

Bacillus sp. FK 14 ผลิตเอนไซม์เคราตินเนสสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 ในอาหารที่ประกอบด้วยขนไก่ป่น (feather meal) 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรทในสภาวะการเลี้ยงดังนี้ ความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้น 7.5 อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาทีและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์เคราตินเนสถูกทำให้เข้มข้นด้วยวิธี Ultrafiltration โดยเมมเบรนขนาด 10 kDa และตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวของเกลือ 40 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE Sepharose 2 ครั้ง เอนไซม์เคราตินเนสบริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 104 ยูนิตต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 41 เท่า และผลผลิต 105 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นโมเลกุลเดี่ยวขนาด 35 กิโลดาลตัน ความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 8.5 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงความเป็นกรดต่าง 7.0–9.0 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์ถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วย phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) EDTA และ Iodoacetamide 96, 62 และ 22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เอนไซม์นี้คาดว่าอยู่ในกลุ่ม serine protease และพบว่าอิออนของโลหะช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์โดยเฉพาะ Mn^{2+} และ Al^{3+} และถูกยับยั้งการทำงานด้วย Fe^{3+} เอนไซม์สามารถย่อยสลายโปรตีนที่ละลายน้ำได้แก่ casein, gelatin, BSA และ elastin มีค่า relative activity 100, 79.5, 76.5 และ 3.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและย่อยสลายโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำได้แก่ collagen, human nail, keratin azure, chicken feather และ human hair มีค่า relative activity 35.6, 16.35, 9.0, 5.1 และ 2.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Bacillus sp. FK14 produced an extracellular keratinase in a medium containing feather meal as a substrate at pH 7.5, 37°C and 150 rpm. The keratinase was purified by ultrafiltration (YM10), 40 % ammonium sulfate fractionation and two columns of anion exchange chromatography (DEAE Sepharose). After purification, the keratinase exhibited high specific activity (104 U/mg) with 41 purification fold and 105% yield. The enzyme was monomeric and had a molecular mass of 35 KDa. The enzyme had optimum pH and temperature of 8.5 and 60 °C, respectively. The enzyme was stable over the pH range between 7 - 9 and stable up to 37°C. The enzyme activity was inhibited by PMSF, EDTA and Iodoacetamide at 96 %, 62 % and 22 %, respectively. It indicates that the enzyme is serine protease. It was stimulated by most metal ions except Fe^{3+} and had the highest relative activity with Mn^{2+} and Al^{3+} . Keratinase was capable of hydrolysing the soluble proteins and insoluble proteins. It hydrolysed soluble proteins; casein, gelatin, BSA and elastin with relative activity of 100%, 79.5%, 76.5% and 3.6%, respectively. It also hydrolysed insoluble proteins; collagen, human nail, keratin azure, chicken feather and human hair with relative activity of 35%, 16.35%, 9.0%, 5.1% and 2.8%, respectively.