

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว
ที่ผ่านการย่อยด้วยโปรตีเอส

ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF
PROTEASE-HYDROLYZED PROTEIN FROM GREEN ALGAE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2565

KMITL-2022-SC-M020-133

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF
PROTEASE-HYDROLYZED PROTEIN FROM GREEN ALGAE



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2022

KMITL-2022-SC-M020-133

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2022

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียวที่ผ่านการย่อยด้วยโปรตีเอส
ชื่อนักศึกษา	โยธาวุธ โตนวุธ
รหัสประจำตัว	63605051
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2565
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือเพื่อค้นหาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียวที่ผ่านการย่อยด้วยโปรตีเอส ผลการศึกษาพบว่าการย่อยโปรตีนหยาบของ *Tetraspora* sp. CU2551 ด้วยเอนไซม์เปปซินให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยสร้างวงใสยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Bacillus subtilis* TISTR 1248 และแกรมลบ *Escherichia coli* TISTR 074 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370 ขนาด (1) 20.0 ± 0.5 (2) 20.7 ± 0.5 (3) 18.3 ± 0.5 และ (4) 21.0 ± 0.8 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อทำการคัดขนาดโปรตีนหยาบที่ผ่านการย่อยด้วย Sephadex G-25 พบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสูงสุดอยู่ในแฟรกชันที่ 17 จึงทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ในแฟรกชันนี้ด้วยเทคนิค LC-MS พบว่ามีเปปไทด์ที่แตกต่างกัน 318 ชนิด ผลการทำงานนายฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยเครื่องมือชีวสารสนเทศ 4 โปรแกรมน ได้แก่ DBAASP AMPDiscover iAMPred และ AMPscanner พบว่ามีเปปไทด์หลายเส้นที่มีความเป็นไปได้ที่จะฤทธิ์ดังกล่าว จึงทำการสังเคราะห์เปปไทด์ 4 เส้นคือ PT8 PT9 PT10 และ PT11 พบว่า PT11 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสี่ชนิดดีที่สุด โดยพบอัตราการเจริญของแบคทีเรียทั้งสี่ต่ำกว่า 20% นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คิดเป็น 42.3 ± 2.79 % เมื่อวัดด้วยวิธี ABTS radical-scavenging activity การศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์จากสาหร่าย (PT11) มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นเปปไทด์ที่มีคุณค่าต่อไปได้

คำสำคัญ : สาหร่ายสีเขียว เปปไทด์ต้านจุลชีพ การทำงานนายเปปไทด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Antimicrobial and Antioxidant Activities of Protease-Hydrolyzed Protein from Green Algae
Student Name	Yothawut Tonawut
Student ID	63605051
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2022
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

Abstract

This study aimed to determine an antimicrobial and antioxidant activities from the protease-hydrolyzed protein from green algae. The study demonstrated that pepsin-hydrolyzed protein from *Tetraspora* sp. CU2551 contained antibacterial activity against gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* TISTR 746 and *Bacillus subtilis* TISTR 1248, and gram-negative bacteria *Escherichia coli* TISTR 074 and *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370 with diameter of (1) 20.0 ± 0.5 (2) 20.7 ± 0.5 (3) 18.3 ± 0.5 and (4) 21.0 ± 0.8 cm., respectively. When excluded the hydrolyzed crude protein using Sephadex G-25, fraction 17 (F17) had highest antibacterial activity among 4 bacterial strains. Therefore, peptides in F17 was analyzed by LC-MS. Three hundreds and eighteen peptide sequences were identified. When antibacterial activity was predicted in silico using DBAASP, AMPDiscover, iAMPred, and AMPscanner, it was discovered that numerous sequences had a high likelihood of containing the activity. We synthesized 4 different peptides named PT8, PT9, PT10, and PT11. The results showed that PT11 contained the highest antibacterial activity, with below 20% growth rate for 4 bacterial strains. Moreover, PT11 also showed antioxidant activity of 42.3 ± 2.79 % when measured by ABTS radical-scavenging activity. This study highlighted PT11 algal peptide showing biological activities and potential as a useful peptide.

Keywords : Green algae, Antimicrobial peptides, Peptide prediction, Antioxidant activity and Antimicrobial activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ในหัวข้อเรื่อง โดยสำเร็จลุล่วงไปได้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี ความรู้ คำแนะนำ ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา แก้ไขปัญหาในงานวิจัย รวมถึงการตรวจสอบเนื้อหาของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น

รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวรัตน์ จันทะโร ประธานกรรมการและผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก สถาบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์บัณฑิตประจำสาขา ที่ร่วมพิจารณาในการแก้ไข ตรวจสอบวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ และถูกต้องมากขึ้น

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังสัญญาเลขที่ KREF016329

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยา ที่ได้เอื้ออำนวยความสะดวกบ้าง บางครั้ง ในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี สำหรับการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ และขอบคุณพี่น้อง เพื่อน ในกลุ่มวิจัยสาขาฯ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำการทำงาน ให้กำลังใจในการวิจัยจนสำเร็จเป็นวิทยานิพนธ์เล่มนี้

โยธาวุธ โตนวุธ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
สารบัญรูป (ต่อ).....	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ซ
บทนำ	1
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
วิธีการดำเนินงานวิจัย	13
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	25
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	45
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก ก.....	54
ภาคผนวก ข.....	58
ภาคผนวก ค	60
ประวัติผู้เขียน.....	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของเอ็นโดเปปติเดสชนิดต่างๆ.....	4
ตารางที่ 2.2 แสดงลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่าง AMPs ตามการจัดกลุ่ม.....	8
ตารางที่ 2.3 เปปไทด์ 7 ชนิดที่ผ่านการรับรองโดย FDA และมีการพัฒนาแล้ว.....	9
ตารางที่ 2.4 สรุปลำดับโปรตีนและเอนไซม์ที่ใช้ เพื่อผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ชีวภาพ	11
ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของ Separating gel และ Stacking gel.....	12
ตารางที่ 3.2 เครื่องมือทางชีวสารสนเทศและฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ AMPs	24
ตารางที่ 4.1 แสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน	28
ตารางที่ 4.2 แสดงความน่าจะเป็นที่ลำดับเปปไทด์จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพ	30
ตารางที่ 4.3 แสดงคุณสมบัติและผลการทำนายของตัวแทนเปปไทด์ที่มีโอกาสเป็น AMP	31
ตารางที่ 4.3 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร) ของโปรตีนจาก <i>Tetraspora</i> sp. CU2551.....	35
ตารางที่ 4.4 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร) ของแต่ละแฟรกชัน	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1	บริเวณย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนเอสชนิดต่างๆ	3
รูปที่ 2.2	แบบจำลองการทำลายเซลล์ของ AMPs ผ่านการทำให้เกิดรูบนเซลล์เมมเบรน	6
รูปที่ 2.3	ตัวอย่างโครงสร้างทั่วไปของ AMPs ทั้ง 5 กลุ่ม โครงสร้างได้มาจาก NMR solution....	7
รูปที่ 3.1	ภาพรวมการดำเนินงานเพื่อค้นหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	13
รูปที่ 4.1	กราฟการเจริญของสาหร่าย 15 สายพันธุ์	25
รูปที่ 4.2	เซลล์สาหร่าย CUJR06 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	25
รูปที่ 4.3	แผนภูมิแสดงขั้นตอน (ก) และกราฟเปรียบเทียบความเข้มข้นโปรตีนกับระยะเวลาที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงแตกเซลล์ (ข)	26
รูปที่ 4.4	12% gel ย้อมสีด้วย CBB เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นโปรตีนกับระยะเวลาที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงแตกเซลล์	27
รูปที่ 4.5	ผลการทดสอบโดยวิธี Disc diffusion และ Agar well diffusion ต่อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ของโปรตีนจากสาหร่าย CUJR06 และ Trypsin hydrolyzed protein	29
รูปที่ 4.6	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ที่คัดเลือกทั้ง 2 ชนิด LINLLGVK (ก) และ VQGGYKYHQYWGR (ข)	30
รูปที่ 4.7	ผลการทดสอบ Agar well diffusion ของเปปไทด์สังเคราะห์ VQGGYKYHQYWGR (ก) และ LINLLGVK (ข) ต่อ <i>E. coli</i>	30
รูปที่ 4.8	โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ที่คัดเลือกทั้ง 6 ชนิด	32
รูปที่ 4.9	ผลการทดสอบ Agar well diffusion ของเปปไทด์สังเคราะห์ทั้ง 6 ชนิด	33
รูปที่ 4.10	แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay....	34
รูปที่ 4.11	แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay....	34
รูปที่ 4.12	ผลของของโปรตีนแต่ละชนิดต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย	36
รูปที่ 4.13	แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay ของ Pepsin hydrolysed-protein	37
รูปที่ 4.14	แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของ Pepsin hydrolysed-protein	37
รูปที่ 4.15	กราฟระหว่างการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ในแกนทุติยภูมิ	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.16 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	40
รูปที่ 4.17 แผนภาพเวนน์ (Venn diagram) แสดงถึงการทำนาย AMPs ของแต่ละเครื่องมือ	41
รูปที่ 4.18 ผลของเปปไทด์แต่ละชนิดต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย	42
รูปที่ 4.19 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเจริญสูงสุดสัมพัทธ์ของเปปไทด์สังเคราะห์แต่ละชนิด	43
รูปที่ 4.20 โครงสร้างทุติยภูมิของ PT11	43
รูปที่ 4.21 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay....	44
รูปที่ 4.22 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay....	44
รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ของ Bradford microassay	58
รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐาน Trolox และ Ascorbic acid ของ DPPH assay	58
รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐาน Trolox และ Ascorbic acid ของ ABTS assay.....	58
รูปที่ ข-4 กราฟมาตรฐาน FeSO ₄ ของ FRAP assay	59
รูปที่ ค-1 การสกัดโปรตีนจากสาหร่าย.....	60
รูปที่ ค-2 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อย่อยโปรตีน BSA ด้วยเอนไซม์โบรมิเลน	61
รูปที่ ค-4 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อย่อยโปรตีนจากสาหร่าย CUJR06 ด้วยเอนไซม์เปปซิน	62
รูปที่ ค-5 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสาหร่ายสีเขียว <i>Tetraspora</i> sp. cu2551 ในถังหมัก....	62
รูปที่ ค-6 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อย่อยโปรตีนจากสาหร่าย <i>Tetraspora</i> sp. CU2551 ด้วย เอนไซม์เปปซิน	63
รูปที่ ค-7 ผลการทดสอบ Agar well diffusion assay ของแต่ละแฟลคชัน	63

คำย่อ/สัญลักษณ์

AA	Amino acid residues
AMPs	Antimicrobial peptides
CV	Column volume
CBB	Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry
MH	Mueller Hinton medium
pI	Isoelectric point
TAP	Tris Acetate Phosphate medium



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กอุดมไปด้วยสารชีวโมเลกุลและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น คาร์โบไฮเดรต ลิพิด โปรตีน โดยเฉพาะโปรตีนที่อาจจะมีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive peptides) แฝงอยู่ในโมเลกุล¹ โดยปัจจุบันการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ มีอยู่ 3 วิธี คือ 1) การใช้เอนไซม์โปรตีเอส (Proteases) ย่อยโปรตีนขนาดใหญ่เพื่อให้ได้เปปไทด์สายสั้นออกมา 2) การหมักโดยใช้จุลชีพที่สามารถผลิตโปรตีเอสได้ และ 3) การสังเคราะห์เปปไทด์ทางเคมี โดยใช้องค์ความรู้ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatic approach) เป็นเครื่องมือออกแบบลำดับกรดอะมิโนในโมเลกุล^{2,3} อย่างไรก็ตามวิธีการที่เป็นที่นิยม คือ การย่อยโปรตีนจากแหล่งต่างๆ ด้วยโปรตีเอส

แหล่งของโปรตีนที่มีการศึกษามากแล้ว ได้แก่ ไลโซไซม์จากไข่ขาว (White egg lysozyme)⁴ เลือด⁵ นม⁶ เวย์ไอโซเลต⁷ เป็นต้น แต่แหล่งโปรตีนดังกล่าวเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์อยู่จึงอาจจะไม่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นแหล่งผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ มีการศึกษาหลายงานที่ค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากแหล่งต่างๆ เช่น เปปไทด์มีลำดับกรดอะมิโนเป็น KVAGT และ KVGIN ได้จากการย่อยเวย์โปรตีน (whey protein isolate) พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย⁷ หรือเปปไทด์ WPRGYFL และ SDWDRF ที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetradismus obliquus* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁸

มีสาหร่ายสีเขียวหลากหลายสายพันธุ์ที่ใช้ประโยชน์ได้ในหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ เช่น การนำเซลล์มาใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน⁹ และผลิตน้ำมันโอเมก้า-3¹⁰ ผู้วิจัยจึงต้องการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายเหล่านี้ในด้านต่างๆ อย่างสูงสุด ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงต้องการทดสอบการนำโปรตีนในเซลล์สาหร่ายเหล่านี้มาพัฒนาให้เป็นเปปไทด์สายสั้นอันมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ หรือต้านอนุมูลอิสระได้ ประโยชน์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ จะมีความเป็นไปได้ในการใช้เปปไทด์เหล่านี้เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะแบบเคมีอื่นๆ ทั้งในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง หรือเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกวิธีการสกัดโปรตีน และเปรียบเทียบการย่อยโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว
- 1.2.2 เพื่อสืบค้นฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่ถูกย่อย
- 1.2.3 เพื่อคัดแยก (Fractionate) โปรตีนสายสั้น ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี (Gel filtration chromatography)
- 1.2.4 เพื่อระบุชนิดของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 คัดเลือกสาหร่ายสีเขียวจากภายในหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มาเพาะเลี้ยงเพื่อนำเซลล์สาหร่ายมาสกัดโปรตีนทั้งหมด และทำการย่อยด้วยโปรตีเอส คือ โบรมิเลน ทริปซิน หรือเปปซิน วัดความเข้มข้นโปรตีนโดยวิธี Bradford assay และคุณภาพของโปรตีนที่ถูกย่อยโดย SDS-PAGE
- 1.3.2 ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยวิธี Agar well diffusion assay และการติดตามการเจริญด้วยความขุ่นเซลล์ 600 นาโนเมตร
- 1.3.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay ABTS assay และ FRAP assay
- 1.3.4 คัดแยกเปปไทด์ที่พบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25
- 1.3.5 การระบุชนิดของเปปไทด์ดังกล่าวโดยเทคนิค LC-MS ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) ที่สามารถทำนายฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโปรตีนหรือเปปไทด์ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงองค์ความรู้ในการสกัดและย่อยโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียวให้เป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย
- 1.4.2 ได้เปปไทด์ผสมที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย
- 1.4.3 ทราบถึงชนิดของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสีเขียว

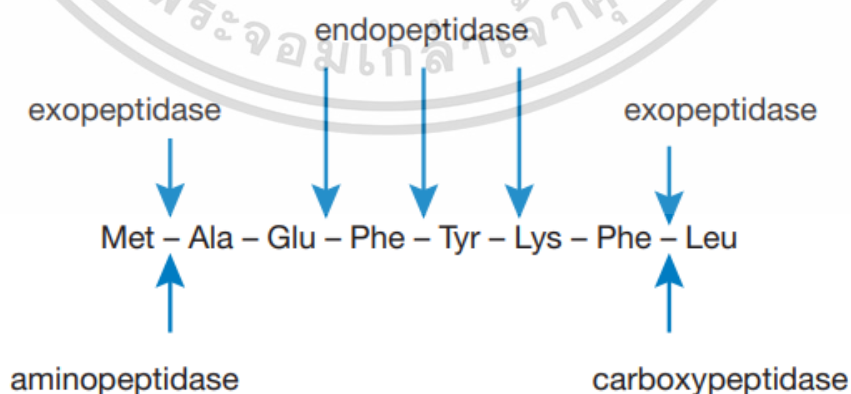
สาหร่ายสีเขียวเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์ขนาดเล็กที่สามารถสังเคราะห์แสงและใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังมีความหลากหลายทางชีวภาพที่สูงมากสามารถพบสาหร่ายได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม มากไปกว่านี้สาหร่ายสีเขียวยังอุดมไปด้วยสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น คาร์โบไฮเดรต ลิพิด โปรตีน รงควัตถุ¹¹ โดยเฉพาะโปรตีนในสาหร่ายสีเขียวที่อาจพบได้ตั้งแต่ 10% ถึง 70% (ต่อน้ำหนักแห้ง)^{12,13} ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวเป็นแหล่งของโปรตีนที่ได้รับความสนใจมากขึ้น

2.2 โปรตีเอส (Protease)

โปรตีเอส (Proteolytic enzymes, Peptidase หรือ Proteinases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ในโปรตีนหรือเปปไทด์ สามารถจำแนกตามบริเวณที่สลายพันธะได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.2.1 เอ็กโซเปปติเดส (Exopeptidases) ที่ย่อยพันธะบริเวณปลายโพลีเปปไทด์ ซึ่งสามารถจำแนกได้อีกว่า ย่อยพันธะปลายด้านไหนของโพลีเปปไทด์ คือ อะมิโนเปปติเดส (Aminopeptidases) ย่อยพันธะจากด้าน N-terminal หรือคาร์บอกซิเปปติเดส (Carboxypeptidases) ย่อยพันธะจากด้าน C-terminal ดังรูปที่ 2.1

2.2.2 เอ็นโดเปปติเดส (Endopeptidases) ที่สามารถสลายพันธะภายในโพลีเปปไทด์สามารถจำแนกได้ตามความจำเพาะของกลไกการย่อยโพลีเปปไทด์ ดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.1 บริเวณย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีเอสชนิดต่างๆ

ที่มา Hooper (2002)¹⁴

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของเอ็นโดเปปติเดสชนิดต่างๆ

เอนไซม์	ตำแหน่งตัด (Cleavage site) จากปลาย N ไปปลาย C
<i>Serine proteases</i>	
Trypsin	-Arg or Lys ↓nonspecific-
Chymotrysin	-Trp (or Phe, Leu, Tyr) ↓nonspecific-
Subtilisin	-Trp (or Tyr, Phe, Leu) ↓nonspecific
<i>Cysteine proteases</i>	
Bromelain	-nonspecific ↓nonspecific-
Papain	-Arg (or Lys) ↓nonspecific-
Ficin (Ficain)	-nonspecific ↓nonspecific-
<i>Metalloproteases</i>	
Thermolysin	-Leu (or Phe) ↓Leu (or Phe, Val, Met, Ala, Ile)-
<i>Aspartic proteases</i>	
Pepsin	-Phe (or Tyr, Leu, Trp) ↓Trp (or Phe, Tyr, Leu)-
Cathepsin D	-Phe (or Leu) ↓nonspecific (not Val, Ala)-

หมายเหตุ ↓ แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์

ที่มา Mótyán. *et al.* (2013)¹⁵

2.3 เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive peptides)

เปปไทด์ คือสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 2 ถึง 20 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive peptides) คือเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ (Antimicrobial activity) ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anti-cancer activity) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)^{2,16-18} เป็นต้น เปปไทด์เหล่านี้สามารถใช้ส่งเสริมสุขภาพและลดความเสี่ยงที่จะเกิดโรคในมนุษย์ได้

2.4 เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ (Antimicrobial peptides)

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ หรือเรียกสั้นๆ ว่า AMPs สำหรับในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จะสนใจต่อกลุ่มเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial peptides) ในธรรมชาติปกติมีขนาดอยู่ที่มากกว่า 15 กรดอะมิโน แต่ก็มีรายงานถึง AMPs ที่สังเคราะห์ขึ้นมาที่มีขนาดเล็กกว่า 10 กรดอะมิโน ซึ่งเปปไทด์สายสั้นจะมีประสิทธิภาพยับยั้งจุลชีพที่น้อยกว่าเปปไทด์สายยาว และโดยทั่วไปใน AMPs จะพบกรดอะมิโนประจุบวก เช่น Arginine Lysine หรือ Histidine ที่ช่วยส่งเสริมการจับกับเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย และจะพบกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) เช่น Tryptophan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phenylalanine หรือ Leucine ที่ส่งเสริมการแทรกผ่านเซลล์เมมเบรน AMPs มีประจุรวม (Net charge) เท่ากับ +1 ถึง +9 ได้แก่กลุ่มของ Cationic AMPs แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมี Anionic AMPs ที่มีประจุรวมเป็นลบ -1 ถึง -8 อยู่บ้างเป็นส่วนน้อย Clark *et al.* (2021)¹⁹

จากการศึกษาพบว่า AMPs มีคุณสมบัติเป็น Amphipathicity กล่าวคือเป็นโปรตีนที่ด้านหนึ่งของโมเลกุลที่มีขั้ว (Hydrophilic) และอีกด้านหนึ่งไม่มีขั้ว (Hydrophobic) ที่ช่วยส่งเสริมการแทรกตัวลงเซลล์เมมเบรนของจุลชีพ นำไปสู่การทำลายเชื้อได้

2.4 กลไกของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ (Modes of action of AMPs)

“เนื่องจากเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพมีหลากหลายชนิดและมีเป้าหมายในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน บางชนิดมีผลยับยั้งการทำงานของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก หรือสารภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่ก็มีเป้าหมายอยู่ที่การทำลายเซลล์ผ่านทางเซลล์เมมเบรน” Intorasoot (2013)²⁰

สำหรับขั้นตอนการทำลายแบคทีเรียและแบบจำลองการทำลายเซลล์ของ AMPs มีดังนี้²¹

2.4.1 การจับ (Binding) ระหว่าง AMPs กับเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย โดยแรงขั้วไฟฟ้า (Electrostatic interaction) ซึ่ง AMPs ส่วนใหญ่จะมีประจุรวมเป็นบวก เพื่อเข้าจับกับสารองค์ประกอบบนผิวของเซลล์เมมเบรนแบคทีเรีย ที่มีประจุเป็นลบ เช่น Teichoic acid ของแบคทีเรียแกรมบวก และ Lipopolysaccharide ของแบคทีเรียแกรมลบ²¹

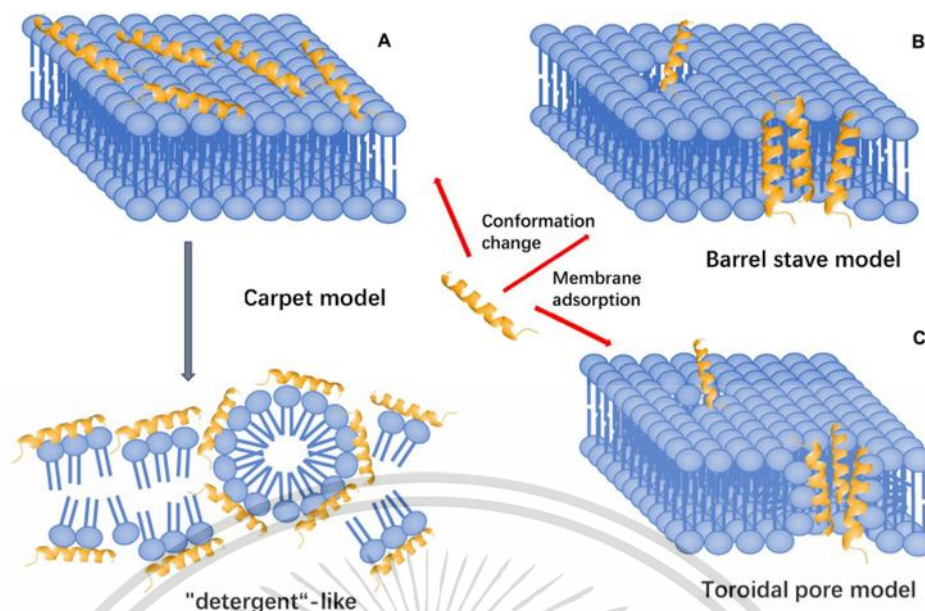
2.4.2 การแทรกสอด (Penetrating) เข้าสู่เซลล์เมมเบรน ด้วยคุณสมบัติความเป็น Hydrophobic ทำให้เกิด membrane permeability มากขึ้นกว่าปกติ จนเกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก

สำหรับการเกิดรู (Pore) ที่เซลล์เมมเบรน มีการเสนอแบบจำลองขึ้นมาดังนี้ (รูปที่ 2.2)

2.4.2.1 แบบจำลอง Barrel-stave เกิดได้จาก AMPs ที่มีโครงสร้างแบบ α -Helix ไปแทรกสอดทะลุเซลล์เมมเบรน แล้วมารวมกันเป็นรู

2.4.2.2 แบบจำลอง Toroidal pore เกิดจาก AMPs ฝังตัวเข้าไปในชั้น Lipid bilayer ไปรวมตัวกัน (Aggregate) และคาดว่า AMPs จับกับ Phospholipid ทำให้เกิดเป็นรู ซึ่งที่ผนังของรูนั้นประกอบด้วย Peptides-lipid complex

2.4.2.3 แบบจำลอง Carpet like เกิดได้จาก AMPs ไปสะสมหรือยึดเกาะบนผิวเมมเบรน ในแนวขนานไปกับผิวเซลล์ จึงเหนี่ยวนำให้เกิดเป็น Micelles จำนวนมาก ทำให้เกิดการสลายตัวของเมมเบรนคล้ายกับการทำงานของ Detergen



รูปที่ 2.2 แบบจำลองการทำลายเซลล์ของ AMPs ผ่านการทำให้เกิดรูบนเซลล์เมมเบรน ทั้ง 3 แบบ

2.5 การจัดกลุ่มเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ

AMPs ปกติจะเป็นเปปไทด์ที่สั้นมาก (น้อยกว่า 100 กรดอะมิโน) ในธรรมชาติความยาวปกติมากกว่า 15 กรดอะมิโน แต่ก็มีรายงานถึง AMPs ที่สังเคราะห์ขึ้นมาที่มีขนาดเล็กกว่า 10 กรดอะมิโน และมีคุณสมบัติคือ ประจุมรวมเป็นบวก มีความไม่มีขั้ว (Hydrophobic) และ Amphipathic AMPs ยังคงเป็นกลุ่มของเปปไทด์ที่มีความหลากหลายมาก การจำแนกโดยใช้เกณฑ์โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) คือ α -helices และ β -sheets ทำให้สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ตามที่ Koehbach and Craik (2019)²² กล่าวไว้ ได้แก่

2.5.1 โครงสร้าง Linear α -helical peptides

ที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวเวียนขวา เป็นกลุ่มที่ใหญ่และมีการศึกษาวิจัยมากที่สุดทั้งจากธรรมชาติที่ได้มนุษย์ ยกตัวอย่างเช่น LL-37 ขณะที่โครงสร้างทุติยภูมินี้จะเกิดขึ้นเมื่อ AMPs ได้ไปอยู่ในเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียเป้าหมายแล้วเท่านั้น

2.5.2 โครงสร้าง Linear extended structures

เป็นกลุ่มของ AMPs ที่ไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิจำเพาะ ทั้งในสารละลาย หรือในเมมเบรน เปปไทด์กลุ่มนี้จะมีกรดอะมิโนบางชนิดตัวใดตัวหนึ่งเป็นจำนวนมากในลำดับ เช่น glycine proline tryptophan หรือ histidine ยกตัวอย่างเช่น bovine indolicidin และ human histatins

2.5.3 เปปไทด์ที่มีโครงสร้าง β -Sheet

เป็นเปปไทด์ที่มีพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bonds) พันธะในการคงรูปร่าง ขึ้นอยู่กับจำนวนกรดอะมิโน Cysteine ในเปปไทด์ ซึ่งสามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยอีกคือ β -hairpin peptides และ α -defensin peptides ยกตัวอย่างเช่น -Protegrin-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

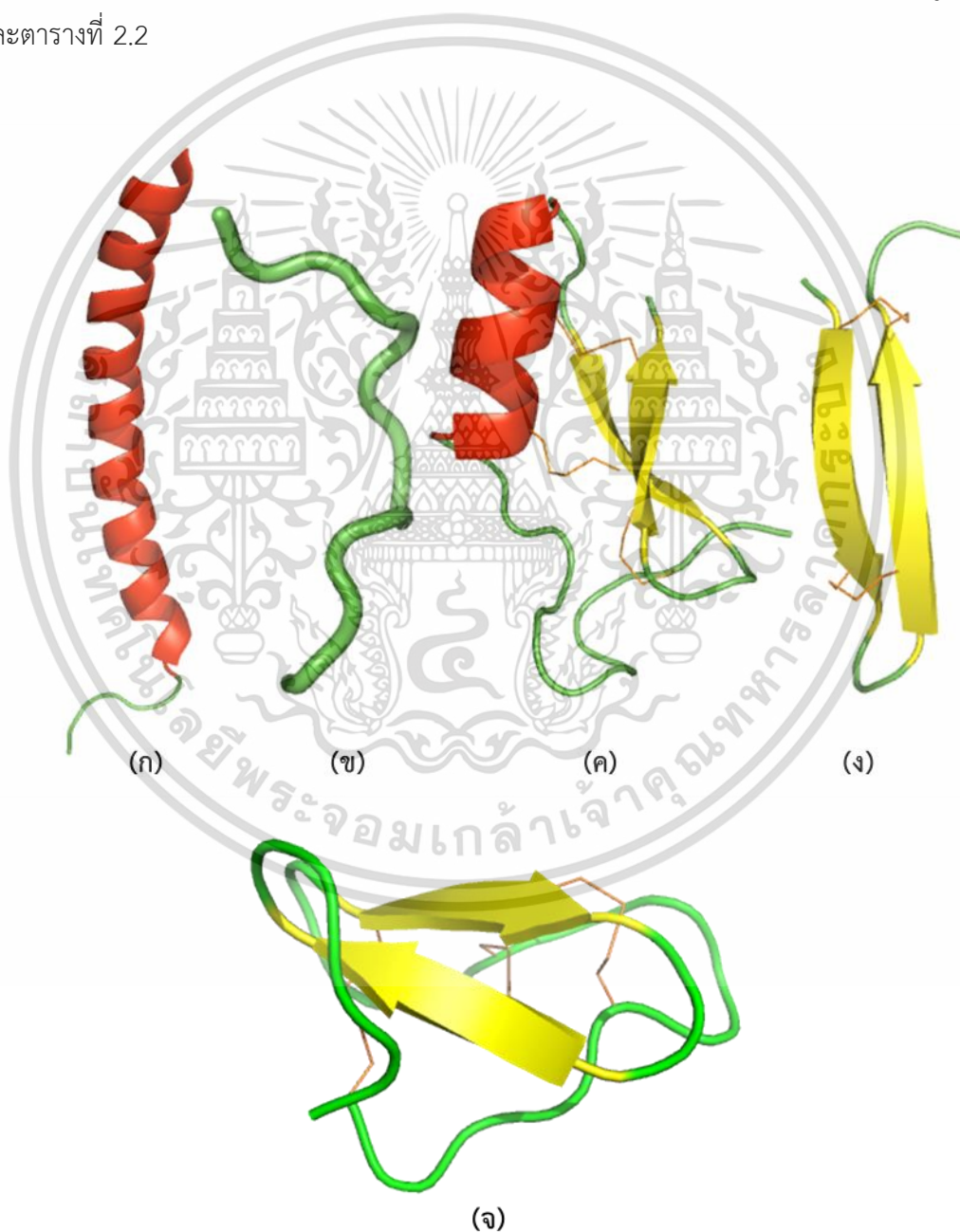
2.5.4 เปปไทด์ที่มีโครงสร้างผสมของ α -helical และ β -Sheet

ยกตัวอย่างเช่น Phormicin

2.5.5 เปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นวงและโครงสร้างซับซ้อนอื่นๆ (Cyclic peptides and other complex topologies)

เป็นกลุ่มที่จัดขึ้นใหม่เนื่องจากปัจจุบันมีการค้นพบและพัฒนา AMPs ที่มีลักษณะเป็นวงปิด และเกิดการพับ (Folding) เป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้น ยกตัวอย่างเช่น Kalata B1 จากพืช และ Microcin J25d

โครงสร้างสามมิติและลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่างเปปไทด์แต่ละกลุ่ม แสดงดังรูปที่ 2.3 และตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.3 ตัวอย่างโครงสร้างทั่วไปของ AMPs ทั้ง 5 กลุ่ม โครงสร้างได้มาจาก NMR solution เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก) LL-37 (PDB ID: 2K6O) มีโครงสร้างเป็นแบบ linear α -helical peptides
 ข) Indolicidin (1G89) มีโครงสร้างเป็นแบบ linear extended structures
 ค) Gomesin (1KFP) มีโครงสร้างเป็นแบบผสมของ α -helical และ β -Sheet
 ง) Phormicin (1ICA) มีโครงสร้างเป็นแบบผสมของ β -Sheet
 และ จ) Cystine-knot peptide kalata B1 (1NB1) มีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นวง
 แสดงในรูปแบบของการ์ตูน (Cartoon representation) โดย สีแดง คือ α -helical สีเหลือง คือ β -Sheet สีเขียว Loop และพันธะไดซัลไฟด์แสดงในรูปแบบเส้นสีส้ม

ตารางที่ 2.2 แสดงลำดับกรดอะมิโนของตัวอย่าง AMPs ตามการจัดกลุ่มของ Koehbach and Craik (2019)²²

เปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	จำนวน AA	Net charge	อ้างอิง
เปปไทด์ที่มีโครงสร้าง linear α -helix				
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	37	+6	(23)
เปปไทด์ที่มีโครงสร้าง linear extended structures				
Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR	13	+4	(24)
เปปไทด์ที่มีโครงสร้าง β -Sheet				
gomesin	QCRRLCYKQRCVTYCRGR	18	+5	(25)
เปปไทด์ที่มีโครงสร้างผสมของ α -helix และ β -Sheet				
Phormicin	ATCDLLSGTGINHSACAAHCLLRGNRGGYCNGKGVCV CRN	40	+3	(26)
เปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นวงและโครงสร้างซับซ้อนอื่นๆ				
Kalata B1	Cyclo-GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN	29	0	(27)
Microcin J25	GGAGHVPEYFVIGITPISFYG	21	-1	(28)

ในปัจจุบันพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพทั้งในธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้นมามากกว่า 3,000 ชนิด แต่มีเพียง 7 ชนิดเท่านั้นที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) และจำหน่ายเชิงพาณิชย์ได้โดยเจ้าของสิทธิบัตร (ตารางที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 เปปไทด์ 7 ชนิดที่ผ่านการรับรองโดย FDA และมีการพัฒนาแล้ว

ชื่อเปปไทด์	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	กลไกการออกฤทธิ์
กราไมซิดิน ดี (Gramicidin D)	1,882	ทำให้เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มเซลล์
เดปโทไมซิน (Daptomycin)	1,621	ละลายเยื่อหุ้มเซลล์
โคลิสติน (Colistin)	1,155	ละลายเยื่อหุ้มเซลล์
แวนโคไมซิน (Vancomycin)	1,449	ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์
ดาลบาแวนซิน (Dalbavancin)	1,817	ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์
โอริทาแวนซิน (Oritavancin)	1,793	ละลายเยื่อหุ้มเซลล์ และยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์
เทลลาแวนซิน (Telavancin)	1,756	ละลายเยื่อหุ้มเซลล์ และยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์

ที่มา Chen and Lu (2020)²⁹

2.6 อนุมูลอิสระ (Free radicals)

อนุมูลอิสระคืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว ทำให้ไม่เสถียรและมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่นได้ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ปลดปล่อยอนุมูลอิสระออกมา อนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากการหายใจระดับเซลล์โดยใช้ออกซิเจนเพื่อสร้างพลังงานภายในเซลล์ เช่น กลุ่ม Reactive Oxygen species (ROS) และ Reactive Nitrogen species (RNS) หากเกิดอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก จะทำให้เกิดภาวะ Oxidative stress ซึ่งอาจมีผลเสียต่อเซลล์ได้ เนื่องจากอนุมูลอิสระกระตุ้นให้เกิด Lipid peroxidation ต่อลิพิดในเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ และสร้างความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ และสุดท้ายอาจเป็นสาเหตุของโรคเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็ง และอัลไซเมอร์ เป็นต้น^{2,16-18}

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีกลไกการป้องกันการเกิด Oxidative stress อยู่มาก เช่นการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่ป้องกัน ยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกได้เป็นสองกลุ่มคือ สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) คตะเลส (Catalase) กลูตาไธโอน เพอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) และ กลูตาไธโอน รีดักเทส (Glutathione reductase)

2.5.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ แบ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นเอง เช่น กลูตาไธโอน (Glutathione) โคเอนไซม์ คิว10 (Coenzyme Q10) เมลาโทนิน (Melatonin) บิลิรูบิน (Bilirubin) โปรตีนที่จับกับโลหะ (Metal-chelating proteins) และสารอาหาร ตัวอย่างเช่น วิตามินอี (Vitamin E) วิตามินซี (Vitamin C) แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ไลโคปีน (Lycopene) กรดไขมันโอเมก้า 3 (Omega-3) และ โอเมก้า 6 (Omega-6 fatty acids) เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่การศึกษาการย่อยโปรตีนจากแหล่งต่างๆ ด้วยเอนไซม์โปรติเอส เพื่อติดตามฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ดังตารางที่ 2.4 ซึ่งหมายถึงกระบวนการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ชีวภาพในลักษณะนี้เป็นวิธีทั่วไป ที่แตกต่างกันคือแหล่งของโปรตีนเอนไซม์ที่ใช้ และเป้าหมายฤทธิ์ชีวภาพที่ต้องการ

ตารางที่ 2.4 สรุปแหล่งโปรตีนและเอนไซม์ที่ใช้อยู่ เพื่อผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ชีวภาพ

แหล่งโปรตีน	เอนไซม์ที่ใช้อยู่	ฤทธิ์ชีวภาพ	อ้างอิง
White egg lysozyme	Trypsin Papain	Antioxidant activity Antimicrobial activity	(4)
Porcine liver	Alcalase® Bromelain	Antioxidant activity Antimicrobial activity	(30)
Deer, sheep และ pig Plasma	Fungal proteases (FP400 และ FP11)	Antioxidant activity	(31)
Fish proteins	Bromelain	Antimicrobial activity	(32)
Goat whey	Alcalase®	Antimicrobial activity	(7)
Whey protein isolate	Pepsin	Antimicrobial activity	(7)
<i>Dunaliella salina</i>	Chymotrypsin Trypsin	Antimicrobial activity Antiproliferative activity	(33)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Pepsin	Antioxidant activity Antimicrobial activity	(34)
<i>Tetrademus obliquus</i>	Alcalase®	ACE-inhibitory activity Antioxidant activity	(8)
<i>Synechococcus</i> sp. VDW	Trypsin	Anti-inflammatory activity Antioxidant activity	(18)
<i>Spirulina platensis</i>	Alkaline protease Papain	Antimicrobial activity	(35)
<i>Spirulina maxima</i>	Trypsin α -chymotrypsin Pepsin	Anti-inflammatory activity	(36)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ Tejano. *et al.* (2019)³⁴ ที่ได้ศึกษาการย่อยโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella sorokiniana* ด้วยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) พบว่าเปปไทด์ (<5 kDa) ที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%DPPH radical scavenging activity) สูงถึง 48% และยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การศึกษาของ Darvish. *et al.* (2018)³³ ได้ศึกษาการย่อยโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว *Dunaliella salina* ด้วยเอนไซม์จากลำไส้เล็กของมนุษย์ (ทริปซินและโครโมทริปซิน) และคัดแยกเปปไทด์โดยวิธี fast protein liquid chromatography (FPLC) พบว่าเปปไทด์ที่ได้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และเปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 3 kDa มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (SW480 cell)

ผลการวิจัยของ Montone. *et al.* (2018)⁸ ได้ศึกษาการย่อยโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว *Tetrademus obliquus* ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase®) พบว่าเปปไทด์ที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity และ ABTS radical scavenging assay) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งแองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติงเอนไซม์ (ACE-inhibitory activities) จากนั้นคัดแยกและระบุชนิดเปปไทด์โดยวิธี 2-Dimension semi-preparative HPLC และ RP-Nano HPLC-MS/MS พบว่ามีเปปไทด์ถึง 500 ชนิด และวิเคราะห์โดย PeptideRanker algorithm พบเปปไทด์ 5 ชนิด หาเปปไทด์ที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งแองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติงเอนไซม์ ดังนี้ WPRGYFL, GPDRPKFLGPF, WYGPDRPKFL, SDWDRF

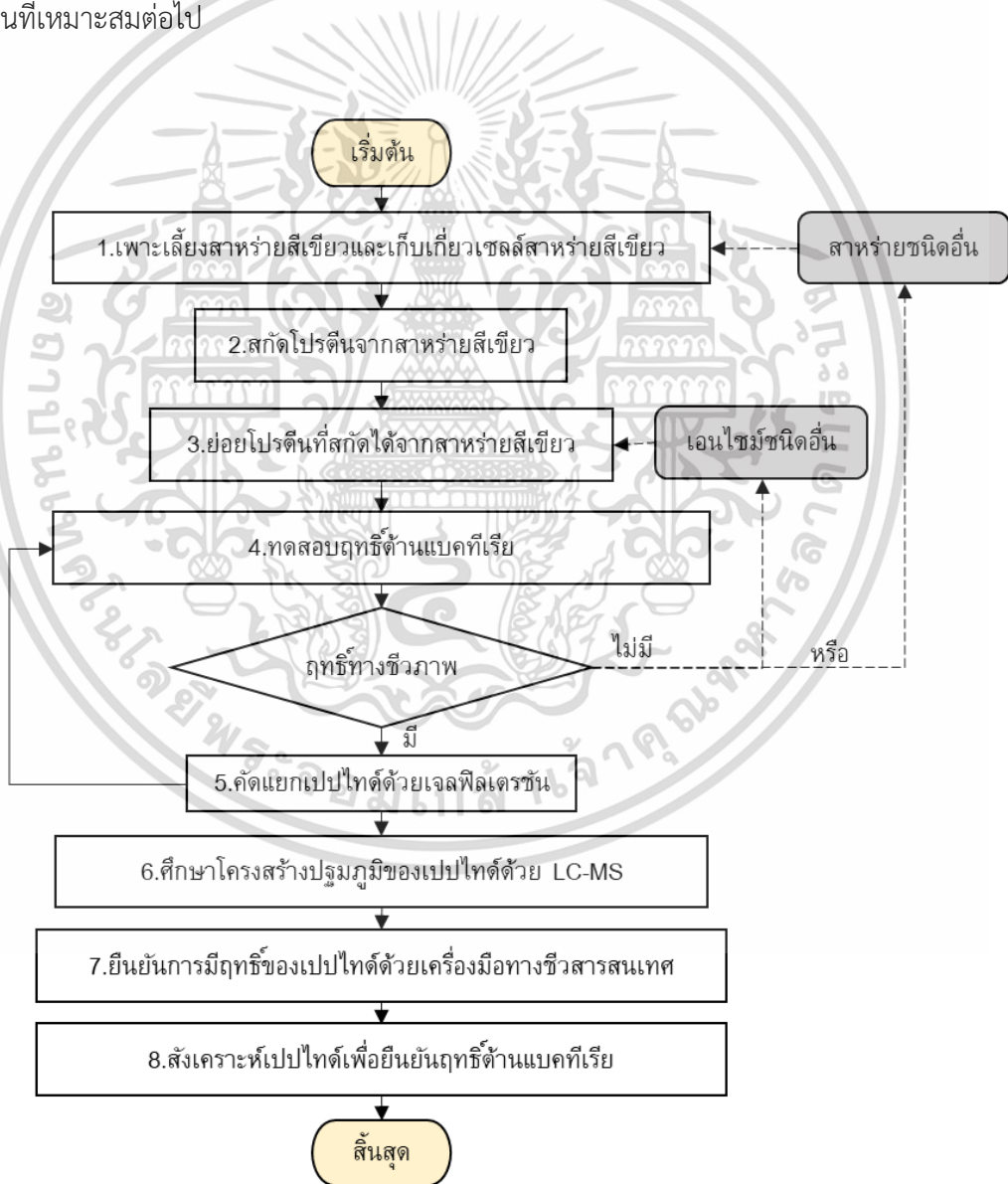
Suttisuwan. *et al.* (2019)¹⁸ ย่อยโปรตีนจากเซลล์ของ *Synechococcus* sp. VDW ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) จากนั้นทำเปปไทด์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Ultrafiltration และ RP-HPLC ได้เปปไทด์ 5 ชนิด คือ AILQSYSAGKTK ALNKTHLIQTK VVLRDGAQQQLGTPR LLVHAPVK และ IPDAHVPK ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%NO radical scavenging activity) อยู่ที่ 10% ถึง 20%

ย่อยโปรตีนจากเซลล์ของ *Spirulina maxima* ด้วยเอนไซม์ทริปซิน อัลฟาโคโมทริปซิน (α -chymotrypsin) และเปปซิน ร่วมกัน จากนั้นคัดแยกเปปไทด์ด้วยวิธี Ultrafiltration Anion-exchange chromatography Gel filtration และสุดท้าย RP-HPLC ได้เปปไทด์ 2 ชนิดคือ LDAVNR และ MMLDF มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ภาพรวมของการศึกษาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวแสดงดังรูปที่ 3.1 โดยผู้วิจัยจะศึกษาตามขั้นตอนการทดลองเบื้องต้น เริ่มจากคัดกรองสาหร่ายสีเขียวที่มีอัตราการเจริญสูงสุดก่อน จากนั้นสกัดและย่อยโปรตีนด้วยโปรตีเอส เช่น โบรมิเลน ทริปซิน หรือเปปซิน ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในกรณีที่ไม่มีพบฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยโปรตีเอส ก็จะดำเนินการสืบค้นเอนไซม์ชนิดอื่นที่เหมาะสม หรือสาหร่ายสายพันธุ์อื่นที่เหมาะสมต่อไป



รูปที่ 3.1 ภาพรวมการดำเนินงานเพื่อค้นหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- 3.1.2 2,4,6-tripyridyl-s-triazine
- 3.1.3 2-2-Azino-dis(3-ethylbenzthiazoline sulfonate)
- 3.1.4 40% Acrylamide/Bis 29:1
- 3.1.5 30% Acrylamide/Bis 29:1
- 3.1.6 4X laemmli sample buffer
- 3.1.7 Acetic acid glacial
- 3.1.8 Acetone
- 3.1.9 Ammonium chloride
- 3.1.10 Ammonium molybdate tetrahydrate
- 3.1.11 Ammonium Persulfate
- 3.1.12 Ascorbic acid
- 3.1.13 Barium chloride
- 3.1.14 Boric acid
- 3.1.15 Bovine serum albumin
- 3.1.16 Calcium chloride dihydrate
- 3.1.17 Cobalt chloride hexahydrate
- 3.1.18 Coomassie brilliant blue g-250
- 3.1.19 Coomassie brilliant blue r-250
- 3.1.20 Copper(II) sulfate pentahydrate
- 3.1.21 Dipotassium hydrogen phosphate
- 3.1.22 Disodium EDTA
- 3.1.23 Ethanol
- 3.1.24 Glycine
- 3.1.25 Hydrochloric acid
- 3.1.26 Iron(III) chloride hexahydrate
- 3.1.27 Iron(III) sulfate heptahydrate
- 3.1.28 Isopropanol
- 3.1.29 Kanamycin
- 3.1.30 Magnesium sulfate heptahydrate
- 3.1.31 Manganese chloride tetrahydrate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.32 β -mercaptoethanol
- 3.1.33 Methanol
- 3.1.34 Mueller Hinton medium
- 3.1.35 Phosphoric acid
- 3.1.36 Potassium chloride
- 3.1.37 Potassium hydroxide
- 3.1.38 Potassium dihydrogen phosphate
- 3.1.39 Potassium persulfate
- 3.1.40 Sephadex G-25 fine
- 3.1.41 Sodium acetate
- 3.1.42 Sodium dodecyl sulfate
- 3.1.43 Sodium hydroxide
- 3.1.44 Streptomycin
- 3.1.45 Sulfuric acid
- 3.1.46 Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 3.1.47 Trichloroacetic acid
- 3.1.48 Tris base
- 3.1.49 Trolox
- 3.1.50 Zinc sulfate heptahydrate

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.2.1 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Processor)
- 3.2.2 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)
- 3.2.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- 3.2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Mini centrifuge)
- 3.2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
- 3.2.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดคลื่นแสง (UV-Vis spectrophotometer)
- 3.2.7 เครื่องวัดค่า pH
- 3.2.8 เครื่องอ่านปฏิกิริยาในถาดหลุม (Microplate reader)
- 3.2.9 ชุดกรองสำหรับเครื่อง HPLC
- 3.2.10 ชุดอุปกรณ์เซตเจลสำหรับ SDS-PAGE
- 3.2.11 ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์เจล (Gel documentaion)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.12 ชุดอุปกรณ์แยกด้วยไฟฟ้า (Eletrophoresis equipment)
- 3.2.13 ตู้บ่มแบบเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- 3.2.14 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow)
- 3.2.15 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.2.16 ตู้อบแบบสุญญากาศ (Vacuum oven)
- 3.2.17 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 3.2.18 ถังหมักโพลีโพรไพลีน พร้อมข้อต่อ (Nalgene Polypropylene, Carboy 12.5L)

3.3 เอนไซม์โปรตีเอส (Proteases)

- 3.3.1 Bromelain 1200 GDU/กรัม
- 3.3.2 Pepsin 1:10000 ex. Porcine Stomach Mucosa
- 3.3.3 Trypsin from hog porcine 93.3 U/มิลลิกรัม

3.4 รายการสาหร่าย

- 3.4.1 สาหร่าย CUJR01
- 3.4.2 สาหร่าย CUJR06
- 3.4.3 สาหร่าย CUJR08
- 3.4.4 สาหร่าย CUJR04
- 3.4.5 สาหร่าย G2
- 3.4.6 สาหร่าย G4
- 3.4.7 *Chlorella* sp. KLSc59
- 3.4.8 สาหร่าย LT
- 3.4.9 สาหร่าย PK
- 3.4.10 *Scenedesmus* 005
- 3.4.11 *Scenedesmus* 006
- 3.4.12 สาหร่าย SK
- 3.4.13 *Chlorella* sp. KLSc64
- 3.4.14 *Tetraspora* sp. CU2551
- 3.4.15 สาหร่าย U1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP medium) ที่สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 xg ที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ลงเชื้อในอาหาร TAP ใหม่โดยปรับค่าความขุ่นเริ่มต้นของสาหร่ายทุกชนิดที่ 750 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 นำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เก็บตัวอย่างเพื่อวัดความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์ที่ 750 นาโนเมตร ทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อเลือกสาหร่ายที่เจริญเร็วมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.6 การสกัดโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว

3.6.1 การเพิ่มปริมาณสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ที่เลือกศึกษา

เมื่อเลือกสายพันธุ์ของสาหร่ายแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสาหร่ายสีเขียวดังกล่าว ในปริมาณที่มากขึ้นในอาหาร TAP ในฟลasksขนาด 500 มิลลิลิตร ที่สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ หรือเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10L ที่สภาวะเป่าอากาศ ในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 – 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายด้วยการปั่นเหวี่ยง และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำเซลล์เปียกไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัดโปรตีน

3.6.2 การสกัดโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว

ดัดแปลงวิธีจาก Montone. *et al.* (2018)⁸ โดยนำเซลล์สาหร่ายสีเขียวแช่แข็งออกมาละลายที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัด 5 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย Tris HCl pH 9 0.60 มิลลิโมลาร์ KCl 0.15 มิลลิโมลาร์ SDS 2% (w/v) และ β -mercaptoethanol 40 มิลลิโมลาร์) ทำให้เซลล์สาหร่ายสีเขียวแตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ 25 กิโลเฮิร์ต, 500 วัตต์, on/off ที่ 1 วินาที/1 วินาที และ แอมพลิจูด 40% เป็นเวลา 5 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บโปรตีนในส่วนใสสำหรับตกตะกอนในขั้นต่อไป

3.6.3 การตกตะกอนโปรตีนเบื้องต้นด้วย 20% TCA/Acetone

ดัดแปลงวิธีจาก Niu. *et al.* (2019)³⁷ ทำการเติมสายละลาย 20% Trichloroacetic acid ใน Acetone (เย็น 4 องศาเซลเซียส) ลงในส่วนใสที่ได้จากการสกัดโปรตีนในข้อ 3.3.3 ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เขย่าของผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที โปรตีนในสารละลายจะตกตะกอนออกมาเนื่องจาก ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อเก็บตะกอนโปรตีน ล้าง

ตะกอนโปรตีนรอบแรกด้วย 100% Acetone จากนั้นล้างด้วย 80% Acetone อีกสองครั้งหรือ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จนกว่าสีเขียวของคลอโรฟิลล์ในตะกอนจะหายไป จากนั้นระเหย Acetone ออกจากตะกอนโปรตีน โดยเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที ปิดฝาหลอดและเก็บตะกอนไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน หรือละลายตะกอนโปรตีนในบัฟเฟอร์ที่ต้องการ

3.7 การวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford microassay

ปิเปตต์ Bradford reagent 250 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม จากนั้นเติมโปรตีนมาตรฐานหรือตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการปิเปตต์สารละลายขึ้นลง โดยไม่ให้เกิดฟอง บ่มนาน 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 595 นาโนเมตร³⁸

3.8 การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียม Separating gel และ Stacking gel

ผสมสารสำหรับเตรียม Separating gel ดังตารางที่ 3.1 ตามลำดับ แล้วปิเปตต์สารละลายลงใน Gel sandwich อย่างช้า ๆ ประมาณ $\frac{3}{4}$ ของพื้นที่ทั้งหมด (3.75 มิลลิลิตร) เติ 50% isopropanol ปิดทับ ทิ้งไว้ให้แข็งตัวประมาณ 30 – 60 นาที จากนั้นผสมสารสำหรับเตรียม Stacking gel ดังตารางที่ 3.1 ตามลำดับ เติ 50% Isopropanol ออก ล้างผิวเจลด้วยน้ำกลั่น ชับน้ำออก แล้วปิเปตต์สารละลายลงใน Gel sandwich อย่างช้า ๆ โดยไม่เกิดฟอง จนเต็มกระจก จากนั้นนำซีทรี (Comb) ใส่ลงในกระจก โดยไม่ให้มีฟองอากาศภายในซีทรี ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 – 60 นาที ถอด Gel sandwich ออกมาประกอบกับ Gasket ใน Chamber ให้ขั้วไฟฟ้าถูกต้อง เติ 1X Running buffer ลงใน Gasket จนเต็ม จากนั้นตั้ง Comb ออก เติ 1X Running buffer ให้ถึงระดับของ Chamber

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของ Separating gel และ Stacking gel

ลำดับ	สารเคมี	12% Separating gel	4% Stacking gel
1	H ₂ O	2.175 มิลลิลิตร	3.180 มิลลิลิตร
2	0.5 โมลาร์ Tris-HCL (pH 6.8)	-	1.260 มิลลิลิตร
3	1.5 โมลาร์ Tris-HCL (pH 8.8)	1.250 มิลลิลิตร	-
4	10% SDS	50 ไมโครลิตร	50 ไมโครลิตร
5	10% Ammonium persulfate	25 ไมโครลิตร	25 ไมโครลิตร
6	40% Acrylamide/Bis	1.5 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร
7	TEMED	2.5 ไมโครลิตร	5.0 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ		5.0025 มิลลิลิตร	5.02 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปยังบุคคลอื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมตัวอย่างสำหรับ Denatured SDS-PAGE

ปิเปตต์ 4X Laemmli sample buffer ที่ผสม β -mercaptoethanol แล้ว 5 ไมโครลิตร ลงในหลอด จากนั้นปิเปตต์ตัวอย่างโปรตีน (อย่างน้อย 1-20 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร (หากสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง เนื่องจาก pH ของสารละลายโปรตีนเป็นกรด ให้เติมเบส จนสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีน้ำเงิน) ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปั่นตก (Spin down) และหยอดตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานลงในหลุม (≤ 20 ไมโครลิตร) ปิดฝา Chamber ให้ขั้วไฟฟ้าถูกต้อง แล้วต่อกับ Power supply ตั้ง Constant voltage และกำหนด Voltage = 40 โวลต์ แล้ว Run จนแถบสีเข้าสู่ Separating gel อย่างสมบูรณ์ เพิ่ม Voltage = 120 โวลต์ Run จนแถบสีเคลื่อนที่จนสุดขอบเจลด้านล่าง ใช้ gel releaser นำเจลออกจาก Gel sandwich ตัดส่วน Stacking gel ทิ้ง จากนั้นล้าง Running buffer ออกจากเจลด้วยน้ำกลั่น แช่เจลใน CBB Staining solution ในสภาวะเขย่า 60 rpm อย่างน้อย 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น แช่เจลใน Destaining solution อย่างน้อย 30 นาที เปลี่ยน Destaining solution เมื่อสีของสารละลายเป็นสีน้ำเงินเข้ม อย่างน้อย 3 รอบ รอจนพื้นหลังจางลงและแถบสีปรากฏขึ้น ถ่ายภาพเจลด้วยชุดอุปกรณ์ถ่ายรูป

3.9 การย่อยโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว

ศึกษาอัตราส่วนระหว่างโปรตีนและโบรมีเลนสำหรับการย่อย ละลายตะกอนโปรตีนจากข้อ 3.3.3 ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ ปริมาณ 1-10% (w/w) ของโปรตีนสาหร่าย บ่มที่ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 4 ถึง 10 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มเป็นเวลา 5 นาที³⁰ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยวิธี SDS-PAGE

3.10 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียวที่ถูกย่อยแล้ว

3.10.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus subtilis* TISTR 1248 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* TISTR 074 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370

3.10.1.1 Disk diffusion assay

เพื่อทดสอบต้านจุลินทรีย์ของโปรตีนเบื้องต้น ตามวิธีมาตรฐานของ EUCAST³⁹ โดยทดสอบโปรตีนที่ถูกย่อยแล้วที่ความเข้มข้นต่างๆ บนอาหารแข็ง Mueller Hinton (MH media) ใช้ยาปฏิชีวนะ Streptomycin (10 ไมโครกรัม) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และบัฟเฟอร์ที่ละลายโปรตีนที่มีโปรตีนที่ต้มเป็นตัวควบคุมเชิงลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลายแบคทีเรียเริ่มต้นในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปราศจากเชื้อโดยใช้เทคนิค Direct colony suspension ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารมาตรฐาน 0.5 McFarland จากนั้นใช้ก้านสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มลงในสารละลายแบคทีเรียเริ่มต้น ป้ายลงบนอาหารแข็ง MH ให้ทั่วโดยไม่เว้นช่องว่าง รอจนหน้าอาหารแห้ง จากนั้นนำแผ่นกระดาษดิस्कทดสอบมาวางลงบนอาหารแข็ง MH หยดสารที่ต้องการทดสอบต่างๆบนดิस्क (ไม่เกิน 5 ไมโครลิตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 20 ชั่วโมง จึงตรวจสอบวงใส (Inhibition zone) โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตร

3.10.1.2 Agar well diffusion assay

เตรียมสารละลายแบคทีเรียเริ่มต้นในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปราศจากเชื้อโดยใช้เทคนิค Direct colony suspension ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารมาตรฐาน 0.5 McFarland จากนั้นใช้ก้านสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มลงในสารละลายแบคทีเรียเริ่มต้น ป้ายลงบนอาหารแข็ง MH ให้ทั่วโดยไม่เว้นช่องว่าง รอจนหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ Cork borer ที่ฆ่าเชื้อโดยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านเปลวไฟ สองรอบ มาเจาะลงอาหารแข็ง MH แล้วนำชิ้นวุ้นออก เติมสารที่ต้องการทดสอบลงในหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 20 ชั่วโมง จึงตรวจสอบวงใส (Inhibition zone) โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตร

3.10.1.3 Growth kinetic assay

เตรียมสารละลายแบคทีเรียเริ่มต้น โดยใช้เทคนิค Growth method ในอาหารเหลว MH บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารมาตรฐาน 0.5 McFarland และเตรียมโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหาร MH เติมอาหาร MH 50 ไมโครลิตร และโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 ไมโครลิตร ลงในภาดหลุม 96 ช่องปราศจากเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายแบคทีเรียเริ่มต้น (5×10^6 CFU/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ปิดฝาและพันรอบ ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำเข้าเครื่องอ่านปฏิกิริยาในภาดหลุม ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร ทุกๆ 30 นาที อัตโนมัติ เป็นเวลา 16 ถึง 20 ชั่วโมง

สร้างกราฟระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตรกับเวลา จะสามารถหาอัตราการเจริญสูงสุด (Maximum growth rate, μ) จากสมการเส้นตรงที่มีความชันมากที่สุด ในช่วง Exponential phase และคำนวณอัตราการเจริญสูงสุดสัมพันธ์ ดังสมการ

$$\text{Relative growth rate (\%)} = [\mu_{\text{ใดๆ}} / \mu_{\text{ควบคุม}}] \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.10.2.1 DPPH radical scavenging assay

ดัดแปลงจาก Memarpour-Yazdi. *et al.* (2012)⁴ เตรียมโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ 90 ไมโครลิตร และโปรตีนทดสอบ 90 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ลดลงที่ 516 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมเชิงลบ และกรดแอสคอร์บิกหรือ Trolox เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันดังสมการ

$$\text{DPPH scavenging rate (\%)} = [(A_{\text{ควบคุมเชิงลบ}} - A_{\text{โปรตีน}}) / A_{\text{ควบคุมเชิงลบ}}] \times 100$$

3.10.2.2 ABTS radical scavenging assay

ดัดแปลงจาก Xiao. *et al.* (2020)⁴⁰ เตรียม ABTS radical cation โดยผสม 7 มิลลิโมลาร์ ABTS กับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลาร์ บ่มไว้ในที่มืด เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางของผสมนี้ 20 เท่าก่อนทดสอบ เริ่มทดสอบโดยผสม ABTS radical cation ที่เจือจางแล้ว 200 ไมโครลิตร กับโปรตีนทดสอบ 10 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด เป็นเวลา 7 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ลดลงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมเชิงลบ และกรดแอสคอร์บิกหรือ Trolox เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันดังสมการ

$$\text{ABTS scavenging rate (\%)} = [(A_{\text{ควบคุมเชิงลบ}} - A_{\text{โปรตีน}}) / A_{\text{ควบคุมเชิงลบ}}] \times 100$$

3.10.2.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

ตามวิธีที่รายงานไว้โดย Borrajo. *et al.* (2020)³⁰ เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสมสารเคมี 3 ชนิดเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 10:1:1 โดยปริมาตร คือ 1) อะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.3 โมลาร์ pH 3.6 2) TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 10 mM ในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ และ 3) FeCl₃.6H₂O 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นผสมสารละลาย FRAP 900 ไมโครลิตร (เตรียมใช้วันต่อวัน) กับโปรตีนทดสอบ 30 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 593 นาโนเมตร รายงานผลเป็น FRAP value ในหน่วยเทียบเท่าไมโครโมลาร์ Fe²⁺ ($\mu\text{M of Fe}^{2+}$ equivalent)

3.11 การคัดแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

คัดแยกเปปไทด์ผสมที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex G-25 เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) ซึ่งจะแยกโปรตีนในช่วงขนาด 1–5 kDa ใช้คอลัมน์ที่มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางต่อความสูง 1:20 ถึง 1:100⁴¹ มีโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เก็บแฟรคชันขนาด 2 มิลลิลิตร ตรวจสอบโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 280 นาโนเมตร⁴² และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแฟรคชันต่างๆ ด้วยวิธี Agar well diffusion assay

3.11.1 การเตรียมคอลัมน์ Sephadex G-25

เจลชนิด Sephadex จะอยู่ในรูปผงแห้ง (Dry powder) โดยจะเริ่มจากการทำให้เจลอิมตัว (Swelling) โดยชั่งน้ำหนักผงเจล 10 กรัม ให้ได้ที่จะมีปริมาตรของเจลที่อยู่ในคอลัมน์ทั้งหมด (Bed volume) อยู่ที่ 40-60 มิลลิลิตร แช่เจลในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นเทบัฟเฟอร์ส่วนเกินทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ใหม่ลงไปอีกประมาณ 25% ของปริมาตรเจล แล้วนำไปไล่ฟองอากาศ (Degas) ในตู้อบสูญญากาศ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปบรรจุลงคอลัมน์ทันที (packing by gravity flow) โดยเตรียมคอลัมน์ที่มีสาลีสสูง 0.5 เซนติเมตร และบัฟเฟอร์อยู่ 1 ใน 3 ของคอลัมน์ เทสารแขวนลอย (slurry) ทั้งหมดลงในครั้งเดียว อย่างระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ปิดก๊อกคอลัมน์ให้ไหล รอให้เจลตกลงมาแพ็กตัวจนหมด แล้วปิดก๊อกคอลัมน์ เก็บรักษาคอลัมน์ Sephadex G-25 ในสารละลาย 20% เอทานอล ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.11.2 การแยกแฟรคชันด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25

บัฟเฟอร์ที่ใช้จะกรองผ่านแผ่นเมมเบรนไนลอนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร และไล่ฟองอากาศโดย Sonic bath เป็นเวลา 20 นาที ก่อนการทดลองจะชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร 3 รอบ (3 Column volumes)

เพื่อหาปริมาตรระหว่างเม็ดเจล (Void volume) จะใช้สารละลายผสมระหว่าง Blue Dextran กับ Potassium dichromate ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โหลดลงคอลัมน์ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร (2% ของ Bed volume) สังเกตการแยกของสีฟ้าของ Blue Dextran และสีเหลืองของ Potassium dichromate เริ่มเก็บแฟรคชันสารละลายที่ออกมาลงในหลอดทดลองหลอดละ 2 มิลลิลิตร จนกว่า Blue Dextran จะไหลออกจากคอลัมน์ นำสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 และ 426 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบ Blue Dextran กับ Potassium dichromate สามารถคำนวณหา Void volume ได้จากปริมาตรของเจลที่อยู่ในคอลัมน์ทั้งหมด ลบปริมาตรที่ Blue Dextran ออกจากคอลัมน์

3.12 การระบุชนิดของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำแฟรคชันที่ตรวจพบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน ส่องวิเคราะห์ Protein identification, Proteomics คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยใช้เทคนิค LC-MS ESI-QUAD-TOF เพื่อหาชนิดของเปปไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Mascot ของสายรหัสสีเขียว

3.13 การทำนายฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเปปไทด์ที่แยกได้

จัดการข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาด้วยโปรแกรม Excel เรียงตามขนาดของกรดอะมิโน แล้วลบเปปไทด์ที่ซ้ำกัน และมีขนาดมากกว่า 50 กรดอะมิโน แล้วบันทึกเป็นไฟล์ Fasta สำหรับใช้ทำนายในโปรแกรมหรือเครื่องมือใดๆ สำหรับการศึกษานี้ เพื่อความสะดวก จึงเลือกเครื่องมือที่มีลักษณะเป็น Web-base tool ที่สามารถเข้าใช้บริการได้ผ่านอินเทอร์เน็ตได้ แสดงในตารางที่ 3.2

จึงสังเคราะห์เปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็น AMPs ได้ โดยใช้บริการ Custom Peptide Synthesis ของบริษัท Genscript

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือทางชีวสารสนเทศและฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ AMPs

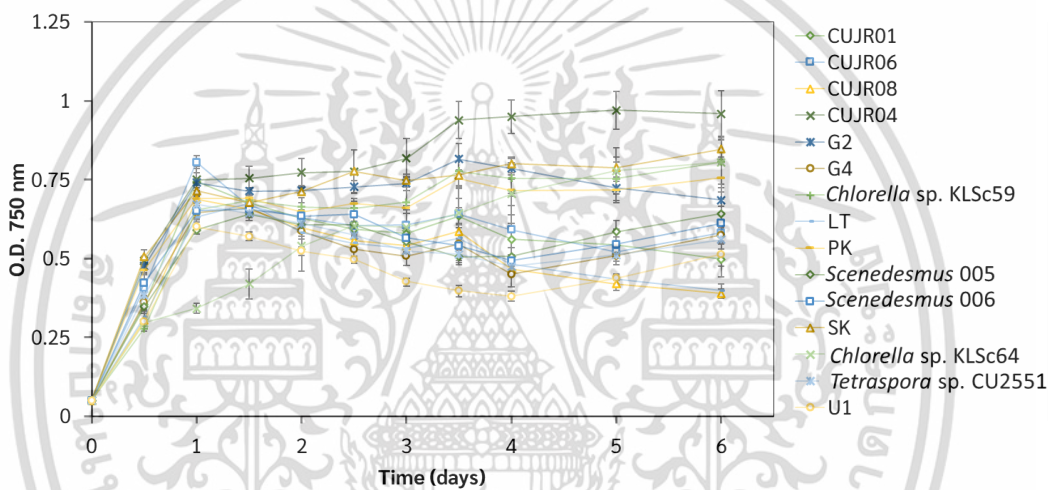
เครื่องมือทำนาย AMPs	URL	อ้างอิง
Antimicrobial Peptide Scanner vr.2	https://www.dveltri.com/ascan/v2/	Veltri. <i>et al.</i> (2018) ⁴³
AMPdiscover	https://biocom-ampdiscover.cicese.mx/	Vishnepolsky and Pirtskhalava (2014) ⁴⁴
Deep-AmPEP30	https://app.cbbio.online/ampep/home	Bhadra. <i>et al.</i> (2018) ⁴⁵
DBAASP	https://dbaasp.org/	Pirtskhalava. <i>et al.</i> (2020) ⁴⁶
iAMPpred	http://cabgrid.res.in:8080/amppred/	Meher. <i>et al.</i> (2017) ⁴⁷
เครื่องมือทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ		
PEP-FOLD 3.5	http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3	Lamiable. <i>et al.</i> (2016) ⁴⁸
เครื่องมือคำนวณคุณสมบัติพื้นฐานของโปรตีน		
PEPTIDE CALCULATOR	https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator	-
Compute pI/Mw	https://web.expasy.org/compute_pi/	-
เครื่องมือแปลงรูปแบบของไฟล์ข้อมูล		
Format Converter	https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/FORMAT_CONVERSION/form.html?sample_input=1	-

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

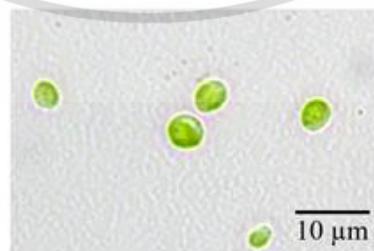
4.1 ผลการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว

ในขั้นแรกของการศึกษา มีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวภายในหน่วยวิจัยพลังงานชีวภาพทั้งหมด 15 สายพันธุ์ จนกว่าจะพบระยะการเจริญคงที่ (Stationary phase) แสดงดังรูปที่ 4.1 พบว่าที่ระยะเวลา 1 วัน สาหร่ายสายพันธุ์ CUJR06 มีการเจริญเติบโตเร็วที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสายพันธุ์อื่น ($p < 0.05$) จึงเลือกใช้เซลล์ของ CUJR06 ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.1 กราฟการเจริญของสาหร่าย 15 สายพันธุ์ (Error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน $n = 3$)

สาหร่ายสายพันธุ์ CUJR06 ที่เจริญในอาหาร TAP ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ทรงกลมรี มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ที่ 4.81 ± 0.64 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.2 ซึ่งคล้ายคลึงกับสาหร่ายสกุล *Chlorella*



รูปที่ 4.2 เซลล์สาหร่าย CUJR06 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

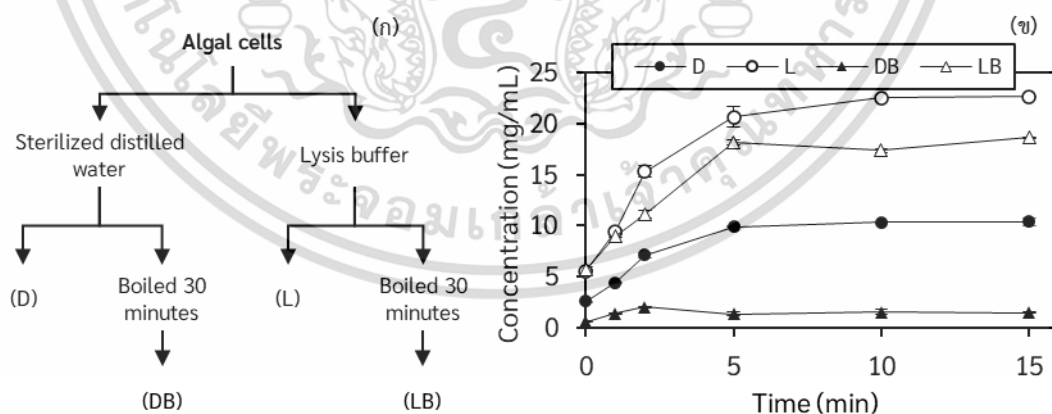
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีนจากสาหร่ายสีเขียว CUJR06

ผู้วิจัยมีการศึกษาการสกัดโปรตีนเบื้องต้น เลือกรสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Sonication) เนื่องจากวิธีนี้สามารถทำให้เซลล์สาหร่ายแตกได้อย่างมีประสิทธิภาพ และร่วมกับการใช้สารเคมีเพื่อรบกวนผนังเซลล์และละลายโปรตีนออกจากเซลล์หรือเศษเซลล์ให้มากที่สุด หลังจากนั้นตกตะกอนด้วย 20% TCA/Acetone เพื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์เบื้องต้น ก่อนนำไปวัดปริมาณโปรตีน

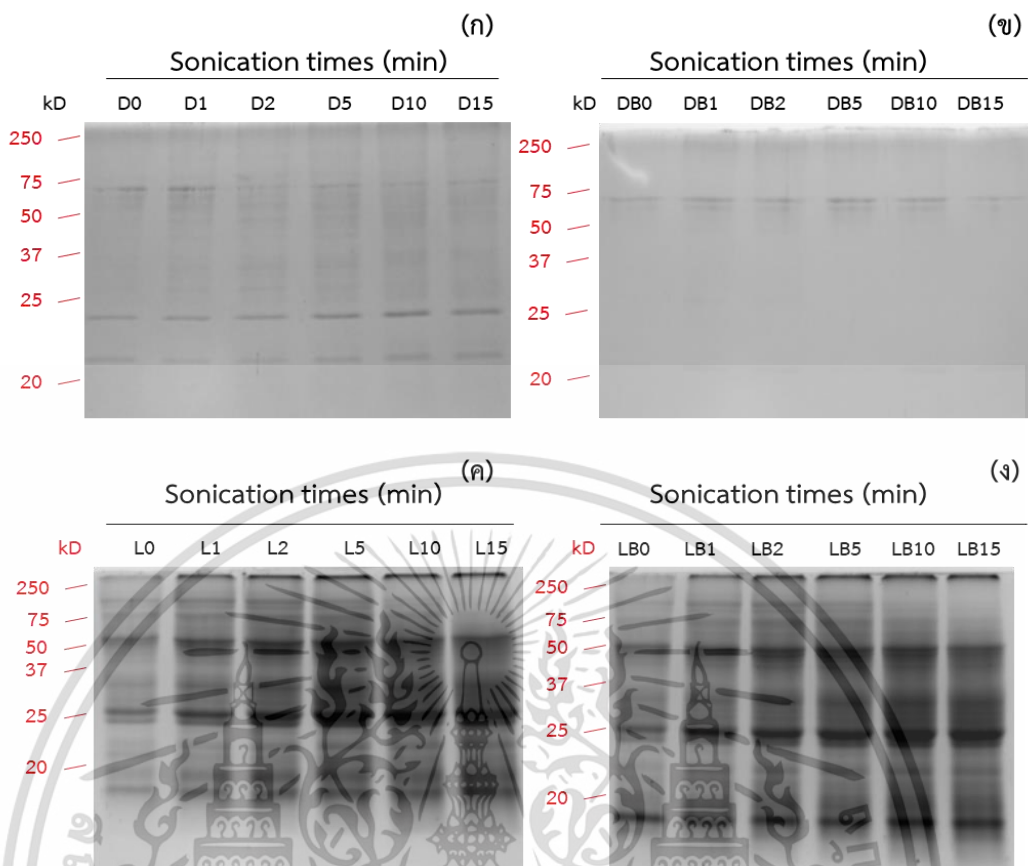
จากแผนภูมิในรูปที่ 4.3ก ได้ทำให้เซลล์สาหร่ายแตกในน้ำกลั่น (D) เปรียบเทียบกับ Lysis buffer (L) และผลของการต้มให้ความร้อนต่อโปรตีนที่สกัดได้ (DB และ LB) ผลทดลอง (รูปที่ 4.3ข) พบว่าควร Sonicate เซลล์สาหร่าย อย่างน้อย 5 นาที ขึ้นไป เพื่อสกัดโปรตีนออกเซลล์ได้มากที่สุด และ Lysis buffer ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด 22.63 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มากกว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นถึงสี่เท่า และการให้ความร้อน (Heat inactivation) หลังทำให้เซลล์แตกส่งผลให้ปริมาณโปรตีนลดลง จากการที่โปรตีนบางชนิดอาจตกตะกอน และเสียสภาพตัวลงเมื่อถูกความร้อน และจากรูปที่ 4.4 พบว่าระยะเวลาการ Sonicate ที่เพิ่มขึ้น ไม่ส่งผลต่อคุณภาพของโปรตีนที่สกัดได้ แต่อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนถึง 30 นาที เพื่อทำลายเอ็นโดโปรตีเอสภายในเซลล์ นั้นส่งผลให้สูญเสียโปรตีนขนาดเล็กกว่า 50 กิโลดาลตันลงเมื่อสกัดด้วยน้ำกลั่น (รูปที่ 4.4ข)

ดังนั้นเพื่อป้องกันการเสียสภาพและลดการถูกย่อยสลายโดยเอ็นโดโปรตีเอสภายในเซลล์ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิของสารละลายในขั้นตอนสกัดโปรตีนให้ต่ำ (4 องศาเซลเซียส) โดยใช้อ่างน้ำแข็ง



รูปที่ 4.3 แผนภูมิแสดงขั้นตอนและรหัสตัวอย่าง 4 วิธีน้ำกลั่น (D) และ Lysis buffer (L) และการให้ความร้อนหลังการสกัด (DB และ LB) (ก) และกราฟเปรียบเทียบความเข้มข้นโปรตีนกับระยะเวลาที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงแตกเซลล์ (Error bar แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n = 3) (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 12% gel ย้อมสีด้วย CBB ทุกเลนไหลลดโปรตีนจากเซลล์ปริมาณเท่ากันเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นโปรตีนกับระยะเวลาที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงทำให้เซลล์แตก ในน้ำกลั่น (ก) และ Lysis buffer (ค) และการให้ความร้อนหลังการสกัด (ข และ ง ตามลำดับ)

หลังการศึกษาการสกัดโปรตีนจากสาหร่าย CUJR06 ผู้วิจัยได้เลือกวิธีสกัดโปรตีนด้วย Lysis buffer และต้มให้ความร้อนหลังการสกัด 30 นาที จากนั้นตกตะกอนโปรตีน ด้วย 20% TCA/Acetone เพื่อแยกโปรตีนออกจาก Lysis buffer และชะสารสีออกจากโปรตีนสาหร่ายในระยะแรกของการศึกษา ตะกอนโปรตีนที่สกัดได้มีสีขาว แต่ในระยะหลังตะกอนโปรตีนที่ได้มีสีเหลืองเขียว แม้ว่าจะเพิ่มรอบการล้างตะกอนด้วย Acetone ยังไม่สามารถชะสารสีออกได้ก็ตาม ผู้วิจัยจึงแนะนำให้สกัดคลอโรฟิลล์ออกจากเซลล์ก่อนการสกัดโปรตีน โดยใช้ 95% Ethanol แช่กับเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว จนกว่าสีของเซลล์จะฟอกจางลง

ต่อมาผู้วิจัยได้พบกับปัญหาการละลายของตะกอนโปรตีนที่ได้ จึงได้ทดลองละลายโปรตีนด้วยบัฟเฟอร์ต่างๆ และพบว่าการปรับค่า pH ของสารละลายโปรตีนด้วย 0.1N NaOH จน pH เป็น 8 สามารถเพิ่มการละลายได้ดีที่สุด แล้ว spin down เพื่อนำส่วนใส (Supernatant) ไปทดสอบต่อไป

4.3 การศึกษาการย่อยโปรตีนจาก CUJR06 ให้เป็นเปปไทด์สายสั้น

ผู้วิจัยได้ศึกษาการใช้เอนไซม์โบรมิเลนเบื้องต้น เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม โดยย่อยโปรตีน Bovine serum albumin ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ และ pH 5.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ที่อัตราส่วน เอนไซม์ต่อโปรตีน 1:10 (w/w) และพบว่าสามารถย่อยโปรตีนเปปไทด์สายสั้นได้ จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้จากสาหร่าย CUJR06 มาย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโปรตีนที่ถูกย่อยโดยโบรมิเลน (Bromelain hydrolysed protein) ไม่พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (ภาคผนวก รูปที่ ค-3) ดังนั้นจึงนำโปรตีนที่สกัดได้มาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซิน

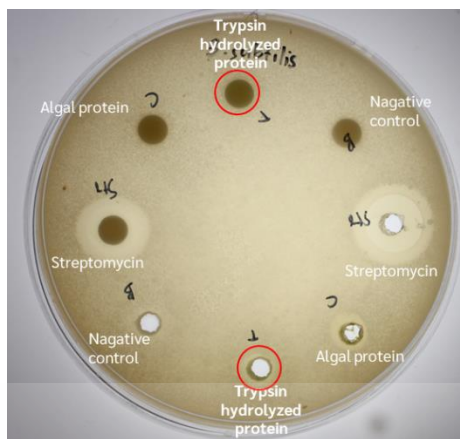
ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์เปปซินไม่ย่อยโปรตีนที่สกัดได้จากสาหร่าย CUJR06 ขณะที่ทริปซินสามารถย่อยโปรตีนเป็นเปปไทด์สายสั้นได้ ที่อัตราส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีน 1:10 (w/w) Tris HCl buffer pH 8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาคผนวก รูปที่ ค-4) จึงนำโปรตีนที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin hydrolysed protein) ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion ไม่พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (รูปที่ 4.5) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Trypsin hydrolysed protein ผลการทดลองพบลักษณะคล้ายการเกิดวงใส ที่ซึ่งแบคทีเรีย *B. subtilis* มีการเจริญหนาแน่นน้อยกว่าบริเวณอื่น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เมื่อนำ Trypsin hydrolysed protein ไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ซึ่งทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการจับอนุมูล DPPH[•] (DPPH radical) และ ABTS radical scavenging assay ซึ่งทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการจับอนุมูล ABTS (ABTS^{•+} radical cation) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และมีน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมเชิงลบ พบว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จึงคำนวณและแสดงผลในหน่วย IC₅₀ (50% Inhibitory concentration) ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน

	IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	วิธีการ
Trypsin hydrolysed protein	1,682.35	DPPH assay
	1,922.04	ABTS assay
Trolox	43.31	DPPH assay
	120.77	ABTS assay
Ascorbic acid	10.78	DPPH assay
	76.26	ABTS assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลการโดยวิธี Disc diffusion และ Agar well diffusion ต่อแบคทีเรีย *B. subtilis* ของโปรตีนจากสาหร่าย CUJR06 และ Trypsin hydrolyzed protein โดยมี denatured trypsin เป็นชุดควบคุมเชิงลบ วงกลมสีแดงแสดงถึงลักษณะคล้ายวงใสที่เกิดขึ้น

เมื่อนำ Trypsin hydrolyzed protein ส่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS พบว่ามีเปปไทด์ในโปรตีนมากกว่า 12,100 เปปไทด์ ประกอบไปด้วย 530 เปปไทด์ที่แตกต่างกัน มีคะแนนเปปไทด์ (Peptide score) ผ่านเกณฑ์ที่รับได้ (Threshold >36) ซึ่งเปปไทด์เหล่านั้น มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ 7 ถึง 42 กรดอะมิโน มีค่า Isoelectric point อยู่ในช่วง 3.7 ถึง 12.0 และมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.7 ถึง 4.0 kDa

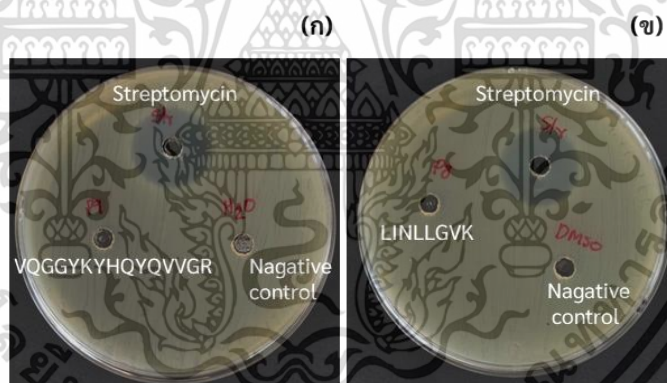
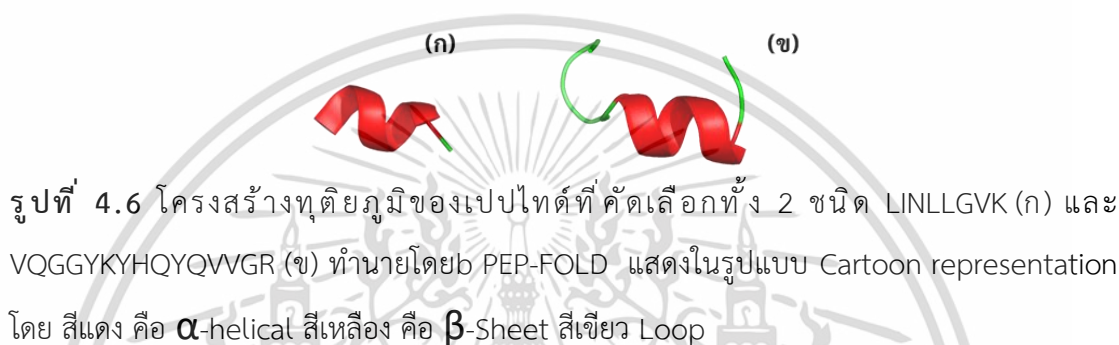
จากนั้นนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ทั้ง 530 เปปไทด์ ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมหรือเครื่องมือด้านชีวสารสนเทศ ได้แก่ iAMPpred และ AxPEP เพื่อทำนายฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้ผลการคำนวณค่าความน่าจะเป็น (Probability) จากแต่ละโปรแกรม จึงคัดเลือกเปปไทด์ที่ได้คะแนนทำนายดีที่สุด 2 อันดับแรก (ตารางที่ 4.2) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโน คือ LINLLGVK (รูปที่ 4.6ก) ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีขั้ว คือ Asparagine และ Lysine และมีกรดอะมิโนที่มีความเป็น Hydrophobic อยู่มาก คือ Isoleucine Leucine และ Valine ขณะที่เปปไทด์ VQGGYKYHQYWGR (รูปที่ 4.6ข) นั้นมี Arginine Asparagine Glutamine และ Lysine ที่ส่งเสริมให้เปปไทด์มีประจุบวก ร่วมกับ Valine Tyrosine และ Histidine ที่ส่งเสริมความเป็น Hydrophobic ให้กับเปปไทด์

จากนั้นส่งสังเคราะห์เปปไทด์ทั้งสอง เพื่อจะยืนยันฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion โดยเบื้องต้น ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองกลับไม่พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย จึงได้ทดสอบด้วย Agar well diffusion (รูปที่ 4.7) ผลการทดลองกลับไม่พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สรุปว่าทั้งสองเปปไทด์ที่สังเคราะห์นั้น ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงความน่าจะเป็นที่ลำดับเปปไทด์ โดยหาค่าเข้าใกล้ 1 หมายถึง มีความน่าจะเป็นที่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ลำดับกรดอะมิโน	LINLLGVK	VOGGYKYHQYQVGR
มวลโมเลกุล (Da)	869.12	1781.99
pI	8.75	9.53
คะแนนทำนายจาก iAMPpred	0.986	0.630
คะแนนทำนายจาก AxPEP	0.822	0.433



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบ Agar well diffusion ของเปปไทด์สังเคราะห์ VOGGYKYHQYQVGR (ก) และ LINLLGVK (ข) ต่อ *E. coli* โดยมี DMSO และน้ำบริสุทธิ์เป็นชุดควบคุมเชิงลบ

ผู้วิจัยได้ค้นหาเครื่องมือชีวสารสนเทศเพื่อทำนาย AMPs เพิ่มขึ้น ได้แก่ iAMPpred, Deep-AmPEP30, Antimicrobial Peptide Scanner vr.2 และ DBAASP ซึ่งเครื่องมือเหล่านี้จะทำนายความน่าจะเป็นที่เปปไทด์จะมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ออกมาเป็นค่าความน่าจะเป็น โดยอาศัยการคำนวณที่แตกต่างกันไปตามโมเดล และความถูกต้องของฐานข้อมูลที่ใช้พัฒนาเครื่องมือต่างๆ ขึ้นมา ซึ่งแตกต่างจากการเครื่องมือทำนายของ DBAASP ที่บอกผลการทำนายว่าเป็น AMPs หรือ non-AMPs ทำให้สามารถกรองข้อมูลได้มากขึ้น ประกอบกับการใช้ BchemRF CPPred ทำนายหาเปปไทด์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

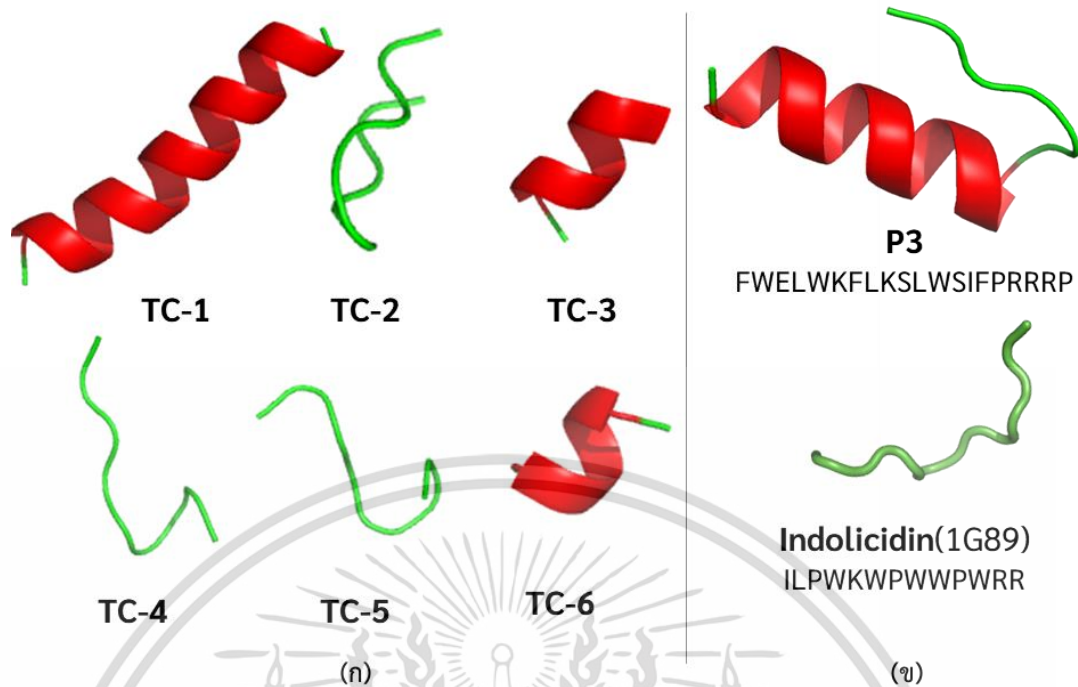
สามารถเจาะเข้าเซลล์เมมเบรนได้ เพราะว่ากลไกของ AMPs ส่วนใหญ่มีเป้าหมายคือทำให้เซลล์เมมเบรนเกิดรูพรุน นอกจากการทำนายโดยเครื่องมือแล้ว ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบคุณสมบัติของแต่ละเปปไทด์ ได้แก่ ค่า pI ประจุรวมของเปปไทด์ ความเป็น Hydrophobicity รวมถึงโครงสร้างทุติยภูมิ จึงได้ตัวแทนเปปไทด์ที่จะสังเคราะห์อีก 6 ชนิด แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงคุณสมบัติและผลการทำนายของตัวแทนเปปไทด์ที่มีโอกาสเป็น AMP

รหัส	ลำดับกรดอะมิโน	มวลโมเลกุล (Da)	pI	Net Charge	DBAASP	AMPscanner	Deep-AmPEP30	iAMPpred
TC-1	FVAQEGVGGLFKGLTPLWGR	2132.47	9.85	+1	AMP	0.86	0.50	0.04
TC-2	ILRPESYWFR	1366.57	9.84	+1	AMP	0.09	0.44	0.20
TC-3	RINNALQR	984.12	12.10	+2	AMP	0.31	0.56	0.36
TC-4	KVIITAPAK	940.19	10.69	+2	AMP	0.35	0.69	0.79
TC-5	VITAPAK	812.01	10.09	+1	AMP	0.38	0.33	0.65
TC-6	INNALQR	827.93	10.50	+1	AMP	0.32	0.25	0.41

การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิจากลำดับกรดอะมิโน สามารถทำได้โดยการใช้ PEP-FOLD 3 ซึ่งเป็นหนึ่งในเครื่องมือของ RPBS จากนั้นเลือกโครงสร้างที่มีความเชื่อมั่นสูงสุด มาศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ โดยใช้ซอฟต์แวร์ the PyMOL Molecular Graphic System

ผลการทำนายโครงสร้างเปปไทด์แสดงดังรูปที่ 4.8 เปปไทด์ TC-1 TC-3 และ TC-6 มีลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ α -helix เป็นหลัก และมีส่วน loop อิสระด้านปลาย คล้ายกับโครงสร้างที่ทำนายได้ของเปปไทด์ P3 จากงานวิจัยของ Yan. *et al.* (2020)⁴⁹ ขณะที่เปปไทด์ TC-2 TC-4 และ TC-5 มีโครงสร้างอิสระแบบ extended random coil คล้ายกับโครงสร้างของเปปไทด์ Indolicidin²⁴



รูปที่ 4.8 โครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ที่คัดเลือกทั้ง 6 ชนิด (ก) ทำนายโดย PEP-FOLD และ ตัวอย่างโครงสร้างของ AMPs ที่มีการค้นพบแล้ว P3 และ Indolicidin (ข) แสดงในรูปแบบ Cartoon representation โดย สีแดง คือ α -helical สีเหลือง คือ β -Sheet สีเขียว Loop

การทำนายของ DBAASP มีอัลกอริทึมที่นำคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของ AMP และฟังก์ชันฐานข้อมูลที่ช่วยจัดกลุ่ม AMP และ non-AMP ซึ่งฐานข้อมูลของ DBAASP ที่จัดเก็บข้อมูลของ AMP ที่มีการทดลองจริง (*In vivo*) และผ่านการคัดกรองด้วยผู้เชี่ยวชาญเอง (Manually curated)

แม้ว่าผลการทำนายโดยเครื่องมือ DBAASP จะบ่งบอกว่าเปปไทด์สังเคราะห์ 6 ชนิด ที่คัดเลือกมา มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยเฉพาะเปปไทด์ TC-1 ที่ผู้วิจัยพิจารณาร่วมแล้วว่ามีโครงสร้างและคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับ P3 แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion กลับไม่พบวงใส หรือฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (รูปที่ 4.9) ซึ่งก็เป็นความท้าทายสำหรับการตามหา AMP ด้วยวิธีทาง *In Sillico* ที่ยังไม่ตอบโจทย์ทั้งหมด อย่างไรก็ตามจากแผนผังการทำงานที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 (รูปที่ 3.1) จึงได้ลองเลือกใช้สายหอยสายพันอื่น และได้รับคำแนะนำถึงการให้ความร้อนกับโปรตีนในขั้นตอนการสกัดโปรตีน ที่อาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการ

เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์สังเคราะห์ทั้ง 6 ชนิด โดยวิธี ABTS assay ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 พบว่าเปปไทด์ TC-2 TC-1 และ TC-3 ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์การยับยั้ง ABTS radical ได้ 45% 36% และ 9% ตามลำดับ ขณะที่เปปไทด์ TC-4 TC-5 และ TC-6 ไม่มีพบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay ซึ่งวัด

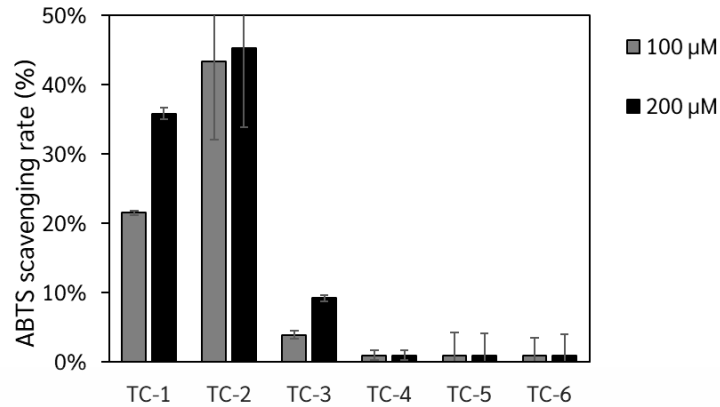
ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนของเหล็ก (Ferric ion) ซึ่งเปรียบเทียบกับสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก รูปที่ ข-4) แสดงดังรูปที่ 4.11 พบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ TC-1 ถึง TC-6 ยกเว้น TC-2 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยการรีดิวซ์ไอออนของเหล็ก ขณะที่ TC-1 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ กลับมี FRAP value มากกว่าความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

เปปไทด์ TC-2 (ILRPESYWFR) มีกรดอะมิโนที่มีวงอะโรมาติก 3 ชนิด⁵⁰ คือ Tyrosine Tryptophane และ Phenylalanine ซึ่งมากกว่าเปปไทด์ TC-1 (FVAQEGVGGLFKGLTPLWGR) และเปปไทด์ที่เหลือนั้นไม่มีกรดอะมิโนที่มีวงอะโรมาติก จึงเป็นไปตามคาดที่เปปไทด์ TC-2 จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในกลุ่ม (%ABTS scavenging rate) แต่ใน FRAP assay กลับไม่พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ อาจเป็นเพราะส่วนที่เป็น Hydrophobic ของเปปไทด์นั้นไม่สามารถเข้าถึง Fe-complex ได้ ขณะที่เปปไทด์อื่นๆ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยการรีดิวซ์ไอออนของเหล็กอย่างอ่อนจากสัดส่วนของกรดอะมิโนที่ทำให้เปปไทด์มีความ Hydrophobic สูงขึ้น เช่น Glycine, Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine เป็นต้น⁵¹

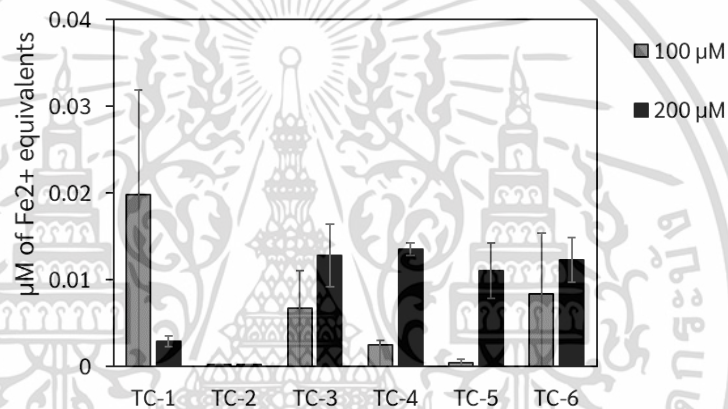


รูปที่ 4.9 ผลการทดสอบ Agar well diffusion ของเปปไทด์สังเคราะห์ทั้ง 6 ชนิด โดยมี DMSO และ น้ำบริสุทธิ์ (UPW) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ เปปไทด์สังเคราะห์ทั้งหมดยกเว้น TC-3 ละลายใน DMSO ส่วน TC-3 ละลายในน้ำบริสุทธิ์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหลุมเท่ากับ 70 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay ของเปปไทด์สังเคราะห์ทั้ง 6 ชนิด



รูปที่ 4.11 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของเปปไทด์สังเคราะห์ทั้ง 6 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาการย่อยโปรตีนจาก *Tetraspora sp.* CU2551 ให้เป็นเปปไทด์สายสั้น

เมื่อจึงได้ลองเปลี่ยนสาหร่ายมาเป็นสายพันธ์ *Tetraspora sp.* CU2551 โดยเฉพาะเลี้ยงในถังหมักโปร่งแสง ปริมาตร 10 ลิตร สภาวะเป่าอากาศ จากนั้นปั่นเหวี่ยงเก็บมวลเซลล์ และทำผงแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

มีการเปลี่ยนแปลงการสกัดโปรตีนจากสาหร่าย หลังจากทำให้เซลล์แตก จะข้ามขั้นตอนการให้ความร้อน จึงนำไปตกตะกอนด้วย 20%TCA ในอะซิโตนทันที ผลการสกัดโปรตีนจากเซลล์ 1 กรัมของ *Tetraspora sp.* CU2551 ได้โปรตีนที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด 190 มิลลิกรัม เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion (100 ไมโครลิตรต่อหลุม) ของโปรตีนจาก *Tetraspora sp.* CU2551 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (Pepsin hydrolysed protein) และทริปซิน (Trypsin hydrolysed protein) แสดงดังตารางที่ 4.3 โดยมีตัวควบคุมเชิงลบ ได้แก่ เอนไซม์ในบัพเพอร์ต่างๆ ที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน Streptomycin 0.01 ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ที่ให้วงใสกว้างที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นใน *B. subtilis* ที่ Pepsin hydrolysed protein และ Trypsin hydrolysed protein ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนก่อนการย่อยพบว่าใน *E. coli* นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ *P. aeruginosa* กับ *S. aureus* มีเพียง Pepsin hydrolysed protein ที่แตกต่างกับจากโปรตีนก่อนย่อย อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.3 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร) ของโปรตีนจาก *Tetraspora sp.* CU2551 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
Streptomycin	21.7±0.5 ^a	25.7±0.5 ^a	22.7±0.5 ^a	19.3±0.5 ^b
Pepsin hydrolysed protein	18.3±0.5 ^b	21.0±0.8 ^b	20.0±0.5 ^b	20.7±0.5 ^a
Trypsin hydrolysed protein	18.3±0.9 ^b	20.0±0.1 ^{bc}	19.0±0.1 ^{bc}	20.7±0.5 ^a
Crude protein	17.7±0.5 ^b	19.0±0.5 ^c	18.3±0.5 ^c	19.0±0.1 ^b

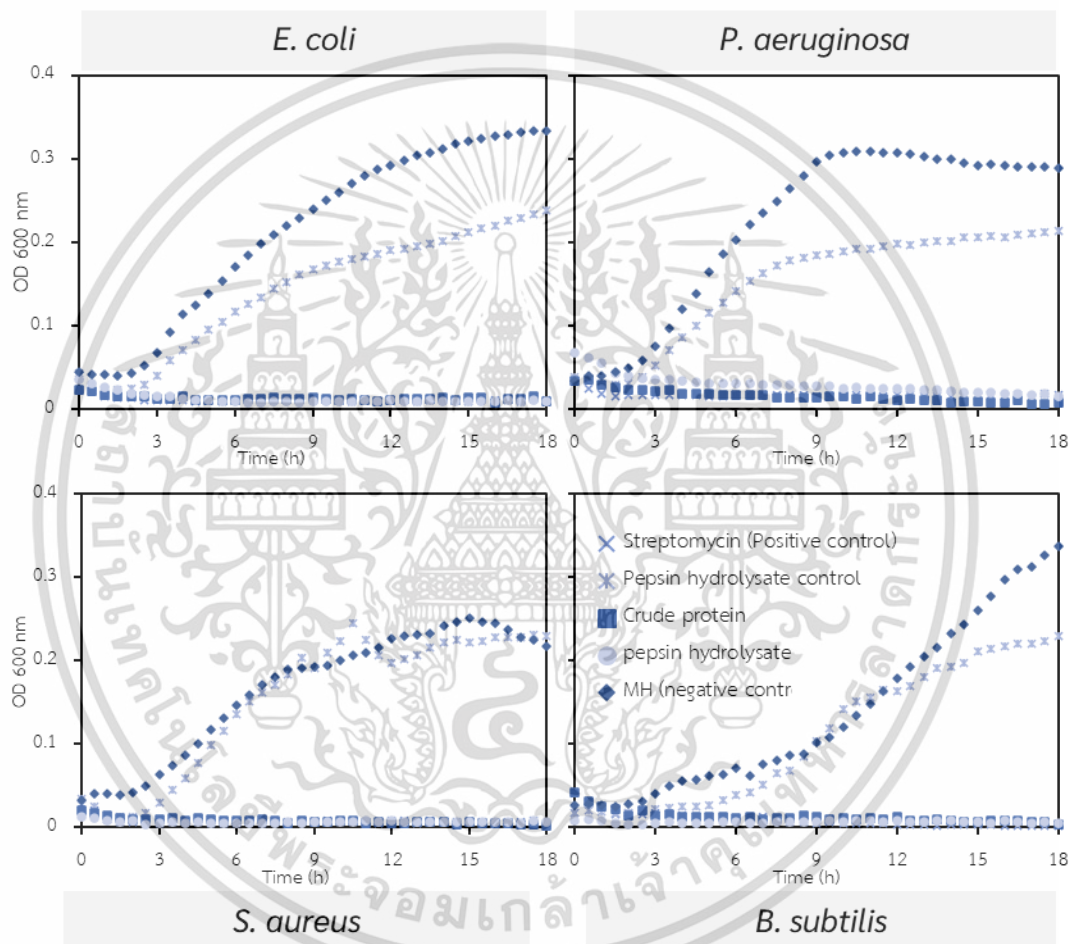
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก a-c ที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p \leq 0.05$)

ต่อมาได้ศึกษาผลของของโปรตีนจาก *Tetraspora sp.* CU2551 ต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยการติดตามค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.12 พบว่า โปรตีนจาก *Tetraspora sp.* CU2551 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

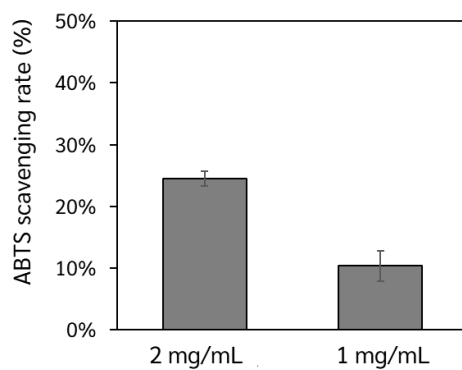
ปซิน (Pepsin hydrolysed protein) และทริปซิน (Trypsin hydrolysed protein) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้ใกล้เคียงกับยา Streptomycin

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ Pepsin hydrolysed-protein แสดงดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 24.5% (ABTS assay) และมี FRAP value เท่ากับ 0.02

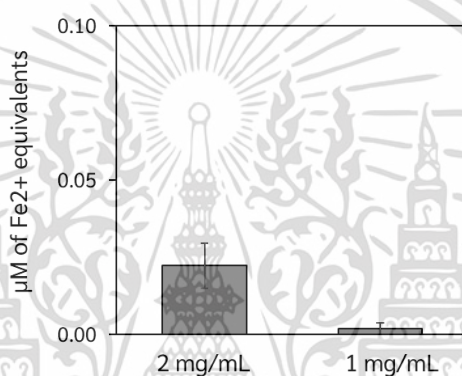


รูปที่ 4.12 ผลของของโปรตีนแต่ละชนิดต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย โดยมีตัวควบคุมเชิงลบ คือ เอนไซม์ในบัพเฟอร์ต่างๆ ที่ถูกทำให้เสียสภาพด้วยความร้อน และ อาหาร MH ตัวควบคุมเชิงบวก คือ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay ของ Pepsin hydrolysed-protein ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.14 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของ Pepsin hydrolysed-protein ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การคัดแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย Sephadex G-25

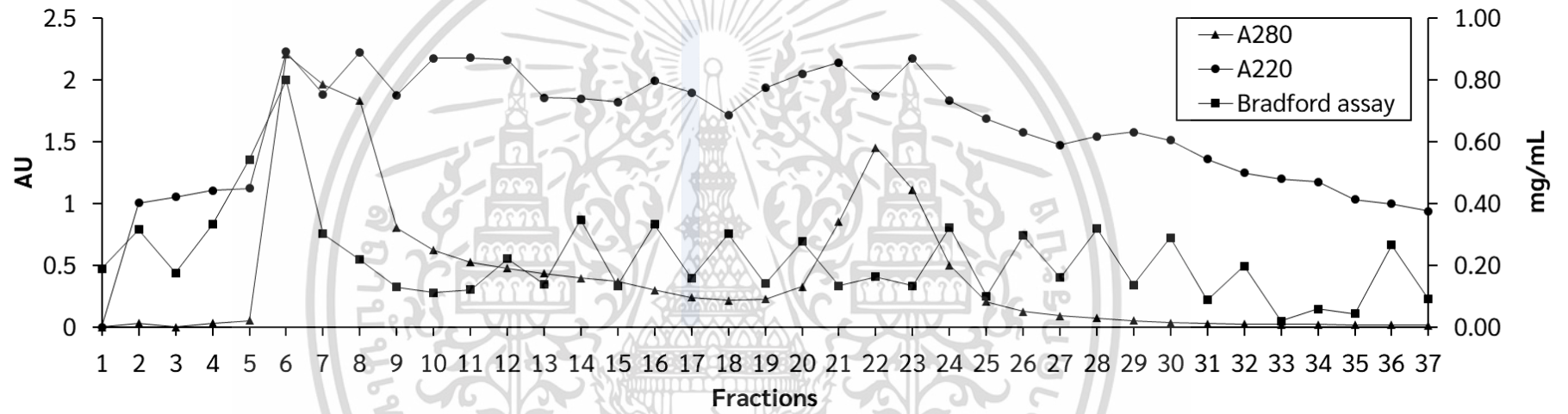
ลักษณะของคอลัมน์ Sephadex G-25 ที่เตรียมได้เมื่อทดสอบร้นคอลัมน์ด้วยสารละลายผสม Blue dextran และ Potassium dichromate

ความสูงของคอลัมน์ (Bed height)	450 มิลลิเมตร
เส้นผ่าศูนย์กลางคอลัมน์ (Column diameter)	10 มิลลิเมตร
อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางต่อความสูงคอลัมน์	1:45
ปริมาตรคอลัมน์ (Bed volume)	45 มิลลิลิตร
ปริมาตรว่างเปล่า (Void volume)	24 มิลลิลิตร
ปริมาตรของตัวอย่างที่แยก (Sample volume)	0.9 มิลลิลิตร
อัตราการไหลเฉลี่ย	0.69 มิลลิลิตรต่อนาที
บัฟเฟอร์	โซเดียมฟอสเฟต pH 7.0
	10 มิลลิโมลาร์
อุณหภูมิห้อง	25 องศาเซลเซียส

แยกโปรตีนของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ถูกย่อยโดยเปปซิน (Pepsin hydrolyzed protein) ความเข้มข้น 10.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเริ่มเก็บแฟรคชันที่ 1 หลังจากมีสารละลายไหลออกจากคอลัมน์แล้ว 24 มิลลิลิตร เก็บแฟรคชันจนนำค่าระหว่างการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 280 นาโนเมตร ของแต่ละแฟรคชันไปสร้างกราฟ ดังรูปที่ 4.15 มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ที่ 0.04 ถึง 0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแต่ละแฟรคชันด้วยวิธี Agar well diffusion assay (100 ไมโครลิตรต่อหลุม) เปรียบเทียบกับ Pepsin hydrolyzed protein (ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียอยู่ที่แฟรคชัน 16 ถึง แฟรคชัน 20 โดยพบฤทธิ์มากที่สุดอยู่ที่แฟรคชัน 17 (F17) และสูญเสียฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *P. aeruginosa* อาจเกิดจากความเข้มข้นของเปปไทด์น้อยลง เพราะว่าเปปไทด์ในแต่ละแฟรคชันนั้น ถูกเจือจางลงอย่างมาจากการเทคนิคเจลฟิลเตรชันที่ส่วนใหญ่ต้องการ การเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนหรือเปปไทด์ก่อนนำไปใช้ต่อ เช่นการใช้ Spin column concentrator เป็นต้น

รูปที่ 4.16 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ F17 ที่ความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 21.7% (ABTS assay) และไม่พบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจาก FRAP assay

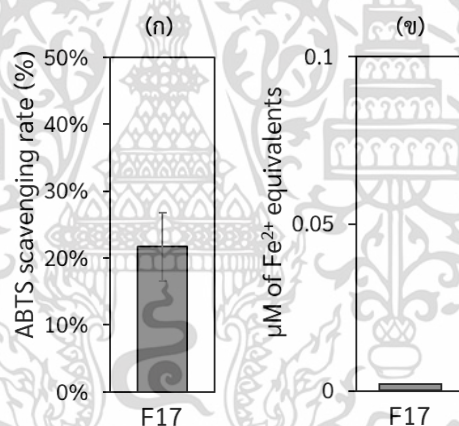


รูปที่ 4.15 กราฟระหว่างการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford ในแกนทุติยภูมิ

ตารางที่ 4.4 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร) ของแต่ละแฟรกชัน

Fraction	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
1-15	nc	nc	nc	nc
16	nc	nc	nc	12.72±0.41
17	11.94±0.30	nc	11.10±0.57	16.37±0.56
18	nc	nc	9.64±0.21	12.78±0.57
19	nc	nc	nc	10.65±0.21
20	nc	nc	nc	10.87±0.60
21-37	nc	nc	nc	nc
Pepsin hydrolyzed protein	17.05±0.42	17.21±0.71	16.26±0.73	21.37±0.56

หมายเหตุ nc คือ ไม่พบวงใส



รูปที่ 4.16 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay

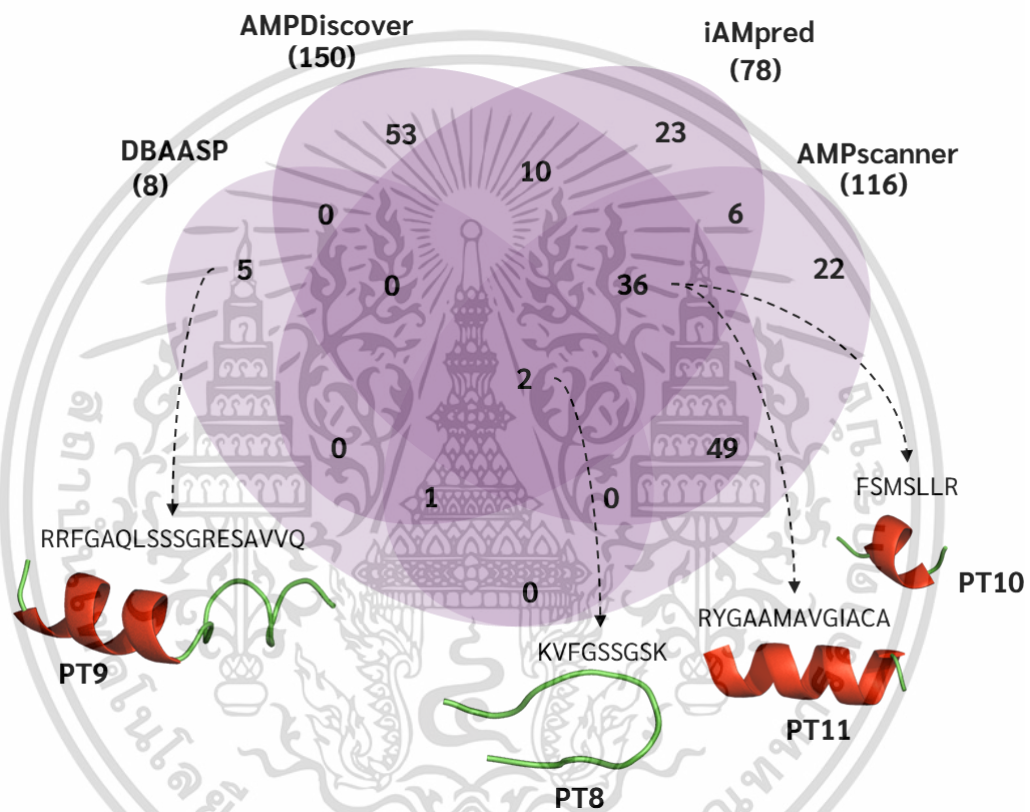
(ก) และ FRAP assay (ข) ของ F17 ที่ความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำแฟรกชัน F17 ส่องวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS โดยเทียบกับฐานข้อมูล Mascot กับ โปรตีนของ *Chlorella* และ *Scenedesmus* พบว่ามีลำดับเปปไทด์อยู่ทั้งหมด 347 เปปไทด์ ซึ่งเป็น เปปไทด์ที่แตกต่างกัน 318 ชนิด มีขนาดตั้งแต่ 7 ถึง 76 กรดอะมิโน มีค่า pI อยู่ในช่วง 2.6 ถึง 12.6 และมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 0.4 ถึง 7.4 kDa เนื่องจากไม่มีเปปไทด์ที่มีค่า Peptide score ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด (Threshold > 59) ผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้ลำดับเปปไทด์ทั้งหมด

ผลการทำนายฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเปปไทด์ในแฟรกชัน F17 จากเครื่องมือ DBAASP, AMPdiscover, iAMPred และ AMPscanner จึงได้กำหนดให้เปปไทด์ที่มีค่า Probability มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.5 เป็น AMPs แล้ววิเคราะห์คุณสมบัติเคมีฟิสิกส์ของแต่ละลำดับเปปไทด์ นำข้อมูล AMP ของแต่ละโปรแกรม ไปสร้างแผนภาพเวนน์ (รูปที่ 4.17) โดยใช้ InteractiVenn: a web-based tool ของ Heberle. *et al.* (2015)⁵² เพื่อแสดงให้เห็นว่าแต่ละเปปไทด์ได้รับการทำนายว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเครื่องมือ แล้วได้คัดเลือกเปปไทด์ 4 ชนิดคือ PT8 PT9 PT10 และ PT11 พร้อมกับ เปปไทด์ AQ-3369 (KWFYTMWH) ที่พัฒนาโดยการทำ Lysine scan เปปไทด์ต้านแบคทีเรียที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวจากทะเล Guzmán. *et al.* (2019)¹ มาเปรียบเทียบกับเป็น Positive control ไปสังเคราะห์

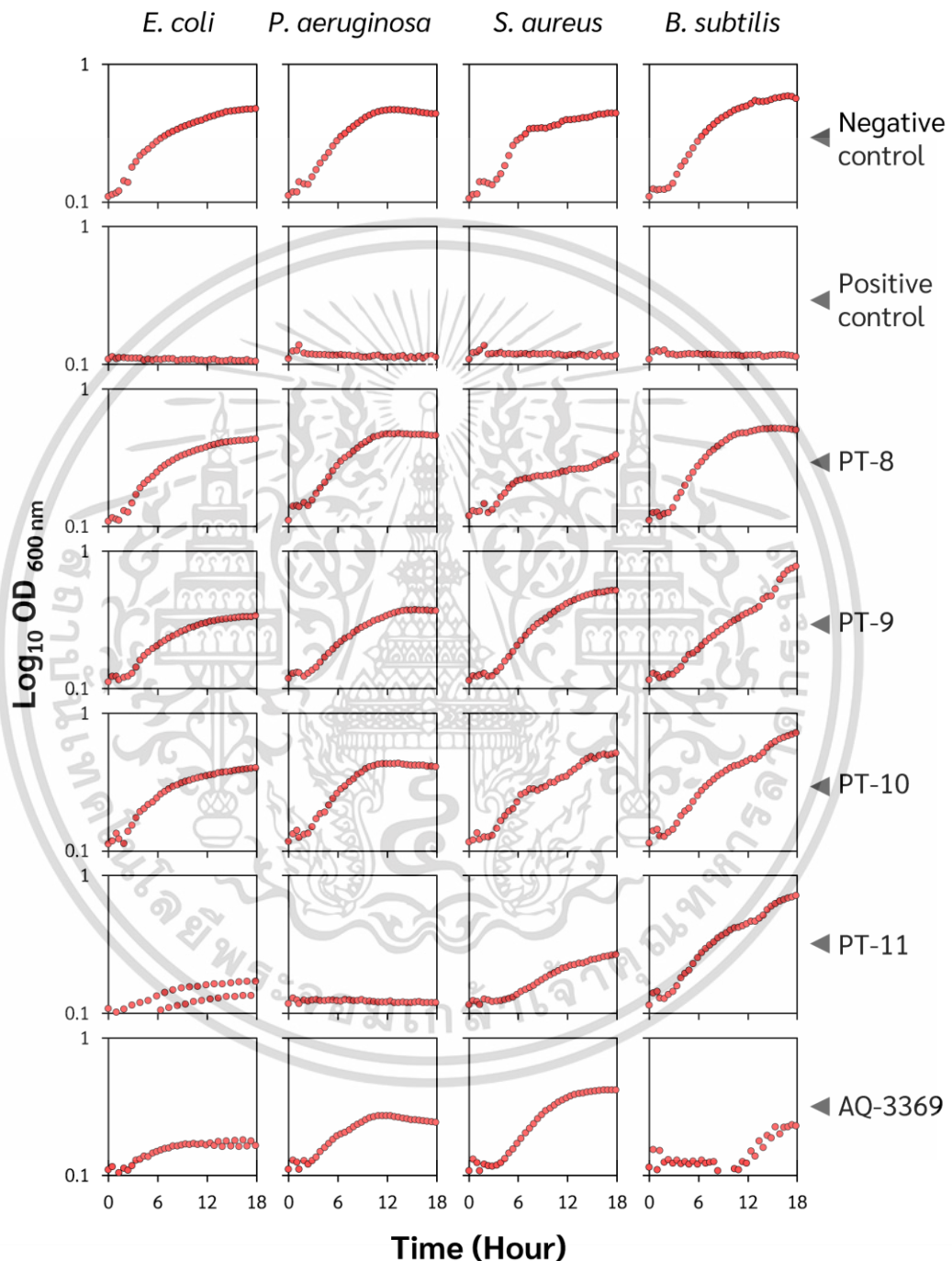


รูปที่ 4.17 แผนภาพเวนน์ (Venn diagram) แสดงถึงการทำนาย AMPs ของแต่ละเครื่องมือต่อลำดับเปปไทด์ ลูกศรชี้ แสดงถึงตำแหน่งของเปปไทด์ที่คัดเลือกมาสังเคราะห์

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.18 จากนั้นจึงแปลงข้อมูลจากกราฟการเจริญความคิดเป็นค่า % ของอัตราการเจริญสัมพัทธ์ ดังรูปที่ 4.19 พบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ PT8 PT9 และ PT10 ให้ผลการต้านแบคทีเรียอย่างอ่อน เปปไทด์ PT11 สามารถยับยั้งหรือลดการเจริญของทุกๆ แบคทีเรียลงได้ แต่อย่างไรก็ตาม จากกราฟการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *B. subtilis* สามารถเจริญกลับมาได้ คาดว่าเกิดจากการปรับตัวของแบคทีเรียที่อาจจะซ่อมแซมรูที่สร้างขึ้น สร้างเอนไซม์โปรติสมาย่อย AMP หรือสร้างชั้นไบโอฟิล์มขึ้นมาป้องกันการเข้าถึงของเปปไทด์

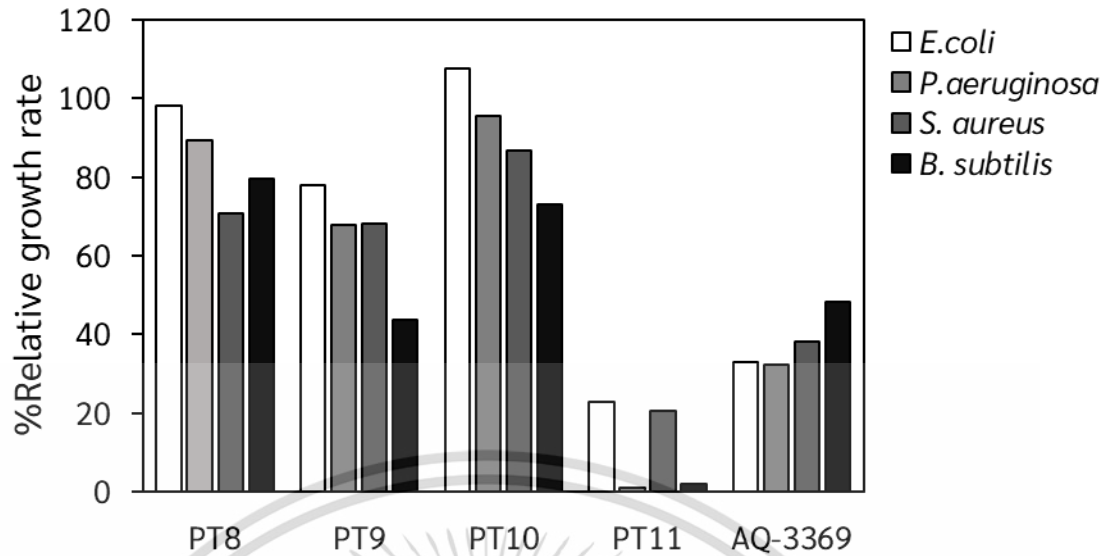
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำนายโครงสร้างสามมิติของ PT11 จากลำดับกรดอะมิโน RYGAAMAVGIACA แสดงดังรูปที่ 4.20 มีโครงสร้างแบบ linear α -helix และมีประจุรวม +2 จึงคาดว่าจะมีกลไกการทำงานที่มีเป้าหมายคือการทำลายเซลล์เมมเบรน¹⁹

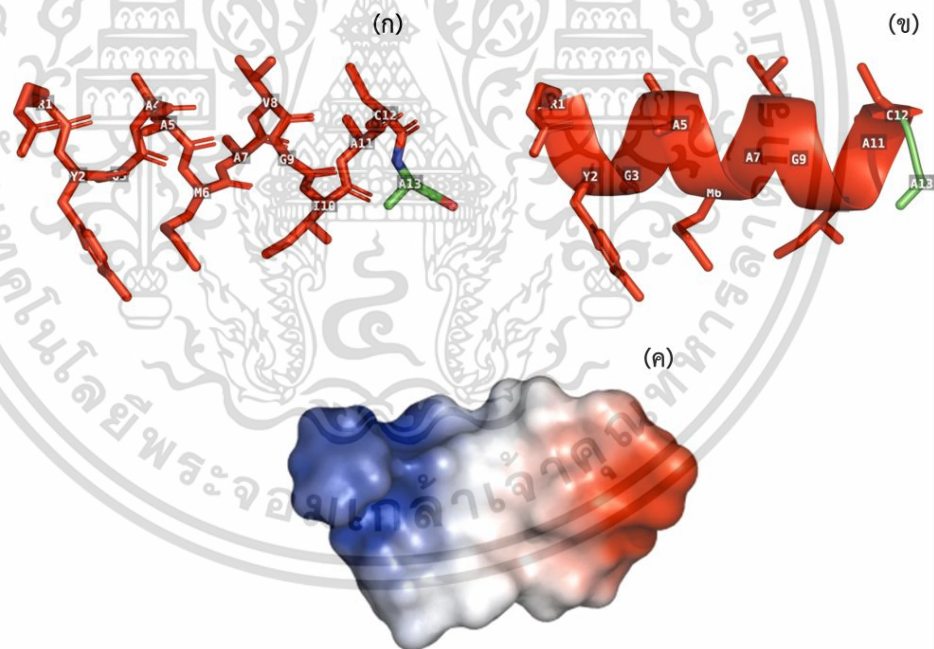


รูปที่ 4.18 ผลของเปปไทด์แต่ละชนิดต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย โดยมีตัวควบคุมเชิงลบ และตัวควบคุมเชิงบวก คือ อาหาร MH และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นสุดท้ายของเปปไทด์เท่ากับ 250 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



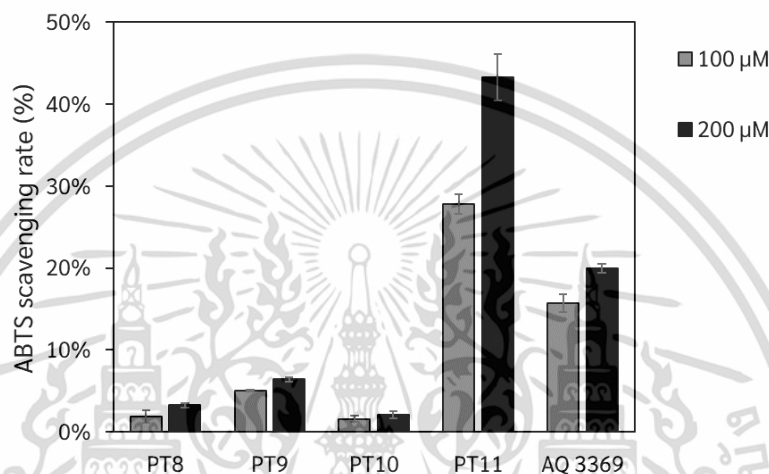
รูปที่ 4.19 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการเจริญสูงสุดสัมพัทธ์ของแบคทีเรียเมื่อทดสอบด้วยเปปไทด์สังเคราะห์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกและเชิงลบ โดยกำหนดให้อัตราการเจริญสูงสุดสัมพัทธ์ของชุดควบคุมเชิงลบเป็น 100%



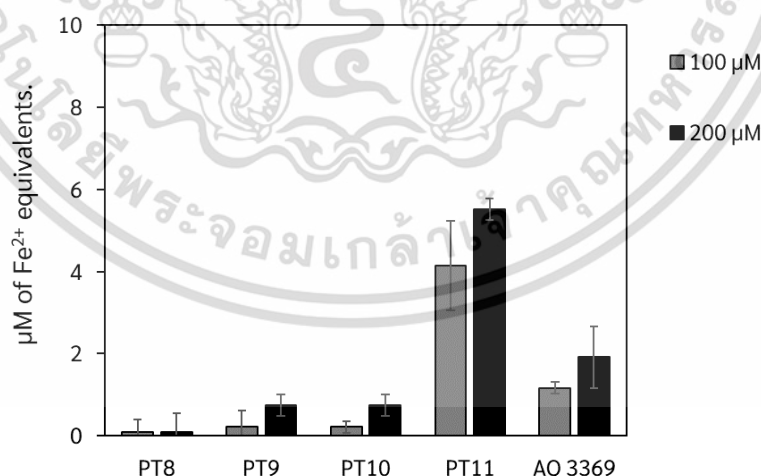
รูปที่ 4.20 โครงสร้างทุติยภูมิของ PT11 แสดงในรูปแบบ Stick (ก) แสดงในรูปแบบของการ์ตูน (ข) โดย สีแดง คือ α -helical สีเหลือง คือ β -Sheet สีเขียว Loop และแสดงในรูปแบบ Electropotential บนผิวโมเลกุลเปปไทด์ Surface model (ค) โดยส่วนที่มีประจุบวกจะมีสีน้ำเงิน และส่วนที่มีประจุลบจะมีสีแดงซึ่งคำนวณอย่างคร่าวๆ ด้วยโปรแกรม Pymol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเปปไทด์สังเคราะห์ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay (รูปที่ 4.21) พบว่า เปปไทด์ PT11 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดถึง 43.2% และ 27.8% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเปปไทด์ AQ-3369 ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 19.9% และ 15.6% ตามลำดับ และจากรูปที่ 4.22 ในส่วนของ FRAP assay เปปไทด์ PT11 ยังมี FRAP value สูงที่สุดเป็น 5.52 และ 4.14 ตามลำดับ แม้ว่า AQ-3369 จะมีการดอะมิโนที่มีวงอโรมาติกมากกว่าใน PT-11 ก็ตาม



รูปที่ 4.21 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay ของเปปไทด์สังเคราะห์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 4.22 แผนภูมิแท่งแสดงผลของการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของเปปไทด์สังเคราะห์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครโมลาร์

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อสืบค้นเปปไทด์สายสั้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ หรือต้านอนุมูลอิสระได้ ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนจากสาหร่าย CUJR06 เมื่อผ่านการย่อยแล้วไม่พบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย แต่โปรตีนจากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน พบว่าโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ หลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 พบว่าฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอยู่ในแฟลคชันที่ 17 (F17) แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 2370

การวิเคราะห์โปรตีนที่อยู่ใน F17 ด้วย LC-MS เข้ากับฐานข้อมูล Mascot พบว่ามีเปปไทด์ที่แตกต่างกัน อยู่ 318 ชนิด ประยุกต์เข้ากับ *In silico* เพื่อตามหาเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกับเครื่องมือทำนายฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้เครื่องการทำนาย AMPs คือ DBAASP iAMPpred, AMP discover และ Antimicrobial Peptide Scanner ver.2 พบว่ามีหลากหลายเปปไทด์ที่มีความน่าจะเป็นที่จะเป็น AMPs จึงคัดเลือกเปปไทด์ออกมาเปรียบคุณสมบัติที่ทำนายได้ เช่น ประจุรวม pi ความเป็น Amphiplicity รวมถึงโครงสร้างทุติยภูมิของเปปไทด์ขึ้นมา คัดเลือกเหลือ 4 ชนิด คือ PT8 PT9 PT10 และ PT11 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า PT11 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งหรือลดอัตราการเจริญสูงสุดการเจริญของ *P. aeruginosa* TISTR 2370, *E. coli* TISTR 074 และ *S. aureus* TISTR 746 ต่ำกว่า 20% เมื่อเปรียบเทียบกับควบคุมเชิงลบ

นอกจากฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย การศึกษานี้ยังพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย ABTS assay ของโปรตีนจากสาหร่าย CUJR06 เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และเปปไทด์ TC-2 ที่ 45% และโปรตีนจากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 24.5% และเปปไทด์ PT 11 ซึ่งมีฤทธิ์อยู่ที่ 43.2% รวมถึงมี FRAP value เทียบเท่ากับ 5.52 ไมโครโมลาร์ของไอออนเหล็ก

5.1 ข้อเสนอแนะ

พัฒนาวิธีการสกัดโปรตีนจากสาหร่าย เพื่อให้ได้โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ง่ายขึ้น สามารถนำเปปไทด์ที่ได้ พัฒนาเป็นสิ่งเจือปนอาหาร หรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้

เพิ่มการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและจุลชีพอื่นๆ เพื่อหาค่า MIC และ MBC ต่อแต่ละแบคทีเรีย ซึ่งจะสามารถนำข้อมูลนี้ไปเปรียบเทียบความได้เปรียบเสียเปรียบระหว่าง PT11 ต่อ สารต้านแบคทีเรียอื่นๆ ได้

เนื่องจากการสังเคราะห์เปปไทด์แต่ละชนิดมาทดสอบ มีค่าใช้จ่ายที่สูงและได้ปริมาณที่ไม่เพียงพอ การศึกษาเทคนิคโคลนนิ่ง และแสดงออกโปรตีน เพื่อผลิตเปปไทด์ AMPs ในปริมาณมาก จึงเป็นงานที่น่าสนใจ ควรค่าแก่การศึกษาในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Guzmán, F., Wong, G., Román, T., Cárdenas, C., Álvarez, C., Schmitt, P., Albericio, F. & Rojas, V. 2019. "Identification of antimicrobial peptides from the microalgae *Tetraselmis suecica* (kylin) butcher and bactericidal activity improvement." *Marine Drugs*. 17(8)
2. Daliri, E.B.M., Oh, D.H. & Lee, B.H. 2017. "Bioactive peptides." *Foods*. 6(5)
3. Tejano, L.A., Peralta, J.P., Yap, E.E.S., Panjaitan, F.C.A. & Chang, Y.W. 2019. "Prediction of bioactive peptides from *Chlorella sorokiniana* proteins using proteomic techniques in combination with bioinformatics analyses." *International Journal of Molecular Sciences*. 20(7)
4. Memarpour-Yazdi, M., Asoodeh, A. & Chamani, J. 2012. "A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates." *Journal of Functional Foods*. 4(1): 278-286
5. Bah, C.S.F., Carne, A., McConnell, M.A., Mros, S. & Bekhit, A.E.D.A. 2016. "Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations." *Food Chemistry*. 202: 458-466
6. Chiozzi, R.Z., Capriotti, A.L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Piovesana, S., Samperi, R. & Lagana, A. 2016. "Purification and identification of endogenous antioxidant and ace-inhibitory peptides from donkey milk by multidimensional liquid chromatography and nanohplc-high resolution mass spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 408(20): 5657-5666
7. Theolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I. & Jean, J. 2013. "Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate." *Journal of Functional Foods*. 5(2): 706-714
8. Montone, C.M., Capriotti, A.L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Piovesana, S., Chiozzi, R.Z. & Lagana, A. 2018. "Peptidomic strategy for purification and identification of potential ace-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetrademus obliquus* microalgae." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410(15): 3573-3586

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. Maswana, T., Phunpruch, S., Lindblad, P. & Maneeruttanarungroj, C. 2018.
"Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp CU2551 grown under anaerobic condition."
Biomass & Bioenergy. 111: 88-95
10. Srimongkol, P., Thongchul, N., Phunpruch, S. & Karnchanatat, A. 2019.
"Optimization of *Synechococcus* sp. Vdw cultivation with artificially prepared shrimp wastewater for ammonium removal and its potential for use as a biofuel feedstock." *Journal of Oleo Science*. 68(3): 233-243
11. Caporgno, M.P. & Mathys, A. 2018. "Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits." *Frontiers in Nutrition*. 5
12. Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarara, N.M., Franco, J.M. & Raymundo, A. 2013.
"Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products." *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*. 2(2): 164-173
13. Koyande, A.K., Chew, K.W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.T. & Show, P.L. 2019.
"Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans." *Food Science and Human Wellness*. 8(1): 16-24
14. Hooper, N.M. 2002. "Proteases: A primer." *Essays in Biochemistry*. 38: 1-8
15. Mótyán, J.A., Tóth, F. & Tózsér, J. 2013. "Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology." *Biomolecules*. 3(4): 923-942
16. Kim, S.K. & Wijesekara, I. 2010. "Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review." *Journal of Functional Foods*. 2(1): 1-9
17. Samarakoon, K. & Jeon, Y.J. 2012. "Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - a review." *Food Research International*. 48(2): 948-960
18. Suttisuwan, R., Phunpruch, S., Saisavoey, T., Sangtanoo, P., Thongchul, N. & Karnchanatat, A. 2019. "Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from trypsin hydrolysis of microalgae protein (*Synechococcus* sp. Vdw)." *Food Biotechnology*. 33(4): 303-324

19. Clark, S., Jowitt, T.A., Harris, L.K., Knight, C.G. & Dobson, C.B. 2021. "The lexicon of antimicrobial peptides: A complete set of arginine and tryptophan sequences." *Communications Biology*. 4(1): 605
20. Intorasoot, S. 2013. "Antimicrobial peptides: The natural proteins and the future application for treatment of infectious diseases." *Journal of Associated Medical Sciences*. 46
21. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. & Yi, H. 2020. "Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields." *Frontiers in Microbiology*. 11
22. Koehbach, J. & Craik, D.J. 2019. "The vast structural diversity of antimicrobial peptides." *Trends Pharmacol Sci*. 40(7): 517-528
23. Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B. & Salcedo, R. 1996. "The human gene fall39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide ll-37 in granulocytes." *European Journal of Biochemistry*. 238(2): 325-332
24. Rozek, A., Friedrich, C.L. & Hancock, R.E. 2000. "Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles." *Biochemistry*. 39(51): 15765-74
25. Mandard, N., Bulet, P., Caille, A., Daffre, S. & Vovelle, F. 2002. "The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider." *European Journal of Biochemistry*. 269(4): 1190-1198
26. Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J.L., Wicker, C., Reichhart, J.M., Dunbar, B., Lepage, P., Van Dorselaer, A., Hoffmann, J., Fothergill, J. & et al. 1989. "Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran phormia terranova of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(1): 262-6
27. Saether, O., Craik, D.J., Campbell, I.D., Sletten, K., Juul, J. & Norman, D.G. 1995. "Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata b1." *Biochemistry*. 34(13): 4147-58
28. Naimi, S., Zirah, S., Hammami, R., Fernandez, B., Rebuffat, S. & Fliss, I. 2018. "Fate and biological activity of the antimicrobial lasso peptide microcin j25 under gastrointestinal tract conditions." *Frontiers in Microbiology*. 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

29. Chen, C.H. & Lu, T.K. 2020. "Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications." *Antibiotics (Basel)*. 9(1)
30. Borrajo, P., Pateiro, M., Gagaoua, M., Franco, D., Zhang, W.G. & Lorenzo, J.M. 2020. "Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of porcine liver protein hydrolysates obtained using alcalase, bromelain, and papain." *Applied Sciences-Basel*. 10(7)
31. Bah, C.S.F., Bekhit, A.E.A., Carne, A. & McConnell, M.A. 2015. "Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations." *Food Chemistry*. 176: 54-63
32. Salampessy, J., Phillips, M., Seneweera, S. & Kailasapathy, K. 2010. "Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins." *Food Chemistry*. 120(2): 556-560
33. Darvish, M., Jalili, H., Ranaei-Siadat, S.O. & Sedighi, M. 2018. "Potential cytotoxic effects of peptide fractions from *Dunaliella salina* protein hydrolyzed by gastric proteases." *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 27(2): 165-175
34. Tejano, L.A., Peralta, J.P., Yap, E.E.S. & Chang, Y.W. 2019. "Bioactivities of enzymatic protein hydrolysates derived from *Chlorella sorokiniana*." *Food Science & Nutrition*. 7(7): 2381-2390
35. Sun, Y., Chang, R., Li, Q. & Li, B. 2016. "Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*." *European Food Research and Technology*. 242(5): 685-692
36. Vo, T.S., Ryu, B. & Kim, S.K. 2013. "Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalga *Spirulina maxima*." *Journal of Functional Foods*. 5(3): 1336-1346
37. Niu, L.J., Zhang, H., Wu, Z.K., Wang, Y.B., Liu, H., Wu, X.L. & Wang, W. 2019. "Modified tca/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis (vol 13, e0202238, 2018)." *Plos One*. 14(1)
38. Kielkopf, C.L., Bauer, W. & Urbatsch, I.L. 2020. "Methods for measuring the concentrations of proteins." *Cold Spring Harbor Protocols*. 2020(4): pdb.top102277

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

39. Testing, E.T.E.C.o.A.S. 2021. "Antimicrobial susceptibility testing eucast disk diffusion method version 9.0." *Journal*. (Issue):
40. Xiao, F., Xu, T., Lu, B. & Liu, R. 2020. "Guidelines for antioxidant assays for food components." *Food Frontiers*. 1(1): 60-69
41. O'Fágáin, C., Cummins, P.M. & O'Connor, B.F. 2011. "Gel-filtration chromatography." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 681: 25-33
42. Zhang, Y., Wang, J., Zhu, Z., Li, X., Sun, S., Wang, W. & Sadiq, F.A. 2021. "Identification and characterization of two novel antioxidant peptides from silkworm pupae protein hydrolysates." *European Food Research and Technology*. 247(2): 343-352
43. Veltri, D., Kamath, U. & Shehu, A. 2018. "Deep learning improves antimicrobial peptide recognition." *Bioinformatics*. 34(16): 2740-2747
44. Vishnepolsky, B. & Pirtskhalava, M. 2014. "Prediction of linear cationic antimicrobial peptides based on characteristics responsible for their interaction with the membranes." *Journal of Chemical Information and Modeling*. 54(5): 1512-1523
45. Bhadra, P., Yan, J., Li, J., Fong, S. & Siu, S.W.I. 2018. "Ampep: Sequence-based prediction of antimicrobial peptides using distribution patterns of amino acid properties and random forest." *Scientific Reports*. 8(1): 1697
46. Pirtskhalava, M., Amstrong, A.A., Grigolava, M., Chubinidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D.E. & Tartakovsky, M. 2020. "Dbasp v3: Database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics." *Nucleic Acids Research*. 49(D1): D288-D297
47. Meher, P.K., Sahu, T.K., Saini, V. & Rao, A.R. 2017. "Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into chou's general pseAAC." *Scientific Reports*. 7(1): 42362
48. Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P. & Tufféry, P. 2016. "Pep-fold3: Faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex." *Nucleic Acids Res*. 44(W1): W449-54

49. Yan, J., Bhadra, P., Li, A., Sethiya, P., Qin, L., Tai, H.K., Wong, K.H. & Siu, S.W.I. 2020. "Deep-ampep30: Improve short antimicrobial peptides prediction with deep learning." *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 20: 882-894
50. Nikoo, M. & Benjakul, S. 2015. "Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant–cryoprotectant: A review." *Journal of Functional Foods*. 19: 753-764
51. Esfandi, R., Walters, M.E. & Tsopmo, A. 2019. "Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals." *Heliyon*. 5(4): e01538
52. Heberle, H., Meirelles, G.V., da Silva, F.R., Telles, G.P. & Minghim, R. 2015. "Interactivenn: A web-based tool for the analysis of sets through venn diagrams." *BMC Bioinformatics*. 16(1): 169
53. Preparation of routine media and reagents used in antimicrobial susceptibility testing. in *Clinical microbiology procedures handbook, 3rd edition* (American Society of Microbiology, 2010).



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหาร Tris acetate phosphate (TAP)

เตรียม Stock solution และผสมสำหรับอาหาร TAP ดังตารางที่ ก-1 ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย NaOH หรือ HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร แล้ว Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 20 นาที

ตารางที่ ก-1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate medium (TAP)

หมายเลข	สารเคมี	ปริมาณ	Stock (มิลลิลิตร)	TAP 1 ลิตร
1	Tris-base	2.42 กรัม	100	10 มิลลิลิตร
2	NH ₄ Cl CaCl ₂ .2H ₂ O MgSO ₄ .7H ₂ O	0.40 กรัม 0.05 กรัม 0.10 กรัม	250	25 มิลลิลิตร
3	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	0.05 กรัม 0.10 กรัม	10	1 มิลลิลิตร
4	Na ₂ -EDTA FeSO ₄ .7H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O H ₃ BO ₃ MnCl ₂ .4H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O	0.05 กรัม 5.60 มิลลิกรัม 22.00 มิลลิกรัม 11.40 มิลลิกรัม 5.52 มิลลิกรัม 0.16 มิลลิกรัม 1.10 มิลลิกรัม 0.16 มิลลิกรัม	10	1 มิลลิลิตร
5	Glacial acetic acid	-	-	1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาปฏิชีวนะ Streptomycin

ชั่ง Streptomycin จากนั้นละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองปราศจากเชื้อ 0.22 ไมโครเมตร ลงในภาชนะปราศจากเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

บัฟเฟอร์สำหรับสกัดโปรตีน (Lysis buffer)

เตรียมสารละลายวันต่อวันดังตารางที่ ก-2 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก-2 องค์ประกอบของบัฟเฟอร์สำหรับสกัด ดัดแปลงจาก Montone. *et al.* (2018)⁸

สารเคมี	ความเข้มข้นของสารละลาย Stock	บัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร
Tris HCl pH 9	0.60 โมลาร์	1 มิลลิลิตร
KCl	0.15 โมลาร์	1 มิลลิลิตร
SDS	20% (w/v)	1 มิลลิลิตร
β -mercaptoethanol		27 ไมโครลิตร

20% Trichloroacetic acid ใน Acetone

ละลาย Trichloroacetic acid 20 กรัม ใน Acetone 60 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย Acetone เป็น 100 มิลลิลิตร³⁷

Bradford reagent

ละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 100 มิลลิกรัม ใน 95% Ethanol 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 85% Phosphoric acid 100 มิลลิลิตร (สารละลายที่ได้ควรมีสีน้ำตาลอ่อน) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO.1 เก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้อง³⁸

Tris HCl 0.5M pH 6.8

ละลาย Tris base 6 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.8 โดยใช้ 6N HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Tris HCl 1.5M pH 8.8

ละลาย Tris base 18.15 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.8 โดยใช้ 6N HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10% SDS (w/v)

เตรียมโดยชั่ง Sodium dodecyl sulfate 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

10% APS (w/v)

เตรียมโดยชั่ง Ammonium Persulfate 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (2-4 สัปดาห์)

5x SDS Page Running buffer

ชั่ง Tris base 15.1 กรัม glycine 72.0 กรัม และ SDS 5.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

Staining solution

ละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 0.4 กรัม ใน Methanol 40 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

Destaining solution

ผสม Methanol 40 มิลลิลิตร กับ glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

สารมาตรฐาน 0.5 McFarland

เตรียมจาก 1% (v/v) Sulfuric acid 95.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.175% (w/v) Barium chloride 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดฝาเกลียวในมืด ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความขุ่นของสารละลายด้วยการวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ที่มี light-path เป็น 1 เซนติเมตร ควรมีค่าในช่วง 0.08 ถึง 0.13⁵³

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารมาตรฐาน Bovine serum albumin

ชั่ง Bovine serum albumin จากนั้นเติมน้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์ที่ต้องการ ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเป็นความเข้มข้นต่างๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับ Bradford assay

สารผสม Blue dextran และ Potassium dichromate

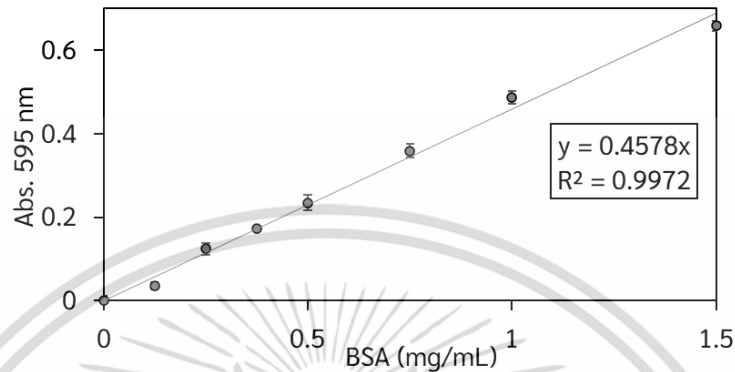
ชั่ง Blue dextran 20 มิลลิกรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีฟ้า 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่ง Potassium dichromate 20 มิลลิกรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรจะได้สารละลายสีเหลืองเข้ม 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วกรองผ่านแมมเบรน 0.45 ไมโครเมตรก่อนใช้



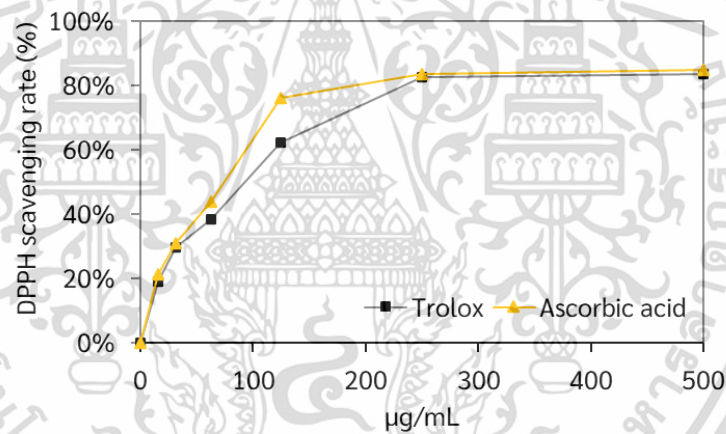
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

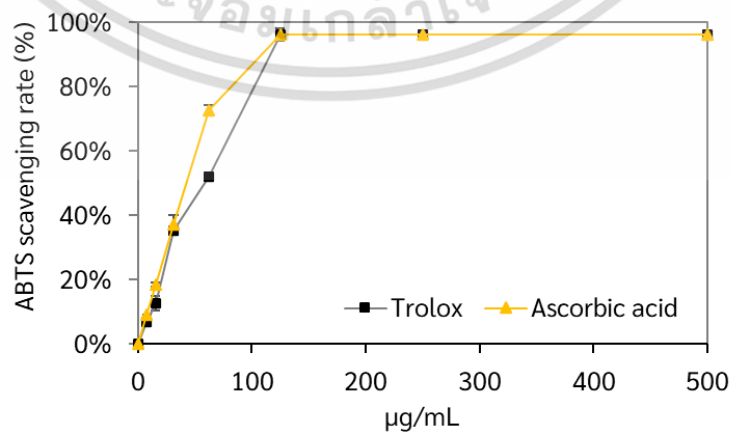
กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ของ Bradford microassay (n=3)

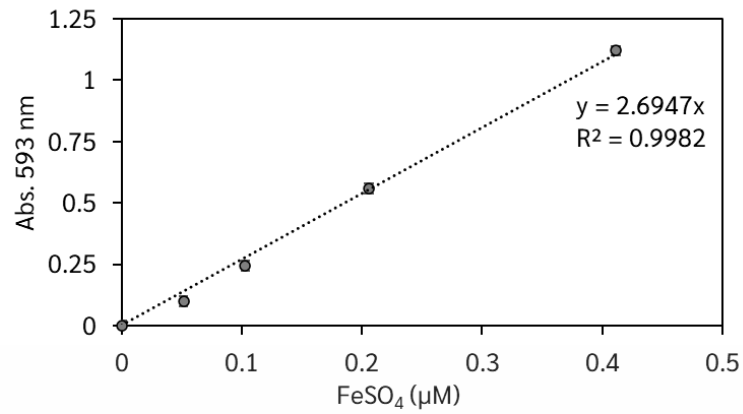


รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐาน Trolox และ Ascorbic acid ของ DPPH assay (n=3)



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐาน Trolox และ Ascorbic acid ของ ABTS assay (n=3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-4 กราฟมาตรฐาน FeSO₄ ของ FRAP assay (n=3)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

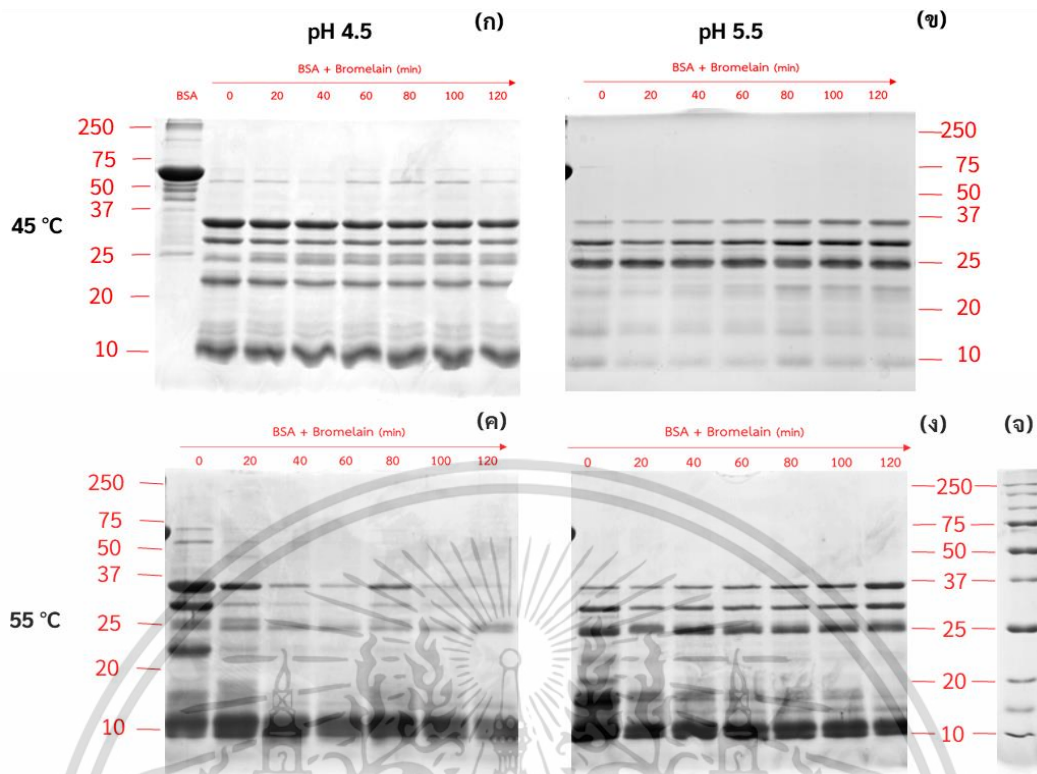
ภาคผนวก ค

ภาพถ่ายการทดลองและผลการทดลอง

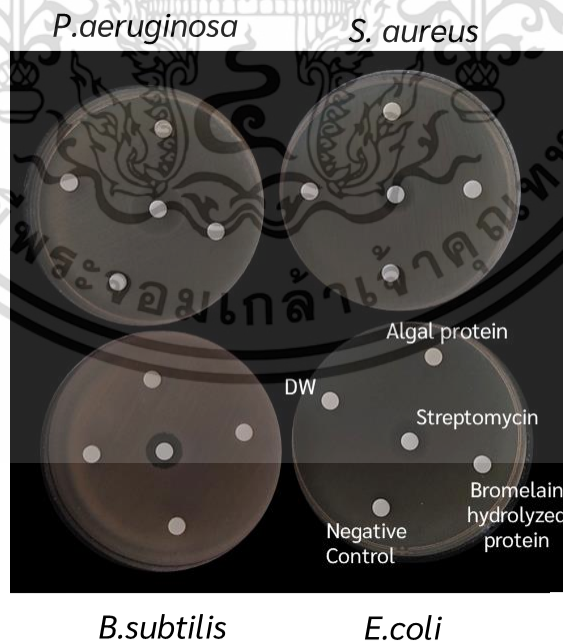


รูปที่ ค-1 การสกัดโปรตีนจากสาหร่ายตามขั้นตอนดังนี้ ปั่นเหรียญเก็บเซลล์สาหร่าย (ก) ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงแตกเซลล์สาหร่ายในบัฟเฟอร์สำหรับสกัด (ข) ตักคอนโปรตีนหลังจากตกตะกอนโปรตีนเบื้องต้นด้วย 20% TCA/Acetone (ค) และ (ง) การระเหย acetone ออกจากตะกอน (จ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

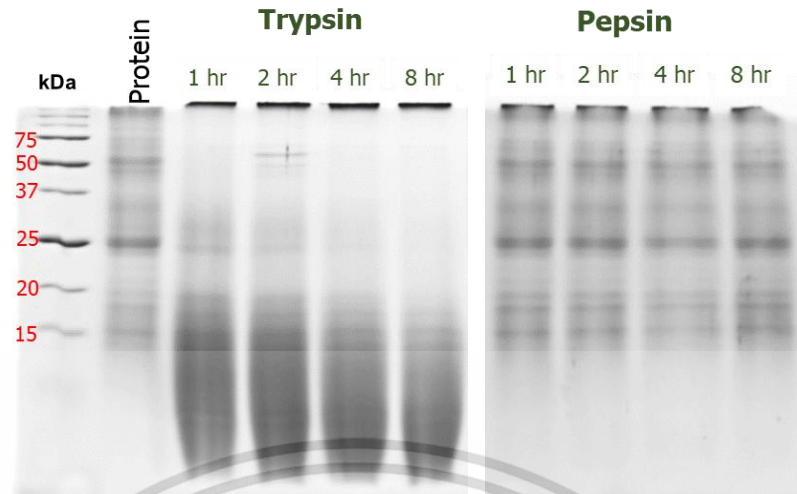


รูปที่ ค-2 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อย่อยโปรตีน BSA ด้วยเอนไซม์โบรมิเลน pH 4.5 และ 5.5 ป่มที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส ทุกเลนโหลดโปรตีนในปริมาณเท่ากัน

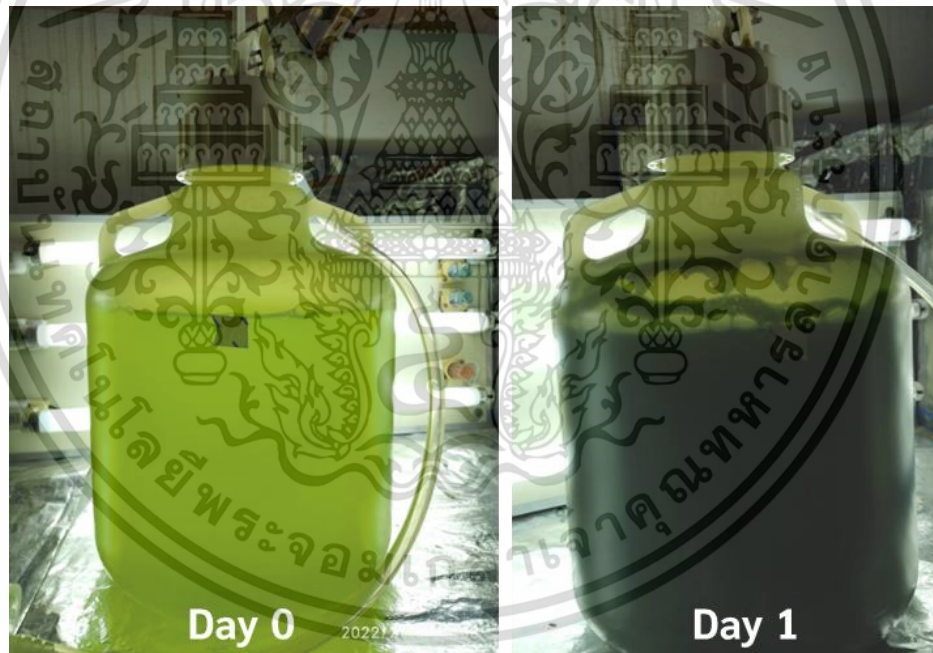


รูปที่ ค-3 Disc diffusion ของโปรตีนจากสาหร่าย CUJR06 และ Bromelain hydrolyzed protein โดยมี น้ำกลั่น (DW) และ Heated bromelain เป็นชุดควบคุมเชิงลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

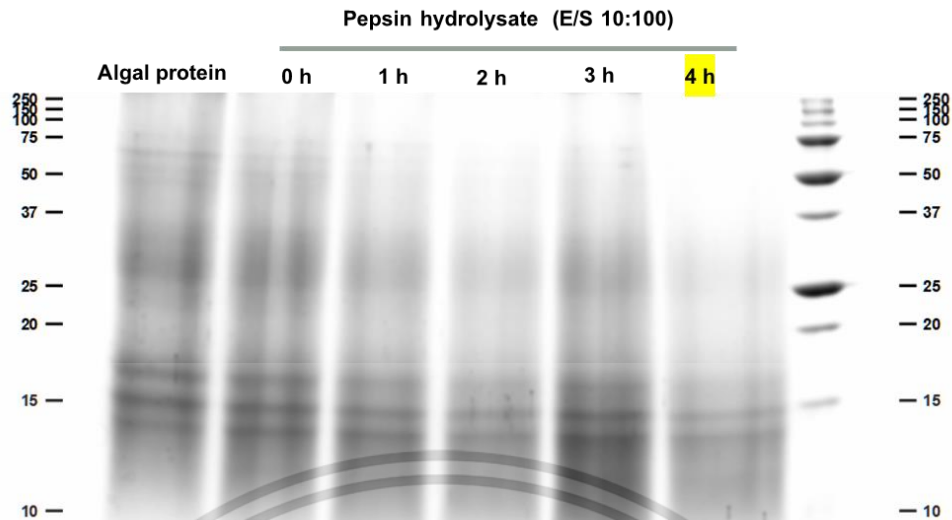


รูปที่ ค-4 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อย่อยโปรตีนจากสาหร่าย CUJR06 ด้วยเอนไซม์เปปซินที่ pH 1.5 และเอนไซม์ทริปซิน pH 8.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทุกเลนโหลดโปรตีนในปริมาณเท่ากัน

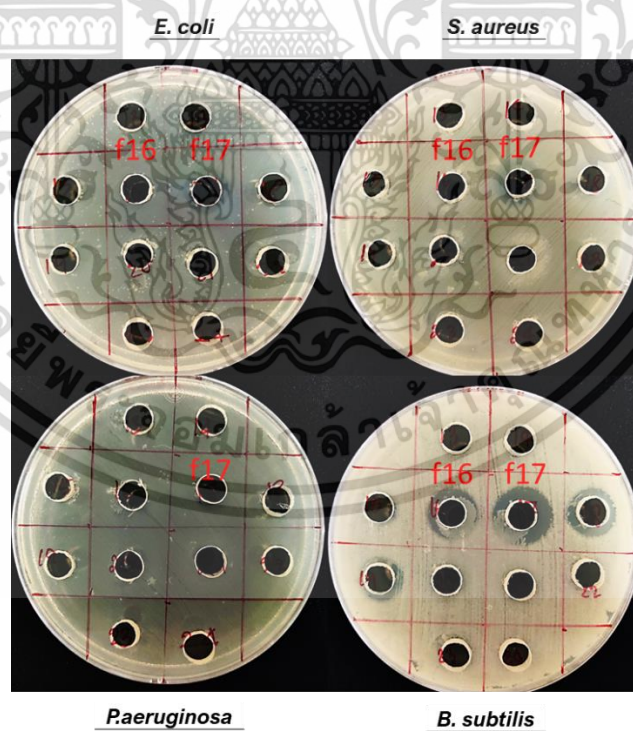


รูปที่ ค-5 การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. cu2551 ในถังหมักขนาด 10L ที่สภาวะเป่าอากาศ ในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 3,000 – 3,500 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-6 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อย่อยโปรตีนจากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ด้วย เอนไซม์เปปซิน ที่ pH 1.5 (ปรับด้วย 1N HCl) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทุกเลนโพลด์โปรตีนใน ปริมาณเท่ากัน



รูปที่ ค-7 ผลการทดสอบ Agar well diffusion assay ของแต่ละแพลตฟอร์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หน้าว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายโยธาวุธ โตนวุธ
วัน เดือน ปีเกิด	11 เมษายน 2541
ประวัติการศึกษา	(2563) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 3.83 (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง สัญญาเลขที่ KREF016329
ผลงานทางวิชาการ	1. Tonawut, Y. and Maneeruttanarungroj C. 2022. "Protein Extraction from Green Alga Strain CUJR06." 143-147. In The 6th International Conference on Food and Applied Bioscience. 2. Tonawut, Y. and Maneeruttanarungroj, C. 2022. "Optimization of Bovine Serum Albumin (BSA) Digestion by Bromelain." 148- 154. In The 6th International Conference on Food and Applied Bioscience.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้