บทคัดย่อ

เล็กตินเป็นสารโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีความจำเพาะคล้ายแอนติบอดีที่สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์แต่เป็นสารที่ได้จากแหล่งผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน จากที่ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ด (ดอกเห็ด) จำนวน 330 ตัวอย่าง ทั้งที่เจริญในธรรมชาติและที่จำหน่ายในตลาดชุมชน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และเชื้อราบริสุทธิ์ในกลุ่ม Polypores และในวงศ์ Xylariaccae ที่ได้แยกและเพาะเลี้ยงเส้นใย จำนวน 19 และ 59 ไอโซเลท ตามลำดับ มาสกัดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดและเส้นใยของเชื้อรา ตรวจหาสารเล็กตินด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (เลือดหมู่ เอ บี และโอ) และสัตว์ (กระต่าย แกะ ห่าน หนูตะเภา หนูเม้าส์ และหนูแรท) พบว่าประมาณร้อยละ 60 และ 70 ของสารสกัดเล็กตินจากดอกเห็ดและเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ตามลำดับ มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ (กระต่ายและหนูแรท) ได้ดี มีปฏิกิริยาน้อยถึงไม่เกิดเลยกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดอื่นและของคน เชื้อราที่พบว่าสะสมสารเล็กตินในปริมาณสูงมีหลายชนิดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Lycoperdon*, *Macrolepiota*, *Marasmius*, *Russula*, *Schizophyllum*, *Termitomyces*, *Volvariella*, *Hypoxylon* และ *Xylaria* เห็ดหลายชนิดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus, Lentinus*, *Russula*, *Termitomyces* และ *Volvariella* เป็นเห็ดรับประทานได้ เมื่อคัดเลือกสารสกัดหยาบจากเห็ดจำนวน 78 ตัวอย่าง และราในกลุ่ม Xylariaceae จำนวน 25 ตัวอย่าง ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่ามีเพียงสารสกัดจากเห็ด *Lycoperdon* sp. ML062 และ *Termitomyces microcarpus* ML057 ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ในระดับต่ำ (ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้ง >1:10) และเมื่อนำสารสกัดเล็กตินเหล่านั้นไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคนที่เพาะเลี้ยง พบว่าสารเล็กตินจากเห็ดและรา 15 ตัวอย่าง มีผลต้านทานเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดี สารสกัดส่วนใหญ่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทนความร้อนถึง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อทดลองผลิตสารเล็กตินโดยเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกในอาหารเหลว พบผลผลิตสารในปริมาณต่ำมาก จึงศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินในเบื้องต้นเพื่อพัฒนาสิ่งมีชีวิตที่ใช้ผลิตสารต่อไปโดยเริ่มศึกษาสมบัติและลำดับกรดแอมิโนของสารเล็กติน ได้เลือกศึกษาสารเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078 ซึ่งเป็นเห็ดรับประทานได้ พบว่าเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ด ML078 เป็นสารไกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 31.5 กิโลดาลตัน มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแล็กโทส เสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 3-10 ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ จากการหาลำดับกรดแอมิโนของ N-terminus ของสารเล็กตินบริสุทธิ์ พบว่าสารไกลโคโปรตีนนี้มี Blocked N-terminus จึงได้หาลำดับกรดแอมิโนบางส่วนภายในเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซิน พร้อมกันนี้ได้ศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินโดยอาศัยแนวทางตามที่มีรายงาน

บทคัดย่อ

เล็กตินเป็นสารโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีความจำเพาะคล้ายแอนติบอดีที่สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์แต่เป็นสารที่ได้จากแหล่งผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน จากที่ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ด (ดอกเห็ด) จำนวน 330 ตัวอย่าง ทั้งที่เจริญในธรรมชาติและที่จำหน่ายในตลาดชุมชน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และเชื้อราบริสุทธิ์ในกลุ่ม Polypores และในวงศ์ Xylariaceae ที่ได้แยกและเพาะเลี้ยงเส้นใย จำนวน 19 และ 59 ไอโซเลท ตามลำดับ มาสกัดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดและเส้นใยของเชื้อรา ตรวจหาสารเล็กตินด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (เลือดหมู่ เอ บี และโอ) และสัตว์ (กระต่าย แกะ ห่าน หนูตะเภา หนูเม้าส์ และหนูแรท) พบว่าประมาณร้อยละ 60 และ 70 ของสารสกัดเล็กตินจากดอกเห็ดและเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ตามลำดับ มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ (กระต่ายและหนูแรท) ได้ดี มีปฏิกิริยาน้อยถึงไม่เกิดเลยกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดอื่นและของคน เชื้อราที่พบว่าสะสมสารเล็กตินในปริมาณสูงมีหลายชนิดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Lycoperdon*, *Macrolepiota*, *Marasmius*, *Russula*, *Schizophyllum*, *Termitomyces*, *Volvariella*, *Hypoxylon* และ *Xylaria* เห็ดหลายชนิดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus, Lentinus*, *Russula*, *Termitomyces* และ *Volvariella* เป็นเห็ดรับประทานได้ เมื่อคัดเลือกสารสกัดหยาบจากเห็ดจำนวน 78 ตัวอย่าง และราในกลุ่ม Xylariaceae จำนวน 25 ตัวอย่าง ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่ามีเพียงสารสกัดจากเห็ด *Lycoperdon* sp. ML062 และ *Termitomyces microcarpus* ML057 ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ในระดับต่ำ (ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้ง >1:10) และเมื่อนำสารสกัดเล็กตินเหล่านั้นไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคนที่เพาะเลี้ยง พบว่าสารเล็กตินจากเห็ดและรา 15 ตัวอย่าง มีผลต้านทานเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดี สารสกัดส่วนใหญ่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทนความร้อนถึง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อทดลองผลิตสารเล็กตินโดยเพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกในอาหารเหลว พบผลผลิตสารในปริมาณต่ำมาก จึงศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินในเบื้องต้นเพื่อพัฒนาสิ่งมีชีวิตที่ใช้ผลิตสารต่อไปโดยเริ่มศึกษาสมบัติและลำดับกรดแอมิโนของสารเล็กติน ได้เลือกศึกษาสารเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078 ซึ่งเป็นเห็ดรับประทานได้ พบว่าเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ด ML078 เป็นสารไกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 31.5 กิโลดาลตัน มีความจำเพาะต่อน้ำตาลกาแล็กโทส เสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 3-10 ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ จากการหาลำดับกรดแอมิโนของ N-terminus ของสารเล็กตินบริสุทธิ์ พบว่าสารไกลโคโปรตีนนี้มี Blocked N-terminus จึงได้หาลำดับกรดแอมิโนบางส่วนภายในเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยทริปซิน พร้อมกันนี้ได้ศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินโดยอาศัยแนวทางตามที่มีรายงาน

การศึกษาเชื้อรากลุ่มใกล้เคียงกับเชื้อราที่คัดเลือก ซึ่งได้ผลผลิตดีเอ็นเอจากวิธีการเพิ่มจำนวนจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินจากเชื้อราที่คัดเลือก 2 ไอโซเลท ในสกุล *Amanita* และ *Russula* จึงได้เลือกเตรียมโคลนของผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้ไว้ในเวกเตอร์พลาสมิดเพื่อการศึกษาต่อไป กล่าวโดยสรุปได้ว่าโครงการวิจัยนี้มีผลสำเร็จที่ได้ชนิดของเชื้อราและสารเล็กตินจากเชื้อรา จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาในเชิงลึกเพื่อระบุชนิดของเชื้อราที่คัดเลือกและยังไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐาน ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเล็กติน และจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินเพื่อพัฒนากรรมวิธีการผลิตสารต่อไป

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin, and able to agglutinate cells. A total of 330 macro-fungus specimens (fruiting bodies) were collected from their natural habitats and local markets, particularly in the Northeastern Thailand. Accumulations of lectins in crude extracts from fruiting bodies of these mushroom specimens and from mycelia of 19 and 59 fungal isolates in polypores group and in the family Xylariaceae respectively, were detected by hemagglutination assay using human (A, B, and O blood groups) and animal (goose, guinea pig, mouse, rabbit, rat and sheep) red blood cells. Approximately 60 and 70% of the extracts from fruiting bodies and mycelia respectively, were found to predominantly perform hemagglutinating for animal red blood cells, especially rabbit and rat. Very low levels of the agglutination reaction against other animal and human red blood cells were detected. The high incidence of lectin accumulations was observed in fungal specimens belonging to genera *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Lycoperdon*, *Macrolepiota*, *Marasmius*, *Russula*, *Schizophyllum*, *Termitomyces*, *Volvariella*, *Hypoxylon* and *Xylaria*. Several fungal species in the genera *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Russula*, *Termitomyces*, and *Volvariella* were edible mushrooms. Then crude extracts of 78 mushrooms and 25 xylariaceous fungi were selected and tested for antimicrobial activity. It was found that only mushroom extracts from *Lycoperdon* sp. ML062 and *Termitomyces microcarpus* ML057 had their weak activity (minimum inhibitory concentration, MIC >1:10) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). These selected extracts were also submitted to cytotoxicity test against human cancer cell lines. Fifteen extracts displayed their efficiently cytotoxic activity against epidermoid carcinoma (KB) and human cervical carcinoma (HeLa) cell lines. These crude lectin extracts were stable at both 4 and 30°C for 24 hours, and most of the extracts were stable at 65°C for 30 minutes. When the experiments for lectin production were performed by culturing some selected fungal isolates in a liquid medium, very low concentrations of lectins were detected. The preliminary investigation of gene(s) encoding for

lectins was, then, carried out for further development of organisms used for lectin production. Both determination of amino acid sequences of the interested lectins and amplification of gene(s) involving lectin production from genomic DNA were focused. The edible mushroom *Schizophyllum commune* ML078 was selected for a detailed study of its lectin including N-terminal amino acid sequence. The ML078 lectin was purified. The purified lectin was proven to be a glycoprotein, had molecular weight of 31.5 kDa, and showed specificity towards galactose. The lectin was stable at 55°C for 30 minutes and also at pH 3-10 for 18-hour test. The *Schizophyllum* lectin had a blocked N-terminus. Some internal amino acid sequences were, then, analyzed from tryptic digests. Concurrently, the amplification of gene(s) involving lectin production reported from closely related fungal species, was performed. DNA amplification products from two selected fugal species in genera *Amanita* and *Russula* were successfully achieved. The amplified products were then cloned into plasmid vector for further investigation. In conclusion, specific species of lectin-producing fungi and their lectins having promising properties for application, were successfully found in this study. Some fungal species that could not be identified by their morphological characteristics, should be further studied in details. Chemical structures of the selected lectins and gene(s) encoding for lectins which will be very useful for the development of lectin production process, should also be further investigated.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี