



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยขนไก่จากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp.

นาย วรพจน์ สุนทรสุข
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

31 มีนาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยขนไก่จากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp.

คณะผู้วิจัย

สังกัด

นาย วรพจน์ สุนทรสุข

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

นาย ธนิต คูสำราญ
(นักวิจัยที่ปรึกษา)

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

Bacillus sp. FK 14 ผลิตเอนไซม์เคราติเนสสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 ในอาหารที่ประกอบด้วยขนไก่ป่น (feather meal) 1 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรทในสภาวะการเลี้ยงดังนี้ ความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้น 7.5 อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาทีและอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์เคราติเนสถูกทำให้เข้มข้นด้วยวิธี Ultrafiltration โดยเมมเบรนขนาด 10 kDa และตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวของเกลือ 40 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE Sepharose 2 ครั้ง เอนไซม์เคราติเนสบริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ 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

Abstract

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.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การเลี้ยงสัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่เนื้อในประเทศไทยมีการพัฒนาขึ้นเป็นลำดับ จากการเลี้ยงในครัวเรือนไปเป็นการเลี้ยงเพื่ออุตสาหกรรม อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อรวมถึงอุตสาหกรรมแปรรูปไก่ในประเทศมีแนวโน้มขยายตัวขึ้นทุกปี เนื่องจากการบริโภคภายในประเทศและการส่งออกไก่สดและเนื้อไก่แปรรูปมีปริมาณเพิ่มขึ้น สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานการเลี้ยงไก่เนื้อในปี 2540 มีปริมาณสูงถึง 700 ล้านตัว ขณะเดียวกันอุตสาหกรรมแปรรูปไก่ผลิตของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูป อาทิ เลือด เครื่องใน กระดูกไก่ และขนไก่ โดยเฉพาะขนไก่เหลือทิ้งคาดว่าจะมีมากถึงประมาณ 50,000 - 80,000 ตันต่อปี ขนไก่เหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโครงสร้างชั้นนอกประเภทเคราติน (keratin) โปรตีนประเภทนี้ย่อยสลายได้ยากและหากสะสมในปริมาณมากอาจก่อมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากขนไก่ไม่สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนปกติที่มีอยู่ในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นขนไก่ไม่สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับอาหารสัตว์ได้โดยตรงแต่ต้องมีการแปรรูปขนไก่ก่อน การแปรรูปขนไวมักนิยมทำโดยผ่านกระบวนการใช้ความร้อนและความดันสูงประมาณ 130-150 องศาเซลเซียส และความดัน 30-50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 0.5-2.5 ชั่วโมง เพื่อให้อยู่ในรูปของขนไก่ป่น (feather meal) นำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ทดแทนการนำเข้าวัตถุดิบสำหรับการผลิตอาหารสัตว์ อาทิ กากถั่วเหลืองและปลาป่น ซึ่งมีราคาสูงในปัจจุบัน และมีแนวโน้มจะสูงขึ้นทุกปี นอกจากนี้ยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศในปริมาณมากทุกปี คิดเป็นมูลค่าประมาณ 12,500 ล้านบาทต่อปี อย่างไรก็ตามขนไก่ป่นมีปริมาณโปรตีนย่อยได้ (digestible protein) และกรดอะมิโนไม่สูงนักเมื่อเทียบกับกากถั่วเหลืองและปลาป่น อีกทั้งการผลิตขนไก่ป่นต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงในการติดตั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ และที่สำคัญต้องใช้พลังงานสูงทำให้ขนไก่สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการบางส่วน อาทิ กรดอะมิโนจำเป็นบางชนิด

วิธีทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นวิธีการหนึ่งในการแปรรูปวัตถุดิบทางการเกษตรให้มีประโยชน์และมีมูลค่าสูงขึ้น เนื่องจากวิธีการนี้มีข้อดีคือ ไม่ใช้พลังงานสูงและไม่มีปฏิกิริยาเคมีที่รุนแรง ดังนั้นจึงไม่ทำลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปและเป็นการไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ในปัจจุบัน อาทิ การใช้เอนไซม์ย่อยสลายเนื้อปลาให้เกิดเป็นโปรตีนย่อยง่าย (fish protein hydrolysate) การสกัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ การใช้เอนไซม์ฟอกเยื่อกระดาษ และการปลูกเปลือกผลไม้ด้วยเอนไซม์ เป็นต้น ปัจจุบันภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ได้คัดเลือกและเก็บรวบรวมจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ย่อยสลายไขมันจำนวนหนึ่ง จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยไขมันได้ ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลในการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยไขมันให้เกิดเป็นโปรตีนย่อยง่ายซึ่งใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ในอนาคต รวมทั้งอาจใช้เอนไซม์เคราติเนสเป็นส่วนผสมโดยตรงในอาหารสัตว์ที่มีไขมันปนผสมอยู่ซึ่งเป็นการช่วยย่อยไขมันในอาหารสัตว์อีกวิธีหนึ่ง การแยกเอนไซม์ย่อยไขมันให้บริสุทธิ์ และศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์จึงมีความจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ดังกล่าวต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการแยกเอนไซม์ย่อยไขมันให้บริสุทธิ์
2. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่มีผลต่อการย่อยไขมัน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

1. ผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ *Bacillus sp.* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย NH_4Cl 0.05%, NaCl 0.05%, K_2HPO_4 0.03%, KH_2PO_4 0.04%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024%, Yeast extract 0.01% และไขมันไก่หรือไขมันไก่ป่น 1% ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 วัน ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปริมาณเอนไซม์ย่อยสลายไขมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ และเก็บรวบรวมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้น

2. แยกเอนไซม์ย่อยไขมันให้บริสุทธิ์

วิธีการต่างๆในการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จะถูกนำมาใช้ อาทิ การตกตะกอนด้วยเกลือ ammonium sulfate และวิธีการทาง column chromatography รวมทั้ง membrane technology วิธีการที่ทำให้ได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงและผลผลิตสูงสามารถจะนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

3. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

อาทิ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ค่า pI ของเอนไซม์ อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการย่อยไขมัน ความคงตัวของเอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ค่าคงที่ Michaelis-Menten ค่าความเร็วสูงสุดและความเฉพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น เป็นต้น

การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยขนไก่จากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp.

นาย วรพจน์ สุนทรสุข

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนงบประมาณ
สำหรับงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ธนิต คำสำราญ นักวิจัยที่ปรึกษา และ รศ. ดร. กนก
รัตนะกนกชัย ที่ให้คำแนะนำ และขอขอบคุณ นางสาวจันทร์ทิพย์ ทองจันทร์ ที่ช่วยเหลืองานวิจัยนี้
ให้สำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
หน้าสรุปโครงการ	5
สารบัญ	8
กิตติกรรมประกาศ	8
บทนำ	9
วิธีการทดลอง	9
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	11
สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก	25

บทนำ

ขนไก่จัดเป็นของเหลือทิ้งประเภทหนึ่งจากอุตสาหกรรมแปรรูปไก่ ขนไก่มีองค์ประกอบเป็นโปรตีนประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโครงสร้างซับซ้อนประเภทเคราติน (keratin) ขนไก่สามารถถูกแปรรูปโดยผ่านกระบวนการใช้ความร้อนและความดันสูง ประมาณ 130-150 องศาเซลเซียส และความดัน 30-50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 0.5-2.5 ชั่วโมง ให้อยู่ในรูปของขนไก่ป่น (feather meal) เพื่อเป็นอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามการผลิตขนไก่ป่นต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงในการติดตั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ และที่สำคัญต้องใช้พลังงานสูงทำให้ขนไก่สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการบางส่วน อาทิ กรดอะมิโนจำเป็นบางชนิด

การใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นวิธีการหนึ่งในการแปรรูปวัตถุดิบทางการเกษตรให้มีประโยชน์และมีมูลค่าสูงขึ้น เนื่องจากวิธีการนี้มีข้อดีคือ ไม่ใช้พลังงานสูงและไม่มีการปนเปื้อนที่รุนแรง ดังนั้นจึงไม่ทำลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูป ปัจจุบันภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ได้เก็บรวบรวมจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ย่อยสลายขนไก่จำนวนหนึ่ง จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยขนไก่ ดังนั้น การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสจากจุลินทรีย์จึงเป็นที่น่าสนใจและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้เอนไซม์ย่อยขนไก่เพื่อเป็นประโยชน์ต่อไป

วิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Bacillus* sp. FK 14 ซึ่งคัดแยกได้จากดินและมีความสามารถในการย่อยสลายขนไก่และผลิตเอนไซม์เคราติเนส (Pissuwan and Suntornsuk, 2001)

2. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

หัวเชื้อจุลินทรีย์เตรียมจากการเลี้ยง *Bacillus* sp. FK 14 ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย NH_4Cl 0.05%, NaCl 0.05% , K_2HPO_4 0.03% , KH_2PO_4 0.04%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024%, Yeast extract 0.01% และขนไก่ป่น 1% (pH 7.5) ทำการเลี้ยง ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ประมาณ 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร

3. การผลิตเอนไซม์เคราติเนส

ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (2%) ในถังหมักขนาด 3 ลิตร (B. Braun รุ่น Biostat B ประเทศเยอรมัน) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย NH_4Cl 0.05%, NaCl 0.05%, K_2HPO_4 0.03% , KH_2PO_4 0.04%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024%,

Yeast extract 0.01% และชนไก่ป่น 1% (pH 7.5) ทำการเลี้ยง ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ กิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ และเก็บรวบรวมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้น

4. การแยกเอนไซม์เคราติเนสให้บริสุทธิ์

กรองเอนไซม์ที่ผลิตได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 และหมุนเหวี่ยงส่วนใสที่ความเร็วรอบ 8,500 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บรวบรวมส่วนใส (supernatant) และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี ultrafiltration โดยใช้เยื่อเลือกผ่านที่มี molecular weight cutoff ที่ 10 kDa (YM-10) และตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวต่าง ๆ (20, 40, 60, 80, 100%) จากนั้นนำตะกอนโปรตีนไปกำจัดเกลือออกด้วยวิธี dialysis โดยใช้ถุง dialysis ด้วย Tris-HCl buffer pH 8.0 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนผ่านคอลัมน์ DEAE Sepharose ขนาด 2.5 ซม. x 30 ซม. โดยใช้ 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 เป็น eluent และใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 M ด้วยอัตราเร็ว 12 มิลลิลิตรต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนที่แสดงเอนไซม์เคราติเนสไปผ่านคอลัมน์ DEAE Sepharose ขนาด 2.5 ซม. x 30 ซม. โดยใช้ 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 เป็น eluent และใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 M ด้วยอัตราเร็ว 12 มิลลิลิตรต่อนาทีอีกครั้ง

5. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เคราติเนส

5.1 SDS-PAGE (เจล 12.5%) (Laemmli, 1970)

5.2 Native PAGE (เจล 10% ไม่ผสม SDS และ run ที่ 4 องศาเซลเซียส) (Hames, 1998)

5.3 SDS-Active PAGE (เจล 10% ที่ผสมเจลาติน 0.5%) (Houssen and Dowdle, 1980)

6. การศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์เคราติเนส

6.1 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ใช้คอลัมน์ gel filtration ขนาด 0.5 ซม. x 90 ซม. ที่บรรจุ Sephadex G 75 โดยใช้ 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ด้วยอัตราเร็ว 15 มิลลิลิตรต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

6.2 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส

6.3 ความคงตัวของเอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ, pH, protease inhibitors และชนิดของโลหะหนัก

6.4 ความเฉพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อสับสเตรตโปรตีน ได้แก่ gelatin, casein, BSA, elastin, soluble keratin, keratin azure, collagen, human hair, human nail และ ชนไก่

7. การวิเคราะห์

นำตัวอย่างขนไก่หมักด้วยจุลินทรีย์ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 4 (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและทราบน้ำหนักแห้ง) เพื่อเก็บส่วนของเหลว เพื่อ (1) วิเคราะห์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยนับจำนวนแบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar จากนั้นปั่นเหวี่ยงส่วนของเหลวด้วยความเร็วรอบ 14,000xg แล้วเก็บส่วนใสเพื่อ (2) วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์เคราตินเนสโดยวิธีการของ Letourneau et al. (1998); บ่มเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มล. กับ keratin azure (Sigma Aldrich, Germany) 4 มก. ใน 50 mM phosphate buffer, pH 8.5 ปริมาตร 1.5 มล. ที่ 60 °C และเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที นาน 1 ชม. และวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรเทียบกับชุดควบคุมที่ทำลายเอนไซม์ด้วยความร้อนก่อนทำปฏิกิริยากับ keratin azure โดยที่ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์เคราตินเนส คือความสามารถของเอนไซม์ที่ทำให้การดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น 0.1 ในเวลา 1 ชม. ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ (3) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) (4) วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนโดยวิธีการของ Rosen (1957)

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

1. การผลิตเอนไซม์เคราตินเนสจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14

จุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสในช่วงเดียวกับการเจริญเติบโต ดังแสดงผลในรูปที่ 1 เอนไซม์ถูกผลิตขึ้นในช่วง exponential phase และมีค่าสูงสุดคือ 3.67 U/ml คิดเป็นค่า specific activity เท่ากับ 1.72 U/mg ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงจุลินทรีย์ เอนไซม์เคราตินเนสที่จุลินทรีย์นี้ผลิตขึ้นส่วนใหญ่อยู่นอกเซลล์ (99%) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 ผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้ไม่สูงนัก จึงควรมีการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์เคราตินเนสจากจุลินทรีย์นี้

จากการศึกษาจะเห็นว่าขนไก่ป่นในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเหนี่ยวนำให้ *Bacillus* FK 14 ผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้เหมือนกับผงขนไก่ (feather powder) และเส้นผม (Cheng et al, 1995; Lal et al, 1999)

2. การแยกเอนไซม์เคราตินเนสจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 ให้บริสุทธิ์

เอนไซม์เคราตินเนสจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนดังนี้

- ก. Ultrafiltration เพื่อทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น
- ข. ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ตารางที่ 1)
- ค. แยกโปรตีนด้วย anion exchange chromatography (DEAE Sepharose) 2 ครั้ง

ผลการแยกเอนไซม์เคราติเนสด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแสดงในรูปที่ 2 และ 3 และสามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 2

สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยลดปริมาตรของเอนไซม์ลงประมาณ 3 เท่า ด้วยเครื่อง ultrafiltration ที่มีแผ่นเมมเบรนขนาด 10KDa อย่างไรก็ตามความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ยังคงเท่าเดิมแต่ผลผลิตลดลงมาก (ตารางที่ 2) เนื่องจากอาจมีเอนไซม์และโปรตีนส่วนหนึ่งถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น หรือเอนไซม์เกิดการย่อยตัวเอง (autolysis) หรือสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (การกวนที่มากเกินไปหรืออุณหภูมิที่ไม่สม่ำเสมอ) นอกจากนี้เอนไซม์และโปรตีนอาจเกาะติดบนแผ่นเมมเบรนด้วย

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือ 40 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสสูงสุด (specific activity สูงสุด) แต่วิธีนี้ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากเช่นเดียวกับขั้นตอน ultrafiltration และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้น ในขั้นตอนนี้ วิธี alcohol fractionation อาจถูกใช้แทนเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ได้

ขั้นตอนการแยกเคราติเนสด้วย anion exchange chromatography ครั้งที่ 2 สามารถให้ผลผลิตที่ดีที่สุดคือ 105 เปอร์เซ็นต์ และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 41 เท่า เนื่องจากขั้นตอนนี้กำจัดโปรตีนส่วนใหญ่ออกไป อาจรวมถึงโปรตีนหรือสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ด้วย ทั้งนี้กิจกรรมของเอนไซม์ส่วนใหญ่ไม่เกาะกับ DEAE Sepharose เมื่อนำส่วนนี้ผ่าน cation exchange chromatography (CM-Sepharose) เอนไซม์ไม่เกาะกับตัว resin เช่นกัน ดังนั้นโครงสร้างของเอนไซม์อาจมีประจุน้อยหรือไม่มีประจุในสภาวะที่ทดลอง วิธี hydrophobic chromatography หรือ affinity chromatography อาจถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์และผลผลิตของเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์เคราติเนสที่ผ่านขั้นตอน anion exchange chromatography ครั้งที่ 2 มาทดสอบ SDS-PAGE, Native PAGE และ SDS-Active PAGE พบโปรตีนแถบเดียวบนแผ่นเจล SDS-PAGE (รูปที่ 4) และ Native PAGE (ไม่ได้แสดงรูป) โปรตีนแถบนี้สามารถย่อยเจลาตินบนแผ่นเจล SDS-Active PAGE ได้เป็นแถบใส (ไม่ได้แสดงรูป) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เคราติเนสที่ผ่าน 4 ขั้นตอนดังกล่าวมีความบริสุทธิ์

3. คุณสมบัติของเอนไซม์เคราติเนสบริสุทธิ์ FK 14

เอนไซม์เคราติเนสบริสุทธิ์เมื่อผ่าน SDS-PAGE (รูปที่ 4) พบว่าเอนไซม์เป็น monomeric มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เคราติเนสเมื่อศึกษาด้วยวิธี gel filtration (ประมาณ 35 kDa; รูปที่ 5 ก, ข) น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus*

licheniformis PWD-1 และ *Streptomyces pactum* DSM 40530 ซึ่งมีรายงานไว้ประมาณ 30-33 kDa (Lin et al, 1992; Cheng et al, 1995; Bockle et al, 1995)

เอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 6) และ pH ที่เหมาะสมคือ 8.5 (รูปที่ 7) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการวิจัย (ตารางที่ 3) โดยที่ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส

เอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงไม่มากนัก (รูปที่ 8) และมีความคงตัวที่ดีในช่วง pH 7-9 (รูปที่ 9) จะเห็นว่าเอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิปานกลาง แต่สามารถย่อย substrate ได้ดีที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่มีความคงตัวในช่วง pH กว้าง และย่อย substrate ได้ดีที่ pH เป็นด่างเล็กน้อย

จากการศึกษาสารยับยั้งเคราติเนสพบว่าสาร PMSF มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์มากที่สุด (ตารางที่ 4) แสดงถึงเอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 น่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม serine protease เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีกรดอะมิโน serine อยู่ใน active site และสามารถถูกยับยั้งด้วยสาร PMSF โดยสารนี้จับกับกรดอะมิโน serine ทำให้กรดอะมิโนดังกล่าวไม่สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนของสับสเตรตได้ นอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสส่วนใหญ่ลดลงด้วยสาร EDTA ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิด metalloprotease การยับยั้งเอนไซม์เคราติเนสด้วยสารทั้งสองนี้เคยมีรายงานจาก Towatana et al (1999) และ Bockle et al (1995) เช่นกัน

สำหรับการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสด้วยไอออนของโลหะพบว่า Fe^{3+} (ferric ion) ลดกิจกรรมของเอนไซม์บางส่วน แต่ไอออนของโลหะส่วนใหญ่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Ca^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease ซึ่งกิจกรรมสามารถถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} , Mn^{2+} และ Mg^{2+} (Towatana et al 1999; Riessen et al 2001; Okamoto et al 2001; Kumer et al 1995) และผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการยับยั้งเอนไซม์ด้วยสาร EDTA ด้วย

เอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 ย่อยโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี อาทิ casein, BSA และ gelatin และสามารถย่อยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำเช่น เล็บ และคอลลาเจนได้ดีพอสมควร สำหรับขนไก่และเส้นผม เอนไซม์เคราติเนสย่อยได้ไม่มากนัก ดังแสดงผลในตารางที่ 6 casein ถูกย่อยสลายได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีนอื่น ๆ ขณะที่คอลลาเจนถูกย่อยได้ดีที่สุดสำหรับโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ การที่เอนไซม์เคราติเนสย่อยขนไก่และเส้นผมไม่มากนัก เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้มีโครงสร้างแข็งแรงด้วยพันธะไดซัลไฟด์

การประยุกต์ใช้เอนไซม์เคราติเนสจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 ในอุตสาหกรรม อาจทำได้โดยเพิ่มความสามารถของเอนไซม์ด้วยการ pretreatment สับเสลดโปรตีน เช่น ขนไก่ เล็บเจลาติน และขนสัตว์ หรือการใส่เกลือของโลหะเพื่อช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

ตารางที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสหลังตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ความเข้มข้นเกลืออัมมัวตัว(%)	Volume (ml)	Activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific Activity (U/mg)
0	455	6.68	1.3	594	3012	5.07
20	46	5.32	0.56	26	245	9.42
40	46	13.05	1.06	49	600	12.24
60	46	11.33	1.36	63	521	8.27
80	48	3.87	1.66	80	186	2.33
100	521	0	0.43	223	0	0

ตารางที่ 2 Purification table of keratinase from *Bacillus* sp. FK 14

Purification step	Total Activity (U)	Total Protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	8,226	3,240	2.54	1	100
Ultrafiltration	3,129	1,229	2.55	1	38
40% (NH ₄) ₂ SO ₄	496	485	1.02	0.4	6
DEAE 1 pool 1	4408	148	29.68	11.7	54
DEAE 2 pool 1	8633	83	104	41	105

ตารางที่ 3 คุณสมบัติบางประการของเคราตินเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์

Microbial source	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	References
<i>Bacillus licheniformis</i>	50	7.5	Lin et al (1992)
PWD-1			Cheng et al (1995)
<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	80	10.0	Frienrich and Antranikian (1996)
<i>Streptomyces pactum</i> DSM 40530	65	8	Bockle et al (1995)
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	40 – 70	6 - 9.5	Bressollier et al (1999)

ตารางที่ 4 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส

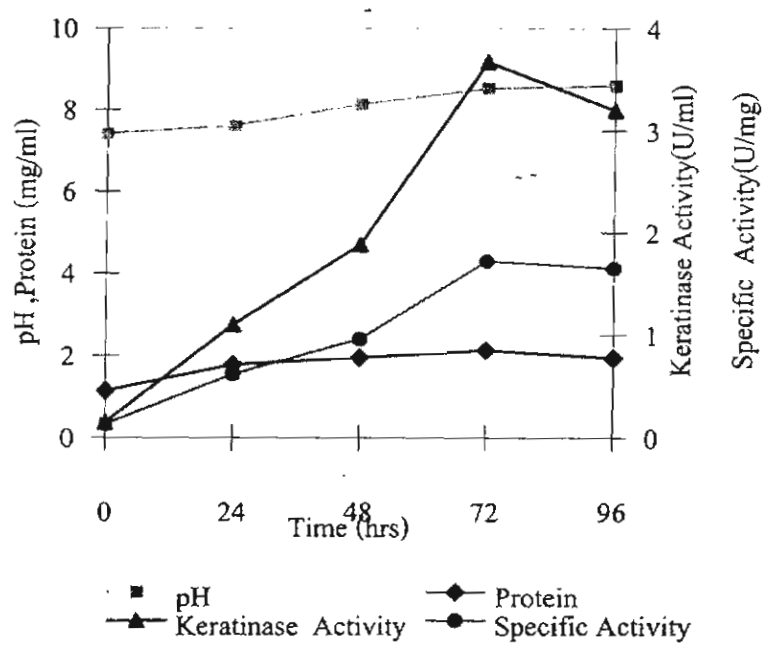
สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (mM)	ชนิดของตัวยับยั้ง	Relative Activity (%)
None	-		100
PMSF	1	Serine protease	4
EDTA	1	Metallo protease	38
Iodoacetamide	1	Cysteine protease	78

ตารางที่ 5 ผลของอิออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส

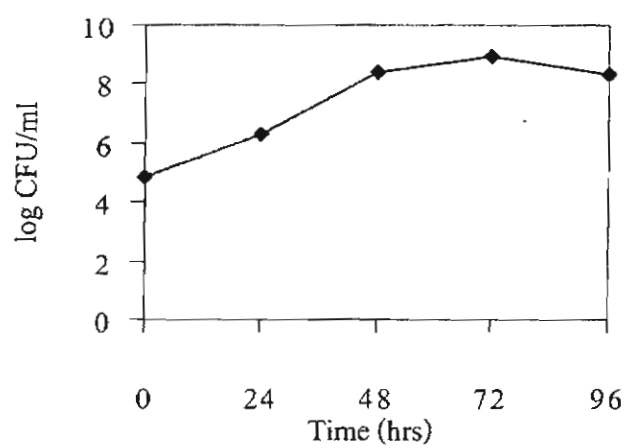
อิออนของโลหะ	Relative Activity (%)
None	100
Mn ²⁺	176
Al ³⁺	174
Ca ²⁺	160
Ni ²⁺	151
Hg ²⁺	148
Mg ²⁺	137
Li ²⁺	124
Zn ²⁺	117
Fe ³⁺	65

ตารางที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนสต่อการย่อยสลายสับเสรดโปรตีน

Substrate	Relative Activity (%)
Casein	100
Gelatin	79.5
BSA	76.5
Collagen	35.6
Human nail	16.35
Keratin azure	9.0
Chicken feather	5.1
Soluble keratin	4.7
Elastin	3.6
Human hair	2.8



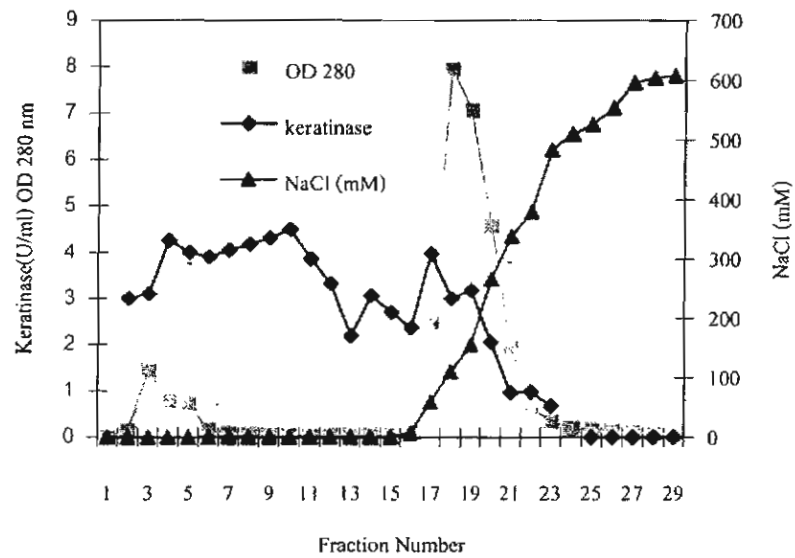
(n)



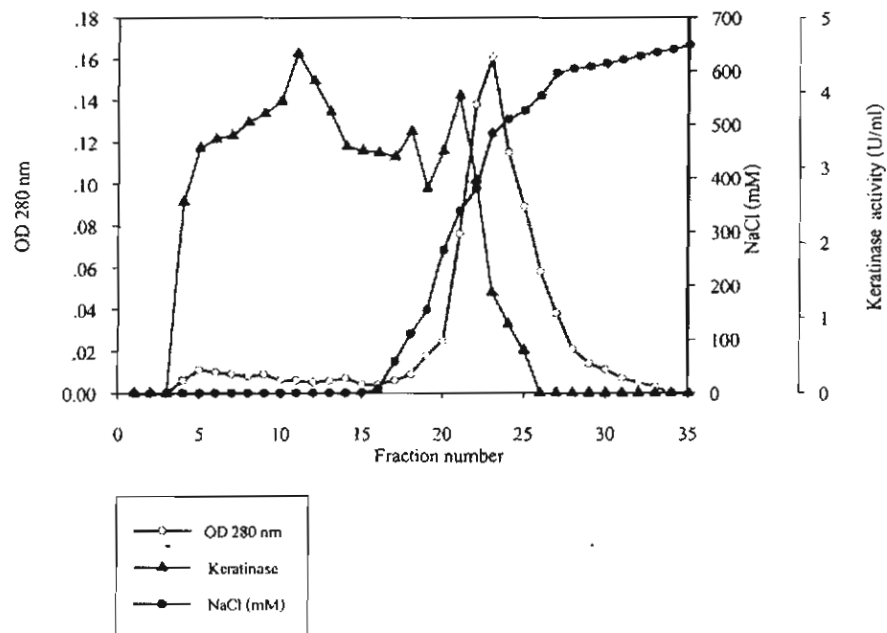
(ข)

รูปที่ 1 (ก) การผลิตเอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus* sp. FK14

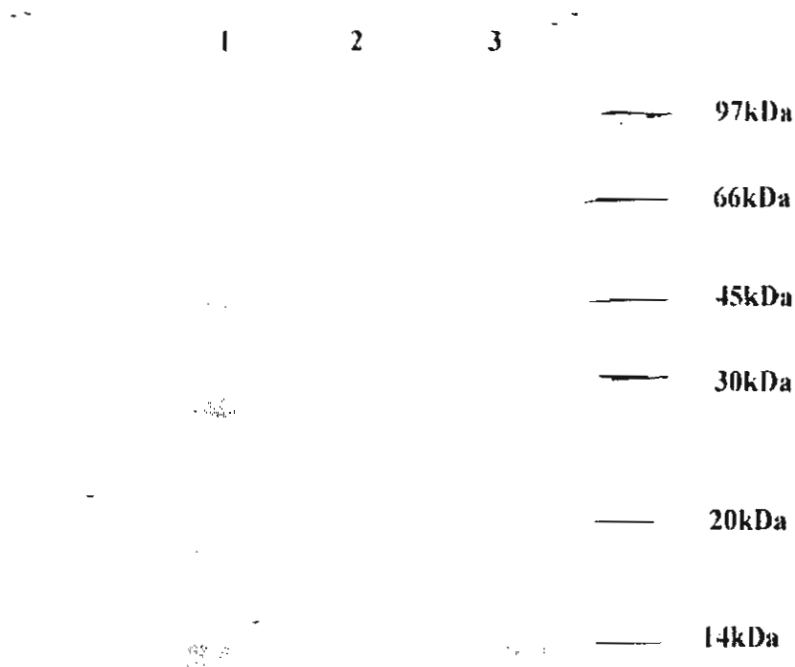
(ข) การเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. FK14



รูปที่ 2 การทำเอนไซม์เคราตินเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE sepharose (Ion Exchange Chromatography) ขนาดคอลัมน์ 2.5 cm. x 30 cm.



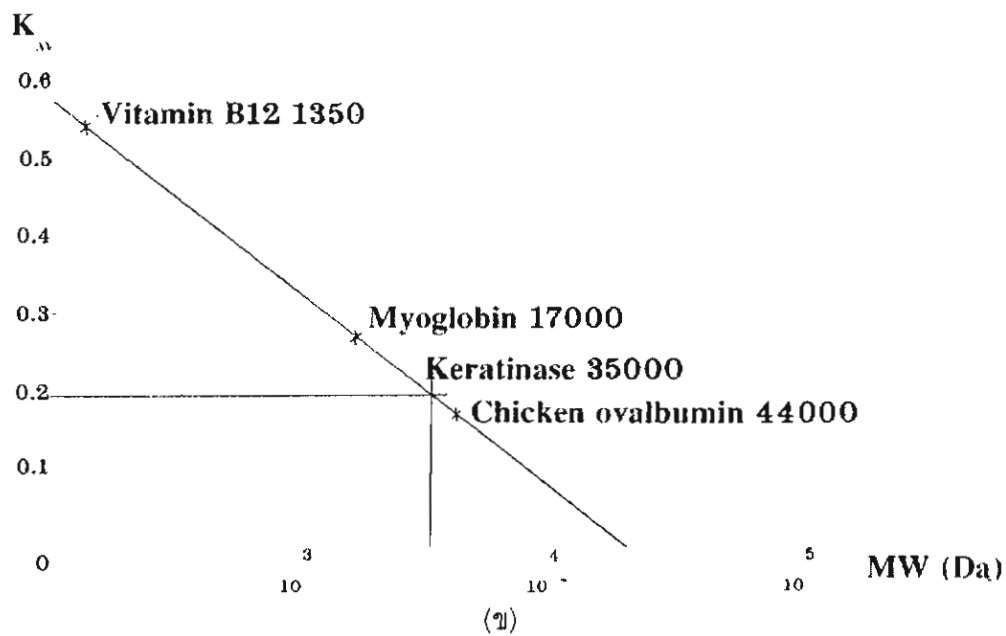
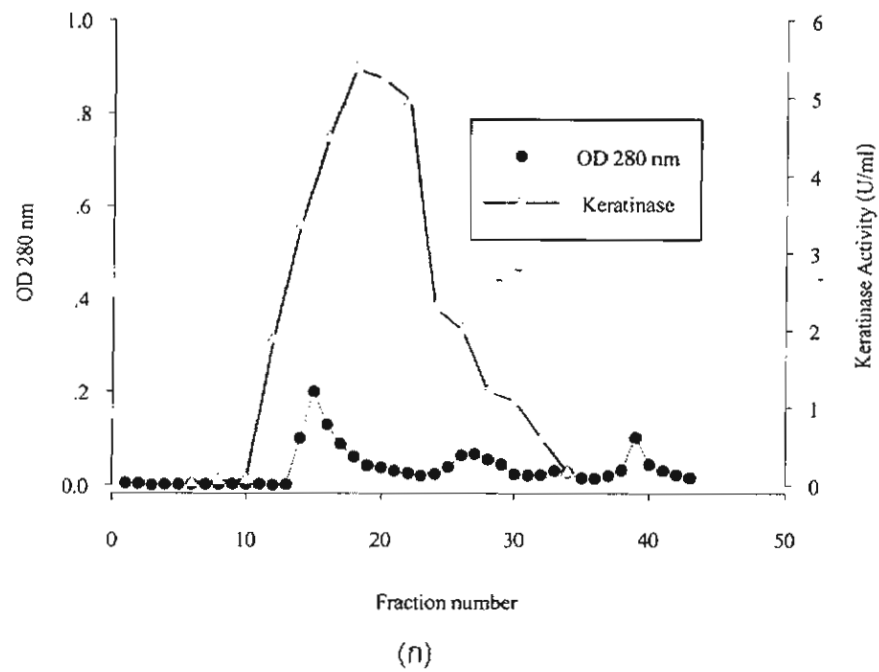
รูปที่ 3 การทำเอนไซม์เคราตินเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE sepharose ครั้งที่ 2



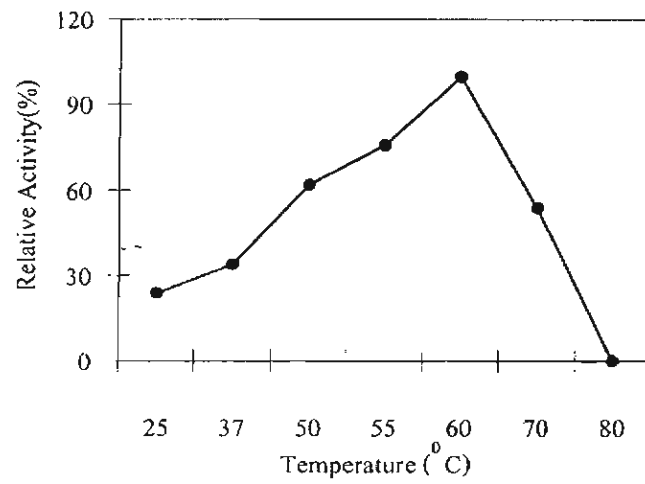
รูปที่ 4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เคราตินเนสโดยวิธี SDS-PAGE

Lane 1 and 3 Protein standard (Phosphorylase b, 97 KDa; Albumin, 66 KDa; Ovalbumin, 45 KDa; Carbonic anhydrase, 30 KDa; Trypsin inhibitor, 21 KDa and α - Lactoalbumin, 14.4 KDa)

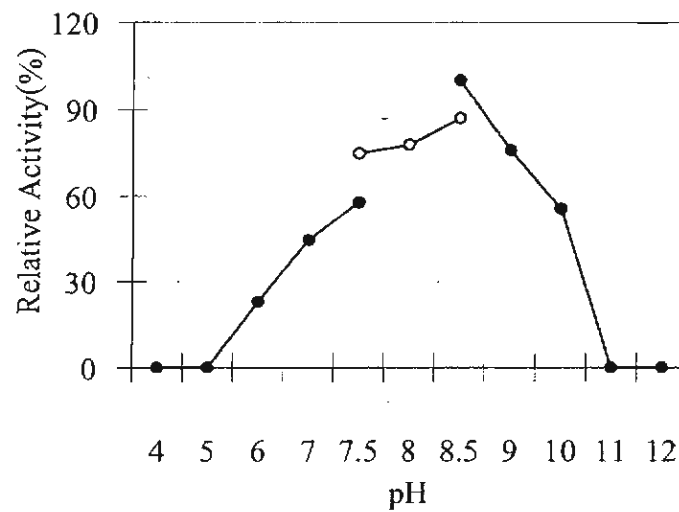
Lane 2 Purified keratinase



รูปที่ 5 ก Elution profile ของเอนไซม์เคราติเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 โดย gel filtration
 ข น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เคราติเนสโดย gel filtration



รูปที่ 6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เคราตินเนส

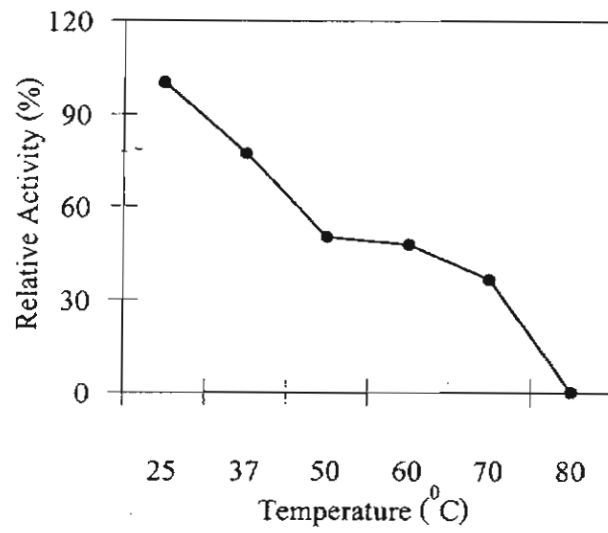


รูปที่ 7 ผลของความเป็นกรดต่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส

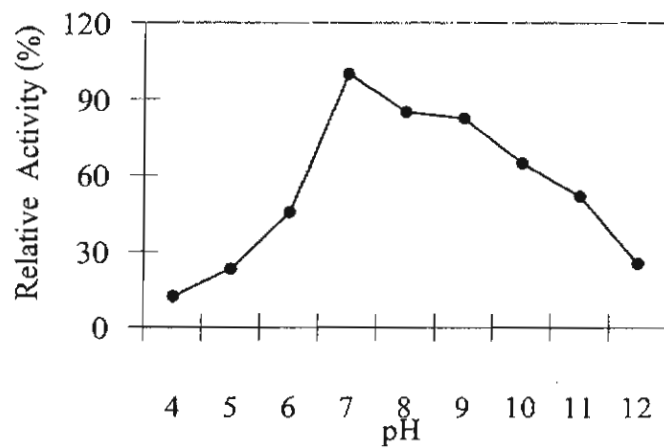
50 mM Phosphate/citric acid (pH 4.0-7.5)

50 mM Tris/HCl (pH 7.5-8.5)

50 mM Phosphate/NaOH (pH 8.5-12.0)



รูปที่ 8 ความคงตัวของเอนไซม์ไคราติเนสต่ออุณหภูมิ



รูปที่ 9 ความคงตัวของเอนไซม์ไคราติเนสต่อความเป็นกรดต่าง

50 mM Phosphate/citric acid (pH 4.0-7.0)

50 mM Tris/HCl (pH 7.5-8.0)

50 mM Phosphate/NaOH (pH 9.0-12.0)

สรุปผลการทดลอง

การทำให้เอนไซม์เคราตินเนสจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 บริสุทธิ์สามารถทำได้ผ่านขั้นตอน Ultrafiltration การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ anion exchange chromatography (DEAE Sepharose) 2 ครั้ง หรือ gel filtration ด้วย Sephadex G-75

เอนไซม์เคราตินเนสจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 จัดเป็น serine protease ที่ออกของโลหะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Ca^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} เอนไซม์มีลักษณะเป็น monomeric มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa มีอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส และ 8.5 ตามลำดับ เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี และสามารถย่อยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น เล็บ คอลลาเจน ขนไก่และเส้นผมได้

เอนไซม์เคราตินเนสจากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. FK 14 อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการย่อยโปรตีนในขนไก่เพื่อเป็นอาหารสัตว์ การถนอมขนสัตว์ในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องหนังทดแทนการใช้สารเคมี

เอกสารอ้างอิง

- Bockle, B., Galunsky, B. and Muller R. (1995) Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (10): 3705-3710.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M. and Verneuil, B. (1999) Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces albidiflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2570-2576.
- Cheng, S.W., Hu, H.M., Shen, S.W., Takagi, H., Asono, M. and Tsai, Y.C. (1995) Production and characterization of keratinase of a feather degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2239 – 2243.
- Friedrich, A.B. and Antranikian, G. (1996). Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8): 2875-2882.
- Hames, B. D. (1998) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. 3rd ed., Oxford University Press, New York.
- Houssen, C. and Dowdle, E. B. (1980) Electrophoresis analysis of plasminogen activators in polyacrylamine gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrate. *Anal. Biochem.* 102: 196-202.

- Kumer, C.G., Tiwari, M.P. and Jany, K.D. (1999) Novel alkaline serine protease from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. *Process Biochem.* 34: 441-449.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lal, S, Rajak, R. and Hasijia, C. (1999) In vitro degradation of keratin by two species of *Bacillus*", *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45: 283-287.
- Lee, C.G., Ferket, P.R. and Shih, J.C.H. (1991) Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. *Fed. Am. Soc. Exper. Biol. J.* 5: A596.
- Letourneau, F., Soussolte, V., Bressollier, P., Branland, P. and Verneuil, B. (1998) Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K₁₋₀₂: a new isolated strain. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 77-88.
- Lin, X., Lee, C.G., Casale, E.S. and Shih, J.C.H. (1992) Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(10): 3271-3275.
- Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, J. R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 242: 265-275.
- Okamoto, M., Yonejima, Y., Tsujimoto, Y., Suzuki, Y. and Watanabe, K. (2001) A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO – 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 103-108.
- Pissuwan, D. and Suntornsuk, W. (2001) Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. *Kasetsart J. (Nat.Sci)* 35:171-178
- Riessen, S. and Antranikian, G. (2001) Isolation of *Thermonarobacter keratinophilus*, a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles* 5: 399-408.
- Rosen, H. (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 67: 10-15.
- Towatana, N. H., Painupong, A. and Sutinanalert, P. (1999) Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 581-587.

ภาคผนวก

Authors: Tongjun, J., W. Suntornsuk, H. Oyama, T. Kusamran and K. Oda

Title: Purification and characterization of keratinase by *Bacillus* sp. FK 14

Conference: 3rd JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Chiang Mai, Thailand, November 18-21, 2002.

The Abstract is attached.

Presented to the 3rd Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and their Applications on 18-21 November 2002 at Chiang Mai, Thailand.

Purification and Characterization of Keratinase by *Bacillus* sp. FK14

Junthip Tongjun¹, Worapot Suntornsuk¹, Hiroshi Oyama³, Thanit Kusamran², and Kohei Oda³

¹*Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140, Thailand*

²*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

³*Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan*

Keratinase is a proteolytic enzyme hydrolyzing keratins which is an insoluble protein found in chicken feather. This enzyme is potential for improving nutritional values of feather and for removing hair in the sewage system. Recently, our group isolated the bacterial strain of *Bacillus* sp. FK14 able to degrade chicken feather. In this study, we purified its keratinase and studied its enzyme properties.

Crude enzyme was prepared by cultivation of *Bacillus* sp. FK14 in base medium containing (g/l): 0.5 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl, 0.4 g KH₂PO₄, 0.3 g K₂HPO₄, 0.24 g MgCl₂ · 6H₂O, 0.1 g yeast extract and 1 g feather meal, at 37 °C, 150 rpm for 72 h. The crude enzyme was purified by ultrafiltration (YM10), ammonium sulfate fractionation and two columns of anion exchange chromatography (DEAE sepharose) with 20 mM Tris buffer, pH 8.0. The purified keratinase was determined for pH and temperature optimum and stability, and tested for enzyme inhibitors (PMSF, EDTA, iodoacetamide) and various metal ions (LiCl₂, AlCl₃, ZnCl₂, CaCl₂, MnCl₂, NiCl₂, FeCl₃ and HgCl₂).

After purification, keratinase exhibited high specific activity (104 U/mg) with 41 purification fold. Its molecular weight determined by SDS PAGE was approximately 35 KDa. Its optimum temperature and pH were found at 60°C and pH 8.5, respectively. The enzyme was stable over the pH range between 7 to 9 and stable up to 37°C. Its activity was stimulated by most metal ions except Fe³⁺. The enzyme activity was completely inhibited by PMSF and partially inhibited by EDTA. Substrate specificity and amino acid sequence are under investigation to identify the protease class.