T 145720

จากตัวอย่างน้ำ 9 ตัวอย่างและตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งที่มีอุณหภูมิสูง 14 แห่ง สามารถแยกแบคทีเรียชอบร้อน 65 องศาเซลเซียส ได้ 42 ไอโซเลต เมื่อทดสอบการสร้างวงใส รอบโคโลนีบนอาหารแข็ง BY ที่มี skim milk 1 % พบว่ามีเพียง 12 ไอโซเลต ที่ให้วงใสรอบโคโลนี ที่มีความกว้างตั้งแต่ 2.5 มม. ขึ้นไป เลือกไอโซเลตที่มีโปรติเอสแอคติวิตีสูงสุดคือ RW 60-6 มา ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีโดยอาศัย Bergey's Manual of Systematic Bacteriology พบว่าน่าจะเป็น *Bacillus stearothermophilus*

นำโปรติเอสจากเชื้อ RW60-6 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้การตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุดีอีเออี ไบโอเจล-เอ พบว่าแยกโปรติเอสได้ 2 ชนิด คือ โปรติเอส U (โปรติเอสที่ไม่จับกับตัวกลาง) และ โปรติเอส B (โปรติเอสที่จับกับตัวกลาง) มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.16 เท่า และ4.77 เท่าตามลำดับ และมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 10.68 % และ 8.28 % ของ crude เอนไซม์ตามลำดับ เมื่อนำมาตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ทั้งสองประกอบด้วยโปรติเอสที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 2 ชนิด ดังนี้ โปรติเอส U ประกอบด้วยโปรติเอสขนาด 200,000 และ 33,000 ดาลตัน ส่วนโปรติเอส B ประกอบด้วย โปรติเอสขนาด 197,000 และ 35,000 ดาลตัน

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่า โปรติเอส ทั้งสองคล้ายคือมีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 65 องศา-เซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ โปรติเอสทั้งสองมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 30 นาที และเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่าง 7.0-8.5 เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ โปรติเอสทั้งสองถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA จึงจัดเป็น นิวทรัลเมทัลโลโปรติเอส

From 9 water samples and 15 soil samples, 42 protease producing bacterial isolates were obtained at 65 degree Celsius. Only 12 isolates could produce clear zone of 2.5 mm or more on BYmedium with 1%. The isolate RW60-6 gave the highest enzyme activity and was identified as *Bacillus stearothermophilus*, according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

The extracellular proteases of the isolate RW60-6 were partially purified by ammonium sulfate fractionation and DEAE Biogel A ion-exchange chromatography. Ion-exchange chromatography resulted in separation of the enzyme preparation into one major (protease U) and one minor (protease B) peak. The two-step purification scheme resulted in 13.16-fold purification and an overall recovery of 10.68 % of protease U and 4.77-fold purification and 8.28% recovery of protease B. SDS-PAGE assay showed two bands with neutral protease activity, at 33 and 200 kDa of protease U and at 35 and 197 kDa of protease B.

Both of partially purified proteases had optimum temperature and pH of 65 degrees Celsius and 7.0. Protease U and B, when together, retained 100% activity at 65 degrees Celsius for 30 min. and 80% activity at pH 7.0-8.5 for 30 min. The enzymes activity was inhibited by metal chelating agents, EDTA. They can thus be classified as neutral-metalloproteases.