รหัสโครงการ SUT1-102-54-12-33

รายงานการวิจัย

การศึกษาเบื้องต้นในการมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำยางจากต้น *Artocarpus heterophyllus*

(Preliminary study of antibacterial property from *Artocarpus heterophyllus* latex)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-54-12-33

รายงานการวิจัย

การศึกษาเบื้องต้นในการมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำยางจากต้น *Artocarpus heterophyllus*

(Preliminary study of antibacterial property from *Artocarpus heterophyllus* latex)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. จารุวรรณ ศิริเทพทวี

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดโปรตีนที่ได้ สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ (Molecular Biology and Genetics) มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการศึกษาการ folding ของโปรตีนด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy ขอขอบคุณกลุ่มวิจัย Protein and Proteomic ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นในการให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการศึกษา 2D gel electrophoresis และขอขอบคุณบริษัท Coax Group Corporation ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการศึกษารูปร่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค atomic force microscopy

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

โปรตีนขนาด 48 kDa สามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์จากน้ำยางของต้น *Artocarpus heterophyllus* (ขนุน) ด้วยการตกตะกอนด้วยกรด และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน โปรตีนนี้มีคุณสมบัติเป็นโปรตีเอสเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลาตินและเคซีนไซโมกราฟี เนื่องจากโปรตีนนี้มีขนาดโมเลกุลเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ประมาณ 48 กิโลดาลตัน จึงเรียกโปรติเอสนี้ว่า antimicrobial protease-48kDa หรือ AMP48 โปรตีน AMP48 มีค่า isoelectric point (pI) ประมาณ 4.2 นอกจากนี้พบว่าโปรตีน AMP48 มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียได้โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่ำสุด (MIC) เท่ากับ 2.2 mg/ml และสามารถเชื้อแบคทีเรียได้ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนต่ำสุด (MBC) เท่ากับ 8.8 mg/ml ผลการวิเคราะห์ AFM image ช่วยในการสนับสนุนว่า AMP48 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียที่ได้รับโปรตีนจะมีรูปร่างและขนาดที่ผิดปกติไปจากสภาวะที่ไม่ได้รับสารอย่างมีนัยสำคัญ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

A 48-kDa protein was isolated and purified from crude latex of *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) by acid precipitation and ion exchange chromatography. This protein contained protease activity by gelatin- and casein-zymography. The protease was designated as antimicrobial protease-48 kDa or AMP48 due to its molecular mass on SDS-PAGE was approximately 48 kDa. The isoelectric point (pI) of AMP48 was approximately 4.2. In addition, AMP48 contained antimicrobial activities by it could inhibit the growths of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 at minimum inhibitory concentration (MIC) 2.2 mg/ml and Minimum bactericidal concentration (MBC) 8.8 mg/ml. AFM image also supported the antimicrobial activities of AMP48 by the treated bacterial morphology and size were altered from normal.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
กรอบแนวคิดของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ขนุน	4
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการมีฤทธิ์เป็น antibacteria ของน้ำยางจากพืช	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง	6
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง	13
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	15
บรรณานุกรม	16
ภาคผนวก	18
ประวัติผู้วิจัย	22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงขั้นตอนการ purify โปรตีนจากน้ำยางของขนุนและ % yield ที่ได้ ……. 7

ตารางที่ 2 Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของโปรตีน AMP48 ……..…… 11

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โปรตีนขนาด 48 kDa ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เมื่อแยกด้วย
เทคนิค 12.5% gel SDS-PAGE ……..…. 7
รูปที่ 2 ผล 2D gel electrophoresis ของโปรตีน AMP48 จากยางขนุน ……..……...… 8
รูปที่ 3 CD spectra ของโปรตีน AMP48……..……..... 9
รูปที่ 4 คุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ protease ของโปรตีน AMP48
ด้วยเทคนิค zymography ……. 10
รูปที่ 5 ภาพพื้นผิว (surface) ของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853
เมื่อวิเคราะห์ด้วย AFM ……..……. 12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาของการวิจัย

น้ำยาง (Plant latex) สามารถพบได้ในพืชหลายวงศ์ (family) เช่น Euphorbiaceae, Asclepiadaceae, Moraceae และ Apocyanaceae โดยทั่วไปแล้วน้ำยางมักประกอบไปด้วย hydrolytic enzyme หลายชนิด รวมทั้ง wax, resin และ lipid like substances ซึ่งบทบาทของน้ำยางต่อสรีระวิทยาของพืชยังไม่ทราบแน่ชัดนัก เคยมีรายงานว่า hydrolytic enzymes จากน้ำยางของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งจำพวก proteases ช่วยป้องกันพืชจากการติดเชื้อโรคต่างๆ และ เมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่รุนแรงหรือเป็นอันตราย (harsh conditions) นอกจากนี้น้ำยางยังสามารถมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสามารถใช้เป็นยาพื้นบ้าน (folk medicine) ได้ น้ำยางจากพืชหลายชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการ hemostatis, การรักษาบาดแผล (wound healing) และ ลดอาการปวดบวมอักเสบ

จากการวิจัยเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าน้ำยางของต้น *Artocarpus heterophyllus* (ชื่อสามัญ: ขนุน) มีกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น protease และ protease inhibitor เช่น โปรตีนในกลุ่ม serine protease inhibitor ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำคุณสมบัติในการเป็น protease และ protease inhibitor ของน้ำยางของต้นขนุนมาใช้ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial property) ทั้ง แกรมโพซิทีฟ (gram-positive) และ แกรมเน็กกาทีฟ (gram-negative) เพื่อเป็นข้อมูลของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบได้ในประเทศไทยที่สามารถใช้เป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย เช่นโรคติดเชื้อทางผิวหนังที่เกิดจากแบคทีเรียพวก แผลพุพอง เป็นโรคที่พบได้บ่อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็ก เป็นโรคที่ติดต่อได้ง่ายและรวดเร็ว ติดต่อโดยสัมผัสถูกคนที่เป็นโรคนี้อยู่ก่อน ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus* หรือ β-*streptococcous* โรคท้องร่วงที่เกิดจากการกินอาหารที่มีเชื้อ *Salmonella*, *Campylobacter* และ *Shigella* เป็นต้น นอกจากนี้การติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิดก็อาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ เช่น *Burkholderia pseudomallei* สามารถก่อให้เกิดโรคเมลิออยโดซิส (melioidosis) ซึ่งเป็นโรคที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและมักพบในชาวนาที่ต้องสัมผัสกับพื้นดินและน้ำ

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงสามารถช่วยให้เข้าใจบทบาทของน้ำยางของขนุนในการรักษาโรค รวมทั้งยังเป็นข้อมูลสำหรับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและใช้ในการวิจัยต่อไปในอนาคตได้ เช่น การนำน้ำยางจากต้นขนุนมาใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ในสัตว์ทดลอง หรือใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบผลิตภัณฑ์ยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกโปรตีนที่เกี่ยวข้องออกฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (antibacteria) จาก crude latex ของน้ำยางต้นขนุน

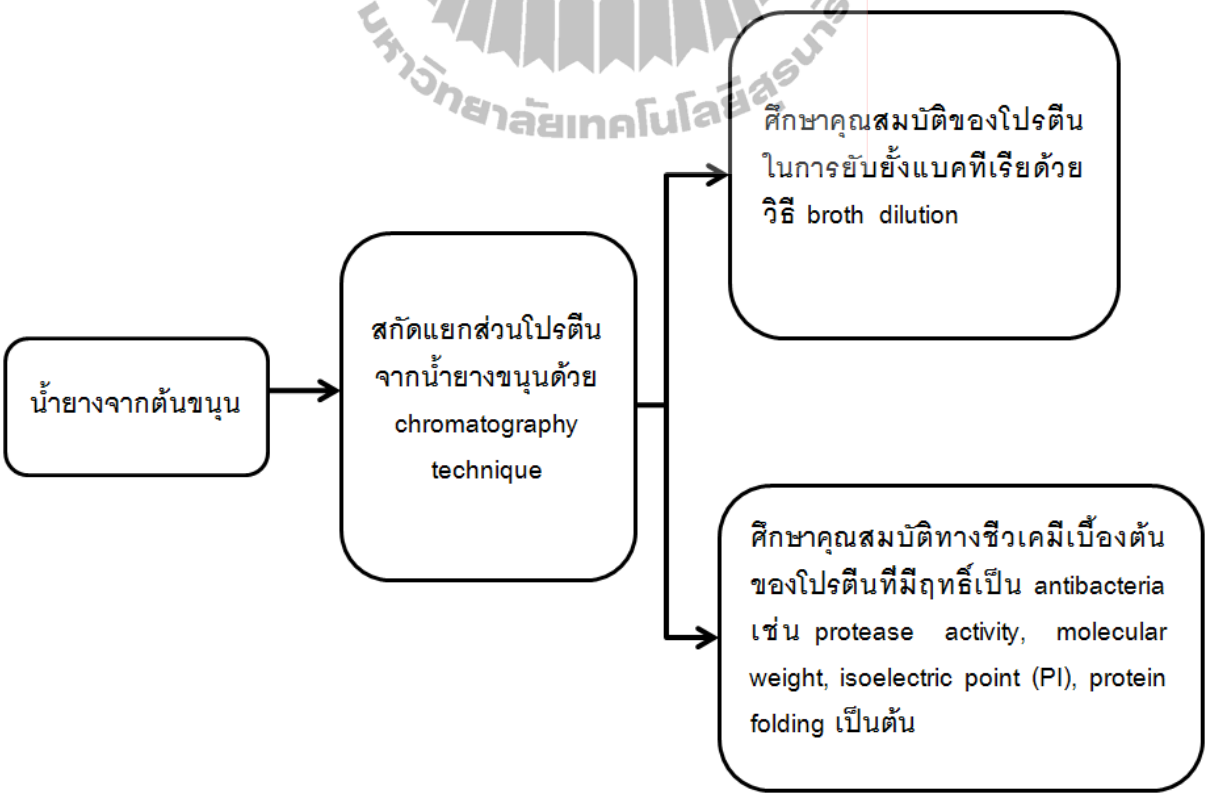
1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรตีนดังกล่าว เช่น protease, folding เป็นต้น

1.2.3 เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของโปรตีนดังกล่าวในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเป็น antibacteria

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วยการเตรียมน้ำยางขนุนจากส่วนขั้วของลูกขนุน ทำการแยกโปรตีนจากน้ำยางของต้นขนุนด้วยเทคนิค chromatography นำโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละส่วนมาศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็น antibacteria คือ molecular weight, ค่า PI, protein identification ด้วย peptide mass fingerprinting (PMF), ศึกษา protein folding โดยใช้เทคนิค CD spectroscopy และศึกษาคุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ protease

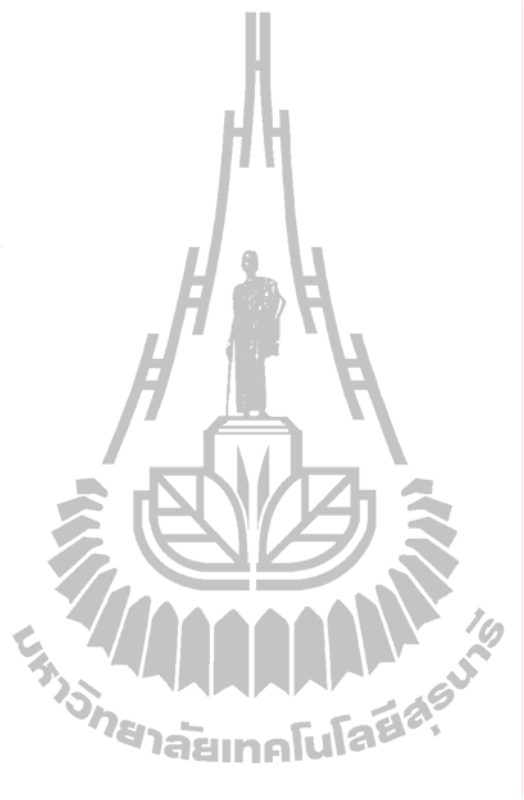
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย



1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.5.1 เป็นข้อมูลสำหรับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและใช้ในการวิจัยต่อไปในอนาคตได้ เช่น การนำน้ำยางจากต้นขนุนมาใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย หรือใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบผลิตภัณฑ์ยารักษา

1.5.2 ผลงานที่ได้สามารถนำเสนอเผยแพร่ในการประชุมวิชาการนานาชาติ



บทที่ 2
เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ขนุน (สำนักวิทยาบริการ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา)

ชื่ออื่นๆ : มะหนุน (ภาคเหนือ, ภาคใต้), ขะนู (ชอง-จันทบุรี), นากอ (มลายู-ปัตตานี), ขะเนอ (เขมร), เนน (ชาวบนนครราชสีมา), นะยวยซะ (กะเหรี่ยง-กาญจนบุรี), ซีคีย, ปะหนอย (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), ล้าง (เงี้ยว-ภาคเหนือ), ปอหล่อปิด (จีน), หมักหมี้ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)

ชื่อสามัญ : Jack Fruit Tree

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Artocarpus Heterophyllus*

วงศ์ : Moraceae

ลักษณะทั่วไป:

ต้น : เป็นพรรณไม้ยืนต้น ลำต้นมีความสูงประมาณ 8-15 เมตร มียางขาวทั้งต้น

ใบ : จะออกสลับกัน และมีลักษณะกลมรียาวประมาณ 7-15 ซม. ตรงปลายใบของมันจะแหลมและสั้น ฐานใบจะเรียว ใบอ่อนบางครั้งจะมีรอยเว้าเข้าลึกๆ 2 รอย แบ่งใบออกเป็น 3 ส่วน หลังใบจะเรียบเป็นมัน เนื้อใบเหนียวคล้ายหนัง ก้านใบยาวประมาณ 1-2.5 ซม. ใบนั้นจะหลุดร่วงง่าย

ดอก : จะออกเป็นช่อ และช่อดอกตัวเมียจะอยู่บนต้นเดียวกัน ส่วนช่อดอกตัวผู้จะออกที่ปลายกิ่งหรือง่ามใบ เป็นแท่งยาวประมาณ 2.5 ซม. และมีกาบหุ้มช่อดอกอยู่ 2 กลีบ ดอกย่อยนั้นจะมีเกสรตัวผู้ 1 อัน ช่อดอกตัวเมียเป็นแท่งกลมยาวออกจากลำต้นหรือกิ่งก้านขนาดใหญ่

เมล็ด (ผล) : ผลจะเป็นผลรวม มีลักษณะกลมยาวประมาณ 25-60 ซม. ขนาดใหญ่ๆ และอาจหนักถึง 20 กก. ส่วนเนื้อหุ้มเมล็ดจะมีสีเหลือง ถ้าสุกจะมีกลิ่นหอม

เปลือกนอก : จะเป็นตุ่มหนามเล็กๆ รูปหกเหลี่ยม

ส่วนที่ใช้ : เมล็ด เนื้อหุ้มเมล็ด ใบ ยาง แกนและราก ใช้เป็นยา

สรรพคุณ :

เมล็ด ให้ใช้ประมาณ 60-240 กรัม ต้มสุกกิน จะมีรสชุ่มช่วยขับน้ำนมในสตรีหลังคลอด มีน้ำนมน้อยหรือไม่มีน้ำนม ช่วยบำรุงร่างกาย

เนื้อหุ้มเมล็ด ให้ใช้สด ผสมกับน้ำหวานกินบำรุงกำลัง หรือจะกินเป็นขนมก็ได้

ใบ ใช้สด นำมาตำให้ละเอียด อุ่นแล้วพอกแผล ใบแห้งให้บดเป็นผงโรย หรือใช้ผสมทาตรงที่เป็นแผล ใช้สำหรับภายนอก รักษาแผลมีหนองเรื้อรัง

ยาง จะมีรสจืด ฝาดเล็กน้อย ให้ใช้ยางสด ทาบริเวณที่บวมอักเสบ แผลมีหนองเรื้อรัง ต่อมน้ำเหลืองอักเสบเกิดจากแผลมีหนองที่ผิวหนัง

แก่นและราก ใช้แห้งประมาณ 30-60 กรัม นำมาต้มน้ำรับประทาน จะมีรสหวานชุ่ม รักษากามโรค และบำรุงเลือด

ตำรับยา : ให้ใช้เมล็ด 60-240 กรัม หรือจะใช้เมล็ดนำมาต้มให้สุกกิน หรือจะนำมาผสมกับน้ำหวานและกะทิกิน สำหรับสตรีหลังคลอด ที่มีน้ำนมน้อยหรือไม่มีน้ำนมใช้กินได้

ปัจจุบันได้มีงานมากมายเกี่ยวกับประโยชน์และคุณสมบัติของสารประกอบที่อยู่ในส่วนต่าง ๆ ของต้นขนุน เช่น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากส่วนต่าง ๆ ของต้นขนุน(Khan และคณะ, 2003) สารสกัดจำพวก lectin จากต้นขนุนสามารถยับยั้งการติดเชื้อ herpesvirus ได้ (Wetprasit และคณะ, 2000)

อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่กล่าวมาส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้นขนุน แต่งานวิจัยทางคุณสมบัติของน้ำยางจากต้นขนุนยังมีน้อย พบว่ามีเพียงการศึกษาองค์ประกอบของน้ำยางที่ได้จากต้นขนุนเปรียบเทียบกับน้ำยางที่ได้จาก natural rubber ของต้น *Hevea brasiliensis* (Mekkriengkrai และคณะ, 2004) ในปี 1990 Prasad และ Virupaksha ได้ทำการแยกโปรตีน artocarpin จากน้ำยางของต้นขนุน และพบว่ามีคุณสมบัติเป็น serine-centred protease นอกจากนี้ยังมีผู้วิจัยพบว่าน้ำยางจากต้นขนุนสามารถทำให้เกิดอาการแพ้แบบ anaphylaxis ได้ (Chantaphakul และคณะ, 2002)

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับน้ำยางของขนุนข้างต้น พบว่ายังไม่มีรายงานหรือการทำวิจัยที่เกี่ยวกับประโยชน์ของน้ำยางขนุนในทางการแพทย์ และการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา งานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนในยางขนุนที่เกี่ยวข้องกับการเป็น antibacterial ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการมีฤทธิ์เป็น antibacteria ของน้ำยางจากพืช

ในปี 2010 Aref และคณะ ได้สกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์จากยางของต้น *Ficus carica* โดยพบว่าสกัดส่วน ethyl acetate สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Enterococcus fecalis*, *Citobacter freundel*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis*

Lokvam และคณะ (2000) ได้ศึกษาสารสกัดจากยางไม้ของต้น *Clusia grandiflora* (Clusiaceae) พบว่าสารสกัดที่ได้ คือ chamone I และ nemorosone II สามารถมีฤทธิ์เป็น antibacterial ต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคในผึ้ง คือ *Paenibacillus larvae* และ *Paenibacillus alvei* ได้

จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นจะเห็นว่ายางต้นไม้มีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรีย แต่ยังมีการศึกษาอยู่น้อย จึงยังต้องการการงานวิจัยที่ทำการศึกษาถึงประโยชน์ของยางไม้ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มเติม งานวิจัยครั้งนี้จึงได้มีจุดมุ่งหมายที่จะหาตัวยาที่สามารถสกัดได้จากสารสกัดตามธรรมชาติมาใช้เป็นการแพทย์ทางเลือกทดแทนยาที่ใช้ในปัจจุบัน โดยการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะสกัดสารจากยางขนุนซึ่งมีสารที่มีคุณสมบัติซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยางขนุนยังหาได้ง่ายในประเทศไทย ทำให้ต้นทุนการผลิตยาลดลง และราคาของยาที่จะนำมาใช้ก็จะถูกลง

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

3.1 น้ำยาและสารเคมี

3.1.1 BCA assay kit (Pierce, Rockford, USA)

3.1.2 IEF pH gradient strip 7.3 cm. pH 3-10 (GE Healthcare, Sweden)

3.1.3 Trypsin sequencing-grade (Promega, USA)

3.1.4 น้ำยาและสารเคมีอื่น ๆ ใช้ของบริษัทต่าง ๆ คือ Sigma (USA), Fluka (USA), GE Healthcare (Sweden), Carlo Erba (Italy), Merck (Germany)

3.2 น้ำยาง

น้ำยางจะเก็บจากขั้วของลูกขนุนที่พบได้ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา โดยจะทำการเก็บเก็บใส่ในขวดแก้วปากกว้างที่สะอาด เมื่อเก็บเสร็จแล้วจะนำน้ำยางมาเก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

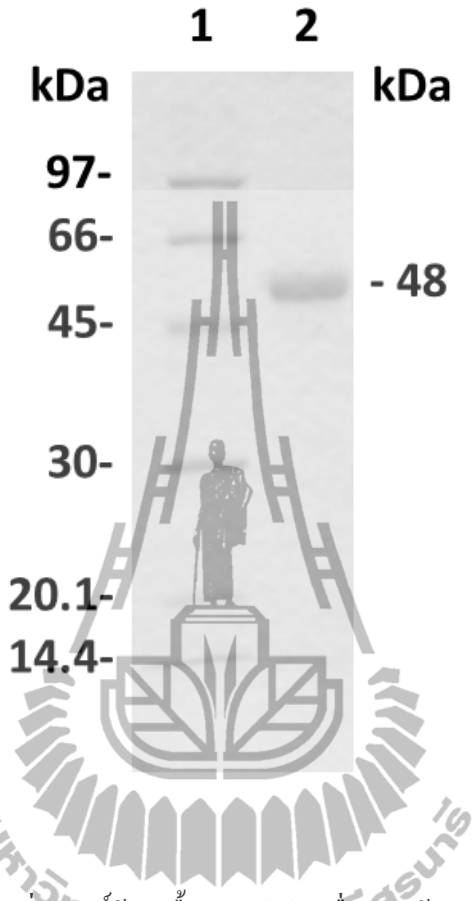
3.3 แบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบการมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดมีสายพันธุ์มาตรฐานตาม Standard American Type Culture Collection (ATCC) strains คือ gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 และ gram-negative coccus: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923

3.4 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

น้ำยางที่เก็บได้จากส่วนขั้วของลูกขนุน นำมาปั่นแยกด้วยเครื่อง high speed centrifuge หลังจากปั่นนำส่วนน้ำที่ได้มา dialysis ด้วย 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5 แล้วนำไปปั่นด้วย high speed centrifuge จะได้ส่วนตะกอนแยกออกจากส่วนน้ำใส นำส่วนใสไปทำให้บริสุทธิ์ (purify) ด้วย cation exchange chromatography โดยใช้ step gradient salt elution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0-0.5 M ใน 25 mM Tris-HCl pH 8.8 หลังจากนั้นนำส่วนโปรตีนที่สกัดในความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 0 M ไป purify ต่อด้วย anion exchange chromatography (Q sepharose) โดยใช้ step gradient salt elution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ในช่วง 0-0.5 M ใน buffer 25 mM Tris-HCl pH 8.8 โดยโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียออกมาที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.4 M และโปรตีนที่ได้เมื่อแยกด้วย 12.5% gel SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli, 1970) พบว่า fraction ของโปรตีนที่ได้ประกอบด้วยแถบโปรตีน (protein bands) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 48 kDa (ดังแสดงในรูปที่ 1) จากวิธี purify โปรตีนข้างต้นจะได้โปรตีนออกฤทธิ์คิดเป็น 1.446% หรือ 6.204 mg ของโปรตีนจากน้ำยางทั้งหมด (429.114 mg) (แสดงในตารางที่ 1) เนื่องจากโปรตีน

ที่ออกฤทธิ์เป็นโปรตีนที่มีขนาด 48 kDa และมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้จึงเรียกโปรตีนนี้ว่า “antimicrobial protein 48 kDa” หรือ “AMP48”



รูปที่ 1 โปรตีนขนาด 48 kDa ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เมื่อแยกด้วยเทคนิค 12.5% gel SDS-PAGE หลังจากpurify โปรตีนจากน้ำยางของต้นขนุนด้วยเทคนิค ion exchange chromatography

ตารางที่ 1 แสดงขั้นตอนการ purify โปรตีนจากน้ำยางของขนุนและ % yield ที่ได้

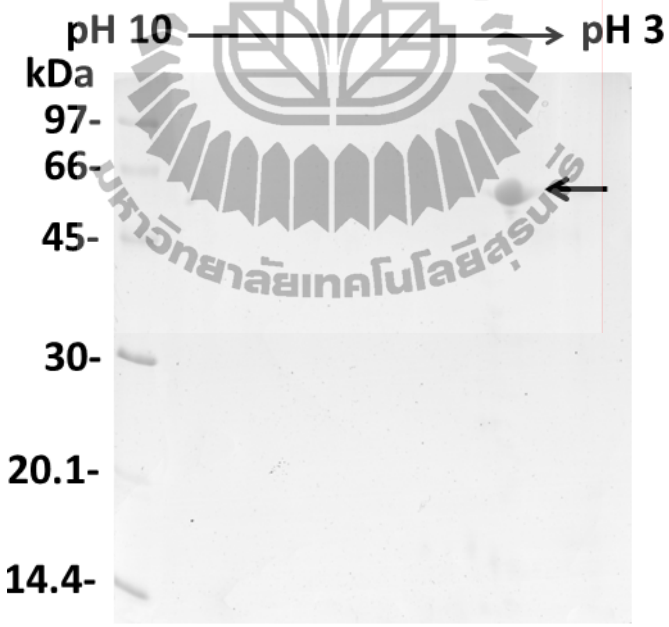
ขั้นตอนการ purify	โปรตีนทั้งหมด (mg)	Yield (%)
1. โปรตีนจากน้ำยางทั้งหมด	429.114	100
2. Dialysis ด้วย 25 mM sodium acetate buffer, pH 4.5	157.500	36.704
2. SP sepharose cation exchange chromatography	66.700	15.544
3. Q sepharose anion exchange chromatography (AMP48 fraction)	6.204	1.446

3.5 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยน้ำยา BCA assay kit ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ นำสารละลายโปรตีน 0.1 ml ผสมกับสารละลาย BCA working reagent 2 ml นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 30 นาที หาความเข้มข้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 562 nm โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.6 Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE)

โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 μg นำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตามประจุใน first dimension โดยใช้ pH gradient strip pH 3-10 ยาว 7 cm และทำการแยกโปรตีนตามขนาด melecular weight อีกครั้งใน second dimension ด้วย 12.5% gel SDS-PAGE แล้วย้อมโปรตีนด้วย colloidal Coomassie brilliant blue G-250 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ImageMasterTM 2D Platinum software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) พบว่าโปรตีนที่ขนาด molecular weight 48 kDa มีเพียงหนึ่ง subunit และมีค่า isoelectric point (pI) ประมาณ 4.2 (แสดงดังรูปที่ 2)



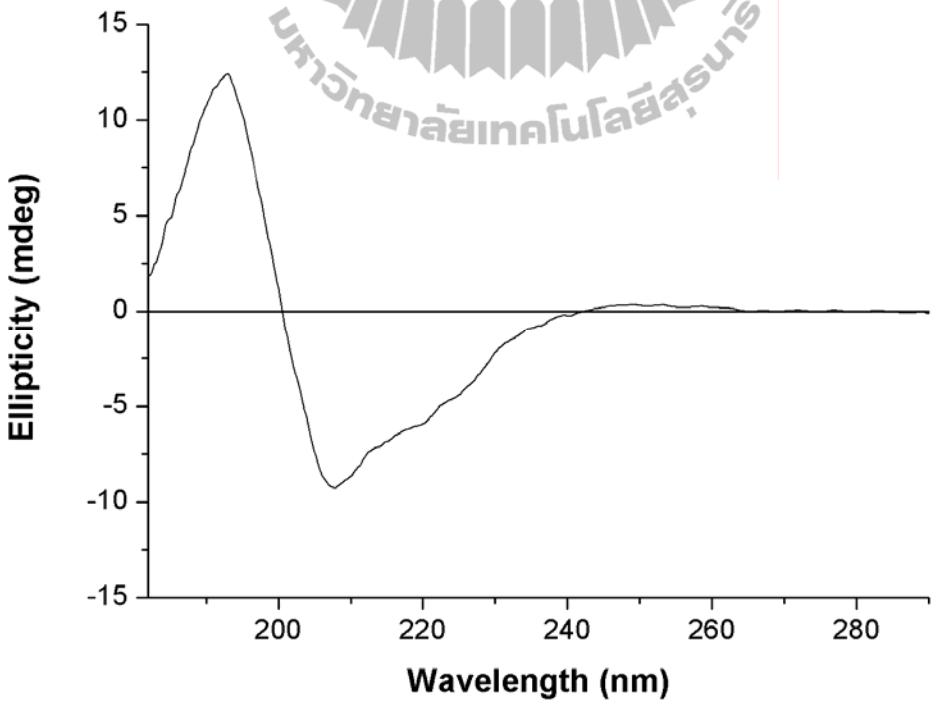
รูปที่ 2 ผล 2D gel electrophoresis ของโปรตีน AMP48 จากยางขนุนที่ทำให้บริสุทธิ์ มีค่า pI ประมาณ 4.2 (ดังลูกศรชี้)

3.7 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค peptide mass fingerprinting (PMF)

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ออกฤทธิ์โดยการตัด spot ของโปรตีน AMP48 ที่ได้จาก 2D gel electrophoresis ในข้อ 3.6 นำไปย่อยด้วย enzyme trypsin วิเคราะห์ PMF ด้วย MALDI-TOF MS ณ หน่วยบริการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร พบว่าโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียไม่มี peptide mass ที่เหมือนกับโปรตีนใน databases ต่าง ๆ

3.8 ศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีนออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy (CD spectroscopy)

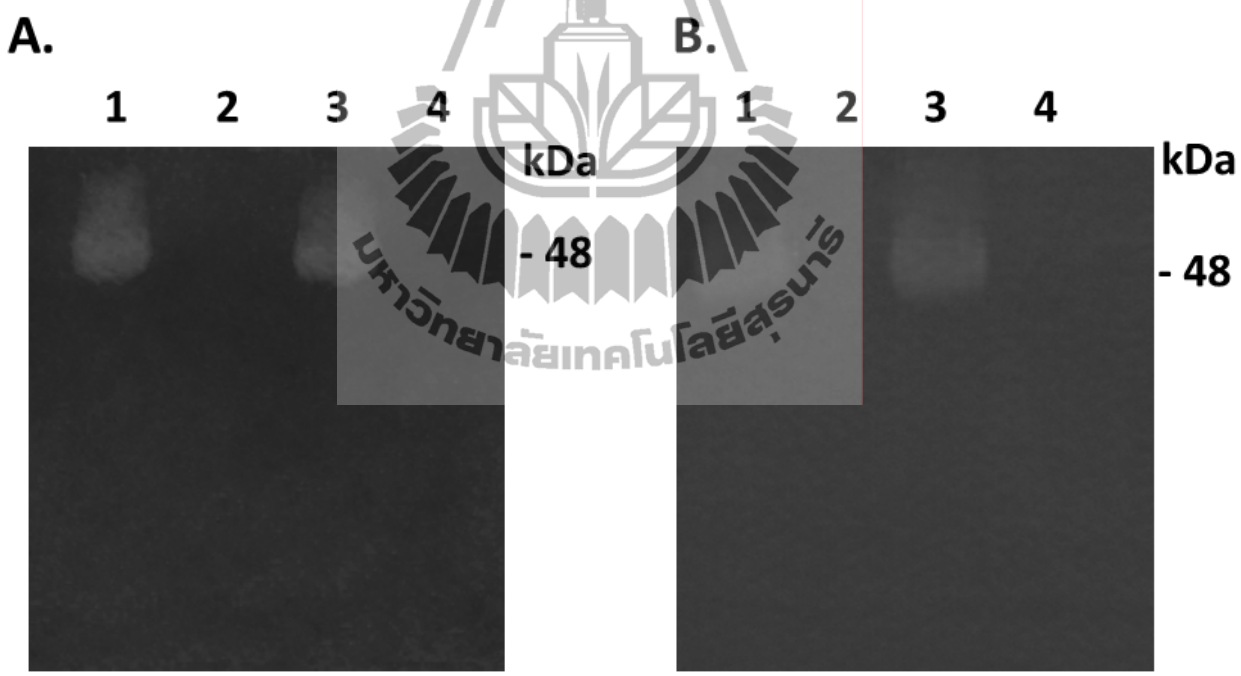
โครงสร้าง secondary structure หรือโปรตีน folding ของโปรตีน AMP48 ศึกษาโดยใช้เทคนิค circular dichroism spectroscopy ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter (Japan) โดยใช้โปรตีนความเข้มข้น 1.6 mg/ml ใช้ speed 20 nm/min, 2 nm bandwidth, 100 mdeg sensitivity, average response time of 2 s และ optical path length เท่ากับ 0.2 mm ผล CD spectrum แสดงในรูปที่ 3 และทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย K2D program (Andrade และคณะ, 1993) พบว่าโปรตีนนี้ประกอบด้วย α-helix ประมาณ 61.9%, β-sheet 6.09%



รูปที่ 3 CD spectra ของโปรตีน AMP48

3.9 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ protease ด้วยวิธี zymography

คุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ protease ของโปรตีน AMP48 ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ Shimokawa และคณะ (2002) โดยใช้ gelatin และ casein เป็น substrate เริ่มจากผสม substrate แต่ละชนิด ความเข้มข้น 1 mg/ml ลงใน 12.5% gel SDS-PAGE แล้วแยกโปรตีน AMP4 ด้วย SDS-PAGE ที่มี substrate แต่ละชนิดในสภาวะที่มีและไม่มี reducing agent (2-mercaptoethanol) และในสภาวะที่มีการต้มและไม่ต้มตัวอย่าง หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ล้างด้วยบัพเฟอร์ 25 mM Tris-HCl pH 8.8 ที่ประกอบด้วย 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3, 0.025% Triton X-100 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้น incubate ในสารละลาย บัพเฟอร์ 25 mM Tris-HCl pH 8.8 ที่ประกอบด้วย 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ 37 °C แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 คุณสมบัติเป็น protease สังเกตได้จากแถบโปรตีนจะไม่ติดสี (zymography) จากการทดลองพบว่าโปรตีน AMP48 สามารถย่อยได้ทั้ง gelatin และ casein (รูปที่ 4) โดยย่อย gelatin ได้ดีกว่า casein นอกจากนี้พบว่า reducing agent ไม่มีผลต่อคุณสมบัติการเป็น protease ของโปรตีน แต่ความร้อน (~95 °C) สามารถทำลายคุณสมบัติของโปรตีนได้



รูปที่ 4 คุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ protease ของโปรตีน AMP48 ด้วยเทคนิค zymography ใช้ substrate ชนิด gelatin (A) และ casein (B) โดยนำตัวอย่างโปรตีน AMP48 ผสมกับ SDS sample buffer ที่ไม่ได้เติม (lanes 1 และ 2) และเติม 2-mercaptoethanol (lanes 3 และ 4) และในสภาวะที่มีการต้มตัวอย่างหลังจากผสม sample buffer ที่ 95 °C นาน 5 นาที (lanes 2 และ 4) เปรียบเทียบกับไม่ได้ต้มตัวอย่าง (lanes 1 และ 3)

3.10 ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)

3.10.1 วิธี broth twofold microdilution

สารสกัดที่ได้จะนำมาทดสอบการมีฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth twofold microdilution สามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด tryptic soy broth ให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1 x 10^3 CFU/ml และใส่เชื้อ (100 µl) ลงในสารสกัดโปรตีน AMP48 ที่เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ (100 µl) เสร็จแล้วนำไปเลี้ยงที่ 37 °C เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วนำมาให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือ Minimal inhibitory concentration (MIC)ของ บันทึกหน่วยเป็นความเข้มข้นของสารโปรตีนสกัด

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าได้เชื้อ Minimal bactericidal concentration (MBC) ได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหาร trypticase soy agar ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลอง (ตารางที่ 2) พบว่าสารสกัดโปรตีน AMP48 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ชนิด *P. aeruginosa* ATCC 27853 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 2.2 mg/ml และสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ที่ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 8.8 mg/ml) โดยสารสกัดโปรตีน AMP48 ไม่สามารถยับยั้และฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923

ตารางที่ 2 Minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของโปรตีน AMP48

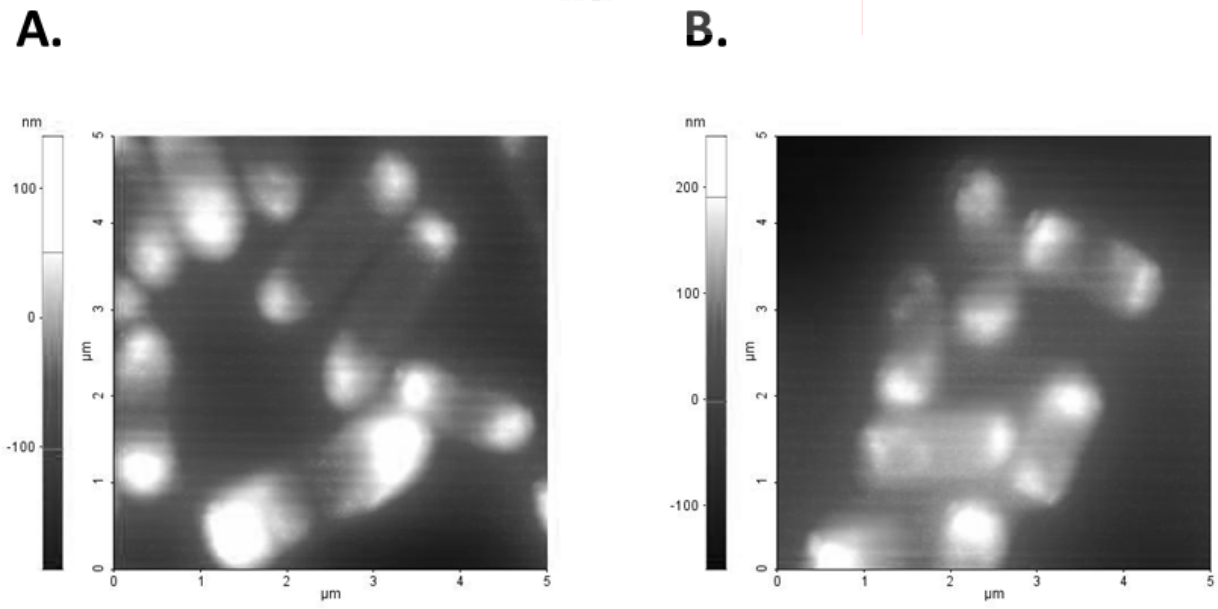
แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	**ความเข้มข้นของโปรตีน AMP48 (mg/ml)**	
	MIC	**MBC**
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	2.2	8.8
Escherichia coli ATCC 25922	No activity	No activity
Staphylococus aureus ATCC 25923	No activity	No activity

3.10.2 AFM imaging และ force measurements

ศึกษาผลของสารสกัดโปรตีน AMP48 ต่อขนาดและรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียโดยใช้เทคนิค atomic force microscopy (AFM) ซึ่งสามารถทำได้โดยนำเซลล์แบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* ATCC 27853 ในขั้นตอนที่ 3.10.1 ที่เติมสารสกัดความเข้มข้น 1.1 mg/ml ปริมาณ 10 µl หยดบน mica discs ขนาด 9.9 mm (PELCO®, TED PELLA Inc., Redding, CA, USA) ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปศึกษาพื้นผิวและขนาดของแบคทีเรียด้วยเครื่อง Park XE-70 atomic force microscopy (Park Systems Inc, Suwan, South Korea) โดยใช้โปรแกรมวัดคือ XEP 1.7.56 software วัดโดยใช้ true non-contact mode ใช้ scan speed 0.5 µm/s และ scan size เท่ากับ 5 x 5 μm^2 ประมวลผลเป็นรูปภาพด้วยโปรแกรม XEI 1.7.6 software ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะทำการเปรียบเทียบระหว่างขนาดและรูปร่างของแบคทีเรียในสภาวะที่เติมสารสกัดโปรตีน AMP48 กับสภาวะที่ไม่มีการเติมสารสกัดโปรตีน โดยการวัดจะวัดตัวอย่างละ 40 เซลล์แบคทีเรีย หรือ 10 microscopic fields ขนาดของแบคทีเรียที่วัดได้ในแต่ละ condition จะมีการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล (normality distribution test) โดยใช้สถิติ Shapiro-Wilk statistic (Shapiro และ Wilk, 1965) หลังจากนั้นข้อมูลที่ได้ระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบคทีเรียที่เติมและไม่เติมสารสกัดโปรตีนจะนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้ Student's *t* test ของชุดโปรแกรม SPSS (windows version 11.5.0)

ผลการทดลองพบว่าเซลล์แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ในสภาวะที่เติมสารสกัดโปรตีน AMP48 มีขนาดและรูปร่างลดลงกว่าแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) (แสดงในรูปที่ 5) โดยแบคทีเรียที่เติมสารสกัดโปรตีนมีขนาดเฉลี่ย 0.668 ± 0.035 x 1.735 ± 0.069 µm และแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการเติมสารสกัดมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 0.915 ± 0.036 µm x 3.019 ± 0.038 µm

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 5 ภาพพื้นผิว (surface) ของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 เมื่อวิเคราะห์ด้วย AFM เปรียบเทียบในสภาวะที่ไม่เติม (A) และเติมสารสกัดโปรตีน AMP48 (B)

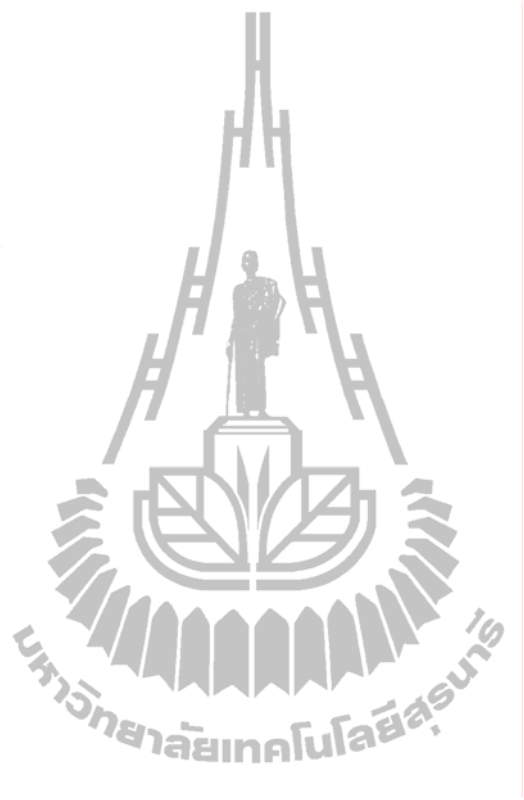
บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกและทำโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากน้ำยางของต้นขนุน โปรตีนดังกล่าวมีขนาดประมาณ 48 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และมีค่า pI ประมาณ 4.2 และโปรตีนนี้มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานชนิด *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ จากคุณสมบัติของโปรตีนดังกล่าวจึงเรียกโปรตีนชนิดนี้ว่า antimicrobial protein 48 kDa (AMP48) นอกจากนี้โปรตีนนี้ยังมี protease activity โดยสามารถย่อย gelatin และ casein ได้เมื่อทดสอบด้วย zymography นอกจากนี้ AMP48 ยังมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่มี reducing agent โดยเมื่อใส่ 2-mercaptoethanol ในโปรตีนพบว่าโปรตีนยังคงสามารถรักษาคุณสมบัติในการเป็น protease ไว้ได้

เอนไซม์ protease มีบทบาทที่สำคับในพืช เช่น ในสรีรวิทยา, ใช้ในกระบวนการสลายสารจำพวกโปรตีนที่สะสมอยู่ภายในเมล็ดของพืชเพื่อใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต หรือการงอกของเมล็ด, ใช้ในกระบวนการกระตุ้นพวก proenzyme ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้เพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ เป็นต้น (Rudenskaya และคณะ, 1998) จากการศึกษาผลงานวิจัยอื่น ๆ พบว่ามีความเป็นไปได้ที่โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ protease หรือเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ สามารถใช้ยับยั้งหรือต้านเชื้อจุลชีพ เช่น สาร zingipain ซึ่งมีฤทธิ์เป็น cysteine protease สกัดได้จากเหง้าไพลดำ (*Zingiber ottensii* Valeton) ซึ่งมีฤทธิต้านเชื้อราและแบคทีเรีย (Karnchanatat และคณะ, 2011) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะนำ protease ที่ได้จากพืชมาใช้เป็นยารักษาโรคติดเชื้อจากจุลชีพได้

เนื่องจากการทดลองนี้โปรตีน AMP48 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความสำคัญ (Kayser และคณะ, 2005) คือ สามารถพบได้ทั่ว ๆ ไปตามธรรมชาติ เช่น ในดิน, น้ำผิวดิน (surface water), ในพืช, ในลำไส้ของสัตว์ นอกจากนี้ยังก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ คือ ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Kayser และคณะ, 2005) ซึ่งเป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยมากว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ หรือโรคที่เกิดจากเชื้อฉวยโอกาสได้ เช่น โรคปอดอักเสบ (pneumonias) จากอุปกรณ์ช่วยหายใจในโรงพยาบาล, โรคติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก, ทำให้เกิดกรวยไตอักเสบเรื้อรัง (chronic pyelonephritis), โรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบในผู้ติดยา, ภาวะที่หูชั้นนอกติดเชื้ออย่างรุนแรง (malignant otitis externa) พบได้บ่อยในผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งเป็นผู้มีภาวะภูมิต้านทานบกพร่อง และการติดเชื้อในกระแสโลหิต (sepsis) ดังนั้นโปรตีน AMP48 ที่สกัดได้จากน้ำยางของต้นขนุน จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลหรืออาจประยุกต์ใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อในอุปกรณ์การแพทย์ได้ นอกจากนี้ AMP48 ยังแสดงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้คล้ายกับยาปฏิชีวนะ (antibiotics) โดยยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์โดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของเซลล์จุลชีพหลังจากที่ได้รับยา ดังนั้นจึงสามารถใช้คุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ของจุลชีพหรือแบคทีเรียในการบ่งชี้ถึงคุณสมบัติของสารสกัดต่อการมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ (Yourassowsky และคณะ, 1982) และสารสกัดโปรตีน AMP48 จากน้ำยางของต้นขนุนในการศึกษาครั้งนี้สามารถออกฤทธิ์โดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและ

ขนาดของเซลล์แบคทีเรียชนิด *P. aeruginosa* โดยทำให้เซลล์แบคทีเรียมีลักษณะโค้งงอ และหดสั้นลง ภายหลังจากเติมสารสกัดโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้เติมสารสกัด ซึ่งสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจนโดยการศึกษาด้วยเทคนิค AFM



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกสารสกัดโปรตีนจากน้ำยางของต้นขนุน โปรตีนดังกล่าวคือ AMP48 เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น protease ที่ทนต่อ reducing agent และมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด gram-negative bacteria ชนิด *P. aeruginosa* ATCC 27853 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้โปรตีนนี้แสดงคุณสมมบัติในการเป็นยาต้านเชื้อจุลชีพหรือ antibiotic โดยทำให้เซลล์แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่ไม่ได้มีการเติมสารสกัดโปรตีน AMP48 จากคุณสมบัติของโปรตีน AMP48 ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดโปรตีน AMP48 จากน้ำยางของต้นขนุนมาใช้เป็นยาต้านจุลชีพ หรือพัฒนาเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อได้

อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นของสารสกัด AMP48 จากน้ำยางของต้นขนุน ซึ่งในการศึกษาต่อไปจะทำการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต่อเชื้อจุลชีพอื่น ๆ ต่อไป เช่น เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ, เชื้อรา และไวรัส เป็นต้น และทำการศึกษาเชิงลึกถึงระดับเซลล์ และโมเลกุลของสารสกัดโปรตีนต่อเซลล์จุลชีพ เช่น การออกฤทธิ์ต่อองค์ประกอบของผนังเซลล์ ต่อส่วนประกอบหรือ DNA หรือ RNA และกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลชีพเป็นต้น เพื่อที่จะพัฒนาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดต่อไป นอกจากนี้จะศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารสกัดเพิ่มเติม เช่นการทำ N-terminal sequencing เพื่อที่จะได้ข้อมูลขององค์ประกอบของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน AMP48 ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่ชัดเจนในการนำไปบ่งชี้ชนิดของโปรตีนนี้ ได้ดีกว่าการทำ peptide mass fingerprint ในการศึกษาครั้งนี้ และทำการศึกษาคุณสมบัติการทำงานและชนิดของ protease ของโปรตีนนี้เพิ่มเติม รวมทั้งทำการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนที่ออกฤทธิ์เพิ่มเติม เช่น การศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนด้วยเทคนิค X-ray crystallography และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนสกัดต่อเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบหรือปรับปรุงโครงสร้างของโปรตีนให้ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือจุลชีพอื่น ๆ ได้ดีขึ้น

บรรณานุกรม

สำนักวิทยาบริการ, สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา. เอกสารสมุนไพรไทย. กรุงเทพมหานคร.

Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., and Morán, F.. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. Prot Eng. 6. 383-390.

Aref, H. L., Salah, K. B., Chaumont, J. P, Fekih, A., and Said, K. (2010). In vitro antimicrobial activity of four *Ficus carica* latex fractions against resistant human pathogens (antimicrobial activity of *Ficus carica* latex). Pak J Pharm Sci. 23. 53-58.

Chantaphakul, H., Tiyasatapon, S., Phanupak, P., and Ruxrungtham, K. (2002). Jackfruit induced anaphylaxis and latex allergy. J Allergy Clin Immunol. 109. S219.

Karnchanatat, A., Tiengburanatam, N., Boonmee, A., Puthong, S., and Sangvanich, P. (2011). Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber ottensii* Valeton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. Prep Biochem Biotechnol. 41. 138-153.

Kawas, C., Gray, S., Brookmeyer, R., Fozard, J., and Zonderman A. (2000). Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: The Baltimore Longitudinal study of Aging. Neurology. 54. 2072-2077.

Kayser, F. H., *et al*. (2005). Medical microbiology. Thieme: New York.

Khan, M. R., Omoloso, A. D., and Kihara, M.. Antibacterial activity of *Artocarpus heterophyllus*. Fitoterapia. 74. 501-505.

Mekkriengkrai, D., Ute, K., Swiezewska, E., Chojnacki, T., Tanaka, Y., and Sakdapipanich, J. T. (2004). Structural characterization of rubber from jackfruit and euphorbia as a model of natural rubber. Biomacromolecules. 5. 2013-2019.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227. 680-685.

Lokvam, J., Braddock, J. F., Reichardt, P. B., and Clausen, T. P. (2000). Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). Phytochemistry. 55. 29-34.

Prasad, R. K. M., and Virupaksha, T. K. (1990). Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. Phytochemistry. 29. 1763-1766.

Rudenskaya, G. N., Bogacheva, A. M., Preusser, A., Kuznetsova, A. V., Dunaevsky, Ya. E., Golovkin, B. N., and Stepanov, V. M. (1998). Taraxalisin-a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb s.l. FEBS Lett. 437. 237-240.

Senanarong, V., Poungvarin, N., Sukhatunga, K., Prayoonwiwat, N., Chaisewikul, R., Petchurai, R., Praditsuwan, R., Udompunthurak, S., and Viriyavejakul, A. (2001). Cognitive status in the community dwelling Thai elderly. J Med Assoc Thai. 84. 408- 16.

Shapiro, S. S., and Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika. 52. 591-611.

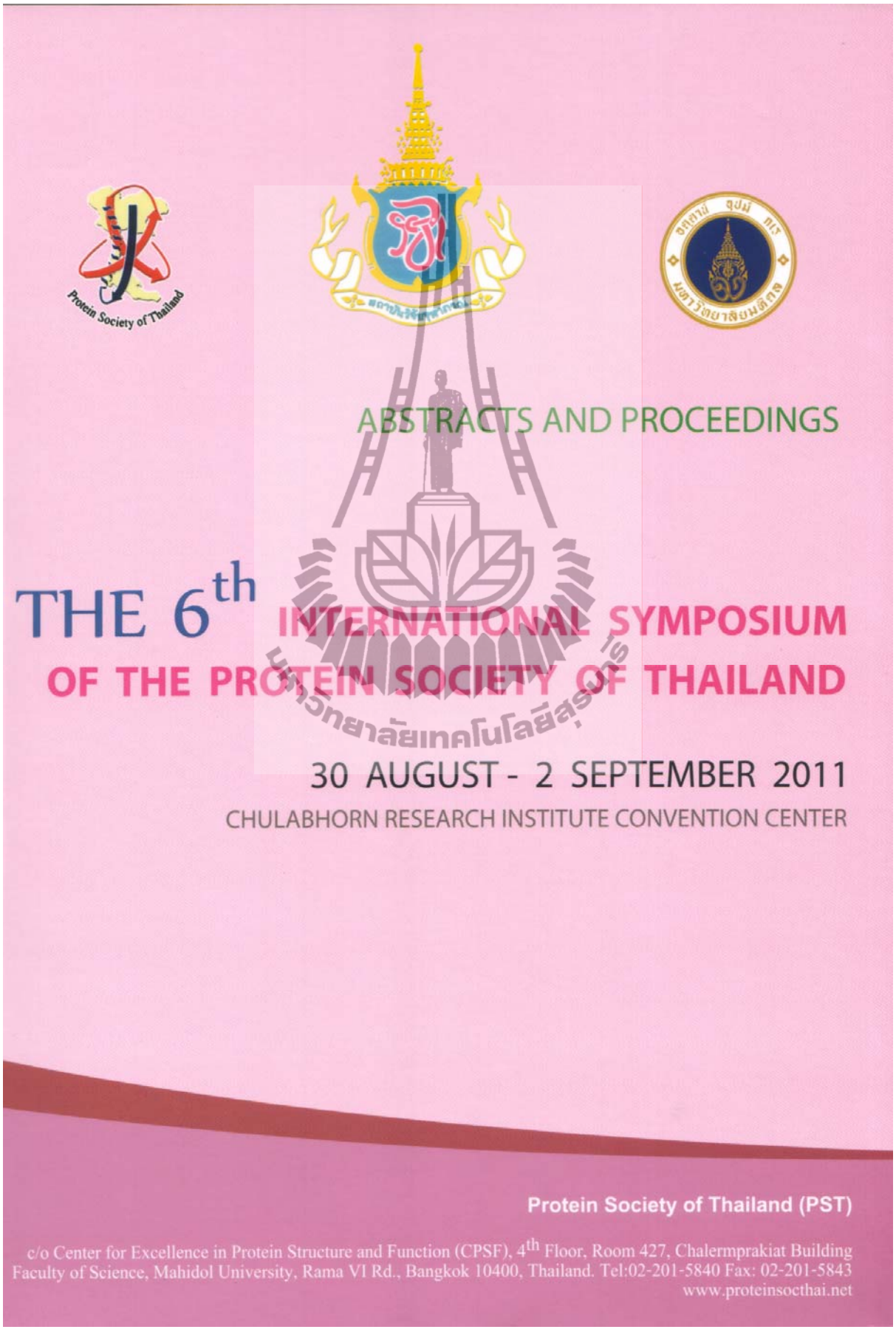
Shimokawa, K., Katayama, M., Matsuda, Y., Takahashi, H., Hara, I., Sato, H., and Kaneko, S. (2002). Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. Mol Hum Reprod. 8. 32-36.

Yourassowsky, E,, van der Linden, M. P., Lismont, M. J., and Croaert, F. (1982). Growth curve patterns and bacterial morphology of *Escherichia coli* subjected to different temocillin (BRL17421) concentrations. J Antimicrob Chemother. 10. 289-293.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ผลงานที่ได้นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ


Protein Society of Thailand
ABSTRACTS AND PROCEEDINGS
THE 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM
OF THE PROTEIN SOCIETY OF THAILAND
30 AUGUST - 2 SEPTEMBER 2011
CHULABHORN RESEARCH INSTITUTE CONVENTION CENTER
Protein Society of Thailand (PST)
c/o Center for Excellence in Protein Structure and Function (CPSF), 4th Floor, Room 427, Chalermprakiat Building
Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok 10400, Thailand. Tel:02-201-5840 Fax: 02-201-5843
www.proteinsocthai.net

POSTER Presentation 13

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF A NOVEL PROTEASE FROM *ARTOCARPUS HETEROPHYLLUS*

Jaruwan Siritapetawee[1], **Sompong Thammasirirak**[2], **Worada Samosornsuk**[3]

[1]Department of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima; [2]Protein and Proteomic Research Group, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen; [3]Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences Faculty of Science, Thammasat University, Pathumthani; Tel: +66-44-223966; Fax: +66-44-223920; E-mail: jaruwan_siritape@yahoo.com

A novel antimicrobial protease (AMP48) was purified from the latex of *Artocarpus heterophyllus* by acid precipitation and ion-exchange chromatography. The protease activity of AMP48 was detected using gelatin-zymography. The apparent molecular mass of this protein on SDS-PAGE was 48 kDa and its estimated pI by isoelectric focusing was 4.2. Antimicrobial activities of AMP48 were analyzed using broth dilution and agar plate methods. AMP48 exhibited antifungal activity against pathogenic strain of fungus (*Candida albican*) and antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.The study highlights the potential of AMP48 as a natural antimicrobial agent.

Supported by Suranaree Univeristy of Technology Research Grant (SUT6-606-54-12-10).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ นางสาวจารุวรรณ ศิริเทพทวี

การศึกษา/คุณวุฒิ: พ.ศ. 2538 ปริญญาตรี: วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

พ.ศ. 2541 ปริญญาโท: วท.ม. (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2547 ปริญญาเอก: วท.ด. (ชีวเคมี)

ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน: สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่อยู่ที่ติดต่อได้: สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 E-mail: jaruwan_siritape@yahoo.com

ผลงานทางวิชาการ/ผลงานวิจัย (ภายใน 5 ปี)

Siritapetawee, J., Pattanasiriwisawa, W. (2008) An attempt of kidney stone analysis with the application of synchrotron radiation. J Synchrotron Radiat. 15: 158-161.

Pattanasiriwisawa, W., Siritapetawee, J., Patarapaibblchi, O., Klinpituksa, P., and Klysubun, W. (2008) Structural analysis of sulfur in natural rubber using X-ray absorption near edge spectroscopy. J Synchrotron Radiat. 15: 510-513.

Siritapetawee, J., Thammasirirak, S., Robinson, R. C., Yuvaniyama, J. (2009) The 1.9 Å X-ray structure of egg-white lysozyme from Taiwanese soft-shelled turtle (*Trionyx Sinensis* Wiegmann) exhibits structural differences from the standard chicken-type lysozyme. J Biochem. 145: 193-198.

Pattanasiriwisawa, W., Sirinupong, N., Suwanmanee, P., Daengkanit, C., Siritapetawee, J. (2009) An attempt to analyze the bark disease in *Havea brasiliensis* using X-ray absorption near-edge spectroscopy. J Synchrotron Radiat. 16(Pt5): 622-627.

Siritapetawee, J., Pattanasiriwisawa, W., Sirithepthawee, U. (2010) Trace element analysis of hairs in patients with dementia. J Synchrotron Radiat. 17(Pt2): 268-272.

Siritapetawee, J., Thammasirirak, S. (2011) Purification and characterization of a heteromultimeric glycoprotein from *Artocarpus heterophyllus* latex with an inhibitory effect on human blood coagulation. Acta Biochimica Polonica, 58: 521-528.

Jandaruang, J., Siritapetawee, J., Thumanu, K., Songsiriritthigul, C., Krittanai, C., Daduang, S., Dhiravisit, A., Thammasirirak, S. (2012) The Effects of Temperature and pH on Secondary Structure and Antioxidant Activity of *Crocodylus siamensis* Hemoglobin. Protein Journal, 31: 43-50.