การศึกษาการย่อยโปรตีนของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และโปรตีนในอาหารกุ้ง ด้วยเอนไซม์โปรติเอสทนร้อน

Digestion of *Vibrio parahaemolyticus* proteins and formulation of shrimp feed By thermostable protease enzyme

จิราพร อ่อนศรีทอง (Jiraporn Oonsrithong)* ดร.นุจริน จงรุจา (Dr. Nujarin Jongruja)**

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus*เป็นสาเหตุของการเกิดโรคกุ้งตายด่วนในกุ้งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ทำให้กุ้งตายได้โดยมีอัตราการตายถึง 90 เปอร์เซ็นต์ภายใน 30 วัน ปัจจุบันผู้เลี้ยงกุ้งเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งโรค แต่อาจส่งผลกระทบต่อไปยังผู้บริโภคได้ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้เอนไซม์โปรติเอสทนร้อนในการย่อยโปรตีนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ โปรตีนอาหารกุ้ง จากการทดลองเมื่อนำโปรติเอสทนร้อนมาทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนหายไปเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF พบว่าเป็นโปรตีน OmpU จาก *Vibrio* sp. และการทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนอาหารกุ้งที่อยู่ในรูปกรดอะมิโนด้วยเทคนิคนินไฮดริน พบว่าการใส่โปรติเอสทนร้อนที่ผสมลงไปในอาหารกุ้งทำให้โปรตีนอาหารกุ้งถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับอาหารกุ้งที่ไม่มีโปรติเอสทนร้อน

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus causes an acute mortal disease in shrimp or early mortality syndrome (EMS). It affects the growth of shrimp and causes the shrimp to die, with a mortality rate of 90% within 30 days. Shrimp farmers usually use antibiotics to inhibit the disease which may negatively affect consumers. This research aims to use thermostable protease enzyme to digest proteins from *V. parahaemolyticus* and from shrimp feed. From the experiment, when we used *V. parahaemolyticus* protein digested by thermostable protease and test the ability of protein degradation by SDS-PAGE. The digested protein bands were analyzed by MALDI-TOF. The OmpU protein was identified. When the shrimp feed was treated by thermostable protease, free amino acid and soluble peptides were detected. Suggesting that protein in the shrimp feed was hydrolyzed by the protease.

คำสำคัญ: โปรติเอสทนร้อน วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส อาหารกุ้ง

Keywords: Thermostable protease, *Vibrio parahaemolyticus*, Shrimp feed

**นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี*

***อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี*

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งถือเป็นอุตสาหกรรมที่มีขนาดใหญ่โดยหนึ่งในนั้นคือประเทศไทย ที่ถือว่าเป็นประเทศที่มีการส่งออกกุ้งที่สูงเป็นอันดับต้นๆของเอเชีย ที่มีการส่งออกกุ้งไปยังประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นจำนวนมาก และหลากชนิดไม่ว่าจะเป็นกุ้งสด กุ้งแช่แข็ง หรือ กุ้งแปรรูป ซึ่งมีมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ด้วยกันซึ่งมีมูลค่ารวมถึง 75 ล้านบาท ซึ่งถือว่ามีมูลค่าที่สูงมากเมื่อเทียบกับตลาดคู่แข่ง (กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, 2560)

แต่ในปี 2556 อัตราการส่งออกกุ้งไทยกลับลดลงมาจากหลายสาเหตุ แต่สาเหตุที่สำคัญคือการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรีย โดยในปี 2556 คณะนักวิจัยจาก University of Arizona สามารถระบุถึงเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคที่สร้างความเสียหายแก่ฟาร์มกุ้งมากมายในเอเชีย คือ *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการลดลงของจำนวนกุ้ง ถ้าหากทำการยับยั้งหรือกำจัดความรุนแรงนี้ได้จะช่วยลดอัตราความเสียหายจากการตายของกุ้งจากเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* โดยที่ลักษณะอาการของโรค คือ เนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อนมีความผิดปกติ โดยเริ่มจากเซลล์เยื่อบุ (epithelial cell) ของตับและตับอ่อนถูกทำลายอย่างรุนแรงคล้ายกับถูกสารพิษ ตับอ่อนมีการสะสมไขมันลดต่ำลง ประสิทธิภาพลดลงด้วย จนในระยะท้ายของโรคมีการติดเชื้อซ้ำ (secondary infection) อย่างรุนแรงซึ่งเกิดขึ้นโดยการฉวยโอกาสของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และในที่สุดกุ้งที่ติดเชื้อจะตาย เป็นผลมาจากการที่ตับและตับอ่อนล้มเหลวซึ่งโรคนี้ส่งผลกระทบให้กุ้งมีอัตราการตาย 90 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลาเพียง 30 วัน (FAO, 2013)

ในหลายปีที่ผ่านมากลุ่มเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งบางรายเลือกที่จะใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการลดปัญหาดังที่กล่าวมาในข้างต้นเพื่อหวังให้กุ้งแข็งแรง โดยยาปฏิชีวนะเป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์เฉพาะกับแบคทีเรียไม่ออกฤทธิ์กับไวรัส ยาปฏิชีวนะที่มักใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งมีตัวอย่างดังนี้ Sarafloxacin, Sulfadimethoxine sodium และ Ormethoprim โดยที่ยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดก็จะมีระยะเวลาบังคับในการใช้งานที่แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของยาปฏิชีวนะ เช่น Sarafloxacin กำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 5 วัน (กรมประมง, 2550)

แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่มากเกินอาจส่งผลให้มีสารตกค้างที่อาจส่งต่อไปถึงผู้บริโภคกุ้งได้ เช่น หากใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาแบคทีเรียในกุ้ง หากแบคทีเรียมีการกลายพันธุ์จะทำให้แบคทีเรียมีการทนต่อยาปฏิชีวนะและจะปะปนอยู่ในเนื้อสัตว์เมื่อคนกินเนื้อสัตว์เข้าไปหากเกิดอาการป่วย เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะชนิดเดียวกันเข้าไปจะไม่มีผลกระทบต่อเชื้อที่ทนต่อยาปฏิชีวนะ หรือ เกิดการดื้อยานั่นเอง ทำให้มนุษย์ไม่หายจากการติดเชื้อ นั่นจึงเป็นข้อเสียของการใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินไปจนส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งของประเทศไทยไปยังประเทศต่างๆที่เป็นตลาดรับซื้อกุ้งหลักจากประเทศไทยได้ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยในปี 2560 องค์กรอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาหรือThe U.S. Food and Drug Administration's (FDA) ได้มีการตรวจพบการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในกุ้งที่มีการนำเข้าและพบว่ามาจากประเทศไทยทั้งหมด 5 รายการด้วยกันซึ่งถือว่าเป็นจำนวนที่สูงมากเมื่อเทียบกับปีที่ผ่านมาที่มีการตรวจพบการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะ (Shrimpalliance, 2017)

อาหารของกุ้งขาวจะมี 2 ประเภท คือ อาหารธรรมชาติ ซึ่งเป็นอาหารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในบ่อหรือสร้างขึ้นมาโดยจะประกอบไปด้วยจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก อีกประเภทคืออาหารเม็ด เป็นอาหารที่ผลิตขึ้นมาโดยผู้ประกอบการผลิตอาหารเม็ดเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยตรงโดยความต้องการสารอาหารของกุ้งขาวไวนาไมจะมีความต้องการปริมาณโปรตีนที่ 35-50 เปอร์เซ็นต์ (กรมประมง, 2558) และถึงแม้ว่าผู้ประกอบการผลิตอาหารเม็ดจะใส่โปรตีนลงไปในอาหารกุ้ง 30 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า กุ้งอาจไม่สามารถรับปริมาณโปรตีนที่ทางผู้ประกอบการใส่เติม

ลงไปได้จนหมด เนื่องจากโปรตีนที่ใส่ลงไปมีขนาดของโปรตีนที่ใหญ่หรืออยู่ในรูปแบบโพลีเปปไทด์ทำให้ยากต่อการนำไปใช้ได้ในครั้งเดียว ทำให้ปริมาณโปรตีนที่เติมลงไปอาจะเกิดการสูญเปล่าหากโปรตีนในอาหารกุ้งมีขนาดที่เล็กลงที่อยู่ในรูปของเปปไทด์สายสั้นหรือกรดอะมิโนอาจทำให้กุ้งได้รับโปรตีนได้ครบถ้วนตามเกณฑ์ที่เหมาะสม

อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับการใช้โปรตีนโปรติเอสเข้ามาใช้การย่อยโปรตีนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และนำมาใช้ในการปรับปรุงสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับกุ้งขาว งานวิจัยนี้จึงสนใจในการนำโปรติเอสมาใช้ในการย่อยโปรตีนจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* โปรติเอสที่ใช้ในการวิจัยมีคุณสมบัติคือ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบกับอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ายังมีกิจกรรมเอนไซม์สูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์, ทนความเค็มสูงถึง 2 โมลาร์ซึ่งมากกว่าระดับความเค็มของน้ำทะเลที่มีความเค็มที่ 0.51 โมลาร์ (Duangjai et al., in press)โดยผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าการใช้โปรติเอสทนร้อนจะสามารถลดความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่อกุ้งขาวลงได้

วัตถุประสงค์

- เพื่อย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *V. parahaemolyticus* ด้วยโปรติเอสทนร้อน
- เพื่อย่อยโปรตีนในอาหารกุ้งด้วยโปรติเอสทนร้อน
- เพื่อทำให้โปรตีนในอาหารกุ้งถูกย่อยออกมาเป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์สายสั้นที่ละลายน้ำได้มากขึ้น

วิธีการวิจัย

การ Transformation

นำ recombinant plasmid ของเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนจาก *Thermomonospora curvata* ที่ได้ทำการสกัดพลาสมิดไว้ด้วยชุด Kit (Presto™ Mini Plasmid Kit) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรใส่ลงใน competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปทำ Heat shock ที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที และนำไปแช่น้ำแข็ง 15 – 30 นาที หลังครบเวลาจะทำการคืน cell โดยการใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่ไม่ผสมยาปฏิชีวนะ 900 ไมโครลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm, 5 นาทีนำอาหารส่วนใสออก 900 ไมโครลิตร และทำการละลายตะกอนเซลล์ให้เข้ากัน นำไป spread plate ลงบน LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และ chloramphenicol บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มียีนของเอนไซม์โปรติเอสทนร้อน

การผลิตโปรติเอสในระบบเซลล์ *E. coli*

นำโคโลนีจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงใน flask อาหาร LB broth 50 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin และ chloramphenicol อย่างละ 0.01% (w/v) ของปริมาตรอาหาร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง, 200 rpm ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ และทำการถ่ายเชื้อไปสู่ Flask อาหาร LB broth 1,000 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะอย่างละ 0.01% (w/v) โดยถ่ายเชื้อลงไป 2% (v/v) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3 – 4 ชั่วโมง ให้ได้ค่า OD (optical density) อยู่ในช่วง 0.4 – 0.6 เมื่อได้ถึงค่าที่ต้องการทำการเติม 1 mM IPTG และบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บตะกอนโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนเซลล์ (pellet) และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การทำให้เซลล์แตก

นำ Pellet ที่เตรียมไว้มาละลายด้วย 100 mM Tris buffer pH 7 ด้วยปริมาตร 10 ml ต่อ Pellet ที่ได้จากการผลิตโปรติเอส 1,000 มิลลิลิตร เมื่อละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันนำไปแตกเซลล์ด้วย sonicator ในขณะแตกเซลล์ในน้ำแข็งตลอดเวลาและระวังไม่ให้ตัวอย่างร้อนจนเกินไป เมื่อเซลล์ที่ต้องการแตกเซลล์เรียบร้อย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที และทำเก็บส่วนใส (supernatant) ไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสทนร้อนด้วย Fast protein liquid chromatography

นำตัวอย่างที่ไม่มีตะกอนปนเปื้อนฉีดเข้าสู่เครื่อง FPLC โดยที่มีบัฟเฟอร์ที่ใช้อยู่ 2 ชนิดคือ 100 mM Tris pH 6 (Buffer A,+) และ 100 mM Tris pH 6 + 1M NaCl (Buffer B,+,-) ใช้ column ion exchange ที่เป็นการแยกโปรตีนตามความเป็นขั้วโดยจะต้องให้ทั้งระบบภายในเครื่องเป็น Buffer A เนื่องจากโปรติเอสมีขั้วเป็น (-)ทำให้ buffer A ที่มีขั้วเป็น (+) ผลักโปรตีนอื่นๆที่มีขั้วเป็น (+) ให้ออกไปและยึดโปรติเอสไว้ และเมื่อเปลี่ยนเป็น Buffer B ที่มีขั้ว (+,-) ทำให้โปรตีนที่ไม่ต้องการที่เป็นขั้ว (-) ถูกผลักออกไปและทำให้ขั้วบวกจาก Na ยึดขั้ว (-) ของโปรติเอสเอาไว้ให้ออกมาพร้อมกันที่ Buffer B 50 -70% และมีความบริสุทธิ์ จากนั้นนำไป concentrate ด้วย protein concentrator ขนาด 10,000 MWCO ที่ 5,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น

การเตรียม secreted proteins จากแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

เตรียม secreted proteins จากแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* โดยการเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ที่มีการเติม 3% NaCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ OD อยู่ในช่วง 0.4 – 0.6 เมื่อได้ค่าที่ต้องการให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่ 4องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเก็บส่วนใสมาทดลองต่อโดยการเติม ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 20-80 % จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส มาใส่ลงในถุง เยื่อเลือกผ่าน (dialysis bag) และแช่ใน PBS buffer ที่ 50 mM ใส่ Magnetic stirring bar เพื่อทำการกวน จะทำการเปลี่ยน PBS buffer ทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 6 รอบ เมื่อครบเก็บสารที่อยู่ในถุงเยื่อเลือกผ่านเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งโปรตีนของ *V. parahaemolyticus* โดยเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำเอนไซม์โปรติเอสทนร้อน และ secreted proteins ที่เตรียมไว้นำมาใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง โดยผสมตัวอย่างทั้งสองชนิดที่มีปริมาณโปรตีนที่เท่ากันที่ 400 ไมโครกรัม (100:100) โดยใช้ Tris buffer pH7 100 mM และน้ำกลั่นในการปรับปริมาตรให้เท่ากันและนำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบทำการเติม Loading dye 6X ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง 25 ไมโครลิตรนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปโหลดลงใน SDS-PAGE โดยโหลดปริมาตรช่องละ 25 ไมโครลิตรเมื่อเสร็จแล้วให้นำแผ่นเจลที่ได้มาย้อมสีด้วย coomassie brilliant blue stain และล้างด้วย destaining solution จากนั้นทำซ้ำโดยการลดปริมาณโปรติเอสลงเป็น 100:5, 100:10, 100:20 และ 100:40 แต่ปริมาณของ Secreted protein ยังคงเป็น 100% เมื่อได้แผ่นเจลที่มีแถบโปรตีนให้เลือกตัดแถบโปรตีนที่ไม่ถูกยับยั้งวิเคราะห์ว่าเป็นโปรตีนชนิดใดของ *Vibrio* spp. ด้วยเทคนิค Matrix assisted laser desorptiontime-of-flight-mass spectrometry (MALDITOF MS)

การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนอาหารกุ้งโดยเอนไซม์โปรติเอสทนร้อน

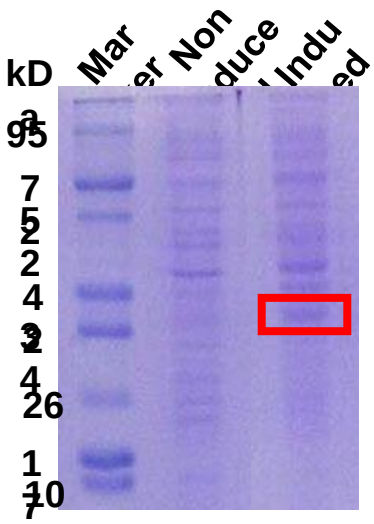
ชั่งอาหารกุ้งบดละเอียด 0.1 กรัมใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube เติมเอนไซม์โปรติเอสทนร้อน และปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตรด้วย 100 mM Tris buffer pH 7 โดยที่ชุดควบคุม เป็นเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนที่ผสมกับ 100 mM Tris pH 7 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน ทำเปรียบเทียบกับการใส่อาหารกุ้งบด 0.1 กรัมที่เติม 100 mM Tris pH 7 จากนั้น

เขย่าให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใส 50 ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยเทคนิคนินไฮดริน (The University of Sydney, n.d.) ส่วนหลอดตัวอย่างให้นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยที่จะเก็บตัวอย่างทุก 30 นาที จนครบ 4 ชั่วโมงโดยเก็บตัวอย่างจากหลอดตัวอย่างเพียงหลอดเดียวตลอดทั้งการทดลอง นำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยใช้ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เติมรีเอเจนต์นินไฮดริน 75 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตั้งไว้ให้เย็นลงและเติม 50% ethanol 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 570 nm

ผลการวิจัย

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนในระบบเซลล์ *E. coli*

ผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนโดยการเติม 1 mM IPTG เข้าไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดผลผลิตที่ต้องการ โดยที่การศึกษาก่อนหน้านี้ (การศึกษาร่วมกับนางสาวดวงใจ สิทธิพล) พบว่าที่ 3 ชั่วโมงในการเติม IPTG จะทำให้มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อน ออกมาได้ค่าที่ดีที่สุด (ภาพที่ 1) จึงได้มีการเติม 1 mM IPTG และใช้เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง และพบว่า เอนไซม์โปรติเอสทนร้อนที่ผลิตได้มีขนาดโปรตีนอยู่ที่ 37 kDa



ภาพที่ 1 SDS-PAGE แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อน ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

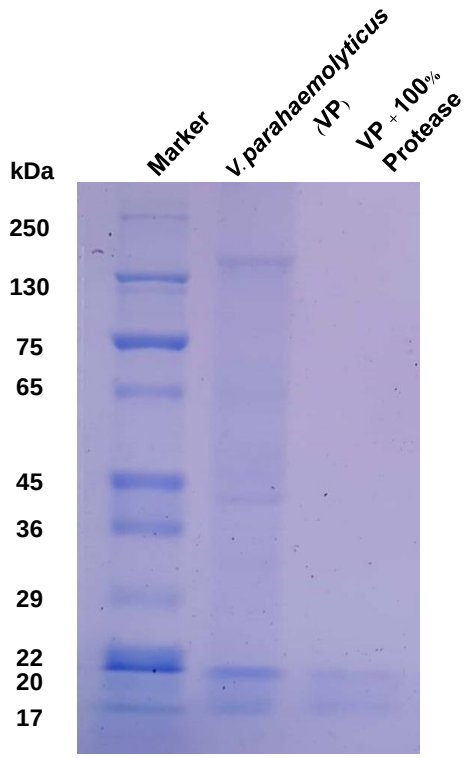
การทดสอบความสามารถในการยับยั้งโปรตีนของ *V. parahaemolyticus* โดยเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งโปรตีนของ *V. parahaemolyticus* โดยใช้ปริมาณโปรตีนที่เท่ากันคือ ปริมาณโปรตีนของ *V. parahaemolyticus* ที่ 400 ไมโครกรัม (100%) และ ปริมาณโปรตีนของโปรติเอสที่ 400 ไมโครกรัม (100%) เท่ากัน พบว่าแบนของโปรตีน *V. parahaemolyticus* ที่มีโปรติเอสผสมจะไม่เห็นแถบโปรตีนเมื่อเทียบกับแถวที่เป็น *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ได้มีการผสมโปรติเอสลงไป (ภาพที่ 2)

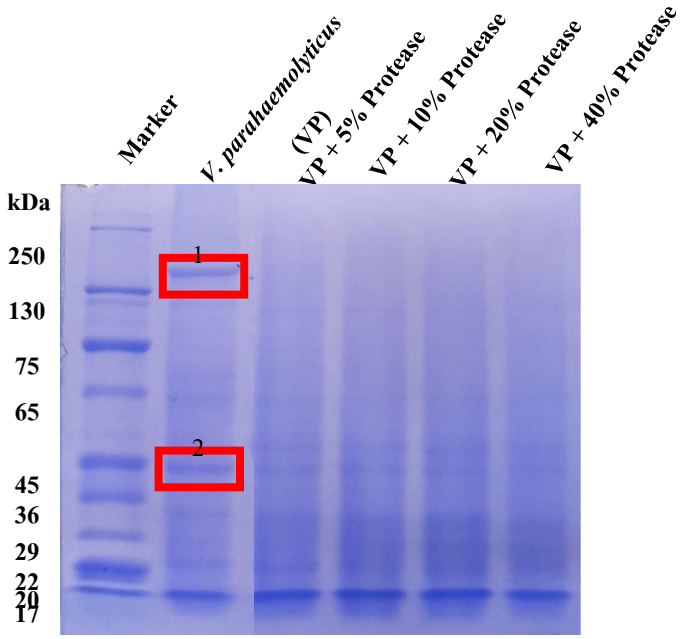
จากภาพที่ 3 และ 4 เป็นการทดสอบเช่นเดียวกันแต่มีการปรับปริมาณโปรติเอส ให้ลดลงเหลือเพียง100:5, 100:10, 100:20 และ 100:40 แต่ยังคงให้ปริมาณโปรตีนของเชื้อคงอยู่ที่ 100 เมื่อทดสอบก็พบว่าโปรติเอสยังสามารถที่จะยับยั้งโปรตีนของเชื้อได้แม้จะมีปริมาณโปรติเอสอยู่เพียง 100:5

ดังนั้นผู้วิจัยจึงลดปริมาณของเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนลงเหลือเพียง 100:0.1, 100:0.5, 100:1 และ 100:2.5 พบว่าเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนยังมีความสามารถที่จะยับยั้งโปรตีนของเชื้อได้แม้จะมีปริมาณโปรตีนเพียง 100:0.1

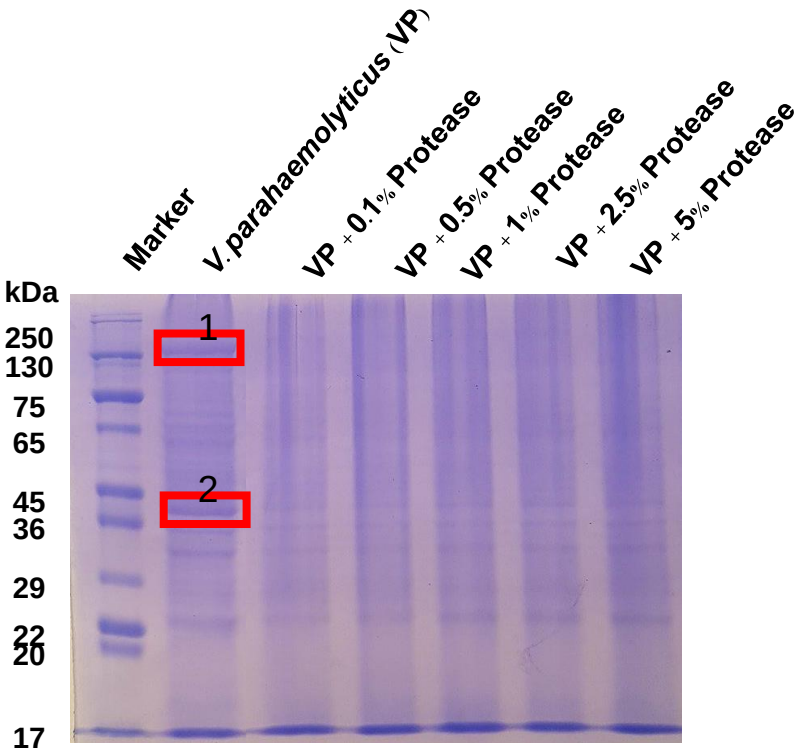
จากการวิเคราะห์แถบโปรตีนของ *V. parahaemolyticus* แต่จำนวน 2 แบน คือ แถบที่ 1 ขนาด 40 kDa และแถบที่ 2 ขนาด 170 kDa ด้วยวิธี MALDI TOF MS ซึ่งใช้หลักการของการทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนก่อนการวิเคราะห์โดยผสมสารตัวอย่างกับสารแมทริกซ์ (matrix) ที่จะทำให้ตัวอย่างมีประจุ ซึ่งจะทำให้ส่วนผสมระเหยกลายเป็นผลึกเมื่อสารแมทริกซ์ถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดพลังงานจากแสงเลเซอร์ส่งไปยังโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีประจุและแตกตัวเป็นไอออนทำให้โปรตีนหรือเปปไทด์สามารถเคลื่อนที่ได้และวิเคราะห์มวลสารด้วย mass analyzer ชนิด time-of-flight (TOF) ซึ่งโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีมวลน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีมวลมากจึงเดินทางไปยังตัวรับ (detector) ได้เร็วกว่าทำให้สามารถคำนวณระยะเวลาที่ตัวอย่างเคลื่อนที่และบอกขนาดมวลสารได้ และพบว่าผลการตรวจแถบโปรตีนทั้ง 2 แถบได้ผลการวิเคราะห์ว่าแถบโปรตีน หมายเลข 1 เป็น Unknown protein แต่ หมายเลข 2 เป็นแถบโปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยโปรติเอส ซึ่งผลการตรวจสอบพบว่าเป็นโปรตีน OmpU (Outer membrane protein) ที่ได้จาก *Vibrio* sp.



ภาพที่ 2 SDS-PAGE การย่อยโปรตีน *V. p arahaemolyticus* ของโปรติเอสทนร้อนที่ 100:100



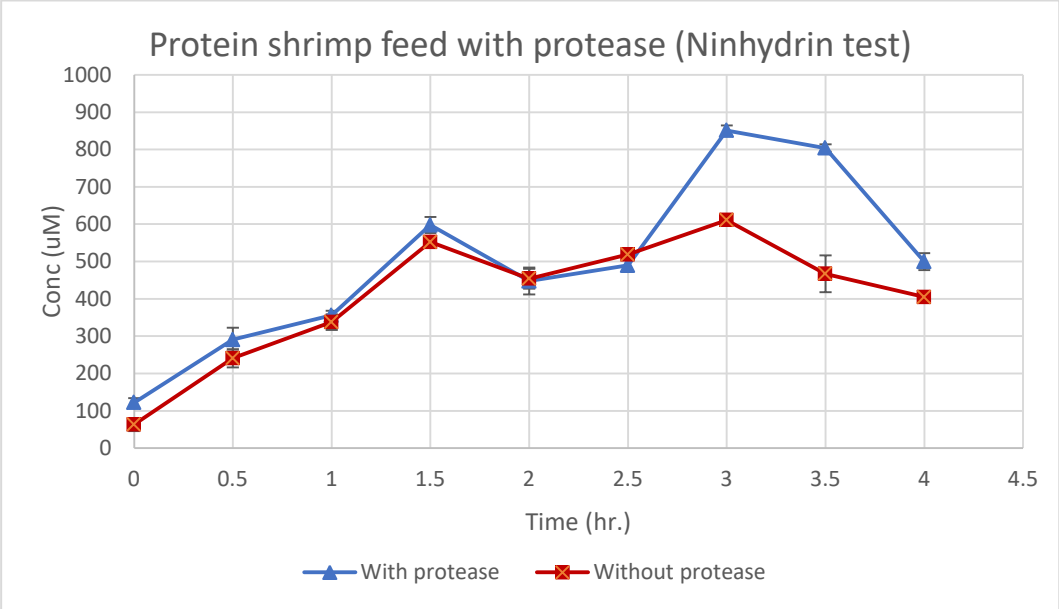
ภาพที่ 3 SDS-PAGE การย่อยโปรตีน *Vibrio parahaemolyticus* ของ โปรติเอส ที่ 100:5, 100:10, 100:20และ 100:40 ตามลำดับ



ภาพที่ 4 SDS-PAGE การย่อยโปรตีน *V. parahaemolyticus* ของโปรติเอสที่ 100:0.1, 100:0.5, 100:1, 100:2.5 และ 100:5 ตามลำดับ

Proteins matching the same set of peptides:
A0A061Q4B5 **Mass:** 35844 **Score:** 73 **Matches:** 2(0) **Sequences:** 2(0)
tr|A0A061Q4B5|JCM19052_4017 A0A061Q4B5_9VIBR Outer membrane protein OmpU n=1 Tax_Id=1460647 [Vibrio sp. JCM 19052]

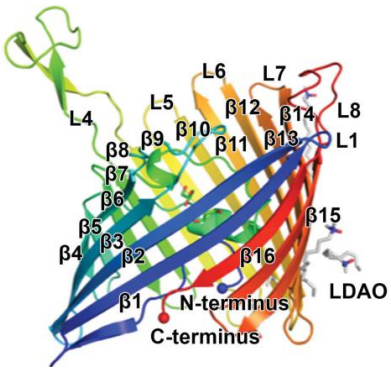
ภาพที่ 5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย MALDI TOF ของแบนหมายเลข 2 ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็น Outer membrane protein U (OmpU) ของ *Vibrio* sp. JCM 19052



ภาพที่ 6 ปริมาณกรดอะมิโนและเปปไทด์ที่ละลายน้ำได้ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการย่อยโปรตีนอาหารกุ้งด้วยโปรติเอสทนร้อนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคนินไฮดรินที่ 0 – 4 ชั่วโมง

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เอนไซม์โปรติเอสทนร้อนที่ได้จากดีเอ็นเอลูกผสม มีความสามารถในการย่อยโปรตีนเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยโปรตีนจากเชื้อที่ถูกย่อยด้วยโปรติเอสทนร้อน คือโปรตีน OmpU (ภาพที่ 7) (Huanyu Li et al., 2017) ซึ่งถ้าหากว่า OmpU ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตโดยกลุ่มของ *Vibrio* sp. ถูกย่อยได้ก็น่าจะมีผลกระทบต่อกุ้งคือกุ้งจะแข็งแรงหรือเกิดโรคได้ยากขึ้นเนื่องจาก OmpU จะมีหน้าที่ในการเป็นตัวคัดเลือกสารเข้าสู่เซลล์ของ *Vibrio* sp. ที่ช่วยในการป้องกันสารอันตรายที่จะเข้ามาภายในและยังเพิ่มความรุนแรงให้เชื้อ *Vibrio* sp. (Soni Priya Valeru et al., 2014) จากงานวิจัยนี้จึงเป็นส่วนหนึ่งที่บอกได้ว่าหากยับยั้งโปรตีน OmpU จากเชื้อ *Vibrio* sp. ได้จะทำให้กุ้งแข็งแรงและเสี่ยงต่อการติดโรคได้ยากขึ้นเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันไม่โดนทำลายด้วยความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio* sp.



ภาพที่ 7 โครงสร้างสามมิติของ Outer membrane protein U

เอนไซม์โปรติเอสทนร้อนสามารถย่อยโปรตีนของอาหารกุ้งให้มีขนาดเล็กลงให้อยู่ในรูปของกรดอะมิโนหรือเปปไทด์สายสั้นได้ดีกว่าอาหารกุ้งที่ไม่มีการเติมโปรติเอสทนร้อน โดยที่โปรติเอสทนร้อนยังคงกิจกรรมของเอนไซม์ได้ในสภาวะที่ใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งการที่โปรตีนในอาหารกุ้งโดนย่อยให้มีขนาดที่เล็กลงทำให้กุ้งสามารถที่จะนำกรดอะมิโนที่เล็กนี้ไปใช้ได้ดีและมากขึ้น ซึ่งการที่โปรตีนในอาหารกุ้งมีขนาดใหญ่ทำให้ยากต่อการที่กุ้งนำไปใช้และทำให้การเติมโปรตีนที่เยอะจนเกินไปในอาหารกุ้งอาจไม่คุ้มค่าแก่การเติม เนื่องจากกุ้งไม่สามารถนำไปใช้ได้หมดและโปรตีนที่หลงเหลืออยู่อาจเป็นผลกระทบที่ทำให้คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งมีค่าที่ไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.นุจริน จงรุจา อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษาแนะนำแนวทางการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดีตลอดมา ขอขอบพระคุณ บริษัท โภคา ฟีด จำกัด อย่างสูง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสนับสนุนทุนการศึกษาของงานวิจัยและวัตถุดิบอาหารกุ้งในการทำวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. การจัดการความรู้ การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ตามมาตรฐาน จีเอพี [ออนไลน์] 2558 [อ้างเมื่อ 15 พฤษภาคม 2560]. จาก https://www.fisheries.go.th/train-gr/coastal/002/GuidelineFGAP.pdf

กรมประมง. ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial agents) [ออนไลน์] 2550 [อ้างเมื่อ 17 สิงหาคม 2561]. จาก http://www.fisheries.go.th/quality/ยาต้านจุลชีพ.pdf

กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. กุ้งสด แช่เย็น แช่แข็ง และแปรรูป (ไม่รวมกุ้งกระป๋อง) [ออนไลน์] 2560 [อ้างเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2560]. จาก http://www.ditp.go.th/contents_attach/166006/166006.pdf

Duangjai et al. Cloning, expression, purification and characterization of a thermo- and surfactant-stable 1 protease from *Thermomonospora curvata*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology; 2019. [in press]

FAO. 2013. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, on 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome. 54 pp.

Shrimpalliance, 2017 Begins With A Large Number of Thai Shrimp Refusals for Banned Antibiotics [Online] 2017 [cited 2017 Nov 19] Available from: http://www.shrimpalliance.com/2017-begins-with-a-large-number-of-thai-shrimp-refusals-for- banned-antibiotics/

Soni Priya Valeru et al. Lack of Outer Membrane Protein A Enhances the Release of Outer Membrane Vesicles and Survival of *Vibrio cholera* and Suppresses Viability of *Acanthamoeba castellanii*. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology Volume 2014, 2014

The University of Sydney. Microplate measurement of amino acids by ninhydrin [online] n.d. [cited 2018 Aug 13]. Available from https://sydney.edu.au/science/biology/warren/docs/microplate_aminoacids_ninhydrin.pdf