ผลของเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียนต่อการเจริญเติบโต และการป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

นายคมศิลป์ พลแดง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-53-2041-2
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF POLYSACCHARIDE GEL FROM DURIAN FRUIT-HULL ON GROWTH AND PROTECTION AGAINST MICROBIAL INFECTION IN THE BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*)

Mr. Komsil Pholdaeng

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biomedicinal Chemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-53-2041-2

Thesis Title	Effects of polysaccharide gel from durian fruit-hull on growth and protection against microbial infection in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)
By	Mr. Komsil Pholdaeng
Field of Study	Biomedicinal Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyoung Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Assistant Professor Niyada Kiatying-Angsulee, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Sukanya Jesadanont, Ph.D.)

.....Member
(Professor Boonsirm Withyachumnarnkul, M.D., Ph.D.)

คมศิลป์ พลแดง: ผลของเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียน ต่อการเจริญเติบโต และการป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (EFFECTS OF POLYSACCHARIDE GEL FROM DURIAN FRUIT-HULL ON GROWTH AND PROTECTION AGAINST MICROBIAL INFECTION IN THE BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*)

อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.สุนันท์ พงษ์สามารถ, 170 หน้า, ISBN 974-53-2041-2

ประเมินผลของการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำและการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน จากการเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งเสริมเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียน อาหารกุ้งในกลุ่มทดลองเสริมด้วยเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียน ในสัดส่วน 0.5 1.0 และ 2.0 กรัม ในอาหารกุ้ง 100 กรัม ส่วนกลุ่มควบคุมเลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมเจลพอลิแซ็กคาไรด์ ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแต่ละกลุ่มด้วยอาหารกุ้งเสริมเจลพอลิแซ็กคาไรด์นาน 56 วัน ในบ่อเลี้ยงหมุนเวียนน้ำในระบบปิด ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวลำตัวของกุ้ง หลังการเลี้ยง 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ พร้อมกับการสังเกต อัตรารอดของกุ้งกุลาดำ ประเมินผลการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน จากผล total hemocytes count และเอ็นไซม์ phenoloxidase activity แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งเสริม 2.0% เจลพอลิแซ็กคาไรด์มีน้ำหนักตัวกุ้งมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ภายหลังการเลี้ยง 8 สัปดาห์ และมีความยาวลำตัวที่ยาวขึ้น อัตรารอดชีวิตของกุ้งสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งเสริม 0.5 และ 1.0% เจลพอลิแซ็กคาไรด์ อัตราการแลกเนื้อของกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งเสริมเจลพอลิแซ็กคาไรด์ มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) มีค่า total hemocytes count และ phenoloxidase activity ในเลือดสูง ($P<0.05$) ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งเสริม 1.0 และ 2.0% เจลพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่ากลุ่มควบคุม อาหารกุ้งเสริมเจลพอลิแซ็กคาไรด์ดูเหมือนช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งจากการให้ติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi* 1526) และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งเสริม 1.0 และ 2.0% เจลพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ หลังการเลี้ยง 4 สัปดาห์ ด้วยอาหารกุ้งเสริม 0.0 0.5 1.0 และ 2.0% เจลพอลิแซ็กคาไรด์ มีค่าเป็น 0 0 57 และ17% ตามลำดับ หลังได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 11 วัน มีค่า RPS ของวันที่ 7 เท่ากับ 9 94 และ 51% ตามลำดับ และหลังการเลี้ยง 8 สัปดาห์ มีค่าอัตรารอดชีวิต เท่ากับ 0 4 4 และ 33% ตามลำดับ หลังจากได้รับเชื้อไวรัส 14 วัน มีค่า RPS ของวันที่ 10 เท่ากับ -37 -63 และ 11% ตามลำดับ อัตรารอดชีวิตหลังการเลี้ยงอาหารสูตรเดียวกัน 8 สัปดาห์มีค่าคงที่สม่ำเสมอที่ 50 58 67 และ 75% ตามลำดับ หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง 4 วัน ค่า RPS ของวันที่ 3 เท่ากับ 18 32 และ 50 ตามลำดับ แสดงว่าการต้านทานการติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ หลังการเลี้ยงด้วยอาหารกุ้งเสริม 2.0% เจลพอลิแซ็กคาไรด์ 8 สัปดาห์ ให้ค่า RPS สูงสุดเพียง 50 เปอร์เซนต์ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงความเป็นไปได้ของเจลพอลิแซ็กคาไรด์ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเรืองแสงด้วยเจลพอลิแซ็กคาไรด์ในหลอดทดลองได้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 6.0 และ 12.5 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดลองเสนอแนะได้ว่าอาหารกุ้งกุลาดำเสริม 1.0% เจลพอลิแซ็กคาไรด์ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันให้แก่กุ้งกุลาดำ จากการศึกษาครั้งนี้

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเวชเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2548.....

4676555233: MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY
KEY WORD: *Durio zibethinus* L./ SHRIMP DIET/ POLYSACCHARIDE GEL/ SHRIMP

KOMSIL PHOLDAENG: EFFECTS OF POLYSACCHARIDE GEL FROM DURIAN FRUIT-HULL ON GROWTH AND PROTECTION AGAINST MICROBIAL INFECTION IN THE BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*)
THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUNANTA PONGSAMART, Ph.D., 170 page.
ISBN 974-53-2041-2

Growth performance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and its immunogenesis was evaluated on feeding with durian polysaccharide gel (PG) additive diet. Diets in treatment groups added 0.5, 1.0 and 2.0 grams PG in 100 grams diet, shrimp diet without PG was used in control group. Each group of black tiger shrimp was fed with the PG additive diets for 56 days in closed-recirculating water system pond. Body weight and total length of shrimps were measured after 4 weeks and 8 weeks, respectively. Survival rate was observed. Immunogenesis was evaluated by the total hemocytes count and phenoloxidase activity test. The results showed that body weight of shrimp in 2.0% PG group was higher ($P<0.05$) than that of control after feeding for 8 weeks, long total length was also observed. Survival rate of shrimp in groups feeding with 0.5 and 1.0 % PG were significantly higher than that of control. Feed conversion ratio (FCR) of PG feeding groups were significantly lower ($P<0.05$) than that of control. Total hemocytes count and phenoloxidase activity in blood were higher ($P<0.05$) in groups feeding with 1.0 and 2.0% PG than that of control group. Oral administration of PG additive diet seemed to increase the survival shrimps against the impact of *Vibrio harvey*i 1526 and white spot syndrome virus (WSSV) infection in groups fed with 1.0 and 2.0% PG compared with control group. The survival rates of shrimps after 4 weeks prefeeding with 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0% PG were 0, 0, 57 and 17%, respectively, at day 11 of WSSV infection; the relative percent survival (RPS) values at day 7 were 9, 94 and 51%, respectively. The survival rates after 8 weeks prefeeding were 0, 4, 4 and 33%, respectively, at day 14 of infection; RPS values at day 10 were -37, -63 and 11%, respectively. Prefeeding of the same three diet formulas for 8 weeks were provided continuously same survival rate at 50, 58, 67 and 75%, respectively, after day 4 of *V. harveyi* 1526 infection; RPS values at day 3 were 18, 32, and 50%, respectively. The disease resistance of *P. monodon* against WSSV in the treated groups of 4 weeks prefeeding 1.0% PG diets showed the best RPS value at 94% compared with the other treatments. The disease resistance of *P. monodon* against *V. harveyi* 1526 in the treated groups of 8 weeks prefeeding 2.0% PG diets possessed the highest RPS values only at 50%. These results indicate the possibility of PG affected *P. monodon* immune stimulation. The *in vitro* antibacterial activity determination of PG against a gram negative bacterium, *V. harveyi* 1526, demonstrated the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of PG at 6.0 and 12.5 mg/ml, respectively. The results suggest that PG at 1.0% in diet stimulate growth and immune system of *P. monodon* shrimp juveniles in this study.

Department……Biochemistry……... Student's signature……Komsil Pholdaeng
Field of study....Biomedicinal Chemistry…. Advisor's signature……Sunanta Pongsamart
Academic year……...2005……....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude and appreciation to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Sunanta Pongsamart for her invaluable advice, guidance and encouragement throughout this study which enable me to carry out my study successfully. Her helpfulness and kindness are also deeply appreciated.

I also wish to express deep appreciation to all members of my thesis committee for their valuable suggestions, expert guidance and kindness throughout this study.

Thanks are also due to Chulalongkorn University for granting partial support to fulfill this study. Also a sincere thank to all members in the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their help and great encouragement.

I would like to thank the Center for shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex shrimp), Faculty of Sciences, Mahidol University for providing equipments and facility. Also sincere thanks to all members in the Centex shrimp, for their help, sincerity and friendshrip.

I would like to thank the Aquaculture Nutrition Research Center and Shrimp Culture Research Center, Charoen Pokphand Foods public company limited, for giving financial support, equipments and facility.

Finally, I would like to express my gratitude and deepest appreciation to my parents and members in my family for their infinite love, attention and encouragement throughout my study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai)	iv
ABSTRACT (English)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	x
LIST OF ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER	
I. GENERAL BACKGROUND	1
II. MATERIALS AND METHODS	64
III. RESULTS AND DISCUSSION	74
IV. CONCLUSIONS	109
REFERENCES	110
APPENDICES	141
BIOGRAPHY	170

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Characteristics of shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes.....	18
2. Crutacean hemocytes and function in the immune response.....	20
3. Some of proteins in plasma of crustaceans has been reported and involved in the immune defense system.....	25
4. Amino acid profile of prawns (g/16 g N).....	53
5. Major natural sources of vitamins.....	57
6. Classification of minerals in feed for cultured aquatic animals and requirements of shrimp.....	60
7. Antimicrobial activity of PG on growth of bacteria *Vibrio harveyi* 1526 by agar diffusion method.....	75
8. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of PG compared to gentamicin sulfate.....	77
9. Nutritional content of the shrimp diets in treated and control groups in the trial rearing.....	80
10. Effect of polysaccharide gel on immunogenic performance of *Penaeus monodon* juvenile after 8 weeks feeding period.....	94
11. Relative percent survival (RPS) of *P. monodon* juvenile shrimp challenged by cohabitation method with WSSV.....	99
12. Relative percent survival (RPS) of *P. monodon* juvenile shrimp challenged by immersion method with *Vibrio harveyi* 1526.....	103
13. Feeding of *Penaeus monodon* shrimp number 100,000 pieces have density 25 pieces per a square meter.....	147
14. Effect of polysaccharide gel from durian fruit-hulls on growth performances of *P. monodon* juvenile in the trial rearing.....	148
15. Water quality during the feeding period in the first trial rearingwas evaluated at every week.....	149
16. The survival rate of black tiger shrimp on challenge test with WSSV by cohabitation method after 4 weeks feeding period.....	150
17. The survival rate of black tiger shrimp on challenge test with WSSV by cohabitation method after 8 weeks feeding period.....	151

Table **Page**

18. The survival rate of black tiger shrimp on challenge test with *V. harveyi* by immersion method after 8 weeks feeding period..... 152
19. Water quality of black tiger shrimp on challenge test with WSSV by cohabitation method after 4 weeks feeding period..... 153
20. Water quality of black tiger shrimp on challenge test with *V. harveyi* by immersion method after 8 weeks feeding period..... 153
21. Water quality of black tiger shrimp on challenge test with WSSV by cohabitation method after 8 weeks feeding period..... 154
22. Antimicrobial activity of PG inhibits growth of bacteria *Vibrio harveyi* 1526 by agar diffusion metod..... 154
23. Total hemocyte count of *P. monodon* juvenile shrimp were counted using haemacytometer after 8 weeks feeding period..... 155
24. Total phenoloxidase activity of *P. monodon* juvenile shrimp were measured in the hemolymph after 8 weeks feeding period..... 156

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Taxonomic definition of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 5
2. Lateral view of the external morphology of *P. monodon* 6
3. Lateral view of the internal anatomy of a female *P. monodon* 7
4. The life history cycle of the black tiger shrimp *P. monodon* 9
5. Immune defense in shrimp responses the pathogenic and microorganisms 22
6. Simplified overview of the most important defense factors of crustaceans that are mediated by the hemocytes 23
7. Overview of the arthropod prophenoloxidase-activating system 26
8. Structure unit of β-1,3 glucan 36
9. Structure unit of lipopolysaccharide 38
10. Structure unit of peptidoglycan 40
11. Structural unit of alginates 41
12. Structure unit of fucoidan 43
13. Structure unit of chitin 44
14. Structure unit of chitosan 46
15. Structure of *k*-carrageenan (kappa-carrageenan) 47
16. Structure of *i*-carrageenan (iota-carrageenan) 47
17. Structure of λ-carrageenan (lambda-carrageenan) 48
18. Structural unit of carrageenan consists of alternating 3-linked-β-D-galactopyranose and 4-linked-α-D-galactopyranose units 48
19. Structural unit of amylose and amylopectin 50
20. Classification of carbohydrates (saccharides) 54
21. The feature of shrimp diets in various feed size was prepared from the durian polysaccharide gel (PG) 79
22. Body weight of *P. monodon* juvenile in the trial rearing after 4 weeks and 8 weeks feeding with diets containing PG 82
23. Total length of *Penaeus monodon* juvenile in the trial rearing after 4 weeks and 8 weeks feeding diets containing PG 83

Figure **Page**

24. Survival rate of *P. monodon* juvenile in the trial rearing after 4 weeks and 8 weeks feeding with diets containing PG..... 84
25. Feed conversion ratio of *P. monodon* juvenile in the trial rearing after 4 weeks and 8 weeks feeding with diets containing PG..... 85
26. Biomass of *P. monodon* juvenile in the trial rearing after 4 weeks and 8 weeks feeding with diets containing PG..... 86
27. Size of *P. monodon* juvenile shrimp in the trial rearing after 4 weeks and 8 weeks..... 87
28. The survival rate of *P. monodon* juvenile on challenge test with WSSV by cohabitation method after 4 weeks feeding period..... 97
29. The survival rate of *P. monodon* juvenile on challenge test with WSSV by cohabitation method after 8 weeks feeding period..... 98
30. The survival rate of *P. monodon* juvenile on challenge test with *Vibrio harveyi* by immersion method after 8 weeks feeding period..... 101
31. Standard curve of bovine serum albumin protein by Bradford protein assay..... 157

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

C	carbon
H	hydrogen
O	oxygen
FCR	feed conversion ration
g	gram
kg	kilogram
WSSV	white sport syndrome virus
LPS	lipopolysaccharide
proPO	prophenoloxidase
PG	polysaccharide gel
hr	hour
%	percent
PLs	post larvae
m^2	square metre
^oC	degree celcius
ppt	parts per thousand
ppm	parts per million
cm	centimeter
CFU	colony forming unit
EU	European Union
HPV	hepatopancreas parvo-like virus
IHHNV	infectious haematopoietic and hypodermal necrosis virus
YHV	yellow head virus
BMN	baculoviral midgut gland necrosis virus
BP	baculovirus penaei
MBV	monodon baculovirus
LOVV	lymphoid organ vacuolization virus
TSV	Taura syndrome virus
µm	micrometer
proPO-AS	prophenoloxidase-activating system

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PO	phenoloxidase
βG	beta-1,3-glucan
βGBP	beta-1,3-glucan binding protein
LPBP	lipopolysaccharide binding protein
PGBP	peptidoglycan binding protein
ppA	prophenoloxidase activating enzyme
GAGs	glycosaminoglycans
HIV	human immunomodeficiency virus
N	nitrogen
kcal	kilocalorie
PUFA	polyunsaturated fatty acids
IU	international unit
mg	milligram
ml	milliliter
min	minut
Ca	calcium
TSB	Tryptic soy broth
TSA	Tryptic soy agar
TCBSA	Thiosulfate citrate salt sucrose agar
MHA	Mueller Hinton agar
MHB	Mueller Hinton both
LHM	Lobster hemolymph medium
NSS	normal saline solution
PCR	polymerase chain reaction
mm	millimeter
µl	microliter
µg	microgram
MIC	minimal inhibitory concentration
MBC	minimal bactericidal concentration
TAN	total ammonia nitrogen
DO	dissolved oxygen
THC	total hemocyte counts
G	gauche
CAC	cacodylate buffer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AC-1	anticoagulant-1 buffer
HLS	hemocyte lysate supernatant
L-DOPA	L-dihydroxyphenylalanine
nm	nanometer
cm^3	cubic centimeter
L	liter
TCBSA	thiosulfate citrate bile salt sucrose agar
ANOVA	analyzed using one way analysis of variance
LSD	least significant difference
SD	standard deviation
NZ	no inhibition zone
PG	polysaccharide gel from durian fruit-hulls
M	molar
et al.	et alii, and others.
no.	number
PBS	phosphate buffered saline
GAGs	glycosaninoglycans
EFA	essential fatty acid
pcs	pieces

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย