**ชื่อวิทยานิพนธ์** สารต้านจุลชีพที่ได้จากน้ำยางพารา

**ผู้เขียน** นางสาวกัญญนัช กนกวิรุฬห์

**สาขาวิชา** ชีวเคมี

**ปีการศึกษา** 2550

## บทคัดย่อ


การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการสุ่มหาโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราจากน้ำยางพารา พร้อมทั้งทำบริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของโปรตีนดังกล่าว ผลจากการสุ่มหาพบว่า B-serum ที่เตรียมได้จากส่วนของก้นหลอดหลังการปั่นแยกน้ำยางสด มีส่วนประกอบของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา จึงได้นำ B-serum ไปผ่านการทำบริสุทธิ์ขั้นแรกโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตน พบว่าส่วนของโปรตีนที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีที่สุดคือ ส่วนที่ตกตะกอนที่ช่วงความเข้มข้นของอะซีโตน 70-80% จึงได้แยกส่วนดังกล่าวไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ DEAE-Sepharose Fast Flow พร้อมทั้งทำการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อนี้ด้วยเครื่อง MALDI-TOF mass spectrometer ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 4,717 ดาลตัน ข้อมูลที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้าน น้ำหนักโมเลกุล, ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน และ องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ ชี้ให้เห็นว่าโปรตีนนี้ตรงกับโปรตีน hevein ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นโปรตีนที่มีความสามารถจับจำเพาะกับ chitin จากการศึกษาความสามารถของ hevein ในการฆ่าเชื้อ *Candida* สายพันธุ์ต่างๆที่พบในช่องปาก พบว่าค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ใช้ยับยั้งเชื้อได้ 80% หรือ $MIC_{80}$ ต่อเชื้อ *C. tropicalis* ATCC 750 คือ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และต้องใช้ความเข้มข้น 95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 และ 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับยับยั้งเชื้อ *C. krusei* ATCC 6258 ในการทดสอบการฆ่าเชื้อด้วยวิธี disk diffusion assay พบว่าโปรตีนยับยั้งโปรตีเอส (*Hevea* protease inhibitor, HPI) ที่เตรียมและทำบริสุทธิ์จากส่วนของ C-serum ที่ได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสด มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ของ hevein พร้อมกับได้พบว่าในภาวะที่มี $Ca^{2+}$ อยู่ด้วย hevein สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของยีสต์

นอกจากนั้น การศึกษาวิจัยยังพยายามมุ่งหาคำอธิบายหน้าที่ทางสรีระของอนุภาคยางขนาดเล็ก (small rubber particle, SRP) ซึ่งมีอยู่จำนวนกระจายในน้ำยางโดยเฉพาะที่เกี่ยวโยงกับการยับยั้งหรือต้านการบุกรุกของเชื้อจุลชีพ รวมทั้งการศึกษาการเสริมฤทธิ์ที่มีต่อยา amphotericin B (AMB) ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อราที่นิยมใช้ในปัจจุบัน โดยพบว่า SRP สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการ

เกาะกลุ่มของยีสต์ พร้อมทั้งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยา AMB ในการฆ่าเชื้อราดังกล่าว ในทำนองเดียวกันพบว่า (small rubber particle protein, SRPP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สกัดได้จาก SRP โดยการใช้ตัวทำละลายไขมันอินทรีย์ ก็สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของยีสต์ และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยา AMB ได้เช่นกัน โดยโปรตีน SRPP มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ของยา AMB เมื่อใช้โปรตีนในปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 0.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้สามารถลดปริมาณยา AMB ที่ต้องใช้ในการฆ่าเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028 และ *C. tropicalis* ATCC 66029 ได้ถึงสี่เท่า โดยเมื่อทำการย่อยโปรตีน SRPP ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ได้เป็นเปบไทด์ขนาดต่างๆ (tryptic SRPP-derived peptide) แล้วทำการแยก tryptic SRPP-derived peptides เหล่านี้ตาม hydrophobicity ด้วยตัวทำละลายไขมัน (คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1) พบว่า tryptic peptides ที่ละลายในส่วนตัวทำละลายคลอโรฟอร์มมีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ของยา AMB ดีกว่าโดยสามารถลดปริมาณโปรตีนที่ต้องใช้ลงได้ถึงสี่เท่า หากเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ต้องใช้กับ tryptic peptides ที่ละลายในส่วนตัวทำละลายเมทานอล ผลแสดงให้เห็นว่าระดับความเป็น hydrophobic ของเปบไทด์ของโปรตีน SRPP มีส่วนสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ ยิ่งมีความเป็น hydrophobic มากก็จะยิ่งมีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ของยา AMB ได้ดียิ่งขึ้น

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Antimicrobials from Latex of *Hevea brasiliensis* |
| **Author** | Miss Kanyanatt Kanokwiroon |
| **Major program** | Biochemistry |
| **Academic Year** | 2007 |

## Abstract

In this study, we report the screening, purification and characterization of antimicrobial related proteins from fresh *Hevea* latex. Upon screening, the antimicrobial protein was found in B-serum fraction prepared from the bottom fraction of ultracentrifuged latex. The B-serum was further fractionated step-wise by acetone to separate the active antimicrobial protein fraction. The most effective fraction, found in 70-80% acetone, was further purified by DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography. The active protein exhibited a major peak corresponding to $M_r$ of 4,717 Daltons when analyzed by MALDI-TOF mass spectrometer. The data obtained for the $M_r$ value, N-terminal sequence residues and amino acid composition confirms that the purified antifungal protein is hevein, a previously known chitin binding protein. The hevein was shown to inhibit growth of several oral *Candida* spp. The $MIC_{80}$ of hevein was found to be as low as 12 μg/ml for *Candida tropicalis* ATCC 750. Higher $MIC_{80}$s were obtained for *Candida albicans* ATCC 10231 (95 μg/ml) and *Candida krusei* ATCC 6258 (190 μg/ml). By disk diffusion assay method, a *Hevea* latex protease inhibitor, isolated and purified from the C-serum fraction of ultracentrifuged latex, was revealed to enhance the antifungal activity of hevein. Moreover, in a presence of $Ca^{2+}$, hevein was also shown to induce yeast cell aggregation.

In addition, possible defense function of the highly abundant *Hevea* latex small rubber particles (SRP) in sustaining the microbial invaders and their enhancing effect on the efficacy of a commercial antifungal drug, amphotericin B (AMB), were also explored. The washed SRP were shown to aggregate yeast cells and enhance the AMB's efficacy. Similarly, the small rubber particle proteins (SRPP), extracted from washed rubber particles with lipid solvent, were also able to induce yeast cell aggregation and enhance AMB's efficacy. In the presence of the SRPP at concentration $\geq$ 0.40 μg/ml, the $MIC_{80}$s of AMB for *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028 and *C. tropicalis* ATCC 66029 were reduced four-fold. When the

tryptic SRPP-derived peptides were fractionated by partitioning in the lipid solvent, chloroform/methanol (2:1, v/v), the tryptic peptides recovered from the chloroform phase were much more effective in reducing the $MIC_{80}$ than those from the methanol phase, a four-fold difference. The positive result on reduced MIC effect seems to be attributed by and directly related to the hydrophobic nature of the SRPP. The higher hydrophobic degree of the tryptic SRPP-derived peptides might probably give rise to the better enhancing effect obtained for lowering the MIC.