



## รายงานการวิจัย

การสกัดและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อสิว  
จากน้ำยางของต้น *Euphorbia cf. antiquorum*  
(Isolation and characterization of proteins that inhibit bacteria  
causing acne from the latex of *Euphorbia cf. antiquorum*)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

การสกัดและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อสิว  
จากน้ำยางของต้น *Euphorbia cf. antiquorum*  
(Isolation and characterization of proteins that inhibit bacteria  
causing acne from the latex of *Euphorbia cf. antiquorum*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. จารุวรรณ ศิริเทพทวี

สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560-2561

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2562

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 และ พ.ศ. 2561 ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองในส่วนเทคนิค X-ray fluorescence (XRF) และ X-ray absorption spectroscopy (XAS) ณ BL5.2: SUT-NANOTEC-SLRI Beamline



## บทคัดย่อ

โพรตีนเลกตินชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้มีการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้จากน้ำยางของต้น *Euphorbia antiquorum* L. โพรตีนนี้มีชื่อว่า EantH และจัดอยู่ในกลุ่มเลกตินที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแลกโทส EantH มีความคงตัวในช่วง pH 5-9 และอุณหภูมิ 5-65 องศาเซลเซียส เลกตินนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้นของโพรตีนต่ำสุด (MIC) เท่ากับ 2000 µg/ml และแบคทีเรียแกรมลบ *Samonella typhimurium* ความเข้มข้นของโพรตีนต่ำสุด (MIC) เท่ากับ 1000 µg/ml EantH สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *Streptococcus agalactiae* ด้วย MIC เท่ากับ 125 µg/ml และ 250 µg/ml ตามลำดับ และสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของโพรตีน (MMC) เท่ากับ 1000 µg/ml และ 2000 µg/ml ตามลำดับ จากผลการทดลอง Scanning electron microscopy พบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่สามารถก่อสิวได้ คือ *P. acnes* และแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ คือ *S. typhimurium* มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากภายหลังที่ได้รับ EantH และเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและตายได้ นอกจากนี้พบว่าคุณสมบัติในการมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของโพรตีนสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาล D-galactose ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าโพรตีนนี้สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้โดยเข้าจับกับน้ำตาลบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนแปลงอย่างมากจนไม่สามารถเจริญเติบโตหรือมีชีวิตต่อไปได้

## Abstract

A lectin with rabbit hemagglutination activity (HA) was purified from the crude latex of *Euphorbia antiquorum* L. The purified protein was designated EantH, and is classified as a galactose-specific thermostable lectin. The HA of EantH was stable at pH values of 5-9 and temperature 5-65 °C. The lectin had bacteriostatic action on the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2000 µg/ml and on a Gram-negative bacterium *Salmonella typhimurium*, with a MIC of 1000 µg/ml. EantH inhibited the growth of *Propionibacterium acnes* and *Streptococcus agalactiae* with MIC of 125 µg/ml and 250 µg/ml, respectively. EantH killed *P. acnes* and *S. agalactiae* with a minimum microbicidal concentration (MMC) of 1000 µg/ml and 2000 µg/ml, respectively. Scanning electron microscopy indicated that binding of EantH to the carbohydrates in the cell walls of *P. acnes* and *S. typhimurium* drastically altered the bacterial cells, and led to inhibition of growth and/or cell death. The antimicrobial activity of EantH could be neutralized by D-galactose, indicating that its bactericidal action involves binding to galactose in the cell wall.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
สารบัญ .....	ง
สารบัญตาราง .....	จ
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
ขอบเขตของการวิจัย .....	2
กรอบแนวคิดของการวิจัย .....	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย .....	3
บทที่ 2 เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	10
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ .....	26
บรรณานุกรม.....	27
ภาคผนวก .....	29
ประวัติผู้วิจัย .....	40

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การทำโปรตีน EantH จากน้ำยางของต้น <i>E. antiquorum</i> ให้บริสุทธิ์.....	17
ตารางที่ 2 ความจำเพาะของน้ำตาลของโปรตีนที่ออกฤทธิ์.....	18
ตารางที่ 3 Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum microbicidal concentration (MMC) ของ EantH.....	23



## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงสาเหตุการเกิดลิว.....	6
รูปที่ 2 แสดงลำดับการเกิดลิวชนิดต่าง ๆ .....	6
รูปที่ 3 ต้นและดอกสลัดได้.....	8
รูปที่ 4 X-ray fluorescence spectra ของโลหะ (metals) และ trace elemets ที่พบได้ในน้ำยางสดของต้น <i>E. antiquorum</i> .....	11
รูปที่ 5 Ca K-edge XANES spectra จากน้ำยางของต้น <i>E. antiquorum</i> และ สารประกอบมาตรฐาน .....	12
รูปที่ 6 Zn K-edge XANES spectra จากน้ำยางของต้น <i>E. antiquorum</i> และ สารประกอบมาตรฐาน .....	13
รูปที่ 7 แสดงแถบโปรตีนของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ก่อน (A) และหลัง (B) purify โปรตีน ด้วยเทคนิค column chromatography .....	14
รูปที่ 8 Elution profile ของโปรตีนออกฤทธิ์ในรูป dimeric form เมื่อหา ขนาดโมเลกุลด้วย gel filtration (Sephacryl S-200) column chromatography .....	15
รูปที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนจากปลาย N-terminal ของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ จากน้ำยางของต้น <i>E. antiquorum</i> กับโปรตีน galactose-inhibitable lectin จากต้น <i>E. marginata</i> .....	16
รูปที่ 10 ความคงทนต่อช่วง pH ต่าง ๆ ของ EantH .....	19
รูปที่ 11 ความคงทนต่อช่วง อุณหภูมิ ต่าง ๆ ของ EantH .....	20
รูปที่ 12 Scanning electron microscopy ของเซลล์ของเชื้อ <i>P. acnes</i> .....	24
รูปที่ 13 Scanning electron microscopy ของเซลล์ของเชื้อ <i>S. typhimurium</i> .....	25



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาของการวิจัย

สิว เป็นโรคอักเสบเรื้อรังที่ชุมชนและต่อมไขมัน พบได้บ่อยที่บริเวณใบหน้าและส่วนบนของลำตัว สิวที่เป็นตามธรรมชาติ (acne vulgaris) เกิดขึ้นในระยะวัยรุ่น สิวเป็นความผิดปกติของ pilosebaceous units ซึ่งประกอบด้วยต่อมไขมัน (sebaceous gland), เส้นขน (hair) และ infundibulum ซึ่งเป็นเซลล์บุล้อมรอบเส้นขนและเปิดออกสู่ผิวส่วนนอก สิวเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยมาพบแพทย์เป็นอันดับ 2 ของผู้ป่วยโรคผิวหนังทั้งหมดและมีจำนวนผู้ป่วยมากขึ้นในแต่ละปี (ประวิตร, 2551) สิวเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ได้หลายปัจจัย เช่น ผนังท่อต่อมไขมันแบ่งตัวมากกว่าปกติและไม่หลุดลอกออก ต่อมไขมันหลั่งไขมันมากกว่าปกติ ปฏิกริยาการอักเสบ และมีเชื้อแบคทีเรียอาศัยอยู่บริเวณต่อมไขมัน แบคทีเรียที่มักเป็นสาเหตุของสิว เช่น *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) และ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีกลไกที่ทำให้เกิดสิวโดยการหลั่งเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น lipase, phosphatase, hyaluronidase และ protease และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งสารเหล่านี้ก่อให้เกิดการระคายเคือง กระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวมารวมกันมากขึ้นและเกิดการอักเสบตามมา การรักษาสิวนั้นไม่รุนแรงจะเลือกใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับทาภายนอก เช่น Clindamycin solution 1% และ Erythromycin solution 2-4% แต่ในปัจจุบันพบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของสิวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. acnes* มักดื้อต่อยา (Ross et al., 2002) ดังนั้นในปัจจุบันเพื่อลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อจึงมักใช้ยา Clindamycin และ Erythromycin ทาร่วมกับ Benzoyl peroxide แต่ Benzoyl peroxide มีผลข้างเคียงคือ อาจทำให้เกิด allergic contact dermatitis (Gollnick et al., 2003)<sup>a</sup>, การระคายเคืองผิวหนัง ทำให้ผิวแห้งลอก (Gollnick et al., 2003)<sup>b</sup> อาจเกิดรอยต่างชั่วคราวในบริเวณที่ทายาและยายังกัดสีเสื้อผ้าทำให้เกิดเป็นรอยต่างได้ (Gollnick et al., 2003)<sup>a</sup> นอกจากนี้ยังมียาทาชนิดอื่น ๆ เช่น Azelaic acid ซึ่งเป็นตัวยาลอกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *P. acnes* แต่อาจมีอาการระคายเคือง แสบ แดงหรือหน้าลอก (Krautheim and Gollnick, 2004) จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าน้ำยางของต้น *Euphorbia cf. antiquorum* (*E. cf. antiquorum*) มีเอนไซม์ protease และ ตัวยับยั้งเอนไซม์ protease (protease inhibitor) อยู่หลายชนิด มีรายงานว่ทั้งเอนไซม์ proteases และ proteases inhibitors สามารถมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น protease inhibitor จากน้ำยางของต้นยางของต้น *Hevea brasiliensis* (Kanokwiroon et al., 2008) และ protease จากน้ำยางของต้น *Artocarpus heterophyllus* (Siritapetawee et al., 2012) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาผลของโปรตีนสกัดจากน้ำยางของต้น *E. cf. antiquorum* ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มักก่อให้เกิดสิว โดยที่ชนิดนี้อยู่ในกลุ่มของต้นสลัดไดและจัดเป็นสมุนไพรไทยที่ใช้รักษาโรคผิวหนัง เช่น หูด (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน ๆ เล่มที่ 24) และสารสกัดโปรตีนที่ได้ อาจสามารถพัฒนาเป็นองค์ประกอบของตัวยาที่ใช้รักษาสิวที่มีผลข้างเคียงน้อยกว่ายา

ที่ใช้ในปัจจุบัน และงานวิจัยนี้ยังเป็นการส่งเสริมให้มีการปลูกและอนุรักษ์พืชสมุนไพรไทยเพื่อใช้เป็นยารักษาโรค

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกโปรตีนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว (antibacteria) จาก crude latex ของน้ำยางต้น *E. cf. antiquorum*

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ เช่น protease, protease inhibitor, secondary structure เป็นต้น

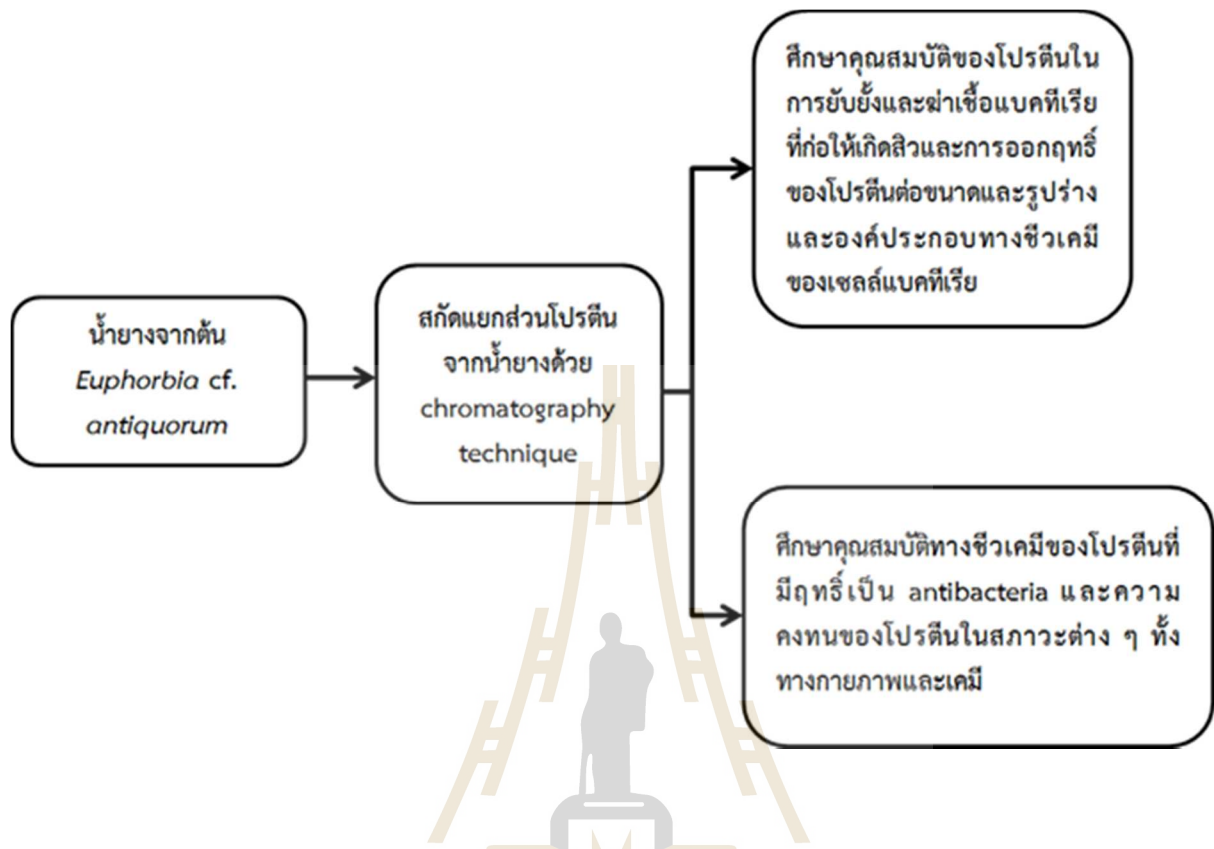
1.2.3 เพื่อศึกษาความคงทนของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต่อสภาพแวดล้อมทั้งทางกายภาพและเคมีต่าง ๆ เช่น ที่อุณหภูมิ, pH ต่าง ๆ และ ในสภาวะที่มีไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ

1.2.4 เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของโปรตีนต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วยการเตรียมน้ำยางจากต้นของ *E. cf. antiquorum* ทำการแยกโปรตีนจากน้ำยางของ *E. cf. antiquorum* ด้วยเทคนิค column chromatography นำโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละส่วนมาศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว คือ *P. acnes*, *S. epidermidis* และ *S. aureus* ด้วยวิธี broth dilution และ agar plate method นำโปรตีนที่ออกฤทธิ์ มาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น molecular weight, ค่า PI วิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นไกลโคโปรตีนของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ ศึกษาความคงทนของโปรตีนในสภาวะต่าง ๆ เช่น ต่อดูดอุณหภูมิ, pH ต่าง ๆ ศึกษาการออกฤทธิ์ของโปรตีนต่อผนังเซลล์หรือรูปร่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค scanning electron microscope (SEM) หรือ Atomic force microscopy (AFM)

## 1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย



## 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.5.1 ได้สารสกัดธรรมชาติ คือ โปรตีนจากน้ำยางของต้น *E. cf. antiquorum* ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียก่อสิวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่มีชีวิต

1.5.2 ได้ข้อมูลเบื้องต้นของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งทางชีวเคมี และชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบผลิตภัณฑ์ยาได้ในการศึกษาครั้งต่อไป เช่น การศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน และการเข้าจับของโปรตีนต่อโมเลกุลที่จำเพาะของเซลล์แบคทีเรียก่อโรค เป็นต้น

1.5.3 ในอนาคตสามารถใช้โปรตีนที่มีฤทธิ์ดังกล่าว เพื่อศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ และต่อยาปฏิชีวนะจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาล

1.5.4 มีแนวโน้มที่สามารถนำโปรตีนที่สกัดได้ดังกล่าวเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ เช่น ในการเป็นส่วนประกอบของยารักษาสิว

1.5.5 ได้ผลงานวิจัยที่สามารถเผยแพร่ประโยชน์ของสารสกัดจากธรรมชาติจากพืชที่พบได้ในประเทศไทย ในการประชุมระดับนานาชาติ หรือตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

## บทที่ 2

### เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สิวและยาพาราซิว

##### 2.1.1 สิว

สิวเป็นโรคอักเสบเรื้อรังที่ขุมขน-ต่อมไขมัน พบได้บ่อยโดยเฉพาะที่บริเวณใบหน้าและส่วนบนของลำตัว สิวเกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มการผลิต sebum ของต่อมไขมันร่วมกับการเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติของ keratin ภายใน pilosebaceous unit การรวมตัวกันของเซลล์ผิวชั้น stratum corneum ซึ่งอยู่บริเวณรูเปิดของท่อไขมัน ทำให้เกิดการอุดตันแน่น จนไปเป็นตุ่มนูนที่เรียกว่า microcomedones ถ้าปล่อยทิ้งไว้จะมีขนาดใหญ่ขึ้น เพิ่มมากขึ้นและอัดแน่น ก่อให้เกิดสภาพเป็นสิิวหัวปิด (closed comedones หรือ white head) ถ้าสภาพนี้ยังคงดำเนินต่อไปจะเกิดการดันและแตกของปลายเปิดของท่อต่อมไขมันสู่ผิวหนังส่วนนอก กลายเป็นสิิวหัวเปิด (opened comedones) เซลล์เยื่อภายในท่อเมื่อถูกแสงจะทำให้สาร melanin มีสีคล้ำลง เห็นเป็นสิิวหัวดำ (blackhead) และพบเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ตามปกติภายในต่อมไขมัน โดยจะสร้างเอนไซม์ lipase ไปทำลาย triglycerides ในไขมันทำให้เกิดเป็นกรดไขมัน นอกจากนี้ *P. acnes* ยังหลั่งเอนไซม์ protease, hyaluronidase และ low molecular weight chemotactic factor ซึ่งทำให้ต่อมระคายเคืองและเกิดกระบวนการอักเสบขึ้น หากเกิดการอุดตันของท่อต่อมไขมันผนังของ pilosebaceous unit แตกออก ปล่อยกรดไขมันสู่เนื้อเยื่อรอบๆ ทำให้บวมและมีเซลล์เม็ดเลือดขาวสะสม เกิดเป็นสิิวอักเสบ เป็นตุ่มแดง (papules), ตุ่มหนอง (pustules), สิวหัวช้าง (nodulocystic acne) และ cyst หรือฝี (abscess) การติดเชืิอระหว่างที่ยังเป็นสิิวหัวปิดอยู่ และผนังของ comedones แตกลงสู่ชั้นหนังกำพร้าด้านล่างและหนังแท้เกิดเป็นกระเปาะนูนใหญ่ที่เรียกว่า สิวหัวช้าง และหากสิิวมีการอักเสบรุนแรงมากขึ้น เช่น มีการบีบเค้นสิิว สิวที่อักเสบจะเกิดเป็นหนองขึ้น

พยาธิกำเนิดของสิิว มีสาเหตุสำคัญร่วมกัน 4 สาเหตุหลัก คือ

1. ต่อมไขมันสร้าง sebum เพิ่มขึ้น การที่ระดับของ sebum สูงขึ้นกว่าปกติ อาจเนื่องจากการสร้างฮอร์โมน androgen เพิ่มขึ้น ซึ่งมีการหลั่งเพิ่มขึ้นในระยะวัยรุ่นกระตุ้นต่อมไขมันให้มีการสร้างไขมันเพิ่มขึ้น, ต่อมไขมันมีความไวต่อการกระตุ้นเพิ่มขึ้นโดยระดับปกติของฮอร์โมนในเลือดโดยอาศัยการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ 5-alpha-reductase ซึ่งเปลี่ยน testosterone ไปเป็นสารที่มีฤทธิ์มากกว่า คือ 5-alpha-dihydrotestosterone ภายในเซลล์ของต่อมไขมัน หรืออาจเป็นความสามารถของ receptor ภายในเซลล์ที่จะจับฮอร์โมน
2. มีความผิดปกติในการสร้างเคราตินภายในท่อขุมขน-ต่อมไขมัน (pilosebaceous follicle) ภายในท่อขุมขน-ต่อมไขมันของผู้ที่เป็นสิิวมีการสร้างสาร keratin เพิ่มขึ้นและอัดกันแน่นเกิดเป็นสิิวหัวขาว (comedones ชนิดปิด) และสิิวหัวดำ (comedones ชนิดเปิด)

3. เชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอาศัยอยู่ที่ผิวหนังและภายในต่อมไขมันเป็นสาเหตุของการเกิดสิว เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบได้ส่วนใหญ่มีดังนี้

3.1 *Propionibacterium acnes* เป็น anaerobic pleomorphic diphtheroid

ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของสิว 2 ประการ คือ

3.1.1 เชื้อ *P. acnes* ก่อการอักเสบในต่อมไขมันโดยการหลั่งเอนไซม์ lipase และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการรวมตัวกันของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil เอนไซม์ lipase มีคุณสมบัติย่อยไขมันกลายเป็นกรดไขมันอิสระ กรดไขมันอิสระและสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำนี้สามารถซึมผ่านต่อมไขมันไปสู่หนังกำพร้าใกล้เคียงได้แล้วจะร่วมกับแอนติบอดีและคอมพลีเมนต์จากน้ำเหลือง ทำให้เกิดปฏิกิริยาแล้วมีเอนไซม์ hydrolytic เกิดขึ้นใหม่ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถกระตุ้นเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด neutrophil และ macrophage ได้โดยตรง โดยไม่ต้องมีแอนติบอดี หรือคอมพลีเมนต์ เอนไซม์ที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะย่อยkeratin และเส้นขน

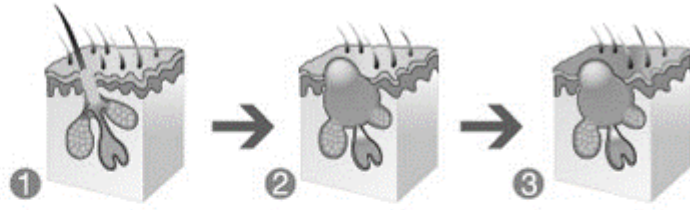
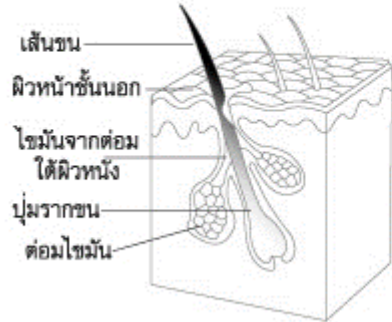
3.1.2 เชื้อ *P. acnes* ผลิตเอนไซม์ lipase ซึ่งสามารถสลาย triglycerides ในไขผิวหนัง ให้เป็นกรดไขมันอิสระ เช่น linoleic acid ซึ่งมีฤทธิ์ระคายก่อให้เกิด comedones และการอักเสบ เชื้อ *P. acnes* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน ดังนั้นจึงชอบอยู่ในที่มีความดันออกซิเจนต่ำ คือ ส่วนลึกของต่อมไขมัน ซึ่งเป็นที่อยู่รวมของแบคทีเรียบนผิวหนัง ในสิวลหัวขาวจะพบ *P. acnes* ประมาณร้อยละ 77 ในสิวลหัวดำพบร้อยละ 72 ในคนเป็นสิวลจะพบแอนติบอดีต่อ *P. acnes* สูงกว่าปกติ และเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้มีการอักเสบเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม จำนวน *P. acnes* บนผิวหนังไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของสิวล แต่จำนวนของ *P. acnes* ในต่อมไขมันจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับความรุนแรงของสิวลโดยการหลั่งสารชีวเคมีที่ทำให้เกิดการอักเสบ (เรณู โคตรจรัส, 2544) กลไกที่ทำให้เกิดสิวลโดย *P. acnes* เนื่องมาจากการหลั่งเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ lipase, phosphatase, lecithinase, deoxyribonuclease, hyaluronidase, protease, neuraminidase และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งเป็นสารแอนติเจนหรือสารเคมีที่กระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้มารวมตัวกันมากขึ้น

3.2 *Staphylococcus epidermidis* และ *S. aureus* แบคทีเรียทั้งสองเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างทรงกลมติดสี่แตรมบวก เป็นต้นเหตุที่พบบ่อยที่สุดของการติดเชื้อแบคทีเรียในคนโดยเฉพาะ *S. aureus* และทำให้เกิดโรคได้เกือบทุกระบบของร่างกาย ส่วนใหญ่มักเกี่ยวกับทางผิวหนัง ได้แก่ ฝี หนอง สิว รวมถึงการติดเชื้อที่แผลหลังการผ่าตัด *S. aureus* สร้างสารพิษและเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยให้แบคทีเรียสามารถต่อสู้กับกลไกต่างๆ ที่ร่างกายใช้ในการกำจัดจุลชีพ ทำให้เชื้อสามารถแบ่งตัวเจริญเติบโตและก่อให้เกิดพยาธิสภาพแก่ร่างกายของมนุษย์ได้

4. การเกิดปฏิกิริยาการอักเสบ เป็นผลของ mediator ต่างๆ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. acnes* ที่อยู่ภายใน ขุมขน กระจาย ผ่านช่อง (gap) ที่ผนังของขุมขนออกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาอักเสบขึ้น

สาเหตุและลำดับการเกิดสิวลชนิดต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

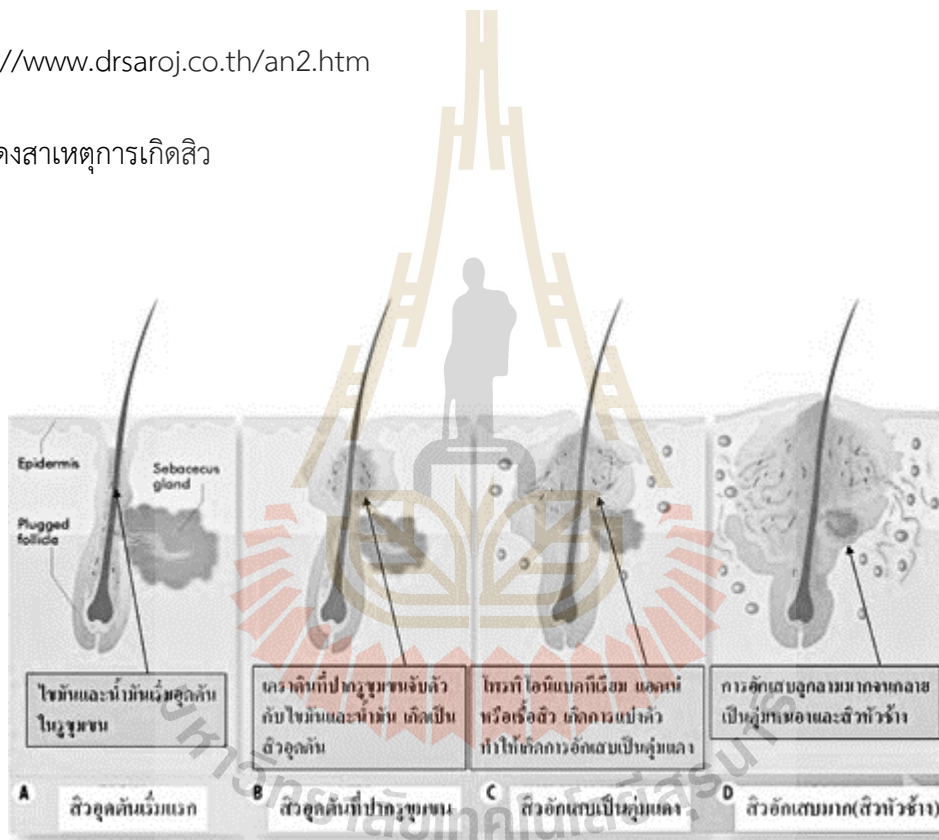
## สาเหตุของการเกิดสิว



เมื่อก้าวเข้าสู่วัยหนุ่มสาว ฮอโมนเริ่มไปกระตุ้นต่อมไขมันให้ผลิตน้ำมันมากขึ้น เป็นผลทำให้ท่อระบายไขมันใกล้รูขุมขนเกิดการอุดตัน เรียกว่า สิวอุดตัน (Comedone) เมื่อแบคทีเรียบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพีแอกเน (P.acne) มาใช้ไขมันที่อุดตันเป็นอาหาร ปล่อยของเสียที่ทำให้ผิวหนังแดงอักเสบ และแบ่งตัวทวีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้กลายเป็นสิวยักเสบที่มีลักษณะเป็นตุ่มบูน บวมแดง และเป็นหนอง

ที่มา: <http://www.dr.saroj.co.th/an2.htm>

รูปที่ 1 แสดงสาเหตุการเกิดสิว



ที่มา: <http://dermonu.lnwshop.com/>

รูปที่ 2 แสดงลำดับการเกิดสิวจนิตต่าง ๆ

### 2.1.2 ยาทารักษาสิว (ประวิตร, 2549)

กรณีที่เป็นสิวน้อยอาจใช้แค่ยาทารักษาสิว ดังนี้

#### 2.1.2.1 เบนซอยล์ เพอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide)

เป็นยารักษาสิวที่ได้ผลดีตัวหนึ่ง ฤทธิ์ของยาตัวนี้ทำให้หัวสิวหลุดออกได้เร็วขึ้น รวมไปถึงการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้สิวยักเสบ และป้องกันไม่ให้เกิดไขมันอุดตัน ยิ่งตัวยานเบนซอซิล เพอร์ออกไซด์ (บีพี) มีความเข้มข้นสูงเพียงใด ก็ยิ่งทำให้ผิวหนังแห้งและลอกมากขึ้นเพียงนั้น ผู้ป่วยบางรายทาบีพีบ่อยเกินไป หน้าจะแห้ง ระคายเคืองมาก ในกรณีนี้จำเป็นต้องหยุดทายา แล้วกลับมาพบแพทย์เพื่อรับการรักษาการระคายเคืองและอักเสบของใบหน้าต่อไป แรกทีเดียวอาจทายา (ต้องทายาก่อนล้างหน้าตอนเย็น) ทิ้งไว้ทั่วหน้า 2-3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเปล่า ถ้าไม่มีการระคายเคืองและอักเสบอย่างค่อยๆ เพิ่มเวลาและความเข้มข้นขึ้นได้

### 2.1.2.2 กรดวิตามินเอ (retinoic acid)

Tretinoin กรดวิตามินเอในรูปยาทาช่วยขจัดปัญหาสิวยุดตันได้ โดยที่กรดวิตามินเอ จะซึมผ่านลงไปสู่รูขุมขน ทำให้เซลล์ผิวหนังในรูขุมขนหลวมตัว สิวอุดตันจึงหลุดออกม่ง่ายขึ้น นอกจากนั้น กรดวิตามินเอทำให้เซลล์ผิวหนังแบ่งตัวเร็วขึ้น สิ่งที่คั่งค้างอุดตันจึงหลุดลอกออกมาเร็ว ยาจะออกฤทธิ์ต่อเมื่อทาไปแล้ว 3-6 สัปดาห์ ปกติแล้วไม่ใช่กรดวิตามินเอชนิดเดียวกับสิวยักเสบ เพราะจะทำให้สิวยักเสบเลวลง ควรใช้กรดวิตามินเอชนิดเดียวกับสิวยุดตันหรือคอมมีโดนเท่านั้น การทายาตัวนี้ให้ทาเพียงบางๆ วันละครั้งก่อนนอน ไม่ต้องล้างหน้าก่อนทา เพราะยิ่งทำให้หน้าแห้งและระคายเคืองง่ายขึ้น นอกจากนั้น ในตอนเช้าควรทากันแดดทั่วหน้าด้วย เพราะแสงแดดยิ่งทำให้ฤทธิ์การระคายเคืองของกรดวิตามินเอต่อผิวหนังสูงขึ้น และต้องใช้ภายใต้การดูแลของแพทย์เท่านั้น Isotretinoin มักอยู่ในรูปเจล 0.05% ได้ผลใกล้เคียงกับ Tretinoin และบีพี ทำให้แห้งลอกเป็นขุยได้ แต่น้อยกว่า Tretinoin ยาทารักษาสิวลุ่ม retinoids คือ adapalene ในบางรายที่ใช้ยากุ่มกรดวิตามินเอ (retinoic acid) แล้วมีปัญหาผิวแห้งระคายเคืองมาก แพทย์อาจเปลี่ยนมาให้ยากุ่ม Retinoids แทน ควรทายาก่อนนอน อาจทาครีมให้ความชุ่มชื้นตามในบริเวณที่ผิวแห้งและรอบดวงตา และควรใช้ยากันแดดร่วมด้วย

### 2.1.2.3 ยาทารักษาสิวงรด

Azelaic นอกจากช่วยให้สิวยุดตันหลุดลอกแล้ว ยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคที่ผิวหนัง โดยทั่วไปยาทา Azelaic acid จะไม่ค่อยทำให้ผิวระคายเคืองและไม่ค่อยก่อให้เกิดผิวไวต่อแสง

### 2.1.2.4 ยาปฏิชีวนะชนิดทา

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชื่อ *P. acnes* ทำให้เกิดสิวยักเสบขึ้นได้ ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทาทั่วไป ได้แก่ Clindamycin, Erythromycin และ Tetracycline ข้อควรระวังก็คือ ยาพวกนี้เมื่อใช้ไปนานๆ ก็ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและให้ผลแทรกซ้อนได้เหมือนยากิน การใช้ยาปฏิชีวนะชนิดทาจึงจำเป็นต้องอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์ผิวหนัง

## 2.2 สลัดได (*Euphorbia antiquorum* Linn.)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Euphorbia antiquorum* Linn.

ชื่ออื่นๆ: กะลำพัก (นครราชสีมา) เคียะผา (เหนือ) เคียะเลียม หงอนงู (แม่ฮ่องสอน) ทูดทะเล (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน)

ชื่ออังกฤษ: Malayan Spurge Tree, Milkbush.



รูปที่ 3 ต้นและดอกสลัดได (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน ฯ เล่มที่ 24)

ลักษณะ: ไม้ต้น ลำต้นเป็นสามเหลี่ยมสีเขียว ตรง สูงประมาณ 2-5 เมตร ลำต้นมักแตกออกเป็นสามยอด ตรงสันของลำต้นมีหนามเป็นกระจุกๆ ละ 2 เรียง ลงมาตลอดลำต้น-ลำต้นมียางสีขาวเหมือนน้ำมัน ใบเดี่ยวขนาดเล็ก เรียงสลับรูปไข่กลับ ร่วงง่ายจึงดูคล้ายไม่มีใบ ดอกจะออกหน้าหนาวออกเป็นตุ่มๆ สีเหลือง 1-3 ดอก สลับกับหนามตรงส่วนปลายกิ่ง ดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย อยู่คนละดอก อยู่ในช่อเดียวกันไม่มีกลีบดอก ผลเป็นสามพู แตกได้ ต้นที่แก่จัด ลำต้นจะมีแก่นแข็ง แข็งข้างใน เมื่ออายุประมาณ 10 ปีขึ้นไป ต้นจะตายลง แต่แก่นแข็งๆ ยังอยู่ มีลักษณะเหมือนไม้แห้งๆ สีน้ำตาล มีกลิ่นหอม และรสขม เรียกว่า “กะลำพัก” ใช้ทำยาแก้ไข้ได้ดี

ส่วนที่ใช้: แก่นที่ตายลง และยาง

สารสำคัญ: น้ำยางสีขาวมีสาร caoutchouc 4-7% มีสารพวก tetracyclic diterpene ได้แก่ phorbol และ ester เช่น 12-deoxyphorbol, 13-tiglate 20-acetate, ingenol และ ester เช่น 16-hydroxyingenol 3,



5,6, 20-tetraacetate นอกจากนั้นพบ tricyclic diterpene ได้แก่ tinyatoxin, huratoxin และ resin พบ  $\beta$ -amyrin, cycloartenol, euphol,  $\alpha$  euphorol (Akihisa et al., 2002)

ประโยชน์ทางยา:

1. ยางใช้กันหูด (ระวังอย่าให้ยางถูกเนื้อดีๆ จะทำให้เนื้อดีเน่าหลุดไปด้วย) ในยางมีสารซึ่งมีฤทธิ์เป็น ยาถ่ายอย่างแรง สาร phorbol ที่พบในน้ำยางเป็นสารที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดการระคายเคืองและเป็นตัวร่วมเร่งทำให้เกิดมะเร็ง (Co-carcinogenic activity) และเป็นตัวช่วยรักษามะเร็งในเม็ดเลือดได้ด้วย

2. กระจ่ำพักสัดไต่มีกลิ่นหอม รสขมร้อน ใช้ขับลม แก้ไข้



## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีวิจัย ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 3.1 น้ำยาและสารเคมี

Low-molecular weight markers for SDS-PAGE, polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, SP Sepharose™ Fast Flow (FF) columns (1.5 cm x 3 cm), phenyl FF (high sub) columns (1.5 cm x 3 cm) และ HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR columns ซึ่งจาก GE Healthcare (Uppsala, Sweden) น้ำยา Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit, glycoprotein carbohydrate estimation kit, supplemented brucella broth และ agar for anaerobes ซึ่งจาก Thermo Fisher Scientific (MA, USA). Standard proteins for gel filtration, Amicon Ultra centrifugal filter units (MWCO 10 kDa) และ Mueller-Hinton broth and agar ซึ่งจาก Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) และ สารเคมีอื่น ๆ ซึ่งจาก Acros Organics (Geel, Belgium).

#### 3.2 การจำแนกชนิดของต้นไม้

จำแนกโดยใช้ลักษณะของหนาม ดอก และลำต้น ตามเกณฑ์ของ Flora of Thailand Volume 8 part 1 (Esser, 2005) ซึ่งสามารถจำแนกได้ว่าต้นไม้ที่ใช้ในงานวิจัยเป็นชนิด *Euphorbia antiquorum* Linn (*E. antiquorum* L.) ซึ่งในการเขียนเกี่ยวกับงานวิจัยเรื่องนี้จะใช้ชื่อต้นไม้ชนิดนี้ว่า *E. antiquorum* แทน *E. cf. antiquorum*

#### 3.3 น้ำยาง

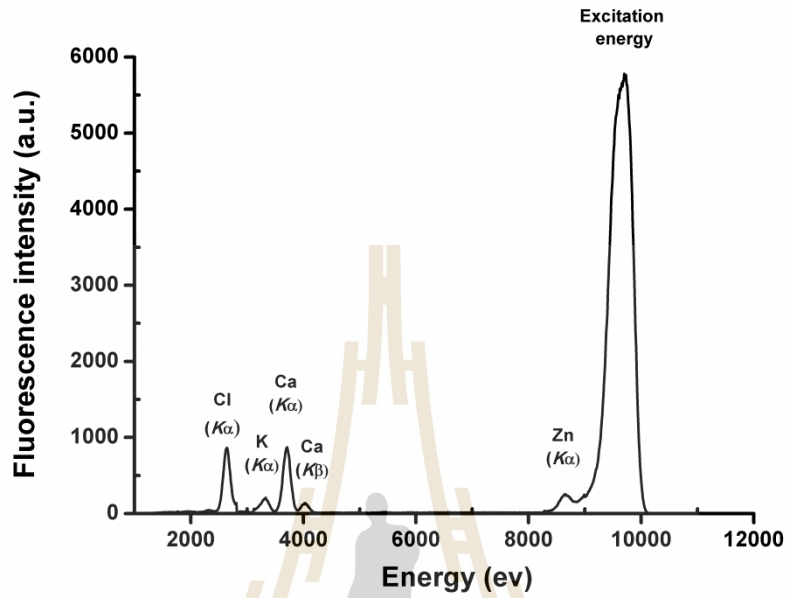
น้ำยางจะเก็บจากต้นของ *E. antiquorum* เมื่อเก็บเสร็จแล้วจะนำน้ำยางมาเก็บไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้

#### 3.4 Screening และ specification ชนิดของธาตุ (trace elements) ในน้ำยางสด

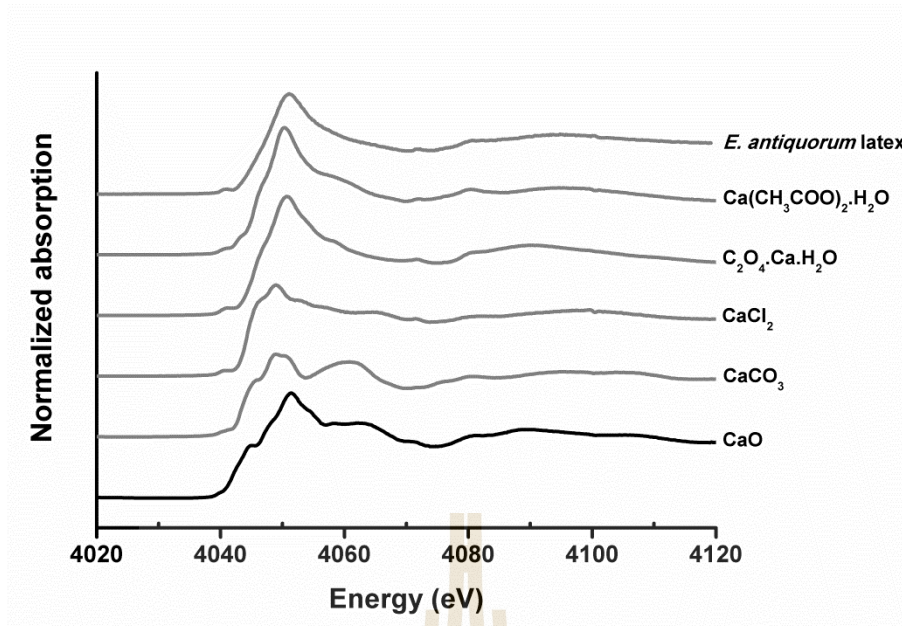
ชนิด trace elements ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยางสดของ *E. antiquorum* ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค X-ray fluorescence (XRF) และ X-ray absorption spectroscopy (XAS) ณ BL5.2: SUT-NANOTEC-SLRI Beamline, Synchrotron Light Research Institute (SLRI) ประเทศไทย

ผลการทดลองพบว่า น้ำยางสดของพืชประกอบด้วยธาตุ  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  เป็นหลัก (แสดงในรูปที่ 4) ผลการทดลอง XAS พบว่า Ca K-edge XANES spectra ของน้ำยางสดประกอบด้วยสารประกอบที่ใกล้เคียงระหว่าง calcium oxalate monohydrate ( $\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (รูปที่ 5) ซึ่งโดยทั่วไปสารประกอบนี้สามารถพบได้ในพืชหลายชนิด (Rodrigues และคณะ, 2009) นอกจากนี้ Zn K-edge XANES spectrum ของน้ำยางพืชมีความใกล้เคียงกับ zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ ) และ/หรือ zinc nitrate ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ) (รูปที่ 6) การที่จะระบุว่า

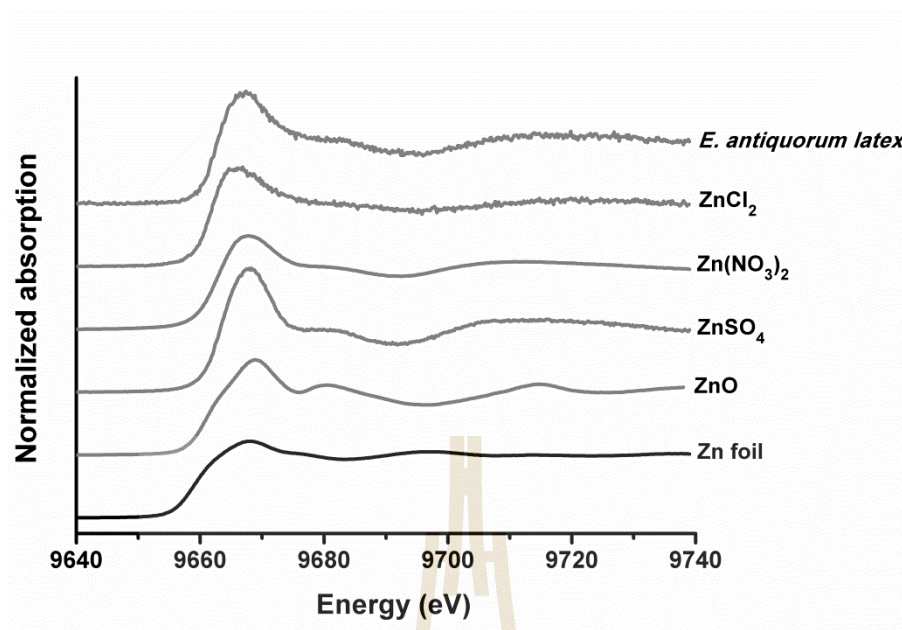
สารประกอบของธาตุ  $Zn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ในน้ำยางของพืชมักทำได้ยากเนื่องจากว่าธาตุทั้งสองสามารถจับได้กับสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่อยู่ในพืชได้หลายชนิด (Sarret และคณะ, 2006)



รูปที่ 4 X-ray fluorescence spectra ของโลหะ (metals) และ trace elements ที่พบได้ในน้ำยางสดของต้น *E. antiquorum*. Calcium (Ca) and zinc (Zn)



รูปที่ 5 แสดง Ca K-edge XANES spectra จากน้ำยางของต้น *E. antiquorum* และ สารประกอบมาตรฐาน (standard compounds) standard compounds ประกอบด้วย calcium acetate monohydrate ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), calcium oxalate monohydrate ( $\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), calcium chloride anhydrous ( $\text{CaCl}_2$ ), calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) และ calcium oxide ( $\text{CaO}$ ).

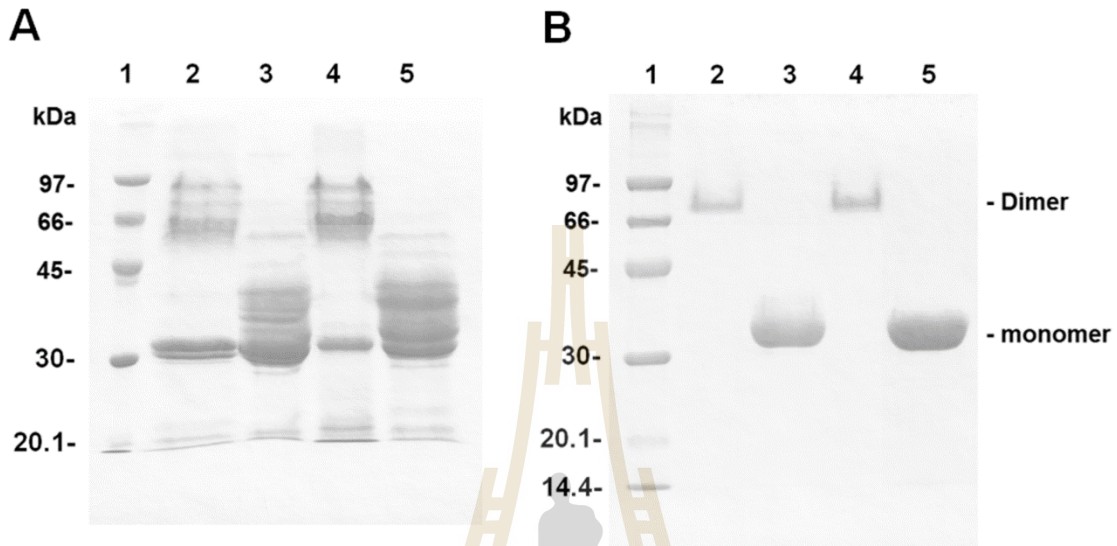


รูปที่ 6 แสดง Zn K-edge XANES spectra จากน้ำยางของต้น *E. antiquorum* และ สารประกอบมาตรฐาน (standard compounds) ประกอบด้วย zinc chloride ( $\text{ZnCl}_2$ ), zinc nitrate ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ), zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ ), zinc oxide ( $\text{ZnO}$ ) และ zinc foil ( $\text{Zn}$  foil)

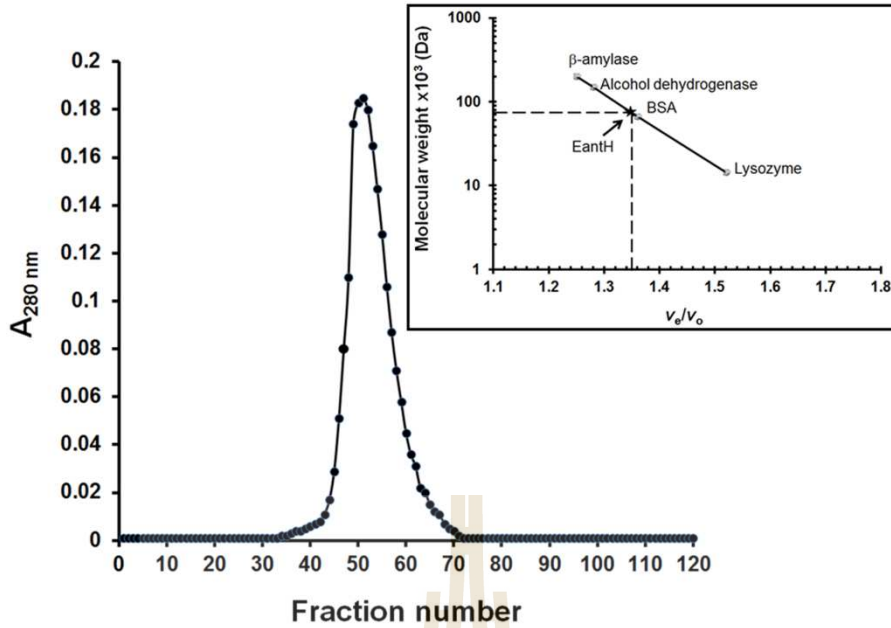
### 3.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ออกฤทธิ์

น้ำยางที่เก็บได้จากต้นของ *E. antiquorum* นำมาปั่นแยกและ purify ด้วย cation exchange chromatography (HiTrap SPFF) โดยใช้ linear gradient salt elution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0-0.5 M ใน 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5 หลังจากนั้นนำส่วนโปรตีนที่สกัดในความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 0.2 M ไป purify ต่อด้วย hydrophobic column chromatography (HiTrap Phenyl FF (high sub) โดยใช้ linear gradient salt elution ที่มีความเข้มข้นของ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ในช่วง 2-0 M ใน buffer 25 mM PBS pH 7.0 โดยโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพถูก purify ออกมาในความเข้มข้นของ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  เท่ากับ 0.3-0.2 M และโปรตีนที่ได้เมื่อแยกด้วย 12.5% gel SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli, 1970) พบว่า fraction ของโปรตีนที่ได้ประกอบด้วยแถบโปรตีน (protein bands) ในรูป dimeric form ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 73 kDa และ monomeric form ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33 kDa (ดังแสดงในรูปที่ 7) โปรตีนดังกล่าว นำมาหาขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีมาตรฐาน คือ size exclusion column chromatography หรือ gel filtration column chromatography (HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR column) ด้วย flow rate

0.5 mL/min ใช้ 0.1 M PBS pH 7.2 เป็น mobile phase เมื่อเทียบกับกราฟสารมาตรฐาน พบว่าโปรตีนนี้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 75 kDa (รูปที่ 8)



รูปที่ 7 แสดงแถบโปรตีนของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ก่อน (A) และหลัง (B) purify โปรตีนด้วยเทคนิค column chromatography ในรูป A และ B ตัวอย่างแต่ละ well จะผสมกับ SDS-PAGE sample buffer ในสถานะที่ไม่มี (lanes 2 และ 3) และมี reducing agent (5% 2-mercaptoethanol) (lanes 4 และ 5) ตัวอย่างสำหรับ lanes ที่ 2 และ 4 ไม่ได้ต้มตัวอย่างก่อนแยกแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE ส่วนตัวอย่างสำหรับ lanes ที่ 3 และ 5 จะถูกต้มที่ 95 °C 5 นาที ก่อนแยกแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE โปรตีนมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแสดงใน lane ที่ 1



**รูปที่ 8** Elution profile ของโปรตีนออกฤทธิ์ในรูป dimeric form เมื่อหาขนาดโมเลกุลด้วย gel filtration (Sephacryl S-200) column chromatography ในกรอบสี่เหลี่ยม แสดงกราฟมาตรฐานระหว่าง ขนาดโมเลกุลของโปรตีน และ relative elution volume ของโปรตีนมาตรฐาน ( $V_e/V_0$ )

### 3.6 การหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน และการหาชนิดของโปรตีน

ลำดับของกรดอะมิโน (21 residues) ของโปรตีนจากปลาย N-terminal ของโปรตีนวิเคราะห์โดย automated Edman degradation method และ วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยการหาชนิดของโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับโปรตีนที่ออกฤทธิ์จาก BLAST database ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้วย ClustalW program ลำดับของกรดอะมิโน 21 residues แรกแสดงในรูปที่ 9 และจากการทำ homology sequence search พบว่าโปรตีนที่ออกฤทธิ์มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ galactose-inhibitable lectin จากต้น *E. marginata* ดังนั้นคุณสมบัติในการเป็น galactose-specific lectin ของโปรตีนที่สกัดได้จากน้ำยางของ *E. antiquorum* จึงทำการวิเคราะห์ต่อไป

	10	20
<b><i>E. antiquorum</i> lectin (EantH):</b>	DFPPNTHIXGPNALXMDVKGS	
<b>Galactose-inhibitable lectin:</b>	AYP-GSHISGPNNGFXMDVK--	
	:* .:* ** **.*:*****	

**รูปที่ 9** การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนจากปลาย N-terminal ของโปรตีนที่ออกฤทธิ์จากน้ำยาของต้น *E. antiquorum* กับโปรตีน galactose-inhibitable lectin จากต้น *E. marginata* ซึ่ง alignment ด้วย ClustalW program ลำดับของกรดอะมิโนที่มีลำดับเหมือนกัน (identity) ระหว่างโปรตีนทั้งสองแสดงด้วยเครื่องหมาย (\*) หรือ มีความคล้ายคลึงกันมาก หรือน้อย แสดงด้วยสัญลักษณ์ (:) หรือ (.) ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความเหมือนหรือคล้ายคลึงประมาณ 52.38%, 14.29% และ 9.52% ตามลำดับ

### 3.7 คุณสมบัติการเป็นโปรตีน lectin ของโปรตีนออกฤทธิ์

คุณสมบัติในการเป็นโปรตีน lectin ทดสอบได้โดยนำโปรตีนที่ออกฤทธิ์มาทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่าย โดยใช้โปรตีนที่เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย 0.1 M PBS pH 7.2 (50 µl) ผสมกับเม็ดเลือดแดงของกระต่าย (red blood cell, RBC) ความเข้มข้น 2% (v/v) (50 µl) ใน U-microwell plate และ incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ค่า 1 hemagglutination unit (HAU) มีค่าส่วนกลับของ dilution สูงสุด (Titer) ของสารสกัดที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายเกาะกลุ่มกันได้

ค่า specific hemagglutination (SHA) คือ อัตราส่วนระหว่าง HAU และ ความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) ดังนั้นหน่วยของ SHA คือ HAU/mg

จากการทดลองพบว่าโปรตีนที่สกัดได้มีความสามารถในการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้ และนำมาใช้ในการหาความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค column chromatography ดังแสดงในตารางที่ 1 จากตารางที่ 1 พบว่าโปรตีนมีความบริสุทธิ์มากขึ้น 22.1 เท่าจาก crude proteins และมีค่า yield เท่ากับ 22.6% (w/w)

เนื่องจากโปรตีนที่ออกฤทธิ์สามารถ purify ได้จากน้ำยาของต้น *E. antiquorum* และสามารถก่อให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ จึงเรียกโปรตีนนี้ว่า “EantH”

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองให้ใช้สัตว์ในการวิจัยได้ตามเอกสารรับรองเลขที่ 9/2017 ที่ออกโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ตารางที่ 1 การทำโปรตีน EantH จากน้ำยางของต้น *E. antiquorum* ให้บริสุทธิ์

Purification step	Volume (ml)	Total Protein (mg)	HAU /0.05 ml	Total HAU	Specific HA (SHA) (HAU/mg)	Purification factor <sup>a</sup> (fold)	Protein Yield <sup>b</sup> (% , w/w)
Crude latex	4	22.08	256	20480	927.54	1	100
Two types of column chromatography	5	5	1024	102400	20480	22.1	22.6

<sup>a</sup> Purification factor คือ อัตราส่วน (ratio) ระหว่าง SHA ที่ได้จากแต่ละ purification step และ SHA เริ่มต้น (initial SHA)

<sup>b</sup> Yield (% , w/w) หาได้จากนำความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ในขั้นตอน purification step หารด้วยจำนวนความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดจาก crude latex คูณด้วย 100

### 3.8 การหาน้ำตาลที่จำเพาะของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ (Sugar specificity of potential protein)

เนื่องจากโปรตีน EantH เป็น plant lectin ซึ่งตามคุณสมบัติของ lectin สามารถที่จะจับกับน้ำตาลที่อยู่บนผิวของเซลล์ต่าง ๆ ได้ และกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มได้ และคุณสมบัตินี้จะหายไปเมื่อน้ำตาลที่จำเพาะเข้าไปจับกับ lectin แทนที่น้ำตาลบนผิวเซลล์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงของกระต่ายเนื่องจาก EantH โดยใช้โปรตีน 0.1 mg/ml ผสมกับน้ำตาลแต่ละชนิด (ดังตารางที่ 2) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-100 mM) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 °C แล้วจึงนำไปทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่ายดังวิธีที่ 3.7

ผลการทดลองพบว่า EantH มีความจำเพาะต่อน้ำตาล D-galactose มากกว่าน้ำตาล N-acetyl-D-galactosamine และ D-acetylmuramic acid จึงสรุปได้ว่า EantH เป็น D-galactose-specific lectin ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง N-terminal sequence alignment และ homology sequence search (ดังแสดงในรูปที่ 9)

#### ตารางที่ 2 ความจำเพาะของน้ำตาลของโปรตีนที่ออกฤทธิ์

Sugars	Concentration <sup>a</sup> (mM)
N-acetyl-D-glucosamine	NI
N-acetylmuramic acid	100
N-Acetyl-D-galactosamine	100
D-arabinose	NI
D-cellobiose	NI
D-fructose	NI
L-fucose	NI
D-galactose	50
D-glucosamine	NI
D-glucose	NI
D-maltose	NI
D-mannose	NI
D-xylose	NI
D-saccharose	NI

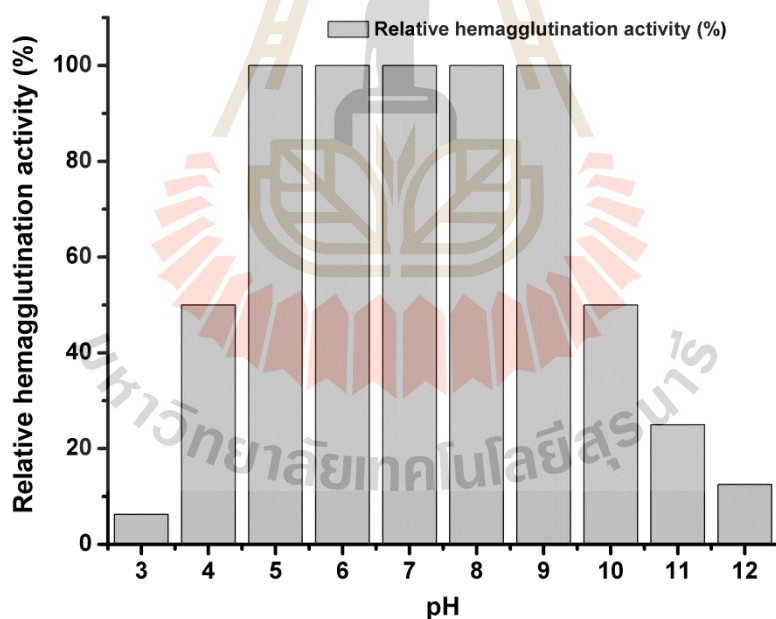
<sup>a</sup> ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลที่สามารถยับยั้ง hemagglutination activity ของ EantH ได้  
NI คือ ไม่พบการยับยั้ง hemagglutination activity ของ EantH ข

คุณสมบัติการเป็น D-galactose-specific lectin ของ EantH มีความคล้ายคลึงกับ lectin ที่พบได้ในน้ำยางของพืชในวงศ์ Euphorbiaceae (Dias และคณะ, 2015)

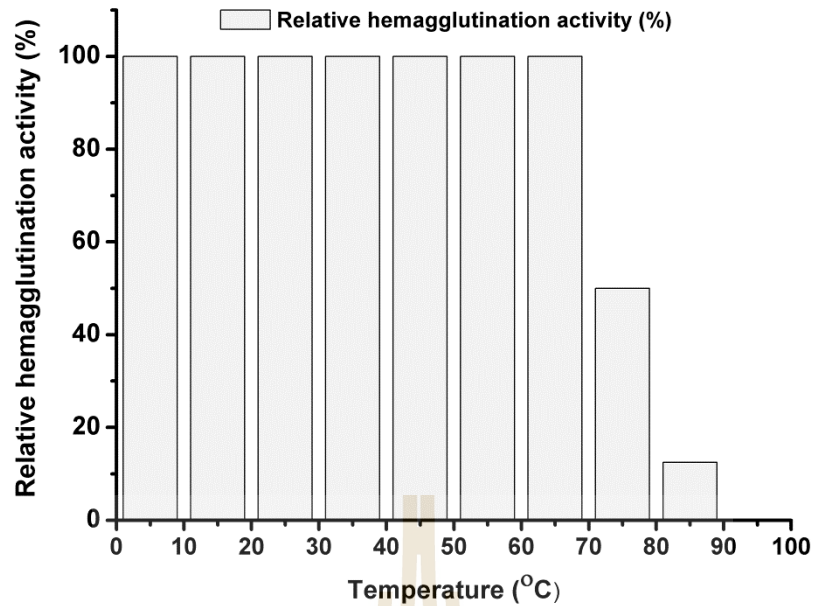
### 3.9 ความคงทน (stability) ของโปรตีนออกฤทธิ์ต่อ pH และ อุณหภูมิ (temperature) ต่าง ๆ

ความคงทนของ EantH ต่อ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ ทำได้โดยบ่ม protein (0.1 mg/ml) ในช่วง pH 3-12 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และในช่วงอุณหภูมิ 5-95 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำโปรตีนไปทำการวัดความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงตามวิธีในข้อ 3.7 แต่ทำการเจือจางโปรตีนด้วย 0.15 M NaCl แทน 0.1 M PBS pH 7.2

ผลการทดลองพบว่า EantH มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH ในช่วง 5-9 และ ช่วงอุณหภูมิ 5-65 °C ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 ตามลำดับ ซึ่งความคงทนต่อ pH ในช่วงไม่เกิน pH 10 ของ EantH มีความใกล้เคียงกับโปรตีน lectins ที่พบได้ในพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เช่น *E. calcina* L., *E. dalberi* และ *E. sp* (Nsimba-Lubaki และคณะ, 1986) แต่ EantH มีความต่างกว่า lectin ของพืชอื่น ๆ ในวงศ์ Euphorbiaceae ที่มักทนอุณหภูมิได้ไม่เกิน 60 °C (Santana และคณะ, 2014)



รูปที่ 10 ความคงทนต่อช่วง pH ต่าง ๆ ของ EantH ประเมินโดยใช้ hemagglutination assay ค่า titers ที่ให้ hemagglutination แบบสมบูรณ คิดเป็นค่า hemagglutination activity เท่ากับ 100%



รูปที่ 11 ความคงทนต่อช่วง อุณหภูมิ ต่าง ๆ ของ EantH ประเมินโดยใช้ hemagglutination assay ค่า titers ที่ให้ hemagglutination แบบสมบูรณ์ คิดเป็นค่า hemagglutination activity เท่ากับ 100%

### 3.10 ผลของไอออน (ion) ของโลหะ และ EDTA ต่อการทำงานของโปรตีนออกฤทธิ์

จากการทดลอง XRF และ XAS พบว่าธาตุที่พบได้ในน้ำยางสดของ *E. antiquorum* คือ  $Ca^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$  ดังนั้นผลของไอออนของธาตุทั้งสองรวมทั้ง EDTA ต่อการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกระต่ายของ EantH จึงได้ทำการทดสอบ โดยการบ่มโปรตีน (0.1 mg/ml) ใน EDTA,  $ZnCl_2$  และ  $CaCl_2$  ในความเข้มข้น 0-100 mM เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่ 4 °C และนำมาทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่ายตามวิธีที่ 3.7

ผลการทดลองพบว่าการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่ายด้วย EantH ไม่ถูกยับยั้งด้วยไอออนของ  $Ca^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$  และ EDTA ซึ่งเป็นลักษณะของ galactose/lactose-specific lectin เช่น Eutirucallin จาก *E. tirucalli* latex (Santana และคณะ, 2014)

### 3.11 ศึกษาคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียที่เรียกก่อสิว และจุลชีพอื่น ๆ

#### 3.11.1 สายพันธุ์ของเชื้อจุลชีพ (Microbial strains)

คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เรียกก่อสิวของ EantH ทดสอบโดยใช้เชื้อ *Propionibacterium acnes* DMST 14976 ซึ่งเป็น Gram-positive anaerobic bacteria และ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, และ clinically isolated strains ของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* TUH93 ซึ่งเป็น Gram-positive bacteria และเพื่อให้ทราบถึงการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและจุลชีพอื่น ๆ จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้แบคทีเรียและยีสต์ ดังนี้

Gram-positive bacteria: *Streptococcus agalactiae* (Group B) DMST 17129

Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311

Yeasts: *Candida albicans* ATCC 10231 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019

### 3.11.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Propionibacterium acnes*

เชื้อ *P. acnes* standard strain ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Brucella broth supplemented with hemin (5 ug/ml), Vitamin K (1 ug/ml) and sheep blood (5%) ในสภาวะไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเจือจางเชื้อด้วย brucella broth ให้ได้เชื้อประมาณ  $10^4$  cells/ml และใส่เชื้อลงในสารสกัดที่เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 96-microwell plate แล้วนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศโดยเก็บ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาให้สังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือ Minimal inhibitory concentration (MIC) บันทึกหน่วยเป็นความเข้มข้นของสารโปรตีนสกัด

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าได้เชื้อ Minimal bactericidal concentration (MBC) ได้ โดยนำหลุมที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหาร anaerobic agar plate แล้วเก็บในสภาวะที่ไม่มีอากาศโดยเก็บ. ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน ความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่มีการเจริญบนอาหารแข็ง ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration (MBC)) ได้

### 3.11.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. epidermidis*, *S. aureus* และ เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ

สารสกัดที่ได้จะนำมาทดสอบการมีฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*, *S. aureus* และ เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ด้วยวิธี broth dilution ใน 96-microwell plate การออกฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีนี้สามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณ  $10^4$  cells/ml และใส่เชื้อลงในสารสกัดที่เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ เสร็จแล้วนำไปเลี้ยงที่ 35 - 37 °C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง แล้วนำมาให้สังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือ Minimal inhibitory concentration (MIC) บันทึกหน่วยเป็นความเข้มข้นของสารโปรตีนสกัด

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าได้เชื้อ Minimal bactericidal concentration (MBC) ได้ โดยนำ media จากหลุมที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหาร trypticase soy

agar ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ความสามารถในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 3 ซึ่ง EantH สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้ดีในแบคทีเรียที่ผนังเซลล์ประกอบไปด้วย galactose เช่น *S. agalactiae* และ *P. acnes* และเป็นแบคทีเรีย Gram-positive ส่วนแบคทีเรีย Gram-negative สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* ได้ แต่ยับยั้ง *E. coli* ไม่ได้แม้ว่าจะมี galactose บนผนังเซลล์ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย Gram-negative มีองค์ประกอบของ lipids จำนวนมากและซับซ้อนกว่าแบคทีเรียกลุ่ม Gram-positive จึงทำให้โปรตีนเข้าไปจับกับน้ำตาลบนผนังเซลล์ได้ยาก (Navarre และ Schneewind, 1999; Delcour, 2009) และ EantH สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผนังเซลล์มี N-acetylmuramic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบในชั้นของ peptidoglycan ของผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยไม่ฆ่าเชื้อ เช่น *S. epidermidis* และ *S. aureus* (Navarre และ Schneewind, 1999) EantH ไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อในกลุ่ม yeasts ได้เนื่องจากผนังเซลล์ของยีสต์มักประกอบด้วย N-acetyl-D-glucosamine (Muszewska และคณะ, 2017) ซึ่ง EantH ไม่สามารถจับได้ และเนื่องจากเมื่อทำการทดลองหากล้างฤทธิ์ของ EantH ในการเข้าจับกับ galactose ที่อยู่ที่ผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการบ่มโปรตีนกับ D-galactose ก่อนทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แล้วเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อได้ลดลงกว่าก่อนบ่มกับ D-galactose (ดังแสดงในตารางที่ 3) จึงสามารถสรุปได้ว่า EantH สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียผ่านการจับกับ galactose ของผนังเซลล์ของเชื้อเป็นหลัก และการทดลองที่สนับสนุนถึงการยับยั้งเชื้อของสารสกัดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย คือ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ของแบคทีเรียเปรียบเทียบก่อนและหลังบ่มกับ EantH ด้วยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM) ซึ่งพบว่า EantH ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *P. acnes* ได้นั้น สามารถทำให้เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ปกติอย่างมาก และเกาะกลุ่มกัน ผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัดเจนนดังแสดงในรูปที่ 12 ส่วนรูปร่างและผนังเซลล์ของเชื้อ *S. typhimurium* ที่สามารถถูกยับยั้งการเจริญโดยไม่ฆ่าด้วย EantH มีการเปลี่ยนแปลงไปจากปกติแต่น้อยกว่า *P. acnes* (ดังแสดงในรูปที่ 13)

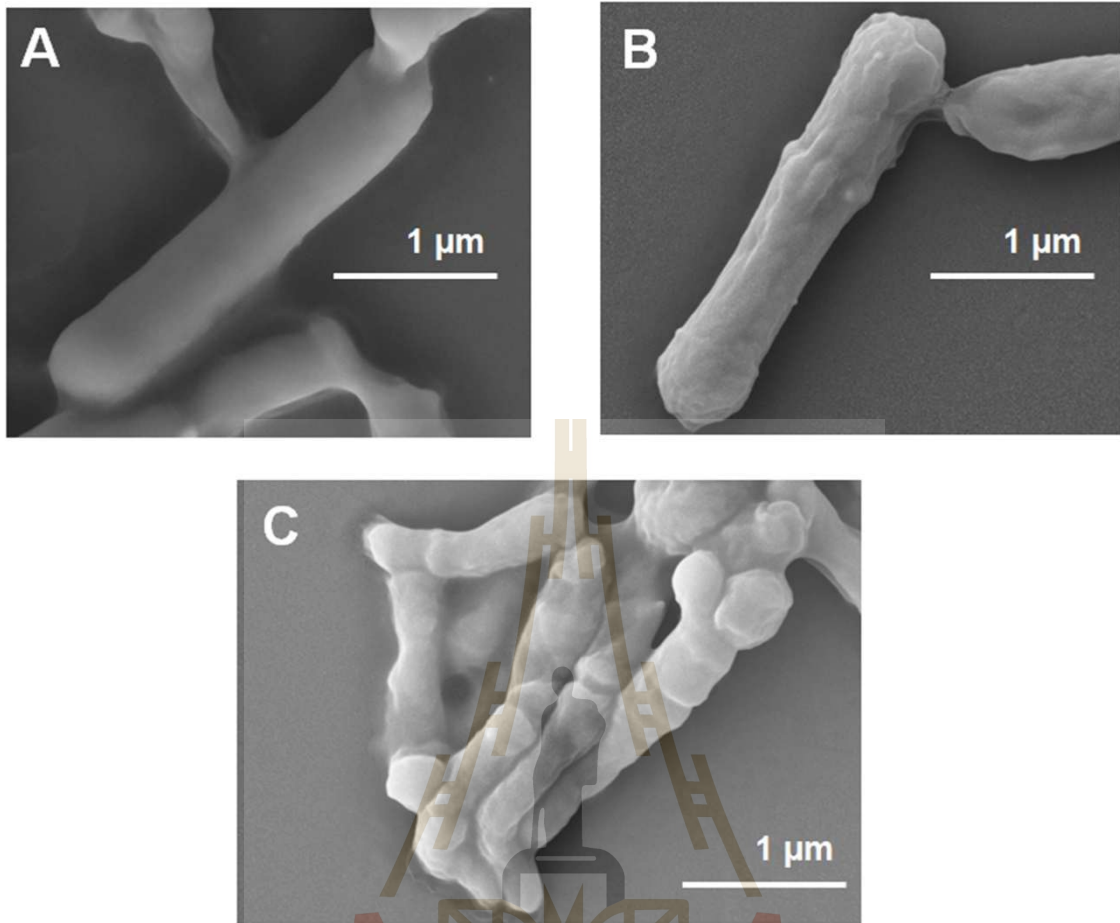
ตารางที่ 3 Minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum microbicidal concentration (MMC) ของ EantH

Microorganism	Concentration of EantH ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Without D-Galactose		With D-Galactose	
	MIC <sup>a</sup>	MMC <sup>b</sup>	MIC <sup>a</sup>	MMC <sup>b</sup>
<b>Gram-positive bacteria:</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	2000	> 4000	2000	> 4000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> TUH93	2000	> 4000	2000	> 4000
<i>Streptococcus agalactiae</i> DMST 17129 <sup>c</sup>	250	2000	2000	> 4000
<b>Gram-positive anaerobic bacteria:</b>				
<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14976 <sup>c</sup>	125	1000	1000	> 4000
<b>Gram-negative bacteria:</b>				
<i>Escherichia coli</i> <sup>c</sup>	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 <sup>c</sup>	1000	> 4000	> 4000	> 4000
<b>Fungus:</b>				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000

<sup>a</sup> MIC คือ minimum inhibitory concentration ของ EantH ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

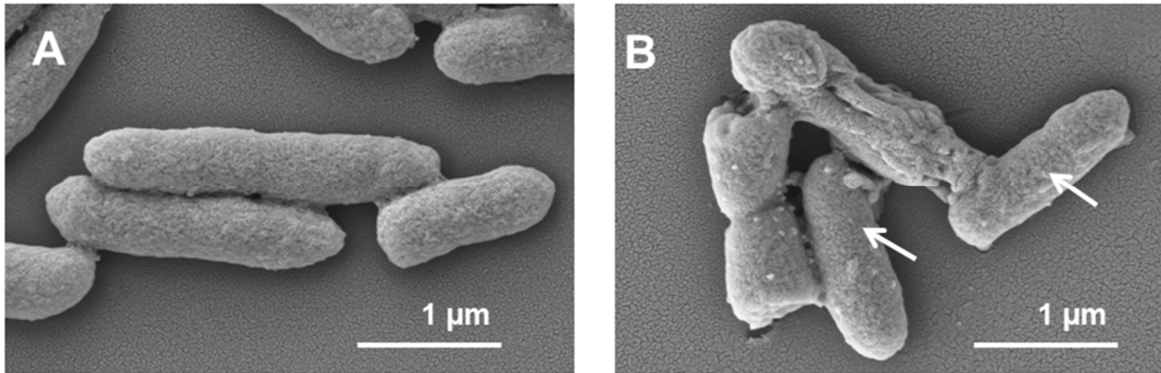
<sup>b</sup> MMC คือ minimum concentration ของ EantH ที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ 99.9%

<sup>c</sup> แบคทีเรียที่มีรายงานว่าผนังเซลล์มี galactose เป็นองค์ประกอบ



**รูปที่ 12** Scanning electron microscopy ของเซลล์ของเชื้อ *P. acnes* ทั้งก่อน (untreated) (รูป A) หรือ หลังบ่ม (treated) (รูป B และ C) ด้วย EantH ภายใต้ anaerobic conditions ณ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นว่าโครงสร้าง (ultrastructure) ของผนังเซลล์ของแบคทีเรียในสถานะที่ไม่มีโปรตีน EantH จะเรียบ และรูปร่างสมบูรณ์ (รูปที่ A) แต่ในทางตรงกันข้ามรูปร่างของแบคทีเรียเมื่อมี EantH จะเปลี่ยนแปลงไป จากปกติอย่างมาก โดยมีรูปร่างเหี่ยว (shrinking) และมีลักษณะของตุ่มเล็ก ๆ บนผนังเซลล์ (blebbing) (รูปที่ B) นอกจากนี้เซลล์ยังมีขนาดเล็กลงและเกาะกลุ่มกันมาก (รูปที่ C)





**รูปที่ 13** Scanning electron microscopy ของเซลล์ของเชื้อ *S. typhimurium* ทั้งก่อน (untreated) (รูป A) หรือหลังบ่ม (treated) (รูป B) ด้วย EantH ณ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นว่าโครงสร้าง (ultrastructure) ของผนังเซลล์ของแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่มีโปรตีน EantH จะเรียบ และรูปร่างสมบูรณ์ (รูปที่ A) แต่ในทางตรงกันข้ามรูปร่างของแบคทีเรียเมื่อมี EantH จะเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ โดยมีรูปร่างเหี่ยว (shrinking) และมีลักษณะของตุ่มเล็ก ๆ บนผนังเซลล์ (blebbing) (รูปที่ B) เซลล์แบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจากปกติภายหลังจากการบ่มด้วย EantH แสดงด้วยลูกศร

## บทที่ 4

### สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้สามารถสกัดโปรตีน EantH ที่เป็นโปรตีนชนิด D-galactose-specific lectin จากน้ำยางของต้น *E. antiquorum* ที่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อสิ่ว *P. aces* และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อสิ่วโดยไม่ฆ่าเชื้อ คือ *S. epidermidis* และ *S. aureus* นอกจากนี้ EantH ยังสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้ คือ *S. typhimurium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น การยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ของ EantH เกิดโดยโปรตีนสามารถจับกับน้ำตาลที่อยู่บนผนังเซลล์ชนิด galactose เป็นหลักร่วมกับ *N-acetylmuramic acid* ที่เป็นองค์ประกอบของ peptidoglycan ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเชื้อ แล้วส่งผลให้เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิมอย่างมาก มีการเกาะกลุ่มกัน ขนาดเล็กลง เหี่ยว และตายได้

งานวิจัยนี้สามารถต่อยอดได้โดยนำโปรตีนสกัดไปทดสอบกับเชื้อ เชื้อก่อโรคอื่น ๆ และเชื้อรา นอกเหนือจาก yeasts ที่ผนังเซลล์มี galactose เป็นองค์ประกอบ เช่น เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* และ *Bacillus* เป็นต้น รวมทั้งผลของโปรตีนต่อเซลล์มะเร็งและการใช้วินิจฉัยโรคมะเร็ง

## บรรณานุกรม

- ประวิตร พิศาลบุตร. (2549) โรคผิวหนังในเวชปฏิบัติ (Acne in Clinical Practice). คลินิกเล่ม: 327 เดือน-ปี: 07/2549, <http://www.doctor.or.th/article/detail/1491>.
- ประวิตร พิศาลบุตร. (2551) โรคผิวหนังในเวชปฏิบัติ (Acne in Clinical Practice). คลินิกเล่ม: 277 เดือน-ปี: 01/2551, <http://www.doctor.or.th/node/6867>.
- เรณู โคตรจรัส. (2544). สิว. ใน ปรียา กุลละวณิชย์ & ประวิตร พิศาลบุตร (บรรณาธิการ). โรคผิวหนังในเวชปฏิบัติ 2. (หน้า 1-13). กรุงเทพฯ:หมอชาวบ้าน.
- สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน ฯ เล่มที่ 24. เรื่องที่ ๒ ไม่นิวรอนคตีไทย (ตอน ๒) / พันธุ์ไม้ที่ใช้เป็นยารักษาโรค. <http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=24&chap=2&page=t24-2-infodetail01.html>
- Akihisa, T., Kithsiri Wijeratne, E.M., Tokuda, H., Enjo, F., Toriumi, M., Kimura, Y., Koike, K., Nikaido, T., Tezuka, Y., Nishino, H. (2002) Eupha-7,9(11),24-trien-3beta-ol ("antiquol C") and other triterpenes from *Euphorbia antiquorum* latex and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *J Nat Prod.* 65:158-162.
- Delcour, A.H. (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794: 808-816.
- Dias, Rde.O., Machado, Ldos.S., Migliolo, L., Franco, O.L. (2015) Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules* 20: 519-541.
- Esser, H.J. (2005) 38. *Euphorbia*. Pages 263–292 in Chayamarit K. and van Welzen, P. C. (editors). *Flora of Thailand: Volume 8, Part 1, Euphorbiaceae (genera A-F)*. National Herbarium Nederland and Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Leiden and Bangkok. 303 pages.
- Gollnick<sup>a</sup>, H., Cunliffe, W., Berson, D., et al. (2003) Antimicrobial therapy (Management of Acne, a report from a global alliance to improve outcomes in acne). *J Am Acad Dermatol.* 49: S16-S17.
- Gollnick<sup>b</sup>, H.P., Krautheim, A. (2003) Topical treatment in acne: current status and future aspects. *Dermatology.* 206: 33-34.
- Krautheim, A., Gollnick, H.P.M. (2004) Acne: topical treatment. *Clinics in Dermatology.* 22: 401-402.
- Murata, J., Satake, M., Suzuki, T. (1963) Studies on snake venom. XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms. *J Biochem (Tokyo)* 53: 431-443.

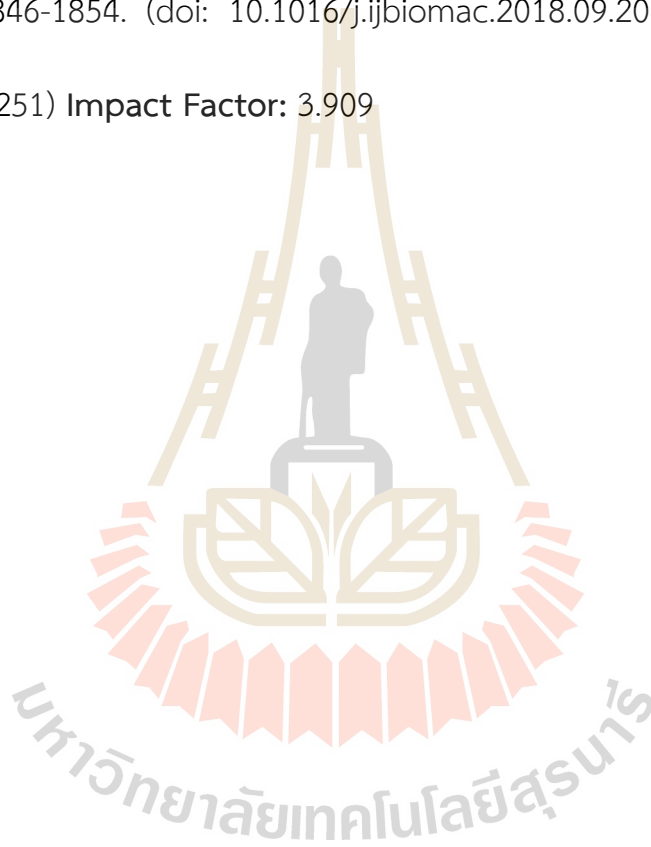
- Muszevska, A., Pitsyk, S., Perlińska-Lenart, U., Kruszevska, J.S. (2017) Diversity of cell wall related proteins in human pathogenic fungi. *J Fungi (Basel)* 4: 6.
- Navarre, W.W., Schneewind, O. (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63: 174-229.
- Nsimba-Lubaki, M., Allen, A.K., Peumans, W.J. (1986) Isolation and partial characterization of latex lectins from three species of the genus *Euphorbia* (Euphorbiaceae). *Physiol Plant.* 67: 193-198.
- Rodrigues, S.P., Da, Cunha.M., Ventura, J.A., Fernandes, P.M.. (2009) Effects of the *Papaya meleira* virus on papaya latex structure and composition. *Plant Cell Rep.* 28: 861-871.
- Ross, J.I., Snelling, A.M., Carmegie, E., et al. (2002) Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol.* 3: 467-478.
- Santana, S.S., Gennari-Cardoso, M.L., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.C., Santiago, Ada S., Alvim, F.C., Pirovani, C.P. (2014) Eutirucallin, a RIP-2 type lectin from the latex of *Euphorbia tirucalli* L. presents proinflammatory properties. *PLoS One* 9: e88422.
- Sarret, G., Harada, E., Choi, Y.E., Isaure, M.P., Geoffroy, N., Fakra, S., Marcus, M.A., Birschwilks, M., Clemens, S., Manceau, A. (2006) Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol.* 141: 1021-1034

ภาคผนวก



## ผลงานที่ได้นำตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

Siritapetawee ,J.\*, Limphirat, W., Wongviriya, W., Maneesan, J., Samosornsuk, W. Isolation and characterization of a galactose-specific lectin (EantH) with antimicrobial activity from *Euphorbia antiquorum* L. latex. Int J Biol Macromol. 2018 Oct 2;120(Pt B):1846-1854. (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.206. [Epub ahead of print] PMID: 30290251) **Impact Factor: 3.909**





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>Isolation and characterization of a galactose-specific lectin (EantH) with antimicrobial activity from *Euphorbia antiqorum* L. latexJaruwat Siritapetawee<sup>a,\*</sup>, Wanwisa Limphirat<sup>b</sup>, Watchara Wongviriya<sup>c</sup>, Janjira Maneesan<sup>d</sup>, Worada Samosornsuk<sup>e</sup><sup>a</sup> Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand<sup>b</sup> Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima 30000, Thailand<sup>c</sup> The Center for Scientific and Technological Equipment, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand<sup>d</sup> Kamnoetvidya Science Academy, Wangchan, Rayong 21210, Thailand<sup>e</sup> Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Center, Pathum Thani 12121, Thailand

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 August 2018

Received in revised form 27 September 2018

Accepted 27 September 2018

Available online 02 October 2018

## Keywords:

*Euphorbia antiqorum* L.

Lectin

Antimicrobial activity

## ABSTRACT

A homodimeric 75 kDa lectin with hemagglutination activity (HA) was purified from the crude latex of *Euphorbia antiqorum* L. by two types of chromatography, on cation exchange (HiTrap SP FF) and hydrophobic HiTrap Phenyl FF (high sub) columns. The purified protein was designated EantH, and is classified as a galactose-specific thermostable lectin. The HA of EantH was stable at pH values of 5–9 and temperature 5–65 °C. The lectin had bacteriostatic action on the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2000 µg/ml and on a Gram-negative bacterium *Salmonella typhimurium*, with a MIC of 1000 µg/ml. EantH inhibited the growth of *Propionibacterium acnes* and *Streptococcus agalactiae* with MIC of 125 µg/ml and 250 µg/ml, respectively. EantH killed *P. acnes* and *S. agalactiae* with a minimum microbicidal concentration (MMC) of 1000 µg/ml and 2000 µg/ml, respectively. Scanning electron microscopy indicated that binding of EantH to the carbohydrates in the cell walls of *P. acnes* and *S. typhimurium* drastically altered the bacterial cells, and led to inhibition of growth and/or cell death. The antimicrobial activity of EantH could be neutralized by D-galactose, indicating that its bactericidal action involves binding to galactose in the cell wall.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Lectins are glycoproteins that bind reversibly to specific monosaccharides or oligosaccharides, either free or linked to cell surfaces [1]. Lectins can be distinguished from other carbohydrate-binding molecules by their ability to agglutinate cells [2], and in addition, they can be distinguished from anti-carbohydrate immunoglobulins that agglutinate cells by their lack of immunological characteristics [2]. They are widely distributed in almost all living cells [3]. Lectins isolated from various sources have been reported and characterized with respect to their antimicrobial [2,4], antitumor [5] and antiprotozoal activities, and have been used in cytochemistry and histochemistry for diagnosis of human diseases [6]. They have been detected in all parts of plants, including plant latices [7]. In this study, a lectin (EantH) was purified from the milky latex of *Euphorbia antiqorum* L. (family Euphorbiaceae). This plant, which is widely distributed in tropical and subtropical regions including Thailand, has been used as a traditional medicine e.g. in the treatment of cutaneous infections and bronchitis and as a nerve tonic

[8]. Some terpenes derived from this plant have been reported to have inhibitory effects on the activation of Epstein-Barr virus [8] and to have anti-HIV activity [9]. In addition, a D-galactose-specific lectin from *E. antiqorum* has been reported [10]. To improve knowledge of the medicinal use of this plant, a lectin from its latex was studied by N-terminal amino acid sequencing, protein identification, glycoprotein detection, hemagglutination activity measurements and antibacterial assays. In addition, the distribution of trace metallic elements in the latex was determined and their effects on the hemagglutination activity of EantH were characterized.

## 2. Materials and methods

## 2.1. Materials

Low-molecular weight markers for SDS-PAGE, polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, SP Sepharose™ Fast Flow (FF) columns (1.5 cm × 3 cm), phenyl FF (high sub) columns (1.5 cm × 3 cm) and HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR columns were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit, glycoprotein carbohydrate estimation kit, supplemented brucella

\* Corresponding author.

E-mail address: [jaruwatS@g.sut.ac.th](mailto:jaruwatS@g.sut.ac.th) (J. Siritapetawee).

broth and agar for anaerobes were purchased from Thermo Fisher Scientific (MA, USA). Standard proteins for gel filtration, Amicon Ultra centrifugal filter units (MWCO 10 kDa) and Mueller-Hinton broth and agar were obtained from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Other chemicals of analytical grade were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium).

## 2.2. Screening and specification of trace elements contained in the plant latex

A latex sheet of estimated size 2.5 cm × 0.5 cm was made by dropping the fresh latex of *E. antiquorum* onto Mylar® X-ray film (Chemplex, FL, USA) and dried at 25 °C. Trace elements in the latex sheet were studied using synchrotron radiation techniques: X-ray fluorescence (XRF) and X-ray absorption spectroscopy (XAS) with the BL5.2: SUT-NANOTEC-SLRI Beamline, at the Synchrotron Light Research Institute (SLRI), Thailand, using an electron energy of 1.2 GeV, a bending magnet and a beam current of 80–150 mA. The photon flux of the X-ray beam at the sample position was  $10^8$ – $10^{10}$  photons/s and was monochromatized by a Ge(220) double-crystal monochromator.

### 2.2.1. Synchrotron X-ray fluorescence measurements

The trace element content of the latex sheet was screened by energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) using the synchrotron light source. All XRF experiments were performed at a photon energy of 9.8 keV, which could produce the fluorescence *K*-lines of P, S, Cl, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu and Zn. The XRF spectra were recorded with a dwell time of 60 s, using a Vortex ME4 four-element silicon drift detector. The sample chamber was filled with helium to minimize air absorption, whereas the fluorescence detector operated in air. The XRF spectra were processed by OriginPro8 software version 8.0724.

### 2.2.2. X-ray absorption spectroscopy

Two elements in the latex sheet that showed high intensity in the XRF data, Ca and Zn, were chosen for further specification of their chemical compositions. The *K*-edge X-ray absorption near edge structure (XANES) spectra of Ca and Zn were measured in fluorescence mode using a Vortex ME4 four-element silicon drift detector. Zn *K*-edge XANES were measured in air, while the sample chamber was maintained in a helium atmosphere for Ca *K*-edge XANES measurement. The photon energy was calibrated using CaCO<sub>3</sub> (at 4049 eV) and Zn foil (at 9659 eV). All XANES spectra were recorded between –20 and +80 eV relative to the Ca and Zn *K*-edge energies with an energy step of 0.2 eV. The obtained XANES spectra were compared with those of the reference compounds. The reference compounds for Ca *K*-edge XANES measurements were calcium oxide (CaO), calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>), anhydrous calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), calcium oxalate monohydrate (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Ca.H<sub>2</sub>O) and calcium acetate monohydrate (Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O). The reference compounds for Zn *K*-edge XANES measurements were zinc foil, zinc oxide (ZnO), zinc sulfate (ZnSO<sub>4</sub>), zinc nitrate (Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) and zinc chloride (ZnCl<sub>2</sub>). The resulting XANES data were averaged and normalized using the Demeter package, version 0.9.18.2 [11]. Radiation damage to the samples was negligible, as assessed by visual observation of the measured samples and the consistency of the obtained XANES spectra.

## 2.3. Isolation and purification of latex lectin (EantH)

The latex was collected from *E. antiquorum*, a plant growing in Muang district, Nakhon Ratchasima, Thailand. The sticky white compound was removed from crude latex by centrifugation (13,000 ×g for 15 min) at room temperature. Absolute ethanol was then added to precipitate the proteins from the clear supernatant. The proteins were pelleted by centrifugation at 13,000 ×g for 15 min and then dissolved in 25 mM sodium acetate, pH 4.5. The protein solution was fractionated by chromatography on a cation exchange (HiTrap SP FF) column, eluted

with a 0–0.5 M linear gradient of NaCl in 25 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 at flow rate 2 ml/min. Protein was monitored by absorbance measurements of all fractions at 280 nm (*A*<sub>280</sub>). Protein fractions eluted around 0.2 M NaCl were pooled and the buffer exchanged with 25 mM phosphate buffer, pH 7.0 containing 2 M ammonium sulfate. The protein was subjected to further purification by hydrophobic chromatography on a HiTrap Phenyl FF (high sub) column (1.5 cm × 3 cm). The proteins were eluted with a linear gradient of 2.0–0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in phosphate buffer at flow rate of 2 ml/min, with 2-ml fractions collected. *A*<sub>280</sub> of all fractions was measured for protein monitoring. The protein fractions eluted by 0.3–0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were pooled and dialyzed against 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 at 4 °C. The purified protein was concentrated using Amicon Ultra centrifugal filter units (MWCO 10 kDa) at 4 °C. The purity and molecular weight of the purified protein (EantH) were initially analyzed by 12.5% SDS-PAGE [12]. Protein bands were observed by staining with Coomassie brilliant blue R-250, and were compared with EantH treated with or without 5% 2-mercaptoethanol (v/v) and either left unheated or heated at 95 °C for 5 min before performing SDS-PAGE.

The concentration of the purified protein was measured using the BCA assay kit, with a calibration curve constructed using bovine serum albumin (BSA) at concentrations in the range 0.025–2.0 mg/ml. Purified EantH was aliquoted and stored at –20 °C until use.

## 2.4. Molecular mass determination

The molecular mass of EantH was determined by gel filtration chromatography on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR column. The protein (4 mg/ml) was eluted with 0.1 M PBS, pH 7.2 at a flow rate of 0.5 ml/min, with 1-ml fractions collected. The void volume (*V*<sub>0</sub>) was determined by loading 0.5 ml of Blue dextran (2 mg/ml) dissolved in the PBS buffer. The column was calibrated by applying each standard protein (sweet potato β-amylase (200 kDa), yeast alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) and hen egg white lysozyme (14.3 kDa)) (0.5 ml of each, at 4 mg/ml) to the column. To determine the elution volume (*V*<sub>e</sub>), all fractions (1 ml) were collected and the absorbance of protein was measured at 280 nm (*A*<sub>280</sub>). A calibration curve was prepared by plotting *V*<sub>e</sub>/*V*<sub>0</sub> for each standard protein against its molecular weight on a semi-logarithmic scale, and the molecular mass of EantH was determined using this plot.

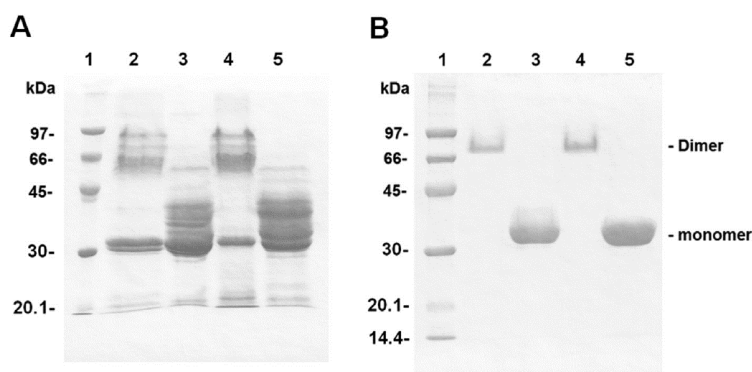
## 2.5. N-terminal amino acid sequencing and sequence homology

N-terminal amino acid sequencing was performed on purified EantH, separated by SDS-PAGE and then transferred onto a PVDF membrane. The membrane was stained with Coomassie brilliant blue R-250, and the visualized protein bands excised and subjected to N-terminal amino acid sequencing by the automated Edman degradation method. The sequencing was performed by the Proteomics International Pty Ltd, Nedlands, Western Australia. Homologues of the N-terminal sequence were sought by matching the EantH sequence against all protein sequences in the BLAST database [13]. Peptide sequences were aligned using the ClustalW program [14].

## 2.6. Glycoprotein detection and carbohydrate content estimation

The glycoprotein assay was performed with the microplate procedure of the Thermo Scientific glycoprotein carbohydrate estimation kit. Protein standards and EantH at a concentration of 2.5 mg/ml (50 μl) were added to the microplate wells. Glycoprotein assay buffer was used as a blank. Twenty five microliters of 10 mM Sodium meta-periodate solution was added into each well, the plate was incubated for 10 min at 25 °C, then the glycoprotein detection reagent (150 μl per well) was added. The plate was incubated for 1 h at 25 °C, and the purple reaction product was estimated from its absorbance at 550 nm. The carbohydrate content of EantH was estimated from a plot of





**Fig. 1.** 12.5% SDS-PAGE of EanH, either before (A) or after (B) purification by two chromatography steps, on cation exchange (HiTrap SP FF) and hydrophobic HiTrap Phenyl FF (high sub) columns. Protein (20  $\mu$ g (A) or 10  $\mu$ g (B)) was mixed with the SDS-PAGE sample buffer without (lanes 2 and 3) and with a reducing agent, 5% 2-mercaptoethanol (lanes 4 and 5). Samples of each type were further prepared without heating (lanes 2 and 4) and with heating at 95 °C for 5 min (lanes 3 and 5) before SDS-PAGE. Lane 1 contains low-molecular weight protein markers.

standard glycoproteins, with all determinations performed in triplicate. The protein standards of known carbohydrate content were lysozyme (0% w/w), ovalbumin (3.2%), apo-transferrin (5.8%), fetuin (22.9%) and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (41.4%).

### 2.7. Hemagglutination assay (HA)

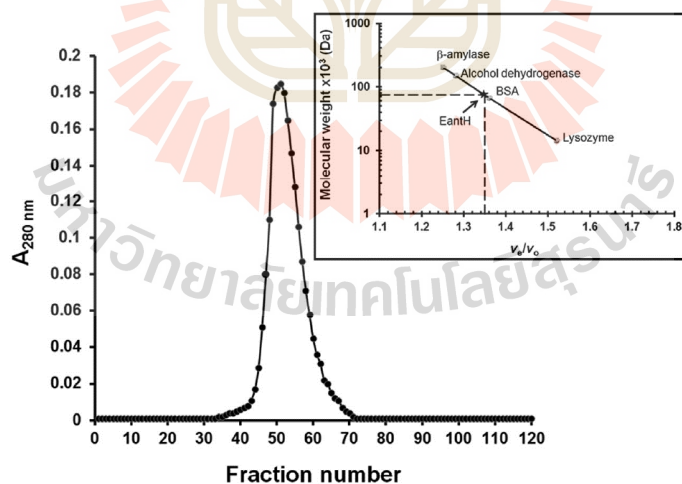
Fresh rabbit blood for use in the hemagglutination assay was collected following the approval of the Ethical Committee of the Suranaree University of Technology (approval number 9/2017). Erythrocytes were separated from the buffy coat, containing platelets, and platelet-poor plasma (PPP) by centrifugation of whole blood at 5000  $\times$ g for 7 min. The erythrocytes were washed 3 times with 0.1 M PBS, pH 7.2 with centrifugation at 2000  $\times$ g for 5 min. Then a 2% (v/v) suspension of erythrocytes was prepared by suspending in 0.1 M PBS, pH 7.2.

Hemagglutination activity was tested in U-microwell plates (Thermo Scientific™ Nunc™, Leicestershire, England). EanH (50  $\mu$ l) was serially diluted two-fold in 0.1 M PBS, pH 7.2 and was mixed in each well with an equal volume of 2% (v/v) erythrocyte (50  $\mu$ l). The

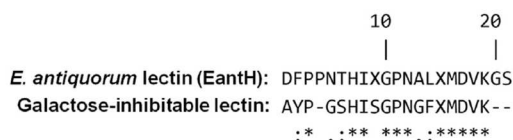
negative control was erythrocytes incubated with buffer. HA was observed after incubating the microwell plate at 37 °C for 1 h. One hemagglutination unit (HAU) was defined as the reciprocal of the highest dilution factor that still induced visible erythrocyte agglutination [7]. Specific hemagglutination (SHA) was defined as the ratio between HAU and the protein concentration (mg/ml) (i.e. SHA corresponding to HAU/mg) [7].

### 2.8. Carbohydrate specificity

The carbohydrate specificity of EanH lectin was determined from the inhibition of HA by various sugars, using a slight modification of the method of Pinto-Junior et al. (2016) [15]. The potential inhibitory sugars used were *N* acetyl D glucosamine, *N* acetylmuramic acid, *N* acetyl D galactosamine, D arabinose, D cellobiose, D fructose, L fucose, D galactose, D glucosamine, D glucose, D maltose, D mannose, D xylose and D saccharose. In the inhibition assay, EanH (0.1 mg/ml) was mixed individually with each diluted sugar (0–100 mM) for 1 h at 37 °C.



**Fig. 2.** Gel filtration (Sephacryl S-200) column chromatography: elution profile of the native, dimeric form of EanH. Inset is the calibration plot of molecular weights of standard proteins versus relative elution volume,  $V_r/V_0$ .



**Fig. 3.** Alignment of the peptide sequence of EantH from *E. antiquorum* with a galactose-inhibitable lectin from *E. marginata*. Sequences were aligned using the ClustalW program. The amino acid sequences of EantH showed identity (\*) or strong (:) or weak (.) similarity to the lectin from *E. marginata* of 52.38%, 14.29% and 9.52%, respectively.

Then, 50  $\mu$ l of 2% (v/v) rabbit erythrocyte was added, and the hemagglutination activity was performed as described in 2.7. The assays were carried out in triplicate.

### 2.9. pH and temperature stability

The pH stability of EantH was investigated by incubating the protein (0.1 mg/ml) at various pH values (3–12) at 25 °C for 2 h, use a slight modification of the method of Pinto-Junior et al. (2016) [15]. The selected buffer systems (all at a concentration of 25 mM) were sodium acetate (pH 3–5), sodium phosphate (pH 6–7), Tris-HCl (pH 8–9) and glycine-NaOH (pH 10–12). After incubation, all reaction mixes were subjected to a 2-fold serial dilution with 0.15 M NaCl and the residual hemagglutination activity of EantH was analyzed as described in 2.7.

The temperature stability of EantH was analyzed by incubating the protein (0.1 mg/ml) at various temperatures within the range 5–95 °C for 1 h. The hemagglutination activity of the protein was then assayed as described in 2.7.

All experiments were performed in triplicate. The residual activity of the pretreated lectin was assayed under the standard condition described in 2.7 and taken as 100%.

### 2.10. Effects of metal ions and EDTA on hemagglutination activity

The effects of divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on HA activity of EantH were assayed by incubating EantH (0.1 mg/ml) with these ions or EDTA (0–100 mM) for 16 h at 4 °C. After this, 50  $\mu$ l of 2% (v/v) rabbit erythrocyte suspension was added, and the hemagglutination activity was estimated as described in 2.7. The assays were performed in triplicate.

### 2.11. Antimicrobial activity assay

#### 2.11.1. Microbial strains

The antibacterial activity of EantH was evaluated using the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and the clinically isolated strains of *Staphylococcus epidermidis* TUH93 and *Streptococcus agalactiae* (Group B) DMST 17129. The Gram-negative bacteria were *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. *Propionibacterium acnes* DMST 14976 was a representative of Gram-positive anaerobic bacteria.

The yeasts *Candida albicans* ATCC 10231 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 were used to screen the antifungal activity of EantH.

#### 2.11.2. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum microbicidal concentration (MMC)

The antimicrobial activity of EantH was screened by the broth microdilution method, performed in flat-bottomed 96-well microplates [16–18]. Various concentrations of lectin, ranging from 31 to 4000  $\mu$ g/ml, were prepared by 2-fold serial dilution of EantH with Mueller Hilton Broth, while for anti-*P. acnes* analysis EantH was diluted with supplemented brucella broth (SBB). Each concentration of EantH (100  $\mu$ l) was incubated with each microbe, at a final cell density of  $10^4$  colony-forming units/ml (CFU/ml), at 37 °C for 24 h, while *P. acnes* was incubated anaerobically using the Gaspak system (HiMedia Labs., Mumbai, India) at 37 °C for 48 h. The growth of microorganisms was followed by measuring the absorbance at 600 nm ( $A_{600}$ ). The minimum inhibitory concentration (MIC) of EantH that could inhibit microbial cell growth was defined as the lowest concentration of protein giving  $A_{600} < 0.1$  [16]. For determination of the minimum microbicidal concentration (MMC), 10  $\mu$ l of the cell suspension from each well of the MIC experiment were subcultured in Mueller Hilton blood agar plates and incubated at 37 °C for 48 h, while *P. acnes* was subcultured in supplemented brucella agar (SBA) for 96 h. The MMC was defined as the lowest concentration of the protein that produced no microorganism growth (i.e. the EantH concentration that killed  $\geq 99.9\%$  of cells) on the agar plate.

The effect of D galactose on the antimicrobial activity of EantH was also determined. EantH (4000  $\mu$ g/ml) was preincubated with 200 mM D galactose at 37 °C for 1 h and then the antimicrobial assays of EantH were performed as described above. Control tests were made with EantH heated at 95 °C for 1 h, the culture media without EantH and the culture media without EantH containing D galactose.

Antimicrobial assays were performed in triplicate.

#### 2.11.3. Scanning electron microscopy

Morphology changes of *P. acnes* and *S. typhimurium* after treatment with EantH were assessed by scanning electron microscopy (SEM). Either *P. acnes* or *S. typhimurium* cells ( $10^4$  CFU/ml) were treated with EantH (50% of MIC or  $\text{MIC}_{50}$ ) at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions for *P. acnes* or aerobic conditions for *S. typhimurium*. The control was bacterial cells cultured without the purified protein. Bacterial cells were harvested by centrifugation at 1500  $\times$ g and washed three times with 0.1 M PBS, pH 7.2. The cells were fixed with 4% (v/v) glutaraldehyde and dehydrated by treatment with a graded series of alcohol solutions (50–100% (v/v)). After drying, cells were coated with a 20 nm-thick gold layer, and their morphologies visualized by scanning electron microscopy (Carl Zeiss Auriga, Oberkochen, Germany).

#### 2.12. Statistical analysis

Data from three independent experiments were analyzed and expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD), using originPro 8 software.

**Table 1**

Purification of a lectin (EantH) from *E. antiquorum* latex.

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	HAU <sup>a</sup> /0.05 ml	Total HAU	Specific HA (SHA) <sup>b</sup> (HAU/mg)	Purification factor <sup>c</sup> (fold)	Protein yield <sup>d</sup> (% w/w)
Crude latex	4	22.08	256	20,480	927.54	1	100
Two types of column chromatography	5	5	1024	102,400	20,480	22.1	22.6

<sup>a</sup> HAU is hemagglutination unit (Titer). Titer is the reciprocal of the highest dilution of protein showing complete agglutination of rabbit red blood cell.

<sup>b</sup> Specific hemagglutination activity (SHA) is the ratio between total HAU and amount (mg) of protein.

<sup>c</sup> Purification factor is the ratio of SHA obtained at each purification step to the initial SHA.

<sup>d</sup> Purification of protein yield is obtained from dividing total protein by starting total amount of protein  $\times$  100.

### 3. Results and discussion

A homodimeric lectin (EantH) was isolated and purified from the crude latex of *E. antiqorum*. The dimeric and monomeric forms of the purified protein migrated on SDS-PAGE with estimated molecular weights of about 73 and 33 kDa, respectively (Fig. 1). The dimers were maintained by non-covalent bonds between the subunits, since they could not be dissociated by the reducing agent 2-mercaptoethanol, but could be dissociated by heating at 95 °C under non-reducing conditions (Fig. 1) [19]. The molecular weight of the dimeric protein determined by gel filtration chromatography was about 75 kDa (Fig. 2). The sequence of the first 21 amino acid residues of the protein (Fig. 3) had homology (52.38% identity) with a galactose-inhibitable lectin isoform Ala-1 del, derived from *E. marginata* (NCBI accession No. P33889) [20]. The result of the N-terminal amino acid sequence homology search suggested a lectin-like protein, so the lectin properties of the purified protein were investigated. As mentioned in the introduction, lectins are glycoproteins, so the carbohydrate content of the purified protein was analyzed. The estimated carbohydrate content of EantH obtained from the standard glycoprotein curve was 12% (w/w).

Hemagglutination testing was used to screen the lectin properties of the protein in this study [21], and also to assess the purity and specific activity of the protein after purification as shown in Table 1. The plant protein was purified by cation exchange chromatography followed by hydrophobic chromatography, with an overall yield of 22.6% (w/w). The specific hemagglutination activity was increased 22.1-fold in the purified protein. Since the purified lectin was derived from the crude latex of *E. antiqorum* and had hemagglutination activity toward rabbit erythrocytes, the protein was designated EantH.

The sugar specificity of EantH was analyzed by determining the degree of inhibition of hemagglutination by various sugars (Table 2). The hemagglutination activity of EantH was completely inhibited by D galactose, N acetylmuramic acid and N Acetyl D galactosamine at the minimum inhibiting concentrations of 50 mM, 100 mM and 100 mM, respectively (Table 2). Since the inhibition by D galactose was stronger than by N acetylmuramic acid and N acetyl D galactosamine, EantH was classified as a D galactose specific lectin. It is similar to several other lectins that have been found in the latices of *Euphorbiaceae* [22].

The effects of pH and temperature on EantH stability were analyzed in this study. The hemagglutination activity of EantH was stable after pre-treatment of the lectin at pH 5–9 (Fig. 4) or at temperatures in the range 5–65 °C (Fig. 5), but was decreased to 6.25 and 12.5% of its maximum value after preincubation at pH 3 and pH 12, respectively (Fig. 4). Similar to other latex lectins of *Euphorbiaceae* e.g. *E. calcina* L., *E. dalberi*

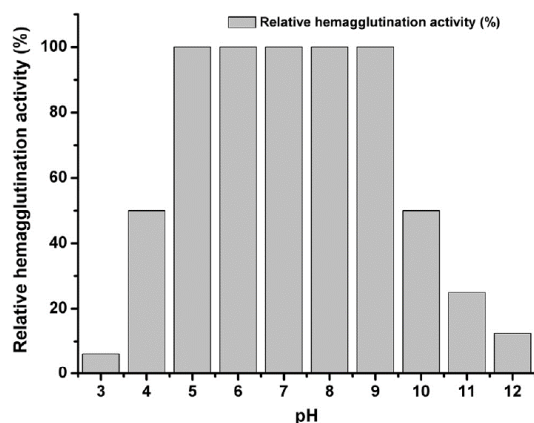


Fig. 4. pH stability of EantH assessed by the hemagglutination assay. Each bar shows the mean  $\pm$  SD from three experimental replicates. Titers that give full hemagglutination are shown as 100%.

L. and *E. sp.*, the activity of EantH rapidly declined at pH values above 10 [23]. EantH was found to be inactive at a temperature of 95 °C (Fig. 5). These results showed that EantH was a thermostable lectin, in contrast with other plant lectins, which are reportedly not stable above 60 °C e.g. lectin from seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen (stable up to 45 °C) [2], an N acetyl D glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* (55 °C) [5] and Eutirucallin from the latex of *E. tirucalli* (55 °C) [7].

Lectins can be divided into 3 main types, based on their divalent cation requirements for carbohydrate binding [22]. The C-type lectins, which require  $\text{Ca}^{2+}$ , include mannose-specific lectin [22] and selectins [24]. The S-type lectins, which are soluble proteins and are  $\text{Ca}^{2+}$ -independent, include galactose-specific lectins and galactin [22]. The L-type lectins (legume lectins) require both  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  [22]. Since metal ions are needed for binding to carbohydrate by some lectins, the natural occurrence of metal ions in a fresh sheet of *E. antiqorum* latex was examined by two synchrotron-based techniques, XRF and XAS. The effects on the hemagglutination activity of EantH of the ions found were also analyzed. The XRF spectra showed that  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  were the main metal ions occurring in the natural latex of *E. antiqorum* (Fig. 6). The compounds of Ca and Zn in the latex were identified using the XAS technique. Ca and Zn K-edge XANES spectra of the plant latex were compared and identified by comparison with reference

Table 2  
Sugar specificity of EantH lectin.

Sugars	Concentration <sup>a</sup> (mM)
N acetyl D glucosamine	NI
N acetylmuramic acid	100
N Acetyl D galactosamine	100
D arabinose	NI
D cellobiose	NI
D fructose	NI
L fucose	NI
D galactose	50
D glucosamine	NI
D glucose	NI
D maltose	NI
D mannose	NI
D xylose	NI
D saccharose	NI

NI denotes that inhibition was not observed.

<sup>a</sup> Minimum concentration of sugars required to completely inhibit hemagglutination activity.

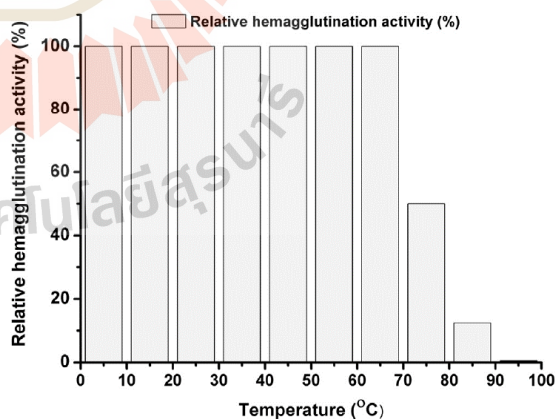


Fig. 5. Temperature stability of EantH assessed by the hemagglutination assay. Each bar presents the mean  $\pm$  SD from three experimental replicates. Titers that give full hemagglutination are shown as 100%.

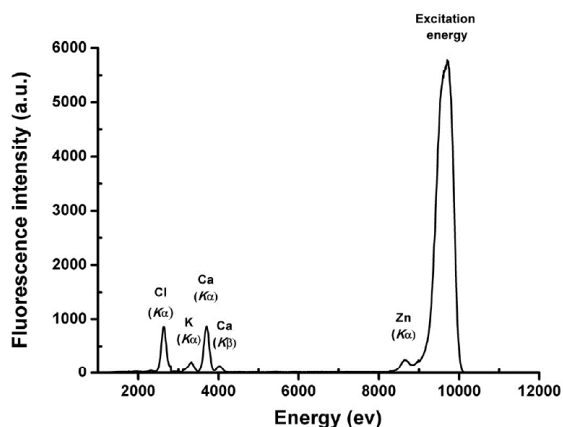


Fig. 6. X-ray fluorescence spectra of some metals and trace elements contained in the natural latex of *E. antiqorum*. Calcium (Ca) and zinc (Zn) are the major metallic components of the latex.

compounds. Ca *K*-edge XANES spectra of the latex (Fig. 7) showed a high degree of similarity to calcium oxalate monohydrate ( $C_2O_4Ca \cdot H_2O$ ), which has been reported to occur in the latices of various plant species [25]. For Zn the *K*-edge XANES spectrum of the latex showed features similar to zinc sulfate ( $ZnSO_4$ ) and/or zinc nitrate ( $Zn(NO_3)_2$ ) (Fig. 8). Compounds of  $Zn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  distributed in the plant latex were difficult to specify since both ions can interact with other organic or inorganic compounds in the plants [26]. From the XRF and XAS data,  $CaCl_2$  and  $ZnCl_2$  were used in determining the effects of  $Ca^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  on the hemagglutination activity of EantH, and the effect of a chelating agent (EDTA) was also determined. Comparison of the hemagglutination activity of untreated EantH and EantH treated with  $CaCl_2$ ,  $ZnCl_2$  or EDTA at concentrations up to 0.1 M for 16 h at 4 °C showed that the activities of the treated and untreated lectin were the same. This suggests that the carbohydrate recognition domain of EantH does not require metal ions, as the chelating agent (EDTA) did not abolish its activity. The metal ion independence of carbohydrate binding by EantH is similar to that of a galactose/lactose-specific lectin (Eutirucallin) from *E. tirucalli* latex [7].

As the sugar specificity of EantH was  $D$  galactose > *N* acetylmuramic acid ~ *N* acetyl  $D$  galactosamine, the antibacterial and antifungal activities of EantH were investigated. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum microbicidal concentration (MMC) of EantH, in

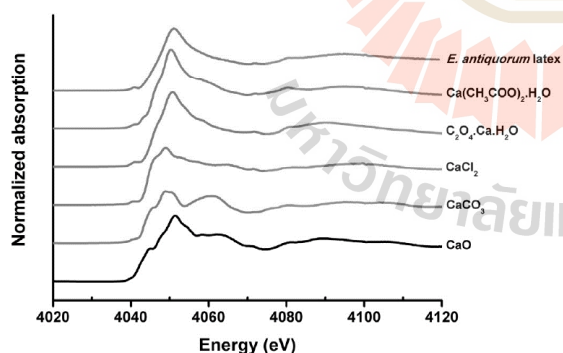


Fig. 7. Comparison of the Ca *K*-edge XANES spectra of the natural latex of *E. antiqorum* and reference compounds. The reference compounds are calcium acetate monohydrate ( $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ ), calcium oxalate monohydrate ( $C_2O_4Ca \cdot H_2O$ ), calcium chloride anhydrous ( $CaCl_2$ ), calcium carbonate ( $CaCO_3$ ) and calcium oxide ( $CaO$ ).

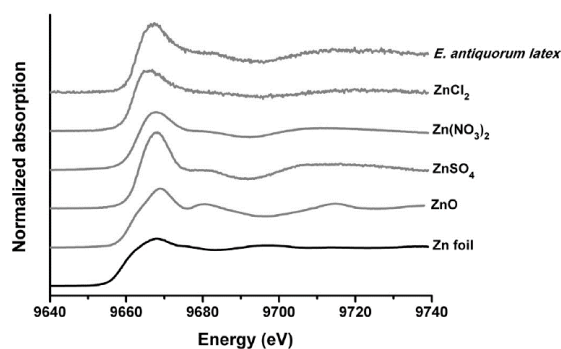


Fig. 8. Comparison of the Zn *K*-edge XANES spectra of the natural latex of *E. antiqorum* and reference compounds. The reference compounds are zinc chloride ( $ZnCl_2$ ), zinc nitrate ( $Zn(NO_3)_2$ ), zinc sulfate ( $ZnSO_4$ ), zinc oxide ( $ZnO$ ) and zinc foil ( $Zn$  foil).

the condition with and without treated with  $D$  galactose, are shown in Table 3. In the condition without  $D$  galactose treatment, EantH inhibited the growth of the Gram-positive bacteria *S. aureus* and *S. epidermidis* with a MIC of 2000  $\mu g/ml$  but the bacteria were not killed by EantH at a concentration of up to 4000  $\mu g/ml$ . The protein inhibited the growth and killed *S. agalactiae* (Group B) with MIC and MMC of 250  $\mu g/ml$  and 2000  $\mu g/ml$ , respectively. The Gram-positive rod anaerobic bacterium *P. acnes*, with a MIC of 125  $\mu g/ml$ , was killed by EantH with a MMC of 1000  $\mu g/ml$ . Neither Gram-negative bacteria (*E. coli*) nor yeasts (*C. albicans* and *C. parapsilosis*) were growth-inhibited or killed by EantH, except that a Gram-negative bacterium, *S. typhimurium* was growth-inhibited but not killed, with a MIC of 1000  $\mu g/ml$ . When EantH was preincubated with  $D$  galactose (200 mM), the protein lost the microbicidal activity against *S. agalactiae*, *S. typhimurium* and *P. acnes* (Table 3), but retained growth inhibition activity against *S. agalactiae* and *P. acnes* with MIC of 2000  $\mu g/ml$  and 1000  $\mu g/ml$ , respectively (Table 3). In addition, the antimicrobial activity of EantH was absolutely abolished by heating the protein at 95 °C for 1 h, due to denaturation and aggregation of the protein.

Since EantH inhibited the growth of *P. acnes* and *S. typhimurium* and killed *P. acnes*, the effects of this lectin at  $MIC_{50}$  on the ultrastructure of

Table 3  
Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) of EantH.

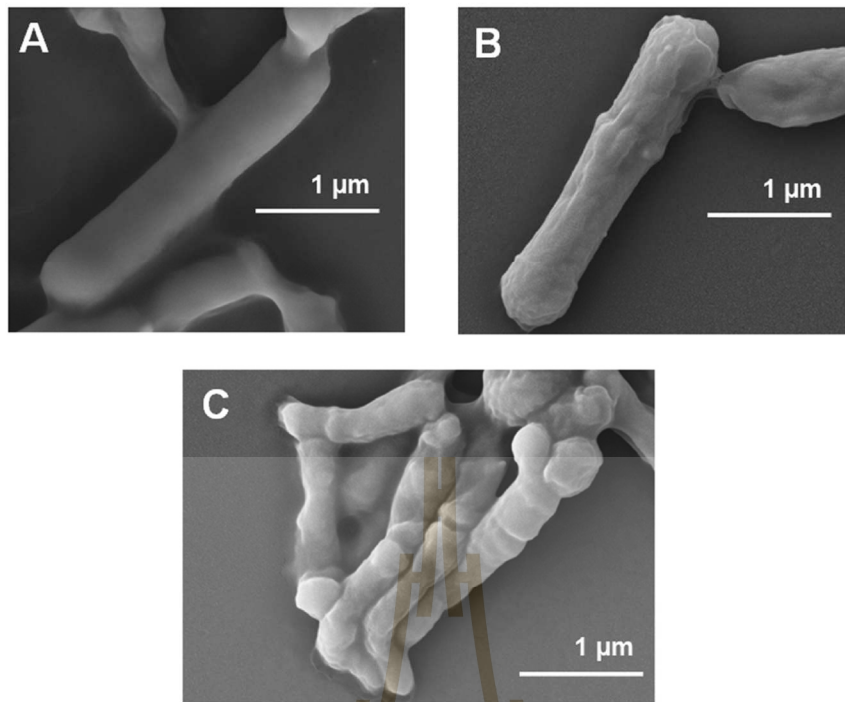
Microorganism	Concentration of EantH ( $\mu g/ml$ )			
	Without $D$ Galactose		With $D$ Galactose	
	MIC <sup>a</sup>	MMC <sup>b</sup>	MIC <sup>a</sup>	MMC <sup>b</sup>
Gram positive bacteria				
<i>Staphylococcus aureus</i>	2000	>4000	2000	>4000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> TUH93	2000	>4000	2000	>4000
<i>Streptococcus agalactiae</i> DMST 17129 <sup>c</sup>	250	2000	2000	>4000
Gram-positive anaerobic bacteria				
<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14976 <sup>c</sup>	125	1000	1000	>4000
Gram-negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <sup>c</sup>	>4000	>4000	>4000	>4000
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311 <sup>c</sup>	1000	>4000	>4000	>4000
Fungus				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>4000	>4000	>4000	>4000
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	>4000	>4000	>4000	>4000

Antimicrobial assays were done in triplicate ( $n = 3$ ).

<sup>a</sup> MIC is the minimum inhibitory concentration of EantH that inhibits microbial cell growth.

<sup>b</sup> MMC is the minimum concentration of EantH that kills 99.9% of microorganism (MMC).

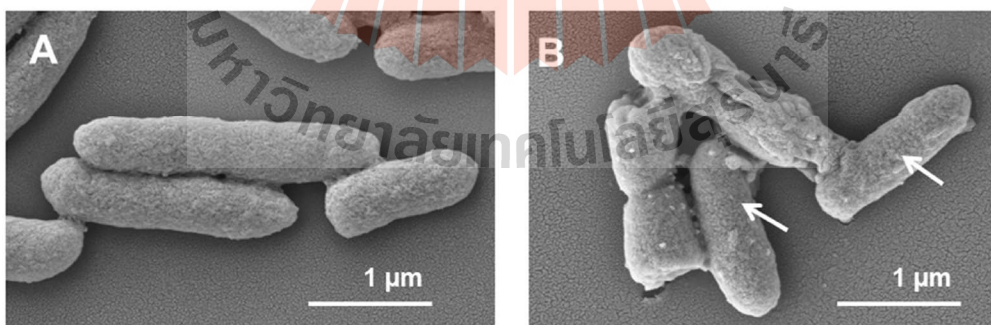
<sup>c</sup> Bacteria that have galactose in their cell walls have been reported.



**Fig. 9.** Scanning electron microscopy of *P. acnes* cells, either untreated (A) or treated (B and C) with  $MIC_{50}$  of EantH under anaerobic conditions at 37 °C for 24 h. The ultrastructure of the bacterial cells in the absence of EantH are unchanged and shows smooth cell walls (A); in contrast the morphology in the presence of the lectin shows shrinking and blebbing (B), cell clumping and decreased cell sizes (C).

these bacteria were investigated by SEM. The visualized morphologies of untreated cells (Fig. 9A and Fig. 10A) and those treated with EantH (Figs. 9B, C and 10B) were compared. EantH induced bacterial cell clumping (Fig. 9C), decreased cell sizes and produced morphological perturbation of the bacterial cells by shrinking and blebbing (Figs. 9B, C and 10B). In contrast with the treated bacteria, the untreated cells had unchanged morphology and smooth cell walls (Figs. 9A and 10A). In addition, the morphology of some treated *S. typhimurium* cells changed slightly from that of the untreated bacterial cells (Fig. 10B). This result corresponded to the antibacterial activity of EantH using

broth dilution and agar plate techniques, which indicated that EantH had bacteriostatic but not bactericidal activities against *S. typhimurium*. EantH inhibited the growth of Gram-positive bacteria but not a Gram-negative bacterium (*E. coli*), even though their cell walls contain *N* acetylmuramic acid, a major component of the peptidoglycan layer [27]. The cell walls of Gram-negative bacteria differ from those of Gram-positive bacteria by having outer membranes that contain many lipoproteins, of which one-third are covalently linked to the peptidoglycan layer [27]. The lipid and protein compositions of the outer membrane may result in the EantH resistance of the bacteria [28]. The cell walls of *P.*



**Fig. 10.** Scanning electron microscopy of *S. typhimurium* cells, either untreated (A) or treated (B) with  $MIC_{50}$  of EantH at 37 °C for 24 h. In the absence of EantH the bacterial cells are unchanged and show smooth cell walls (A); in contrast their morphology in the presence of the lectin shows shrinking and blebbing (B). Arrows indicate the morphology of some treated *S. typhimurium* cells slightly altered from untreated bacterial cells (B).

*acnes* are composed mainly of peptidoglycan, neutral sugars (53.5%), fatty acids (2.3%), amino acids and amino sugars [29]. Since galactose is present in the cell walls of *P. acnes* (amounting to 2.24%), the galactose-binding lectin EantH binds to these cells [29]. In addition, EantH could also bind to the *N* acetylmuramic acid component of the peptidoglycan. EantH binding to galactose and *N* acetylmuramic acid on the cell walls of the bacteria produced cell clumping and ultrastructural changes, as shown in this study. Drastic changes in *P. acnes* cell walls can induce bacterial cell death [30]. Other bacteria with galactose-containing cell walls are *S. agalactiae* [31], *E. coli* [32] and *S. typhimurium* [33]. EantH inhibited growth and killed *S. agalactiae* by binding to galactose and *N* acetyl muramic acid on the cell of this Gram-positive bacterium. EantH inhibited growth without killing *S. typhimurium* and did not inhibit *E. coli* even though their cell walls contain galactose, since the walls of these Gram-negative bacteria differ from those of Gram-positive bacteria as described above. Neutralization of the antimicrobial activity of EantH with  $\beta$  galactose strongly confirmed that EantH could inhibit the growth and/or kill bacteria containing galactose in their cell walls. Lectins that act as antifungal agents have been reported [4], their interaction with carbohydrates present in fungal and yeast cell walls inducing growth inhibition and cell death [4]. The results presented here show that EantH could not inhibit the growth or kill *C. albicans* and *C. parapsilosis*, since the cell walls of fungi and yeasts are composed mainly of glucan, cellulose, mannoproteins and chitin (a long-chain polymer of *N* acetyl  $\beta$  glucosamine) [34], which are not recognized by EantH. In addition, most of outer layer of yeast cells is covered by a network of mannan chains [35], mainly complexed with proteins. Mannoproteins in yeast contain 50–95% carbohydrate by weight, comprising minor amounts of galactose, rhamnose, glucose, fucose and xylose [35]. Consequently, EantH had no anti-*Candida* activity. The cell walls of some fungi have major carbohydrate components, of galactose and complexed galactose such as the galactomannan of *Aspergillus* [35]. Therefore, the antifungal activity of EantH against fungi with cell walls containing a galactose will be studied further.

The results presented in this study confirmed that EantH is a plant lectin that can interact with galactose more strongly than with *N* acetylmuramic acid. The lectin has bacteriostatic and bactericidal properties toward bacteria that contain galactose in their cell wall. In addition, EantH can bind to *N* acetyl  $\beta$  galactosamine, which is found in the cell walls of some microorganisms e.g. a Gram-positive bacillus [36] and has an important role in cancer cell adhesion [37]. The effects of EantH on other microorganisms and cancer cells will therefore be investigated in further studies.

#### 4. Conclusion

EantH, a galactose-specific thermostable lectin derived from *E. antiqorum* latex, bound carbohydrate in a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent manner, similar to the S-type lectins. EantH had bacteriocidal activity toward an aerobic bacterium, *P. acnes* and a Gram-positive coccus bacterium, *S. agalactiae* which have cell walls composed of galactose and *N* acetylmuramic acid, allowing the lectin to bind. When the lectin interacts with carbohydrates on the bacterial cell wall the ultrastructure of the bacteria is drastically changed, producing growth inhibition and then death of the bacteria. Since the lectin binds to *N* acetylmuramic acid more weakly than to  $\beta$  galactose, it only inhibits the growth of some Gram-positive bacteria such as *S. aureus* and *S. epidermidis*, without killing them. The cell walls of the Gram-negative bacteria *E. coli* and *S. typhimurium* also contain *N* acetylmuramic acid and galactose, but EantH could not inhibit the growth of *E. coli* or kill *S. typhimurium*, probably because lipoproteins on their cell membranes interfere with binding of the lectin to the carbohydrates in the cell walls. The lectin had no anti-*Candida* activity, as it does not bind to carbohydrates in the yeast cell wall, which are composed mainly of glucan and chitin. Further studies will address the effects of EantH on fungi which have cell walls containing galactose, and since EantH can bind to *N* acetyl  $\beta$  galactosamine,

the antimicrobial activity of EantH against other microorganisms, normal cells and tumors, in humans and animals, will be determined. Since this protein is stable at high temperature and across a broad range of pH values and has antimicrobial activity, it may have medical applications as an antimicrobial agent.

#### Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Authors' contributions.

Jaruwan Siritapetawee performed purification and characterizations of EantH, XRF and XAS measurements, the antimicrobial activities, Scanning electron microscopy analysis and wrote the manuscript. Wanwisa Limphirat performed XRF and XAS data analysis. Watchara Wongviriya collected rabbit blood samples. Janjira Maneesan performed the N-terminal amino acid sequencing. Worada Samosornsuk performed and interpreted the antimicrobial activities. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

This work was supported by the National Research Council of Thailand (NRCT) and Suranaree University of Technology (Grant no. SUT1-102-60-24-14). The authors would like to thank the Synchrotron Light Research Institute (public organization), Thailand for providing the facility to perform the XRF and XAS experiments at BL5.2: SUT-NANOTEC-SLRI Beamline. We gratefully thank Dr. David Apps, Centre for Integrative Physiology, School of Biomedical Sciences, University of Edinburgh, United Kingdom for valuable proofreading and discussions.

#### References

- [1] S.K. Lam, T.B. Ng, Lectins: production and practical applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 45–55.
- [2] S. Charungchittrak, A. Petsom, P. Sangvanich, A. Karnchanat, Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen, *Food Chem.* 126 (2011) 1025–1032.
- [3] H. Ishida, T. Moritani, Y. Hata, A. Kawato, K. Suginami, Y. Abe, S. Imayasu, Molecular cloning and overexpression of fleA gene encoding a fucose-specific lectin of *Aspergillus oryzae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 1002–1008.
- [4] P.M. da Silva, M.C. de Moura, F.S. Gomes, D. da Silva Trentin, A.P. Silva de Oliveira, G.S.V. de Mello, M.G. da Rocha Pitta, M.J.B. de Melo Rego, L.C.B.B. Coelho, A.J. Macedo, R.C.B.Q. de Figueiredo, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*, *Int. J. Biol. Macromol.* 108 (2018) 391–400.
- [5] A. Kaur, J. Singh, S.S. Kamboj, A.K. Sexana, R.M. Pandita, M. Shammugavel, Isolation of an *N* acetyl  $\beta$  glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity, *Phytochemistry* 66 (2005) 1933–1940.
- [6] A.F.S. Santos, M.D.C. da Silva, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva M.T.S. Correia, Lectins: function, structure, biological properties and potential applications, *Curr. Top. Pept. Protein Res.* 15 (2014) 40–58.
- [7] S.S. Santana, M.L. Gennari-Cardoso, F.C. Carvalho, M.C. Roque-Barreira, Ada S. Santiago, F.C. Alvim, C.P. Pirovani, Eutricucallin, a RIP-2 type lectin from the latex of *Euphorbia tirucalli* L. presents proinflammatory properties, *PLoS One* 9 (2014) e88422.
- [8] T. Akihisa, E.M. Kithsiri Wijeratne, H. Tokuda, F. Enjo, M. Toriumi, Y. Kimura, K. Koike, T. Nikaïdo, Y. Tezuka, H. Nishino, Eupha-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ -ol ("antiqual C") and other triterpenes from *Euphorbia antiqorum* latex and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 158–162.
- [9] M. Dong, X.Q. Chen, C.H. Chen, R.T. Li, Terpenes from *Euphorbia antiqorum* and their in vitro anti-HIV activity, *Chem. Biodivers.* 22 (2018), e1700560.
- [10] R.J. Doyle, Introduction to lectins and their interactions with microorganisms, in: R.J. Doyle, M. Sliemers (Eds.), *Lectin-Microorganism Interactions*, Marcel Dekker, Inc., New York 1994, pp. 1–65.
- [11] B. Ravel, M. Newville, ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT, *J. Synchrotron Radiat.* 12 (2005) 537–541.
- [12] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [13] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [14] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [15] V.R. Pinto-Junior, J.L. Correia, R.I. Pereira, F.N. Pereira-Junior, M.Q. Santiago, V.J. Osterme, J.C. Madeira, J.B. Cajazeiras, C.S. Nagano, P. Delatorre, A.M. Assreuy, K.S.

- Nascimento, B.S. Cavada, Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity, *J. Mol. Recognit.* 29 (2016) 134–141.
- [16] S.P. Uday, D. Thiagarajan, S. Goswami, M.D. Adhikari, G. Das, A. Ramesh, Amphiphile-mediated enhanced antibiotic efficacy and development of a payload nanocarrier for effective killing of pathogenic bacteria, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 5818–5827.
- [17] S.M. Bersan, L.C. Galvão, V.F. Goes, A. Sartoratto, G.M. Figueira, V.L. Rehder, S.M. Alencar, R.M. Duarte, P.L. Rosalen, M.C. Duarte, Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms, *BMC Complement. Altern. Med.* 14 (2014) 451.
- [18] A.P. Debois, K.C. Lawlor, Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acid against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*, *Mar. Drugs* 11 (2013) 4544–4557.
- [19] P. Raghun, S. Ghosh, K. Soundarya, A. Haseeb, B. Aruna, N.Z. Ehtesham, Dimerization of human recombinant resistin involves covalent and noncovalent interactions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 642–646.
- [20] F. Stirpe, F. Licastro, M.C. Morini, A. Parente, G. Savino, A. Abbondanza, A. Bolognesi, A.I. Falasca, C.A. Rossi, Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from the latex of *Euphorbia marginata*, *Biochim. Biophys. Acta* 1158 (1993) 33–39.
- [21] A. Sharma, T.B. Ng, J.H. Wong, P. Lin, Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi beans), *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009), 929568.
- [22] Rde.O. Dias, Ldos.S. Machado, L. Migliolo, O.L. Franco, Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities, *Molecules* 20 (2015) 519–541.
- [23] M. Nsimba-Lubaki, A.K. Allen, W.J. Peumans, Isolation and partial characterization of latex lectins from three species of the genus *Euphorbia* (*Euphorbiaceae*), *Physiol. Plant.* 67 (1986) 193–198.
- [24] D. Ding, Y. Yao, S. Zhang, C. Su, Y. Zhang, C-type lectins facilitate tumor metastasis, *Oncol. Lett.* 13 (2017) 13–21.
- [25] S.P. Rodrigues, Cunha M. Da, J.A. Ventura, P.M. Fernandes, Effects of the *Papaya meleira* virus on papaya latex structure and composition, *Plant Cell Rep.* 28 (2009) 861–871.
- [26] G. Sarret, E. Harada, Y.E. Choi, M.P. Isaure, N. Geoffroy, S. Fakra, M.A. Marcus, M. Birschwilks, S. Clemens, A. Manceau, Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds, *Plant Physiol.* 141 (2006) 1021–1034.
- [27] W.W. Navarre, O. Schneewind, Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (1999) 174–229.
- [28] A.H. Delcour, Outer membrane permeability and antibiotic resistance, *Biochim. Biophys. Acta* 1794 (2009) 808–816.
- [29] S. Ryu, Y. Park, B. Kim, S.M. Cho, J. Lee, H.H. Lee, C. Gurley, K. Song, A. Johnson, C.A. Armstrong, P.I. Song, Inhibitory and anti-inflammatory effects of the *Helicobacter pylori*-derived antimicrobial peptide HPA3NT3 against *Propionibacterium acnes* in the skin, *Br. J. Dermatol.* 171 (2014) 1358–1367.
- [30] I. Azuma, K. Sugimura, T. Taniyama, A. Aladin, Y. Yamamura, Chemical and immunological studies on the cell walls of *Propionibacterium acnes* strain C7 and *Corynebacterium parvum* ATCC 11829, *Jpn. J. Microbiol.* 19 (1975) 265–275.
- [31] É. Caliot, S. Dramsi, M.P. Chapot-Chartier, P. Courtin, S. Kulakauskas, C. Pêchoux, P. Trieu-Cuot, M.Y. Mistou, Role of the group B antigen of *Streptococcus agalactiae*: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis, *PLoS Pathog.* 8 (2012), e1002756.
- [32] D.N. Medearis Jr., B.M. Camitta, E.C. Heath, Cell wall composition and virulence in *Escherichia coli*, *J. Exp. Med.* 128 (1968) 399–414.
- [33] H. Nikaïdo, Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. I. Linkage between o side chains and R core, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 2835–2845.
- [34] W.L. Chaffin, *Candida albicans* cell wall proteins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72 (2008) 495–544.
- [35] A. Muszewska, S. Piskyk, U. Perlińska-Lenart, J.S. Kruszezewska, Diversity of cell wall related proteins in human pathogenic fungi, *J. Fungi (Basel)* 4 (2017) 6.
- [36] S. Brown, J.P.M. Santa Jr., S. Walker, Wall teichoic acids of gram-positive bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 67 (2013) 313–336.
- [37] D. Bapu, J. Runions, M. Kadhim, S.A. Brooks, N acetylgalactosamine glycans function in cancer cell adhesion to endothelial cells: a role for truncated O-glycans in metastatic mechanisms, *Cancer Lett.* 375 (2016) 367–374.



## ประวัตินักวิจัย

ชื่อ นางสาวจรรุวรรณ 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: สาขาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่อยู่ติดต่อได้: สาขาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง  
จ.นครราชสีมา 30000

E-mail: jaruwanS@g.sut.ac.th และ jaruwanS@sut.ac.th

ผลงานทางวิชาการ/ผลงานวิจัย (ภายใน 5 ปี)

**Siritapetawee, J.\***, Limphirat, W., Wongviriyaya, W., Maneesan, J., Samosornsuk, W. (2018)

Isolation and characterization of a galactose-specific lectin (EantH) with antimicrobial activity from *Euphorbia antiquorum* L. latex. *Int J Biol Macromol.* 120: 1846-1854.

**Siritapetawee, J.\***, Limphirat, W., Nantapong, N., Songthamwat, D. (2018) Fabrication of silver

chloride nanoparticles using a plant serine protease in combination with photo-activation and investigation of their biological activities. *Biotechnol Appl Biochem.* 65: 572-579.

Hemung B., Yongsawatdigul J., Chin K. B., Limphirat, W., **Siritapetawee, J.** (2018) Silver Carp

Bone Powder as Natural Calcium for Fish Sausage. *J Aquat Food Prod T.* 27: 305-315.

**Siritapetawee, J.\***, Talabnin, C., Vanichtanankul, J., Songsiriritthigul, C., Thumanu, K., Chen, C.-

J., Komanasin, N. (2017) Characterization of the binding of a glycosylated serine protease from *Euphorbia cf. lactea* latex to human fibrinogen. *Biotechnol Appl Biochem.* 64: 862-870.

**Siritapetawee, J.\***, Sojikul, P., Klaynongsruang, S. (2015) Biochemical characterization of a new

glycosylated protease from *Euphorbia cf. lactea* latex. *Plant Physiol Biochem.* 92: 30-38

**Siritapetawee, J.\***, Limphirat, W., Kantachot, C., Kongmark, C. (2015) The effects of metal ions

in *Euphorbia cf. lactea* latex on the fibrinolytic activity of a plant protease. *Appl Biochem Biotechnol.* 175: 232-242.



Jandaruang, J., **Siritapetawee, J.**, Songsiriththigul, C., Preecharram, S., Azuma, T., Dhiravisit, A., Fukumori, Y., Thammasirirak, S. (2014) Purification, characterization, and crystallization of *Crocodylus siamensis* hemoglobin. *Protein J.* 33: 377-385.

**Siritapetawee, J.\***, Sojikul, P., Soontaranon, S., Liphirat, W., Thammasirirak, S. (2013) A protein from *Aloe vera* that inhibits the cleavage of human fibrin(ogen) by plasmin. *Appl Biochem Biotechnol.* 170: 2034-2045.

