รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: เปปติโดมิกส์และการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศเพื่อประเมินการใช้ประโยชน์เปปไทด์จากน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24

โดย: ดร. ภัทรอร หาวนพันธ์ และคณะ

เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2559

สัญญาเลขที่ RDG5850088

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: เปปติโดมิกส์และการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศเพื่อประเมินการใช้ประโยชน์เปปไทด์จากน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร. ภัทรอร หาวนพันธ์	สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล ม.มหิดล
2. ดร. อภิชัย บัวชูก้าน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.สงขลานครินทร์
3. ดร. วไลรัตน์ พรวิรุฬห์	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.สงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

งานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมในการแยกซีรั่ม (ส่วนที่ไม่ใช่เนื้อยาง) ออกจากเนื้อยางของต้นยางพาราพันธุ์ BPM24 โดยการใช้เทคนิค Ultrafiltration และ solid-phase extraction ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดเปปไทด์ และแยกเปปไทด์ออกเป็นส่วนๆ โดยให้ได้ปริมาณมากพอ ที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์และชนิดของเปปไทด์ ที่ได้ผลมาจากวิธีการทางชีวสารสนเทศ มีทั้งที่เหมือนกัน คล้ายคลึงกัน และอาจแตกต่างกัน ขึ้นกับวิธีในการสกัดและวิเคราะห์ข้อมูล ผู้วิจัยได้ประเมินบทบาทและการออกฤทธิ์ของเปปไทด์แต่ละส่วน (E1-E4) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งสิ้น 6 ชนิด โดยแบ่งออกเป็นแกรมบวก 2 ชนิด และแกรมลบ 4 ชนิด พบว่า ส่วนของเปปไทด์ E4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด โดยยับยั้งได้ถึง 95%-97% ซึ่งค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามเปปไทด์จากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 จะต้องนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น เชื้อรา ยีสต์ ไวรัส ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ต่อไป ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าเปปไทด์จากส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพาราต่อไป

บทคัดย่อ

น้ำยางพาราจากต้นยาง (*Hevea brasiliensis* (Wild.) Muell.-Arg.) สายพันธุ์ซึ่งมีความต้านทานต่อเชื้อไฟทอฟทอร่า (BPM24) น่าจะมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของเปปไทด์ ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่ง ที่เป็นตัวผลักดันให้เกิดความเป็นระบบระเบียบทางสรีระวิทยา โดยซีรั่มที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นส่วนของน้ำยางพาราที่เหลือทิ้งอย่างไร้ประโยชน์ในรูปของน้ำทิ้งและก่อให้เกิดปัญหาด้านมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมตั้งแต่การเก็บตัวอย่างน้ำยางพารา แยกซีรั่มออกจากน้ำยาง สกัดและแยกเปปไทด์ รวมถึงการทำ ESI-MS/MS ร่วมกับการใช้วิธีการทางชีวสารสนเทศในการระบุลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์พร้อมชนิดของโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ เปปไทด์ซึ่งได้จากซีรั่มของน้ำยางพาราสดพันธุ์ BPM24 ที่ไม่ผ่านการเติมสารเคมีใดๆ เพื่อการเก็บรักษาสภาพน้ำยาง ด้วยตัวทำละลาย lysis buffer (ที่ประกอบด้วย 8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, 0.4% Triton X-100, 50 mM DTT) จะให้ปริมาณเปปไทด์มากที่สุดและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดเปปไทด์ เพื่อให้ได้ปริมาณเปปไทด์ที่มากเพียงพอต่อการนำไปพิสูจน์สมบัติการเป็น antibacterial ของเปปไทด์ จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Broth microdilution assay พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการสกัด โดยแบ่งออกเป็นส่วนๆ (E1-E4) ซึ่งส่วนของเปปไทด์ E4 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นของสาร ที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าส่วนของเปปไทด์ E4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* ได้ถึง 95% - 97% (MIC_{90}) ขณะที่ *Enterococcus faecium* และ *Pseudomonas aeruginosa* มีค่า MIC_{70} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกเหนือจากส่วนของเปปไทด์ E4 แล้ว ยังพบว่าส่วนของเปปไทด์ E2 และ E3 ก็สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. faecium* (MIC_{80} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *B. cereus* (MIC_{70} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ โดยความรู้ที่ได้ในโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ต่อยอดในเชิงอุตสาหกรรม และจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำยางพาราในส่วนที่เหลือทิ้งนี้ได้

Abstract

Peptidomic analysis was employed to investigate on the quantity of the constitutive expression of peptides including protein names in latex serum from *Phytophthora* species tolerant (BPM24) clone of para rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Wild.) Muell.-Arg.). In this work, we successfully optimized conditions for serum isolation, peptide extraction, peptide purification and concentration, protein identification (ESI-MS/MS), database searching. The results from peptidomic workflow showed that peptide extraction from fresh rubber latex without any preservatives by lysis buffer (composed of 8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, 0.4% Triton X-100, 50 mM DTT) is the efficient method to obtain superior serum peptide recovery and protein names than using other chemical reagents. The screening and isolation of the antimicrobial peptides from latex serum were performed by Broth dilution assay. The E1-E4 peptide fraction were evaluated for its antibacterial activity against Gram-positive (2 strains) and Gram-negative (4 strains) by assay for minimum inhibitory concentration (MIC). The results showed that E4 peptide fraction were found to be highly active anti- *Bacillus cereus* peptide. The MIC_{90} values were 500 µg/ml. Moreover, E2 and E3 peptides were less active against *Enterococcus faecium* and *Pseudomonas aeruginosa* at concentrations of 2,000 µg/ml. Therefore, latex serum which is a waste product in rubber industry could be a great potential resource for bioactive agents.

สารบัญ

	หน้า
Executive Summary	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
ผลการดำเนินงานวิจัย	
1) บทนำ	1
2) เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3) การดำเนินงานวิจัย	7
4) ผลการทดลอง	17
5) อภิปรายผลการทดลอง	35
6) สรุปผลการทดลอง	39
7) เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	
แผนการดำเนินงานของโครงการ	
ตารางแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ	

สัญญาเลขที่ RDG5850088

โครงการ “เปปติโดมิกส์และการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศเพื่อประเมินการใช้ประโยชน์เปปไทด์จากน้ำยางพารา พันธุ์ BPM24”

รายงานฉบับสมบูรณ์

---

1) บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

น้ำยางพาราธรรมชาติมีส่วนประกอบหลักคือเนื้อยาง (rubber) และส่วนที่ไม่ใช่ยาง (non-rubber) กล่าวคือนอกเหนือจากเนื้อยาง ในน้ำยางสดยังมีองค์ประกอบที่เป็นสารชีวโมเลกุลหลายชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต ลิปิด โปรตีน แร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น ในการผลิต ยางแท่งและน้ำยางข้นในโรงงานอุตสาหกรรมรวมไปถึงการผลิตยางแผ่นของเกษตรกรนั้นส่วนที่ไม่ใช่ยางจะถูกทิ้งอย่างไร้ประโยชน์ในรูปของน้ำทิ้งและก่อให้เกิดปัญหาด้านมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม ได้มีการนำส่วนที่ไม่ใช่ยางมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้เป็นเครื่องสำอาง การผลิตเป็นปุ๋ย การใช้เลี้ยงไรแดง เป็นต้น แต่การแยกใช้งานสารชีวโมเลกุลเฉพาะกลุ่มยังไม่มีการศึกษามากนัก โปรตีนโมเลกุลเล็กและเปปไทด์เป็นหนึ่งในกลุ่มสารชีวโมเลกุลที่เป็นตัวผลักดันให้เกิดความเป็นระบบระเบียบทางสรีระวิทยา เช่น เปปไทด์ฮอร์โมนต่างๆ มีการสกัดเปปไทด์เพื่อศึกษาและใช้ประโยชน์ในหลายแนวทาง เช่น ใช้เป็นสารต้านการเจริญของจุลชีพต่างๆ ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา รวมไปถึงการใช้เป็นสารต้านมะเร็ง เป็นต้น โดยสกัดจากแหล่งต่างๆ เช่น จากแบคทีเรีย เห็ด รา สัตว์ต่างๆ และพืชหลายชนิด

โดยทั่วไปต้นยางพาราจะถูกกรีดเพื่อเก็บน้ำยางเกือบจะทุกวัน แต่ต้นยางสามารถรักษาบาดแผลที่เกิดจากการกรีดได้โดยปราศจากการรุกรานของโรคที่รอยกรีดและหน้ายาง หรือมีน้อยมาก ยกเว้นในบางช่วงฤดู เช่น ฤดูฝน ในรายงานการวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าส่วนต่างๆ ของพืชมีการผลิตเปปไทด์และโปรตีนที่สามารถต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ มีความเป็นไปได้ว่าหากมีการผลิตและสะสมโปรตีนเหล่านี้ในส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางก็น่าจะสามารถแยกโปรตีนที่มีประโยชน์เหล่านี้ออกมาใช้ประโยชน์ได้

การวิจัยนี้มุ่งศึกษาพิสูจน์ชนิดของโปรตีนโมเลกุลเล็กและเปปไทด์ในส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพาราธรรมชาติร่วมกับการวิเคราะห์ทำนายสมบัติทางชีวภาพของเปปไทด์ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าเปปไทด์จากส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพาราต่อไป อันเป็นการตอบสนองนโยบายการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าทรัพยากรธรรมชาติในประเทศอีกทางหนึ่ง

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อพิสูจน์ชนิดเปปไทด์ในเปปติโดมของส่วนที่ไม่ใช่ยางในน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24

2.2 เพื่อวิเคราะห์บทบาทและความสำคัญทางชีวภาพของเปปไทด์ในน้ำยางพารา

2.3 เพื่อคัดเลือกและประเมินสมบัติการเป็น antibacterial ของเปปไทด์ที่ได้ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

3. ขอบเขตงานวิจัย

3.1 วิเคราะห์และพิสูจน์ชนิดของเปปไทด์ด้วย LC-MS/MS

3.2 วิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพของเปปไทด์ด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ

3.3 พิสูจน์การปรากฏอยู่ของ antibacterial peptides ในน้ำยางพาราธรรมชาติพันธุ์ BPM24

4. ทฤษฎีและสมมติฐาน

เปปไทด์และโปรตีนโมเลกุลเล็กนั้นนอกจากจะทำงานอย่างมีนัยสำคัญในทางสรีระวิทยาในเซลล์สิ่งมีชีวิตแล้ว ยังได้กลายเป็นเป้าหมายที่ได้รับความสนใจคัดแยก และศึกษาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านการแพทย์ การเกษตร รวมไปถึงทางด้านวิทยาศาสตร์การอาหาร พืชเป็นหนึ่งในแหล่งวัตถุดิบที่ได้รับการศึกษา คัดแยก และวิเคราะห์การทำงานของเปปไทด์เพื่อการนำไปใช้งานเป็นจำนวนมาก ในส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพารามีสารชีวโมเลกุลหลากหลายชนิดซึ่งรวมไปถึงโปรตีนและเปปไทด์ต่างๆ ถูกทิ้งไปอย่างไร้คุณค่า ซึ่งการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีนและเปปไทด์อาจก่อให้เกิดทางเลือกใหม่ของการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าส่วนที่ไม่ใช่ยางของยางพาราได้

เปปติโดมิกส์ (peptidomics) เป็นหนึ่งในกลุ่มการศึกษาโปรตีโอมิกส์แต่เจาะจงศึกษาโปรตีนและเปปไทด์โมเลกุลเล็กจากหน่วยสิ่งมีชีวิต หรือเรียกรวมๆ ว่าเปปติโดม (Peptidome) มีแนวทางและเป้าหมายคือมุ่งศึกษาชนิด ปริมาณ ลำดับกรดอะมิโน หน้าที่กลไกการแสดงออก การก่อกำเนิด และบทบาทของเปปไทด์แต่ละชนิดในเปปติโดมต่อกระบวนการทางสรีระวิทยาต่างๆ ในหน่วยชีวิต ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับแยกหรือพัฒนาเปปไทด์เหล่านี้ต่อไปเพื่อใช้เป็นยาหรือองค์ประกอบทางยาสำหรับต้านจุลชีพ หรือต้านสภาวะพยาธิสภาพต่างๆ ได้ สารน้ำในร่างกายและเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ล้วนเป็นเป้าหมายสำคัญที่ใช้เป็นตัวอย่างหรือโมเดลสำหรับสกัดและศึกษาเปปติโดมเนื่องจากสารน้ำเหล่านี้เป็นศูนย์รวมของผลผลิตเปปไทด์และโปรตีนจากเซลล์ต่างๆ หรือเป็นเส้นทางขนส่งสิ่งเหล่านี้ไปยังบริเวณเป้าหมายต่างๆ นั้นเอง

สมมติฐาน

ในต้นยางพาราธรรมชาติอาจมีการสร้างและปลดปล่อยเปปไทด์ออกมาในเปปติโดมของน้ำยางเพื่อทำหน้าที่ทางสรีรวิทยาทั้งแบบที่ถูกผลิตอย่างต่อเนื่องในช่วงอายุขัยและแบบที่เกิดมาเนื่องจากผลของการกรีดต้นยางเพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง เช่น การต่อต้านจุลินทรีย์ การสมานแผลจากการถูกกรีด เป็นต้น การศึกษาวิเคราะห์เปปติโดมในน้ำยางพาราด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมตรีร่วมกับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศจะทำให้ทราบชนิดของเปปไทด์ในน้ำยางพารา หน้าที่และความสำคัญทางชีวภาพ และจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะสามารถนำเปปไทด์เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้งานที่เหมาะสมต่อไป

5. ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

5.1 ประโยชน์เชิงความรู้และองค์ความรู้

5.1.1. ความรู้ด้านองค์ประกอบเปปไทด์ในเปปติโดมจากส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพารา

5.1.2. ทราบหน้าที่ของเปปไทด์ในเปปติโดมจากส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพาราด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ

5.1.3. ทราบส่วนของเปปไทด์ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้

5.2 ประโยชน์เชิงเทคนิคและกระบวนการ

5.2.1. วิธีการแยกเปปไทด์ที่มีประโยชน์จากส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพารา

5.2.2. แนวทางประยุกต์ใช้เปปไทด์ที่แยกได้จากส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพารา

5.3 ประโยชน์เชิงการพัฒนากำลังคน

5.3.1. การพัฒนาเครือข่ายหรือทีมวิจัยที่เข้มแข็งระหว่างนักวิจัยของมหาวิทยาลัยในส่วนกลางและในภูมิภาค

5.3.2. การถ่ายทอดทักษะและการเสริมสร้างทักษะการบริหารงานวิจัยและระบบการทำงานเป็นทีมวิจัยโดยที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญสู่หัวหน้าโครงการวิจัยและนักวิจัยรุ่นใหม่ในทีมนักวิจัย

2) เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทนำ

ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีโปรตีนและเปปไทด์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำหน้าที่ผลักดันทำให้เกิดกระบวนการทางสรีระวิทยา ภายหลังการรายงานความสำเร็จต่อการศึกษาจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดก็ได้มีความพยายามที่จะศึกษาชนิดของโปรตีนที่แสดงออกจากยีนทั้งหมดภายในระบบสิ่งมีชีวิต โดยหวังว่าจะเข้าใจถึงกระบวนการทำงานรวมไปถึงความจำเป็นของโปรตีนแต่ละชนิด นอกจากโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่ง่ายต่อการศึกษาวิเคราะห์แล้ว โปรตีนโมเลกุลเล็กๆ และเปปไทด์หรือเปปติโดมกำลังถูกศึกษาวิเคราะห์อย่างจริงจังมากขึ้น และด้วยพัฒนาการทางเทคโนโลยีการวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย mass spectrometry ร่วมกับความก้าวหน้าด้านโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้อำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์เปปไทด์ในเปปติโดมของสิ่งมีชีวิตได้มากขึ้น ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์เปปติโดมช่วยเพิ่มองค์ความรู้ และความเข้าใจต่อบทบาทการแสดงออกของสารชีวโมเลกุลกลุ่มโปรตีนและเปปไทด์ต่อกิจกรรมระดับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้มากขึ้น ซึ่งโปรตีนโมเลกุลเล็กหรือเปปไทด์นี้อาจมีหน้าที่สำคัญขั้นวิกฤติเฉพาะตัวของมันเอง โดยอาจทำหน้าที่เป็น เปปไทด์ฮอร์โมน เช่น growth hormone, insulin เป็น protease inhibitor เช่น trypsin inhibitor, leupeptin หรือทำหน้าที่เชิงภูมิคุ้มกัน เช่น เปปไทด์ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย หรือต้านเชื้อรา เป็นต้น มีการนิยามการศึกษาโปรตีนและเปปไทด์โมเลกุลเล็กจากหน่วยสิ่งมีชีวิตว่า Peptidomic [1] เป็นหนึ่งในกลุ่มของ “omic research” โดยจัดเป็นหนึ่งในการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ซึ่งเจาะจงวิเคราะห์โปรตีนโมเลกุลเล็กและเปปไทด์ การวิเคราะห์โดย peptidomic มักใช้ระบบโครมาโตกราฟีประสิทธิภาพสูงร่วมกับการวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry

2.2 การวิเคราะห์ peptidomic

การวิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิคโปรตีโอมิกส์โดยการแยกด้วยเทคนิคแผ่นเจลแบบสองมิติมีข้อด้อยคือความไม่สะดวกต่อการวิเคราะห์โปรตีนโมเลกุลเล็กๆ รวมไปถึงเปปไทด์สายสั้นๆ [1] อันเนื่องมาจากขนาดโมเลกุลซึ่งมีขนาดเล็ก ทำให้สามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้ดี และยากที่จะแยกออกจากกัน ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้อาจทำหน้าที่สำคัญๆ หลายประการต่อสิ่งมีชีวิต ดังนั้นเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนโมเลกุลเล็ก จึงได้รับความสนใจพัฒนามากขึ้น ระบบโครมาโต กราฟีแบบของเหลว (Liquid chromatography) จึงเป็นเทคนิคแรกที่ถูกนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ [1-3] โดยเฉพาะชนิด reverse phase และ ion exchange โดยก่อนที่จะผ่านสารสกัดเหลวเข้าสู่ระบบโครมาโตกราฟี โปรตีนโมเลกุลใหญ่จะถูกกำจัดออกก่อนเพื่อลดการรบกวนประสิทธิภาพการแยกของโมเลกุลเล็กๆ การคัดกรองขนาดโมเลกุลโดยการปั่นแยกด้วยเทคนิค ultrafiltration ผ่านเยื่อคัดกรองขนาดต่างๆ [4] เป็นหนึ่งในวิธีที่ช่วยเสริมการวิเคราะห์ได้ดีในเชิงการจำกัดขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ ถัดมาคือการแยกและการวิเคราะห์ชนิดเปปไทด์ด้วยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry [5] ซึ่งนิยมใช้สำหรับพิสูจน์ลำดับกรดอะมิโนอยู่แล้ว และเนื่องด้วยปริมาณของเปปไทด์บางชนิดอาจมีปริมาณน้อยมากจึงวิเคราะห์ได้ยากจึงต้องมีการเพิ่มความเข้มข้นหรือกระบวนการ enrichment เสียก่อน [6-8]

2.3 การใช้ประโยชน์เปปไทด์

มีการศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์เปปไทด์ในหลายประการตั้งแต่การใช้ด้านวิทยาศาสตร์การอาหาร การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การใช้เป็นสารต้านมะเร็ง [9] การใช้ประโยชน์ของเปปไทด์นั้นมักจะรับรู้กันโดยทั่วไปในด้านการใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา หรือแม้แต่ไวรัส และหากติดตามข้อมูลการตีพิมพ์จากฐานข้อมูล Pubmed ตั้งแต่ปี 1995 เป็นต้นมา จะพบว่าเริ่มมีความชัดเจนในแนวคิดการใช้เปปไทด์ต้านมะเร็ง ซึ่งยังคงมีรายงานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากการศึกษาใช้ประโยชน์เปปไทด์เพื่อต่อต้านโรคมะเร็งอย่างชัดเจน ซึ่งหากพิจารณาจะพบว่า anticancer peptide นั้นได้มาจากหลายแหล่งที่การสกัดแยกจากสิ่งมีชีวิตรวมทั้งพืช เช่น Lunasin จากถั่วเหลือง [10] หรือมีการปรับปรุงโครงสร้างจากเปปไทด์ชนิดอื่นเพื่อเพิ่มฤทธิ์และความจำเพาะ [11] เป็นต้น

โปรตีนและเปปไทด์จากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ลำต้น ใบ และเมล็ด ในพืชหลายชนิด มีฤทธิ์ในการต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง แบคทีเรีย [12] ยีสต์ [13] และเชื้อรา [14, 15] เนื่องจากไม่มีการตกค้างหลังการใช้งานซึ่งแตกต่างจากยาหรือสารเคมีสังเคราะห์ แม้การใช้โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่ยังมีข้อด้อยด้านการความไม่คงทนต่อสภาวะแวดล้อม แต่ก็ยังมีแนวคิดการใช้โปรตีนเพื่อเสริมฤทธิ์ยาหรือสารเคมีสังเคราะห์ได้ [16-20] ซึ่งจะส่งผลดีอย่างยิ่งต่อการควบคุมจุลินทรีย์ที่ดื้อยา หรือช่วยลดปริมาณการใช้ยาลง

2.4 โปรตีนโมเลกุลเล็กและเปปไทด์ในน้ำยางพาราและแนวทางการใช้ประโยชน์

การศึกษาอย่างจำเพาะเจาะจงด้านเปปติโดมในยางพาราและน้ำยางนั้นยังไม่ปรากฏอย่างประจักษ์ชัดจากกลุ่มวิจัยใด อย่างไรก็ตามพบว่ามีการเผยแพร่ออกมาในรูปโปรตีนและเปปไทด์เชิงเดี่ยวเสียค่อนข้างมากและมักมุ่งหมายไปยังโปรตีนก่อภูมิแพ้ [21-27] และโปรตีนต้านจุลินทรีย์ โดยในช่วงปี ค.ศ. 1999-2002 มีรายงานว่าส่วนที่ไม่ใช่ยางในน้ำยางพาราแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อยีสต์ร่วมกับยาบางชนิดได้ [28, 29] จากนั้นจึงมีรายงานการต้านการเจริญของ *Aspergillus niger* จากส่วนซีรัมของน้ำยางพาราด้วยแต่ทั้งนี้ไม่ได้ระบุว่าเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ใด [30, 31] เมื่อได้มีการศึกษาเชิงลึกมากขึ้นโดยใช้เทคนิคการคัดแยกโปรตีนจากส่วนที่ไม่ใช่ยางทำให้พบว่าหนึ่งในสารต้านเชื้อราคือโปรตีนขนาดเล็กที่มีชื่อว่า hevien [32].

มีการศึกษาเพื่อใช้งานสารชีวโมเลกุลจากน้ำยางในวิทยาศาสตร์เนื้อเยื่อ โดยช่วงต้นปี 2010 มีหลักฐานสนับสนุนว่าสารประกอบประเภทเปปไทด์หรือโปรตีนในน้ำยางพารามีสมบัติช่วยสมานแผล กระตุ้นการสร้างหลอดเลือด และอื่นๆ [33-35] ล่าสุดมีรายงานว่าโปรตีนชนิดที่พบใหม่นี้มีสมบัติเด่นในการเยียวยาการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทด้วย [36]

ในการศึกษาสมบัติต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารประกอบในซีรัมน้ำยางพารานั้น แม้จะยังไม่ระบุชัดว่าเป็นเปปไทด์หรือโปรตีนหรือไม่ ก็อาจสามารถใช้เป็นแนวคิดพื้นฐานเพื่อต่อยอดการวิจัยต่อไปได้ แนวคิดการศึกษาสารประกอบในน้ำยางพาราเพื่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งนี้ได้ถูกกล่าวโดย Daruliza และคณะ [30] และที่น่าตื่นเต้น คือ ในช่วงปี 2012 มีรายงาน Cell Proliferation โดย Lam และคณะ [37] พบว่า C-Serum ของน้ำยางพารานั้นมีฤทธิ์กระตุ้นการตายของเซลล์ hepatocellular carcinoma ชนิด HepG2 ได้ ซึ่งรายงานนี้ประมวลผลได้ในสองประการ ประการแรกคือการได้รับ C-Serum เข้าสู่ร่างกายอาจมีโทษกับตับ ประการที่สองคือมีสารบางชนิดใน C-Serum ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับได้ แม้ Lam และคณะจะไม่ได้รายงานระบุว่าสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์ HepG2 ที่มีในซีรัมน้ำยางนั้นเป็นสารชนิดใด ก็ถือเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีต่อการศึกษาเพื่อ

ต่อยอด ซึ่งสารประกอบประเภทเปปไทด์นั้นเป็นหนึ่งในเป้าหมายที่ได้รับความสนใจในโครงการวิจัยนี้ และเหล่านี้พอจะเป็นตัวอย่างได้ว่าในส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพาราธรรมชาติมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มโปรตีนโมเลกุลเล็กและเปปไทด์ปรากฏอยู่และรอการวิเคราะห์แยกไปใช้งานอย่างเหมาะสมต่อไป

3) วิธีดำเนินงาน

3.1 เก็บตัวอย่างน้ำยางพาราและแยกซีรั่มออกจากเนื้อยาง

Hevea brasilliensis clone BPM24 อายุประมาณ 10 ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง คือ สวนยางของเกษตรกร ต.ชำฆ้อ อ.เขาชะเมา จ.ระยอง โดยให้เกษตรกรเจ้าของสวนยางกรีดหน้ายางตามวิธีการกรีดหน้ายางปกติ ซึ่งเป็นการกรีดหน้ายางที่ระดับความสูงตั้งแต่ 150 เซนติเมตร ลงมา การเปิดกรีด จะมีไม้แบบทาบกับลำต้นที่ความสูงประมาณ 150 เซนติเมตรจากพื้น การกรีดจะกรีดเป็นแนวซ้ายบนลงมาขวาล่าง เพื่อให้ตัดท่อน้ำยางให้มากที่สุด ให้ได้ความยาวครึ่งหนึ่งของลำต้น โดยกรีดเอียงจากซ้ายไปขวา ทำมุมประมาณ 35 องศากับแนวขนานพื้นดิน ใช้มีดกรีดยางกรีดเบา ๆ เพื่อทำเป็นรอยเปิด โดยกรีดให้ลึกเข้าใกล้เยื่อเจริญมากที่สุด หลังจากเปิดกรีดแล้วให้กรีดลงในแนวดิ่ง ทำทางไหลของน้ำยางลงมา 30 เซนติเมตร แล้วตอกลิ้นรองรับน้ำยาง ระบบกรีดหน้ายางปกติ จะใช้ระบบกรีดครึ่งลำต้นวันเว้นสองวัน เวลากรีดประมาณ 04.00 น. หลังจากการกรีดปล่อยให้น้ำยางไหลทิ้งเพื่อลดสิ่งปนเปื้อนประมาณ 5-10 หยด แล้วจึงรองน้ำยางในภาชนะรองรับน้ำยางที่ใช้ในการศึกษานี้โดยเฉพาะ หลังจากนั้นเมื่อได้ปริมาณน้ำยางพาราสดเพียงพอแล้ว จึงนำน้ำยางจากภาชนะรองรับมาบรรจุใส่ขวดพลาสติกบรรจุน้ำ

น้ำยางที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง มาจากน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 รวมกันทั้งหมด 25-30 ต้น ต้นละประมาณ 200 มิลลิลิตร จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ 1. น้ำยางพาราสดซึ่งไม่มีการเติมสารใดๆในการศึกษา แช่ตัวอย่างน้ำยางพาราสดที่ได้ในน้ำแข็ง แล้วขนส่งกลับห้องปฏิบัติการ โดยจะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง (ตัวอย่างน้ำยางพาราจาก จ.ระยอง) 2. น้ำยางพาราที่ผสมกับ 30% แอมโมเนียให้ได้ความเข้มข้น 0.6% (v/v) เพื่อรักษาสภาพน้ำยางเขย่าจนสารละลายน้ำยางเข้ากันดี โดยช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำยางพาราเพื่อใช้ในการทดลอง จะพยายามเก็บให้ครอบคลุมทุกฤดูกาลภายในหนึ่งปี คณะผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างมาทั้งหมด 2 ครั้ง ได้แก่ เดือนธันวาคม 2558 และ กุมภาพันธ์ 2559

ในส่วนของน้ำยางพาราสดซึ่งไม่มีการเติมสารใดๆเพื่อการเก็บรักษา จะทำการทดลองโดยการปั่นแยกซีรั่มภายในเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่นำตัวอย่างน้ำยางกลับสู่ห้องปฏิบัติการ ในระหว่าง 3 ชั่วโมงจะเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่เย็น (แช่น้ำแข็ง) หากเป็นกลุ่มน้ำยางที่ผ่านการเติมสารเคมี (แอมโมเนีย) เพื่อการเก็บรักษาจะทำการปั่นแยกซีรั่มประมาณวันที่ 10-15 หลังการเติมสารเคมีรักษาสภาพน้ำยาง โดยได้ทำการปั่นเหวี่ยงน้ำยางที่ความเร็วรอบ 20,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง จำนวน 1 รอบ แล้วจึงนำส่วนใส (ส่วนที่ไม่ใช่เนื้อยาง) ไป ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 16,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 1 รอบ ซึ่งภายหลังการปั่นเหวี่ยงจะเห็นได้ว่าชั้นเนื้อยางกับชั้นซีรั่มแยกออกจากกันชัดเจน ผู้วิจัยได้ทำการดูดเก็บชั้นซีรั่ม (ส่วนที่เป็นสารละลาย) ซึ่งอยู่ด้านล่างด้วยหลอดฉีดยาซึ่งใส่หัวเข็มขนาดเล็ก (เบอร์ 21G) ในขณะที่ชั้นเนื้อยางซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นหนาๆ เหนียวหนืดจะอยู่บริเวณส่วนบนของหลอดทดลอง ซึ่งจะถูกทิ้งไปหลังจากเก็บซีรั่มหมดแล้ว แต่อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ว่าผู้วิจัยอาจจะดูดเก็บซีรั่มไม่ได้ทั้งหมด (โดยเฉพาะส่วนที่อยู่บริเวณล่างสุดของหลอดทดลอง) อย่างไรก็ตามซีรั่มที่เหลืออยู่ในหลอดทดลอง จะมีในปริมาณที่น้อยมาก

3.2 แยกเปปไทด์จากซีรั่ม

3.2.1 สกัดโปรตีนและเปปไทด์จากซีรั่ม

เติมตัวทำละลายชนิดต่างๆ ซึ่งแต่ละชนิดจะผสมด้วย 1x protease inhibitor cocktail ลงในซีรั่มที่แยกได้จากข้อ 3.1 จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายดังแสดงในตารางที่ 1 นอกเหนือจาก

ตัวทำละลายเดี่ยวๆชนิดต่างๆแล้ว ยังมีการใช้ lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย 8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0.4% Triton X-100, protease inhibitor cocktails ในขั้นตอนการสกัดเปปไทด์ด้วย โดยอัตราส่วนที่ใช้ระหว่างปริมาณซีรั่ม: lysis buffer เท่ากับ 1:2 ทั้งนี้เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนและเปปไทด์สูงสุด หลังจากทำการผสมกันระหว่างปริมาณซีรั่มและตัวทำละลายชนิดต่างๆ รวมทั้ง lysis buffer พบว่าสารละลายที่ได้ยังคงมีความขุ่น ดังนั้นจึงต้องกรองสารละลายที่ได้ผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน

ตารางที่ 1: แสดงความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายชนิดต่างๆ

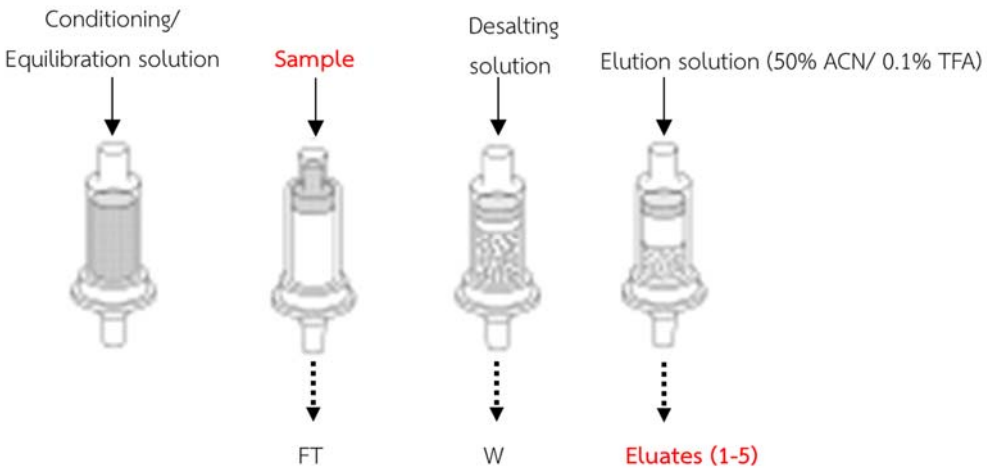
ตัวทำละลาย	ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลาย
อะซีโตน (Acetone)	80%
เมทานอล (Methanol)	80%
ยูเรีย (Urea)	8 M
กรดฟอร์มิก (Formic acid)	2 %
ผงกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ (GuHCl)	6 M
แอมโมเนีย (Ammonia)	10%

3.2.2 คัดแยกเปปไทด์จากซีรั่ม

ทำการคัดแยกเปปไทด์ออกจากสารละลาย ตามขนาดของมวลโมเลกุล (ขนาดต่ำกว่า 10 กิโลดัลตัน) ด้วยเทคนิค Ultrafiltration โดยการกรองผ่านแผ่นเมมเบรน ที่มีขนาดรูพรุนในรูปของค่า MWCO (molecular weight cut off) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงความสามารถในการกักกันสารตามมวลโมเลกุลของสาร โดยใส่สารละลายลงในคอลัมน์ขนาดบรรจุ 50 มิลลิลิตร (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Merck) ที่มีขนาด MWCO เท่ากับ 30, 10, และ 3 กิโลดัลตัน ตามลำดับ ภายหลังการปั่นเหวี่ยงสารละลาย ด้วยความเร็วรอบ 5,000 Xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง โดยการปั่นในแต่ละครั้งนั้น จะเก็บเฉพาะสารละลายส่วนที่สามารถผ่านแผ่นเมมเบรนได้ โดยสารละลาย (เปปไทด์) ที่ได้หลังผ่าน MWCO 3 kDa จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.3 เพิ่มความเข้มข้นและทำบริสุทธิ์เปปไทด์

นำเปปไทด์ที่ผ่านการทำแห้งแล้ว ไปทำให้มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น (concentrated) และมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น (purified) ด้วยเทคนิค Solid phase extraction (SPE) โดยใช้ SEP-PAK [Waters] ชนิดที่เป็น C18 reverse phase chromatography โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้



1. ละลายผงเปปไทด์ที่ผ่านการทำแห้งแล้วด้วย 0.1% TFA และปรับค่า pH ของสารละลายให้ไม่เกิน 3

2. ในส่วนของคอลัมน์ SEP-PAK ทำการเตรียมและปรับสภาพของคอลัมน์ด้วย สารละลาย 2 ชนิด ได้แก่ conditioning solution (ประกอบด้วย 90% methanol ใน 0.1% TFA) และ equilibration solution (ประกอบด้วย 0.1% TFA)

3. นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.4.1 มาเติมในคอลัมน์ที่ปรับสภาพไว้เรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นเติม equilibration solution และ desalting solution (ประกอบด้วย 5% methanol ใน 0.1% TFA) เพื่อชะสิ่งต่างๆนอกเหนือจากเปปไทด์ที่ต้องการออกมาก่อน

4. ทำการชะเปปไทด์ที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์ด้วย elution solution (50 % Acetonitrile ใน 0.1 % TFA) โดยแบ่งการเก็บเปปไทด์ออกเป็นส่วนๆ ขึ้นกับระยะเวลาในการผ่านคอลัมน์ ทั้งหมด 5 ส่วน (มิลลิลิตรที่ 1-5; E1-5) พร้อมทั้งทำการวัดหาความเข้มข้นด้วยเทคนิค Bradford assay และทำการเก็บแต่ละส่วนรวมกัน แล้วทำแห้งด้วยเครื่อง Speed Vac Concentrator เพื่อนำไปทำ MS, MS/MS และทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อไป (ดังหัวข้อ 3.5)

3.3 การระบุปริมาณ ลำดับกรดอะมิโนและชนิดของเปปไทด์ด้วยวิธี Mass spectrometric analysis (MS) ดังนี้

3.3.1 MALDI-TOF MS ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยโปรตีโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

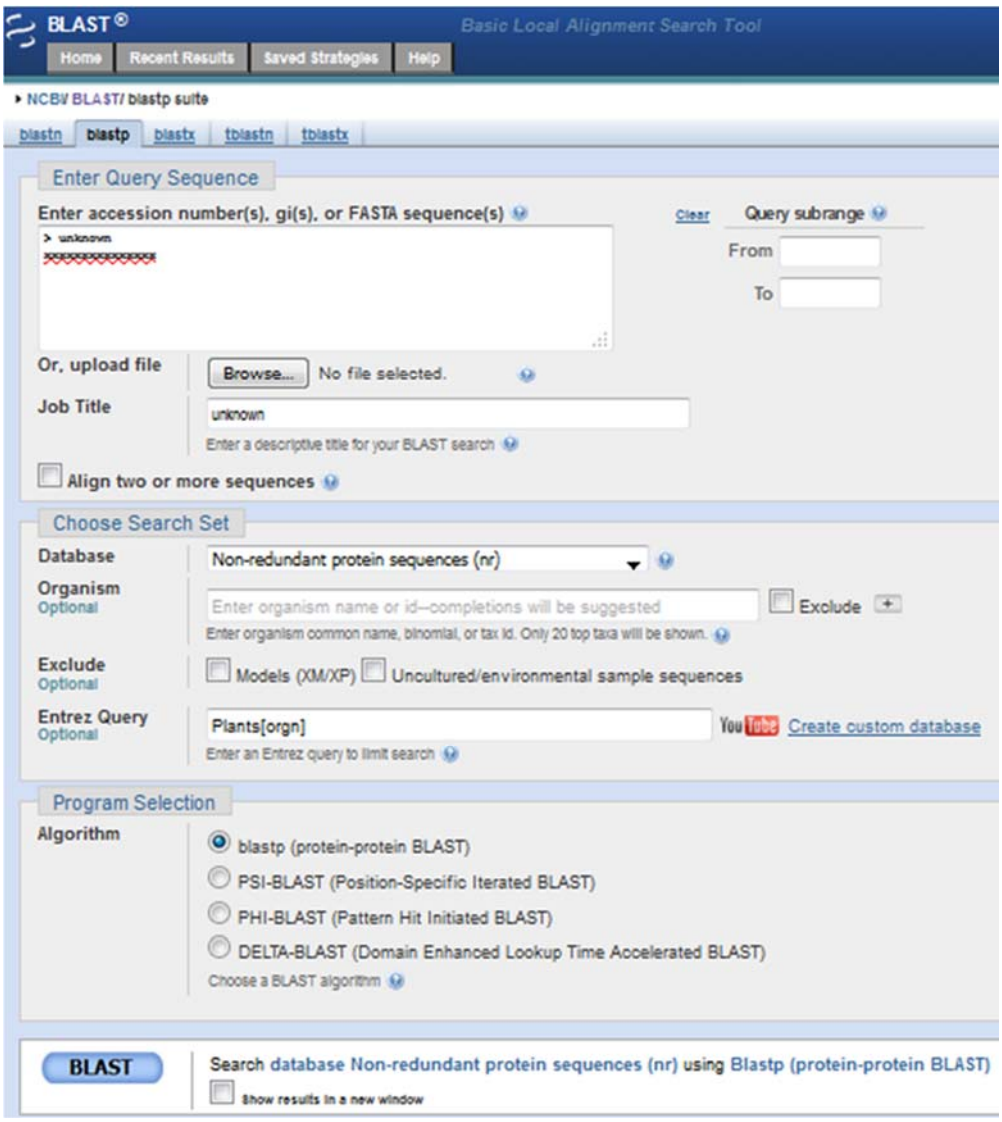
3.3.2 LC-ESI-Ion Trap MS/MS (an Ultimate 3000 LC System (Dionex, USA) coupled to an ESI-Ion Trap MS (HCT Ultra PTM Discovery System, Bruker, Germany) ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยโปรตีโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.3.3 nanoLC-ESI-QTOF MS/MS (Maxis II, Bruker) ณ หน่วยบริการเครื่องมือวิจัย ศูนย์เครื่องมือกลางศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเปปไทด์ในเชิงชีวสารสนเทศ (Bioinformatic tools)

3.4.1 วิเคราะห์ข้อมูลเปปไทด์ที่ได้ (จากโครงการระยะที่ 1) ด้วยโปรแกรม Blastp

Blastp (Basic Local Alignment Search Tool Protein) คือ โปรแกรมที่ทำหน้าที่ในการค้นหาความเหมือนหรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่สนใจกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในฐานข้อมูล เพื่อบอกถึงชนิดของโปรตีนนั้นๆ โดยทำการวิเคราะห์ผ่าน Protein Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ แล้วเลือก blastp) ดังแสดงในรูปที่ 1

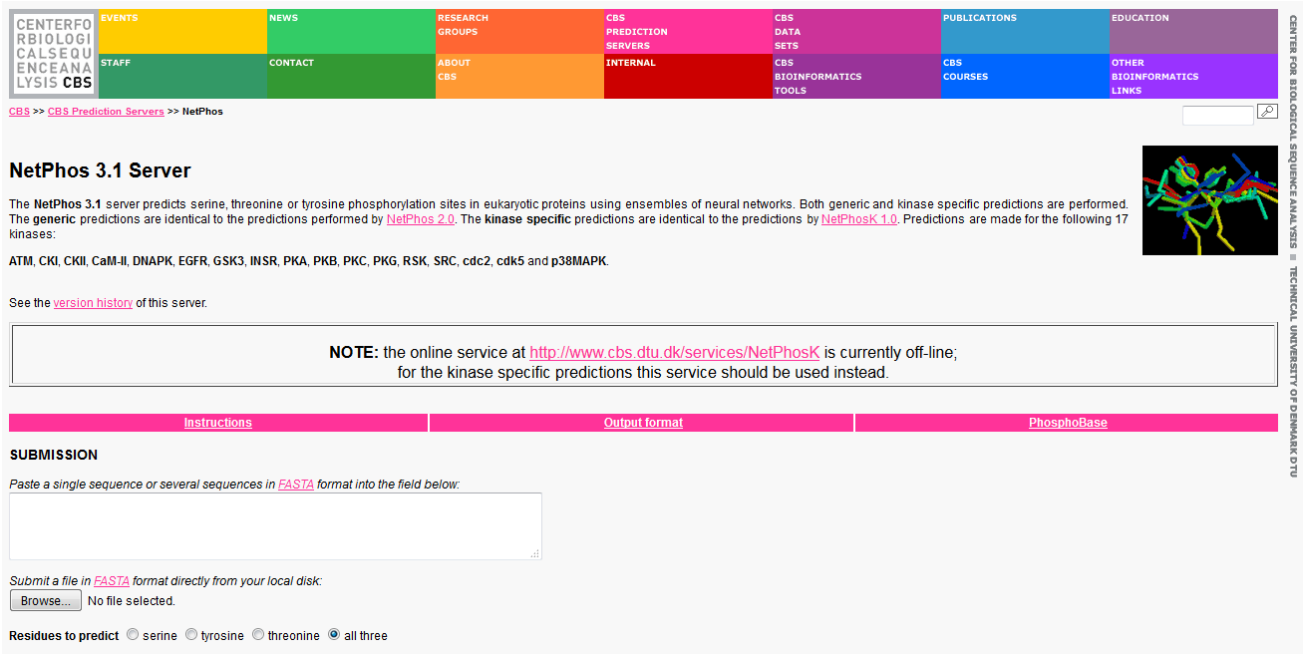


รูปที่ 1: โปรแกรม Blastp ซึ่งใช้ในการทำนายและค้นหาชนิดของโปรตีน โดยการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBInr database

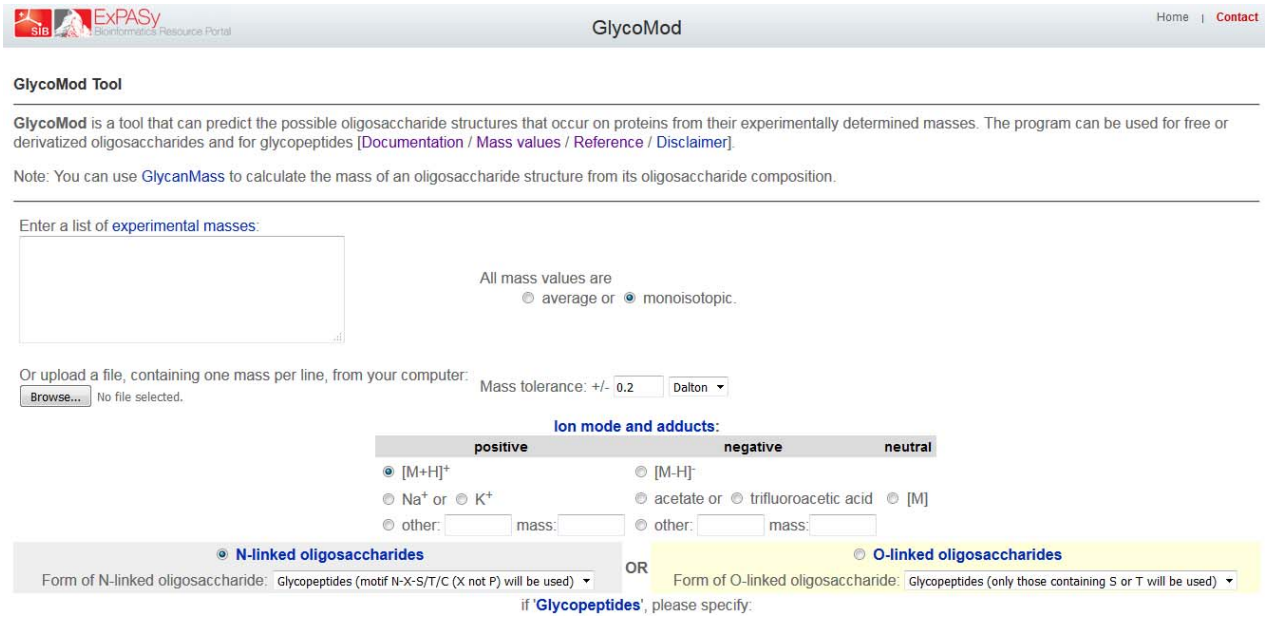
3.4.2 ทำนายการเกิดกระบวนการปรับแต่งหลังทรานสเลชั่น

นอกเหนือจากการระบุชนิดของโปรตีนดังกล่าวแล้ว การศึกษาหรือทำนายถึงโอกาสในการเกิดกระบวนการปรับแต่งหลังทรานสเลชั่น (Post-translational modification) เป็นสิ่งที่สำคัญในการศึกษาถึงชีววิทยาของเซลล์และนำไปสู่ความเข้าใจในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะการปรับแต่งหลัง ทรานสเลชั่น ชนิดที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต ที่เรียกว่าฟอสโฟรีเลชั่น (Phosphorylation) ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้โปรแกรม NetPhos 2.0 ผ่าน http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/ ดังรูปที่ 2 โดยลำดับของกรดอะมิโน (ที่ได้มาจากผลการทดลองของโครงการระยะที่ 1) ที่มีความยาวไม่น้อยกว่า 15 ตำแหน่ง สามารถนำมาใช้ในการทำนายเปปไทด์ที่มีโอกาสเกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชั่น หรือฟอสโฟเปปไทด์ได้

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำนายถึงเปปไทด์ที่มีโอกาสเกิดกระบวนการไกลโคซีเลชั่น (glycosylation) หรือไกลโคเปปไทด์ ชนิด N-linked oligosaccharide ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษากระบวนการต่างๆ ที่จุลินทรีพสามารถเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆได้ ทั้งยังมีประโยชน์ในแง่ของการยับยั้งกลไกการเกิดโรคต่างๆได้ด้วย โดยเลือกใช้โปรแกรม Glycomod ผ่าน http://web.expasy.org/glycomod/ ดังรูปที่ 3 โดยลำดับของกรดอะมิโน (ที่ได้มาจากผลการทดลองของโครงการระยะที่ 1) สามารถนำมาใช้ในการทำนายเปปไทด์ที่มีโอกาสเกิดกระบวนการไกลโคซีเลชั่น หรือไกลโคเปปไทด์ได้



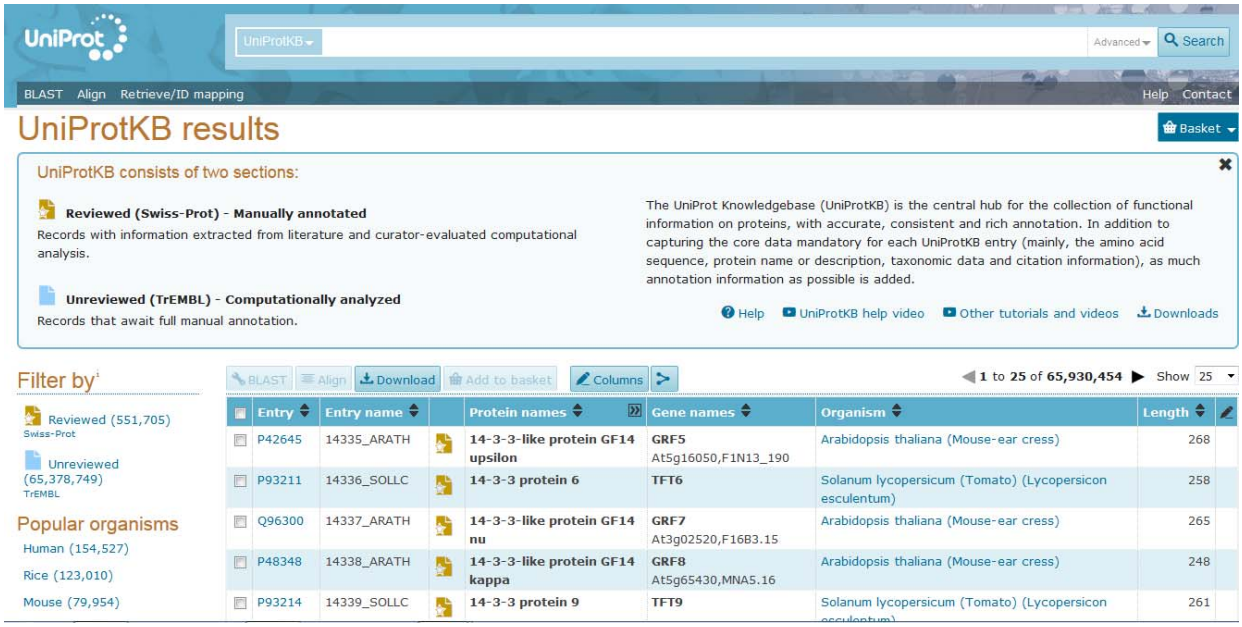
รูปที่ 2: โปรแกรมที่ใช้ในการทำนายโอกาสในการเกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชั่น (NetPhos 3.1)



รูปที่ 3: โปรแกรมที่ใช้ในการทำนายโอกาสในการเกิดกระบวนการไกลโคซีเลชั่น (GlycoMod)

3.4.3 ระบุบทบาทหน้าที่และทำนายตำแหน่งของโปรตีน

ลำดับของกรดอะมิโนของแต่ละเปปไทด์จากซีรั่มน้ำยางพาราพันธุ์ที่ต่อต้านเชื้อราไฟทอฟทอร่า (BPM24) ที่ไม่ผ่านการเติมสารเคมีใดๆ เพื่อการเก็บรักษาสภาพน้ำยาง ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ได้ใช้การศึกษานี้ ได้แก่ 80% อะซีโตน, 80% เมทานอล, 8M ยูเรีย, 6M กัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์, 2% กรดฟอร์มิก, lysis buffer (8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0.4% Triton X-100) ได้นำมาใช้ทำนายและระบุบทบาทหน้าที่ พร้อมทั้งตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB (Protein Knowledgebase) ซึ่งเป็นการรวมฐานข้อมูลสองส่วนเข้าไว้ด้วยกัน ได้แก่ Swiss-Prot และ TrEMBL ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งสามารถเข้าถึงฐานข้อมูลนี้ได้จาก http://www.uniprot.org/uniprot/



รูปที่ 4: แสดง UniProt Knowledgebase (UniProtKB) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ในการทำนายคุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนหรือเปปไทด์ชนิดต่างๆ

3.4.4 ทำนายหน้าที่และบทบาทของเปปไทด์

จากความหลากหลายของเปปไทด์ซึ่งได้รับการวิเคราะห์และพิสูจน์ออกมามากมาย ทำให้มีการจัดตั้งฐานข้อมูลเพื่อรวบรวมลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ โดยในปัจจุบันฐานข้อมูลของ antimicrobial และ bioactive peptide รวมทั้ง search engine จากหลายหน่วยงานดังแสดงตัวอย่างใน**ตารางที่ 2** ซึ่งสามารถใช้ฐานข้อมูลเหล่านี้ในการค้นและวิเคราะห์สมบัติของเปปไทด์ได้

ตารางที่ 2: ตัวอย่างฐานข้อมูลของเปปไทด์ ที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Name	Link	Description
AMPer	http://marray.cmdr.ubc.ca/cgi-bin/amp.pl	Database of antimicrobial peptides and program searching for fragments with sequences similar to antimicrobial peptides in query protein sequence
APD	http://aps.unmc.edu/AP/main.html	Database of antimicrobial and anticancer peptides
PepBank	http://pepbank.mgh.harvard.edu	A database of biologically active peptides providing program searching for fragments with sequences similar to peptides in the database.
PeptideDB	http://www.peptides.be/	Major database of biologically active peptides, peptide precursors and motifs in Metazoa.

3.5 การประเมินสมบัติการเป็น antibacterial ของเปปไทด์ที่ได้

ผู้วิจัยได้นำเปปไทด์แต่ละส่วน (E1 – E5) ไปทำแห้งด้วยเครื่อง Speed Vac Concentrator และเครื่อง Freeze Dryer ร่วมด้วย หลังจากนั้นทำการชั่งผงเปปไทด์แต่ละส่วนที่ได้ปริมาณ 3 มิลลิกรัม/assay สำหรับการทดสอบแบบหาค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ค่าเดียว และปริมาณ 5 มิลลิกรัม/assay สำหรับการทดสอบแบบหาค่า MIC 3 ค่า โดยจะใช้วิธี Broth tube dilution method ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดยจะทำการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Enterococcus faecium* (ATCC 51559), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) และ แบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Escherichia coli* (ATCC 25922) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความชุกของการดื้อยาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยที่ *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa และ A. baumannii* เป็นเชื้อที่พบมากใน 10 อันดับแรกจากตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยเกือบทุกชนิด เช่น เลือด ปัสสาวะ แผลฝีหนอง เสมหะ น้ำไขสันหลัง เป็นต้น

โดยทำการตรวจสอบจากค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 90% (MIC_{90}) ซึ่งปริมาณของเปปไทด์ที่ใช้จะรายงานเป็นหน่วยไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยขั้นตอนในการทดลองจะเริ่มจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในถาดหลุมที่มีจำนวน 384 ช่อง แล้วจึงใส่แบคทีเรียที่สนใจลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอยู่ในสภาพของเหลว หลังจาก

นั้นหยดเปปไทด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (15.63 – 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ต้องการทดสอบลงไปในถาดหลุมที่มีจำนวน 384 ช่องที่เตรียมไว้ รวมทั้งกลุ่มที่เป็น positive และ negative control ด้วย **(ดังตารางที่ 3)** หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อประมาณ 37 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาต่างๆแล้วแต่ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย หลังการบ่มเชื้อกับเปปไทด์ต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวแล้ว จะทำการตรวจสอบความสามารถหรือประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเปปไทด์แต่ละชนิด โดยการวัดค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยค่า OD_{600} ด้วยเครื่อง microplate reader ค่า OD ที่ได้จากแต่ละกลุ่มจะถูกนำมาใช้ในการคำนวณหา %inhibition ตามสูตรที่ใช้ในการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [1- (FU_T/FU_C)] \times 100$$

(โดยค่า FU_T และ FU_C หมายถึง ค่าเฉลี่ยของหน่วยฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์แบคทีเรียที่ผสมอยู่กับเปปไทด์ที่ต้องการทดสอบ และผสมอยู่กับสารละลาย 0.5% Dimenthylsulfoxide (DMSO) ตามลำดับ)

ส่วนแบคทีเรียชนิด *B. cereus* จะใช้เทคนิค Resazurin microplate assay (REMA) ในการทดสอบ โดยจะนำเปปไทด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ (15.63 – 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มาผสมกับแบคทีเรียชนิด *B. cereus* ที่เตรียมไว้ พร้อมทั้งใส่สารละลาย resazurinที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ PBS หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อประมาณ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงวัดค่าสัญญาณของสีฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้ค่าความยาวคลื่นของการ excitation และ emission เท่ากับ 530 และ 590 ตามลำดับ ค่าสัญญาณของสีฟลูออเรสเซนต์ที่ได้จากแต่ละกลุ่มจะถูกนำมาใช้ในการคำนวณหา %inhibition ตามสูตรที่ใช้ในการคำนวณข้างต้น หาก %inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 90% จะถูกรายงานเป็นเปปไทด์ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (active peptide) ในทางตรงกันข้าม หาก %inhibition น้อยกว่า 90% จะถูกรายงานเป็นเปปไทด์ที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (inactive peptide) โดยในการทดลองแต่ละครั้งจะทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วจึงหาค่าเฉลี่ย โดยผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำยางพาราทั้งหมดสองครั้งดังกล่าวข้างต้น

ตารางที่ 3: แสดงการทดลองในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

Assays	Detection Method	Positive control agent	Negative control agent	Incubation time at 37 °C
Anti- *Acinetobacter baumannii*	OD_{600}	Rifampicin, Erythromycin	0.5% DMSO	14 hours
Anti- *Pseudomonas aeruginosa*	OD_{600}	Amikacin, Ofloxacin	0.5% DMSO	6-7 hours
Anti- *Klebsiella pneumoniae*	OD_{600}	Amikacin, Ofloxacin	0.5% DMSO	14 hours
Anti- *Enterococcus faecium*	OD_{600}	Rifampicin, Tetracycline	0.5% DMSO	6 hours
Anti- *Escherichia coli*	OD_{600}	Amikacin, Ofloxacin	0.5% DMSO	14 hours
Anti- *Bacillus cereus*	Resazurin microplate assay (REMA)	Vancomycin	0.5% DMSO	2 hours

OD_{600} = Optical density measurement at 600 nm

DMSO = Dimenthylsulfoxide

4) ผลการทดลอง

4.1 วิเคราะห์และพิสูจน์ชนิดของเปปไทด์ด้วย LC-MS/MS

4.1.1 วิเคราะห์ข้อมูลเปปไทด์ที่ได้ ด้วยโปรแกรม blast p (Basic Local Alignment Search Tool Protein)

MALDI-TOF MS และ LC-ESI-Ion Trap MS/MS เป็นเทคนิคที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยเป็นการวิเคราะห์เปปไทด์ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ 80% อะซีโตน, 80% เมทานอล, 8M ยูเรีย, 6M กัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์, 2% กรดฟอร์มิก, 10% แอมโมเนีย, lysis buffer (8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0.4% Triton X-100) ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ จากผลสำเร็จของโครงการ (ระยะที่ 1) ผู้วิจัยได้สร้างฐานข้อมูลเปปไทด์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ใน in-house Mascot server ผ่าน http://10.30.1.250/mascot/ โดยให้ชื่อฐานข้อมูลว่า UniProtHevea8_2558 ทั้งนี้เพื่อความสมบูรณ์ของข้อมูลเชิงโปรตีน (Protein database) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการรวบรวมลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์แต่ละชนิด ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ โดยรวบรวมลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์แต่ละชนิดจากฐานข้อมูล 2 แหล่ง ได้แก่ NCBInr และ UniProtHevea8_2558 (**ดังตารางที่ 4**) แล้วมาทำการวิเคราะห์ข้อมูลของเปปไทด์ที่ได้ด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศ โดยผู้วิจัยได้เลือกใช้ algorithm เป็น blastp (protein-protein BLAST) และเลือก database เป็น Non-redundant protein sequences เพื่อใช้ในการค้นหาความเหมือนหรือความแตกต่าง (identity and similarlity) ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่สนใจ จากฐานข้อมูล NCBInr และ UniProtHevea8_2558 มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในฐานข้อมูล เพื่อบอกถึงชนิดของโปรตีนนั้นๆ **ดังตารางที่ 5** และ **6** ตามลำดับ

4.1.2 ทำนายการเกิดกระบวนการปรับแต่งหลังทรานสเลชั่น

จากการใช้โปรแกรม NetPhos 2.0 ผ่าน http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/ โดยนำลำดับของกรดอะมิโน (ดังแสดงในตารางที่ 4) ที่มีความยาวไม่น้อยกว่า 15 ตำแหน่ง มาใช้ในการทำนายเปปไทด์ที่มีโอกาสเกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชั่นได้ หรือที่เรียกว่าฟอสโฟเปปไทด์ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 โดยเครื่องหมาย * จะแสดงถึงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนั้นๆ [ชนิด serine (S) หรือ Tyrosine (Y) หรือ Threonine (T)] ซึ่งจะมีโอกาสในการเกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชั่น โดยในบางฟอสโฟเปปไทด์โอกาสในการเกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชั่น อาจมีได้มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง อย่างไรก็ตามลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้มาจากฐานข้อมูล UniProtHevea8_2558 ส่วนใหญ่จะมีความยาวกรดอะมิโนไม่เกิน 15 ตัว ดังนั้นเปปไทด์ส่วนใหญ่จึงไม่สามารถนำมาทำนายโอกาสในการเกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชั่นได้ จึงพบโอกาสที่จะเป็นฟอสโฟเปปไทด์พียง 2 ชนิดเท่านั้น (**ดังตารางที่ 6**)

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำนายถึงเปปไทด์ที่มีโอกาสเกิดกระบวนการไกลโคซีเลชั่น หรือไกลโคเปปไทด์ ชนิด N-linked oligosaccharide ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษากระบวนการต่างๆ ที่จุลินชีพสามารถเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆได้ ทั้งยังมีประโยชน์ในแง่ของการยับยั้งกลไกการเกิดโรคต่างๆได้ด้วย โดยเลือกใช้โปรแกรม Glycomod ผ่าน http://web.expasy.org/glycomod/ อย่างไรก็ตามจากการทำนายไม่มีเปปไทด์ใดเลยที่แสดงคุณสมบัติในการเกิดไกลโคซีเลชั่น ชนิด N-linked oligosaccharide

ตารางที่ 4: แสดงลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลที่ต่างกัน

Peptide extraction	Peptide Scores	(NCBInr) Amino acid sequences	Peptide Scores	(UniprotHevea8_2558) Amino acid sequences
6M Guanidine HCl	53	M.LIPQILLLLLL.	47	G.ILILLII.N
	10	IIRSPEP	43	F.LNLINEFVG.K
	8	KSFLILALLAIVATTATTA	31	M.HALII.Y
	7	NHSRLSIATFQNPAPEATVYPL	31	N.AHLLI.K
	6	MASKFLL	28	AATLNLLRAFAT
	4	MLRDGKEG	27	LMLLDEAT
	2	RPNHLVHVVAYT	27	AYSENLPL
	1	MLGGLIISAAMAVQ	27	L.NLINEFVG.K
	1	MLRDGKEG	26	ASYLLI
	0	LCQTSRCHKTLES	22	LPKILLL
8M Urea	46	M.LIPQILLLLLL.	41	F.LNLINEFVG.K
	9	MLRDGKEG	31	ILLLDEV
	6	MDQLASLE	31	LLLMIDST
	5	MDNLSNKC	28	LMLLDEAT
	5	MLTDLLKVFKVTTHIVPF	27	FSSQDLLL
	5	SVAGRAQGM	26	ASYLLI
	3	MDNLSNKC	25	AYSENLPL
	2	MMVSYIY	25	LAHFLRATAKVPDAHIITE
	2	KHKCCFGSNLNFSDQ	22	K.KILNNEFINR.V

	0	YRDLVFLVICHIGLAKCVGL	20	PELPKIDI
80% Methanol	4	PMSKTWSCTQSHIVDPMS	38	LNLINEFVG
	4	MDNLSNKC	35	FSSQDLLL
	2	IKNSFISFQEKKEENRGAIEFQVFSFTNKI	30	LLLMIDST
	2	PKKTKFR	29	L.FAKDKSGPLQPGVD.I
	1	GVWTSRVSPLSLKCQNRIIKIDHTA	25	AYSENLPL
	1	MLRDGKEG	23	LMLLDEAT
	1	SQQTQTKASM	22	CYPALLL
	0	MSVTKKPD	21	LILLLMIDST
	0	VXXXGIVLGLIPITLAGLFVTAYLQYRRGDQLDL	21	S.AIRAAPEAARSL.A
	0	MSCREGFMSPQTETKASV	20	EEDIAKPVNPFVFLLRF
80% Acetone	38	M.LIPQILLLLLL.	58	T.SLDGVVPPVIKQ.V
	8	MLRDGKEG	37	ILILDEAT
	4	MSPQTETKAGVGF	33	F.LNLINEFVG.K
	3	AISSSTPPYDLNRFK	30	LMLLDEAT
	3	ISLTLGLF	29	L.NLINEFVG.K
	3	MEPPLLVILAR	28	LLMIDST
	2	MMVSYIY	28	LMLLDEAT
	1	SFFCATNK	27	KCKKPIICSL
	1	SCGRVSKSICMPCFDTA	24	ATVSILISRMAT
	1	MLRDGKEG	23	FPILKDCS
2% Formic acid	22	M.LIPQILLLLLL.	43	F.LNLINEFVG.K
	7	MLGNGKEGT	42	A.AETATTEVPVEKTEE.-
	5	SPQTETKPALDH	41	L.FAKDKSGPLQPGVD.I
	4	YPRLKID	39	ILLGWLCS
	3	MDDIIPPHRCDISKTL	36	L.NLINEFVG.K
	3	GRPHGRVNLASSNMA	33	ILILDEAT
	2	LLIEMLKC	28	LMLLDEAT
	2	MMVSYIY	28	LLLMIDST

	1	MDNLSNKC	26	ASYLLI
Lysis buffer (น้ำยางที่เติม 0.6% แอมโมเนีย)	22	.APNFPLDLAAVEVSSTNG.	34	F.LNLINEFVG.K
	10	MASKFLL	34	L.NLINEFVG.K
	9	MLRDGKEG	34	HAILRSIP
	7	IFLPDGLLDRDDVP	33	ARAVLKDPAILLLDEAT
	6	QPPKQNIK	32	ILILLII
	5	GANNVDAARK	30	IELVEPEILRF
	4	GSHGKPPLPYAYKPLPS	29	ILLLDEV
	4	IDYLISQGINAGDV	28	LMLLDEAT
	4	MHISSTNM	22	QAPGSSPAGANKNG
	4	MSCREGLMSPKTETKPSVG	21	TNPLTQIVHGRKL
Lysis buffer	12	MASKFLL	34	LPKILLL
	10	MCNYIICLVMLRNPISALNTGEGCYIYWC	33	NLINEFVG
	9	PEHIEQREQTLHEKF	32	LNLINEFVG
	8	EKGSLAAIKAFSLAKSVSTGDSKSFFVRQTSK KIL	30	LMLLDEAT
	7	KVVAAYLRAVL	28	LLMIDST
	6	MSHNHRNSPIDRYRMHHI	27	M.AKKAVLIGINYPGT*KAELK GCINDVK.R
	5	HNFPIDLAAIEAPSTNG	26	ASYLLI
	4	MCYRVRPRLGRLHRFMIYM	23	ILLGWLCS
	4	HERNAHNFPLDLASIEAPTNG	23	AVLKDPAILLLDEAT
	4	LIFFGKIV	23	SQEIIMLIGRW

ตารางที่ 5: ชนิด (ชื่อ) ของโปรตีนที่ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastp โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้มาจาก NCBInr ในการค้นหา

Peptides (amino acid sequences)	Accession no.	Protein name [Organism]
YRDLVFLVICHIGLAKCVGL	KHG08741.1	Hypothetical protein F383_36157 [*Gossypium arboreum*]
PM**S*** KTWSCTQSHIVDPMS	KHG19714.1	Hypothetical protein F383_25919 [*Gossypium arboreum*]
SCGRVSK**S*** ICMPCFDTA	KHF99958.1	Hypothetical protein F383_19570 [*Gossypium arboreum*]
GRPHGRVNLASSNMA	KHG00418.1	Hypothetical protein F383_38948 [*Gossypium arboreum*]
MCNYIICLVMLRNPISALNTGEGCYIYWC	KHG09745.1	Hypothetical protein F383_13945 [*Gossypium arboreum*]
MSHNHRNSPIDRYRMHHI	KHG20617.1	Hypothetical protein F383_06071 [*Gossypium arboreum*]
MCYRVRPRLGRLHRFMIYM	KHG18030.1	Hypothetical protein F383_10153 [*Gossypium arboreum*]
MDDIIPPHRCDISKTL	XP_006411341.1	Hypothetical protein EUTSA_v10016713mg [*Eutrema salsugineum*]
APNFPLDLAAVEVSSTNG	ABD75366.1	PsbA [*Scaphochlamys rubescens*]
HNFPIDLAAIEAPSTNG	AHA15013.1	PsbA [*Machairophyllum sp.* PMB8485]
HERNAHNFPLDLASIEAPTNG	AEQ61664.1	PsbA [*Stachyopsis oblongata*]
MSCREGFM**S*** PQ**T*** ETKA**S*** V	YP_007353923.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [*Tectona grandis*]
MSCREGLM**S*** PKTETKP**S*** VG	ACB57146.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [*Monoon coffeoides*]
NHSRLSIATFQNPAPEA**T*** VYPL	NP_001268034.1	Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase [*Vitis vinifera*]
MLTDLLKVFKVTTHIVPF	CDX81236.1	BnaC09g06470D [*Brassica napus*]
IKNSFI**S*** FQEKKEENRGAIEFQVFSFTNKI	AGW45633.1	Rps15 [*Cleomella palmeriana*]
VXXXGIVLGLIPITLAGLFVTAYLQYRRGDQLDL	YP_009057170.1	Cytochrome b6/f complex subunit V [*Allium cepa*]
AISSSTPP**Y*** DLNRFK	EMT30436.1	Thiazole biosynthetic enzyme 1-2, chloroplastic [*Aegilops tauschii*]
IFLPDGLLDRDDVP	S50900	Chlorophyll a/b-binding protein Lhcb5 - spinach (fragment)
GSHGKPPLPYAYKPLPS	AER10527.1	Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase 1 [*Triticum aestivum*]
IDYLISQGINAGDV	ACJ60826.1	Disrupted meiotic cDNA 1 [*Hordeum erectifolium*]
PEHIEQREQ**T*** LHEKF	AAA86276.1	pMA1951 [*Triticum aestivum*]
EKGSLAAIKAFSLAK**S*** V**S*** TGD**S*** KSFFVRQ**T*S*** KKIL	BAK18459.1	Ribosomal protein L32, partial (chloroplast) [*Asparagus asparagoides*]
LIPQILLLLLL	A0A0B0NI70	Uncharacterized protein [*Gossypium arboreum*]

ตารางที่ 6: ชนิด (ชื่อ) ของโปรตีนที่ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม blastp โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้มาจาก UniProtHevea8_2558 ในการค้นหา

Peptides (amino acid sequences)	Accession no.	Protein name [Organism]
FLNLINEFVGK	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
LNLINEFVGK	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
FLNLINEFVGK	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
KKILNNEFINRV	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
LNLINEFVG	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
FLNLINEFVGK	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
LNLINEFVGK	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
L.NLINEFVG.K	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
NLINEFVG	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
LNLINEFVG	YP_004327719.1	Hypothetical chloroplast RF1 [*Hevea brasiliensis*]
PELPKIDI	BAE98356.1	ABC transporter [*Arabidopsis thaliana*]
LMLLDEAT	KHN48276.1	ABC transporter B family member 1 [*Glycine soja*]
LMLLDEAT	KHN48276.1	ABC transporter B family member 1 [*Glycine soja*]
LMLLDEAT	KHN48276.1	ABC transporter B family member 1 [*Glycine soja*]
LMLLDEAT	XP_007027421.1	ATP binding cassette subfamily B1 isoform 3 [*Theobroma cacao*]
LMLLDEAT	XP_007027421.1	ATP binding cassette subfamily B1 isoform 3 [*Theobroma cacao*]
ATVSILISRMAT	AIU41629.1	ABC transporter family protein [*Hevea brasiliensis*]
FPILKDCS	AIU41659.1	ABC transporter family protein [*Hevea brasiliensis*]
ARAVLKDPAILLLDEAT	EMT07148.1	ABC transporter B family member 19 [*Aegilops tauschii*]
ILLGWLCS	XP_007027774.1	ABC transporter B family member 29 isoform 3 [*Theobroma cacao*]
AVLKDPAILLLDEAT	XP_010274280.1	ABC transporter B family member 2-like isoform X2 [*Nelumbo nucifera*]
SQEIIMLIGRW	AIU41625.1	ABC transporter family protein [*Hevea brasiliensis*]
LFAKDKSGPLQPGVDI	AGT17847.1	Rubber elongation factor protein [*Hevea brasiliensis*]
SAIRAAPEAARSLA	AGT17847.1	Rubber elongation factor protein [*Hevea brasiliensis*]
TSLDGVVPPVIKQV	AHF95715.1	Small rubber particle protein [*Hevea brasiliensis*]

ตารางที่ 6: (ต่อ)

Peptides (amino acid sequences)	Accession no.	Protein name [Organism]
LILLLMIDST	AEM55519.1	NADH-plastoquinone oxidoreductase chain 2 [*Astrocaryum scopatum*]
GILILLIIN	AKG55565.1	Plasma membrane H+-ATPase [*Hevea brasiliensis*]
LAHFLRA**T*** AKVPDAHIITE	AIE47261.1	Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase [*Hevea brasiliensis*]
EEDIAKPVNPFVFLLRF	BAH10641.1	2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltranferase [*Hevea brasiliensis*]
KCKKPIICSL	BAH10642.1	Homogentisate geranylgeranyl transferase [*Hevea brasiliensis*]
IELVEPEILRF	AEW43294.1	Ribosomal protein S9 [*Hevea brasiliensis*]
QAPGSSPAGANKNG	AAS66771.1	PPase [*Hevea brasiliensis*]
TNPLTQIVHGRKL	XP_003606245.1	RNA polymerase Rpb2 domain 3 protein [*Medicago truncatula*]
MAKKAVLIGINYPG**T*** KAELKGCINDVKR	ADM52185.1	type II metacaspase [*Hevea brasiliensis*]

4.2 วิเคราะห์คุณสมบัติและหน้าที่ทางชีวภาพของเปปไทด์ด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ

ผู้วิจัยได้ทำการระบุบทบาทหน้าที่และทำนายตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ โดยใช้ฐานข้อมูล UniProtKB (Protein Knowledgebase) ซึ่งเป็นการรวมฐานข้อมูลสองส่วนเข้าไว้ด้วยกัน ได้แก่ Swiss-Prot และ TrEMBL ซึ่งสามารถเข้าถึงฐานข้อมูลนี้ได้จาก http://www.uniprot.org/uniprot/ ผลการค้นหาถึงบทบาทหน้าที่และตำแหน่งของโปรตีน ดังแสดงใน**ตารางที่ 7** โดยเป็นการสรุปรวบรวมข้อมูลของเปปไทด์ ได้แก่ ชนิด (ชื่อโปรตีน), แหล่งที่มาของลำดับของกรดอะมิโน, บทบาทหน้าที่ของโปรตีน, ตำแหน่งของโปรตีน และการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ รวมทั้งการสกัดเปปไทด์ของน้ำยางพาราที่มีการเติมสารเคมี (0.6% แอมโมเนีย) เพื่อรักษาสภาพน้ำยางด้วย lysis buffer (Lysis+) ด้วย โดยโปรตีน Hypothetical chloroplast RF1 และ ABC transporter family protein เป็นโปรตีนที่สามารถพบได้จากการสกัดเปปไทด์ด้วยตัวทำละลายทุกชนิด ส่วนโปรตีนชนิดอื่นๆ สามารถพบได้จากการสกัดเปปไทด์ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างๆกันไป แต่อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ผลการทดลอง สามารถสรุปได้ว่าการสกัดเปปไทด์จากซีรั่มของน้ำยางพาราสดพันธุ์ BPM24 ที่ไม่ผ่านการเติมสารเคมีใดๆ เพื่อการเก็บรักษาสภาพน้ำยาง ด้วยสารทำละลาย lysis buffer (Lysis-) ที่ประกอบด้วย 8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, 0.4% Triton X-100, 50 mM DTT จะพบชนิดของโปรตีนมากที่สุด จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดเปปไทด์ และจะนำเปปไทด์ที่ได้จากการสกัดน้ำยางพาราสดพันธุ์ BPM24 ที่ไม่ผ่านการเติมสารเคมีใดๆ เพื่อการเก็บรักษาสภาพน้ำยาง ด้วยสารละลาย lysis buffer ไปทดสอบบทบาทความสำคัญทางชีวภาพ และสมบัติการเป็น antibacterial ของเปปไทด์ต่อไป

ตารางที่ 7: สรุปชนิด แหล่งที่มา บทบาท/หน้าที่ และตำแหน่งของโปรตีน ที่รวบรวมได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

Source	Protein name	Function	Subcellular localization	Peptide extraction						
				GuHCl	MeOH	Acetone	Formic â	Urea	Lysis+	Lysis-
blastp, mascot	Plasma membrane H+-ATPase	ATP biosynthetic process	Membrane	x						x
blastp, mascot	Hypothetical protein F383_10822	NA	NA	x	x	x	x	x		x
blastp, mascot	Hypothetical chloroplast RF1	NA	Chloroplast	x	x	x	x	x	x	x
mascot	ATP synthase subunit alpha	ATP hydrolysis coupled proton transport, ATP synthesis coupled proton transport	Mitochondria	x	x	x				x
mascot	CXE protein	Hydrolase activity	NA	x	x	x				x
blastp, mascot	Rubber elongation factor protein	Rubber biosynthesis	Cytoplasm		x		x			
blastp, mascot	Small rubber particle protein	Rubber biosynthesis	Cytoplasm			x				
blastp, mascot	ABC transporter family protein	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	Membrane	x	x	x	x	x	x	x
mascot	Major latex allergen Hev b 5	Allergenic properties	NA				x			
blastp, mascot	PsbA (Photosystem II protein)	Photosynthetic electron transport in photosystem II, Response to herbicide	Chloroplast, membrane						x	x
mascot	Catalase	Response to oxidative stress, Hydrogen peroxide catabolic process	NA						x	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Source	Protein name	Function	Subcellular localization	Peptide extraction						
				GuHCl	MeOH	Acetone	Formic â	Urea	Lysis+	Lysis-
mascot	Photosystem II CP43 reaction center protein	Photosynthetic electron transport in photosystem II	Plastid, chloroplast, thylakoid membrane						x	
mascot	Latex-abundant protein	Cysteine-type endopeptidase activity	NA							x
blastp	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	Photorespiration, Reductive pentose-phosphate cycle	Plastid, Chloroplast		x				x	
blastp	Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase	Flavonoid biosynthetic process	NA	x						
blastp	BnaC09g06470D	NA	NA					x		
blastp	Rps15	Ribosome biogenesis	Cytoplasm		x					
blastp	Cytochrome b6/f complex subunit	Electron transport Photosynthesis	Plastid, chloroplast, thylakoid membrane		x					
blastp	Thiazole biosynthetic enzyme 1-2, chloroplastic	Response to stress Thiamine biosynthetic process	Plastid, chloroplast			x				
blastp	Chlorophyll a/b-binding protein Lhcb5	Photosynthesis	Plastid, chloroplast, thylakoid membrane						x	
blastp	Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase 1	Carbohydrate metabolic process	Membrane						x	
blastp	Disrupted meiotic cDNA 1	DNA repair, Reciprocal meiotic recombination	Nucleus						x	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Source	Protein name	Function	Subcellular localization	Peptide extraction						
				GuHCl	MeOH	Acetone	Formic â	Urea	Lysis+	Lysis-
blastp	pMA1951	NA	NA							x
blastp	Ribosomal protein L32	Mitochondrial translation	Mitochondria							x
blastp	Uncharacterized protein	NA	NA	x		x	x	x		
blastp	Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase	Carbohydrate phosphorylation Photosynthesis	Cytoplasm					x		
blastp	NADH-plastoquinone oxidoreductase chain 2	Oxidoreductase activity	Chloroplast		x					
blastp	2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltranferase	Methyltransferase activity	Membrane		x					
blastp	Homogentisate geranylgeranyl transferase	Prenyltransferase activity	Membrane			x				
blastp	Ribosomal protein S9	Translation	Ribosome						x	
blastp	PPase	Proton transport	Membrane						x	
blastp	RNA polymerase Rpb2 domain 3 protein	Transcription	Nucleus						x	
blastp	type II metacaspase	Cysteine-type endopeptidase activity	NA							x

NA (Not applicable) หมายถึง ไม่มีข้อมูล

4.3 ทำนายหน้าที่และบทบาทของเปปไทด์

โดยในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้นำลำดับของกรดอะมิโนที่ได้ทั้งหมดจากแต่ละวิธีการทดลอง มาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลหลักๆ จำนวน 2 ฐานข้อมูล (เป็นฐานข้อมูลที่กว้างและเป็นแบบเปิดที่สามารถเข้าถึงได้ง่าย) ได้แก่ ฐานข้อมูล APD และ AMPer โดยฐานข้อมูล APD ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมจำนวน antimicrobial peptides ไว้ทั้งสิ้น 2,649 เปปไทด์ โดยเมื่อใช้ APD ในการค้นหา พบว่าเปปไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการทดลองไม่มีสมบัติของการเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้งเซลล์มะเร็งได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูล APD อาจมีความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง และอาจเป็น search engine ที่ยังไม่เหมาะสมกับงานวิจัยนี้ เนื่องจากข้อมูลของเปปไทด์บางประเด็นที่จะต้องใส่ลงไปขณะทำการค้นหายังคงมีจำกัดและไม่เพียงพอ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ search engine และ ฐานข้อมูล AMPer เนื่องจากเป็นฐานข้อมูลที่ค่อนข้างกว้างและมีโปรแกรมที่ใช้ค้นหา โดยการนำสายของลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการ ทั้งในรูปแบบ HMM (profile-based hidden Markov models) และ sequence clustering ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ โดย AMPer มีความสามารถในการดาวน์โหลด HMM model มาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ได้ทันที อย่างไรก็ตาม AMPer ไม่ได้รวบรวมข้อมูลในส่วนที่เป็นข้อมูลจากสิ่งมีชีวิตชนิด Prokaryote โดยแรกเริ่มเป็นฐานข้อมูลที่ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับเป็นฐานข้อมูลของ antibacterial peptides (bacteriocins) และยังไม่ปรากฏข้อมูลและการวิเคราะห์สมบัติของเปปไทด์ใดๆจากยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เลย

การทำนายถึงบทบาท หน้าที่และสมบัติของเปปไทด์จากซีรั่มของน้ำยางพารา โดยใช้ HMM models ดัง**ตารางที่ 8** และ Sequence clustering โดยวิธีการ Blast ดัง**ตารางที่ 9** ซึ่งจะใช้การเปรียบเทียบกับ mature peptides หรือ Propeptides ในฐานข้อมูล โดยกำหนดค่า E-value threshold เป็น 1e-1 จากการวิเคราะห์จะพบว่าบทบาทหน้าที่และคุณสมบัติของเปปไทด์เหล่านี้จะเกี่ยวข้องทั้งในส่วนที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (แกรมบวกและลบ), เชื้อรา, ยีสต์, ไวรัส, โปรโตซัว และเซลล์มะเร็งบางชนิด อย่างไรก็ตามผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9 เป็นเพียงผลจากการทำนายโดยใช้กระบวนการทางชีวสารสนเทศเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ให้ทราบถึงฤทธิ์ของเปปไทด์ที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะต้องทำการทดลองต่อไป โดยโครงการในระยะที่ 2 นี้ ผู้วิจัยจะเลือกเฉพาะการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

ตารางที่ 8: แสดงคุณสมบัติและทำนายการออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆของเปปไทด์ที่ได้จากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 ด้วยวิธี HMM model

Input sequences	Peptide Families	Lowest HMM E-value	Antimicrobial spectrum [Source organism]
HMM Matches to Mature Peptide (UniProtHevea)			
FLNLINEFVGK	Temporin, Ranatuerin, Hemolytic protein	0.039	G+, G-, yeast [*Rana catesbeiana*]
LNLINEFVGK, LNLINEFVG, NLINEFVG	Hematopoietic antimicrobial peptide-37	0.078	G+, G-, fungi [*Myxine glutinosa*]
KCKKPIICSL	Eosinophil granule major basic protein	0.081	G+, G-, fungi [*Homo sapiens*]
MAKKAVLIGINYPGTKAELKGCINDVKR	Aurein, Citropin, Dahlein, Dermaseptin, Maculatin	0.086	G+, G-, cancer [*Litoria aurea*]
(NCBInr)			
SCGRVSKSICMPCFDTA	Cryptdin, Androctonin	0.057	G+, G-, fungi [*Androctonus australis*]
MCNYIICLVMLRNPISALNTGEGCYIYWC	Beta-defensin	0.038	G+, G- [*Homo sapiens*]
MSCREGFMSPQTETKASV	Cathelicidin	0.085	G+, G-, fungi, virus [*Homo sapiens*]
MSCREGLMSPKTETKPSVG	Levitide, PYLa/PGLa, Xenopsin	0.081	G+, G-, protoxoan [*Xenopus laevis*]
MLTDLLKVFKVTTHIVPF	Dermaseptin	0.066	G+, G-, yeast, protozoa [*Phyllomedusa sauvagii*]
VXXXGIVLGLIPITLAGLFVTAYLQYRRGDQ LDL	Maximin	0.012	G+, G-, fungi [*Bombina maxima*]
	BPI, LBP, (Lipopolysaccharide-binding protein, Bactericidal permeability-increasing protein)	0.040	G- [*Homo sapiens*]
GSHGKPPLPYAYKPLPS	Bactenecin	0.079	G+, G- [*Bos taurus*]

Input sequences	Peptide Families	Lowest HMM E-value	Antimicrobial spectrum [Source organism]
EKGSLAAIKAFSLAKSVSTGDSKSFFVRQTSKKIL	Cecropin-A, Hyphancin, Moricin	0.072	G+, G- [*Hyalophora cecropia*]
	Brevinin-, Ranatuerin, Palustrin, Ocellatin	0.087	G+, G- [*Rana esculenta*]
HMM Matches to Propeptide (UniProtHevea)			
ARAVLKDPAILLLDEAT	Pleurocidin	0.016	G+, G- [*Pleuronectes americanus*]
(NCBInr)			
MSCREGFMSPQTETKASV	Neutrophil defensin 3,4	0.015	G+, G- (Plant) [*Homo sapiens*]
VXXXGIVLGLIPITLAGLFVTAYLQYRRGDQLDL	Clavanin, Clavaspirin	0.066	G+, G- [*Styela clava*]

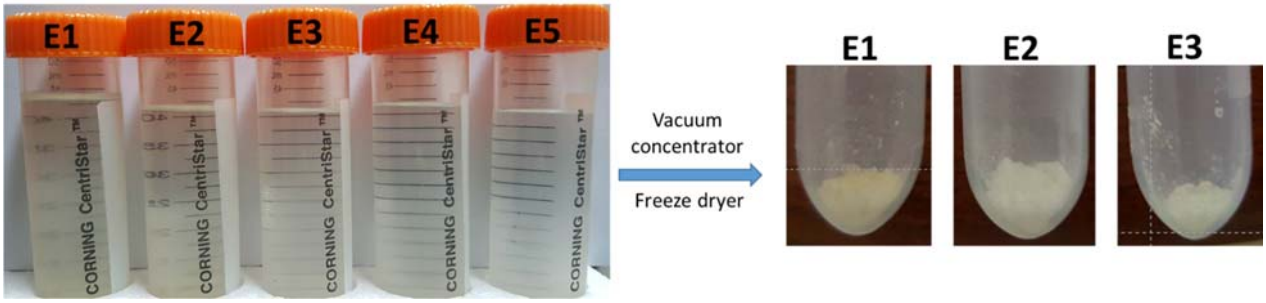
ตารางที่ 9: แสดงคุณสมบัติและทำนายการออกฤทธิ์ต่อจุลินชีพชนิดต่างๆของเปปไทด์ที่ได้จากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 ด้วยวิธี BLAST

Input sequences	Peptide Families	Best match	Alignment length	blastp E-value	% Identity	Antimicrobial spectrum [Source organism]
BLAST Matches to Mature Peptides (UniprotHevea)						
AVLKDPAILLLDEAT	Cecropin-A, Hyphancin, Moricin	CE3G_HYPCU-1	11	0.037	45.45	G+, G- [*Bombyx mori*]
KCKKPIICSL	Alpha-defensin 6, Corticostatin	DEF2_RABIT-1	8	0.06	50	G+, G-, fungi, virus [*Homo sapiens*]
	Beta-defensin, Dolabellanin	DBB2_DOLAU-1	7	0.054	57.14	G+, G-, fungi [*Dolabella auricularia*]
(NCBI)						
YRDLVFLVICHIGLAKCVGL	Bactenecin-1	BCTN1_SHEEP-1	8	0.079	37.5	G+, G- [*Bos taurus*]
	Beta-defensin, Corticostatin	D104A_PANTR-23-72	9	0.08	55.56	G+, G-, fungi, virus [*Homo sapiens*]
SCGRVSKSICMPCFDTA	Mast cell degranulating peptide	MCDP_MEGPE-1	9	0.044	44.44	Inflammation [*Megabombus pennsylvanicus*]
	Defensin	DEFD4_SPIOL-1	16	0.05	43.75	G+, G-, fungi, virus [*Homo sapiens*]
APNFPLDLAAVEVSSTNG	Coleoptericin., Acaloleptin-A1.	COLE_ZOPAT-1	5	0.023	100	G-, fungi [*Zophobas atratus*]
	Rhinocerosin, Holotricin	RHIC_ORYRH-1	17	0.029	41.18	G- [*Oryctes rhinoceros*]
HERNAHNFPLDLASIEAPTNG	Mytilin	Q9NL72_CAEEL-1	17	0.086	35.29	G+, G- [*Mytilus galloprovincialis*]
MSCREGLMSPKTETKPSVG	Levitide, PYLa/PGLa, Xenopsin	LEVI_XENLA-1	7	0.041	71.43	G+, G-, protoxoan, yeast [*Xenopus laevis*]

Input sequences	Peptide Families	Best match	Alignment length	blastp E-value	% Identity	Antimicrobial spectrum [Source organism]
MLTDLLKVFKVTTHIVPF	Ponericin, Pandinin, Gaegurin	GGN5_RANRU-42-65	10	0.081	40	G+, G-[*Pachycondyla goeldii*]
GSHGKPPLPYAYKPLPS	Abaecin	ABAE_BOMPA-1	13	0.083	53.85	G+, G-, fungi [*Apis mellifera*]
BLAST Matches to Propeptides (UniProtHevea)						
AVLKDPAILLLDEAT	Rhinocerosin, Rhinocerosin	RHIC_ORYRH-1	8	0.068	62.5	G- [*Oryctes rhinoceros*]
ARAVLKDPAILLLDEAT	Pleurocidin	PLE1_PSEAM-48-68	13	0.011	38.46	G+, G- [*Pleuronectes americanus*]
SAIRAAPEAARSLA	Tachyplesin	TAC1_TACTR-1	8	0.091	50	G+, G- [*Tachypleus tridentatus*]

4.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

คณะผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างน้ำยางพาราสด *Hevea brasilliensis* clone BPM24 สถานที่เก็บตัวอย่าง คือ สวนยางของเกษตรกร ต.ชำฆ้อ อ.เขาชะเมา จ.ระยอง ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 เปปไทด์ที่ได้ ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายที่ผ่าน MWCO 3 kDa ถูกทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้นด้วยวิธี solid-phase extraction โดยใช้ SEP-PAK (C18 Reversed-phase chromatography) ขณะที่ทำการชะเปปไทด์ที่ต้องการออกจากคอลัมน์ ด้วย 50% Acetronitrile/0.1% TFA ผู้วิจัยได้แบ่งการเก็บตัวอย่างเปปไทด์ออกเป็น 5 ส่วนด้วยกัน ซึ่งจะเรียกแต่ละส่วนว่า E1-E5 (**ดังรูป 5**) หลังจากนั้นนำเปปไทด์ที่ได้แต่ละส่วนมาทำแห้งให้เป็นผงด้วยเครื่อง Concentrator Plus อย่างไรก็ตามภายหลังการทำแห้งแล้วพบว่า ไม่สามารถทำการทดสอบฤทธิ์ส่วนของเปปไทด์ E5 ได้ เนื่องจากปริมาณของผงเปปไทด์แห้งจากส่วน E5 นั้นน้อยมาก โดยผงเปปไทด์แห้งที่ได้จากส่วน E1-E4 จะมีปริมาณน้อยลงตามลำดับ (E1>E2>E3>E4) แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่อไป อย่างไรก็ตามหากวัดความเข้มข้นของเปปไทด์จากแต่ละส่วนที่ได้ ด้วยวิธี Bradford assay โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตราฐาน พบว่าหากตั้งต้นด้วยปริมาณผงแห้งของสารสกัดเปปไทด์แต่ละส่วนที่เท่ากัน แล้วนำมาละลายด้วย lysis solution ในปริมาตรที่เท่ากันจะพบว่าความเข้มข้นส่วนของเปปไทด์เรียงจากมากไปหาน้อย ได้ดังนี้ E4>E3>E1>E2 ซึ่งมีความเข้มข้นโดยประมาณคิดเป็น 9.5, 7.7, 0.68, - ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 5: สารละลายที่ได้หลังผ่าน MWCO 3 กิโลดัลตัน (ซ้าย) หลังการทำแห้งด้วย Vacuum Concentrator ร่วมกับ Freeze dryer แล้วจะได้ลักษณะของผงเปปไทด์ที่มีลักษณะและสีแตกต่างกัน (ขวา)

หลังจากได้นำเปปไทด์แต่ละส่วน (E1-E4) ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิดดังได้กล่าวมาแล้วในส่วนวิธีการทดลอง โดยในครั้งแรกผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์เปปไทด์ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558 ด้วยวิธี Broth microdilution assay ซึ่งกำหนดให้ความเข้มข้นของเปปไทด์เป็น 2,000 1,000 500 250 125 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองดังแสดงใน**ตารางที่ 10** ซึ่งเป็นตารางสรุปผลการทดสอบจากตัวอย่างน้ำยางพาราที่เก็บมา 2 ครั้ง (แต่ละครั้งจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ) โดยเป็น

ตัวอย่างของน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558 และ เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 ภายใต้สภาวะทดสอบเหมือนเดิม ซึ่งจะรายงานด้วยค่า MIC range (µg/ml)

ตารางที่ 10: ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆของเปปไทด์แต่ละส่วนจากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24

Microorganism pathogens	MIC_{70} (µg/ml)				MIC_{80} (µg/ml)				MIC_{90} (µg/ml)			
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4
Gram-positive bacteria												
Bacillus cereus (ATCC 11778)	-	-	2,000	-	-	-	-	-	-	-	-	500
Enterococcus faecium (ATCC 51559)	-	-	-	2,000	-	2,000	-	-	-	-	-	-
Gram-negative bacteria												
Acinetobacter baumannii (ATCC 19606)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae (ATCC 700603)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli (ATCC 25922)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 15692)	-	-	-	2,000	-	-	-	-	-	-	-	-

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งหรือต้านการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด **(ตารางที่ 10 และภาคผนวกดังตารางที่ I-X)** และได้ทำการทดสอบซ้ำอีกในความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ต่างกันไป พบว่าส่วนของเปปไทด์ E4 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต แบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* และ *Enterococcus faecium* และแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ใช้ทดสอบ เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* ได้ถึง 95% -97% (MIC_{90}) ขณะที่ *E. faecium* และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC_{70} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกเหนือกจากส่วนของเปปไทด์ E4 แล้ว ยังพบว่าส่วนของเปปไทด์ E2 และ E3 ก็สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. faecium* (MIC_{80} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *B. Cereus* (MIC_{70} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

5) อภิปรายผลการทดลอง

ในส่วนที่ไม่ใช่ยาง (non-rubber constituents) ของน้ำยางพาราธรรมชาติซึ่งประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลหลายชนิด โดยส่วนที่ไม่ใช่ยางมักจะถูกทิ้งอย่างไร้ประโยชน์เป็นจำนวนมาก จึงได้มีการนำส่วนที่ไม่ใช่ยางมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้เป็นเครื่องสำอาง การผลิตเป็นปุ๋ย การใช้เลี้ยงไรแดง เป็นต้น แต่การแยกใช้งานสารชีวโมเลกุลเฉพาะกลุ่มยังไม่มีการศึกษามากนัก โดยเฉพาะโปรตีนโมเลกุลเล็กและเปปไทด์ ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มสารชีวโมเลกุลที่เป็นตัวผลักดันให้เกิดความเป็นระบบระเบียบทางสรีระวิทยา เช่น เปปไทด์ฮอร์โมนต่างๆ ปัจจุบันมีการสกัดเปปไทด์เพื่อศึกษาและใช้ประโยชน์ในหลายแนวทาง เช่น ใช้เป็นสารต้านการเจริญของจุลชีพต่างๆ ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา รวมไปถึงการใช้เป็นสารต้านมะเร็ง เป็นต้น ในรายงานการวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าส่วนต่างๆ ของพืชมีการผลิตเปปไทด์และโปรตีนที่สามารถต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ มีความเป็นไปได้ว่าหากมีการผลิตและสะสมโปรตีนเหล่านี้ในส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางก็น่าจะสามารถแยกโปรตีน/เปปไทด์ที่มีประโยชน์เหล่านี้ออกมาใช้ประโยชน์ได้

ในเริ่มแรกผู้วิจัยมุ่งใช้น้ำยางพันธุ์ RRIM600 เป็นตัวอย่าง แต่ได้รับคำแนะนำอันมีประโยชน์ยิ่งจากคณะผู้ทรงคุณวุฒิให้ปรับใช้น้ำยางพันธุ์ BPM24 เป็นตัวอย่างเพื่อการศึกษา เนื่องจากเป็นพันธุ์ยางที่มีการต้านทานโรคดีกว่ายางพันธุ์ RRIM600 และนอกจากนั้นงานวิจัยเผยแพร่เกี่ยวกับโปรตีนในยางพันธุ์ BPM24 ยังมีค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับ RRIM600 โดยสรุปงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้สร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกซีรั่ม (ส่วนที่ไม่ใช่เนื้อยาง) ออกจากเนื้อยาง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเปปไทด์ เพื่อทำเปปติโดมิกส์ของซีรั่ม จากน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 การวิเคราะห์หาปริมาณเปปไทด์ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น Bradford assay, MALDI-TOF MS (PMF Spectrums), MS/MS และทำ database search ผ่าน Pepnovo, Mascot โดยใช้ฐานข้อมูล NCBInr และ UniprotHevea8_2558 นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการระบุลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์และชนิดของเปปไทด์ (บางส่วน) ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าเปปไทด์จากส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางพาราต่อไป จากผลการทดลองในขั้นต้น สามารถสรุปได้ว่า การสกัดเปปไทด์จากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 ที่ไม่ผ่านการเติมสารเคมีใดๆ เพื่อการเก็บรักษาสภาพน้ำยาง ด้วยตัวทำละลาย lysis buffer (ที่ประกอบด้วย 8 M Urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, 0.4% Triton X-100, 50 mM DTT) จะให้ปริมาณเปปไทด์มากที่สุด และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดเปปไทด์ เพื่อให้ได้ปริมาณเปปไทด์ที่มากเพียงพอต่อการนำไปทดสอบบทบาทความสำคัญทางชีวภาพ และสมบัติการเป็น antimicrobial ของเปปไทด์ต่อไป เนื่องจากใน lysis buffer มีตัวทำละลายหลายชนิดผสมอยู่ด้วยกัน เช่น Urea และ Thiourea ที่จะช่วยในการทำลายพันธะไฮโดรเจน, CHAPS และ Triton X-100 ที่ช่วยในการทำลาย hydrophobic interaction, DTT ที่ใช้ในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งพันธะที่กล่าวมาข้างต้นที่เป็นพันธะที่มีความสำคัญในการเกิดเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ขึ้น ดังนั้นหากในสารละลายหรือตัวทำละลายชนิดใดที่มีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ ก็จะสามารถเพิ่มการละลายของโปรตีนโมเลกุลใหญ่ได้ ในทาง

ตรงกันข้ามตัวทำละลายชนิดเดี่ยวที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ 80% Methanol, 6M Formic acid, 6M Guanidine HCl, 80% Acetone, 8M Urea ประสิทธิภาพที่ใช้ในการสกัดยังคงด้อยกว่าการใช้ lysis buffer อยู่ค่อนข้างมาก แต่อย่างไรก็ตามต้นทุนของการใช้ lysis buffer ในการสกัดเปปไทด์ ก็มีราคาที่สูงกว่าการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายชนิดเดี่ยว

จากผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามสมมติฐานคือ ในต้นยางพาราธรรมชาติอาจมีการสร้างและปลดปล่อยเปปไทด์ (native peptide) ออกมา ซึ่งปริมาณเปปไทด์ที่พบจะมีความมากน้อยแตกต่างกัน (อยู่ในช่วง 10 -100 เปปไทด์) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการสกัดและฐานข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ ในการศึกษาเปปติโดมของน้ำยางเพื่อให้ทราบถึงหน้าที่ทางสรีรวิทยาทั้งแบบที่ถูกผลิตอย่างต่อเนื่องในช่วงอายุขัย (constitutive expression) และแบบที่เกิดมาเนื่องจากผลของการกรีดต้นยางเพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (inducible expression) อย่างไรก็ตาม การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับยางพาราในระดับโมเลกุล โดยเฉพาะที่มุ่งเน้นไปในกลุ่มของเปปไทด์หรือโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็ก ยังคงไม่แพร่หลาย ซึ่งในระยะแรกผู้วิจัยจะยังมุ่งเน้นผลการทดลอง เพื่อให้ทราบถึงชนิดและลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์ชนิดที่ถูกผลิตอย่างต่อเนื่องในสภาวะปกติ (native peptides) โดยสามารถสรุปและสร้างฐานข้อมูลเปปไทด์และเปปติโดมของส่วนที่ไม่ใช่ยางในน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 ได้ รวมทั้งทำการวิเคราะห์บทบาทหน้าที่ คุณสมบัติของโปรตีนและเปปไทด์จากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 ทั้งนี้เพื่อความสมบูรณ์ของข้อมูลเชิงโปรตีน (Protein database) และจะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยยางพาราในเชิงชีววิทยาศาสตร์โมเลกุลต่อไป หากเปรียบเทียบกับการศึกษาเปปติโดมในน้ำเลือดของมนุษย์ [38] พบว่าในการสกัดเปปไทด์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น Ultrafiltration, Desalting column (SEC), Acetonitrile supernatant (2:1 ACN:plasma), Acetonitrile supernatant (10:1 ACN:plasma), Oasis HLB 15% ACN และ Sep-Pak C8 15% ACN จะให้ปริมาณเปปไทด์ (ions) ที่แตกต่างกัน โดยวิธีที่ให้ปริมาณเปปไทด์ที่มากที่สุด คือ Oasis HLB 15% ACN และวิธีที่ให้เปปไทด์น้อยที่สุดคือ Acetonitrile supernatant (2:1 ACN:plasma) ซึ่งจะให้จำนวนของ ion เท่ากับ 100 ± 6 และ 40 ± 1 ตามลำดับ โดยอาจกล่าวได้ว่าจำนวนของเปปไทด์ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ขึ้นกับวิธีในการสกัดและคุณลักษณะเฉพาะของเปปไทด์ในเปปติโดมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

หลังจากการวิเคราะห์และทำนายคุณสมบัติของเปปไทด์ที่ได้ในการต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆด้วยกระบานการทางชีวสารสนเทศแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการพิสูจน์ ทราบถึงส่วนของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆได้ โดยในขั้นแรกจะทำการทดสอบต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนและมีรายงานว่าเป็นเชื้อดื้อยาที่มีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ จำนวน 6 ชนิด อย่างไรก็ตามจะการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆด้วย เทคนิค Broth dilution assay พบว่า เปปไทด์ที่ได้จากการสกัด โดยแบ่งออกเป็นส่วนๆด้วยวิธี reversed phase chromatography (E1-E4) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 3 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* (ATCC 11778) และ *Enterococcus faecium* (ATCC 51559) และ แบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692)

โดยไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Escherichia coli* (ATCC 25922) อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนของเปปไทด์ E4 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* (ATCC 11778) ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นของสาร (ส่วน E4) ที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าส่วนของเปปไทด์ E4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* ได้ถึง 95% - 97% ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้มากกว่า 100% ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ *E. faecium* และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC_{70} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกเหนือจากส่วนของเปปไทด์ E4 แล้ว ยังพบว่าส่วนของเปปไทด์ E2 และ E3 ก็สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. faecium* (MIC_{80} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *B. cereus* (MIC_{70} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าส่วนของเปปไทด์ E4 มีความเข้มข้นมากที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนของเปปไทด์อื่นๆ (E1-E3) จึงเป็นไปได้ว่าส่วนของเปปไทด์ E4 ที่สกัดด้วย lysis buffer ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเป็นเปปไทด์ชนิดที่มีความไม่มีขั้วสูง (strongly hydrophobic peptides) เนื่องจากเป็นส่วนของเปปไทด์ที่ถูกชะออกมาหลังจากส่วนของเปปไทด์อื่นๆ และอาจมีสมบัติความไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของเปปไทด์ ซึ่งสมบัตินี้มีบทบาทสำคัญต่อเปปไทด์ในกระบวนการแทรกตัวผ่านเยื่อไขมันสองชั้น (lipid bilayer) ของเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเปปไทด์จะจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำในส่วนหางของฟอสโฟไลปิดต่างๆในชั้นเซลล์เมมเบรน

แบคทีเรีย *B. cereus* ก็นับว่าเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มักตรวจพบในอาหารแบคทีเรียชนิดนี้พบการปนเปื้อนในธรรมชาติทั่วไป เช่น ดิน แหล่งน้ำ อากาศ ฝุ่นละออง และพืช โดยก่อให้โรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ทำให้เกิดอาการ อาเจียน ปวดท้อง ถ่ายเหลว เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) เจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน และจะสร้างสารพิษ (toxin) เมื่ออยู่ภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนน้อย มีรายงานการศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อพบว่า *B. cereus* ดื้อต่อยากลุ่ม β-lactam และ trimethoprim-sulphamethoxazole มีรายงานการศึกษาสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาติจากพืชสมุนไพรพบว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีในการออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย มีรายงานการศึกษาจากกลุ่ม Alzoreky และ Nakahara [39] พบว่า มีพืช 6 ชนิด จากพืชที่รับประทานได้ (edible plants) ทั้งหมด 26 ชนิด ที่พบในประเทศจีน ญี่ปุ่น ไทย และเยเมน ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* คือ สะเดา (*Azadirachta indica*), อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*), ผักกาดส้ม (*Rumex nervosus*), อีหรุด (*Ruta graveolens*), Thymus serpyllum และขิง (*Zingiber officinale*) พบว่า พืชสมุนไพรดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่ค่าความ เข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) อยู่ในช่วง 165 - 660 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Ryu [40] ได้ทำการสกัดสารจากพืช 2116 ชนิด พบว่าสารสกัดจากใบ *Siegesbeckia glabrescens* (Siegesbeckia herb), ชั้น cortex ของ *Morus alba* (*white mulberry),* ราก *Dryopteris erythrosora (autumn fern),* ราก *Carex*

pumila (sand sedge) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cereus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1,000, 2,000, 2,000, และ 8,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามหากรวมสารสกัดของ *D. erythrosora* (1.00 mg/ml) และ *C. pumila* (1.00 mg/ml) เข้าด้วยกัน จะเป็นผลของการยับยั้งแบบเสริมฤทธิ์บางส่วน นั่นคือสามารถลดปริมาณสารสกัดลง 50% และ 87% โดยมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้เท่าเดิม

สำหรับรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารชีวโมเลกุลในน้ำยางพาราที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ยังคงมีไม่มากนัก ดังเช่นงานวิจัยก่อนหน้านี้ [32] พบว่า เฉพาะส่วนบีซีรั่ม (B-serum) ของน้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพ โดยการทดลองได้นำส่วนของโปรตีนจากบีซีรั่มที่ตกตะกอนด้วย 60-80% อะซีโตน ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดต่างๆซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่อาศัยอยู่ช่องปากและระบบทางเดินหายใจของมนุษย์ จากผลการทดลองได้รายงานว่า ส่วนของโปรตีนจากบีซีรั่มที่นำมาทดสอบนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อแบคทีเรียแกรมลบ *Porphyromonas gingivalis* A, *Porphyromonas gingivalis* W50, *Porphyromonas gingivalis* 381, *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277, *Prevotella intermedia* 25611, *Tannerella forsythia* ATCC 43037 และ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384 ได้ โดยมีค่า MIC_{80} 896 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น *P. aeruginosa* และ แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด (*Streptococcus mutans* ATCC 25175 และ *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931) ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้โดยใช้โปรตีนที่ความเข้มข้น 1,800 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรจากบีซีรั่มที่ตกตะกอนด้วย 60-80% อะซีโตนได้ อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้จะพบว่าส่วนของเปปไทด์ E4 จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* strain PAO1 ประมาณ 77% ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

เปปไทด์จากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ MIC_{90} ได้เพียง 1 ชนิด จากทั้งหมด 6 ชนิด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเปปไทด์นี้จะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น เชื้อราได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากยางพาราพันธุ์ BPM24 ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อราไฟทอฟทอร่าอยู่แล้ว จึงน่าจะพบเปปไทด์ชนิดต่างๆจากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆได้ด้วย

6) สรุปผลการทดลอง

ผู้วิจัยได้ทำการสกัดโปรตีนและเปปไทด์จากซีรั่มของน้ำยางพาราสด (ที่ไม่มีการเติมสารรักษาสภาพน้ำยาง) สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อราไฟทอฟทอร่า (BPM24) ด้วย lysis solution และคัดแยกเฉพาะส่วนเปปไทด์ด้วยวิธี ultrafiltration ผ่าน MWCO 3 กิโลดัลตัน แล้วจึงทำเปปไทด์ให้บริสุทธิ์และเข้มข้น พร้อมทั้งแบ่งสารสกัดเปปไทด์ออกเป็นส่วนๆ (E1-E4) ด้วยเทคนิค solid phase extraction (SEP-PAK C18 reversed phase chromatography) ผลจากการนำแต่ละส่วนของเปปไทด์ไปทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆแล้ว พบว่าส่วนของเปปไทด์ E4 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 2 ชนิดได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Enterococcus faecium* และแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ใช้ทดสอบ เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* ได้ถึง 95% -97% (MIC_{90}) ขณะที่ *E. faecium* และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC_{70} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกเหนือกจากส่วนของเปปไทด์ E4 แล้ว ยังพบว่าส่วนของเปปไทด์ E2 และ E3 ก็สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. faecium* (MIC_{80} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *B. Cereus* (MIC_{70} เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเปปไทด์จากซีรั่มของน้ำยางพาราพันธุ์ BPM24 จะต้องนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆต่อไปโดยอาจใช้ความเข้มข้นที่มากขึ้นร่วมด้วย เพื่อโอกาสที่จะตรวจพบเปปไทด์เป้าหมายได้มากยิ่งขึ้น

7) เอกสารอ้างอิง

[1] P. Schulz-Knappe, H.D. Zucht, G. Heine, M. Jurgens, R. Hess, M. Schrader, Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures, Comb Chem High Throughput Screen, 4 (2001) 207-217.
[2] M. Jurgens, M. Schrader, Peptidomic approaches in proteomic research, Curr Opin Mol Ther, 4 (2002) 236-241.
[3] P. Schulz-Knappe, M. Schrader, H.D. Zucht, The peptidomics concept, Comb Chem High Throughput Screen, 8 (2005) 697-704.
[4] M. Hardt, L.R. Thomas, S.E. Dixon, G. Newport, N. Agabian, A. Prakobphol, S.C. Hall, H.E. Witkowska, S.J. Fisher, Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry, Biochemistry, 44 (2005) 2885-2899.
[5] C. Guarino, F. Fuselli, A. La Mantia, L. Longo, A. Faberi, R.M. Marianella, Peptidomic approach, based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, for detecting sheep's milk in goat's and cow's cheeses, Rapid Commun Mass Spectrom, 24 (2010) 705-713.
[6] D.W. Greening, R.J. Simpson, A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight (<or=25K) component of human plasma proteome, J Proteomics, 73 (2010) 637-648.
[7] J. Wu, Y. An, H. Pu, Y. Shan, X. Ren, M. An, Q. Wang, S. Wei, J. Ji, Enrichment of serum low-molecular-weight proteins using C18 absorbent under urea/dithiothreitol denatured environment, Anal Biochem, 398 (2010) 34-44.
[8] M.C. Baracat-Pereira, M. de Oliveira Barbosa, M.J. Magalhaes, Jr., L.C. Carrijo, P.D. Games, H.O. Almeida, J.F. Sena Netto, M.R. Pereira, E.G. de Barros, Separomics applied to the proteomics and peptidomics of low-abundance proteins: Choice of methods and challenges - A review, Genet Mol Biol, 35 (2012) 283-291.
[9] G. Gajski, V. Garaj-Vrhovac, Melittin: a lytic peptide with anticancer properties, Environ Toxicol Pharmacol, 36 (2013) 697-705.
[10] L.E. Seber, B.W. Barnett, E.J. McConnell, S.D. Hume, J. Cai, K. Boles, K.R. Davis, Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean, PLoS One, 7 (2012) e35409.
[11] Q.Z. Yang, C. Wang, L. Lang, Y. Zhou, H. Wang, D.J. Shang, Design of potent, non-toxic anticancer peptides based on the structure of the antimicrobial peptide, temporin-1CEa, Arch Pharm Res, 36 (2013) 1302-1310.
[12] M.U. Dahot, Antibacterial and antifungal activity of small protein of Indigofera oblongifolia leaves, J Ethnopharmacol, 64 (1999) 277-282.

[13] J.C. Koo, B. Lee, M.E. Young, S.C. Koo, J.A. Cooper, D. Baek, C.O. Lim, S.Y. Lee, D.J. Yun, M.J. Cho, Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts, Plant Cell Physiol, 45 (2004) 1669-1680.
[14] L. Xia, T.B. Ng, Actinchinin, a novel antifungal protein from the gold kiwi fruit, Peptides, 25 (2004) 1093-1098.
[15] M. Shahid, M. Tayyab, F. Naz, A. Jamil, M. Ashraf, A.H. Gilani, Activity-guided isolation of a novel protein from Croton tiglium with antifungal and antibacterial activities, Phytother Res, 22 (2008) 1646-1649.
[16] S.S. Kim, S. Kim, E. Kim, B. Hyun, K.K. Kim, B.J. Lee, Synergistic inhibitory effect of cationic peptides and antimicrobial agents on the growth of oral streptococci, Caries Res, 37 (2003) 425-430.
[17] Y. Park, S.N. Park, S.C. Park, J.Y. Park, Y.H. Park, J.S. Hahm, K.S. Hahm, Antibiotic activity and synergistic effect of antimicrobial peptide against pathogens from a patient with gallstones, Biochem Biophys Res Commun, 321 (2004) 631-637.
[18] K.H. Rhee, Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties, Int J Antimicrob Agents, 24 (2004) 423-427.
[19] R. Ferre, M.N. Melo, A.D. Correia, L. Feliu, E. Bardaji, M. Planas, M. Castanho, Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100, Biophys J, 96 (2009) 1815-1827.
[20] S. Ruden, K. Hilpert, M. Berditsch, P. Wadhwani, A.S. Ulrich, Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides, Antimicrob Agents Chemother, 53 (2009) 3538-3540.
[21] H. Alenius, N. Kalkkinen, M. Lukka, T. Reunala, K. Turjanmaa, S. Makinen-Kiljunen, E. Yip, T. Palosuo, Prohevein from the rubber tree (Hevea brasiliensis) is a major latex allergen, Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, 25 (1995) 659-665.
[22] A. Posch, Z. Chen, C. Wheeler, M.J. Dunn, M. Raulf-Heimsoth, X. Baur, Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing, The Journal of allergy and clinical immunology, 99 (1997) 385-395.
[23] Z. Chen, A. Posch, R. Cremer, M. Raulf-Heimsoth, X. Baur, Identification of hevein (Hev b 6.02) in Hevea latex as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy, J Allergy Clin Immunol, 102 (1998) 476-481.
[24] D.A. Kostyal, V.L. Hickey, J.D. Noti, G.L. Sussman, D.H. Beezhold, Cloning and characterization of a latex allergen (Hev b 7): homology to patatin, a plant PLA2, Clin Exp Immunol, 112 (1998) 355-362.

[25] K. Mengumpun, C. Tayapiwatana, R.G. Hamilton, P. Sangsupawanich, R. Wititsuwannakul, Hydrophobic allergens from the bottom fraction membrane of Hevea brasiliensis, Asian Pac J Allergy Immunol, 26 (2008) 129-136.
[26] K. Berthelot, S. Lecomte, Y. Estevez, B. Coulary-Salin, A. Bentaleb, C. Cullin, A. Deffieux, F. Peruch, Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in Hevea brasiliensis latex has amyloid properties, PLoS One, 7 (2012) e48065.
[27] A. Rodriguez-Romero, A. Hernandez-Santoyo, D. Fuentes-Silva, L.A. Palomares, S. Munoz-Cruz, L. Yepez-Mulia, S. Orozco-Martinez, Structural analysis of the endogenous glycoallergen Hev b 2 (endo-beta-1,3-glucanase) from Hevea brasiliensis and its recognition by human basophils, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 70 (2014) 329-341.
[28] R. Giordani, C. Gachon, J. Buc, P. Regli, J.L. Jacob, Antifungal action of Hevea brasiliensis latex. Its effect in combination with fluconazole on Candida albicans growth, Mycoses, 42 (1999) 465-474.
[29] R. Giordani, P. Regli, J. Buc, Antifungal effect of Hevea brasiliensis latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against Candida albicans, Mycoses, 45 (2002) 476-481.
[30] K.M. Daruliza, K.L. Lam, K.L. Yang, J.T. Priscilla, E. Sunderasan, M.T. Ong, Anti-fungal effect of Hevea brasiliensis latex C-serum on Aspergillus niger, European review for medical and pharmacological sciences, 15 (2011) 1027-1033.
[31] K.M. Daruliza, K.L. Yang, K.L. Lam, J.T. Priscilla, E. Sunderasan, M.T. Ong, Anti-Candida albicans activity and brine shrimp lethality test of Hevea brasiliensis latex B-serum, European review for medical and pharmacological sciences, 15 (2011) 1163-1171.
[32] K. Kanokwiroon, R. Teanpaisan, D. Wititsuwannakul, A.B. Hooper, R. Wititsuwannakul, Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of Hevea brasiliensis on oral microorganisms, Mycoses, 51 (2008) 301-307.
[33] R.J. Mendonca, V.B. Mauricio, B. Teixeira Lde, J.J. Lachat, J. Coutinho-Netto, Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree Hevea brasiliensis, Phytotherapy research : PTR, 24 (2010) 764-768.
[34] R.B. Sampaio, R.J. Mendonca, A.R. Simioni, R.A. Costa, R.C. Siqueira, V.M. Correa, A.C. Tedesco, A. Haddad, J. Coutinho Netto, R. Jorge, Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model, Curr Eye Res, 35 (2010) 56-62.
[35] J.P. Issa, H.L. Defino, Y.C. Pereira, J.C. Netto, W. Sebald, M.V. Bentley, M.M. Iyomasa, E. Ervolino, Bone repair investigation using rhBMP-2 and angiogenic protein extracted from latex, Microscopy research and technique, 75 (2012) 145-152.
[36] F.J. Dias, J.P. Issa, M.M. Iyomasa, J. Coutinho-Netto, R.A. Calzzani, D.M. Iyomasa, L.G. Sousa, S.R. de Almeida, D.P. Cury, I.S. Watanabe, Application of a low-level laser therapy and the purified

protein from natural latex (*Hevea brasiliensis*) in the controlled crush injury of the sciatic nerve of rats: a morphological, quantitative, and ultrastructural study, Biomed Res Int, 2013 (2013) 597863.

[37] K.L. Lam, K.L. Yang, E. Sunderasan, M.T. Ong, Latex C-serum from Hevea brasiliensis induces non-apoptotic cell death in hepatocellular carcinoma cell line (HepG2), Cell proliferation, 45 (2012) 577-585.

[38] L.P. Aristoteli, M.P. Molly, M.s. Baker, Evaluation of endogenous plasma peptide extraction methods for mass spectrometric biomarker discovery, J Proteome Res, 6 (2007) 571-581.

[39] N. S. Alzoreky, K. Nakahara . Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int. J. Food Microbiol. 80 (2003) 223-30.

[40] H. Jun, J. Kim, J. Bang, H. Kim, L. R. Beuchat, J. H. Ryu. Combined effects of plant extracts in inhibiting the growth of *Bacillus cereus* in reconstituted infant rice cereal. Int. J. Food Microbiol. 160 (2013) 260-266.

ภาคผนวก

แผนการดำเนินงานของโครงการ

ระยะเวลา	กิจกรรม	กิจกรรมที่ทำจริง
เดือนที่ 1 – 6	1. การระบุชนิดเปปไทด์ในเปปติโดมด้วย LC-MS/MS 2. ทำการวิเคราะห์เปปไทด์ที่ได้ด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics analysis) - Identification Post-translational modified peptides	- ทราบชนิดและลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ - ทราบบทบาททางชีวภาพที่เป็นไปได้ของโปรตีน พร้อมทั้งค้นหาและวิเคราะห์คุณสมบัติของเปปไทด์ ทั้งทางตรงและเชิงเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นที่ปรากฏในฐานข้อมูลโปรตีนและเปปไทด์ - ได้กลุ่มของฟอสโฟเปปไทด์ แต่ไม่พบกลุ่มไกลโคเปปไทด์ชนิด N-linked oligosaccharide
เดือนที่ 7 - 12	1. การคัดแยกและแบ่งกลุ่มเปปไทด์สำหรับวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพ 2. การศึกษาสมบัติ antibacterial ของเปปไทด์ด้วยเทคนิค Broth dilution assay	- ได้ส่วนของเปปไทด์และมีปริมาณที่มากพอ (E1-E4) สำหรับการศึกษาสมบัติ antibacterial ของเปปไทด์ - พิสูจน์ ทราบว่าส่วนของเปปไทด์ E4 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ได้ ประมาณ 95% - 97% ที่ MIC เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ I: แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Acinetobacter baumannii* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558 (**ตารางที่ I.I**) และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 (**ตารางที่ I.II**)

ตารางที่ I.I: Anti- *Acinetobacter baumannii* assay (Dec)

Test: Anti-*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
Method: Optical density microplate assay
MIC_{90} of positive control: Amikacin = 3.13 µg/ml, Ofloxacin = 0.391 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 8/4/2016
Total number of sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC_{90} (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.991	0.022	0.00	-	-
1	VA0217	E 1	2000.00	0.930	0.018	6.10	Inactive	-
			1000.00	0.909	0.011	8.29	Inactive	-
			500.00	0.937	0.006	5.43	Inactive	-
			250.00	0.959	0.004	3.17	Inactive	-
			125.00	0.967	0.022	2.43	Inactive	-
			62.50	1.008	0.013	-1.74	Inactive	-
2	VA0218	E 2	2000.00	0.755	0.032	23.83	Inactive	-
			1000.00	0.852	0.030	14.04	Inactive	-
			500.00	0.903	0.007	8.89	Inactive	-
			250.00	0.933	0.013	5.86	Inactive	-
			125.00	0.982	0.008	0.85	Inactive	-
			62.50	1.013	0.005	-2.21	Inactive	-
3	VA0219	E 3	2000.00	0.778	0.052	21.44	Inactive	-
			1000.00	0.899	0.019	9.30	Inactive	-
			500.00	0.888	0.010	10.41	Inactive	-
			250.00	0.939	0.016	5.22	Inactive	-
			125.00	0.976	0.008	1.46	Inactive	-
			62.50	1.011	0.005	-2.04	Inactive	-
1	VA0195	E 4	500.00	0.944	0.017	7.83	Inactive	-
			250.00	0.959	0.003	6.30	Inactive	-
			125.00	0.992	0.013	3.15	Inactive	-
			62.50	0.998	0.008	2.50	Inactive	-
			31.25	1.033	0.008	-0.92	Inactive	-
			15.63	1.019	0.009	0.48	Inactive	-

ตารางที่ I.II: Anti- *Acinetobacter baumannii* assay (Feb)

Test: Anti-*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
Method: Optical density microplate assay
MIC_{90} of positive control: Amikacin = 3.13 µg/ml, Ofloxacin = 0.391 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 9/6/2016
Total number of sample: 4

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC_{90} (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	1.067	0.017	0.00	-	-
	Positive 1	Amikacin	12.50	0.000	0.001	99.99	Active	
			6.25	-0.002	0.001	100.14	Active	
			3.13	0.052	0.016	95.08	Active	3.13
			1.56	0.428	0.072	59.85	Inactive	-
			0.781	1.049	0.006	1.71	Inactive	-
			0.391	1.071	0.011	-0.35	Inactive	-
	Positive 2	Ofloxacin	1.56	0.000	0.001	99.96	Active	
			0.781	-0.001	0.001	100.11	Active	
			0.391	0.004	0.004	99.61	Active	0.391
			0.195	0.497	0.057	53.44	Inactive	-
			0.0977	0.927	0.023	13.11	Inactive	-
			0.0490	1.046	0.028	1.93	Inactive	-
	Negative	Cell+DW	Distilled water	1.055	0.019	0.00	-	-
1	VA0276*	E1_R	2000.00	0.818	0.013	22.47	Inactive	-
			1000.00	0.883	0.007	16.30	Inactive	-
			500.00	0.933	0.006	11.60	Inactive	-
			250.00	0.957	0.012	9.29	Inactive	-
			125.00	0.998	0.017	5.43	Inactive	-
			62.50	1.037	0.003	1.67	Inactive	-
2	VA0277*	E2_R	2000.00	0.788	0.019	25.34	Inactive	-
			1000.00	0.886	0.006	15.99	Inactive	-
			500.00	0.919	0.015	12.86	Inactive	-
			250.00	0.956	0.009	9.38	Inactive	-
			125.00	0.992	0.014	5.94	Inactive	-
			62.50	1.033	0.010	2.05	Inactive	-
3	VA0278*	E3_R	2000.00	0.953	0.033	9.70	Inactive	-
			1000.00	0.969	0.016	8.12	Inactive	-
			500.00	0.950	0.021	9.95	Inactive	-
			250.00	0.985	0.018	6.64	Inactive	-
			125.00	1.026	0.021	2.75	Inactive	-
			62.50	1.040	0.013	1.45	Inactive	-
4	VA0279*	E4_R	2000.00	0.831	0.108	21.20	Inactive	-
			1000.00	0.964	0.017	8.66	Inactive	-
			500.00	0.962	0.006	8.85	Inactive	-
			250.00	0.993	0.010	5.88	Inactive	-
			125.00	1.012	0.003	4.04	Inactive	-
			62.50	1.055	0.009	-0.03	Inactive	-

ตารางที่ II: แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558 (**ตารางที่ II.I**) และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2559 (**ตารางที่ II.II**)

ตารางที่ II.I: Anti- *Bacillus cereus* assay (Dec)

Test: Anti-bacterial against *Bacillus cereus* (Anti-*B. cereus*)
Method: Resazurin Microplate assay (REMA)
MIC of positive control: Vancomycin = 2.00 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 19/04/2016
Total No. of tested sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Fluorescence unit		%Inhibition	Activity	MIC (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	30684	282	0.00	-	-
	Positive	Vancomycin	8.00	1642	32	94.65	Active	
			4.00	1784	17	94.19	Active	
			2.00	1747	57	94.31	Active	2.00
			1.00	10768	969	64.91	Inactive	-
			0.500	28378	657	7.52	Inactive	-
			0.250	30446	492	0.775	Inactive	-
	Negative	Cell+DW	Distilled water	29997	901	0.00	-	-
1	VA0217	E 1	2000.00	25313	584	15.62	Inactive	-
			1000.00	28467	168	5.10	Inactive	-
			500.00	29426	324	1.90	Inactive	-
			250.00	29754	186	0.811	Inactive	-
			125.00	30165	163	-0.560	Inactive	-
			62.50	29764	103	0.775	Inactive	-
2	VA0218	E 2	2000.00	22173	1712	26.08	Inactive	-
			1000.00	28108	302	6.30	Inactive	-
			500.00	28920	191	3.59	Inactive	-
			250.00	29603	298	1.31	Inactive	-
			125.00	29976	277	0.0705	Inactive	-
			62.50	30143	586	-0.487	Inactive	-
3	VA0219	E 3	2000.00	16035	589	46.55	Inactive	-
			1000.00	25079	1037	16.39	Inactive	-
			500.00	28356	148	5.47	Inactive	-
			250.00	29448	223	1.83	Inactive	-
			125.00	30057	184	-0.200	Inactive	-
			62.50	29751	989	0.821	Inactive	-
1	VA0195	E 4	500.00	215	21	99.46	Active	500.00
			250.00	24568	1756	38.36	Inactive	-
			125.00	38436	1182	3.57	Inactive	-
			62.50	39565	187	0.737	Inactive	-
			31.25	39909	51	-0.126	Inactive	-
			15.63	40252	778	-0.987	Inactive	-

ตารางที่ II.II: Anti- *Bacillus cereus* assay (Feb)

Test: Anti-bacterial against *Bacillus cereus* (Anti-*B. cereus*)
Method: Resazurin Microplate assay (REMA)
MIC of positive control: Vancomycin = 2.00 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 09/06/2016
Total No. of tested sample: 4

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Fluorescence unit		%Inhibition	Activity	MIC (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	30008	633	0.00	-	-
	Positive	Vancomycin	8.00	1227	217	95.91	Active	
			4.00	1544	77	94.85	Active	
			2.00	2053	94	93.16	Active	2.00
			1.00	19746	1580	34.20	Inactive	-
			0.500	28622	202	4.62	Inactive	-
			0.250	29436	270	1.91	Inactive	-
	Negative	Cell+DW	Distilled water	30018	432	0.00	-	-
1	VA0276	E1_R	2000.00	24107	412	19.69	Inactive	-
			1000.00	26995	251	10.07	Inactive	-
			500.00	27744	343	7.58	Inactive	-
			250.00	28455	77	5.21	Inactive	-
			125.00	28867	523	3.83	Inactive	-
			62.50	29252	306	2.55	Inactive	-
2	VA0277	E2_R	2000.00	22230	1070	25.95	Inactive	-
			1000.00	27434	43	8.61	Inactive	-
			500.00	28798	147	4.06	Inactive	-
			250.00	29248	248	2.57	Inactive	-
			125.00	29683	339	1.12	Inactive	-
			62.50	29639	234	1.26	Inactive	-
3	VA0278	E3_R	2000.00	8352	951	72.18	Inactive	-
			1000.00	25072	1373	16.48	Inactive	-
			500.00	26935	508	10.27	Inactive	-
			250.00	28990	481	3.43	Inactive	-
			125.00	29031	464	3.29	Inactive	-
			62.50	29362	197	2.19	Inactive	-
4	VA0279	E4_R	2000.00	-247	31	100.82	Active	
			1000.00	-69	10	100.23	Active	
			500.00	717	169	97.61	Active	500.00
			250.00	26780	692	10.79	Inactive	-
			125.00	28309	412	5.69	Inactive	-
			62.50	28511	454	5.02	Inactive	-

ตารางที่ III: แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558 (**ตารางที่ III.I**) และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2559 (**ตารางที่ III.II**)

ตารางที่ III.I: Anti- *Escherichia coli* assay (Dec)

Test: Anti-*E. coli* ATCC 25922
Method: Optical density microplate assay
MIC_{90} of positive control: Amikacin = 1.00 µg/ml, Ofloxacin = 0.0313 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 25/02/2016
Total number of sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC_{90} (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.824	0.024	0.00	-	-
1	VA0164	E1	500.00	0.819	0.008	0.57	Inactive	-
			250.00	0.841	0.023	-2.14	Inactive	-
			125.00	0.839	0.014	-1.86	Inactive	-
			62.50	0.868	0.017	-5.34	Inactive	-
			31.25	0.881	0.010	-6.92	Inactive	-
			15.63	0.835	0.028	-1.33	Inactive	-
2	VA0165	E2	500.00	0.837	0.011	-1.61	Inactive	-
			250.00	0.853	0.013	-3.60	Inactive	-
			125.00	0.854	0.011	-3.64	Inactive	-
			62.50	0.857	0.007	-4.08	Inactive	-
			31.25	0.889	0.005	-7.89	Inactive	-
			15.63	0.869	0.027	-5.46	Inactive	-
3	VA0166	E3	500.00	0.830	0.013	-0.76	Inactive	-
			250.00	0.874	0.011	-6.11	Inactive	-
			125.00	0.861	0.010	-4.57	Inactive	-
			62.50	0.838	0.007	-1.73	Inactive	-
			31.25	0.866	0.015	-5.18	Inactive	-
			15.63	0.850	0.024	-3.15	Inactive	-
1	VA0195	E4	500.00	0.774	0.010	-6.14	Inactive	-
			250.00	0.799	0.000	-9.57	Inactive	-
			125.00	0.785	0.009	-7.70	Inactive	-
			62.50	0.782	0.011	-7.33	Inactive	-
			31.25	0.793	0.015	-8.84	Inactive	-
			15.63	0.770	0.025	-5.64	Inactive	-

ตารางที่ III.II: Anti- *Escherichia coli* assay (Feb)

Test: Anti-*E. coli* ATCC 25922
Method: Optical density microplate assay
MIC_{90} of positive control: Amikacin = 2.00 µg/ml, Ofloxacin = 0.0313 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 06/07/2016
Total number of sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC_{90} (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.903	0.042	0.00	-	-
1	VA0276	E1_R	50.00	0.037	0.014	95.81	Active	50.00
			25.00	0.825	0.003	5.85	Inactive	-
			12.50	0.814	0.006	7.07	Inactive	-
			6.25	0.840	0.018	4.14	Inactive	-
			3.13	0.833	0.017	4.86	Inactive	-
			1.56	0.822	0.015	6.12	Inactive	-
1	VA0277	E2_R	2000.00	0.758	0.049	16.03	Inactive	-
			1000.00	0.820	0.014	9.12	Inactive	-
			500.00	0.869	0.005	3.73	Inactive	-
			250.00	0.870	0.014	3.65	Inactive	-
			125.00	0.881	0.018	2.43	Inactive	-
			62.50	0.898	0.007	0.51	Inactive	-
2	VA0278	E3_R	2000.00	0.787	0.026	12.81	Inactive	-
			1000.00	0.870	0.013	3.58	Inactive	-
			500.00	0.940	0.015	-4.14	Inactive	-
			250.00	0.959	0.033	-6.25	Inactive	-
			125.00	0.890	0.011	1.36	Inactive	-
			62.50	0.862	0.021	4.47	Inactive	-
3	VA0279	E4_R	2000.00	0.794	0.027	12.07	Inactive	-
			1000.00	0.910	0.015	-0.82	Inactive	-
			500.00	0.914	0.007	-1.30	Inactive	-
			250.00	0.919	0.011	-1.78	Inactive	-
			125.00	0.919	0.009	-1.78	Inactive	-
			62.50	0.926	0.013	-2.63	Inactive	-

ตารางที่ IV: แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Enterococcus faecium* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558 (**ตารางที่ IV.I**) และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 (**ตารางที่ IV.II**)

ตารางที่ IV.I: Anti- *Enterococcus faecium* assay (Dec)

Test: Anti-bacterial against *Enterococcus faecium* (Anti-*E. faecium*)
Method: Optical density microplate assay (OD)
MIC of positive control: Rifampicin = 3.13 µg/ml; Tetracycline HCl = 0.195 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 25/04/2016
Total number of sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled Water	0.874	0.014	0.00	-	
1	VA0217	E 1	2000.00	0.523	0.040	40.23	Inactive	-
			1000.00	0.807	0.022	7.71	Inactive	-
			500.00	0.927	0.021	-6.05	Inactive	-
			250.00	0.936	0.015	-7.01	Inactive	-
			125.00	0.938	0.014	-7.27	Inactive	-
			62.50	0.951	0.018	-8.74	Inactive	-
2	VA0218	E 2	2000.00	0.140	0.030	83.94	Inactive	-
			1000.00	0.632	0.035	27.74	Inactive	-
			500.00	0.912	0.000	-4.31	Inactive	-
			250.00	0.935	0.012	-6.87	Inactive	-
			125.00	0.923	0.027	-5.53	Inactive	-
			62.50	0.901	0.005	-3.07	Inactive	-
3	VA0219	E 3	2000.00	0.393	0.008	55.11	Inactive	-
			1000.00	0.602	0.032	31.19	Inactive	-
			500.00	0.869	0.002	0.668	Inactive	-
			250.00	0.902	0.013	-3.19	Inactive	-
			125.00	0.917	0.010	-4.84	Inactive	-
			62.50	0.905	0.009	-3.45	Inactive	-
1	VA0195	E 4	500.00	0.294	0.033	62.13	Inactive	-
			250.00	0.579	0.023	25.48	Inactive	-
			125.00	0.781	0.007	-0.572	Inactive	-
			62.50	0.811	0.015	-4.43	Inactive	-
			31.25	0.832	0.026	-7.14	Inactive	-
			15.63	0.842	0.013	-8.38	Inactive	-

ตารางที่ IV.II: Anti- *Enterococcus faecium* assay (Feb)

Test: Anti-bacterial against *Enterococcus faecium* (Anti-*E. faecium*)
Method: Optical density microplate assay (OD)
MIC of positive control: Rifampicin = 3.13 µg/ml; Tetracycline HCl = 0.0976 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 13/06/2016
Total number of sample: 4

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	0.760	0.056	0.00	-	
	Positive 1	Rifampicin	25.00	0.0164	0.007	97.84	Active	
			12.50	0.0158	0.007	97.93	Active	
			6.25	0.0134	0.003	98.23	Active	
			3.13	0.0179	0.001	97.64	Active	3.13
			1.56	0.451	0.027	40.67	Inactive	-
			0.781	0.717	0.015	5.57	Inactive	-
	Positive 2	Tetracycline HCl	0.781	0.0000877	0.004	99.99	Active	
			0.391	-0.00591	0.004	100.78	Active	
			0.195	-0.000246	0.002	100.03	Active	
			0.0976	0.0514	0.003	93.23	Active	0.0976
			0.0488	0.410	0.015	45.98	Inactive	-
			0.0244	0.676	0.011	11.01	Inactive	-
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.771	0.041	0.00	-	
1	VA0276	E1_R	2000.00	0.256	0.032	66.82	Inactive	-
			1000.00	0.570	0.019	26.03	Inactive	-
			500.00	0.777	0.005	-0.780	Inactive	-
			250.00	0.791	0.014	-2.55	Inactive	-
			125.00	0.802	0.008	-4.02	Inactive	-
			62.50	0.796	0.012	-3.20	Inactive	-
2	VA0277	E2_R	2000.00	0.302	0.028	60.88	Inactive	-
			1000.00	0.667	0.033	13.49	Inactive	-
			500.00	0.798	0.011	-3.55	Inactive	-
			250.00	0.823	0.037	-6.70	Inactive	-
			125.00	0.822	0.037	-6.66	Inactive	-
			62.50	0.787	0.011	-2.12	Inactive	-
3	VA0278	E3_R	2000.00	0.299	0.022	61.18	Inactive	-
			1000.00	0.532	0.060	30.96	Inactive	-
			500.00	0.787	0.019	-2.08	Inactive	-
			250.00	0.809	0.011	-4.93	Inactive	-
			125.00	0.814	0.010	-5.54	Inactive	-
			62.50	0.773	0.006	-0.262	Inactive	-
4	VA0279	E4_R	2000.00	0.228	0.019	70.43	Inactive	-
			1000.00	0.361	0.037	53.18	Inactive	-
			500.00	0.527	0.010	31.69	Inactive	-
			250.00	0.769	0.020	0.214	Inactive	-
			125.00	0.801	0.009	-3.94	Inactive	-
			62.50	0.801	0.009	-3.89	Inactive	-

ตารางที่ V: แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella pneumoniae* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558 (**ตารางที่ V.I**) และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2559 (**ตารางที่ V.II**)

ตารางที่ V.I: Anti- *Klebsiella pneumoniae* assay (Dec)

Test: Anti-*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
Method: Optical density microplate assay
MIC_{90} of positive control: Amikacin = 0.500 µg/ml, Ofloxacin = 1.00 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 25/02/2016
Total number of sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC_{90} (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.575	0.054	0.00	-	-
1	VA0164	E1	500.00	0.730	0.072	-26.92	Inactive	-
			250.00	0.687	0.084	-19.55	Inactive	-
			125.00	0.551	0.003	4.17	Inactive	-
			62.50	0.609	0.062	-5.98	Inactive	-
			31.25	0.584	0.066	-1.52	Inactive	-
			15.63	0.527	0.036	8.25	Inactive	-
2	VA0165	E2	500.00	0.663	0.029	-15.41	Inactive	-
			250.00	0.599	0.008	-4.18	Inactive	-
			125.00	0.686	0.063	-19.26	Inactive	-
			62.50	0.762	0.062	-32.63	Inactive	-
			31.25	0.609	0.021	-5.92	Inactive	-
			15.63	0.603	0.039	-4.82	Inactive	-
3	VA0166	E3	500.00	0.744	0.070	-29.35	Inactive	-
			250.00	0.786	0.065	-36.77	Inactive	-
			125.00	0.668	0.084	-16.28	Inactive	-
			62.50	0.645	0.083	-12.25	Inactive	-
			31.25	0.600	0.062	-4.36	Inactive	-
			15.63	0.665	0.056	-15.67	Inactive	-
1	VA0195	E4	500.00	0.769	0.026	-58.09	Inactive	-
			250.00	0.798	0.037	-64.13	Inactive	-
			125.00	0.711	0.020	-46.17	Inactive	-
			62.50	0.692	0.105	-42.26	Inactive	-
			31.25	0.597	0.040	-22.72	Inactive	-
			15.63	0.527	0.064	-8.46	Inactive	-

ตารางที่ V.II: Anti- *Klebsiella pneumoniae* assay (Feb)

Test: Anti-*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
Method: Optical density microplate assay
MIC_{90} of positive control: Ofloxacin = 0.500 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 06/07/2016
Total number of sample: 4

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC_{90} (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.778	0.130	0.00	-	-
1	VA0276	E1_R	2000.00	0.850	0.016	-9.30	Inactive	-
			1000.00	0.907	0.040	-16.68	Inactive	-
			500.00	0.825	0.048	-6.09	Inactive	-
			250.00	0.665	0.119	14.53	Inactive	-
			125.00	0.578	0.071	25.64	Inactive	-
			62.50	0.684	0.109	12.09	Inactive	-
2	VA0277	E2_R	2000.00	0.909	0.045	-16.89	Inactive	-
			1000.00	0.983	0.015	-26.45	Inactive	-
			500.00	0.991	0.028	-27.40	Inactive	-
			250.00	0.987	0.009	-26.92	Inactive	-
			125.00	0.917	0.036	-17.88	Inactive	-
			62.50	0.852	0.073	-9.52	Inactive	-
3	VA0278	E3_R	2000.00	0.960	0.028	-23.41	Inactive	-
			1000.00	0.962	0.043	-23.75	Inactive	-
			500.00	0.953	0.011	-22.51	Inactive	-
			250.00	0.852	0.073	-9.56	Inactive	-
			125.00	0.654	0.064	15.91	Inactive	-
			62.50	0.554	0.009	28.81	Inactive	-
4	VA0279	E4_R	2000.00	1.136	0.031	-46.09	Inactive	-
			1000.00	1.100	0.002	-41.46	Inactive	-
			500.00	1.084	0.026	-39.36	Inactive	-
			250.00	1.023	0.025	-31.51	Inactive	-
			125.00	0.972	0.023	-25.04	Inactive	-
			62.50	0.986	0.027	-26.84	Inactive	-

ตารางที่ VI: แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558 (**ตารางที่ V.I**) และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 (**ตารางที่ VI.II**)

ตารางที่ VI.I: Anti- *Pseudomonas aeruginosa* assay (Dec)

Test : Anti-*P.aeruginosa* strain PAO1 wild type (*Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1)
Method: Optical density microplate assay (OD)
MIC of positive control: Amikacin = 0.781 µg/ml and Ofloxacin = 0.781 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 19/04/16
Total No. of tested sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled Water	0.348	0.048	0.00		
1	VA0217	E 1	2000.00	0.237	0.006	31.98	Inactive	-
			1000.00	0.281	0.008	19.14	Inactive	-
			500.00	0.299	0.019	13.97	Inactive	-
			250.00	0.313	0.015	9.94	Inactive	-
			125.00	0.318	0.033	8.60	Inactive	-
			62.50	0.307	0.014	11.86	Inactive	-
2	VA0218	E 2	2000.00	0.216	0.005	37.83	Inactive	-
			1000.00	0.258	0.022	25.94	Inactive	-
			500.00	0.283	0.005	18.66	Inactive	-
			250.00	0.281	0.002	19.24	Inactive	-
			125.00	0.292	0.022	15.98	Inactive	-
			62.50	0.286	0.018	17.80	Inactive	-
3	VA0219	E 3	2000.00	0.187	0.020	46.36	Inactive	-
			1000.00	0.269	0.012	22.59	Inactive	-
			500.00	0.323	0.012	7.16	Inactive	-
			250.00	0.377	0.025	-8.27	Inactive	-
			125.00	0.270	0.002	22.49	Inactive	-
			62.50	0.282	0.010	18.95	Inactive	-
1	VA0195	E 4	500.00	0.235	0.010	32.56	Inactive	-
			250.00	0.270	0.027	22.30	Inactive	-
			125.00	0.296	0.034	14.83	Inactive	-
			62.50	0.289	0.031	17.03	Inactive	-
			31.25	0.314	0.033	9.84	Inactive	-
			15.63	0.313	0.035	10.13	Inactive	-

ตารางที่ VI.II: Anti- *Pseudomonas aeruginosa* assay (Feb)

Test : Anti-*P.aeruginosa* strain PAO1 wild type (*Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1)
Method: Optical density microplate assay (OD)
MIC of positive control: Amikacin = 0.391 µg/ml and Ofloxacin = 0.391 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 10/06/2016
Total No. of tested sample: 4

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.453	0.047	0.00	-	-
1	VA0276	E1_R	2000.00	0.343	0.023	24.29	Inactive	-
			1000.00	0.405	0.024	10.51	Inactive	-
			500.00	0.425	0.041	6.02	Inactive	-
			250.00	0.409	0.023	9.70	Inactive	-
			125.00	0.402	0.019	11.25	Inactive	-
			62.50	0.366	0.023	19.06	Inactive	-
2	VA0277	E2_R	2000.00	0.341	0.036	24.66	Inactive	-
			1000.00	0.418	0.020	7.64	Inactive	-
			500.00	0.360	0.024	20.46	Inactive	-
			250.00	0.386	0.033	14.82	Inactive	-
			125.00	0.399	0.030	11.84	Inactive	-
			62.50	0.363	0.006	19.79	Inactive	-
3	VA0278	E3_R	2000.00	0.385	0.012	14.93	Inactive	-
			1000.00	0.418	0.005	7.64	Inactive	-
			500.00	0.421	0.008	6.98	Inactive	-
			250.00	0.433	0.009	4.40	Inactive	-
			125.00	0.406	0.031	10.22	Inactive	-
			62.50	0.402	0.023	11.25	Inactive	-
4	VA0279	E4_R	2000.00	0.103	0.015	77.35	Inactive	-
			1000.00	0.257	0.005	43.14	Inactive	-
			500.00	0.325	0.006	28.26	Inactive	-
			250.00	0.373	0.001	17.59	Inactive	-
			125.00	0.402	0.009	11.25	Inactive	-
			62.50	0.423	0.012	6.46	Inactive	-

ตารางที่ VII : แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *A. baumannii* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558

Test: Anti-*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
Method: Optical density microplate assay
MIC_{90} of positive control: Amikacin = 3.13 µg/ml, Ofloxacin = 0.391 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 25/2/2016
Total number of sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC_{90} (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	1.017	0.021	0.00	-	-
	Positive 1	Amikacin	12.50	-0.020	0.004	101.92	Active	
			6.25	-0.021	0.005	102.05	Active	
			3.13	0.002	0.004	99.78	Active	3.13
			1.56	0.327	0.045	67.83	Inactive	-
			0.781	1.008	0.018	0.95	Inactive	-
			0.391	1.021	0.037	-0.36	Inactive	-
	Positive 2	Ofloxacin	1.56	-0.021	0.005	102.04	Active	
			0.781	-0.022	0.004	102.13	Active	
			0.391	-0.020	0.001	101.99	Active	0.391
			0.195	0.664	0.046	34.76	Inactive	-
			0.0977	0.901	0.041	11.40	Inactive	-
			0.0490	0.999	0.034	1.80	Inactive	-
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.996	0.014	0.00	-	-
1	VA0164	E1	500.00	0.982	0.009	1.33	Inactive	-
			250.00	0.985	0.004	1.09	Inactive	-
			125.00	0.982	0.009	1.40	Inactive	-
			62.50	0.992	0.001	0.39	Inactive	-
			31.25	0.991	0.019	0.42	Inactive	-
			15.63	0.990	0.002	0.59	Inactive	-
2	VA0165	E2	500.00	0.935	0.006	6.12	Inactive	-
			250.00	0.941	0.005	5.45	Inactive	-
			125.00	0.954	0.008	4.14	Inactive	-
			62.50	0.971	0.005	2.50	Inactive	-
			31.25	0.977	0.010	1.90	Inactive	-
			15.63	0.993	0.004	0.29	Inactive	-
2	VA0166	E3	500.00	0.985	0.009	1.06	Inactive	-
			250.00	0.988	0.013	0.79	Inactive	-
			125.00	1.001	0.007	-0.58	Inactive	-
			62.50	0.997	0.010	-0.18	Inactive	-
			31.25	1.002	0.008	-0.61	Inactive	-
			15.63	0.995	0.018	0.09	Inactive	-

ตารางที่ VIII : แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558

Test: Anti-*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
Method: Optical density microplate assay
MIC_{90} of positive control: Amikacin = 3.13 µg/ml, Ofloxacin = 0.391 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 25/2/2016
Total number of sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC_{90} (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.996	0.014	0.00	-	-
1	VA0164	E1	500.00	0.982	0.009	1.33	Inactive	-
			250.00	0.985	0.004	1.09	Inactive	-
			125.00	0.982	0.009	1.40	Inactive	-
			62.50	0.992	0.001	0.39	Inactive	-
			31.25	0.991	0.019	0.42	Inactive	-
			15.63	0.990	0.002	0.59	Inactive	-
2	VA0165	E2	500.00	0.935	0.006	6.12	Inactive	-
			250.00	0.941	0.005	5.45	Inactive	-
			125.00	0.954	0.008	4.14	Inactive	-
			62.50	0.971	0.005	2.50	Inactive	-
			31.25	0.977	0.010	1.90	Inactive	-
			15.63	0.993	0.004	0.29	Inactive	-
2	VA0166	E3	500.00	0.985	0.009	1.06	Inactive	-
			250.00	0.988	0.013	0.79	Inactive	-
			125.00	1.001	0.007	-0.58	Inactive	-
			62.50	0.997	0.010	-0.18	Inactive	-
			31.25	1.002	0.008	-0.61	Inactive	-
			15.63	0.995	0.018	0.09	Inactive	-

ตารางที่ IX : แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *E. faecium* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558

Test: Anti-bacterial against *Enterococcus faecium* (Anti-*E. faecium*)
Method: Optical density microplate assay (OD)
MIC of positive control: Rifampicin = 3.13 µg/ml; Tetracycline HCl = 0.0976 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 29/02/2016
Total number of sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	0.818	0.036	0.00	-	
	Positive 1	Rifampicin	25.00	0.00342	0.005	99.58	Active	
			12.50	-0.00458	0.001	100.56	Active	
			6.25	-0.00758	0.001	100.93	Active	
			3.13	0.0159	0.002	98.05	Active	3.13
			1.56	0.730	0.057	10.77	Inactive	-
			0.781	0.867	0.013	-5.98	Inactive	-
	Positive 2	Tetracycline HCl	0.781	-0.00725	0.004	100.89	Active	
			0.391	-0.00825	0.002	101.01	Active	
			0.195	-0.00392	0.003	100.48	Active	
			0.0976	0.0631	0.010	92.29	Active	0.0976
			0.0488	0.478	0.052	41.58	Inactive	-
			0.0244	0.727	0.045	11.14	Inactive	-
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.810	0.035	0.00	-	
1	VA0164	E1	500.00	0.870	0.005	-7.44	Inactive	-
			250.00	0.908	0.009	-12.13	Inactive	-
			125.00	0.901	0.012	-11.19	Inactive	-
			62.50	0.897	0.022	-10.78	Inactive	-
			31.25	0.888	0.065	-9.58	Inactive	-
			15.63	0.839	0.015	-3.62	Inactive	-
2	VA0165	E2	500.00	0.795	0.013	1.82	Inactive	-
			250.00	0.820	0.040	-1.19	Inactive	-
			125.00	0.764	0.027	5.68	Inactive	-
			62.50	0.870	0.039	-7.36	Inactive	-
			31.25	0.870	0.041	-7.36	Inactive	-
			15.63	0.829	0.027	-2.34	Inactive	-
3	VA0166	E3	500.00	0.805	0.004	0.66	Inactive	-
			250.00	0.847	0.016	-4.52	Inactive	-
			125.00	0.868	0.005	-7.15	Inactive	-
			62.50	0.870	0.018	-7.44	Inactive	-
			31.25	0.867	0.019	-7.03	Inactive	-
			15.63	0.866	0.010	-6.95	Inactive	-

ตารางที่ X : แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* จากเปปไทด์แต่ละส่วนที่สกัดจากตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ.2558

Test : Anti-*P.aeruginosa* strain PAO1 wild type (*Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1)
Method: Optical density microplate assay (OD)
MIC of positive control: Amikacin = 0.391 µg/ml and Ofloxacin = 0.391 µg/ml
Reported date (dd/mm/yy): 03/02/2016
Total No. of tested sample: 3

Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Optical density		% Inhibition	Activity	MIC (µg/ml)
				Average	SD			
	Negative	Cell+DMSO	0.5%DMSO	0.327	0.038	0.00	-	-
	Positive1	Amikacin	3.13	-0.000532	0.001	100.16	Active	
			1.56	0.00197	0.003	99.40	Active	
			0.781	0.00219	0.003	99.33	Active	
			0.391	0.0265	0.007	91.91	Active	0.391
			0.195	0.226	0.017	30.97	Inactive	-
			0.0977	0.301	0.032	7.96	Inactive	-
	Positive2	Ofloxacin	3.13	-0.000532	0.001	100.16	Active	
			1.56	0.00247	0.004	99.25	Active	
			0.781	-0.000198	0.001	100.06	Active	
			0.391	0.0268	0.004	91.81	Active	0.391
			0.195	0.156	0.010	52.46	Inactive	-
			0.0977	0.261	0.005	20.33	Inactive	-
	Negative	Cell+DW	Distilled water	0.334	0.030	0.00	-	-
1	VA0164	E1	500.00	0.364	0.022	-8.88	Inactive	-
			250.00	0.370	0.002	-10.67	Inactive	-
			125.00	0.373	0.018	-11.72	Inactive	-
			62.50	0.366	0.014	-9.62	Inactive	-
			31.25	0.358	0.018	-7.08	Inactive	-
			15.63	0.348	0.010	-4.24	Inactive	-
2	VA0165	E2	500.00	0.328	0.004	1.85	Inactive	-
			250.00	0.374	0.022	-11.92	Inactive	-
			125.00	0.364	0.012	-8.83	Inactive	-
			62.50	0.375	0.010	-12.22	Inactive	-
			31.25	0.368	0.011	-10.02	Inactive	-
			15.63	0.354	0.015	-6.03	Inactive	-
3	VA0166	E3	500.00	0.339	0.003	-1.44	Inactive	-
			250.00	0.370	0.003	-10.62	Inactive	-
			125.00	0.393	0.006	-17.71	Inactive	-
			62.50	0.393	0.019	-17.61	Inactive	-
			31.25	0.380	0.007	-13.82	Inactive	-
			15.63	0.379	0.006	-13.42	Inactive	-