

## การตอบสนองของโปรตีนในเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ต่อน้ำมันหอมระเหยแมงลักด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

### Proteomics Analysis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Response to American Basil (*Ocimum americanum* L.) Oil

จूरีย์ ตั้งฤทัยวานิชย์<sup>1,2</sup> สิริเพ็ญ จริเกษม<sup>3</sup> ภูษิตา วรณิสสร<sup>3</sup> นฤมล เผ่านักรบ<sup>4</sup>  
สิทธิรัชช์ รอยตระกูล<sup>4</sup> และ วิชัย โขสิตรัตนา<sup>1,2,5,\*</sup>

Juree Tuangrithaiwanich<sup>1,2</sup>, Siripen Jarikasem<sup>3</sup>, Bhusita Wannissorn<sup>3</sup>, Narumon Phaonakrop<sup>4</sup>,  
Sittiruk Roytrakul<sup>4</sup> and Wichai Kositratana<sup>1,2,5,\*</sup>

<sup>1</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>1</sup> Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

<sup>2</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/ PERDO- CHE), Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup> สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คลองหลวง ปทุมธานี 12120

<sup>3</sup> Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

<sup>4</sup> ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ คลองหลวง ปทุมธานี 12120

<sup>4</sup> Proteomics Research Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

<sup>5</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>5</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง: กรกฎาคม 2559 Received: July 2016

รับตีพิมพ์: สิงหาคม 2560 Accepted: August 2017

\* Corresponding author: agrwck@ku.ac.th

**ABSTRACT:** *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XCC) is the causative agent of the citrus canker, one of the most devastating diseases of citrus worldwide. It decreases the production and quality of citrus fruits and can spread rapidly. The American basil (*Ocimum americanum* L.) oil was found to inhibit growth of XCC. In this study, the inhibitory mechanism of basil oil against XCC was investigated. The proteomics analysis of XCC which grown in the presence of basil oil at the level of the sub-minimum inhibitory concentration (sub-MIC; 125 µg/ml) was performed. Total proteins isolated from treated *Xanthomonas citri* subsp. *citri* were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), tryptic in-gel digestion and identified by LC-MS (GeLC-MS). GeLC-MS analysis identified 8,551 proteins which are significantly differential expression, 172 of which were expressed in accordance with survival of XCC. Analysis based on STITCH database, 28 out of 172 proteins were involved in bacterial response to antibiotics. Seventeen proteins were predicted to associate with streptomycin treatment via histidine metabolism, shikimate pathway and tRNA synthesis.

**Keywords:** *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, bactericide, American basil oil, LC/ESI-MS

## บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XCC) เป็นเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่จัดเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งที่ทำให้ความเสียหายต่อการปลูกส้มทั่วโลก โรคนี้แพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วส่งผลให้ผลผลิตและคุณภาพของผลส้มโอลดลง และน้ำมันหอมระเหยแมงลัก (*Ocimum americanum* L.) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ การศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อ XCC ด้วยน้ำมันหอมระเหยแมงลัก โดยการวิเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียตอบสนองต่อน้ำมันหอมระเหยแมงลักในระดับเข้มข้น sub-MIC (sub-minimum inhibitory concentration; 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โปรตีนของแบคทีเรียหลังจากแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ In-gel digestion ด้วยเอนไซม์ทริปซิน และวิเคราะห์ด้วย LC-MS (GeLC-MS) พบว่ามีโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียที่มีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ 8,551 ชนิด โดยโปรตีน 172 ชนิด มีการแสดงออกที่สอดคล้องกับการอยู่รอดของเชื้อ XCC เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STITCH database พบว่ามีโปรตีนจำนวน 28 ชนิดจาก 172 ชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย และจำนวน 17 ชนิดที่คล้ายกับการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน ผ่านกลไกเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโนฮิสติดีน เมแทบอลิซึมของซิกิเมท และการสังเคราะห์ tRNA

**คำสำคัญ :** *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย, น้ำมันแมงลัก, LC/ESI-MS

## บทนำ

แบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* เป็นเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ของส้มโอ ซึ่งเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจเป็นผลไม้ส่งออก โดยใน

ปี 2559 มีการส่งออกถึง 18,873 ตัน คิดเป็นมูลค่า 376 ล้านบาท (Customs Department, 2016) ปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้สารประกอบทองแดง และสารปฏิชีวนะในการควบคุมโรคนี้ ส่งผลให้เชื้อเกิดความต้านทานเมื่อใช้ในระยะเวลายาว และอาจส่งผลกระทบต่อการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคของมนุษย์ (Boonwatana *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*, 2008) อีกทั้งสารดังกล่าวต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมและผลผลิต ทำให้ไม่สามารถส่งออกไปยังกลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น หรือสิงคโปร์ได้

การใช้ น้ำมันหอมระเหยเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการทดแทนการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เนื่องจากสารพิษเคมีในน้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่มีความซับซ้อนทั้งในด้านของโครงสร้างทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถช่วยลดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียได้ มีรายงานว่าน้ำมันแมงลัก (*Ocimum americanum* L.) สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (Gebrehiwot *et al.*, 2015) *Lactobacillus casei* และ *Candida albicans* (Thaweboon and Thaweboon, 2009) และจากรายงานของ Kokošková and Pavela (2005) พบว่าน้ำมันหอมระเหยแมงลักสามารถยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* เช่นเดียวกับที่พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* และควบคุมโรคแคงเกอร์ได้ดี (Tuangrithaiwanich, 2016) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาและรายงานอย่างชัดเจนถึง กลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อแบคทีเรียชนิดนี้ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ ศึกษากลไกยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ของน้ำมันหอมระเหยแมงลัก



## อุปกรณ์ และวิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างเชื้อและการสกัดโปรตีน

เลี้ยงเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* (XCC) บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขูดเก็บโคโลนีเชื้อมาเจือจางปรับความขุ่นของเชื้อด้วยอาหารเหลว NB ให้ได้ค่าความขุ่น (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.05 ผสมกับน้ำมันหอมระเหยแมงลักที่ความเข้มข้น 125 µg/ml ซึ่งเป็นระดับ sub-MIC ของน้ำมันหอมระเหยแมงลักต่อเชื้อ XCC (Tuangrithaiwanich, 2016) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 15 นาที, 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง และใช้เซลล์ที่ไม่ได้บ่มกับน้ำมันหอมระเหยแมงลักเป็นกรรมวิธีควบคุมเมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงตะกอนที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและปั่นเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้งนำมาสกัดโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์แบคทีเรียโดยทำให้เซลล์แตกด้วยไนโตรเจนเหลว นำมาละลายน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วย 10 % *trichloroacetic acid* ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลาย acetone ที่มี dithiothreitol 0.1 % (Gahlaut and Dabur, 2013)

### 2. แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำโปรตีนที่ได้จากข้างต้น มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) นำโปรตีนไปวิเคราะห์แยกขนาดตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค 12.5% SDS-PAGE ใช้ความต่างศักย์คงที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Laemmli, 1970) ตรวจสอบแถบโปรตีนที่แยกได้บนแผ่นเจลโดยการย้อมด้วย *silver nitrate* (Rabilloud, 1992) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

### 3. วิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรีย

ตัดแถบโปรตีนตัวอย่างของเชื้อตัวอย่างที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยแมงลักและไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหยที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin โดยเทคนิค in-gel digestion ตามวิธีของ Jaresitthikunchai *et al.* (2009) วิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS รุ่น HCT-Ultra PTM Discovery System, (Bruker, Germany) (GeLC-MS) นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบเชิงปริมาณด้วยโปรแกรม DeCyderMS (Johansson *et al.*, 2006; Thorsell *et al.*, 2007) จากนั้นนำข้อมูลเปปไทด์ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันเชิงปริมาณมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และทำการระบุชนิดของโปรตีนโดยกำหนดเอนไซม์ที่ใช้อยู่เป็น trypsin และใช้ฐานข้อมูล Proteobacterial ในการเปรียบเทียบ โดยใช้โปรแกรม MASCOT (Perkins *et al.*, 1999)

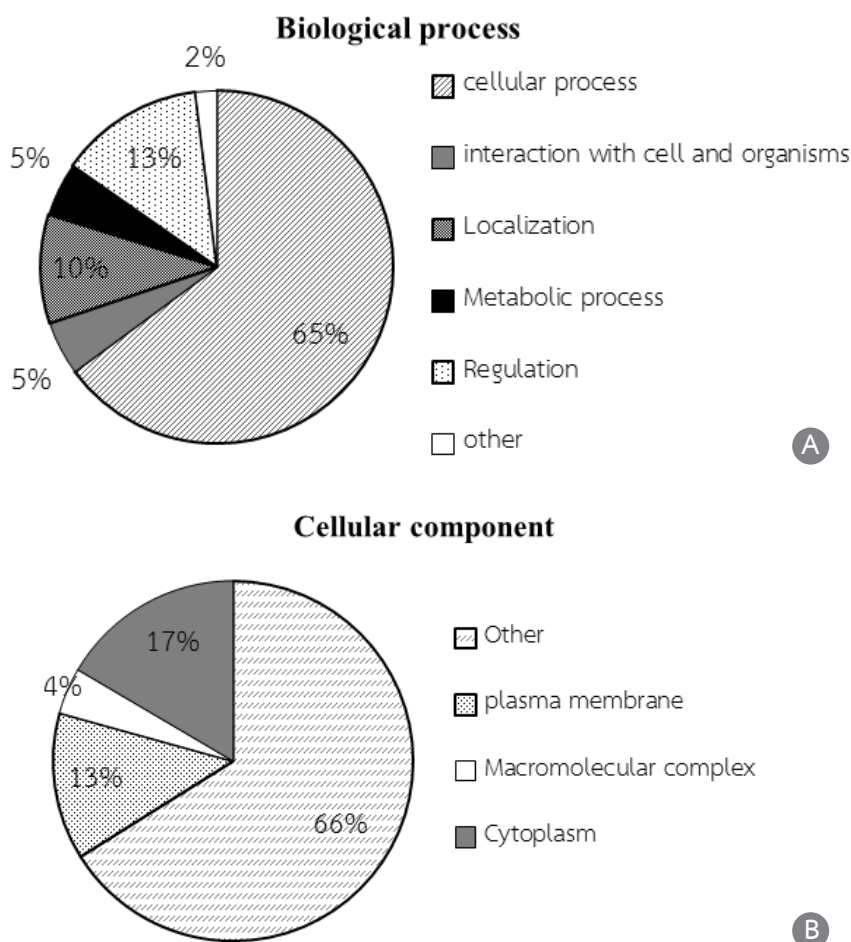
จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบค้นหาหน้าที่ของโปรตีนด้วยฐานข้อมูล NCBI และ UniProt แล้ววิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกคล้ายกับการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียเมื่อสัมผัสกับน้ำมันหอมระเหยแมงลักด้วยโปรแกรม MultiExperiment Viewer (Mev) version 4.6.1 (Howe *et al.*, 2010) ร่วมกับโปรแกรม STRAP (Software Tool for Rapid Annotation of Proteins) version 1.1.0.0 (Bhatia *et al.*, 2009) จากนั้นวิเคราะห์ความเชื่อมโยงปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของโปรตีนกับสารปฏิชีวนะโดยใช้โปรแกรม STITCH (Search Tool for Interactions of Chemicals; <http://stitch.embl.de/>)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

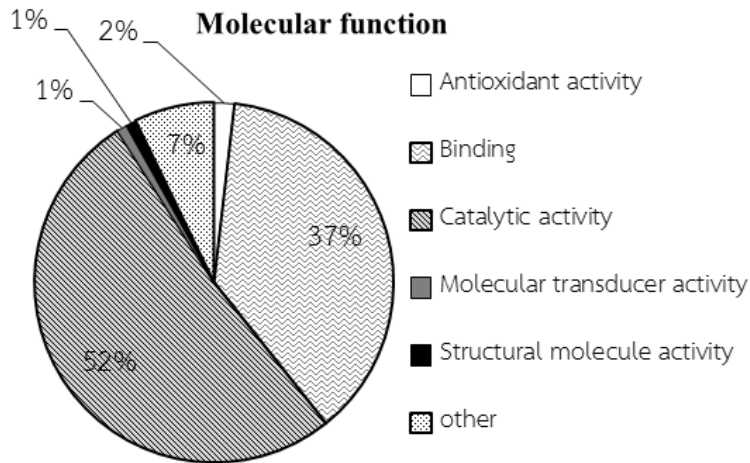
### 1. การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* เมื่อได้รับสารน้ำมันหอมระเหยแมงลัก

โปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE ย่อยด้วยเทคนิค In-gel digestion แล้ววิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS และนำข้อมูล MS/MS ที่ได้มาเปรียบเทียบปริมาณของเปปไทด์โดยโปรแกรม DeCyderMS

และนำข้อมูลเปปไทด์ที่มีการแสดงออกเชิงปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ในแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม MASCOT โดยเทียบกับกลุ่มฐานข้อมูล Proteobacteria พบว่ามีโปรตีนจำนวน 8,551 ชนิดที่มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกตัวอย่าง แบ่งเป็นโปรตีนที่ทราบชื่อและหน้าที่จำนวน 5,429 ชนิด และกลุ่ม hypothetical protein จำนวน 3,122 ชนิด



**Figure 1** The differentially expressed proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* after treatment with American basil oil (*Ocimum americanum* L.) at sub-MIC level (125  $\mu\text{g/ml}$ ) were analyzed according to their (A) biological process, (B) cellular component, (C) molecular function.



**Figure 1** The differentially expressed proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* after treatment with American basil oil (*Ocimum americanum* L.) at sub-MIC level (125 µg/ml) were analyzed according to their (A) biological process, (B) cellular component, (C) molecular function.

เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกข้อมูลโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม MeV พบว่ามีโปรตีนจำนวน 172 ชนิด มีปริมาณแสดงออกสอดคล้องกับการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียหลังจากได้รับน้ำมันหอมระเหยแมงลัก ผลการวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีน 172 ชนิด ด้วยโปรแกรม STRAP สามารถแบ่งกลุ่มโปรตีนได้ตาม biological process protein, cellular component protein และ molecular function (Figure 1)

กลุ่มของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ biological process ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโปรตีนหน้าที่ cellular process คิดเป็น 65% เช่น putative transcriptional regulator xerD, กลุ่มโปรตีนหน้าที่ regulation คิดเป็น 13% เช่น glutaredoxin histidine kinase, กลุ่มโปรตีนหน้าที่ localization คิดเป็น 10 % เช่น protein translocase subunit SecD และ inner membrane subunit, กลุ่มโปรตีนหน้าที่ metabolic process คิดเป็น 5 % เช่น Dyp-type peroxidase family, thiamine ABC transporter และกลุ่มโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์และสิ่งมีชีวิตอื่น คิดเป็น 5% เช่น invasion protein

InvA, uncharacterized protein และโปรตีนอื่นๆ คิดเป็น 2 % เช่น SufD domain protein (Figure 1A)

กลุ่มโปรตีนตาม cellular component แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มโปรตีนอื่น ๆ คิดเป็น 6% เช่น Hep\_Hag superfamily protein (Fragment), putative exported protein กลุ่มโปรตีนใน cytoplasm คิดเป็น 17% เช่น protein maf GTP cyclohydrolase 1 กลุ่มโปรตีนใน plasma membrane คิดเป็น 13% เช่น invasion protein InvA และกลุ่มโปรตีนที่เป็น macromolecular complex คิดเป็น 4% เช่น fumarate hydratase class I (Figure 1B)

กลุ่มโปรตีนตาม molecular function สามารถแบ่งเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโปรตีนที่มี catalytic activity คิดเป็น 52% เช่น nickel import ATP-binding protein Nike และ shikimate kinase กลุ่มโปรตีน binding คิดเป็น 37% เช่น histidine kinase และ pyridoxal phosphate-dependent enzyme กลุ่มโปรตีนอื่น คิดเป็น 7% เช่น glutaredoxin และ protein translocase subunit



SecD, กลุ่มโปรตีน antioxidant activity คิดเป็น 2 % เช่น heterocyclic compound binding, กลุ่มโปรตีน molecular transducer activity คิดเป็น 1 % และ กลุ่มโปรตีน structural molecule activity คิดเป็น 1% (Figure 1C)

## 2. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของเชื้อ *Xanthomonas citri* subsp. *citri* เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยแมงลัก

ผลการวิเคราะห์หน้าที่ และชนิดของโปรตีน ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยแมงลัก โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม STRAP พบว่ามีโปรตีนที่ทราบหน้าที่จำนวน 82 ชนิด เมื่อนำไปวิเคราะห์ถึงปฏิสัมพันธ์ที่เชื่อมโยงกับการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียต่อสารปฏิชีวนะด้วยโปรแกรม STITCH 4.0 โดยพบว่ามีโปรตีนจำนวน 28 ชนิดที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในเซลล์แบคทีเรียหลังสัมผัสกับสารปฏิชีวนะ และมีโปรตีนที่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ streptomycin ทั้งสิ้น 17 ชนิด (Figure 2) โดยมีการกระตุ้นผ่านเมแทบอลิซึม (metabolism) ของกรดอะมิโน histidine มีผลเชื่อมโยงต่อกลุ่ม his protein (histidinol dehydrogenase) ได้แก่ XAC1830 (histidinol-phosphate aminotransferase), hisB (histidinol phosphatase), hisI (bifunctional phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase protein) และ XAC0452 protein (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase) นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีน aroA (3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyl transferase) aroK (shikimate kinase) และ xerD (site-specific tyrosine recombinase XerD) ซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดการตัดและจับกันของโมเลกุล recombining DNA molecules และยังพบความเชื่อมโยงระหว่างโปรตีน truD protein (tRNA

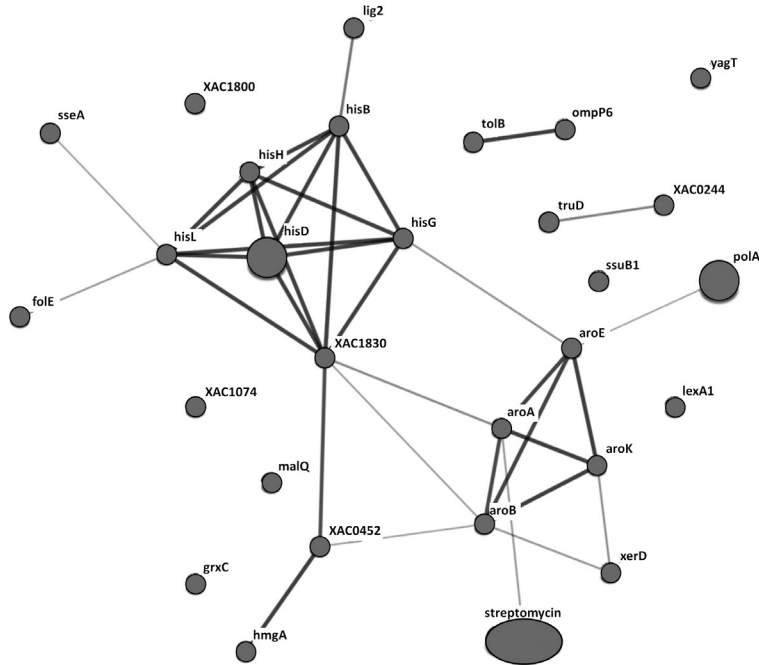
pseudouridine synthase D) และ XAC0244 (pseudouridylate synthase) ทำหน้าที่ตอบสนองในกระบวนการ pseudouridine synthase จาก uracil-13 ส่งไปยัง tRNAs (Figure 2)

ผลการทดลองสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยแมงลัก มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ด้วยกลไกคล้ายคลึงกับสารปฏิชีวนะ streptomycin ผ่านเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน histidine (Barbosa *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย และ shikimate pathway ในการสังเคราะห์ aromatic compounds ชนิดต่าง ๆ เช่น phenylalanine, tyrosine, indole, และ flavanoids ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ ribosome (Lafontaine and Tollervey, 2001) รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของโปรตีน RacA ซึ่งทำให้เกิด oxidative stress response และทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดความเครียด (Bandow *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีผลต่อโปรตีน aro ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างกรดอะมิโนโรมาติกซึ่งมีความสำคัญต่อการมีชีวิตของแบคทีเรียด้วย (Matthijs *et al.*, 2004)

น้ำมันหอมระเหยมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลชีพและสามารถออกฤทธิ์แบบกว้าง (broad spectrum) (Al-Abbasy *et al.*, 2015) โดยมีองค์ประกอบด้วยสารสำคัญ 2 กลุ่ม คือ เทอปีน (terpenes) และฟีนีลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) สารกลุ่มเทอปีนสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ โมโนเทอปีน (monoterpenes) เช่น limonene, citral, geraniol, linalool, camphor และเสสควิเทอปีน (sesquiterpenes) เช่น  $\beta$ -bisabolene,  $\beta$ -caryophyllene, fennel เป็นต้น กลุ่มฟีนีลโพรพานอยด์ ได้แก่ eugenol และ anethole ซึ่งมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์ในการฆ่าเชื้อด้วยกลไกรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ และมีรายงานถึง free fatty acids (FFAs) ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ โดยรบกวนการลำเลียงอิเล็กตรอน ปฏิกริยาฟอสโฟไรเลชัน และ

การสร้างพลังงานในเซลล์ หรือทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์แตก ตลอดจนการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์และการรับสารอาหาร ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เป็น แบบกว้างไม่เฉพาะเจาะจง (broad spectrum activity) มีความปลอดภัยสูง (Desbois and Smith,

2010) ด้วยเหตุนี้จึงเริ่มเป็นที่นิยมในการนำเอาสาร น้ำมันหอมระเหยมาใช้ควบคุมการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งในด้านการแพทย์ การเกษตร และการเก็บรักษา ถนอมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อไม่ต้องการ หรือมี การห้ามการใช้สารปฏิชีวนะในการควบคุมแบคทีเรีย



**Figure 2** STITCH 4.0 predicted the relationship between antibiotics and protein obtained from proteomics analysis including aroA (3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyl transferase), aroB (3-dehydroquinate synthase), aroE (shikimate 5-dehydrogenase), aroK (shikimate kinase), folE (GTP cyclohydrolase I), hisB (histidinol phosphatase), hisD (histidinol dehydrogenase), hisG (ATP phosphoribosyltransferase), hisH (imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH), hisI (bifunctional phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase), hmgA (homogentisate 1,2-dioxygenase), lig2 (ATP-dependent DNA ligase), polA (DNA polymerase I), sseA (thiosulfate sulfurtransferase), tolB (translocation protein), truD (tRNA pseudouridine synthase), XAC0452 (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase), XAC1830 (histidinol-phosphate aminotransferase), xerD (site-specific tyrosine recombinase), and proteins not found a relationship between protein including grxC (glutaredoxin), lexA1 (LexA repressor), malQ (4- $\alpha$ -glucanotransferase), ompP6 (outer membrane protein), ssuB1 (ABC transporter ATP-binding protein), XAC1074 (sensor histidine kinase), XAC1800 (phosphatidylglycerophosphatase B-related protein), XAC0244 (pseudouridylate synthase), yagT (putative xanthine dehydrogenase iron-sulfur-binding subunit)

## สรุป

เมื่อเชื้อ *X. citri* subsp. *citri* ได้รับความมันหอมระเหยแมงลักที่ระดับ sub-MIC (125 µg/ml) พบมีโปรตีนจำนวน 17 ชนิดที่เหมือนกับการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะ streptomycin ของแบคทีเรีย ผ่านทางเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน histidine ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ ribosome เซลล์แบคทีเรียเกิดความเครียดผ่านการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน RecA นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน aro A (3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase) aro Q, glt A และ mtl D และ การสร้าง shikimic acid เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของสารปฏิชีวนะ streptomycin อีกด้วย

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และโครงการความร่วมมือในการผลิตนักวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้ “โครงการสร้างภาคีบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก ระหว่างสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กับสถานศึกษา ประจำปี 2552”

## เอกสารอ้างอิง

- Al-Abbasy, D.W., N. Pathare, J.N. Al-Sabahi and S.A. Khan. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 5: 645–649.
- Bandow, J.E., H. Brötz, L.I.O. Leichert, H. Labischinski and M. Hecker. 2003. Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 948–955.
- Barbosa, J.G., J. Sivaraman, Y. Li, R. Larocque, A. Matte, J.D. Schrag and M. Cygler. 2002. Mechanism of action and NAD<sup>+</sup>-binding mode revealed by the crystal structure of L-histidinol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 1859–1864.
- Bhatia, V.N., D.H. Perlman, C.E. Costello and M.E. Mc Comb. 2009. Software tool for searching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. *Anal. Chem.* 81: 9819–9823.
- Boonwatana, N., W. Kositratana, N. Thaveechai and W. Daengsubha. 1992. Plasmid-mediated copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. p. 337–343. *In* Proceedings of the 30<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Plants, Bangkok, Thailand.
- Customs Department. 2017. Report of import and export statistics of harmonize code 08054000 Jan–Dec. 2016. Available Source: <http://search.customs.go.th:8090/StatSubStat2550jsp?h-scode=08054000&statType=export&productCodeCheck=Y&countryCheck=null&country=&month=12&year=2559>, 3 March 2017.



- Desbois, A.P. and V.J. Smith. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1629–1642.
- Gahlaut, A. and R. Dabur. 2013. Proteomic analysis of *Escherichia coli* in response to catechins rich fraction. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6: 784–787.
- Gebrehiwot, H., R.K. Bachetti and A. Dekebo. 2015. Chemical composition and antimicrobial activities of leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) herb. *Int. J. Basic. Clin. Pharmacol.* 4: 869–875.
- Howe, E., K. Holton, S. Nair, D. Schlauch, R. Sinha and J. Quackenbush. 2010. MeV: MultiExperiment Viewer. p. 267–277. *In* M.F. Ochs *et al.* (eds.), *Biomedical Informatics for Cancer Research*. Springer Science, USA.
- Jaresitthikunchai, J., N. Phaonakrop, S. Kittisenachai and S. Roytrakul. 2009. Rapid in-gel digestion protocol for protein identification by peptide mass fingerprint, p. 29. *In* Proceeding of The 2<sup>nd</sup> Biochemistry and Molecular Biology Conference: Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development. Khon Kaen, Thailand.
- Johansson, C., J. Samskog, L. Sundstrom, H. Wadensten, L. Bjorkesten and J. Flensburg. 2006. Differential expression analysis of *Escherichia coli* proteins using novel software for relative quantitation of LC–MS/MS data. *Proteomics* 6: 4475–4485.
- Kokošková, B. and R. Pavela. 2005. Effectivity of essential oils against *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, the causal agent of bacterial blight on geranium, p. 77–81. *In* Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases. Darmstadt, Germany.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lafontaine, D.L. and D. Tollervey. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 514–520.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Matthijs, S., C. Baysse, N. Koedam, K.A. Tehrani, L. Verheyden, H. Budzikiewicz, M. Schäfer, B. Hoorelbeke, J.M. Meyer, H.D. Greve and P. Cornelis. 2004. The *Pseudomonas* siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an intermediate of the kynurenine pathway. *Mol. Microbiol.* 52: 371–384.
- Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy and J.S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551–3567.
- Rabilloud, T. 1992. A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis* 13: 429–439.

- Teixeira, E.C., J.C. Franco de Oliveira, M.T. Marques Novo and M.C. Bertolini. 2008. The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. *Microbiology* 154: 402–412.
- Thaweboon, S. and B. Thaweboon. 2009. *In vitro* antimicrobial activity of *Ocimum americanum* L. essential oil against oral microorganisms. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 40: 1025–1033.
- Thorsell, A., E. Portelius, K. Blennow and B.A. Westman. 2007. Evaluation of sample fractionation using microscale liquid–phase isoelectric focusing on mass spectrometric identification and quantitation of proteins in a SILAC experiment. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 771–778.
- Tungrithaiwanich, J. 2016. Antibacterial activity of crude herbal extracts and mechanisms against bacterial canker pathogen in pomelo (*Citrus maxima* Merr.) M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.