การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากเพรียงทราย *Perinereis nuntia* Savigny

นางสุพิศรา เตชะเปรมปรีชา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM THE SANDWORM *Perinereis nuntia* Savigny

Mrs. Supissara Techaprempreecha

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

501490

Thesis Title	PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM THE SANDWROM *Perinereis nuntia* Savigny
By	Mrs. Supissara Techaprempreecha
Field of study	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Chanya Chaicharoenpong, Ph.D.
	Nanthika Khongchareonporn, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

S. Hannongbua ..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Sirirat Rengpipat ..... Chairman

(Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

Chanya Chaicharoenpong ..... Thesis Co-advisor

(Chanya Chaicharoenpong, Ph.D.)

Nanthika K. .....Thesis Co-advisor

(Nanthika Khongchareonporn, Ph.D.)

Polkit Sangvanich ..... Member

(Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)

..... Member

(Porcham Aranyakananda, Ph.D.)

Paisarn Sithigorngul ..... External Member

(Professor Paisarn Sithigorngul, Ph.D.)

สุพิศรา เตชะเปรมปรีชา : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากเพรียงทราย *Perinereis nuntia* Savigny (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM THE SANDWORM *Perinereis nuntia* Savigny) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อมร เพชรสม, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. จรรยา ชัยเจริญพงศ์, ดร. นันทิกา คงเจริญพร, 90 หน้า.

เพรียงทราย *Perinereis nuntia* Savigny (คลาสโพลีคีท) ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากคุณค่าทางอาหารของเพรียงทรายสำคัญต่อการเจริญพันธุ์ของสัตว์น้ำหลายชนิด เพรียงทรายที่ใช้นำมาเป็นอาหารสัตว์น้ำเศรษฐกิจเหล่านี้นำมาจากเพรียงทรายในธรรมชาติและอาจนำโรคมาสู่สัตว์น้ำที่เลี้ยงได้ ดังนั้นฟาร์มสัตว์น้ำต่างๆนิยมที่จะใช้เพรียงทรายจากฟาร์มมากกว่าจับจากธรรมชาติ แต่เนื่องจากว่าเพรียงทรายจากฟาร์มและเพรียงธรรมชาติมีความแตกต่างกันในเรื่องของอาหารและแหล่งที่อยู่อาศัย ซึ่งคุณค่าทางอาหารจากตัวเพรียงทรายของทั้งสองแหล่งยังไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบกันมาก่อน งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณค่าทางอาหารของเพรียงทรายจากฟาร์มและจากธรรมชาติ พบว่าโปรตีนและไขมันจากเพรียงทรายฟาร์มและเพรียงทรายธรรมชาติ มีค่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนความชื้นของเพรียงธรรมชาติมีค่าสูงกว่าเพรียงฟาร์มอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เถ้านั้นตรงกันข้าม ในเพรียงทรายฟาร์มสูงกว่าในเพรียงทรายธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบของกรดไขมันในเพรียงทรายทั้ง 2 แหล่ง พบว่ากรดไขมันหลักในกลุ่ม Saturated fatty acid (SFA) Monounsaturated fatty acid (MUFA) และ Polyunsaturated fatty acid (PUFA) ของเพรียงทรายจากทั้ง 2 แหล่งเหมือนกันคือ C16:0 C18:1 และ C18:2 ตามลำดับ ปริมาณกรดไขมันรวมในกลุ่ม SFA และ MUFA ในเพรียงทรายธรรมชาติพบสูงกว่าในเพรียงทรายฟาร์มอย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้ามกรดไขมันรวมในกลุ่มของ PUFA นั้น พบในเพรียงทรายฟาร์มสูงกว่าในธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบกรดอะมิโนในตัวเพรียงทรายทั้ง 2 แหล่ง พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ โดยที่กรดอะมิโนหลักที่พบในเพรียงทรายทั้ง 2 กลุ่มคือ กรดกลูตามิคและกรดแอสปาติก ส่วนปริมาณเกลือแร่ที่วิเคราะห์ได้นั้น พบว่าทั้งในเพรียงทรายฟาร์มและเพรียงทรายธรรมชาติมีปริมาณเกลือแร่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด ยกเว้นโพแทสเซียมเพียงชนิดเดียวที่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณคลอเลสเตอรอลและวิตามินต่างๆในเพรียงทราย พบว่าคลอเลสเตอรอลและวิตามินเอในเพรียงทรายธรรมชาติมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับเพรียงทรายฟาร์ม ในทางตรงกันข้ามวิตามินซี ดี 3 และอี ในเพรียงทรายฟาร์มกลับมีปริมาณมากกว่าเพรียงทรายธรรมชาติ ส่วนวิตามินบี 1 นั้นพบว่ามีปริมาณเท่ากันในเพรียงทรายจากทั้ง 2 แหล่ง

เพรียงทรายนั้นอาศัยอยู่ตามหาดทรายซึ่งเต็มไปด้วยจุลินทรีย์จำนวนมาก แสดงว่าเพรียงทรายมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ระบบภูมิคุ้มกันของเพรียงทรายที่ใช้ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์คือ innate immunity ซึ่งมีหลายแบบ และหนึ่งใน innate immunity คือเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ antimicrobial peptides (AMPs) ในการทดลองนี้ AMPs จากเนื้อเยื่อและน้ำเลือดของเพรียงทราย *P. nuntia* ได้ถูกสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ การทำให้บริสุทธิ์ประกอบไปด้วยการสกัดด้วยสารละลายกรด การแยกเพปไทด์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่น solid phase extract และด้วย reverse phase HPLC นอกจากนี้ยังได้ทำการกระตุ้นเพรียงทรายให้ผลิตสาร AMPs ออกมาจำนวนมากขึ้นด้วยการทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และพบว่าหลังจากการทำให้ติดเชื้อไปแล้ว 24 ชั่วโมงสารสกัดหยาบเพรียงทรายจะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากที่สุด ซึ่งในการทดลองนี้ทุกขั้นตอนที่ทำการทำให้บริสุทธิ์จะตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc และใช้เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อทดสอบ จากการทดลองสามารถแยกสาร AMPs จากเพรียงทรายได้ 3 ตัว คือ AMP-F5(P) AMP-F15(P) และ AMP-F40(P) ซึ่งเป็นเพปไทด์ผสม และมีน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์หลักของ AMP-F5(P) AMP-F15(P) และ AMP-F40(P) เท่ากับ 2461.797 8564.595 และ 8459.779 ดาลตัน ตามลำดับ แต่มีเพียง AMP-F5(P) เท่านั้นที่ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* เมื่อผ่านขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ AMP-F5(P) จากเพรียงทรายที่สกัดได้มีปริมาณ 0.26 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเพรียงทรายสด 1 กรัม

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต สุพิศรา

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม จรรยา ชัยเจริญพงศ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นันทิกา คงเจริญพร

4673843423 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : *Perinereis nuntia* / SANDWORM / PROXIMATE COMPOSITION/ ANTIMICROBIAL PEPTIDES

SUPISSARA TECHAPREMPREECHA : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM THE SANDWORM *Perinereis nuntia* Savigny. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., THESIS COADVISOR : CHANYA CHAICHAROENPONG, Ph.D., NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., 90 pp.

Sandworm, *Perinereis nuntia* Savigny, (class Polychaeta) is widely used as live food in aquatic animal industry due to its nutritional values which are essential for maturation in many aquaculture species. Although farmed and wild sandworms are different in both diet and habitat, their nutritional values have never been comparatively reported. The proximate composition of farmed sandworm fed with a commercial shrimp diet and wild sandworm caught from shore line of Chonburi, Thailand, were investigated. Protein and fat contents in farmed and wild sandworms were not significantly different. Moisture content of wild animal was significantly higher than that of farmed animal while the ash content was in the contrary. The fatty acid profile of major saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in both groups of sandworm were C16:0, C18:1 and C18:2 respectively. SFA and MUFA contents of wild sandworm were significantly higher, while its PUFA content was significantly lower than that of farmed sandworm. Amino acid profile of both groups of sandworm was not different and the major amino acids were glutamic acid and aspartic acid in both groups of worm. Mineral contents in farmed and wild sandworms were significantly different except potassium. The cholesterol and vitamin A contents in wild sandworm were higher than those of farmed sandworm while vitamin C, D3 and E contents were in contrary and vitamin B1was in the same order.

Sandworms live in sandy beach which rich in microorganism and their abundance in this type of environment suggest that they have developed efficient immunodefense. They are able to protect themselves against invading pathogens due to efficient innate defense mechanism, one is antimicrobial peptides (AMPs). The AMPs were isolated and purified from sandworm *P. nuntia* tissue and coelomic fluid. The general protocol of peptides purification method including acid extraction, purification step by gel-filtration chromatography, solid phase extraction and reverse phase HPLC. Moreover, sandworms were challenged by *Vibio harveyi* before extraction and found the highest antimicrobial activity after 24 hr challenged. Each purified step was checked for antimicrobial activity by paper disc method against gram positive bacteria *Bacillus subtilis*. Three AMPs; AMP-F5(P), AMP-F15(P) and AMP-F40(P) were isolated from sandworm and they were mixed peptides. Molecular weight of major peptided of AMP-F5(P), AMP-F15(P) and AMP-F40(P) were 2461.797, 8564.595 and 2459.779 Daltons, respectively. Only AMP-F5(P) showed activity against *B. subtilis* after purification by the last step. Furthermore, 0.26 μg of AMP-F5(P) was found from 1 g of wet weight of fresh sandworm.

Field of study ..... Biotechnology ..... Student's signature ..... Supissara T. .....

Academic year ..... 2007 ..... Advisor's signature .....

Co-advisor's signature ..... Chanya Chaicharoenpong

Co-advisor's signature ..... Nanthika K. .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Amorn Petsom and my co-advisors Dr. Chanya Chaicharoenpong and Dr. Nanthika Khongchareonporn for their excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this dissertation. Without their kindness, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extent to Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat, Professor Dr. Paisarn Sithigorngul, Associate Professor Dr. Polkit Sangvanich and Dr. Porcham Aranyakananda for serving as dissertation committee, for their available comments and also for useful suggestions.

My special thanks to Associate Professor Dr. Janenuj Wongtavatchai for *Vibrio harveyi*, Dr. Chantragan Phiphopmongkol for LC-MSMS and Khun Suraphol Chunhabundit for sandworm samples.

Sincere thanks also extend to all members and all friends of the Program of Biotechnology, Department of Biochemistry and Institute of Biotechnology and Genetic Engineering for their kindness, friendships and helpfulness.

This work was financially supported by National Research Council of Thailand (NRCT) and the Graduate School Research Fund of Chulalongkorn University.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my family for their unlimited love, understanding and encouragement.

CONTENTS

Pages

ABSTRACT (THAI) iv

ABSTRACT (ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xii

LIST OF SCHEMES xiv

LIST OF ABBREVIATIONS xv

CHAPTER I INTRODUCTION 1

CHAPTER II LITERATURE REVIEWS 4

2.1 Sandworm *Perinereis nuntia* Savigny 4

2.1.1 General morphology of sandworm 5

2.1.2 Reproductive of sandworm 5

2.1.3 Important of sandworm 6

2.2 Proximate composition of sandworm 6

2.3 The innate immunity of invertebrate animals 9

2.4 Antimicrobial peptides (AMPs) 10

2.4.1 Classification of antimicrobial peptides 11

2.4.2 Mechanism of antimicrobial peptides 12

2.4.2.1 Mechanism of targets specificity 12

Pages

2.4.2.2 Mechanism of AMPs action 13

2.4.3 Antimicrobial peptides from marine invertebrates 16

CHAPTER III PROXIMATE COMPOSITION OF FARMED AND WILD SANDWORM 22

3.1 Introduction 24

3.2 Materials and methods 24

3.2.1 Equipments 24

3.2.2 Chemicals 24

3.2.3 Animals 25

3.2.4 Proximate composition analysis 26

3.2.4.1 Protein content by Kjeldahl method 26

3.2.4.2 Fat content by Soxhlet extraction 26

3.2.4.3 Moisture and ash contents 27

3.2.4.4 Energy content 28

3.2.5 Fatty acid composition 28

3.2.6 Cholesterol content 29

3.2.7 Amino acid composition 29

3.2.8 Minerals and vitamins contents 29

3.2.9 Statistical analysis 30

3.3 Results and discussion 30

3.4 Conclusion 37

Pages

CHAPTER IV PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM THE SANDWORM *Perinereis nuntia* Savigy 39

4.1 Introduction 39

4.2 Materials and methods 40

4.2.1 Equipments 40

4.2.2 Chemicals 41

4.2.3 Organisms 42

4.2.3.1 Farmed sandworm (*P. Nuntia*) 42

4.2.3.2 Microorganisms 42

4.2.4 Isolation of antimicrobial peptides from sandworm *P. nuntia* 43

4.2.4.1 Challenged sandworm with *V. harveyi* 43

4.2.4.2 Acid extraction 44

4.2.4.3 Purification of AMPs by gel-filtration 44

4.2.4.4 Purification by solid phase extraction (SPE) 45

4.2.4.5 Purification by Reverse - phase HPLC 45

4.2.5 Antimicrobial activity assay by paper disc method 47

4.2.5.1 Preparation of paper discs 47

4.2.5.2 Preparation of microorganisms 47

4.2.5.3 Antimicrobial activity assay 48

4.2.6 Molecular weight determination 48

Pages

4.3 Results and discussion 48

4.3.1 Challenged sandworm with *Vibrio harveyi* strain 104 48

4.3.2 Peptide purification by gel filtration 51

4.3.3 Peptide purification by solid phase extraction (SPE) 54

4.3.4 Peptide purification by Reverse-phase HPLC 56

4.3.4.1 Purification by semi-preparative column 56

4.3.4.2 Purification by analytical column 58

4.3.5 Molecular weight determination 60

4.4 Conclusion 63

CHAPTER V SUMMARY 64

REFERENCES 66

APPENDICES 76

BIOGRAPHY 90

LIST OF TABLES

Pages

2.1 Major host defense system in invertebrate animal 10

2.2 AMPs from marine invertebrates 18

3.1 The proximate composition of farmed and wild sandworms *P. nuntia* 31

3.2 Fatty acid composition (% of total fatty acid) and cholesterol content of farmed and wild sandworms *P. nuntia* 33

3.3 Mineral concentration in farmed and wild sandworms *P.nuntia* 34

3.4 Amino acid profile (% of dry tissue) of farmed and wild sandworms *P. nuntia* 36

3.5 Vitamins content in farmed and wild sandworms *P. nuntia* 37

3.6 Conclusion of proximate composition in farmed and wild sandworms 37

4.1 Antimicrobial activity against *B. subtilis* of challenged sandworm 49

4.2 Antimicrobial activity of gel–filtration fraction of challenged sandworm 54

LIST OF FIGURES

Pages

2.1 Wild and farmed sandworm 7

2.2 Model for the mechanism of action of AMPs 15

2.3 Effect of AMPs (portegrin, PG-1) on *E. coli* cell 15

4.1 Protein absorbance and antimicrobial activity against *B. subtilis* of each fraction from gel-filtration step 52

4.2 RP-HPLC chromatogram of 50 ACN fraction by semi-preparative column with a gradient of 9 - 63% ACN containing 0.1% TFA 56

4.3 RP-HPLC chromatogram of AMP-F5(P) fraction by analytical column with a gradient of 4.5 – 13.5% ACN containing 0.1% TFA 59

4.4 RP-HPLC chromatogram of AMP-F15(P) fraction by analytical column with a gradient of 9 – 22.5% ACN containing 0.1% TFA 59

4.5 RP-HPLC chromatogram of AMP-F40(P) fraction by analytical column with a gradient of 31.5 – 45% ACN containing 0.1% TFA 60

4.6 MALDI-TOF spectrum of AMP – F5(P) 61

4.7 MALDI-TOF spectrum of AMP – F15(P) 61

4.8 MALDI-TOF spectrum of AMP – F40(P) 62

B1 Standard curve of protein determination 81

C1 Antimicrobial activity of crude extract from non-challenged and challenged sandworms against *B. subtilis* 82

C2 Antimicrobial activity of crude extract from non-challenged and challenged sandworms against *S. aureus* and *E. coli* 83

Pages

C3 Antimicrobial activity of crude extract from non-challenged and challenged sandworms against *V. harveyi* and *C. albicans* 84

C4 Antimicrobial activity of peptides from gel-filtration fraction (each fraction) against *B. subtilis* 85

C5 Antimicrobial activity of peptide from concentrated gel-filtration fraction against *B. subtilis* (1X), *S. aureus*, *E. coli*, *V. harveyi* and *C. albican* (5X) 86

C6 Antimicrobial activity of peptide from SPE C18 against *B. subtilis* 87

C7 Antimicrobial activity of peptide from semi-preparative RP-HPLC against *B. subtilis* 88

C8 Antimicrobial activity of peptide from AMP - F5(P), AMP - F15(P) and AMP - F40(P) against *B. subtilis* 89

LIST OF SCHEMES

Pages

1 Peptide purification by gel-filtration 53

2 Peptide purification by solid phase extraction 55

3 Summary of AMPs purification step 57

LIST OF ABBREVIATIONS

Å	=	Angstrom
AA	=	Arachidonic acid
ACN	=	Acetonitrile
AMPs	=	Antimicrobial peptides
AOAC	=	Association of Official Analysis Chemists
°C	=	Degree Celsius
cfu	=	Colonies forming unit
DHA	=	Docosahexaenoic acid
EPA	=	Eicosapentaenoic acid
FAME	=	Fatty acid methyl ester
g	=	Gram (s)
GC	=	Gas chromatography
hr	=	Hour (s)
kg	=	Kilogram (s)
kDa	=	Kilodalton (s)
MALDI	=	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
TOF	=	Time of Flight
MW	=	Molecular weight
MUFA	=	Monounsaturated fatty acid
min	=	Minute (s)
ml	=	Milliliter (s)
mg	=	Milligram (s)
N	=	Normality

PUFA	=	Polyunsaturated fatty acid
RP-HPLC	=	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
rpm	=	Round per minute
SD	=	Standard deviation
SFA	=	Saturated fatty acid
SPE	=	Solid phase extraction
SPSS	=	Statistical package for the social science
TFA	=	Trifluoroacetic acid
µg	=	Microgram (s)
µl	=	Microliter (s)
∅	=	Diameter

One letter amino acid codes

G	Glycine
A	Alanine
V	Valine
L	Leucine
I	Isoleucine
S	Serine
T	Threonine
C	Cysteine
M	Methionine
P	Proline
D	Aspartic acid

N	Asparagine
E	Glutamic acid
Q	Glutamine
K	Lysine
R	Arginine
H	Histidine
Y	Phenylalanine
W	Tryptophan