หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

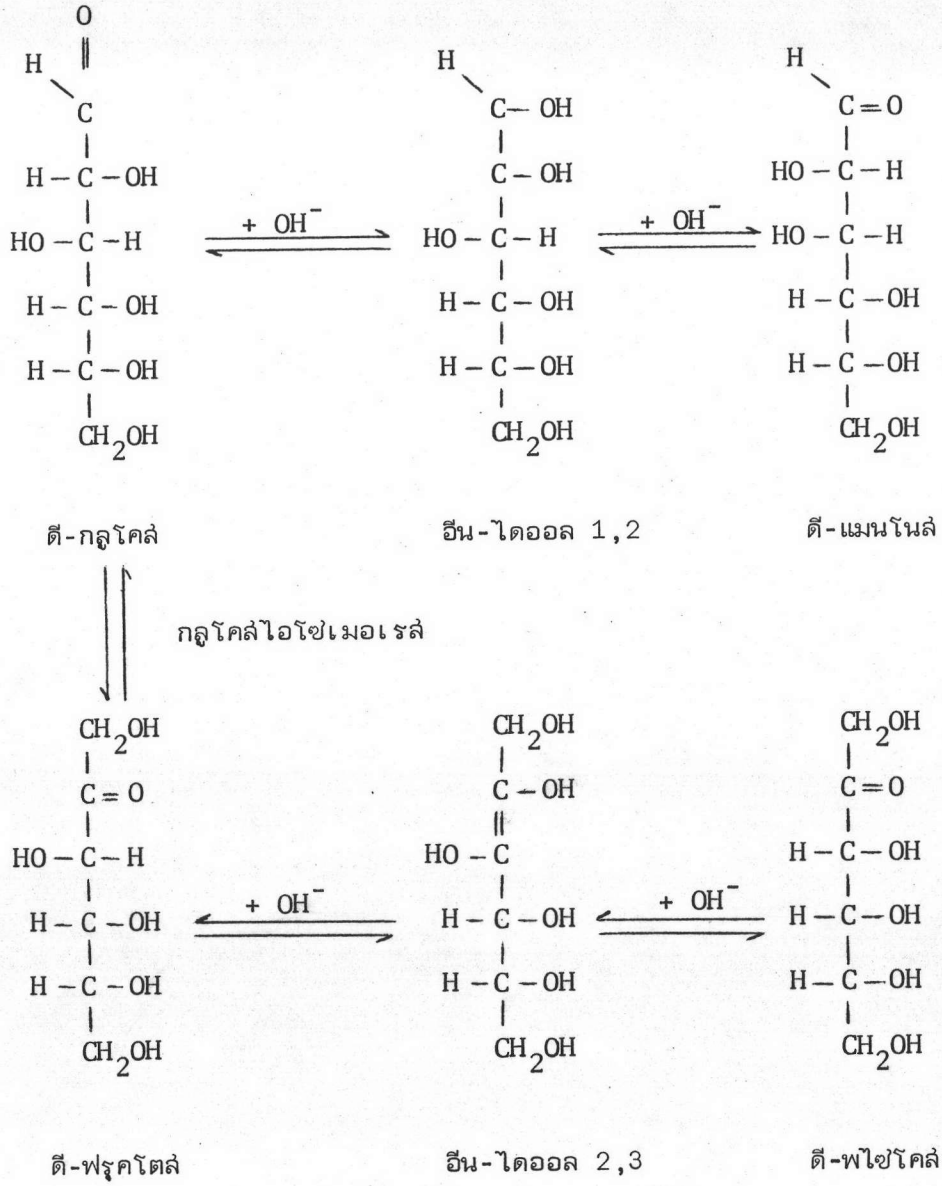
บทที่ 1

บทนำ

ในอุตสาหกรรมจำพวกอาหารหลายประเภทจำเป็นที่จะต้องใช้น้ำตาลเป็นส่วนประกอบ แต่เดิมนั้นแหล่งน้ำตาลที่ใช้คือน้ำตาลซูโครส ต่อมาเมื่อความต้องการน้ำตาลสูงขึ้น จึงมีการค้นหาแหล่งน้ำตาลใหม่ขึ้นอีก พบว่าฟรุคโตสเป็นน้ำตาลธรรมชาติที่มีความหวานสูงสุด (หวานกว่าซูโครส 1.7 เท่า) และมีคุณสมบัติที่ดีทั้งทางกายภาพและทางเคมีคือไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และมีความต้นออสโมติคสูง ทำให้สามารถที่จะต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสได้โดยไม่เกิดการตกผลึก (1) จากคุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้สามารถที่จะนำฟรุคโตสมาใช้แทนน้ำตาลซูโครสได้ การผลิตฟรุคโตสในระดับอุตสาหกรรมนั้น เดิมใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นน้ำตาลฟรุคโตสในสภาพที่เป็นด่าง (alkaline isomerization) และอุณหภูมิสูง (2) แต่เนื่องจากพบว่าวิธีนี้ไม่สามารถผลิตฟรุคโตสได้สูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ และเป็นปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะเนื่องจากในปฏิกิริยานี้ นอกจากจะให้น้ำตาลฟรุคโตสแล้ว ยังให้ผลผลิตอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เช่นพไซโคส (Psicose) ดังรูปที่ 1 และสารประกอบที่มีสีหลายชนิด ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความหวานลดลง และทำให้เกิดสีและกลิ่นที่ไม่ต้องการ จึงต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารเหล่านี้ (3-7)

จากความไม่เหมาะสมดังกล่าว จึงไม่นิยมนำขบวนการทางเคมีมาผลิตน้ำตาลฟรุคโตสในระดับอุตสาหกรรม และหันมาสนใจศึกษาการผลิตน้ำตาลฟรุคโตสโดยอาศัยเอนไซม์กันมาก เนื่องจากปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง และหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้ขบวนการทางเคมีได้ เช่นสามารถกระทำที่อุณหภูมิสูง และ pH ต่ำ ๆ ได้

การผลิตน้ำตาลฟรุคโตสโดยอาศัยเอนไซม์นี้ เริ่มต้นจากการที่ Marshall และ Kooi (8) ค้นพบว่าในสารสกัดจากเซลของ Pseudomonas hydrophila มีเอนไซม์กลูโคสไอโซ-เมอเรสหรือไซโลสไอโซเมอเรส (EC. 5.3.1.5) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสและยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นฟรุคโตส (9) หลังจากนี้ได้มีการค้นพบว่ามีจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ เช่น B. coagulans HN-68 (10-11), E. intermedia (12), L. brevis (13), Brevibacterium incertum NRRL-B-5383



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุคโตส โดยสารละลายด่างหรือเอนไซม์กลูโคส-ไอโซเมอเรส

(14) เป็นต้น นอกจากแบคทีเรียเหล่านี้ยังมีราและ Actinomycetes บางชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ เช่น Micromonospora sp., Nocardia sp. (15) Actinomyces olivochromogenes (16) เป็นต้น สำหรับพวก Actinomycetes ในสกุลของสเตรพโตมัยซีสนั้น หลังจากที่ Tsumura และ Sato (17) ได้ค้นพบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ครั้งแรกใน S. phaeochromogenes แล้ว ได้มีผู้สนใจศึกษากลูโคสไอโซเมอเรสในสเตรพโตมัยซีสกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงในอาหารที่มีไซโลสเป็นตัวชักนำในการสร้างเอนไซม์ จึงมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม สเตรพโตมัยซีสที่ใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์นี้ได้แก่ S. albus (18-19), S. flavogriseus (21), S. fridiae (21-22), และ S. flavovirens.IFO (25) เป็นต้น การที่เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสที่พบในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยการชักนำของไซโลส (D-xylose) ซึ่งมีราคาแพง (8-9) จึงเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตเอนไซม์นี้ในระดับอุตสาหกรรม ในปี 1966 Takasaki (18-19) พบว่า S. albus สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์นี้ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนหรือวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (xylan containing materials) เช่นเปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว และรำข้าว เป็นต้น หลังจากนั้นได้มีผู้พบว่าสเตรพโตมัยซีสอีกหลายสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้เช่นกัน (17, 20, 22) ดังนั้นจึงมีการผลิตเอนไซม์นี้ขึ้นในระดับอุตสาหกรรม

นอกจากนี้ก็ยังได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดยไม่ต้องใช้ไซโลสหรือไซแลนเป็นสารชักนำ เช่นมิวแตนท์ของ S. olivochromogenes ATCC 21114 (25) เป็นต้น

การสกัดแยกเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากเซลของจุลินทรีย์

การที่เอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลของจุลินทรีย์ ยกเว้นจุลินทรีย์บางชนิดเช่น Streptomyces glaucescens ซึ่งสร้างเอนไซม์นี้และขับออกสู่ภายนอกเซล (26) เช่นเดียวกับ S. flavogriseus (27) ดังนั้นการศึกษาเอนไซม์นี้จึงต้องมีการสกัดแยกเอนไซม์จากเซลก่อน โดยทั่วไปจะใช้วิธีการทำให้ผนังเซลแตก (cell wall disruption) ด้วยวิธีการทางกล (mechanical disruption) เช่น การบด (abrasive grinding) การทำให้ผนังเซลแตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonication) การทำให้เซลแตกโดยใช้เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (homogenizer) สำหรับวิธีการที่ใช้สกัดแยกกลูโคสไอโซเมอเรสในห้องปฏิบัติการ นิยมใช้การทำให้ผนังเซลแตกโดยใช้คลื่นเสียง (28-31) หรือวิธีการบดให้เซลแตก (12, 32) แต่

อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ต้องใช้เวลานาน และใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ทั้งยังไม่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม จึงมีผู้สนใจการทำให้เซลแตกโดยวิธีทางเคมี (chemical disruption) และพบว่าวิธีนี้ให้ผลดี เพราะสามารถสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเซลได้ง่าย เนื่องจากสารเคมีมีผลทำให้เกิดการสลายตัวของผนังเซล (autolysis) การสกัดแยกเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสโดยใช้สารเคมีนี้มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง (33-35) ต่อมา Chen และ Anderson (35) พบว่าสารจำพวกแคทไอออนิคดีเทอร์เจนต์ (cationic detergents) เช่นไดเมทิลเบนซิลแอลกิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (dimethyl benzylakyl ammonium bromide) และเซทิลไพริเดียมคลอไรด์ (cetylpyridium chloride) เป็นต้น สามารถสกัดแยกเอนไซม์นี้ได้ในปริมาณใกล้เคียงกับการทำให้เซลแตกด้วยวิธีกล และค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ได้ยังสูงกว่าถึง 20 เปอร์เซนต์ Takasaki และคณะ (33-36) พบว่าสามารถสกัดแยกเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสจากเซลของสเตรพโตมัยซีสได้ โดยการบ่มเซลที่อุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส ในสารละลายที่มี 0.1 เปอร์เซนต์ของแคทไอออนิคดีเทอร์เจนต์ เช่น เซทิลไตร-เมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltrimethyl ammonium bromide) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไลโซไซม์ (lysozyme), ทอลูอีน (toluene) และ 2-โปรปานอล (2-propanol) ทำลายผนังเซลของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ เช่น S. olivochromogenes (37) แต่พบว่าแอนไอออนิคดีเทอร์เจนต์ เช่น โซเดียม ลอว์ริล ซัลเฟต (sodium lauryl sulfate) ไดออคติลโซเดียมซัลโฟซัคซิเนท (dioctyl sodium sulfosuccinate) และนิวทรอล-ดีเทอร์เจนต์ เช่น ทวีน-80 นั้นไม่มีผลต่อผนังเซลของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์นี้เลย (33, 35)

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

มีรายงานหลายฉบับกล่าวถึงการสกัดแยกกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์บางชนิดพร้อมทั้งทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ถึงระดับภาวะเอกพันธุ์ (homogeneity) (34, 36, 38-44)

การทำกลูโคสไอโซเมอเรสที่ถูกสกัดแยกจากเซลให้บริสุทธิ์นั้นอาจทำโดยนำมาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟต หรืออะซีโตนที่เย็นจัด (30, 37, 40) การตกตะกอนด้วยอะซีโตนนี้นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถที่จะแยกอะซีโตนกลับคืนมาได้ภายหลังการตกตะกอนโปรตีน นอกจากนี้อาจนำเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับแมงกานีสซัลเฟตหรือแมงกานีสคลอไรด์, รีวานอล (rivanol) หรือให้ความร้อนเพื่อทำให้เอนไซม์หรือโปรตีนอื่น ๆ เสียสภาพไป (37-38) ต่อจากนั้นนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยการกรองผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีทั้งชนิดที่อาศัยความ

แตกต่างระหว่างประจุ (ion exchange column chromatography) เช่น ดีอีเอดี-เซลลูโลส (DEAE-Cellulose) ดีอีเอดี-เซฟาเด็กซ์ (DEAE-Sephadex) และความแตกต่างของขนาดโมเลกุล (molecular sieve หรือ gel filtration) เช่น เซฟาเด็กซ์ จี-200 (Sephadex G-200) เป็นต้น โดยที่ขั้นตอนการทำเอนไซม์นี้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์จะแตกต่างกันไป (ตารางที่ 1) Natake (37) ได้นำเอนไซม์จาก E. intermedia สายพันธุ์ HN-500 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำปฏิกิริยากับแมงกานีสไอออนและรีวานอล หลังจากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น (crude enzyme) ถึง 180 เท่า และมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 44 เปอร์เซนต์ เมื่อนำมาทำอีเลกโตรโฟรีซีสบนโพลีอะไครลาไมด์เจลได้โปรตีนแถบเดียว (single band) ส่วนเอนไซม์จาก B. coagulans สายพันธุ์ HN-68 ซึ่ง Danno (39) ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการทำปฏิกิริยากับแมงกานีสซัลเฟต, ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50 เปอร์เซนต์ และกรองผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 2 ครั้งที่ pH 6.0 และ 8.6 ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้นี้มีความบริสุทธิ์กว่าเอนไซม์เริ่มต้น 44 เท่า โดยยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 46 เปอร์เซนต์ และจากการทดสอบโดยวิธีการทำให้ตกตะกอน (sedimentation) ด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ พบว่าเอนไซม์นี้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับผลการทดสอบโดยทำอีเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอะไครลาไมด์เจล นอกจากนี้ Gong และคณะ (42) ได้สกัดแยกเอนไซม์จากพวกแอคติโนมัยซีตีส(Actinomycetes) ในวงศ์ของ Actinoplanes ซึ่งไม่ต้องการไซโลสหรือไซแลนเป็นตัวชักนำในการสร้างเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยสกัดแยกเอนไซม์โดยใช้คลื่นเสียงแล้วทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียมคลอไรด์ และกรองผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลสชนิดเม็ด (DEAE-Cellulose bead) และดีอีเออี-เซลลูโลส ชะเอนไซม์ออกโดยใช้เกรเดียนท์เส้นตรง (linear gradient) ของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 500 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ที่ได้นี้มีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นจากเอนไซม์ตั้งต้น 3.04 เท่า แต่มิได้แสดงการทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้ สำหรับเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ในวงศ์ของสเตรพโตมัยซีสนั้นมีผู้สนใจนำมาทำให้บริสุทธิ์กันมาก Chen และ Anderson (40) ได้นำเอนไซม์ซึ่งสกัดแยกจาก S. flavogriseus โดยใช้สารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ของเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70-90 เปอร์เซนต์ และกรองผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลสโดยใช้เกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 300 มิลลิโมลาร์ในการแยกเอนไซม์ ต่อจากนั้นจึงกรองผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของ

ตารางที่ 1 สรุปขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์แหล่งต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์

แหล่งจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
L. brevis	ทำปฏิกิริยากับแมงกานีสคลอไรด์ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้ความร้อน (heat treatment) โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ตกผลึก	16
E. intermedia	ทำปฏิกิริยากับแมงกานีสซัลเฟต ตกตะกอนด้วยรีวานอล โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์	37
B. coagulans, HN-68	ทำปฏิกิริยากับแมงกานีสซัลเฟต ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์	39
S. albus, YT-5	ตกตะกอนด้วยอะซีโตน โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส " ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ ตกผลึก	36
S. olivochromogenes	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ " เซฟาเด็กซ์ จี-200	16
S. griseolus, CL-71	ตกตะกอนด้วยอะซีโตน โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส " เซฟาเด็กซ์ จี-200	46

ตารางที่ 1 (ต่อ)

แหล่งจุลินทรีย์	ขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	เอกสารอ้างอิง
S. albus	ตกตะกอนด้วยอะซีโตน	41
	โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส์	
	" ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์	
S. griseofuscus, S-41	การกลั่นตัว (condensation)	43
	โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ I	
	" ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ II	
	ตกผลึก	
S. flavogriseus	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	40
	โครมาโตกราฟฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลส์	
	" ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์	
-	แอฟฟินีตี โครมาโตกราฟฟี (xylitol linked to CNBr--activated sepharose 4B)	44

โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 900 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์ที่ได้บริสุทธิ์กว่าเอนไซม์เริ่มต้น 12.6 เท่า โดยมีแอคติวิตีเหลือ 11 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบโดยอีเลคโตรโฟรีซีสบนโพลีอะไครลาไมด์เจลได้โปรตีนแถบเดียวเช่นเดียวกับกลูโคสไอโซเมอเรสจาก S. albus ที่ Takasaki และคณะ (36) ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็นจัดที่ความเข้มข้น 44-67 เปอร์เซ็นต์ และกรองผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซลลูโลส และดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ตกผลึกเอนไซม์ที่ได้ 2 ครั้ง และนำมากรองผ่านคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-200 เอนไซม์ที่ได้นี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 10.2 เท่า โดยมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 2.04 เปอร์เซ็นต์ Kasumi และคณะ (43) ได้นำเอนไซม์จาก S. griseofuscus, S-41 ซึ่งสกัดแยกโดยการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการกรองผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 2 ครั้ง โดยใช้เกรเดียนท์เส้นตรงของโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 500 มิลลิโมลาร์ในการแยกเอนไซม์ และตกผลึกด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟต เอนไซม์ที่ได้นี้มีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์เริ่มต้น 4.3 เท่า โดยมีแอคติวิตีเหลือ 30 เปอร์เซ็นต์ และจากการตรวจสอบโดยการทำอีเลกโตรโฟรีซีสบนโพลีอะไครลาไมด์เจลพบว่าเอนไซม์ที่ได้บริสุทธิ์

มีรายงานถึงการใช้แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟฟี (affinity chromatography) ในการทำให้กลูโคสไอโซเมอเรสบริสุทธิ์ (44) โดยผ่านเอนไซม์ลงบนคอลัมน์ที่มีไซลีตอลซึ่งเชื่อมกับเซฟาโรส 4 บี ที่มีไซยาโนเจนโบรไมด์เกาะอยู่ (xylitol linked to CNBr-activated Sepharose 4B) เป็นลิแกนด์ (ligand) และชะเอนไซม์ออกมาด้วยโซเดียมคลอไรด์ เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 1.5 เท่า แม้ว่าวิธีการนี้จะให้ผลดี และสามารถแยกโปรตีนบางชนิดที่มีปริมาณน้อย เช่น โปรตีเอสออกจากเอนไซม์ได้ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่เหมาะที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก

นอกจากนี้มีรายงานว่าในการทำกลูโคสไอโซเมอเรสให้บริสุทธิ์ สามารถใช้เรซินของแอนอิออน เอกซเชนจ์ที่มีรูพรุน (porous anion exchange resin) จำพวกไตรเมทิลแอมโมเนียม (trimethyl ammonium) ในรูปของเกลือซัลเฟตบรรจุในคอลัมน์ เอนไซม์จะจับกับเรซินเหล่านี้ หลังจากนั้นชะล้างคอลัมน์ด้วย 0.5 นอร์มอลโซเดียมคลอไรด์ เอนไซม์ที่ได้จะมีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นจากเอนไซม์ตั้งต้น 12.4 เท่า (45)

คุณสมบัติของเอนไซม์

การที่จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างกลูโคสไอโซเมอเรสได้ จึงมีการศึกษาคุณสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ทั้งในทางกายภาพและทางชีวเคมี

ความจำเพาะต่อซับสเตรท

หลังจากที่ Marshall (8) ได้พบว่าเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรสที่พบใน Pseudomonas hydrophila สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรุคโตสได้ ต่อมา Yamanaka (38) จึงได้พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จาก L. brevis สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนทั้งกลูโคสและไซโลสได้โดยที่อัตราส่วนของการไอโซเมอไรซ์กลูโคสต่อไซโลสมีค่าคงที่ จึงสนับสนุนข้อเสนอแนะที่ว่าเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและไซโลสไอโซเมอเรสเป็นเอนไซม์ตัวเดียวกัน ต่อจากนั้นได้มีผู้ศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรทของเอนไซม์นี้กันมากมาย และพบว่านอกจากความจำเพาะต่อ ดี-กลูโคส และดี-ไซโลสแล้ว กลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ยังมีความจำเพาะต่อน้ำตาลอื่นอีกด้วย (ตารางที่ 2) และเอนไซม์นี้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันมีความจำเพาะต่อน้ำตาลชนิดอื่นไม่เหมือนกัน เช่น กลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5,6 โมเลกุล (Pentose, Hexose sugar), น้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) และน้ำตาลในรูปฟอสเฟต (sugar phosphate) เป็นซับสเตรทได้ Yamanaka (38) Takasaki และคณะ (36-37) และ Danno (39, 47) พบว่าเอนไซม์จาก L. brevis และ B. coagulans, HN-68 สามารถจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลทั้งดี-ไซโลส, ดี-กลูโคส และดี-ไรโบสได้ ส่วนเอนไซม์จาก E. intermedia สามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนได้ทั้งดี-กลูโคส และดี-กลูโคส-6-ฟอสเฟต (37) และเอนไซม์จาก A. missouriensis ก็สามารถจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนดี-กาแลคโตสได้ด้วย (42)

ความจำเพาะต่อซับสเตรทของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์นั้นมิได้ขึ้นกับสกุลของจุลินทรีย์ ทั้งนี้แม้ว่าเอนไซม์จากสเตรพโตมัยซีสส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะต่อ ดี-ไซโลส และดี-กลูโคสเท่านั้น (28) เช่น เอนไซม์จาก Streptomyces sp. (หรือ S. albus, YT-5) (24, 35-36), S. flavogriseus (40) S. flavovirens, IFO 3197 (23) และ S. phaeochromogenes (17) แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีสเตรพโตมัยซีสบางสายพันธุ์ที่สามารถไอโซเมอไรซ์น้ำตาลอื่นได้อีกด้วย เช่น S. griseofuscus, S-41 (43) ซึ่งสามารถ

ไอโซเมอเรซ์ได้ทั้ง ดี-กลูโคส, ดี-ไซโลส และดี-ไรโบส เอนไซม์จาก S. bikiniensis (48) สามารถไอโซเมอไรซ์ได้ทั้ง ดี-กลูโคส, ดี-ไซโลส, ดี-ไรโบส และแอล-แรมโนส (D-rhamnose) และเอนไซม์จาก S. olivochromogenes (16) สามารถไอโซเมอไรซ์ได้ทั้ง ดี-กลูโคส, ดี-ไซโลส, ดี-ไรโบส และแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ส่วนเอนไซม์จาก S. albus สายพันธุ์ NRRL-B-5778 (49) ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการไอโซเมอไรซ์ทั้ง ดี-กลูโคส, ดี-ไซโลส, ดี-ไรโบส, แอล-อะราบิโนส, แอล-แรมโนส, ดี-แอลโลส (D-allose) และดีออกซีไรโบส (deoxyribose) ได้นั้นจัดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อซับสเตรทน้อยที่สุด

ค่า K_m ของเอนไซม์ที่มีต่อซับสเตรทชนิดต่าง ๆ เช่น ดี-กลูโคส, ดี-ไซโลส และดี-ไรโบส จะต่างกันไปขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นั้น ๆ (50, 57) แต่จะอยู่ในช่วง 0.086-0.920 โมลาร์ สำหรับดี-กลูโคส, 0.005-0.093 โมลาร์สำหรับดี-ไซโลส และ 0.035-0.67 โมลาร์สำหรับดี-ไรโบส พบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีค่า K_m ต่อไซโลสต่ำกว่ากลูโคส เช่น เอนไซม์จาก S. albus, YT-5 (36, 41) ซึ่งมีค่า K_m สำหรับดี-กลูโคส และดี-ไซโลส เป็น 0.16, และ 0.032 โมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์จาก S. flavogriseus (40) ซึ่งมีค่า K_m สำหรับดี-กลูโคส และดี-ไซโลส เป็น 0.249 และ 0.078 โมลาร์ ตามลำดับ ค่า K_m ของเอนไซม์จากสเตรพโตมัยซีสทั้ง 2 นี้มีค่าเช่นเดียวกับเอนไซม์จากแบคทีเรีย เช่น B. coagulans HN-68 (39-47) ซึ่งมีค่า K_m สำหรับดี-กลูโคส 0.09 และ 0.07 โมลาร์ สำหรับดี-ไซโลส เอนไซม์จาก L. brevis (38, 51) มีค่า K_m สำหรับดี-กลูโคส และดี-ไซโลส เป็น 0.92 และ 0.05 โมลาร์ ตามลำดับ

อุณหภูมิ

เอนไซม์นี้มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานกว้างมาก (ดังตารางที่ 2) เช่น เอนไซม์ที่ได้จาก Pseudomonas hydrophila (8-9) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมราว ๆ 42-43 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างต่ำ เช่นเดียวกับเอนไซม์จาก L. brevis และเอนไซม์จาก E. intermedia และ A. cloacae ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส (30, 37-38)

ส่วนเอนไซม์จาก B. coagulans (39) จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 60 องศา-เซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์จากสเตรพโตมัยซีสที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมค่อนข้างสูง เช่น

เอนไซม์จาก S. flavogriseus (40) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 70 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์จาก S. phaeochromogenes NRRL B-3559 (17) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 80 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกับเอนไซม์จาก Streptomyces sp. (49), S. albus (36), และ S. olivochromogenes (16) สำหรับเอนไซม์จาก A. missouriensis (42) พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานสูงถึง 95 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ Takasaki (52) ยังรายงานว่าสามารถแยกเชื้อที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophile) ในสกุลของสเตรพโตมัยซีสที่ทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส

สำหรับเสถียรภาพของเอนไซม์ที่มีต่อความร้อนนั้น พบว่าโดยทั่วไปเอนไซม์นี้จะมีเสถียรภาพต่อช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้าง (53-55) เอนไซม์จากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิค่อนข้างต่ำ (8, 37-38, 51) ยกเว้นเอนไซม์จากแบคทีเรียในสกุลบาซิลลัส (16, 39) ซึ่งสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงเช่นเดียวกับเอนไซม์จากสเตรพโตมัยซีสส่วนใหญ่ที่พบว่าจะมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์จาก S. griseolus, S-41 ซึ่ง Tsumura และคณะ (43) พบว่าเอนไซม์จะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลยเมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 80 องศาเซลเซียสครึ่งชั่วโมง และเมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ก็พบว่ายังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งดูเหมือนว่าเอนไซม์จากสเตรพโตมัยซีสสายพันธุ์นี้จะมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ที่ได้จากสเตรพโตมัยซีสสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น S. albus, S. phaeochromogenes และ S. olivochromogenes เป็นต้น (16, 24, 36)

นอกจากนี้มีรายงานว่าเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อความร้อนจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อมีไอออนของโลหะอยู่ด้วย เช่น แมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) ซึ่งทำให้เอนไซม์จาก L. brevis (38, 51) และ B. coagulans (56) มีเสถียรภาพต่อความร้อนเพิ่มขึ้น โคบอลท์ไอออนทำให้เอนไซม์จาก S. phaeochromogenes (57) มีเสถียรภาพเพิ่มขึ้น เมื่อมีปริมาณโคบอลท์ตั้งแต่ 10^{-3} โมลาร์ขึ้นไป สำหรับไอออนอื่น ๆ ที่ช่วยทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความร้อนสูงขึ้นได้ เช่น นิเกิลไอออน และเฟอร์รัส ไอออน เป็นต้น (53, 55)

ความเป็นกรดด่าง (pH)

ส่วนใหญ่ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสอยู่ในช่วง 7.0-9.0 (50, 53) และเอนไซม์จากสเตรพโตมัยซีสส่วนใหญ่ยกเว้น S. flavogriseus (40) จะมี

pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานสูงกว่าเอนไซม์จากแบคทีเรีย (54) แต่อย่างไรก็ตามก็มีเอนไซม์ที่มี pH ที่เหมาะสมแตกต่างออกไป เช่นเอนไซม์จาก L. brevis ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมประมาณ 6.5 (38) นอกจากนี้เอนไซม์ที่ได้จาก S. phaeochromogenes ก็มี pH ที่เหมาะสมที่ต่างไปจากเอนไซม์ส่วนใหญ่คือ 9.0-9.5 (17, 29)

ในปี 1970 Danno (47) ได้ศึกษา pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่แยกได้จาก B. coagulans, HN-68 เมื่อใช้ซับสเตรทต่าง ๆ กัน พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะเปลี่ยนไปเมื่อใช้ซับสเตรทต่างกัน เช่นเมื่อใช้ดี-กลูโคสเป็นซับสเตรท เอนไซม์จะมี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็น 7.0 แต่จะเปลี่ยนเป็น 7.5 เมื่อใช้ ดี-ไรโบสเป็นซับสเตรท และจะมี pH ที่เหมาะสมเป็น 8.0-8.5 เมื่อใช้ ดี-ไซโลสเป็นซับสเตรท

นอกจากนี้ยังพบว่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์จะเปลี่ยนไปได้ขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อนั้น ๆ ด้วย Tsumura และ Sato (57) พบว่าเมื่อเลี้ยง S. phaeochromogenes ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคบอลท์ไอออนเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ เอนไซม์จะมี pH ที่เหมาะสมเปลี่ยนเป็น 7.5

Giovenco และคณะ (46) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ยังขึ้นกับชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ เช่นเอนไซม์บริสุทธิ์จาก S. griseolus จะมี pH ที่เหมาะสมเป็น 7 เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 8.5 เมื่อใช้ไตรเอทานอลามีนบัฟเฟอร์ เป็นต้น

โดยทั่วไปกลูโคสไอโซเมอเรสจะมีเสถียรภาพต่อ pH ในช่วงค่อนข้างกว้างตั้งแต่ pH ประมาณ 5.0 ถึง 9.0 แต่จะไม่เสถียรที่ pH ต่ำกว่านี้ (53) สำหรับเอนไซม์จาก B. coagulans (39, 56) แม้ว่าจะมี pH ที่เหมาะสมในการทำงานในช่วง 8.0-8.5 แต่ที่ pH 6.0 เอนไซม์ก็ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ pH ต่ำกว่า 5.0 เอนไซม์จะเสียสภาพแบบไม่ผันกลับ (irreversible denaturation) นอกจากนี้ pH เดียวกันเมื่อมีโคบอลท์ไอออนอยู่ด้วย เอนไซม์จะมีเสถียรภาพดีขึ้น โดยที่พบว่าเอนไซม์นี้ที่ pH 7.6 เมื่อมีโคบอลท์ไอออน เอนไซม์จะมีแอคติวิตี 41 เปอร์เซ็นต์ หากขาดโคบอลท์ แอคติวิตีจะลดลงเหลือเพียง 28 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าที่ pH สูงกว่า 8 เอนไซม์นี้ยังคงมีเสถียรภาพอยู่ได้โดยไม่ต้องการโคบอลท์ไอออนเลย

การที่เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่ pH ช่วงกว้าง ดังนั้นจึงมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ทำปฏิกิริยาในช่วง pH ต่ำ ๆ หรือเป็นกลาง ทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะที่เป็นกลางหรือกรดนั้นจะ

หลีกเลี่ยงการเกิดสารอื่นที่ไม่ต้องการ เช่น พไซโคส เป็นต้น (55)

ความต้องการไอออนของโลหะ

ในปี 1957 ที่ Marshall และ Kooi (8) ค้นพบกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ครั้งแรกในสาร สกัดจากเซลของ Ps. hydrophila นั้น พบว่าเอนไซม์นี้ต้องการอาร์ซิเนท (Arsenate) ต่อมา มีผู้พบจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่สร้างเอนไซม์นี้และต้องการอาร์ซิเนทเช่นเดียวกัน เช่น A. aerogenes, HN-56 (58) และ A. cloacae (30) เป็นต้น จากการศึกษาผลของไอออนต่อการทำงานของ กลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (50, 53, 55) ก็พบว่าโดยทั่วไปเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่ ต้องการอิออนที่มีประจุบวกซึ่งมีวาเลนซีส์อง (divalent cation) เช่น แมงกานีส์ไอออน (Mn^{2+}) โคบอลท์ไอออน (Co^{2+}) หรือแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) แต่อย่างไรก็ตามไอออนแต่ละชนิดจะมีผล ต่อเอนไซม์ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ไม่เหมือนกันไอออนชนิดหนึ่งอาจจะจำเป็นต่อการมีแอคติวิตีของ เอนไซม์จากแหล่งหนึ่ง แต่อาจไม่มีผลต่อเอนไซม์จากอีกแหล่งหนึ่ง (ดังตารางที่ 2) เช่น เอนไซม์ จาก L. brevis (51) ซึ่งไม่ต้องการอาร์ซิเนทไอออน แต่ต้องการแมงกานีส์ไอออน และอาจ ใช้โคบอลท์ไอออนแทนได้บ้าง แต่พบว่าถ้าใช้แมกนีเซียมไอออน และซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) จะ ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เลย นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากจุลินทรีย์บาง ชนิดต้องการโคบอลท์ไอออนในการไอโซเมอไรซ์กลูโคส์และไรโบส์ และแมงกานีส์ไอออนในการ ไอโซเมอไรซ์ไซโลส์ (56)

จากการศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก S. albus (34) พบว่าในผลึก ของเอนไซม์จะมีไอออนของทั้งโคบอลท์และแมกนีเซียม โดยใน 1 โมเลกุลของเอนไซม์จาก S. albus จะมีโคบอลท์และแมกนีเซียมไอออนอยู่ 1.4 และ 0.3 อะตอม ตามลำดับ

Kasumi และคณะ (43) รายงานว่ากลูโคส์ไอโซเมอเรส์ส่วนใหญ่ต้องการแมกนีเซียม ไอออนในการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ต้องการโคบอลท์เพื่อช่วยป้องกันการถูกทำให้เสียสภาพ ด้วยความร้อน, กรด และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต หรืออาจช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย เช่น เอนไซม์จาก A. missouriensis (42) และ S. griseofuscus, S-41 (43) แต่พบว่า เอนไซม์จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Arthrobacter sp. NRRL-B-3724-3728 (59-60) ไม่ ต้องการโคบอลท์ไอออนเพื่อเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ หรือช่วยให้เอนไซม์มีเส์ถียรภาพต่อความร้อน เลย การที่กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ส่วนใหญ่ต้องการไอออนของโลหะในการกระตุ้นให้เอนไซม์มี แอคติวิตีนั้น สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มตามความต้องการโลหะต่างชนิดกัน (50, 53) ดังนี้

ตารางที่ 2 สรุปคุณสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

จุลินทรีย์	ความจำเพาะต่อซับสเตรท	Km (โมลาร์)	อุณหภูมิที่เหมาะสม	pH ที่เหมาะสม	ความต้องการไอออนของโลหะ	ตัวยับยั้ง	ความคงทนต่ออุณหภูมิ (%)	ความคงทนต่อ pH	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	จำนวนหน่วยย่อย	เอกสารอ้างอิง
Bacillus coagulans, HN-68	ดี-กลูโคส	0.09	60	7.0	Mg^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} As^{3+}	Cu^{2+} Zn^{2+} Ca^{2+}, Ni^{2+}	100 (170°C, 10')	-	175,000	4	39
	ดี-ไซโลส	0.07									
	ดี-ไรโบส	-									
Escherichia intermedia	ดี-กลูโคส	-	50	7.0		-	0 (60°C,10')	7.0-9.0			37
	ดี-ไซโลส										
	2-ดีออกซี-กลูโคส										
Lactobacillus brevis	ดี-กลูโคส	0.92	-	6.0-7.0	Mn^{2+} Co^{2+}	ไฮดีดอล อะราบิตอล ไลโซส์	10 (60°C,30')	-	191,000	-	38
	ดี-ไซโลส	0.005									
	ดี-ไรโบส	0.67									
Streptomyces albus	ดี-กลูโคส	0.16	80	8.0-8.5	Mg^{2+} หรือ Co^{2+}	โลหะหนัก (Ag^{+},Cu^{+}, Hg^{2+})	90 (70°C,10')	4-11	165,000	4	36
	ดี-ไซโลส	0.032									
S. bikiniensis	ดี-กลูโคส	-	80	8.0-9.0	Mg^{2+} Co^{2+}	-	-	-	52,000	-	48
	ดี-ไซโลส										
	ดี-ไรโบส										
	แอล-แรมโนส										
S. flavogriseus	ดี-กลูโคส	0.249	70	7.5	Mg^{2+} Co^{2+}	Ag^{+},Cu^{+},Hg^{2+}	100 (170°C,10')	5.0-9.0	171,000	4	40
	ดี-ไซโลส	0.078									
S. olivochromogenes	ดี-กลูโคส	-	80	8.0-9.0	Mg^{2+} Co^{2+}	-	-	-	120,000	2	16
	ดี-ไซโลส										
	ดี-ไรโบส										
	แอล-อะราบิโนส										
S. phaeochromogenes	ดี-กลูโคส	0.30 (60°C)	80	9.0-9.5	Mg^{2+}	-	40 (70°C,24 h.)	-	157,000	4	17
	ดี-ไซโลส										
Streptomyces sp.	ดี-กลูโคส	-	80	8.0-8.5	Mg^{2+} Co^{2+}	Ag^{+}, Hg^{+} Cu^{2+}	-	4.5-11.0	187,000	4	49
	ดี-ไซโลส										
A. missouriensis	ดี-กลูโคส	1.33	95	7.0	Mg^{2+} Co^{2+}	น้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์	-	5.5-9.0	80,000	2	42
	ดี-ไซโลส										
S. albus, NRRL 5778	ดี-กลูโคส	8.6×10^{-2}	70-80	7.0-9.0	Mg^{2+} Co^{2+}	ดี-ซอร์บิตอล	-	-	-	-	49
	ดี-ไซโลส	9.3×10^{-2}									
	ดี-ไรโบส	3.50×10^{-1}									
	แอล-อะราบิโนส	1.53×10^{-1}									
	แอล-แรมโนส	3.12×10^{-1}									
S. griseofuscus, S-41	ดี-ไซโลส	5.4×10^{-2}	80	8.5	Co^{2+} Mg^{2+}	ดี-ไฮดีดอล ดี-ซอร์บิตอล ดี-อะราบิตอล แอล-อะราบิตอล ดี-แมนนิตอล ดี-ไลโซส์ Ag^{+},Cu^{2+},Hg^{2+} ทริส(ไฟเฟอร์	50 (90°C, 30')	5.0-11.0	180,000	4	43
	ดี-กลูโคส	2.2×10^{-1}									

กลุ่มแรก เป็นเอนไซม์ที่ต้องการแมงกานีส์ไอออนในการทำงานของเอนไซม์ กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่ต้องการโคบอลท์ไอออน กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่ต้องการแมกนีเซียม และกลุ่มที่ 4 เป็นเอนไซม์ที่ไม่ต้องการไอออนของโลหะใด ๆ เลยในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม การแบ่งกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามความต้องการโลหะของแต่ละเอนไซม์นั้นก็ยังไม่ถูกต้องนัก ทั้งนี้เพราะเอนไซม์จากบางจุลินทรีย์อาจเปลี่ยนแปลงความต้องการไอออนของโลหะได้ขึ้นกับซับส์เตรทที่ใช้ เช่น เอนไซม์จาก B. coagulans (56) ซึ่งต้องการโคบอลท์ในการไอโซเมอไรซ์กลูโคส์ แต่ต้องการแมงกานีส์ในการไอโซเมอไรซ์ไซโลส์

นอกจากนี้ไอออนของโลหะประเภทแมงกานีส์, โคบอลท์ และแมกนีเซียม ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังพบว่าไอออนอื่น ๆ ก็มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ได้บ้างเล็กน้อย เช่น เฟอร์รัสไอออนและนิเกิลไอออน ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์จากแอคติโนมัยซีส์ และส์เตรพโตมัยซีส์หลายสายพันธุ์ได้เช่น S. flavogriseus, S. griseofuscus, S-41 เป็นต้น (40, 42-43)

สารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

กลูโคส์ไอโซเมอเรส์ส่วนใหญ่ถูกยับยั้งการทำงานโดยไอออนของโลหะหนักหลายชนิด เช่น ทองแดง (Cu^{2+}), สังกะสี (Zn^{2+}), นิเกิล (Ni^{2+}), ปรอท (Hg^{2+}) และเงิน (Ag^{+}) (39-43, 50, 53) นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) สามารถยับยั้งการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากจุลินทรีย์บางชนิดได้ (43, 61)

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยไอออนของโลหะเหล่านี้ เนื่องมาจากการที่ไอออนของโลหะนี้ไปแทนที่แหล่งที่เป็นที่จับ (binding site) ของโลหะที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ (43, 56) เอนไซม์จากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ถูกยับยั้งด้วยไอออนของโลหะเหล่านี้ เช่น เอนไซม์จาก B. coagulans, HN-68 (56) ซึ่งถูกยับยั้งได้โดยไอออนของทองแดง, สังกะสี, นิเกิล และแคลเซียม เช่นเดียวกับเอนไซม์จาก A. missouriensis (42) ซึ่งถูกยับยั้งโดยไอออน 3 ชนิดแรกที่กล่าวมาข้างต้น และเอนไซม์จาก S. flavogriseus (39) ที่ถูกยับยั้งโดยไอออนของทองแดง, ปรอท และเงิน

นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลและน้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์บางชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เช่นแอล-อะราบิโนส์, ดี-กาแลคโตส์, ดี-แมนโนส์, ดี-ไซลีตอล (D-xylitol),

009044

ดี-ซอร์บิตอล (D-sorbitol) และดี-แมนนิตอล เป็นต้น (49-51, 56-58) Yamanaka (38) และ Danno (39, 47) พบว่าน้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์ที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด คือ ดี-ไซลีตอล แสดงว่าเอนไซม์มีแอฟฟินิตี้ต่อไซลีตอลค่อนข้างสูง โดยมีค่าคงที่ยับยั้ง (K_i) ของไซลีตอลตั้งแต่ 1.5-7.0 มิลลิโมลาร์ ส่วนน้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์อื่น ๆ ที่มีรายงานว่าเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีได้แก่ ดี-อะราบิตอล, แอล-อะราบิตอล ซึ่งมีค่า K_i 0.13 และ 0.146 โมลาร์ ตามลำดับ (38-39), ดี-ซอร์บิตอล และดี-แมนนิตอล ซึ่งมีค่า K_i เป็น 0.029 และ 0.070 โมลาร์ ตามลำดับ (53) และการยับยั้งการทำงานของน้ำตาลเหล่านี้เป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) (39-40, 61)

สารละลายบัฟเฟอร์ของทริส (ไฮดรอกซีเมทิล) อะมิโนมีเทน ก็สามารถยับยั้งการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากจุลินทรีย์บางชนิดได้ เช่นจาก B. coagulans สายพันธุ์ HN-68 โดยยับยั้งแบบแข่งขันและมีค่า K_i เป็น 0.003-0.0075 โมลาร์ซึ่งน้อยกว่าค่าคงที่ของซับส์เตรท (K_m) ที่ใช้คือ ดี-ไซโลส์ (39) อย่างไรก็ตาม Slein พบว่าทริส์บัฟเฟอร์สามารถยับยั้งการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จาก P. pestis แบบไม่แข่งขัน (Non-competitive inhibition) (62) แต่ก็พบว่าทริส์บัฟเฟอร์ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของกลูโคส์ไอโซเมอเรส์จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่นจาก S. flavogriseus (40) และนอกจากนั้นยังพบว่ากลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่ได้จาก S. phaeochromogenes มีแอคติวิตีในช่วง pH 7.5-9.0 เมื่อใช้ทริส์บัฟเฟอร์สูงกว่าที่ pH 7.0 เมื่อใช้ฟอส์เฟตบัฟเฟอร์ (29)

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

โดยทั่วไปกลูโคส์ไอโซเมอเรส์ที่พบในจุลินทรีย์แหล่งต่าง ๆ จะมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงกว้างตั้งแต่ 52,000-197,000 ดาลตัน (50, 53, 66) เช่นจาก B. coagulans, HN-68, L. brevis, L. xylosus, S. albus และ S. griseofuscus, S-41 มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 165,000-197,000 ดาลตัน (36, 38, 53, 63, 67) เอนไซม์จากส์เตรพโตมัยซีส์ส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง (50, 53-55) และเมื่อนำมาทำให้แตกออกเป็นหน่วยย่อยด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต หรือ 6 โมลาร์กวานิดีนไฮโดรคลอไรด์ จะได้ประมาณ 2-4 หน่วยย่อยที่มีลักษณะเหมือนกัน (identical subunit) เช่นเอนไซม์จาก S. flavogriseus (40) มีน้ำหนักโมเลกุล 171,000 และมี 4 หน่วยย่อยซึ่งแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน เอนไซม์จาก S. griseofuscus, S-41 (63-64) มีน้ำหนัก

โมเลกุล 180,000 ดาลตัน และมี 4 หน่วยย่อยซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน ส่วนเอนไซม์จาก S. olivochromogenes มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 117,000 ดาลตัน และมี 2 หน่วยย่อย (16) และเอนไซม์จาก B. coagulans มีน้ำหนักโมเลกุล 175,000 ดาลตัน โดยมี 3 หรือ 4 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 49,000 ดาลตัน (39) นอกจากนี้ Danno (39) และ Angeletti (67) ได้ศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่ได้จากสกุลของสเตรพโตมัยซีสและบาซิลลัส พบว่าเอนไซม์นี้เป็นแอซิดิคโปรตีน สำหรับ Isoelectric point ของกลูโคสไอโซเมอเรสจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ มีค่าต่างกัน เช่น จาก B. coagulans, HN-68 มีค่าเป็น (39) และจาก S. griseofuscus มีค่าเป็น 4.0 (63)*

ในงานวิจัยนี้จะทำการสกัดแยกกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซีส สายพันธุ์ 190-1 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย และสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคส-ไอโซเมอเรสได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (69) นอกจากนี้จะกล่าวถึงขั้นตอนในการทำเอนไซม์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ ตลอดจนคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางกายภาพของเอนไซม์ที่เตรียมได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปศึกษาการผลิตเอนไซม์ในระดับขยายส่วนต่อไป