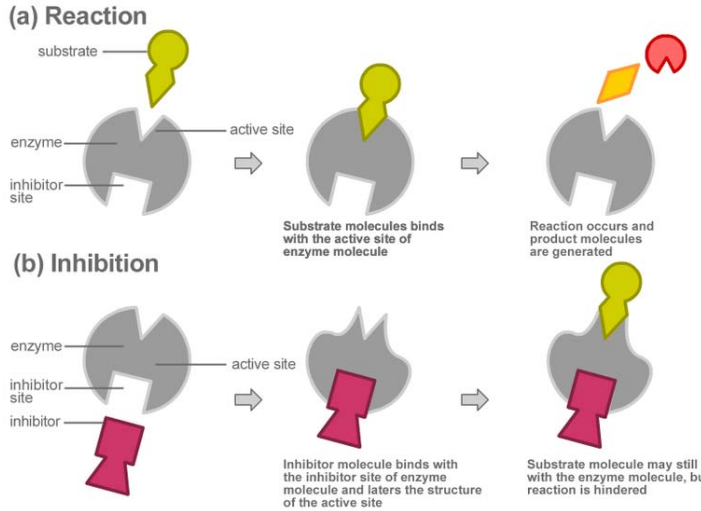


4. ตัวยับยั้ง (Inhibitor)

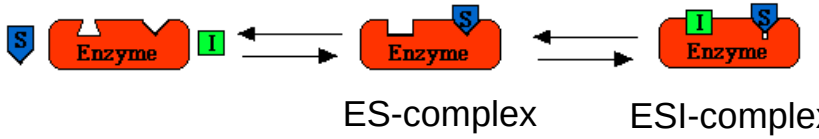
4.1 Competitive inhibitors: จับที่ active site เช่น malonic acid เป็นตัวยับยั้ง succinic dehydrogenase



4.2 Non-competitive inhibitors: จับที่ตำแหน่งอื่นที่ไม่ใช่ active site และทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป เช่น พวกโลหะหนัก



4.3 Uncompetitive inhibitors: จับกับ ES- complex เกิดเป็น ESI-complex ทำให้เกิดปฏิกิริยาไม่ได้

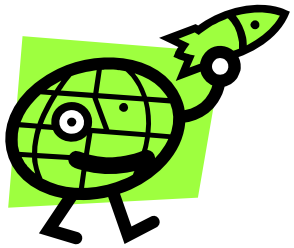


สิ่งที่ควรทราบก่อนทำการทดลองเรื่องเอนไซม์

Buffer solution เป็นสารละลายที่ใช้เพื่อควบคุมให้ pH คงที่ตามที่ต้องการตลอดการทดลอง

Indicator เป็นสารที่ใช้เป็นตัวทดสอบโดยอาจจะทดสอบ substrate ในกรณีที่จะหาอัตราการทำงานของเอนไซม์ หรือใช้ทดสอบผลิตผลในกรณีต้องการทราบผลของสภาพแวดล้อมต่อการทำงานของ enzyme อย่างไร

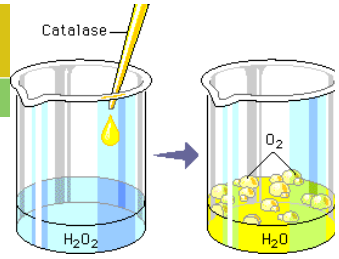
งานที่ต้องปฏิบัติ



Enzyme: น้ำมันฝรั่ง: Catalase

Substrate: H_2O_2

Indicator: O_2

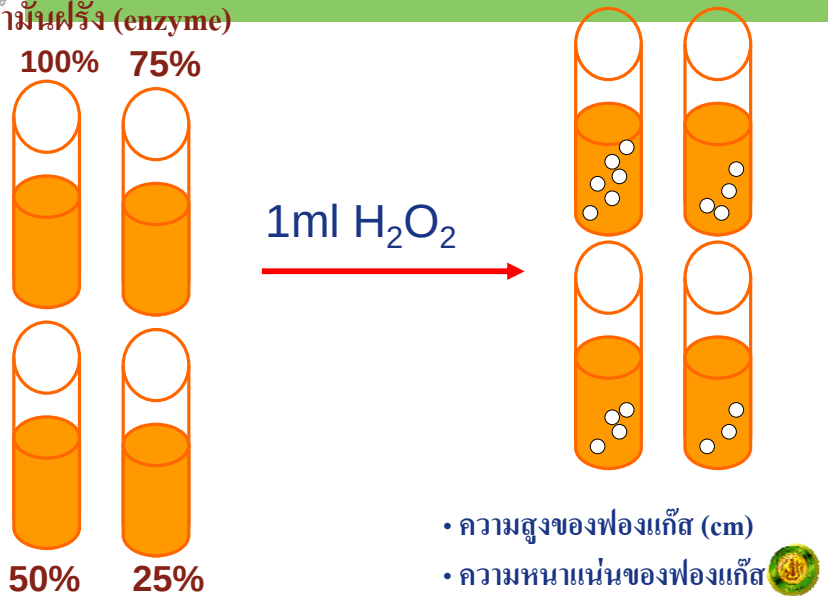


$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + O_2$$

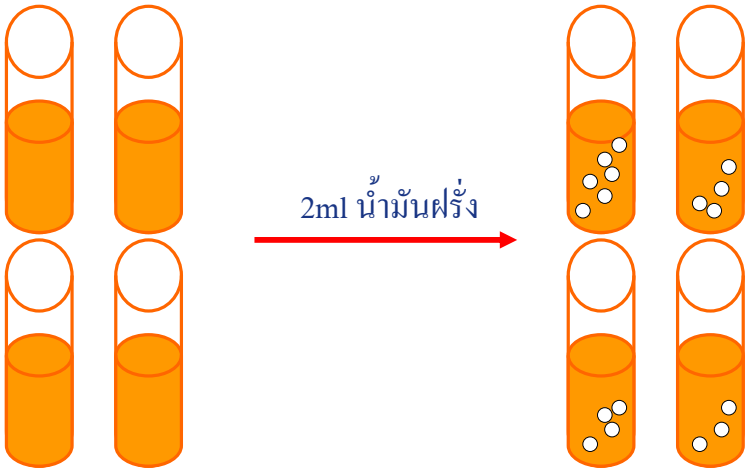
1. ผลของความเข้มข้นของ enzyme ต่ออัตราปฏิกิริยา
2. ผลของความเข้มข้นของ substrate ต่ออัตราปฏิกิริยา
3. อุณหภูมิกับอัตราปฏิกิริยา
4. pH กับอัตราปฏิกิริยา

1. ผลของความเข้มข้นของ enzyme ต่ออัตราปฏิกิริยา

น้ำมันฝรั่ง (enzyme)

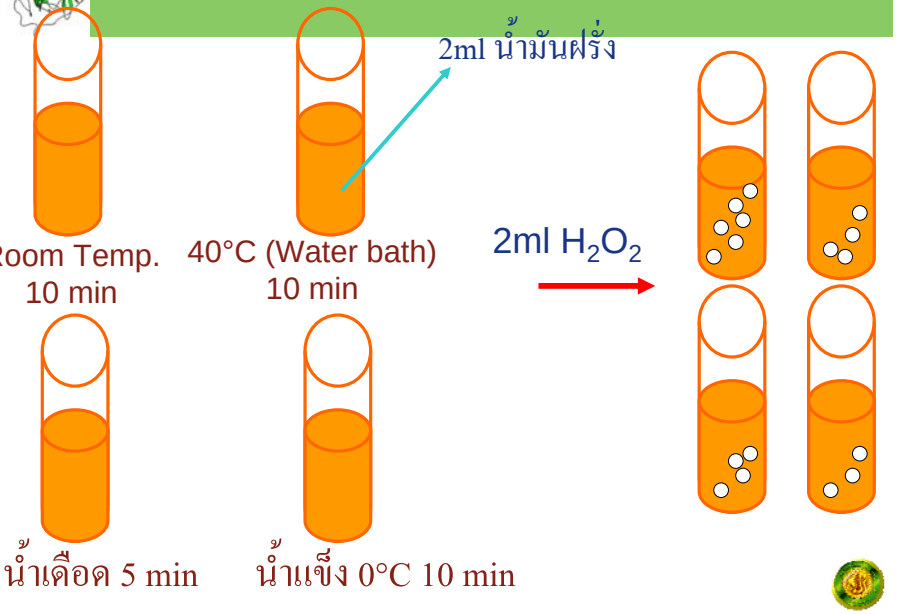


2. ผลของความเข้มข้นของ Substrate ต่ออัตราปฏิกิริยา

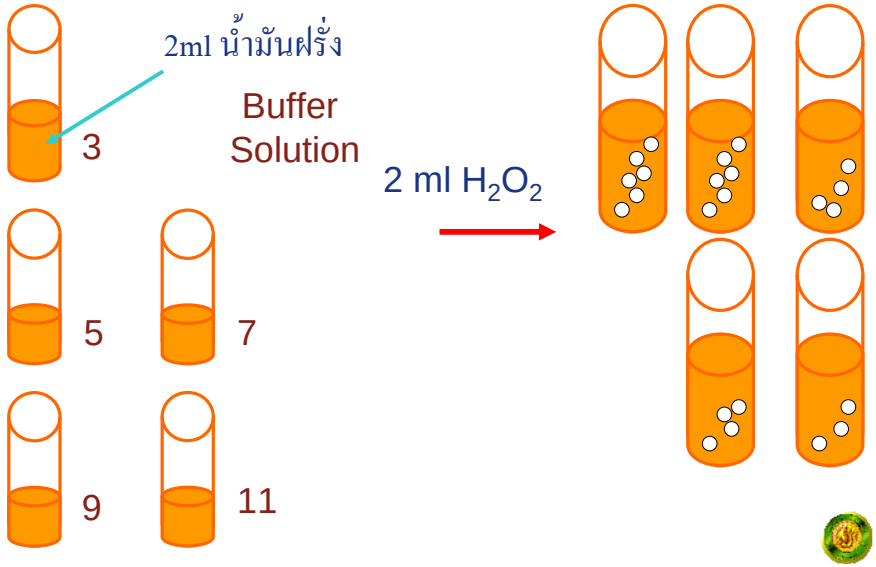


100% 75% 50% 25% H_2O_2

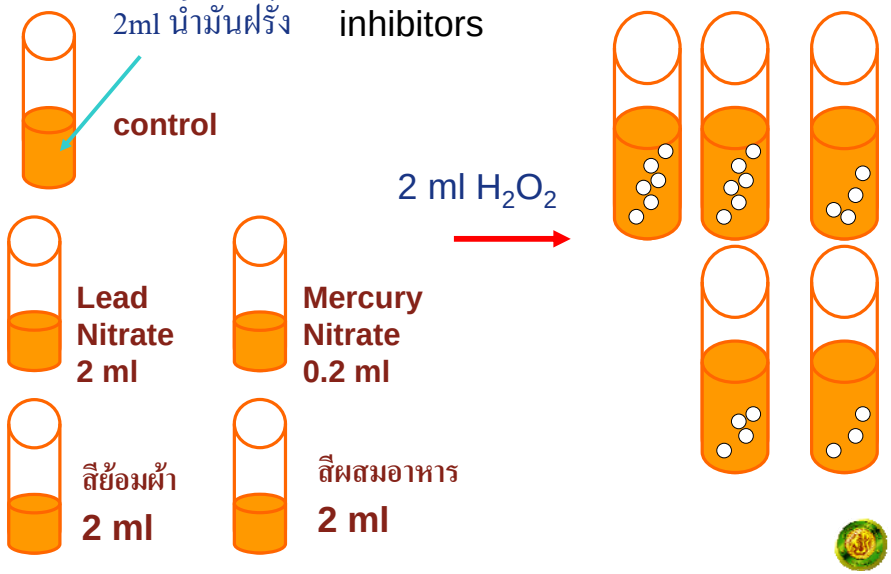
3 . อุณหภูมิกับอัตราปฏิกิริยา



4 . pH กับอัตราปฏิกิริยา

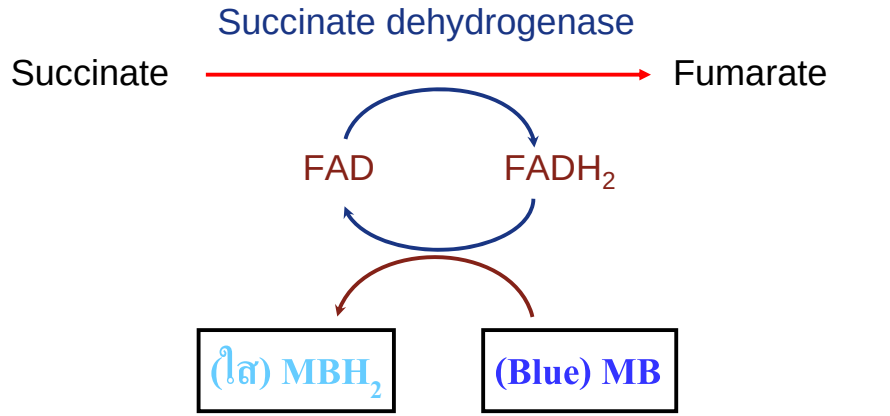


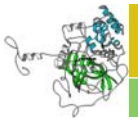
5.1 Non-competitive inhibitor



5.2 Competitive inhibitor

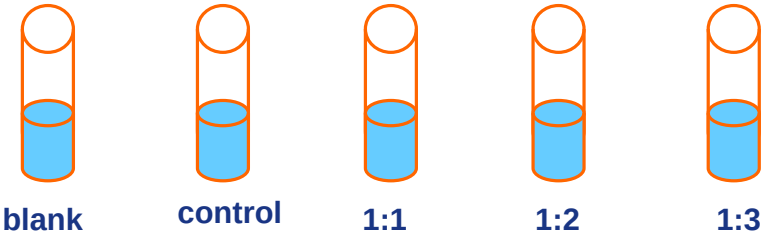
- **Enzyme** — Succinate dehydrogenase จาก yeast
- **Substrate** — Succinic acid
- **Inhibitor** — Malonic acid
- **Product** — Fumaric acid + H^+
- **Indicator** — Methylene Blue





5.2 Competitive inhibitor

Malonic acid : Succinic acid



- 1 ml 2% ยีสต์ใน sucrose 0.2%
- 0.5 ml 0.2% MB
- Malonic acid : Succinic acid
- น้ำกลั่น

1 หยด ~ 0.1 ml

สังเกตความเข้มของสี MB