รหัสโครงการ SUT 1-104-46-24-08

รายงานการวิจัย

เล็กตินของเชื้อรา

(Fungal Lectins)

โครงการวิจัยภายใต้ชุดโครงการ

การศึกษาวิจัยการผลิตโปรตีน (Protein Production Research)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 1-104-46-24-08

รายงานการวิจัย

เล็กตินของเชื้อรา

(Fungal Lectins)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2546-2547

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน พ.ศ. 2551

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย "เล็กตินของเชื้อรา" เป็นโครงการภายใต้ชุดโครงการ "การศึกษาวิจัยการผลิตโปรตีน" ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณที่เป็นค่าใช้จ่าย เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด ผู้อำนวยการแผนงานวิจัยของชุดโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ ผู้ประสานงานและผู้วางแผนของชุดโครงการ และขอขอบคุณ Professor Dr. Colin D. Reynolds, School of Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, England ที่ปรึกษาของโครงการวิจัย Professor Roy Watling, Royal Botanic Garden Edinburgh/Caledonian Mycological Enterprises, Scotland ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบผลการระบุชนิดของเห็ดป่า แม่ชีราตรี ตุรงควัธน์ และคณะ สำนักปฏิบัติธรรมเขาภูหลวง อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อราที่เจริญในพื้นที่ธรรมชาติบริเวณเขาภูหลวง ดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้ ที่ให้ความร่วมมือศึกษาเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes (วงศ์ Xylariaceae) รองศาสตราจารย์ ดร. นิวัฒ เสนาะเมือง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความร่วมมือศึกษาเชื้อราในกลุ่ม Polypores ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ หัวหน้างานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้ความร่วมมือในการทดสอบฤทธิ์ของสารเล็กตินในการต้านเซลล์มะเร็ง รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบฤทธิ์ของสารเล็กตินที่มีต่อจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม ศูนย์บริการโลหิตสภากาชาดไทย จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดแดงของคน โครงการวิจัยนี้มีนางสาวยุบล พิกุลเงิน เป็นผู้ช่วยนักวิจัย และนางสาวพจนา ชุ่มขุนทด นักศึกษาช่วยงานวิจัย ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ..... จ
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญภาพ..... ซ
สารบัญตารางผนวก..... ญ
สารบัญภาพผนวก..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 4
1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย..... 4
1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย..... 14
2.1.1 ครุภัณฑ์..... 14
2.1.2 วัสดุ..... 15
2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 16
2.2.1 การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตสารเล็กติน..... 16
2.2.2 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะพื้นฐานของสารเล็กตินที่พบ..... 19
2.2.3 การทดลองผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อราชนิดที่สามารถแยกได้เชื้อบริสุทธิ์..... 20
2.2.4 การศึกษาเพื่อการโคลนจีนที่เกี่ยวข้องการผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อรา/เห็ด ที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้น..... 20
บทที่ 3 ผลการวิจัย
3.1 การรวบรวมและวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราตามลักษณะทางสัณฐาน..... 27
3.2 การแยกและเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์..... 27
3.3 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตสารเล็กติน..... 35

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.1 การสกัด/แยกสารเล็กตินในลักษณะสารสกัดหยาบ..... 35
3.3.2 การทดสอบสมบัติของสารเล็กตินในสารสกัดหยาบด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่ม ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์..... 36
3.3.3 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตหรือที่พบการสะสมของเล็กติน..... 41
3.4 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะพื้นฐานของสารเล็กตินที่พบ..... 44
3.4.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์..... 44
3.4.2 ความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน..... 44
3.4.3 ความเสถียรต่อความร้อน..... 49
3.5 การทดลองผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อราชนิดที่สามารถแยกได้เชื้อบริสุทธิ์..... 53
3.6 การศึกษาเพื่อการโคลนจีนที่เกี่ยวข้องการผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อรา/เห็ดที่ คัดเลือกได้ในเบื้องต้น..... 56
3.6.1 การศึกษาสมบัติและลำดับกรดแอมิโนของสารโปรตีนเล็กตินจากเชื้อรา ชนิดที่คัดเลือก..... 56
3.6.2 การศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน..... 64
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัย..... 67
ข้อเสนอแนะ..... 72
บรรณานุกรม..... 73
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สารละลายและน้ำยาเคมี..... 81
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์..... 86
ภาคผนวก ค รูปผนวก..... 88
ภาคผนวก ง ตารางผนวก..... 124
ประวัติผู้วิจัย..... 142
เอกสารแนบ..... 145

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 Oligonucleotide primers ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน..... 26
ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างของเชื้อราในกลุ่มเห็ดที่รวบรวมเพื่อศึกษาการผลิต/สะสมสารเล็กติน..... 28
ตารางที่ 3.2 ผลการระบุชนิดของเชื้อราที่เก็บรวบรวมและ/หรือแยกได้จากแหล่งธรรมชาติและนำมาทดสอบการสะสมสารเล็กตินในโครงสร้าง..... 29
ตารางที่ 3.3 ค่าความชื้นของตัวอย่างแห้งที่ใช้สกัดเล็กติน..... 36
ตารางที่ 3.4 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจากราในกลุ่ม Polypores ทั้งที่สกัดจากเส้นใย และอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ..... 40
ตารางที่ 3.5 ตัวอย่างของผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดจากดอกเห็ดในกลุ่ม Red russula เมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดต่างๆ..... 42
ตารางที่ 3.6 ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก fruiting body ของเห็ดบางชนิดต่อเซลล์มะเร็งของคน 2 ชนิด ด้วยวิธี MTT colorimetric assay 46
ตารางที่ 3.7 ตัวอย่างฤทธิ์ของเล็กตินที่ผลิตจากเชื้อราบางชนิด ที่มีผลต้านเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบ และมีความเสถียรต่อความร้อนในระดับต่างๆ กัน..... 52
ตารางที่ 3.8 ตารางเปรียบเทียบผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจากดอกเห็ด เส้นใย และสารเล็กตินในอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเส้นใยเห็ด..... 55
ตารางที่ 3.9 ผลการทดสอบ hemagglutination ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ของ *Schizophyllum commune* lectin ML078..... 59
ตารางที่ 3.10 Hemagglutination ของ *Schizophyllum commune* lectin (16 HA units) เมื่อทดสอบความจำเพาะกับน้ำตาล..... 61
ตารางที่ 3.11 ชนิดของเชื้อราและผลการเพิ่มจำนวน DNA จาก genomic DNA ด้วย primers สำหรับศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินของเชื้อรา..... 65

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 3.1 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้บนอาหารวุ้น Potato dextrose agar และใน Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน..... 32

รูปที่ 3.2 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่ม Polypores ที่เจริญบนอาหาร Potato dextrose agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน..... 33

รูปที่ 3.3 ตัวอย่างเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae แสดงลักษณะทางสัณฐานของ stroma ที่เจริญในธรรมชาติ และเส้นใยที่เจริญบน Malt extract agar 34

รูปที่ 3.4 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราในกลุ่ม Xylariaceae เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Malt extract agar และในอาหาร Malt extract broth เป็นเวลา 14 วัน..... 35

รูปที่ 3.5 ตัวอย่างผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดหยาบของเล็กตินจากเชื้อรา เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์..... 38

รูปที่ 3.6 สัดส่วนของสารสกัดจากเห็ดจากจำนวน 86 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ hemagglutination reaction เมื่อทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์..... 39

รูปที่ 3.7 เห็ดในกลุ่ม Red russula ที่พบการสะสมสารเล็กตินในดอกเห็ด ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกัน แต่มีลักษณะของ basidiospore ที่แตกต่างกันเมื่อศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด..... 43

รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงของคนชนิด Human epidermoid carcinoma (KB) และ Human cervical carcinoma (HeLa) ที่เจริญเป็นปกติและถูกยับยั้ง/ทำลายด้วยสารสกัดเล็กติน..... 45

รูปที่ 3.9 รูปร่างและโครงสร้างของเห็ดที่ให้สารสกัดเล็กตินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa..... 47

รูปที่ 3.10 SDS-PAGE ของสารสกัดจาก fruiting body ของเชื้อราที่มีสมบัติของเล็กติน..... 50

รูปที่ 3.11 ตัวอย่างความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดเล็กตินจากดอกเห็ดและเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae..... 51

รูปที่ 3.12 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ ที่คัดเลือกเพื่อผลิตสารเล็กตินในอาหาร Malt extract broth ในสภาพที่ไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน..... 54

รูปที่ 3.13 สารสกัดเล็กตินในส่วน fractions จากเห็ด *Schizophyllum commune* ML078 ที่ผ่าน Mucin-Sepharose affinity chromatograph..... 58

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.14 SDS-PAGE ของเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078..... 60
รูปที่ 3.15 การวิเคราะห์ Schiff's periodic ของเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์..... 62
รูปที่ 3.16 ความเสถียรต่อความร้อนและ pH ของเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078..... 63
รูปที่ 3.17 Peptide sequences ของสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่สกัดจาก fruiting body ของ *Schizophyllum commune* ML078 จากการย่อยด้วย Trypsin..... 64
รูปที่ 3.18 Agarose gel electrophoresis ของผลผลิตจากการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อรา สายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วย PCR primers ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเล็กติน..... 66

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตารางผนวก

หน้า

ตารางผนวกที่ 1 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเชื้อราในกลุ่มเห็ดเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์.....124

ตารางผนวกที่ 2 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae เมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์..... 131

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบ (crude extract) ของเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae และดอกเห็ด..... 133

ตารางผนวกที่ 4 ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของสารสกัดหยาบจาก fruiting body ของเห็ดบางชนิดต่อเซลล์มะเร็งของคน 2 ชนิด ด้วยวิธี MTT colorimetric assay.....136

ตารางผนวกที่ 5 การทดสอบความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae และจาก fruiting body ของเห็ด.....140

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพผนวก

หน้า

รูปผนวกที่ 1 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Agaricaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 88

รูปผนวกที่ 2 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Amanitaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 92

รูปผนวกที่ 3 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Auriculariaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 95

รูปผนวกที่ 4 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Coprinaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 95

รูปผนวกที่ 5 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Boletaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 96

รูปผนวกที่ 6 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Boletinellaeae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 99

รูปผนวกที่ 7 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Cantharellaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 100

รูปผนวกที่ 8 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Entolomataceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 102

รูปผนวกที่ 9 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Lycoperdaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 103

รูปผนวกที่ 10 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Pluteaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 104

รูปผนวกที่ 11 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Polyporaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 105

รูปผนวกที่ 12 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Peniophoraceae และ Cariolaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 105

รูปผนวกที่ 13 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Pleurotaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 106

รูปผนวกที่ 14 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Ramariaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 107

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพผนวก (ต่อ)

หน้า

รูปผนวกที่ 15 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 108
รูปผนวกที่ 16 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Schizophyllaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 116
รูปผนวกที่ 17 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 117
รูปผนวกที่ 18 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 118
รูปผนวกที่ 19 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 120
รูปผนวกที่ 20 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Phallaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน..... 123

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เล็กติน (Lectins) เป็นสาร Proteins หรือ Glycoproteins หรือ Multivalent carbohydrate binding proteins ที่มีความจำเพาะที่เรียกได้ว่ามี antibody-like carbohydrate binding specificity ซึ่งสามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์ (cell agglutination) และการตกตะกอน (precipitation) ของ Glycoconjugated lectins (Guillot and Konska, 1997; Mo *et al.*, 2000; Oguri *et al.*, 1996; Pemberton, 1994; Weis and Drickamer, 1996) เล็กตินเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา พืช และสัตว์ (Mo *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2000) และใช้ประโยชน์ทั้งทางเภสัชวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน การแพทย์ และการเกษตร ในปัจจุบันเล็กตินจัดเป็นสารชีวภาพที่มีความต้องการในการใช้ประโยชน์มากขึ้น ซึ่งแหล่งของเล็กตินที่มีการศึกษาในเชิงลึกและนำมาใช้ประโยชน์คือพืช และมีการศึกษาในสัตว์ รวมทั้งมีรายงานการพบสารกลุ่มดังกล่าวในจุลินทรีย์บางชนิดในกลุ่มแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส แต่ยังไม่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายและในเชิงลึกเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในพืชและสัตว์

เล็กตินจากพืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปโปรตีนสะสม (Storage protein) ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันแมลง หรือเชื้อราที่มาทำลายต้นหรือเมล็ดพืช เล็กตินในพืชตระกูลถั่วบางชนิด มีประโยชน์ต่อการอยู่ร่วมกันแบบ symbiosis ระหว่างพืชกับแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ (Nitrogen-fixing bacteria) β-Galactoside specific lectins จากสัตว์มีบทบาทในการควบคุม differentiation และการสร้างอวัยวะต่างๆ *N*-Acetylglucosamine-specific lectins จาก Macrophage มีความสามารถจับและทำให้เกิด phagocytosis ของจุลินทรีย์แปลกปลอมที่บุกรุกเข้าร่างกาย นอกจากนี้เล็กตินยังมีบทบาทในการเคลื่อนย้าย (migration) ของ Lymphocytes ในเส้นเลือดไปสู่ Lymphoid organ และบทบาทใน metastasis ของเซลล์มะเร็ง (Reynolds *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998b)

เชื้อรา (Fungi) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ได้รับความสนใจในการศึกษาถึงความสามารถในการผลิตเล็กตินโดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ด (Mushroom) ซึ่งเป็นเชื้อราชั้นสูงที่มีขนาดใหญ่ (Macro-fungi) เนื่องจากมองเห็นบางโครงสร้างได้ด้วยตาเปล่า เห็ดหลายชนิดรับประทานได้ และจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เห็ดหลายชนิดมีสรรพคุณทางยา งานวิจัยจากประเทศจีนและญี่ปุ่นแสดงให้เห็นชัดเจนว่าเห็ดมีประโยชน์ในการใช้เป็นยารักษาโรค มีผลในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคที่เกิดจากไวรัส โรคความดันโลหิตสูง โรคคอเลสเตอรอลในเลือดสูง และสามารถช่วยป้องกันการจับตัวของเกล็ดเลือด (Wang *et al.*, 1998b; Yu *et al.*, 1999) Reynolds *et al.* (2000) รายงานเกี่ยวกับเล็กตินที่พบในเชื้อราในกลุ่มเห็ด ที่พบมากได้แก่เห็ดบางชนิดในสกุล (genus) *Lactarius*, *Russula*,

Boletus, *Phallus* และกลุ่ม Hygrophoraceae เป็นต้น ได้มีการสันนิษฐานกันว่าเล็กตินที่พบอาจมีบทบาททางด้านสรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของเห็ดราเหล่านั้น เห็ด Hygrophoraceae และ Strophariaceae หลายสกุล ได้แก่ *Amanita*, *Mycena*, *Oudemansiella* และ *Agrocybe* ที่พบผลิตเล็กติน สารโปรตีนเล็กตินที่พบยังมีสมบัติทำให้เกิดการสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง (haemolysis) ที่เรียกได้ว่าเป็นสาร Hemolysin เห็ดบางชนิดสามารถผลิตเล็กตินได้หลายอนุพันธ์ (Lectin derivatives) ที่มีสมบัติใกล้เคียงกันมาก อาจแตกต่างกันเพียง isoelectic point จึงเรียกว่าเป็น Isolectins หรืออาจมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน เช่น Lectins PCL-a, PCL-b และ PCL-c จากเห็ด *Pleurotus cornucopiae* นอกจากนี้ Lectin derivatives ที่สกัดได้จากเห็ดตัวอย่างหรือชนิดเดียวกันอาจแสดงสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น เล็กตินที่แยกได้จาก *Laccaria amethystea* ที่ให้ชื่อว่า Lectin LAF สามารถจับกับ L-Fucose ขณะที่ Lectin LAL ถูกยับยั้งโดย Lactose ในกรณีนี้เล็กตินทั้งสองมีความสัมพันธ์กันด้านโครงสร้างแม้ว่าจะมีความจำเพาะที่ต่างกัน (Guillot and Konska, 1997)

เล็กตินเป็นสารที่พบได้ในดอกเห็ด (fruiting body) ทั้งบริเวณก้านดอก (stalk/carpophores) และหมวก (cap) และเส้นใย (mycelium) ของเห็ด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด จากที่มีการศึกษาโดยใช้เอนไซม์และ Lectin rabbit antibody พบว่าบริเวณผนังเส้นใยมีการสะสมของเล็กตินในปริมาณสูง ปริมาณของเล็กตินที่พบในเห็ดยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดของเห็ด อายุของเห็ด ฤดูกาลที่เก็บ และสถานที่ที่เกิด (มีการเจริญ) ของเห็ดนั้นๆ (Guillot and Konska, 1997) จึงกล่าวได้ว่าเล็กตินมีบทบาทโดยตรงทางสรีรวิทยาต่อความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดราหรือเชื้อรากับสิ่งแวดล้อม โดยอาจจะเกี่ยวข้องกับการเจริญและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเชื้อรา เกี่ยวข้องกับการพักตัว และการสร้างโครงสร้างพิเศษต่างๆ เช่น mycelium, rhizoid เป็นต้น ซึ่งเอื้ออำนวยต่อการเป็น parasite ของเชื้อรา และการย่อยเศษไม้ที่เน่าเปื่อย เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเล็กตินเกี่ยวข้องกับการจดจำ (recognition) ด้านความจำเพาะกับพืชที่เกิดขึ้นในช่วงแรกของ mycorrhization เนื่องจากว่าเชื้อราในกลุ่ม Mycorrhizal fungus แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับ host คือพืชที่เชื้อรานั้นๆ เจริญอยู่ด้วย ดังนั้นการที่เชื้อราสร้างเล็กตินต่างชนิดกัน ทำให้สามารถจดจำ host ที่แตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตามในธรรมชาติอาจมีโมเลกุลของสารบางชนิดในดินที่มีความจำเพาะกับเล็กตินจากเชื้อรา และในขณะเดียวกันก็สามารถจับกับ binding site ของ host ทำให้เล็กตินไม่สามารถเข้าจับได้อีก จึงไม่เกิดการจดจำ เช่น สารประกอบในกลุ่ม Phenolic acid ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลง receptor ที่บริเวณรากของต้นไม้ที่เป็นพืชอาศัย (host tree) ได้ (Guillot and Konska, 1997; Reynolds *et al.*, 2000)

จากรายงานการศึกษาสมบัติของเล็กตินในปัจจุบัน พบว่าเล็กตินจากเห็ดส่วนใหญ่มีสมบัติที่สำคัญในการต้านทานมะเร็งซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโรค (Mo *et al.*, 2000) ตัวอย่างเช่น เล็กตินจากเห็ดชนิด *Volvariella volvacea* แสดงสมบัติ antitumor ต่อ Sarcoma S-180 cells *Grifola frondosa* lectin เป็นพิษต่อ HeLa cells สารเล็กตินจาก *Agaricus biporus* มี antiproliferation activities ต่อเซลล์มะเร็งในลำไส้ของคน (Human colon cancer cell line HT29) และ

เซลล์มะเร็งเต้านม (Breast cancer cell line MCF-7) และสารเล็กตินจาก *Trichoderma mongolicum* นอกจากจะสามารถยับยั้ง Mastocytoma D815 cells แล้ว ยังสามารถต้านทานต่อ Sarcoma S-180 cells ในหนูได้อีกด้วย นอกจากนี้มีการค้นพบ Clitocypin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเล็กติน (Lectin derivatives) จากเห็ด *Clitocybe nebularis* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Cysteine proteinase inhibitor เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาทางการแพทย์ (Brzin *et al.*, 2000)

เห็นได้ว่ามีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับเล็กตินจากเชื้อรามากขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยในสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ยังมีน้อยมากเมื่อเทียบกับที่ได้มีรายงานการศึกษาเล็กตินจากพืชและสัตว์ และเนื่องจากเชื้อราในกลุ่มเห็ดในประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงเป็นผลดีต่อการศึกษาค้นคว้า และวิจัยเกี่ยวกับเล็กตินจากเชื้อราที่พบในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดป่า ซึ่งมีแนวโน้มการนำไปสู่การค้นพบเล็กติน/หรืออนุพันธ์ของเล็กตินชนิดใหม่ที่อาจมีสมบัติและประโยชน์ที่แตกต่างจากที่มีรายงาน นอกจากนี้การศึกษาจีน (gene/s) ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินจากเชื้อรายังเป็นแนวทางสู่การพัฒนาการผลิตเล็กตินในปริมาณมากได้ต่อไป

การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเล็กตินที่พบในเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดป่าที่รับประทานได้ในประเทศไทย และเน้นในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ศึกษาชนิดของเชื้อราที่สามารถสร้างเล็กติน สมบัติพื้นฐานของเล็กตินที่พบเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์ต่อไป ศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินชนิดเด่นที่พบในเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การสร้าง cDNA library และ DNA cloning เพื่อการผลิตเล็กตินซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตเล็กตินต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัยโครงการนี้มีดังนี้

1) เพื่อคัดเลือกและให้ได้ชนิดของเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดป่าที่เจริญในประเทศไทย (เน้นพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ที่มีความสามารถในการผลิตเล็กติน (Lectins) และอนุพันธ์ของเล็กติน (Lectin derivatives) ที่มีความสำคัญในการใช้ประโยชน์

2) เพื่อทดสอบสมบัติทางชีวภาพของเล็กตินที่พบ เพื่อการคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ และให้ได้คุณลักษณะพื้นฐานของเล็กตินชนิดเด่น

3) เพื่อศึกษาจีน (gene/s) ที่เกี่ยวข้องการผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อราที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้น เพื่อการโคลนจีน (gene cloning) ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินซึ่งจะนำไปสู่การแสดงออกของจีน (gene expression) และการผลิต (production) สารต่อไป

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เน้นการรวบรวมและคัดเลือกเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดป่าที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่สามารถผลิตสารเล็กตินที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ โดยทดสอบในเบื้องต้นถึงสมบัติของสารเพื่อการใช้ประโยชน์และเป็นประโยชน์ทางการแพทย์ และศึกษาจีน

(Gene/s) ของเชื้อราที่มีความสำคัญในการผลิตเล็กตินในเบื้องต้น เพื่อการโคลนจีนและการผลิตสารในปริมาณมากและใช้เวลาสั้น เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัยครั้งนี้ มีดังนี้

1) ได้ชนิดของเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดป่าในประเทศไทยที่สร้างเล็กตินซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในวงการแพทย์ และยังเป็นประโยชน์ในการศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อรานั้น

2) ได้สารเล็กตินจากเชื้อรา ซึ่งอาจเป็นชนิดหรืออนุพันธ์ของสารเล็กตินชนิดใหม่ที่มีสมบัติแตกต่างจากที่มีรายงานการศึกษาและมีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ทางด้านการศึกษาและวิจัย ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม และถึงแม้ในกรณีที่พบสารที่คล้ายกับที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่นพืช ก็ยังมีข้อดีอย่างน้อยประการหนึ่งที่เหนือกว่าพืชคืออัตราการเจริญของเชื้อราสูงกว่าพืชมาก จึงมีโอกาสที่จะผลิตสารในปริมาณมากในระยะเวลาสั้นได้

3) ทราบถึงจีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อราที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้น ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่นำไปสู่การศึกษาถึงการแสดงออกของจีนและการผลิตสารที่ได้ในปริมาณมากและใช้เวลาสั้น

4) มีผลสำเร็จในการใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศไทยให้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจ

5) ได้ผลงานวิจัยที่ช่วยเพิ่มความเข้มแข็งทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้ส่วนหนึ่ง

1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เล็กติน (Lectins) ซึ่งเป็นสารประเภท Proteins หรือ Glycoproteins หรือ Multivalent carbohydrate-binding proteins ที่มีความจำเพาะที่เรียกได้ว่ามี antibody-like carbohydrate-binding specificity และมีการใช้ประโยชน์ทั้งทางเภสัชวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน การแพทย์ และการเกษตร (Guillot and Konska, 1997; Mo *et al.*, 2000; Oguri *et al.*, 1996; Pemberton, 1994; Weis and Drickamer, 1996) นั้นโดยส่วนใหญ่ได้จากพืช เชื้อราในกลุ่มเห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มหนึ่งที่มีแนวโน้มสูงในการใช้เป็นแหล่งผลิตสารเล็กติน ตามที่มีการรายงาน มีการศึกษาในเบื้องต้นถึงสมบัติของเล็กตินจากเชื้อราในกลุ่มเห็ดหลายชนิดได้แก่ *Agaricus* sp., *Amanita pantherina*, *Boletus satanas*, *Coprinus cinereus*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondasa*, *Hericium erinaceum*, *Ischnoderma resinosum*, *Lactarius deterrimus*, *Lactiporus sulphureus*, *Tricholoma mongolicum* และ *Volvariella volvacea* ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเห็ดที่มีการเพาะเลี้ยง และยังพบว่าเล็กตินจากเห็ดเหล่านี้มีสมบัติหรือคุณลักษณะทางเคมี (chemical characteristics) ที่ค่อนข้างหลากหลายคือมีทั้งแบบ monomeric, dimeric, trimeric หรือแม้แต่ tetrameric ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 12 ถึง 160 กิโลดาลตัน (kDa) และมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบตั้งแต่ 0 ถึง 18% ในธรรมชาติ

โดยส่วนใหญ่พบว่าเล็กตินมีความจำเพาะกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่พบมากคือ Galactose, *N*-Acetylgalactosamine และ Mannose (Lis and Sharon, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารเล็กตินจาก *Agaricus bisporus*, *Boletus satanas*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondasa*, *Tricholoma mongolicum* และ *Volvariella volvacea* มีสมบัติที่น่าสนใจคือเป็น antitumor และ cytotoxic activities ต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งสำคัญมากต่อการนำไปสู่การพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็ง (Guillot and Konska, 1997; Wang *et al.*, 1998b)

อย่างไรก็ตามข้อมูลที่รวบรวมได้นี้มาจากการวิจัยในต่างประเทศทั้งสิ้นโดยงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยในระยะเริ่มแรกของการศึกษาเล็กตินจากเห็ดในต่างประเทศ ได้แก่ อังกฤษ จีน และญี่ปุ่น และไม่มีข้อมูลด้านการศึกษาทางชีวเคมีและโครงสร้างของเล็กตินในเชิงลึกดังที่มีการรายงานอย่างกว้างขวางในพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชใบเลี้ยงคู่ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาเล็กตินจากเชื้อราในประเทศไทยอย่างจริงจัง ซึ่งจากที่มีรายงานความหลากหลาย (diversity) ของเห็ดในประเทศไทย (เกษม สร้อยทอง, 2537; อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2539; สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2541, 2542 และ 2543) แสดงให้เห็นชัดเจนว่าเห็ดที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายของชนิดสูงและมีปริมาณมากซึ่งเป็นผลโดยตรงจากสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ ซึ่งทำให้เป็นที่น่าสนใจว่า ความหลากหลายของเห็ดอาจมีผลต่อความหลากหลายของชนิดและ/หรืออนุพันธ์ของเล็กตินที่พบในเห็ดเหล่านั้น และน่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบเล็กติน/หรืออนุพันธ์ของเล็กติน (Lectins/Lectin derivatives) ชนิดใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ การศึกษาจีน (gene/s) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเล็กตินในเบื้องต้น ยังนำไปสู่การพัฒนากระบวนการผลิตเล็กตินต่อไป

1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.6.1 เล็กติน

เล็กติน (Lectins) เป็นสาร Proteins หรือ Glycoproteins หรือ Multivalent carbohydrate-binding proteins ที่กำเนิดจากแหล่งที่ไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (non-immune origin) มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ 0-18% โดยส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตนี้เกี่ยวข้องกับความจำเพาะ (specificity) ซึ่งเป็นความจำเพาะที่เรียกได้ว่ามี antibody-like carbohydrate binding specificity ที่สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์ (cell agglutination) และการตกตะกอน (precipitation) ของ Glycoconjugated lectins (Guillot and Konska, 1997; Mo *et al.*, 2000; Oguri *et al.*, 1996; Pemberton, 1994; Weis and Drickamer, 1996) เล็กตินเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา พืช และสัตว์ (Mo *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2000)

Ricin เป็นเล็กตินชนิดแรกที่พบเป็นโปรตีนที่ได้จากพืช Castor bean (*Ricinus communis*) และ Concanavalin A เป็นเล็กตินที่เป็นที่รู้จักกันดี ได้จากพืชตระกูลถั่ว Jack bean เล็กตินจากพืชตระกูลถั่ว

เหล่านี้โดยปกติประกอบด้วย Carbohydrate-binding site จำนวน 1 ตำแหน่ง หรือมากกว่า ที่เรียกว่า Carbohydrate recognition domains (CRD) (Rini, 1995; Lindhorst, 2000)

เล็กตินอาจจะทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะไฮโดรเจนหรือ metal coordination, Van der Waals หรือ hydrophobic interactions (Weis and Drickamer, 1996; Elgavish และ Shaanan, 1997) โดยทั่วไปกลุ่ม Hydroxyl บนโมเลกุลน้ำตาลสามารถเป็นทั้งตัวให้และตัวรับร่วมกับพันธะไฮโดรเจน (Elgavish and Shaanan, 1997) สมบัติหลักของเล็กตินที่ใช้อย่างกว้างขวางนั้นคือ เพื่อการตรวจหาสารและแสดงคุณลักษณะของกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemagglutination activity) (Lis and Sharon, 1998; Pusztai, 1991) อย่างไรก็ตาม เล็กตินหลายๆ ชนิด มีตำแหน่ง binding site เพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาล ดังนั้นเล็กตินเหล่านี้จึงไม่สามารถเกิดการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (Peumans and Van Damme, 1995; Sharon and Lis, 1989)

โดยภาพรวมของโครงสร้างของเล็กตินจากพืชแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดหลัก คือ Merolectins, Hololectins, และ Chimerolectins (Peumans and Van Damme, 1995) Merolectins เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมีลักษณะเป็น single polypeptide และประกอบด้วย domain ซึ่งมีกลุ่ม Carbohydrate-binding site เพียง 1 ตำแหน่ง มีประจุ monovalent และไม่สามารถตกตะกอน Glycoconjugates หรือการจับกลุ่มของเซลล์ได้ ตัวอย่างของเล็กตินในกลุ่มนี้ เช่น Monomeric proteins ที่เป็น Man-binding lectins (Mannose-binding proteins) จากกล้วยไม้ (Pusztai, 1991)

Hololectins มีรูปแบบโครงสร้างคล้ายกับ Merolectins แต่ประกอบด้วย domain ของ Carbohydrate-binding site ที่เหมือนกัน 2 ตำแหน่งหรือมากกว่า เป็นเล็กตินชนิดที่เป็นที่รู้จักกันส่วนใหญ่ (Peumans and Van Damme, 1995) เนื่องจากมี binding sites หลายตำแหน่งจึงสามารถเกิดการจับกลุ่มของเซลล์หรือตกตะกอน Glycoconjugates ได้ และได้ชื่อว่าเป็น Hemagglutinins (Sharon and Lis, 1989; Pusztai, 1991)

1.6.2 แหล่งของเล็กติน

แหล่งของเล็กตินที่มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์คือพืช และมีการศึกษาในสัตว์ รวมทั้งมีรายงานการพบสารกลุ่มดังกล่าวในจุลินทรีย์บางชนิดในกลุ่มแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส (Mo *et al.*, 2000) แต่ยังไม่มีการศึกษามากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในพืชและสัตว์

1.6.2.1 พืช

พืชตระกูลถั่วและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเป็นแหล่งหลักของเล็กตินจากพืช ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง (Wood *et al.*, 1999) เล็กตินจากพืชสามารถแบ่งออกเป็น 4 ตระกูลหลัก ตามโครงสร้างและวิวัฒนาการของโปรตีน คือ Legume lectins, Type 2 ribosome-inactivating proteins, Chitin-binding lectins และ Monocot mannose-binding lectins (Van Damme *et al.*, 1999; Wright *et al.*,

1999a, 1999b) นอกจากนี้ยังมีเล็กตินตระกูลเล็กๆ อีกได้แก่ Cucurbitaceae phloem lectins, Amaranthins และ Jacalin-related lectins (Van Damme *et al.*, 1999).

เล็กตินจากพืชตระกูลถั่ว (Legume lectins) เป็นตัวแทนเล็กตินจากพืชที่มีการศึกษามากที่สุด เล็กตินตระกูลนี้แยกได้จากเมล็ด ลำต้น และเปลือกของลำต้น (bark) (Imberty *et al.*, 2000) เล็กตินจากพืชที่รู้จักกันดีที่สุด คือ Phytohemagglutinin (PHA) จาก Red kidney bean, Soybean (SBA), Jackbean (Concanavalin A), Peanut (PNA), และ Pea (PSL) (Lis and Sharon, 1998)

Type 2 ribosome-inactivating proteins ประกอบด้วย Toxic A subunit และ Gal/GalNAc-binding subunit ของ B chain ซึ่ง A chain มี RNA glycosidase activity และ B chain มีหน้าที่ในการจับกับพื้นผิวของเซลล์เป้าหมาย และช่วยใน internalization ของโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (Kaku *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 1999)

Chitin-binding lectins ประกอบด้วย Hevein domains ที่พบอยู่ทั่วไปในธัญพืช ตัวอย่าง ได้แก่ Wheat germ agglutinin, Pokeweed mitogen, Rice lectins, Rye lectins และ Barley lectins (Lis and Sharon, 1998; Wright *et al.*, 1999b; Wood *et al.*, 1999).

Monocot mannose-binding lectins เป็นสารที่มีรายงานการพบครั้งแรกใน Snowdrop (*Galanthus nivalis*) (Van Damme *et al.*, 1997b) ต่อมาได้มีการสกัดและศึกษาลักษณะเฉพาะในเชิงลึกของเล็กตินจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายวงศ์ ได้แก่ Alliaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Bromeliaceae, Iridaceae, Liliaceae และ Orchidaceae (Wright *et al.*, 1999b; Wood *et al.*, 1999) ตัวอย่างเช่น เล็กตินจาก*Narcissus pseudonarcissus* (Daffodil) และ *Scilla campanulata* (Bluebell) (Sauerborn *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1999)

1.6.2.2 สัตว์

เล็กตินพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิดรวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น หอยทาก ปู และหอยกาบคู่ (Miarons and Fresno, 2000; Dodd and Drickamer, 2001) เล็กตินจากสัตว์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ C-type lectins และ S-type lectins (Frits and Gary, 2000) C-type lectins เป็น Calcium-dependent lectins เป็นกลุ่มเล็กตินจากสัตว์ที่พบมากที่สุด เล็กตินกลุ่มนี้มี Carbohydrate-binding activity ที่ขึ้นอยู่กับ Ca^{2+} และการทำงานของ Carbohydrate recognition domains (CRD) เป็นคุณลักษณะเฉพาะของโครงสร้างของเล็กติน (Dodd and Drickamer, 2001) C-type lectins ยังประกอบด้วย 2 class หลัก คือ Selectins และ Collectins ซึ่ง Selectins เป็น Transmembrane C-type lectins ที่เป็นที่รู้กันว่าเป็นกลุ่มของ cell adhesion molecules สำหรับ Collectins เป็น Oligomeric C-type animal lectins ประกอบด้วย 3 ชนิดหลักคือ Serum lectins (Mannose-binding protein (MBP), Conglutinin และ Collectin-43 (CL-43) กับ Pulmonary surfactant proteins (SP-A และ SP-D) (Matsushita *et al.*, 1996)

S-type lectins เป็นเล็กตินที่ละลายได้ และมี β-Galactose specific binding proteins ที่เรียกกันทั่วไปว่า Galectins (Frits and Gary, 2000; Gitt *et al.*, 1995) พบได้ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ พยาธิตัวกลม แมลง ฟองน้ำ เล็กตินจากสัตว์ที่เป็นกลุ่มอื่นๆ ที่พบได้แก่ Annexins ประกอบด้วยกลุ่มของ Calcium และ Phospholipid-binding proteins มีรายงานว่าพบในพืชด้วย (Kojima *et al.*, 1996) Annexins สามารถจับกับ Phosphatidylinositol ที่พบมากในชั้นในของ Plasma membrane ยังมีเล็กตินจากสัตว์อีกบางชนิดที่เป็นที่รู้จัก ได้แก่ Calnexin และ Calreticulin พบใน Endoplasmic reticulum (ER) ทำหน้าที่เป็น Chaperones ในการควบคุมการสังเคราะห์ Glycoproteins ใน secretory pathway (Hauri *et al.*, 2000; Dodd and Drickamer, 2001)

1.6.2.3 จุลินทรีย์

ก) ไวรัส

ไวรัสบางชนิดเช่น Influenza A พบว่ามี surface proteins 2 ชนิด คือ Hemagglutinin (HA) และ Neuraminidase (NA) HA protein เป็น Trimeric type I membrane protein ซึ่งเป็น Sialyloligosaccharide-binding protein (Hughes *et al.*, 2001) Lis and Sharon (1998) ระบุถึง Murine polyoma virus ซึ่งเป็น non-enveloped symmetrical particle มีสารพันธุกรรมเป็น circular double-stranded DNA ว่าเป็นอีกแหล่งหนึ่งของเล็กตินจากไวรัส มีโครงสร้างที่ห่อหุ้ม virion ประกอบด้วย 360 copies ของ Viral protein (VP1) เรียงกันแบบ pentamers แต่ละหน่วยของโปรตีนมี 2 Antiparallel β sheets ซึ่งคล้ายกับการม้วนพับของโครงสร้างเล็กติน (lectin fold)

ข) แบคทีเรีย

แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสารประเภทเล็กตินได้ ได้แก่ *Eschericia coli, Streptococcus sobrinus*, *S. cricetus* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Sharon and Lis, 1989) Streptococci บางชนิด เช่น *Streptococcus sobrinus* และ *Streptococcus cricetus* มี Glucan-binding lectins ที่อยู่ร่วมกับ cell surfaces ในปริมาณที่เทียบเท่ากับที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งสามารถวัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Wu *et al.*, 1995)

ค) เชื้อรา

เชื้อรา (Fungi) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ได้รับความสนใจในการศึกษาถึงความสามารถในการผลิตสารเล็กติน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ด (Mushrooms) ซึ่งเป็นเชื้อราชั้นสูงที่มีขนาดใหญ่ (Macro-fungi) เนื่องจากมองเห็นบางโครงสร้างได้ด้วยตาเปล่า เห็ดหลายชนิดรับประทานได้ และจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (มีโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และวิตามิน ซึ่งมักพบว่ามีวิตามินบี 1 และบี 2 มากกว่าวิตามินชนิดอื่นๆ) เห็ดหลายชนิดมีสรรพคุณทางยา งานวิจัยจากประเทศจีนและญี่ปุ่นแสดงให้เห็นชัดเจนว่าเห็ดมีประโยชน์ในการใช้เป็นยารักษาโรค มีผลในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคที่เกิดจากไวรัส โรคความดันโลหิตสูง โรคคอเลสเตอรอลในเลือดสูง และสามารถช่วยป้องกันการจับตัวกันของ

เกล็ดเลือด (Wang *et al.*, 1998b; Yu *et al.*, 1999) เล็กตินพบในเห็ดวงศ์ *Hygrophoraceae* และ *Strophariaceae* ซึ่งมีหลายสกุล ได้แก่ *Amanita*, *Mycena*, *Oudemansiella* และ *Agrocybe* เป็นต้น สารเล็กตินที่พบนี้อาจมีสมบัติทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ที่เรียกได้ว่าเป็นสาร Hemolysin ด้วย เห็ดบางชนิดสามารถผลิตเล็กตินได้หลายอนุพันธ์ที่มีสมบัติใกล้เคียงกันมาก อาจแตกต่างกันเพียง isoelectic point จึงเรียกว่าเป็น Isolectins หรืออาจมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน เช่น Lectins PCL-a, PCL-b และ PCL-c จากเห็ด *Pleurotus cornucopiae* นอกจากนี้ Lectin derivatives ที่สกัดได้จากเห็ดชนิดเดียวกันอาจแสดงสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น เล็กตินที่แยกได้จาก *Laccaria amethystea* ที่ให้ชื่อว่า Lectin LAF สามารถจับกับ L-Fucose ขณะที่ Lectin LAL ถูกยับยั้งโดย Lactose ซึ่งในกรณีนี้เล็กตินทั้งสองมีความสัมพันธ์กันด้านโครงสร้างแม้ว่าจะมีความจำเพาะที่ต่างกัน (Guillot and Konska, 1997)

เชื้อราในกลุ่มเห็ดหลายชนิดที่มีรายงานการสะสมสารเล็กติน เช่น *Auricularia polytricha* และ *Grifola frondasa* สะสมเล็กตินที่ประกอบด้วยน้ำตาล 3.5 และ 3.3% ตามลำดับ *Coprinus cinereus*, *Laccaria amethystea*, *Laccaria amethystea* สะสมเล็กตินที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ *Psathyrella lacrymabunda* สะสมเล็กตินที่มีมีน้ำตาล 0.5% (Wang *et al.* 1998b; Guillot and Konska, 1997)

เล็กตินเป็นสารที่พบได้ทั้งในดอกเห็ด (fruiting body) บริเวณก้านดอก (stalk/carpophores) หมวก (cap) และเส้นใย (mycelium) ของเห็ด ทั้งนี้ขึ้นอยู่ชนิดของเห็ด จากที่มีรายงานการศึกษาโดยใช้เอนไซม์และ Lectin rabbit antibody พบว่าบริเวณผนังเส้นใยของเห็ดหลายชนิดมีการสะสมของเล็กตินในปริมาณสูง และยังพบว่าปริมาณของเล็กตินที่พบในเห็ดขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของเห็ด อายุของเห็ด ฤดูกาลที่เก็บ และสถานที่ที่เกิด (มีการเจริญ) ของเห็ดนั้นๆ (Guillot and Konska, 1997) จึงกล่าวได้ว่า เล็กตินมีบทบาทโดยตรงทางสรีรวิทยาต่อความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดราหรือเชื้อรากับสิ่งแวดล้อม โดยอาจจะเกี่ยวข้องกับการเจริญและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเชื้อรา เกี่ยวข้องกับการพักตัวและการสร้างโครงสร้างพิเศษต่างๆ ซึ่งเอื้ออำนวยต่อการเป็น parasite ของเชื้อรา และการย่อยเศษไม้ที่เน่าเปื่อย เป็นต้น นอกจากนี้เล็กตินยังเกี่ยวข้องกับการจดจำ (recognition) ด้านความจำเพาะกับพืชที่เกิดขึ้นในช่วงแรกของ mycorrhization ของเชื้อราในกลุ่ม Mycorrhizal fungi เนื่องจากว่า Mycorrhizal fungus แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับพืชที่เชื้อรานั้นๆ เจริญอยู่ด้วย (host) ดังนั้นการที่เชื้อราสร้าง เล็กตินต่างชนิดกัน ทำให้สามารถจดจำ host ที่แตกต่างกันได้ แต่อย่างไรก็ตามในธรรมชาติอาจมีโมเลกุลของสารบางชนิดในดินที่มีความจำเพาะกับเล็กตินจากเชื้อรา และในขณะเดียวกันก็สามารถจับกับ binding site ของ host ทำให้เล็กตินไม่สามารถเข้าจับได้อีก จึงไม่เกิดการจดจำ เช่น สารประกอบในกลุ่ม Phenolic acids ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลง receptor ที่บริเวณรากของต้นไม้ที่เป็นพืชอาศัย (host tree) ได้ (Guillot and Konska, 1997; Reynolds *et al.*, 2000)

1.6.3 บทบาทของสารเล็กติน

เล็กตินจากพืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปโปรตีนสะสม (storage protein) มีบทบาทในการป้องกันแมลง หรือเชื้อราที่มาทำลายต้นพืชหรือเมล็ดพืช เล็กตินในพืชตระกูลถั่วบางชนิด มีประโยชน์ต่อการอยู่ร่วมกันแบบ symbiosis ระหว่างพืชตระกูลถั่วกับแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ (Nitrogen-fixing bacteria) ในสัตว์เลือดอุ่น *N*-Acetylglucosamine-specific lectins จาก Macrophage มีความสามารถจับและทำให้เกิด phagocytosis ของจุลินทรีย์แปลกปลอมที่บุกรุกเข้าร่างกาย β-Galactoside-specific lectins จากสัตว์มีบทบาทในการควบคุม differentiation และการสร้างอวัยวะต่างๆ นอกจากนี้เล็กตินยังมีบทบาทในการเคลื่อนย้าย (migration) ของ Lymphocytes ในเส้นเลือดไปสู่ Lymphoid organ และบทบาทใน metastasis ของเซลล์มะเร็ง (Reynolds *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998b)

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาเล็กตินจากพืชกันอย่างกว้างขวาง แต่ก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจสำหรับบทบาทของเล็กตินจากพืช เล็กตินจากพืชมีพฤติกรรมคล้ายกับ storage proteins (เก็บสะสมไนโตรเจนในgerminated seed เป็นหลัก) และอาจแสดงบทบาท host defense protein (Janzens *et al.*, 1976; Peumans and Van Damme, 1995) เล็กตินจากพืชหลายชนิดเป็นพิษกับเซลล์ของสัตว์ และมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยคาดว่ามีหน้าที่ป้องกันพืชจาก Phytopathogenic fungi และ Predatory animals (Lis and Sharon, 1998; Gatehouse *et al.*, 1995) เล็กตินจำนวนมากมีความคงตัวที่ช่วง pH กว้าง และทนต่อเอนไซม์ Proteases ของสัตว์และแมลง (Peumans and Van Damme, 1995) เนื่องจากมีการพบใน Ederberry (*Sambucus nigra*) และ Black locust (*Ribinia pseudoacacia*) ที่ไม่มีสัตว์ทำลาย และมีการศึกษาพบ Bark lectins ในพืชทั้ง 2 ชนิด ที่มี toxicity effects ต่อสัตว์ นอกจากนี้ Type 2 RIPs ยังต่อต้าน Plant viruses ได้ (Hartley *et al.*, 1996; Van Damme *et al.*, 1997a) เล็กตินจากพืชยังมีปฏิกิริยาต่อแบคทีเรียในดินเพื่อการอยู่แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Peumans and Van Damme, 1995) เช่น พืชตระกูลถั่ว ได้แก่ Pea (*Pisum sativum*), Sweet pea (*Lathyrus ochrus*), Lentil (*Lens culinaris*) และ Vetch (*Vicia faba*) ที่มี Nitrogen-fixing bacteria (*Rhizobium* และ *Bradyrhizabium*) อยู่ร่วมด้วย (Guillot and Konska, 1997; Frits and Gary, 2000; Ngai and Ng, 2004)

บทบาทของเล็กตินที่พบในสัตว์นั้นเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับ cell-cell interactions และกลไกของกระบวนการ endocytosis (Elgavish and Shaanan, 1997; Matsushita *et al.*, 1996) ตัวอย่างเช่น Selectins ซึ่งเป็น C-type lectins ที่เป็นตัวกลางทำให้เกิดการยึดติดกันระหว่าง Leukocytes และ Endothelial cells ของเส้นเลือด (Lis and Sharon, 1998) Collectins ซึ่งมี Collagen-like domain แสดงบทบาทที่สำคัญในการต้านต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส โดยจับกับ Antibody ทำให้เป็นกลางหรือฆ่าโดยระบบ complement system และ opsonization (Matsushita *et al.*, 1996; Ohtani *et al.*, 1999)

บทบาทของเล็กตินที่พบในจุลินทรีย์ได้แก่ Hemagglutinin (HA) protein จาก Influenza virus มีหน้าที่ในการหลอมรวมระหว่างไวรัส และ cell membrane ของ host โดย endocytosis และพบว่า

HA protein เป็นเล็กตินของไวรัสชนิดแรกที่มีสมบัติ Lymphocyte-activating property (Rott *et al.*, 1996) สำหรับ Neuraminidase (NA) เป็น Sialidase ที่ตัดปลายของ Sialic acid จาก Glycoconjugates ของ host

เล็กตินจากแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญที่เริ่มการติดเชื้อ โดยยึดเซลล์แบคทีเรียกับ Epithelial cell ของ Host มีรายงานว่า FimH adhesin (หน่วยย่อยของ Fimbrial proteins) ของ *E. coli* มีหน้าที่ในการกระตุ้นการยึดเกาะแบคทีเรียกับ Urinary epithelial cells ของคน (Mirelman, 1986; Thankavel *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามเล็กตินที่อยู่บน cell surface ของแบคทีเรียอาจจับกับน้ำตาลบน Phagocytic cells และกระตุ้นการเกิด phagocytosis ของแบคทีเรีย เป็นผลให้เกิดการตายของเซลล์ได้ (Sharon and Lis, 1989) เล็กติน 2 ชนิด (PA-IL and PA-IIL) จาก *Pseudomonas aeruginosa* สามารถช่วยกระตุ้น tissue infectivity และ pathogenicity (Winzer *et al.*, 2000)

เล็กตินมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของเห็ด ในระยะพัก (dormancy) ระยะที่มีการเจริญ (growth) และการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง (morphogenesis) เช่น ในระยะแรกของ mycorrhization (Guillot and Konka, 1997)

1.6.4 สมบัติทางชีวภาพของเล็กติน

เนื่องจากเล็กตินมีความจำเพาะเจาะจงของคาร์โบไฮเดรต ทำให้เล็กตินสามารถจับกับเซลล์ได้ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นผลทำให้เกิดปฏิกิริยา hemagglutination (Pusztai, 1991) การจับกลุ่มของเซลล์ (cell agglutination) ของเล็กตินแต่ละโมเลกุล ซึ่งโดยทั่วไปจะประกอบด้วยตำแหน่งการจับของคาร์โบไฮเดรตสองตำแหน่งหรือมากกว่า และสามารถจับกับน้ำตาลที่บริเวณพื้นผิวได้ส่งผลให้เกิดการตกตะกอน (Sharon and Lis, 1989) ดังนั้นการจับกลุ่มกันของเซลล์เม็ดเลือดแดงของเล็กตินจัดเป็นสมบัติที่สำคัญของโปรตีนชนิดนี้และใช้สำหรับการตรวจสอบคุณลักษณะของเล็กติน เล็กตินสามารถเกิด cross-links ระหว่างพอลิแซคคาไรด์หรือ Glycoprotein ในสารละลายได้และเหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอน

การจับกลุ่มกันของสารเป็นปฏิกิริยาที่ซับซ้อนเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ สมบัติของเล็กติน (Molecular size, จำนวนของ carbohydrate-binding sites, binding affinity, cell surface properties, accessibility และจำนวนของเล็กตินต่อ binding sites) (Wood, 1995) นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับสภาวะระหว่างเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิ ชนิดของเซลล์และเล็กติน และความเข้มข้นของเซลล์ ปฏิกิริยาการจับกลุ่มกันของเซลล์และการตกตะกอนของเล็กตินคล้ายกับ Antibody ซึ่งสามารถถูกยับยั้งโดยสารประกอบน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่เรียกว่า Haptens ในกรณีนี้น้ำตาลจะทำหน้าที่คล้าย Haptens ในปฏิกิริยาการยับยั้งซึ่งจะแสดงถึงโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตที่จำเพาะของเล็กตินบนพื้นผิวเซลล์ (Sharon and Lis, 1989)

ด้านความจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตของเล็กตินจำแนกได้เป็น 5 กลุ่มตามชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีปฏิกิริยา คือ Galactose, *N*-Acetylgalactosamine, *N*-Acetylglucosamine, *N*-Acetylneuraminic acid, Fucose และ Mannose กิจกรรมทางชีวภาพของเล็กตินเนื่องมาจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวพบมากในธรรมชาติ (Lis and Sharon, 1998) ในธรรมชาติโดยส่วนใหญ่พบว่าเล็กตินมีความจำเพาะกับน้ำตาล Galactose และ *N*-Acetylgalactosamine มากที่สุด ตามด้วยน้ำตาล Mannose

Wood *et al.* (1999) พบกิจกรรมการยับยั้งไวรัสของเล็กตินที่มีความจำเพาะกับน้ำตาล Mannose จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น Liliaceae, Amyryllidaceae และ Orchidaceae ที่ควรจะนำไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้ สำหรับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ของเล็กตินจาก *Pleurotus ostreatus* (POL) พบว่าไม่แสดงกิจกรรมการยับยั้งไวรัสแต่แสดงกิจกรรมการต้านมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wang *et al.*, 2000)

อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยเกี่ยวกับเล็กตินจากพืชบางชนิดเช่น มันฝรั่ง ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas solanacearum* บางสายพันธุ์ โดยสารไปจับที่ผนังเซลล์ (Gozia *et al.*, 1993) กรณีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามีรายงานน้อยมากว่าเล็กตินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เช่น Class I chitinase ที่สร้างจากพืชบางชนิด (Collinge *et al.*, 1993) กิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของเล็กตินนั้นพบในเชื้อราชั้นสูง เช่น *Agrocybe cylindracea*, *Agaricus bisporus* (Wang *et al.*, 2001) และ *Lyophyllum shimeiji* lectins (Lam *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามกลไกการยับยั้งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การค้นพบสารเล็กตินจากพืชและเชื้อราชั้นสูงที่มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อราจึงเป็นที่สนใจ

เล็กตินจากเห็ดบางชนิดสามารถต้านเซลล์มะเร็งได้ เช่น *Agaricus bisporus* lectin ต้านการเพิ่มจำนวนของ Human colon cancer cell line HT29 และ Breast cancer cell line MCF-7

Wang *et al.* (1998b) แสดงให้เห็นว่า *Volvariella volvacea* lectin สามารถแสดง antitumor activity ต่อเซลล์ Sarcoma S-180 โดยสามารถลดการเจริญของเนื้องอกในหนู (Mice) จาก 63 เป็น 100% นอกจากนี้เล็กตินยังแสดง immunomodulatory activity โดยการเพิ่มการแสดงออกโดยการเลียนแบบ Interleukin-2 และ Interleukin-γ แสดงให้เห็นว่ามีผลต่อ immunomodulatory โดย Cytokine regulation (She *et al.*, 1998)

เล็กตินจาก *Grifola frondosa* เป็นสารพิษต่อ HeLa cells (Guillot and Konska, 1997) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถชักนำให้เซลล์ทั้งหมดตายคือที่ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เล็กติน 2 ชนิดจาก *Tricholoma mongolicum* คือ TML-1 และ TML-2 สามารถกระตุ้นการผลิตของ Nitrite ions โดย Macrophage และกระตุ้น Macrophage ในหนูได้ดีพอๆ กับการยับยั้งการเจริญของเซลล์ Sarcoma 180 (Wang *et al.*, 1995)

จากรายงานการศึกษาสมบัติของเล็กตินในปัจจุบัน พบว่าเล็กตินจากเห็ดส่วนใหญ่มีสมบัติที่สำคัญในการต้านทานมะเร็ง (antitumor) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโรค (Mo *et al.*, 2000) ตัวอย่างเช่น เล็กตินจากเห็ดชนิด *Volvariella volvacea* แสดงความสามารถในการเป็น

antitumor ต่อ Sarcoma S-180 cells *Grifola frondosa* lectin เป็น cytotoxic ต่อ HeLa cells *Agaricus biporus* lectin มี antiproliferation activities ต่อเซลล์มะเร็งในลำไส้ของคนชนิด Human colon cancer cell line HT29 และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด Breast cancer cell lines MCF-7 ส่วน *Trichoderma mongolicum* lectin นอกจากจะสามารถยับยั้ง Mastocytoma D815 cells แล้วยังสามารถต้านทานต่อ Sarcoma S-180 cells ที่เกิดในหนูได้ (Mo *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบ Clitocypin ซึ่งเป็น Lectin derivatives จากเห็ด *Clitocybe nebularis* มีสมบัติเป็น Cysteine proteinase inhibitor ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาทางการแพทย์ (Brzin *et al.*, 2000)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานศึกษาสารเล็กตินจากเชื้อรา ใช้สถานที่ปฏิบัติงานหลัก คือ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาคารเครื่องมือ 2 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และรวบรวมเชื้อราในกลุ่มเห็ดป่าและเห็ดที่มีการเพาะเลี้ยงบางชนิดในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราบริสุทธิ์ในกลุ่ม Ascomycetes (วงศ์ Xylariaceae) จาก ดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ ห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้ และเชื้อราในกลุ่ม Polypores จาก รองศาสตราจารย์ ดร. นิวัฒ เสนาะเมือง ห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การทดสอบฤทธิ์ของสารเล็กตินในการต้านเซลล์มะเร็ง โดย ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ ห้องปฏิบัติการงานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ การทดสอบฤทธิ์ของสารเล็กตินในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม โดย รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนที่ติดตั้ง ณ ห้องปฏิบัติการกลาง สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี วัสดุและอุปกรณ์หลักที่ใช้ศึกษาสารเล็กตินจากเชื้อราและวิธีดำเนินการศึกษา มีดังนี้

2.1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

2.1.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังต่อไปนี้ หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Hirayama, Hirayama Manufacturing Corp., Japan) ตู้อบไอร้อน (Hot air oven) (1375FX SHEL LAB, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้เขี่ยจุลินทรีย์ (Laminar flow hood, CA-REV6, Clean Air, The Netherlands) ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส (SHEL LAB) ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (4-12 องศาเซลเซียส) สำหรับเก็บเชื้อและสารชีวภาพ (FOC225I Velp® Scientific, Progen Scientific Ltd., U.K.) ตู้แช่แข็ง (Freezer) -20 องศาเซลเซียส (HLLE-370 Heto, Heto-Holten, Denmark) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance, TC-205, Denver Instrument Company, Japan) เครื่องชั่งหยาบ (Pan balance, LB3200D Sartorius, Sartorius AG Göttingen, Germany) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, S20 SevenEasy™, Mettler Toledo International Inc., Switzerland) เครื่องนับโคโลนี (Colony counter, Colony-Star, Germany) กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope, Olympus BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope, JEOL-6400 SEM, JEOL, JEOL Ltd., Japan) กล้องถ่ายภาพภาคสนาม (Olympus,

Camedia, Olympus optical Co., Ltd., Japan) เครื่องควบคุมอุณหภูมิเพื่อเพิ่มจำนวนจีน (Thermocycler หรือ GeneAmp™ PCR System 9800, Perkin-Elmer, PerkinElmer, Inc., U.S.A.) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1245PC SHEL LAB, Sheldon Manufacturing, U.S.A.) เครื่องตีป่น (Blender; Waring Comercial, U.S.A.), Electrophoresis apparatus (Sub-Cell GT Mini, BioRad, U.S.A.), Fraction collector (Fraction collector 2110; Bio-Rad, U.S.A.) เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (Sorvall RC 5C Plus Superspeed Centrifuge, GMI, Inc., U.S.A.), Micropipitte sets (Gilson Pipetman Products, Gilson, Inc., U.S.A.), Refrigerated microcentrifuge (Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Germany), Spectrophotometer (SmartSpec™3000, BioRad), Ultracentrifuge (45Ti Rotor, L80 Ultracentrifuge, Beckman Coulter, U.S.A.), Lambda 40 UV-VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer Instruments), P-1 Peristatic pump (Pharmacia Biotech, Sweden), Monitor UV-1 (Pharmacia Biotech), Graphic 450 flat bed recorder (Lloyd Instruments Ltd., U.K.), Protein Sequenator (Protein Sequenator Model 471A, Applied Biosystems, U.K.), Vortex mixer (Finevortex, FinePCR®, Korea) และ UV transilluminator พร้อมกล้องถ่ายรูป (Syngene, Synopics Ltd., U.K.)

2.1.2 วัสดุ

วัสดุที่ใช้มีดังต่อไปนี้ เครื่องแก้วพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยา เครื่องพลาสติก และเครื่องแก้ว สำหรับเก็บรักษาการมีชีวิตของเชื้อรา บรรจุตัวอย่างสารสกัด ทดสอบสมบัติของสารเล็กตินการผลิตเล็กตินจากเส้นใย และศึกษาจีน (gene/s) ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ได้เส้นใยของเชื้อรา ผลิตเล็กตินจากเส้นใย ศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน และเพื่อทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ Malt extract agar (Merck, Merck Ltd., Germany), Nutrient broth/Nutrient agar (Oxoid, Basingstoke, U.K.), Mueller-Hinton agar (Oxoid), Potato dextrose agar (Oxiod) สารเคมี (Analytical grade) และวัสดุชีวภาพที่ใช้เพื่อศึกษาเชื้อรา การสกัด การทำบริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะเฉพาะของสารเล็กตินจากเชื้อรา ได้แก่ Ammonium peroxodisulphate (APS) (Univar, Ajax Chemicals, New Zealand), Agarose gel (Low EEO Agarose, BIO 101, Inc., U.S.A.), Bromophenol blue (USB™, Amersham Life Science, U.S.A), bis-*N,N''*-Methylenebisacrylamide (Sigma, Sigma-Aldrich Chemical Company, U.S.A.), Calcium chloride 2-hydrate (Carlo Erba reagent, Carlo Erba Reagenti, Italy), Coomassie blue R-250 (Simply Blue™ SafeStain, Invitrogen, Invitrogen Life Technologies, U.S.A), Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) (Sigma), 2-Mercaptoethanol (Merck), Magnesium chloride (Univar, Ulixes B.V., U.K.), Glycerol (Merck), Glycine (Promega, Promega Corporation, U.S.A), Sodium dodecyl sulphate (SDS) (Fluka, BioChemika, Germany), Tris-Hydroxymethylamine (Sigma), *N*-Tris-Hydroxymethyl methylglycine (Sigma), *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (BDH-

Merck Chemicals Ltd., U.K.), Agarose (Seakem®, BioWhitttaker Molecular Applications, U.S.A), Bradford reagent (Pierce, PerBio, U.S.A), Benzamidine hydrochloride (98%) (Sigma), $MgCl_2$ (1.5mM, QIAGEN, QIAGEN GmbH, Germany) Periodic acid solution (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), Sodium metabisulphite (J.T. Boker, Mallinckrodt Baker, Inc., U.S.A) Enzymes โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Proteinase K (Merck), Ribonuclease (Merck), *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Invitrogen Life Technologies, U.S.A), BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen), HMW-SDS Marker kit (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), DNA Molecular weight markers (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), Oligonucleotide primers (Invitrogen) และ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim, Bochringer Mannheim GmbH, Germany) เพื่อวิเคราะห์จีนด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล pCR®8/GW/TOPO® Vector (Invitrogen) และ pCR®8/GW/TOPO® Cloning kit (Invitrogen) เพื่อการโคลนจีน

เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ โอ เอ บี และ เอบี ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์บริการโลหิตสภากาชาดไทย จังหวัดนครราชสีมา เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ที่ใช้ในการทดสอบสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย มีขั้นตอนและวิธีการดังนี้

2.2.1 การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตสารเล็กติน

2.2.1.1 การรวบรวมเชื้อรา

รวบรวมเชื้อราจากแหล่งเก็บและที่เจริญตามธรรมชาติ เน้นเชื้อราในกลุ่มเห็ดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดป่าที่พบการเจริญและสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ในธรรมชาติ เก็บรวบรวมดอกเห็ด (fruiting body) ที่ยังมีความสดประมาณ 100 กรัม จากป่าตามธรรมชาติ และตลาดพื้นบ้านที่มีการจำหน่ายเห็ด เก็บรวบรวมและรักษาดอกเห็ดตามวิธีการของ Arora (1986) และ Alexopoulos *et al.* (1996) บันทึกภาพลักษณะปรากฏของตัวอย่าง เมื่อกลับมาถึงห้องปฏิบัติการเตรียมตัวอย่างเพื่อระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน ทดลองแยกให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ และเตรียมตัวอย่างเชื้อราเพื่อสกัดสารเล็กติน นอกจากนี้ยังมีเชื้อราบริสุทธิ์กลุ่ม Ascomycetes ในวงศ์ Xylariaceae และกลุ่ม Polypores ดังกล่าวข้างต้น

2.2.1.2 การวิเคราะห์ชนิดของเชื้อรา

จำแนกและวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราในกลุ่มเห็ดตามลักษณะทางสัณฐานตาม Arora (1986), Alexopoulos *et al.* (1996), LæssØe and Conte (1996), Hawksworth (1993), Turnbull and Watling (1999a, 1999b) และ

Watling (2003) ตรวจสอบลายพิมพ์สปอร์ (spore prints) สำหรับเห็ดบางตัวอย่าง ตรวจสอบโครงสร้าง (spore-bearing) ของดอกเห็ดโดยตัดส่วน gill หรือ pore ตามขวางด้วยใบมีดโกน วางลงบนแผ่นแก้วสไลด์ หยดสารละลายสารใดสารหนึ่งดังนี้ 10% Ammonium hydroxide (ภาคผนวก ก1) Melzer's reagent (ภาคผนวก ก6) หรือ Lactophenol (ภาคผนวก ก3) ศึกษาโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งศึกษาโครงสร้างของเชื้อราที่สะสมสารเล็กตินที่มีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ ด้วยวิธีการตาม Bozzola and Russell (1999) และใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; JSM-6400, JEOL)

2.2.1.3 การแยกและเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์

แยกและเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์โดยใช้สปอร์หรือส่วนของดอกเห็ดด้วยอาหาร Potato dextrose agar (ภาคผนวก ข5) บ่มให้เชื้อราเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เลี้ยงเชื้อราในกลุ่ม Xylariaceae โดยใช้อาหาร Malt extract agar (ภาคผนวก ข1) จากนั้นเพาะเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราในอาหารเหลว Malt extract broth (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บเกี่ยวเส้นใยและอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาสารเล็กตินด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงตามวิธีการในข้อ 2.2.1.5

2.2.1.4 การสกัด/แยกสารเล็กตินในลักษณะสารสกัดหยาบ (crude extract)

ตัวอย่างเชื้อราที่นำมาสกัดสารเล็กตินมีทั้งดอกเห็ดและเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ สำหรับดอกเห็ด (fruiting body) ที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม นำไปทำให้แห้งโดยอบในตู้อบไอร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทดลองหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการอบตัวอย่างเห็ดที่ยังคงรักษาสมบัติของสารเล็กติน (ทดสอบจากปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงตามวิธีการในข้อ 2.2.1.5) และไม่มีเมือกหรือสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในโครงสร้างของดอกเห็ดสดปนเปื้อนออกมาขัดขวางกระบวนการสกัดสารเล็กติน นำดอกเห็ดที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องตีป่น (Blender; Waring Comercial) เป็นเวลาประมาณ 1-5 นาที ที่ความเร็วสูงสุด โดยปั่นหยุดเป็นช่วงทุกๆ 30 วินาที สกัดสารเล็กตินโดยชั่งผงแห้งของดอกเห็ดปริมาณ 5 กรัม เติมสารละลาย 0.01M Phosphate buffer saline (PBS pH 7.2, ภาคผนวก ก9) ที่มี 0.02M Sodium bisulphate ให้ได้ความเจือจาง (น้ำหนักต่อปริมาตร) เริ่มต้น 1:10 กวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองและปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (Sorvall RC 5C Plus Superspeed Centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ซึ่งเป็นสารสกัดที่เรียกว่าสารสกัดหยาบ (crude extract) เพื่อวิเคราะห์หาสารเล็กตินด้วย hemagglutination assay

กรณีเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ สกัดสารเล็กตินโดยชั่งเส้นใยที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (ข้อ 2.2.1.3) บันทึกน้ำหนัก แล้วบดเส้นใยในโกร่งบดยา เติมสารละลาย 0.01M Phosphate

buffer saline (PBS pH 7.2, ภาคผนวก ก9) ที่มี 0.02M Sodium bisulphate ปริมาณ 5 เท่า (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นดำเนินการสกัดสารตามวิธีการเช่นเดียวกับการสกัดสารจากดอกเห็ดดังกล่าวข้างต้น

2.2.1.5 การทดสอบสมบัติทางชีวภาพด้านการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสารเล็กตินในสารสกัดหยาบ

ทดสอบสมบัติทางชีวภาพด้านการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ของสารเล็กติน เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของสารและอนุพันธ์ของสารเล็กตินที่พบและเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ โดยนำสารละลายโปรตีนเล็กตินมาเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) แบบ two-fold ด้วยสารละลาย 0.01M Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4, ภาคผนวก ก8) ทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (หมู่เลือด เอ บี และ โอ) และเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ 6 ชนิด แกะ กระต่าย ห่าน หนูแรท (Rat) หนูเม้าส์ (Mouse) และหนูตะเภา (Guinea pig) เลือดที่ได้จากทั้งของคนและสัตว์จะเก็บรักษาใน 8% Sodium citrate ก่อนใช้ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง 3 ครั้ง ด้วย 0.01M PBS (pH 7.4, ภาคผนวก ก8) และเตรียมสารละลาย 2% ของเซลล์ เม็ดเลือดในสารละลาย 0.01M PBS (pH 7.4) ปิเปตสารสกัดเล็กตินที่เจือจาง เป็นลำดับแบบ Two-fold สารสกัดละ 50 ไมโครลิตร ลงในช่องของ Microtiter plate (130×85×15 มิลลิเมตร) ที่ประกอบด้วย 8×12 wells ลักษณะ U-shaped bottom ทำการทดลองสองซ้ำ จากนั้นเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจือจาง 2% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดเล็กติน ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เติม 0.01M PBS (pH 7.4) เป็นการทดลองควบคุม (control) บ่ม Microtiter plates ที่บรรจุสารทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง บันทึกผลบวกของการจับกลุ่มซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกันเป็นสีแดงปกคลุมที่ก้นของ Microtiter plate ผลลบพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมดตกลงอยู่ที่ก้นหลุม เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นเป็นจุดสีแดง เซลล์เม็ดเลือดอาจเกิดการแตกสลาย (hemolysis) เนื่องจากสารสกัดเล็กตินทำให้สารละลายที่มีเซลล์เม็ดเลือดนั้นมีลักษณะใส บันทึกค่า Hemagglutination titer ซึ่งคือส่วนกลับของค่าของความเจือจางสูงสุดที่แสดงการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เลือกสารสกัดจากเชื้อราที่แสดงค่า Hemagglutination titer สูง เพื่อประมาณปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารสกัดของเชื้อราที่แสดงสมบัติของเล็กตินด้วยวิธี Bradford (1976) ใช้ Bovine serum albumin เป็นสารละลายมาตรฐาน และทดสอบสมบัติทางชีวภาพอื่นในขั้นตอนต่อไป

2.2.1.6 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตหรือที่พบการสะสมของเล็กติน

คัดเลือกเชื้อราที่พบการสะสมของสารเล็กตินในโครงสร้างของเชื้อราในปริมาณสูง โดยเทียบจาก Hemagglutination titer ของสารสกัดที่ทดสอบทั้งจากดอกเห็ด เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ และอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ

2.2.2 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะพื้นฐานของสารเล็กตินที่พบ

เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของเล็กตินและอนุพันธุ์ของเล็กตินที่พบ และเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต โดยศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะพื้นฐานของสารเล็กตินที่ให้ผลบวก hemagglutination ดังนี้

2.2.2.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบบางชนิด โดยเลือกสารสกัดจากเชื้อราที่ให้ผลบวก Titer สูงเมื่อทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ในการดำเนินการทดสอบ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายใต้การดูแลของ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร จุลินทรีย์ทดสอบมาตรฐานที่ใช้ คือ แบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922) เลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar (ภาคผนวก ข4) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบคือ Mueller Hinton Agar (ภาคผนวก ข3) และเชื้อรา 4 สายพันธุ์ (*Candida albicans* NCPF 3153, Flucytosine-sensitive *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, Flucytosine-resistant *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113 และ *Microsporum gypseum*) และใช้สารสกัดที่ยังไม่ทำให้เข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อ paper disc มาตรฐานปลอดเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ก่อนใช้ทำให้สารสกัดปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง (0.45 ไมโครเมตร) ปลอดเชื้อ ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion ตามวิธีของ Murray *et al.* (1999)

2.2.2.2 ความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน

ทดสอบความเป็นพิษของสารเล็กตินต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งในขั้นต้นทดลองกับเซลล์มะเร็งที่พบมากในประเทศไทย 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (Human epidermoid carcinoma (KB) cell lines) และมะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma (HeLa) cell lines) และศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดนั้น (เลือกเฉพาะบางสารที่ได้ผลการทดสอบขั้นต้นแล้วเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์) ต่อเซลล์ปกติของคนหรือของลิง จำนวน 1 ชนิด เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัด และในการทดสอบความเป็นพิษใช้ MTT colorimetric assay ตาม Mosmann (1983) และ Wilson (2000) ที่อาศัยปฏิกิริยาในไมโตรคอนเดรียรีดิวซ์สาร MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็น Tetrazole ชนิดหนึ่งที่มีสีเหลือง เมื่อถูกรีดิวซ์เกิดเป็นสีม่วงของ Formazan ในไมโตคอนเดรียของเซลล์สิ่งมีชีวิต เติม solubilization solution (ใช้ Dimethyl sulfoxide ในสารละลาย Hydrochloric acid) เพื่อละลายสาร

สีม่วงที่ไม่ละลายที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีในสารละลายนี้ที่ความยาวแสง 500 และ 600 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer ในขั้นตอนนี้ได้ความอนุเคราะห์ในการดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยสมุนไพร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ภายใต้การดูแลของ ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์

2.2.2.3 ความเสถียรต่อความร้อน

ทดสอบความเสถียรต่อความร้อนของสารเล็กตินด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Otta *et al.* (2002) และ Freire *et al.* (2002) โดยนำสารละลายโปรตีนเล็กตินที่คัดเลือกมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และที่ 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้สารสกัดที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นการทดลองผลบวกควบคุม (positive control) จากนั้นทดสอบกิจกรรมของสารเล็กตินที่ยังเหลืออยู่ด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดที่สารเล็กตินนั้นมีปฏิกิริยาที่ให้ค่า Hemagglutination titer สูงสุด

2.2.3 การทดลองผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อราชนิดที่สามารถแยกได้เชื้อบริสุทธิ์

ทดลองผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อราชนิดที่สามารถแยกได้เชื้อบริสุทธิ์ และมีผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ค่า Titer สูงมาเพาะเลี้ยง โดยทดลองปรับสูตรของสารอาหารโดยใช้อาหาร Malt yeast broth (ภาคผนวก ข2) เป็นอาหารเริ่มต้นเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน กรองแยกเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบสมบัติของสารเล็กติน ทั้งจากสารสกัดหยาบของเส้นใยของเชื้อรา และจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อรา สกัดสารเล็กตินออกจากเส้นใยของเชื้อรา โดยบดเส้นใยของราและเติมสารละลาย PBS (0.01M, pH 7.2; ภาคผนวก ก9) ปริมาณ 5 เท่า (น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ แล้วจึงปั่นแยกตะกอนจากเส้นใยที่ตกค้างด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (Sorvall RC 5C Plus Superspeed Centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่า Hemagglutination titer ของเล็กตินในสารสกัดและอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเตรียม serial dilution แบบ two-fold ของทั้งสารสกัดหยาบและอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1.5 บันทึกค่า Hemagglutination titer คัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพผลิตสารเล็กตินจากค่า Titer สูง เพื่อศึกษาในข้อ 2.2.4. ต่อไป

2.2.4 การศึกษาเพื่อการโคลนจีน (gene cloning) ที่เกี่ยวข้องการผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อรา/เห็ดที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้น

2.2.4.1 การเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราชนิดที่ผลิตเล็กตินชนิดเด่นด้านปริมาณการผลิตสูงและสมบัติทางชีวภาพที่ได้ทดสอบ

เลือกเชื้อราจากผลการศึกษาในข้อ 2.2.1-2.2.3 เพื่อนำมาผลิตหรือสกัดสารเล็กตินจากโครงสร้างของเชื้อรา ทำบริสุทธิ์สารเล็กตินเพื่อทดสอบสมบัติของสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ว่า

ยังคงมีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบ ศึกษาลำดับของกรดแอมิโน และศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินจาก genomic DNA โดยอาศัยข้อมูลจากการระบุชนิดของเชื้อราที่ได้ศึกษาข้อมูลจากแหล่งอ้างอิงเมื่อเปรียบเทียบทั้งชนิดของเชื้อรา และสมบัติทางชีวภาพของสารเล็กติน

2.2.4.2 การสกัดเล็กตินจากโครงสร้างของเชื้อรา

นำเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์หรือดอกเห็ดที่อบแห้ง 15 กรัม มาเตรียมให้เป็นผงด้วย เครื่องตีป่น (Blender) เติม Ice-cold extraction buffer (0.01M PBS, pH 7.4; ภาคผนวก ก8) ปริมาตร 10 เท่า (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในโกร่ง ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Insoluble poly(vinylpyrrolidone) (PVPP) ปริมาณ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อดูดซับ Polyphenolic substances กวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น เพื่อแยกกากที่มีขนาดใหญ่ออก แล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (Sorvall RC 5C Plus Superspeed Centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาตกตะกอนด้วย Ammonium sulphate ความเข้มข้น 30% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นแยก เนื่องจากสารเล็กตินที่ศึกษามีความเข้มข้นต่ำจึงใช้การปั่นแยกด้วยเครื่อง Ultracentrifuge (45Ti Rotor, L80 Ultracentrifuge, Beckman Coulter) ที่ความเร็ว 35,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายใสที่ได้ไปทำ Dialysis ด้วย Cellulose acetate dialysis-tubing membrane (Molecular weight cut-off (NMWC) ที่ 10 kDa) แล้วทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Chromatography

ก) การทำบริสุทธิ์สารเล็กติน

จากผลการศึกษาสมบัติของเล็กตินและอาศัยข้อมูลจากแหล่งอ้างอิง เริ่มทำบริสุทธิ์สารเล็กตินที่คัดเลือกด้วยวิธี Chromatography โดยทดลองใช้ Ion exchange chromatography นำสารละลายโปรตีนเล็กตินมาแยกโดยวิธี Ion exchange chromatograph เก็บ fraction และทดสอบกิจกรรมหรือสมบัติของสารเล็กตินด้วยการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ โดยเลือกเฉพาะเลือดของสัตว์ชนิดที่ได้ทดสอบแล้วได้ค่า Titer สูงสุด เก็บ fraction ที่มีกิจกรรมของสารเล็กติน เพื่อแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อโดยวิธี Affinity chromatography เริ่มทดลองใช้ resin ชนิด Mucin-Sepharose 4B และทดสอบกิจกรรมของสารที่แยกได้ด้วยสมบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์

นำสารสกัดเล็กตินบรรจุลงในคอลัมน์ Mucin-Sepharose 4B column (2.6×5 cm; 25 ml bed volume) ผ่าน Running buffer (ภาคผนวก ก11) ด้วยปั๊ม P-1 peristatic pump (Pharmacia Biotech) อัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่เชื่อมต่อกับ Monitor UV-1 (Pharmacia Biotech) และ Graphic 450 flat bed recorder (Lloyd Instruments Ltd.) เมื่อ peak ของ Un-bound protein ปรากฏและ base line เรียบ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ต่ำกว่า 0.01) แสดงว่าคอลัมน์อิ่มตัวไปด้วยสารสกัดเล็ก

ติน จึงล้างคอลัมน์ด้วย Buffer ปริมาตร 2 เท่าของ bed volume แล้วชะสารสกัดเล็กตินที่ถูกดูดซับด้วย Elution buffer (20mM 1,3-Diaminopropane, DAP; ภาคผนวก ก2) จนกระทั่ง peak กลับคืนสู่สถานะ base line เก็บ fraction ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Fraction collector (Fraction collector 2110; Bio-Rad) ปรับ pH ให้เป็นกลางทันทีด้วย 1M Tris-HCl (pH 7.0, ภาคผนวก ก19) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำแต่ละ fraction ไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และทดสอบ hemagglutinating activity จากนั้นเทสารละลายของแต่ละ fraction ที่มีสมบัติของเล็กตินรวมกัน ทำ dialysis ด้วย dialysis tubing membrane ชนิด Cellulose acetate ซึ่งเป็น Nominal molecular weight cut-off (NMWC) ที่ 10 kDa Dialysis ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และทำให้เข้มข้นด้วย ultrafiltration เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

ข) การหาความเข้มข้นของโปรตีนในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง

หาความเข้มข้นของโปรตีนระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Lambda 40 UV-VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer Instruments)

ค) การศึกษาสมบัติและคุณลักษณะของสารเล็กตินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

(1) การทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของเล็กติน

เจือจางสารละลายเล็กตินจากเชื้อราเป็นลำดับแบบ Serial two-fold dilution ใน Microtiter U-plates (50 ไมโครลิตร) แล้วผสม 2% ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ที่จับกับสารที่ดีที่สุดจากผลการทดสอบขั้นต้นใน PBS (0.01M, pH 7.2, ภาคผนวก ก9) ในปริมาณที่เท่ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง บันทึกค่า Hemagglutination titer คือส่วนกลับของค่าการเจือจางสูงสุดที่แสดงการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 Hemagglutination unit คำนวณค่า specific activity เป็นจำนวนของ Hemagglutination unit ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

(2) การหามวลโมเลกุลของสารเล็กติน

การหามวลโมเลกุลของเล็กตินจากเชื้อราในขั้นตอนนี้ใช้ Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่ใช้ 17.5% Polyacrylamide gel (ภาคผนวก ก10 และ ก12-13) ด้วยวิธีการตาม Laemmli (1970) ย้อม Gel ด้วย Coomassie brilliant blue (ภาคผนวก ก 14) หาน้ำหนักโมเลกุลของเล็กตินโดยเทียบการเคลื่อนที่กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (HMW-SDS Marker kit, Amersham Pharmacia Biotech) ในการศึกษาได้ใช้ Tricine-SDS-PAGE gel electrophoresis (ภาคผนวก ก17) เพื่อช่วยในการแยกเล็กตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก วิธีการจะคล้ายกับระบบของ SDS-PAGE แต่ใช้ Tricine แทน Glycine วิธีการนี้ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดเล็กระหว่าง 5 ถึง 20 kDa

(3) ความจำเพาะของสารเล็กตินต่อน้ำตาล

น้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบ คือ L-Arabinose, Fucose, D-Glucose, D-Galactose, *N*-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc), *N*-Acetyl-D-glucosamine, Lactose, D-Mannose, Raffinose, L-Rhamnose และ D-Xylose โดยเจือจางน้ำตาลที่ใช้ทดสอบเป็นลำดับแบบ two-fold ด้วย Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4, ภาคผนวก ก8) จากนั้นนำสารละลายโปรตีนเล็กตินที่ปรับความเข้มข้นมาผสมกับน้ำตาล บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์

(4) การทดสอบคุณลักษณะ Glycoprotein

ทดสอบคุณลักษณะ *Glycoprotein* ของสารเล็กตินโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Periodic acid Schiff (PAS) staining ตามวิธีการที่ระบุโดย Fukuda and Kobata (1993) บ่มเจลจากวิธี SDS-PAGE เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ใน fixation solution (ภาคผนวก ก7.1) และตามด้วยการจุ่มในสารละลาย Periodic acid (Amersham Pharmacia Biotech) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเจลด้วยน้ำ เติมสารละลาย Meta-bisulfite (ภาคผนวก ก7.2) จะสังเกตว่าเจลเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเติมสารละลาย Meta-bisulfite ที่เตรียมขึ้นใหม่และใช้งานทันที ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที จนกระทั่งไม่มีสี จากนั้นนำเจลวางลงใน Schiff's reagent (Amersham Pharmacia Biotech) และบ่มจนกระทั่งแถบสีแดงของคาร์โบไฮเดรตปรากฏขึ้น โดยปกติจะปรากฏหลังจาก 2 ชั่วโมง กำจัด reagent ส่วนเกินด้วย Destaining solution ß2 glycoprotein I (Amersham Pharmacia Biotech) และใช้ Chicken IgG เป็นผลบวกควบคุม (positive control)

(5) ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ทดสอบความเสถียรต่อความร้อนและ pH ของเล็กตินที่คัดเลือกโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Otta *et al.* (2002) และ Freire *et al.* (2002) ความเสถียรต่อความร้อนทดสอบจากการให้ความร้อนสารสกัดของเล็กติน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย PBS (0.01M pH 7.2, ภาคผนวก ก9) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 40, 50, 55, 65, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาแล้ว ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วด้วยน้ำเย็น นำไปปั่นแยกเอาตะกอนออกมา หาค่า Hemagglutination titer โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดเล็กตินชุดควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสความร้อนระดับที่ศึกษาซึ่งมีค่า Hemagglutination titer คิดเป็น 100%

สำหรับความเสถียรที่ระดับ pH ต่างๆ ของเล็กติน ทดสอบโดยปรับ pH ของสารสกัดเล็กตินในช่วง pH 3 ถึง pH 10 และเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สารละลายที่ใช้เพื่อปรับ pH มีช่วง pH ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 50mM Glycine-HCl buffer (pH 2.0-3.0), 50mM Sodium acetate buffer (pH 4.0-5.5), 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0-8.5) และ 50mM Glycine-NaOH buffer (pH 9.0-11.0) จากนั้นทำ dialysis ตัวอย่างเล็กตินใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจหาค่า Hemagglutination titer คิดเทียบร้อยละ (%) กับ control

ง) การวิเคราะห์ลำดับกรดแอมิโนของสารโปรตีนเล็กติน

นำสารละลายโปรตีนเล็กตินไปแยกด้วยเทคนิค Tricine SDS-PAGE ตัดแถบเจลของโปรตีน *ย่อยสลาย*เจลตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Rosenfeld *et al.* (1992) โดยตัดเจลจาก SDS-PAGE เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ล้างด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 50% Acetonitrile และ 0.2M Ammonium bicarbonate pH 8.9 แล้วนำไประเหิดน้ำภายใต้สุญญากาศ (freeze-drying) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลนั้นมาแช่ในสารละลาย buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.2M Ammonium bicarbonate pH 7.8, 0.02% Tween 20 ที่มี 2M Urea และ Trypsin 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของ Target protein โดยใส่สารละลาย buffer 10-20 ไมโครลิตร เมื่อเจลชุ่มด้วย buffer นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นกำจัดสารละลาย buffer ส่วนเกินโดยเทลงใน microcentrifuge tube และสกัด Peptide ออกจากเจลด้วยสารละลาย 60% Acetonitrile และ 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) สกัด 2 ครั้ง แล้วล้างเจลด้วยสารละลาย buffer รวมส่วนที่สกัดได้ทั้งหมด ทำให้เข้มข้นโดย Centrifugal evaporation และบรรจุสารละลายที่มีเปปไทด์ลงใน PE-Biosystems PepMap C18 RP-HPLC column (100×2.1 mm) ที่ equilibrate ด้วย 0.08% TFA ซึ่งเปปไทด์จะถูกแยกออกมาที่เวลา 95 นาที ด้วยการชะของสารละลาย gradient ของ 0-64% Acetonitrile ใน 0.08% TFA ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 214 นาโนเมตร นำเปปไทด์ไปวิเคราะห์หาลำดับกรดแอมิโนด้าน N-terminus ด้วยวิธี Edman degradation โดยใช้ Protein Sequenator (Protein Sequenator Model 471A, Applied Biosystems) เปรียบเทียบลำดับกรดแอมิโนของเล็กตินที่มีการศึกษาแล้วใน NCBI Database (U.S.A.) ด้วยโปรแกรม NCBI-Blast และ FASTA

2.2.4.3 การศึกษายีน (gene/s) ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน

ศึกษาจาก Genome จากเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์หรือส่วนของ fruiting body ที่เก็บรักษาไว้ในช่วงที่มีการรวบรวมตัวอย่างเชื้อราที่เจริญในสภาพธรรมชาติ โดยคัดเลือกเชื้อราชนิดเด่นที่มีผลการศึกษาการสะสมสารเล็กตินในโครงสร้างและผลการทดสอบสมบัติทางชีวภาพของสารที่มีแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ เพื่อศึกษายีนโดยอาศัยข้อมูลตามที่มีการศึกษาเชื้อราในกลุ่มใกล้เคียงตาม Iijima *et al.* (2002), Wright *et al.* (1999b) และ Yoshida *et al.* (1994) โดยสกัดแยก DNA จากส่วนของดอกเห็ดที่ยังอ่อนหรือเส้นใย และทดลองตรวจจับยีนด้วย specific oligonucleotide primers ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) จากที่มีรายงานการศึกษาบ้างแล้วในเชื้อราชนิดใกล้เคียง (Penas *et al.*, 1998; Stoop and Moolbrock, 1998; Boulianne, 2000; Kruger *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นการตรวจสอบแนวโน้มความเหมือนหรือแตกต่างของยีน ซึ่งยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันสามารถให้ผลผลิตสารโปรตีนเล็กตินต่างชนิดกัน

ก) การสกัดแยก genomic DNA

นำเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้หรือตัดตัวอย่างดอกเห็ดขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร

ลงในหลอดขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis buffer (ภาคผนวก ก5) 500 ไมโครลิตร บดตัวอย่างเยื่อกแข็ง (แช่ในไนโตรเจนเหลว) ให้แตกด้วยแท่งแก้ว เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสด้านบนปริมาตรประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดบรรจุหลอดใหม่ เติม 0.6 เท่าของ Isopropanol พลิกกลับหลอดผสมกันเบาๆ ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร ทำให้ตะกอนแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ละลายตะกอนด้วย TE buffer (ภาคผนวก ก16) 50 ไมโครลิตร ละลายตะกอนที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำความสะอาด DNA 100 ไมโครลิตร ด้วย RNase A solution (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม Proteinase K solution (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 100 ไมโครลิตร ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสด้านบนใส่หลอดบรรจุใหม่ เติม 3M Sodium acetate (pH 5.2) 4 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol (-20 องศาเซลเซียส) 150 ไมโครลิตร ต่อปริมาตรส่วนใสที่เก็บได้ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ สังเกตการจับกลุ่มของเส้นตะกอนสีขาวในหลอดซึ่งเป็นตะกอน DNA จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างและละลายตะกอนด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่ระบุข้างต้น ตรวจสอบ DNA ด้วย Agarose gel electrophoresis (ใช้ 0.8% Agarose gel, Low EEO Agarose, BIO 101, Inc.) ใช้ของเหลวที่มี DNA ปริมาณ 2ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย TE buffer ให้ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading buffer (ภาคผนวก ก4) 2 ไมโครลิตร บรรจุส่วนผสมลงในช่อง (Well) ของ Agarose gel ในสารละลาย TBE (ภาคผนวก ก15) ใช้ 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) เป็น DNA Molecular weight markers แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 50 โวลท์ จากนั้นตรวจหาตำแหน่งของแถบ (band) DNA โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที และตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 295 นาโนเมตร ของ UV Transilluminator บันทึกภาพผลที่ได้

ข) การเพิ่มจำนวนจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน

เพิ่มปริมาณจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินจาก genomic DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ใช้ Primers ตามตารางที่ 2.1 โดยเตรียม PCR reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดที่มีฝาปิด ขนาดบรรจุ 200 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer ที่มี 1.5mM $MgCl_2$ (QIAGEN) 100 ไมโครโมล ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP;

Boehringer Mannheim) 20 พิโคโมล ของแต่ละคู่ของ primers (ตารางที่ 2.1) 1.6 หน่วย ของ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) และ 200 นาโนกรัม ของ genomic DNA

จากนั้นเริ่มกระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp™ PCR System 9800 (Perkin-Elmer) จำนวน 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาต่างกันตามลำดับ ดังนี้

(1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

(2) รอบที่ 1-30 โดยแต่ละรอบประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50, 43, 50 และ 48 องศาเซลเซียส สำหรับ primers AgbiF/AgbiR, Cgl1F/Cgl1R; MaosF/MaosR และ PlosF/PlosR (ตารางที่ 2.1 ที่มี single 3'A-overhangs) ตามลำดับ เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 นาที

(3) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจหาผลผลิต (PCR product) โดยใช้ Agarose gel electrophoresis (1.5% Agarose gel) ตามวิธีเดียวกับที่ตรวจหา genomic DNA ดังระบุข้างต้น

ตารางที่ 2.1 Oligonucleotide primers ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน

Primer	Sequence (5'-3')	PCR product (bp)/ Mushroom species	Reference
AgbiF	ATGGCCCCAGGATTCACTATCAGC	798/ *Agaricus bisporus*	Stoop and
AgbiR	CTACCAAATGAGTTGACCACCATC		Moolbrock (1998)
Cgl1F	ACAGCAGGACCAAGGGT	340/*Coprinus* galectin gene	Boulianne (2000)
Cgl1R	CTACCGACAGCTAGCAAGCA		
MaosF	ARYTGRTGCCARTTRATCGT	879/*Marasmius oreades*	Kruger *et al.* (2002)
MaosR	TGCCARTTRATCGTGTCTGG		
PlosF	CGCGGATCCACTGAAACGCCGGTTA	579/*Pleurotus ostraetus*	Penas *et al.* (1998)
PlosR	GGGAAGCTTATAGCATTGAGCAAGT		

R = A, G

Y = C, T

ค) การทดลอง clone จีนที่เพิ่มจำนวนได้ (PCR product)

นำผลผลิตจีนที่เพิ่มจำนวนจาก genomic DNA ด้วย primers ที่มีความจำเพาะตัดต่อเข้า pCR®8/GW/TOPO® Vector (Invitrogen) โดยใช้ pCR®8/GW/TOPO® Cloning kit (Invitrogen) ตามวิธีการที่ระบุจากผู้ผลิต เพื่อทดสอบสมบัติของจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน ซึ่งอาจใช้เป็น marker ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราในโครงการวิจัยต่อเนื่องที่จะวางแผนดำเนินการต่อไป

บทที่ 3
ผลการวิจัย

การศึกษาสารเล็กตินจากเชื้อรา โดยเน้นเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ในกลุ่ม Ascomycetes และ Basidiomycetes ได้ผลการวิจัยดังนี้

3.1 การรวบรวมและวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราตามลักษณะทางสัณฐาน

เชื้อราที่รวบรวมในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ (Macro-fungi) 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งเป็นราชั้นสูงที่เรียกว่า เห็ด (Mushroom) และกลุ่ม Ascomycetes ในวงศ์ Xylariaceae ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ด (fruiting body) จากป่าธรรมชาติและในตลาดชุมชนที่มีการจำหน่ายเห็ดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดที่เจริญตามธรรมชาติ (เห็ดป่า) ในพื้นที่ 8 จังหวัดเป็นหลัก คือ จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ อุบลราชธานี สกลนคร ขอนแก่น ชัยภูมิ นครปฐม และพิษณุโลก (ตารางที่ 3.1) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด 330 ตัวอย่าง (specimen) ดังตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของดอกเห็ดที่แสดงในรูปผนวกที่ 1-20 เมื่อจำแนกและระบุชนิดของเห็ด (เชื้อรากลุ่ม Basidiomycetes) ตามลักษณะทางสัณฐานตาม Arora (1986), Alexopoulos *et al.* (1996), Læssøe and Conte (1996), Hawksworth (1993), Turnbull and Watling (1999a, 1999b) และ Watling (2003) สามารถจัดจำแนกได้ 24 วงศ์ 44 สกุล (ตารางที่ 3.2 ยกเว้นวงศ์ Xylariaceae) คือ วงศ์ Agaricaceae, Amanitaceae, Auriculariaceae, Bolbitiaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Cariolaceae, Clavariaceae, Coprinaceae, Entolomataceae, Geastraceae, Helvellaceae, Hymanochaetaceae, Lycoperdaceae, Peniophoraceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Phallaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae, Sclerodermataceae และ Tricholomataceae

เชื้อราในกลุ่มเห็ดที่พบมากคือ วงศ์ Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Plurotaceae, Russulaceae, Tricholomataceae เห็ดที่รวบรวมได้นี้มีลักษณะทางสัณฐานทั้งที่แตกต่างและคล้ายกันมากจนยากที่จะจำแนกในระดับสกุล (genus) และระบุชนิด (species) ได้อย่างแน่นอนและชัดเจนเมื่อเทียบกับแหล่งอ้างอิง

สำหรับเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes ในวงศ์ Xylariaceae ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ กรมป่าไม้ เป็นลักษณะเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar จำนวน 59 ไอโซเลท (ตารางผนวกที่ 1)

3.2 การแยกและเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์

จากการแยกและเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์เพื่อการทดสอบสารเล็กติน และทดลองผลิตสารในห้องปฏิบัติการนั้น เชื้อราที่รวบรวมได้ส่วนใหญ่เป็นเห็ดซึ่งจัดเป็นเชื้อราชั้นสูงซึ่งมีการ

พัฒนาโครงสร้างของเซลล์มากขึ้นกว่าเชื้อรากลุ่มอื่น มีการเจริญของเส้นใยช้ากว่ารากลุ่มอื่น และยังพบอีกว่าเห็ดที่รวบรวมได้ส่วนใหญ่ (หลายชนิดในวงศ์ Boletaceae, Russulaceae และ Tricholomataceae) เป็น Mycorrhizal fungi ซึ่งจะอยู่ร่วมกับพืช เมื่อนำมาแยกให้ได้เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์จึงเพาะเลี้ยงได้ยากและตายง่ายเมื่อถ่ายเชื้อต่อเนื่อง จึงมีผลสำเร็จของการแยกและเพาะเลี้ยงและอยู่รอดภายหลังการถ่ายเชื้อจำนวน 24 ไอโซเลท ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเห็ดที่แยกได้เชื้อบริสุทธิ์เจริญบน Potato dextrose agar และที่ทดลองเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร Malt extract broth เพื่อการสกัดสารเล็กตินจากเส้นใยและทดสอบการสะสมสารเล็กตินที่อยู่ในอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างของเชื้อราในกลุ่มเห็ดที่รวบรวมเพื่อศึกษาการผลิต/สะสมสารเล็กติน

Fungal collection area	Dominant fungal family
1. จังหวัดนครราชสีมา พื้นที่ทั้งในป่าธรรมชาติและตลาดพื้นบ้านในเขตอำเภอเมือง (ป่าพันธุกรรมพืชบ้านหนองระเวียง) อำเภอปักธงชัย อำเภอโชคชัย อำเภอครบุรี อำเภอหนองกี่ และอำเภอวังน้ำเขียว (เขาภูหลวง)	Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Cariolaceae, Clavariaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Geastraceae, Hymanochaetaceae, Lycoperdaceae Marasmiaceae, Peniophoraceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae และ Tricholomataceae
2. จังหวัดบุรีรัมย์	Agaricaceae, Amanitaceae, Auriculariaceae, Boletaceae, Boletinelleceae, Cantharellaceae, Russulaceae และ Tricholomataceae
3. จังหวัดอุบลราชธานี	Russulaceae
4. จังหวัดสกลนคร	Boletaceae และ Boletinellaceae
5. จังหวัดขอนแก่น	Agaricaceae
6. จังหวัดชัยภูมิ	Boletaceae และ Russulaceae
7. จังหวัดเลย	Amanitaceae, Boletaceae และ Russulaceae
8. จังหวัดพิษณุโลก	Amanitaceae, Boletaceae, Russulaceae และ Tricholomataceae

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สำหรับเชื้อราในกลุ่ม Polypores มีโครงสร้างของ fruiting body ที่แข็ง จึงยากต่อการสกัดสารเล็กตินจากโครงสร้างนี้ จึงมีการเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์มีจำนวนทั้งสิ้น 19 ไอโซเลท (ตัวอย่างลักษณะโคโลนีดังแสดงในรูปที่ 3.2) ในขณะเดียวกันเชื้อราในกลุ่ม Xylariaceae ที่รวบรวมได้มีทั้งสิ้น 59 ไอโซเลท เป็นเชื้อราที่สร้าง stroma มีลักษณะแข็ง (รูปที่ 3.3 และ 3.4) การสกัดสารจึงใช้เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์

ในขั้นตอนการแยกและเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์เพื่อการทดสอบความสามารถในการสร้างหรือสะสมสารเล็กตินนี้ ได้ศึกษาทั้งจากเส้นใยและในอาหารเหลว (Malt extract broth) ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.2 ผลการระบุชนิดของเชื้อราที่เก็บรวบรวมและ/หรือแยกได้จากแหล่งธรรมชาติและนำมาทดสอบการสะสมสารเล็กตินในโครงสร้าง

Fungal family	Fungal species
1. Agaricaceae	*Agaricus* sp.
	Chamaemyces fracidus
	Chlorophyllum molybdites
	Heimannomyces splendidissima
	Lepiota sp.
	Leucoagaricus sp.
	Leucocoprinus sp.
	Macrolepiota sp.
2. Amanitaceae	*Amanita* sp.
	Amanita hemibapha subsp. *javanica*
	A. nauseosa
	A. sect. *Vaginatae*
3. Auriculariaceae	*Auricularia polytricha*
4. Boletaceae	*Boletus* sp.
	Boletellus sp.
	Heimiella prob. *retispora*
	Gyroporus sp.
	Strobilomyces mollis
	Tylopilus sp.
	Tylopilus plumbeoviolaceu
	Xerocomus sp.
5. Boletinellaceae	*Phlebopus* sp.
6. Cantharellaceae	*Cantharellus* sp.
	Cantharellus minor
	Cantharellus cf. *cibarius*

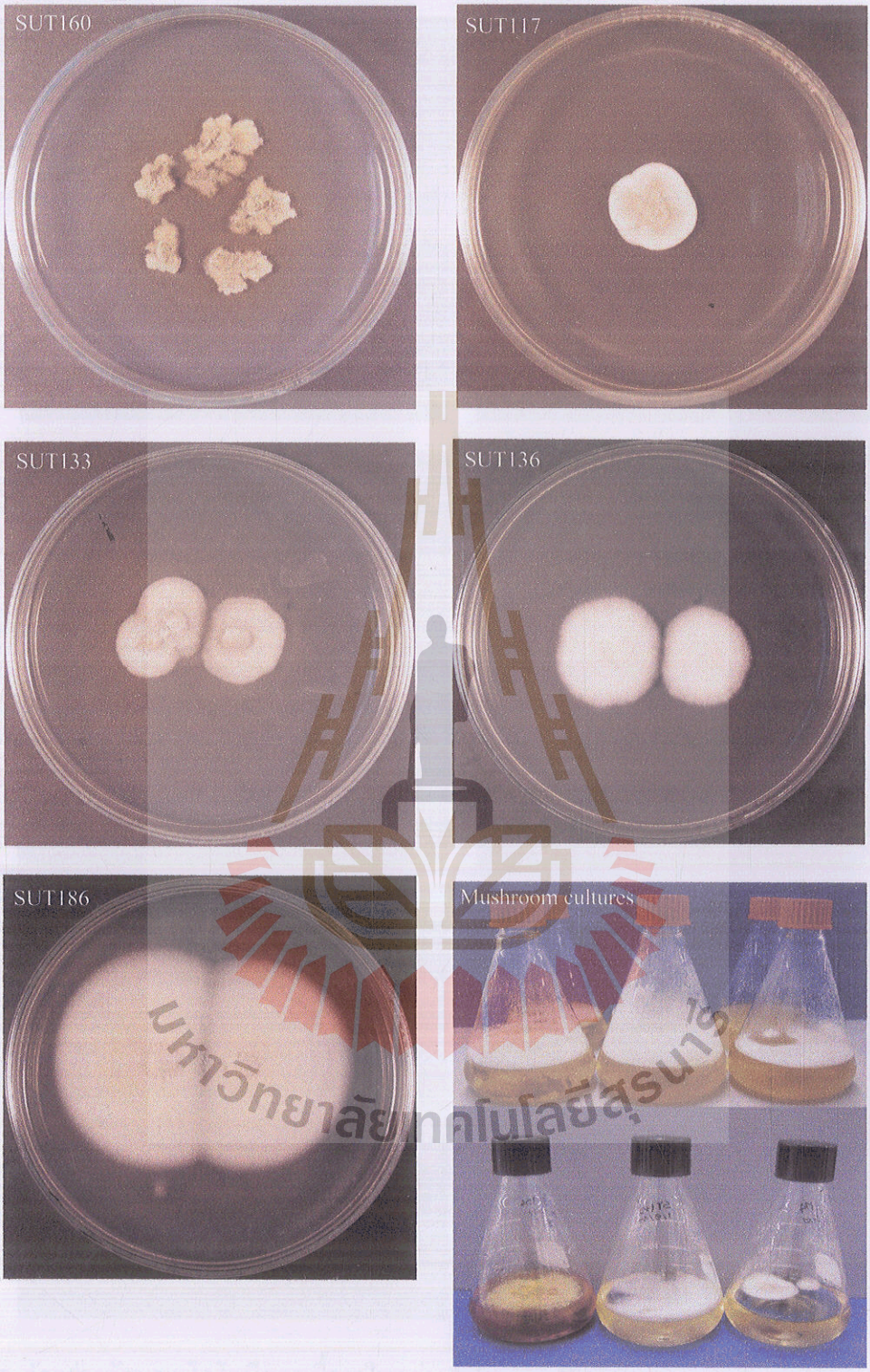
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Fungal family	Fungal species
7. Cariolaceae	*Pycnoporus cinnabarius*
8. Clavariaceae	*Clavulina* sp.
	Clavulina cristata
9. Coprinaceae	*Coprinus* sp.
	Psathyrella sp.
10. Entolomataceae	*Entoloma* sp.
11. Geastraceae	*Geastrum triptex*
12. Helvellaceae	*Stereopsis radicans*
13. Hymanochaetaceae	*Hymenochaete* sp.
14. Lycoperdaceae	*Lycoperdon* sp.
	Mycoamaranthus sp.
15. Peniophoraceae	*Stereum* sp.
	Stereum ostrea
16. Pleurotaceae	*Pleurotus* sp.
	Lentinus sp.
17. Pluteaceae	*Volvariella* sp.
	Volvariella volvacea
18. Phallaceae	Order Phallales
19. Polyporaceae	*Microporus* sp.
	Pycnoporus sp.
	Polyporus sp.
20. Ramariaceae	*Ramaria* sp.
21. Russulaceae	*Lactarius* sp.
	Lactarius volemus
	Russula sp.
	Russula aeruginea
	R. alboareolata
	R. anthracina
	R. delica
	R. cf. *heterophylla*
	R. luteotacta
	R. nigriscentae
	R. rosacea
	R. sect. *Plarantae*
	R. sect. *Foetinae*
22. Schizophyllaceae	*Schizophyllum* sp.
	Schizophyllum commune

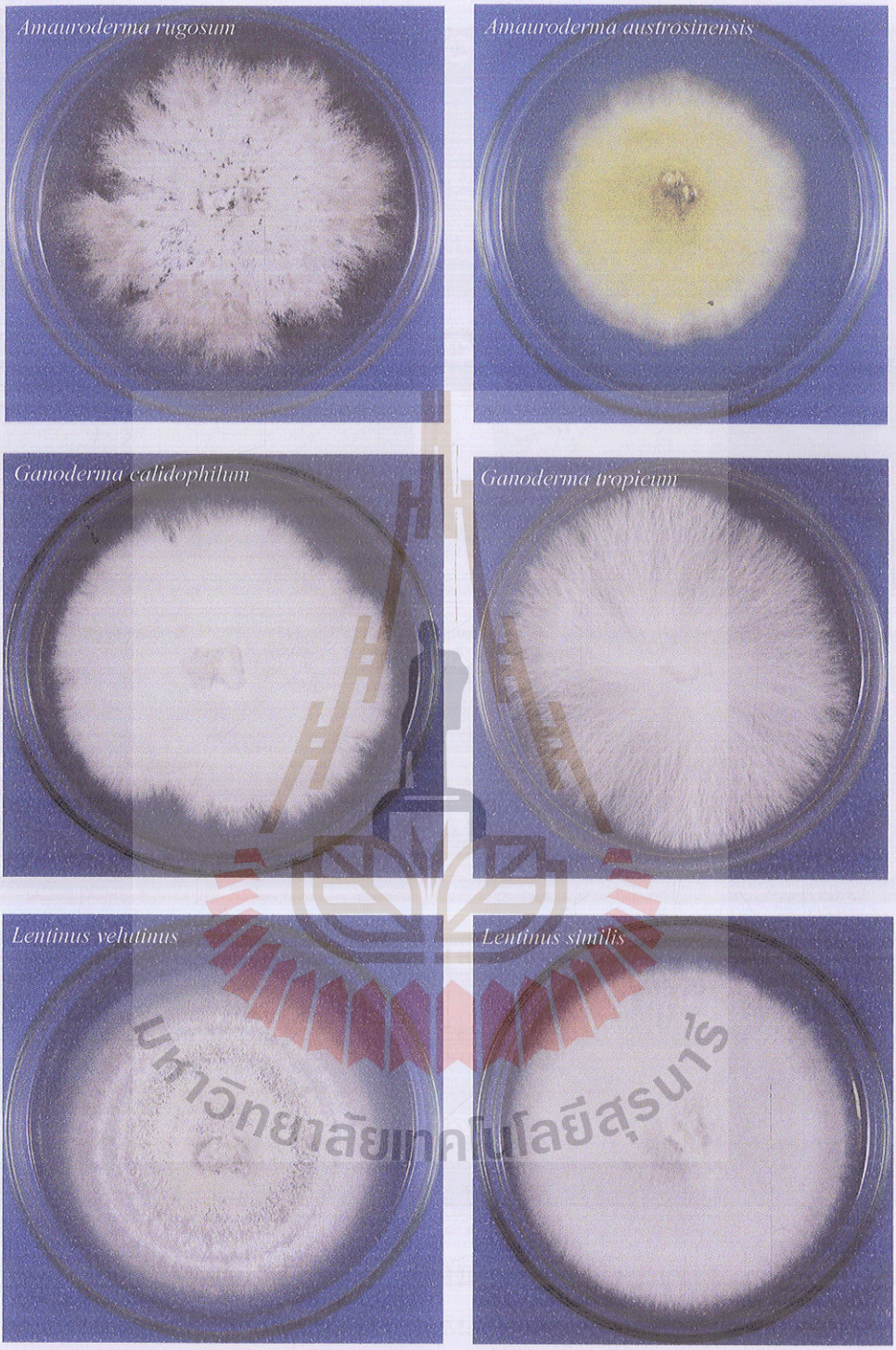
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Fungal family	Fungal species
23. Sclerodermataceae	*Scleroderma* sp.
24. Tricholomataceae	*Collybia* sp.
	Crinipellis sp.
	Laccaria sp.
	Macrocybe sp.
	Marasmius sp
	Mycena sp
	Mycenella sp.
	Termitomyces sp.
	Termitomyces clypeatus
	T. aurantiacus
	T. microcarpus
	T. striatus
	Tricholoma sp.
	Trogia sp.
25. Xylariaceae	*Biscogniauxia* sp.
	Daldinia sp.
	Hypoxylon sp.
	Hypoxylon fendleri
	Hypoxylon cf. *archeri*
	H. moriforme
	H. nitens
	H. monticulosum
	H. lenormandii var. *microspora*
	H. bovei var. *microspora*
	H. truncatum
	H. stygium
	Xylaria sp.
	Xylaria curta
	X. poitei
	X. multiplex
	X. allantoidea
	X. grammica
	X. schweinitzil
	X. feejeensis
	X. cubensis

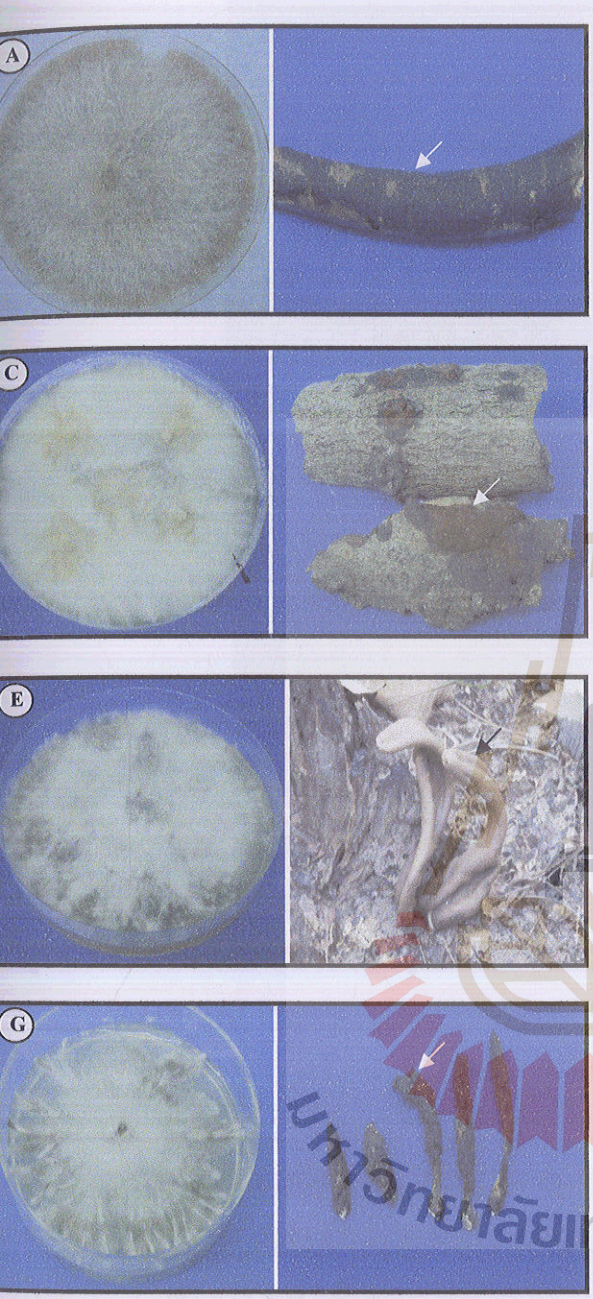
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.1 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้บนอาหารวุ้น Potato dextrose agar และใน Malt extract broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

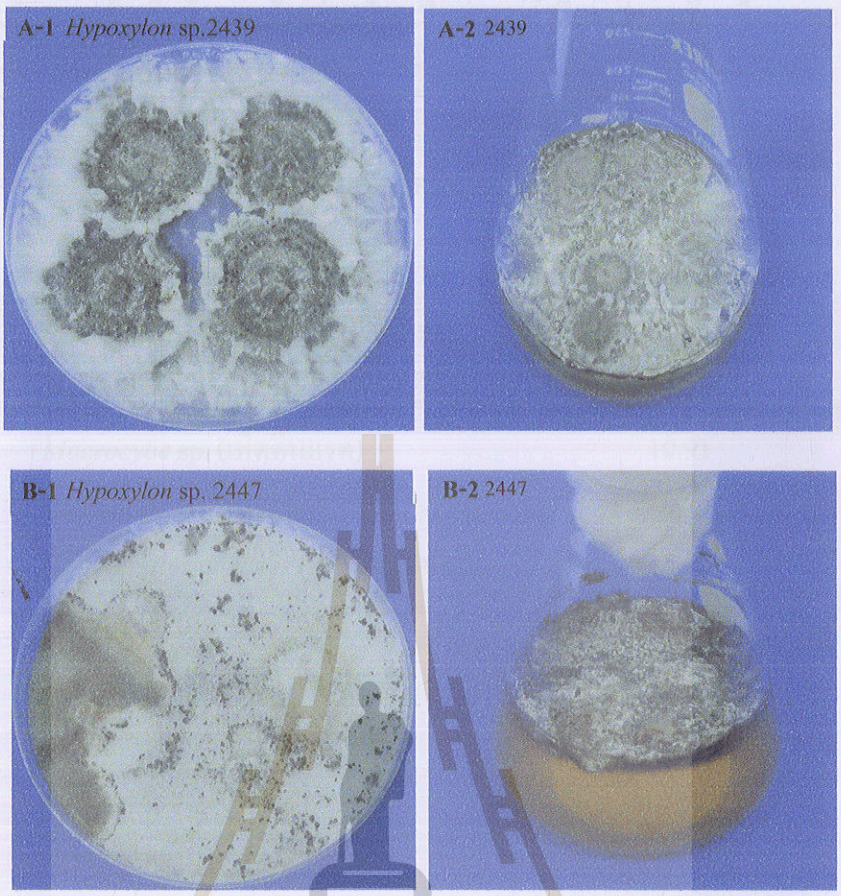


รูปที่ 3.2 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่ม Polypores ที่เจริญบนอาหาร Potato dextrose agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae แสดงลักษณะทางสัณฐานของ stroma ที่เจริญในธรรมชาติ (ลูกศร) และเส้นใยที่เจริญบน Malt extract agar ของเชื้อรา *Biscogniauxia* sp. 2412 (A), *Hypoxylon* cf. *archeri* (B), *H. fendler* 2396 (C), ลักษณะ ascospores (D) ของ *Hypoxylon* sp. 2596 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด, *Xylaria allantoidea* 2510 (E), *X. curta* (F), *X. feejeensis* (G) และ *X. cubensis* 2326 (H)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.4 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อราในกลุ่ม Xylariaceae 2 ไอโซเลท คือ *Hypoxylon* sp. 2439 (A) และ *Hypoxylon* sp. 2447 (B) เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Malt extract agar และในอาหาร Malt extract broth เป็นเวลา 14 วัน

3.3 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตสารเล็กติน

คัดเลือกเชื้อราที่ผลิตสารเล็กตินโดยสกัดแยกสารเล็กตินในรูปสารสกัดหยาบ (crude extract) ประมาณค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด และทดสอบสมบัติของสารเล็กตินด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemagglutination) เปรียบเทียบค่า Titer ที่ได้

3.3.1 การสกัด/แยกสารเล็กตินในลักษณะสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่ใช้ศึกษาในขั้นตอนนี้มีทั้งที่สกัดจากดอกเห็ดที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม และจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งดอกเห็ดส่วนที่ใช้สกัดเล็กตินนี้ผ่านการอบแห้งในตู้อบไอร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากการทดลองหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการอบตัวอย่างเห็ดที่ยังคงรักษาสมบัติของสารเล็กตินที่ทดสอบจากปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ และไม่มีเมือกจากโครงสร้างของดอกเห็ดสดออกมาปนเปื้อนในขั้นตอนการสกัดสารเล็กติน พบว่าการอบที่อุณหภูมิ 40

องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6-18 ชั่วโมง ทำให้ได้ตัวอย่างเห็ดมีความชื้นประมาณ 4-10% (ตารางที่ 3.3) ขึ้นกับความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างเห็ด เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมดอกเห็ดเพื่อใช้ในการสกัดสารเล็กติน

ตารางที่ 3.3 ค่าความชื้นของตัวอย่างแห้งที่ใช้สกัดเล็กติน

Fungal code	Fungal species	Moisture content (%)
ML078	*Schizophyllum commune* (เห็ดแครง)	3.89
SDNA01	*Russula* sp. (เห็ดแดง)	5.91
SUT018	*Macrocybe* sp. (เห็ดตีนแรด)	10.91
SUT107	*Russula* sp. (เห็ดน้ำแป้ง)	8.79
SUT110	*Cantharellus cibarius* (เห็ดมันปูใหญ่)	6.93
SUT113	*Boletus* sp. (เห็ดผึ้ง)	9.61
SUT142	*Lentinus* sp.	6.25
SUT149	*Amanita* sp. (เห็ดระโงกเหลือง)	8.19
SUT150	*Lactarius* sp. (เห็ดหาด)	6.77
SUT151	*Amanita* sp. (เห็ดระโงกขาว)	6.26
SUT162	*Russula* sp. (เห็ดแดง)	6.90
SUT170	*Russula* sp. (เห็ดถ่าน)	6.44
SUT185	*Termitomyces* sp. (เห็ดโคน)	7.98
SUT191	*Cantharellus minor* (เห็ดมันปูเล็ก)	9.37
SUT196	*Marasmius* sp.	8.77
SUT227	*Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง)	10.79

3.3.2 การทดสอบสมบัติของสารเล็กตินในสารสกัดหยาบด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์

ทดสอบสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กตินเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ โดยให้ความสำคัญกับสมบัติทางชีวภาพของสารเล็กตินด้านความสามารถในการทำให้เกิดการจับกลุ่ม (agglutination) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง เน้นความสามารถในการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์และไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน

สกัดสารเล็กตินจากของตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดที่รวบรวมได้ 330 ตัวอย่าง เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ในกลุ่มเห็ดที่แยกได้จากดอกเห็ด ราในกลุ่ม Polypores และราในวงศ์ Xylariaceae จำนวน

24, 19 และ 59 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาตรวจหากิจกรรม hemagglutination พบว่าจากการเจือจางสารละลายโปรตีนเล็กตินเป็นลำดับแบบ two-fold นั้น บางสารสกัดให้ค่า Hemagglution titer ที่สรุปได้ยากระหว่างค่าความเจือสองค่า จึงได้เจือจางสารสกัดหยาบ (crude extract) ในช่วงที่ให้ผลบวกไม่ชัดเจนนั้นเพิ่มอีก 1.5 เท่า แล้วจึงตรวจหากิจกรรม hemagglutination สารสกัดจากดอกเห็ดจำนวน 220 ตัวอย่าง และเส้นใย 43 ไอโซเลท (ตารางผนวกที่ 1 และ 2) มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ได้ดี (ตัวอย่างดังรูปที่ 3.5) และยังพบ hemolytic activity และ partial hemolysis ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเนื่องจากสารสกัดจากเชื้อรา สารสกัดเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ด้วยสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่เกิดปฏิกิริยากับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ได้ดีกว่าคน (รูปที่ 3.6) สารสกัดเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์และที่สะสมในอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมีค่า Titer ต่ำมากจนถึงไม่พบเลย (ตารางที่ 3.4 และ 3.5)

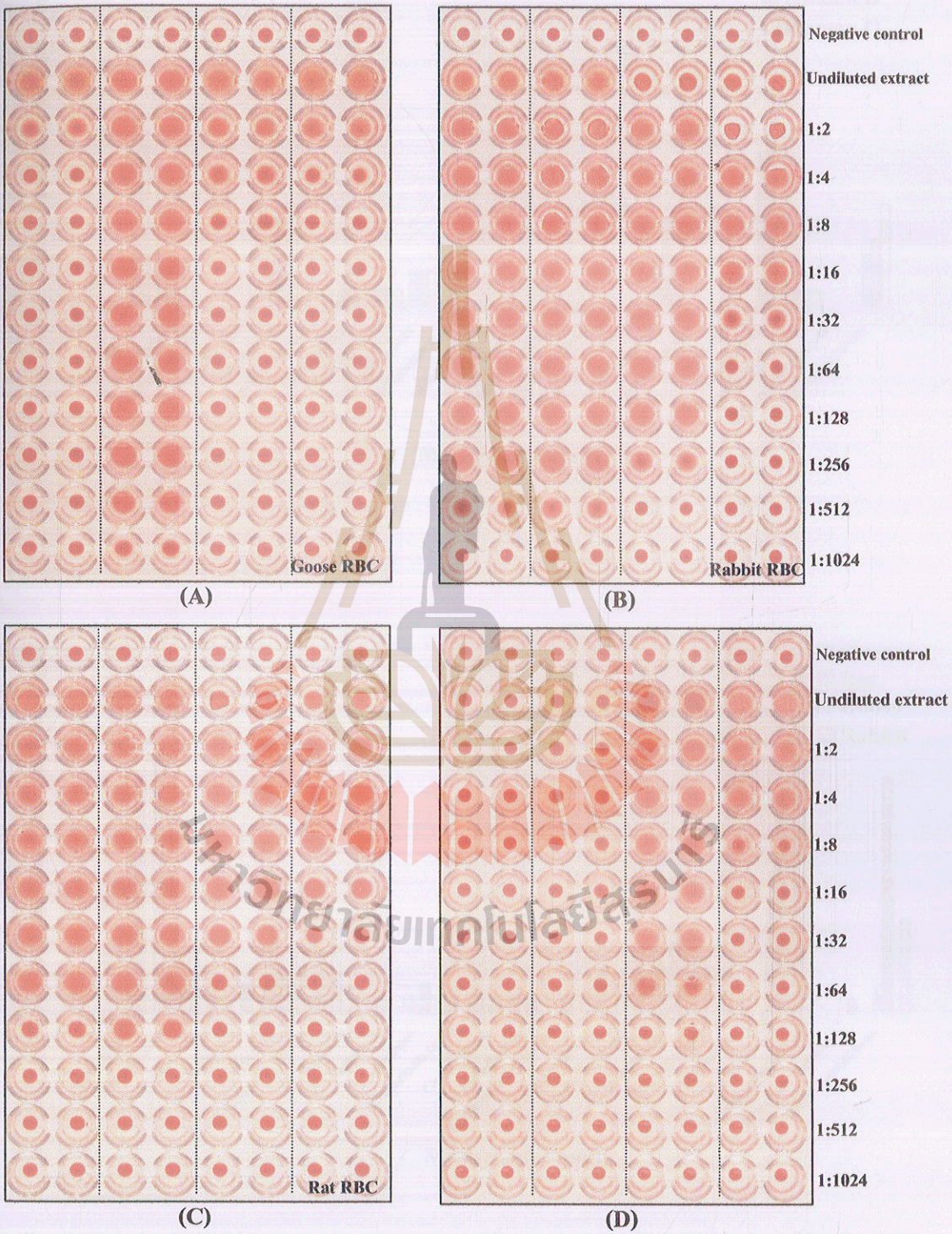
ผลการทดสอบ hemagglutination แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ทดสอบสามารถจับกลุ่มกับเซลล์ของคนในระบบเลือด เอบีโอ (ABO) ได้แตกต่างกัน สารที่เป็น Anti-A และ Anti-B ได้จากเชื้อราบางตัวอย่างในสกุล *Amanita*, Agaricoid, *Psathyrella*, *Boletus*, *Chamaemyces*, *Clavulina*, *Coprinus*, *Macrolepiota* และ *Russula* (ตารางผนวกที่ 1 และรูปที่ 3.6) สารเล็กตินที่เป็น Anti-O ได้จากเชื้อราบางชนิดในสกุล *Amanita, Boletus, Cantharellus, Clavulina, Coprinus, Lentinellus, Macrolepiota, Psathyrella* และ *Russula* โดยสารสกัดจากเชื้อราบางชนิดในสกุล *Amanita, Boletus, Coprinus, Lepiota* และ *Russula* แสดงผลการจับกลุ่มให้ผลบวกกับเลือด ABO ของคนทั้งระบบ

อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีความแตกต่างกันของเล็กตินที่สะสมในโครงสร้างของดอกเห็ดที่ระบุได้ว่าเป็นสกุลหรือชนิดเดียวกัน แต่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งที่พบการเจริญของเห็ดต่างแหล่งกัน แสดงให้เห็นว่าพื้นที่ที่เห็ดเจริญมีผลต่อการสะสมสารเล็กตินที่พบ ขนาดและอายุของดอกเห็ดอาจมีผลต่อการสะสมเล็กติน สอดคล้องกับรายงานของ Guillot and Konska (1997)

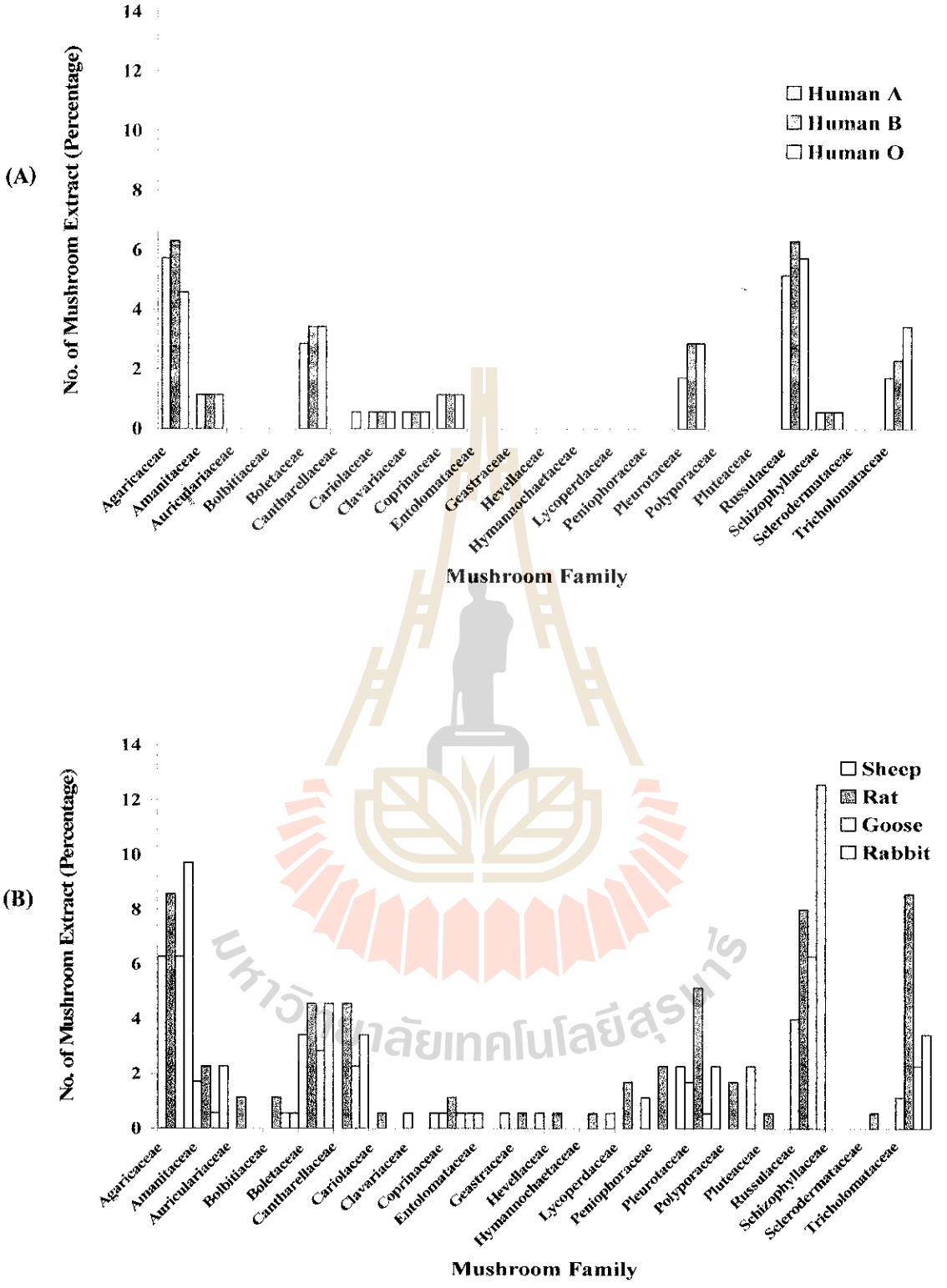
ตัวอย่างเห็ดและราในกลุ่ม Xylariaceae ที่นำมาศึกษาจำนวน 68 และ 31 ตัวอย่างตามลำดับ สะสมสารเล็กตินไว้ใน fruiting body และเส้นใยที่มีปริมาณ Hemagglutination titer สูง $\geq$ 256 เชื้อราเหล่านี้จัดอยู่ในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Chlorophyllum*, *Lentinus*, *Lepiota*, *Leucocoprinus*, *Lycoperdon*, *Macrolepiota*, *Macrocybe*, *Marasmius*, *Russula*, *Schizophyllum*, *Volvariella*, *Hypoxylon* และ *Xylaria* เห็ดหลายชนิดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Russula* และ *Volvariella* เป็นเห็ดรับประทานได้ ที่สารสกัดเล็กติน (ความเจือจางเริ่มต้น 10 เท่า ในขั้นตอนการสกัดสาร) ให้ค่า Hemagglutination titer สูงถึง 1024 สารสกัดเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์และที่สะสมในอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโดยเฉลี่ยมีค่า Titer ต่ำมากจนถึงไม่พบเลย (ตารางที่ 3.4)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นอกจากนี้ยังพบ hemolytic activity และ partial hemolysis ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการใช้ประโยชน์ทางด้านการวิจัยทางการแพทย์ เช่น การผลิต Hemolysin ซึ่งเห็ดที่มีการสะสม Hemolysin ในปริมาณที่สูง ได้แก่ เห็ดบางชนิดในสกุล *Amanita*, *Entoloma* และ *Macrolepiota*



รูปที่ 3.5 ตัวอย่างผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดหยาบของเล็กตินจากเชื้อรา เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ คือ ห่าน (A, Goose) กระต่าย (B, Rabbit) หนู (C, Rat) และ แกะ (D, Sheep)



รูปที่ 3.6 สัดส่วนของสารสกัดจากเห็ดจากจำนวน 86 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ hemagglutination reaction เมื่อทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (A) และสัตว์ (B)

ตารางที่ 3.4 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจากราในกลุ่ม Polypores ทั้งที่สกัดจากเส้นใย และอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ

Fungal species	Hemagglutination against animal red blood cells (Titer)					
	Goose	Guinea pig	Mouse	Rabbit	Rat	Sheep
Mycelium extracts						
Amauroderma austrosinense	-	-	-	2	-	-
Amauroderma rugosum	-	-	-	16	-	-
Bjerkandera adusta	-	-	-	1 (undiluted)	1 (undiluted)	-
Daedelopsis confragosa	-	1 (undiluted)	-	1 (undiluted)	1 (undiluted)	-
Fomitopsis feei	-	-	-	-	-	-
Ganoderma calidophilum	-	-	-	64	-	-
Ganoderma lucidum	-	-	-	-	-	-
Ganoderma tropicum	-	-	-	128	-	-
Hexagonia apiaria	-	-	-	2	1 (undiluted)	-
Hexagonia tenuis	-	1 (undiluted)	-	1 (undiluted)	-	-
Lentinus polychrous	-	-	-	16	-	-
Lentinus similis	-	-	-	16	-	-
Lentinus velutinus	-	-	-	128	-	-
Lenzites acuta	-	-	-	-	-	-
Microporus xanthopus	-	1 (undiluted)	-	-	1 (undiluted)	-
Pycnoporus cinnabarinus	-	-	-	-	-	-
Trametes versicolor	-	-	-	-	-	-
Trichaptum byssogenum	-	-	-	-	-	-
Tyromyces stipticus	-	1 (undiluted)	-	-	1 (undiluted)	-
Cultured broth						
Amauroderma austrosinense	-	-	-	1	-	-
Amauroderma rugosum	-	-	-	8	-	-
Bjerkandera adusta	1 (undiluted)	-	-	2	-	-
Daedelopsis confragosa	-	-	1 (undiluted)	1 (undiluted)	-	-

- : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.4 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจากราในกลุ่ม Polypores ทั้งที่สกัดจากเส้นใย และอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ (ต่อ)

Fungal species	Hemagglutination against animal red blood cells (Titer)					
	Goose	Guinea pig	Mouse	Rabbit	Rat	Sheep
Cultured broth (cont.)						
Fomitopsis feei	-	-	1 (undiluted)	1 (undiluted)	-	-
Ganoderma calidophilum	-	-	-	8	-	-
Ganoderma lucidum	-	-	-	1 (undiluted)	-	-
Ganoderma tropicum	-	-	-	1	-	-
Hexagonia tenuis	-	-	-	-	-	-
Lentinus polychrous	-	-	2	2	-	-
Lentinus similis	-	-	-	-	-	-
Lentinus velutinus	-	-	-	32	-	-
Lenzites acuta	-	-	-	-	-	-
Microporus xanthopus	-	-	1 (undiluted)	1 (undiluted)	1 (undiluted)	1 (undiluted)
Pycnoporus cinnabarinus	-	-	-	-	-	-
Trametes versicolor	-	-	-	2	-	-
Trichaptum byssogenum	-	-	-	1 (undiluted)	1 (undiluted)	-
Tyromyces stipticus	-	-	1 (undiluted)	2	1 (undiluted)	1 (undiluted)

- : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.3 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตหรือที่พบการสะสมของเล็กติน

จากผลการระบุชนิดของเชื้อรา แหล่งธรรมชาติที่พบการเจริญของเชื้อราจากพื้นที่ต่างกัน และปริมาณเล็กตินที่ผลิตหรือสะสมในโครงสร้างของเชื้อราที่วัดจาก Hemagglutination titer รวมทั้งข้อมูลการใช้ประโยชน์เชื้อราในกลุ่มเห็ดเป็นอาหารของคนในชุมชนที่เป็นปกติอยู่แล้ว สามารถคัดเลือกเชื้อราในกลุ่มเห็ดได้ 78 ตัวอย่าง และราในกลุ่ม Xylariaceae ได้ 25 ไอโซเลท เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะพื้นฐานของเชื้อที่ผลิตสารเล็กตินต่อไป

การศึกษาครั้งนี้พบว่าเห็ดรับประทานได้บางชนิดเป็นเห็ดที่พบการเจริญในหลายพื้นที่ เช่น ในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Catharellus*, *Russula* และ *Termitomyces* (ตารางที่ 3.1) เห็ดชนิด

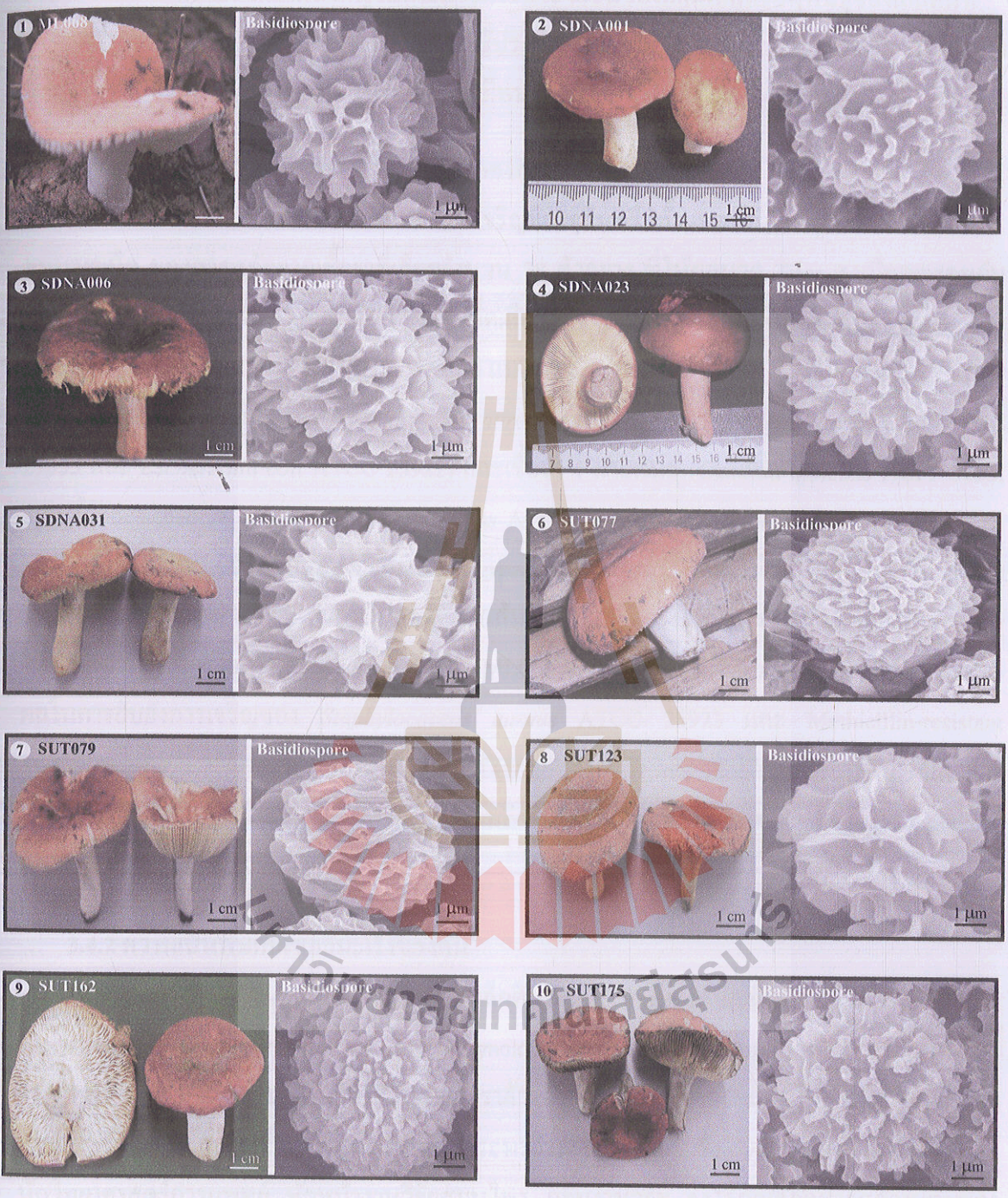
Cantharellus minor Peck. เป็นเห็ดรับประทานได้ที่พบอยู่ทั่วไปในพื้นที่ป่าจังหวัดนครราชสีมาและบุรีรัมย์ที่ให้ผลปริมาณเล็กตินที่สะสมแตกต่างกัน

เห็ดที่เป็น Mycorrhizal fungi ที่พบมีหลายสกุลในวงศ์ Boletaceae พบอย่างน้อย 4 สกุล (*Boletus*, *Gyroporus*, *Tylopilus* และ *Xerocomus*) และเห็ดในวงศ์ Russulaceae สกุล *Russula* เป็นสกุลใหญ่ที่มีรายงานว่าสามารถพบในหลายๆ แหล่งของโลก (Walting, 1998) หลายชนิดมีความคล้ายกันของลักษณะทางสัณฐานเช่นจากรูปร่างและสีของหมวกดอกเห็ด การตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาโครงสร้างของเห็ดจึงมีความสำคัญดังเช่นลักษณะที่แสดงในรูปที่ 3.7 เป็นเห็ดในสกุล *Russula* ที่มี cap สีแดงเรียกว่า Red russula ซึ่งตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดเหล่านี้มีความแตกต่างด้านการสะสมสารเล็กตินในโครงสร้าง fruiting body (ตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.7)

เห็ดในวงศ์ Agaricaceae ที่พบมีหลายสกุล ได้แก่ *Leucocoprinus*, *Leucoagaricus*, *Lepiota* และ *Macrolepiota* ที่สะสมของเล็กตินในปริมาณที่สูง แต่หลายชนิดรับประทานไม่ได้ มักเรียกว่า "เห็ดเมา" พบว่าดอกเห็ดในวงศ์นี้มีความแข็งมากกว่าเห็ดวงศ์อื่นๆ ที่พบหลายวงศ์ (เช่น Amanitaceae และ Boletaceae) เป็นเห็ดที่ fruiting body มักมีความชื้นต่ำ ทำให้ใช้เวลาสั้นในการเตรียมดอกเห็ดแห้งเพื่อสกัดสารเล็กติน

ตารางที่ 3.5 ตัวอย่างของผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดจากดอกเห็ดในกลุ่ม Red russula เมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดต่างๆ

Lectin extract code	Hemagglutination against animal red blood cells (Titer)					
	Goose	Guinea pig	Mouse	Rabbit	Rat	Sheep
SDNA001	512	128	1024	1024	128	256
SDNA023	1024	128	1024	1024	1024	256
SDNA031	8	4	16	64	4	4
SUT077	256	16	16	256	8	16
SUT079	1024	16	64	1024	32	32
SUT116	512	32	32	128	32	16
SUT123	2	2	8	8	8	2
SUT162	1024	256	1024	1024	2	256



รูปที่ 3.7 เห็ดในกลุ่ม Red russula ที่พบการสะสมสารเล็กตินในดอกเห็ด ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกัน แต่มีลักษณะของ basidiospore ที่แตกต่างกันเมื่อศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.4 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะพื้นฐานของสารเล็กตินที่พบ

เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของเล็กตินและอนุพันธุ์ของเล็กตินที่พบ และเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต จึงมีการศึกษาสมบัติทางชีวภาพ และคุณลักษณะพื้นฐานของสารเล็กตินที่พบดังต่อไปนี้

3.4.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด ของสารสกัดจากเชื้อราที่เลือกจำนวน 78 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวก Titer สูงเมื่อทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ โดยทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion และใช้จุลินทรีย์ทดสอบมาตรฐาน คือ แบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922) และเชื้อรา 4 สายพันธุ์ (*Candida albicans* NCPF 3153, Flucytosine-sensitive *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, Flucytosine-resistant *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113 และ *Microsporum gypseum*) ใช้สารสกัดที่ยังไม่ทำให้เข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อ paper disc มาตรฐานปลอดเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) พบว่ามีเพียงสารสกัดที่ได้จากดอกเห็ด 2 ตัวอย่าง คือ *Lycoperdon* sp. ML062 และ *Termitomyces microcarpus* ML057 ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ในระดับต่ำ (ความกว้างของ inhibition zone เท่ากับ 7.3 และ 9.4 มิลลิเมตร และ 8.3 และ 9.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ) ทั้งสองสารสกัดมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) >1:10

3.4.2 ความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน

เนื่องจากมีรายงานการศึกษาสมบัติของเล็กตินที่สกัดจากเห็ดหลายชนิดมีสมบัติสำคัญในการต้านทานมะเร็ง (Antitumor) (Mo *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998b) การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดสอบสมบัติดังกล่าวของสารสกัดจากเชื้อราด้วย โดยได้รับความร่วมมือในการดำเนินการวิจัยจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่ง ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ หัวหน้างานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย จึงได้คัดเลือกสารสกัดหยาบของเชื้อราจำนวน 103 ตัวอย่าง ไปทดสอบโดยการเจือจางสารแต่ละตัวอย่างเพื่อหา Titer และหา MIC จากสัดส่วนของการเจือจาง

การคัดเลือกสารสกัดเล็กตินจากเห็ดและราในขั้นตอนนี้ได้เลือกสารสกัดหยาบที่ให้ผลบวกกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ได้ Titer ที่สูงกว่าเมื่อทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน ไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคนที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง โดยก่อนการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ได้หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารสกัดด้วยวิธีที่ระบุตาม Bradford

(1976) สารสกัดหยาบของเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราและจากดอกเห็ดมีค่าปริมาณโปรตีนโดยประมาณอยู่ในช่วง 0.1-1.5 และ 0.5-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 3)

จากนั้นได้ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งของคน โดยเตรียม Trypsinized cells (2×10^4 เซลล์ต่อไมโครลิตร) ของเซลล์มะเร็งของคน 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (Human epidermoid carcinoma, KB) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma, HeLa) (รูปที่ 3.8) และใช้ MTT (3-[5,5-Dimethylthyazol-2-yl]-2,5-diphenyltetra zolium bromide) colorimetric assay พบว่าสารเล็กตินที่สกัดได้จากทั้งเห็ดและรา 15 ตัวอย่าง/สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.6 ตารางผนวกที่ 4 และรูปที่ 3.9) ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของคนที่ทดสอบได้ดี เห็ดป่าที่รับประทานได้หลายชนิดมีสารเล็กตินที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของคน ได้แก่ เห็ดระโงก (สกุล *Amanita*) เห็ดมันปู (สกุล *Cantharellus*) เห็ดหาด (สกุล *Lactarius*) เห็ดแดงหรือเห็ดน้ำหมาก (สกุล *Russula*) เห็ดแครง (สกุล *Schizophyllum*) และ เห็ดโคนบางชนิด (สกุล *Termitomyces*) และพบราบางสายพันธุ์ในสกุล *Hypoxylon* และ *Xylaria* สารสกัดเล็กตินจาก *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016 (รูปที่ 3.9A) เป็นสารที่น่าสนใจ แสดงค่า IC_{50} เมื่อทดสอบทั้งกับ KB และ HeLa ที่ 3.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.6) สารออกฤทธิ์จากเชื้อราดังกล่าวข้างต้นไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ใช้ทดสอบคือเซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney cell, Vero) และเห็ดชนิดนี้ยังเป็นเห็ดรับประทานได้ พบได้ง่ายในปริมาณมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงของคนชนิด Human epidermoid carcinoma (KB; A และ B) และ Human cervical carcinoma (HeLa; C และ D) ที่เจริญเป็นปกติ (control; A และ C) และที่ถูกทำลายด้วยสารสกัดเล็กติน (treated cells; B และ D)

ตารางที่ 3.6 ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก fruiting body ของเห็ดบางชนิดต่อเซลล์มะเร็งของคน 2 ชนิด ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

Fungal code	Fungal species	IC_{50} (μg/ml)	
		KB	HeLa
ML015	*Cantharellus minor*	68	68
ML016	*Cantharellus* cf. *cibarius*	3.55	3.55
ML020	*Amanita* sect. *Vaginatae*	28	12
ML034	*Strobilomyces mollis*	3	36.5
ML037	*Russula* sp.	125	125
ML046	*Cantharellus* sp.	96	96
ML051	*Russula alboareolata*	51.7	51.7
ML054	*Russula* sp.	21	21
ML055	*Lentinus* sp.	8	7
ML057	*Termitomyces microcarpus*	30	55
ML071	*Marasmius* sp.	30	9.5
ML078	*Schizophyllum commune*	20	350
ML106	*Macrolepiota* sp.	100	15
ML128	*Leucoagaricus* sp.	55	1000
ML139	*Leucoagaricus* sp.	81	81
SUT024	*Lepiota* sp.	0.53	0.9
SUT087	*Russula* sp.	16	16
SUT129	*Volvariella volvacea*	12.5	8.75
SUT227	*Volvariella volvacea*	16	9.5
SUT220	*Volvariella volvacea*	14	9.06
SUT150	*Lactarius* sp.	190	150
SUT156	*Lactarius* sp.	40	28
SUT162	*Russula* sp.	35	60
2420	*Xylaria cubensis*	60	150
2435	*Xylaria cubensis*	80	80
2439	*Hypoxylon* sp.	96	200
2447	*Hypoxylon* sp.	16	50
2511	*Xylaria allantoidea*	65	-

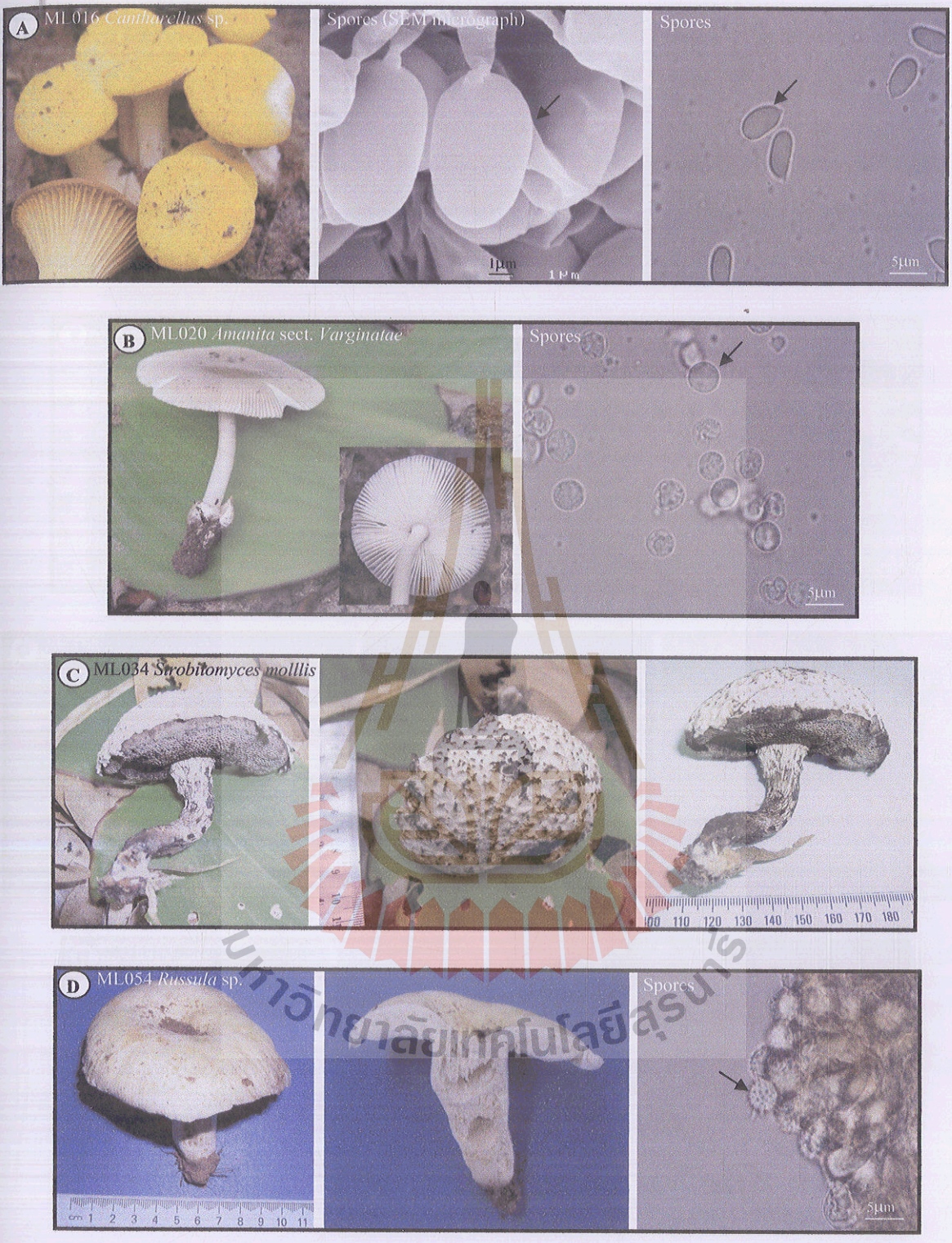
IC_{50} (50% inhibition concentration) = ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Significance: IC_{50} ของ crude extracts $\leq$ 30 μg/ml

KB = Human epidermoid carcinoma (มะเร็งเยื่อบุช่องปากของคน)

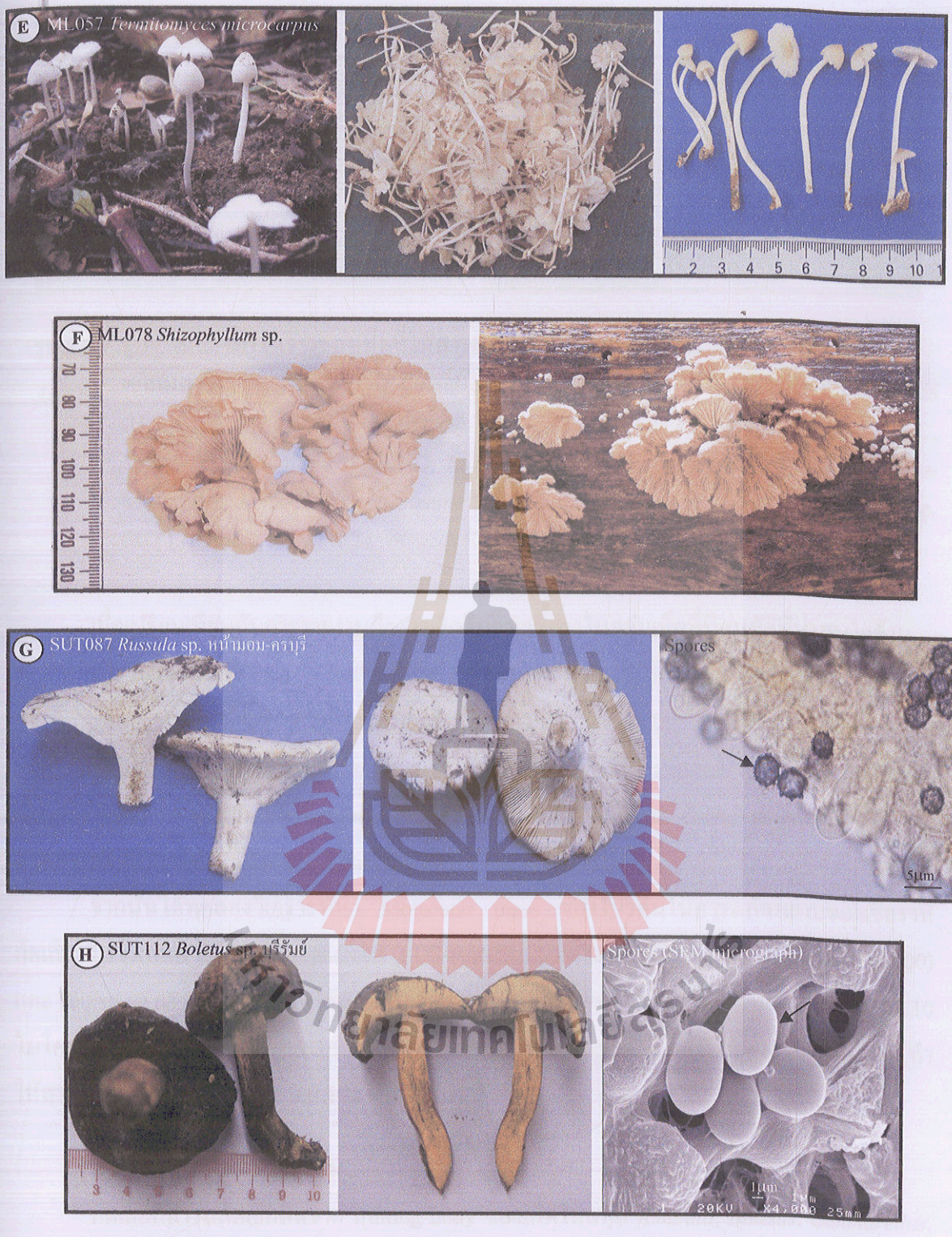
HeLa = Human cervical carcinoma (มะเร็งปากมดลูกของคน)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.9 รูปร่างและโครงสร้างของเห็ดที่ให้สารสกัดเล็กตินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งชนิด Human epidermoid carcinoma (KB) และ Human cervical carcinoma (HeLa): A, *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016; B, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML020; C, *Strobilomyces mollis* ML034; D, *Russula* sp. ML054; E, *Termitomyces microcarpus* ML057; F, *Schizophyllum commune* ML078; G, *Russula* sp. SUT087; H, *Boletus* sp. SUT112 และ I, *Volvariella volvacea* SUT228

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.9 (ต่อ) รูปร่างและโครงสร้างของเห็ดที่ให้สารสกัดเล็กตินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งชนิด Human epidermoid carcinoma (KB) และ Human cervical carcinoma (HeLa): A, *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016; B, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML020; C, *Strobilomyces mollis* ML034; D, *Russula* sp. ML054; E, *Termitomyces microcarpus* ML057; F, *Schizophyllum commune* ML078; G, *Russula* sp. SUT087; H, *Boletus* sp. SUT112 และ I, *Volvariella volvacea* SUT228

รูปที่ 3.9 (ต่อ) รูปร่างและโครงสร้างของเห็ดที่ให้สารสกัดเล็กตินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งชนิด Human epidermoid carcinoma (KB) และ Human cervical carcinoma (HeLa): A, *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016; B, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML020; C, *Strobilomyces mollis* ML034; D, *Russula* sp. ML054; E, *Termitomyces microcarpus* ML057; F, *Schizophyllum commune* ML078; G, *Russula* sp. SUT087; H, *Boletus* sp. SUT112 และ I, *Volvariella volvacea* SUT228

เมื่อเปรียบเทียบกับการรายงานถึงสารเล็กตินจากเชื้อราในกลุ่มเห็ดที่มีสมบัติที่น่าสนใจด้าน antitumor และ cytotoxic activity ต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งสำคัญต่อการนำไปสู่การพัฒนาและการออกแบบยา (Drug design) เพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็ง ได้มีการระบุถึงสารเล็กตินจากเห็ดหลายชนิดได้แก่ *Agaricus bisporus*, *Boletus satanas*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondasa*, *Tricholoma mongolicum* และ *Volvariella volvacea* ที่ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Guillot and Konska, 1997; Wang *et al*., 1998b)

จากนั้นได้ทดลองวิเคราะห์หา Molecular mass ของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเชื้อราที่คัดเลือกในขั้นต้นด้วย Gel eletrophoresis (SDS-PAGE; 12.5% Gel) ตามวิธีที่ระบุใน Mo *et al*. (2000) และ Nagata *et al*. (1991) ซึ่งเมื่อใช้สารสกัดหยาบของเชื้อราที่สกัดได้โดยไม่ทำให้เข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อช่องของ SDS-PAGE พบความแตกต่างของ molecular mass (ตัวอย่างในรูปที่ 3.10) ทำให้สามารถคัดเลือกสารที่มีความแตกต่างกันได้มากยิ่งขึ้น

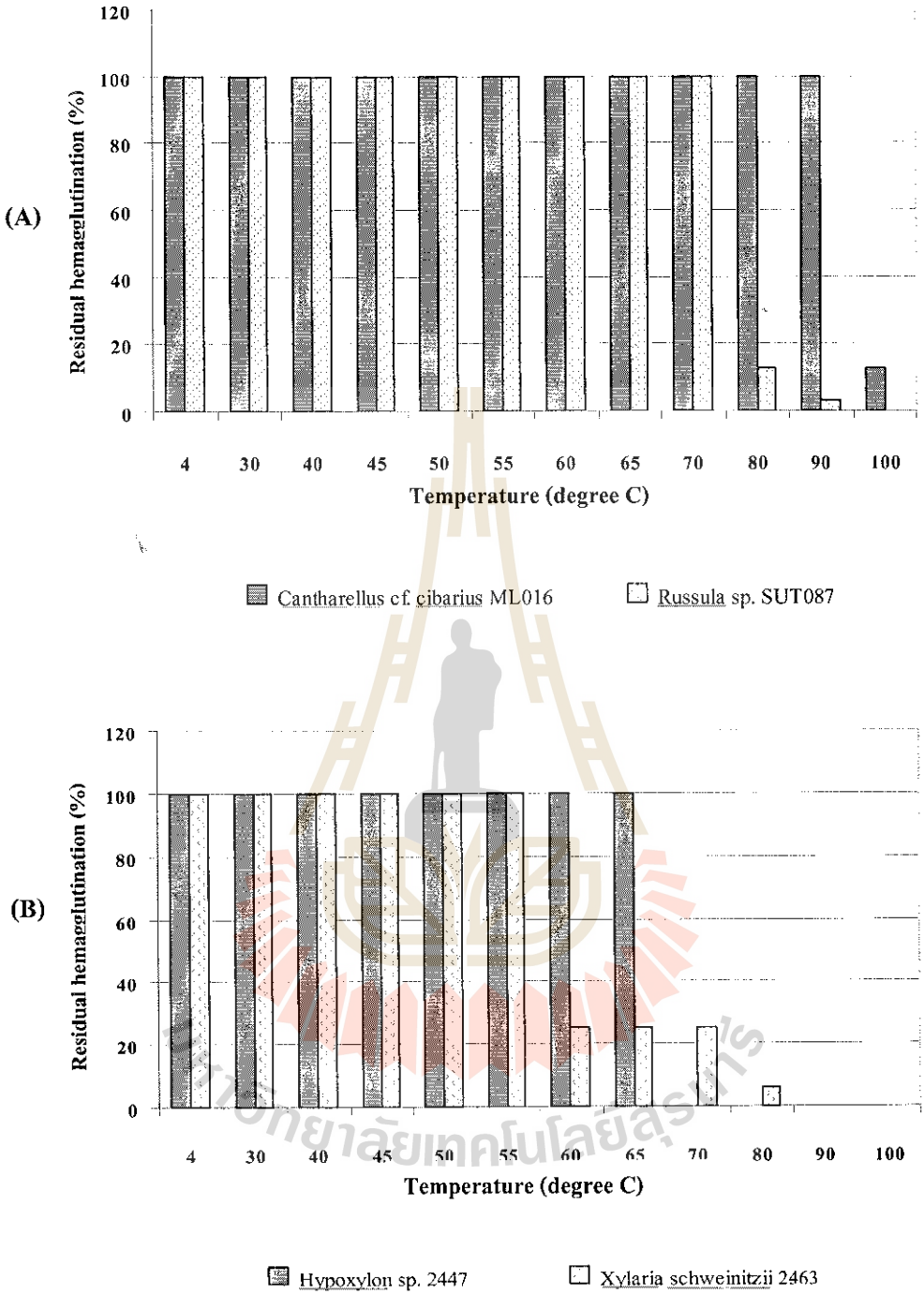
3.4.3 ความเสถียรต่อความร้อน

คัดเลือกสารสกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเห็ดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lactarius*, *Russula*, *Schizophyllum* และ *Volvariella* และจากเส้นใยของราในสกุล *Hypoxylon* และ *Xylaria* (ตารางผนวกที่ 5) โดยประเมินจากผลการทดสอบสมบัติทางชีวภาพ มาทดสอบความคงตัว (ความเสถียร) ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทนความร้อนถึง 65 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 30 นาที (ตารางผนวกที่ 5) ตัวอย่างเช่น สารสกัดจาก *Amanita* sect. *Vaginatae* ML020, *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016, *Russula* sp. SUT087, *Schizophyllum commune* ML078, *Lactarius* sp. SUT156 และ *Hypoxylon* sp. 2447 (ตัวอย่างดังรูปที่ 3.11) ซึ่งสารสกัดเล็กตินที่คัดเลือกมาศึกษานี้มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของคน (ตารางที่ 3.7)

รูปที่ 3.10 SDS-PAGE (12.5% Gel) ของสารสกัดจาก fruiting body ของเชื้อราที่มีสมบัติของเล็กติน (ช่องที่ 1 ถึง 42) ช่อง M คือ Molecular mass standards (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.11 ตัวอย่างความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเห็ด *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016 และ *Russula* sp. SUT087 (A) และเส้นใยของเชื้อรา ในวงศ์ Xylariaceae 2ชนิด คือ *Hypoxylon* sp. 2447 และ *Xylaria schweinitzii* 2463 (B)

ตารางที่ 3.7 ตัวอย่างฤทธิ์ของเล็กตินที่ผลิตจากเชื้อราบางชนิด ที่มีผลต้านเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบ และมีความเสถียรต่อความร้อนในระดับต่างๆ กัน

Fungal specimen	IC_{50} (µg/ml)		Heat stability result
	KB	HeLa	
Amanita sect. *Vaginatae* ML020	28	12	30 องศาเซลเซียส 1 วัน ไม่ทนร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส
Cantharellus cf. *cibarius* ML016 (เห็ดมันปูใหญ่)	3.55	3.55	90 องศาเซลเซียส 30 นาที
Lactarius sp. SUT156 (เห็ดหาด)	40	28	80 องศาเซลเซียส 30 นาที
Lentinus sp. ML055	8	7	65 องศาเซลเซียส 30 นาที
Russula sp. ML054	21	21	70 องศาเซลเซียส 30 นาที
Russula sp. SDNA1 (เห็ดแดง)	30	400	80 องศาเซลเซียส 30 นาที
Russula sp. SUT087 (เห็ดหน้ามอม)	16	16	70 องศาเซลเซียส 30 นาที
Schizophyllum commune ML078 (เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก)	20	350	60 องศาเซลเซียส 30 นาที
Strobilomyces mollis ML034	3	36.5	90 องศาเซลเซียส 30 นาที
Termitomyces microcapus ML057 (เห็ดข้าวตอกหรือเห็ดโคนเล็ก)	30	55	60 องศาเซลเซียส 30 นาที
Volvariella volvacea SUT129 (เห็ดฟาง)	12.5	8.75	50 องศาเซลเซียส 30 นาที
Hypoxylon sp. 2447	16	50	65 องศาเซลเซียส 30 นาที

IC_{50} (50% inhibition concentration) = ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Significance: IC_{50} ของ crude extracts $\leq$ 30 µg/ml

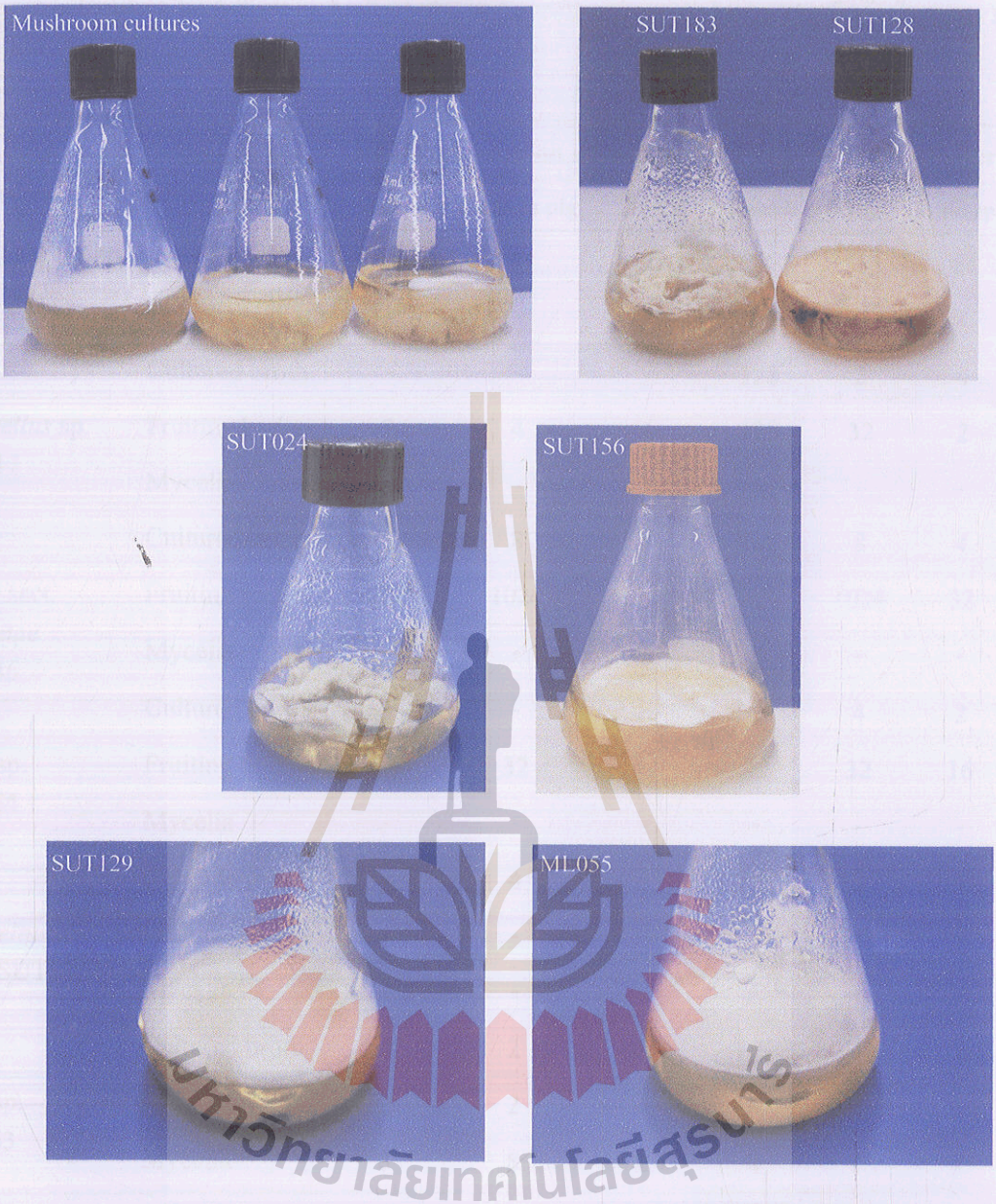
KB = Human epidermoid carcinoma (มะเร็งเยื่อบุช่องปากของคน)

HeLa = Human cervical carcinoma (มะเร็งปากมดลูกของคน)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5 การทดลองผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อราชนิดที่สามารถแยกได้เชื้อบริสุทธิ์

ได้ทดลองผลิตเล็กตินโดยเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ที่คัดเลือกในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Russula* และไอโซเลทในวงศ์ Agaricaceae จากตัวอย่างเชื้อราที่ประสบความสำเร็จในการแยกและเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและจากสมบัติทางชีวภาพของสารที่ผ่านการทดสอบแล้ว โดยเลี้ยงในอาหาร Malt extract broth (ภาคผนวก ข2) เริ่มทดลองเลี้ยงเลือกเชื้อราบริสุทธิ์ที่คัดเลือก 5 ไอโซเลท ในอาหาร Malt extract broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพทั้งที่มีการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที และไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ไม่มีการเขย่ามีการเจริญของเชื้อราเป็นแผ่นและกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ที่เห็นได้ชัดเจน และได้เส้นใยในปริมาณที่เพียงพอกับการสกัดสารเพื่อทดสอบ (ตัวอย่างในรูปที่ 3.12) แต่การเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาเท่ากัน ให้เชื้อที่เจริญมีลักษณะเป็นก้อนเล็กๆ (Pellet) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Pellet ประมาณ 3 มิลลิเมตร เก็บเกี่ยวเส้นใยได้ปริมาณใกล้เคียงกับที่เลี้ยงในสภาพที่ไม่มีการเขย่าและไม่พบความแตกต่างของผลการสะสมสารเล็กตินในเส้นใย ในขั้นตอนนี้ได้ทดลองปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเติม Glucose เป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 0, 1 และ 2% ในอาหาร Malt extract broth (ภาคผนวก ข2) พบว่าอาหารที่เติม 2% Glucose ให้ผลการสะสมเล็กตินในเส้นใยดีที่สุด อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเล็กตินของเชื้อราที่มีแนวโน้มสูงในการใช้ประโยชน์ต่อไป ในขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อขั้นตอนนี้จึงเลือกวิธีการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Malt extract broth ที่เติม 2% Glucose ในสภาพที่ไม่มีการเขย่าสำหรับการศึกษาเชื้อไอโซเลทที่คัดเลือกต่อไป โดยเพิ่มปริมาตรอาหารเหลวจาก 100 เป็น 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีการผลิตสารเล็กตินที่สะสมในเส้นใยในปริมาณต่ำ สารสกัดให้ผล Titer ในช่วง 32 ถึง 1 และจนถึงผลลบ (ตารางที่ 3.8) และพบสารที่มีสมบัติของเล็กตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเมื่อตรวจสอบโปรตีนโดยการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ก็พบแถบของโปรตีนที่มีความเข้มต่ำ ซึ่งจากผลที่ได้นี้น่าจะเป็นข้อมูลที่สนับสนุนความสำคัญของการศึกษาเพื่อการโคลนจีนที่เกี่ยวข้องกับผลิตเล็กติน เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น



รูปที่ 3.12 ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ ที่คัดเลือกเพื่อผลิตสารเล็กตินในอาหาร Malt extract broth ในสภาพที่ไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.8 ตารางเปรียบเทียบผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจากดอกเห็ด (fruiting body/fruiting bodies) เส้นใย (mycelium/mycelia) และสารเล็กตินในอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเส้นใยเห็ด (cultured broth)

Fungal species	Sample for lectin extraction	Hemagglutination against animal red blood cells (Titer)					
		Goose	Guinea pig	Mouse	Rabbit	Rat	Sheep
Agaricoid SUT060	Fruiting bodies	16	8	16	64	512	64
	Mycelia	-	-	-	-	-	-
	Cultured broth	-	-	-	128	2	4
Cantharellus sp. SUT117	Fruiting bodies	2	4	4	128	32	2
	Mycelia	-	-	-	-	-	-
	Cultured broth	8	8	-	1	8	4
Amanita sect. *Vaginatae* SUT136	Fruiting bodies	256	1024	1024	128	1024	32
	Mycelia	-	-	-	-	-	-
	Cultured broth	-	-	-	8	4	2
Boletus sp. SUT154	Fruiting bodies	16	32	32	32	32	16
	Mycelia	-	-	-	-	-	-
	Cultured broth	-	4	-	1 H	8	4
Cantharellus minor SUT133	Fruiting bodies	-	-	16	-	-	-
	Mycelia	-	-	-	-	-	-
	Cultured broth	2	2	-	1 H	4	2
Boletes sp. SUT163	Fruiting bodies	2	2	4	4	2	2
	Mycelia	8	8	2	4	1	4
	Cultured broth	8	32	-	16 H	16	32
Termitomyces sp. SUT186	Fruiting bodies	2	2	32	4	-	2
	Mycelia	4	8	1	4	4	2
	Cultured broth	-	-	-	4	-	2
Schizophyllum commune ML078	Fruiting bodies	16	8	64	1024	256	16
	Mycelia	-	1	-	-	1	-
	Cultured broth	-	-	1	1	1	1

H: Hemolysis, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.6 การศึกษาเพื่อการโคลนจีน (gene cloning) ที่เกี่ยวข้องการผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อรา/เห็ดที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้น

ในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาในเบื้องต้นทั้งศึกษาสมบัติและลำดับกรดแอมิโนของสารเล็กติน (สารโปรตีน) และศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินจาก genomic DNA ของเชื้อราชนิดที่คัดเลือกได้จากความสามารถในการผลิต/สะสมสาร และสมบัติของสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์

3.6.1 การศึกษาสมบัติและลำดับกรดแอมิโนของสารโปรตีนเล็กตินจากเชื้อราชนิดที่คัดเลือก

3.6.1.1 การเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่ผลิตเล็กตินชนิดเด่นและมีการสะสมสารในปริมาณสูง

เลือกสายพันธุ์ของเชื้อราตามข้อมูลที่ได้จากการทดสอบสารสกัดเล็กตินจากปฏิกิริยา hemagglutination ที่ให้ค่า Titer สูง แสดงความเป็นพิษหรือความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของคน มีความเสถียรต่อความร้อนสูง และมีปริมาณของตัวอย่าง (fruiting body หรือเส้นใย) ที่เพียงพอต่อการสกัดสารเล็กตินเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนนี้ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญและให้ความสำคัญกับชนิดของเห็ดที่เป็นเห็ดรับประทานได้ ซึ่งเลือกเชื้อราในกลุ่มเห็ดเพื่อทดลองได้ 2 ชนิด คือ *Schizophyllum commune* ML078 และ *Termitomyces microcarpus* ML057

3.6.1.2 การสกัดเล็กตินจากโครงสร้างของเชื้อราและการทำบริสุทธิ์เล็กติน

เนื่องจากผลการศึกษาที่ได้ พบว่าการสะสมสารเล็กตินในเส้นใยของเชื้อที่สกัดได้มีความเข้มข้นต่ำกว่าที่สะสมใน fruiting body (ตารางที่ 3.8) จึงได้สกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเชื้อราที่เลือกทั้ง 2 จากนั้นทำบริสุทธิ์สารเล็กตินโดยใช้ Affinity column, Ion exchange chromatography และ Gel filtration พบว่า Affinity chromatography มีประสิทธิภาพมากในการทำบริสุทธิ์เล็กตินจากเห็ดด้วยการผ่าน Affinity chromatography column เพียงขั้นตอนเดียวเท่านั้นก็สามารถได้สารสกัดเล็กตินจากเห็ดที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่ Ion exchange columns (DEAE-Sapharose and CM-Sepharose) ต้องใช้ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอนเพื่อให้ได้ความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับการใช้ Affinity chromatography สำหรับ Gel filtration ได้ใช้ Gel filtration ชนิด Sephadex G75 พบว่ามีการปนเปื้อนของ DNA ในสารสกัด นับว่าเป็นปัญหาของการทำบริสุทธิ์สารเล็กติน

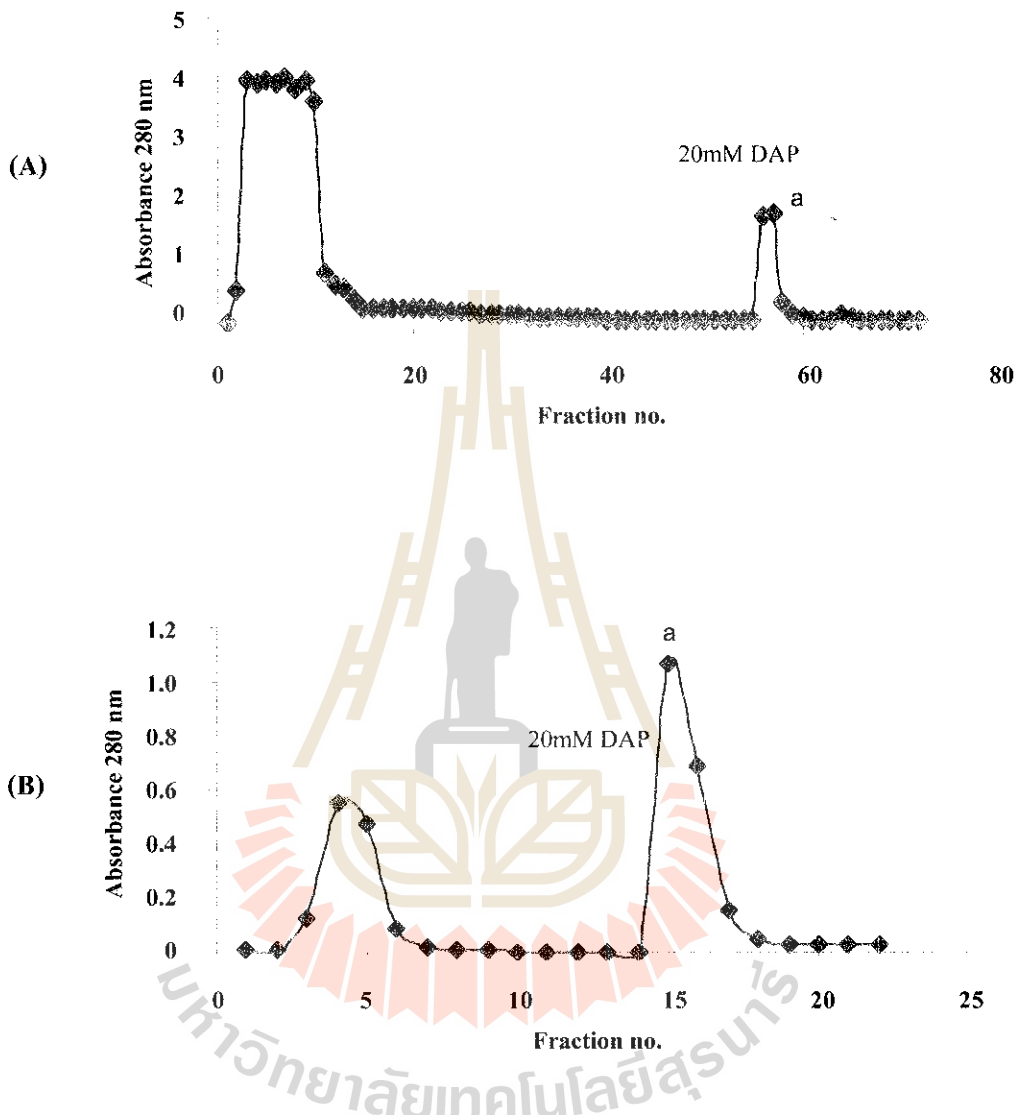
การทำบริสุทธิ์เล็กตินของเชื้อราที่คัดเลือกจึงใช้ Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B column ที่ได้เลือกจากการทดลองใช้ columns 3 ชนิด คือ Mucin-Sepharose 4B, Desialylated mucin Sepharose 4B และ *N*-Acetyl-D-galactosamine (GalNac) สารสกัดจากเห็ด *Termitomyces microcarpus* ML057 สามารถทำให้บริสุทธิ์ด้วย Affinity chromatography แต่พบว่าสารที่สกัดได้และผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มีความเข้มข้นต่ำมาก ไม่เพียงพอสำหรับการใช้ทดสอบและศึกษาสารบริสุทธิ์ ประกอบกับเห็ดชนิดนี้มี fruiting body ขนาดเล็กที่มีน้ำหนักเบา (รูปที่

3.9E) จึงเลือกเชื้อราเพื่อศึกษาเพียง *Schizophyllum commune* ที่สะสมสารเล็กตินใน fruiting body ในความเข้มข้นสูง และเป็นเห็ดรับประทานได้ ที่พบเจริญได้ทั่วไปบนขอนไม้ เปลือกไม้ ในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงในเชิงการค้าในประเทศไทย

เนื่องจากโครงสร้างของเห็ดมีปริมาณสารประกอบ Phenolic ที่สูงเช่นเดียวกับพืช ในการสกัดสาร จึงมีการเติม 1.5% Poly(vinylpyrrolidone) (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงในสารละลาย buffer ที่ใช้ในการสกัดเล็กติน เพื่อลดปัญหาของ Polyphenols ที่ปนเปื้อนและรบกวนการวัดปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เมื่อนำสารสกัดหยาบเล็กตินจาก fruiting body ของ *Schizophyllum commune* ผ่านการตกตะกอนสารด้วย Ammonium sulphate และ Dialysis แล้วทำบริสุทธิ์สารเล็กติน พบว่า Mucin-Sepharose affinity chromatography ซึ่งเป็น Column ชนิดเดียวกับที่มีรายงานผลสำเร็จในการคัดเลือกเล็กตินจากเชื้อรา *Rhizopus stolonifer* (Oda *et al.*, 2003) นั้นให้ผลดีที่สุด เมื่อผ่าน Affinity chromatograph 2 ครั้ง (รูปที่ 3.13 A และ B) เมื่อล้าง column ด้วย 10mM Tris-HCl buffer (pH 8) และล้างสารเล็กตินที่เกาะกับ column ด้วย 20mM DAP (รูปที่ 3.13B) พบ peak ของ Lectin fraction ที่ทำบริสุทธิ์ด้วย Affinity chromatography (peak a รูปที่ 3.13B)

จากการทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบเล็กตินจากผง Fruiting body แห้งเริ่มต้นของเห็ดปริมาณ 15 กรัม ที่มีกิจกรรม (specific hemagglutinating activity) เท่ากับ 86 หน่วย (units) ต่อมิลลิกรัม ภายหลังการทำบริสุทธิ์โดยผ่าน Affinity chromatograph 2 ครั้ง (รูปที่ 3.13 และตารางที่ 3.9) ได้สารเล็กตินหลังการทำบริสุทธิ์แล้ว 32.30 มิลลิกรัม ค่ากิจกรรมของสารเล็กตินเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2,496 units ต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์มากขึ้น 28.86 เท่า ปริมาณของเล็กตินบริสุทธิ์นี้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับที่มีรายงานการทำบริสุทธิ์เล็กตินของ *Pleurotus ostreatus* (Brechtel *et al.*, 2001) และ *Volvariella volvacea* (Lin and Chou, 1984)

Schizophyllum commune เป็นเชื้อราในกลุ่มเห็ดที่เมื่อจัดจำแนกชนิดจะมีความใกล้เคียงกับ *Pleurotus ostreatus* ซึ่งเป็นเห็ดรับประทานได้และมีการเพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายเป็นการค้า โครงการวิจัยนี้ได้ทดลองสกัดสารเล็กตินจาก fruiting body ของ *Pleurotus ostreatus* เพื่อใช้เป็น Positive control นั้นไม่สามารถทำบริสุทธิ์ของสารเล็กตินได้โดยใช้ Mucin-Sepharose affinity chromatography ตามที่ใช้ทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของสารเล็กตินและมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการทำบริสุทธิ์สารเพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสาร ซึ่งสำคัญมากต่อการนำไปสู่การพัฒนาและการออกแบบยา (Drug design) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของโรคมะเร็ง (Guillot and Konska, 1997; Wang *et al.*, 1998a)



รูปที่ 3.13 สารสกัดเล็กตินในส่วน fractions จากเห็ด *Schizophyllum commune* ML078 ที่ผ่าน Mucin-Sepharose affinity chromatograph ครั้งที่ 1 (A) และครั้งที่ 2 (B) โดย peak a แสดงเล็กตินที่บริสุทธิ์

ตารางที่ 3.9 ผลการทดสอบ hemagglutination ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายของ *Schizophyllum commune* lectin (ML078) จาก Chromatographic fractions ที่เริ่มจากผงเห็ดแห้ง 15 กรัม

Step	Yield (mg)	Specific hemagglutinating activity (units/mg)	Total hemagglutinating activity (units)	Recovery of hemagglutinating activity (%)	Purification fold
Extraction	7548	86.48	652,800	100	-
Precipitation using 30% $(NH_4)_2SO_4$	4371	87.85	384,000	58.82	1.015
Purification by Mucin-Sepharose affinity chromatography	32.30	2496.09	80,640	12.35	28.86

3.6.1.3 การหามวลโมเลกุลของสารเล็กติน

นำโปรตีนเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078 ที่ทำบริสุทธิ์ด้วย Chromatography มาวิเคราะห์น้ำหนักโมลกุลของสารเล็กตินด้วยวิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ได้ผลการทดลองตามรูปที่ 3.14 (ช่องที่ 2, 3, 5, 9 และ 10 แสดงความบริสุทธิ์ของโปรตีนเพิ่มขึ้นตามลำดับของการทำบริสุทธิ์) พบ strong band ของเล็กตินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 31.5 kDa และ faint band ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 29 kDa Faint band ที่พบอาจเป็นสารเล็กตินที่มีโครงสร้างเป็น dimer ดังที่มีรายงานผลการศึกษาเล็กตินที่พบในพืช เช่น Bluebell bulb lectin (Wright, 1998)

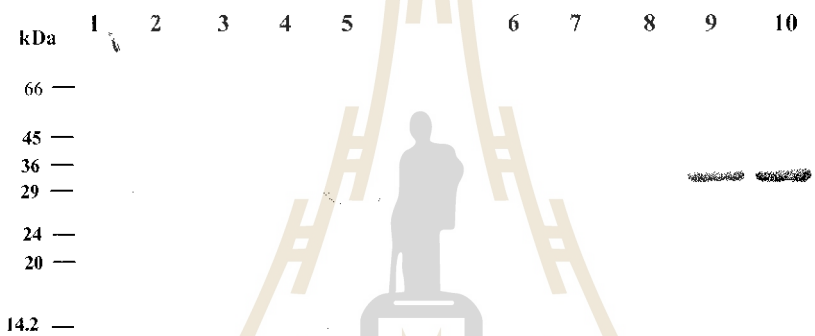
3.6.1.4 ความจำเพาะของสารเล็กตินต่อน้ำตาล

จากผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Hemagglutination สารเล็กตินที่สกัดจาก *Schizophyllum commune* ML078 สามารถจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ได้ดีกว่าคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระต่ายและหนูแรท ที่ให้ค่า Titer กับเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้สูงกว่าหนูแรท (ตารางผนวกที่ 1) ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายเพื่อทดสอบความจำเพาะของสารน้ำตาล

เมื่อนำสารเล็กตินบริสุทธิ์ของ *Schizophyllum commune* มาทดสอบความจำเพาะกับน้ำตาล คือ L-Arabinose, Fucose, D-Glucose, D-Galactose, *N*-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc), *N*-Acetyl-D-glucosamine, Lactose, D-Mannose, Raffinose, L-Rhamnose และ D-Xylose พบว่าสารเล็กตินบริสุทธิ์มีความจำเพาะกับ D-Galactose, GalNAc และ Lactose (ตารางที่ 3.10) ที่ความเข้มข้น 100,

0.78, และ 0.78 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ ไม่มีความจำเพาะต่อน้ำตาล L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Glucose, D-Mannose และ Raffinose

จากผลการศึกษาที่ได้ เล็กตินจาก *Schizophyllum commune* มีความจำเพาะต่ำต่อน้ำตาล Galactose แต่มีความจำเพาะสูงต่อน้ำตาล GalNAc และ Lactose เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาความจำเพาะของเล็กตินจากเห็ดต่อน้ำตาลพบว่ามีรายงานถึงสารเล็กตินจาก *Pleurotus cornucopiae* และ *Pleurotus ostreatus* ที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาล Galactose (Oguri *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000) สารเล็กตินจาก *Lactarius deliciosus* มีความจำเพาะต่อน้ำตาล GalNAc (Guillot *et al.*, 1991) และสารเล็กตินจาก *Agrocybe cylindracea* (Wang *et al.*, 2001) และ *Hygrophorus hypothejus* มีความจำเพาะต่อน้ำตาล Lactose (Veau *et al.*, 1999)



รูปที่ 3.14 SDS-PAGE ของเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078

ช่องที่ 1, 4 และ 6 Low molecular weight standard markers จากน้ำหนักโมเลกุลมากไปหาน้อย, Bovine serum albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), Bovine carbonic anhydrase (29 kDa), Bovine pancreas trypsinogen (24 kDa), Soybean trypsin inhibitor (20 kDa) และ Bovine milk α-lactalbumin (14.2 kDa)

ช่องที่ 2, Crude extracts ของเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078

ช่องที่ 3, เล็กตินหลังจากตกตะกอนด้วย 30% Ammonium sulphate

ช่องที่ 5, 7, 8, 9 และ 10 เล็กตินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 3.10 Hemagglutination ของ *Schizophyllum commune* lectin (16 HA units) เมื่อทดสอบความจำเพาะกับน้ำตาล

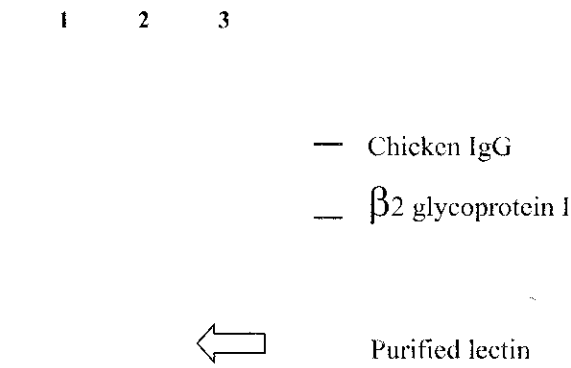
Sugars	Sugar concentration (mmol/l)											
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.17	PBS
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = positive result of hemagglutination, - = negative result of hemagglutination

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.6.1.5 การทดสอบคุณลักษณะ Glycoprotein

ผลการย้อมสี SDS-PAGE ด้วย Periodic acid Schiff's reagent แสดง faint band แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตของเล็กตินจากเห็ด *Schizophyllum commune* (รูปที่ 3.15) สารเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ชนิดนี้จึงเป็นสาร Glycoprotein โดยปกติมีรายงานถึงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่พบในเล็กตินจากเห็ดประมาณ 2-30% (Guillot and Konska, 1997)

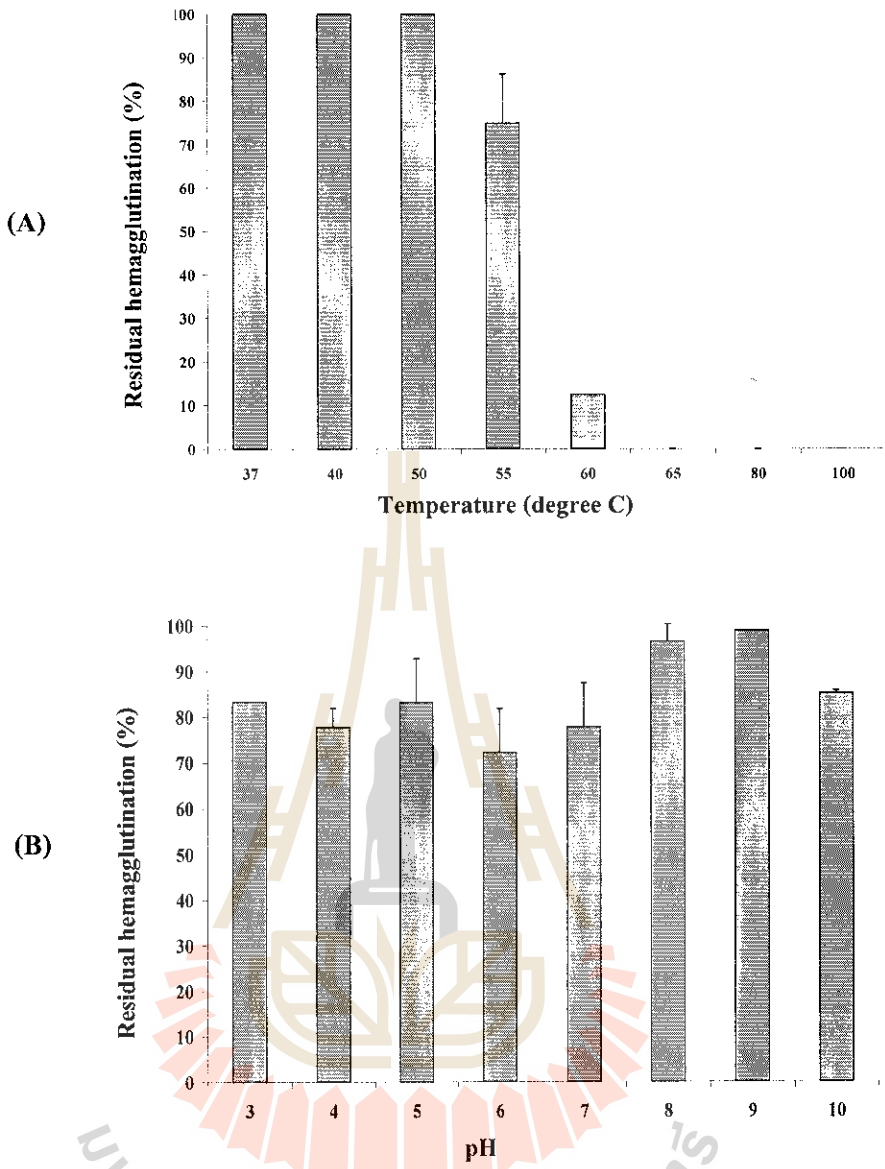


รูปที่ 3.15 การวิเคราะห์ Schiff's periodic ของเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (ช่องที่ 1 และ 2) โดยใช้ β2 glycoprotein I และ Chicken IgG เป็น positive control (ช่องที่ 3)

3.6.1.6 ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากสารเล็กตินบริสุทธิ์ของ *Schizophyllum commune* ML078 ที่ศึกษาเป็นสาร Glycoprotein มีน้ำหนักโมเลกุล 31.5 kDa เมื่อนำสารบริสุทธิ์มาทดสอบความคงตัวหรือความเสถียรที่อุณหภูมิ 40, 50, 55, 65, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสารบริสุทธิ์นี้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (รูปที่ 3.16A) สารเล็กตินสูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์เมื่อให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

เมื่อนำสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่สกัดจาก fruiting body ของ *Schizophyllum commune* ML078 มาทดสอบความคงตัวที่ pH 3 ถึง 10 พบว่าสารบริสุทธิ์นี้มีความคงตัวดีที่สุดที่ pH 8-9 ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ ส่วนที่ pH 3-7 และ 10 ก็ยังคงมีสมบัติของสารเล็กตินอยู่ราว 70-85% (รูปที่ 3.16B)



รูปที่ 3.16 ความเสถียรต่อความร้อน (A) และต่อ pH (B) ของเล็กตินจาก *Schizophyllum commune* ML078 (Activity 100% สัมพันธ์กับ Titer เท่ากับ 8)

3.6.1.7 การวิเคราะห์ลำดับกรดแอมิโนของสารเล็กติน

จากการหาลำดับกรดแอมิโนของ N-terminus ของสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่สกัดจาก fruiting body ของ *Schizophyllum commune* ML078 เพื่อเป็นแนวทางนำไปสู่ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนที่บงการการสร้างเล็กติน ผลการวิเคราะห์พบว่า N-terminus ของสารเล็กตินถูกบล็อก ซึ่งมีรายงานการพบลักษณะเดียวกันจากการศึกษาเล็กตินจากเห็ดชนิดอื่นเช่นกัน ได้แก่ *Agrocybe cylindracea* (Wang *et al.*, 2001), *Grifola frondasa* (Kawagishi *et al.*, 1990) และ *Mycoleptodonoides aitchisonii* (Kawagishi *et al.*, 2001) จึงเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์โดยย่อยสารเล็กตินด้วย Trypsin เพื่อหา

ลำดับกรดแอมิโนบางส่วนภายในเปปไทด์ จากการศึกษาพบลำดับกรดแอมิโนบางส่วนภายในเปปไทด์ (รูปที่ 3.17) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดแอมิโนของเล็กตินจากเห็ดบางชนิดที่มีข้อมูลใน NCBI database (U.S.A.) พบว่ามีความเหมือนกับเล็กตินจาก *Marasmius oreades* มากที่สุดคือ 66% และมีความเหมือนกับ Ricin B-related lectin จาก *Polyporus squamosus* 53%

Peptide A: I Q G X V G G s D E

Peptide B: G T P I I G W D Y X E X

Peptide C: T F L A D I K P G X

รูปที่ 3.17 Peptide sequences ของสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่สกัดจาก fruiting body ของ *Schizophyllum commune* ML078 จากการย่อยด้วย Trypsin

3.6.2 การศึกษายีน (Gene/s) ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กติน

เนื่องจากผลการหาลำดับของกรดแอมิโนของ N-terminus ของสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่สกัดจาก *Schizophyllum commune* ML078 ยังไม่เพียงพอที่จะใช้เป็นแนวทางหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนที่บงการการสร้างเล็กตินของเชื้อราเด่นที่คัดเลือกนั้น ประกอบกับข้อจำกัดของงบประมาณของโครงการวิจัย จึงได้คัดเลือกเชื้อราในสกุล *Amanita*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Lepiota*, *Russula* และ *Volvariella* ที่มีผลการศึกษาการสะสมสารเล็กตินในโครงสร้างและผลการทดสอบสมบัติทางชีวภาพของสารที่มีแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ (ตารางผนวกที่ 1, 4 และ 5) เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินโดยอาศัยแนวทางการศึกษาตาม Iijima *et al.* (2002), Wright *et al.* (1999b) และ Yoshida *et al.* (1994) โดยสกัดแยก DNA จาก fruiting body ที่ยังอ่อนหรือเส้นใย และทดลองตรวจจับยีนด้วย specific oligonucleotide primers และเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากที่มีรายงานการศึกษาบ้างแล้วในต่างประเทศในเชื้อราชนิดใกล้เคียงกับชนิดที่ได้ศึกษาของโครงการวิจัยนี้ เป็นการตรวจสอบแนวโน้มที่จะพบสารชนิดใหม่อีกทางหนึ่ง

จากการเพิ่มจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินจาก genomic DNA ด้วยเทคนิค PCR และใช้ primers 4 คู่ พบว่า primers ที่เลือกจากรายงานการศึกษาเล็กตินของเห็ด *Agaricus bisporus* (Stoop *et al.*, 1998) และ *Marasmius oreades* (Penas *et al.*, 1998) ให้ผลการเพิ่มจำนวน DNA (ตารางที่ 3.11) ที่มีขนาด DNA fragment (รูปที่ 3.18) ใกล้เคียงกับที่มีการศึกษาของแหล่งอ้างอิง (ตารางที่ 2.1) อย่างก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกเตรียม clone ผลผลิตของ DNA ที่ได้จากเชื้อรา *Amanita* sp. SUT004, *Russula* sp. SUT054 และ *Russula* sp. SUT087 ที่ผลิตสารเล็กตินซึ่งทนระดับ pasteurization (ตารางผนวกที่ 5) และออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งบางชนิดของคน (ตารางผนวกที่ 4) ไว้ใน Plasmid vector (pCR® 8/GW/TOPO® vector) เพื่อการศึกษาของโครงการวิจัยโครงการต่อไป

ตารางที่ 3.11 ชนิดของเชื้อราและผลการเพิ่มจำนวน DNA จาก genomic DNA ด้วย primers สำหรับศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินของเชื้อรา

Fungal code	Fungal species	PCR primers			
		AgbiF/AgbiR[a]	Cgl1F/Cgl1R[b]	MaosF/MaosR[c]	PlosF/PlosR[d]
ML016	*Cantharellus* cf. *cibarius*	-	-	-	-
ML048	*Russula aeruginea*	+	-	+	-
ML054	*Russula* sp.	+	-	+	-
ML055	*Lentinus* sp.	+	-	+	-
ML142	*Russula luteotacta*	-	-	+	-
SUT004	*Amanita* sp.	+	-	+	-
SUT024	*Lepiota* sp.	+	-	+	-
SUT054	*Lepiota* sp.	+	-	+	-
SUT087	*Lepiota* sp.	+	-	+	-
SUT129	*Volvariella volvacea*	-	-	+	-
SUT219	*Marasmius* sp.	+	-	+	-

[a] *Agaricus bisporus*

[b] *Coprinus* galectin gene

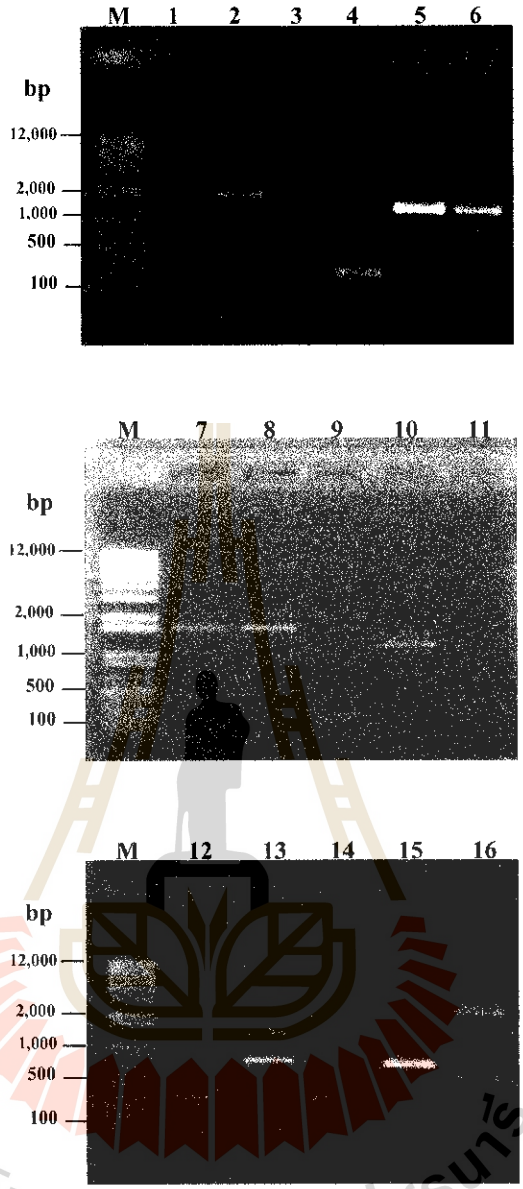
[c] *Marasmius oreades*

[d] *Pleurotus ostraetus*

+ = Positive DNA amplification result

- = Negative DNA amplification result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.18 Agarose gel electrophoresis ของผลผลิตจากการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วย PCR primers ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเล็กติน

ช่อง M, Molecular mass standards (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen)

ช่องที่ 1-11, PCR products จาก primers AgbiF/AgbiR: ช่อง 1, ML016; 2, ML048; 3, ML054; 4, ML055; 5, ML142; 6, SUT004; 7, SUT024; 8, SUT054; 9, SUT087; 10, SUT129; 11, SUT219

ช่องที่ 12-16, PCR products จาก primers MaosF/MaosR: ช่อง 12, SUT024; 13, SUT129; 1- ML142; 15, SUT219; 16, SUT087

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุป

4.1 สรุปผลการวิจัย

จากวัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อคัดเลือกให้ได้ชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตสารเล็กตินและ/หรืออนุพันธ์ของเล็กตินที่มีความสำคัญในการใช้ประโยชน์นั้น ได้รวบรวมเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ (Macro-fungi) 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งเป็นราชั้นสูงที่เรียกว่า เห็ด (Mushroom) และกลุ่ม Ascomycetes ในวงศ์ Xylariaceae โดยสำรวจและเก็บตัวอย่าง fruiting body จากป่าธรรมชาติ (เห็ดป่า) และในตลาดชุมชนที่มีการจำหน่ายเห็ดในพื้นที่ 8 จังหวัดเป็นหลัก คือ จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ อุบลราชธานี สกลนคร ขอนแก่น ชัยภูมิ นครปฐม และพิษณุโลก ได้ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดจำนวน 330 ตัวอย่าง (specimen) สามารถจัดจำแนกและระบุชนิดของเห็ดตามลักษณะทางสัณฐาน ได้ 24 วงศ์ 44 สกุล คือ วงศ์ Agaricaceae, Amanitaceae, Auriculariaceae, Bolbitiaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Cariolaceae, Clavariaceae, Coprinaceae, Entolomataceae, Geastraceae, Helvellaceae, Hymanochaetaceae, Lycoperdaceae, Peniophoraceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Phallaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae, Sclerodermataceae และ Tricholomataceae ที่พบมากคือวงศ์ Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Plurotaceae, Russulaceae และ Tricholomataceae เห็ดหลายตัวอย่างที่รวบรวมได้มีลักษณะทางสัณฐานทั้งที่แตกต่างและคล้ายกันมากจนยากที่จะจำแนกในระดับสกุล (genus) และระบุชนิด (species) ได้อย่างแน่นอนเมื่อเทียบกับข้อมูลการระบุชนิดตามแหล่งอ้างอิง สำหรับเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes ในวงศ์ Xylariaceae ที่รวบรวมได้เป็นเชื้อราบริสุทธิ์จำนวน 59 ไอโซเลท

กรณีตัวอย่างที่เก็บในลักษณะ fruiting body ได้ทดลองแยกและเพาะเลี้ยงให้ได้เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์เพื่อการทดสอบสารเล็กตินและทดลองผลิตสารในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเชื้อราที่รวบรวมได้ส่วนใหญ่เป็นเห็ดซึ่งจัดเป็นเชื้อราชั้นสูงซึ่งมีการพัฒนาโครงสร้างของเซลล์มากกว่าเชื้อรากลุ่มอื่น มีการเจริญของเส้นใยช้ากว่ารากลุ่มอื่น และยังพบอีกว่าเห็ดที่รวบรวมได้ส่วนใหญ่ (หลายชนิดในวงศ์ Boletaceae, Russuleceae และ Tricholomataceae) เป็น Mycorrhizal fungi ซึ่งจะอยู่ร่วมกับพืช เมื่อนำมาแยกให้ได้เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์จึงเพาะเลี้ยงได้ยากและตายง่ายเมื่อถ่ายเชื้อ (subculture) ต่อเนื่อง จึงมีผลสำเร็จของการแยก เพาะเลี้ยง และอยู่รอดภายหลังการถ่ายเชื้อจำนวน 24 ไอโซเลท จากนั้นได้สกัดแยกสารเล็กตินจากดอกเห็ดที่มีลักษณะอ่อนนุ่มและจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้ในรูปสารสกัดหยาบ (crude extract) ดอกเห็ดที่ใช้สกัดเล็กตินนี้ผ่านการอบแห้งในตู้อบไอร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยได้ทดลองหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการอบตัวอย่างเห็ดที่ยังคงรักษาสมบัติของสารเล็กติน และไม่มีเมือกจากโครงสร้างของดอกเห็ดสดออกมาปนเปื้อนในขั้นตอนการสกัดสาร เล็กติน

พบว่าการอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6-18 ชั่วโมง ทำให้ได้ตัวอย่างเห็ดมีความชื้นประมาณ 4-10% ขึ้นกับความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างเห็ด เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมดอกเห็ดเพื่อใช้ในการสกัดสารเล็กติน

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กตินเพื่อการคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ โดยเน้นความสามารถในการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์และไม่มีผลหรือมีผลน้อยมากกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ที่ใช้ทดสอบมี 6 ชนิด คือ กระต่าย แกะ ห่าน หนูตะเภา หนูแรท และหนูเม้าส์ และเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนมีทั้งเลือดหมู่เอ บี และโอ (ระบบเลือด ABO) เปรียบเทียบค่า Titer (ความเจือจางสูงสุดของสารสกัดที่มีเล็กตินที่ยังให้ผลบวกของการเกิดการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง) ที่ได้ จากสารเล็กตินที่สกัดจากตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดที่รวบรวมได้ 330 ตัวอย่าง เส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ในกลุ่มเห็ดที่แยกได้จากดอกเห็ด ราในกลุ่ม Polypores และราในวงศ์ Xylariaceae จำนวน 24, 19 และ 59 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมทั้งอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ เมื่อตรวจหากิจกรรม hemagglutination พบว่าสารสกัดจากดอกเห็ดจำนวน 220 ตัวอย่าง และเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae จำนวน 43 ไอโซเลท มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ ได้ และยังพบ hemolytic activity และ partial hemolysis ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเนื่องจากสารสกัดจากเชื้อรา สารสกัดที่ทดสอบเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ด้วยสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่เกิดปฏิกิริยากับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ได้ดีกว่าคน ซึ่งนับได้ว่ามีแนวโน้มที่ดีในการใช้ประโยชน์สารเล็กตินจากเชื้อราที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ในวงการแพทย์และเภสัชกรรมในอนาคต ผลการทดสอบยังพบอีกว่ามีความแตกต่างกันของเล็กตินที่สะสมในโครงสร้างของดอกเห็ดที่ระบุได้ว่าเป็นสกุลหรือชนิดเดียวกัน แต่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งที่พบการเจริญของเห็ดต่างแหล่งกัน แสดงให้เห็นว่าพื้นที่ที่เห็ดเจริญมีผลต่อการสะสมสารเล็กตินที่พบ ขนาดและอายุของดอกเห็ดอาจมีผลต่อการสะสมเล็กติน ตัวอย่างเห็ดและราในกลุ่ม Xylariaceae ที่นำมาศึกษาจำนวน 68 และ 31 ตัวอย่างตามลำดับ สะสมสารเล็กตินไว้ใน fruiting body และเส้นใยที่มีปริมาณ Hemagglutination titer สูง $\geq$ 256 เชื้อราเหล่านี้จัดอยู่ในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Chlorophyllum*, *Lentinus*, *Lepiota*, *Leucocoprinus*, *Lycoperdon*, *Macrolepiota*, *Macrocybe*, *Marasmius*, *Russula*, *Schizophyllum*, *Volvariella*, *Hypoxylon* และ *Xylaria* เห็ดหลายชนิดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus, Lentinus*, *Russula* และ *Volvariella* เป็นเห็ดรับประทานได้ ที่สารสกัดเล็กติน (ความเจือจางเริ่มต้น 10 เท่า ในขั้นตอนการสกัดสาร) ให้ค่า Hemagglutination titer สูงถึง 1024 สารสกัดเล็กตินจากเส้นใยเห็ดและที่สะสมในอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโดยเฉลี่ยมีค่า Titer ต่ำมากจนถึงไม่พบเลย นอกจากนี้ยังพบ hemolytic activity และ partial hemolysis ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการใช้ประโยชน์ทางด้านการวิจัยทางการแพทย์ เช่น การผลิต Hemolysin ซึ่งเห็ดที่มีการสะสม Hemolysin ในปริมาณที่สูง ได้แก่ เห็ดบางชนิดในสกุล *Amanita, Entoloma* และ *Macrolepiota*

จากผลการระบุชนิดของเชื้อรา แหล่งธรรมชาติที่พบการเจริญของเชื้อราในแต่ละพื้นที่ และปริมาณเล็กตินที่ผลิตหรือสะสมในโครงสร้างของเชื้อราที่วัดจาก Hemagglutination titer รวมทั้งข้อมูลการใช้ประโยชน์เชื้อราในกลุ่มเห็ดเป็นอาหารของคนในชุมชนที่เป็นปกติอยู่แล้ว สามารถคัดเลือกเชื้อราในกลุ่มเห็ดได้ 78 ตัวอย่าง และราในกลุ่ม Xylariaceae ได้ 25 ไอโซเลท เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะพื้นฐานของเชื้อและสารเล็กตินเพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของเล็กตินและอนุพันธุ์ของเล็กตินที่พบ และเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

กรณีเห็ดที่คัดเลือกในการศึกษาครั้งนี้มีเห็ดรับประทานได้หลายชนิดที่พบการเจริญในหลายพื้นที่ เช่น ในสกุล *Amanita, Boletus, Catharellus, Russula* และ *Termitomyces* เห็ดชนิด *Cantharellus minor* เป็นเห็ดรับประทานได้ที่พบอยู่ทั่วไปในพื้นที่ป่าจังหวัดนครราชสีมาและบุรีรัมย์ที่ให้ผลปริมาณเล็กตินที่สะสมแตกต่างกัน และยังมีเห็ดที่เป็น Mycorrhizal fungi หลายสกุลในวงศ์ Boletaceae พบอย่างน้อย 4 สกุล (*Boletus, Gyroporus, Tylopilus* และ *Xerocomus*) และเห็ดในวงศ์ Russulaceae สกุล *Russula* เป็นเห็ดกลุ่มใหญ่ที่ลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกันมากยากต่อการระบุชนิดและยังมีความแตกต่างด้านการสะสมสารเล็กตินในโครงสร้าง fruiting body รวมทั้งเห็ดในวงศ์ Agaricaceae ที่พบมีหลายสกุล ได้แก่ *Leucocoprinus, Leucoagaricus, Lepiota* และ *Macrolepiota* ที่สะสมของเล็กตินในปริมาณที่สูง แต่เห็ดหลายชนิดรับประทานไม่ได้ มักเรียกว่า “เห็ดเมา” พบว่าดอกเห็ดในวงศ์นี้มีความแข็งมากกว่าและเน่าเสียช้ากว่าเห็ดวงศ์อื่นๆ (เช่น Amanitaceae และ Boletaceae) เป็นเห็ดที่ fruiting body มักมีความชื้นต่ำ ทำให้ใช้เวลาสั้นในการเตรียมดอกเห็ดแห้งเพื่อสกัดสารเล็กติน

เมื่อทดสอบสมบัติทางชีวภาพด้านความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดและเชื้อรา ของสารสกัดจากเชื้อราจำนวน 78 ตัวอย่าง ที่คัดเลือก พบว่ามีเพียงสารสกัดที่ได้จากดอกเห็ด 2 ตัวอย่าง คือ *Lycoperdon* sp. ML062 และ *Termitomyces microcarpus* ML057 ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ได้ในระดับต่ำ (ความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 7.3 และ 9.4 มิลลิเมตร และ 8.3 และ 9.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ) ทั้งสองสารสกัดมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) >1:10

จากนั้นได้ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงของคน 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (Human epidermoid carcinoma, KB) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma, HeLa) พบว่าสารเล็กตินที่สกัดได้จากทั้งเห็ดและรา 15 ตัวอย่าง (สายพันธุ์) ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของคนที่ทดสอบได้ดี เห็ดป่าที่รับประทานได้หลายชนิดมีสารเล็กตินที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของคน ได้แก่ เห็ดระโงก (สกุล *Amanita*) เห็ดมันปู (สกุล *Cantharellus*) เห็ดหาด (สกุล *Lactarius*) เห็ดแดงหรือเห็ดน้ำหมาก (สกุล *Russula*) เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก (สกุล

Schizophyllum) และ เห็ดโคนบางชนิด (สกุล *Termitomyces*) และพบราบางสายพันธุ์ในสกุล *Hypoxylon* ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้น สารสกัดเล็กตินจาก *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016 เป็นสารที่น่าสนใจ แสดงค่า IC_{50} เมื่อทดสอบทั้งกับ KB และ HeLa ที่ 3.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารออกฤทธิ์จากเชื้อราดังกล่าวข้างต้นไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิงปกติ (African green monkey kidney cell) และเห็ดชนิดนี้ยังเป็นเห็ดรับประทานได้ พบได้ง่ายในปริมาณมากในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

พร้อมกันนี้ได้ทดสอบความคงตัว (ความเสถียร) ต่อความร้อนของสารสกัดเล็กติน พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทนความร้อนถึง 65 หรือใกล้เคียง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตัวอย่างเช่น สารสกัดจาก *Amanita* sect. *Vaginatae* ML020, *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016, *Lactarius* sp. SUT156, *Russula* sp. SUT087, *Schizophyllum commune* ML078 และ *Hypoxylon* sp. 2447

ในขั้นตอนทดลองผลิตเล็กตินโดยเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ที่คัดเลือกในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Russula* และไอโซเลทในวงศ์ Agaricaceae จากตัวอย่างเชื้อราที่ประสบความสำเร็จในการแยกและเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและจากสมบัติทางชีวภาพของสารที่ผ่านการทดสอบแล้ว โดยเลี้ยงในอาหาร Malt extract broth ที่เติม 2% Glucose บ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีการผลิตสารเล็กตินที่สะสมในเส้นใยในปริมาณต่ำ สารสกัดให้ผล Titer ในช่วง 32 ถึง 1 และจนถึงผลลบ และพบสารที่มีสมบัติของเล็กตินในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการเลี้ยงเชื้อบางไอโซเลทในปริมาณต่ำเช่นกัน ผลที่ได้นี้เป็นข้อมูลที่สนับสนุนความสำคัญของการศึกษาเพื่อการโคลนจีนที่เกี่ยวข้องกับผลิตเล็กติน เพื่อพัฒนาสิ่งมีชีวิตที่ผลิตเล็กตินและกรรมวิธีการผลิตสารให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น

การศึกษาขั้นตอนสุดท้ายของโครงการวิจัยนี้เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตและใช้ประโยชน์สารเล็กติน คือการศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องการผลิตเล็กตินชนิดเด่นจากเชื้อราที่คัดเลือกได้ในเบื้องต้น โดยได้ศึกษาทั้งสมบัติและลำดับกรดแอมิโนของสารเล็กติน (สารโปรตีน) และจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินจาก Genomic DNA ของเชื้อรา ได้เลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในกลุ่มเห็ดคือ *Schizophyllum commune* ML078 ตามข้อมูลที่ได้จากการทดสอบสารสกัดเล็กตินจากปฏิกิริยา Hemagglutination ที่ให้ค่า Titer สูง แสดงความเป็นพิษหรือความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของคน มีความเสถียรต่อความร้อนสูง มีปริมาณของตัวอย่าง (fruiting body หรือเส้นใย) ที่เพียงพอต่อการสกัดสารเล็กตินเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนนี้ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญ และให้ความสำคัญกับชนิดของเห็ดชนิดที่เป็นเห็ดรับประทานได้

Schizophyllum commune ML078 สะสมสารเล็กตินใน fruiting body ในความเข้มข้นสูง และเป็นเห็ดรับประทานได้ พบเจริญบนได้ทั่วไปบนขอนไม้ เปลือกไม้ ในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงในเชิงการค้าในประเทศไทย สารสกัดหยาบเล็กตินจาก fruiting body ของ *Schizophyllum*

commune ผ่านการตกตะกอนสารด้วย Ammonium sulphate และ Dialysis แล้วสามารถทำบริสุทธิ์สารเล็กตินได้ด้วย Mucin-Sepharose affinity chromatography เล็กตินบริสุทธิ์ที่ได้เป็นสาร Glycoprotein มีน้ำหนักโมเลกุล 31.5 kDa สามารถจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ได้ดีกว่าคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระต่ายและหนูแรท ที่ให้ค่า Titer กับเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้สูงกว่าหนูแรท มีความจำเพาะกับ D-Galactose มากที่สุด รองลงมาคือ GalNAc และ Lactose ไม่มีความจำเพาะต่อน้ำตาล L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Glucose, D-Mannose และ Raffinose สารบริสุทธิ์นี้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สารเล็กตินสูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์เมื่อให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีความคงตัวดีที่สุดที่ pH 8-9 ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ ส่วนที่ pH 3-7 และ 10 ก็ยังคงมีสมบัติของสารเล็กตินอยู่ราว 70-85%

จากการหาลำดับกรดแอมิโนของ N-terminus ของสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่สกัดจาก fruiting body ของ *Schizophyllum commune* ML078 เพื่อเป็นแนวทางนำไปสู่ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนที่บงการการสร้างเล็กติน ผลการวิเคราะห์พบว่าสารไกลโคโปรตีนนี้มี Blocked N-terminus จึงเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์โดยย่อยสารเล็กตินด้วย Trypsin เพื่อหาลำดับกรดแอมิโนบางส่วนภายในเปปไทด์ จากการศึกษาพบลำดับกรดแอมิโนบางส่วนภายในเปปไทด์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดแอมิโนของเล็กตินจากเห็ดบางชนิดที่มีข้อมูลใน NCBI database (U.S.A.) พบว่ามีความเหมือนมากที่สุด (ความเหมือน 66%) กับเล็กตินจาก *Marasmius oreades*

เนื่องจากผลการหาลำดับของกรดแอมิโนของ N-terminus ของสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่สกัดจาก *Schizophyllum commune* ML078 ยังไม่เพียงพอที่จะใช้เป็นแนวทางหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของจีนที่บงการการสร้างเล็กตินของเชื้อราชนิดเด่นที่คัดเลือกนั้น จึงได้คัดเลือกเชื้อราในสกุล *Amanita*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Lepiota*, *Russula* และ *Volvariella* ที่มีผลการศึกษาการสะสมสารเล็กตินในโครงสร้างและผลการทดสอบสมบัติทางชีวภาพของสารที่มีแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ เพื่อศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินโดยอาศัยแนวทางการศึกษาตามที่มีรายงานการศึกษาของเชื้อรากลุ่มใกล้เคียง โดยสกัดแยก DNA จาก fruiting body ที่ยังอ่อนหรือเส้นใย และทดลองตรวจจับจีนด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ specific oligonucleotide primers จากที่มีรายงานการศึกษาบ้างแล้วในต่างประเทศในเชื้อราชนิดใกล้เคียงกับชนิดที่ได้ศึกษาของโครงการวิจัยนี้ เป็นการตรวจสอบแนวโน้มที่จะพบสารชนิดใหม่อีกทางหนึ่ง จากการเพิ่มจำนวนจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินจาก genomic DNA ด้วยเทคนิค PCR และใช้ primers 4 คู่ พบว่า primers ที่เลือกจากรายงานการศึกษาเล็กตินของเห็ด *Agaricus bisporus* (Stoop and Moolbrock,1998) และ *Marasmius oreades* (Penas *et al.*, 1998) ให้ผลการเพิ่มจำนวน DNA ที่มีขนาด DNA fragment ใกล้เคียงกับที่มีการศึกษาของแหล่งอ้างอิง จากนั้นได้เลือกเตรียม clone ผลผลิตของ DNA ที่ได้จากเชื้อรา *Amanita* sp. SUT004, *Russula* sp. SUT054 และ *Russula* sp. SUT087 ซึ่งสามารถผลิตสารเล็กตินที่ทนระดับ pasteurization และออกฤทธิ์ต้าน

เซลล์มะเร็งบางชนิดของคน ไว้ใน Plasmid vector (pCR®8/GW/TOPO® vector) เพื่อการศึกษาของโครงการวิจัยโครงการต่อไป

4.2 ข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้มีผลสำเร็จที่ได้ชนิดของเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ (Macro-fungi) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดป่าที่เจริญในประเทศไทย ที่มีความสามารถในการผลิตและสะสมสารเล็กตินที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ ได้สารเล็กตินจากเชื้อราซึ่งควรมีการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารในเชิงลึกต่อไป สารที่พบอาจเป็นชนิดหรืออนุพันธ์ของสารเล็กตินชนิดใหม่เนื่องจากพบสมบัติบางประการจากการศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะพื้นฐานของสารเล็กติน ที่แตกต่างจากที่มีรายงานการศึกษาและมีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ทางด้านการศึกษาและวิจัย ด้านการแพทย์ และเภสัชกรรม และถึงแม้ว่าอาจพบสารที่คล้ายกับที่ผลิตจากพืช ก็ยังมีข้อดีอย่างน้อยประการหนึ่งที่เหนือกว่าพืชคืออัตราการเจริญของเชื้อราสูงกว่าพืชมากจึงมีโอกาสที่จะผลิตสารในปริมาณมากในระยะเวลาสั้นได้ ได้ข้อมูลในเบื้องต้นของสารเล็กตินชนิดเด่นและจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินของเชื้อราที่คัดเลือกได้ ซึ่งเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปสู่การศึกษาการโคลนจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเล็กตินการแสดงออกของจีน และการผลิตสารที่ได้ในปริมาณมากและใช้เวลาสั้น และผลสำเร็จนี้ชี้แนะถึงการใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศไทยให้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจ ผลสำเร็จที่ได้ของโครงการวิจัยนี้ยังเป็นพื้นฐานสำคัญที่ควรมีการศึกษาต่อในเชิงลึกในส่วนที่เกี่ยวข้องในประเด็นดังต่อไปนี้

1) การจัดจำแนกและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเชื้อราที่ได้ทดสอบความสามารถในการผลิตเล็กตินให้ได้ชนิดหรือสายพันธุ์ที่แน่นอน ควรมีการศึกษาสารพันธุกรรมด้วยเพื่อแก้ปัญหาการระบุชนิดและจำแนกสายพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก เชื้อราที่พบอาจเป็นชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่

2) การสร้างฐานข้อมูล DNA (DNA database) ของเชื้อราที่สามารถสร้างสารเล็กติน ซึ่งนำไปสู่การแสดงถึง phylogenetic relationship ของเชื้อราที่พบการเจริญในประเทศไทย และเป็นข้อมูลที่สามารถใช้เพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำในการตรวจหาและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเชื้อราต่อไป

3) การศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้างทางเคมีของสารเล็กตินชนิดเด่นที่พบ สารที่พบอาจเป็นชนิดหรืออนุพันธ์ของสารเล็กตินชนิดใหม่

4) การศึกษาจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเล็กตินของเชื้อราที่คัดเลือกได้ เพื่อพัฒนาสู่กรรมวิธีการผลิตสารในปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยไม่ต้องรอการเพาะเลี้ยงเส้นใยและการเพาะเลี้ยง fruiting body

บรรณานุกรม

เกษม สร้อยทอง. 2537. *เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ. ห้างหุ้นส่วนจำกัดวอร์ดเมดิก. 222 หน้า

สุรีลักษณ์ รอดทอง หนึ่ง เตียอำรุง และพินิจ ชูคล้าย. 2541. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 58 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เธียรหิรัญ หนึ่ง เตียอำรุง และพินิจ ชูคล้าย. 2542. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 157 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เธียรหิรัญ และหนึ่ง เตียอำรุง. 2543. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 133 หน้า.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2539. *เห็ดเมืองไทย*. กรุงเทพฯ: บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพาณิช จำกัด. 161 หน้า.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley and Sons.

Arora, D. 1986. *Mushroom Demystified: A Comprehensive Guide to the Freshly Fungi (2nd ed.)*. Berkeley: Ten Speed Press.

Boulianne, R.P., Liu, Y., Aebi, M., Lu, B.C., and Kües, U. 2000. Fruiting body development in *Coprinus cinereus*: regulated expression of two galectins secreted by a non-classical pathway. *Microbiology*. 148: 1841-1853.

Bozzola, J.J. and Russell, L.D. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*, *Second edition*. Boston, Jones and Bartlett Publishers.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Brechtel, R., Watzig, H., and Rudiger, H. 2001. The lectin from the mushroom *Pleurotus ostreatus*: a phosphatase-activating protein that is closely associated with an alpha-galactosidase activity.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

A part of this paper has been presented as a preliminary report at *the 17th Interlec. Meeting 1997 in Wurzburg*, Germany. *Plant Science*. 160(5): 1025-1033.

Brzin, J., Rogelj, B., Popovic, T., Strukelj, B., and Ritonja, A. 2000. Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 20104-20109.

Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., and Vad, K. 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal*. 3: 31-40.

Dodd, R.B. and Drickamer, K. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: Implication for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*. 11(5): 71R-79R.

Elgavish, S. and Shaanan, B. 1997. Lectin-carbohydrate interactions: Different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences*. 22: 462-467.

Freire, M.G.M., Gomes, V.M., Corsini, R.E., Machado, O.T., De Simone, S.G., Novello, J.C., Marangoni, S., and Macedo, M.L.R. 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 61–68.

Frits, A.D.W. and Gary, M.B. 2000. Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands. *Pharmacological Reviews*. 52(2): 207-236.

Fukuda, M. and Kobata, A. 1993. *Glycobiology: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.

Gatehouse, A.M.R., Powell, K.S., Peumans, W.J., Van Damme, E.J., and Gatehouse, S.A. 1995. Insectical properties of some lectins: their potential in plant protection. In Puztai, A., and Bardocz, S. (eds.). *Lectins: Biomedical Perspectives* (pp. 35-57). London: Taylor and Francis.

Gitt, M.A., Michael A. Gitt, Wiser, M.F., Leffler, H., Herrmann, J., Xia, Y., Massa, S.M., Cooper, D.N.W., Lusis, A.J., and Barondes, S.H. 1995. Sequence and mapping of galectin-5, a β-galactoside-binding lectin, found in rat erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 5032-5038.

Gozia, O., Ciopraga, J., Bentia, T., Lungu, M., Zamfirescu, I., Tudor, R., Roseanu, A., and Nitu, F. 1993. Antifungal properties of lectin and new chitinase from potato tubers. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie.* 316(8): 788-792.

Guillot, J., Giollant, M., Damez, M., and Dusser, M. 1991. Isolation and characterization of a lectin from the mushroom, *Lactarius deliciosus*. *Journal of Biochemistry*. 109(6): 840-845.

Guillot, J. and Konska, G. 1997. Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematic and Ecology*. 25: 203-230.

Hartley, M.R. 1996. The structure and function of ribosome-inactivating proteins. *Trends in Plant Science*. 1: 254-259.

Hauri, H.P., Appenzeller, C., Kuhn, F., and Nufer, O. 2000. Minireview: lectins and traffic in secretory pathway. *FEBS Letters*. 476: 32-37.

Hawksworth, D.H. 1993. The tropical fungal biota, census, pertinence, prophylaxis and prognosis. *In* Isaac, S., Frankland, J.C., Watling, R., and Whalley, A.J.S. (eds.). *Aspects of Tropical Mycology*. Cambridge: British Mycological Society.

Hughes, M.T., McGregor, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., and Kawaoka, Y. 2001. Adaptation of influenza a viruses to cells expressing low levels of sialic acid leads to loss of neuraminidase activity. *Journal of Virology*. 75(8): 3766-3770.

Iijima, N., Yoshino, H., Ten, L.C., Ando, A., Watanabe, K., and Nagata, Y. 2002. Two genes encoding fruit body lectins of *Pleurotus cornucopiae*: sequence similarity with the lectin of a nematode-trapping fungus. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 66: 2083-2089.

Imberty, A., Gautier, C., Lescar, J., Perez, S., Wyns, L., and Loris, R. 2000. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*. 275(23): 17541-17548.

Janzen, D.H., Juster, H.B., and Liener, I.E. 1976. Insectical action of the phytohemagglutinatinin. *Science*. 192: 795-796.

Kaku, H., Tanaka, Y., Tazaki, K., Minami, E., Mizuno, H., and Shibuya, N. 1996 Sialylated oligosaccharide-specific plant lectin from Japanese elderberry (*Sambucus sieboiliana*) bark tissue has homologous structure to type II ribosome-inactivating protein, ricin and abrin. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 1480-1485.

Kawagishi, H., Nomura, A., Mizuno, T., Kimura, A., and Chiba, S. 1990. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondasa* fruiting bodies. *Biochemica Et Biophysica Acta*. 1034: 247-252.

Kawagishi, H., Takagi, J., Taira, T, Murata, T., and Usui, T. 2001. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*. 56: 53-58.

Kojima, K., Yamamoto, K., Irimura, T., Osawa, T., Ogawa, H., and Matsumoto, I. 1996. Characterization of carbohydrate-binding protein p33/41. *Journal of Biological Chemistry*. 271(13): 7679-7685.

Kruger, R.P., Winter, H.C., Simonson-Leff, N., Stuckey, J.A., Goldstein, I.J., and Dixon, J.E. 2002. Cloning, expression, and characterization of the Galα1,3Gal high affinity lectin from the mushroom, *Maramius oreades*. *Journal of Biochemistry*. 277: 15002-15005.

Lam, Y.W., Ng, T.B., and Wang, H.X. 2001. Antiproliferative and antimitogenic activities in a peptide from puff ball mushroom *Calvatia caelata*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 289: 744-749.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lin, J.Y. and Chou, T.B. 1984. Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, *Volvariella volvacea*. *Journal of Biochemistry*. 96: 35-40.

Lindhorst, T.K. 2000. *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*. Toronto: Wiley-VCH.

Lis, H. and Sharon, N. 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*. 98(2): 637-674.

LæssØe, T. and Conte, A.D. 1996. *The Mushroom Book*. London: Dorling Kindersley. 256 pp.

Matsushita, M., *et al.* 1996. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen- like domains that functions as an opsonin. *Journal of Biological Chemistry*. 271(5): 2448-2454.

Miarons, P.B. and Fresno, M. 2000. Lectins from tropical sponges: Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(38): 29283-29289.

Mirelman, D. 1986. *Microbial Lectins and Agglutinins: Properties and Biological Activity*. New York: John Wiley & Sons.

Mo, H., Winter, H.C., and Goldstein, I.J. 2000. Purification and characterization of Neu5Acα2-6Galβ1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(14): 10623-10629.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.

Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Yolke, R.H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edition. Washington: ASM.

Nagata, Y., Fukumori, F., Sakai, H., Hagiwara, T., Hiratsuka, Y., Kochibe, N., and Kabata, A. 1991. Crystallization and characterization of a lectin obtained from a mushroom, *Aleuria aurantia*. *Biochemica Et Biophysica Acta*. 1076: 187-190.

Ngai, P-H.K., and Ng, T.B. 2004. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferation activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 314: 988-993.

Oda, Y., Senaha, T., Matsuno, Y., Nakajima, K., Naka, R., Kinoshita, M., Honda, E., Furuta, I., and Kakehi, K. 2003. A new fungal lectin recognizing α-(1,6)-linked fucose in the N-glycan. *Journal of Biological Chemistry*. 278(34): 32439-32447.

Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Yamazaki, H., Shimada, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., and Wakamiya, N. 1999. Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *Journal of Biological Chemistry*. 274(19): 13681-13689.

Oguri, S., Ando, A., and Nagata, Y. 1996. A novel development stage-specific lectin of the Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Bacteriology*. 178(19): 5692-5698.

Otta, Y., Amano, K., Nishiyama, K., Ando, A., Ogawa, S., and Nagata, Y. 2002. Purification and properties of a lectin from ascomycete mushroom, *Ciborinia camelliae*. *Phytochemistry* 60: 103–107.

Pemberton, R.T. 1994. Agglutinins (lectins) from some British higher fungi. *Mycological Research*. 98: 277-290.

Penas, M.M., Asgeirsdottir, S.A., Lasa, I., Culianez-Macia, F.A., Pisabarro, A.G., Wessels, J.G.H., and Ramirez, L. 1998. Identification, characterization, and *in situ* detection of fruit-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10): 4028-4034.

Peumans, W.J. and Van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*. 109: 347-352.

Pusztai, A. 1991. *Plant Lectins*. Cambridge: The Rowett Research Institute, Aberdeen Cambridge University Press.

Reynolds, C.D., Chattopadhyay, T.K., Donovan, M.J., Lambert, S.J., Palmer, R.A., Rizkallah, P.J., Rodtong, S., Whalley, A.J.S., and Wright, L.M. 2000. Purification and characterization of fungal and plant lectins: An overview. *The Oral Presentation Handout of the Tropical Mycology 2000,* 25-29 April 2000, Liverpool, U.K. 29 pp.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Rini, J.M. 1995. Lectin structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 24: 551-577

Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C., and Ferrara, P. 1992. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 203: 173-179.

Rott, O., Charreive, J., and Cash, E. 1996. Influenza A virus hemagglutinin is a B cell-superstimulatory lectin. *Medical Microbiological Immunology*. 184(4): 185-193.

Sauerborn, M.K., Wright, L.M., Reynolds, C.D., Grossmann, J., and Rizkallah, P.J. 1999. Insights into carbohydrate recognition by *Narcissus pseudonarcissus* lectin: The crystal structure at 2 Å resolution in complex with α1-3 mannobiose. *Journal of Molecular Biology*. 290: 185-199.

Sharon, N. and Lis, H. 1989. *Lectins*: Rehovot: Department of Biophysics, The Weizmann Institute of Science, Israel.

She, Q.B., Ng, T.B., and Liu, W.K. 1998. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 247(1): 106-111.

Stoop, J.M. and Moolbrock, H. 1998. Cloning and characterization of NADP-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom, *Agaricus bisporus* and its expression in response to NaCl stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 275: 20104-20109.

Thankavel, K., Madison, B., Ikeda, T., Malaviya, R., Shah, A.H., Arumugam, P.M., and Abraham, S.N. 1997. Localization of a domain in the fim H adhesion of *Escherichia coli* type1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *Journal of Clinical Investigation*. 100(5): 1123-1136.

Turnbull, E. and Watling, R. 1999a. Taxonomic and floristic notes on Malaysian larger fungi III. *Malayan Nature Journal*. 53(3): 189-200.

Turnbull, E. and Watling, R. 1999b. Some records of *Termitomyces* from old world rainforests. *Kew Bulletin*. 54: 731-738.

Van Damme, E.J.M., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F., and Peumans, W.J. 1997a. Isolation and molecular cloning of a novel type 2 ribosome-inactivating protein with an inactive B chain from elderberry (*Sambucus nigra*) bark. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 8353-8360.

Van Damme, E.J., Peumans, W.J., Pusztai, A., and Bardocz, S. 1997b. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. Chichester: John Wiley & Sons.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Van Damme, E.J., Barre, A., Mazard, A.M., Verhaert, P., Horman, A., Debray, H., Rouge, P., and Peumans, W.J. 1999. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. *European Journal of Biochemistry*. 259: 135-142.

Veau, B., Guillot, J., Damez, M., Dusser, M., Konska, G., and Botton, B. 1999. Purification and characterization of an anti-(A+B) specific lectin from the mushroom *Hygrophorus hypothejus*. *Biochemica Et Biophysica Acta*. 1428(1): 39-44.

Wang, H.X., Ng., T.B., Liua, W.K., Ooi, V.E., and Chang, S.T. 1995. Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *International of Peptide and Protein Research*. 46(6): 508-513.

Wang, H., Ng, T.B., and Ooi, V.E.C. 1998a. Lectin activity in fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 44(1): 135-141.

Wang, H., Ng, T.B., and Ooi, V.E.C. 1998b. Lectins from mushrooms. *Mycological Research*. 102(8): 897-906.

Wang, H., Gao, J., and Ng, T.B. 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 275: 810-816.

Wang, H., Ng, T.B., and Liu, Q. 2001. Isolation of a new heteromeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Life Science*. 70: 877-885.

Walting, R. 1998. Thai national forest & nature reserves: Thai mycodiversity in relation to surrounding countries. In *Proceeding of the Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology 1998* (pp. 7-12). Hua Hin, Thailand.

Watling, R. 2003. *Fungi*. London, The Natural History Museum.

Weis, W.I. and Drickamer, K. 1996. Structure basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*. 65: 441-443.

Wilson, A.P. 2000. Cytotoxicity and Viability Assays in *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 3rd edition (ed. Masters, J.R.W.) Vol. 1 (pp. 175-219). Oxford: Oxford University Press.

Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M., and Williams, P. 2000. The *Pseudomonas aeruginasa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by Rpos. *Journal of Bacteriology*. 182(22): 6401-6411.

Wood, S.D. 1995. *Crystallographic Studies of Molecules of Biological and Chemical Interest*. Ph.D. Thesis, Liverpool John Moores University, England.

Wood, S.D., Wright, L.M., Reynolds, C.D., Rizkallah, P.J., Allen, A.K., Peumans, W.J., and Van Damme, E.J.M. 1999. Structure of the native (unligated) mannose-specific bulb lectin from *Scilla campanulata* (bluebell) at 1.7 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. D55: 1264-1272.

Wright, L.M. 1998. *Biochemical and X-ray Crystallography Studies of Monocot Lectins in Their Native and Ligated states*. Ph.D. Thesis, Liverpool John Moores University, England.

Wright, L.M., Reynolds, C.D., Rizkallah, P.J., Allen, A.K., Peumans, W.J., Van Damme, E., and Donovan, M.J. 1999a. Purification and crystallization of a novel two-domain lectin from *Scilla campanulata*. *Protein and Peptide Letters*. 6(4): 253-258.

Wright, L.M., Van Damme, E.J.M., Barre, A., Allen, A.K., Leuven, F.V., Reynolds, C.D., Rouge, P., and Peumans, W.J. 1999b. Isolation, characterization, molecular cloning and molecular modeling of two lectins of different specificities from bluebell (*Scilla campanulata*) bulbs. *Biochemical Journal*. 340: 299-308.

Wu, Q., Wang, Q., Taylor, K.G., and Doyle, R.J. 1995. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect cell surface properties of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Bacteriology*. 177(5): 1399-1401.

Yoshida, M., Kata, S., Oguri, S., and Nagata, Y. 1994. Purification and properties of lectins from a mushroom *Pleurotus cornucopiae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 58: 498-501.

Yu, L.G., Fernig, D.G., White, M.R.H., Spiller, D.G., Appleton, P., Evans, R.C., Grierson, I., Smith, J.A., Davies, H., Geraimenkk, O.V., Peterson, O.H., Milton, J.D., and Rhodes, J.M. 1999. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 4890-4899.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สารละลายและน้ำยาเคมี

1. Ammonium hydroxide (10%)

Ammonium hydroxide	10.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. DAP (1,3-Diaminopropane; 20mM)

DAP (1,3-Diaminopropane)	1.48	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. Lactophenol

Lactic acid	20.00	มิลลิลิตร
Phenol crystal	20.00	กรัม
Glycerol	40.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20.00	มิลลิลิตร

เก็บในขวด (อาจเติม 0.05 กรัมของ Cotton blue หรือ Methylene blue)

4. Loading buffer สำหรับ Agarose gel

Sucrose	4.00	กรัม
Bromophenol blue	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5. Lysis buffer

2.5% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

50mM Tris-HCl (pH 8.0)

10mM Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

7.5mM NaCl

6. Melzer's reagent

Iodine	1.50	กรัม
Potassium iodide	5.00	กรัม
Chloral hydrate	100.00	กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

7. Periodic Acid Schiff (PAS) สำหรับย้อม Polyacrylamide gel

7.1 Fixation/destaining solution

Acetic acid	10.00	มิลลิลิตร
Methanol	35.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	55.00	มิลลิลิตร

7.2 Meta-bisulfite solution

ละลาย Sodium meta-bisulfite ($Na_2S_2O_5$) 0.2 กรัม ใน 100 มิลลิลิตร ของ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) Acetic acid (เตรียมก่อนใช้)

8. Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) สำหรับการสกัดในการวิเคราะห์ Antimicrobial assay และการทำให้เล็กตื้นบริสุทธิ์

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
Benzamidine (1mM)	0.15	กรัม
2-Mercaptoethanol	2.00	มิลลิลิตร
Poly(vinylpyrrolidone) (PVPP)	7.50	กรัม
NaN_3	0.20	กรัม

ปรับ pH เท่ากับ 7.4 ด้วย HCl และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

9. Phosphate buffer saline (PBS)

เตรียมจาก 0.2M Sodium-phosphate buffer ซึ่งได้จากการผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2M Monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.12H_2O$, 31.20 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2M Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 53.65 กรัม หรือ 71.70 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.0	90.0	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

ปรับความเข้มข้นตามต้องการ กรณีเตรียมเพื่อการสกัดสารเล็กตินจากโครงสร้างของเชื้อรา ให้เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8 กรัมต่อลิตร และเติม Sodium bisulphate ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02M

10. Resolving gel SDS-PAGE (17.5%)

Tris-HCl (1.5M, pH 8.8)	3.75	มิลลิลิตร
N,N'-Methylene bisacrylamide (1%)	1.12	มิลลิลิตร
Sodium dodecyl sulphate (20%)	0.15	มิลลิลิตร
Acrylamide (30%)	8.75	มิลลิลิตร
APS (10%)	0.10	มิลลิลิตร
N,N,N',N' Tetramethylethane-1,2-diamine (TEMED)	0.01	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.14	มิลลิลิตร

11. Running buffer สำหรับ Mucin-Sepharose 4B affinity chromatography column

Tris (2M stock solution Tris-Base, pH 8)	5.00	มิลลิลิตร
$CaCl_2$	0.15	กรัม
$MgCl_2$ (1mM)	1.00	มิลลิลิตร
NaN_3	0.20	กรัม

ปรับ pH เท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. Running buffer สำหรับ SDS-PAGE

Glycine	14.40	กรัม
Tris-Base	3.03	กรัม
Sodium dodecyl sulphate	0.50	กรัม

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

13. SDS-gel loading buffer

Tris-HCl (1M, pH 6.8)	4.00	มิลลิลิตร
Sodium dodecyl sulphate	1.00	กรัม
2-Mercaptoethanol	0.50	มิลลิลิตร
Bromophenol blue (0.1%)	1.00	กรัม
Glycerol	10.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

14. Staining/Destaining solution

14.1 Staining solution ที่มี Coomassie brilliant blue

Coomassie brilliant blue R-250	2.00	กรัม
Methanol	450.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

14.2 Destaining solution สำหรับ Coomassie stain

Methanol	450.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

14.3 Destaining solution สำหรับ Protein blotting

Methanol	50.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

15. TBE buffer (pH 8.0)

89mM Tris-HCl

89mM Boric acid

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2mM Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

16. TE buffer

5mM Tris-HCl (pH 8.0)

0.5mM Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

17. Tricine SDS-PAGE (สำหรับ small protein and peptide separation)

17.1 Acrylamide solution (48%)

Acrylamide	240.00	กรัม
N,N'-Methylene bisacrylamide	7.00	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

17.2 Gel buffer (3M Tris-HCl, pH 8.45, SDS 0.3%)

Tris-HCl	181.00	กรัม
Sodium dodecyl sulphate	1.50	กรัม

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

17.3 Glycerol solution (50%)

Glycerol	250.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

17.4 Resolving gel SDS-PAGE (12%)

Acrylamide solution	7.20	มิลลิลิตร
Gel buffer	10.00	มิลลิลิตร
Glycerol solution (50%)	6.70	มิลลิลิตร
APS (10%)	0.10	มิลลิลิตร
N,N,N',N'-Tetramethylethane-1,2-diamine (TEMED)	0.01	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.10	มิลลิลิตร

17.5 Running buffer สำหรับ Tricine SDS-PAGE

Tris-Base (100mM)	6.06	กรัม
Tricine	8.96	กรัม
Sodium dodecyl sulphate	0.50	กรัม

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

17.6 Stacking gel (4%)

Acrylamide solution	1.00	มิลลิลิตร
Gel buffer	4.00	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	600.00	ไมโครลิตร
APS (10%)	100.00	ไมโครลิตร
N,N,N',N'-Tetramethylethane-1,2-diamine (TEMED)	20.00	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	6.35	ไมโครลิตร

18. Tris (2M, pH 8.0)

Tris-Base	242.28	กรัม

ปรับ pH เท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

19. Tris-HCl (1M, pH 7.0)

Tris-HCl	121.14	กรัม

ปรับ pH เท่ากับ 7.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Malt extract agar สำหรับเลี้ยงเชื้อราในกลุ่ม Xylariaceae

Malt extract	30.00	กรัม
Peptone	5.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม

ปรับ pH 5.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1 ลิตรของ ให้ความร้อนจนละลายสมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Malt extract broth สำหรับเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์ให้ผลิตสารเล็กติน

Malt extract	20.00	กรัม
Peptone	1.00	กรัม
Glucose	20.00	กรัม

ปรับ pH 5.5± 0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1 ลิตร ให้ความร้อนจนละลาย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อ เติมสารปฏิชีวนะ: Penicillin-G 40,000 unitsต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin 80,000 unitsต่อมิลลิลิตร หรือ Chloramphenicol 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ Chlotetracycline 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. Mueller-Hinton agar

Beef extract, dehydrated infusion form	300.00	กรัม
Casien hydrolysate	17.50	กรัม
Soluble starch	1.50	กรัม
Agar	15.00	กรัม

ปรับ pH 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1 ลิตร ให้ความร้อนจนละลาย สมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient agar (NA)

Beef extract	1.00	กรัม
Yeast extract	2.00	กรัม
Peptone	5.00	กรัม
Sodium chloride	5.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม

ปรับ pH 7.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1 ลิตรให้ความร้อนจนละลาย สมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Potato dextrose agar (PDA)

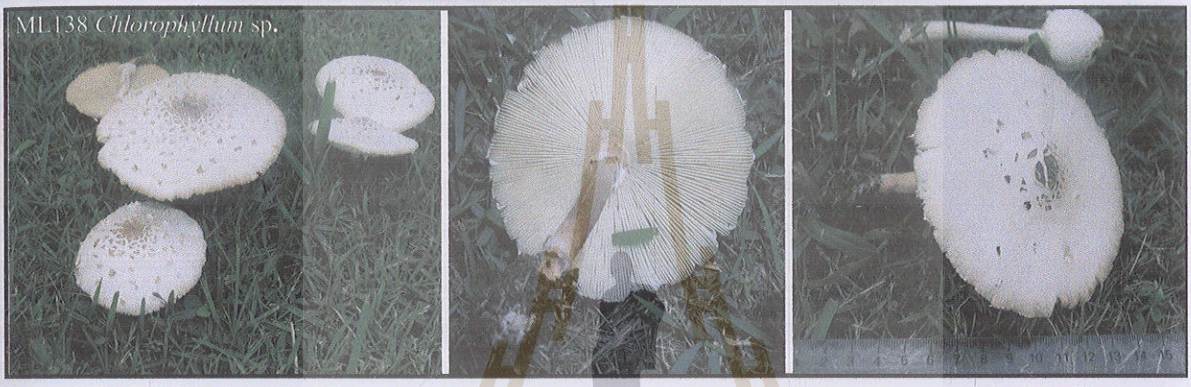
Potato dextrose	4.00	กรัม
Glucose	20.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม

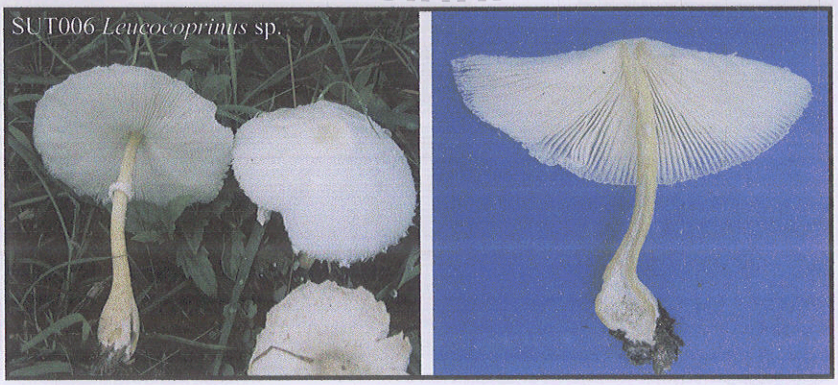
ปรับ pH 5.6 ± 0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1 ลิตร ให้ความร้อนจนละลาย สมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

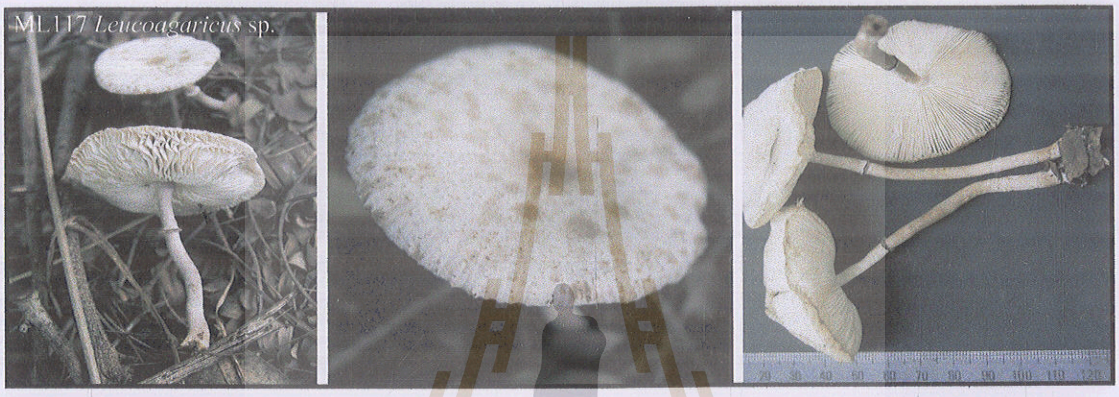
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ค รูปผนวก



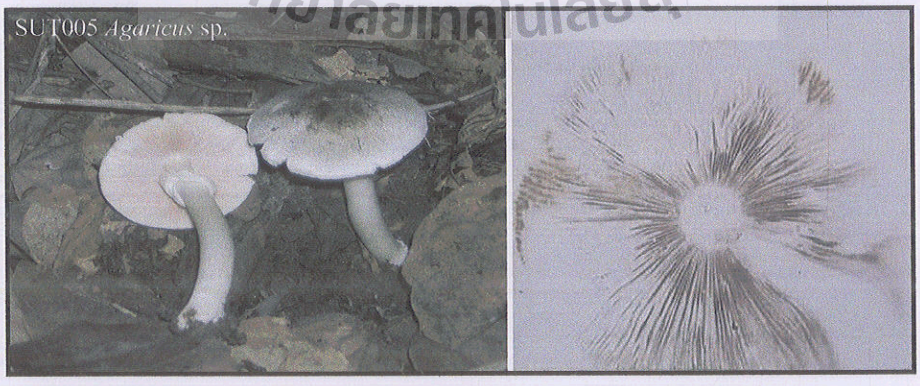


รูปผนวกที่ 1 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Agaricaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน



รูปผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Agaricaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

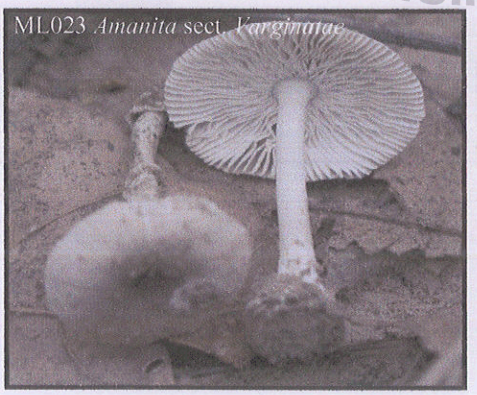


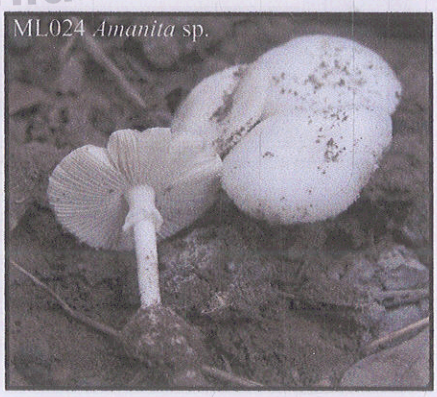
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Agaricaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

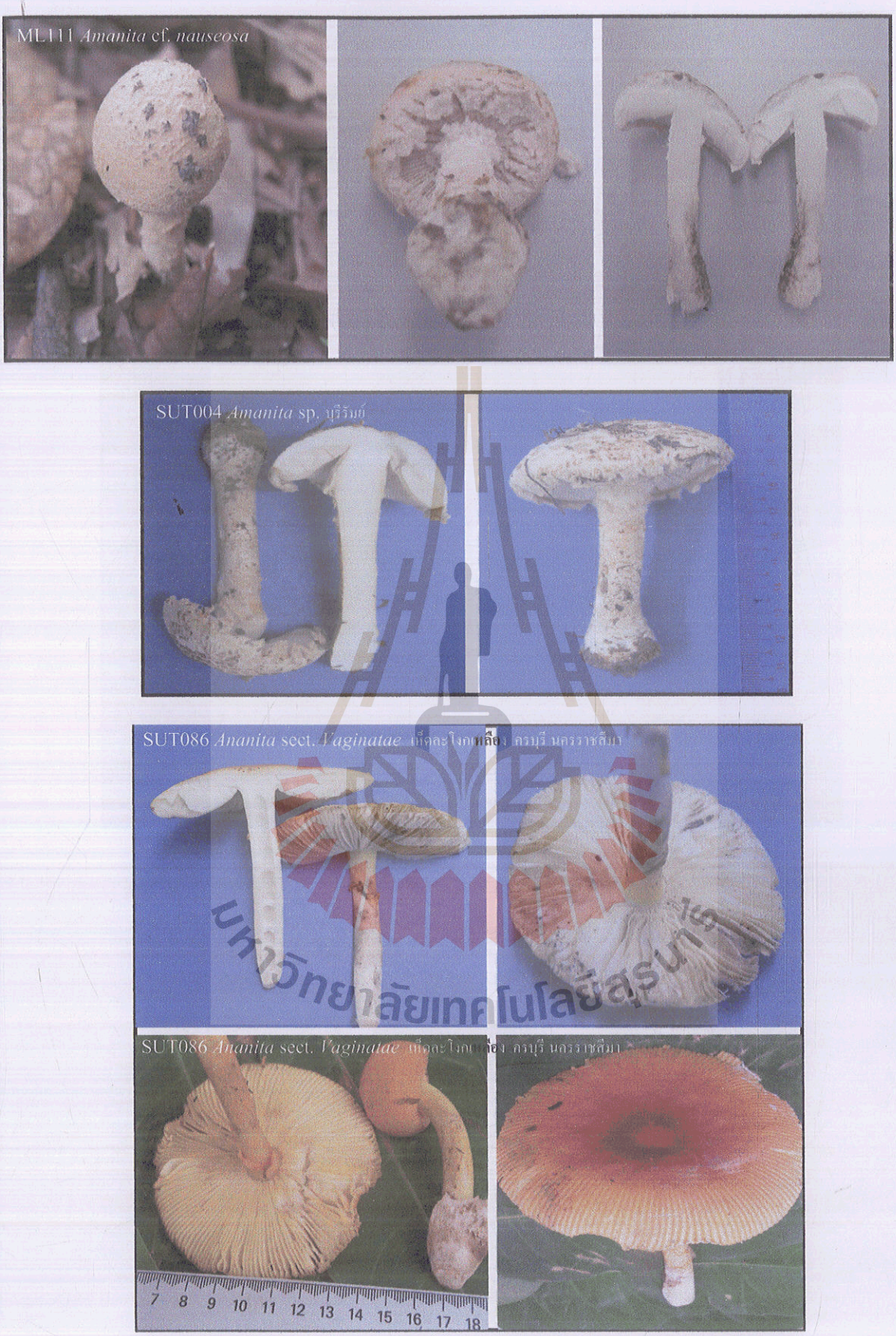
รูปผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Agaricaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน





มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 2 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Amanitaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

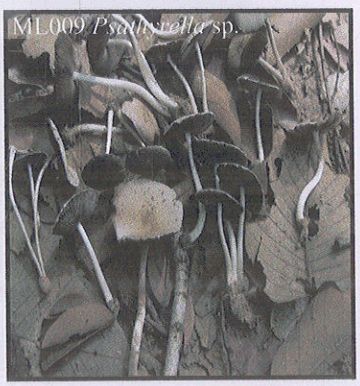


รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Amanitaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Amanitaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

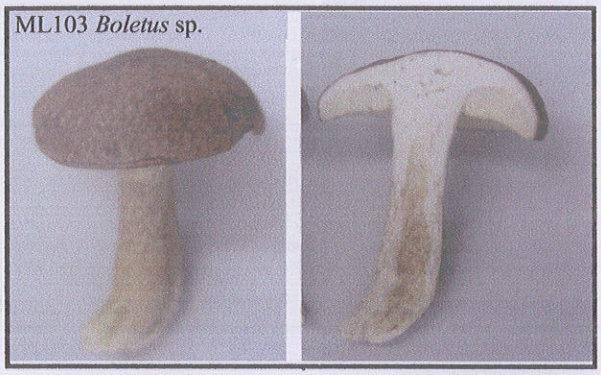
รูปผนวกที่ 3 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Auriculariaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

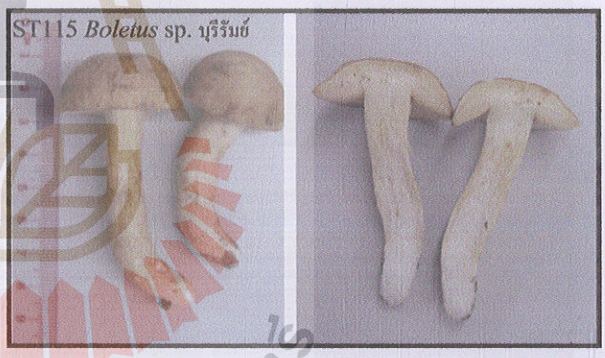


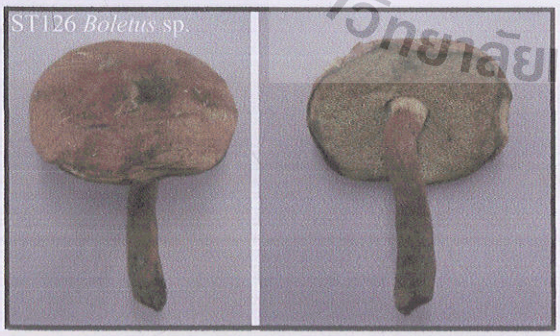
รูปผนวกที่ 4 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Coprinaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

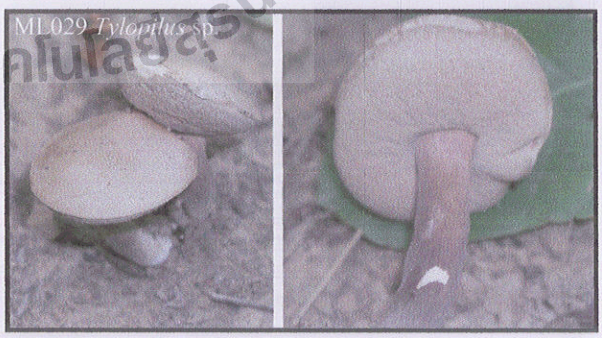
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 5 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Boletaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

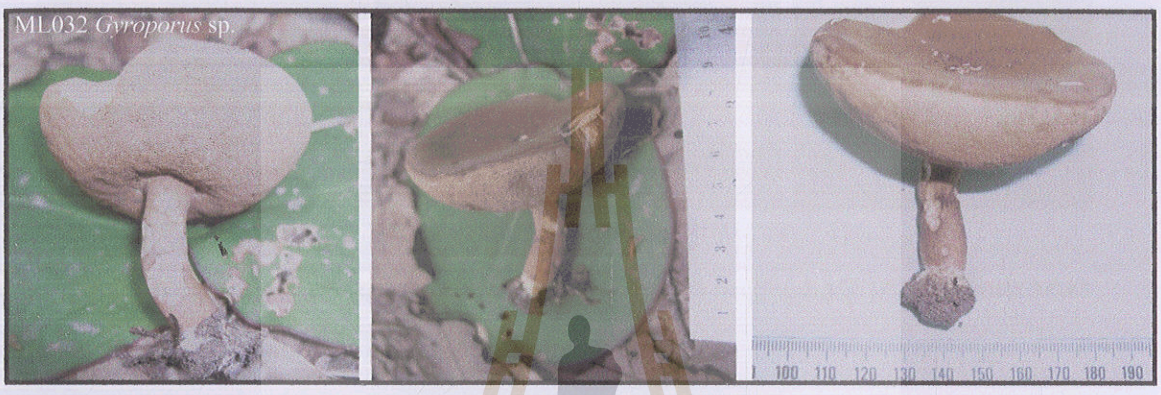








รูปผนวกที่ 5 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Boletaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน



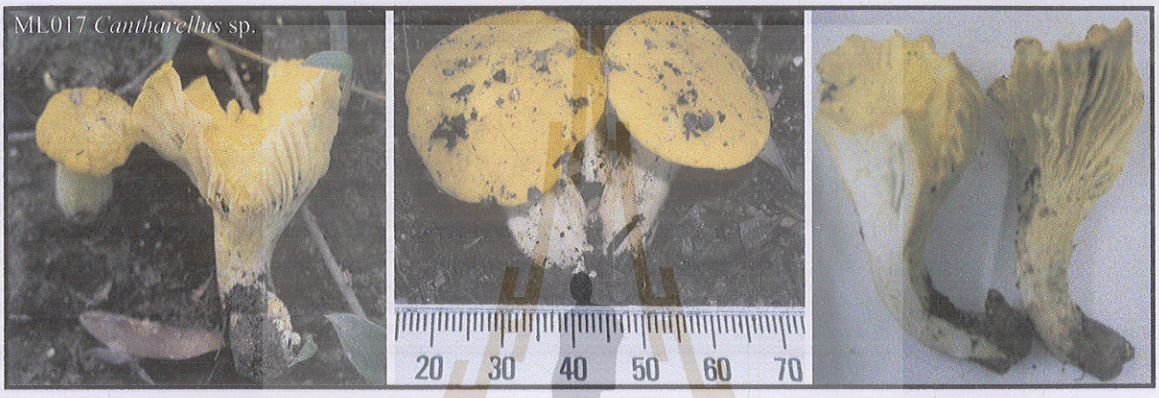
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

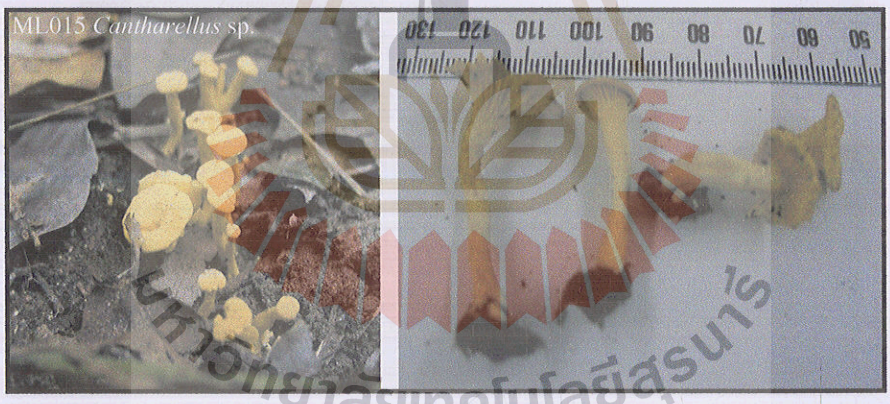
รูปผนวกที่ 5 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Boletaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดสารเล็กติน (ต่อ)

รูปผนวกที่ 5 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Boletaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน (ต่อ)

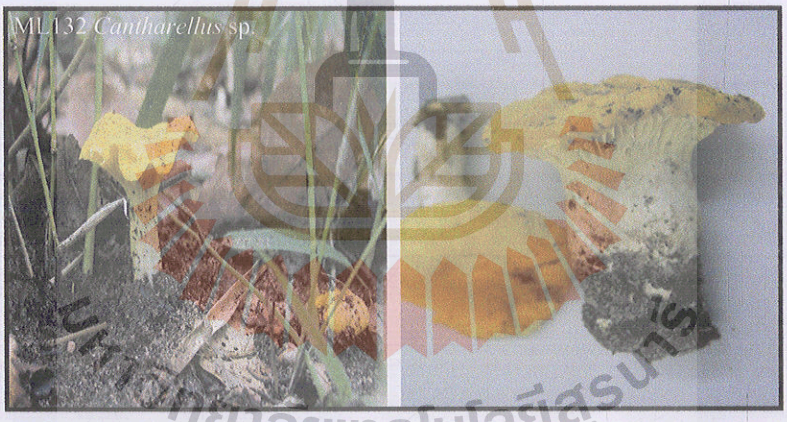
รูปผนวกที่ 6 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Boletinellaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



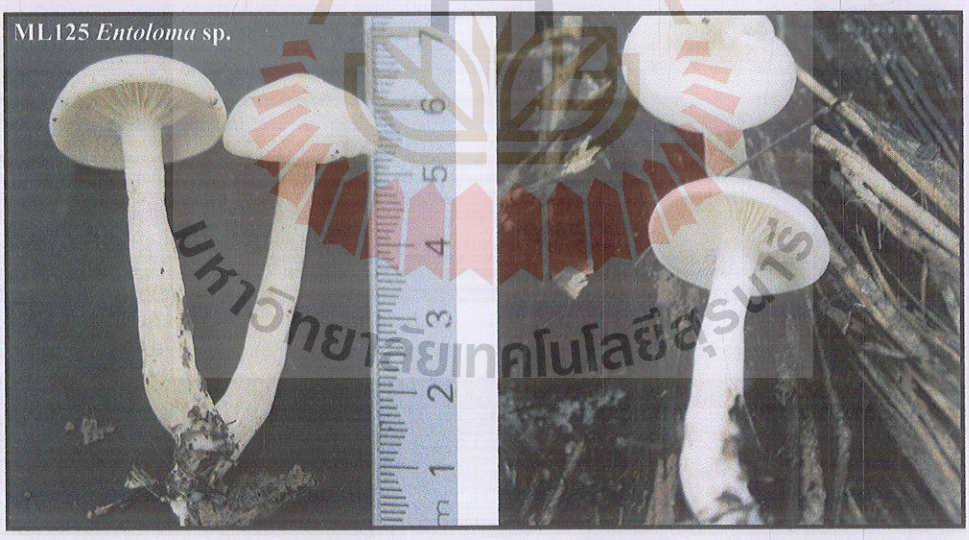


รูปผนวกที่ 7 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Cantharellaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน



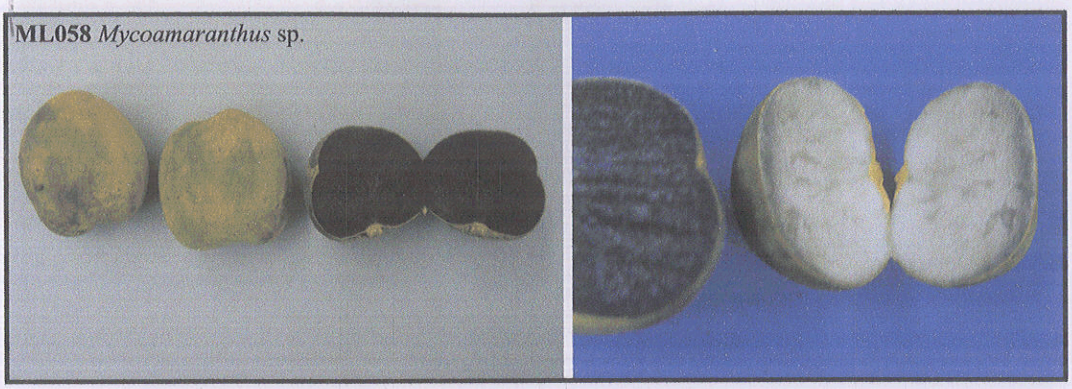
รูปผนวกที่ 7 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Cantharellaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

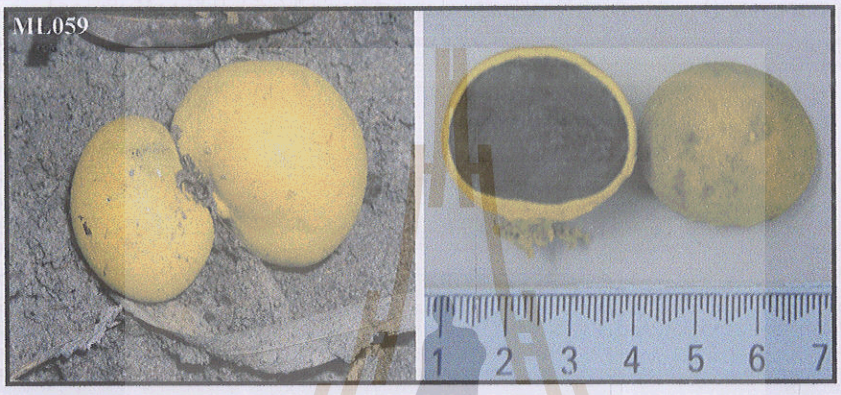
รูปผนวกที่ 7 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Cantharellaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

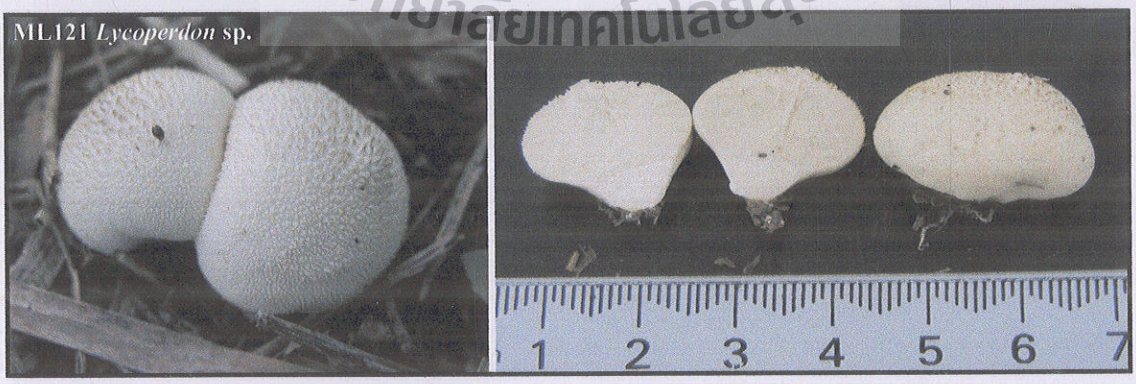


รูปผนวกที่ 8 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Entolomataceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

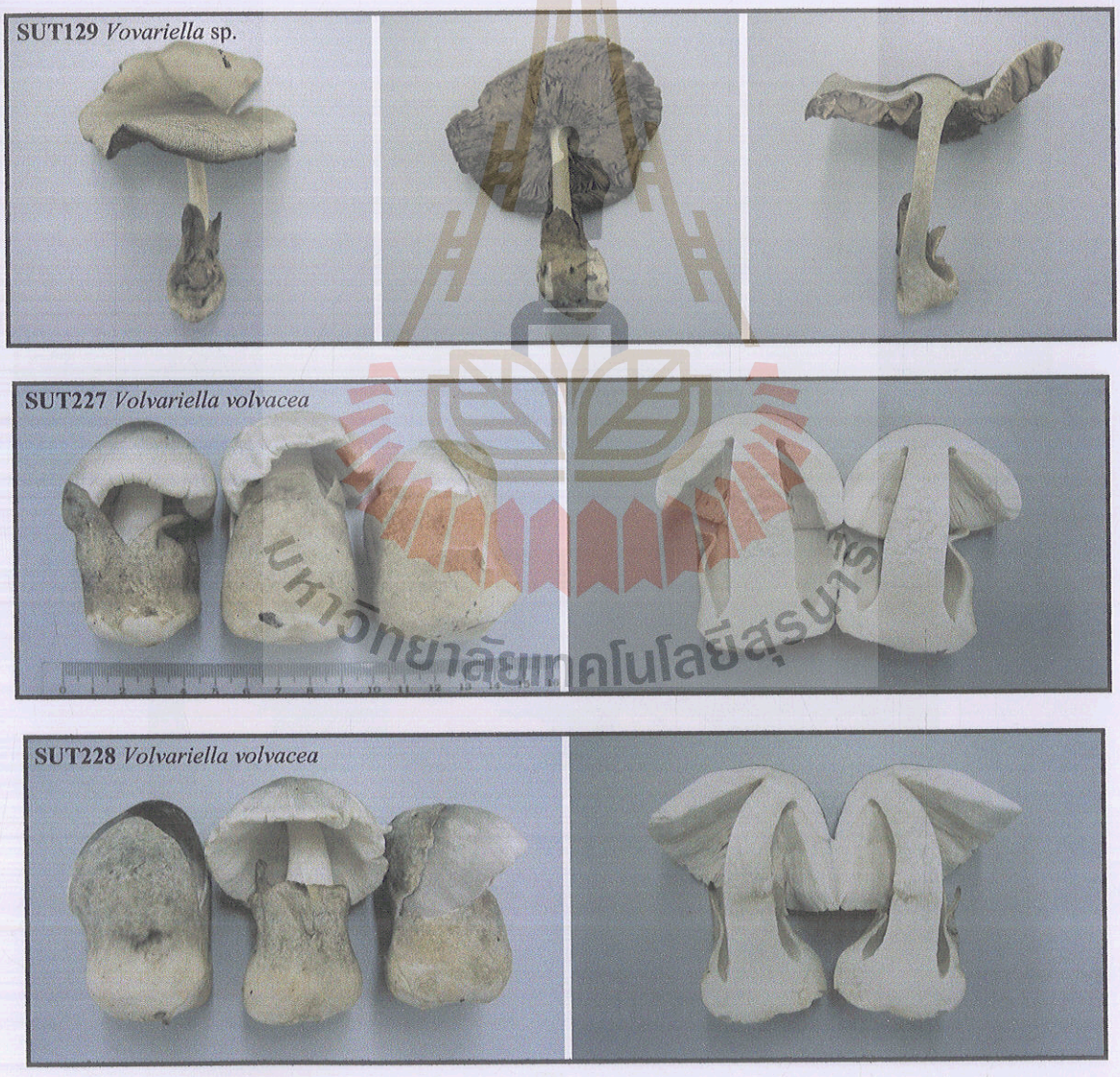






รูปผนวกที่ 9 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Lycoperdaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

รูปผนวกที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Lycoperdaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน



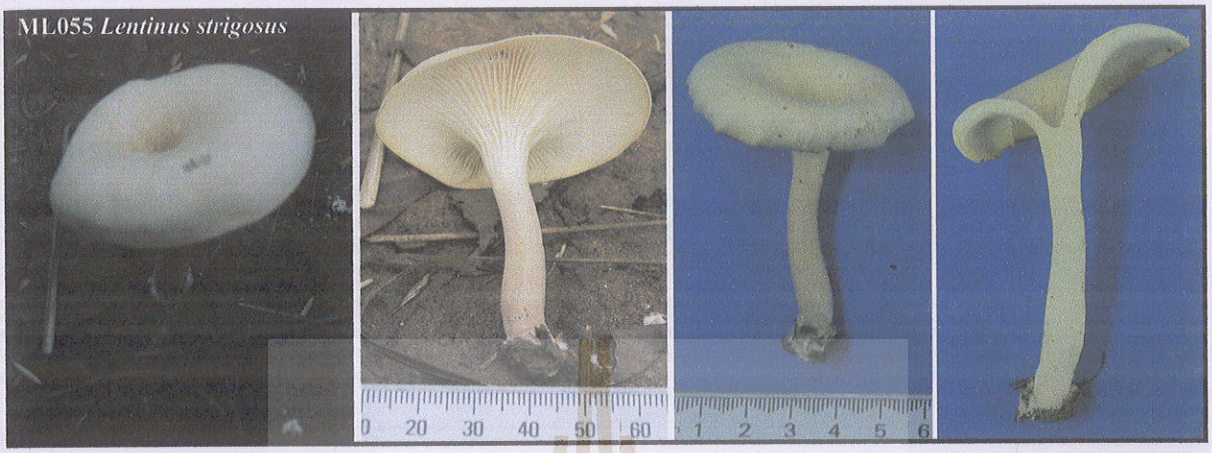
รูปผนวกที่ 10 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Pluteaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

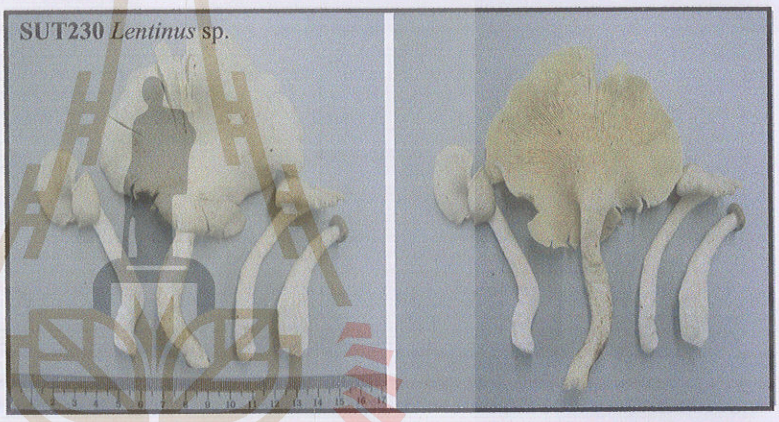
รูปผนวกที่ 11 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Polyporaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

(A)

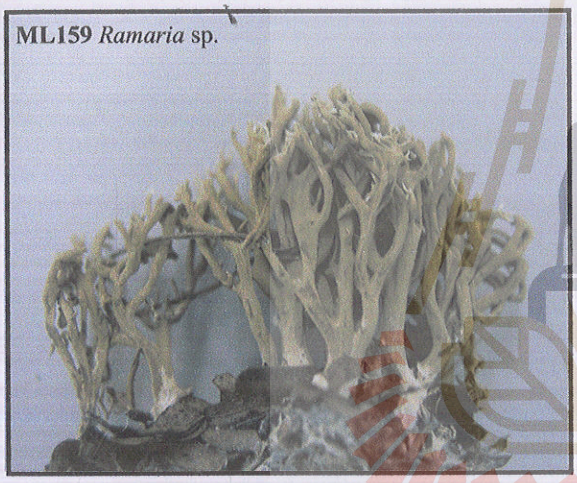
(B)

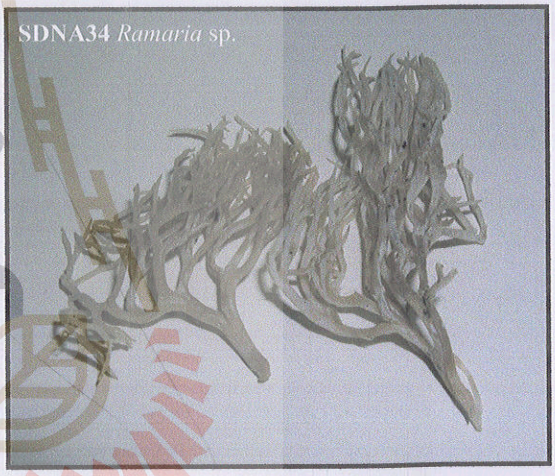
รูปผนวกที่ 12 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Peniophoraceae (A) และ Cariolaceae (B) ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน



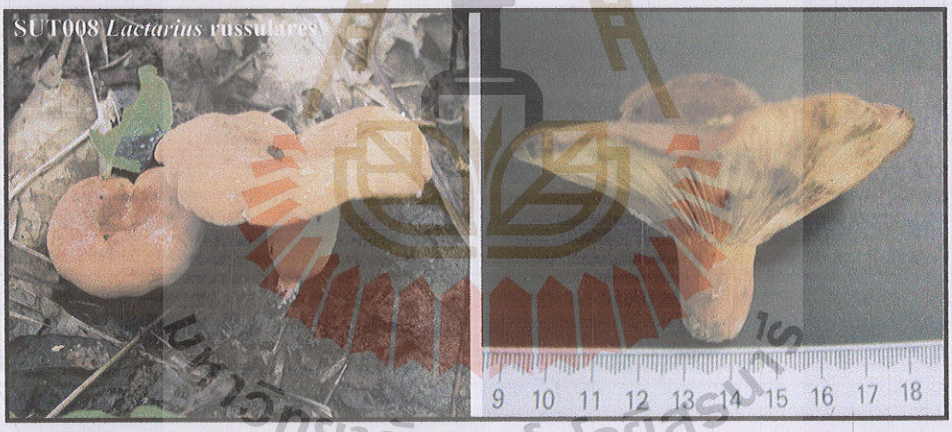


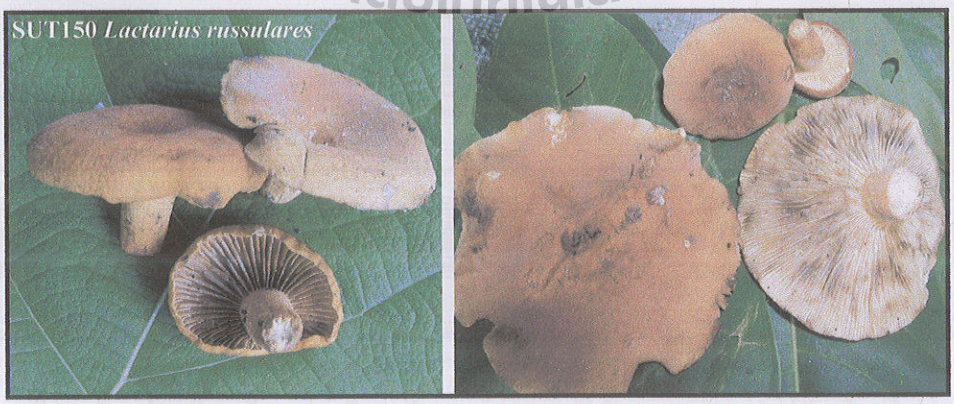
รูปผนวกที่ 13 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Pleurotaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน



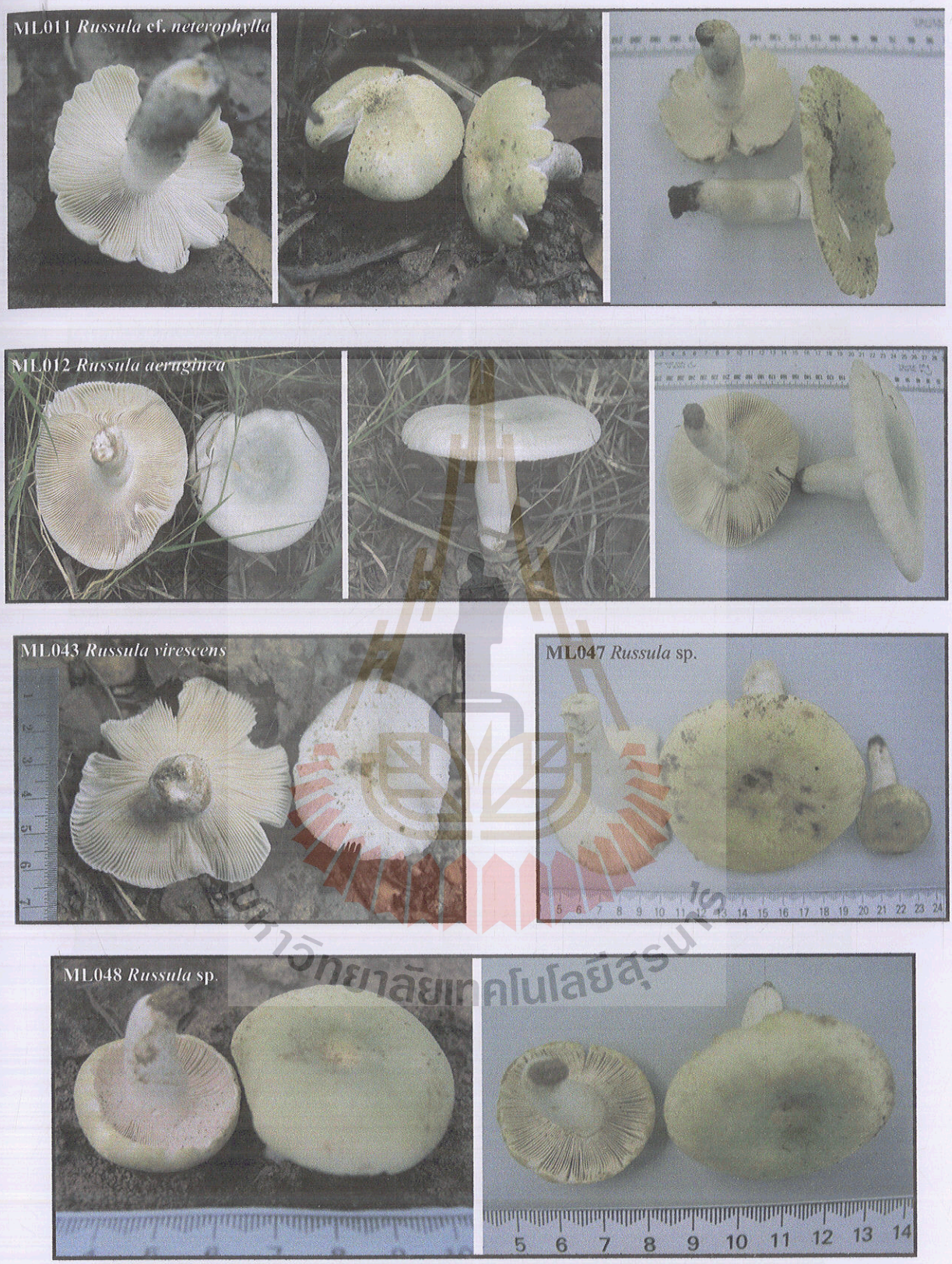


รูปผนวกที่ 14 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Ramariaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

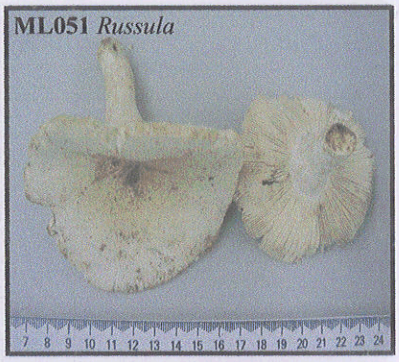


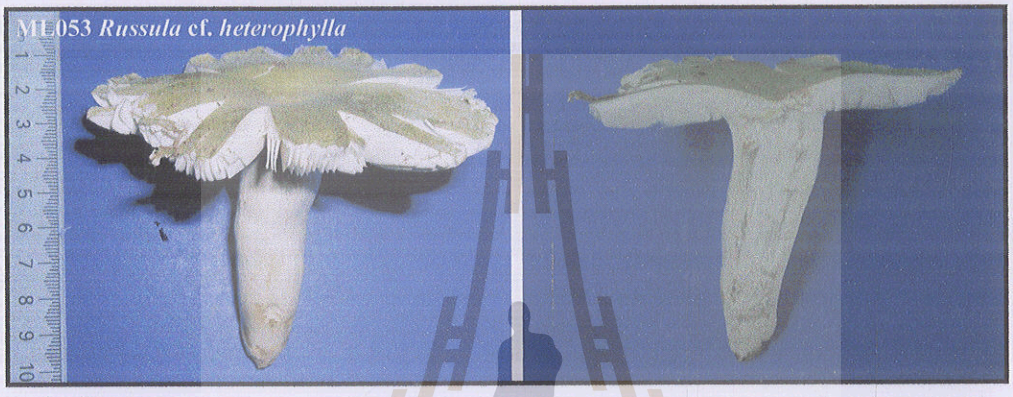


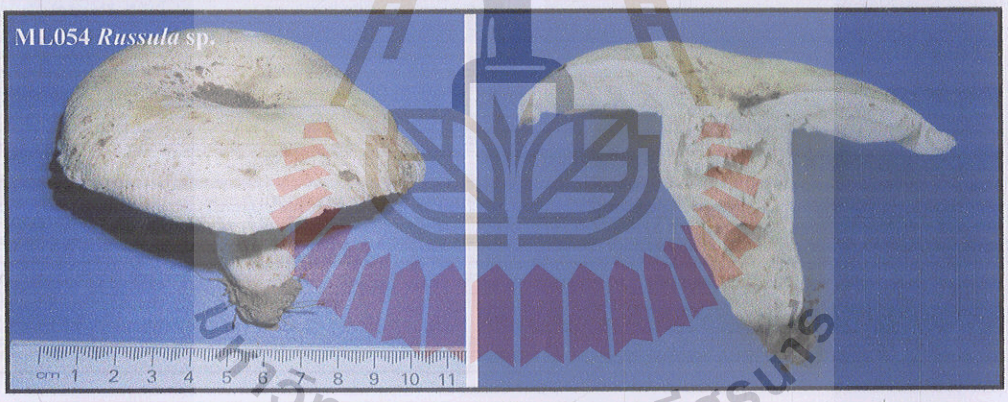
รูปผนวกที่ 15 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

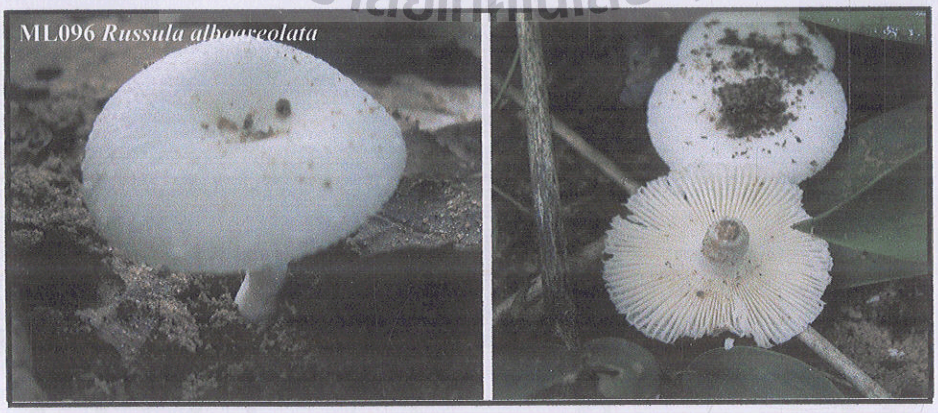


รูปผนวกที่ 15 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน (ต่อ)



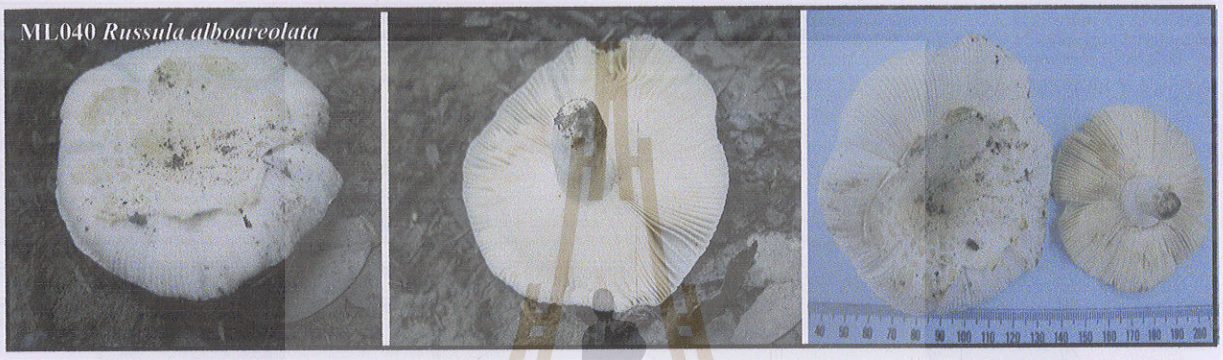


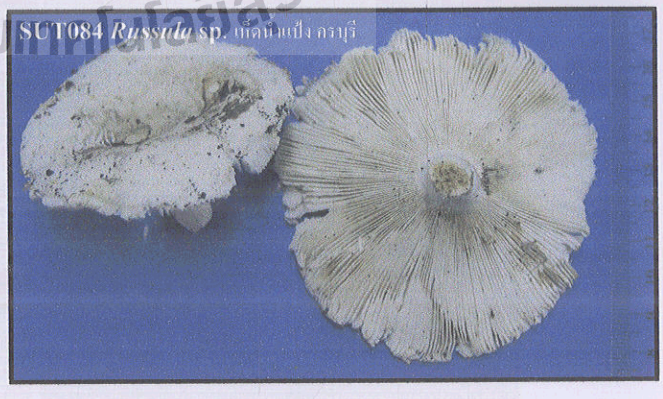




มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

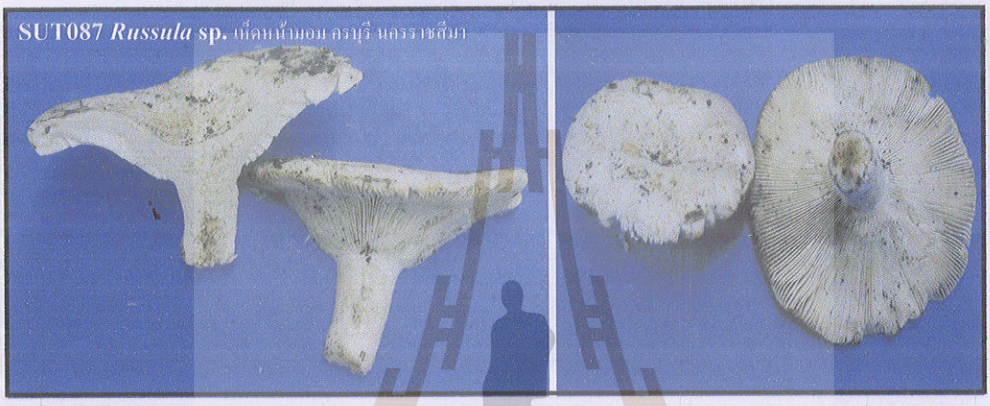
รูปผนวกที่ 15 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหา (ต่อ) สารเล็กติน

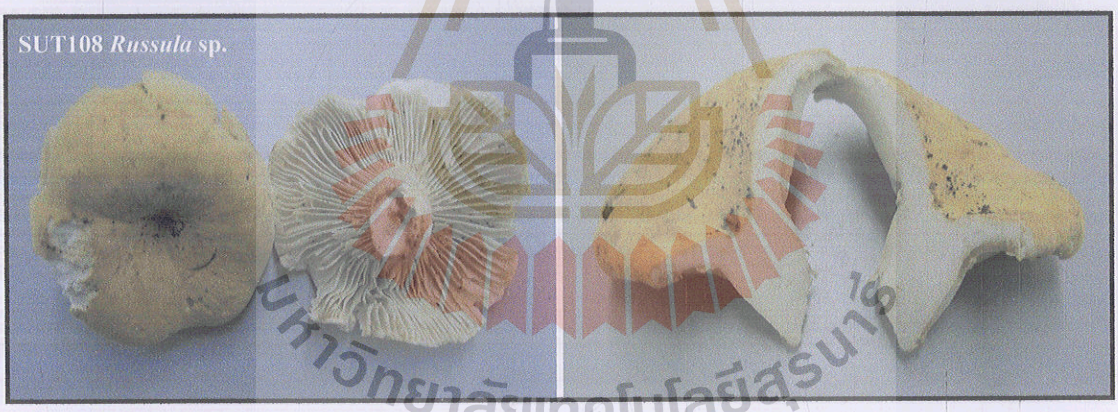




มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

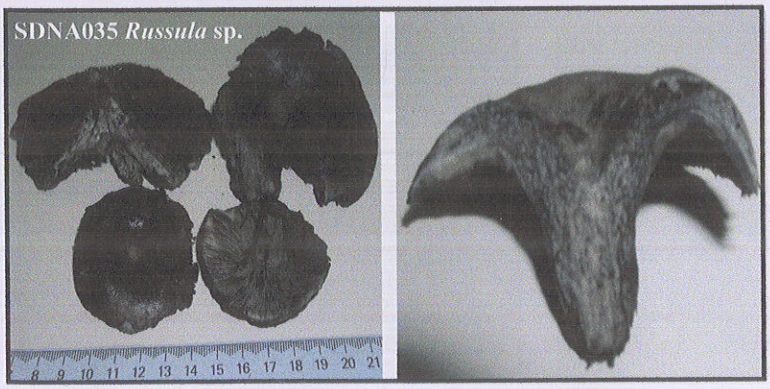
รูปผนวกที่ 15 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน (ต่อ)

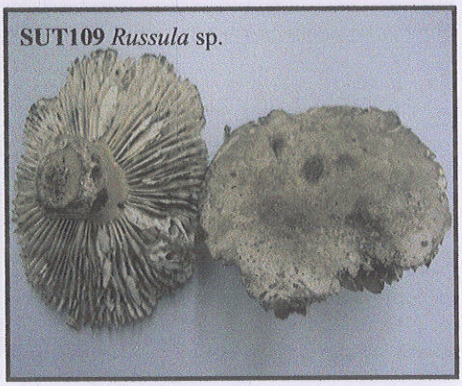




มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 15 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสาร (ต่อ) เล็กติน



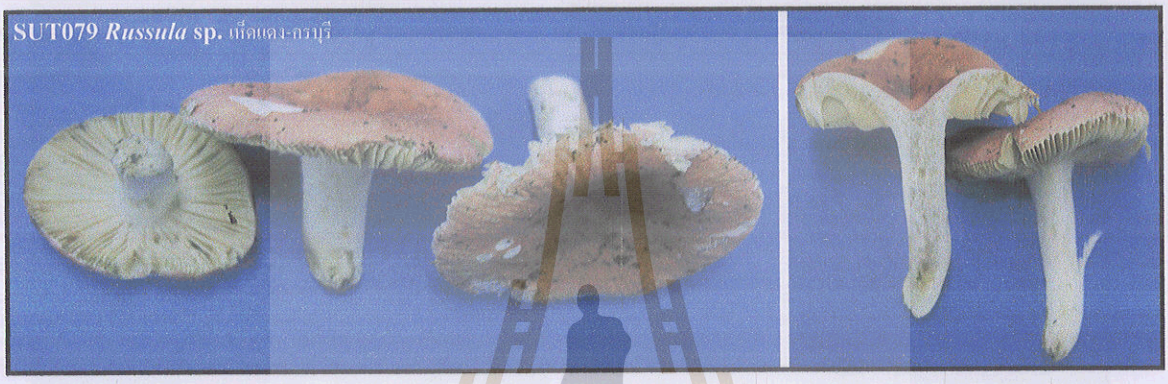


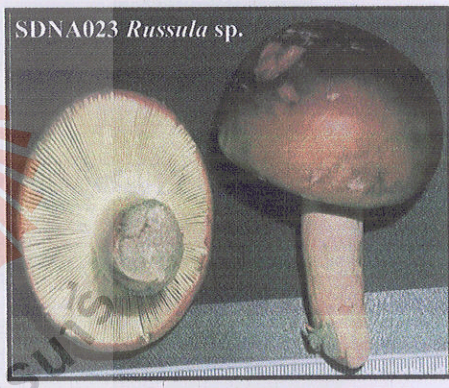
รูปผนวกที่ 15 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

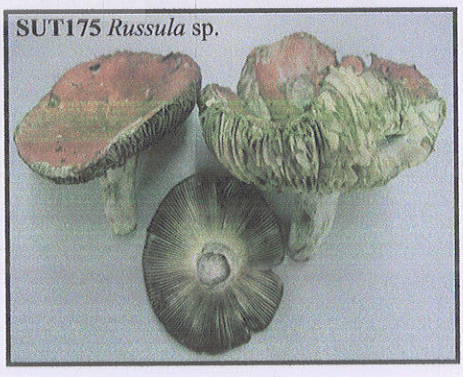
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 15 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน (ต่อ)

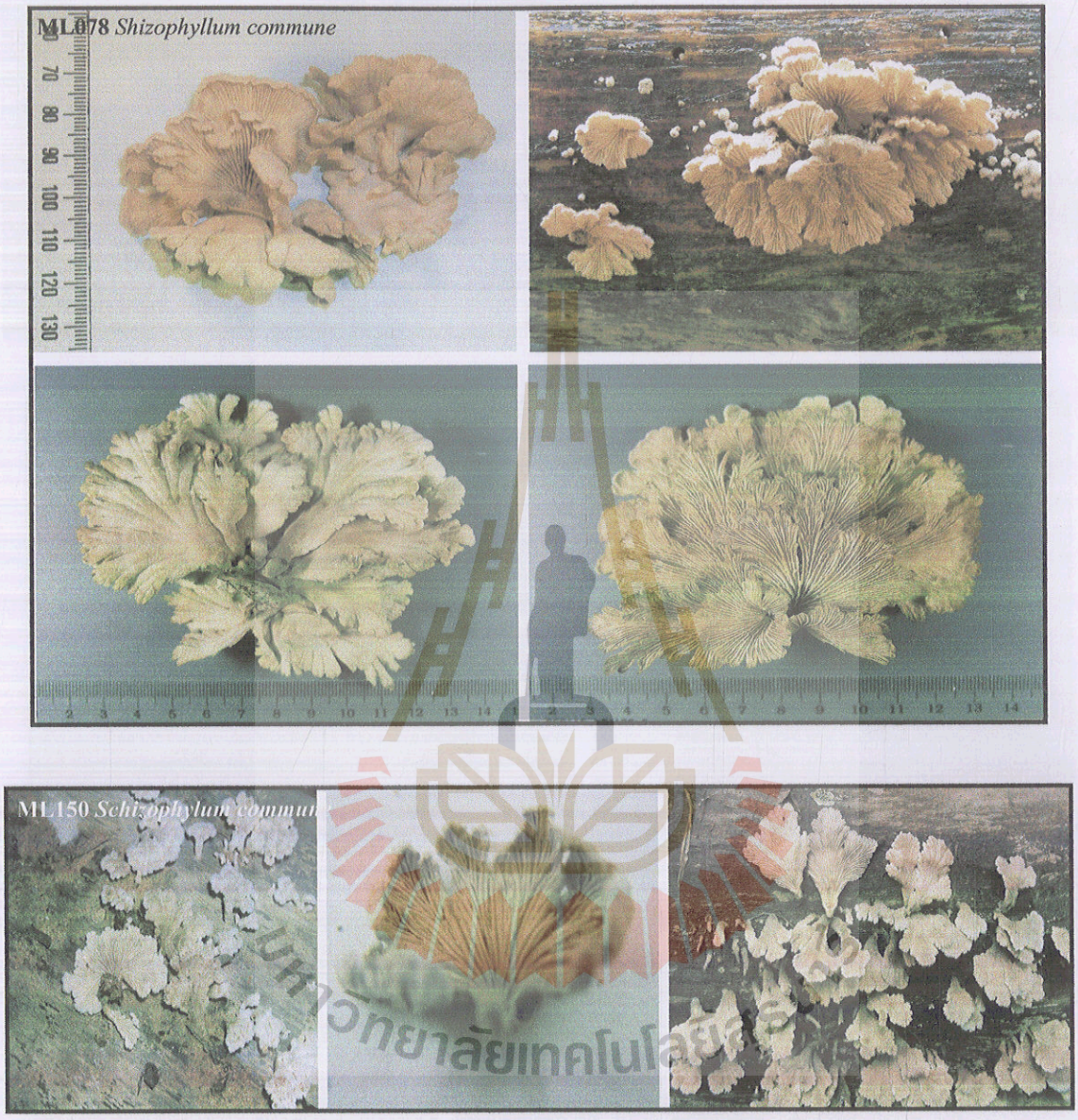




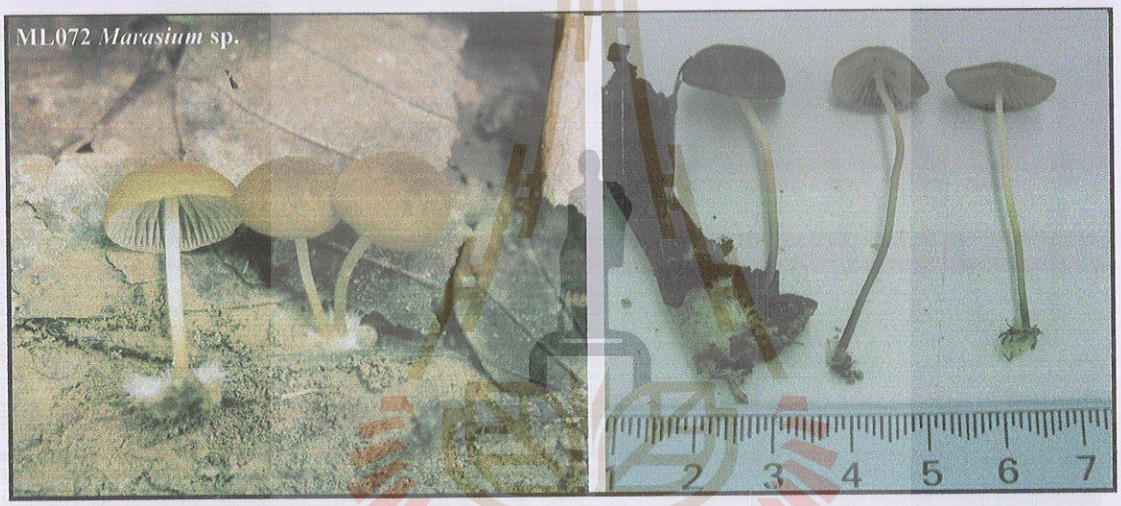


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 15 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Russulaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหา (ต่อ) สารเล็กติน



รูปผนวกที่ 16 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Schizophyllaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

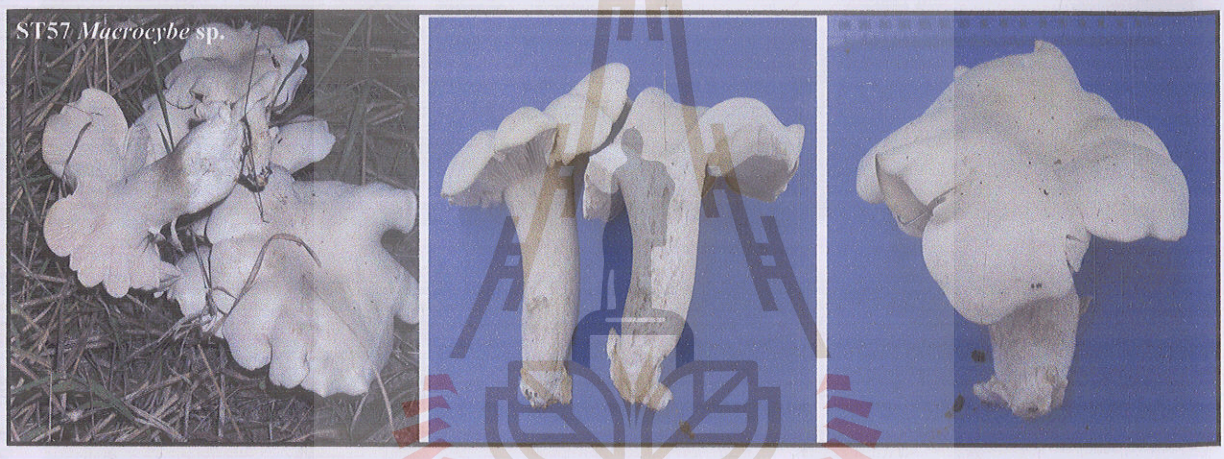


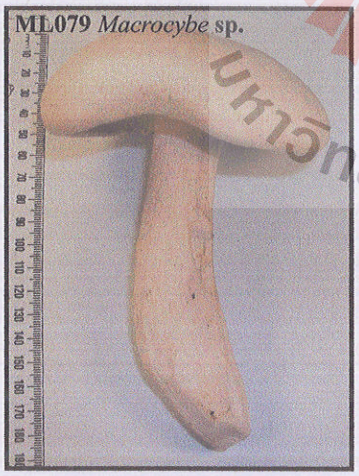
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 17 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

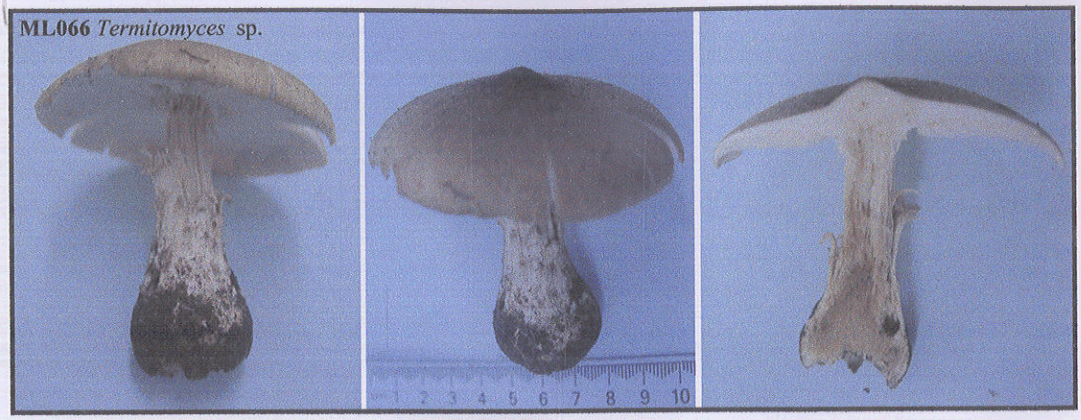
รูปผนวกที่ 18 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

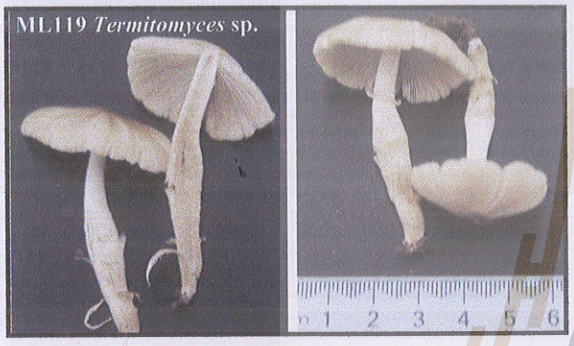


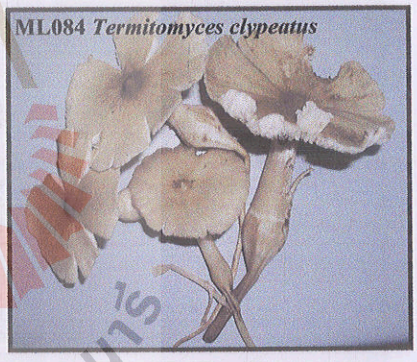


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

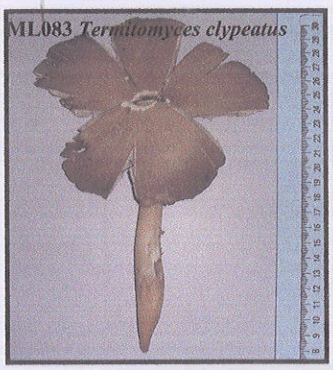
รูปผนวกที่ 18 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน (ต่อ)

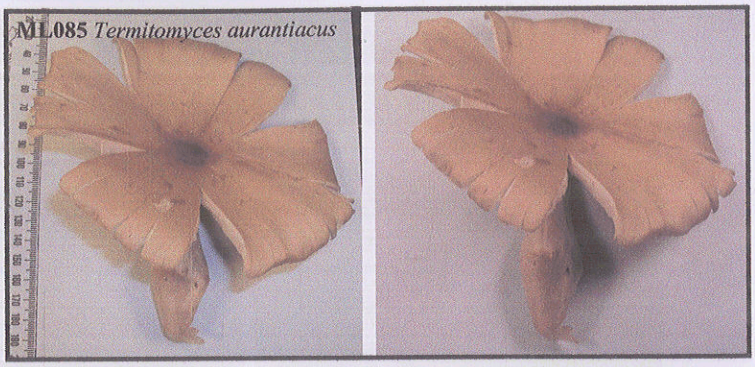


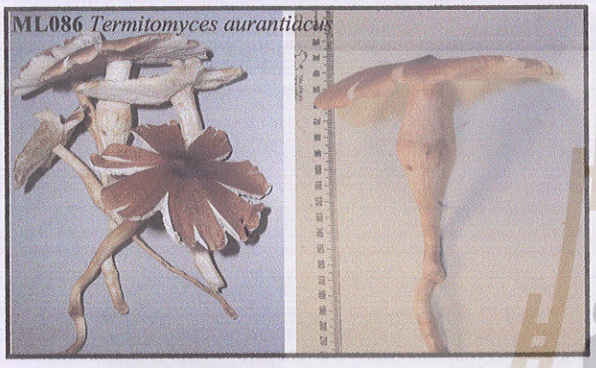


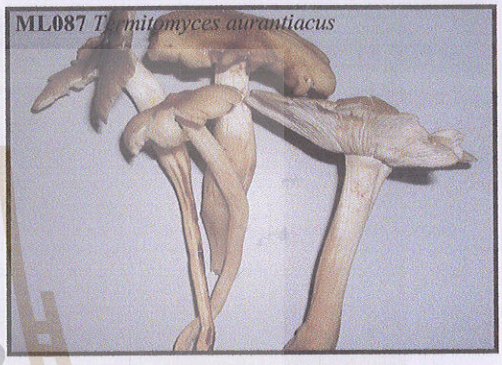


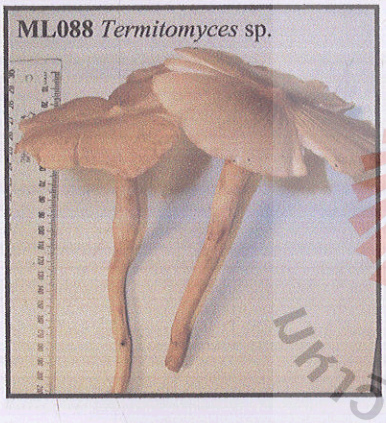
รูปผนวกที่ 19 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน







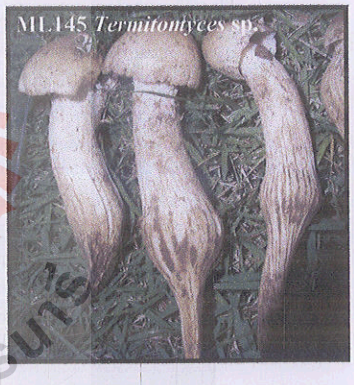




มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 19 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหา

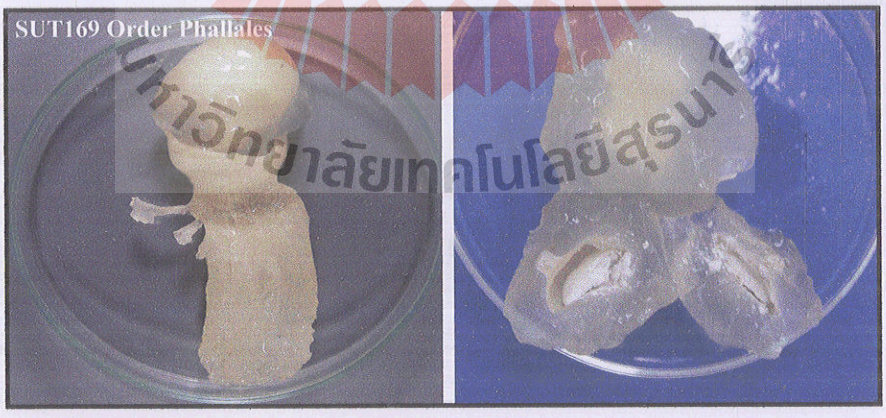
(ต่อ) สารเล็กติน



รูปผนวกที่ 19 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหา (ต่อ) สารเล็กติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปผนวกที่ 19 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomaraceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน (ต่อ)



รูปผนวกที่ 20 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Phallaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ง ตารางผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเชื้อรา ในกลุ่มเห็ดเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Mushroom family/species	Mushroom code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Agaricaceae								
Agaricoid	ML151	8	8	8H	4	256PH	16	16
Agaricus sp.	SUT005	ND	ND	ND	128	H	256	H
Agaricoid	SUT095	ND	ND	ND	32	64	512	512
Agaricus sp.	SUT096	ND	ND	ND	32	512	512	512
Chamaemyces fracidus (Fr.) Donk.	ML061	4	1.5	-	6	24	1	12
Chlorophyllum molybdites (Meyer: Fr.) Massee	ML138	H	H	1024H	H	72PH	H	162
Heimannomyces splendidissima Watl.	ML109	H	H	H	H	48H	H	6
Lepiota sp.	ML105	-	-	-	-	16	-	18
Lepiota sp.	ML115	-	-	-	H	192PH	-	24
Lepiota sp.	ML127	64H	130	32H	288H	512H	32	32H
Lepiota sp.	ML129	12H	576H	-	2H	96H	2H	64
Lepiota sp.	ML130	H	4H	3H	-	288H	-	32H
Lepiota sp.	SUT024	ND	ND	ND	8	128	8	1024
Lepiota sp.	SUT089	ND	ND	ND	-	-	-	512
Lepiota sp.	SUT222	ND	ND	ND	128	2	128	1024
Leucocoprinus sp.	ML094	-	-	-	-	4H	-	4H
Leucoagaricus sp.	ML116	1.5H	H	24H	-	128H	-	24
Leucoagaricus sp.	ML117	1024H	-	-	-	PH	-	32
Leucoagaricus sp.	ML120	1024H	-	-	-	-	-	-
Leucocoprinus sp.	ML126	128	256	192	64	PH	1024	256
Leucoagaricus sp.	ML128	1024H	H	H	48	288H	H	96
Leucoagaricus sp.	ML139	64	64	96	16	192H	128	192
Leucocoprinus sp.	SUT006	ND	ND	ND	32	256	1024	1024

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 1 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเชื้อรา (ต่อ) ในกลุ่มเห็ดเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Mushroom family/species	Mushroom code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Macrolepiota gracilenta (Krombh.) Sing.	ML154	36H	H	-	-	-	-	-
Macrolepiota sp.	ML075	-	-	-	H	8	-	-
Macrolepiota sp.	ML106	4	12	8	12	48	16	32
Macrolepiota sp.	ML114	4H	2H	3H	4H	128	4H	4H
Amanitaceae								
Amanita sp.	ML024	-	-	-	-	-	-	-
Amanita sp.	ML137	-	-	-	H	32H	-	6H
Amanita sp.	SUT007	ND	ND	ND	-	256	32	32
Amanita sp.	SUT125	ND	ND	ND	-	64	-	32
Amanita sp.	SUT004	ND	ND	ND	256	1024	256	H
Amanita sp.	SUT136	ND	ND	ND	32	1024	256	128
Amanita hemibapha subsp. *javanica* Corner & Bas	ML014	-	-	-	H	-	-	1
Amanita sect. *Vaginatae*	ML020	4H	8H	16H	ND	96H	-	128H
Amanita sect. *Vaginatae*	ML023	-	-	-	2H	H	-	H
Amanita sect. *Vaginatae*	ML107	-	-	-	-	-	-	-
Amanita sect. *Vaginatae*	ML110	2H	2H	2H	4H	128H	2H	6H
Amanita sect. *Vaginatae*	ML113	1.5H	H	2H	3H	48H	2H	4H
Amanita sect. *Vaginatae*	ML118	128H	-	-	16	256PH	-	162
Auriculariaceae								
Auricularia polytricha (Mont.) Sacc.	ML146	H	1024H	48H	-	-	-	-
Boletaceae								
Boletus sp.	ML026	4	8	8	4	384	64	48
Boletus sp.	ML030	24	32	32	48	576	128	512
Boletus sp.	ML031	24	32	16	16	48	192	48
Boletus sp.	ML103	24	64	64	48	128	768	768
Gyroporus sp.	ML032	6H	2H	H	H	256	H	H
Gyroporus sp.	ML033	-	-	-	-	-	-	512

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเชื้อรา ในกลุ่มเห็ดเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Mushroom family/species	Mushroom code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Hiemiella prob. *retispora* (Pat. & Baker) Boedijn	ML135	-	-	2H	-	-	1024	288H
Strobilomyces mollis Corner gp.	ML034	-	-	-	9	512	-	32
Tylopilus plumbeoviolaceus (Snell & Dick) Sing.	ML101	-	-	-	-	-	-	3H
Tylopilus sp.	ML029	-	4	2	-	-	-	-
Xerocomus sp.	ML018	-	-	-	H	128	-	5
Xerocomus sp.	ML028	16	24	32	32	64	256	64
Boletus edulis	SUT106S	ND	ND	ND	64	1024	1024	1024
Boletus sp.	SUT112	ND	ND	ND	64	512	1024	1024
Boletus sp.	SUT113	ND	ND	ND	32	32	1024	1024
Boletus sp.	SUT114	ND	ND	ND	32	64	1024	512
Boletus sp.	SUT115	ND	ND	ND	8	2	1024	512
Boletus sp.	SUT126	ND	ND	ND	128	512	1024	1024
Boletus sp.	SUT128	ND	ND	ND	128	1024	1024	1024
Boletinellaceae								
Phlebopus sp.	SUT183	ND	ND	ND	32	32	256	1024
Cantharellaceae								
Cantharellus cf. *cibarius* Fr.	ML016	-	-	-	-	512	-	288
Cantharellus cf. *cibarius* Fr.	ML042	-	-	-	H	1	1	16
Cantharellus minor Peck.	ML015	-	-	1	H	8	1.5	256
Cantharellus minor Peck.	ML046	-	-	-	24H	288	1	512
Cantharellus minor Peck.	ML070	-	-	-	-	1.5	-	H
Cantharellus minor Peck.	ML134	-	H	H	-	8PH	-	2
Cantharellus minor Peck.	ML143	-	-	-	-	96PH	-	16
Cantharellus sp.	ML069	-	-	-	H	1	1.5H	H
Cantharellus sp.	ML132	8H	10H	40H	H	1024PH	2	32H
Canthrarellus sp.	SUT117	ND	ND	ND	2	32	2	128
Cariolaceae								
Pycnoporus cinnabarius (Jacq.: Fr.) P. Karst.	ML136	-	H	H	8H	64	H	2H

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเชื้อรา ในกลุ่มเห็ดเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Mushroom family/species	Mushroom code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Clavariaceae								
Clavulina cristata var. *cineroides* or *cinerea*	ML152	1.5H	2H	3H	4	64H	-	16
Clavulina cristata	ML159	8	4	4	-	-	-	-
Coprinaceae								
Coprinus sp.	ML060	4	2	4	H	64	-	-
Psathyrella sp.	ML009	2	2	2	4	48	32	128
Entolomataceae								
Entoloma sp.	ML125	1024H	1024H	1024H	8	1024H	-	10
Geastraceae								
Geastrum triptex Jungh.	ML112	-	-	-	-	48	-	2
Helvellaceae								
Stereopsis radicans	ML090	-	-	-	-	10	-	24H
Hymanochaetaceae								
Hymenochaete sp.	ML008	-	-	-	2.5H	16	-	516
Lycoperdaceae								
Mycoamaranthus sp.	ML058	16H	16H	2H	12	256	2	256
Mycoamaranthus sp.	ML059	-	-	-	-	-	-	-
Lycoperdon sp.	ML062	-	-	2H	H	512	-	2
Lycoperdon sp.	ML063	-	-	-	H	ND	-	6
Lycoperdon sp.	ML098	-	-	-	-	12	-	-
Peniophoraceae								
Stereum ostrea (Blume & Nees) Fr.	ML001	-	-	-	-	4	-	16
Stereum ostrea (Blume & Nees) Fr.	ML002	-	-	-	-	16	-	6
Stereum ostrea (Blume & Nees) Fr.	ML003	-	-	-	H	64	-	96
Stereum sp.	ML005	-	-	-	H	32	-	6
Pleurotaceae								
Lentinellus	ML095	3H	1	2	1.5H	24	H	8

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจาก fruiting body ของเชื้อรา ในกลุ่มเห็ดเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Mushroom family/species	Mushroom code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Lentinus sp.	ML055	3H	2H	H	H	1024	-	3
Volvariella volvacea	SUT129	ND	ND	ND	512	1024	512	1024
Volvariella volvacea	SUT227	ND	ND	ND	128	1024	64	1024
Volvariella volvacea	SUT228	ND	ND	ND	512	1024	256	1024
Phallaceae								
Order Phallales	SUT069	ND	ND	ND	2	2	8	16
Polyporaceae								
Microporus sp.	ML006	-	-	-	H	16	-	128
Polyporus sp.	ML004	-	-	-	-	8	-	4
Polyporus sp.	ML007	-	-	-	H	-	-	12
Polyporus sp.	ML013	-	-	-	-	96	-	256
Ramariaceae								
Clavulina sp.	SUT011	ND	ND	ND	8	64	4	64
Clavulina sp.	SUT143	ND	ND	ND	-	-	-	-
Russulaceae								
Lactarius volemus	ML041	32	256	128	32	32	512	256
Lactarius sp.	ML038	1.5	1.5	2.5H	H	16	H	4
Russula aeruginea Lindbl.	ML012	-	-	-	-	-	-	-
Russula aeruginea Lindbl.	ML048	-	-	-	-	-	-	384
Russula aeruginea Lindbl.	ML097	8	16	10	4	32	16	24
Russula anthracina Romagn.	ML149	3H	1024H	H	-	256	-	12
Russula alboareolata Hongo.	ML040	-	-	-	-	-	-	1
Russula alboareolata Hongo.	ML051	-	-	-	-	128	1	12
Russula alboareolata Hongo.	ML096	3H	8	8	16H	8H	8H	16H
Russula delica Fr.	ML044	-	-	-	H	10	4	16
Russula delica Fr.	ML050	-	-	-	H	-	-	8
Russula cf. *Heterophylla* (Fr.) Fr.	ML011	-	-	-	-	256	-	16
Russula cf. *Heterophylla* (Fr.) Fr.	ML047	-	-	-	H	-	-	4

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 1 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กดินจาก fruiting body ของเชื้อรา (ต่อ) ในกลุ่มเห็ดเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Mushroom family/species	Mushroom code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Russula cf. *Heterophylla* (Fr.) Fr.	ML053	4H	3H	-	H	-	3	8
Russula luteotacta Rea.	ML039	-	3	3	2	2	2	4
Russula luteotacta Rea.	ML100	8	8	6	4	32	32	16
Russula luteotacta Rea.	ML142	8	8	16	H	512H	64	48
Russula ochroleuca Pers.	ML049	-	-	-	-	-	-	10
Russula sect. *Foetinae*	ML140	8H	16	24H	2	64H	2	3
Russula sect. *Plorantae brevipes/delica*	ML147	-	9H	-	-	-	-	-
Russula sect. *Plorantae* prob. *Pseudodelica*	ML133	8H	32H	64H	8	72	-	48
Russula sp.	ML019	1	2	2	H	1.5	-	1024
Russula sp.	ML037	-	-	-	H	128	-	1024
Russula virescens	ML043	32	48	24	64	128	512	384
Russula sp.	ML052	-	-	-	H	-	-	24
Russula sp.	ML148	-	-	-	-	-	-	1
Russula sp.	ML054	4	12	4	2	32H	16	16
Lactarius sp.	SUT008	ND	ND	ND	32	128	16	512
Lactarius sp.	SUT150	ND	ND	ND	64	4	512	1024
Russula sp.	SUT054	ND	ND	ND	1024	256	1024	1024
Russula sp.	SUT087	ND	ND	ND	4	64	128	1024
Russula sp.	SUT079	ND	ND	ND	32	32	1024	512
Russula sp.	SUT083	ND	ND	ND	16	128	32	1024
Russula sp.	SUT084	ND	ND	ND	16	32	32	1024
Russula sp.	SUT085	ND	ND	ND	256	-	4	256
Russula sp.	SUT086	ND	ND	ND	32	512	4	256
Russula sp.	SUT108	ND	ND	ND	4	64	64	128
Russula sp.	SUT116	ND	ND	ND	16	32	512	128
Russula sp.	SUT135	ND	ND	ND	2	4	2	4
Russula sp.	SUT162	ND	ND	ND	256	2	1024	1024
Russula sp.	SUT175	ND	ND	ND	64	256	128	256

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กดินจาก fruiting body ของเชื้อรา ในกลุ่มเห็ดเมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Mushroom family/species	Mushroom code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Schizophyllaceae								
Schizophyllum commune	ML078	16	16	12	-	32	-	1024
Schizophyllum commune	ML150	16	16	8	-	32H	-	1024
Sclerodermataceae								
Scleroderma sinnamariense Mont.	ML099	-	-	-	-	-	-	-
Scleroderma sp.	ML064	-	-	-	256H	2	-	H
Scleroderma sp.	ML093	1024H	-	-	-	12H	-	-
Tricholomataceae								
Laccaria sp.	ML108	1	4	6	2	16	1	128
Lepista sordida (Fr.) Sing.	ML102	H	-	-	6	32	48	128
Macrocybe sp.	SUT056	ND	ND	ND	64	512	16	64
Macrocybe sp.	SUT57F	ND	ND	ND	-	256	-	32
Marasmius sp.	SUT219	ND	ND	ND	-	2	-	1024
Termitomyces sp.	ML056	-	-	-	H	1	-	2H
Termitomyces sp.	ML066	-	-	-	H	3	-	1.5H
Termitomyces sp.	ML088	1.5H	-	-	H	96	2H	2H
Termitomyces sp.	ML089	H	H	H	H	48	2H	2H
Termitomyces sp.	ML131	H	-	4H	H	4	-	64
Termitomyces sp.	ML145	-	-	-	-	-	-	64H
Termitomyces sp.	SUT186	ND	ND	ND	2	2	2	4
Termitomyces aurantiacus R. Heim	ML085	-	-	-	H	H	H	H
Termitomyces aurantiacus R. Heim	ML086	-	H	H	1.5H	96	H	1.5H
Termitomyces aurantiacus R. Heim	ML087	1.5H	H	H	H	8H	3H	64H
Termitomyces aurantiacus R. Heim	ML144	-	-	H	-	-	-	-
Termitomyces clypeatus R. Heim	ML083	1.5H	-	-	-	-	2H	2H
Termitomyces clypeatus R. Heim	ML084	H	H	H	-	-	-	H
Termitomyces microcarpus (Berk. et Br.) Heim	ML057	-	-	-	-	32	-	32
Tricholoma sp.	SUT196	ND	ND	ND	-	2	-	2
Trogia adelphus Corner	ML104	H	ND	H	ND	64	-	32

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 2 ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae เมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Fungal species	Fungal code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Xylaria sp.	2297	ND	ND	ND	-	-	-	512
Xylaria coccophore	2309	ND	ND	ND	-	4	-	1024
Xylaria anisopleura	2329	ND	ND	ND	-	16	-	512
Xylaria grammica	2348	ND	ND	ND	-	8	-	512
Xylaria sp.	2352	ND	ND	ND	-	-	-	2
Xylaria curta	2382	ND	ND	ND	-	16	-	512
Xylaria curta	2383	ND	ND	ND	-	16	-	-
Hypoxylon fendleri	2396	ND	ND	ND	-	4	-	512
Hypoxylon moriforme	2401	ND	ND	ND	-	2	2	128
Hypoxylon nitens	2403	ND	ND	ND	-	32	32	32
Biscogniauxia sp.	2412	ND	ND	ND	-	2	2	512
Biscogniauxia capnodes	2416	ND	ND	ND	-	-	-	512
Xylaria badia	2417	ND	ND	ND	-	-	-	-
Xylaria badia	2418	ND	ND	ND	-	-	-	-
Xylaria cubensis	2420	ND	ND	ND	-	2	-	1024
Hypoxylon haematostroma	2424	ND	ND	ND	-	-	2	8
Hypoxylon coccophora	2426	ND	ND	ND	-	-	-	256
Xylaria allantoidea	2427	ND	ND	ND	-	-	-	-
Xylaria allantoidea	2428	ND	ND	ND	-	-	-	256
Xylaria sp.	2430	ND	ND	ND	8	-	-	128
Xylaria allantoidea	2431	ND	ND	ND	4	-	-	256
Xylaria sp.	2432	ND	ND	ND	-	32	-	512
Xylaria laevis	2433	ND	ND	ND	-	8	2	256
Xylaria laevis	2434	ND	ND	ND	-	8	4	128
Xylaria cubensis	2435	ND	ND	ND	-	16	-	1024
Hypoxylon sp.	2436	ND	ND	ND	-	8	2	256
Hypoxylon sp.	2437	ND	ND	ND	-	-	-	16
Hypoxylon monticulosum	2438	ND	ND	ND	-	16	16	128
Hypoxylon sp.	2439	ND	ND	ND	-	8	2	1024

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ) ผลการทดสอบ hemagglutination ของสารสกัดเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae เมื่อทดสอบโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ (4 ชนิดจากสัตว์ 6 ชนิด ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ)

Fungal species	Fungal code	Hemagglutination against red blood cells (Titer)						
		Human			Animal			
		A	B	O	Sheep	Rat	Goose	Rabbit
Hypoxylon sp.	2442	ND	ND	ND	-	-	-	128
Hypoxylon sp.	2443	ND	ND	ND	-	-	-	128
Hypoxylon atroroseum	2444	ND	ND	ND	-	-	-	64
Hypoxylon moriforme	2445	ND	ND	ND	-	32	-	64
Hypoxylon sp.	2446	ND	ND	ND	-	-	-	256
Hypoxylon sp.	2447	ND	ND	ND	-	-	-	1024
Hypoxylon sp.	2448	ND	ND	ND	-	-	-	128
Hypoxylon sp.	2449	ND	ND	ND	-	4	-	128
Biscogniauxia capnodes var. *microspora*	2451	ND	ND	ND	-	-	-	2
Xylaria fockei	2458	ND	ND	ND	4	16	4	256
Xylaria sp.	2460	ND	ND	ND	-	16	-	512
Xylaria allantoidea	2461	ND	ND	ND	-	16	-	1024
Xylaria fockei	2462	ND	ND	ND	4	32	4	256
Xylaria schweinitzii	2463	ND	ND	ND	-	32	-	1024
Xylaria curta	2465	ND	ND	ND	-	128	-	4
Hypoxylon sp.	2471	ND	ND	ND	-	-	-	16
Hypoxylon sp.	2474	ND	ND	ND	-	12	2	256
Hypoxylon sp.	2475	ND	ND	ND	-	8	2	128
Hypoxylon sp.	2476	ND	ND	ND	-	-	-	128
Daldinia eschscholzii	2477	ND	ND	ND	-	-	2	-
Xylaria feejeensis	2478	ND	ND	ND	-	8	-	H
Xylaria obovata	2479	ND	ND	ND	-	16	-	256
Xylaria melanaxia	2482	ND	ND	ND	8	16	-	256
Xylaria sp.	2483	ND	ND	ND	-	16	-	32
Hypoxylon sp.	2485	ND	ND	ND	-	2	-	16
Hypoxylon sp.	2487	ND	ND	ND	-	2	-	8
Xylaria sp.	2491	ND	ND	ND	-	16	-	256
Xylaria sp.	2495	ND	ND	ND	-	2	-	256
Xylaria sp.	2502	ND	ND	ND	-	8	-	256
Xylaria allantoidea	2511	ND	ND	ND	-	32	-	1024

H: Hemolysis, PH: Partial hemolysis, ND: Not detected, - : Negative result

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบ (crude extract) ของเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae (ลำดับที่ 1-30) และดอกเห็ด (ลำดับที่ 31-131)

Sample no.	Fungal code	Protein concentration (mg/ml)	Sample no.	Fungal code	Protein concentration (mg/ml)
1	2309	0.144	28	2511	0.557
2	2329	0.439	29	2326	0.117
3	2396	0.616	30	2349	0.116
4	2472	1.445	31	ML003	1.930
5	2412	0.452	32	ML009	0.395
6	2420	0.426	33	ML011	0.501
7	2431	0.243	34	ML013	1.219
8	2432	0.666	35	ML015	0.136
9	2434	0.527	36	ML016	0.355
10	2435	0.548	37	ML019	0.360
11	2438	1.793	38	ML020	0.258
12	2439	1.48	39	ML022	7.609
13	2442	0.729	40	ML026	6.850
14	2446	0.858	41	ML028	8.647
15	2447	0.102	42	ML029	3.415
16	2448	0.448	43	ML030	14.31
17	2449	1.945	44	ML031	24.76
18	2458	0.684	45	ML032	21.42
19	2461	0.668	46	ML034	0.073
20	2462	0.598	47	ML037	0.250
21	2463	0.386	48	ML039	2.512
22	2472	1.445	49	ML041	3.330
23	2474	0.770	50	ML043	4.680
24	2479	0.674	51	ML046	0.192
25	2482	0.588	52	ML048	0.073
26	2507	0.491	53	ML051	1.034
27	2510	0.394	54	ML054	2.103

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบ (crude extract) ของเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae (ลำดับที่ 1-30) และดอกเห็ด (ลำดับที่ 31-131) (ต่อ)

Sample no.	Fungal code	Protein concentration (mg/ml)	Sample no.	Fungal code	Protein concentration (mg/ml)
55	ML055	1.290	82	ML149	3.491
56	ML062	1.382	83	ML150	8.28
57	ML071	0.747	84	ML151	3.268
58	ML086	9.731	85	ML152	0.356
59	ML088	13.91	86	ML155	7.53
60	ML089	21.53	87	ML159	13.07
61	ML092	10.59	88	SDNA1	3.45
62	ML095	4.841	89	SDNA8	0.75
63	ML097	4.306	90	SDNA17	7.15
64	ML100	4.74	91	SDNA24	5.65
65	ML102	7.57	92	SDNA29	3.91
66	ML103	6.434	93	SI011	4.92
67	ML104	7.709	94	SUT004	11.1
68	ML106	0.690	95	SUT018(S)	8.0
69	ML108	2.466	96	SUT019(S)	4.99
70	ML111	8.19	97	SUT020	12.36
71	ML112	9.29	98	SUT021	14.60
72	ML114	11.63	99	SUT024	0.68
73	ML126	8.32	100	SUT049	5.249
74	ML127	9.52	101	SUT054	11.674
75	ML128	10.23	102	SUT064(F)	7.795
76	ML135	30.91	103	SUT065	2.677
77	ML136	7.443	104	SUT079	4.601
78	ML138	12.57	105	SUT081	4.909
79	ML139	8.087	106	SUT082	0.337
80	ML142	4.03	107	SUT084	3.864
81	ML143	3.902	108	SUT087	0.440

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบ (crude extract) ของเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราใน (ต่อ) วงศ์ Xylariaceae (ลำดับที่ 1-30) และดอกเห็ด (ลำดับที่ 31-131)

Sample no.	Fungal code	Protein concentration (mg/ml)
109	SUT092	2.715
110	SUT096	6.71
111	SUT106(F)	3.77
112	SUT106(S)	4.79
113	SUT107	2.45
114	SUT109	3.92
115	SUT111	11.68
116	SUT112	5.34
117	SUT113	0.70
118	SUT126	8.52
119	SUT127	6.12
120	SUT128	10.95
121	SUT129	15.88
122	SUT150	1.68
123	SUT156	1.37
124	SUT162	6.57
125	SUT168	1.02
126	SUT176	4.87
127	SUT183	6.06
128	SUT193	5.17
129	SUT197	13.58
130	SUT201	10.65
131	SUT202	8.77

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 4 ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของสารสกัดหยาบจาก fruiting body ของเห็ดบางชนิดต่อเซลล์มะเร็งของคน 2 ชนิด ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

Fungal code	Fungal species	IC_{50} (µg/ml)	
		KB	HeLa
ML003	*Stereum ostrea* (Blume & Nees) Fr.	550	500
ML011	*Russula* cf. *heterophylla* (Fr.) Fr.	400	145
ML013	*Polyporus* sp.	200	200
ML015	*Cantharellus minor* Peck	68	68
ML016	*Cantharellus* cf. *cibarius* Fr.	3.55	3.55
ML020	*Amanita* sect. *Vaginatae*	28	12
ML026	*Boletus* sp.	120	600
ML028	*Xerocomus* sp.	180	450
ML030	*Boletus* sp.	420	400
ML034	*Strobilomyces mollis* Corner gp.	3	36.5
ML037	*Russula* sp.	125	125
ML039	*Russula luteotacta* Rea.	400	500
ML041	*Lactarius volemus* Fr.: Fr.	600	800
ML046	*Cantharellus* sp.	96	96
ML051	*Russula alboareolata* Hongo.	51.7	51.7
ML054	*Russula* sp.	21	21
ML055	*Lentinus* sp.	8	7
ML057	*Termitomyces microcarpus*	30	55
ML062	*Lycoperdon* sp.	483	400
ML071	*Marasmius* sp.	30	9.5
ML078	*Schizophyllum commune* Fr.: Fr.	20	350
ML086	*Termitomyces aurantiacus* R. Heim	97.3	97.3
ML088	*Termitomyces* sp.	1050	1980
ML089	*Termitomyces* sp.	6500	2500
ML095	*Lentinellus* sp.	170	650
ML097	*Russula aeruginea* Lindbl.	350	500
ML100	*Russula* sp.	1500	1100

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 4 ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของสารสกัดหยาบจาก fruiting body ของเห็ด (ต่อ) บางชนิดต่อเซลล์มะเร็งของคน 2 ชนิด ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

Fungal code	Fungal species	IC_{50} (µg/ml)	
		KB	HeLa
ML102	*Lepista sordida* (Fr.) Sing.	76	76
ML103	*Boletus* sp.	480	320
ML104	*Trogia adelphus* Corner	120	320
ML106	*Macrolepiota* sp.	100	15
ML108	*Laccaria* sp.	900	300
ML111	*Amanita* cf. *nauseosa* (Wakef.) Reid	160	140
ML112	*Geastrum triptex* Jungh.	2000	1500
ML114	*Macrolepiota* sp.	1990	200
ML126	*Leucocoprinus* sp.	1500	2000
ML127	*Lepiota* sp.	380	200
ML128	*Leucoagaricus* sp.	55	1000
ML136	*Pycnoporus cinnabarius* (Jacq.: Fr.) P. Karst.	NT	220
ML138	*Chlorophyllum molybdites* (Meyer: Fr.) Massee	400	500
ML139	*Leucoagaricus* sp.	81	81
ML142	*Russula luteotacta* Rea.	40.3	40.3
ML149	*Russula anthracina* Romagn.	600	600
ML151	Agaricoid	140	350
ML152	*Clavulina cristata* var. *cineroides*	280	800
ML159	*Clavulina cristata* (Fr.) Schroet.	2000	400
SUT18(S)	*Macrocybe* sp. (stalk)	190	75
SUT19(S)	*Macrocybe* sp. (stalk)	350	160
SUT020	*Macrocybe* sp. (cap)	950	140
SUT021	*Macrolepiota* sp. (stalk)	50	55
SUT024	*Lepiota* sp.	0.53	0.9
SUT064(f)	*Macrocybe* sp. (cap)	800	700
SUT065	*Canthrarellus* sp.	350	160
SUT081	*Russula* sp.	700	1450

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 4 ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของสารสกัดหยาบจาก fruiting body ของเห็ดบางชนิดต่อเซลล์มะเร็งของคน 2 ชนิด ด้วยวิธี MTT colorimetric assay (ต่อ)

Fungal code	Fungal species	IC_{50} (µg/ml)	
		KB	HeLa
SUT084	*Russula* sp.	600	>1932
SUT087	*Russula* sp.	16	16
SUT092	*Russula* sp.	350	600
SUT095	Agaricoid	700	650
SUT096	Agaricoid	1000	180
SUT107	*Russula* sp.	300	350
SUT109	*Amanita* sp.	650	>1960
SUT111	*Clavulina* sp.	2000	1500
SUT113	*Boletus* sp. (ลำปลายมาศ)	>350	160
SUT126	*Boletus* sp. (นางรอง)	>4260	490
SUT127	*Boletus* sp. (นางรอง)	>3060	80
SUT128	*Boletus* sp. (นางรอง)	500	1000
SUT129	*Volvariella volvacea*	12.5	8.75
SUT227	*Volvariella volvacea*	16	9.5
SUT220	*Volvariella volvacea*	14	9.06
SUT150	*Lactaricus* sp.	190	150
SUT156	*Lactaricus* sp.	40	28
SUT162	*Russula* sp.	35	60
SUT176	*Russula* sp.	60	700
SUT183	*Phlebopus* sp.	55	30
SUT193	*Canthrarellus* sp.	650	650
SUT197	*Marasmius* sp.	100	103
SUT201	*Lepiota* sp.	150	180
SUT202	*Agaricus* sp.	70	85
2309	*Xylaria coccophore*	>72	>72
2329	*Xylaria anisopleura*	219.5	>219.5
2396	*Hypoxylon fendleri*	150	160

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 4 ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของสารสกัดหยาบจาก fruiting body ของเห็ดบางชนิดต่อเซลล์มะเร็งของคน 2 ชนิด ด้วยวิธี MTT colorimetric assay (ต่อ)

Fungal code	Fungal species	IC_{50} (µg/ml)	
		KB	HeLa
2412	*Biscogneoxia* sp.	>226	130
2420	*Xylaria cubensis*	60	150
2431	*Xylaria allantoidea*	100	>122
2432	*Xylaria* sp.	80	-
2434	*Xylaria* laevis	>264	190
2435	*Xylaria cubensis*	80	80
2438	*Hypoxylon monticulosum*	350	>897
2439	*Hypoxylon* sp.	96	200
2442	*Hypoxylon* sp.	190	>365
2446	*Hypoxylon* sp.	190	>430
2447	*Hypoxylon* sp.	16	50
2448	*Hypoxylon* sp.	>224	>224
2449	*Hypoxylon* sp.	150	380
2458	*Xylaria fockei*	>340	>340
2461	*Xylaria allantoidea*	90	-
2462	*Xylaria fockei*	>299	-
2463	*Xylaria schweinitzii*	150	-
2474	*Hypoxylon* sp.	110	-
2479	*Xylaria obovata*	150	-
2482	*Xylaria melanaxis*	>290	-
2511	*Xylaria allantoidea*	65	-

IC_{50} (50% inhibition concentration) = ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Significance: IC_{50} ของ crude extracts $\leq$ 30 µg/ml

KB = Human epidermoid carcinoma (มะเร็งเยื่อบุช่องปากของคน)

HeLa = Human cervical carcinoma (มะเร็งปากมดลูกของคน)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 5 การทดสอบความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดเอ็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae และจาก fruiting body ของเห็ด

Sample code	Mushroom species	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)												
		Temperature (°C)												
		Control (-20)	4 (1 d)	30 (1 d)	40 (30 min)	45 (30 min)	50 (30 min)	55 (30 min)	60 (30 min)	65 (30 min)	70 (30 min)	80 (30 min)	90 (30 min)	100 (30 min)
2309	*Xylaria coccophore*	16	16	16	16	16	16	16	16	16	4	4	4	-
2420	*Xylaria cubensis*	256	256	256	256	256	256	256	256	128	128	128	128	2
2435	*Xylaria cubensis*	256	256	256	256	64	64	16	-	-	-	-	-	-
2439	*Xylaria schweinitzii*	128	128	128	128	128	128	128	64	64	64	32	32	8
2447	*Hypoxylon* sp.	64	64	64	64	64	64	64	64	64	2	2	1	-
2511	*Xylaria allantoidea*	32	16	8	8	8	8	8	-	-	-	-	-	-
ML015	*Cantharellus minor*	16	16	16	16	16	16	16	65	65	32	8	8	8
ML016	*Cantharellus* cf. *cibarius*	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	32
ML020	*Amanita* sect. *Vaginatae*	512	512	64	64	64	64	64	-	-	-	-	-	-
ML022	*Amanita* sect. *Vaginatae*	512	512	512	512	512	512	512	256	32	32	16	16	8
ML032	*Gyroporus* sp.	256	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	64
ML034	*Strobilomyces mollis*	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	64
ML054	*Russula* sp.	16	16	16	16	16	16	16	16	8	-	-	-	-
ML055	*Lentinus* sp.	64	64	64	64	64	64	64	64	64	16	-	-	-
ML057	*Termitomyces microcarpus*	32	32	32	32	32	32	32	32	16	16	-	-	-
ML071	*Marasmius* sp.	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	128	64
ML128	*Leucoagaricus* sp.	512	512	512	512	512	512	256	256	256	256	256	128	16
ML139	*Leucoagaricus* sp.	256	256	256	128	128	128	128	128	128	128	4	4	4
ML142	*Russula luteotacta*	256	256	256	256	256	256	256	256	128	128	128	128	32
ML150	*Schizophyllus commune*	256	256	256	256	256	256	256	256	64	1	-	-	-

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 5 การทดสอบความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดเล็กตินจากเส้นใยของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae และจาก fruiting body ของเห็ด (ต่อ)

Sample code	Mushroom species	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)												
		Temperature (°C)												
		Control (-20)	4 (1 d)	30 (1 d)	40 (30 min)	45 (30 min)	50 (30 min)	55 (30 min)	60 (30 min)	65 (30 min)	70 (30 min)	80 (30 min)	90 (30 min)	100 (30 min)
SDNA1	*Russula* sp.	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	256	4	-
SDNA8	*Lactaricus* sp.	512	512	512	512	512	512	512	128	128	128	128	32	16
SUT021	*Macrolepiota* sp.	8	8	8	8	8	4	4	4	-	-	-	-	-
SUT018	*Macrocybe* sp.	8	8	8	8	8	8	8	8	4	2	2	2	1
SUT082	*Russula* sp.	512	512	512	512	512	512	256	256	256	256	64	16	16
SUT087	*Russula* sp.	512	512	512	512	256	256	256	256	256	256	16	16	16
SUT106 (f)	*Macrolepiota* sp.	1024	1024	1024	1024	1024	1024	512	256	128	64	32	16	16
SUT129	*Volvariella volvacea*	1024	1024	1024	1024	1024	1024	512	512	256	256	128	128	64
SUT150	*Lactaricus* sp.	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	64	32
SUT156	*Lactaricus* sp.	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	512	32	4
SUT162	*Russula* sp.	1024	1024	1024	1024	512	512	512	512	512	512	256	16	16
SUT176	*Russula* sp.	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	512	512	256	256	16
SUT183	*Phlebopus* sp.	1024	1024	512	512	512	512	512	512	512	512	256	-	-
SUT202	*Agaricus* sp.	512	512	512	512	512	512	512	512	512	-	-	-	-

d = day

min = minute

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีลักษณ์ รอดทอง*

หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 044-22 4297, 044-22 4633 โทรสาร 044-22 4633
E-mail sureelak@sut.ac.th

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
PGDip. Sc. with Credit (Biotechnology)	University of Otago	New Zealand
Ph.D. (Microbiology)	University of Otago	New Zealand

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) และความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อรา

ผลงานทางวิชาการ

1. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (บางส่วน)

Green, D.H., Lewis, G.D., Rodtong, S., and Loutit, M.W. 1991. Detection of faecal pollution in water by an *Escherichia coli uid*A gene probe. *Journal of Microbiological Methods*. 13: 207-214.

Rodtong, S. and Tannock, G.W. 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(10): 3480-3484.

Rodtong, S., Dobbinson, S., Thode-Andersen, S., McConnell, M.A., and Tannock, G.W. 1993. Derivation of DNA probes for the enumeration of a specific strain of *Lactobacillus acidophilus* in piglet digestive tract samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(11): 3871-3877.

Towprayoon, S., Rodtong, S., Feungchan, S., Chindaprasert, S., Yimsawat, T., and Kitpowsong, P. 1996. *Rhizobium* studies on tamarind root. *Thai Journal of Agricultural Science*. Special issue 1: 57-67.

Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Ng, J., Munro, K., and Alatossava, T. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9): 4264-4267.

Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., and Munro, K. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(1): 297-303.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. 2001. Bioconversion of cassava roots to high protein product for animal feed. *Thai Journal of Biotechnology*. 3(1): 17-25.

Edwards, R.L., Jonglaekha, N., Kshirsagar, A., Maitland, D.J., Mekkanol, S., Nugent, L.K., Phosri, C., Rodtong, S., Ruchikachorn, N., Sangvichien, E., Sharples, G.P., Sihanonth, P., Suwannasai, N., Thienhirun, S., Whalley, A.J.S., and Whalley, M.A. 2003. The Xylariaceae as phytopathogens. *Recent Research Developments in Plant Sciences*. 1: 1-19.

Rodtong, S. and Ishizaki, A. 2003. Potential microorganism for the direct production of L-lactic acid from cassava starch without carbon dioxide production. *MACRO REVIEW*. 16(1): 332-336.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., and Reynolds, C.D. 2005. Lectin crystals from split-gill fungus, *Schizophyllum commune*. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 19(1): 205-206.

Manassila, M., Sooksa-nguan, T., Boonkerd, N., Rodtong, S., and Teaumroong, N. 2005. Phylogenetic diversity of wild edible *Russula* from Northeastern Thailand on the basis of internal transcribed spacer sequence. *ScienceAsia*. 31: 323-328.

Rodtong, S., Nawong, S., and Yongsawatdigul, J. 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Microbiology*. 22: 475-482.

Rodtong, S. and Ratanachai, K. 2005. Basidiospore ornamentation study of the red russula mushrooms. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 19(1): 209-210.

Suwannasai, N., Rodtong, S., Thienhirun, S., and Whalley, A.J.S. 2005. Perispore ornamentations for the indication of *Hypoxylon* species. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 19(1): 207-208.

Suwannasai, N., Rodtong, S., Thienhirun, S., and Whalley, A.J.S. 2005. New species and phylogenetic relationships of *Hypoxylon* species found in Thailand inferred from the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA sequences. *Mycotaxon*. 94: 303-324.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Lambert, S.J., Fordham-Skelton, A.P., Rizkallah, P.J., Wilkinson, M.C., and Reynolds, C.D. 2006. Purification and characterization of an *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1760: 326-332.

Ratanachai, K., Suwannasai, N., Rodtong, S., Thienhirun, S., and Whalley, A.J.S. 2006. Ascospore wall ornamentation for the taxonomic study of xylariaceous fungi. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 20(1): 229-230.

Rodtong, S., Nunthisa, M., and Ratanachai, K. 2007. Characterization of selected lactic acid bacterial strains for applying as potential silage inoculants. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 230-234.

Rodtong, S., Pikul-ngoen, Y., and Ratanachai, K. 2007. Specific strains of lectin-producing wild mushrooms. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 226-229.

Chimsungnern, P., Ratanachai, K., and Rodtong, S. 2007. Morphological study of water meal, a millimeter size flowering plant found in Thailand. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 215-220.

Ratanachai, K., Rodtong, S., and Saksirirat, W. 2007. Morphological characteristics of different plant-pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 221-225.

Suwannasai, N., Rodtong, S., Thienhirun, S., Phosri, C., Sihanonth, P., Whalley, M.A., and Whalley, A.J.S. 2007. Ascospore ornamentation in the Xylariaceae. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 235-236.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. 2007. NaCl-Activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. *Journal of Food Science*. 72(5): C264–C269.

Tayuan, C., Ratanachai, K., and Rodtong, S. 2007. Strain variation of exopolysaccharide-producing *Weissella confuse*. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 185-189.

Vongshewarat, K., Ratanachai, K., and Rodtong, S. 2007. Taxonomic study of *Laurera benguelensis* (lichen) found in Thailand. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 192-196.

Wechklang, K., Ratanachai, K., Rodtong, S., and Boontawan, A. 2007. Investigation of amylase-producing *Bacillus* sp. isolated from dried cassava-root chips. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 211-214.

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Raksakulthai, N. 2007. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. *Journal of Food Science*. 72(9): S676-S688.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. 2008. Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochemistry*. 43: 185-192.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. 2008. Characterization of Ca^{+2}-activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. *Food Science and Technology*. 41: 2166-2174.

2. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน Proceedings
   จำนวน 16 เรื่อง

3. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ
   จำนวน 55 เรื่อง

4. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
   จำนวน 44 เรื่อง

5. สิทธิบัตร

   (1) กรรมวิธีการเพิ่ม CLA ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

   (2) กรรมวิธีการผลิตปลาส้มด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารแนบ

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Lambert, S.J., Fordham-Skelton, A.P., Rizkallah, P.J., Wilkinson, M.C., and Reynolds, C.D. 2006. Purification and characterization of an *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1760: 326-332.

Rodtong, S., Pikul-ngoen, Y., and Ratanachai, K. 2007. Specific strains of lectin-producing wild mushrooms. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 226-229.

2. ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ

Rodtong, S. 2003. Study of lectins from wild mushrooms. *Abstracts of The NRCT-JSPS/DOST/LIPI/VCC Seminar on Bioresources in Southeast Asia: Its Diversity and Utilization, 10-11 March 2003, Bangkok, Thailand*: 10.

Rodtong, S., Pikul-ngoen, Y., Yahaufai, J., and Siripong, P. 2005. Edible wild mushroom lectins and their cytotoxic activities against cancer cell lines. *Abstracts of the 8th National Cancer Conference (NCC 8), 7-9 September 2005, Bangkok, Thailand*: 129.

Rodtong, S., Thienhirun, S., Yahaufai, J., and Siripong, P. 2005. Antiproliferative agents from xylariaceous fungi. *Abstracts of the 8th National Cancer Conference (NCC8), 7-9 September 2005, Bangkok, Thailand*: 130.

Armassa, N., Thamsirirak, S., Rodtong, S., and Sanoamuang, N. 2005. Nutritional and medicinal potential of twenty three polypores from northeast Thailand. *The 3rd International Medicinal Mushroom Conference (IMMC3), 12-17 October 2005, Washington, U.S.A.*

Rodtong, S. and Pikul-ngoen, Y. 2006. Lectin accumulation in edible wild mushrooms in Northeastern Thailand. *Congress Handbook and Abstracts of the 8th International Mycological Congress (IMC 8), 21-25 August 2006, Cairns, Australia*: 277.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., and Reynolds, C.D. 2007. An *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the tropical mushroom, *Schizophyllum commune*. *Proceedings of the*

11th International Conference on Culture Collections (ICCC 11), 7-11 October 2007, Goslar, Germany: 207.

Rodtong, S. and Siripong, P. 2007. Cytotoxic lectins from some tropical wild mushrooms. *Proceedings of the 11th International Conference on Culture Collections (ICCC 11), 7-11 October 2007, Goslar, Germany*: 207.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., and Reynolds, C.D. 2007. Characterization of a cytotoxic lectin from the tropical mushroom, *Schizophyllum commune*. *Abstracts of the 9th National Cancer Conference (NCC 9), 12-14 December 2007, Bangkok, Thailand*: P-51.

3. ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในรูปแบบอื่น

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2548. เห็ดป่าและสารต้านมะเร็ง. ออกอากาศทางสถานีวิทยุกระจายเสียงแห่งประเทศไทย จังหวัดนครราชสีมา ระบบเอฟ.เอ็ม. ความถี่ 105.25 เมกะเฮิร์ต วันจันทร์ที่ 13 มิถุนายน พ.ศ. 2548 เวลา 13.00-14.00น.

นิทรรศการแสดงผลงานวิจัย สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดรา (พร้อมตัวอย่างของจริง) ในงานสัมมนา การพัฒนากลุ่มงานวิจัยในเครือข่ายอุดมศึกษานครราชสีมา วันที่ 24 มิถุนายน 2548 ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

นิทรรศการแสดงผลงานวิจัยหัวข้อ "เล็กติน" สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดรา จำนวน 3 โปสเตอร์ (90x100 เซนติเมตร) พร้อมรูปเห็ดราและตัวอย่างของจริง ในบูธ (3x3เมตร) ในงาน "การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2549 (Thailand Research Expo 2006)" วันที่ 9-13 กันยายน พ.ศ. 2549 ณ Sky Hall เซ็นทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร

นิทรรศการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี หัวข้อ "เล็กติน" สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดรา จำนวน 3 โปสเตอร์ (90x100 เซนติเมตร) ในงานศักยภาพเมืองหญิงกล้า 2006 (KORAT EXPO 2006) วันที่ 9-15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2549 ณ ศาลากลางจังหวัดนครราชสีมา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี