

Abstract:

Antibacterial activity was screened from seed protein extracts of legume plants found in Northeast of Thailand by disc diffusion method. The results demonstrated that the crude seed protein extracts of *Bauhinia purpurea* and *Bauhinia acuminata* showed interesting ability to inhibit selected bacterial growth in both gram positive and gram negative strains. The most sensitive and the least sensitive bacterial strains against *Bauhinia purpurea* extract were *Shigella flexneri* DMST 4423 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 with Minimum Inhibition Concentration (MIC) values about 5.00 and 322.0 µg/mL, respectively. Whilst the most and the least sensitive bacterial strains against *Bauhinia acuminata* extract were *Bacillus subtilis* ATCC 7058 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 with MIC values about 8.34 and 66.72 µg/mL, respectively. Scanning electron microscopy (SEM) of bacteria treated with the *Bauhinia purpurea* and *Bauhinia acuminata* extracts showed bacterial membrane damaging of both gram positive and gram negative bacteria. In hemolysis assay, the human erythrocytes were incubated with the *Bauhinia purpurea* and *Bauhinia acuminata* extracts. It was found that, the *Bauhinia purpurea* extract did not show the hemolytic activity on human erythrocytes even treating these erythrocytes with protein concentration as high as 1,329.0 µg/mL. On the other hand, *Bauhinia acuminata* crude extract at 577.00 µg/mL protein concentration made 40% hemolysis when compared to Triton X-100 treatment. Some properties of antibacterial activity of the *Bauhinia purpurea* extract were also studied. It was found that, the antibacterial activities were not abolished after heat treatment at 100 °C for 30 min. Sodium chloride up to 1.0 M had no effect on *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *B. subtilis* ATCC 7058 growth-inhibiting activity, whilst calcium chloride at concentration as low as 10 mM abolished this activity. Moreover, the

effect of pHs (pH 2, 4, 6 and 9) on antibacterial activity were tested. It was found that the antibacterial activity of *Bauhinia purpurea* seed extract was remained after incubating at pH 2-6. However, the activity of *Bauhinia purpurea* extract against bacteria was lost after incubating at pH 9. Purification of proteins from the *Bauhinia purpurea* extract was performed by using heat treatment and Q-sepharose column. It was found that the antibacterial peptides were enriched in the supernatant after heat treatment at 85 °C for 10 min. After Q-sepharose column chromatography, the antibacterial activities were found on both part including the unbound (Qu1, Qu2 and Qu3 fractions) and bound fractions (QE1, QE2 and QE3 fractions). All fractions showed antibacterial activity. Each fraction after Q sepharose column was subjected to a reverse phase column (C18) of high performance liquid chromatography (HPLC). Peak fractions based on absorbance at 214 nm were analyzed by tandem mass spectrometry. It was found that several peptides have been revealed.

(บทคัดย่อ):

สารสกัดโปรตีนหยาบของเมล็ดพืชตระกูลถั่วที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยได้ถูกนำมาตรวจหาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธีดิสก์ดифฟิวชัน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดโปรตีนหยาบของเมล็ดชงโค (*Bauhinia purpurea*) และกาหลง (*Bauhinia acuminata*) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองได้อย่างน่าสนใจ โดยยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดและไม่ดีที่สุดโดยสารสกัดโปรตีนหยาบจากเมล็ดชงโคคือ *Shigella flexneri* DMST 4423 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อทั้งสอง (MIC) เป็น 5.00 และ 322.0 µg/mL ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากเมล็ดกาหลงสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 7058 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เป็น 8.34 µg/mL และยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ไม่ดีที่สุดและมีค่า MIC เป็น 66.72 µg/mL จากการศึกษารูปร่างของเซลล์แบคทีเรียที่ป่มกับสารสกัดโปรตีนหยาบจากเมล็ดชงโคและกาหลงโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเมมเบรนของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบเกิดความเสียหาย ในการตรวจสอบฤทธิ์การทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์พบว่าสารสกัดโปรตีนหยาบจากเมล็ดชงโคไม่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นโปรตีนสูงถึง 1,329.0 µg/mL ในขณะที่สารสกัดโปรตีนหยาบจากเมล็ดกาหลงที่ความเข้มข้นโปรตีน 577.00 µg/mL สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก 40% เมื่อเทียบกับ Triton X-100 สารสกัดโปรตีนหยาบจากเมล็ดชงโคได้มีศึกษาสมบัติต่างๆ จากการนำไปให้ความร้อนที่ 100 °C นาน 30 min สารสกัดโปรตีนหยาบจากเมล็ดชงโคดังกล่าวยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียอยู่ โซเดียมคลอไรด์ (1.0 M) ไม่มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *B. subtilis* ATCC 7058 ในขณะที่แคลเซียมคลอไรด์แม้ความเข้มข้นต่ำ (10 mM) ก็สามารถทำให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหายไป สารสกัดโปรตีนหยาบจากเมล็ดชงโคยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในช่วง pH 2-6 แต่ที่ pH 9 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหายไป การแยกบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในสารสกัดโปรตีนหยาบจากเมล็ดชงโคทำได้โดยการให้ความร้อนที่ 85 °C นาน 10 min

ให้นำสารละลายโปรตีนส่วนใสผ่านลงคอลัมน์ Q-sepharose column โปรตีนที่ไม่จับคอลัมน์แบ่งได้สามส่วนคือ Qu1, Qu2 และ Qu3 ส่วนโปรตีนที่จับคอลัมน์ก็แบ่งได้สามส่วนคือ QE1, QE2 และ QE3 ทุกส่วนของโปรตีนทั้งที่จับและไม่จับคอลัมน์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โปรตีนแต่ละส่วนจึงถูกนำไปผ่านลงยัง reverse phase column (C18) นำส่วนฟีดเมื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 214 nm ไปวิเคราะห์เปปไทด์โดย tandem mass spectrometry พบว่าประกอบด้วยเปปไทด์หลายชนิด

Keywords : Plant antimicrobial peptide, antibacterial activity, seed protein extract, legume plants, plant innate immunity

(คำหลัก): เปปไทด์ต้านจุลชีพจากพืช ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โปรตีนสกัดจากเมล็ด พืชตระกูลถั่ว
ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดในพืช