สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อ	ง
Abstract	จ
สารบาญตาราง	ฐ
สารบาญภาพ	ต
รายการอักษรย่อ	น
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2 โปรติเอส	4
1.2.1 การจำแนกประเภท	4
1.2.2 ประโยชน์ของโปรติเอส	9
1.2.3 การหาแอคติวิตีของโปรติเอส	10
1.2.4 การยับยั้งของโปรติเอส	11
1.2.5 อิทธิพลของไอออนโลหะต่อแอคติวิตีของโปรติเอส	11
1.3 การไฮโดรไลส์โปรตีนโดย Trinitrobenzenesulfonic acid	13
1.4 การทำบริสุทธิ์และการตรวจสอบโปรติเอส	16
1.5 วัตถุประสงค์การวิจัย	24
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 สารเคมีและอุปกรณ์	26
2.1.1 สารเคมี	26
2.1.2 จุลินทรีย์	29
2.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	29
2.2 วิธีการทดลอง	30
2.2.1 การเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสสูงสุด	30
2.2.1.1 การเจริญเติบโตและการผลิตโปรติเอสของ F13, TLS43 และ P2	31
2.2.1.2 วิธีหาแอคติวิตีโปรติเอสโดยการไฮโดรไลส์เอโซเคซีน	31
2.2.1.3 วิธีหาแอคติวิตีโปรติเอสโดยการไฮโดรไลส์เคซีน	32

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

หน้า

2.2.2 วิธีตรวจรูปร่างลักษณะและชนิดกรัมของแบคทีเรีย F13 33
2.2.3 การทำบริสุทธิ์โปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 34
2.2.3.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford 34
2.2.3.2 วิธีทำสารละลายโปรติเอสให้แห้งโดยวิธีไลโอฟิไลเซชัน 36
2.2.3.3 ไดอะไลซีส 36
2.2.3.4 การทำบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยคอลัมน์ Sephadex 36
2.2.4 การศึกษาสมบัติของโปรติเอส 39
2.2.4.1 วิธีเตรียมสารละลาย 40
2.2.4.2 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม 42
2.2.4.3 ผลของตัวยับยั้ง 42
2.2.4.4 ผลของไอออน 44
2.2.4.5 ความจำเพาะต่อ BAPNA 44
2.2.4.6 ความจำเพาะต่อ FAGLA 44
2.2.4.7 ความจำเพาะต่อเอสเทอร์ 46
2.2.4.8 การไฮโดรไลส์โปรตีนด้วยวิธี Trinitrobenzenesulfonic acid 46
2.2.5 การตรวจสอบมวลโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE 48
2.2.5.1 วิธีเตรียมสารละลาย 48
2.2.5.2 วิธีการทำอิเลคโตรฟอริซีส 50
2.2.5.3 การย้อมสีเจลโดยวิธี Silver staining 52
2.2.6 การตรวจสอบค่าไอโซอิเลคตริกโดยวิธีไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง 53
2.2.6.1 วิธีเตรียมสารละลาย 53
2.2.6.2 วิธีการทำไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง 54
2.2.7 การตรวจสอบค่าไอโซอิเลคตริกโดยวิธีโครมาโตรโฟคัสซิง 55
2.2.7.1 วิธีเตรียมสารละลาย 56
2.2.7.2 วิธีการทำโครมาโตรโฟคัสซิง 57
บทที่ 3 ผลการทดลอง 59
3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตโปรติเอส 59
3.1.1 การเจริญเติบโตของเทอร์โมไฟล์ 59

หน้า

3.1.2 การผลิตโปรติเอส 61

3.2 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ F13 65

3.3 การเตรียมโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 66

3.4 การทำบริสุทธิ์โปรติเอสที่ผลิตจาก F13 69

3.4.1 การเตรียมผงโปรติเอสดิบ 69

3.4.1.1 การหาแอคติวิตี 70

3.4.1.2 การหาปริมาณโปรตีน 71

3.4.2 การแยกโปรติเอสด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 73

3.4.3 การแยกโปรติเอสบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 75

3.4.3.1 การทำบริสุทธิ์โปรติเอส 76

3.4.3.2 การตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรติเอส 76

3.5 คุณสมบัติของโปรติเอส 82

3.5.1 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม 82

3.5.2 ผลของตัวยับยั้ง 82

3.5.3 ผลของไอออน 85

3.5.4 ความจำเพาะต่อสับสเตรท 86

3.5.4.1 N-α-Benzoyl -DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) 87

3.5.4.2 3-(-2-Furylacryloyl)-glycyl-L-leucine amide (FAGLA) 88

3.5.4.3 เอสเทอร์ 90

3.5.4.4 การไฮโดรไลส์โปรตีนโดย TNBS 92

3.6 การตรวจสอบมวลโมเลกุลโดย SDS-PAGE 98

3.7 จุดไอโซอิเลคตริก 99

3.7.1 ไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง 101

3.7.2 โครมาโตรโฟคัสซิง 103

บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 108

4.1 การผลิตโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 TLS 43 และ P2 108

4.2 การผลิตโปรติเอสโดยแบคทีเรีย F13 109

4.3 สมบัติของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 109

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

หน้า

4.4 การทำบริสุทธิ์โปรติเอส 113
4.5 สรุปผลการทดลอง 116
เอกสารอ้างอิง 118
ประวัติผู้เขียน 123

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

สารบาญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 การผลิตโปรติเอสและอุณหภูมิของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์	2
1.2 คุณสมบัติของโปรติเอสที่ผลิตจากเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรีย	2
1.3 การจำแนกชนิดของ Proteinase ตามความจำเพาะเบื้องต้น (aa = amino acid)	6
1.4 การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส	10
1.5 ตัวยับยั้งของโปรติเอสแต่ละชนิด	12
1.6 Kjeldahl conversion factors และ h_{tot} ของโปรตีนต่าง ๆ	15
1.7 ชนิดของ Sephadex และสมบัติที่ใช้ในการทำเจลฟิลเตรชัน	20
2.1 ส่วนประกอบของสารละลายตัวยับยั้งเอนไซม์	41
2.2 ส่วนประกอบของสารละลายตัวยับยั้งเพื่อศึกษาอิทธิพลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของโปรติเอส	43
2.3 ส่วนประกอบของสารละลายไอออนในการศึกษาอิทธิพลของไอออนต่อแอคติวิตีของโปรติเอส	45
3.1 การเจริญเติบโต (OD_{620}) และแอคติวิตีโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 TLS43 และ P2 ซึ่งเลี้ยงในสารละลายอาหารที่ 65°C	60
3.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานไทโรซีนในช่วงความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัม/ลบ.ซม.	63
3.3 แอคติวิตีของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 และ TLS43 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ที่ 65°C	64
3.4 การเจริญเติบโตของเซลล์และแอคติวิตีของโปรติเอสซึ่งได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.01%-1.0% ที่ 65°C	67
3.5 ปริมาณผงโปรติเอสดิบจากการทำไลโอฟิไลเซชัน	70
3.6 แอคติวิตีของสารละลายและผงโปรติเอสดิบที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในสารละลายอาหาร 1 ลิตร	70
3.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี Bradford	71

ตาราง หน้า

3.8 ปริมาณโปรตีนของผงโปรติเอสดิบที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในอาหาร 1 ลิตร 72
3.9 แอคติวิตีโปรติเอสและปริมาณโปรตีนจากของโปรติเอส F13 ที่แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 73
3.10 แอคติวิตีของโปรติเอสและปริมาณโปรตีนจากการทำบริสุทธิ์โปรติเอส F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 75
3.11 การทำบริสุทธิ์โปรติเอส F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 76
3.12 ค่า A_{280} และแอคติวิตีของโปรติเอสที่ได้จากการแยกสารละลายโปรตีนจาก F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 1.5x50 ซม. (ครั้งที่ 3) ซึ่งชะด้วย 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 5 mM $CaCl_2$ โดยเก็บ fraction ละ 2 ลบ.ซม. 77
3.13 แอคติวิตีของโปรติเอสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โปรติเอสที่ผลิตจาก F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3 78
3.14 ปริมาณโปรตีนจากการทำบริสุทธิ์โปรติเอสที่ผลิตจาก F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3 79
3.15 การทำบริสุทธิ์โปรติเอสที่ผลิตจาก F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 79
3.16 ค่า V_e/V_0 และ log ของมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ Sephadex G-75 80
3.17 มวลโมเลกุลของโปรติเอสบริสุทธิ์ที่ได้จากการอ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 81
3.18 แอคติวิตีของโปรติเอสที่อุณหภูมิและพีเอชต่าง ๆ 82
3.19 แอคติวิตีของโปรติเอสเมื่อมีตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ 84
3.20 เปอร์เซนต์แอคติวิตีที่ปรากฏเมื่อมีตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ 84
3.21 แอคติวิตีของโปรติเอสเมื่อมีไอออนชนิดต่าง ๆ 85
3.22 เปอร์เซนต์แอคติวิตีที่ปรากฏเมื่อมีไอออนชนิดต่าง ๆ 86
3.23 การเปลี่ยนแปลงของ A_{405} เนื่องจากแอคติวิตีของโปรติเอสชนิดต่าง ๆ 87
3.24 amidase activity ต่อ BAPNA ของโปรติเอสจาก F13, Alcalase, Metalloprotease type IX และทริปซิน ซึ่งมีแอคติวิตีต่อเอโซเคซีน 1 UA/ลบ.ซม. เหมือนกัน 88

ตาราง หน้า

3.25 แอคติวิตีต่อ 1 UA ของโปรติเอสจาก F13 โปรติเอสจาก S2 และ Metallo-protease type IX ในการไฮโดรไลส์ FAGLA 90
3.26 แอคติวิตีการไฮโดรไลส์ ATEE, ATpEE, BAEE, PME และ TAME โดยโปรติเอสจาก F13, Metalloprotease type IX, Alcalase และโปรติเอสจาก S2 93
3.27 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรของสารละลาย leucine มาตรฐานใน 1% SDS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 94
3.28 ปริมาณโปรตีนของสับสเตรทชนิดต่าง ๆ 96
3.29 ประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ โดยไลโอฟิไลส์โปรติเอส F13 สารละลายโปรติเอสจาก F13 และ Alcalase 97
3.30 ค่า Rm และ log ของมวลโมเลกุลของสารละลายโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ บน 10% Polyacrylamide gel จาก SDS-PAGE 99
3.31 มวลโมเลกุลของโปรติเอสบริสุทธิ์ที่ได้จาก SDS-PAGE 100
3.32 การเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานโดยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง 102
3.33 ค่า pI ของโปรติเอส I, II และ III โดยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง 103
3.34 แอคติวิตี, A_{280} และ pH ของสารละลายโปรติเอสบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์ polybuffer exchanger 94 (1.0x30 ซม.) 104
3.35 แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรติเอสบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยโครมาโตรโฟคัสซิง 106
3.36 ผลผลิตของสารละลายโปรติเอสที่แยกด้วยคอลัมน์ polybuffer exchanger 94 106
4.1 สมบัติต่าง ๆ ของโปรติเอสที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G100-120 111
4.2 มวลโมเลกุลของโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 115
4.3 pI ของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ซึ่งแยกด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิงและโครมาโตรโฟคัสซิง 116
4.4 สมบัติของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ที่แยกด้วยเจลฟิลเตรชัน 116

สารบาญภาพ

รูป		หน้า
1.1	ปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ในสารละลายน้ำและปฏิกิริยาการสร้างพันธะเปปไทด์ในสารละลายอินทรีย์โดยโปรติเอส	5
1.2	ปฏิกิริยาระหว่าง TNBS กับกลุ่มอะมิโนของโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการหาพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลส์โดยวิธี TNBS	14
1.3	การไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดต่าง ๆ โดย Alcalase ซึ่งใช้ความเข้มข้นของโปรตีน (S) = 8% ของ (Nx6.25) ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อโปรตีน (E/S) = 0.5% ที่อุณหภูมิ 50°C พีเอช 8.0	15
1.4	การไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดต่าง ๆ โดย Neutrase ซึ่งใช้ความเข้มข้นของโปรตีน (S) = 8% ของ (Nx6.25) ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อโปรตีน (E/S) = 2.0% ที่อุณหภูมิ 50°C พีเอช 8.0	15
1.5	กราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลโปรตีนที่ได้จากการทำเจลฟิลเตรชัน	20
1.6	โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ก) และโครมาโตโฟคัสซิง (ข)	21
1.7	การเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีค่า pI เท่ากับ 9 โดยโครมาโตโฟคัสซิงในคอลัมน์ที่มีพีเอช 8-10	21
1.8	กราฟมาตรฐานของโมเลกุลโปรตีนจากการทำ SDS-PAGE	23
2.1	แผนผังขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 และการทดสอบสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์	35
2.2 (ก)	การทำสารละลายโปรติเอสดิบให้แข็งตัวในขวด (1) ซึ่งหมุนอยู่ในสารละลายเอทานอลที่เย็นจัดในเครื่อง Freezer (2)	37
2.2 (ข)	การระเหิดน้ำออกจากสารละลายโปรติเอสดิบในระบบที่เป็นสูญญากาศของเครื่อง Lyophilizer ซึ่งมีสวิทช์ปิด-เปิดเครื่อง (1) ปุ่มให้เครื่องทำงาน (2) ปุ่มช่วยละลายน้ำแข็ง (3) จอแสดงอุณหภูมิและความดันของเครื่อง (4) ท่อสำหรับต่อเข้ากับขวดสารตัวอย่าง (5) และถาดสำหรับรองน้ำที่เกาะข้างขวดสารตัวอย่าง (6)	37
2.3	การไดอะไลส์สารละลายโปรติเอส (1) ซึ่งจะแพร่ผ่านถุงไดอะไลซีสเข้ามาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (2) โดยการกวนสารละลายบัฟเฟอร์ด้วย magnetic bar (3)	38
2.4	การเตรียมเจลใน chamber ของชุดอิเลคโตรฟอริซีส (Hoefer SE 280) ซึ่งประกอบด้วย chamber บน (1) chamber ล่าง (2) และใช้ตัวหนีบ (3) ยึดกระจกทั้งสองข้าง	50

รูป หน้า

2.5 การแยกโปรติเอสโดย SDS-PAGE ซึ่งประกอบด้วย Power supply (1) และชุดอิเลคโตรฟอริซีส (2) 52

2.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิงซึ่งประกอบด้วยแผ่น gel support film (1), แผ่นกระจก (2), ถาดเตรียมเจล (3), แผ่นแบบช่องใส่ตัวอย่าง (4), chamber นอก (5), ฝาปิด chamber พร้อมล็อคภายในที่มีขั้วไฟฟ้า (6) และอิเลคโทรดกราไฟท์ (7) 55

2.7 การตรวจสอบค่า pI ของสารละลายโปรติเอสโดยวิธีไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง ซึ่งประกอบด้วยเจลที่มีสารทดสอบวางใน chamber นอก (1) ซึ่งต่อเข้ากับ power supply (2) ด้วยอิเลคโทรดกราไฟท์ (3) 56

2.8 การทำอัลตราฟิลเตรชันของสารละลายโปรติเอสบริสุทธิ์โดยผ่านแก๊สไนโตรเจน (1) เข้าสู่อัลตราฟิลเตรชันยูนิต (2) ซึ่งมีสารละลายโปรติเอสบริสุทธิ์ที่ถูกกวนตลอดเวลาด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก (3) และเก็บสารละลายที่ผ่านเมมเบรนไว้ในบีคเกอร์ (4) 57

2.9 การทำบริสุทธิ์และการหาค่า pI ของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 โดยโครมาโตรโฟคัสซิงซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์ของ polybuffer exchanger 94 (1) สารละลาย polybuffer 74/96 (2) โดยใช้ peristaltic pump ช่วยควบคุมอัตราการไหลที่ 40 มล.ซม./ชม. (3) และเก็บสารละลายจากคอลัมน์ด้วย fraction collector (4) 58

3.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย F13 (●) TLS43 (o) และ P2 (■) ที่ 65°C ในอาหารที่ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 60

3.2 แอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เอโซเคซีนของโปรติเอสซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย F13 (●) TLS43 (o) และ P2 (■) ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงที่ 65°C 61

3.3 กราฟมาตรฐานไทโรซีนในการหาแอคติวิตีโปรติเอสโดยการไฮโดรไลส์เคซีน 64

3.4 แอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 (●) TLS43 (o) ในอาหารที่ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 65

3.5 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย F13 ซึ่งถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 200 เท่า 65

3.6 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย F13 ซึ่งเลี้ยงที่ 65°C ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.01% (●), 0.1% (o) และ 1.0% (■) 67

รูป หน้า

3.7 แอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เอโซเคซีนของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ซึ่งเลี้ยงที่ 65°C ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.01% (●), 0.1% (o) และ 1.0% (■) 68

3.8 แอคติวิตีในการไฮโดรไลส์เคซีนของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ซึ่งเลี้ยงที่ 65°C ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.01% (●), 0.1% (o) และ 1.0% (■) 68

3.9 ขั้นตอนการทำโปรติเอสจาก F13 ให้บริสุทธิ์ 69

3.10 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford 72

3.11 แอคติวิตีของโปรติเอส (o) และ A_{280} (●) ของสารละลายต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกโปรตีนที่ผลิตจาก F13 โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 1 ขนาด 1.5x50 ซม. 74

3.12 แอคติวิตีของโปรติเอส (o) และ A_{280} (●) ของสารละลายต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกโปรตีนที่ผลิตจาก F13 โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 2 ขนาด 1.5x50 ซม. 74

3.13 แอคติวิตีของโปรติเอส (o) และ A_{280} (●) ของสารละลายต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกโปรตีนที่ผลิตจาก F13 โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 1.5x50 ซม. 78

3.14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของสารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ได้แก่ BSA (66,000) Ovalbumin (45,000) Carbonic anhydrase (29,000) และ Lysozyme (14,300) เมื่อผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 80

3.15 กราฟมาตรฐานระหว่าง V_e/V_o และ log MW ของโปรตีนมาตรฐานผ่าน Sephadex G-75 (1.5x50 ซม.) 81

3.16 แอคติวิตีของโปรติเอสในสารละลายพีเอชต่าง ๆ กัน เมื่อใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรทที่อุณหภูมิ 40° (●) 50° (o) 60° (▲) 65° (Δ) 70° (■) 80° (□) และ 90°C (+) 83

3.17 แอคติวิตีที่ปรากฏ (%) ของโปรติเอสในสภาวะที่มี Mg^{2+} (●), Ca^{2+} (o), Mn^{2+} (■), Fe^{3+} (□), Cu^{2+} (▲), Zn^{2+} (Δ) และ Co^{2+} (+) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 86

3.18 การเปลี่ยนแปลงของ A_{405} ในระหว่างการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส BAPNA โดยทริปซินที่อุณหภูมิ 27°C 88

รูป หน้า

3.19 การเปลี่ยนแปลง A_{345} จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ FAGLA โดยการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอส F13 (ก) โปรติเอส S2 (ข) และ Metalloprotease type IX (ค) 89

3.20 ความสัมพันธ์ระหว่าง A_{345} กับความเข้มข้นของ FAGLA 90

3.21 การเปลี่ยนแปลง A_{253} จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ BAEE โดยการเร่งปฏิกิริยาของ Alcalase (ก) และโปรติเอส S2 (ข) 91

3.22 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ ATEE (I), ATpEE (II) และ PME (III) (ก) และ TAME (ข) โดยการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอส S2 91

3.23 กราฟมาตรฐานของ leucine 94

3.24 SDS-PAGE ของ Sigma Marker [ประกอบด้วย BSA (66,000), Ovalbumin (45,000), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000), Carbonic anhydrase (29,000), Trypsinogen (24,000), Trypsin inhibitor (20,000), α-Lactalbumin (14,200) และ Aprotinin (6,500)] (ช่องที่ 1 และ 9) BSA (ช่องที่ 2) Trypsin inhibitor (ช่องที่ 3) Lysozyme (ช่องที่ 4) โปรติเอส F13 จากไลโอฟิไลส์ (ช่องที่ 5) โปรติเอส F13 จากไดอะไลซีส (ช่องที่ 6) โปรติเอส I (ช่องที่ 7) และโปรติเอส II (ช่องที่ 8) 98

3.25 กราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน Sigma Marker M-3193 โดย SDS-PAGE 100

3.26 การแยกโปรติเอสจาก F13ด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง ช่องที่ 1, 4 และ 8 คือโปรตีนมาตรฐาน ประกอบด้วย Amyloglucosidase pI 3.6, Trypsin inhibitor pI 4.6, β-Lactoglobulin A pI 5.1, Carbonic anhydrase I และ II pI 5.9 และ 6.6, Myoglobin pI 6.8 และ 7.2, Lentil Lectin pI 8.2, 8.6 และ 8.8, และ Trypsinogen pI 9.3 ช่องที่ 2, 3, 5, 6 และ 7 คือสารละลายโปรติเอส 101

3.27 กราฟมาตรฐานของการหาค่า pI ด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง ประกอบด้วย Amyloglucosidase pI 3.6, Trypsin inhibitor pI 4.6, β-Lactoglobulin A pI 5.1 และ Lentil Lectin pI 8.2, 8.6 และ 8.8 ตามลำดับ 102

3.28 แอคติวิตี (o), A_{280} (●) และ pH (■) ของสารละลายที่ได้จากการแยกโปรติเอสบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ polybuffer exchanger 94 (1.0x30 ซม.) 103

รายการอักษรย่อ

ชม	ชั่วโมง
ซม	เซนติเมตร
มก	มิลลิกรัม
ลบ.ซม.	ลูกบาศก์เซนติเมตร
A_{275}	Absorbance at 275 nm
ATpEE	Acetyl-tryptophan ethyl ester
ATEE	Acetyl-tyrosine ethyl ester
BAEE	Benzoyl-arginine ethyl ester
BAPNA	N-α-Benzoyl-DL-arginine-p-nitronilide
^{o}C	degree of celsius
DH	degree of hydrolysis
DCI	Dichloroesocoumarin
DipF	Diisopropylphosphofluoride
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAGLA	3-(-2-Furylacryloyl)-glycyl-L-leucine amide
g	gram
kD	kilodalton
pI	isoelectric point
µg	microgram
µl	microlitre
µm	micrometre
µM	micromolar
mL	millilitre
mM	millimolar
M	Molar
MW	molecular weight
nm	nanometre

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

OD	Optical density
PME	L-Phenylalanine methyl ester
PMSF	Phenylmethanesulphonylfluoride
Rm	Relative mobility
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
TAMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TAME	p-Tosyl-L-arginine methyl ester
TNBS	Trinitrobenzenesulfonic acid
UA	Azocasein unit
UAm	Amide unit
UC	Casein unit
UE	Ester unit

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University