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