



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เคราตินจากสิ่งแวดล้อม
ท้องถิ่นและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารทิ้งเคราติน
(Screening of keratinase-producing microbes from
local environmental samples and their efficiency
in hydrolyzing keratinous wastes)

โดย

อับดุลลาห์ โตลาห์ ดาลี
คอสิยาร์ สะลี
นุรฮัยนี หะยียูโซะ

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555
มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากสิ่งแวดล้อม
ท้องถิ่นและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารทิ้งเคราติน
(Screening of keratinase-producing microbes from
local environmental samples and their efficiency
In hydrolyzing keratinous wastes)

โดย

อับดุลลาห์ โตลาห์ ดาลี
คอสิยาห์ สะลี
นุรฮัยนี หะยียูโซะ

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555
มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เคราตินจากสิ่งแวดล้อมท้องถิ่น และประสิทธิภาพการย่อยสลายสารทิ้งเคราติน

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยสีทจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จุลินทรีย์ประจำถิ่นของดินแหล่งทิ้งสารเคราติน เป็นที่รู้จักกันในเรื่องของการผลิตเคราตินเอส และ/หรือโปรติเอสเคราติโนไลติก วัสดุเคราตินสำหรับจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งของพลังงาน คาร์บอนและไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียว จุลินทรีย์เหล่านี้กับเอนไซม์ที่ผลิตพบมีศักยภาพต่อการประยุกต์ใช้ในการนำการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพสารทิ้งเคราตินที่แข็งกร้าว โดยอาศัยกระบวนการการย่อยสลาย การหมุนเวียนแร่ธาตุ และเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ต้นทุนต่ำและควบคุมอย่างง่าย ๆ ได้ ด้วยวัตถุประสงค์ทั้งหมดนี้ ตัวอย่างดินที่ทับถมของขยะปนเปื้อนจากจุดต่าง ๆ ในหมู่บ้านบาโงระนะ บาโงอาแซและโดนด จังหวัดนราธิวาส รวมทั้งยะหา บ้านเนียง ปุโรง บันนังสะเรงและมลายูบางกอก จังหวัดยะลา จึงถูกใช้เพื่อเป็นแหล่งคัดแยกเชื้อราและแบคทีเรียที่ผลิตเคราตินเอส โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Enrichment และการคัดเลือก Horikoshi medium และ keratin (1%) agar การคัดแยกเชื้อรา 3 ไอโซเลตและแบคทีเรีย 4 ไอโซเลตถูกดำเนินการจนสำเร็จผล ซึ่งเชื้อทั้งหมดนี้แสดงการผลิตไฮโดรไลสของการย่อยเคราตินขนาดกว้างกว่า ทั้งหมดจึงถูกคัดเลือกสำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป ผลของการใช้ Dichotomous key ของเชื้อราอย่างง่ายพิสูจน์เชื้อราเหล่านี้ในเบื้องต้น ปรากฏว่า เป็นจีส *Aspergillus*, *Penicillium*, และ *Cladosporium* และจึงกำหนดชื่อเรียกเป็น *Aspergillus* KF1, *Penicillium* KF2 และ *Cladosporium* KF3 และสำหรับแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต การพิสูจน์เบื้องต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ได้แสดงผลออกมาว่า เป็นจีส *Bacillus* ทั้งหมด จึงเรียกชื่อเป็น *Bacillus* KB1, *Bacillus* KB2, *Bacillus* KB3, และ *Bacillus* KB4 ถัดมาได้ดำเนินการทดสอบภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเคราตินเอสของแต่ละไอโซเลต โดยใช้อาหารจำเพาะ Feather meal medium ณ 37°C ในภาวะเขย่า และผลโดยรวมปรากฏว่า บรรดาเชื้อราและแบคทีเรียเหล่านี้มีรูปแบบการเจริญเติบโตปกติทั่ว ๆ ไปคือ เริ่มจากระยะ Lag สู่ Log, Stationary และสิ้นสุดที่ Decline phase อย่างไรก็ตาม ภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเคราตินเอสมีความแตกต่างกันเล็กน้อย คือพบว่า *Penicillium* KF2 ปล่อยเคราตินนอกเซลล์ ณ จุดสิ้นสุดของ Lag phase (1.0 U/ml) ในขณะที่ *Aspergillus* KF1 และ *Cladosporium* KF3 เริ่มปล่อย ณ จุดเริ่มต้นของ Log phase (3.9 และ 2.9 U/ml) ในทำนองคล้ายกัน การปล่อยเคราตินเอส ณ จุดเริ่มต้นของ Log phase ยังพบใน *Bacillus* ทั้ง 4 จีส (U/ml: 4.1 สำหรับ *Bacillus* KB1; 3.7, *Bacillus* KB2; 0.3, *Bacillus* KB3 และ 0.3, *Bacillus* KB4). การผลิตเคราตินเอสสูงสุดพบในเชื้อราในวันที่ 4 และ 5 และใน *Bacillus* KB1 และ *Bacillus* KB2 หลังจากบ่มแบบเขย่านาน 48 ชั่วโมง และใน *Bacillus* KB3 และ *Bacillus* KB4 หลังจากบ่มแบบเขย่านาน 60 ชั่วโมง ค่าของกิจกรรมที่แตกต่างกัน จะสังเกตได้ใน *Aspergillus* KF1 (70.7 U/ml), *Penicillium* KF2 (83.5), *Cladosporium* KF3 (72.4), *Bacillus*

KB1 (61.3), *Bacillus* KB2 (69.2), *Bacillus* KB3 (22.0) และ *Bacillus* KB4 (22.3) อีกทั้ง ยังพบว่า เชื้อเหล่านี้มีอัตราของการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันคือ ทั้ง *Aspergillus* KF1 และ *Penicillium* FK2 ถึง สูงสุดในวันที่ 4 (CFU/ml: 8.9×10^6 and 8.4×10^6) *Cladosporium* FK3 ถึงในวันที่ 5, 8.95×10^6 CFU/ml เชื้อ *Bacillus* KB1, *Bacillus* KB2, และ *Bacillus* KB3 หลังจากบ่ม 48 ชั่วโมง ค่า Viable count ถึง 11.1×10^{12} , 18.0×10^{12} และ 11.7×10^{12} CFU/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Viable count ของ *Bacillus* KB4 หลังจาก 60 ชั่วโมงเท่ากับ 17.9×10^{12} CFU / ml บนพื้นฐานของ ภาวะการณนี้ เคราตินเนสน่าจะเป็น Primary metabolite ซึ่งการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดควรทำ ณ จุดเริ่มต้นของ Stationary phase ข้อมูลพื้นฐานพร้อมกับฟังใจ 3 ไอโซเลตและแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้เหล่านี้นับเป็นสมบัติอันล้ำค่าทางวิทยาศาสตร์ของท้องถิ่น สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยและการใช้ประโยชน์ในขั้นสูงต่อไป

คำสำคัญ : keratinase, สารทั้งเคราติน, keratinase-producing microbes, ตัวอย่าง สิ่งแวดล้อมท้องถิ่น

Screening of keratinase-producing microbes from local environmental samples and their efficiency In hydrolyzing keratinous wastes

ABSTRACT

Numerous of bacteria, fungi and actinomycetes, especially keratinous waste soil microflora are known to produce keratinase or/and keratinolytic protease(s). Keratinous materials are sole sources of their energy, carbon and nitrogen. These microbes with their enzymes are of potential application in bioconversion of recalcitrant keratinous wastes through environmentally friendly, low cost and easily controlled processes of biodegradation, mineralization and biotechnology. For these purposes, the chicken feather wastes-dumping soil samples from several locations in villages of Bangorana, Bangoasae, and Tanod, Narathiwat Province, and of Yaha, Banniang, Purong, Bannangsareng and Melayubangkok Yala Province were screened for keratinase-producing fungi and bacteria. By using enrichment and selective media of Horikoshi media and keratin (1%) agar plate, 3 isolates of fungi and 4 isolates of bacteria were shown to produce wider clear zone of keratin hydrolysis, and they were selected for further tests. Using simple fungi dichotomous key, the primary identification of these fungal isolates was completed, and they were found to be *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Cladosporium* sp., and thus designated as *Aspergillus* KF1., *Penicillium* KF2 and *Cladosporium* KF3. For 4 bacterial isolates, primary identification involving biochemical and morphological characteristics was performed, results showed that they were *Bacillus*, and thus designated as *Bacillus* KB1, *Bacillus* KB2, *Bacillus* KB3, and *Bacillus* KB4. Each isolate was then subjected to growth and keratinase production profile determination using defined Feather meal medium with 37°C in shaking condition of incubation. Overall results showed that these fungi and bacteria did have typical growth profile, starting lag to log, and proceeded to stationary and decline phases. Extracellular keratinase profile was however slightly different. For *Penicillium*, the keratinase release was at the late lag phase (1 U/ml), whereas those of *Aspergillus* KF1, and *Cladosporium* KF3 started at the log phase (in U/ml: 3.9 and 2.9). Similarly, log phase start was also found in 4 *Bacillus* sp. (in U/ml: 4.1 for *Bacillus* KB1; 3.7, *Bacillus* KB2; 0.3, *Bacillus* KB3 and 0.3, *Bacillus* KB4). Maximum production of keratinase was observed in fungi on day 4 and day 5 and in *Bacillus* KB1 and *Bacillus* KB2 after 48 hours of shaking incubation at 37°C and in *Bacillus* KB3 and *Bacillus* KB4 after 60 hours of shaking incubation at 37°C. Different scores of activity

were observed in U/ml, 70.7 for *Aspergillus* KF1; 83.5, *Penicillium* KF2; 72.4, *Cladosporium* KF3; 61.3, *Bacillus* KB1; 69.2, *Bacillus* KB2, 22.0, *Bacillus* KB3, and 22.3, *Bacillus* KB4. As expected, different rates of growth were observed. Both *Aspergillus* KF1 and *Penicillium* FK2 reached maximum at day 4 (in CFU/ml: 8.9×10^6 and 8.4×10^6) *Cladosporium* FK3 at day 5 were 8.95×10^6 CFU/ml. On the other hand, *Bacillus* KB1, *Bacillus* KB2, and *Bacillus* KB3 after 48 hours were in CFU/ml, 11.1×10^{12} , 18.0×10^{12} and 11.7×10^{12} , respectively. *Bacillus* KB4 after 60 hours was 17.9×10^{12} CFU/ml. Based on these profiles, these keratinases were expected to be of primary metabolites, and hence best harvested at the beginning of stationary phase. These primary data with 3 fungal and 4 bacterial isolates were obviously scientifically invaluable treasures for use in further and advanced investigation and applications.

Keywords: keratinase, Keratinous wastes, keratinase-producing microbes, Environmental samples

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เล่มนี้จัดทำจนเป็นรูปเล่มได้ ด้วยกำลังใจจากทุก ๆ คนในบ้าน และในที่ทำงาน ห้องแล็บจุลชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา รวมถึงคณะผู้บริหารคณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร และในระดับมหาวิทยาลัยฯ ด้วย จึงถือโอกาสนี้ ส่งคำขอบคุณให้กับทุก ๆ คน ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณเป็นพิเศษ อาจารย์คอสียาห์ สะลีและอาจารย์นุรฮัยนี หะยียูโซะ รวมทั้งคุณอำพร ท่าตะ ที่ช่วยงานในห้องแล็บวิจัย และดูแลความเรียบร้อยของห้องแล็บ ตลอดจนบำรุงรักษาเครื่องมือของห้องแล็บโดยรวมทั้งหมดอย่างสมบูรณ์และเรียบร้อยตลอดมา

วิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ดังนั้น ทุก ๆ คนที่เกี่ยวข้องในระดับนี้ กรุณารับคำขอบคุณเป็นอย่างสูงและด้วยความคารวะมา ณ โอกาสนี้ด้วยเช่นกัน

อับดุลลาล่าห์ โตลาห์ ดาลี และคณะ
ตุลาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	i
บทคัดย่อ	ii
ABSTRACT	iv
กิตติกรรมประกาศ	vi
สารบัญ	vii
สารบัญรูป	x
สารบัญตาราง	xi
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการศึกษา	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 รายงานเอกสารที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 บทนำ	5
2.2. แบคทีเรียผลิตเคราตินเนส	6
2.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเคราตินเนส	9
2.4 การย่อยสลายทิ้งอุตสาหกรรมด้วยกระบวนการชีวภาพ	13
2.5 การประยุกต์ใช้งานที่เกิดขึ้นใหม่สำหรับเคราตินเนส	15
2.6 ฟังไจผลิตเคราตินเนส	18
2.7 อนุกรมวิธานของเชื้อราเคราติโนไลติก	20
2.8 ศักยภาพเคราติโนไลซิสของเชื้อรา	24
2.9 สับสเตรทของเคราตินเนส	31
2.10 เคราตินเนสในกระบวนการก่อโรค	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	40
3.1 การเก็บตัวอย่างดิน	40
3.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยชนิด	40
3.2.1 การคัดแยกเชื้อราผลิตเอนไซม์เคราตินเนส	40
3.2.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เคราตินเนส	41
3.2.3 การคัดแยกเชื้อราผลิตเอนไซม์โปรติเอส	41
3.3 วิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์	41
3.3.1 วิธีการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์	41
3.3.2 วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์	41
3.4 การพิสูจน์เชื้อ	41
3.4.1 การพิสูจน์เชื้อรา	41
3.4.2 การพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย	42
3.5 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนส	42
3.5.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น	42
3.5.2 การตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อผู้ผลิตเอนไซม์เคราตินเนส	42
3.5.3 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสของเชื้อราและแบคทีเรียผู้ผลิต	44
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	45
4.1 การคัดแยกเชื้อราและแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เคราตินเนส	45
4.2 การตรวจพิสูจน์เชื้อ	50
4.3 ภาวะการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนส	58
4.3.1 <i>Aspergillus</i> KF1, <i>Penicillium</i> KF2, และ <i>Cladosporium</i> KF3	58
4.3.2 <i>Bacillus</i> KB1 และ <i>Bacillus</i> KB2	62
4.3.3 <i>Bacillus</i> KB3 และ <i>Bacillus</i> KB4	62

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	71
5.1 สรุป	71

5.2 ข้อเสนอแนะ	73
บรรณานุกรม	75
ภาคผนวก	103
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	103
ภาคผนวก ข แนวทางการพิสูจน์เชื้อราจาก Dichotomous key of simple fungi	107
ภาคผนวก ค แนวทางการพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย (Genus <i>Bacillus</i>)	110
ภาคผนวก ง อาหารและแนวทางปฏิบัติสำหรับพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย	113
ภาคผนวก จ ผลทดสอบภาวะการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนส	125
ประวัติโดยย่อของนักวิจัย	133
ประวัติโดยย่อของนักวิจัยร่วม	135

สารบัญรูป

ลำดับรูป	หน้า
2.1. การประยุกต์ใช้ประโยชน์ของเคราตินสแบคทีเรีย	15
2.2. กิจกรรมการถอนขนของหนังวัวโดยเคราตินส Kr6	17
4.1. โคโลนีของเชื้อราที่ล้อมรอบด้วย clear zone ของ KF1, KF2 และ KF3	47
4.2. โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ล้อมรอบด้วยโซนใสของ BK1 และ BK2	48
4.3 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ล้อมรอบด้วยโซนใสของ BK3 และ BK4	49
4.4 ภาพการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราตินสของเชื้อ <i>Aspergillus</i> sp. KF1, <i>Penicillium</i> sp. KF2 และ <i>Cladosporium</i> sp. KF3 ในอาหาร keratin broth	60
4.5 ภาพการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราตินสของเชื้อ <i>Bacillus</i> KB1 ในอาหาร keratin broth	64
4.6 ภาพการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราตินสของเชื้อ <i>Bacillus</i> KB2 ในอาหาร keratin broth	65
4.7 ภาพการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราตินสของเชื้อ <i>Bacillus</i> KB3 และ KB4 ในอาหาร keratin broth	67

สารบัญตาราง

ลำดับตาราง	หน้า
2.1 แหล่งของสายพันธุ์แบคทีเรียย่อยสลายเคราตินเนส (Feather-degrading bacteria)	7
2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเคราตินเนสบางกลุ่ม	9
2.3 ลำดับปลาย N ของเคราตินเนสและโปรตีนเอนไซม์บางส่วน	10
2.4 ฟังไจที่ใช้ประโยชน์สับสเตรทเคาติน กลุ่ม Zygomycota	21
2.5 ฟังไจที่ใช้ประโยชน์สับสเตรทเคาติน กลุ่ม Ascomycota	22
2.6 ฟังไจที่ใช้ประโยชน์สับสเตรทเคราติน กลุ่ม Anamorphic fungi	25
2.7 การจัดประเภทฟังไจอาศัยชนิดของสับสเตรท ซึ่งเป็นแหล่งคัดแยกและ/หรือเป็นสับสเตรทที่ถูกย่อยสลายได้	35
4.1. จำนวนโคโลนีของเชื้อรา KF1, KF2 และ KF3 ที่เจริญบนอาหาร keratin (1%) agar plate	46
4.2. ลักษณะทาง Macroscopic และ Microscopic ของเชื้อราที่คัดแยกได้	51
4.3 สรุปผลการตรวจพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียผลิตเคราตินเนสที่คัดแยกจากอำเภอมือง กรงปินังและยะหา จังหวัดยะลา	55

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารเหลือทิ้งประเภทเคราติน เช่น ขนจากสัตว์ชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะขนไก่เป็นสารทิ้งที่มีปริมาณมาก เนื่องจากการเลี้ยงสัตว์ปีก โดยเฉพาะไก่เนื้อในประเทศไทยมีการพัฒนาขึ้นเป็นลำดับ จากการเลี้ยงในครัวเรือนไปเป็นการเลี้ยงเพื่ออุตสาหกรรม อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อ รวมถึงอุตสาหกรรมแปรรูปไก่ในประเทศไทยมีแนวโน้มขยายตัวขึ้นทุกปี เนื่องจากการบริโภคภายในประเทศและการส่งออกไก่สดและเนื้อไก่แปรรูปมีปริมาณเพิ่มขึ้น อุตสาหกรรมแปรรูปไก่ผลิตของเหลือทิ้งจากการแปรรูป อาทิ เลือด เครื่องใน กระดูกไก่ และขนไก่ โดยเฉพาะขนไก่เหลือทิ้ง คาดว่ามีถึงประมาณ 50,000-80,000 ตันต่อปี รวมถึงในพื้นที่ 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ที่มีค่านิยมการบริโภคเนื้อไก่ในการดำรงชีวิตเพิ่มขึ้น ทำให้มีสารเหลือทิ้งจากการค้าขายเนื้อไก่มากขึ้น และต้องกลายเป็นปัญหาทางมลภาวะอย่างหนึ่งในพื้นที่ในอนาคต การแปรรูปสารเหลือทิ้งเหล่านี้ให้อยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์ เช่น การแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของสารเหลือทิ้ง อีกทั้งยังช่วยลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่ง เนื่องจากขนไก่เหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 85% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโครงสร้างซับซ้อนประเภทเคราติน (keratin) เนื่องจากขนไก่ไม่สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนปกติที่มีอยู่ในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้น ขนไก่ไม่สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับอาหารสัตว์ได้โดยตรง แต่ต้องมีการแปรรูปขนไก่ก่อนในการแปรรูปนี้ มักนิยมทำเป็นกระบวนการ โดยใช้ความร้อนและความดันสูงประมาณ 130-150 °C และที่ความดัน 30-50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 0.5-2.5 ชั่วโมง (Latsshaw, 1994) ซึ่งมีข้อเสียคือ ต้นทุนการผลิตสูงและเกิดการสูญเสียกรดอะมิโนที่ไวต่อความร้อน นอกจากนั้น ยังพบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่ย่อยได้มีปริมาณต่ำ (Baker และคณะ, 1981) ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณค่าทางอาหารต่ำไม่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ การแปรรูปทางเคมีโดยการนำขนไก่ไปอบด้วยไอน้ำภายใต้ความดันสูงก็ให้ผลใกล้เคียงกับวิธีทางกายภาพคือ ทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการลดลงและต้องใช้ต้นทุนสูง เนื่องจากสารเคมีราคาแพง และยากต่อการควบคุมในการผลิตระดับอุตสาหกรรม อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่สิ้นเปลืองพลังงานอีกด้วย

การใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์หรือใช้จุลินทรีย์เป็นวิธีการหนึ่งในการแปรรูปวัตถุดิบทางการเกษตรให้มีประโยชน์และมีมูลค่าสูงขึ้น ข้อดีคือ ไม่ใช้พลังงานสูงและไม่มีปฏิกิริยาเคมีที่รุนแรง ทำให้ไม่ทำลายผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันพบว่า วิธีการทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์เคราติเนส ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยขนไก่ กลายเป็นทางเลือก ซึ่งเป็นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์เคราติเนสในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของขนไก่ป่น ซึ่งพบว่าเมื่อนำขนไก่ป่นที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมลงในอาหารไก่ในปริมาณไม่เกิน 20-50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลูกไก่จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารที่เติมขนไก่ป่นที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นี้ (Williams et al., 1991) วิธีการทางชีวภาพนี้สามารถควบคุมการผลิตได้ง่าย ใช้ต้นทุนต่ำ อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดผลเสียใดๆ ต่อสภาพแวดล้อมและตัวสัตว์ (ภุชฉณี, 2545)

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยขนไก่ตามธรรมชาติ พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตเอนไซม์เคราติเนสได้ โดยส่วนมากมักจะพบในบริเวณต่างๆ เช่น โรงเลี้ยงไก่ บริเวณ

กำจัดของเสียในโรงงานฆ่าและชำแหละไก่ บ่อหมักก๊าซชีวภาพ และบริเวณกำจัดขยะชุมชน เป็นต้น ซึ่งบริเวณต่างๆ เหล่านี้เป็นบริเวณที่มีการทับถมของเคราติน โดยจุลินทรีย์ที่พบและสามารถย่อยขนไก่ได้มีหลายชนิด เช่น รา แบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท

ไม่ใช่สิ่งมีชีวิตทุกชนิดสามารถย่อยและใช้เคราตินได้ มีเฉพาะบางส่วนของแบคทีเรีย Actinomycetes และเชื้อรา และตัวอ่อนแมลงเกาะเสื้อผ้า (*Tineola bisselliella* Hummel) ที่สามารถใช้เคราตินเป็นแหล่งเดียวของ C, N, S และพลังงาน แบคทีเรีย Keratinolytic โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จากยีส *Bacillus* และ Actinomycetes จะถูกคัดแยกมาจากขนตัว และขนนกเป็นส่วนใหญ่ (Burt & Ichida, 1999; Ichida, et al, 2001), กองขยะขนไก่ที่ถูกแปรรูปด้วยกระบวนการหมัก (Williams and Shih, 1989; Williams et al., 1990) หรือปุ๋ยหมัก (Kim et al. 2001) ในแบคทีเรียความสามารถ ย่อยสลายเคราตินของขนไก่จะพบในสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* เป็นส่วนใหญ่ (Burt and Ichida, 1999; Lin et al., 1999), น้อยครั้งจะพบในประชากร ของ *Bacillus pumilis*, *B. cereus* และ *B. subtilis* (Kim et al., 2001) และแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างสปอร์ เช่น *Stenotrophomonas* sp. (Yamamura et al. 2002) *Fervidobacterium pannavorans* (Friedrich and Antranikian, 1996) และ *F islandicum* (Nam et al., 2002). สปีชีส์เคราติโนไลติกของ Actinomycetes ชนิดที่ย่อยสลายเคราตินพื้นเมืองในขน หม และเล็บหรือเขาได้ จะเป็น ชนิด *Streptomyces* เป็นส่วนใหญ่ รวมทั้ง *S. fradiae* (Noval & Nickerson, 1959; Nickerson et al., 1963), *S. pactum* (Bockle et al., 1995) *S. thermoviolaceus* (Chitte et al., 1999), or ยีสอื่น ๆ เช่น *Thermoactinomyces* (Gousterova et al., 2005). (Gousterova et al. 2005)

ในส่วนของการเชื้อรา ที่รู้จักกันเป็นเคราติโนไลติก ได้แก่กลุ่มที่ต้องการสารอาหารพิเศษที่ใช้เคราติน เป็นสารตั้งต้น และอยู่ในระบบนิเวศที่อุดมไปด้วย สารอาหารเคราติน (Kornittowicz - Kowalska , 1997) ซึ่งอาจเป็นเชื้อราเคราติโนไลติกตัวแทนจาก dermatophytes และสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับยีส *Chrysosporium*, Dermatophytes ถัดจากเชื้อก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ รวมถึงกลุ่ม Saprotrophs ที่เลือกอาศัยอยู่ในดิน (Geophilic dermatophytes) เว้นแต่ *Microsporum gypseum* ซึ่งเป็นสาเหตุของการอักเสบ tinea corporis และ tinea capitis ในมนุษย์ (Hayashi & Toshitani, 1983; Offidani et al., 1998) และ Dermatophytoses ในสัตว์ (Caretta et al., 1992) Geophilic dermatophytes รวมถึง *Trichophyton* และ *Microsporum* บางชนิด และ teleomorphs ของ *Arthroderma* และ *Nannizzia* ตามลำดับ กลุ่มเชื้อรา Non dermatophytic keratinophilic ประกอบด้วย 2 กลุ่มคือ *Chrysosporium* และ *Myceliophthora* (anamorphs) เชื้อรา Teleomorphs ได้แก่ กลุ่ม *Arthroderma*, *Aphanoascus* และ *Ctenomyces* (Oorschot van, 1980; Currah, 1985)

บรรดาเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีการผลิตเอนไซม์เคราติเนสที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ดังนั้น การแยกและการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีความสามารถย่อยขนไก่ จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาอย่างละเอียด เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพของขนไก่ที่จะนำไปเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ต่อไปในอนาคต (กฤษณี, 2545) ข้อดีอีกประการหนึ่งก็คือ การคัดแยกเชื้อในท้องที่มาใช้ประโยชน์ เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เพราะนอกจากจะได้จุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมแล้ว ยังช่วยลดปริมาณการสั่งซื้อจุลินทรีย์จากต่างประเทศอีกด้วย ดังนั้น ทางสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร จึงจะดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับการคัดเลือกจุลินทรีย์

สายพันธุ์ที่ย่อยสลายขนไก่ได้ เพื่อใช้ศึกษาความสามารถและวิธีการผลิตเอนไซม์ keratinase เพื่อเป็นข้อมูลในการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยขนไก่ให้เกิดเป็นโปรตีนย่อยง่าย ซึ่งใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์หรือผสมเอนไซม์ keratinase โดยตรงในอาหารสัตว์ที่มีขนไก่ปนผสมอยู่ รวมทั้ง เป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้ประโยชน์และการวิจัยในขั้นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ และขอบเขตของการศึกษา

การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เคราตินเนส เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ keratinase อีกทั้งเพื่อบ่งชี้ชนิดและศึกษาคุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่แยกได้ โดยกำหนดกรอบการเก็บตัวอย่างเชื้อราและแบคทีเรียในท้องถิ่น ซึ่งก็ครอบคลุมตัวอย่างดินกองขยะขนไก่ที่หมู่บ้านบาโงระนะ อำเภอระแงะ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 1 แหล่ง หมู่บ้านตะโหนด อำเภอศรีสาคร จังหวัดนราธิวาส จำนวน 1 แหล่ง และหมู่บ้านบาโงอาแซ อำเภอระแงะ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 1 แหล่ง ส่วนในจังหวัดยะลาดินกองขยะจากหมู่บ้านหลังโรงหนังเก่า อ.ยะหา 1 แหล่ง หมู่บ้านพังกูแม อ.ยะหา จ.ยะลา 1 แหล่ง และหมู่บ้านสามแยกบ้านเนียง อ.เมือง จ.ยะลา 1 แหล่ง หมู่บ้านกูแบปูโรง หมู่ที่ 5 ตำบลบังนังสาเรง อำเภอเมืองและบ้านมลายูบางกอก

ตัวอย่างจะถูกนำมาศึกษาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ keratinase พร้อมทั้งศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงและมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นแนวทางลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมในพื้นที่และระดับประเทศ การได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้เองและสามารถย่อยขนไก่ บวกกับข้อมูลพื้นฐานที่ใช้สำหรับการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์จากสารเหลือทิ้งพวกคราติน น่าจะเป็นส่วนสำคัญสำหรับการช่วยลดต้นทุนการผลิตทางการเกษตร เช่น การเลี้ยงปลา ไก่ เป็ด เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดทั้งสิ้นเป็นผลมาจากการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนย่อยง่ายจากขนไก่ด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมโปรตีนในอาหารสัตว์ เป็นการเพิ่มมูลค่าและคุณค่าทางโภชนาการของสารเหลือทิ้งชนิดเคราติน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลและผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากงานวิจัยนี้คาดว่าจะ เป็นแนวทางลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมในพื้นที่และระดับประเทศได้โดยการนำจุลินทรีย์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้เองและสามารถย่อยขนไก่ไปเป็นทรัพยากรชีวภาพที่สำคัญ รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้สำหรับการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์จากสารเหลือทิ้งพวกคราติน ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตทางการเกษตร เช่น การเลี้ยงปลา ไก่ เป็ด เป็นต้น เป็นการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนย่อยง่ายจากขนไก่ด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมโปรตีนในอาหารสัตว์ เป็นการเพิ่มมูลค่าและคุณค่าทางโภชนาการของสารเหลือทิ้งชนิดเคราติน หรือนำไปสร้างประโยชน์ด้านอื่น ๆ ทั้งประโยชน์ทางวิทยาศาสตร์อุตสาหกรรมและประโยชน์ทางการศึกษาในระดับที่สูงขึ้นไป

บทที่ 2

รายงานเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทนำ

เอนไซม์ย่อยโปรตีนหรือเอนไซม์โปรตีโอไลติกเป็นหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์ในเชิงพาณิชย์ที่สำคัญมากที่สุด เอนไซม์เหล่านี้มีการใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการทางอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอกที่เป็นลูกค้าส่วนใหญ่ของโปรตีเอส เช่นเดียวกันกับอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องหนัง (Kumar & Takagi, 1999; Gupta et al. 2002) เคราตินเนสเป็นชั้นจำเพาะของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แสดงความสามารถในการย่อยสลายเคราตินที่ไม่ละลายน้ำ เอนไซม์เหล่านี้กำลังดึงดูดความสำคัญในปีที่ผ่านมา เพราะการใช้งานหลาย ๆ อย่างที่มีศักยภาพถูกโยงเกี่ยวกับการย่อยสลายเคราตินในปริมาณโปรตีนเส้นใยไม่ละลายน้ำจำนวนมากในรูปแบบของหนัง ขน ผม เล็บ งาและอื่น ๆ มีอยู่ทั่วไปในรูปของผลพลอยได้ของการแปรรูปอุตสาหกรรมการเกษตร (Onifade et al. 1998) ของเสียอุตสาหกรรมดินเหล่านี้ยากที่จะย่อยสลาย เพราะพอลิเปปไทด์ถูกบรรจุแบบแน่นขนาดและความเสถียรสูงจากพันธะไฮโดรเจนมากมายและปฏิสัมพันธ์ไม่ชอบน้ำ นอกเหนือไปจากหลาย ๆ พันธะไดซัลไฟด์ เคราตินเป็นโปรตีนโครงสร้างของขนนกและผ้าขนสัตว์ที่ไม่ละลายน้ำและเป็นที่รู้จักในเรื่องความเสถียรสูง (Bradbury 1973) องค์ประกอบและโครงสร้างระดับโมเลกุลของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบประกันความแข็งแรงของโครงสร้าง พอลิเปปไทด์เคราตินที่แตกต่างกันอย่างน้อย 30 ชนิดได้เป็นที่รู้จักกันโดยจัดได้ 2 evolutionary families คือประเภท I และประเภท II (รูป 2.1) ภายในพอลิเปปไทด์ของแต่ละสาย โดเมนทรงกระบอกกลมยาวประมาณ 310 กรดอะมิโนถูกขนานบ้างด้วยส่วนหัวไม่กลมและที่สั้นกว่า ซึ่งเข้าใจว่า จะมีโครงสร้างที่ยืดหยุ่นกว่า (Cohlberg 1993) สายเคราตินจะถูกบรรจุแน่นอยู่ในรูปเกลียว α (α -เคราติน) หรือแผ่น β (β -เคราติน) จนกลายเป็นซูเปอร์เกลียวของสายพอลิเปปไทด์ (Parry & North 1998; Kreplak et al. 2004), ส่งผลให้มีเสถียรภาพและความต้านทานต่อเอนไซม์โปรตีโอไลติกทั่วไป เช่น pepsin, trypsin และ papain นอกจากนี้ โครงตาข่ายของสายโปรตีนโดย cysteine bridges ก่อให้เกิดความเสถียรภาพทางกลและความต้านทานสูงต่อการสลายตัวด้วยโปรตีโอไลติกของเคราติน

แม้จะมีความต้านทานสูง เคราตินก็ไม่เหมาะสมในธรรมชาติและสามารถย่อยสลายโดยจุลินทรีย์บางชนิด เอนไซม์เคราติโนไลติกถูกผลิตโดยเชื้อรา แอคติโนมัยซีตและแบคทีเรีย และบ่อยครั้งสามารถคัดแยกได้จากดิน ที่ ๆ ซึ่งมีสารเคราตินสะสมอยู่ (Kaul & Sumbali 1997; Riffel & Brandelli 2006). ในบรรดาเชื้อรา เคราตินเนสมีการอธิบายพบในหมู่ dermathophytes โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ที่แยกจากการบำบัดเจ็บของมนุษย์และสัตว์ เคราตินเนสที่ผลิตโดย *Microsporium*, *Trychophyton* และ *Doratomyces microsporium* ก็ถูกรายงานออกมาเหมือนกัน (Kushwaha 1983; Grzywnowicz et al. 1989; Gradisar et al. 2000) และเอนไซม์เหล่านี้บางส่วนถูกศึกษาคุณลักษณะมาเป็นอย่างดี เพราะมีความเกี่ยวข้องทางการแพทย์เป็นอย่างดี (Deschamps et al, 2003) สายพันธุ์ *Aspergillus fumigatus* และ *Aspergillus flavus* ที่ผลิตเคราตินเนสก็ถูกรายงานออกมา (Santos et al., 1996) ในหมู่แบคทีเรีย กิจกรรมเคราติโนไลติกได้รับการรับรองอย่างกว้างขวางสำหรับสายพันธุ์จากจีนัส *Bacillus* และ *Streptomyces* (Lin et al. 1999; Kim et al. 2001; Bressolier et al. 1999) เอนไซม์เคราติโนไลติกจากแบคทีเรียอาจมีการนำไปใช้ที่สำคัญในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเกี่ยวข้องกับของเสียที่มีส่วนประกอบของเคราตินจากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกและเครื่องหนัง ที่สามารถ

แปลง หลังจากที่ผ่านมาการพัฒนาการของกระบวนการที่ไม่ก่อให้เกิดมลพิษ หลังจากการย่อยสลายด้วย เอนไซม์ เคราตินเครื่องหนังที่ไม่ละลายน้ำสามารถแปลงเป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ย, กาว, และแผ่นฟิล์ม หรือใช้ สำหรับการผลิตกรดอะมิโน ที่หายาก serine, cysteine, และ proline (Papadopoulos et al. 1986; Onifade et al. 1998; Gupta & Ramnani 2006)

การเพิ่มขึ้นอย่างมากของอุตสาหกรรมสัตว์ปีกได้สร้างผลพลอยได้พวกหนังซึ่งเป็นจำนวนมาก การใช้ประโยชน์จากเศษสารทางอุตสาหกรรมและการเกษตรอาจเป็นมูลค่าเพิ่มสำหรับอุตสาหกรรมและ ตอบโจทย์ของการเพิ่มขึ้นของการอนุรักษ์และการรีไซเคิลพลังงานที่ถูกต้อง ข้อเท็จจริงเหล่านี้กระตุ้น การศึกษาค้นคว้าเพื่อหาทางเลือกในการแปลงขยะเคราตินที่ทนทาน ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่า ใน เรื่องนี้ แม้ว่าการย่อยเคราตินโดยเอนไซม์จุลินทรีย์ได้รับการรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว (Noval และ Nickerson 1959), งานวิจัยเกี่ยวกับเคราตินเนสได้เพิ่มขึ้นจากปี 1990 เป็นต้นไปอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ข้อมูลเกี่ยวกับการย่อยเคราตินจำนวนมากจึงเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม กลไกของการย่อยสลาย เคราตินโดยจุลินทรีย์ยังไม่มี การอธิบายอย่างสมบูรณ์ และแม้ว่าการลดของ cysteine bridges อาจมี อิทธิพลสำคัญในการย่อยสลายเคราติน (Kunert & Stransky 1988; Kunert 1992; Böckle & Müller 1997), การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเคราตินเนสในปัจจุบันยังได้รับความสนใจต่อจุลินทรีย์ย่อยโปรตีนเป็น ทวีคูณ รายงานที่ครอบคลุมเกี่ยวกับเคราตินเนสและการใช้ประโยชน์จึงได้รับการตีพิมพ์ต่อมา (Onifade et al. 1998; Gupta & Ramnani 2006; Shih & Wang 2006)

2.2 แบคทีเรียผลิตเคราตินเนส

แบคทีเรียเคราติโนไลติกอ้างอิงถึงแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสและสามารถแยกได้ จากดินและเศษของเสียของเสียสัตว์ปีก (ตาราง 2.1) แม้ว่าเชื้อเหล่านี้ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* และ *Bacillus* แต่การศึกษายังได้แสดงให้เห็นว่า ยังมีความหลากหลายของแบคทีเรีย ที่ย่อยสลายขนนอย่างมีนัยสำคัญอีกมาก (Lucas et al. 2003) ในหมู่แบคทีเรียแกรมบวก กลุ่ม สำคัญที่พบสามารถย่อยสลายขนนจัดอยู่ใน *Arthrobacter* sp. (Lucas et al. 2003), *Microbacterium* sp. (Thys et al. 2004) และ *Kocuria rosea* (Bernal et 2006a) สายพันธุ์เคราติ โนไลติกส่วนใหญ่จะสามารถย่อยสลายขนเคราตินภายใน 48 ชั่วโมง เช่น ที่พบในกรณีของ *Microbacterium* sp. (รูป 2.1)

ตาราง 2.1 แหล่งของสายพันธุ์แบคทีเรียย่อยสลายเคราตินเนส (Feather-degrading bacteria)

Bacterial isolate(s)	Origin	Reference
Gram-positive		
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1	Poultry waste	Williams et al. 1990
<i>Bacillus subtilis</i> S14	Soil	Macedo et al. 2005
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , and <i>Bacillus cereus</i>	Poultry waste	Kim et al. 2001
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Alkaline soda lake	Gessesse et al. 2003
<i>Bacillus macroides</i> and <i>Bacillus cereus</i>	Dry meadow soil	Lucas et al. 2003
<i>Streptomyces pactum</i> DSM 40530	Collection culture	Böckle et al. 1995
<i>Streptomyces albidoflavus</i> K ₁₋₀₂	Hen house soil	Bressolier et al. 1999
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Soil	Chitte et al. 1999
<i>Fervidobacterium pennavorans</i>	Hot springs	Friedrich and Antranikian 1996
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Decomposing feathers	Thys et al. 2004
<i>Microbispora aerate</i> and <i>Streptomyces flavus</i>	Antarctic soil	Gushterova et al. 2005
<i>Terrabacter terrae</i>	Soil	Montero-Barrientos et al. 2005
<i>Kocuria rosea</i>	Soil	Bemal et al. 2006a
Gram-negative		
<i>Vibrio</i> sp. kr2	Poultry abattoir soil	Sangali and Brandelli 2000b
<i>Lysobacter</i> sp. NCIMB 9497	Collection culture	Allpress et al. 2002
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Deer fur	Yamamura et al. 2002
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Decomposing feathers	Riffel et al. 2003a
<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Janthinobacterium lividum</i> , and <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Dry meadow soil	Lucas et al. 2003

กิจกรรมเคราตินโอไลติกได้ถูกพาดพิงถึง *Streptomyces* sp. หลายสายพันธุ์ ซึ่งมีรายงานแรก ๆ เกี่ยวกับการย่อยสลายเคราตินโดยโปรตีนเอสจุลินทรีย์ (Noval & Nickerson, 1959; Elmayergi & Smith, 1971)

Streptomyces เคราตินโอไลติกหลาย ๆ สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่า สามารถเจริญเติบโตและการย่อยสลายเคราตินที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C (Chitte et al, 1999; Mohamedin 1999) อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strains) ก็มีการรายงานถึงความสามารถย่อยสลายเคราตินเช่นกัน อาทิ *S. pactum* DSM 40530 (Böckle et al. 1995) และ *S. albidoflavus* K1-02 (Bressolier et al. 1999) ความสามารถของ *Streptomyces* ในการย่อยสลายเคราตินได้ดีมากนั้นอาจสืบเนื่องมาจากความจริงที่ว่า บรรดา *Streptomyces* ทั้งหมดสามารถสังเคราะห์โปรตีนเอสที่หลากหลาย ซึ่งได้แก่ pronase ที่ผลิตได้ในเชิงพาณิชย์โดย *S. griseus* (Jurasek, et al. 1974) นอกจากนี้ *S. pactum* ที่พบว่าสามารถรีดิวซ์พันธะซัลไฟด์ในระหว่างการเจริญเติบโตในชน (Böckle & Müller 1997) ก็แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียนี้อาจสังเคราะห์ disulfide reductase เพื่อสนับสนุนการย่อยเคราตินนั่นเอง

กิจกรรมเคราตินโอไลติกขึ้นชื่อมากในหมู่ *Bacillus* spp. หลาย ๆ สายพันธุ์ของ *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ถึงโยงกับลักษณะเคราตินโอไลติกเช่นกัน (Lin et al. 1999; Suh & Lee 2001), อีกทั้ง สปีชีส์อื่น ๆ อาทิ *B. pumilus* และ *B. cereus* ก็พบสร้างเคราตินเนสได้เช่นเดียวกัน (Kim et al. 2001; Werlang & Brandelli 2005) *B. licheniformis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์เคราตินโอไลติก มักมีความสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ และเอนไซม์โปรตีนโอไลติกของแบคทีเรียนี้มีกิจกรรมโปรตีน

โอบิดิกในวงกว้างอีกด้วย (Lin et al. 1992; Cheng et al. 1995) เมื่อเร็ว ๆ นี้ บรรดา *Bacillus* ทั้งหมด 3 สปีชีส์ที่เป็นเคราติโนไลติกชั้นเยี่ยมก็ได้ถูกคัดแยกจากอ่าวอเมซอน (Giongo et al. 2007) บรรดาแบคทีเรียเหล่านี้แสดงไฮโมโลยีที่ชัดเจนร่วมกับ *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, และ *B. velezensis*, และพบผลิตภัณฑ์โปรตีนโอบิดิกผสม ซึ่งสามารถแสดงการหลุดของขนอย่างชัดเจนใน bovine pelts *Bacillus* สายพันธุ์ hermophilic และ alkaliphilic strains บางสายพันธุ์ก็เคยพบแสดงกิจกรรมการย่อยเคราติน เช่น *Bacillus* sp. P-001A (Atalo & Gashe 1993), *B. halodurans* AH-101 (Takami et al. 1992a, 1999), *B. pseudofirmus* AL-89 (Gessesse et al. 2003), และ *B. pseudofirmus* FA30-01 (Kojima et al. 2006).

นอกจาก *Bacillus* สายพันธุ์ดังกล่าวแล้ว กิจกรรมเคราติโนไลติกยังพบมีความเกี่ยวข้องกับ extremophiles อื่น ๆ กลางคือ เคราติเนสติกกับ thermophiles *Fervidobacterium pennavorans* (Friedrich & Antranikian, 1996), *Thermoanaerobacter keratinophilus* (Riessen & Antranikian, 2001) *Fervidobacterium islandicum* (Nam et al. 2002), และ alkaliphilic สายพันธุ์ *Nesternkonio* sp. AL-20 (Gessesse et. Al., 2003) และ *Nocardiopsis* sp. TOA-1 (Mitsuiki et al, 2004) จะเห็นว่า แบคทีเรียเหล่านี้มีแนวโน้มของการย่อยสลายโปรตีนที่ละลายน้ำยาก อย่างเช่น เคราติน จนกลายเป็นโปรตีนที่มีความเป็นพลาสติกเพิ่มขึ้น (Nam et al. 2002), และที่อุณหภูมิสูงจะทำให้มีความอ่อนไหวต่อการย่อยโดยโปรติเอสในที่สุด (Suzuki et al., 2006) สองสายพันธุ์ของ actinomycete คือ *Streptomyces flavis* 2BG และ *Microbispora aerata* IMBAS-11A ซึ่งแยกได้จากดินขี้โลกใต้ พบแสดงพฤติกรรมการผลิตเอนไซม์เคราติโนไลติกในระหว่างการเจริญเติบโตบนของเสียสัตว์ (Gushterova, et al. 2005)

เมื่อเร็ว ๆ นี้ กิจกรรมเคราติโนไลติกถูกโยงเกี่ยวกับแบคทีเรียแกรมลบ (ตาราง 2.1) พบว่า *Vibrio* sp. (Sangali & Brandelli, 2000a) *Xanthomonas maltophilia* (De Toni et al., 2002), *Stenotrophomonas* sp. (Yamamura et al, 2002.) และ *Chryseobacterium* sp. (Riffel & Brandelli, 2002) สายพันธุ์ย่อยขนนกถูกคัดแยกได้สำเร็จจากขนไก่ในสารทึบของของกอกขะ ในการศึกษาตรวจสอบข้อเท็จจริงเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียเคราติโนไลติกในหมู่สายพันธุ์ที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อมดินภายใต้สภาพภูมิอากาศแวดล้อมต่าง ๆ พบว่า สายพันธุ์ของกลุ่ม of Proteobacteria และ Cytophaga-Flavobacterium มีจำนวนมากเหนือกลุ่มอื่น (Lucas et al. 2003) นี่ก็สอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่ระบุว่า แบคทีเรียเคราติโนไลติกกอกขะของขนไก่ส่วนใหญ่เป็นแกรมลบ (Riffel & Brandelli, 2006)

2.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเคราตินเนส

ส่วนใหญ่ของเคราตินเนสที่มีการรายงานกันทุกวันนี้ พบว่าเป็นประเภทโปรตีเอสซีรีน (Lin et al. 1992; Böckle et al. 1995; Friedrich & Antranikian 1996; Bressolier et al. 1999; Suh & Lee 2001; Nam et al. 2002), และประเภทเมทัลโลโปรตีเอสเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่แสดงกิจกรรมเคราติโนไลติก (Brouta et al. 2001; Allpress et al. 2002; Farag & Hassan 2004) โดยรายงานที่เกี่ยวกับเมทัลโลโปรตีเอสเคราติโนไลติก ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแกรมลบนั้น ได้เพิ่มจำนวนมากขึ้น ในส่วนของคุณสมบัติของเคราตินเนสบางส่วนได้สรุปไว้ในตาราง 2.2

ตาราง 2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเคราตินเนสบางกลุ่ม

Producer bacteria	Catalytic type	Molecular mass (kDa)	Optimum pH	Reference
<i>B. licheniformis</i> PWD-1	Serine	33	7.5	Lin et al. 1992
<i>B. subtilis</i> KS-1	Serine	25.4	7.5	Suh and Lee 2001
<i>B. pseudofirmus</i> FA30-10	Serine	27.5	9–10	Kojima et al. 2006
<i>S. pactum</i> DSM40530	Serine	30	7–10	Böckle et al. 1995
<i>S. albidoflavus</i> K ₁₋₀₂	Serine	18	6–9.5	Bressolier et al. 1999
<i>F. pennavorans</i>	Serine	130	10	Friedrich and Antranikian 1996
<i>X. maltophilia</i> POA-1	Serine	36	8.0	De Toni et al. 2002
<i>Vibrio</i> sp. kr2	Serine	30	8.0	Sangali and Brandelli 2000a
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Metallo	64	7.5	Riffel et al. 2007
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Metallo	42	7.5	Thys and Brandelli 2006
<i>Kocuria rosea</i> LPB-3	Serine	240	10	Bemal et al. 2006a

เคราตินเนสที่ผลิตโดย *B. licheniformis* PWD-1 ถูกศึกษาคุณสมบัติเป็นอย่างดี โดยที่เอนไซม์นี้เป็นโปรตีเอสประเภทซีรีน (Lin et al., 1992) และยีนที่เป็นรหัส *kerA* มีความคล้ายคลึงกันสูงกับ subtilisin Carlsberg (Lin et al., 1995) ลำดับปลาย N ของเอนไซม์นี้ก็เหมือนกันกับของ subtilisin Carlsberg (ตาราง 2.3) ยีน *kerA* ซึ่งเป็นรหัสเคราตินเนสของ *B. licheniformis* จะแสดงเฉพาะสำหรับการย่อยสลายขนนกเท่านั้น (Lin et al., 1995) ดังนั้น การมีเคราตินขนนกเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแหล่งเดียวในคัลเจอร์เพาะเลี้ยงอาจส่งผลถึงการแสดงออกเป็นพิเศษของเอนไซม์โปรตีเอสเคราติโนไลติกออกมา ยีนนี้เคยถูกโคลนและแสดงออกในจุลินทรีย์ heterologous อย่างเช่น เชื้อ *E. coli* และ *B. subtilis* แต่ปริมาณเคราตินเนสที่ได้จะต่ำกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (Wang & Shih 1999; Wang et al. 2003a) อย่างไรก็ตาม ปริมาณเพิ่มขึ้นของเคราตินเนสที่ได้ ยังสามารถทำได้ด้วยการรวมโครโมโซมหลายชุดของยีน *kerA* ใน *B. licheniformis* และ *B. subtilis* (Wang et al. 2004) ยีน *kerA* ยังถูกโคลนสำหรับการแสดงออกนอกเซลล์ใน *Pichia pastoris* จนส่งผลให้ได้ recombinant enzyme ที่ glycosylated และทำงานดีกับ azokeratin (Porres et al. 2002.) นอกจากเคราตินเนสที่ศึกษามาเป็นอย่างดีจากสายพันธุ์ PWD-1 แล้ว โปรตีเอสเคราติโนไลติกอื่น ๆ ของ *B. licheniformis* ก็ถูกรายงานออกมา Rozs และคณะ (2001) ได้พิสูจน์สายพันธุ์ผลิตเคราตินเนสของ *B. licheniformis* และพบคุณสมบัติเร่งปฏิกิริยาที่ผิดปกติ ในส่วนของ *B. licheniformis* สายพันธุ์ HK-1 พบผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเคราติโนไลติก ซึ่งถูกยับยั้งบางส่วนโดย EDTA, 1,10-phenanthroline (Zn²⁺-specific chelator) และ PMSF, แต่ถูกยับยั้งอย่างชัดเจนโดย Zn²⁺ (Korkmaz, et al. 2004)

เช่นเดียวกันกับ *B. licheniformis* กิจกรรมโปรติโอไลติกหลักของเคราตินเนสจาก *B. subtilis* พบว่ามักจะเกี่ยวข้องกับกิจกรรมโปรติเอสซีรีน -Zaghloul (1998) ได้ทำการโคลนยีน *aprA* จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ย่อยขนนก ยีน *aprA* นี้ได้แสดงความเหมือนอย่างมีนัยกับ subtilisins ซึ่งเป็นสมาชิกตามแบบฉบับของ family ซีรีนโปรติเอส อย่างไรก็ตาม มีรายงานไม่กี่ชิ้นเท่านั้นที่ได้อธิบายถึงเคราตินเนสบริสุทธิ์จาก *B. subtilis* โปรติเอสเคราติโนไลติกได้ถูกสกัดบริสุทธิ์จาก *B. subtilis* KS-1 เอนไซม์นี้ถูกค้นพบว่า มีมวลโมเลกุล 25.4 kDa และลำดับปลาย N มีความคล้ายกับว่าโปรติเอสซีรีนอื่นๆ ของ *B. subtilis* (Suh & Lee 2001) นอกจากนี้ Macedo และคณะ (2005) ยังได้อธิบายถึงเคราตินเนสใหม่จาก *B. subtilis* ซึ่งมีลำดับของปลาย N เหมือนกับของ subtilisin E (ตาราง 2.3) อีกทั้งไม่แสดงกิจกรรมต่อคอลลาเจนและกิจกรรมถอนขน (dehairing) ที่ดีเยี่ยม คุณสมบัติอันนี้เป็นในทางตรงกันข้ามกับเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* PWD-1 ซึ่งมีสเปกตรัมของกิจกรรมที่หลากหลายครอบคลุม โปรตีนเส้นใยอื่น ๆ เช่น คอลลาเจนและอีลาสติน (Lin et al., 1992) เอนไซม์เคราติโนไลติกจาก *Bacillus* 3 สายพันธุ์ที่โดดเด่นถูกศึกษาลักษณะมาเมื่อเร็ว ๆ นี้ พบว่า เอนไซม์เหล่านี้ถูกยับยั้งโดย phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ benzamidine จึงสามารถสรุปว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของโปรติเอสซีรีน (Giongo, et al. 2007)

ตาราง 2.3 ลำดับปลาย N ของเคราตินเนสและโปรติเอสบางส่วน ให้สังเกต ^(a) ซึ่งก็คือ กรดอะมิโนส่วนเกินที่เขียนตัวเอียงจะแตกต่างจากส่วนเกินที่สอดคล้องกันใน Carlsberg subtilisin และ ^(b) คือ ลำดับปลาย N ของเปปไทด์ขนาด 73-kDa

Enzyme	N-terminal sequence ^a	Reference
Carlsberg subtilisin	AQTVPYGIPLIKADK	Jacobs et al. 1985
Keratinase PWD-1	AQTVPYGIPLIKADK	Lin et al. 1995
Subtilisin E	AQSVPYGISQIKAPA	Stahl and Ferrari 1984
Keratinase of <i>B. subtilis</i>	AQSVPYGISQIKAPA	Macedo et al. 2005
Depilatory protease	AQTVPYGIPQIKAPA	Huang et al. 2003
Keratinase of <i>B. pseudofirmus</i>	XQTVPXGIPYISDD	Kojima et al. 2006
Keratinase of <i>B. halodurans</i>	SQTVPWGISFLSTQQ	Takami et al. 1992a
Keratinase of <i>Nocardiosis</i> sp.	ADIIGGLAXYTMGGX	Mitsuiki et al. 2004
Fervidolysin ^b	SKAKDLASLPEIKSQ	Kluskens et al. 2002
Keratinase of <i>P. marquandii</i>	ALTQQPGAPWGLG	Gradisar et al. 2005
Keratinase of <i>D. microsporus</i>	ATVTQNNAPWGLG	Gradisar et al. 2005
Keratinase <i>A. fumigatus</i>	ALTQKGAPWGLGSI	Noronha et al. 2002

เคราตินเนสส่วนใหญ่จะจัดเป็นประเภทโปรติเอสซีรีน ตามที่ ถูกกำหนดโดยสับสเตรทและตัวยับยั้งเฉพาะเจาะจง *S. albidoflavus* ผลิตเคราตินเนสที่คล้ายกับ chymotrypsin โดยแสดงความเฉพาะเจาะจงสำหรับกรดอะมิโนส่วนเกิน aromatic และ hydrophobic เมื่อใช้เปปไทด์สังเคราะห์เพื่อการแสดงผล (Bressolier, et al. 1999) ความจำเพาะ P1 ของเคราตินเนส NAPase ของ *Nocardiosis* sp. ได้ถูกทดสอบกับสับสเตรท 11 synthetic p-nitroanilide (pNA) พบว่า เอนไซม์ชอบกรดอะมิโนส่วนเกิน aromatic และ hydrophobic ที่ตำแหน่ง P1 (Mitsuiki, et al. 2004) *Nesterenkonia* AL20 สายพันธุ์ย่อยขนนก ผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งยังคงแสดงฤทธิ์สูงกว่าต่อ tetrapeptides ที่มีส่วนเกิน hydrophobic ที่ P1 ในลำดับ Tyr > Phe > Leu (Bakhtiar et al.

2005) *B. licheniformis* K-508 สายพันธุ์เคราตินโนโลติกยับยั้ง trypsin-like thiol protease ที่ผลิตปกติ และว่องไวอย่างรุนแรงต่อ benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA อีกทั้งยังไม่ถูกยับยั้งโดย PMSF อีกด้วย (Rozs et al, 2001.) โปรติเอสซีรีนเคราตินโนโลติกของ *S. pactum* DSM 40530 พบแสดงความจำเพาะต่อสับสเตรทและ stereospecificity ต่ออนุพันธ์ PNA ของกรดอะมิโนพื้นฐานไลซีนและอาร์จินีน (L-enantiomers) แต่ไม่พบการย่อยสลายของ benzoyl-DArg-pNAwas (Böckle, et al. 1995) เคราตินเนสบริสุทธิ์ของ *Kocuria rosea* ถูกยับยั้งอย่างรุนแรงโดย 4-(2- aminoethyl) benzene sulfonyl fluoride, soybean trypsin inhibitor และ chymostatin ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเคราตินเนสชนิดนี้อยู่ในประเภทโปรติเอสซีรีน (Bernal et al, 2006a)

ลำดับปฐมภูมิของ fervidolysin ซึ่งผลิตโดย *Fervidobacterium pennavorans* สายพันธุ์ขอบร้อน ถูกตัดรหัสจากยีนรหัส *fls* (Kluskens et al, 2002) บริเวณ active site ของโปรติเอสซีรีนเสมือน subtilisin ได้ถูกพิสูจน์ออกมา ลำดับปฐมภูมิที่ถูกตัดรหัสแสดงความเหมือนอย่างสูงกับโปรติเอสเสมือน subtilisin โดยโครงสร้างผลึกสำหรับเอนไซม์ย่อยเคราตินที่ถูกรายงานขณะนี้มีมีความเกี่ยวข้องกับ fervidolysin (Kim et al., 2004) โครงสร้างผลึกความละเอียด 1.7^oA ได้แสดงให้เห็นว่า fervidolysin ประกอบด้วย 4 โดเมน: โดเมนเร่งปฏิกิริยา 1 โดเมน โดเมน β แชนดริช 2 โดเมน และโดเมน propeptide อีก 1 โดเมน สถาปัตยกรรมของโดเมนเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะคล้ายกับของ subtilisin นั้น ชี้ให้เห็นถึงการมีลำดับกรดอะมิโนแบบอนุรักษ์สูง ตำแหน่งจับแคลเซียมจะสังเกตเห็นภายในโดเมนเร่งปฏิกิริยา ซึ่งตรงกันพอดีกับของ subtilisin E-propeptide domain complex (Kim et al., 2004)

เมื่อเร็ว ๆ นี้ ข้อมูลเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับ keratinolytic metalloproteases มีปรากฏขึ้นมา Allpress และคณะ (2002) ได้รายงาน keratinolytic metalloprotease จาก *Lysobacter* ที่ว่องไวอย่างแรงต่อ carboxybenzoyl-Phe-pNA *Microbacterium* sp. สายพันธุ์ kr10 ผลิต Zn²⁺ metalloprotease ที่มีประสิทธิภาพย่อยขนเคราติน (Thys & Brandelli 2006) เคราตินเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบ *Chryseobacterium* sp. สายพันธุ์ kr6 ดูเหมือนจัดอยู่ในประเภท metalloprotease เพราะถูกยับยั้งได้โดย EDTA และ 1,10-phenanthroline และไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรท benzoyl-L-Arg-PNA (Riffel et al. 2003a) คุณสมบัติเหล่านี้สอดคล้องกับคุณสมบัติที่ถูกอธิบายไว้สำหรับโปรติเอสของ *Flavobacterium/Chryseobacterium* สองโปรติเอสทั้ง 2 ชนิดที่หลังโดย *Flavobacterium meningosepticum* นี้ เป็น zinc metalloendopeptidases โดยหนึ่งในสมาชิกมี O-glycosylation ที่ผลิตปกติ (Tarentino, et al. 1995) โปรติเอสถูกสกัดบริสุทธิ์จาก *Chryseobacterium indologenes* และถูกยับยั้งโดย EDTA และ 1,10-phenanthroline และการวิเคราะห์การดูดซึมอะตอมได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มี Ca²⁺ และ Zn²⁺ (Venter, et al. 1999) การกระตุ้นโดย Ca²⁺ และการยับยั้งโดย Zn²⁺ ของ keratinases แกรมลบ (Sangali & Brandelli 2000b. Riffel et al, 2003a) คล้ายกันกับ calpains บางส่วน (Sorimachi et al, 1997.) และ metalloproteases ของแบคทีเรียทั่วไป เช่น thermolysin และโปรติเอสนอกเซลล์จาก *Pseudomonas* sp. (Auld 1995) ผลที่ได้รับจากตัวยับยั้งโปรติเอสยังชี้ให้เห็นว่า แบคทีเรียแกรมลบอาจมีเคราตินเนส ซึ่งแตกต่างจากที่แยกไว้ก่อนจากแบคทีเรียแกรมบวก (Riffel, et al. 2003a)

เมื่อเร็ว ๆ นี้ สาร keratinolytic metalloprotease ได้ถูกสกัดบริสุทธิ์จากส่วนใสของคัลเจอร์ *Chryseobacterium* sp. สายพันธุ์ kr6 เอนไซม์นี้ ซึ่งเป็นสมบัติของ family M14 ของ peptidases ยังรู้จักด้วยชื่อ carboxypeptidase A family ซึ่งเป็นเอนไซม์แรกของ family นี้ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรม keratinolytic และจีโนม *Chryseobacterium* (Riffel, et al. 2007) เอนไซม์นี้ยังแสดง O-

glycosylation site DS* ในเปปไทด์ 5 (KGSSADS * PNSEK) ซึ่งมักจะพบในโปรตีนที่หลังโดยสปีชีส์ *Chryseobacterium meningosepticum* ที่เกี่ยวข้อง (Plummer et al. 1995) Flavastacin ซึ่งเป็น metalloprotease นอกเซลล์จาก *C. meningosepticum* มี heptaglycoside เชื่อมโยงไปยัง DS* site (Tarentino, et al. 1995) ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันต่อ autoproteolysis

Keratinolytic metalloproteases อาจมีคุณค่าทางเทคโนโลยีชีวภาพมาก อย่างการทำหน้าที่เป็น secondary keratinases ในการเอาชนะ proteolysis อย่างจำกัดบนพื้นผิวของอนุภาคเคราติน ซึ่งไม่ละลายน้ำ เนื่องจากการปฏิสัมพันธ์เอนไซม์-สับสเตรทที่จำกัตนเอง (Allpress et al, 2002) นอกจากนี้ ธรรมชาติ metalloenzyme จะเป็นวิธีการที่มีศักยภาพของการตรึงเอนไซม์ ความมั่นคงที่เพิ่มขึ้นของเคราตินที่ถูกตรึง ถูกนำมาเกี่ยวข้องกับ reduced autolysis (Wang et al, 2003b) ซึ่งสามารถกระทำสำเร็จโดย metalloenzyme ด้วยการ inactivate ชั่วคราวใช้ chelating agents ในระหว่างการเก็บรักษา

ความหลากหลายของกลไกการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งครอบคลุมทั้ง serine และ metalloproteases, อาจมีผลกระทบที่สำคัญในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ ที่ ๆ ซึ่งมีจุลินทรีย์ย่อยสลายเคราตินมากมาย พร้อมทั้งจะย่อยเคราตินเดิม ๆ ได้ง่ายกว่าใช้เชื้อบริสุทธิ์ (Ichida et al, 2001.) นอกจากนี้การแตกของพันธะ disulfide จะต้องเกิดขึ้นเพื่อให้การย่อยเคราตินดำเนินไปอย่างเหมาะสม (Kunert 1992; Böckle & Müller 1997) Keratinases โดยพื้นฐานเป็น endo-proteases ที่แสดงสเปกตรัมกิจกรรมกว้าง (Lin et al, 1992; Gradisar et al, 2000; Brandelli 2005), และความสามารถในการย่อยสลายเคราตินดั้งเดิมจะมีความเกี่ยวข้องกับการกระทำของหลาย ๆ เอนไซม์ ในลักษณะร่วมกัน (Yamamura et al, 2002; Giongo et al, 2007) การจุ่มครั้งแรกโดย keratinases และ disulfide reductases จะต้องเปิดทางให้โปรตีนอื่น ๆ ที่มีความเฉพาะเจาะจงน้อยลงได้ทำหน้าที่ในลำดับต่อไป เพื่อส่งผลให้เกิดการย่อยเคราตินที่กว้างขวางยิ่งขึ้น

2.4 การย่อยสารทิ้งอุดมเคราตินด้วยกระบวนการชีวภาพ

การใช้จุลินทรีย์เคราติโนไลติกเกิดขึ้นในฐานะเป็นทางเลือกที่สำคัญสำหรับการรีไซเคิลผลิตผลพลอยได้เคราติน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกและหนัง การพัฒนากระบวนการทางชีวภาพที่สามารถแปลงผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจำนวนมาก ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มเพิ่มขึ้นถูกศึกษาค้นคว้าขึ้นมา (Zaghloul et al. 2004; Bertsch & Coello 2005; Grazziotin et al. 2007) ความสามารถของ keratinases ส่วนใหญ่ในการย่อยสับสเตรทที่มีความหลากหลาย (Lin et al, 1992; Böckle et al, 1995; Brandelli 2005) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเอนไซม์ดังกล่าวในการแปลงสารทิ้งเคราตินทางชีวภาพ เป็นอาหารสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมูลค่าอื่น ๆ

เคราตินมีปริมาณถึงเกือบ 90% ของน้ำหนักขนนกซึ่งประกอบกันถึง 10% ของน้ำหนักไก่ทั้งหมด ปริมาณที่เพิ่มขึ้นของขนนก ซึ่งเกิดโดยกระบวนการเชิงพาณิชย์ของสัตว์ปีก ได้กลายเป็นปัญหามลพิษและเร่งความต้องการในการจัดการที่เหมาะสม (Shih 1993) ปัจจุบัน ขนจะถูกแปลงเป็นอาหารจากขนนกโดยใช้แรงดันไอน้ำ ซึ่งต้องใช้พลังงานสูง อาหารจากขนนกถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ได้อย่างจำกัด เพราะขาด methionine, histidine, และ tryptophan (Papadopoulos et al. 1986; Wang & Parsons 1997) การใช้เคราตินในการอัพเกรดคุณค่าทางโภชนาการของขนนกหรืออาหารจากขนนก ได้ถูกรายงานออกมา (Onifade et al. 1998; Grazziotin et al. 2006) ผลชัดเจนเกิดขึ้นจากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างไก่ที่เลี้ยงด้วยถั่ว

เหลืองอย่างเดียวและที่เลี้ยงด้วยอาหารจากขน ซึ่งหมักด้วยเชื้อ *Streptomyces fradiae* เสริมด้วย methionine (Elmayergi & Smith 1971) การใช้ประโยชน์จาก lysate *B. licheniformis*-ขน พร้อมกับเสริมกรดอะมิโนในอาหารทดสอบเพื่อเลี้ยงไก่เนื้อ ปรากฏผลของการเจริญเติบโตจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น เหมือนกับที่เลี้ยงใช้กากถั่วเหลือง (Williams et al. 1991) การใช้เคราตินชนิดหยาบทำให้การย่อยกรดอะมิโนจากขนดิบและอาหารขนนกตามท้องตลาดมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Lee et al. 1991; Odetallah et al. 2003)

การเพิ่มประสิทธิภาพของสภาวะทดลองสำหรับการย่อยเคราตินโดยเคราตินเนสของ *Doratomyces Microsporium* ถูกศึกษาด้วยการใช้แบบการทดลอง 2 ชั้น เมื่อเลี้ยงหรือกิบที่ thioglycolated ทำปฏิกิริยากับเคราตินเนส ทำให้โปรตีนละลายน้ำเกิดขึ้นในปริมาณที่เพิ่มขึ้น (Vignardet et al, 2001.) ไฮโดรไลเซทโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเคราติโนไลติกแบบจมใต้น้ำ (Submerged cultivation) ในอาหารขนไก่ ให้คุณค่าทางโภชนาการของเคราตินขนนกที่เพิ่มขึ้น (Bertsch & Coello 2005; Grazziotin et al. 2006) การใช้แบคทีเรียเคราติโนไลติก สำหรับการผลิตไฮโดรไลเซทขนได้กลายเป็นเรื่องของกระบวนการที่จดสิทธิบัตรไปแล้วบางส่วน (Shih & Williams 1990; Burt & Ichida 1999), และเคราตินเนสจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ PWD-1 ถูกผลิตในเชิงพาณิชย์ภายใต้ชื่อทางการค้า Versazyme

การผลิตเคราตินเนสใช้อาหารขนนกหรือขนดิบเป็นพื้นฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงดูรายงานและปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น pH ความเข้มข้นของขน. หัวเชื้อและอุณหภูมิสามารถมีอิทธิพลต่อผลลัพธ์ของเอนไซม์ (Wang & Shih 1999; Brandelli & Riffel 2005) เมื่อเร็ว ๆ นี้ การใช้การเพิ่มประสิทธิภาพทางสถิติโดยวิธีการตอบสนองพื้นผิวได้ดูรายงาน เพื่อการผลิต keratinases ของแบคทีเรียในระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารขนดิบ (Ramnani & Gupta 2004; Thys et al. 2006; Bernal et al. 2006b) ปัจจัยต่าง ๆ อาทิอุณหภูมิและองค์ประกอบของอาหารมีอิทธิพลต่อการผลิต keratinases อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจจะดีขึ้นเกือบ 40 เท่า หลังจากการเพิ่มประสิทธิภาพ

การผลิตเครื่องหนังทำให้เกิดปริมาณของเสียอินทรีย์อย่างมาก ซึ่งส่วนหนึ่งจะมาจากเคราตินที่เสื่อมสภาพ ทางเลือกทางเทคโนโลยีชีวภาพจะมีให้สำหรับการจัดการสิ่งปฏิกูลและขยะมูลฝอยโปรตีน (Thanikaivelan, et al. 2004) การย่อยสลายของเสียจากอุตสาหกรรมเครื่องหนังทางชีวภาพถูกเอมารายงาน เหมือน ๆ กับการรายงานถึงความสามารถของ *Streptomyces* และ *Bacillus* ในการย่อยสลายเคราตินผมและขนสัตว์ (Mukhopadhyay & Chandra 1990; Takami et al. 1992b; Lal et al. 1996).แบคทีเรีย *S. fradiae* ลดโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาที่ซับซ้อนของสับสเตรทขน ผมและหนังอย่างมีนัยสำคัญ ด้วยการผสมผสานของกิจกรรมทางกลและเอนไซม์ จนส่งผลปลดปล่อยโปรตีนที่ละลายน้ำในระหว่างกระบวนการหมัก (Hood & Healy 1994) Shama และ Berwick (1991) ได้อธิบายถึงการก่อสร้างเครื่อง bioreactor แบบหมุนได้ ซึ่งสับสเตรทขนสัตว์จะถูกย่อยละลายเกือบทั้งหมดโดย *S. fradiae*

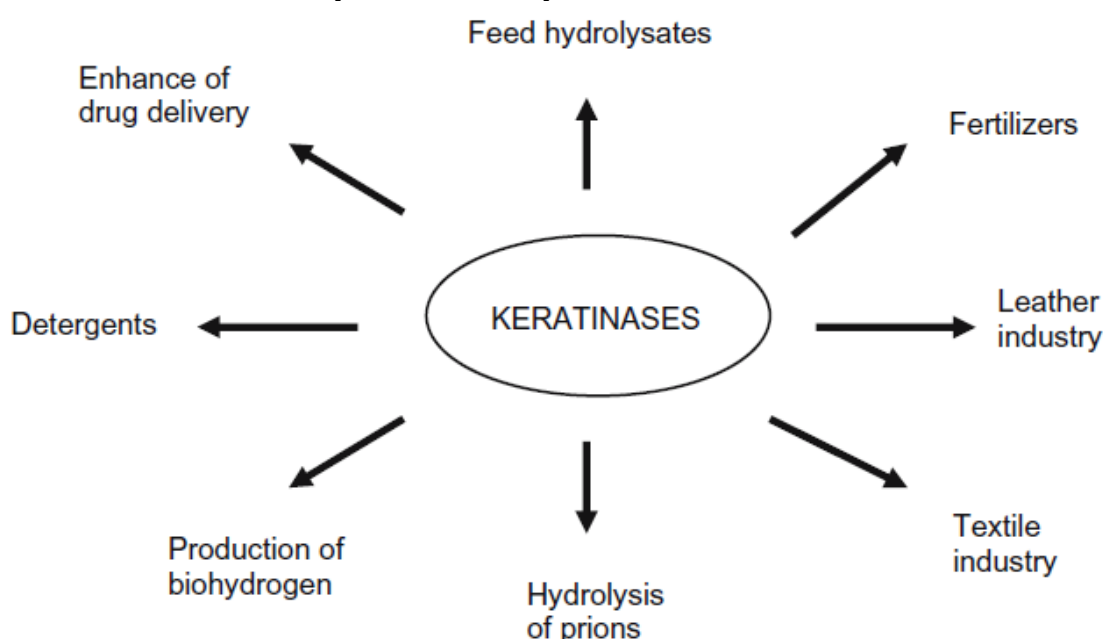
ปัจจุบัน อุตสาหกรรมอาหารสัตว์เป็นผู้บริโภคหลักของไฮโดรไลเซทเคราตินจากผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ ของอุตสาหกรรมการเกษตร รีไซเคิลหนังขนเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับการผลิตอาหารสัตว์ เนื่องจากมีศักยภาพในการเป็นแหล่งโปรตีนราคาไม่แพงและทางเลือก แม้เคราตินจะมีคุณค่าทางโภชนาการที่จำกัด แต่ทั้งการย่อยและความสมดุลของกรดอะมิโนของโปรตีนขนนกอาจจะดีขึ้นด้วยการใช้กระบวนการหมักจุลินทรีย์ (Williams et al. 1991; Grazziotin et al. 2006)

สารทั้งเคราตินได้รับการพิจารณาว่าเป็นปุ๋ยดิน อินทรีย์วัสดุหลาย ๆ อย่างจากสัตว์ อาทิ อาหารเลือด กีบ, งา หนัง กระดูกและปุยได้รับการประเมินว่า เป็นปุ๋ยไนโตรเจนที่ปลดปล่อยช้า อย่างไรก็ตาม

ประมาณ 70% ของไนโตรเจนจะถูกปล่อยออกในช่วง 30 วันแรกในสภาวะแวดล้อมของภาคสนาม และยกเว้นสำหรับขี้ไก่ ไนโตรเจนที่ปลดปล่อยทั้งหมดจะเกิดขึ้นระหว่างวันที่ 6 และ 7 สัปดาห์ (Williams & Nelson 1992) ในกรณีของอาหารขี้ไก่ ซึ่งได้รับความร้อนสูง ๆ การปลดปล่อยไนโตรเจนทั้งหมดก็ยังคงเกิดขึ้นใน 6-7 สัปดาห์ (Hadas & Kautsky 1994) ขี้ไก่ประมาณ 15% ของไนโตรเจน จึงมีศักยภาพที่จะเอาไปใช้เป็นปุ๋ยไนโตรเจน การปลดปล่อยไนโตรเจนจากขี้ไก่แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์ดินไม่สามารถย่อยโครงสร้างเคราตินได้ง่าย อย่างไรก็ตาม ถ้าโครงสร้างเคราตินถูกปรับเปลี่ยนแก้ไขโดยการแตกสลายของพันธะเคมี อัตราการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุจะเพิ่มขึ้น การปรับเปลี่ยนโครงสร้างเคราตินสามารถทำได้โดยการใช้ความร้อนและการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ จนมีการแตกสลายของสะพานซัลไฟด์และพันธะเปปไทด์ (Williams et al. 1990; Kim et al. 2005) ทางเลือกเพิ่มเติมอีก ก็คือการก่อตัวของ Schiff base ระหว่างกลุ่มอะมิโนของเคราตินที่มีอัลดีไฮด์ (Means & Feeney 1998), ส่งผลให้เกิดพันธะเคมีใหม่ที่น่าไปสู่การปลดปล่อยไนโตรเจนช้าลง (Choi & Nelson 1996) สำหรับในเรื่องนี้ การใช้จุลินทรีย์เคราติโนไลติกจะกลายเป็นทางเลือกสำหรับการพัฒนาแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้เป็นปุ๋ย ความสามารถทางเอนไซม์ของแบคทีเรียย่อยขนนกในการเร่งการสลายตัวของไก่ตายหรือสารทิ้งขนนก อาจจะเป็นวิธีที่ประหยัดและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมของอินทรีย์วัสดุรีไซเคิลเหล่านี้จนกลายเป็นปุ๋ยมีไนโตรเจนสูง (Ichida et al, 2001)

2.5 การประยุกต์ใช้งานที่เกิดขึ้นใหม่สำหรับ Keratinases

แม้ว่ากระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของเสียเคราตินเป็นเรื่องแรกสำหรับ keratinases ของจุลินทรีย์ ยังมีแนวโน้มการใช้งานอื่น ๆ อีกที่ได้รับการเชื่อมโยงกับเอนไซม์เคราติเนส ด้วยความก้าวหน้าในความรู้เกี่ยวกับเคราติเนสและปฏิกิริยา keratinolysis การใช้งานใหม่ของเอนไซม์เหล่านี้ถูกแนะนำออกมา (รูป 2.1)



รูป 2.1 การประยุกต์ใช้ประโยชน์ของเคราติเนสแบคทีเรีย เคราติเนสอาจมีประโยชน์สำหรับเปลี่ยนสารเคราตินเป็นอาหารสัตว์และปุ๋ย เอนไซม์ที่คัดแยกได้อาจใช้สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องหนัง ผ้า และผงซักฟอก. และสำหรับการประยุกต์ใช้ทางชีวการแพทย์

การถอนขนด้วยเอนไซม์ (Enzymatic dehairing) เป็นทางเลือกที่เชื่อถือได้และมีให้เห็นมากขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่สร้างขึ้นโดยซัลไฟต์ในการฟอกหนัง (Cantera 2001; Thanikaivelan et al. 2004) ข้อดีของการถอนขนด้วยเอนไซม์คือการลดขององค์ประกอบซัลไฟต์น้ำทิ้ง ในการกู้คืนของเส้นผม ซึ่งจะได้เส้นผมที่มีคุณภาพดี อย่างไรก็ตาม ประโยชน์ที่มีแนวโน้มมากนี้ก็ยังยังไม่เกิดขึ้นเพราะเอนไซม์มีราคาแพงกว่าสารเคมีแบบเดิมและต้องการความระมัดระวังในการควบคุม (Schraeder, et al. 1998) ศักยภาพสำหรับการใช้งานเชิงพาณิชย์ของเอนไซม์ในการผลิตเครื่องหนังอาจมีความเป็นไปได้เนื่องจากคุณสมบัติของเอนไซม์นั้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะสูง ความประหยัดที่ได้รับในกระบวนการนี้อาจเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเครื่องหนัง ซึ่งหมายถึงมูลค่าเพิ่มให้แก่ผู้ประกอบการฟอกหนัง คุณลักษณะที่สำคัญของกระบวนการการถอนขนด้วยเอนไซม์คือ การกำจัดขนที่สมบูรณ์แบบและการใช้ซัลไฟต์ในงานนี้น้อยที่สุด และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลาย จะพร้อมด้วยคุณภาพที่ดีกว่า เพราะการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานฟอกหนังถูกปรับปรุงให้ดีขึ้นตามไปด้วย ดังนั้น การแทนที่ของสารเคมีกำจัดขนด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมเครื่องหนังจะเกิดผลกระทบสำคัญต่อการประหยัดและสถานะสิ่งแวดล้อม มีรายงานได้กล่าวถึงจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งผลิตเคราตินเนสออกเซลล์และแสดงกิจกรรมการถอนขนโดยในหมูแบคทีเรีย สายพันธุ์ *Bacillus* มีการศึกษามากที่สุด *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ย่อยโปรตีนได้ถูกนำเสนอลักษณะและคุณสมบัติที่พึงประสงค์สำหรับการแปรรูปเครื่องหนัง (George et al. 1995; Varela et al. 1997; Macedo et al. 2005; Giongo et al. 2007) ความจริงที่ว่า keratinases เหล่านี้สามารถย่อยเคราตินโดยสามารถหลีกเลี่ยงการก่อความเสียหายต่อโครงสร้างของโปรตีนอื่น ๆ อาทิ คอลลาเจนได้ ทำให้เอนไซม์มีความโดดเด่นสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ของกวดแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์นี้มักจะย่อยโครงสร้างทรงกระบอกเปลือกนอก ส่งผลให้เส้นผมเกิดหลวม (Riffel et al, 2003b.) ซึ่งถัดมาจะหลุดจากผิวหนังได้อย่างง่ายดาย (รูป 2.2) บางเคราตินเนสไม่ได้ย่อยเจลาตินและสับสเตรตสังเคราะห์สำหรับคอลลาเจนเนส และการใช้เอนไซม์นี้สำหรับถอนขนวัว จึงไม่มีคอลลาเจนเกิดความเสียหายใด ๆ (Gradisar et al. 2000; Riffel et al. 2003b) เอนไซม์เหล่านี้มีลักษณะที่น่าสนใจสำหรับการผลิตเครื่องสำอางและยา ซึ่งคอลลาเจนไม่ควรถูกกำจัดออกไป การใช้เคราตินเนสสำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของเครื่องสำอางเป็นการใช้เป็นส่วนผสมในยากำจัดขนของผลิตภัณฑ์สำหรับโกนหนวด (Neena 1993; Slavtcheff et al. 2004) เคราตินเนสอาจจะมีประโยชน์ในสูตรเฉพาะสำหรับการขจัดเคราตินในผิวหนังหรือโรคสะเก็ดเงิน และการกำจัดแคลลัสของมนุษย์ (Holland 1993; Vignardet et al. 2001)

เมื่อเร็ว ๆ นี้ การใช้เอนไซม์เคราติโนไลติก เพื่อเพิ่มการนำส่งยาได้ถูกศึกษาตรวจสอบ ประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาทาของโรคเล็บมักจะจำกัด โดยการซึมผ่านของยาผ่านแผ่นเล็บ ที่ต่ำมาก การปรากฏตัวของเคราตินเนสจาก *Paecilomyces marquandii* ได้เพิ่มการซึมผ่านของยา ผ่านทางอุปกรณ์ตัดเล็บของมนุษย์ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Mohorcic, et al. 2007)

โปรตีนพรีออนเป็นสาเหตุของโรคระบาดที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทเสื่อมถอยในสัตว์ ครอบคลุม spongiform encephalopathy ในแกะ (โรควัวบ้า), chronic wasting disease, Kuru disease, และ Creutzfeldt-Jakob disease (Caughey 2001) เคราตินเนส PWD-1 แสดงสเปกตรัมกว้างของกิจกรรม และย่อยพรีออนโปรตีน PrPSc ซึ่งเป็นสาเหตุของ bovine spongiform encephalopathy (Langeveld, et al. 2003) เชื้อ *Bacillus* sp สายพันธุ์ MSK103 ผลิตเคราตินเนสที่แสดงลำดับที่คล้ายคลึงกันมาก ๆ กับ subtilisin DY และมีกิจกรรมสำหรับย่อย PrPSc (Yoshioka, et al. 2007) เอนไซม์ Keratinolytic ของ anaerobic thermophiles บางชนิดก็ยังพบย่อย amyloid prion ที่ผ่าน

ความร้อนมาก่อนได้ (Suzuki et al., 2006) การย่อยด้วยเอนไซม์ของโปรตีนหรืออนธือเป็นการนำไปใช้ประโยชน์ที่มีแนวโน้มเป็นไปได้มากสำหรับเคราตินของ แบททีเรีย



รูป 2.2 กิจกรรมการถอนขนของหนังวัวโดยเคราตินเนส Kr6 a, ชุดควบคุมใช้เคราตินเนสที่ผ่านความร้อนมา, b ชุดทดสอบใช้เคราตินเนส, c และ d ชุดใช้เคราตินเนสและตามด้วยการถูออก

โปรตีนเอสตรังรูปมักจะแสดง autolysis ที่น้อยมากและดังนั้น เพิ่มความมั่นคงมากขึ้น อย่างไรก็ตาม มีพยายามที่จะทำให้เคราตินเอสตรังรูป เคราตินจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ PWD-1 ถูกตรึงรูปบนลูกปิดแก้วควบคุมรูป (Lin et al. 1996) เคราตินเอสตรังรูปแสดงความเสถียรต่อความร้อนและแสดงกิจกรรมกับขนเคราตินและเคซีนดีขึ้น ในการศึกษาอื่น การหลอมรวม keratinase-streptavidin ถูกตรึงรูปบนเมทริกซ์ biotinylated (Wang et al., 2003b) เสถียรภาพต่อความร้อนและความคงทนต่อ pH ได้รับการปรับปรุงอย่างมากโดยการตรึงรูป แม้ว่าประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยาลดลงถึง 8 เท่า k เคราตินเอสตรังรูปอาจมีประโยชน์ในการพัฒนากระบวนการ proteolysis ที่จำกัด สำหรับการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติการทำงานของโปรตีนอย่างเหมาะสม อาทิ ความสามารถละลายน้ำ, ความเอมัลซีและการเป็นเจล (Chen et al., 1994)

มีความสนใจเพิ่มขึ้นในการแปลงเคราตินลงเป็นแผ่นฟิล์มที่ย่อยสลายได้และเป็นสารเคลือบสำหรับการใช้งานทั้งในด้านการเกษตรและชีวการแพทย์ กล่าวคือเคราตินถูกบำบัดทางเคมีหรือทางเอนไซม์และเคราตินผลิตภัณฑ์ที่ถูกแปลงจะถูกเปลี่ยนสำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์บรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายแผ่นฟิล์มทางการเกษตรหรือแผ่นฟิล์มชีวโกลด์ (Yamauchi et al. 1996; Schrooyen et al. 2001; Zaghoul et al. 2004) สารประกอบจาก Polyethylene ถูกเตรียมขึ้นโดยใช้เส้นใยเคราตินที่ได้จากขนไก่ (Barone & Schmidt 2005) เส้นใยเคราตินนี้สามารถนำรวมเข้าในพอลิเมอร์โดยตรง โดยใช้

เทคนิคมาตรฐานการผสมความร้อนเชิงกล และเส้นใยขนเคราตินจะทำหน้าที่เสริมสร้างเมทริกซ์พอลิเมอร์เอทิลีน พอลิเมอร์ผสมผสานขนเคราตินถูกแสดงว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับเทอร์โมพลาสติกสังเคราะห์จำนวนมาก (Barone & Arikan 2007) หนึ่งในลักษณะที่สำคัญของพอลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้ก็คือ การย่อยสลายด้วยตัวเองภายใต้สภาพธรรมชาติ ลดผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมของพลาสติกบรรจุภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญ

Bálint และคณะ (2005) ได้อธิบายระบบการหมัก 2 ขั้นตอน เพื่อแปลงขยะเคราตินเป็นไบโอไฮโดรเจน สายพันธุ์ *Bacillus* ถูกใช้ในการย่อยสลายวัสดุส่วนผสมเคราติน แปลงลงไปเป็นผลิตภัณฑ์หมัก ซึ่งอุดมด้วยเปปไทด์และกรดอะมิโน ส่วนผสมนี้ต่อมาสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งสารอาหารสำหรับแบคทีเรียแอโนโรบชอบร้อน *Thermococcus litoralis* ซึ่งได้ผลตอบแทนที่สำคัญของ H₂ เป็นผลพลอยได้ทางสรีรวิทยา

การประยุกต์ใช้ในผงซักฟอกสำหรับเคราตินเนสได้รับการเสนอแนะ (Gupta & Ramnani 2006) เหล่านี้ครอบคลุมการกำจัดสิ่งสกปรกเคราตินที่มักจะพบอยู่ในเสื้อผ้า เช่น ที่ปลอกคอของเสื้อ และถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในการทำความสะดวกสบายน้ำอูตตันด้วยขยะเคราติน เอนไซม์เคราติโนไลติกอาจมีศักยภาพต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอผ้าขนสัตว์ ในฐานะเป็นวิธีการด้านการลดตัวขนสัตว์และปรับปรุงการย้อมสีขนสัตว์ (Sousa, et al. 2007)

กล่าวโดยสรุปแล้ว เคราตินเนสเป็นเอนไซม์ทรงคุณค่าสำหรับของเสีย เคราตินจากกระบวนการแปรรูปทางชีวภาพ ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนเคราตินแข็งแกร่งถือว่าเป็นคุณสมบัติที่โดดเด่น มีข้อมูลที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับจุลินทรีย์เคราติโนไลติกและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเคราตินเนส จนทำให้เกิดความเข้าใจการย่อยสลายทางชีวภาพของเคราตินดีขึ้น ข้อมูลทั้งหมดดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์และกระบวนการ ซึ่งจะเชื่อมโยงถึงการจัดการขยะที่เหมาะสม ผ่านการรีไซเคิลผลผลิตพลอยได้ทางอุตสาหกรรมเกษตรที่อุดมสารเคราติน

2.6 ฟังไจผลิตเคราตินเนส

เคราตินเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีความพิเศษสูง ซึ่งถูกผลิตในเซลล์เยื่อบุผิวของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของชั้นหนังกำพร้าและของผลิตภัณฑ์ เช่น ขน เ็นียง งา เล็บ กีบ กรงเล็บหรือหนังขน ซึ่งอยู่ในกลุ่มของเคราตินที่แข็งแรง และโดดเด่นด้วยความเข้มข้นซิสตีนสูง (3-12%) พันธะไดซัลไฟด์จำนวนมากอันเกิดจากซิสตีน สร้างโครงสร้างพอลิเมอร์ของแข็งน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีบทบาทสำคัญในการสร้างความต้านทานของเคราตินต่อการสลายตัวด้วยเอนไซม์ (Asquith, 1977; Timar-Balazsy & Eastop, 1998) ความอ่อนไหวของวัสดุเคราตินแต่ละชนิดต่อการโจมตีของเชื้อราสืบเนื่องมาจากสัดส่วนต่างๆ ของส่วนประกอบของโครงสร้างพื้นฐาน ได้แก่ หนังกำพร้า, เยื่อหุ้มสมอง และไขกระดูกเช่นเดียวกับ การบรรจุ microfibril ที่แตกต่างกันและปริมาณและองค์ประกอบของเมทริกซ์ เมื่อเจริญเติบโตบนวัสดุสารเคราตินเนส จุลินทรีย์จะเริ่มใช้สับสเตรทที่เป็นองค์ประกอบที่ไม่ใช่เคราตินเนสก่อน อาทิ เศษวัสดุเมมเบรน เศษกรดนิวคลีอิกเศษสารตกค้างของเซลล์, endocuticle หรือเยื่อเซลล์ที่ซับซ้อน รวมทั้ง ไขมันที่มีอยู่ในวัสดุดังกล่าว (Baxter & Mann, 1969–1970; Al Musallam & Radwan, 1990) จุลินทรีย์ดังกล่าวจะเริ่มต้นในการย่อยสลายเคราติน หลังจากที่ได้ใช้องค์ประกอบเหล่านี้จนหมดเท่านั้น แม้ว่าองค์ประกอบที่ไม่ใช่เคราตินเนสของผลิตภัณฑ์ผิวนอกของงาสามารถนำไปใช้โดยเชื้อราที่หลากหลายก็ตาม แต่การสลายตัวของวัสดุเคราตินเนสทั้งหมดก็มีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่จำเพาะ ซึ่งสามารถในสร้างลำดับขั้นการสลายตัวที่จำเพาะ (Dix & Webster, 1995;

Jennings, 1995) กระบวนการเคราติโนไลซิสไม่เกี่ยวข้องกับเฉพาะกิจกรรมเคราติเนสอย่างเดียวเท่านั้น แต่สับสเตรทเคราติเนสจะถูกเปลี่ยนแปลงก่อนที่จะมีกิจกรรมนี้ตามมา โดยจะส่งผลให้เกิดการทำลายพันธะซัลไฟด์ กระบวนการ ซึ่งเรียกว่า sulfitolysis นี้จะถือเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญของกระบวนการเคราติโนไลซิส เพราะลำพังโปรตีเอสจะไม่สามารถสลายพันธะซัลไฟด์และสร้างการย่อยสลายที่สมบูรณ์ของเคราตินได้ ดังนั้น การย่อยสลายเคราตินคือผลจากปฏิกิริยาทั้ง 3 ปฏิกิริยาก็คือ: deamination, sulfitolysis และ proteolysis (Kunert, 1972, 1992, 2000; Ruffin et al., 1976)

ในขณะที่ศึกษากระบวนการของการย่อยสลายเคราตินที่กระทำโดยเชื้อจุลินทรีย์ สิ่งสำคัญประการหนึ่งก็คือ การนำผลผลิตทางชีวเคมีมาเสริมกับข้อสังเกตทางสัณฐานวิทยาของการเจาะเข้าไปยังพื้นผิวสับสเตรทเคราติเนสของเส้นใยรา รูปแบบการเจาะสับสเตรทวัสดุเคราติเนส 2 รูปแบบคือการกัดเซาะพื้นผิว (surface erosion) และการเจาะรอบ ๆ (radial penetration) รูปแบบแรกเป็นการทำลายรูกหน้า ซึ่งพัฒนาจากภายนอกไปยังกึ่งกลางของเส้นใย และจะปรากฏตัวให้เห็นในลักษณะการสลายตัวของหนังกำพร้าและในลักษณะของคลื่นพื้นผิวเยื่อหุ้ม รูปแบบที่สองคือการบุกรุกทะลุสับสเตรทแบบอุบัติขึ้นเอง ซึ่งเกิดโดยการกระทำของเส้นใยพิเศษ โดยเส้นใยจะเจาะในทิศทางตั้งฉากกับพื้นผิว สำหรับกรณีนี้ รูปแบบรูกลำที่สุดจะทำให้เกิดการปรุพังของอวัยวะที่จะพัฒนา การค้นพบรูปแบบการบุกรุกของเชื้อราทั้ง 2 แบบนี้ให้ความหมายถึงการย่อยโมเลกุลเคราตินกำลังดำเนินต่อไป และจุลินทรีย์เหล่านี้จะจัดเป็นจุลินทรีย์เคราติโนไลติก (Filipello Marchisio et al., 1994; Filipello Marchisio, 2000) รายละเอียดของการสลายตัวเส้นใยเคราตินของเชื้อราในแต่ละช่วงจะพบเป็นเนื่องานในโครงการวิจัยที่เกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างเส้นผม (English, 1963, 1965)

การก่อตัวเป็นชั้น ๆ และโครงสร้างวัสดุสารทางกายภาพเหล่านี้กระตุ้นเส้นใยราคล้ายใบเฟินและทำให้ตัวเจาะเกิด (borer) ขึ้นมา เชื้อราทั้งหมด ซึ่งสามารถเจริญเติบโตบนสับสเตรทเคราติเนสจะผลิตเส้นใยราคล้ายใบเฟิน และดูเหมือนว่าการก่อตัวของของเส้นใยราดังกล่าวกลายเป็นเงื่อนไขสำคัญสำหรับเชื้อราที่จะเติบโตบนวัสดุของโครงสร้างที่ซับซ้อนเช่นนั้น ฟังก์ชันหลักของเส้นใยราคล้ายใบเฟิน ก็คือการดูดซึมสารอาหาร เฉพาะเชื้อราบางชนิดที่สัมผัสเคราตินที่แข็งเท่านั้นจะก่อตัวเจาะ (borers) ดูเหมือนว่าตัวเจาะเหล่านี้จะรูกทะลุสับสเตรท โดยการสร้างความดัน แต่ไม่สามารถที่จะย่อยสลายได้ ซึ่งก็ชี้ให้เห็นว่า เส้นใยามีเพียงบทบาทเชิงกล ที่ประกอบด้วยการรูกทะลุวัสดุสารที่ทนทานและที่ย่อยได้ไม่ดีเท่านั้น ในกรณีของเชื้อราโนไลติก สับสเตรทเคราติเนสจะถูกบุกรุกโดยใบเส้นใยราหรือโดยเส้นใยที่ไม่จำเพาะ ใบเส้นใยราที่คล้ายเฟินและเส้นใยราตัวเจาะเป็นอวัยวะตัวแทงในเชื้อราเคราติโนไลติก บรรดาโครงสร้างจำเพาะที่สร้างขึ้นจากสองกลุ่มรานั้นจะมีความคล้ายคลึงกัน และคงมีความแตกต่างเพียงอย่างเดียว คือใบเส้นใยตัวเจาะและอวัยวะตัวแทง ซึ่งจะมีคุณสมบัติเคราติโนไลติกบ้าง โดยตรงกันข้ามกับใบเส้นใยราและเส้นใยตัวเจาะของเคราติโนไลติกที่จำเพาะตามชนิดของแต่ละเชื้อรา (Vanbreuseghem, 1952; English, 1965; Hawks & Rowe, 1988)

กิจกรรมของจุลินทรีย์ในวัสดุสารหลายชนิดเป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพหลายแบบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงพื้นผิว เช่น การเปลี่ยนแปลงในความอึดตัวของสี การสูญหายของลักษณะเดิมของวัสดุกลืนลักษณะของเชื้อรา (โดยลักษณะทั้งสามดังกล่าวข้างต้นนี้เป็นสัญญาณแรกของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนสับสเตรท) คราบน้ำเกล็ดหลายชนิด ซึ่งมักจะเป็นเรื่องยากมากที่จะกำจัดออกไป อีกทั้งการสลายตัวของโครงสร้างของวัสดุสารที่เป็นผลมาจากการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องและกิจกรรมเมแทบอลิซึมอาหารของจุลินทรีย์ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในสับสเตรท และในที่สุด ส่งผลให้ความแข็งแรงลดลงและการสูญเสียของวัสดุสาร ปัจจัยหลายอย่างส่งผลกระทบต่อระดับของการย่อยสลาย

ทางชีวภาพของวัสดุสาร ซึ่งได้แก่ ผลิตภัณฑ์เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ อย่างเช่น เอนไซม์ กรดและสารสี องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุสาร และสารเพิ่มเติม (หากมี) เช่น สีย้อมที่มีอยู่ในวัสดุ องค์ประกอบ ความชื้น และการเข้าถึงของจุลินทรีย์ ประวัติและอายุของวัสดุสาร และสภาพแวดล้อมเฉพาะที่ องค์ประกอบออกซิเจนและแสง อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์

2.7 อนุกรมวิธานของเชื้อราเคราตินโกลติก

จุลินทรีย์ตามที่ระบุไว้ในตาราง 2.4-2.6 และที่ได้อธิบายไว้ในเนื้อหาต่อไปจัดอยู่ใน 2 อาณาจักร คือ Chromista และฟังไจ ตัวแทน Chromista จะมีเพียงหนึ่งสปีชีส์จากไฟลัม Oomycota ได้แก่ *Pythium oligandrum* Drechsler ซึ่งแยกได้จากขนนกโดย Kornilowicz (1991-1992) ในขณะที่ ในอาณาจักรฟังไจพบใน 3 ไฟลัม กล่าวคือ ไฟลัม Chytridiomycota มี 2 สปีชีส์ คือ *Catenophlyctis variabilis* (Karling) Karling และ *Rhizophydium keratinophilum* Karling ซึ่งถูกพบอยู่ในดิน เจริญเติบโตในรูปแบบทั่วไปบนเนื้อเยื่อที่มีเคราติน รวมทั้งขนสัตว์ แต่ไม่พบในวัสดุอื่น ๆ (White et al., 1950; Batko, 1975) ไฟลัม Zygomycota มีตัวแทนถึง 24 สปีชีส์ (ตาราง 2.4) และ Ascomycota มี 54 สปีชีส์ (ตาราง 2.5) กลุ่มฟังไจที่นอกเหนือจากที่กล่าวมา ซึ่งมีจำนวนมากที่สุดเป็นพวกเชื้อรา

ตาราง 2.4 ฟังไจที่ใช้ประโยชน์สับสเตรทเคาติน กลุ่ม Zygomycota

No.	Species name	Strain source, comments	References
Mucorales			
1.	<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Saccardo & Trotter ^a	disintegration of the medullae of cattle hair, hedgehog spines, human toe-nails and human plantar callus	English (1965)
2.	<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem	- degradation of keratinous substrates such as human scalp hair (most favoured), sheep's wool, dog claws, cow horns, hooves, snake skin and hen feathers; - keratinase secretion which has stronger hydrolytic action on keratin of human origin than that of animal origin	Rajak et al. (1992)
3.	<i>Absidia glauca</i> Hagem	isolated from feathers	Kornilowicz (1991–1992)
4.	<i>Absidia spinosa</i> Lendner	isolated from human hair	Ramesh and Hilda (1999)
5.	<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxter) Thaxter ex Blakeslee	isolated from human hair	Ramesh and Hilda (1999)
6.	<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner	- isolated from feathers, human and cow hair; - disintegration of the medullae of cattle hair, hedgehog spines, human toe-nails and human plantar callus	Griffin (1960), English (1965), Kornilowicz (1991–1992), Moubahser et al. (1992)
7.	<i>Mucor circinelloides</i> van Tieghem	- isolated from sheep's wool; - isolated from donkey hair; - frequent infections of sheep fleece	Michalska (1957), Ali-Shtayeh et al. (1988b), Abdel-Gawad (1997)
8.	<i>Mucor genevensis</i> Lendner	isolated from donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
9.	<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	isolated from feathers, donkey and rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b), Kornilowicz (1991–1992)
10.	<i>Mucor mucedo</i> Fresenius	isolated from rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
11.	<i>Mucor piriformis</i> Fischer	isolated from goat and rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
12.	<i>Mucor plumbeus</i> Bonorden	frequent infections of sheep fleece	Michalska (1957)
13.	<i>Mucor racemosus</i> Fresenius	- isolated from sheep's wool; - isolated from buffalo, rabbit and cow hair; - frequent infections of sheep fleece	Michalska (1957), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Abdel-Gawad (1997)
14.	<i>Mucor ramosissimus</i> Samouitsevitch	isolated from feathers	Kornilowicz (1991–1992)
15.	<i>Mucor satuminus</i> Hagem	isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
16.	<i>Mucor strictus</i> Hagem	isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
17.	<i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper	- isolated from feathers; - degradation of keratinous substrates such as human scalp hair (most favoured), sheep's wool, dog nails, cow horns, hooves, snake skin and hen feathers; - keratinase secretion which has stronger hydrolytic action on keratin of human origin than that of animal origin	Kornilowicz (1991–1992), Rajak et al. (1992)
18.	<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prinsen Geerligs	isolated from human and cow hair	Moubahser et al. (1992)
19.	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg) Lind	- isolated from sheep's wool; - isolated from human, cow, rabbit, goat and camel hair; - frequent infections of sheep fleece; - human hair degradation by means of surface erosion and radial penetration; production of invasive structures; - strongly keratinolytic	Michalska (1957), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Abdel-Gawad (1997), Ramesh and Hilda (1999), Ali-Shtayeh and Jamous (2000)
20.	<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex Schroeter	- isolated from human, goat and rabbit hair; - keratinophilic	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Ulfing (2003)
21.	<i>Thamnidium elegans</i> Link	frequent infections of sheep fleece	Michalska (1957)
22.	<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuillemin	isolated from feathers	Kornilowicz (1991–1992)
Mortierellales			
1.	<i>Mortierella alpina</i> Peyronel	isolated from cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
2.	<i>Mortierella mutabilis</i> Linnemann	isolated from human hair	Griffin (1960)

หมายเหตุ ให้สังเกตดังนี้ ชื่อฟังไจที่ปรากฏอยู่ในตารางนี้ได้ผ่านการตรวจสอบทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) โดยชื่อที่ปรากฏอาศัยรายงานของ Shipper (1976), Domsch และคณะ (1993), CBS List of cultures (1994), Hawksworth และคณะ (1995), Kirk และคณะ (2001), Samson และคณะ (2002), CBS Filamentous fungi database (2008), The Index Fungorum (2008) และ MycoBank (2008) ในส่วนของกระบวนการก่อโรค (Pathogenicity) ของสายพันธุ์ฟังไจที่ปรากฏในตารางเป็นพื้นฐานของ Summerbell และคณะ (1989), Tan และคณะ (1994), De Hoog (1996), De Hoog และ Guarro (1995, 2000), Midgley และคณะ (1997), Baran (1998), Flannigan และคณะ (2001), Straus (2004), ATCC The global bioresource center (2008) และ CBS Filamentous fungi database (2008) (๖) ตัวหนาอ้างอิงฟังไจสาเหตุของโรคในคน

anamorphic มีทั้งหมด 218 สปีชีส์ (ตาราง 2.6) ซึ่งมากถึง 73% ของเชื้อราทั้งหมดที่นำเสนอในบทความนี้ ส่วนสปีชีส์ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน 2 orders คือ Onygenales และ Eurotiales และไม่น่าแปลกใจว่า สปีชีส์จาก Onygenales มักพบบ่อยครั้งมากบนวัสดุสารเคราติน เหตุผลก็คือเชื้อรา genera *Arthroderma*, *Aphanoascus*, *Onygena*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Chrysosporium*, อื่น ๆ เหล่านี้ดำรงชีวิตด้วยความพิเศษสูง คือมีความสามารถย่อยผลิตภัณฑ์ผิวหนังชั้นนอกของงวงหรืองาที่ประกอบด้วยเคราติน บางส่วนของเชื้อรา เคราตินโอไลติกเหล่านี้เป็นพวก saprophyte บนสารเคราติน ในขณะที่กลุ่มอื่นพัฒนากิจกรรมทางชีวเคมีและการแปรเปลี่ยนเป็นเชื้อโรคที่มีความสามารถในการบุกรุกและใช้เคราตินที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิต (Mercantini et al., 1989; Benny et al., 2001; Geiser & LoBuglio, 2001; Kirk et al., 2001) ส่วน Eurotiales ได้แก่

ตาราง 2.5 ฟังไจที่ใช้ประโยชน์สับสเตรทเคาติน กลุ่ม Ascomycota

No.	Species name	Strain source, comments	References
Onygenales			
1.	<i>Amauroascus mutatus</i> (Quelet) Rammeloo	■ degradation of human hair; ■ keratinolytic	Ulfig (2003)
2.	<i>Aphanoascus cinnabarinus</i> Zukal	■ isolated from hair; ■ formation of perforating organs and eroding fronds which occur on and in the hair; ■ highly keratinolytic	De Vries (1964)
3.	<i>Aphanoascus fulvescens</i> (Cooke) Apinis ^a	■ isolated from cow and donkey hair; ■ utilization of native feather keratin; ■ decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion and radial penetration;	Ali-Shtayeh et al. (1988b), Filipello Marchisio et al. (1994), Komilowicz-Kowalska (1997)
4.	<i>Aphanoascus</i> sp. (strain GPCK 534)	■ keratinolytic ■ cuticle lifting in human hair by development of needle, tunnel, fissure and torpedo types of perforators	Katiyar and Kushwaha (2002)
5.	<i>Arthroderma cuniculi</i> Dawson	■ isolated from goat and rabbit hair and feathers	Ali-Shtayeh et al. (1988a), ATCC The global bioresource center (2008), CBS Filamentous fungi database (2008)
6.	<i>Arthroderma curreyi</i> Berkeley	■ isolated from wool; ■ frequently isolated from bird feathers; ■ isolated from goat hair; ■ complete solubilization of native feather keratin; ■ keratinase production	Pugh and Mathison (1962), Pugh and Evans (1970a), Parbery (1977), Ali-Shtayeh et al. (1988a), Komilowicz-Kowalska (1997, 1999), ATCC The global bioresource center (2008)
7.	<i>Arthroderma incurvatum</i> (Stockdale) Weitzman et al.	■ isolated from horse hair	Chmel et al. (1972)
8.	<i>Arthroderma gertleri</i> Böhme	■ isolated from horse hair	Chmel et al. (1972)
9.	<i>Arthroderma gypseum</i> (Nannizzi) Weitzman et al.	■ isolated from wool and hair; ■ degradation of wool after 40 days	Griffin (1960), McQuade (1964), Parbery (1974, 1977)
10.	<i>Arthroderma quadrifidum</i> Dawson & Gentles	■ isolated from bird feathers; ■ isolated from horse hair; ■ complete solubilization of native feather keratin; ■ keratinase production	Pugh and Evans (1970a), Chmel et al. (1972), Komilowicz-Kowalska (1997, 1999)
11.	<i>Arthroderma tuberculatum</i> Kuehn	■ isolated from hair; ■ isolated from feathers; ■ degradation of feather keratin; ■ very rapid wool degradation under moist and warm conditions; ■ keratinase production	Parbery (1974, 1977), Komilowicz-Kowalska (1997)
12.	<i>Arthroderma uncinatum</i> Dawson & Gentles	■ isolated from horse hair and bird feathers	Pugh and Evans (1970a,b), Chmel et al. (1972)
13.	<i>Auxarthron conjugatum</i> (Kuehn) Orr & Kuehn	■ isolated from feathers; ■ utilization of human hair as a sole source of carbon and nitrogen, degradation of the substrate	Deshmukh and Agrawal (1982), CBS Filamentous fungi database (2008)
14.	<i>Auxarthron umbrinum</i> (Boudier) Orr & Plunkett	■ degradation of human hair by means of surface erosion; ■ keratinolytic	Filipello Marchisio et al. (1994)
15.	<i>Auxarthron zuffianum</i> (Morini) Orr & Kuehn	■ isolated from sheep's wool and buffalo hair	Moubahser et al. (1992)
16.	<i>Ctenomyces mentagrophytes</i> (Robin) Langeron & Milochewitch	■ degradation of wool after 40 days	McQuade (1964)
17.	<i>Ctenomyces persicolor</i> (Sabouraud) Nannizzi	■ very active in hair degradation; production of perforating organs; ■ keratinolytic	Vanbreuseghem (1952)
18.	<i>Ctenomyces serratus</i> Eidam	■ isolated from wool, horse hair and feathers; ■ frequently found on feathers; ■ degradation of feather keratin; ■ keratinase production	Pugh and Mathison (1962), Pugh and Evans (1970a,b), Chmel et al. (1972), Parbery (1977), Komilowicz (1994), Komilowicz-Kowalska (1997), Gugnani (2000)
19.	<i>Ctenomyces</i> sp.	■ isolated from woollen fabric (strain CBS 228.51); ■ degradation of wool after 40 days (strain 381 TDEL)	McQuade (1964), Denizel et al. (1974)
20.	<i>Emmonsia parva</i> (Emmons & Ashburn) Ciferri & Montemartini	■ growth on wool	Al Musallam and Radwan (1990)
21.	<i>Gymnascella citrina</i> (Massee & Salmon) Orr et al.	■ isolated from human, buffalo and cow hair as well as sheep's wool	Moubahser et al. (1992)
22.	<i>Gymnascella marginispora</i> (Kuehn & Orr) Currah	■ isolated from human hair; ■ keratinophilic	Ulfig (2003)
23.	<i>Gymnoascoides petalosporus</i> Orr et al.	■ decomposition of human hair; ■ keratinase production	Rajak et al. (1991)

สปิซีส์ *Aspergillus* และ *Penicillium* anamorphs ซึ่งมีความสำคัญมากและเป็นเชื้อราที่พบมากที่สุด
ในธรรมชาติ

การวิเคราะห์จีโนมได้แสดงให้เห็นว่า ตัวแทนต่อไปนี้โดดเด่นคือ *Aspergillus* และ *Penicillium*
(29 สปีชีส์/จีโนม), *Chrysosporium* (21 สปีชีส์), *Fusarium* (13 สปีชีส์), *Trichophyton*,
Microsporum และ *Acremonium* (11 สปีชีส์/จีโนม), *Mucor* (10 สปีชีส์) *Arthroderma* (8 สปีชีส์),
Malbranchea (7 สปีชีส์), *Chaetomium*, *Ulocladium* และ *Verticillium* (6 สปีชีส์/จีโนม) และ

ตาราง 2.5 ฟังไจที่ใช้ประโยชน์สับสเตรทเคาติน กลุ่ม Ascomycota (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
24.	<i>Gymnoascus arxii</i> Cano & Guarro	■ isolated from contemporary woollen textiles; ■ abundant growth on woollen textiles, overgrowth of the other fungi; ■ very rapid and severe degradation of undyed and dyed woollen textiles; ■ strongly keratinolytic, conversion of woollen textiles into powder	Btyskal (2005)
25.	<i>Onygena corvina</i> Albertini & Schweinitz	■ isolated from wool; ■ isolated from wool remnants	Denizel et al. (1974), CBS Filamentous fungi database (2008)
26.	<i>Onygena piligena</i> Fries	■ isolated from a woollen slipper	Denizel et al. (1974)
Eurotiales			
1.	<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuillemin	■ isolated from sheep's wool; ■ isolated from human, buffalo, rabbit, goat, donkey and cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Moubahser et al. (1992), Abdel-Gawad (1997)
2.	<i>Emericella quadrilineata</i> (Thom & Raper) Benjamin	■ isolated from sheep's wool; ■ isolated from rabbit hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991), Abdel-Gawad (1997)
3.	<i>Emericella rugulosa</i> (Thom & Raper) Benjamin	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
4.	<i>Eurotium chevalieri</i> Mangin	■ isolated from sheep's wool and antique woollen textiles; ■ slight structural but strong aesthetic (mainly cinnamon discolouration) deterioration of undyed and dyed woollen textiles	Moubahser et al. (1992), Btyskal (2005)
5.	<i>Fennellia nivea</i> (Wiley & Simmons) Samson	■ isolated from cow, goat and rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
6.	<i>Neosartorya fischeri</i> (Wehmer) Malloch & Cain	■ isolated from human and rabbit hair; ■ isolated from ancient woollen textiles; ■ keratinophilic	Bagy and Abdel-Mallek (1991), Abdel-Kareem (2000), Ulfing (2003)
7.	<i>Talaromyces luteus</i> (Zukal) Benjamin	■ isolated from human, buffalo and cow hair	Moubahser et al. (1992)
8.	<i>Talaromyces trachyspermus</i> (Shear) Stolk & Samson	■ isolated from buffalo hair; ■ decomposition of human hair; ■ keratinase production	Rajak et al. (1991), Moubahser et al. (1992)
9.	<i>Thermoascus aurantiacus</i> Mieh	■ isolated from rabbit, camel, horse and sheep hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
Sordariales			
1.	<i>Chaetomium fimeti</i> (Fuckel) Saccardo	■ isolated from goat and donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
2.	<i>Chaetomium cochlioides</i> Palliser		Griffin (1960)
3.	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze: Fries	■ isolated from human hair ■ isolated from sheep's wool, destruction of the wool; ■ isolated from human, camel and buffalo hair; ■ isolated from contemporary woollen textiles; ■ structural and aesthetic (greenish, brownish and reddish discolourations) deterioration of undyed and dyed woollen textiles; ■ utilization of non-keratinous protein components of sheep's wool (intercellular material); denaturation of hard keratin, i.e. cleavage of S-S bonds does not occur; ■ growth on wool in the presence of distilled water only; ■ disintegration of the cortex of hedgehog spines, cattle and human hair by means of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration the medullae of the spines, human toe-nails, human plantar callus and cattle hair; ■ low keratinolytic activity	White et al. (1950), Kowalik and Czerwinska (1956), Michalska (1957), English (1965), Stefaniak (1969), Safranek and Goos (1982), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Mahmoud (1995), Abdel-Gawad (1997), Btyskal (2005)
4.	<i>Chaetomium indicum</i> Corda	■ disintegration of the cortex of hedgehog spines, cattle and human hair by means of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration of the medullae of the spines, human toe-nails, human plantar callus and cattle hair	English (1965)

(continued on next page)

Paecilomyces และ *Scopulariopsis* (5 สปีชีส์/จีนัส) ส่วนจีนัสนอกจากที่กล่าวมามี 4 สปีชีส์หรือน้อยกว่า โดยสมาชิกส่วนใหญ่สปีชีส์เดี่ยวเท่านั้น

ตาราง 2.5 ฟังไจที่ใช้ประโยชน์สับสเตรทเคาติน กลุ่ม Ascomycota (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
5.	<i>Chaetomium nozdrenkoae</i> Sergejeva	■ isolated from feathers	Komilowicz (1991–1992)
6.	<i>Chaetomium seminudum</i> Ames	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
7.	<i>Chaetomium spirale</i> Zopf	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
8.	<i>Corynascus sepedonium</i> (Emmons) von Arx	■ isolated from human hair;	Griffin (1960)
9.	<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge) Cesati & de Notaris	■ keratinolytic ■ strong destruction of sheep's wool	Michalska (1957)
Pleosporales			
1.	<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> Alcorn	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
2.	<i>Cochliobolus spicifer</i> Nelson		
3.	<i>Pleospora herbarum</i> (Fries) Rabenhorst		
4.	<i>Setosphaeria rostrata</i> Leonard		
Hypocreales			
1.	<i>Nectria haematococca</i> Berkeley & Broome	■ isolated from sheep's wool;	Ali-Shtayeh et al. (1988b), Abdel-Gawad (1997)
2.	<i>Nectria ventricosa</i> Booth	■ isolated from cow hair ■ isolated from human hair	Ali-Shtayeh et al. (2002)
Incertae sedis			
1.	<i>Apiospora montagnei</i> Saccardo	■ isolated from contemporary woollen textiles;	Bysskal (2005)
2.	<i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis et al.	■ blackish discolouration on undyed woollen textiles ■ isolated from human hair and sheep's wool; ■ keratinophilic	Moubahser et al. (1992), Ulfing (2003)
Microascales			
1.	<i>Microascus cirrosus</i> Curzi	■ isolated from antique woollen textiles; structural and aesthetic (black, brown and grey discolourations) deterioration of undyed and dyed textiles	Bysskal (2005)
Xylariales			
1.	<i>Monographella cucumerina</i> (Lindfors) Arx	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)

หมายเหตุ ให้สังเกตดังนี้ ชื่อฟังไจที่ปรากฏอยู่ในตารางนี้ได้ผ่านการตรวจสอบทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) โดยชื่อที่ปรากฏอาศัยรายงานของ Ajello (1968), Shipper (1976), Salata และ Rudnicka-Jeziarska (1979), Domsch และคณะ (1993), CBS List of cultures (1994), Hawksworth และคณะ (1995), Simpanya (2000), Vidal และคณะ (2000), Kirk และคณะ (2001), Samson และคณะ (2002), CBS Filamentous fungi database (2008), The Index Fungorum (2008) และ MycoBank (2008) ในส่วนของกระบวนการก่อโรค (Pathogenicity) ของสายพันธุ์ฟังไจที่ปรากฏในตารางเป็นพื้นฐานของ Summerbell และคณะ (1989), Tan และคณะ (1994), De Hoog (1996), De Hoog และ Guarro (1995, 2000), Midgley และคณะ (1997), Baran (1998), Simpanya (2000), Flannigan และคณะ (2001), Geiser และ LoBuglio (2001), Straus (2004), ATCC The global bioresource center (2008) และ CBS Filamentous fungi database (2008) ⁽³⁾ ตัวหนาอ้างถึงฟังไจสาเหตุของโรคในคน

2.8 ศักยภาพเคราตินโอไลซิสของเชื้อรา

เชื้อราเคราตินโอไลติกส่วนใหญ่ของ keratinolytic ไม่ได้อาศัยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากเคราตินเพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่เป็นเชื้อที่มีความพิเศษและสับสเตรทจำเพาะสูง สามารถเจริญเติบโตและใช้สารอาหารบนวัสดุสารเคราตินสโดยเฉพาะ สปีชีส์คุณสมบัติเช่นนั้น ได้แก่ เชื้อราประชากรดินจาก Chytridiomycota ซึ่งได้แก่ *C. variabilis* และ *R. keratinophilum*

ตาราง 2.7 เป็นแคตตาล็อกเชื้อราบนฐานของชนิดสับสเตรทที่ได้คัดแยกออกมา หรือที่ถูกย่อยสลาย ตารางนี้ไฮไลต์สปีชีส์ที่คล่องงานมากที่สุดในการย่อยสลายของวัสดุสารเคราติน ในจำนวนนี้มี 3 สปีชีส์คือ *Aspergillus terreus*, *Gliocladium catenulatum* และ *Scopulariopsis brevicaulis* ที่แสดงกิจกรรมสูงต่อเคราตินในคลเจอร์ ซึ่งเจริญเติบโตอาศัยกับเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวเท่านั้น อีก 6 สปีชีส์คือ *Auxarthron conjugatum*, *S. brevicaulis*, *Chrysosporium indicum*, *Chrysosporium pannicola*, *Microsporum gypseum*, และ *Trichophyton ajelloi*

ตาราง 2.6 ฟังไจที่ใช้ประโยชน์สับสเตรทเคราติน กลุ่ม Anamorphic fungi

No.	Species name	Strain source, comments	References
1.	<i>Acremonium butyri</i> (van Beyma) Gams	■ isolated from donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
2.	<i>Acremonium camptosporum</i> Gams	■ isolated from antique woollen textiles; ■ strong entanglement of wool fibres, creation of a tight layer of mycelium on the fabric; ■ structural and aesthetic deterioration of dyed and undyed woollen textiles	Btyskal (2005)
3.	<i>Acremonium falciforme</i> (Carrión) Gams ^a	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
4.	<i>Acremonium furcatum</i> (Moreau & Moreau) ex Gams	■ isolated from rabbit and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
5.	<i>Acremonium fusidioides</i> (Nicot) Gams	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
6.	<i>Acremonium glaucum</i> Gams	■ isolated from a woollen overcoat	Denizel et al. (1974), CBS Filamentous fungi database (2008)
7.	<i>Acremonium killense</i> Grütz	■ isolated from human, goat and cow hair as well as sheep's wool	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Moubahser et al. (1992), Abdel-Gawad (1997)
8.	<i>Acremonium murorum</i> (Corda) Gams	■ degradation of wool	McQuade (1964)
9.	<i>Acremonium roseum</i> Petch	■ isolated from hair; ■ utilization of non-keratinous protein components of sheep's wool (intercellular material); denaturation of hard keratin, i.e. cleavage of S-S bonds does not occur	Safranek and Goos (1982)
10.	<i>Acremonium strictum</i> Gams	■ isolated from sheep's wool, human, rabbit, cat and cow hair; ■ low keratinolytic activity; ■ keratinophilic	Ali-Shtayeh et al. (1988b, 2002), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Abdel-Gawad (1997), Ulfing (2003)
11.	<i>Acremonium</i> sp.	■ degradation of wool (strain 89c QMCC); ■ colonization of wool after 5 days, structural damage of wool (strain AC-R); ■ colonization of human hair after 22 days, cuticle lifting and its disruption (strain GPKC 531)	McQuade (1964), Ghawana and Shrivastava (1995), Katiyar and Kushwaha (2002)
12.	<i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler	■ isolated from sheep's wool; ■ frequently isolated from wool; ■ isolated from human, rabbit, goat, cow, donkey, cat, dog, camel and horse hair; ■ isolated from contemporary woollen textiles; severe structural and aesthetic (black discolouration) deterioration of undyed and dyed woollen textiles; ■ heavy destruction of sheep's wool; ■ low keratinolytic activity	White et al. (1950), Michalska (1957), Ali-Shtayeh et al. (1988a, 2002), McCarthy and Greaves (1988), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Mahmoud (1995), Abdel-Gawad (1997), Ramesh and Hilda (1999), Btyskal (2005)
13.	<i>Alternaria chlamyospora</i> Mouchacca	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
14.	<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze: Fries) Wiltshire	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
15.	<i>Arthrographis kalrae</i> (Tewari & Macpherson) Sigler & Carmichael	■ degradation of human hair; ■ keratinolytic	Ulfing (2003)
16.	<i>Aspergillus alutaceus</i> Berkeley & Curtis	■ isolated from human and goat hair; ■ keratinophilic	Ali-Shtayeh et al. (1988a), Ulfing (2003)
17.	<i>Aspergillus candidus</i> Link	■ isolated from cow, donkey, rabbit, goat and dog hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
18.	<i>Aspergillus carneus</i> (van Tieghem) Blochwitz	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
19.	<i>Aspergillus cervinus</i> Massee	■ isolated from ancient woollen textiles	Abdel-Kareem (2000)
20.	<i>Aspergillus clavatus</i> Desmazieres	■ isolated from sheep's wool as well as cow, donkey and rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b), Abdel-Gawad (1997)
21.	<i>Aspergillus erythrocephalus</i> Berkeley & Curtis	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
22.	<i>Aspergillus flavipes</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	■ isolated from rabbit, goat and cat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
23.	<i>Aspergillus flavus</i> Link	■ isolated from sheep's wool; ■ isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers; ■ isolated from ancient woollen textiles; ■ isolated from human, buffalo, goat, cow, donkey, cat, dog, rabbit, camel and horse hair; ■ keratinolytic	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Al Musallam and Radwan (1990), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Nigam et al. (1994), Abdel-Gawad (1997), Ramesh and Hilda (1999), Abdel-Kareem (2000)
24.	<i>Aspergillus foetidus</i> Thom & Raper	■ isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers	Nigam et al. (1994)
25.	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	■ isolated from feathers, human, buffalo, goat and cow hair, sheep's wool and ancient woollen textiles; ■ frequent infections of sheep fleece; ■ disintegration of the cortex of cattle and human hair and hedgehog spines by means of fronded mycelium, also disintegration of the medullae of the spines, human toe-nails, human plantar callus and cattle hair; lifting of the scales of the cuticle; very slow attack; ■ high keratinolytic activity; ■ not keratinolytic; ■ keratinophilic	Michalska (1957), English (1963, 1965), Parbery, (1977), Ali-Shtayeh et al. (1988a), Al Musallam and Radwan (1990), Moubahser et al. (1992), Mahmoud (1995), Abdel-Gawad (1997), Abdel-Kareem (2000), Ulfing (2003)

(continued on next page)

พบใช้เส้นผมมนุษย์เป็นแหล่งเดียวของคาร์บอนและไนโตรเจน (ดูเพิ่มเติมในตาราง 2.5 และตาราง 2.6) นอกจากนี้ จะพบว่า หลาย ๆ สปีชีส์จาก *Chrysosporium*, *Microsporum*, และ *Trichophyton* แสดงกิจกรรมย่อยสลายผมสูง (ตาราง 2.6) อย่างไรก็ตาม วัสดุสารเคราตินที่มีการศึกษาน้อยมากก็คือ สิ่งทอ ซึ่งจะพบถูกย่อยสลายอย่างหนัก หากสัมผัสกับ *Gymnoascus arxii* (ตาราง 2.4) เพื่อรา 3

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
26.	<i>Aspergillus glaucus</i> Link	■ frequent infections of sheep fleece	Michalska (1957)
27.	<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
28.	<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) Winter	■ isolated from ancient woollen textiles;	Michalska (1957), Abdel-Kareem (2000)
29.	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	■ frequent infections of sheep fleece	
		■ isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers;	Michalska (1957), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), McCarthy and Greaves (1988), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Nigam et al. (1994), Abdel-Gawad, 1997; Abdel-Kareem (2000)
		■ isolated from sheep's wool;	
		■ isolated from human, cat, buffalo, goat, cow, rabbit, horse and camel hair;	
		■ isolated from ancient woollen textiles;	
		■ frequent infections of sheep fleece;	
		■ growth on wool fibres	
30.	<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm	■ isolated from buffalo, cat, cow and rabbit hair as well as sheep's wool	Ali-Shtayeh et al. (1988b), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992)
31.	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	■ isolated from rabbit, goat and horse hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a), Bagy and Abdel-Mallek (1991)
32.	<i>Aspergillus penicillioides</i> Spegazzini	■ isolated from cat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
33.	<i>Aspergillus raperi</i> Stolk & Meyer	■ isolated from ancient woollen textiles	Abdel-Kareem (2000)
34.	<i>Aspergillus repens</i> (Corda) Saccardo	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
35.	<i>Aspergillus restrictus</i> Smith	■ isolated from rabbit and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
36.	<i>Aspergillus sparsus</i> Raper & Thom	■ isolated from ancient woollen textiles	Abdel-Kareem (2000)
37.	<i>Aspergillus spinulosus</i> Warcup	■ isolated from ancient woollen textiles	Abdel-Kareem (2000)
38.	<i>Aspergillus sulphureus</i> (Fresenius) Thom & Church	■ isolated from museum exhibits (feathers), human hair and sheep's wool;	Moubahser et al. (1992), Nigam et al. (1994)
		■ deterioration of the feathers	
39.	<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	■ isolated from sheep's wool;	Ali-Shtayeh et al. (1988b), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Abdel-Gawad (1997)
		■ isolated from buffalo, donkey, cow and rabbit hair	
40.	<i>Aspergillus tamarii</i> Kita	■ isolated from sheep's wool;	Bagy and Abdel-Mallek (1991), Abdel-Gawad (1997)
		■ isolated from rabbit hair	
41.	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	■ isolated from sheep's wool as well as human, buffalo, rabbit, cat and cow hair;	Michalska (1957), Pugh and Mathison (1962), Mathison (1964), English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988b), Moubahser et al. (1992), Abdel-Gawad (1997), Ramesh and Hilda (1999), Ulfig (2003)
		■ frequent infections of sheep fleece;	
		■ disintegration of the cortex of cattle and human hair and hedgehog spines by means of fronded mycelium, also disintegration of the medullae of the spines, human toe-nails, human plantar callus and cattle hair; very slow attack;	
		■ high activity on keratin in cultures grown on hooves as single source of carbon and nitrogen;	
		■ keratinolytic;	
		■ keratinophilic	
42.	<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church	■ isolated from camel, goat and cow hair;	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Byskal (2005)
43.	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi	■ isolated from antique woollen textiles	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Moubahser et al. (1992), Byskal (2005)
		■ isolated from cow, goat and rabbit hair as well as sheep's wool;	
		■ isolated from antique and contemporary woollen textiles	
44.	<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer	■ isolated from ancient woollen textiles;	Michalska (1957), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Moubahser et al. (1992), Abdel-Kareem (2000)
		■ isolated from buffalo, rabbit, goat and donkey hair;	
		■ frequent infections of sheep fleece	
45.	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud	■ isolated from woollen cloth	Denizel et al. (1974)
46.	<i>Basipetospora rubra</i> Cole & Kendrick	■ isolated from cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
47.	<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin	■ isolated from human hair;	Filipello Marchisio et al. (1994), Ali-Shtayeh et al. (2002)
		■ degradation of human hair by the action of boring hyphae;	
		■ keratinolytic	
48.	<i>Botryotrichum atrogriseum</i> van Beyma	■ isolated from contemporary woollen textiles;	Kowalik and Czerwinska (1956), Stefaniak (1969), Bagy and Abdel-Mallek (1991)
		■ isolated from rabbit and camel hair	
49.	<i>Botryotrichum piluliferum</i> Saccardo & Marchal	■ isolated from feathers, human, horse and buffalo hair;	Michalska (1957), English (1965), Kornilowicz (1991–1992), Moubahser et al. (1992), Ulfig (2003)
		■ frequent infections of sheep fleece;	
		■ disintegration of the cortex of cattle and human hair by means of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration of the medullae of human toe-nails, human plantar callus and cattle hair;	
		■ keratinophilic	
50.	<i>Candida saitoana</i> Nakase & Suzuki	■ frequently isolated from wool	McCarthy and Greaves (1988)
51.	<i>Cephalosporium curtipes</i> Saccardo	■ isolated from human hair	Ramesh and Hilda (1999)
52.	<i>Chrysomya sitophila</i> (Montagne) Arx	■ isolated from donkey and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)

สายพันธุ์คือ *Chrysosporium queenslandicum*, *Engyodontium album*, และ *Graphium penicillioides* พบย่อยเคราตินที่ไม่ละลายน้ำเพื่อใช้เป็นแหล่งเดียวของคาร์บอน ไนโตรเจนและกำมะถัน (ตาราง 2.6) *M. gypseum* และ *T. ajelloi* ดูเหมือนจะมีศักยภาพสูงสุดในการย่อยวัสดุเคราติน โดยไม่คำนึงถึงประเภทของสับสเตรทแต่อย่างใด

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
53.	<i>Chrysosporium carmichaeli</i> Van Oorschot	60% weight loss of wool after 4 weeks when cultivated on a mineral medium; - keratinase production; - slightly keratinolytic; - not keratinolytic; - not keratinophilic	Nigam and Kushwaha (1992a), Kushwaha (2000)
54.	<i>Chrysosporium europae</i> Sigler et al.	utilization of native feather keratin	Kornilowicz-Kowalska (1997)
55.	<i>Chrysosporium georgii</i> (Varsavsky & Ajello) Oorschot	- degradation of human hair by means of surface erosion and radial penetration; production of boring hyphae; - keratinolytic	Van Oorschot (1980), Mitola et al. (2002)
56.	<i>Chrysosporium indicum</i> (Randhawa & Sandhu) Garg	- isolated from sheep's wool; - isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers; - isolated from human, goat, buffalo and cow hair; - utilization of human hair as a sole source of carbon and nitrogen; - visual appearance of colonization of human hair first observed after 6 days, complete degradation occurs after 24 days; development of medullary, needle and tunnel types of perforators; - decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion; - keratinase production	Deshmukh and Agrawal (1982), Ali-Shtayeh et al. (1988a), Rajak et al. (1991), Moubahser et al. (1992), Filipello Marchisio et al. (1994), Nigam et al. (1994), Abdel-Gawad (1997), Katiyar and Kushwaha (2002), Ulfig (2003)
57.	<i>Chrysosporium keratinophilum</i> (Frey) Carmichael	- isolated from bird feathers; - isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers; - isolated from human, buffalo, rabbit, camel, horse, donkey, cat, goat, dog and cow hair as well as sheep's wool; - rapid attack and utilization of keratinous substrates; - softening and subsequent degradation of wool fibres after 14 days; - degradation of sheep's wool, peacock and chicken feathers in soil; - decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion and radial penetration and by the action of borers; - rapid perforation and degradation of buffalo, cow, dog, goat, horse and human hair; infected hair showed undulation, lifting and disruption of cuticle, narrow and broad perforating organs, projection of medulla and decolouration; - thermostable keratinolytic enzyme production when grown in medium containing keratin as an exogenous inducer; maximum activity of the enzyme at pH 9.0; - keratinase production	Pugh and Evans (1970a), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Al Musallam and Radwan (1990), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Nigam and Kushwaha (1992a,b), Nigam et al. (1994), Dozie et al. (1994), Filipello Marchisio et al. (1994), Mahmoud, 1995, Abdel-Gawad (1997), Kornilowicz-Kowalska (1997), Ramesh and Hilda (1999), Ali-Shtayeh and Jamous (2000), Kushwaha (2000), Ulfig (2003)
58.	<i>Chrysosporium kreiselii</i> Dominik	- degradation of feather keratin; - keratinase production	Kornilowicz-Kowalska (1997)
59.	<i>Chrysosporium lucknowense</i> Garg	- isolated from feathers; - degradation of human hair by means of surface erosion and radial penetration, production of boring hyphae; - keratinolytic	Van Oorschot (1980), Mitola et al. (2002), CBS Filamentous fungi database (2008)
60.	<i>Chrysosporium merdarium</i> (Link) Carmichael	- degradation of chicken feathers; - keratinolytic; - not keratinolytic	Van Oorschot (1980), Nigam and Kushwaha (1992a), Kushwaha (2000)
61.	<i>Chrysosporium pannicola</i> (Corda) Van Oorschot & Stalpers	- isolated from feathers, buffalo, goat and donkey hair as well as sheep's wool; - isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers; - utilization of human hair as a sole source of carbon and nitrogen; - decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days; - degradation of feather keratin and human hair; - keratinolytic	Deshmukh and Agrawal (1982), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Bahuguna and Kushwaha (1989), Kornilowicz (1991–1992), Moubahser et al. (1992), Filipello Marchisio et al. (1994), Nigam et al. (1994), Kornilowicz-Kowalska (1997), Kushwaha (2000), Ulfig (2003)
62.	<i>Chrysosporium queenslandicum</i> Apinis & Rees	- isolated from wool, feathers and hair; - cuticle lifting of human hair; development of medullary, fissure and torpedo types of perforators; - utilization of insoluble keratin as a sole source of carbon, nitrogen and sulphur; - degradation of human hair by means of surface erosion and radial penetration, production of perforating organs; - keratinase production; - not keratinolytic	Van Oorschot (1980), Malviya et al. (1992b), Nigam and Kushwaha (1992a), Filipello Marchisio et al. (1994), Katiyar and Kushwaha (2002)

(continued on next page)

ตาราง 2.6 แสดงให้เห็นว่าวรรณกรรมอาจจะขัดแย้งกัน (ให้สังเกต *Aspergillus fumigatus* เลขที่ 25, *A. terreus* เลขที่ 41, *Chrysosporium carmichaeli* เลขที่ 53, *Chrysosporium merdarium* เลขที่ 60, *C. queenslandicum* เลขที่ 62 และ *Chrysosporium sulfureum* เลขที่

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
63.	<i>Chrysosporium sulfureum</i> (Fiedler) Van Oorschot & Samson	■ isolated from sheep's wool; ■ keratinolytic; ■ not keratinolytic; ■ not keratinophilic;	Van Oorschot (1980), Abdel-Gawad (1997)
64.	<i>Chrysosporium tropicum</i> Carmichael	■ isolated from a woollen overcoat; ■ isolated from sheep's wool; ■ isolated from human, buffalo, rabbit, camel, goat, horse, donkey, dog and cow hair; ■ isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers; ■ visual appearance of colonization of human hair first observed after 7 days, complete degradation occurs after 24 days; cuticle lifting; development of medullary, tunnel and torpedo types of perforators; ■ decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion; ■ degradation of human hair by means of radial penetration, production of boring hyphae; ■ decomposition of chicken feathers; ■ degradation of buffalo horn, woman hair and wool; ■ keratinolytic	Denizel et al. (1974), Van Oorschot (1980), Deshmukh and Agrawal (1985), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Filippello Marchisio et al. (1994), Kornilowicz (1994), Nigam et al. (1994), Mahmoud (1995), Abdel-Gawad (1997), Ramesh and Hilda (1999), Katiyar and Kushwaha (2002), Mitola et al. (2002), ATCC The global bioresource center (2008)
65.	<i>Chrysosporium xerophilum</i> Pitt	■ isolated from sheep's wool; ■ slightly keratinolytic	Van Oorschot (1980), Abdel-Gawad (1997), Kushwaha (2000)
66.	<i>Chrysosporium zonatum</i> Al-Musallam & Tan	■ degradation of human hair; ■ strongly keratinolytic	Vidal et al. (2000), Ulfing (2003)
67.	<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Aphanoascus clathratus</i> Cano & Guarro	■ degradation of human hair; ■ keratinolytic	Ulfing (2003)
68.	<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Aphanoascus reticuliporus</i> (Rutien) Hubálek	■ degradation of human hair; ■ keratinolytic	Ulfing (2003)
69.	<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Arthroderma cuniculi</i> Dawson	■ isolated from feathers and rabbit fur; ■ isolated from human hair; ■ degradation of chicken feathers; ■ degradation of human hair by means of surface erosion and radial penetration also by the action of boring hyphae and 'palm of the hand' structures; ■ keratinolytic	Filippello Marchisio et al. (1994), Ramesh and Hilda (1999), Kushwaha (2000)
70.	<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Arthroderma curreyi</i> Berkeley	■ degradation of human hair; ■ keratinolytic	Kushwaha (2000), Ulfing (2003)
71.	<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Pectinotrichum Hanense</i> Varsavsky & Orr	■ decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion and radial penetration; ■ degradation of chicken feathers; ■ keratinolytic	Filippello Marchisio et al. (1994), Kushwaha (2000)
72.	<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Renispora flavissima</i> Sigler et al.	■ decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion and radial penetration and by the action of 'palm of the hand' fungal structures; ■ keratinolytic	Filippello Marchisio et al. (1994)
73.	<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Nannizzopsis vriesii</i> (Apinis) Currah	■ degradation of human hair by means of surface erosion and radial penetration, production of boring hyphae; ■ keratinolytic	Van Oorschot (1980), Mitola et al. (2002)
74.	<i>Cladophialophora bantiana</i> (Saccardo) de Hoog et al.	■ isolated from cow, goat and rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
75.	<i>Cladophialophora carrionii</i> (Trejos) de Hoog et al.	■ isolated from donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
76.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresenius) de Vries	■ frequently isolated from wool; ■ isolated from human and goat hair; ■ isolated from antique woollen textiles; discolouration and degradation of undyed and dyed woollen textiles; ■ disintegration of the medullae of cattle hair, hedgehog spines, human toe-nails and human plantar callus; ■ no keratinolytic activity	English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988a), McCarthy and Greaves (1988), Mahmoud (1995), Ramesh and Hilda (1999), Szostak-Kot et al. (2004a), Blyskal (2005)
77.	<i>Cladosporium graminum</i> Corda	■ frequent infections of sheep fleece	Michalska (1957)
78.	<i>Cladosporium herbarum</i> (Persoon) Link ex Grey	■ frequent infections of sheep fleece; ■ isolated from human, cow, donkey, goat, rabbit and dog hair; ■ keratinolytic activity	Michalska (1957), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Ramesh and Hilda (1999), Ali-Shtayeh and Jamous (2000)
79.	<i>Clonostachys rosea</i> (Link: Fries) Schroers et al.	■ isolated from feathers, rabbit and goat hair; ■ degradation of wool after 40 days	McQuade (1964), Ali-Shtayeh et al. (1988a), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Kornilowicz (1991–1992)

63) ข้อขัดแย้งนี้อาจเป็นผลมาจากความจริงที่ว่า สายพันธุ์ที่เป็นสปอร์เดียวกันอาจมีความต่างกันในกิจกรรมเคราติโนไลติก เนื่องจากกิจกรรมประเภทนี้ก็เช่นเดียวกับคุณสมบัติทางสรีรวิทยาอื่น ๆ อีกมากมาย ซึ่งจะไม่ใช่เป็นคุณลักษณะที่คงที่ของสายพันธุ์ที่กำหนดแต่อย่างใด หากแต่เป็นคุณลักษณะที่ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยหลาย ๆ ประการ ภายใต้สภาวะแวดล้อมเดียวกัน สปอร์เดียวกันอาจจะมีสายพันธุ์เชื้อเคราติโนไลติก ทั้งที่คล่องและไม่คล่องงานก็ได้ นอกจากนี้ ยังมีรูปแบบที่แตกต่างกันและความ

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
80.	<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	■ disintegration of the cortex of hedgehog spines, cattle and human hair by means of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration of the medullae of the spines, cattle hair, human toe-nails and human plantar callus	English (1965)
81.	<i>Curvularia ramosa</i> (Bainier) Boedijn	■ disintegration of human hair cortex by means of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration of the medullae of human toe-nails and human plantar callus	English (1965)
82.	<i>Cylindrocarpon magnusianum</i> Wollenweber	■ isolated from rabbit hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
83.	<i>Drechslera bisepitata</i> (Saccardo & Roumeguère) Richardson & Fraser	■ isolated from camel hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
84.	<i>Engyodontium album</i> (Limber) de Hoog	■ isolated from sheep's wool; ■ utilization of native keratin as a sole source of carbon and nitrogen	McCarthy and Greaves (1988), Abdel-Gawad (1997)
85.	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	■ isolated from sheep's wool, human, buffalo and cow hair	Moubahser et al. (1992)
86.	<i>Epidermophyton floccosum</i> (Harz) Langeron & Milochkevitch	■ very active in hair degradation; production of eroding fronds; ■ keratinolytic	Vanbreuseghem (1952), De Vries (1962), English (1963)
87.	<i>Fusarium chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> Wollenweber et Reinking	■ isolated from cat and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
88.	<i>Fusarium culmorum</i> (Smith) Saccardo	■ isolated from feathers; ■ frequently isolated from wool	McCarthy and Greaves (1988), Kornilowicz (1991–1992)
89.	<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Saccardo	■ isolated from feathers	Kornilowicz (1991–1992)
90.	<i>Fusarium heterosporum</i> Nees	■ isolated from human and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a, 2002)
91.	<i>Fusarium javanicum</i> Koorders	■ degradation of woollen fabrics	White et al. (1950)
92.	<i>Fusarium lateritium</i> Nees	■ isolated from human hair	Ali-Shtayeh et al. (2002)
93.	<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	■ isolated from human, cow, goat, donkey, rabbit, dog and cat hair; ■ degradation of woollen fabrics	White et al. (1950), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Ramesh and Hilda (1999)
94.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl	■ isolated from feathers, human, cow, goat, donkey, cat, camel and cow hair; ■ disintegration of the cortex of human hair and hedgehog spines by means of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration of the medullae of the spines and human plantar callus; ■ keratinophilic	Griffin (1960), English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Kornilowicz (1991–1992), Moubahser et al. (1992), Ramesh and Hilda (1999), Ulfing (2003)
95.	<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenweber	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
96.	<i>Fusarium roseum</i> Link	■ isolated from human hair	Griffin (1960)
97.	<i>Fusarium solani</i> (Martius) Saccardo	■ isolated from feathers, human, buffalo, donkey, rabbit, camel, horse, goat and cow hair as well as sheep's wool; ■ wool degradation; ■ disintegration of the cortex of human hair by means of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration of the medullae of human toe-nails and human plantar callus; ■ efficient degradation of nail keratin	McQuade (1964), English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Kornilowicz (1991–1992), Moubahser et al. (1992), Ramesh and Hilda (1999)
98.	<i>Fusarium tricinctum</i> (Corda) Saccardo	■ isolated from human hair	Ali-Shtayeh et al. (2002)
99.	<i>Fusarium xylarioides</i> Steyaert	■ isolated from cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
100.	<i>Geomyces pannorum</i> var. <i>pannorum</i> (Link) Sigler & Carmichael	■ isolated from human, horse, goat, donkey and cat hair; ■ isolated from bird feathers; ■ penetration of the cortex of cattle and human hair and hedgehog spines by means of boring hyphae; ■ keratinolytic	English (1965), Pugh and Evans (1970a), Van Oorschot (1980), Ali-Shtayeh et al. (1988b), Filippello Marchisio et al. (1994), Ramesh and Hilda (1999)
101.	<i>Geotrichum candidum</i> Link	■ isolated from sheep's wool, human, donkey and cow hair; ■ decomposition of human hair; ■ keratinase production	Ali-Shtayeh et al. (1988b, 2002), Rajak et al. (1991), Moubahser et al. (1992)
102.	<i>Gliocladium catenulatum</i> Gilman & Abbott	■ isolated from human hair; ■ high activity on keratin in cultures grown on hooves as single source of carbon and nitrogen	Mathison (1964), Ramesh and Hilda (1999), Ali-Shtayeh et al. (2002)
103.	<i>Gliocladium nigrovirens</i> Beyma	■ isolated from human hair	Ali-Shtayeh et al. (2002)
104.	<i>Gliocladium solani</i> (Harting) Petch	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
105.	<i>Gliocladium viride</i> Matruchot	■ isolated from cow, goat and rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
106.	<i>Graphium penicillioides</i> Corda	■ utilization of insoluble keratin as a sole source of carbon, nitrogen and sulphur; ■ keratinase production	Malviya et al. (1992b)
107.	<i>Humicola fuscoatra</i> Traaen	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
108.	<i>Humicola grisea</i> Traaen	■ isolated from feathers, human, goat and cow hair; ■ disintegration of the cortex of cattle and human hair by means of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration of the medullae of cattle hair, human toe-nails and human plantar callus	Griffin (1960), English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Kornilowicz (1991–1992)
109.	<i>Lecanicillium psalliotae</i> (Treschow) Zare & Gams	■ isolated from human and goat hair; ■ keratinophilic	Ali-Shtayeh et al. (1988a), Ulfing (2003)

(continued on next page)

เข้มที่แตกต่างกันของการโจมตีสัปดาห์แรก รวมถึงชนิดของโครงสร้างจำเพาะ ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นเพื่อจุดประสงค์นี้ ความขัดแย้งอีกอย่างหนึ่งคือ ศัพท์ที่ใช้อ้างอิงถึง โดยบางคนใช้คำ เคราติโนไลติก (keratinolytic) คนอื่น ๆ ใช้เคราติโนฟิลิก (keratinophilic) (ตาราง 2.6 ประกอบด้วยข้อมูลทั้งหมดที่มีอยู่และการวิเคราะห์) ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะความจริงที่ว่า หลายปีที่ผ่านมา ความหมายของฟังไจเคราติโนไลติกและเคราติโนฟิลิกถูกนำมาใช้งานและศัพท์ที่นำมาใช้ก็ใช้ในฐานะเป็นคำพ้อง อย่างไรก็ตาม

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
110.	<i>Madurella grisea</i> McKinnon et al.	■ disintegration of the medullae of cattle hair, hedgehog spines, human toe-nails and human plantar callus	English (1965)
111.	<i>Madurella mycetomi</i> (Laveran) Brumpt	■ disintegration of the medullae of hedgehog spines, human toe-nails and human plantar callus	English (1965)
112.	<i>Malbranchea arcuata</i> Sigler & Carmichael	■ destruction of human hair by the action of boring hyphae; ■ keratinolytic	Filipello Marchisio et al. (1994)
113.	<i>Malbranchea aurantiaca</i> Sigler & Carmichael	■ degradation of human hair	Deshmukh and Agrawal (1985)
114.	<i>Malbranchea chrysosporioides</i> Sigler & Carmichael	■ isolated from sheep's wool, human and cow hair	Moubahser et al. (1992)
115.	<i>Malbranchea cinnamomea</i> (Libert) Van Oorschot & De Hoog	■ destruction of human hair by an action of boring hyphae; ■ keratinolytic	Filipello Marchisio et al. (1994)
116.	<i>Malbranchea fulva</i> Sigler & Carmichael	■ destruction of human hair by an action of boring hyphae; ■ keratinolytic	Filipello Marchisio et al. (1994), Ulfig (2003)
117.	<i>Malbranchea anamorph</i> of <i>Uncinocarpus reesii</i> Sigler & Orr	■ isolated from wool; ■ softening and subsequent degradation of wool fibres after 14 days; ■ decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion and radial penetration; ■ keratinolytic	Al Musallam and Radwan (1990), Filipello Marchisio et al. (1994)
118.	<i>Malbranchea</i> sp. (strain GPCK 535)	■ cuticle lifting of human hair; production of needle-shaped perforators	Katiyar and Kushwaha (2002)
119.	<i>Memnoniella echinata</i> (Rivolta) Galloway	■ isolated from cow, donkey, rabbit, goat and cat hair; ■ penetration of the cortex of hedgehog spines, cattle and human hair through boring hyphae	English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
120.	<i>Metarhizium brunneum</i> Petch	■ degradation of wool after 40 days	McQuade (1964)
121.	<i>Microsporium audouinii</i> Gruby	■ isolated from rabbit and goat hair; ■ hair degradation; ■ keratinolytic	Vanbreuseghem (1952), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
122.	<i>Microsporium boullardii</i> Dominik & Majchrowicz	■ isolated from rabbit and horse hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
123.	<i>Microsporium canis</i> Bodin	■ isolated from cat hair; ■ one of the most active species in hair degradation; ■ disintegration of hair derived from various animal species such as sheep, fox, guinea pig, dog, cat and human (most resistant) by the action of keratinolytic enzymes; ■ decomposition of hair; production of a wide and solid mass of eroding fronds penetrating right through the hair shaft; ■ keratinolytic	Vanbreuseghem (1952), English (1963), Ali-Shtayeh et al. (1988b), Wawrzkievicz et al. (1997)
124.	<i>Microsporium cookei</i> Ajello	■ isolated from wool; ■ highly active keratin-degrading fungus; ■ sulfitolysis of human hair, i.e. denaturation of keratin by the reduction of disulfide bonds which renders keratin vulnerable to proteolytic attack; ■ degradation of feather keratin; ■ keratinase production	De Vries (1964), Safranek and Goos (1982), Simpanya and Baxter (1996), Kornilowicz-Kowalska (1997)
125.	<i>Microsporium fulvum</i> Urbur	■ isolated from museum exhibits, commonly occurs on works of art made of feathers, hair and on woollen textiles	Agrawal (1995)
126.	<i>Microsporium gallinae</i> (Megnin ex Guéguen) Grigoraki	■ utilization of chicken feathers as the only source of carbon and nitrogen	Wawrzkievicz et al. (1991)
127.	<i>Microsporium gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigorakis	■ isolated from a strip of wool buried in soil; ■ isolated from sheep's wool, human, buffalo, cow, cat and horse hair; ■ isolated from dyed woollen textiles; rapid degradation of the textiles; ■ ready growth on clean (devoid of contaminants and lipids) wool; ■ utilization of human hair as a sole source of carbon and nitrogen; ■ highly active keratin-degrading fungus; ■ decomposition of keratin from human hair, wool, woollen fabrics, fingernails and horns; ■ digestion of fibrillar proteins in feathers, hooves, horns, horse hair, wool, mohair (percentage-based in descending order); ■ keratin denaturation by sulfitolysis, i.e. cleavage of the substrate disulfide bridges; ■ visual appearance of colonization of human hair first observed after 6 days, complete degradation occurs after 24 days; development of medullary, needle and tunnel types of perforators; ■ human hair degradation by means of surface erosion and radial penetration; production of invasive structures; ■ highly keratinolytic	Mandels et al. (1948), Page (1950), Stahl et al. (1950), White et al. (1950), Vanbreuseghem (1952), Crewther (1955), De Vries (1964), Chmel et al. (1972), Denizel et al. (1974), Deshmukh and Agrawal (1982), Ali-Shtayeh et al. (1988b), Kunert (1989), Moubahser et al. (1992), Nigam and Kushwaha (1992a), Mahmoud (1995), Simpanya and Baxter (1996), Ramesh and Hilda (1999), Ali-Shtayeh and Jamous (2000), Katiyar and Kushwaha (2002), Ulfig (2003), Byskal's unpublished results
128.	<i>Microsporium nanum</i> Fuentes et al.	■ isolated from human, cow, rabbit, goat and cat hair; ■ utilization of modified keratin from chicken feathers	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Wawrzkievicz et al. (1991), Ramesh and Hilda (1999)

ความหมายของคำ “keratinolytic” ถูกนำไปใช้เพื่ออ้างถึงกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เฉพาะเคราตินเนส มีความสามารถในการโจมตีและการย่อยสลายเคราติน, ก่อให้เกิดโรคที่อาจเกิดขึ้นกับมนุษย์ ในขณะที่สปอร์ของเคราตินอฟิลิกคือผู้ที่มีความสามารถของการใช้สารที่สามารถย่อยสลายได้อย่างง่ายดายคายเท่านั้น (คือผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวบางส่วนของเคราติน วัสดุที่เกี่ยวข้องกับเคราติน ฯลฯ) อย่างไร

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
129.	<i>Microsporium persicolor</i> (Sabouraud) Guiart & Grigorakis	■ degradation of horse hair; ■ keratinolytic	Mahmoud (1995)
130.	<i>Microsporium racemosum</i> Borelli	■ isolated from rabbit and rat hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
131.	<i>Microsporium ripariae</i> Hubálek & Rush-Munro	■ destruction of chicken feathers and human hair; ■ production of perforating organs in contact with human hair	Hubálek and Rush-Munro (1973)
132.	<i>Monodictys castaneae</i> (Wallroth) Hughes	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
133.	<i>Myceliophthora vellerea</i> (Saccardo & Spegazzini) Van Oorschot	■ isolated from horse, goat and dog hair; ■ degradation of feather keratin; ■ degradation of human hair by means of surface erosion; ■ keratinase production	Chmel et al. (1972), Van Oorschot (1980), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Filipello Marchisio et al. (1994), Komilowicz-Kowalska (1997), Ulfing (2003)
134.	<i>Myceliophthora</i> sp.(strain BBT 41, CBS 116055)	■ isolated from antique woollen textiles; ■ strong entanglement of wool fibres, creation of tight mat of mycelium on the fabric; ■ structural and aesthetic deterioration of dyed and undyed woollen textiles	Szostak-Kot et al. (2004b), Blyskal (2005)
135.	<i>Myrothecium verrucaria</i> (Albertini & Schweinitz) Ditmar	■ isolated from sheep's wool; ■ isolated from human and cow hair; ■ ready growth on clean (devoid of contaminants and lipids) wool; ■ degradation of wool after 10 days	White et al. (1950), Crewther (1955), McQuade (1964), Moubahser et al. (1992), Abdel-Gawad (1997)
136.	<i>Oidiodendron griseum</i> Robak	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
137.	<i>Paecilomyces cameus</i> (Duché & Heim) Brown & Smith	■ isolated from goat and donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
138.	<i>Paecilomyces furinosus</i> (Holmskjöld) Brown & Smith	■ isolated from human, goat and donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002)
139.	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	■ isolated from feathers, human, goat, donkey, rabbit, cat, dog and cow hair as well as sheep's wool; ■ keratinophilic	Griffin (1960), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Komilowicz (1991–1992), Moubahser et al. (1992), Ulfing (2003)
140.	<i>Paecilomyces marquandii</i> (Masse) Hughes	■ isolated from human, cow, donkey, goat and dog hair; ■ keratinophilic	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Ulfing (2003)
141.	<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	■ isolated from antique and contemporary woollen textiles; brownish discolouration of undyed woollen textiles; ■ isolated from human, cow and goat hair	Kowalik and Czerwinska (1956), Stefaniak (1969), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Blyskal (2005)
142.	<i>Papulaspora sepedonioides</i> Preuss	■ isolated from camel hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
143.	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	■ isolated from rabbit hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
144.	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	■ isolated from human, rabbit, cow, donkey, goat and camel hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Bagy and Abdel-Mallek (1991)
145.	<i>Penicillium canescens</i> Sopp	■ isolated from ancient woollen textiles; ■ isolated from cow, donkey, rabbit and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Abdel-Kareem (2000)
146.	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	■ isolated from sheep's wool; ■ isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers; ■ isolated from human, buffalo, rabbit, cow, goat and camel hair; ■ isolated from antique and contemporary woollen textiles; structural and aesthetic deterioration of undyed and dyed woollen textiles; ■ disintegration of the medullae of cattle hair, hedgehog spines, human toe-nails and human plantar callus; ■ keratinolytic	English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Nigam et al. (1994)
147.	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	■ isolated from museum exhibits (feathers), deterioration of the feathers; ■ isolated from rabbit and goat hair; ■ disintegration of the medullae of cattle hair, hedgehog spines, human toe-nails and human plantar callus	English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Nigam et al. (1994)
148.	<i>Penicillium cyclopium</i> Westling	■ isolated from ancient woollen textiles	Abdel-Kareem (2000)
149.	<i>Penicillium daleae</i> Zaleski	■ isolated from cow, goat and rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
150.	<i>Penicillium expansum</i> Link	■ isolated from goat hair; ■ strong destruction of sheep's wool	Michalska (1957), Ali-Shtayeh et al. (1988a)
151.	<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	■ isolated from sheep's wool, human, buffalo, rabbit, goat and cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Moubahser et al. (1992), Abdel-Gawad (1997), Ramesh and Hilda (1999)
152.	<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling	■ isolated from antique woollen textiles; ■ isolated from human and goat hair; ■ human hair degradation by means of surface erosion and radial penetration; production of invasive structures; ■ strongly keratinolytic	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Ali-Shtayeh and Jamous (2000), Blyskal (2005)
153.	<i>Penicillium glandicola</i> (Oudemans) Seifert & Samson	■ isolated from ancient woollen textiles; ■ isolated from rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b), Abdel-Kareem (2000)
154.	<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)

(continued on next page)

ก็ตาม Filipello Marchisio (2000) ได้อ้างถึงรากศัพท์ตามหลักนิรุกติศาสตร์ของคำว่าเคราตินอฟิลิก และเสนอแนะว่า คำศัพท์ถูกใช้อ้างถึงสิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่โคโลไนซ์วัสดุสารเคราติน

2.9 สับสเตรทเคราตินเนส

ตาราง 2.7 แสดงให้เห็นว่าชนและชนเกาะเป็นสับสเตรทที่มีการใช้มากที่สุดสำหรับศึกษาความสามารถใช้วัสดุเคราตินเนสเป็นแหล่งสารอาหารของเชื้อรา (มีรายงานถึง 225 เชื้อราพบในชนและ

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
155.	<i>Penicillium herquei</i> Bainier & Sartory	■ isolated from cow and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
156.	<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	■ isolated from human, rabbit, goat and cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Moubahser et al. (1992)
157.	<i>Penicillium italicum</i> Wehmer	■ isolated from cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
158.	<i>Penicillium janczewskii</i> Zaleski	■ isolated from human hair; ■ keratinophilic	Ulfig (2003)
159.	<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge	■ isolated from human, goat and donkey hair; ■ keratinophilic	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Ulfig (2003)
160.	<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom	■ isolated from sheep's wool; ■ isolated from human, cow, goat and donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Abdel-Gawad (1997)
161.	<i>Penicillium paxilli</i> Bainier	■ isolated from ancient woollen textiles	Abdel-Kareem (2000)
162.	<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll	■ isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
163.	<i>Penicillium rubrum</i> Stoll	■ isolated from goat and cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
164.	<i>Penicillium rugulosum</i> Thom	■ isolated from rabbit hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
165.	<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudemans) Thom	■ isolated from antique woollen textiles; ■ greenish discolouration of undyed woollen textiles; ■ isolated from rabbit and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Blyskal (2005)
166.	<i>Penicillium soppi</i> Zaleski	■ isolated from ancient woollen textiles	Abdel-Kareem (2000)
167.	<i>Penicillium spinulosum</i> Thom	■ isolated from antique woollen textiles	Blyskal (2005)
168.	<i>Penicillium thomii</i> Maire	■ isolated from human hair	Ramesh and Hilda (1999)
169.	<i>Penicillium variabile</i> Sopp	■ isolated from cow, donkey, goat and cat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
170.	<i>Penicillium verruculosum</i> Peyronel	■ isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
171.	<i>Penicillium vulpinum</i> (Cooke & Massee) Seifert & Samson	■ isolated from rabbit hair	Ali-Shtayeh et al. (1988b)
172.	<i>Pestalotia bicolor</i> Ellis & Everhart	■ degradation of wool	Denizel et al. (1974)
173.	<i>Phialophora cyclaminis</i> Beyma	■ isolated from cow and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
174.	<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenweber & Hochapfel	■ isolated from wool; ■ isolated from camel hair; ■ development of black, hard to remove, discolouration on fleece wool, in the regions of discolouration fibres show a very low tensile strength characteristic of extreme weathering; severe mechanical disruption of cortical cells within the fibres	Mulcock (1959, 1965), Denizel et al. (1974), Bagy and Abdel-Mallek (1991)
175.	<i>Phoma humicola</i> Gilman & Abbott	■ isolated from camel hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
176.	<i>Pithomyces sacchari</i> (Spegazzini) Ellis	■ isolated from camel hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
177.	<i>Rutola graminis</i> (Desmazières) Crane & Schoknecht	■ isolated from camel hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
178.	<i>Scopulariopsis acremonium</i> (Delacroix) Vuillemin	■ isolated from rabbit and goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
179.	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Saccardo) Bainier	■ isolated from sheep's wool, woollen textiles, human, buffalo, rabbit, donkey, camel, goat and cow hair; ■ degradation of feathers and human hair; ■ penetration of the cortex of hedgehog spines, cattle and human hair by the action of boring hyphae (scanty borers); ■ utilization of insoluble keratin of human hair as a sole source of carbon, nitrogen and sulphur; ■ high activity on keratin in cultures grown on hooves as single source of carbon and nitrogen; ■ keratinase production	Kowalik and Czerwinska (1956), Mathison (1964), English (1965), Stefaniak (1969), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), McCarthy and Greaves (1988), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Rajak et al. (1991), Malviya et al. (1992a,b), Moubahser et al. (1992), Mahmoud (1995), Abdel-Gawad (1997), Filipello Marchisio et al. (2000), Ulfig (2003)
180.	<i>Scopulariopsis brumptii</i> Salvanet-Duval	■ isolated from antique woollen textiles; ■ creation of a tight layer of mycelium on the fabric; ■ isolated from rabbit, goat and cow hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Blyskal (2005)
181.	<i>Scopulariopsis candida</i> (Guéguen) Vuillemin	■ growth on wool; ■ isolated from rabbit, cow, goat and donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Al Musallam and Radwan (1990), Bagy and Abdel-Mallek (1991)
182.	<i>Scopulariopsis koningii</i> (Oudemans) Vuillemin	■ isolated from rabbit hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
183.	<i>Sepedonium chrysospermum</i> (Bulliard) Fries	■ isolated from human and buffalo hair	Moubahser et al. (1992)
184.	<i>Sporothrix schenckii</i> Hektoen & Perkins	■ isolated from goat and donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
185.	<i>Sporotrichum pruinosum</i> Gilman & Abbott	■ isolated from feathers; ■ complete solubilization of native feather keratin; ■ keratinase production	Kornilowicz (1991–1992), Kornilowicz-Kowalska (1997, 1999)
186.	<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenberg) Hughes	■ isolated from sheep's wool; ■ isolated from contemporary woollen textiles; ■ blackish discolouration of undyed woollen textiles; ■ isolated from buffalo and rabbit hair; ■ decomposition of wool; ■ disintegration of the cortex of cattle and human hair by the action of boring hyphae and fronded mycelium, also disintegration of the medullae of cattle hair, human toe-nails and human plantar callus	English (1965), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Moubahser et al. (1992), Domsch et al. (1993), Abdel-Gawad (1997), Blyskal (2005)
187.	<i>Staphylotrichum coccospurum</i> Meyer & Nicot	■ isolated from cow, goat and donkey hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b)
188.	<i>Stemphylium macrosporoides</i> (Berkeley & Broome) Saccardo	■ isolated from contemporary woollen textiles	Kowalik and Czerwinska (1956), Stefaniak (1969)

108 เชื้อราในขนแกะ) สำหรับสิ่งทอขนสัตว์มีรายงานถูกนำมาใช้ในการศึกษาเพียงครั้งคราวเท่านั้น แต่ก็ยังมีความสำคัญเป็นพิเศษในการอนุรักษ์ของคอลเลกชันที่มีคุณค่า โดยถูกเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ ข้อมูลส่วนใหญ่ที่เกี่ยวกับสปีชีส์เชื้อรา ซึ่งคัดแยกได้จากสิ่งทอผ้าขนสัตว์ที่ถูกย่อยโดยจุลินทรีย์เหล่านี้ถูก รายงานโดย Blyskal (2005) และผลศึกษาที่ไม่ได้ตีพิมพ์ของ Blyskal จากบรรดาสปีชีส์เชื้อราที่แยก โดย Barbara (2009) มีรายงานมาว่า 15 สปีชีส์คัดแยกได้จากสิ่งทอผ้าขนสัตว์เป็นครั้งแรก โดยเป็น เชื้อ *Alternaria alternata*, *Aspergillus ustus*, *A. versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*,

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
189.	<i>Stilbella fimetaria</i> (Persoon) Lindau	■ disintegration of the medullae of hedgehog spines, human toe-nails and human plantar callus	English (1965)
190.	<i>Stilbella</i> sp. (strain QM 833)	■ isolated from wool	Denizel et al. (1974)
191.	<i>Torula herbarum</i> (Persoon) Link	■ isolated from sheep and camel hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
192.	<i>Trichoderma virens</i> (Miller et al.) von Arx	■ isolated from feathers	Kornilowicz (1991–1992)
193.	<i>Trichoderma viride</i> Persoon: Fries	■ isolated from feathers and human hair; ■ penetration of the cortex of hedgehog spines, cattle and human hair by an action of boring hyphae; ■ extensive destruction of sheep's wool	Michalska (1957), Griffin (1960), English (1965), Kornilowicz (1991–1992), Ramesh and Hilda (1999), Ali-Shtayeh et al. (2002)
194.	<i>Trichophyton ajelloi</i> (Vanbreuseghem) Ajello	■ isolated from wool, feathers, horse and cat hair; ■ degradation of wool, human, guinea pig hair and feather keratin; ■ highly active keratin-degrading fungus; ■ utilization of human hair as a sole source of carbon and nitrogen; ■ decomposition of hair, production of a wide and solid mass of eroding fronds penetrating right through the hair shaft; growth between the laminations of the human toe-nails occurs in the same manner as in the cortex of hair or hedgehog spines, i.e. by developing eroding fronds and perforating organs; ■ solubilization of 67% of wool in 11 days when grown on wool which acts as a sole source of carbon and nitrogen; ■ keratinase production	Chesters and Mathison (1963), English (1963), De Vries (1964), Mathison (1964), Baxter and Mann (1969–1970), Chmel et al. (1972), Deshmukh and Agrawal (1982), Ali-Shtayeh et al. (1988b), Wawrzekiewicz et al. (1991), Kornilowicz (1991–1992), Simpanya and Baxter (1996), Kornilowicz-Kowalska (1997), Ali-Shtayeh and Jamous (2000), Simpanya (2000), Ulfing (2003)
195.	<i>Trichophyton equinum</i> (Matruchot & Dassonville) Geddoelst	■ isolated from horse and rabbit hair; ■ highly keratinolytic	Ali-Shtayeh et al. (1988b), Mahmoud (1995)
196.	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> (Priestley) Georg	■ degradation of hair; ■ destruction of woollen blanket	White et al. (1950), De Vries (1962), Oyeka (2000)
197.	<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanchard	■ isolated from human, cow, cat, goat, dog and rabbit hair; ■ degradation of keratin of guinea pig hair; ■ sulfitolysis of human hair, i.e. denaturation of keratin by the reduction of disulfide bonds which renders keratin vulnerable to proteolytic attack; ■ decomposition of hair; production of a wide and solid mass of eroding fronds penetrating right through the hair shaft; growth between the laminations of the human toe-nails occurs in the same manner as in the cortex of hair or hedgehog spines, i.e. by development of eroding fronds and perforating organs; ■ digestion of intercellular membranes of both the fibrous α-keratin and the amorphous matrix protein (γ-keratin) of hair; ■ decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion; ■ complete degradation of healthy human nail plate in the absence of extraneous nutrients; ■ discolouration and slight deterioration of wool; ■ highly keratinolytic	Cruickshank and Trotter (1956), De Vries (1962), English (1963), Mathison (1964), Agarwal and Puvathingal (1969), Baxter and Mann (1969–1970), Kamalam and Thambiah (1980), Safranek and Goos (1982), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Bagy and Abdel-Mallek (1991), Wawrzekiewicz et al. (1991), Filipello Marchisio et al. (1994), Mahmoud (1995), Ramesh and Hilda (1999), Oyeka (2000)
198.	<i>Trichophyton rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	■ isolated from sheep's wool; ■ very active in hair degradation; ■ sulfitolysis of human hair, i.e. denaturation of keratin by the reduction of disulfide bonds which renders keratin vulnerable to proteolytic attack; ■ hair decomposition by the action of perforating organs; growth between the laminations of the human toe-nails occurs in the same manner as in the cortex of hair or hedgehog spines, i.e. by production of eroding fronds; ■ decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion and radial penetration; ■ highly keratinolytic	Vanbreuseghem (1952), De Vries (1962), English (1963), Baxter and Mann (1969–1970), Kamalam and Thambiah (1980), Safranek and Goos (1982), Deshmukh and Agrawal (1985), Filipello Marchisio et al. (1994), Abdel-Gawad (1997)
199.	<i>Trichophyton schoenleinii</i> (Lebert) Langeron & Milochevitch	■ very active in hair degradation; ■ keratinolytic	Vanbreuseghem (1952)

(continued on next page)

Eurotium chevalieri, *Penicillium chrysogenum*, *P. glabrum*, *P. simplicissimum*, *P. spinulosum*, *Scopulariopsis brumptii*, *Stachybotrys chartarum*, *Acremonium camptosporum*, *Apiospora montagnei*, *G. arxii* และ *Microascus cirrosus* ยกเว้นสำหรับ *A. alternata*, *A. ustus*, *P. simplicissimum*, และ *S. chartarum* ทุกสปีชีส์ของเชื้อราที่กล่าวมาข้างต้น ถูกรายงานเป็นครั้งแรกว่ามีความสามารถในการทำลายสิ่งทอขนสัตว์ นอกจากนี้ *A. camptosporum*, *A. montagnei*, *G. arxii*, และ *M. cirrosus* ถูกรายงานเป็นครั้งแรกว่ามี

ตาราง 2.6 (ต่อ)

No.	Species name	Strain source, comments	References
200.	<i>Trichophyton terrestre</i> Durie & Frey	- isolated from sheep's wool, feathers, human, horse, buffalo and cow hair; - highly active keratin-degrading fungus; - degradation of feather keratin; - sulfitolysis of human hair, i.e. denaturation of keratin by the reduction of disulfide bonds which renders keratin vulnerable to proteolytic attack; - growth between the laminations of the human toe-nails occurs in the same manner as in the cortex of hair or hedgehog spines, i.e. by development of eroding fronds and perforating organs; - decomposition of c. 80% of human hair after only 3–5 days by means of surface erosion and radial penetration; - keratinase production	Griffin (1960), English (1963), De Vries (1964), Chmel et al. (1972), Hsu and Volz (1975), Safranek and Goos (1982), Deshmukh and Agrawal (1985), Kornilowicz (1991–1992), Moubahser et al. (1992), Filipello Marchisio et al. (1994), Simpanya and Baxter (1996), Abdel-Gawad (1997), Kornilowicz-Kowalska (1997), Ramesh and Hilda (1999), Ulfing (2003)
201.	<i>Trichophyton tonsurans</i> Malmsten	sulfitolysis of human hair, i.e. denaturation of keratin by the reduction of disulfide bonds which renders keratin vulnerable to proteolytic attack	Kamalam and Thambiah (1980), Safranek and Goos (1982)
202.	<i>Trichophyton vanbreuseghemii</i> Rioux et al.	- isolated from horse hair; - degradation of hair	Chmel et al. (1972), Bahuguna and Kushwaha (1989)
203.	<i>Trichophyton verrucosum</i> Bodin	- isolated from cow, donkey, goat and rabbit hair; - hair decomposition; - degradation of keratin of guinea pig hair; - keratinolytic	English (1963), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b), Wawrzekiewicz et al. (1991), Mahmoud (1995)
204.	<i>Trichophyton violaceum</i> Sabouraud	- hair degradation; - keratinolytic	Vanbreuseghem (1952)
205.	<i>Trichosporiella cerebriformis</i> (de Vries & Kleine-Natrop) Gams	isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
206.	<i>Trichothecium roseum</i> (Persoon : Fries) Link	- isolated from sheep's wool and goat hair; - frequent infections of sheep fleece	Michalska (1957), Ali-Shtayeh et al. (1988a), Moubahser et al. (1992)
207.	<i>Ulocladium alternariae</i> (Cooke) Simmons	isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
208.	<i>Ulocladium atrum</i> Preuss	isolated from rabbit and camel hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
209.	<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss	isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
210.	<i>Ulocladium chartarum</i> (Preuss) Simmons		
211.	<i>Ulocladium consortiale</i> (Thümen) Simmons	isolated from camel hair	Bagy and Abdel-Mallek (1991)
212.	<i>Ulocladium tuberculatum</i> Simmons	isolated from sheep's wool	Abdel-Gawad (1997)
213.	<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold	- isolated from human, donkey and goat hair; - penetration of the cortex of hedgehog spines, cattle and human hair by the action of boring hyphae	English (1965), Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002)
214.	<i>Verticillium chlamydosporium</i> Goddard	isolated from feathers and human hair	Kornilowicz (1991–1992), Ali-Shtayeh et al. (2002)
215.	<i>Verticillium lecani</i> (Zimmermann) Viégas	- isolated from human, cow, goat and donkey hair; - keratinophilic	Ali-Shtayeh et al. (1988a,b, 2002), Ulfing (2003)
216.	<i>Verticillium luteoalbum</i> (Link) Subramanian	- isolated from human hair; - frequent infections of sheep fleece; - degradation of wool after 40 days	Michalska (1957), McQuade (1964), Ramesh and Hilda (1999)
217.	<i>Verticillium nigrescens</i> Pethybridge	isolated from goat hair	Ali-Shtayeh et al. (1988a)
218.	<i>Verticillium nubilum</i> Pethybridge	isolated from human hair	Ali-Shtayeh et al. (2002)

หมายเหตุ ให้สังเกตดังนี้ ชื่อฟังไจในตารางนี้ได้ผ่านการตรวจสอบทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) โดยชื่อทั้งหมดอาศัยจากพื้นฐานของ Ajello (1968), Samson (1974), Domsch และคณะ (1993), CBS List of cultures (1994), Hawksworth และคณะ (1995), Samson และ Pitt (2000), Simpanya (2000), Vidal และคณะ (2000), Kirk และคณะ (2001), Seifert และ Gams (2001), Zare และ Gams (2001), Klich (2002), Samson และคณะ (2002), CBS Filamentous fungi database (2008), The Index Fungorum (2008) และ MycoBank (2008). กระบวนการก่อโรค (Pathogenicity) ของสายพันธุ์ฟังไจในตารางอาศัยพื้นฐานของ Summerbell และคณะ (1989), Tan และคณะ (1994), De Hoog (1996), De Hoog และ Guarro (1995, 2000), Midgley และคณะ (1997), Baran (1998), Gughani (2000), Simpanya (2000), Flannigan และคณะ (2001), Kantarcioglu และคณะ (2002), Straus (2004), ATCC The global bioresource center (2008) และ CBS Filamentous fungi database (2008) (๓) ตัวหนาอ้างอิงฟังไจสาเหตุของโรคในคน

ความสามารถในการทำลายกลุ่มวัสดุสารเคราตินเช่นกัน ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับเชื้อราที่คัดแยกได้จากสิ่งทอผ้าขนสัตว์สามารถหาข้อมูลจากรายงานของ Kowalik & Czerwinska (1956), Stefaniak

ตาราง 2.7 การจัดประเภทฟังไจอาศัยชนิดของสับสเตรท ซึ่งเป็นแหล่งคัดแยกและ/หรือเป็น
สับสเตรทที่ถูกย่อยสลายได้

Species name	Keratinous substrate* from which fungus was isolated and/or which it degraded									
	wool	textile	hair	feather	nail	hoof	horn	hedgehog spine	human plantar callus	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Saccardo & Trotter			+		+			+	+	
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem	+		+	+		+	+			
<i>Absidia glauca</i> Hagem				+						
<i>Absidia spinosa</i> Lendner			+							
<i>Acremonium butyri</i> (van Beyma) Gams			+							
<i>Acremonium camptosporum</i> Gams^b		+								
<i>Acremonium falciforme</i> (Carrión) Gams			+							
<i>Acremonium furcatum</i> (Moreau & Moreau) ex Gams			+							
<i>Acremonium fusidioides</i> (Nicot) Gams			+							
<i>Acremonium glaucum</i> Gams		+								
<i>Acremonium killense</i> Grütz	+		+							
<i>Acremonium murorum</i> (Corda) Gams	+									
<i>Acremonium roseum</i> Petch	+		+							
<i>Acremonium strictum</i> Gams	+		+							
<i>Acremonium</i> sp.										
strain 89c QMCC;	+									
strain AC-R;	+									
strain GPCK 531			+							
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler	+	+	+							
<i>Alternaria chlamydospora</i> Mouchacca	+									
<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Fries Wiltshire	+									
<i>Amauroascus mutatus</i> (Quelet) Rammeloo			+							
<i>Aphanoascus cinnabarinus</i> Zukal			+							
<i>Aphanoascus fulvescens</i> (Cooke) Apinis			+	+						
<i>Aphanoascus</i> sp. (strain GPCK 534)			+							
<i>Apiospora montagnei</i> Saccardo		+								
<i>Arthroderma cuniculi</i> Dawson			+	+						
<i>Arthroderma curreyi</i> Berkeley	+		+	+						
<i>Arthroderma incurvatum</i> (Stockdale) Weitzman et al.			+	+						
<i>Arthroderma gertleri</i> Böhme			+							
<i>Arthroderma gypseum</i> (Nannizzi) Weitzman et al.	+		+							
<i>Arthroderma quadrifidum</i> Dawson & Gentles			+	+						
<i>Arthroderma tuberculatum</i> Kuehn	+		+	+						
<i>Arthroderma uncinatum</i> Dawson & Gentles			+	+						
<i>Arthrographis kalrae</i> (Tewari & Macpherson) Sigler & Carmichael			+							
<i>Aspergillus alutaceus</i> Berkeley & Curtis			+							
<i>Aspergillus candidus</i> Link			+							
<i>Aspergillus carneus</i> (van Tiegem) Blochwitz	+									
<i>Aspergillus cervinus</i> Masse		+								
<i>Aspergillus clavatus</i> Desmazieres	+		+							
<i>Aspergillus erythrocephalus</i> Berkeley & Curtis			+							
<i>Aspergillus flavipes</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church			+							
<i>Aspergillus flavus</i> Link	+	+	+	+						
<i>Aspergillus foetidus</i> Thom & Raper				+						
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	+	+	+	+	+		+		+	
<i>Aspergillus glaucus</i> Link	+									
<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	+									
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) Winter	+	+								
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	+	+	+	+						
<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm	+		+							
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare			+							
<i>Aspergillus penicillioides</i> Spegazzini			+							
<i>Aspergillus raperi</i> Stolk & Meyer		+								
<i>Aspergillus repens</i> (Corda) Saccardo			+							
<i>Aspergillus restrictus</i> Smith			+							
<i>Aspergillus sparsus</i> Raper & Thom		+								
<i>Aspergillus spinulosus</i> Warcup		+								
<i>Aspergillus sulphureus</i> (Fresenius) Thom & Church	+		+	+						
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	+		+							
<i>Aspergillus tamarii</i> Kita	+		+							
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	+		+		+	+		+	+	
<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church		+	+							
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi	+	+	+							
<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer	+	+	+							
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud		+								
<i>Auxarthron conjugatum</i> (Kuehn) Orr & Kuehn			+	+						
<i>Auxarthron umbrinum</i> (Boudier) Orr & Plunkett			+							
<i>Auxarthron zuffianum</i> (Morini) Orr & Kuehn	+		+							
<i>Basipetospora rubra</i> Cole & Kendrick			+							
<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin			+							
<i>Botryotrichum atrogriseum</i> van Beyma		+	+							

(continued on next page)

(1969), Denizel et al. (1974), และ Abdel-Kareem (2000) เชื้อราที่แยกได้จากสิ่งทอผ้าขนสัตว์
รวมแล้วมีถึง 14% จากสปีชีส์ทั้งหมดที่คัดแยกได้จากวัสดุสารเคราตินเนส

จากมุมมองของจำนวนสับสเตรทที่ถูกโคลนซีโดยเชื้อราที่กำหนด สามารถจัดแบ่งกลุ่ม
จุลินทรีย์ได้ดังนี้คือ *Absidia cylindrospora*, *A. fumigatus*, *M. gypseum*, *P. chrysogenum*, และ

ตาราง 2.7 (ต่อ)

Species name	Keratinous substrate ^a from which fungus was isolated and/or which it degraded									
	wool	textile	hair	feather	nail	hoof	horn	hedgehog spine	human plantar callus	
<i>Botryotrichum piluliferum</i> Saccardo & Marchal	+		+	+	+				+	
<i>Candida saitoana</i> Nakase & Suzuki	+									
<i>Cephalosporium curtipetes</i> Saccardo			+							
<i>Chaetomidium fimeti</i> (Fuckel) Saccardo			+							
<i>Chaetomium cochlioides</i> Palliser			+							
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze : Fries	+	+	+		+		+		+	
<i>Chaetomium indicum</i> Corda			+		+		+		+	
<i>Chaetomium nozdrenkoae</i> Sergejeva				+						
<i>Chaetomium seminudum</i> Ames	+									
<i>Chaetomium spirale</i> Zopf	+									
<i>Chrysosilia sitophila</i> (Montagne) Arx			+							
<i>Chrysosporium carmichaeli</i> Van Oorschot	+									
<i>Chrysosporium europae</i> Sigler et al.				+						
<i>Chrysosporium georgii</i> (Varsavsky & Ajello) Oorschot			+							
<i>Chrysosporium indicum</i> (Randhawa & Sandhu) Garg	+		+	+						
<i>Chrysosporium keratinophilum</i> (Frey) Carmichael	+		+	+						
<i>Chrysosporium kreiselii</i> Dominik				+						
<i>Chrysosporium lucknowense</i> Garg			+	+						
<i>Chrysosporium merdarium</i> (Link) Carmichael				+						
<i>Chrysosporium pannicola</i> (Corda) Van Oorschot & Stalpers	+		+	+						
<i>Chrysosporium queenslandicum</i> Apinis & Rees	+		+	+						
<i>Chrysosporium sulfureum</i> (Fiedler) Van Oorschot & Samson	+									
<i>Chrysosporium tropicum</i> Carmichael	+	+	+	+			+			
<i>Chrysosporium xerophilum</i> Pitt	+									
<i>Chrysosporium zonatum</i> Al-Musallam & Tan			+							
<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Aphanoascus clathratus</i> Cano & Guarro			+							
<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Aphanoascus reticulisporus</i> (Rutien) Hubálek			+							
<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>A. cuculi</i> Dawson			+	+						
<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>A. curreyi</i> Berkeley			+							
<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Pectinotrichum ilanense</i> Varsavsky & Orr			+	+						
<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Renispora flavissima</i> Sigler et al.			+							
<i>Chrysosporium</i> anamorph of <i>Nannizziopsis vriesii</i> (Apinis) Currah			+							
<i>Cladophialophora bantiana</i> (Saccardo) de Hoog et al.			+							
<i>Cladophialophora carrionii</i> (Trejos) de Hoog et al.			+							
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresenius) de Vries	+	+	+		+		+		+	
<i>Cladosporium graminum</i> Corda	+									
<i>Cladosporium herbarum</i> (Persoon) Link ex Grey	+		+							
<i>Clonostachys rosea</i> (Link: Fries) Schroers et al.	+		+	+						
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> Alcorn	+									
<i>Cochliobolus spicifer</i> Nelson	+									
<i>Corynascus sepedonium</i> (Emmons) von Arx			+							
<i>Ctenomyces mentagrophytes</i> (Robin) Langeron & Milochevitch	+									
<i>Ctenomyces persicolor</i> (Sabouraud) Nannizzi			+							
<i>Ctenomyces serratus</i> Eidam	+		+	+						
<i>Ctenomyces</i> sp.	+	+								
strain CBS 228.51										
strain 381 TDEL										
<i>Cunninghamella echinulata</i> (Thaxter) Thaxter ex Blakeslee			+							
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner			+	+	+		+		+	
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn			+		+		+		+	
<i>Curvularia ramosa</i> (Bainier) Boedijn			+		+				+	
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i> Wollenweber			+							
<i>Drechslera biseptata</i> (Saccardo & Roumeguère) Richardson & Fraser			+							
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuillemin	+		+							
<i>Emericella quadrilineata</i> (Thom & Raper) Benjamin	+		+							
<i>Emericella rugulosa</i> (Thom & Raper) Benjamin	+									
<i>Emmonsia parva</i> (Emmons & Ashburn) Ciferri & Montemartini	+									
<i>Engyodontium album</i> (Limber) de Hoog	+									
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	+		+							
<i>Epidermophyton floccosum</i> (Harz) Langeron & Milochevitch			+							
<i>Eurotium chevalieri</i> Mangin	+	+								
<i>Fennellia nivea</i> (Wiley & Simmons) Samson			+							
<i>Fusarium chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> Wollenweber et Reinking			+							
<i>Fusarium culmorum</i> (Smith) Saccardo	+			+						
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Saccardo				+						
<i>Fusarium heterosporum</i> Nees			+							
<i>Fusarium javanicum</i> Koorders		+								
<i>Fusarium lateritium</i> Nees			+							
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon		+	+							
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl			+	+			+		+	
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenweber			+							
<i>Fusarium roseum</i> Link			+							
<i>Fusarium solani</i> (Martius) Saccardo	+		+	+	+				+	
<i>Fusarium tricinctum</i> (Corda) Saccardo			+							

Rhizomucor pusillus (7 สับสเตรทสำหรับแต่ละสปีชีส์); *A. terreus*, *Chaetomium globosum*, *C. cladosporioides*, และ *S. brevicaulis* (6 สับสเตรทสำหรับแต่ละสปีชีส์); *Botryotrichum piluliferum*, *Chrysosporium tropicum*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *S. chartarum*, *T. ajelloi*, และ *Trichophyton terrestre* (5 สับสเตรทสำหรับแต่ละสปีชีส์) และ *Absidia corymbifera*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Chaetomium indicum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola grisea*, *Madurella grisea*,

ตาราง 2.7 (ต่อ)

Species name	Keratinous substrate ^a from which fungus was isolated and/or which it degraded									
	wool	textile	hair	feather	nail	hoof	horn	hedgehog spine	human plantar callus	
<i>Fusarium xyliarioides</i> Steyaert			+							
<i>Geomyces pannorum</i> var. <i>pannorum</i> (Link) Sigler & Carmichael			+	+				+		
<i>Geotrichum candidum</i> Link	+		+							
<i>Gliocladium catenulatum</i> Gilman & Abbott			+			+				
<i>Gliocladium nigrovirens</i> Beyma			+							
<i>Gliocladium solani</i> (Harting) Petch			+							
<i>Gliocladium viride</i> Matruchot			+							
<i>Gymnascella citrina</i> (Massee & Salmon) Orr et al.	+		+							
<i>Gymnascella marginispora</i> (Kuehn & Orr) Currah			+							
<i>Gymnoscoideus petalosporus</i> Orr et al.			+							
<i>Gymnosascus arxii</i> Cano & Guarro		+								
<i>Humicola fuscoatra</i> Traaen			+							
<i>Humicola grisea</i> Traaen			+	+	+					+
<i>Lecanicillium psalliotae</i> (Treschow) Zare & Gams			+							
<i>Madurella grisea</i> McKinnon et al.			+		+			+		+
<i>Madurella mycetomi</i> (Laveran) Brumpt					+			+		+
<i>Malbranchea arcuata</i> Sigler & Carmichael			+							
<i>Malbranchea aurantiaca</i> Sigler & Carmichael			+							
<i>Malbranchea chrysosporioides</i> Sigler & Carmichael	+		+							
<i>Malbranchea cinnamomea</i> (Libert) Van Oorschot & de Hoog			+							
<i>Malbranchea fulva</i> Sigler & Carmichael			+							
<i>Malbranchea anamorph</i> of <i>Uncinocarpus reesii</i> Sigler & Orr	+		+							
<i>Malbranchea</i> sp. (strain GPKC 535)			+							
<i>Memnoniella echinata</i> (Rivolta) Galloway			+					+		
<i>Metarhizium brunneum</i> Petch	+									
<i>Microascus cirrosus</i> Curzi		+								
<i>Microsporum audouinii</i> Gruby			+							
<i>Microsporum boullardii</i> Dominik & Majchrowicz			+							
<i>Microsporum canis</i> Bodin	+		+							
<i>Microsporum cookei</i> Ajello	+		+	+						
<i>Microsporum fulvum</i> Uniburu		+	+	+						
<i>Microsporum gallinae</i> (Megnin ex Guéguen) Grigorakis				+						
<i>Microsporum gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigorakis	+	+	+	+	+	+	+			
<i>Microsporum nanum</i> Fuentes et al.			+	+						
<i>Microsporum persicolor</i> (Sabouraud) Guiart & Grigorakis			+							
<i>Microsporum racemosum</i> Borelli			+							
<i>Microsporum ripariae</i> Hubálek & Rush-Munro			+	+						
<i>Monodictys castaneae</i> (Wallroth) Hughes	+									
<i>Monographella cucumerina</i> (Lindfors) Arx			+							
<i>Mortierella alpina</i> Peyronel			+							
<i>Mortierella mutabilis</i> Linnemann			+							
<i>Mucor circinelloides</i> van Tieghem	+		+							
<i>Mucor genevensis</i> Lendner			+							
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer			+	+						
<i>Mucor mucedo</i> Fresenius			+							
<i>Mucor piriformis</i> Fischer			+							
<i>Mucor plumbeus</i> Bonorden	+									
<i>Mucor racemosus</i> Fresenius	+		+							
<i>Mucor ramosissimus</i> Samoutsevitch				+						
<i>Mucor satuminus</i> Hagem			+							
<i>Mucor strictus</i> Hagem			+							
<i>Myceliophthora vellerea</i> (Saccardo & Spegazzini) Van Oorschot			+	+						
<i>Myceliophthora</i> sp. (strain BBT 41, CBS 116055)		+								
<i>Myrothecium verrucaria</i> (Albertini & Schweinitz) Ditmar	+		+							
<i>Nectria haematococca</i> Berkeley & Broome	+		+							
<i>Nectria ventricosa</i> Booth			+							
<i>Neosartorya fischeri</i> (Wehmer) Malloch & Cain		+	+							
<i>Oidiodendron griseum</i> Robak			+							
<i>Onygena corvina</i> Albertini & Schweinitz	+									
<i>Onygena piligena</i> Fries	+									
<i>Paecilomyces carneus</i> (Duché & Heim) Brown & Smith			+							
<i>Paecilomyces farinosus</i> (Holmskjöld) Brown & Smith			+							
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	+		+	+						
<i>Paecilomyces marquandii</i> (Massee) Hughes			+							
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier		+	+							
<i>Papulaspora sepedonioides</i> Preuss			+							
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx			+							
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx			+							
<i>Penicillium canescens</i> Sopp		+	+							
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	+	+	+	+	+		+		+	
<i>Penicillium citrinum</i> Thom			+	+	+		+		+	
<i>Penicillium cycloptum</i> Westling		+								
<i>Penicillium daleae</i> Zaleski			+							

Continued on next page

(continued on next page)

Trichoderma viride, *Trichophyton mentagrophytes*, และ *Trichophyton rubrum* (4

สับสเตรทสำหรับแต่ละสปีชีส์) และในบรรดาสปีชีส์ที่เหลือ 19 ชนิดเชื้อราพบโคโลไนซ์ 3 สับสเตรทที่แตกต่างกัน 63 เชื้อรา 2 สับสเตรท 188 ชนิดโคโลไนซ์เพียง 1 สับสเตรทเคราตินเนสเท่านั้น (ตาราง 2.7)

ตาราง 2.7 (ต่อ)

Species name	Keratinous substrate ^a from which fungus was isolated and/or which it degraded									
	wool	textile	hair	feather	nail	hoof	horn	hedgehog spine	human plantar callus	
<i>Penicillium expansum</i> Link	+		+							
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	+		+							
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling		+	+							
<i>Penicillium glandicola</i> (Oudemans) Seifert & Samson		+	+							
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx			+							
<i>Penicillium herquei</i> Bainier & Sartory			+							
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp			+							
<i>Penicillium italicum</i> Wehmer			+							
<i>Penicillium janczewskii</i> Zaleski			+							
<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge			+							
<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom	+		+							
<i>Penicillium paxilli</i> Bainier		+								
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll			+							
<i>Penicillium rubrum</i> Stoll			+							
<i>Penicillium rugulosum</i> Thom			+							
<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudemans) Thom		+	+							
<i>Penicillium soppi</i> Zaleski		+								
<i>Penicillium spinulosum</i> Thom		+								
<i>Penicillium thomii</i> Maire			+							
<i>Penicillium variabile</i> Sopp			+							
<i>Penicillium verruculosum</i> Peyronel	+									
<i>Penicillium vulpinum</i> (Cooke & Massee) Seifert & Samson			+							
<i>Pestalotia bicolor</i> Ellis & Everhart	+									
<i>Phialophora cyclaminis</i> Beyma			+							
<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenweber & Hochapfel	+		+							
<i>Phoma humicola</i> Gilman & Abbott			+							
<i>Pithomyces sacchari</i> (Spegazzini) Ellis			+							
<i>Pleospora herbarum</i> (Fries) Rabenhorst	+									
<i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis et al.	+		+							
<i>Pythium oligandrum</i> Drechsler				+						
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper	+		+	+	+	+	+			
<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prinsen Geerligs			+							
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg) Lind	+		+							
<i>Rutola graminis</i> (Desmazières) Crane & Schoknecht			+							
<i>Scopulariopsis acremonium</i> (Delacroix) Vuillemin			+							
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Saccardo) Bainier	+	+	+	+		+		+		
<i>Scopulariopsis brumptii</i> Salvanet-Duval		+	+							
<i>Scopulariopsis candida</i> (Guéguen) Vuillemin	+		+							
<i>Scopulariopsis koningii</i> (Oudemans) Vuillemin			+							
<i>Sepedonium chrysospermum</i> (Bulliard) Fries			+							
<i>Setosphaeria rostrata</i> Leonard	+									
<i>Sordaria finicola</i> (Roberge) Cesati & de Notaris	+									
<i>Sporothrix schenckii</i> Hektoen & Perkins			+							
<i>Sporotrichum pruinosum</i> Gilman & Abbott				+						
<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenberg) Hughes	+	+	+		+				+	
<i>Staphylotrichum coccosporum</i> Meyer & Nicot			+							
<i>Stemphylium macrosporoideum</i> (Berkeley & Broome) Saccardo		+								
<i>Stilbella fimetaria</i> (Persoon) Lindau					+		+		+	
<i>Stilbella</i> sp. (strain QM 833)	+									
<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex Schroeter			+							
<i>Talaromyces luteus</i> (Zukal) Benjamin			+							
<i>Talaromyces trachyspermus</i> (Shear) Stolk & Samson			+							
<i>Thamnidium elegans</i> Link	+									
<i>Thermoascus aurantiacus</i> Miehe	+		+							
<i>Torula herbarum</i> (Persoon) Link	+		+							
<i>Trichoderma virens</i> (Miller et al.) von Arx				+						
<i>Trichoderma viride</i> Persoon: Fries	+		+	+				+		
<i>Trichophyton ajelloi</i> (Vanbreuseghem) Ajello	+		+	+	+			+		
<i>Trichophyton equinum</i> (Matruchot & Dassonville) Gedoelst			+							
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> (Priestley) Georg	+		+							
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanchard	+		+		+			+		
<i>Trichophyton rubrum</i> (Castellani) Sabouraud	+		+		+			+		
<i>Trichophyton schoenleinii</i> (Lebert) Langeron & Milochевич			+							
<i>Trichophyton terrestre</i> Durie & Frey	+		+	+	+			+		
<i>Trichophyton tonsurans</i> Malmsten			+							
<i>Trichophyton vanbreuseghemii</i> Rioux et al.			+							
<i>Trichophyton verrucosum</i> Bodin			+							
<i>Trichophyton violaceum</i> Sabouraud			+							
<i>Trichosporiella cerebriiformis</i> (de Vries & Kleine-Natrop) Gams			+							
<i>Trichothecium roseum</i> (Persoon: Fries) Link	+		+							
<i>Ulocladium alternariae</i> (Cooke) Simmons	+									
<i>Ulocladium atrum</i> Preuss	+									
<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss			+							
<i>Ulocladium chartarum</i> (Preuss) Simmons			+							
<i>Ulocladium consortiale</i> (Thümen) Simmons			+							
<i>Ulocladium tuberculatum</i> Simmons	+									
<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold			+					+		
<i>Verticillium chlamydosporium</i> Goddard			+	+						
<i>Verticillium lecanii</i> (Zimmermann) Viégas			+							
<i>Verticillium luteoalbum</i> (Link) Subramanian	+		+							
<i>Verticillium nigrescens</i> Pethybridge			+							
<i>Verticillium nubilum</i> Pethybridge			+							
<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuillemin				+						
Number of species	108	44	225	58	23	6	4	23	19	

หมายเหตุ (^a) สับสเตรทที่ระบุในตารางเป็นสับสเตรทที่ฟังไจสามารถย่อยสลายได้อย่างน้อย 3 เท่า (^b) ตัวหนาเป็นฟังไจที่มีปฏิกิริยาทรงประสิทธิภาพที่สุดในการย่อยสลายสับสเตรทที่เกี่ยวข้อง

2.10 เคราตินเนสในกระบวนการเกิดโรค

ในบรรดา 299 สายพันธุ์ของเชื้อราที่ได้กล่าวถึงในตาราง มีถึง 107 สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ กล่าวคือประมาณ 36% ของจำนวนทั้งหมด ในจำนวนส่วนใหญ่ 31 สปีชีส์เป็นกลุ่ม Onygenales และอีก 30 ที่เหลือเป็น Eurotiales ในบรรดา 299 สปีชีส์ที่กล่าวมา มี 298 ที่จัดอยู่ในระดับความปลอดภัยทางชีวภาพ (bio-safety levels; BSL) ดังนั้น ทั้ง 1 และ 2 จึงจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่เป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์ อย่างไรก็ตาม บรรดาสปีชีส์ที่อยู่ในกลุ่ม 2 ได้แก่ กลุ่ม Dermatophytes ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Dermatomycoses ส่วนใน BSL คลาส 3 จะมีเพียง 1 สปีชีส์เท่านั้นที่อยู่ในความกังวลสูง นั่นคือ *Cladophialophora bantiana* (ตาราง 2.6) เชื้อนี้เคยถูกคัดแยกได้จากขนสัตว์ และเป็นเชื้อโรคทางประสาท (neurotropic pathogen) ที่มักจะก่อให้เกิดโรค phaeohyphomycosis ในสมองมนุษย์อย่างร้ายแรง เชื้อโรคนี้ ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม BSL 3 อาจมีความสามารถในการก่อให้เกิด systemic mycoses ชนิดเฉียบพลันและในเนื้อเยื่อลึกของคนแข็งแรง (Baran, 1998; De Hoog & Guarro, 1995)

โดยสรุปแล้ว การสลายตัวของซีสเตรทเคราตินเป็นผล keratinous พื้นผิวจากกระบวนการทางกลและทางชีวเคมี ซึ่งเกิดจากเชื้อรากลุ่มจำเพาะ โดยสายพันธุ์เคราติโนไลติกนี้จะพบได้ไม่เพียงแต่ในหมู่ Onygenales เท่านั้น แต่จะยังพบอยู่ในกลุ่มอื่น ๆ รวมทั้ง Mucorales อีกด้วย อัตราและระดับของการเสื่อมสลายของวัสดุจะขึ้นอยู่กับชนิดของซีสเตรทและความเข้มข้นของซีสติน ดังนั้นเส้นผมหรือขนของมนุษย์, สุนัข, ม้าและแมวจะสลายตัวช้ากว่า ขนของหนูหรือขนแกะหรือหนัง กล่าวคือ ระดับความต้านทานของเล็บและเขาจะต่ำกว่ามาก ๆ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเก็บตัวอย่างดิน

แหล่งตัวอย่างดินที่มาทำการคัดแยกแบคทีเรียและฟังไจผลิตเคราตินเนสเป็นบริเวณทิ้งขยะชนไก่จาก 3 แหล่งในจังหวัดยะลาและนราธิวาส คือ บริเวณทิ้งชนไก่หลังโรงพยาบาลนิตยยะหาเก่า เขตเทศบาลตำบลยะหา อำเภอยะหา จังหวัดยะลา และพื้นที่หมู่บ้านกูแบบูโรงและหมู่บ้านมลายูบางกอก อ.เมือง จ.ยะลา และอีก 3 แหล่งของจังหวัดนราธิวาส จากหมู่บ้านบาโงอาแซ หมู่บ้านบาโงระนะ และหมู่บ้านตะโหนด อำเภอยี่งอ ในแต่ละแห่ง ตัวอย่างดินถูกสุ่มเก็บ 3 จุด ในปริมาณจุดละ 3 กก โดยแต่ละจุดมีระยะห่างกัน 1 เมตรเป็นอย่างต่ำ ที่ระดับความลึก 5 ซม จากผิวน้ำดิน ดินเก็บถูกบรรจุลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 12×20 นิ้ว และใส่ในกล่องโฟมที่มีฝาปิดขนาดเล็ก ตัวอย่างเหล่านี้ถูกลำเลียงด้วยยานพาหนะ และทำการคัดแยกเชื้อราและแบคทีเรียทันทีเมื่อถึงห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

3.2 การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยชนไก่

ในขั้นตอนของวิธีการ Enrichment Enrichment: 1gm ตัวอย่างดินที่เก็บจากกองของเสียชนไก่จะถูกเจือจางต่อเนื่องเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น ตัวอย่างเจือจางที่เหมาะสมจะถูกนำลงเลี้ยงใน Basal feather broth (BFB) ซึ่งมีส่วนผสมของชนที่ถูกล้าง อบให้แห้งในตู้อบ (Mettler, Germany) และบดละเอียดด้วยเครื่องบด (SHARP, Malaysia) อาหารเลี้ยงนี้จะทำการสเตอริไลซ์ก่อนในเครื่อง autoclave (DAIHAN Scientific, Korea) และถูกเก็บในลักษณะเป็นผลแห้งสเตอริไลซ์ เพื่อจะได้เอาออกมาใช้ตลอดการทดลองที่ใช้ชนไก่บดนี้ ฟลาस्क BFB-ตัวอย่างดินนี้จะถูกบ่มที่ 37°C ในภาวะเขย่าต่อเนื่องที่ 120 rpm เป็นเวลา 24-48 ชม. หรือจนกว่าจะเห็นความขุ่นของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นจะทำการ sub-culture ในอาหารใหม่ชนิดเดียวกัน อย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียหรือราย่อยชนไก่มีโอกาสเพิ่มจำนวนมากและมากยิ่งขึ้น (Shih and Michael, 1992) ก่อนทำการคัดแยกโดยใช้อาหารจำเพาะสำหรับเชื้อราหรือแบคทีเรียต่อไป

3.2.1 การคัดแยกเชื้อราผลิตเอนไซม์เคราตินเนส

สำหรับการคัดแยกเชื้อราผลิตเอนไซม์เคราตินเนส ปฏิบัติตามวิธีการของ (Wawrzkiwicz et al., 1991) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังนี้ คัลเจอร์จาก BFB-ตัวอย่างดินจะถูกนำมาตรวจสอบและคัดเลือกเชื้อราบนอาหาร keratin (1%) agar plate ที่ประกอบด้วย (g/l) agar: 15, MgSO₄·H₂O: 0.5, KH₂PO₄: 0.1, FeSO₄·7H₂O: 0.01, ZnSO₄·7H₂O: 0.005 และชนไก่ผงสเตอริไลซ์ 1% pH 7.5 โดยวิธี Spread plate หลังจากนั้นจะถูกนำไปบ่ม (WTB binder, German) ที่ 37°C เพื่อตรวจสอบผลภายใน 5 วัน โคโลนีที่ล้อมรอบด้วยโซนใส (clear zone) จะถูกคัดเลือกและคัดแยกเพื่อให้บริสุทธิ์โดยวิธี hyphal tip isolation ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เคราตินเนส

ส่วนการคัดแยกแบคทีเรียนั้น Enriched culture ถูกนำคัดแยกแบคทีเรียย่อยชนไก่โดยใช้อาหาร 3 สูตรดังนี้คือ Horikoshi media, Feather meal media-I, และ Feather meal media-II และทำการบ่มเชื้อที่ 37°C บนเครื่อง Shaker (Wishshake, English) ที่อัตราเร็ว 160 rpm นาน 7 วัน โดยทุก ๆ 24 ชม. คัลเจอร์นี้จะถูกดูดออกมาเพื่อทำการ Spread plate และ Streak plate บนอาหาร

Feather meal agar (Gordon Ruth, 1973) หลังจากบ่มในตู้บ่ม (WTB binder, German) ที่ 37°C โคโลนีจะถูกตรวจสอบผลภายใน 4 วัน และโคโลนีที่ล้อมรอบด้วยโซนใสกว้างที่สุดจะถูกคัดเลือกและคัดแยกเพื่อให้บริสุทธิ์ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ในการคัดแยกเชื้อบนจานอาหาร Skim milk agar อาหาร Skim milk agar จะถูกเตรียมขึ้นมาและใช้คัดแยกโคโลนีเชื้อที่มีกิจกรรม caseinolytic หลังทำการ streak บนจานอาหาร Skim milk agar แล้ว เชื้อแบคทีเรียจะถูกบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สายพันธุ์ที่สร้างโซนใส (Clear zones) รอบ ๆ โคโลนีจะถูกคัดออกมาเป็นเชื้อผลิตโปรติเอส (Zerdani *et al.*, 2004) และทำ stock เชื้อไว้ใช้ในโอกาสต่อไป

3.3 วิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

3.3.1 วิธีการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

Hyphal tip isolation (ยอดชาย, 2544) มีวิธีการทำโดยสรุปดังนี้ ส่วน Hyphal tip จะถูกตัดที่บริเวณขอบโคโลนี ประมาณ 1 มม. โดยใช้เข็มเย็บเชื้อราที่ทนไฟฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจะถูกนำไปวางเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (Himedia, India) โดยจะวางที่บริเวณกึ่งกลาง และนำไปบ่มที่ 37°C นาน 3-4 วัน เมื่อครบกำหนด โคโลนีของเชื้อราจะถูกเชื้อลงบนอาหาร PDA slant เพื่อทำเป็น stock culture และจะถูกเก็บรักษาไว้ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.1 วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

ในการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ จะใช้วิธีการ Streak plate ทั่ว ๆ ไป และใช้อาหาร Nutrient agar (NA; Himedia, India) และทำดังนี้ โคโลนีที่ล้อมรอบด้วยโซนใสที่กว้างที่สุดบนอาหาร Feather meal agar จะถูกคัดและใช้เข็มเย็บเชื้อสเตอไรซ์แต่ละเล็กน้อย แล้วทำการ Streak บนอาหาร NA และบ่มที่ 37°C นาน 48 ชม. จากนั้น Uniformed colonies บนจานเพาะจะถูกคัด และย้อมสีแกรมยืนยันความบริสุทธิ์ ก่อนจะนำมาทำ Stock เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.4 การพิสูจน์เชื้อ

3.4.1 การพิสูจน์เชื้อรา

ในการพิสูจน์เชื้อราจะปฏิบัติตามวิธีการของ (เลขาและคณะ, 2548) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ดังนี้ เชื้อราจาก stock ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะถูกบ่มที่ 37°C นาน 4 วัน ทำการพิสูจน์เชื้อโดยอาศัยการเทียบเคียงลักษณะทาง Macroscopic และ Microscopic morphology ที่ได้จากการสังเกตสไลด์ ซึ่งเตรียมขึ้นอาศัยเทคนิค Wet mount และ Slide culture ได้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา โดยใช้ Simplified fungi identification key ของ Jean Williams-Woodward และใช้ Dichotomous keys ออนไลน์ของ Mould Laboratory, University of Toronto, Canada ที่ <http://labs.csb.utoronto.ca/moncalvo/malloch/Moulds/Moulds.html> หรือใช้ Mould: Isolation, cultivation and identification ออนไลน์ของ New Brunswick Museum, Canada ที่ <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Moulds.html>

3.4.2 การพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย

การพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียสำหรับงานวิจัยนี้อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ตามที่อธิบายใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (2009) โดยใช้วิธีการขั้นพื้นฐานและเบื้องต้น ดังนี้ เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และอยู่ใน Stock จะถูก Refresh ในอาหารเหลว NB และบ่มที่ 37°C นาน 24 ชม จากนั้น เชื้อจะถูกนำมา Streak บน NA เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ และนำไปย้อมสีแกรมเพื่อทดสอบแกรมและการจัดเรียงตัว รวมทั้งสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ขั้นต่อไปจะทดสอบการสร้างเอนโดสปอร์โดยใช้อาหาร Pre-sporulation broth (potassium acetate, 20g/L; yeast extract, 8g/L; peptone, 3g/L) และ Sporulation agar (potassium acetate, 20g/L; yeast extract, 1g/L; agar, 17g/L) การทดสอบทางชีวเคมีที่จัดตรวจสอบในครั้งนี้ได้แก่ Indole, Methyl Red-Voges Proskauer, Citrate utilization, Catalase, Oxidase, Urease, Nitrate reduction, Gelatin liquefaction, Starch hydrolysis, Hydrogen sulphide, Glucose, Sucrose, และ Lactose

3.5 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนส

3.5.1. การเตรียมเชื้อราเริ่มต้น

การเตรียมเชื้อราเริ่มต้นปฏิบัติตามวิธีของ (Saber & Hersh, 2010) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังนี้ เชื้อจาก stock ถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร PDA ที่ 37°C เมื่อครบ 4 วัน สปอร์จะถูกเก็บเกี่ยวโดยวิธีการเติมน้ำกลั่นสเตอริไลซ์ 3 ml ลงไปในจานเพาะเลี้ยง พร้อมกับใช้ loop ที่ผ่านการลนไฟแล้ว เชี่ยสปอร์เบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออกจากอาหาร สปอร์ที่หลุดทั้งหมดจะถูกดูดเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นของการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสในอาหาร Feather meal media I รวมทั้งการผลิตเอนไซม์ในขั้นต่อไป

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นปฏิบัติตามวิธีของ Saber และ Hersh (2010) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังนี้ เชื้อแบคทีเรียจากอาหารเอียง NA จะถูก refresh ด้วยการการเพาะเลี้ยงในอาหาร NA เมื่อครบ 48 ชั่วโมง โคโลนีจะถูกเก็บเกี่ยวโดยวิธีการเติมน้ำกลั่นสเตอริไลซ์ 3 ml ลงไปในจานเพาะเลี้ยง พร้อมกับใช้ loop ที่ผ่านการลนไฟแล้ว เชี่ยโคโลนีเบาๆ เพื่อให้หลุดออกจากอาหาร โคโลนีที่หลุดทั้งหมดจะถูกดูดด้วยปิเปตสเตอริไลซ์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นของการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสในอาหาร Feather meal media I รวมทั้งการผลิตเอนไซม์ในขั้นต่อไป

3.5.2. การตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อผู้ผลิตเอนไซม์เคราติเนส

อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อผู้ผลิตเอนไซม์เคราติเนสจะปฏิบัติตามวิธีการของ (Wawrzekiewicz at al., 1991) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังนี้ สปอร์แขวนลอยจากเชื้อราเริ่มต้น 3 ml จะถูกดูดด้วยปิเปตใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 ml ซึ่งบรรจุอาหารเหลว Feather meal broth (g/l ของ $MgSO_4 \cdot H_2O$: 0.5, KH_2PO_4 : 0.1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.01, และ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.005 รวมทั้งชนไก่ผง 1%, pH 7.5 ปริมาณ 50 ml ฟลาสก์จะนำไปบ่มที่ $37^\circ C$ บนเครื่องเขย่าที่ 120 rpm นาน 7 วัน ทุก ๆ วัน คัลเจอร์จากฟลาสก์นี้จะถูกดูดด้วยปิเปตไม่โครเป็นระยะ ๆ เพื่อนำออกไปศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยการนับจำนวนโคโลนีบนอาหาร PDA และวัดค่าความขุ่นที่ 600 nm ด้วยเครื่องวัดความขุ่น UV-VIS spectrophotometer (LIBRA S32, England) พร้อมทั้งวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนสและประมาณความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในขั้นต่อไป

สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จะปฏิบัติตามวิธีการของ Wawrzekiewicz และคณะ (1991) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังนี้ แบคทีเรียแขวนลอยจากเชื้อเริ่มต้นจะถูกดูดด้วยปิเปตไม่โครปริมาณ 3ml ใส่ลงไปในฟลาสก์ขนาด 250 ml ที่บรรจุอาหาร Feather meal broth ปริมาณ 100 ml จากนั้น จะนำไปบ่มที่ $37^\circ C$ บนเครื่องเขย่าที่ 160 rpm นาน 4 วัน ตัวอย่างจะถูกดูดออกด้วยปิเปตไม่โคร เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์และประมาณโปรตีนทั้งหมด รวมถึงกำหนดอัตราการเจริญเติบโต โดยวิธีการนับโคโลนี สำหรับหา Viable count และวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600nm เพื่อหา Total count เป็นระยะ ๆ

ในการตรวจหา Viable count จะใช้วิธีการนับจำนวนโคโลนีตามวิธีการของ (King at al., 1979) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ทุก ๆ ระยะที่กำหนด คัลเจอร์เชื้อราในฟลาสก์ขนาด 250 ml จะถูกดูดออกมาด้วยไมโครปิเปตปริมาณ 1 ml จากนั้น จะทำการเจือจาง 10 เท่าต่อเนื่อง และ 0.1 ml ของคัลเจอร์ที่ความเจือจางที่เหมาะสม จะถูกนำลงใส่ลงบนอาหาร PDA ที่มีส่วนผสม 1% ของ Apsa 80 (Amway, Thailand) ทำการกวาดให้ทั่วด้วยแก้วกวาดสเตอริไลซ์ หลังจากการบ่มที่ $37^\circ C$ นาน 3 วัน โคโลนีทั้งหมดบนจานเพาะเลี้ยงจะถูกนับ และทำการคำนวณหาโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 ml เป็นค่าของ Viable count ที่ต้องการศึกษา วิธีการนี้ทำขึ้น 2 ซ้ำ ค่า Viable count จึงเป็นค่าเฉลี่ย

สำหรับการตรวจหา Viable count ของเชื้อแบคทีเรีย คัลเจอร์จะถูกดูดด้วยปิเปตไม่โครเป็นระยะ ๆ ที่กำหนดในปริมาณ 1 ml ทำการเจือจาง 10 เท่าต่อเนื่อง และเลือกคัลเจอร์เจือจางที่เหมาะสมเพื่อทำการดูด 0.1 ml ออกมาด้วยปิเปตไม่โครและนำไปใส่ลงบนอาหาร NA จากนั้น จะทำการกวาดด้วยแก้วกวาดให้ทั่วพื้นอาหารในจาน นำไปบ่มที่ $37^\circ C$ ในตู้บ่ม เมื่อครบกำหนด 24 ชั่วโมง โคโลนีที่ปรากฏจะถูกตรวจนับเป็นค่า Viable count ต่อ 1 ml

ในหาค่า Total count ของคัลเจอร์ ความขุ่นของคัลเจอร์จะถูกตรวจวัดตามวิธีการของ (Abrusci at al., 2005) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังนี้ คัลเจอร์แบคทีเรีย และคัลเจอร์ราจะถูกดูดออกมา 1.5 ml ใส่ลงไปใน Disposable cuvette และจากนั้น จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยใช้เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer และใช้อาหาร Feather meal broth สเตอริไลซ์ปราศจากคัลเจอร์ราหรือแบคทีเรียเป็นตัวปรับค่าหรือ Blank

3.5.3 รูปแบบการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสของเชื้อราและแบคทีเรียผู้ผลิต

ในการศึกษารูปแบบการผลิตเอนไซม์ ค่าที่จะต้องตรวจหาคือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนสและค่าประมาณของโปรตีนทั้งหมด ซึ่งได้ดำเนินการตามวิธีการของ (Yu et al., 1968) พร้อมปรับเปลี่ยนเล็กน้อย ดังนี้ คัสเจอร์เชื้อราและแบคทีเรีย ปริมาณ 10 ml จะดูดด้วยปิเปตไมโครออกมาจากคัสเจอร์อาหาร Feather meal broth ในฟลาสก์เดียวกันกับที่ใช้วัดอัตราการเจริญเติบโต จากนั้น จะทำการกรองด้วยเยื่อกรอง เพื่อให้ได้ส่วนใส (Supernatant) โดยใช้เยื่อกรอง Nitrocellulose ที่มีขนาดรูผ่าน (Pore size) 0.45 ไมครอน ส่วนใสที่ได้จะนำไปตรวจหากิจกรรมเอนไซม์เคราตินเนสและประมาณค่าโปรตีนทั้งหมด

ในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 ml ซึ่งบรรจุขุ่นไก่ 0.002 g ละลายใน Phosphate buffer, pH 7.8 ปริมาตร 3.8 ml จะถูกผสมด้วยส่วนใส 3.0 ml จากนั้นจะนำไปบ่มที่ 37°C เพื่อเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย (Hydrolysis) ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อถึงกำหนดเวลา ปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวจะถูกระงับในทันทีด้วยวิธีการแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที หลังจากนั้น สารละลายจะถูกนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4 ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 ml ส่วนใสที่ได้จะนำไปตรวจวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยอ่านค่าที่ความยาวคลื่น 280 nm ใช้เครื่อง UV-VIS spectrophotometer และใช้ส่วนใสที่ไม่ผ่านปฏิกิริยาการย่อยสลายเป็นปรับค่า (Blank) ณ ที่นี้ กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับค่าการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ที่เกิดขึ้นโดยการกระทำของเอนไซม์ (ส่วนใส) 0.01 ในเวลา 1 ชั่วโมง

ในการประมาณค่าโปรตีนทั้งหมดของส่วนใส เทคนิคการประมาณค่าโปรตีนทั้งหมดของ Bradford (1976) จะถูกใช้ โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA; Bio-Rad, USA) เป็นมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

4.1. การคัดแยกเชื้อราและแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เคราตินเนส

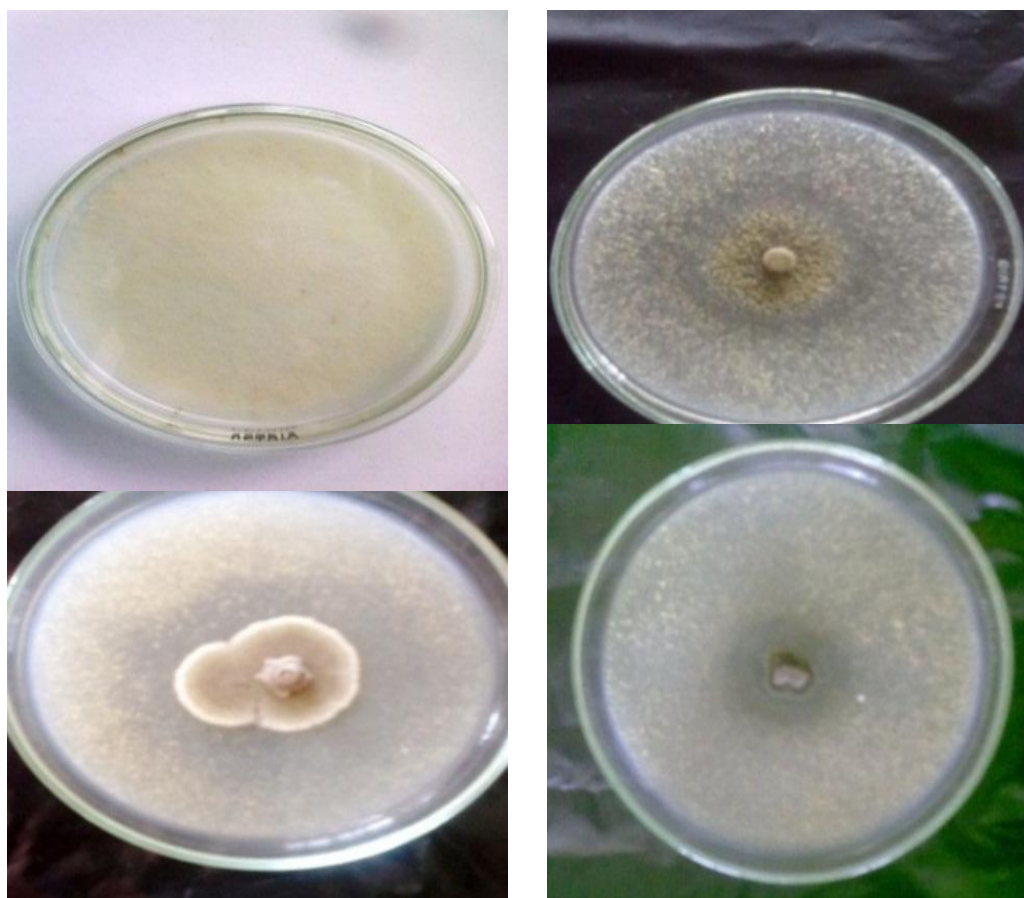
ผลการศึกษาการคัดแยกเชื้อราและแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนส จากบริเวณดินที่มีการทับถมของขนไก่เหลือทิ้งอยู่ในพื้นที่จังหวัดนราธิวาส (สำหรับคัดแยกรา) จำนวน 3 แหล่งและจังหวัดยะลา (สำหรับคัดแยกแบคทีเรีย) จำนวน 6 แหล่ง โดยใช้วิธีการ spread plate และ Streak plate ลงบนอาหาร keratin (1%) agar plate และบ่มที่ 37°C นาน 5 วันและ 4 วันตามลำดับ ปรากฏว่าพบเชื้อราจำนวน 138 โคโลนี ซึ่งในจำนวนนี้พบ 53 โคโลนี 3 ไอเลตที่ล้อมรอบด้วยเคลียร์โซน คิดเป็นร้อยละ 38.41 ของจำนวนเชื้อราทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร Feather meal agar ดังตาราง 4.1 ประกอบด้วย KF1, KF2 และ KF3 ดังรูป 4.1 และพบแบคทีเรียที่สร้างโซนใสชัดเจนที่สุดในทุกงานที่ทดสอบ เพียง 4 สายพันธุ์ คือ BK1, BK2, BK3, และ BK4 ในจำนวนสายพันธุ์ที่ไม่แสดงการย่อยสลายเคราตินเนสจำนวนมาก และเป็นโคโลนีขนาดเล็กไม่สามารถแยกแยะและนับโคโลนีได้สะดวกและมั่นใจ ดังรูป 4.2 และ 4.3

ปัจจุบัน งานวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เคราตินเนสกระทำอย่างกว้างขวางในพื้นที่ที่แตกต่างกันทั่วโลก รายงานในวรรณกรรมแสดงให้เห็นว่ามีจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนส โดยอาจเป็นเชื้อรา แบคทีเรียและแอคติโนมัย และแสดงความสามารถย่อยสลายโปรตีนเคราตินที่มีอยู่ในผิวหนัง, ขน, ขน, เขาและกีบสัตว์ (Kumar et al., 2012) ส่วนเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ค้นพบในงานวิจัยนี้ จึงเป็นเรื่องธรรมดา เพราะก่อนการคัดแยกได้ใช้วิธีคัดเลือกโดยเทคนิค Enrichment ก่อน Kumar และคณะ (2012) ในการศึกษาราเคราติโนไลติกพบสปีชีส์ *Absidia* ใน 26 ตัวอย่างจาก 80 ตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวม (28.9%) แต่ เชื้อ *Entomophthora coronata* พบน้อยที่สุดคือ 6 ตัวอย่าง (6.7%) เท่านั้น เปอร์เซ็นต์การค้นพบจึงขึ้นกับโอกาสและเทคนิคที่ใช้เพื่อคัดแยกล้วน ๆ (Kumar et al., 2012) อีกกรณีตัวอย่างหนึ่งก็คือ การคัดแยกเชื้อราในชนบทของเมือง Kerala ประเทศอินเดียโดย Mini และคณะ (2012) โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณฟาร์มสัตว์ปีก จำนวน 60 ตัวอย่าง ทำการเจือจางตัวอย่าง และนำลงเลี้ยงบนอาหาร Keratin Agar medium พบว่ามี 51 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งในจำนวนนี้พบเชื้อรา 8 ไอโซเลต (15.7%) ที่สร้างโซนใสชัดเจน คือ *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Penicillium sp.*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagrophytes*

แบคทีเรียที่แยกได้จากกองขยะสัตว์ปีกถูกแสดงให้เห็นว่า พร้อมย่อยขนเคราติน หากใช้ขนนกเป็นแหล่งของพลังงาน คาร์บอน ไนโตรเจนและกำมะถัน แบคทีเรียที่แยกได้จากสภาวะแวดล้อมแอน

ตาราง 4.1 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา KF1, KF2 และ KF3 ที่เจริญบนอาหาร keratin (1%) agar plate หลังการบ่มที่ 28 ° C นาน 5 วัน ตามสภาวะที่ได้กำหนดให้
ในวิธีการทดลอง

แหล่งเก็บตัวอย่าง	โคโลนีทั้งหมด (%)	จำนวนโคโลนีที่มีการสร้างโซนใส (%)			
		KF1	KF2	KF3	รวมราที่สร้างโซนใส (%)
หมู่บ้านบาโงระนะ	46 (33.34)	9 (19.57)	7 (15.22)	3 (6.52)	19 (41.30)
หมู่บ้านบาโงอาแซ	47 (34.06)	8 (17.02)	5 (10.64)	4 (8.50)	17 (36.17)
หมู่บ้านตะโหนด	45 (32.61)	8 (17.78)	6 (13.33)	3 (6.67)	17 (37.78)
รวม %	138 (100)	25 (18.12)	18 (13.04)	10 (7.25)	53 (38.41)



KF1

รูป 4.1. โคโลนีของเชื้อราที่ล้อมรอบด้วย clear zone ของ KF1, KF2 และ KF3

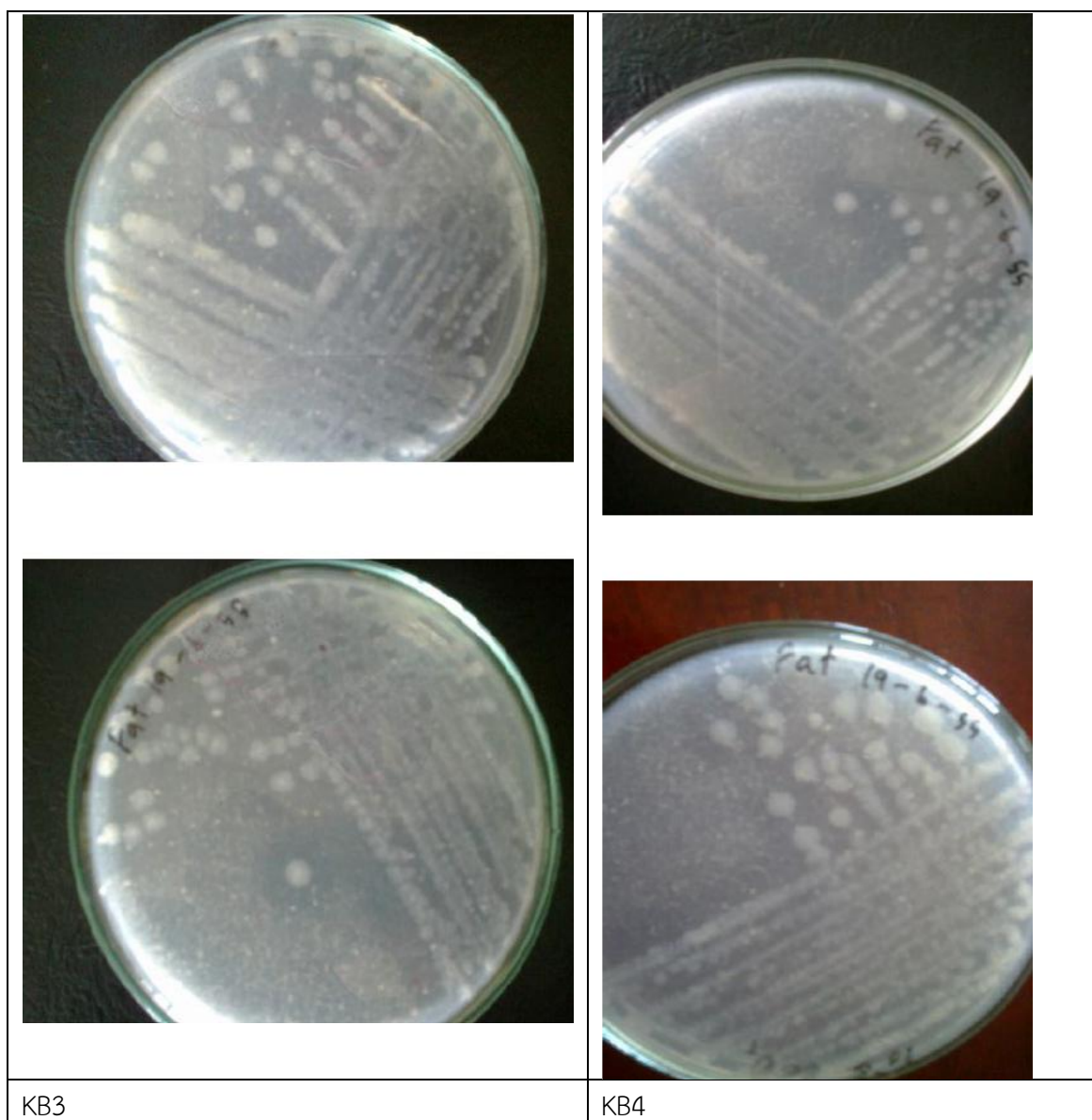


KB1



KB2

รูป 4.2 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ล้อมรอบด้วยโซนใสของ BK1 และ BK2



รูป 4.3 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ล้อมรอบด้วยโซนใสของ BK3 และ BK4

แอโรบิก ก็เห็นการเจริญเติบโตสูงสุดภายใต้สภาวะแอโรบิก อย่างที่เห็นในกรณีของสมาชิกใน Family Bacillaceae (Williams et al., 1990) คำอธิบายหนึ่งสำหรับการปรากฏตัวของสายพันธุ์นี้ในกองขยะสัตว์ปีกก็คือ แบคทีเรียเหล่านี้เชื้อประจำถิ่นในลำไส้ไก่ อย่างไรก็ตาม ความเป็นไปได้มากกว่านี้ ก็คือน่าจะเป็นเพราะสภาวะแวดล้อมที่ ๆ ซึ่งมูลสัตว์ปีกถูกเก็บรวบรวมนั้นเป็นสภาวะของจุลินทรีย์ด้วย ประกอบกับมีขนสัตว์อยู่มากมาย จึงทำให้การปรับตัวให้เข้ากับการใช้สับสเตรทนี้ทำง่าย รวดเร็วและทำได้มากขึ้น (Savitha et al. 2007) การแปรเปลี่ยนของเสียขนนกโดยจุลินทรีย์เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการย่อยสลายของขนและการใช้ประโยชน์ในฐานะเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ (Sangali & Brandelli, 2000; Riffel et al, 2003) จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายขนและเอนไซม์ keratinolytic สามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้ของเคราตินขนนก (Suntornsuk and Suntornsuk, 2003; Zerdani et al., 2004; Suntornsuk et al., 2005)

เชื้อแบคทีเรียถูกคัดแยกได้จากโรงงานแปรรูปสัตว์ปีก ซึ่งเป็นเจ้าของกิจกรรม keratinolytic และความสามารถในการย่อยสลายของเสียเคราติน แบคทีเรียเหล่านี้แสดงลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น การเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง กิจกรรมโปรตีนไฮโดรไลติกที่สูงที่สุดถูกตรวจพบระหว่าง 30°C และ 37°C ในขณะที่รายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้กล่าวถึงแบคทีเรีย keratinolytic ที่มีกิจกรรมย่อยสลายขนนกส่วนใหญ่ที่อุณหภูมิสูง (Atalo & Gashe, 1993; Friedrich & Antranikian, 1996; Mohamedin, 1999) แต่สายพันธุ์เหล่านี้มีพฤติกรรมคล้ายกับสายพันธุ์เชื้อ *Vibrio* KR2 แยกออกก่อนหน้านี้จากการย่อยสลายขน (Sangali & Brandelli, 24) กิจกรรมย่อยสลายเคราตินสูงสุดที่อุณหภูมิปานกลางควรจะเป็นลักษณะที่พึงประสงค์ เพราะจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสลายได้ด้วยพลังงานที่ลดลง

4.2. การตรวจพิสูจน์เชื้อ

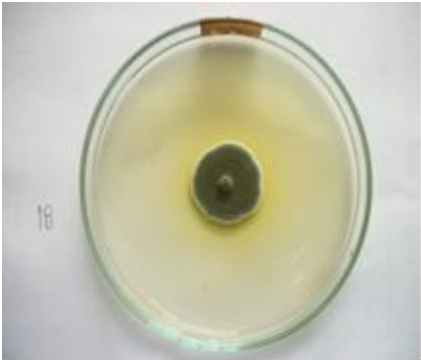
การพิสูจน์เชื้อราในครั้งนี้โดยเบื้องต้นใช้การเทียบเคียงกับ Dichotomous keys ออนไลน์ของ Mould Laboratory, University of Toronto, Canada และ Mould: Isolation, cultivation and identification ออนไลน์ของ New Brunswick Museum, Canada สามารถสรุปผลพิสูจน์และลักษณะของเชื้อราที่คัดแยกได้ว่า KF1, KF2, และ KF3 เป็น *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp., และ *Cladosporium* sp. ดังตาราง 4.2

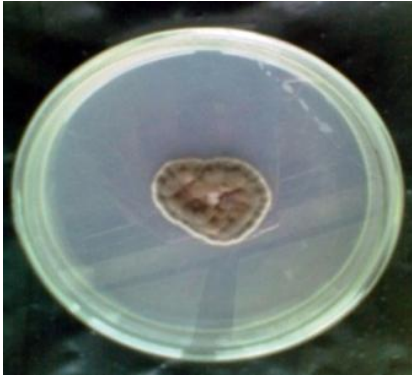
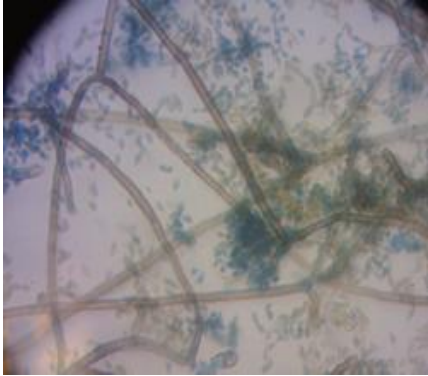
กล่าวโดยย่อ KF 1 ที่เป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ระยะแรกโคโลนีเป็นสีขาว ซึ่งเป็นสีของสายรา ต่อมาเมื่อมีการสร้างสปอร์โคโลนีจะมีสีเขียว ผิวโคโลนีคล้ายกำมะหยี่ไม่เรียบ ใต้โคโลนีมีสีขาวและเหลือง ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์สายราใส มีผนังกันก้านชูสปอร์หรือ conidiophore ยาว ผิวเรียบ ตั้งตรงมาจาก foot cell ปลายของก้านชูสปอร์พองออกเป็น vesicle มี phialide รูปร่างคล้ายแจกัน ตั้งอยู่โดยรอบแถวเดียวที่ปลาย phialide มี conidia รูปกลม เรียบ ต่อกันเป็นแถวยาวคล้ายโซ่เรียงโดยรอบ ส่วน KF 2 ที่เป็น *Penicillium* sp.

ตาราง 4.2 ลักษณะทาง Macroscopic และ Microscopic ของเชื้อราที่คัดแยกได้

เชื้อราที่คัดแยกได้	ลักษณะ	รูปเชื้อ	คำอธิบาย	ผลพิสูจน์เชื้อ
KF 1	Macroscopic morphology		ลักษณะโคโลนี ระยะแรกโคโลนีเป็นสีขาวซึ่งเป็นสีของสายรา ต่อมาเมื่อมีการสร้างสปอร์โคโลนีจะมีสีเขียวผิวโคโลนีคล้ายกำมะหยี่ไม่เรียบ ใต้โคโลนีมีสีขาวและเหลือง	<i>Aspergillus</i> sp.
	Microscopic morphology		สายราสีมีผนังกัน ก้านชูสปอร์หรือ conidiophore ยาวผิวเรียบ ตั้งตรงมาจาก foot cell ปลายของก้านชูสปอร์พองออกเป็น vesicle มี phialide รูปร่างคล้ายแจกันตั้งอยู่โดยรอบ แถวเดียวที่ปลาย phialide มี conidia รูปกลม เรียบ ต่อกันเป็นแถวยาว คล้ายโซ่เรียงโดยรอบ	

ตาราง 4.2 ลักษณะทาง Macroscopic และ Microscopic ของเชื้อราที่คัดแยกได้ (ต่อ)

เชื้อราที่คัดแยกได้	ลักษณะ	รูปเชื้อ	คำอธิบาย	ผลพิสูจน์เชื้อ
KF 2	Macroscopic morphology		เชื้อระยะแรกโคโลนีสีขาวแล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมฟ้า ขอบสีขาว ผิวโคโลนีคล้ายผงแบ่ง ได้โคโลนีสีขาวและเหลือง	<i>Penicillium</i> sp.
	Microscopic morphology		สายราสีมีผนังกัน ก้านชูสปอร์แตกแขนง บน metula มี phialide รูปร่างคล้ายแจกันรองรับ conidia ที่มีรูปร่างกลม ผนังเรียบเรียงต่อกันยาวคล้ายสายโซ่ ลักษณะโดยรวมคล้ายแปรงหรือไม้กวาด	

เชื้อราที่คัดแยกได้	ลักษณะ	รูปเชื้อ	คำอธิบาย	ผลพิสูจน์เชื้อ
KF 3	Macroscopic morphology		ผิวโคโลนีคล้ายกำมะหยี่สีเขียวน้ำตาลถึงดำโคโลนียกนูนเล็กน้อย และมีรอยหยักย่นใต้โคโลนีสีดำ	<i>Cladosporium</i> sp.
	Microscopic morphology		สายราสีเข้มมีผนังกัน ก้านชูสปอร์สีเข้ม แตกแขนงความยาวไม่แน่นอน สร้าง conidia เรียงต่อเป็นสายยาวตั้งแต่สองสายขึ้นไป ลักษณะคล้ายแขนงต้นไม้ conidia ผนังเรียบรูปร่างกลม รี หลุดออกจากกันง่าย	

พบว่า โคโลนีระยะแรกมีสีขาวแล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมฟ้า ขอบสีขาว ผิวโคโลนีคล้ายผงแป้ง ใต้โคโลนีสีขาวลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์สายราสีมีผนังกัน conidiophore แตกแขนงบน metula มี phialide รูปร่างคล้ายแจกันรองรับ conidia ที่มีรูปร่างกลม ผนังเรียบเรียงต่อกันยาวคล้ายสายโซ่ ลักษณะโดยรวมคล้ายแปรงหรือไม้กวาด และ KF 3 ที่เป็น *Cladosporium* sp. แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่ผิวโคโลนีคล้ายกำมะหยี่ สีเขียวน้ำตาลถึงดำ โคโลนียกลูกเล็กน้อยและมีรอยหยักยื่น ใต้โคโลนีสีดำ ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์สายราสีเข็ม มีผนังกันก้านชูสปอร์สีเข็ม แตกแขนงความยาวไม่แน่นอน สร้าง conidia เรียงต่อเป็นสายยาวตั้งแต่สองสายขึ้นไปลักษณะคล้ายแขนงต้นไม้ conidia ผนังเรียบ รูปร่างกลมรี

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 isolate ถูกทำการทดสอบเพื่อพิสูจน์เชื้อ ผลปรากฏว่า KB1, KB2, KB3, และ KB4 เป็น *Bacillus* sp. จึงจะเรียกหลังจากนี้ว่า เป็น *Bacillus* KB1, *Bacillus* KB2, *Bacillus* KB3 และ *Bacillus* KB4 โดยที่ 2 สายพันธุ์แรกจากอำเภอเมืองและกรงปิ้งตามลำดับ ส่วน 2 สายพันธุ์ที่เหลือเป็นสายพันธุ์จากอำเภอยะหา ผลการตรวจพิสูจน์มีสรุปไว้ในตาราง 4.3

รายงานเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งคัดแยกจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะ Mesophiles ผลิตเอนไซม์เคราตินเอสที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อยสลายขนไก่นั้น ไม่ใช่เรื่องใหม่ และมีรายงานจำนวนมาก Gaur และคณะ (2010) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรีย mesophilic 3 ชนิด ที่ผลิตเอนไซม์ Keratinolytic และในขนไก่และนกพิราบ ภายใน 120 ชั่วโมง จากตัวอย่างดินบริเวณ Gazipur poultry processing plant แต่เชื้อที่คัดแยกได้แตกต่างจากงานวิจัยในครั้งนี้ คือ ได้ *Pseudomonas thermaerum* GW1 นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับคลัสเตอร์ย่อยสลายขนนกถูก Enriched ด้วยเชื้อจาก digester ของเสียสัตว์ปีก และปรับตัวให้เติบโตในสารอาหารขนนกในฐานะเป็นแหล่งหลักของคาร์บอน กำมะถันและพลังงาน ต่อมาแบคทีเรียสัณฐานทรงกระบอก ย่อยสลายขนนก, สร้างเอนโดสปอร์, และเคลื่อนที่ได้ถูกแยกออกจากคลัสเตอร์ย่อยสลายขนนก ซึ่งก็คือ *Bacillus licheniformis* PWD-1 (Williams et al., 1990)

การแปลงของเสียขนนกโดยจุลินทรีย์เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการย่อยสลายขนและการใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ (Sangali & Brandelli, 2000. Riffel et al, 2003) จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายขนและมีเอนไซม์เคราติโนไลติกสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเคราตินขนนกได้ (Suntornsuk & Suntornsuk, 2003; Zerdani et al., 2004; Suntornsuk et al., 2005)

สปีชีส์ *Bacillus* จำนวนมากถูกรายงานว่าผลิตโปรตีนเอสเคราติเนส (Lin et al., 1992; Cheng et al., 1995; Lin et al., 1999; Manczinger et al., 2003; Suntornsuk & Suntornsuk, 2003; Zerdani et al., 2004; Suntornsuk et al., 2005). และสายพันธุ์ย่อยสลายเคราตินที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดไนจีนัส *Bacillus* ก็คือ *B. licheniformis*

ตาราง 4.3 สรุปผลการตรวจพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียผลิตเคราตินเนสที่คัดแยกจากอำเภอมือง กรงปินังและ
ยะหา จังหวัดยะลา

ลักษณะที่ตรวจสอบ		ผลตรวจสอบ			
		KB1	KB2	KB3	KB4
Cultural characters	Colony morphology	Large, round, irregular, mucoid, fast growing colonies			
Microscopic characters	Spore staining Gram staining Motility	Spore forming Gram positive rods Non motile			
Biochemical characters	Indole	Negative	Negative	Negative	Negative
	Methyl Red	Negative	Negative	Negative	Negative
	Voges Proskauer	Positive	Positive	Positive	Positive
	Citrate utilization	Negative	Negative	Positive	Positive
	Catalase	Positive	Positive	Positive	Positive
	Oxidase	Negative	Negative	Negative	Negative
	Urease	Negative	Negative	Negative	Negative
	Nitrate reduction	Positive	Positive	Positive	Positive
	Gelatin liquefaction	Positive	Positive	Positive	Positive
	Starch hydrolysis	Positive	Positive	Positive	Positive
	Hydrogen sulphide	Negative	Negative	Negative	Negative
	Glucose	Positive	Positive	Positive	Positive
	Sucrose	Positive	Positive	Positive	Positive
	Lactose	Negative	Negative	Negative	Negative
	Caseinase	Positive	Positive	Positive	Positive
	Cellulase	Negative	Negative	Negative	Negative
	Deaminase	Negative	Negative	Negative	Negative

จากงานศึกษาก่อนหน้านี้ *B. licheniformis* PWD-1 ย่อยสลายขนไก่พื้นเมืองได้อย่างสมบูรณ์เมื่อคัลเจอร์ที่ 50°C เป็นเวลา 10 วัน และมีการเจริญเติบโตที่เหมาะสมและการผลิตเคราตินเนสที่ 50°C (Williams et al. 1990, Lin et al. 1992, Cheng et al. 1995) เคราตินเนสจาก *B. licheniformis* PWD-1 แสดงกิจกรรมเคราติโนไลติกสูง ซึ่งจะได้ Optimum ที่ pH 7.5 และ 50°C-55°C อย่างไรก็ตาม การหลั่งเอนไซม์นี้จะถูกระงับโดยสิ้นเชิงจากการปรากฏตัวของกลูโคสและกิจกรรมเอนไซม์จะหายไปอย่างสิ้นเชิงที่อุณหภูมิสูง (สูงกว่า 65°C) โดยอาจเป็นผลมาจากการสลายตัวของเอนไซม์ คุณลักษณะเหล่านี้ทั้งหมดจะไม่เหมาะสมการนำเอนไซม์นี้ไปใช้เชิงพาณิชย์ สายพันธุ์ L-25 ของ *B. licheniformis* มีความสามารถในการย่อยขนไก่ได้อย่างมีประสิทธิภาพและผลิตกิจกรรมเคราตินเนสสูงที่สุด (11.1 UML⁻¹) ที่ 40°C-45°C เมื่อบ่มนาน 60 ชั่วโมง (Lin et al., 1999) แต่กิจกรรมเคราตินเนสของแบคทีเรียนี้ต่ำกว่าของ *Bacillus* เคราติโนไลติกโปรตีนเอสสายพันธุ์อื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด สายพันธุ์ใหม่ของ *B. licheniformis*, K-508 ถูกรายงานว่าย่อยขนไก่ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ pH 7.0 และ 47°C และ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 8.5 และ 52°C อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติเหล่านี้ยังไม่เหมาะสมกับการใช้งานจริงเชิงพาณิชย์มากไปกว่าของเคราติเนสโปรตีนเอสของ *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ เช่นกัน (Rozs, et al., 2001) แม้ว่า *B. licheniformis* FK14 ให้กิจกรรมเคราติโนไลติกที่ดีที่สุดที่ pH 8.5 และ 60°C เคราตินเนสของ FK14 แสดงความทนร้อนที่แย่มากที่ 50°C-60°C คือหลังจาก 60 นาที จะมีเพียง 40% ที่เหลืออยู่จากกิจกรรมเริ่มต้น (Suntornsuk et al. 2005) ผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า เคราตินเนสจากสายพันธุ์ก่อน ๆ จำนวนหนึ่งไม่เหมาะสำหรับการใช้งานเชิงพาณิชย์

การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรีย ที่ได้คัดแยกมา ชี้ชัดว่ากิจกรรมเคราติโนไลติกมีอยู่จริงในส่วนใหญ่ของคัลเจอร์ การแสดงการทำงานของเอนไซม์เคราตินเนสบนสับสเตรทเคราตินในฐานะเป็นแหล่งเดียวของคาร์บอนและไนโตรเจน โดยสปีชีส์ *Bacillus* พบในรายงานก่อน ๆ มากมายเช่นกัน (Korkmaz et al., 2004; Hoq et. al., 2005; Tapia & Contiero, 2008; Brutt & Ichida, 2001; Cai & Lou, 2008; Lee et. al., 2005)

ชนส่วนใหญ่ มี β - เคราติน และดั่งที่ได้รับรายงานมาในงานวิจัยอื่น ๆ สายพันธุ์ *Bacillus* ส่วนใหญ่ ผลิต keratinases ย่อยสลาย β - เคราติน (Korkmaz et al., 2004; Hoq et. al., 2005; Cortezi et al., 2008) การละลายของ ขนไก่พื้นเมือง โดยส่วนใหญ่ของเซลล์แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายเคราตินโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพของการแปรรูป ของเสียจากอุตสาหกรรมสัตว์ปีก

จากการศึกษาของ (Geethanjali, 2011) ได้คัดแยกเชื้อราจากดินในเมือง Madikeri ประเทศอินเดีย โดยใช้เส้นผมเป็นเหยื่อล่อวางบนดินในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพบเชื้อราในอาหาร Agar media จำนวน 46 โคลนีสและมี 10 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 21.7 ที่มีการสร้างเคลือบ ซึ่งได้พบสูงกว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่เชื้อ *Microsporum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Staphylotrichum*, *Gleocladium*, *Pithomyces* และ *Saccharomyces* ขณะที่ (Ingle et al., 2012) ได้คัดแยกเชื้อราจากดินในเมือง Nanded, Maharashtra ประเทศอินเดียโดยใช้วิธีการเจือจาง บนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) medium พบเชื้อรา 22 ชนิด และพบ 7 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 31.8 ที่สร้างเคลือบบน Agar plate ซึ่งได้พบสูงกว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่เชื้อ *Aspergillus niger*, *Alternaria alternate*, *Curvularia*

lunata, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp. *Myrothecium roridum* และ *Trichoderma hamatum* and. ส่วน (Mini at al., 2012) ได้คัดแยกเชื้อราในชนบทของเมือง Kerala ประเทศอินเดีย โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณฟาร์มสัตว์ปีก จำนวน 60 ตัวอย่างทำการการเจือจางและเลี้ยงบนอาหาร Keratin Agar medium มี 51 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีการเจริญของเชื้อรา ซึ่งในจำนวนนี้พบเชื้อรา 8 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 15.7 ที่สร้างเคลียร์โซนได้ ซึ่งได้พบสูงกว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่เชื้อ *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Penicillium* sp. *Chrysosporium keratinophylum*, *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagrophytes* และ (Saber at al., 2009) ได้คัดแยกและรวบรวมเชื้อรา 82 ชนิดจากตัวอย่างดินบริเวณฟาร์มไก่ในประเทศอียิปต์ โดยใช้วิธีการเจือจางบนอาหาร Agar plate medium พบเชื้อรา 27 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 32.9 ที่สามารถสร้างเอนไซม์เคราติเนส ซึ่งได้พบสูงกว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่เชื้อในกลุ่ม *Alternaria*., *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* และ *Trichoderma* และ (Perna and Kushwaha, 2011) ได้คัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินในเมือง Kanpur ประเทศอินเดีย โดยใช้วิธีการเจือจางบนอาหาร skim milk agar (SMA) medium พบเชื้อราจำนวน 101 โคโลนี และพบ 13 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์เคราติเนส คิดเป็นร้อยละ 12.9 ซึ่งได้พบสูงกว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ *Acremonium brunnescens* (MTCC 10376), *Acr. Byssoides* (MTCC 9985), *Acr. Chrysogenum* (NTCCI 1883), *Alternaria alternata* (NFCCI 1878), *Alt. citri* (GPCK 3033), *Chrysosporium indicum* (MTCC 10377), *Chry. siglerae* (GPCK 3042), *Chr. Tropicum* (NFCCI 1884), *Cladosporium chlorocephalum* (GPCK 3069), *Cla. Cladosporiodides* (MTCC 9983, *Cla. Herbarum* (GPCK 3030), *Fusarium culmorum* (GPCK 3204), *Scopulariopsis stercoraria* (NFCCI 1885)

จากการศึกษาครั้งนี้ พบจำนวนและสายพันธุ์ของเชื้อราแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งเป็นเรื่องปกติที่นักวิจัยประสบมา ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณของจุลินทรีย์ในดินจะมีความแตกต่างกันที่ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหรือปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดและปริมาณของสารอาหาร ความชื้นในดิน การระบายอากาศ อุณหภูมิ pH สภาพบางอย่าง เช่น เกิดน้ำท่วมหรือการปรับปรุงดิน (นงลักษณ์และปรีชา, 2553)

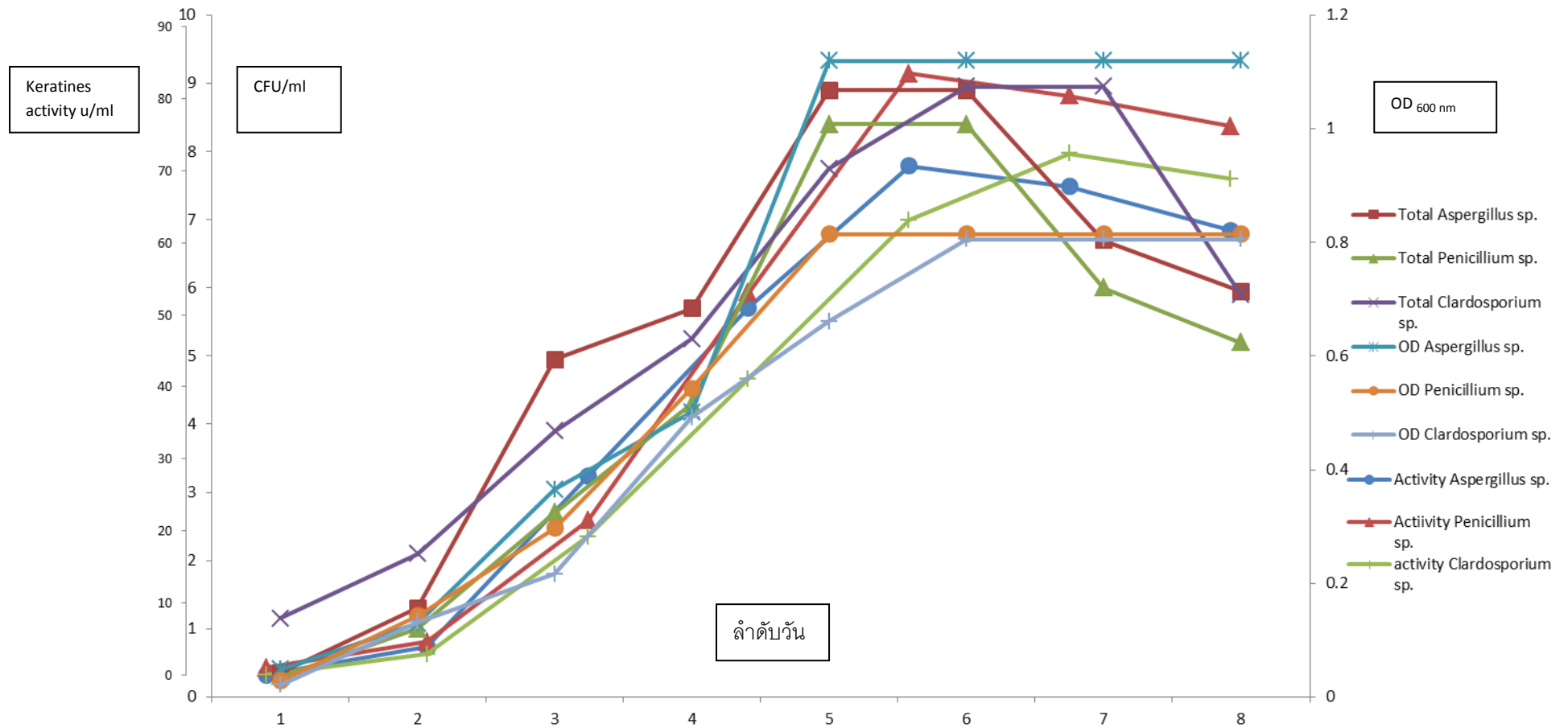
4.3ภาวะการณ์การเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราติเนส

4.3.1 *Aspergillus* KF1, *Penicillium* KF2 และ *Cladosporium* KF3

ผลจากการทดสอบภาวะการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราติเนสของเชื้อ *Aspergillus* KF1, *Penicillium* KF2 และ *Cladosporium* KF3 ในอาหาร keratin broth ที่ได้จากการศึกษาการเจริญของเชื้อราโดยการนับจำนวนโคโลนีบนอาหาร PDA ที่ได้จากการวิธีการ spread plate การวิเคราะห์ค่า OD และการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส ปรากฏว่า เชื้อ *Penicillium* KF2 เริ่มปล่อยเคราติเนสนอกเซลล์ ณ ช่วงสิ้นสุดระยะ Lag phase (1 unit/ml) ของการเจริญเติบโต ในขณะที่ *Aspergillus* KF1 และ *Cladosporium* KF3 ถูกตรวจพบการปล่อยเคราติเนส ณ ช่วงเริ่มต้นของระยะ Log phase ของการเจริญเติบโต (3.9 unit/ml และ 2.9 unit/ml) ซึ่งเชื้อราเหล่านี้แสดงการผลิตเคราติเนสสูงสุด ณ ช่วงสิ้นสุดของระยะ Log phase ของการเจริญเติบโต โดยมีกิจกรรม

เอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus* KF1 เท่ากับ 70.7 unit/ml, *Penicillium* KF2 เท่ากับ 83.5 unit/ml และ *Cladosporium* KF3 เท่ากับ 72.4 unit/ml คือเกิดหลังจากวันที่ 4 และ 5 ของการบ่ม และการผลิตเคราตินจะลดลง ณ ช่วงสิ้นสุดของระยะ Stationary phase ของการเจริญเติบโต โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus* KF1 เท่ากับ 67.8 unit/ml, *Penicillium* KF2 เท่ากับ 80.4 unit/ml และ *Cladosporium* KF3 เท่ากับ 68.9 unit/ml คือเกิดหลังจากวันที่ 5 และ 6 ของการบ่ม การเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 นี้ดูค่อนข้างต่างกัน กล่าวคือ ในวันที่ 4 พบว่า *Aspergillus* KF1 มีอัตราการเจริญเติบโต viable count เท่ากับ 8.9×10^6 cfu/ml ค่า OD เท่ากับ 1.119 ในขณะที่ *Penicillium* KF2 มีค่า viable count 8.4×10^6 cfu/ml, ค่า OD เท่ากับ 0.814 ส่วน *Cladosporium* KF3 ให้ค่า viable count ของการเจริญเติบโตใกล้เคียง ในวันที่ 5 คือเท่ากับ 8.95×10^6 cfu/ml ค่า OD เท่ากับ 0.085 ดังรูป 4.4 ในประเด็นของค่า OD ที่ต่างกันมากมีเหตุผลอธิบายได้หลายประการ แต่ประการสำคัญอาจเกิดจากมวลต่างกันมากของราต่างชนิดกัน กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ การนับ viable count นับจากปริมาณสปอร์ที่ Germinate บนอาหารแข็ง แต่การวัดความขุ่นหรือ OD วัดจากมวลทั้งหมด ได้แก่ สปอร์ เส้นใยและองค์ประกอบอื่นของรา ไม่ใช่สปอร์อย่างเดียว ในประเด็นของช่วงการผลิตเคราตินพบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานการผลิตเคราตินของ *Streptomyces gulbargensis* DAS 131 ซึ่งพบถึงสูงสุดในช่วงสุดท้ายของระยะ Log ของการเจริญเติบโต (Syed et al., 2009) และคล้ายกันกับที่รายงานโดย Kim และคณะ (2001)

แม้ว่าในความเป็นจริงเชื้อรามีความน่าสนใจมากกว่าก็ตาม การศึกษาเชื้อราผลิตเคราตินสียังมีค่อนข้างน้อยกว่าแบคทีเรีย Saber และคณะ (2009) ได้ศึกษาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราตินสีย ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Alternaria tenuissima* และ *Aspergillus nidulans* ซึ่งได้จากการบ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าในอาหาร Broth basal medium และใช้ Tris-HCL buffer pH 7.8 ในการวิเคราะห์เอนไซม์เคราตินสีย พบว่า เชื้อ *A.tenuissima* สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินสียได้สูงสุด ณ วันที่ 5 เท่ากับ 53.4 u / ml



รูป 4.4 ภาพการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราติเนส (Growth and production profile extracellular keratinase) ของเชื้อ *Aspergillus sp. KF1*, *Penicillium sp. KF2* และ *Cladosporium sp. KF3* ในอาหาร keratin broth ที่ได้จากการศึกษาการเจริญของเชื้อราโดยการนับจำนวนโคโลนีบนอาหาร PDA การวิเคราะห์ค่า OD และการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราติเนส

และ *A. nidulans* ในวันที่ 6 เท่ากับ 55.8 u/ml Ingle และคณะ (2012) ได้วิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เคราตินเนส ที่ได้จากการบ่มเลี้ยงแบบเขย่าในอาหาร liquid mineral medium และใช้ phosphate pH 8.0 ในการวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เคราตินเนส พบว่า เชื้อ *A. niger* สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้เท่ากับ 75 U/ml ใน 12 วัน และเชื้อ *Penicillium* sp. สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้สูงสุดเท่ากับ 64 U/ml ใน 11 วัน ส่วน Mini และคณะ (2012) ได้วิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เคราตินเนสที่ได้จากการบ่มเลี้ยงแบบเขย่าในอาหาร keratin salt medium นาน 5 วัน และใช้ phosphate buffer pH 8.5 ในการวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เคราตินเนส พบว่า *A. niger* สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้เท่ากับ 406 U/gds, *A. flavus* ได้ 560 U/gds, *A. fumigates* ได้ 425 U/gds และ *A. nidulans* ได้ 324 U/gds อย่างไรก็ตาม Prerna และ Kushwaha (2011) ได้วิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เคราตินเนส ที่ได้จากการบ่มเลี้ยงในอาหาร liquid medium นาน 60 นาที และใช้ NaOH buffer pH 10 ในการวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เคราตินเนส พบว่า *Cladosporium chlorocephalum* (GPKC 3069) สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้เพียง 10.98 ± 0.50 และ *Cla. cladosporioides* (MTCC 9983) ได้ 18.57 ± 1.84 อีกรายก็คือ Friedrich และคณะ (1999) ได้วิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เคราตินเนส ที่ได้จากการบ่มเลี้ยงแบบเขย่าในอาหาร solid medium นาน 14 วัน และใช้ phosphate buffer pH 7.8 ในการวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์เคราตินเนส ปรากฏว่า *A. flavus* สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้เท่ากับ 781 mU/ml^{-1} ณ วันที่ 7 และ *Cla. cladosporioides* สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินเนสได้เท่ากับ 92 mU/ml^{-1} ณ วันที่ 10 ซึ่งรายงานทั้งหมดนี้และผลจากวิจัยครั้งนี้ จะเห็นได้ชัดเจนว่า ค่ากิจกรรมของเคราตินเนสไม่บริสุทธิ์หรือชนิดหยาดนั้นจะขึ้นกับเชื้อที่ใช้ อายุของคัลเจอร์ และสภาวะการเพาะเลี้ยงหรือการผลิต รวมทั้งสภาวะของปฏิกิริยาเอนไซม์ ทั้งนี้เมื่อใช้สับสเตรทที่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน (Son et. al., 2008; Park et. al., 2009)

Faraq & Hassan (2003) ได้คัดแยกและสกัดกรองบริสุทธิ์เอนไซม์เคราตินเนสจากคัลเจอร์ย่อยชนไก่ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* พร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์บริสุทธิ์ อาทิ ประเภทของเอนไซม์ที่เป็น monomeric มวลโมเลกุล ซึ่งเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน ประสิทธิภาพเอนไซม์ต่อสับสเตรทโปรตีนชนิดต่าง ๆ อาทิ Bovine serum albumin และ Casein เคราตินชนไก่, คอลลาเจนชนเป็ด และชนแกะ รวมถึง ช่วง pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งก็คือ 7.0-7.4, 60°C ในภาวะถูกตรึง และ 8.0, 50°C ในภาวะอิสระของการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งสามารถเห็นได้ชัดเจนว่า เอนไซม์บริสุทธิ์มีทนความร้อนสูง และครึ่งชีวิตของเอนไซม์ที่ 45°C 60 นาที

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนสจะได้ค่าในปริมาณที่แตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งเป็นเรื่องปกติที่นักวิจัยได้ประสบมา เพราะอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะดำเนินไปได้ช้าหรือเร็ว มีประสิทธิภาพเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่ประกอบด้วย ความเข้มข้นของสับสเตรท ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และการสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท การทำงานของเอนไซม์นอกจากจะต้องสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการทำงานแล้ว เอนไซม์บางชนิดต้องรวมกับสารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนอีก จึงจะทำให้เร่งปฏิกิริยาได้ ได้แก่ ไอออนของโลหะ ที่เรียกว่า โคแฟกเตอร์ (Co-factors) และสารอินทรีย์โมเลกุลเล็กที่เรียกว่า โคเอนไซม์ (Co-enzymes) อีกประการหนึ่งก็คือ ขนส่วนใหญ่มี β -เคราติน และดังที่ได้เคยมีคำอธิบายไว้ในงานวิจัยอื่น ๆ *Bacillus* สายพันธุ์ส่วนใหญ่ผลิต keratinases ย่อยสลาย β -เคราติน (Korkmaz, et al, 2004; Hoq, et al, 2005; Cortezi et.al., 2008) การละลายของขนไก่พื้นเมืองโดยส่วนเอนไซม์ของ

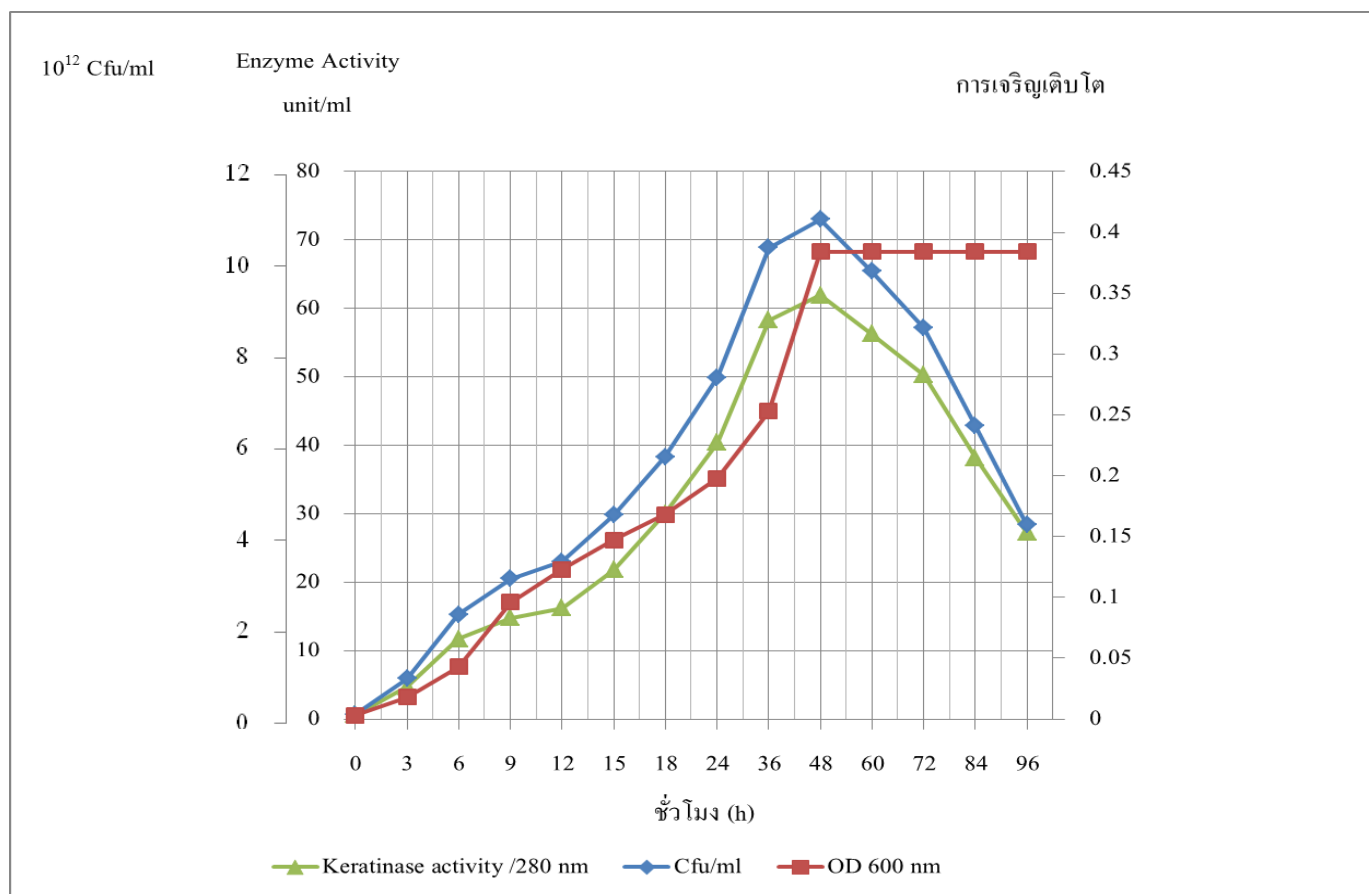
เซลล์เพาะเลี้ยงชี้ให้เห็นว่า มีศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเคราตินในการแปรรูปของเสียสัตว์ปีกจากอุตสาหกรรมได้

4.3.2 *Bacillus* KB1, และ *Bacillus* KB2

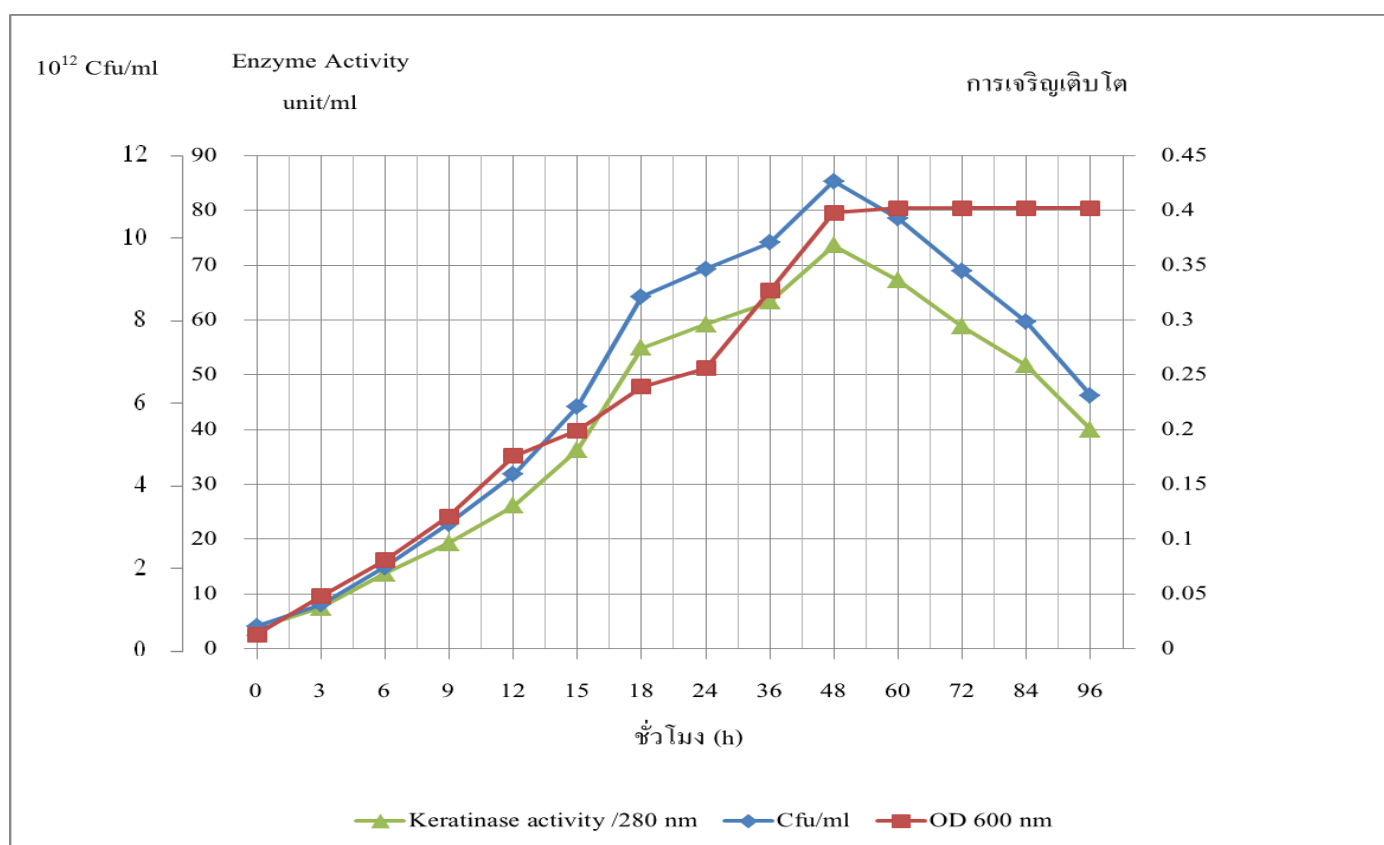
ผลจากการทดสอบภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของเชื้อ *Bacillus* KB1 และ *Bacillus* KB2 ในอาหาร Feather meal agar โดยใช้วิธีติดตามอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเคราติเนสเป็นระยะ ๆ ต่อเนื่อง ปรากฏว่า เชื้อ *Bacillus* KB1 เริ่มปล่อยเคราติเนสนอกเซลล์ออกมาให้ตรวจพบได้ ณ ช่วงสิ้นสุดระยะ Lag phase โดยกิจกรรมมีค่าเท่ากับ 0.6 unit/ml และสำหรับ *Bacillus* KB2 ก็เช่นเดียวกันคือ ถูกตรวจพบการปล่อยเคราติเนส ณ ช่วงเริ่มต้นของระยะ Lag phase ให้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 3.8 unit/ml เคราติเนสสามารถตรวจพบสูงขึ้นเรื่อย ๆ พร้อมการเจริญเติบโตที่เข้าสู่ช่วง Log phase ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบผลิตเคราติเนสสูงสุด ณ ช่วงสิ้นสุดของระยะ Log phase ของการเจริญเติบโต โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus* KB1 เท่ากับ 61.9 unit/ml และ *Bacillus* KB2 เท่ากับ 73.6 unit/ml หลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการเจริญเติบโต ซึ่งหมายถึงการเข้าสู่ระยะ Stationary phase พบการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของทั้ง 2 สายพันธุ์ ลดลงและลดลงเรื่อย ๆ ต่อไป พร้อม ๆ กับการดำเนินต่อไปของระยะ Stationary phase ของการเจริญเติบโต กิจกรรมเอนไซม์เคราติเนสของเชื้อ *Bacillus* KB1 เท่ากับ 56.3 unit/ml และ *Bacillus* KB2 เท่ากับ 58.8 unit/ml ณ ชั่วโมงที่ 60 ของการเจริญเติบโต ทั้ง 2 เชื้อนี้ จะสังเกตเห็น Viable count ค่อนข้างต่างกันระหว่างทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *Bacillus* KB1 มีจำนวน Viable count สูงที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 11.1×10^{12} cfu/ml ที่ OD เท่ากับ 0.384 ส่วนของ *Bacillus* KB2 อยู่ที่ 11.7×10^{12} cfu/ml ที่ค่า OD เท่ากับ 0.398 ตามลำดับ รายละเอียดทั้งหมดมีแสดงในรูป 4.5 และ 4.6

4.3.3 *Bacillus* KB3 และ *Bacillus* KB4

การติดตามภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราติเนส ของเชื้อ *Bacillus* sp. KB3 และ *Bacillus* sp. KB4 ในอาหาร keratin broth โดยการตรวจนับ Viable count และ Total count รวมทั้งการหาล้างเอนไซม์เคราติเนส โดยวิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ผลปรากฏว่า การเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ให้รูปแบบ (Pattern) ที่ค่อนข้างต่างกันเล็กน้อย กล่าวคือ แต่ละระยะของการเจริญเติบโต ตั้งแต่ ระยะ Lag, log, และ Stationary phase, *Bacillus* KB1 จากระยะ Log phase เข้าสู่ระยะ Stationary phase เป็นไปค่อนข้างช้ากว่า *Bacillus*



รูป 4.5 ภาพการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราตินเนส (Growth and production profile extracellular keratinase) ของเชื้อ *Bacillus* KB1 ในอาหาร keratin broth กราฟแสดง Viable count และ Total count (Turbidity) สำหรับอัตราการเจริญเติบโต พร้อมทั้งแสดงกิจกรรมเอนไซม์เคราตินเนส ซึ่งหมายถึงการหลั่งเอนไซม์เคราตินเนส



รูป 4.6 ภาพการณ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราตินเนส (Growth and production profile extracellular keratinase) ของเชื้อ *Bacillus KB2* ในอาหาร keratin broth กราฟแสดง Viable count และ Total count (Turbidity) สำหรับอัตราการเจริญเติบโต พร้อมทั้งแสดงกิจกรรมเอนไซม์เคราตินเนส ซึ่งหมายถึงการหลั่งเอนไซม์เคราตินเนส

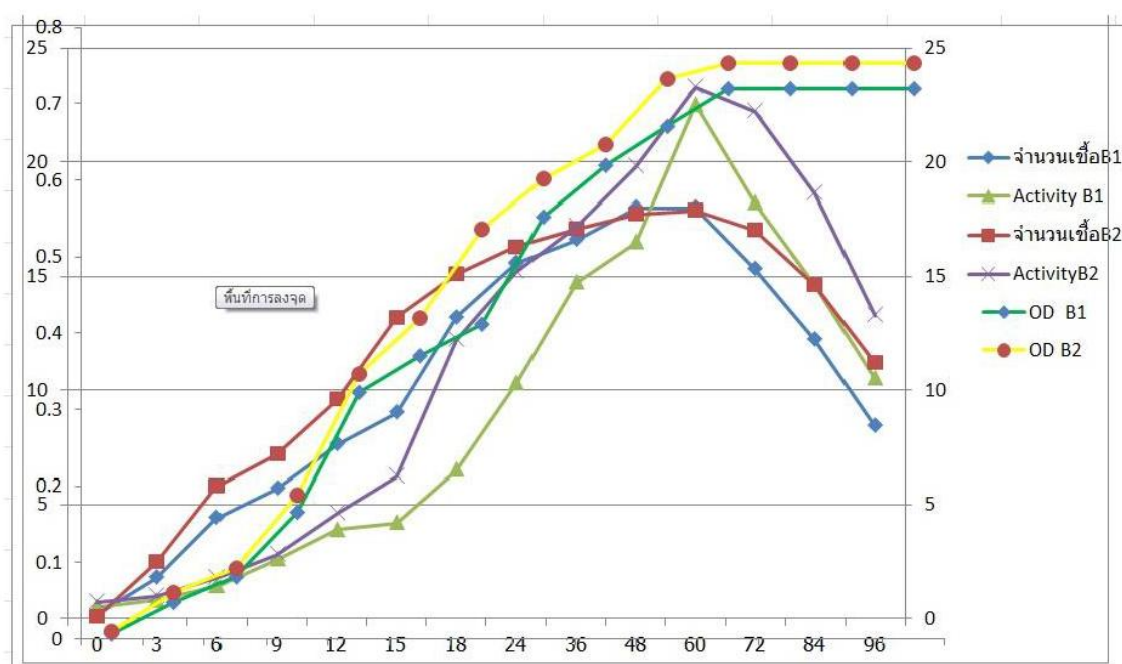
KB2 คือถึง Stationary phase ใน 60 ชั่วโมงของการเจริญเติบโต ในขณะที่ *Bacillus* KB2 เข้าถึง Stationary phase ในชั่วโมงที่ 48 ในส่วนของการหลังเคราตินเนสพบว่า *Bacillus* KB1 และ *Bacillus* KB2 มีรูปแบบการผลิตที่ใกล้เคียงกันในแง่ของการผลิตสูงสุด ซึ่งพบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์หลังเคราตินเนสได้สูงสุด ณ เวลาสิ้นสุดของระยะ Log phase ทั้งคู่ ต่างกันเฉพาะปริมาณเคราตินเนสที่หลั่งออกมา และเวลาเท่านั้น ทั้งนี้ยังสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโตที่ต่างกันระหว่างทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ ค่ากิจกรรมเคราตินเนสสูงสุดของสายพันธุ์ *Bacillus* KB3 และ *Bacillus* KB4 เท่ากับ 22.5 U/ml และ 23.3 U/ml ตามลำดับ ส่วน Viable count สูงสุดเท่ากับ 18.0×10^{12} cfu/ml และ 17.9×10^{12} cfu/ml รายละเอียดทั้งหมดปรากฏในรูป 4.7

สายพันธุ์ *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 ผลิตสาม keratinases ที่เสริมฤทธิ์ในการย่อยสลายขนและขนนก (Fang et al., 2013) และเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ keratinolytic อื่น ๆ *S. maltophilia* (Cao et al, 2009; Jeong, et al, 2010), สายพันธุ์ BBE11-1 มีประสิทธิภาพมากกว่า และสามารถย่อยสลายขนได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 2 วัน อย่างไรก็ตาม มีข้อแตกต่างระหว่างเอนไซม์นี้และ multimeric keratinases ซึ่งมักจะเกิน 100 KDa (Nam et al., 2002; Xie et al., 2010) น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โมโนเมอร์ทั้ง 3 อยู่ระหว่าง 15-50 KDa และแม้ว่า keratinases ที่ผลิตจากสายพันธุ์แบคทีเรียแกรมบวกของ *Bacillus* มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ K1 และ K2 (Brandelli et al. 2010), *S. maltophilia* BBE11-1 เป็นสายพันธุ์แกรมลบที่อาจผลิต keratinases เคราตินเนส K1 (48 KDa) และ K2 (36 KDa) จาก *S. maltophilia* ถูกรายงานเป็นครั้งแรก

เคราตินเนสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ต้องกระตุ้นหรือชักนำ (Inducible enzymes) ตามที่รายงานโดย Cheng และคณะ (1995) วัสดุเคราตินต่างๆ เช่นขนไก่, อาหารขนไก่ ขนและเส้นขนวัวถูกใช้เป็นสารชักนำ (Inducers) ของเคราตินเนส (De Toni et al., 2002; Ignatova et al., 1999; Kumar et al., 2008; Nam et al., 2002)

Park และ Son (2009) รายงานการย่อยสลายขนไก่บางส่วนโดย *Bacillus megaterium* F7-1 ซึ่งสามารถพบได้หลังจากบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 2 วัน แต่ขนไก่ส่วนใหญ่จะถูกย่อยหมดหลังจาก 4 วัน ยกเว้นก้านขนไก่ ซึ่งจะถูกย่อยอย่างสมบูรณ์หลังจาก 7 วัน Williams และคณะ (1990) ชี้ให้เห็นว่า *Bacillus licheniformis* PWD-1 ย่อยขนไก่ได้อย่างสมบูรณ์ที่ 50°C ใน 10 วัน ส่วน Boockle และคณะ (1995) รายงาน *Streptomyces pactum* DSM40530 ย่อยขนไก่บ้านได้บางส่วนที่ 50°C อย่างไรก็ตาม มีรายงานถึงแบคทีเรียเคราติโนไลติกบางชนิด อาทิ *Vibrio* strain kr2 (Sangali & Brandelli, 2000), *Chryseobacterium* strain kr6 (Riffel et al., 2003) และ *Bacillus* strain kr16 (Werlang & Brandelli, 2005) ซึ่งแสดงกิจกรรมย่อยสลายขนนกสูงสุดที่ 30°C -37°C

เชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ซึ่งแยกได้จากดินกองขยะสัตว์ปีกถูกรายงานว่าผลิตเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 36 KDa มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม 7.0 และ 50°C และเป็น Serine keratinases (Anitha & Palanivelu, 2013) เชื้อราอื่น ๆ ผลิตเอนไซม์เคราตินเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน เช่น *Scopulariopsis brevicaulis*, 39 KDa (Anbu et al., 2005), *Trichophyton*



รูป 4.7 ภาพการเจริญเติบโตและการผลิตของเอนไซม์เคราตินเนส (Growth and production profile extracellular keratinase) ของเชื้อ *Bacillus* KB3 และ KB4 ในอาหาร keratin broth กราฟแสดง Viable count และ Total count (Turbidity) สำหรับอัตราการเจริญเติบโต พร้อมทั้งแสดงกิจกรรมเอนไซม์เคราตินเนส ซึ่งหมายถึงการหลั่งเอนไซม์เคราตินเนส

mentagrophytes, 38 KDa (Muhsin & Aubaid, 2000), *Rhizomucor pusillus*, 35 KDa (Rajak et al., 1991), *Paecilomyces marquandii*, 33 KDa และ *Doratomyces microspores*, 30 KDa (Gradisar et al., 2000) ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับเคราตินสจากเชื้อราจะแตกต่างกัน แต่ที่ใกล้เคียง อาทิ pH 8.0 สำหรับของ *A. oryzae* (Farak & Hassan, 2000), *D. microsporus* (Gradisar et al., 2000), *S. brevicaulis* (Anbu et al., 2005), *Microsporum canis* (Lee et al., 1987), pH 9.0 สำหรับ *A. fumigatus* (Santos et al., 1996) และ pH 11.0 สำหรับ *A. flavus* (Gradisar et al., 2000) Friedrich & Kern (2003) ได้ศึกษาเอนไซม์โปรติเอสเคราติโนไลติกของ เชื้อรา *Doratomyces microsporus* โดยพบว่า มีความสามารถย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้ รวมถึง globular และ fibrillar proteins ด้วย

เชื้อ *Bacillus* ผลิตเคราตินหรือโปรติเอสเคราติโนไลติกไม่ใช่เรื่องใหม่ มีรายงานที่เกี่ยวข้องปรากฏออกมาเรื่อย ๆ ตัวอย่าง โปรติเอสเสถียรร้อนจากเชื้อ *Bacillus* sp JB 99 แสดงกิจกรรม keratinolytic และลอกขนหรือหนังอย่างมีนัยสำคัญ (Shrinivas & Naik, 2011) โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 29 KDa pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 11.0 และ 70 °C ตามลำดับ ที่น่าสนใจที่สุดก็คือ เอนไซม์นี้สามารถลอกหนังควายและแพะได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ทำลายชั้นของคอลลาเจน จึงน่าจะมีศักยภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องหนังได้ เพราะไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารเคมีในอุตสาหกรรม เอนไซม์นี้ยังย่อยขนไก่ในภาวะมีตัวรีดิวซ์ (Reducing agents) ที่สามารถช่วยจัดการของเสียเคราตินในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกและเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ เอนไซม์โปรติเอสต่างเสถียรร้อนจากเชื้อ thermoalkalophilic *Bacillus* sp JB 99 บนสับสเตรทของแข็งที่เคยถูกรายงาน (Johnvesly et al. 2002) รายงานอื่น ๆ ที่เกี่ยวกับเชื้อ thermoalkalophilic *Bacillus* sp. ที่สามารถผลิตโปรติเอสย่อยขนนกก่อนหน้านี้ได้แก่ *B. halodurans* AH-101 (Takami et al, 1999) และ *B. pseudofirmus* FA 30-01 (Kojima et al., 2006) Daroit และคณะ (2009) รายงานเชื้อ *Bacillus* sp P45 ซึ่งแยกได้จากลำไส้ปลา *Piaractus mesopotamicus* จากกลุ่มน้ำอเมซอน แสดงกิจกรรมย่อยโปรตีน เมื่อเจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยง skimmed milk และ feather meal ศักยภาพเคราติโนไลติกของเชื้อนี้ถูกศึกษาโดยใช้ whole feather broth และ human hair broth ผลก็คือ เชื้อ *Bacillus* sp P45 ย่อยได้เกือบ 90% ของขนไก่ หลังจาก 72 ชั่วโมงของการคัลเจอร์แบบ Submerged cultivation *Bacillus cereus* Wu2 จากฟาร์มสัตว์ปีกในไต้หวันถูกคัดแยกและพิสูจน์อาศัยลำดับ 16S rRNA สามารถผลิตเอนไซม์เคราติโนไลติกย่อยขนไก่เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แต่กลูโคส ฟรุคโตส แป้ง ซูโครสหรือแลคโตส พบเป็น catabolite repressor ต่อการหลั่งเอนไซม์หรือกิจกรรมเคราติโนไลติก เมื่อสารเคราตินเป็นแหล่งโปรตีน (Lo et al., 2012) กรดอะมิโนจากการย่อยขนไก่โดย *B. cereus* Wu2 จะมีปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Lysine, Methionine และ Threonine ซึ่งเป็นกรดจำเป็นที่สำคัญ สายพันธุ์ท้องถิ่น *Bacillus cereus* LAU 08 ซึ่งคัดแยกได้จากกองขยะขนไก่ในไนจีเรียผลิตเคราตินสด้วยการชักนำของแหล่งเคราติน 3 แหล่งคือ: กีบ ฮอร์นและขน (Lateef et al., 2010)

สปีชีส์ *Bacillus* เป็นที่รู้จักกันถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติกจำนวนหนึ่ง รวมทั้ง เคราติเนส ซึ่งสามารถย่อยขน ขนสัตว์ และเส้นผม (Daroit et al. 2009) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการเคราติน ซึ่งส่วนใหญ่จะจำกัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้งเชื้อ *Bacillus*, *Lysobacter* และสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จำนวนหนึ่ง คือ *Vibro* และ *Xanthomonas* (Gupta และ Ramnani, 2006) แบคทีเรียที่สำคัญมากที่เกี่ยวข้องกับการย่อยขนสัตว์และไฟเบอร์สัตว์

อื่น ๆ ได้แก่ *Bacillus putrificus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, และ *B. mesentericus* (Lal , et al., 1999) นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงเคราตินเนสจากแบคทีเรีย Actinomycetes และเชื้อราส่วนใหญ่ มีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วงกลางถึงต่ำ (Riffel et al., 2003; Anbu et al., 2005), และยังเป็นที่ยึดกัน ในแง่ของเสถียรภาพ ซึ่งอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ pH 5-13 (Farag and Hassan, 2004) อีกทั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมของเคราตินเนสส่วนใหญ่ อยู่ใน ช่วงของ 30°C-80°C (Gupta & Ramnani, 2006)

อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบค่า pH และอุณหภูมิ รวมทั้งกิจกรรมเอนไซม์นั้น ถือว่าเป็นยาก เพราะความแตกต่างในวิธีการของการวิเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ของสับสเตรทและนิยามของหน่วยเคราตินเนส (Gupta และ Ramnani, 2006; Son et al., 2008) และกรณีเดียวกันกับการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์อย่างไรก็ตาม Son และคณะ (2008) ได้รายงานกิจกรรมเคราติโนไลติกอยู่ในช่วง 14.6-16.7 kU mg⁻¹ สำหรับ *Bacillus pumilus* เมื่อใช้ขนนก เป็นตัวชักนำ ในขณะที่ Lal และคณะ (1999) ได้กิจกรรมเคราตินเนสสูงสุด 4.89 kUml⁻¹ สำหรับ *B. subtilis* S1 จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารผสมหนังสัตว์เด็ก ในทำนองเดียวกัน Joshi และคณะ (2007) รายงานกิจกรรมเคราตินเนสสูงสุด 30.5 และ 50 kUml⁻¹ สำหรับ *B. licheniformis* PWD1 และ *Bacillus* spp PW- 1 โดยใช้ขนนก เป็นตัวชักนำ ส่วน Nagal และ Jain (2010) ได้กิจกรรม เคราตินเนสสูงสุด 39.1 kUml⁻¹ สำหรับ *B. cereus* ที่เลี้ยงในขนนก

แบคทีเรียย่อยสลายขนไก่ที่แสดงคุณสมบัติเคราติโนไลติก ร่วมกับศักยภาพของการผลิตสารเสริมการเจริญเติบโตของพืชและกิจกรรมต้านเชื้อรา ได้ถูกคัดแยกและพิสูจน์เป็นเชื้อ *Xanthomonas* sp. P5 สารเสริมการเจริญเติบโตนี้อยู่ในรูปของกรดอะมิโนที่ถูกปล่อยออกมา ผลของการย่อยสับสเตรทเคราติน (Jeong et. al., 2010) โปรตีนเอสซีรินเคราติโนไลติก ซึ่งหลังโดย *Purpureocillium lilacinum* (เดิมเรียก *Paecilomyces lilacinus*) เมื่อคัลเจอร์ในอาหารพื้นฐาน (Basal medium) ที่มีส่วนผสมของเส้นผมทั้ง 1 % (w/v) ในฐานะเป็นแหล่งคาร์บอนและ ไนโตรเจน มีความโดดเด่น เพราะคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น น้ำหนักโมเลกุล 37.0 KDa, pH ในช่วงกว้าง 4.0-9.0 และเสถียรอุณหภูมิถึง 65°C อีกทั้งการผลิตกิจกรรมโปรตีนเอสและเคราตินเนสสูงสุดคือ 2.46 U/ml และ 25 U/ml เกิดขึ้นเมื่อบ่มเชื้อระหว่าง 111 และ 117 ชั่วโมง ตามลำดับ (Cavello et. al., 2013)

จลนศาสตร์เปรียบเทียบของการผลิตเคราตินเนส ได้ถูกรายงานสำหรับจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น *Bacillus subtilis* MTCC (9102) ในอาหาร Horn-meal (Balaji et al. 2008) และ *Microbacterium* sp. สายพันธุ์ kr10 ใน Feather-meal medium (Thys & Brandelli, 2006) ใน คัลเจอร์ของเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* (Do et al. 2004), *A. oryzae* (Jousson et al. 2004) และ *Trichophyton vanbreuseghemii* (Moallaei et al. 2006) การผลิตเคราตินเนสสูงสุดเกิดหลังจาก 21 วันของการคัลเจอร์

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เคราตินในสบนอาหาร keratin (1%) agar plate จากตัวอย่างดินที่เป็นกองทับถมของขยะในอำเภอยิ่งอ จังหวัดนราธิวาส และอำเภอมือและอำเภอยะหาของจังหวัดยะลา สามารถคัดเลือกเชื้อราและแบคทีเรียที่ผลิตเคราตินในสบนอาหารเลี้ยงที่มีแหล่งอาหารจากขนไก่บดละเอียด จำนวน 3 ไอโซเลต และ 4 ไอโซเลต การพิสูจน์เชื้อราที่คัดเลือกโดยใช้ Dichotomous key จาก Mould Laboratory, Botany Unit, University of Toronto, Canada, และใช้คู่มือ Mould: Isolation, cultivation and identification ออนไลน์ของ New Brunswick Museum, Canada ปรากฏว่า ไอโซเลต FK1, FK2, และ FK3 เป็นเชื้อราในจีนัส *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Cladosporium* sp. ตามลำดับ ส่วนไอโซเลตแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตถูกพิสูจน์ด้วยวิธี Conventional อาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา อันได้แก่ รูปร่างลักษณะได้กล้องจุลทรรศน์ ปฏิกริยาแกรม และการจัดเรียงตัว รวมทั้งการแสดงเอนสปอร์และการเคลื่อนที่ ประกอบกับอาศัยการทดสอบทางชีวเคมีบางส่วนที่จำเป็น ซึ่งมีแนะนำในตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology พบว่า ไอโซเลตทั้ง 4 เป็นจีนัส *Bacillus* ทั้งสิ้น จึงได้เรียกชื่อเพื่อการอ้างอิงเป็น *Bacillus* KB1, *Bacillus* KB2, *Bacillus* KB3 และ *Bacillus* KB4 ในส่วนของเชื้อราได้ใช้ชื่อ *Aspergillus* FK1, *Penicillium* FK2 และ *Cladosporium* FK3 และจะใช้ชื่อนี้ไปก่อน จนกว่าจะได้มีการพิสูจน์เชื้อในระดับสปีชีส์ต่อไป

ในการศึกษาภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินในสของเชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ เพื่อหาความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์นอกเซลล์เคราตินในส ปรากฏผลว่า เชื้อ *Penicillium* KF2 มีรูปแบบการเจริญเติบโตตามแบบฉบับเชื้อราทั่ว ๆ ไป กล่าวคือมีรูปแบบการเจริญเติบโตที่ประกอบด้วย 4 ระยะคือ Lag, Log, Stationary, และ Decline phases เช่นเดียวกันกับเชื้อราอีก 2 เชื้อคือ *Aspergillus* sp. และ *Cladosporium* sp. จะต่างก็เพียงระยะเวลาของแต่ละ Phase ของการเจริญเติบโตเท่านั้น ซึ่งจะมากหรือน้อย นอกจากเกิดจากปัจจัยชนิดเชื้อแล้ว ยังได้อิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมของการเจริญเติบโต รวมถึงปริมาณของเชื้อเริ่มต้นด้วย ยิ่งกว่านั้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ จะเป็น *Bacillus* KB1, *Bacillus* KB2, *Bacillus* KB3 หรือ *Bacillus* KB4 ก็ดี พบว่ามรเจริญเติบโตตามรูปแบบแบคทีเรียทั่ว ๆ ไป เช่นกัน คือมีทุกระยะของการเจริญเติบโต โดยเริ่มจาก Lag phase และตามด้วย Log, Stationary phase และ Decline phase

ที่อยู่ในความสนใจอย่างยิ่งของงานวิจัยนี้คือการหนึ่งของการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก็คือ การเจริญเติบโตที่สมบูรณ์และการเจริญเติบโตเพื่อการเก็บเกี่ยวเอนไซม์นอกเซลล์ใช้เวลาเท่าไร และจากการติดตามรูปแบบการเจริญเติบโตครั้งนี้ พบว่า ทั้งเชื้อ *Aspergillus* FK1, *Penicillium* FK2 และ *Cladosporium* FK3 อยู่ในระยะ Lag phase น้อยกว่า 1 วัน แต่อยู่ในระยะ Log phase นานกว่า คือ เริ่มตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 5 สำหรับ *Aspergillus* FK1, และ *Penicillium* FK2 แต่ *Cladosporium* FK3 อยู่ถึงวันที่ 6 อย่างไรก็ตาม เชื้อทั้ง 3 เริ่มหลั่งเคราตินนอกเซลล์ในระยะสิ้นสุดของ Lag phase และ

ได้ปริมาณสูงสุดเมื่อสิ้นสุดระยะ Log phase ปริมาณกิจกรรมเคราตินเนส ณ จุดสูงสุดสำหรับเชื้อ *Aspergillus* KF1 เท่ากับ 70.7 unit/ml, *Penicillium* KF2 เท่ากับ 83.5 unit/ml และ *Cladosporium* KF3 เท่ากับ 72.4 unit/ml ฉะนั้น การเก็บเกี่ยวเอนไซม์สำหรับเชื้อรา *Aspergillus* KF1 และ *Penicillium* KF2 ในสภาวะการบ่มที่ 37°C เขย่าที่ 120 rpm ควรกระทำในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงหรือการหมัก แต่สำหรับ *Cladosporium* FK3 ต้องเก็บเกี่ยวเอนไซม์ในวันที่ 6 นอกจากนี้ จากการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์นี้ เรายังได้สามารถคาดคะเนถึงเสถียรภาพของเคราตินเนสจากเชื้อราทั้ง 3 อีกด้วย กล่าวคือ จากเส้นกราฟของกิจกรรมเคราตินเนส ซึ่งพบว่าลดลงเล็กน้อยในช่วงเวลา 3 วัน หลังระยะ Log phase แสดงถึงเคราตินเนสที่ถูกสร้างขึ้นมีเสถียรภาพพอสมควร โดยอาจจะมีความสูงขึ้นอยู่กับสภาวะเป็นเอนไซม์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์มากขึ้น

ในส่วนของการเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 เชื้อคือ *Bacillus* KB1, *Bacillus* KB2, *Bacillus* KB3 และ *Bacillus* KB4 เนื่องจากเป็นเชื้อจากจีนัสเดียวกัน การไม่พบความแตกต่างระหว่างกันมากนักในการศึกษาการเจริญเติบโต จึงเป็นเรื่องที่ค่อนข้างปกติและธรรมดา จีนัส *Bacillus* ที่ศึกษาแสดงระยะ Lag phase ในระยะเวลาสั้น ๆ แต่อยู่ในระยะ Log phase จนถึงชั่วโมงที่ 36 สำหรับ *Bacillus* KB1, ชั่วโมงที่ 48 สำหรับ *Bacillus* KB2 และ *Bacillus* KB4 ในส่วนของ *Bacillus* KB3 ระยะ Log phase สิ้นสุดที่ชั่วโมง > 48. อย่างไรก็ตาม การผลิตเคราตินเนสสูงสุดของเชื้อทั้ง 4 จะเหมือนกันคือ พบ ณ จุดสิ้นสุด Log phase โดย *Bacillus* KB1 มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 61.9 unit/ml และ *Bacillus* KB2 เท่ากับ 73.6 unit/ml ในขณะที่ค่ากิจกรรมสูงสุดสำหรับ *Bacillus* KB1 และ *Bacillus* KB2 มีค่า 22.5 U/ml และ 23.3 U/ml

สำหรับเสถียรภาพของเคราตินเนสนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 โดยภาพรวม แสดงให้เห็นว่ามีเสถียรภาพน้อยกว่าของเชื้อราทั้ง 3 กล่าวคือพบอยู่ในสภาวะแวดล้อมของคลเจอร์คือที่ 37°C เขย่าที่ 160 rpm ได้ไม่ถึง 24 ชั่วโมง ฉะนั้น สรุปเวลาที่เหมาะสมของการเก็บเกี่ยวเคราตินเนสจากทั้ง 4 เชื้อแบคทีเรียนี้ ควรเป็น 36 ชั่วโมงสำหรับ *Bacillus* KB1, และ 48 ชั่วโมง สำหรับ *Bacillus* KB2, *Bacillus* KB3, และ *Bacillus* KB4

ค่า Viable count ซึ่งหมายถึงเชื้อ Active หรือเชื้อในระยะ Log phase ของเชื้อราพบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 นี้ค่อนข้างต่างกัน กล่าวคือพบว่า *Aspergillus* KF1 ใช้เวลา 4 วัน เพื่อการเจริญเติบโตสูงสุดและให้ viable count เท่ากับ 8.9×10^6 cfu/ml, *Penicillium* KF2 มีค่า viable count 8.4×10^6 cfu/ml ในส่วน *Cladosporium* KF3 ให้ค่า viable count ของการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียง ในวันที่ 5 คือเท่ากับ 8.95×10^6 cfu/ml สำหรับแบคทีเรีย ทั้ง *Bacillus* KB1 และ *Bacillus* KB2 แสดง Viable count ที่ค่อนข้างต่างกัน กล่าวคือ *Bacillus* KB1 มีจำนวน Viable count สูงที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 11.1×10^{12} cfu/ml ที่ OD เท่ากับ 0.384 ส่วนของ *Bacillus* KB2 อยู่ที่ 11.7×10^{12} cfu/ml ที่ค่า OD เท่ากับ 0.398 ตามลำดับ ในส่วน Viable count พบสูงสุดเท่ากับ 18.0×10^{12} cfu/ml และ 17.9×10^{12} cfu/ml สำหรับ *Bacillus* KB3 และ *Bacillus* KB4 ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

เอนไซม์เคราตินเนสหรือโปรติเอสเคราติโนไลติกได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางทั่วโลก จึงมีการศึกษาวิจัยออกมามากมาย แต่ก็น่าสลดใจที่ในประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคใต้ หรือในวงแคบ ในจังหวัดชายแดนใต้ ยังมีการศึกษาถึงทรัพยากรชีวภาพแบบนี้้น้อยมาก เพราะความสำคัญได้ถูกกลืนไป

กับภาวะทางการเมืองและการทหาร ประเด็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์นี้ ไม่ใช่เฉพาะเคราติเนสเท่านั้น เอนไซม์หลาย ๆ ชนิดจากจุลินทรีย์ที่สามารถได้จากสิ่งแวดล้อมท้องถิ่น ได้รับความสนใจโดยนักวิชาการ และนักวิจัยในพื้นที่น้อยมาก ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุมาจากหลาย ๆ เหตุผล เช่น นักวิจัยมีจำนวนน้อย งบประมาณสนับสนุนน้อย ความสำคัญถูกมองข้าม งานวิจัยไม่ต่อเนื่อง จึงไม่สิ้นสุดที่การนำไปใช้ ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ที่สมควรจะเป็นหรือจะเกิด อย่างเคราติเนส หากให้โอกาสการวิจัยต่อเนื่อง เพื่อการศึกษาวิจัยอย่างจริงจังในรายละเอียดที่เกี่ยวข้อง เอนไซม์และทรัพยากรชีวภาพที่ได้มานี้ สามารถผลิตในปริมาณมากและสามารถใช้สำหรับการบำบัดของเสียสารทิ้งเคราติน การแปรรูปหนังสัตว์ รวมทั้งการเตรียมและการผลิตอาหารเสริมสำหรับสัตว์เลี้ยงเพื่อการปศุสัตว์ที่รอความรุ่งเรืองในพื้นที่ นอกจากนี้ เอนไซม์ยังอาจพบกับการใช้งานอย่างได้ผลและกำไรสูงในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา สำหรับการรักษาสิวเสี้ยนและโรคสะเก็ดเงิน

การผลิตของเคราติเนสจากเชื้อ *Bacillus* เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางว่า สามารถทำง่าย เพราะ แบคทีเรียนี้เจริญเติบโตอย่างง่าย ๆ ต้องการอาหารที่ธรรมดา คือมีเพียงขยะขี้ไก่เล็กน้อยก็สามารถทำ ประโยชน์ให้กับมนุษย์ได้มากมายมหาศาลแล้ว ดังจะเห็นจากงานวิจัยนี้และวรรณกรรมเกี่ยวกับ แบคทีเรียนี้ แบคทีเรียนี้ อย่างไม่ต้องสงสัยเลย มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ โดยการนำไปใช้เป็นเชื้อ เริ่มต้นสำหรับการแปรรูปสารตั้งต้นที่มีราคาไม่แพง ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตต่ำ ในเวลาเดียวกันก็เปลี่ยน ชนิดของกากอุตสาหกรรม (ขี้ไก่) เป็นสารอาหารที่เป็นที่ต้องการทางโภชนาการ ซึ่งจะช่วยปกป้อง สิ่งแวดล้อมโดยการลดกองขยะย่อยยาก การศึกษาวิจัยสำหรับการต่อยอดต่อไป จึงควรดำเนินการ เพื่อ ประเมินศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพของเคราติเนสนี้ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย เคราติน

ในแง่ของการจัดการขยะจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ของสัตว์ ควรเล็งเห็นความสำคัญของเทคโนโลยีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งใช้จุลินทรีย์เคราติโนไลติกที่มีประสิทธิภาพในการ พัฒนาระบบการแปรรูปสารทิ้งเคราติน โดยวิธีใช้จุลินทรีย์นี้เป็นการใช้จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยก จากแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ แล้วนำมาศึกษาวิจัยและพัฒนา ในเมื่อทรัพยากรธรรมชาติของเรามี ความหลากหลายมาก ๆ จุลินทรีย์เพื่อวัตถุประสงค์นี้ก็ย่อมมีมากและหลากหลายอีกด้วย ฉะนั้น งานวิจัยคัดแยกจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ควรต้องอุดหนุน ส่งเสริมและสนับสนุน เพื่อขยายความ เป็นไปได้ของการนำทรัพยากรชีวภาพในท้องถิ่น จนเกิดประโยชน์สูงสุด อันที่จริงแล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้ มีบทบาทในกระบวนการหมัก (Fermentation) และกระบวนการรีไซเคิลแร่ธาตุ (Mineralization) ใน ธรรมชาติอยู่แล้ว การนำมาใช้ประโยชน์ตามความต้องการของมนุษย์จึงไม่ใช่เรื่องยากและผิดธรรมชาติ แต่เป็นการเปลี่ยนสถานที่และสิ่งแวดล้อมทำงานหรือที่ทำงานของมันเท่านั้น

ดังนั้น โดยสรุป งานวิจัยต่อไปสำหรับงานนี้ก็คือ การแสวงหาหรือคัดแยกจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ต่อไป พร้อม ๆ ทั้งการวิจัยต่อเนื่องกับจุลินทรีย์ที่ได้คัดแยกมาแล้ว เพื่อให้เกิดประโยชน์โดยเร็วที่สุด เนื่องจากโปรติเอสเคราติโนไลติกจากจุลินทรีย์เป็นที่ยอมรับว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน เทคโนโลยีชีวภาพต่าง ๆ และในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง อาหารสัตว์ ปุ๋ยชีวภาพและสารเสริมอาหาร ความต้องการที่เพิ่มขึ้นสำหรับเอนไซม์เหล่านี้ จึงควรถือเป็นความจำเป็นสำหรับการตรวจหา คัดแยก และคัดเลือก รวมถึงศึกษาวิจัยจุลินทรีย์เคราติโนไลติกต่อเนื่องและต่อไป

บรรณานุกรม

- Abdel-Gawad, K.M. 1997. Mycological and some physiological studies of keratinophilic and other moulds associated with sheep wool. *Microbiol. Res.* 152: 181–188.
- Abdel-Kareem, O.M.A. 2000. Application of Fungicides and Polymers in Preservation of Linen Textiles. PhD thesis. Krakow University of Economics, Faculty of Commodity Science, Krakow, Poland.
- Abrusci, C., A. Martin-Gonzalez, A. Del Amo, F Catalina, J. Collado, Platas. 2005. Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films. *International Biodegradation & Biodeterioration* 56: 58-68.
- Agarwal, P.N. and Puvathingal, J. M., 1969. Microbiological deterioration of woolen materials. *Textile Research J.* 39: 38–42.
- Agrawal, S. C. 1995. Biodeterioration of wool: efficacy of some fungicides in controlling the deterioration. In: Aranyanak, Ch., Singhasiri, Ch. (Eds.), Biodeterioration of Cultural Property 3. Proceedings of the Third International Conference on Biodeterioration of Cultural Property, Bangkok: 202–208.
- Ajello, L. 1968. A taxonomic review of the dermatophytes and related species. *Sabouraudia* 6: 147–159.
- Al Musallam, A. A. and S.S. Radwan. 1990. Wool colonizing microorganisms capable of utilizing wool lipids and fatty acids as sole sources of carbon and energy. *J Appl Bacteriol.* 69: 806–813.
- Ali-Shtayeh, M.S. and R. M. F. Jamous. 2000. Keratinophilic fungi and related dermatophytes in polluted soil and water habitats. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi, Revista Iberoamericana de Micologia, pp. 51–59. Bilbao.
- Ali-Shtayeh, M.S., H. M. Arda, M. Hassouna, S. .F. Shaheen. 1988b. Keratinophilic fungi on the hair of cows, donkeys, rabbits, cats and dogs from the West Bank of Jordan. *Mycopathologia* 104: 109–121.
- Ali-Shtayeh, M.S., H.M. Arda, M. Hassouna, S. F. Shaheen. 1988a. Keratinophilic fungi on the hair of goats from the West Bank of Jordan. *Mycopathologia* 104: 103–108.
- Ali-Shtayeh, M.S., T. K. M. Khaleel, R. M. Jamous. 2002. Ecology of dermatophytes and other keratinophilic fungi in swimming pools and polluted and unpolluted streams. *Mycopathologia* 156: 193–205.
- Allpress, J. D., G. Mountain, P. C. Gowland. 2002. Production, purification, and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. *Lett Appl Microbiol.* 34: 337–342.

- Anbu, P., S.C.B Gopinath, A. Hilda, T. Lakshmipriya, G. Annadurai. 2005. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 639-647.
- Anbu, P., S.C.B. Gopinath, A. Hilda, T. Lakshmipriya, G. Annadurai. 2005. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enz Microb. Technol.* 36: 639–647.
- Anbu, P., S.C.B. Gopinath, A. Hilda, T. Lakshmipriya, G. Annadurai. 2005. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 639–647.
- Anitha, T.S. and P. Palanivelu. 2013. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and Purification* 88: 214–220
- Asquith, R.S. 1977. Chemistry of Natural Protein Fibers. Plenum Press, New York.
- Atalo, K., and B. A. Gashe. 1993. Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A) which degrades various kinds of fibrous proteins. *Biotechnology Letters*, 15: 1151–1156.
- ATCC, The global bioresource center, 2008. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/fungiYeast/%20fungiYeastIndex.cfm>.
- Auld, D. S. 1995. Removal and replacement of metal ions in metalloproteinases. *Methods in Enzymology*. 248: 228–242.
- Bagy, M. M. K. and A.Y. Abdel-Mallek, 1991. Saprophytic and keratinolytic fungi associated with animals hair from Riyadh, Saudi Arabia. *Zentralblatt für Microbiologie* 146: 305–310.
- Bahuguna, S. and R.K.S., Kushwaha, 1989. Hair perforation by keratinophilic fungi. *Mycoses* 32: 340–343.
- Baker, D.H., R.C. Blitenthal, K.P. Boebel, G.L. Czarnecki, L.L. Southern and G.M. Willis. 1981. Protein-amino acid evaluation of stream-processed feather meal. *Poultry Sci.* 60: 1865-1872.
- Bakhtiar, S., R. J Estiveira, R. Hatti-Kaul. 2005. Substrate specificity of alkaline protease from alkaliphilic feather-degrading *Nesterenkonia* sp. AL20. *Enzyme Microbial Technol.* 37: 534–540.
- Balaji, S., M. S. Kumar, R. Karthikeyan, R. Kumar, S. Kirubanandan, R. Sridhar, et al. 2008. Purification and characterization of an extracellular keratinase from horn meal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). *World J Microb Biotech.* 24: 2741–2745.
- Bálint, B., Bagi, Z., Rákhely, G., Perei, K., & Kovács, K. L. 2005. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Appl Microbiol Biotech.* 69: 404–410.

- Baran, E. 1998. Outline of Medical Mycology. Volumed, Wroclaw (in Polish).
- Barone, J. R. and O. Arkan. 2007. Composting and biodegradation of thermally processed feather keratin polymer. *Polymer Degradation and Stability*, 92: 859–867.
- Barone, J. R. and W. F. Schmidt. 2005. Polyethylene reinforced with keratin fibers obtained from chicken feathers. *Composites Science and Technology*, 65: 173–181.
- Batko, A. 1975. Outline of Hydromycology. PWN, Warszawa (in Polish).
- Baxter, M. and P.R. Mann 1969–1970. Electron microscopic studies of the invasion of human hair in vitro by three keratinophilic fungi. *Sabouraudia* 7: 33–37.
- Benny, G.L., R. A. Humber, J. B. Morton. 2001. Zygomycota: Zygomycetes. In: Esser, K., Lemke, P.A. (Eds.), The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. vol. 7A. In: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.), Systematics and Evolution. Springer, Berlin, pp. 113–146.
- Bernal, C., I. Diaz, N. Coello,. 2006b. Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 445–450.
- Bernal, C., J. Cairó, N. Coello. 2006a. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 49–54.
- Bertsch, A., and N. Coello. 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource Technology*. 96: 1703–1708.
- Bilbao, Page, R.M.1950. Observations on the keratin digestion by *Microsporium gypseum*. *Mycologia* 62: 591–602.
- Blyskal, B. 2005. The Influence of Dyes on the Degree of Biodeterioration of a Woollen Textile. PhD Dissertation. Krakow University of Economics, Faculty of Commodity Science, Krakow, Poland (in Polish).
- Boćkle, B., B. Galunsky, R. Müller. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM40530. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3705–3710.
- Böckle, B. and Müller, R. 1997. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. *Appl Environ Microbiol.* 63: 790–792.
- Bradbury, J. H. 1973. The structure and chemistry of keratin fibers. *Advances in Protein Chemistry*. 27: 111–211.
- Brandelli, A. 2005. Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic strain of *Chryseobacterium* sp. *Annals Microbiol.* 55: 47–50.

- Brandelli, A. 2008. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess Technol*;1:105–16.
- Brandelli, A. and A. Riffel, 2005. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. *Electronic J Biotech*. 8: 35–42.
- Brandelli, A., D. J. Daroit, A. Riffel. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85: 1735–1750.
- Bressolier, P., F. Letourneau, M. Urdaci, B. Verneuil. 1999. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl Environ Microbiol*. 65: 2570–2576.
- Brouta, F., F. Descamps, T. Fett, B. Losson, C. Gerday, B. Mignon. 2001. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. *Med. Mycol*. 39: 269–275.
- Brouta, F., F. Deschamps, T. Fett, B. Losson, C. Gerday. 2001. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. *Med Mycol* 39: 269–275.
- Brutt E.H. and J.M. Ichida. 2001.04.10. Bacteria useful for degrading Keratin. United States Patent No. 6, 214, 576 B1. 7 p.
- Brutt E.H. and J.M. Ichida. 2001.04.10. Bacteria useful for degrading Keratin. United States Patent No. 6, 214, 576 B1. 7 p.
- Burt, E. H. and J. M. Ichida. 1999. Bacteria useful for degrading keratin. US Patent 6214676.
- Cai C., B. Lou, X. Zheng. 2008. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *J Zhejiang University Sci B*, 9(1): 60–67.
- Cantera, C. S. 2001. Hair saving unhairing process. Part 4. Remarks on the evolution of the investigation on enzyme unhairing. *J the Society Leather Technol Chemists*. 85: 836–841.
- Cao, L., H. Tan, Y. Liu, X. Xue, S. Zhou. 2008. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather, *Appl. Microbiol. Lett. Appl. Microbiol*. 46: 89–394.
- Caughey, B. 2001. Interactions between prion protein isoforms: The kiss of death? *Trends in Biochem Sci*, 26: 235–242.
- Cavello, I. A., R. A. Hours, N. L. Rojas, S. F. Cavalitto. 2013. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. *Process Biochem*. 48: 972–978.
- CBS Filamentous fungi database, 2008. <http://www.cbs.knaw.nl/databases/index.htm>.

- CBS List of cultures, 1994. Fungi and Yeasts, 33rd ed. CBS, Baarn and Delft. Chesters, C.G.C., Mathison, G.E., 1963. The decomposition of wool keratin by *Keratinomyces ajelloi*. *Sabouraudia* 2: 225–237.
- Chen, S. X., H. E. Swaisgood, E. A. Foegeding, 1994. Gelation of β -lactoglobulin treated with limited proteolysis by immobilization trypsin. *J Agri Food Chem* 42: 234–239.
- Cheng, S.W., Hu, H.M., Shen, S.W., Takagi, H., Asano, M., Tsai, Y.C., 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 2239–2243.
- Chitte, R. R., V. K Nalawade, S. Dey, 1999. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Lett Appl Microbiol.* 28: 131–136.
- Chmel, L., A. Hasilikova, J. Hrasko, A. Vlacilikova. 1972. The influence of some ecological factors on keratinophilic fungi in the soil. *Sabouraudia* 10: 26–34.
- Choi, J. M. and P. V. Nelson. 1996. Developing a slow release nitrogen fertilizer from organic sources. II. Using poultry feathers. *J Am Society Horticult Sci.* 121: 639–643.
- Cohlberg, J. A. 1993. The structure of α -keratin. *Trends Biochem Sci.* 18: 360–362.
- Cortezi, M., J. Contiero, C. J. B Lima, R. B. Lovaglio, R. Monti. 2008. Characterization of a feather degrading by *Bacillus amyloliquefaciens* protease: A new strain. *World J Agricult Sci.* 4(5): 648–656.
- Crewther, W.G. 1955. Pre-treatments which affect the susceptibility of wool to proteolysis. The effects of pH, wetting agents and solvent extraction. In: Crewther, W.G. (Ed.), *Proceedings of the International Wool Textile Research Conference*. Morris and Walker Pty. Ltd., Melbourne, pp. 227–256.
- Cruikshank, C.N.D. and M. D. Trotter. 1956. Separation of epidermis from dermis by filtrates of *Trichophyton mantagrophytes*. *Nature.* 177: 1085–1086.
- Daroit, D. J., A. P. F. Corrêa, A. Brandelli. 2009. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *Inter Biodeterior Biodegrad.* 63: 358–363
- De Hoog, G.S. and J. Guarro. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*, second ed. CBS, Utrecht.
- De Hoog, G.S., 1996. Risk assessment of fungi reported from humans and animals. *Mycoses* 39: 407–417 (Review article).
- De Hoog, G.S. and J. Guarro. 1995. *Atlas of Clinical Fungi*. CBS, Baarn and Delft.
- De Toni, C. H., M. F. Richter, J. R. Chagas, J. A. P. Henriques, C. Termignoni. 2002. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophila* strain. *Canadian J Microbiol.* 48: 342–348.

- De Vries, G. 1964. Keratinophylic fungi. *Annales des Societes belges Medecine tropicale* 44: 795–802.
- De Vries, G.A. 1962. Keratinophilic fungi and their action. *Antonie van Leeuwenhoek* 28: 121–133.
- Denizel, T., B. Jarvis, A. H. S Onions, A. C. Rhodes, R. A. Samson, E. G. Simmons, M. T. Smith, E. H. Hueck van der Plas. 1974. A catalogue of potentially biodeteriogenic fungi held in the culture collections of the CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), CMI (Commonwealth Mycological Institute) and QM (U.S. Army Natick Laboratories). *International Biodeterioration Bulletin* 10: 3–23.
- Deschamps, F., F. Brouta, S. Vermout, M. Monod, B. Losson, B. Mignon. 2003. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 38: 29–34.
- Deshmukh, S.K. and S. C. Agrawal. 1982. In vitro degradation of human hair by some keratinophilic fungi. *Mycosen.* 25: 454–458.
- Deshmukh, S.K. and S. C. Agrawal. 1985. Degradation of human hair by some dermatophytes and other keratinophilic fungi. *Mycosen* 28: 463–466.
- Dix, N.J. and J. Webster. 1995. Fungal Ecology. Chapman and Hall, London.
- Do, J. H., M. J. Anderson, D. W. Denning, E. Bornberg-Bauer. 2004. Inference of *Aspergillus fumigatus* pathway by computational genome analysis: tricarboxylic acid cycle (TCA) and glyoxilate shunt. *J Microb Biotechnol.* 14: 74–80.
- Domsch, K.H., W. Gams, T. H. Anderson. 1993. Compendium of Soil Fungi. IHWVerlag, Eching.
- Domsch, K.W., W. Gams, T. H. Anderson. 1980. Compendium of Soil Fungi. 1st Edn., Academic Press. London. ISBN-10:0122204018. pp : 22-23.
- Dozie, I. N. S., C. N. Okeke, N. C. Unaeze. 1994. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *W J Microbiol Biotech.* 10: 563–567.
- Elmayergi, H. H., and R. E Smith. 1971. Influence of growth of *Streptomyces fradiae* on pepsin-HCl digestibility and methionine content of feather meal. *Can J Microbiol.* 17: 1067–1072.
- English, M.P. 1963. The saprophytic growth of keratinophilic fungi on keratin. *Sabouraudia.* 3: 115–130.
- English, M.P. 1965. The saprophytic growth of non-keratinophilic fungi on keratinized substrata and a comparison with keratinophilic fungi. *Transactions of British Mycological Society.* 48: 219–235.

- Fang, Z., J. Zhang, B. Liu, J. Guocheng-Chen. 2013. Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. *Internat Biodeteriorat & Biodegradat*. 82: 166-172
- Farag, A. M., M. A. Hassan, 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* 34: 85-93.
- Filipello Marchisio, V., 2000. Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*, Revista Iberoamericana de Micologia, pp. 86-92. Bilbao.
- Filipello Marchisio, V., A. Fusconi, F.L. Querio. 2000. *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or a keratinolytic fungus? *Mycoses* 43: 281-292.
- Filipello Marchisio, V., A. Fusconi, S. Rigo. 1994. Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. *Mycopathologia* 127: 103-115.
- Flannigan, B., R. A. Samson, J. D. Miller. 2001. *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. Taylor and Francis, London.
- Friedrich J., H.Gradisar, D.Mandin, J.P.Chaaumont. 1999. Screening fungi for synthesis of Keratinolytic enzymes. *Lett Appl Microbiol*. 28: 127-130.
- Friedrich, A. B. and G. Antranikian. 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermatogales. *Appl Environ Microbiol*. 61: 3705-3710.
- Friedrich, J. & S. Kern. 2003. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microspores*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 21: 35-37
- Geethanjali P.A.. 2011. Screening of Keratinolytic fungi from the Poultry Soil for the Degradation of Chicken Feather. *Journal of Theoretical and Experimental Biology* (ISSN: 0972-9720),8 (1and2):53-56,2011.
- Geiser, D.M.and K. F. LoBuglio. 2001. The monophyletic *Plectomycetes*: Ascosphaerales, Onygenales, Eurotiales. In: Esser, K., Lemke, P.A. (Eds.), *The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. vol. 7A. In: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.), *Systematics and Evolution*. Springer, Berlin, pp. 201-219.
- George, S., V. Raju, M. R. V. Krishnan, T. E. Subramanian, K. Jayraman. 1995. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Process Biochemistry*. 30: 457-462.
- Gessesse, A., R. Hatti-Kaul, B. A. Gashe, B. Mattiasson. 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 519-524.

- Ghawana, V.K. and J. N. Shrivastava. 1995. Morphological changes induced during the biodeterioration of wool by soil-borne fungus. In: Aranyanak, Ch., Singhasiri, Ch. (Eds.), Biodeterioration of Cultural Property 3. Proceedings of the 3rd International Conference on Biodeterioration of Cultural Property, Bangkok, pp. 693–697.
- Giongo, J. L., F. S. Lucas, F. Casarin, P. Heeb, A. Brandelli. 2007. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *W J Microbiol Biotechnol.* 23: 375–382.
- Gradisar, H., J. Friedrich, I. Krizaj, R. Jerala, 2005. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3420–3426.
- Gradisar, H., S. Kern, J. Friedrich. 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl Microbiol Biotech.* 53: 196–200.
- Gradisar, H., S. Kern, J. Friedrich. 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl Microbiol Biotech.* 53 : 196-200.
- Grazziotin, A., F. A. Pimentel, E. V. de Jong, A. Brandelli. 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Anim Feed Sci Technol.* 126: 135–144.
- Grazziotin, A., F. A. Pimentel, S. Sangali, E. V. de Jong, A. Brandelli. 2007. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. *Bioresource Technology.* 98: 3172–3175.
- Griffin, D.M. 1960. Fungal colonization of sterile hair in contact with soil. *Transactions of British Mycological Society.* 43: 583–596.
- Grzywnowicz, G., J. Lobarzewski, K. Wawrzekiewicz, T. Wolski, 1989. Comparative characterization of proteolytic enzymes from *Trichophyton gallinae* and *Trichophyton verrucosum*. *J Med Vet Mycol.* 27: 319–328.
- Gugnani, H.C. 2000. Non-dermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi, Revista Iberoamericana de Micologia, pp. 109–114. Bilbao.
- Gupta, R. and P. Ramnani. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70: 21–33.
- Gupta, R., Q. K. Beg, P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 15–32.
- Gushterova, A., E. Vasileva-Tonkova, E. Dimova, P. Nedkov, T. Haertlé. 2005. Keratinase production by newly isolated *Antarctic actinomycete* strains. *W J Microbiol Biotechnol.* 21: 831–834.

- Hadas, A. and L. Kautsky. 1994. Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. *Fertilizer Research*. 38: 165–170.
- Hawks, C.A., W.F. Rowe. 1988. Deterioration of hair by airborne microorganisms: implications for museum biological collections. In: Houghton, D.R., Smith, R.N., Eggins, H.O.W. (Eds.), *Biodeterioration 7*. Elsevier Applied Science, London, pp. 461–465.
- Hawksworth, D.L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, D. N. Pegler. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi, 8 ed. CAB International, Wallingford.
- Holland, K. T. 1993. Protease from *Micrococcus sedentarius* for degrading protein of human callus or corn tissue. US Patent 5213978.
- Hood, C. M. and M. G. Healy. 1994. Bioconversion of waste keratins: Wool and feathers. *Resources Conservation and Recycling*. 11: 179–188.
- Hoq, M. M., K. A. Z. Siddiquee, H. Kawasaki, T. Seki. 2005. Keratinolytic activity of some newly isolated *Bacillus* species. *J Biol Sci*. 5(2): 193-200.
- Hsu, Y.C.. and P. A. Volz, 1975. Penetration of *Trichophyton terrestre* in human hair. *Mycopathologia*. 55: 179–183.
- Huang, Q., Y. Peng, X. Li. 2003. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilis*. *Current Microbiol*. 43: 169–173.
- Hubalek, Z. and F. M. Rush-Munro. 1973. A dermatophyte from birds: *Microsporum ripariae* sp. nov. *Sabouraudia*. 11: 287–292.
- Ichida, J. M., L. Krizova, C. A. LeFevre, H. M. Keener, D. L. Elwell, E. H. Burt. 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J Microbiol Methods*. 47: 199–208.
- Identification of moulds. (2555). [on-line]. Available: <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Moulds.html>. [4 กันยายน 2555].
- Ignatova, Z., A. Gousterova, G. Spassov, P. Nedkov. 1999. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can. J. Microbiol*. 45: 217–222.
- Ingle S.S., V.D. Kalyankar, G.M.Karadkhele,M.M.V. Baig. 2012. Biodegradation of Poultry feather by non dermatophytic filamentous Keratinolytic Fungi. *Asian J. Biol Biotechnol*. 1(1): 102.
- Jacobs, M., M. Eliasson, H. Uhlen, J. I. Flock. 1985. Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Research*. 13: 8913–8926.
- Jennings, D.H. 1995. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University Press, Cambridge.

- Jeong, J. H., Y. D. Jeon, O. M. Lee, J. D. Kim, N. R. Lee, G. T. Park, et al. 2010. Characterization of a multifunctional feather-degrading *Bacillus subtilis* isolated from forest soil. *Biodegradation*; doi:10.1007/s10532-010-9363-y.
- Jeong, J-H., K-H. Park, D-J. Oh, D-Y. Hwang, H-S. Kim, C-Y. Lee, H-J. Son. 2010. Keratinolytic enzyme-mediated biodegradation of recalcitrant feather by a newly isolated *Xanthomonas* sp. P5. *Polymer Degradation and Stability*. 95: 1969-1977.
- Johnvesly, B., B.R. Manjunath, G.R. Naik. 2002. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99. *Bioresource Technol.* 82: 61-64.
- Joshi, S.G., M. M. Tejashwini, N. Revati, R. Sridevi, D. Roma. 2007. Isolation, Identification and characterization of a feather degrading bacterium. *Inter J. Poultry Sci.* 6: 689-693.
- Jousson, O., B. Lechenne, O. Bontems, S. Capoccia, B. Mignon, J. Barblan, et al. 2004. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporium*. *Microbiology*. 150: 301–310.
- Jurasek, L., M. R. Carpenter, L. B. Smillie, A. Getler, S. Levis, L. H. Ericson. 1974. Amino acid sequence of *Streptomyces griseus* protease B, a major component of pronase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 61: 1095–1100.
- Kamalam, A., A. S. Thambiah. 1980. Growth pattern and constituents of dermatophytes in varied substrates. *Mycosen*. 23: 141–150.
- Kanekar, P. P., S. S. Nilegaonkar, S. S. Sarnaik, A. S. Kelkar. 2002. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. *Biores Technol.* 85: 87–93.
- Kantarcioglu, A.S., A. Yucel, G. S. de Hoog. 2002. Case report. Isolation of *Cladosporium cladosporioides* from cerebrospinal fluid. *Mycoses*. 45: 500–503.
- Katiyar, S., R. K. S. Kushwaha. 2002. Invasion and biodegradation of hair by house dust fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 50: 89–93.
- Kaul, S., G. Sumbali. 1997. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathologia*, 139: 137–140.
- Kim, J. M., W. J. Lim, H. J. Suh. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochem*. 37: 287–291.
- Kim, J. M., Y. M. Choi, H. J. Suh. 2005. Preparation of feather digests as fertilizer with *Bacillus pumilus* KHS-1. *J Microbiol Biotechnol*. 15: 472–476.
- Kim, J. S., L. D. Kluskens, W. M. de Vos, R. Huber, J. vand der Oost. 2004. Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to subtilisin. *J Mol Biol*. 335: 787–797.

- Kim, W. K., P. H. Patterson. 2000. Nutritional value of enzyme- or sodium hydroxide treated feathers from dead hens. *Poult Sci.* 79: 528-34.
- King, A.D., Jr., A.D. Hocking, J.I. Pitt. 1979. Dichloran rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 959-964.
- Kirk, P.M., P.F. Cannon, J. C. David, J. A. Stalpers. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi, ninth ed. CAB International, Wallingford.
- Klich, M., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. CBS, Utrecht.
- Klusken, L. D., W. G. B. Voorhorst, R. J. Siezen, R. M. Schwerdtfeger, G. Antranikian, J. van der Oost, et al. 2002. Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*. *Extremophiles*. 6: 185–194.
- Kojima, M., M. Kanai, M. Tominaga, S. Kitazume, A., Inoue, K. Horikoshi. 2006. Isolation and characterization of a featherdegrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. *Extremophiles*. 10: 229–235.
- Koolman, J., K.H. Roehm. 2005. Color Atlas of Biochemistry. 2 ed. Thieme. New York.
- Korkmaz H., H. Hür, S. Dinçer. 2004. Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* strain HK-1 from poultry waste. *Annals Microbiol.* 54(2): 201-211.
- Kornilowicz, T. 1991–1992. Studies on the mycoflora colonizing raw keratin wastes in soil. *Acta Mycologica*. 27: 231–245 (in Polish).
- Kornilowicz, T., 1994. Methods for determining keratinolytic activity of saprophytic fungi. *Acta Mycologica*. 29: 169–178.
- Kornilowicz-Kowalska, T. 1997. Studies on the decomposition of keratin waste by saprotrophic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. *Acta Mycologica*. 32: 51–79.
- Kornilowicz-Kowalska, T. 1999. Studies on the decomposition of keratin waste by saprotrophic microfungi. III. Activity and properties of keratinolytic enzymes. *Acta Mycologica*. 34: 65–78.
- Kowalik, R., E. Czerwinska. 1956. Microorganisms concerned in decaying cotton and wool fibers. *Acta Microbiologica Polonica* 5: 291–297 (in Polish).
- Kreplak, L., J. Doucet, P. Dumas, F. Briki. 2004. New aspects of the α -helix to β -sheet transition in stretched hard α -keratin fibers. *Biophysical Journal*. 87: 640–647.
- Kumar, A.G., S. Swarnalatha, S. Gayathri, N. Nagesh, G. Sekaran. 2008. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* 104: 411–419.
- Kumar, C. G., H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17: 561–594.

- Kumar, P., Y. F. Kazi, I. H. Soomro. 2012. A comparative characterization of indigenous keratinase enzymes from district Khairpur, Sindh, Pakistan. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25(1): 73-79.
- Kunert, J. 1972. Thiosulphate esters in keratin attacked by dermatophytes *in vitro*. *Sabouraudia*. 10: 6-13.
- Kunert, J. 1989. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporum gypseum*: a comparison. *J. Basic Microbiol.* 29: 597-604.
- Kunert, J. 1992. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses*. 35: 343-348.
- Kunert, J. 1992. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses*. 35: 343-348.
- Kunert, J. 2000. Physiology of keratinophilic fungi. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*, Revista Iberoamericana de Micologia, pp. 77-85. Bilbao.
- Kunert, J., Z. Stransky. 1988. Thiosulfate production from cysteine by the keratinophilic prokaryote *Streptomyces fradiae*. *Arch Microbiol.* 150: 600-601.
- Kushwaha, R. K. S. 1983. The *in vitro* degradation of peacock feathers by some fungi. *Mykosen*. 26: 324-326.
- Kushwaha, R.K.S. 2000. The genus *Chrysosporium*, its physiology and biotechnological potential. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*, Revista Iberoamericana de Micologia, pp. 66-76. Bilbao.
- LaI, S., R. C. Rajak, S. K. Hasija. 1996. Biodegradation of keratin by actinomycetes inhabiting gelatin factory campus at Jablapur: Screening of isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences India*, 66: 175-180.
- LaI, S., R. C. Rajak, S. K. Hasija. 1999. *In vitro* degradation of keratin by two species of *Bacillus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45, 283-287.
- Langeveld, J. P. M., J. J. Wang, D. F. M. van de Wiel, G. C. Shih, G. J. Garssen, A. Bossers, et al. 2003. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. *J. Inf. Dis.* 188: 1782-1789.
- Lastshaw, J. D., N. Musharaf, R. Retram. 1994. Processing of feather to maximize its nutrition Value for poultry. *Anim.Feed.Aci.Technol.* 47:179-188.
- Lateef, A., J. K. Oloke, E. B. Gueguim Kana, B. O. Sobowale, S. O. Ajao, B. Y. Bello. 2010. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64: 162-165.

- Lee, G. G., P. R. Ferket, J. C. H. Shih. 1991. Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. *FASEB Journal*. 59: 1312.
- Lee, H., D. B. Suh, J. H. Hwang, H. J. Suh. 2002. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Appl. Biochem Biotechnol*. 97: 123-133.
- Lee, K. H., K. K. Park, S. H. Park, J. B. Lee. 1987. Isolation, purification and characterization of keratinolytic proteinase from *Microsporum canis*. *Yonsei Med. J.* 28: 131-138.
- Lin, X., C. G. Lee, E. S. Casale, & J. C. H. Shih. 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl Environ Microbiol*. 58: 3271-3275.
- Lin, X., C. G. Lee, E. S. Casale, J. C. H. Shih. 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather- degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol*. 58: 3271- 3275.
- Lin, X., D. W. Kelemen, E. S. Miller, J. C. H. Shih. 1995. Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Appl Environ Microbiol*. 61: 1469-1474.
- Lin, X., G. D. Inglis, L. J. Yanke, K. J. Cheng. 1999. Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 23: 149-153.
- Lin, X., G. D. Inglis, L. J. Yanke, K. J. Cheng. 1999. Selection and characterization of feather degrading bacteria from canola meal compost. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol*. 23: 149-153.
- Lin, X., J. C. H. Shih, H. E. Swaisgood. 1996. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. *Appl Environ Microbiol*. 62: 4273-4275.
- Lo, W-H., J-R. Too, & J. Y W. 2012. Production of keratinolytic enzyme by an indigenous Feather-degrading strain *Bacillus cereus* Wu2. *J. Biosci. and Bioengineering*. 114(6): 640-647.
- Lucas, F. S., O. Broennimann, I. Febbraro, P. Heeb, 2003. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. *Microbial Ecol*. 45: 282-290.
- Macedo, A. J., W. O. B. Silva, R. Gava, D. Driemeier, J. A. P. Henriques, C. Termignoni. 2005. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 showing remarkable dehairing capabilities. *Appl Environ Microbiol*. 71: 594-596.
- Mahmoud, A.L.E., 1995. Dermatophytes and other keratinophilic fungi causing ringworm of horses. *Folia Microbiologica*. 40: 293-296.
- Malviya, H. K., R. C. Rajak, S. K. Hasija. 1992a. Purification and partial characterization of extracellular keratinases of *Scopulariopsis brevicaulis*. *Mycopathologia*. 119: 161-165.

- Malviya, H. K., R. C. Rajak, S. K. Hasija. 1992b. Synthesis and regulation of extracellular keratinases in three fungi isolated from the grounds of a gelatin factory, Jabalpur, India. *Mycopathologia*. 120: 1–4.
- Manczinger, L., M. Rozs, Cs. Vágólyi, F. Kevei. 2003. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 35–39.
- Mandels, G.R., W. H. Stahl, H. S. Levinson. 1948. Structural changes in wool degraded by the ringworm fungus *Microsporum gypseum* and other microorganisms. *Textile Res. J.* 18: 224–231.
- Marcondes, N. R., C. L. Taira, D. C. Vandresan, T. I. E. Svidzinski, M. K. Kadowaki, R. M. Peralta. 2008. New feather – degrading filamentous fungi, *Microb. Ecol.* 56: 13–17.
- Mathison, G.E., 1964. The microbiological decomposition of keratin. *Annales des Sociétés belges de Médecine tropicale*. 44: 767–792.
- McCarthy, B.J., P.H. Greaves. 1988. Mildew – causes, detection methods and prevention. *Wool Sci. Rev.* 85: 27–48.
- McQuade, A.B. 1964. Microbiological degradation of wool. *Dermatologica* 128: 249–266.
- Means, G. E., R. E. Feeney. 1998. Chemical modifications of proteins: A review. *J. Food Biochem.* 22: 399–425.
- Mercantini, R., R. Marsella, G. Prignano, D. Moretto, W. Marmo, F. Leonetto, G. C. Fuga, G. Serio. 1989. Isolation of keratinophilic fungi from the dust of ferry boats and trains in Italy. *Mycoses* 32: 590–594.
- Michalska, I., 1957. Fungi and bacteria as a factor in decaying of wool fiber. *Acta Microbiologica Polonica*. 6: 171–189 (in Polish).
- Midgley, G., R. J. Hay, Y. M. Clayton. 1997. Medical Mycology. Czelej, Lublin (in Polish).
- Mini K.D., K. P. Mini, J. Methew. 2012. Screening of fungi isolated from poultry farm soil for keratinolytic activity. *Advances in Applied Science Research*. (3)4: 2073–2077.
- Mitola, G., F. Escalona, R. Salas, E. Garcia, A. Ladesma. 2002. Morphological characterization of in vitro human hair keratinolysis, produced by identified wild strains of *Chrysosporium* species. *Mycopathologia*. 156: 163–169.
- Mitsuiki, S., M. Ichikawa, T. Oka, M. Sakai, Y. Moriyama, Y. Sameshima, et al. 2004. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardopsis* sp. TOA-1. *Enz. Microbial Technol.* 34: 482–489.
- Moallaei, H, F. G. Zaini, B. Larcher, J. Beucher, P. Bouchara. 2006. Partial purification and characterization of a 37 KDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. *Mycopathologia*. 161: 369–375.

- Mohamedin, A. H. 1999. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as substrate. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 43, 13-21,
- Mohorcic, M., A. Torkar, J. Friedrich, J. Kristl, S. Murdan. 2007. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. *Int. J. Pharmaceutics*. 332: 196–201.
- Montero-Barrientos, M., R. Rivas, E. Velazquez, E. Monte, M. G. Roig. 2005. *Terrabacter terrae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil in Spain. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 55: 2491–2495.
- Moubahser, A.H., M. A. El-Naghy, H. M. Abdel-Fattah, S. M. Maghazy. 1992. Keratiolytic fungi in Egyptian soils. I. Baited with hair and wool. *Zentralblatt für Microbiologie* 147: 529–535.
- Muhsin, T.M., A.H. Aubaid. 2000. Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var *erinacei*. *Mycopathologia*. 150: 121–125.
- Mukhopadhyay, R. P., A. L. Chandra. 1990. Keratinase of a Streptomycetes. *Indian J. Exp. Biol.* 28: 575–577.
- Mulcock, A.P. 1959. Discoloration of wool fibres by a fungus. *Nature*. 183: 1281–1282.
- Mulcock, A.P. 1965. *Peyronellaea glomerata* – a fungus growing within the fibres of the unshorn fleece. *Aust. J. Agri Res.* 16: 691–697. MycoBank, 2008. <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx>.
- Nagal, S., P.C. Jain. 2010. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feather. *Bra. J. Microbiol.* 41: 196-200.
- Nam, G.W., D. W. Lee, H. S. Lee, N. J. Lee, B. C. Kim, E. A. Choe, J. K. Hwang, M. T. Suhartono, Y. R. Pyun. 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 178: 538–547.
- Neena, K. 1993. Cosmetic treatment of hirsutism. *Indian J. Dermatol. Venerol. Leprol.* 59: 109–116.
- Nigam, N., S. Dhawan, M. V. Nair. 1994. Deterioration of feather and leather objects of some Indian Museum by keratinophilic and non-keratinophilic fungi. *Int. Biodet. Biodeg.* 33: 145–152.
- Nigam, N., K. S. Kushwaha. 1992a. Biodegradation of wool by *Chrysosporium keratinophilum* acting singly or in combination with other fungi. *Transactions of Mycological Society of Japan* 33: 481–486.
- Nigam, N., R. K. S. Kushwaha, 1992b. Biodegradation of keratinous substrates. In: Toishi, K., Arai, H., Kenjo, T., Yamano, K. (Eds.), *Biodeterioration of Cultural Property* 2.

- Proceedings of the Second International Conference on Biodeterioration of Cultural Property, Yokohama, pp. 180–185.
- Noronha, E. F., B. D. Lime, C. M. Sá, C. R. Felix. 2002. Heterologous production of *Aspergillus fumigatus* keratinase in *Pichia pastoris*. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 563–568.
- Noval, J. J., W. J. Nickerson. 1959. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 77: 251–263.
- Odetallah, N. H., J. J. Wang, J. D. Garlich, J. C. H. Shih. 2003. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poultry Science*. 82: 664–670.
- Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallam, S. Al-Zarban. 1998. Potentials for biotechnological applications of keratin degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*. 66: 1–11.
- Oyeka, C.A. 2000. *Trichophyton mentagrophytes* a keratinophilic fungus. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*, *Revista Iberoamericana de Micología*, pp. 60–65.
- Papadopoulos, M. C., A. R. A. Boushy, E. Roodbeen, E.H. Ketelaars. 1986. Effect of Processing Time and Moisture Content on Amino Acid Composition and Nitrogen Characteristics of Feather Meal. *Animal Feed Science and Technology*. 14:279-290.
- Parbery, D.G. 1974. Biodeterioration in Australia. *Int. Biodeter. Bul.* 10: 63–74.
- Parbery, D.G. 1977. Isolation techniques and identification of fungal biodeteriogens from soil. In: Walters, A.H. (Ed.), *Biodeterioration Investigation Techniques*. Applied Science Publishers Ltd, London, pp. 123–148.
- Park, G-T., H-J. Son. 2009. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiol Res.* 164: 478—485
- Parry, D. A. D., A. C. T. North. 1998. Hard α -keratin intermediate filament chains: Substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains. *J. Str. Biol.* 122: 67–75.
- Peddu, J. L., C. M. K. Chitturi and V. V. Lakshmi. 2010. Purification and Characterization of Keratinase from Feather Degrading *Bacillus* sp.. *The Internet J Microbiology*. 8(2)
- Plummer, T. H., A. L. Tarentino, C. R. Hauer. 1995. Novel, specific O-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 33192–33196.

- Porres, J. M., M. J. Benito, X. G. Lei. 2002. Functional expression of keratinase (kerA) gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 24: 631–636.
- Perna, A., R.K.S. Kushwaha. 2011. Keratinase Activity of Some Hyphomycetous Fungi From Dropped off Chicken Feathers. *Int. J. Pharmaceut.Biol. Arch.* 2(6):1745-1750
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 711-753.
- Pugh, G.J.F., M. D. Evans. 1970a. Keratinophilic fungi associated with birds. I. Fungi isolated from feathers, nests and soils. *Transactions of British Mycological Society* 54: 233–240.
- Pugh, G.J.F., M. D. Evans. 1970b. Keratinophilic fungi associated with birds. II. Physiological studies. *Transactions of British Mycological Society* 54: 241–250.
- Pugh, G.J. F., G. E. Mathison. 1962. Studies on fungi in coastal soils. III. An ecological survey of keratinophilic fungi. *Transactions of British Mycological Society* 45: 567–572.
- Rajak, R.C., H.K. Malviya, H. Deshpande, S.K. Hasija. 1991. Production and comparative characterization of keratinase from *Absidia cylindrospora* and *Rhizomucor pusillus*, *Ind. J. Microbiol.* 31: 243–250.
- Rajak, R.C., H. K. Malviya, H. Deshapande, S. K. Hasija, 1992. Keratinolysis by *Absidia cylindrospora* and *Rhizomucor pusillus*: biochemical proof. *Mycopathologia* 118: 109–114.
- Rajak, R.C., S. Parwekar, H. Malviya, S. K. Hasija. 1991. Keratin degradation by fungi isolated from the grounds of a gelatin factory in Jabalpur, India. *Mycopathologia* 114: 83–87.
- Ramesh, V.M., A. Hilda. 1999. Incidence of keratinophilic fungi in the soil of primary schools and public parks of Madras city, India. *Mycopathologia* 143: 139–145.
- Ramnani, P., R. Gupta. 2004. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnol Appl. Biochem.* 40: 491–496.
- Riessen, S., G. Antranikian. 2001. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles.* 5: 399–408.
- Riffel, A., F. Lucas, P. Heeb, A. Brandelli. 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch Microbiol.* 179: 258-265.
- Riffel, A., A. Brandelli. 2002. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 29: 255–258.

- Riffel, A., A. Brandelli. 2006. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian J. Microbiol.* 37: 395–399.
- Riffel, A., Brandelli, A., Bellato, C. M., Souza, G. H. M. F., Eberlin, M. N., & Tavares, F. C. A. 2007. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *Journal of Biotechnology*, 128: 693–703.
- Riffel, A., F. P. Lucas, Heeb, A. Brandelli. 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.* 179: 258–265.
- Riffel, A., Lucas, F., Heeb, P., & Brandelli, A. 2003a. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.* 179: 258–265.
- Riffel, A., S. Ortolan, & A. Brandelli 2003b. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78: 855–859.
- Rozs, M., L. Manczinger, C. Vagvolgyi, F. Kevei. 2001. Secretion of a trypsin-like thiol protease from by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 221–224.
- Ruffin, P., S. Andrieu, G. Biserte, J. Biguet. 1976. Sulphitolysis in keratinolysis. Biochemical proof. *Sabouraudia* 14: 181–184.
- Saber, W. I. A., M. M. El-Metwally, M.S.El-Hersh. 2009. Keratinase Production and Biodegradation of Some Keratinous Wastes by *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus nidulans*. *Res. J. Microbiol.* ISSN 1816-4935.
- Safranek, W. W., R. D. Goos. 1982. Degradation of wool by saprotrophic fungi. *Can. J. Microbiol.* 28: 137–140.
- Salata, B., W. Rudnicka-Jeziarska. 1979. Ascomycetes. In: Kochman, J., Skirgiello, A. (Eds.), *Mycota*, vol. 12. PWN, Warszawa (in Polish).
- Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*. In: *Studies in Mycology*, vol. 6. CBS, Baarn.
- Samson, R. A., E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, O. Filtenborg. 2002. Introduction to Food and Airborne Fungi. CBS, Utrecht. Seifert, K.A., Gams, W., 2001. The taxonomy of anamorphic fungi. In: Esser, K., Lemke, P.A. (Eds.), *The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. vol. 7A. In: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.), *Systematics and Evolution*. Springer, Germany, pp. 307–347.
- Samson, R. A., J. Pitt. 2000. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Sangali S, A. Brandelli. 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J. Appl. Microbiol.* 89: 735–743.

- Sangali, S. A. Brandelli. 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J. Appl. Microbiol.* 89: 735–743.
- Sangali, S., & Brandelli, A. 2000a. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J. Appl. Microbiol.* 89: 735–743.
- Sangali, S., & Brandelli, A. 2000b. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. *Appl Biochem Biotechnol.* 87: 17–24.
- Santos, R. M. D. B., A. A. P. Firmino, C. M. de Sa, C. R. Felix. 1996. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Curr. Microbiol.* 33: 364–370.
- Savitha, G. M., Joshi, M. M. Tejashwini, N. Revati, R. Sridevi and D. Roma. 2007. Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium. *Int. J. Poultry Sci.* 6 (9): 689-693.
- Schraeder, C. E., R. T. Ervin, J. L. Eberspacher. 1998. Economic analysis of the feasibility of using enzymes in the unhairing process. *J. Am. Leather Chemists Ass.* 93: 265–271.
- Schrooyen, P. M. M., P. J. Dijkstra, R. C. Oberthur, A. Bantjes, J. Feijen. 2001. Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. *J. Agri. Food Chem.* 49: 221–230.
- Shama, G., P. G. Berwick. 1991. Production of keratinolytic enzymes in a rotating frame bioreactor. *Biotechnol Tech.* 5:359–362.
- Shih, J. C. H. 1993. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization—A review. *Poultry Science.* 72: 1617–1620.
- Shih, J. C. H., J. J. Wang, 2006. Keratinase technology: From feather degradation and feed additive, to prion destruction. CAB Reviews: *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 1(42): 6 pp.
- Shih, J. C. H., C. M. Williams, 1990. Feather-lysate, a hydrolyzed feather feed ingredient and animal feeds containing the same. US Patent 4908220.
- Shih, J.C.H., W.C. Michael, 1992. Purified *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase. United States Patent 5171682
- Shipper, M. A. A. 1976. On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. In: Studies in Mycology, vol. 12. CBS, Baarn. Simpanya, M.F., 2000. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi, Revista Iberoamericana de Micologia, pp. 1–12. Bilbao.
- Shrinivas, D., G. R. Naik. 2011. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 65: 29-35

- Simpanya, M.F., M. Baxter. 1996. Isolation of fungi from soil using the keratin baiting technique. *Mycopathologia*. 136: 85–89.
- Slavtcheff, C. S., J. W. Goldberg, A. Shiloach, M. Massaro, C. E. Kennedy. 2004. Method and kit for reducing irritation of skin depilatory compositions. US Patent 20040219118.
- Son, H. J., H. C. Park, H. S. Kim, C. Y. Lee. 2008. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. *Biotechnol Lett*. 30: 461–465.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, K. Suzuki. 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*. 328: 721–732.
- Sousa, F., S. Jus, A. Erbel, V. Kokol, A. Cavaco-Paulo, G. M. Gubitz, 2007. A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enz. Microb. Technol*. 40: 1772–1781.
- Stahl, M. L., E. Ferrari. 1984. Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with in-vitro derived mutant. *J. Bacteriol*. 158: 411–418.
- Stahl, W.H., B. McQue, G. R. Mandels, R. G. H. Siu. 1950. Studies on the microbiological degradation of wool. Digestion of normal and modified fibrillar proteins. *Textile Res. J*. 20: 570–579.
- Stefaniak, H. 1969. Protection of textiles against microorganisms. Postępy mikrobiologii 8: 157–160 (in Polish).
- Steinert, P. M. 1993. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J. Investigative Dermatol*. 100: 729–734.
- Straus, D.C. (Ed.), 2004. Sick Building Syndrome. Advances in Applied Microbiology, vol. 55. Elsevier Academic Press, London.
- Suh, H. J., H. K. Lee, 2001. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *J. Protein Chem*. 20: 165–169.
- Summerbell, R.C., J. Kane, S. Krajden. 1989. Onychomycosis, tinea pedis and tinea manuum caused by non-dermatophytic filamentous fungi. *Mycoses*. 32: 609–619.
- Suntornsuk W, L. Suntornsuk. 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp.FK 46 in submerged cultivation. *Bioresour. Technol*. 86: 239–243.
- Suntornsuk W, J. Tongjun, P. Onnim, H. Oyama, K. Ratanakanokchai, T. Kusamran, K. Oda. 2005. Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 21: 1111–1117.
- Suzuki, Y., Y. Tsujimoto, H. Matsui, K. Watanabe, 2006. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J. Biosci. Bioengin*. 102: 73–81.

- Syed, D. G., J. C. Lee, W.-J. Li, C.-J. Kim, D. Agasar. 2009. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technol.* 100: 1868–1871.
- Szostak-Kot, J., B. Błyskal, J. Sygula-Cholewinska. 2004a. Biodeterioration of dyed woollen textiles by fungi. In: Rong, W., Changju, Y., Min, J., Jianghua, L., Xuzhe, F., Liqin, L., Jiajie, L., Zhenwang, K., Song, Ch., Yan, Z. (Eds.), *Proceedings of the Fourteenth IGWT Symposium, Focusing New Century: Commodity – Trade – Environment*. China Agriculture Press, Beijing, pp. 197–201.
- Szostak-Kot, J., B. Błyskal, J. Sygula-Cholewinska. 2004b. Influence of *Myceliophthora* sp. on tensile properties of woollen textiles. In: Zuchowski, J. (Ed.), *Science of Commodities and Integration with European Union*. Wydawnictwo Instytutu Technologii Eksploatacji, Radom, pp. 589–592 (in Polish).
- Takami, H., T. Kobayashi, R. Aono, K. Horikoshi. 1992a. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the structural gene for a thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 101–108.
- Takami, H., F. Nakamura, R. Aono, K. Hirishiri. 1992b. Degradation of human hair by a thermostable alkaline proteinase from alkalophilic *Bacillus* sp. no. AH-101. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1667–1669.
- Takami, H., Y. Nogi, K. Horikoshi, 1999. Reidentification of the keratinaseproducing facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. *Extremophiles* 3: 293–296.
- Tan, S., E. S. Hoekstra, R. A. Samson. 1994. *Fungi That Cause Superficial Mycoses*. CBS, Baarn.
- Tapia, D. M. T., J. Contiero. 2008. Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. *African J. Biotechnol.* 7(3): 296–300.
- Tarentino, A. L., G. Quinones, B. G. Grimwood, C. R. Hauer, T. H. Plummer. 1995. Molecular cloning and sequence analysis of flavastascin: An O-glycosylated prokaryotic zinc metalloendopeptidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 281–285.
- Thanikaivelan, P., J. R. Rao, B. U. Nair, T. Ramasami. 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends Biotechnol.* 22: 181–188.
- The Index Fungorum, 2008. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>.
- Thys, R. C. S., A. Brandelli. 2006. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *J Appl Microbiol.* 101: 1259–1268.
- Thys, R. C. S., S. O. Guzzon, F. Cladera-Olivera, A. Brandelli. 2006. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. on feather meal using response surface methodology. *Process Biochem.* 41: 67–73.

- Thys, R. C. S., F. S. Lucas, A. Riffel, P. Heeb, A. Brandelli. 2004. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 181–186.
- Timar-Balazsy, A., Eastop, D., 1998. Chemical Principles of Textile Conservation. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Ulfig, K. 2003. Factors influencing the occurrence of keratinolytic and keratinophilic fungi in sewage sediments. In: *Zeszyty Naukowe*, vol. 932. Politechnika Lodzka, Lodz, pp. 1–146 (in Polish).
- Van Oorschot, C. A. N. 1980. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. In: *Studies in Mycology*, vol. 20. CBS, Baarn.
- Vanbreuseghem, R. 1952. Keratin digestion by dermatophytes: a specific diagnostic method. *Mycologia*. 44: 176–182.
- Varela, H., M. D. Ferrari, L. Belobrajdic, A. Vázquez, M. L. Loperena. 1997. Skin unhairing proteases of *Bacillus subtilis*, production and partial characterization. *Biotechnol. Lett.* 19: 755–758.
- Venter, H., G. Osthoff, D. Litthauer. 1999. Purification and characterization of a metalloprotease from *Chryseobacterium indologenes* Ix9a and determination of the amino acid specificity with electrospray spectrometry. *Protein Expression and Purification*, 15: 282–295.
- Vesela, M., J. Friedrich. 2009. Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marquandii*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 14: 84–90.
- Vidal, P., M. de los Angeles Vinuesa, J. M. Sanchez-Puelles, J. Guarro. 2000. Phylogeny of the anamorphic genus *Chrysosporium* and related taxa based on rDNA internal transcribed spacer sequences. In: Kushwaha, R.K.S., Guarro, J. (Eds.), *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*, Revista Iberoamericana de Micologia, pp. 22–29. Bilbao.
- Vignardet, C., Y. C. Guillaume, L. Michel, J. Friedrich, J. Millet. 2001. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *Int. J. Pharmaceutics*, 224: 115–122.
- Wang, J. J., J. C. H. Shih. 1999. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 22: 608–616.
- Wang, J. J., K. Rojanatavorn, J. C. H. Shih. 2004. Increased production of *Bacillus* keratinase by chromosomal integration of multiple copies of the *kerA* gene. *Biotechnol. Bioengin.* 87: 459–464.

- Wang, J. J., H. E. Swaisgood, J. C. H. Shih. 2003a. Bioimmobilization of keratinase using *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* systems. *Biotechnol. Bioengin.* 81: 421–429.
- Wang, J. J., H. E. Swaisgood, J. C. H. Shih. 2003b. Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis. *Enz. Microb. Technol.* 32: 812–819.
- Wang, X., C. M. Parsons. 1997. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hog hair meals. *Poultry Sci.* 76: 491–496.
- Wawrzekiewicz, K., T. Wolski, J. Lobarzewski. 1991. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia.* 114: 1–8.
- Wawrzekiewicz, K., G. Ziolkowska, J. Wawrzekiewicz, 1997. In vitro biodegradation of hair from different animal species by *Microsporum canis*. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 39: 15–25.
- Werlang, P. O., A. Brandelli. 2005. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120: 71–80.
- White, W.L., G.R. Mandels, R. G. H. Siu. 1950. Fungi in relation to the degradation of woollen fabrics. *Mycologia.* 62: 199–223.
- Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Mackenzi, J. C. H. Shih. 1990. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6): 1509-1515.
- Williams, C. M., Lee, C. G., Garlich, J. D., & Shih, J. C. H. 1991. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, featherlysate, as a feed protein. *Poultry Science*, 70: 85–94.
- Williams, K. A., P. V. Nelson. 1992. Low, controlled nutrient availability provided by organic waste materials for *Chrysanthemum*. *J. Am. Society Horticult. Sci.* 117: 422–429.
- Williams, C. M., J. C. H. Shih,, 1989. Enumeration of Some Microbial Groups in Thermophilic Poultry Waste Digesters and Enrichment of a Feather-Degrading culture. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 25-35.
- Yamamura S, Y. Morita, Q. Hasan, S. R. Rao, Y. Murakami, K. Yokoyama, et al. 2002. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. *J Biosci Bioeng.* 93: 595-600.
- Yamamura, S., Y. Morita, Q. Hasan, K. Yokoyama, E. Tamiya. 2002. Keratin degradation: A cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 294: 1138–1143.
- Yamauchi, K., A. Yamauchi, T. Kusunoki, A. Khoda, Y. Konishi. 1996. Preparation of stable aqueous solutions of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. *J. Biomed. Material Res.* 31: 439–444.

- Yoshioka, M., T. Miwa, H. Horii, M. Takata, T. Yokoyama, K. Nishizawa, et al. 2007. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. *J. Appl. Microbiol.* 102: 509–515.
- Yu, R.J., S. R. Harmon, J. Blank, 1968. Isolation and Purification of an Extracellular Keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Bacteriol.* 96:435.
- Zaghloul, T. I. 1998. Cloned *Bacillus subtilis* alkaline protease (aprA) gene showing high level of keratinolytic activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70/72: 199–205.
- Zaghloul, T. I., M. A. Haroun, K. El-Gayar, A. Abedalal. 2004. Recycling of keratin-containing materials (chicken feather) through genetically engineered bacteria. *Polymer–Plastics Technol. Engin.* 43: 1589–1599.
- Zare, R., W. Gams, 2001. A revision of *Verticillium* section Prostrata IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73: 1-50.
- Zerdani, I, M. Faid, A. Malki. 2004. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in Morocco. *Afr. J. Biotech.* 3: 67-70.
- เลขา มาโนช อรอุมา เจียมจิตต์ ธิตา เดชฮาบ ผจงจิตต์ ภูจิณญาณ์ และ ยุพดี เผ่าพันธุ์. 2548. ชนิดและการแพร่กระจายของเชื้อ ราจากดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินทำการเกษตรและดินจากแหล่งอื่นๆ น 737-746. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 43 สาขาพืช
- กฤษฎี รังสิยานนท์. 2545. การโคลนยีนแสดงเอนไซม์เคราตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* KUB-K0006. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

สูตรอาหาร PDA

มันฝรั่ง	200 กรัม
วุ้น	17 กรัม
เดกโทรส	30 กรัม
น้ำ	1 ลิตร

เตรียมโดยต้มมันฝรั่งกับน้ำกลั่น 500 ml จนเปื่อย กรองเอาแต่น้ำใส เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แล้วเติมวุ้นลง อย่าต้มมันฝรั่งนานเกินไป เพราะน้ำตาลอาจรวมตัวเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น สูตรนี้อาจใช้น้ำตาลทราย (sucrose) 10 g แทนน้ำตาลเดกโทรสได้ (นุกูล, 2551)

สูตรอาหาร PDA ที่ผสม Apsa 80 1 %

มันฝรั่ง	200 กรัม
วุ้น	17 กรัม
เดกโทรส	30 กรัม
น้ำ	1 ลิตร
Apsa 80	1 %

เตรียมโดยต้มมันฝรั่งกับน้ำกลั่น 500 ml จนเปื่อย กรองเอาแต่น้ำใส เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แล้วเติมวุ้นลง อย่าต้มมันฝรั่งนานเกินไป เพราะน้ำตาลอาจรวมตัวเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น สูตรนี้อาจใช้น้ำตาลทราย (sucrose) 10 g แทนน้ำตาลเดกโทรสได้ และเติม Apsa 80 1 % (King at al., 1979)

สูตรอาหาร keratin (1%) agar plate

Agar	15 กรัม
MgSO ₄ .H ₂ O	0.5 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.1 กรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 กรัม
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.005 กรัม
ขนไก่ผง	1%

เตรียมโดยนำสารเคมีแต่ละชนิดมาผสมในน้ำกลั่น 1000 ml จากนั้นเติมวุ้นและขนไก่ ปรับ pH ให้ได้ 7.5 (Wawrzekiewicz at al., 1991)

สูตรอาหารอาหาร keratin broth

MgSO ₄ .H ₂ O	0.5 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.1 กรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 กรัม
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.005 กรัม
ขนไก่ผง	1%

เตรียมโดยนำสารเคมีแต่ละชนิดมาผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml จากนั้นเติมขนไก่ลงไป ปรับ pH ให้ได้ 7.5 (Wawrzekiewicz et al., 1991)

สูตรอาหาร Nutrient agar

Nutrient broth	0.8 g
ผงวุ้น	15 g

เตรียมโดยนำสารเคมีแต่ละชนิดมาผสมในน้ำกลั่น 1000 ml จากนั้นเติมขนไก่ ปรับ pH ให้ได้ 7.5 (Sarita et al., 2010)

อาหาร Horikoshi media

Soluble starch	5 g
Peptone	5g
Glucose	5g
KH ₂ PO ₄	1g
Mgso ₄ 7H ₂ O	0.2g
Na ₂ CO ₃	1g
Yeast extract	5g
Feathers	10 g

เตรียมโดยนำสารเคมีแต่ละชนิดมาผสมในน้ำกลั่น 1000 ml จากนั้นเติมขนไก่ ปรับ pH ให้ได้ 7.5 (Sarita et al., 2010)

อาหาร Feahter meal media I

NaCl	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.3g
KH ₂ PO ₄	0.4g
Feather	10g

เตรียมโดยนำสารเคมีแต่ละชนิดมาผสมในน้ำกลั่น 1000 ml จากนั้นเติมขนไก่ ปรับ pH ให้ได้ 7.5 (Sarita et al., 2010)

อาหาร Feather meal media II

NH ₄ Cl	0.5g
--------------------	------

NaCl	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.3g
KH ₂ PO ₄	0.4g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.1g
Yeast extracts	0.1g
Feather	10g

เตรียมโดยนำสารเคมีแต่ละชนิดมาผสมในน้ำกลั่น 1000 ml จากนั้นเติมชนไก่ ปรับ pH ให้ได้

7.5 (Sarita et al., 2010)

อาหาร Feather meal agar

NH ₄ Cl	0.5g
NaCl	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.3g
KH ₂ PO ₄	0.4g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.1g
Yeast extract	0.1g
Feather	10g
Agar	20 g

เตรียมโดยนำสารเคมีแต่ละชนิดมาผสมในน้ำกลั่น 1000 ml จากนั้นเติมชนไก่ และอุ่นปรับ pH

ให้ได้ 7.5 (Sarita et al., 2010)

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ตามวิธีการของ Gomori, 1955 อ้างโดย Perin และ Dempsey, 1974 เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลาย A : 0.05 M dibasic sodium phosphate (Na₂HPO₄ 7.80 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) สารละลาย B : 0.05 M Monobasic sodium phosphate (NaH₂PO₄·2H₂O 8.90 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ดังตาราง

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)

pH	A มิลลิลิตร	A มิลลิลิตร
----	-------------	-------------

5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

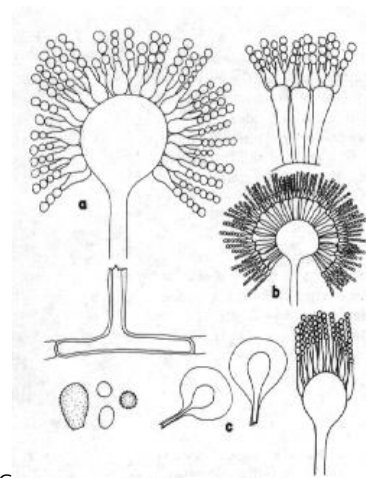
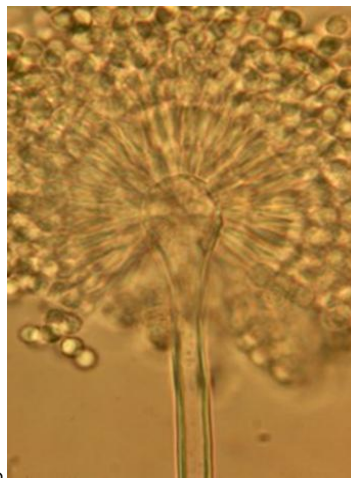
(การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer, 2555))

ภาคผนวก ข

แนวทางการพิสูจน์เชื้อราจาก Dichotomous keys of simple fungi

เชื้อ FK1

1. Spores 1-celled [2](#)
2. [\(1\)](#) Colonies, spores, and other tissues colourless or brightly coloured [3](#)
3. [\(2\)](#) Spores produced in chains [4](#)
4. [\(3\)](#) Conidiophores with a swollen head or vesicle bearing bottle-shaped phialides [Aspergillus](#) sp.

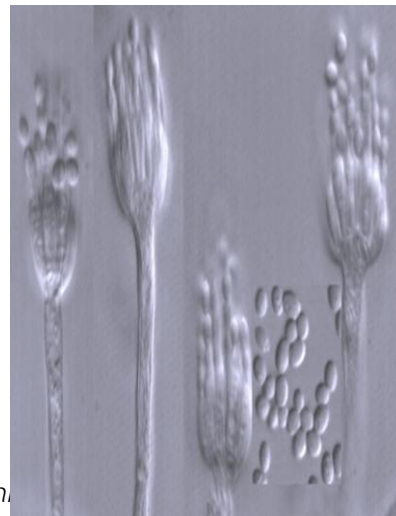
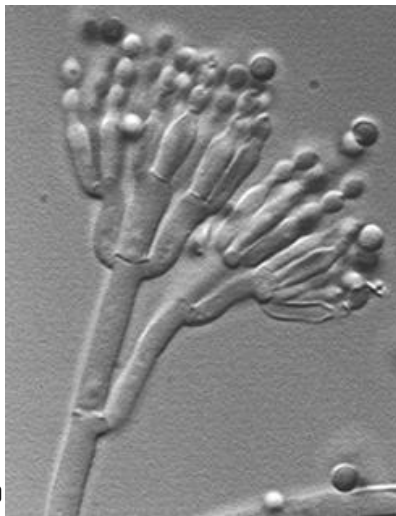


ลักษณะเชื้อ [Aspergillus](#) sp. ทาง microscopic morphology (Identification of moulds, 2555)

เชื้อ FK2

1. Spores 1-celled [2](#)
2. [\(1\)](#) Colonies, spores, and other tissues colourless or brightly coloured [3](#)
3. [\(2\)](#) Spores produced in chains [4](#)
4. Conidiophores not swollen at apex [5](#)
5. [\(4\)](#) Spores in unbranched chains, borne from clusters of cylindrical to bottle-shaped phialides; colonies usually green

Penicillium sp.



ลักษณะเชื้อ

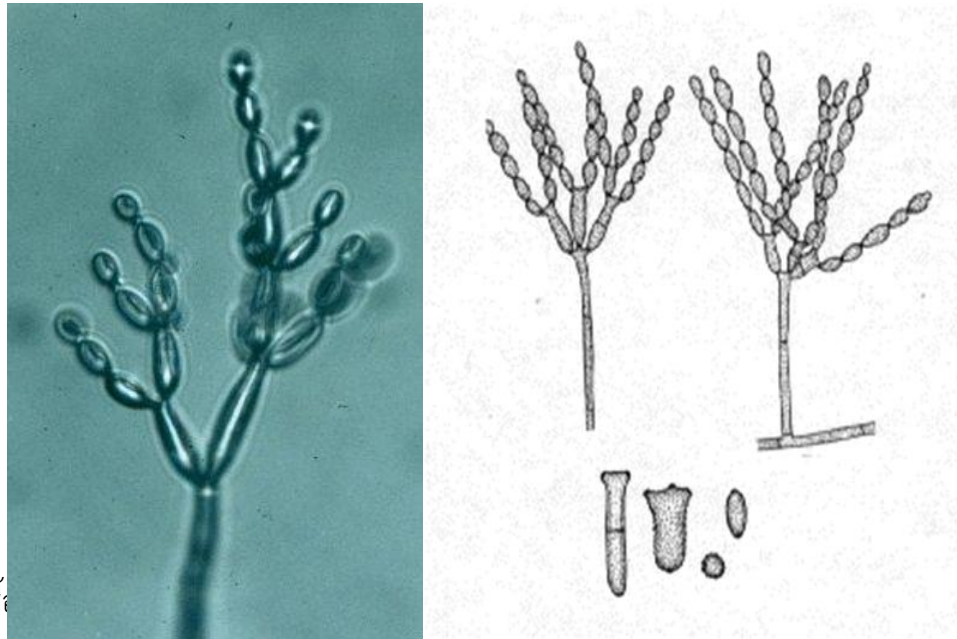
Pen

orphology

(Identification of moulds, 2555)

FK3

1. Spores with more than one cell [12](#)
 12. [\(1\)](#) Spores with transverse septa only [13](#)
 13. [\(12\)](#) Spores dark, produced in branched chains
- [Cladosporium](#) sp.

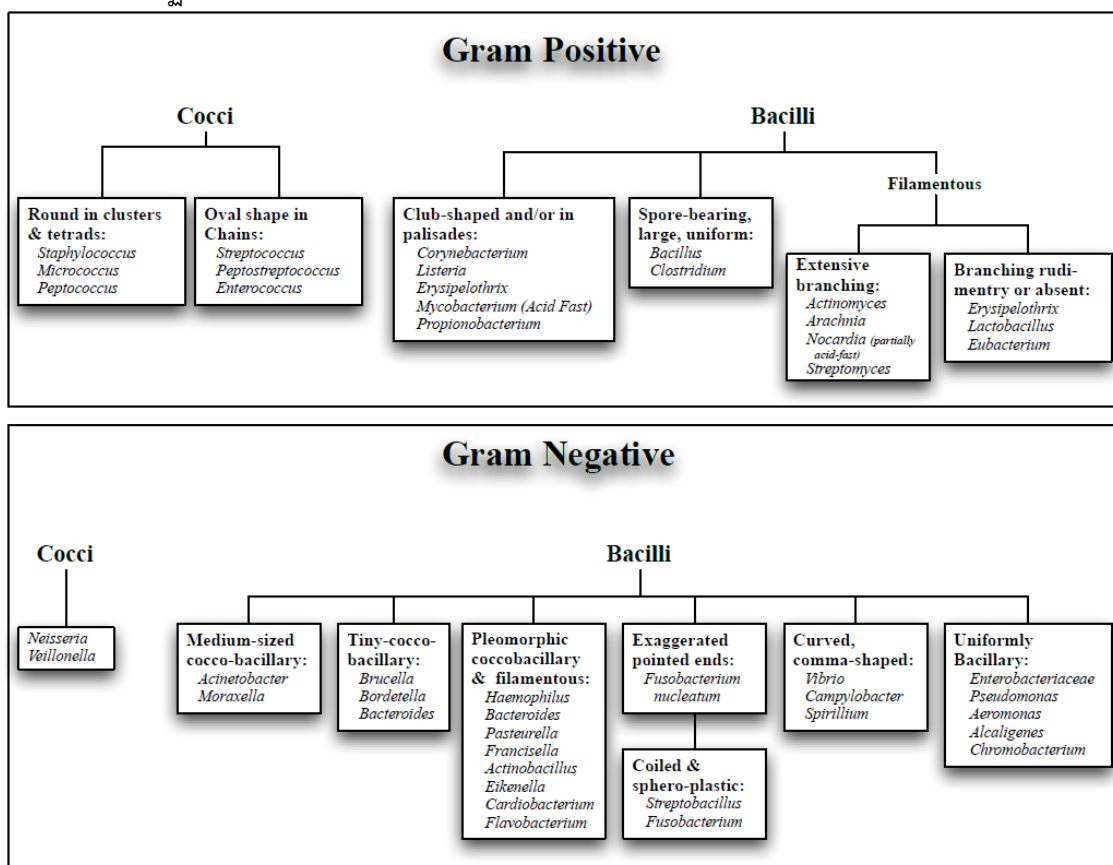


ลักษณะเชื้อ
(2555)

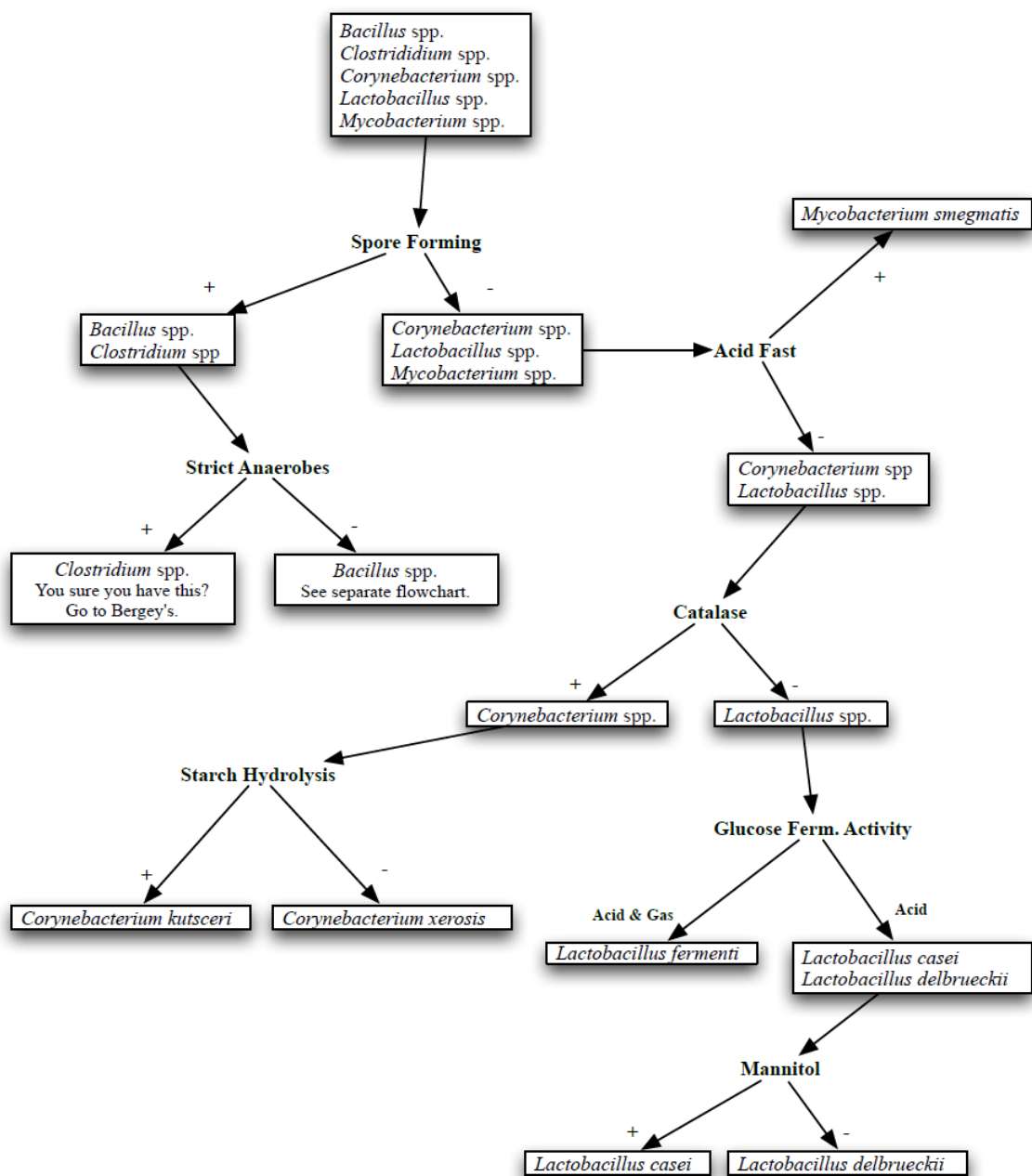
ภาคผนวก ค
 แนวทางการพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย (Genus *Bacillus*)
 สรุปลจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

1. การหาความต่างกันโดยใช้ปฏิกิริยาแกรม (Gram's reaction) และสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอาศัย Flowchart ต่อไปนี้

1.1 ปฏิกิริยาแกรมและสัณฐานวิทยาเบื้องต้น



1.2 สัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้น

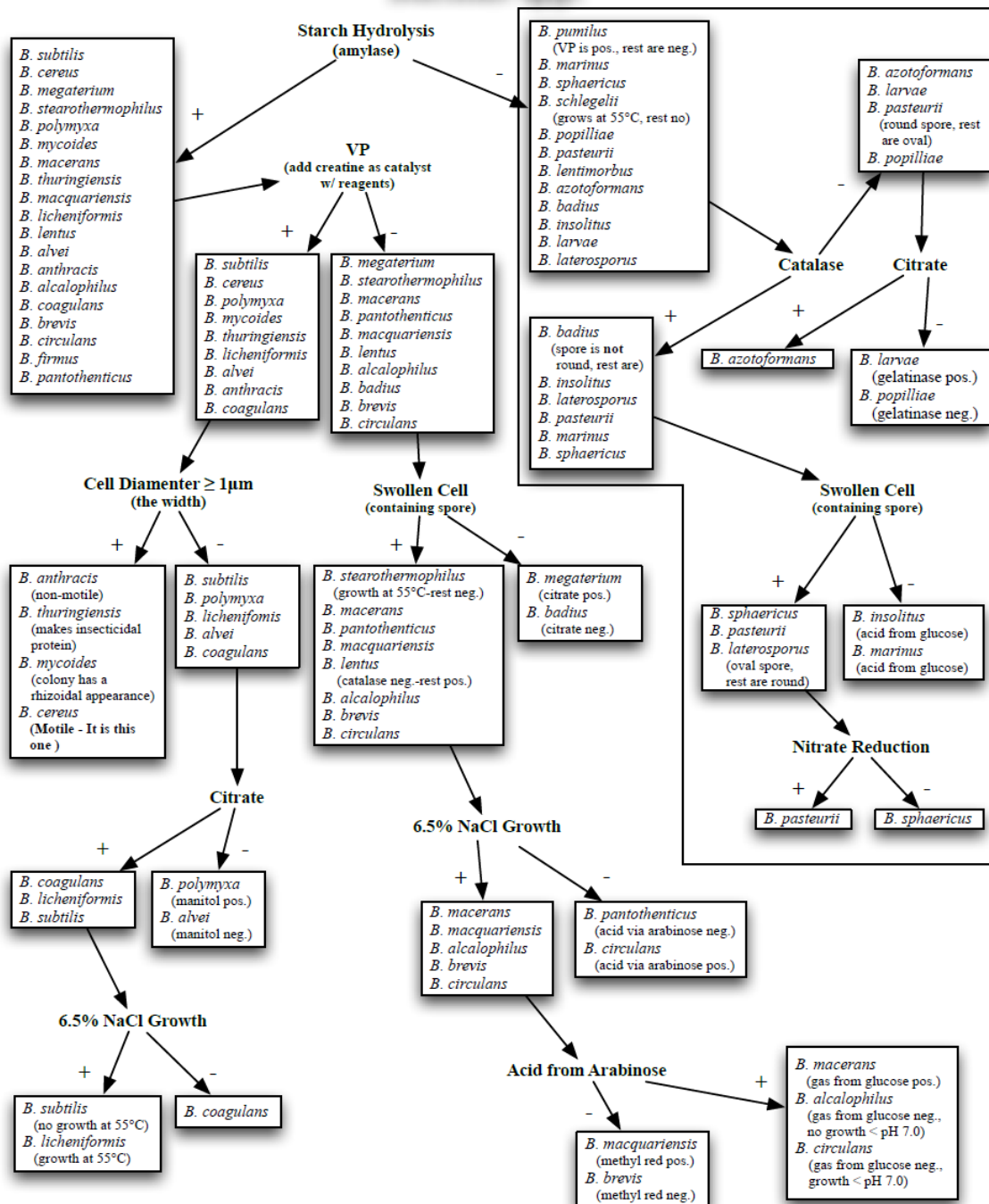


2. การยืนยันด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี

พิสูจน์คุณสมบัติทางชีวเคมีตามผังใน Flowchart ของ *Bacillus* spp. ID

Bacillus spp. ID Flowchart

Bacillus spp.



ภาคผนวก ง
อาหารและแนวทางปฏิบัติสำหรับการพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย (Genus *Bacillus*)
 (เลือกทำเฉพาะการทดสอบที่จำเป็นเท่านั้น)

1. Oxidase Test

หลักการ เป็นการทดสอบหา Cytochrome C oxidase ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะไป oxidize สารเคมีทำให้เกิดสารประกอบสีม่วง

อุปกรณ์และน้ำยา

1. Kovac's oxidase reagent (1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride)
2. กระจกชกรอง

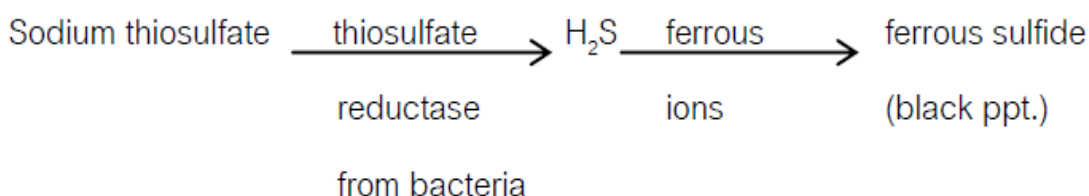
วิธีทำ

เลี้ยงเชื้อใน Nutrient agar นำมาขีดบนกระจกชกรองที่หยด Kovac's oxidase reagent โดยใช้ platinum loop หรือแท่งแก้ว

การแปลผล ถ้าเชื้อมี Cytochrome C oxidase จะให้ผลเป็นสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

2. Triple sugar iron agar (TSI agar)

หลักการของ TSI ในอาหาร TSI ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิดคือ 0.1% glucose น้ำตาล Lactose และ Sucrose อย่างละ 1% เนื่องจากที่ผิว slant มีเชื้อมากกว่าบริเวณอื่น น้ำตาล glucose ที่ slant จึงถูกใช้หมดเร็วกว่า ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาล lactose และ/หรือ sucrose ก็จะหันไปใช้โปรตีนที่มีอยู่ในอาหารทำให้ slant มีความเป็นด่าง (เปลี่ยนสี phenol red เป็นสีแดง) ส่วนที่ butt เชื้อน้อยกว่าภายใน 24 ชั่วโมง น้ำตาล glucose จะยังไม่หมด จึงมีความเป็นกรด (เปลี่ยนสี phenol red เป็นสีเหลือง) (ปฏิกิริยาใน TSI เป็น K/A) ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป จะทำให้อาหารทั้งหลอดยังคงเป็นกรด (ปฏิกิริยาใน TSI เป็น A/A) แต่ถ้าเชื้อไม่สามารถ ferment น้ำตาลทั้งสามชนิด ปฏิกิริยาใน TSI อาจเป็น N/N, K/N หรือ A/N ถ้าเชื้อใช้น้ำตาลแล้วให้แก๊สก็จะดันอาหารให้ยกตัวขึ้น หรือทำให้อาหารแตก นอกจากนี้ ในอาหาร TSI ยังมี Sodium thiosulfate และ ferrous sulfate เป็นผลให้เชื้อบางชนิดสร้าง H_2S ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ ferrous ion ได้ ferrous sulfide เป็นตะกอนสีดำอยู่ที่ก้นหลอด



ส่วนประกอบ

0.1% glucose, 1% lactose, 1% sucrose, phenol red (เป็น indicator), peptone, sodium thiosulfate, ferrous ammonium sulfate

เมื่อเตรียมส่วนผสมอาหารจนละลายเข้ากันดี จึงใส่หลอดแก้วขนาด 13x100 มม. หลอดละ 4 มล. และนำมานึ่งที่ 121°C 15 นาที จากนั้น ปล่อยให้เย็นโดยเอียงให้เป็น slant ให้ได้ส่วนของ butt ไม่ต่ำกว่า 1

นี้ว เพื่อให้มีสภาวะเป็น anaerobic และจุลินทรีย์ที่ใช้ควรเป็นจุลินทรีย์สาลี เพื่อให้อากาศถ่ายเท จะได้ช่วยให้เกิด alkaline slant ในกรณีที่มีการ ferment น้ำตาล glucose อย่างเดียว (ถ้าใช้จุลินทรีย์จะต้องไม่บีบจนแน่น)

การทดสอบ เชื้อเชื้อโดยใช้ needle แทงลงเกือบถึงก้นหลอด แล้วลากผ่านบน slant อบที่ 37°C อ่านผล 18-24 ชม.

ปฏิกิริยาจาก TSI K/A มีการหมักย่อย glucose ไม่หมักย่อย lactose และ sucrose, A/A มีการหมักย่อย glucose lactose และ/หรือ sucrose, A/AG,H₂S มีการหมักย่อย glucose lactose และ/หรือ sucrose ให้ gas และให้ hydrogen sulfide K/K, K/N, N/N ไม่หมักย่อย glucose lactose และ sucrose

3. Lysine – Indole – Motile Medium (LIM)

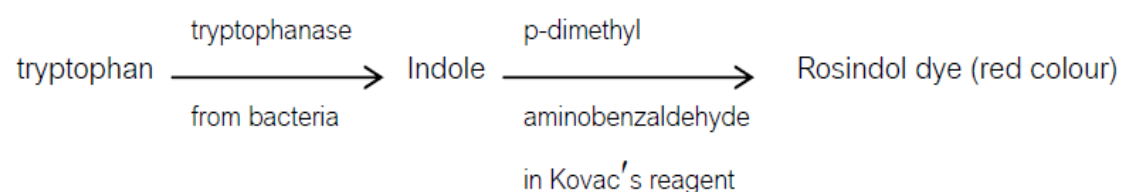
อาหารนี้ใช้ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อใน family Enterobacteriaceae และ Vibrionaceae ภายในหลอดเดียวกัน โดยการ stab เชื้อที่ต้องการจะทดสอบลงในอาหารนี้และอบที่ 35°C - 37°C 18-24 ชั่วโมง

หลักการและการอ่านผล Motility test อาหารที่ทดสอบลักษณะกึ่งเหลว มีความเข้มข้นของวุ้นประมาณ 0.4% หรือน้อยกว่า ดังนั้น เมื่อแทงเชื้อลงไปตรงๆ ในอาหารเหลวแล้วนำไปอบ เชื้อที่เคลื่อนที่ได้จะเจริญออกมารอบ ๆ รอยแทง ทำให้อาหารขุ่น ส่วนเชื้อที่เคลื่อนที่ไม่ได้เชื้อจะเจริญเฉพาะรอยที่แทงเท่านั้น

การอ่านปฏิกิริยา ผลบวก เชื้อเจริญมารอบรอย stab จนทำให้อาหารขุ่น ผลลบ เชื้อเจริญเฉพาะรอย stab เท่านั้น

2. Indole test:

แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ tryptophanase จะสามารถย่อย tryptophan ได้ indole ซึ่งจะทำให้ปฏิกิริยากับ p-dimethylaminobenzaldehyde ในน้ำยา Kovac ที่หยดลงไปได้สีแดงเกิดขึ้น

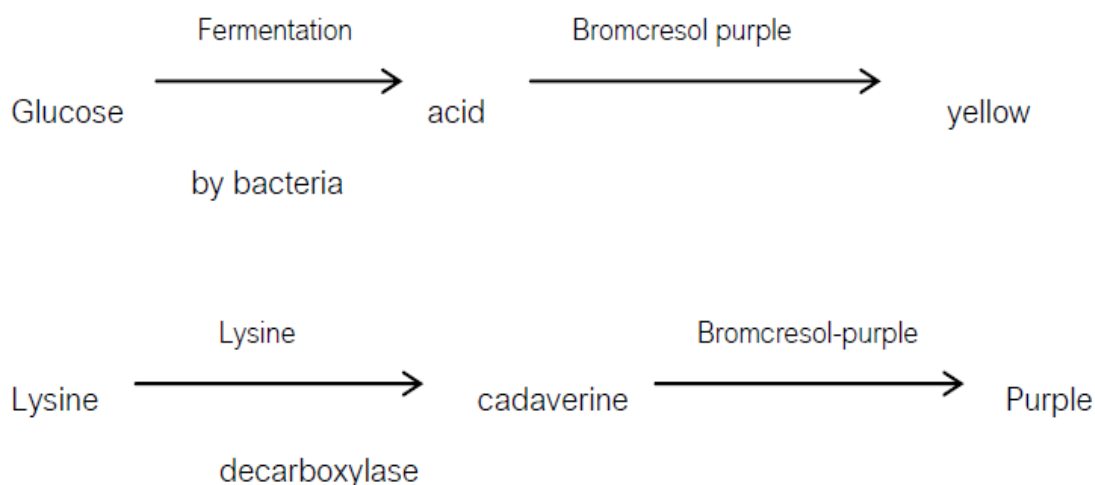


การอ่านปฏิกิริยา ผลบวก เกิดขึ้นสีแดงอยู่ส่วนบน เมื่อหยด Kovac's reagent ส่วนผลลบ ไม่เกิดขึ้นสีแดงอยู่ส่วนบน เมื่อหยด Kovac's reagent

3. Lysine decarboxylase test (LDC)

ในอาหารมีน้ำตาล glucose ในปริมาณน้อย เริ่มแรกเชื้อหมักย่อย glucose หมด เปลี่ยนสี indicator เป็นสีเหลือง จากนั้นเชื้อหันไปใช้อาหารอื่น โดยที่เชื้อนั้นมีเอนไซม์ decarboxylase ที่จำ

เพาะต่อกรดอะมิโนที่ต้องการทดสอบ ทำให้ย่อยกรดอะมิโนได้เอมีน มีฤทธิ์เป็นด่าง เปลี่ยนสี indicator จากเหลืองเป็นม่วง



การอ่านปฏิกิริยา ผลบวก อาหารที่ส่วนล่างมีสีม่วง ผลลบ อาหารที่ส่วนล่างเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

4. Lysine deaminase test (LDA)

ผลบวก ที่ผิวหน้าอาหาร (1/4 ของทั้งหมด) สีแดง ผลลบ ที่ผิวหน้าอาหาร (1/4 ของทั้งหมด) สีม่วง เชื้อที่ให้ผลบวกมี 3 genera คือ *Proteus* *Morganella* และ *Providencia*

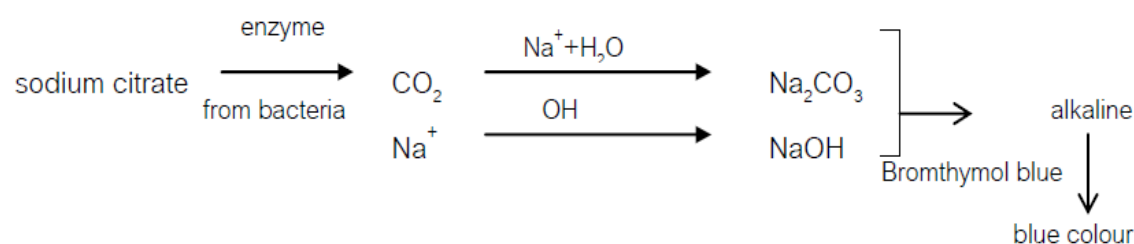
ส่วนประกอบของ LIM medium มีดังนี้

Decarboxylase medium base (Difco) 9 g. ประกอบด้วย peptone 5 g., yeast extract 3 g., dextrose 1 g., bromocresol purple 0.2 g., Tryptone 10 g., Ferric ammonium citrate 0.5 g., L-lysine monohydrochloride 10 g., และ Agar 2.5 g.

น้ำกลั่นเติมให้ถึง 1000 ml. และปรับ pH เป็น 6.8 เมื่อสารละลายดีแล้ว จึงนำไปใส่หลอดแก้ว ขนาด 13x100 มล. หลอดละประมาณ 3 มล. จากนั้นนำไปนึ่งที่ 121 °C 15 นาที ทิ้งให้อยู่ในรูปของ deeped media (ตั้งทิ้งไว้ในแนวตั้งธรรมดา)

4. Citrate

หลักการ เพื่อจะทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการ metabolism และให้ผลผลิตเป็นด่าง ซึ่งเปลี่ยนสี indicator เป็นสีน้ำเงิน



ส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Simmon citrate medium) Sodium citrate, Bromthymol blue (เป็น indicator), เมื่อเตรียมตามฉลากของอาหารสำเร็จรูปแล้ว นำมาเอียงให้เป็นรูปของอาหาร slant

5. Voges-Proskauer Test (VP)

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างสาร Acetyl-methyl carbinol (acetoin) จาก glucose สารนี้มีฤทธิ์เป็นกลาง จะถูก oxidise โดย KOH และอากาศ ได้ Diacetyl แล้ว Diacetyl ที่ได้นี้ถ้ามี alpha-naphthol (catalyst) และกรดอมิโน arginine (เหลือจากอาหาร Peptone) หรือ Creatine อยู่ด้วยจะเกิดเป็น complex สีแดงส้มขึ้น

อุปกรณ์และน้ำยา (1). alpha-naphthol; 5% in absolute ethyl alcohol, (2). 40% KOH, (3). MR/VP broth

MR/VP broth (formulated by Clark and Lubs) Polypeptone 7 g., Glucose 5 g., Dipotassium phosphate 5 g., Distilled water to 1 ml., Final pH = 6.9

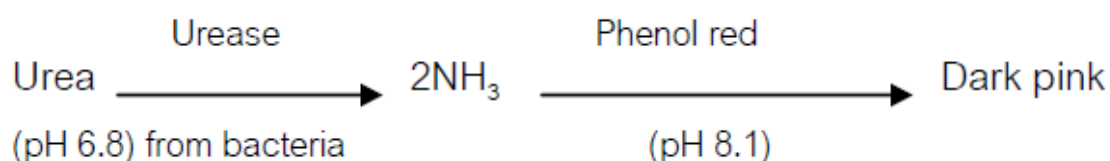
วิธีทำ ใช้เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง inoculate ลงใน MR/VP medium 0.3-0.5 มล. ให้ชุ่มมากๆ incubate ใน water bath 35 °C เวลา 4 ชั่วโมง นำมาหยด alpha-naphthol 3 หยด และ 40% KOH 1 หยด เขย่าและอ่านผลภายใน 10-15 นาที

การแปลผล ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารภายใน 10-15 นาที แสดงว่าให้ผลบวก เชื้อที่ให้ผลบวก ได้แก่ Enterobacter, Serratia, Klebsiella pneumoniae, Hafnia เชื้อที่ให้ผลลบ ได้แก่ *E.coli*

หมายเหตุ การทดสอบนี้ไม่ควรอ่านเกิน 1 ชม. เพราะเชื้ออาจผลิต Copper-like colour ทำให้เกิด false positive ได้

6. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease

หลักการ แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ urease สามารถย่อย urea ได้ ammonium carbonate ซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างเปลี่ยนสี indicator เป็นสีชมพูแดง



ส่วนประกอบสำคัญของอาหาร Urea, Phenol red (indicator), เตรียม urea base ซึ่งเป็นอาหารสำเร็จรูป 100 มล. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย ชั่ง agar 15 กรัม ใส่ น้ำกลั่น 900 มล. นำไปต้มจนละลายนิ่ง (Autoclave) และทิ้งให้เย็นถึง 5 °C จึงเติม sterile urea base ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำใส่หลอดแก้ว และทิ้งให้เย็นในรูปของอาหาร slant กรณีที่ไม่มีเครื่อง กรองเชื้อแบคทีเรีย อาจดัดแปลงใช้วิธี rapid method กล่าวคือ ใช้ urea (ไม่ต้องเติม agar) เตรียมครั้ง ละ 10 มล. แบ่งใส่หลอดแก้วหลอดละ 0.5 มล. เก็บในตู้เย็น เมื่อจะทดสอบให้ใส่เชื้อจำนวนมากจะ สามารถอ่านผลภายใน 2 ชั่วโมง

หมายเหตุ (1) ส่วนอาหารอื่นที่ใช้ไม่มาก เช่น Malonate, Acetate ฯลฯ มีอาหารสำเร็จรูปขายจะไม่กล่าวรายละเอียดในที่นี้ (2) อาหารคาร์โบไฮเดรตบางชนิด เช่น lactose, sucrose, arabinose, salicin ฯลฯ เมื่อถูกความร้อนและอยู่ใน pH ที่เป็นด่าง จะสลายเป็น simple carbohydrates การทำให้ปราศจากเชื้อต้องใช้เครื่องกรองแบคทีเรีย หรือเข้านิ่ง 10-12 ปอนด์ (110 °C) ในเวลาไม่เกิน 25 นาที

7. Carbohydrate Fermentation Test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้ได้ของเชื้อ

ส่วนประกอบของอาหาร (1) 20% carbohydrate ใน broth (peptone 10 g; meat extract 3 g; NaCl 5 g, น้ำกลั่น 1 ลิตร) และ (2) Buffer-salt solution (pH 7.0) มี 1% phenol red เป็น indicator

วิธีทำ หยด carbohydrate 1 หยด (0.04 มล.) ; buffer-salt solution 0.1 มล. และ heavy bacterial cell suspension ใน buffer-salt solution ลงในหลอดทดลองและอบใน 35 °C นาน 4 ชม. จากนั้นจึงจะอ่านผล

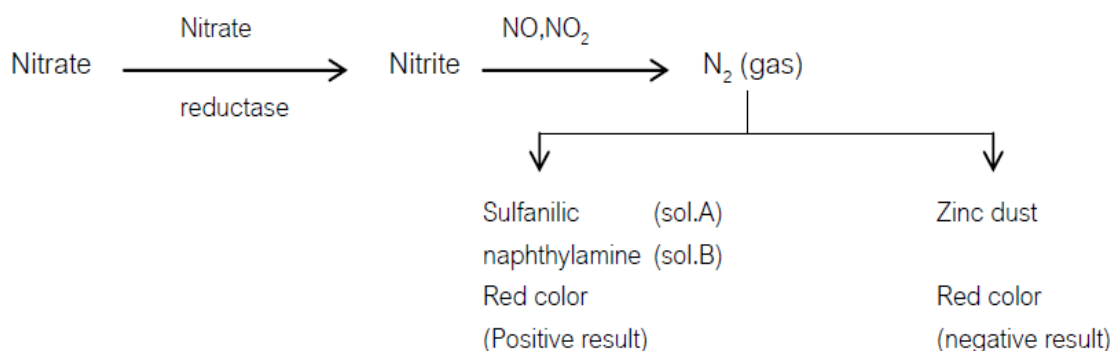
การแปลผล ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลทำให้เกิดกรดได้ phenol red ซึ่งเป็น indicator จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

หมายเหตุ carbohydrate ที่ใช้บ่อยๆ เช่น กลูโคส ซูโครส แลคโตส เป็นต้น buffer salt solution ใช้ phosphate buffer

8. Motile-Nitrate-Pyocyanin medium (MNP)

อาหารนี้ใช้ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อในกลุ่ม Nonfermentative gram-negative bacteria โดยปรับปรุงจากอาหาร motility medium จากอาหาร MNP นี้ สามารถอ่านผลปฏิกิริยาทางชีวเคมีได้ 3 การทดสอบภายในหลอดเดียวกัน โดยการ stab เชื้อที่ต้องการจะทดสอบลงในอาหารนี้ incubate 35 °C -37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แต่ถ้าเชื้อนั้นเจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้อง (22 °C) เช่น *Pseudomonas fluorescens* ให้ incubate ที่อุณหภูมิห้อง

หลักการและการอ่านผล กรณี Motility test : เช่นเดียวกับ LIM สำหรับ Nitrate test : หยด nitrate solution A และ B อย่างละ 5 หยด



ดังนั้น ถ้าเกิดสีแดงภายใน 1-2 นาที แสดงว่า nitrate ถูก reduce เป็น nitrite แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงขึ้น (อาจเกิดจากเชื้อนั้นได้ nitrite ต่อ) จึงต้องทดสอบดูว่ามี unreduced nitrate เหลืออยู่หรือไม่

โดยการเติม Zinc dust ไป reduce nitrate เป็น nitrite ถ้าสีของน้ำยาที่เติมลงไปยังคงไม่มีสี แสดงว่าผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่ามี nitrate เหลืออยู่ ดังนั้นผลเป็นลบ

กรณี Pyocyanin production test ผลบวก: มีการสร้าง pyocyanin pigment ซึ่งมีสีเขียวที่ผิวหน้าของอาหาร เชื้อที่ให้ผลบวก ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*

ผลลบ: ไม่มี pyocyanin pigment

1. การเตรียม MNP: ส่วนประกอบของ MNP medium มีดังนี้คือ Nitrate medium, 9 g.; Agar, 2 g.; Sodium chloride, 5 g.; Manganese chloride, 1.4 g.; Potassium sulfate, 10 g.; Glycerol, 10 g.; และน้ำกลั่น, 1000 ml, ปรับ pH ให้ได้ 7.2 และเมื่อส่วนผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำใส่หลอดแก้วขนาด 13x100 มม. หลอดละ 3 มล. และนำเข้าที่ 121 °C 15 ปอนด์ 15 นาที

2. น้ำยาที่ใช้ทดสอบ nitrate reduction

Solution A: Sulfanilic acid, 8 g. + Acetic acid (5N), 30%, 1 L

Solution B alpha-Naphthylamine, 5 g. + Acetic acid (5N), 30%, 1 L

การเตรียม Acetic acid 5N : Glacial acetic acid 1 ส่วน + น้ำกลั่น 25 ส่วน

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่ต้องการทำ Nitrate reduction test ส่วนผสมของอาหารไม่ต้องเติม nitrate medium จะสามารถดูผล motility และการสร้าง Pyocyanin pigment ได้เหมือนเดิม จึงเป็นอาหารที่ใช้แยกพวก *P.aeruginosa* ได้ดี

9. Bile Solubility test

หลักการ เป็นการทดสอบการสลายของเซลล์ด้วย bile salt ภายในเวลาและอุณหภูมิที่กำหนดให้ เป็นการแยก *Streptococcus pneumoniae* ออกจาก alpha-hemolytic streptococcus อื่นๆ

อุปกรณ์และวัสดุ 2% sodium deoxycholate, pH 7.0 (ละลายในน้ำกลั่น), Blood agar plate และสไลด์

วิธีทำ Plate technique: เลี้ยงเชื้อบน 5% blood agar plate เป็นเวลานาน 18-24 ชม. และหยด 2% deoxycholate 1 หยด ลงบนโคโลนีโดยตรง ใช้ดินสอเขียนแก้วทำเครื่องหมายไว้ incubate ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 30 นาที ถ้าเป็น *S.pneumoniae* โคโลนีหายไป

วิธีทำ Direct Method: เป็นการทดสอบตัวอย่างเลือด (blood specimens) ของผู้ป่วยโดยตรง นำเลือดมา หยดบนสไลด์ 2 หยด หยดที่ 1 นำไปย้อมแกรม ถ้าพบเชื้อแกรมบวกเป็นคู่หรือเป็นสาย (chain) ให้หยด 2% sodium deoxycholate 1 หยด ลงบนเลือดอีกหยดหนึ่งเพียงครั้งเดียว ทิ้งให้แห้งในอากาศ ย้อมแกรม ถ้าเป็น *S.pneumoniae* ด้านที่หยด bile salt นั้น เชื้อจะลดปริมาณลง ส่วน Streptococci อื่นๆ เชื้อจะยังคงเดิม ถ้ามีเชื้อในตัวอย่างน้อยให้ปั่นก่อนนำมาทดสอบ

* ทำในกรณี zone of optochin < 18 mm

10. 6.5% NaCl slant (J. Clin. Micro. 7;238, 1978)

ส่วนประกอบของอาหาร Brain heart infusion agar, 26 g.; Glucose, 5 g.; Sodium chloride, 30 g.; Bromcresol purple (1% ethanol), 1 ml.; Proteose peptone, 5 g.; น้ำกลั่น, 500 g.; pH = 7.0 ยังสามารถละลายในน้ำกลั่น ทำให้ละลายอย่างสมบูรณ์ โดยนำไปตั้งไฟ พร้อมทั้งเขย่าจากนั้นนำใส่หลอดแก้ว 13x100 มม. หลอดละ 3 มล. ปิดจุกด้วยสาลีนํ้าเข้าหนึ่งและทำให้เย็นในรูปอาหาร slant

หลักการ เนื่องจากอาหารนี้มีความเข้มข้นของ NaCl ถึง 6.5% เชื่อที่สามารถทนต่อความเข้มข้นนี้ได้จึงเจริญและใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะเปลี่ยนสี Bromcresol purple จากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง

สำหรับ 6.5% NaCl (broth) 1. Phenol red broth base (Gibco), 1.5 g.; Peptone, 10 g.; Sodium chloride, 5 g.; Phenol red, 0.018 g.; Dextrose, 0.5 g.; Sodium chloride, 6.5 g.; Beef extract, 0.1 g.; Distilled water, 100 ml, pH = 7.4

วิธีเตรียม นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมให้เนื้ออาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดแก้ว 13x100 มม. หลอดละ 2 มล. นำไปนึ่งที่ 121 °C 15 ปอนด์ 15 นาที

การอ่านผล ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ผลลบ สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

11. Esculin Hydrolysis

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อย glycoside esculin เป็น esculetin และ glucose ช่วยในการวินิจฉัย group D Streptococci, Listeria monocytogenes หรือ non-fermentative gram-negative rods ได้

อุปกรณ์และน้ำยา Esculin solution เตรียมจาก Esculin (Sigma), 5.0 g.; Ferric ammonium citrate, 0.5 g.; NaCl, 8.1 g.; K₂HPO₄, 0.4 g.; KH₂PO₄, 0.1 g.; น้ำกลั่น เติมให้ถึง 1 L, หลอดแก้วทดลอง ขนาด 12x75 มม.

วิธีทำ ตูบ esculin solution 0.2 มล. ใส่ในหลอดทดลอง ใส่เชื้อปริมาณมากพอแล้วอบ ที่ 35 °C นาน 30 นาที

การแปลผล ถ้าเชื้อสามารถ hydrolyse glycoside esculin เป็น esculetin ซึ่งทำปฏิกิริยากับ ferric ammonium citrate จะได้สารสีดำเกิดขึ้น เช่น Group D Streptococci, Listeria monocytogenes หรือ non-fermentative gram-negative rod บางตัว

วิธีเตรียม Bile esculin agar (เป็นอาหารสำเร็จรูป) เตรียมส่วนผสมตามคำแนะนำข้างขวด ต้มให้อาหารละลาย แบ่งใส่หลอดแก้ว 13x100 มม. หลอดละ 3 มล. นำไปนึ่งที่ 121 °C 15 ปอนด์ 15 นาที แล้วนำมาวางเอียง

การอ่านผล ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ แต่ผลลบ สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

12. Catalase test

หลักการ catalase enzyme สามารถเปลี่ยน H₂O₂ ไปเป็น O₂ และ H₂O

น้ำยา 3% Hydrogen peroxide

การทดสอบ เชื้อเชื้อที่ต้องการทดสอบ ลงบน slide แล้วหยด 3% H₂O₂ ลงบนเชื้อ 1 หยด

การอ่านผล ผลบวก มีฟองก๊าซเกิดขึ้น ผลลบ ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

ข้อควรระวัง ในการเชื้อเชื้อจากอาหารที่มีเลือดผสมอยู่ ควรตะแคงเพาะโคโลนีของเชื้อมาทดสอบ อย่าให้โดนอาหารที่มีเลือดผสม เพราะจะทำให้เกิดวากปลอมได้ (เอนไซม์ Catalase พบได้ในเม็ดเลือดแดง)

13. Plasma (For coagulase test)

พลาสมาสำหรับ slide coagulase test ใช้ undiluted plasma พลาสมาสำหรับ tube coagulase test ใช้พลาสมาเจือจาง ด้วย Trypticase soy broth ในอัตราส่วน 1:4 (ทำให้ก้อน clot แข็งตัวอยู่ได้นานขึ้น สามารถอ่านผลได้ใน 4-20 ชั่วโมง) แบ่งใส่หลอดแก้วที่ปราศจากเชื้อ หลอดละ 0.5 มล. เก็บในตู้เย็นที่ 4°C

หมายเหตุ (Tube coagulase test) (1) ควรใช้พลาสมาที่ปราศจากเชื้อ และเชื้อที่นำมาทดสอบควรเป็นเชื้อบริสุทธิ์ เพราะเชื้ออื่น เช่น Enterococci และ gram negative rod เช่น *P. aeruginosa* สามารถใช้ citrate ซึ่งเป็นสารกันเลือดแข็งในพลาสมา ทำให้เกิดผลบวกเท็จได้, (2) ในกรณีที่บดเลี้ยงเชื้อนานกว่า 20 ชั่วโมง อาจเกิดผลลบเท็จได้ เพราะ *S. aureus* อาจปล่อย Staphylokinase ทำให้ก้อน clot ที่เกิดขึ้นละลาย ดังนั้นควรทำการทดสอบ ทั้งวิธี slide และ tube coagulase test ประกอบกัน

14. PR Glucose / PR Mannitol

ส่วนประกอบ Phenol red broth base (Difco), 1.6 g.; Proteose peptone No. 3, 10 g.; Bacto-Beef extract, 1 g.; Sodium chloride, 5 g.; Phenol red, 0.025 g.; Agar, 0.5 g.; Glucose หรือ Mannitol, 1 g.; Distilled Water, 100 ml.

วิธีเตรียม นำอาหารผสมเข้าด้วยกัน ให้เนื้ออาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดแก้ว 13x100 มม. หลอดละ 3 มล. นำไปนึ่งที่ 100 °C 10 ปอนด์ 10 นาที แล้วทิ้งให้อาหารเย็น ในรูปของ Deep medium

การอ่านผล ผลบวก สีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอด ส่วนผลลบ สีของอาหารยังคงเป็นสีแดง (สีแดง)

15. PPR Medium (สำหรับการสร้าง pigment ของเชื้อ streptococci group B)

ส่วนประกอบ Proteose Peptone No.3, 3 g.; แป้งข้าวเจ้า, 5 g.; NaCl, 0.5 g.; Agar, 1 g.; น้ำกลั่น, 100 ml.

วิธีเตรียม ละลายแป้งในน้ำเย็นก่อน แล้วเติมส่วนผสมอื่นๆ ลงไป นำไปต้มให้ละลาย ใส่ใน tube ขนาด 13x100 มม. ให้มีความสูงประมาณ 2 ซม. ทิ้งไว้ให้เย็นนำอาหารเลี้ยงเชื้อนี้เก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน ก่อนนำมาใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดี จะต้องซุ่นทั่วทั้งหลอด

การทดสอบ ใช้ loop หรือ needle เชี่ยเชื้อที่จะทำการทดสอบมาแทงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแทงลงข้างๆ หลอดแก้ว นำไป incubate 35 °C 24 ชั่วโมง

ผลการทดสอบ ให้ดูสีตรงรอยที่แทงเชื้อไว้ แล้วอ่านผลดังนี้คือ ผลบวก อาหารเปลี่ยนเป็นสีส้ม ส่วนผลลบ สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

16. Gelatin liquefaction

หลักการ Gelatinase ซึ่งเป็น enzyme จะย่อย Gelatin

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient gelatin

การทดสอบ Stab เชื้อลงใน Nutrient gelatin นำไปบ่ม 37 °C 24 ชม. ก่อนอ่านผลให้ นำไปใส่ตู้เย็นให้เย็นก่อน

การอ่านผล ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ส่วนผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

17. Lecithinase test

หลักการ Lecithinase เมื่อ hydrolyse lecithin แล้ว end product เป็น diglyceride และ phosphorylcholine ก่อให้เกิดความขุ่นขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากไม่ละลายน้ำ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Egg yolk agar

การทดสอบ เชื้อใน Egg yolk agar 18-24 ชม. 37 °C

การอ่านผล ผลบวก เกิด zone ขุ่นรอบ colonies ผลลบ ไม่เกิด zone

18. Phenylalanine deaminase

หลักการ เชื้อบนผิวหน้าเอียงของอาหารรอบ 35°C 18-24 ชม. หยด 10% ferric chloride ลงบนผิวหน้าของเชื้อที่ทดสอบ 4-5 หยด

การอ่านผล ผลบวก เกิดสีเขียวขึ้นบนผิวหน้าอาหาร ส่วนผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

19. Dnase test agar

ส่วนประกอบ Dnase test agar w/methyl green 42 gm. หรือ Dnase test agar 42 gm. แล้วเติม 5% methyl green 1 ml. + น้ำกลั่น 1,000 ml. นำไปนึ่งที่ 121°C 15 ปอนด์ 15 นาที ทำให้มีอุณหภูมิ 50°C เทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

การทดสอบ ใช้ loop เชี่ยเชื้อไปบนผิวหน้าอาหาร ยาวประมาณ 1-2 ซม. หรือป้ายเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 5 มม. นำไปอบที่ 35°C 18-24 ชม.

การอ่านผล ผลบวก เกิด clear zone รอบบริเวณที่เชื้อขึ้น ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนแปลง

20. Carbohydrate broth (manitol, sorbitol, arabinose, raffinose)

ส่วนประกอบ Brain heart infusion 37 กรัม, คาร์โบไฮเดรต (น้ำตาล) 10 กรัม, 1, 6-Bromcresol purple in 95% ethanol 1 มล. และ น้ำกลั่น 1 L แบ่งอาหารซึ่งละลายดีแล้วใส่หลอดจุกเกลียวขนาด 13x100 มม. จำนวนหลอดละ 3 มล. ไปอบโดยใช้ความดัน 10 ปอนด์ เวลา 10 นาที

การอ่านผล ผลบวก : อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ผลลบ : อาหารมีสีม่วงเหมือนเดิม

21. Arginine dihydrolase

ส่วนประกอบ Moeller's decarboxylase 10.5 กรัม, L-arginine 10 กรัม (ถ้าใช้ DL-arginine ให้เพิ่มอีก 20 กรัม) และ น้ำกลั่น 1 L ต้มอาหารให้ละลาย ปรับ pH ให้ได้ 6.0-6.5 แบ่งใส่หลอดจุกเกลียวขนาด 13x100 มม. หลอดละ 3 มล. นำไปนึ่ง 10 ปอนด์ 10 นาที เมื่อเพาะเชื้อที่จะทดสอบแล้ว ให้เท mineral oil ที่ปราศจากเชื้อลงไปหลอดทันที (ให้ความหนาประมาณ 10 มม.)

การอ่านผล ผลบวก: อาหารเปลี่ยนจากสีม่วง เป็นสีม่วงแดง ผลลบ: อาหารมีสีม่วงเหมือนเดิม หรือ ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (เป็นผลที่เกิดจากกรดไม่ใช่ arginine dihydrolase)

22. Rapid carbohydrate utilization test for identification of Neisseria sp.

ส่วนประกอบ Buffered balanced salt indicator solution (BSS), KH_2PO_4 , 0.01 g.; K_2HPO_4 0.04 g.; KCl, 0.8 g.; Phenol red (1% aqueous solution), 0.4 ml.; Distilled water, 100 ml. ซึ่งสารทั้งหมดแล้วปรับ pH=7 ก่อน sterile โดยการกรอง เก็บในขวดฝาเกลียวที่ 4°C

การเติมน้ำตาล จะใช้ 20% carbohydrate solution ซึ่งเตรียมน้ำตาล glucose, maltose, sucrose, lactose หรือ fructose ในน้ำกลั่น sterile โดยการกรอง เก็บใน freezer

วิธีเตรียม (1) นำ BSS และ carbohydrate solution ออกจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้จนเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำเชื้อมา suspend ใน BSS 0.3 ml. โดยใช้เชื้อจำนวนมาก (ประมาณ 2 loop) ผสมกันให้ดี, (2) เตรียมแต่ละการทดสอบโดยใส่ 0.1 ml. BSS ลงในแต่ละหลอด แล้วใช้ sterile pasteur pipette หยด 20% carbohydrate solution ชนิดที่ต้องการลงไป 1 หยด, (3) ใช้ sterile pasteur pipette ดูด cell suspension ในข้อ 1 หยดลง 1 หยด เขย่าแรงๆ, (4) นำไป incubate ใน water bath (37°C) และเขย่าเป็นครั้งคราว, (5) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเห็นได้ใน 15-30 นาที แต่บางครั้งต้องใช้เวลารั้ง 4 ชั่วโมง

การอ่านผล : ผลบวกจะเป็นสีเหลือง

ภาคผนวก จ
ผลการทดสอบภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนส

สรุปผลของการทดสอบภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสของเชื้อ *Aspergillus* sp. FK1

ลำดับวัน	cfu/ml	OD _{600 nm}	Keratinase activity _{280 nm}
0	0.35×10^6	0.048	0
1	1.3×10^6	0.129	3.9
2	4.95×10^6	0.365	27.6
3	5.7×10^6	0.501	51
4	8.9×10^6	1.119	70.7
5	8.9×10^6	1.119	67.8
6	6.7×10^6	1.119	61.7
7	5.95×10^6	1.119	56.8

สรุปผลของการทดสอบภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของเชื้อ *Penicillium* sp. FK2

ลำดับวัน	cfu/ml	OD _{600 nm}	Keratinase activity _{280 nm}
0	0.3×10^6	0.028	1
1	1.0×10^6	0.143	4.6
2	2.7×10^6	0.297	21.4
3	4.3×10^6	0.543	53.1
4	8.4×10^6	0.814	83.5
5	8.4×10^6	0.814	80.4
6	6.0×10^6	0.814	76.2
7	5.2×10^6	0.814	63.5

สรุปผลของการทดสอบภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของเชื้อ
Cladosporium sp. FK3

ลำดับวัน	cfu/ml	OD _{600 nm}	Keratinase activity _{280 nm}
0	1.15×10^6	0.021	0
1	2.1×10^6	0.132	2.9
2	3.9×10^6	0.216	19.2
3	5.25×10^6	0.492	41.1
4	7.75×10^6	0.661	63.2
5	8.95×10^6	0.805	72.4
6	8.95×10^6	0.805	68.9
7	5.9×10^6	0.805	53.7

สรุปผลของการทดสอบสภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสของเชื้อ
Bacillus KB1

ลำดับชั่วโมง	Cfu/ml	OD _{600 nm}	Keratinase activity _{280 nm}
0	0.1×10^{12}	0.003	0.6
3	1.2×10^{12}	0.018	4.7
6	3.6×10^{12}	0.043	11.7
9	5.7×10^{12}	0.096	14.8
12	6.8×10^{12}	0.123	16.2
15	8×10^{12}	0.147	21.8
18	8.3×10^{12}	0.168	30
24	9.5×10^{12}	0.198	40.4
36	10.6×10^{12}	0.253	58.3
48	11.1×10^{12}	0.384	61.9
60	9.1×10^{12}	0.384	56.3
72	6.8×10^{12}	0.384	50.3
84	4.6×10^{12}	0.384	38.2
96	1.2×10^{12}	0.384	27.2

สรุปผลของการทดสอบสภาวะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราตินเนสของเชื้อ
Bacillus KB2

ลำดับชั่วโมง	Cfu/ml	OD _{600 nm}	Keratinase activity _{280 nm}
0	0.3×10^{12}	0.013	3.8
3	0.6×10^{12}	0.048	7.5
6	1.2×10^{12}	0.081	13.7
9	3.5×10^{12}	0.121	19.3
12	5.7×10^{12}	0.176	26.1
15	7.9×10^{12}	0.199	36.3
18	9.4×10^{12}	0.239	54.9
24	10.1×10^{12}	0.256	59.2
36	10.8×10^{12}	0.327	63.3
48	11.7×10^{12}	0.398	73.6
60	11.3×10^{12}	0.402	67.2
72	10.1×10^{12}	0.402	58.8
84	7.9×10^{12}	0.402	51.7
96	6.2×10^{12}	0.402	40

สรุปผลของการทดสอบสภาวะการเจริญเติบโตค่า Viable count ของ Bacillus KB3 และ Bacillus KB4

ชั่วโมง/วันที่	KB3	KB4
0/18-9-55	0.2×10^{12}	0.1×10^{12}
3/18-9-55	1.8×10^{12}	2.5×10^{12}
6/18-9-55	4.4×10^{12}	5.8×10^{12}
9/18-9-55	5.7×10^{12}	7.2×10^{12}
12/18-9-55	7.6×10^{12}	9.6×10^{12}
15/18-9-55	9×10^{12}	13.2×10^{12}
18/18-9-55	13.2×10^{12}	15.1×10^{12}
24/19-9-55	15.6×10^{12}	16.3×10^{12}
36/19-9-55	16.6×10^{12}	17.1×10^{12}
48/19-9-55	18×10^{12}	17.7×10^{12}
60/19-9-55	18×10^{12}	17.9×10^{12}
72/20-9-55	15.3×10^{12}	17×10^{12}
84/20-9-55	12.2×10^{12}	14.6×10^{12}
96/21-9-55	8.4×10^{12}	11.2×10^{12}

สรุปผลของการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus sp.* KB3 และ *Bacillus sp.* KB4 ค่า Total count

ชั่วโมง/วันที่	KB3	KB4
0/18-9-55	0.006	0.009
3/18-9-55	0.048	0.060
6/18-9-55	0.082	0.092
9/18-9-55	0.166	0.189
12/18-9-55	0.322	0.347
15/18-9-55	0.370	0.420
18/18-9-55	0.411	0.536
24/19-9-55	0.552	0.602
36/19-9-55	0.620	0.647
48/19-9-55	0.670	0.733
60/19-9-55	0.720	0.754
72/20-9-55	0.720	0.754
84/20-9-55	0.720	0.754
96/21-9-55	0.720	0.754

สรุปผลของการผลิตเอนไซม์เคราตินেসค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus sp.* KB3 และ *Bacillus sp.* KB4

ชั่วโมง/วันที่	KB3	KB4
0/18-9-55	0.5	0.7
3/18-9-55	0.8	1
6/18-9-55	1.4	1.8
9/18-9-55	2.6	2.8
12/18-9-55	3.9	4.6
15/18-9-55	4.2	6.2
18/18-9-55	6.5	12.2
24/19-9-55	10.3	15.2
36/19-9-55	14.7	17.2
48/19-9-55	16.5	19.8
60/19-9-55	22.5	23.3
72/20-9-55	18.2	22.2
84/20-9-55	14.6	18.6
96/21-9-55	10.5	13.3

ประวัติโดยย่อของนักวิจัย

1. **ชื่อ-สกุล** นายอับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี/ MR. ABDULLAH DOLAH DALEE
2. **ชื่อ-สกุลบิดาและมารดา** นายเจ๊ะโม่ง ดาลี และนางแม่โม๊ะ ดาลี
3. **วัน-เดือน-ปีและสถานที่เกิด** 10 มกราคม 2502 ที่บ้านบาโงยคูรียัน ตำบลบาโงยซิแน อ. ยะหา จ. ยะลา
4. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ข้าราชการ
5. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสารและ email**
 สาขาจุลชีววิทยา หลักสูตรจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและ
 การเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
 โทรศัพท์ 0807172817 อีเมล Abdullah.ddalee@gmail.com, dolah_dalee@yahoo.com
6. **ประวัติการศึกษา**
 ประกาศนียบัตรประถมศึกษา จากโรงเรียนบ้านยะลา, ปี พ.ศ. 2516
 ประกาศนียบัตรมัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนยะหาศรียานุกุล อ. ยะหา จ. ยะลา, ปี พ.ศ. 2519
 ประกาศนียบัตรมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนคณะราษฎรบำรุง อ. เมือง จ. ยะลา. ปี พ.ศ.
 2521
 ปริญญาตรี B. Sc (Hons.), Microbiology จาก University of Karachi ประเทศปากีสถาน, ปี
 ค.ศ. 1984
 ปริญญาโท M. Sc, Microbiology จาก University of Karachi ประเทศปากีสถาน, ปี ค.ศ. 1986
 ปริญญาโท M. Sc Microbiology จาก Universiti Kebangsaan Malaysia ประเทศมาเลเซีย, ปี
 ค.ศ. 1994
 ปริญญาโท MScM (Science Management) จาก University of Technology Sydney
 ประเทศออสเตรเลีย, ปี ค.ศ. 2009
7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทางภายในและภายนอกประเทศ**
 - **วิทยานิพนธ์** The pathogenicity and antigenicity of extracellular protease(s) from *Burkholderia pseudomallei*, Master Thesis 1994, Universiti Kebangsaan Malaysia
 - **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:** ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน
 - คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาของน้ำประปาชนบทในจังหวัดปัตตานี ยะลาและนราธิวาส, 2545, งบประมาณการศึกษา สถาบันราชภัฏยะลา
 - ประสิทธิภาพของแอนติบอดีพอลิโคลนจากไข่ไก่ในตรวจสอบสารปนเปื้อนในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม, 2547, งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
 - การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิตเคราตินสจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมท้องถิ่นและประสิทธิภาพการย่อยสลายขี้ไก่, 2555, งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

- คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอากาศในห้องเรียนและสำนักงาน มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา, 2556, งบประมาณการศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

ประวัติโดยย่อของผู้ร่วมวิจัย 1

1. ชื่อ - สกุล นางสาวคอสียาห์ สะลี (MISS KHOSIYA SALI)
2. ที่อยู่ปัจจุบัน เลขที่ 1/1 หมู่ที่ 4 ตำบล กาลูบิง อำเภอรามัน จังหวัด ยะลา
3. วัน/เดือน/ปีเกิด 31 กรกฎาคม 2520 สถานที่เกิด อำเภอรามัน จังหวัด ยะลา
4. บิดาชื่อ นายวาเซ็ง สะลี มารดาชื่อ นางคอลีเยาะ สะลี
5. ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์ประจำหลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
6. หน่วยงานที่ติดต่อได้ :
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ภาควิชาวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
โทรศัพท์: 084-8531948 E-mail: khosiya_s@yahoo.com
7. ประวัติการศึกษา :
 - ปี พ.ศ 2535 ประถมศึกษา โรงเรียนบ้านป้อดอง
 - ปี พ.ศ 2538 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนอาสาสุตติณวิทยา
 - ปี พ.ศ 2541 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนธรรมวิทยามูลนิธิ
 - ปี พ.ศ 2545 ปริญญาตรี (วท.บ.) ชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
 - ปี พ.ศ 2551 ปริญญาโท M. Sc Microbiology, Universiti Kebangsaan Malaysia, ประเทศมาเลเซีย
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
 - 8.1 วิทยานิพนธ์
 - The production of CGTase by alkalophilic *Bacillus* sp. G1 in continuous culture
9. ผลงานทางวิชาการ
 1. Khosiya Sali, Aidil Abdul Hamid & Wan Mohtar Wan Yusoff. 2007. Impact of dilution rate on CGTase activity and productivity from an alkalophilic *Bacillus* sp. G1 in continuous culture. *Nu Science Journal*. 4(2):148-153.
 2. Khosiya Sali, Aidil Abdul Hamid & Wan Mohtar Wan Yusoff. 2008. Increased productivity of CGTase activity using continuous culture. *Sains Malaysiana* 37(4):429-433.

ประวัติโดยย่อของผู้ร่วมวิจัย 2

1. ชื่อ - สกุล นางสาวนุรอัยนี หะยียูโซะ

MISS Nur-ainee Hayeeyusoh

2. ที่อยู่ปัจจุบัน เลขที่ 6/2 หมู่ที่ 3 ตำบล ลิตล อำเภอก เมือง จังหวัด ยะลา

3. วัน/เดือน/ปีเกิด 1 กันยายน 2522 สถานที่เกิด อำเภอยะหริ่ง จังหวัด ปัตตานี

4. บิดาชื่อ นายอับดุลเลาะ หะยียูโซะ มารดาชื่อ นางกอดีเยาะ อูมา

5. ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์ประจำหลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

6. หน่วยงานที่ติดต่อได้ :

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

โทรศัพท์: 081-5437235 E-mail: hnurainee@yahoo.com

7. ประวัติการศึกษา :

- ปี พ.ศ 2535 ประถมศึกษา โรงเรียนเทศบาล ๕ บ้านตลาดเก่า
- ปี พ.ศ 2538 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสตรียะลา
- ปี พ.ศ 2541 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนคณะราษฎรบำรุง จ.ยะลา
- ปี พ.ศ 2545 ปริญญาตรี (วท.บ.) ชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
- ปี พ.ศ 2551 ปริญญาโท M. Sc Microbiology, Universiti Kebangsaan Malaysia, ประเทศมาเลเซีย

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 วิทยานิพนธ์

- The production of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* SN5 in Repeated Batch Culture

9. ผลงานทางวิชาการ

Nur-ainee Hayeeyusoh, Aidil Abdul Hamid & Wan Mohtar Wan Yusoff. 2007. A simple technique to enhance the productivity of delta-endotoxin in batch culture. *Nu Science Journal*. 4(1):18-24.