นฤมล โม้ทอง : เล็กตินจากเห็ดฟางเพาะเลี้ยงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (LECTINS FROM STRAW MUSHROOM CULTIVATED IN NORTH-EASTERN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง, 193 หน้า.

เล็กตินเป็นสารโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีความจำเพาะคล้ายแอนติบอดีที่สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์ และได้จากแหล่งผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจหา ทำบริสุทธิ์ ศึกษาคุณลักษณะ และปลูกผลึกสารเล็กตินจากเห็ดฟางเพาะเลี้ยงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากการตรวจหาสารเล็กตินที่สะสมในตัวอย่างดอกเห็ดฟางจำนวน 11 ตัวอย่าง ด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย พบว่า เห็ดฟางทุกตัวอย่างสะสมสารเล็กตินในปริมาณแตกต่างกันทั้งที่แยกส่วนหมวก ส่วนก้าน และรวมทุกส่วนของดอกเห็ด ตามค่าความเจือจางสูงสุดของสารสกัดหยาบเล็กตินเริ่มต้นที่ความเจือจาง 1:10 เกิดการจับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่ความเจือจางสูงสุดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2,048 2,048 และ 4,096 ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบเล็กตินที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบสารเล็กตินเพียง 2 ตัวอย่าง คือ รหัส MC131 และ MC133 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ที่ความเข้มข้น 0.090 และ 0.123 0.057 และ 0.053 และ 0.116 และ 0.128 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารสเตรปโตมัยซินมาตรฐาน สารสกัดหยาบเล็กตินรหัส MC134 และ MC145 ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ที่ความเข้มข้น 0.066 และ 0.065 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ สารเล็กตินรหัส MC145 และ MC168 สามารถยับยั้ง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ได้โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งน้อยกว่าสารไนสเตตินมาตรฐาน (100 หน่วย) 1.65 และ 1.46 เท่า ตามลำดับ สาร MC168 ยังสามารถยับยั้ง *Candida albican* ATCC 10231 และ *Penicillium funiculosum* ATCC 36839 ได้โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งน้อยกว่าและมากกว่าสารไนสเตตินมาตรฐาน (100 หน่วย) 0.60 และ 1.38 เท่า ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารเล็กตินต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนที่เพาะเลี้ยง พบว่า สารสกัดหยาบเล็กติน MC131 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (IC_{50}) ที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับ 4.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีเพียงสาร MC134 ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับ 21.38 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงเลือกเห็ดฟางรหัส MC131 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ขนาด 1,687 คู่เบส เหมือนมากที่สุดที่ร้อยละ 98 กับ *Volvariella volvacea* JM leg. SLR (DQ851588) ตามฐานข้อมูล GenBank สหรัฐอเมริกา มาสกัดแยกสารเล็กตินเพื่อทำบริสุทธิ์ จากการศึกษาพบว่า วิธีที่มีประสิทธิภาพในการทำบริสุทธิ์

สารเล็กตินของเห็ดฟางคือ การตกตะกอนสารเล็กตินด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 90 จากนั้นแยกสารโดยการแลกเปลี่ยนประจุ และแยกตามขนาดโมเลกุลด้วยเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี (Gel filtration chromatography) สารเล็กตินบริสุทธิ์ MC131 เป็นสารไกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน มีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนร้อยละ 99 กับโปรตีน Volvatoxin A2 precursor ที่มี ขนาด 24.2 กิโลดาลตัน ของ *Volvariella volvacea* (AAQ92757.1) ตามฐานข้อมูล GenBank มีจุดที่มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (พีไอ) ประมาณ 5 และไม่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลชนิดใดเลยจากน้ำตาล 32 ชนิดที่ทดสอบ สารเล็กตินบริสุทธิ์ MC131 ทนอุณหภูมิสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ ในขณะที่สารสกัดหยาบเล็กตินจากเห็ดตัวอย่างนี้ทนอุณหภูมิสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5-12 ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ สารเล็กตินบริสุทธิ์ MC131 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดที่สารสกัดหยาบยับยั้งได้ดังกล่าวข้างต้น แต่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนที่เพาะเลี้ยงได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ค่าความเข้มข้นเท่ากับ 0.58 และ 0.70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารเล็กตินบริสุทธิ์ MC131 มาทดลองปลูกผลึกพบสภาวะที่เหมาะสมทำให้ได้ผลึกเล็กตินที่มีลักษณะเพลทที่ให้แบบแผนการกระจายรังสีเอกซ์ที่มีการแจกแจงรายละเอียด 3 อังสตรอม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาสารเล็กตินและโครงสร้างของสารในเชิงลึกต่อไป กล่าวโดยสรุปได้ว่า เห็ดฟางเพาะเลี้ยงในที่ต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เป็นแหล่งของสารเล็กตินที่มีสมบัติทางเคมี และชีวภาพด้านความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนได้แตกต่างกัน จึงมีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม การแพทย์ และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

NARUMOL MOTHONG : LECTINS FROM STRAW MUSHROOM CULTIVATED IN NORTH-EASTERN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, Ph.D. 192 PP.

LECTIN / STRAW MUSHROOM / *Volvariella volvacea* / PURIFICATION / CRYSTALLIZATION

Lectins able to agglutinate cells, are proteins or glycoproteins of non-immune origin. Investigation of lectins from straw mushroom cultivated in North-eastern Thailand, were performed. All 11 straw mushroom specimens collected from different locations, were found to accumulate lectins in caps, stalks and whole fruiting bodies at different hemagglutination titers (from 1:10 original lectin dilution and using rabbit red blood cells) on the average of 2,048, 2,048 and 4,096, respectively. The crude extracts were then tested for their biological properties. Lectins from specimen codes MC131 and MC133 inhibited *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 at concentrations of 0.090 and 0.123, 0.057 and 0.053, and 0.116 and 0.128 μg/μl compared to standard streptomycin, respectively. MC134 and MC145 extracts inhibited *S. aureus* ATCC 29213 at concentrations of 0.066 and 0.065 μg/μl, respectively. MC145 and MC168 extracts could inhibit *Aspergillus niger* ATCC 6275 at 1.65 and 1.46 times, respectively, narrower than standard nystatin (100 U) inhibition zone diameter. MC168 extract also inhibited *Candida albican* ATCC 10231 and *Penicillium funiculosum* ATCC 36839 at 0.60 and 1.38 times narrower and wider than standard nystatin inhibition zone, respectively. For cytotoxic test against two human cancer

cells, crude MC131 lectin extract displayed strong cytotoxicity against human epidermoid carcinoma (KB) cells with 50% inhibition concentration (IC_{50}) value of 4.80 μg/ml. Only MC134 extract showed cytotoxicity against human cervical carcinoma (HeLa) cells (IC_{50} of 21.38 μg/ml). The mushroom MC131 having 98% nucleotide sequence similarity of 18S rRNA gene (1,687 bp) compared to *Volvariella volvacea* (DQ851588) from GenBank database, U.S.A., was then selected for lectin purification. MC131 lectin could be purified by 90% ammonium sulfate precipitation, ion exchange and gel filtration chromatography. The lectin was proven to be a 25 kDa glycoprotein, that showed 99% amino acid sequence similarity compared to 24.2 kDa of *V. volvacea* volvatoxin A2 precursor (AAQ92757.1), and had isoelectric point (pI) of approximately 5. The purified lectin was not specific to 32 sugars tested, but stable at 60°C for 30 min and at pH 7 for 18 h test whereas the crude extract was stable for 1 h and at pH 5-12. The glycoprotein exhibited no antimicrobial activity but the crude extract showed cytotoxicity against KB and HeLa cells (IC_{50} of 0.58 and 0.70 μg/ml, respectively). The plate-like crystals of MC131 lectin giving an X-ray diffraction pattern of 3.0 Å resolution, were achieved. Results obtained reveal that straw mushroom cultivated in North-eastern Thailand, could be served as a source of lectins possessing biological properties that will be useful for further study and applications.

School of Microbiology

Academic Year 2009

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____