จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

แผนงานวิจัยเรื่อง

ฤทธิ์ชีวภาพและการใช้ประโยชน์ของเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนด้านการต้านสารก่อมะเร็ง การปรับภูมิคุ้มกันและต้านแบคทีเรีย

โครงการวิจัยที่ 1 ผลของเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเจริญเติบโตในกุ้งกุลาดำ

โครงการวิจัยที่ 2 ผลของสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกผลทุเรียนต่อระบบภูมิคุ้มกันและการลดโคเลสเตอรอลในไก่

โดย

สุนันท์ พงษ์สามารถ

กรกฎาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และความอนุเคราะห์และร่วมมือจากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จฬ
เลขหมู่ ว 15
เลขทะเบียน 016745
วัน, เดือน, ปี 21 ก.ค. 58

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

บทคัดย่อ

การให้กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กินสารพอลีแซคคาไรด์เจล (PG) ที่ให้ผสมกับอาหารกุ้งพบว่ามีศักยภาพไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันและต้านการเกิดโรคในกุ้ง PG สกัดจากเปลือกของผลทุเรียน (*Durio zibethinus*) เป็นสารเพคติคพอลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันและต้านแบคทีเรียได้ PGไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (*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 PGขนาด 1, 2 และ 3% ผสมในอาหารกุ้งและกลุ่มควบคุมให้อาหารกุ้งที่ไม่มี PG โดยเลี้ยงกุ้งนาน 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าอาหารกุ้งผสม PGไม่มีผลต่อภาพรวมของการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่ามีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นโดยการวิเคราะห์ว่ามีการเพิ่มของเอนไซม์ Prophenoloxidase และเพิ่ม total hemocyte count สูงขึ้นในกุ้งที่ให้กินอาหารกุ้งผสม PG เป็นเวลา 12 สัปดาห์สูงกว่ากลุ่มควบคุม พบมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสูงกว่าในกุ้งที่ให้อาหารผสม PG ในการทำ Challenge test ทั้งต่อไวรัส White Spot Syndrome Virus (WSSV) และแบคทีเรีย (*Vibrio harveyi* 1526) เทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่า relative percent survival (RPS)ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งผสม PG 2% มีค่าการต้านโรคที่ 100% และ 36% ต่อการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย ตามลำดับ พบว่ามีการตายต่ำกว่ามากจากการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกลุ่มที่ให้กินอาหารผสม 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 ($P < 0.05$) then 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 *Vibrio harveyi* 1526 โดยวิธี immersion method....7
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ....8
ผลการวิจัยและอภิปรายผล....9
ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน (PG)....9
การทดสอบการต้านเชื้อโดยวิธี Agar diffusion test....9
การทดสอบการต้านเชื้อโดยวิธี 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
Vibrio harveyi 1526 challenge test by immersion method....27
สรุปผลการทดลอง....32
เอกสารอ้างอิง....33

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ จากเปลือกทุเรียนโดยวิธี agar diffusion 10
2. ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของ PG เปรียบเทียบกับ gentamicin sulfate ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* 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 *Vibrio harveyi* 1526 ด้วย วิธี immersion method โดยค่า Cumulative mortality และ RPS 31

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. ขนาดเม็ดของอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากทุเรียน (PG) ที่ความเข้มข้นต่างๆ....13
2. น้ำหนักตัวของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนนาน 8 และ 12 สัปดาห์ 15
3. ความยาวของลำตัวกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทีมี่เจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ .16
4. อัตราการรอดชีวิต (survival rate) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจล โพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ 17
5. ค่า Feed conversion ratio (FCR) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติม เจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ 18
6. ค่า Biomass ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์ จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ 19
7. ขนาดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 (a) และ 12 (b)สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์ จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ 20
8. Total phenoloxidase activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์ จากเปลือกทุเรียน (PG) 24
9. Total hemocyte count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์ จากเปลือกทุเรียน (PG) 25
10. อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำที่ให้ติดเชื้อ WSSV โดยวิธี cohabitation method หลังจากที่เลี้ยงกุ้ง ด้วยอาหารที่มี PG ที่ความเข้มข้น 1-3% นาน 12 สัปดาห์ 28
11. อัตราการรรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ขนาด $1.47x10^6$ CFU/ml ด้วยวิธี immersion method หลังเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG ที่ความเข้มข้น 1-3% นาน 12 สัปดาห์ 30

บทนำ

ทุเรียนมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Durio zibethinus* Murr. เป็นผลไม้ที่นิยมมากในประเทศไทย ลักษณะของผลมีหนามแหลม สีเขียวอมน้ำตาล น้ำหนักของผลประมาณ 1.5-5 kg เปลือกมีความหนารูปร่างคล้ายเรือ ภายในมีสีขาวซึ่งติดกับบริเวณเนื้อสีเหลืองที่มีรสหวานมัน เปลือกของทุเรียนถูกนำมาพัฒนาเพิ่มมูลค่าโดยการนำเปลือกมาสกัดโพลีแซคคาไรด์มาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมและการแพทย์ (Pongsamart *et al.*, 2005, 2006, Chansiripornchai *et al.*, 2005, Tinmamee *et al.*, 2006) โดยโพลีแซคคาไรด์เจล (PG) เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์และตรวจหาโครงสร้างพบว่า PG เป็นเพคติคโพลีแซคคาไรด์ที่พองตัวในน้ำได้ โครงสร้างประกอบด้วย long chain polygalacturonic acid เชื่อมต่อกับ neutral sugars เช่น arabinose, rhamnose, galactose, glucose และ fructose (Pongsamart and Panmuang, 1998, Hokputsa *et al.*, 2004) เนื่องจาก PG มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ฤทธิ์การรักษาบาดแผล (wound-healing activity) (Pongsamart *et al.*, 2005, 2006, Chansiripornchai *et al.*, 2005, Lipipun *et al.*, 2006) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันซึ่งสามารถทดสอบด้วยวิธี complement fixation assay (Hokputsa *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า PG ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลองซึ่งทดสอบโดยวิธี acute และ subchronic toxicity tests ในหนูถีบจักร (mice) และหนูขาว (rats) (Pongsamart *et al.*, 2001,2002)

ในส่วนของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทยเป็นอย่างมากประเภทหนึ่ง ซึ่งก็มีปัญหาที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือ การติดเชื้อ *V. harveyi* 1526 จึงมีการศึกษาโดยหาสารที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันและช่วยให้กุ้งต้านทานต่อโรค ซึ่งพบว่าระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อให้กุ้งกินอาหารที่เติมสารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งโพลีแซคคาไรด์จะมีสารอาหารสำคัญที่สามารถเหนี่ยวนำการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กุ้ง ได้แก่ peptidoglycan (Itami *et al.*, 1998), lipopolysacchaside (Takahashi *et al.*, 2000), glucan (Chang *et al.*, 2003), sodium alginate (Cheng *et al.*, 2004) และ fucoidan (Chotigeat *et al.*, 2004) เป็นต้น ดังนั้นโพลีแซคคาไรด์สามารถใช้เป็นสารเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันได้อาจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างกว้างขวางได้ต่อไป การศึกษานี้ต้องการประเมินว่า PG มีผลต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำและผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ให้กินอาหารผสม PG

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เตรียมสูตรอาหารเสริมกุ้งที่เติมสารเจลโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณเหมาะสมเพื่อไปเร่งการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

2. ศึกษาการเจริญเติบโตความแข็งแรงและอัตราการรอดของกุ้งในช่วงเวลาหลังให้กินอาหารเสริมกุ้งที่เติมสารเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน

3. ศึกษาการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันและอัตราการเพิ่มน้ำหนักกุ้งที่ให้กินอาหารเสริมกุ้งที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน

วัสดุและวิธีการวิจัย

1. วัสดุ

1.1 สารเคมี

Tryptic soy agar, Mueller Hinton broth, Mueller Hinton agar, thiosulfate citrate bile salt sucrose agar, Titriplex® III (ethylenediaminetetraacetic acid), 95% ethyl alcohol are analytical grade, glacial acetic acid, formaldehyde และ glucose anhydrous จาก Merck ประเทศเยอรมนี

Magnesium chloride hexahydrate, trypsin, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-cysteine, bovine serum albumin, sodium hexametaphosphate, gentamicin sulfate, potassium chloride, sodium dihydrogen phosphate dehydrate, hematoxylin crystals, potassium aluminium sulfate, chloral hydrate, eosin Y และ sodium cacodylate trihydrate จากบริษัท Sigma Chemical Co. Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

Calcium chloride dihydrate, sodium chloride and citric acid จากบริษัท BDH Chemicals Ltd. ประเทศอังกฤษIsopropyl alcohol, xylene และ citric acid จากบริษัท Farmitalia Carlo Erba Company ประเทศเยอรมนี

MEM essential amino acid ที่เติม L-glutamine และ Hepes buffer จากบริษัท Gibco Chemical Co. จากประเทศสหรัฐอเมริกา

Trisodium citrate และ sodium hydrogen carbonate จากบริษัท Fisher Chemicals ประเทศอังกฤษ

Sodium iodate from Fluka, Switzerland. Barford protein assay kits from Bio-Rad Laboratories Ltd. จากประเทศสหรัฐอเมริกา

Hydrochloric acid (36.5-38.0%) solution from Mallinckrodt Baker Inc. จากประเทศสหรัฐอเมริกา Water quality kits ได้มาจาก NASA Lab Co. Ltd ประเทศไทย

1.2 ตัวอย่างวิจัย

สารสกัดเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง *Durio zibethinus* Murr. " Monthong" ผลทุเรียนสุกเก็บจากจังหวัดชุมพร นำเปลือกมาอบแห้งและนำไปใช้ในการสกัดสารทดลอง

1.3 อุปกรณ์การวิจัย

- Rotary evaporator (Büchi, Rotavapor R-220 and R-200, Switzerland)
- Vacuum pump (Büchi, Vac®V-1000, Switzerland)
- Vacuum pump (SIBATA, WJ-20, Japan)
- Recirculating chiller (Büchi, B-740/14, Switzerland)
- Recirculating chiller (Boss Tech., CB-1, Thailand)
- Filter set (BRITISH PORTACEL®, CRB, Thailand)
- Electric Pump (GRUNDFOS®X, MQ3-45 A-O-A-BVBP, Italy)
- Hot plate (E.G.O., 931-12607, Germany)
- pH Meter (Mettler Toledo, Seven Easy, Switzerland)

- Pipetting aid (Eppendorf, Easypet 4420, Germany)
- Hot air Oven (Memmert, UL40, Germany)
- Hot air Oven (YEO HENG Co. Ltd., Capacity 50 kg., Thailand)
- Viscometer (Brookfield, LVDV-I^{+}, USA)
- Electric Balance (Mettler Toledo, PL602-5, Switzerland)
- Spectrophotometer (Spectronic®, GENESYS^{TM}5, USA)
- Refrigerator (Bio Advance, SY-200, Thailand)
- Upright Freezer (Sandent, ID974, Thailand)
- Microplate reader (Molecular Devices, VERSAmax, USA)
- High speed centrifuge (Hettich zentrifugen, Universal 32R, Germany)
- High Intensity Ultrasonic Processor (Sonics & Material Inc., VCX 750, USA)
- Microscopy (Nikon, AFX-IIA, Japan)
- Tissue embedding centre (Cambridge instruments Company, 8041, USA)
- Vortex (Scientific industries Inc., Vortex-2 Genic® G-560E, USA)
- Hand refractometer (ATAGO, S-10E, Japan)
- Hematocytometer (BLAUBRAND®, Neubauer Improved bright-line, Germany)
- Automatic tissue processor (Cambridge instruments Co., Histokinette 2000, USA)
- Inverted microscope with phase contrast (Zeiss, Axiovert 135, Germany)

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG) จากเปลือกทุเรียน

2.1.1 การแยกเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG)

โพลีแซคคาไรด์เจลสกัดมาจากเปลือกทุเรียนแห้ง โดยนำเปลือกทุเรียนสดพันธุ์หมอนทองมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ นำไปบดแล้วอบแห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 °C จากนั้นเก็บตัวอย่างแห้งไว้ในที่เย็นจนกว่าจะนำเปลือกแห้งมาสกัดแยกเจลโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งกระบวนการในการแยกเจลโพลีแซคคาไรด์ทำตามวิธีการของ Pongsamart และ Panmuang (1998) และ Hokputsa (2004) ตามวิธีการโดยย่อดังนี้กระบวนการในการสกัดโพลีแซคคาไรด์เจล (PG) จากเปลือกทุเรียน เริ่มจากต้มเปลือกทุเรียนแห้งที่เตรียมข้างต้นในน้ำกลั่นปริมาตร 25 เท่าของน้ำหนักเปลือกแห้ง ปรับ pH ให้เป็น 4.0 ด้วย citric acid ต้มเป็นเวลานาน 45 นาที กรองจนได้น้ำกรองใส แล้วนำไประเหยน้ำจนข้นหนืดและตกตะกอนเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG) ด้วย acid-ethanol (4%HCl ใน 75% ethanol) จากนั้นนำ PG ที่ได้ไปอบแห้งที่ 60 °C แล้วบดให้ละเอียด ซึ่งจะได้ผง PG ที่มีสีเหลืองน้ำตาลอ่อนๆ

2.1.2 การเตรียมสารละลาย PG สำหรับการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์(antimicrobial test)

นำผงเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG) มาละลายใน sterile distilled water แล้วเจือจางในความเข้มข้นที่ต้องการโดยการเจือจางที่ละ 2 เท่าเป็นลำดับ (series of two fold dilution) จากนั้นเติมโพลีแซคคาไรด์ในความ

เข้มข้นที่เจือจางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อปรับให้ได้เป็นความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ (3.2, 6.3, 12.5, 25.0 และ 50.0 mg/ml)

2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและเหลว

อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและเหลวเตรียมโดยละลายผงอาหารด้วยน้ำกลั่นที่เติม 1% NaCl แล้วนำไป sterile ด้วย autoclave นาน 15 นาทีที่ความดัน 15 lbs/in^2 อุณหภูมิ 121 °C อาหารประกอบด้วย Tryptic soy broth (TSB) หรือ tryptic soy agar (TSA) เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบ Thiosulfate citrate salt sucrose agar (TCBSA) ที่เติม 1% NaCl จะใช้เป็นอาหารในการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย ส่วน Mueller Hinton agar (MHA) ที่เติม 1% NaCl ใช้ในการทดสอบ agar diffusion test ส่วน Mueller Hinton both (MHB) ที่เติม 1% NaCl ใช้ในการทดสอบ broth macrodilution test

2.2.2 การเตรียมอาหารในการทดสอบ White spot syndrome virus (WSSV)

ใช้ Lobster hemolymph medium (LHM) เป็นอาหารเหลวใช้สำหรับการทดสอบเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคจุดขาวในกุ้ง (WSSV) และใช้ในการทดสอบการนับจำนวน hemocytes (total hemocytes count test) โดยเตรียมอาหารจากการละลายผงอาหารด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 7.4 ด้วย7.5% $NaHCO_3$ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 ml ใน volumemetric flak แล้ว sterile อาหารโดยการกรองผ่าน membrane filter ที่มีรูกรองที่เส้นผ่านศูนย์กลางของเท่ากับ 0.45 µm

2.2.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

2.2.3.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

Vibrio harveyi 1526 ซึ่งเป็น luminescent bacteria ได้มาจาก Shrimp Culture Research Center, Charoen Pokphand Foods public company limited โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (tryptic soy broth : TSB) ที่เติม 1% NaCl ใน shaking flasks เพื่อใช้ในการทดสอบ จากนั้นนำอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อนี้ไปทำการ streak บนอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) slant ที่เติม 1% NaCl แล้วทำการเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเจลโพลีแซคคาไรด์ โดยนำแบคทีเรียจากผิวหน้าของ agar slant มาผสมลงใน sterile normal saline solution (NSS) เพื่อปรับความขุ่นให้เท่ากับ standard McFarland no. 0.5 เป็น bacterial suspension ก่อนนำไปทดสอบ

2.2.3.2 ไวรัส White spot syndrome virus (WSSV)

เชื้อไวรัส WSSV ได้จาก Shrimp Culture Research Center, Charoen Pokphand Foods public company limited ซึ่งจะนำมาเตรียมเป็น WSSV stock solution จากการปรับวิธีการตามวิธีของ Wu *et al.* (2002) โดยนำ hemolymph ของกุ้งที่ตายจากไวรัส WSSV ที่ติดเชื้ออยู่ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยใช้ 26-gauche needle และ 5 ml syringe ผสมลงในอาหาร LHM pH 7.6, 5% L-cysteine ปริมาตร 4 เท่าของ hemolymph เพื่อใช้เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ซึ่งความเข้มข้นของไวรัสที่อยู่ใน hemolymph จะสามารถวัดได้จากการทำ two-step WSSV PCR method ก่อนการนำไปแช่แข็งและใช้ทดสอบ เมื่อต้องการทดสอบจะนำ WSSV stock solution ที่เตรียมไว้ข้างต้นมาละลายน้ำแข็งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง

ที่ความเร็ว 1500X g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางในความเข้มข้นที่ต้องการแล้วฉีดเข้าไปในกล้ามเนื้อของกุ้งที่เป็น carrier ในการทดลอง challenge test ต่อไป

2.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเจลโพลีแซคคาไรด์

2.3.1 Agar diffusion test

Agar diffusion test ทำตามวิธีมาตรฐานของ Lorian, 1991 และปรับตามวิธีการของ Brock *et al.* (1994) โดยทำการเจือจางเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG) ที่ความเข้มข้น 50.0, 25.0, 12.5, 6.3 และ 3.2 mg/ml ด้วยน้ำกลั่น นำ bacterial suspension ความเข้มข้น 1% ในอาหารเหลว MHB เทลงบนอาหารวุ้นแข็ง MHA ที่เติม 1% NaCl ในจานเพาะเลี้ยงตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง จากนั้นนำ sterile stainless steel cups (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6 mm และภายนอก 10 mm) วางลงบนอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น แล้วเติม PG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องการทดสอบลงไปปริมาตร 300 µl/cup ใน sterile stainless steel cups ที่วางไว้ จากนั้นตั้งจานเพาะเลี้ยงทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1 ชม. เพื่อให้สาร PG แพร่กระจายในอาหาร เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำจานเพาะเลี้ยงนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 16 ชม. เมื่อครบเวลาสังเกตวงใสที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดขึ้น (clear inhibition zones) วัดความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส ซึ่งในการทดลองจะใช้ sterile normal saline เป็นตัวควบคุมการทดลอง (control) และใช้ gentamycin เป็น positive control ในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.3.2 Broth microdilution test

2.3.2.1 การหาค่า MIC

Broth microdilution test ปรับตามวิธีการของ Brock *et al.* (1994). ซึ่งทำโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB ปริมาตร 100 µl ผสมกับ 100 µl PG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน well ของ microtitre plate เติมเชื้อ bacterial suspension ที่ใช้ในการทดสอบปริมาตร 0.5 µl โดยในการทดลองจะใช้อาหารเหลวที่ไม่มี PG ผสมอยู่เป็นตัวควบคุมการทดลอง (control) และในแต่ละการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง

MIC คือค่าความเข้มข้นของ PG ที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่มองเห็นได้โดยเห็นสารละลายใสไม่มีความขุ่น โดยจะทำการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี PG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 16 ชม. หากเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าแล้วไม่พบว่ามีความขุ่น แสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย

2.3.2.2 การหาค่า MBC

การหาค่า MBC สามารถหาโดยการนำเชื้อจากอาหารเหลว MHB ที่เติม PG ในความเข้มข้นที่พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MHA ที่ไม่มีการเติม PG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 16 ชม. โดยค่า MBC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ PG จากอาหารเหลวใน well ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อและไม่พบการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้ง

การทดลองจะใช้เจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งสำหรับกลุ่มทดลองโดยเติมปริมาณ 1, 2 และ 3 กรัมต่ออาหารเลี้ยงกุ้ง 100 กรัมและใช้อาหารเลี้ยงกุ้งปกติที่ไม่มีการเติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนเป็นกลุ่มควบคุมการทดลอง ซึ่งอาหารเลี้ยงกุ้งเตรียมโดยการนำส่วนผสมอาหารแข็งทั้งหมดผสมกับส่วนผสมของน้ำมันแล้วเติมน้ำเย็นลงไปจนได้ก้อนแป้ง จากนั้นจะนำก้อนแป้งที่ได้ใส่ลงในเครื่องบด

ผสมแล้วผ่าน die ที่มีรู (pore) ขนาด 2.3 mm ได้เป็นเส้นยาวออกมา จากนั้นก็นำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 4 ชม. แล้วนำไปบดให้เป็นเม็ดเล็กๆ ผ่านตาตะแกรงขนาด 10, 14 และ 25 mesh ตามลำดับ อาหารที่ได้นำไปวิเคราะห์สารอาหารและเก็บในที่แห้ง

2.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงกุ้ง

การวิเคราะห์องค์ประกอบสารอาหารในอาหารเลี้ยงกุ้งโดยตรวจวัดปริมาณความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, ใยอาหาร, ขี้เถ้า, แคลเซียม และฟอสฟอรัส โดยทำตามที่กำหนดของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) official method of analysis (2000) ส่วนของการคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด คำนวณจากการหักลบจากน้ำหนักรวมของ โปรตีน, ไขมัน, ความชื้น, ใยอาหารและขี้เถ้าออกจากน้ำหนักตัวอย่างของอาหารที่นำมาวิเคราะห์

2.6 การเตรียมตัวอย่างและการทดลองเลี้ยงกุ้ง

คัดเลือกลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 0.29 ± 0.04 กรัม จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งที่แม่กลอง จ.สมุทรสงคราม โดยการสุ่มตัวอย่างแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 100 ตัว ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งย่อยเป็น 5 กลุ่มกลุ่มละ 20 ตัว โดยจะนำกุ้งไปเลี้ยงในบ่อเลี้ยงระบบน้ำปิดนาน 84 วัน (12 สัปดาห์) ในกลุ่มทดลองจะเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมกับ PG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่วนกลุ่มควบคุมการทดลอง(control) จะเลี้ยงด้วยอาหารปกติที่ไม่มีการผสม PG ทำการวัดน้ำหนักตัว, ความยาวตัว, อัตราการมีชีวิตรอด, คำนวณค่าชีวมวลและอัตราแลกเนื้อ (FCR) ของกุ้งกุลาดำที่ทดลองที่สัปดาห์ที่ 8 และ 12 ตามลำดับ ค่า FCR สามารถคำนวณได้จากปริมาณของอาหารที่ให้กุ้ง (kg) ต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น 1 กิโลกรัม ในระหว่างการเลี้ยงกุ้งจะต้องมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆ ดังนี้ ความเค็มน้ำเท่ากับ 16-21 ppt, ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (TAN) เท่ากับ 0.0-0.2 ppm, ปริมาณไนโตรเจน (NO_2) เท่ากับ 0.0-2.0 ppm, ความเป็นด่างเท่ากับ 100-160 ppm, ความกระด้างน้ำเท่ากับ 2100-3250 ppm, อุณหภูมิเท่ากับ 29.5-33 °C, ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ (DO) เท่ากับ 3.5-6.0 ppm และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 7.6-8.2

2.7 การตรวจวัดค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte counts: THC)

ทำการทดลองตามวิธีของ Itami *et al.*, 1994 หลังการทดลองเลี้ยงกุ้งนาน 12 สัปดาห์ เจาะเลือดกุ้งที่บริเวณสันหลังในส่วนของ haemocoel บริเวณช่วงกลางลำตัวซึ่งจะอยู่ตรงขาที่สาม (pereiopods) ที่เรียกว่า haemocoel มาปริมาตร 100 µl โดยใช้เข็ม 26-gauche needle และหลอดฉีดยาปริมาตร 1 ml ที่มีสารละลาย lobster hemolymph medium เย็นปริมาตร 400 µl, 5% L-cysteine ซึ่งจะใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นจะนำเลือดที่เจาะไปนับเม็ดเลือดรวมด้วย haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X แล้วคำนวณปริมาณของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร

2.8 การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (Pro-phenoloxidase activity)

การวัด activity ของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสจากน้ำเลือดกุ้งทดสอบตามวิธีการของ Söderhäll and Smith 1983 ซึ่งจะวัดผลจากเลือดกุ้งทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมที่สัปดาห์ที่ 12 โดยเจาะเลือดกุ้ง 200 µl ด้วย 26-gauche needle และหลอดฉีดยาปริมาตร 1 ml ที่มี anticoagulant-1 (AC-1) ปริมาตร 400 µl จากนั้นนำเลือดกุ้งไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500X g ที่ 4 °C นาน 10 นาที แยกเม็ดเลือดออกมาแล้วนำเม็ดเลือดที่ได้ไป resuspend ใน cacodylate buffer (CAC buffer) pH 7.4 ปริมาตร 200 µl จากนั้นเตรียม hemocyte lysate

supernatant (HLS) โดยใช้ sonicator ที่ความถี่ 35 amplitudes นาน 5 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ 1000X g ที่ 4 °C นาน 10 นาที แล้วรวบรวม HLS ที่ได้ปริมาตร 20 µl ผสมกับ0.1% trypsin (sigma) ที่อยู่ใน CAC buffer ใน 96-well microtiter plate จากนั้นเติม 0.3% L-3, 4-dihydroxyphenyl alanine (L-DOPA, sigma) ปริมาตร 20µl ที่อุณหภูมิ 25 °C แล้วนำไปวัด activity ของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490 nm โดยใช้ CAC buffer เป็น blank

การวัดปริมาณโปรตีนใน HLS ทำตามวิธีการของ Bradford method (1975), BioRad Protein Assay System Kit โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน(standard) โดยหนึ่งหน่วยของ activity ของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสคำนวณจากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสง 0.001 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน (Söderhäll และ Unestam, 1979)

2.9 การทดลองการให้ติดเชื้อ โดยวิธี Challenge test

2.9.1 การทดลองกับไวรัส WSSV ด้วยวิธี cohabitation method

การทดลองนี้จะเริ่มดำเนินการหลังจากที่เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 84 วัน โดยคัดเลือกกุ้งกุลาดำในแต่ละกลุ่มแต่ละช่วงเวลามา 4 กลุ่มกลุ่มละ 8-10 ตัวโดยทำ 3 ซ้ำ ซึ่งจะแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมการทดลองและกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มโดยแต่ละซ้ำจะนำกุ้งมาเลี้ยงในตู้เลี้ยงปริมาตร 200 ลิตรขนาด 50x90x50 cm^3 ด้วยระบบน้ำวนปิด ซึ่งกุ้งในกลุ่มทดลองที่ถูกเลี้ยงร่วมกันจะถูกทำให้ติดเชื้อโดยปล่อยกุ้ง carrier ที่ถูกฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้วยไวรัส WSSV ปริมาตร 0.1 ml ของ 10^6 x WSSV(dilution 1:30) ของสารละลายไวรัส stock solution หลังจากปล่อยกุ้งที่ฉีดไวรัสลงไปในตู้เลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จะหาค่าอัตราการรอดชีวิตกุ้งและเฝ้าดูต่อไปเป็นเวลา 10 วันหรือจนกว่าที่กุ้งในกลุ่มควบคุมการทดลองจวนตายทั้งหมด โดยในระหว่างการทดลองจะควบคุมสภาวะแวดล้อมทั้งหมด จากนั้นจะสุ่มกุ้งที่จวนจะตายทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมการทดลองในแต่ละซ้ำ นำไปเก็บที่ Divison fixation เพื่อทำการย้อมดูเนื้อเยื่อของกุ้งด้วยสี hematoxylin และ eosin แล้วจะหาค่าการตายโดยรวมของกุ้งทั้งหมดโดยแสดงเป็นค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต, relative percent survival (RPS) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{\% Mortality in experimental group}}{\text{\% Mortality in control group}} \right) \times 100$$

ซึ่งค่า RPS นี้จะประมาณจากกลุ่มการทดลองที่มีการตายต่ำกว่าประมาณ 20-50% เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยค่า RPS ที่ไม่น้อยกว่า 60% แสดงถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้ต้านไวรัสว่าสามารถยอมรับได้ (Amend, 1981)

2.9.2 การทดลองกับเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 โดยวิธี immersion method

เริ่มทำการทดลองเมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา เวลา 12 สัปดาห์หรือ 84 วัน โดยคัดเลือกกุ้งกุลาดำในแต่ละกลุ่มมา 4 กลุ่มกลุ่มละ 8-10 ตัวแล้วทำซ้ำ แต่ละซ้ำจะนำกุ้ง 8-10 ตัวมาเลี้ยงในตู้เลี้ยงปริมาตร 35 ลิตร ขนาด 50x90x50 cm^3 กุ้งในกลุ่มทดลองถูกจุ่มกับเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^5-10^7CFU/ml เมื่อครบเวลานาน 24

ชั่วโมงจึงจะหาค่าอัตราการรอดชีวิตกุ้งและเฝ้าดูไปเป็นเวลา 10 วันหรือจนกว่าที่กุ้งในกลุ่มควบคุมการทดลองจวนตายทั้งหมด โดยในระหว่างการทดลองจะควบคุมสภาวะแวดล้อมทั้งหมดจากนั้นจะสุ่มกุ้งที่จวนจะตายทั้งกลุ่มทดลองและควบคุมการทดลองในแต่ละซ้ำมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยใช้อาหารแข็ง thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBSA) จากนั้นหาค่าการตายโดยรวมของกุ้งทั้งหมดโดยแสดงเป็นค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต relative percent survival, (RPS) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$RPS = \left[1 - \frac{\text{\% Mortality in experimental group}}{\text{\% Mortality in control group}} \right] \times 100$$

ซึ่งค่า RPS นี้จะประมาณจากกลุ่มการทดลองที่มีการตายต่ำกว่าประมาณ 20-50% เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยค่า RPS ที่ไม่น้อยกว่า 60% แสดงถึงประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้ต้านไวรัสว่าสามารถยอมรับได้ (Amend, 1981)

2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองจะวิเคราะห์ข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้ Least Significant Difference (LSD)ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน (PG)

การทดลองโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน (PG) ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ แสดงให้เห็นฤทธิ์ของ PG ที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 1526 ที่ก่อโรคในกุ้งได้ ซึ่งเชื้อนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถเรืองแสงได้ โดยทั่วไปเชื้อนี้จะพบในสัตว์ทะเลและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ซึ่งเชื้อนี้ก่อให้เกิดการตายของกุ้งกุลาดำในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย (Kasornchandra *et al.*, 1995) การทดลองนี้จึงทำเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนในการต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

1.1 การทดสอบการต้านเชื้อโดยวิธี Agar diffusion test

ผลของการศึกษาโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน (PG) แสดงให้เห็นว่า PG มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ซึ่งพบว่าเกิดวงใสบนอาหารแข็งที่ทำการทดลองในความเข้มข้นของ PG ที่ 50.0, 25.0, 12.5, 6.3 และ 3.2 mg/ml เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่พบจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ PG ที่ใช้ ดังแสดงตามตารางที่ 1 ซึ่งผลการศึกษาคล้ายกับผลการศึกษาของ Chotigeat *et al.* (2004) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum polycystum* พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 12 mg/ml โดยวิธี agar plate diffusion

1.2 การทดสอบการต้านเชื้อโดยวิธี Broth microdilution test

1.2.1 การหาค่า MIC และ MBC

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 โดยวิธี Broth microdilution test นั้นแสดงตามตารางที่ 2 ซึ่งค่าความเข้มข้นของ PG ในการยับยั้งการเจริญต่ำสุด (MIC) มีค่า 6.3 mg/ml ในอาหารเหลว MHB และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ PG ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) มีค่า 12.5 mg/ml โดยสังเกตจากการไม่เจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลังการ incubate ไว้นานเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 °C (ตารางที่ 2) เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ซัลเฟตจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum polycystum* ที่มีค่า MIC เท่ากับ 12.0 mg/ml (Chotigeat et al., 2004) ในการทดสอบกับโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียน พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนมีฤทธิ์ที่ดีกว่าและสามารถฆ่าเชื้อนี้ได้ในความเข้มข้นต่ำกว่า สำหรับกลไกในการต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ของ PG อาจเกิดจากคุณสมบัติของPG ที่มีความหนืดและเหนียวและเนื่องมาจาก electronegativity ของโมเลกุล polysaccharide rhamnogalacturonan รวมทั้ง neutral sugar side chain ที่จับกับบริเวณผิวเซลล์ด้านนอก (Nantawanit, 2001; Hokputsa, 2004) ส่งผลต่อการทำงานบริเวณด้านนอกของผิวเซลล์ของแบคทีเรียและร่วมกับคุณสมบัติทางกายภาพของ PG ที่มีความเป็นกรดมีค่า pH 2.2-2.6 (Gerddit, 2002) โดยภายในโครงสร้างของ polysaccharide จะประกอบด้วย acidic sugar คือ galacturonic acid ต่อเป็นสายยาวและมีกิ่งเป็น neutral sugars ได้แก่ rhamnose, fructose, glucose, galactose และ arabinose (Hokputsa *et al*, 2004)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนโดยวิธี agar diffusion แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD, Normal saline solution (NSS) เป็น control, NZ = ไม่พบวงใส

Concentration of PG (mg/ml)	Diameter of inhibition zone mean ± SD, mm
50.0	20.43 ± 1.72
25.0	16.47 ± 1.32
12.5	12.15 ± 0.67
6.3	10.70 ± 0.56
3.2	8.88 ± 0.51
NSS	NZ

ตารางที่ 2 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของ PG เปรียบเทียบกับ gentamicin sulfate ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526

Polysaccharide gel (PG)		Gentamicin sulfate	
MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
6.3	12.5	4.0	8.0

โดยปกติเชื้อ *Vibrio harveyi* จะพบได้ในน้ำเค็มแต่มีจำนวนน้อย (Ruby and Nealson, 1978; Shilo and Yetinson, 1979; Lavilla-Pitogo, 1995) หากแต่มีสภาวะที่เหมาะสมเชื้อนี้ก็สามารถเพิ่มจำนวนได้ เช่น ปริมาณวัตถุอินทรีย์สูง, ความเค็มมีค่า 10-60 ppt, อุณหภูมิน้ำมีค่า 25-32 °C, pH น้ำมีค่า 5-9 และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีค่า 0.5-7.8 mg/l แต่ในสภาวะที่มีความเค็มต่ำประมาณ 5 ppt และมี pH ของน้ำสูงประมาณ 9.5 และต่ำประมาณ 3.0 จะยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ นั่นคือหาก pH ของน้ำต่ำลงเชื้อนี้ก็ไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้น PG จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้อาจเนื่องจากความเป็นกรดสูงของ PG ที่ภายในโครงสร้างมี acidic sugar ได้แก่ galacturonic acid

2. Polysaccharide gel additive diet

2.1 ปริมาณสารประกอบในอาหาร

ขนาดต่างๆ ของอาหารเลี้ยงกุ้งแสดงไว้ดังรูปที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงกุ้งแสดงดังตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าอาหารกุ้งไม่มีความแตกต่างของสารอาหารกุ้งพื้นฐาน ยกเว้นปริมาณของ PG ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้ง

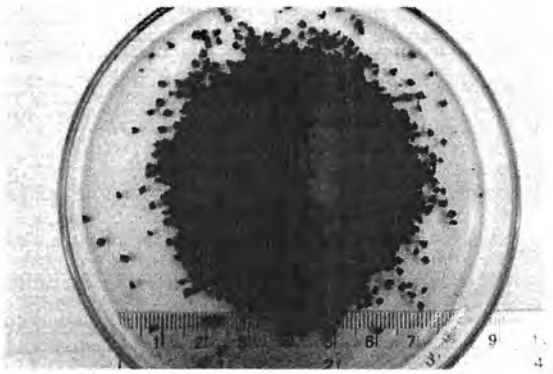
3. Growth performance

เจลโพลีแซคคาไรด์จากทุเรียน (PG) ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของกุ้งกุลาดำ ซึ่งโครงสร้างของ PG ประกอบด้วย long chain acidic sugar, galacturonic acid รวมทั้งมี side chain เป็น neutral sugars ได้แก่ rhamnose, fructose, glucose, galactose and arabinose (Pongsamart, 1998; Hokputsa *et al*., 2004) เจลโพลีแซคคาไรด์จากทุเรียน (PG) มีผลเพิ่มน้ำหนักกุ้งกุลาดำในกลุ่มทดลองที่มีการเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0% และ 2.0% หลังจากเลี้ยงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ และในระยะเวลา 12 สัปดาห์มีผลเพิ่มน้ำหนักกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0% การเพิ่มน้ำหนักของกุ้งไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ไม่มี PG การเจริญเติบโตของกุ้งที่เลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG น้ำหนักตัวของกุ้งจะเพิ่มขึ้น ($P>0.05$) ในกลุ่มที่เติม PG 1.0% เมื่อเทียบกับกลุ่ม control โดยน้ำหนักของกุ้งที่เลี้ยงนาน 84 วันด้วยอาหารที่เติม PG 1.0, 2.0, 3.0% มีค่า 16.75, 17.37, 16.33 และ 16.23 กรัม ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2

ความยาวลำตัวกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0% และ 2% นาน 8 สัปดาห์และในกลุ่มทดลองทั้งหมดที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0-3.0% นาน 12 สัปดาห์ พบว่ามีลำตัวยาวกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แสดงดังรูปที่ 3 ความยาวของลำตัวกุ้งจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ ซึ่งความยาวของลำตัวกุ้งที่เปรียบเทียบเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 0.0, 1.0, 2.0 และ 3.0% นาน 3 เดือนพบว่ามีความยาวเท่ากับ 135.2, 143.7, 143.0 และ 142.0 mm ตามลำดับ ส่วน survival rate, feed conversion ratio (FCR) และ biomass ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในกลุ่มทดลองนาน 8 และ 12 สัปดาห์ แสดงดังรูปที่ 4, 5 และ 6 ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ($P>0.05$) แต่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0% พบว่ามีค่า biomass เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังให้กินอาหารนาน 12 สัปดาห์ โดยค่า biomass ที่เลี้ยงนาน 84 วัน ด้วยอาหารที่เติม PG 0.0, 1.0, 2.0 และ 3.0% เท่ากับ 315.18, 322.88, 302.22 และ 311.56 กรัม ตามลำดับ ซึ่งภาพถ่ายตัวกุ้งทั้งขนาดและความยาวของกุ้งที่เลี้ยงแสดงดังรูปที่ 7

(a)

(b)



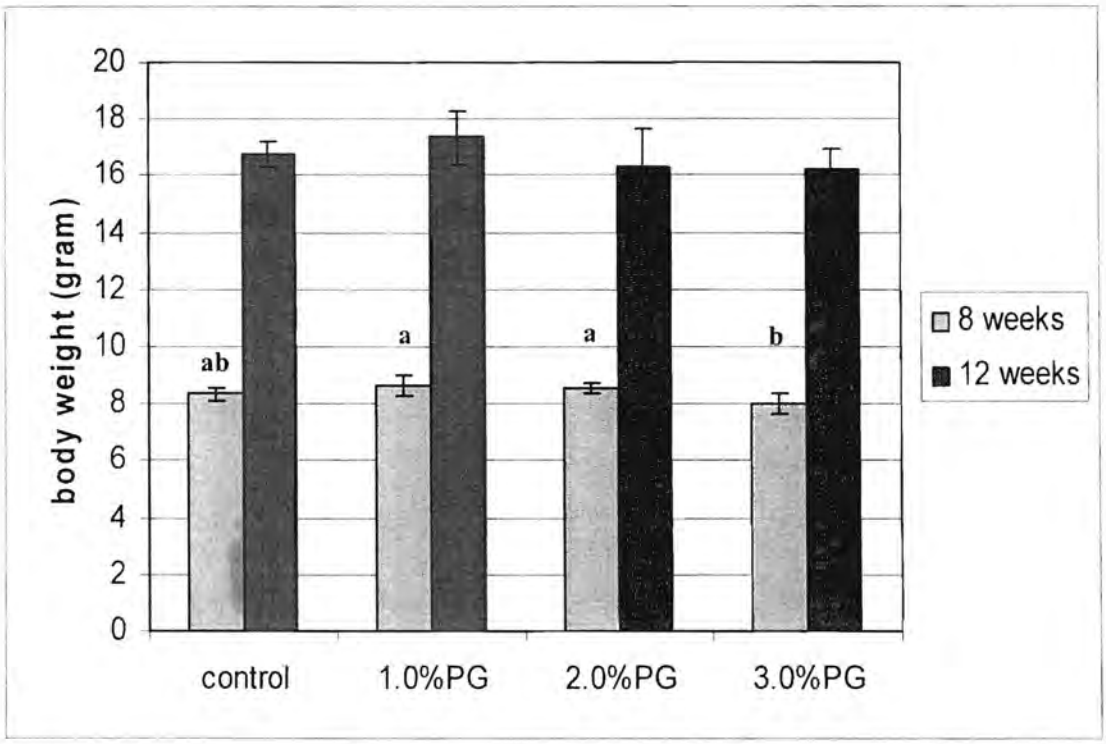
(c)

รูปที่ 1 ขนาดเม็ดของอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากทุเรียน (PG) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยอาหารที่เลี้ยงจะใช้กับกุ้งในช่วงอายุที่ต่างกัน โดยอาหารขนาดเม็ดเล็กผ่านแร่งขนาด 10 mesh (a) จะใช้เลี้ยงลูกกุ้งและอาหารขนาดเม็ดใหญ่ใช้เลี้ยงกุ้งที่มีขนาดใหญ่ผ่านแร่งขนาด 14 mesh (b) และผ่านแร่งขนาด 25 mesh (c) ตามลำดับ

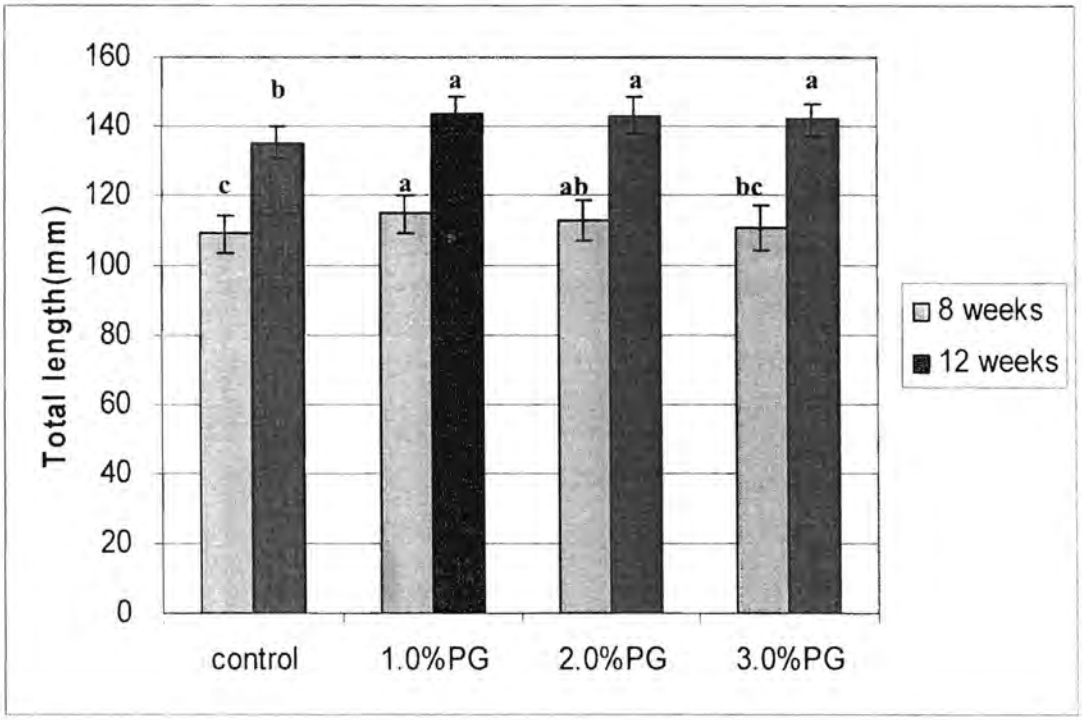
ตารางที่ 3 ปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงกุ้งที่ใช้ในการทดลองและอาหาร base diet เป็น control โดย Control = อาหารที่ไม่เติม PG, 1.0% PG = อาหารที่เติม 1.0% PG, 2.0% PG = อาหารที่เติม 2.0% PG, 3.0% PG = อาหารที่เติม 3.0% PG ปริมาณ calcium และ phosphorus รวมอยู่ในปริมาณ ash

Ingredients	Compositions (g/100g)	Nutritional content of shrimp diet (g/100g)			
		Control	1.0% PG	2.0% PG	3.0% PG
Moisture	9.00	9.13	7.76	8.24	7.33
Protein	40.00	41.00	40.70	40.50	41.10
Fat	6.00	5.94	6.15	5.89	5.96
Fiber	1.50	1.33	1.56	1.46	1.23
Ash	10.00	10.10	10.10	10.10	10.50
Calcium	(1.50)	(1.97)	(1.87)	(1.93)	(1.84)
Phosphorus	(1.50)	(1.40)	(1.40)	(1.50)	(1.62)
Total carbohydrate	33.50	32.50	33.73	33.81	33.88
PG (g in 100 g diet)	0-3.00	0.00	1.00	2.00	3.00

ผลใกล้เคียงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่า 1.0% ความชื้นน้อยกว่า 10.0%

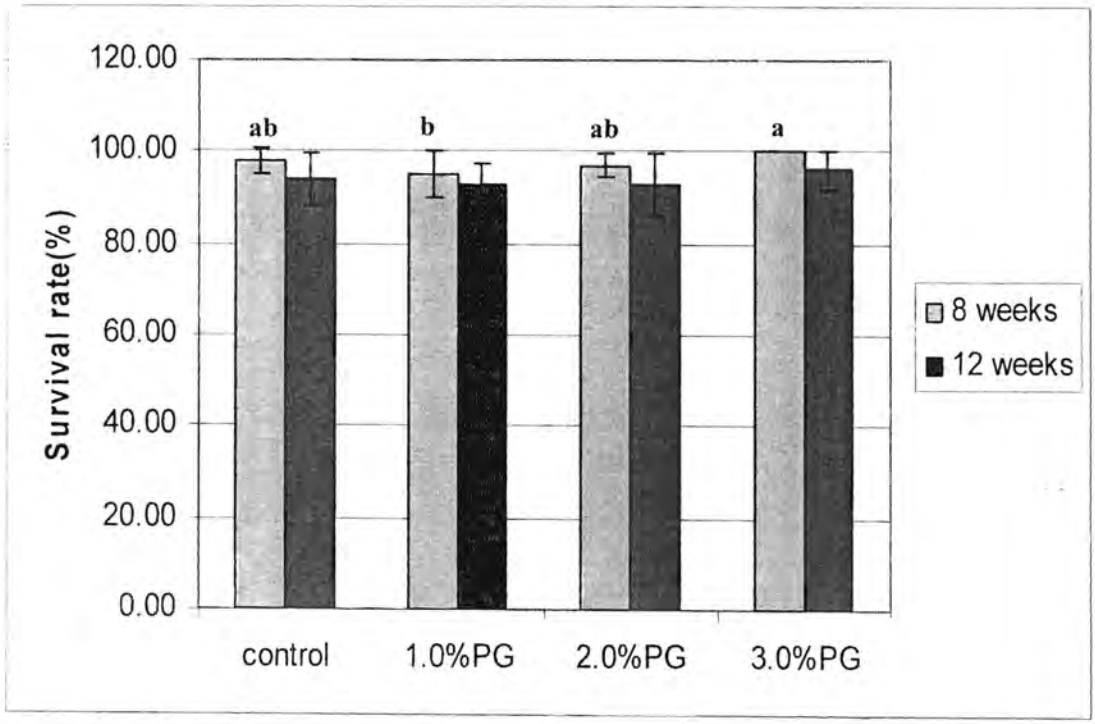


รูปที่ 2 น้ำหนักตัวของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติมโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนนาน 8 และ 12 สัปดาห์ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, control = 0% PG

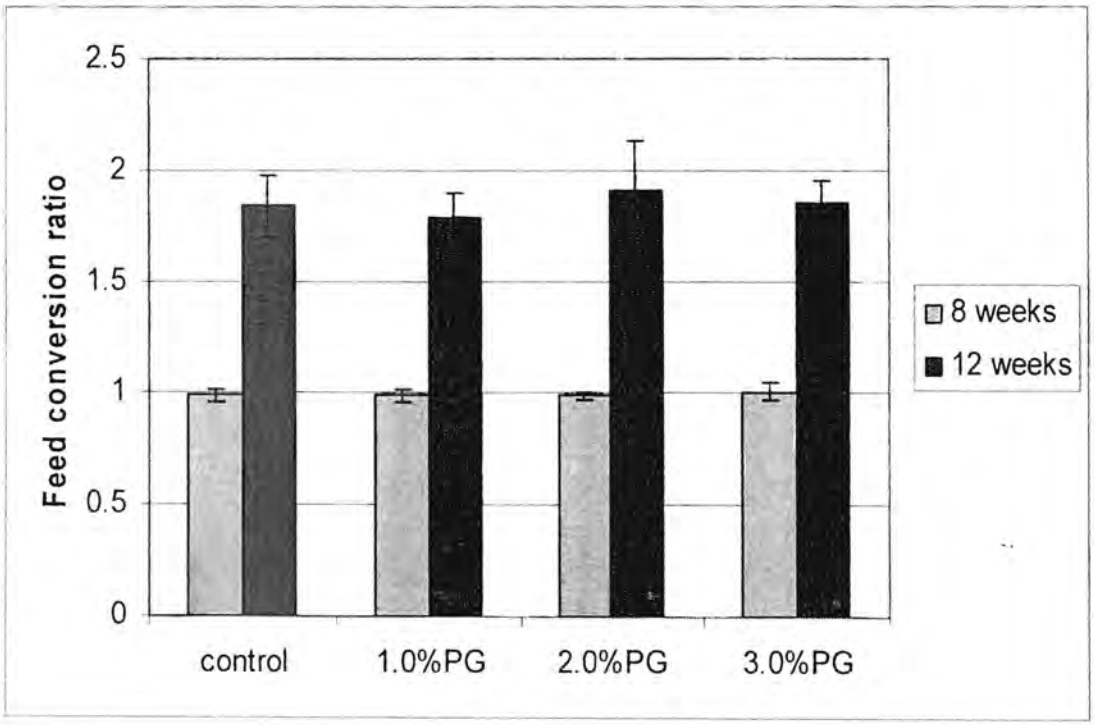


รูปที่ 3 ความยาวของลำตัวกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทีมีเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 8 และ 12 สัปดาห์ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), control = 0% PG

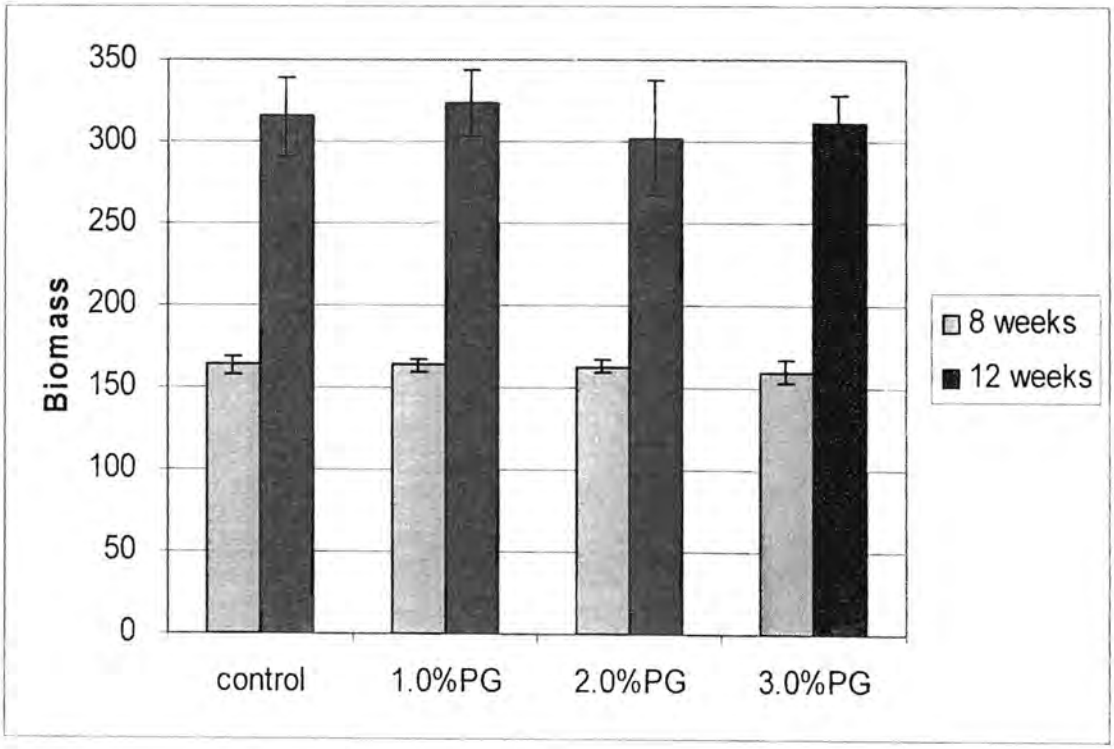
a, b = กลุ่มการทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ, ($P<0.05$)



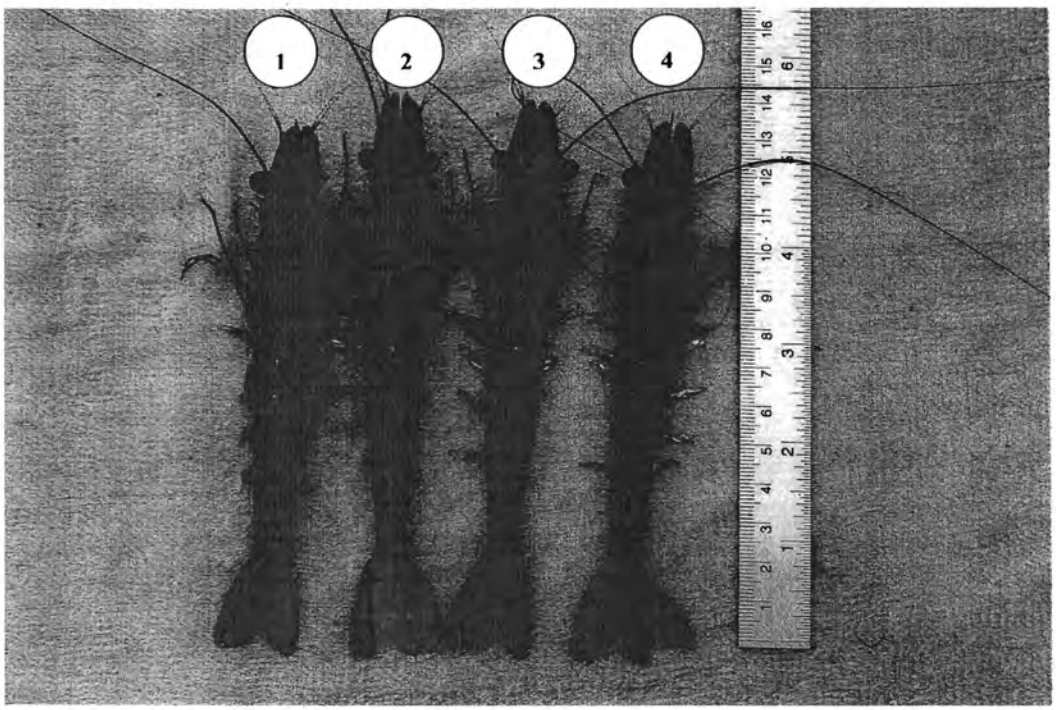
รูปที่ 4 อัตราการรอดชีวิต (survival rate) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD), control = 0% PG



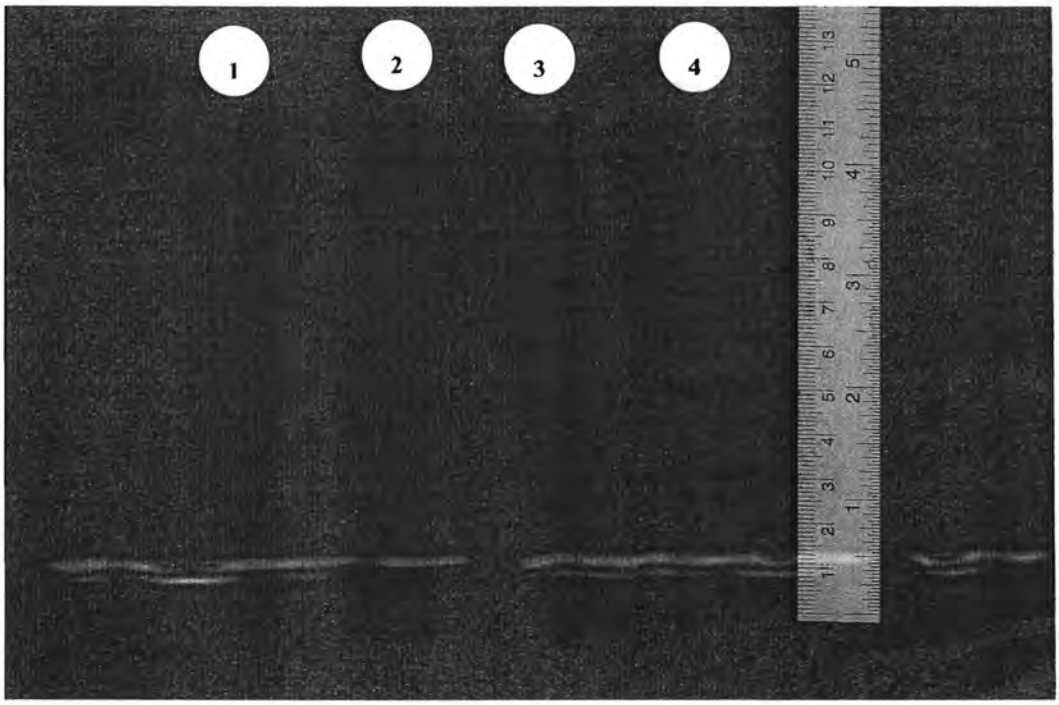
รูปที่ 5 ค่า Feed conversion ratio (FCR) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD), control = 0% PG ค่า FCR ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 6 ค่า Biomass ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 และ 12 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD), control = 0% PG ค่า biomass ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



(a)



(b)

รูปที่ 7 ขนาดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 8 (a) และ 12 (b)สัปดาห์ ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยหมายเลข 1 = 0% PG, 2 = 1.0% PG, 3 = 2.0% PG and 4 = 3.0% PG.

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม 3.0% PG มีการเพิ่มของน้ำหนักตัวและ biomass ลดลง เนื่องมาจาก PG ที่ความเข้มข้นสูง 3% มีความหนืดสูงอาจมีผลทำให้ลดการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ทางเดินอาหารต่ำลง ซึ่งอัตราในการดูดซึมอาหารจะขึ้นกับอัตราการดูดซึมของอาหารเข้าสู่ epithelium cell ดังนั้น PG ที่มีความเข้มข้นสูงอาจจะทำให้การดูดซึมอาหารเกิดได้ต่ำลงทำให้อัตราของการดูดซึมอาหารต่ำลงด้วย และยังส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของอาหารอยู่ในกระเพาะเป็นเวลานานแต่การดูดซึมต่ำอีกด้วย ซึ่งสรุปภาพรวมของการเพิ่มน้ำหนักของกุ้งและความยาวตัวกุ้งแสดงไว้ในตารางที่ 4 และค่า survival rate, biomass และ FCR สรุปไว้ในตารางที่ 5

ดังนั้นจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงกุ้งช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตกุ้งได้ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งแสดงออกมาเป็นค่าน้ำหนักตัวและ biomass ที่เพิ่มขึ้นของกุ้งกุลาดำที่ศึกษาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

4. ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory effects)

เจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งพบว่ามีผลในการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ จากการศึกษาของกลุ่มทดลองที่เติม PG พบว่ามีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของกุ้งกุลาดำและความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสก่อโรคได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมการทดลอง จากผลนี้ชี้ให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงกุ้งที่มีการเติม PG จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งและเพิ่มความต้านทานต่อการเกิดโรคของกุ้งกุลาดำต่อเชื้อไวรัส WSSV และเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 1526 ซึ่งเชื้อทั้งสองนี้เป็นเชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดการตายของกุ้งกุลาดำในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ในสัตว์น้ำตระกูล crustacean จะเกิดกระบวนการ melanization ขึ้นเมื่อระบบการปกป้องเซลล์เริ่มขึ้น เอนไซม์ prophenoloxidase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ melanin ซึ่งจะเกิดขึ้นในน้ำเลือด โดยเอนไซม์ prophenoloxidase (proPO) จะเข้าไปกระตุ้นเอนไซม์ phenoloxidase (PO) ให้ไปกระตุ้นเอนไซม์ serine protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ (Söderhäll and Cerenius, 1998 and 2004)

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งที่เติม PG ที่ความเข้มข้น 1.0-3.0% มีการเพิ่ม activity ของเอนไซม์ proPO และในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0 และ 2.0% พบว่าทำให้เพิ่มค่าปริมาณเม็ดเลือดโดยรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมการทดลอง (control) อย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ (ดังแสดงไว้ในรูปที่ 8 และ 9) และแสดงค่าต่าง ๆ สรุปไว้ในตารางที่ 6 ซึ่งจากผลนี้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าอาหารที่ผสม PG จะช่วยเพิ่ม activity ของเอนไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ในส่วนของเม็ดเลือดนั้นจะมีความสำคัญต่อกลไกของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันรวมถึงเกี่ยวข้องกับการ clotting, non-self recognition, phagocytosis, melanization, encapsulation, cytotoxicity และ cell-to-cell communication (Söderhäll, 1999) ในกระบวนการสร้าง melanin นั้นเม็ดเลือดจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ผ่านทาง prophenoloxidase (proPO) system โดย semi-granular และ granular cells จะช่วยในการทำหน้าที่ของ proPO system (Johansson and Söderhäll, 1989) ในส่วนของเอนไซม์ phenoloxidase จะเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายใน proPO system ซึ่งจะถูกกระตุ้นด้วยสารพวก polysaccharides ได้ (Sritunyalucksana, *et al.*, 1999)

ตารางที่ 4 สรุปผลของ PG ต่อการเพิ่มน้ำหนักตัวกุ้งและความยาวตัวกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimps) หลังการเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งผสม PG เป็นเวลานาน 8 และ 12 สัปดาห์ แสดงผลค่า mean ± SD

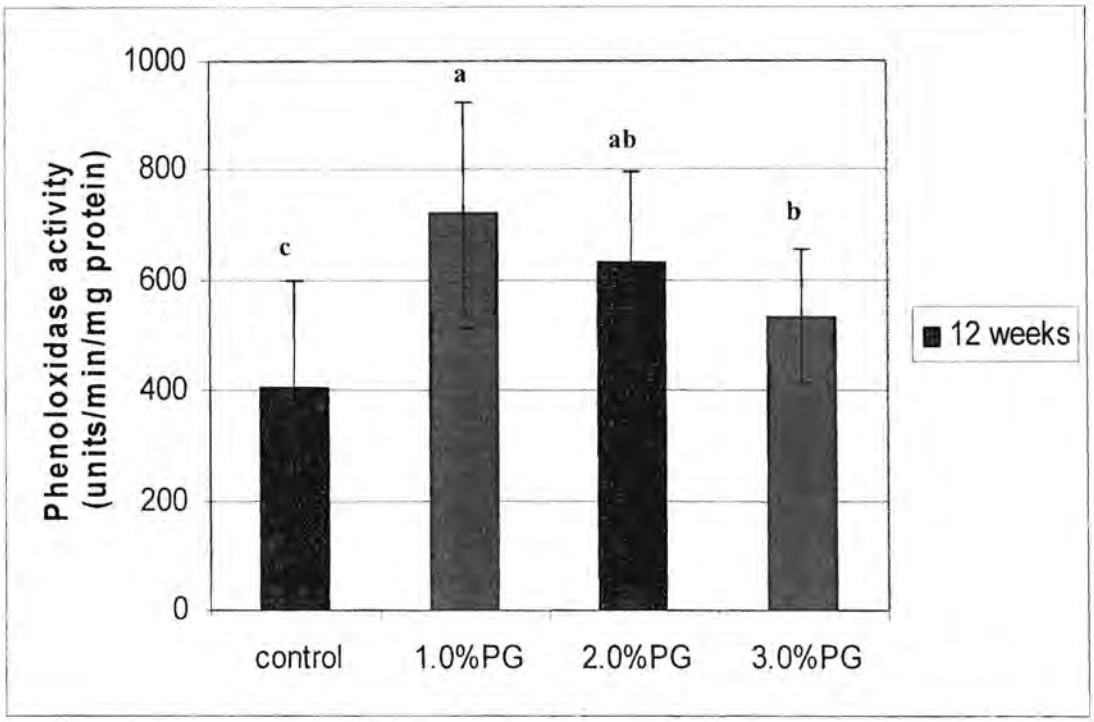
Group	Body weight gain (g)		Total length (cm)	
	8 week	12 week	8 week	12 week
0%PG	8.05 ± 0.19^{ab}	16.46 ± 0.47	7.26 ± 0.54^{c}	9.88 ± 0.46^{c}
1%PG	8.34 ± 0.34^{a}	17.08 ± 0.95	7.84 ± 0.54^{a}	10.73 ± 0.50^{a}
2%PG	8.30 ± 0.17^{a}	16.04 ± 1.31	7.67 ± 0.56^{ab}	10.66 ± 0.54^{ab}
3%PG	7.72 ± 0.34^{b}	15.94 ± 0.69	7.45 ± 0.65^{bc}	10.56 ± 0.47^{a}

a,b และ c = กลุ่มทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 5 สรุปผลของ PG ต่อ survival rate, FCR และ biomass ในกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimps) หลังการเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งผสม PG เป็นเวลานาน 8 และ 12 สัปดาห์ แสดงผลค่า mean ± SD

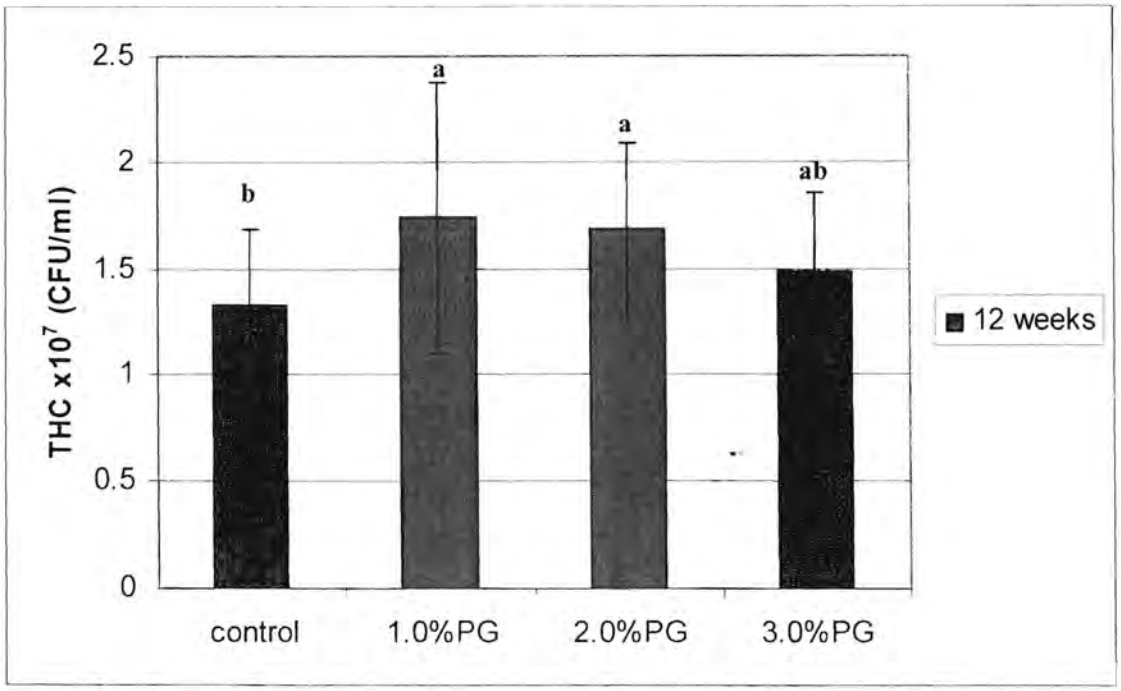
Group	survival rate (%)		Biomass (g)		FCR	
	8 week	12 week	8 week	12 week	8 week	12 week
0% PG	98.00 ± 2.74^{ab}	94.00 ± 5.48	163.44 ± 4.99	315.18 ± 23.82	0.99 ± 0.03	1.84 ± 0.14
1% PG	95.00 ± 5.00^{b}	93.00 ± 4.47	163.76 ± 4.06	322.88 ± 20.10	0.99 ± 0.03	1.79 ± 0.11
2% PG	97.00 ± 2.74^{b}	93.00 ± 6.71	166.69 ± 4.33	302.22 ± 35.31	0.99 ± 0.02	1.91 ± 0.22
3% PG	100.00 ± 0.00^{a}	96.00 ± 4.18	160.08 ± 6.73	311.56 ± 16.07	1.01 ± 0.04	1.85 ± 0.10

a,b และ c = กลุ่มทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 8 Total phenoloxidase activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน (PG) โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), Control = 0% PG.

a, b, c = ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองที่ความเชื่อมั่น $P < 0.05$



รูปที่ 9 Total hemocyte count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 12 สัปดาห์ด้วยอาหารที่เติมเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน (PG) โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), Control = 0% PG.

a, b, c = ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองที่ความเชื่อมั่น $P < 0.05$

ตารางที่ 6 ผลของ PG ต่อภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งหลังกินอาหารผสม PG เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ แสดงค่า mean ± SD

Immunity tests	Shrimp number	Control (0% PG)	Shrimp basal diet with PG		
			1% PG	2%PG	3%PG
THC ($x10^7$ cells/ml)	15	1.33 ± 0.36^{b}	1.74 ± 0.64^{a}	1.68 ± 0.41^{a}	1.48 ± 0.37^{ab}
ProPO activity (units/mins/mg protein)	15	405 ± 195.19^{c}	721.08 ± 205.27^{a}	633.80 ± 164.99^{ab}	534.66 ± 120.88^{b}

a,b และ c = กลุ่มทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0-3.0% แสดงค่าเพิ่มขึ้นของ activity ของเอนไซม์ phenoloxidase ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0 และ 2.0% แสดงค่าเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือด ($P < 0.05$) มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 8 และ 9 ตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดโดยรวม (THC) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงนาน 90 วันที่อุณหภูมิ 24.2-27.5 °C ในระบบน้ำวนแบบปิด นับจำนวนของเม็ดเลือดโดยใช้ haemocytometer (Rukpratanporn ,1999) เคยมีรายงานว่ามีค่าอยู่ที่ $1.35 \pm 0.56 \times 10^7$ cells/ml นอกจากนี้ Lee และ Siau (2004) ได้วัดค่า THC ของกุ้งที่เลี้ยงนาน 49 วัน ที่อุณหภูมิ 24.2-27.5 °C ใน aquarium tank พบว่ามีค่า $1.52 \pm 3.69 \times 10^7$ cells/ml ซึ่งจากผลทั้งหมดชี้ให้เห็นถึงผลของ PG ต่อการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลดำซึ่งแสดงจากค่า total hemocytes ที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมและ activity ของเอนไซม์ prophenoloxidase มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม

5. Challenge test

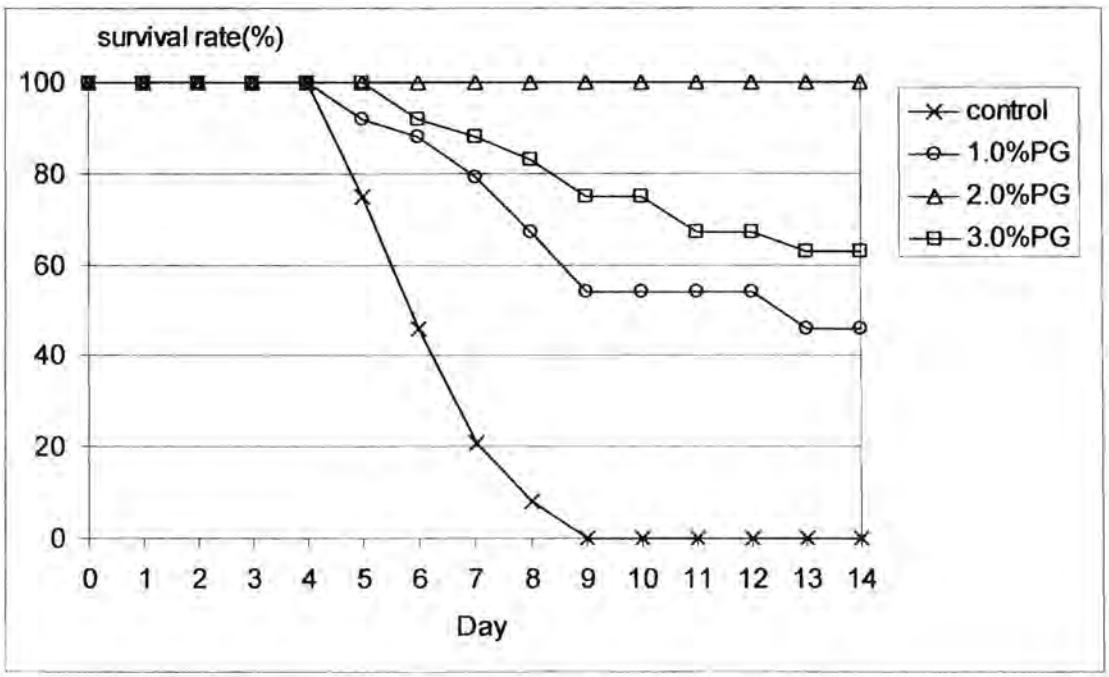
5.1 WSSV Challenge test by cohabitation method

ผลการศึกษาดังรูปที่ 10 แสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งผสม PG นาน 12 สัปดาห์ และให้ติดเชื้อไวรัสด้วยเชื้อ WSSV 10^6 cells/ml (1:30 dilution) ด้วยวิธี cohabitation method แสดงด้วยค่า relative percent survival (RPS) จะบ่งบอกถึงความต้านทานต่อเชื้อ WSSV โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0, 2.0 และ 3.0 % แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม การทดลอง(control) หลังจากการให้ติดเชื้อนาน 9 วัน ซึ่งกุ้งในกลุ่มควบคุมจะตายหมดหรือมีอัตราการรอดชีวิตลดลงจนเท่ากับ 0 ส่วนกลุ่มทดลองที่เลี้ยงกุ้งนาน 12 สัปดาห์ด้วยอาหารที่มี PG 1.0, 2.0 และ 3.0% ก่อนเริ่มการทดลองให้ติดเชื้อ และพบว่าเมื่อให้ติดเชื้อจะมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 76, 100 และ 83% ตามลำดับ ดังสรุปไว้ในตารางที่ 7 และในทิศทางที่สอดคล้องกันผลของการต้านทานต่อโรคของกุ้งกุลาดำต่อเชื้อ WSSV ด้วยวิธี cohabitation method ในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี PG 1.0, 2.0 และ 3.0% ก่อนการทำให้ติดเชื้อ 12 สัปดาห์ พบว่ามีค่า percent mortality ที่ต่ำกว่าค่าที่พบในกลุ่ม control ในวันที่ 6 หลังจากการให้ติดเชื้อ ซึ่งค่า mortality (%) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี PG 1.0, 2.0 และ 3.0% นาน 12 สัปดาห์มีค่า 13, 0 และ 9% ตามลำดับ

การเลี้ยงด้วยอาหารที่มี PG ก่อนนาน 12สัปดาห์ แล้วทำให้ติดเชื้อ WSSV พบว่าให้ค่า RPS สูงไม่น้อยกว่าเกณฑ์ 60% ซึ่งถือได้ว่าเป็น fish vaccines ที่มีประสิทธิภาพ (Amend. 1981) พบว่าค่า RPS ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี PG 1-3% มีค่าสูงกว่า 60% ต่อเชื้อ WSSV จึงถือได้ว่า PG เป็นสารที่ช่วยในการต้านทานต่อเชื้อ WSSV โดยไปเพิ่มระบบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในการต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำได้

5.2 *Vibrio harveyi* 1526 challenge test by immersion method

ผลของการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของกุ้งต่อการทำให้ติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526, ขนาด 1.47×10^6 CFU/ml ด้วยวิธี immersion method ในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0, 2.0 และ 3.0% นาน 12 สัปดาห์ก่อนการให้เชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุมการทดลอง (control) ได้ผลแสดงดังรูปที่ 11 หลังจากทำให้ติดเชื้อแบคทีเรียนาน 4 วัน ทำการคำนวณค่าที่แสดงถึงความต้านทานต่อการเกิดโรคต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 แสดงเป็นค่า relative percent survival (RPS) และ percent mortality (ตารางที่ 8) ของกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0, 2.0 และ 3.0% ซึ่งมีค่า RPS values ที่ 31, 36 และ 22% ตามลำดับ

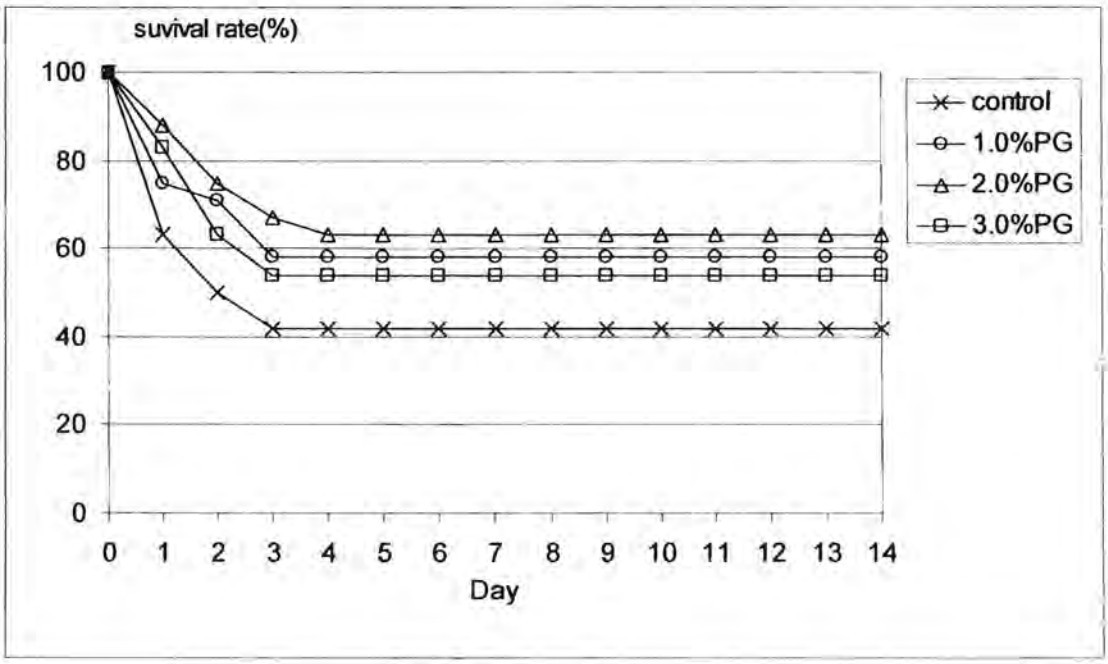


รูปที่ 10 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำที่ให้ติดเชื้อ WSSV โดยวิธี cohabitation method หลังจากที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่มี PG ที่ความเข้มข้น 1-3% นาน 12 สัปดาห์ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ซ้ำและ control คือ อาหารเลี้ยงกุ้งที่ไม่มี PG

ตารางที่ 7 ค่า Relative percent survival (RPS) และ percent mortality ของกุ้งกุลาดำที่ทำให้ติดเชื้อ WSSV โดยวิธี cohabitation method มีค่า Cumulative mortality และ RPS หาได้ในวันที่ 6 ของการให้ติดเชื้อหลังจากเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารกุ้งที่มี PG นาน 12 สัปดาห์ โดยกลุ่ม Control ให้ 0.0% PG. n = จำนวนกุ้งที่ใช้ในการทดลองในแต่ละการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

Shrimp group	Mean of dead shrimp/n	Mortality (%)	RPS (%)
Control	4.3/8	54^{a}	0^{c}
1.0% PG	1.0/8	13^{b}	76^{b}
2.0% PG	0.0/8	0^{c}	100^{a}
3.0 %PG	0.7/8	9^{bc}	83^{b}

a,b และ c = กลุ่มทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 11 อัตราการรรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ขนาด $1.47x10^6$ CFU/ml ด้วยวิธี immersion method หลังเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG ที่ความเข้มข้น 1-3% นาน 12 สัปดาห์ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ซ้ำและ control คืออาหารเลี้ยงกุ้งที่ไม่มี PG

ตารางที่ 8 Relative percent survival (RPS) ของกุ้งกุลาดำต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ด้วยวิธี immersion method โดยค่า Cumulative mortality และ RPS จะวิเคราะห์ในวันที่ 4 ของการติดเชื้อ โดย Control = 0.0% PG. n = จำนวนกุ้งที่ใช้ในการทดลองในแต่ละการทำ 3 ซ้ำ

Shrimp group	Mean of dead shrimp/n	Mortality (%)	RPS (%)
Control	4.7/8	59^{a}	0
1.0% PG	3.3/8	41^{ab}	31
2.0% PG	3.0/8	38^{b}	36
3.0 %PG	3.7/8	46^{ab}	22

a,b และ c = กลุ่มทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ขณะที่มี percent mortality เท่ากับ 59% ในกลุ่ม control ซึ่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ให้กินอาหารผสม PG มีค่า mortality (%) ที่ 41, 38, และ 46% ในกลุ่ม 1, 2 และ 3% PG ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ค่า relative percent survival (RPS) ควรสูงไม่น้อยกว่าเกณฑ์ 60% จึงจะถือว่าเป็น fish vaccines ที่มีประสิทธิภาพ (Amend, 1981) ซึ่งการทดลองพบว่าค่า RPS ของอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติม PG 2.0% มีค่าสูงที่สุดกว่ากลุ่มอื่นๆ อยู่ที่ 36% ในส่วนของอาหารที่เติม PG 1.0% มีค่า RPS เท่ากับ 31% (ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ 60%) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0% ขณะที่มี percent mortality เท่ากับ 59% หลังจากให้ infect นาน 4 วัน ผลของการต้านทานการเกิดโรคต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงกุ้งที่เติม PG 1.0-2.0% ก่อนการให้ติดเชื้อ นาน 12 สัปดาห์ พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งได้ในระดับปานกลาง (เนื่องจากมีค่า RPS ต่ำกว่า 60%)

สรุปผลการทดลอง

เจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จะช่วยในการกระตุ้นการเจริญของกุ้งซึ่งพิจารณาจากการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและ biomass ซึ่งกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0% จะเพิ่มน้ำหนักตัวและ biomass มากขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่ม control เมื่อเลี้ยงกุ้งนาน 12 สัปดาห์ ส่วนความยาวของลำตัวกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0-3.0% พบมีความยาวเพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ในส่วนของค่าอัตราการรอดชีวิตและ feed conversion ratio (FCR) ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG พบว่าไม่มีความแตกต่างเทียบกับกลุ่ม control

ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งนั้น พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่เติมลงในอาหาร ช่วยเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม PG 1.0 และ 2.0% นาน 12 สัปดาห์เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มี PG ในส่วนของ activity ของเอนไซม์ prophenoloxidase ของกุ้ง ด้วยอาหารที่เติม PG 1.0-3.0% นาน 12 สัปดาห์ มีค่าสูงกว่ากลุ่ม control ที่ไม่เติม PG นอกจากนี้เจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่เติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้ง 1.0 และ 2.0% เมื่อทำให้ติดเชื้อ พบว่าการกินอาหารกุ้งที่ผสม PG จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและเพิ่มความต้านทานของกุ้งกุลาดำต่อโรคจากเชื้อ *Vibrio harveyi* 1526 และ white spot syndrome virus (WSSV)

เอกสารอ้างอิง

Amend, D. F. 1981. Potency testing of fish vaccines. In D. P. Anderson, and W. Hennessen (eds.), Fish biologics : serodiagnostics and vaccines. Developments in biological standardization, pp. 447-454. Basel, Switzerland: S. Karger.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J.M. *et al.* 1994. Biology of Microorganisms. 7 th ed., pp.118-124. Prentice Hall: Englewood Cloffs, N. J. USA.

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., and Lian, I.C. 2003. Dietary β-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol. 15 : 297-310.

Chansiripornchai, P., Pongsamart, S., Nakchat, O. *et al.* 2005. The efficiency of polysaccharide gel extracted from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.) for wound healing in pig skin. Acta Hortic. 679 : 37-43.

Cheng, W., Liu, C.H., Yeh, S.T., and Chen, J.C. 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 17 : 41-51.

Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. *et al.* 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture. 233: 23-30.

Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K., and Phongdara, A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture. 233 : 23-30.

Gerddit, W. 2002. Polysaccharide gel from dried fruit-hulls of durian as dressing-patch. Master'thesis. Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University.

Hokputsa, S., Gerddit, W., Pongsamart, S. *et al.* 2004. Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from the rinds of durian (*Durio zibethinus* L.): isolation, fraction, characterization and bioactivity. Carbohydrate polymers. 56: 471-481.

Itami, T., Asano, M., Tokushige, K. *et al.* 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture, 164 : 277–288.

Itami, T., Takahashi, Y., Tsuchihira, E. *et al.* 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn Penaeus japonicus and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β-1,3-glucan (Schizophyllan), L.M. Chou, A.D. Munro, T.J. Lam, T.W. Chen, L.K.K. Cheong, J.K. Ding, K.K. Hooi, H.W. Khoo. V.P.E. Phang, K.F. Shim, C.H. Tan, Editors , *The 3rd Asian fisheries forum*, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines , pp. 375–378.

Johansson, M. W., and Söderhäll, K. 1989, Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitol Today. 5: 171-176.

Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S., Aekpatithanpong, U. *et al.* 1995. Mass mortality caused by systemic bacilliform virus in cultured penaeid shrimp, *Penaeus monodon*, in Thailand. Asian Shrimp News. 5(2): 2-3.

Lavilla-Pitogo, C. R. 1995. Bacterial diseases of penaeid shrimp: an Asia view. In M. Shariff, J. R. Arthur, and R. P. Subasinghe (eds.), Diseases in Asia Aquaculture II, pp. 107-121. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society.

Lee, M. H., and Shiau, S. Y. 2004. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon* and effects on non-specific immune responses *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology. 16: 475-485.

Lipipun, V., Phaunfoong, T., Ajariyakajorn, K., Pongsamart, S. 2006. *In vitro* inhibitory activity of antibacterial polysaccharide from durian-rinds against field isolates of mastitis causing bacteria in dairy cows. Acta Pharmacol Sin Suppl. 1 : 54.

Lorian, V. 1991. Antibiotics in laboratory medicine. 3 rd ed., pp.739-786. London: Williams & Wilkins.

Nantawanit, N. 2001. Antimicrobial property of polysaccharide gel from durian fruit-hulls. Master'thesis. Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University.

Pongsamart, S., and Panmaung, T. 1998. Isolation of polysaccharides from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.). Songklanakarin Journal Science and Technology. 20(3): 323-332.

Pongsamart, S., Lipipun, V., Jesadanont, S. *et al.* 2006. Antimicrobial polysaccharide of durian-rind and natural essential oils combination in an effective non-alcoholic antiseptic lotion for hands. Planta Med. 72 : 996.

Pongsamart, S., Lipipun, V., Nantawanit, N., Lertchaiporn, L. 2005. Novel watersoluble antibacterial dressing of durian polysaccharide gel. Acta Hortic. 678: 65-73.

Pongsamart, S., Sukrong, S., Tawatsin, A. 2001. The determination of toxic effects at a high oral dose of polysaccharide gel extracts from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.) in mice and rats. Songklanakarin J Sci Technol. 23 : 55–62.

I 26981130

Pongsamart, S., Tawatsin, A., Sukrong, S. 2002. Long-term consumption of polysaccharide gel from durian fruit-hulls in mice. Songklanakarin J Sci Technol. 24 : 649–661.

Ruby, E. G., and Nealson, K. H. 1978. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in near shore seawater. Limmology and Oceanography. 23: 530-533.

Rukpratapom, S. 1999. Immunoenhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by *Bacillus* strain S11. Master thesis. Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University.

Shilo, M., and Yetinson, T. 1979. Physiological characteristics underlying the distribution patterns of luminous bacteria in the Mediterranean Sea and the Gulf of Elat. Applied and Environmental Microbiology. 38: 577-584.

Söderhäll, K. 1999. Invertebrate immunity. Developmental and Comparative Immunology. 23: 263-266.

Söderhäll, K., and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology. 10: 23-28.

Söderhäll, K., and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate. Immunology Reviews. 198: 116-126.

Söderhäll, K., and Cerenius, L. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology. 10: 23-28.

Söderhäll, K., and Smith, V. J. 1983. Separation of hemocyte populations of *Carcinus maenus* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. Developmental and Comparative Immunology. 7: 229-239.

Söderhäll, K., and Unestam, T. 1979. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. Canadian Journal of Microbiology. 25: 406-414.

Sritunyalucksana, K., Sithisarn, P., Withayachumnarkul, B. *et al.* 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in hemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. Fish and Shellfish Immunology. 9: 21-30.

Takahashi, Y., Kondo, M., and Itami, T. 2000. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in hemolymph of kuruma shrimp, *Peneaus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). Fish Shellfish Immunol. 10 : 555–558.

Tinmamee, R., Vayumhasuwan, P., Pongsamart, S. 2006. Release characteristic (*in vitro*) of triamcinolone from mucoadhesive films of natural polymer from durian-rinds. In: Proceedings of the 33rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. 22–26 July 2006, Vienna, Austria, p. 65.

Wu, J. L., Nishioka, T., Mori, K. *et al.* 2002. Preparation of an inoculum of white spot syndrome virus for challenge tests in *Penaeus japonicus*. Fish Pathology. 37: 65-69.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

แผนงานวิจัยเรื่อง

ฤทธิ์ชีวภาพและการใช้ประโยชน์ของเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนด้านการต้านสารก่อมะเร็ง การปรับภูมิคุ้มกันและต้านแบคทีเรีย

โครงการวิจัยที่ 2

ผลของสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกผลทุเรียนต่อระบบภูมิคุ้มกันและการลดโคเลสเตอรอลในไก่

โดย

รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย

รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย

และรองศาสตราจารย์ ภญ.ดร.สุนันท์ พงษ์สามารถ

กันยายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และความอนุเคราะห์และร่วมมือจากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อแผนงานวิจัย	ฤทธิ์ชีวภาพและการใช้ประโยชน์ของเจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนด้านการต้านสารก่อมะเร็ง การปรับภูมิคุ้มกันและด้านแบคทีเรีย
ชื่อโครงการ	ผลของสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกผลทุเรียนต่อระบบภูมิคุ้มกันและการลดโคเลสเตอรอลในไก่
ชื่อผู้วิจัย	นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย, ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย และสุนันท์ พงษ์สามารถ
เดือน-ปีที่วิจัยเสร็จ	30 กันยายน 2554

บทคัดย่อ

ไก่เนื้อกินสารโพลีแซคคาไรด์เจล (PG) ที่ให้ผสมกับอาหารเลี้ยงไก่ PG สกัดจากเปลือกของผลทุเรียน (*Durio zibethinus*) เป็นสารเพคติคโพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันและต้านแบคทีเรียได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการประเมินประสิทธิภาพของ PG ในฐานะอาหารเสริม ในด้านการเพิ่มน้ำหนัก อัตราแลกเนื้อ การลดโคเลสเตอรอล การลดจำนวนแบคทีเรียโดยรวมและซัลโมเนลลาในมูลของไก่เนื้อ ไก่เนื้อจำนวน 80 ตัว แบ่งไก่ออกโดยสุ่มเป็น 4 กลุ่มๆละ 2 ซ้ำ ไก่กลุ่มทดลองให้อาหารที่เคลือบด้วย PG ในอัตราส่วน 1, 2 และ 3 กรัมต่อ 100 กรัมอาหารไก่ ตามลำดับ และไก่กลุ่มควบคุมให้อาหารพื้นฐานที่ไม่เสริม PG เป็นเวลา 42 วัน ไก่ทุกตัวได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลและเบอร์ซาอักเสบติดต่อ ทำการบันทึกน้ำหนักตัวไก่ ปริมาณอาหารที่กิน เพื่อใช้คำนวณน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราแลกเนื้อ(FCR) เก็บตัวอย่างมูลไก่สดทุก 1 สัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง เพื่อตรวจหาจำนวนแบคทีเรียโดยรวมและซัลโมเนลลาในมูลไก่สด ทำการเจาะเลือดไก่ทุก 1 สัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง เพื่อศึกษาผลของ PG ต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล และเบอร์ซาอักเสบติดต่อ เมื่อสิ้นสุดการทดลองสุ่มไก่เพื่อทำการการุณยฆาต ทำการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลในเนื้อหน้าอกไก่ ที่อายุ 42 วัน และในพลาสมา ที่อายุ 1 วันและ 42 วัน ด้วยวิธี HPLC พบว่า PG ไม่มีผลต่อความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักไก่ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ที่อายุ 42 วันไก่กลุ่มที่ได้รับ PG มีค่า FCR น้อยกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับ PG อย่างไม่มีนัยสำคัญ ไก่ทดลองกลุ่มที่ได้รับ PG พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 มีจำนวนแบคทีเรียโดยรวมในมูลไก่สดลดลง 81-97 % อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับไก่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ PG ปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาลดลงอย่างและมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาในสัปดาห์ที่ 6 อีกทั้งไก่กลุ่มที่ได้รับ 3%PG ในอาหารมีปริมาณโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่น้อยกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับ PG อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า PG ซึ่งผสมในอาหารพื้นฐานไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต ต่อการเพิ่มน้ำหนักและค่า FCRของไก่ แต่ช่วยลดจำนวนแบคทีเรียโดยรวมและซัลโมเนลลาในมูลไก่สดได้ดี ไก่ที่กินอาหารที่ผสม 3%PG จะมีปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้ออกไก่ต่ำกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับ PG ดังนั้นอาจใช้ประโยชน์ของ PG เป็นสารช่วยเสริมในอาหารไก่เพื่อช่วยเพิ่มการตอบสนองภูมิคุ้มกันของไก่และเสริมสุขภาพในไก่เนื้อได้

Research Plan	Bioactivity and uses of polysaccharide gel from durian fruit-rinds as antimutagen, immunomodulator and antibacteria
Project Title	Effects of polysaccharide gel extracted from durian fruit-rinds on immune system and cholesterol reduction in chickens
Name of the Investigators	Niwat Chansiripornchai, Piyarat Chansiripornchai and Sunanta Pongsamart
Year	30 September, 2011

Abstract

Broiler chickens were fed with polysaccharide gel (PG) mixed in chicken feed. PG extracted from fruit-rind of durian (*Durio zibethinus* Murr.) is a pectic polysaccharide having the immunomodulating and antibacterial activity. The objective of this study was to evaluate the efficacy of PG as a feed-supplement diet on weight gain, fed conversion ratio (FCR), reduction of cholesterol, reduction of total bacterial count and Salmonella bacterium in feces of broiler chickens. Eighty of 1 day old broiler chicks were randomly divided into 4 groups of 2 replicates each. Experimental groups fed commercially available broiler diet coated with PG 1, 2 and 3 g/100 g diet, respectively, and control group fed basal broiler diet without PG for 42 days. All chickens were vaccinated with Newcastle and Infectious bursal disease vaccines. Chickens weights were measured and feed intake was recorded, weight gains and FCR were calculated. Feces were sampled every week until the end of experiment to evaluate the total bacterial count and Salmonella bacterium colony. Chicken blood was withdrawn every week to examine the immune response against Newcastle and Infectious bursal disease. At the end of experiment, chickens were euthanized. Cholesterols in chest muscles at 42 days old and plasma at 1 and 42 days old were analyzed by HPLC method. PG did not affect on chicken weight gains in treated groups, total weight gain in treatment groups were not significantly different from that of the control group. FCR values at 42 days old of PG treatment groups were not significantly lower than that of the control group. At 4 weeks old, total bacterial counts in chicken feces were significantly reduced and exhibited 81-97 % reduction in treated groups comparing to the control group. The Salmonella bacterium was much reduced and these bacterial colonies were not found at 6 weeks of age. Cholesterol content in chest muscles of broiler chicken fed with 3% PG feed-supplement diet was significantly lower than the control group. The results suggest that PG did not affect the weight gains and FCR in broiler chickens whereas the effect on high bacterial reduction in feces was observed in group fed feed-supplement diet contained 1-3%PG. Chicken fed with 3%PG exhibited a lower amount of cholesterol in chicken muscle than control group fed the diet without PG. It may be conclude that PG from durian-rind may be useful in diet for the immune response and health promotion in broiler chickens.

สารบัญ

หน้า

ชื่อเรื่องและชื่อผู้วิจัย.....i
กิตติกรรมประกาศ.....ii
บทคัดย่อภาษาไทย.....iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....iv
สารบัญ.....v
สารบัญตาราง.....vii
สารบัญรูป.....viii
บทนำ.....1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....2
วิธีการวิจัย.....3
1. การเตรียมเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG) จากเปลือกทุเรียน.....3
1.1 การแยกเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG).....3
1.2 การเตรียม PG สำหรับผสมในอาหารเลี้ยงไก่ (feed-supplement diet).....3
2. การทดลองในเนื้อไก่และการเก็บตัวอย่าง.....3
3. การหาจำนวนแบคทีเรียโดยรวมและจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สด.....4
3.1 การเตรียมตัวอย่าง.....4
3.2 การหาจำนวนแบคทีเรียโดยรวมในมูลไก่สด, Total plate count (TPC).....4
3.3 การหาปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่.....4
4. การหาปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาและเนื้อไก่.....4
4.1 การสกัดโคเลสเตอรอลจากพลาสมา.....4
4.2 การสกัดโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่.....4
4.3 ขั้นตอนการหาปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาและเนื้อไก่ด้วยวิธี HPLC.....5
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....5
ผลและอภิปรายผล.....6
1.ผลของ PG ต่อน้ำหนักตัวไก่ ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราแลกเนื้อ.....6
2.ผลของ PG ต่อภูมิคุ้มกันโรคนิวคาสเซิล (ND).....7
3.ผลของ PG ต่อภูมิคุ้มกันต่อโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อ (IBD).....9
4.ผลของ PG ต่ออัตราส่วนเม็ดเลือดขาวชนิด Heterophill : Lymphocyte (H:L ratio).....9
5.ผลของ PG ต่อจำนวนแบคทีเรียโดยรวมในมูลไก่สด.....10

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

6.ผลของ PG ต่อปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สด.....12
7.ปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาไก่.....13
8.ปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อไก่.....13
สรุปผลการทดลอง.....16
เอกสารอ้างอิง.....17

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. น้ำหนักไก่เฉลี่ยหลังการทดลอง น้ำหนักตัวไก่ที่เพิ่มขึ้น ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราแลกเนื้อของไก่ 4 กลุ่ม โดยไก่กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารพื้นฐานที่ไม่ผสม PG กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานผสม PG 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ.....6
2. การเพาะเชื้อแบคทีเรียโดยรวมในมูลไก่ ในไก่ 4 กลุ่ม ที่ให้กินอาหารไก่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ.....11
3. การเพาะเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สดในไก่ 4 กลุ่มที่ให้กินอาหารไก่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ.....12
4. ปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อของไก่ (mg/100 g) ในไก่ 4 กลุ่มที่ให้กินอาหารไก่ ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ.....14

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. อัตราแลกเนื้อ (FCR) ของไก่ 4 กลุ่ม โดยไก่กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารพื้นฐานที่ไม่ผสม PG กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานผสม PG 1, 2 และ 3g%ตามลำดับ.....7
2. ระดับแอนติบอดีต่อโรคนิวคาสเซิลโดยวิธี HI test ในไก่ 4 กลุ่มที่ได้รับอาหารไก่พื้นฐานที่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ.....8
3. ระดับแอนติบอดีต่อโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อโดยวิธี ELISA test ในไก่ 4 กลุ่มที่ได้รับอาหารไก่พื้นฐานที่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ.....9
4. ค่าสัดส่วนเม็ดเลือดขาวชนิด Heterophill : Lymphocyte ในไก่แต่ละกลุ่มที่ได้รับอาหารไก่พื้นฐานที่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ.....10
5. เปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนแบคทีเรียโดยรวมที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในมูลไก่สดในไก่ 4 กลุ่มที่ให้กินอาหารไก่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ.....11
6. ปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาของไก่ 4 กลุ่มที่ให้กินอาหารไก่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 42 วัน.....13
7. ปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อของไก่ (mg/100 g) ในไก่ 4 กลุ่มที่ให้กินอาหารไก่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g%ตามลำดับ.....15

บทนำ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยมีการเพาะปลูกและส่งออกทุเรียนในปริมาณมาก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2554 ประเทศไทยส่งออกทุเรียนโดยเฉลี่ยปีละมากกว่า 12 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรโดยความร่วมมือของกรมศุลกากร) ทุเรียนเป็นผลไม้ที่คนไทยนิยมรับประทาน ส่งผลให้เกิดเปลือกทุเรียนเหลือจากการบริโภคในปริมาณมาก ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาขยะตามมา การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเปลือกทุเรียน เป็นการศึกษาที่มีประโยชน์และเป็นผลพลอยได้จากการเพาะปลูกทุเรียนและขยะเปลือกทุเรียนที่เหลือจากการบริโภค สารสกัดจากเปลือกทุเรียนที่เป็นที่สนใจศึกษา คือ โพลีแซคคาไรด์เจล (polysaccharide gel; PG) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยสามารถบริโภคได้ (dietary fiber; DF) ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการเป็นสื่อ (excipient) สำหรับผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม (Pongsamart and Panmaung, 1998) และมีคุณสมบัติในการต้านทานแบคทีเรีย (antibacterial activity) (Pongsamart et al., 2005, Pholdaeng *et al.*, 2005) นอกจากนี้ PG ไม่สามารถถูกสลาย (hydrolyse) จากเอ็นไซม์ในระบบทางเดินอาหาร (Brody, 1999) ซึ่ง DF ได้รับการศึกษาว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ สามารถป้องกันโรค และเป็นการรักษาโรคด้วยอาหาร (nutritional therapy) (Gallaher et al., 2002; Jenkins et al., 1997; Lu et al., 2000; Wolk et al., 1999) นอกจากนี้ความหนืดของ PG หรือคุณสมบัติในการดูดน้ำและพองตัวออกเป็นเจลเหนียว ส่งผลให้ PG สามารถอยู่ในกระเพาะและลำไส้ได้โดยไม่ถูกย่อยโดยน้ำย่อยและไม่ถูกดูดซึมในลำไส้ ทำให้ถูกขับถ่ายออกจากทางเดินอาหารเป็นการเพิ่มกากอุจจาระ ซึ่งส่งผลดีต่อระบบขับถ่าย และพบว่าสารสกัดเจลพอลิแซ็กคาไรด์จะกักเก็บสารอาหารพวกลิปิด จะมีความสามารถในการลดโคเลสเตอรอลในเลือด (Cynthia et al., 2000) การบริโภค DF ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจะช่วยควบคุมความอ้วน (David et al., 1984) ลดโคเลสเตอรอลในพลาสมา ลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจโคโรนารี และลดความต้องการอินซูลินในผู้ป่วยเบาหวาน (Kiehm et al., 1976; Wood et al., 1994) ตลอดจนป้องกันมะเร็งลำไส้ส่วนโคลอน (Freudenheim, 1990) นอกจากนี้พบว่า PG ไม่เหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันและความเป็นพิษเรื้องรังในหนูแรตและหนูไมซ์ (Pongsamart et al., 2001,2002) พบว่า PG มีประโยชน์ในการปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Pholdaeng *et al.*, 2005) จากการทดลองเบื้องต้นในไก่ โดย Chansiripornchai et al. (2008) พบว่า การผสม PG ในอาหารไก่เนื้อ ในฐานะวัตถุเติมเต็มในอาหาร (feed additive) มีแนวโน้มในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อไก่

วัตถุประสงค์

1. ประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนโรคติดเชื้อไวรัสที่สำคัญบางชนิดในไก่

2. ประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนในการลดโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG) จากเปลือกทุเรียน

1.1 การแยกเจลโพลีแซคคาไรด์ (PG)

ทำการสกัด PG จากเปลือกทุเรียน โดยนำเปลือกทุเรียนสดพันธุ์หมอนทองมาล้างทำความสะอาด นำไปบดแล้วอบแห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 60°C จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ในที่เย็นจนกว่าจะนำเปลือกแห้งมาสกัดแยก PG ซึ่งกระบวนการในการแยก PG ทำตามวิธีการของ Pongsamart และ Panmuang (1998) และ Hokputsa (2004) ดังนี้ ทำการต้มเปลือกทุเรียนแห้งที่เตรียมข้างต้นในน้ำกลั่นปริมาตร 25 เท่าของน้ำหนักเปลือกแห้ง ปรับ pH ให้เป็น 4.0 ด้วย citric acid ต้มเป็นเวลานาน 45 นาที กรองจนได้น้ำกรองใส แล้วนำไประเหยน้ำจนข้นหนืดและตกตะกอน PG ด้วย acid-ethanol (4% HCl ใน 75% ethanol) จากนั้นนำ PG ที่ได้ไปอบแห้งที่ 60 °C แล้วบดให้ละเอียด ซึ่งจะได้ผง PG สีเหลืองน้ำตาลอ่อน

1.2 การเตรียม PG สำหรับผสมในอาหารเลี้ยงไก่ (feed-supplement diet)

นำ PG จากเปลือกทุเรียนเติมลงในอาหารเลี้ยงไก่สำหรับกลุ่มทดลอง ในปริมาณ 1, 2 และ 3 กรัมต่ออาหารเลี้ยงไก่ 100 กรัมและใช้อาหารเลี้ยงไก่ที่ไม่มีการเติม PG เป็นกลุ่มควบคุม การผสม PGในอาหารเลี้ยงไก่ ทำโดยนำผง PG ปริมาณ 1, 2 และ 3 กรัม มาผสมน้ำและพ่นเพื่อเคลือบบนอาหารเลี้ยงไก่สำเร็จรูปชนิดเม็ดที่จำหน่ายในท้องตลาด (Betagro, Thailand) ปริมาณ 100 กรัม เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงไก่ที่มี PG เสริมในอาหาร ในระดับ 1%, 2% และ 3% ตามลำดับ

2. การทดลองในไก่เนื้อ และการเก็บตัวอย่าง

ไก่เนื้อเพศเมีย อายุ 1 วัน จำนวน 80 ตัว ทำการสุ่มแบ่งเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 10 ตัว ไก่กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารที่ไม่ผสม PG กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานผสม PG 1, 2 และ 3 กรัม % ตามลำดับ ไก่ทุกตัวทำวัคซีนเชื้อเป็นโรคนิวคาสเซิล (B1 Type, B1 Strain) (Merial SERECT, INC., Gainesville, USA) ทำวัคซีนเชื้อตายโรคนิวคาสเซิล (Chick N-K) (Fort Dodge Saude Animal Ltda, Campinas, Brazil) และทำวัคซีนเชื้อเป็นโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อ (Merial SERECT, INC., Gainesville, USA) เมื่ออายุ 1, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ เมื่ออายุ 1, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน ทำการบันทึกน้ำหนักไก่และปริมาณอาหารที่กิน เพื่อคำนวณอัตราแลกเนื้อ (feed conversion ratio, FCR) ทำการเก็บมูลไก่สดเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียและปริมาณเชื้อซัลโมเนลลา เจาะเลือดไก่เพื่อวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและระดับภูมิคุ้มกัน ได้แก่ อัตราส่วนเม็ดเลือดขาวชนิด Heterophill : Lymphocyte (H:L ratio) ภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล (ND) ด้วยวิธี Hemagglutination inhibition test ภูมิคุ้มกันต่อโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อ (IBD) ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ (Synbiotics, USA) เมื่อไก่อายุ 42 วัน ทำการุณยฆาตและเก็บเนื้อบริเวณหน้าอก เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลโดยเทคนิค HPLC

3. การหาจำนวนแบคทีเรียโดยรวมและจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สด

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างมูลไก่สดจำนวน 5 จุด จากถาดรองมูลไก่ คือ 4 จุดที่มุมถาด และ 1 จุดที่กลางถาด แล้วนำทั้ง 5 จุดมาผสมรวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สด โดยการนำตัวอย่างมูลไก่สดเติม buffer peptone water (BPW) pH 7.5 ในอัตราส่วน 1:9 (ตัวอย่าง (g): BPW (ml)) เพื่อเป็น stock ในการตรวจหาสำหรับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สด

3.2 การหาจำนวนแบคทีเรียโดยรวมในมูลไก่สด, Total plate count (TPC)

เจือจางตัวอย่างปริมาณ 1 ml ด้วย BPW ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2} ถึง 10^{-13} เท่า จากนั้นใช้ปิเปตดูดถ่ายของเหลวปริมาตร 0.1 ml หยดลงบน plate count agar agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ทำการ spreaded plate จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี (Benson, 2002).

3.3 การหาปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สด (ISO, 2002)

เจือจางตัวอย่างปริมาณ 1 ml ด้วย BPW ในอัตราส่วน 1:9 (ตัวอย่าง (g): BPW (ml)) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} เท่า จากนั้นใช้ปิเปตดูดถ่ายของเหลวปริมาตร 0.1 ml หยดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ xylose lysine tergitol 4 agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ทำการ spreaded plate จากนั้นนำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อ ใช้อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีที่มีสีดำในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี (Xiong, 1998)

4. การหาปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาและเนื้อไก่

4.1 การสกัดโคเลสเตอรอลจากพลาสมา (Havel et al., 1995)

ทำการสกัดโคเลสเตอรอลจากพลาสมาไก่อายุ 1 และ 42 วัน โดยนำพลาสมาปริมาตร 0.5 ml ด้วย methanol ที่แช่เย็นปริมาตร 0.5 ml และ hexane ปริมาตร 2.5 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วรอบ 1700 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที นำโคเลสเตอรอลในชั้น hexane ไประเหยให้แห้งด้วยก๊าซ N_2 และละลายตัวอย่างด้วย acetonitrile/isopropanal (75:25, v/v) ปริมาตร 1 ml จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC (Shimadzu Corporation, Japan)

4.2 การสกัดโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่

สุ่มตัวอย่างไก่กลุ่มละ 6 ตัวจากทั้งหมด 4 กลุ่ม ทำการุณฆาต และใช้เนื้อบริเวณหน้าอกมาสกัดโคเลสเตอรอล โดยสกัดตามวิธีของ Folch et al. (1957) โดยนำตัวอย่างเนื้อไก่ 100 กรัม มาทำปฏิกิริยา saponification ที่อุณหภูมิ 93°C ด้วย ethanol และ potassium hydroxide จากนั้นนำมาสกัดด้วยน้ำกลั่น และ hexane ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น นำโคเลสเตอรอลในชั้น hexane ไประเหยให้แห้งด้วยก๊าซ N_2 และละลายตัวอย่าง

6. ผลของ PG ต่อปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สด

ปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมดในมูลไก่สด จากตารางที่ 3 พบว่าเมื่อไก่อายุ 1-6 สัปดาห์ ยกเว้นที่อายุ 4 สัปดาห์ ไก่กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งได้รับอาหารผสม PG พบปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมดน้อยกว่าไก่กลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และที่อายุ 6 สัปดาห์ พบว่าไก่กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม PG 1, 2 และ 3 g % ตามลำดับ มีเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมดเป็น 0 สรุปว่า PG ช่วยในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่ และสามารถใช้ PG ในปริมาณที่ต่ำ (1g%PG) ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการที่ PG ไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหาร (Tippayakul et al., 2002) จึงผ่านไปยังลำไส้เล็กซึ่งเป็นบริเวณแรกในการติดเชื้อซัลโมเนลลา (Bangtrakulnonth, 2002) และ PG มีคุณสมบัติในการต้านทานแบคทีเรีย (antibacterial activity) (Pholdaeng et al., 2005) PG จึงสามาถยับยั้งจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาได้โดยตรง ทำให้มูลไก่สดมีปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาน้อยมากจนถึงไม่มีเลย

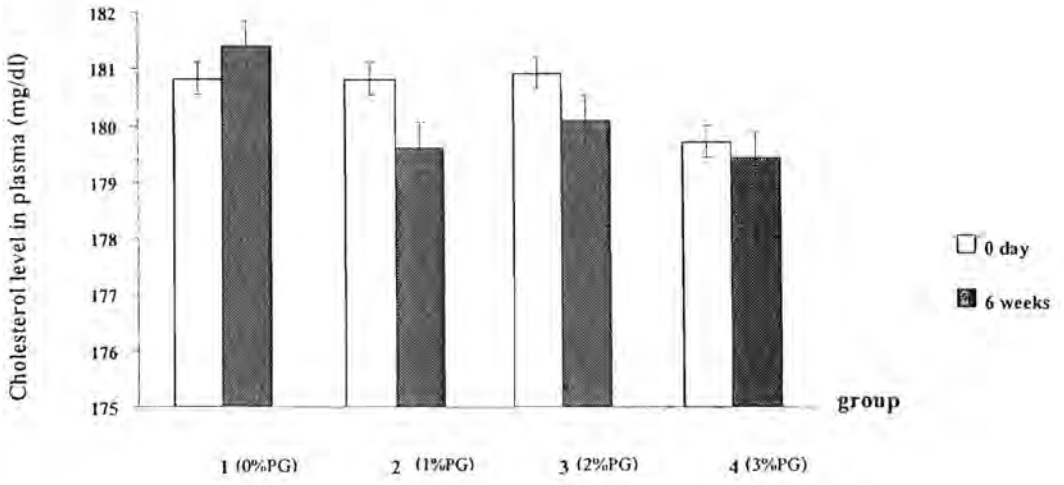
ตารางที่ 3 การเพาะเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่สดในไก่ 4 กลุ่มที่ให้กินอาหารไก่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ

Group	Number of Salmonella (mean±SDx10^2 cfu/ml)					
	1 week (1-7 days)	2 weeks (8-14 days)	3 weeks (15-21 days)	4 weeks (22-28 days)	5 weeks (29-35 days)	6 weeks (36-42 days)
1(0% PG)	272.75±25.75[a]	299±24.25[a]	350±14.00[a]	30±15	27.5±6. 50[a]	10±1.00[a]
2(1% PG)	112.5±2.75[b]	196.25±7.50[b]	105±4.50[b]	0	0[b]	0[b]
3(2% PG)	47.25±23.63[b]	113.5±1. 50[b]	89.75±22.25[b]	5±2.00	0[b]	0[b]
4(3% PG)	24.75±6.25[b]	100.5±39.75[b]	16.5±6.50[b]	0	2±1.00[b]	0[b]

a, b = statistically significant difference between group ($p<0.05$).

7. ปริมาณโคลสเตอรอลในพลาสมาไก่

ปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาของไก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ และกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสม PG ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6) แต่จากการทดลองพบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับ PG มีแนวโน้มที่จะมีปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาต่ำกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับ PG ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chansiripornchai et al. (2008) ได้ทำการทดลองขั้นต้นโดยการผสม PG ลงในอาหารพื้นฐานที่ใช้เลี้ยงไก่ และหาปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัม พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับ PG และไม่ได้รับ PG มีปริมาณโคเลสเตอรอลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 6 ปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาของไก่ 4 กลุ่มที่ให้กินอาหารไก่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 42 วัน

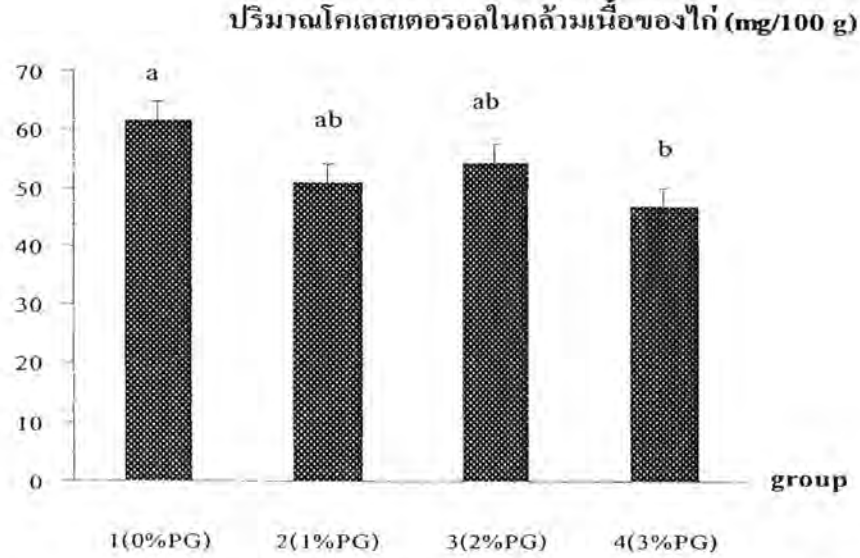
8. ปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อไก่

พบว่าปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้ออกของไก่กลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสม PG 3% มีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารพื้นฐานไก่ปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)(รูปที่ 7) โดยพบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารผสม PG 3 g% มีการลดลงของโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่เหลือ 75.78 % เมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับอาหารปกติที่ไม่ผสม PG (ตาราง 4) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chansiripornchai et al. (2008) ซึ่งทดลองหาปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อไก่โดยวิธี colorimetric พบว่า PG สามารถลดปริมาณโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่ได้ ถึงแม้วิธีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลจะแตกต่างกัน แต่ผลการวิเคราะห์พบว่ามีความสอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน นั้นคือการผสม PG ลง

ในอาหารพื้นฐานที่ใช้เลี้ยงไก่ สามารถลดปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อไก่ได้ อีกทั้งยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tippayakul et al. (2002) พบว่า PG มีความสามารถในการกักเก็บสารอาหารพวกลิปิด เช่น cholesterol และกรดไขมันได้ดี จากคุณสมบัติดังกล่าวอาจมีผลให้เกิดการดูดซึมสารอาหาร lipid และ cholesterol ในทางเดินอาหารได้น้อยกว่าปกติทำให้เกิดการสะสมน้อยในกล้ามเนื้อไก่จึงตรวจพบปริมาณโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่มีปริมาณโคเลสเตอรอลต่ำในกลุ่มที่ได้รับ PG กว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ PG ดังนั้น PG จึงสามารถช่วยลดโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่ จากตารางที่ 4 พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสม PG 3 g% จะทำให้เนื้อไก่มีเปอร์เซ็นต์ของโคเลสเตอรอลลดลงเหลือ 75% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและสามารถนำมาประยุกต์เป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงไก่ที่ต้องการควบคุมปริมาณโคเลสเตอรอลในเนื้อไก่ เนื่องจากเนื้อไก่ที่ได้มีไขมันต่ำ อาจเหมาะสำหรับผู้ป่วยที่ต้องการควบคุมไขมัน

ตารางที่ 4 ปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อของไก่ (mg/100 g) ในไก่ 4 กลุ่มที่ให้กินอาหารไก่ผสม PG 0, 1, 2 และ 3g% ตามลำดับ

กลุ่ม	ปริมาณโคเลสเตอรอล (mg/100 g)	%ปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้อไก่จากกลุ่มควบคุม
1(0%PG)	61.73 ± 1.77^{a}	100.00
2(1%PG)	50.85 ± 1.70^{ab}	82.37
32(%PG)	54.31 ± 4.59^{ab}	87.98
4(3%PG)	46.78 ± 6.94^{b}	75.78



a, b = statistically significant difference between group ($p<0.05$).

รูปที่ 7 ปริมาณโคเลสเตอรอลในกล้ามเนื้ออกของไก่ (mg/100 g) หลังการเลี้ยงด้วยอาหารเสริม PG เป็นเวลา 42 วัน

สรุปผลการทดลอง

เจลโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนที่ผสมลงในอาหารเลี้ยงไก่ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของไก่ โดยจะเห็นได้จากน้ำหนักตัวของไก่และปริมาณอาหารที่กินของไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับ PG และได้รับ PG ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไก่กลุ่มที่ได้รับ PG มีแนวโน้มที่มีอัตราแลกเนื้อดีกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับ PG

ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของไก่นั้น พบว่าเจลโพลีแซคคาไรด์ที่เติมลงในอาหาร มีผลกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของไก่ โดยจะเห็นได้จากระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคนิวคาสเซิล และเบอร์ซาอักเสบติดต่อ ไก่กลุ่มที่ได้รับ PG มีสูงกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับ PG อีกทั้ง PG ยังช่วยลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียโดยรวมและซัลโมเนลลาในมูลไก่สดได้ดีมากด้วย

ผลต่อปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาและกล้ามเนื้อไก่ พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับ PG มีแนวโน้มที่จะมีปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมาและกล้ามเนื้อต่ำกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับ PG

จากการทดลองอาจสรุปได้ว่าสามารถใช้ PG ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติผสมลงในอาหารเลี้ยงสัตว์ได้เพื่อช่วยเพิ่มภูมคุ้มกันโรคของไก่ และมูลค่าให้กับเนื้อสัตว์ และลดการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์ให้ลดน้อยลง

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากรม , http://www.oae.go.th.

Bangtrakulnonth, A. 2002. Protocols for isolation, identification, serotyping and susceptibility testing of *Salmonella*. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the world Health Organization, Department of Communicable Disease surveillance and Response (CSR). In collaboration with Centers for Disease control and prevention, USA, Danish Veterinary Laboratory, Denmark and national Salmonella and Shigella Center, Thailand. 39-56

Benson, H.J. 2002. Microbiological Applications. In: A Laboratory Manual in General Microbiology, 8th ed. Wm.C. Brown Publishers. Dubuque. I.A.

Brody, T. 1999. Nutrients that resist or escape digestion. In: Nutritional Biochemistry. 2nd ed. T. Brody. (ed.). Academic Press, San Diego. pp. 53-61.

Chansiripornchai, N., Chansiripornchai, P. and Pongsamart, S. 2008. A preliminary study of polysaccharide gel extracted from the fruit-hulls of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) on immune responses and cholesterol reduction in chicken. Acta Hort. 786: 57-60.

Cynthia, M.G., Jessa, M., Robert, H. and John, W. 2000. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is immediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. J. Nutr. 130: 2753-2759.

David, E. W., Vaghoubian, V. and Behforooz, A. 1984. Effect of glucomannan of obese patients: A clinical study. J. Int. Obesity. 8: 289-290.

Freudenheim, J.L., Graham, S., Horvath, P.J., Marshall, J.R., Haughey, B.P. and Wilkinson, G. 1990. Risks associated with source of fiber and fiber components in cancer of the colon and rectum. Cancer Res. 50: 3295-3300.

Folch, J., Less, M. and Stoanestamley, G.H.. 1957. A Simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissues. J. Biol. Chem. 226: 497-509.

Gallaher D.D., Gallaher. C.M. , Mahrt, G.J., Carr, T.P., Hollingshead, C.H., Hesslink, R. Jr. and Wise, J. 2002. A glucomanan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol and increases cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic humans. J. Am. Coll. Nutr. 21: 428-433

Hokputsa S., Gerddit W. and Pongsamart S. 2004. Water soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from durian rinds (*Durio zibethinus* Murr.): isolation, fractionation, characterisation and bioactivity. Carbohydrate polymer J. 56:471-481.

ISO, 2002. International Organization of Standardization 6579:2002. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., Geneve.

Jenkins, D.J., Wolever, T.M., Vidgen, E., Kendall, C.W., Ransom, T.P., Mehling, C.C., Mueller, S., Cunnane, S.C., O'Connell, N.C., Setchell, K.D., Lau, H., Teitel, J.M., Garvey, M.B. Fulgoni, V. 3rd, Connellym, P.W., Patten, R. and Corey, R.N., 1997. Effect of psyllium in hypercholesterolemia at two monounsaturated fatty acid intakes. Am. J. Clin. Nutr. 65:1524-1533.

Kiehm, T.G., Anderson, J.W. and Ward, K. 1976. Beneficial effects of high carbohydrate, high fiber diet on hyperglycemic diabetic men. Am. J. Clin. Nutr. 29: 895-899.

Lipipan, V., Nantawanit, N. and Pongsamart, S. 2002. Antimicrobial activity (in vitro) of polysaccharide gel from durian fruit-hulls. Songklanakarin J. Sci. Technol.24(1):31-38

Lu, X.Z., Walker, Z.K., Muir, G.J., Mascara, T. and O'Dea, K. 2000. Arbinoxylan fiber, a by-products of wheat flour processing the postprandial glucose response in mormoglycemic subjects. Am. J. Clin. Nutr. 71: 1123-1128.

Pholdaeng, K., Withyachumnarnkul, B. and Pongsamart, S. 2005. Effect of antibacterial durian polysaccharide additive diet on immune response in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Proceeding of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand, October 18-20, Nakhon Ratchasima; pp. 264.

Pongsamart, S. and Panmaung, T. 1998. Isolation of polysaccharide from fruit-hulls of durian (*Durio ziberthinjus* L.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 20 (3): 323-332.

Pongsamart, S., Sukrong, S. and Tawatsin, A. 2001. The determination f toxic effects at a high oral dose of polysaccharide gel extract from fruit-hulls durian (*Durio zibethenus* Murr.) in mice and rats. Songklanakarin J. Sci. Technol. 23 (1): 55-62.

Pongsamart, S., Tawatsin, A. and Sukrong, S. 2002. Long-term consumption of polysaccharide gel from durian fruit-hulls in mice. Songklanakarin J. Sci. Technol. 24 (4): 555-567.

Pongsamart, S., Lipipan, V., Nantawanit, N. and Lertchaiporn, J. 2005. Novel water soluble antibacterial dressing of durian polysaccharide gel. Acta Hort. 678: 65-73.

Puvadolptrod, S. and J.P. Thaxton. 2000a. Model of physiological stress in chickens. 1. Response parameter. Poult. Sci. 78:370-376

Tippayakul, C., Piyasirananda, W. and Pongsamart, S. 2002. Evaluation (*in vitro*) of durian gel in trapping of lipid and sugar to asses its potential use as dietary control. Proceedings on 28th Congress on Science and Technology of Thailand. October 24-26, 2002. Queen Sirikit Nation Convention Center, Bankok, Thailand. pp. 331.

Wolk, A., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Hu, F.B., Speizer, F.E., Hennekens, C.H. and Willett, W.C. 1999. Long-term intake of dietary fiber and decreased risk of coronary heart disease among woman. JAMA. 281:1998-2004.

Wood, P.J., Braaten, J.T., Scott, F.W., Riedel, K.D., Wolynetz, M.S. and Collins, M.W. 1994. Effect of dose and modification of viscous properties of oat gum on plasma glucose and insulin following an oral glucose load. British J. Nutr. 72: 731-743

Xiong, H.; Slavik, M.F. and Walker, J.T. 1998. Spraying chicken skin with selected chemicals to reduce attached *Salmonella Typhimurium*. J Food Prot. 61: 272-275.