Concept 9-1

1. พลังงานในสิ่งมีชีวิต ได้มาจากกระบวนการ metabolism
2. **<u>Bioenergetics</u>** เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งการนำเอาพลังงานที่สร้างขึ้นไปใช้ในขบวนการชีวภาพต่าง ๆ เพื่อการเจริญเติบโตหรือการดำรงชีวิตอยู่ของเซลล์
3. **<u>กฎการคงอยู่ของพลังงาน</u>** (Law of Conservation of energy)
4. "พลังงานในระบบใดจะสร้างขึ้นมาใหม่ หรือ จะสูญหายไปไม่ได้ แต่พลังงานเปลี่ยนรูปได้"
5. ปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์เกิดขึ้นตลอดเวลา
6. ตรวจสอบว่า ปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นในเซลล์ $\Rightarrow$ วิเคราะห์ส่วนประกอบของก๊าซ 3 ชนิด ในลมหายใจออกเปรียบเทียบกับลมหายใจเข้า
   - 6.1. ปริมาณ N_2 ใกล้เคียงกัน (79.5-79.0 = 0.5 %)
   - 6.2. ปริมาณ O_2 ในลมหายใจออกลดลง (16.4-20.96 = -4.56 %)
   - 6.3. ปริมาณ CO_2 ในลมหายใจออกเพิ่มขึ้น (4.1-0.03 = +4.07 %)
   - 6.4. แสดงให้เห็นว่า เซลล์น่าจะมีการนำ O_2 ไปใช้ แล้วปล่อย CO_2 ออกมา $\Rightarrow$ มีการเกิดปฏิกิริยาเคมีขึ้นในเซลล์
   - 6.5. ทั้งลมหายใจเข้า/ออก $\Rightarrow N_2 > O_2 > CO_2$
7. **<u>เมแทบอลิซึม</u>** (metabolism) $\Rightarrow$ ปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งมีชีวิต โดยมีเอนไซม์เข้าร่วมปฏิกิริยา

anabolism	catabolism
เป็นกระบวนการสร้างสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่จากสารโมเลกุลเล็ก โดยใช้พลังงานจากเซลล์ ซึ่งเป็นผลให้เซลล์เกิดการเติบโต	เป็นกระบวนการสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็ก

1. สารอินทรีย์ทุกชนิดสังเคราะห์โดยเซลล์ที่มีชีวิต
   - 1.1. แต่เซลล์ทุกเซลล์มิใช่ว่าจะสามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ได้ทุกชนิด
   - 1.2. เซลล์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์บางอย่างได้ ก็จำเป็นจะต้องนำสารอินทรีย์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เข้าไป

การหายใจ	การเผาไหม้

CONCEPT 9-1

• ใช้ O_2 • ทำให้เกิด ht + CO_2 + H_2O • ใช้เอนไซม์ลดพลังงานกระตุ้น (activation energy) (ที่สูงกว่าความต้านทานของเซลล์ที่จะทนทานได้) ให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิร่างกาย • มีกรรมวิธีควบคุมการปล่อยพลังงานเป็นระยะ ๆ เพื่อมิให้พลังงานที่ปล่อยออกมานั้นเป็นอันตรายต่อเซลล์ และเซลล์สามารถนำเอาพลังงานนั้นไปใช้ทำงานด้านต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ • เก็บพลังงานที่เกิดจากปฏิกิริยาให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นอันตรายแก่เซลล์และสะดวกต่อการนำไปใช้ (เช่น ในรูป ATP)	• ใช้ O_2 • ทำให้เกิด ht + CO_2 + H_2O • เป็นปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว • $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ + heat + แสง • ใช้พลังงานความร้อนสูงมากเพื่อกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา • ผลจากปฏิกิริยาก็จะได้รับความร้อนสูงมาก • ถ้าเกิดในสิ่งมีชีวิตเซลล์ในร่างกายต้องตายแน่นอน

1. ปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์เกิดขึ้นอย่างเป็นระเบียบ เพราะมีสารอินทรีย์ที่เซลล์สร้างขึ้นทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง หรือ Catalyst สารประกอบอินทรีย์ดังกล่าวนี้ คือ enzyme
2. นักวิทยาศาสตร์ ไม่มีโอกาสที่จะเข้าไปดูการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ได้ จึงต้องศึกษาการทำงานของเอนไซม์นอกเซลล์ $\Longrightarrow$ มีเงื่อนไขบางประการแตกต่างจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์
3. Enzyme
   - 3.1. สารอินทรีย์จำพวกโปรตีนที่มีรูปร่างกลม (globular proteins) ที่เซลล์สร้างขึ้นมา
   - 3.2. ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต $\Longrightarrow$ Biological catalyst, Biocatalyst, ตัวเร่งชีวภาพ
   - 3.3. เมื่อปฏิกิริยาเคมีสิ้นสุดแล้ว คุณสมบัติทางเคมีและปริมาณของเอนไซม์ยังคงเหมือนเดิม ไม่มีการเปลี่ยนแปลง สามารถทำปฏิกิริยาได้ต่อไปอีก และใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น
   - 3.4. ทุกชนิดทำงานในเซลล์ แต่หลายชนิด ยังสามารถทำงานนอกเซลล์ที่มีสภาพใกล้เคียงกับเซลล์
   - 3.5. ต่างจาก catalyst อื่น ๆ ตรงที่ว่ามันถูกสร้างจากสิ่งมีชีวิตเท่านั้น
   - 3.6. แต่ละชนิดมีโครงสร้าง (structure) และโครงรูป (conformation) ที่จำเพาะ ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติต่าง ๆ และการทำงาน
   - 3.7. สามารถเร่งหรือเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมีได้โดยการลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา
   - 3.8. ทำงานได้ดีกว่าตัวเร่งอนินทรีย์
   - 3.9. อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะสูงกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ช่วยเร่งได้ถึง 10^{20} เท่า แสดงว่าประสิทธิภาพ (efficiency) ของเอนไซม์นั้นสูงมาก (enzyme are highly efficient)
   - 3.10. เอนไซม์มี substrate specificity $\Longrightarrow$ เอนไซม์ แตกต่างจากตัวเร่งอนินทรีย์ตรงที่เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่เข้าทำปฏิกิริยา (substate) สูง (Enzymes are highly specific)
     - ช่วยให้ปฏิกิริยาต่าง ๆ ในเซลล์ดำเนินไปเป็นขั้นตอนอย่างมีระบบระเบียบ
   - 3.11. เร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้ แต่ช้า

4. เอนไซม์ ประกอบขึ้นจากสาย polypeptide ที่เกิดจากกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์

โพลิเพปไทด์สายเดียว	โพลีเปปไทด์มากกว่า 1 สาย
Ribonuclease ● จากตับอ่อน ● สายพอลิเพปไทด์ถูกดึงโยงเข้าหากันเป็นก้อนโดยพันธะโควาเลนท์ แบบพันธะซัลไฟด์ (-S-S) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโน	Chymotrypsin ● ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 สาย คือ สาย (Chain) A,B และ C ยึดกันไว้ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 2 พันธะ

1. **heloenzyme** ⟹ เอนไซม์ที่สามารถแยกออกได้เป็น

   1.1. apoenzyme ⟹ ส่วนที่เป็นโปรตีนซึ่งไม่สามารถทำงานตามลำพังได้

   1.2. cofactor ⟹ ส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน แต่ช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ อาจเป็น

   1.2.1. อิออนของโลหะ ⟹ มักจะจับอยู่ตรงส่วนสำคัญของเอนไซม์ (active site)

   ● Zn^{2+} (ไคโมทริปซิน), Mg^{2+} (เอนไซม์ที่เคลื่อนย้าย phosphate), Ca^{2+} (เอนไซม์ที่ทำให้กล้ามเนื้อหดตัว), Fe, Cu

   1.2.2. สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน แบ่งเป็น

   1.2.2.1. Coenzyme ⟹ จับส่วนที่เป็นโปรตีนอย่างหลวม ๆ สามารถแยกออกจากกันได้ง่าย และ ส่วนใหญ่มักจะมีวิตามินเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย เช่น

   ● NAD^+ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) ⟹ มีวิตามิน B_5 เป็นองค์ประกอบ

   1.2.2.1.1.FAD (Flavine Adenine Dinucleotide) ⟹ มีวิตามิน B_2 เป็นองค์ประกอบ

   1.2.2.2. Prosthetic group ⟹ ยึดติดกับส่วนที่เป็นโปรตีนอย่างหนาแน่นด้วยพันธะโคเวเลนต์จนดูเหมือนเป็นโครงสร้างเดียวกัน

   ● มีหลายกรณีที่เราไม่ทราบแน่นอนว่าสารที่ทำหน้าที่ช่วยการทำงาน ของเอนไซม์เป็นโคเอนไซม์หรือหมู่พรอสทิติก ดังนั้นจึงมีผู้ใช้คำว่า โคแฟกเตอร์"ซึ่งหมายความรวมถึงสารทั้งสองชนิด

2. เอนไซม์บางชนิด แต่ละชนิด เร่งปฏิกิริยาของ S ได้หลายชนิด แต่ S เหล่านั้น จะต้องเป็น S ที่เป็น สปก. ประเภทเดียวกัน

   ● ทริปซิน จะเร่งการสลายพันธะเพปไทด์ที่อยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีน ทางด้านหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์เป็นเบส เช่น อาร์จินิน (Arg) และ ไลซีน (Lys)

   ● ไคโมทริปซินจะเร่งการสลายพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ทางด้านหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน ฟีนิลอะลานีน (Phe) , ไทโรซีน (Tyr) และ ทริปโทเฟน (Trp)

3. S บางชนิด แม้เป็นโมเลกุลเดียวกัน ยังถูกย่อยโดยเอนไซม์หลายชนิด

4. bac. แต่ละเซลล์ มีเอนไซม์มากกว่า 1,000 ชนิด

5. กิจกรรม

   5.1. H_2O_2 เป็นสารเคมีที่ใช้สำหรับฟอกสี สารนี้เป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่เป็นผลิตภัณฑ์ (product) ของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์อยู่ตลอดเวลาจากกระบวนการ metabolism $\Rightarrow$ ถ้าไม่กำจัดก็จะทำให้เซลล์ตายได้

   5.2. ในเซลล์มีเอนไซม์ catalase ทำหน้าที่เร่งการสลาย H_2O_2

   5.3. ในเซลล์ทั่ว ๆ ไป มีเอนไซม์ catalase ที่เร่งปฏิกิริยาเคมีได้เร็วถึงนาทีละ 5.6 ล้านโมเลกุล

6. ในโมเลกุลของเอนไซม์ จะมีบริเวณเฉพาะสำหรับจับหรือรวมตัวกับ substate เรียกบริเวณนี้ของเอนไซม์ ว่า บริเวณเร่ง (Catalytic or substrate site) $\Rightarrow$ active site

   6.1. active site เป็นสิ่งที่กำหนดว่า จะเปลี่ยนแปลงพันธะเคมีใดของ S $\Rightarrow$ความจำเพาะของเอนไซม์อยู่ที่การเร่งปฏิกิริยาของ active site

   6.2. คำว่า active site ของเอนไซม์ อาจหมายรวมถึงบริเวณอื่น ๆ ของเอนไซม์ที่สามารถรวมกับสารอื่นที่ไม่ใช่ซับสเตรตแล้วทำให้เพิ่มหรือลดการทำงานของเอนไซม์ได้

   6.3. ctive site ของเอนไซม์อาจประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียงหน่วยเดียว หรือ กรดอะมิโนหลาย ๆ หน่วยจากตำแหน่งต่าง ๆ กัน ทำให้ active site มีลักษณะเป็นร่อง (cleft) ซึ่งจะมีขนาดเล็กหรือใหญ่ ขึ้นอยู่กับขนาดของ S

7. E + S $\Leftrightarrow$ ES-Complex $\Leftrightarrow$ E+ P (E = เอนไซม์ S = ซับสเตรต P = ผลิตภัณฑ์)

   7.1. การรวมตัวระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตส่วนมากมักเป็นพันธะทางเคมีอย่างอ่อน (weak bond) เช่น พันธะไฮโดรเจน หรือแรงแวนเดอร์วาลส์

   7.2. เอนไซม์บางชนิดจะจับกับซับสเตรตด้วย พันธะโคแวเลนท์ ได้แก่ เอนไซม์ไคโมทริปซิน และทริปซิน

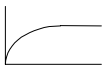
8. สมมติฐานอธิบายกลไกการเกิด ES-complex

สมมติฐานแม่กุญแจ-ลูกกุญแจ (Lock and key hypothesis) สมมติฐานแม่แบบของฟีซเชอร์ (Fischer's template hypothesis) แบบจำลองแม่กุญแจกับลูกกุญแจ (lock and key model)	สมมติฐานการเหนี่ยวนำให้เหมาะ (Induced Fit Hypothesis)

CONCEPT 9-1

• เสนอโดย Emil Fischer ในปี ค.ศ.1894 • active site ของเอนไซม์จะถูกกำหนดโครงสร้างมาแล้วให้มีรูปร่างและขนาดที่แน่นอนไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ • S ที่มีรูปร่างและขนาดพอเหมาะกับ active site ของ enzyme เท่านั้น จึงจะเข้ารวมกับเอนไซม์ได้ และเกิดปฏิกิริยากลายเป็นผลิตภัณฑ์ • enzyme เปรียบเสมือนลูกกุญแจที่จะไขได้เฉพาะกับแม่กุญแจของมันเท่านั้น ซึ่งเทียบได้กับ S • ลูกกุญแจแต่ละดอก จะไม่สามารถไขแม่กุญแจได้ทุกชนิด • ลูกกุญแจสามารถไขแม่กุญแจได้หลายครั้ง โดยที่โครงสร้างของลูกกุญแจ ไม่เปลี่ยนแปลง	• เสนอโดย Koshland ในปี ค.ศ.1959 • active site ของเอนไซม์จะมีความยืดหยุ่นและเปลี่ยนสภาพได้ (flexible) ⟹ เมื่อ S เข้าใกล้บริเวณ active site ของเอนไซม์ S จะเหนี่ยวนำ (induce) ให้เอนไซม์เปลี่ยนลักษณะโครงรูป (Conformation) ตรงบริเวณ active site ให้มีขนาดและรูปร่างพอเหมาะเพื่อที่จะรวมกับ S ได้พอดี • สามารถอธิบายกลไกการทำงานในปฏิกิริยาเอนไซม์ได้ดีกว่าของฟิชเชอร์ โดยเฉพาะในกรณีที่เอนไซม์สามารถรวมกับสารอื่นที่มีรูปร่างคล้ายซับสเตรตได้ แต่ไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น • ดังนั้น โครงสร้างของเอนไซม์ยืดหยุ่นได้ ไม่อยู่ตัวเหมือนลูกกุญแจ

1. อัตราการทำงานของเอนไซม์

อุณหภูมิ	• เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่ทำงานได้ดีที่สุด (optinum temperature) • โดยทั่ว ๆ ไป ⟹ 25-40°C ⟹ อุณหภูมิของร่างกาย • เพิ่ม T ⟹ อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เนื่องจากโมเลกุลมีพลังงานจลน์มากขึ้น • T สูงเกินไป ⟹ ปฏิกิริยาจะลดลง เพาะเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนจะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (denature) • การที่พอลิเพปไทด์ที่ม้วนเป็นก้อนโปรตีนคลายตัวเมื่อได้รับความร้อน เนื่องจากพันธะที่ยึดระหว่างสายของพอลิเพปไทด์ เช่น พันธะไดซัลไฟด์ จะสลายตัวแต่ (ถ้าความร้อนไม่สูงจนเกินไป) เมื่ออุณหภูมิลดลง โปรตีนจะคืนสภาพ เดิมได้อีก เพราะมีการสร้างพันธะขึ้นมาใหม่อีกครั้งนั่นเอง
ความเป็นกรดเป็นด่าง	• เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีความเป็นกรดเป็นด่างพอเหมาะ (optinum pH) • โดยทั่วไป ⟹ 6-7.5 • เปปซิน = 1.5-2.5 , ซูเครส = 6.2 , ไลเปส = 7.0 , ทริปซิน = 8-11
ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์	• อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาจะแปรเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ • ถ้าเอนไซม์มีมากเกินพอ ความเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะไม่มีซับสเตรตเหลือพอที่จะเข้าทำปฏิกิริยา
ปริมาณความเข้มข้นของซับสเตรต 	• ความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของซับสเตรตในช่วงที่ความเข้มข้นยังน้อย เพราะถ้าเพิ่มซับสเตรตมากเกินไป ปฏิกิริยาก็จะไม่เกิดเร็วขึ้น เนื่องจากปริมาณของเอนไซม์ไม่เพียงพอ

1. ตัวยับยั้งเอนไซม์ (inhibitor) ⟹ สารที่สามารถทำให้ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นคะตะลิสต์เกิดช้าลง หรือหยุดชะงักลงได้

competitive inhibitor	non competitive inhibitor

CONCEPT 9-1

สารที่มีโครงสร้างเหมือนกับอณูของ S มีกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยการแข่งขันกับ S ในการเข้าจับกับ active site ของเอนไซม์ ได้เป็น EI complex ทำให้ไม่มีเอนไซม์เหลือไปช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยา มีผลให้ปฏิกิริยานั้นหยุดชะงักลง	สารที่ทำปฏิกิริยากับอณูของ S ทำให้อณูของ S ไม่สามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาได้ ⟹ ไซยาไนต์, CO

1. ตัวยับยั้งเอนไซม์ตัวหนึ่ง ทำให้ปฏิกิริยาอย่างหนึ่งหยุดชะงักลง แต่ไม่มีผลกระทบกระเทือนต่อปฏิกิริยาอื่น ๆ ที่มีเอนไซม์ชนิดอื่นเป็นคะตะลิสต์

   1.1. จากการศึกษาค้นคว้าวิจัยของนักชีวเคมีทำให้ทราบว่า มีตัวยับยั้งเอนไซม์เฉพาะอย่างอยู่หลายชนิดที่สามารถทำให้การหายใจของเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลองหยุดชะงักลงได้

   1.2. จากความรู้เกี่ยวกับตัวยับยั้งเอนไซม์ ⟹ สามารถค้นหาลำดับขั้นตอนของขบวนการหายใจจนถึงขั้นได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายออกมา ⟹ ข้อเท็จจริงนี้ ทำให้เราทราบว่า ขบวนการหายใจประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้น ซึ่งเกิดต่อเนื่องกันไป และแต่ละขั้นมีเอนไซม์ต่างชนิดกันเป็นตัวควบคุม

2. ตัวอย่างการศึกษาค้นหาลำดับขั้นตอนขบวนการหายใจ โดยใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์

   2.1. $\rightarrow A \xrightarrow{a} B \xrightarrow{b} C \xrightarrow{c} D \rightarrow$

   2.2. ถ้าใส่ Ic ลงไปใน หลังจากนั้นระยะหนึ่งก็ทดสอบปริมาณสาร A B C D ⟹ เราควรจะพบว่า มีสาร C มากกว่าปกติ เพราะขาดเอนไซม์ C ที่จะช่วยเปลี่ยนสาร C ให้เป็นสาร D ซึ่งมีผลทำให้สาร D มีปริมาณลดน้อยลงจนกระทั่งไม่มีเหลือเลย ส่วนสาร A และ B มีปริมาณเท่าเดิม

   2.3. ถ้าใส่ Ib ลงไป ⟹ สาร B มีปริมาณมากขึ้นกว่าปกติ สาร A มีปริมาณเท่าเดิม ส่วนสาร C และสาร D ไม่มีอยู่เลย

   2.4. ถ้าเราใส่ Ia ลงไป ⟹ สาร A มากกว่าปกติ ส่วนสาร B สาร C และสาร D ลดน้อยลงจนไม่มีเหลือเลย

   2.5. จากหลักการเช่นนี้ทำให้ทราบว่า สาร A จะต้องเกิดก่อนสาร B และ สาร B เกิดก่อนสาร C ส่วนสาร D เกิดหลังสาร C

3. ตัวอย่างการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาเคมีในเซลล์สิ่งมีชีวิต

   3.1. $HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COOH$ (กรด succinic)

   $\xrightarrow{\text{succinic dehydrogenase}}$ HOOC-CH=CH-COOH (กรด fumuric) + 2H

   3.2. สาร TTC (2,3,5, - triphenyl tetrazolium chloride) 0.4 %

   3.2.1. สารละลายไม่มีสี สลายตัวในที่มีแสงสว่าง และเป็นสารพิษ

   3.2.2. เปลี่ยนไปเป็นสารใหม่ คือ formazan (2,3,5-triphenyl tetrazolium formazan) (เมื่อรวมกับ H^+) ซึ่งมีสีแดง, ชมพู

   3.3. กรดมาโลนิก ($HOOC\text{-}CH_2\text{-}COOH$) ⟹ ตัวยับยั้งเอนไซม์ ⟹ โครงสร้างคล้ายกับกรดซักซินิก ⟹ กรดซักซินิกไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดฟิวมาริกได้ ⟹ ไม่มี H^+ เกิดขึ้น ⟹ เมื่อใช้สาร TTC ตรวจสอบ ไม่มีสีแดงปรากฏ