บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทำโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.1.1 การแยกสารละลายโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana*

เมื่อนำใบป่านศรนารายณ์ 2 กิโลกรัม มาสกัดตามวิธีการทดลองข้อ 3.2.1 ได้สารละลายสกัดเรียกว่า crude enzyme ซึ่งมีปริมาณโปรตีนรวม 1,700 มก แอคติวิตีรวม 294.47 หน่วย และมีแอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอส 0.17 หน่วย / มก.โปรตีน

4.1.2 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนใน crude enzyme ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 25- 80 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.2.2 แล้วนำไปไดอะไลส์เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า ผลผลิตเอนไซม์ (% activity yield) ที่ได้มีค่า 39.12 เปอร์เซ็นต์ และทำให้โปรติเอสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.30 เท่า จากนั้นละลายเอนไซม์ที่ได้ แล้ว นำไปผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 และดีอีเออี-เซลลูโลส ตามลำดับเพื่อแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไป ดังตารางที่ 3

4.1.3 ผลการทำเอนไซม์โปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100

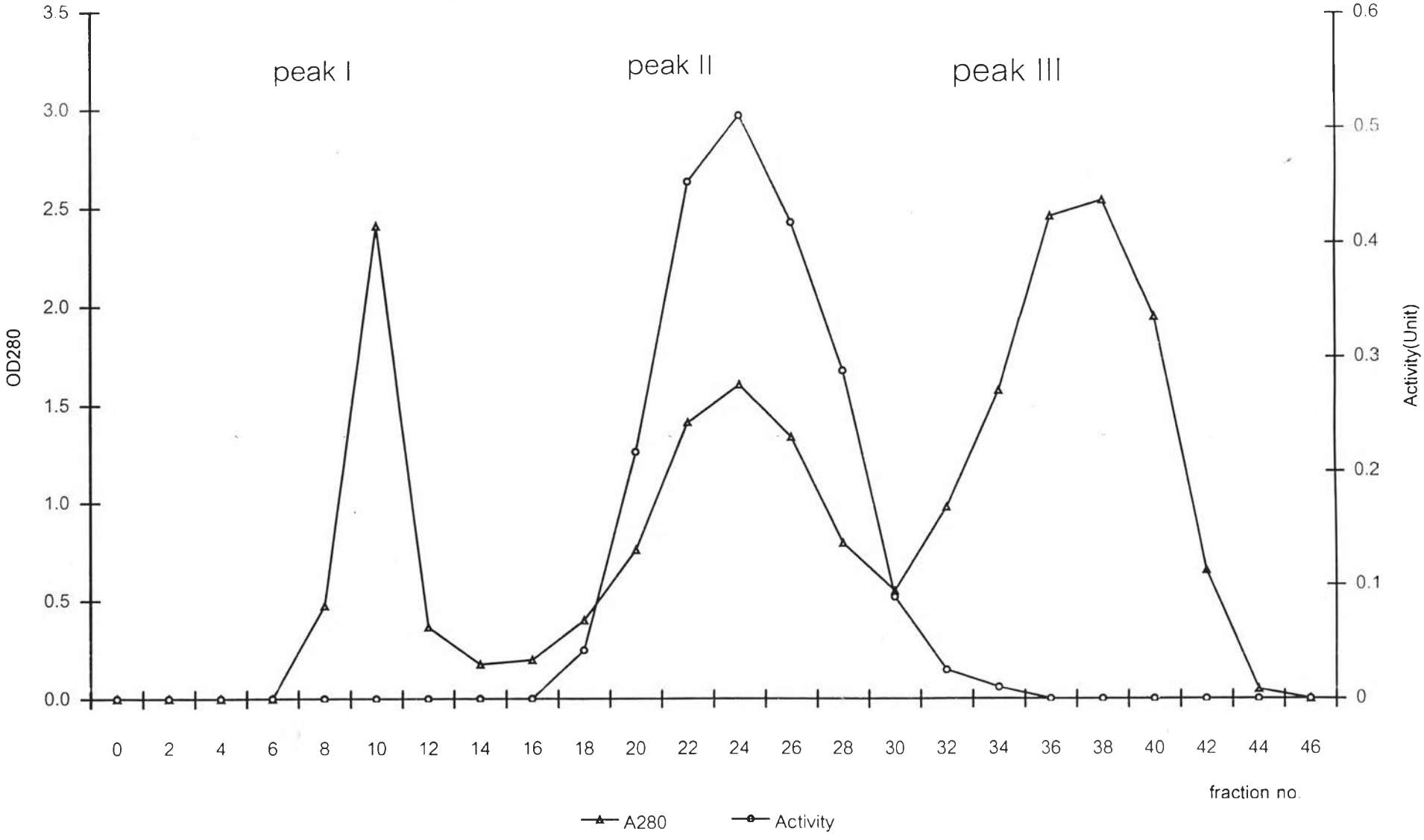
นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.1.2 ไปผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.2.3 ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 1 ปรากฏโปรตีน 3 พีค โดยพีค I และพีค III ไม่มีแอคติวิตี พีค II มีแอคติวิตีให้ผลผลิตเอนไซม์ 189.27 % และทำให้โปรติเอสนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 24.24 เท่า ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปผลการทำให้โปรติเอสบริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	โปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีรวม (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	Yield (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
Crude enzyme	1,700.00	294.47	0.17	100	1
ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 25 - 80 %	533.33	115.20	0.22	39.12	1.30
Gel filtration Sephadex G-100	135.33	557.33	4.12	189.27	24.24
DEAE-Cellulose	126.67	546.67	4.32	185.65	25.41

Yield (%) = activity yield

รูปที่ 1 รูปแบบการแยกและทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 บรรจุสารละลายโปรตีนจาก ข้อ 4.2.2 ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 2.0x55 ซม. ชะด้วยบัฟเฟอร์ทริส ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.5 อัตราการไหล 15 มล./ซม. เก็บแยกส่วน หลอดละ 5 มล.ตามวิธีการทดลองข้อ 3.2.3


peak I
peak II
peak III
OD280
Activity(Unit)
fraction no.
A280
Activity
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46

4.1.4 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.2.2 ไปผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส ตามวิธีการทดลองข้อ 3.2.4 ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 2 ปรากฏโปรตีน 2 พีค คือ พีค I ซึ่งไม่จับกับคอลัมน์ และ พีค II ซึ่งชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 - 0.8 โมลาร์ เฉพาะ พีค I เท่านั้นที่มีแอคติวิตี เมื่อรวบรวมแฟรกชันซึ่งมีแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่า ให้ผลผลิตเอนไซม์ 185.65 เปอร์เซ็นต์และโปรติเอสนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 25.41 เท่า ดังตารางที่ 3

4.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรติเอส

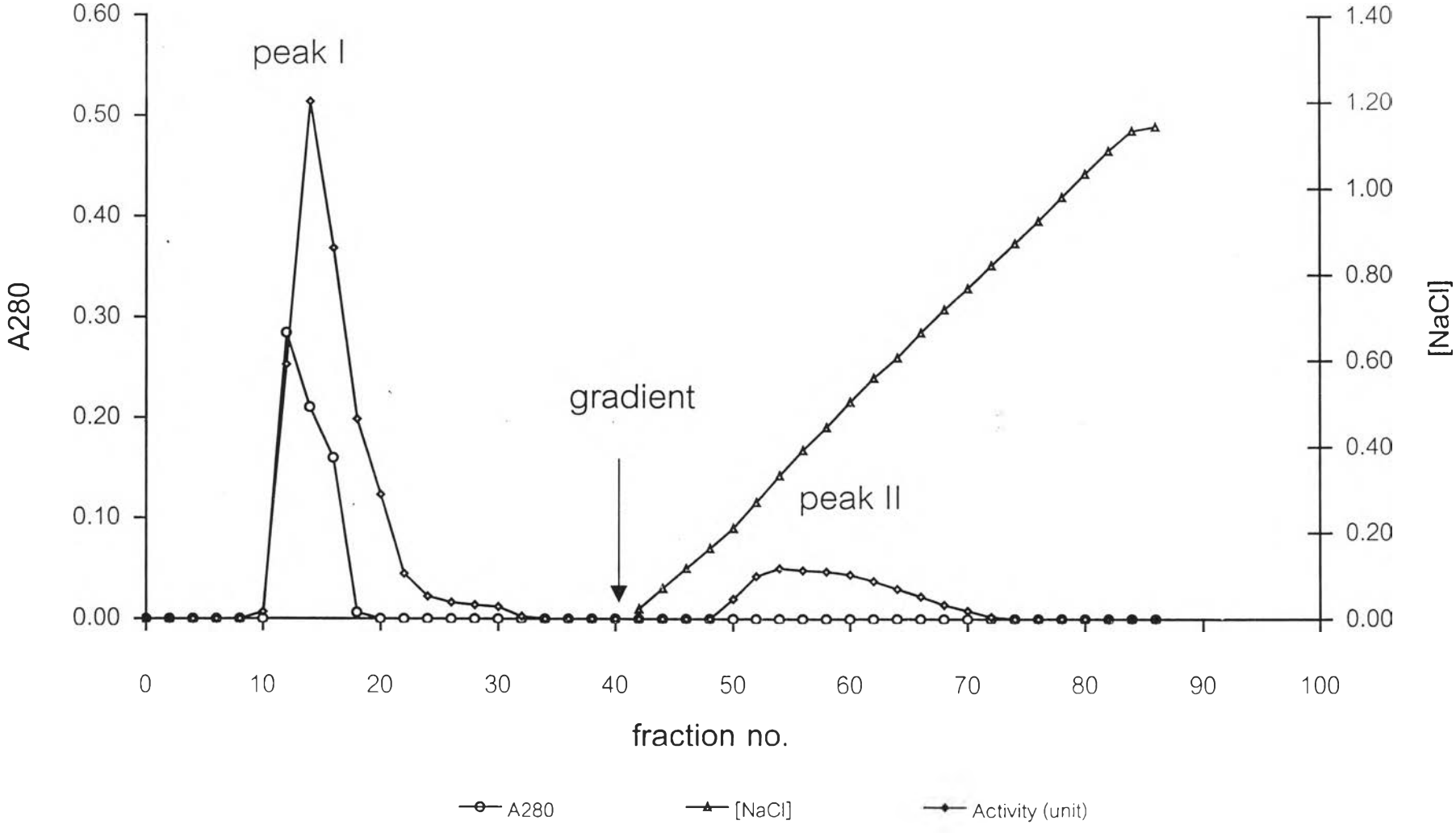
4.2.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรติเอสโดยพอลิอะคลิลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟริซีสแบบ Non-denaturing PAGE

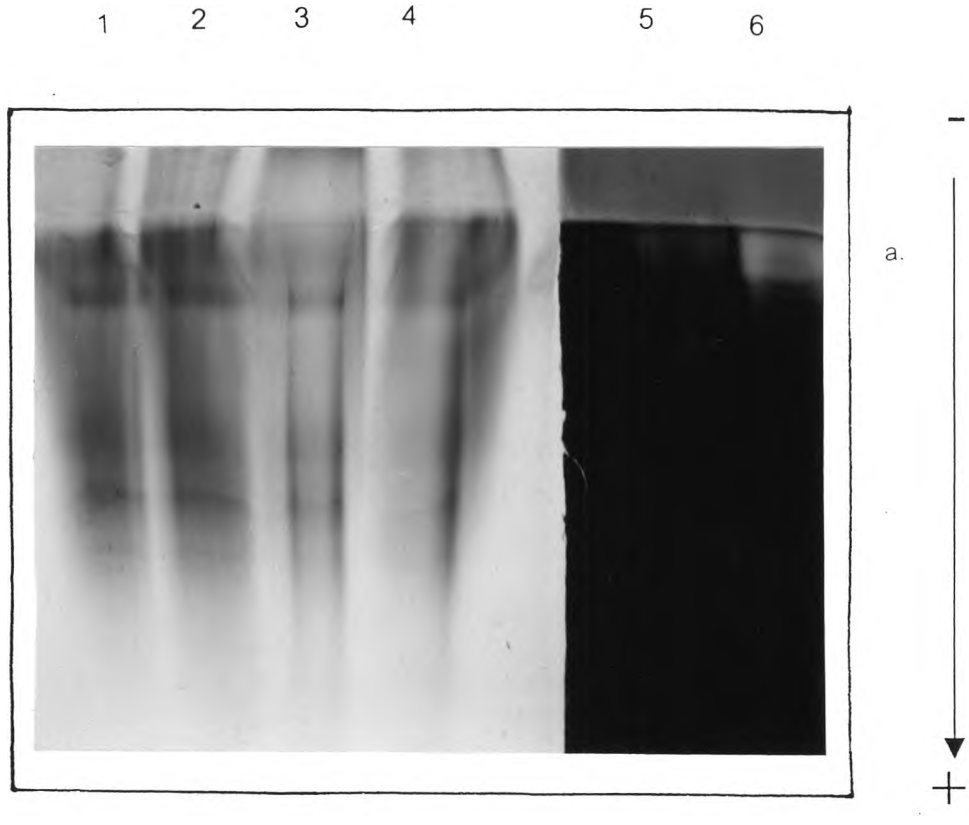
นำสารละลาย crude enzyme และสารละลายโปรติเอสที่เตรียมได้จาก การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เซฟาเด็กซ์ จี-100 และ ดีอีเออี–เซลลูโลส ไปทำการแยกโปรตีนโดยการทำ Non-denaturing PAGE ตามวิธีการทดลองข้อ3.3.9 และ 3.3.10 พบว่า โปรตีนจากเซฟาเด็กซ์ จี-100 และดีอีเออี-เซลลูโลสแฟรกชัน จะมีแถบโปรตีนที่น้อยกว่าในสารละลาย crude enzyme และสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อนำไปย้อมสีแอคติวิตี พบว่าจะให้แถบแอคติวิตีแถบเดียวที่ ตำแหน่ง a. ดังรูปที่ 3

4.2.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรติเอสโดยพอลิอะคลิลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟริซีส แบบ SDS-polyacrylamide electrophoresis

นำสารละลายโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำอีเลคโตรโฟเรซีสโดยวิธีเอสดีเอส ควบคู่กับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าโปรตีนมาตรฐาน BSA (66 KD), ovabumin (45KD), chymotrypsinogen A (25KD), และ myoglobin (12.5KD) จะมีการเคลื่อนที่ในแผ่นเอสดีเอส พอลิอะคลิลาไมด์เจล (ดังรูปที่ 5) ซึ่งแสดงโดยค่า relative mobility เรียงลำดับดังนี้ คือ 0.36, 0.50, 0.71 และ 0.85 ส่วนแถบเข้มหลักของตัวอย่างทุกขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์จะมีหลายแถบที่ตรงกันให้ชื่อ a, b, c และ d มีค่า relative mobility ดังนี้ 0.50, 0.60, 0.70, 0.80 ดังนั้นแสดงว่าในการทดลองนี้สามารถทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์ขึ้นได้บางส่วนเท่านั้น โดยสามารถกำจัดโปรตีนซึ่งมีขนาดย่อยใหญ่ ๆบางชนิดออกได้

รูปที่ 2 รูปแบบการแยกและทำโปรตีเอสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส บรรจุสารละลายโปรตีนจาก ข้อ 4.2.2 ลงในคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส ขนาด 1.7x30 ซม. ชะด้วย บัฟเฟอร์ทริสทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 แล้วตามด้วย linear salt gradient (250 มล.บัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 และ 250 มล. บัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ที่มี 2 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์) อัตราการไหล 30 มล./ซม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มล. ตามวิธีทดลองข้อ 3.2.4


peak I
gradient
peak II
A280
[NaCl]
fraction no.
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
A280
[NaCl]
Activity (unit)



รูปที่ 3 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยพอลิอะคลิลาไมด์ เจลอิเลคโตรโฟเรซีสแบบไม่เสียสภาพ ตามวิธีการทดลองที่ 3.3.9

A. การย้อมโปรตีนด้วย protein staining

Lane 1. โปรตีนจากสารละลาย crude enzyme (40 μg)

2. โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 25-80 % ammoniumsulfate (40 μg)

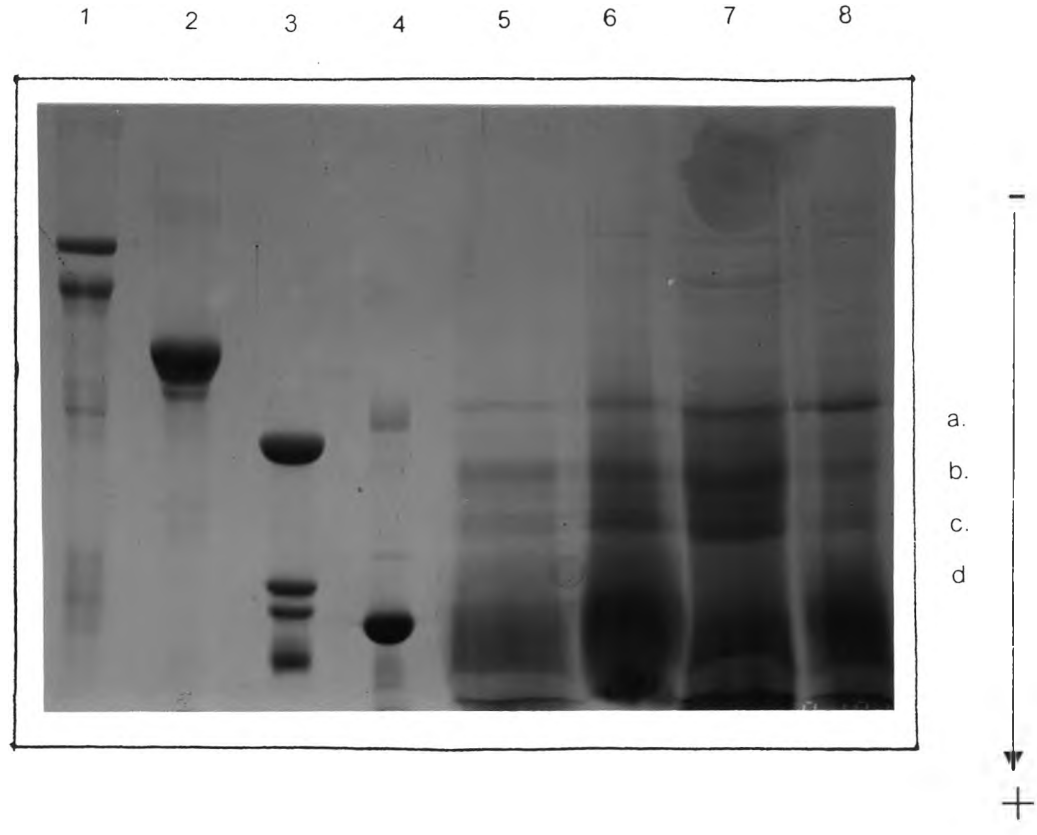
3. โปรตีนที่ได้จาก Sephadex G-100 คอลัมน์ (20 μg)

4. โปรตีนที่ได้จาก DEAE-Cellulose คอลัมน์ (20 μg)

B. การย้อมแอคติวิตีของโปรติเอสจากการย่อยเคซีน

Lane 5. โปรตีนที่ได้จาก DEAE-Cellulose คอลัมน์ (20 μg)

6. โปรติเอสจาก *Streptomyces griseus* (10 μg)



รูปที่ 4 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและโปรติเอสแยกโดยเอสดีเอส-พอลิอะคลิลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟเรซีส ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.10

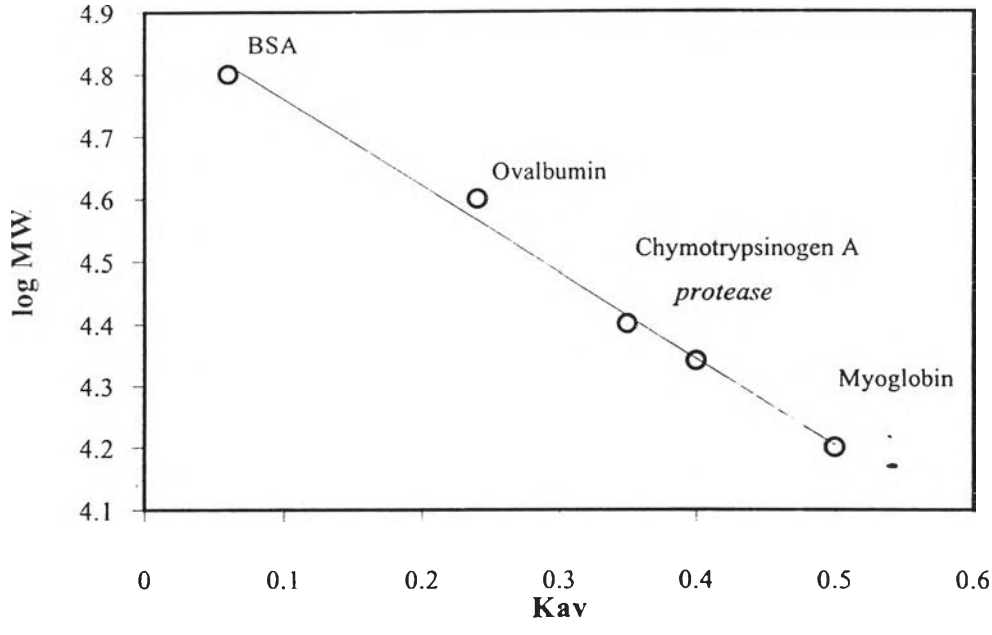
1. BSA (66KD) 2 µg
2. ovalbumin (45KD) 2 µg
3. chymotrypsinogen A (25KD) 2 µg
4. myoglobin (12.5KD) 2 µg
5. DEAE-cellulose (30µg)
6. gel filtration (20µg)
7. ammoniumsulfate (30µg)
8. crude (30µg)

4.3 **ผลของการศึกษาคุณสมบัติของโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์** *Agave sisalana*

4.3.1 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยการใช้คอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100

เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายเอนไซม์โปรติเอสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ลงในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 แล้วชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ดังแสดงในวิธีการทดลองในข้อ 3.3.11 ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า โปรตีนมาตรฐาน BSA, ovabumin, chymotrypsinogen A และ myoglobin จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution volume 88, 112, 128, และ 148 มล. ตามลำดับ ในขณะที่ โปรติเอสจะออกจากคอลัมน์หลัง ovabumin โดยมีค่า elution volume 134 มล. และใกล้กับ chymotrypsinogen A เมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยประมาณได้เท่ากับ 21,800 ดาลตัน โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังแสดงใน รูปที่ 5

I19035528



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุล ของโปรติเอสจากปานศรนารายณ์ โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 1.7x85 ซม. ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.10

4.3.2 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดที่ pH 4.8, 6.5 และ 8.3 ที่อุณหภูมิห้องแล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือในเวลาต่าง ๆ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าที่ pH 8.3 เอนไซม์จะมีความเสถียรสูงสุด ในขณะที่ pH 4.8 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง 45 % ที่เวลา 30 นาที และ pH 6.5 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง 51 % ที่เวลา 150 นาที

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าในช่วงเวลา 30 นาที ของการบ่มที่อุณหภูมิ 20-40 °ซ โปรติเอสไม่สูญเสียแอคติวิตี มีแอคติวิตีลดลงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ถ้าบ่มที่ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 70 ° ซ มีแอคติวิตีน้อยมากดังแสดงรูปที่ 7

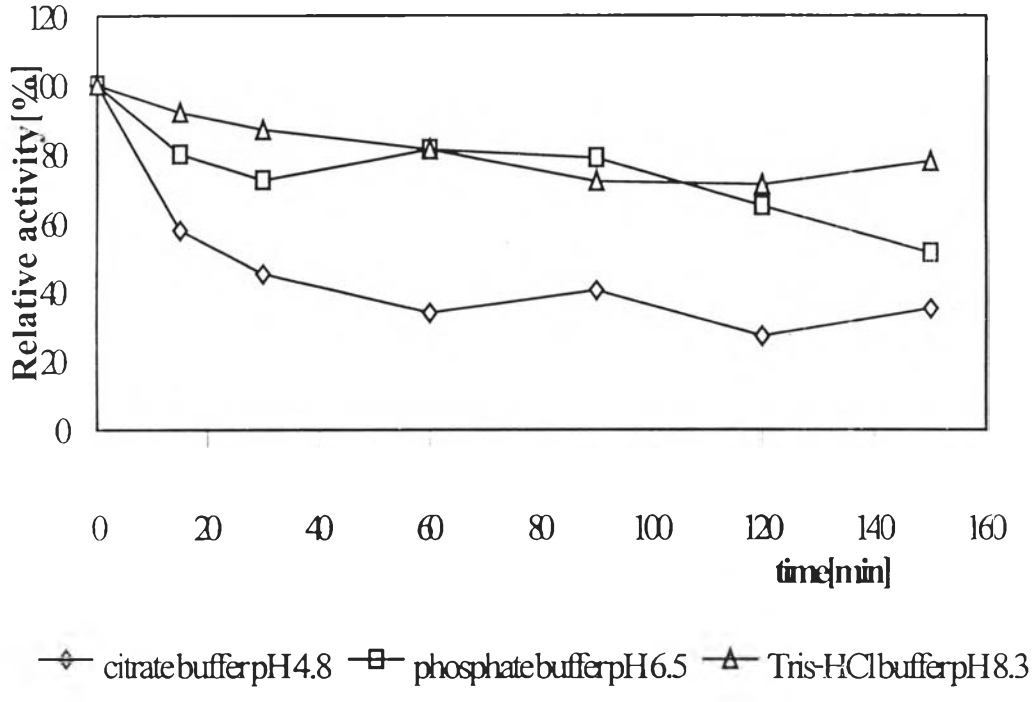
4.3.3 ผลของการศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำการวัดแอคติวิตีของโปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากป่านศรนารายณ์ โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท ในช่วง pH 5.0 – 10.5 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 8 พบว่าช่วง pH 7.0 - 8.5 เป็น pH ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์นี้ในการเร่งปฏิกิริยา เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท

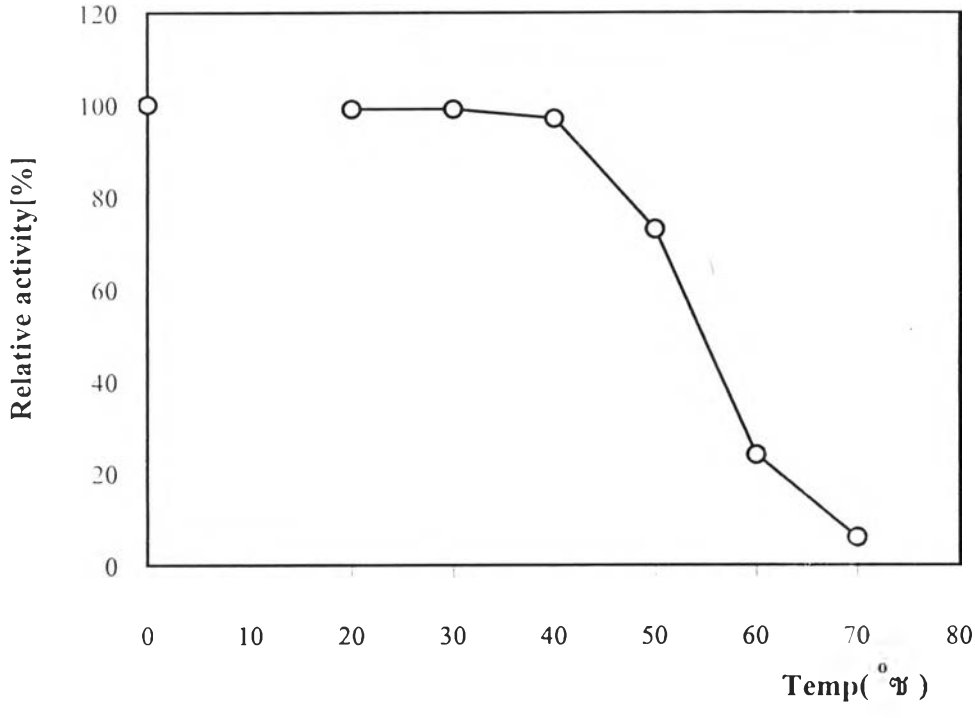
เมื่อวัดแอคติวิตีของโปรติเอสชนิดนี้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30 - 80 °ซ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.5 พบว่าโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์นี้ มีแอคติวิตีดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 - 65 ° ซ แอคติวิตีจะลดลงเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 65 ° ซ ดังแสดงในรูปที่ 9

4.3.4 ผลของการศึกษาจลนศาสตร์ของโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์

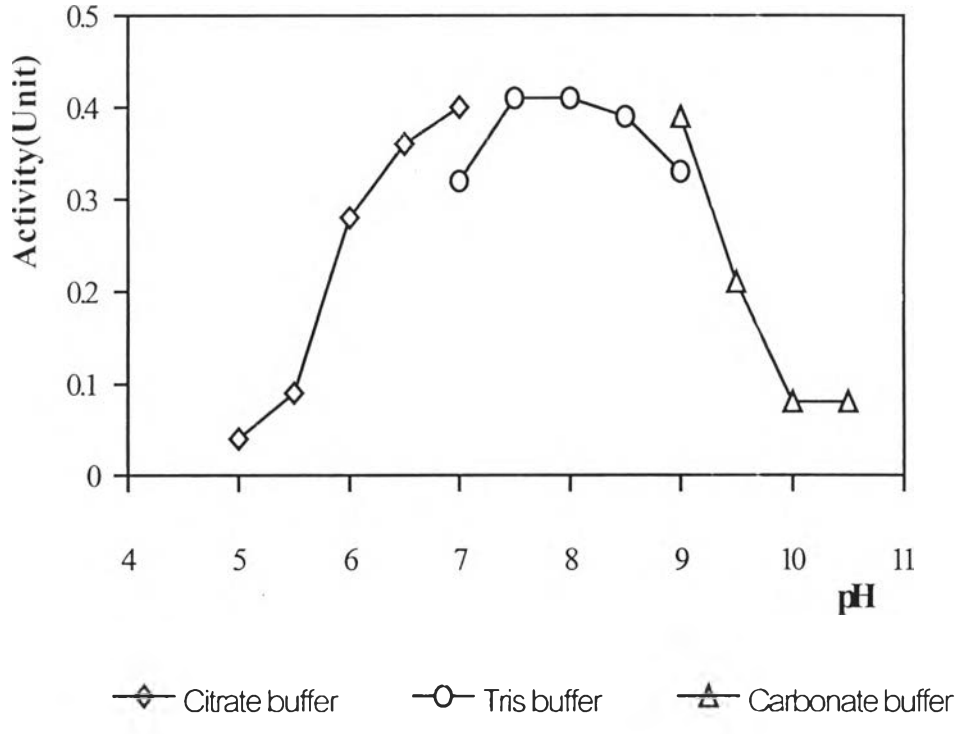
จากการศึกษาจลนศาสตร์ของโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* จากการไฮโดรไลส์สับสเตรตธรรมชาติ hemoglobin, BSA และ casein นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} โดยวิธี Lineweaver-Burk ได้ผลดังแสดงดังรูปที่ 10, 11 และ 12 ตามลำดับ โดยทำการวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 60 ° ซ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.7 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4



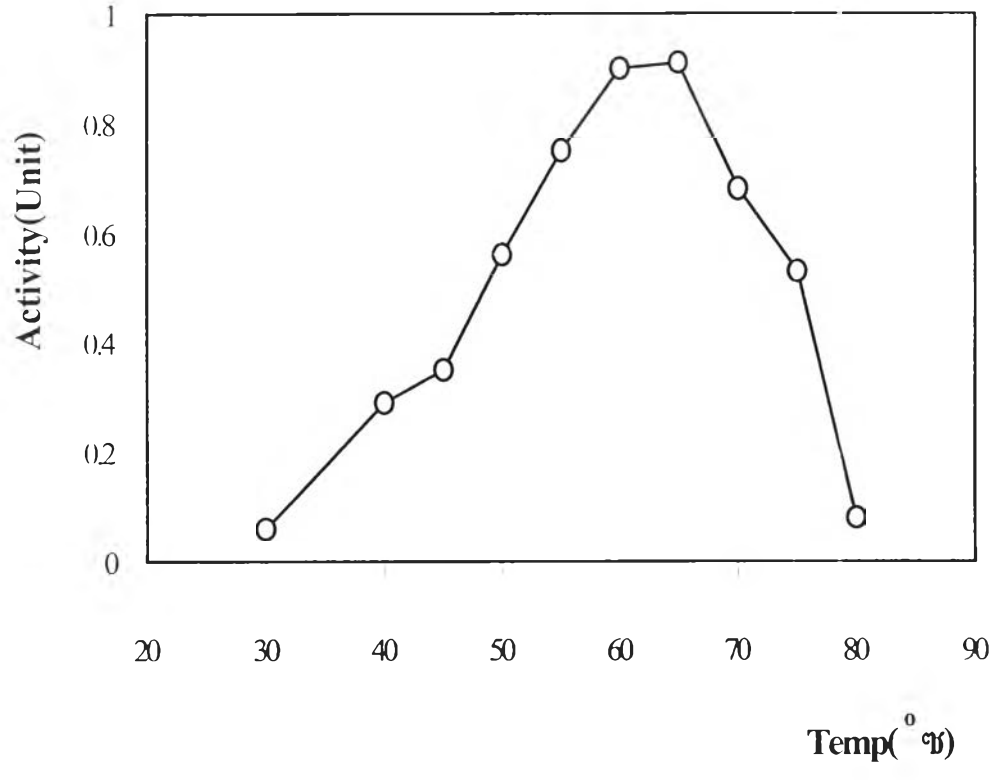
รูปที่ 6 ผลของ pH ต่อความเสถียรของโปรติเอส *Agave sisalana* เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิคงที่ ที่อุณหภูมิห้อง ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตท pH 4.8 , สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 6.5 และสารละลายบัฟเฟอร์ทริส pH 8.3 ที่เวลาต่าง ๆ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.4



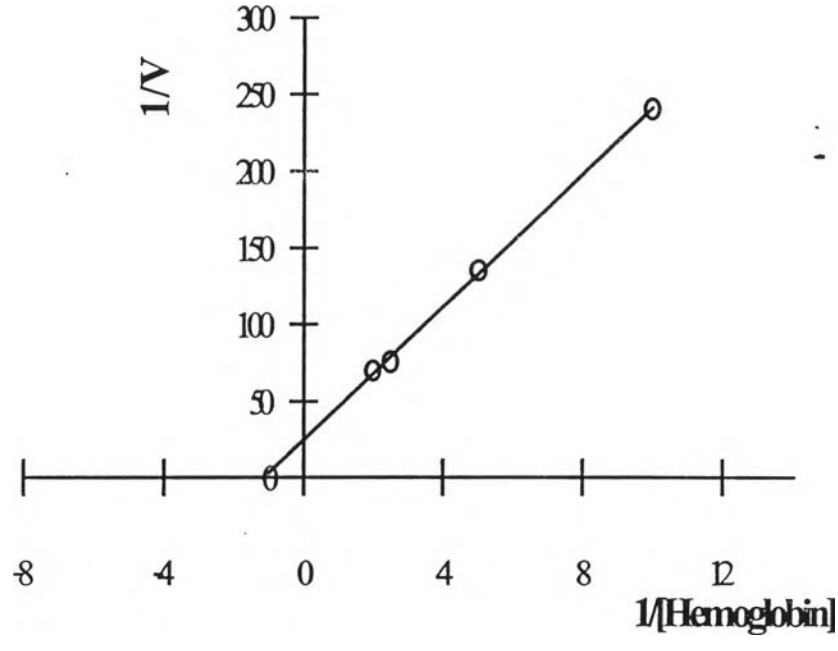
รูปที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของโปรติเอส *Agave sisalana* โดยบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส pH 7.5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆเป็นเวลา 30 นาที วัดแอคติวิตีที่ 60 ° ซ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.6



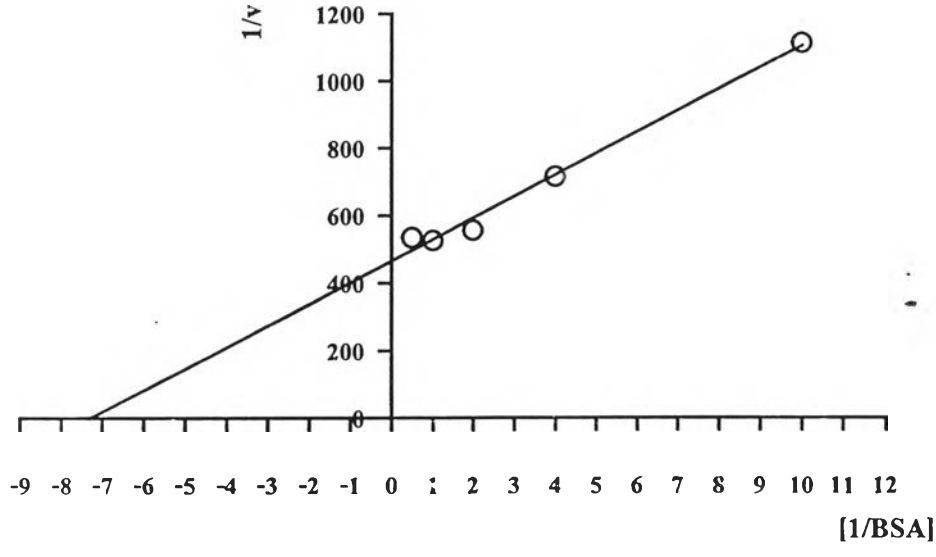
รูปที่ 8 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของโปรติเอส *Agave sisalana* วัดแอคติวิตีที่ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 5.0-10.5 ที่อุณหภูมิ 60 °ซ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3



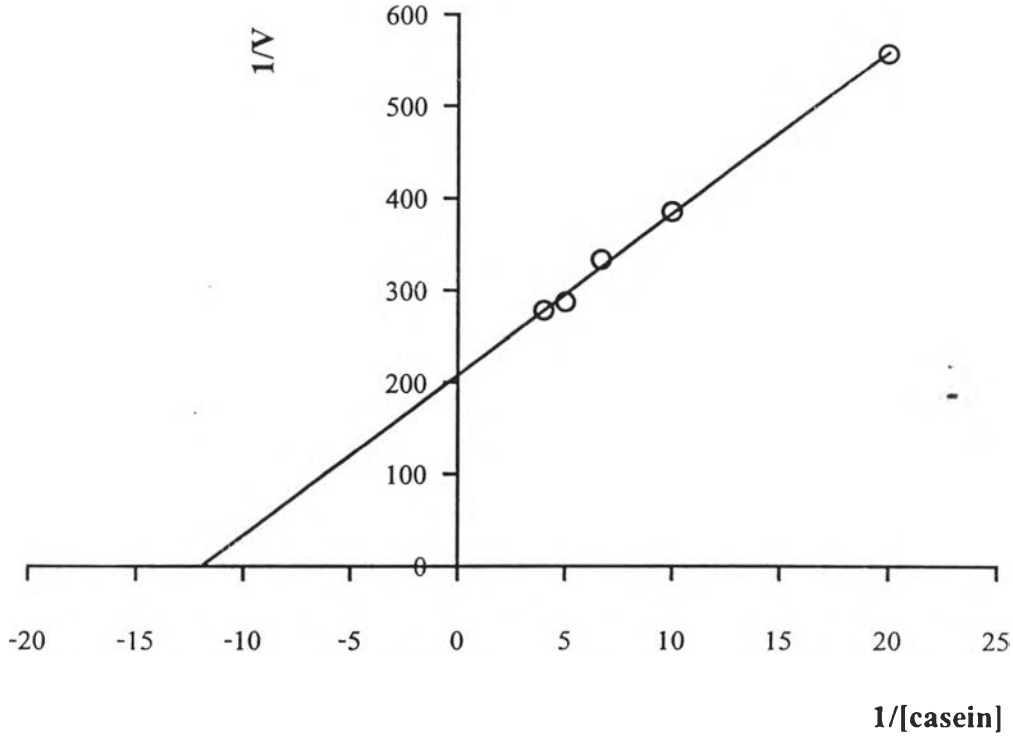
รูปที่ 9 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของโปรติเอส *Agave sisalana* วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-80 °ซ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.5



รูปที่ 10 Lineweaver-Burk plot **ของโปรติเอส เมื่อใช้** hemoglobin เป็นสับสเตรต ทำการวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 60 ° ซ pH 7.5 ตามวิธีในข้อ 3.3.7



รูปที่ 11 Lineweaver-Burk ของโปรติเอส เมื่อใช้ BSA เป็นสับสเตรต ทำการวัดแอคติวิตี ที่อุณหภูมิ 60 ° ซ pH 7.5 ตามวิธีในข้อ 3.3.7



รูปที่ 12 Lineweaver-Burk **ของโปรติเอส เมื่อใช้** casein **เป็นสับสเตรต ทำการวัดแอคติวิตี** ที่อุณหภูมิ 60 ° ซ pH 7.5 ตามวิธีในข้อ 3.3.7

ตารางที่ 4 สรุปค่า K_m และ V_{max} ของโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* เมื่อใช้สับสเตรตต่างๆ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.7

Substrate	Kinetic parameters.	
	K_m (% w/v)	V_{max}(ΔOD/min)
hemoglobin	0.877	0.040
BSA	0.161	0.002
casein	0.084	0.005

K_m ของสับสเตรต ทั้งหมด มีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก

V_{max} มีหน่วยเป็น OD/min ของเอนไซม์

4.3.5 ผลของอิออนของโลหะและตัวยับยั้งต่อแอคติวิตีของโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์

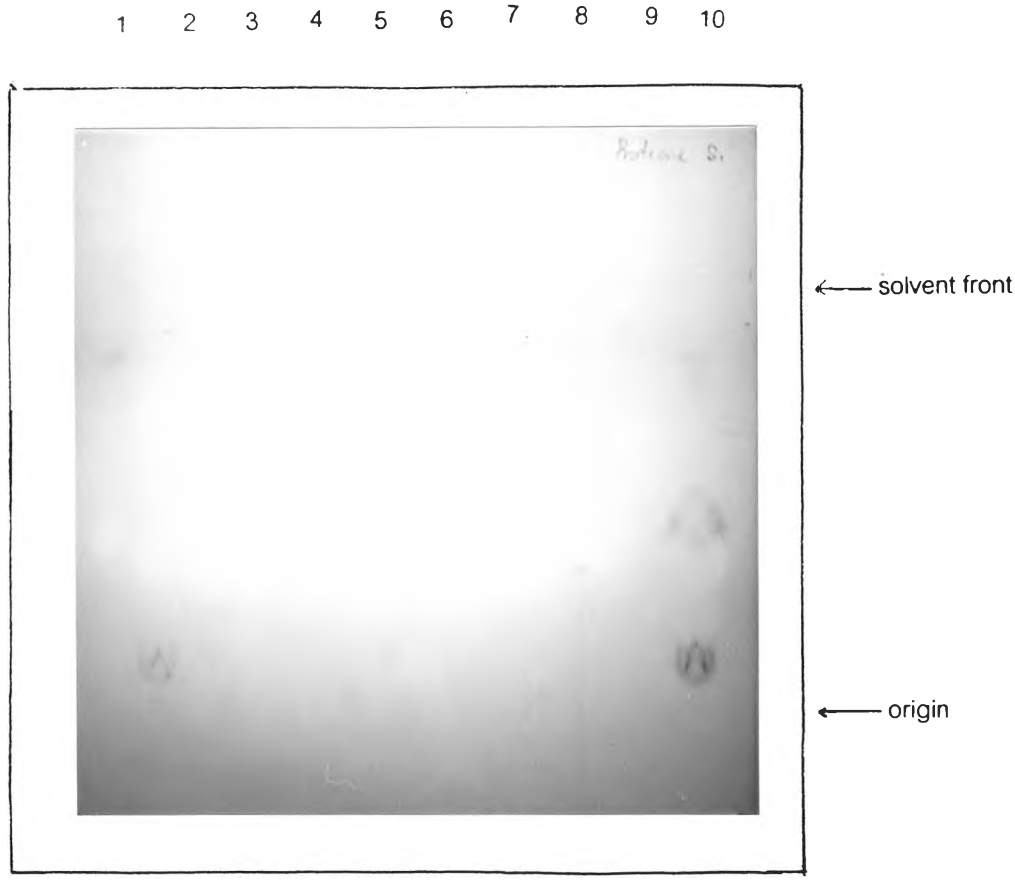
นำเอนไซม์ไปบ่มตามวิธีการทดลองที่ 3.3.8.1 และ 3.3.8.2 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5 พบว่า $MnCl_2$ $CdCl_2$ $HgCl_2$ *p*-chloromercuribenzoic acid, phenylmethylsulfonylfluoride และ iodoacetamide มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ โดยให้ค่า relative activity ลดลงในขณะที่ $Na_2S_2O_5$, dithiothreitol และ 2- mercaptoethanol กระตุ้นให้แอคติวิตีของโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์สูงขึ้นขณะที่ $CaCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, EDTA, 1,10 phenantroline ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

4.3.6 ความจำเพาะของโปรตีเอสต่อเปปไทด์สังเคราะห์

เมื่อทำการทดลองศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตสังเคราะห์คือใช้ *p*-nitroaniline, อะลานีน, วาลีน และอาร์จีนีน เป็นสารมาตรฐาน และใช้โปรติเอสจาก *Streptomyces geceus* เป็นตัวควบคุม ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13, 14, 15 และ 16 เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่า Rf ดังตารางที่ 6 พบว่าโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ ไม่สามารถย่อย NBz-Val-Gly-Arg-pNA แต่สามารถย่อย N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA ได้ผลิตภัณฑ์คือ *p*-nitroaniline แสดงตำแหน่งการย่อยดังรูปที่ 17

ตารางที่ 5 แสดงผลของสารเคมีต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของโปรติเอส

Chemical	Relative Activity (%)	
	1 mM	5 mM
Control	100	100
$CaCl_2$	113.01	99.02
$CuCl_2$	97.68	50.19
$ZnCl_2$	95.56	71.66
$MnCl_2$	7.06	0
$CdCl_2$	1.82	3.12
$HgCl_2$	0	9.94
EDTA	104.24	112.61
$Na_2S_2O_5$	150.26	340.52
Phenylmethylsulfonylfluoride	29.06	13.06
1,10 Phenantroline	90.66	89.50
Dithiothreitol	229.52	245.55
2-Mercaptoethanol	166.20	180.86
p-Chloromercuribenzoic acid	0	0
Iodoacetamide	0	0



รูปที่ 13 การทำโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเมื่อใช้ NBz-Val-Gly-Arg pNA เป็นสับสเตรตย่อยด้วยโปรติเอสจาก *Streptomyces griseus*

lane 1 สารมาตรฐาน *p*-nitroaniline

2. สารมาตรฐาน arginine

3. สารมาตรฐาน glycine

4. สารมาตรฐาน valine

5. blank (0.05 M Tris-HCl pH 7.5 + 10% (v/v) dimethylformamide)

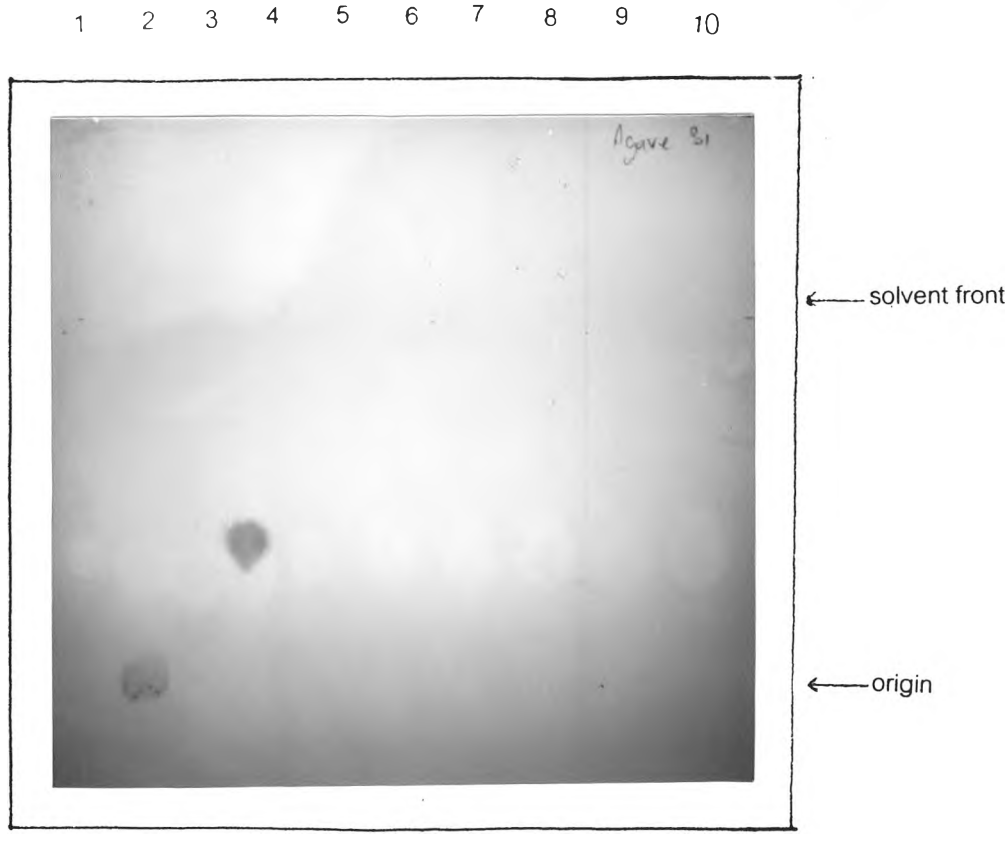
6. protease

7. boiled protease

8. NBz-Val-Gly-Arg pNA

9. boiled protease + NBz-Val-Gly-Arg pNA

10. protease + NBz-Val-Gly-Arg pNA



รูปที่ 14 การทำโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเมื่อใช้ NBz-Val-Gly-Arg pNA เป็นสับสเตรตย่อยด้วยโปรติเอสจาก *Agave sisalana*

lane 1. สารมาตรฐาน *p*-nitroaniline

2. สารมาตรฐาน arginine

3. สารมาตรฐาน glycine

4. สารมาตรฐาน valine

5. blank (0.05 M Tris-HCl pH 7.5 + 10% (v/v) dimethylformamide)

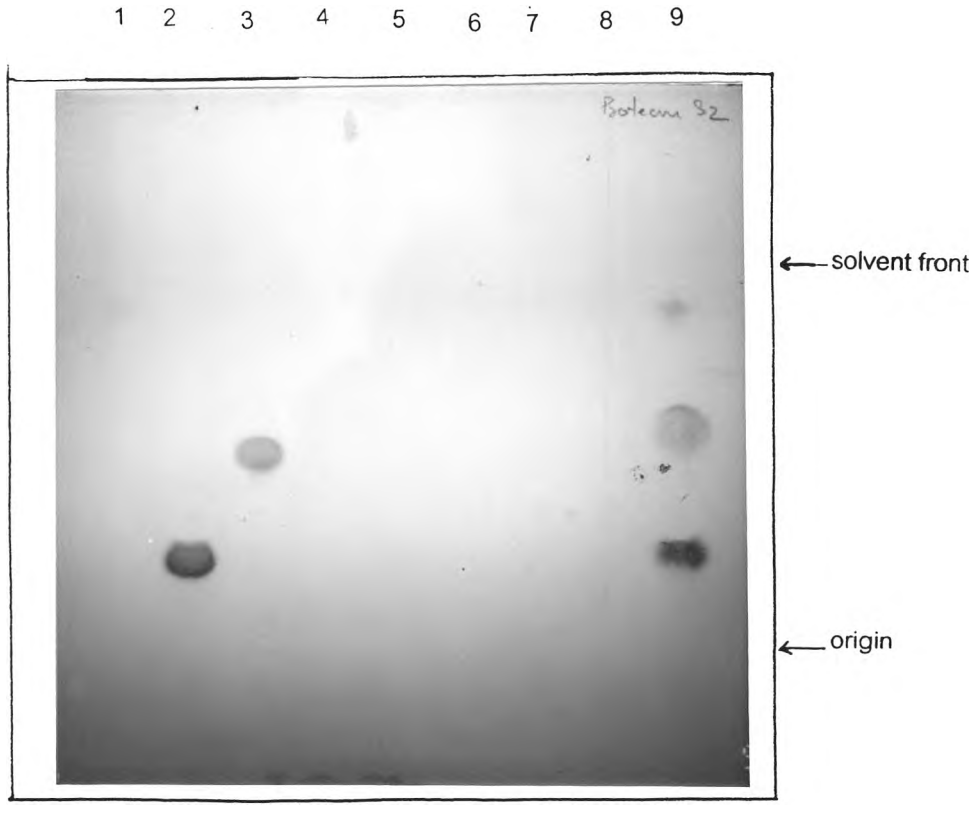
6. protease

7. boiled protease

8. NBz-Val-Gly-Arg pNA

9. boiled protease + NBz-Val-Gly-Arg pNA

10. protease + NBz-Val-Gly-Arg pNA



รูปที่ 15 การทำโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเมื่อใช้ N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA เป็นสับสเตรตย่อยด้วยโปรติเอสจาก *Streptomyces griseus*

lane 1. สารมาตรฐาน *p*-nitroaniline

2. สารมาตรฐาน alanine

3. สารมาตรฐาน Leucine

4. blank (0.05 M Tris-HCl pH 7.5 + 10% (v/v) dimethylformamide)

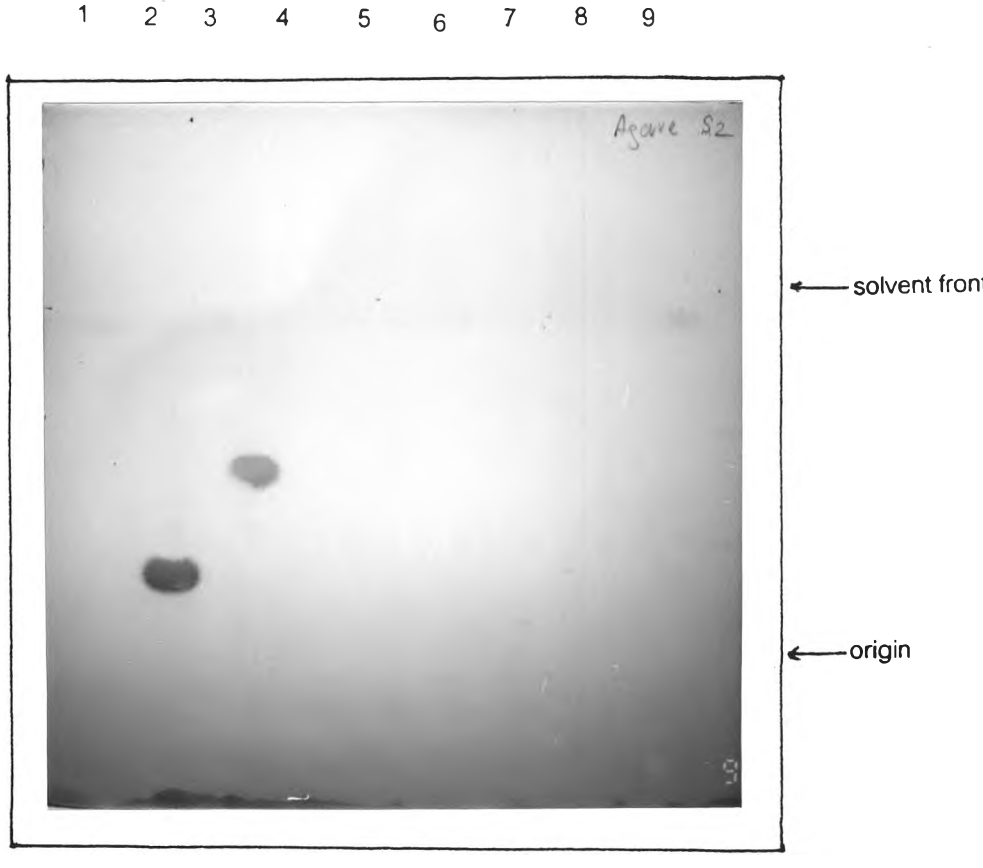
5. protease

6. boiled protease

7. N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA

8. boiled protease + N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA

9. protease + N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA



รูปที่ 16 การทำโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเมื่อใช้ N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA เป็นสับสเตรต ย่อยด้วยโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana*

lane 1. สารมาตรฐาน *p*-nitroaniline

2. สารมาตรฐาน alanine

3. สารมาตรฐาน Leucine

4. blank (0.05 M Tris-HCl pH 7.5 + 10% (v/v) dimethylformamide)

5. protease

6. boiled protease

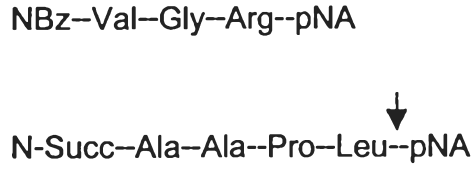
7. N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA

8. boiled protease + N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA

9. protease + N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA

ตารางที่ 6 ค่า R_f ของจุดบนแผ่น TLC ของสารมาตรฐาน และ ผลิตภัณฑ์จากการย่อย ของเอนไซม์ ตามวิธีข้อ 3.3.13

Standard amino acids or enzyme hydrolysates	Rf
p-Nitroaniline	0.90
Arg	0.10
Ala	0.27
Gly	0.23
Val	0.43
Leu	0.55
NBz-Val-Gly-Arg-pNA ที่ย่อยด้วยโปรติเอสจาก *Streptomyces gecius*	0.10, 0.23, 0.43, 0.90
NBz-Val-Gly-Arg-pNA ที่ย่อยด้วยโปรติเอสจาก *Agave sisalana*	-
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA ที่ย่อยด้วยโปรติเอสจาก *Streptomyces gecius*	0.27, 0.55, 0.90
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA ที่ย่อยด้วยโปรติเอสจาก *Agave sisalana*	0.90



รูปที่ 17 ความจำเพาะในการไฮโดรไลส์เปปไทด์สับสเตรตของโปรติเอสจาก ป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* (ลูกศรแสดงพันธะที่เอนไซม์สามารถตัดได้)