รายงานการวิจัย เรื่อง

ชื่อภาษาไทย

การโคลนนิ่งยีนเคอราติเนสจาก *Fervidobacterium* spp.ชอบร้อนสูงที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในประเทศไทย สำหรับกำจัดขยะขนสัตว์ปีกจากโรงฆ่าสัตว์

ชื่อภาษาอังกฤษ

Cloning of a gene encoding keratinase from hyperthermophilic *Fervidobacterium* species isolated from hot springs in Thailand, for feather waste treatment from slaughterhouses

ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย/ภาษาอังกฤษ)

รองศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ กนกศิลปธรรม

Associate Professor Dr. Wirojne Kanoksilapatham

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2560

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร
แบบ สว.ว 5

แบบฟอร์มบทคัดย่อ

ภาษาไทย

ส่วนที่ 1

ชื่อโครงการ “การโคลนนิ่งยีนเคอราติเนสจาก *Fervidobacterium* spp. ชอบร้อนสูงที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในประเทศไทย สำหรับกำจัดขยะขนสัตว์ปีกจากโรงฆ่าสัตว์”

ชื่อผู้วิจัย 1 รองศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ กนกศิลปธรรม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2559
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2559

ประเภทการวิจัย การวิจัยพื้นฐาน / **การวิจัยประยุกต์** / การพัฒนาทดลอง

สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ แขนงวิชาจุลชีววิทยา

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

Fervidobacterium sp. FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. FA004 เป็นแบคทีเรียชอบร้อนสูงใน order Thermotogales ที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหายีนผลิตเอนไซม์ทนร้อนเคอราติเนส จากจีโนมของ *Fervidobacterium* sp. และเพื่อโคลนนิ่งยีน สำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป ในการศึกษานี้ค้นพบยีนผลิต serine protease (522 กรดอะมิโน) จากโครโมโซมของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ด้วยวิธี shortgun sequencing และตั้งชื่อยีนว่า “*proA1*” (เรียกโปรตีนว่า “ProA1”) การวิเคราะห์ด้วย BlastP analysis แสดงว่าโปรตีน ProA1 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ large S8_subtilase superfamilies of serine proteases (ขนาด 682 – 710 กรดอะมิโน) จาก *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078^{T} (WP_064012406.1; 52 %), *F. islandicum* AW-1 (WP_052107197.1; 48 %) และ *F. nodosum* Rt17-B1T (WP_011994230.1; 48 %) แต่มีขนาดเล็กกว่า โมเดล 3 มิติของ ProA1 คล้ายกับ fervidolysin (large S8_subtilase ชนิดหนึ่ง) โมเลกุล ProA1 ประกอบด้วย signal peptide (ประมาณ 20 กรดอะมิโน) โดเมน PD

(propeptide domain), CD (catalytic domain) และโดเมนที่คล้ายกับ SD หรือ SD-like (substrate binding domain) 1 ชุด แต่ไม่พบ SD2 (substrate binding domain ชุดที่ 2) บริเวณ CD ของ ProA1 มี catalytic triad คือ D169, H207 และ S379 และมี calcium binding site ประกอบด้วย E136, D178, D220, K222 และ V224 ผลการศึกษาแสดงว่า ProA1 อาจถูกสังเคราะห์เป็น ProA1 precursor (proProA, ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์) ซึ่ง PD ถูกตัดออกก่อนเพื่อเปลี่ยนเป็น ProA1 เต็มวัย (มีกิจกรรมเอนไซม์) ในการศึกษานี้ชิ้น DNA ที่มีรหัสของ ProA1, CD และ SD-like ถูกจำลองด้วยไพร์เมอร์ ยืนยันการมีอยู่ของยีน *proA1* ในโครโมโซมของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 อุปสรรคในการโคลนนิ่งยีนนี้เข้าสู่ expression vector อาจเนื่องมาจาก ProA1 เต็มวัยเป็นพิษต่อเซลล์ และอาจมีปัจจัยภายในที่ไม่ทราบสาเหตุต่าง ๆ จากตัวยีนและเจ้าบ้าน ถึงแม้ว่า *Fervidobacterium* sp. FC2004 สามารถย่อยขนเป็ดได้ และโดเมน SD-like ของ Pro1 คล้ายกับโดเมนที่ทำหน้าที่เกาะกับโปรตีนเป้าหมายของ collagen binding protein และ fibronectin binding protein อย่างไรก็ตามบทบาทหน้าที่ของ SD-like ในการเกาะกับ สับสเตรทเคอราติน ยังไม่ได้รับการพิสูจน์แน่ชัด

คำสำคัญ : keratinase, serine protease, thermostable, extreme thermophile, *Fervidobacterium*

ภาษาอังกฤษ

ส่วนที่ 1

Research Title “Cloning of a gene encoding keratinase from hyperthermophilic *Fervidobacterium* species isolated from hot springs in Thailand, for feather waste treatment from slaughterhouses”

Researcher Associate Professor Wirojne Kanoksilapatham

Faculty of Science, Silpakorn University

Research Grants Fiscal Year 2016,

Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion 2016

Type of research basic research / **applied research** / experimental development

Subjects (based NRCT) Agriculture and Biology/Biological Sciences/Microbiology

ส่วนที่ 2 Abstract (ไม่เกิน 250 คำ)

Fervidobacterium sp. FC2004 and *Fervidobacterium* sp. FA004 are extreme thermophilic bacteria belonging to order Thermotogales which can degrade feathers. This research aims to search a gene encoding keratinase from genomic DNA of a *Fervidobacterium* sp., and to clone the gene for future applications. In this study, a putative gene encoding a serine protease (522 amino acids) named “proA1” (named protein as ProA1) is identified in chromosome of *Fervidobacterium* sp. FC2004 using shortgun sequencing methods. BlastP analysis reveals that amino acid sequence of ProA1 is similar to large peptidase S8_subtilase superfamilies of serine proteases (size range of 682 – 710 amino acids) of *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078^{T} (WP_064012406.1; 52 %), *F. islandicum* AW-1 (WP_052107197.1; 48 %) and *F. nodosum* Rt17-B1T (WP_011994230.1; 48 %). 3-D model of ProA1 is similar to fervidolysin (a large S8_subtilase). ProA1 molecule is composed of a signal peptide (approx. 20 amino acids), PD (propeptide domain), CD (catalytic domain) and a domain similar to SD or SD-like (substrate binding domain), but the second substrate binding domain (SD2) was not detected. The CD region of ProA1 contains a catalytic triad of D169, H207

and S379, and a calcium binding site that is composed of E136, D178, D220, K222 and V224. The results suggest that ProA1 might be produced as ProA1 precursor (proProA, inactive enzyme) that requires cleavage off PD to become mature ProA1 (active enzyme). In this study, DNA segments encoding ProA1, CD and SD-like are amplified using primers confirming the existing of *proA1* gene sequence in the chromosome of *Fervidobacterium* sp. FC2004. Difficulty in cloning the gene into an expression vector might result from toxicity of the mature ProA1 and unknown intrinsic factors from the gene and host. Although, *Fervidobacterium* sp. FC2004 is able to degrade native feather and SD-like of ProA1 has similar 3D-structure to target specific binding domain of collagen binding protein and fibronectin binding protein, function of SD-like in binding to its keratin substrate is unclear.

Key words : keratinase, serine protease, thermostable, extreme thermophile, *Fervidobacterium*

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนเงินทุนวิจัย ผ่านทางมหาวิทยาลัยศิลปากร และขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความสนับสนุนโครงการประสานงานและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทนำ (Introduction)	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย	2
เนื้อเรื่อง (Main body)	3
1. ตรวจสอบเอกสาร	3
1.1 Thermotogae	3
1.2 เอนไซม์ทนร้อน	6
1.3 Keratinolytic enzyme	7
2. วิธีการศึกษา	9
1. การเตรียมหัวเชื้อ	9
2. วิธีการเตรียมอาหารและวิธีทำลอง	9
3. การสกัด genomic DNA	10
4. การออกแบบไพร์เมอร์	11
5. การวิเคราะห์ DNA โดยวิธี gel electrophoresis	12
6. การเตรียม competent cell	12
7. การวิเคราะห์โมเดลสามมิติ	13
8. การ cloning gene *proA1*	14
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ (Result and Comment)	14
1. การค้นหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีก	14
2. การค้นหายีน protease จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004	15
3. การศึกษา phylogeny ของยีน subtilases	19
4. การศึกษาอัลลิว (allele) ของ large subtilase S8	19
5. การวิเคราะห์โมเดลสามมิติของ ProA1 และการพิสูจน์เอกลักษณ์	23
6. ProA1 เป็น proS8_serine protease	27
7. การ cloning ยีน *proA1*	29
4. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	31
บรรณานุกรม (Bibliography)	35
ภาคผนวก อาหารเลี้ยงเชื้อ	39
ประวัติคณะผู้วิจัย	41

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกแบคทีเรียชอบร้อนและแบคทีเรียชอบร้อนสูงในไฟลั่ม Thermotogae (Bhandari and Gupta, 2014; Ito et al., 2016)	5
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์และค่า annealing temperature ของไพร์เมอร์แต่ละคู่	11

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

ภาพที่		หน้า
1	การย่อยขนเป็ดที่ 80 °C โดย *Fervidobacterium* sp. strain FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. strain FA004 เทียบกับ uninoculated control (ขวาสุด)	14
2	เซลล์ของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ที่มีการย่อยสลายขนเป็ดหลังจากบ่มไว้ 24 h	15
3	(A) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน putative *proA1* บริเวณ 200 เบสก่อนและหลัง open reading frane (ORF) ยีนเริ่มต้นที่ GTG (โคดอน Val) สัญลักษณ์: บริเวณขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งของไพร์เมอร์ ตัวเอนหนา แทน ribosome binding site และ (B) translated protein (ProA1) ตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1095126 ถึง 1099964	16
4	แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการจำลองด้วยคู่ไพร์เมอร์ ProT1AF/ProT1AR, CD125F/CD421R และ CD125F/ProT1AR สัญลักษณ์: แถวที่ 1 จำลองด้วย ProT1AF/ProT1AR แถวที่ 2 จำลองด้วย CD125F/CD421R และ แถวที่ 3 จำลองด้วย CD125F/ProT1AR	17
5	Phylogenetic analysis ของ proteases ใน super family serine proteases	19
6	แผนผังแสดงตำแหน่งสัมพัทธ์ของยีนและ ORFs ...	21-22
7	โมเดล 3 มิติของ fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans* DSM9078^T (Kim et al., 2004)	23
8	โดเมน CD ของ fervidolysin (A) บริเวณ active site และ (B) บริเวณ calcium binding site	24

ภาพที่		หน้า
9	แสดงโมเดล 3 มิติ (3D-models) ของ peptidase_S8 family serine proteases จาก *Fervidobacterium pennivorans*, *F. islandicum* และ *F. nodosum* (A) - (F) โมเดลของ large S8_subtilase (A) fervidolysin (Ir6v.1.A เป็นแม่พิมพ์), (B) WP_014451869.1 (*F. pennivorans*), (C) WP_011994230.1 (*F. nodosum*), (D) WP_011994224.1 (*F. nodosum*), (E) WP_052107197.1 (*F. islandicum*), และ (F) WP_033191969.1 (*F. islandicum*), (G) – (I) แสดงโมเดล 3 มิติของ small_S8 subtilases (G) WP_014451703.1 (*F. pennivorans*), (H) WP_033191846.1 (*F. islandicum*) และ (I) WP_011993735.1 (*F. nodosum*) (H) แสดงโมเดล 3 มิติของ ProA1 จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004 สัญลักษณ์: ตัวเลขในวงเล็บแทนจำนวนกรดอะมิโนในโมเลกุล PD แทน propeptide domain, CD แทน catalytic domain และ SD แทน sandwich หรือ substrate binding domain	25
10	alignment ของ ProA1 amino acid sequences กับ large S8_subtilase, fervidolysin และ islandisin	26
11	(A) alignment บริเวณ C-terminal ของ large S8_subtilases กับ ProA1 (B) 3D-model ของ ProA1 สร้างโดยใช้แม่พิมพ์ 3kpt.1.A (collagen binding protein) และ 2x5p.1.A (fibronectin binding protein like domain) (C) ภาพ superimposed images สร้างจากแม่พิมพ์ที่บริเวณโดเมน SD กับ protein binding domains (1r6v.1.A, 3kpt.1.A and 2x5p.1.A)	27
12	ภาพที่ 12 (A) alignment บริเวณ signal peptide และ propeptide (B) บริเวณ active groove และ C-terminal ของ PD จากภาพ P115 ถึง L118 พาดขวาง active site (D169, H207 และ S379) ช่วยป้องกันการย่อย substrate	28
13	Colony PCR แสดงโคลนที่มี insert CDS	30

บทนำ (Introduction)

ในแต่ละปีมีขนสัตว์ปีกเหลือทิ้งและทำให้เกิดมลพิษ ขยะขนสัตว์ที่ถูกทิ้งทับถมอยู่เป็นแหล่งเพาะเชื้อรา dermatophilic fungi สร้างปัญหาการบริหารจัดการ อย่างไรก็ตามขนเป็ด ขนไก่ และขนสัตว์ปีกชนิดอื่น ๆ มีคุณค่าเป็นแหล่งของโปรตีนและกรดอะมิโน ใช้เป็นตัวเพิ่มคุณค่าโภชนาการในอาหารสัตว์ และใช้เป็นปุ๋ยของพืช การกำจัดเคอราตินในขนสัตว์ปีกโดยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ชอบร้อนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและปลอดเชื้อโรค (pathogen free) เนื่องจากเชื้อ *Fervidobacterium* spp. ไม่ใช่เป็นเชื้อโรคและไม่สามารถเจริญในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 $^{\circ}$C ดังนั้นจึงไม่เจริญในร่างกายมนุษย์และสัตว์ (Gupta et al., 2013; Kornikłowicz-Kowalska and Bohacz, 2011)

keratinase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการประยุกต์ในเทคโนโลยีการหมักของเหลือทิ้ง (waste) จากอุตสาหกรรมสัตว์ปีก เอนไซม์นี้ย่อยโปรตีนเคอราติน (keratin) ในขนสัตว์ปีก และขนสัตว์อื่น ๆ ได้กรดอะมิโน และเพปไทด์ที่เป็นประโยชน์ใช้ผสมในอาหารสัตว์เป็นอาหารเสริม เอนไซม์ keratinase ยังสามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้เตรียมหนังสัตว์ ถอนขนในขั้นตอน dehairing process แทนการใช้สารเคมี sodium sulfide และเอนไซม์สามารถกำจัดคราบสกปรกบนผ้าเป็นประโยชน์ช่วยเพิ่มมูลค่าในผงซักฟอก (ผสมเอนไซม์ทนร้อน ในผงซักฟอก สำหรับเครื่องซักผ้า)

ในประเทศไทยมีการค้นพบแบคทีเรียชอบร้อนสูง *Fervidobacterium* sp. FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. FA004 ซึ่งเจริญที่สภาวะเหมาะสม 75-80 ºC, pH 7.5 และสามารถย่อยขนสัตว์ปีก (Keawram and Kanoksilapatham, 2013) ดังนั้นจึงน่าจะมีเอนไซม์ keratinase

วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

Fervidobacterium sp. FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. FA004 เป็นแบคทีเรียชอบร้อนสูงใน order Thermotogales ที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ค้นหายีนผลิตเอนไซม์เคอราติเนสชอบร้อนจากจีโนมของ *Fervidobacterium* sp. และโคลนยีนเข้าสู่ *E. coli* เพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย ทำการค้นหายีนจาก genomic DNA ของสายพันธุ์ที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีกด้วยเทคนิค shortgun sequencing ซึ่งได้เลือกใช้ genomic DNA ของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 เนื่องจากมีข้อมูล DNA ทำการระบุชนิดยีน และวิเคราะห์ชนิดของเอนไซม์จากลำดับกรดอะมิโนของสายเพปไทด์ ทำการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อจำลองยีนและให้ชิ้น insert ที่มียีนที่ต้องการสามารถแสดงออกได้ภายใต้ strong promoter เช่น T7 promoter ทำการโคลนิ่งชิ้น DNA insert ที่จำลองได้จาก PCR reaction เพื่อใส่ใน cloning plasmid vector จากนั้นทำการ transformation และคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดและชิ้น insert โดยใช้คุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินของพลาสมิด และทำการ screening หาชิ้น insert ที่ถูกต้องโดยวิธี colony PCR วิเคราะห์ขนาดของชิ้น insert โดยใช้ agarose gel electrophoresis ทำการเก็บโคลนที่ให้ผลบวก และเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดพลาสมิดที่ต้องการ เก็บพลาสมิดที่ต้องการและยืนยันความถูกต้องอีกครั้งหนึ่งโดยทำ DNA sequencing ของชิ้น insert ทุกชิ้น เก็บโคลนที่มี insert ที่ถูกต้องและมียีนที่ต้องการ เพื่อการประยุกต์ต่อไป

เนื้อเรื่อง (Main body)

1. ตรวจสอบเอกสาร

1.1 Thermotogae

แบคทีเรียในไฟลั่ม Thermotogae ประกอบด้วยแบคทีเรียชอบร้อนและแบคทีเรียชอบร้อนสูงที่หลากหลายในกลุ่ม strictly anaerobic organotrophs ซึ่งมีถิ่นอาศัยและเจริญได้ดีและพบได้ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง พบได้ตั้งแต่ น้ำพุร้อน บ่อโคลนเดือด บ่อน้ำมันบนบกและนอกชายฝั่ง ภูเขาไฟบนแผ่นดิน และภูเขาไฟและน้ำร้อนตามรอยต่อแผ่นเปลือกโลกในทะเลและมหาสมุทร แต่เดิมมาแบคทีเรียในไฟลั่มนี้ประกอบด้วยหนึ่งออร์เดอร์ คือ order Thermotogales และหนึ่งแฟมิมลี คือ family Thermotogaceae ปัจจุบันการจัดจำแนกแบคทีเรียในไฟลั่มนี้อาศัยรูปร่างและคุณสมบัติของ DNA ยีน 16S rRNA และ conserved signature indels (CSIs) ในโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งจำเพาะต่อแต่ละ clade ที่ประกอบเป็นไฟลั่ม Thermotogae ได้เป็น 4 ออเดอร์ 5 แฟมิลี คือ (1) order Thermotogales ซึ่งแยกเป็นสองแฟมิลีคือ families Thermotogaceae และ Fervidobacteriaceae (2) order Kosmotogales ord. nov. (Kosmotogaceae) (3) order Petrotogales (Petrotogaceae fam. nov.) และแยกย่อยจีนัส *Themotoga* เป็นสองจีนัสคือจีนัส *Thermotoga* ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกที่เป็นแบคทีเรียชอบร้อนสูงทั้งหมด (hyperthermophiles) รวมถึง *Thermotoga maritima, T. neapolitana, T. petrophila, T. napthophila* และ hyperthermophilic *Thermotoga* sp. PD524^{T} (สายพันธุ์เดียวกันกับ DSM 28089) และแยกจีนัสใหม่และตั้งชื่อใหม่ว่า “*Pseudothermotoga*” ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกที่เป็นแบคทีเรียชอบร้อน (thermophiles) ทั้งหมด (ในขณะนั้น) คือ *Thermotoga thermarum, T. lettingae, T. elfii, T. subterranea* และ *T. hypogea* ตั้งชื่อใหม่เป็น *Pseudothermotoga thermarum, Pst. lettingae, Pst. elfii, Pst. subterranea* และ *Pst. hypogea* ตามลำดับ ต่อมารวมแบคทีเรียชอบร้อน *Thermotoga*

caldifontis AZM44c09^{T} and *T. profunda* AZM34c06^{T} ที่ค้นพบโดย Mori et al. (2014) (*Pst*. *caldifontis* และ *Pst*. *profunda*) (Bhandari and Gupta, 2014; Kanoksilapatham, 2015) และ (4) order Mesoaciditogales (Mesoaciditogaceae) ซึ่งประกอบด้วยสองจีนัสคือ *Mesoaciditoga lauensis* OCM 1212T and *Athalassotoga saccharophila* NAS-01T (Reysenbach et al., 2013; Itoh et al., 2016) การจัดจำแนกใหม่สรุปได้ดังตารางที่ 1

ภรณี แก้วรามและคณะ (Keawram et al., 2016) คำนวณค่า ดัชนีระดับสปีชีส์ (species index) และ ดัชนีระดับจีนัส (generic index) โดยวิเตราะห์พารามิเตอร์ยีน *16S rRNA* ของสมาชิกในไฟลั่มนี้ และเสนอค่า ดัชนีระดับสปีชีส์ เท่ากับ 94.5% similarity {95%-CI limit (92.4, 96.6)} และค่าดัชนีระดับจีนัส เท่ากับ 81.9% similarity {95%-CI limit (81.8, 82.1)} นอกจากนี้พบว่า *Geotoga aestuarianus* T3B^{T} มีความใกล้ชิดทาง phylogenetics กับ *Oceanotoga* sp. JC186 และ *O. teriensis* OCT74^{T} มากกว่า *Geotoga petraea* ATCC 51226^{T} และ *G. subterranea* CC-1^{T}

เซลล์ของแบคทีเรียในไฟลั่ม Thermotogae มีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ที่เรียกว่า “toga” ซึ่งเป็นลักษณะร่วมที่พบได้ในทุก ๆ จีนัส และใช้แยกความแตกต่างของ *Fervidobacterium* spp. ออกจากจีนัสอื่น ๆ แบคทีเรียไฟลั่มนี้มีรูปร่างหลายแบบ สามารถจำแนกตามรูปร่างแยกจีนัส *Thermotoga* และ *Fervidobacterium* สมาชิกของจีนัส *Thermotoga* มีรูปร่างเป็นแท่งยาว คดเคี้ยว (flexible rod shaped) ที่ปลายทั้งสองข้างมีถุงเยื่อหุ้มคล้ายลูกโป่ง (a balloon-like toga at each cell pole) (Huber et al. 1986; Jannasch et al. 1988; Windberger et al. 1989; Jeanthon et al. 1995; Ravot et al. 1995; Fardeau et al. 1997; Takahata et al. 2001; Balk et al. 2002) *Thermotoga* sp. PD524^{T} ซึ่งเป็น hyperthermophile ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนโป่งเดือด มีเซลล์รูปร่างเป็นแท่งยาวและมีโครงสร้างคล้ายสปอร์แรงเจียมของเชื้อรา (sporangium-like structure) ที่ปลายที่เรียกว่า “golf club structure” (Kanoksilapatham et al., 2015)

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกแบคทีเรียชอบร้อนและแบคทีเรียชอบร้อนสูงในไฟลั่ม Thermotogae (Bhandari and Gupta, 2014; Ito et al., 2016)

Phylum (Class) Thermotogae				
Thermotogales		**Kosmotogales**	**Petrotogales**	**Mesoaciditogales**
Thermotogaceae	**Fervidobacteriaceae**	**Kosmotogaceae**	**Petrotogaceae**	**Mesoaciditogaceae**
Thermotoga maritima MSB8^T *T. neapolitana* NES^T *T. petrophila* RKU-1^T *T. naphthophila* RKU-10^T *Thermotoga* sp. RQ2, *Thermotoga* sp. EMP *Thermotoga* sp. A7A *Thermotoga* sp. PD524^T (DSM 28089)	*Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1^T *F. islandicum* H-21^T *F. gondwanense* AB39^T *F. pennivorans* DSM 9078^T *F.* changbaicum CBS-1^T *F. riparium* 1445t^T *Fervidobacterium* sp. FC2004^T	*Kosmotoga olearia* TBF 19.5.1^T *K. arenicorallina* S304^T *K. pacifica* SLHLJ1^T *K. shengliensis* 2SM-2^T	*Petrotoga halophila* MET-B^T *P. mexicana* MET12^T *P. miotherma* SJ95t^T *P. mobilis* SJ95^T *P. olearia* SL24^T *P. siberica* SL25^T	*Mesoaciditoga lauensis* OCM 1212^T
^ *Pseudothermotoga elfii* G1^T, *Pst. thermarum* DSM 5069^T *Pst. subterranea* SL1^T *Pst. lettingae* TMO^T *Pst. caldifontis* AZM44c09^T *Pst. profunda* AZM34c06^T	*Thermosipho globiformans* DSM 19918^T, *Tsp. japonicus* IHB1^T *Tsp. africanus* Ob7^T *Tsp. melanesiensis* BI429^T *Tsp. ferriphilus* *Tsp. geolei* DSM 13256^T *Tsp. atlanticus* DV1140^T	*Meotoga prima* MesG1.Ag.4.2^T *Mesotoga infera* VNs100^T	*Geotoga petraea* ATCC 51226^T, *G. subterranea* CC-1^T *G. aestuarianus* T3B^T *Oceanotoga teriensis* OCT74^T *Oceanotoga* sp. ST186^T *Defluviitoga tunisiensis* SulfLac1^T	*Athalassotoga saccharophila* NAS-01^T
			Marinitoga camini MV1075^T *Ma. piezophila* KA3^T *Ma. hydrogenitolerans* AT1271^T *Ma. okinawensis* JCM 13303^T *Ma. litoralis*	
^ ชื่อเดิม *Thermotoga* (Bhandari and Gupta, 2014)				

แบคทีเรียชอบร้อนสูงกลุ่มนี้เป็นแหล่งเอนไซม์ทนร้อน และมียีนที่เก็บรหัสของโปรตีนและเอนไซม์ทนร้อนมากมาย จึงเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่า มีการค้นพบยีน 16S rRNA ของ thermophiles และ hyperthermophiles ในไฟลั่ม Thermotogae จากตัวอย่างที่เก็บจากแผ่นตะกอนเชื้อที่อุณหภูมิ 65 – 90 $^{\circ}$C ตามลำธารในน้ำพุร้อนฝาง (Cuecas et al. 2014) และมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยง hyperthermophiles จนสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 19 สายพันธุ์ซึ่งแบ่งได้ตามยีน 16S rRNA และรูปร่างของเซลล์ได้เป็น จีนัส *Thermotoga* spp. (7 สายพันธุ์) และ *Fervidobacterium* spp. (12 สายพันธุ์) ทั้งสองจีนัสนี้ เป็น hyperthermophiles สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิเหมาะสม 75-80 $^{\circ}$C มียีน 16S rRNA ที่แตกต่างจากแบคทีเรียในจีนัสเดียวกันที่เคยมีรายงานไว้ (90-96 % similarity) ซึ่งสูงในระดับ species index ดังกล่าวแล้วข้างต้น แสดงว่าอาจเป็นสปีชีส์ใหม่ (candidate of sp. nov.) (Keawram et al., 2016; Keawram and Kanoksilapatham, 2013)

1.2 เอนไซม์ทนร้อน

ส่วนใหญ่ของสมาชิกในไฟลั่ม Thermotogae เจริญที่อุณหภูมิเหมาะสม (optimal growth temperatures) ระหว่าง 50 - 90 $^{\circ}$C การเจริญโดยการหมักโปรตีนและคาร์โบไฮเดรท เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมีเอนไซม์ทนร้อนในกลุ่ม hydrolases หลายชนิด ซึ่งบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้ hydrolases ในการย่อยแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่เป็นพอรีเมอร์เช่นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญ เอนไซม์จากแบคทีเรียชอบร้อนสูง (optimal growth temperature ca. 80 $^{\circ}$C) กลุ่มนี้สามารถทนความร้อนที่ >70°C ได้หลายวัน ตัวอย่างของเอนไซม์ทนร้อนที่ค้นพบแล้วจาก *Thermotoa* และ *Fervidobacterium* ได้แก่ xylanase A และ xylanase B จาก *Thermotoga maritima* MSB8, trehalose synthase จาก *Thermotoga maritima* DSM3109, cellulase จาก *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1, islandisin (keratinolytic enzyme) จาก *Fervidobacterium islandicum* AW-1 และ fervidolysin (keratinolytic enzyme) จาก *Fervidobacterium pennavorans* DSM 9078 เป็นต้น

(Winterhalter and Liebl, 1995; Ryu et al., 2010; Wang et al., 2010; Nam, et al., 2002; Friedrich and Antranikian, 1996)

1.3 Keratinolytic enzyme

เคอราติน (keratins) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำย่อยสลายได้ยาก พบเป็นองค์ประกอบหลักของขนสัตว์ปีก ขนสัตว์ (wool) เล็บ เส้นผม ผิวหนัง กีบเท้าสัตว์ อย่างไรก็ตามสามารถถูกย่อยเป็นเพปไทด์ละลายน้ำและกรดอะมิโนได้โดยเอนไซม์ในกลุ่ม keratinases เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถย่อยเคอราตินและมีแหล่งที่มาจากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* (Cedrola et al., 2012), *Geobacillus stearothermophilus* AD-11. (Gegeckas et al., 2015), *Streptomyces fradiae* var. k11. (Wu et al., 2010), *Thermoanaerobacter keratinophilus* (Riessen and Antranikian, 2001), *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 (Kublanov et al., 2009), และแบคทีเรียชอบร้อนในจีนัส *Fervidobacterium* (*Fervidobacterium pennivorans* and *F. islandicum* AW-1) (Nam, et al., 2002; Friedrich and Antranikian, 1996) เป็นต้น

Keratinase เป็นเอนไซม์ protease (โปรตีเอส) หรือ peptide hydrolase ชนิดหนึ่ง สามารถย่อยพันธะเพปไทด์ แบ่งประเภทของโปรตีเอสได้เป็น 4 คลาส (classes) ดังนี้คือ cysteine protease, serine protease, metallo protease และ aspartic protease ในบรรดาโปรตีเอสเหล่านี้ serine proteases (ซึ่งมีกรดอะมิโน serine ในบริเวณ conserved catalytic triad) ถูกแบ่งย่อยตามโครงสร้างได้เป็น “chymotrypsin-like” (หรือ “trypsin-like”) และ “subtilisin-like” (หรือ “subtilase”) เอนไซม์กลุ่ม serine protease เป็นกลุ่มครอบครัวใหญ่ (superfamily) ซึ่งสามารถถูกแบ่งย่อยได้เป็นกลุ่มเล็กลง (clans) ดังนี้ subtilisin, thermitase, proteinase K, lantibiotic peptidase, kexin และ pyrolysin (Siezen and Leunissen, 1997) clan ของ subtilisin ประกอบด้วย S8 subtilase family ซึ่งมี Asp (D), His (H) และ

Ser (S) เป็น catalytic triad และ S53 subtilase family ซึ่งมี Glu (E), Asp (D) และ Ser (S) เป็น catalytic triad

คุณสมบัติทั่วไปของ subtilisins เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแบบไม่จำเพาะ มีขนาดเล็ก (20 - 45 kDa) และในที่นี้จะเรียกกลุ่มนี้ว่า “small S8_subtilase” เอนไซม์ subtilases อีกพวกหนึ่งมีโมเลกุลใหญ่กว่า เรียกในที่นี้ว่า “large S8_subtilase” กลุ่มหลังนี้รวมถึง keratinolytic enzymes จาก thermophilic *Fervidobacterium* spp. ซึ่งมีขนาดประมาณ 2 เท่าขึ้นไป เอนไซม์ keratinases (หรือที่รู้จักอีกชื่อหนึ่งว่า fervidolysin) จาก thermophilic *F. pennivorans* เป็น serine protease ชนิดหนึ่ง ที่เป็น cell bound enzyme มีขนาด 130 kDa (Friedrich and Antranikian, 1996)

ยีน *fls* (2.1 kb) ของ *Fervidobacterium pennivorans* เป็นยีน fervidolysin (699 กรดอะมิโน) ซึ่งเป็น prosubtilase (proenzyme) ถูกโคลนนิ่งและให้มีการแสดงออกใน *E. coli* เอนไซม์ที่แสดงออกเป็น subtilase precursor (73 kDa) และเกิดการตัดย่อยตัวเอง (autoproteolysis) ได้เป็นโปรตีน 2 ชิ้น ขนาด 58 kDa ของ mature subtilase และ 14 kDa ของ propeptide (Kluskens et al., 2002) เอนไซม์ keratinase (หรือ islandisin) จาก *Fervidobacterium islandicum* เป็น homomultimeric membrane bound keratinase พบที่เยื่อหุ้ม เป็น complex ใหญ่ >200 kDa และประกอบด้วยหน่วยย่อย subunit ชนิดเดียวขนาด 97 kDa มีกิจกรรมเหมาะสมที่ 80 $^{\circ}$C และสามารถทนความร้อนได้ดีโดยไม่มีการสูญเสียกิจกรรมหลังจากบ่มที่ 80 $^{\circ}$C นาน > 32 h (Nam, et al., 2002; Godde, et al., 2005)

Fervidobacterium sp. FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. FA004 เป็น extreme thermophile ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในประประเทศไทย เจริญได้ที่อุณหภูมิเหมาะสม 75-80 $^{\circ}$C, pH 7.5 และสามารถย่อยขนสัตว์ปีก (Keawram and Kanoksilapatham, 2013) จึงอาจมีเอนไซม์ keratinase

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อ inoculum เตรียมในอาหาร 480GM5 และบ่มที่ 75 – 80 °C หรืออุณหภูมิอื่นที่เหมาะสมกับแบคทีเรีย

2. วิธีการเตรียมอาหารและวิธีทำการทดลอง

ผสมอาหารตามสูตร (ยกเว้น $CaCl_2.2H_2O$ ซึ่งเตรียมแยก) ไม่ต้องปรับ pH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำอาหารในขวดไปต้มพร้อมกับกวนเป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง เตรียมหลอด Hungate tube เติมสารละลาย Na_2S ปริมาตร 0.3 ml/อาหาร 100 ml ตวงอาหารเหลวใส่ในหลอด Hungate tube หลอดละ 10 ml ใส่ขนเป็ดที่ผ่านการต้ม 100 ºC เป็นเวลา 60 นาทีและทำให้แห้ง ปริมาณ 15-100 mg (1 ชิ้น)/หลอด พร้อมทั้งทำการพ่นแก๊ส N_2 ตลอดเวลา จนอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียม เพื่อที่จะทำให้อาหารอยู่ในสภาวะ anaerobic ทุกขั้นตอนจะต้องระวังปนเปื้อน O_2 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 105 ℃ 60 นาที

เตรียม 1% $CaCl_2.2H_2O$ ในขวด serum ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนปิดฝาขวดด้วยจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียมนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 105 °C เป็นเวลา 60 นาที

ก่อนการเลี้ยงเชื้อดูด 1% $CaCl_2.2H_2O$ (ปลอดเชื้อ) 0.1 ml ฉีดใส่ 10 ml ของ FD medium ที่เตรียมไว้ก่อนหน้า จากนั้นทำการฉีดหัวเชื้อ 0.1 ml บ่มในตู้บ่ม 80 °C หรืออุณหภูมิที่แบคทีเรียเจริญได้ดี พร้อมบ่ม uninoculated control ที่อุณหภูมิเดียวกัน

3. การสกัด genomic DNA

ทำการสกัด genomic DNA จาก FC2004 ในอาหาร 480GM5 อายุ 24 h ปริมาตร 100 ml การตกตะกอนโดยใช้การปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 min และละลายตะกอนด้วย TNE buffer 400 µl แล้วจึงดูดสารละลายใส่ microcentrifuge tube ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ 20% N-lauroyl sarcrocine (50 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ และ 10% SDS (100 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ย่อยโปรตีนด้วย 10 mg/ml Proteinase K solution (100 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ และบ่มปฏิกิริยาใน water bath 50°C เป็นเวลา 3 h (ในระหว่างการบ่มควรกลับหลอดบ่อยๆ) ตกตะกอนโปรตีนด้วย TE-saturated phenol (750 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลาย (aqueous phase) ด้านบนใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ ตกตะกอนโปรตีนซ้ำด้วย chloroform : Isoamyl alcohol (750 µl) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายด้านบนใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ทำการตกตะกอนด้วย absolute ethanol ที่เย็นจัด (-20 °C) ดังต่อไปนี้ ปรับ pH เป็นกรดด้วย 3M sodium acetate pH 5.25 (0.1 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง) แล้วตกตะกอนด้วย absolute ethanol ที่เย็น (-20 °C) (2.5 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ บ่มปฏิกิริยาที่ -20 °C 1 คืนโดยไม่เขย่า หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm เป็นเวลา 20 min ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นจึงเทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป โดยเก็บส่วนที่เป็นตะกอน DNA ไว้ ซับปากหลอดด้วยกระดาษทิชชู ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol (500 µl) กลับหลอดไปมาเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป โดยเก็บส่วนที่เป็นตะกอน DNA ไว้ ซับปากหลอดด้วยกระดาษทิชชู ตากตะกอน DNA โดยการเปิดฝาหลอด microcentrifuge tube จนแห้ง

(บ่มที่ 37 °C 1 h) ละลายตะกอนด้วย TE buffer (50 µl) และย่อย RNA ด้วย DNase free RNAase (1 µl) แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 h

เพื่อให้ DNA มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ทำการตกตะกอนด้วย absolute ethanol ที่เย็นจัด (-20 °C) ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง และล้างด้วย 70% ethanol ตากแห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer (50 µl) เติม chloroform (0.5 µl) ในสารละลาย DNA และเก็บ DNA ที่ 4 °C

4. การออกแบบไพร์เมอร์

ไพร์เมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสและค่า Tm ดังสรุปในตารางที่ 2

ตารางรางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์และค่า annealing temperature ของไพร์เมอร์แต่ละคู่

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm	หมายเหตุ
ProT1AF	CATATGCGTAGACCCGTTAACGTC	54.1	ขีดเส้นใต้ Nde I restriction site
ProT1AR	TTACTATAGTTCAACTTCAATTTGCAC	53.8/50.9	
CD125F	CATATGGTAACCGATGCTGGCA	52.8/53.7	ขีดเส้นใต้ Nde I restriction site
CD421R	GGATCCTAGTCCAAGCCAGGTAAATCT	52.7/53.2	ขีดเส้นใต้ BamH I restriction site
ชื่อผลิตภัณฑ์	Primer pairs ที่ใช้	Product (bp)	Annealing temperature
ProA1	ProT1AF/ProT1AR	1575	45 °C
CD125	CD125F/CD421R	905	46 °C
CDS (CD+SD)	CD125F/ProT1AR	1200 bp	46 °C

การจำลองชิ้น DNA ทำโดยใช้วิธี PCR ที่ใช้กันทั่วไปโดยตั้งค่า annealing temperature ที่ 45-46 °C 1 min และ polymerization ที่ 72 °C 1 min ทำซ้ำ 30 รอบ และตามด้วย extension ที่ 72 °C 10 min

5. การวิเคราะห์ DNA โดยวิธี gel electrophoresis

ทำการแยกชิ้น DNA โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis และ TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา เป็นเวลา 40 min ในการทำให้ DNA เคลื่อนที่ นำแผ่น gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide และไปส่องดูด้วยเครื่อง gel document

6. การเตรียม competent cell

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* DH5**α** ในอาหาร LB broth บ่มที่ 37 °C 250 rpm เป็นเวลา 24 h ดูดหัวเชื้ออายุ 24 h ข้างต้น (0.5 ml) แล้ใส่ใน 50 ml ของ LB บ่มใน shaker incubator 37 °C, 250 rpm บ่มจนได้ OD600 ประมาณ 0.3-0.5 OD (ประมาณ 3 h) แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดการเจริญของเชื้อ ดูดหัวเชื้อที่มีความขุ่น 0.3-0.5 ใส่ลงในหลอด centrifuge ที่เย็น และบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 min ปั่นเหวี่ยง 3,000 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 7 min เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 5 ml ของ $CaCl_2$ solution ที่แช่เย็น แล้วเขี่ยตะกอนเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยกระจายดีไม่จับเป็นก้อน (ทำในน้ำแข็งและใช้แท่งแก้วที่แช่เย็นเขี่ยเบาๆ) ปั่นเหวี่ยง 2,500 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 min เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม 5 ml ของ $CaCl_2$ solution ที่แช่เย็น แล้วเขี่ยตะกอนเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยกระจายดีไม่จับเป็นก้อน (ทำในน้ำแข็งและใช้แท่งแก้วที่แช่เย็นเขี่ยเบาๆ) และบ่มในน้ำแข็ง 30 min ปั่นเหวี่ยง 2,500 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 min เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างอีครั้งโดยเติม 1.5 ml ของ $CaCl_2$ solution ที่แช่เย็น แล้วเขี่ยตะกอนเบา ๆ ให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยกระจายดีไม่จับเป็นก้อน (ทำในน้ำแข็งและใช้แท่งแก้วที่แช่เย็นเขี่ยเบาๆ) แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube ที่แช่เย็น หลอดละ 50 µl และเก็บที่ -80 °C

ทำการตรวจสอบ competency โดยสุ่มมา เพื่อ transform ด้วย plasmid เช่น pUC 19 หรือ derivative อื่น ๆ

7. การวิเคราะห์โมเดลสามมิติ

การแปลรหัสทำโดยใช้ ExPASy - Translate tool (http://web.expasy.org/translate/)

การสร้างโมเดลของโปรตีน ทำผ่าน SWISS_MODEL (https://swissmodel.expasy.org/) Swiss Institute of Bioinformatics

การ cloning gene *proA1*

การโคลนนิ่งยีน ใส่ pGT-19 cloning vector โดยใช้ TA cloning technique และทำการคัดเลือกโคลนที่มี insert ทำโดยใช้เทคนิค colony PCR และไพร์เมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ชิ้น insert

ทำการเพาะเลี้ยงโคลนที่มี insert ในอาหาร LB ที่มี 100 µg/ml ampicillin

การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดของ QIAprep Spin Miniprep Kit

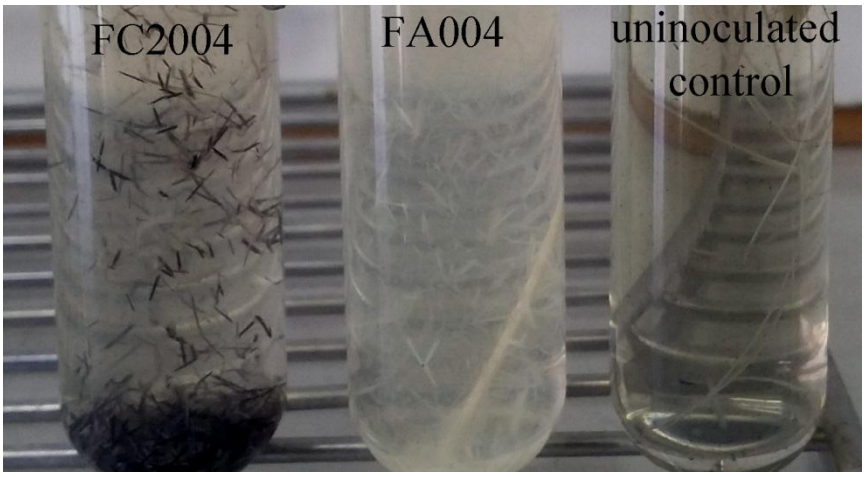
การออกแบบไพร์เมอร์มีการเติมเบสตัดจำเพาะ (5’ CATATG 3’) ของ Nde I restriction endonuclease ที่ 5’ ของ forward primer และเบสตัดจำเพาะ (5’ GGATCC 3’) ของ BamH I restriction endonuclease ที่ 3’ ของ reverse primer หรืออาศัย BamH I restriction endonuclease site ของพลาสมิด pGT-19 vector

ก่อนโคลนนิ่ง insert เข้าสู่ pET11a expression vector ทำการตัด insert ออกจาก cloning vector ด้วย restriction enzymes Nde I และ Bam HI แล้วจึงโคลนนิ่งโดย ligation กับ vector เพื่อให้ insert อยู่ภายใต้ T7 promoter จากนั้น transformation เข้าสู่ expression host เช่น *E. coli* BL21(DE3) pLyss หรือ *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLyss

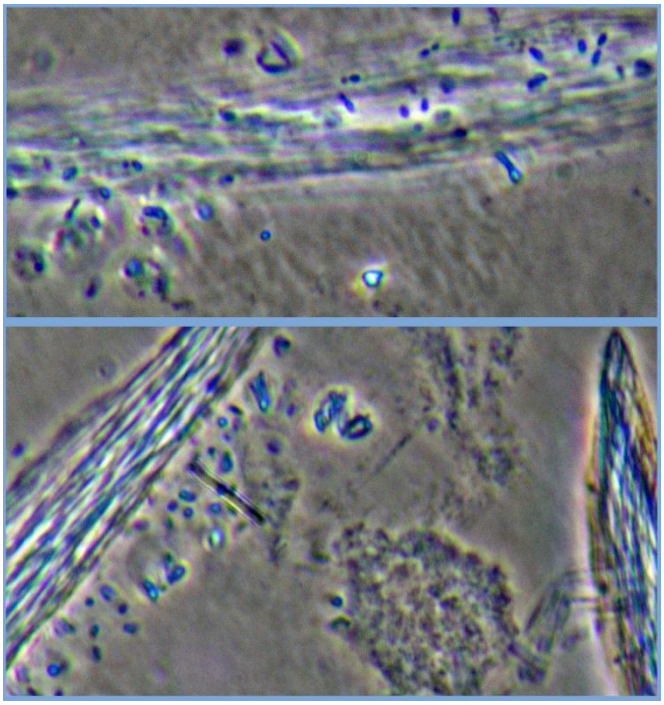
ผลการวิจัยและวิจารณ์ (Result and Comment)

1. การค้นหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีก

ทำการเลี้ยง *Fervidobacterium* spp. ที่มีอยู่ใน stock culture collection ในอาหาร FD medium และบ่มที่อุณหภูมิ 75 – 80 °C ตามความเหมาะสม ผลการทดลองพบว่า *Fervidobacterium* sp. strain FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. strain FA004 สามารถย่อยขนเป็ดได้ภายใน 1-2 วัน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การย่อยขนเป็ดที่ 80 °C โดย *Fervidobacterium* sp. strain FC2004 และ *Fervidobacterium* sp. strain FA004 เทียบกับ uninoculated control (ขวาสุด)



ภาพที่ 2 เซลล์ของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ที่มีการย่อยสลายขนเป็ดหลังจากบ่มไว้ 24 h

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast แสดงเซลล์ของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ใน culture 24 h (ภาพที่ 2) จากภาพที่ 2 ตัวแบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ (pleomorphic shapes) พบทั้งที่เป็นแท่ง (rod shaped) และที่มีลักษณะเป็นถุงเยื่อหุ้มทรงกลมภายในบรรจุเซลล์มากกว่า 2 เซลล์ขึ้นไป ที่เรียกว่า “rotund body” เกาะอยู่กับเศษขนเป็ดและภายในโพรงของก้านขนเป็ด

2. การค้นหายีน protease จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004

การทำ shortgun sequencing สามารถพบชิ้น DNA ที่มี open reading frame (ORF) ขนาด 1569 เบส (ภาพที่ 3) จากภาพที่ 3(A) แสดงนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1 ถึง 1969 นิวคลีโอไทด์ 1 – 200 แสดงบริเวณปลาย 5’ ของ ORF เบสเริ่มต้นตรง G (^{201}G) ของ valine codon (5’ GUG 3’) ซึ่งแทน methionine codon (5’ AUG 3’) ยีนมีความยาว 1569 เบส ประกอบด้วยกรดอะมิโน 522 หน่วย และพบ putative ribosome binding site (^{189}*GGAG*^{192}) ทาง 5’ เหนือ valine codon ตัวแรก

(A)

```
>Consensus_A1 From 1-1969 (1094926 to 1096894) (±200)

1
AAAGGCCTAGCGGAGAAACGATAAGCGAGCTTTTAGTAGGCCACCCGTACGAGTGGGGACTTGAACTGATCG
TTGCTGAGTGGCGAGATGAAAGTAATTCGTCCATTTCGATCTCACTCAACTGTGACTACAATTCTAAGTTTG
                                                        ProT1AF →
GAGCTTACCAGATTCCGCCGGAAAGGTACTACCTGTTTGTAACGGGAGGGAACTGAGTGCGTAGACCCGTTA
ACGTCTTAATCTTGGTTTTTTTGGTTTCCATCGTAGCCACGTTTTCCTGCGTGAAGTTTCCAGATACCAAAA
CCGCTGGTGAAGAAGTGTTCCTGAACAGTCTCGATCATCCGCACGAGCAAGGTAAACTCTTGGTTGGATTTT
CCGAAGAAGCTGCGGTTTACGAACTTGCACGCGAACTTGGTGCGGTGGTTTTGGGTGTGGATAAGGTTTTAA
AATTTGCGGCACTCGGTGTGCGCGAAGAACTGGATAAGGTTTACGCTAAACTGAAGAATTTAAGAATCGAAG
GTGTGACGTACGTTGAACCGAGTTATGTCAGAACTATTCCATCCGTTCTGGAGCTTCCCACTCCGCGA
CD125F→
GTAACCGATGCTGGCACCGACCTGAAAATTCTTGAGAACGAGAGTAAATACCTTTGGGGCTTGCAAGTAACG
GAAATCAAGAAGGCGTGGGAGCTTGGATTTACCGGTGACGGCGTAATCGTCGCGGTTTTGGACACGGGGGTA
GACGGTACACATCCAGATCTCGCACCAAACGTGATAAAAGGTTACAACGCGGTCAACGGAAGCGAGATTGCA
CCGTCAACTGATAGTTCGATAGGTGGTGCACACGGAACACATGTGGCCGGTACGATTGCCGCCGTTTTGGAT
GGAAAGGGAGTTGTTGGCGTTGCACCGAAAGCGAAGATCATGCCAGTGGTGATTTTCGGGAGTTGGTACGTC
GGCGATGATAAAGTTGCAGAGGCTATCCGCTGGGCGGTACAAAACGGGGCCAAAGTGTTGAGCAACTCCTGG
GGTGGGATGGGTTATTCGATGACGCTAAAACGGGCGATTGACTATGCGTTGGAGAACGGTGTAGTTGTCGTC
GCCGCCGCTGGAAACAGTTCGGCTTACCAATCGTCATTGTATCCCGCGAATTATCCGGGCGTTATCCAAGTT
GGCGCCGTTGAAAACGGTGAACCTCCGTTCACTACGAGTTTTTCAAACAGGAGCCCTTTGGTTTCGGTTGGA
GCACCTGGTAGATTGGTGCTCTCAACCATGCCGATGCGCGGATCGGCTGGTTACGAGAGTGGTTCTTTGTAT
TCTTCCGAGAACGGTGGTTACTACGGGTTCATGAGTGGTACGTCGATGGCTACACCACATGTTTCCGGAATG
GCTGCGCTTTTGCTTCAAAAGTTTCCCAGCGCAAAACCTTGGCAAATCAGAAAACTGATCGAAAACGGTGCA
                    ← CD421R
CGGGATATAGATTTACCTGGCTTGGACGAACATTCCGGCTACGGTTTACTGAATGCCCGTTCCGTGGGGCTT
GAGCTTCCTGAGAATGGAGCGGCAAACGTGGTGGTAAAGGTGAAAGTCAATGGAAAAGTAGTAACCGGTGCC
ATTGTTTCGTTGTTAGGAAAAAACGGGATAAGTTACGCACGTAGGTACTTTGCGTTGACCGATGTGGGAATC
GCGAAGTTCCTGGGAATCGATGTTGGAGAGTACAGAATGATTGTTTCAAGCCAGGAAAAATGCTTCGAGCAA
                                          ←ProT1AR
GAAGTAAACATAAATTCGGACGTGCAAATTGAAGTTGAACTATAGTATCCTCCCCGAGATGCCCGAATTATC
TTGTTTACTCCCAACTCACAACGCTCAGTTAGCCATCCCCAGCATTTTTATCGTCAGCGTTTGACTCTTTGT
GGGGGTCCCAACTGGTTGATACGCACCGGTGACGATCCTCGGATCGTAAACGTAAGCTTTTTTGTAACCTGT
GATAATCTGACCTGTTGACGGATTAAATG 1969
```

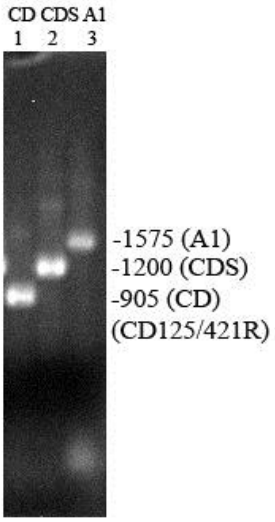
(B)

```
 Translated sequence of proA1 (201 to 1769)

1   VRRPVNVLIL VFLVSIVATF SCVKFPDTKT AGEEVFLNSL DHPHEQGKLL VGFSEEAAVY 60
61  ELARELGAVV LGVDKVLKFA ALGVREELDK VYAKLKNLRI EGVTYVEPSY VRTIPSVLEL 120
121 PTPRVTDAGT DLKILENESK YLWGLQVTEI KKAWELGFTG DGVIVAVLDT GVDGTHPDLA 180
181 PNVIKGYNAV NGSEIAPSTD SSIGGAHGTH VAGTIAAVLD GKGVVGVAPK AKIMPVVIFG 240
241 SWYVGDDKVA EAIRWAVQNG AKVLSNSWGG MGYSMTLKRA IDYALENGVV VVAAAGNSSA 300
301 YQSSLYPANY PGVIQVGAVE NGEPPFTTSF SNRSPLVSVG APGRLVLSTM PMRGSAGYES 360
361 GSLYSSENGG YYGFMSGTSM ATPHVSGMAA LLLQKFPSAK PWQIRKLIEN GARDIDLPGL 420
421 DEHSGYGLLN ARSVGLELPE NGAANVVVKV KVNGKVVTGA IVSLLGKNGI SYARRYFALT 480
481 DVGIAKFLGI DVGEYRMIVS SQEKCFEQEV NINSDVQIEV EL 522
```

ภาพที่ 3 (A) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน putative *proA1* บริเวณ 200 เบสก่อนและหลัง open reading frame (ORF) ยีนเริ่มต้นที่ GTG (โคดอน Val) สัญลักษณ์: บริเวณขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งเกาะของไพร์เมอร์ ตัวเอนหนา แทน ribosome binding site และ (B) translated protein (ProA1) ตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 201 ถึง 1769 บริเวณขีดเส้นใต้แทน catalytic amino acid triad

การจำลองด้วยเทคนิค PCR และใช้คู่ไพร์เมอร์ ProT1AF/ProT1AR จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1575 bp ซึ่งมี ORF ของ ProA1 (522 กรดอะมิโน) การจำลองด้วยคู่ไพรเมอร์ CD125F/CD421R จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 905 bp ซึ่งประกอบด้วยเพปไทด์บริเวณ CD (ตั้งแต่ V125 ถึง D421, 296) เรียกเพปไทด์สายนี้ว่า “CD125” หรือ “CD” และการจำลองด้วยคู่ไพรเมอร์ CD125F/ProT1AR จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1200 เบส ซึ่งประกอบด้วยเพปไทด์บริเวณ CD และ SD เรียกเพปไทด์สายนี้ว่า “CDS” (ภาพที่ 4) จากภาพที่ 4 แสดงผลิตภัณฑ์ ขนาด 1575 bp, 905 bp และ 1200 bp ที่ถูกจำลองด้วยคู่ไพร์เมอร์ ProT1AF/ProT1AR, CD125F/CD421R และ CD125F/ProT1AR ตามลำดับ



ภาพที่ 4 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการจำลองด้วยคู่ไพร์เมอร์ ProT1AF/ProT1AR, CD125F/CD421R และ CD125F/ProT1AR สัญลักษณ์: แถวที่ 1 จำลองด้วย ProT1AF/ProT1AR แถวที่ 2 จำลองด้วย CD125F/CD421R และ แถวที่ 3 จำลองด้วย CD125F/ProT1AR

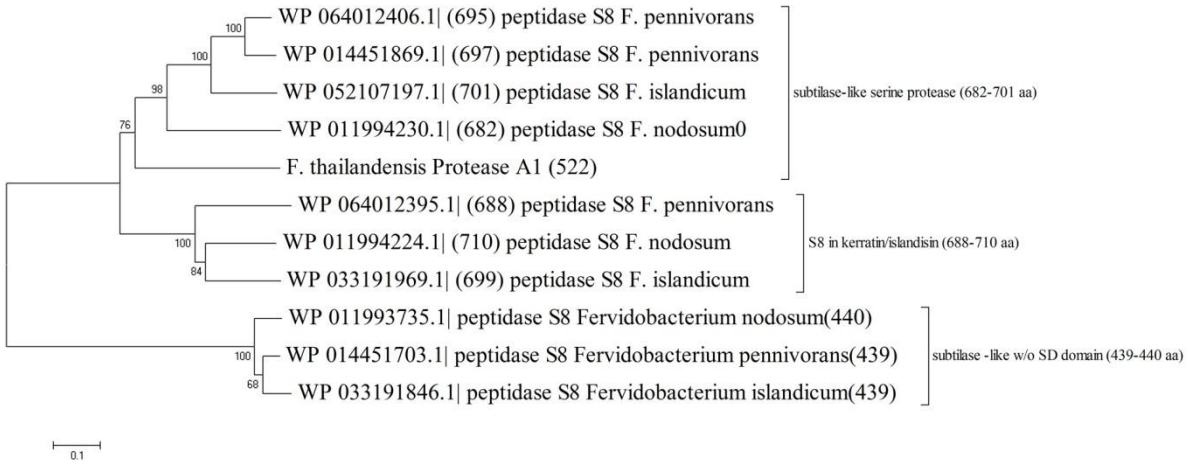
การ BlastP กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าโปรตีน ProA1 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ**เอนไซม์** peptidase S8 จาก *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078^{T} (WP_064012406.1; 52 %), *F. islandicum* AW-1 (WP_052107197.1; 48 %) และ *F. nodosum* Rt17-B1^{T} (WP_011994230.1; 48 %) และคล้ายกับ subtilase จาก *Thermosipho africanus* (WP_004102466.1; 47%) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ดังกล่าวมีขนาดประมาณ 700 กรดอะมิโน (ในที่นี้เรียกว่า “large S8_family serine protease” ซึ่งหมายถึง subtilase ที่มีขนาดใหญกว่า 650 กรดอะมิโน) และไม่พบว่ามีโปรตีนขนาด 522 กรดอะมิโนหรือใกล้เคียงอยู่ใน complete genomes ของแบคทีเรียชอบร้อนที่เป็นญาติกันคือ *Fervidobacterium pennivorans*, *F. islandicum* AW-1 และ *F. nodosum* Rt17-B1^{T} อย่างไรก็ตาม มีขนาดใหญ่กว่า subtilysin อีกกลุ่มหนึ่ง (ในที่นี้เรียกว่า “small S8_subtilase” ขนาดประมาณ 440 กรดอะมิโน) กลุ่มแรก (large S8_subtilase) รวมถึง keratinolytic enzymes จาก thermophilic *Fervidobacterium* spp. ซึ่งรวม fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078^{T} (WP_064012395.1) และ islandisin จาก *F. islandicum* AW-1 (WP_033191969.1) โปรตีเอสทั้งสองชนิดนี้ สามารถย่อยเคอราตินได้ (Godde et al., 2005; Kluskens et al., 2002)

การค้นหาโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI พบว่า *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078^{T} (CP003260.1), *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (CP014334.1) และ *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1^{T} (CP000771.1) มีโปรตีนที่เป็น large S8_subtilases (ขนาด 682-710 กรดอะมิโน) ใน complete genome sequences สายละ 2 ชนิด ดังต่อไปนี้ WP_104451857.1 และ WP_014451869 จาก *F. pennivorans* DSM 9078^{T}, WP_011994230.1 และ WP_011994224.1 จาก *F. nodosum* Rt17-B1^{T} และ WP_052107197.1 และ WP_033191969.1 จาก *F. islandicum* AW-1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ small S8_subtilase อีก 1 ชนิด อยู่ใน complete genome คือ WP_014451703.1 (439 กรดอะมิ

โน), WP_033191846.1 (439 กรดอะมิโน) และ WP_011993735.1 (440 กรดอะมิโน) จาก CP003260.1, CP014334.1 และ CP000771.1 ตามลำดับ

3. การศึกษา phylogeny ของยีน subtilases

การศึกษาเปรียบเทียบทาง phylogenetic analysis พบว่า ProA1 (522 กรดอะมิโน) อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ large S8_subtilases และแตกต่างจากกลุ่ม small S_8 subtilase (ภาพที่ 5) แสดงว่า ProA1 อาจเป็น intermediate isoform ระหว่าง large กับ small_S8 หรืออาจเป็น truncated mutant S8_subtilase ของ large homolog



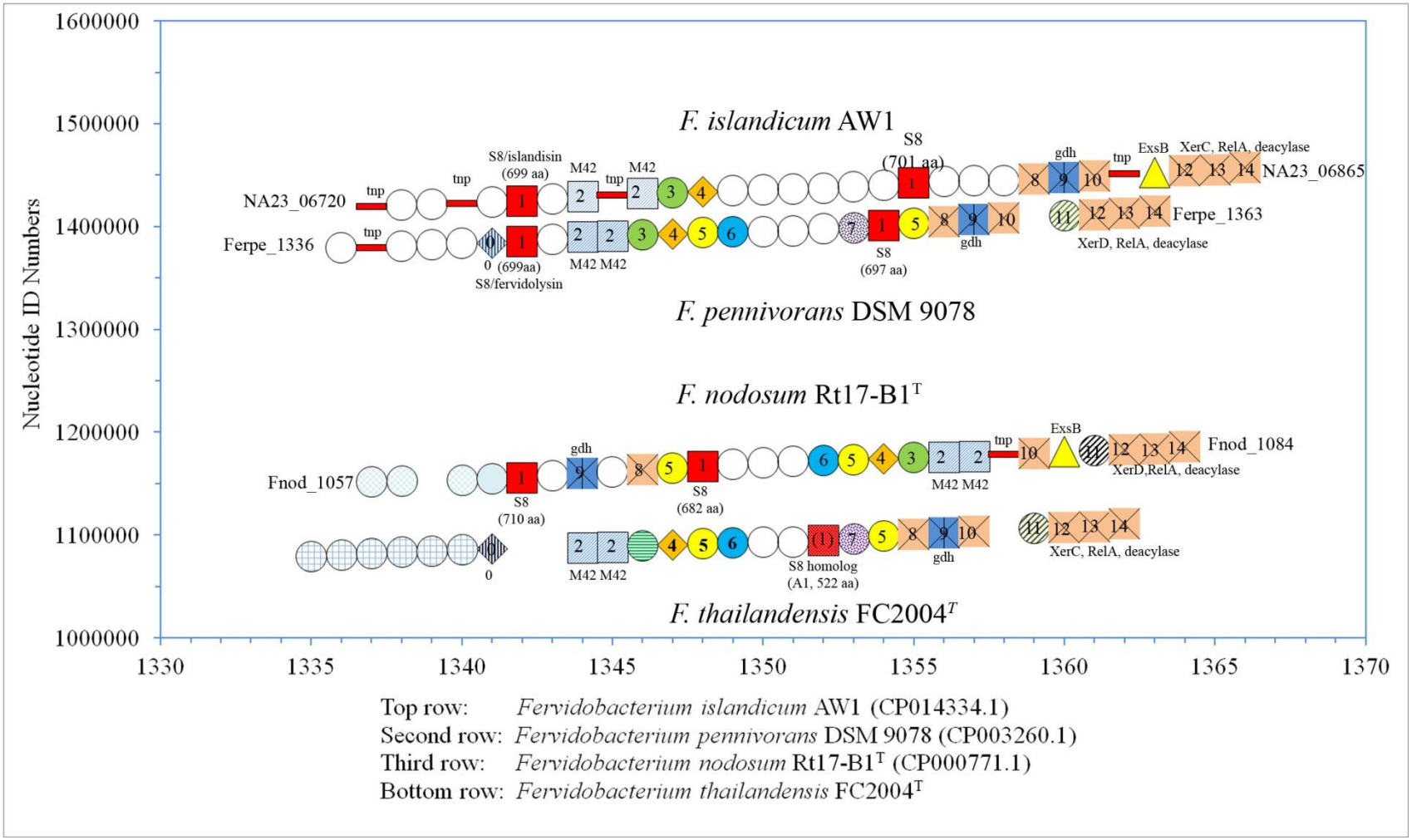
ภาพที่ 5 Phylogenetic analysis ของ proteases ใน super family serine proteases

4. การศึกษาอัลลิว (allele) ของ large subtilase S8

การ mapping บริเวณอัลลิว (alleles) ระหว่าง large S8_subtilases ทั้งสอง loci (รวม fervidolysin และ islandisin) ใน complete genome sequences ทั้งสาม Accession Numbers CP0143341.1 (*F. islandicum* AW-1), CP003260.1 (*F. pennivorans* DSM 9078^{T}) และ CP000771.1 (*F. nodosum* Rt17-B1^{T}) และฐานข้อมูลของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ผลการทดลองแสดงดังภาพ

ที่ 6 จากภาพที่ 6 พบว่า *Fervidobacterium* sp. FC2004 มี large S8_subtilase เพียง 1 homolog และไม่พบ homolog ที่เป็น fervidolysin (WP_014451857.1) และ islandisin (WP_033191969.1) การเปรียบกับ CP003260.1 (*F. pennivorans* DSM 9078^{T}) พบว่ามีการจัดเรียงของยีนอื่น ๆ คล้ายกัน แต่ยีน *proA1* สลับตำแหน่งกับยีน carboxypeptidase regulatory-like domain (CarboxypepD_reg) (หมายเลข 7 ในภาพที่ 6) และไม่พบ large S8_subtilase ที่อยู่ระหว่าง ribokinase (sugar kinase) (หมายเลข 0 ในภาพที่ 7) กับ M42 Peptidase/ Endoglucanases/M42 glutamyl aminopeptidase (หมายเลข 2 ในภาพที่ 7) ผลการทดลองแสดงว่า ในบริเวณ homologous ชิ้นนี้ของแบคทีเรียทั้งสามสปีชีส์ของจีนัส *Fervidobacterium* มี large S8_subtilase อยู่ 2 ชุด แต่ใน *Fervidobacterium* sp. FC2004 ที่พบในประเทศไทยพบ ProA1 เพียง 1 ชุดและมีขนาดสั้นกว่า (522 กรดอะมิโน) แสดงว่าอาจเกิด recombination และทำให้การจัดเรียงองค์กรเปลี่ยนแปลงจีโนมเกิดขึ้นในสายพันธุ์ FC2004 เพราะฉะนั้น ProA1 อาจเป็น truncated mutant ของ large S8_subtilase ที่บริเวณ SD2 ขาดหายไป อย่างไรก็ตามในจีโนมของสายพันธุ์ FC2004 อาจมี large S8_subtilase อีกหนึ่ง homolog นอกบริเวณดังกล่าว

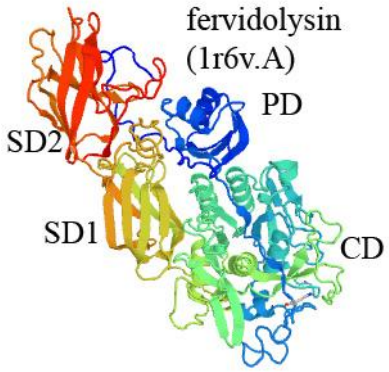
ภาพที่ 6 แผนผังแสดงตำแหน่งสัมพัทธ์ของยีนและ ORFs บริเวณ large S8_subtilases ของ *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078^{T} (CP003260.1: 1379255 to 1379581), *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (CP014334.1: 1419430 to 1457824), *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1^{T} (CP000771.1: 1151958 to 1166477) และ *Fervidobacterium thailandense* FC2004^{T} (1079770 to 1080543) สัญลักษณ์: สี่เหลี่ยม สี่เหลี่ยมและกากบาท วงกลม และสามเหลี่ยม แทนยีนหรือ open reading frame เครื่องหมาย ขีดสีแดง (red dash line) แทน transposase (tnp) ข้าวหลามตัดลายและ “0” แทน ribokinase (sugar kinase) สีเหลี่ยมสีแดงและ “1” แทน Peptidases_S8_serine protease (Fervidolysin/subtilisin_like protease) สี่เหลี่ยมลาย และ “2” แทน M42 Peptidase/Endoglucanases/M42 glutamyl aminopeptidase วงกลมเขียว และ “3” แทน Septum formation inhibitor MinC ข้าวหลามตัดและ “4” แทน phosphohydrolases วงกลมทึบสีเหลืองและ “5” แทน diguanylate-cyclase (GGDEF domain) วงกลมทึบสีฟ้าและ “6” แทน prepilin-type N-terminal cleavage วงกลมลายจุดและ “7” แทน carboxypeptidase regulatory-like domain (CarboxypepD_reg) สี่เหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “8” แทน ABC-type multidrug transport system สี่เหลี่ยมสีน้ำเงินพร้อมเส้นทะแยงมุมและเส้นแบ่งและ “9” แทน glutamate dehydrogenase/leucine dehydrogenase สี่เหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “10” แทน formyltetrahydrofolate synthetase/formate--tetrahydrofolate ligase สี่เหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “11” แทน Ribonuclease III C terminal domain สี่เหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “12” แทน site-specific recombinase XerD /Phage integrase family, N-terminal SAM-like domain/recombinase XerC สี่เหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “13” แทน (p)ppGpp synthetase, RelA/SpoT family สี่เหลี่ยมสีชมพูพร้อมเส้นทะแยงมุม และ “14” แทน (p)ppGpp synthetase, RelA/SpoT family สามเหลี่ยมสีเหลืองแทน ExsB family regulator Ferpe_1336 ถึง Ferpe_1363 แทนยีน locus ID ใน complete genome sequence ของ *F. pennivorans* (35986 nt), NA23_06720 ถึง NA23_06865 แทนยีน locus ID ใน complete genome sequence ของ *F. islandicum* (38394 nt), Fnod_1057 ถึง Fnod_1084 แทนยีน locus ID ใน complete genome sequence ของ *F. nodosum* (34497 nt) และ locus ID ของ *F. thailandensis* FC2004 (31557 nt) แกน Y แทน coordinates ของลำดับนิวคลีโอไทด์ แกน X แทน locus ID ของ *F. pennivoran* (Ferpe_1336 ถึง Ferpe_1363) ส่วน locus IDs ของสปีชีส์อื่น เพื่อการนำเสนอได้แปลงหมายเลขให้สอดคล้องกับ Ferpe ID 13642 (แทน S8_fervidolysin) เทียบเท่าตำแหน่งสัมพัทธ์ของ Fnod_1062 และ NA23_06725


Nucleotide ID Numbers
1600000
1500000
1400000
1300000
1200000
1100000
1000000
1330
1335
1340
1345
1350
1355
1360
1365
1370
F. islandicum AW1
NA23_06720
Ferpe_1336
S8/islandisin (699 aa)
S8 (701 aa)
NA23_06865
Ferpe_1363
XerC, RelA, deacylase
XerD, RelA, deacylase
S8/fervidolysin
S8 (697 aa)
F. pennivorans DSM 9078
F. nodosum Rt17-B1T
Fnod_1057
Fnod_1084
S8 (710 aa)
S8 (682 aa)
XerD,RelA, deacylase
S8 homolog (A1, 522 aa)
XerC, RelA, deacylase
F. thailandensis FC2004T
Top row: Fervidobacterium islandicum AW1 (CP014334.1)
Second row: Fervidobacterium pennivorans DSM 9078 (CP003260.1)
Third row: Fervidobacterium nodosum Rt17-B1T (CP000771.1)
Bottom row: Fervidobacterium thailandensis FC2004T

ภาพที่ 6

5. การวิเคราะห์โมเดลสามมิติของ ProA1 และการพิสูจน์เอกลักษณ์

โมเลกุล large S8 และ small S8_subtilases ของ *Fervidobacterium pennivorans, F. nodosum* และ *F. islandicum* และ ProA1 จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004 ที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น ประกอบด้วยโปรตีนขนาด 682 – 710 กรดอะมิโน, 439-440 กรดอะมิโน และ 522 กรดอะมิโน ตามลำดับ ในจำนวนนี้ fervidolysin เป็น large S8_subtilase ที่มีกิจกรรม keratinase (ขนาด 699 กรดอะมิโน) จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติโดยใช้ข้อมูล X-ray crustal structure (Kim et al., 2004) ซึ่งศึกษาจาก mutant fervidolysin (A200/H200) ที่เปลี่ยน active residue H200 เป็น A200และตัดส่วนของ signal peptide ออก โมเดลสามมิติของ fervidolysin (SWISS PORT no. 1r6v.1.A) ประกอบด้วย 4 โดเมน ดังต่อไปนี้ propeptide domain (PD), catalytic domain (CD), sandwich domain 1 (SD1) และ sandwich domain 1 (SD1) (ภาพที่ 7) sandwich domain เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า substrate binding domain



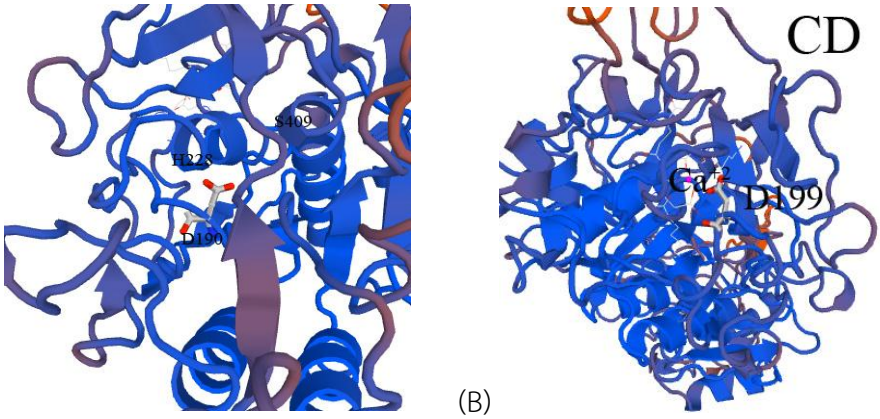
ภาพที่ 7 โมเดล 3 มิติของ fervidolysin จาก *Fervidobacterium pennivorans* DSM9078^{T} (Kim et al., 2004)

โดเมน PD เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า prepeptide หรือ precursor domain อาจทำหน้าที่ช่วยในการขดของเอนไซม์ (folding) และมีบทบาทยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ถูกสังเคราะห์เป็น

propeptidase (ไม่มีกิจกรรม) ซึ่งแบคทีเรียจำเป็นต้องตัดส่วนของ PD ออกโมเลกุลเอนไซม์ตั้งต้น (peptidase precursor) เพื่อให้ได้โมเลกุล mature peptidase

โดเมน CD หรือ catalytic domain (ภาพที่ 8A) มี active amino acid residues คือ aspartic acid (D190) histidine (H228) และ serine (S409) และมี calcium binding site ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน glutamic acid (E157) aspartic acid (D199) lysine (K239) aspartic acid (D241) lysine (K243) และ isoleucine (I245) (ใช้ประจุลบของหมู่ carbonyl เพื่อยึดอิออนแคลเซียม) (ภาพที่ 8B)

โดเมน SD1 และ SD2 อยู่ทาง C-terminal ของโมเลกุลเอนไซม์ พบเฉพาะใน large S8_subtilase เท่านั้นเชื่อว่าเป็นโดเมนที่มีบทบาทจับกับ สับสเตรทของเอนไซม์ เช่น เคอราตินและไม่พบใน small S8_subtilase (ภาพที่ 9G, H, I) ผลการศึกษาแสดงว่า small S8_subtilase อาจไม่สามารถ ย่อยเคอราตินซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ เนื่องจากเอนไซม์เข้าถึงสับสเตรทได้ยาก

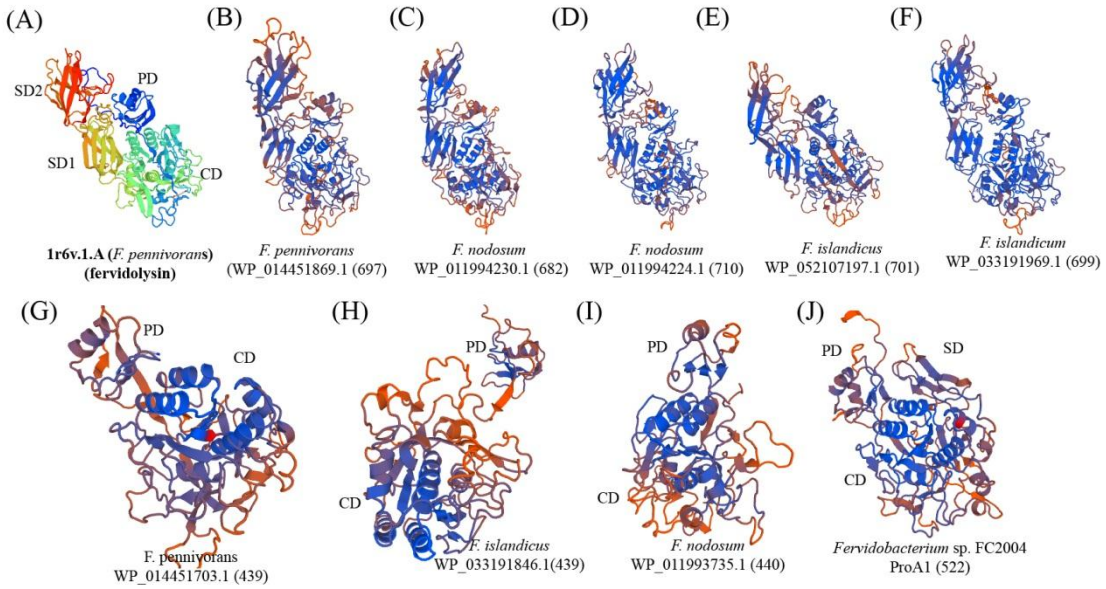


(A) (B)

ภาพที่ 8 โดเมน CD ของ fervidolysin (A) บริเวณ active site และ (B) บริเวณ calcium binding site

การสร้างโมเดลจาก large S8_subtilases ชนิดอื่น ๆ จาก *Fervidobacterium pennivorans F. islandicum* และ *F. nodosum* โดยใช้ Ir6v.1.A เป็นแบบแม่พิมพ์ พบว่าโมเดลของ large S8_subtilases ทุกชนิด มีรูปร่างคล้ายกับ fervidolysin คือประกอบด้วยโดเมน PD, CD และ SD สองชุด (ภาพที่ 9A, B, C,

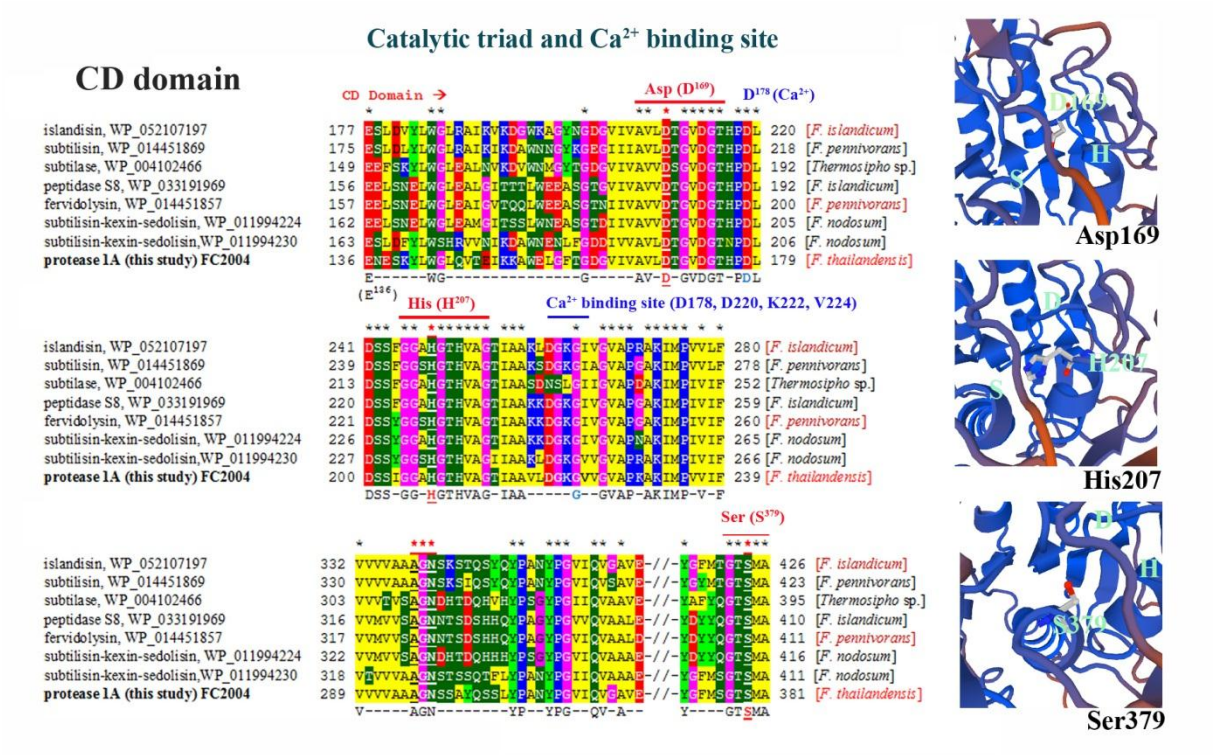
D, E, F) จากภาพที่ 9G-J แสดงโมเลกุลของ small peptidase ซึ่งประกอบด้วย PD และ CD โดยไม่พบ SD การสร้าง 3D-model ของ ProA1 ว่า ProA1 ประกอบด้วยโดเมน PD CD และโดเมนที่คล้ายกับ SD (SD-like) 1 ชุดโดยไม่พบชุด SD2



ภาพที่ 9 แสดงโมเดล 3 มิติ (3D-models) ของ peptidase_S8 family serine proteases จาก *Fervidobacterium pennivorans*, *F. islandicum* และ *F. nodosum* (A) - (F) โมเดลของ large S8_subtilase (A) fervidolysin (Ir6v.1.A เป็นแม่พิมพ์), (B) WP_014451869.1 (*F. pennivorans*), (C) WP_011994230.1 (*F. nodosum*), (D) WP_011994224.1 (*F. nodosum*), (E) WP_052107197.1 (*F. islandicum*), และ (F) WP_033191969.1 (*F. islandicum*), (G) – (I) แสดงโมเดล 3 มิติของ small_S8 subtilases (G) WP_014451703.1 (*F. pennivorans*), (H) WP_033191846.1 (*F. islandicum*) และ (I) WP_011993735.1 (*F. nodosum*) (H) แสดงโมเดล 3 มิติของ ProA1 จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004 สัญลักษณ์: ตัวเลขในวงเล็บแทนจำนวนกรดอะมิโนในโมเลกุล PD แทน propeptide domain, CD แทน catalytic domain และ SD แทน sandwich หรือ substrate binding domain

alignment sequences บริเวณ CD ของ ProA แสดงดังภาพที่ 10 จากภาพที่ 10 พบว่า CD มี highly conserved amino acid sequences และพบ catalytic triad ของ ProA1 ประกอบด้วย aspartic acid (D169) histidine (H207) และ serine (S379) แสดงว่า ProA1 คือ serine protease นอกจากนี้ยังพบ

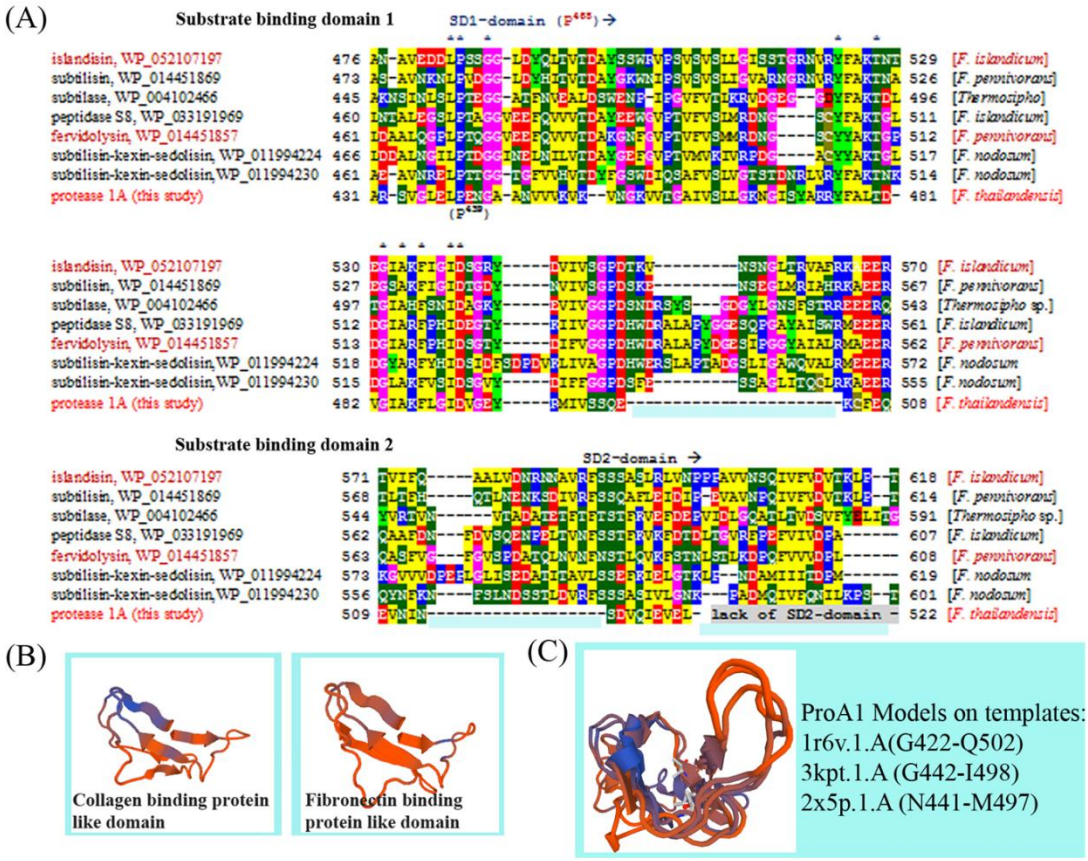
calcium binding site ในโดเมน CD ของ ProA1 (E136, D178, D220, K222, และ V224) แสดงว่า calcium อาจมีผลต่อกิจกรรมของ ProA1



ภาพที่ 10 alignment ของ ProA1 amino acid sequences กับ large S8_subtilase, fervidolysin และ islandisin

การ alignment บริเวณ C-terminal sequences ของ ProA1 (A431 - Y495 segment) กับ large S8_subtilases แสดงดังภาพที่ 11 จากภาพที่ 11A พบว่า กรดอะมิโนที่ 431 (A431) ถึง 514 (N514) มี homologous กับบริเวณ SD1 ของ large S8_subtilases เรียกบริเวณนี้ของ ProA1 ว่า “SD-like” การสร้างโมเดลใช้บริเวณ SD-like region (G422 - Q502) เทียบกับแม่พิมพ์ที่เป็น peotein-protein binding proteins (ภาพที่ 11B, C) ผลการทดลองพบว่า บริเวณ G442 ถึง I498 และ N441 ถึง M497 คล้ายกับบางส่วนของ collagen adhesion protein (3kpt.1) และ fibronectin binding protein (2x5p.1.A) ตามลำดับ และภาพที่นำมาซ้อนกัน (superimposed) ของบริเวณดังกล่าวกับแม่พิมพ์ทั้งสอง สามารถซ้อนทับกันได้ดี (ภาพที่ 11B, C) ผลการทดลองสนับสนุนว่า SD-like อาจมีคุณสมบัติ protein binding protein คล้ายกับ SD1 ของ fervidolysin อย่างไรก็ตาม ProA1 ไม่มีโดเมน SD2 และความสามารถในการ

ย่อยเคอราตินของ mature ProA1 กับ phenotype ในการย่อยขนเป็ดของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 จะเกี่ยวข้องกันหรือไม่ ยังไม่ทราบแน่ชัด และจากหลักฐานทาง genome organization (ภาพที่ 6) อาจเป็นไปได้ว่า *Fervidobacterium* sp. FC2004 มี large S8_subtilase อีกหนึ่งชนิด

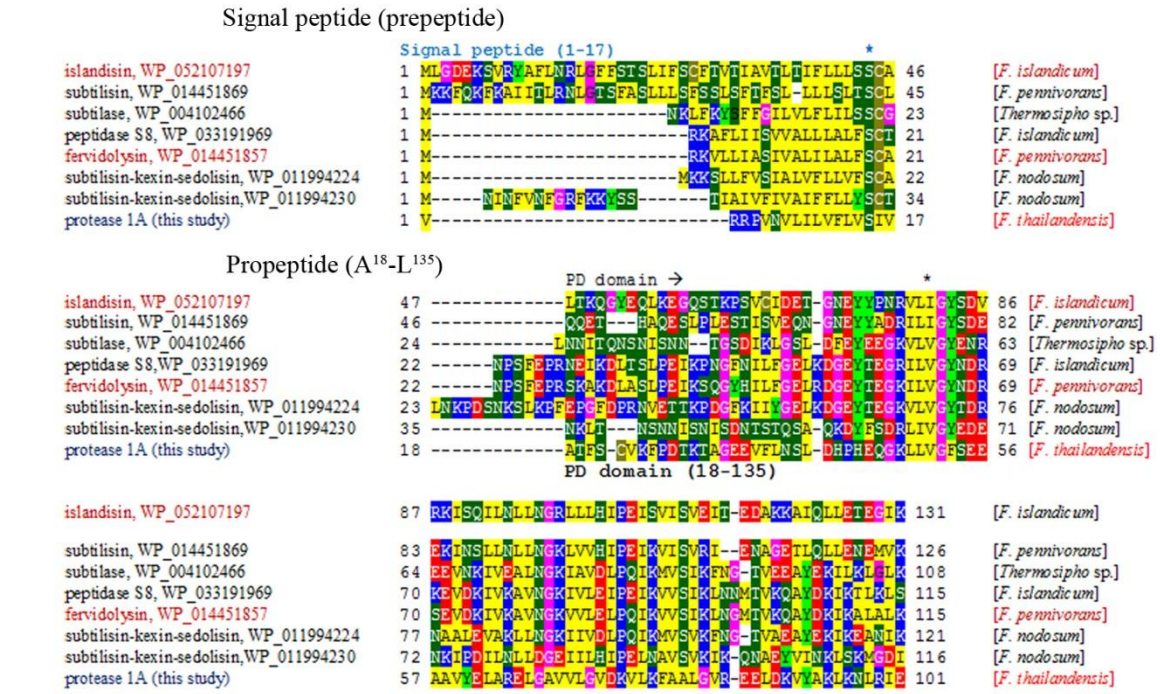


ภาพที่ 11 (A) alignment บริเวณ C-terminal ของ large S8_subtilases กับ ProA1 (B) 3D-model ของ ProA1 สร้างโดยใช้แม่พิมพ์ 3kpt.1.A (collagen binding protein) และ 2x5p.1.A (fibronectin binding protein like domain) (C) ภาพ superimposed images สร้างจากแม่พิมพ์ที่บริเวณโดเมน SD กับ protein binding domains (1r6v.1.A, 3kpt.1.A and 2x5p.1.A)

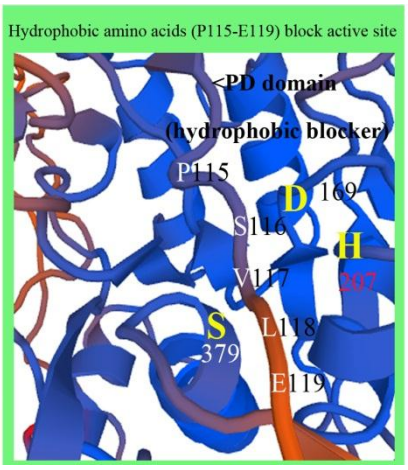
6. ProA1 เป็น proS8_serine protease

การ alignment บริเวณกรดอะมิโนที่ 1-101 (PD) ของ ProA1 กับบริเวณ N-terminal ของ large S8_subtilases แสดงดังภาพที่ 12 จากภาพที่ 12 บริเวณ N-terminal มีมี homologous ของ nonpolar amino acid sequence (ประมาณ 20 กรดอะมิโน) ตรงกับบริเวณ nonpolar amino acid rich signal peptides ของ peptidases แสดงว่า ProA1 น่าจะมี signal peptide ก่อนหน้าบริเวณ PD signal

peptide เป็นสัญญาณให้แบคทีเรียส่งออก ProA1 ดังนั้นคาดว่า ProA1 ถูกสังเคราะห์เป็น extracellular หรือ membrane bound proProA1 precursor (inactive)



(A)



(B)

ภาพที่ 12 (A) alignment บริเวณ signal peptide และ propeptide (B) บริเวณ active groove และ C-terminal ของ PD จากภาพ P115 ถึง L118 พาดขวาง active site (D169, H207 และ S379) ช่วยป้องกันการย่อย substrate

ถัดจาก signal peptide sequence เป็นบริเวณ PD คาดว่า PD อาจเริ่มต้นที่บริเวณใกล้เคียงกับ D27 จนถึงบริเวณใกล้เคียงกับ E136 หรือก่อนหน้านั้นเล็กน้อย PD เป็น homologous sequence ที่มี

conserved hydrophobic regions ภาพที่ 12B แสดงบริเวณ C-terminal ของ PD (P115-E119) ที่พาดผ่าน active groove ของ CD ซึ่งเป็นลักษณะการขดของโปรตีนที่พบตรงกันใน fervidolysin และ small S8_subtilase (WP_014451703.1) ทุกชนิด Kim et al. (2004) รายงานว่าบริเวณ homologous C-terminal ของ PD ใน fervidolysin (ภาพที่ 8A) ที่พาดขวางบริเวณ active groove ทำให้ block การเข้าถึงของ substrate (ยับยั้งกิจกรรม ทำให้เอนไซม์ inactive) ทั้งนี้อาจเพื่อป้องกันเกิด mature ProA1 ภายในเซลล์ ป้องกันการย่อยทำลายตัวเอง (protease ทุกชนิดมี PD ช่วยขัดขวางกิจกรรมของ proenzyme) ผลการศึกษาสอดคล้องกับเอนไซม์ fervidolysin และ islandisin (Kluskens et al., 2002; Nam, et al., 2002; Godde, et al., 2005)

ผลการวิเคราะห์แสดงว่า ProA1 จำเป็นต้องตัดส่วนของ PD ออกจากโมเลกุล เพื่อเปลี่ยน ProA1 precursor เป็น mature ProA1

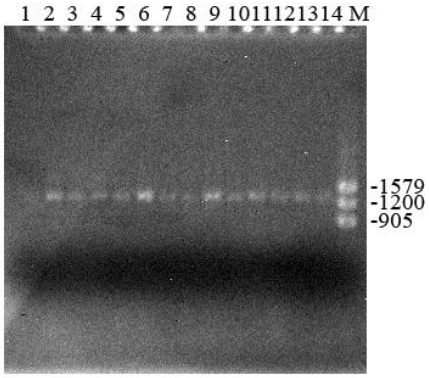
7. การ cloning ยีน *proA1*

การจำลองยีนส์ *proA1* ด้วยคู่ไพร์เมอร์ ProT1AF/ProT1AR ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1579 bp (ภาพที่ 4) และมี ORF ที่แปลรหัสได้ 522 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3B) ซึ่งประกอบด้วย N-terminal segment ที่เป็น signal pepride (ประมาณ 20 กรดอะมิโน) ถัดมาคือส่วนของ PD (ประมาณ 120 กรดอะมิโน) CD และ SD-like ตามลำดับ (ภาพที่ 10, 11, 12) ซึ่งเป็น proProA1 และน่าจะเป็น inactive peptidase

การจำลองยีน *proA1* ด้วยคู่ไพร์เมอร์ CD125F/CD421R สามารถจำลองชิ้น DNA ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 905 bp (ภาพที่ 4) ที่มี ORF ที่แปลรหัสได้ 297 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3B) และเป็นบริเวณที่ครอบคลุม catalytic triad และไม่รวมบริเวณ SD-like (ภาพที่ 10)

การจำลองยีนส์ยีน *proA1* ด้วยคู่ไพร์เมอร์ CD125F/ProT1AR สามารถจำลองชิ้น DNA ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1200 bp (ภาพที่ 4) ที่มี ORF ที่แปลรหัสได้ 398 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3B) และเป็นบริเวณที่ครอบคลุม catalytic triad (ภาพที่ 10) และ SD-like (ภาพที่ 11)

ก่อนการโคลนิ่ง ได้กำจัดนิวคลีโอไทด์และ dNTP ด้วย PCR clean kit ขั้นแรกทำการ cloning โดยวิธี TA cloning ใส่ชิ้น insert DNA ที่ได้ใน pTG-19 vector และ transform *E. coli* DH5α การทดลอง cloning ชิ้น DNA ขนาด 1200 bp ซึ่งมีรหัสครอบคลุม บริเวณ CD และ SD-like และเรียกแทนในที่นี้ว่า CDS โปรตีนที่คาดว่าจะได้รับจะเป็น (putative) mature ProA1 ที่มี SD-like domain ในโมเลกุล ผลการทดลองและการ screening หาโคลนที่มี insert (จำลองจากคู่ไพร์เมอร์ CD125F/ProT1AR) โดยใช้ colony PCR สามารถได้โคลนที่มี plasmid และ insert ที่ต้องการ รูปที่ 13 แสดงผลของ colony PCR จากรูปที่ 13 แสดงผลิตภัณฑ์ของ positive clones ที่ถูกจำลองโดยเทคนิค colony PCR และใช้คู่ ไพร์เมอร์ CD125F/ProT1AR



ภาพที่ 13 Colony PCR แสดงโคลนที่มี insert CDS

ทำการสกัด plasmid 10 โคลน เพื่อทำ sequencing ยืนยันลำดับเบสต่อไป

4. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)

Fervidobacterium sp. FC2004 เป็น extreme thermophile ที่สามารถย่อยขนเป็ดและขนสัตว์ปีกได้ที่ 80 °C ดังนั้นอาจมีเอนไซม์ทนร้อนที่สามารถย่อยเคอราตินในขนสัตว์ปีกได้ ในงานวิจัยนี้สามารถ identify ยีน serine protease ชนิดหนึ่ง จาก *Fervidobacterium* sp. FC2004 (ภาพที่ 3) เรียกในที่นี้ว่า “ProA1” โมเลกุลของ ProA1 precursor มี signal peptide ทาง N-terminal (ภาพที่ 12A) การศึกษาทาง phylogenetic analysis (ภาพที่ 5) และการสร้างโมเดล 3 มิติ สามารถแสดงโครงสร้างของ ProA1 คล้ายกับ fervidolysin (ซึ่งเป็น thermostable keratinase ชนิดหนึ่งจาก *F. pennivorans*) อย่างไรก็ตาม ProA1 มีขนาดสั้นกว่า (ภาพที่ 7) และไม่เคยมีรายงานว่ามี ProA1 ในแบคทีเรียจีนัสนี้มาก่อน การวิเคราะห์การจัดเรียงองค์กรของยีนในโครโมโซม ของแบคทีเรียทั้งสามสปีชีส์ของจีนัส *Fervidobacterium* (ภาพที่ 6) พบว่า *Fervidobacterium* sp. FC2004 ที่พบในประเทศไทยมี ProA1 เพียง 1 ชุดและมีขนาดสั้นกว่า (522 กรดอะมิโน) แสดงว่าอาจเคยเกิดการแลกเปลี่ยนยีน และ gene recombination และทำให้การจัดเรียงองค์กรเปลี่ยนแปลงจีโนมเกิดขึ้นในสายพันธุ์ FC2004 เพราะฉะนั้น ProA1 อาจเป็น truncated mutant ของ large S8_subtilase ที่บริเวณ SD2 ขาดหายไป การศึกษานี้ยังสามารถวิเคราะห์โครงสร้าง 3 มิติและทำนายหน้าที่ของแต่ละโดเมน และได้พิสูจน์ทราบหาตำแหน่ง catalytic triad ทั้งสาม ซึ่งประกอบด้วย D169 H207 และ S379 เรียงอยู่ในระนาบที่มี functional groups (carboxylic ของ aspartic acid, imidazole ring ของ histidine และ hydroxyl ของ serine) ใน active groove (ภาพที่ 10, 12B) ProA1 น่าจะถูกสังเคราะห์เป็น proProA1 precursor ซึ่งไม่สามารถแสดงกิจกรรมภายในเซลล์ ProA1 มี PD ทำหน้าที่ขัดขวางบริเวณ active groove ของเอนไซม์ (ภาพที่ 12B) proProA1 น่าจะเป็น membrane bound หรือ extracellular S8_family serine protease และแบคทีเรียขับออกนอกเซลล์เมื่อพบ signal peptide ในโมเลกุล preproProA1 ดังนั้น proProA1 ต้องถูกย่อยตัดชิ้น PD ออกจากโมเลกุลเพื่อเปลี่ยนเป็น mature ProA1

การโคลนิ่งยีน proProA1 ชิ้นเต็ม (522 กรดอะมิโน) อาจจะได้เอนไซม์ที่ไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ ตามที่เสนอไว้ในวัตถุประสงค์ ในการศึกษานี้จึงทำการดัดแปลงโดยออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ CD โดยเพิ่ม Nde I restriction endonuclease site (5’ CATATG 3’) เรียกว่าไพร์เมอร์นี้ว่า “CD125F” และใช้ร่วมกับไพร์เมอร์ ProA1R (Table 1) การจำลอง DNA ด้วยเทคนิค PCR สามารถจำลองได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 1200 bp ซึ่งคือโดเมน CDS ของ ProA1 (CD+SD) และสามารถโคลนชิ้น DNA นี้ใส่ใน pTG-19 vector สำหรับโคลนนิ่ง เพื่อจะได้ศึกษาต่อไปใน expression vector อย่างไรก็ตามคาดว่ายีนนี้จะเป็นพิษรุนแรงต่อ bacterial host เนื่องจาก CDS เป็น active protease ซึ่งย่อยโปรตีนของ *E. coli* เจ้าบ้านที่ใช้เป็น expression host

กล่าวโดยสรุป การศึกษานี้สามารถค้นพบยีน *proA1* จากจีโนมของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบร้อนที่แยกได้จากน้ำพุร้อนในประเทศไทย *proA1* มีรหัสของ S8_subtilase family serine protease ที่ไม่เหมือนกับ large S8_subtilase family serine protease ที่พบใน *Fervidobacterium pennivorans* DSM 9078^{T} (WP_014451857.1 และ WP_014451869.1), *F. nodosum* Rt17-B1^{T} (WP_011994230.1 และ WP_011994224.1) และ *F. islandicum* AW-1 (WP_052107197.1 และ WP_033191969.1) mature ProA1 น่าจะเป็น thermoactive และ thermostable serine protease การศึกษานี้ได้ระบุโดเมน SD-like ของ ProA1 ถึงแม้ว่า *Fervidobacterium* sp. FC2004 สามารถย่อยขนเป็ดได้ (ภาพที่ 1) โดเมน SD-like ในโมเลกุล mature ProA1 จะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยเคอราตินหรือไม่ยังไม่แน่ชัด และยีโนมของ *Fervidobacterium* sp. FC2004 อาจมี S8_large subtilase อีกชนิดหนึ่งซึ่งอาจมีกิจกรรม keratinase

ปัญหาและอุปสรรค

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่สำคัญคือ ค้นหายีน ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและขนสัตว์ปีก จากแบคทีเรียชอบร้อนสูงในจีนัส *Fervidobacterium* spp. ที่แยกๆ ได้จากน้ำพุร้อนในประเทศไทย แบคทีเรียกลุ่มนี้จึงไม่มีข้อมูล DNA โดยตรงที่ช่วยอำนวยความสะดวกต่อการสืบค้น

ปัญหาในช่วงแรกจึงอยู่ที่การสืบค้นหาตัวยีน และการออกแบบการทดลองจำเป็นต้องเตรียมการล่วงหน้า ทำให้การทดลองต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการเพื่อให้สอดรับกับข้อมูลที่ได้มาใหม่จากการศึกษานี้ อุปสรรคแรกคือการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อจำลองยีน proA1 นั้นเพื่อจำลองโปรตีนทั้งหมด 522 กรดอะมิโน ต่อมาเมื่อทราบถึงโดเมนต่าง ๆ ที่ประกอบกันเป็นตัว proProA1 precursor จึงได้มีการออกแบบไพร์เมอร์เพิ่มเติม

ปัญหาในช่วงถัดมา เกิดจากการที่ mature ProA1 เป็นเอนไซม์โปรตีเอส ดังนั้นการขาดโดเมน PD ในโมเลกุล จะส่งผลให้ CD เป็น active enzyme ที่เป็น intracellular และเป็นพิษรุนแรง in vivo นอกจากนี้อาจมีจากปัจจัยภายในที่ไม่ทราบสาเหตุต่าง ๆ (unknown intrinsic factors) อาจมีการรั่ว (leak) ของ promoter เกิดขึ้นในเซลล์เจ้าบ้าน หรือการแสดงออกไม่มีการ depress หรือ express มากเกินไป หรือโปรตีนที่รั่วซึ่งเป็นเอนไซม์ทนร้อน แต่อาจสามารถแสดงกิจกรรมที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C แม้เพียงเล็กน้อย และด้วยอัตราที่ช้ามาก ๆ อย่างไรก็ตามกิจกรรมเพียงเล็กน้อยสามารถย่อยทำลายโปรตีนและเอนไซม์ที่จำเป็นต่าง ๆ ทำให้แบคทีเรียตายได้ เป็นสาเหตุให้ยีนนี้จึง highly toxic gene และน่าจะมีผลกระทบต่อ ประสิทธิภาพของการโคลนนิ่ง และอาจเป็นสาเหตุให้ transformants ตายหมด ไม่สามารถโคลนนิ่งยีนเพื่อผลิตเอนไซม์ได้

ข้อเสนอแนะ

1 การเลือก expression vector ควรเลือก vector ที่มี tight promoter ควบคุมอย่างแน่นกันการรั่วในระหว่างการ expression

2. การ expression ควรทำที่อุณหภูมิประมาณ 25 $^{\circ}$C ซึ่ง *E. coli* เจ้าบ้านสามารถเจริญได้ แต่ป้องกัน recombinant thermoactive CDS แสดงกิจกรรม และฆ่าเจ้าบ้านได้

3. ควรศึกษาหน้าที่ของแต่ละโดเมนเพื่อยืนยันผลการทำนายด้วยโมเดล

4. ควรทดสอบกิจกรรมของ recombinant ProA1, recombinant CD125 และ recombinant CDS กับ protein ชนิดต่าง ๆ และ keratin

5. ควรศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์และชีวเคมีของ recombinant เอนไซม์

6. ควรศึกษา kinetics ของเอนไซม์

7. ควรประยุกต์ใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์

บรรณานุกรม (Bibliography)

Balk, M., Weijma, J. and Stams, A.J. (2002). *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1361-1368.

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: 143 – 168.

Cedrola, S.M., de Melo, A.C., Mazotto, A.M., Lins, U., Zingali, R.B., Rosado, A.S., Peixoto, R.S. and Vermelho, A.B. (2012). Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(3): 1259-1269.

Cuecas, A., Portillo, M.C., Kanoksilapatham, W. and Gonzalez, J.M. (2014). Bacterial distribution along a 50 ℃ temperature gradient reveals a parceled out hot spring environment. *Microb Ecol* 68: 729 – 739.

Friedrich, A.B. and Antranikian, G. (1996). Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2875 – 2882.

Fardeau, M.L., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Magot, M., Thomas, P., Rimbault, A., Rocchiccioli, F., Garcia, J.L. (1997). *Thermotoga hypogea* sp. nov., a xylanolytic, thermophilic bacterium from an oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1013-1019.

Gegeckas, A., Gudiukaitė, R., Debski, J. and Citavicius, D. (2015). Keratinous waste decomposition and peptide production by keratinase from *Geobacillus stearothermophilus* AD-11. *Int J Biol Macromol.* 75: 158-165.

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*, *Appl Environ Microbiol*. 71(7): 3951-3958.

Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, .C.R. Sleytr, U.B., Stetter, K.O. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol* 144: 324-333.

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 of Japan, and proposal of *Mesoaciditogales* ord. nov., *Mesoaciditogaceae* fam. nov. in the phylum Thermotogae. *Int J Syst Evol Microbiol* 66: 1045 – 1051.

Jannasch, H.W., Huber, R., Belkin, S. and Stetter, K.O. (1988). *Thermotoga neapolitana* sp. nov. of the extremely thermophilic, eubacterial genus *Thermotoga*. *Arch Microbiol* 150: 103-104.

Jeanthon, C., Reysenbach, A.L., L'Haridon, S., Gambacorta, A., Pace, N.R., Glénat, P. and Prieur, D. (1995). *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. *Arch Microbiol* 164: 91-97.

Kanoksilapatham, W., Keawram, P. and Gonzalez, J.M. and Robb, F.T. (2015). Isolation, characterization, and survival strategies of *Thermotoga* sp. strain PD524, a hyperthermophile from a hot spring in Northern Thailand. *Extremophiles* 19: 853 – 861.

Keawram, P. and Kanoksilapatham, W. (2013). 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): 9-16.

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. Vos, W.M., Huber, R. and Oost, J.V.D. (2004). Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to subtilisin. *J. Mol. Biol.* 335: 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* 6(3): 185-194.

Kornitłowicz-Kowalska, T. and Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manag.* 31(8): 1689-1701. Review.

Kublanov, I.V., Tsirul'nikov, K.B., Kaliberda, E.N., Rumsh, L.D., Haertle, T. and Bonch-Osmolovskaia, E.A., (2009). Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium Thermoanaerobacter sp. strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal Rift zone. *Mikrobiologiia*. 78(1): 79-88.

Mori, K., Yamazoe, A., Hosoyama, A., Ohji, S., Fujita, N., Ishibashi, J., Kimura, H. and Suzuki, K. (2014). *Thermotoga profunda* sp. nov. and *Thermotoga caldifontis* sp. nov., anaerobic thermophilic bacteria isolated from terrestrial hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64: 2128-2136.

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. *Arch Microbiol*. 178: 538 – 547.

Ravot, G., Magot, M., Fardeau, M.L., Patel, B.K.C., Prensier, G., Egan, A., Garcia, J.L. and Ollivier, B. (1995). *Thermotoga elfii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium from an African oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol*. 45: 308-314.

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. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63: 4724 – 4729.

Riessen, S. and Antranikian, G. (2001). Isolation of Thermoanaerobacter keratinophilus sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles*. .5:(6) 399 – 408.

Ryu, S-I., Kim, J.-E., Huong, N.T., Woo, E.-J., Moon, S.K. and Lee, S.-B. (2010). Molecular cloning and characterization of trehalose synthase from *Thermotoga maritima* DSM3109: Syntheses of trehalose disaccharide analogues and NDP-glucoses. *Enzyme Microb Technol*. 47(6): 249 – 256.

Siezen, R.J. and Leunissen, J.A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* 6(3): 501-23. Review.

Takahata, Y., Nishijima, M., Hoaki, T. and Maruyama, T. (2001). *Thermotoga petrophila* sp. nov. and *Thermotoga naphthophila* sp. nov., two hyperthermophilic bacteria from the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 1901 – 1909.

Windberger, E., Huber, R., Trincone, A., Fricke, H. and Stetter, K.O. (1989). *Thermotoga thermarum* sp. nov. and *Thermotoga neapolitana* occurring in African continental solfataric springs. *Arch Microbiol*. 151:506-512**.**

Wang, Y., Wang, X., Tang, R.,Yu, S., Zheng, B. and Feng, Y. (2001). A novel thermostable cellulase from *Fervidobacterium nodosum*. *J Mol Catal B: Enzym* 66(3–4): 294 – 301.

Winterhalter, C. and Liebl, W., (1995). Two Extremely Thermostable Xylanases of the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol* 61(5): 1810–1815.

Wu. B., Shi, P., Li, J., Wang, Y., Meng, K., Bai, Y., Luo, H., Yang, P., Zhou, Z. and Yao, B. (2010). A new aminopeptidase from the keratin-degrading strain *Streptomyces fradiae* var. k11. *Appl Biochem Biotechnol* 163(3): 730-739.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 480GM5 medium (1 ลิตร), pH 7.2-7.5

NaCl	0.5	g (อาจลดความเข้มข้น 0-0.5 g/l)
NH_4Cl	0.33	g
$CaCl_2.2H_2O$	0.15	g
$MgCl_2.6H_2O$	0.35	g
KCl	0.3	g
KH_2PO_4	0.3	g
A5 solution	1	ml (มีสูตรอาหารตามข้อ 1.2)
Pancreatic digestion of casein	5	g
Yeast extract	0.5	g
0.02 % Resazurin solution	0.5	ml

1.2 A5 solution (trace metal mix A5), pH 7.4

$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.00494	g/l
$CuSO_4.5H_2O$	0.0079	g/l
H_3BO_3	0.286	g/l
$MnCl_4.4H_2O$	0.181	g/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.039	g/l
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0222	g/l

2. การค้นหาแบคทีเรียที่สามารถย่อยขนสัตว์ปีก

การทดลองทำในอาหาร FD medium ซึ่งมีสูตรอาหารดังต่อไปนี้

2.1 FD medium ประกอบด้วย (/liter)

$K_2HPO_4.3H_2O$	2.09	g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	1.29	g
$(NH_4)_2SO_4$	1.5	g
NaCl	0.3	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	g
$NaHCO_3$	1	g

$CaCl_2.2H_2O$	0.1	g
Pancreatic digestion of casein	1	g
Yeast Extract	1	g
Cystein	0.5	g
0.1% $FeCl_2$	6	ml
A5 solution	1	ml
0.2% Resazurin solution	0.5	ml

<u>ส่วน ค</u> : ประวัติคณะผู้วิจัย

ตอนที่ 1 ประวัติทั่วไป

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาอังกฤษ) นาย วิโรจน์ กนกศิลปธรรม
(ภาษาอังกฤษ) WIROJNE KANOKSILAPATHAM
2. **หมายเลขประจำตัวประชาชน (ต้องระบุ)** **3 1012 01399 97 5**
3. **ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน** √☐ **ข้าราชการ** ☐ พนักงาน

o อาจารย์ o ชำนาญการ
o ผู้ช่วยศาสตราจารย์ o เชี่ยวชาญ
√o **รองศาสตราจารย์** o เชี่ยวชาญพิเศษ
o ศาสตราจารย์ o อื่นๆ (โปรดระบุ).....

เงินเดือน 50,000.00 (บาท) เวลาที่ใช้ทำวิจัย 16 ชั่วโมง/สัปดาห์

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
โทรศัพท์ 034 273045 ต่อ 28805 โทรสาร034 273045
e-mail address: kanoksilapatham@su.ac.th
ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 542 ซอย/ถนนราชมรรคา ตำบล สนามจันทร์
อำเภอ เมือง จังหวัดนครปฐม 73000
โทรศัพท์มือถือ 0810183404

5. **ประวัติการศึกษา**

ปริญญาตรี	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)	
สถาบัน	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปีที่จบ พ.ศ. 2522
ปริญญาโท	วท.ม. (จุลชีววิทยา)	
สถาบัน	มหาวิทยาลัยมหิดล	ปีที่จบ พ.ศ. 2524
ปริญญาโท	M.Sc. (Biotechnology)	
สถาบัน	University of New South Wales, Australia	ปีที่จบ พ.ศ. 2534
ปริญญาเอก	Ph.D. (Marine, Estuarine, and Environmental Sciences)	
สถาบัน	University of Maryland (College Park), U.S.A.	ปีที่จบ พ.ศ. 2547

อื่น ๆ (โปรดระบุ)
รางวัลวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตยอดเยี่ยมประจำปี 2525
จากมูลนิธิศาสตราจารย์ ดร. แถบ นีละนิธิ

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ และแนวเรื่องย่อยด้วย (ถ้ามี)

☐ วิทยาศาสตร์ชีวภาพ สาขาจุลชีววิทยาและจุลชีววิทยาประยุกต์ แขนงการเพาะเลี้ยงและอณูพันธุศาสตร์

☐ วิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงวิชา เทคนิคการแพทย์

อื่น ๆ พันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์ ระบบนิเวศน์ของน้ำพุร้อน

การเพาะเลี้ยง hyperthermophiles การเทียบเคียงและการจำแนก hyperthermophiles

สรีรวิทยาของจุลินทรีย์ Bioinformatics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

1. ตำรา

วิโรจน์ กนกศิลปธรรม (พ.ศ. 2558) ตำรา ***จุลินทรีย์ชอบร้อนสูงและเทคนิคการเพาะเลี้ยง (Hyperthermophilic Microorganisms and Cultivation Technique)*** ISBN: 978-616-382-514-8 ภายใต้การสนับสนุนจากกองทุนวิจัยและสร้างสรรค์ส่วนกลางมหาวิทยาลัยศิลปากร โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม 73000, 129 หน้า

2. บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

2.1 ระดับนานาชาติ

Kanoksilapatham, W., Pasomsup, P., Keawram, P., Cuecas, A., Portillo, M. C. and Gonzalez, J. M. (2016) *Fervidobacterium thailandense* sp. nov., a novel extreme thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Northern Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Published Ahead of Print: 26 August, 2016 doi: 10.1099/ijsem.0.001463 (ISI Impact Factor 2014/2015: 2.511)

Kanoksilapatham, W., Keawram, P., Gonzalez, J. M. and Robb, F. T. (2015) Isolation, Characterization and Survival Strategies of *Thermotoga* sp. Strain PD524, a Hyperthermophile from a Hot Spring in Northern Thailand. *Extremophiles*, **19(4):** 853-861. (ISI Impact factor 2014 = 2.306)

Cuecas, A., Portillo, M. C., **Kanoksilapatham, W**. and Gonzalez, J. M. (2014) Bacterial Distribution Along a 50°C Temperature Gradient Reveals a Parceled Out Hot Spring Environment. *Microbial Ecology* **68(4):** 729-739. (ISI Impact factor 2014 = 2.973)

Kanoksilapatham, W., Pasomsup, P., Portillo, M. C., Keawram, P. and Gonzalez, J. M. (2012) Identification and Characterization of a Freshwater *Pyrococcus* sp. Strain PK 5017 and Identification of Pfu-Like IS Elements in *Thermococcus sibiricus* MM 739. *International Journal of Biology*, **4(4):** 11-22.

Portillo, M. C., Sririn, V., **Kanoksilapatham, W**. and Gonzalez, J. M. (2009) Differential Microbial Communities in Hot Spring Mats from Western Thailand. *Extremophiles*, **13(2):** 321–331. (ISI Impact factor 2019: 2.000)

Portillo, M. C., Sririn, V., **Kanoksilapatham, W.** and Gonzalez, J. M. (2009) Pigment Profiles and Bacterial Communities from Thailand Thermal Mats. *Antonie van Leeuwenhoek*, **96 (4):** 559-567. (ISI 2009 Impact factor = 1.982)

Kanoksilapatham, W., Gonzalez, J.M., Maeder, D.L., DiRuggiero, J. and Robb, F.T. (2004) A Proposal to Rename the Hyperthermophile *Pyrococcus woesei* as *Pyrococcus furiosus*, sub sp. *woesei*. *Archaea*, **1:** 277-283. (ISI 2015 Impact Factor = 2.709)

2.2 ระดับชาติ (ภาษาอังกฤษ)

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. (2013 Thai-Journal Impact Factors = 0.05)

Keawram, P. and **Kanoksilapatham, W.** (2013) 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):** 17-27. (2013 Thai-Journal Impact Factors = 0.05)

Pasomsup, P., Gonzalez, J. M., Portillo, M. C., Pongsapukdee, V. and **Kanoksilapatham, W.** (2011) Differentiation of a Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus* sp. strain Pikanate

5017, by Arbitrarily Primed PCR. *Silpakorn University Science and Technology Journal,* **5(1):** 8-16. (2013 Thai-Journal Impact Factors = 0.05)

Kanoksilapatham, W., J. Gonzalez, J. M. and Robb, F. T. (2007) Directed-Mutagenesis and Deletion Generated through an Improved Overlapping-Extension PCR Based Procedure. *Silpakorn University Science and Technology Journal,* **1(2):** 7-12. (2013 Thai-Journal Impact Factors = 0.05)

2.3 บทความวิจัย

อุทัยทิพย์ ทนเถื่อน สุดารัตน์ สุวรรณชัย วีรานันท์ พงศาภักดี และ**วิโรจน์ กนกศิลปธรรม**. (2555) "การวิเคราะห์จำนวนนับเซลล์แบคทีเรียจาก Hemacytometer ด้วยวิธีการเชิงสถิติ" *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์* ปีที่ 20 ฉบับที่ 2 (เมษายน – มิถุนายน 2555), **20(2):** 117-126.

2.4 บทความวิชาการ

วิโรจน์ กนกศิลปธรรม. (2550). "Recoding: การเลื่อนเฟรมในขณะแปลรหัสและการกำหนดรหัสพันธุกรรมใหม่นอกกฎ" *วารสารมหาวิทยาลัยศิลปากร* ฉบับ 35 ปีของคณะวิทยาศาสตร์ (II), **27(2):** 13-36.

3. บทความวิจัยเสนอในการประชุมวิชาการ ระดับนานาชาติและระดับชาติ

3.1 Keynote speech presentation

Kanoksilapatham, W (2016) Invited Keynote speech on "Hyperthermophilic Bacterial Lineages Thriving in Thailand's Hot Springs and A Thermostable Keratinase Producing *Fervidobacterium* sp. Strain FA004 In "The Eighth International Conference on Sciences, Technology and Innovation for Sustainable Well-Being" 15-17 June 2016, Yangon, Myanmar, (Abstract in the Conference Proceedings page xxxiv).

3.2 Oral presentation

Romruen, U., Gonzalez J. M. and **Kanoksilapatham, W.** (2016) "Identification of a Putative Keratinase Gene and Analysis of a Peptidase S8 Family from a Hyperthermophilic, *Fervidobacterium* sp. strain FC2004 in Thailand." In *TSB 2016 Conference Proceedings: The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference under the theme "Natural Resources & Bio-based Innovative Products"* November 28-30, 2016, Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. (Oral presentation by Romruen)

Chamnanklang, N., Boonpoon, S., Mapheueng, P., Lipsittikul, T., Subsomboon, T. **Kanoksilapatham, W.** and Leiwseree, P. (2016) "Chicken Feather Digestion by *Fervidobacterium* sp. FA004 : Comparing Between Whole Cell and Crude Protease Digestions." In *TSB 2016 Conference Proceedings: The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference under the theme "Natural Resources & Bio-based Innovative Products"* November 28-30, 2016, Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Keawram, P. and **Kanoksilapatham, W.** (2013) "Growth Kinetics and t-RNA Fingerprints of Seven Hyperthermophilic Bacteria Belonging to Order Thermotogales, Isolated from Three Hot Springs in Thailand" In *TSB 2013 Conference Proceedings: The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference under the theme "Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity"* October 16-19, 2013 at the Emerald Hotel, Bangkok, Thailand. Pages: 154-162 (Oral presentation no. O-07-003) (presented by Keawram)

Kanoksilapatham, W., Pasomsup, P. and Mongkol, N. (2009) Identification and Characterization of the First Terrestrial *Pyrococcus* sp. strain Pikanate 5017 Isolated from a Hot Spring in Thailand. In *Proceedings of the 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology*, September 24-25, 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, page 150-158. (Oral Presentation no. O-MF04)

Pasomsup, P. and **Kanoksilapatham, W.** (2009) Genomic Fingerprints of Hyperthermophilic Archaea in the Order Thermococcales using Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) Technique: Identification of A *Pyrococcus* sp. strain Pikanate 5017. Abstract in *Proceedings of the 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology*, September 24-25, 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, page 33. (Oral Presentation no. O-MB05) (presented by Pasomsup)

3.3 Poster presentation

Wattananit, W., Keawram, P. and **Kanoksilapatham, W.** (2014) Scanning Electron Microscopes Study on a Hyperthermophilic Strain FC 302 Belonging to Order Thermotogales, Formation of Giant Toga. Abstract in *PACCON2014 Pure and Applied*

Chemistry International Conference 2014 under the theme "Moving Towards Innovation in Chemistry" January 8 – 10, 2014 at Centrara Hotel and Convention Center, Khon Kaen, Thailand. Organized by Department of Chemistry, Faculty of Science Khon Kaen University and Chemical Society of Thailand under the Patronage of Her Royal Highness Princess Chulabhorn Mahidol (Poster no. NMC P074)

Kheawkhum, R., Kalayanon, P., **Kanoksilapatham W.** and Liewsaree, P. (2013) "Investigation of Protease Activities from Hyperthermophilic Bacteria" Abstract in *TSB 2013 Programme & Book of Abstract: The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference under the theme "Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity".* October 16-19, 2013 at the Emerald Hotel, Bangkok, Thailand. Page: 228 (Poster no. P-08-008)

Kanoksilapatham, W., Keawram, P., Pasomsup, P., Portillo, M.C. and Gonzalez, J.M. (2012) "Characterization and Identification of Two Hyperthermophilic Bacteria Isolated From a Hot Spring in Thailand: a *Thermotoga* sp. strain FC 1002 and a *Fervidobacterium* sp. strain FC 2004." Abstract in abstract book *The 9th International Congress EXTREMOPHILES_2012.* September, 10-13 2012, Sevilla, Spain, page 127 (P1)

Kanoksilapatham, W., Portillo, M. C., Keawram, P., Pasomsup, P. and Gonzalez, J.M. (2554) "Culture-dependent and –independent Study on the Microbial Diversity and Functional Distribution Along a Wide Temperature Gradient at Mae Fang Hot Spring" ใน ABSTRACT BOOK, การประชุมวิชาการ "การบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพแห่งชาติ" ครั้งที่ 1 "วิจัยทรัพยากรชีวภาพ เพื่อพัฒนาชุมชนและระบบนิเวศ" วันที่ 12 - 14 ตุลาคม 2544 ณ ศูนย์ประชุมอุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จ.ปทุมธานี abstract page 60. (PP-01-009)

Portillo, M.C., A. Cuecas, Pasomsup, P. **Kanoksilapatham, W.** and Gonzalez, J.M. (2010) Microbial Diversity Across a Temperature Gradient at Mae Fang Hot Springs in Thailand. Abstract in Abstract Book *The 8th International Congress on Extremophiles 2010*. September 2010, 12-16. Ponta Delgada, Azores, Portugal, page 124. (P124)

Kanoksilapatham, W., Chetanachan, P., Pasomsup, P., Mongkol, N., Worawirunwong, D. and Bangtrakulnonth, A. (2009) Electron Microscopic Studies of a Novel Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Hot Spring in Thailand: *Pyrococcus* sp. strain Pikanate 5017. In

Proceedings of the MST Annual Conference, January 28-30, 2009, Chiangmai, Thailand, pages 121-126. (Poster presentation)