บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สกัดแยกเอนไซม์โปรติเอสจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* ในงานวิจัยนี้ได้ปรับปรุงจากวิธีการสกัดแยกโปรติเอสจาก *Agave Americana Variegata* (Du Toit, 1975) โดยการเติม 2% polyvinylpyrrolidone (Scopes, 1975) เพื่อทำการดูดซับสารประกอบพวกฟีนอล (phenolic compound) ซึ่งส่วนมากพบในพืชและพบว่าสามารถแยกสารกลุ่มนี้ออกไปได้ในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ได้ทดลองทำการตกตะกอนด้วย 70% แอลกอฮอล์ไม่แสดงผลการทดลองซึ่งเป็นการกำจัดพิกเมนต์อีกทางหนึ่งแต่ปรากฏว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สูญเสียไปเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับการแยกโปรติเอสจาก *Agave sisalanus* ที่แอคติวิตีจะสูญเสียไปจำนวนมากเช่นกัน เมื่อใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงตัดขั้นตอนนี้ออกและใช้การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน (Tipton, 1965)โดยขั้นแรกตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 0-25 % พบว่าโปรติเอส ตกตะกอนออกมาเป็นปริมาณน้อยมาก และสามารถกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่มีแอคติวิตีของโปรติเอสออกไปได้บางส่วน จากนั้นจึงนำมาตกตะกอนต่อด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเป็น 25-80 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีโปรติเอสตกตะกอนออกมาในส่วนนี้โดยมีแอคติวิตีรวมคิดเป็น 39.12 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.30 เท่า (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2) จากนั้นจึงนำตะกอนของเอนไซม์ที่ได้ไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ และทำการไดอะไลซ์เพื่อกำจัดเกลือที่ใช้ในการตกตะกอนออก ใช้หลักการแยกโปรตีนตามขนาดโดยใช้เยื่อบางที่มีรูเล็กๆ เมื่อบรรจุสารละลายโปรตีนที่ได้จากการละลายตะกอนแล้วนำไปแช่ในบัฟเฟอร์ สารใดก็ตามที่มีขนาดเล็กกว่ารูของเยื่อก็จะแพร่ออกมาจากถุง ส่วนสารละลายใดที่มีขนาดใหญ่กว่าจะไม่สามารถแพร่ผ่านรูของเยื่อได้ จึงถูกเก็บไว้ในถุง จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้วัดปริมาตร วัดปริมาณโปรตีนและนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโตกราฟี

การทำเอนไซม์โปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่ใช้หลักการแยกตามขนาดของโปรตีนด้วยตัวกลางที่มีรูพรุน (gel matrix) สารละลาย

โปรตีนใดที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าก็จะออกมาก่อน ส่วนสารละลายโปรตีนใดที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนก็จะสามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนทำให้ใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์มากกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ จากการใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 สามารถแยกโปรติเอสจาก *Agave sisalana* ออกจากโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่มีขนาดใหญ่ใน พีค I และ ขนาดเล็กใน พีค III เมื่อนำไปตรวจสอบแอคติวิตี มีเพียงพีค II เท่านั้นที่มีแอคติวิตีของโปรติเอส ในขณะที่อีกสองพีคไม่มีแอคติวิตี ผลผลิตในขั้นตอนนี้สูงถึง 189.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นไปได้ว่ามีการกำจัดเอาตัวยับยั้งของโปรติเอสออกไปและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์สูงขึ้นมากถึง 24.24 เท่า เนื่องจากสามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกไปได้ 2 ใน 3 ส่วน

มีรายงานการใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 แยกโปรติเอสจาก *Agave sisalana*_(Tipton, 1964), Sephadex G-200 และ Sephadex G-75 แยกโปรติเอสจาก *Agave americana variegata* (Du Toit, 1975) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 แสดงดังตารางที่ 7 จะเห็นว่าเอนไซม์จาก *Agave sisalana* จากการทดลองเมื่อผ่านคอลัมน์นี้จะให้ผลผลิตมากกว่าสายพันธุ์อื่น เพราะโปรติเอสจาก *Agave sisalanus* นอกจากสาเหตุข้างต้นแล้วอาจเป็นไปได้ว่าโปรติเอสต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ ตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ตามด้วยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จึงจะนำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ในขณะที่ *Agave americana variegata* ก็ผ่านหลายขั้นตอนเช่นเดียวกันได้แก่ ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วตามด้วยตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose จากการที่ผ่านหลายขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ของทั้งสองสายพันธุ์จึงทำให้มีการสูญเสียผลผลิตไป ในขณะที่ป่านศรนารายณ์ที่ใช้ในการทดลองทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมแล้วผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ทันทีจึงทำให้ลดขั้นตอนในการสูญเสียผลผลิตแต่ความบริสุทธิ์จะน้อยกว่า *Agave americana variegata* เพราะมีขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์มากกว่า

จากการศึกษาแยกโปรติเอสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นในงานวิจัยนี้ได้ใช้คอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส ซึ่งอาศัยความแตกต่างของประจุในโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งสารตัวกลางที่ใช้แยกนี้มีประจุเป็นบวก เมื่อผ่านสารละลาย โปรติเอสจากคอลัมน์ Sephadex G-100 ลงไป พบว่ามีพีคโปรตีน 2 พีค โดยพีค I จะออกมาพร้อมกับสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการชะแสดงว่าโปรติเอสนี้ไม่จับกับคมลัมน์ และ พีค II ถูกชะด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะ เมื่อนำไปตรวจ

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel filtration chromatography

สายพันธุ์	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก. โปรตีน)	ผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ชนิดเจล
Agave sisalana	4.120	189.27	24.24	Sephadex G-100
Agave sisalanus (Tipton, 1964)	1.540	92.90	3.85	Sephadex G-100
Agave americana variegata (Du Toil, 1974)	0.365	41.70	470	Sephadex G-200
	0.400	38.90	565	Sephadex G-75

สอบแอคติวิตีมีเพียง พีค I เท่านั้นที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส และเมื่อนำโปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และเมื่อนำโปรติเอสที่ได้จากการทดลองมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตร-โฟเรซีสแบบไม่เสียสภาพพบว่าโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากขั้นตอนแรกจนถึงการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส มีแถบโปรตีนเกิดขึ้นอย่างน้อย 2 แถบ ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันแถบที่เป็นโปรติเอสด้วยการย้อมแอคติวิตีของโปรติเอส โดยใช้วิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซีสแบบไม่เสียสภาพ โดยให้เจลมีความเข้มข้นของเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 220 โวลท์ อุณหภูมิ 4 °ซ แล้ว หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 60 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาย้อมด้วยสารละลาย protein staining สังเกตแถบใสที่เกิดขึ้น ในการทดลองนี้ได้ใช้ตัวควบคุมคือโปรติเอสจาก *Streptomyces geceus* โดยใช้ปริมาณที่ใส่ลงไป 20 ไมโครกรัม และโปรติเอสที่ได้จาการทดลองใส่โปรตีนลงไป 20 ไมโครกรัม ผลการทดลองแสดง ดังรูปที่ 3 จะเห็นแถบโปรตีนที่ตรงกับแถบแอคติวิตีซึ่งเป็นแถบใสเนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีโปรติเอสอยู่ ดังนั้นเมื่อนำไปบ่มในภาวะที่เหมาะสมก็สามารถย่อยเคซีนที่อยู่ในเจลได้และเมื่อนำไปย้อมด้วยสีโปรตีนบริเวณที่ถูกย่อยก็จะไม่ติดสีน้ำเงินจึงเป็นแถบใส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแถบที่แสดงแอคติวิตีของโปรติเอสมีค่า Rf เป็น 0.1

เมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสจาก *Agave sisalana* โดยวิธีเจลฟิลเตรชันซึ่งแยกตามขนาดของโปรตีนที่ยังไม่เสียสภาพโดยอาศัยการผ่านรูเล็กๆ ของตัวยึด สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 21,800 ดาลตัน ดังนั้นในงานวิจัยของทั้งสองแหล่งจึงหาในรูปของการตกผลึกแล้วจึงนำไปผ่านกระแสไฟฟ้า โดยน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสจาก *Agave sisalanus* น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 52,500 ดาลตัน และโปรติเอสจาก *Agave americana variegata* มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดาลตัน (Du toil, 1974) พบว่าโปรติเอสที่ได้จากการทดลองมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าทั้งสองสายพันธุ์ประมาณเกือบสามเท่า ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นจากสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนไปจะเข้ามามีอิทธิพลอย่างมาก ดังนั้น *Agave sisalanus* ที่ปลูกในประเทศไทยจึงอาจมีความต่างกันได้ เนื่องจากได้นำพืชชนิดนี้จากบราซิลมาปลูกในประเทศไทยมากกว่า 60 ปี จึงเป็นไปได้ที่สิ่งแวดล้อมจะเป็นตัวเลือกให้สายพันธุ์ที่มี โปรติเอสนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเปลี่ยนไปเนื่องจากภาวะในการเจริญที่แตกต่างกันในแต่ละถิ่นที่ใช้ปลูก เช่น อุณหภูมิ อาหาร และ ความชื้น เป็นต้น (Garduce, 1975) ซึ่งอาจจะมีผลทำให้รูปแบบของโปรตีนที่ได้มีลักษณะแตกต่างกันด้วยอาจจะเป็นไปได้ว่าโปรติเอสที่ได้จาการทดลองที่ผ่านคอลัมน์

Sephadex G-100 เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลนั้นอาจจะมีค่า *Kav* ที่ผิดไป เพราะอาจเกิดระหว่างอิเลคโตสตาติกระหว่างคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในโปรติเอสกับคาร์โบไฮเดรตที่อยู่บนตัวเจลโดยมีรายงานว่า โปรติเอสจาก *Agave americana variegata* มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโปรติเอส *Agave sisalanus* จากการทดลองเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein)

ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* สามารถทำงานได้ดีเมื่อใช้สารละลายเคซีนเป็นสับสเตรตในช่วง pH 7.5-8.0 สำหรับผลการศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อความเสถียร ในช่วง pH ประมาณ 8.3 สำหรับผลการศึกษาอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการทำงานของโปรติเอสจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-65 ° ซ ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ทั่ว ๆ ไป และผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อความเสถียรพบว่าโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์นี้ มีความเสถียรที่อุณหภูมิ ประมาณ 50 ° ซ เหมือนกับเอนไซม์อื่น ๆ โดยทั่ว ๆไป และเมื่อทำการเปรียบเทียบอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมและความเสถียรของโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 9 จะเห็นว่า pH ที่เหมาะสมของโปรติเอสที่ได้จากการทดลองประมาณ 7.5-8.0 ซึ่งคล้ายกับ โปรติเอสจากอีกสองสายพันธุ์ ซึ่งแสดงว่าโปรติเอสที่ได้อาจเป็น แอลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) และยังสามารถทำงานได้ในที่อุณหภูมิสูงซึ่งแตกต่างจากอีก สองสายพันธุ์

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์โปรติเอสจากป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* โดยใช้สับสเตรตจากธรรมชาติ 3 ตัวคือ hemoglobin ซึ่งเป็น functional protein ที่สำคัญของระบบเลือด มีลักษณะเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ มีโครงสร้างจตุรภูมิ (quateranary structure) ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยเรียงตัวกันแบบจตุรมุข (trtrahedral) BSA และ casein เป็นโปรตีนชนิดก้อนกลม (globular protein) พบว่า casein ให้ค่า K_m ต่ำสุด สูงขึ้นมาเป็น BSA และ hemoglobin ตามลำดับ แสดงว่า เอนไซม์จับกับ casein ได้ดีกว่า BSA และ hemoglobin ซึ่งคล้ายกับโปรติเอสจาก *Agave americana variegata* ที่มีความจำเพาะต่อ casein มากที่สุด (Du Toil, 1974)

ศึกษาผลของสารเคมีต่าง ๆต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้สารเคมีแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองพบว่า iodoacetamide, *p*-chloromercuribenzoate ซึ่งเป็นสาร

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของ ป่านศรนารายณ์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	**อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)**	**อุณหภูมิที่เสถียร (องศาเซลเซียส)**	pH **ที่เหมาะสม**	pH **ที่เสถียร**
Agave sisalana	60-65	20-40	7.5-8.0	8.3
Agave sisalanus (Tipton, 1964)	37	25	7.2	4.8
Agave americana variegata (Du Toit, 1974)	37	25	7.8-8.0	5.2

เคมีซนิดที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ ซัลไฮดริล (-SH) ของกรดอะมิโน สารเคมีนี้มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นทั้งสองอย่างชัดเจน แสดงว่าโปรติเอสจากป่านศรนารายณ์นี้ น่าจะเป็น cystein protease หรือ sulfhydryl protease และโปรติเอสนี้ถูกยับยั้งด้วยสาร PMSF แสดงว่ามีกรดอะมิโนซีรีนเป็นส่วนสำคัญที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน แต่เอนไซม์นี้ไม่มีผลต่อการยับยั้งโดย EDTA และ 1,10 phenantroline แสดงว่า เอนไซม์นี้ไม่ใช่ metallo proteinases มีรายงานว่าโปรติเอส *Agave americana variegata* ไม่สามารถยับยั้งด้วย TosPheCH_2Cl แสดงว่าเป็น serine alkaline protease และไม่สามารถยับยั้งด้วย EDTA แสดงว่าไม่เป็น metallo protease (Du toil, 1974) และในทำนองเดียวกันโปรติเอสที่ได้จากการทดลองไม่เป็น metallo protease

ในการศึกษาผลของอิออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์พบว่า $CdCl_2$ และ $HgCl_2$ เท่านั้นที่แสดงการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการเกิดคีเลทกับบริเวณเร่งในการเร่งปฏิกิริยา และสารเคมีที่มีผลต่อการกระตุ้นในเร่งปฏิกิริยาได้แก่ $Na_2S_2O_5$ dithiothreitol และ 2-mercaptoethanol ซึ่งสารข้างต้นมีคุณสมบัติการเป็นสารรีดิวซ์ที่ดี ซึ่งสารเคมีเหล่านี้จะเข้าไปตัดตรงตำแหน่ง disulfide bond ของสายเปปไทด์ให้เป็น ซัลไฮดริลกรุ๊ป (–SH) ที่ว่องไวในการเร่งปฏิกิริยา (Stryer, 1988)

ในการศึกษาความจำเพาะในการไฮโดรไลส์เปปไทด์สังเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางนั้น ได้ใช้เปปไทด์สังเคราะห์ 2 ชนิดเท่านั้น คือ Nbz-Val-Gly-Arg-pNA และ N-succ-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA ดังนั้นการทดลองนี้อาจจะไม่สมบูรณ์นักในผลของการทดลอง

เมื่อใช้เปปไทด์ Nbz-Val-Gly-Arg-pNA เป็นสับสเตรตบ่มด้วยโปรติเอส เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสับสเตรตตัวนี้เลยได้เลยได้โดยทำการเปรียบเทียบกับโปรติเอสจาก *Streptomyces gecius* ซึ่งเป็น serine protease ดังนั้นจึงสามารถย่อยเปปไทด์ดังกล่าวได้สังเกตจากผลการทำ TLC ให้จุดหลังจากการพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินให้ค่า R_f ที่ตรงกับตัวกรดอะมิโนมาตรฐาน และเมื่อใช้เปปไทด์ N-succ-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA เป็นสับสเตรตบ่มด้วยโปรติเอสนี้สามารถตัดปลาย คาร์บอกซิลของ Leu ได้ให้ pNA อิสระแสดงเป็นจุดสีเหลืองที่จุดปลายของแผ่น TLC โดยศึกษาเปรียบเทียบกับโปรติเอสจาก *Streptomyces gecius* ซึ่งเป็น serine protesae มีรายงานว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อ large alophatic side chain และ aromatic side chain (Sachdev, 1994) ดังนั้นจึงสามารถย่อยเปปไทด์ดังกล่าวได้สังเกตจากผล TLC ให้จุดหลังจากการพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน

ให้ค่า R_f ที่ตรงกับตัวกรดอะมิโนมาตรฐาน และจากรายงานของโปรติเอสจาก *Agave americana variegata* นั้นสามารถย่อยสับสเตรตที่กรดอะมิโนตัวแรกเป็น aromatic amino acid และ branch amino acid ดังนั้นจึงสอดคล้องกับโปรติเอสที่ได้จากการทดลองที่สามารถย่อยกรดอะมิโนที่เป็น branch amino acid ระหว่าง Leu กับ pNA ได้

สรุปผลการทดลอง

1. นำสารละลายสกัดจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 25.41 เท่า และให้ผลผลิต 185.61 เปอร์เซ็นต์
2. โปรติเอสที่แยกได้นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21,800 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี
3. โปรติเอสจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* นี้ มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนที่ pH 7.5-8.0 และความเสถียรของเอนไซม์ที่ pH 8.3
4. โปรติเอสจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* นี้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนที่ 60-65 $^{\circ}$ ซ และความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 20-40° ซ
5. เมื่อศึกษาทางด้านจลนศาสตร์ พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* นี้มีค่าแอฟฟินิตีต่อสับสเตรต เรียงลำดับดังนี้ casein>BSA>hemoglobin
6. โปรติเอสจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* สามารถถูกยับยั้งแอคติวิตีด้วยสารเคมีดังต่อไปนี้ $CdCl_2$, $HgCl_2$, *p*-chloromercuribenzoic acid และ iodoacetamide
7. โปรติเอสจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* สามารถถูกกระตุ้นแอคติวิตีด้วยสารเคมีดังต่อไปนี้ $Na_2S_2O_5$, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol
8. โปรติเอสจากใบป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* มีความจำเพาะต่อปลายด้าน C ของกรดอะมิโนที่เป็น Leu