

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

แผนงานวิจัยเรื่อง

ฤทธิ์ชีวภาพและการใช้ประโยชน์ของเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนด้านการต้าน
สารก่อมะเร็ง การปรับภูมิคุ้มกันและต้านแบคทีเรีย

โครงการวิจัยที่ 1

ผลของเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการ
เจริญเติบโตในกิ้งกูดดำ

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพันธ์ พงษ์สามารถ

นายคมศิลป์ พลแดง

กันยายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ
ความอนุเคราะห์และร่วมมือจากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อแผนงานวิจัย	ฤทธิ์ชีวภาพและการใช้ประโยชน์ของเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนด้านการต้านสารก่อมะเร็ง การปรับภูมิคุ้มกันและต้านแบคทีเรีย
ชื่อโครงการ	ผลของเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเจริญเติบโตในกุ้งกุลาดำ
ชื่อผู้วิจัย	สุนันท์ พงษ์สามารถ และคมศิลป์ พลแดง
เดือน-ปีที่วิจัยเสร็จ	30 กันยายน 2554

บทคัดย่อ

การให้กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กินสารโพลีแซคคาไรด์เจล (PG) ที่ให้ผสมกับอาหารกุ้งพบว่า มีศักยภาพไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันและต้านการเกิดโรคในกุ้ง PG สกัดจากเปลือกของผลทุเรียน (*Durio zibethinus*) เป็นสารเพคติกโพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันและต้านแบคทีเรียได้ PG ไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (*Vibrio harveyi* 1526) ในกุ้งกุลาดำ ทดสอบโดยวิธี agar diffusion และ broth microdilution พบการเกิดโซนใสของการยับยั้งเชื้อที่ความเข้มข้นของ PG 3.1 mg/ml มีค่า MIC และ MBC ที่ความเข้มข้นของ PG ที่ 6.3 และ 12.5 mg/ml ตามลำดับ การทดลองในกุ้งกุลาดำโดยใช้ลูกกุ้งขนาดน้ำหนักตัวเริ่มต้น 0.29 ± 0.04 g ให้กินอาหารที่มี PG ขนาด 1, 2 และ 3% ผสมในอาหารกุ้งและกลุ่มควบคุมให้อาหารกุ้งที่ไม่มี PG โดยเลี้ยงกุ้งนาน 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าอาหารกุ้งผสม PG ไม่มีผลต่อภาพรวมของการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่ามีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น โดยการวิเคราะห์ว่ามี การเพิ่มของเอนไซม์ Prophenoloxidase และเพิ่ม total hemocyte count สูงขึ้นในกุ้งที่ให้กินอาหารกุ้งผสม PG เป็นเวลา 12 สัปดาห์สูงกว่ากลุ่มควบคุม พบมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าในกุ้งที่ให้อาหารผสม PG ในการทำ Challenge test ฝั่งต่อไวรัส White Spot Syndrome Virus (WSSV) และแบคทีเรีย (*Vibrio harveyi* 1526) เทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่า relative percent survival (RPS) ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งผสม PG 2% มีค่าการต้านโรคที่ 100% และ 36% ต่อการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย ตามลำดับ พบว่าการตายต่ำกว่ามากจากการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกลุ่มที่ให้กินอาหารผสม PG เทียบกับกลุ่มควบคุม

Research Plan	Bioactivity and uses of polysaccharide gel from durian fruit-rinds as antimutagen, immunomodulator and antibacteria
Project Title	Effect of polysaccharide gel from durian fruit-rinds on immunostimulation and growth in black tiger shrimp
Name of the Investigators	Sunanta Pongsamart and Komsil Pholdang
Year	30 September, 2011

Abstract

Oral administration of polysaccharide gel (PG) in shrimp diets revealed immunostimulating potential and disease resistance in *Penaeus monodon* (black tiger shrimp). PG from the fruit-rind of *Durio zibethinus* has been characterized to be a pectic polysaccharide with immunomodulating and antibacterial activities. PG inhibited growth of the shrimp bacterial pathogen, *Vibrio harveyi* 1526, by agar diffusion and broth microdilution tests. Clear inhibition zones on agar plates were observed at the lowest PG concentration of 3.1 mg/ml, where minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values for PG were 6.3 and 12.5 mg/ml, respectively. Each group of juvenile shrimps, initial mean body weight 0.29 ± 0.04 g, was housed in a closed-recirculating treated water system and was fed with PG-supplemented diets containing 1,2 and 3% PG or shrimp basal diet in the control group for 8 and 12 weeks. PG-supplemented diets did not contribute to the overall growth of black tiger shrimp. The immune response was evaluated by analysis of prophenoloxidase activity and total hemocyte count in the shrimp fed PG-supplemented diets for 12 weeks. Prophenoloxidase activity in shrimp fed the 1, 2 and 3% PG-supplemented diet and total hemocyte count in shrimp fed the 1 and 2% PG-supplemented diet were higher ($P < 0.05$) than those of the control group. The percent survival was higher in groups fed the 1-3% PG-supplemented diets in challenge test with either white spot syndrome virus (WSSV) or the bacterium *V. harveyi* 1526 than that of the control group. Relative percent survival (RPS) values in group fed the 2% PG-supplemented diet showed the highest RPS value for disease resistance of 100% (at Day 6) and 36% (at Day 4) in treated shrimp against viral and bacterial infection, respectively. Mortality of PG-supplemented diets in treated shrimps against WSSV infection was also found to be much lower ($P < 0.05$) than that of the control group.

สารบัญ

หน้า

ชื่อเรื่องและชื่อผู้วิจัย.....	i
กิตติกรรมประกาศ.....	ii
บทคัดย่อภาษาไทย.....	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iv
สารบัญ.....	v
สารบัญตาราง.....	vii
สารบัญรูป.....	viii
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	1
วัสดุและวิธีการวิจัย.....	2
วัสดุ.....	2
สารเคมี.....	2
ตัวอย่างวิจัย.....	2
อุปกรณ์การวิจัย.....	2
วิธีการวิจัย.....	3
การเตรียมเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG) จากเปลือกทุเรียน.....	3
การแยกเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG).....	3
การเตรียมสารละลาย PG สำหรับการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial test).....	3
การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	4
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและเหลว.....	4
การเตรียมอาหารในการทดสอบ White spot syndrome virus (WSSV).....	4
การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์.....	4
แบคทีเรีย (Bacteria).....	4
ไวรัส White spot syndrome virus (WSSV).....	4
การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเจลโพลีแซคคาไรด์.....	5
Agar diffusion test.....	5
Broth microdilution test.....	5
การหาค่า MIC.....	5
การหาค่า MBC.....	5
การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้ง.....	5

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงกุ้ง.....	6
การเตรียมตัวอย่างและการทดลองเลี้ยงกุ้ง.....	6
การตรวจวัดค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte counts: THC).....	6
การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (Pro-phenoloxidase activity).....	6
การทดลองการให้ติดเชื้อ โดยวิธี Challenge test.....	7
การทดลองกับไวรัส WSSV ด้วยวิธี cohabitation method.....	7
การทดลองกับเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> 1526 โดยวิธี immersion method.....	7
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	8
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	9
ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของโพลีแซคคาไรด์เจลาจากเปลือกทุเรียน (PG).....	9
การทดสอบการต้านเชื้อ โดยวิธี Agar diffusion test.....	9
การทดสอบการต้านเชื้อ โดยวิธี Broth microdilution test.....	9
การหาค่า MIC และ MBC.....	9
Polysaccharide gel additive diet.....	12
ปริมาณสารประกอบในอาหาร.....	12
Growth performance.....	12
ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory effects).....	21
Challenge test.....	27
WSSV Challenge test by cohabitation method.....	27
<i>Vibrio harveyi</i> 1526 challenge test by immersion method.....	27
สรุปผลการทดลอง.....	32
เอกสารอ้างอิง.....	33

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> 1526 ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ จากเปลือกทุเรียน โดยวิธี agar diffusion.....	10
2. ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของ PG เปรียบเทียบกับ gentamicin sulfate ต่อเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> 1526.....	11
3. ปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงกุ้งที่ใช้ในการทดลองและอาหาร base diet เป็น control.....	14
4. สรุปผลของ PG ต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวกุ้งและความยาวตัวกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimps) หลังการเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งผสม PG เป็นเวลานาน 8 และ 12 สัปดาห์	22
5. สรุปผลของ PG ต่อ survival rate, FCR และ biomass ในกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimps) หลังการเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งผสม PG เป็นเวลานาน 8 และ 12 สัปดาห์	23
6. ผลของ PG ต่อภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งหลังกินอาหารผสม PG เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์	26
7. ค่า Relative percent survival (RPS) และ percent mortality ของกุ้งกุลาดำที่ทำให้ติดเชื้อ WSSV โดยวิธี cohabitation method มีค่า Cumulative mortality และ RPS.....	29
8. Relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำต่อเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> 1526 ด้วยวิธี immersion method โดยค่า Cumulative mortality และ RPS	31

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ขนาดเม็ดของอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากทุเรียน (PG) ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	13
2. น้ำหนักตัวของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนนาน 8 และ 12 สัปดาห์	15
3. ความยาวของลำตัวกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ .	16
4. อัตราการรอดชีวิต (survival rate) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ	17
5. ค่า Feed conversion ratio (FCR) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ	18
6. ค่า Biomass ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ	19
7. ขนาดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 (a) และ 12 (b) สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ	20
8. Total phenoloxidase activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน (PG)	24
9. Total hemocyte count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน (PG)	25
10. อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำที่ให้ติดเชื้อ WSSV โดยวิธี cohabitation method หลังจากที่ได้รับเลี้ยงด้วยอาหารที่มี PG ที่ความเข้มข้น 1-3% นาน 12 สัปดาห์	28
11. อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำต่อเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> 1526 ขนาด 1.47×10^6 CFU/ml ด้วยวิธี immersion method หลังเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG ที่ความเข้มข้น 1-3% นาน 12 สัปดาห์	30