หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การสกัดแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

1.1 การสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเซล

1.1.1 การศึกษาวิธีการที่ใช้ในการสกัดแยกเอนไซม์

Chen และคณะ (35) ได้รายงานถึงความสามารถในการนำสารละลายของเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์และสารเคมีบางชนิดมาใช้สกัดแยกเอนไซม์กลูโคส-ไอโซเมอเรสจากเซลของสเตรพโตมัยซีส ดังนั้นการทดลองนี้จึงเปรียบเทียบการสกัดแยกเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 โดยการบดกับผงอะลูมินาละเอียด (abrasive grinding) และโดยการบ่มเซลในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ที่มีสารเคมีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ทอลูอีน (1.0 %), ทวีน-80 (0.1 %) หรือเซทิล-ไดเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (0.1 %) ดังผลการทดลองในตารางที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสกัดแยกเอนไซม์โดยการบ่มเซลใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 เปอร์เซนต์ของเซทิลไดเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้วิธีการสกัดแยกเอนไซม์โดยการใช้สารเคมีดังกล่าวนี้

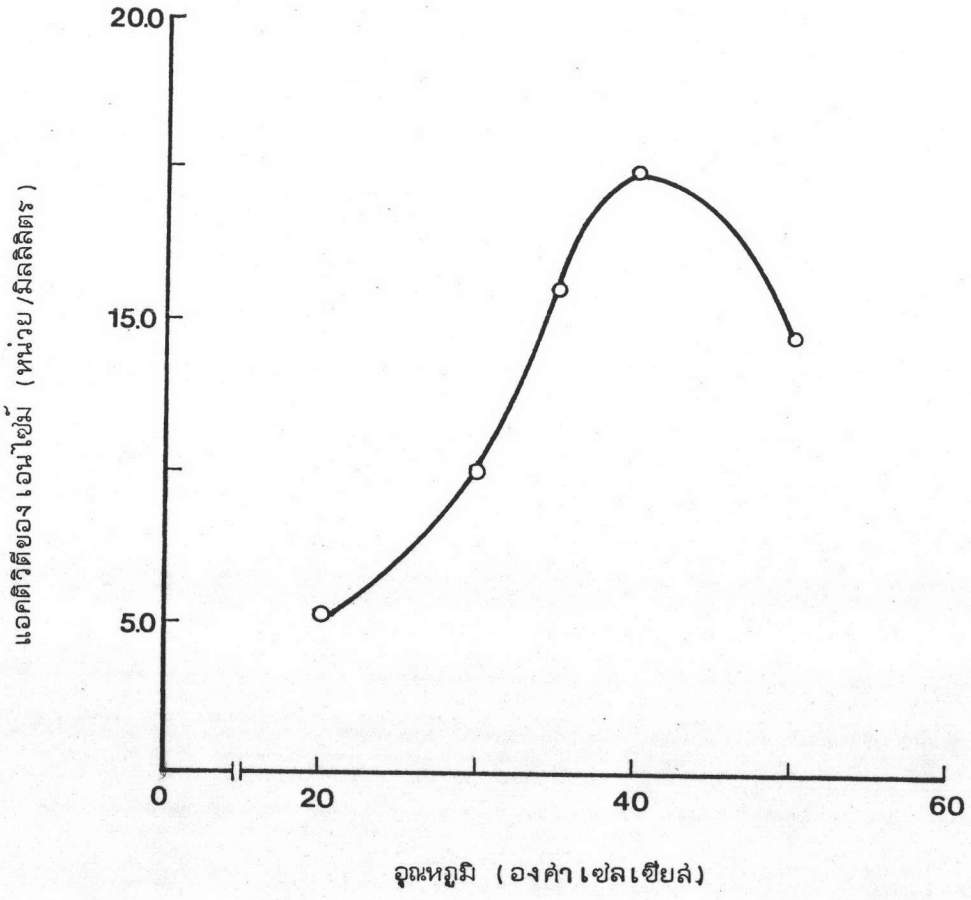
1.1.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัดแยกเอนไซม์จากเซลของสเตรพโต-มัยซีส สายพันธุ์ 190-1

การนำเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 มาสกัดแยกด้วย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 เปอร์เซนต์เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียม-โบรไมด์ โดยการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 20-50 องศาเซลเซียส ดังการทดลองที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 5.2.1 นั้น พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสามารถสกัดแยกเอนไซม์ออกมาจากเซลได้สูงสุด ดังรูปที่ 2 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้การสกัดแยกเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 องศา-เซลเซียส

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1

วิธีการสกัดแยกเอนไซม์	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน
การสกัดแยดเอนไซม์โดยวิธีกล				
- การบด	15	26	75	2.88
การสกัดแยกเอนไซม์ด้วยสารเคมี				
- ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่มี				
1.0 % ทอลูอีน	10	21	56	2.67
0.1 % ทวีน-80	5	18	28	1.56
0.1 % เซทิลไตรเมทิล-แอมโมเนียมโบรไมด์	18	32	103	3.22

หมายเหตุ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2 และ 4.1 วิธีการสกัดแยกเอนไซม์ดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 5.1



รูปที่ 2 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์จากเซลของสเตรพโตมัยซีส ด้วย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่มี 0.1 % เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์

1.1.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์

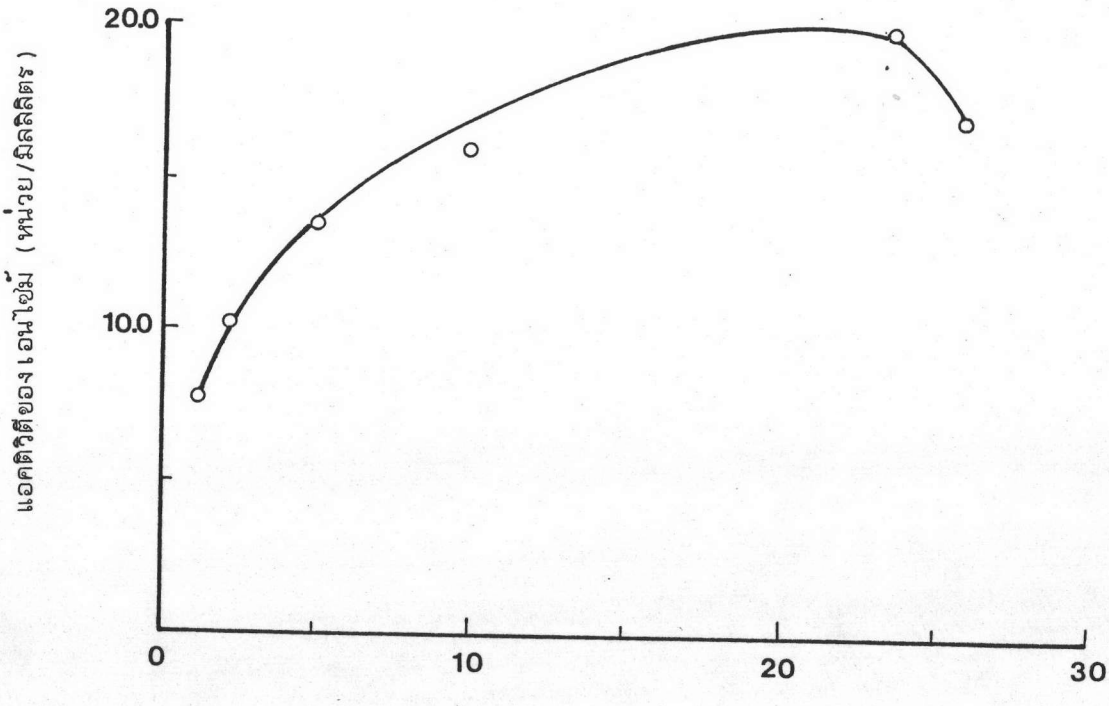
จากการสกัดแยกเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากเซลของสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ตามวิธีการดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 5.1.1 ได้เปรียบเทียบระยะเวลาต่าง ๆ กันที่ใช้ในการสกัดแยกดังนี้คือ 1, 2, 5, 10, 24, และ 26 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงเพียงพอต่อการสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเซล ดังแสดงในรูปที่ 3 ดังนั้นการสกัดแยกเอนไซม์ต่อไปจะใช้เวลา 24 ชั่วโมง

1.1.4 การศึกษาปริมาณเซลที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์

จากการนำสารแขวนลอยของเซลใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 % เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้นของเซลต่าง ๆ กันคือ 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ มาสกัดแยกเอนไซม์ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 5.1.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของเซลเป็น 50 เปอร์เซนต์ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด แต่เนื่องจากสารละลายของเซลที่ได้นี้มีลักษณะข้นมาก ยากต่อการปฏิบัติ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเซลที่ต่ำลงมาคือ 40 เปอร์เซนต์ ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะไม่แตกต่างกันมากนักในการสกัดแยกเอนไซม์ดังกล่าวนี้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณเซลที่ใช้ในการสกัดแยกเอนไซม์

ปริมาณเซล (%)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีน (มก./มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน)
10	10	54	4	21	2.50
20	19	98	7	36	2.71
30	31	161	11	56	2.82
40	45	230	15	76	3.02
50	49	256	16	83	3.08



รูปที่ 3 เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการล่กัดกลูโคล่ไอโซเมอเรล่จากเซลของ Streptomyces sp. ล่ายพันธุ์ 190-1 ด้วย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอล่เฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่มี 0.1 เปอร์เซนต์เซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์

1.2 การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการนำเซล 20 กรัมมาสกัดแยกกลูโคสไอโซเมอเรสโดยแช่ใน 50 มิลลิลิตรของ 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ของเซทิลไตรเมทิล-แอมโมเนียมโบรไมด์ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสซึ่งเขย่าตลอดเวลา นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้มาปั่นแยกเซลที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที และเก็บส่วนน้ำใสมาทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ต่อไปโดยขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์นี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Takasaki และคณะ (33) และ Chen & Anderson (35)

1.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตก-ตะกอนกลูโคสไอโซเมอเรส

ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการแยกตกตะกอนกลูโคสไอโซเมอเรสจากสารแขวนลอยของโปรตีนที่สกัดแยกจากเซลของสเตรพโตมัยซีส ลายพันธุ์ 190-1 โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0-30, 30-60, 60-90 เปอร์เซ็นต์ และ 0-40, 40-80 เปอร์เซ็นต์ และ 0-30, 30-80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแยกโปรตีนแต่ละลำดับส่วนโดยการนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำโปรตีนที่ได้ไปละลายใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วไดอะไลส์ใน 2.5 ลิตรของ 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 5, 6 และ 7 พบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 30-80 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณเอนไซม์และแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ดังนั้นในขั้นตอนการทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์จะใช้ลำดับส่วนของโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-80 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-30, 30-60 และ 60-90 เปอร์เซ็นต์

ลำดับส่วน	ปริมาตร (มล.)	โปรตีน (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	% เอนไซม์
สารสกัดของเอนไซม์	50.0	313	947	3.02	100
แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0-30 %	2.0	11	5	0.45	0.53
แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-60 %	9.0	196	706	3.60	74.55
แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 60-90 %	2.0	36	83	2.30	8.76

ตารางที่ 6 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40 และ 40-80 เปอร์เซ็นต์

ลำดับส่วน	ปริมาตร (มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	% เอนไซม์
สารสกัดของเอนไซม์	55.0	318	987	3.10	100
แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0-40 %	2.0	29	45	1.55	4.56
แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 40-80 %	10	202	703	3.48	71.26

ตารางที่ 7 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-30 และ 30-80 เปอร์เซ็นต์

ลำดับส่วน	ปริมาตร (มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	% เอนไซม์
สารสกัดของเอนไซม์	54.0	309	951	3.08	100
แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0-30 %	2.0	10	4	0.40	0.42
แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-80 %	15.0	198	797	4.02	83.81

1.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Purification of Enzyme)

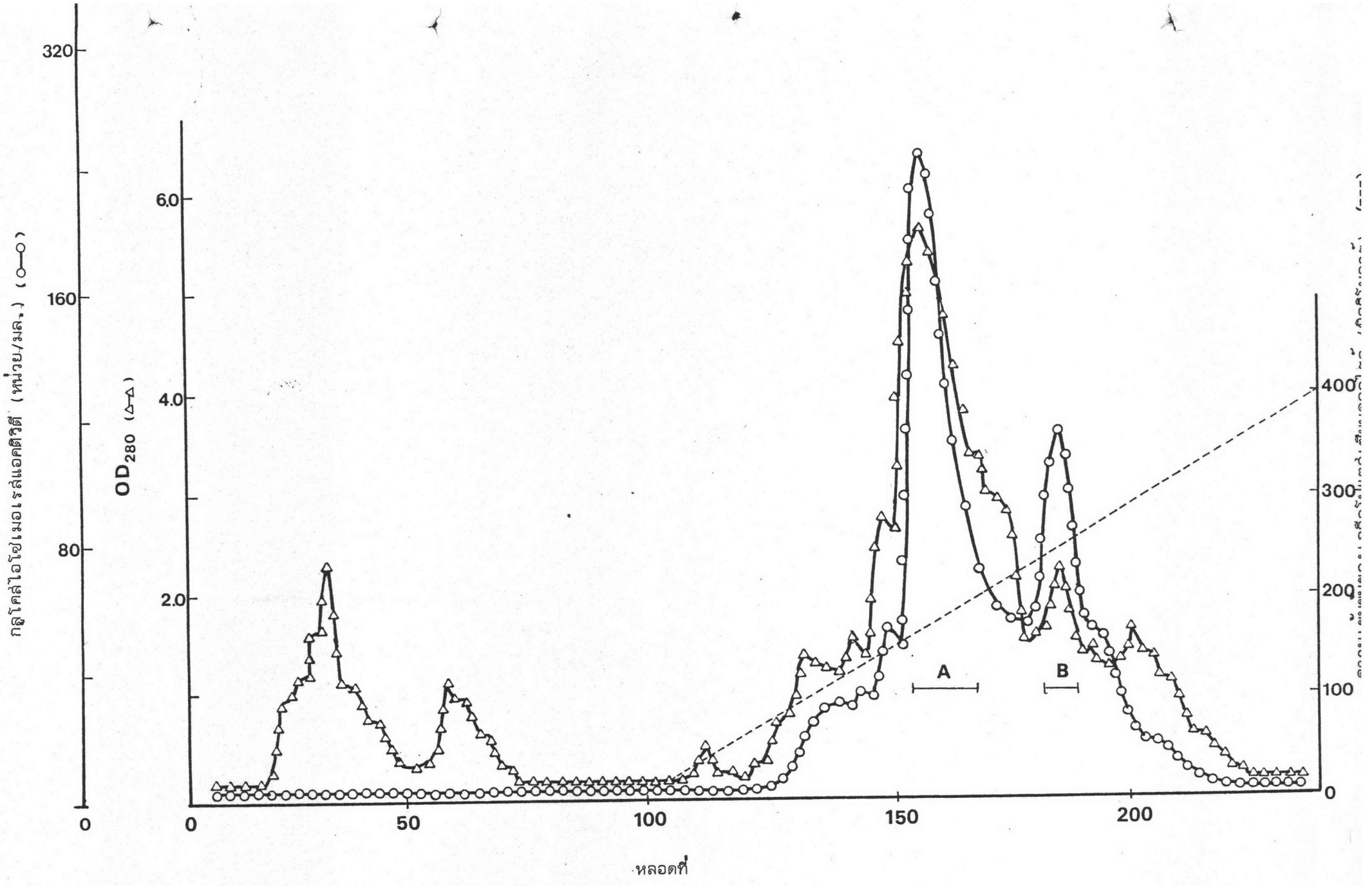
นำ 4411 มก. ของโปรตีนซึ่งมีกลูโคส์ไอโซเมอเรส์แอคติวิตีที่ส์กัดได้จากส์เตรพโต-มัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ปริมาณ 160 กรัม (น้ำหนักเปียก) โดยวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 5.1.1.2 บทที่ 2 มาผ่านขั้นตอนในการทำให้ได้กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ มีผลการทดลองดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.3.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-80 เปอร์เซนต์

จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-80 เปอร์เซนต์ พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์เพิ่มขึ้นเกือบ 4 เท่าเมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะในโปรตีนเริ่มต้น และเหลือปริมาณเอนไซม์ 80 เปอร์เซนต์ ดังแส์ดงในตารางที่ 8 (หน้า 42)

1.3.2 โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส์

นำ 897 มก. ของโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-80 เปอร์เซนต์ ซึ่งแขวนลอยอยู่ในส์ารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 47 มล. มาผ่านลงในคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส์ (ขนาด 2.5 x 40 ซม.) (ซึ่งเตรียมดังกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6) เริ่มต้นชะเอาโปรตีนอื่นที่ไม่เกาะกับเซลลูโลส์ออกด้วยส์ารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) จนกระทั่งการดูดกลืนแส์งที่ช่วงคลื่น 280 นาโนเมตรของส์ารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์มีค่าประมาณ 0.01 จึงชะล้างคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโปแตส์เซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นจาก 0-400 มิลลิโมลาร์ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ เก็บส์ารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร มาวัดปริมาณโปรตีนโดยดูจากค่าการดูดกลืนแส์งที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และแอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ ผลการทดลองในรูปที่ 4 แส์ดงให้เห็นว่าโปรตีนที่มีแอคติวิตีของกลูโคส์-ไอโซเมอเรส์มี 2 ยอด (peak) ยอดแรกเป็นยอดที่มีแอคติวิตีส่วนใหญ่ของเอนไซม์ และออกมาที่ความเข้มข้นของโปแตส์เซียมคลอไรด์ระหว่าง 150-200 มิลลิโมลาร์ ให้ชื่อว่าลำดับส่วน A และยอดหลังเป็นยอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยกว่า และออกมาที่ความเข้มข้นของโปแตส์เซียมคลอไรด์ระหว่าง 230-250 มิลลิโมลาร์ ให้ชื่อว่าลำดับส่วน B เมื่อนำลำดับส่วน A และ B มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชั่น (Ultrafiltration) พบว่าลำดับส่วน A มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 18.09 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น และมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 46.33 เปอร์เซนต์



รูปที่ 4 การแยกกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส์ รายละเอียดการทดลองนี้กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 1.3.2

สำหรับลำดับส่วน B มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 16.68 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น และมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 17.39 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในตารางที่ 8

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไป โดยการนำลำดับส่วน A ไปกรองผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และเซฟาเด็กซ์ จี-200 ส่วนลำดับส่วน B ซึ่งมีปริมาณโปรตีนน้อย นำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยการนำมาผ่านเฉพาะคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200 เท่านั้น

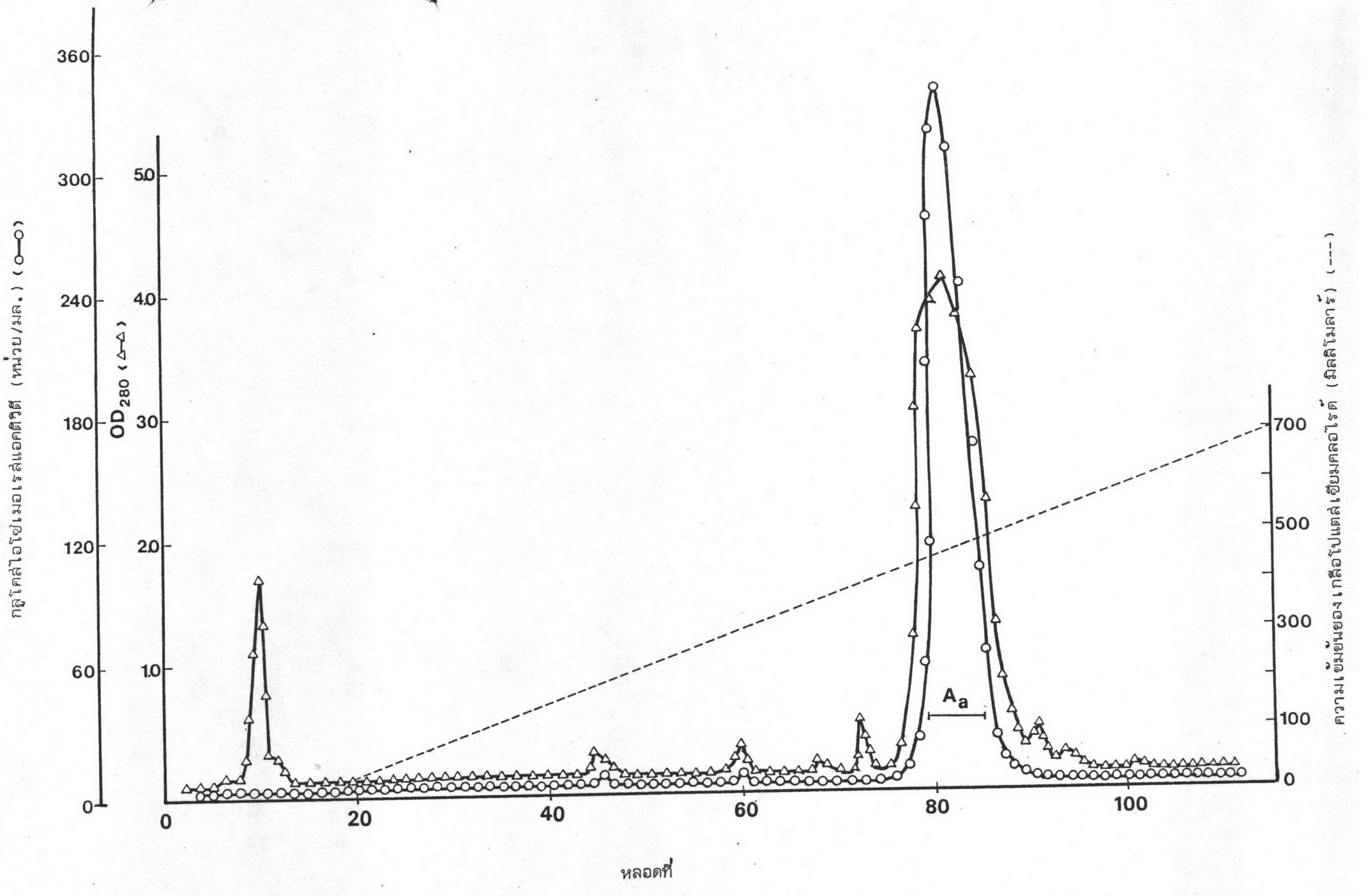
1.3.3 <u>การทำเอนไซม์ในลำดับส่วน A ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50</u>

นำสารละลายเอนไซม์ลำดับส่วน A ที่ได้จากการกรองผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส ซึ่งมีโปรตีน 113 มก. ใน 4 มล. ของสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH. 7.0) ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ และ 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอลมาผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (ขนาด 1.5 x 60 ซม. ซึ่งเตรียมโดยวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7) ชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2.5 มิลลิลิตร มาวัดปริมาณโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนได้ค่าต่ำกว่า 0.01 และชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์ของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์จาก 100-800 มิลลิโมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วเก็บแยกส่วนสารละลายที่ได้จากคอลัมน์นำมาวัดโปรตีน และแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรส พบว่าโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ออกมาเพียงยอดเดียวที่ความเข้มข้นของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ในช่วง 660-710 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 5 ให้ชื่อลำดับส่วนนี้ว่า Aa เอนไซม์ในลำดับส่วนนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 24.65 เท่า และมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 36.32 เปอร์เซนต์จากเอนไซม์เริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 8

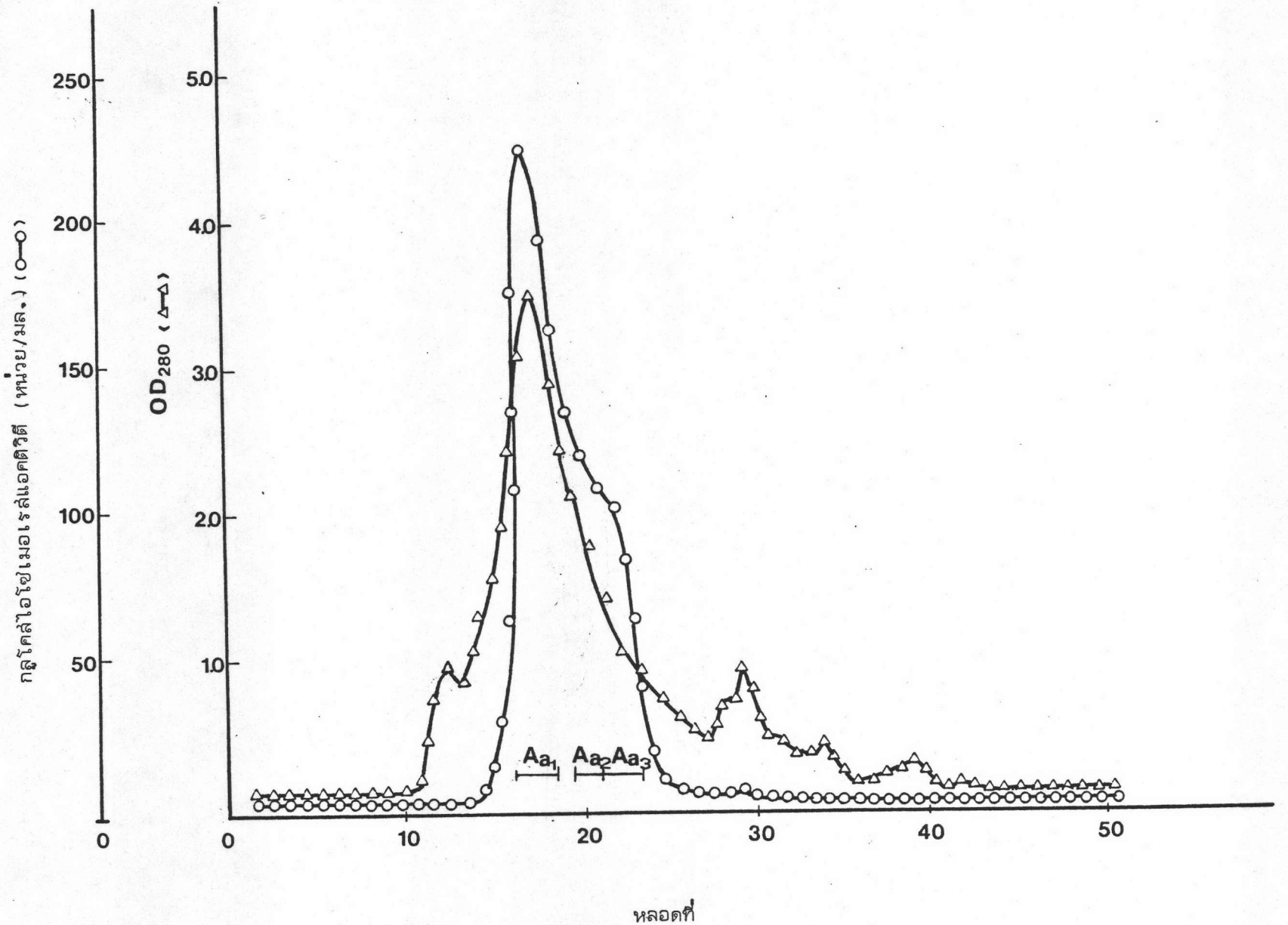
1.3.4 <u>การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200 (Sephadex G-200 Column Chromatography)</u>

1.3.4.1 <u>ลำดับส่วน Aa</u>

นำลำดับส่วน Aa ซึ่งมีโปรตีน 65 มก. ใน 2 มล. ของ 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ และ



รูปที่ 5 การทำโครมาโตกราฟฟีของลำดับส่วน A บนคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 รายละเอียดของการทดลองนี้กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 1.3.3



รูปที่ 6 การทำโครมาโตกราฟฟีของลำดับส่วน Aa บนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 รายละเอียดการทดลองนี้กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 1.3.4.1

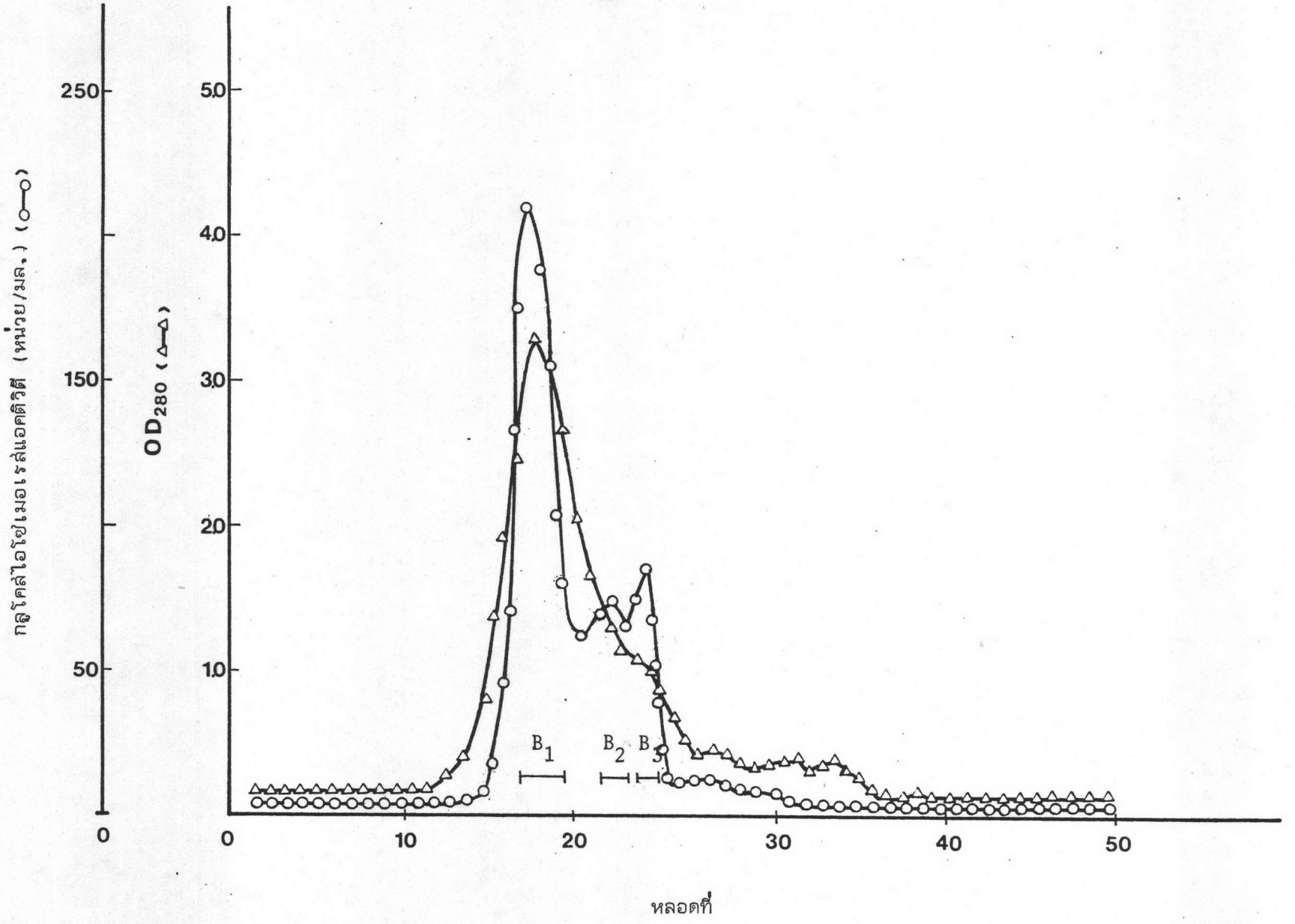
50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลมาผ่านลงบนคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200 (2.0 x 40 ซม.) ซึ่งวิธีเตรียมกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8 ชะล้างด้วย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ลำดับส่วนละ 3 มล. มาวัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ ผลการทดลองในรูปที่ 6 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตกอยู่ในช่วงโปรตีนส่วนใหญ่ที่ออกมาหลังปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ (void volume) เล็กน้อย และมีไหล่ (shoulder) ของแอคติวิตีซึ่งสังเกตเห็นได้ชัด ดังนั้นเพื่อให้เอนไซม์ที่แยกเก็บมีความบริสุทธิ์สูง จึงแยกออกเป็น 3 ส่วนได้แก่ Aa_1 คือช่วงที่เป็นยอดของเอนไซม์แอคติวิตี Aa_3 คือไหล่ของแอคติวิตี และ Aa_2 คือส่วนที่อาจจะเป็นส่วนผสมของ Aa_1 และ Aa_3 หลังจากนำเอนไซม์ทั้ง 3 ส่วนมาทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วตรวจสอบแอคติวิตีเฉพาะของเอนไซม์ พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้นดังนี้คือ Aa_1 41.34 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น Aa_2 38.29 เท่า และ Aa_3 36.76 เท่า

1.3.4.2 <u>ลำดับส่วน B</u>

นำลำดับส่วน B ซึ่งมีโปรตีน 46 มก.ใน 2 มล. ของ 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่มี 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ และ 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลมาผ่านลงบนคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200 (2.0 x 40 ซม.) ผลการทดลองในรูปที่ 7 พบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสใน 3 ยอด โดยยอดของเอนไซม์ปริมาณมากสอดคล้องกับยอดของโปรตีนส่วนใหญ่ เก็บแยกเอนไซม์ที่ได้ทั้ง 3 ส่วนให้ชื่อว่า B_1, B_2 และ B_3 ซึ่งทั้ง 3 ส่วนนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 41.67, 36.88 และ 35.37 เท่าตามลำดับ และมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 10.39, 4.18 และ 1.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในรูปที่ 8

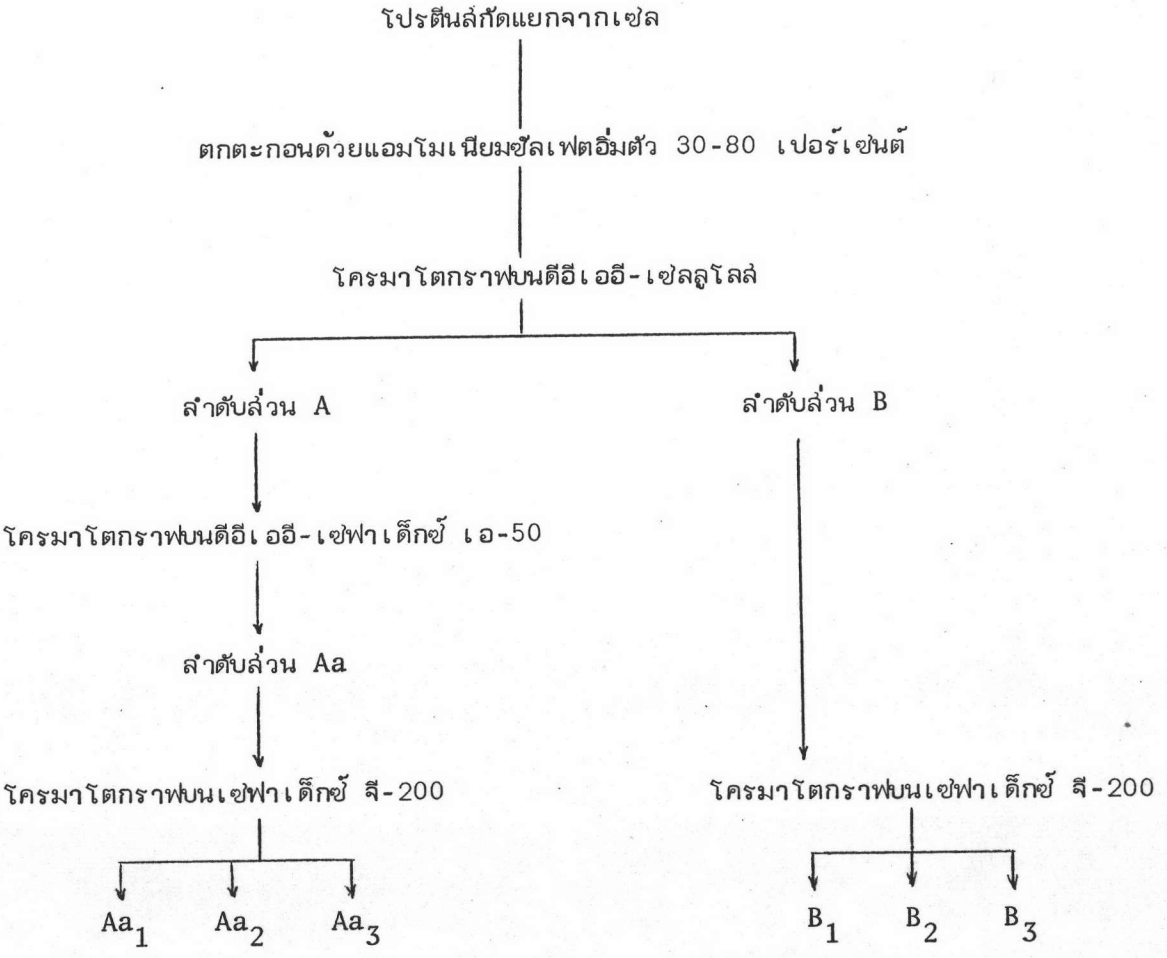
1.4 <u>การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้</u>

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ทำโดยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอะไครลาไมด์เจล พบว่าเอนไซม์ที่ได้ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์จะให้จำนวนแถบโปรตีนบนแท่งเจลลดลงจากเอนไซม์เริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 9 แต่โปรตีนที่เตรียมได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์ทั้งลำดับส่วน Aa_1, Aa_2, Aa_3 (รูปที่ 10) และ B_1, B_2 และ B_3 (รูปที่ 11) รวมทั้งโปรตีนที่ได้จากลำดับส่วนที่เป็นยอดของ Aa_1 (รูปที่ 12) ซึ่งแสดงแถบโปรตีนมากกว่า 1 แถบโดยมีแถบโปรตีนที่ติดสีเข้มชัด 2 แถบคือที่ R_f ประมาณ 0.69 และ 1.0



รูปที่ 7 การทำโครมาโตกราฟฟีของลำดับส่วน B บนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 รายละเอียดการทดลองนี้กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 1.3.4.2

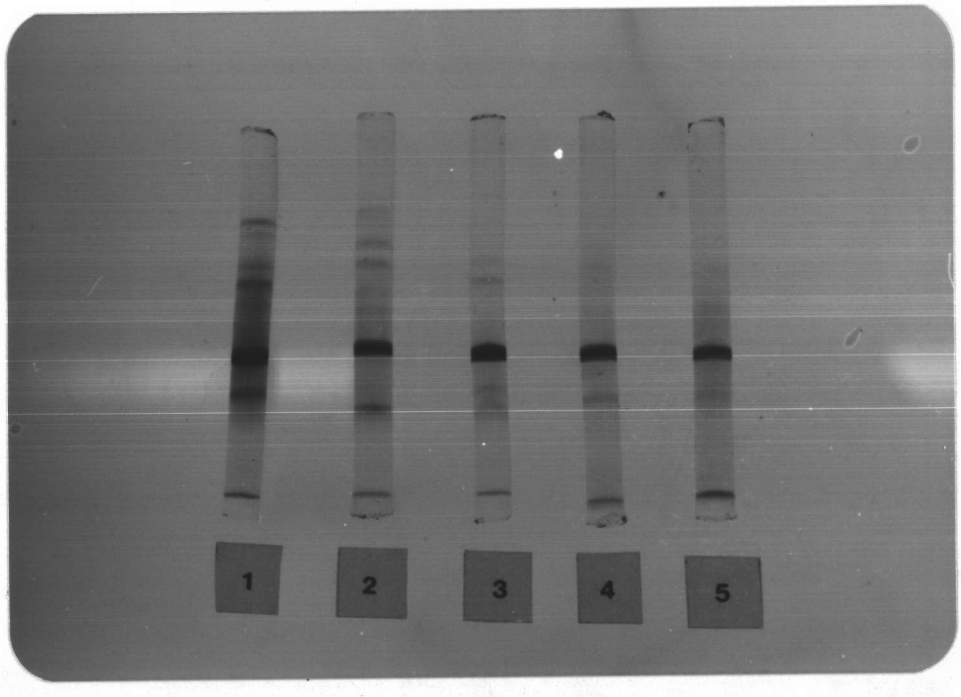
รูปที่ 8 สรุปขั้นตอนการทำเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ให้บริสุทธิ์บางส่วน



ตารางที่ 8 สรุปขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

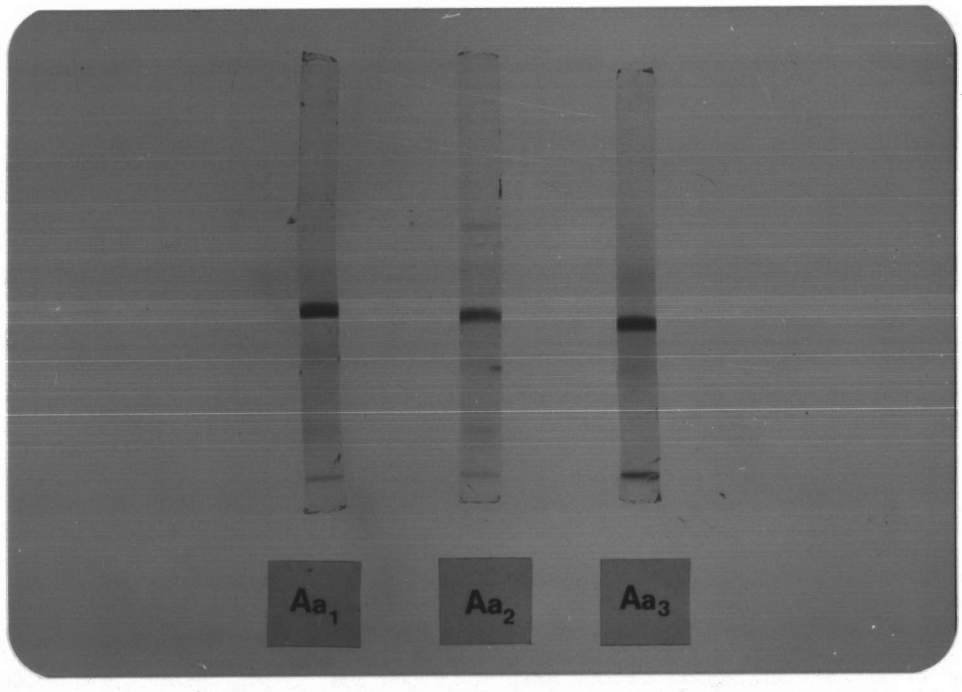
ขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	ปริมาณ (มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (เท่า)	ปริมาณเอนไซม์ (เปอร์เซนต์)
สารสกัดของเอนไซม์	985	4,411	36,173	8.20	1	100.0
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น30-80%	47	897	28,939	32.26	3.93	80.0
โครมาโตกราฟฟี่บนดีอีเออี-เซลลูโลส						
ลำดับส่วน A	4	113	16,759	148.31	18.09	46.33
ลำดับส่วน B	2	46	6,291	136.76	16.68	17.39
โครมาโตกราฟฟี่ของลำดับส่วน A บนดีอีเอดี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50						
ลำดับส่วน Aa	2	65	13,137	202.11	24.65	36.32
โครมาโตกราฟฟี่บนเซฟาเด็กซ์ จี-200						
ก. ของลำดับส่วน Aa						
ลำดับส่วน Aa_1	3	17	5,763	339	41.34	15.93
ลำดับส่วน Aa_2	1.5	12	3,768	314	38.29	10.42
ลำดับส่วน Aa_3	2	5	1,505	301	36.76	4.16
ข. ของลำดับส่วน B						
ลำดับส่วน B_1	3	11	3,759	341.73	41.67	10.39
ลำดับส่วน B_2	2.5	5	1,512	302.40	36.88	4.18
ลำดับส่วน B_3	1.5	2	580	290.00	35.37	1.60

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



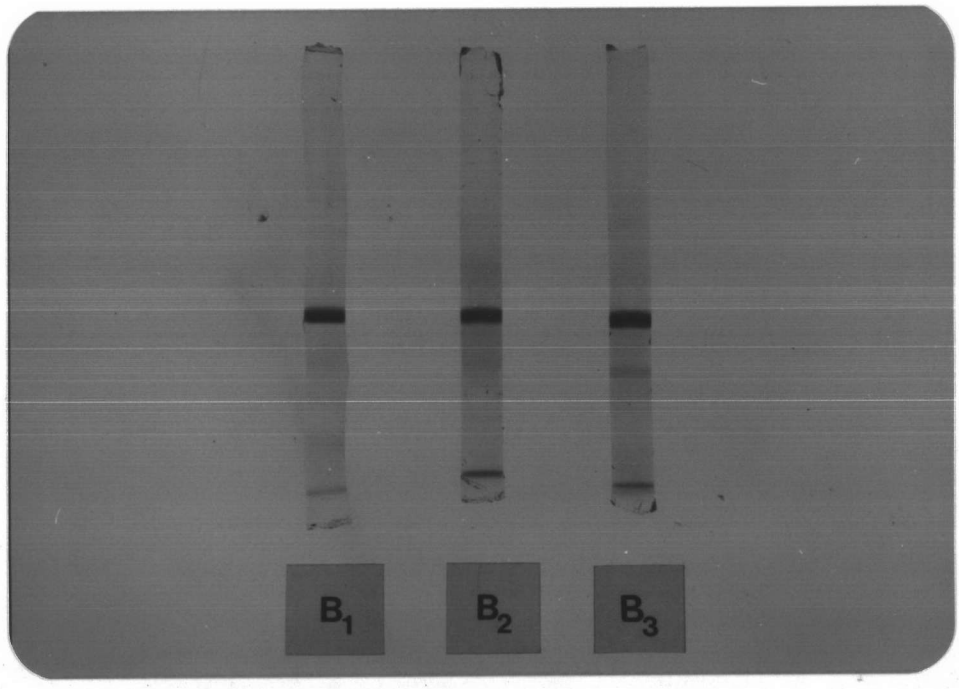
รูปที่ 9 โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลกโตรโฟรีซีส์ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ รายละเอียดของการทดลองตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 7.3

1. สารสกัดจากเซลเริ่มต้น (ปริมาณโปรตีน 60 ไมโครกรัม)
2. สำตับส่วน 30-80 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟต (ปริมาณโปรตีน 55.3 ไมโครกรัม)
3. สำตับส่วน A (ปริมาณโปรตีน 54.0 ไมโครกรัม)
4. สำตับส่วน B (ปริมาณโปรตีน 53.2 ไมโครกรัม)
5. สำตับส่วน Aa (ปริมาณโปรตีน 54.8 ไมโครกรัม)



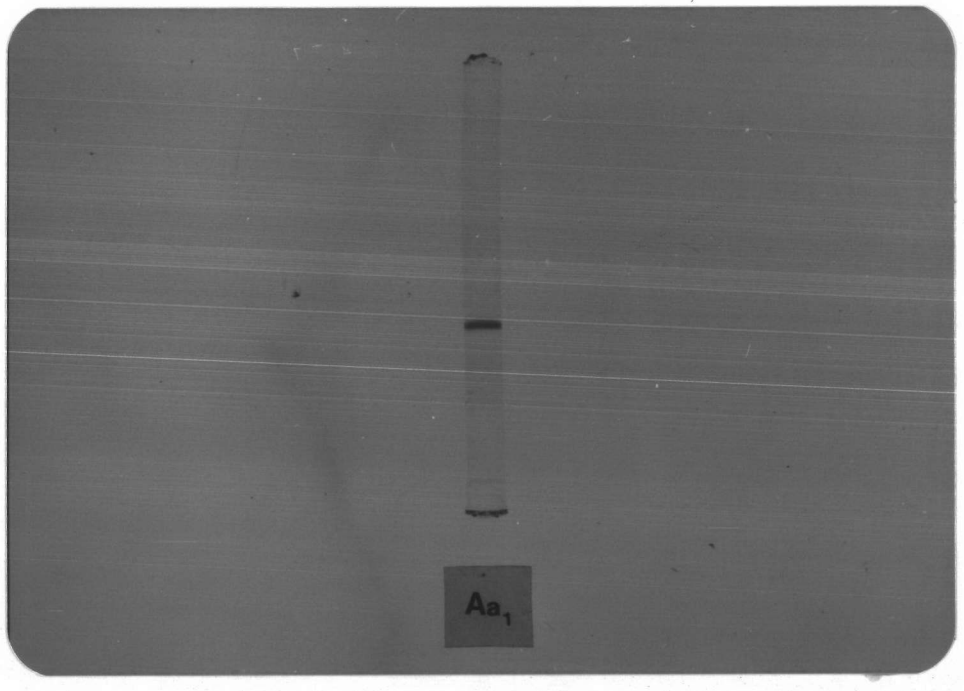
รูปที่ 10 โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลกโตรโฟรีซีส์ของโปรตีนลำดับส่วน Aa ที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200

1. ลำดับส่วน Aa_1 (ปริมาณโปรตีน 51.8 ไมโครกรัม)
2. ลำดับส่วน Aa_2 (ปริมาณโปรตีน 50.3 ไมโครกรัม)
3. ลำดับส่วน Aa_3 (ปริมาณโปรตีน 53.7 ไมโครกรัม)



รูปที่ 11 โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส์ของโปรตีนลำดับส่วน B ที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200

1. ลำดับส่วน B_1 (ปริมาณโปรตีน 50.6 ไมโครกรัม)
2. ลำดับส่วน B_2 (ปริมาณโปรตีน 53.5 ไมโครกรัม)
3. ลำดับส่วน B_3 (ปริมาณโปรตีน 54.2 ไมโครกรัม)



รูปที่ 12 โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลกโตรโฟรีซีสของโปรตีนที่ได้จากยอดของลำดับส่วน Aa_1

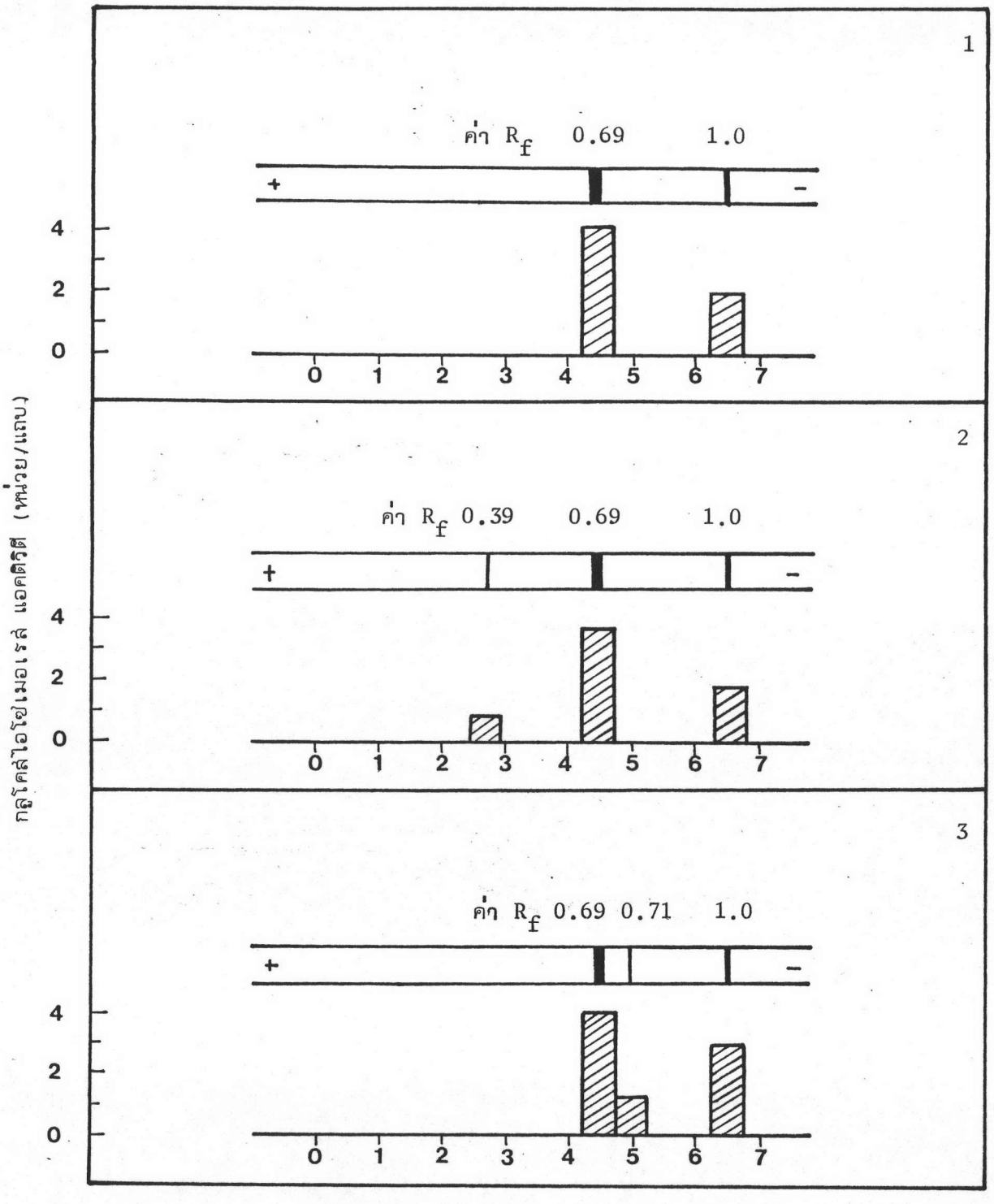
เซนติเมตร จากรูปแบบที่คล้ายคลึงกันบนโพลีอะไครลาไมด์เจลนี้ อาจกล่าวได้ว่า Aa_1, Aa_2, Aa_3, B_1, B_2 และ B_3 คือเอนไซม์เดียวกัน นอกจากนั้นจากการตรวจล่อบแอคติวิตีของเอนไซม์ตรงตำแหน่งที่มีแถบโปรตีน พบว่าแถบโปรตีนบนแท่งเจลนี้มีความสัมพันธ์กับแอคติวิตีของเอนไซม์โดยที่ทุกแถบของโปรตีนจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ และแอคติวิตีนี้แปรผันตามความเข้มของแถบโปรตีนบนแท่งเจล ดังแสดงในรูปที่ 13 ก และ 13 ข จากผลการทดลองดังกล่าวอาจกล่าวได้ว่ากลูโคส-ไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 เป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ (complex molecule) ที่ประกอบด้วยเปปไทด์หลายสายที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ และเมื่อเอนไซม์นี้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ อาจทำให้สายโพลีเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลเชิงซ้อนหลุดออกมา แต่โพลีเปปไทด์ที่หลุดออกมานี้ยังคงมีแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ ดังนั้นจากรูปแบบของโปรตีนบนโพลีอะไครลาไมด์เจล และจากการตรวจพบแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสของโปรตีนที่เตรียมได้ทุกลำดับส่วน แสดงว่าในทุกลำดับส่วนของโปรตีนที่เตรียมได้จะเป็นส่วนผสมของโมเลกุลของเอนไซม์ที่มีขนาดต่าง ๆ กัน คืออาจเป็นทั้งโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่, โมเลกุลเชิงซ้อนขนาดเล็ก และ/หรือ โพลีเปปไทด์ที่หลุดออกมา

1.5 <u>การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์</u>

1.5.1 <u>การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่เตรียมได้โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200</u> การหาน้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 โดยการทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ คาตาเลส (240,000 ดาลตัน), อัลบูมิน (67,000 ดาลตัน) และไซโตโครม-ซี (12,270 ดาลตัน) (รูปที่ 14) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 15,16 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ Aa_1, Aa_2, Aa_3 เป็น 185,000, 120,000 และ 80,000 ดาลตัน ตามลำดับ และ B_1, B_2 และ B_3 มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 185,000, 80,000 และ 45,000 ดาลตัน ตามลำดับ

1.5.2 <u>โดยวิธีอีเลกโตรโฟรีซีสบนโซเดียมโดเดซิล-ซัลเฟตโพลีอะไครลาไมด์เจล</u>

จากการนำเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว (ข้อ 69) ทุกลำดับส่วนคือ Aa_1, Aa_2, Aa_3 และ B_1, B_2, B_3 มาศึกษาองค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์โดยการทำอีเลกโตรโฟรีซีสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะไครลาไมด์เจล ดังการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 9 ผลการทดลองในรูปที่ 17 พบว่าทุกลำดับส่วนจะให้แถบโปรตีนที่ติดสีเข้มชัดเพียงแถบเดียวซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 46,000 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน แสดงว่าเอนไซม์ทุกลำดับส่วนซึ่งได้ผ่าน

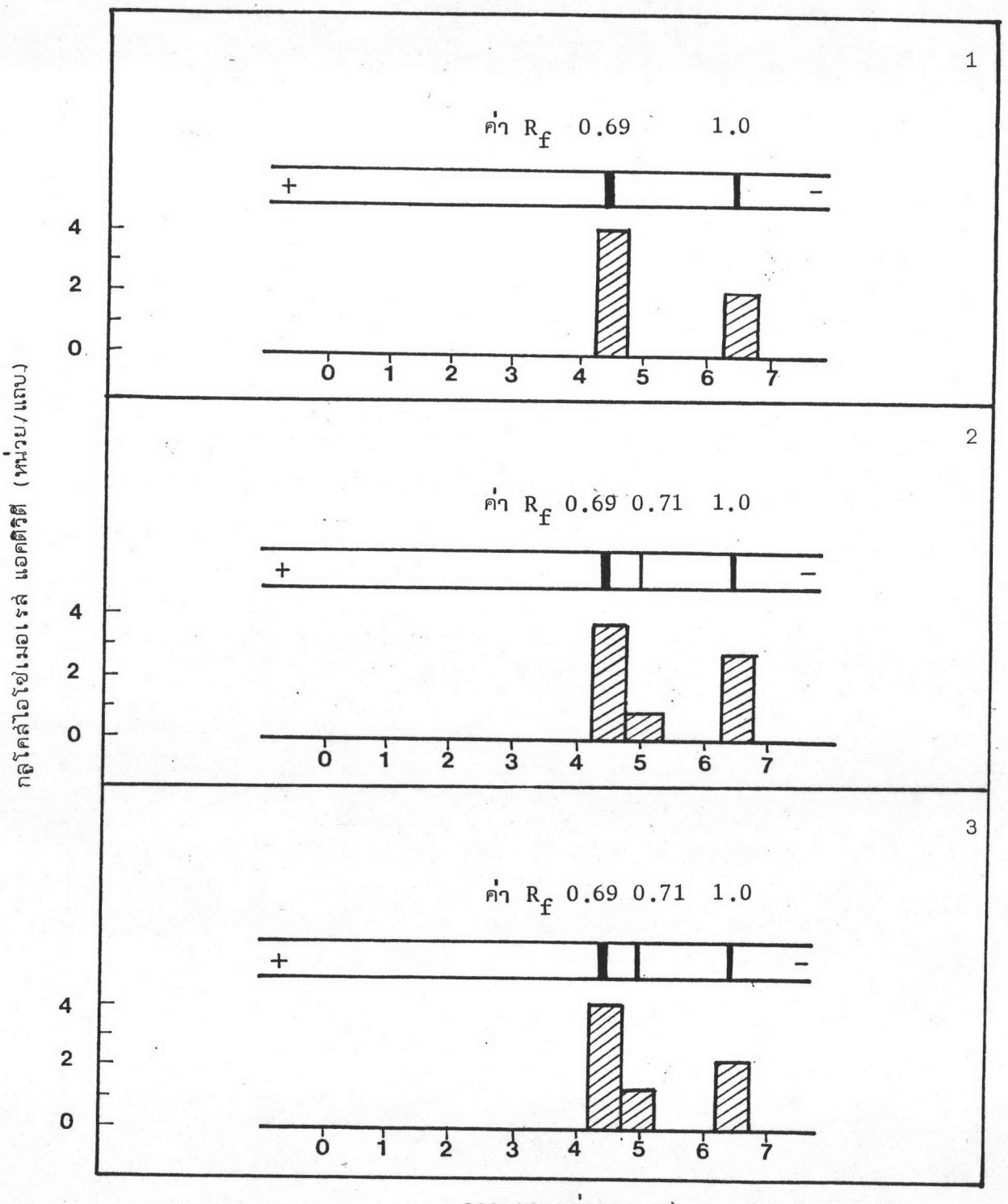


รูปที่ 13 ก. แอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่พบในแถบโปรตีนของลำดับส่วนที่ผ่านการทำอีเลกโตรโฟรีซีส์บนโพลีอะไครลาไมด์เจล

1. Aa_1 2. Aa_2 3. Aa_3

— แถบโปรตีน

▨ แอคติวิตีของเอนไซม์

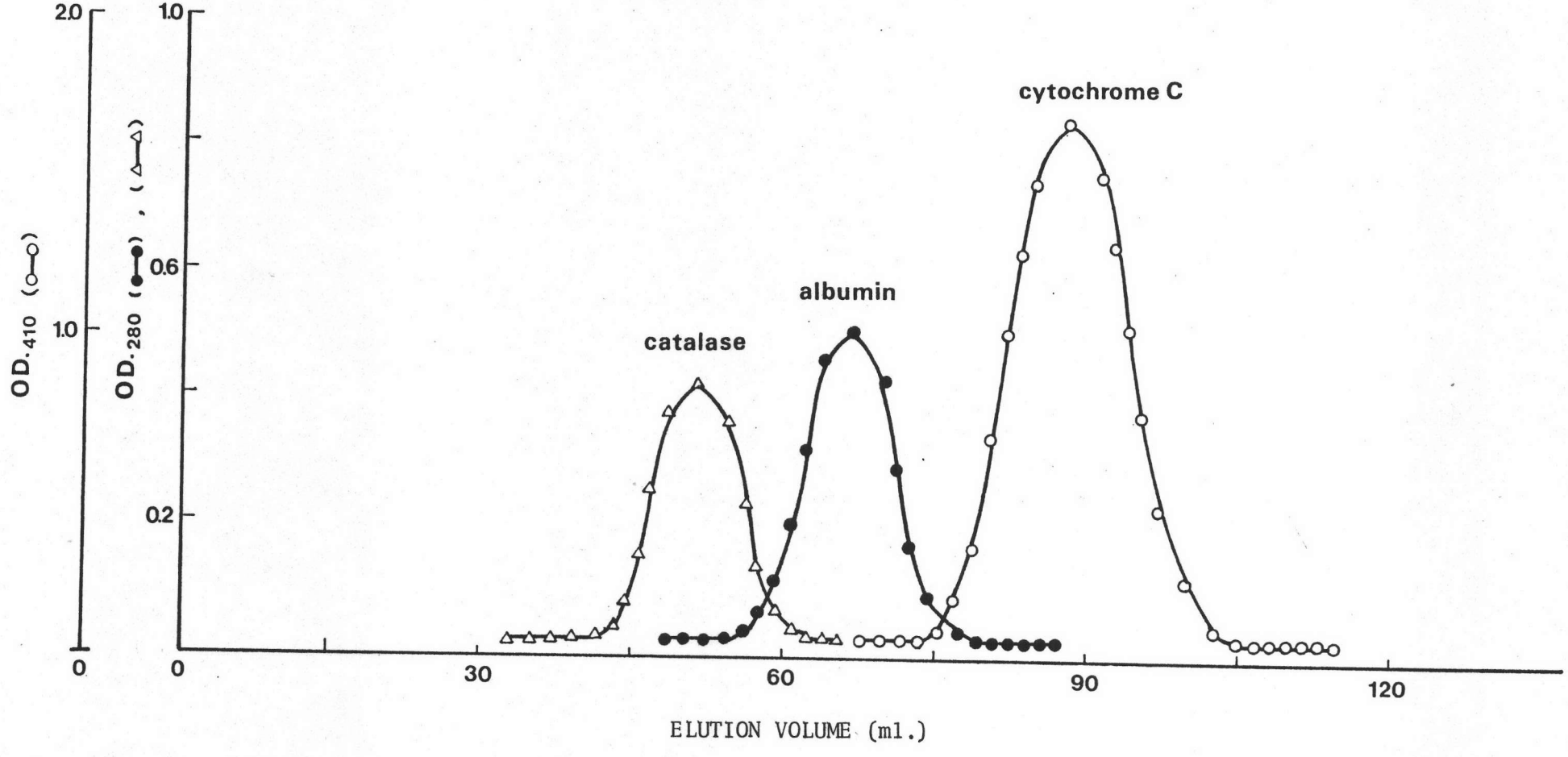


รูปที่ 13 ข. แอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่พบในแถบโปรตีนของลำดับส่วนที่ผ่านการทำอีเลกโตรโฟรีซีสบนโพลีอะไครลาไมด์เจล

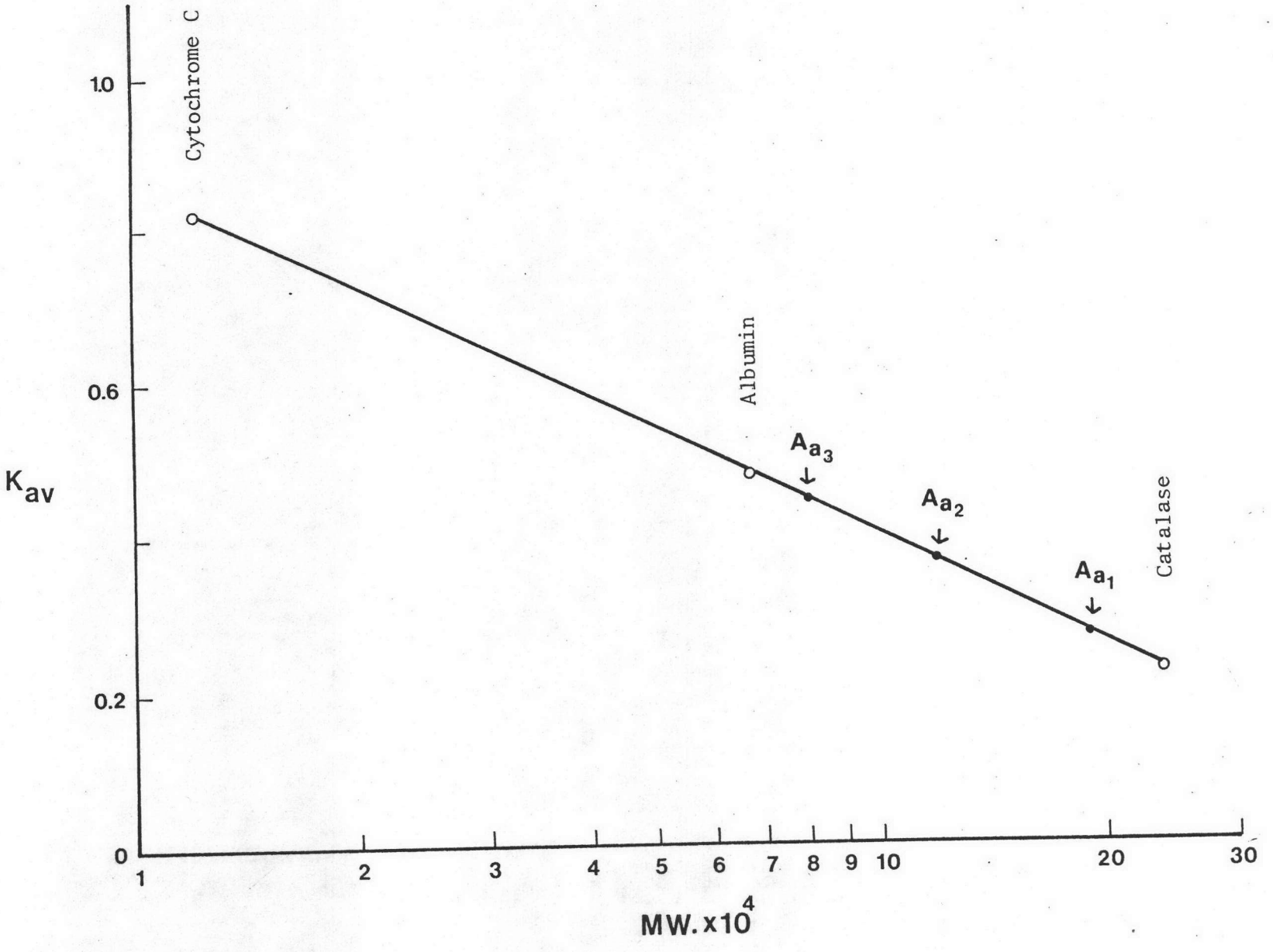
1. B_1 2. B_2 3. B_3

— แถบโปรตีน

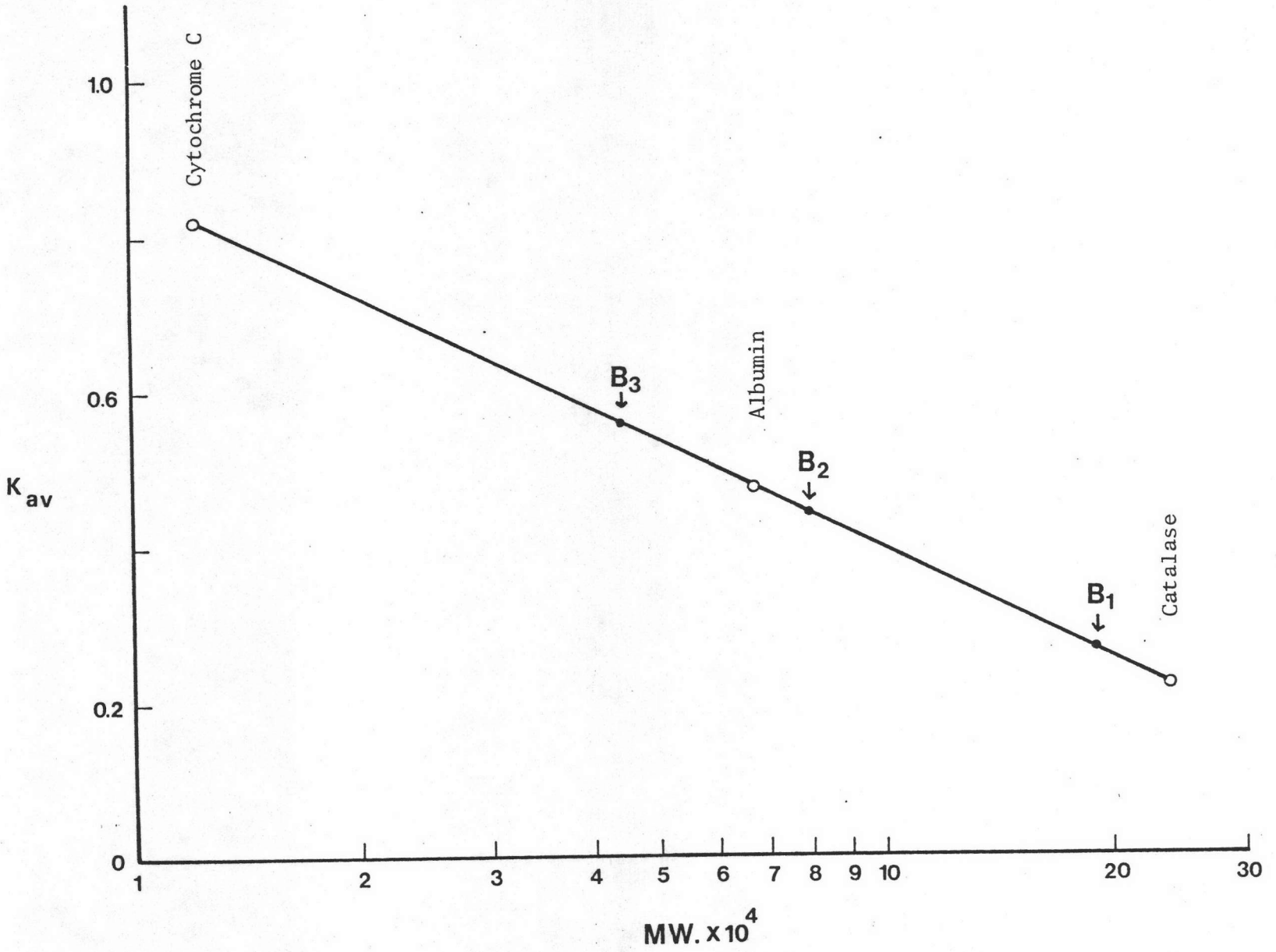
▨ แอคติวิตีของเอนไซม์



รูปที่ 14 โครมาโตกราฟฟีของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรสบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ดังวิธีการทดลองบทที่ 2 ข้อ 9.1.2



รูปที่ 15 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุลและค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของลำดับส่วน Aa โดยใช้คอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200 (2.0 x 40.0 เซนติเมตร) ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 9.1.2



รูปที่ 16 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุลและค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุลของลำดับส่วน B โดยใช้คอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200 (2.0 x 40.0 เซนติเมตร) ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 9.1.2

ขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำให้บริสุทธิ์มาแล้วนั้น ค่อนข้างจะบริสุทธิ์

นอกจากนี้การที่เอนไซม์ที่เตรียมได้ทุกลำดับส่วนให้แถบโปรตีนที่ติดสีเข้มชัดเพียง 1 แถบ และอยู่ในตำแหน่งเดียวกันเป็นการสนับสนุนผลการทดลองที่ได้จากการทำอีเลคโตรโฟรีซีสบนโพลี-อะไครลาไมด์เจลว่า เอนไซม์ทั้งหมดที่เตรียมได้นี้ควรจะเป็นเอนไซม์ตัวเดียวกัน และมีหน่วยย่อยที่เหมือนกัน (Identical subunit) และเมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ซึ่งได้จากการทำโครมาโตกราฟฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-200 พบว่า Aa_1 และ B_1 มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุด และเท่ากัน คือ 185,000 ดาลตัน และเมื่อคำนวณจากน้ำหนักของหน่วยย่อย (46,000 ดาลตัน/หน่วย) แสดงว่าเอนไซม์ในลำดับส่วน Aa_1 และ B_1 อาจประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน สำหรับลำดับส่วน B_3 เป็นลำดับส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุดคือ 45,000 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักของหน่วยย่อยของเอนไซม์ ดังนั้น B_3 อาจคือหน่วยย่อยของเอนไซม์นี้ จากคุณสมบัติที่กลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 อาจประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีลักษณะเหมือนกัน จึงทำให้เอนไซม์ที่เตรียมได้นี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น กลูโคสไอโซเมอเรสจาก B. coagulans, HN. 68 (41) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 175,000 ดาลตัน และมี 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกันซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 49,000 ดาลตัน/หน่วย และ S. griseofuscus, S-41 (45) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 180,000 ดาลตัน และมี 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน เป็นต้น

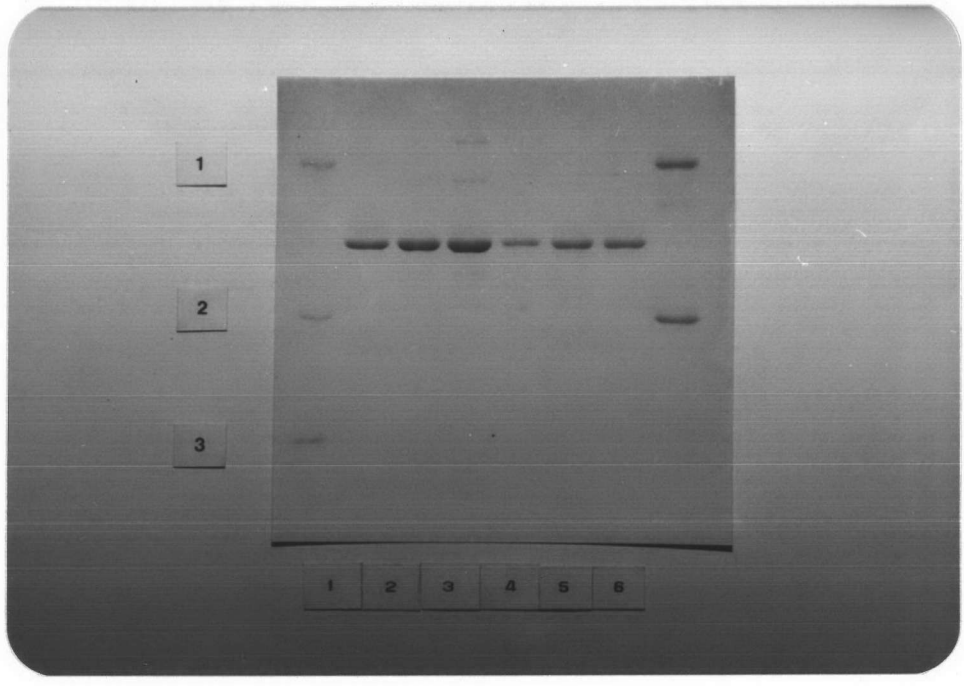
2. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

ในการศึกษาคุณสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 นี้ ได้นำลำดับส่วน Aa_1 ซึ่งเป็นลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีส่วนใหญ่ของกลูโคสไอโซเมอเรสมาศึกษา ผลการทดลองเป็นดังนี้

2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

2.1.1 อุณหภูมิ

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว (ข้อ 1.3.4.1) โดยนำเอนไซม์มาบ่มในส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ซึ่งมีองค์ประกอบดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 50, 60, 70, 75, 80 และ 90 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ จากผลการทดลองในรูปที่



รูปที่ 17 โซเดียมโดเดซิล-ซัลเฟตโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีสของโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อย (subunit) ของทุกลำดับส่วน และโปรตีนมาตรฐาน

แถวตั้ง : 1. โบวีนซีรั่มอัลบูมิน (M_r= 67,000 ดาลตัน)

2. ไคโมทริปซีโนเจน (M_r= 25,700 ดาลตัน)

3. ไซโตโครม-ซี (M_r= 11,700 ดาลตัน)

แถวนอน 1. ลำดับส่วน Aa_1 (ปริมาณโปรตีน 16.50 ไมโครกรัม)

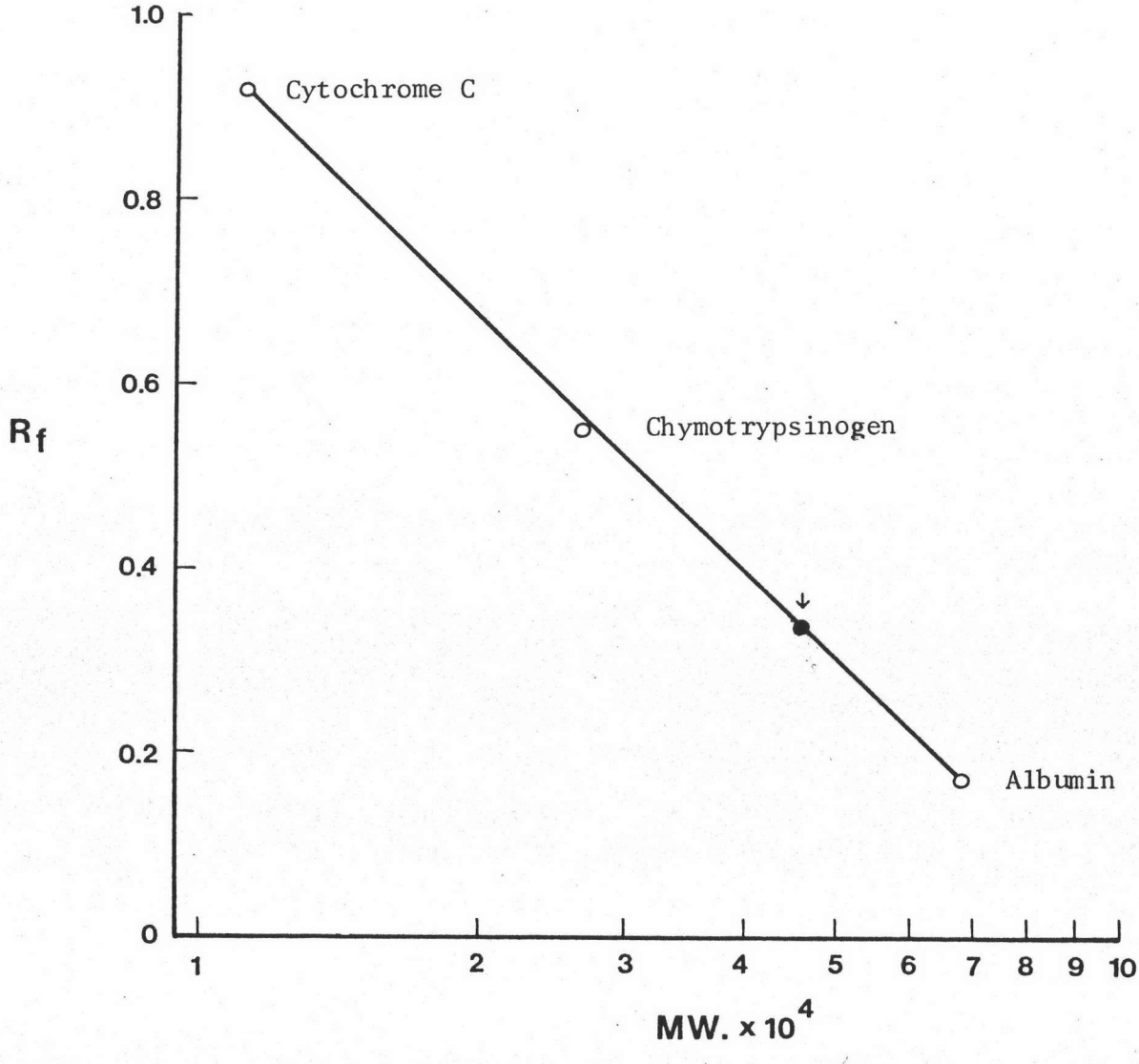
2. ลำดับส่วน Aa_2 (ปริมาณโปรตีน 17.21 ไมโครกรัม)

3. ลำดับส่วน Aa_3 (ปริมาณโปรตีน 19.14 ไมโครกรัม)

4. ลำดับส่วน B_1 (ปริมาณโปรตีน 14.17 ไมโครกรัม)

5. ลำดับส่วน B_2 (ปริมาณโปรตีน 15.42 ไมโครกรัม)

6. ลำดับส่วน B_3 (ปริมาณโปรตีน 15.33 ไมโครกรัม)



รูปที่ 18 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (โดยการทำโซเดียมโดเดซิลโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส ตามการทดลองที่ 9.2) และ log ของน้ำหนักโมเลกุล

ลูกศร แสดงถึงหน่วยย่อยของกลูโคสไอโซเมอเรส

19 พบว่าในช่วงอุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์นี้เมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (69) พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานไม่แตกต่างกันมากนัก

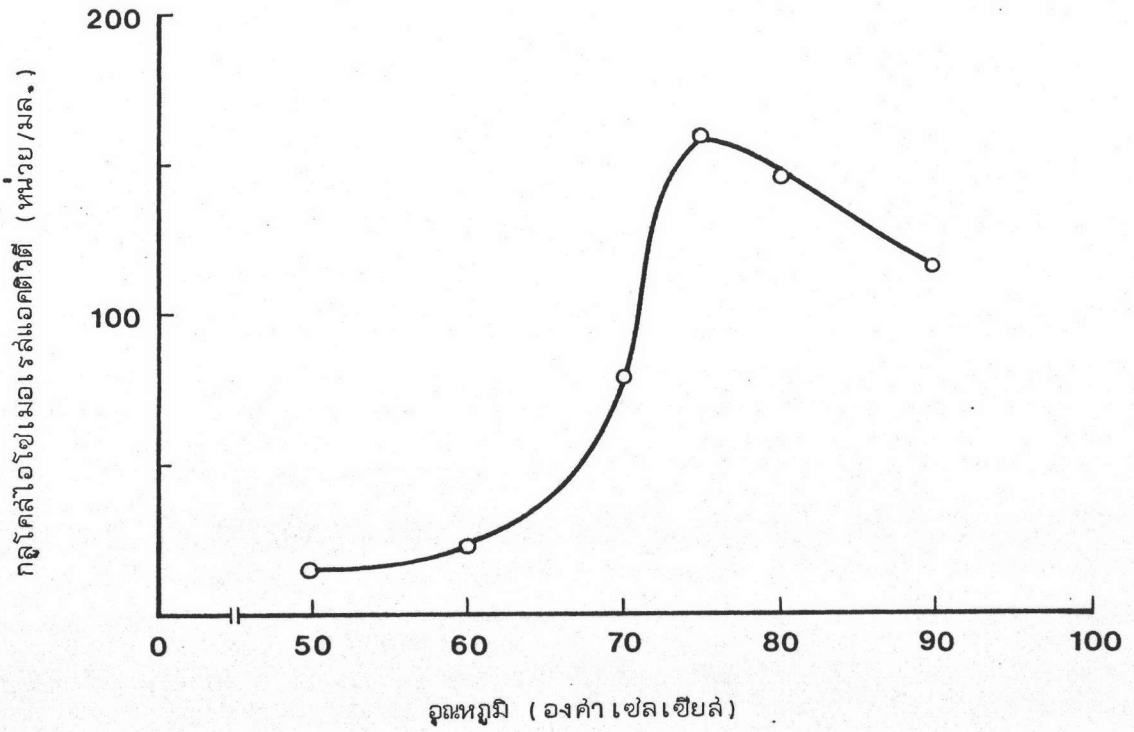
2.1.2 pH

จากการตรวจสอบ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ดังผลการทดลองในรูปที่ 20 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่ pH 7.0 (ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และ pH 9.0 (ในทริสบัฟเฟอร์) เช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (69) คุณสมบัตินี้คล้ายคลึงกับคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จากสเตรพโตมัยซีสอื่น ๆ เช่น S. griseolus, CL-71 (46) ซึ่งทำงานได้ดีที่ pH 8.5 (ในไตรเอทานอลามีน ไฮโดรคลอไรด์) และที่ pH 9.0 (ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) และเอนไซม์จาก S. phaeochromogenes (17, 29) ซึ่งทำงานได้ดีที่ pH 7.0 (ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และ 9.0 (ในทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน) ซึ่งทั้งนี้ Strandberg และคณะ (29) สรุปว่าเนื่องจากในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH สูงกว่า 7.0 และอุณหภูมิสูง แมกนีเซียมจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นปริมาณแมกนีเซียมที่เอนไซม์ต้องการจะลดลง จึงมีผลต่อปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส ด้วยเหตุนี้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH สูงกว่า 7.0 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์จึงต่ำลง ซึ่งต่างจากบัฟเฟอร์อื่น เช่น ทริสบัฟเฟอร์ที่ pH 7.5-9.0 พบว่าอัตราการให้ฟรุคโตสจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น เนื่องจากไม่ถูกจำกัดปริมาณแมกนีเซียมซึ่งจำเป็นต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าว

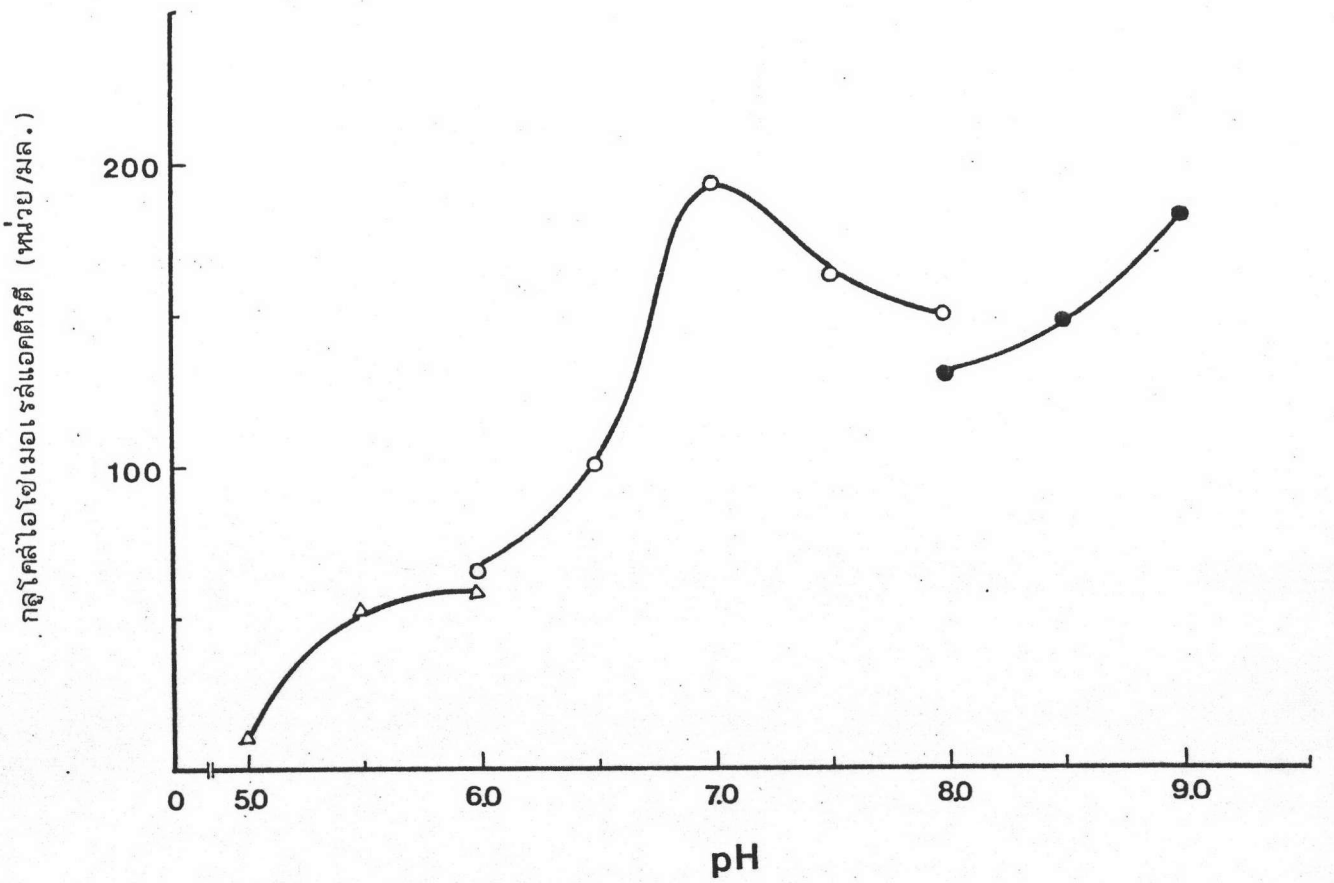
อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแอคติวิตีของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีสบางชนิด เช่น S. griseofuscus, S-41 (43) และ S. flavovirens, IFO 3197 (50) จะลดลงเมื่อใช้ทริสบัฟเฟอร์ pH 8-9

2.1.3 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์

จากการบ่มเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่เตรียมได้ (ข้อ 1.3.4.1) ในส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 2 ที่ 75 องศาเซลเซียส และแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 จาก 0 ถึง 300 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในรูปที่ 21 แสดงว่าที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งคล้ายคลึงกับการทำงานของเอนไซม์ที่ยังมิได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (69)



รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 2 ยกเว้นอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังแสดงไว้ในรูป ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 150 หน่วย/มล.

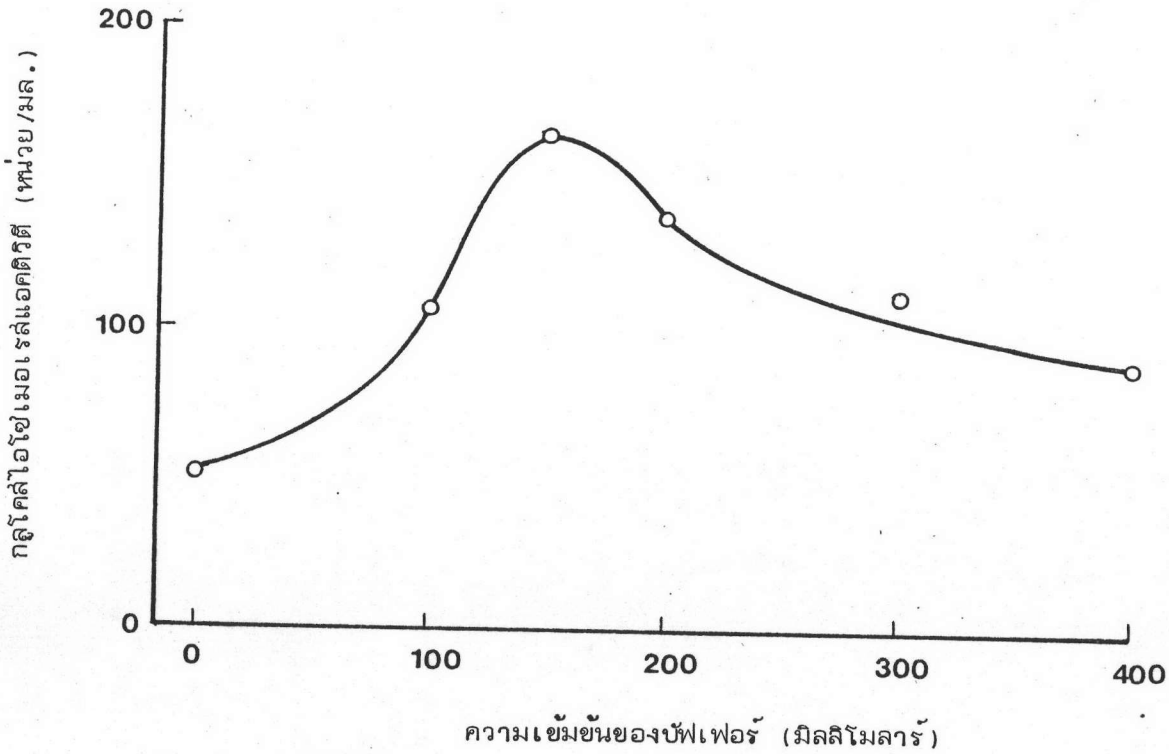


รูปที่ 20 ผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 150 หน่วย/มล.

△—△ อะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 5.0-6.0)

○—○ โซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0-8.0)

●—● ทริส์-บัฟเฟอร์ (pH 8.0-9.0)



รูปที่ 21 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ต่อการทำงานของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1 การตรวจส์อบแอคติวิตีของเอนไซม์ทำตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 2 ยกเว้นในโซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังบ่งไว้ในรูป และบ่มที่ 75 องศาเซลเซียส

2.1.4 ความเข้มข้นของโคบอลท์อิออน และแมกนีเซียมอิออน

2.1.4.1 โคบอลท์อิออน

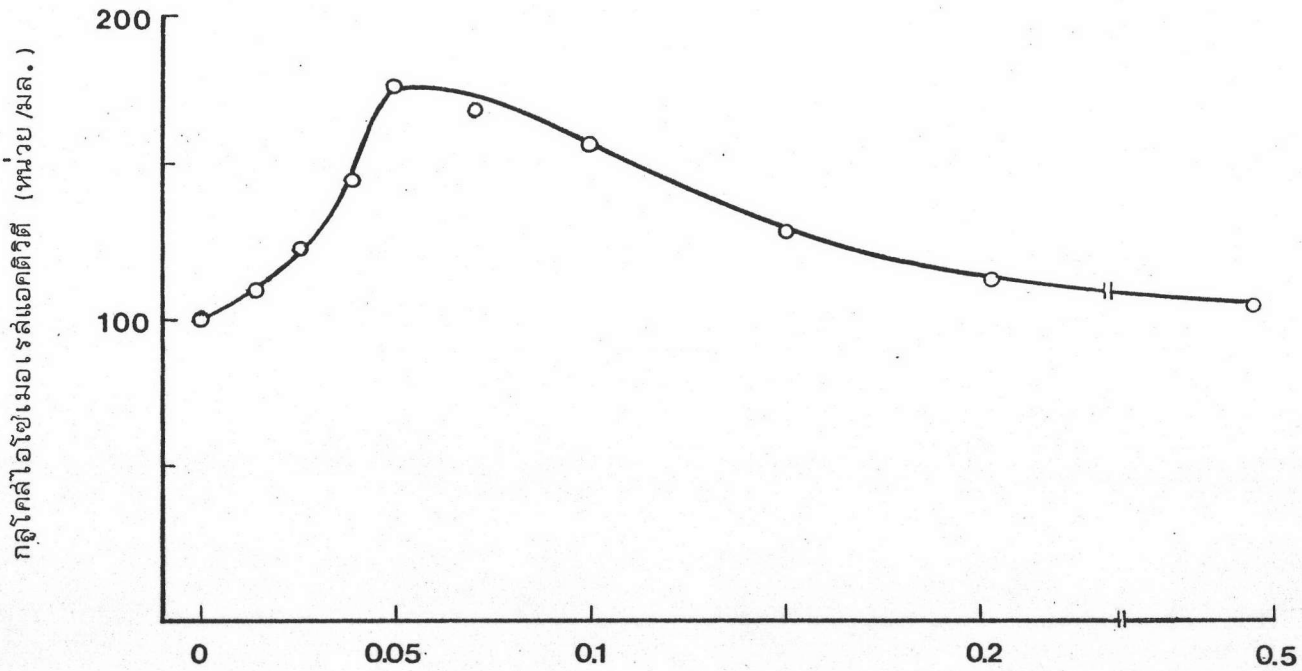
จากการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ผลการทดลองในรูปที่ 22 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุด คือเพิ่มขึ้นจากที่ไม่ได้ใส่โคบอลท์ประมาณ 2 เท่า ซึ่งแสดงว่าโคบอลท์มีส่วนสำคัญในการช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของโคบอลท์สูง ๆ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง และจากการเปรียบเทียบกับเอนไซม์ซึ่งมิได้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (69) พบว่าปริมาณโคบอลท์ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เตรียมดังกล่าวสูงกว่าเล็กน้อยคือ 0.1 มิลลิโมลาร์

2.1.4.2 แมกนีเซียมอิออน

จากการนำเอนไซม์ที่เตรียมได้ (ข้อ 1.3.4.1) มาตรวจสอบผลของแมกนีเซียมอิออนต่อการทำงานของเอนไซม์ ผลการทดลองในรูปที่ 23 แสดงว่าแมกนีเซียมอิออนมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยจะช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ และที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด ซึ่งความต้องการแมกนีเซียมอิออนของเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้กับเอนไซม์ที่มิได้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (69) มีค่าไม่แตกต่างกันเลย

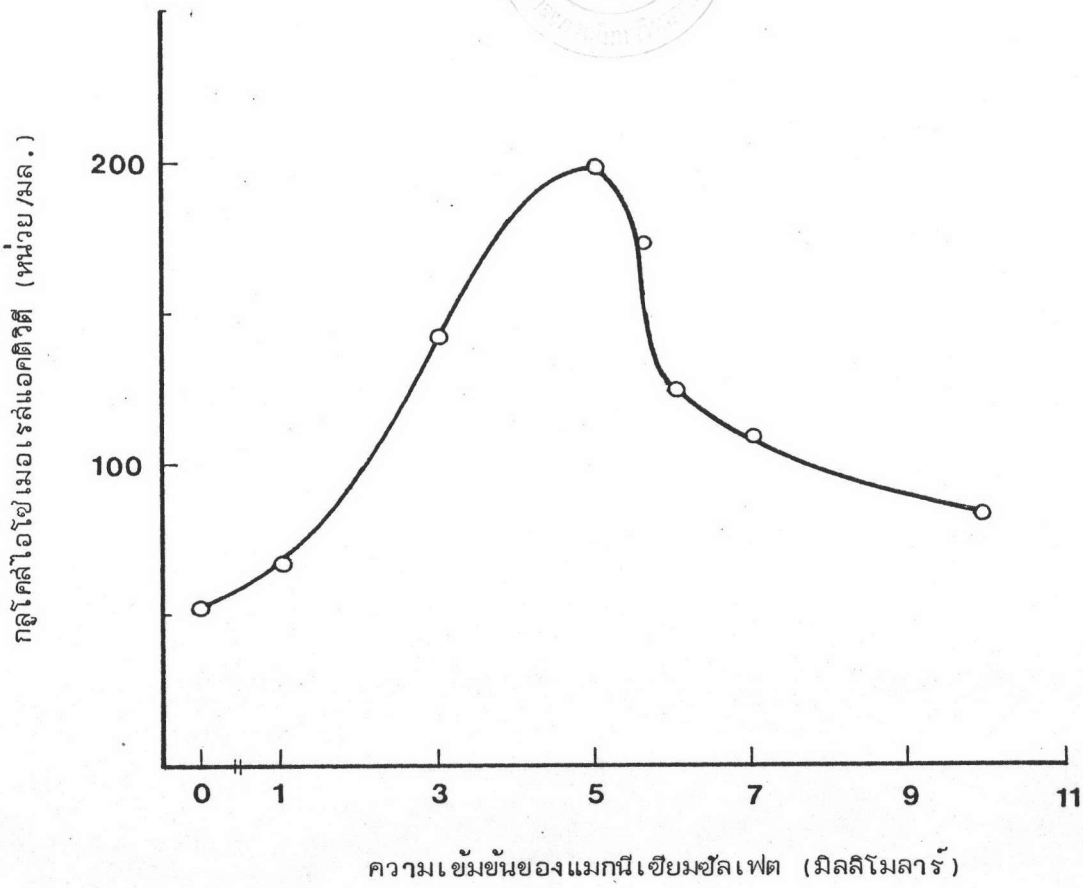
2.2 ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรท

การศึกษาความจำเพาะของกลูโคสไอโซเมอเรสที่เตรียมได้ต่อซับสเตรท ทำโดยนำน้ำตาลชนิดต่าง ๆ รวมทั้งน้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์มาบ่มกับเอนไซม์ โดยน้ำตาลต่าง ๆ ที่ใช้เป็นซับสเตรท มีความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มีดังนี้ ดี-กลูโคส, ดี-ไรโบส (D-ribose), ดี-แมนโนส (D-mannose), ดี-กาแลคโตส (D-galactose), แอล-อะราบิโนส (L-arabinose), ดี-ไซโลส (D-xylose), แอล-ไซโลส (L-xylose), ดี-ซอร์บิตอล (D-sorbitol),



รูปที่ 22 ผลของโคบอลท์ไอออนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ทำเช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ใต้รูปที่ 21 ยกเว้นใน 150 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 และโคบอลท์คลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังบ่งไว้ในรูป



รูปที่ 23 ผลของแมกนีเซียมไอออนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ทำเช่นเดียวกับที่บรรยายไว้ใต้รูปที่ 22 ยกเว้นใน 0.05 โมลาร์โคบอลท์คลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในรูป

ดี-แมนนิตอล (D-mannitol), และ ดี-ไซลีตอล (D-xylitol) ผลการทดลองในตารางที่ 9 แสดงว่าเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อ ดี-กลูโคส, ดี-ไซโลส และ ดี-ไรโบส และไม่สามารถใช้ ดี-แมนโนส, ดี-กาแลคโตส, แอล-ไซโลส, แอล-อะราบิโนส, ดี-แมนนิตอล, ดี-ซอร์บิตอล และ ดี-ไซลีตอล เป็นซับสเตรทได้ ซึ่งคล้ายกับกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จาก S. griseofuscus, S-41 (43) ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิดเป็นซับสเตรทได้เช่นกัน

ตารางที่ 9 แสดงความจำเพาะของเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ที่มีต่อซับสเตรทต่าง ๆ (Substrate specificity)

ชนิดของซับสเตรท	แอคติวิตีสัมพัทธ์เมื่อเทียบกับกลูโคส (เปอร์เซ็นต์)
ดี-กลูโคส	100.0
ดี-แมนโนส	0.0
ดี-ไรโบส	36.2
แอล-อะราบิโนส	0.0
ดี-กาแลคโตส	0.0
ดี-ไซโลส	220.0
แอล-ไซโลส	0.0
ดี-แมนนิตอล	0.0
ดี-ซอร์บิตอล	0.0
ดี-ไซลีตอล	0.0

หมายเหตุ กำหนดให้แอคติวิตีต่อ ดี-กลูโคส ภายใต้สภาวะของการตรวจสอบดังกล่าวในรูปที่ 23 ยกเว้นใน 5 มิลลิโมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟต และที่ความเข้มข้นของซับสเตรท 500 มิลลิโมลาร์

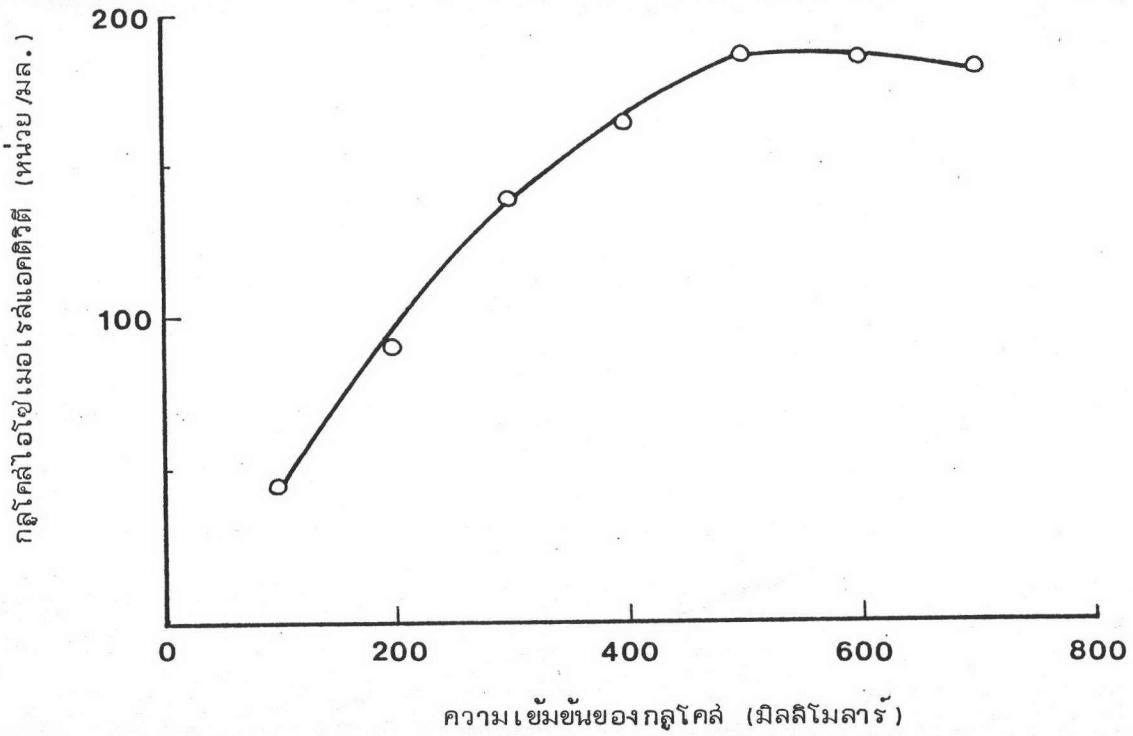
2.3 ผลของความเข้มข้นของกลูโคส่และไซโคส่ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

การนำเอนไซม์กลูโคส่ไอโซเมอเรส่ที่เตรียมได้มาบ่มในส่ารละลายที่มีกลูโคส่ที่ความเข้มข้น 100-700 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส่ 500 มิลลิโมลาร์ ดังในรูปที่ 24 ก. และจากการเขียนกราฟแบบไลน์วีเวอร์-เบิร์ค (Lineweaver-burk plot) (รูปที่ 24 ข.) พบว่า K_m สำหรับกลูโคส่มีค่าเท่ากับ 0.22 โมลาร์ ดังแส่ดงในรูปที่ 24 ข. และเมื่อนำเอนไซม์มาบ่มกับไซโลส่ภายใต้ส่ภาวะเดียวกับเมื่อมีกลูโคส่ โดยใช้ไซโลส่ที่ความเข้มข้น 50-300 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์นี้ส่ามารถที่จะไอโซเมอไรซ์ได้เช่นเดียวกับกลูโคส่ โดยความเข้มข้นของไซโลส่ที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดคือ 250 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 25 ก.) และค่า K_m สำหรับไซโลส่มีค่าเท่ากับ 0.122 โมลาร์ ดังรูปที่ 25 ข. ซึ่งทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าค่า K_m สำหรับ ดี-กลูโคส่ และ ดี-ไซโลส่ ของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วนี้มีค่าต่ำกว่าค่า K_m ที่ได้จากเอนไซม์ที่มิได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีค่า 0.25 และ 0.125 โมลาร์ ตามลำดับ (69) และค่า K_m นี้ยังใกล้เคียงกับกลูโคส่ไอโซเมอเรส่ที่ได้จากส่เตรพโตมัยซีส่อีกหลายส่ายพันธุ์ เช่น S. griseofuscus, S-41 (49) และ S. flavogriseus (40) ซึ่งมีค่า K_m สำหรับดี-กลูโคส่ และดี-ไซโลส่ เป็น 0.22, 0.054, 0.376 และ 0.12 ตามลำดับ

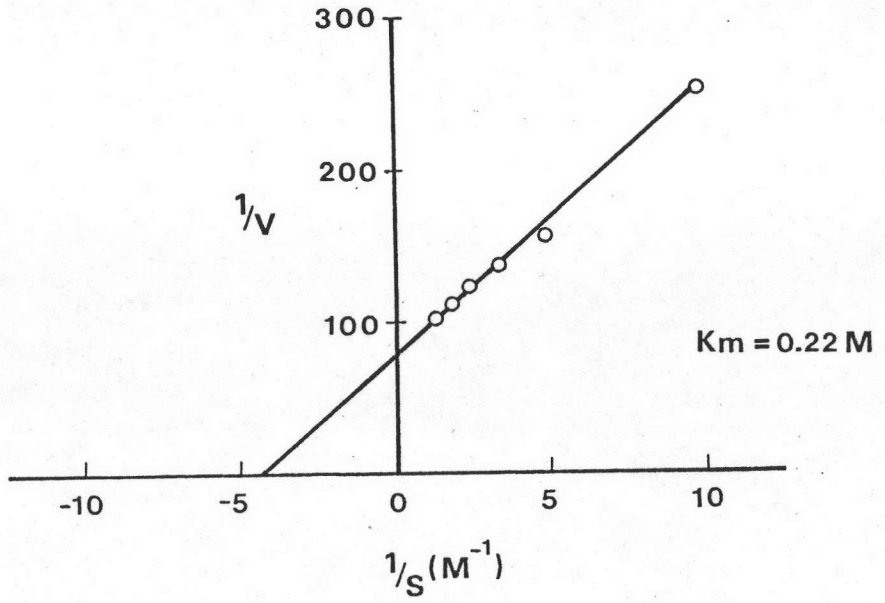
2.4 ส่ารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

2.4.1 น้ำตาลบางชนิด

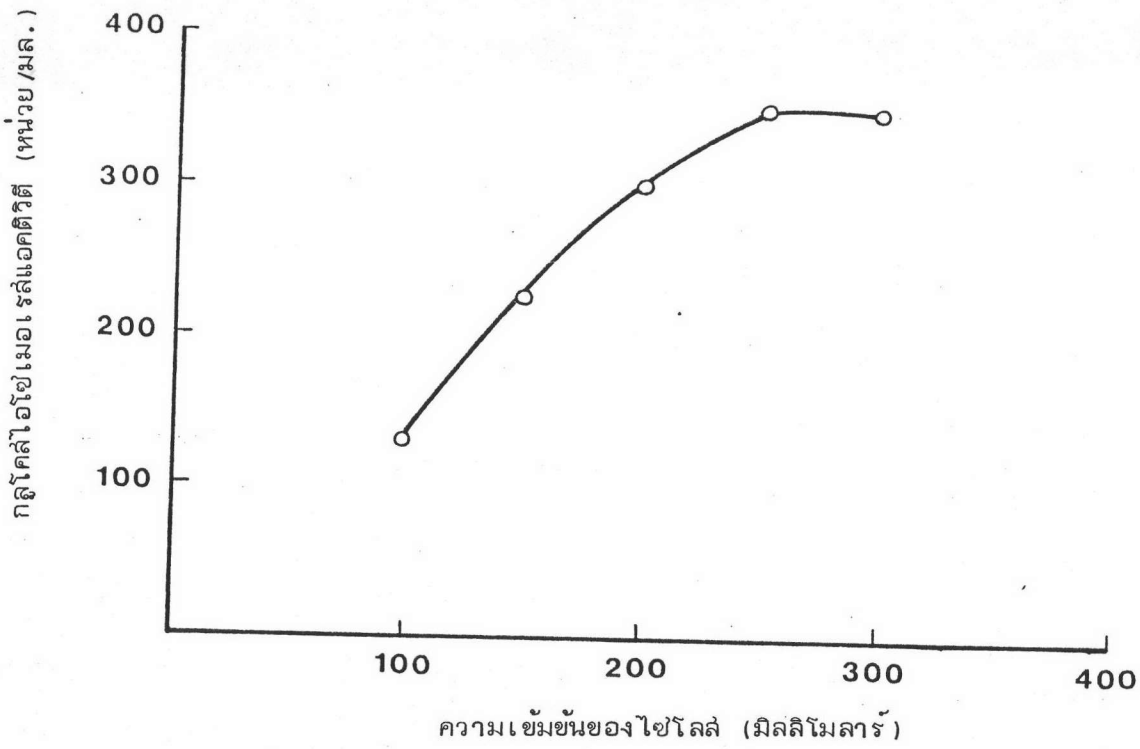
จากการทดลองพบว่าน้ำตาลหลายชนิดรวมทั้งน้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์ (Sugar alcohol) มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของกลูโคส่ไอโซเมอเรส่ที่เตรียมได้จากส่เตรพโตมัยซีส่ ส่ายพันธุ์ 190-1 ผลการทดลองดังแส่ดงในรูปที่ 26 ถึง 31 พบว่าน้ำตาลทุกชนิดที่นำมาทดส่อบส่ามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในลักษณะแข่งขัน (competitive inhibition) โดยมีค่า K_i ดังแส่ดงในตารางที่ 10 โดยที่ ดี-ไซลีตอล และดี-ซอร์บิตอล มีค่า K_i ต่ำที่สุดคือ 0.014 และ 0.028 โมลาร์ ตามลำดับ ค่า K_i ของดี-ไซลีตอลและ ดี-ซอร์บิตอลต่อกลูโคส่-ไอโซเมอเรส่ ส่ายพันธุ์ 190-1 นี้มีค่าค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับค่า K_i สำหรับน้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์ทั้ง 2 ต่อกลูโคส่ไอโซเมอเรส่ที่ได้จากจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น จาก S. griseofusous, S-41 (49) ซึ่งมีค่า K_i สำหรับ ดี-ไซลีตอล และดี-ซอร์บิตอลเป็น 1.2×10^{-3} และ 1.1×10^{-2} โมลาร์ ตามลำดับ และเอนไซม์จาก S. albus NRRL 5776 ซึ่งมีค่า K_i สำหรับ ดี-ซอร์บิตอล เป็น 0.055 โมลาร์ เป็นต้น นอกจากนี้ Yamanaka (51, 67) และ Danno



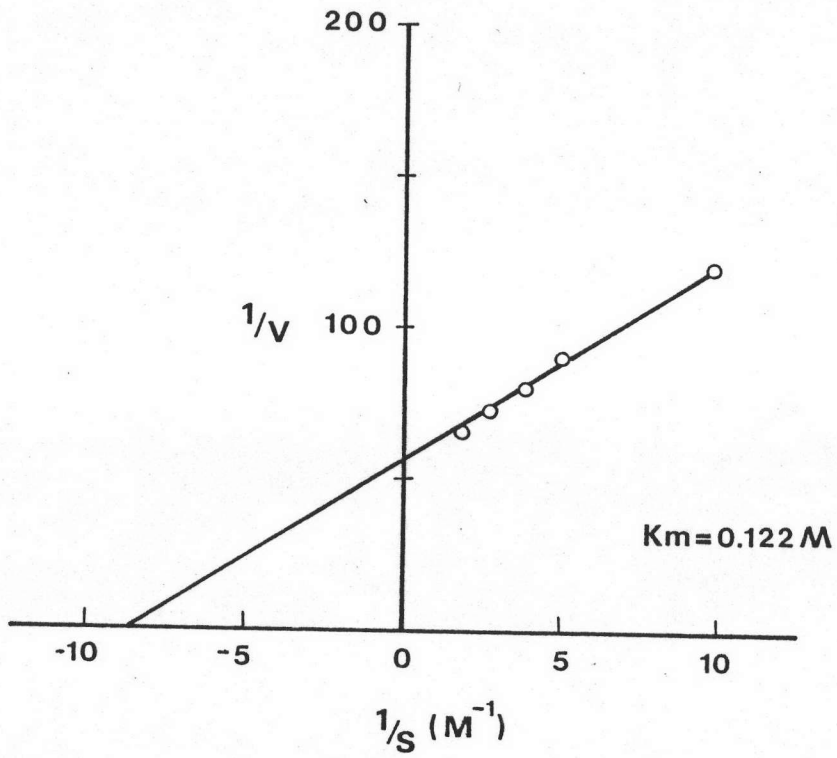
รูปที่ 24 ก. ผลของความเข้มข้นของกลูโคส์ต่อแอคติวิตีของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1



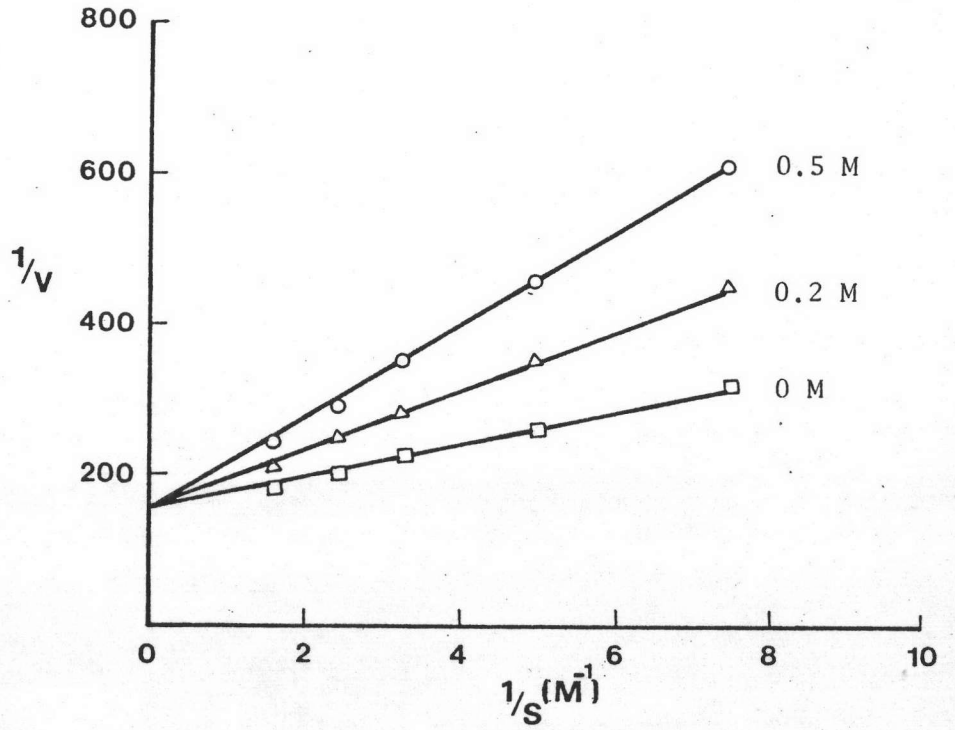
รูปที่ 24 ข. ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_m ของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์เมื่อมีกลูโคส์เป็นซับส์เตรท



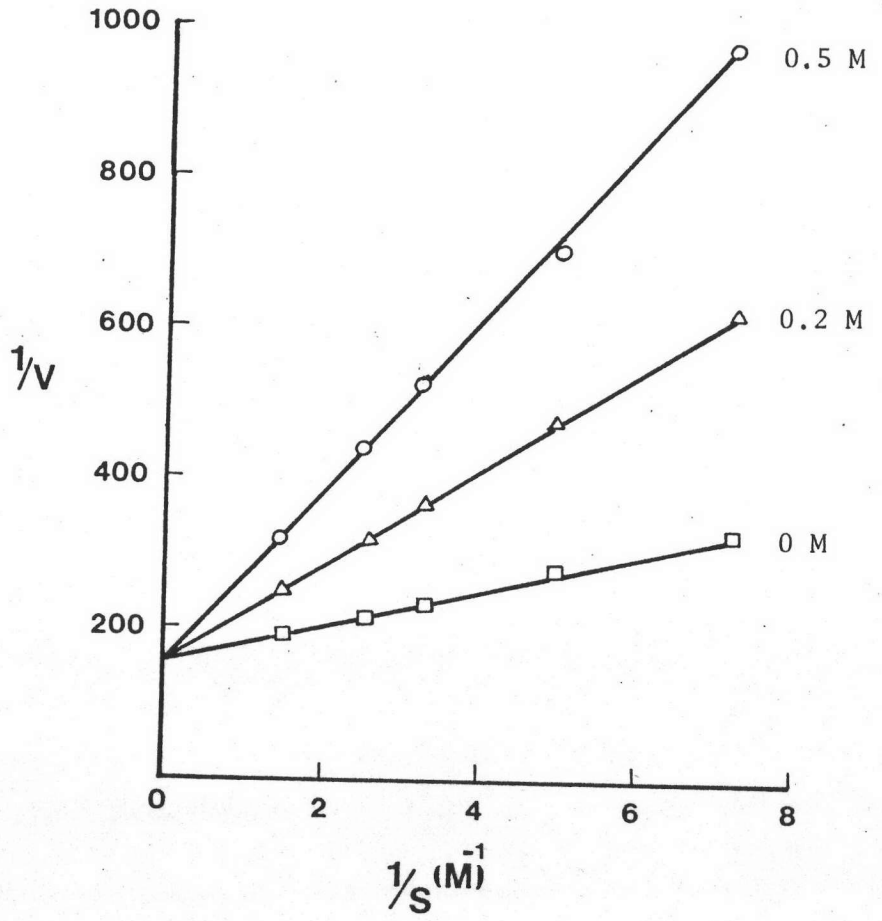
รูปที่ 25 ก. ผลของความเข้มข้นของไซโลส์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์จาก Streptomyces sp. สายพันธุ์ 190-1



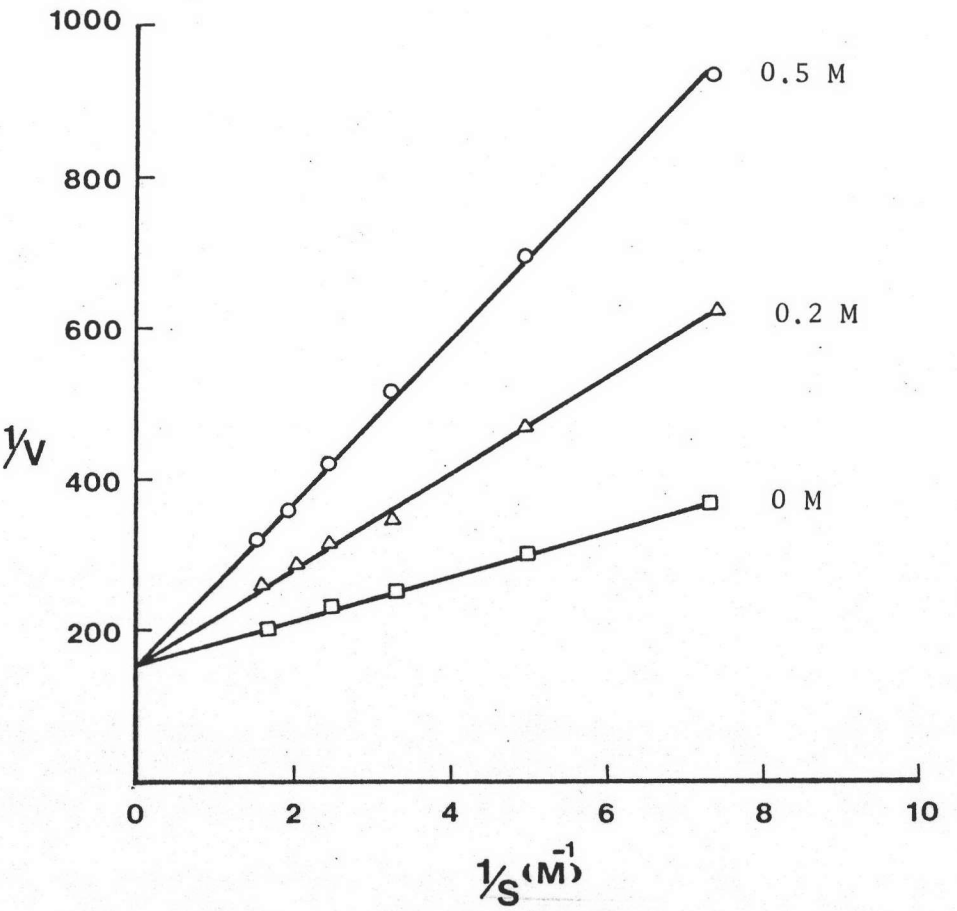
รูปที่ 25 ข. ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_m ของกลูโคส์ไอโซ์เมอเรส์ เมื่อมีไซโลส์เป็นซับส์เตรท



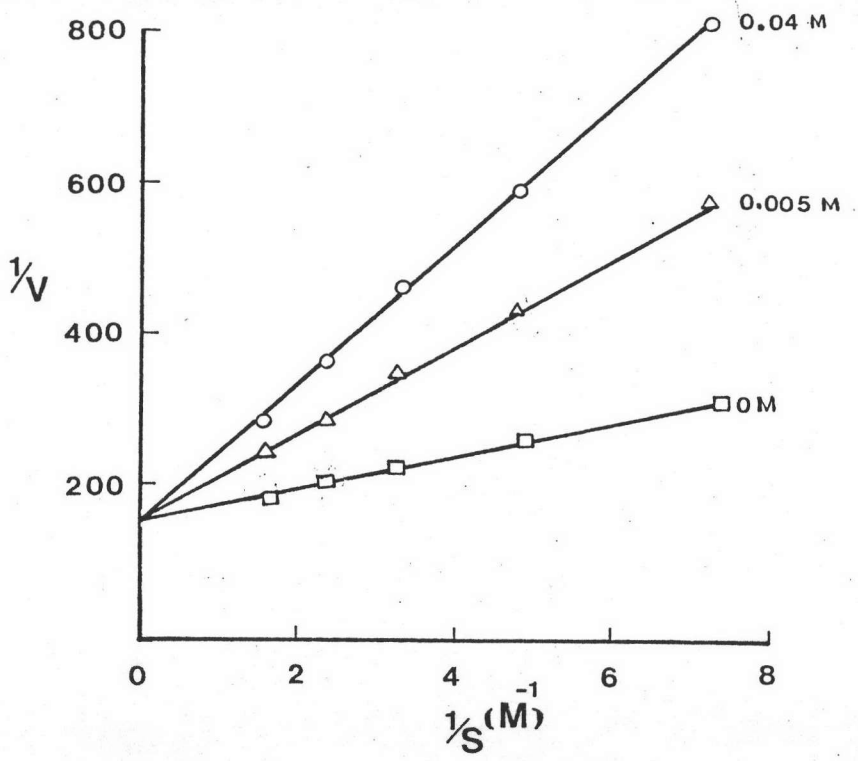
รูปที่ 26 ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_i ของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์เมื่อมีแอล-อะราบิโนส์ เป็นสารยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังบ่งไว้ และมีกลูโคส์ที่เข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นซับส์เตรท



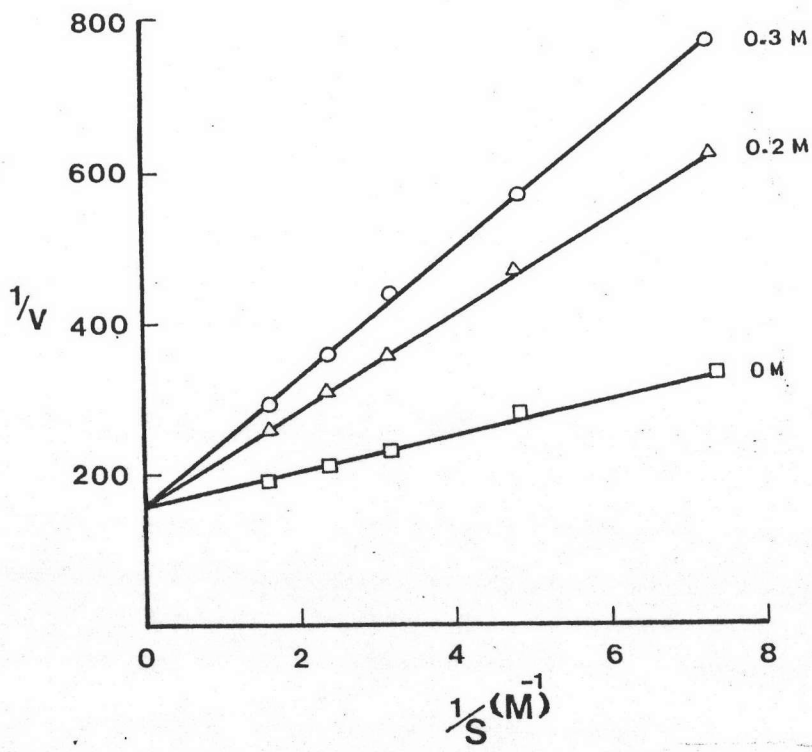
รูปที่ 27 ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_i ของเอนไซม์กลูโคส ไอโซเมอเรสเมื่อมีดี-กาแลคโตส เป็นสารยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังบ่งไว้ และมีกลูโคสที่เข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นซับสเตรท



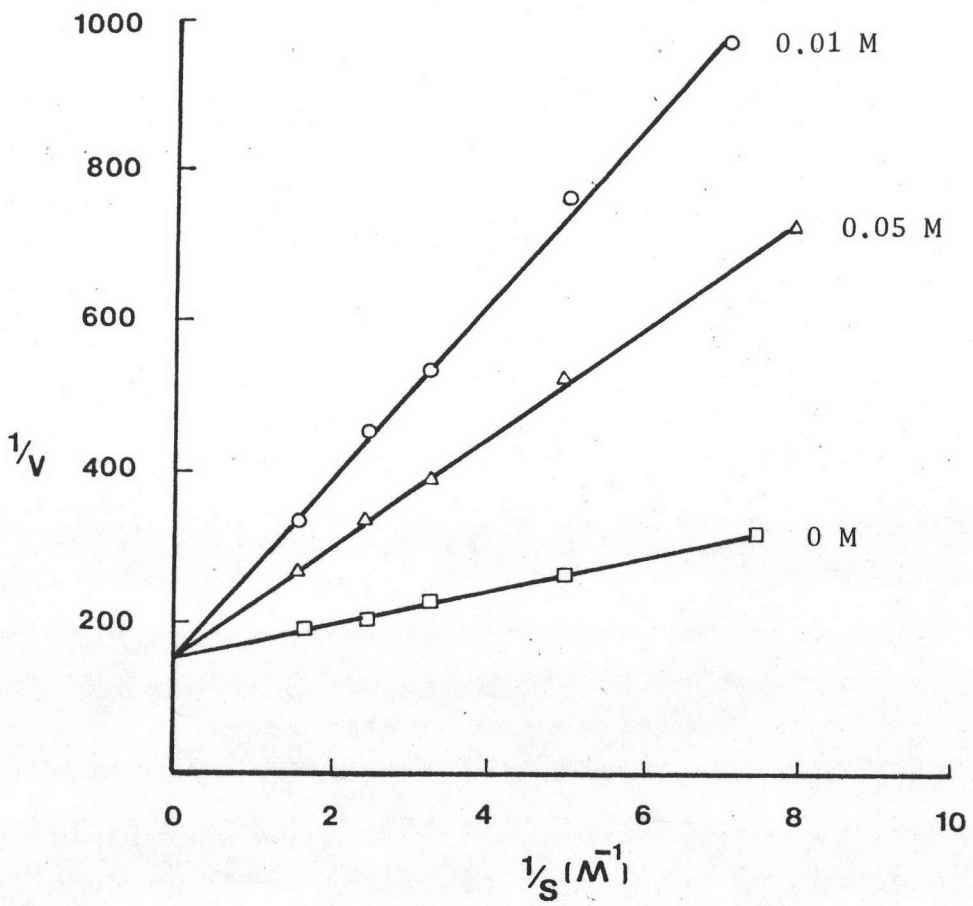
รูปที่ 28 ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_i ของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์เมื่อมีดี-แมนโนส์เป็นสารยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังบ่งไว้ และมีกลูโคส์ที่เข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นซับส์เตรท



รูปที่ 29 ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_i ของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์เมื่อมีดี-ซอร์บิตอลเป็นสารยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังบ่งไว้ และมีกลูโคส์ที่เข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นซับสเตรท



รูปที่ 30 ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_i ของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์เมื่อมีดี-แมนนิตอลเป็นสารยับยั้งแอคติวิตีของเอ็นไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังบ่งไว้ และมีกลูโคส์ที่เข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นซับส์เตรท



รูปที่ 31 ไลน์วีเวอร์-เบิร์คพลอตในการหาค่า K_i ของเอนไซม์กลูโคส-ไอโซเมอเรสเมื่อมีดี-ไซลีตอลเป็นสารยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังบ่งไว้ และมีกลูโคสที่เข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นซับสเตรท

(47) ยังรายงานไว้ว่า ดี-ไซลีตอล ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ค่อนข้างรุนแรงที่สุด

ตารางที่ 10 แสดงค่า K_i ที่ได้จากไลน์-วีเวอร์เบิร์คพลอตของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ได้จากส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 กับน้ำตาลและน้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ

สารยับยั้ง	K_i*
แอล-อะราบิโนส์	1.12
ดี-แมนโนส์	0.96
ดี-กาแลคโตส์	0.91
ดี-ซอร์บิตอล	0.028
ดี-แมนนิตอล	0.38
ดี-ไซลีตอล	0.014

*หน่วยของ K_i เป็นโมลาร์

2.5 ผลของเกลือแร่ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

จากการนำเอนไซม์ที่ผ่านการกำจัดเกลือแร่ออกแล้วมาบ่มในสารละลายที่มีเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ ดังการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 10 พบว่าเกลือแร่บางชนิดมีความจำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีแมกนีเซียมอิออนหรือโคบอลท์อิออนเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูง นอกจากนั้นยังพบว่าเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงขึ้นเมื่อมีทั้งแมกนีเซียมอิออนและโคบอลท์อิออนอยู่ร่วมกัน ซึ่งคุณสมบัตินี้คล้ายคลึงกับกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ได้จากส์เตรพโตมัยซีส์อีกหลายสายพันธุ์ เช่น S. griseofuscus, S-41 (49) S. flavogriseus (40) และ S. albus, YT-5 (32) รวมทั้งที่ได้จากแบคทีเรีย เช่น B. stearothermophilus (16) เป็นต้น ส่วนอิออนบางชนิด เช่น แมงกานีส์, แคลเซียม,

แบเรียม และเหล็ก (II) สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้เล็กน้อย ดังตารางที่ 11 สำหรับอิออนของโลหะหนัก เช่น เงิน (Ag^{+}), ตะกั่ว (Pb^{2+}) และปรอท (Hg^{2+}) มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้เช่นเดียวกับยับยั้งการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (17, 29, 40, 53)

ตารางที่ 11 แสดงผลของเกลือแร่ต่าง ๆ ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

ชนิดของเกลือแร่	แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เมื่อเทียบกับเมื่อมีแมกนีเซียมซัลเฟตร่วมด้วย (เปอร์เซนต์)
ไม่มี	0
$MgSO_4$ & $CoCl_2$	266.67
$MgSO_4$	100.0
$CoCl_2$	83.33
$MnSO_4$	71.43
$FeSO_4$	42.50
$Fe_2(SO_4)_3$	0.00
$ZnSO_4$	5.69
$CaCl_2.2H_2O$	10.54
$BaCl_2$	9.69
$HgCl_2$	0.00
$AgCl$	0.00
$PbSO_4$	0.00

ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 โมลาร์กลูโคส์, 150 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) เอนไซม์ 150 หน่วย/มล. และ 0.001 โมลาร์ของไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ บ่มสารละลายผสมนี้ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

เอนไซม์ที่ใช้ผ่านการไดอะไลส์ใน 0.01 โมลาร์ EDTA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไดอะไลส์ใน 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ค้างคืนก่อนนำมาทดสอบ

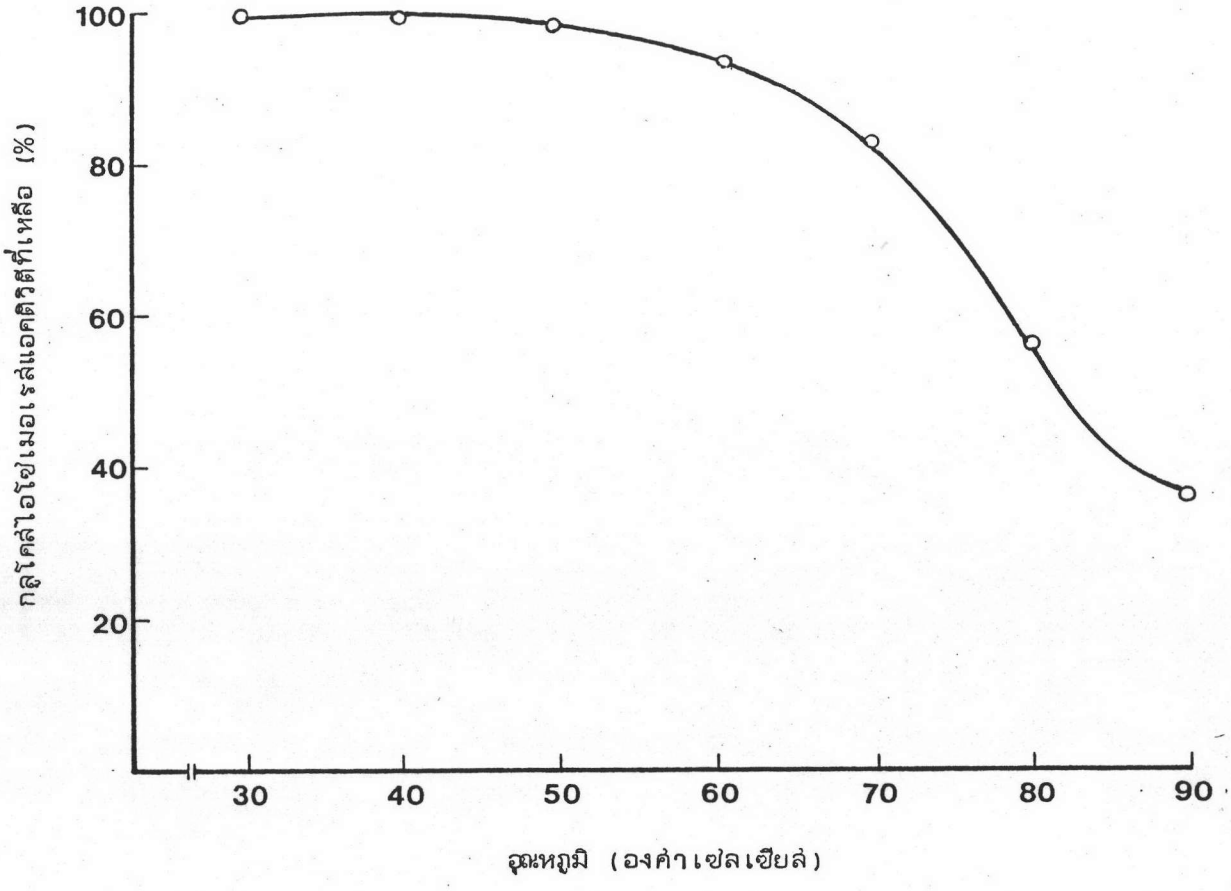
2.6 เสถียรภาพของเอนไซม์

2.6.1 เสถียรภาพของเอนไซม์ต่อความร้อน (Thermal stability)

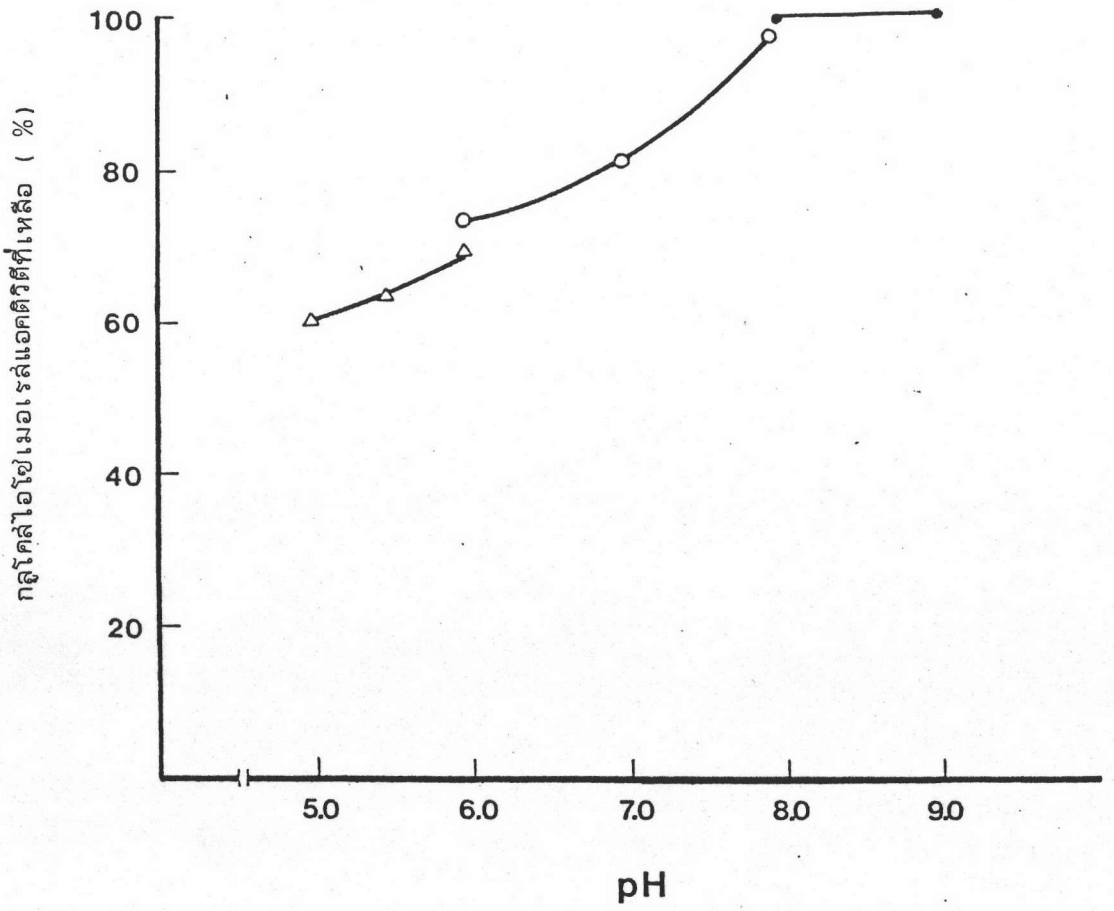
จากการตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ที่เตรียมได้ซึ่งผ่านการนำไปบ่มในสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 50-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีพบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ได้ดี โดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์นี้จะลดลงอย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส แต่จะลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส ดังผลการทดลองในรูปที่ 32

2.6.2 เสถียรภาพของเอนไซม์ต่อ pH

ผลการทดลองในรูปที่ 33 แสดงว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีเสถียรภาพสูงในpH ที่เป็นด่าง โดยพบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์ก่อนการทำปฏิกิริยา (preincubation) ที่ pH 8-9 เอนไซม์จะให้แอคติวิตีสูงกว่าในช่วง pH ที่เป็นกลางและเป็นกรด ซึ่งสอดคล้องกับกลูโคส-ไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์อื่น ๆ หลายชนิด (43, 46, 55) จึงเห็นว่า pH ที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์คืออยู่ในช่วงที่เป็นด่าง



รูปที่ 32 เส์ถียรภาพของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ผลิตโดยส์เตรพโตมัยซีส์ ส์ายพันธุ์ 190-1 ต่อความร้อน บ่มเอนไซม์ (150 หน่วย/มล.) ก่อนการทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังแส์ดงในรูป เป็นเวลา 30 นาที ตรวจส์อบแอคติวิตีที่เหลือโดยวิธีการที่บรรยายไว้ใต้รูปที่ 23 ยกเว้นที่ 5 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต



รูปที่ 33 เส์ถียรภาพของเอนไซม์กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากส์เตรพโตมัยซีส์ สายพันธุ์ 190-1 ต่อระดับความเป็นกรดด่างโดยบ่มเอนไซม์ 150 หน่วย/มล. ที่ pH ต่าง ๆ ดังแส์ดงไว้ในรูป ที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือตามวิธีการที่กล่าวไว้ใต้รูปที่ 32

△—△ อะซีเตทบัฟเฟอร์

○—○ โซเดียมฟอส์เฟตบัฟเฟอร์

●—● ทริส์-บัฟเฟอร์

ตารางที่ 12 สรุปคุณสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1

น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	
- ลำดับส่วน Aa_1	185,000
Aa_2	120,000
Aa_3	80,000
- ลำดับส่วน B_1	185,000
B_2	80,000
B_3	45,000
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	ประมาณ 75-80°C
pH " "	7.0 (ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์)
	ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์
ความเข้มข้นของโคบอลท์	0.05 มิลลิโมลาร์
" " แมกนีเซียม	5 มิลลิโมลาร์
ความจำเพาะต่อซับสเตรท	ดี-กลูโคส
	ดี-ไซโลส
K_m (M) สำหรับ ดี-กลูโคส (โมลาร์)	0.22
" ดี-ไซโลส	0.122
สารยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์	ดี-แมนโนส
	แอล-อะราบิโนส
	ดี-กาแลคโตส
	ดี-ซอร์บิตอล
	ดี-ไซลีตอล
	ดี-แมนนิตอล
	โลหะหนัก เช่น Ag^+, Hg^{2+}

ตารางที่ 12 (ต่อ) สรุปคุณสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1

K_i (M) สำหรับ แอล-อะราบิโนส	1.12
ดี-แมนโนส	0.96
ดี-กาแลคโตส	0.91
ดี-ซอร์บิตอล	0.028
ดี-ไซลีตอล	0.014
ดี-แมนนิตอล	0.38
เสถียรภาพต่ออุณหภูมิ (%)	50 (80°C, 30 นาที)
" pH	7.0-9.0