

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เคราติเนสที่แยกได้จากดิน
ของฟาร์มสัตว์ปีกในการย่อยสลายขนไก่
EFFICIENCY OF KERATINASE ENZYME PRODUCING BACTERIA
ISOLATED FROM SOIL OF POULTRY FARMING FOR
DEGRADATION OF CHICKEN FEATHER

กีรติ ตันเรือน^{1*} เรืองวุฒิ ชุตินา¹ รัตนาภรณ์ ใจเย็น¹ และสุทธิดา วิทยาลัย²
Keerati Tanruean^{1*}, Ruangwut Chutima¹, Rattanaporn Chaiyen²,
and Suttida Wittanalai²

¹Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

²Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University

*corresponding author e-mail: keerati.t@psru.ac.th

(Received: 19 August 2018; Revised: 4 November 2018; Accepted: 13 November 2018)

บทคัดย่อ

ในแต่ละปีประเทศไทยมีขนไก่ที่เหลือจากกระบวนการผลิตไก่เนื้อจำนวนมากและมักจะถูกกำจัดโดยการเผาซึ่งทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ อย่างไรก็ตามขนไก่สามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ได้โดยใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายขนไก่ ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายขนไก่โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากดินของฟาร์มสัตว์ปีกในจังหวัดพิษณุโลกที่ทำให้เกิดวงใสบนอาหาร skim milk agar จำนวน 18 ไอโซเลท (PSRU 1–PSRU 18) มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่ในอาหารจำกัดพบว่าแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท สามารถย่อยสลายขนไก่ได้แต่มีประสิทธิภาพต่างกัน อีกทั้งยังได้จัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายขนไก่โดยใช้วิธีการย้อมสีแกรม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้เป็น *Staphylococcus* sp. 9 ไอโซเลท *Bacillus* sp. 7 ไอโซเลท และ *Corynebacterium* sp. 2 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่สูงที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ ไอโซเลท PSRU 8 PSRU 11 และ PSRU 12 และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มาศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 30, 37, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 และ 10.5 ต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PSRU 11 สามารถย่อยสลายขนไก่ได้ดีที่สุดเท่ากับ 73.60 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 7.5 และจากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าไอโซเลท PSRU 8 PSRU 11 และ PSRU 12 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus* *B. subtilis* และ *B. siamensis* ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้เป็นแนวทางสำหรับการลดการกำจัดขนไก่ที่อาจจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือทิ้งโดยนำไปใช้ในการผลิตแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์

คำสำคัญ: ขนไก่ เอนไซม์ แบคทีเรียย่อยสลายขนไก่ สภาวะที่เหมาะสม

Abstract

In each year, Thailand has a large amount of feather left from the process of chicken meat production. Burning or land filling of those feathers can cause the air pollution. However, feather wastes can be potential used as substrates for digestible protein production by feather degrading microorganisms. This study, therefore, aimed to investigate the ability in feather degradation of 18 bacteria isolated (PSRU 1 – PSRU 18) from soil in Pathum poultry farm, Phitsanulok Province, which produced clear zone in skim milk agar plate. It was found that all bacteria were grown on raw feathers minimal medium and could degrade chicken feather in different levels. Further, gram stain, morphological studies and biochemical assays were used to identify the isolated feather degrading bacteria. The results showed 18 strains including, 9 isolates of *Staphylococcus* sp., 7 isolates of *Bacillus* sp., and 2 isolates of *Corynebacterium* sp.. The first three of high efficiency bacteria were selected to study the effects of temperature (30, 37, 40, 50 and 60°C) and pH values (4.5, 6.0, 7.5, 9.0, and 10.5) on degradation ability. The isolate PSRU 11 possessed 73.60% of degradation at 37°C and pH 7.5. Based on molecular identification, isolates PSRU 8, PSRU 11 and PSRU 12 were closely related to *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *B. siamensis*, respectively. The results from this study are likely to be applied for reducing feather wastes and could be a potential application in the production of protein source for animal feed.

Keywords: feathers, enzyme, feather degrading bacteria, optimizing conditions

บทนำ

ปัจจุบันมีการนำขนไก่ที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปไก่มาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์และปุ๋ยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ที่มีราคาสูง และต้องใช้แหล่งโปรตีนทดแทนเพื่อลดต้นทุนการผลิต แต่เนื่องจากขนไก่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกระเพาะสัตว์จึงมีการใช้กระบวนการทางเคมี และกายภาพในกระบวนการแปรรูปขนไก่วิธีทางเคมี เช่น ต้มขนไก่ด้วยสารผสมของโซเดียมซัลไฟท์กับแอลกอฮอล์ เป็นต้น และวิธีทางกายภาพ โดยนำขนไก่มาผ่านกระบวนการใช้ความร้อนสูงประมาณ 130 ถึง 150 องศาเซลเซียส และใช้ความดันสูง 30 ถึง 50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 ถึง 150 นาที ซึ่งวิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองทั้งพลังงานและต้นทุนในการผลิต และที่สำคัญยังทำลายกรดอะมิโนหลายชนิดโดยเฉพาะกรดอะมิโนที่จำเป็น ทำให้คุณภาพของโปรตีนจากขนไก่ลดลง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการใช้วิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces* sp., *Aspergillus* sp. เป็นต้น ในการย่อยสลายเคราตินเนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ใช้สภาวะรุนแรง และยังไม่ทำลายกรดอะมิโนในขนไก่อีกด้วย จึงสามารถนำโปรตีนจากขนไก่มาใช้ประโยชน์ได้สูงสุด โดยเอนไซม์ที่ย่อยสลายเคราติน คือ เอนไซม์เคราติเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส เอนไซม์เคราติเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ในสภาวะที่สับสเตรทมีเคราตินเป็นองค์ประกอบโดยจะถูกสร้างและขับออกนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ เอนไซม์เคราติเนสจะทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (-S-S-, disulfide bond) ของสับสเตรท เคราติน (Bockle

et al., 1995) ทำงานได้ดีในสภาวะที่ค่าพีเอชเป็นกลางจนถึงด่างและที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส (Gupta & Ramnani, 2006) มีการนำเอนไซม์เคราติเนสไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การผลิตปุ๋ย อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก การผลิตก๊าซชีวภาพ (Macedo et al., 2005; Bálint et al., 2005) เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าการนำเอนไซม์เคราติเนสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ในการคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสจะใช้วิธีการคัดเลือกเบื้องต้นโดยอาศัยผลของกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสโดยให้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินเจริญบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของนมแล้วสังเกตการเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคลนินของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่แยกจากดิน เช่น *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 *B. pumilus* KUB-K0082 และ *Pseudomonas aeruginosa* KTDw9 สามารถย่อยสลายขนไก่ได้ (Wanchaitanawong et al., 2000; Eksittikul & Kudan, 2012) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากดินของฟาร์มสัตว์ปีกในจังหวัดพิษณุโลกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate และนำแบคทีเรียที่มีผลทดสอบในการสร้างวงใสมาใช้ในการย่อยสลายขนไก่ และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่ได้มาทดสอบผลของอุณหภูมิ และค่าพีเอช ต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่ ค่าปริมาณโปรตีน จัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายขนไก่โดยใช้วิธีการย้อมสีแกรม ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมีและเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินที่จะใช้ในการแยกหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากฟาร์มสัตว์ปีกในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย ใช้วิธีการเก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสตามวิธีของ Prasad et al. (2010) โดยเก็บตัวอย่างดินในเล้าไก่จำนวน 3 เล้า แต่ละเล้าใช้วิธีการเก็บแบบสุ่มตามเส้นทแยงมุม 5 จุด

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตโปรติเอสเบื้องต้น

การแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เคราติเนส ในเบื้องต้นจะใช้การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส โดยนำดิน 1 กรัมมาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำเอาส่วนใสไปเจือจางถึงระดับความเข้มข้น 10^{-3} และดูดส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร และทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate (peptone 5 กรัม, yeast extract 2.5 กรัม, skim milk powder 1 กรัม, กลูโคส 1 กรัม, agar 15 กรัม และน้ำ 1,000 มิลลิลิตร) ปรับให้ค่าพีเอช เป็น 7.5 ตามงานวิจัยของ Eksittikul & Kudan (2012) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อดูกิจกรรมการย่อยโปรตีนจากการเกิดวงใสรอบโคโลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate จากนั้นนำเชื้อมาทดสอบอีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar plate ที่ปริมาณต่าง ๆ กันและเลือกใช้ skim milk powder ปริมาณ 3.0 กรัม (คิดเป็น 3 เท่าจากสูตรเดิม) ซึ่งช่วยให้สามารถสังเกตเห็นวงใสได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จากนั้นวัดขนาดของวงใส และขนาดของโคโลนินำเชื้อที่ทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนินมา streak plate บนอาหาร nutrient agar เพื่อคัดแยกโคโลนินเดี่ยว (single colony) และกำหนดรหัสเป็น PSRU no.XX และเก็บรักษาแบคทีเรียในอาหารวุ้นเยียงที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายขี้ไก่

ในการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายขี้ไก่จะใช้แบคทีเรียโอโซเลทที่ให้งาในสบนอาหาร skim milk agar plate ตามงานวิจัยของ Eksittikul & Kudan (2012) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละโอโซเลทในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว nutrient broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารจำกััดที่ประกอบด้วย NaCl 0.5 กรัม MgCl₂·6H₂O 0.1 กรัม CaCl₂ 0.06 กรัม KH₂PO₄ 0.7 กรัม และ K₂HPO₄ 1.4 กรัม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ค่าพีเอช 7.5) และมีขี้ไก่ประมาณ 0.5 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดรูปชมพู่ที่ทำการทดสอบดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วกรองแยกขี้ไก่ที่เหลือจากการย่อยของแบคทีเรีย ล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอน คำนวณน้ำหนักของขี้ไก่ที่หายไปเทียบกับชุดควบคุมเพื่อหาประสิทธิภาพการย่อยขี้ไก่ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละของการย่อยสลาย} &= [(W_0 - W_1) / W_0] \times 100 \\ \text{เมื่อ } W_0 &= \text{น้ำหนักขี้ไก่เริ่มต้น} \\ W_1 &= \text{น้ำหนักขี้ไก่สุดท้าย} \end{aligned}$$

4. การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและค่าพีเอชต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายขี้ไก่

เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขี้ไก่สูงที่สุดจะถูกเลือกเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและค่าพีเอชต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายขี้ไก่

4.1 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายขี้ไก่ทำได้โดยการให้แบคทีเรียย่อยสลายขี้ไก่เจริญในอาหารจำกััดที่มีขี้ไก่อยู่ (ค่าพีเอช 7.5) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 30, 37, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วคำนวณน้ำหนักของขี้ไก่ที่หายไปเทียบกับชุดควบคุมเพื่อหาประสิทธิภาพการย่อยขี้ไก่

4.2 อิทธิพลของค่าพีเอช ต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายขี้ไก่ทำได้โดยการให้แบคทีเรียย่อยสลายขี้ไก่เจริญในอาหารจำกััดที่มีขี้ไก่อยู่และกำหนดค่าพีเอช เท่ากับ 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 และ 10.5 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (ได้จากข้อ 4.1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วคำนวณน้ำหนักของขี้ไก่ที่หายไปเทียบกับชุดควบคุมเพื่อหาประสิทธิภาพการย่อยขี้ไก่

5. การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการย่อยขี้ไก่ของแบคทีเรียใช้วิธี Kjeldahl method โดยนำสารตัวอย่างประมาณ 0.5 ถึง 1.0 กรัม มาผ่านกระบวนการย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมี CuSO₄·5H₂O 5 กรัม และ K₂SO₄ 6.5 กรัม เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เปิดเครื่องดักจับไอกรด จากนั้นนำสารตัวอย่างมาผ่านกระบวนการกลั่นโดยไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของ (NH₄)₂SO₄ จะทำปฏิกิริยากับ NaOH เกิดเป็น NH₃ ซึ่งจะถูกจับโดย Boric acid แล้วนำมาไทเทรตด้วย 0.1 M HCl ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และทำการคำนวณหาปริมาณของโปรตีนในสารตัวอย่างในรูปของไนโตรเจน ดังนี้

$$\begin{aligned} \%N &= 14.01 \times (V_1 - V_2) \times \text{Conc. of HCl (mol/L)} / \text{Weight of Sample (g)} \times 10 \\ \text{เมื่อ } V_1 &= \text{ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรต sample} \\ V_2 &= \text{ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรต blank} \end{aligned}$$

จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนมาคูณกับ conversion factor (6.25) เพื่อหาปริมาณโปรตีน โดยค่า conversion factor สำหรับการหาโปรตีนจากขนไก่เท่ากับ 6.25 เนื่องจากขนไก่จัดอยู่ในกลุ่มอาหารชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลุ่มของข้าว ถั่ว นมและเจลาติน เป็นต้น

6. จำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียย่อยสลายขนไก่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

6.1 แบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ให้วงใสบนอาหาร skim milk agar จะถูกนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับวงศ์โดยใช้การย้อมสีแกรม (gram stain) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological studies) และการทดสอบชีวเคมี (biochemical assays) (Sneath et al., 1986)

6.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด 3 ลำดับแรกในการย่อยสลายขนไก่ด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

6.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เจริญในอาหาร nutrient broth (Difco®, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง และเก็บเซลล์ของแบคทีเรียมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Favorgen, Taiwan)

6.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 6.2.1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สโดยใช้ universal primer 27F และ 1525R (Brosius et al., 1978; Lane et al., 1985) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (Applied Biosystem, USA) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส (5 นาที) 1 รอบ ตามด้วย denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส (1 นาที) annealing 55 องศาเซลเซียส (1 นาที) และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส (1 นาที) 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส (10 นาที) 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลที่มีเอทิลเดียมโบรไมด์ภายใต้แสงยูวี และทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ NucleoSpin® Gel และ PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany)

6.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำผลผลิต PCR ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st Base (Kembangan, Malaysia) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Log-Expectation (Muscle) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum likelihood (1,000 bootstrap) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0

ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากฟาร์มประทุม อำเภอมือง จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย โดยเจือจางสารละลายตัวอย่างดินแล้วนำมา spread plate บนอาหารที่มีส่วนผสมของนมพร่องมันเนย และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนจากการเกิดวงใสรอบโคโลนี พบว่า แบคทีเรียทั้งหมด 18 ไอโซเลท มีค่าอัตราส่วนของการเกิดวง

ใสและขนาดของโคโลนีแตกต่างกันตั้งแต่ 1.95 ถึง 2.92 โดยแบคทีเรียที่มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวสูงที่สุด 3 อันดับแรก คือ ไอโซเลท PSRU 14, PSRU 17 และ PSRU 8 เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่ที่ต่างกันระหว่าง 10.67 ถึง -73.60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท PSRU 11 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่สูงสุด ($p < 0.05$) รองลงมา คือ แบคทีเรียไอโซเลท PSRU 8 (61.53 เปอร์เซ็นต์) และ แบคทีเรียไอโซเลท PSRU 12 (38.93 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 1 (Table 1) ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าอัตราส่วนของการเกิดวงใสและขนาดของโคโลนีกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่ที่จุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนนั้นไม่สัมพันธ์กันทั้งนี้เนื่องจากการเกิดวงใสบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของนมพร่องมันเนยเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสได้ทั้งหมดแต่การย่อยสลายขนไก่นั้นเกิดได้จากกิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสเท่านั้น

Table 1 Screening of keratinase producing bacteria on skim milk agar plate (1st) and on raw feathers minimal medium (2nd)

Isolated Bacteria (PSRU no.)	Protease producing bacteria	Feather degradable ability
	Ratio (diameter of clear zone (cm)/ diameter of colony (cm))	Percent of degradation
1	1.78±0.18	17.32±2.52ijk
2	1.55±0.16	23.07±2.44fg
3	1.79±0.19	15.11±1.82kl
4	1.89±0.13	15.50±1.57jkl
5	2.05±0.19	33.87±3.32d
6	2.05±0.16	12.66±2.49lm
7	1.80±0.05	19.18±1.63hij
8	2.33±0.12	61.53±2.97b
9	2.00±0.09	18.65±0.79hijk
10	2.29±0.09	28.88±3.01e
11	2.11±0.11	73.60±2.16a
12	1.98±0.26	38.93±1.72c
13	1.73±0.11	30.32±2.25e
14	2.92±0.07	24.13±1.69f
15	2.00±0.08	10.67±1.67m
16	1.65±0.03	20.33±1.10ghi
17	2.39±0.22	21.37±0.67fgh
18	2.31±0.08	35.00±0.92d

Remark Average ± standard deviation from three replicates.

The different letters in the same column are considered significantly different according to Duncan's multiple comparison test ($p < 0.05$).

ในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายขนไก่ทั้ง 18 ไอโซเลทเบื้องต้นโดยใช้วิธีการย้อมสีแกรม ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีที่มีส่วนผสมของนมพร้อมมันเนยและสามารถย่อยขนไก่ได้ทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดฟองแก๊สเมื่อทดสอบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะมิลเลส และเมื่อศึกษาถึงรูปร่างของโคโลนี (form) พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีรูปร่างของโคโลนีเป็นแบบที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) แต่มีความนูนของโคโลนี (elevation) ที่ต่างกัน ได้แก่ โคโลนีที่มีทั้งแบบที่เป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (undulate) หรือเป็นคลื่นที่แหวกว้ามาก (lobate) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียบางไอโซเลทสามารถสร้าง endospore ได้ จากข้อมูลดังกล่าวจึงสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม ประกอบไปด้วย *Staphylococcus* sp. 9 ไอโซเลท *Bacillus* sp. 7 ไอโซเลท และ *Corynebacterium* sp. 2 ไอโซเลท (Table 2) ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท PSRU 8 PSRU 11 และ PSRU 12 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายขนไก่มากที่สุด 3 อันดับแรกอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp.

Table 2 Morphological studies, gram strain and biochemical assays of isolated proteinase producing bacteria

Isolated Bacteria (PSRU no.)	Colony morphology		Shape structure	Endospore	Identification
	Elevation	Margin			
1	Raised	Undulate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.
2	Flat	Undulate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.
3	Raised	Undulate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.
4	Convex	Undulate	Rod	+	<i>Bacillus</i> sp.
5	Convex	Undulate	Rod	+	<i>Bacillus</i> sp.
6	Raised	Undulate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.
7	Raised	Lobate	Rod	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
8	Convex	Undulate	Rod	+	<i>Bacillus</i> sp.
9	Flat	Undulate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.
10	Raised	Lobate	Rod	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
11	Convex	Undulate	Rod	+	<i>Bacillus</i> sp.
12	Convex	Undulate	Rod	+	<i>Bacillus</i> sp.
13	Raised	Lobate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.
14	Convex	Undulate	Rod	+	<i>Bacillus</i> sp.
15	Raised	Lobate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.
16	Raised	Lobate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.
17	Convex	Undulate	Rod	+	<i>Bacillus</i> sp.
18	Raised	Undulate	Coccus	NT	<i>Staphylococcus</i> sp.

Remark NT = not test, + = positive, - = negative

ในการหาอุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายขนไก่ได้เลือกศึกษาในแบคทีเรียโอโซเลท PSRU 8, PSRU 11 และ PSRU 12 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่สูงสุดดังตารางที่ 1 (Table 1) โดยศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายขนไก่ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายขนไก่ของแบคทีเรียโอโซเลท PSRU 8, PSRU 11 และ PSRU 12 คือ 40, 37 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อศึกษาผลของค่าพีเอชที่ 4.5, 6.0, 7.5, 9.0 และ 10.5 ต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมของแบคทีเรียแต่ละโอโซเลท พบว่า แบคทีเรียโอโซเลท PSRU 8 สามารถย่อยสลายขนไก่ได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 7.5 (57.60 เปอร์เซ็นต์) แบคทีเรียโอโซเลท PSRU 11 ย่อยสลายขนไก่ได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 7.5 (73.60 เปอร์เซ็นต์) และแบคทีเรียโอโซเลท PSRU 12 ย่อยสลายขนไก่ได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 9.0 (63.02 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ได้มีการทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารจำกัดที่มีขนไก่พบปริมาณโปรตีนในช่วง 0.126 ถึง 0.329 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยแบคทีเรียโอโซเลท PSRU 11 มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียโอโซเลท PSRU 8 (0.225 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) และแบคทีเรียโอโซเลท PSRU 12 (0.126 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ

เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอโซเลท PSRU 8, PSRU 11 และ PSRU 12 โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าแบคทีเรียโอโซเลท PSRU 8 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียโอโซเลท PSRU 12 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus siamensis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียโอโซเลท 11 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 1 (Figure 1)

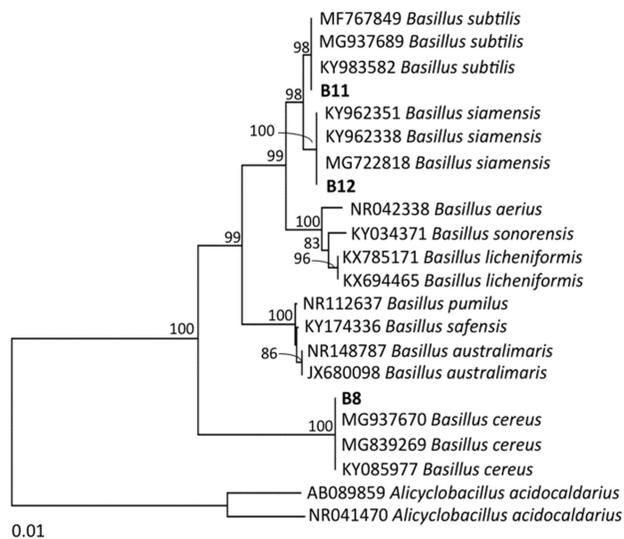


Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of the B8 (PSRU 8), B11 (PSRU 11) and B12 (PSRU 12) and selected *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *B. siamensis* strains, respectively, from the database.

อภิปรายผล

จากการคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เคราตินเนสเบื้องต้นบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของนมพร่องมันเนยโดยสังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนี ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส ทำให้สามารถช่วยคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เคราตินเนสที่สามารถย่อยสลายขนไก่ได้ โดยจากการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียย่อยสลายขนไก่ได้จำนวน 18 ไอโซเลท และเมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่แล้ว พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PSRU 8, PSRU 11 และ PSRU 12 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการย่อยสลายขนไก่ และเมื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท PSRU 8 PSRU 11 และ PSRU 12 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus cereus*, *B. subtilis* และ *B. siamensis* ตามลำดับ โดยเชื้อ *B. cereus* มีลักษณะของโคโลนีมีรูปร่างกลม (circular) ขอบโคโลนีเรียบ (entire) ขณะที่ *B. subtilis* และ *B. siamensis* ลักษณะของโคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) และมีลักษณะขอบของโคโลนีเว้าเพียงเล็กน้อย (undulate) นอกจากนี้เมื่อย้อมสีแกรมของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จะติดสีม่วง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้าง endospore และสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ซึ่งที่ผ่านมามีรายงานถึงการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสโดยเชื้อ *B. cereus* และ *B. subtilis* (Laskhmi et al., 2013; Sivakumar et al., 2013) อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานว่า *B. siamensis* สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้ นอกจากนี้จากการหาค่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายขนไก่ของแบคทีเรียทั้งสามแล้ว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายขนไก่ คือ ที่อุณหภูมิช่วง 37-40 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 7.5-9.0 โดยผลจากการย่อยสลายขนไก่ในอาหารจำกัดของแบคทีเรียทำให้ได้สารละลายโปรตีน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าแบคทีเรียจากดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายขนไก่ส่วนมากเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. (Lin et al., 1995; Kim et al., 2001) โดย Wanchaitanawong et al. (2000) ได้รายงานถึงการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสโดยเชื้อ *B. licheniformis* KUB-K0006 และ *B. pumilus* KUB-K0082 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Prasad et al. (2010) ที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนสและพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้คือ *Bacillus* sp. และมีค่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 7.0 นอกจากนี้ Laskhmi et al. (2013) รายงานว่า *B. subtilis* และ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายขนไก่โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 8.5 ยิ่งไปกว่านั้น Eksittikul & Kudan (2012) ได้รายงานว่าการแยกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์เคราตินเนสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่ ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์เคราตินเนสสามารถย่อยสลายขนไก่และทำให้เกิดโปรตีนขึ้นจึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับขนไก่เหลือทิ้งและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ต่อไปได้

สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เคราตินเนสด้วยอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของนมพร่องมันเนย และการทดสอบการย่อยสลายขนไก่ในอาหารที่จำกัดสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 18 ไอโซเลท จำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp. และ *Veillonella* sp. โดยแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย่อยสลายขนไก่เป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* sp. ได้แก่ *B. cereus* (PSRU 8),

B. subtilis (PSRU 11) และ *B. siamensis* (PSRU 12) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายขนไก่คือ ที่อุณหภูมิในช่วง 37-40 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 7.5-9.0 นอกจากนี้การย่อยสลายขนไก่ของแบคทีเรียทำให้เกิดโปรตีนซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตอาหารสัตว์ซึ่งเป็นแนวทางในการลดการกำจัดขนไก่ที่อาจจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเสีย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนพัฒนาการวิจัยและบริหารจัดการงานวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (พ.ศ. 2560) ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม และห้องปฏิบัติการวิจัยด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- Bálint B, Bagi Z, Tóth A. et al. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005; 69: 404-410.
- Brosius J, Palmer L, Kennedy JP. et al. Complete nucleotide sequence of a 16s ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978; 75: 4801-4805.
- Bockle B, Galunsky B, Muller R. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM. 40530. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61: 3705-3710.
- Eksittikul T, Kudan S. Isolation and partial purification of keratinase from novel bacteria isolated from poultry farm soil. *Ramkhamhaeng Research Journal of Sciences and Technology*. 2012; 15: 45-54.
- Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 70: 21-33.
- Kim JM, Lim WJ, Suh HJ. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*. 2001; 37: 287-291.
- Lane DJ, Pace B, Olsen G.J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*. 1985; 82: 6955-6959.
- Laskhmi PJ, Chitturi ChMK, Lakshmi WV. Efficient degradation of feather by keratinase producing *Bacillus* sp. *International Journal of Microbiology*. 2013; 2013, 1-7.
- Lin X, Kelemen DW, Miller ES. et al. Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61: 1469-1474.
- Macedo AJ, Beys da Silva WO, Gava R. et al. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71: 594-596.
- Prasad HV, Kumar G, Karthik L. et al. Screening of extracellular keratinase producing bacteria from feather processing areas in Vellore, Tamil Nadu. *Indian Journal of Scientific Research*. 2010; 2: 559-565.
- Riffel A, Brandelli A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006; 37: 395-399.
- Scott JA, Untereiner WA. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Medical Mycology*. 2004; 42: 239-246.
- Shih JCH, Williams CM. (1990). Feather-lysate, a hydrolyzed feather feed ingredient and animal feeds containing the same. *US patent*. 4, 908, 220. 4p.

- Sivakumar T, Shankar T, Thangapandian V. et al. Optimization of cultural condition for keratinase production using *Bacillus cereus* TS1. *Insight Microbiology*. 2013; 1-8.
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME. et al. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2 Baltimore: Williams and Wilkins. 1986. ISBN0-683-07893-3.
- Wanchaitanawong P, Ritthitham S, Nitisinprasert S. Production of keratinase by *Bacillus licheniformis* KUB-K0006 and *Bacillus pumilus* KUB-K0082. *Proceedings of the 38th Kasetsart University Annual Conference: Engineering, Agro-Industry*. 2000; 522-528.