บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การสกัด fucoidan จากสาหร่ายทะเลและแพลงก์ตอน

3.1.1 การสกัด crude fucoidan จากสาหร่ายทะเลแห้ง

จากการสกัด crude fucoidan จากสาหร่ายทะเลแห้ง (รูปที่ 7) ปริมาณ 100 กรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ทำการกรองเก็บส่วนใสและสกัดใหม่อีก 2 ครั้ง หลังจากนั้นผ่านกระบวนการทำแห้ง สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาล (รูปที่ 8) ชั่งหาน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส โดยให้สัญลักษณ์การสกัดในครั้งที่ 1, 2 และ 3 แทนด้วยสัญลักษณ์ F1, F2 และ F3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) พบว่า การสกัดตัวอย่างที่ 1 มีค่า F1 เท่ากับ 8.92 กรัม, F2 มีค่าเท่ากับ 7.05 กรัม และ F3 มีค่าเท่ากับ 2.26 กรัม การสกัดตัวอย่างที่ 2 มีค่า F1 เท่ากับ 10.77 กรัม, F2 มีค่าเท่ากับ 7.89 กรัม และ F3 มีค่าเท่ากับ 2.46 กรัม การสกัดตัวอย่างที่ 3 มีค่า F1 เท่ากับ 11.96 กรัม, F2 มีค่าเท่ากับ 7.07 กรัม และ F3 มีค่าเท่ากับ 2.05 กรัม และการสกัดตัวอย่างที่ 4 มีค่า F1 เท่ากับ 13.28 กรัม, F2 มีค่าเท่ากับ 10.33 กรัม และ F3 มีค่าเท่ากับ 5.15 กรัม การสกัดสาหร่ายแห้งจำนวน 100 กรัมซ้ำ 3 ครั้งจะได้ crude fucoidan มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.29±4.51 กรัม/100 กรัม ในการสกัดครั้งที่ 1 ของทุกตัวอย่าง (F1) มีน้ำหนักแห้งมากที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.23±1.85 กรัม/100กรัม หลังจากการสกัดซ้ำหลายๆครั้งน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ (crude fucoidan) จะลดน้อยลงโดยมีค่าการสกัดในครั้งที่2 (F2) เท่ากับ 8.08± 1.55 กรัม/100กรัม และการสกัดในครั้งที่3 (F3) เท่ากับ 2.98±1.45 กรัม/100กรัม

ตารางที่ 4 ปริมาณ fucoidan ที่สกัดจากสาหร่ายแห้ง *S. polycystum* จำนวน 100 กรัม

Table 4 Crude fucoidan content extracted from brown algae *S. polycystum* (100 g)

Sample (100 g)	F1	F2	F3	Total weight (g)
1	8.92	7.05	2.26	18.23
2	10.77	7.89	2.46	21.12
3	11.96	7.07	2.05	21.08
4	13.28	10.33	5.15	28.76
Mean±SD	11.23±1.85	8.08±1.55	2.98±1.45	22.29±4.51

3.1.2 การสกัด crude fucoidan จากแพลงก์ตอน

แพลงก์ตอนชนิด *I. galbana* ที่เลี้ยงในอาหาร Sato and Serikawa เป็นระยะเวลา 3 วัน ปริมาตร 14 ลิตร หลังจากนั้นทำการกรองและอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.81 กรัม ก่อนนำมาสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M จำนวน 3 ครั้ง ได้น้ำหนักภายหลังการทำแห้งในการสกัดครั้งที่ 1 (F1), ครั้งที่2 (F2) และ ครั้งที่ 3 (F3) มีค่าเท่ากับ 1.27, 0.01 และ 0.01 กรัม ตามลำดับ ลักษณะของ crude fucoidan ที่สกัดได้จากแพลงก์ตอนชนิด *I. galbana* แสดงดังรูปที่ 9 ผลผลิตของ crude fucoidan จากแพลงก์ตอนแห้งจำนวน 100 กรัมมีค่าเท่ากับ 71.27 กรัม

รูปที่ 7 ลักษณะของสาหร่ายทะเลแห้ง (*S. polycystum*)

Figure 7 Dry seaweed (*S. polycystum*)

รูปที่ 8 สาร fucoidan ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *S. polycystum*

Figure 8 Crude fucoidan extracted from brown seaweed *S. polycystum*

รูปที่ 9 สาร fucoidan ที่สกัดได้จากแพลงก์ตอนพืช *I. galbana*

Figure 9 Crude fucoidan extracted from *I. galbana*

3.1.3 การหาความเข้มข้นของ fucose และ fucoidan จากสาหร่ายแห้ง *S. polycystum* และแพลงก์ตอนพืช *I. galbana*

สาร crude fucoidan ที่สกัดได้จากสาหร่ายแห้ง *S. polycystum* และแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* ปริมาณ 0.05 กรัม นำมาหาปริมาณของน้ำตาล fucose โดยการใช้กรดซัลฟูริกและน้ำ อัตราส่วน 6: 1 ตามวิธีการข้อที่ 2.3.1.3 นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล fucose (ภาคผนวก ข) แล้วคำนวณหาปริมาณของ fucoidan พบว่าปริมาณของ fucose และ fucoidan มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.6 ± 0.67 และ 2.7 ±1.18 กรัม /100 กรัมสาหร่ายแห้งในการสกัดตามลำดับ ในส่วนของแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* มีปริมาณของ fucose และ fucoidan เท่ากับ 6.6 และ 11.5 มิลลิกรัมต่อ 1.8 กรัมแพลงก์ตอนแห้งตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ปริมาณของ fucose และ fucoidan จากสาหร่าย *S. polycystum* และแพลงก์ตอน *I. galbana*

Table 5 Fucose and fucoidan content extracted from *S. polycystum* and phytoplankton *I. galbana*

sample	Tolal weight (g) (n=3)	Fucose (g) (n=3)	Fucoidan (g) (n=3)	%Fucoidan/dry weight extract(100g) (n=3)
Dry seaweed (100 g)	22.9±4.51	1.6±0.67	2.7±1.18	11.9±2.61
Dry phytoplankton (1.81 g)	1.3	0.006	0.011	0.9

3.2 คุณลักษณะของ fucoidanที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล

3.2.1 การทำบริสุทธิ์ crude fucoidan จากสาหร่าย *S. polycystum*

การทำบริสุทธิ์ใช้ส่วนที่เป็น crude fucoidan (จากข้อ 2.3.1.1) ที่สกัดได้จากสาหร่าย *S. polycystum* น้ำหนักแห้งปริมาณ 0.5 กรัมที่ประกอบด้วย fucoidan ปริมาณ 29 มิลลิกรัม แยกด้วย DEAE –cellulose column ทำการชะด้วยสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องอัตราการชะ 12 มิลลิลิตร /ชั่วโมง โดยเก็บสารละลายที่ชะ 3 มิลลิลิตรต่อ 1 หลอด จำนวน 80 หลอด แบ่งแต่ละหลอดไปทำการทดสอบหาปริมาณของน้ำตาล fucose (cysteine-sulfuric method) , uronic acid (carbazole reaction) และคุณสมบัติในการย้อมติดสีของ fucoidan (metachromatic property) สาร fucoidan ที่บริสุทธิ์ประกอบด้วยน้ำตาล fucose เป็นส่วนใหญ่และมีปริมาณของน้ำตาลที่เป็นกลาง (neutral sugar) เป็นจำนวนน้อยหรือไม่มีเมื่อตรวจสอบโดยการ hydrolized ด้วยกรดแล้ววัดหาปริมาณของ uronic acid โดยวิธี carbazole reaction, จะแสดงคุณสมบัติในการย้อมติดสีของ fucoidan (metachromasia) โดยสารกลุ่ม sulfate polysaccharide (fucoidan) 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) จากรูปที่ 10 สาร fucoidan จะไม่ถูกชะออกมาในช่วงแรกที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือต่ำๆแต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มสูงขึ้น สาร fucoidan จะถูกชะออกมาได้จนมีค่าสูงสุดแล้วจึงลดลง สาร fucoidan จะแยกและถูกชะออกมาในช่วงกว้าง 2 ช่วง คือ ในช่วงที่ 1 ลำดับของ fraction 7-14 (P1) และ ช่วงที่ 2 ลำดับของ fraction 15-30 (P2) เก็บ fractionที่ต้องการคือ peak ที่ 1 (P1) และ peak ที่ 2 (P2) กำจัดเกลือออกโดยการ dialysis และทำแห้งโดยกระบวนการ lyophilization จะได้ส่วนของ purified fucoidan มีน้ำหนักภายหลังการทำแห้งใน peak ที่ 1 และ peak ที่ 2 เท่ากับ 2.3 และ 20 มิลลิกรัม ตามลำดับ ปริมาณของ fucoidan ที่ได้จาก peak ที่1 และ 2 เท่ากับ 2.3 มิลลิกรัม และ 20.6

มิลลิกรัม ปริมาณสารที่ได้ภายหลังการแยกผ่านคอลัมน์คิดเป็น 78.96 เปอร์เซ็นต์จากสารเริ่มต้นมีความบริสุทธิ์ต่อน้ำหนักแห้งเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของ purified fucoidan โดยวิธี agarose gel electrophoresis

นำส่วนของ purified fucoidan (จากข้อ 2.3.2.1) ทั้งใน peak ที่ 1 และ peak ที่ 2 ปริมาณ 1 มิลลิกรัม มาผ่านการแยกด้วยสนามไฟฟ้าโดยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 1,3 diaminopropane/acetate และย้อมน้ำตาลโดยวิธี periodic acid leucofuschin (PAS) method (ตามวิธีการที่ 2.3.2.2) ผลการแยกในสนามไฟฟ้าพบว่าใน peak ที่ 1 เมื่อนำมาแยกในสนามไฟฟ้าจะปรากฏแถบจำนวน 2 แถบ (ใน laneที่ 4) ในขณะที่ peak ที่ 2 (laneที่ 5) จะปรากฏเพียงแถบเดียว (รูปที่11) โดยภายหลังการย้อมน้ำตาลจนเห็นแถบชัดเจนแล้วทำการวัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ของแถบที่เกิดขึ้น นำมาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าของ Rf และค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) ซึ่งประกอบด้วย Chondroitin sulfate A (lane 1, 15 kDa), Chondroitin sulfate C (lane 2, 60 kDa) และ Dextran sulfate (lane 3, 500 kDa) พบว่าใน peak ที่ 1 มีค่า Rf เท่ากับ 0.7 และ 0.48 ส่วนใน peak ที่ 2 มีค่า Rf เท่ากับ 0.61 เมื่อนำมาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลตามสมการจากกราฟมาตรฐานใน peak ที่ 1 มีค่าเท่ากับ 22 kDa และ 101 kDa ใน peak ที่ 2 มีค่าเท่ากับ 41 kDa ตามลำดับ

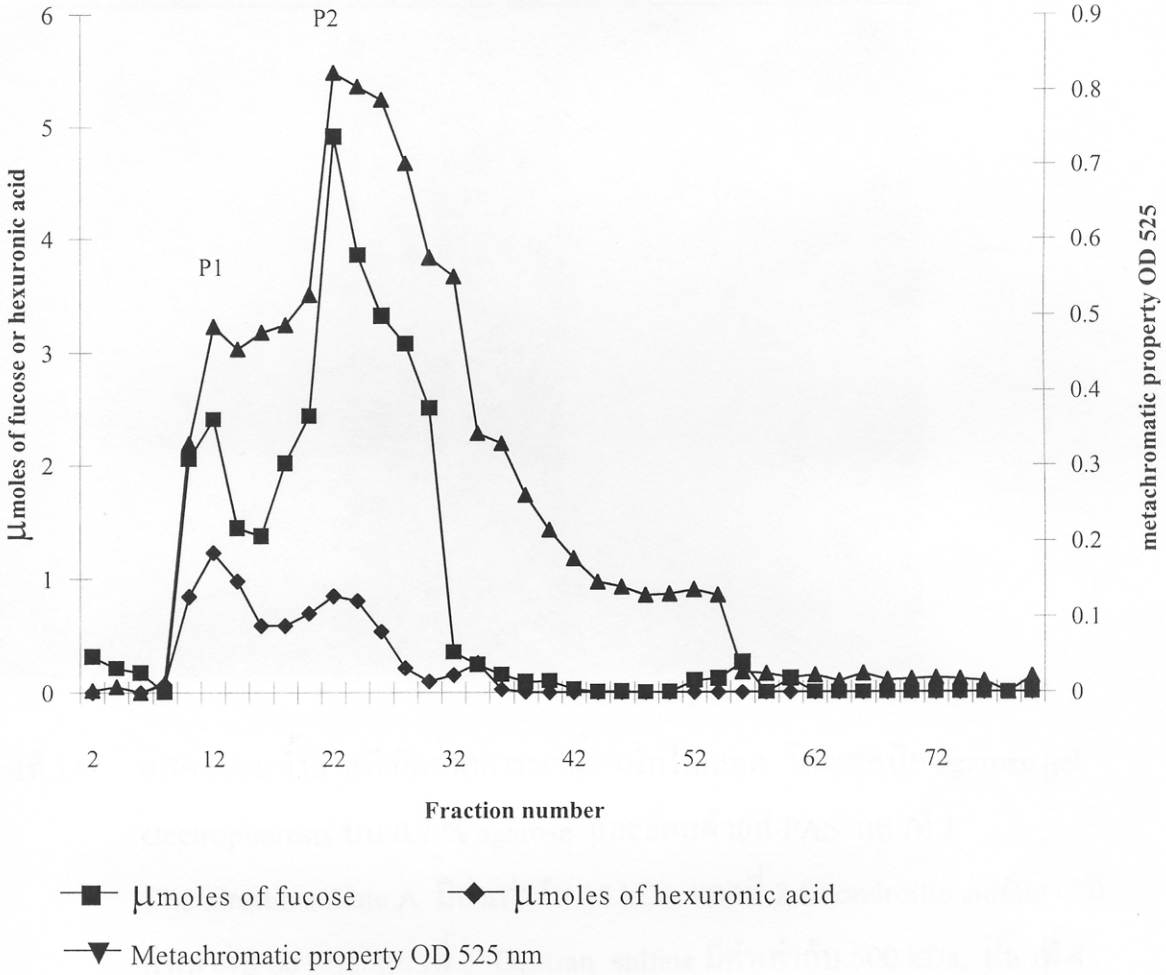
3.2.3 การหาองค์ประกอบของน้ำตาลใน fucoidan โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ส่วนของ fucoidan บริสุทธ์ (peakที่2) จากข้อ 2.3.2.1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัม และสารมาตรฐานน้ำตาล fucose, xylose, arabinose, mannose และ galactose ปริมาณ 5 มิลลิกรัม นำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ ZORBAX Carbohydrate analysis column 4.6 mm ID x150 mm (Agilent) ทำการชะด้วยส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 75 : 25 (v/v) ด้วยอัตราเร็ว 1.4 มิลลิลิตร/นาที เป็นระยะเวลา 10 นาที (ตามวิธีการข้อที่

2.3.2.3) พบว่าสารมาตรฐานน้ำตาลทั้ง 5 ชนิดคือ fucose, xylose, arabinose, mannose และ galactose ถูกแยกออกมาที่เวลา 3.140, 3.189, 3.612 , 4.246 และ 4.804 นาทีตามลำดับ (ภาคผนวก ข) สำหรับสารตัวอย่างเมื่อใช้เวลาในการแยกนาน 10 นาทีจะปรากฏ peak จำนวน 3 peak มีขนาดและความสูงแตกต่างกัน โดยใน peak ที่ 1 จะถูกแยกออกมาได้ที่เวลา 3.147 นาที, peak ที่ 2 จะถูกแยกออกมาได้ที่เวลา 4.241 นาที และ peak ที่ 3 จะถูกแยกออกมาได้ที่เวลา 4.810 นาที (รูปที่ 12) และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเวลาในการใช้แยกสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิดคือน้ำตาล fucose, xylose, arabinose, mannose และ galactose พบว่ามีน้ำตาลจำนวน 3 ชนิดที่มีระยะเวลาในการแยกที่ตรงกับสารมาตรฐาน คือ ใน peak ที่ 1 มีเวลาในการแยกตรงกับน้ำตาล fucose, ใน peak ที่ 2 มีเวลาในการแยกตรงกับน้ำตาล mannose และใน peak ที่ 3 มีเวลาในการแยกตรงกับน้ำตาล galactose เมื่อนำมาเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์พบว่ามีปริมาณของน้ำตาล fucose เท่ากับ 56.3%, ปริมาณของน้ำตาล mannose เท่ากับ 18.6% และปริมาณของน้ำตาล galactose เท่ากับ 17.5%

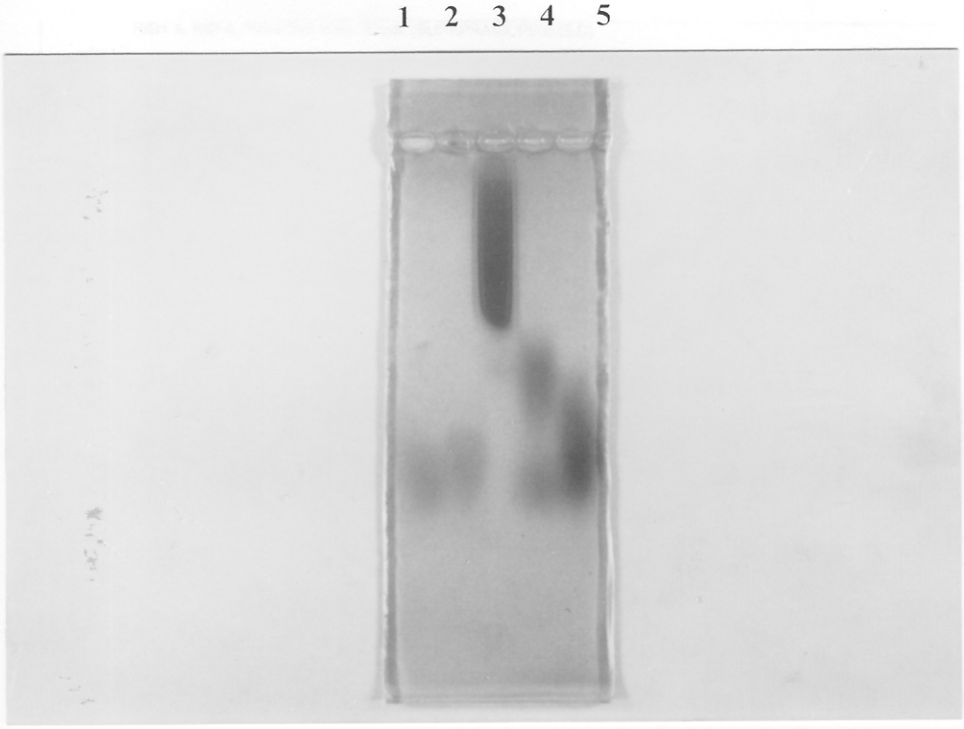
3.2.4 การหาปริมาณซัลเฟตใน fucoidan

จากการหาปริมาณซัลเฟตโดยการใช้สาร fucoidan ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์จากข้อ 2.3.2.1 ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำที่กำจัดอิออนปริมาตร 3 มิลลิลิตรแล้วนำมาหาปริมาณซัลเฟตโดยการใช้ Test kit Spectroquant 14791 Sulfate ที่ระดับความยาวคลื่น 515 nm ปรากฏว่ามีปริมาณของ sulfate (SO_4^{2-}) เท่ากับ 7.7 %



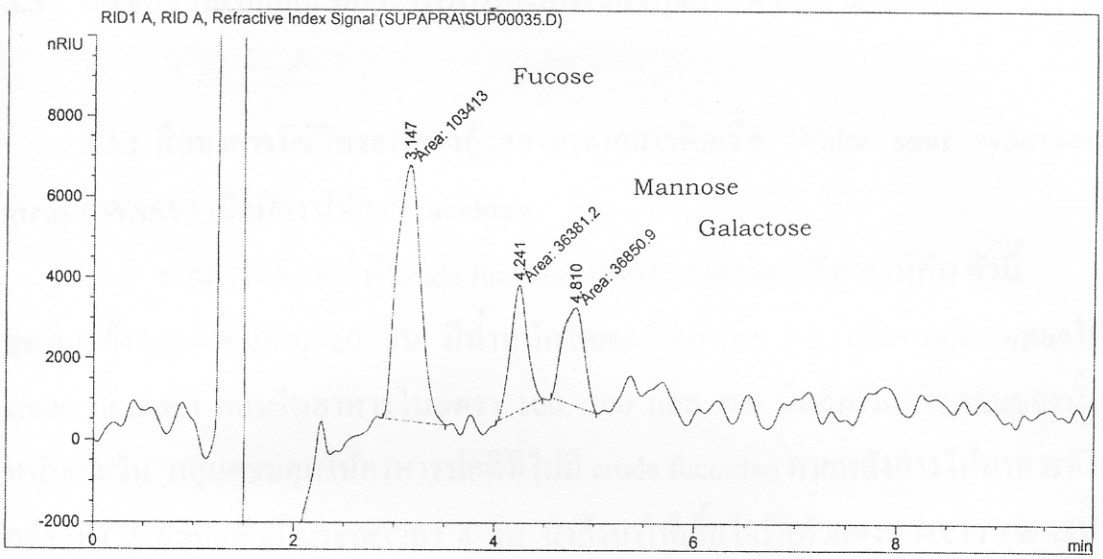
รูปที่ 10 การทำบริสุทธิ์สาร crude fucoidan จากสาหร่าย *S. polycystum* โดย DEAE cellulose column (ขนาด 9x2cm) และทดสอบหาปริมาณของน้ำตาล fucose (cysteine-sulfuric method), uronic acid และคุณสมบัติในการย้อมติดสีของ fucoidan (metachromatic property)

Figure 10 Purification of fucoidan from *S. polycystum* by DEAE cellulose column (column9x2cm). Fractions were analysed for fucose, uronic acid and metachromatic property.



รูปที่ 11 แสดงแถบน้ำตาลที่เกิดจากการหาน้ำหนักโมเลกุล โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis บน 0.7 % agarose และย้อมด้วยสี PAS แถวที่ 1 Chondroitin sulfate A มีค่าเท่ากับ 15 kDa, แถวที่ 2 Chondroitin sulfate C มีค่าเท่ากับ 60 kDa, แถวที่ 3 Dextran sulfate มีค่าเท่ากับ 500 kDa, แถวที่ 4 Peak ที่ 1 (P1) และแถวที่ 5 Peak ที่ 2 (P2)

Figure 11 Fucoidan was separated on 0.7 % agarose gel electrophoresis and stained with PAS, lane 1 Chondroitin sulfate A (15 kDa), lane 2 Chondroitin sulfate C (60 kDa), lane 3 Dextran sulfate (500 kDa), lane 4 peak 1 (P1) and lane 5 peak 2 (P2)



รูปที่ 12 ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสาร fucoidan โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ ZORBAX Carbohydrate analysis column 4.6 mm ID x150 mm (Agilent) ทำการชะด้วยส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ อัตราส่วน 75 : 25 (v/v) ด้วยอัตราเร็ว 1.4 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของ Refractive index detector (HP 1100 RID) และ column คงที่เท่ากับ 30 ^{o}C

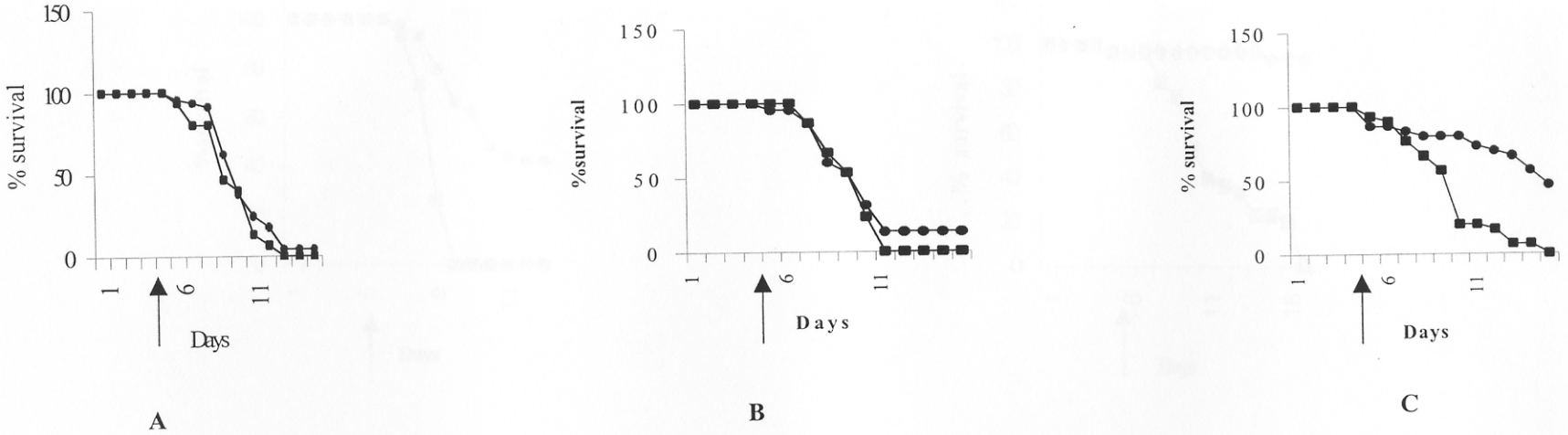
Figure12 Identification sugar components of fucoidan by ZORBAX Carbohydrate analysis column 4.6 mm ID x150 mm (Agilent). The operating condition was performed at 30 ^{o}C as follows ; mobile phase was 75 /25 acetonitrile/H_2O, flow rate was 1.4 ml/min and sugars were detected by refractive index detector (HP1100 RID)

3.3 ผลของ fucoidan ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*)

3.3.1 ศึกษาการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำจากการติดเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) เมื่อมีการให้สาร fucoidan

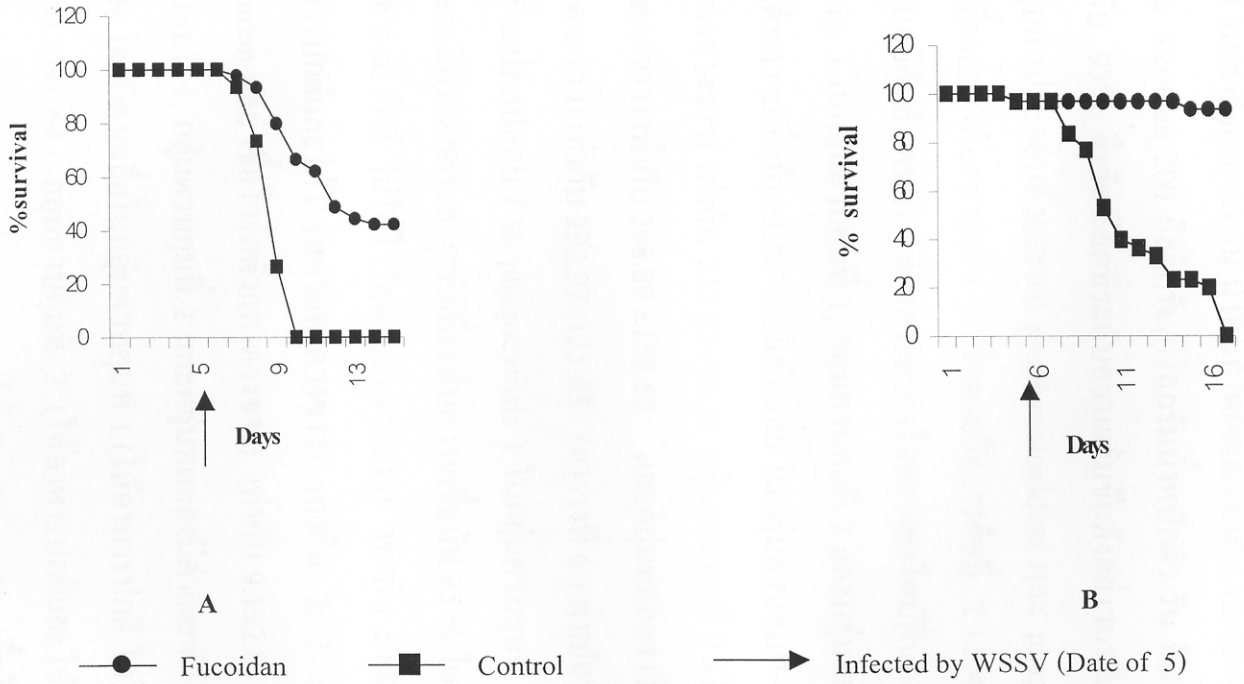
จากการทดลองให้ crude fucoidan แก่กุ้งกุลาดำโดยวิธีการให้กิน ดังนี้ ชุดที่ 1 กุ้งกุลาดำที่มีอายุ 60 วัน มีน้ำหนักโดยเฉลี่ยเท่ากับ 5-8 กรัม กลุ่มทดลองให้ crude fucoidan ผสมในอาหารในอัตรา 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว/วัน กลุ่มควบคุมให้อาหารปกติที่ไม่มี crude fucoidan ภายหลังการให้อาหารดังกล่าวทั้ง 2 กลุ่มแล้วเป็นระยะเวลา 4 วัน นำกุ้งมาให้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) โดยวิธีการแช่ในอัตราความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3-5 วัน (ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นอัตราส่วน 1: 2 ทำการแช่ในอัตรา 4 มิลลิลิตรต่อน้ำทะเล 1 ลิตร) เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงตามปกติและให้อาหารต่อไปอีกจนครบระยะเวลา 15 วัน ตรวจดูจำนวนกุ้งที่ตายและรอดชีวิตในแต่ละวันแล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดในแต่ละกลุ่มพบว่าในชุดที่ 1 ระดับความเข้มข้นของ crude fucoidan 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว/วัน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 4.4, 14 และ 46 ตามลำดับ (รูปที่13)

ชุดที่ 2 กุ้งกุลาดำที่มีอายุ 90 วัน มีน้ำหนักโดยเฉลี่ยเท่ากับ 12-15 กรัม กลุ่มทดลองให้ crude fucoidan ผสมในอาหารในอัตรา 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว/วัน กลุ่มควบคุมให้อาหารปกติที่ไม่มี crude fucoidan พบว่าที่ระดับของความเข้มข้นของ crude fucoidan 100, และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว/วันมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเท่ากับ 42 และ 93 ตามลำดับ (รูปที่ 14) ในส่วนของความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว/วันในกลุ่มที่ 2 ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากผลของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว/วันมีค่าสูงเป็นที่น่าพอใจแล้ว



รูปที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำเมื่อมีการติดเชื้อ WSSVในกลุ่มที่1 (น้ำหนักตัวเฉลี่ย 5-8 กรัม) ภายหลังจากได้รับอาหารผสม crude fucoidan ในอัตรา 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน A : fucoidan 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน B : fucoidan 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน C : fucoidan 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

Figure 13 Survival rate of shrimps weighting of 5-8 g. The shrimps were fed with crude fucoidan 100, 200 and 400 mg/kg bodyweight/day before and after the WSSV infection., A : fucoidan fed 100 mg/kg body weight/day B : fucoidan fed 200 mg/kg body weight/day C : fucoidan fed 400 mg/kg body weight/day.



รูปที่ 14 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำเมื่อมีการติดเชื้อ WSSV ในกลุ่มที่ 2 (น้ำหนักตัวเฉลี่ย 12-15 กรัม) ภายหลังจากได้รับอาหารผสม crude fucoidan ในอัตรา 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน A : fucoidan 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน B : fucoidan 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

Figure 14 Survival rate of shrimps weighting of 12-15 g. The shrimps were fed with crude fucoidan 100 and 200 mg/kg body weight/day before and after the WSSV infection., A : fucoidan fed 100 mg/kg body weight/day B : fucoidan fed 200 mg/kg body weight/day.

3.3.2 ผลการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

ภายหลังการเลี้ยงและศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำในการให้กิน crude fucoidan (ตามวิธีการข้อที่ 2.3.3.3) ในระดับต่างๆกันแล้ว จึงนำผลของ fucoidan ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงสุดมาศึกษาความสามารถของสาร fucoidan ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ จากผลการทดลองในข้อ 3.3.1 พบว่ากุ้งอายุ 90 วัน น้ำหนักโดยเฉลี่ยเท่ากับ 12-15 กรัม ที่ระดับความเข้มข้นของ crude fucoidan 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงสุดเท่ากับ 93% จึงคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมาเลี้ยงกุ้งซ้ำเพื่อนำมาศึกษาระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วยระบบ prophenoloxidase และ phagocytic activity โดยภายหลังการเลี้ยงและให้อาหารแล้ว 7 วันตามวิธีการข้อที่ 2.3.3.4 จึงทำการเจาะเลือดมาศึกษาระบบภูมิคุ้มกันพบว่า มีค่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ในกลุ่มควบคุมที่ 1, กลุ่มควบคุมที่ 2 และกลุ่มทดลองมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่าเฉลี่ย ในกลุ่มควบคุมที่ 1 (ให้อาหารปกติ ไม่ให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 213.53±90.18 กลุ่มควบคุมที่ 2 (ให้อาหารปกติและให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 268.89 ±158.59 และกลุ่มทดลอง (ให้ fucoidan และ เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 292.97±125.63 (ตารางที่ 6) ค่าเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (% phagocytosis) ในกลุ่มควบคุมที่ 1, กลุ่มควบคุมที่ 2 และกลุ่มทดลองมีค่าแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยมีค่าเฉลี่ยในกลุ่มควบคุมที่ 1 (ให้อาหารปกติ ไม่ให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 5.88±2.39 กลุ่มควบคุมที่ 2 (ให้อาหารปกติและให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 3.72 ±1.83 และกลุ่มทดลอง (ให้ fucoidan และ เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 9.1±2.0 ค่า Phagocytic index ในกลุ่มควบคุมที่ 1, กลุ่มควบคุมที่ 2 และกลุ่มทดลองมีค่าแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยมีค่าเฉลี่ยในกลุ่มควบคุมที่ 1 (ให้อาหารปกติ ไม่ให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 0.83±0.64 กลุ่มควบคุมที่ 2 (ให้อาหารปกติและให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 0.30±0.28 และกลุ่มทดลอง (ให้ fucoidan และ เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 2.36±1.28 ตามลำดับ ค่า ABPC ในกลุ่มควบคุมที่ 1, กลุ่มควบคุมที่ 2 และกลุ่มทดลองมีค่าแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยมีค่าเฉลี่ยในกลุ่มควบคุมที่ 1

(ให้อาหารปกติ ไม่ให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 1.98±0.41 กลุ่มควบคุมที่ 2 (ให้อาหารปกติและให้ไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 1.70 ±0.56 และกลุ่มทดลอง (ให้ fucoidan และ เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว) เท่ากับ 2.67±0.61

ตารางที่ 6 แสดงการศึกษาความว่องไวของฟาโกไซโทซิสและเอนไซม์ Phenoloxidase ของการทดลองในกุ้ง 90 วัน ขนาด 12-15 กรัม ซึ่งให้กิน crude fucoidan 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ก่อนการได้รับเชื้อ WSSV โดยการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุดที่ได้รับเชื้อ WSSV โดยไม่ให้ fucoidan และชุดควบคุมซึ่งไม่ให้เชื้อ WSSV และ fucoidan

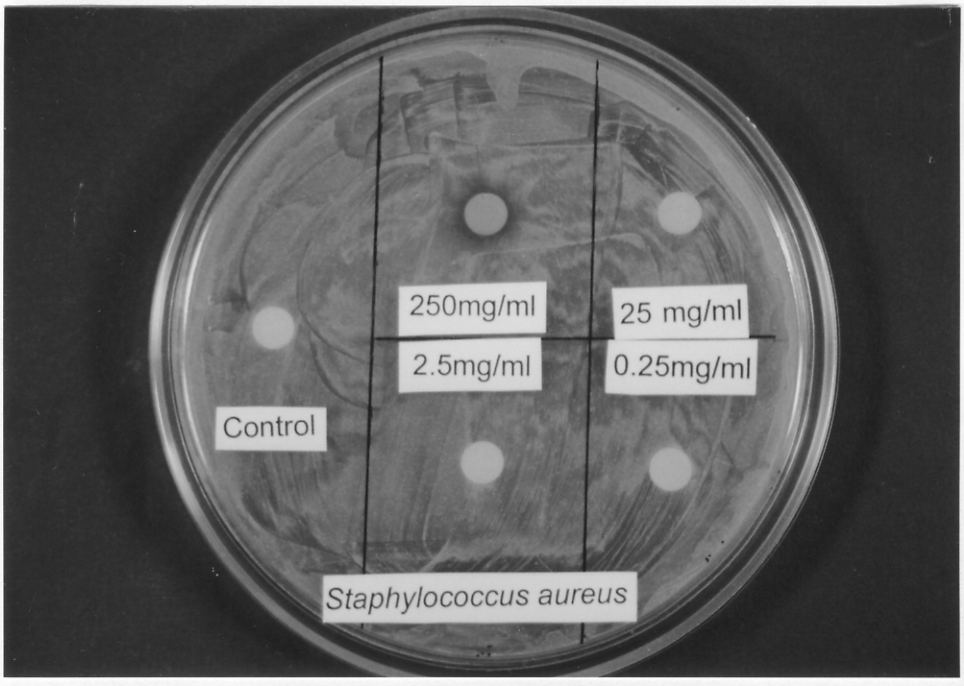
Table 6 Phagocytic activity and Phenoloxidase activity of the shrimps were fed with crude fucoidan 200 mg/kg bodyweight /day before challenging with WSSV. Shrimps without WSSV infection and shrimps infection by WSSV without fucoidan feeding were as the two control groups.

Immunity Indexes	Control group (without WSSV and fucoidan)	Control (challenge with WSSV)	Test group (fed fucoidan and challenge with WSSV)
Phagocytic activity (n=10)			
Phagocytic index	0.83±0.64	0.30±0.28	2.36± 1.28
% Phagocytosis	5.88± 2.39	3.72 ±1.83	9.1 ± 2.0
ABPC	1.98± 0.41	1.70± 0.56	2.67± 0.61
Phenoloxidase (n=10) (unit/min/mg protein)	213.53±90.18	268.89±158.59	292.97± 125.63

3.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 การศึกษาผลของ fucoidan ต่อความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี agar plate sensitivity method

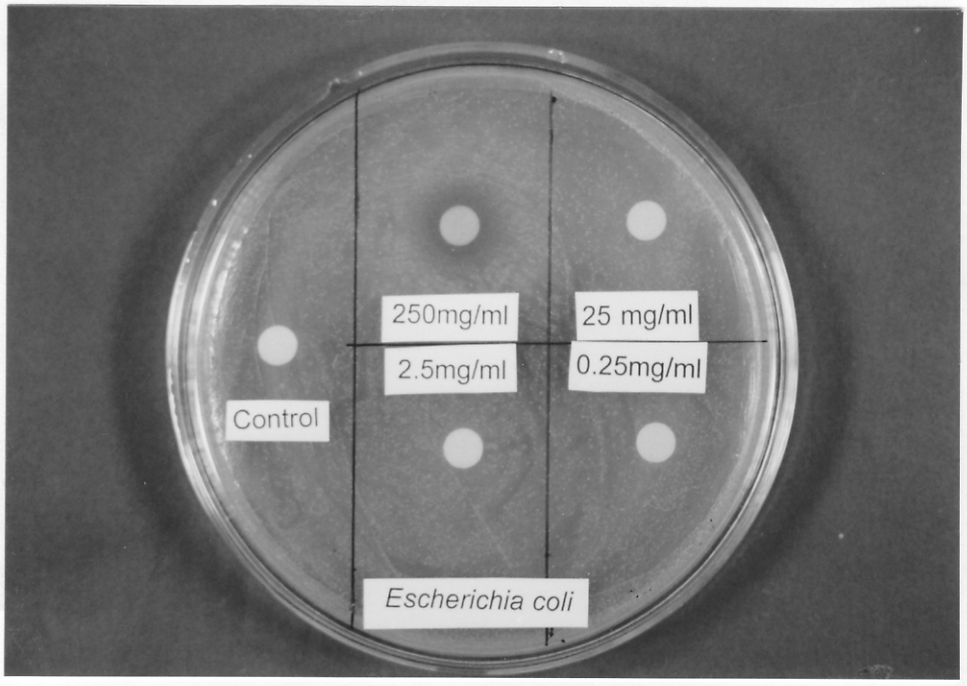
จากการศึกษาผลของ fucoidan ต่อความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *S. aureus*, *E. coli* และ *V. harveyi* (ตามวิธีการที่ 2.3.4.1) โดยการใช้ crude fucoidan ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล *S. polycystum* และ แพลงก์ตอนพืช *I. galbana* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน 4 ระดับความเข้มข้นคือ 250, 25, 2.5 และ 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่ามีเพียงระดับความเข้มข้นของ crude fucoidan 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง *S. aureus*, *E. coli* และ *V. harveyi* ได้โดยที่ระดับความเข้มข้นของ crude fucoidan 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีปริมาณของ fucoidanในสาหร่ายทะเลเท่ากับ 30.83 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และในแพลงก์ตอนพืชเท่ากับ 2.24 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่น disc (∅ 6 mm) จากสาหร่ายทะเล *S. polycystum* บนเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *V. harveyi* มีค่าเท่ากับ 12±0.70, 8±2.12 และ 13±1.41 ตามลำดับ (รูปที่ 15) ส่วนขนาดของวงใสรอบแผ่น disc จากแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* บนเชื้อ *S. aureus* และ *V. harveyi* มีค่าเท่ากับ 10.75±0.62, และ 12.5±0.62 ตามลำดับ ลักษณะของวงใสจากแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* บนเชื้อ *S. aureus* และ *V. harveyi* แสดงดังรูปที่16



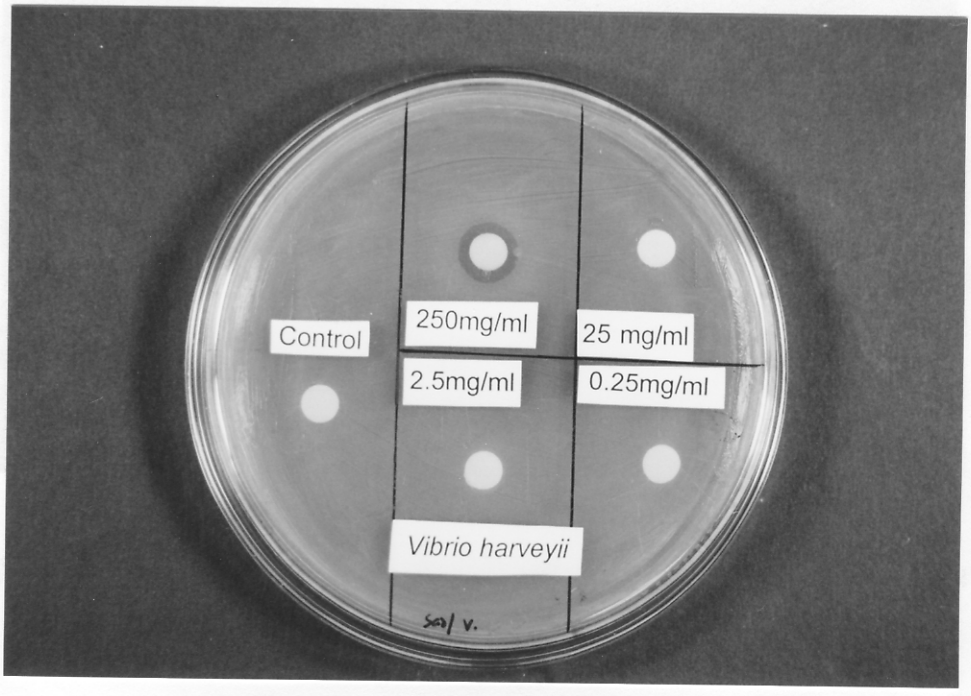
A

รูปที่ 15 แสดงวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจาก crude fucoidan ในสาหร่าย *S. polycystum* ความเข้มข้น 250 mg/ml ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (A), *E. coli* (B) และ *V. harveyi* (C)

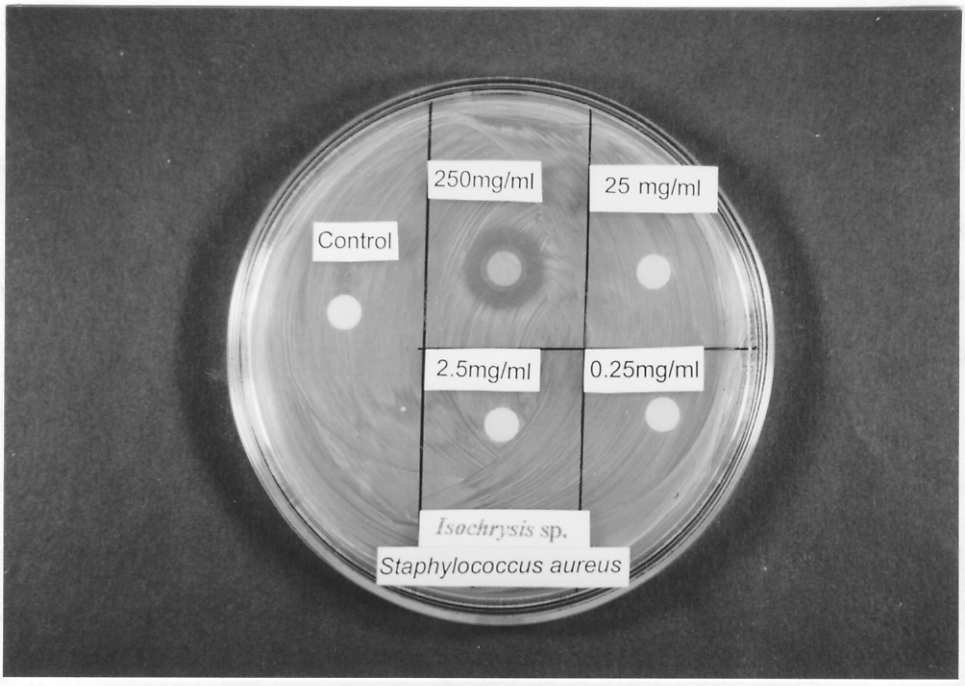
Figure 15 Clear zone inhibition of crude fucoidan from *S. polycystum*. Fucoidan at 250 mg/ml inhibited *S. aureus* (A), *E. coli* (B) and *V. harveyi* (C).


250mg/ml
25 mg/ml
2.5mg/ml
0.25mg/ml
Control
Escherichia coli

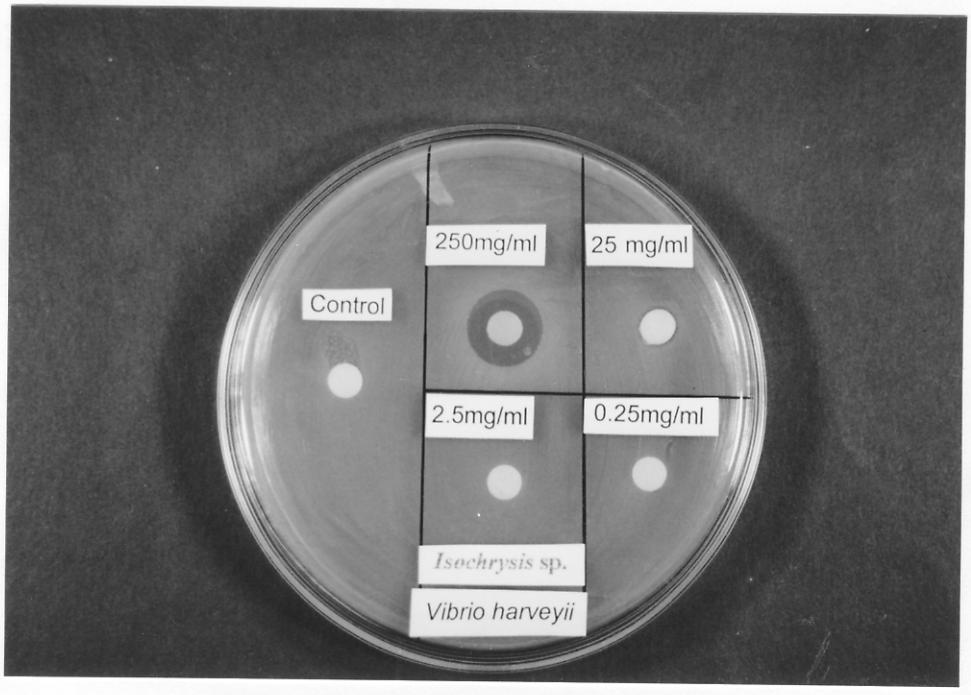
B


Control
250mg/ml
25 mg/ml
2.5mg/ml
0.25mg/ml
Vibrio harveyii

C



A



B

รูปที่ 16 แสดงวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจาก crude fucoidan ในแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* ความเข้มข้น 250 mg/ml ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (A), และ *V. harveyi* (B)

Figure 16 Clear zone inhibition of crude fucoidan from *I. galbana.* Fucoidan at 250 mg/ml inhibited *S. aureus* (A), and *V. harveyi* (B).

3.4.2 การหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) ของ *S. polycystum* และ *I. galbana* ต่อการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

การศึกษาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) ของ fucoidan จากสาหร่าย *S. polycystum* และแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* ต่อการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *S. aureus, E. coli* และ *V. harveyi* พบว่าค่า MIC ของสาร fucoidan จากสาหร่าย *S. polycystum* ในการต้านการเจริญของเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *V. harveyi* มีค่าเท่ากับ 1.9, 1.9 และ 1.0 mg/ml ตามลำดับ (ตัวอย่างภาพซึ่งหาค่า MIC ของ fucoidan ในสาหร่าย *S. polycystum* ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (A), *E. coli* (B) และ *V. harveyi* (C) แสดงดังรูปที่ 17) ส่วนในแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* มีค่าเท่ากับ 0.14, 0.07 และ 0.07 mg/ml ตามลำดับ (ตัวอย่างภาพซึ่งหาค่า MIC ของ fucoidan ในแพลงก์ตอนพืช *I. galbana* ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (A), *E. coli* (B) และ *V. harveyi* (C) แสดงดังรูปที่ 18)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (control)

A, B

รูปที่ 17 แสดง Minimum inhibition concentration (MIC) ของ crude fucoidan ใน สาหร่ายทะเล *S. polycystum* ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (A), *E. coli* (B) และ *V. harveyi* (C) โดยในหลอดที่ 1 มีความเข้มข้น 30.83 mg/ml และมีความเข้มข้นลดลง 1:2 ตามลำดับ จนถึงหลอดที่ 9 มีความเข้มข้น 0.01 mg/ml

Figure 17 Minimum inhibition concentration (MIC) of crude fucoidan from *S. polycystum* affected on *S. aureus* (A), *E. coli* (B) and *V. harveyi* (C), Tube 1 (concentration 30.83 mg/ml) ⟶ serial dilution to tube 9

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (control)

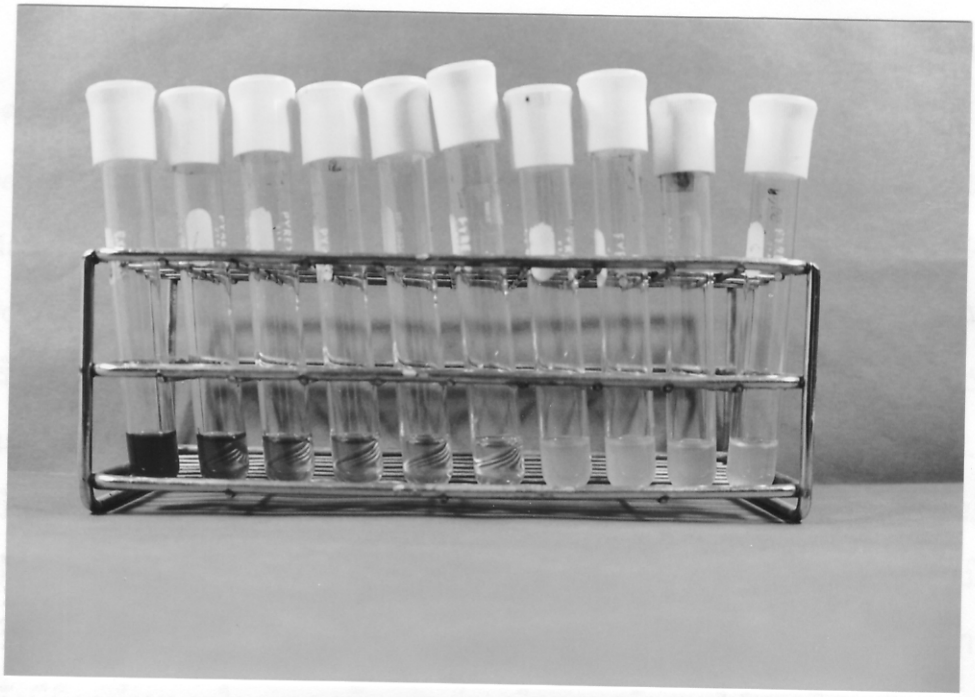
C

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (control)

A

รูปที่ 18 แสดง Minimum inhibition concentration (MIC) ของ crude fucoidan ใน แพลงก์ตอนพืช *I. galbana* ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (A), *E. coli* (B) และ *V. harveyi* (C) โดยในหลอดที่ 1 มีความเข้มข้น 2.24 mg/ml และมีความเข้มข้นลดลง 1:2 ตามลำดับ จนถึงหลอดที่ 9 มีความเข้มข้น 0.008 mg/ml

Figure 18 Minimum inhibition concentration (MIC) of crude fucoidan from *I. galbana* affected on *S. aureus* (A), *E. coli* (B) and *V. harveyi* (C) Tube 1 (concentration 2.24 mg/ml) ⟶ serial dilution to tube 9



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (control)

B,C