

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</i>	80	10.0	Frienrich and
<i>pennavorans</i>			Antranikian (1996)
<i>Streptomyces</i>	65	8	Bockle et al (1995)
<i>pactum</i> DSM 40530			
<i>Streptomyces</i>	40 – 70	6 - 9.5	Bressollier et al
<i>albidoflavus</i>			(1999)

ตารางที่ 4 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส

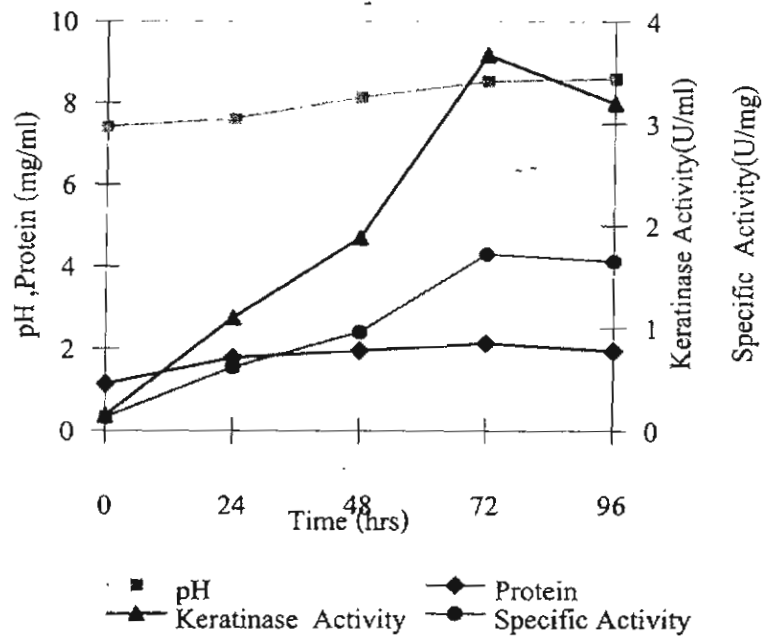
สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (mM)	ชนิดของตัวยับยั้ง	Relative Activity (%)
None	-		100
PMSF	1	Serine protease	4
EDTA	1	Metallo protease	38
Iodoacetamide	1	Cysteine protease	78

ตารางที่ 5 ผลของอิออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส

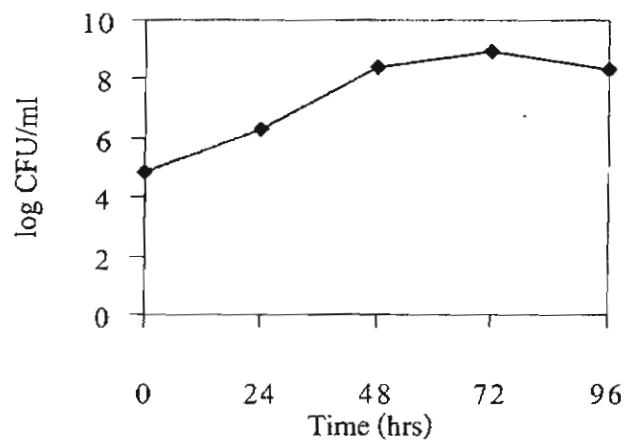
อิออนของโลหะ	Relative Activity (%)
None	100
Mn ²⁺	176
Al ³⁺	174
Ca ²⁺	160
Ni ²⁺	151
Hg ²⁺	148
Mg ²⁺	137
Li ²⁺	124
Zn ²⁺	117
Fe ³⁺	65

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



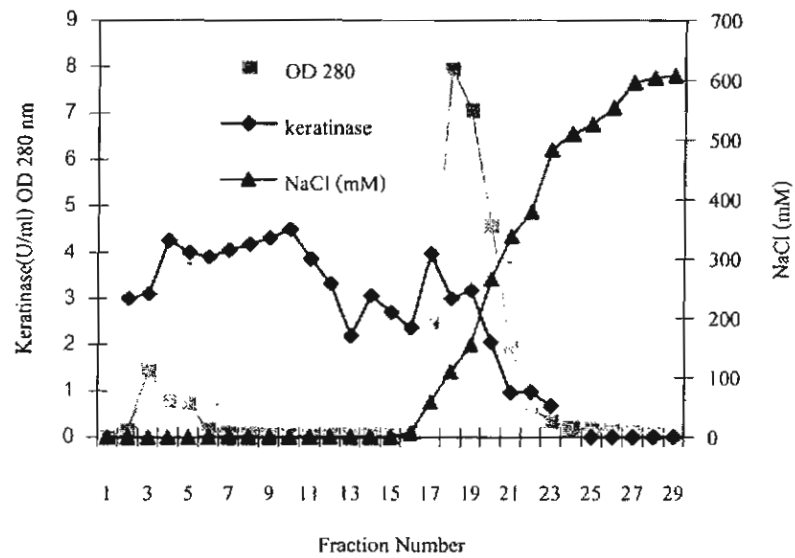
(n)



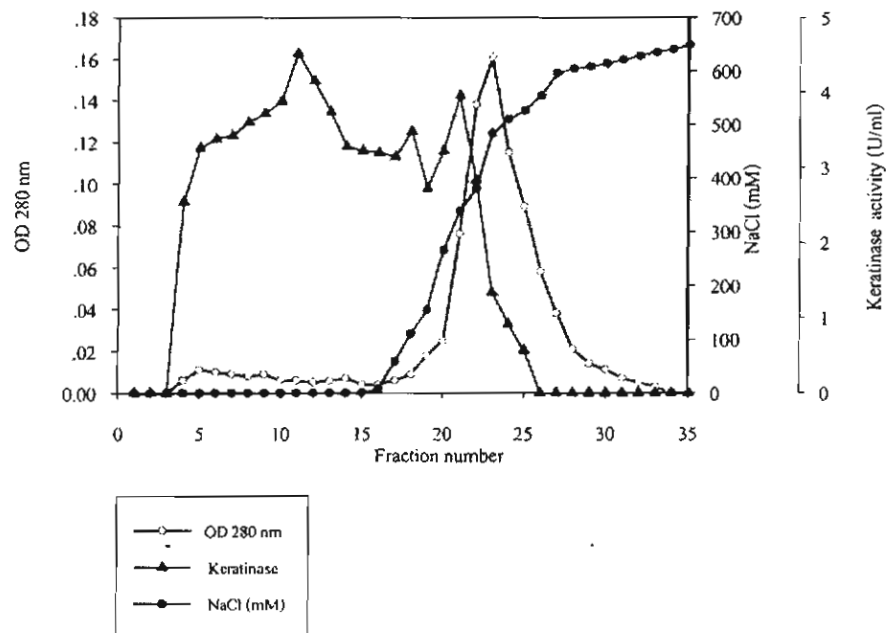
(ข)

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

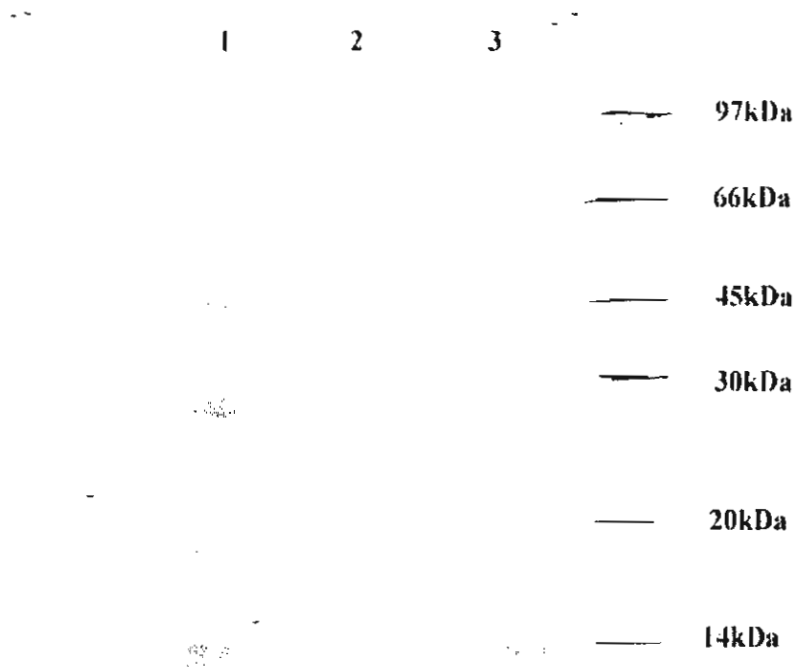
(ข) การเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. FK14



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



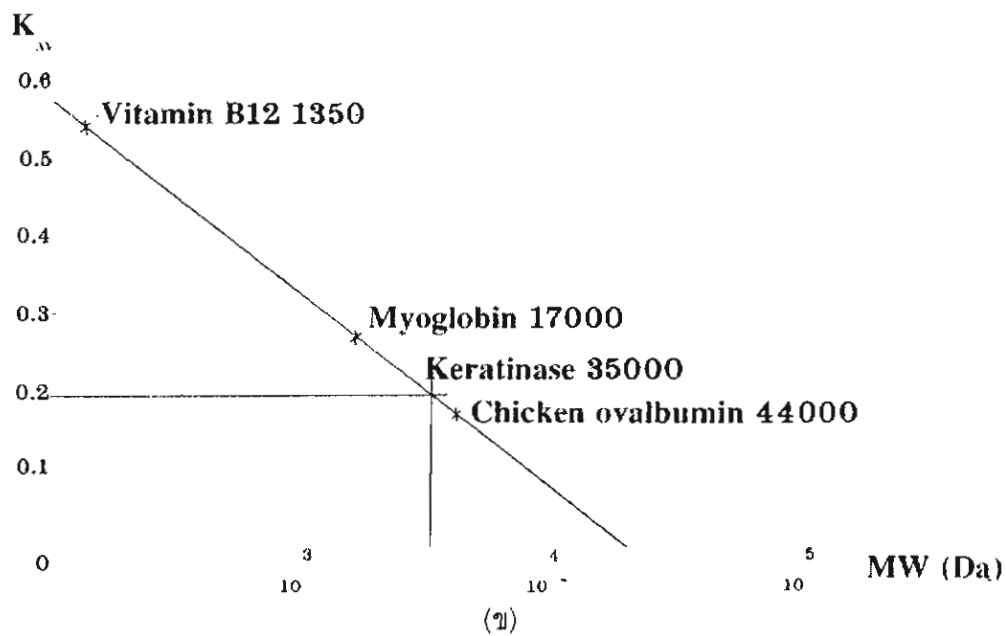
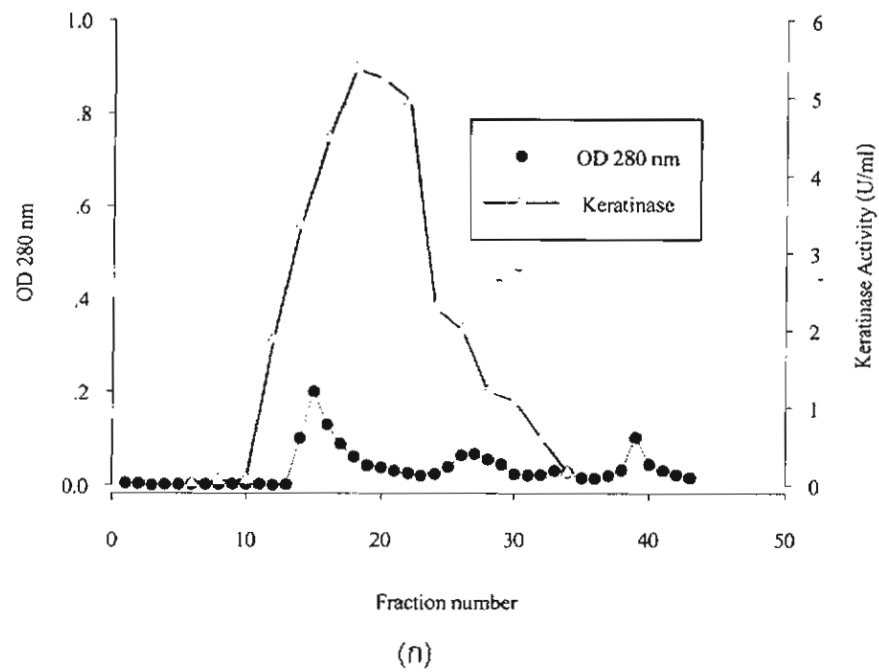
รูปที่ 3 การทำเอนไซม์เคราตินเนสจาก *Bacillus* sp. FK 14 ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE sepharose ครั้งที่ 2



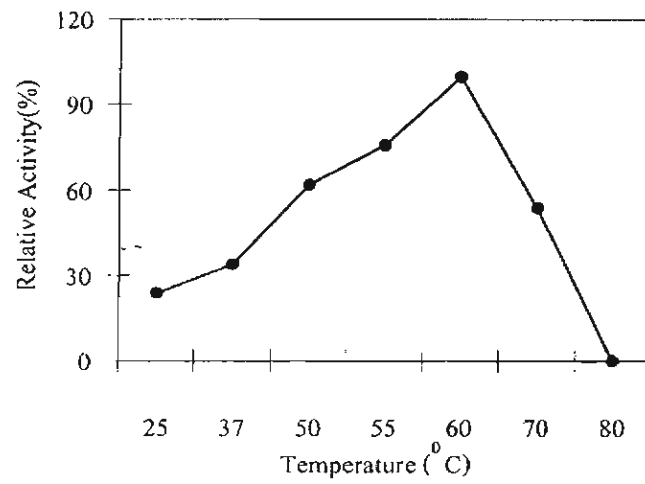
รูปที่ 4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เคราตินเนสโดยวิธี SDS-PAGE

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)

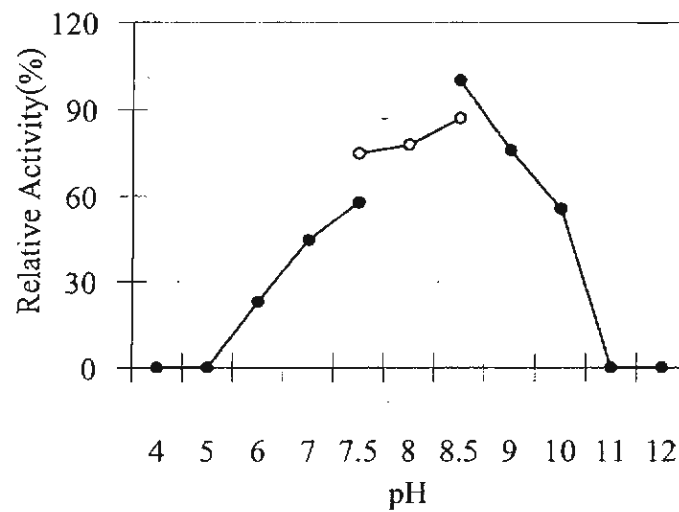
Lane 2 Purified keratinase



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



รูปที่ 6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์เคราตินเนส

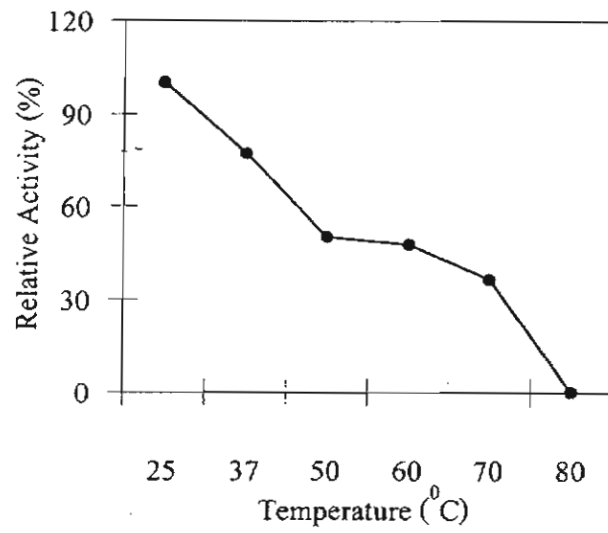


รูปที่ 7 ผลของความเป็นกรดต่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส

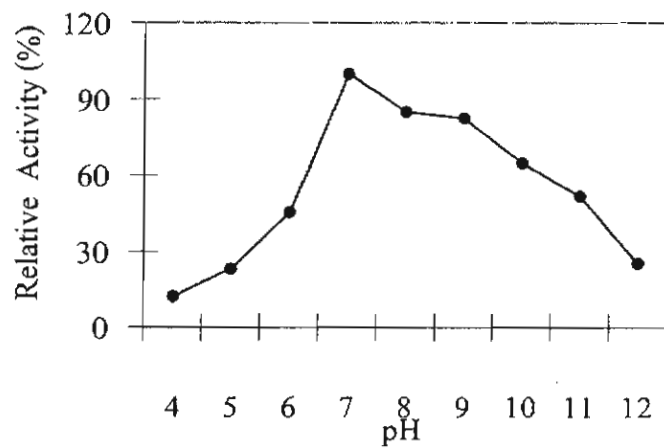
50 mM Phosphate/citric acid (pH 4.0-7.5)

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.