

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU5180044

ชื่อโครงการ : การใช้สารสกัดจากสาหร่ายผสมนางในการต้านการติดเชื้อแบคทีเรีย การติดเชื้อไวรัส และการเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้ง
ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร. กนกพรรณ วงศ์ประเสริฐ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : sckbp@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤศจิกายน 2551 ถึงวันที่ 15 พฤษภาคม 2554

สาหร่ายผสมนางเป็นสาหร่ายทะเลสีแดง ที่พบมากแถบทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย มีรายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัสได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัสจากสาหร่ายผสมนาง และทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัสและความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจของประเทศไทย โดยทำการสกัดสารจากสาหร่ายผสมนางโดยใช้วิธีการสกัด 2 วิธี คือ การสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ methanol, ethanol, chloroform และ hexane และการสกัดด้วยน้ำเพื่อให้ได้สารกลุ่ม sulfated galactans (SGs) นำสารสกัดต่างๆ ที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียเรื่องแสง *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*) ในจานเลี้ยงเชื้อ พบว่าสารสกัด ethanol extract มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง พบว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัด ethanol extract มีอัตราการรอดและระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุม สารสกัด SGs ที่เป็นวัณ คือ WE2NGF สามารถต้านการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ในกุ้งโดยกุ้งมีอัตราการรอดสูง และมีค่า Immune parameters ต่างๆ สูงกว่ากลุ่มควบคุม มีปริมาณการเพิ่มจำนวนของไวรัส และมีการแสดงออกของโปรตีน VP28 น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสาร จากการทำ solid-phase virus binding assay พบว่า WE2NGF สามารถจับกับไวรัส WSSV ได้ และเมื่อกำจัดหมู่ sulfate จาก WE2NGF ความสามารถในการจับกับไวรัสลดลง การศึกษาโดยวิธี In vitro assay ในเม็ดเลือดกุ้ง พบว่า WE2NGF ช่วยลดการเกิด cytopathic effect ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง และโดยวิธี Far Western blot analysis พบว่า WE2NGF สามารถจับได้กับโปรตีนที่ผิวของ WSSV ที่น้ำหนักโปรตีน 12, 16, 19, 28 และ 39-41 kDa และเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่ได้รับ WE2NGF และติดเชื้อ WSSV แสดงจำนวนปริมาณ fluorescent ของ VP28 น้อยกว่ากลุ่มเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่ได้รับ WE2NGF โดยมีปริมาณเป็น 24% ของกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ส่วนเซลล์เม็ดเลือดที่ได้รับ WE2NGF ที่กำจัดหมู่ sulfate ออก พบปริมาณ fluorescent ของ VP28 สูงขึ้นเป็น 83% ของกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด WE2NGF การศึกษาโครงสร้างโดยวิธี NMR และ FT-IR spectroscopy พบว่า WE2NGF มีโครงสร้างทางเคมีเป็น repeating unit ของ 3-linked β -D-galactopyranose และ 4-linked 3,6-anhydrogalactose โดยมีหมู่ sulfate ที่ตำแหน่ง C4 ของ D-galactopyranose และที่ C6 ของ L-galactopyranose จากการศึกษาหน้าหลักโมเลกุลโดยวิธี polyacrylamide gel และ agarose gel electrophoresis พบว่า WE2NGF มีน้ำหนักประมาณ 100 kDa และมีปริมาณซัลเฟตประมาณ 12%

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดโดยตัวทำละลาย ethanol มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้ดีกว่าสารสกัดกลุ่ม sulfated galactans ช่วยลดอัตราการตายของกุ้งที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย และยังมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งด้วย ส่วนสารสกัด sulfated galactans มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้งได้โดยมีผลลดการเพิ่มปริมาณไวรัสในกุ้ง ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้ง การต้านเชื้อไวรัส WSSV ของ WE2NGF อาจเกิดจากคุณสมบัติในการจับกับโปรตีนที่ผิวของไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่ง VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญที่ไวรัสใช้ในการจับและเข้าสู่เซลล์ ทำให้ขัดขวางการเข้าเซลล์ของไวรัส ส่งผลการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ลดลง ลดอัตราการตายของเซลล์ และโครงสร้างสำคัญที่มีผลต่อการจับกันของเซลล์กับไวรัส น่าจะเป็นหมู่ sulfate ของ WE2NGF

คำหลัก สาหร่ายผมนาง, Sulfated galactans, การต้านเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง, การต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว, การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน, กุ้ง,

Abstract

Project Code : RMU5180044

Project Title : The antimicrobial and antiviral activities of *Gracilaria* extracts and the application to increase immunity in shrimp

Investigator: Assistant professor Kanokpan Wongprasert, Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address : sckbp@yahoo.com

Project Period : November 15, 2008 - May 15, 2011

It has been reported that substances extracted from seaweed have anti-bacterial and anti-viral activities. This research aimed to extract compounds with activity against bacteria and viruses from red seaweed *Gracilaria fisheri* (*G. fisheri*) and evaluate the ability of the extracts to stimulate immunity in shrimp. *G. fisheri* were extracted by using 2 methods: 1) extraction with solvents including methanol, ethanol, chloroform and hexane, and 2) extraction with water to obtain sulfated galactans (SGs). The different extracts were evaluated for anti-bacterial activities against *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*) and SGs were evaluated for anti-viral activity against white spot syndrome virus (WSSV). The results demonstrated that the ethanol extract showed the highest anti-*V. harveyi* activity *in vitro* and increased levels of immune parameters in shrimp. Shrimp treated with the non-jelly fractions of SGs, WE2NGF, significantly increased the survival rate, the immune parameters levels and decreased amplification of viral protein 28 (VP 28) gene and VP 28 protein. The solid-phase virus binding assay revealed the binding ability of WE2NGF with WSSV and on removal of sulfate from WE2NGF, the binding ability decreased. *In vitro* haemocytes culture showed that WE2NGF reduced the cytopathic effect induced by WSSV. Far Western blot analysis demonstrated the binding of WE2NGF with the viral surface proteins particularly 19, 24, and 28 kDa proteins. Haemocytes treated with WE2NGF showed less fluorescent intensity of VP28, compared to control (24% of the control). Moreover, haemocytes treated with desulfated-WE2NGF showed the intensity of fluorescent increased to 83% of control. Structure analysis by NMR and FT-IR spectroscopy showed that WE2NGF is a repeating unit of 3-linked β -D-galactopyranose and 4-linked 3,6-anhydrogalactose with sulfate groups at position C4 of the D-galactopyranose and C6 of the L-galactopyranose. Molecular weight determination of WE2NGF was about 100 kDa and the percentage of sulfation was about 12%. The results suggested that the ethanol extract had anti-*V. harveyi* activity, and its activity was better than SGs. Both ethanol extract and SGs had immune

boosting properties. The WE2NGF showed the potent anti-WSSV activity in shrimp by reducing the virus replication which might be the consequence of the binding of WE2NGF with proteins on the surface of the virus, particularly, VP28, an important protein in viral binding and entry into cells. Additionally, the important structure that affects the binding of WE2NGF to the virus might be the sulfate groups.

Keywords: *Gracilaria fisheri*, sulfated galactans, anti-WSSV, anti-*V. harveyi*, immunity, shrimp