247512
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247512

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การทดสอบประสิทธิภาพและศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของฮีโมโกลบินจระเข้ในรูปยาเม็ด แคปซูล หรือครีม

โดย รศ.ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์และคณะ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปีงบประมาณเงินรายได้ พ.ศ. 2554

b00252181

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247512

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การทดสอบประสิทธิภาพและศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของฮีโมโกลบินจระเข้ในรูปยาเม็ด แคปซูล หรือครีม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

โดย รศ.ดร. สมปอง ธรรมศิริรักษ์และคณะ
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปีงบประมาณเงินรายได้ พ.ศ. 2554

การทดสอบประสิทธิภาพและศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของฮีโมโกลบินจระเข้ในรูปยาเม็ด แคปซูล หรือครีม

247512

บทคัดย่อ

จระเข้มีความสามารถอาศัยอยู่ในน้ำได้เป็นเวลานานกว่ามนุษย์ เนื่องจากจระเข้มีฮีโมโกลบินที่มีความสามารถจับและปล่อยออกซิเจนได้ดีกว่ามนุษย์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่าฮีโมโกลบินจระเข้นอกจากจะทำหน้าที่ในการขนส่งสารแล้วยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย ในการศึกษานี้ได้แยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย โดยใช้ Column sephadex G-50 ซึ่งสามารถแยกโปรตีนได้ peak ใหญ่ๆ 1 peak จากนั้นนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินได้โดยพบแถบของโปรตีนหลักที่คาดว่าน่าจะเป็นฮีโมโกลบินที่มีขนาดเท่ากับ 15 kDa และ 14 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นสายแอลฟาฮีโมโกลบิน และสายเบต้าฮีโมโกลบินตามลำดับ จากผลการทดลองแยกบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่าฮีโมโกลบินที่ทำการสกัดนั้นมีความบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงนำฮีโมโกลบินที่ทำการสกัดได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เทคนิค lyophilized เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไปโดยไม่ต้องผ่าน gel filtration chromatography ซึ่งขั้นตอนนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม จากนั้นนำส่วนของฮีโมโกลบินไปศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งส่วน intact hemoglobin, unfold hemoglobin ที่มีการให้ความร้อนที่ 40 ^{o}C และ 50 ^{o}C ที่เวลาต่างๆ และ fragmented hemoglobin ทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.05 M โดยเทคนิค disc diffusion assay จากผลการทดลองพบว่า fragmented hemoglobin มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยสามารถยับยั้งเชื้อได้ 9 สายพันธุ์ จากนั้นนำ fragmented hemoglobin ไปทำการแยกบริสุทธิ์ต่อด้วย RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ C4 พบว่าสามารถแยกเปปไทด์ได้ 6 peak จากนั้นเก็บทั้ง 6 peak ไปทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่า peak ที่ 3 สามารถทำลายเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ และจากผลการศึกษาผลของเปปไทด์ peak ที่ 3 ต่อเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้อง SEM พบว่ามีกลไกการเข้าทำลายเชื้อแบคทีเรียที่บริเวณเมมเบรนโดยเกิดการแตกหรือถูกทำลายในที่สุด จากนั้นนำทั้งส่วน intact hemoglobin และ fragmented hemoglobin ไปทำการขึ้นรูปอัดเม็ดทั้งหมด 5 สูตร พบว่าสูตรที่ 2 ที่ใช้ PVP (K30) โดยใช้น้ำในการละลายมีคุณสมบัติเหมาะสมในการขึ้นรูปอัดเม็ด และสูตรที่มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อดีที่สุดคือสูตรที่ 4 เพราะมีส่วนผสมของ fragmented hemoglobin การศึกษาทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า ฮีโมโกลบินจระเข้สายพันธุ์ไทยน่าจะมีคุณสมบัติสามารถนำมาอัดเม็ด เพื่อพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพต่อไปในอนาคต

Abstract

247512

Hemoglobin is an important component of crocodile red blood cell, which shows high affinity binding to oxygen better than human hemoglobin. While hemoglobin is one of the most well characterized proteins due to its function in oxygen transport, few additional properties of hemoglobin have been described. In this study, the antibacterial activity of hemoglobin was studied and then hemoglobin tablet was prepared and studied. Finally, the antibacterial activity of tablet form was tested. The protein hemoglobin was purified by G-50 column chromatography. The disc diffusion assay was used to study antibacterial activity of intact hemoglobin and fragmented hemoglobin. Further, scanning electron microscopy (SEM) technique was used to study killing mechanism. Then the hemoglobin tablet was produced. The solubility, binder, and the hardness of tablet were studied. The purified hemoglobin showed 2 proteins bands, molecular weight of 14 and 15 kDa by SDS-PAGE. Both intact hemoglobin and fragmented hemoglobin showed antibacterial activity against 9 bacterial strains. SEM demonstrated that abnormal bacterial membrane was found when treated with hemoglobin protein. For hemoglobin tablet production, PVP k30, water, is the best composition. The variations on a common tablet design can be distinguished by both color and shape. The Crocodile hemoglobin tablets are active against nine bacterial strains (*B. pumilus, B. licheniformis, B. subtilis* TISTR 008, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis, B. megaterium, B. sphaericus, B. amylo* and *B. cereus* ATCC 1177). Even though the precise mechanism of antibacterial peptides from hemoglobin has not been known, it evidently helps to use crocodile blood for treating infectious disease.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณเงินรายได้ พ.ศ. 2554 จาก มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สารบัญ

หัวเรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย	31
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	40
บรรณานุกรม	41
ประวัติคณะผู้วิจัย	43

สารบัญรูป

ชื่อรูป	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของฮีโมโกลบิน	13
รูปที่ 2 โครงสร้างลำดับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของไลโซไซม์	14
รูปที่ 3 แสดง Molecular models ของ antimicrobial peptides ในแต่ละกลุ่ม	19
รูปที่ 4 เปรียบเทียบโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (ซ้าย) และแบคทีเรียแกรมลบ(ขวา)	21
รูปที่ 5 แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel -stave (ซ้าย) และแบบจำลอง Carpet (ขวา)	23
รูปที่ 6 แสดงลักษณะแบบจำลอง barrel-stave (ซ้าย) และแบบจำลอง toroidal pore (ขวา)	24
รูปที่ 7 Elution profile ของการแยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทยด้วย column sephadex G-50	31
รูปที่ 8 ผลการแยกบริสุทธิ์ฮีโมโกลบินโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (lane M: Maker, lane1:crude hemoglobin และ lane2:purified hemoglobin)	32
รูปที่ 9 ผลการทดสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ATCC 6633 โดยใช้ฮีโมโกลบินที่ทำเป็น fragmentated hemoglobin โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน	33
รูปที่ 10 ผลการทดสอบความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อ *Bacillus pumilus* โดยใช้ฮีโมโกลบินที่ทำเป็น fragmentated hemoglobin โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.05 M HCl ที่เวลาต่างกัน	35
รูปที่ 11 โครมาโตแกรมของ intact hemoglobin และ fragmented hemoglobin แยกด้วยเทคนิค RP-HPLC (C4 column) โดยใช้ 0.1% TFA และ 60% Acetonitrile ใน 0.1% TFA อัตราเร็ว 1ml/min	36
รูปที่ 12 ลักษณะผิวเซลล์ *B. subtilis* ATCC 6633 เมื่อบ่มกับเปปไทด์ (peak no. 3)	37
รูปที่ 13 ลักษณะของเม็ดยาแต่ละสูตรที่ทำการอัดเม็ด	39
รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมโกลบินหลังอัดเม็ดยาโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (lane M: Maker)	39

สารบัญตาราง

หัวตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 โปรตีนและเปปไทด์ต่างๆที่ทดลองทางคลินิก	16
ตารางที่ 2 แสดง antimicrobial peptide ในกลุ่ม a-helical และ β-sheet	17
ตารางที่ 3 ตัวอย่างของ Cationic antimicrobial peptides (ดัดแปลงจาก Vizioli J. and Salzet M., (2002))	18
ตารางที่ 4 ตัวอย่างของ Non-cationic antimicrobial peptides (ดัดแปลงจาก Vizioli J. and Salzet M., (2002))	19
ตารางที่ 5 เชื้อก่อโรคที่นำมาทดสอบกับฮีโมโกลบินที่แยกได้จากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย	27
ตารางที่ 6 แสดงสูตรของเม็ดยาแต่ละสูตร	30