บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัด crude fucoidan จากสาหร่ายทะเลและแพลงก์ตอน

การสกัดสาร crude fucoidan จากสาหร่ายต่างๆได้มีผู้ทดลองด้วยวิธีต่างๆกัน มีการทดลองสกัดสารกลุ่ม sulfate polysaccharide จากสาหร่ายสีน้ำตาล 3 ชนิดคือ *Dictyota mertensis, Padina gymnospora* และ *Sargassum vulgare* จำนวน 100 กรัม ด้วยเอนไซม์ Maxatase พบว่ามีน้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยเท่ากับ 20 กรัม (Dietrich *et al.*, 1995) เมื่อ Hoshino และคณะ (1998) ทำการสกัดจากสาหร่าย *Sargassum horneri* ปริมาณ 100 กรัม ด้วย 10 % Trichloroacetic acid มีน้ำหนักภายหลังการทำแห้งเท่ากับ 1.85 กรัมแต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้สาหร่ายแห้ง 100 กรัม สามารถให้น้ำหนักแห้งถึง 22.29±4.51 กรัมและมีปริมาณ fucoidan 2.7±1.18 g การสกัดโดยการใช้ 0.1 M HCl ไม่สามารถเปรียบเทียบปริมาณที่สกัดได้เมื่อเทียบกับวิธีที่กล่าวมาแล้วทั้งนี้เนื่องจากไม่มีรายงานปริมาณ fucoidan หากมีการรายงานเพียงน้ำหนักแห้งของสารสกัดเท่านั้น ในการทดลองครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายในการลดขั้นตอนต่างๆในการสกัดสารให้มากที่สุดเนื่องจากต้องการลดปริมาณสารเคมีที่เป็นพิษและเป็นการลดต้นทุนในกรณีที่ต้องการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์จริงในอนาคต ส่วนการสกัดสาร fucoidan จากแพลงก์ตอนพืชชนิด *I. galbana* พบว่าปริมาณของสารที่สกัดได้ยังมีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบปริมาตรของแพลงก์ตอนในน้ำเลี้ยง

4.2 การศึกษาคุณลักษณะของ fucoidan

4.2.1 การทำบริสุทธิ์ fucoidan

จาก crude fucoidan เมื่อนำมาผ่าน DEAE cellulose column จะเห็นได้ว่าสารจะถูกชะออกมาได้ 2 peak พบว่าทั้ง 2 peak จะประกอบไปด้วยน้ำตาล fucose ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสาร fucoidan มีปริมาณของน้ำตาลที่เป็นกลางจำนวนน้อยเมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสแล้วตรวจหาปริมาณของ uronic acid และมีคุณสมบัติในการย้อมติดสีของสาร fucoidan (metachromatic property) เพราะว่าสารกลุ่ม sulfate polysaccharide เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร 1,9 dimethylmethylene blue chloride จะเกิดการเชื่อมพันธะระหว่างซัลเฟตและ dimethylmethylene blue chloride ($C_{18}H_{22}N_3S.HCl$) เกิดเป็น sulfate polysaccharide-dimethylmethylene blue complex ให้สีน้ำเงิน-ม่วง (Farndale *et al.*,1986) fucoidanใน peak ที่ 1 (P1) และ peak ที่ 2 (P2) เท่ากับ 7.93 และ 71.03 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และจากการทดลองของ Fuiihara *et al.*, (1984) ทำบริสุทธิ์สารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล *Sargassum fulvellum* โดยการใช้ DEAE- cellulose column (DE-23) (Cl^- form) ขนาดของ column 1.9 x 43 cm ชะด้วย 0-0.4 M ของ NaCl พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ yield เท่ากับ 57.14 % ซึ่งใกล้เคียงกับการทำบริสุทธ์สารที่เป็น crude polysaccharide ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Laminaria brasiliensis* โดยการใช้ DEAE –cellulose column ขนาด 9x2 cm พบเปอร์เซ็นต์ yield เท่ากับ 50% (Pereira *et al.*, 1999) จะเห็นได้ว่าการทำบริสุทธิ์สาร fucoidan ในการทดลองครั้งนี้มีเปอร์เซ็นต์ได้คืนมา (yield) ที่สูงกว่า คือมีค่าเท่ากับ 78.96 % (ทั้งใน peak ที่ 1 และ 2) นอกจากนี้สารกลุ่ม sulfate polysaccharide สามารถทำบริสุทธิ์ได้โดยการใช้ gel permeation chromatography ชนิด Sepharose –2B หากแต่มีเปอร์เซ็นต์ได้คืนมา (yield) เท่ากับ 14.17% (Duarte *et al.*, 2001) ซึ่งน้อยกว่าการทำบริสุทธิ์โดย Ion exchange chromatography.

4.2.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ purified fucoidan โดยวิธี agarose gel electrophoresis

จากการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของสาร fucoidan ที่แยกได้จากการทำบริสุทธิ์โดยวิธี agarose gel electrophoresis ทั้งใน peak ที่ 1 และใน peak ที่ 2 พบว่าใน peakที่ 1 แยกได้ 2 แถบมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 22 kDa และ 101 kDa ส่วนใน peakที่ 2 แยกได้ 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 41 kDa ซึ่งต่างจากการทดลองของ Colliec และคณะ (1994) ที่ทำการสกัดสาร fucoidan จากสาหร่ายแห้งชนิด *Pelvetia canaliculata* นำส่วนของ partial purified fucoidan ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์โดยวิธี gel filtration chromatography มาศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารพบว่าสาร fucoidan ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 kDa สำหรับการทดลองของ Pereira และคณะ (1999) หลังจากการทำบริสุทธิ์สาร fucoidan จากสาหร่ายสีน้ำตาล 3 ชนิด คือ *Fucus vesiculosus, Laminaria brasiliensis* และ *Ascophyllum nodosum* โดยวิธี anion exchange chromatography และศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ใน 0.02 M sodium barbital (pH 8.6) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยประมาณ 30 kDa ซึ่งต่างจากการทดลองในครั้งนี้ที่มีขนาดของโมเลกุลเท่ากับ 41 kDa แสดงว่าสาร fucoidan ที่สกัดได้จากสาหร่าย *S. polycystum* มี 3 ขนาดด้วยกันซึ่งแตกต่างจากที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิดอื่นๆ วิธีการที่ใช้หาขนาดโมเลกุลในการทดลองครั้งนี้เป็นแบบคร่าวๆทั้งนี้ขนาดโมเลกุลที่ถูกต้องควรศึกษาโดยการศึกษาโครงสร้างโดยละเอียด

4.2.3 การหาองค์ประกอบของ fucoidan โดยวิธี HPLC และปริมาณของซัลเฟต (Test kit Spectroquant 14791 Sulfate, E. Merck, Darmstadt, Germany)

ผลการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในสาร fucoidan ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์โดยการใช้ Carbohydrate analysis column 4.6 mm ID x150 mm (ZORBAX) พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลจำนวน 3 ชนิดคือ มีปริมาณของน้ำตาล fucose และ xylose เท่ากับ 56.3%, ปริมาณของน้ำตาล mannose เท่ากับ 18.6% ปริมาณของน้ำตาล galactose เท่ากับ 17.5% และปริมาณของ sulfate เท่ากับ 7.7 % ซึ่งต่างจากการทดลองหาองค์-

ประกอบของสาร fucoidan ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum stenophyllum* ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์โดยวิธี GLC analysis HP-5890 (FID detector, อัตรา 1 มิลลิลิตร/นาที) พบว่าน้ำตาลที่แยกได้ประกอบด้วย fucose 36.2 %, xylose 9.10 %, mannose 16.48 %, galactose 15.58 % และ sulfate 18 % และ glucuronic acid 4.59 % (Duarte *et al*., 2001) ซึ่ง Doner and Whistler, (1973) กล่าวว่า องค์ประกอบของน้ำตาลชนิดต่างๆที่พบในสาร fucoidan คือน้ำตาล fucose มีประมาณ (31-72%), galactose (5-13%), mannose (4-20%), xylose (3-29%) และ arabinose (0-25%) ซึ่งผลจากการแยกองค์ประกอบในครั้งนี้ไม่พบน้ำตาล arabinose โดยอาจจะไม่มีอยู่ในองค์ประกอบตามข้อมูลข้างต้น นอกจากนั้นโดยวิธีนี้ไม่สามารถแยก fucose ออกจาก xylose ได้ซึ่งเป็นผลจากการที่น้ำตาล fucose และ xylose มีค่า Retention Time ใกล้เคียงกันมากคือ 3.140 และ 3.189 นาที ตามลำดับ ดังนั้นในผลการทดลองครั้งนี้จึงแสดงค่า fucose และ xylose รวมกัน

4.3 การทดสอบผลของ fucoidan ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*)

จากการทดสอบผลของ crude fucoidan ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำโดยศึกษาทั้งการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากการติดเชื้อ WSSV เมื่อมีการให้สาร fucoidan และศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำประกอบด้วยระบบprophenoloxidaseและ phagocytic activity ในส่วนของการศึกษาการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากการติดเชื้อ WSSV พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสาร fucoidan ส่งผลให้กุ้งกุลาดำมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงขึ้นทั้งในกุ้งอายุ 60 วัน (ที่ระดับของความเข้มข้นของ crude fucoidan 100, 200 และ 400 mg/kg ของน้ำหนักตัว/วัน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 4.4, 14 และ 46 ตามลำดับ) และกุ้งอายุ 90 วัน (ที่ระดับของความเข้มข้นของ crude fucoidan 100, และ 200 mg/kg ของน้ำหนักตัว/วัน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 42 และ 93 ตามลำดับ) เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของ fucoidan เป็นการเพิ่มปริมาณของหมู่ sulfate ซึ่งหมู่ sulfate มีผลต่อการยับยั้งไวรัสได้โดยตรง มีการศึกษาถึงผลของ fucoidan ที่สกัด

ได้จากสาหร่ายทะเล *Fucus vesiculosus* ต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ เช่น human immunodeficiency virus (HIV) ซึ่งทำให้เกิดโรคเอดส์ (Sugawara *et al.*, 1989) และ Galactan sulfateในการยับยั้งโรคเอดส์ (HIV-1) และกลไกการทำงานในการป้องกันเชื้อไวรัสของสารในกลุ่มนี้ พบว่าค่า fifty percent effective concentration (EC_{50}) ของ Galactan sulfate ต่อเชื้อ HIV-1 มีค่าเท่ากับ 0.6 ug/ml มีปริมาณของ sulfate ต่อน้ำหนักแห้งเท่ากับ 28 % และการที่สารกลุ่ม sulfate polysaccharide สามารถป้องกันไวรัสได้เกิดจากประจุลบของ sulfate group จะไปจับกับ amino acid site chain บริเวณ V3 loop ของ gp 120 ที่มีประจุเป็นบวกทำให้ไวรัสไม่สามารถเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) จึงไม่สามารถก่อโรคได้ (Witvrouw and Clercq, 1997) และการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ fucoidan ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Cladosiphon okamuranus* ต่อการควบคุมโรคจุดแดงดวงขาวใน Kuruma Shrimp (*Penaeus japonicus*)ในประเทศญี่ปุ่น พบว่าสารสกัดที่ได้มีคุณสมบัติในการป้องกันการติดเชื้อจากไวรัสชนิดนี้ได้แต่รายงานดังกล่าวไม่ได้ศึกษาองค์ประกอบและโครงสร้างของสารที่สกัดจึงไม่สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ sulfate และความสามารถในการป้องกันโรคจุดแดง-ดวงขาวในกุ้ง Kuruma Shrimpได้และกลไกในการป้องกันโรคในสัตว์น้ำของสารกลุ่มนี้ก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Takahashi *et al.*, 1998) และมีรายงานไม่มากนัก

Bouhedja และคณะ (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างหมู่ซัลเฟตและคุณสมบัติทางชีวภาพของสาร fucoidan ต่อความสามารถในการป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) และป้องกันการขยายตัวของเซลล์ (antiproliferative) พบว่าปริมาณของซัลเฟตมีผลโดยตรงต่อความสามารถดังกล่าวโดยคุณสมบัติในการป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) และป้องกันการขยายตัวของเซลล์ (antiproliferative) จะลดลงเมื่อปริมาณของซัลเฟตในองค์ประกอบของสารกลุ่มนี้มีค่าต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำกุ้งที่เลี้ยงในระดับความเข้มข้นของสาร fucoidan ที่ให้เปอร์เซ็นต์การรอดสูงสุด (กุ้งอายุ 90 วัน ที่ระดับความเข้มข้นของ crude fucoidan 200 mg/kg ของน้ำหนักตัว/วัน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์) มาศึกษาระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วย ระบบ prophenoloxidase และ phagocytic activity จะพบว่าสาร fucoidan

สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่มีการติดเชื้อได้โดยสามารถกระตุ้นเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (% phagocytosis) ในกุ้งกลุ่มที่ให้ fucoidan เนื่องจากสัตว์จำพวก crustacean รวมทั้งกุ้งกุลาดำในอายุที่แตกต่างกันจะมีการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันโดยระบบ phagocytic activity จะพบและแสดงออกได้ในกุ้งทุกวัยและเป็นระบบแรกที่ทำงานได้ทันทีที่มีเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ในการทดลองครั้งนี้จึงพบการเปลี่ยนแปลงของค่า phagocytic activityในกุ้งได้ชัดเจนกว่าการกระตุ้นระบบ prophenoloxidase

ผลของสารกลุ่ม sulfate polysaccharide ต่อความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลบ่งชี้แน่ชัดมีเพียงการศึกษาสารเบต้ากลูแคนซึ่งเป็น polysaccharide ที่ประกอบด้วยน้ำตาล glucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะβ-1,3 และ β-1,6 linkages ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งเท่านั้น โดยจะมี β- glucan binding protein เกิดขึ้นภายหลังจากสาร β- glucan ทำปฏิกิริยาต่อบริเวณผิวของ hemocyte กระตุ้นให้เกิด opsonic factor ต่างๆ ที่จำเป็นต่อกระบวนการ phagocytosis และการทำงานของระบบ prophenoloxidase activating system (Robertsen *et al*., 1990)

4.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 3 ชนิด คือ *S. aureus*, *E. coli* และ *V. harveyi* โดยการใช้สาร crude fucoidan ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล *S. polycystum* และแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* โดยวิธี Agar plate diffusion method และ Minimum inhibition concentration method (MIC) พบว่าสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายทะเลและแพลงก์ตอนพืชมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ทั้ง 3 ชนิดแสดงว่าสาร crude fucoidan ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลและแพลงก์ตอนพืชน่าจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แบบ broad spectrum คือ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก (อโนชา อุทัยพัฒน์ และนงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์, 2541)

มีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายทะเลชนิดต่างๆ รวมทั้งสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 2 ชนิด คือ *Padina gymnospora* และ *Dictyota dichotoma* พบว่าสารสกัดที่ได้

จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus megatherium* และ *S. aureus* ได้ (Rao *et al.*, 1981) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลกลุ่ม *A. nodosum*, *Fucus serratus, F. spiralis, F. vesiculosus, Himanthalia elongata, Pelvetia canaliculata* และ *Sargassum muticum* ต่อการยับยั้ง marine bacteria จำนวน 35 สายพันธุ์ โดยวิธี agar plate diffusion method และ MIC พบว่าสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *S. muticum* สามารถยับยั้งการเจริญของ marine bacteria ได้ทั้งกลุ่มที่เป็น gram positive bacteria และ gram negative bacteria (Hellio *et al.*, 2001)

สำหรับกลไกที่สาร fucoidan ออกฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์นั้นยังไม่ทราบข้อมูลแน่ชัดแต่ยาต้านจุลชีพโดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ในทางใดทางหนึ่ง ประกอบด้วย การออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์, ออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน, ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน, ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก หรือ รบกวนการสังเคราะห์เมตาบอไลท์ที่จำเป็นในการดำรงชีพของจุลินทรีย์ (มาลิน จุลศิริ, 2540)