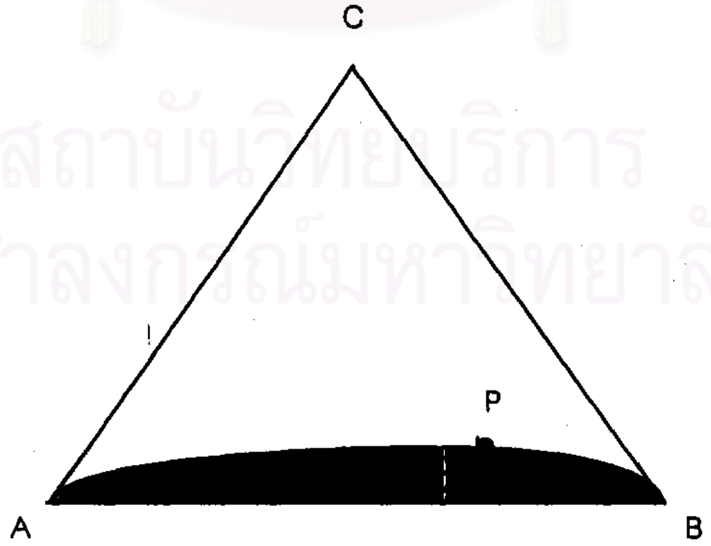
บทที่ 3

ทฤษฎี

3.1 ระบบรีเวิร์สไมเซลล์

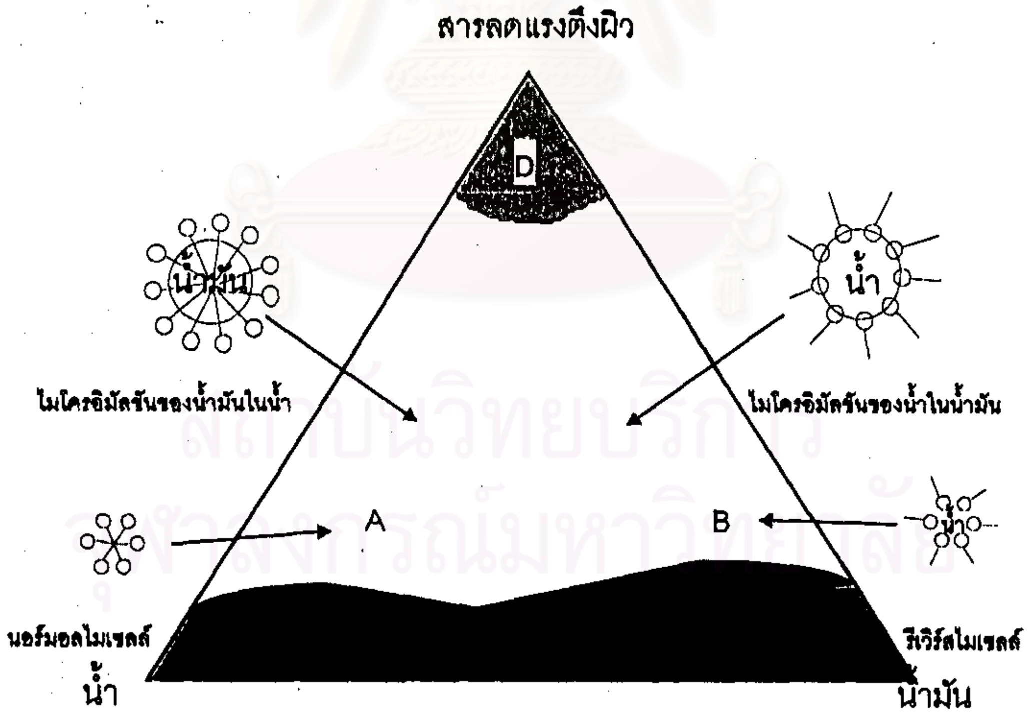
ในระบบที่มีของเหลวสองชนิดไม่รวมตัวกันเช่น น้ำและน้ำมัน สามารถทำให้สารทั้งสองตัว (A และ B) ที่ไม่รวมกัน กลายเป็นของผสมเนื้อเดียวได้ โดยการเติมสารที่มีคุณสมบัติในการละลายได้ในของเหลวทั้งสอง ได้แก่สารจำพวกสารลดแรงตึงผิว (C ซึ่งจัดเป็นตัวแพร่กระจาย (dispersing agent)) ซึ่งสามารถแทนด้วยไดอะแกรมของระบบสามองค์ประกอบได้ตามกราฟรูปที่ 3.1 หากองค์ประกอบของระบบมีความเหมาะสมอาจจะทำให้ได้สารเนื้อเดียวที่ประกอบด้วย หยดน้ำที่แพร่กระจายในตัวทำละลาย และโมเลกุลของสารอื่นๆ ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น สารตั้งต้น และผลผลิต



รูปที่ 3.1 แผนภาพไดอะแกรมของระบบสามองค์ประกอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารลดแรงตึงผิวที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์แล้วมีการรวมตัวกันเป็นรูปทรงกลมจะเรียกว่า รีเวิร์สไมเซลล์ โดยลักษณะของการรวมกันเป็นไมเซลล์สามารถทำได้ทั้งในกรณีที่มีน้ำและไม่มีน้ำอยู่ในไมเซลล์ ซึ่งน้ำที่ละลายอยู่ในแกนของไมเซลล์ที่มีขั้ว (polar core) เราจะเรียกว่าเป็นหยดน้ำ (water pool) และน้ำที่มีอยู่ในไมเซลล์จะมีผลต่อขนาดของไมเซลล์ โดยขนาดของไมเซลล์จะแปรผันตามค่า W_0 ซึ่งคือสัดส่วนเชิงโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ซึ่ง Pileni (1993) ได้กำหนดถึงการรวมตัวของน้ำในปริมาณที่น้อยคือ W_0 ต่ำกว่า 15 จะเรียกว่าเป็นรีเวิร์สไมเซลล์ ในขณะที่ถ้า W_0 มากกว่า 15 จะเรียกว่าเป็นไมโครอิมัลชันตามรูปที่ 3.2 ซึ่งเป็นแผนภาพแทนไดอะแกรมของระบบสามองค์ประกอบ ซึ่งองค์ประกอบที่ต่างกันจะได้ระบบแตกต่างกัน ซึ่ง A แทน ระบบนอร์มอลไมเซลล์ (normal micelle) หรือไมโครอิมัลชันของน้ำมันในน้ำ, B แทน รีเวิร์สไมเซลล์ (reverse micelle) หรือไมโครอิมัลชันของน้ำในน้ำมัน, D แทน ผลึกของเหลวหรือเจล, และพื้นที่ส่วนที่แรเงาด้านฐานของสามเหลี่ยมจะเป็นขอบเขตที่มีสองเฟส [Leung และคณะ,1991]



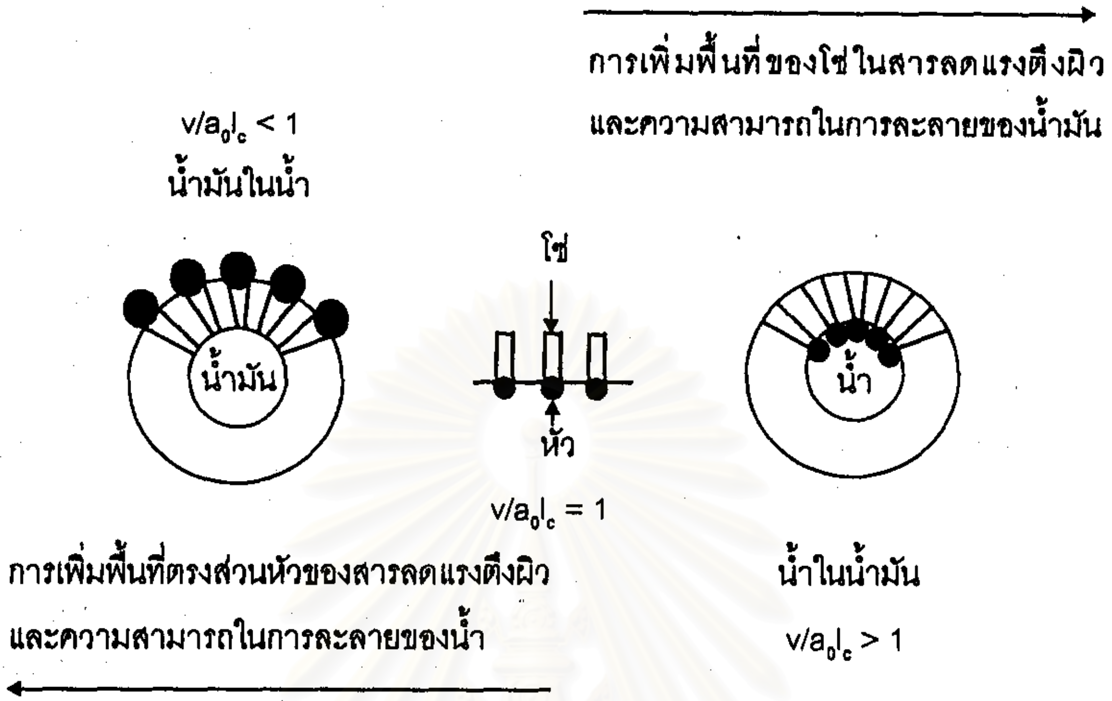
รูปที่ 3.2 แผนภาพไดอะแกรมของสามเฟสในระบบน้ำ-น้ำมัน-สารลดแรงตึงผิว

3.1.1 รูปทางเรขาคณิตและโครงสร้างของไมเซลล์หรือไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชันสามารถแบ่งได้เป็นสองชนิด คือเป็นหยดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) และหยดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil) ซึ่งก็มีผู้พยายามเสนอถึงการวิเคราะห์ตัวแปรที่ใช้หารูปแบบที่เฉพาะของโครงสร้างในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ของน้ำ-น้ำมัน-สารลดแรงตึงผิว โดยตัวแปรที่จะนำมาอธิบายถึงรูปทรงทางเรขาคณิตซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว คือค่าดัชนีการบรรจุ (packing index) ซึ่งเป็นสัดส่วนของพื้นที่หน้าตัดของโซ่ในส่วนที่ไม่มีขั้ว (nonpolar tail) ต่อส่วนหัวที่มีขั้ว (polar head) ของโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว

$$\text{packing index} = v/a_0 l_c$$

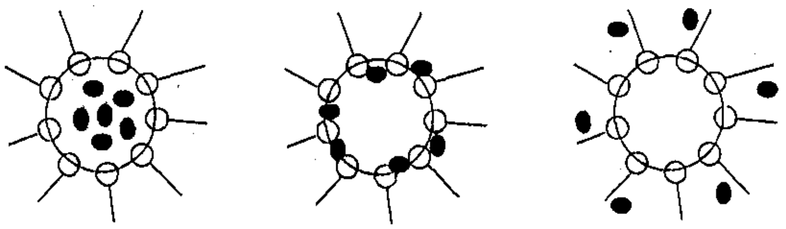
เมื่อ v คือปริมาตรของโซ่ในส่วนที่ไม่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว, a_0 เป็นพื้นที่หน้าตัดของส่วนหัวที่มีขั้วที่คิดในระนาบของพื้นผิว, และ l_c เป็นความยาวของโซ่ในสารลดแรงตึงผิว ซึ่งค่าดัชนีการบรรจุสามารถบอกได้ถึงลักษณะการรวมตัวกันของอิมัลชันนั่นคือ ถ้าพื้นที่หน้าตัดในส่วนหาง (v/a_0l_c) มีมากกว่าส่วนหัว ($v/a_0l_c > 1$) จะทำให้รูปแบบของอิมัลชันเป็นแบบน้ำในน้ำมัน ในขณะที่ถ้าพื้นที่หน้าตัดในส่วนหางน้อยกว่าในส่วนหัว ($v/a_0l_c < 1$) จะทำให้รูปแบบของอิมัลชันเป็นแบบน้ำมันในน้ำ และถ้าการจัดเรียงตัวอยู่ในระนาบ จะไม่มีการจัดตัวเป็นไมเซลล์ ทำให้ได้ค่าดัชนีการบรรจุ (v/a_0l_c) เท่ากับ 1 ซึ่งสามารถเขียนความสัมพันธ์ของโครงสร้างกับค่าดัชนีการบรรจุได้ตามรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างอิมัลชันกับค่าดัชนีการบรรจุ

3.1.2 ตำแหน่งของเอนไซม์ในรีเวิร์สไมเซลล์หรือไมโครอิมัลชัน

ลักษณะการละลายของเอนไซม์ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์สามารถแบ่งได้เป็นสามกรณี ตามตำแหน่งของเอนไซม์ที่สามารถละลายอยู่ในกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวที่มีการรวมตัวกัน คือกรณีที่หนึ่ง เอนไซม์อยู่บริเวณตรงกลางของไมเซลล์ (micelle interior) ตามรูปที่ 3.4a กรณีที่สอง เอนไซม์จะอยู่บริเวณพื้นผิวระหว่างเฟสตรงส่วนหัวที่มีขั้ว และส่วนหางที่ไม่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิวตามรูปที่ 3.4b และกรณีสุดท้ายอยู่ตรงบริเวณส่วนหางที่ไม่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว ตามรูปที่ 3.4c



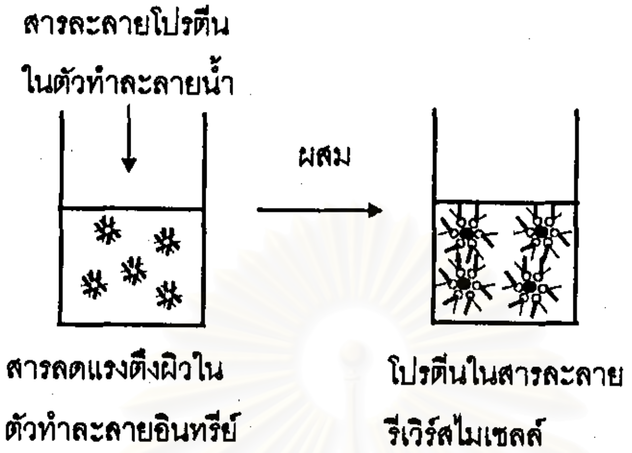
(a) (b) (C.)

รูปที่ 3.4 การละลายของเอนไซม์ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ในตำแหน่งที่ต่างกัน a) ภายในไมเซลล์, b) พื้นผิวระหว่างเฟสของไมเซลล์, c) ส่วนหางของไมเซลล์

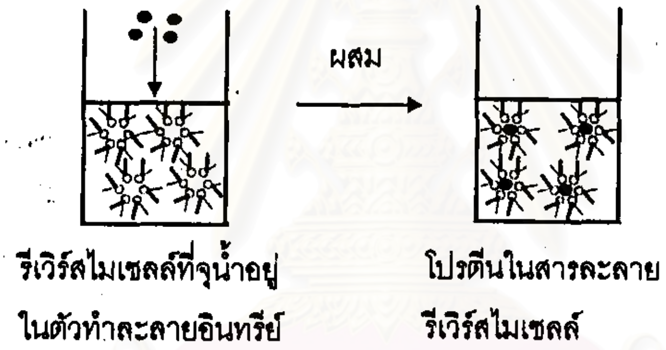
3.1.3 รีเวิร์สไมเซลล์ที่ใช้เป็นตัวกลางสำหรับการเกิดปฏิกิริยา

สารตั้งต้นสามารถละลายเข้าไปในเฟสแพร่กระจายและทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ละลายอยู่ในหยดน้ำของรีเวิร์สไมเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ก็มีหลายชนิด เช่น ไซโตรโครม (cytochrome c), ไคโมทริปซิน (chymotrypsin), โรดอปซิ่น (rhodopsin), ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease), เปอร์ออกซิเดส (peroxidase), ไลเปส (lipase), ไลโซโทรม (lysozyme), แลคแทส (lactate) และดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) โดยการเตรียมเอนไซม์ให้อยู่ในไมเซลล์สามารถเตรียมได้สามวิธีคือ วิธีแรก แบบฉีด (injection method) เตรียมโดยการฉีดสารละลายของเอนไซม์ลงไปในเฟสต่อเนื่องที่มีสารลดแรงตึงผิวและสารตั้งต้นอยู่ วิธีที่สอง เป็นแบบการเติมผงเอนไซม์ลงไปในสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์ที่มีน้ำอยู่ในไมเซลล์แล้ว และวิธีสุดท้ายเป็นแบบการถ่ายเทข้ามเฟส (phase transfer method) ระหว่างเอนไซม์ในเฟสตัวทำละลายน้ำ และสารลดแรงตึงผิวในเฟสตัวทำละลายอินทรีย์มาผสมกันในสัดส่วนที่เท่ากันตามรูปที่ 3.5

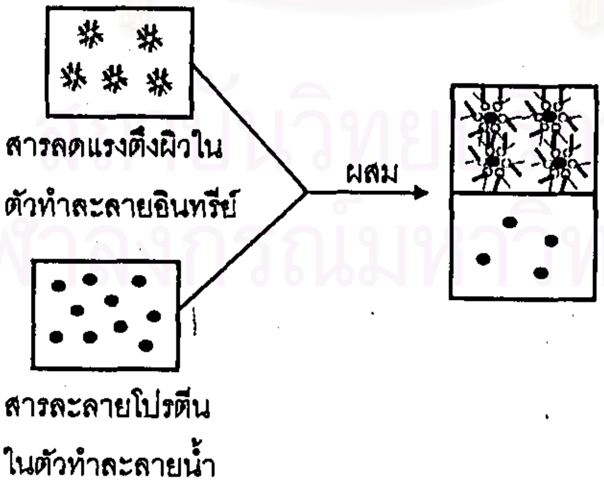
1.การเตรียมสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์แบบฉีด (injection method)



2.การเตรียมสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์แบบเติมผงไลเปส (addition of protein powder)



3.การเตรียมสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์แบบการถ่ายเทข้ามเฟส (phase transfer method)



รูปที่ 3.5 วิธีการละลายเอนไซม์ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อได้เปรียบของการใช้ระบบรีเวิร์สไมเซลล์เป็นตัวกลางของการทำปฏิกิริยา และการใช้เป็นสารละลายสกัดเอาโปรตีนออกมาใช้ใหม่หรือทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นสูงขึ้น คือ เป็นระบบที่มีพื้นผิวระหว่างเฟสสูง ทำให้มีอัตราการถ่ายเทมวลระหว่างเฟสสูง ปฏิกิริยาที่เกิดบนพื้นผิวมีได้มาก อัตราการเกิดปฏิกิริยาจึงสูง ด้วยลักษณะพิเศษดังกล่าวของระบบรีเวิร์สไมเซลล์จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้งานได้มากมาย เช่น

-ผลผลิตทางด้านเครื่องสำอางและสารบำรุงผิว

-การผลิตยา

-งานทางด้านเภสัชกรรม

-เกี่ยวกับการถ่ายเทเลือดเพื่อรักษาสภาวะแวดล้อมของของไหล

3.2 **จลนพลศาสตร์อย่างง่ายของเอนไซม์** (enzyme kinetics)

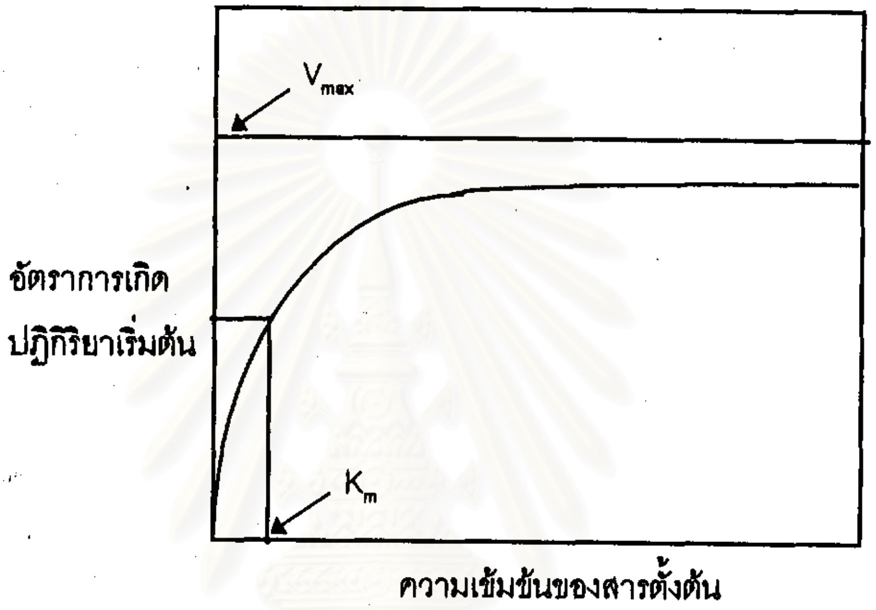
การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ คือ การศึกษาเกี่ยวกับอัตราเร็วของปฏิกิริยา (reaction rate) รวมทั้งกลไกในการทำงานของเอนไซม์ ปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์ และสารตั้งต้น อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ จะเป็นตัวกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา เอนไซม์ที่ต่างชนิดกันจะมีผลทำให้กลไกการเกิดปฏิกิริยานั้นต่างกัน แต่จะยังคงมีหลักการและพื้นฐานเดียวกัน จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งสามารถศึกษาได้จากการวัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา ซึ่งการวัดความเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยาสามารถทำได้โดยการหาความเข้มข้นสารผลิตภัณฑ์ (product) ที่เพิ่มขึ้นต่อเวลา หรือความเข้มข้นสารตั้งต้น (substrate) ที่ลดลงต่อเวลา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสะดวกในขั้นตอนการวัด

ในปฏิกิริยาที่มีสารตั้งต้นตัวเดียว เรากำหนดให้ปริมาณของเอนไซม์คงที่ แล้วหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ต่างกัน จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น (V) กับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ตามกราฟรูปที่ 3.6 ซึ่งลักษณะของกราฟที่ได้สามารถบอกได้ถึง

-อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงตามสัดส่วนความเข้มข้นของสารตั้งต้นในช่วงความเข้มข้นต่ำๆ (ปฏิกิริยาที่ได้จะเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง)

-อัตราการเกิดปฏิกิริยานั้นจะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นเมื่อสารตั้งต้นมีความเข้มข้นสูงๆ (ปฏิกิริยาที่ได้จะเป็นปฏิกิริยาอันดับศูนย์)

-อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) จะมีการเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของเอนไซม์



รูปที่ 3.6 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น

เอนไซม์ที่จับกับสารตั้งต้นเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อน สามารถเขียนเป็นขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์ได้เป็น

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (3.1a)$$

$$ES \xrightarrow{K_2} E + P \qquad (3.1b)$$

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จะพิจารณาถึงการที่เอนไซม์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสารตั้งต้น และการที่เอนไซม์สามารถนำกลับไปใช้ในปฏิกิริยาได้ใหม่ ซึ่งขั้นตอนที่ผลผลิตหลุดจากเอนไซม์ ตามสมการ 3.1b จะช้ากว่าปฏิกิริยาย้อนกลับในสมการที่ 3.1a ดัง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นั้นจึงใช้ขั้นตอนที่ช้ากว่าในการหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาตามสมการ 3.2 และใช้ในสภาวะที่คงตัว (steady state) คือไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระหรือสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสารตั้งต้น ซึ่งเขียนได้สมการ 3.3

$$V = k_2 C_{ES} \tag{3.2}$$

$$\frac{dC_{ES}}{dt} = 0 = k_1 C_E C_S - (k_2 + k_{-1})\, C_{ES} \tag{3.3}$$

โดยความเข้มข้นทั้งหมดของเอนไซม์ (C_{E0}) สามารถหาได้โดย

$$C_{E0} = C_E + C_{ES} \tag{3.4}$$

ถ้าในกรณีที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงเกินพอแล้วทุก ๆ โมเลกุลของเอนไซม์จะกลายเป็น C_{ES} หมด ทำให้ $V = V_{max}$ แล้วแทนในสมการ 3.2 จะได้

$$V_{max} = k_2 C_{E0} \tag{3.5}$$

แทนสมการ (3.3), (3.4), และ (3.5) ลงในสมการ (3.2) แล้วจัดรูปใหม่ได้เป็น

$$V = \frac{V_{max} C_S}{C_S + K_m} \tag{3.6}$$

เมื่อ

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \tag{3.7}$$

ปฏิกิริยาที่สามารถอธิบายได้ตามสมการที่ 3.6 มักจะทำการทดลองในปฏิกิริยาที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาอยู่ในภาวะที่ต่างกับ ตัวทำละลายของระบบในปฏิกิริยาทางเคมี (heterogeneous catalytic reaction)* ซึ่งปกติเอนไซม์ซึ่งจัดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สามารถละลายน้ำได้ แต่โมเลกุลที่ใหญ่และมีโครงสร้างสามมิติที่ซับซ้อนทำให้เอนไซม์นั้นมีการทำงานที่เหมือนกับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งในปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งจะมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีเป็นสองขั้นตอนคือขั้นตอนแรก เอนไซม์จะมีการจับตัวกับสารตั้งต้นเป็นรูปของสารเชิงซ้อนซึ่งจะมีแรงระหว่างโมเลกุลน้อยมาก มีผลทำให้ขั้นตอนของการเกิดเป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้เร็วกว่าขั้นตอนที่จะเกิดเป็นผลผลิตออกมา

จากการทำการทดลองโดยวิธีของ michaelis menten แล้วเขียนกราฟระหว่าง V กับ C_s จะได้กราฟไฮเปอร์โบลาตามกราฟรูปที่ 3.6 ซึ่งค่า K_m จะเท่ากับ C_s เมื่อ V เท่ากับ $0.5V_{max}$ โดยการประเมินค่า V_{max} และ K_m นั้นทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นเพื่อที่จะให้สามารถหาค่าทั้งสองได้ จึงต้องหาวิธีเขียนกราฟความสัมพันธ์ออกมาเป็นเส้นตรง โดยการวาดกราฟแบบไลน์วีฟเวอร์–เบอร์ก (line weaver-burk plot) ซึ่งพลอตระหว่าง $\frac{1}{V}$ กับ $\frac{1}{S}$ ซึ่งความสัมพันธ์นี้สามารถหาได้จากสมการแบบไมเคลิส-เมนเทนดังนี้

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (3.8)$$

เนื่องจากว่า V_{max} เท่ากับ $K_2[E_0]$ แสดงว่า V_{max} จะคงที่เมื่อความเข้มข้นทั้งหมดของเอนไซม์คงที่ แต่ถ้าหากความเข้มข้นทั้งหมดของเอนไซม์เปลี่ยน จะทำให้ V_{max} เปลี่ยนแปลงไปด้วย ส่วนการพิจารณาค่า K_m จะขึ้นกับปฏิกิริยาตามสมการ 3.1a ถ้า K_m มีค่าต่ำ แสดงว่าเอนไซม์สามารถอิ่มตัวได้ที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่ำ

* Heterogeneous Catalytic Reaction จะเกิดขึ้นในสองขั้นตอน คือขั้นตอนแรก เป็นการดูดซับของสารตั้งต้นบนพื้นผิวของตัวเร่งปฏิกิริยา และขั้นตอนที่สองเป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ไปเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งในขั้นตอนแรกจะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของสารนั้นน้อย ทำให้การเกิดปฏิกิริยาของขั้นตอนแรกนั้นเร็วกว่าขั้นตอนที่สอง

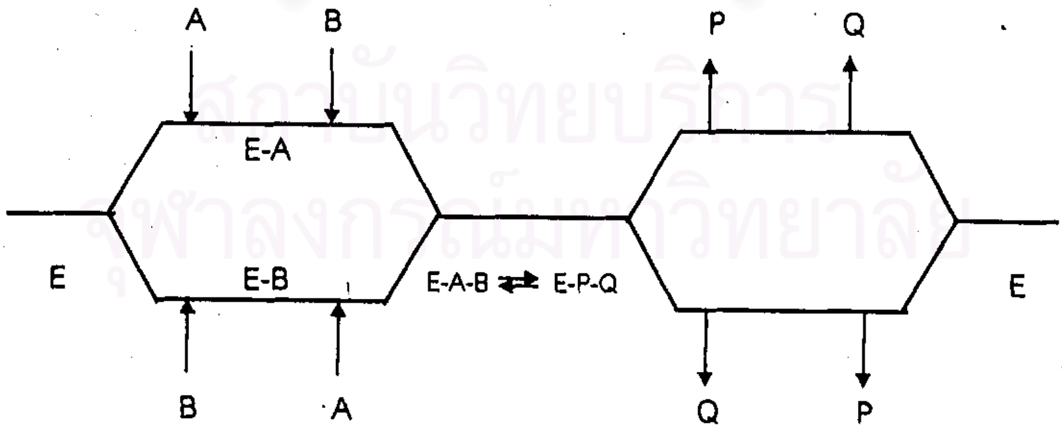
I 17904742

โดยทั่วไปปฏิกิริยาที่มีสารตั้งต้นเพียงตัวเดียวนั้นจะพบได้น้อย ส่วนมากจะเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับสารตั้งต้นที่มากกว่าสองตัว ซึ่งในการทำวิจัยนี้เราใช้สารตั้งต้นสองตัวในการทำปฏิกิริยากันคือ (±)เมนทอล กับ ไตรอะซิติน ทำให้การศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยานั้นยุ่งยากและซับซ้อน

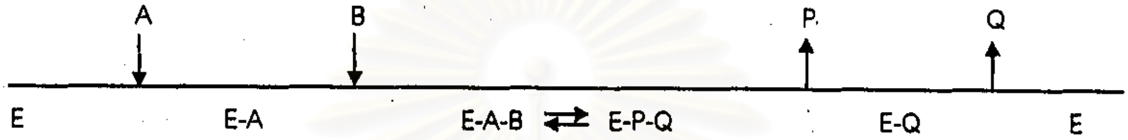
กลไกของปฏิกิริยา (mechanism of reaction) ที่มีสารตั้งต้นสองตัว แบ่งออกเป็นสองแบบคือ

1.กลไกแบบลำดับ (sequential mechanism) เป็นกลไกที่มีสารตั้งต้นทั้งสองตัวเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ก่อนที่จะมีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น ปฏิกิริยาที่มีกลไกแบบนี้เรียกว่าปฏิกิริยา single-displacement กลไกแบบนี้ยังแบ่งย่อยได้อีกเป็นสองชนิด

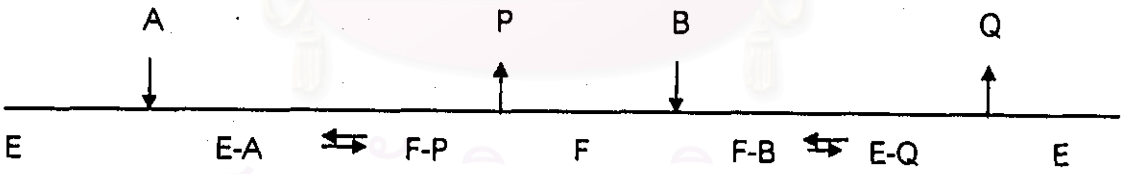
1.1 Rapid equilibrium random bi bi เป็นกลไกที่สารตั้งต้นทั้งสองตัวเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ก่อนที่จะมีผลิตภัณฑ์สองตัวเกิดขึ้น และสารตั้งต้นตัวใดตัวหนึ่งจะจับเอนไซม์ก่อนก็ได้ ในทำนองเดียวกันผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสองตัวนั้นตัวใดตัวหนึ่งจะถูกปล่อยออกจากเอนไซม์ก่อนก็ได้ นั่นคือการจับของสารตั้งต้นและการปล่อยผลิตภัณฑ์เป็นแบบสุ่ม (random) อาจเขียนปฏิกิริยาแบบนี้คือ



1.2 Ordered bi bi เป็นกลไกที่สารตั้งต้นทั้งสองตัว (A และ B) เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ก่อนที่จะมีผลิตภัณฑ์สองตัว (P และ Q) เกิดขึ้น แต่จะเห็นได้ว่าสารตั้งต้น A จะจับกับเอนไซม์ก่อนสารตั้งต้น B และผลิตภัณฑ์ P จะถูกปล่อยออกจากเอนไซม์ก่อนผลิตภัณฑ์ Q นั่นคือ การจับของสารตั้งต้นและการปล่อยผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นอย่างมีระเบียบ ซึ่งสามารถเขียนเป็นแผนภาพของการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น



2.กลไกแบบไม่ลำดับ (non-sequential mechanism) เป็นกลไกที่สารตั้งต้นตัวแรก เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วสามารถให้ผลิตภัณฑ์ตัวแรกเกิดขึ้นในปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องอาศัยสารตั้งต้นตัวที่สอง กลไกของปฏิกิริยาชนิดนี้เรียกว่ากลไกแบบ ping pong bi bi ซึ่งสามารถเขียนเป็นแผนภาพของปฏิกิริยาได้เป็น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

อัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะมีผลเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ, ความสามารถในการละลายของสารตั้งต้น และการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และเอนไซม์ รวมทั้งค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.3.1 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

เมื่อให้ปริมาณเอนไซม์คงที่ แล้วค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น พบว่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกๆที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นนั้นยังน้อย จนกระทั่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีกแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นให้มากขึ้นเท่าไร ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาได้สูงสุด (V_{max}) เรียกว่าความเข้มข้นอิ่มตัวของสารตั้งต้น สำหรับค่า K_m (michaelis constant) จะมีค่าเท่ากับ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น (V) เท่ากับ $V_{max} / 2$

3.3.2 ผลความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์

ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา จะมีผลอย่างมากต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาของระบบที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาก็จะต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ เช่น เปปซิน (pepsin) จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมระหว่าง 2 ถึง 3 ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของอะไมเลส (amylase) จะเท่ากับ 6.8 ซึ่งผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาสามารถอธิบายได้โดย

-เอนไซม์จัดเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย ส่วนที่เหลือของกรดอะมิโน (amino acid residues คือ กรดอะมิโนที่ไม่มีโมเลกุลของน้ำ)

-ส่วนที่เหลือของกรดอะมิโน จะมีกลุ่มที่สามารถแตกตัวเป็นอิออนได้ ซึ่งปริมาณของประจุบวกหรือลบในสารละลาย ก็จะมีผลต่อการแตกตัวเป็นอิออนของบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์

-เอนไซม์จะมีการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา เมื่อส่วนที่เหลือของกรดอะมิโนที่อยู่ในตำแหน่งเร่งปฏิกิริยานั้นมีประจุที่เฉพาะ ดังนั้นการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างจึงมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

3.3.3 ผลของอุณหภูมิ

อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นกับส่วนประกอบของสารในระบบ เช่น ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และเอนไซม์ นอกจากนั้นยังขึ้นกับอุณหภูมิด้วย ตามความสัมพันธ์ของสมการ 3.11

$$-r_A = [K(T)][f(C_A, C_B,....)] \qquad (3.11)$$

อุณหภูมิจะมีผลต่อค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา [K(T)] ซึ่งมีความสัมพันธ์กันตามสมการของอาร์รีเนียส (Arrhenius equation) ตามสมการ 3.12:

$$K(T) = A_0 e^{-E/RT} \qquad (3.12)$$

การกระตุ้นของเอนไซม์ในปฏิกิริยาจะขึ้นกับอุณหภูมิ ซึ่งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้น แต่อุณหภูมิก็จะมีขีดจำกัดต่อการใช้งานในปฏิกิริยาทางชีวภาพ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้เอนไซม์นั้นสูญเสียสภาพไป ทำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ลดลง สำหรับโปรตีนทั่วๆ ไปจะมีการสูญเสียสภาพเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 45 องศาเซลเซียส แต่ก็มีเอนไซม์บางชนิดที่มีความทนทานสูงต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น