

เชื้อ alkaliphilic *Bacillus* sp. RS1 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์เซรีน โปรตีนเนส และสามารถปล่อยออกนอกเซลล์ได้ ซึ่งคัดแยกได้จากบ่อน้ำเสียจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ ในจังหวัดกาญจนบุรี ประเทศไทย ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี 16S rDNA พบว่า alkaliphilic *Bacillus* sp. RS1 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus halodurans* DSM 497 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบแต่เพียงอย่างเดียวร้อยละ 2 ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เซรีน โปรตีนเนสจาก alkaliphilic *Bacillus* sp. RS1 สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และใช้คอลัมน์ DEAE ร่วมกับ คอลัมน์ Mono Q และ Gel-filtration sepracryl S-100 จากการศึกษาสารยับยั้งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่า PMSF 10 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการทำงานของเซรีน โปรตีนเนส ได้เกือบสมบูรณ์ แสดงว่าเอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม เซรีน โปรตีนเนส เมื่อทำการศึกษาลักษณะของเซรีน โปรตีนเนส โดย bell-shaped profile พบว่า สามารถทำงานได้ดีที่ pH 11.0 (เนื่องจากมีเซรีนอยู่ที่บริเวณเร่ง) และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 60 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีน 2 แถบ ขนาด 44.7 และ 30.2 kDa และจากการตรวจสอบชนิดของเอนไซม์ด้วยสับสเตรทจำเพาะ คือ AZCL-casein และ เคซีน พบว่าสามารถย่อยโปรตีนได้ และเมื่อทำการศึกษสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทสังเคราะห์ พบว่าเอนไซม์เซรีน โปรตีนเนสสามารถย่อย Gyl-Arg-p-nitroanilide dihydroxychloride ได้ดีที่สุด และพบว่าไม่สามารถย่อย Ala-Ala-Phe-p-nitroanilide, Val-Ala-p-nitroanilide acetate, N-succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide, N-succinyl-L-Phenylalanine-p-nitroanilide และ N-Benzoyl-L-Tyrosine-p-nitroanilide ได้เลย แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง subsite P₁ ของเซรีน โปรตีนเนสชนิดนี้มีความจำเพาะสำหรับกรดอะมิโน arginine ได้ดี

Alkaliphilic *Bacillus* sp. RS1, isolated from a waste water treatment plant of a pulp and paper manufacturer in Kanjanaburi province Thailand, produced an extracellular serine proteinase and was identified as *Bacillus halodurans* DSM 497 through 16S rDNA analysis. Maximum enzyme activity was achieved when the bacterium was grown on 2% deoiled soybean meal with shaking at 250 rpm, pH 11, 37°C and 60 h incubation period. The enzyme has been purified by ammonium sulfate precipitation and a combination of DEAE ion-exchange chromatography, Mono Q ion-exchange chromatography and Gel-filtration Sepharose S-100 chromatography. Purified enzyme activity was strongly inhibited by phenylmethyl sulphonyl fluoride. The purified enzyme was thus a serine proteinase. The enzyme activity is characterized by a bell-shaped profile with an optimum pH value around 11 (possible the serine residue present at the active site). The optimum temperature of serine was 60 °C. It hydrolyzed natural substrate AZCL-casein and caseine. The molecular weight of the purified serine proteinase were determined to be 44.7 and 30.2 kDa by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In investigating the *Bacillus halodurans* DSM 497, serine proteinase can catalyze hydrolysis of Gly-Arg-p-nitroanilide dihydrochloride but not catalyze Ala-Ala-Phe p-nitroanilide, Val-Ala-p-nitroanilide acetate, N-succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide, N-succinyl-L-Phenylalanine-p-nitroanilide and N-Benzoyl-L-Tyrosine-p-nitroanilide indicated that P₁ subsite of serine proteinase specific for arginine.