

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของโปรตีน จากเชื้อ alkaliphilic *Bacillus* sp.B3 โดย Fast Protein Liquid Chromatography เชื้อ *Bacillus* sp.B3 เป็นเชื้อที่คัดแยกจากบ่อน้ำเสียของโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ ในประเทศไทย ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากถั่วเหลืองบด ร้อยละ 2.0 ที่ pH 11.0 บ่มที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ crude proteinase อยู่ในช่วง 6.0 -12.0 และมีเสถียรภาพต่อ pH ในช่วง 6.0 - 12.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมและเสถียรภาพในการทำงานของ crude proteinase อยู่ในช่วง 30-60 องศาเซลเซียส โปรตีนจาก alkaliphilic *Bacillus* sp. B3 สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ anion exchange chromatography โดยเครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography ผ่านคอลัมน์ DEAE ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและเร็วที่สุด พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์โดย phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) แสดงว่าเอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์โปรตีนเอส เช่นเดียวกับ trypsin, chymotrypsin, thrombin และ subtilisin นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์สามารถทำงานได้ดีที่ pH 11.0 และมีเสถียรภาพต่อ pH ในช่วง 8.0-11.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 60 องศาเซลเซียสและมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีน 2 แถบ ขนาด 45 และ 30 kDa และจากการศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทสังเคราะห์ 2 ชนิดคือ N-Omega-Nitro-L-Arginine p-Nitroanilide Hydrobromide และ NA-Benzoyl-L-Arginine p- Nitroanilide Hydrochloride พบว่าเอนไซม์สามารถย่อย N-Omega-Nitro-L-Arginine p-Nitroanilide Hydrobromide ได้ดีโดยให้ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์(K_m) ได้เท่ากับ $784.52 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$ และมีความเร็วสูงสุดเท่ากับ (V_{max}) เท่ากับ $2.36 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$ ในขณะที่เดียวกันพบว่าไม่สามารถย่อย NA-Benzoyl-L-Arginine p- Nitroanilide Hydrochloride ได้เลย

The aim of this work is to purify a proteinase from alkaliphilic *Bacillus* sp. B3 by Fast Protein Liquid Chromatography and to study its properties. *Bacillus* sp. B3, isolated from a waste water treatment plant of a pulp and paper manufacturer in Thailand, produced an extracellular proteinase. The maximum enzyme activity was achieved when the bacterium was grown on 2% deoiled soybean meal at pH 11.0, 250 rpm, 37 °C and over 60 h incubation period. The crude proteinase had an optimum pH from 6.0 to 12.0 and maintained its stability in the pH range of 6 to 12. The optimum temperature of crude proteinase were 30 to 60 °C and maintained its stability in the temperature range of 30 to 60 °C. The proteinase was purified by ammonium sulphate precipitation and anion exchange chromatography. However, the simplest and most rapid purification method was the use of Fast Protein Liquid DEAE Chromatography. The enzyme activity was strongly inhibited by phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF). As it has been shown to have a serine residue which is essential for activity, therefore, it has been grouped with other serine proteinases, such as trypsin, chymotrypsin, thrombin and subtilisin. The purified enzyme has an optimum pH of 11.0 and maintained its stability in the pH range of 8.0 to 11.0. Its optimum temperature is around 60 °C and maintained its stability at the temperature between 50 and 60 °C. The relative molecular mass of the serine proteinase was determined to be 30 and 45 kDa by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Kinetic studies of this enzyme for N-Omega-Nitro-L-Arginine p-Nitroanilide Hydrobromide and NA-Benzoyl-L-Arginine p-Nitroanilide Hydrochloride showed that serine proteinase could hydrolyse N-Omega-Nitro-L-Arginine p-Nitroanilide Hydrobromide it have shown K_m and V_{max} were 784.52 and 2.36 $\mu\text{mol}^{-1}.\text{sec}^{-1}$ respectively but could not hydrolyse NA-Benzoyl- L-Arginine p- Nitroanilide Hydrochloride.