

บทที่ 3

ผลการทดลอง

แบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ F13 TLS43 และ P2 ซึ่งคัดจากป้อน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ สามารถผลิตโปรตีนที่เสถียรต่ออุณหภูมิที่ 65°C ได้⁽⁴⁰⁾ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตโปรตีนส่งออกนอกเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จึงได้เลือกศึกษาโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย F13 ซึ่งได้เตรียมเอนไซม์ให้เข้มข้นด้วยไลโอไฟไลเซชัน ก่อนการแยกและทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยคอลัมน์ของ Sephadex G 100-120 พร้อมกับได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ดังนี้

1. อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน
2. ผลของตัวยับยั้งและไอออนต่อการทำงาน
3. ความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเอไมด์ FAGLA เอสเทอร์และการไฮโดรไลสโปรตีน
4. มวลโมเลกุล
5. จุดไอโซอิเล็กตริก

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตโปรตีน

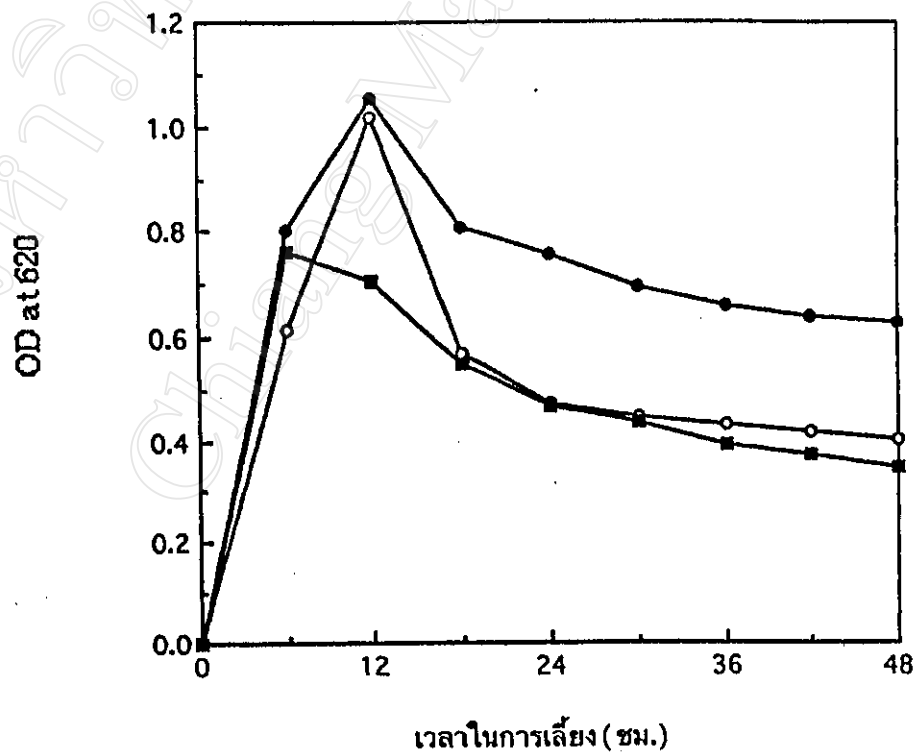
แบคทีเรีย F13 TLS43 และ P2 สามารถผลิตโปรตีนส่งออกนอกเซลล์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 ที่ 65°C ในสภาวะที่มีการเขย่า⁽⁴⁰⁾ ดังนั้นจึงได้นำมาศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีน เพื่อเลือกศึกษาสมบัติของโปรตีนจากแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว

3.1.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์

ผลการเลี้ยงแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ F13 TLS43 และ P2 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 ให้การเจริญเติบโตดังตาราง 3.1 และรูป 3.1 ซึ่งพบว่า F13 มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบคทีเรีย TLS43 และ P2 โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง หลังจากนั้นการเจริญเติบโตจึงลดลงอย่างรวดเร็วถึงชั่วโมงที่ 18 และค่อย ๆ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่ TLS43 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 18 และค่อนข้างคงที่ในช่วง 18-48 ชั่วโมง ส่วนอัตราการเจริญเติบโตของ P2 สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงและมีการเจริญเติบโตลดลงค่อนข้างคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 18 เป็นต้นไป ซึ่งใกล้เคียงกับ TLS43

ตาราง 3.1 การเจริญเติบโต (OD_{620}) และแอกติวิตีของโปรตีนของแบคทีเรีย F13 TLS43 และ P2 ซึ่งเลี้ยงในสารละลายอาหารที่ 65°C

ชั่วโมงที่	OD_{620}			แอกติวิตีของโปรตีน (UA/ลบ.นม.)		
	F13	TLS43	P2	F13	TLS43	P2
0	0	0	0	0	0	0
6	0.801	0.617	0.759	0.460	0.032	0.018
12	1.055	1.021	0.708	0.500	0.466	0.030
18	1.809	0.569	0.548	0.502	0.540	0.092
24	0.754	0.474	0.471	0.510	0.548	0.116
30	0.698	0.449	0.440	0.530	0.578	0.126
36	0.659	0.432	0.393	0.520	0.566	0.138
42	0.642	0.420	0.373	0.496	0.532	0.116
48	0.632	0.405	0.347	0.496	0.516	0.098



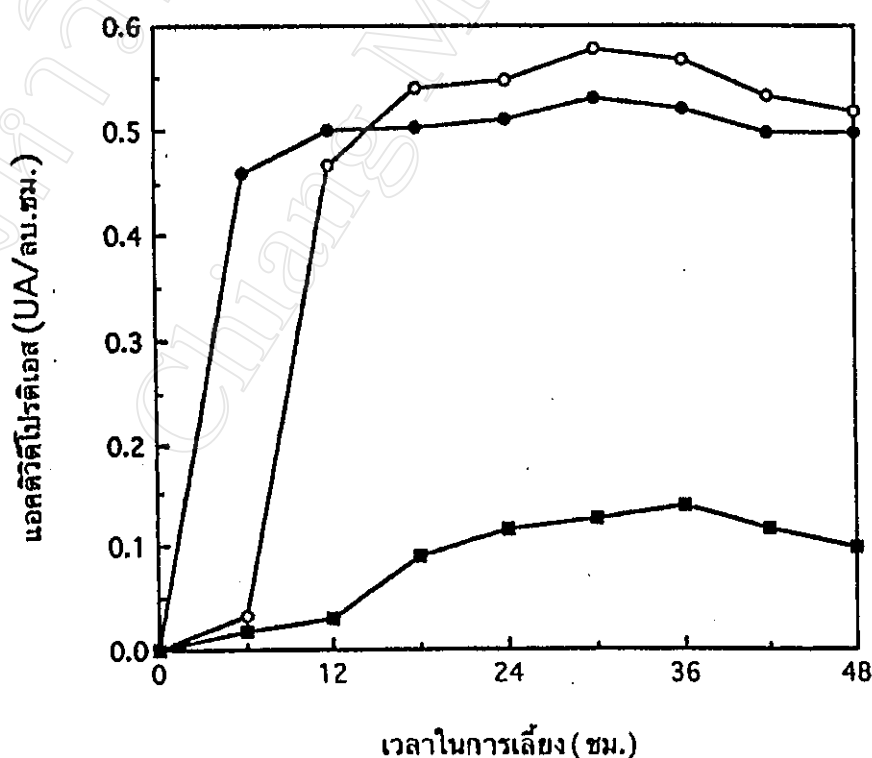
รูป 3.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย F13 (●) TLS43 (○) และ P2 (■) ที่ 65°C ในอาหารที่ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2

3.1.2 การผลิตโปรตีน

แบคทีเรีย F13 TLS43 และ P2 สามารถผลิตโปรตีนส่งออกนอกเซลล์ ดังนั้นเมื่อเลี้ยงในสารละลายอาหารและแยกตะกอนเซลล์ออก จึงสามารถตรวจสอบการผลิตโปรตีนของแบคทีเรีย ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตได้โดยตรวจสอบแอกติวิตีของโปรตีนในสารละลายน้ำเลี้ยงซึ่งทำโดยใช้สารละลายโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ ณ เวลาต่าง ๆ 0.5 ลบ.ซม. ไฮโดรไลส์เอโซเคซีนที่ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และวัดผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของโปรตีนในหน่วยของเอโซเคซีน (UA) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร เท่ากับ 1 หน่วย ณ สภาวะทดลองในเวลา 1 ชั่วโมง ดังนั้นจึงคำนวณหาแอกติวิตีของโปรตีนได้โดยความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{แอกติวิตีของโปรตีนในสารละลายน้ำเลี้ยง} = 2 \times A_{440} \text{ UA/ลบ.ซม.}$$

ผลการคำนวณหาแอกติวิตีโปรตีนที่แบคทีเรียทั้งสามผลิตส่งออกนอกเซลล์ในช่วงเวลาต่าง ๆ ในการเลี้ยงแสดงได้ดังตาราง 3.1 และกราฟรูป 3.2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า TLS43 ผลิตโปรตีนได้ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย F13 แต่ดีกว่า P2 โดยพบว่า F13 มีอัตราการผลิตโปรตีนสูงสุดในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง ในขณะที่ TLS43 มีอัตราการผลิตโปรตีนได้สูงสุดในช่วงชั่วโมง 6-12 จากนั้นอัตราการผลิตโปรตีนจะค่อย ๆ ลดลงจนเกือบคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยง ในส่วนของ



รูป 3.2 แอกติวิตีในการไฮโดรไลส์เอโซเคซีนของโปรตีนซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย F13 (●)

TLS43 (○) และ P2 (■) ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงที่ 65°C

P2 นั้น มีอัตราการผลิตโปรตีนสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 12-18 แล้วค่อย ๆ เพิ่มขึ้นทีละน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 36 จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตโปรตีนจากแบคทีเรียทั้งสาม พบว่า TLS43 และ F13 ผลิตโปรตีนได้ใกล้เคียงกันซึ่งอยู่ในช่วง 500-600 UA/ลบ.ชม. แต่ P2 ผลิตโปรตีนสูงสุดที่ 138 UA/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งต่ำกว่าแบคทีเรียสองชนิดแรกประมาณ 3-4 เท่า

เนื่องจากการตรวจสอบแอกติวิตีของโปรตีนโดยวิธีไฮโดรไลซิสเคซีน แบคทีเรีย TLS43 และ F13 สามารถผลิตโปรตีนได้ใกล้เคียงกัน จึงได้นำสารละลายน้ำเลี้ยงเดิมซึ่งได้จากการเลี้ยงเซลล์ ณ เวลาต่าง ๆ มาตรวจสอบแอกติวิตีของโปรตีนโดยวิธีการไฮโดรไลซิสเคซีน จากปฏิกิริยาการเร่งการไฮโดรไลซิสโปรตีนของโปรตีน ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งไม่ถูกตกตะกอนด้วยกรดและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรเช่นเดียวกับไทโรซีน ดังนั้นในการคำนวณหาแอกติวิตีการสลายเคซีนของโปรตีนจึงทำได้โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของโปรตีนกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ตาราง 3.2 และรูป 3.3) เช่น ถ้าสารละลายตัวอย่างจากการไฮโดรไลซิสเคซีนด้วยโปรตีนจากตาราง 3.3 ให้ A_{275} ซึ่งเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน รูป 3.3 สมมติให้เท่ากับ A ไมโครกรัม/ลบ.ชม.

$$\begin{aligned}
 \text{เนื่องจากสารละลายทั้งหมดในหลอดทดลองมีปริมาตร} &= 3.5 \text{ ลบ.ชม.} \\
 \text{ดังนั้นปริมาณไทโรซีนในหลอดทดลอง} &= 3.5 \times A \text{ ไมโครกรัม} \\
 \text{ใช้สารละลายตัวอย่างโปรตีน} &= 0.5 \text{ ลบ.ชม.} \\
 \text{นั่นคือสารละลายตัวอย่าง 1 ลบ.ชม. ทำให้เกิดไทโรซีน} &= \frac{3.5 \times A}{0.5} \text{ ไมโครกรัม} \\
 \text{เวลาในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเคซีน} &= 60 \text{ นาที} \\
 \therefore \text{สารละลายตัวอย่าง 1 ลบ.ชม. ทำให้เกิดไทโรซีน} &= \frac{3.5 \times A}{0.5 \times 60} \text{ ไมโครกรัม/นาที}
 \end{aligned}$$

เมื่อกำหนดให้ 1 ยูนิตของโปรตีนในหน่วยของเคซีน (UC) เท่ากับ ปริมาณไทโรซีน 1 ไมโครกรัมที่ถูกทำให้เกิดขึ้นในเวลา 1 นาที ที่สภาวะทดลองหนึ่ง ๆ

$$\text{ดังนั้นสารละลายตัวอย่าง 1 ลบ.ชม. จะมีแอกติวิตี} = \frac{3.5 \times A}{0.5 \times 60} \text{ UC}$$

ซึ่งทำให้ได้สูตรทั่วไปในการหาแอกติวิตีของโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิสเคซีน ดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{แอกติวิตีของโปรตีน (UC)} &= \frac{AB}{ET}
 \end{aligned}$$

ตาราง 3.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานไทโรซีน
ในช่วงความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัม/ลบ.ซม.

ความเข้มข้นของไทโรซีน (ไมโครกรัม/ลบ.ซม.)	A_{275}
0	0
10	0.069
20	0.137
30	0.208
40	0.278
50	0.348
60	0.418
70	0.488
80	0.558
90	0.624
100	0.693
200	1.443
300	2.207
400	2.371
500	2.502

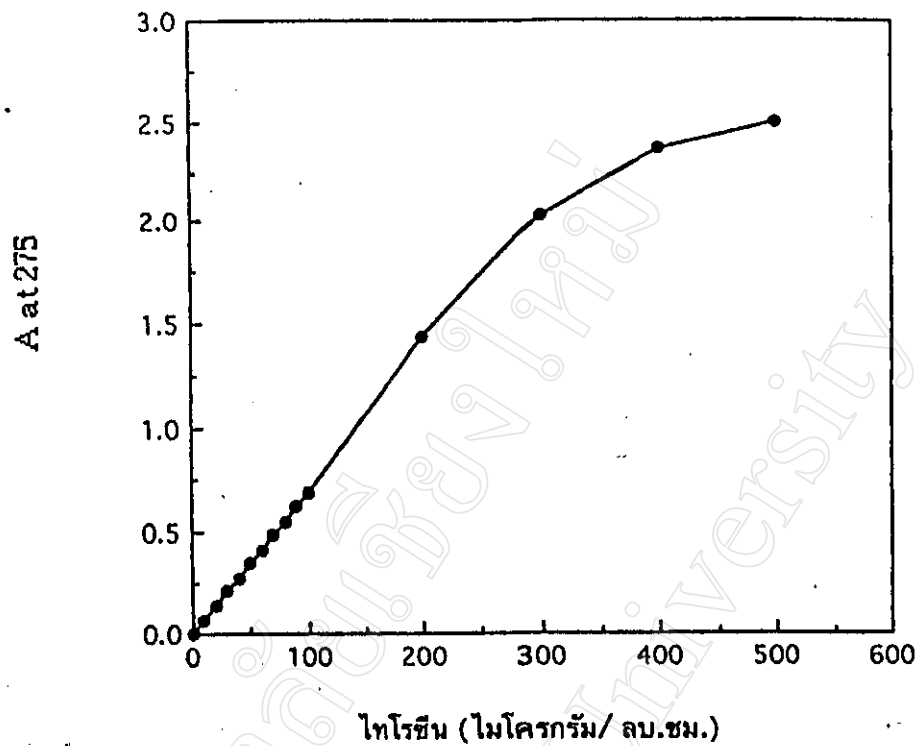
โดยที่ A คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนจากกราฟ (ไมโครกรัม/ลบ.ซม.)

B คือ ปริมาณสารละลายทั้งหมดในปฏิกิริยา (ลบ.ซม.)

E คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ (ลบ.ซม.)

T คือ เวลา (นาที)

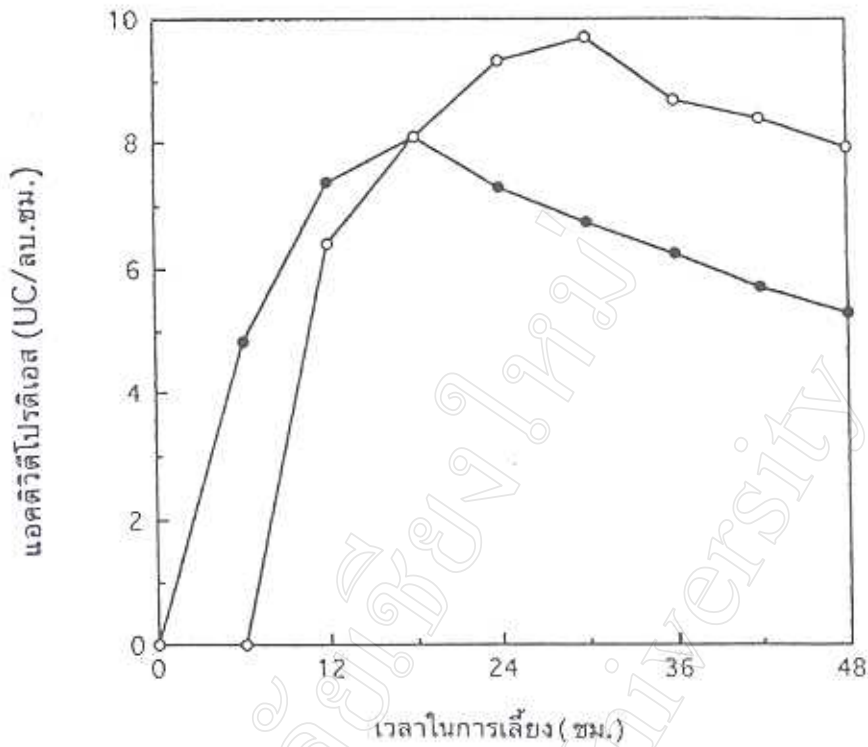
ผลการคำนวณหาแอกติวิตีโปรตีนที่แบคทีเรีย F13 และ TLS43 ผลิตส่งออกนอกเซลล์ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงเซลล์แสดงได้ดังตาราง 3.3 และรูป 3.4 ซึ่งพบว่า TLS43 ผลิตโปรตีนได้ดีกว่า F13 โดยที่ TLS43 มีอัตราเร็วของการผลิตโปรตีนสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 6-12 จากนั้นอัตราเร็วของการผลิตจะค่อย ๆ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงและผลผลิตโปรตีนลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 30 จนถึงสิ้นสุดการเก็บสารตัวอย่างในชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่ F13 มีอัตราเร็วของการผลิตโปรตีนสูงสุดในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเซลล์ แล้วค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งชั่วโมงที่ 18 จากนั้นแอกติวิตีโปรตีนลดลงเรื่อย ๆ จนถึงสิ้นสุดการเลี้ยงเซลล์ ผลผลิตโปรตีนสูงสุดของแบคทีเรีย TLS43 และ F13 พบที่ 9, 700 และ 8, 110 UC/ลิตร/นาที่ ตามลำดับ ในการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกศึกษาโปรตีนจากแบคทีเรีย F13 ส่วน TLS43 นั้น มีผู้อื่นที่ได้ทำการทดลองไปพร้อม ๆ กัน



รูป 3.3 กราฟมาตรฐานไทโรซีนในการหาแอกติวิตีโปรตีนโดยการไฮโดรไลสเคซีน

ตาราง 3.3 แอกติวิตีของโปรตีนจากแบคทีเรีย F13 และ TLS43 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.1% ที่ 65°C

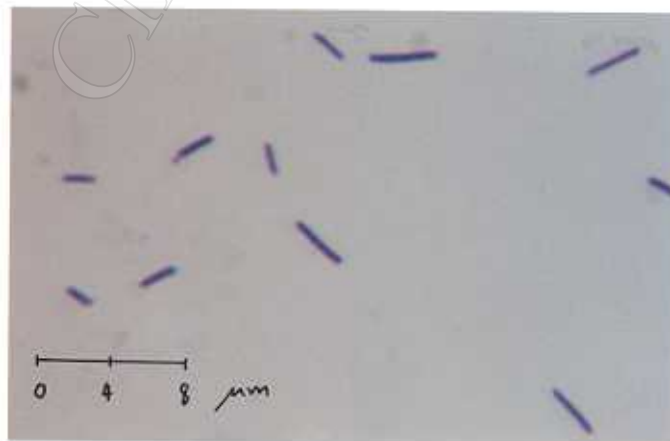
ชั่วโมงที่	แอกติวิตีของโปรตีน (UC/ลบ.ซม.)	
	F13	TLS43
0	0	0
6	4.80	0
12	7.37	6.40
18	8.11	8.09
24	7.32	9.34
30	6.75	9.70
36	6.24	8.68
42	5.70	8.39
48	5.29	7.93



รูป 3.4 แอกติวิตีในการไฮโดรไลสเคซีนของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 (●) และ TLS43(○) ในอาหารที่ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผลมพีเอช 7.2

3.2 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ F13

เมื่อได้เลือกศึกษาโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 จึงได้ตรวจสอบชนิดกรัมของแบคทีเรีย พบว่าย้อมติดสีน้ำเงิน-ม่วงของ crystal violet ดังรูป 3.5 แสดงว่าแบคทีเรีย F13 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จากภาพถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์จะมีรูปร่างเป็นท่อน และมีความยาว 1.2-4 μm จากข้อมูลดังกล่าว คาดว่าแบคทีเรีย F13 เป็น *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยที่เซลล์จะมีรูปร่างเป็นท่อนตรง และมีขนาด 0.5-2.5 x 1.2-10 μm



รูป 3.5 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย F13 ซึ่งถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 200 เท่า

3.3 การเตรียมโปรตีนจากแบคทีเรีย F13

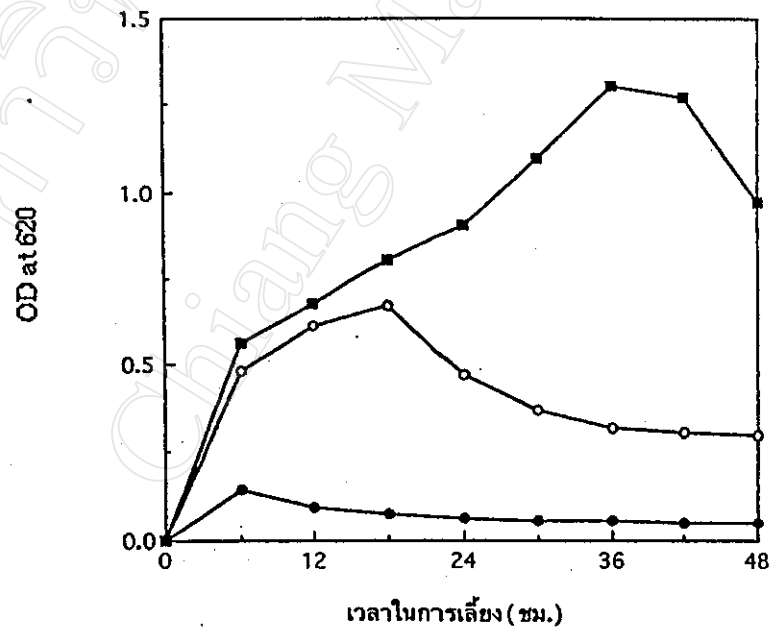
จากการศึกษาผลของชนิดอาหารที่ใช้เลี้ยง *Thermus* S2 โดยใช้อาหาร 3 กลุ่มประเภท ได้แก่ (1) สิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสม (ประกอบด้วยแร่ธาตุที่สำคัญอันได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก และ Titriplex I ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน) 20-100% (2) สิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.2% ในสารละลายเบสผสม 100% และ (3) นมพร่องมันเนยที่มีความเข้มข้น 0.1-1.0% ในน้ำ พบว่าอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสม 100% เป็นอาหารที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตและผลิตโปรตีนได้ดีที่สุด สำหรับการเพิ่มปริมาณสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนในสารละลายเบสผสมอย่างละ 0.2% พบว่าแอกติวิตีของโปรตีนเพิ่มขึ้นเพียง 13% และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนในสารละลายเบสผสม พบว่าอาหารประเภทนมพร่องมันเนยจะทำให้เชื้อชนิดนี้มีการผลิตโปรตีนได้น้อย และช้ากว่าประมาณเท่าตัว⁽⁹⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์อื่นๆ เช่น F11, F13, P2, TLO43, TLS43, TP2, TP433, TP441, TP62 และ S12 ให้ผลผลิตโปรตีนได้ดีที่สุดในอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทน⁽¹⁰⁾ ดังนั้นจึงได้ศึกษาการผลิตโปรตีนของ F13 ในอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนที่ต่างกัน

ผลการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.01, 0.1 และ 1.0% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 เมื่อติดตามการเจริญเติบโตและแอกติวิตีโปรตีนได้ผลดังตาราง 3.4 ซึ่งพบว่าการเจริญเติบโตของ F13 (รูป 3.6) ในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 1.0% มีมากกว่าในอาหารที่มีส่วนประกอบทั้งสองอย่างละ 0.1 และ 0.01% ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดพบที่ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงและค่อย ๆ ลดลงในชั่วโมงที่ 36-48 ในขณะที่อาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% พบการเจริญเติบโตสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 18 ในช่วง 18-36 ชั่วโมงปริมาณเซลล์ค่อย ๆ ลดลงและคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 36 จนถึงสิ้นสุดการเลี้ยงเซลล์ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.01% พบการเจริญเติบโตน้อยมาก ซึ่งให้ค่า OD₆₂₀ ต่ำกว่า 0.15 นั่นคือการเจริญเติบโตของ F13 แปรผันตามปริมาณของสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทน

ผลการผลิตโปรตีนของแบคทีเรีย F13 ซึ่งตรวจสอบแอกติวิตีโดยมีเอไซด์จีนเป็นสับสเตรท แสดงได้ดังรูป 3.7 ซึ่งพบว่าในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1, 0.01 และ 1.0% ได้ผลผลิตโปรตีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18, 12 และ 6 ที่ 574, 260 และ 152 UA/ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่แอกติวิตีในการไฮโดรไลสเคซีนสูงสุดที่ 3985, 2450 และ 784 UC/ลิตร ตามลำดับ แสดงได้ดังรูป 3.8 โดยที่มีการผลิตโปรตีนได้มากที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเหมือนกัน นั่นคือสารละลายอาหารซึ่งมีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ทำให้ F13 เจริญเติบโตและผลิต

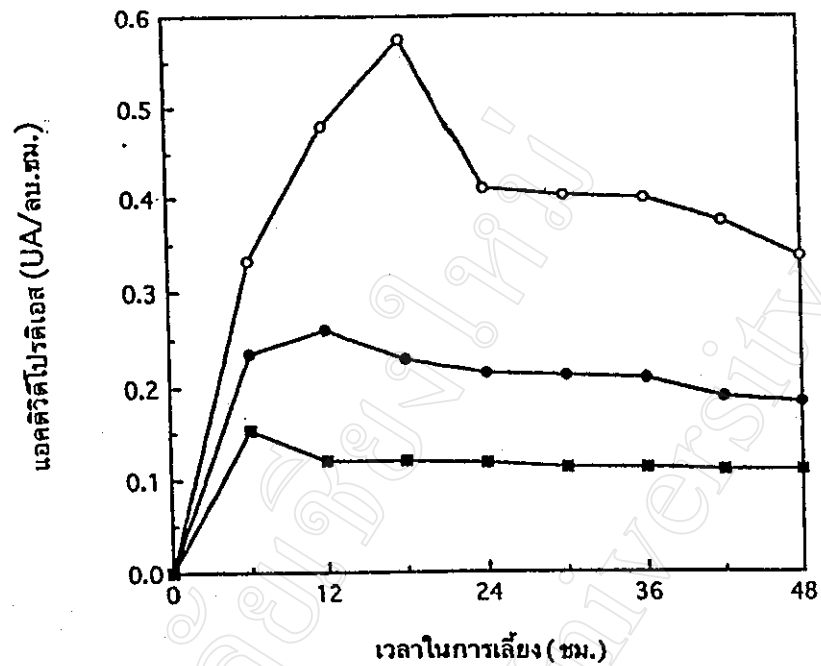
ตาราง 3.4 การเจริญเติบโตของเซลล์และแอกติวิตีของโปรตีนซึ่งได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.01-1.0% ที่ 65°C (เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่ทำการทดลอง)

เวลาในการเลี้ยง เซลล์ (ชม.)	OD ₆₂₀ ในอาหารเหลวที่มีสิ่ง สกัดจากยีสต์และทรีปโทน (%)			แอกติวิตีของโปรตีน					
				UA/ลบ.ชม.			UC/ลบ.ชม.		
				0.01	0.1	1.0	0.01	0.1	1.0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0.148	0.408	0.561	0.234	0.332	0.154	-	-	-
12	0.096	0.611	0.676	0.260	0.480	0.122	0.784	3.985	2.450
18	0.078	0.671	0.805	0.230	0.574	0.122	-	-	-
24	0.065	0.471	0.904	0.214	0.410	0.118	0.490	3.299	2.026
30	0.058	0.369	0.100	0.212	0.404	0.114	-	-	-
36	0.054	0.319	0.302	0.210	0.402	0.114	0.261	2.123	1.830
42	0.053	0.301	0.273	0.188	0.376	0.110	-	-	-
48	0.053	0.295	0.975	0.184	0.338	0.110	0.147	2.107	1.438

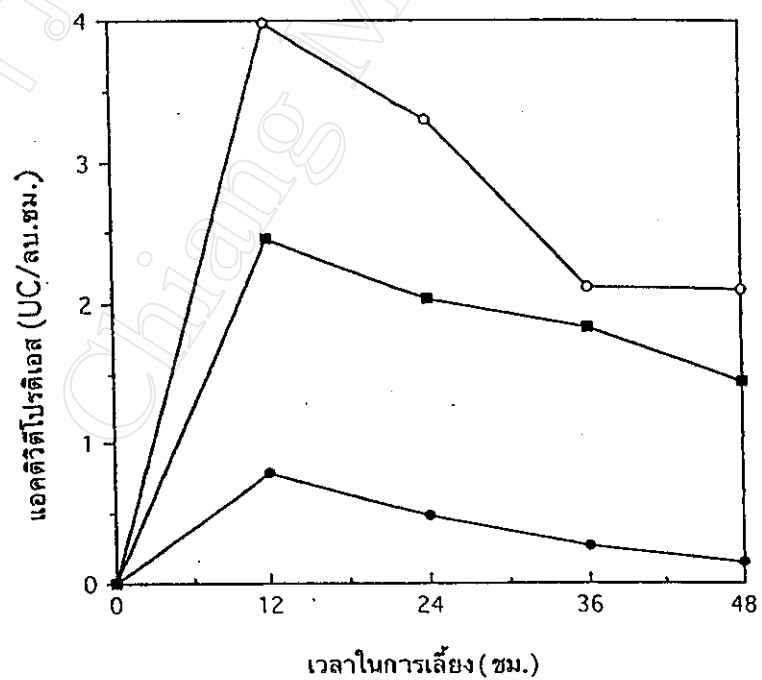


รูป 3.6 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย F13 ซึ่งเลี้ยงที่ 65°C ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.01% (●), 0.1% (○) และ 1.0% (■)

โปรตีนได้ดีกว่าในอาหารอีก 2 ชนิด ดังนั้นในการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 จึงเลือกใช้อาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2



รูป 3.7 แอคติวิตีในการไฮโดรไลสเอนไซม์ของโปรตีนจากแบคทีเรีย F13 ซึ่งเลี้ยงที่ 65°C ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโตนอย่างละ 0.01% (●), 0.1% (○) และ 1.0% (■)



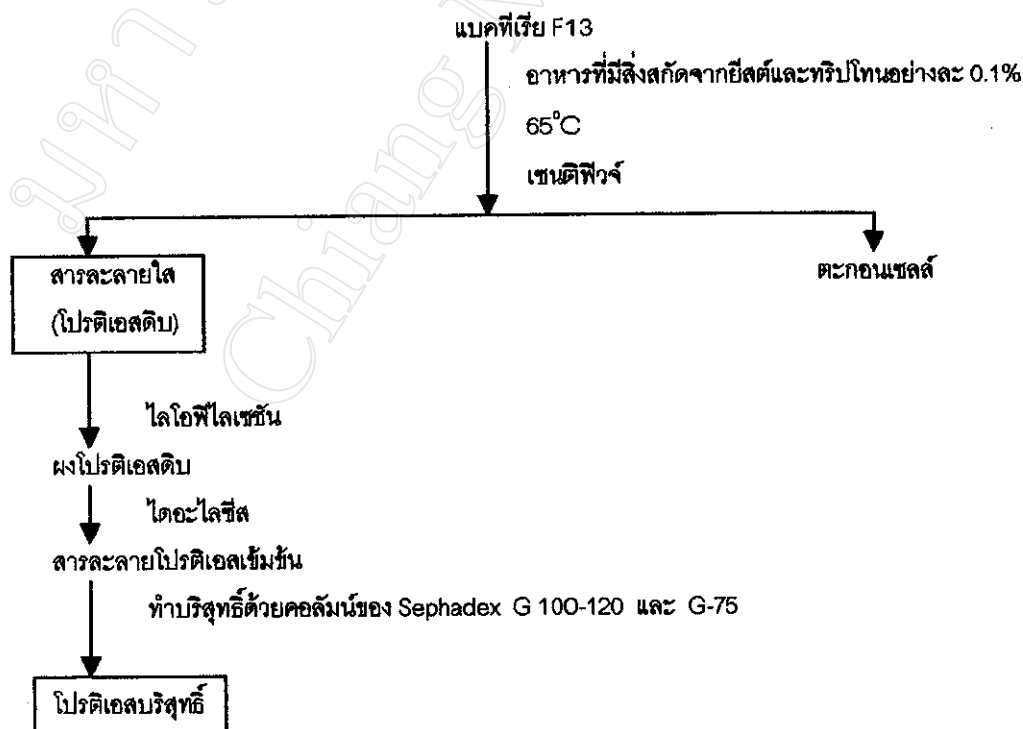
รูป 3.8 แอคติวิตีในการไฮโดรไลสเอนไซม์ของโปรตีนจากแบคทีเรีย F13 ซึ่งเลี้ยงที่ 65°C ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโตนอย่างละ 0.01% (●), 0.1% (○) และ 1.0% (■)

3.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีนที่ผลิตจาก F13

ผลการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในอาหารซึ่งประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.01-1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 65°C พบว่าแบคทีเรียผลิตโปรตีนได้สูงที่สุดจากการใช้ปริมาณสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.1% ในเวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นจึงได้เลือกเตรียมสารละลายโปรตีนจากแบคทีเรีย F13 โดยการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะดังกล่าวและทำโปรตีนที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยใช้ขั้นตอนต่าง ๆ ดังแผนผังรูป 3.9 ซึ่งเริ่มต้นจากการเตรียมผงโปรตีน โดยทำไลโอไฟไลเซชันสารละลายโปรตีนและตามด้วยการกำจัดสารโมเลกุลเล็กด้วยไดอะไลซิสก่อนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G 100-120 และ G-75

3.4.1 การเตรียมผงโปรตีน

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทรีปโทนอย่างละ 0.1% ทำให้ได้สารละลายโปรตีน 886 ลบ.ซม. ซึ่งได้แบ่งสารละลายเป็น 3 ส่วนเพื่อทำให้แห้งด้วยไลโอไฟไลเซชัน เก็บผงโปรตีนรวมกันทั้งหมดได้ 3.53 กรัม (ตาราง 3.5) แบ่งผงโปรตีน 1 กรัม ผสมกับ 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. ทำไดอะไลซิส 24 ชั่วโมงที่ 4°C ในสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าว แยกสารละลายไลเก้บไว้ซึ่งได้สารละลายทั้งหมด 12.6 ลบ.ซม. จากนั้นจึงวิเคราะห์หาแอกติวิตีและโปรตีน



รูป 3.9 ขั้นตอนการทำโปรตีนจาก F13 ให้บริสุทธิ์

ตาราง 3.5 ปริมาณผงโปรตีนเอสดีจากการทำไลโอไฟไลเซชัน

ครั้งที่	สารละลายโปรตีนเอสดี (ลบ.ชม.)	ผงโปรตีนเอสดี (กรัม)
1	300	1.22
2	300	1.20
3	286	1.11
รวม	886	3.53

3.4.1.1 การหาแอกติวิตี

ในการหาแอกติวิตีโดยวิธีไฮโดรไลซิสเคซีนทั้งในสารละลายโปรตีนเอสดีและโคอะไลสต์โปรตีนเอสดี ได้ใช้สารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร เท่ากัน และได้ค่า A_{440} จากการทดลองซึ่งสามารถคำนวณหาแอกติวิตีของโปรตีนเอสดีดังนี้

$$\begin{aligned}
 &\text{เช่น จากค่า } A_{440} \text{ ที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายโปรตีนเอสดี} &= 0.261 \\
 &\text{เนื่องจาก 1 UA มีค่าเท่ากับ } A_{440} &= 1 \text{ หน่วย} \\
 &\therefore \text{แอกติวิตีของโปรตีนเอสดี} &= \frac{1}{0.50} \times 0.261 \\
 & &= 0.52 \text{ UA/ลบ.ชม.} \\
 &\text{และเนื่องจากสารละลายโปรตีนเอสดีทั้งหมด} &= 886 \text{ ลบ.ชม.} \\
 &\therefore \text{แอกติวิตีทั้งหมดของสารละลายโปรตีนเอสดี} &= 886 \times 0.52 \text{ UA} \\
 & &= 460.7 \text{ UA}
 \end{aligned}$$

ในทำนองเดียวกันสามารถคำนวณหาแอกติวิตีของโคอะไลสต์โปรตีนเอสดี ซึ่งผลการคำนวณได้สรุปไว้ในตาราง 3.6

ตาราง 3.6 แอกติวิตีของสารละลายและผงโปรตีนเอสดีที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในสารละลายอาหาร 1 ลิตร

โปรตีนเอสดี	ปริมาตร (ลบ.ชม.)	ปริมาตรที่ใช้ทดสอบ (ลบ.ชม.)	A_{440}	แอกติวิตีของโปรตีนเอสดี	
				(UA/ลบ.ชม.)	ทั้งหมด (UA)
สารละลาย	886.00	0.50	0.261	0.52	460.7
โคอะไลสต์โปรตีนเอสดี	12.6	0.50*	0.196	9.80	123.5

* เจือจาง 50 เท่าก่อนการทดลอง

3.4.1.2 การหาปริมาณโปรตีน

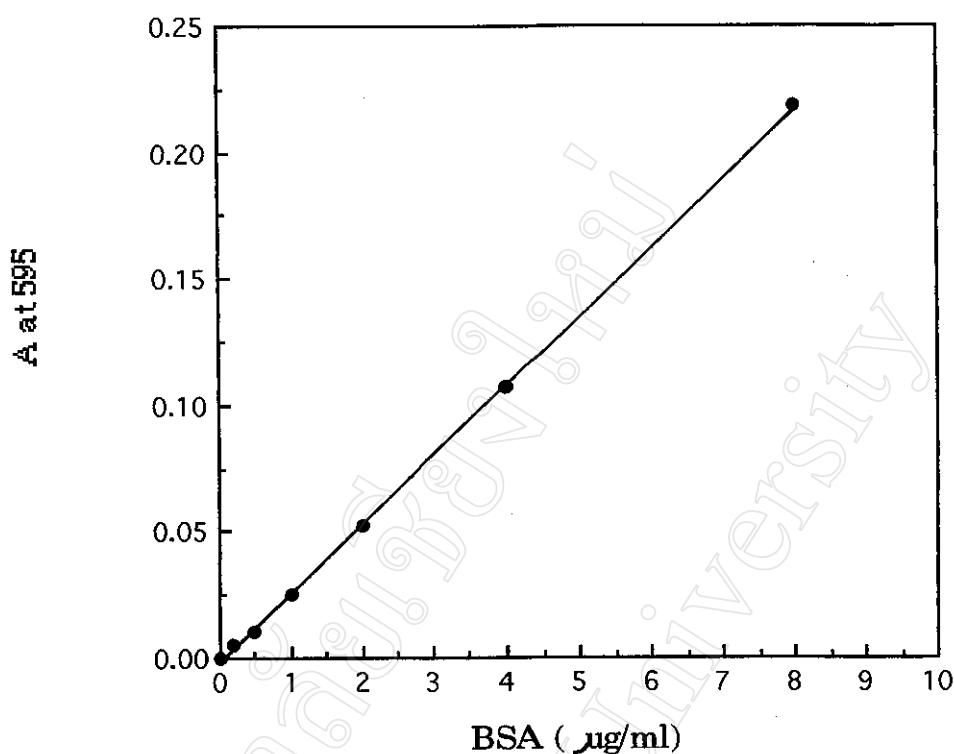
ในการหาปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนและโคอะเลสโปรตีนโดยวิธี Bradford ได้ใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ Coomassie brilliant blue แล้ว ทำให้ได้สารละลายที่มีค่า A_{595} ต่าง ๆ ดังตาราง 3.7 ซึ่งเมื่อเขียนกราฟมาตรฐานของโปรตีนทำให้ได้ผลดังรูป 3.10 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายทั้งสองชนิด ๆ ละ 500 ไมโครลิตร ทำให้ได้ค่า A_{595} ดังแสดงในตาราง 3.8 และสามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
 &\text{สารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร ให้ค่า } A_{595} \text{ จากการทดลอง} = 0.142 \\
 &\text{เมื่อเทียบค่า } A_{595} \text{ กับกราฟมาตรฐานรูป 3.10 ได้ปริมาณโปรตีน} = 4.65 \text{ ไมโครกรัม/ลบ.ซม.} \\
 &\text{เนื่องจากสารละลายทั้งหมดในหลอดทดสอบ} = 1.5 \text{ ลบ.ซม.} \\
 &\text{ดังนั้นสารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตรมีโปรตีน} = 1.5 \times 4.65 \text{ ไมโครกรัม} \\
 &= 6.98 \text{ ไมโครกรัม} \\
 &\therefore \text{สารละลายโปรตีน 1 ลบ.ซม. มีโปรตีน} = 6.98 \text{ ไมโครกรัม} \\
 &= 0.500 \\
 &= 13.96 \text{ ไมโครกรัม} \\
 &\text{เนื่องจากการเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหาร 1 ลิตรได้} \\
 &\text{สารละลายโปรตีน} = 886 \text{ ลบ.ซม.} \\
 &\therefore \text{เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร 1 ลิตร ทำให้ได้สารละลายโปรตีนทั้งหมด} = 886 \times 13.96 \text{ มก.} \\
 &= 12.37 \text{ มิลลิกรัม}
 \end{aligned}$$

ในทำนองเดียวกันสามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนของโคอะเลสโปรตีน ซึ่งได้ผลดังแสดงในตาราง 3.8

ตาราง 3.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี Bradford

ปริมาณ BSA (ไมโครกรัม/ลบ.ซม.)	A_{595}
0	0
0.2	0.005
0.4	0.011
1.0	0.025
2.0	0.053
4.0	0.107
8.0	0.219



รูป 3.10 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ตาราง 3.8 ปริมาณโปรตีนของไดอะไลสโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในอาหาร 1 ลิตร

โปรตีน	ปริมาตร (ลบ.ซม.)	ปริมาตรที่ใช้ทดสอบ (ลบ.ซม.)	A_{595}	โปรตีน	
				(มก./ลบ.ซม.)	ทั้งหมด (มก.)
สารละลาย	886.0	0.5	0.142	0.0139	12.37
ไดอะไลสโปรตีน	12.6	0.5*	0.065	0.0030	0.38

* เจือจาง 50 เท่าก่อนการทดลอง

ผลการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 ในสารละลายอาหาร 1 ลิตร ที่ 65°C 24 ชั่วโมง ทำให้ได้ผงโปรตีนทั้งหมด 3.535 กรัม ผลการหาแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีนและไดอะไลสโปรตีน แสดงดังตาราง 3.6 และ 3.8 พบว่าสารละลายโปรตีนจะมีแอกติวิตีของโปรตีนและปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 460.7 UA และ 12.37 มิลลิกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ไดอะไลสโปรตีนมีแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนทั้งหมดลดลงเหลือ 123.5 UA และ 0.38 มิลลิกรัม ตามลำดับ

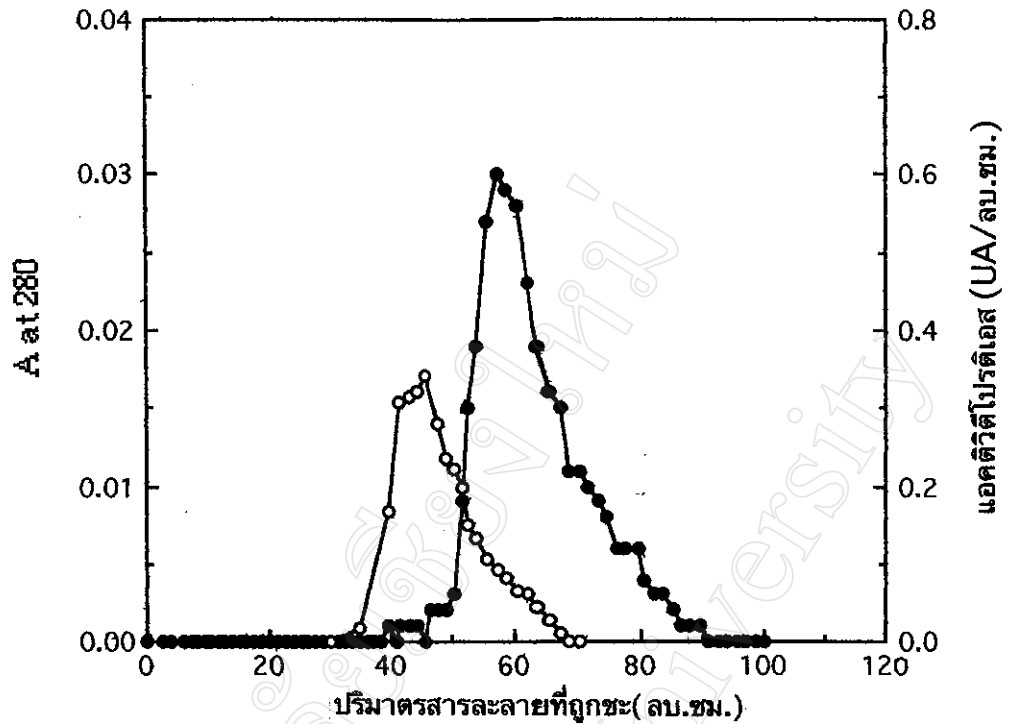
3.4.2 การแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120

การแยกโปรตีนนั้น ได้เริ่มทำการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G100-120 โดยเริ่มจากการทำโคโอะไลเซชันสารละลายของผงโปรตีนดิบ 1% (w/v) ละลายใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ก่อนการแยกด้วยเจลฟิเลตเรชันทั้งหมด 8 ครั้ง โดยที่การแยกครั้งที่ 1-3 ใช้สารละลายโปรตีนดิบ 0.1-0.2 ลบ.ซม. ทั้งนี้เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแยกสาร ส่วนในการแยกครั้งที่ 4-8 ได้เพิ่มสารละลายโปรตีนดิบเริ่มต้นให้มากขึ้นในช่วง 0.5-5.0 ลบ.ซม. ผลการหาแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนของสารละลายที่แยกได้แสดงดังตาราง 3.9 ซึ่งเมื่อคำนวณหาแอกติวิตีและโปรตีนของสารละลายโปรตีน ทำให้ได้ผลดังสรุปในตาราง 3.9 โคมาโตแกรมจากการทำเจลฟิเลตเรชันทั้ง 8 ครั้ง ได้พบโปรตีนที่เคลื่อนที่ทุกครั้ง และมีลักษณะคล้ายคลึงกันดังรูป 3.11 และ 3.12 ซึ่งได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยเจลฟิเลตเรชันครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ผลจากการแยกโปรตีนทั้ง 8 ครั้งนี้ไม่ได้นำมารวมกัน

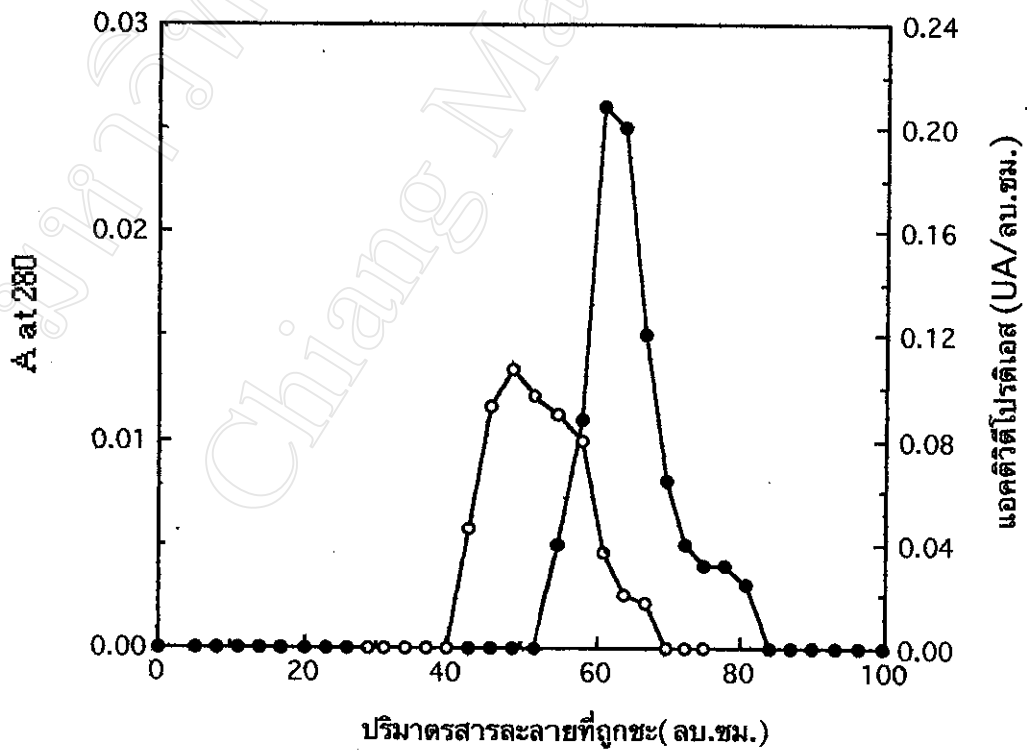
ตาราง 3.9 แอกติวิตีโปรตีนและปริมาณโปรตีนของโปรตีน F13 ที่แยกด้วยคอลัมน์

Sephadex G 100-120

ครั้งที่	สารละลาย	ปริมาตร (ลบ.ซม.)	แอกติวิตี			ปริมาณโปรตีน		
			A ₄₄₀	UA/ลบ.ซม.	ทั้งหมด (UA)	A ₂₉₅	มก./ลบ.ซม.	ทั้งหมด(มก.)
1	เริ่มต้น	0.10	0.070	46.67	4.67	0.031	0.331	0.033
	โปรตีนที่ได้	20.30	0.070	0.23	4.75	0.018	0.001	0.032
2	เริ่มต้น	0.20	0.070	28.00	5.60	0.108	0.562	0.110
	โปรตีนที่ได้	14.70	0.046	0.15	2.25	0.078	0.002	0.030
3	เริ่มต้น	0.20	0.050	20.00	4.00	0.168	0.872	0.170
	โปรตีนที่ได้	19.20	0.009	0.03	0.57	0.033	0.001	0.018
4	เริ่มต้น	0.50	0.252	12.60	6.30	0.030	0.090	0.045
	โปรตีนที่ได้	173.00	0.009	0.03	5.19	0.012	0.003	0.519
5	เริ่มต้น	1.00	0.220	11.00	11.00	0.025	0.240	0.240
	โปรตีนที่ได้	69.50	0.065	0.13	9.04	0.018	0.004	0.280
6	เริ่มต้น	3.00	0.239	11.95	35.85	0.051	0.495	1.485
	โปรตีนที่ได้	78.00	0.225	0.45	35.10	0.021	0.003	0.234
7	เริ่มต้น	3.00	0.252	12.60	37.80	0.038	0.075	0.225
	โปรตีนที่ได้	241.00	0.035	0.12	28.92	0.049	0.006	1.446
8	เริ่มต้น	5.00	0.252	12.60	63.00	0.030	0.060	0.300
	โปรตีนที่ได้	231.00	0.039	0.13	30.03	0.021	0.037	8.660



รูป 3.11 แอคติวิตีของโปรตีน (o) และ A_{280} (●) ของสารละลายต่าง ๆ ที่ได้รับการแยกโปรตีนที่ผลิตจาก F13 โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G100-120 ครั้งที่ 1 ขนาด 1.5x50 ซม.



รูป 3.12 แอคติวิตีของโปรตีน (o) และ A_{280} (●) ของสารละลายต่าง ๆ ที่ได้รับการแยกโปรตีนที่ผลิตจาก F13 โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G100-120 ครั้งที่ 2 ขนาด 1.5x50 ซม.

แต่ได้ใช้ทดสอบสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนโดยใช้โปรตีนที่แยกได้ในแต่ละครั้งดังได้กล่าวไว้ในวิธีการศึกษาสมบัติโปรตีน เนื่องจากเมื่อพิจารณารูปร่างและลักษณะของพีคแอกติวิตีที่ปรากฏทำให้คาดว่าน่าจะมีโปรตีนมากกว่าหนึ่งชนิด แต่อาจจะเนื่องมาจากใช้โปรตีนเริ่มต้นมากเกินไป ประกอบกับประสิทธิภาพของ Sephadex G 100-120 (ของ Fluka) อาจไม่เพียงพอสำหรับแยกโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลที่แตกต่างกันไม่มาก ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนไปใช้ Sephadex G-75 (ของ Sigma) เพื่อให้ทำให้มีการแยกของโปรตีนแต่ละชนิด

3.4.3 การแยกโปรตีนบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

การทำบริสุทธิ์โปรตีนจากสารละลายที่ได้จากการไดอะไลซิสโปรตีนดิบ 1 กรัม มีปริมาตรทั้งหมด 12.6 ลบ.ซม. โดยเจลฟิลเทรชันซึ่งมีคอลัมน์ Sephadex G-75 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 และ 2 ใช้สารละลายโปรตีนเริ่มต้นเท่ากัน 3 ลบ.ซม. ส่วนครั้งที่ 3 ใช้สารละลายเริ่มต้นเพียง 1 ลบ.ซม. ผลการแยกครั้งที่ 1 และ 2 แสดงดังตาราง 3.10 โดยที่การแยกครั้งที่ 1 พบโปรตีนบริสุทธิ์ถูกชะออกมาที่ fraction 10-34 ซึ่งเก็บสารละลายรวมกันได้ 87.4 ลบ.ซม. ในขณะที่การแยกครั้งที่ 2 โปรตีนบริสุทธิ์ถูกชะออกมาที่ fraction 25-46 ซึ่งเก็บสารละลายรวมกันได้ 59.4 ลบ.ซม. ซึ่งเมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์เหล่านี้มาคำนวณค่าแอกติวิตีและโปรตีน จะได้ค่า A_{440} และ A_{595} ดังแสดงในตาราง 3.10 และสามารถคำนวณหาแอกติวิตีโปรตีนและปริมาณโปรตีนทั้งหมดดังสรุปผลในตาราง 3.11 นั่นคือสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์มีแอกติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 13.37 และ 8.14 UA ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.087 และ 0.149 มิลลิกรัม ตามลำดับ จากค่าที่ได้สามารถคำนวณค่าแอกติวิตีจำเพาะได้ โดยผลการคำนวณสรุปในตาราง 3.11 ซึ่งพบว่าสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์จากการแยกทั้ง 2 ครั้ง มีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 153.68 และ 54.62 UA/มก. ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเหลืออยู่เพียง 79.58 และ 48.44% ตามลำดับ

ตาราง 3.10 แอกติวิตีของโปรตีนและปริมาณโปรตีนจากการทำบริสุทธิ์โปรตีน F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

ครั้งที่	สารละลายโปรตีน	Fraction no.	ปริมาตร (ลบ.ซม.)	แอกติวิตี		ปริมาณโปรตีน	
				A_{440}	UA/ลบ.ซม.	A_{595}	มก./ลบ.ซม.
1	เริ่มต้น	-	3.0	0.014	5.600	0.040	0.183
	บริสุทธิ์	10-34	87.4	0.046	0.153	0.043	0.001
2	เริ่มต้น	-	3.0	0.014	5.600	0.040	0.314
	บริสุทธิ์	25-46	59.4	0.041	0.137	0.071	0.002

ตาราง 3.11 การทำบริสุทธิ์โปรตีน F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

ครั้งที่	สารละลายโปรตีน	ปริมาตร (ลบ.ซม.)	แอกติวิตี (UA)	ปริมาณโปรตีน (มก.)	แอกติวิตีจำเพาะ (UA/มก.)	ผลผลิต (%)
1	เริ่มต้น	3.0	16.80	0.549	30.60	100
	บริสุทธิ์	87.4	13.37	0.087	153.68	79.58
2	เริ่มต้น	3.0	16.80	0.943	17.82	100
	บริสุทธิ์	59.4	8.14	0.149	54.62	48.44

3.4.3.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีน

การแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ในครั้งที่ 3 ได้ใช้สารละลายโปรตีนที่ผ่านไลโอไฟไลส์ 1.0 ลบ.ซม. ซึ่งมีแอกติวิตีเท่ากับ 2.0 UA จะโปรตีนออกด้วย 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ที่มี mM CaCl_2 เก็บสารละลายตัวอย่าง fraction ละ 2 ลบ.ซม. จำนวน 85 fractions ซึ่งแต่ละ fraction มีค่า A_{280} ดังตาราง 3.12 และเมื่อหาค่าแอกติวิตีของโปรตีนโดยใช้สารละลายตัวอย่าง 0.30 ลบ.ซม. ได้ผลสรุปในตาราง 3.13 และเมื่อเขียนกราฟแสดงค่า A_{280} และแอกติวิตีของโปรตีนในแต่ละ fraction ได้ผลดังรูป 3.13 จะเห็นว่าโปรตีนจาก F13 มีพีคของโปรตีน 6 พีค แต่เนื่องจากพีค IV-VI มีแอกติวิตีต่ำมาก ๆ (< 0.099 UA) และมีปริมาณโปรตีนต่ำมาก (< 0.01 มก.) จึงไม่ได้ศึกษาโปรตีนทั้งสามนี้ แต่จะศึกษาเฉพาะโปรตีน I-III เท่านั้น สำหรับโปรตีน I ซึ่งถูกชะออกมาที่ปริมาตรระหว่าง 48-60 และเก็บสารละลายรวมกันได้ 11.20 ลบ.ซม. โปรตีน II ถูกชะออกมาที่ปริมาตรระหว่าง 62-80 ซึ่งเก็บสารละลายรวมกันได้ 18.30 ลบ.ซม. และโปรตีน III ถูกชะออกมาที่ปริมาตรระหว่าง 84-94 และเก็บสารละลายรวมกันได้ 9.90 ลบ.ซม. ผลการคำนวณค่าแอกติวิตี (ปริมาตรการวิเคราะห์ = 0.30 ลบ.ซม.) และโปรตีน (ปริมาตรการวิเคราะห์ = 0.20 ลบ.ซม.) ของโปรตีนทั้งสามได้ค่า A_{440} และ A_{595} ดังแสดงในตาราง 3.13 และ 3.14 ตามลำดับ เมื่อคำนวณหา % ผลผลิตที่ได้กลับคืนและความบริสุทธิ์ของโปรตีนแต่ละชนิด ทำให้ได้ผลดังตาราง 3.15 ซึ่งจะเห็นว่าโปรตีนบริสุทธิ์ 3 ชนิดที่แยกได้ คือโปรตีน I, II และ III มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.43, 7.47 และ 1.27 เท่า ตามลำดับ และมีผลผลิต 15.10, 52.15 และ 4.95% ตามลำดับ นั่นคือ โปรตีน II มีผลผลิตและความบริสุทธิ์สูงสุด

3.4.3.2 การตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรตีน

ผลการแยกโปรตีนบริสุทธิ์ (โปรตีน I, II และ III) ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3 ซึ่งให้ผลดังรูป 3.13 ทำให้คำนวณหามวลโมเลกุลได้โดยประมาณค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

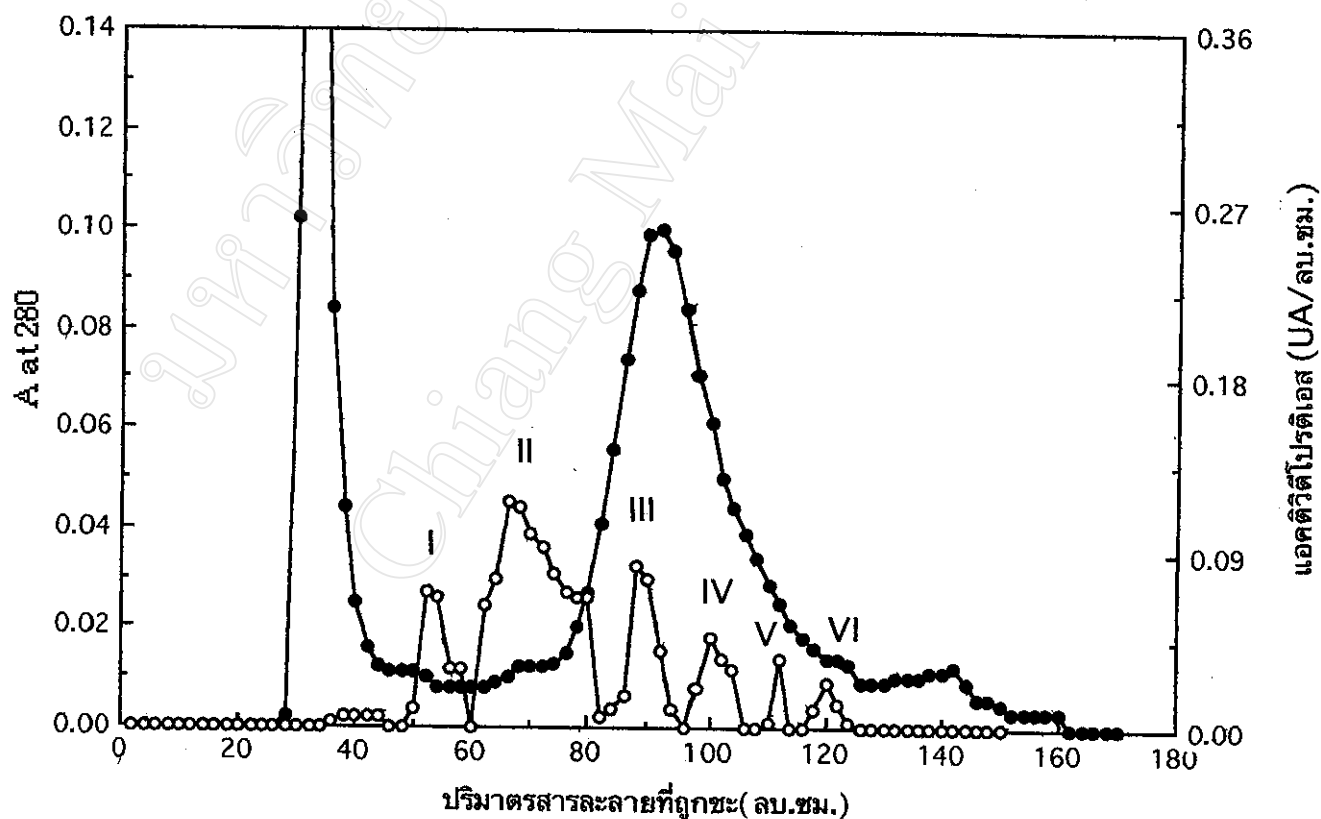
ตาราง 3.12 ค่า A_{280} และแอกติวิตีของโปรตีนที่ได้จากการแยกสารละลายโปรตีนจาก F13
ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 1.5x50.0 ซม. (ครั้งที่ 3) ซึ่งชะด้วย 0.02 M
Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 5 mM CaCl_2 โดยเก็บ fraction ละ 2 ลบ.ซม.

Fraction no.	A_{280}	แอกติวิตี		Fraction no.	A_{280}	แอกติวิตี		Fraction no.	A_{280}	แอกติวิตี	
		A_{440}	UA/ลบ.ซม.			A_{440}	UA/ลบ.ซม.			A_{440}	UA/ลบ.ซม.
14	0.002	0	0	35	0.012	0.030	0.100	56	0.025	0.011	0.036
15	0.102	0	0	36	0.012	0.028	0.093	57	0.021	0	0
16	0.304	0	0	37	0.013	0.024	0.080	58	0.018	0	0
17	0.190	0	0	38	0.015	0.021	0.070	59	0.016	0.003	0.010
18	0.084	0.001	0.003	39	0.020	0.020	0.167	60	0.014	0.007	0.023
19	0.044	0.002	0.006	40	0.027	0.020	0.067	61	0.014	0.004	0.013
20	0.025	0.002	0.006	41	0.041	0.002	0.006	62	0.013	0.001	0.003
21	0.016	0.002	0.006	42	0.056	0.003	0.010	63	0.009	0	0
22	0.012	0.002	0.006	43	0.074	0.005	0.016	64	0.009	0	0
23	0.011	0	0	44	0.088	0.025	0.083	65	0.009	0	0
24	0.011	0	0	45	0.099	0.023	0.076	66	0.010	0	0
25	0.011	0.003	0.010	46	0.100	0.012	0.040	67	0.010	0	0
26	0.010	0.021	0.070	47	0.096	0.003	0.010	68	0.010	0	0
27	0.008	0.020	0.067	48	0.084	0	0	69	0.011	0	0
28	0.008	0.009	0.030	49	0.071	0.006	0.020	70	0.011	0	0
29	0.008	0.009	0.030	50	0.061	0.014	0.046	71	0.012	0	0
30	0.008	0	0	51	0.050	0.011	0.036	72	0.009	0	0
31	0.008	0.019	0.063	52	0.044	0.009	0.030	73	0.006	0	0
32	0.009	0.023	0.076	53	0.039	0	0	74	0.006	0	0
33	0.010	0.035	0.116	54	0.034	0	0				
34	0.012	0.034	0.113	55	0.029	0.001	0.003				

ของโปรตีนมาตรฐานที่ชะออกจากคอลัมน์ชนิดเดียวกัน V_0 และ V_i ของคอลัมน์ตรวจสอบโดยใช้ Blue dextran และ Bromophenol blue ซึ่งเท่ากับ 38 และ 130 ลบ.ซม. ตามลำดับ (รูป 3.14) ส่วนกราฟมาตรฐานเตรียมจากโปรตีนมาตรฐานซึ่งเลือกใช้ BSA, Ovalbumin, Carbonic anhydrase และ

ตาราง 3.13 แอคติวิตีของโปรตีนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่ผลิตจาก F13 ด้วยคอลัมน์
Sephadex G-75 ครั้งที่ 3

สารละลาย โปรตีน	Fraction no.	ปริมาตร (ลบ.ซม.)	ปริมาตรที่ใช้ ในการทดสอบ (ลบ.ซม.)	A_{440}	แอคติวิตีโปรตีน	
					(UA/ลบ.ซม.)	ทั้งหมด (UA)
เริ่มต้น	-	1.0	0.5	0.020	2.000	2.000
โปรตีน I	24-30	11.2	0.3	0.008	0.027	0.302
โปรตีน II	31-40	18.3	0.3	0.017	0.057	1.043
โปรตีน III	42-47	9.0	0.3	0.003	0.010	0.099
โปรตีน IV	49-52	7.1	0.3	0.001	0.003	0.021
โปรตีน V	55-57	5.0	0.3	0.001	0.003	0.015
โปรตีน VI	59-61	6.1	0.3	0.002	0.006	0.036



รูป 3.13 แอคติวิตีของโปรตีน (o) และ A_{280} (●) ของสารละลายต่าง ๆ ที่ได้จากการแยก
โปรตีนที่ผลิตจาก F13 โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 1.5x50 ซม.

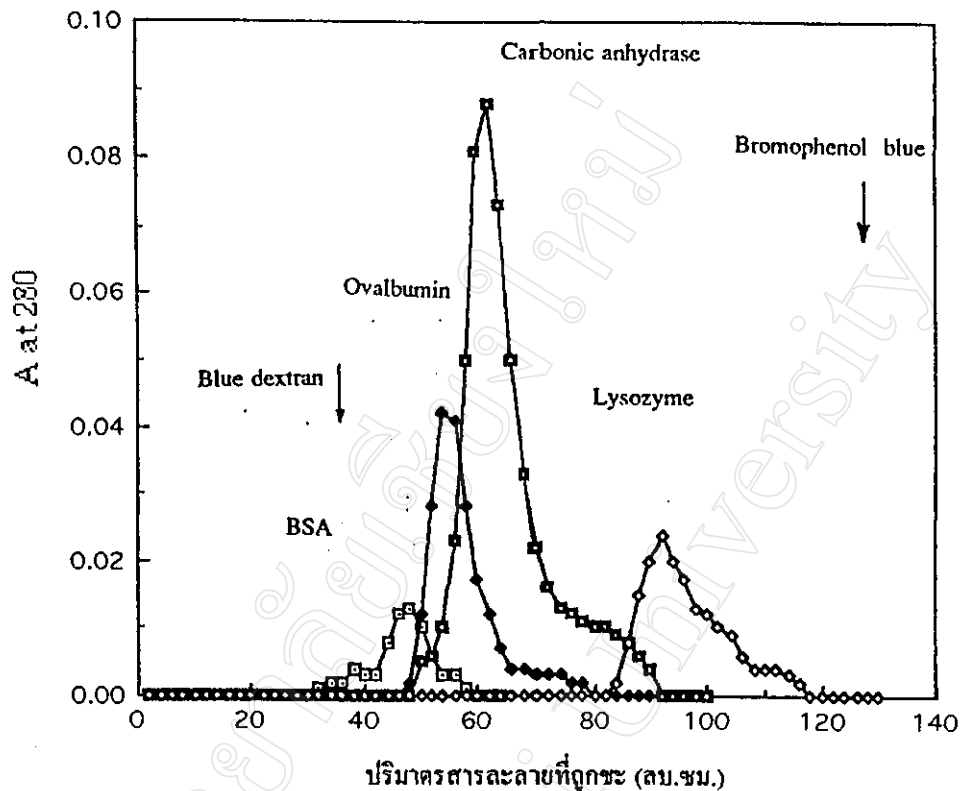
ตาราง 3.14 ปริมาณโปรตีนจากการทำบริสุทธิ์โปรตีนเอนไซม์ที่ผลิตจาก F13 ด้วยคอลัมน์
Sephadex G-75 ครั้งที่ 3

สารละลาย โปรตีนเอนไซม์	Fraction no.	ปริมาตร (ลบ.ซม.)	ปริมาตรที่ใช้ ในการทดสอบ (ลบ.ซม.)	A_{595}	โปรตีน	
					(มก./ลบ.ซม.)	ทั้งหมด (มก.)
เริ่มต้น	-	1.0	0.8	0.145	0.258	0.258
โปรตีนเอนไซม์ I	24-30	11.2	0.2	0.102	0.014	0.016
II	31-40	18.3	0.2	0.112	0.016	0.018
III	42-47	9.9	0.2	0.096	0.013	0.010
IV	49-52	7.1	0.2	< 0.096	< 0.013	< 0.010
V	55-57	5.0	0.2	< 0.096	< 0.013	< 0.010
VI	59-61	6.1	0.2	< 0.096	< 0.013	< 0.010

ตาราง 3.15 การทำบริสุทธิ์โปรตีนเอนไซม์ที่ผลิตจาก F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

สารละลาย โปรตีนเอนไซม์	ปริมาตร (ลบ.ซม.)	แอกติวิตีทั้งหมด (UA)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอกติวิตีจำเพาะ (UA/มก.)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (%)
เริ่มต้น	1.0	2.000	0.258	7.75	1.00	100.00
โปรตีนเอนไซม์ I	11.2	0.302	0.016	18.87	2.43	15.10
II	18.3	1.043	0.018	57.94	7.47	52.15
III	9.9	0.099	0.010	9.90	1.27	4.95

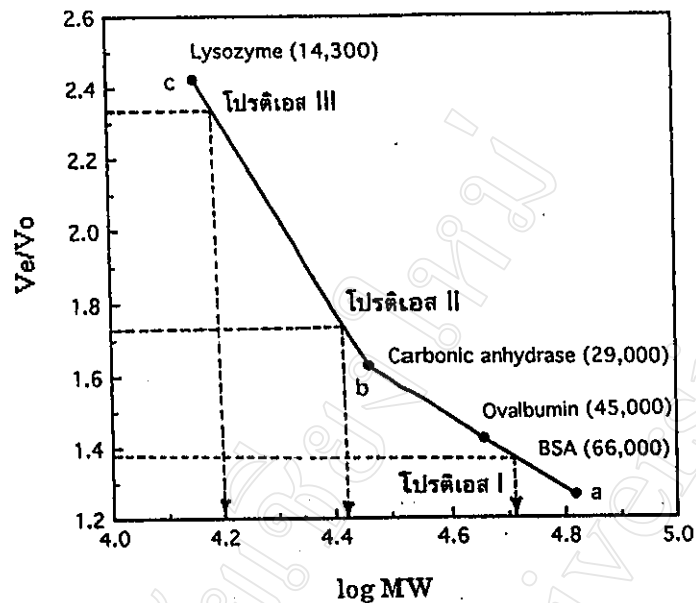
Lysozyme เมื่อผ่านโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดลงในคอลัมน์ Sephadex G-75 ในสภาวะเดียวกับ
การทำบริสุทธิ์โปรตีนเอนไซม์ ได้ผลดังปรากฏในรูป 3.14 ซึ่งทำให้ได้ปริมาตรของการชะโปรตีนมาตรฐาน
แต่ละชนิด (V_e) และเขียนกราฟระหว่าง V_e/V_0 และ $\log$ ของมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละ
ชนิด (ตาราง 3.16) ได้ผลดังรูป 3.15 ในการหามวลโมเลกุลของโปรตีนเอนไซม์ I, II และ III นั้น ทำโดยอ่าน
ค่าปริมาตรการชะโปรตีนเอนไซม์บริสุทธิ์ทั้งสามจากรูป 3.13 ซึ่งได้ผลดังตาราง 3.16 และเนื่องจาก V_0 ของ
คอลัมน์ = 38 ลบ.ซม. ทำให้ได้อัตราส่วนของ V_e/V_0 ที่สามารถเทียบหามวลโมเลกุลของโปรตีนเอนไซม์ทั้ง
สามได้จากกราฟมาตรฐานรูป 3.15 เช่น



รูป 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

ตาราง 3.16 ค่า V_e/V_0 และ $\log$ ของมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ที่ถูกระออกจากคอลัมน์ Sephadex G-75

โปรตีนมาตรฐาน	ขนาดมวลโมเลกุล (ดาลตัน)	ค่า $\log$ ของมวลโมเลกุล	ปริมาตรที่ถูกระ (ลบ.ซม.)	V_e/V_0
BSA	66,000	4.819	48	1.263
Ovalbumin	45,000	4.653	54	1.421
Carbonic anhydrase	29,000	4.462	62	1.631
Lysozyme	14,300	4.155	92	2.421



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

โปรตีน I มีค่า V_e/V_o ตรงกับ = 1.37
 จากกราฟรูป 3.13 ที่ V_e/V_o 1.37 ได้ log MW = 4.74
 ดังนั้น MW ของโปรตีน I = 55,000 ดาลตัน

ในทำนองเดียวกันสามารถเปรียบเทียบหามวลโมเลกุลของโปรตีน II และ III ได้ ซึ่งให้ผลดังสรุปในตาราง 3.17 ซึ่งจะเห็นว่ามวลโมเลกุลของโปรตีน 3 ชนิดจากแบคทีเรีย F13 อยู่ในช่วง 55,000-16,000 ดาลตัน เนื่องจากในช่วงเส้นกราฟมาตรฐาน b-c นั้น ได้จากข้อมูลของโปรตีนมาตรฐานเพียง 2 ชนิด ดังนั้นจึงใช้ SDS-PAGE ช่วยวิเคราะห์หา MW ของโปรตีน I และ II อีกวิธีหนึ่งสำหรับโปรตีน III นั้น มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้

ตาราง 3.17 มวลโมเลกุลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75

โปรตีนบริสุทธิ์	ปริมาตรที่ถูกชะ (ลบ.ซม.)	V_e/V_o	log ของมวลโมเลกุล	ขนาดมวลโมเลกุล (ดาลตัน)
โปรตีน I	52	1.37	4.74	55,000
โปรตีน II	66	1.74	4.42	27,000
โปรตีน III	88	2.32	4.20	16,000

3.5 คุณสมบัติของโปรตีน

3.5.1 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม

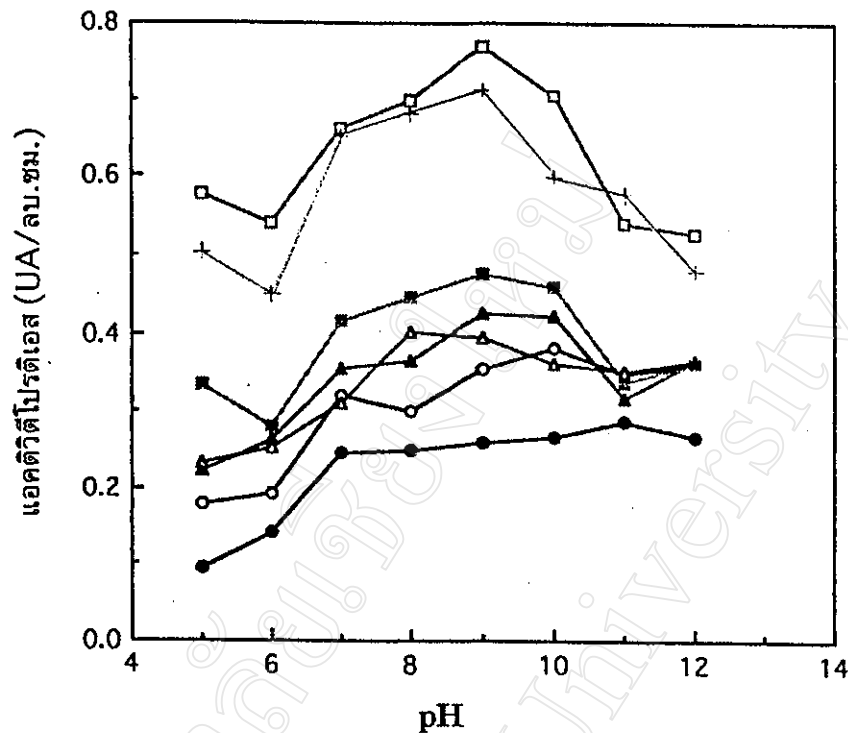
เมื่อนำโปรตีน 0.3 ลบ.ชม. ไปหาแอกติวิตีโดยการไฮโดรไลสเอซเคซีน โดยใช้สารละลายเอซเคซีน 0.2% ใน 0.02 M ของ Acetate, Phosphate, Tris-HCl และ Glycine-NaOH บัฟเฟอร์ พีเอช 5-12 ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 65, 70, 80 และ 90°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คำนวณแอกติวิตีของโปรตีนให้ผลสรุปดังตาราง 3.18 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของโปรตีนอุณหภูมิและพีเอชได้ผลดังรูป 3.16 ซึ่งพบว่าแอกติวิตีของโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 0.770 UA/ลบ.ชม. ที่อุณหภูมิ 80°C และพีเอช 9.0 ในขณะที่อุณหภูมิ 90°C พีเอชต่ำกว่า 7.0 และสูงกว่า 9.0 พบว่าแอกติวิตีโปรตีนมีค่าต่ำลง โดยเฉพาะที่พีเอช 7.0 และ 12.0 แอกติวิตีของโปรตีนคงเหลือน้อยส่วนอุณหภูมิในช่วง 40-70°C พีเอชต่ำกว่า 8.0 และสูงกว่า 9.0 พบว่าแอกติวิตีโปรตีนลดลงมาก โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 40°C แอกติวิตีมีค่าต่ำที่สุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโปรตีนทำงานได้ดีที่สุดในสารละลายพีเอช 9 ที่ 80°C

ตาราง 3.18 แอกติวิตีของโปรตีนที่อุณหภูมิและพีเอชต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	แอกติวิตี (UA/ลบ.ชม.) ณ พีเอชต่าง ๆ							
	5	6	7	8	9	10	11	12
40	0.094	0.142	0.246	0.250	0.260	0.266	0.286	0.268
50	0.180	0.194	0.322	0.300	0.354	0.382	0.348	0.362
60	0.222	0.264	0.356	0.366	0.424	0.422	0.318	0.366
65	0.232	0.252	0.312	0.402	0.394	0.360	0.350	0.366
70	0.334	0.280	0.416	0.444	0.476	0.458	0.338	0.362
80	0.576	0.540	0.660	0.700	0.770	0.706	0.504	0.526
90	0.503	0.450	0.653	0.683	0.713	0.600	0.576	0.480

3.5.2 ผลของตัวยับยั้ง

การศึกษามลของตัวยับยั้งที่มีต่อแอกติวิตีของโปรตีน ซึ่งทำให้สามารถบ่งบอกชนิดของโปรตีนได้นั้น ได้เลือกใช้ตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ EDTA, 1,10-Phenanthroline, PMSF, Amastatin, Bestatin, Iodoacetic acid, Leupeptin และ Phosphoramidon เพื่อยับยั้งการไฮโดรไลสเอซเคซีนของโปรตีน 0.50 ลบ.ชม. ที่ 80°C 1 ชั่วโมง คำนวณแอกติวิตีของโปรตีนในหน่วย



รูป 3.16 แอคติวิตีของโปรติเอสในสารละลายพีเอชต่าง ๆ กัน เมื่อใช้เอไซด์เป็น
 สับสเตรทที่อุณหภูมิ 40° (●) 50° (○) 60° (▲) 65° (△) 70° (■) 80° (□) และ
 90°C (+)

ของ UA ต่อโปรติเอส 1 ลบ.ชม. และให้ผลสรุปดังตาราง 3.19 และ 3.20 เมื่อพิจารณาแอคติวิตีที่ปรากฏ (%) ของโปรติเอสเมื่อมีตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับตาราง 1.5 ซึ่งจัดจำพวกของโปรติเอส ทำให้จัดประเภทของโปรติเอสชนิดนี้ได้ ผลการทดสอบด้วย Amastatin และ Bestatin (1-10 μ M) ซึ่งทำให้แอคติวิตีโปรติเอสลดลง 22-40% จึงคาดว่ามีสมบัติเป็น exopeptidase ส่วนผลการใช้ Iodoacetate (10-50 μ M) ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของแอคติวิตีอยู่บ้าง แต่คาดว่าไม่น่าจะเป็น cysteine โปรติเอส ผลการเปลี่ยนแปลงของแอคติวิตีเมื่อใช้ leupeptin (1-100 μ M) ไม่สามารถตัดสินได้ว่ามีคุณสมบัติเป็น serine โปรติเอสหรือไม่ แต่เมื่อพิจารณาจากการลดลงของแอคติวิตี (98%) เมื่อใช้ PMSF (10 mM) แสดงว่าควรจะมีลักษณะของ serine โปรติเอส ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาผลการลดลงของแอคติวิตีของโปรติเอสเหลือเพียง 21% เมื่อใช้ EDTA 10 mM แสดงว่าโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 มีสมบัติของ metalloprotease ส่วนผลของ 1,10-Phenanthroline และ phosphoramidon ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของ metalloprotease นั้นไม่ชัดเจนเหมือนกับ EDTA นั่นคือ อาจทำให้สรุปได้ว่าโปรติเอสที่ทดสอบนี้มีสมบัติของ Serine-metalloprotease

ตาราง 3.19 แอคติวิตีของโปรตีนเมื่อมีตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ (-) หมายถึง ไม่ทำการทดลอง

ชนิดตัวยับยั้ง	ความเข้มข้นตัวยับยั้ง (mM)											
	0		0.001		0.01		0.1		1		10	
	A ₄₄₀	UA/ ลบ. ชม.	A ₄₄₀	UA/ ลบ. ชม.	A ₄₄₀	UA/ ลบ. ชม.	A ₄₄₀	UA/ ลบ. ชม.	A ₄₄₀	UA/ ลบ. ชม.	A ₄₄₀	UA/ ลบ. ชม.
Bestatin	0.225	0.450	-	-	-	-	0.177	0.354	0.223	0.446	-	-
Iodoacetic acid	0.225	0.450	-	-	0.193	0.386	0.182	0.364	0.206	0.412	-	-
Leupeptin	0.225	0.450	-	-	0.188	0.376	0.184	0.368	0.193	0.386	-	-
1,10-Phenanthroline	0.225	0.450	-	-	-	-	0.203	0.406	0.179	0.358	0.184	0.368
Amastatin	0.225	0.450	0.137	0.274	0.180	0.360	-	-	-	-	-	-
Phosphoramidon	0.225	0.450	-	-	-	-	0.192	0.392	0.173	0.346	-	-
EDTA	0.225	0.450	-	-	-	-	0.173	0.346	0.218	0.436	0.048	0.096
PMSF	0.225	0.450	-	-	-	-	0.180	0.360	0.135	0.270	0.006	0.010

ตาราง 3.20 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่ปรากฏเมื่อมีตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ (- หมายถึงไม่ได้ทดลอง)

ความเข้มข้น (mM)	% แอคติวิตีที่ปรากฏ							
	Bestatin	Iodoacetic acid	Leupeptin	1,10-Phenan- throline	Amastatin	Phosphoramidon	EDTA	PMSF
0	100	100	100	100	100	100	100	100
0.001	-	-	-	-	60	-	-	-
0.01	-	85	83	-	80	-	-	-
0.1	78	80	81	90	-	87	76	80
1	99	91	85	79	-	76	85	60
10	-	-	-	81	-	-	21	2

3.5.3 ผลของไอออน

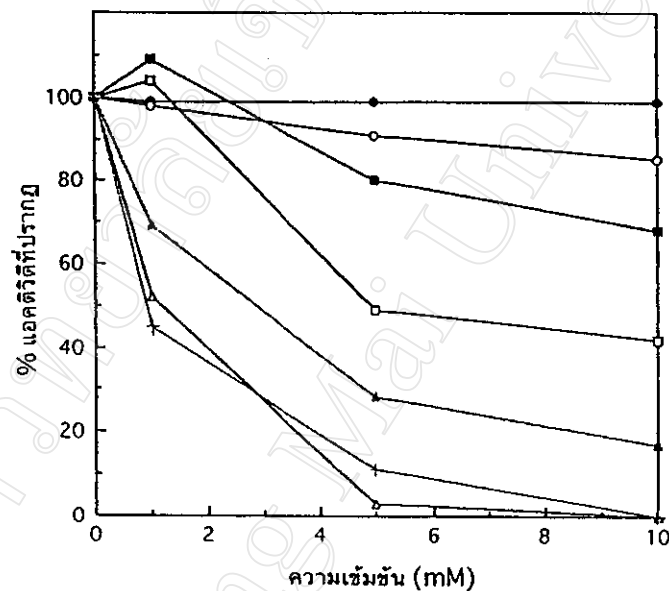
ผลการทดสอบอิทธิพลของตัวยับยั้งพบว่าโปรตีนจาก F13 จัดอยู่ในกลุ่ม metalloprotease ซึ่งเป็นโปรตีนที่ต้องการไอออนของโลหะในการเพิ่มแอกติวิตี เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} และ Co^{2+} เป็นต้น ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงแอกติวิตีของโปรตีนจาก F13 ด้วยไอออนต่าง ๆ ผลการทดสอบแอกติวิตีการไฮโดรไลสเอชเคซีนด้วยโปรตีนในสภาวะที่มีไอออนของ Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ในช่วง 1-10 mM ได้แอกติวิตีของโปรตีนดังแสดงในตาราง 3.21 และ 3.22 และให้ความสัมพันธ์ของแอกติวิตีโปรตีนที่ปรากฏกับความเข้มข้นของไอออนโลหะแต่ละชนิดดังรูป 3.17 ซึ่งแสดงว่า Mg^{2+} 1-10 mM ไม่มีผลทำให้โปรตีนมีแอกติวิตีเปลี่ยนแปลง ส่วน Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 1-10 mM มีผลทำให้แอกติวิตีของโปรตีนลดลง 2-15% ซึ่ง Fe^{3+} และ Mn^{2+} 1 mM ในปฏิกิริยามีผลทำให้แอกติวิตีเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ Fe^{3+} เพิ่มขึ้นเป็น 5-10 mM ทำให้โปรตีนทำงานลดลงกว่า 50% ในทำนองเดียวกันความเข้มข้นของ Mn^{2+} เพิ่มขึ้นเป็น 5-10 mM แอกติวิตีของโปรตีนกลับลดลงเหลืออยู่เท่ากับ 80-68% แต่สำหรับ Cu^{2+} 1-10 mM แอกติวิตีลดลงเหลือ 69-17% ในขณะที่ Co^{2+} และ Zn^{2+} 1-10 mM พบแอกติวิตีของโปรตีนลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อความเข้มข้นของไอออนเพิ่มขึ้น (1-5 mM) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 mM ขึ้นไป พบการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเกือบทั้งหมดและที่ 10 mM พบว่าไม่มีแอกติวิตีเหลืออยู่ เมื่อพิจารณาผลของไอออนทั้งหมดต่อแอกติวิตีของโปรตีนจาก F13 สรุปได้ว่า Zn^{2+} และ Co^{2+} ที่ 10 mM สามารถทำให้แอกติวิตีสูญเสียได้ 100% ในขณะที่ Mg^{2+} นั้น ไม่ทำให้แอกติวิตีเปลี่ยนแปลงแม้ว่ามีความเข้มข้นถึง 10 mM ส่วน Mn^{2+} และ Fe^{3+} ที่ 1 mM สามารถทำให้แอกติวิตีเพิ่มขึ้นได้ 9 และ 4% ตามลำดับ

ตาราง 3.21 แอกติวิตีของโปรตีนเมื่อมีไอออนชนิดต่าง ๆ

ชนิดไอออน	แอกติวิตีเมื่อมีความเข้มข้นไอออน (mM)							
	0		1		5		10	
	A_{440}	UA/ลบ.ทม.	A_{440}	UA/ลบ.ทม.	A_{440}	UA/ลบ.ทม.	A_{440}	UA/ลบ.ทม.
Mg^{2+}	0.214	0.428	0.213	0.426	0.212	0.424	0.212	0.424
Ca^{2+}	0.214	0.428	0.211	0.422	0.196	0.392	0.184	0.368
Mn^{2+}	0.214	0.428	0.234	0.468	0.173	0.346	0.146	0.292
Fe^{3+}	0.214	0.428	0.223	0.466	0.106	0.212	0.091	0.182
Cu^{2+}	0.214	0.428	0.149	0.298	0.060	0.120	0.038	0.076
Zn^{2+}	0.214	0.428	0.113	0.226	0.007	0.014	0	0
Co^{2+}	0.214	0.428	0.097	0.194	0.025	0.050	0	0

ตาราง 3.22 เปอร์เซ็นต์แอกติวิตีที่ปรากฏเมื่อมีไอออนชนิดต่าง ๆ

ความเข้มข้น (mM)	% แอกติวิตีที่ปรากฏในขณะที่มีไอออน						
	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Mn ²⁺	Fe ³⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺
0	100	100	100	100	100	100	100
1	99	98	109	104	69	52	45
5	99	91	80	49	28	3	11
10	99	85	68	42	17	0	0



รูป 3.17 แอกติวิตีที่ปรากฏ (%) ของโปรติเอสในสภาวะที่มี Mg²⁺ (●), Ca²⁺ (○), Mn²⁺ (■), Fe³⁺ (□), Cu²⁺ (▲), Zn²⁺ (Δ) และ Co²⁺ (+) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.5.4 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

โปรติเอสซึ่งแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 6 เริ่มต้นด้วยโปรติเอสดิบ 3 ลบ.ซม. มีแอกติวิตี 35.85 UA และปริมาณโปรตีน 1.485 มิลลิกรัม จะได้สารละลายโปรติเอส 78 ลบ.ซม. ซึ่งมีแอกติวิตี 35.10 UA และปริมาณโปรตีน 0.234 มิลลิกรัม นำไปศึกษาคุณสมบัติการไฮโดรไลสพันธะเอไมด์ เอสเทอร์ ในขณะที่การไฮโดรไลสโปรตีนโดยวิธี TNBS จะใช้สารละลายโปรติเอสที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 4 และ 7 (ตาราง 3.9) เทียบกับ Alcalase, Metalloprotease type IX จาก *Bacillus polymyxa*, ทริปซิน และโปรติเอสจากแบคทีเรีย S2

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

ในการศึกษา amidase activity ของโปรติเอสจาก F13 โดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท เปรียบเทียบกับ Alcalase, Metalloprotease type IX และทริปซินที่ความเข้มข้น 10 มก./ลบ.ซม. อย่างละ 100 ไมโครลิตรนั้น สารละลายโปรติเอสให้ทำปฏิกิริยาที่ 80°C ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่เปรียบเทียบให้ทำปฏิกิริยาที่ 60°, 37° และ 27°C ตามลำดับ ให้ผลดังตาราง 3.23

ในการคำนวณหา amidase activity ได้กำหนดให้ 1 หน่วยโปรติเอสในหน่วย UAm (BAPNA) หมายถึง ปริมาณโปรติเอสที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และให้ค่า A_{405} ที่เปลี่ยนแปลงต่อนาที เท่ากับ 1 หน่วย เช่น กรณีของทริปซินซึ่งให้ผลการเปลี่ยนแปลงของ A_{405} ดังรูป 3.18 สามารถคำนวณหาแอกติวิตี้ได้ดังนี้

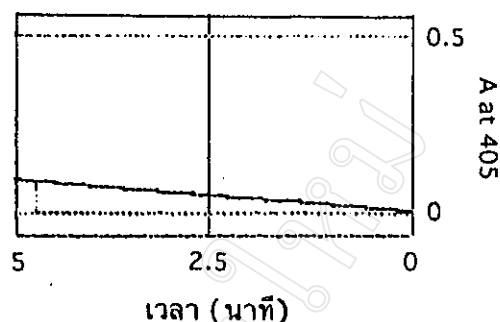
การทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายทริปซิน 0.1 ลบ.ซม. กับ BAPNA มากเกินพอจะได้อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรใน 5 นาที เท่ากับ 0.1 (รูป 3.20)

$$\begin{aligned}
 \text{นั่นคือในเวลา 1 นาที ทริปซินทำให้ } A_{405} \text{ เปลี่ยนไป} &= 0.02 \quad \text{หน่วย} \\
 \text{แสดงว่าทริปซิน 0.1 ลบ.ซม. มี amidase activity} &= 0.02 \quad \text{UAm (BAPNA)} \\
 \text{ดังนั้นทริปซิน 1.0 ลบ.ซม. มี amidase activity} &= \frac{0.02 \times 1.0}{0.1} \text{ UAm(BAPNA)} \\
 &= 0.2 \text{ UAm (BAPNA)/ลบ.ซม.}
 \end{aligned}$$

การคำนวณ amidase activity ของสารละลายโปรติเอส, Alcalase และ Metalloprotease type IX ทำได้ในทำนองเดียวกัน และได้ผลสรุปดังตาราง 3.24 ซึ่งพบว่าโปรติเอสจาก F13, Alcalase และ Metalloprotease type IX ไม่สามารถไฮโดรไลส์พันธะเอไมด์ของ BAPNA ได้ ในขณะที่ทริปซินมี amidase activity เท่ากับ 0.2 UAm (BAPNA)/ลบ.ซม.

ตาราง 3.23 การเปลี่ยนแปลงของ A_{405} เนื่องจากแอกติวิตี้ของโปรติเอสชนิดต่าง ๆ

โปรติเอส	ΔA_{405} / นาที
โปรติเอสจาก F13	0
Alcalase	0
Metalloprotease	0
ทริปซิน	0.02



รูป 3.18 การเปลี่ยนแปลงของ A_{405} ในระหว่างการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส BAPNA โดยทริปซินที่อุณหภูมิ 27°C

ตาราง 3.24 amidase activity ต่อ BAPNA ของโปรติเอสจาก F13, Alcalase, Metalloprotease type IX และทริปซิน ซึ่งมีแอกติวิตีต่อเอซีเคซีน 1 UA/ลบ.ชม. เหมือนกัน

สารละลาย	ปริมาตรทดสอบ (ลบ.ชม.)	amidase activity (UAm (BAPNA)/ลบ.ชม.)
โปรติเอสจาก F13	0.20	0
Alcalase	0.10	0
Metalloprotease type IX	0.10	0
ทริปซิน	0.10	0.20

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

การตรวจสอบแอกติวิตีต่อ FAGLA ของโปรติเอสจาก F13 เปรียบเทียบกับ Alcalase S2 และ Metalloprotease type IX ซึ่งวัดการเปลี่ยนแปลงของ A_{345} ในช่วงเวลา 5 นาทีของปฏิกิริยาให้ผลการทดลองดังรูป 3.19 ซึ่งสามารถคำนวณหาค่าการลดของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร (ΔA_{345})/นาที ได้ดังตาราง 3.25 และเมื่อเทียบค่านี้กับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ FAGLA (รูป 3.20) ทำให้ได้ปริมาณ FAGLA ที่หายไปเนื่องจากแอกติวิตีของโปรติเอสและจากการกำหนดให้ 1 ยูนิตอะมิเนสแอกติวิตีของโปรติเอส [UAm (FAGLA)] หมายถึง จำนวนโมลของ FAGLA ที่ลดลง 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที เนื่องจากการไฮโดรไลซิสของโปรติเอส ทำให้คำนวณหาอะมิเนส

แอกติวิตีของโปรติเอสได้ ตัวอย่างเช่น Metalloprotease type IX (10 มก./ลบ.ชม.) จำนวน 1 ลบ.ชม. สามารถไฮโดรไลส์ FAGLA ให้ค่า A_{345} ลดลง 0.080 ในเวลา 1 นาที เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน รูป 3.20 ให้ค่าความเข้มข้นของ FAGLA 0.07 mM

เนื่องจากปริมาตรทั้งหมดของสารละลายในการทดลอง

= 3.0 ลบ.ชม.

สารละลาย 1000 ลบ.ชม. มี FAGLA

= 0.07 mmole

สารละลาย 3 ลบ.ชม. มี FAGLA

= 0.07×3 mmole

1000

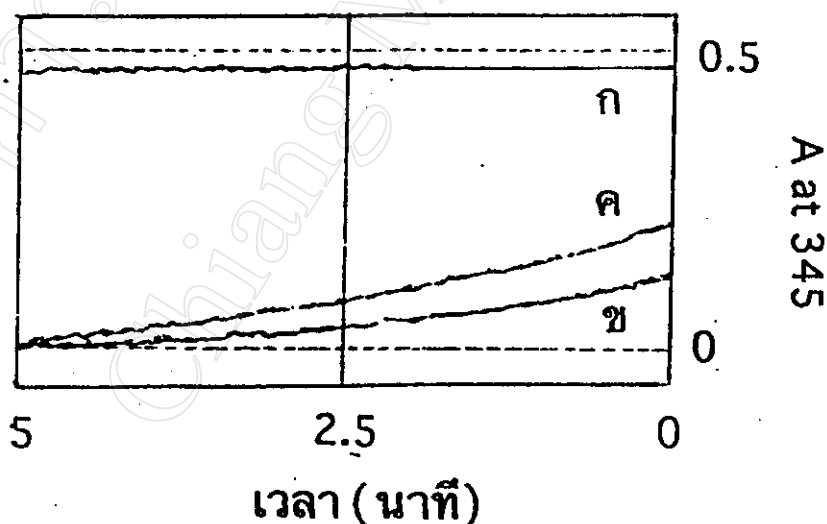
= 2.1×10^{-4} mmole

= 210 μ mole

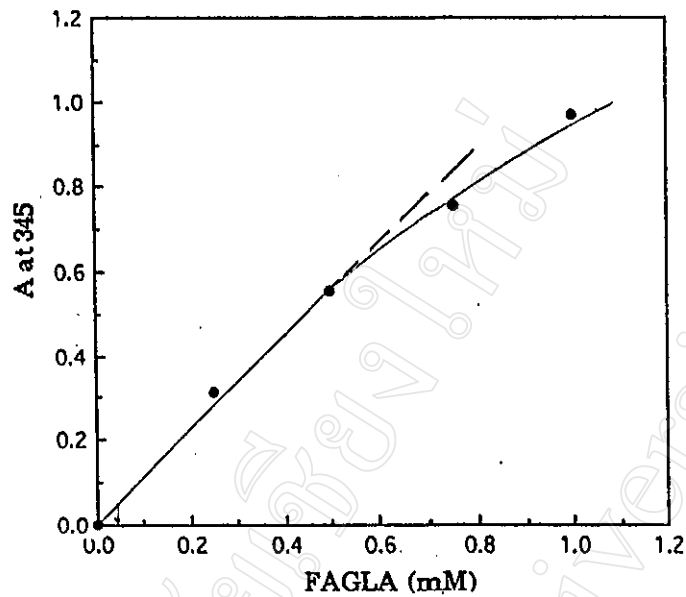
Metalloprotease type IX 1 ลบ.ชม. ทำให้ FAGLA ลดลงใน 1 นาที = 210 μ mole

ดังนั้น Metalloprotease type IX มีแอกติวิตีต่อ FAGLA 210 UAm (FAGLA)/ลบ.ชม.

ในทำนองเดียวกันสามารถคำนวณหาแอกติวิตีของสารละลายโปรติเอสอื่น ๆ ได้ดังผลสรุปในตาราง 3.25 จะเห็นได้ว่าโปรติเอสจาก F13 ไม่สามารถไฮโดรไลส์พันธะเอไมด์ของ FAGLA ได้ ในขณะที่โปรติเอสจาก S2 และ Metalloprotease type IX มีแอกติวิตีต่อ FAGLA เท่ากับ 148.15 และ 210 UAm (FAGLA)/ลบ.ชม. ตามลำดับ



รูป 3.19 การเปลี่ยนแปลง A_{345} จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ FAGLA โดยการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอส F13 (ก) Alcalase (ข) และ Metalloprotease type IX (ค)



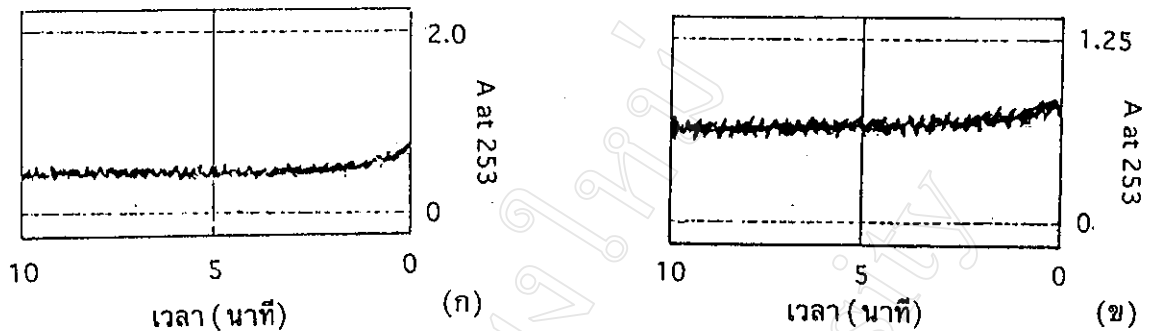
รูป 3.20 ความสัมพันธ์ระหว่าง A_{345} กับความเข้มข้นของ FAGLA

ตาราง 3.25 แอคติวิตีต่อ 1 UA ของโปรติเอสจาก F13, โปรติเอสจาก S2 และ Metalloprotease type IX ในการไฮโดรไลส์ FAGLA

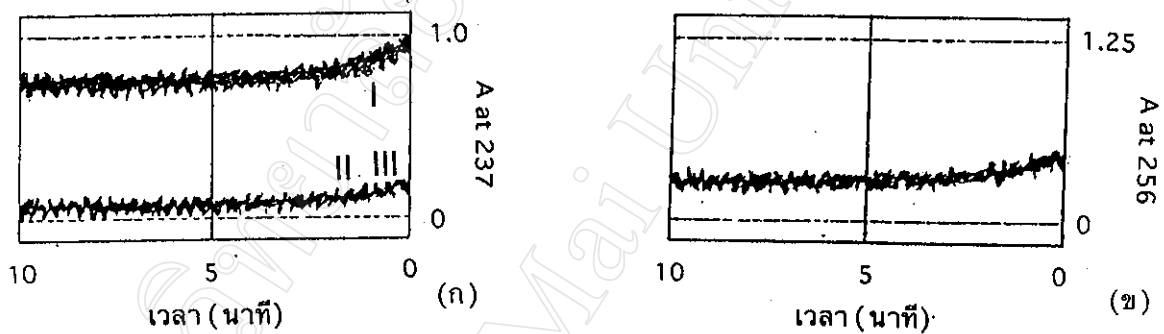
ชนิดโปรติเอส	ปริมาตรทดสอบ (ลบ.ซม.)	$\Delta A_{345}/\text{นาที}$	FAGLA		UAm (FAGLA)/ลบ.ซม.
			mM	μmole	
โปรติเอสจาก F13	2.00	0	0	0	0
Alcalase	0.81	0.047	0.04	120	148.15
Metalloprotease type IX	1.00	0.080	0.07	210	210.00

3.5.4.3 เอสเทอร์

ในการศึกษาความสามารถในการไฮโดรไลส์เอสเทอร์ของโปรติเอสจาก F13 เปรียบเทียบกับ Metalloprotease type IX, Alcalase และโปรติเอสจาก S2 ได้เลือกใช้เอสเทอร์ 5 ชนิด ได้แก่ ATEE, ATpEE, BAEE, PME และ TAME โดยใช้โปรติเอสจาก F13 2.0 ลบ.ซม., Metalloprotease type IX 1.0 ลบ.ซม., Alcalase 0.81 ลบ.ซม. และโปรติเอสจาก S2 2.0 ลบ.ซม. ซึ่งโปรติเอสแต่ละชนิดมีแอกติวิตี 1 UA เท่ากัน ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80° , 37° , 60° และ 65°C ตามลำดับ บันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า A_{235} ของ BAEE ค่า A_{237} ของ ATEE, ATpEE และ PME และค่า A_{256} ของ TAME ได้ผล ดังรูป 3.21 และ 3.22 ตามลำดับ



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



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

ในการคำนวณหาแอกติวิตีของโปรติเอสต่อเอสเทอร์แต่ละชนิด ได้กำหนดให้ 1 หน่วยเอสเทอร์แอกติวิตี (UE) หมายถึง ปริมาณเอสเทอร์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของเอสเทอร์เปลี่ยนไป 1 หน่วยใน 1 นาที ณ สภาวะทดลองนั้น ๆ คำนวณได้ดังตัวอย่างเช่น

จากรูป 3.21 ปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์ BAEE ของ Alcalase มีค่า $\Delta A_{253}/\text{นาที} = 0.38$

เนื่องจากสารละลาย Alcalase (1 UA) ที่ใช้ในการทดลอง = 0.81 ลบ.ชม.

ดังนั้น Alcalase 0.81 ลบ.ชม. มีแอกติวิตีต่อ BAEE = 0.38 UE

Alcalase 1.00 ลบ.ชม. มีแอกติวิตีต่อ BAEE = 0.38×1.00 UE

0.81

= 0.47 UE/ลบ.ชม.

ในการทำงานเดียวกันสามารถคำนวณหาแอกติวิตีของโปรติเอสจาก F13, Metalloprotease type IX และโปรติเอสจาก S2 เมื่อใช้ ATEE หรือเอสเทอร์ชนิดอื่นเป็นสับสเตรท สรุปผลการคำนวณ แสดงไว้ในตาราง 3.26 ซึ่งพบว่า Alcase สามารถไฮโดรไลส์ BAEE ได้เพียงชนิดเดียว โดยมีค่าแอกติวิตีต่อ BAEE เท่ากับ 0.47 UE/ลบ.ซม. ในขณะที่โปรติเอสจาก S2 สามารถไฮโดรไลส์ ATEE และ TAME ได้มากกว่า ATpEE, BAEE และ PME โดยมีแอกติวิตีต่อ ATEE และ TAME เท่ากับ 0.06 UE/ลบ.ซม. และมีแอกติวิตีต่อ ATpEE, BAEE และ PME เท่ากัน คือ 0.05 UE/ลบ.ซม. โดยที่ Metalloprotease type IX และโปรติเอสจาก F13 ไม่สามารถไฮโดรไลส์เอสเทอร์ทั้ง 5 ชนิดได้

3.5.4.4 การไฮโดรไลส์โปรตีนโดย TNBS

ในการศึกษาความสามารถของโปรติเอสจาก F13 เปรียบเทียบกับโปรติเอสที่ยังไม่บริสุทธิ์ (ไลโอไฟไลส์โปรติเอส) ในการไฮโดรไลส์โปรตีนได้เลือกใช้เอโซเคซีน เคซีน ฮีโมโกลบิน เจลาติน โปรตีนจากถั่วเหลืองและนมพร่องมันเนย เมื่อไฮโดรไลส์โปรตีนด้วยโปรติเอส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งไม่ตกตะกอนด้วยกรด ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ TNBS และได้สารละลายของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอนซึ่งเกิดจากกลุ่ม NH_2 ของกรดอะมิโนที่ทำให้ดูดกลืนแสงได้ที่มีความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ดังนั้นจึงใช้ leucine แทนกรดอะมิโนซึ่งทำปฏิกิริยากับ TNBS และให้การดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ดังตาราง 3.27 และกราฟมาตรฐาน รูป 3.23 เพื่อคำนวณค่า milliequivalent ของ leucine ซึ่งใช้คำนวณหาประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์โปรตีน (degree of hydrolysis, DH) โดยอาศัยความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

โดยที่ DH = ประสิทธิภาพของการไฮโดรไลส์ คือ ร้อยละของพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัด

h = จำนวนของพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัด ซึ่งเท่ากับความสัมพันธ์ leucine เป็น milliequivalent ต่อกรัมของโปรตีนที่เกิดขึ้นหลังจากการไฮโดรไลส์

h_{tot} = จำนวนพันธะเปปไทด์ทั้งหมด คือ ปริมาณกรดอะมิโนเดี่ยว ๆ ใน 1 กรัมของโปรตีน (ตาราง 1.6)

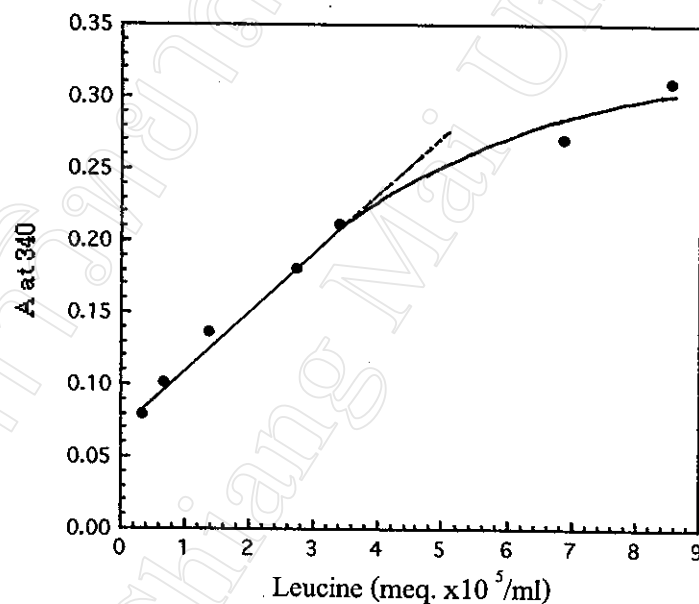
ในการคำนวณค่า h นั้น ปริมาณโปรตีนของสับสเตรทต่าง ๆ (เอโซเคซีน เคซีน ฮีโมโกลบิน เจลาติน โปรตีนจากถั่วเหลืองและนมพร่องมันเนย) วิเคราะห์โดยวิธี Bradford ปรากฏว่าได้ A_{595} ดังปรากฏในตาราง 3.28 และคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้ดังตัวอย่างเช่น การหาปริมาณโปรตีนของ 0.2% เอโซเคซีน (1% เจลาติน, 0.25% โปรตีนจากถั่วเหลืองและนมพร่องมันเนย) โดยใช้สับสเตรท 300 μl เจือจาง 100 เท่า นั่นคือ สับสเตรท 3 μl ให้ค่า $A_{595} = 0.155$ (ในกรณีของ 1% เคซีนและฮีโมโกลบิน ใช้สับสเตรท 40 μl เจือจาง 100 เท่า)

ตาราง 3.26 แอคติวิตีการไฮโดรไลส ATEE, ATpEE, BAEE, PME และ TAME โดยโปรตีนจาก F13, Metalloprotease type IX, Alcalase และโปรตีนจาก S2

ชนิดของโปรตีน	ATEE				ATpEE				BAEE				PME				TAME			
	ΔA_{237} / นาที	ปริมาณ (ลบ.ชม.)	ปริมาณต่อกรัม (ลบ.ชม.)	แอคติวิตี (UE/ลบ.ชม.)	ΔA_{237} / นาที	ปริมาณ (ลบ.ชม.)	ปริมาณต่อกรัม (ลบ.ชม.)	แอคติวิตี (UE/ลบ.ชม.)	ΔA_{237} / นาที	ปริมาณ (ลบ.ชม.)	ปริมาณต่อกรัม (ลบ.ชม.)	แอคติวิตี (UE/ลบ.ชม.)	ΔA_{237} / นาที	ปริมาณ (ลบ.ชม.)	ปริมาณต่อกรัม (ลบ.ชม.)	แอคติวิตี (UE/ลบ.ชม.)	ΔA_{237} / นาที	ปริมาณ (ลบ.ชม.)	ปริมาณต่อกรัม (ลบ.ชม.)	แอคติวิตี (UE/ลบ.ชม.)
โปรตีนจาก F13	0	2.0	0	0	0	2.0	0	0	0	2.0	0	0	0	2.0	0	0	0	2.0	0	0
Metalloprotease type IX	0	1.0	0	0	0	1.0	0	0	0	1.0	0	0	0	1.0	0	0	0	1.0	0	0
Alcalase	0	0.81	0	0	0	0.81	0	0	0.38	0.81	0	0.47	0	0.81	0	0	0	0.81	0	0
โปรตีนจาก S2	0.12	2.0	0.06	0.10	0.10	2.0	0.05	0.09	0.05	2.0	0.05	0.05	0.10	2.0	0.05	0.11	2.0	0.06	0.06	0.06

ตาราง 3.27 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรของสารละลาย leucine มาตรฐานใน 1% SDS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

Leucine			A_{340}
1.5 mM ปริมาตร (μl)	ปริมาณ (meq.)	ความเข้มข้น (meq./ลบ.ชม.)	
10	1.45×10^{-5}	3.41×10^{-6}	0.080
20	2.90×10^{-5}	6.82×10^{-6}	0.101
40	5.79×10^{-5}	1.36×10^{-5}	0.137
80	1.16×10^{-4}	2.73×10^{-5}	0.181
100	1.45×10^{-4}	3.41×10^{-5}	0.212
200	2.90×10^{-4}	6.82×10^{-5}	0.270
250	3.62×10^{-4}	8.52×10^{-5}	0.310



รูป 3.23 กราฟมาตรฐานของ leucine

เมื่อเทียบ A_{595} กับกราฟมาตรฐาน รูป 3.10 จะได้ปริมาณโปรตีน = 5.74 ไมโครกรัม/ลบ.ชม.
 เนื่องจากสารละลายทั้งหมดในหลอดทดสอบ = 1.50 ลบ.ชม.
 ดังนั้นสารละลายเอชเคซีน 3 ไมโครลิตร มีโปรตีน = 1.50×5.74 ไมโครกรัม
 = 8.61 ไมโครกรัม
 $\therefore$ สารละลายเอชเคซีน 1000 ไมโครลิตร มีโปรตีน = 8.61×1000 ไมโครกรัม

3

= 2.87 มิลลิกรัม

นั่นคือเอโซเคซีน 1 ลบ.ซม. ที่ใช้เป็นสับสเตรทมีโปรตีน = 0.0029 กรัม

ในทำนองเดียวกันปริมาณโปรตีนของสับสเตรทชนิดอื่น ๆ ได้สรุปผลไว้ในตาราง 3.28

ตัวอย่างการคำนวณค่าหาประสิทธิภาพการไฮโดรไลสของไลโอฟีไลส์โปรตีน F13 โดยใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรท ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.0029 กรัม (จากตาราง 3.28) หลังจากการไฮโดรไลสเอโซเคซีนด้วยไลโอฟีไลส์โปรตีน F13 จะได้กรดอะมิโน เมื่อทดสอบหาปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นจากการหาพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลสโดยวิธี TNBS จะได้สารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เท่ากับ 0.120 เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน leucine สามารถคำนวณค่า milliequivalent ต่อกรัมของโปรตีนทดสอบ (h) ได้ดังนี้

เมื่อเทียบค่า A_{340} จากการทดลองด้วยโปรตีน F13 เท่ากับ 0.120 กับกราฟมาตรฐาน leucine

จะมีค่า = 1.40×10^{-5} meq./ลบ.ซม.

นั่นคือสารละลาย 1 ลบ.ซม. มี leucine = 1.40×10^{-5} meq.

เนื่องจากสารละลายทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ = 8.25 ลบ.ซม.

ดังนั้นสารละลาย 8.25 ลบ.ซม. มี leucine = $1.40 \times 10^{-5} \times 8.25$ meq.

= 1.16×10^{-4} meq.

เนื่องจากใช้สารละลายตัวอย่าง = 0.25 ลบ.ซม.

ดังนั้นสารละลายตัวอย่าง 0.25 ลบ.ซม. จึงมี leucine = 1.16×10^{-4} meq.

เมื่อสารละลายตัวอย่างทั้งหมด = 3.30 ลบ.ซม.

นั่นคือสารละลายตัวอย่างมี leucine = $\frac{1.16 \times 10^{-4} \times 3.30}{0.25}$ meq.

= 1.53×10^{-3} meq.

เนื่องจากสารละลายตัวอย่างทั้งหมด 3.30 ลบ.ซม. เตรียมจากสารละลายเอโซเคซีนเริ่มต้น 1 ลบ.ซม.

ซึ่งมีโปรตีน = 0.0029 กรัม

นั่นคือเอโซเคซีน 0.0029 กรัม ถูกสลายให้ leucine = 1.53×10^{-3} meq.

∴ เอโซเคซีน 1 กรัม ถูกสลายให้ leucine = $\frac{1.53 \times 10^{-3}}{0.0029}$ meq.

= 0.53 meq.

ตาราง 3.28 ปริมาณโปรตีนของสารละลายสับสเตรทชนิดต่าง ๆ 1 ลบ.ซม.

สับสเตรท	A ₅₉₅	ปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟ มาตรฐาน (μg/ลบ.ซม.)	ปริมาณโปรตีน (กรัม)
เอโซเคซีน	0.155	5.74	0.0029
เคซีน	0.115	4.26	0.0160
ซีโมไกลบิน	0.163	6.04	0.0227
เจลาติน	0.191	7.07	0.0035
โปรตีนจากถั่วเหลือง	0.083	3.07	0.0015
นมพร่องมันเนย	0.075	2.78	0.0014

จากความสัมพันธ์

$$\begin{aligned}
 \text{ประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์เอโซเคซีน} &= \frac{\text{meq.leucine/กรัมโปรตีน} \times 100}{h_{\text{total}} \text{ ของเอโซเคซีน}} \\
 &= \frac{0.53}{8.2} \times 100 \\
 &= 6.46 \%
 \end{aligned}$$

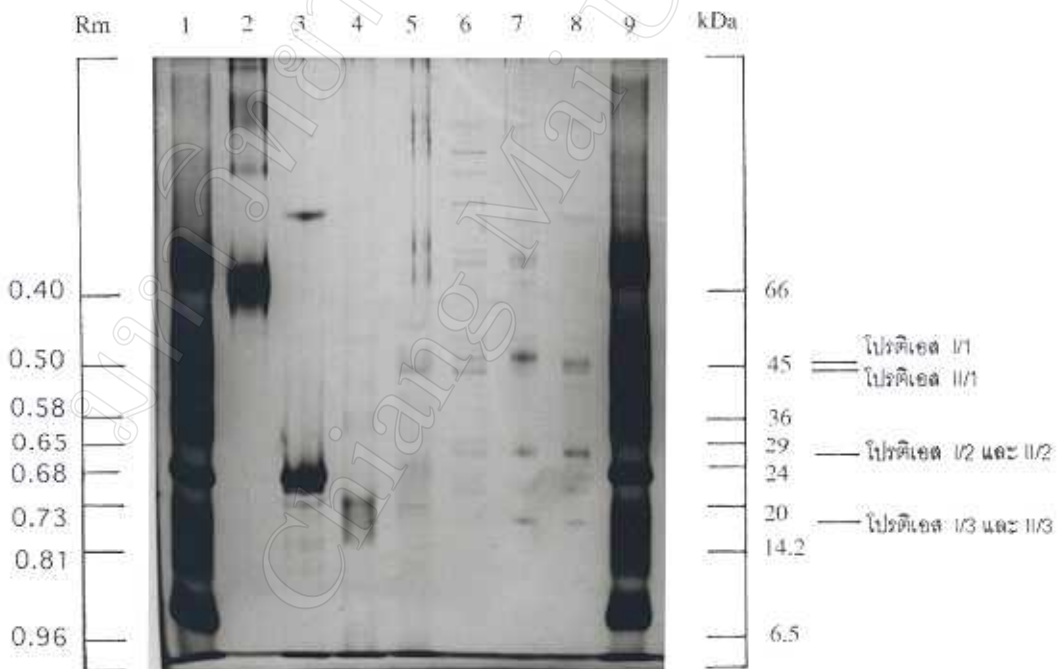
ในทำนองเดียวกันสามารถคำนวณค่าร้อยละของพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัด (% DH) จากการไฮโดรไลส์สับสเตรทชนิดต่าง ๆ โดยสารละลายโปรตีนจาก F13 และ Alcalase ดังแสดงในตาราง 3.29 พบว่าไลโอไฟล์โปรตีน F13 สามารถไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้น้อยกว่า Alcalase โดยที่ไลโอไฟล์โปรตีน F13 และสารละลายโปรตีนจาก F13 สามารถไฮโดรไลส์เอโซเคซีน > นมพร่องมันเนย > เจลาติน > โปรตีนจากถั่วเหลือง > เคซีน > ซีโมไกลบิน ซึ่งมีประสิทธิภาพของการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ในช่วง 6.46-0.46 และ 6.46-0.35% ตามลำดับ ในขณะที่ Alcalase สามารถไฮโดรไลส์เอโซเคซีน > เจลาติน > นมพร่องมันเนย > โปรตีนจากถั่วเหลือง > เคซีน > ซีโมไกลบิน ด้วยประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ในช่วง 13.78-2.29%

ตาราง 3.29 ประสิทธิภาพการไฮโดรไลสัฟันระเปปไทด์ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ โดยไลโอฟีไลต์
โปรตีนเอส F13 สารละลายโปรตีนเอสจาก F13 และ Alcalase

ชนิดของ โปรตีน	สับสเตรท	A_{340}	h (meq.leucine/กรัม โปรตีนทดสอบ)	h_{tot} (meq./กรัม โปรตีน)	DH %
ไลโอฟีไลต์ โปรตีนเอส F13	เอโซเคซีน	0.120	0.53	8.2	6.46
	เคซีน	0.090	4.08×10^{-2}	8.2	0.50
	อีโมโกลบิน	0.095	3.84×10^{-2}	8.3	0.46
	เจลาติน	0.141	0.56	11.1	5.05
	โปรตีนจากถั่วเหลือง	0.086	0.29	7.8	3.72
	นมพว่องมันเนย	0.089	0.47	8.8	5.34
สารละลาย โปรตีนเอส จาก F13ครั้งที่ 4	เอโซเคซีน	0.126	0.53	8.2	6.46
	เคซีน	0.110	6.81×10^{-2}	8.2	0.83
	อีโมโกลบิน	0.113	4.80×10^{-2}	8.3	0.58
	เจลาติน	0.172	0.81	11.1	7.30
	โปรตีนจากถั่วเหลือง	0.089	0.44	7.8	5.64
	นมพว่องมันเนย	0.092	0.47	8.8	5.34
สารละลาย โปรตีนเอส จาก F13ครั้งที่ 5	เอโซเคซีน	0.119	0.53	8.2	6.46
	เคซีน	0.086	3.41×10^{-2}	8.2	0.42
	อีโมโกลบิน	0.090	2.88×10^{-2}	8.3	0.35
	เจลาติน	0.130	0.50	11.1	4.51
	โปรตีนจากถั่วเหลือง	0.084	0.29	7.8	2.72
	นมพว่องมันเนย	0.089	0.47	8.8	5.34
Alcalase	เอโซเคซีน	0.200	1.13	8.2	13.78
	เคซีน	0.249	0.28	8.2	3.42
	อีโมโกลบิน	0.237	0.19	8.3	2.29
	เจลาติน	0.181	0.82	11.1	9.88
	โปรตีนจากถั่วเหลือง	0.093	0.41	7.8	5.26
	นมพว่องมันเนย	0.095	0.58	8.8	6.59

3.6 การตรวจสอบมวลโมเลกุลโดย SDS-PAGE

ผลการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของโปรตีน I และ II ซึ่งทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 โดย SDS-PAGE พบแถบโปรตีนดังรูป 3.24 เมื่อคำนวณค่า R_m ของแถบโปรตีนมาตรฐานที่ปรากฏในช่องที่ 1 และ 9 ซึ่งประกอบด้วย BSA, Ovalbumin, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Carbonic anhydrase, Trypsinogen, Trypsin inhibitor, α -Lactalbumin และ Aprotinin โดยที่ใช้โปรตีนมาตรฐานในช่องที่ 2 (BSA) ช่องที่ 3 (Trypsin inhibitor) และช่องที่ 4 (Lysozyme) เป็นตัวเปรียบเทียบ ได้ผลสรุปค่า R_m ของโปรตีนมาตรฐาน ดังตาราง 3.30 เมื่อเขียนกราฟมาตรฐานของโปรตีนเหล่านี้ทำให้ผลดังรูป 3.25 เมื่อพิจารณาโปรตีนบริสุทธิ์ได้จากไลโอฟีไลส์ (ช่องที่ 5) และเมื่อทำไดอะไลซิสของไลโอฟีไลส์โปรตีน ทำให้ได้ผลดังปรากฏในช่องที่ 6 ซึ่งทั้งสองช่องนี้พบแถบโปรตีนจำนวนมากกระจายอยู่ตั้งแต่ MW 66,000-19,000 คาลตัน แต่จะเห็นว่า มีแถบโปรตีนที่สอดคล้องกับแถบโปรตีนที่ปรากฏในช่องที่ 7 และ 8 ซึ่งเกิดจากโปรตีนบริสุทธิ์ I และ II ซึ่งแยกได้จากคอลัมน์ของ Sephadex G-75 โปรตีน I ในช่องที่ 7 ให้แถบโปรตีน 3 แถบ คือ โปรตีน I/1, I/2 และ I/3 มีค่า R_m เท่ากับ 0.50, 0.66 และ 0.78 ตามลำดับ และโปรตีน II



รูป 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) ไลโอฟีไลส์โปรตีน F13 (ช่องที่ 5) ไดอะไลซิสโปรตีน F13 (ช่องที่ 6) โปรตีน I (ช่องที่ 7) และโปรตีน II (ช่องที่ 8)

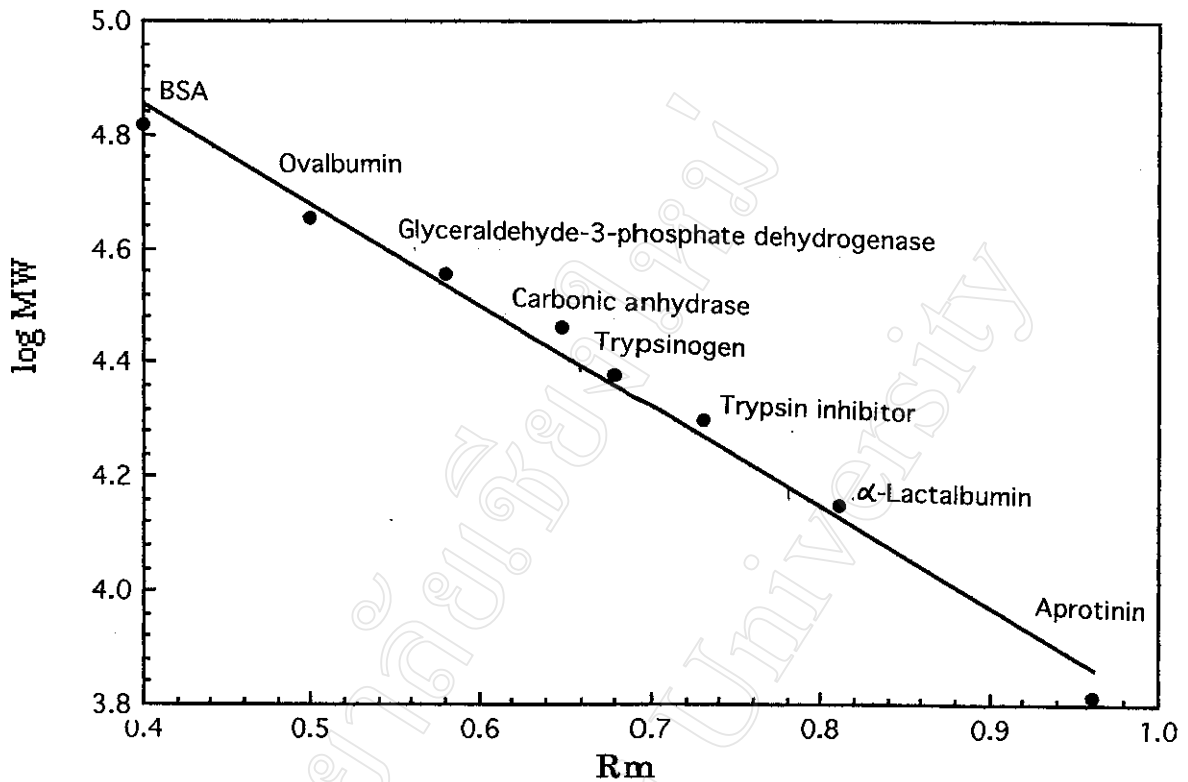
ตาราง 3.30 ค่า Rm และ log ของมวลโมเลกุลของสารละลายโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ บน 10% Polyacrylamide gel จาก SDS-PAGE

ชนิดโปรตีนมาตรฐาน	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	log ของ มวลโมเลกุล	ระยะทางที่เคลื่อนที่ (ซม.)	Rm
BSA	66,000	4.819	3.9	0.40
Ovalbumin	45,000	4.653	4.9	0.50
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,000	4.556	5.7	0.58
Carbonic anhydrase	29,000	4.462	6.4	0.65
Trypsinogen	24,000	4.380	6.7	0.68
Trypsin inhibitor	20,000	4.301	7.2	0.73
α -Lactalbumin	14,200	4.152	7.9	0.81
Aprotinin	6,500	3.812	9.4	0.96

ในช่องที่ 8 มีแถบโปรตีน 3 แถบคือ โปรตีนเอส II/1, II/2 และ II/3 ซึ่งมีค่า Rm เท่ากับ 0.51, 0.66 และ 0.78 ตามลำดับ เมื่อเทียบค่า Rm ที่ได้จากกราฟมาตรฐานรูป 3.25 ทำให้ได้แถบโปรตีนในโปรตีนเอส I ที่ MW 48,000, 29,000 และ 16,000 ดาลตัน และโปรตีนเอส II ให้แถบโปรตีนที่ MW 46,000, 29,000 และ 16,000 ดาลตัน ตามลำดับ (ตาราง 3.31) ซึ่งจะเห็นได้ว่าโปรตีนเอส I และ II มีโปรตีนชนิดแรกที่มี MW อยู่ในช่วง 48,000-46,000 ดาลตัน โปรตีนชนิดที่สองมี MW 29,000 ดาลตัน และชนิดที่สามมี MW ที่ 16,000 ดาลตัน เหมือนกัน เมื่อพิจารณาผลการทดลองนี้ควบคู่กับเจลฟิลเตรชัน ทำให้คาดว่าโปรตีนเอสบริสุทธิ์ของ F13 มี 3 ชนิด คือ มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 55,000-46,000, 29,000-27,000 และ 16,000 ดาลตัน ตามลำดับ

3.7 จุดไอโซอิเล็กตริก

ผลการตรวจสอบมวลโมเลกุลด้วยเจลฟิลเตรชันและ SDS-PAGE ของโปรตีนเอสจากแบคทีเรีย F13 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 คาดว่ามีโปรตีนได้ 3 ชนิด และได้ตรวจค่า pI ของโปรตีนบริสุทธิ์ด้วยไอโซอิเล็กตริกโฟคัสซิงและโครมาโตโฟคัสซิง



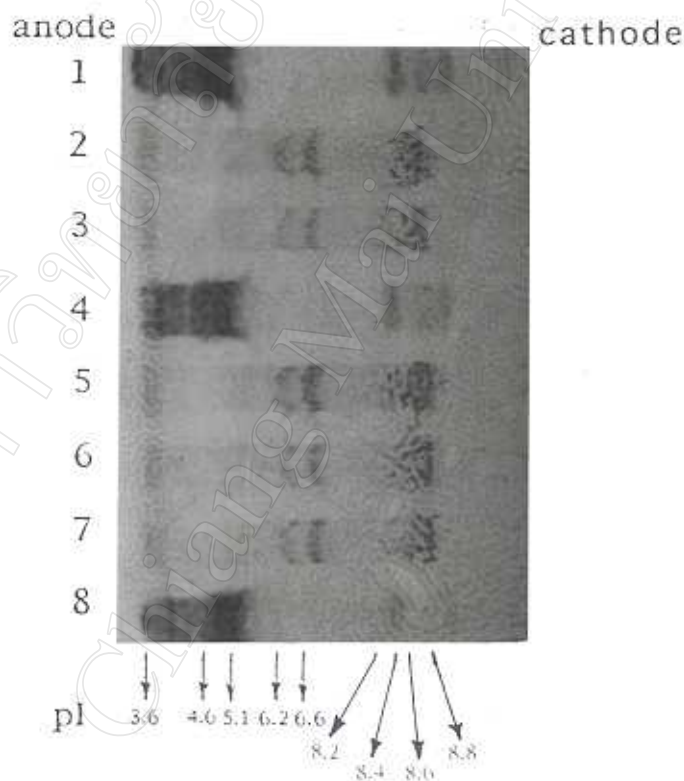
รูป 3.25 กราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน Sigma Marker M-3193 โดย SDS-PAGE

ตาราง 3.31 มวลโมเลกุลของโปรตีนบริสุทธิ์ตรวจสอบโดย SDS-PAGE

ชนิดโปรตีน	ระยะทางที่เคลื่อนที่ (ซม.)	Rm	log ของมวลโมเลกุล	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)
โปรตีน I/1	4.9	0.50	4.68	48,000
I/2	6.5	0.66	4.40	29,000
I/3	7.6	0.78	4.20	16,000
โปรตีน II/1	5.0	0.51	4.66	46,000
II/2	6.5	0.66	4.40	29,000
II/3	7.6	0.78	4.20	16,000

3.7.1 ไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง

ในการหาค่า pI ของโปรตีนจาก F13 ได้ใช้สารละลายโปรตีนที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ที่เตรียมในครั้งที่ 7 (ตาราง 3.9) ซึ่งมีผลการแยกที่ให้โปรตีนเพียงพืดเดียว ดังรูป 3.12 เนื่องจากปริมาณโปรตีนในสารละลายทั้งหมดมีความเข้มข้นไม่เพียงพอ จึงทำให้เข้มข้นขึ้น 3 เท่า โดยการกรองด้วยหลอด microcentrifuge filter ซึ่งมีโปรตีน 0.07 มก./ลบ.ซม. และใช้สารละลายนี้ใส่ลงในช่องใส่สารบนเจลช่องที่ 2, 3, 5, 6 และ 7 ช่องละ 1 ไมโครลิตร ส่วนช่องที่ 1, 4 และ 8 ใส่โปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูป 3.26 เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างจากหัวแอโนดกับค่า pI ของโปรตีนมาตรฐานบางค่า (เนื่องจากโปรตีนคือสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ที่พบเพียงพืดเดียวนั้น ปรากฏว่ามีโปรตีนอยู่ 3 ชนิด เช่นเดียวกับการแยกด้วย SDS-PAGE ดังนั้นจึงแสดงได้ว่าโปรตีนมาตรฐานที่ใช้บางชนิดไม่ปรากฏแถบสี จึงเลือกใช้ค่า pI บางค่าเท่านั้น) ดังที่แสดงในตาราง 3.32 ได้

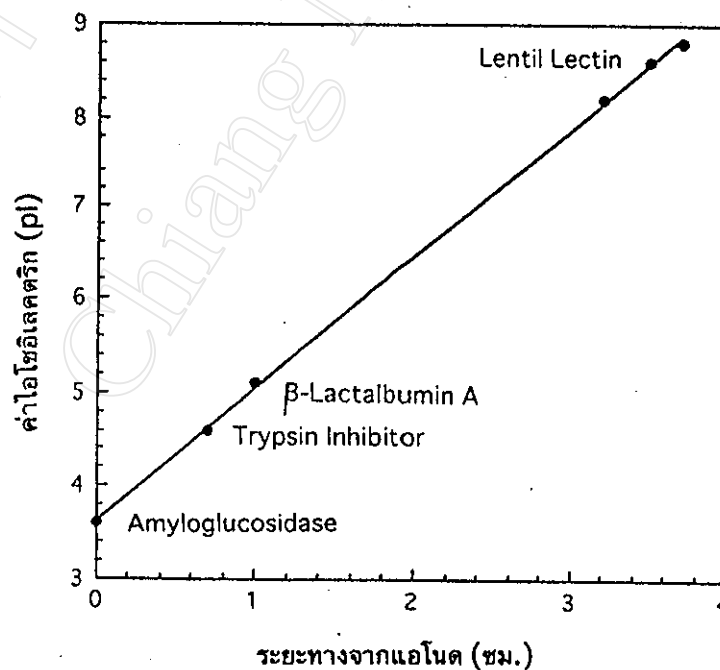


รูป 3.26 การแยกโปรตีนจาก F13 ด้วยไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิงช่องที่ 1, 4 และ 8 คือโปรตีนมาตรฐาน ประกอบด้วย Amyloglucosidase pI 3.6, Trypsin Inhibitor pI 4.6, β -Lactoglobulin A pI 5.1, Carbonic anhydrase I และ II pI 5.9 และ 6.6, Myoglobin pI 6.8 และ 7.2, Lentil Lectin pI 8.2, 8.6 และ 8.8 Trypsinogen pI 9.3 ช่องที่ 2, 3, 5, 6 และ 7 คือสารละลายโปรตีน

ผลดังรูป 3.27 จากรูป 3.26 จะเห็นได้ว่าสารละลายโปรตีนให้แถบโปรตีน 3 แถบ ซึ่งเมื่อเทียบค่าระยะห่างจากหัวแอโนดกับกราฟมาตรฐาน (รูป 3.29) จะได้ค่า pI ของโปรตีนดังตาราง 3.33 นั้น คือสารละลายโปรตีนที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ที่พบเพียงพิกเดียว นั้น ปรากฏว่ามีโปรตีนอยู่ 3 ชนิดเช่นเดียวกับการแยกด้วย SDS-PAGE ดังนั้นจึงแสดงได้ว่าโปรตีนที่ค

ตาราง 3.32 การเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานโดยไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง (- คือไม่ปรากฏ)

ชนิดโปรตีน	pI	ระยะห่างจากแอโนด (ซม.)
Amyloglucosidase	3.6	0
Trypsin Inhibitor	4.6	0.7
β -Lactoglobulin A	5.1	1.0
Carbonic anhydrase I	5.9	-
Carbonic anhydrase II	6.6	-
Myoglobin	6.8	-
	7.2	-
Lentil Lectin	8.2	3.2
	8.6	3.5
	8.8	3.7
Trypsinogen	9.3	-



รูป 3.27 กราฟมาตรฐานของการหาค่า pI ด้วยไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง 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

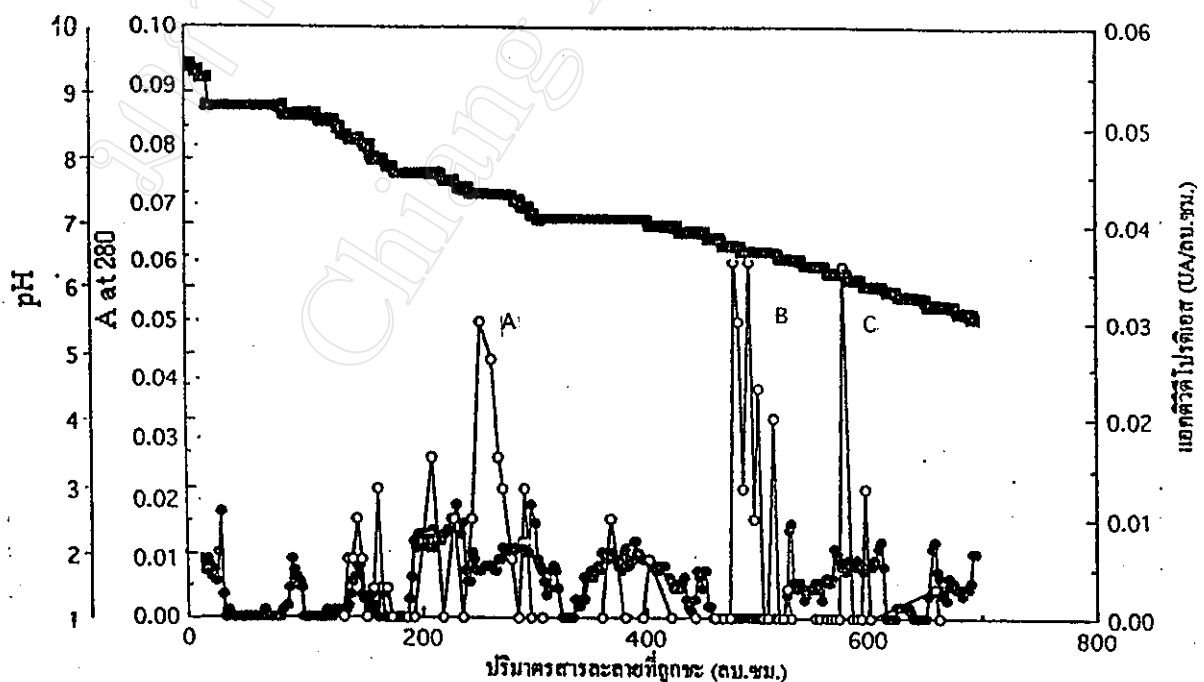
เดี่ยวที่แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 นั้น ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิดซึ่งมี pI ที่ 6.2, 6.6 และ 8.4

ตาราง 3.33 ค่า pI ของโปรตีน I, II และ III โดยไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง

โปรตีน	ระยะห่างจากแอนโอด (ซม.)	pI
I	1.9	6.2
II	2.2	6.6
III	3.4	8.4

3.7.2 โครมาโตกราฟโฟกัสซิง

เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 1 ลบ.ซม. ซึ่งมีแอกติวิตี 20 UA และปริมาณโปรตีน 3 มิลลิกรัม (รวมสารละลายโปรตีนที่แยกได้ในครั้งที่ 1 และ 2 ในตาราง 3.10 รวมกัน) แล้วใช้สารละลายนี้ 116 ลบ.ซม. ทำให้เข้มข้นขึ้นประมาณ 50 เท่าด้วยอัลตราฟิลเตรชัน) ลงในคอลัมน์ของ polybuffer exchanger (PBE 94) และชะคอลัมน์ด้วย polybuffer 96 จนพีเอชของสารละลายที่ถูกระเท่ากับ 6.0 จากนั้นชะตามด้วย polybuffer 74 จนพีเอชของสารละลายที่ถูกระเท่ากับ 4.0 ทำให้ได้ค่าต่าง ๆ ดังตาราง 3.34 และให้กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง A_{280} , pH และแอกติวิตีโปรตีนของสารละลายที่แยกได้ ดังรูป 3.28 จะเห็นว่ามีพีคของโปรตีน 3 พีค ซึ่งอยู่ใน



รูป 3.28 แอกติวิตี (○), A_{280} (●) และ pH (■) ของสารละลายที่ได้จากการแยกโปรตีน

ผ่านคอลัมน์ polybuffer exchanger 94 (1.0x30 ซม.)

ตาราง 3.34 แอคติวิตี, A_{280} และ pH ของสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์ polybuffer exchanger 94 (1.0x30 ซม.)

หลอดที่	ปริมาตรที่ระ (ลบ. ซม.)	A_{280}	pH	แอคติวิตี (UA/ลบ. ซม.)	หลอดที่	ปริมาตรที่ระ (ลบ. ซม.)	A_{280}	pH	แอคติวิตี (UA/ลบ. ซม.)
1	2.15	0.011	9.4	0.000	81	174.15	0.000	7.9	0.000
3	6.45	0.009	9.4	0.000	83	178.45	0.000	7.9	0.000
5	10.75	0.010	9.3	0.000	85	182.75	0.000	7.8	0.000
7	15.05	0.010	9.2	0.000	87	187.05	0.000	7.8	0.000
9	19.35	0.007	9.2	0.000	90	193.50	0.013	7.8	0.000
11	23.65	0.006	8.8	0.000	93	199.95	0.014	7.8	0.000
13	27.95	0.018	8.8	0.000	95	204.25	0.012	7.8	0.000
15	32.25	0.000	8.8	0.000	97	208.55	0.015	7.8	0.016
17	36.55	0.000	8.8	0.000	99	212.85	0.015	7.8	0.006
19	40.85	0.000	8.8	0.000	102	219.30	0.014	7.8	0.000
21	45.15	0.000	8.8	0.000	104	223.60	0.015	7.7	0.000
23	49.45	0.000	8.8	0.000	106	227.90	0.017	7.7	0.010
25	53.75	0.000	8.8	0.000	109	236.00	0.016	7.6	0.006
27	58.05	0.000	8.8	0.000	111	240.30	0.006	7.6	0.006
29	62.35	0.000	8.8	0.000	113	244.60	0.011	7.6	0.010
31	66.65	0.000	8.8	0.000	115	248.90	0.008	7.5	0.016
33	70.95	0.000	8.8	0.000	117	253.20	0.008	7.5	0.030
35	75.25	0.000	8.8	0.000	119	257.50	0.009	7.5	0.028
37	79.55	0.000	8.8	0.000	121	261.80	0.009	7.5	0.026
39	83.85	0.002	8.8	0.000	124	268.25	0.010	7.5	0.016
41	88.15	0.010	8.7	0.000	126	272.55	0.012	7.5	0.013
43	92.45	0.007	8.7	0.000	129	279.00	0.011	7.5	0.006
45	96.75	0.005	8.7	0.000	132	285.45	0.012	7.4	0.000
47	101.05	0.000	8.7	0.000	135	291.90	0.011	7.3	0.003
49	105.35	0.000	8.7	0.000	138	298.35	0.019	7.3	0.000
51	109.65	0.000	8.7	0.000	142	306.95	0.008	7.1	0.000
53	113.95	0.000	8.7	0.000	145	313.40	0.005	7.1	0.000
55	118.25	0.000	8.6	0.000	147	317.70	0.009	7.1	0.000
57	122.55	0.000	8.6	0.000	149	322.00	0.005	7.1	0.000
59	126.85	0.001	8.6	0.000	151	326.30	0.000	7.1	0.000
61	131.15	0.001	8.5	0.000	153	330.60	0.000	7.1	0.000
63	135.45	0.002	8.4	0.006	155	334.90	0.000	7.1	0.000
65	139.75	0.006	8.4	0.006	157	339.20	0.002	7.1	0.000
67	144.05	0.009	8.3	0.010	159	343.50	0.003	7.1	0.000
69	148.35	0.004	8.3	0.006	161	347.80	0.007	7.1	0.000
71	152.65	0.000	8.2	0.000	163	352.10	0.007	7.1	0.000
73	156.95	0.001	8.2	0.003	165	356.40	0.009	7.1	0.000
75	161.25	0.000	8.0	0.013	167	360.70	0.011	7.1	0.000
77	165.55	0.004	8.0	0.003	169	365.00	0.010	7.1	0.000
79	169.85	0.000	8.0	0.003	171	369.30	0.011	7.1	0.010

ตาราง 3.34 (ต่อ)

หลอดที่	ปริมาตรที่ใส (ลบ.ทม.)	A ₂₈₀	pH	แอมพิวติตี (UA/ลบ.ทม.)	หลอดที่	ปริมาตรที่ใส (ลบ.ทม.)	A ₂₈₀	pH	แอมพิวติตี (UA/ลบ.ทม.)
173	373.60	0.009	7.1	0.000	254	547.75	0.005	6.4	0.000
175	377.90	0.008	7.1	0.000	256	552.05	0.006	6.4	0.000
177	382.20	0.012	7.1	0.000	258	556.35	0.006	6.4	0.000
179	386.50	0.010	7.1	0.000	260	560.65	0.007	6.4	0.000
181	390.80	0.013	7.1	0.000	262	564.95	0.006	6.3	0.000
183	395.10	0.010	7.1	0.000	264	569.25	0.012	6.3	0.000
186	401.55	0.010	7.1	0.006	266	573.55	0.010	6.3	0.013
188	405.85	0.009	7.0	0.000	268	577.85	0.009	6.3	0.030
190	410.15	0.009	7.0	0.000	271	584.30	0.009	6.2	0.000
192	414.45	0.009	7.0	0.000	273	588.60	0.010	6.2	0.000
194	418.75	0.007	7.0	0.000	275	592.90	0.009	6.2	0.000
196	423.05	0.005	7.0	0.000	277	597.20	0.009	6.1	0.013
198	427.35	0.005	7.0	0.000	279	601.50	0.009	6.1	0.000
200	431.65	0.006	6.9	0.000	281	605.80	0.010	6.1	0.000
202	435.95	0.003	6.9	0.000	283	610.10	0.013	6.1	0.000
204	440.25	0.001	6.9	0.000	285	614.40	0.000	6.1	0.000
206	444.55	0.008	6.9	0.000	287	618.80	0.000	6.0	0.000
208	448.85	0.005	6.9	0.000	289	623.00	0.000	6.0	0.000
210	453.15	0.008	6.9	0.000	291	627.30	0.002	5.9	0.000
212	457.45	0.002	6.8	0.000	293	631.60	0.002	5.9	0.000
214	461.75	0.000	6.8	0.000	295	635.90	0.001	5.9	0.000
216	466.05	0.000	6.8	0.010	297	640.20	0.000	5.9	0.000
218	470.35	0.000	6.7	0.013	299	644.50	0.000	5.9	0.000
220	474.65	0.000	6.7	0.016	301	648.80	0.000	5.9	0.000
222	478.95	0.000	6.7	0.036	303	653.10	0.004	5.8	0.000
224	483.25	0.000	6.7	0.003	305	657.40	0.013	5.8	0.003
226	487.55	0.000	6.6	0.013	307	661.70	0.007	5.8	0.000
228	491.85	0.000	6.6	0.036	309	666.00	0.005	5.8	0.000
230	496.15	0.000	6.6	0.010	311	670.30	0.007	5.8	0.000
232	500.45	0.000	6.6	0.023	313	674.60	0.006	5.8	0.000
234	504.75	0.000	6.6	0.000	315	678.90	0.005	5.7	0.000
236	509.05	0.000	6.6	0.000	317	683.20	0.005	5.7	0.000
238	513.35	0.000	6.6	0.020	319	687.50	0.005	5.7	0.000
240	517.65	0.000	6.6	0.000	321	691.80	0.011	5.7	0.000
242	521.95	0.000	6.5	0.000					
244	526.25	0.004	6.5	0.000					
246	530.55	0.016	6.5	0.000					
248	534.85	0.005	6.5	0.000					
250	539.15	0.005	6.5	0.000					
252	544.45	0.004	6.4	0.000					

ช่วงปริมาตรการชะ 236-285 ลบ.ซม. (พีค A), 476-490 ลบ.ซม. (พีค B) และ 577-580 ลบ.ซม. (พีค C) ซึ่งมีพีเอช 7.5, 6.7 และ 6.3 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำสารละลายโปรตีนเหล่านี้ไปหา แอคติวิตีและโปรตีน ทำให้ได้ผลดังปรากฏในตาราง 3.37 และเมื่อคำนวณค่าแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนทั้งหมดทำให้ได้ผลดังตาราง 3.36 ซึ่งพบว่าโปรตีน A, B และ C มีค่าแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 1.335, 0.194 และ 0.086 UA โดยที่มีปริมาณโปรตีนในสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 0.495, 0.077 และ 0.034 มิลลิกรัม ตามลำดับ จากค่าที่ได้สามารถคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดได้เท่ากับ 2.70, 2.52 และ 2.52 UA/มก. ตามลำดับ ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเหลืออยู่เพียง 6.68, 0.97 และ 0.86% ตามลำดับ

ผลจากโครมาโตกราฟีคัลซิงนี้แสดงว่าโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ในครั้งที่ 1 และ 2 ซึ่งได้พีคโปรตีนเพียงพีคเดียวนั้น มีโปรตีนทั้งหมด 3 ชนิด เช่นเดียวกับผลของการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง ซึ่งพบว่ามีโปรตีน 3 ชนิด ในสารละลายโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120

ตาราง 3.35 แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีคัลซิง

ชนิดโปรตีน	pH	หลอดที่	ปริมาตร (ลบ.ซม.)	แอคติวิตี		โปรตีน	
				A ₄₄₀	UA/ ลบ.ซม.	A ₅₉₅	มก./ลบ.ซม.
โปรตีน A	7.5	109-132	49.45	0.008	0.027	0.291	0.010
โปรตีน B	6.7	221-230	19.35	0.003	0.010	0.105	0.004
โปรตีน C	6.3	268-270	4.30	0.006	0.020	0.212	0.008

ตาราง 3.36 ผลผลิตของสารละลายโปรตีนที่แยกด้วยคอลัมน์ polybuffer exchanger 94

ชนิดโปรตีน	แอคติวิตีทั้งหมด (UA)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (UA/มก.)	% ผลผลิต
โปรตีนเริ่มต้น	20.000	3.000	6.67	100.00
โปรตีน A	1.335	0.495	2.70	6.68
โปรตีน B	0.194	0.077	2.52	0.97
โปรตีน C	0.086	0.034	2.52	0.86

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรีย F13 ผลิตโปรตีนได้อย่างน้อย 3 ชนิด การทำบริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์ Sephadex G-75 (2 ครั้งแรก) หรือ G 100-120 นั้น ใช้โปรตีนดิบตั้งต้นมากเกินไป ทำให้ไม่สามารถแยกโปรตีนสามชนิดออกจากกันได้ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากผลการทำบริสุทธิ์ด้วย คอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่สาม ซึ่งใช้สารละลายโปรตีนดิบที่เริ่มต้นในปริมาณที่น้อยลง เหลือ 2 ลบ.ซม. (เดิมใช้ 3 ลบ.ซม.) ทำให้พบโปรตีนทั้งหมด 6 ชนิด แต่มี 3 ชนิดที่มีปริมาณ เพียงพอสำหรับการศึกษา ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่วิเคราะห์พบโดย SDS-PAGE ไอโซอิเล็กตริก- ไฟคัลลิงและโครมาโตกราฟี