การศึกษาโปรติเอสทนร้อนจากแบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004

โดย

นายณัฐวุฒิ พึ่งพสุธาดล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาโปรติเอสทนร้อนจากแบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004

โดย

นายณัฐวุฒิ พึ่งพสุธาดล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

STUDY OF THERMOSTABLE PROTEASE FROM HYPERTHERMOPHILIC BACTERIA *FERVIDOBACTERIUM* SP. STRAIN FA004

By

MR. Nutthawut PHEUNGPHASUTADOL

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2018

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การศึกษาโปรติเอสทนร้อนจากแบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004
โดย	ณัฐวุฒิ พึ่งพสุธาดล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ดร. สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร. สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทยา หลิวเสรี)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ กนกศิลปธรรม)

.... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ดร. ปริปก พิศสุวรรณ)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

58401203 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : Fervidobacterium thailandense, แบคทีเรียทนร้อนสูง, โปรติเอสทนร้อน, การแยกบริสุทธิ์โปรติเอส, การย่อยสลายขนนก

นาย ณัฐวุฒิ พึ่งพสุธาดล: การศึกษาโปรติเอสทนร้อนจากแบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ดร. สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม

แบคทีเรียทนร้อนสูงเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่อุณหภูมิสูง (80-100 องศาเซลเซียส) เอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีคุณค่าในเชิงพาณิชย์สูง ในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกบริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์โปรเอสทนร้อนที่สามารถย่อยสลายเคราตินได้จากแบคทีเรียทนร้อนสูง *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *Fervidobacterium thailandense* (ATCC BAA-2483^{T}) โดยนำ *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 480GM5 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟส (%เกลืออิ่มตัว 20-60%) และแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนโดยใช้คอลัมม์ DEAE sephacel และ Sephadex G-100 โปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 54.98 ยูนิต/มิลลิกรัม ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 89.27 เท่า และได้ผลผลิต 10.37% จากการวิเคราะห์ zymogram พบแถบที่มีกิจกรรมโปรติเอสสามแถบ โดยแถบ 67 kDa มี % intensity สูงสุด (86%) ซึ่งคาดว่าเป็น fervidolysin โดยโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และแสดงกิจกรรมได้ดีในช่วง 7.0-9.0 และอุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส โปรติเอสกลุ่มนี้มีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 12 , 10 และ น้อยกว่า 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กิจกรรมโปรติเอสถูกยับยั้งด้วยการเติม phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเป็นโปรติเอสในกลุ่มเซรีนโปรติเอส การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขนไก่ชี้ให้เห็นว่าโปรติเอสสกัดหยาบทำงานได้ดีกว่าโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ภายใต้สภาวะเดียวกัน ซึ่งน้ำหนักของขนไก่ลดลงไปประมาณ 40% ในระยะเวลา 5 วัน โปรติเอสทนร้อนที่สามารถย่อยสลายขนไก่ได้จาก *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มมูลค่าของวัสดุประเภทเคราติน

58401203 : Major (BIOTECHNOLOGY)
Keyword : Fervidobacterium thailandense, Hyperthermophile, Feather degradation, Protease purification, Thermostable protease

MR. NUTTHAWUT PHEUNGPHASUTADOL : STUDY OF THERMOSTABLE PROTEASE FROM HYPERTHERMOPHILIC BACTERIA *FERVIDOBACTERIUM* SP. STRAIN FA004 THESIS ADVISOR : SINTHUWAT RITTHITHAM, Ph.D.

Hyperthermophiles are microorganisms that grow in high-temperature environments (80-100°C). Their thermozymes have high commercial relevance. This study aims to purify and characterize the keratinolytic protease from an extremely thermophilic *Fervidobacterium* sp. strain FA004 a indigenous stream to Thailand, closely related to *Fervidobacterium thailandense* type strain ATCC BAA-2483^{T}. The strain FA004 was cultured in 480GM5 medium at 80°C for 48 h. The crude protease was harvested from culture supernate by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation (20-60% saturation) and then purified by using DEAE Sephacel and Sephadex G-100 column, respectively. The purified protease had the specific activity of 54.98 unit/mg protein with increased purity and yield of 89.27 fold and 10.37%, respectively. The zymogram showed three bands of caseinolytic activity which 67 kDa band have 86% intensity, suggesting fervidolysin form. The optimum pH and temperature of the protease were found to be 9.0 and 80°C, respectively. Furthermore, the protease show activity in range of pHs (7.0-9.0) and temperatures (70-90°C), and show thermostability with half-life values of >12h at 70°C, >10 h at 80°C and <1h at 90°C. The proteolytic activity was inhibited in the presence of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), indicating the serine protease activity. The protease posseses a keratinolytic activity on chicken feather. Both crude protease and purified were able to digest chicken feather. Approximately of 40% weight loss was obtained within 5 day at 80°C. The thermostable keratinolytic protease from strain FA004 could be of relevance for biotechnological application to offers an alternative method for value enhancement of keratin materials.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอแสดงความกตัญญูและความรู้สึกขอบคุณ ผ่านกิตติกรรมประกาศนี้ วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ตามความคาดหวังของผู้จัดทำนั้น กระผมต้องขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทยา หลิวเสรี ที่มอบโอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิตเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.วิโรจน์ กนกศิลปธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สำหรับคำแนะนำ ข้อมูลอุปกรณ์และเทคนิคต่างๆ ที่เอื้อต่อการทำงานวิจัย ให้การชี้แนะในสิ่งที่เป็นประโยชน์จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักให้ข้าพเจ้า อีกทั้งยังช่วยชี้แนะแนวทางและการแก้ไขปัญหาต่างๆ จนสามารถทำงานวิจัยให้สำเร็จได้

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ และ ดร. ปริปก พิศสุวรรณ ที่ให้เกียรติร่วมเป็นประธานและกรรมการภายนอก ในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ผ.ศ. ดร. เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ และ ผ.ศ. ดร. รุจิกาญจน์ นาสนิท ที่อนุญาตให้ข้าพเจ้าใช้ห้องปฏิบัติการและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย ให้เป็นไปอย่างราบรื่น

ขอขอบคุณนางสาวฑิพาภรณ์ ทรัพย์สมบูรณ์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษประจำภาควิชา ที่คอยอบรมสั่งสอนเทคนิคต่างๆ ที่ต้องใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกให้ตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความร่วมมืออีกมาก ซึ่งผู้วิจัยไม่อาจสามารถกล่าวนามให้หมดในที่นี้ได้ จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ในโอกาสนี้ด้วย

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าต้องขอขอบพระคุณ คุณตาและครอบครัวของข้าพเจ้า ที่เข้าใจและคอยสนับสนุนข้าพเจ้าให้ได้ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต คอยเป็นกำลังใจในวันที่ข้าพเจ้าท้อแท้และเหน็ดเหนื่อย ให้มีแรงและกำลังใจในการศึกษาต่อ จนสำเร็จลุล่วงอย่างที่ปรารถนา หากมีข้อบกพร่องใดๆ ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียวและยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

ณัฐวุฒิ พึ่งพสุธาดล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ....จ
กิตติกรรมประกาศ....ฉ
สารบัญ....ช
สารบัญตาราง....ฏ
สารบัญรูปภาพ....ฐ
บทที่ 1 บทนำ....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย....1
1.2 วัตถุประสงค์....2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย....2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ....2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....3
2.1 โปรติเอส....3
2.1.1 ประเภทของโปรติเอส....3
2.1.1.1 Exopeptidases....3
2.1.1.2 Endopeptidase....4
2.1.2 กลไลการทำงานของโปรติเอส....5
2.1.2.1 เซรีนเปปติเดส....5
2.1.2.2 ซีสเตอีนเปปติเดส....5
2.1.2.3 แอสปาติกเปปติเดส....5
2.1.2.4 เมทัลโลเปปติเดส....6

2.1.2.5 ทีโอนีนเปปติเดส 6

2.1.3 MEROPS database 7

2.1.3.1 การจำแนกกลุ่มโปรติเอสในระบบ Families 7

2.1.3.2 การจำแนกกลุ่มโปรติเอสในระบบ Clans 7

2.2 โปรติเอสจากแบคทีเรีย 9

2.2.1 การสร้างและนำโปรติเอสออกสู่นอกเซลล์ของแบคทีเรีย 9

2.2.2 โปรติเอสทนร้อนจากจุลินทรีย์ชอบร้อนสูง 9

2.3 แบคทีเรียชอบร้อนสูงไฟลัม Thermotogae 12

2.4 แบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium sp.* 14

2.4.1 *Fervidobacterium nodosum* 16

2.4.2 *Fervidobacterium islandicum* 17

2.4.3 *Fervidobacterium gondwanense* 19

2.4.4 *Fervidobacterium pennivorans* 19

2.4.5 *Fervidobacterium changbaicum* 20

2.4.6 *Fervidobacterium riparium* 21

2.4.7 *Fervidobacterium thailandense* 21

2.5 โครงสร้างและการทำงานของโปรติเอสจาก *Fervidobacterium* 21

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ *F. thailandense* FA004 25

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย 28

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีและวัสดุที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย 28

3.1.1 เครื่องมือ 28

3.1.2 อุปกรณ์ 29

3.1.3 สารเคมี 30

3.1.4 โปรตีนมาตรฐาน 32

3.1.5 เรซินสำหรับแยกบริสุทธิ์โปรตีน 32
3.1.6 ขนไก่ 32
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 32
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย 32
3.3.1 สภาวะการเพาะเลี้ยง 32
3.3.2 การแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง 33
3.3.3 การหาช่วง % อิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอนโปรติเอส 33
3.3.4 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอส 34
3.3.4.1 การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 34
3.3.4.2 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี 34
3.3.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส 35
3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 35
3.3.7 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซีส 35
3.3.7.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีน 35
3.3.7.2 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซีส 36
3.3.7.3 การย้อมแถบโปรตีนบนแผ่นเจล 36
3.3.7.4 การย้อมหากิจกรรมโปรติเอสบนแผ่นเจลด้วย casein zymogram 37
3.3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรติเอส 37
3.3.8.1 ผลของ pH ต่อกิจกรรมของโปรติเอส 37
3.3.8.2 ผลของ pH ต่อความเสถียรของโปรติเอส 37
3.3.8.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของโปรติเอส 38
3.3.8.4 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของโปรติเอส 38
3.3.8.5 การระบุชนิดโปรติเอสด้วยตัวยับยั้งโปรติเอส 38
3.3.8.6 ผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรติเอส 38

3.3.8.7 ผลของสารซักล้างต่อกิจกรรมของโปรติเอส 39

3.3.8.8 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมของโปรติเอส 39

3.3.9 การศึกษาจลนพลศาสตร์โปรติเอส 39

3.3.10 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขนไก่ 39

3.5 การวิเคราะห์โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* spp. เชิงชีวสารสนเทศ 40

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการวิจัย 41

4.1 การเพาะเลี้ยง *Fervidobacterium thailandense* FA004 41

4.2 สัดส่วนของกิจกรรมโปรติเอสจากการเพาะเลี้ยง *F. thailandense* FA004 42

4.3 การหาช่วง % อิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอนโปรติเอส 43

4.4 การหากิจกรรมของโปรติเอสด้วย zymogram เบื้องต้น 44

4.5 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 46

4.5.1 การตกตะกอนโปรติเอสด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 46

4.5.2 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน 47

4.5.3 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน 48

4.5.4 SDS-PAGE และ zymogram 50

4.5.5 เซรีนโปรติเอสใน complete genome sequence ของ *F. thailandense* FC2004^T 52

4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 56

4.6.1 ผลของ pH ต่อกิจกรรมและความเสถียรของโปรติเอส 56

4.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความเสถียรของโปรติเอส 57

4.6.3 ผลของตัวยับยั้งโปรติเอส 59

4.6.4 ผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรติเอส 60

4.6.5 ผลของสารซักล้างและตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมของโปรติเอส 61

4.7 จลนพลศาสตร์ของโปรติเอส 62

4.8 การย่อยสลายขนไก่ 64

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 68

ภาคผนวก 69

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 และการเตรียมหัวเชื้อ FA004 70

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีในการทดลอง 72

ภาคผนวก ค การคำนวณค่ากิจกรรมของโปรติเอส 78

ภาคผนวก ง การหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง 79

ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ 80

รายการอ้างอิง 90

ประวัติผู้เขียน 97

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การจัดประเภทโปรติเอสในฐานข้อมูล IUBMB 4

ตารางที่ 2 การจัดจำแนกระบบโปรติเอสบนฐานข้อมูล MEROPS 8

ตารางที่ 3 การจำแนกจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิของการเจริญ 10

ตารางที่ 4 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนชีวมวลและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ทนร้อน 11

ตารางที่ 5 การจัดกลุ่มสมาชิกแบคทีเรียชอบร้อนในไฟลัม Thermotogae 13

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียในไฟลัม Thermotogae 14

ตารางที่ 7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นพบ *Fervidobacterium* sp. 15

ตารางที่ 8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. 16

ตารางที่ 9 การตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่ % ความอิ่มตัวต่างๆ 44

ตารางที่ 10 การตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่ช่วง % อิ่มตัว 60 และ 80% 44

ตารางที่ 11 ผลการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 50

ตารางที่ 12 เซรีนโปรติเอสที่ได้จากจีโนมของ *F. thailandense* FC2004^T 54

ตารางที่ 13 ผลของตัวยับยั้งโปรติเอสต่อกิจกรรมโปรติเอส 59

ตารางที่ 14 ผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมโปรติเอส 60

ตารางที่ 15 ผลของสารซักล้างต่อกิจกรรมโปรติเอส 61

ตารางที่ 16 ตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมโปรติเอส 62

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *Fervidobacterium riparium* sp. ... 15

รูปที่ 2 ลำดับส่วนสำคัญต่างๆ ของ fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans* 23

รูปที่ 3 โครงสร้าง 3D ของ fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans* 23

รูปที่ 4 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ subtiases family และ keratinases จาก *Fervidobacterium* spp. 24

รูปที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004......................... 25

รูปที่ 6 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสมาชิกในออเดอร์ Thermotogales.......... 26

รูปที่ 7 การตัดแบ่งเจลหลังการทำ electrophoresis.. 36

รูปที่ 8 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 ที่บรรจุอยู่ภายในขวดซีรั่ม 41

รูปที่ 9 ลักษณะของ F. thailandense FA004 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast............. 42

รูปที่ 10 สัดส่วนของกิจกรรมโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 43

รูปที่ 11 แถบกิจกรรมของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004... 46

รูปที่ 12 โครมาโทรแกรมของการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสผ่านคอลัมน์ DEAE Sephacel................... 48

รูปที่ 13 โครมาโทรแกรมของการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 49

รูปที่ 14 SDS-PAGE (S) และ zymogram (Z) ของการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ในขั้นตอนต่างๆ.. 50

รูปที่ 15 โครงสร้างแบบริบบิ้นของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FC2004 53

รูปที่ 16 ไดอะแกรมแสดงโดเมนของ immature และ mature peptidase S8s จาก *Fervidobacterium* spp. 53

รูปที่ 17 Fervidolysin-like peptidase S8 (WP_069293857) จาก *F. thailandense* FC2004 54

รูปที่ 18 Islandisin-like peptidase S8 (WP_069292648) จาก *F. thailandense* FC2004..... 54

รูปที่ 19 Thermitase-like peptidase S8 (WP_069293332) จาก *F. thailandense* FC2004 . 55

รูปที่ 20 ผลของ pH ต่อกิจกรรมของโปรติเอส 56

รูปที่ 21 ผลของ pH ต่อความเสถียรของโปรติเอส 57

รูปที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของโปรติเอส 58

รูปที่ 23 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของโปรติเอส 58

รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของค่า A_{440} เมื่อใช้ azocasein ความเข้มข้นต่างๆ เป็น substrate 63

รูปที่ 25 กราฟ Lineweaver-Burk ของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 63

รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของขนไก่หลังบ่มด้วยโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 65

รูปที่ 27 ลักษณะของขนไก่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4X 66

รูปที่ 28 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักขนไก่หลังบ่มด้วยโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ... 67

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

โปรติเอส (EC 3.4.X.X) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสที่สามารถสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้ โปรติเอสส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องหนังและการจัดการของเสียประเภทโปรตีน แหล่งของโปรติเอสสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ (Garcia-Carreno, 1992) จุลินทรีย์ชอบร้อน มีความสามารถในการปรับตัว เพื่อให้อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ยากต่อการดำรงชีวิตได้ เป็นแหล่งของตัวเร่งชีวภาพทนร้อนหลากหลายชนิด เช่น แอลฟา-อะมัยเลส โพลูลาเนส ไซเลนเนส ไคติเนส เซลลูเลส ไลเปส และ ดีเอ็นเอ-โพลีเมอเรส รวมทั้งโปรติเอสด้วย (Haki and Rakshit, 2003)

โปรติเอสทนร้อนเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมอย่างมาก เนื่องด้วยกระบวนการผลิตที่ต้องใช้ความร้อนมีข้อดีหลายอย่าง เช่น เพิ่มการละลายตัว เพิ่มอัตราการถ่ายโอนมวลสาร ลดความหนืด ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ทั่วไป เป็นต้น (Frock and Kelly, 2012) โปรติเอสทนร้อนส่วนใหญ่สามารถสกัดได้จากแบคทีเรียตระกูล Bacillaceae (Azlina and Norazila, 2013; Banerjee et al., 1999; Frock and Kelly, 2012; Rahman *et al*., 1994) จีนัส *Fervidobacterium* เป็นแบคทีเรียชอบร้อนในออร์เดอร์ *Thermotogales* ซึ่งมีรายงานว่า *Fervidobacterium pennivorans* (DSM 9078) สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนเพื่อย่อยสลายวัสดุประเภทเคราตินได้ (Friedrich and Antranikian, 1996) Lee *et al.* (2015) ได้ศึกษาการทำงานของยีน *fiscp* ของ *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (KCTC 4680) แสดงออกเป็น chain FIAW1_1600 A ของโปรตีน FIAW1_1600 (WP_033190981) ซึ่งมีรหัสโปรตีนเป็น M32 carboxypeptidase โดยนำยีน *fiscp* โคลนนิ่งเข้าไปใน *E. coli* พบว่าสารสกัดจากเซลล์ *E. coli* ที่ผ่านการโคลนยีน สามารถย่อยสลายขนไก่ได้

Fervidobacterium sp. สายพันธุ์ FA004 คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนฝาง มีคุณสมบัติในการย่อยสลายขนนกซึ่งเป็นวัสดุเคราตินได้ (Keawram and Kanoksilapatham, 2013a) แต่ยังไม่มีการรายงานถึงเอกลักษณ์ของโปรติเอสบริสุทธิ์ที่สกัดได้จาก *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 และในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการสกัด แยกบริสุทธิ์และหาเอกลักษณ์ของโปรติเอสที่ได้จาก *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อแยกบริสุทธิ์และศึกษาเอกลักษณ์และปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของโปรติเอสจากแบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และสกัดโปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004

1.3.2 ศึกษาวิธีการแยกบริสุทธิ์โปรติเอส ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1.3.3 ศึกษาเอกลักษณ์ของโปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 ได้แก่

1) ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของโปรติเอส

2) ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อความเสถียรของโปรติเอส

3) ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของโปรติเอส

4) ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความเสถียรของโปรติเอส

5) ผลของตัวยับยั้งโปรติเอส

6) ผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรติเอส

7) ผลของสารซักล้างต่อกิจกรรมของโปรติเอส และ

8) ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมของโปรติเอส

1.3.4 การศึกษาจลน์ศาสตร์โปรติเอส

1.3.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขนไก่

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมในการการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสในงานวิจัยถัดไป

1.4.2 ทราบถึงลักษณะคุณสมบัติของโปรติเอสทนร้อนสูงจาก *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 ทำให้สามารถนำข้อมูลจากงานวิจัย ไปปรับปรุงกระบวนผลิตและการใช้งานได้อย่างเหมาะสม

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โปรติเอส

โปรติเอส (protease), เปปติเดส (peptidase), โปรติเนส (proteinase) หรือ โปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ที่ทำปฏิกิริยาสลายพันธะเปปไทด์ โดยมีน้ำเข้าร่วมในปฏิกิริยา มี EC number คือ EC 3.4.X.X โปรติเอสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ทั้งจุลินทรีย์ พืชและสัตว์ ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โปรติเอสมีบทบาทสำคัญในการทำงานของร่างกาย เช่น การทำงานของระบบย่อยอาหาร กระตุ้นการทำงานของโปรเอนไซม์หรือโปรฮอร์โมน ควบคุมการแสดงออกของยีนบางประเภทและป้องกันกลไกลบางอย่าง เช่น การแข็งตัวของเลือด ในบางครั้งโปรติเอสถูกใช้เพื่อดัดแปลงโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งช่วยปรับเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและการใช้งาน โปรติเอสถูกนำมาใช้งานในอุตสาหกรรมอาหารเป็นส่วนใหญ่และมีการนำไปใช้ในการเพิ่มคุณค่าของเสียซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรม (Garcia-Carreno, 1992)

2.1.1 ประเภทของโปรติเอส

โปรติเอสสามารถแบ่งตามลักษณะเฉพาะของการทำงาน (specific activity) และบริเวณเร่ง (active site) ออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ exopeptidases และ endopeptidases มีลักษณะการทำงานที่ต่างกัน ฐานข้อมูลของ IUBMB (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology) ได้แบ่งประเภทของโปรติเอสและกำหนด EC number ตามตารางที่ 1

2.1.1.1 Exopeptidases

โปรติเอสกลุ่มนี้สามารถจำแนกได้จากตำแหน่งการทำปฏิกิริยาทางด้านปลาย N- หรือ C-terminal และจำนวนของกรดอะมิโนที่ถูกปลดปล่อยออกมาขณะเร่งปฏิกิริยา เช่น ถ้าเป็น exopeptidases ที่ปลดปล่อยกรดอะมิโนหนึ่งตัวจากทางด้าน N-terminal จะเรียกว่า aminopeptidase (EC 3.4.11.X) ถ้าปลดปล่อย dipeptide จากทางด้าน N-terminal จะเรียกว่า dipeptidyl-peptidase (EC 3.4.14.X) หรือ ถ้าปลดปล่อย tripeptide จากทางด้าน N-terminal จะเรียกว่า tripeptidyl-peptidase (EC 3.4.14.X)

แต่ถ้าเป็น exopeptidases ที่ปลดปล่อยกรดอะมิโนหนึ่งตัวจากทางด้าน C-terminal จะเรียกว่า carboxypeptidase (EC 3.4.16.X, 3.4.17.X และ 3.4.18.X) และถ้าปลดปล่อย dipeptide จากทางด้าน N-terminal จะเรียกว่า peptidyl- dipeptidase (EC 3.4.15.X) และ exopeptidases ที่สลายพันธะของ dipeptide เพียงอย่างเดียว จะเรียกว่า dipeptidase (EC 3.4.13.X)

2.1.1.2 Endopeptidase

โปรติเอสกลุ่มนี้จะเข้าทำลายพันธะเปปไทด์ภายในสายเปปไทด์หรือโปรตีน ซึ่งเป็นเรื่องยากที่จะทราบตำแหน่งที่แน่ชัดของการเข้าทำปฏิกิริยา เมื่อเทียบกับ exopeptidases จึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องจัดจำแนกตามลักษณะการทำงาน ดังนั้น ในปัจจุบันได้แบ่งกลุ่มของโปรติเอส กลุ่มนี้ออกเป็น 6 กลุ่ม ตามกลไกลการเร่งปฏิกิริยา คือ serine endopeptidases (EC 3.4.21.X), cysteine endopeptidases (EC 3.4.22.X), aspartate endopeptidases (EC 3.4.23.X), metallo-endopeptidases (EC 3.4.24.X) และ threonine endopeptidases (EC 3.4.25.X) ในขณะที่กลุ่มสุดท้าย (EC 3.4.99.X) จะเป็นเอนไซม์จำนวนหนึ่งที่ยังไม่ทราบกลไกในการทำงาน

ตารางที่ 1 การจัดประเภทโปรติเอสในฐานข้อมูล IUBMB

E.C. number	Protease type	
EXOPEPTIDASES		Action
3.4.11.X	Aminopeptidases	N-terminal residue released
3.4.13.X	Dipeptidases	Acts only on dipeptides
3.4.14.X	Dipeptidyl-peptidases	N-terminal dipeptide released
3.4.14.X	Tripeptidyl-peptidases	N-terminal tripeptide released
3.4.15.X	Peptidyl-dipeptidases	C-terminal dipeptide released
3.4.16.X	Serine-type carboxypeptidases	C-terminal residue released
3.4.17.X	Metallocarboxypeptidases	C-terminal residue released
3.4.18.X	Cysteine-type carboxypeptidases	C-terminal residue released
3.4.19.X	Omega peptidases	Releases modified residues from N- or C-termini
ENDOPEPTIDASES		Active site
3.4.21.X	Serine endopeptidases	Ser/His/Asp
3.4.22.X	Cysteine endopeptidases	Cys/His
3.4.23.X	Aspartic endopeptidases	Asp
3.4.24.X	Metalloendopeptidases	Metal-binding site
3.4.25.X	Threonine endopeptidases	Thr
3.4.99.X	Endopeptidases of unknown catalytic mechanism	

ที่มา: Moss (2018)

2.1.2 กลไลการทำงานของโปรติเอส

2.1.2.1 เซรีนเปปติเดส

เซรีนเปปติเดส (serine peptidases) หรือ อัลคาไลเปปติเดส (alkali peptidases) (EC 3.4.21.X) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นด่าง (pH 7-11) ที่บริเวณเร่งของเปปติเดสชนิดนี้อาศัยการทำงานร่วมกันของหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ Ser (serine), His (histidine) และ Asp (aspartic acid) ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ การเติม diisopropyl fluorophosphate (DFP) หรือ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) สามารถยับยั้งการทำงานของเซรีนเปปติเดสได้

ตัวอย่างของ serine peptidases เช่น chymotrypsin (EC 3.4.21.1), cucumisin (EC 3.4.21.25) จาก sarcocarp ของแตงหอม (*Cucumis melo*), xanthomonalisin (EC 3.4.21.101) จากแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp., aqualysin 1 หรือ caldolysin (EC 3.4.21.111) จากแบคทีเรียทนร้อน *Thermus aquaticus* เป็นต้น

2.1.2.2 ซีสเตอีนเปปติเดส

ซีสเตอีนเปปติเดส (cysteine peptidases) หรือ ซัลไฟดริลเปปติเดส (sulfhydryl peptidases) หรือ ไทออลเปปติเดส (thiol peptidases) (EC 3.4.22.X) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง pH 6.5-7 ที่บริเวณเร่งของเปปติเดส ชนิดนี้มีหมู่ไทออล (thiol group) จาก Cys (cysteine) และ His (histidine) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ การเติม iodoacetamide (IA) หรือ N-ethylmaleimide (NEM) สามารถยับยั้งการทำงานของซีสเตอีนเปปติเดสได้

ตัวอย่างของ cysteine peptidases เช่น papain (EC 3.4.22.2) จากยางของมะละกอ (*Carica papaya*), ficain (EC 3.4.22.3) จากยางของมะเดื่อ (*Ficus glabrata*), asclepain (EC 3.4.22.7) จากยางของ milkweed (*Asclepias syriaca*), separase หรือ separin (EC 3.4.22.49) พบได้ทั้งใน *Saccharomyces cerevisiae* และเซลล์มนุษย์ ซึ่งมีส่วนช่วยในการแยกไมโครติดของกระบวนการไมโตซีส (mitosis), calicivirin (EC 3.4.22.66) จาก *Norovirus* ที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบแบบเฉียบพลัน เป็นต้น

2.1.2.3 แอสปาติกเปปติเดส

แอสปาติกเปปติเดส (aspartic peptidases) หรือ แอซิดเปปติเดส (acid peptidases) หรือ คาร์บอกซิลเปปติเดส (carboxyl peptidases) (EC 3.4.23.X) ทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด (pH 2-4) ที่บริเวณเร่งของเปปติเดส ชนิดนี้มี Asp (aspatic acid) แอสปาติกเปปติเดสทุกชนิดจัดเป็น endopeptidase การเติม Pepstatin A สามารถยับยั้งการทำงานของแอสปาติกเปปติเดสได้

ตัวอย่างของ aspartic peptidases เช่น pepsin (EC 3.4.23.1) จากน้ำย่อยในกระเพาะของสัตว์มีกระดูกสันหลัง chymosin หรือ rennin (EC 3.4.23.4) เอนไซม์ในกระเพาะของลูกวัวที่ทำให้เกิดการแข็งตัวของนม penicillopepsin (EC 3.4.23.20) จากเชื้อรา *Penicillium janthinellum* phytepsin (EC 3.4.23.40) ที่พบได้ในข้าวบาเลย์ thermopsin (EC 3.4.23.42) จากอาเคียทนร้อน *Sulfolobus acidocaldarius* เป็นต้น

2.1.2.4 เมทัลโลเปปติเดส

เมทัลโลเปปติเดส (metallopeptidases) (EC 3.4.24.X) ที่บริเวณเร่งของเปปติเดสชนิดนี้มีกรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยการทำงานร่วมกับโคเฟคเตอร์ (cofactor) ประเภทประจุไอออน 2^{+} (divalent cation) เช่น Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} เป็นต้น สามารถยับยั้งการทำงานของโปรติเอสชนิดนี้โดยใช้ ethylenediaminetetraacetate (EDTA), ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid (EGTA), 1, 10-phenanthroline

ตัวอย่างของ metallopeptidases เช่น atrolysin A (EC 3.4.24.1) หนึ่งในพิษจากงูหางกระดิ่ง ใช้ Zn^{2+} เป็นโคเฟคเตอร์, microbial collagenase (EC 3.4.24.3) เอนไซม์ที่ย่อยคอลลาเจนธรรมชาติ ซึ่งสามารถแยกได้จาก *Clostridium histolyticum* ใช้ Zn^{2+} เป็นโคเฟคเตอร์, thermolysin (EC 3.4.24.27) จาก *Micrococcus caseolyticus* และ *Aspergillus oryzae* ใช้ Ca^{2+} และ Zn^{2+} เป็นโคเฟคเตอร์, insulysin (EC 3.4.23.56) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกับการใช้พลังงานในกล้ามเนื้อและหัวใจ พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและแมลงวันทอง (*Drosophila melanogaster*) ใช้ Zn^{2+} เป็นโคเฟคเตอร์, bontoxilysin (EC 3.4.24.69) จากแบคทีเรีย *Clostridium botulinum* ใช้ Zn^{2+} เป็นโคเฟคเตอร์ เป็นต้น

2.1.2.5 ทีโอนีนเปปติเดส

ทีโอนีนเปปติเดส (Threonine peptidases) (EC 3.4.25.X) ถูกตั้งข้อสันนิษฐานว่าที่บริเวณเร่งของโปรติเอสชนิดนี้ มี Thr (treonine) โดยการเร่งปฏิกิริยาจะใช้ทั้งหมู่ hydroxyl ที่ side chain และหมู่อะมิโนของ Thr ทางด้านปลาย N-terminal เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (nucleophile) เพื่อใช้ในการสร้างพันธะกับสับสเตรทและเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์

ตัวอย่างของ threonine peptidases เช่น proteasome endopeptidase complex หรือ macropain (EC 3.4.25.1) เป็นโปรติเอสเชิงซ้อนที่สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้หลากหลาย มีอยู่ทั้งหมด 28 subunit พบได้ทั้งในเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอต (Prosite, 2013), HslU--HslV peptidase (EC 3.4.25.2) เป็นโปรติเอสที่สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้หลากหลายโดยต้องอาศัย ATP ในการเร่งปฏิกิริยา แบ่งเป็น HslU และ HslV subunit ซึ่ง HslU จะเข้าจับกับสับเตรททางด้าน N-terminal และทำให้สับสเตรทคลายตัว (unfold) แล้ว HslV จะเข้าเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (IntEnz, 2010)

2.1.3 MEROPS database

MEROPS คือ ฐานข้อมูลออนไลน์ที่รวบรวมและจำแนกข้อมูลของโปรติเอสและตัวยับยั้งโปรติเอส ซึ่งเริ่มก่อตั้งโดย Rawlings และ Barrett เมื่อปี ค.ศ. 1993 และเริ่มเผยแพร่ข้อมูลบนอินเตอร์เน็ตเมื่อปี ค.ศ. 1996 MEROPS จัดจำแนกโปรติเอสโดยใช้ความเหมือนและความสัมพันธ์ของโครงสร้างปฐมภูมิและตติยภูมิ ในการจำแนกกลุ่มของโปรติเอสและแบ่งออกเป็น families และ clans ตามตารางที่ 2 ซึ่งความคิดที่นำ families และ clans มาใช้จัดกลุ่มโปรติเอส ได้มาจากรายการสารคดีโทรทัศน์ ที่นำเสนอเรื่องราวของ Bee-eater หรือ นกจาบคา (*Merops* sp.) ดังนั้น พวกเขาจึงเลือกใช้ชื่อสกุลวิทยาศาสตร์ของนกจาบคามาเป็นชื่อฐานข้อมูลนี้ โดยสามารถสืบค้นทางออนไลน์ได้จาก www.ebi.ac.uk/merops/

2.1.3.1 การจำแนกกลุ่มโปรติเอสในระบบ Families

จำแนกโดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ซึ่งสมาชิกทุกตัวที่อยู่ใน families เดียวกัน เมื่อทดสอบทางสถิติจะมีความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังรวมไปถึงโมเลกุลของหน่วยโปรติเอส (protease unit) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอส ในแต่ละ families จะมีตัวอักษรตัวแรกนำหน้าที่แสดงถึงชนิดของการเร่งปฏิกิริยา (S: serine, C: cysteine, T: threonine, A: aspartic, G: glutamic, M: metallo, N: asparagine และ U: unknown) ตามด้วยหมายเลขของแต่ละ families ตัวอย่างเช่น C14 คือ cysteine protease ในกลุ่มของ family caspase เป็นต้น ที่ผ่านมามีการอัพเดทข้อมูลและรวมกลุ่มของ families เข้าด้วยกันบ่อยๆ ทำให้ชื่อของ families ที่เคยใช้ไปแล้ว ไม่สามารถนำมาใช้ซ้ำอีกได้ ดังนั้น ในปัจจุบันระบบตัวเลขของ families จึงหยุดพัฒนาไป

2.1.3.2 การจำแนกกลุ่มโปรติเอสในระบบ Clans

จำแนกโดยอาศัยลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาบนสายเปปไทด์และกรดอะมิโนรอบข้าง นอกจากนี้ยังใช้ความเหมือนของข้อมูลโครงสร้างสามมิติในการจัดจำแนกด้วย ในแต่ละ clans จะมีตัวอักษรตัวแรกที่บ่งบอกชนิดของการเร่งปฏิกิริยา (เช่นเดียวกับ families) ตามด้วยตัวอักษรที่สอง ตัวอย่างเช่น clan CA คือ cysteine peptidases ในกลุ่ม A เป็นต้น หากเป็น clans ที่ประกอบด้วยโปรติเอสที่มีมาจาก families มากกว่า 1 families (C, S และ T) จะใช้ตัวอักษรตัวแรกเป็น P แล้วตามด้วยตัวอักษรที่สอง ตัวอย่างเช่น clan PA ที่มีทั้ง serine peptidases (families S1) และ cysteine peptidases (families C3) เป็นสมาชิกที่อยู่ใน clans เดียวกัน

ตารางที่ 2 การจัดจำแนกระบบโปรติเอสบนฐานข้อมูล MEROPS

Class	Families	Clans	Active site residues
Serine (EC 3.4.21.X)	S1-S44	PA (S1-3, 6, 7, 29-32, 35, 43)	His, Asp, Ser
		SB (S8)	Asp, His, Ser
		SC (S9, 10, 15, 28, 33, 37)	Ser, Aso, His
		SE (S11-13)	Ser, Lys, (SXXK)
		SF (S24, 26, 41, 44)	Ser, Lys, (His)
		SH (S21)	His, Ser, His
		SK (S14)	Ser, His
		SX (S16, 18, 19, 38)	
Cysteine (EC 3.4.22.X)	C1-C47	CA (C1, 2, 6-10, 12, 16, 19, 21, 23, 27-29, 31-36, 39, 41, 42, 47	Cys, His, Asp (Asn)
		PA (C3, 4, 24, 30, 37, 38)	His, Asp, Cys
		CD (C11-14, 25)	His, Cys
		CE (CS)	His, Glu (Asp), Cys
		CF (ClS)	Glu, Cys, His
		CG (C17)	Cys, Cys
		CH (C46)	Cys, Thr, His
		CX (C22, 26, 40)	
Aspartic (EC 3.4.23)	A1-A21	AA (A1-3, 9, 11-13, 16-8)	Asp, Asp
		AB (A6, 21)	Asp, Asn
Metallo (EC 3.4.24.X)	M1-M51	MA (M1, 2, 4-13, 30, 36, 48)	His, Glu, His (HEXXH)
		MC (M14)	His, Glu, His
		MD (M15, 45)	His, Asp, His
		ME (M16, 44)	His, Glu, His (HXXEH)
		MF (M17)	Lys, Asp, Asp, Asp, Glu
		MG (M24)	Asp, Asp, His, Glu, Glu
		MH (M18, 20, 25, 48, 40, 42	His (Asp), Asp, Glu, Asp (Glu), His
		MJ (M38)	His, His, L ys, His, His, Asp
		MX (M3, 26, 27, 32, 34, 35, 41, 43, 50, 51)	
Threonine (EC 3.4.25.X)	T1, T3	PB (T1, 3)	Thr, Ser or Cys

ที่มา: Rawlings *et al.* (2017)

2.2 โปรติเอสจากแบคทีเรีย

2.2.1 การสร้างและนำโปรติเอสออกสู่นอกเซลล์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียหลายชนิดสร้างและหลั่งโปรติเอสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อย่อยสารอาหารจำพวกโปรตีนและเพปไทด์ให้กลายเป็นกรดอะมิโน เพื่อใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งโปรติเอสที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular proteases) นี้ จะต้องอาศัยเพปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ซึ่งเป็นสายเพปไทด์สายสั้นๆ ที่ช่วยนำเปปไทด์ไปสู่เอนโดพลาสมิก เรติคิวลัม (ในยูคาริโอต) หรือ เยื่อหุ้มเซลล์ (ในโพรคาริโอต) และเข้าสู่วิถีการหลั่งสาร (secretion) ต่อไป ทำให้สามารถนำโปรติเอสออกสู่นอกเซลล์ได้ โดยปกติโปรติเอสที่สร้างในเซลล์ (intracellular protease) แบคทีเรีย จะถูกผลิตออกมาอยู่ในสภาวะที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive form) ซึ่งเป็นกลไกลป้องกันการทำงานของโปรติเอสภายในเซลล์ เนื่องจากโปรติเอสบางชนิดที่เซลล์ผลิตออกมาก็เป็นอันตรายต่อตัวมันเองด้วย โดยรูปแบบของสภาวะที่ไม่พร้อมทำงาน คือ ในสายเปปไทด์ของโปรติเอสจะมี propeptide แทรกอยู่ระหว่างเพปไทด์ส่งสัญญาณและโปรตีนที่พร้อมทำงาน (mature protein) ทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางหรือป้องกันไม่ให้บริเวณเร่งไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์

การหลั่งโปรติเอสออกนอกเซลล์แบคทีเรียเกิดขึ้นโดย เพปไทด์ส่งสัญญาณจะช่วยพาโปรติเอสที่อยู่ในสภาวะที่ไม่พร้อมทำงานออกนอกเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะมี secretory proteins ที่ทำหน้าที่ในการขนย้ายโปรตีนชนิดต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและโปรตีนที่ต้องนำออกสู่นอกเซลล์ ในระหว่างกระบวนการขนส่งโปรติเอสออกนอกเซลล์ เพปไทด์ส่งสัญญาณและ proprotein บางส่วนจะถูกกำจัดออกไปด้วยทำให้โปรติเอสที่ถูกหลั่งออกมาอยู่ในสภาพที่พร้อมทำงาน (mature protease) สามารถเข้าเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ของสารอาหารในสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ได้ (Wandersman, 1989)

2.2.2 โปรติเอสทนร้อนจากจุลินทรีย์ชอบร้อนสูง

สิ่งมีชีวิตบนโลกนี้ มีอยู่มากมายหลายชนิด กระจายอยู่ในสถานที่ต่างๆ บนโลก ซึ่งมีสภาพอากาศหรือสภาวะแวดล้อมแตกต่างกันไป ซึ่งในบางแห่งมีสภาพแวดล้อมที่เลวร้ายจนสิ่งมีชีวิตทั่วไปไม่สามารถอาศัยอยู่ได้ แต่จุลินทรีย์หลายๆสายพันธุ์สามารถปรับตัวและดำรงอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เลวร้ายนั้นได้ เราเรียกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตท่ามกลางสภาวะแวดล้อมที่เลวร้ายเหล่านี้ได้ว่า เอกซ์ตรีโมไฟล์ (extremophile)

การแบ่งกลุ่มของจุลินทรีย์ตามสภาวะอุณหภูมิที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ คือ ไซโครไฟล์ (Pyschrophile) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะเย็นถึงเย็นจัด อุณหภูมิต่ำกว่าปกติ (ต่ำกว่า 10°C) มีโซไฟล์ (Mesophile) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถ

เจริญเติบโตได้ในสภาวะอุณหภูมิปกติ และ เทอร์โมไฟล์ (Thermophile) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะร้อนจนถึงร้อนจัด อุณหภูมิสูงกว่าปกติ (สูงกว่า 60°C) โดยการจำแนกจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิของการเจริญแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การจำแนกจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิของการเจริญ

Organism	Temperature range (°C)	Optimum Temperature (°C)
Pyschrophiles	(-20) -10°C	<10°C
Mesophiles	20-45°C	30-37°C
Moderate thermophiles	50-60°C	50-<70°C
Extream thermophiles	40-80°C	70-<80°C
Hyperthermophiles	60-100°C	80°C

ที่มา: วิโรจน์ กนกศิลปธรรม (2558)

จุลินทรีย์ชอบร้อนสูง (hyperthermophiles) เป็นจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตที่ดีในช่วงอุณหภูมิ 60-100°C สามารถพบได้ตามแหล่งระบบนิเวศบนพื้นดิน (terrestrial habitats) ใต้ดิน (subterranean habitats) รวมถึงใต้ทะเล (submarine habitats) ที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในโดเมนอาร์เคีย (archaea) และแบคทีเรีย (bacteria) (Gomes and Steiner, 2004; Vieille and Zeikus, 2001)

จุลินทรีย์ชอบร้อนสูงเป็นแหล่งของเอนไซม์ทนร้อน (thermostable enzymes หรือ thermozymes) ที่มีคุณค่ามากมายที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ (ตารางที่ 4) ปัจจุบันเอนไซม์ทนร้อนหลายชนิดนั้นเป็นที่ต้องการในภาค อุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการผลิตสารซักล้าง อาหาร อาหารสัตว์ แป้ง สิ่งทอ เครื่องหนัง กระดาษและยา (Gomes and Steiner, 2004; Haki and Rakshit, 2003) เนื่องด้วยการผลิตที่ใช้กระบวนการทางชีวภาพที่อุณหภูมิสูงมีข้อดีอยู่หลายประการ (Frock and Kelly, 2012) ดังนี้

1) ที่อุณหภูมิสูงจะเพิ่มคุณสมบัติการละลายของคาร์โบไฮเดรทและกรดอะมิโน

2) เพิ่มอัตราการถ่ายโอนมวลสาร

3) ง่ายต่อการแยกผลิตภัณฑ์ที่ระเหยได้

4) ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

5) สามารถใช้อุณหภูมิในการควบคุมการผลิตได้

6) สภาวะเหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทนร้อนซึ่งทนทานและมีความคงทน

ตารางที่ 4 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนชีวมวลและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ทนร้อน

เอนไซม์	ช่วงอุณหภูมิ (°C)	การเปลี่ยนแปลงชีววภาพ	การประยุกต์ใช้
a-Amylase (bacterial)	90–100	Starch → dextrose syrups	Starch hydrolysis, brewing, baking, detergents
a-Amylase (fungal)	50–60	Starch → dextrose syrups	Production of maltose
Pullulanase	50–60	Starch → dextrose syrups	Production of glucose syrups
Xylanase	45–65, 105[a]	Craft pulp → xylan+lignin	Pulp and paper industry
Chitinase	65–75[b]	Chitin → chitobiose Chitin → *N*-acetyl glucosamine (chitibiase) *N*-acetyl glucosamine → glucosamine (deacetylation) Chitin → chitosan (deacetylase)	Food, cosmetics, pharmaceuticals, agrochemicals
Cellulase	45–55, 95[c]	Cellulose → glucose	Cellulose hydrolysis, polymer degradation in detergents
Protease	65–85	Protein → amino acids and peptides	Baking, brewing, detergents, leather industry
Lipase	30–70	Fat removal, hydrolysis, interesterification, alcholysis, aminolysis	Dairy, oleo chemical, detergent, pulp, pharmaceuticals, cosmetics and leather industry
DNA polymerase	90–95	DNA amplification	Genetic engineering/PCR

[a] Xylanase from *Thermotoga* sp.

[b] Within this range enzyme activity was high.

[c] Cellulases from *Thermotoga* sp.

ที่มา: Haki and Rakshit (2003)

ในปี 1962 ได้มีการค้นพบ Thermolysin จาก *Bacillus thermoproteolyticus* ถือเป็นโปรติเอสทนร้อนตัวแรกที่ได้มีการรายงานไว้ หลังจากนั้น ก็ได้มีการค้นพบโปรติเอสทนร้อนอีกหลายชนิดจากจุลินทรีย์ (Endo, 1962) มีรายงานว่าอาเคียชอบร้อน (thermophilic archaea) ในกลุ่มของ *Pyrococcus* , *Thermococcus*, *Staphylothermus*, *Desulfurococcus*, *Pyrobaculum* และ *Sulfolobus* สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนได้ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรอยู่ในช่วง 90–100°C นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่า อาเคียสายพันธุ์ *Desulfurococcus* สามารถผลิตเซรีนโปรติเอสทนร้อนได้ เชื้อราชอบร้อน (thermophilic fungi) กลุ่ม *Achaetomium*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporotrichum*, *Torula* และ *Rhizomucor* สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนปานกลางได้ และโปรติเอสทนร้อนบางชนิดก็มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและอัตราการทำปฏิกิริยาที่ค่อนข้างสูง มีรายงานว่าเชื้อรา *Penicillium duponti* K1014 ที่คัดแยกได้จากปุ๋ยหมักสามารถผลิตโปรติเอสกรดทนร้อน (thermostable acid proteases) ได้ ในทางตรงข้ามกันนี้เชื้อรา *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* และ *Humicola lanuginose* ก็สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนชอบด่าง (alkaline thermostable proteases) ได้เช่นกัน ในบรรดาแบคทีเรียทั้งหมด โปรติเอสทนร้อนส่วนใหญ่ถูกค้นพบจาก *Bacillus* sp. โดยรายงานที่เก่าที่สุดในปี 1977 เป็นการค้นพบโปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus stearothermophilus* โดยโปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus stearothermophilus* สายพันธุ์ต่างๆ ก็มีความเสถียรต่อความร้อนที่แตกต่างกันไป เช่น โปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* sp. ทำงานได้ดีที่ 85°C ในขณะที่ *Bacillus stearothermophilus* TP26 ทำงานได้ดีที่ 75°C นอกจากนี้ *Bacillus* sp. JB-99 ก็สามารถผลิตโปรติเอสทนร้อนชอบด่างได้ (Sinha and Khare, 2013)

2.3 แบคทีเรียชอบร้อนสูงไฟลัม Thermotogae

Thermotogae ลักษณะเด่นของไฟลัมนี้ คือ เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตและอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง รวมถึงน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิที่สูงถึงเกือบ 100°C และมีโครงสร้างพิเศษที่ห่อหุ้มรอบเซลล์ไว้หรือเรียกว่า “toga” การจัดจำแนกแบคทีเรียชอบร้อนในไฟลัม Thermotogae แบ่งออกเป็น 4 ออร์เดอร์ รวม 15 จีนัส ในจำนวนนี้ แบ่งย่อยจีนัส Thermotoga ตามลำดับเบสในยีน 16S rRNA และช่วงอุณหภูมิการเจริญเติบโตเป็น *Thermotoga* และ *Pseudothermotoga* รวมเป็น 15 จีนัส ดังตารางที่ 5 (Bhandari and Gupta, 2014; Itoh *et al.*, 2016; Reysenbach *et al.*, 2013) และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียไฟลัม Thermotogae บางสายพันธุ์แสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 การจัดกลุ่มสมาชิกแบคทีเรียชอบร้อนในไฟลัม Thermotogae

Phylum	Order	Family	Genus
Thermotogae	Thermotogales	*Thermotogaceae*	*Thermotoga*
			Thermopallium
			Pseudothermotoga
			Oceanotoga
		Fervidobacteriaceae	*Fervidobacterium*
			Thermosipho
	Kosmotogales	*Kosmotogaceae*	*Kosmotoga*
			Mesotoga
	Petrotogales	*Petrotogaceae*	*Defluviitoga*
			Geotoga
			Marinitoga
			Petrotoga
	Mesoaciditogales	*Mesoaciditogaceae*	*Athalassotoga*
			Mesoaciditoga

ที่มา: ฐานข้อมูลออนไลน์ NCBI สืบค้นได้จาก https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียในไฟลัม Thermotogae

Species	G+C content (mol%)	Temperature optimum (°C)	Temperature range (°C)	pH optimum	pH range	NaCl optimum (%)	NaCl range (%)
Thermotoga maritima	46	80	55–90	6.5	5.5–9.0	2.7	0.25–6.0
Thermotoga neapolitana	41	80	55–90	7.0	5.5–9.0	2.0	0.25–6.0
Thermotoga thermarum	40	70	55–84	7.0	6.0–9.0	0.35	0.2–0.55
Thermotoga elfii	40	66	50–72	7.5	5.5–8.7	1.0	0–2.4
Thermotoga subterranea	40	70	50–75	7.0	6.0–8.5	1.2	0–2.4
Thermotoga hypogea	50	70	56–90	7.3–7.4	6.1–9.1	0.02	0–0.5
Thermotoga petrophila	46.6	80	47–88	7.0	5.2–9.0	1.0	0–5.5
Thermotoga naphthophila	46.1	80	48–86	7.0	5.4–9.0	1.0	0.1–6.0
Thermotoga lettingae	39.2	65	50–75	7.0	6.0–8.5	1.0	0–2.8
Thermosipho africanus	30	75	35–77	7.2	6.0–8.0	n.d.	0.11–3.6
Thermosipho melanesiensis	30.5	70	50–75	6.5–7.5	4.5–8.5	3.0	1.0–6.0
Thermosipho japonicus	31	72	45–80	7.2–7.6	5.3–9.3	4.0	0.66–7.9
Thermosipho geolei	30.0	70	45–75	7.5	6.0–9.4	2–3	0.5–7.0
Fervidobacterium nodosum	33.7	70	41–79	7.0	6.0–8.0	<1.0	n.d.
Fervidobacterium islandicum	40	65	50–80	7.0	6.0–8.0	<0.7	n.d.
Fervidobacterium gondwanense	35	65–68	45–80	7.0	6.0–8.0	<0.2	n.d.
Fervidobacterium pennivorans	40	70	50–80	6.5	5.5–8.0	0.4	0–4
Geotoga petraea	30	50	30–55	6.5	5.5–9.0	3	0.5–10
Geotoga subterranea	30	45	30–66	6.5	5.5–9.0	4	0.5–10
Petrotoga miotherma	40	55	35–65	6.5	5.5–9.0	2	0.5–10
Petrotoga mobilis	31–34	58–60	40–65	6.5–7.0	5.5–8.5	3–4	0.5–9.0
Petrotoga olearia	35	55	37–60	7.5	6.5–8.5	2	0.5–8
Petrotoga sibirica	33	55	37–55	8	6.5–9.4	1	0.5–7.0
Marinitoga camini	29	55	25–65	7.0	5.0–9.0	3.0	1.0–4.5
Marinitoga piezophila	29 (±1)	65	45–70	6.0	5.0–8.0	3.0	1.0–5.0

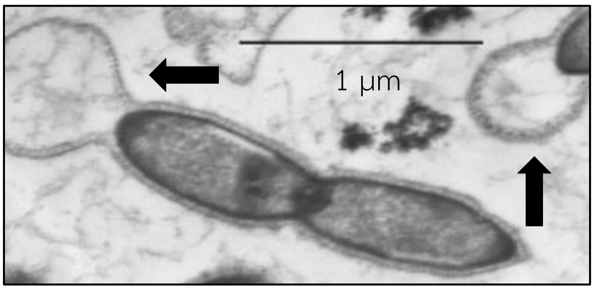
Abbreviation: n.d., not determined.

ที่มา: Huber and Hannig (2006)

2.4 แบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium sp.*

Fervidobacterium sp. เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง (rod shaped) สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ มีผนังเซลล์สองชั้น โดยผนังเซลล์ชั้นนอกที่บริเวณขั้วเซลล์ด้านหนึ่งมีลักษณะที่โป่งพองคล้ายลูกโป่ง เรียกว่า สเฟียรอยด์ (spheroids) หรือ โทกา (toga) ดังรูปที่ 1

ในปัจจุบัน มีการค้นพบและรายงานสปีชีส์ของ *Fervidobacterium* spp. อยู่ทั้งหมด 7 สปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งทั้งหมดเป็นแบคทีเรียชอบร้อนสูงและเจริญเติบโตในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic thermophiles) ทุกสายพันธุ์คัดแยกได้จากบริเวณแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีความร้อน เช่น น้ำพุร้อนหรือน้ำบาดาลจากใต้พิภพ แบคทีเรียสปีชีส์นี้ไม่ทนเกลือ NaCl



รูปที่ 1 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ *Fervidobacterium riparium* sp.
ที่มา: Podosokorskaya *et al.* (2011)

ตารางที่ 7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นพบ *Fervidobacterium* sp.

Culture		Culture condition		Reference
Organism	Originally isolated from	Opt. pH	Opt. temp.	
Fervidobacterium nodosum (ATCC 35602, DSM 5306)	New Zealand hot spring (New Zealand)	7.0-7.5	65-70°C	Patel *et al.,* 1985
Fervidobacterium islandicum (ATCC 49647, DSM 5733)	Bank of Varma river (Hveragerdi, Iceland)	n.d.	65°C	Huber *et al.,* 1990
F.islandicum AW-1 (KCTC 4680)	Geothermal hot stream (Indonesia)	7.0	70°C	Nam *et al*., 2002
Fervidobacterium gondwanense (ACM 5017, DSM 13020)	Bore sources and runoff channels of Great Artesian Basin (Australia)	7.0	65-68°C	Andrews and Patel, 1996
Fervidobacterium pennivorans (DSM 9078)	Hot spring of San Miguel (Azores, Portugal)	6.5	70°C	Friedrich and Antranikian, 1996
Fervidobacterium changbaicum (DSM 17883, JCM 13353)	Geothermal water of Changbai Mountains (China)	7.5	75-80°C	Cai *et al.,* 2007
Fervidobacterium riparium (DSM 21630)	Hot spring of Kunashir (Kuril Island, Russia)	7.8	65°C	Podosokorskaya *et al.,* 2011
Fervidobacterium thailandense (JCM 18757T, ATCC BAA-2483)	Fang hot spring in northern Thailand	6.0–8.5	78–80	Kanoksilapatham *et. al.*, 2016

Abbreviation: n.d., not determined

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp.

Culture	Protease purification			Gene	Reference
Organism	Protease	M.W.	Proceduce	Explassion	
Fervidobacterium islandicum (ATCC 49647, DSM 5733)	Islandisin	72 kDa	Cells pellet, sonication, cell extract, heat-treatment, hydroxyapatite	*fis* gene ⟶ *E.coli* BL21(DE3)	Gödde *et al.*, 2005
F.islandicum AW-1 (KCTC 4680)	keratinolytic protease	>200 kDa , 97 kDa	Cells pellet, sonication, cell extract , treat n-octyl-β-D-glucopyranoside, DEAE column, ultrafiltration, Superdex 200	n.d.	Nam *et al.*, 2002
	M32 carboxypeptidase	107 kDa	Cells pellet, sonication, cell extract , heat-treatment, Ni^{2+} affinity resin, treat human α-thrombin, Superdex 200	FIAW_1600 gene ⟶ *E.coli* BL21(DE3)	Lee *et al.*, 2015
Fervidobacterium pennivorans (DSM 9078)	keratinolytic protease	130 kDa	Cells pellet, sonication, cell extract, treat CHAPS, ultrafiltration, cylindrical SDS-PAGE gel	n.d.	Friedrich and Antranikian, 1996
	Fervidolysin	73 kDa , 58 kDa, 14 kDa	Cells pellet, sonication, cell extract, heat-treatment , Q Sepharose	*fls* gene ⟶ *E.coli* BL21(DE3)	Kluskens *et al.*, 2002

Abbreviation: n.d., not determined

มหาวิทยาลัยศิลปากร

งานวิจัยที่ศึกษาการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* spp. แสดงในตารางที่ 8 และงานวิจัยเหล่านี้ศึกษาเฉพาะ intracellular protease กับ membrane bound protease และงานโคลนยีนเป็นส่วนใหญ่ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาจากเซลล์ *Fervidobacterium thailandense* โดยตรง

2.4.1 *Fervidobacterium nodosum*

ค้นพบโดย Patel *et al.* (1985) คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนในประเทศนิวซีแลนด์ (New Zealand) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง มีทั้งเป็นแบบแท่งเดียว แบบเกาะกลุ่มหรือแบบสายโซ่ เจริญเติบโตในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) และไม่มีการสร้างสปอร์ มีผนังเซลล์สองชั้น

ผนังเซลล์ด้านนอกที่ห่อหุ้มเรียกว่า สเฟียรอยด์ (spheroids) เจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 65-70°C และ pH 7.0-7.5 มีระยะเวลาในการแบ่งตัว (doubling time) ที่สภาวะเหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ที่ 105 นาที สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ได้แก่ glucose, sucrose, starch และ lactose สามารถผลิต lactate, acetate, hydrogen และ carbon dioxide จากกระบวนการหมัก glucose ได้ แต่มีการผลิตเอทานอลที่น้อยกว่า

2.4.2 *Fervidobacterium islandicum*

ค้นพบโดย Huber *et al.* (1990) คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนและโคลนร้อนที่ริมฝั่งแม่น้ำ Varma (Hveragerdi, Iceland) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง (0.6x1.8 μm) มีบางส่วนมีสเฟียรอยด์ ที่ด้านใดด้านหนึ่งของตัวเซลล์เหมือนกับ *F. nodosum* เจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 65°C มีความแตกต่างของ DNA ตรงที่มีเบส G+C อยู่ 41 mol %

Nam *et al.* (2002) ศึกษาการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสที่สามารถย่อยวัสดุเคราตินได้ จาก *Fervidobacterium islandicum* AW-1 ที่เพาะเลี้ยงในขวดซีรัมขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงจากสูตร TF medium pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ นำเซลล์มาล้างด้วย 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) และนำไปแตกเซลล์โดยใช้เครื่อง sonicator ปั่นแยกนำสารสกัดเซลล์ออกมา ใส่ 10 mM *n*-octyl-β-D-glucopyranoside ลงไปในสารสกัดเซลล์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วย อัลตราเซนตริฟิลจ์ ที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Hiprep 16/10 DEAE โดยปรับสมดุลคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) และใช้ 0-1.0 M NaCl เป็นสารละลายตัวชะ ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที หาส่วนที่มีกิจกรรมของโปรติเอส นำส่วนที่มีเอนไซม์มาเพิ่มความเข้มข้นด้วย Amicon TCF-10 ultrafiltration system (MWCO=50K) จากนั้นนำมาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200 โดยปรับสมดุลคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) ที่มีการเติม 0.15 M NaCl ใช้อัตราการไหลที่ 0.5 มิลลิลิตร/นาที จนได้โปรติเอสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.4 เท่า มี specific activity 21.5 หน่วย/มิลลิกรัม และมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 97 และ >200 kDa โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ได้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่อุณหภูมิ 100°C pH 9.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 70-90°C และ pH 7-10 โปรติเอสบริสุทธิ์ถูกยับยั้งการทำงานโดยการเติม 10 mM PMSF ซึ่งทำให้ทราบว่าเป็นเซรีนโปรติเอส ไอออนของ (1 mM) Ag^{2+} และ Cu^{2+} ทำให้กิจกรรมของโปรติเอสลดลงเหลือเพียง 43% และ 54% ตามลำดับ โปรติเอสบริสุทธิ์มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ และสามารถย่อยวัสดุประเภทเคราติน เช่น ขนนกและโปรตีนชนิดอื่นๆได้

Godde *et al.* (2005) ศึกษาการโคลนนิ่งยีน *fis* ที่เมื่อถูกแปลรหัสพันธุกรรมเป็นโปรตีนแล้วได้เป็น Islandisin จาก *Fervidobacterium islandicum* (DSMZ 5733) และศึกษาการแสดงออกของยีน *fis* ใน *E. coli* โดยนำตะกอนเซลล์ *E. coli* ที่ผ่านการโคลนยีน มาแตกเซลล์โดยใช้ sonicator ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM potassium phosphate, pH 7.2 แล้วปั่นแยกสารสกัดเซลล์ออกจากเศษเซลล์ แล้วนำสารสกัดเซลล์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นโปรตีนที่เสียสภาพของ *E. coli* ออก จากนั้นนำไปทำไดอะไลซีสในสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM potassium phosphate, pH 7.2 แล้วนำสารสกัดที่ได้แยกบริสุทธิ์โดยใช้ hydroxyapatite column ชะโปรตีนโดยไล่ระดับความแรงของไอออน (ionic strength) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 10-500 mM sodium phosphate ใช้อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตร/นาที แล้วเก็บส่วนที่มีกิจกรรมของโปรติเอสไปวิเคราะห์ พบว่า Islandisin ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23.9 เท่า และได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ 28.6% มี specific activity 2.3 หน่วย/มิลลิกรัม มีน้ำหนักโมเลกุล 72 kDa สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 80°C pH 8.0 ถูกยับยั้งกิจกรรมของโปรติเอสโดย PMSF และ 4-(2-aminoethyl)-benzylsulfonylflouride ซึ่งจัดเป็นเซรีนโปรติเอส มีค่าครึ่งชีวิต (half-lives: $t_{1/2}$) ที่อุณหภูมิ 80, 90 และ 100°C อยู่ 32, 4 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ Islandisin พบว่ามีกรดอะมิโน Asp177, His215 และ Ser391 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนสำคัญที่บริเวณเร่งของเซรีนโปรติเอส

Lee *et al.* (2015) ศึกษาการแสดงออกของยีน *fiscp* จาก *Fervidobacterium islandicum* AW-1 โดยโคลนนิ่งเข้าไปใน *E. coli* เพื่อให้ผลิต M32 carboxypeptidase (CP, EC 3.4.17.X) (WP_033190981.1) จากนั้นนำเซลล์ *E. coli* ที่ผ่านการโคลนมาแตกเซลล์ด้วยเครื่อง sonicator แล้วปั่นแยกสารสกัดเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ จากนั้นนำสารสกัดเซลล์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นแยกโปรตีนที่เสียสภาพของ *E. coli* ออก นำส่วนใสมาแยกบริสุทธิ์ด้วย Ni^{2+}-affinity resin (10 มิลลิลิตร) โปรตีนที่ติดอยู่ถูกชะด้วย 20 mM Tris-HCl buffer (ประกอบด้วย 500 mM NaCl และ 250 mM imidazole) ตามด้วยการเติม human athrombin (2.9 U, Haematologic Technologies Inc., USA) ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืนเพื่อนำ His-tag ออก แล้วแยกบริสุทธิ์ต่อด้วย Superdex 200 pg 10/300 GL (GE Healthcare, USA) โดยปรับสมดุลคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl buffer (ประกอบด้วย 50 mM NaCl; pH 7.5) พบว่า carboxypeptidase ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่อุณหภูมิ 80°C pH 7.0 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 57 kDa และจัดเป็นโปรติเอสที่เหมือนเมทัลโลโปรติเอส โดยไอออนของ Co^{2+} และ Mn^{2+} ช่วยกิจกรรมของโปรติเอสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและได้ทดสอบค่าพารามิเตอร์ทางจลน์ศาสตร์โดยใช้ benzyloxycarbonyl Ala-Arg (ZAR) และ benzyloxycarbonyl Ala-Ala (ZAA) เป็นซับสเตรทในการทดสอบพบว่าเมื่อใช้ ZAR เป็นซับสเตรทได้ K_m = 5.22±0.11 mM และ

V_{max} = 7.99±0.13 หน่วย/มิลลิกรัม และเมื่อใช้ ZAA เป็นซับสเตรทได้ K_m = 8.27±0.76 mM และ V_{max} = 3.35±0.08 หน่วย/มิลลิกรัม ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายเคราติน พบว่าสารสกัดเซลล์ที่ยังไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์สามารถย่อยสลายขนไก่ได้ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70°C และหากใช้ร่วมกับ carboxypeptidase ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วพบว่าปริมาณของกรดอะมิโนจะมากเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้สารสกัดเซลล์เพียงอย่างเดียว

2.4.3 *Fervidobacterium gondwanense*

ค้นพบโดย Andrews and Patel (1996) คัดแยกได้จากน้ำบาดาลที่ไหลขึ้นมาจากแหล่งความร้อนใต้พิภพ (Great Artesian Basin, Australia) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ รูปร่างเป็นแท่ง ไม่มีสปอร์ มีทั้งเป็นแบบแท่งเดียว แบบเกาะกลุ่ม เจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 65-68°C และ pH 7.0 สามารถหยุดการเจริญเติบโตด้วย lysozyme, penicillin, tetracycline, phosphomycin และ vancamycin (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.2% มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ได้แก่ glucose, maltose, starch, amylopectin, cellobiose, carboxymethyl cellulose และ dextrin เมื่อใช้หมัก glucose พบว่าสามารถผลิต lactate, acetate, ethanol, CO_2 และ H_2 สามารถกำจัดกำมะถันได้ยกเว้น thiosulfate, sulfite หรือ sulfate และรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase-contrast และกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน พบสเฟียรอยด์ที่ส่วนท้าย (terminal spheroids) เพียงหนึ่งอัน จึงจัดอยู่ในจีนัส *Fervidobacterium* และปริมาณเบส G+C บน DNA ของ *F. changbaicum* มีอยู่ 35 mol%

2.4.4 *Fervidobacterium pennivorans*

ค้นพบโดย Friedrich and Antranikian (1996) คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนของเกาะ San Miguel (Azores, Portugal) เจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 70°C และ pH 6.5 มีความสามารถในการใช้ starch, glycogen, pullulan, glucose, fructose, maltose และ xylose เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโต แล้วยังสามารถผลิตเอทานอลและอะซิเตทในกระบวนการหมัก หลังหมักไป 48 ชั่วโมง โดยใช้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนและบ่มที่อุณหภูมิ 70°C โดยอะซิเตทเป็นผลผลิตหลักของกระบวนการหมัก นอกจากนี้ *F. pennivorans* ยังสามารถผลิตเอนไซม์เคราติเนสมาย่อยสลายขนนกป่นได้ โดยนำเซลล์ *F. pennavorans* จำนวน 1 กรัม มาละลายในบัฟเฟอร์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปแตกเซลล์โดยใช้เครื่อง sonicator แล้วปั่นแยกเศษเซลล์ออกจากสารสกัดเซลล์ นำสารสกัดเซลล์มาบ่มกับ 10 mM CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate) ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อละลายเอนไซม์ที่ติดอยู่

กับ toga ออกมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย อัลตราเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 100,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15°C นำไปทำไดอะไลซีส (MWCO=100 kDa) จากนั้นแยกบริสุทธิ์โดยใช้ cylindrical SDS-PAGE gel (3.7x5 cm; 0.1% (w/v) SDS, 6.0% (w/v) acrylamide) ใช้ 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 เป็นตัวชะและเก็บตัวอย่างหลอดละ 8 มิลลิลิตร นำไปเพิ่มความเข้มข้นต่อด้วย 10-ml ultrafiltration chamber (Amicon) (MWCO=10 kDa) ได้โปรติเอสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 32 เท่า มี specific activity 3.2 หน่วย/มิลลิกรัม และมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 130 kDa โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ได้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่อุณหภูมิ 80°C pH 10.0 ถูกยับยั้งกิจกรรมโปรติเอสด้วยการเติม PMSF และ 3,4-dichloroisocoumarin ซึ่งจัดเป็นเซรีนโปรติเอส

Kluskens *et al.* (2002) ศึกษาการโคลนยีน *fls* ที่เมื่อถูกแปลรหัสพันธุกรรมเป็นโปรตีนแล้วได้เป็น fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans* และศึกษาการแสดงออกของยีน *fls* ใน *E. coli* โดยนำตะกอนเซลล์ *E. coli* ที่ผ่านการโคลนยีน มาแตกเซลล์โดยใช้ sonicator ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM Tris, pH 8.0 แล้วปั่นแยกสารสกัดเซลล์ออกจากเศษเซลล์ แล้วนำสารสกัดเซลล์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นแยกโปรตีนที่เสียสภาพของ *E. coli* ออก นำสารสกัดที่ได้แยกบริสุทธิ์โดยใช้ Q Sepharose column ชะโปรตีนโดยไล่ระดับความเข้มข้นของ NaCl จาก 0-1 M ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM Tris, pH 8.0 แล้วเก็บส่วนที่มีกิจกรรมของโปรติเอสไปวิเคราะห์ จากการทำ SDS-PAGE และ zymogram พบว่า fervidolysin ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ มีแถบโปรตีนทั้งหมด 3 แถบ (73 kDa (percursor), 58 kDa (mature) และ 14 kDa (propeptide)) แต่มีแถบเดียว (58 kDa) ที่มีกิจกรรมของโปรติเอสและการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ fervidolysin พบว่ามีกรดอะมิโน Asp41, His79 และ Ser260 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนสำคัญที่บริเวณเร่งของเซรีนโปรติเอส

2.4.5 *Fervidobacterium changbaicum*

ค้นพบโดย Cai *et al.* (2007) คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนผสมโคลนของภูเขาฉางไป๋ (Changbai Mountains, China) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง (0.5-0.6x1.0-8.0 μm) และไม่มีการสร้างสปอร์ เจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 75-80°C และ pH 7.5 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ได้แก่ glucose, lactose, D-fructose, sucrose, maltose, starch, sorbitol, cellobiose, trehalose dihydrate, D-galactose, *meso*-erythritol, dulcitol, chrysanthanol, melibiose, pyruvate, dextrin และ glycerin ผงกำมะถันมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโต แต่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดยการใช้ streptomycin, chloramphenicol,

carbenicillin, kanamycin, ampicillin และ tetracycline (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ neomycin 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร DNA ของ *F. changbaicum* มีเบส G+C อยู่ 31.9 mol%

2.4.6 *Fervidobacterium riparium*

ค้นพบโดย Podosokorskaya *et al.* (2011) คัดแยกได้จากน้ำพุร้อนของเกาะ Kunashir (Kuril Islands, Russia) เจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 65°C และ pH 7.8 มีความสามารถในการย่อยสลายแป้ง เซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส อาหารที่มีแร่ธาตุกำมะถันมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ยกเว้น โซเดียมซัลเฟต ซัลไฟต์และไทโอซัลเฟต DNA ของ *F. riparium* มีเบส G+C อยู่ 31 mol% และเมื่อเปรียบเทียบ 16s RNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *F. gondwanense* อยู่ถึง 94.9-98.3%

2.4.7 *Fervidobacterium thailandense*

ค้นพบโดย Kanoksilapatham *et al.* (2016) คัดแยกได้จากตะกอนดินที่น้ำพุร้อนฝาง (เชียงใหม่, ประเทศไทย) โดยชื่อเดิมของสายพันธุ์ คือ strain FC2004^T (JCM 18757) เซลล์ของ FC2004^T มีรูปร่างเป็นท่อน (0.5-0.6 x 1.1-2.5 μm) มี โทกา (toga) ใหญ่ คล้ายบอลลูนที่ขั้วเซลล์ด้านหนึ่ง พบเซลล์รูปไข่ติดสีย้อม malachite green อยู่ภายใน ที่บริเวณกลางเซลล์ (ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเอนโดสปอร์) เจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิ 78-80°C, pH 7.5 และความเข้มข้นเกลืออยู่ในช่วง 0-5 กรัมต่อลิตร ดีที่สุดที่ 0.5 กรัมต่อลิตร มีความสามารถในการย่อยสลาย glucose, maltose, sucrose, fructose, cellobiose, CM-cellulose และ starch การใส่ $S_2O_3^{2-}$ และ NO_3^- ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ที่ผนังเซลล์ประกอบไปด้วยกรดไขมันอิ่มตัว $C_{16:0}$ และ $C_{18:0}$ DNA ของ *F. thailandense* มีเบส G+C อยู่ 45.8 mol% และเมื่อเปรียบเทียบ 16s RNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ*F. pennivorans* DSM 9078 อยู่ถึง 96-97%, *F. islandicum* AW-1 (96 %), *F. changbaicum* CBS-1T (96 %), *F. islandicum* H21T (95 %), *F. nodosum* Rt17-B1T (95 %), *F. riparium* 1445tT (95 %) และ *F. gondwanense* AB39T (93 %).

2.5 โครงสร้างและการทำงานของโปรติเอสจาก *Fervidobacterium*

Kluskens *et al*. (2002) ทรานฟอร์มเวกเตอร์ pLUW761 ที่มียีน fls จาก *F. pennivorans* เข้าไปใน *E.coli* BL21(DE3) และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ได้เป็น fervidolysin ซึ่งเป็นโปรติเอสในกลุ่ม serine protease เมื่อสกัดแยกสารสกัดเซลล์ทนร้อนจาก *E.coli* BL21(DE3) ที่ผ่านการแตกเซลล์และให้ความร้อน (70°C, 20 min) ไปแยกบริสุทธิ์ด้วย

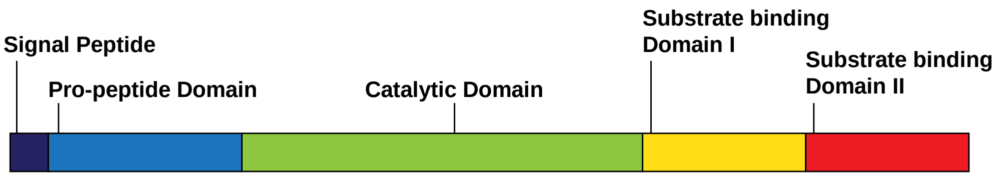
Q Sepharose column และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วย SDS-PAGE gel พบแถบโปรตีนเกิดขึ้นทั้งหมด 3 แถบ คือ ที่ขนาด 73, 58 และ 14 kDa

ผู้วิจัยอธิบายว่า แถบแรก คือแถบของ fervidolysin precursor (78 kDa), แถบที่ 2 คือแถบของ mature fervidolysin (58 kDa) และแถบที่ 3 คือ แถบของ propeptide (14 kDa) ทั้งนี้ที่บริเวณเร่งของ mature fervidolysin มี catalytic triad ซึ่งประกอบไปด้วย Asp162, His200 และ Ser381 (นับลำดับการอะมิโนตัวแรกจาก protein ID: 1R6V) จากการวิเคราะห์ N-terminal sequence ของโปรตีนแต่ละแถบ ชี้ให้เห็นว่า mature fervidolysin มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ fervidolysin precursor ที่ตัดส่วนของกรดอะมิโน 128 ตัวแรก (propeptide) ออก ซึ่งเป็นกลไกการควบคุมการทำงานของโปรติเอสภายในสิ่งมีชีวิต เรียกว่ากระบวนการ autoproteolytic เปลี่ยนรูปโปรติเอสในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive form) ไปเป็นรูปที่ทำงานได้ (active form)

เพื่อศึกษาการเกิดกระบวนการเกิด autoproteolytic ภายในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ผู้วิจัยได้ทำการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (site-directed mutagenesis) โดยเปลี่ยนกรดอะมิโน His200 ของ fervidolysin ไปเป็น Ala200 พบว่า เมื่อนำสารสกัดเซลล์ที่ผ่านการทำการกลายพันธุ์เฉพาะที่ไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าแถบขนาด 58 และ 14 kDa หายไป เหลือเพียงแค่แถบของ fervidolysin precursor 73 kDa เท่านั้น ชี้ให้เห็นว่า His200 มีความสำคัญต่อกระบวนการเกิด autoproteolytic (เป็น active group) ย่อย proprptide ทิ้ง ให้เป็น mature protein (ในระหว่างขนส่งไปสู่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและขับออกนอนเซลล์เป็น extracellular protein)

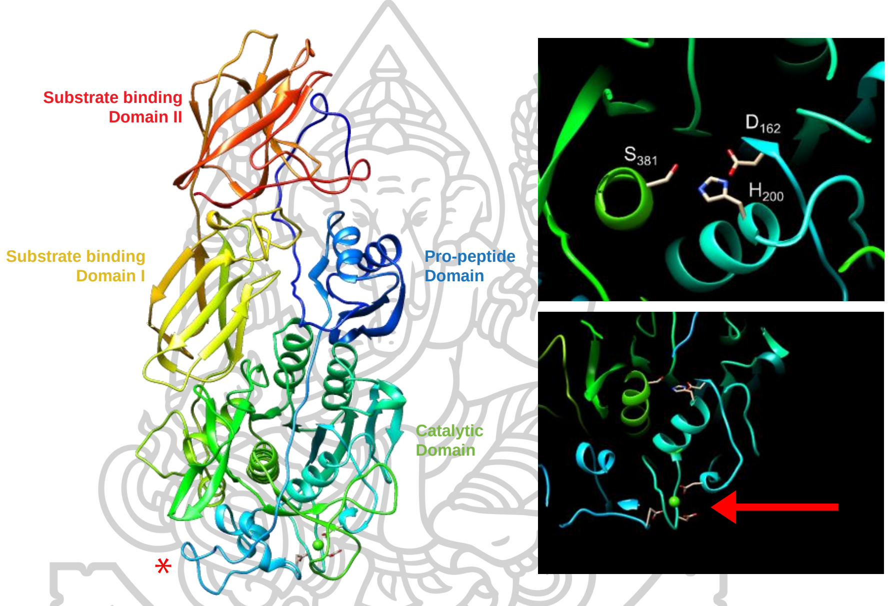
Kim *et al.* (2004) ศึกษาโครงสร้างผลึก fervidolysin จาก *F. pennivorans* (WP_014451857) ซึ่งเป็นโปรติเอสที่มีความสามารถในการย่อยสลายเคราติน (keratinase) โดยจากการศึกษาโครงสร้างผลึกโปรตีนที่ความละเอียด 1.7 Å ได้อธิบายไว้ว่า fervidolysin ประกอบด้วยโครงสร้างสำคัญอยู่ 4 ส่วน คือ 1) propeptide domains (PD) 2) catalytic domain (CD) และ 3) β-sandwich domains (SDs) อีก 2 ส่วน ดังรูปที่ 2 และ 3

PD และ CD ของ fervidolysin มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเร่งปฏิกิริยา โดยสายเปปไทด์ทางด้าน C-terminal ของ PD จะไปพาดขวางระหว่างบริเวณเร่งของ CD ทำให้โปรติเอสอยู่ในรูปของ proenzyme เป็นการควบคุมและป้องกันการทำงานของโปรติเอสไม่ให้ทำอันตรายต่อตัวเซลล์ โดยการหลั่งโปรติเอสในรูปของ proenzyme และกระตุ้นให้ทำงานโดยนำส่วนของ PD ออก ผ่านกระบวนการ autoproteolysis หรือการทำงานของโปรติเอสตัวอื่นๆ ส่วน SDs ทั้งสองโดเมน มีลักษณะรูปร่างที่คล้ายกับ fibronectin (FN) หรือ immunoglobulin (Ig) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะเซลล์หรือการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน-โปรตีน โดย SDs จะเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยากับ β-keratin และช่วยแยกชั้นของโครงสร้าง keratin ทำให้โปรตีนแต่ละสายสามารถจับกับ mature protease และเกิดกระบวนการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนต่อไป



รูปที่ 2 ลำดับส่วนสำคัญต่างๆ ของ fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans*

ที่มา: Kim *et al.* (2004)



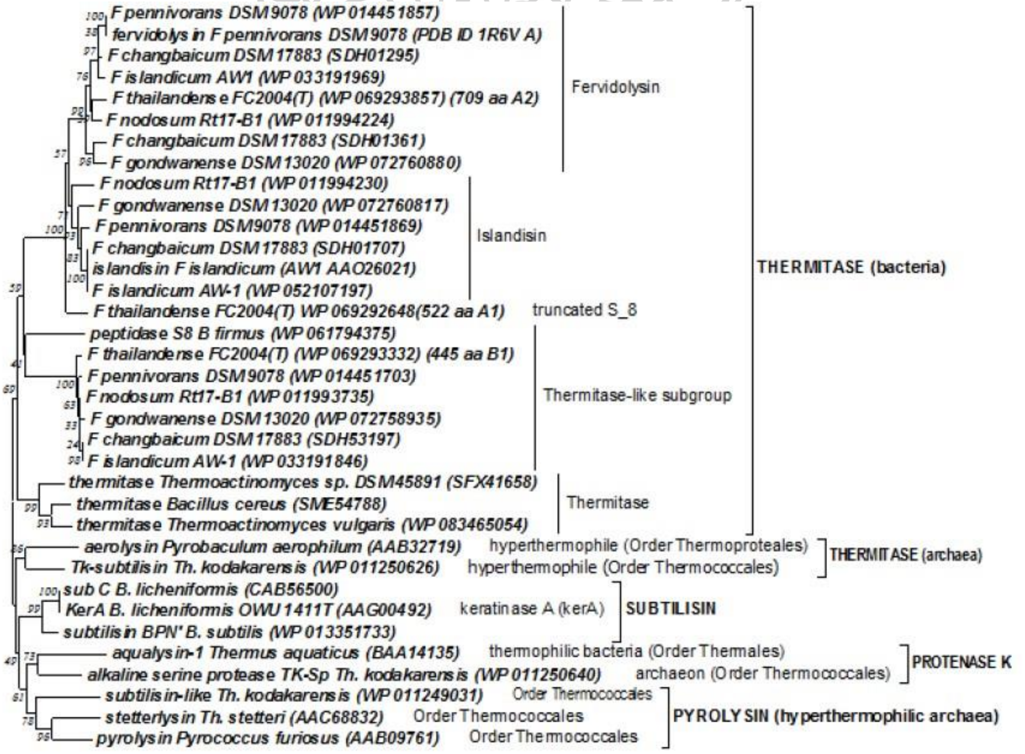
รูปที่ 3 โครงสร้าง 3D ของ fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans* โครงสร้างสำคัญต่างๆ ถูกแยกและระบุด้วยสีที่แตกต่างกัน เครื่องหมายดอกจันทร์สีแดงเป็นตัวแบ่งส่วนของ PD และ CD ภาพขวาบน: หมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง (Ser381; His200; Asp162) และภาพขวาล่าง: ตำแหน่งที่เข้าจับของไอออนแคลเซียม (calcium-binding sites)

ที่มา: Kim *et al.* (2004)

Romruen *et al.* (2016) ได้ศึกษาเปรียบเทียบโปรติเอสที่แปลรหัสจากยีน proA1 ของ *Fervidobacterium* sp. strain FC2004 ที่พบในน้ำพุร้อนฝาง ทางภาคเหนือของประเทศไทยกับโปรติเอสของ *Fervidobacterium* sp. ที่มีในฐานข้อมูล NCBI ทั้งหมด 9 ชนิด (1R6V, WP_011993735, WP_011994224, WP_011994230, WP_014451703, WP_014451869, WP_033191846, WP_033191969 และ WP_052107197) โดยใช้ fervidolysin (1R6V) ซึ่งเป็น

โปรติเอสจาก *Fervidobacterium pennivorans* เป็นโมเดลต้นแบบ (protein template) ในการสร้างโครงสร้าง 3 มิติ จาก protein sequence (WP_069292648) ข้างต้น ผ่านซอฟแวร์ออนไลน์ SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/) พบว่า โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. strain FC2004 (WP_069292648) มีขนาดสั้นกว่า fervidolysin S8 จาก *F. pennivorans* DSM9078 (WP_014451857) และ islandisin S8 จาก *F. islandicum* AW-1 (WP_052107197) กล่าวคือ มีโดเมนทั้งหมดเพียง 3 โดเมนเท่านั้น

Intagun and Kanoksilapatham (2017) นำลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ของโปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. จากจีโนมที่สมบูรณ์ (complete genome) ในฐานข้อมูล NCBI มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เทียบกับโปรติเอสชนิดอื่นๆ จากรูปที่ 4 โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. ทั้งหมดถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ thermitase จากแบคทีเรีย *Thermoactinomyces* (SFX416858 และ WP_083465054)

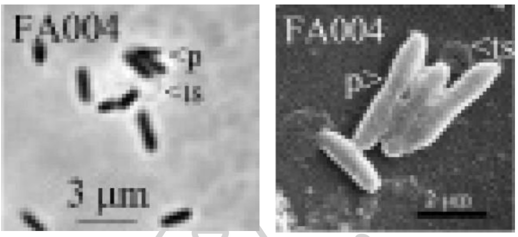


รูปที่ 4 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ subtiases family และ keratinases จาก *Fervidobacterium* spp.

ที่มา: Intagun and Kanoksilapatham (2017)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ *F. thailandense* FA004

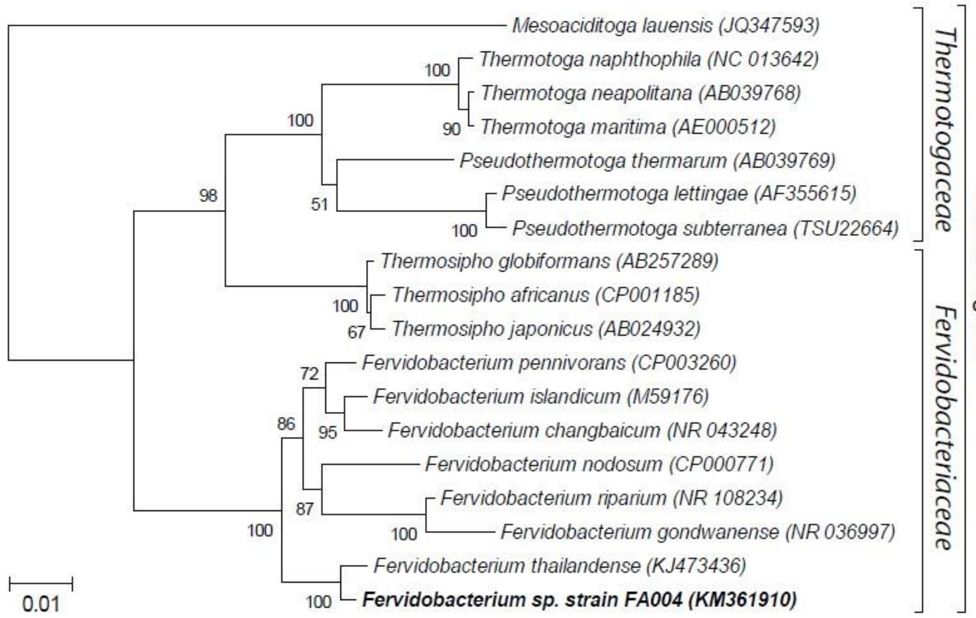
Fervidobacterium sp. สายพันธุ์ FA004 คัดแยกได้จากตะกอนดินในบ่อน้ำพุร้อนฝาง ตั้งอยู่ภายในอุทยานแห่งชาติดอยผ้าห่มปก จังหวัดเชียงใหม่ (19°58’ N, 99°12’ E) ถูกค้นพบในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 (ค.ศ. 2009) (Keawram and Kanoksilapatham, 2013a)



รูปที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast (ซ้าย) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ขวา)
สัญลักษณ์ p หมายถึง palisade arrangement และ ts หมายถึง terminal spheroid
ที่มา: (Kanoksilapatham *et al.*, 2016; Keawram and Kanoksilapatham, 2013a)

Fervidobacterium sp. สายพันธุ์ FA004 ย้อมติดสีแกรมลบ เรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวและจับกลุ่ม 2-4 เซลล์ด้านข้าง (palisade) มีรูปร่างเป็นแท่งอ้วนสั้น (0.6-0.7x1.5-2.5 ไมโครเมตร) เคลื่อนที่ได้ ล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอกที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งพองคล้ายโลกโป่งพอง (terminal spheroid) (รูปที่ 5) มีความสามารถในการย่อย glucose, sucrose, maltose และ starch อีกทั้งมีความสามารถในการย่อยสลายขนนกได้ภายใน 48 ชั่วโมง *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร 480GM5 ในสภาวะไร้ออกซิเจน ในช่วงอุณหภูมิ 60-<90°C, pH 5.5-8.0 และ 0-0.2 %NaCl โดยมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 75°C, pH 6.5 และ 0-0.13 %NaCl

การศึกษา phylogenetic โดยใช้ arbitrariiy PCR สร้าง tRNA finger printing ของ *Fervidobacterium* spp. ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนฝาง (Keawram and Kanoksilapatham, 2013b) และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ 16S rRNA กับแบคทีเรียใน order Thermotogalase ที่พบในประเทศไทย พบว่า *Fervidobacterium thailandense* FC2004^T มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงคาดว่ายีนในกลุ่ม serine protease (3 ชนิด) ของ FA004 น่าจะมีความคล้ายคลึงกันมากและต่อจากนี้ไป จะเรียก *Fervidobacterium* sp. FA004 เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ “*Fervidobacterium thailandense* FA004” (*F. thailandense* FA004)



รูปที่ 6 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสมาชิกในออเดอร์ Thermotogales (วิเคราะห์จากข้อมูล 16s rRNA ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้ซอฟแวร์ MEGA 7.0.21.)

พรสุดา คลายานนท์ and ระวีวรรณ เขียวขำ (2555) ศึกษากิจกรรมโปรติเอสในอาหารเหลว (extracellular protease) ของแบคทีเรียชอบร้อนสูงในออเดอร์ Thermotogales ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน (สายพันธุ์ FA004, FC002, PD501, PD502 และ PD504) ในอาหาร 480GM5 (ไม่มีการเติมขนเป็ด) และ FD medium (มีการเติมขนเป็ด) ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียชอบร้อนสูงสายพันธุ์ FA004 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงที่สุด (3.98×10^{-3} หน่วย/มิลลิลิตร) ในบรรดา 5 สายพันธุ์ข้างต้นและการเพาะเลี้ยงในอาหาร 480GM5 ให้ค่ากิจกรรมโปรติเอส มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร FD medium นอกจากนี้ยังได้ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอส หยาบ (crude protease) ซึ่งพบว่ากิจกรรมของโปรติเอสสามารถทำงานได้ดีที่ ความเข้มข้นของซับสเตรท (azocasein) เท่ากับ 0.3% (w/v) อุณหภูมิ 90°C pH 9.0 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิและ pH ประมาณ 70°C และ 7.0 และสามารถเก็บที่อุณหภูมิช่องแช่แข็งได้นานถึง 28 วัน โดยค่ากิจกรรมโปรติเอสลดลงไปเพียงประมาณ 20%

นวรัตน์ ชำนาญกลาง and แสงตะวัน บุญพูล (2556) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสและการย่อยสลายขนไก่ ของ *F. thailandense* FA004 โดยพบว่าการเติมขนไก่ป่นในอาหาร 480GM5 ลงไป 1% และ 5% (w/v) inoculums เป็นสภาวะที่เหมาสมต่อการผลิตโปรติเอสและการย่อยสลายขนไก่ ซึ่งน้ำหนักของขนไก่ลดลงไป 45.65% เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา

48 ชั่วโมง และจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลาทั้งหมด 9 วัน พบว่ากิจกรรมโปรติเอสและการย่อยสลายขนไก่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ซึ่งลดลงไปถึง 96.05% จากการตรวจสอบขนาดของโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ zymogram พบว่ามีแถบโปรตีนปรากฏอยู่ 2 แถบ ขนาด 212 kDa และ 53.7 kDa และโปรตีนที่ได้สามารถทนต่อสารซักล้าง เช่น SDS และ β-mercaptoethanol และทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง

พรเทพ ทรงนิพิฐกุล and ระวิวรรณ ใจรักษ์ (2557) ศึกษาการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสทนร้อนจาก *F. thailandense* FA004 โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร 480GM5 ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยนำโปรติเอสในอาหารเหลวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงและแยกเซลล์ออก มาแยกบริสุทธิ์และเพิ่มความเข้มข้นโดยการทำไดอะไลซีท ทำแห้งแบบเยือกแข็งและแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี (Sephadex G-200, 1.0x60 cm) โดยใช้ 20 mM Tris-HCl pH 9.0 เป็นตัวปรับสมดุลและตัวชะเก็บ fraction ละ 2 มิลลิลิตร จากกระบวนการแยกบริสุทธิ์ข้างต้น ลักษณะของโครมาโทแกรม แสดงให้เห็นว่าการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชั่น เพียงวิธีเดียว ไม่สามารถแยกบริสุทธิ์โปรตีนจาก *F. thailandense* FA004 ได้โดยสมบูรณ์ แต่โปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.28 เท่า และได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ 9.62% จากการตรวจสอบขนาดของโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ zymogram พบว่ามีแถบโปรตีนปรากฏอยู่ 2 แถบ ขนาด >200 kDa และ 52.5 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ นวรัตน์ และ แสงตะวัน (2556)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีและวัสดุที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

3.1.1 เครื่องมือ

Analytical 2-decimal place balance: TE1502S	(Sartorius, Germany)
Analytical 4-decimal place balance: TE214S	(Sartorius, Germany)
Autoclave SS-325	(TOMY , Japan)
Autoclave SX-700	(TOMY , Japan)
Centrifuge: UNIVERSAL 32 R	(HETTICH, Germany)
Centrifuge: Z 36 HK	(HERMLE, Germany)
Electroelution cell: 422 Electro-Eluter	(BIORAD®, USA)
Fraction collector: 2110 Fraction Collector	(BIORAD®, USA)
Freeze dryer: CoolSafe 55-4 Pro	(SCANVAC, Denmark)
Hot air oven: ULM 500	(Memmert, Germany)
Hot plate	
Magnetic stirrer: MS 3000	(Biosan , Latvia)
Microcentrifuge: MPW-52	(MPW , Poland)
Microplate reader: Sunrise-Basic Tecan	(TECAN , Switzerland)
Peristaltic pump: EP-1 Econo Pump	(BIORAD®, USA)
pH meter: STARTER 2100	(OHAUS®, USA)
Phase contrast microscope: ECLIPSE E200	(Nikon, Japan)
Power supplier: PowerPac 300	(BIORAD®, USA)
Rocker shaker	
Sonicator: VCX750	(Vibra Cell®, USA)
Sonicator bath: B2210E-MTH	(Bransonic®, USA)
Ultra-pure water purifier: Maxima LS.	(ELGA, UK)
UV-Visible Spectrophotometer: Libra S22	(Biochrom, USA)
Vortex mixer: G560F	(Scientific Industries, USA)
Water bath: DH-30-110	(Scientific Promotion, Thailand)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

3.1.2 อุปกรณ์

Adjustable volume micropipette	100-1000 µl	(BIOHIT, Germany)
Adjustable volume micropipette	20-200 µl	(BIOHIT, Germany)
Adjustable volume micropipette	2-20 µl	(BIOHIT, Germany)
Adjustable volume micropipette	1000-5000 µl	(JOHNLAB, China)
Aluminium cap		
Beakers	100-2500 ml	
Blue butyl rubber stoppers		
Centrifuge tubes	15 และ 50 ml	(Corning, USA)
Compressed gas regurator		(MESSER, Thailand)
Cotton wool		
Cylinders	100 และ 500 ml	(VITLAB, Germany)
Dialysis membrane clamps		(Cellu·Sep®, USA)
Dialysis tube (MWCO= 15 kDa)		(Cellu·Sep®, USA)
Disposable syringe 3 ml		(NIPRO, Thailand)
Duran bottles 250-1000 ml		(SCHOTT, Germany)
Filter cone		
Forceps		
Glass column (1.5 x 100 cm)		
Glass column (1.5 x 15 cm)		
Glass pipettes		
Glass rod		
Hand-operated aluminum cap crimper		
Heat resistant gloves		
Hunggate tubes		
Ice bath		
Magnetic bar		
Microcentrifuge tube 1.5 ml		(Axygen™, USA)
Microcentrifuge tube racks		
Microtiter plate flat bottom 96 well		(COSTAR, USA)
Oak ridge centrifuge Tube 50 ml		(Thermo, USA)

Parafilm		
Pipette tips		(Extragene, Taiwan)
Plastic cuvette		
Quart cuvette		
Serum bottles		
Silicone tube		
Spatula		
Sterile Syringe needle		(NIPRO, Thailand)
Test tubes	5 และ 15 ml	
Test tubes racks		
Thermometer		
Volumetric flasks	25-500 ml	

3.1.3 สารเคมี

2-Mercaptoethanol	(ACROS Organics, USA)
30% Bis-acrylamide solution	(AMRESCO, USA)
85% o-Phosphoric acid	(RCL Labscan, Thailand)
Acetic acid	(RCL Labscan, Thailand)
Acetone	(RCL Labscan, Thailand)
Acetonitrile	(RCL Labscan, Thailand)
Ammonium chloride	(Fluka, USA)
Ammonium persulphate	(AMRESCO, USA)
Ammonium sulphate	(RCL Labscan, Thailand)
Azocasein	(Sigma-Aldrich, USA)
Boric acid	(AMRESCO, USA)
Bovine serum albumin (BSA)	(Sigma-Aldrich, USA)
Bromophenol blue	(Sigma-Aldrich, USA)
Calcium chloride dihydrate	(Riedel-deHaën, Germany)
Casein	(Sigma-Aldrich, USA)
Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)	(AMRESCO, USA)
Cobalt (II) chloride hexahydrate	(Ajax Finechem, Australia)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

Cobalt (II) nitrate hexahydrate	(CARLO ERBA, Italy)
Coomassie brilliant blue G-250	(Sigma-Aldrich, USA)
Coomassie brilliant blue R-250	(Sigma-Aldrich, USA)
Copper (II) chloride dihydrate	(Riedel-deHaën, Germany)
Copper (II) sulfate pentahydrate	(Ajax Finechem, Australia)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	(AMRESCO, USA)
Ethanol	(RCL Labscan, Thailand)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	(Sigma-Aldrich, USA)
Glycerol	(AMRESCO, USA)
Glycine	(RCL Labscan, Thailand)
Hydrochloric acid	(RCL Labscan, Thailand)
Iodoacetamide (IA)	(Sigma-Aldrich, USA)
Iron (II) chloride hexahydrate	(Sigma-Aldrich, USA)
Isopropanol	(Fluka, USA)
Keratin azure	(Sigma-Aldrich, USA)
Magnesium (II) chloride hexahydrate	(Fluka, USA)
Manganese (II) chloride dihydrate	(Ajax Finechem, Australia)
Methanol	(RCL Labscan, Thailand)
Nitrogen gas	(MSG, Thailand)
Pancreatic digest of casein	(CRITERION™, USA)
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	(Sigma-Aldrich, USA)
Potassium chloride	(RCL Labscan, Thailand)
Potassium dihydrogen phosphate	(RCL Labscan, Thailand)
Resazurin sodium salt	(Sigma-Aldrish, USA)
Sodium chloride	(RCL Labscan, Thailand)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	(Fluka, USA)
Sodium hydroxide	(RCL Labscan, Thailand)
Sodium molybdate dihydrate	(CARLO ERBA, Italy)
Sodium sulfide	(Sigma-Aldrich, USA)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	(Invitrogen, USA)
Trichloroacetic acid (TCA)	(Fluka, USA)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

Tris-base	(AMRESCO, USA)
Triton X-100	(AMRESCO, USA)
Yeast extract	(CRITERION™, USA)
Zinc sulfate heptahydrate	(Fluka, USA)

3.1.4 โปรตีนมาตรฐาน

TriColor Broad Protein Ladder	(Biotechrabbit, Thailand)

3.1.5 เรซินสำหรับแยกบริสุทธิ์โปรตีน

DEAE Sephacel	(GE Healthcare, USA)
Suphadex G-100	(GE Healthcare, USA)

3.1.6 ขนไก่

ขนไก่ที่ใช้เป็นขนไก่สีดำ ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มไก่ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม โดยนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ตัดส่วนก้านขนออก แล้วนำขนไก่ที่ตัดก้านขนออกไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำขนนกมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่แห้ง เพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Fervidobacterium* สายพันธุ์ FA004 คัดแยกได้จากดินในบ่อน้ำพุร้อนฝาง จังหวัดเชียงใหม่ (Keawram and Kanoksilapatham, 2013a) ซึ่งได้รับมาเป็นสต๊อกเชื้อที่อยู่ในอาหารสูตร 480GM5 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในขวดซีรั่ม ที่อุณหภูมิ 4°C (เก็บในตู้เย็น) และก่อนนำไปใช้ศึกษาต้องเลี้ยงกระตุ้นในอาหาร 480GM5 ขวดใหม่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 สภาวะการเพาะเลี้ยง

Fervidobacterium สายพันธุ์ FA004 เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนในขวดซีรั่มที่บรรจุอาหารเหลวสูตร 480GM5 โดยการเพาะเลี้ยงจะใช้เชื้อปริมาตร 0.1% (v/v) จากขวดสต็อกเชื้อที่ผ่านการกระตุ้นในอาหารเหลวสูตร 480GM5 (ภาคผนวก ก.) มาแล้ว 24 ชั่วโมง โดยใช้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร แทงให้ปลายเข็มทะลุผ่านจุกยางเข้าไปในขวดซีรั่ม ฉีดสต๊อกเชื้อและดึง

เข็มออกจากจุกยางอย่างรวดเร็วเพื่อป้องออกซิเจนเข้าสู่ขวดซีรั่ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Keawram and Kanoksilapatham, 2016)

3.3.2 การแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

นำอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน 3.3.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ (cell pellet) ที่มี intracellular protease และ membrane bound protease นำไปแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ส่วนสารละลายส่วนใส (supernate) ซึ่งมี extracellular protease นำไปวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสและปริมาณโปรตีนต่อไป

นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยบัฟเฟอร์ (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำซ้ำทั้งหมด 2 ครั้ง ชั่งหาน้ำหนักเซลล์เปียก (wet weight) นำบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีตะกอนเซลล์ แล้วนำไปแตกเซลล์โดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงด้วย sonicator (SONICS Vibra cell™, pulse 05/01, 10 นาที) ควบคุมอุณหภูมิให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง นำสารละลายเซลล์ที่ผ่านการแตกเซลล์แล้วมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกเศษเซลล์ (cell debris) ออก แล้วใช้ autopipette ดูดสารสกัดเซลล์ (cell extract) ในชั้นส่วนใสเก็บแยกในอีกหลอดทดลอง แล้วละลายเศษเซลล์ที่ก้นหลอดด้วยบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4°C นำสารละลายไปวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสและปริมาณโปรตีนต่อไป

3.3.3 การหาช่วง % อิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอนโปรติเอส

ในการหาช่วง % $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับตกตะกอนโปรติเอส ได้เพาะเลี้ยง *Fervidobacterium* สายพันธุ์ FA004 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ FA004 ออก แล้วแบ่งส่วนใสใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 250 ml โดยใส่บีกเกอร์ละ 100 มิลลิลิตร ทั้งหมด 4 ใบ แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ในแต่ละบีกเกอร์ที่ความอิ่มตัว 20, 40, 60 และ 80 % ตามลำดับ กวนข้ามคืนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วปั่นแยกตะกอนโปรตีนในแต่ละ % อิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ เก็บไว้ (P_{20}, P_{40}, P_{60} และ P_{80}) ละลายตะกอนกลับด้วยบัฟเฟอร์ (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) ที่ทราบปริมาตร (ช่วง 1-2 มิลลิลิตร) นำไปวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสและปริมาณโปรตีนต่อไป

จากนั้นนำส่วนใสที่มี $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว 20% (S_{20}) และที่มี $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว 40% (S_{40}) มาตกตะกอนโปรตีนต่อโดยการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ให้ได้ % อิ่มตัวเป็น 60% และ 80% ตามลำดับ กวนข้ามคืนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วปั่นแยกตะกอนโปรตีนในแต่ละช่วง % อิ่มตัวของ

$(NH_4)_2SO_4$ ได้แก่ P_{20-60} และ P_{40-80} ตามลำดับ ละลายตะกอนกลับด้วยบัฟเฟอร์ (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสและปริมาณโปรตีนต่อไป

3.3.4 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอส

3.3.4.1 การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$

เพาะเลี้ยง *Fervidobacterium* สายพันธุ์ FA004 ตามขั้นตอนที่ 3.3.1 แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 3,500g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำสารละลายส่วนใส (culture supernate) ที่ได้ไปตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ โดยเริ่มตกตะกอนที่ความอิ่มตัว 20% กวนข้ามคืนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วปั่นแยกตะกอนโปรตีน (P_1) ออกจากส่วนใส (S_1) โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใส (S_1) มาตกตะกอนโปรตีนต่อ โดยใส่ $(NH_4)_2SO_4$ เพิ่ม ให้ได้ความอิ่มตัวของเกลือ 60% แล้วกวนข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C แล้วปั่นแยกเก็บตะกอนโปรตีน (P_2) ไว้ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000g เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนโปรตีน (P_2) มาละลายกลับในสารละลายบัฟเฟอร์ (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) นำสารละลายโปรตีน (P_2) มากำจัด $(NH_4)_2SO_4$ ออกด้วยการ dialysis (Cellu-Sep, MWCO=15k) ในสารละลายบัฟเฟอร์ (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง เป็นเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างโปรติเอสสกัดหยาบ (crude protease) ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ในตู้เย็น นำไปวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสและปริมาณโปรตีนต่อไป

3.3.4.2 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

นำตัวอย่างโปรติเอสสกัดหยาบจากขั้นตอนที่ 3.3.4.1 มาแยกบริสุทธิ์ขั้นแรกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ผ่านคอลัมน์ DEAE Sephacel (1.5x15 เซนติเมตร) ที่ปรับสมดุลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) และใช้บัฟเฟอร์ที่มีการเติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, และ 0.8 M ชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ ความเข้มข้นละประมาณ 3-4 bed volume โดยเริ่มจากความเข้มข้นของ NaCl น้อยไปมาก (stepwise elution) ใช้อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตร/นาที และเก็บตัวอย่าง fraction ละ 5 มิลลิลิตร นำแต่ละ fraction ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm (A_{280}) และกิจกรรมของโปรติเอส รวมช่วง fraction ที่มีค่ากิจกรรมโปรติเอสที่สูง นำไปเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่าง ด้วยการทำ freeze dried ก่อนนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อในขั้นตอนถัดไป

นำตัวอย่างโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ มาแยกบริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิคเจลฟิลเตรชั่น ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 (1.5x100 เซนติเมตร) ใช้บัฟเฟอร์ (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) เป็นตัวปรับสมดุลและตัวชะคอลัมน์ ใช้อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตร/นาที และเก็บตัวอย่าง fraction ละ 5 มิลลิลิตร นำแต่ละ fraction ไป

ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm (A_{280}) และกิจกรรมของโปรติเอส รวมช่วง fraction ที่มีค่ากิจกรรมโปรติเอสที่สูงและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.3.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส

นำตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendoft แล้วเติม reaction buffer [0.3% (w/v) azocasein ใน 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0] ปริมาตร 350 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% (w/v) trichloroacetic acid ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 2.0 M NaOH 125 ไมโครลิตร ในหลอด eppendoft ใหม่ แล้วดูดสารสะลาย 250 ไมโครลิตร ใส่หลุมของ microtiter pate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (ดัดแปลงจาก พรเทพ ทรงนิพิฐกุล and ระวิวรรณ ใจรักษ์ (2557))

ควบคุมปฏิกิริยาโดยใช้หลอดเอนไซม์ควบคุม (enzyme blank) ซึ่งนำเอนไซม์ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับ 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร และหลอดสับสเตรทควบคุม (substrate blank) ซึ่งนำ 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับ reaction buffer 350 ไมโครลิตร โดยหลอดควบคุมทั้งสองหลอดต้องบ่มที่เวลาและสภาวะเดียวกับหลอด reaction mixture และคำนวณกิจกรรมของโปรติเอส ตามภาคผนวก ค.

กำหนดให้กิจกรรมของโปรติเอส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm เพิ่มขึ้น 1.0 หน่วย ในระยะเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 80°C

3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Bradford reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm (A_{595}) เทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) โดยใช้ความเข้มข้นของ BSA อยู่ในช่วง 0.2-1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Bradford, 1976)

3.3.7 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซีส

3.3.7.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

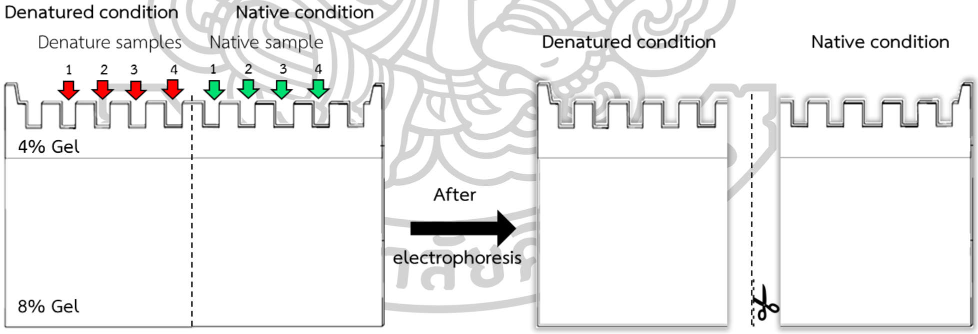
สำหรับการวิเคราะห์ SDS-PAGE เตรียมตัวอย่างให้อยู่ใน denatured condition โดยนำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 1 ไมโครกรัม (ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร) ผสมกับ 5X SDS

reducing buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (4:1) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที (Laemmli, 1970)

สำหรับการวิเคราะห์ casein zymogram เตรียมตัวอย่างให้อยู่ใน native condition โดยนำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 1 ไมโครกรัม (ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร) ผสมกับ 5X loading buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (มีสารองค์ประกอบเหมือน SDS reducing buffer แต่ไม่มี reducing agent ผสมอยู่) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วผสมให้เข้ากัน

3.3.7.2 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซีส

เตรียม 8% polyacrlamide gel ขนาด 8.6x6.7x0.1 cm (ภาคผนวก ข) และประกอบชุดสำหรับทำอิเล็กโทรโฟเรซีส นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่างที่เตรียมไว้โหลดใส่หลุมเจลแต่ละหลุม จากนั้นต่อขั้วไฟฟ้าของชุดสำหรับทำอิเล็กโทรโฟเรซีสเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) เปิดเครื่องจ่ายไฟและใช้ปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่าน 24 mA หลังจากที่สีของ bromophenol blue เคลื่อนลงมาจนถึงปลายแผ่นเจล ก็ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แกะแผ่นเจลออกจากกระจกแล้วตัดเจลออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วน denatured condition สำหรับการย้อมแถบโปรตีน (3.3.7.3) และส่วน native condition สำหรับการย้อมด้วย casein zymogram (3.3.7.4) ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การตัดแบ่งเจลหลังการทำ electrophoresis
เพื่อย้อมแถบโปรตีนและทำ casein zymogram บนเจลแผ่นเดียวกัน

3.3.7.3 การย้อมแถบโปรตีนบนแผ่นเจล

นำแผ่นเจลในส่วน denatured condition มาแช่ใน staining solution (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปเขย่าไว้บนเครื่อง rocker shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลมาแช่ใน destaining solution (ภาคผนวก ข) ทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยน

destaining solution ใหม่ ทำเช่นนี้จนมองเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินบนแผ่นเจลใส วัดค่า Rf ของโปรตีนตัวอย่าง แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนจากสมการกราฟของโปรตีนมาตรฐาน

3.3.7.4 การย้อมหากิจกรรมโปรติเอสบนแผ่นเจลด้วย casein zymogram

นำแผ่นเจลในส่วน native condition มาแช่ใน 2.5% triton X-100 นำไปเขย่าไว้บนเครื่อง rocker shaker เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และล้างด้วย Tris-HCl buffer pH 8.0 จากนั้นแช่แผ่นเจลใน 2% (w/v) casein ที่ละลายใน 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 90 นาที ดูดสารละลาย 2% (w/v) casein ออก แช่แผ่นเจลใน staining solution แล้วนำไปเขย่าไว้บนเครื่อง rocker shaker เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเห็นแถบใสบนแผ่นเจลสีน้ำเงิน (ดัดแปลงจาก Garcia-Carreno *et al.* (1993))

3.3.7.5 การหา %Intensity บนแผ่น casein zymogram

นำรูปถ่ายของแผ่น zymogram วิเคราะห์หาความเข้มแสงของแถบกิจกรรมโปรติเอส ผ่านใช้ซอฟแวร์ GelAnalyzer Version 2010 (โหลดได้จาก http://www.gelanalyzer.com/) เลือกใช้โหมดการวิเคราะห์แบบ Light on Dark กำหนดแถวที่ต้องการวิเคราะห์ใน Lanes mode จากนั้นกำหนดแถบที่ต้องการตรวจวัดความเข้มแสงใน Band mode และปรับ base line ของพื้นหลังใน Background Substrate mode โปรแกรมจะคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละแถบให้อัตโนมัติ รวมค่าพื้นที่ใต้กราฟของแถบกิจกรรมโปรติเอสทั้งหมด แล้วรายงานผลเป็นสัดส่วน % Intensity ของแต่ละแถบ

3.3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรติเอส

3.3.8.1 ผลของ pH ต่อกิจกรรมของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาบ่มกับ 0.3% (w/v) azocasein ที่ละลายในบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ (pH 4-6 : 20 mM acetate buffer, pH 7-9 : 20 mM Tris–HCl buffer และ pH 10-11 : 20 mM glycine-NaOH buffer) ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส (3.3.5) คำนวณหากิจกรรมของโปรติเอส แล้วรายงานค่าเป็น % relative activity โดยกำหนดให้ pH ที่ให้ค่ากิจกรรมของโปรติเอสสูงที่สุดมีค่า relative activity เป็น 100% เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน

3.3.8.2 ผลของ pH ต่อความเสถียรของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ในระยะเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ในบัฟเฟอร์ต่างๆ (pH 4-6 : 20 mM acetate buffer, pH 7-9 : 20 mM Tris–HCl buffer และ pH 10-11 : 20 mM glycine-NaOH buffer) นำไปทดสอบหากิจกรรมของโปรติเอสตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส (3.3.5) คำนวณหากิจกรรมของโปรติ

เอสที่เหลืออยู่ แล้วรายงานค่าเป็น % residual activity โดยกำหนดให้ pH ที่ให้ค่ากิจกรรมของโปรติเอสสูงที่สุดมีค่า residual activity เป็น 100% เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน

3.3.8.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาบ่มกับ 0.3% (w/v) azocasein ที่ละลายใน 20 mM Tris–HCl pH 8.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100°C) เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส (3.3.5) คำนวณหากิจกรรมของโปรติเอส แล้วรายงานค่าเป็น % relative activity โดยกำหนดให้อุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมของโปรติเอสสูงที่สุดมีค่า relative activity เป็น 100% เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน

3.3.8.4 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่หลอด microcentrifuge (โดยแต่ละอุณหภูมิเตรียมตัวอย่าง 5 หลอด) มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (70, 80, 90 และ 100°C) และในระยะเวลาที่แตกต่างกัน (1, 2, 4, 8 และ 12 ชั่วโมง) โดยไม่มีการเติมซับสเตรทลงไป จากนั้นนำไปทดสอบหากิจกรรมของโปรติเอสตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส (3.3.5) คำนวณหากิจกรรมของโปรติเอสที่เหลืออยู่ แล้วรายงานค่าเป็น % residual activity โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C มีค่า residual activity เป็น 100% เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน

3.3.8.5 การระบุชนิดโปรติเอสด้วยตัวยับยั้งโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาบ่มร่วมกับสารยับยั้งชนิดต่างๆ ได้แก่ PMSF, Iodoacetamide, EDTA, และ 2-mercaptoethanol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM และ 5 mM (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปทดสอบหากิจกรรมของโปรติเอสตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส (3.3.5) คำนวณหากิจกรรมของโปรติเอส แล้วรายงานค่าเป็น % relative activity โดยกำหนดให้โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ไม่มีการเติมตัวยับยั้งลงไปมีค่า relative activity เป็น 100% เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน (ดัดแปลงจาก Nam *et al.*, 2002)

3.3.8.6 ผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาบ่มกับอิออนชนิดต่างๆ ได้แก่ $CaCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $MgCl_2$, $FeCl_2$ และ $ZnSO_4$ ที่ความเข้มข้นของไอออนสุดท้าย 1 mM (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปทดสอบหากิจกรรมของโปรติเอสตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส (3.3.5) คำนวณหากิจกรรมของโปรติเอส แล้วรายงานค่าเป็น % residual activity โดยกำหนดให้โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ไม่มีการเติมอิออนลงไปมีค่า residual activity เป็น 100% เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน (ดัดแปลงจาก Nam *et al.*, 2002)

3.3.8.7 ผลของสารซักล้างต่อกิจกรรมของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาบ่มร่วมกับสารซักล้างชนิดต่างๆ ได้แก่ SDS (anionic detergent), CTAB (cationic detergent) และ Triton X-100 (nonionic detergent) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปทดสอบหากิจกรรมของโปรติเอสตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส (3.3.5) คำนวณหากิจกรรมของโปรติเอส แล้วรายงานค่าเป็น % residual activity โดยกำหนดให้โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ไม่มีการเติมสารซักล้างลงไปมีค่า residual activity เป็น 100% เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน (ดัดแปลงจาก Nam *et al.* (2002))

3.3.8.8 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาบ่มร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ isopropanol, acetone, ethanol, acetonitrile และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (v/v) (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปทดสอบหากิจกรรมของโปรติเอสตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส (3.3.5) คำนวณหากิจกรรมของโปรติเอส แล้วรายงานค่าเป็น % residual activity โดยกำหนดให้โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปมีค่า residual activity เป็น 100% เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน (ดัดแปลงจาก Nam *et al.* (2002))

3.3.9 การศึกษาจลนพลศาสตร์โปรติเอส

การศึกษาจลนพลศาสตร์โปรติเอสตรวจวัดจากการเพิ่มขึ้นของ A_{440} โดยใช้ azocasein ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 0.3, 0.5, 0.75 และ 1.0 % (w/v)) บ่มรวมกับโปรติเอสภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน (pH 8.0 และอุณหภูมิ 80°C) แบ่งเก็บ reaction mixture และหยุดปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่างๆ (15, 30, 60, 120, 240 และ 360 นาที) สร้างกราฟ Lineweaver-Burk (1/V กับ 1/[S]) แล้วหาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของโปรติเอส (K_m และ V_{max}) จากกราฟ Lineweaver-Burk

3.3.10 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขนไก่

นำโปรติเอส (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร) ใส่ลงไปใน Hungate tube ที่มีขนไก่ 20 มิลลิกรัม และ 20 mM Tris-HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 5 วัน โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของขนไก่ภายในหลอดทุกวัน เขย่าหลอดทดลองวันละ 1 ครั้ง เมื่อครบ 5 วัน กรองสารละลายในหลอด Hungate tube ผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 อบที่

อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักของขนไก่ที่เหลืออยู่ แล้วรายงานค่าเป็น % residual weight เทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมโปรติเอส

3.5 การวิเคราะห์โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* spp. เชิงชีวสารสนเทศ

การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) ขั้นตอนและรูปภาพประกอบแสดงไว้ในภาคผนวก จ. เริ่มต้นจากการรวบรวม protein sequence ของโปรติเอสจาก *Fervidobacterium* spp. จากฐานข้อมูลออนไลน์ NCBI สืบค้นได้จาก https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการผ่านซอฟแวร์ MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) เพื่อจัดกลุ่มโปรติเอส และคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเบื้องต้น โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ออนไลน์ Expasy (Wilkins *et al.*, 1999) สืบค้นได้จาก https://web.expasy.org/compute_pi/

จากนั้นนำ protein sequence ของ *F. thailandense* FC2004 (WP_069293857, WP_069292648 และ WP_069293332) ที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ *F. thailandense* FA004 มาสร้าง 3D-structure ของโปรติเอส เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและโดเมนสำคัญของโปรติเอส ผ่านเครื่องมือวิเคราะห์ออนไลน์ SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) สืบค้นได้จาก https://swissmodel.expasy.org/ โดยใช้ fervidolysin จาก *F. pennivorans* DSM 9078 (1R6V.A) เป็นโมเดลต้นแบบในการสร้างโครงสร้าง 3D ของโปรติเอส

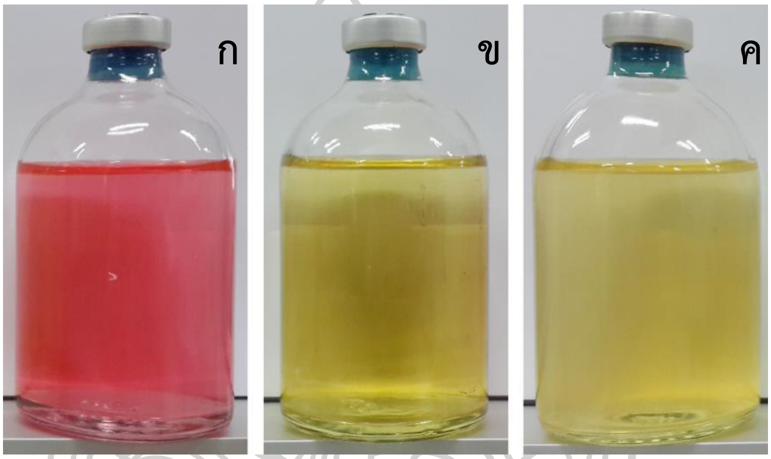
เมื่อได้ไฟล์ .pdb ของโครงสร้าง 3D ของโปรติเอสจาก *F. thailandense* ครบทุกตัวแล้ว นำมาเปรียบเทียบโครงสร้าง โดยใช้ซอฟแวร์ Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) ในการจัดการรูปภาพ ระบุตำแหน่งและหมู่ฟังก์ชั่นของ catalytic triad บนโครง 3D ของโปรติเอส

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการวิจัย

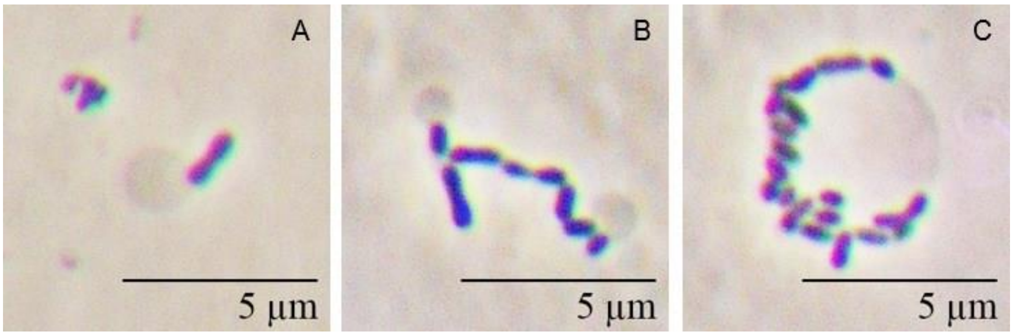
4.1 การเพาะเลี้ยง *Fervidobacterium thailandense* FA004

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 เมื่อเตรียมเสร็จใหม่และบรรจุในขวดซีรั่มจะมีสีชมพู หลังจากไล่ออกซิเจนด้วยการพ่นแก๊สไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองใส ดังรูปที่ 8ก. และ 8ข. ตามลำดับ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยง *F. thailandense* FA004 ขวดซีรั่มที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 จะขุ่นขึ้นเล็กน้อย มีตะกอนเซลล์บางส่วนนอนก้น ดังรูปที่ 8ค.



รูปที่ 8 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 ที่บรรจุอยู่ภายในขวดซีรั่ม
(ก) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีออกซิเจนผสมอยู่ (ข) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการไล่ออกซิเจนและฆ่าเชื้อ
(ค) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *F. thailandense* FA004 เจริญอยู่

เมื่อนำเซลล์มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast microscope (Nikon Eclipse E200, Japan) ที่กำลังขยาย 1000X จะเห็นเซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง ขนาดประมาณ 0.5-2.0 ไมโครเมตร โดยพบทั้งอยู่แบบเดี่ยว สามารถเคลื่อนที่ได้และที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของตัวแบคทีเรียจะมีลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกพองออกเป็นถุงกลมๆ คล้ายลูกโป่ง ซึ่งเรียกว่า toga ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียทนร้อนชนิดนี้ (Andrews and Patel, 1996; Podosokorskaya *et al.*, 2011) สามารถพบได้ทั้งในรูปแบบเซลล์เดี่ยว (single) เซลล์ที่เชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่ (chain) และในบางครั้งพบการรวมตัวกันของเซลล์หลายๆเซลล์ อยู่ภายใน outer membrane ขนาดใหญ่ ทำให้มองเห็นเป็น ถุงที่มีขนาดใหญ่ (Ø ~ 4-5μm) เรียกว่า “rotund body” (รูปที่ 9) (Keawram and Kanoksilapatham, 2013a, 2013b; Keawram *et al.*, 2016)



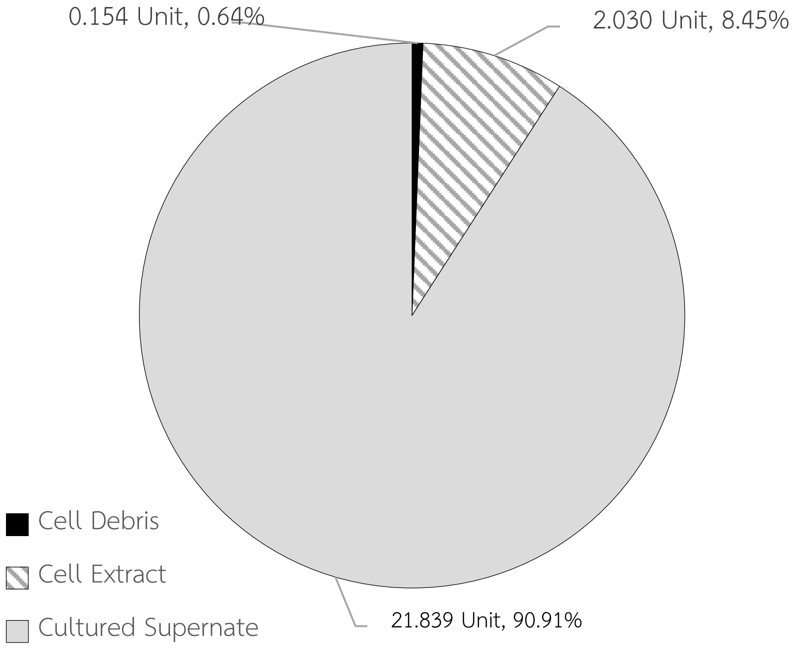
รูปที่ 9 ลักษณะของ *F. thailandense* FA004 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast โดยพบทั้งการจัดเรียงตัวแบบ (A) เดี่ยว (B) ต่อเป็นสาย และ (C) rotund body

4.2 สัดส่วนของกิจกรรมโปรติเอสจากการเพาะเลี้ยง *F. thailandense* FA004

เมื่อเพาะเลี้ยง *F. thailandense* FA004 ในอาหารสูตร 480GM5 ปริมาตรรวม 2,000 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปั่นแยกเซลล์ FA004 ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้น้ำหนักเปียกของตะกอนเซลล์ 0.4909 กรัม นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปแตกเซลล์ตามขั้นตอนที่ 3.3.2 เมื่อนำสารสกัดเซลล์ส่วนใส (cell extract) มาตรวจวัดค่ากิจกรรมของโปรติเอสและปริมาณโปรตีน ได้ค่ากิจกรรมโปรติเอสทั้งหมดเท่ากับ 2.03 ยูนิต (ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส เท่ากับ 0.1224 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน) และส่วนของเศษเซลล์ (cell debris) ได้ค่ากิจกรรมโปรติเอสทั้งหมดเท่ากับ 0.154 ยูนิต (ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส เท่ากับ 0.0273 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน) ส่วนอาหาร 480GM5 ที่ผ่านการแยกเซลล์แล้ว (cultured medium) มีค่ากิจกรรมโปรติเอสทั้งหมด 21.839 ยูนิต (ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส เท่ากับ 0.3454 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน)

เมื่อเทียบสัดส่วนของกิจกรรมโปรติเอสในแต่ละส่วนแล้ว จะเห็นว่าโปรติเอสส่วนใหญ่ ถูกผลิตและหลั่งออกมานอกเซลล์อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง คิดเป็น 91% ของโปรติเอสทั้งหมด (รูปที่ 10) ดังนั้น จึงเลือกใช้ส่วนของอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการแยกเซลล์แล้ว มาศึกษาต่อไป

รายงานวิจัยเกี่ยวกับโปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโปรติเอสที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound protease) (Friedrich and Antranikian, 1996; Nam *et al.*, 2002) และการโคลนยีนเข้าไปในเซลล์ *E.coli* (Godde *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004; Kluskens *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015) เท่านั้น



รูปที่ 10 สัดส่วนของกิจกรรมโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ที่ได้จากส่วนต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง

4.3 การหาช่วง % อิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการตกตะกอนโปรติเอส

แบ่งส่วนใสของอาหาร 480GM5 ที่ผ่านการแยกเซลล์แล้วเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 100 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ ให้ได้ % อิ่มตัวที่ 20, 40 60 และ 80% ในแต่ละบีกเกอร์ เมื่อกวนข้ามคืนในตู้เย็นตามขั้นตอน 3.3.3 แล้ว ตะกอนโปรตีน P_{20} มีลักษณะเป็นสีขาว ไม่มีกิจกรรมของโปรติเอส และตะกอนโปรตีนของ P_{40} มีสีน้ำตาลและมีกิจกรรมโปรติเอส คิดเป็น 17% ของโปรติเอสทั้งหมด ทั้งนี้การตกตะกอนโปรตีนที่ $\%(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัวที่มากกว่า 40% ขึ้นไป จะได้ตะกอนโปรตีนที่มีสีน้ำตาลแดงตกลงมา เมื่อละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์จะได้สารละลายสีชมพูเข้ม ซึ่งอาจเป็นสีของ resazurin ตกมากับตะกอนโปรตีนด้วย ตะกอนโปรตีนที่ตกด้วย $\%(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัวที่ 60 และ 80% มีค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสและความบริสุทธิ์ของโปรติเอสลดลง อาจเป็นเพราะโปรตีนอื่นๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตกปนลงมากับโปรติเอสด้วย ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่ % ความอิ่มตัวต่างๆ

ตัวอย่าง	% ความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัม)	ผลได้ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
S_0	0 % saturation	2.700	4.650	1.722	100.00	1
P_{20}	20 % saturation	0.109	0.000	0.000	0.00	0
P_{40}	40 % saturation	0.121	0.795	6.558	17.10	3.81
P_{60}	60 % saturation	0.383	1.917	5.008	41.22	2.91
P_{80}	80 % saturation	0.807	3.040	3.768	65.38	2.19

ในกรณีของบีกเกอร์ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว 20% และ 40% หลังปั่นแยกตะกอน P_{20} และ P_{40} ได้นำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนต่อขั้นที่ 2 ให้ได้ % อิ่มตัว 60 และ 80% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่า โปรตีน P_{20-60} มีค่าความบริสุทธิ์สูงสุด จึงเลือกใช้การตกตะกอนโปรตีนแบบแบ่งส่วน (fractionation precipitation) ด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัวจาก 20 ไป 60% ในการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004

ตารางที่ 10 การตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่ช่วง % อิ่มตัว 60 และ 80%

ตัวอย่าง	% ความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัม)	ผลได้ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
P_{20-60}	20-60 % saturation	0.204	2.330	11.432	50.11	6.64
P_{40-80}	40-80 % saturation	1.553	0.545	0.351	11.72	0.20

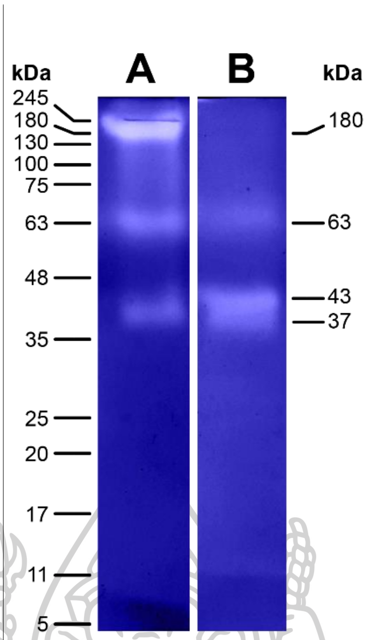
4.4 การหากิจกรรมของโปรติเอสด้วย zymogram เบื้องต้น

นำตัวอย่างจากการตกตะกอนโปรตีนแบบแบ่งส่วน (fractionation precipitation) ด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัวจาก 20 ไป 60% ในข้อ 4.3 มาทำ dialysis ข้ามคืน และทดสอบทำ zymogram เพื่อดูจำนวนแถบใสบนแผ่น zymogram ตามรูปที่ 11A จะเห็นว่าเกิดแถบทั้งหมด 3 แถบด้วยกัน คือที่ประมาณ 37 kDa (19% intensity), 63 kDa (35% intensity) และ >180 kDa (46% intensity) แสดงว่า *F. thailandense* FA004 ผลิตโปรติเอสได้หลายชนิดหรือหลายรูปแบบ อาจเป็นไปได้ทั้ง monomeric protease, dimeric protease และ multimeric protease เมื่อนำตะกอนโปรตีนมาแยกบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย DEAE Sephacel ลักษณะของแถบที่มีกิจกรรมของโปรติเอสเปลี่ยนแปลงไป ดังรูปที่ 11B กล่าวคือ แถบที่ >180 kDa หายไปและเกิดแถบสว่างสองแถบ

ติดกันที่ประมาณ 37 kDa (22% intensity) และ 43 kDa (43% intensity) เนื่องจาก FA004 เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ *F. thailandense* FC2004^{T} ดังนั้นคาดว่าโปรติเอสจาก FA004 อาจมีขนาดใกล้เคียงกับโปรติเอสชนิด thermitase-like peptidase S8 (WP_069293332) และ islandisin-like peptidase S8 (WP_069292648) ของ FC2004^{T} นอกจากนี้ แถบที่ขนาด 63 kDa (35% intensity) ซึ่งใกล้เคียงกับโปรติเอสชนิด fervidolysin-like peptidase S8 (WP_069293857) ของ FC2004^{T} การปรากฏแถบกิจกรรมที่ 43 kDa เพิ่มขึ้นมา (รูป 12B) แต่กิจกรรมที่ >180 kDa หายไป เมื่อเปรียบเทียบกับแถบกิจกรรมจากโปรติเอสในตัวอย่างก่อนผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วย DEAE Sephacel (รูป 11A) แสดงว่าแถบกิจกรรมนี้ (43 kDa) อาจเกิดมาจากการ dissociation ของ multimeric protease (>180 kDa) ซึ่งอาจประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย

เนื่องจาก islandisin-like peptidase S8 (WP_069292648) ของ *F. thailandense* FC2004^{T} มีขนาดสั้นกว่าโปรติเอสชนิด islandisin และ islandisin-like และ fervidolysin-like peptidase S8 ที่รายงานไว้ในจีโนมของ *Fervidobacterium islandicum* AW1 (WP_052107197) และ *Fervidobacterium* spp. สปีชีส์อื่นๆ ดังนั้นจึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างของแถบกิจกรรมที่เกิดจาก islandisin ออกจาก islandisin และ fervidolysin-like peptidase S8 ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม mature form ของ islandisin มีขนาดใหญ่กว่าของ thermitase-like peptidase S8

ในบรรดา islandisin-like peptidase S8 ทั้งหมด เฉพาะ islandisin-like peptidase S8 ที่พบในสายพันธุ์ FC2004^{T} (WP_069292648) และ FA004 (43 kDa) เป็น truncated enzyme ที่ C-terminal amino acid ขาดหายไป (Intagun and Kanoksilapatham, 2017) โดยการทำนายจากลำดับกรดอะมิโน ขนาดของโปรติเอสนี้ใน FC2004^{T} (WP_069292648) มีขนาดของ immature protease ประมาณได้ 56 kDa (รวม signal peptide และ pro-peptide domain) และ mature protease ประมาณ 42.6 kDa (รวม catalytic domain และบางส่วนของ SD-like domain) ซึ่งส่วนที่ขาดหายไปเป็นส่วนของ SD-like domain ดังนั้นจึงเป็นที่สงสัยว่า truncated protease นี้ยังมีกิจกรรมโปรติเอสอยู่หรือไม่ ผลของการทดลองนี้สนับสนุนว่าแถบกิจกรรม (43 kDa) ใกล้เคียงกับขนาดของเอนไซม์นี้จาก FC2004^{T} ดังกล่าวข้างต้น (ดูข้อ 4.5.5 Serine proteases ใน complete genome sequence ของ *F. thailandense* FC2004^{T})



รูปที่ 11 แถบกิจกรรมของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004

A = โปรติเอสจากการตกตะกอนโปรตีนแบบแบ่งส่วนจาก 20 ไป 60% $(NH_4)_2SO_4$

B = โปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วย DEAE Sephacel

4.5 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004

4.5.1 การตกตะกอนโปรติเอสด้วย $(NH_4)_2SO_4$

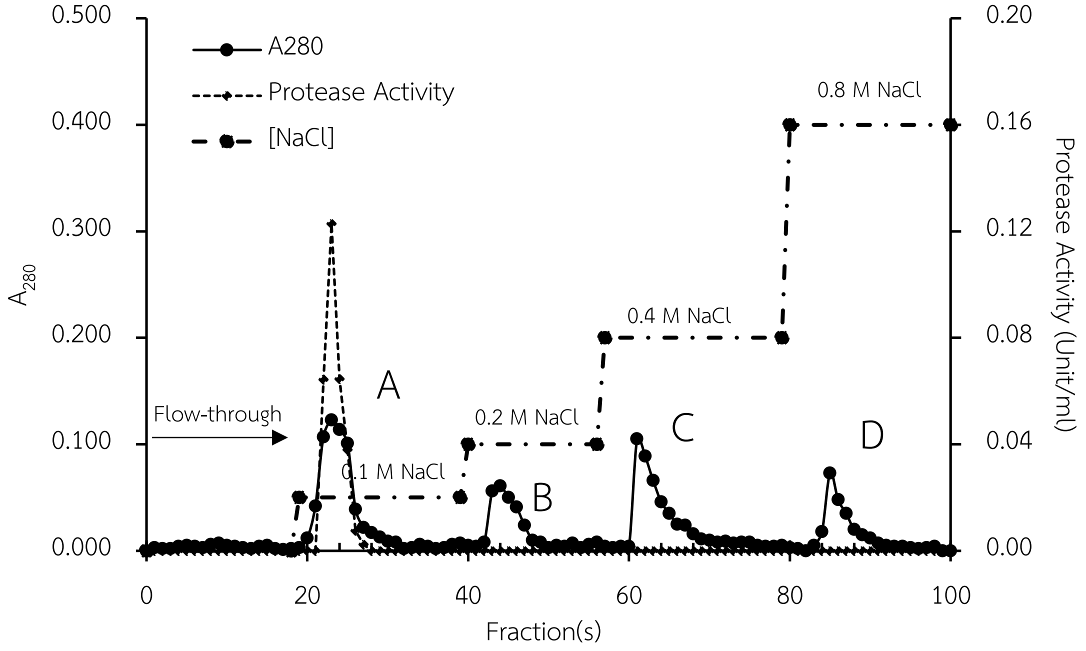
ทำการเพาะเลี้ยง *F. thailandense* FA004 ในอาหารเหลวสูตร 480GM5 ในขวดซีรั่ม 20 ขวด ขวดละ 100 มิลิลิตร ตามขั้นตอนที่ 3.3.1 หลังจากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์แล้วนำส่วนของ culture supernate มาตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ จะได้ตะกอนโปรตีน 2 ส่วน คือ P_1 (โปรตีนที่ตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว 20%) และ P_2 (โปรตีนที่ตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัวจาก 20 ไป 60%) โดย P_1 หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้วจะได้ตะกอนสีขาวขุ่นตกลงมา ในส่วนนี้จะไม่พบกิจกรรมของโปรติเอส ส่วน P_2 หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้วจะได้ตะกอนสีน้ำตาลแดงตกลงมา เมื่อละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีชมพูเข้ม มีค่ากิจกรรมโปรติเอสทั้งหมด 3.938 ยูนิต (ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส เท่ากับ 1.495 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน) ในกระบวนการนี้หลังละลาย ทั้ง P_1 และ P_2 ในบัฟเฟอร์แล้ว จะยังคงมีส่วนของตะกอนที่ไม่ละลายเหลืออยู่ แม้ว่าจะละลายและปั่นเหวี่ยงซ้ำแล้วก็ตาม (ทำซ้ำ 3 รอบ) จึงเก็บเพียงแค่โปรตีนที่สามารถละลายได้ (soluble protein) ในบัฟเฟอร์ได้ไปตรวจวัดค่ากิจกรรมโปรติเอสและปริมาณโปรตีน ก่อนนำไปกำจัดเกลือออกจากสารละลายด้วยการทำไดอะไลซิส ซึ่งอาจเป็นเหตุที่ทำให้ผลผลิตเหลืออยู่ประมาณ 57.08% ของโปรติเอสเริ่มต้น แต่มีความบริสุทธิ์เป็น 2.43 เท่า

หลังจากนำโปรตีน P_2 ไปทำไดอะไลซิส ค่ากิจกรรมของโปรติเอสทั้งหมดเหลืออยู่ 1.89 ยูนิต เหลือผลผลิตอยู่ 41.44% ซึ่งลดลงเล็กน้อย แต่ส่งผลให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสเพิ่มขึ้น (ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส เท่ากับ 1.507 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน) การที่ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากตัวรบกวน เช่น $(NH_4)_2SO_4$ หรือโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็กๆ (≤15 kDa) ถูกกำจัดออกไปจากตัวอย่างผ่านรูพรุนของถุงไดอะไลซิส ทำให้ปริมาณโปรตีนหายไปประมาณ 0.5 มิลลิกรัม อีกทั้งในขั้นตอนของการทำไดอะไลซิสนี้จะช่วยกำจัดสีของ resazurin ออกจากตัวอย่างด้วย โดยตัวอย่างหลังผ่านการทำไดอะไลซิสจะมีสีน้ำตาลใส มีความบริสุทธิ์เป็น 2.45 เท่า

4.5.2 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน

หลังจากปรับสมดุลคอลัมน์ DEAE Sephacel ด้วย 20 mM Tris-HCl pH 8.0 แล้วนำตัวอย่างโปรติเอสในหัวข้อ 4.5.1 มาโหลดบนผิวเจล ตัวอย่างโปรตีนจะเริ่มจับกับเรซิ่นและสะสมที่ผิวหน้าจนมองเห็นเป็นสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ หลังจากโหลดตัวอย่าง ทำการชะด้วยบัฟเฟอร์อีก 100 มิลลิลิตร (ประมาณ 4 bed volumes) เพื่อชะโปรตีนที่ไม่จับกับเรซินออกมา โปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์จะออกมาในพีค A (รูปที่ 13) จากนั้นจึงเริ่มชะด้วย 20 mM Tris-HCl pH 8.0 ที่เพิ่มความเข้มข้น NaCl เป็น 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 M ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 4 bed volumes สีน้ำตาลเข้มที่ผิวหน้าเจลจะเริ่มจางลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้น NaCl

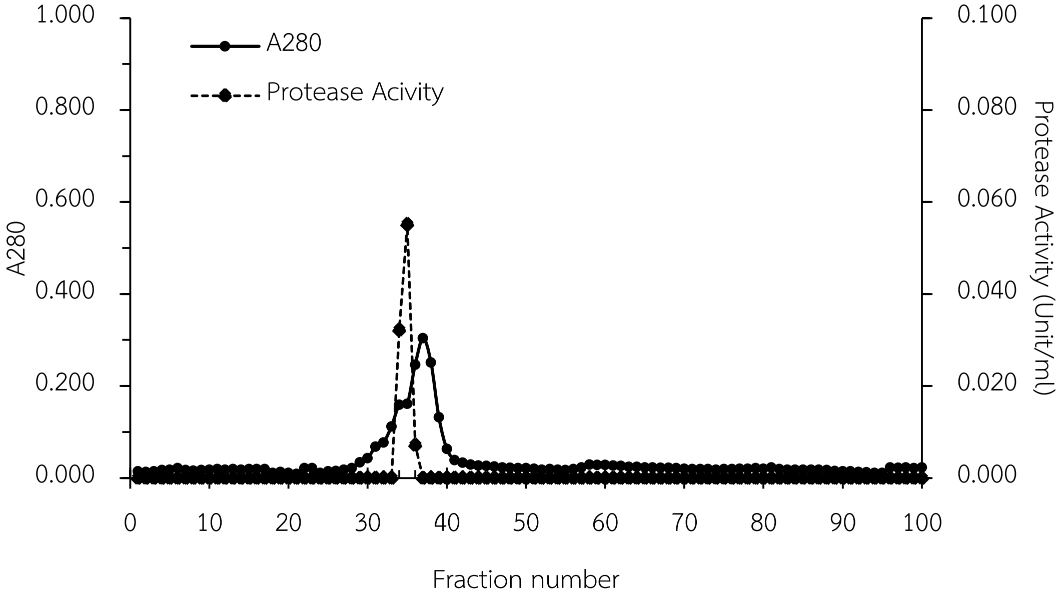
จากรูปที่ 12 จะเห็นว่าพีคของโปรตีนทั้ง 4 พีค (A, B, C และ D) จะหลุดออกจากคอลัมน์ในทุกๆ ครั้งที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์ โดยโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (flow through) ซึ่งอาจเป็นโปรตีนที่มีประจุสุทธิ (net charge) เป็นบวกหรือเป็นกลาง ไม่สามารถจับกับเรซินซึ่งมีประจุเป็นบวกได้และถูกบัฟเฟอร์ชะออกจากคอลัมน์ในช่วงแรก หลังจากค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะ จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่มีกิจกรรมของโปรติเอสถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี NaCl เข้มข้น 0.1 M (พีค A) ตั้งแต่ fraction ที่ 22-28 จึงรวมทุกหลอดที่มีกิจกรรมของโปรติเอสเข้าด้วยกันแล้วนำไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่อง freeze dry แล้วละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ทำให้โปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE Sephacel มีค่ากิจกรรมของโปรติเอสทั้งหมดเหลืออยู่ 0.913 ยูนิต (ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส เท่ากับ 9.595 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน) มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 15.58 เท่า และเหลือผลผลิตอยู่ 13.23% ส่วนพีคโปรตีน B, C และ D นั้น ไม่พบกิจกรรมของโปรติเอส



รูปที่ 12 โครมาโทรแกรมของการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสผ่านคอลัมน์ DEAE Sephacel

4.5.3 การแยกบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน

หลังปรับสมดุลคอลัมน์ Sephadex G-100 ด้วย 20 mM Tris-HCl pH 8.0 นำตัวอย่างโปรติเอสในข้อ 4.5.2 โหลดบนผิวเจล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากรูปที่ 13 โปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีอยู่ 1 พีค (fraction 30-41) หลอดที่มีกิจกรรมโปรติเอสอยู่ใน fraction 34-36 จึงรวมเฉพาะหลอดที่มีกิจกรรมของโปรติเอสเข้าด้วยกัน (fraction 34-36) ไม่เอามาทั้งพีคโปรตีน โปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 มีค่ากิจกรรมของโปรติเอสทั้งหมดเหลืออยู่ 0.715 ยูนิต (ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส เท่ากับ 54.978 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 89.27 เท่า และเหลือผลผลิตอยู่ 10.37% จากลักษณะของพีคโปรตีนที่ปรากฏอาจมีพีคโปรตีนสองพีคซ้อนกัน โดยพีคแรกมีกิจกรรมของโปรติเอส ส่วนพีคหลังไม่มีกิจกรรมของโปรติเอส



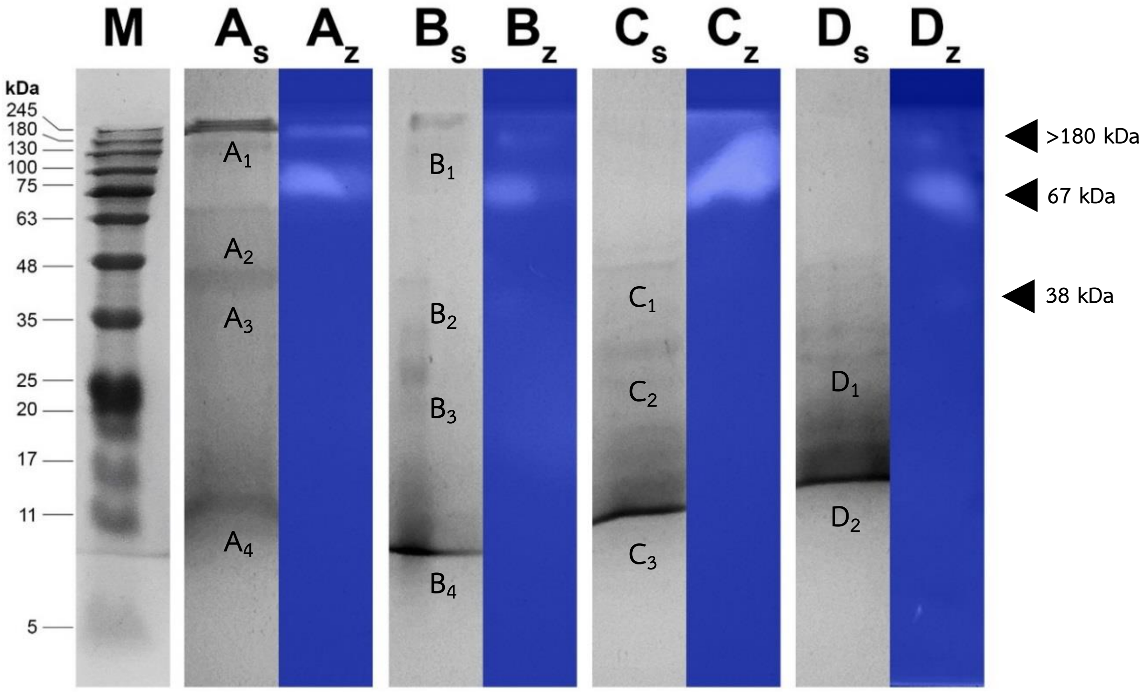
รูปที่ 13 โครมาโทรแกรมของการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของแต่ละขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 11 ก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้ แยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 สิ้นสุดในขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยคอลัมน์ DEAE Sephacel โดยชะโปรตีนด้วยบัพเฟอร์ 20 mM Tris-HCl pH 8.0 ที่มีความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 M ตามลำดับ ด้วยอัตราการชะ 0.5 มิลลิลิตร/นาที ซึ่งโปรติเอสออกมาในพีคโปรตีนที่ถูกชะด้วยบัพเฟอร์ที่มี 0.2 M NaCl ผสมอยู่และทำให้โปรติเอสที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 12 เท่า และมี % ผลได้อยู่ที่ 12% (Pheungphasutadol *et al.*, 2017) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองในตารางที่ 11 แต่การทดลองในนี้ เพิ่มขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน ทำให้ได้โปรติเอสที่ได้มีความบริสุทธิ์เป็น 89.27 เท่า และมี % ผลได้อยู่ที่ 10.37% มีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ที่ 54.98 ยูนิต/มิลลิกรัม

ตารางที่ 11 ผลการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004

ขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์	กิจกรรมทั้งหมด (ยูนิต)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัม)	ผลได้ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
Culture medium	6.898	11.201	0.616	100.00	1.00
$(NH_4)_2SO_4$ precipitation	3.938	2.634	1.495	57.08	2.43
Dialyzed Protease	2.858	1.897	1.507	41.44	2.45
DEAE Sephacel	0.913	0.095	9.595	13.23	15.58
Sephadex G-100	0.715	0.013	54.978	10.37	89.27

4.5.4 SDS-PAGE และ zymogram



รูปที่ 14 SDS-PAGE (S) และ zymogram (Z) ของการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ในขั้นตอนต่างๆ

โดย lane A = ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออก

lane B = ตัวอย่างหลังผ่านการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$

lane C = ตัวอย่างหลังผ่านคอลัมน์ DEAE Sephacel

lane D = ตัวอย่างหลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

ในการศึกษารูปแบบของแถบที่ย้อมติดสี coomassie brilliant blue จากตัวอย่างในขั้นตอนต่างๆ ของการแยกบริสุทธิ์ (รูปที่ 14 lane A_S-D_S) พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออก (A_S) ปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจน 4 แถบ คือ แถบขนาด ≥ 245 kDa (A_1), ขนาด 63 kDa (A_2) , ขนาด 38 kDa (A_3) และขนาด 11 kDa (A_4) หลังการตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ (B_S) มีแถบโปรตีนปรากฏชัดเจนเพิ่มขึ้นอีก 1 แถบ คือ แถบขนาด 25 kDa (B_3) และแถบที่ขนาด 63 kDa ได้หายไป หลังผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE Sephacel (C_S) ปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจน 3 แถบ คือ แถบขนาด 38 kDa (C_1), ขนาด 26 kDa (C_2) และขนาด 11 kDa (C_3) โดยแถบที่ขนาด ≥ 245 kDa ได้หายไป หลังผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 (D_S) ปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจน 2 แถบ คือ แถบขนาด 26 kDa (D_1), ขนาด 11 kDa (D_2) แถบโปรตีนขนาดเล็ก (11 kDa) ในช่อง C_S และ D_S เคลื่อนที่ช้ากว่าในช่อง A_S และ B_S อาจเนื่อมาจากตัวอย่างจากโครมาโตกราฟฟี แต่ละขั้นตอนต้องนำไปเพิ่มความเข้มข้น โปรตีนด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยไม่ได้ทำการกำจัดเกลือ (Tris-HCl) อันเนื่องจากปริมาณที่ได้น้อยมาก (~ 1000 μl) เกลือความเข้มข้นสูงที่มีอยู่ อาจไปทำให้การเคลื่อนที่ของโปรตีนบนแผ่นเจลช้าลง

รูปแบบของแถบกิจกรรมโปรติเอสจากตัวอย่างในขั้นตอนต่างๆ ของการแยกบริสุทธิ์ (รูปที่ 14 lane A_Z-D_Z) พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออก (A_Z) ปรากฏแถบกิจกรรมโปรติเอสที่ชัดเจน 2 แถบ คือ แถบขนาด ≥ 180 kDa และขนาด 67 kDa หลังการตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ (B_Z) ยังปรากฏแถบกิจกรรมโปรติเอส 2 แถบเช่นเดิม แต่แถบขนาด ≥ 180 kDa จางลง หลังผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE Sephacel (C_Z) แถบกิจกรรมโปรติเอสที่ขนาด 67 kDa มีแถบค่อนข้างกว้างและใหญ่ หลังผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 (D_Z) ปรากฏแถบกิจกรรมโปรติเอส 3 แถบ คือ ที่ตำแหน่งประมาณ ≥ 180 kDa, 67 kDa และ 38 kDa โดยแถบที่ชัดเจนที่สุดอยู่ที่ 67 kDa โดยค่า intensity ของแถบที่ปรากฏ lane D_Z เท่ากับ 10, 86 และ 4% ตามลำดับขนาดของแถบ จากงานวิจัยก่อนหน้า โปรติเอสหยาบจาก *F. thailandense* FA004 มีแถบกิจกรรมบน casein zymogram อยู่ทั้งหมด 3 แถบ คือ ที่ตำแหน่งประมาณ 37, 63 และ >180 kDa (Pheungphasutadol *et al.*, 2017) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบที่ปรากฏใน lane ที่ย้อมด้วย Coomassie blue กับ lane zymogram จะเห็นได้ว่า แถบ A_1 และ B_1 คือแถบกิจกรรมโปรติเอสขนาด >180 kDa ขณะที่แถบ A_3, B_2, C_1 และ D_1 อาจเป็นแถบกิจกรรมโปรติเอสขนาด 38 หรือ 43 kDa ซึ่งแถบกิจกรรมโปรติเอสแถบนี้ไม่เด่นชัด ไม่มีแถบใดบน lane ที่ย้อมด้วย Coomassie blue ตรงกับแถบกิจกรรมโปรติเอสขนาด 67 kDa ทั้งที่แถบนี้มี intensity มากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากขนาด 67 kDa เป็นรูปแบบที่โปรติเอสมีกิจกรรมสูงสุด ปริมาณโปรตีนเพียงเล็กน้อยก็ทำให้เกิดแถบกิจกรรมได้ ขณะที่แถบโปรตีนขนาด 11 kDa (A_4, B_4, C_3 และ D_2) ซึ่งปรากฏชัดเจนแต่ไม่แสดงกิจกรรมโปรติเอสอาจเป็นรูปแบบย่อย

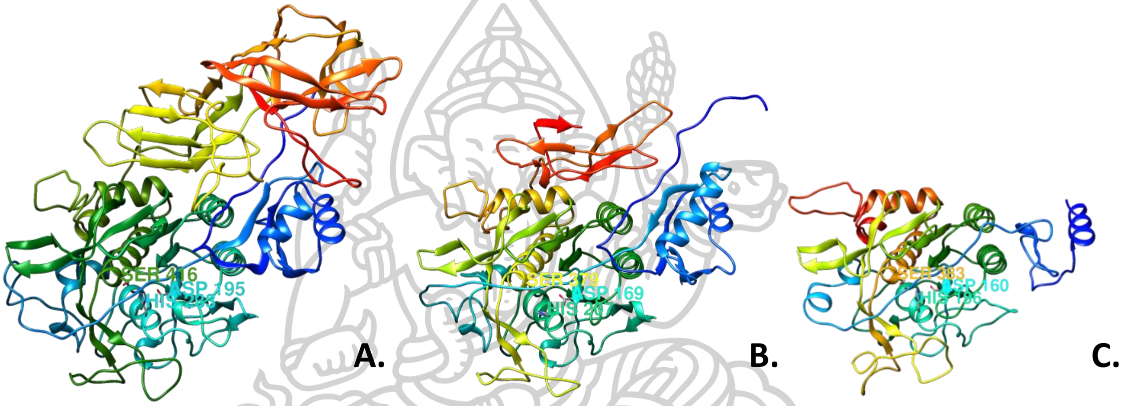
สลาย (degraded form) ของโปรติเอส จากผลการทดลองอาจเป็นไปได้ว่าแถบกิจกรรมโปรติเอสขนาด 38, 67 และ 180 kDa เป็นรูปแบบของ monomer, dimer และ multimer ตามลำดับ

โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ Friedrich and Antranikian (1996) สกัดและแยกบริสุทธิ์เคราติเนสจากผนังเซลล์ของ *Fervidobacterium pennivorans* ได้เคราติเนส ขนาด 130 kDa ซึ่งมีตำแหน่งตรงกับแถบที่มีกิจกรรมโปรติเอสบน zymogram โดยก่อนการแยกบริสุทธิ์เคราติเนสจาก *F. pennivorans* มีขนาด 250 kDa ซึ่งผู้วิจัยอธิบายว่าอาจเป็นไปได้ว่าเคราติเนสอาจจับตัวอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ที่เรียกว่า toga ซึ่งสามารถแยกเคราติเนสออกจากผนังเซลล์โดยใช้สารซักล้าง CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate) เป็นตัวช่วย Kluskens *et al.* (2002) สกัดเคราติเนสจากของ *Fervidobacterium pennivorans* DSM 7003 เมื่อผ่านการแยกบริสุทธิ์ได้เคราติเนสที่มีกิจกรรมของ โปรติเอสอยู่ที่ 90 kDa นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาการทำงานของ fervidolysin จากยีนของ *F. pennivorans* DSM 7003 โดยใช้เทคนิค site-direct mutagenesis พบว่า fervidolysin ที่อยู่ในรูปแบบพร้อมทำงาน (activated form) มีกิจกรรมของโปรติเอสจะอยู่ที่ 58 kDa โดยก่อนที่ fervidolysin จะเริ่มทำงานได้ จะต้องตัดส่วนที่เป็น propeptide ซึ่งเป็นส่วนที่ขัดขวางการทำงานออกก่อน Nam *et al.* (2002) สกัดโปรตีนขนาด >200 kDa จากสารสกัดเซลล์ *Fervidobacterium islandicum* นอกจากนี้ยังได้นำโปรติเอสบริสุทธิ์มาทำ electrophoresis บน SDS-PAGE (denature condition) ทำให้เกิดแถบโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) ที่ขนาด 97 kDa

4.5.5 เซรีนโปรติเอสใน complete genome sequence ของ *F. thailandense* FC2004^T

เนื่องจาก *F. thailandense* FA004 เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ *F. thailandense* FC2004^T จึงนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล NCBI ของ *F. thailandense* FC2004^T มาใช้ในการสนับสนุนผลการทดลอง ซึ่ง *F. thailandense* FC2004^T มีเซรีนโปรติเอสอยู่ 3 homolog (GenBank no. LWAF01000000) (รูปที่ 15) คือ 1. fervidolysin-like (WP_069293857), 2. truncated S8 (islandisin-like) (WP_069292648) และ 3. thermitase-like (WP_069293332) โดยขนาดของ signal peptide และ propeptide domain แสดงไว้ในตารางที่ 12

Signal peptide และ propeptide domain ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการนำส่งและการทำงานของโปรติเอส เมื่อส่วนนี้ถูกตัดออกจะมีขนาดรวมกันประมาณ 13-16 kDa ซึ่งเซรีนโปรติเอสหลังตัดส่วนของ signal peptide และ propeptide domain ออก จะอยู่ในสภาพที่พร้อมทำงาน (active form) ตามรูปที่ 16 มีขนาดของ monomeric protease ประมาณ 62 kDa, 43 kDa และ 35 kDa ตามลำดับ ซึ่งผลจากการคาดคะเนขนาดของเซรีนโปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. สายพันธุ์ FA004 อาจเป็นไปได้ว่ามีขนาดอยู่ที่ประมาณ 67 kDa (รูปที่ 14) และ 37 kDa (รูปที่ 11) จากผลการทำ zymogram

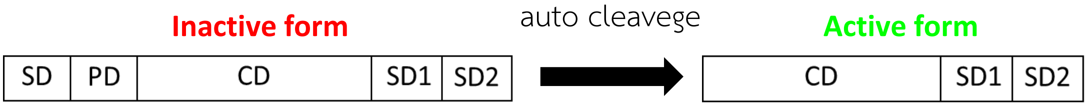


รูปที่ 15 โครงสร้างแบบริบบิ้นของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FC2004

(A) Fervidolysin-like peptidase S8 (WP_069293857)

(B) Islandisin-like peptidase S8 (WP_069292648)

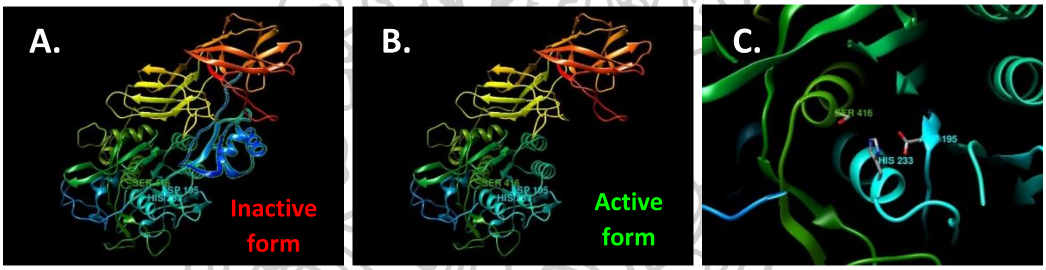
(C) Thermitase-like peptidase S8 (WP_069293332)



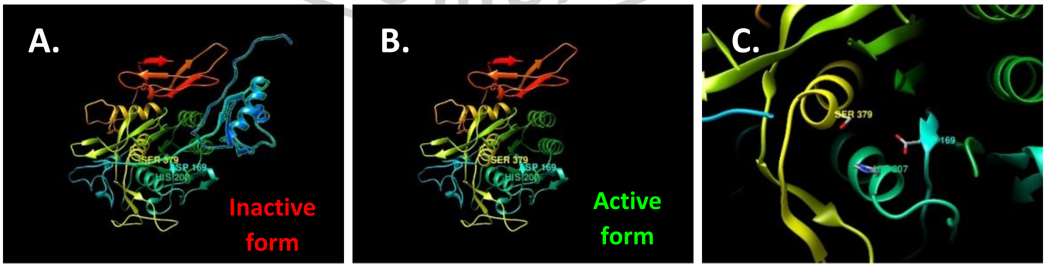
รูปที่ 16 ไดอะแกรมแสดงโดเมนของ immature และ mature peptidase S8s จาก *Fervidobacterium* spp.

ตารางที่ 12 เซรีนโปรติเอสที่ได้จากจีโนมของ *F. thailandense* FC2004^{T}

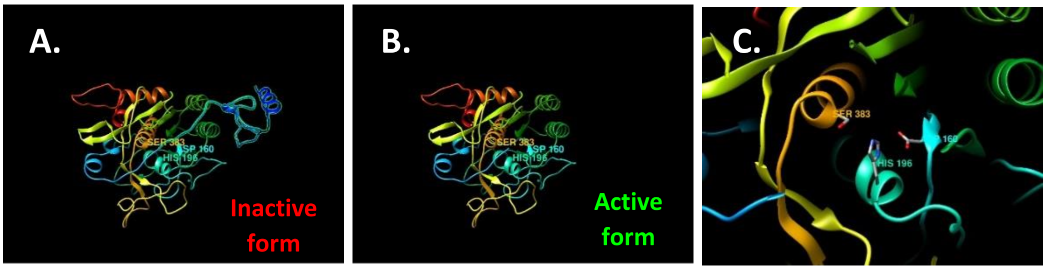
F. thailandense FC2004	Fervidolysin-like homolog	Islandisin-like homolog or truncated S8 (ProA1)	Thermitase-like homolog
Protein IDs	WP_069293857	WP_069292648	WP_069293332
Sizes (aa-long) / (kDa) / pI	709 aa / 77 kDa / 5.21	522 aa/ 56 kDa / 5.57	445 aa/ 49 kDa/ 6.39
Predicted length of signal peptide+PD (putative cleavage site)	K48/P137 (15.5 kDa)	F25/V117 (12.96kDa)	D66/I119 (13.36 kDa)
CD+SD aa-long/(kDa)	572 (61.6 kDa)	405 (42.58 kDa)	326 (35.28 kDa)
Catalytic triads	D195; H233; S416	D169; H207; S379	D160; H196; S383



รูปที่ 17 Fervidolysin-like peptidase S8 (WP_069293857) จาก *F. thailandense* FC2004 (A) inactive form, (B) active form และ (C) ตำแหน่งของ catalytic triad (Asp195; His233; Ser416)



รูปที่ 18 Islandisin-like peptidase S8 (WP_069292648) จาก *F. thailandense* FC2004 (A) inactive form, (B) active form และ (C) ตำแหน่งของ catalytic triad (Asp196; His207; Ser379)



รูปที่ 19 Thermitase-like peptidase S8 (WP_069293332) จาก *F. thailandense* FC2004 (A) inactive form, (B) active form และ (C) ตำแหน่งของ catalytic triad (Asp160; His196; Ser383)

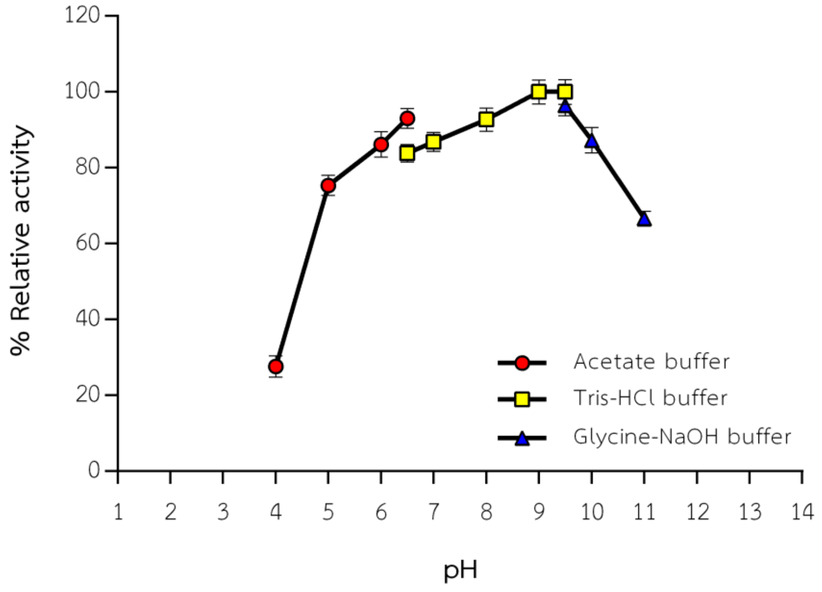
จากผลการทดลอง zymogram และการวิเคราะห์เชิงชีวสารสนเทศ โปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้ว มีส่วนที่มีกิจกรรมมากที่สุด (ความสว่างของแถบใสบนแผ่นเจลสีน้ำเงิน) อยู่ประมาณที่ 67 kDa ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า อาจจะเป็น fervidolysin-like peptidase S8 (77 kDa) ที่ถูกตัดส่วนของ signal peptide และ PD บางส่วนออกไปแล้ว และอยู่ในรูปแบบที่พร้อมทำงาน (mature protease) โดยน้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 หายไปประมาณ 10 kDa เมื่อเทียบกับ fervidolysin-like peptidase S8 ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของ mature fervidolysin-like peptidase S8 จะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 61.6 - 77 kDa

แม้ว่าผลของ zymogram ของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 จะแสดงให้เห็นว่ายังมีโปรติเอสฟอร์มอื่นๆ ปะปนอยู่ด้วย (>180 kDa) ซึ่งคาดว่าเป็นรูปแบบของ multimeric protease แต่ทั้งนี้นั้น ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น multimeric protease ชนิดใด อาจเป็น homomultimeric protease ที่ประกอบด้วย fervidolysin-like peptidase จำนวนมากกว่า 2 subunits หรืออาจเป็น heteromultimeric protease ที่ประกอบด้วยโปรติเอสและโปรตีนอื่นๆ มากกว่า 3 subunits ซึ่งเป็นเรื่องยากที่จะคาดเดา แต่จากผลการวิเคราะห์ชีวสารสนเทศ ช่วยจำกัดขอบเขตของความเป็นไปได้ ซึ่งตามผลการทดลองจะตรวจไม่พบ Islandisin-like peptidase S8 (42.58 - 56 kDa) หรือ Thermitase-like peptidase S8 (35.28 - 49 kDa) ในรูปแบบของ mature protease อยู่ในโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ จึงมีความเป็นไปได้ว่าโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ส่วนใหญ่จะเป็น fervidolysin-like peptidase S8 และมีโปรติเอสในรูป multimeric ปะปนอยู่เล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่าโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ส่วนใหญ่เป็น fervidolysin-like peptidase S8 (>85%) (รูปที่ 14) และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ต่อไปได้

4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004

4.6.1 ผลของ pH ต่อกิจกรรมและความเสถียรของโปรติเอส

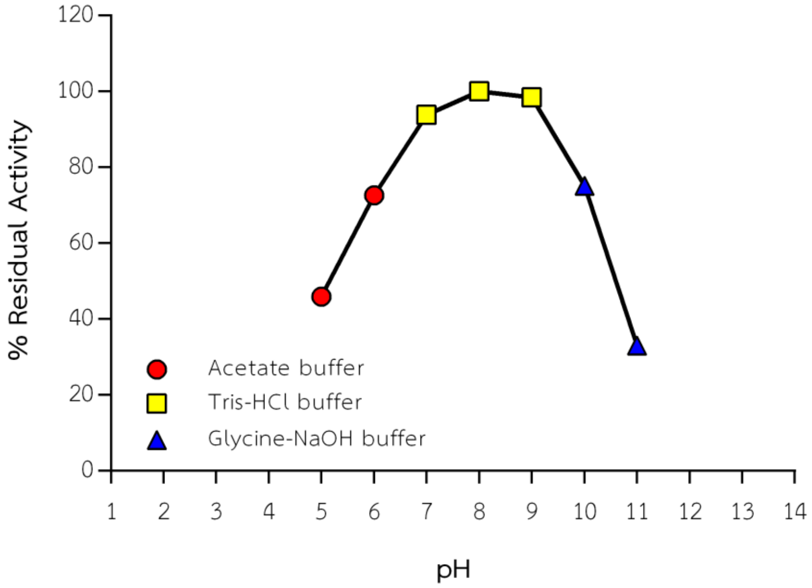
ในการหาช่วงของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานและช่วง pH ที่ส่งผลต่อความเสถียรของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 จะช่วยให้ทราบถึงช่วง pH ที่ทำให้โปรติเอสทนร้อนทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและทำงานได้นานที่สุด ผลของ pH ที่ส่งผลต่อกิจกรรมของโปรติเอส แสดงไว้ในรูปที่ 20 โปรติเอสสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 5-10 (ค่ากิจกรรมของโปรติเอสไม่ต่ำกว่า 75% เมื่อเทียบกับ pH ที่มีกิจกรรมสูงที่สุด) โดย pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานมากที่สุดคือ pH 9.0



รูปที่ 20 ผลของ pH ต่อกิจกรรมของโปรติเอส

การทดสอบผลของ pH ต่อความเสถียรของโปรติเอส ทดสอบโดยเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่ช่วยให้โปรติเอสทำงานได้ดีที่สุดมาทดสอบ (Tris-HCl pH 7.0-9.0) และใช้บัฟเฟอร์ acetic acid pH 5.0-6.0 และ glycine-NaOH pH 10.0-11.0 เป็นตัวเปรียบเทียบ จากรูปที่ 21 โปรติเอสมีความเสถียรในช่วง pH 7.0-9.0 แต่จะเสถียรที่สุดที่ pH 8.0 หลังบ่มในบัฟเฟอร์นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

ผลของ pH ต่อกิจกรรมและความเสถียรของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ยังมีความสอดคล้องกับโปรติเอสจาก *F. islandicum* AW-1 ที่ทำงานได้ดีที่ pH 9.0 และมีความเสถียรในช่วง pH 7-10 (Nam *et al.*, 2002), islandisin และ carboxypeptidase จาก *F. islandicum* มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ pH 8.0 และ 7.0 ตามลำดับ (Godde *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2015) และโปรติเอสจาก *F. pennavorans* มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทางานอยู่ที่ pH 10.0 (Friedrich and Antranikian, 1996)



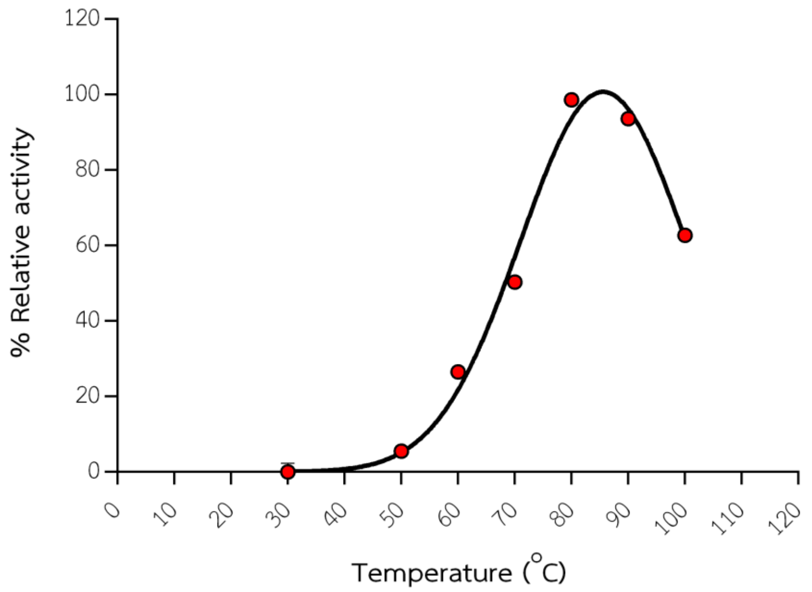
รูปที่ 21 ผลของ pH ต่อความเสถียรของโปรติเอส

4.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความเสถียรของโปรติเอส

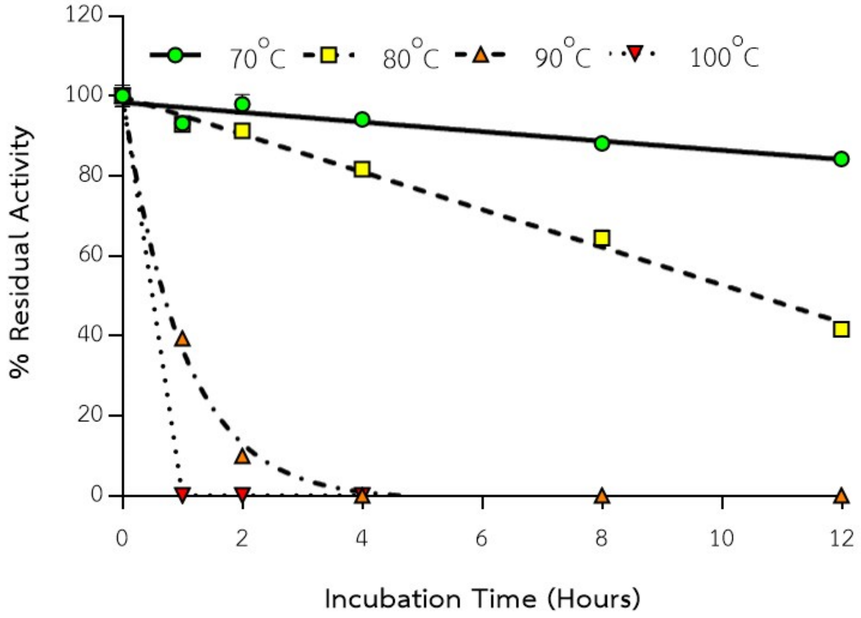
ผลของอุณหภูมิที่ส่งผลต่อกิจกรรมของโปรติเอส แสดงไว้ในรูปที่ 22 พบว่าที่อุณหภูมิ 30°C ไม่มีกิจกรรมของโปรติเอส โปรติเอสสามารถเริ่มทำงานได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 50°C ไปจนถึง 100°C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานมากที่สุด คือ 80°C และหากอุณหภูมิเกิน 80°C ค่ากิจกรรมของโปรติเอสก็จะลดลงซึ่ง Godde *et al.* (2005) พบว่าโปรติเอสจาก *F. islandicum* ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 60-80°C ขณะที่ Lee *et al.* (2015) พบว่าโปรติเอสจาก *F. islandicum* AW-1 ซึ่งทำงานได้ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 40-80°C โดยหลังจาก 80°C กิจกรรมของโปรติเอสจะลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (Pheungphasutadol *et al.*, 2017)

โปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกันไป แต่จะอยู่ในช่วงประมาณ 70-100°C เช่น โปรติเอสจาก *F. islandicum* AW-1 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 100°C (Nam *et al.*, 2002) และโปรติเอสจาก *F. pennavorans* ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 80°C (Friedrich and Antranikian, 1996)

ค่าครึ่งชีวิต (haft-life, $t_{1/2}$) ของโปรติเอส ที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100°C พบว่าที่อุณหภูมิ 70°C มีค่า $t_{1/2} > 12$ ชั่วโมง, 80°C มีค่า $t_{1/2} = 10$ ชั่วโมง และ 90°C มีค่า $t_{1/2} = < 60$ นาที ส่วนที่ 100°C กิจกรรมของโปรติเอสจะสูญเสียไปอย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ 1 ชั่วโมงแรก (รูปที่ 23) Godde *et al.* (2005) ได้ทดสอบหาค่าครึ่งชีวิตของโปรติเอสจาก *F. pennavorans* ที่อุณหภูมิ 80, 90 และ 100°C พบว่ามีค่าครึ่งชีวิตอยู่ที่ 32, 4 และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของโปรติเอส



รูปที่ 23 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของโปรติเอส

ด้วยผลของอุณหภูมิที่ส่งผลต่อกิจกรรมและความเสถียรของโปรติเอสนี้ ชี้ให้เห็นว่าโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 จัดอยู่ในกลุ่มของโปรติเอสทนร้อน (thermostable protease)

4.6.3 ผลของตัวยับยั้งโปรติเอส

ตัวยับยั้งโปรติเอส (protease inhibitor) คือ สารที่มีความสามารถในการเข้าจับและขัดขวางการทำงานของโปรติเอส ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณเร่งของโปรติเอสโดยตรงหรือทางอ้อมก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวยับยั้งโปรติเอส จึงสามารถใช้คุณสมบัติของตัวยับยั้งโปรติเอส ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณเร่งของโปรติเอสแต่ละชนิด ในการระบุหาชนิดของโปรติเอสได้

การทดสอบเพื่อดูผลของตัวยับยั้งโปรติเอสส่วนใหญ่ งานวิจัยส่วนใหญ่เลือกใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละตัวเป็น 1, 2, 5 หรือ 10 mM โดยใช้ 2-3 ความเข้มข้น เพื่อดูผลความสัมพันธ์ของค่ากิจกรรมโปรติเอสต่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งโปรติเอสที่เพิ่มขึ้น สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ *Fervidobacterium* sp. เช่น Nam *et al.* (2002) เลือกใช้ความเข้มข้นของตัวยับยั้งโปรติเอสที่ 1 และ 10 mM Godde *et al.* (2005) เลือกใช้ความเข้มข้นของตัวยับยั้งโปรติเอสที่ 1 และ 5 mM

ตารางที่ 13 ผลของตัวยับยั้งโปรติเอสต่อกิจกรรมโปรติเอส

	กิจกรรมสัมพันธ์ (%)		
ตัวอย่างควบคุม	100.00	±	2.06
ตัวยับยั้งโปรติเอส			
1 mM PMSF	0.00	±	0.00
5 mM PMSF	0.00	±	0.00
1 mM IA	107.16	±	2.49
5 mM IA	109.79	±	0.87
1 mM EDTA	34.72	±	1.23
5 mM EDTA	29.83	±	1.03
1 mM BME	66.91	±	1.70
5 mM BME	63.74	±	0.16

ผลของตัวยับยั้งโปรติเอสต่อกิจกรรมของโปรติเอสสจาก *F. thailandense* FA004 แสดงในตารางที่ 13 พบว่าการเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSM) ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 mM ทำให้สามารถยับยั้งกิจกรรมของโปรติเอสได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้สามารถระบุได้ว่าโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 เป็นโปรติเอสในกลุ่มของเซรีนโปรติเอส (serine protease) นอกจากนี้การเติม EDTA ซึ่งเป็นสารที่จับอิออนประจุบวก (chelating agent) ลงไป ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของโปรติเอสลดลงเหลือต่ำกว่า 40% เมื่อใช้ EDTA ความเข้มข้นเท่ากับ 1 และ 5 mM ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 อาจจะมีตำแหน่งจับอิออนโลหะ (metal-binding site) อยู่ภายในโมเลกุล และจำเป็นต้องใช้โคแฟคเตอร์ (cofactor) บางชนิด เพื่อช่วยเพิ่ม

ประสิทธิภาพการทำงานของโปรติเอส ส่วนการเติม iodoacetamide (IA) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น cysteine protease inhibitor ไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรติเอส และการเติม β-mercaptoethanol (BME) ซึ่งเป็น reducing agent เพื่อทำลายพันธะ disulfide ของโปรตีนลงไปนั้น พบว่าทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของโปรติเอสลดลงเหลือต่ำกว่า 70% เมื่อใช้ BME ความเข้มข้นเท่ากับ 1 และ 5 mM

โปรติเอสที่มีความสามารถในการย่อยเคราติน หรือ เคราติเนสจากแบคทีเรีย ส่วนใหญ่เป็นโปรติเอสในตระกูลเซรีนโปรติเอส เช่น *Fervidobacterium pennivorans* (Friedrich and Antranikian, 1996; Kim *et al.*, 2004; Kluskens *et al.*, 2002) *Fervidobacterium islandicum* (Godde *et al.*, 2005) นอกจากนี้มีโปรติเอสในกลุ่มของ ซิสเตอีน (cysteine protease) และเมทัลโลโปรติเอส (metallo protease) บางส่วนที่สามารถย่อยสลายขนนกได้เช่นกัน (Gupta *et al.*, 2013)

4.6.4 ผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรติเอส

ตารางที่ 14 ผลของอิออนโลหะต่อกิจกรรมโปรติเอส

	กิจกรรมสัมพันธ์ (%)		
ตัวอย่างควบคุม	100.00	±	2.06
อิออนโลหะ			
1 mM Cu^{2+}	0.00	±	0.00
1 mM Ca^{2+}	108.61	±	0.42
1 mM Co^{2+}	26.84	±	0.42
1 mM Fe^{2+}	81.41	±	1.75
1 mM Mg^{2+}	106.53	±	0.96
1 mM Zn^{2+}	17.41	±	0.47
1 mM Na^{+}	97.10	±	1.36

จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ fervidolysin โปรติเอสทนร้อนที่ถูกผลิตจาก *F. pennivorans* (Kim *et al.*, 2004) พบว่าในโครงสร้างของ fervidolysin มีตำแหน่งของ Ca^{2+} binding site ซึ่งแสดงว่าโปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. อาจมี co-factor เข้าร่วมด้วยในการเร่งปฏิกิริยา งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของอิออนโลหะแต่ละตัวที่ส่งผลต่อการทำงานของโปรติเอส ในตารางที่ 14 พบว่าการเติม Cu^{2+}, Co^{2+} หรือ Zn^{2+} ไปยับยั้งหรือรบกวนการทำงานของโปรติเอสอย่างมาก การเติม Fe^{2+} ทำให้ไปรบกวนการทำปฏิกิริยาของโปรติเอสบางส่วน โดยกิจกรรมของ

โปรติเอสลดลงไป 20% แต่การเติม Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} จะช่วยทำให้กิจกรรมของโปรติเอสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และการเติม Na^{+} ไม่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาของโปรติเอส เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ตัวอย่างทดลองที่ไม่มีการเติมอิออนโลหะใดๆ ลงไป)

การศึกษาโครงสร้างโปรตีน 3D โดยการเทียบ fervidolysin-like peptidase S8 (WP_069293857) ของ *F. thailandense* FC2004[T] กับ fervidolysin ของ *F. pennivorans* (Kim *et al.*, 2004) แสดงให้เห็นว่า fervidolysin-like peptidase S8 มีตำแหน่งของ Ca^{2+}-binding site อยู่ 1 ตำแหน่งเช่นเดียวกัน ดังนั้นโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 อาจจะมีตำแหน่งของ metal-binding site เช่นเดียวกัน

4.6.5 ผลของสารซักล้างและตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมของโปรติเอส

ตารางที่ 15 ผลของสารซักล้างต่อกิจกรรมโปรติเอส

	กิจกรรมสัมพันธ์ (%)
ตัวอย่างควบคุม	100.00 ± 2.06
สารซักล้าง	
1% (v/v) Titon X-100	83.50 ± 1.19
1% (w/v) CTAB	-
1% (w/v) SDS	-

การศึกษาผลของสารซักล้าง (ตารางที่ 15) ชี้ให้เห็นว่า Titon X-100 (non-ionic detergent) ไปรบกวนการทำงานของโปรติเอสบางส่วน โดยที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ทำให้ ค่ากิจกรรมโปรติเอสลดลงไปประมาณ 17% ผลการทดลองพบว่าการใช้ CTAB (cationic detergent) ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ทำให้ azocasein และ โปรติเอสตกตะกอนไม่สามารถวัดค่ากิจกรรมโปรติเอสได้ จึงยังไม่สามารถสรุปผล CTAB ต่อกิจกรรมโปรติเอสได้ และการใช้ SDS (anionic detergent) ความเข้มข้น 1% (w/v) โปรติเอสและ azocasein ไม่ตกตะกอน หลังการเติม TCA จึงยังไม่สามารถสรุปผล SDS ต่อกิจกรรมโปรติเอสได้เช่นกัน Nam *et al.* (2002) ทดสอบผลของ Titon X-100 และ SDS ต่อกิจกรรมของโปรติเอสจาก *F. islandicum* AW-1 โดยใช้ความเข้มข้นสาร 1% พบว่า Titon X-100 ทำให้กิจกรรมโปรติเอสเหลืออยู่ 88% ส่วน SDS ทำให้กิจกรรมโปรติเอสเหลืออยู่ 49%

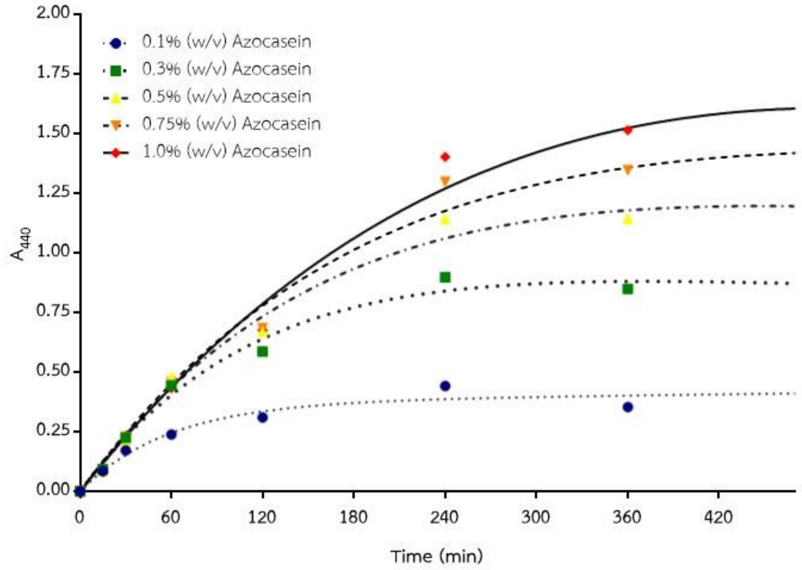
ตารางที่ 16 ตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมโปรติเอส

	กิจกรรมสัมพันธ์ (%)		
ตัวอย่างควบคุม	100.00	±	2.06
ตัวทำละลายอินทรีย์			
1% (v/v) Isopropanol	81.96	±	0.63
1% (v/v) Acetone	100.45	±	0.96
1% (v/v) Ethanol	97.64	±	1.25
1% (v/v) Acetonitrile	98.10	±	1.29
1% (v/v) DMSO	95.92	±	1.13

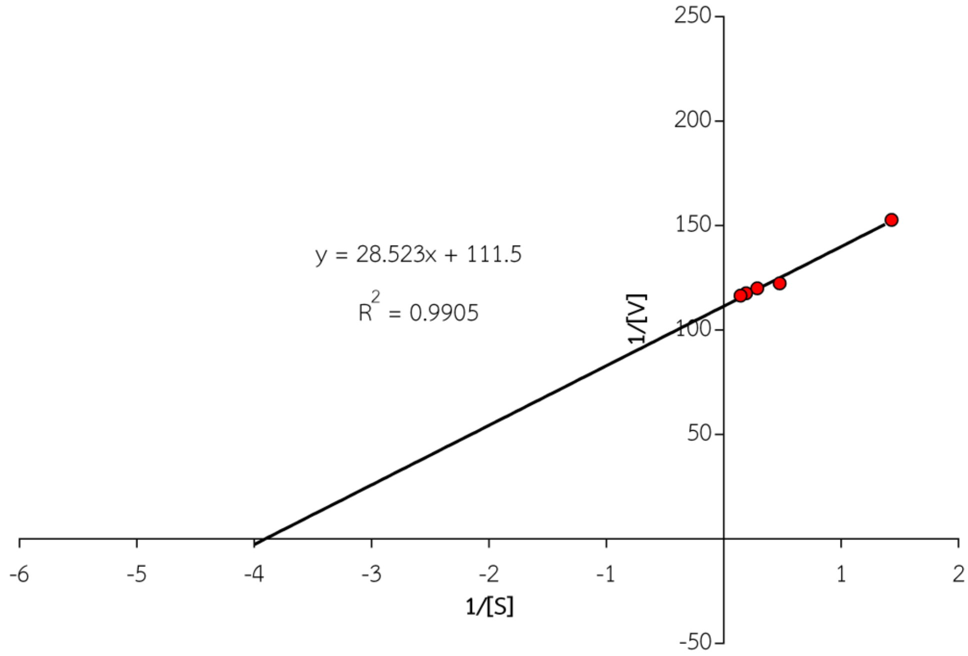
การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ (ตารางที่ 16) พบว่า acetone, ethanol, acetonitrile หรือ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (v/v) ไม่มีผลต่อการทำงานของโปรติเอส ส่วน isopropanol ทำให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสลดลงไปประมาณ 20% ซึ่งคุณสมบัติการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์นี้ ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์เปปไทด์ในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้โปรติเอสทนร้อนจาก *F. thailandense* FA004 เป็นตัวเร่งชีวภาพ (Mukherjee and Gupta, 2015) Nam *et al.* (2002) รายงานว่าโปรติเอสจาก *F. islandicum* AW-1 มีความคงทนต่อ DMSO, Isopropyl alcohol, Methanol, Ethanol และ beta-mercaptoethanol ที่ความเข้มข้นตัวทำละลายอินทรีย์ 1%

4.7 จลนพลศาสตร์ของโปรติเอส

การศึกษาจลนพลศาสตร์โปรติเอส ได้ทดลองในสภาวะที่เหมาะสม ต่อกิจกรรมของโปรติเอส ศึกษาโดยใช้สภาวะของการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมคือ pH 8.0 อุณหภูมิ 80°C (ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 4.6) แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของค่า A_{440} ตามวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส โดยใช้ azocasein ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 0.3, 0.5, 0.75 และ 1.0% (w/v)) ผสมกับโปรติเอสแล้วบ่มทำปฏิกิริยา แบ่งเก็บแต่ละช่วงเวลา (15, 30, 60, 120, 240 และ 360 นาที หลังบ่มทำปฏิกิริยา) มาวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส โดยกราฟที่แสดงค่า A_{440} ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละเวลา (รูปที่ 24) หาความชันของแต่ละเส้นกราฟทุกความเข้มข้น แล้วสร้างกราฟ Lineweaver-Burk หาค่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) และค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m) จากรูปที่ 25 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 จากกราฟ Lineweaver-Burk มีค่า K_m เท่ากับ 0.256 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} เท่ากับ 8.969 มิลลิยูนิต A_{440}/นาที



รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของค่า A_{440} เมื่อใช้ azocasein ความเข้มข้นต่างๆ เป็น substrate



รูปที่ 25 กราฟ Lineweaver-Burk ของโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004

งานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาจลนพลศาสตร์ของโปรติเอสจาก *Fervidobacterium* sp. โดยตรง มีเพียงแค่งานวิจัยที่โคลนยีนของ *Fervidobacterium* sp. เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้วทำให้เกิดการแสดงออกของยีน เช่น carboxypeptidase จาก *F. islandicum* AW-1 มีค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์โดยใช้ benzyloxycarbonyl Ala-Arg (ZAR) และ benzyloxycarbonyl Ala-Ala (ZAA) เป็นซับสเตรทในการทดสอบพบว่าเมื่อใช้ ZAR เป็นซับสเตรทได้ K_m = 5.22±0.11 mM และ V_{max} = 7.99±0.13 หน่วย/มิลลิกรัม และเมื่อใช้ ZAA เป็นซับสเตรทได้ K_m = 8.27±0.76 mM และ V_{max} = 3.35±0.08 หน่วย/มิลลิกรัม (Lee *et al.*, 2015)

4.8 การย่อยสลายขนไก่

โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 สามารถย่อยสลายเคราติน ตรวจสอบโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดขึ้นกับขนไก่ตามระยะเวลาที่บ่มทำปฏิกิริยาและดูน้ำหนักของขนไก่ที่ลดลงไป ได้ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายขนไก่ของโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ (pure protease), โปรติเอสหยาบ (crude protease) และสารสกัดเซลล์ (cell extract) โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรติเอส 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 5 วัน การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของขนไก่ในแต่ละวัน แสดงในรูปที่ 26 หลังบ่มทำปฏิกิริยาในวันแรกบัฟเฟอร์จะเริ่มมีสีเหลือง อาจเนื่องมาจากเม็ดสีเมลานินที่เป็นองค์ประกอบของขนไก่สีดำหลุดออกมาบางส่วน ไม่ได้มาจากกิจกรรมโปรติเอส สังเกตได้จากสีของบัฟเฟอร์ในหลอดควบคุม (control tube) ที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย

หลังการบ่มโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 กับขนไก่ในหลอดตัวอย่าง การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของขนไก่สังเกตจากหลอดตัวอย่างเทียบกับหลอดควบคุม ขนไก่ในหลอดตัวอย่างค่อยๆ ถูกย่อยสลายและกลายเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวนมากตามระยะเวลาในการบ่ม ส่วนขนไก่ในหลอดควบคุมยังคงมีสภาพเดิม เมื่อครบ 5 วัน นำขนไก่ออกมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4X (รูปที่ 27) โดยในหลอดควบคุม ขนไก่ยังคงเรียงกันเป็นเส้นใยต่อกันปกติ แต่ขนไก่ที่ผ่านการบ่มด้วยโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 ทั้ง 3 ตัวอย่าง (โปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ โปรติเอสหยาบ และ สารสกัดเซลล์) มีลักษณะเหมือนกัน คือ มีลักษณะเป็นท่อนเล็กๆ จำนวนมาก มีขนาดแตกต่างกันไป

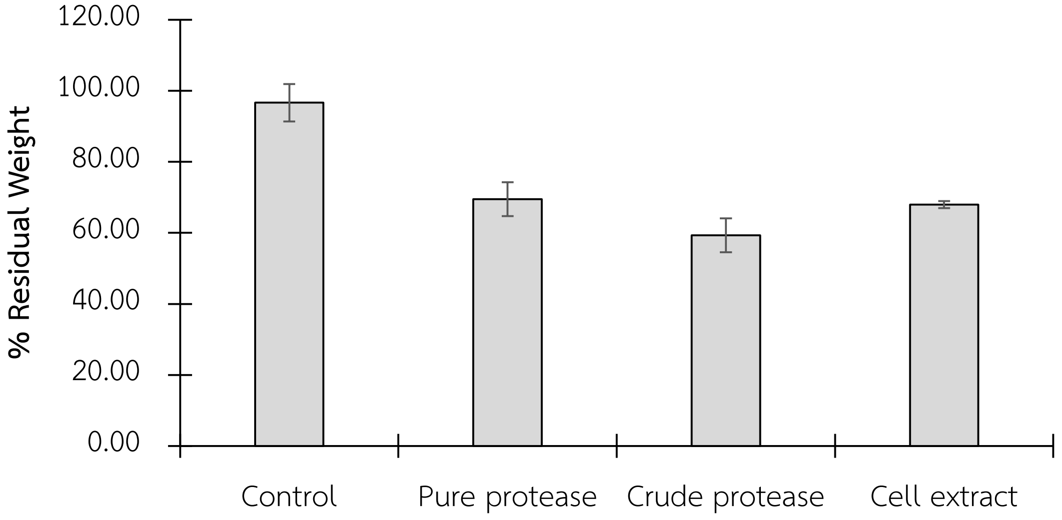
รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของขนไก่หลังบ่มด้วยโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004

รูปที่ 27 ลักษณะของขนไก่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4X

โดย A = *ขนไก่*ที่อยู่ในหลอดควบคุมเป็นระยะเวลา 5 วัน

B = ขนไก่ที่บ่มด้วยโปรติเอสจาก *F. thailandense FA004* เป็นระยะเวลา 5 วัน

ขนไก่ที่ผ่านการบ่มด้วยโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์และสารสกัดเซลล์ จาก F. thailandense FA004 เป็นระยะเวลา 5 วัน มีน้ำหนักลดไปประมาณ 30% เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม ส่วนหลอดที่เติมโปรติเอสหยาบ (crude protease) น้ำหนักของขนไก่ลดลงไปประมาณ 40% ดังแสดงในรูปที่ 28 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า ที่โปรติเอสหยาบจาก F. thailandense FA004 สามารถย่อยสลายขนไก่ได้ดีกว่าโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วอย่างมีนัยสำคัญ (Pheungphasutadol et al., 2017) อาจเป็นไปได้ว่า ในโปรติเอสหยาบประกอบไปด้วยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ รวมถึง islandisin-like และ thermitase-like S8 และเอนไซม์ที่สามารถย่อยพันธะ disulfide bonds ในโมเลกุล keratin (disulfide reductase) (Lange et al., 2016; Yamamura et al., 2002)



รูปที่ 28 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักขนไก่หลังบ่มด้วยโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004

Lee *et al.* (2015) ทดสอบกิจกรรมของเคราติเนสจากยีนของ *Fervidobacterium* islandicum AW-1 ที่โคลนให้แสดงออกใน *E.coli* BL21 โดยใช้วิธี ninhydrin ตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นตามระยะเวลาในการบ่มทำปฏิกิริยา พบว่า สารสกัดเซลล์ (WCE) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถย่อยสลายขนนกได้ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70℃, pH 8.0 และหากทำงานร่วมกับคาร์บอกซีเปปติเดสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ (FisCP) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้ได้ปริมาณของกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า

จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำโปรติเอสทนร้อนจาก *F. thailandense* FA004 มาเป็นตัวเร่งชีวภาพในการย่อยสลายวัสดุเคราติน เพื่อเพิ่มคุณค่าของเสียทางการเกษตรจากอุตสาหกรรมสัตว์ปีก ซึ่งขนนกเหล่านี้สามารถนำมาผ่านกระบวนการทางชีวภาพให้เปลี่ยนไปเป็น เปปไทด์และกรดอะมิโนหายาก เช่น โปรลีน (proline) และ เซรีน (serine) นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติของการทนต่อความร้อน (thermostability) ของโปรติเอสทนร้อนนี้ การเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงกว่า 70℃ จะเป็นการลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ต่างๆ ให้น้อยลงด้วย (Friedrich and Antranikian, 1996)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยง *F. thailandense* FA004 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 ภายใต้สภาวะ pH 7.0, อุณหภูมิ 80°C ทำให้จุลินทรีย์ผลิต extracellular protease เป็นเป็นส่วนใหญ่ หลังผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ (20-60% saturation), การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนและโครมาโทรกราฟฟีแบบเจลฟิลเตรชั่นตามลำดับ ทำให้โปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 89.27 เท่า และเหลือผลผลิตอยู่ 10.37% ค่ากิจกรรมจำเพาะของโปรติเอส เท่ากับ 54.978 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน จากการนำโปรติเอสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ไปทดสอบหากิจกรรมโปรติเอสด้วยการทำ zymogram จะปรากฏแถบกิจกรรมโปรติเอส 3 แถบ โดยส่วนใหญ่ของกิจกรรมโปรติเอส (มากกว่า 85%) อยู่ที่แถบ 67 kDa โปรติเอสทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 9.0 และอุณหภูมิ 80°C และทำงานได้ดีในช่วง pH 7.0-9.0 และอุณหภูมิ 70-90°C โดยมีความเสถียรที่พีเอช 8.0 และมีค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ที่อุณหภูมิ 70°C มากกว่า 12 ชั่วโมง จัดเป็นโปรติเอสในกลุ่มเซรีนโปรติเอส มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในด้านการสังเคราะห์สารเคมีในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ได้ พบว่า Ca^{2+} และ Mg^{2+} ที่ช่วยส่งเสริมการทำงานของโปรติเอส ในขณะที่ Cu^{2+}, Co^{2+} หรือ Zn^{2+} ขัดขวางการทำงาน จากการศึกษาจลนพลศาสตร์โปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 มีค่า K_m เท่ากับ 0.256 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} เท่ากับ 8.969 มิลลิยูนิต A_{440}/นาที และโปรติเอสจาก *F. thailandense* FA004 มีความสามารถในการย่อยสลายขนไก่ได้ ภายในระยะเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะ pH 8.0, อุณหภูมิ 80°C

ผลการวิเคราะห์ด้วยระบบชีวสารสนเทศ โดยอาศัยข้อมูลของเซรีนโปรติเอสจาก *F. thailandense* FC2004^T ทำให้คาดว่าแถบกิจกรรมโปรติเอสที่ 67 kDa เป็น fervidolysin-like peptidase S8 (WP_069293857)

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 และการเตรียมหัวเชื้อ FA004

1. อาหารสูตร 480GM5 (ดัดแปลงจาก Desulfurella medium โดย Juan Manuel Gonzalez)

ตารางที่ ก1 ส่วนประกอบหลักของอาหารสูตร 480GM5 ต่อปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมี	**หน่วย**	
Sodium chloride (NaCl)	0.5	กรัม
Ammonium chloride (NH_4Cl)	0.33	กรัม
Calcium chloride dehydrate ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$)	0.15	กรัม
Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2{\cdot}6H_2O$)	0.35	กรัม
Potassium chloride (KCl)	0.30	กรัม
Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)	0.30	กรัม
Pancreatic digest of casein	5.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
**A5 solution	1.0	มิลลิลิตร

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 0.2% (w/v) resazurin ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น redox indicator แล้วปรับ pH ของอาหารเป็น 7.0-7.2 นำไปต้มบน hotplate stirrer จนอาหารเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู แบ่งอาหารใส่ขวดซีรั่ม (serum bottle) แล้วเติม 25% (w/v) Na2S เล็กน้อยในแต่ละขวด นำขวดซีรั่มไปให้ความร้อนจนอาหารเริ่มเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลือง แล้วไล่ออกซิเจนที่เหลือในอาหารออกโดยพ่นไล่ (flush) ด้วยก๊าซไนโตรเจน (N_2) รีบปิดปากขวดซีรั่มด้วยจุกยางบิวทิว (rubber butyl stopper) และปิดครอบด้วยฝาอะลูมิเนียม (aluminum seal) นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

<u>**คำแนะนำ**</u> ในขั้นตอนระหว่างการเตรียมอาหาร ตัวขวดซีรั่มที่บรรจุอาหารจะมีความร้อนสูงเพื่อช่วยในการไล่ออกซิเจนออกจากอาหาร ซึ่งเป็นอันตรายอย่างมากหากสัมผัสโดยตรง ควรใส่ถุงมือป้องกันความร้อนทุกครั้ง

2. A5 solution

ตารางที่ ก2 ส่วนประกอบของ A5 solution ต่อปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมี	**กรัม**
Cobalt(II) nitrate hexahydrate ($Co(NO_3)_2{\cdot}6H_2O$)	0.00494
Copper(II) Sulfate Pentahydrate ($CuSO_4{\cdot}5H_2O$)	0.0079
Boric acid (H_3BO_3)	0.286
Manganese(II) Chloride Tetrahydrate ($MnCl_2{\cdot}4H_2O$)	0.181
Sodium molybdate dihydrate ($Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$)	0.039
Zinc Sulfate Heptahydrate ($ZnSO_4{\cdot}7H_2O$)	0.0222

ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3. การเตรียมหัวเชื้อ *F. thailandense* FA004

นำเชื้อจากขวดสต๊อกเชื้อเก่ามากระตุ้น โดยใช้เข็มฉีดยาแทงผ่านจุกยางแล้วดูดเชื้อจากขวดเก่า มาฉีดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 ขวดใหม่ ฉีดเชื้อเข้าไป 0.1% (v/v) ของปริมาตรขวดใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อได้ โดยดูจากความขุ่นของอาหาร จากนั้นสามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรติเอสได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีในการทดลอง

1. สารละลายบัฟเฟอร์

- 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0

ชั่ง Tris-base 0.6057 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 450 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ด้วย 0.1 M HCl ให้เป็น 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 500 มิลลิลิตร

2. สารละลายตัวชะสำหรับ ion exchange chromatography

ชั่ง sodium chloride (NaCl) 1.4611, 2.9221, 5.8442 และ 14.6105 กรัม (สำหรับการเตรียมสารละลายตัวชะที่ความเข้มข้นเกลือ 0.1, 0.2, 0.4 และ 1.0 M ตามลำดับ) ละลายด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ปริมาตร 200 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ตัวเดิมให้ได้ปริมาตรสุทธิ 250 มิลลิลิตร

3. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

- 0.3% (w/v) azocasein

ชั่ง azocasein 0.3 กรัม ละลายใน 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร

- 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)

ชั่ง trichloroacetic acid 10 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร

- 2 M Sodium Hydroxide (NaOH)

ชั่ง sodium hydroxide 20 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 250 มิลลิลิตร

4. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

- Bradford reagent

ชั่ง Comassie Blue G-250 0.025 กรัม ละลายใน 95% ethanol ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านสำลี แล้วเติม 85% *otho*-phosphoric acid (H_3PO_4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ใช้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์หลังจากเตรียม

- 2 mg/ml Bovine serum albumin (BSA)

ชั่ง BSA 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

5. สารละลายสำหรับการทำ electrophoresis

- 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8

ชั่ง Tris-base 6.06 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วย HCl เข้มข้น ให้มีค่าเป็น 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร

- 1.5 M Tris-HCl buffer,pH 8.8

ชั่ง Tris-base 18.17 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วย HCl เข้มข้น ให้มีค่าเป็น 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร

- 10% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS)

ชั่ง SDS 5.0 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 50 มิลลิลิตร

- 10% (w/v) Ammonium persulfate

ชั่ง ammonium persulfate 0.05 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 0.5 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

- Staining solution

ชั่ง Coomassie brilliant blue R-250 ปริมาณ 0.5 กรัม ละลายใน methanol 200 มิลลิลิตร แล้วเติม acetic acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 500 มิลลิลิตร

- Destining solution

ผสม methanol 200 มิลลิลิตร กับ acetic acid 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 1,000 มิลลิลิตร

- SDS Reducing Buffer

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.0	มิลลิลิตร
Glycerol	0.8	มิลลิลิตร
10% (w/v) SDS	1.6	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	0.4	มิลลิลิตร
0.05% (w/v) Bromophenol blue	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.0	มิลลิลิตร

- SDS-PAGE Running Buffer

Tris-base	3.02	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
SDS	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ก่อนที่จะเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ให้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ SDS-PAGE Running Buffer ด้วย 6N NaOH ให้มีค่าเป็น 8.3 ก่อน

6. สารละลายสำหรับการวิเคราะห์ zymogram

- 2% (w/v) casein

ชั่ง casein 5 กรัม ละลายใน 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปกวนให้ความร้อนบน hotplate stirrer จนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บใส่ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C

- 2.5% (v/v) Triton X-100

ดูด Triton X-100 ปริมาตร 6.25 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร

7. สารละลายสำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์โปรติเอส

- 50 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride

ชั่ง Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma Aldrich, M.W. 174.19) 0.0871 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM Iodoacetic acid

ชั่ง Iodoacetic acid (IA) (Sigma Aldrich, M.W. 184.19) 0.0921 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM Ethylenediaminetetraacetic acid

ชั่ง Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma Aldrich, M.W. 292.24) 0.1461 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM beta-Mercaptoethanol

ดูด beta-Mercaptoethanol (BME) (ACROS ORGANICS, M.W. 78.13) 35 ไมโครลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM Ca^{2+}

ชั่ง Calcium chloride dehydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Riedel-deHaën, M.W. 147.01) 0.0735 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM Co^{2+}

ชั่ง Cobalt (II) chloride hexahydrate ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) (Ajax Finechem, M.W. 237.93) 0.1190 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM Cu^{2+}

ชั่ง Copper (II) chloride dihydrate ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) (Riedel-deHaën, M.W. 63.546) 0.0852 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM Mg^{2+}

ชั่ง Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Fluka, M.W. 203.31) 0.1017 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM Fe^{2+}

ชั่ง Iron (II) chloride hexahydrate ($FeCl_2 \cdot 6H_2O$) (Sigma Aldrich, M.W. 198.81) 0.0994 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 50 mM Zn^{2+}

ชั่ง Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, M.W. 287.54) 0.1438 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 10% (w/v) SDS

ชั่ง Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Sigma Aldrich, M.W. 288.38) 1 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 10% (w/v) CTAB

ชั่ง Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (AMRESCO, M.W. 364.46) มา 1 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 10% (v/v) Titon X-100

ดูด Polyethylene glycol *tert*-octylphenyl ether (Titon X-100) (AMRESCO, M.W. 647) มา 1 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 10% (v/v) Isopropanol

ดูด Isopropanol (FLUKA) มา 1 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 10% (v/v) Acetone

ดูด Acetone (RCL Labscan) มา 1 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 10% (v/v) Ethanol

ดูด Ethanol (RCL Labscan) มา 1 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 10% (v/v) Acetonitrile

ดูด Acetonitrile (RCL Labscan) มา 1 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

- 10% (v/v) DMSO

ดูด Dimethyl sulfoxide (RCL Labscan) มา 1 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ค

การคำนวณค่ากิจกรรมของโปรติเอส

ตัวอย่าง การคำนวณหาค่าโปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 หลังการเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ค่าการตรวจวัด A_{440} จากตารางภาคผนวก ฉ

จากสมการ กิจกรรมของโปรติเอส 1 ยูนิต = $\frac{(A_{RM}-A_{EB}-A_{SB}) * Dilution * V_R}{T * V_E * V_{CD}}$

$$= \frac{(0.263-0.103-0.055) * 0.3 * 0.75 \ \text{(ml)}}{60 \ (min) * 0.15 \ (ml) * 0.25 \ \text{(ml)}}$$

$$= \frac{0.0236}{2.25 \ (min * ml)}$$

$$= \frac{0.0105}{(min * ml)}$$

กำหนดให้กิจกรรมของโปรติเอส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm เพิ่มขึ้น 1.0 หน่วย ในระยะเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 80°C

ดังนั้น กิจกรรมของโปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 480GM5 หลังการเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า 0.0105 ยูนิต/มิลลิลิตร

เมื่อ A_{RM}= ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ของหลอด Reaction mixture

A_{EB}= ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ของหลอด Enzyme blank

A_{SB}= ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm ของหลอด Substrate blank

T = เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (นาที) มีค่าเท่ากับ 60 นาที

V_E = ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

V_R = ปริมาตรทั้งหมดของการทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

V_{CD}= ปริมาตรของสารที่ใช้ในการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ง
การหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

ตัวอย่าง การคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่ตกตะกอน $(NH_4)_2SO_4$ ที่ % อิ่มตัว 20-60% โดยใช้ค่าการตรวจวัด A_{595} จากตารางที่ ภาคผนวก ฉ

วิธีทำ นำตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Bradford reagent ปริมาตร 2.5 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานแล้วคำนวณเป็นความเข้มข้นโปรตีน

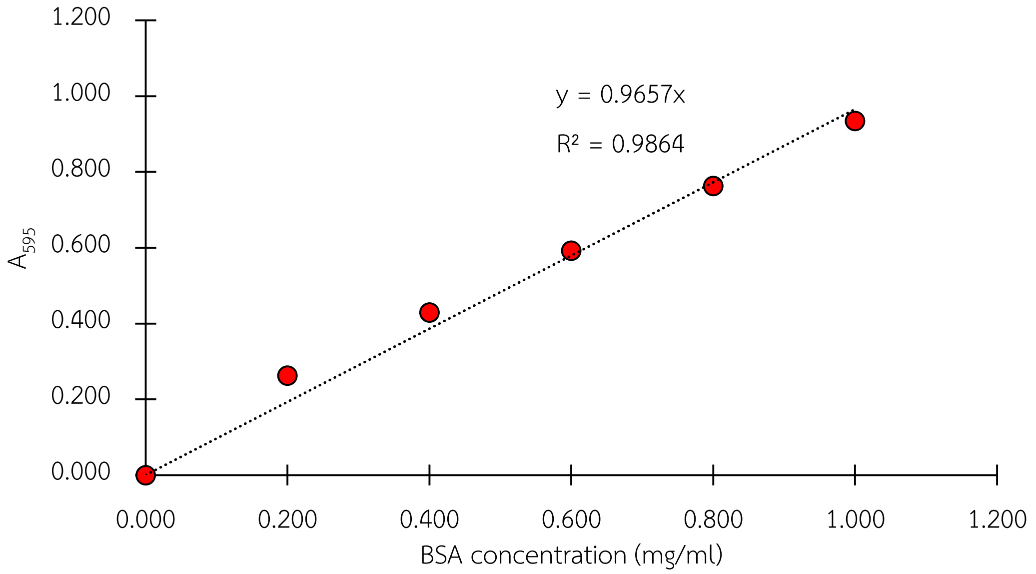
โปรตีนที่ตกด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่ % อิ่มตัว 20-60% ($P_{20\text{-}60}$) ให้ค่า A_{595} = 0.204

แทนค่า A_{595} = 0.204 ลงในค่า Y ของสมการกราฟ Y = 0.9657X

$$0.204 = 0.9657X$$

$$X = 0.211 \text{ mg/ml}$$

ดังนั้น โปรตีนที่ตกด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่ % อิ่มตัว 20-60% ($P_{20\text{-}60}$) มีความเข้มข้นโปรตีนอยู่ 0.211 mg/ml

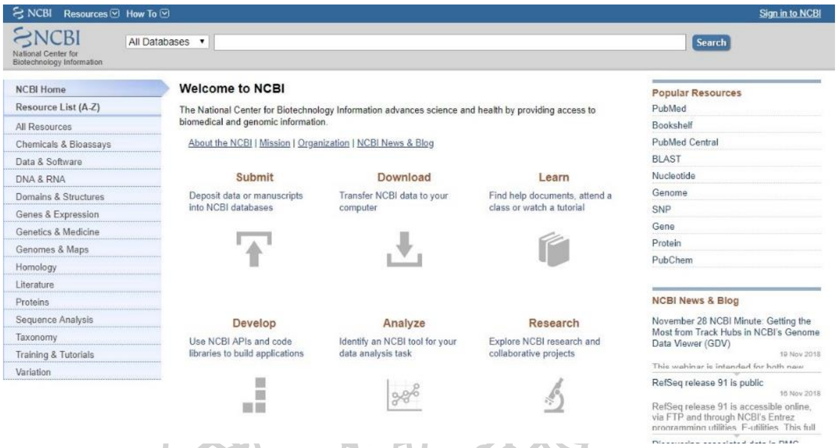


รูปที่ ง1. กราฟโปรตีนมาตรฐาน

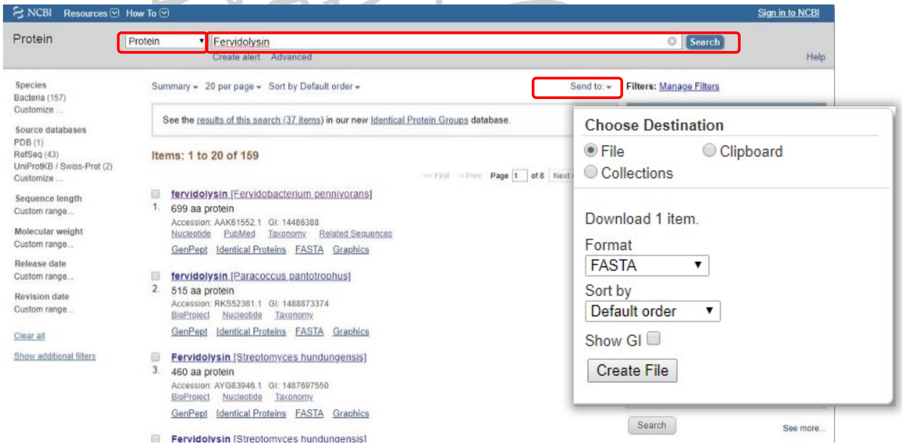
ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ

1. การเตรียมข้อมูล protein sequence

เปิด browser แล้วไปที่ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/



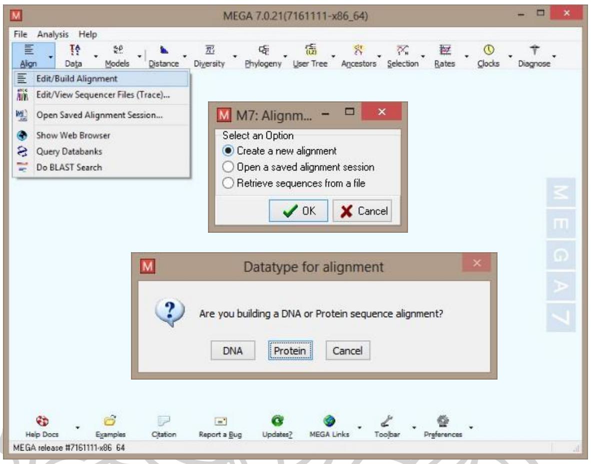
พิมพ์ข้อมูลที่ต้องการค้นหาและจำกัดขอบเขตการค้นหาเฉพาะในฐานข้อมูล Protein



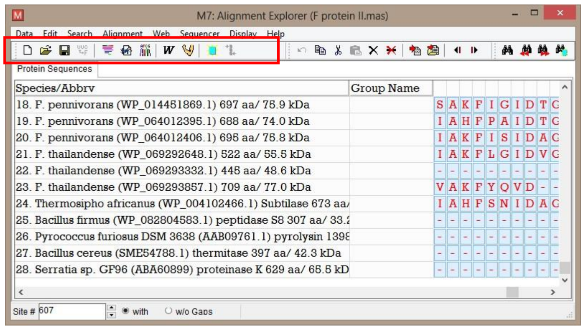
เลือกข้อมูลที่ต้องการบันทึกโดย กดช่องทำเครื่องหมาย select ข้อมูลที่สนใจไว้ (ปุ่มขาวเล็กๆหน้าชื่อข้อมูล) แล้วกดไปที่ Send to แล้วเลือกค่าต่างๆ ตามรูปด้านล่างจากนั้นกด Create File แล้วเลือกตำแหน่งในการบันทึกข้อมูล

2. การสร้าง phylogenetic tree ด้วยซอฟแวร์ MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016)

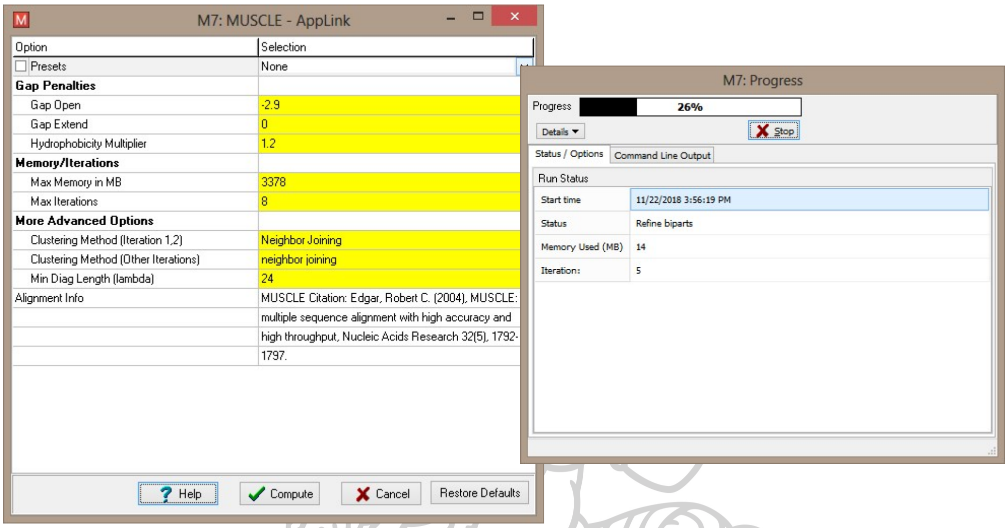
เปิดโปรแกรม MEGA 7 ขึ้นมา จะปรากฏหน้าต่างหลักขึ้นมา เลือก Align > Edit/Build Alignment จะปรากฏหน้าต่าง M7: Alignm... ขึ้นมา ให้เลือก Create a new aliment (สำหรับการทำครั้งแรก) แล้วกด OK จากนั้นจะปรากฏหน้าต่าง Datatype for alignment ให้เลือกคลิกปุ่ม Protein



จะปรากฏหน้าต่าง M7: Alignment Explorer จากนั้นให้เปิดไฟล์ .fasta ที่เก็บ protein sequence ที่ต้องการวิเคราะห์ทั้งหมดขึ้นมา เมื่อนำ protein sequence ที่ต้องการสร้าง phylogenetic tree ขึ้นมาหมดแล้ว ให้เลือกคำสั่ง Alignment > Align by MUSCLE จากนั้นจะปรากฏหน้าต่าง M7: MUSCLE - App Link ขึ้นมา

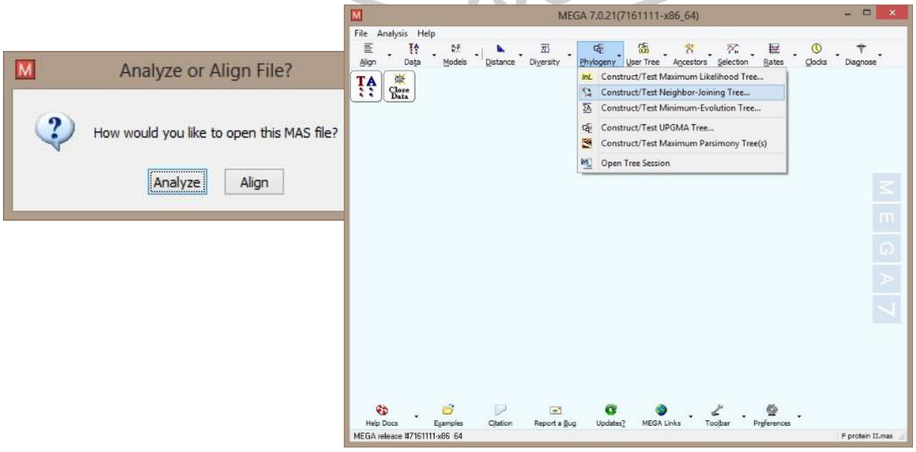


กำหนดค่าตัวเลือกต่างๆ ตามที่ต้องการ (ปกติใช้ค่าที่โปรแกรมกำหนดมาให้) แล้วคลิกปุ่ม Compute โปรแกรมจะขึ้นหน้า M7: Progress ขึ้นมารอจนกระทั่งโปรแกรมวิเคราะห์เสร็จ protein sequence ทั้งหมดจะถูกจัดเรียงใหม่ ให้ทำการ save ข้อมูลที่ได้เก็บไว้โดยไปที่หน้าต่าง M7: Alignment Explorer > Data > Save Session > เลือกตำแหน่งบันทึกข้อมูล โดยไฟล์ที่ได้จะเป็นสกุล Aln session (*.mas)



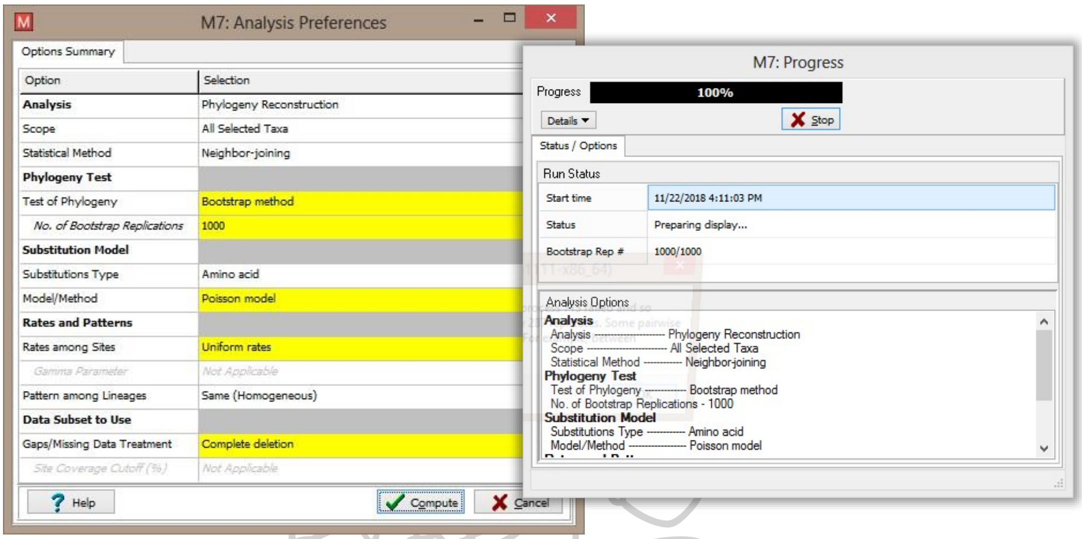
มหาวิทยาลัยศิลปากร

เมื่อได้ไฟล์ .mas แล้วให้กลับไปที่หน้าต่างหลัก เปิดไฟล์ .mas ที่สร้างไว้ขึ้นมา โดยไปที่ File > Open a File/Session... > ไฟล์ที่เตรียมไว้ โปรแกรมจะขึ้นหน้าต่างถามอีกครั้งว่า Analyze or Align File? ให้เลือก Analyze จากนั้นไปที่คำสั่ง Phylogeny > Construct/Test Neighbor-

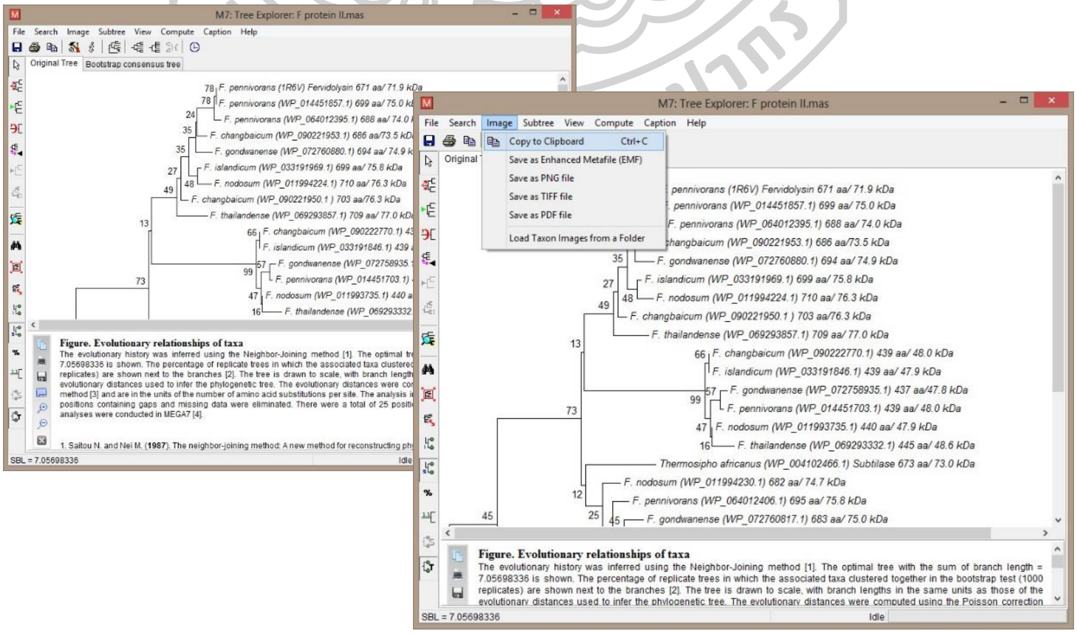


Joining Tree...

โปรแกรมจะปรากฏหน้าต่าง M7: Analysis Preferences มาให้ กำหนดค่าตัวเลือกต่างๆ ตามที่ต้องการ (ปกติใช้ค่าที่โปรแกรมกำหนดมาให้) แล้วคลิกปุ่ม Compute โปรแกรมจะขึ้นหน้า M7: Progress ขึ้นมารอจนกระทั่งโปรแกรมวิเคราะห์เสร็จ โปรแกรมก็จะปรากฏหน้าต่าง M7: Tree Explorer: *ชื่อไฟล์งานที่ใช้สร้าง Tree* โดยในหน้าต่างนี้จะแสดง phylogenetic tree ที่สร้างได้เอาไว้

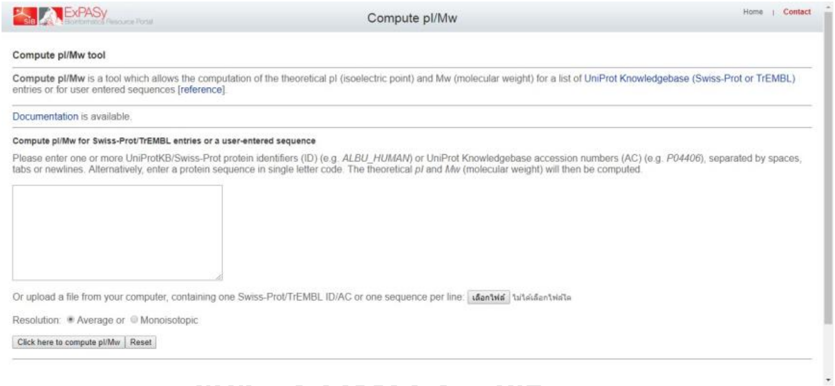


ทำการ save ไฟล์เก็บไว้ (*.mts) หรือ นำภาพออกไปใช้งาน โดยไปที่คำสั่ง Image > Copy to Clipart แล้วนำไปวางไว้ในเอกสารที่ต้องการใช้งาน



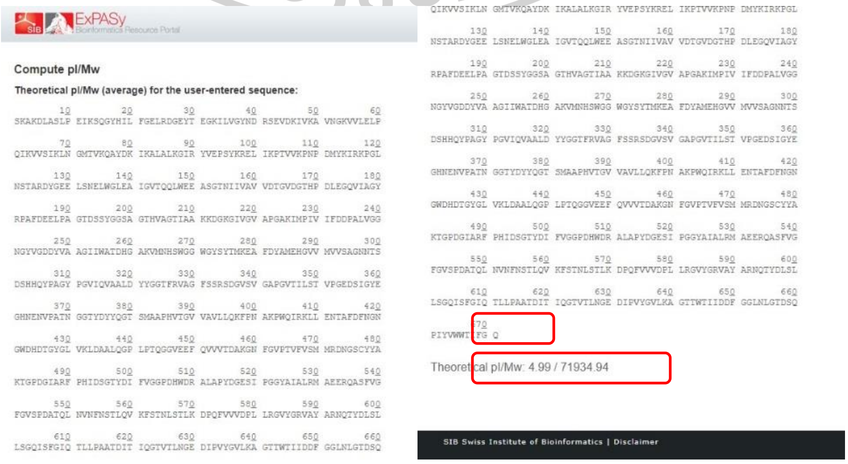
3. การคาดการน้ำหนักโมเลกุลโปรตีน (Wilkins *et al.*, 1999)

เปิด browser แล้วไปที่ https://web.expasy.org/compute_pi/



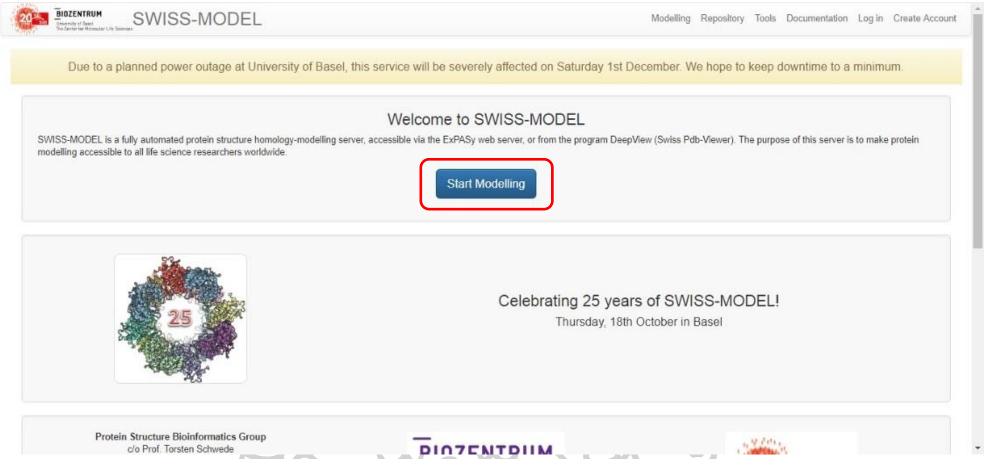
ป้อนข้อมูล protein sequence ในรูปแบบ Fasta ลงในช่องว่าง แล้วกด Click here to compute pI/Mw

ระบบจะวิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผล เป็นจำนวนกรดอะมิโน ค่า pI และน้ำหนักโมเลกุล

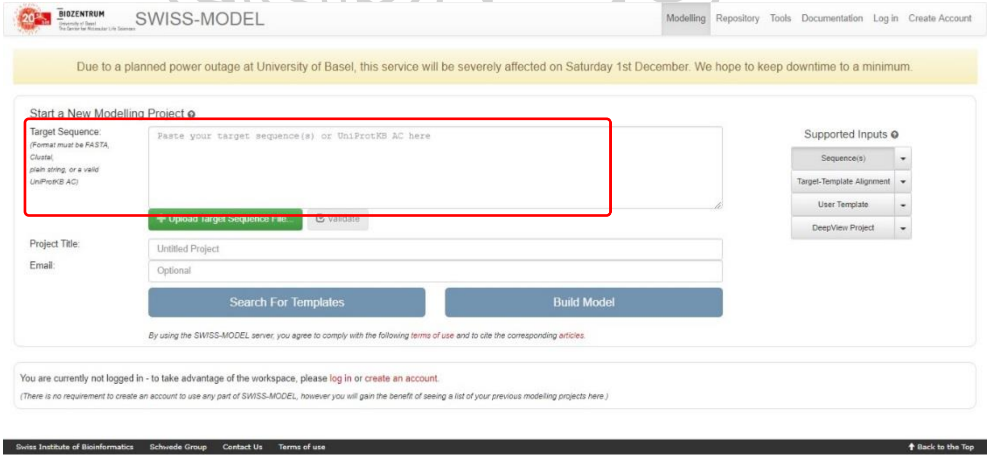


4. การสร้าง 3D-structure บนเว็บไซต์ SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018)

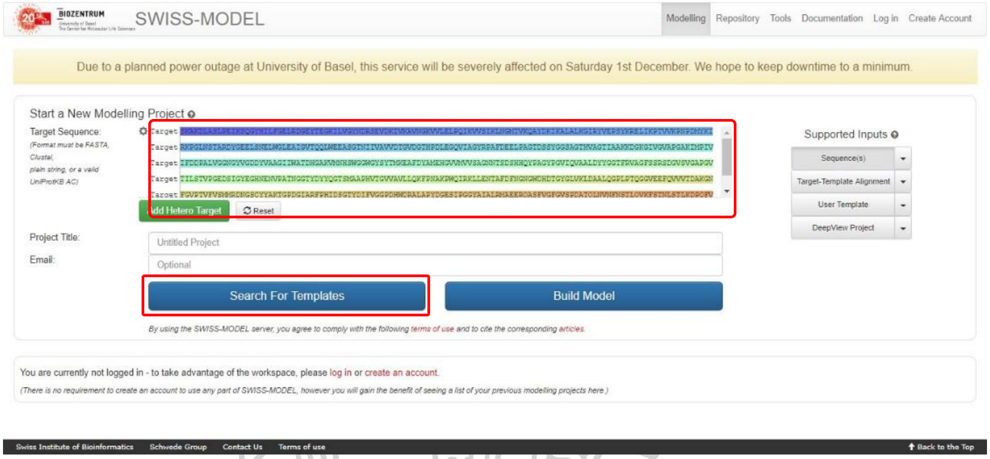
เปิด browser แล้วไปที่ https://swissmodel.expasy.org/ คลิกปุ่ม Start Modelling



ป้อนข้อมูล protein sequence ในรูปแบบ Fasta ลงในช่อง Target Sequence

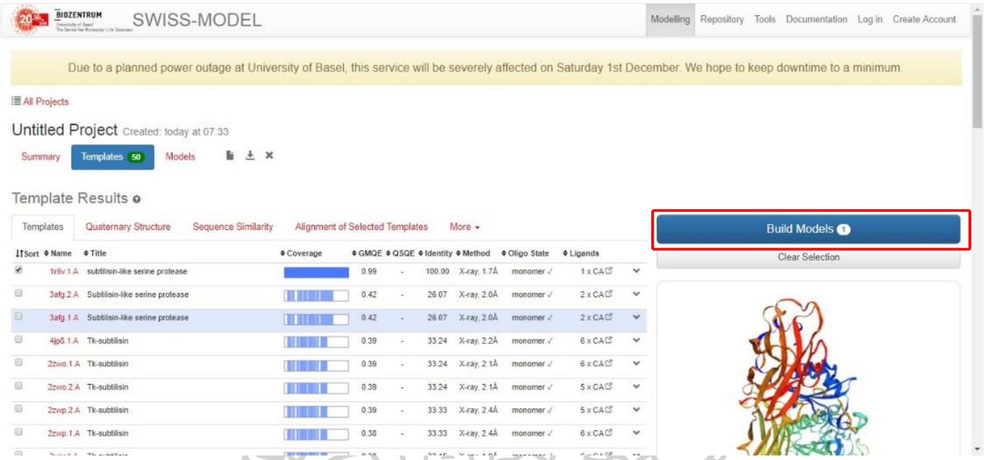


หากข้อมูลมีรูปแบบที่ถูกต้องและสามารถใช้ได้ ระบบจะแสดงพื้นหลังของ protein sequence เป็นสีรุ้งจากสีน้ำเงินไปสีแดง จากนั้นคลิกปุ่ม Search For Templates เพื่อหาโมเดลต้นแบบ (template) ในการสร้าง 3D-structure ที่เหมาะสม

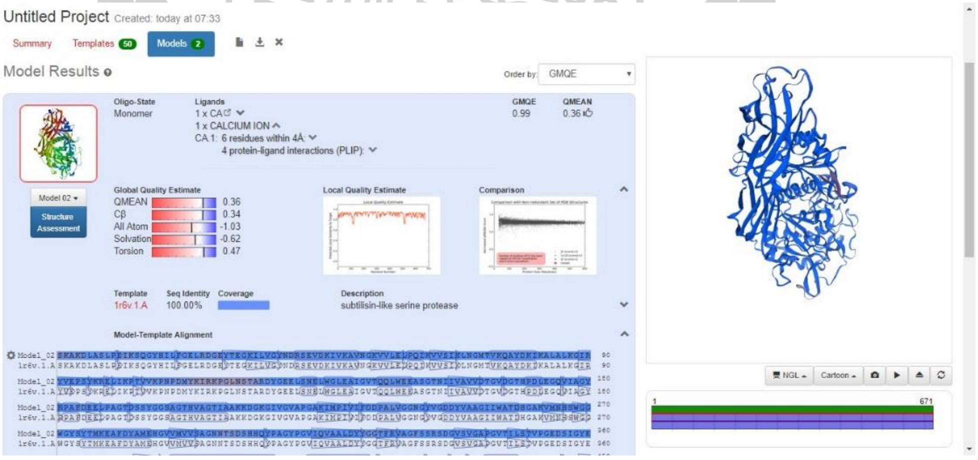


ระบบจะใช้เวลาในการสืบหา template เหมาะสมสักระยะ สังเกตได้จากการวิ่งเป็นลูกคลื่นของ protein sequence

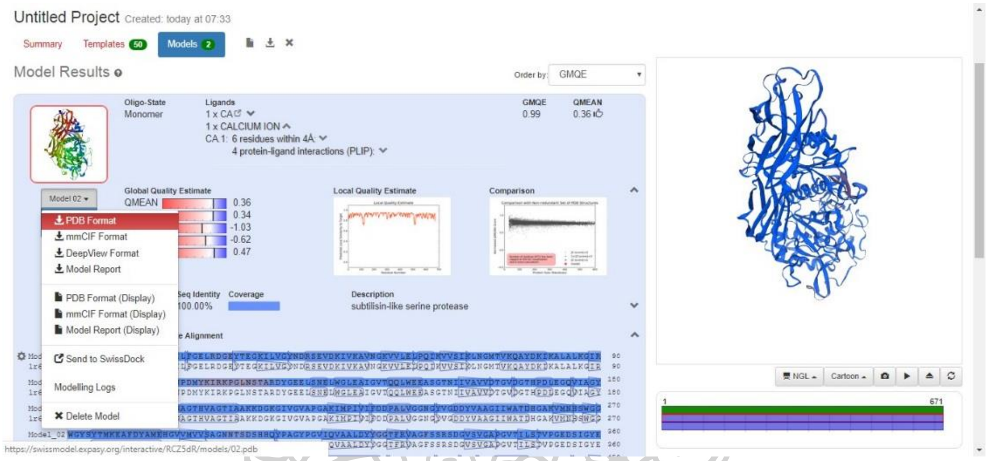
เมื่อระบบสืบหา template เสร็จแล้ว จะมี template ให้เลือกใช้อยู่มาก พิจารณาเลือกใช้ โดยดูที่ Coverage ควรจะมีสีน้ำเงินมากที่สุด และ Identity ควรจะมีค่ามากที่สุด แล้วคลิกปุ่ม Build Models เพื่อสร้างโมเดลจาก template ที่เลือกใช้



ระบบจะแสดง 3D-structure ข้อมูลเทียบของ protein sequence กับ template ที่เลือกใช้และค่าต่างๆ

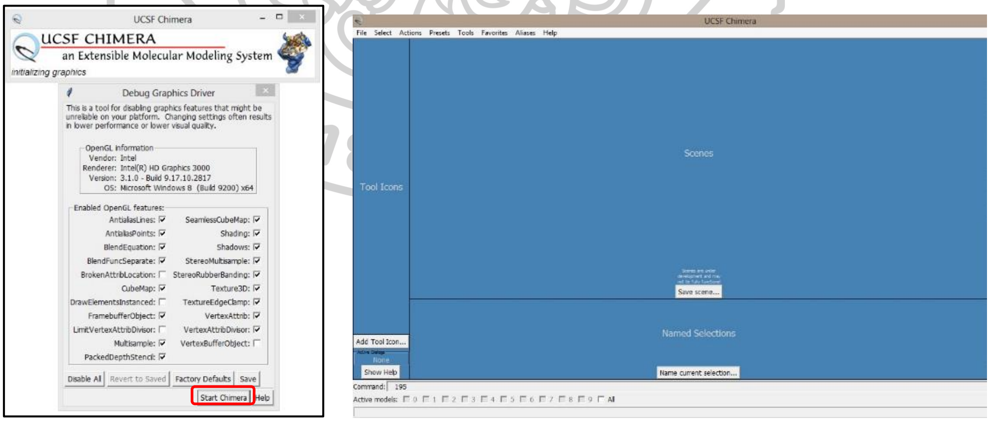


ให้เลือกโมเดลที่ต้องการและกดบันทึก 3D-structure เก็บไว้ โดยคลิกที่กล่องใต้รูปโมเดล เลือกเป็น PDB format แล้วบันทึกชื่อไฟล์และตำแหน่งการจัดเก็บข้อมูลตามที่ต้องการ

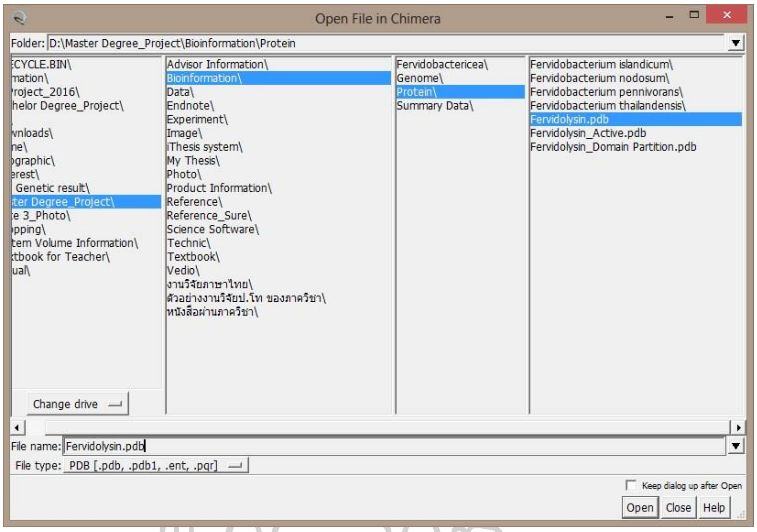


4. การจัดการรูปภาพ 3D-Structure ผ่านซอฟแวร์ Chimera (Pettersen *et al.*, 2004)

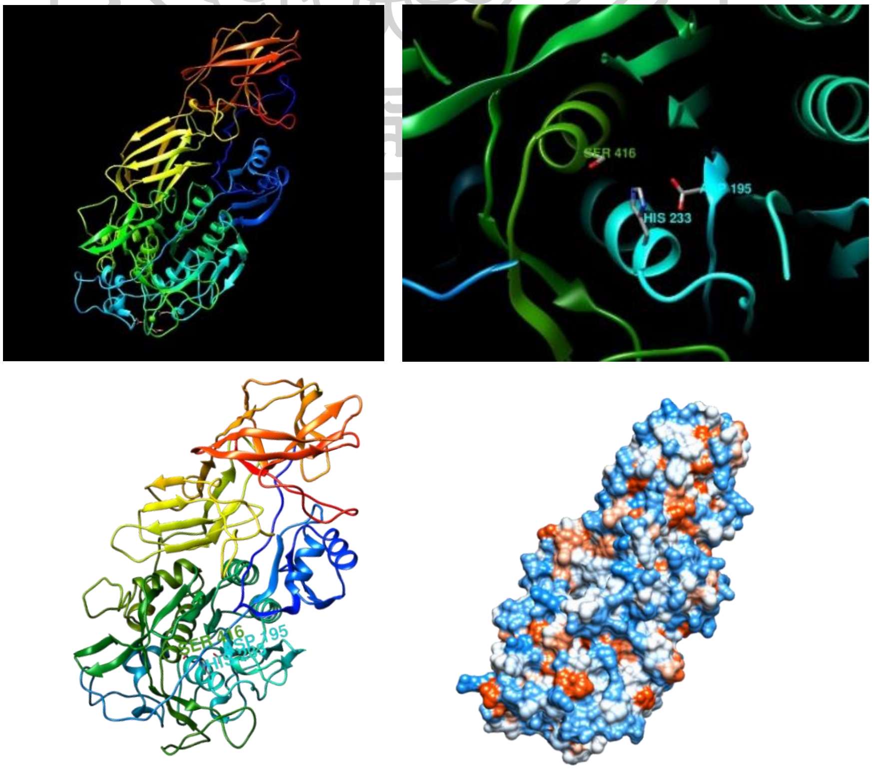
เปิดโปรแกรม Chimera ขึ้นมา แล้วกด Start Chimera แล้วจะปรากฏหน้าต่างสีฟ้าขึ้นมา



เลือกคำสั่ง File > Open... >>> ตำแหน่งของไฟล์ .pdb ที่ต้องการใช้งาน



จัดรูปแบบของ 3D-structure ตามต้องการ เช่น การแสดงหมู่ฟังก์ชั่นของอะมิโนบางตำแหน่ง การแสดงสีของสายโปรตีน การปรับแต่ง secondary structure ในสายโปรตีน โดยสามารถดูเทคนิคการวิเคราะห์และการจัดการภาพ ได้ที่ https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/tutorials.html



รายการอ้างอิง

Andrews, K. T. and Patel, B. K. C. (1996). *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a New Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from Nonvolcanically Heated Geothermal Waters of the Great Artesian Basin of Australia. *International journal of systematic bacteriology, 46*(1), 265-269.

Azlina, I. N. and Norazila, Y. (2013). Thermostable Alkaline Serine Protease from Thermophilic *Bacillus* Species. *International Research Journal of Biological Sciences 2*(2), 29-33.

Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W. and Soni, R. (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry, 35*, 213–219.

Bhandari, V. and Gupta, R. S. (2014). Molecular signatures for the phylum (class) Thermotogae and a proposal for its division into three orders (*Thermotogales*, *Kosmotogales* ord. nov. and *Petrotogales* ord. nov.) containing four families (*Thermotogaceae*, *Fervidobacteriaceae* fam. nov., *Kosmotogaceae* fam. nov. and *Petrotogaceae* fam. nov.) and a new genus *Pseudothermotoga* gen. nov. with five new combinations. *Antonie van Leeuwenhoek, 105*(1), 143-168.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry, 72*, 248-254.

Cai, J., Wang, Y., Liu, D., Zeng, Y., Xue, Y., Ma, Y. and Feng, Y. (2007). *Fervidobacterium changbaicum* sp. nov., a novel thermophilic anaerobic bacterium isolated from a hot spring of the Changbai Mountains, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 57*(10), 2333-2336.

Endo, S. (1962). Studies on protease produced by thermophilic bacteria. *Journal of Fermentation Technology, 40*, 346-353.

Friedrich, A. B. and Antranikian, G. (1996). Keratin Degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a Novel Thermophilic Anaerobic Species of the Order Thermotogales. *Applied and environmental microbiology, 62*(8), 2875–2882.

Frock, A. D. and Kelly, R. M. (2012). Extreme Thermophiles: Moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Current opinion in chemical engineering, 1*(4), 363-372.

Garcia-Carreno, F. L. (1992). Protease inhibition in therory and practice. *Biotechnology Education, 3*(4), 145-150.

Garcia-Carreno, F. L., Dimes, L. E. and Haard, N. F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical biochemistry, 214*(1), 65-69.

Godde, C., Sahm, K., Brouns, S. J., Kluskens, L. D., van der Oost, J., de Vos, W. M. and Antranikian, G. (2005). Cloning and expression of islandisin, a new thermostable subtilisin from *Fervidobacterium islandicum*, in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology, 71*(7), 3951-3958.

Gomes, J. and Steiner, W. (2004). The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnology, 42*(4), 223–235.

Gupta, R., Tiwary, E., Sharma, R., Rajput, R. and Nair, N. (2013). Microbial Keratinases: Diversity and Applications. In T. Satyanarayana, J. Littlechild, & Y. Kawarabayasi (Eds.), *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles* (pp. 881-904). Dordrecht: Springer Netherlands.

Haki, G. and Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology, 89*(1), 17-34.

Huber, R. and Hannig, M. (2006). Thermotogales *Prokaryotes* (Vol. 7, pp. 899–922). New York: Springer.

Huber, R., Woese, C. R., Langworthy, T. A., Kristjansson, J. K. and Stetter, K. O. (1990). *Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the "*Thermotogales*". *Archives of Microbiology, 154*(2), 105-111.

Intagun, W. and Kanoksilapatham, W. (2017). A Review Biodegradation and Applications of Keratin Degrading Microorganisms and Keratinolytic Enzymes. *American Journal of Applied Sciences, 14*(11), 1016-1023.

IntEnz. (2010). EC 3.4.25.2 - HslU—HslV peptidase. Retrieved from https://www.ebi.ac.uk/intenz/query?cmd=SearchEC&ec=3.4.25.2

Itoh, T., Onishi, M., Kato, S., Iino, T., Sakamoto, M., Kudo, T., Takashina, T. and Ohkuma,

M. (2016). *Athalassotoga saccharophila* gen. nov., sp. nov., isolated from an acidic terrestrial hot spring, and proposal of *Mesoaciditogales* ord. nov. and *Mesoaciditogaceae* fam. nov. in the phylum *Thermotogae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66*(2), 1045-1051.

Kanoksilapatham, W., Pasomsup, P., Keawram, P., Cuecas, A., Portillo, M. C. and Gonzalez, J. M. (2016). Fervidobacterium thailandense sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66*, 1-6.

Keawram, P. and Kanoksilapatham, W. (2013a). Diversity of hyperthermophilic bacteria belonging to Order Thermotogales thriving in three hot springs in Thailand: Resources of genes encoding thermostable enzymes. *Silpakorn University Science and Technology Journal, 7*(2), 17-28.

Keawram, P. and Kanoksilapatham, W. (2013b). Growth kenetics and t-RNA fingerprints of seven hyperthermophilic bacteria belonging to order Thermotogales, isolated from three hot springs in Thailand. *Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Bangkok, Thailand*(October 16-19, 2013), 154-162.

Keawram, P., Pongsapukdee, V. and Kanoksilapatham, W. (2016). Isolation of *Thermotoga* spp. and *Fervidobacterium* spp., and characterization of 16S rRNA genes of Order Thermotogales: Unique lineage of hyperthermophiles thriving in 3 hot springs in Thailand. *Silpakorn University Science and Technology Journal, 10*(1), 9-20.

Kim, J.-S., Kluskens, L. D., de Vos, W. M., Huber, R. and van der Oost, J. (2004). Crystal Structure of Fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a Keratinolytic Enzyme Related to Subtilisin. *Journal of Molecular Biology, 335*(3), 787-797.

Kluskens, L. D., Voorhorst, W. G., Siezen, R. J., Schwerdtfeger, R. M., Antranikian, G., van der Oost, J. and de Vos, W. M. (2002). Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*. *Extremophiles : life under extreme conditions, 6*(3), 185-194.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics

Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol, 33*(7), 1870-1874.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227*(5259), 680-685.

Lange, L., Huang, Y. and Busk, P. K. (2016). Microbial decomposition of keratin in nature-a new hypothesis of industrial relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology, 100*(5), 2083-2096.

Lee, Y. J., Dhanasingh, I., Ahn, J. S., Jin, H. S., Choi, J. M., Lee, S. H. and Lee, D. W. (2015). Biochemical and structural characterization of a keratin-degrading M32 carboxypeptidase from *Fervidobacterium islandicum* AW-1. *Biochemical and biophysical research communications, 468*(4), 927-933.

Moss, G. P. (2018). Peptidase Nomenclature. *Enzyme Nomenclature.* Retrieved from http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/

Mukherjee, J. and Gupta, M. N. (2015). Increasing importance of protein flexibility in designing biocatalytic processes. *Biotechnol Rep (Amst), 6*, 119-123.

Nam, G. W., Lee, D. W., Lee, H. S., Lee, N. J., Kim, B. C., Choe, E. A., Hwang, J. K., Suhartono, M. T. and Pyun, Y. R. (2002). Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of microbiology, 178*(6), 538-547.

Patel, B. K. C., Morgan, H. W. and Daniel, R. M. (1985). *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology, 141*(1), 63-69.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem, 25*(13), 1605-1612.

Pheungphasutadol, N., Ritthitham, S., Kanoksilapatham, W. and Leiwseree, P. (2017, November 23-25, 2017). *Purification and characterization of thermostable karatinolytic protease from Fervidobacterium sp. strain FA004 isolated in Thailand.* Paper presented at the The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand.

Podosokorskaya, O. A., Merkel, A. Y., Kolganova, T. V., Chernyh, N. A., Miroshnichenko,

M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A. and Kublanov, I. V. (2011). *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 61*(11), 2697-2701.

Prosite. (2013). Proteasome alpha-type subunit signature and profile. Retrieved from https://prosite.expasy.org/PDOC00326

Rahman, R. N. Z. A., Razak, C. N., Ampon, K., Basri, M., Zin, W. M., Yunus, W. and Salleh, A. B. (1994). Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Applied Microbiology and Biotechnology, 40*(6), 822-827.

Rawlings, N. D., Barrett, A. J. and Finn, R. (2017). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research, 44*(Database issue), D343–D350.

Reysenbach, A. L., Liu, Y., Lindgren, A. R., Wagner, I. D., Sislak, C. D., Mets, A. and Schouten, S. (2013). *Mesoaciditoga lauensis* gen. nov., sp. nov., a moderately thermoacidophilic member of the order Thermotogales from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 63*(Pt 12), 4724-4729.

Romruen, U., Gonzalez, J. M. and Kanoksilapatham, W. (2016, November 28-30). *Identification of a Putative Keratinase Gene and Analysis of a Peptidase S8 Family from a Hyperthermophilic Isolate, Fervidobacterium sp. Strain FC2004 in Thailand.* Paper presented at the The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Sinha, R. and Khare, S. K. (2013). Thermostable Proteases. In T. Satyanarayana, J. Littlechild, & Y. Kawarabayasi (Eds.), *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles* (pp. 859-880). Dordrecht: Springer Netherlands.

Vieille, C. and Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 65*(1), 1-43.

Wandersman, C. (1989). Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Molecular Microbiology, 3*(12), 1825-1831.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. and Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res, 46*(W1), W296-W303.

Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D. and Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol, 112*, 531-552.

Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K. and Tamiya, E. (2002). Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochemical and biophysical research communications, 294*(5), 1138-1143.

นวรัตน์ ชำนาญกลาง and แสงตะวัน บุญพูล. (2556). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสและการย่อยสลายขนไก่ของ *Fervidobacterium sp.* สายพันธุ์ *FA004.* (จุลนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต), ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พรเทพ ทรงนิพิฐกุล and ระวิวรรณ ใจรักษ์. (2557). การศึกษาเบื้องต้นในการแยกบริสุทธิ์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium sp.* สายพันธุ์ *FA004.* (จุลนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต), ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พรสุดา คลายานนท์ and ระวีวรรณ เขียวขำ. (2555). การศึกษากิจกรรมโปรติเอสในอาหารเหลวของแบคทีเรียชอบร้อนสูง สายพันธุ์ *FA004* ใน *order Thermotogales* ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนฝาง. (จุลนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต), ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

วิโรจน์ กนกศิลปธรรม. (2558). จุลินทรีย์ขอบร้อนสูงและเทคนิคการเพาะเลี้ยง (Vol. 2). นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายณัฐวุฒิ พึ่งพสุธาดล
วัน เดือน ปี เกิด	18 กุมภาพันธ์ 2536
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลระนอง ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	
ที่อยู่ปัจจุบัน	599/46 หมู่ 3 หมู่บ้านทักษิณธานี ต.บางนอน อ.เมืองระนอง จ.ระนอง 85000
ผลงานตีพิมพ์	Pheungphasutadol, N., Ritthitham, S., Kanoksilapatham, W. and Leiwseree, P. Purification and characterization of thermostable karatinolytic protease from Fervidobacterium sp. strain FA004 isolated in Thailand. Proceedings of the 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand (November 23-25, 2017), Oral presentation.
	Pheungphasutadol, N., Bunpim, D., Auschanalimpakorn, K., Bangsuanhluang, S., Subsomboon, T. and Liewsaree, P. Comparative studies of antioxidant content in black sesame (Sesamum indicum L.) seed from different extraction methods. Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Mandarin Hotel Bangkok by Centre Point, Bangkok, Thailand (November 17-20, 2015) Poster presentation.