



รายงานการวิจัย

การศึกษาลักษณะเฉพาะของเล็คตินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดที่
รับประทานได้

(Characterization of Bioactive Lectins from Edible Mushrooms)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การศึกษาลักษณะเฉพาะของเล็คตินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดที่ รับประทานได้

(Characterization of Bioactive Lectins from Edible Mushrooms)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. ชมกฤษ สวัสดิ์ฤทธิกุล

สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การศึกษาลักษณะเฉพาะของเล็กดินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดที่รับประทานได้” เป็นโครงการที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานประมาณในส่วนของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ผ่านการพิจารณาโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณที่เป็นค่าใช้จ่าย เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัยหลายขั้นตอนของโครงการที่เกี่ยวข้อง และ ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ หัวหน้างานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ร่วมทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งของคน โครงการวิจัยนี้มี นางสาวนฤมล ไม้ทอง เป็นผู้ช่วยนักวิจัย และยังมีผู้ช่วยวิจัยของโครงการวิจัยอื่นภายใต้การดูแลของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรลักษณ์ รอดทอง บุคลากร และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

บทคัดย่อ

เล็กตินเป็นสารประเภทโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีความจำเพาะคล้ายแอนติบอดีที่สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์ เป็นสารที่ได้จากแหล่งผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดเลือกให้ได้เล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ที่พบในประเทศไทยชนิดที่มีสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสมบัติเพื่อการใช้ประโยชน์สาร ศึกษาวิธีการทำบริสุทธิ์ คุณลักษณะ และการปลูกผลึกสารเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ที่คัดเลือก จากการตรวจหาสารเล็กตินที่สะสมในตัวอย่างดอกเห็ดรับประทานได้ที่พบเจริญตามธรรมชาติและเพาะเลี้ยงได้โดยทั่วไปจำนวน 132 ตัวอย่าง ที่จัดอยู่ใน 17 สกุล คือ *Amanita*, *Boletus*, *Boletellus*, *Gyroporus*, *Heimiella*, *Phylloporus*, *Strobilomyces*, *Tylophilus*, *Xerocomus*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Volvariella*, *Scytinopogon*, *Lactarius*, *Russula*, *Schizophyllum* และ *Termitomyces* พบว่าสารสกัดหยาบของ เล็กตินจากเห็ดหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) เห็ดระโงก (*Amanita* sp.) และ เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) หลายสายพันธุ์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบหลายสายพันธุ์และต้านเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนไข้เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง สารสกัดหยาบเล็กตินจากเห็ดข้างต้นมีความเสถียรที่อุณหภูมิโดยเฉลี่ยในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6-10 ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ ในการทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* และเห็ดระโงก *Amanita* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือก สามารถตกตะกอนได้ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 90 และแยกได้โดย Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column จัดเป็น Monomeric lectin ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในขณะที่สารเล็กตินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* สายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อเปรียบเทียบ ตกตะกอนได้ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 70 และแยกได้โดยวิธี Affinity chromatography ด้วย Mucin-Sepharose 4B column มีน้ำหนักโมเลกุล 29 และ 32 กิโลดาลตัน สารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นสาร ไกลโคโปรตีนสามารถปลูกผลึกสารเล็กตินจากเห็ดฟางและเห็ดแครง (ตัวอย่างเปรียบเทียบ) ได้สำเร็จ ส่วนเห็ดระโงกยังต้องศึกษาต่อไป ผลึกเล็กตินของเห็ดฟางสายพันธุ์ที่คัดเลือกมีลักษณะพลทที่ให้แบบแผนการกระจายรังสีเอกซ์ที่มีการแจกแจงรายละเอียด 3 อังสตรอม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาสารเล็กตินและโครงสร้างของสารในเชิงลึก ผลการศึกษาแสดงถึงเห็ดรับประทานได้ที่พบในประเทศไทย เป็นแหล่งสำคัญของสารเล็กตินที่แตกต่างกันตามสายพันธุ์และแหล่งที่เห็ดชนิดนั้นเจริญ และยังคงแสดงสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน ทำให้สามารถประยุกต์ใช้สารเล็กตินได้ในด้านเภสัชกรรม การแพทย์ และการวิจัยทางวิทยาศาสตร์

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin, and able to agglutinate cells. This study aimed to select lectins accumulated in fruiting bodies of edible mushrooms found in Thailand. The lectins having useful bioactive activity, were then purified, characterized, and crystallized. From the detection of lectins accumulated in fruiting bodies of edible mushroom naturally found and

cultivated, 132 specimens of mushrooms classified into 17 genera (*Amanita*, *Boletus*, *Boletellus*, *Gyroporus*, *Heimiella*, *Phylloporus*, *Strobilomyces*, *Tylopilus*, *Xerocomus*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Volvariella*, *Scytinopogon*, *Lactarius*, *Russula*, *Schizophyllum*, and *Termitomyces*) were collected. Crude lectin extracts from several mushroom specimens, particularly different strains of *Volvariella volvacea*, *Amanita* sp., and *Schizophyllum commune*, displayed inhibitory activity against bacterium and fungal test organisms, and cytotoxicity against two human cancer cell lines, human epidermoid carcinoma and human cervical carcinoma cells. The crude extracts from selected specimens of *Volvariella volvacea*, *Amanita* sp., and *Schizophyllum commune* were stable at 50-60°C for 30 min, and at pH 6-10 for 18 h test. The efficient purification methods of the selected *Volvariella volvacea* and *Amanita* lectins were by 90% ammonium sulphate precipitation and anion exchange chromatography using DEAE-Sepharose column. The purified lectins were monomeric lectins having molecular weight of 25 and 30 kDa, respectively. Whereas, the selected *Schizophyllum commune* lectin performed as comparison, could be precipitated by 70% ammonium sulphate, then purified by affinity chromatography using Mucin-Sepharose 4B column. The purified *Schizophyllum commune* lectin had molecular weight of 29 and 32 kDa. All selected lectins were proven to be a glycoprotein. The plate-like crystal of the selected straw mushroom, *Volvariella volvacea*, lectin was successfully grown. The crystal displayed an X-ray diffraction pattern diffracting to 3.0 Å resolution, which is very useful for further structural study of the lectin. Results from this study reveal that several species of edible mushrooms are the potential sources of lectins, which can exhibit different biological properties, and could be useful for pharmaceutical, medical and scientific research applications.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	3
1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	3
1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1.6.1 แหล่งของเล็กติน.....	5
1.6.2 สารเล็กตินจากเห็ดรา.....	8
1.6.3 การทำบริสุทธิ์และการตกผลึกสารเล็กตินจากเห็ดรา.....	10
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย.....	11
2.1.1 ครุภัณฑ์.....	11
2.1.2 วัสดุวิทยาศาสตร์.....	12
2.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
2.2.1 การคัดเลือกเห็ดที่ผลิตสารเล็กตินและเก็บรวบรวมดอกเห็ด (Fruiting body) ที่ยังมีความสด.....	13
2.2.2 การสกัด/แยกสารเล็กตินในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract).....	13
2.2.3 การทำบริสุทธิ์สารเล็กติน.....	13
2.2.3.1 การตกตะกอนโปรตีนเล็กตินด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต.....	14
2.2.3.2 Anion exchange chromatography ด้วย Diethylaminoethyl cellulose (DEAE)-Sephrose column.....	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.3.3 Cation exchange chromatography ด้วย CM-Sepharose column.....	15
2.2.3.4 Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B column.....	15
2.2.3.5 Gel filtration chromatography.....	16
2.2.4 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กตินที่พบ.....	16
2.2.4.1 ปฏิกริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์.....	16
2.2.4.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	17
2.2.4.3 ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง (pH).....	18
2.2.4.4 ความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน.....	18
2.2.4.5 มวลโมเลกุล และ Isoelectric point (pI).....	19
2.2.4.6 ความจำเพาะของสารต่อน้ำตาล.....	20
2.2.4.7 คุณลักษณะ Glycoprotein.....	20
2.2.4.8 โครงสร้างปฐมภูมิของเล็กติน.....	21
2.2.4.9 การทดสอบกรรมวิธีการปลูกผลึกเล็กติน.....	21
บทที่ 3 ผลและอภิปรายผลการวิจัย	
3.1 การคัดเลือกเห็ดที่ผลิตสารเล็กตินและเก็บรวบรวมดอกเห็ดที่ยังมีความสด.....	23
3.2 การสกัด/แยกสารเล็กตินในลักษณะสารสกัดหยาบ.....	35
3.3 การทดสอบสมบัติทางชีวภาพเพื่อคัดเลือกสารสกัดหยาบของเล็กตินจากเห็ด มาทำบริสุทธิ์.....	38
3.3.1 ปฏิกริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ของสารสกัดหยาบเล็กติน....	38
3.3.2 ฤทธิ์ของสารเล็กตินในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	46
3.3.2.1 แบคทีเรีย.....	46
3.3.2.2 เชื้อรา.....	46
3.3.3 ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดหยาบเล็กติน.....	53
3.3.3.1 ความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดหยาบเล็กติน.....	53
3.3.3.2 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดหยาบเล็กติน.....	58
3.3.4 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ที่เลือกกับ เซลล์มะเร็งของคน.....	59
3.4 การทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้.....	63
3.4.1 การตกตะกอน โปรตีนเล็กตินด้วยเกลือแอม โมเนียมซัลเฟต.....	63

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.2 การทำบริสุทธิ์สารเล็กดินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133	
ด้วยวิธี Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column.....	63
3.4.3 การทำบริสุทธิ์สารเล็กดินจากเห็ดระโงก <i>Amanita</i> sp. MC188 ด้วยวิธี	
Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column.....	71
3.4.4 การศึกษาเปรียบเทียบทำบริสุทธิ์สารเล็กดินจากเห็ดแครง <i>Schizophyllum</i>	
<i>commune</i> MC322 โดยวิธี Affinity chromatography ด้วย	
Mucin-Sepharose 4B column.....	73
3.5 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กดินบริสุทธิ์ที่คัดเลือก.....	77
3.5.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	77
3.5.2 ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่างของสารเล็กดินบริสุทธิ์.....	78
3.5.3.1 ความเสถียรต่อความร้อน.....	78
3.5.3.2 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง.....	80
3.5.4 ความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน.....	85
3.5.5 มวลโมเลกุลและ Isoelectric point.....	86
3.5.6 ความจำเพาะของสารเล็กดินบริสุทธิ์ต่อน้ำตาล.....	87
3.5.7 คุณลักษณะ Glycoprotein ของสารเล็กดินบริสุทธิ์.....	97
3.5.8 โครงสร้างปฐมภูมิของเล็กดินจากเห็ดรับประทานได้ที่คัดเลือก.....	97
3.5.9 การทดสอบกรรมวิธีการปลูกผลึกเล็กดิน.....	103
3.5.9.1 การทดสอบหาสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดผลึก.....	103
ก. การตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง	
<i>Volvariella volvacea</i> MC133.....	104
ข. การตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง	
<i>Volvariella volvacea</i> MC131 เพื่อเปรียบเทียบกับ MC133.....	104
ค. การตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก	
<i>Amanita</i> sp. MC188.....	105
ง. การศึกษาเปรียบเทียบการตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กดินบริสุทธิ์	
จากเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322.....	107
3.5.9.2 การปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึก.....	107

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ก. การปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึกของสารเล็กดินบริสุทธิ์ จากเห็ดฟางที่เลือกจากชนิดที่มีแนวโน้มการเกิดผลึก.....	107
ข. การปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึกของสารเล็กดินบริสุทธิ์จาก เห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322 เพื่อเปรียบเทียบกับ เห็ดชนิดอื่นที่ศึกษา.....	113
3.5.9.3 การทดสอบคุณภาพผลึกของเล็กดิน.....	114
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	
4.1 สรุปผลการวิจัย.....	116
4.2 ข้อเสนอแนะ.....	124
บรรณานุกรม.....	126
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สารละลายและน้ำยาเคมี.....	131
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์.....	139
ภาคผนวก ค ตารางผนวก.....	140
ภาคผนวก ง รูปผนวก.....	142
ประวัติผู้วิจัย.....	184
เอกสารแนบ.....	187

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1	<p>เห็ดที่รับประทานได้ที่คัดเลือกจากผลงานวิจัยพื้นฐานเพื่อนำมาทดสอบ การสะสมสารเล็กดินในโครงสร้าง..... 23</p>
ตารางที่ 3.2	<p>ตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ของสารสกัดเล็กดินที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือกเพื่อศึกษา สารเล็กดิน..... 39</p>
ตารางที่ 3.3	<p>ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) และ Nystatin (100 Units)..... 47</p>
ตารางที่ 3.4	<p>ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) ของสารสกัด หยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดที่รับประทานได้ที่เลือกจำนวน 59 ตัวอย่าง..... 48</p>
ตารางที่ 3.5	<p>ความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของ เห็ดที่คัดเลือก..... 54</p>
ตารางที่ 3.6	<p>ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดที่คัดเลือก..... 59</p>
ตารางที่ 3.7	<p>ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดที่รับประทานได้บางชนิด กับเซลล์มะเร็งของคนด้วยวิธี MTT Colorimetric assay..... 60</p>
ตารางที่ 3.8	<p>สรุปผลการทำบริสุทธิ์ โปรตีนเล็กดินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133..... 71</p>
ตารางที่ 3.9	<p>สรุปผลการทำบริสุทธิ์ โปรตีนเล็กดินจากเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322.. 77</p>
ตารางที่ 3.10	<p>ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ ของสารเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียร ต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส..... 81</p>
ตารางที่ 3.11	<p>ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ ของสารเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความ เสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 2-12..... 84</p>
ตารางที่ 3.12	<p>ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด กับเซลล์มะเร็งของคน ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay..... 85</p>
ตารางที่ 3.13	<p>ผลการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง กระต่ายของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 โดยน้ำตาล 32 ชนิด..... 88</p>

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 3.14 ผลการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ของกระต่ายของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก <i>Amanita</i> sp. MC188 โดยน้ำตาล 32 ชนิด.....	91
ตารางที่ 3.15 ผลการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ของกระต่ายของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322 โดยน้ำตาล 32 ชนิด.....	94
ตารางที่ 3.16 ลำดับกรดอะมิโนของ Tryptic peptides ของเล็กดินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ที่วิเคราะห์โดย LC/ESI/MS.....	98
ตารางที่ 3.17 สรุปลักษณะที่น่าสนใจซึ่งมีแนวโน้มจะให้ผลึกเล็กดินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131 จากการทดลอง Microbatch.....	106
ตารางที่ 3.18 สรุปลักษณะที่น่าสนใจซึ่งมีแนวโน้มจะให้ผลึกเล็กดินของเห็ดระโงก <i>Amanita</i> sp. MC188 จากการทดลอง Microbatch.....	108
ตารางที่ 3.19 สรุปลักษณะที่น่าสนใจจากการใช้สารละลายตรวจสอบ 11 ชนิด ซึ่งมีแนวโน้ม จะให้ผลึกเล็กดินของเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322 จากการทดลอง Microbatch.....	109
ตารางที่ 3.20 การปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 40 ของการปลูกผลึกเล็กดินของ เห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131.....	110
ตารางที่ 3.21 การปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 13 ของการปลูกผลึกเล็กดินของ เห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131.....	111
ตารางที่ 3.22 การปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 22 ของการปลูกผลึกเล็กดินของ เห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131.....	112

สารบัญญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 วิธี Hanging drop vapour diffusion เพื่อปลูกผลึก โปรตีน.....	22
รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล <i>Amanita</i> วงศ์ Amanitaceae ชนิดที่เลือกและ เก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	24
รูปที่ 3.2 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Boletaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	26
รูปที่ 3.3 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล <i>Cantharellus</i> วงศ์ Cantharellaceae ชนิดที่เลือก และเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	27
รูปที่ 3.4 ลักษณะของเห็ด <i>Scytinopogon</i> sp. ในวงศ์ Clavariaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	28
รูปที่ 3.5 ลักษณะของเห็ด <i>Lentinus</i> sp. ในวงศ์ Pleurotaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	28
รูปที่ 3.6 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> ในวงศ์ Pluteaceae ที่เก็บ ตัวอย่าง Fruiting body จากต่างแหล่งจำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ ประเทศไทย มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	29
รูปที่ 3.7 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	31
รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> ในวงศ์ Schizophyllaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	33
รูปที่ 3.9 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล <i>Termitomyces</i> วงศ์ Tricholomataceae ที่เลือก และเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลำไส้.....	34
รูปที่ 3.10 ตัวอย่างแถบโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัดหยาบของสารเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Amanitaceae, Cantharellaceae และ Pleurotaceae จากการวิเคราะห์ ด้วย SDS-PAGE.....	36
รูปที่ 3.11 ตัวอย่างแบบแผน โปรตีนจากสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ด ในวงศ์ Boletaceae จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE.....	36
รูปที่ 3.12 ตัวอย่างแถบโปรตีนสารสกัดหยาบของสารเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ด ในวงศ์ Pluteaceae จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE.....	37

สารบัญญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.13	ตัวอย่างแถบโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัดหยาบของสารเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Schizophyllaceae, Clavariaceae และ Russulaceae ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE.....	37
รูปที่ 3.14	ตัวอย่างผลการทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก โครงสร้าง Cap, Stalk และ Whole fruiting body ของเห็ด 6 ตัวอย่าง.....	44
รูปที่ 3.15	ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133, MC168 และเห็ดระโงก <i>Amanita</i> sp. MC188 ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย....	51
รูปที่ 3.16	ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดรับประทานได้บางชนิด ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	52
รูปที่ 3.17	ผลการทดสอบความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่จำนวน 6 ตัวอย่าง.....	54
รูปที่ 3.18	ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่จำนวน 6 ตัวอย่าง ภายหลังจากที่สารผ่านการสัมผัสความร้อนที่อุณหภูมิ 4 ถึง 100 องศาเซลเซียส.....	55
รูปที่ 3.19	ผลการทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่จำนวน 6 ตัวอย่าง.....	58
รูปที่ 3.20	ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดที่รับประทานได้ที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ.....	61
รูปที่ 3.21	ตัวอย่างผลการทดสอบความเป็นพิษของสารเล็กดินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ต่อเซลล์มะเร็งของคนด้วยวิธี MTT Colorimetric assay.....	62
รูปที่ 3.22	Elution profile จากการทำบริสุทธิ์สารเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose) เมื่อชะสาร โปรตีนเล็กดินด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มี Sodium chloride 0-1M (Stepwise concentration gradient).....	64

สารบัญญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.23 ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายกับสารเล็กติน บริสุทธิ์จากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ที่แยกด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose).....	64
รูปที่ 3.24 สาร โปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ที่แยก ด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose) และวิเคราะห์ ด้วย SDS-PAGE.....	65
รูปที่ 3.25 Elution profiles จากการทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella</i> MC133 ด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose) เมื่อชะสาร โปรตีน เล็กตินด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มี Sodium chloride 0-0.5M (Stepwise concentration gradient).....	66
รูปที่ 3.26 ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายกับสารเล็กติน บริสุทธิ์จากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ที่แยกด้วย Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose).....	66
รูปที่ 3.27 สาร โปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ที่แยกด้วย Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose) และวิเคราะห์ด้วยวิธี ด้วย SDS-PAGE.....	68
รูปที่ 3.28 Elution profile ของการทำบริสุทธิ์สาร โปรตีนเล็กตินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ด้วยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Superdex 75 column ที่ได้จาก DEAE-Sepharose column.....	69
รูปที่ 3.29 ผลการทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายกับสาร โปรตีนเล็กตินจากเห็ดฟาง MC133 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Superdex 75 column.....	70
รูปที่ 3.30 สาร โปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์ของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ที่ผ่าน Gel filtration chromatography ด้วย Superdex 75 column ตรวจวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE.....	70
รูปที่ 3.31 Elution profile ของการทำบริสุทธิ์สาร โปรตีนเล็กตินจากเห็ดระโงก <i>Amanita</i> sp. MC188 ด้วยวิธี Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column ชะแบบ Stepwise concentration gradient โดยใช้ Sodium chloride 0-1M.....	71

สารบัญญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.32	ผลการทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายกับสารโปรตีนเล็กคินที่แยกบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก <i>Amanita</i> sp. MC188 ด้วยวิธี Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column.....	72
รูปที่ 3.33	สารโปรตีนเล็กคินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก <i>Amanita</i> sp. MC188 ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE.....	73
รูปที่ 3.34	Elution profiles จากการทำให้บริสุทธิ์สารโปรตีนเล็กคินจาก <i>Schizophyllum commune</i> MC322 ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B resin ะสารโปรตีนเล็กคินด้วย 1,3 Diaminopropane (DAP) ความเข้มข้น 5-15mM.....	74
รูปที่ 3.35	สารโปรตีนเล็กคินบริสุทธิ์จาก <i>Schizophyllum commune</i> MC322 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B resin และวิเคราะห์ห้มวลโมเลกุลด้วย SDS-PAGE.....	75
รูปที่ 3.36	Elution profile ของการทำให้บริสุทธิ์สารโปรตีนเล็กคินจากเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322 ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Resin ชนิด Mucin-Sepharose 4B เมื่อชะสารโปรตีนเล็กคินด้วยสารละลาย 20mM 2,3 Diamino-propane (DAP).....	75
รูปที่ 3.37	ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายกับสารเล็กคินบริสุทธิ์จาก <i>Schizophyllum commune</i> MC322 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B resin.....	76
รูปที่ 3.38	สารโปรตีนเล็กคินบริสุทธิ์จาก <i>Schizophyllum commune</i> MC322 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B resin และวิเคราะห์ห้มวลโมเลกุลด้วย SDS-PAGE.....	76
รูปที่ 3.39	ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ของสารเล็กคินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส.....	78
รูปที่ 3.40	ความเสถียรต่อความร้อนของสารเล็กคินบริสุทธิ์ของเห็ดรับประทานได้ 3 ชนิด จากปฏิกิริยา Hemagglutination โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย.....	80
รูปที่ 3.41	ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ของสารเล็กคินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 2-12.....	82

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 3.42 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างของสารเล็กตินบริสุทธิ์ของเห็ดรับประทานได้ บางชนิดที่ pH ในช่วง 2-12.....	83
รูปที่ 3.43 การแยกโปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์ของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ด้วย เทคนิค 2-Dimension Electrophoresis (2D-PAGE) ในช่วง pH 3.0-10.0.....	86
รูปที่ 3.44 การแยกโปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์ของเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322 ด้วยเทคนิค 2-Dimension Electrophoresis (2D-PAGE) ในช่วง pH 3.0-10.0.....	87
รูปที่ 3.45 ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) กับเซลล์ เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 โดยน้ำตาล 32 ชนิด.....	89
รูปที่ 3.46 ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์ เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดเห็ดระโงก <i>Amanita</i> sp. MC188 โดยน้ำตาล 32 ชนิด.....	92
รูปที่ 3.47 ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์ เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322 โดยน้ำตาล 32 ชนิด.....	95
รูปที่ 3.48 การทดสอบคุณลักษณะ Glycoprotein ของสารเล็กตินโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Periodic Acid Schiff (PAS) staining.....	97
รูปที่ 3.49 Tryptic peptides ของเล็กตินจากเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC133 ที่เปรียบเทียบ ด้วยการจัดตำแหน่ง (alignment) กับลำดับ Peptides คู่เทียบที่มีในฐานข้อมูล GenBank (U.S.A.).....	99
รูปที่ 3.50 ผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131 ในสภาวะ 5% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000 in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส.....	110
รูปที่ 3.51 ผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131 ในสภาวะสารละลาย 18% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether (PME) 2,000, 0.2M Ammonium sulfate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน และสารละลาย 26% (w/v) PME 2,000, 0.2M Ammonium sulfate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน.....	111

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.52	ผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131 ในสภาวะ 20% (w/v) Polyethylene glycol 20,000 in 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) (pH 6.5) และ 16% (w/v) Polyethylene glycol 20,000 in 0.1M MES monohydrate (pH 6.5).....	112
รูปที่ 3.53	ผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดแครง <i>Schizophyllum commune</i> MC322 จาก สารละลาย 18% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 0.2M Ammonium acetate in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6) และสารละลาย 14% (w/v) Polyethylene glycol 8,000, 0.2M Calcium acetate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5).....	113
รูปที่ 3.54	ผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131 ในสภาวะ 20% (w/v) Polyethylene glycol 20,000 in 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES), pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน และผลึกโปรตีนเล็กตินของ เห็ดฟาง MC131 ที่เลือกไปวิเคราะห์ห้ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์.....	115
รูปที่ 3.55	แบบแผนการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง <i>Volvariella volvacea</i> MC131.....	115

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

สืบเนื่องมาจากผลการดำเนินงานของโครงการวิจัยเรื่อง “เล็กตินของเชื้อรา” ที่คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2546 และ 2547 ทำให้เห็นแนวทางการใช้ประโยชน์สารเล็กติน (Lectins) จากเห็ดอย่างกว้างขวาง เล็กตินเป็นสาร Proteins หรือ Glycoproteins หรือ Multivalent carbohydrate-binding proteins มีความจำเพาะที่เรียกว่ามี Antibody-like carbohydrate-binding specificity และมีการใช้ประโยชน์ทั้งทางเภสัชวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน การแพทย์ และการเกษตร (Guillot and Kanska, 1997; Mo *et al.*, 2000; Oguri *et al.*, 1996; Pemberton, 1994; Weis and Drickamer, 1996) แหล่งของเล็กตินที่มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์คือฟิช กรณีเห็ด (Mushrooms) เป็นทางเลือกหนึ่งของแหล่งผลิตเล็กตินเพื่อให้ได้สารเล็กตินหรืออนุพันธ์ชนิดใหม่ที่มีศักยภาพสูง เห็ดยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญได้ดีในสภาพร้อนชื้นและให้ผลผลิตได้เร็วกว่าพืชมาก เห็ดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราหรือเห็ดรา (Fungi) มีการเจริญเป็นเส้นใย เมื่อถึงระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างโครงสร้างที่มีรูปร่างเป็นดอกเห็ด (Fruiting body) มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดอกเห็ดมีรูปร่างและสีแตกต่างกัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบ่งบอกถึงชนิดของเห็ดนั้น เห็ดรวมถึงเห็ดป่า (Wild mushroom) หลายชนิดรับประทานได้ตามภูมิปัญญาท้องถิ่น และจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (มีโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และวิตามิน ซึ่งมักพบว่ามีวิตามินบี 1 และบี 2 มากกว่าวิตามินชนิดอื่น ๆ) เห็ดหลายชนิดมีสรรพคุณทางยา งานวิจัยจากประเทศจีน และญี่ปุ่นแสดงให้เห็นชัดเจนว่าเห็ดมีประโยชน์ในการใช้เป็นยารักษาโรค มีผลในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคที่เกิดจากไวรัส โรคความดันโลหิตสูง โรคคอเลสเตอรอลในเลือดสูง และสามารถช่วยป้องกันการจับตัวกันของเกล็ดเลือด (Wang *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999)

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาสารเล็กตินที่ผลิตจากเห็ดที่พบเจริญในพื้นที่ป่าธรรมชาติในประเทศไทย พบว่าเล็กตินจากเห็ดเหล่านี้มีสมบัติหรือคุณลักษณะทางเคมี (Chemical characteristics) ที่ค่อนข้างหลากหลายคือมีทั้งแบบ Monomeric, Dimeric, Trimeric หรือแม้แต่ Tetrameric lectins ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 12 ถึง 160 กิโลดาลตัน (kDa) และมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ โดยส่วนคาร์โบไฮเดรตนี้เกี่ยวข้องกับความจำเพาะ (Specificity) ที่พบโดยส่วนใหญ่ได้แก่ Galactose, Lactose และ N-Acetylgalactosamine นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับเล็กตินจากเชื้อราในกลุ่มเห็ดหลายชนิด มีสมบัติที่น่าสนใจคือเป็น Antitumor และ Cytotoxic activity ต่อเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เห็ด *Agaricus bisporus*, *Boletus satanas*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Tricholoma mongolicum* และ *Volvariella volvacea* ซึ่งสำคัญมากต่อการนำไปสู่การพัฒนาและการออกแบบยา (Drug design) เพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็ง (Guillot and Kanska, 1997; Wang *et al.*, 1998, Chumkhunthod *et al.*, 2006)

อย่างไรก็ตามข้อมูลที่รวบรวมได้ถ้าไม่รวมผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยของโครงการนี้แล้ว มาจากการวิจัยเห็ดในต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ประเทศอังกฤษ จีน และญี่ปุ่น ที่ยังมีข้อมูลด้านการศึกษาทางชีวเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสารเล็กน้อยเมื่อเทียบกับที่มีการรายงานอย่างกว้างขวางในพืชที่ส่วนใหญ่เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาสารเล็กน้อยจากเชื้อราในกลุ่มเห็ด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดที่รับประทานได้ในประเทศไทยอย่างจริงจัง จากที่มีรายงานความหลากหลาย (Diversity) ของเห็ดในประเทศไทย (เกษม สร้อยทอง, 2537; อนงค์ จันทรศรีกุล, 2539; สุริลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2541, 2542 และ 2543) แสดงให้เห็นว่าเห็ดที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายของชนิดมากซึ่งเป็นผลโดยตรงจากสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ ความหลากหลายของชนิดของเห็ดอาจมีผลต่อความหลากหลายของชนิดและ/หรืออนุพันธุ์ของสารเล็กน้อยที่พบในเห็ดเหล่านั้น และน่าจะเป็นไปได้สูงที่จะพบสารเล็กน้อย/อนุพันธ์ (Derivatives) ของสารเล็กน้อยชนิดใหม่ๆ เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์

การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารเล็กน้อยจากเห็ดรับประทานได้ที่พบในประเทศไทยชนิดที่มีข้อมูลของสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสมบัติเพื่อการใช้ประโยชน์สารเล็กน้อย เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์ทรัพยากรจุลินทรีย์อย่างคุ้มค่าในอนาคตอันใกล้ อีกทั้งสามารถใช้ผลการวิจัยเพื่อให้ความรู้แก่ประชาชนผู้ใช้ประโยชน์เห็ดที่รับประทานได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้

- 1) เพื่อคัดเลือกและให้ได้ชนิดของสารเล็กน้อยจากเห็ดรับประทานได้ที่พบในประเทศไทยชนิดที่มีข้อมูลของสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งบางชนิดของคน และสมบัติเพื่อการใช้ประโยชน์สารอย่างชัดเจน
- 2) เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพ กายภาพ และคุณลักษณะทางเคมีของสารเล็กน้อยที่คัดเลือก
- 3) เพื่อให้ได้ข้อมูลของกรรมวิธีการทำบริสุทธิ์สาร โครงสร้างปฐมภูมิทางเคมี และกรรมวิธีการตกผลึกโปรตีนของสารเล็กน้อยจากเห็ดชนิดที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้ดำเนินการภายใต้ความร่วมมือของบุคลากรในสังกัดมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์ในกลุ่มเห็ดราของประเทศไทย การดำเนินงานเริ่มจากการคัดเลือกเห็ดรับประทานได้ให้ได้สองชนิดที่ผลิตสารเล็กน้อยโดยอาศัยข้อมูลที่ได้ศึกษาแล้วในโครงการเล็กน้อยของเชื้อรา (สุริลักษณ์ รอดทอง, 2551) และเก็บรวบรวม Fruiting body ของเห็ดจากแหล่งที่ได้มีการสำรวจแล้ว สกัดแยกสารเล็กน้อยในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract) ทำบริสุทธิ์สารเล็กน้อยโดยวิธี Chromatography ศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของสารเล็กน้อยที่พบ เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของสารเล็กน้อยและอนุพันธ์ของสารเล็กน้อยที่พบและเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ โดยศึกษาปฏิกิริยาการจับกลุ่มของ

เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ ถูกใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งบางชนิดของคน (ได้รับความอนุเคราะห์ทดสอบสารจาก ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ งานวิจัยสมุนไพรรักษา มะเร็งแห่งชาติ) ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง (pH) มวลโมเลกุล ความจำเพาะของสารต่อน้ำตาล คุณลักษณะ Glycoprotein โครงสร้างปฐมภูมิของเล็กติน การทดสอบกรรมวิธีการปลูกผลึกเล็กติน และปรับปรุงสถานะของการเกิดผลึก ทดสอบคุณภาพผลึกของเล็กตินโดยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนเล็กตินระดับทุติยภูมิ สรุปผลการวิจัยและเผยแพร่ผลงานวิจัยในวงการวิชาการและประชาชนผู้ใช้ประโยชน์

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย มีดังนี้

1) สารเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ที่พบในประเทศไทยและมีสมบัติโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเล็กติน ด้านความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน และสมบัติทางเคมีและกายภาพที่แตกต่างจากที่มีรายงานการศึกษาและมีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ทางการศึกษาและวิจัย ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม แตกต่างจากสารเล็กตินชนิดที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่นพืชซึ่งเป็นแหล่งผลิตเล็กตินที่สำคัญ อีกทั้งเห็ดยังเจริญได้รวดเร็วกว่าพืชมาก จึงมีโอกาที่จะผลิตสารในปริมาณมากในระยะเวลาสั้นได้

2) กรรมวิธีการทำบริสุทธิ์สาร โปรตีนเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ชนิดที่คัดเลือก ข้อมูลของโครงสร้างปฐมภูมิทางเคมีและกรรมวิธีการตกผลึกโปรตีนของสารเล็กตินจากเห็ดชนิดที่คัดเลือกรับนั้น เป็นพื้นฐานของการพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ประโยชน์จริงของสารสกัดเล็กตินที่พบในเห็ดที่รับประทานได้ชนิดที่ศึกษา

3) ผลสำเร็จในการศึกษาเพื่อหาแนวทางการใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ในกลุ่มเห็ดราของประเทศไทย ให้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจยิ่งขึ้น

4) ผลงานวิจัยที่เผยแพร่แก่สาธารณชน สถาบันการศึกษาสามารถใช้ผลการวิจัยนี้ในด้านการเรียนการสอน เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อเนื่อง และเป็นการบริการความรู้แก่ประชาชนเกี่ยวกับสารเล็กตินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและลักษณะเฉพาะของเล็กตินนั้นที่สะสมในดอกเห็ดรับประทานได้ที่พบในประเทศไทย

1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เล็กติน (Lectins) ซึ่งเป็นสารประเภท Proteins หรือ Glycoproteins หรือ Multivalent carbohydrate-binding proteins ที่มีความจำเพาะที่เรียกว่ามี Antibody-like carbohydrate-binding specificity ที่สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์ (Cell agglutination) และการตกตะกอน (Precipitation) ของ Glycoconjugated lectins และมีการใช้ประโยชน์ทั้งทางเภสัชวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน การแพทย์ และการเกษตร (Guillot and Kanska, 1997; Mo *et al.*, 2000; Oguri *et al.*, 1996; Pemberton, 1994; Weis and Drickamer, 1996) เล็กตินที่เป็นที่รู้จักโดยส่วนใหญ่ได้จากพืช เชื้อราในกลุ่มเห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มหนึ่งที่มีแนวโน้มสูงในการใช้เป็น

แหล่งผลิตสารเล็กดิน ตามที่มีรายงานมีการศึกษาในเบื้องต้นถึงสมบัติของเล็กดินจากเห็ดหลายชนิด ได้แก่ *Agaricus spp.*, *Amanita pantherina*, *Boletus satanas*, *Coprinus cinereus*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceum*, *Ischnoderma resinosum*, *Lactarius deterrimus*, *Lactiporus sulphureus*, *Tricholoma mongolicum* และ *Volvariella volvacea* ซึ่งมีทั้งเห็ดที่มีการเพาะเลี้ยงและพบการเจริญได้ในสภาพธรรมชาติ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาสารเล็กดินที่ผลิตจากเห็ดที่พบเจริญในพื้นที่ป่าธรรมชาติในประเทศไทย พบว่าเล็กดินจากเห็ดเหล่านี้มีสมบัติหรือคุณลักษณะทางเคมีที่ค่อนข้างหลากหลาย (สุริลักษณ์ รอดทอง, 2551; Chumkhunthod *et al.*, 2006) และมีคาร์โบไฮเดรตที่เกี่ยวข้องกับความจำเพาะที่เอื้ออำนวยต่อการใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเล็กดินจากเห็ด *Agaricus bisporus*, *Boletus satanas*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Tricholoma mongolicum* และ *Volvariella volvacea* มีสมบัติที่น่าสนใจคือเป็น Antitumor และ Cytotoxic activity ต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งสำคัญมากต่อการนำไปสู่การพัฒนาและการออกแบบยา (Drug design) เพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็ง (Guillot and Konska, 1997; Wang *et al.*, 1998, Chumkhunthod *et al.*, 2006)

ปัจจุบันงานวิจัยที่ศึกษาเล็กดินจากเห็ดยังไม่เป็นที่แพร่หลายทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย และมีข้อมูลด้านการศึกษาทางชีวเคมีและโครงสร้างของเล็กดินน้อยมากเมื่อเทียบกับที่มีการรายงานอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับเล็กดินจากสัตว์และพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชใบเลี้ยงคู่ และเนื่องจากเชื้อราในกลุ่มเห็ดที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงซึ่งเป็นผลโดยตรงจากสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ (เกษม สร้อยทอง, 2537; อนงค์ จันทรศรีกุล, 2539; สุริลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2541, 2542 และ 2543) ทำให้เป็นที่น่าสนใจว่า ความหลากหลายของเห็ดอาจมีผลต่อความหลากหลายของชนิดและ/หรืออนุพันธุ์ของเล็กดินที่พบในเห็ดเหล่านั้น และมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบเล็กดิน/อนุพันธุ์ของเล็กดินชนิดใหม่ๆ ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ จึงเป็นผลดีต่อการศึกษา ค้นคว้า และวิจัยเกี่ยวกับเล็กดินจากเห็ดที่พบในประเทศไทย ซึ่งเล็กดินที่พบอาจมีสมบัติและประโยชน์ที่แตกต่างจากที่มีรายงาน และมีประโยชน์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรักษาโรคมะเร็ง ปัจจุบันโรคมะเร็งนับเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั้งของประเทศไทยและของโลก โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประเทศไทย ถ้าไม่นับการเสียชีวิตเนื่องจากอุบัติเหตุ และมีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นทุกปี (Wibulpolprasert, 2002) การรักษาให้หายจากโรคมะเร็ง สามารถทำได้โดยการฉายรังสี (และต้องได้รับการรักษาเสริม ได้แก่ การให้ยาเคมีบำบัด) หรือการผ่าตัด (และต้องได้รับการรักษาเสริม ได้แก่ การให้ยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี) เป็นต้น เนื่องจากมะเร็งเป็นกลุ่มโรคที่มีความหลากหลายที่สาเหตุ ตำแหน่งของโรค ขนาดของการกระจายตัว ตลอดจนอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็ง จึงเป็นการยากที่จะหายาที่สามารถต้านมะเร็งได้ทุกชนิด จากปัญหาและข้อจำกัดดังกล่าวในการรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัดนั้นยังมีความต้องการหาสารใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นและที่สำคัญควรมีผลข้างเคียงต่ำกว่ายารักษามะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน

เห็ดจึงเป็นทางเลือกที่สำคัญของแหล่งผลิตสารเล็กดิน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพืช เห็ดสามารถเจริญและผลิตสารได้เร็วกว่าพืชมาก โครงการวิจัยนี้จึงเน้นการศึกษาเพื่อคัดเลือกและให้ได้ชนิดของสารเล็กดินจากเห็ดรับประทานได้ ที่พบในประเทศไทย ชนิดที่มีข้อมูลของสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้ง

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน และสมบัติทางเคมีและกายภาพเพื่อการใช้ประโยชน์สารอย่างชัดเจน พร้อมทั้งศึกษากลไกการทำให้เซลล์ตาย การกระตุ้นการตายของเซลล์ ตกผลึกโปรตีน และโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารเล็กคินที่คัดเลือก

1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เล็กคิน (Lectins) เป็นสาร Proteins หรือ Glycoproteins หรือ Multivalent carbohydrate-binding proteins มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ 0-18% โดยส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตนี้เกี่ยวข้องกับความจำเพาะ (Specificity) ซึ่งเป็นความจำเพาะที่เรียกได้ว่ามี Antibody-like carbohydrate binding specificity ที่สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์ (Cell agglutination) และการตกตะกอน (Precipitation) ของ Glycoconjugated lectins (Guillot and Kanska, 1997; Mo *et al.*, 2000; Oguri *et al.*, 1996; Pemberton, 1994; Weis and Drickamer, 1996) เล็กคินเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา (เห็ดรา) พืช และสัตว์ (Mo *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2000) และใช้ประโยชน์ทั้งทางเภสัชวิทยา วิทยาศาสตร์การแพทย์ และการเกษตร ปัจจุบันเล็กคินจัดเป็นสารชีวภาพที่มีความต้องการในการใช้ประโยชน์มากขึ้น พืชเป็นแหล่งของเล็กคินที่มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ และมีการศึกษาสารเล็กคินจากสัตว์ รวมทั้งมีรายงานการพบสารกลุ่มเล็กคินในจุลินทรีย์บางชนิดในกลุ่มแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส แต่ยังไม่มีการศึกษามากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในพืชและสัตว์

1.6.1 แหล่งของเล็กคิน

ดังกล่าวข้างต้น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์เป็นแหล่งของเล็กคินที่มีการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ เล็กคินจากพืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปโปรตีนสะสม (Storage protein) มีบทบาทในการป้องกันแมลง หรือเชื้อราที่มาทำลายต้นพืชหรือเมล็ดพืช เล็กคินในพืชตระกูลถั่วบางชนิด มีประโยชน์ต่อการอยู่ร่วมกันแบบ symbiosis ระหว่างพืชตระกูลถั่วกับแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ (Nitrogen-fixing bacteria) ในสัตว์เลือดอุ่น *N*-Acetylglucosamine-specific lectins จาก Macrophage มีความสามารถจับและทำให้เกิด Phagocytosis ของจุลินทรีย์แปลกปลอมที่บุกรุกเข้าร่างกาย β -Galactoside-specific lectins จากสัตว์มีบทบาทในการควบคุม differentiation และการสร้างอวัยวะต่างๆ นอกจากนี้เล็กคินยังมีบทบาทในการเคลื่อนย้าย (migration) ของ Lymphocytes ในเส้นเลือดไปสู่ Lymphoid organ และบทบาทใน metastasis ของเซลล์มะเร็ง (Reynolds *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998)

Ricin เป็นเล็กคินชนิดแรกที่พบเป็นโปรตีนที่ได้จากพืช Castor bean (*Ricinus communis*) และ Concanavalin A เป็นเล็กคินที่เป็นที่รู้จักกันดี ได้จากพืชตระกูลถั่ว Jack bean เล็กคินจากพืชตระกูลถั่วเหล่านี้โดยปกติประกอบด้วย Carbohydrate-binding site จำนวน 1 ตำแหน่ง หรือมากกว่า ที่เรียกว่า Carbohydrate recognition domains (CRD) (Rini, 1995; Lindhorst, 2000)

เล็กคินอาจจะทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะไฮโดรเจนหรือ metal coordination, Van der Waals หรือ hydrophobic interactions (Weis and Drickamer, 1996; Elgavish and Shaanan, 1997)

โดยทั่วไปกลุ่ม Hydroxyl บนโมเลกุลน้ำตาลสามารถเป็นทั้งตัวให้และตัวรับร่วมกับพันธะไฮโดรเจน (Elgavish and Shaanan, 1997) สมบัติหลักของเล็คตินที่ใช้อย่างกว้างขวางนั้นคือ เพื่อการตรวจหาสารและแสดงคุณลักษณะของกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemagglutination activity) (Lis and Sharon, 1998; Pusztai, 1991) อย่างไรก็ตาม เล็คตินหลายๆ ชนิด มีตำแหน่ง Binding site เพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาล ดังนั้นเล็คตินเหล่านี้จึงไม่สามารถเกิดการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (Peumans and Van Damme, 1995; Sharon and Lis, 1989)

โดยภาพรวมของโครงสร้างของเล็คตินจากพืชแบ่งออกได้เป็น 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 ตัวอย่างของเล็คตินในกลุ่มนี้ 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 เป็นเล็คตินชนิดที่เป็นที่รู้จักกันส่วนใหญ่ (Peumans and Van Damme, 1995) เนื่องจากมี Binding site หลายตำแหน่งจึงสามารถเกิดการจับกลุ่มของเซลล์หรือตกตะกอน Glycoconjugates ได้ และได้ชื่อว่าเป็น Hemagglutinins (Sharon and Lis, 1989; Pusztai, 1991)

พืชตระกูลถั่วและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเป็นแหล่งหลักของเล็คตินจากพืช ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง (Wood *et al.*, 1999) เล็คตินจากพืชวงศ์ถั่ว (Legume lectins) เป็นตัวแทนเล็คตินจากพืชที่มีการศึกษามากที่สุด แยกได้จากเมล็ด ลำต้น และเปลือกของลำต้น (bark) (Imberty *et al.*, 2000) เล็คตินจากพืชที่รู้จักกันดีที่สุดคือ Phytohemagglutinin (PHA) จาก Red kidney bean, Soybean (SBA), Jackbean (Concanavalin A), Peanut (PNA), และ Pea (PSL) (Lis and Sharon, 1998)

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

เล็คตินจากสัตว์พบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิดรวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น หอยทาก ปู และหอยกาบคู่ (Miarons and Fresno, 2000; Dodd and Drickamer, 2001) เล็คตินจากสัตว์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ C-type lectins และ S-type lectins (Frits and Gary, 2000) C-type lectins เป็น Calcium-dependent lectins เป็นกลุ่มเล็คตินจากสัตว์ที่พบมากที่สุด เล็คตินกลุ่มนี้มี Carbohydrate-binding activity ที่ขึ้นอยู่กับ Ca^{2+} และการทำงานของ Carbohydrate

recognition domains (CRD) เป็นคุณลักษณะเฉพาะของโครงสร้างของเล็กติน (Dodd and Drickamer, 2001) C-type lectins ยังประกอบด้วย 2 classes 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 เป็นเล็กตินที่ละลายได้และมี β -Galactose specific binding proteins ที่เรียกกันทั่วไปว่า Galectins (Frits and Gary, 2000; Gitt *et al.*, 1995) พบได้ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ พยาธิตัวกลม แมลง ฟองน้ำ เล็กตินกลุ่มอื่นจากสัตว์ได้แก่ 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 ทำหน้าที่เป็น Chaperones ในการควบคุมการสังเคราะห์ Glycoproteins ใน Secretory pathway (Hauri *et al.*, 2000; Dodd and Drickamer, 2001)

จุลินทรีย์ที่มีรายงานการสร้างเล็กตินได้แก่ 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) ระบุว่า Murine polyoma virus ซึ่งเป็น Non-enveloped symmetrical particle มีสารพันธุกรรมเป็น circular double-stranded DNA เป็นอีกแหล่งหนึ่งของเล็กตินจากไวรัส มีโครงสร้างที่ห่อหุ้ม Virion ประกอบด้วย 360 copies ของ Viral protein (VP1) เรียงกันแบบ pentamers แต่ละหน่วยของโปรตีนมี 2 Antiparallel β sheets คล้ายกับการม้วนพับของโครงสร้างเล็กติน (lectin fold)

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มที่สร้างสารประเภทเล็กตินได้แก่ *Escherichia coli*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Sharon and Lis, 1989) *Streptococcus sobrinus* และ *Streptococcus cricetus* มี Glucan-binding lectins ที่อยู่ร่วมกับ Cell surface ในปริมาณที่เทียบเท่ากับที่ปล่อยออกมาออกเซลล์ ซึ่งตรวจพบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Wu *et al.*, 1995)

เห็ดราหรือเชื้อรา (Fungi) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ได้รับความสนใจในการศึกษาถึงความสามารถในการผลิตสารเล็กติน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ด (Mushrooms) ซึ่งเป็นเชื้อราชั้นสูงที่มีขนาดใหญ่ (Macro-fungi) เนื่องจากมองเห็นโครงสร้างในระยะหนึ่งของวงจรชีวิตได้ด้วยตาเปล่า เห็ดหลายชนิดรับประทานได้ จัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (มีโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และวิตามิน ซึ่งมักพบว่ามียูตามินบี 1 และบี 2 มากกว่าวิตามินชนิดอื่นๆ) เห็ดหลายชนิดมีสรรพคุณทางยา งานวิจัยจากประเทศจีนและญี่ปุ่นแสดงให้เห็นชัดเจนว่าเห็ดมีประโยชน์ในการใช้เป็นยารักษาโรค มีผลในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคที่เกิดจากไวรัส โรคความดันโลหิตสูง โรคคอเลสเตอรอลในเลือดสูง และสามารถช่วยป้องกันการจับตัวกันของเกล็ดเลือด (Wang *et al.*, 1998b; Yu *et al.*, 1999) เล็กตินพบในเห็ดหลายสกุลในวงศ์ Hygrophoraceae

และ Strophariaceae ได้แก่ *Amanita*, *Mycena*, *Oudemansiella* และ *Agrocybe* เป็นต้น สารเล็กคินที่พบนี้อาจมีสมบัติทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ที่เรียกได้ว่าเป็นสาร Hemolysin เห็ดบางชนิดสามารถผลิตเล็กคินได้หลายอนุพันธ์ (Derivatives) ที่มีสมบัติใกล้เคียงกันมาก อาจแตกต่างกันเพียง Isoelectric point จึงเรียกว่าเป็น Isolectins หรืออาจมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน เช่น Lectin PCL-a, PCL-b และ PCL-c จากเห็ด *Pleurotus cornucopiae* นอกจากนี้ Lectin derivatives ที่สกัดได้จากเห็ดชนิดเดียวกันอาจแสดงสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น เล็กคินที่แยกได้จาก *Laccaria amethystea* เรียกว่า Lectin LAF สามารถจับกับ L-Fucose ขณะที่ Lectin LAL จับยังได้โดย Lactose เล็กคินทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันด้านโครงสร้างแม้ว่ามีความจำเพาะที่ต่างกัน (Guillot and Kanska, 1997)

1.6.2 สารเล็กคินจากเห็ดรา

ดังกล่าวข้างต้น เห็ดจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ได้รับความสนใจศึกษาถึงความสามารถในการผลิตสารเล็กคิน เล็กคินที่พบมีทั้งที่สะสมในดอกเห็ด (Fruiting body) บริเวณก้านดอก (Stalk/Carpophores) หมวก (Cap) และเส้นใย (Mycelium) ของเห็ด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด จากที่มีรายงานการศึกษาโดยใช้ เอนไซม์ และ Lectin rabbit antibody พบว่าบริเวณผนังเส้นใยของเห็ดหลายชนิดมีการสะสมของเล็กคินในปริมาณสูง และยังพบว่าปริมาณของเล็กคินที่พบในเห็ดขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของเห็ด อายุของเห็ด ฤดูกาลที่เก็บ และสถานที่ที่เกิด (มีการเจริญ) ของเห็ดนั้นๆ (Guillot and Kanska, 1997) จึงกล่าวได้ว่าเล็กคินมีบทบาทโดยตรงทางสรีรวิทยาต่อความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดราหรือเชื้อรากับสิ่งแวดล้อม โดยอาจจะเกี่ยวข้องกับการเจริญและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเชื้อรา เกี่ยวข้องกับการพักตัว และการสร้างโครงสร้างพิเศษต่างๆ ซึ่งเอื้ออำนวยต่อการเป็น Parasite ของเชื้อรา และการย่อยเศษไม้ที่เน่าเปื่อย เป็นต้น นอกจากนี้ เล็กคินยังเกี่ยวข้องกับการจดจำ (recognition) ด้านความจำเพาะกับพืชที่เกิดขึ้นในช่วงแรกของ Mycorrhization ของเชื้อราในกลุ่ม Mycorrhizal fungi เนื่องจากว่า Mycorrhizal fungus แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับ Host คือพืชที่เชื้อรานั้นๆ เจริญอยู่ด้วย ดังนั้นการที่เชื้อราสร้างเล็กคินต่างชนิดกัน ทำให้สามารถจดจำ Host ที่แตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตาม ในธรรมชาติอาจมีโมเลกุลของสารบางชนิดในดินที่มีความจำเพาะกับเล็กคินจากเชื้อรา และในขณะเดียวกันก็สามารถจับกับ Binding site ของ Host ทำให้เล็กคินไม่สามารถเข้าจับได้อีก จึงไม่เกิดการจดจำ เช่น สารประกอบในกลุ่ม Phenolic acids สามารถเปลี่ยนแปลง Receptor ที่บริเวณรากของต้นไม้ที่เป็นพืชอาศัย (Host tree) ได้ (Guillot and Kanska, 1997; Reynolds *et al.*, 2000)

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาสารเล็กคินที่ผลิตจากเห็ดที่พบเจริญในพื้นที่ป่าธรรมชาติในประเทศไทย พบว่า เล็กคินจากเห็ดเหล่านี้มีสมบัติหรือคุณลักษณะทางเคมี (Chemical characteristics) ที่ค่อนข้างหลากหลายคือมีทั้งแบบ Monomeric, Dimeric, Trimeric หรือแม้แต่ Tetrameric lectins ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 12 ถึง 160 กิโลดาลตัน และมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ โดยส่วนคาร์โบไฮเดรตนี้เกี่ยวข้องกับความจำเพาะ (Specificity) ที่พบโดยส่วนใหญ่มีความจำเพาะกับ Galactose, Lactose และ N-Acetylgalactosamine (Chumkhunthod *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเล็กคินจากจากเห็ดอีกหลายชนิด ได้แก่ *Agaricus bisporus*, *Boletus satanus*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Tricholoma mongolicum* และ *Volvariella volvacea* มีสมบัติที่น่าสนใจคือเป็น Antitumor และ Cytotoxic activities ต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งสำคัญมากต่อการนำไปสู่การพัฒนาและ

การออกแบบยา (Drug design) เพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคมะเร็ง (Guillot and Kanska, 1997; Wang *et al.*, 1998a, Chumkhunthod *et al.*, 2006)

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 สามารถยับยั้ง Mastocytoma D815 cells และต้านทานต่อ Sarcoma S-180 cells ที่เกิดในหนูได้ (Mo *et al.*, 2000) *Schizophyllum commune* ML078 มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 และต้านเซลล์มะเร็งของคนชนิดเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก (Human epidermoid carcinoma cells) ได้ดี (Chumkhunthod *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังได้มีการค้นพบ Clitocypin ซึ่งเป็น Lectin derivative จากเห็ด *Clitocybe nebularis* มีสมบัติเป็น Cysteine proteinase inhibitor ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาทางการแพทย์ (Brzin *et al.*, 2000)

สารเล็กตินจากเห็ดยังมีผลส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulator) ทำนองเดียวกับสารเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) โปรตีน (Proteins) อื่น และ พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides) Immunomodulator เหล่านี้พบได้ในเห็ด *Agaricus buberfescens*, *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Poria cocos* และ *Trametes versicolor* สารดังกล่าวข้างต้นผลิตได้โดยธรรมชาติจากเห็ดที่เพาะเลี้ยง จึงมีแนวโน้มที่จะผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อตอบสนองความต้องการใช้ประโยชน์ (Ei Enshasy and Hatti-Kaul, 2013)

สารเล็กตินตามที่มีรายงานส่วนใหญ่พบการสะสมในดอกเห็ด และยังพบเล็กตินสะสมในเส้นใย (Mycelial lectin) ดังเช่นจากเห็ด *Lentinus squarrosulus* สารเล็กตินที่พบนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa ให้ผลการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่ (A, B, O และ AB) และจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ที่ใช้ทดสอบ คือ แพะ (Goat) แกะ (Sheep) กระต่าย (Rabbit) และหมู (Pig) ผลการทดสอบได้ค่า Hemagglutination titer สอดคล้องกับ Neuraminidase treatment ของเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่ O จากการทดสอบ Carbohydrate inhibition พบว่าสารเล็กตินสามารถจับได้ดีกับ Mucin และ Asialofetuin สารบริสุทธิ์เล็กตินมี optimum pH สำหรับ lectin activity ในช่วง 6.5-8.0 และ optimum temperature เท่ากับ 25-30 องศาเซลเซียส มีความเสถียรที่ pH 7.0-7.5 แต่ทนอุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส สารเล็กตินดังกล่าวไวต่อ Ethylenediaminetetraacetic acid ที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของสารเล็กติน (Singh *et al.*, 2013)

1.6.3 การทำบริสุทธิ์และการตกผลึกสารเล็กตินจากเห็ดรา

ด้านการศึกษาโครงสร้างในเชิงลึกของสารเล็กติน Chumkhunthod *et al.* (2006) รายงานถึงความสำเร็จที่สามารถปลูกผลึกสารเล็กตินซึ่งสกัดจากเห็ด *Schizophyllum commune* ML078 ที่พบในประเทศไทยได้สำเร็จเป็นครั้งแรก ผลึกเล็กตินที่ได้ ให้แบบแผนการกระจายรังสีเอกซ์ที่มีการแจกแจงรายละเอียด 3 อังสตรอม และสารเล็กตินนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 66% กับสารเล็กตินของเห็ด *Marasmius oreades* (Grahm *et al.*, 2004)

Bovi *et al.* (2011) ศึกษาโครงสร้างของเล็กตินชนิดใหม่จาก Fruiting body ของเห็ด *Boletus edulis* ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ Malignant cell lines หลายชนิด และสามารถจับกับ Neoplastic cell-specific T-antigen disaccharide (Gal β 1-3GalNAc) เล็กตินจากเห็ด *Boletus edulis* นี้สกัดแยกและทำบริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Chitin column เป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบ Homotetramer ประกอบด้วยกรดอะมิโน 142 ลำดับในสายโมเลกุล เป็นสารโปรตีนในกลุ่มที่ละลายในน้ำเกลือ (Saline-soluble family ของ mushroom Fruiting body-specific lectins) มีโครงสร้างผลึกและโครงสร้าง 3 มิติ ที่ตรวจวัดด้วย X-ray diffraction ที่ 1.47 Å resolution มีความคล้ายกับโครงสร้างของเล็กตินที่สกัดจาก *Agaricus bisporus*

Jiang *et al.* (2012) รายงานการค้นพบสารเล็กตินชนิดใหม่จากเห็ด *Agrocybe aegerita* ให้ชื่อสารที่พบว่า AAL-2 สามารถสกัดแยกได้ด้วย Affinity chromatography ที่ใช้ GlcNAc (N-acetylglucosamine)-coupled Sepharose 6B หลังจาก Ammonium sulphate precipitation สาร AAL-2 มีขนาดมวลโมเลกุล 43.175 kDa สามารถจับได้ดีกับ Terminal non-reducing GlcNAc residues จึงจัดเป็น GlcNAc-binding lectins เช่นเดียวกับ Wheatgerm agglutinin และ *Griffonia simplicifolia* lectin-II สาร AAL-2 สามารถจับได้ดีกับผิวของ Hepatoma cells นำไปสู่การกระตุ้น Cell apoptosis เมื่อทดลองแบบ *in vitro* และยังมีผลเป็น Anti-hepatoma ที่ยับยั้งการเจริญของ Tumor ในหนูทดลอง

Liu and Wang (2013) รายงานการแยกเล็กตินชนิดใหม่จากเห็ด *Xerocomus spadiceus* โดยทดลองใช้ Ion exchange chromatography ด้วย DEAE-cellulose, Affinity chromatography ด้วย Affi-gel blue gel, Ion exchange chromatography ด้วย CM-cellulose และ Gel filtration โดย Fast protein liquid chromatography ด้วย Superdex 75 พบว่าสารเล็กตินไม่ยึดกับ DEAE-cellulose และ Affi-gel blue gel แต่จับบน CM-Sepharose สามารถกระตุ้น Mitogenic response ใน Murine splenocytes ได้ 4 เท่า มีความเสถียรถึง 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเล็กตินลดลง 25% ที่ 75 องศาเซลเซียส และสูญเสียกิจกรรมการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่ 80 องศาเซลเซียส กิจกรรมความเป็นเล็กตินคงที่ในสถานะที่มี Divalent (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} และ Mn^{2+}) chlorides ที่ความเข้มข้นของเกลือถึง 10mM มีความจำเพาะกับ Inulin เท่านั้นจากที่ทดสอบกับคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการ “การศึกษาลักษณะเฉพาะของเล็กดินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดที่รับประทานได้” นี้ ใช้สถานที่ปฏิบัติงานหลักคือ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (อาคารเครื่องมือ 2) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) พร้อมทั้งได้รับความอนุเคราะห์ทดสอบความเป็นพิษของสารเล็กดินต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดของคนจาก ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ ห้องปฏิบัติการงานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ครูภัณฑ์และวัสดุ-อุปกรณ์หลักที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัยของโครงการ มีดังนี้

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

2.1.1 ครูภัณฑ์

ครูภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังต่อไปนี้ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, Hirayama, Hirayama Manufacturing Corp., Japan) ตู้อบความร้อน (Hot air oven, 1375FX Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้เขี่ยจุลินทรีย์ (Laminar flow hood, CA-REV6, Clean Air, The Netherlands) ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส (Incubator, Shel Lab 1555, Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., Oregon, U.S.A.) ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ 4-12 องศาเซลเซียส (FOC225I Velp® Scientific, Progen Scientific Ltd., U.K.) สำหรับเก็บเชื้อและสารชีวภาพ ตู้แช่แข็ง (Freezer) -20 องศาเซลเซียส (HLLC-370 Heto, Heto-Holten, Denmark) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance, TC-205, Denver Instrument Company, Japan) เครื่องชั่งหยาบ (Pan balance, LB3200D Sartorius, Sartorius AG Göttingen, Germany) เครื่องตีปั่น (Blender; Waring Comercial, U.S.A.) เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer, C-MAG HS 7 IKAMAG®, IKA®-WERKE GMBH & CO. KG, Germany) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1245PC Shel Lab) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (CCMD 510 pH and conductivity meter, WPA, England), Freeze dryer (Heto Dry winner:DW 3, Denmark), Refrigerated microcentrifuge (Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Germany), High speed refrigerated centrifuge (Avanti 26 XPI, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., U.S.A.), Ultracentrifuge (45Ti rotor, L80 ultracentrifuge, Beckman Coulter), Heat box (WealTech Bioscience Co., Ltd., U.S.A.), Spectrophotometer (UV/VISIBLE GBC 916, Scientific Equipment Ltd., Australia และ Smartspec™ 3000, BioRad, U.S.A.), Fraction collector (Frac-920 Collection Fractor, GE Healthcare Life Science, U.S.A.), P-1 Peristaltic 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), Micropipette sets (Gilson Pipetman Products, Gilson, Inc., U.S.A.) กล้องถ่ายภาพภาคสนาม (Olympus, Camedia, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope, Olympus BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Japan), Stereo microscope (Stemi 2000-C, Zeiss, Carl Zeiss MicroImaging, Inc., U.S.A.), Gel filtration chromatography, Electrophoresis apparatus (Sub-Cell GT Mini, BioRad, U.S.A.), UV transilluminator พร้อมกล้องถ่ายภาพ (SynGene, Synopics Ltd., U.S.A.)

2.1.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

วัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้โดยภาพรวมมีดังนี้ เครื่องแก้วพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยา เครื่องพลาสติก และเครื่องแก้ว สำหรับบรรจุตัวอย่างสารสกัด ทดสอบสมบัติของสารเล็กดิน และเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อทดสอบสารเล็กดิน หลอดแก้วและพลาสติกชนิดทนต่อการแช่แข็ง ขวดฝาเกลียวขนาด บรรจุ 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่ทนความร้อนในการนึ่งฆ่าเชื้อ, Centrifuge tubes ขนาดบรรจุ 50 และ 250 มิลลิลิตร, Microcentrifuge tubes, Micropipette tips, อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อทดสอบความสามารถของ สารในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ Malt extract agar (Merck, Merck Ltd., Germany), Nutrient broth/Nutrient agar (Oxoid, Basingstoke, U.K.), Mueller-Hinton agar (Oxoid), เซลล์เม็ดเลือดแดงของ สัตว์สังเคราะห์จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สารเคมีระดับคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) ได้แก่ Ammonium peroxodisulphate (APS) (Univar, Ajax Chemicals, New Zealand), Ammonium sulphate (NH₄)₂SO₄, Poly(vinylpyrrolidone) (PVPP), Tris-Hydroxymethylamine (Sigma, Sigma-Aldrich Chemical Company, U.S.A.), Benzimidazole hydrochloride (98%) (Sigma), Magnesium chloride (MgCl₂ 1.5mM, QIAGEN, QIAGEN GmbH, Germany), Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA; Sigma), Ethanol (Merck), Lactophenol, Melzer's reagent, Periodic acid solution (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), Potassium hydroxide, Potassium chloride, Sodium chloride, Sodium dihydrogenphosphate (Sigma), Bromophenol blue (USB[™], Amersham Life Science, U.S.A.), bis-*N,N'*-Methylenebisacrylamide (Sigma), 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.), Bradford reagent (Pierce, PerBio, U.S.A), Sodium metabisulphite (J.T. Boker, Mallinckrodt Baker, Inc., U.S.A), Low molecular weight (LMW) standards (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, U.K.), Crystallization basic kit for proteins/commercial screening kit (Crystal Screen HR2-110, Crystal Screen HR2-112, Sigma-Aldrich), Resins (CNBr-activated Sepharose

4B, DEAE-Sapharose, Superdex 75), Ligands (Mucin type III partially purified from porcine stomach, N-Acetyl-D-galactosamine (GalNac) สำหรับ Affinity chromatography, Vivaspin ultrafiltration spin columns (Molecular weight cut-off 10 kDa, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยของโครงการเป็นไปตามลำดับขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.2.1 การคัดเลือกเห็ดที่ผลิตสารเล็กดินและเก็บรวบรวมดอกเห็ด (Fruiting body) ที่ยังมีความสด

คัดเลือกเห็ดรับประทานได้ให้ได้อย่างน้อยสองชนิดที่ผลิตสารเล็กดิน จากตัวอย่างเห็ดที่ได้ศึกษาแล้วไม่น้อยกว่า 300 ตัวอย่าง (Specimen) โดยอาศัยข้อมูลที่ได้ศึกษาแล้วจากโครงการวิจัยเล็กดินของเชื้อรา (สุรลักษณ์ รอดทอง, 2551) และเก็บรวบรวม Fruiting body ของเห็ดจากแหล่งที่ได้มีการสำรวจแล้ว ที่มีการสะสมของเล็กดินเพื่อสกัดสารเล็กดิน ตรวจสอบชนิดของเห็ดเพื่อยืนยันว่าเป็นตัวอย่างตามต้องการด้วยลักษณะทางสัณฐานที่สำคัญคือ Fruiting body และ Basidiospores (Arora, 1986; Alexopoulos *et al.*, 1996; Læssøe and Conte, 1996; Hawksworth, 1993; Turnbull and Watling, 1999a, 1999b; Watling, 2003) ตรวจสอบโครงสร้างรองรับ (spore-bearing) ของดอกเห็ดโดยตัดส่วน gill หรือ pore ตามขวางด้วยใบมีดโกน วางชิ้นตัดขวางของเห็ดลงบนแผ่นแก้วสไลด์ หยดสารละลายสารไอสารหนึ่งดังนี้ 10% Ammonium hydroxide (ภาคผนวก ก2) Melzer's reagent (ภาคผนวก ก11) หรือ Lactophenol (ภาคผนวก ก8) ศึกษาโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง

2.2.2 การสกัด/แยกสารเล็กดินในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract)

สกัด/แยกเล็กดินในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract) เพื่อทดสอบหาเล็กดินที่สะสมในโครงสร้างของเห็ด (สุรลักษณ์ รอดทอง, 2551) โดยนำ Fruiting body ของเห็ดสด มาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง พิจารณาจากปริมาณความชื้นและขนาดของตัวอย่าง จากนั้นบดตัวอย่างเห็ดแห้งด้วยเครื่องตีปั่น (Blender) เป็นเวลาประมาณ 1-5 นาที ที่ความเร็วสูงสุด โดยปั่นหยุดเป็นช่วงทุกๆ 30 วินาที สกัดสารเล็กดินจากผงแห้งของดอกเห็ดด้วยการเติมสารละลาย 0.01M Phosphate buffer saline (PBS pH 7.4, ภาคผนวก ก13) ที่มี 0.02M Sodium bisulphite ให้ได้ความเจือจาง 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Poly(vinylpyrrolidone) (PVPP) ปริมาณ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อดูดซับ Polyphenolic substances ที่อาจปนเปื้อนในดอกเห็ด กวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น เพื่อแยกกากที่มีขนาดใหญ่ออกแล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ซึ่งเรียกว่าสารสกัดหยาบ (Crude extract) เพื่อใช้ทดสอบหาเล็กดินที่สะสมในโครงสร้างของเห็ด การทำบริสุทธิ์สารเล็กดิน และทดสอบสมบัติและคุณลักษณะของสารเล็กดิน

2.2.3 การทำบริสุทธิ์สารเล็กดิน

ทำบริสุทธิ์สารเล็กดินโดยอาศัยผลงานวิจัยพื้นฐานและจากเอกสารอ้างอิง (Chumkhumtod *et al.*,

2006; Wang *et al.*, 2005) เริ่มจากการตกตะกอนสารละลายโปรตีนเล็กคินด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (ตารางผนวกที่ 1) ตามด้วยวิธี Chromatography โดยทดลองใช้ Ion exchange chromatography, Affinity chromatography และ Gel filtration chromatography ตามวิธีการดังนี้

2.2.3.1 การตกตะกอนโปรตีนเล็กคินด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

จากสารสกัดหยาบโปรตีนเล็กคิน นำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในปริมาณ 10-100% (ตารางผนวกที่ 1) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บั่นแยกตะกอนของโปรตีนเล็กคิน ออกจากส่วนน้ำใส หากสารเล็กคินที่ศึกษามีความเข้มข้นต่ำควรบั่นแยกตะกอนด้วยเครื่อง Ultracentrifuge (45Ti rotor, L80 ultracentrifuge, Beckman Coulter, U.S.A.) ที่ความเร็ว 35,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายใสที่ได้ไปแยกเกลือออกด้วย Dialysis bag ใช้ Cellulose acetate dialysis-tubing membrane ที่มี Molecular weight cut-off สอดคล้องกับขนาดโมเลกุลของโปรตีนเล็กคินที่ต้องการแยก เช่น ที่ 10 กิโลดาลตัน (kDa) เตรียมให้สารละลายโปรตีนเล็กคินให้อยู่ใน 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.3; ภาคผนวก ก29) ก่อนนำไปแยกโดยวิธี Chromatography ซึ่งอาจใช้ Ion exchange chromatography ชนิด Anion exchange หรือ Cation exchange หรือ Affinity chromatography ดังนี้

2.2.3.2 Ion exchange chromatography ชนิด Anion exchange chromatography ด้วย

Diethylaminoethyl cellulose (DEAE)-Sephacolumn

เปลี่ยนบัฟเฟอร์ของสารละลายโปรตีนเล็กคินที่ผ่าน Dialysis ด้วย Vivaspin ultrafiltration spin column (Molecular weight cut-off 10 kDa, GE Healthcare) ที่ 4 องศาเซลเซียส ใน 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.3; ภาคผนวก ก29) เพื่อให้สารละลายโปรตีนเล็กคินอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำบริสุทธิ์ด้วย DEAE-sephacolumn บรรจุสารละลายโปรตีนเล็กคินลง DEAE-sephacolumn ขนาด 1.5×11 เซนติเมตร (โดย 9 มิลลิลิตร เท่ากับ 1 column volume) Equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) และล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ใช้ปริมาตร 27 มิลลิลิตร (3 column volumes) จะโปรตีนออกแบบ Stepwise concentration gradient ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) ตั้งแต่ 0-1M อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ปริมาตร 18 มิลลิลิตร (2 column volumes) ในแต่ละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เก็บ Fraction ละ 1 มิลลิลิตรต่อหลอด นำทุก Fraction ที่เก็บได้จากการแยก ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร และทดสอบกิจกรรมของสารเล็กคินด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดที่เหมาะสม (วิธีตามข้อ 2.2.4.1) นำ Fraction ที่มีกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนเล็กคินที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยใช้วิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เก็บรวบรวม Fraction ที่มีกิจกรรมของสารเล็กคิน นำไปกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่อยู่ในสารละลายโปรตีนเล็กคินโดยใช้ Vivaspin ultrafiltration spin column (Molecular weight cut-off 10 kDa, GE Healthcare) ที่ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยนบัฟเฟอร์ของสารละลายโปรตีนเล็กคินให้อยู่ใน 10mM Tris-

HCl buffer (pH 8.0; ภาคผนวก ก31) นำไปหามวลโมเลกุลในสภาพธรรมชาติของโปรตีนเล็กคินด้วย Gel filtration chromatography และปลูกผลึกเล็กคิน

2.2.3.3 Cation exchange chromatography ด้วย CM-Sepharose column

เปลี่ยนบัฟเฟอร์ของสารละลายโปรตีนเล็กคินที่ผ่าน Dialysis ด้วย Vivaspin ultrafiltration spin column (Molecular weight cut-off 10 kDa, GE Healthcare) ที่ 4 องศาเซลเซียส ให้อยู่ในบัฟเฟอร์ 10mM Ammonium acetate (NH_4OAc) (pH 4.5; ภาคผนวก ก1) เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำบริสุทธิ์สารเล็กคินด้วย CM-Sepharose column นำสารละลายโปรตีนบรรจุลง CM-Sepharose column ขนาด 1.5×11 เซนติเมตร (โดย 9 มิลลิลิตร เท่ากับ 1 column volume) Equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Ammonium acetate (pH 4.5) และล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Ammonium acetate (pH 4.5) ใช้ปริมาตร 27 มิลลิลิตร (3 column volumes) อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ชะโปรตีนออกแบบ Stepwise concentration gradient ด้วยสารละลาย 10mM Ammonium acetate (pH 4.5) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) ตั้งแต่ 0-1M ใช้ปริมาตร 18 มิลลิลิตร (2 column volumes) ในแต่ละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เก็บ Fraction ละ 1 มิลลิลิตรต่อหลอด และนำทุก Fraction ที่เก็บได้จากการแยกไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และนำไปทดสอบกิจกรรมของสารเล็กคินต่อการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดที่เหมาะสม นำ Fraction ที่มีกิจกรรมของสารเล็กคินมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนเล็กคินด้วยวิธี SDS-PAGE เก็บรวบรวม Fraction ที่มีกิจกรรมของสารเล็กคิน และนำไปกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่อยู่ในสารละลายโปรตีนเล็กคินโดยใช้ Vivaspin ultrafiltration spin column (Molecular weight cut-off 10 kDa, GE Healthcare) ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเปลี่ยนบัฟเฟอร์ของสารละลายโปรตีนเล็กคินให้อยู่ใน 10mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) เพื่อหามวลโมเลกุลในสภาพธรรมชาติของโปรตีนเล็กคินด้วย Gel filtration chromatography และใช้เพื่อการปลูกผลึกเล็กคิน

2.2.3.4 Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B column

นำสารละลายโปรตีนเล็กคินที่ผ่านการ Dialysis แล้วมาบรรจุลงใน Mucin-Sepharose 4B column ขนาด 1.5×6 เซนติเมตร (โดย 3.5 มิลลิลิตร เท่ากับ 1 column volume) อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที Equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 8.0; ภาคผนวก ก31) ที่มี 1mM Calcium chloride (CaCl_2), 1mM Magnesium chloride (MgCl_2) และ 1mM Benzamidine ชะสารละลายโปรตีนเล็กคินออกด้วย 20mM 1,3 Diaminopropane (DAP) เก็บ Fraction ละ 1 มิลลิลิตรต่อหลอด นำ Fraction ที่เก็บได้มาปรับ pH ให้เป็นกลางทันทีด้วยสารละลาย 1M Tris-HCl (pH 7.0; ภาคผนวก ก27) ใช้ปริมาตร 0.142 มิลลิลิตรต่อปริมาตรของสารละลายที่ชะได้จากคอลัมน์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำทุก Fraction ที่ปรับ pH แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร และนำไปทดสอบกิจกรรมของสารเล็กคินต่อการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย นำ Fraction ที่มีกิจกรรมของสารเล็กคินมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนเล็กคินที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยใช้วิธี SDS-PAGE

2.2.3.5 Gel filtration chromatography

เพื่อหามวลโมเลกุลในสภาพธรรมชาติของโปรตีนเล็กดิน นำสารโปรตีนเล็กดินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย Chromatography ดังกล่าวข้างต้นมาใส่ใน Superdex 75 column ขนาด 1×30 เซนติเมตร ซึ่งต่ออยู่กับเครื่อง ÄKTA purifier system (Amersham Biosciences, New Jersey, U.S.A.) อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที Equilibrate คอลัมน์และชะสารละลายโปรตีนเล็กดินออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) ที่มี 100mM NaCl เก็บ Fraction ละ 0.5 มิลลิลิตรต่อหลอด และนำทุก Fraction ที่เก็บได้จากการแยกไปทดสอบกิจกรรมของสารเล็กดินต่อการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดที่เหมาะสม นำ Fraction ที่มีกิจกรรมของสารเล็กดินมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนเล็กดินที่ทำบริสุทธิ์ได้ด้วย SDS-PAGE ใช้ Gel filtration calibration kit low molecular weight (GE Healthcare) เป็นสารโปรตีนมาตรฐานสำหรับหามวลโมเลกุลของโปรตีนเล็กดิน

2.2.4 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กดินที่พบ

การศึกษสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กดิน เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของเล็กดินและอนุพันธ์ของเล็กดินที่พบ และเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ โดยศึกษาดังนี้

2.2.4.1 ปฏิกริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์

ทดสอบสมบัติทางชีวภาพด้านการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ของสารเล็กดิน เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของสารและอนุพันธ์ของสารเล็กดินที่พบ และเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ โดยนำสารละลายโปรตีนเล็กดินมาเจือจางเป็นลำดับ (Serial dilution) แบบ Two-fold ด้วยสารละลาย 0.01M Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4; ภาคผนวก ก15) ทดสอบปฏิกริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดที่เหมาะสมจากข้อมูลของผลการศึกษาจากโครงการวิจัยเล็กดินของเข็วรา (สุรลักษณ์ รอดทอง, 2551) เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้เก็บรักษาใน 8% Sodium citrate ก่อนใช้ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง 3 ครั้ง ด้วย 0.01M PBS (pH 7.4; ภาคผนวก ก15) และเตรียมสารละลาย 2% ของเซลล์เม็ดเลือดแดงในสารละลาย 0.01M PBS (pH 7.4) ปิเปตสารสกัดเล็กดินที่เจือจางเป็นลำดับแบบ Two-fold สารสกัดละ 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม (well) ของ Microtiter plate (130×85×15 มิลลิเมตร) ที่ประกอบด้วย 8×12 wells ลักษณะ U-shaped bottom ทำการทดลองสองซ้ำ จากนั้นเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจือจาง 2% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดเล็กดิน ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เติม 0.01M PBS (pH 7.4; ภาคผนวก ก15) เป็นการทดลองควบคุม (Control) บ่ม Microtiter plate ที่บรรจุสารทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง บันทึกผลบวกของการจับกลุ่มซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกันเป็นสีแดงปกคลุมที่ก้นหลุมของ Microtiter plate ผลพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมดตกลงอยู่ที่ก้นหลุม เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นเป็นจุดสีแดง เซลล์เม็ดเลือดอาจเกิดการแตกสลาย (Hemolysis) เนื่องจากสารสกัดเล็กดินทำให้สารละลายที่มีเซลล์เม็ดเลือดนั้นมีลักษณะใส บันทึกค่า Hemagglutination titer ซึ่งคือส่วนกลับของค่าของความเจือจางสูงสุดที่แสดงการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

เลือกสารสกัดจากเห็ดที่แสดงค่า Hemagglutination titer สูง เพื่อประมาณปริมาณ โปรตีนทั้งหมดในสารสกัดของเชื้อราที่แสดงสมบัติของเเล็กตินด้วยวิธี Bradford (1976) ใช้ Bovine serum albumin เป็นสารละลายมาตรฐาน ค่า Hemagglutination titer มีค่าเท่ากับ 1 Hemagglutination unit คำนวณค่า specific activity เป็นจำนวนของ Hemagglutination unit ต่อมิลลิกรัม โปรตีน

2.2.4.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด และเชื้อราบางชนิดด้วย Agar disc diffusion method ตามวิธีของ Murray *et al.* (1999) สารละลายโปรตีนที่ใช้ทำให้หลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง (0.45 ไมโครเมตร) ปลอดเชื้อ การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มีวิธีการดังนี้

ก. แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารเเล็กตินมี 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (ภาคผนวก ข4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจาง Suspension ของเซลล์ด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4; ภาคผนวก ก15) ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland scale 0.5 (ภาคผนวก ก9) ซึ่งมีปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ จากนั้นใช้ Cotton swab ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อจุ่ม Suspension ของเซลล์ป้าย (swab) ลงบนผิวอาหาร Mueller-Hinton agar (ภาคผนวก ข3) เป็นระนาบ 3 ระนาบ (Three dimension swab) ให้ทั่วผิวหน้า นำสารละลายโปรตีนเเล็กตินปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดบน Paper disc (6 mm in diameter, Whatman, U.K.) ปลอดเชื้อ วาง Paper disc บรรจุสารเเล็กตินลงบนผิวอาหารที่ป้ายเชื้อแล้ว บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (มิลลิเมตร) โดยวัดคัลอัม Paper disc และหาค่าเฉลี่ย บันทึกผลการทดลอง ใช้สารปฏิชีวนะมาตรฐาน Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ Disc เป็นการทดลองควบคุม (Positive control)

ข. เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบสมบัติของสารเเล็กตินในการยับยั้งการเจริญมี 5 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Candida albican* ATCC 10231, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896 และ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 เลี้ยงเชื้อราที่นำมาทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract broth (ภาคผนวก ข1) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Cotton swab จุ่ม Suspension ของเชื้อที่ได้ปริมาณเชื้อ 10^7 เซลล์หรือสปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ ป้ายลงบนผิวอาหาร Malt extract agar (ภาคผนวก ข2) เป็น 3 ระนาบ (Three dimension swab) ให้ทั่วผิวหน้า จากนั้นนำสารละลายโปรตีนเเล็กตินปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาหยดบน Paper disc (6 mm in diameter, Whatman) ปลอดเชื้อ และนำมาวางลงบนผิวอาหารที่ป้ายเชื้อแล้ว นำไป

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ใช้สารปฏิชีวนะมาตรฐาน Nystatin (100 units) เป็นการทดลองควบคุม (Positive control)

2.2.4.3 ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ก. ความร้อน

ทดสอบความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดดินด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Otta *et al.* (2002) และ Freire *et al.* (2002) โดยนำสารละลายโปรตีนเล็กดินที่คัดเลือกความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย PBS (0.01M pH 7.2; ภาคผนวก ก16) มาบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่ 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้สารสกัดที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นการทดลองผลบวกควบคุม (Positive control) เมื่อครบเวลาแล้ว ทำใหเย็นอย่างรวดเร็วด้วยน้ำเย็น นำไปปั่นแยกตะกอนออก จากนั้นทดสอบกิจกรรมของสารสกัดดินที่ยังเหลืออยู่ใน Supernatant ด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดที่เหมาะสม หาค่า Hemagglutination titer เทียบกับสารสกัดเล็กดินชุดควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสความร้อนระดับที่ศึกษาซึ่งมีค่า Hemagglutination titer คิดเป็น 100%

ข. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยนำสารสกัดเล็กดินมาปรับค่า pH ระดับ 2-12 ด้วย 50mM Glycine-HCl buffer (pH 2.0-3.0; ภาคผนวก ก6), 50mM Sodium acetate buffer (pH 4.0-5.0; ภาคผนวก ก23), 50mM Phosphate buffer (pH 6.0-7.0; ภาคผนวก ก16) 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0-8.5; ภาคผนวก ก32) และ 50mM Glycine-NaOH buffer (pH 9.0-11.0; ภาคผนวก ก7) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปรับสภาพของสารสกัดหยาบเล็กดินให้เป็นกลาง แล้วทดสอบกิจกรรมของสารสกัดดินที่ยังเหลืออยู่ด้วยการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดที่เหมาะสม คำนวณกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดที่เหมาะสม ของสารสกัดดินที่ยังเหลืออยู่โดยเทียบกับสารสกัดดินที่ไม่ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (คิดเป็น 100%)

2.2.4.4 ความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดดินต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ตาม Mosmann (1983) และ Wilson (2000) ที่อาศัยปฏิกิริยาในไมโทคอนเดรียรีดิวซ์สาร MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็น Tetrazole ชนิดหนึ่งที่มีสีเหลือง เมื่อถูกรีดิวซ์เกิดเป็นสีม่วงของ Formazan ในไมโทคอนเดรียของเซลล์สิ่งมีชีวิต เดิม solubilization solution (ใช้ Dimethyl sulfoxide ในสารละลาย Hydrochloric acid) เพื่อละลายสารสีม่วงที่ไม่ละลายที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีในสารละลายนี้ที่ความยาวแสง 500 และ 600 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer ในขั้นตอนนี้ได้ความอนุเคราะห์ในการดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยสมุนไพร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ภายใต้การดูแลของ ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบเป็นเซลล์มะเร็งของคนที่ได้ง่ายในประเทศไทย 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line, HeLa) และเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (Human epidermoid carcinoma cell line, KB) พร้อมทั้งเซลล์ปกติ 1 ชนิด คือ เซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney epithelial cell line, Vero) โดยเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการ Trypsinized แล้วต่อใน Microtiter plate (130×85×15 มิลลิเมตร) ที่ประกอบด้วย 8×12 wells ลักษณะ Flat bottom ในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ (5% CO₂) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในแต่ละหลุม (well) ของ Microtiter plate มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 3,000 เซลล์ ต่อ 90 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิเปตสารสกัดหยาบเล็กดินหรือสารสกัดดินบริสุทธิ์ที่เจือจางเป็นลำดับแบบ Ten-fold ด้วย Phosphate buffer saline (PBS pH 7.4; ภาคผนวก ก14) สารสกัดละ 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ Microtiter plate ที่เลี้ยงเซลล์ไว้ ทำการทดลองหกซ้ำ บ่มในตู้ที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ถ่ายอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ออก เติมสารละลาย MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออก แล้วเติมสารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader ชุดควบคุมที่ไม่มีสารละลายโปรตีนเล็กดินใช้เป็น Negative control และชุดควบคุมที่มี Adriamycin 100 ไมโครโมลาร์ เป็น Positive control โดยค่า IC₅₀ (50% Inhibition concentration) คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งค่า IC₅₀ มาตรฐานของสารสกัดหยาบที่สามารถทำลาย/ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC₅₀ มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.4.5 มวลโมเลกุล และ Isoelectric point (pI)

หามวลโมเลกุลของโปรตีนเล็กดินโดยวิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Bollag *et al.*, 1996) ด้วยสารละลายตามภาคผนวก ก17-ก25 และ Gel filtration chromatography และวิเคราะห์หา Isoelectric point (pI) นำสารละลายโปรตีนเล็กดินที่บริสุทธิ์มาแยกโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 มิติ (2 Dimension Electrophoresis) โดยทำการแยกโปรตีนในระนาบที่ 1 บนเครื่องแยก IEF ด้วย Drystrip ขนาด 7 เซนติเมตร ในช่วง pH 3.0-10.0 (GE Healthcare) ซึ่งแยกโปรตีนตามประจุ pI (First dimensional isoelectric focusing gel, IEF) จากนั้นแยกโปรตีนในระนาบที่ 2 โดยใช้ SDS-PAGE ซึ่งแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล (Gel casting second dimension SDS-PAGE) และย้อมสีโปรตีนในเจลด้วย Silver staining ถ่ายภาพเจล นำไปแปลผลกับโปรแกรม (Gels Scan) การหามวลโมเลกุลของเล็กดินจากเชื้อราในขั้นตอนนี้ใช้ Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่ใช้ 17.5% Polyacrylamide gel (ภาคผนวก ก 17, ก19 และ ก21-22) ด้วยวิธีการตาม Laemmli (1970) ย้อม Gel ด้วย Coomassie brilliant blue (ภาคผนวก ก24.1) หาน้ำหนักโมเลกุลของเล็กดินโดยเทียบการเคลื่อนที่กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

มาตรฐาน และใช้ Tricine-SDS-PAGE gel electrophoresis (ภาคผนวก ก25) เพื่อช่วยในการแยกเล็กตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก (ระหว่าง 5 ถึง 20 kDa) วิธีการทำนองเดียวกับ SDS-PAGE แต่ใช้ Tricine แทน Glycine

2.2.4.6 ความจำเพาะของสารต่อน้ำตาล

น้ำตาลที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะของสารเล็กติน ได้แก่ *N*-Acetyl-D-Galactosamine (GalNAc), 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, D-Adonitol, Amygdalin, L-Arabinose, Cellobiose, Esculin, Fructose, Fucose, D-Galactose, D-Glucose, Inositol, Inulin, Lactose, Lactitol, Maltose, Mannitol, D-Mannose, D-Melezitose, Melibiose, Methyl- α -D-galactopyranoside, Methyl- β -D-galactopyranoside, 4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, 4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Salicin, Sorbitol, Trehalose, D-Turanose, และ D-Xylose เจือจางน้ำตาลที่ใช้ทดสอบปริมาณ 25 ไมโครลิตร เป็นลำดับแบบ Two-fold ด้วย 0.04M Phosphate buffer saline (PBS pH 7.4; ภาคผนวก ก16) ในหลุมของ Microtiter plate (130×85×15 มิลลิเมตร) ที่ประกอบด้วย 8×12 wells ลักษณะ U-shaped bottom ทำการทดลองสองซ้ำ ปิเปตสารเล็กตินที่ปรับความเข้มข้นปริมาณ 25 ไมโครลิตร มาผสมกับน้ำตาล นำ Microtiter plates ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ที่เหมาะสม ที่เจือจาง 2% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน Microtiter plate ที่มีสารเล็กตินผสมกับน้ำตาล ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ที่เติม 0.01M PBS (pH 7.4; ภาคผนวก ก16) เป็นการทดลองควบคุม (control) บ่ม Microtiter plates ที่บรรจุสารทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง บันทึกผลบวกของการจับกลุ่มซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกันเป็นสีแดงปกคลุมที่ก้นของ Microtiter plate ผลพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมดตกลงอยู่ที่ก้นหลุม บันทึกค่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่แสดงการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) กับเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย

2.2.4.7 คุณลักษณะ Glycoprotein

ทดสอบคุณลักษณะ Glycoprotein ของสารเล็กตินโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Periodic Acid Schiff (PAS) staining (ภาคผนวก ก13) ตามวิธีการที่ระบุโดย Fukuda and Kobata (1993) โดยนำสารเล็กตินบริสุทธิ์มาแยกด้วย 12.5% SDS-PAGE จากนั้นแช่แผ่นเจลใน 12.5% Trichloroacetic acid (TCA) เป็น fixation solution (ภาคผนวก ก13.1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อตรึงโปรตีนให้อยู่กับที่และป้องกันการแพร่กระจายของโปรตีนแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 15 วินาที แล้วนำแผ่นเจลไปแช่ใน 1% Periodic acid (Amersham Pharmacia Biotech) เป็นเวลา 50 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วจึงแช่แผ่นเจลใน Fuchsin-sulphite solution ในที่มืด เป็นเวลา 50 นาที ล้างสีที่ไม่ได้จับกับไกลโคโปรตีนด้วย 0.5% Sodium metabisulphite (ภาคผนวก ก13.2) 3 ครั้งๆละ 10 นาที จะเห็นเป็นสีเหลือง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งไม่มีสี จากนั้นนำแผ่นเจลวางลงใน Schiff's reagent (Amersham Pharmacia Biotech) และบ่มจนกระทั่งแถบสีแดงของคาร์โบไฮเดรตปรากฏขึ้น โดยปกติจะปรากฏหลังจาก 2 ชั่วโมง กำจัด reagent ส่วนเกินด้วย Destaining solution β 2 glycoprotein I (Amersham Pharmacia Biotech) และใช้

Ribonuclease B (Sigma-Aldrich, U.S.A.) เป็นผลบวกควบคุม (Positive control) ถ่ายรูปทันที และเก็บแผ่นเจลไว้ใน 7% Acetic acid

2.2.4.8 โครงสร้างปฐมภูมิของเล็กติน

นำสารละลายโปรตีนเล็กติน ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตัดแถบของโปรตีนที่สนใจมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Shevchenko *et al.*, 1996) วิเคราะห์เปปไทด์ที่ย่อยได้ด้วยเครื่อง Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (Bruker nanoLC-HCTultra system) โดยเทคนิค MS/MS ion search และฐานข้อมูล MASCOT (<http://www.matrixscience.com>)

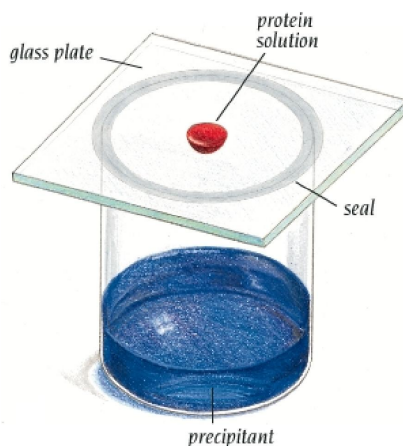
2.2.4.9 การทดสอบกรรมวิธีการปลูกผลึกเล็กติน

ก. การทดสอบหาสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดผลึก

นำเล็กตินที่บริสุทธิ์มาทดสอบหาสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดผลึก (crystallization) ด้วย Commercial screening kit ซึ่งเป็นชุดสารละลายสำเร็จรูป Crystallization Basic Kit for Proteins คือ Crystal Screen HR2-110 และ Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research, California, U.S.A.) การทดสอบเบื้องต้นใช้การปลูกผลึกด้วยวิธี Microbatch เป็น Microbatch under oil โดยเปิดสารละลายทดสอบปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในช่องของ Microwell plate (NUN™, NordicCell, Denmark) ขนาด 60×80×10 มิลลิเมตร ที่ประกอบด้วย 6×10 wells ลักษณะก้นแบบราบ (Flat bottom) ที่มี Mineral oil ปริมาตร 5 ไมโครลิตร อยู่ในหลุม (well) จากนั้นเปิดสารเล็กตินบริสุทธิ์ 1 ไมโครลิตร ลงใน well บ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส สังเกตการเกิดผลึกภายใต้ Stereo microscope และวิเคราะห์คุณภาพของผลึกอย่างต่อเนื่องทุกวันในสัปดาห์แรก หลังจากหนึ่งสัปดาห์ผ่านไปให้สังเกตและบันทึกสัปดาห์และครั้ง และหลังจากหนึ่งเดือนผ่านไปให้สังเกตและบันทึกเดือนละครั้ง

ข. การปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึก

ปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึก ได้แก่ ความเข้มข้นของโปรตีน ความเข้มข้นและ pH ของสารละลายที่ใช้ และอุณหภูมิ เพื่อปรับปรุงให้ได้ผลึกที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น โดยใช้การปลูกผลึกด้วยวิธี Hanging drop vapour diffusion โดยเปิดสารเล็กตินบริสุทธิ์ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 2-5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ที่ละลายใน 10mM Tris-HCl (pH 8.0; ภาคผนวก ก31) และเปิดสารละลายที่ใช้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบน Glass plate จากนั้นนำไปวางบน 24-well VDX™ plate with sealant (Hampton Research) ขนาด 100×145×25 มิลลิเมตร ที่ประกอบด้วย 4×6 wells ลักษณะ Flat bottom ที่มีสารละลายที่ใช้ปริมาตร 1 มิลลิตร อยู่ใน well และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ต้องการทดสอบ สังเกตติดตามวัดขนาดและประเมินคุณภาพของผลึกอย่างต่อเนื่องด้วย Stereo microscope



รูปที่ 2.1 วิธี Hanging drop vapour diffusion เพื่อปลูกผลึก โปรตีน

ค. การทดสอบคุณภาพผลึกของเล็กติน

ทดสอบคุณภาพผลึกของเล็กติน โดยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction) ด้วย X-Ray source และ Detector ที่ติดตั้ง ณ สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) จังหวัดนครราชสีมา เมื่อรังสีเอกซ์ที่มีความเข้มสูงไปกระทบผลึกของเล็กตินจะให้ข้อมูลในเชิงของแบบแผนการกระจายรังสีเอกซ์ ข้อมูลการกระเจิงของรังสีเอกซ์ที่ได้จากผลึกเดี่ยวเล็กตินที่ให้ความละเอียดระดับ 2 อังสตรอมหรือดีกว่า จะนำมาคำนวณด้วยโปรแกรม เช่น MOSFLM หรือ Crystal-Clear/d*TREK เพื่อวิเคราะห์หากลุ่มสมมาตร และปริมาตรของ Unit cell ของผลึกเล็กติน

บทที่ 3

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัย “การศึกษาลักษณะเฉพาะของเห็ดดินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดที่รับประทานได้” ได้ผลดังนี้

3.1 การคัดเลือกเห็ดที่ผลิตสารเห็ดดินและเก็บรวบรวมดอกเห็ด (Fruiting body) ที่ยังมีความสด

คัดเลือกเห็ดเพื่อทดสอบผลการผลิตสารเห็ดดินจากข้อมูลตัวอย่างเห็ดที่ได้ศึกษาในเบื้องต้นแล้ว จำนวน 330 ตัวอย่าง (specimen) ของโครงการวิจัยเรื่อง เห็ดดินของเชื้อรา (สรีรลักษณะ รอคทอง, 2551) เลือกเห็ดรับประทานได้จาก 9 วงศ์ (family) (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) เพื่อการศึกษาของโครงการวิจัยนี้ จากนั้นได้เก็บรวบรวม Fruiting body ของเห็ดที่เลือกจากแหล่งที่ได้มีการสำรวจ สามารถรวบรวม Fruiting body ของเห็ดได้จำนวน 133 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.2 และตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ดังรูปที่ 3.1-3.9 และรูปผนวกที่ 1-7) เพื่อนำมาคัดกรองให้ได้เห็ดอย่างน้อยสองชนิดเพื่อการศึกษาลักษณะเฉพาะของสารเห็ดดินเพื่อการใช้ประโยชน์

จากดอกเห็ดสดที่เก็บรวบรวมได้ นำมาอบแห้งในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 6-18 ชั่วโมง ทำให้ได้ตัวอย่างเห็ดมีความชื้นประมาณ 4-10% ขึ้นกับความชื้นเริ่มต้นและขนาดของตัวอย่างเห็ด ตามวิธีการที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นเพื่อการเตรียมตัวอย่างเห็ดที่ยังคงรักษาสสมบัติของสารเห็ดดินและไม่มีเมือกจากโครงสร้างของดอกเห็ดสดปนเปื้อนในขั้นตอนการสกัดสารเห็ดดิน

ตารางที่ 3.1 เห็ดรับประทานได้ที่คัดเลือกจากผลงานวิจัยพื้นฐานเพื่อนำมาทดสอบการสะสมสารเห็ดดินในโครงสร้าง

Mushroom family	Mushroom genus
Amanitaceae	<i>Amanita</i>
Boletaceae	<i>Boletus, Boletellus, Gyroporus, Heimiella, Phylloporus, Strobilomyces, Tylopilus, Xeroconomus</i>
Cantharellaceae	<i>Cantharellus</i>
Clavariaceae	<i>Scytinopogon</i>
Pleurotaceae	<i>Lentinus</i>
Pluteaceae	<i>Volvariella</i>
Russulaceae	<i>Lactarius, Russula</i>
Schizophyllaceae	<i>Schizophyllum</i>
Tricholomataceae	<i>Termitomyces</i>



MC178 *Amanita hemibapha* subsp. *javanica* Corn



MC182 *Amanita* sp. (เห็ดระโงกเหลือง) วังน้ำเขียว นครราชสีมา



MC353 *Amanita caesaria* (Fr.) Schweinitz (เห็ดระโงกเหลืองแดง) วังน้ำเขียว นครราชสีมา



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Amanita* วงศ์ *Amanitaceae* ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



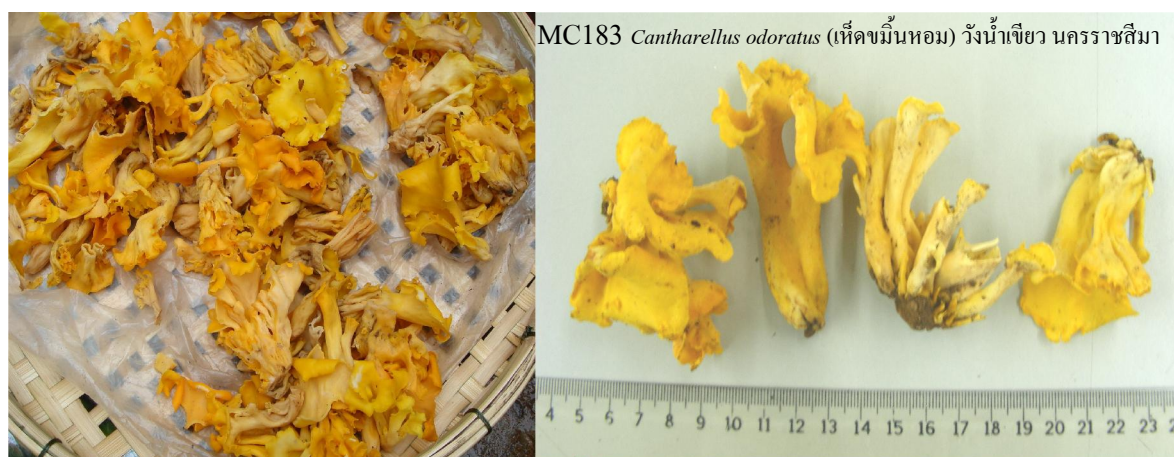
รูปที่ 3.1 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Amanita* วงศ์ *Amanitaceae* ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Boletaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกลำไส้



รูปที่ 3.2 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Boletaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Cantharellus* วงศ์ Cantharellaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.3 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Cantharellus* วงศ์ Cantharellaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.4 ลักษณะของเห็ด *Scytinopogon* sp. ในวงศ์ Clavariaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.5 ลักษณะของเห็ด *Lentinus* sp. ในวงศ์ Pleurotaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.6 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ในวงศ์ Pluteaceae ที่เก็บตัวอย่าง Fruiting body จากต่างแหล่งจำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มาสกัดสารเล็กติน เพื่อการคัดเลือกลูกสาร



รูปที่ 3.6 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดฟาง *Vovariella volvacea* ในวงศ์ Pluteaceae ที่เก็บตัวอย่าง Fruiting body จากต่างแหล่งจำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มา สกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.6 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ในวงศ์ Pluteaceae ที่เก็บตัวอย่าง Fruiting body จากต่างแหล่งจำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มา สกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.7 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มา สกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.7 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกลักษณะ



รูปที่ 3.7 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาตรฐานเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* ในวงศ์ Schizophyllaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาตรฐานเล็กน้อยเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.8 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* ในวงศ์ Schizophyllaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



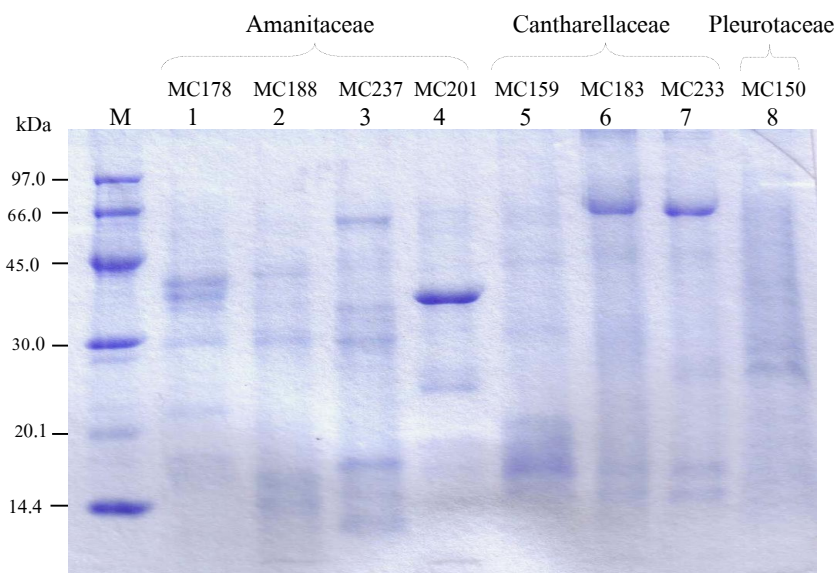
รูปที่ 3.9 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Termitomyces* วงศ์ Tricholomataceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปที่ 3.9 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Termitomyces* วงศ์ Tricholomataceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร

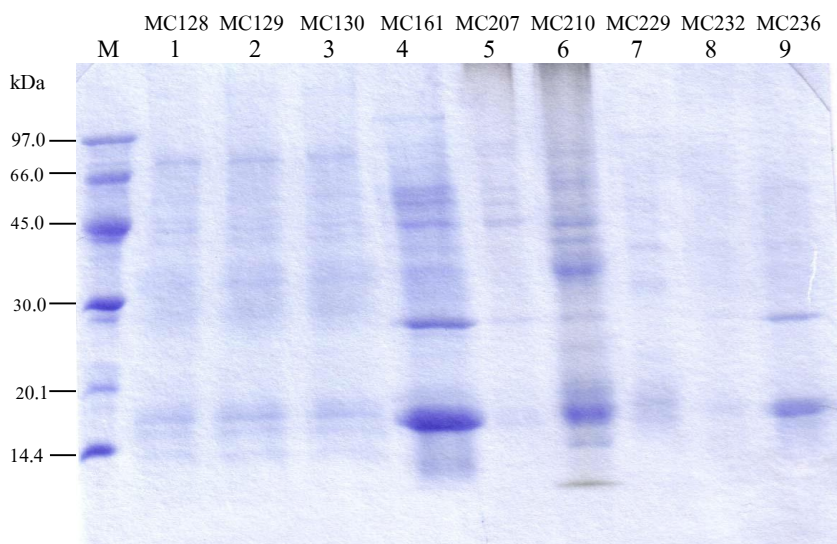
3.2 การสกัด/แยกสารเล็กดินในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract)

สกัด/แยกเล็กดินในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract) เพื่อการทดสอบหาเล็กดินที่สะสมในโครงสร้างของเห็ดโดยนำ Fruiting body ของเห็ดที่ผ่านการอบแห้งมาเตรียมให้เป็นผงด้วยเครื่องตีปั่น (Blender) เติม Ice-cold extraction buffer (0.01M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4) ให้ได้ความเจือจาง 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Insoluble polyvinylpyrrolidone (PVPP) ปริมาณ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อดูดซับ Polyphenolic substances ที่อาจปนเปื้อนในดอกเห็ด กวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบาง และปั่นแยกเพื่อเก็บเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (Crude extract) ของเล็กดินที่ใช้ทดสอบหาปริมาณสารเล็กดินทดสอบสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญและคัดเลือกสารเพื่อทำบริสุทธิ์ จากสารสกัดหยาบเล็กดินที่ได้จากดอกเห็ดที่เลือก เมื่อตรวจสอบแบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบนั้น SDS-PAGE (12.5% gel) พบว่ามีความแตกต่างกันตามแบบของแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 15 ถึง 95 kDa โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 25-40 kDa (ตัวอย่างในรูปที่ 3.10-3.13 และรูปผนวกที่ 8-15)



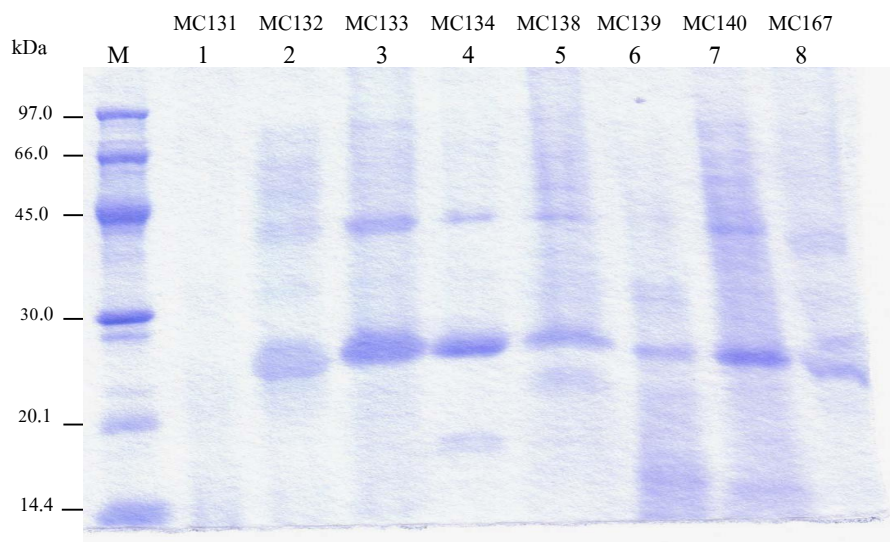
รูปที่ 3.10 ตัวอย่างแถบโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัดหยาบของสารเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Amanitaceae, Cantharellaceae และ Pleurotaceae จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12% gel)

Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 1-4, สารสกัดหยาบของเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Amanitaceae รหัส MC178, MC188, MC237, และ MC201; 5-7, สารสกัดหยาบของเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Cantharellaceae รหัส MC159, MC183, และ MC233 ตามลำดับ; 8, สารสกัดหยาบของเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Pleurotaceae รหัส MC150

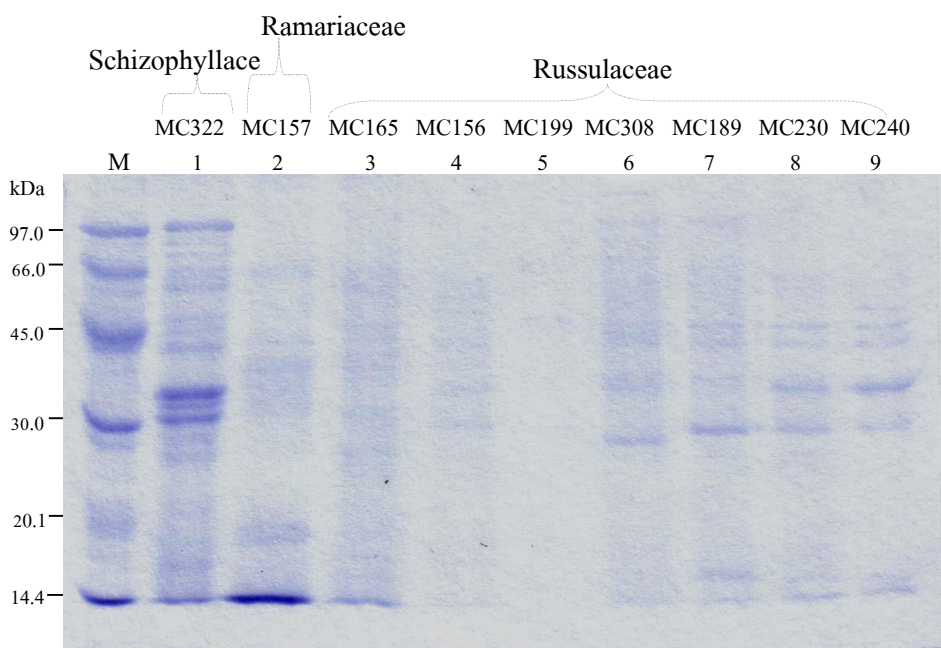


รูปที่ 3.11 ตัวอย่างแบบแผนโปรตีนจากสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Boletaceae จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12% gel)

Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 1-9, สารสกัดหยาบของเล็กดินจากเห็ด MC128, MC129, MC130, MC161, MC207, MC210, MC229, MC232, และ MC236 ตามลำดับ



รูปที่ 3.12 ตัวอย่างแถบโปรตีนสารสกัดหยาบของสารเล็กน้อยจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Pluteaceae จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12% gel)
Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 1-8, สารสกัดหยาบของเล็กน้อยจากเห็ด MC131, MC132, MC133, MC134, MC138, MC139, MC140, และ MC167 ตามลำดับ



รูปที่ 3.13 ตัวอย่างแถบโปรตีนที่ตรวจพบในสารสกัดหยาบของสารเล็กน้อยจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Schizophyllaceae, Ramariaceae และ Russulaceae ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel) Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 1-9, สารสกัดหยาบของเล็กน้อยจากเห็ด MC322, MC157, MC165, MC156, MC199, MC308, MC189, MC230, และ MC240 ตามลำดับ

3.3 การทดสอบสมบัติทางชีวภาพเพื่อคัดเลือกสารสกัดหยาบของเห็ดกินจากเห็ดมาทำบริสุทธิ์

จากการทดสอบสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของสารสกัดหยาบเห็ดกิน เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของเห็ดกินและอนุพันธ์ของเห็ดกินที่พบ และเพื่อคัดเลือกคัดเลือกรสารสกัดหยาบของเห็ดกินจากเห็ดมาทำบริสุทธิ์ ได้ผลดังนี้

3.3.1 ปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ของสารสกัดหยาบเห็ดกิน

นำสารสกัดหยาบโปรตีนเห็ดกิน (Crude extract) จากเห็ดรับประทานได้ที่เลือกมาเจือจางเป็นลำดับ ด้วยสารละลาย 0.01M Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) และทดสอบปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย (ผลจากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้ศึกษาแล้ว) ที่เตรียมเป็นสารละลาย 2% ในสารละลาย 0.01M PBS (pH 7.4) ใน Microtiter plate (U-shaped bottom) ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เติม 0.01M PBS (pH 7.4) เป็นการทดลองควบคุมผลลบ (Negative control) ภายหลังป้อน Microtiter plate ที่บรรจุสารทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemagglutination titer) พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ด 132 ตัวอย่าง ให้ผลบวกของ Hemagglutination ที่ให้ค่า Titer แตกต่างกันไปแม้ว่าจะเป็นเห็ดชนิดเดียวกันแต่รวบรวมได้จากต่างแหล่งกัน (ตารางที่ 3.2 และตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination รูปที่ 3.14) กรณีของเห็ดในวงศ์ Boletaceae มีหลายตัวอย่างที่สะสมเห็ดกินที่มีค่า Titer สูง แต่มีข้อจำกัดของปริมาณตัวอย่างที่ไม่เพียงพอต่อการทำบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่างๆ ของสารเห็ดกิน

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ของ สารสกัดเล็กดินที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือกเพื่อศึกษาสารเล็กดิน

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Amanitaceae				
<i>Amanita hemibapha</i> subsp. <i>javanica</i> Corner&Bas (เห็ดระโงกเหลือง) นครราชสีมา	MC178	ND	ND	128
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	MC181	ND	ND	64
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกเหลือง) นครราชสีมา	MC182	ND	ND	64
<i>Amanita princeps</i> Corner&Bas (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	MC188	ND	ND	256
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดข้าวสาร) บุรีรัมย์	MC237	ND	ND	4
<i>Amanita</i> (เห็ดกะทิ) บุรีรัมย์	MC201	ND	ND	16
<i>Amanita vaginata</i> (เห็ดไส้เดือน) นครราชสีมา	MC209	ND	ND	128H
<i>Amanita caesaria</i> (Fr.) Schweinitz (เห็ดระโงกเหลือง แดง) นครราชสีมา	MC353	ND	ND	128
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	MC354	ND	ND	128
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงก) นครราชสีมา	MC355	ND	ND	64
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	ML023	ND	ND	16H
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	ML024	ND	ND	64
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) บุรีรัมย์	SUT004	ND	ND	H
<i>Amanita caesarie</i> (เห็ดระโงกเหลืองแดง) นครราชสีมา	SUT086	ND	ND	256
<i>Amanita hemibapha</i> subsp. <i>javanica</i> Corner&Bas. (เห็ดระโงกเหลือง) นครราชสีมา	SUT109	ND	ND	128
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกเหลือง) พิษณุโลก	SUT149	ND	ND	64
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) ขอนแก่น	SUT137	ND	ND	128
Boletaceae				
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC125	ND	ND	1024
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC128	512	1024	1024
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC129	4096	1024	1024
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC130	2048	1024	1024

หมายเหตุ: ND, Not determined ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กดินจาก Whole Fruiting body

H, Hemolysis

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ของ สารสกัดเล็กดินที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือกเพื่อศึกษาสารเล็กดิน

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Boletaceae (ต่อ)				
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) สกลนคร	MC135	ND	ND	64
<i>Tyloporus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC161	ND	ND	64
<i>Boletus edulis</i> (เห็ดตับเต่า) นครราชสีมา	MC177	ND	ND	1024
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC179	ND	ND	16
<i>Leccinum</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC187	ND	ND	48
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC193	ND	ND	48
<i>Boletellus emodensis</i> (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC194	ND	ND	16
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC197	ND	ND	48
<i>Boletellus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC203	ND	ND	128
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC204	ND	ND	128
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC205	ND	ND	48
<i>Xerocomus</i> sp. นครราชสีมา	MC207	ND	ND	64
<i>Xerocomus</i> sp. นครราชสีมา	MC210	ND	ND	128
<i>Xerocomus</i> sp. บุรีรัมย์	MC212	ND	ND	64
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC234	ND	ND	48
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้งไข) นครราชสีมา	MC232	ND	ND	4
<i>Leccinum subglabripes</i> (เห็ดผึ้งหวาน) บุรีรัมย์	MC236	ND	ND	1024
<i>Phylloporus</i> sp. บุรีรัมย์	MC229	ND	ND	8
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC239	ND	ND	64
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC242	ND	ND	16
<i>Heimiella</i> sp. บุรีรัมย์	MC243	ND	ND	256H
<i>Xerocomus</i> sp. บุรีรัมย์	MC244	ND	ND	16
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC325	ND	ND	16
<i>Boletellus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) สกลนคร	MC335	ND	ND	64
<i>Boletus obscureumbrinus</i> Hongo (เห็ดผึ้ง) สกลนคร	MC336	ND	ND	8
<i>Boletus lactissimus</i> Hongo (เห็ดผึ้งส้ม) สกลนคร	MC337	ND	ND	512

หมายเหตุ: ND, Not determined ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กดินจาก Whole Fruiting body

H, Hemolysis

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ของ สารสกัดเล็กดินที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือกเพื่อศึกษาสารเล็กดิน

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Boletaceae (ต่อ)				
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) สกลนคร	MC338	ND	ND	128
<i>Gyroporus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC359	ND	ND	512
<i>Tylophilus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC360	ND	ND	128
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC361	ND	ND	16
<i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	ML026	ND	ND	48
<i>Xerocomus</i> sp. นครราชสีมา	ML028	ND	ND	64
<i>Tylophilus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	ML029	ND	ND	4
<i>Gyroporus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	ML032	ND	ND	2H
<i>Strobilomyces floccopus</i> นครราชสีมา	ML034	ND	ND	32
<i>Heimiella</i> sp. (เห็ดคุด) บุรีรัมย์	ML135	ND	ND	256H
Cantharellaceae				
<i>Cantharellus</i> sp. (เห็ดมันปูหรือเห็ดขมิ้น) สกลนคร	MC159	ND	ND	4
<i>Cantharellus odoratus</i> (เห็ดขมิ้นหอม) นครราชสีมา	MC183	ND	ND	16
<i>Cantharellus xathopus</i> (Persoon) Duby (เห็ดมันปู) บุรีรัมย์	MC233	ND	ND	64
<i>Cantharellus</i> sp. (เห็ดมันปู) นครราชสีมา	MC332	ND	ND	4
<i>Cantharellus minor</i> Peck. (เห็ดมันปูเล็ก) นครราชสีมา	ML015	ND	ND	256
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr. (เห็ดมันปูใหญ่) นครราชสีมา	ML016	ND	ND	256
<i>Cantharellus</i> sp. (เห็ดมันปู) นครราชสีมา	ML017	ND	ND	4
<i>Cantharellus</i> sp. (เห็ดมันปู) นครราชสีมา	ML069	ND	ND	2H
<i>Cantharellus minor</i> Peck. (เห็ดมันปูเล็ก) นครราชสีมา	ML070	ND	ND	2H
Clavariaceae				
<i>Scytinopogon</i> sp. (เห็ดหนวด) สกลนคร	MC157	ND	ND	64
Pleurotaceae				
<i>Lentinus</i> sp. (เห็ดขอน) อุบลราชธานี	MC150	ND	ND	64
<i>Lentinus</i> sp. (เห็ดขอน) นครราชสีมา	MC164	ND	ND	16
<i>Lentinus polychrous</i> (เห็ดขอนขาว) นครราชสีมา	ST230	ND	ND	16

หมายเหตุ: ND, Not determined ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กดินจาก Whole Fruiting body

H, Hemolysis

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ของ สารสกัดเล็กดินที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือกเพื่อศึกษาสารเล็กดิน

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Pluteaceae				
<i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	MC131	2048	2048	2048
<i>Volvariella volvacea</i> นครราชสีมา	MC132	2048	2048	2048
<i>Volvariella volvacea</i> สุรินทร์	MC133	1024	512	2048
<i>Volvariella volvacea</i> บุรีรัมย์	MC134	2048	2048	2048
<i>Volvariella volvacea</i> ขอนแก่น	MC138	2048	1024	1024
<i>Volvariella volvacea</i> กาฬสินธุ์	MC139	1024	1024	1024
<i>Volvariella volvacea</i> บุรีรัมย์	MC140	4096	256	512
<i>Volvariella volvacea</i> ชัยภูมิ	MC144	1024	512	1024
<i>Volvariella volvacea</i> มหาสารคาม	MC145	1024	1024	1024
<i>Volvariella volvacea</i> สกลนคร	MC167	512	512	512
<i>Volvariella volvacea</i> อุบลราชธานี	MC168	256	256	256
<i>Volvariella volvacea</i> สกลนคร	MC330	ND	ND	1024
<i>Volvariella volvacea</i> อุบลราชธานี	MC352	ND	ND	1024
<i>Volvariella volvacea</i> นครราชสีมา	ST129	ND	ND	1024
<i>Volvariella volvacea</i> บุรีรัมย์	ST227	ND	ND	1024
<i>Volvariella volvacea</i> บุรีรัมย์	ST228	ND	ND	1024
Russulaceae				
<i>Lactarius volemus</i> (Fr.) Fr. (เห็ดหาด) บุรีรัมย์	MC165	ND	ND	64
<i>Russula</i> sp. บุรีรัมย์	MC154	ND	ND	48
<i>Russula</i> sp. บุรีรัมย์	MC156	ND	ND	64
<i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) อุบลราชธานี	MC164	ND	ND	16
<i>Russula</i> sp. (เห็ดแดง) นครราชสีมา	MC184	ND	ND	4
<i>Russula anthracina</i> (เห็ดถ่าน) นครราชสีมา	MC185	ND	ND	16
<i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	MC189	ND	ND	32
<i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	MC195	ND	ND	16
<i>Russula</i> sp. (เห็ดแดง) นครราชสีมา	MC196	ND	ND	4
<i>Russula anthracina</i> (เห็ดถ่าน) นครราชสีมา	MC199	ND	ND	16
<i>Russula</i> sp. (เห็ดน้ำแป้ง) นครราชสีมา	MC208	ND	ND	4
<i>Russula</i> sp. (เห็ดหน้ำอม) นครราชสีมา	MC213	ND	ND	4
<i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	MC230	ND	ND	64
<i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	MC231	ND	ND	16
<i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	MC235	ND	ND	16
<i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	MC240	ND	ND	128
<i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	MC308	ND	ND	16
<i>Russula anthracina</i> (เห็ดถ่าน) นครราชสีมา	MC323	ND	ND	48

หมายเหตุ: ND, Not determined ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กดินจาก Whole Fruiting body

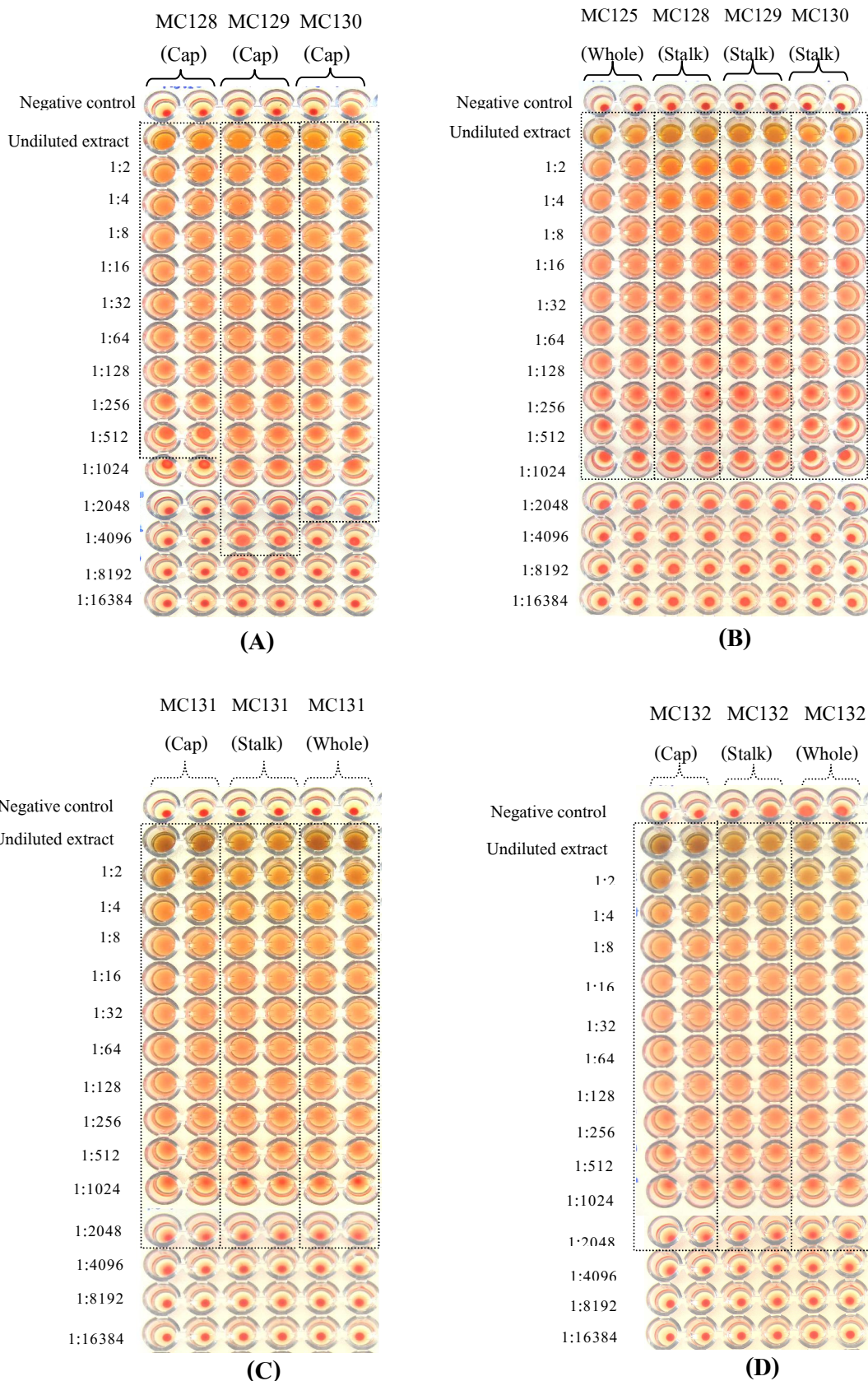
H, Hemolysis

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination เมื่อใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ของ สารสกัดเล็กดินที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือกเพื่อศึกษาสารเล็กดิน

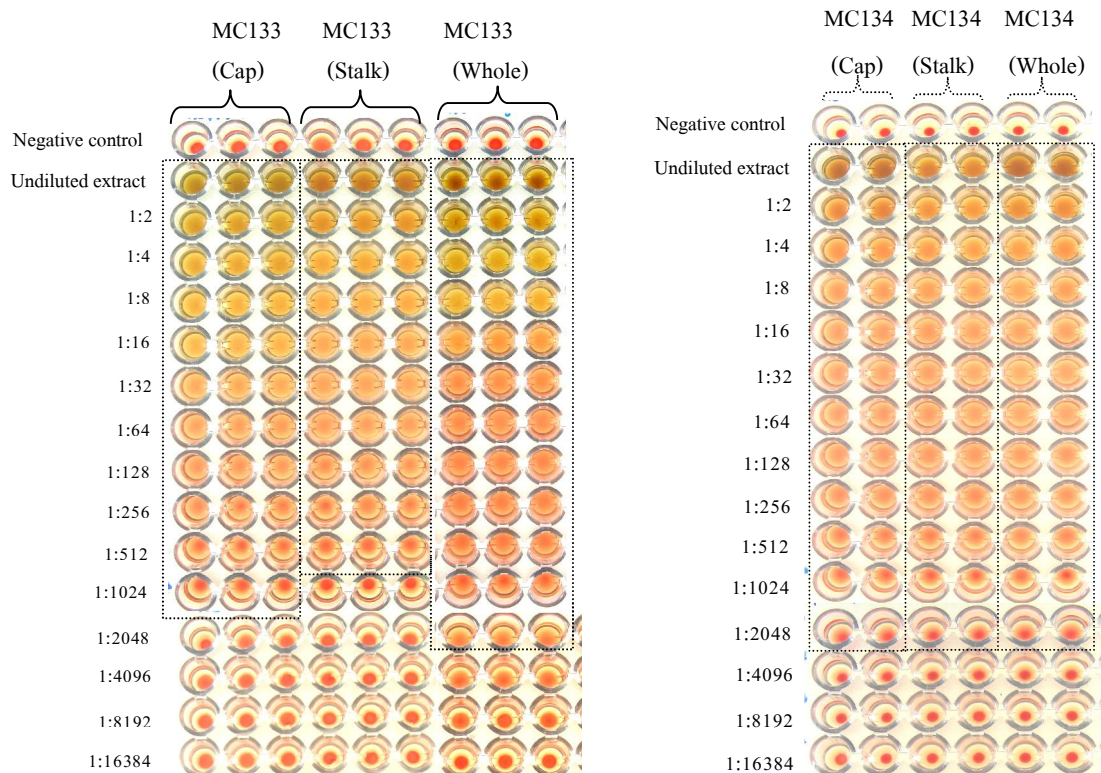
Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Russulaceae (ต่อ)				
<i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	MC324	ND	ND	64
<i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) สกลนคร	MC329	ND	ND	8
<i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) สกลนคร	MC331	ND	ND	8
<i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคลเขียว) นครราชสีมา	MC357	ND	ND	8
<i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคลเขียว) นครราชสีมา	MC358	ND	ND	8
Schizophyllaceae				
<i>Schizophyllum commune</i> Fries (เห็ดแครง) นครราชสีมา	MC173	ND	ND	1024
<i>Schizophyllum commune</i> Fries (เห็ดแครง) นครปฐม	MC322	ND	ND	64
<i>Schizophyllum commune</i> Fries (เห็ดแครง) สกลนคร	ML150	ND	ND	1024
Tricholomataceae				
<i>Termitomyces clypeatus</i> Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	MC190	ND	ND	16
<i>Termitomyces clypeatus</i> Heim (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	MC191	ND	ND	64
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	MC200	ND	ND	4
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	MC206	ND	ND	4
<i>Termitomyces microcarpus</i> (Berk et Br.) Heim. (เห็ดข้าวตอก) สกลนคร	MC327	ND	ND	32
<i>Termitomyces clypeatus</i> Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	MC356	ND	ND	4
<i>Termitomyces microcarpus</i> (Berk et Br.) Heim. (ข้าวตอก) นครราชสีมา	ML057	ND	ND	32
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML066	ND	ND	4
<i>Termitomyces striatus</i> (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML067	ND	ND	4
<i>Termitomyces clypeatus</i> Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML083	ND	ND	4
<i>Termitomyces clypeatus</i> Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML084	ND	ND	4
<i>Termitomyces aurantiacus</i> R. Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML085	ND	ND	2H
<i>Termitomyces aurantiacus</i> R. Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML086	ND	ND	2H
<i>Termitomyces aurantiacus</i> R. Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML087	ND	ND	64H
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML088	ND	ND	2H
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML089	ND	ND	2H
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	ML119	ND	ND	4
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML130	ND	ND	4
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML131	ND	ND	4
<i>Termitomyces aurantiacus</i> R. Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML144	ND	ND	2H
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML145	ND	ND	4
<i>Termitomyces</i> sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	SUT186	ND	ND	4

หมายเหตุ: ND, Not determined ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กดินจาก Whole Fruiting body

H, Hemolysis

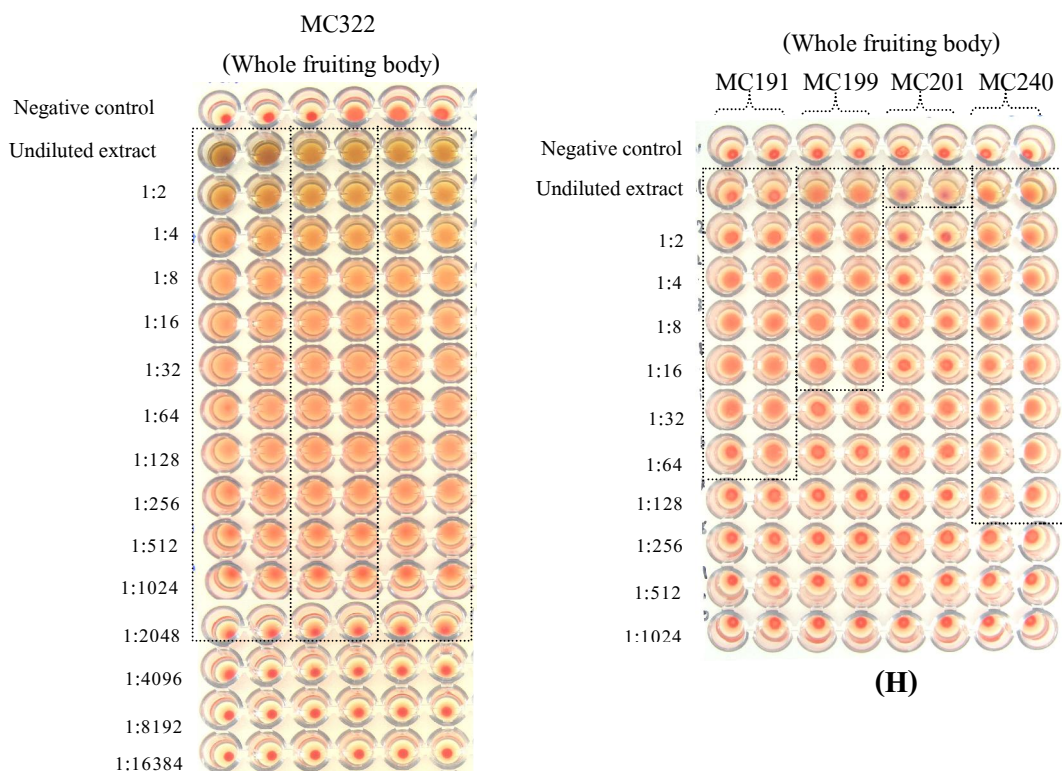


รูปที่ 3.14 ตัวอย่างผลการทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดหยาบเล็กตินจากโครงสร้าง Cap, Stalk และ Whole fruiting body ของเห็ดฟาง *Boletus sp.* (A และ B) เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* (C ถึง F) เห็ดแครง *Schizophyllum commune* (G) เห็ดโคน (*Termitomyces clypeatus* MC190 และ MC191, H) เห็ดกะทิ (*Amanita sp.* MC201, H) และเห็ดตะไคล (*Russula virescens* MC240, H)



(E)

(F)



(G)

(H)

รูปที่ 3.14 (ต่อ) ตัวอย่างผลการทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดหยาบเล็กดินจากโครงสร้าง Cap, Stalk และ Whole fruiting body ของเห็ดฟาง *Boletus* sp. (A และ B) เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* (C ถึง F) เห็ดแครง *Schizophyllum commune* (G) เห็ดโคน (*Termitomyces clypeatus* MC190 และ MC191, H) เห็ดกะทิ (*Amanita* sp. MC201, H) และเห็ดตะไคล (*Russula virescens* MC240, H)

3.3.2 ฤทธิ์ของสารสกัดดินในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดที่รับประทานได้ที่เลือกจำนวน 59 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.3) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ดังนี้

3.3.2.1 แบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดดินในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย คือ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี Agar disc diffusion ใช้สารปฏิชีวนะมาตรฐาน Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) เป็น Positive control พบการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแตกต่างกันของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดที่คัดเลือกมาทดสอบ (ตารางที่ 3.3 และ 3.4 ตัวอย่างในรูปแบบที่ 3.15 และ 3.16 และรูปผนวกที่ 16-19) พบเพียงสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดย *Volvariella volvacea* MC131 และ MC133 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 ที่ความเข้มข้น 3.36 และ 3.57 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ (เล็กดินจาก MC131 ให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับสารมาตรฐาน ในขณะที่ MC133 ให้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมากกว่า 1.04550 เท่า เมื่อเทียบกับ Streptomycin ที่ใช้เป็น Positive control) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้น 1.64 และ 2.81 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร (มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งน้อยกว่า 0.7188 และ 0.8438 เท่า ตามลำดับ) และยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ที่ความเข้มข้น 2.36 และ 2.86 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร (มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งน้อยกว่า 0.77923 และ 0.8077 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ Streptomycin ที่ใช้เป็น Positive control) ยังมีสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟาง MC134, MC330 และ MC352 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งน้อยกว่า 0.8125, 0.8750 และ 0.8438 เท่า ตามลำดับ) สารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟาง MC134, MC145 และ MC352 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 เช่นเดียวกันโดยมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งน้อยกว่า 0.8462, 0.8462 และ 0.7692 เท่า ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับของ Positive control (ตารางที่ 3.3 และ 3.4)

3.3.2.2 เชื้อรา

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดที่รับประทานได้ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Candida albican* ATCC 10231, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896 และ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 โดยใช้สารปฏิชีวนะมาตรฐาน Nystatin (100 Units) เป็น Positive control

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188, เห็ดผึ้ง *Gyroporus* sp. MC359, เห็ดฟาง MC168, *Lactarius* sp. MC165 และ เห็ดหนวด *Scytinopogon* sp. MC157 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 โดยมีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งน้อยกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารมาตรฐาน Nystatin (100 Units) เท่ากับ 0.904, 0.904, 0.857, 0.761 และ 0.952 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 3.3 และ 3.4) สารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดผึ้ง *Tyropilus* sp. MC161 และ MC360, *Phylloporus* sp. MC229, *Gyroporus* sp. MC359, *Boletus* sp. MC361 และเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC145 และ MC168 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในขณะที่สารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ด *Leccinum* sp. MC187, *Russula* sp. MC164 และ *Volvariella volvacea* MC168 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Penicillium funiculosum* ATCC 36839 โดยมีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งน้อยกว่า 0.843 และ 0.812 และมากกว่า 1.375 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารมาตรฐาน Nystatin (100 Units)

ส่วนสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC168 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albican* ATCC 10231 โดยมีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งน้อยกว่า 0.619 เท่า เมื่อเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารมาตรฐาน Nystatin (100 Units) และสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดหนวด *Scytinopogon* sp. MC157 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896 และ ATCC 18824 โดยมีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมากกว่า 1.023 และน้อยกว่า 0.925 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Nystatin (100 Units) (ตารางที่ 3.3 และ 3.4)

สารเล็กดินจากดอกเห็ดฟางให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์โดยรวมดีกว่าสารจากเห็ดชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 3.3 และ 3.4 และตัวอย่างในรูปที่ 3.15 และรูปผนวกที่ 20-23)

ตารางที่ 3.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) และ Nystatin (100 Units)

Standard antibiotic	Inhibition zone (mm)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Streptomycin	16	16	11	13	-	-	-	-	-
Nystatin	-	-	-	-	19	21	16	21	21

หมายเหตุ: 1, *Bacillus cereus* ATCC 11778; 2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; 3, *Escherichia coli* ATCC 25922; 4, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; 5, *Aspergillus niger* ATCC 6275; 6, *Candida albican* ATCC 10231; 7, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839; 8, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896; 9, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824; -, ไม่เกิด Inhibition zone

ตารางที่ 3.4 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) ของสารสกัดเห็ดขยาบเล็กดิน จาก Fruiting body ของเห็ดที่รับประทานได้ที่เลือกจำนวน 59 ตัวอย่าง

Mushroom code/family/species/collection location	Inhibition zone (mm)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amanitaceae									
MC178 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกเหลือง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC188 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	19
MC237 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดข้าวสาร) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC201 <i>Amanita</i> (เห็ดกะทิ) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC353 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกเหลืองแดง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC354 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกแดง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC355 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกแดง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boletaceae									
MC128 <i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC129 <i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC130 <i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC161 <i>Tylopilus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	-	-	-	-	15	-	-	-	-
MC187 <i>Leccinum</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	13.5	-	-
MC207 <i>Xerocomus</i> sp. นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC210 <i>Xerocomus</i> sp. นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC229 <i>Phylloporus</i> sp. บุรีรัมย์	-	-	-	-	13.5	-	-	-	-
MC232 <i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้งไข) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC236 <i>Leccinum subglabripes</i> (เห็ดผึ้งหวาน) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC325 <i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC359 <i>Gyroporus</i> sp. (เห็ดผึ้งหวาน) บุรีรัมย์	-	-	-	-	18	-	-	-	19
MC360 <i>Tylopilus</i> sp. (เห็ดผึ้งนกยูง) บุรีรัมย์	-	-	-	-	17	-	-	-	-
MC361 <i>Boletus</i> sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	-	-	-	-	16.5	-	-	-	-
Cantharellaceae									
MC159 <i>Cantharellus</i> sp. (เห็ดมันปู) สกลนคร	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: 1, *Bacillus cereus* ATCC 11778; 2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; 3, *Escherichia coli* ATCC 25922; 4, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; 5, *Aspergillus niger* ATCC 6275; 6, *Candida albican* ATCC 10231; 7, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839; 8, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896; 9, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824; -, ไม่เกิด Inhibition zone

ตารางที่ 3.4 (ต่อ) ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) ของสารสกัดเห็ดขี้ดิน
จาก Fruiting body ของเห็ดที่รับประทานได้ที่เลือกจำนวน 59 ตัวอย่าง

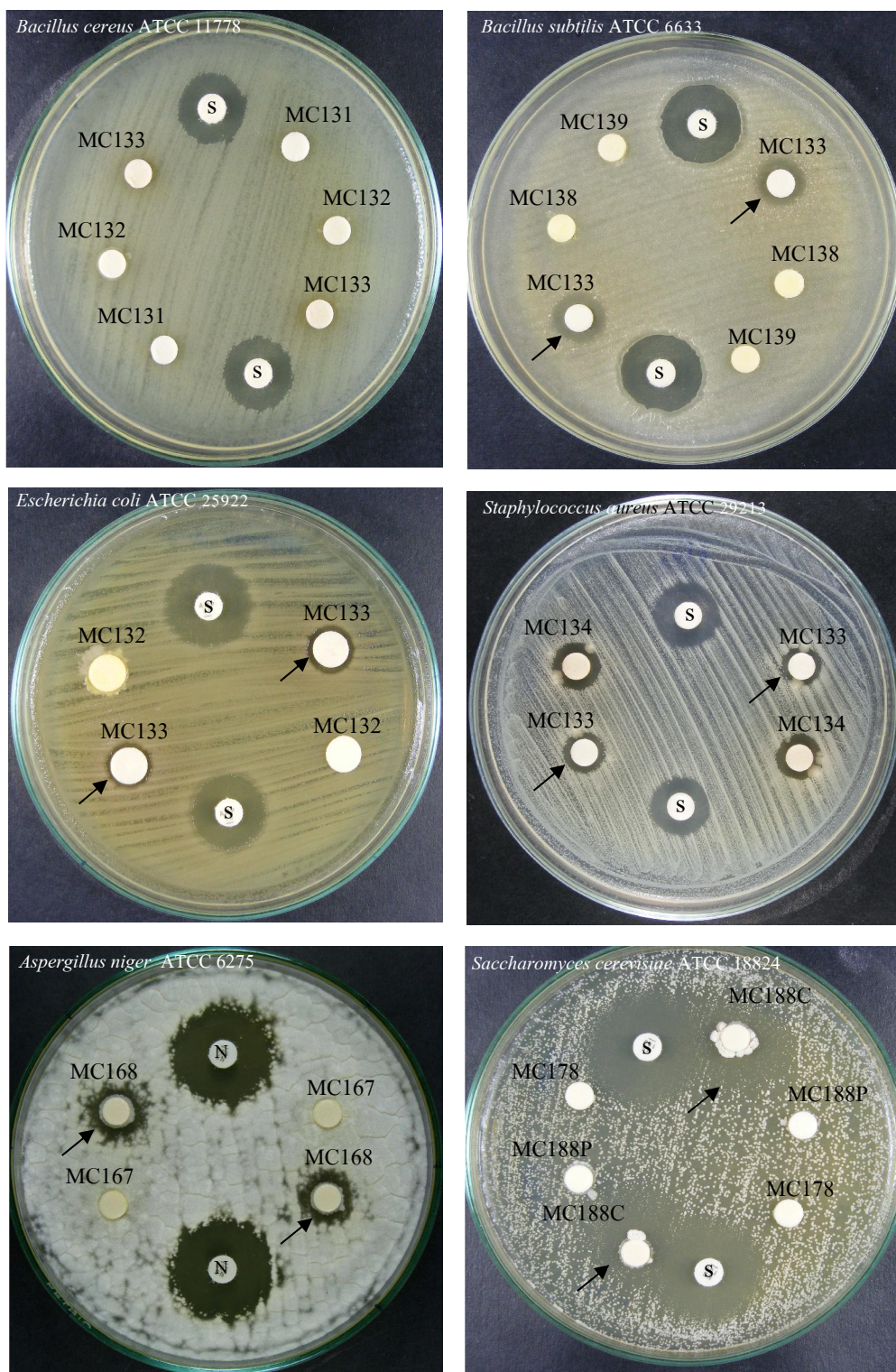
Mushroom code/family/species/collection location	Inhibition zone (mm)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cantharellaceae									
MC183 <i>Cantharellus odoratus</i> (เห็ดขมิ้นหอม) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC233 <i>Cantharellus xanthopus</i> (Persoon) Duby (เห็ดมันปู) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC332 <i>Cantharellus</i> sp. (เห็ดมันปู) สกลนคร	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clavariaceae									
MC157 <i>Scytinopogon</i> sp. (เห็ดหนวด) สกลนคร	-	-	-	-	-	-	-	21.5	20
Pleurotaceae									
MC150 <i>Lentinus</i> sp. อุบลราชธานี	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pluteaceae									
MC131 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	-	11.5	11	10.3	-	-	-	-	-
MC132 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC133 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สุรินทร์	-	13.5	11.5	10.5	-	-	-	-	-
MC134 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) บุรีรัมย์	-	13	-	11	-	-	-	-	-
MC138 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) ขอนแก่น	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC139 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) กาฬสินธุ์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC140 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC144 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) ชัยภูมิ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC145 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) มหาสารคาม	-	-	-	11	11.5	-	-	-	-
MC167 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สกลนคร	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC168 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) อุบลราชธานี	-	-	-	-	13	13	22	-	18
MC330 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สกลนคร	-	14	-	-	-	-	-	-	-
MC352 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) อุบลราชธานี	-	13.5	-	10	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: 1, *Bacillus cereus* ATCC 11778; 2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; 3, *Escherichia coli* ATCC 25922; 4, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; 5, *Aspergillus niger* ATCC 6275; 6, *Candida albican* ATCC 10231; 7, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839; 8, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896; 9, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824; -, ไม่เกิด Inhibition zone

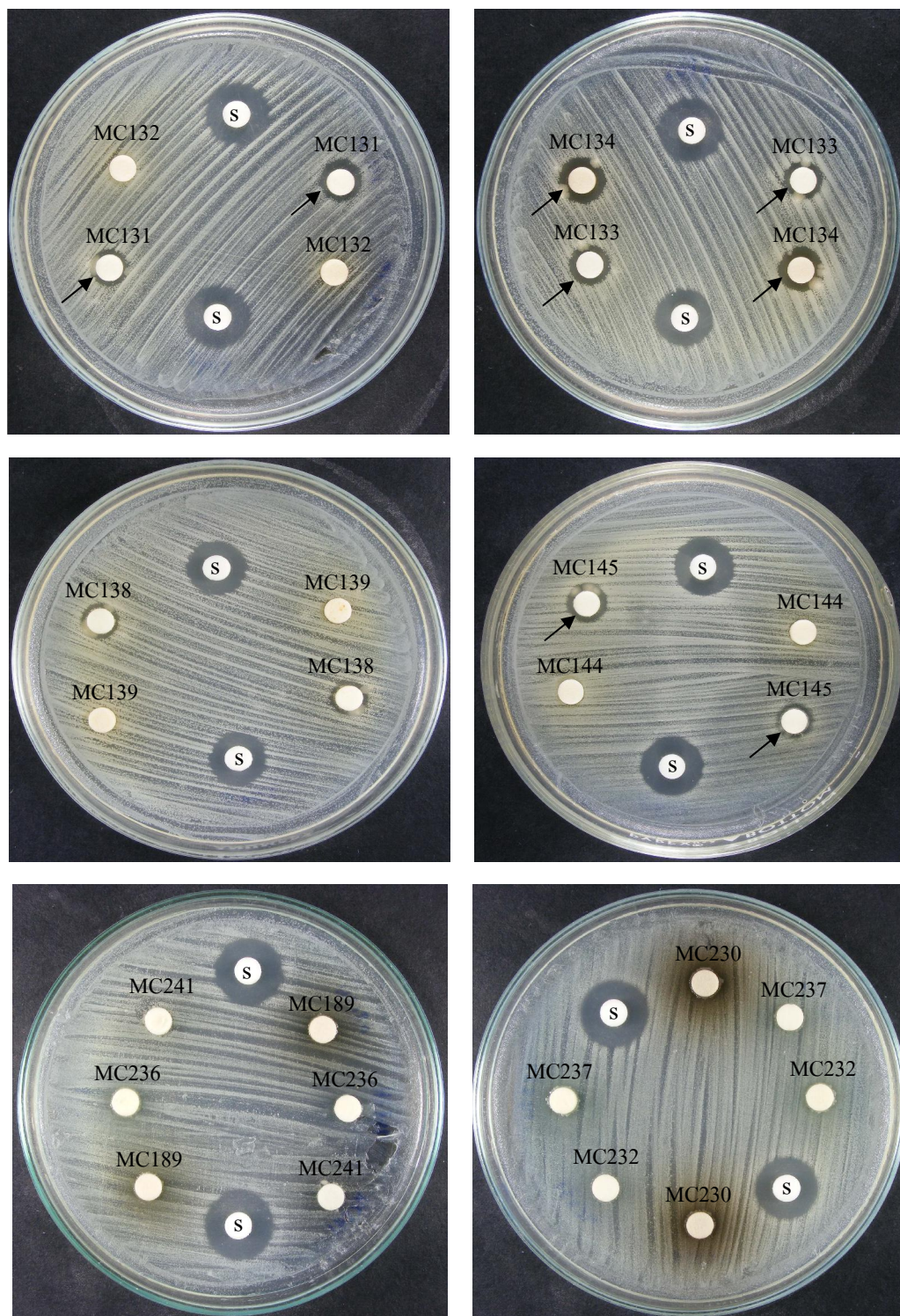
ตารางที่ 3.4 (ต่อ) ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) ของสารสกัดหยาบเล็กดิน จาก Fruiting body ของเห็ดที่รับประทานได้ที่เลือกจำนวน 59 ตัวอย่าง

Mushroom code/family/species/collection location	Inhibition zone (mm)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Russulaceae									
MC156 <i>Russula</i> sp. บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC164 <i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) อุบลราชธานี	-	-	-	-	13.5	-	13	-	-
MC165 <i>Lactarius volemus</i> (Fr.) Fr. (เห็ดหาด) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	16
MC189 <i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC199 <i>Russula anthracina</i> (เห็ดถ่าน) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC230 <i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC240 <i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC308 <i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC323 <i>Russula anthracina</i> (เห็ดถ่าน) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC324 <i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC329 <i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) สกลนคร	-	-	-	-	16.5	-	-	-	-
MC331 <i>Russula</i> sp. (เห็ดก่อ) สกลนคร	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC357 <i>Russula virescens</i> (เห็ดตะไคลเขียว) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC358 <i>Russula virescens</i> Fr. (เห็ดตะไคลขาว) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Schizophyllaceae									
MC322 <i>Schizophyllum commune</i> (เห็ดแครง) นครปฐม	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tricholomataceae									
MC190 <i>Termitomyces clypeatus</i> (เห็ดโคน) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC191 <i>Termitomyces clypeatus</i> (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC327 <i>Termitomyces microcarpus</i> (Berk et Br.) Heim. (เห็ดข้าวตอก) สกลนคร	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC356 <i>Termitomyces clypeatus</i> (เห็ดโคน) นครราชสีมา	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: 1, *Bacillus cereus* ATCC 11778; 2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; 3, *Escherichia coli* ATCC 25922; 4, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; 5, *Aspergillus niger* ATCC 6275; 6, *Candida albican* ATCC 10231; 7, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839; 8, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896; 9, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824; -, ไม่เกิด Inhibition zone



รูปที่ 3.15 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 (A1-A4), MC168 (B) และเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 (C) ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นเชื้อทดสอบ โดยวัดจากบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone, ลูกศร) และเทียบกับสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร)

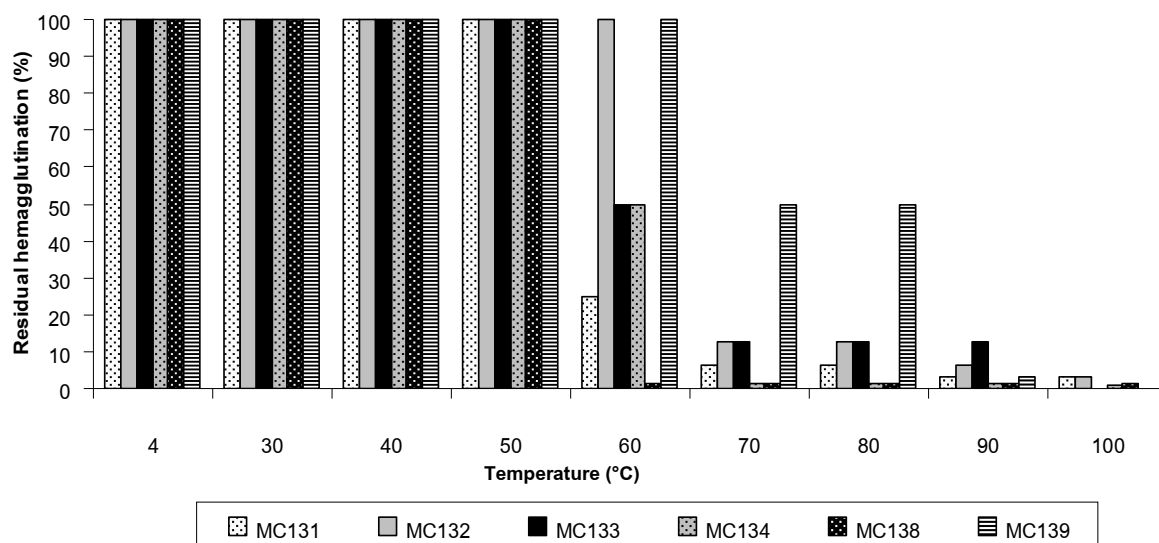


รูปที่ 3.16 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเล็กลงดินจากเห็ดรับประทานได้บางชนิด ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 โดยวัดจากบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone, ลูกศร) และเทียบกับสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร)

3.3.3 ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดหยาบเห็ดกิน

3.3.3.1 ความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดหยาบเห็ดกิน

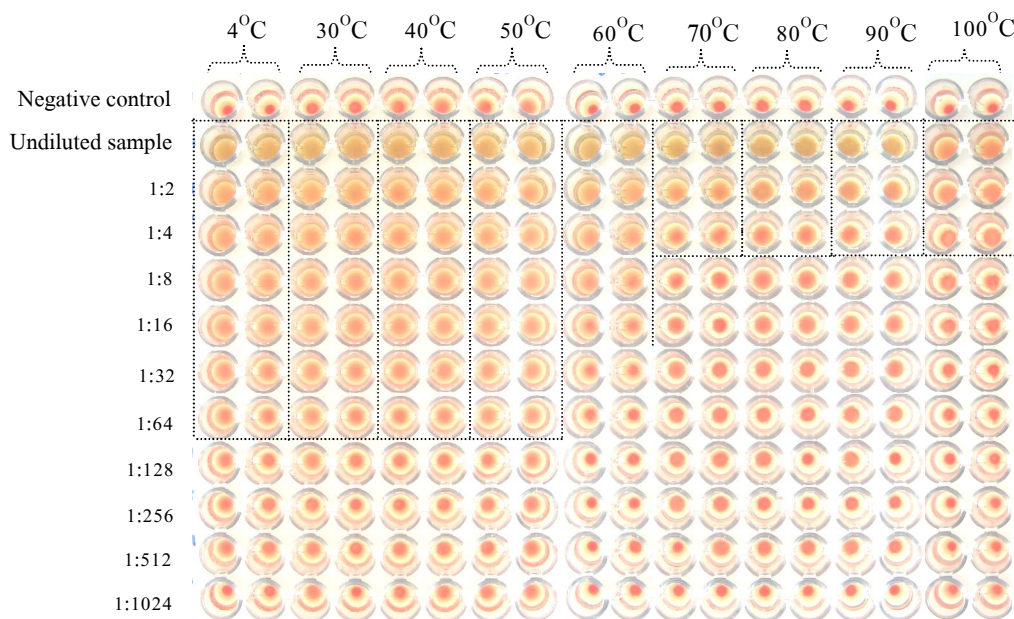
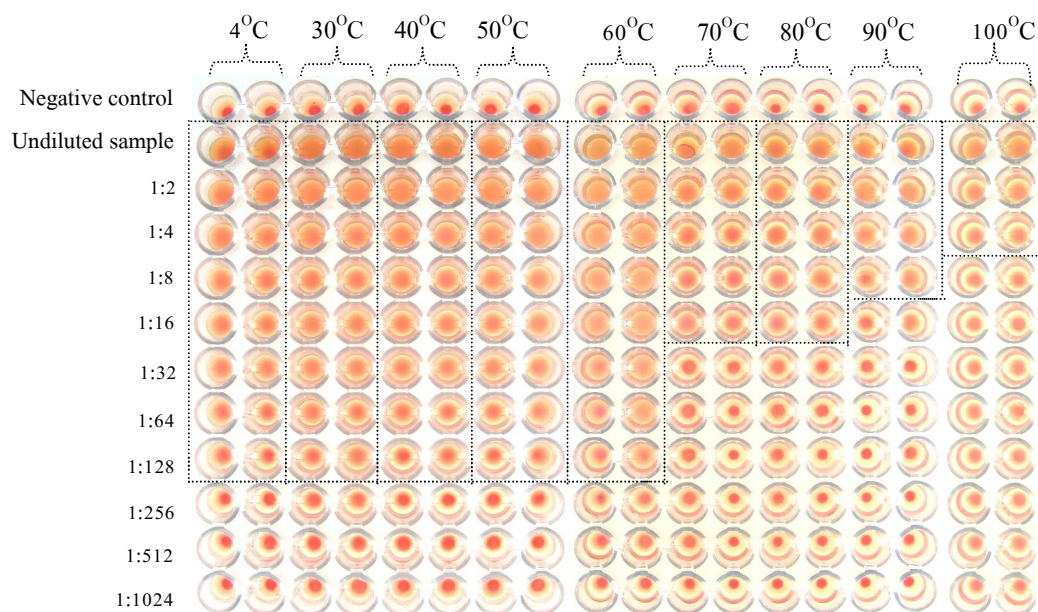
เมื่อทดสอบความเสถียรของกิจกรรมสารสกัดหยาบของเห็ดกิน (1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) ของเห็ดรับประทานได้ที่คัดเลือกที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่ อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยตรวจสอบกิจกรรมของสาร เห็ดกินที่ยังเหลืออยู่ด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย เปรียบเทียบกับสารสกัด เห็ดกินที่ไม่ให้ความร้อน (มีกิจกรรมการจับกลุ่ม 100%) พบว่าสารสกัดหยาบเห็ดกินจากเห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีความ เสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่สารเห็ดกินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่คัดเลือกจำนวน 6 ตัวอย่าง คือ MC131 ถึง MC134, MC138 และ MC139 ที่เก็บรวบรวมจาก ต่างพื้นที่กัน มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อให้ความร้อน สูงขึ้น สารเห็ดกินจากเห็ด 4 ตัวอย่าง (MC131, MC133, MC134 และ MC138) มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากเห็ด 2 ตัวอย่าง (MC132 และ MC139) มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสารเห็ดกินบริสุทธิ์ของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (รูปที่ 3.17 และ 3.18 และตารางที่ 3.5)



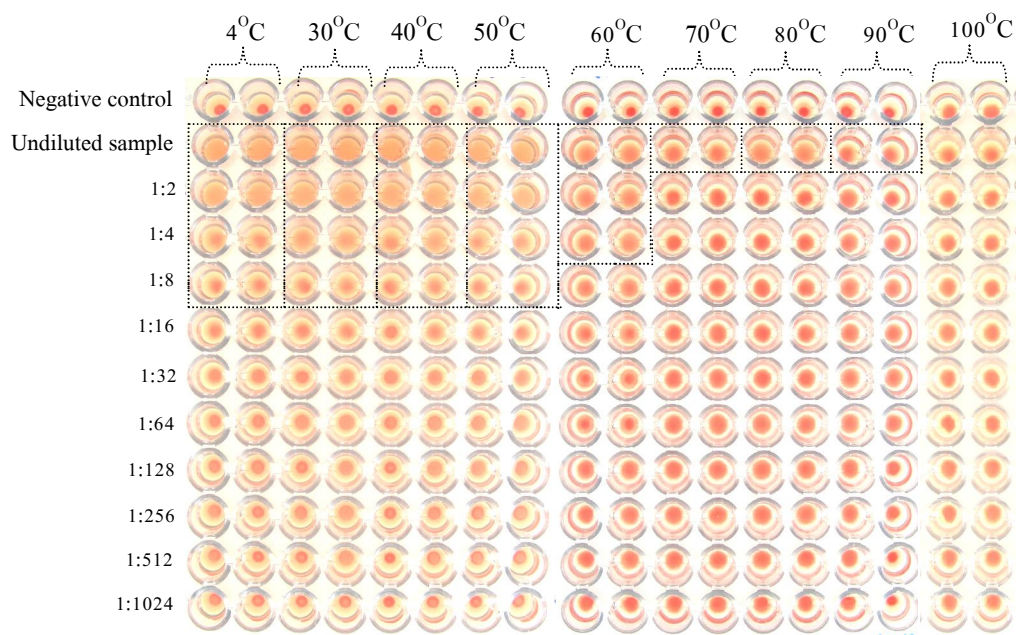
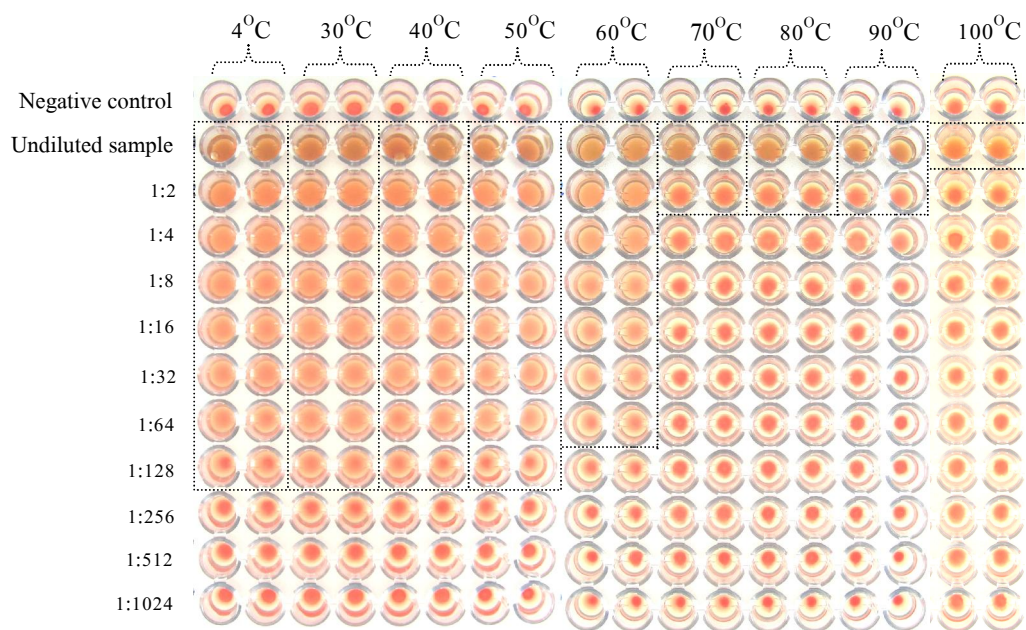
รูปที่ 3.17 ผลการทดสอบความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่ จำนวน 6 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.5 ความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดที่คัดเลือก

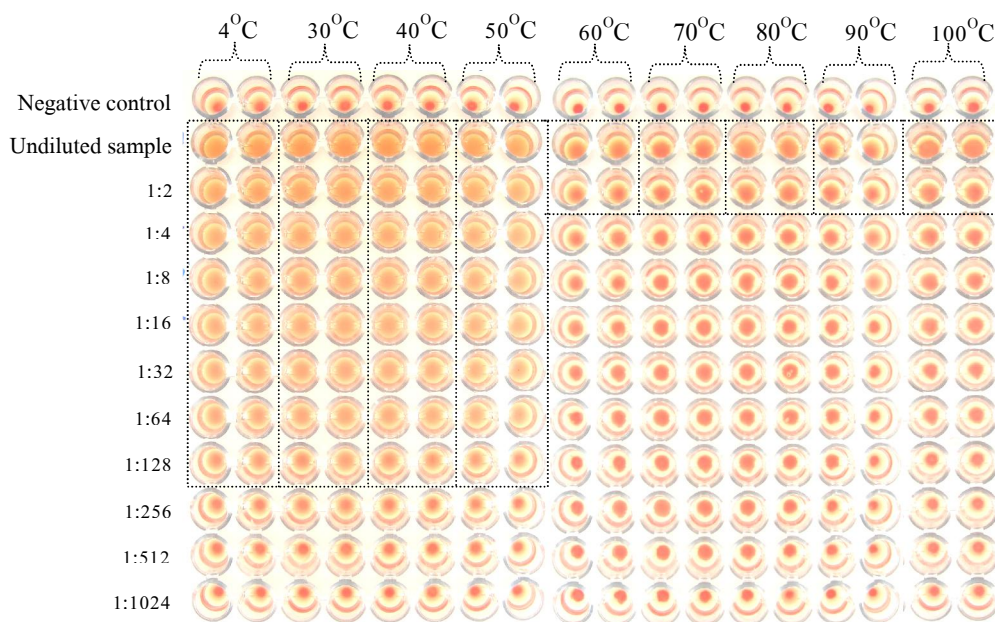
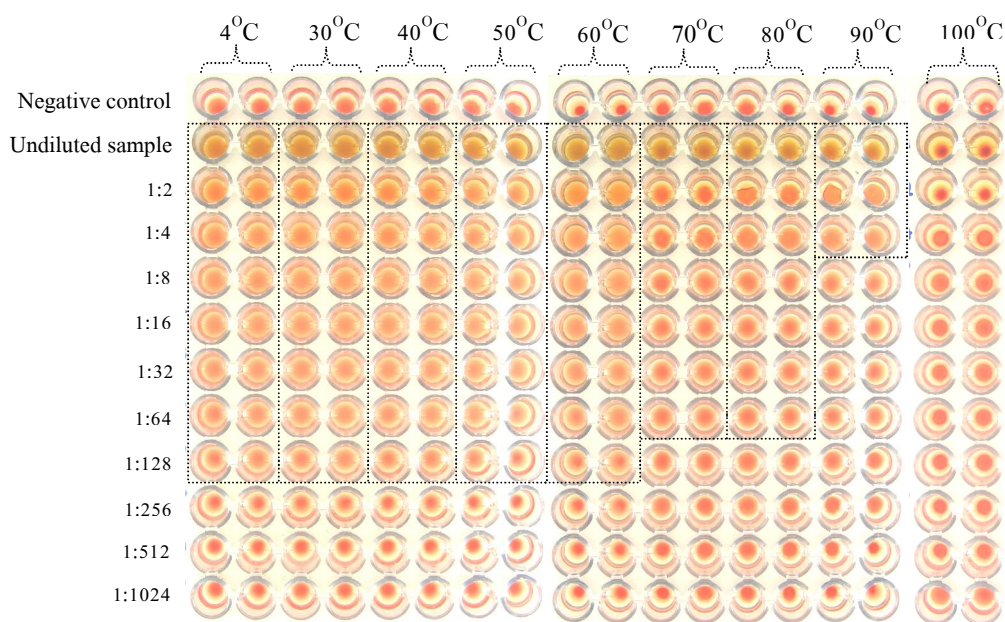
Crude extract of lectins from mushroom species/mushroom collection location	Stability at temperature (°C) for 30 min
MC188 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	60
MC131 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	50
MC132 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	60
MC133 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สุรินทร์	50
MC134 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) บุรีรัมย์	50
MC138 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) ขอนแก่น	50
MC139 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) กาฬสินธุ์	60
MC322 <i>Schizophyllum commune</i> (เห็ดแครง) นครปฐม	65

(A) *Volvariella volvacea* MC131(B) *Volvariella volvacea* MC132

รูปที่ 3.18 ผลการทดสอบปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดเห็ด
 เล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่เก็บรวบรวมจากต่าง
 พื้นที่จำนวน 6 ตัวอย่าง (A ถึง F) ภายหลังจากที่สารผ่านการสัมผัสความร้อนที่อุณหภูมิ 40
 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
 24 ชั่วโมง

(C) *Volvariella volvacea* MC133(D) *Volvariella volvacea* MC134

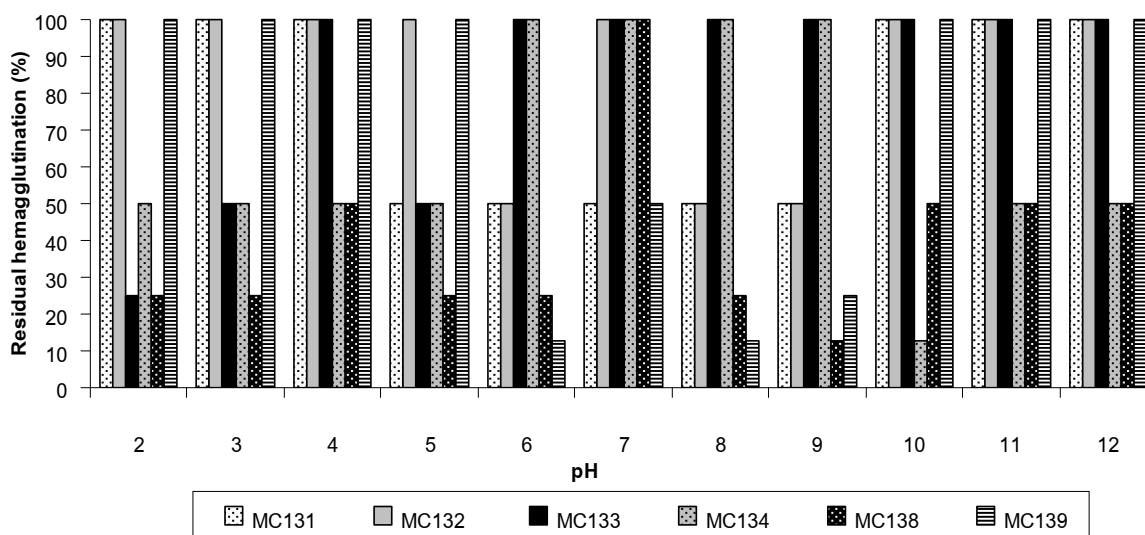
รูปที่ 3.18 (ต่อ) ผลการทดสอบปฏิกริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดเห็ดขยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่จำนวน 6 ตัวอย่าง (A ถึง F) ภายหลังจากที่สารผ่านการสัมผัสความร้อนที่อุณหภูมิ 40 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(E) *Volvariella volvacea* MC138(F) *Volvariella volvacea* MC139

รูปที่ 3.18 (ต่อ) ผลการทดสอบปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดหยาบ เล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่จำนวน 6 ตัวอย่าง (A ถึง F) ภายหลังจากที่สารผ่านการสัมผัสความร้อนที่อุณหภูมิ 40 ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.2 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดเหยาบเล็กดิน

จากการทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 2-12 ของสารสกัดเหยาบเล็กดินของเห็ดที่รับประทานได้ที่คัดเลือกโดยนำสารสกัดเหยาบของเล็กดิน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) มาปรับ pH ด้วยสารละลายดังนี้ 50mM Glycine-HCl (pH 2.0-3.0), 50mM Sodium acetate (pH 4.0-5.5), 50mM Tris-HCl (pH 8.0-8.5), และ 50mM Glycine-NaOH (pH 9.0-12.0) จากนั้นเก็บสารละลายเล็กดินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงปรับสภาพของสารละลายโปรตีนเล็กดินให้เป็นกลาง เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของสารเล็กดินที่ยังเหลืออยู่ด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย เปรียบเทียบกับสารสกัดเล็กดินเริ่มต้น (มีกิจกรรมการจับกลุ่ม 100%) พบว่าสารสกัดเหยาบเล็กดินจากเห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 7-11 เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ ในขณะที่สารสกัดเล็กดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* จำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่าง (MC131 ถึง MC134, MC138 และ MC139) ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่กัน 3 ตัวอย่าง (MC131, MC132 และ MC139) มีความเสถียรที่ pH 2-12 สารเล็กดินจากเห็ด 1 ตัวอย่าง (MC133) มีความเสถียรที่ pH 4-12 สารเล็กดิน 1 ตัวอย่าง (MC134) มีความเสถียรที่ pH 6-9 และสารเล็กดินจากเห็ด 1 ตัวอย่าง (MC139) มีความเสถียรที่ pH 7 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และสารเล็กดิน ของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง ที่ 6-10 เป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง (รูปที่ 3.19 และตารางที่ 3.6)



รูปที่ 3.19 ผลการทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดเหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่จำนวน 6 ตัวอย่าง

ตารางที่ 3.6 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดที่คัดเลือก

Crude extract of lectins from mushroom species/mushroom collection location	Stability at pH
MC188 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดกระโถกขาว) นครราชสีมา	7-11
MC131 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	2-12
MC132 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	2-12
MC133 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สุรินทร์	4-12
MC134 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) บุรีรัมย์	6-9
MC138 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) ขอนแก่น	7
MC139 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) กาฬสินธุ์	2-12
MC322 <i>Schizophyllum commune</i> (เห็ดแครง) นครปฐม	6-10

3.3.4 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดรับประทานได้ที่เลือกกับเซลล์มะเร็งของคน

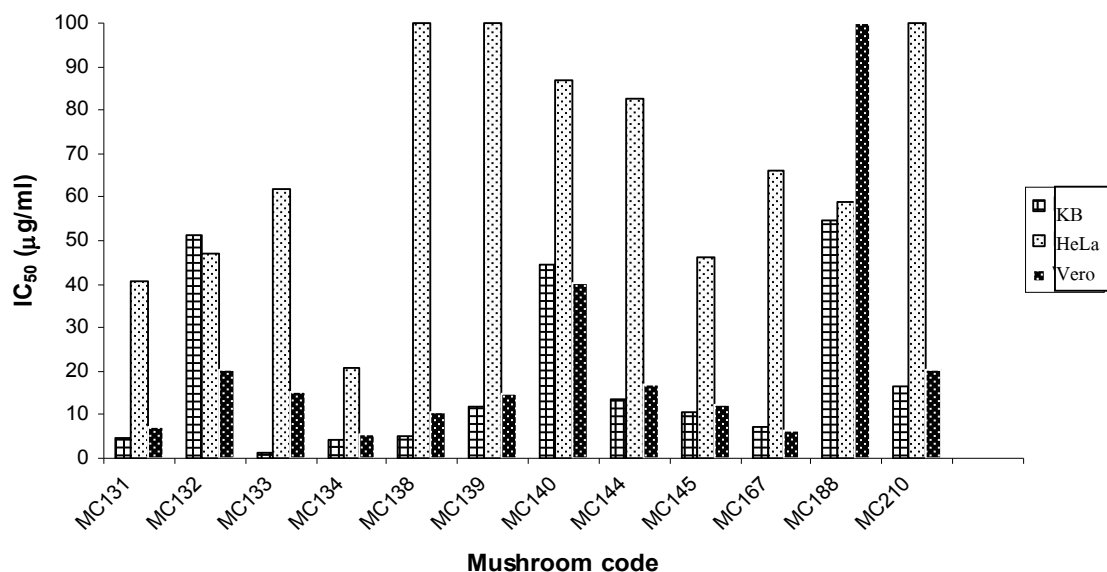
จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดดินจากเห็ดที่รับประทานได้ที่เลือก ต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ที่พบมาก คือ มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก (Human epidermoid carcinoma, KB) และมะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma, HeLa) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay พร้อมทั้งศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดนั้นต่อเซลล์ปกติ คือ เซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney epithelial cell line, Vero) ใช้ชุดควบคุมที่ไม่มีสารละลายโปรตีนเล็กดินเป็น Negative control และชุดควบคุมที่มี Adriamycin 100 ไมโครโมลาร์ เป็น Positive control โดยค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) เป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งค่า IC_{50} มาตรฐานของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคนชนิดเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell line), เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก (KB cell line) และเซลล์ไตของลิง (Vero cell line) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.20 และ 3.21)

สารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฝิ่ง *Xerocomus* sp. MC210 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปากและเซลล์จากไตของลิงที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 16.40 ± 2.05 และ 20.27 ± 0.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดกระโถก *Amanita* sp. MC188 ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์จากไตของลิง แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 54.783 ± 1.980 และ 59.11 ± 2.48 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.20)

ตารางที่ 3.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดกินจากเห็ดที่รับประทานได้บางชนิดกับเซลล์มะเร็งของหนูด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

Mushroom family/species/collection location	IC ₅₀ Value (µg/ml) at λ 550 nm		
	Mean ± SD		
	KB	Hela	Vero
Tricholomataceae			
MC190 <i>Termitomyces clypeatus</i> (เห็ดโคน) นครราชสีมา	>100	>100	>100
Cantharellaceae			
MC183 <i>Cantharellus odoratus</i> (เห็ดขมิ้นหอม) นครราชสีมา	>100	>100	>100
Amanitaceae			
MC188 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	54.783±1.980	59.11±2.48	>100
MC354 <i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	>100	>100	>100
Russulaceae			
MC329 <i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) สกลนคร	>100	>100	>100
MC331 <i>Russula</i> sp. (เห็ดตะไคล) สกลนคร	>100	>100	>100
MC357 <i>Russula virescens</i> (เห็ดตะไคลเขียว) นครราชสีมา	>100	>100	>100
Pluteaceae			
MC131 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	4.801±0.302	40.887±4.312	7.004±0.376
MC132 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	51.34	47.06±3.90	20.156
MC133 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สุรินทร์	1.40±0.157	61.68±4.70	15.436±1.362
MC134 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) บุรีรัมย์	4.06±0.34	21.386±2.62	5.63±0.26
MC138 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) ขอนแก่น	5.08±0.39	>100	10.78±2.19
MC139 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) กาฬสินธุ์	11.96±0.96	>100	14.76±1.49
MC140 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) บุรีรัมย์	44.34±2.95	82.736±3.20	40.11±0.91
MC144 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) ชัยภูมิ	13.68±3.71	82.74±3.18	17.05±0.95
MC145 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) มหาสารคาม	10.40±2.43	45.99±5.645	12.26±2.26
MC167 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สกลนคร	7.30±0.87	66.197±2.40	6.32±0.30
MC168 <i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) อุบลราชธานี	>100	>100	>100
Boletaceae			
MC210 <i>Xerocomus</i> sp. นครราชสีมา	16.40±2.05	>100	20.27±0.25
MC360 <i>Tylopilus</i> sp. (เห็ดผึ้งนกยูง) บุรีรัมย์	>100	>100	>100
Schizophyllaceae			
MC322 <i>Schizophyllum commune</i> (เห็ดแครง) นครปฐม	>100	>100	>100
Adriamycin (100 ไมโครโมลาร์)	3.299±0.455	58.518±3.43	20.74±4.341

หมายเหตุ: KB, เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (Human epidermoid carcinoma cell line); HeLa, เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line); Vero, เซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney epithelial)
 IC₅₀ (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
 ค่า IC₅₀ มาตรฐานของสารสกัดเห็ดที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม
 ค่า IC₅₀ มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม



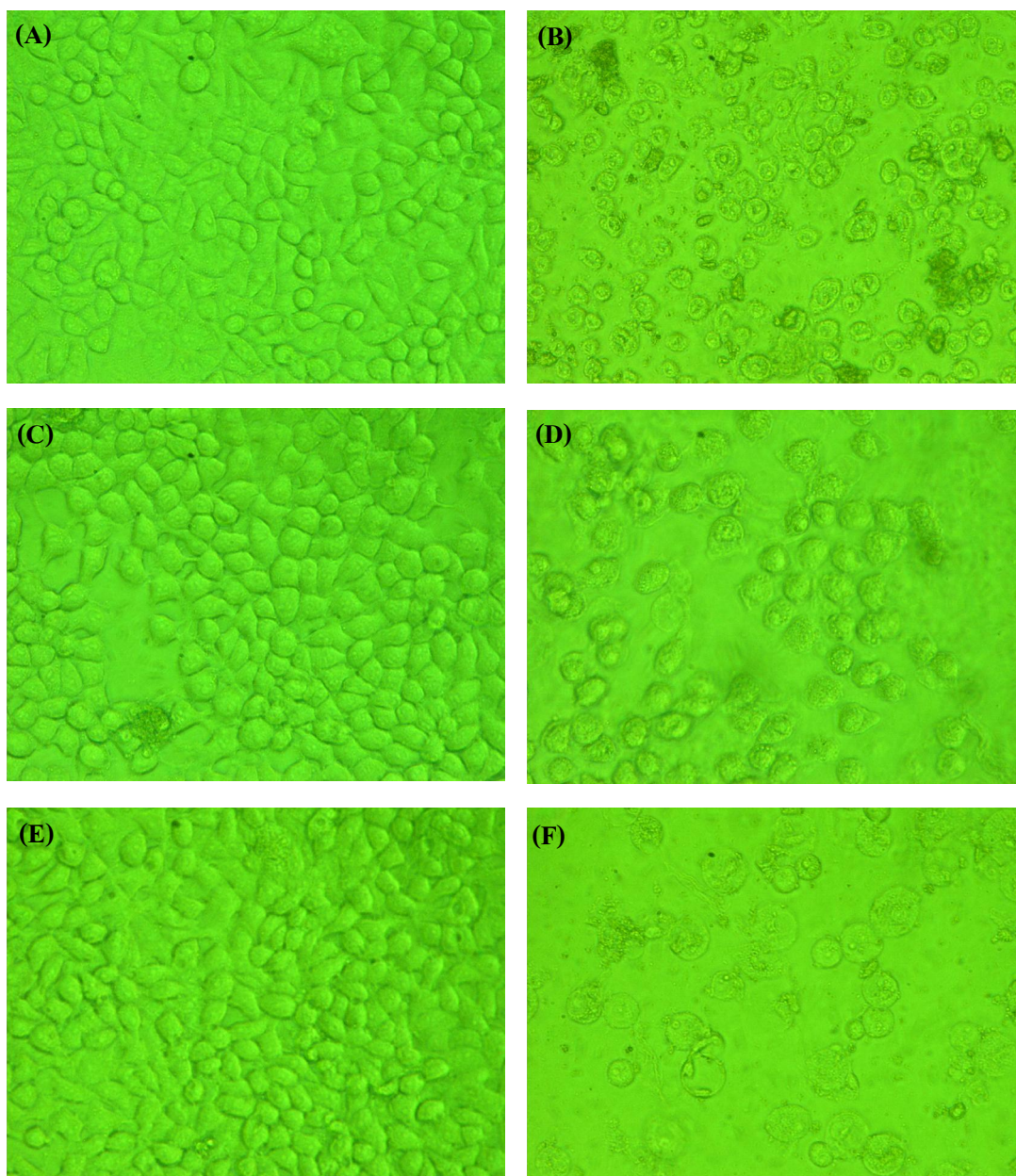
รูปที่ 3.20 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเห็ดกิน (Crude extract) จากเห็ดที่รับประทานได้ที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

Mushroom codes: MC131, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) นครราชสีมา; MC132, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) นครราชสีมา; MC133, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) สุรินทร์; MC134, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) บุรีรัมย์; MC138, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) ขอนแก่น; MC139, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) กาฬสินธุ์; MC140, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) บุรีรัมย์; MC144, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) ชัยภูมิ; MC145, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) มหาสารคาม; MC167, *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) สกลนคร; MC188, *Amanita* sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา, และ MC210, *Xerocomus* sp. นครราชสีมา

KB, เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก (Human epidermoid carcinoma cell line)

HeLa, เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line)

Vero, เซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney epithelial)



รูปที่ 3.21 ตัวอย่างผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ต่อเซลล์มะเร็งของคนด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

(A), (C), และ (E): เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB cell line) และ เซลล์ไตของลิง (Vero cell line) ตามลำดับ เป็นชุดควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารโปรตีนสกัดดิน

(B), (D), และ (F): เซลล์มะเร็งปากมดลูก, เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก, และเซลล์ไตของลิง ตามลำดับ ทดสอบด้วยสารสกัดเห็ดฟางโปรตีนสกัดดินที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4 การทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้

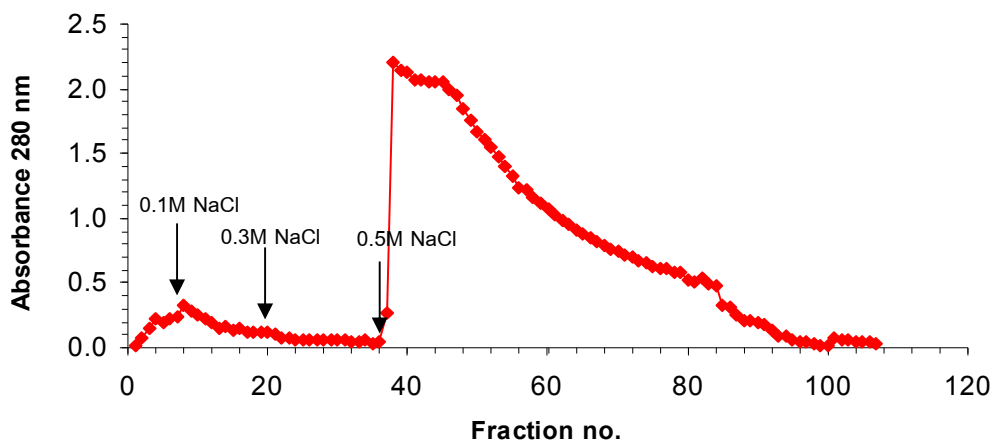
จากผลการตรวจหาสารเล็กตินที่ผลิตจากเห็ดรับประทานได้ด้วยปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์และการทดสอบสมบัติทางชีวภาพในเบื้องต้น ด้านความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเชื่อมช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคน ได้เลือกตัวอย่างเห็ด 2 ชนิด (เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 และเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188) เพื่อทำบริสุทธิ์สารเล็กติน และเลือกเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 เพื่อศึกษาการทำบริสุทธิ์เพื่อเปรียบเทียบควบคุมไปจากที่มีผลงานวิจัยพื้นฐานของคณะผู้วิจัย การทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ 3 ตัวอย่าง มีผลสำเร็จตามขั้นตอนเป็นลำดับดังนี้

3.4.1 การตกตะกอนโปรตีนเล็กตินด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

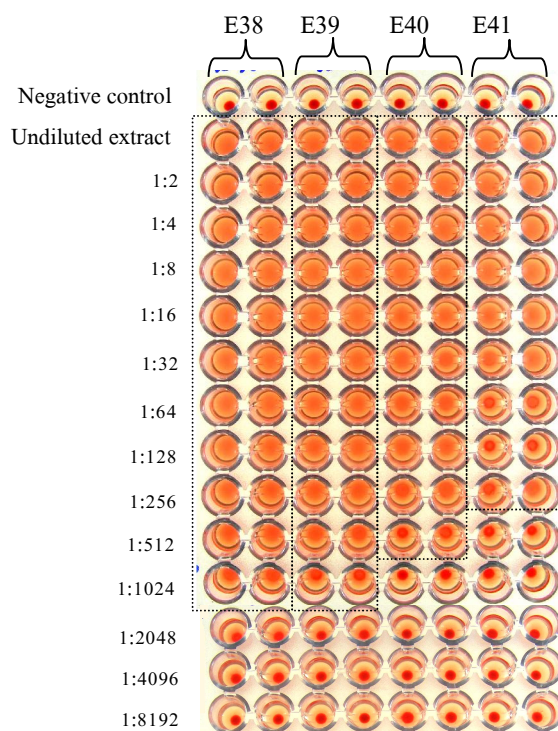
จากที่ได้ทดลองตกตะกอนเล็กตินจากเห็ดที่คัดเลือก ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate) ความเข้มข้น 50-90% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่าเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 และเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ตกตะกอนด้วย 70-90 และ 50% Ammonium sulphate ตามลำดับ สารเล็กตินที่ศึกษามีความเข้มข้นต่ำจึงใช้การปั่นแยกตะกอนโปรตีนด้วยเครื่อง Ultracentrifuge (45Ti rotor, L80 Ultracentrifuge, Beckman Coulter, U.S.A.) ที่ความเร็ว 35,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายใสที่ได้ไปแยกเกลือออกด้วย Dialysis ใช้ Cellulose acetate dialysis-tubing membrane ที่มี Molecular weight cut-off (NMWC) ที่ 10 kDa เตรียมให้สารละลายโปรตีนเล็กตินให้อยู่ใน 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.3) ก่อนนำไปแยกโดยวิธี Chromatography ดังนี้

3.4.2 การทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ด้วยวิธี Ion exchange chromatography ชนิด Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column

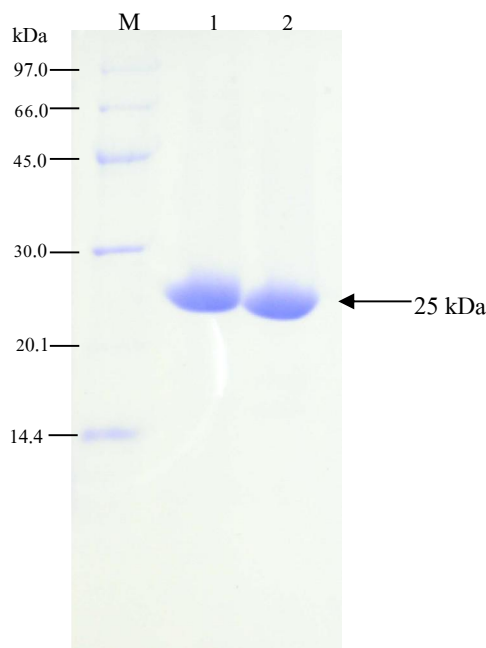
เมื่อดอกตะกอนสารสกัดหยาบเล็กตินของเห็ด *Volvariella volvacea* MC133 ด้วย 70% Ammonium sulphate และทำบริสุทธิ์โดยใช้ Anionic exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose ในคอลัมน์ (1.5×11 เซนติเมตร) ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) จะสารละลายโปรตีนเล็กตินด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มีความเข้มข้นของ Sodium chloride ตั้งแต่ 0-1M สามารถทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจากเห็ด *Volvariella volvacea* MC133 ได้ดี สารโปรตีนออกมาที่ความเข้มข้นของ Sodium chloride เท่ากับ 0.5M (รูปที่ 3.22) สารเล็กตินที่แยกบริสุทธิ์มีกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่ค่าความเจือจาง 1:256 ถึง 1:1024 (รูปที่ 3.23) เมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดมวลโมเลกุลในสภาพเสียธรรมชาติด้วย 15% Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าสารโปรตีนเล็กตินมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 25 kDa (รูปที่ 3.24)



รูปที่ 3.22 Elution profile จากการทำบริสุทธิ์สารโปรตีนจาก Fruiting body ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose) เมื่อชะสารโปรตีนเล็กคินด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มีความเข้มข้นของ Sodium chloride ตั้งแต่ 0-1M (Stepwise concentration gradient) และเก็บส่วนของสารละลายที่ชะออกจากคอลัมน์ Fraction ละ 1 มิลลิลิตร

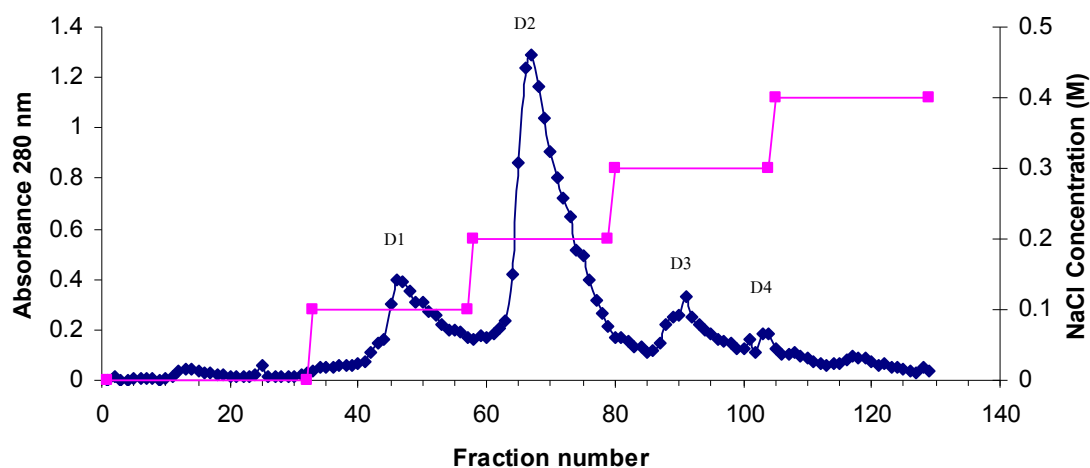


รูปที่ 3.23 ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายกับสารโปรตีนบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่แยกด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose)
E38, E39, E40, และ E41: ส่วนของสารโปรตีนเล็กคินที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ (eluate) Fractions ลำดับที่ 38, 39, 40, และ 41 ตามลำดับ

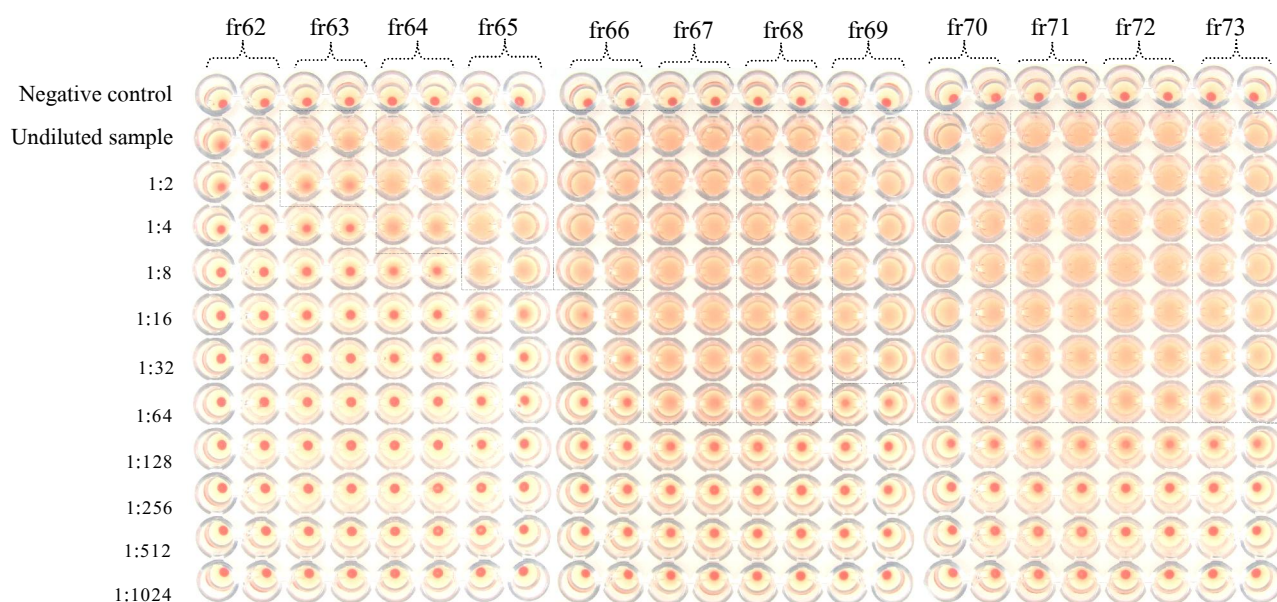


รูปที่ 3.24 สาร โปรตีนเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่แยกด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose) และวิเคราะห์ด้วย 15% SDS-PAGE
Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 1 และ 2, สาร โปรตีนเล็กดินที่แยกบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133

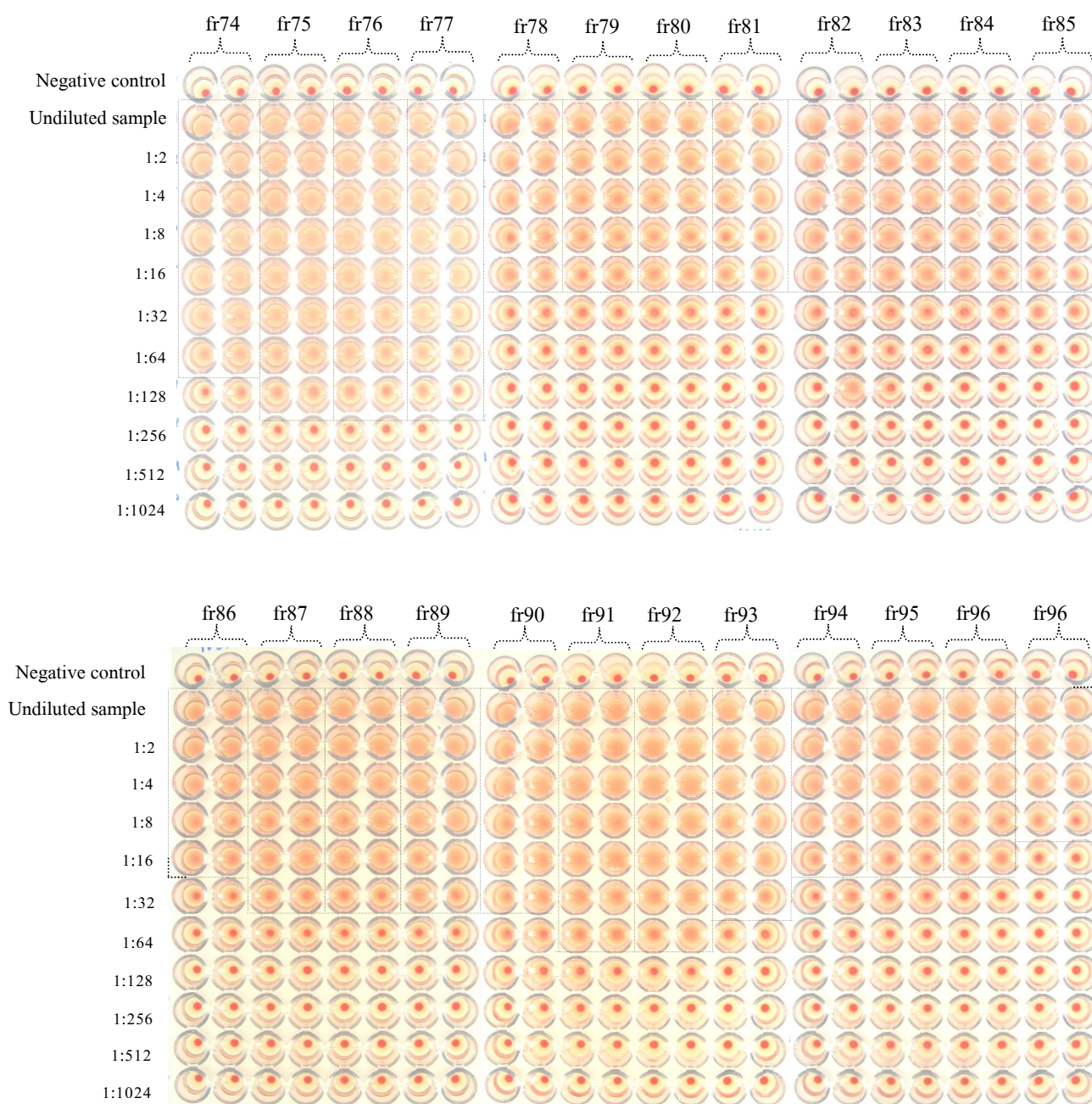
จากนั้นได้ทดลองตกตะกอนสารสกัดหยาบของเล็กดินจาก *Volvariella volvacea* MC133 ซ้ำด้วย 90% Ammonium sulphate กำจัดเกลือ Ammonium sulphate ด้วย Dialysis bag (Molecular weight cut-off 10 kDa) ที่ 4 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลายโปรตีนเล็กดินให้อยู่ใน 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ก่อนนำไปทำบริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sepharose resin ขนาด 1.5×5 เซนติเมตร Equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) และล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) (3 bed volumes) เมื่อชะโปรตีนออกโดยใช้สารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มีความเข้มข้นของ Sodium chloride (NaCl) ตั้งแต่ 0-0.5M (Stepwise concentration gradient) ใช้ 2 bed volumes อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ในแต่ละความเข้มข้น เก็บ fraction โดยเก็บ 1 มิลลิลิตรต่อหลอด พบสารโปรตีนเล็กดินจาก *Volvariella volvacea* MC133 เมื่อชะโปรตีนออกมาที่ความเข้มข้น 0.2M NaCl เมื่อทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายในส่วนของ D2 เป็น fractions ที่ 63-99 (รูปที่ 3.25) สารโปรตีนเล็กดินที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วย Elution buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มีความเข้มข้น 0.2M NaCl นี้มีกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายอยู่ในช่วงค่าความเจือจาง 1:1 ถึง 1:128 (รูปที่ 3.26)



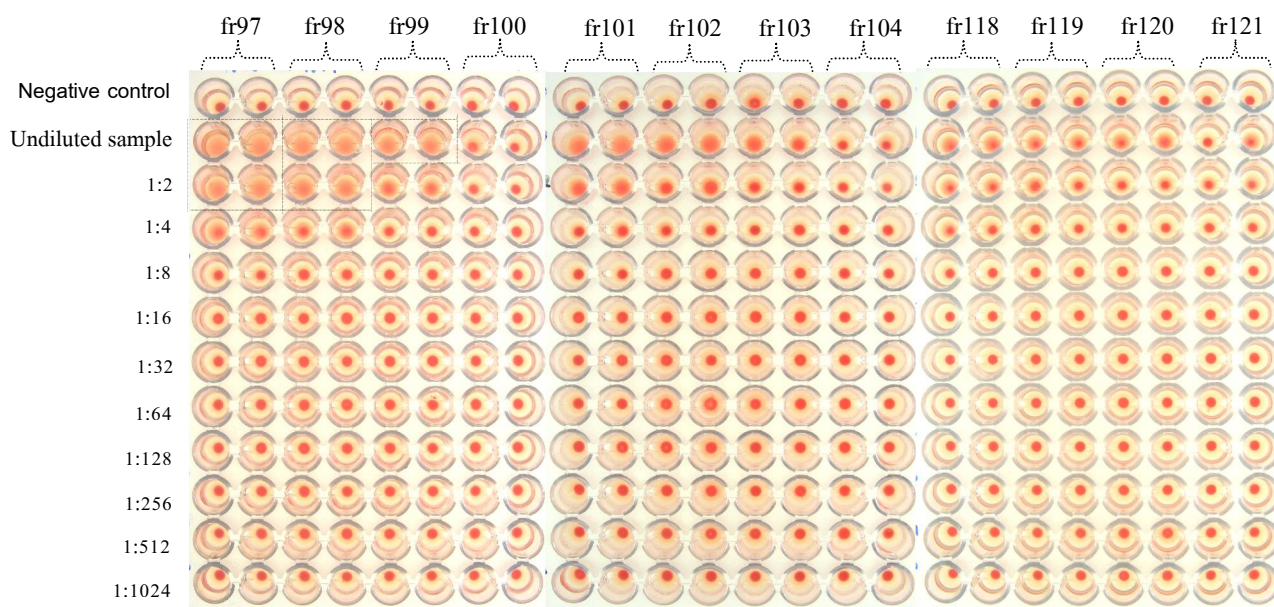
รูปที่ 3.25 Elution profile จากการทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ด้วยวิธี Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose) ขนาดของคอลัมน์ 1.5×5 เซนติเมตร เมื่อชะสาร โปรตีนเล็กตินด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มีความเข้มข้นของ Sodium chloride ตั้งแต่ 0 ถึง 0.5M (Stepwise concentration gradient) อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บส่วนของสารละลายที่ชะออกจากคอลัมน์ Fraction ละ 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 3.26 ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายกับสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่แยกด้วย Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose)
Fr62-121: ส่วนของสาร โปรตีนเล็กตินที่ชะออกจากคอลัมน์ (Eluate) Fractions ลำดับที่ 62-121 ตามลำดับ

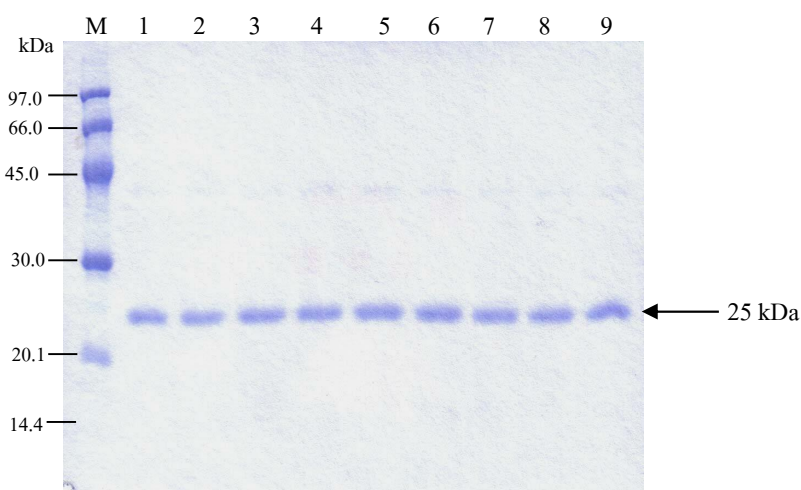


รูปที่ 3.26 (ต่อ) ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายกับสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่แยกด้วย Anionic exchange chromatography (DEAE-Sephrose)
Fr62-121: ส่วนของสารโปรตีนเล็กดินที่ชะออกจากคอลัมน์ (Eluate) Fractions ลำดับที่ 62-121 ตามลำดับ



รูปที่ 3.26 (ต่อ) ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายกับสารโปรตีนบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่แยกด้วย Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose)
Fr62-121: ส่วนของสารโปรตีนเล็กคินที่ชะออกจากคอลัมน์ (Eluate) Fractions ลำดับที่ 62-121 ตามลำดับ

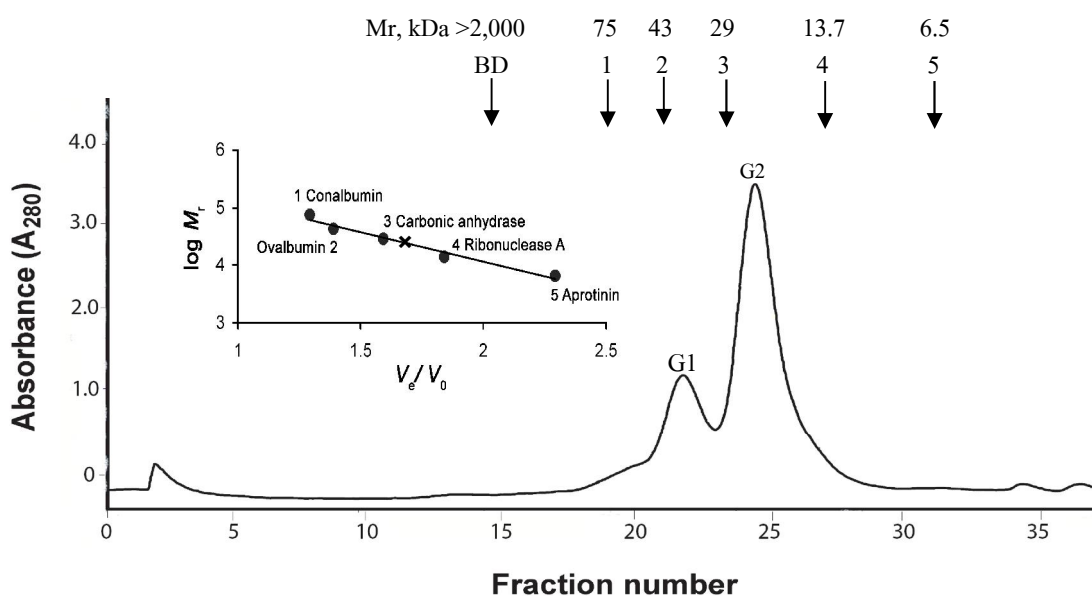
จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารโปรตีนเล็กคินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 (หลังจากผ่าน DEAE- Sepharose column ที่มีการชะแบบ Stepwise concentration gradient) ด้วย 12.5% SDS-PAGE พบว่าได้แถบโปรตีนขนาด ประมาณ 25 kDa (รูปที่ 3.27)



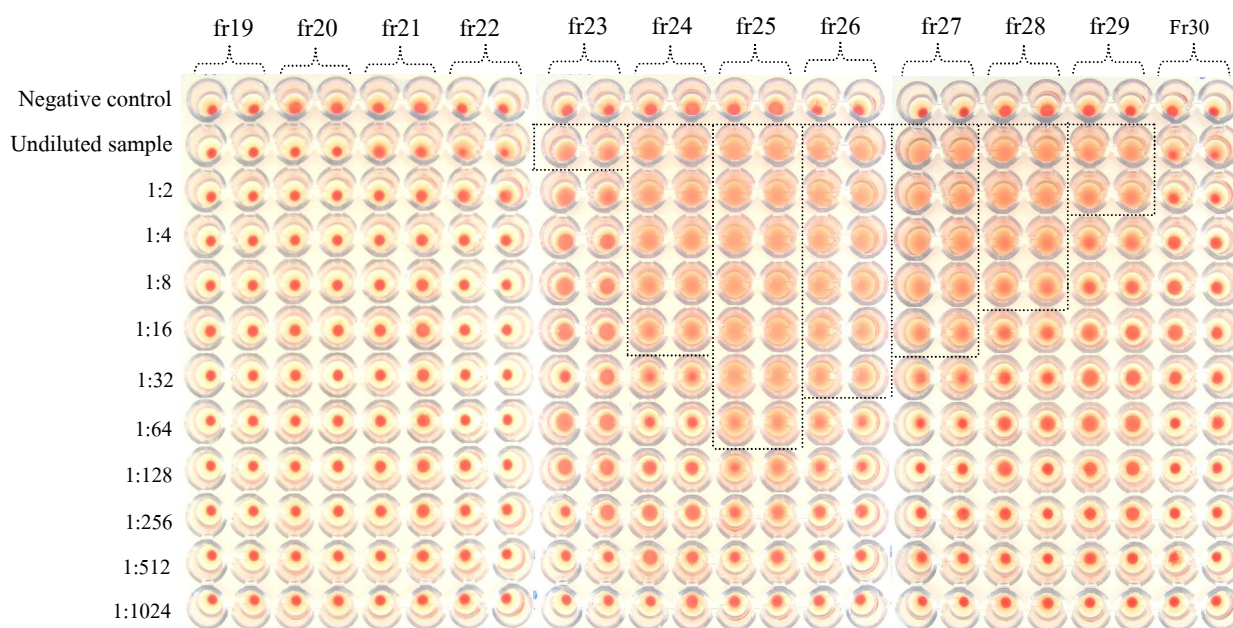
รูปที่ 3.27 สารโปรตีนเล็กคินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่แยกด้วย Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose) และวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วย 15% gel SDS-PAGE
Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare UK Limited); 1-9, Fractions ของสารโปรตีนเล็กคินที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วย 0.2M NaCl: 66, 68, 70, 74, 76, 78, 84, 88, และ 92 ตามลำดับ

เมื่อรวม Fraction ของสารละลายโปรตีนในส่วนของ D2 (Fractions ที่ 63-99 รูปที่ 3.25) ซึ่งมีกิจกรรมของสารเล็กตินนำไปหามวลโมเลกุลในสภาพธรรมชาติของโปรตีนเล็กตินด้วยวิธี Gel filtration chromatography พบ Peak ของโปรตีนเล็กติน 1 Peak คือ G2 (Fractions 23-29) (รูปที่ 3.28) มีกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายอยู่ในช่วงค่าความเจือจางระหว่าง 1:1 ถึง 1:64 (รูปที่ 3.29)

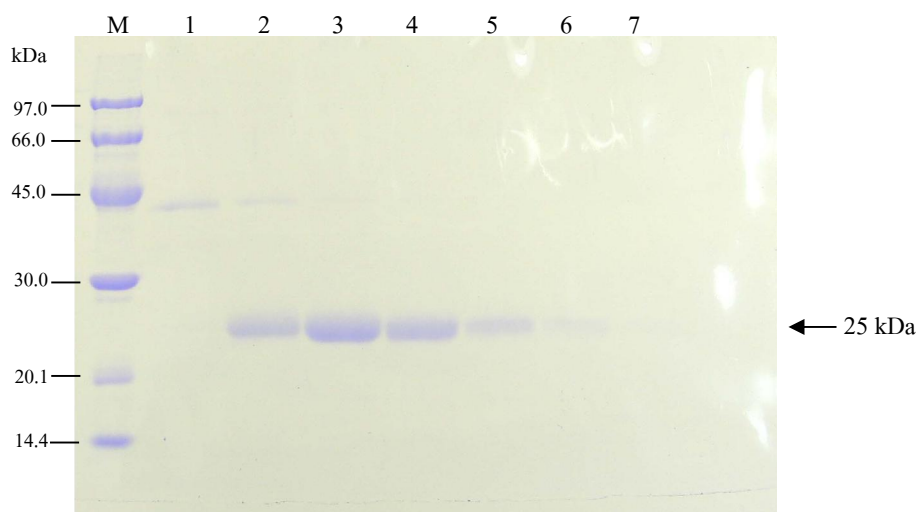
เมื่อวิเคราะห์ขนาดมวลโมเลกุลจาก Gel filtration chromatography ด้วย Superdex 75 column พบว่าสารเล็กตินที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเห็ดฟาง MC133 มีขนาด 25 kDa จากนั้นนำ Fraction ที่ชะออกจากคอลัมน์ที่มีกิจกรรมของสารเล็กตินมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย 12.5% SDS-PAGE พบว่าได้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่มีขนาดมวลโมเลกุล 25 kDa (รูปที่ 3.30) ซึ่งตรงกับขนาดมวลโมเลกุลในสภาพธรรมชาติของโปรตีนเล็กตินจาก Gel filtration chromatography แสดงว่าสารเล็กตินที่ทำบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง MC133 มี 1 หน่วยย่อย ซึ่งจัดเป็น Monomeric lectin (รูปที่ 3.30) และมีผลสำเร็จในการทำบริสุทธิ์สารเล็กติน (ตารางที่ 3.9)



รูปที่ 3.28 Elution profile ของการทำบริสุทธิ์สารโปรตีนเล็กตินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ด้วยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Superdex 75 column จาก Fraction D2 (รูปที่ 3.25) ที่ได้จาก DEAE-Sephrose column



รูปที่ 3.29 ผลการทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายกับสารโปรตีนเล็กตินจากเห็ดฟาง MC133 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel filtration chromatography โดยใช้ Superdex 75 column



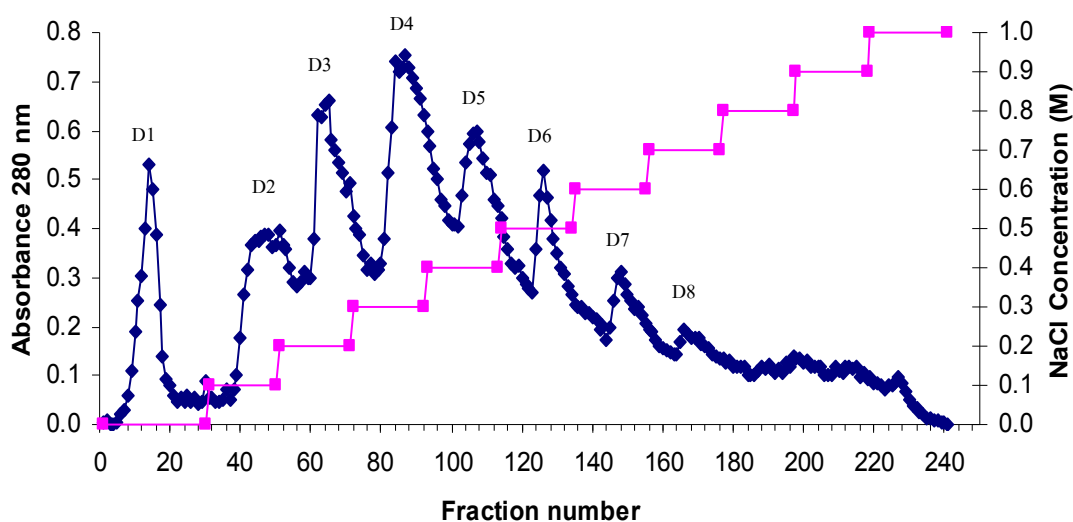
รูปที่ 3.30 สารโปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่ผ่าน Gel filtration chromatography ด้วย Superdex 75 column ตรวจวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE
Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare UK Limited); 1-7, สารบริสุทธิ์เล็กติน Fractions ที่ 23, 24, 25, 26, 27, 28 และ 29 ตามลำดับ ที่ชะออกจากคอลัมน์

ตารางที่ 3.8 สรุปผลการทำบริสุทธิ์โปรตีนเล็กดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133

Step	Yield (mg)	Specific hemagglutinating activity (unit/mg)	Total hemagglutinating activity (unit)	Recovery of hemagglutinating activity (%)	Fold of purification
Extraction	6,393	2.50	16,000	100.00	1.00
90% (NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	2974.20	5.16	15360	96.00	2.06
DEAE-Sepharose column	2190.24	2.10	4608	28.80	0.84
Superdex 75 column	9.34	123.31	1152	7.20	49.27

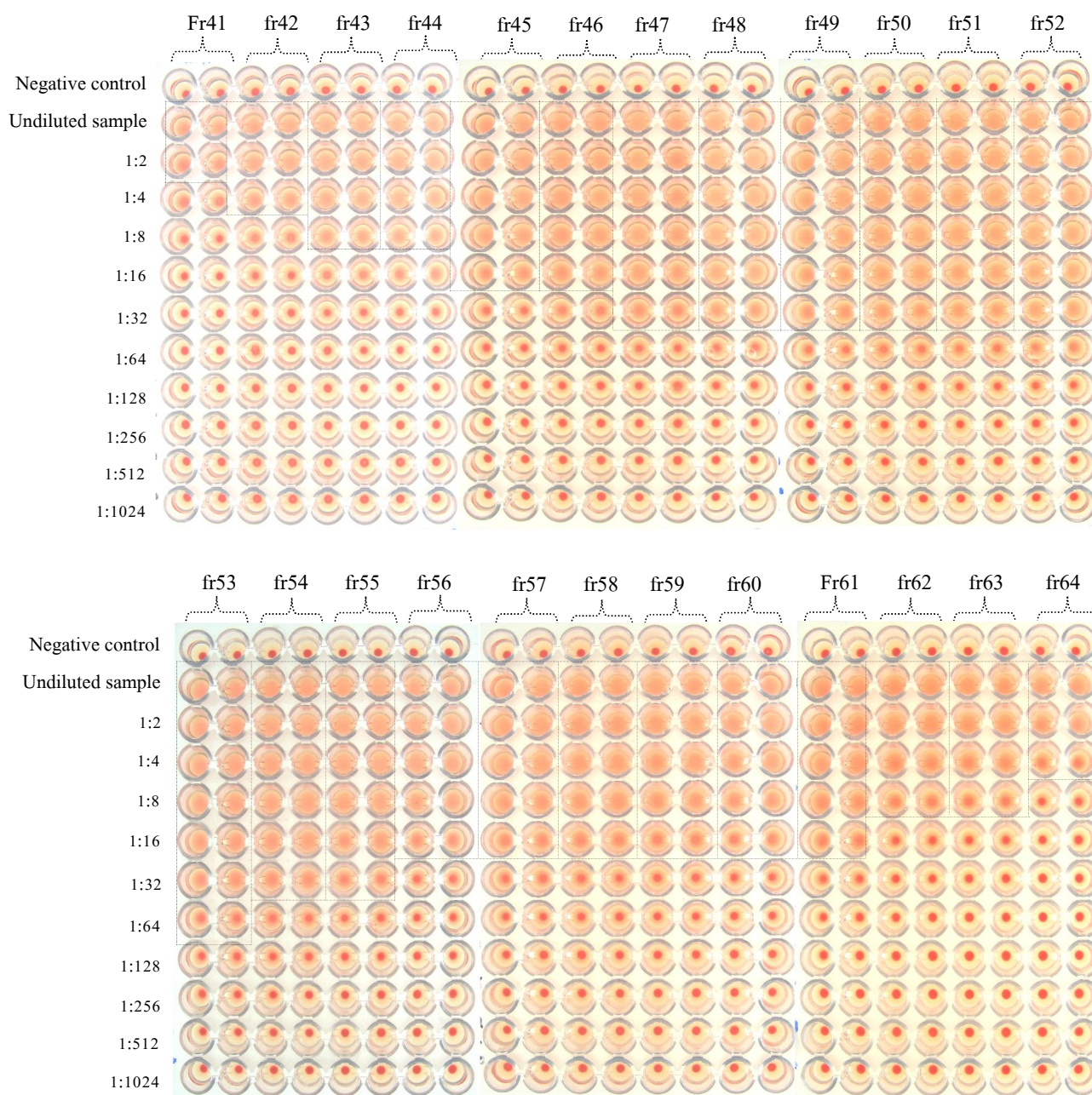
3.4.3 การทำบริสุทธิ์สารเล็กดินจากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ด้วยวิธี Ion exchange chromatography ชนิด Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column

จากการตกตะกอนโปรตีนเล็กดินจากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ด้วย 50% Ammonium sulphate เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์สารเล็กดินโดยใช้ Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column แบบ Stepwise concentration gradient พบสารโปรตีนเล็กดินที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2M อยู่ในส่วนของ D3 (Fractions ที่ 51-64) (รูปที่ 3.31)



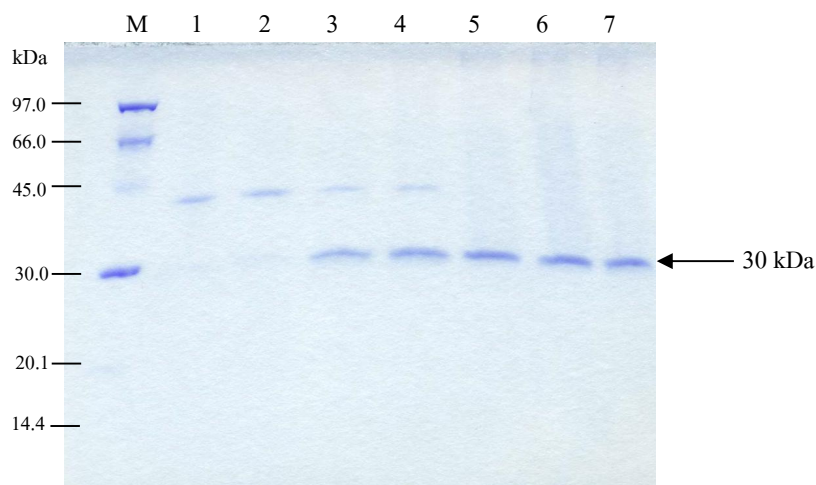
รูปที่ 3.31 Elution profile ของการทำบริสุทธิ์สารโปรตีนเล็กดินจากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ด้วยวิธี Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column ขนาดของคอลัมน์ 1.5×11 เซนติเมตร แบบ Stepwise concentration gradient โดยใช้ความเข้มข้นของ Sodium chloride ตั้งแต่ 0 ถึง 1M อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บส่วนของสารละลายที่ชะออกจากคอลัมน์ Fraction ละ 1 มิลลิลิตร

เมื่อนำ Fraction ที่เป็นตัวแทนของแต่ละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ใช้ในการชะสาร โปรตีนเล็กดินมาทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย พบว่าสารโปรตีนเล็กดินในส่วนของ Peak D2 (Fractions ที่ 41-50) และ D3 (Fractions ที่ 51-64) (รูปที่ 3.31) ที่ชะออกจากคอลัมน์ ด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มี 0.1 และ 0.2M NaCl ตามลำดับ มีกิจกรรมการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายอยู่ในช่วงค่าความเจือจางระหว่าง 1:2 ถึง 1:64 (รูปที่ 3.32)



รูปที่ 3.32 ผลการทดสอบกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายกับสาร โปรตีนเล็กดินที่แยกบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ด้วยวิธี Anion exchange chromatography ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sepharose column

จากนั้นได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารโปรตีนเล็กตินที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเห็ดระโงก MC188 ในส่วนของ Peak D2 (Fractions ที่ 41-50) และ Peak D3 (Fractions ที่ 51-64) (รูปที่ 3.31) ด้วย 12.5% SDS-PAGE พบว่าสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่ได้ MC188 อยู่ในส่วนของ Peak D3 มีขนาด 30 kDa (รูปที่ 3.33)



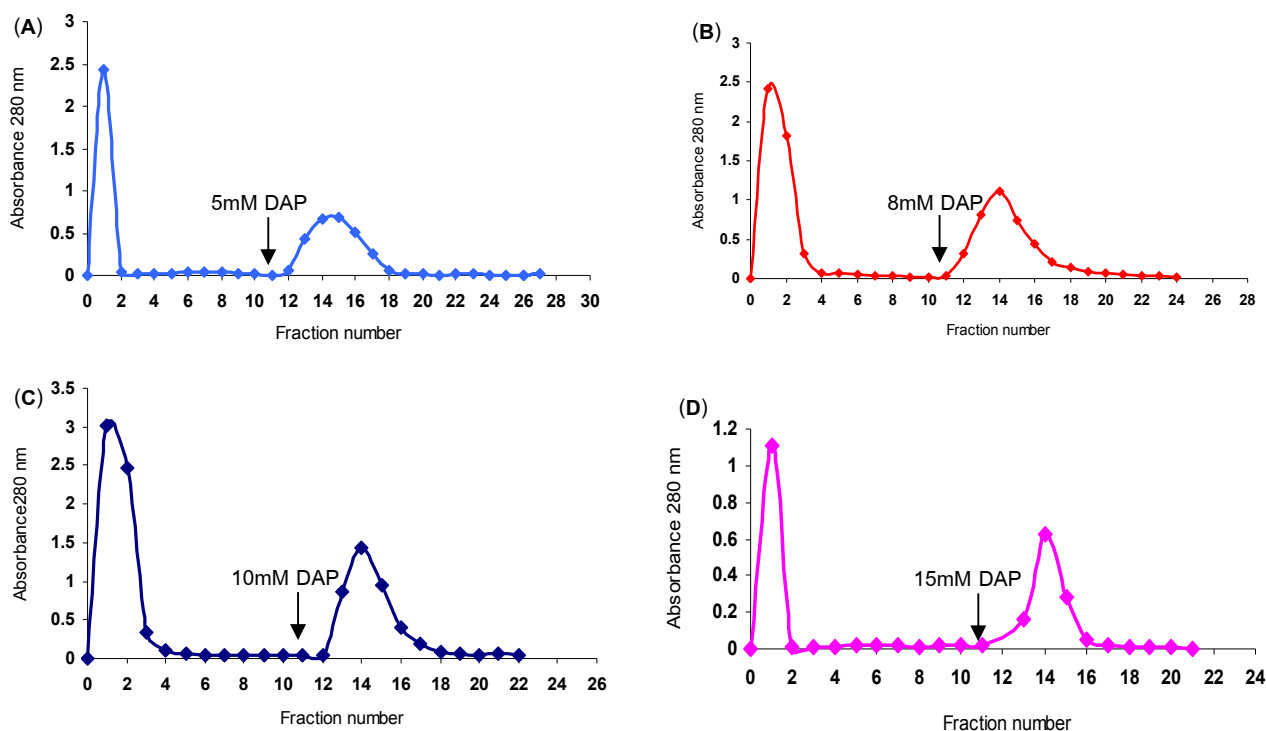
รูปที่ 3.33 สารโปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE

Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 1 และ 2, ส่วนของสารละลาย Fractions ที่ 14 และ 15 (รูปที่ 3.31) ตามลำดับ ที่ไม่จับกับคอลัมน์; 3 และ 4, ส่วนของสารโปรตีนเล็กติน Fractions ที่ 44 และ 48 ตามลำดับ ที่ชะได้จากคอลัมน์ด้วย 0.1M NaCl; และ 5-7, ส่วนของสารโปรตีนเล็กติน Fractions ที่ 51, 58 และ 60 ตามลำดับ ที่ชะได้จากคอลัมน์ด้วย 0.2M NaCl

3.4.4 การศึกษาเปรียบเทียบทำบริสุทธิ์สารเล็กตินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322

โดยวิธี Affinity chromatography ด้วย Mucin-Sepharose 4B column

จากผลงานวิจัยพื้นฐานสามารถทำบริสุทธิ์สารละลายโปรตีนเล็กตินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 โดยตกตะกอนด้วย 70% Ammonium sulphate แล้วแยกบริสุทธิ์สารเล็กตินโดยใช้ Affinity chromatography ด้วยคอลัมน์ Mucin-Sepharose 4B ชะสารละลายโปรตีนเล็กตินออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 1,3 Diaminopropane (DAP) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเพื่อให้ได้สารเล็กตินบริสุทธิ์ความเข้มข้นสูง ได้ทดลองใช้ DAP ความเข้มข้นเท่ากับ 5, 8, 10 และ 15mM และตรวจพบสารโปรตีนเล็กตินแยกออกจากคอลัมน์จากการชะด้วย DAP ทั้ง 4 ความเข้มข้น (รูปที่ 3.34A-D)

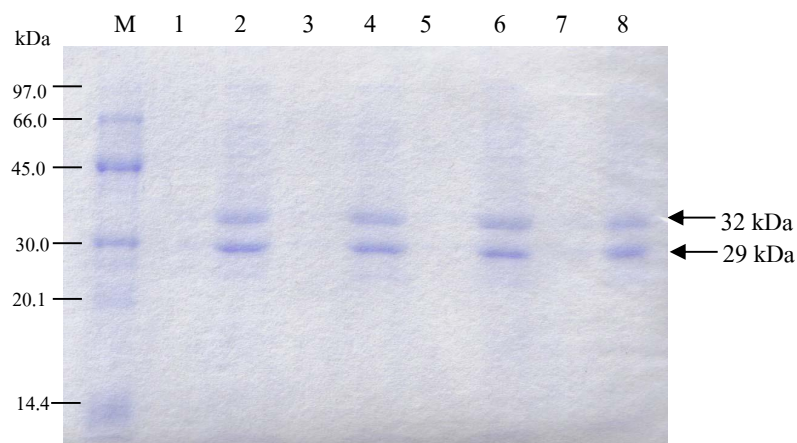


รูปที่ 3.34 Elution profiles จากการทำบริสุทธิ์สารโปรตีนเล็กคินจาก *Schizophyllum commune* MC322 ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B resin ขนาดของคอลัมน์ 1.5×5 เซนติเมตร ะสารโปรตีนเล็กคินด้วย 1,3 Diaminopropane (DAP) ความเข้มข้น 5mM (A), 8mM (B), 10mM (C), และ 15mM (D) อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที และเก็บส่วนของสารละลายที่ชะออกจากคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร

เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารโปรตีนเล็กคินที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเห็ดแครง MC322 ด้วย 12.5% SDS-PAGE พบว่าได้แถบโปรตีน 2 แถบ ขนาดประมาณ 29 และ 32 kDa ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ไม่ว่าจะใช้สารละลาย 1,3 Diaminopropane (DAP) ที่มีความเข้มข้น 5, 8, 10 และ 15mM เพื่อชะสารโปรตีนเล็กคินออกจากคอลัมน์ (รูปที่ 3.35)

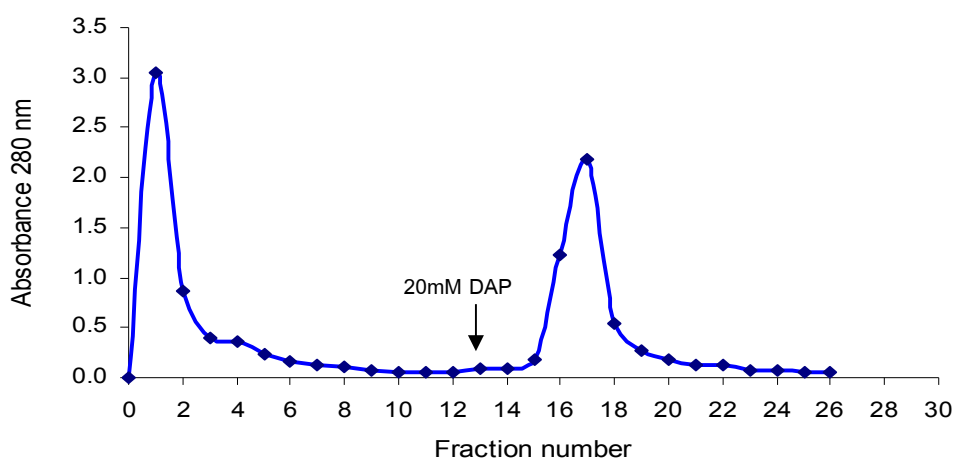
สารละลายโปรตีนเล็กคินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 70% Ammonium sulphate เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธีการเดิม (ใช้ Affinity chromatography ด้วย Mucin-Sepharose 4B column) แต่ชะด้วย 1,3 Diaminopropane (DAP) ความเข้มข้นสูงขึ้นไปเป็น 20mM พบสารโปรตีนเล็กคินจากเห็ดแครง MC322 ชะออกมาอยู่ใน Fractions ที่ 15-20 (รูปที่ 3.36)

Fractions ที่ 15-18 (รูปที่ 3.36) ที่ชะได้จากคอลัมน์ด้วย 20mM DAP มีสารโปรตีนเล็กคิน ที่มีกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายอยู่ในช่วงค่าความเจือจางระหว่าง 1:8 ถึง 1:64 (รูปที่ 3.37) มีแถบโปรตีนขนาดประมาณ 29 และ 32 kDa (รูปที่ 3.38) เมื่อตรวจสอบโปรตีนเล็กคินที่ได้ด้วย 12.5% SDS-PAGE ผลการทำบริสุทธิ์สารโปรตีนเล็กคินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ได้ผลผลิต (Yield) 49.15 มิลลิกรัม จากโปรตีนในสารสกัดหยาบ 3,390 มิลลิกรัม (ตารางที่ 3.9)

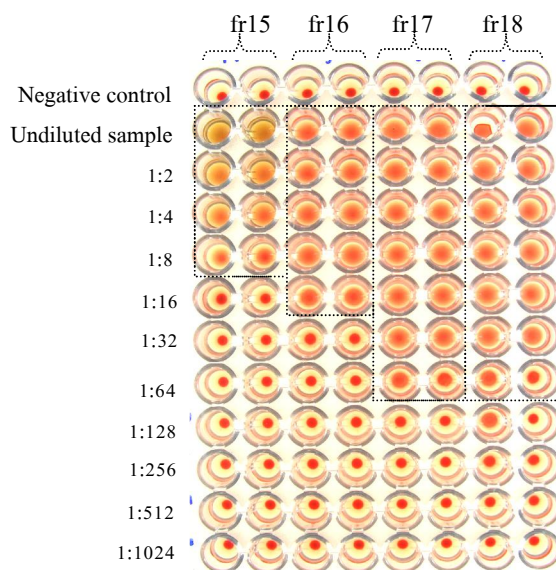


รูปที่ 3.35 สารโปรตีนเล็กดินบริสุทธิ์จาก *Schizophyllum commune* MC322 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B resin และวิเคราะห์หุ้มวลโมเลกุลด้วย 12.5% SDS-PAGE

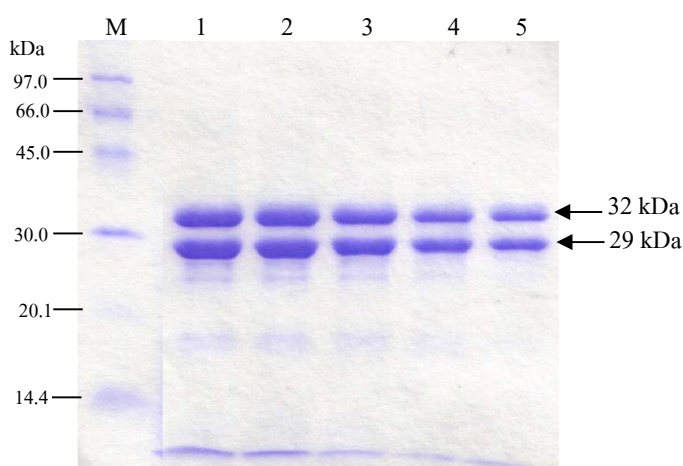
Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 2, 4, 6 และ 8, Fractions ของสารโปรตีนเล็กดินที่ชะออกจากคอลัมน์ ด้วย 1,3 Diaminopropane (DAP) ความเข้มข้น 5, 8, 10 และ 15mM; 1, 3, 5 และ 7, Negative control ตามลำดับ



รูปที่ 3.36 Elution profile ของการทำบริสุทธิ์สารโปรตีนเล็กดินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Resin ชนิด Mucin-Sepharose 4B ขนาดของคอลัมน์ 1.5×6 เซนติเมตร เมื่อชะสารโปรตีนเล็กดินด้วยสารละลาย 20mM 2,3 Diaminopropane (DAP) และเก็บส่วนของสารละลายที่ชะออกจากคอลัมน์ Fraction ละ 1 มิลลิลิตร



รูปที่ 3.37 ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายกับสารโปรตีนบริสุทธิ์จาก *Schizophyllum commune* MC322 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B resin ส่วนของสารละลายที่ไม่จับกับคอลัมน์ (Flow through): fr15, fr16, fr17 และ fr18 เป็น ส่วนของสารโปรตีนเล็กคินที่ชะออกจากคอลัมน์ (eluate) ลำดับที่ 15-18 (รูปที่ 3.36) ตามลำดับ



รูปที่ 3.38 สารโปรตีนเล็กคินบริสุทธิ์จาก *Schizophyllum commune* MC322 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Mucin-Sepharose 4B resin และวิเคราะห์ด้วยโมเดลกุลด้วย 12.5% SDS-PAGE Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 1-5, Fractions ของสาร โปรตีนเล็กคินที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ ด้วย 20mM DAP ลำดับที่ 16-20 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.9 สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบการทำบริสุทธิ์โปรตีนเล็กดินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322

Step	Yield (mg)	Specific hemagglutinating activity (units/mg)	Total hemagglutinating activity (units)	Recovery of hemagglutinating activity (%)	Fold of purification
Extraction	3,390.00	47.20	160,000.00	100.00	1.00
70% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	748.50	128.26	96,000.00	60.00	2.70
Affinity chromatography using Mucin-Sepharose 4B column	49.15	520.85	25,600.00	16.00	11.00

3.5 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กดินบริสุทธิ์ที่คัดเลือก

การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดรับประทานได้ที่คัดเลือกเพื่อเป็นแนวทางในการนำเล็กดินและอนุพันธ์ของเล็กดินที่พบรวมถึงเห็ดที่เป็นแหล่งของเล็กดิน ไปใช้ประโยชน์ โดยศึกษา ดังนี้

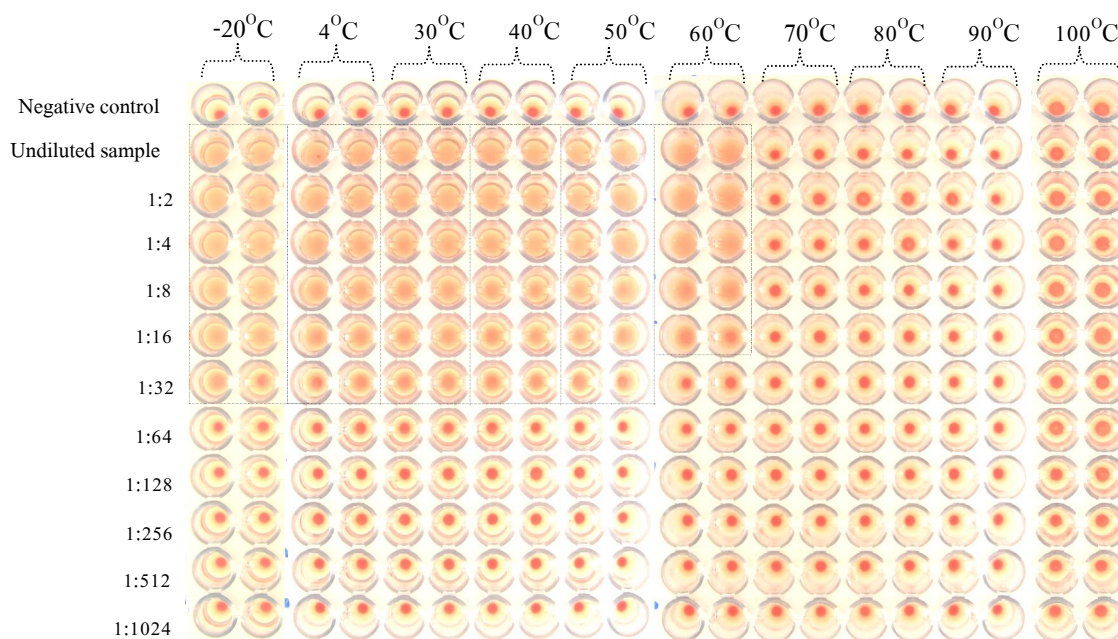
3.5.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

นำสารละลายโปรตีนเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดที่คัดเลือก 3 ตัวอย่าง ที่ผ่านการกรองด้วยเยื่อกรอง (0.45 µm membrane filter) เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 และเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 6275 (ร่า), *Candida albican* ATCC 10231 (ยีสต์), *Penicillium funiculosum* ATCC 36839 (ร่า), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896 (ยีสต์), และ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 (ยีสต์) ด้วยวิธี Disk-Diffusion เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเล็กดิน (ข้อ 3.3.2) ผลการทดสอบพบว่าสารบริสุทธิ์ของเล็กดินจากเห็ดทั้ง 3 ตัวอย่าง (เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133, เห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบชนิดใดเลย

3.5.2 ความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดดินบริสุทธิ์

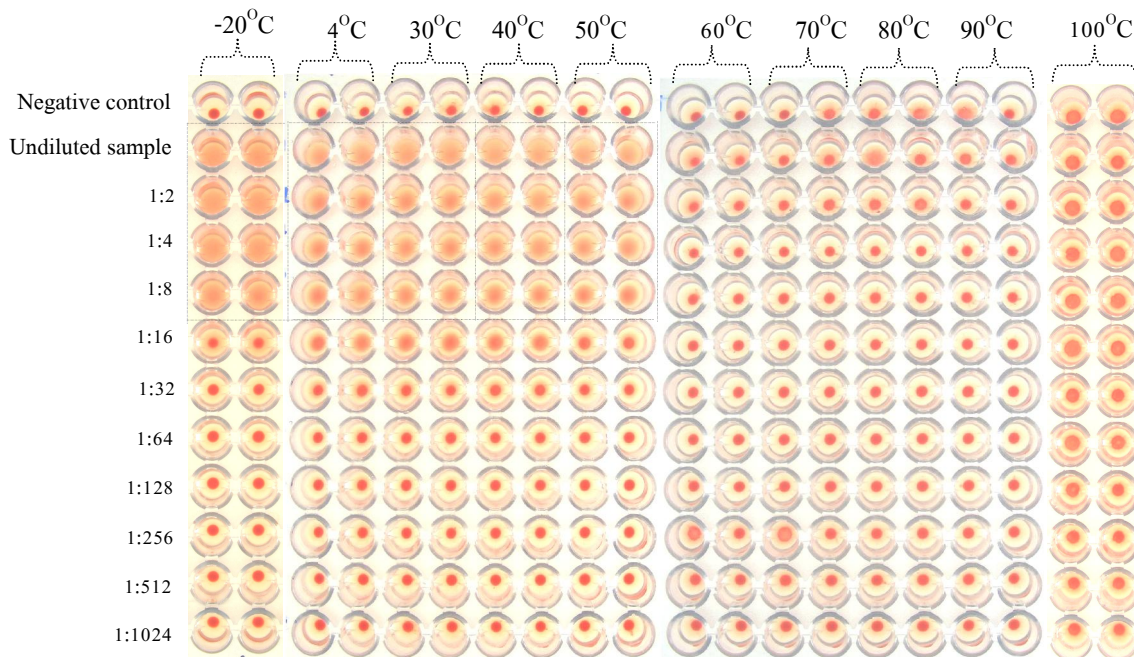
3.5.3.1 ความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดดินบริสุทธิ์

เมื่อหาสารสกัดดินบริสุทธิ์ของเห็ดรับประทานได้ที่คัดเลือก (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาให้ความร้อนเป็นเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส และเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้สารสกัดดินที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นผลบวกควบคุม (Positive control) จากนั้นทดสอบกิจกรรมของสารสกัดดินที่ยังเหลืออยู่ด้วยการทดสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย และคำนวณกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายของสารสกัดดินที่ยังเหลืออยู่เป็นร้อยละเปรียบเทียบกับสารสกัดดินบริสุทธิ์ที่ไม่ได้ให้ความร้อน (คิดเป็น 100%) พบว่าสารสกัดดินบริสุทธิ์ทั้งจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133, เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีที่ทดสอบ สารสกัดดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 เมื่อสัมผัสความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ยังคงเหลือสมบัติของสารสกัดดินราว 50% (รูปที่ 3.39 และ 3.40 และตารางที่ 3.10) และสามารถเก็บสารสกัดดินบริสุทธิ์จากเห็ดทั้ง 3 ชนิด ไว้ที่อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส ได้นาน 24 ชั่วโมง โดยไม่สูญเสียสมบัติการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่จำเพาะ

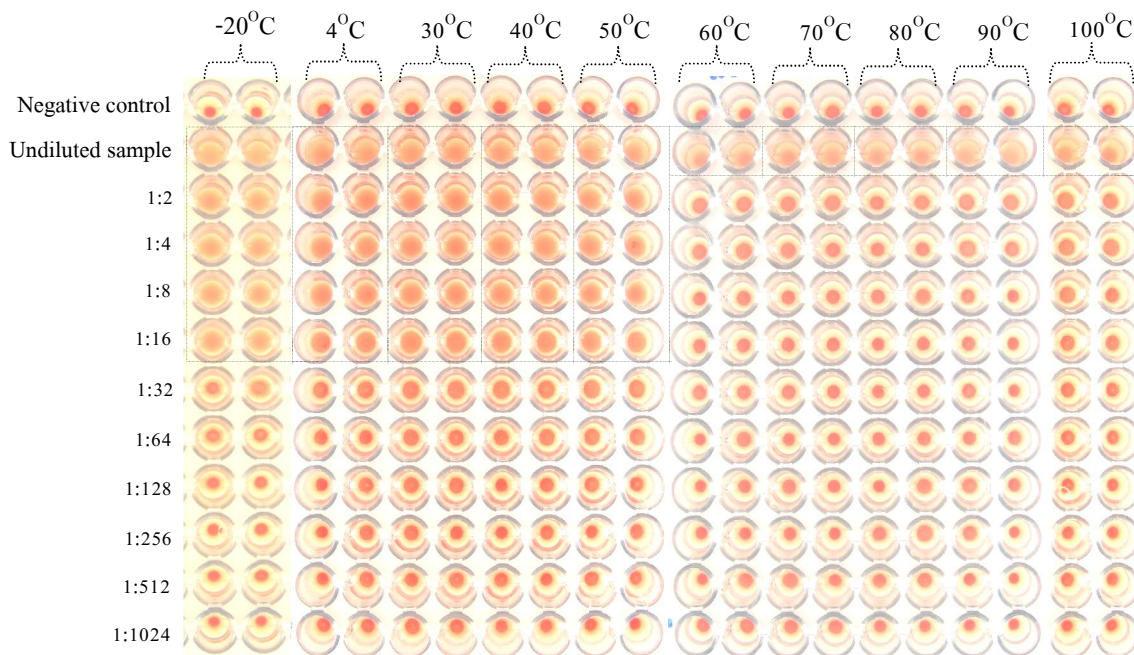


(ก) สารสกัดดินบริสุทธิ์ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133

รูปที่ 3.39 ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ของสารสกัดดินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสารที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็น Positive control

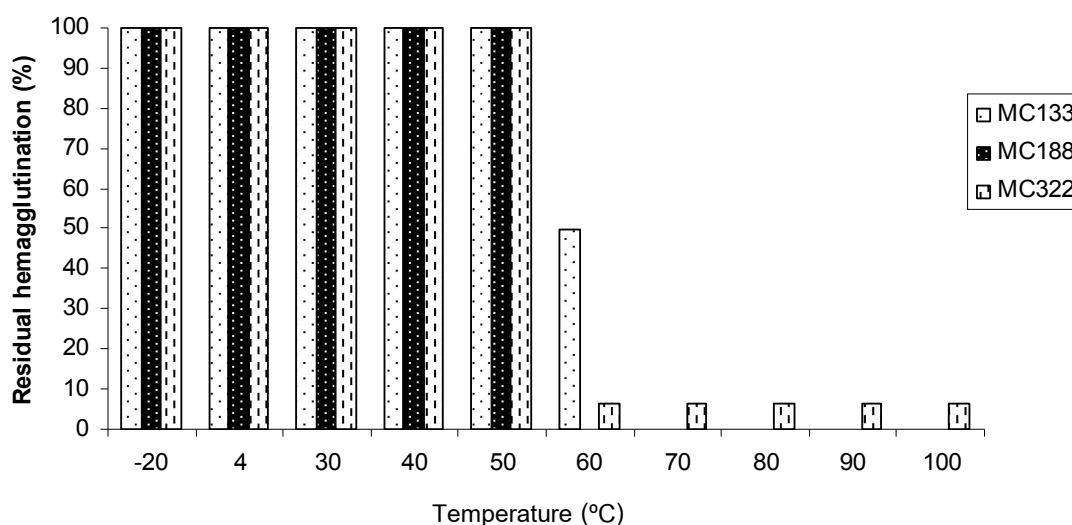


(ข) สารเล็กดีนบริสุทธิ์ของเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188



(ค) สารเล็กดีนบริสุทธิ์ของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322

รูปที่ 3.39 (ต่อ) ผลการทดสอบปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ของสารเล็กดีนบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสารที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็น Positive control



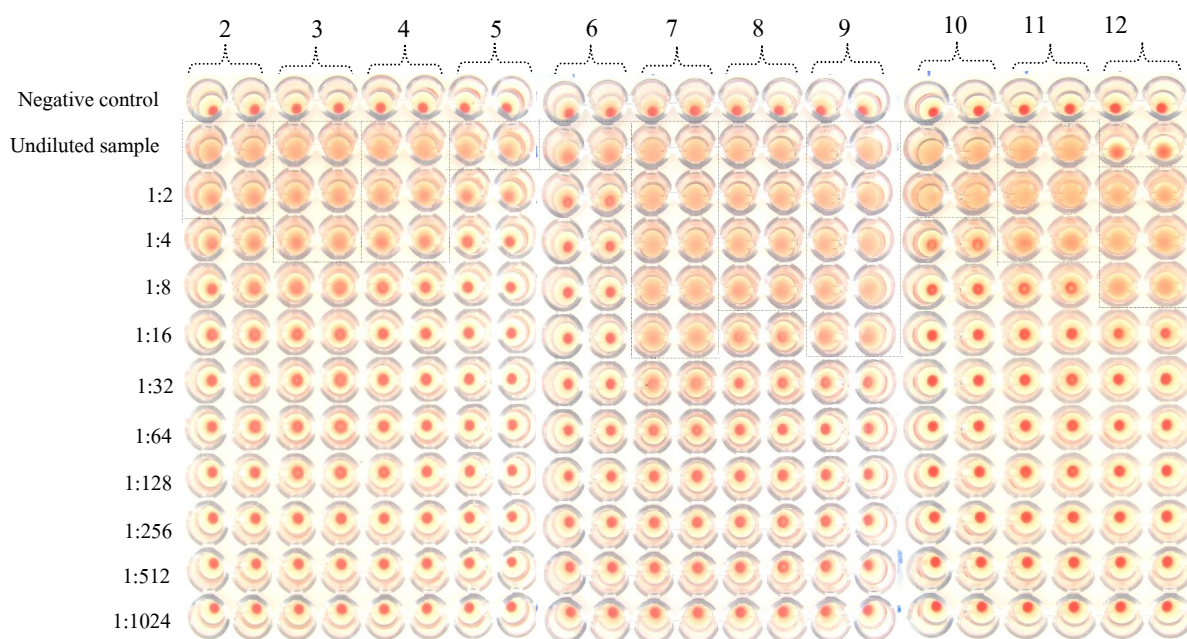
รูปที่ 3.40 ความเสถียรต่อความร้อนของสารเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดรับประทานได้ 3 ชนิด จากปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย โดยเก็บสารเล็กดินที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 40-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.5.3.2 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารเล็กดินบริสุทธิ์

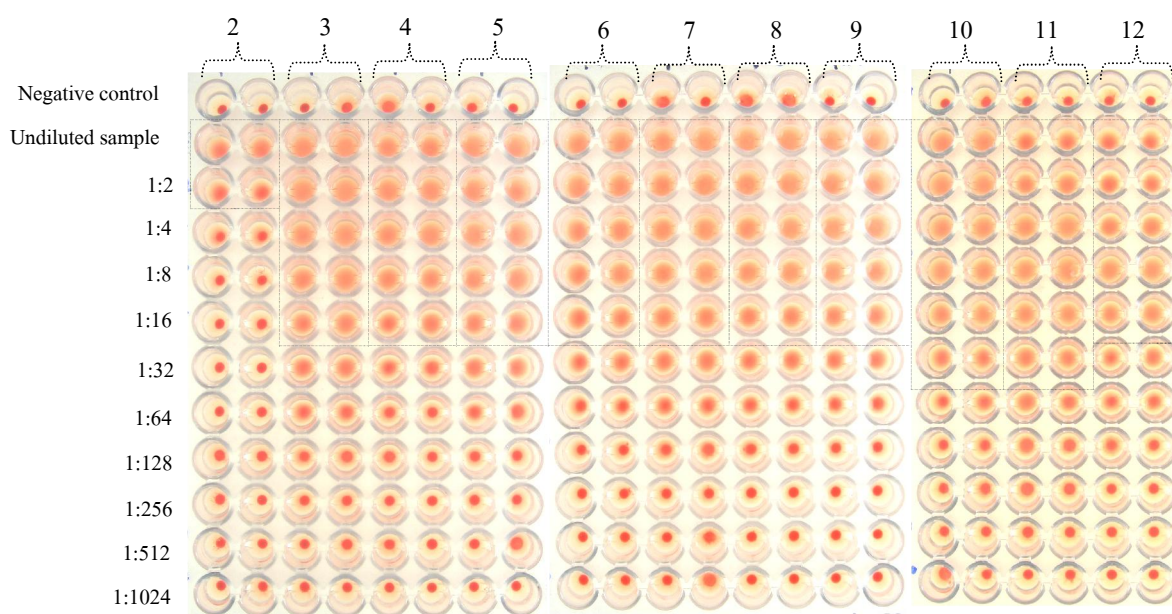
จากการศึกษาความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ที่คัดเลือก 3 ชนิด ที่ pH 2-12 โดยตรวจหาสารเล็กดินที่เหลือด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย พบว่าสารเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างที่ pH 7.0-9.0, 10.0-11.0, และ 7.0 ตามลำดับ เป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ (รูปที่ 3.41 และ 3.42 และตารางที่ 3.11)

ตารางที่ 3.10 ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ของสาร
 เล็กดินบริสุทธิของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียรต่อความร้อน
 ที่อุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็น
 เวลา 24 ชั่วโมง โดยสารที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็น Positive control

Mushroom species/collection location	Mushroom code	Temperature tested ($^{\circ}$ C)	Residual hemagglutination against rabbit red blood cells		Heat stability at ($^{\circ}$ C)
			(Titer)	(%)	
<i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สุรินทร์	MC133	-20	32	100	60
		4	32	100	
		30	32	100	
		40	32	100	
		50	32	100	
		60	16	50	
		70	-	0	
		80	-	0	
		90	-	0	
		100	-	0	
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	MC188	-20	8	100	50
		4	8	100	
		30	8	100	
		40	8	100	
		50	8	100	
		60	-	0	
		70	-	0	
		80	-	0	
		90	-	0	
		100	-	0	
<i>Schizophyllum commune</i> (เห็ด แครง) นครปฐม	MC322	-20	16	100	50
		4	16	100	
		30	16	100	
		40	16	100	
		50	16	100	
		60	1	6.25	
		70	1	6.25	
		80	1	6.25	
		90	1	6.25	
		100	1	6.25	

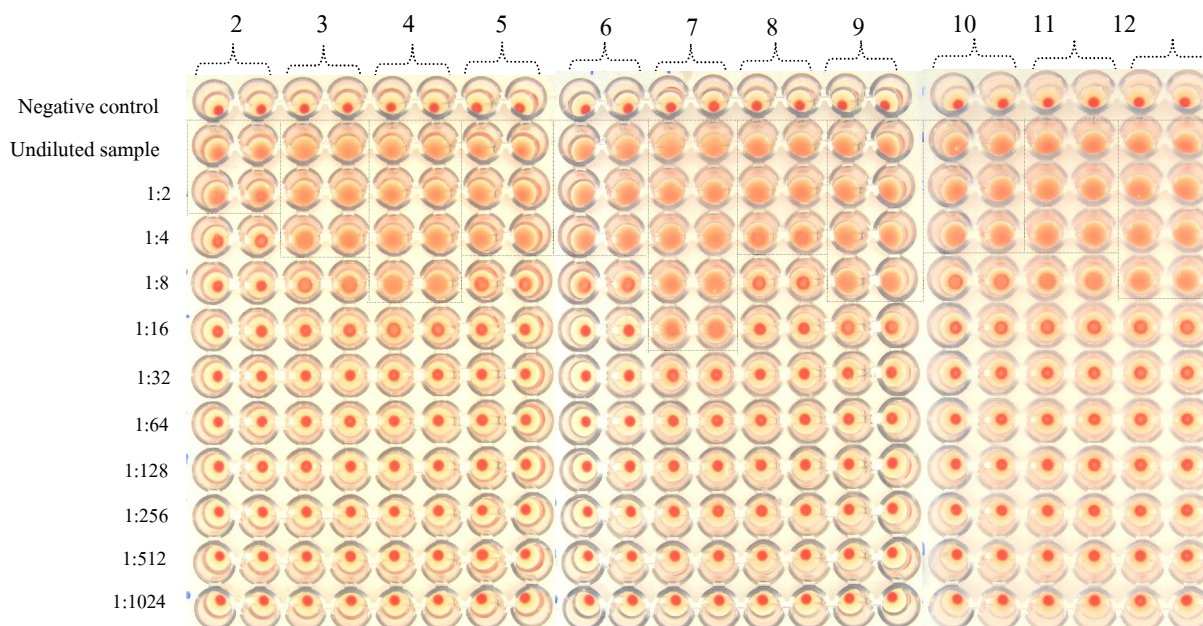


(ก) สารเล็กดีนบริสุทธิ์ของเห็ดฟาง MC133 สุรินทร์



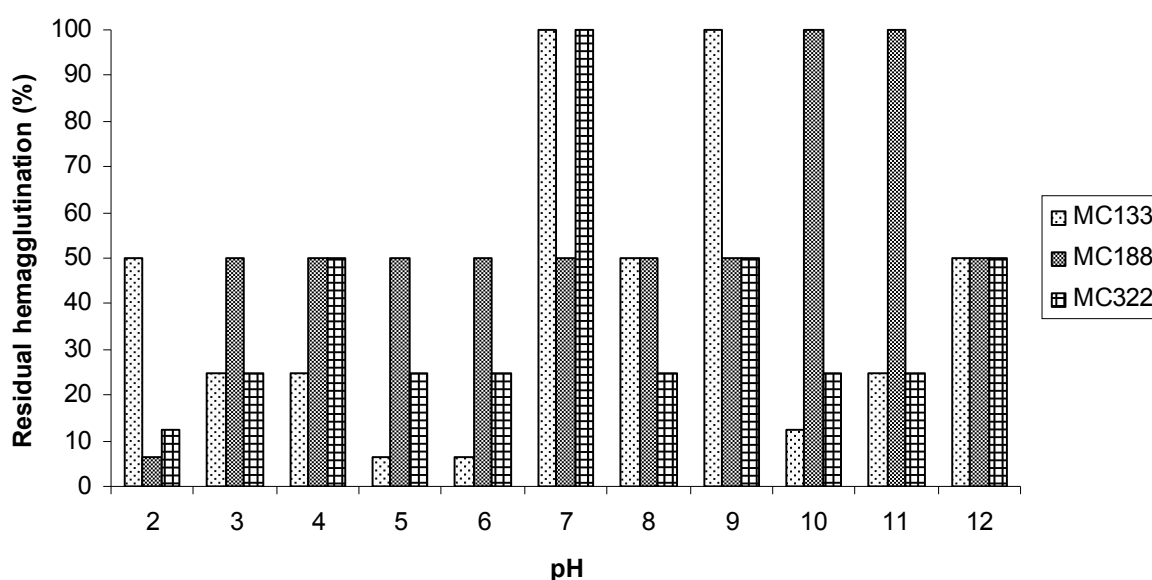
(ข) สารเล็กดีนบริสุทธิ์ของเห็ดระโงก MC188 นครราชสีมา

รูปที่ 3.41 ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ของสารเล็กดีนบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 2-12 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



(ค) สารเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดแครง MC322 นครปฐม

รูปที่ 3.41 (ต่อ) การทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ของสารเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 2-12 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.42 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารเล็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้บางชนิดที่ pH ในช่วง 2-12 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.11 ผลการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่าย ที่ยังเหลืออยู่ของสารเด็กดินบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด จากการทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 2-12 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Mushroom species/collection location	Mushroom code	pH tested	Residual hemagglutination against rabbit red blood cells		pH stability
			(Titer)	(%)	
<i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) สุรินทร์	MC131	2.00	2.00	50.00	7.0 & 9.0
		3.00	4.00	25.00	
		4.00	4.00	25.00	
		5.00	1.00	6.25	
		6.00	1.00	6.25	
		7.00	16.00	100.00	
		8.00	8.00	50.00	
		9.00	16.00	100.00	
		10.00	2.00	12.50	
		11.00	4.00	25.00	
		12.00	8.00	50.00	
		<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	MC188	2.00	
3.00	16.00			50.00	
4.00	16.00			50.00	
5.00	16.00			50.00	
6.00	16.00			50.00	
7.00	16.00			50.00	
8.00	16.00			50.00	
9.00	16.00			50.00	
10.00	32.00			100.00	
11.00	32.00			100.00	
<i>Schizophyllum commune</i> (เห็ดแครง) นครปฐม	MC322	2.00	2.00	12.50	7.0
		3.00	4.00	25.00	
		4.00	8.00	50.00	
		5.00	4.00	25.00	
		6.00	4.00	25.00	
		7.00	16.00	100.00	
		8.00	4.00	25.00	
		9.00	8.00	50.00	
		10.00	4.00	25.00	
		11.00	4.00	25.00	
12.00	8.00	50.00			

3.5.4 ความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดดินบริสุทธิ์จากเห็ดที่รับประทานได้ที่คัดเลือก 3 ชนิด ต่อเซลล์มะเร็งที่พบมากและเลี้ยงในหลอดทดลอง 2 ชนิด คือ มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก (KB) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์ปกติ คือ เซลล์ไตของลิง (Vero) ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดเห็ดพิษจากเห็ดพิษ คำนวณค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 แสดงความเป็นพิษมากต่อเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก เซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์ปกติจากไตของลิงที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.562, 0.626, และ 0.225 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดดินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปากและเซลล์ปกติจากไตของลิงที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 16.08 และ 72.97, และ 81.46 และ 52.29 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

สารสกัดดินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง MC322 ไม่มีฤทธิ์ทำลาย/ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกเลย ในขณะที่สารสกัดดินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก MC188 มีฤทธิ์ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 29.005 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 3.12) ผลจากการทดสอบขั้นตอนนี้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกใช้ประโยชน์สารสกัดดินจากเห็ดรับประทานได้

ตารางที่ 3.12 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดดินบริสุทธิ์จากเห็ดที่รับประทานได้ 3 ชนิด กับเซลล์มะเร็งของคน ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay

Purified lectin sample from mushroom	IC_{50} Value ($\mu\text{g/ml}$) at 550 nm		
	KB	HeLa	Vero
<i>Volvariella volvacea</i> (เห็ดฟาง) MC133	0.562±0.03	0.626±0.04	0.225±0.008
<i>Amanita</i> sp. (เห็ดระโงกขาว) MC188	16.084±2.22	29.005±3.72	81.46±12.04
<i>Schizophyllum commune</i> (เห็ดแครง) MC322	72.97±1.89	>100	52.29±6.77
Adriamycin (100 ไมโครโมลาร์)	3.299±0.455	58.518±3.43	20.74±4.341

หมายเหตุ: KB, เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก (Human epidermoid carcinoma cell line)

HeLa, เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line)

Vero, เซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney epithelial cell line)

IC_{50} (50% Inhibition concentration), ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่า

เซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

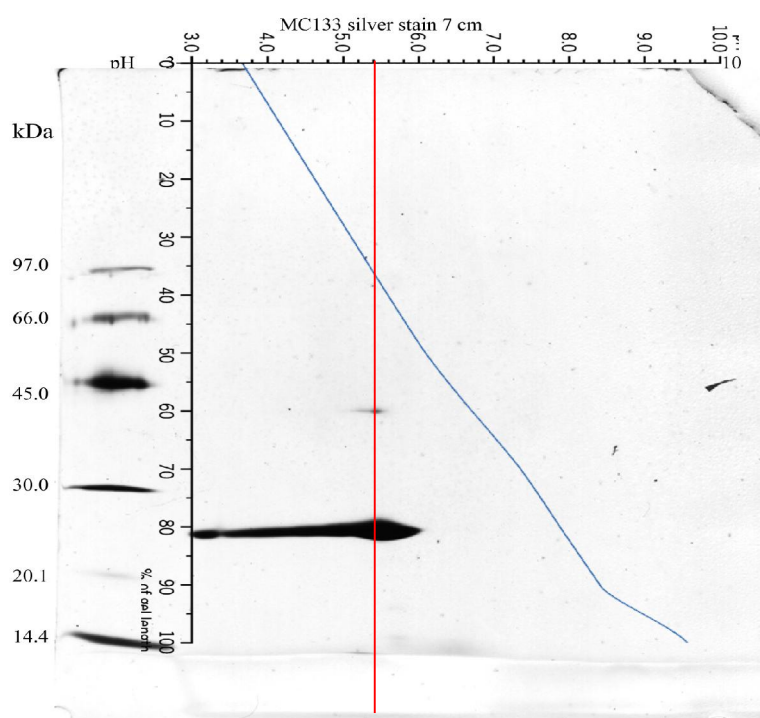
ค่า IC_{50} มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่า

หรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

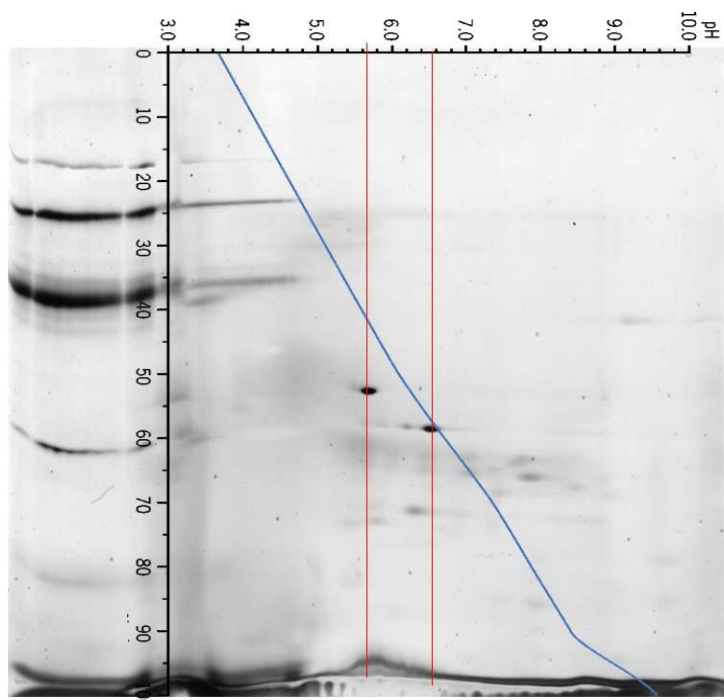
3.5.5 มวลโมเลกุลและ Isoelectric point (pI)

จากการหามวลโมเลกุลของโปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์จาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ พบว่าเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 เห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 สะสมเล็กตินที่มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 25 kDa (รูปที่ 3.27 และ 3.30), 30 kDa (รูปที่ 3.33), และ 29 และ 32 kDa (รูปที่ 3.35 และ 3.38) ตามลำดับ

เมื่อศึกษาค่า pI ของโปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ด 2 ชนิด คือ เห็ดฟาง MC133 และเห็ดแครง MC322 พบว่ามีค่า pI ประมาณ 5.4 (รูปที่ 3.43) และ 5.6-6.6 (รูปที่ 3.44) ตามลำดับ



รูปที่ 3.43 การแยกโปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ด้วยเทคนิค 2-Dimension Electrophoresis (2D-PAGE) ด้วย Drystrip ขนาด 7 เซนติเมตร ในช่วง pH 3.0-10.0 (GE Healthcare)



รูปที่ 3.44 การแยกโปรตีนเล็กคินบริสุทธิ์ของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ด้วยเทคนิค 2-Dimension Electrophoresis (2D-PAGE) ด้วย Drystrip ขนาด 7 เซนติเมตร ในช่วง pH 3.0-10.0 (GE Healthcare)

3.5.6 ความจำเพาะของสารเล็กคินบริสุทธิ์ต่อน้ำตาล

จากการศึกษาความจำเพาะของสารเล็กคินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 เห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ต่อน้ำตาล 32 ชนิด คือ *N*-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc), 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, D-Adonitol, Amygdalin, L-Arabinose, Cellobiose, Esculin, Fructose, Fucose, D-Galactose, D-Glucose, Inositol, Inulin, Lactose, Lactitol, Maltose, Mannitol, D-Mannose, D-Melezitose, Melibiose, Methyl- α -D-galactopyranoside, Methyl- β -D-galactopyranoside, 4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, 4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Salicin, Sorbitol, Trehalose, D-Turanose และ D-Xylose พบว่าสารเล็กคินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง MC133 (3HA) และเห็ดระโงก MC188 (2HA) ไม่แสดงความจำเพาะต่อน้ำตาลชนิดใดเลย (ตารางที่ 3.13 และ 3.14 และรูปที่ 3.45 และ 3.46) ในขณะที่สารเล็กคินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 (4HA) มีความจำเพาะต่อน้ำตาล 13 จาก 32 ชนิด คือ *N*-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc), L-Arabinose, D-Galactose, Lactose, Lactitol, Melibiose, Methyl- α -D-galactopyranoside, Methyl- β -D-galactopyranoside, 4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, 4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, Raffinose, Rhamnose และ Ribose ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 3.91, 62.5, 7.82, 62.5, 125, 31.25, 15.63, 125, 31.25, 125, 31.25, 125 และ 500 มิลลิโมลต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.15 และรูปที่ 3.47)

ตารางที่ 3.13 ผลการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของ
สารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 (3HA) โดยน้ำตาล 32 ชนิด

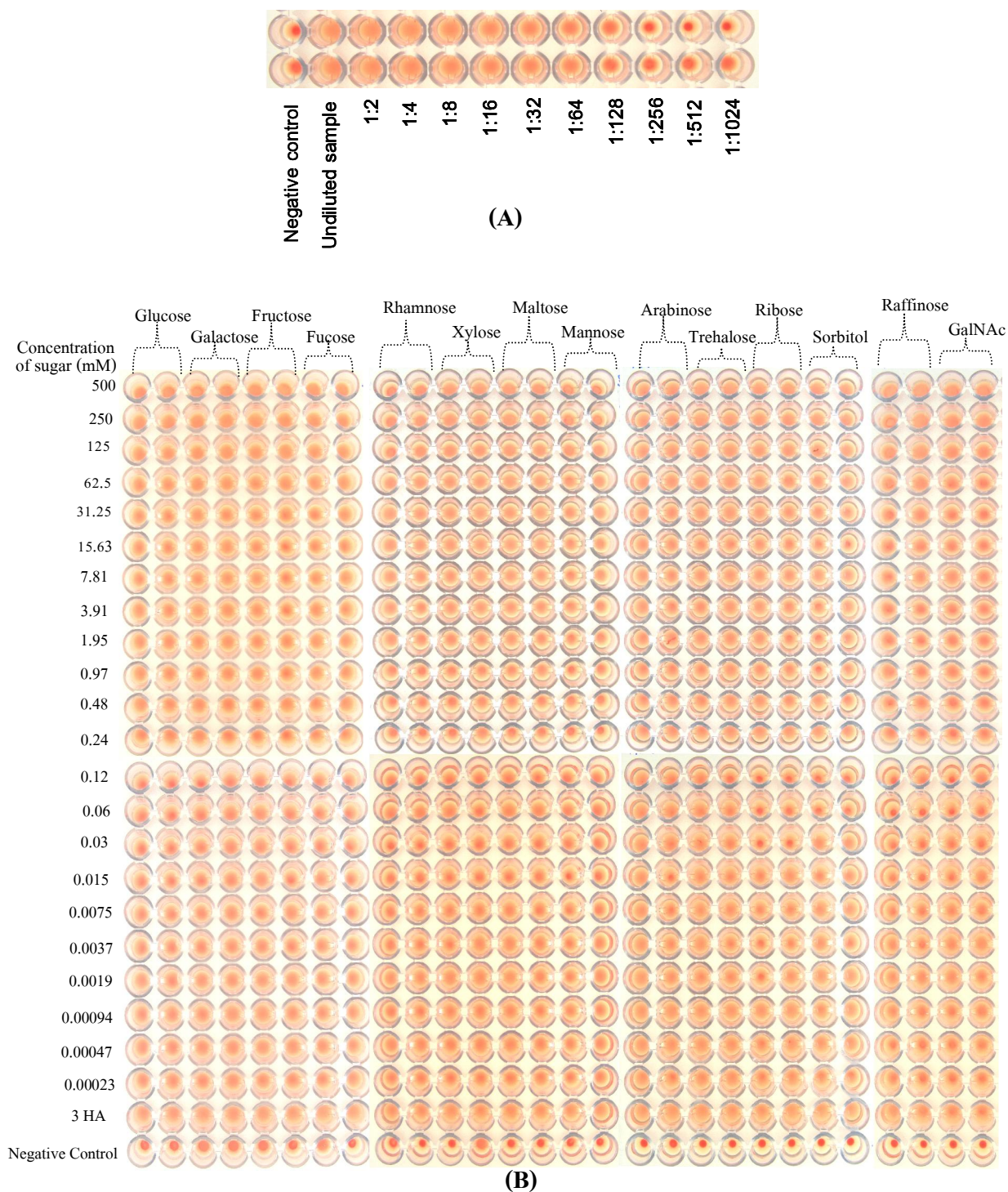
Sugar	Concentration of sugar (mM/l)												PBS
	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.82	3.91	1.95	0.97	0.49	0.24	
N-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2-Acetamido-2-deoxy D-glucopyranose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
D-Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Inulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Lactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Methyl- α -D-galactopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Methyl- β -D-galactopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-
D-Xylose												+	

หมายเหตุ: +, Positive hemagglutination reaction

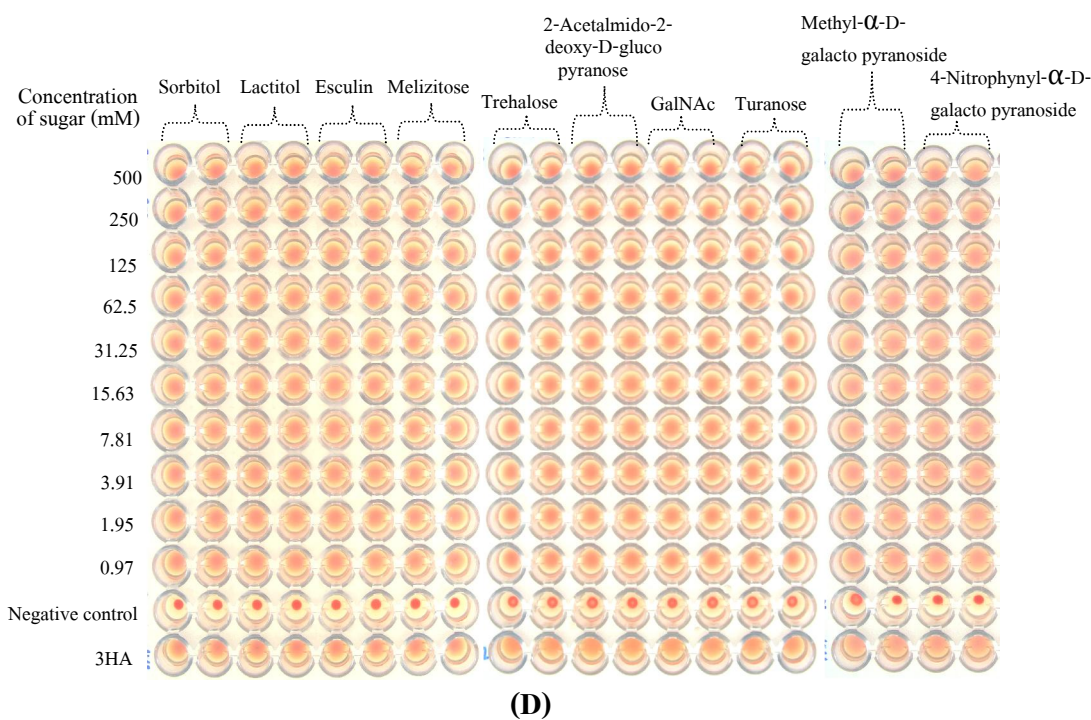
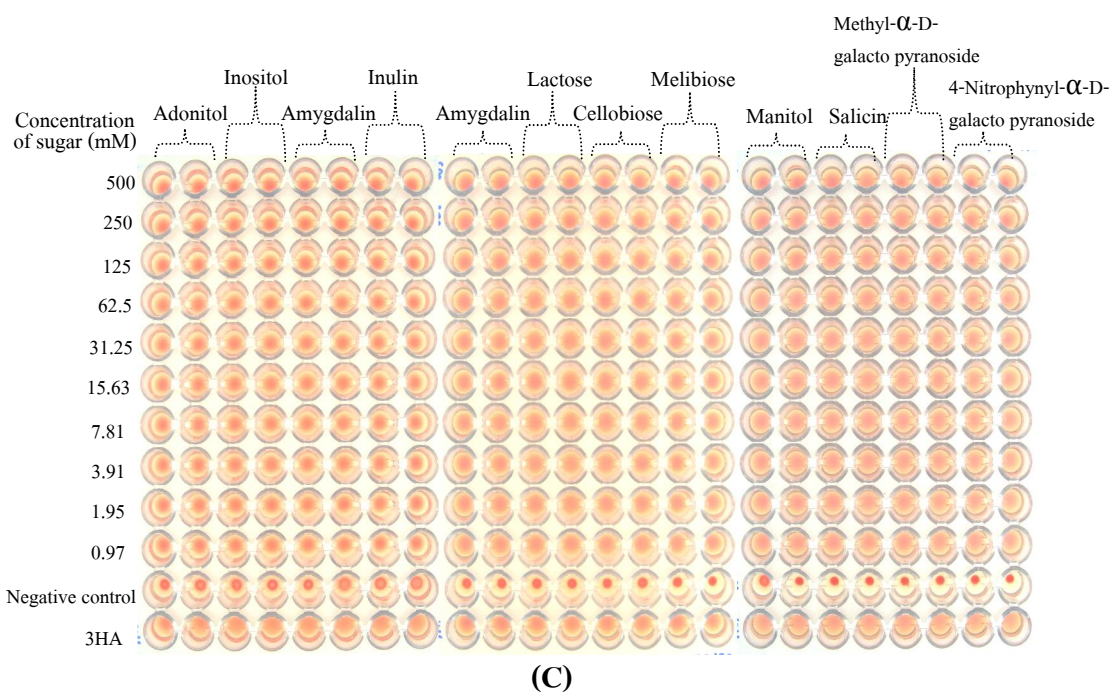
-, Negative hemagglutination reaction

ND, Not determined

PBS, Phosphate buffer saline (0.01M, pH 7.4)



รูปที่ 3.45 ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) กับเซลล์เม็ดเลือดแดง กระต่ายของสารเล็กคินบิริสุทซ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 (3HA; A) โดย น้ำตาล 32 ชนิด (B-D)



รูปที่ 3.45 (ต่อ) ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 (3HA; A) โดยน้ำตาล 32 ชนิด (B-D)

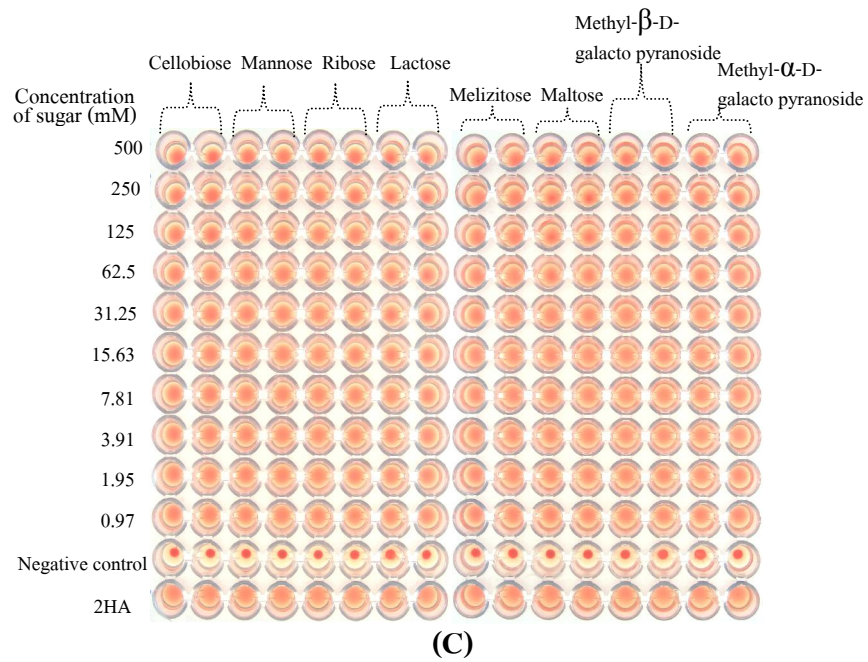
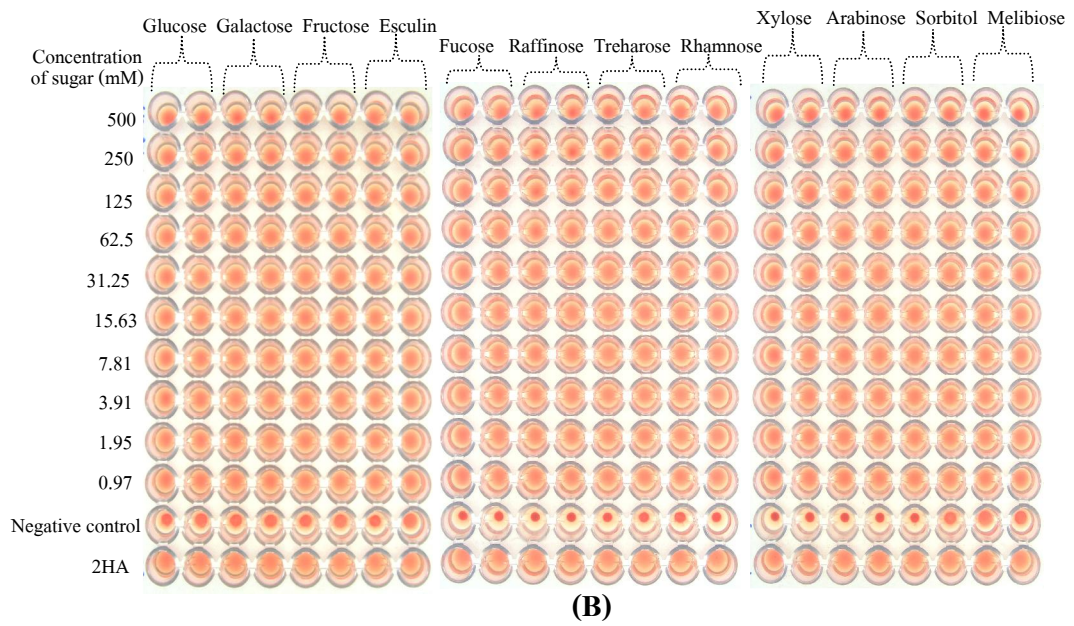
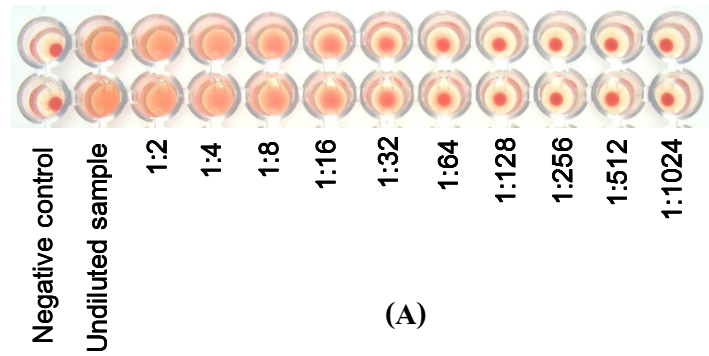
ตารางที่ 3.14 ผลการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายของสารเด็กทินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 (2HA) โดยน้ำตาล 32 ชนิด

Sugar	Concentration of sugar (mM/l)											
	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.82	3.91	1.95	0.97	0.49	PBS
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Methyl- α -D-galactopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Methyl- β -D-galactopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

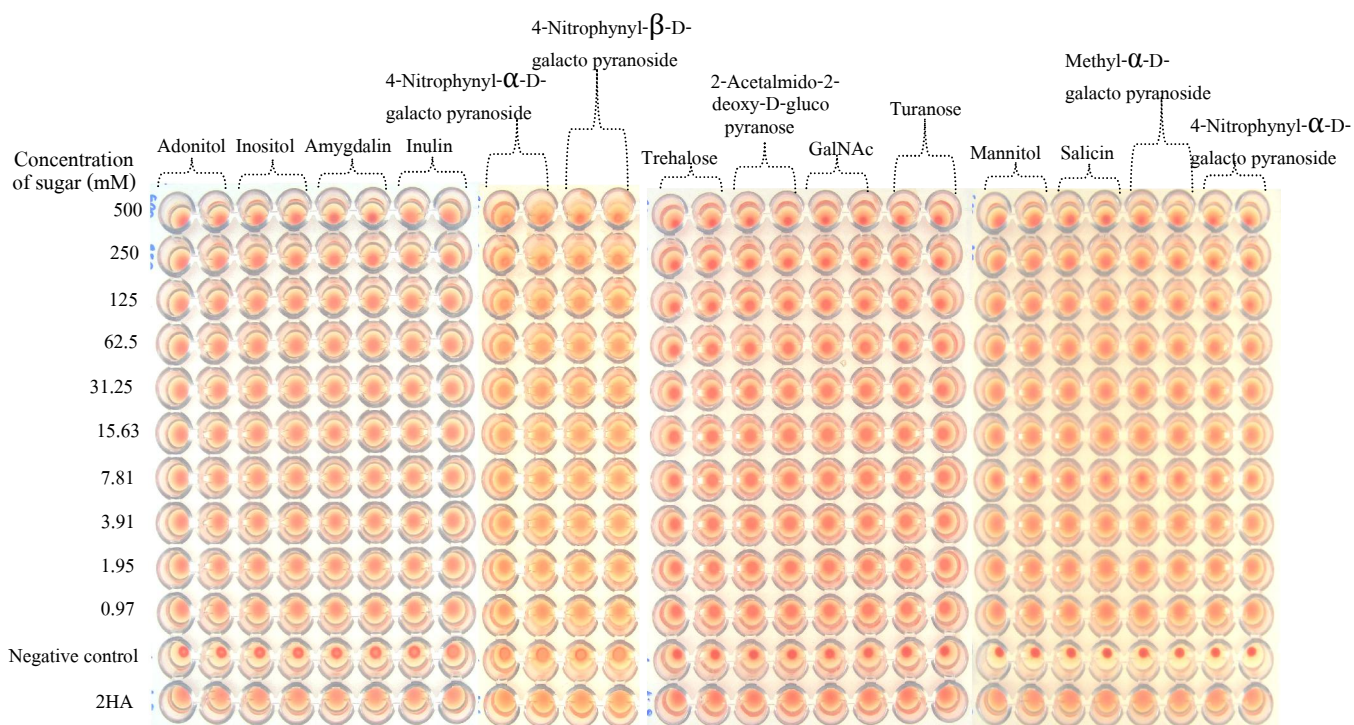
หมายเหตุ: +, Positive hemagglutination reaction

-, Negative hemagglutination reaction

PBS, Phosphate buffer saline (0.01M, pH 7.4)



รูปที่ 3.46 ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดอินบรุษูทซ์จากเห็ดเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 (2HA; A) โดยน้ำตาล 32 ชนิด (B-D)



(D)

รูปที่ 3.46 (ต่อ) ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 (2HA; A) โดยน้ำตาล 32 ชนิด (B-D)

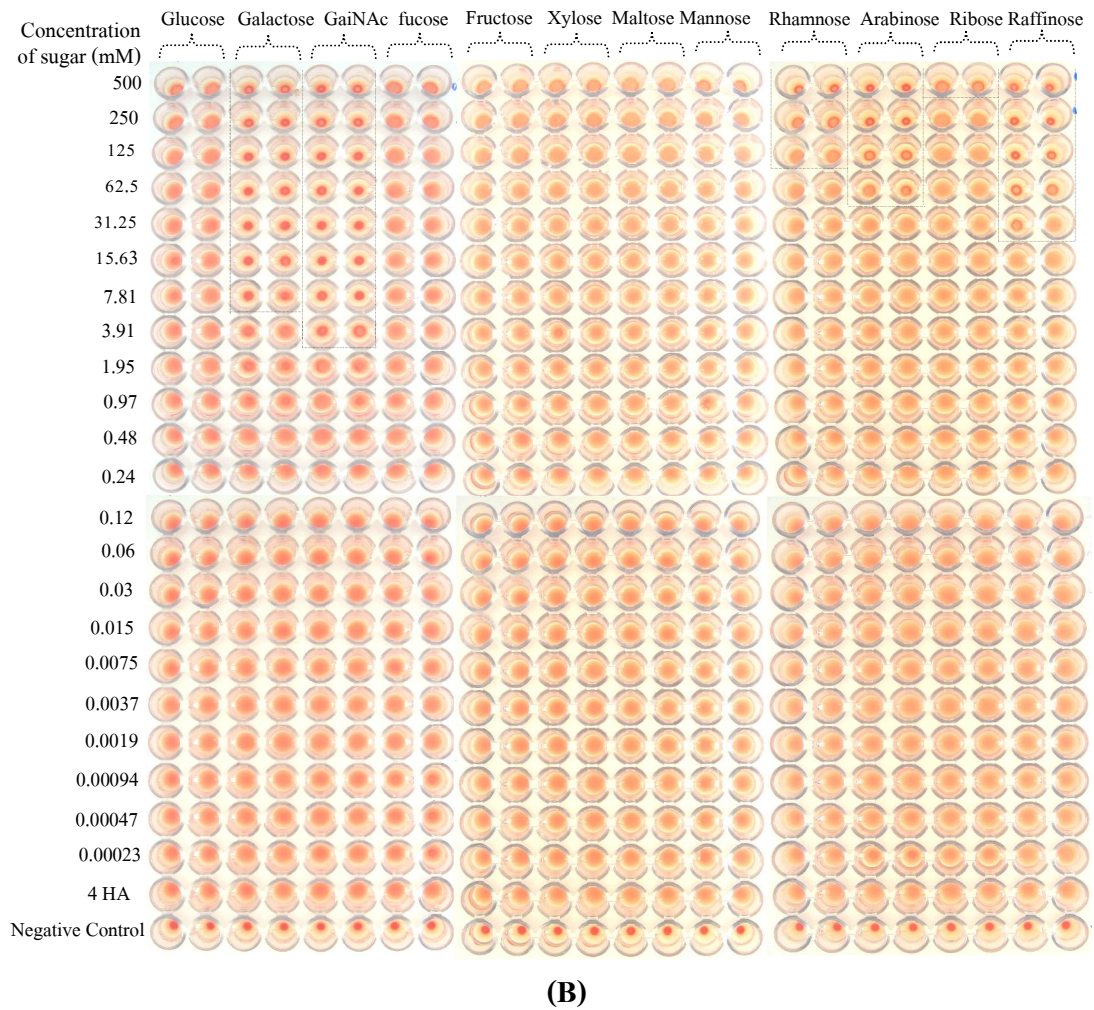
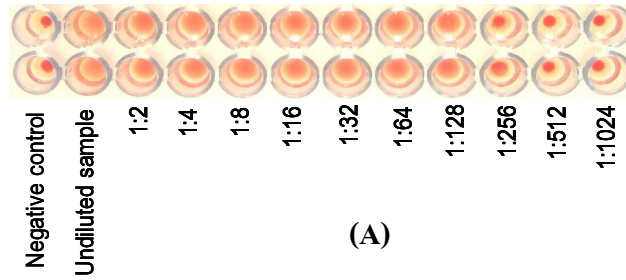
ตารางที่ 3.15 ผลการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง *Schizophillum commune* MC322 (4HA) โดยน้ำตาล 32 ชนิด

Sugar	Concentration of sugar (mM/l)											PBS
	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.82	3.91	1.95	0.97	0.49	
N-Acetyl-D-galactosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L-Arabinose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Lactitol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Melibiose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Methyl- α -D-galactopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Methyl- β -D-galactopyranoside	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Raffinose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Rhamnose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ribose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

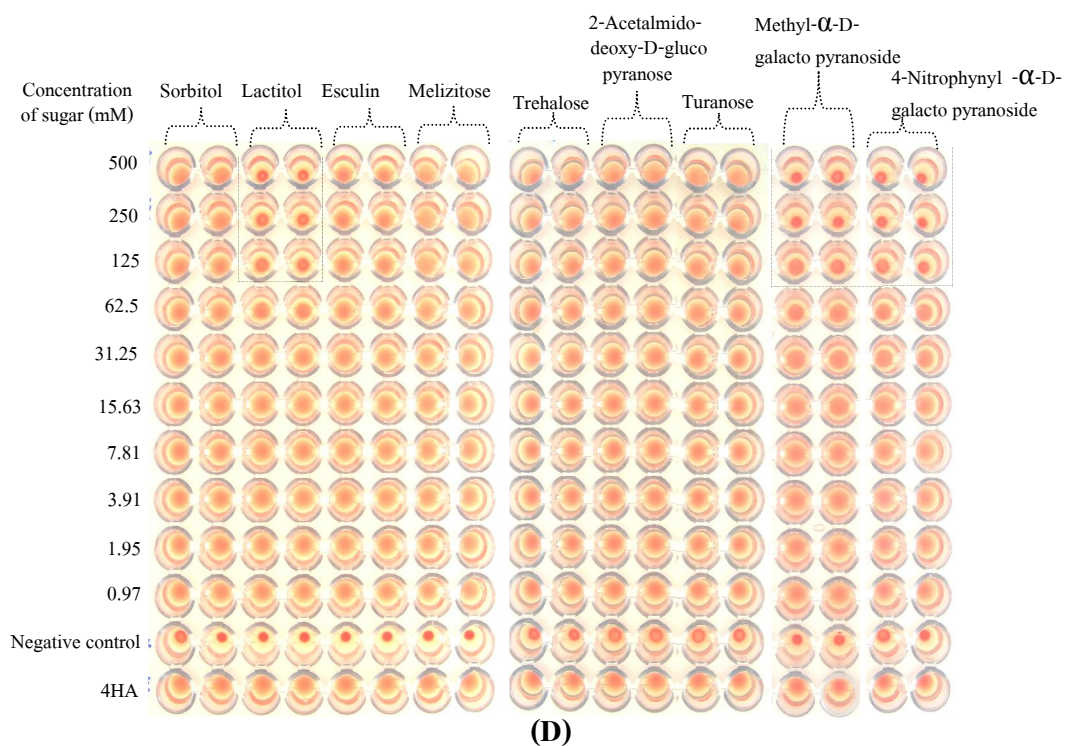
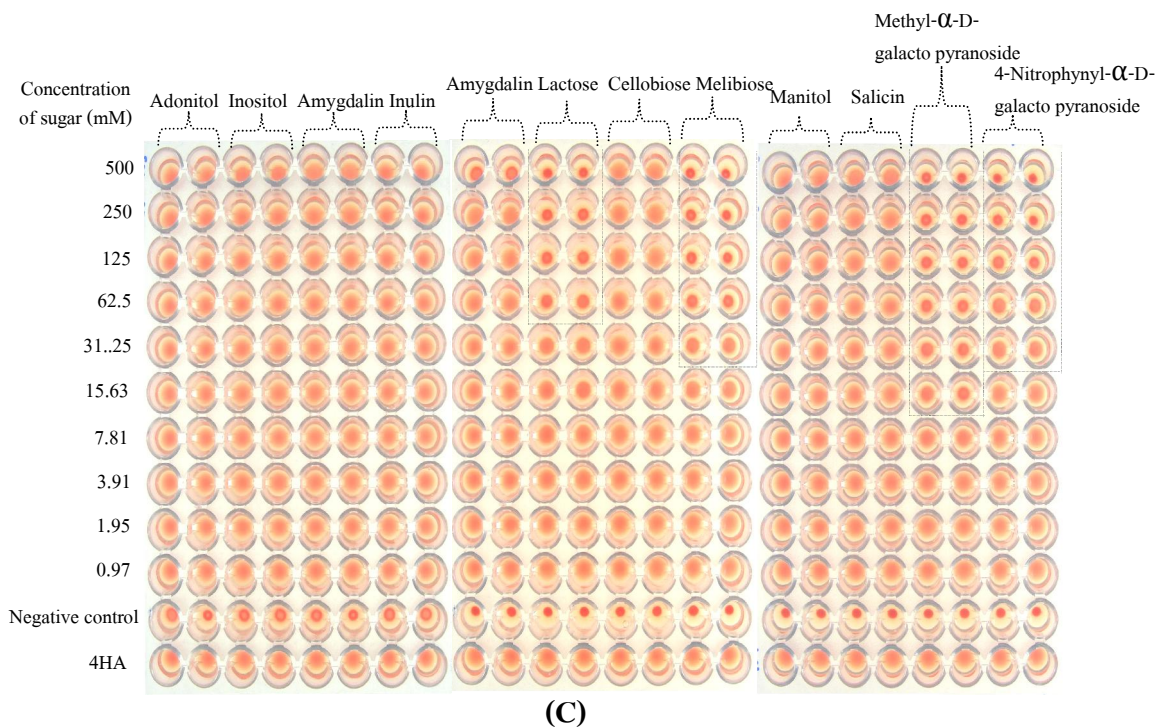
หมายเหตุ: +, Positive hemagglutination reaction

-, Negative hemagglutination reaction

PBS, Phosphate buffer saline (0.01M, pH 7.4)



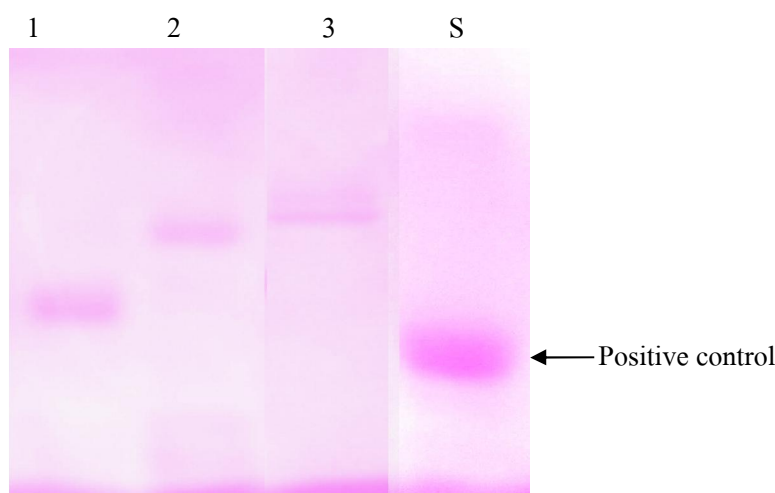
รูปที่ 3.47 ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง กระต่ายของสารสกัดอินบริสุทรีจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 (4HA; A) โดยน้ำตาล 32 ชนิด



รูปที่ 3.47 (ต่อ) ผลการทดสอบการยับยั้งการจับกลุ่ม (Hemagglutination inhibition) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงกระต่ายของสารสกัดอินบริสุทรีจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 (4HA; A) โดยน้ำตาล 32 ชนิด (B-D)

3.5.7 คุณลักษณะ Glycoprotein ของสารเล็กตินบริสุทธิ์

จากการทดสอบคุณลักษณะ Glycoprotein ของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ด 3 ชนิด (*Volvariella volvacea* MC 133, *Amanita* sp. MC188 และ *Schizophyllum commune* MC322) โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Periodic Acid Schiff (PAS) staining พบว่าสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง MC133, เห็ดระโงก MC188 และเห็ดแครง MC322 ปรากฏแถบสีแดงของคาร์โบไฮเดรต เช่นเดียวกับ Ribonuclease B ที่ใช้เป็น Positive control แสดงถึงสารโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 3.48) จึงจัดได้ว่าสารโปรตีนเล็กตินของเห็ดรับประทานได้เหล่านี้เป็นสารประเภท Glycoprotein



รูปที่ 3.48 การทดสอบคุณลักษณะ Glycoprotein ของสารเล็กตินโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Periodic Acid Schiff (PAS) staining
Lanes: 1-3, สารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133, เห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ตามลำดับ; S, RNase B (Sigma) เป็น Positive control

3.5.8 โครงสร้างปฐมภูมิของเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ที่คัดเลือก

การศึกษาในขั้นตอนนี้ได้เลือกศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยตัดแถบของโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง MC133 ขนาดโมเลกุล 25 kDa ที่สนใจมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้ววิเคราะห์เปปไทด์ที่ย่อยได้ด้วย Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI/MS) (Bruker nanoLC-HCTultra system) โดยเทคนิค MS/MS ion search และฐานข้อมูล MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) พบว่าได้ Peptides 9 ชุด (ตารางที่ 3.16) แถบโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินมีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 88-100% กับโปรตีน Volvatoxin A2 precursor มีขนาด 24.2 kDa ของ *Volvariella volvacea* (AAQ92757.1) ตามฐานข้อมูล GenBank (U.S.A.) (รูปที่ 3.49)

ตารางที่ 3.16 ลำดับกรดอะมิโนของ Tryptic peptides ของเชื้อเห็ดจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่วิเคราะห์โดย Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI/MS)

Tryptic peptide	Observed mass	Calculated mass	Amino acid sequences
T11	565.3540	1129.5233	AYFDWPGFK
T12	575.8580	1150.5870	DAFSAVVDLSK
T13	581.5520	1742.8304	LEQDKAYFDWPGFK
T15	601.3400	1201.5444	AYFDWPEFK
T21	719.5450	2155.9692	YDQSTINQSQEVGAMVDK
T24	766.3960	1531.8035	FLHDAFAAVVDLSK
T35	843.4490	1685.9716	NFAVQIDALELVVKK
T37	872.0240	1742.8304	LEQDKAYFDWPGFK
T38	907.3860	1813.8675	LEQNKAYFDWPEFK

(A) T13-T11 LEQDKAYFDWPGFK

```

>gb|AAQ92757.1| volvatoxin A2 precursor [Volvariella volvacea]
Length=217

Score = 51.5 bits (114), Expect = 1e-05
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%), Gaps = 0/14 (0%)

Query 1  LEQDKAYFDWPGFK 14
          LEQDKAYFDWPGFK
Sbjct 52  LEQDKAYFDWPGFK 65

>pdb|1PP0|A S Chain A, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP0|B S Chain B, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP0|C S Chain C, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
8 more sequence titles

pdb|1PP0|D S Chain D, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP6|A S Chain A, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|B S Chain B, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|C S Chain C, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|D S Chain D, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|E S Chain E, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1VGF|A S Chain A, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
pdb|1VGF|B S Chain B, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
Length=199

Score = 51.5 bits (114), Expect = 1e-05
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%), Gaps = 0/14 (0%)

Query 1  LEQDKAYFDWPGFK 14
          LEQDKAYFDWPGFK
Sbjct 34  LEQDKAYFDWPGFK 47

>pdb|1VCY|A S Chain A, Vva2 Isoform
Length=213

Score = 44.8 bits (98), Expect = 0.001
Identities = 12/14 (85%), Positives = 13/14 (92%), Gaps = 0/14 (0%)

Query 1  LEQDKAYFDWPGFK 14
          LEQ+KAYFDWP FK
Sbjct 48  LEQNKAYFDWPEFK 61

>ref|ZP_03529831.1| transcriptional regulator, TetR family protein [Rhizobium etli
CIAT 894]
Length=85

Score = 31.6 bits (67), Expect = 12
Identities = 9/11 (81%), Positives = 10/11 (90%), Gaps = 1/11 (9%)

Query 1  LEQ-DKAYFDW 10
          LE+ DKAYFDW
Sbjct 55  LEHRDKAYFDW 65

```

รูปที่ 3.49 Tryptic peptides (A-F) ของเล็กตินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่เปรียบเทียบกับการจัดให้ตำแหน่ง (alignment) กับลำดับ Peptides คู่เทียบที่มีในฐานข้อมูล GenBank (U.S.A.)

(B) T21 YDQSTINQQSQEVGAMVDK

```

>gb|AAQ92757.1| volvatoxin A2 precursor [Volvariella volvacea]
Length=217

Score = 64.7 bits (145), Expect = 1e-09

Identities = 19/19 (100%), Positives = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%)
Query 1 YDQSTINQQSQEVGAMVDK 19
      YDQSTINQQSQEVGAMVDK
Sbjct 81 YDQSTINQQSQEVGAMVDK 99

>pdb|1PP0|A Chain A, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP0|B Chain B, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP0|C Chain C, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
8 more sequence titles

pdb|1PP0|D Chain D, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP6|A Chain A, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|B Chain B, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|C Chain C, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|D Chain D, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|E Chain E, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1VGF|A Chain A, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
pdb|1VGF|B Chain B, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
Length=199

Score = 64.7 bits (145), Expect = 1e-09
Identities = 19/19 (100%), Positives = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%)
Query 1 YDQSTINQQSQEVGAMVDK 19
      YDQSTINQQSQEVGAMVDK
Sbjct 63 YDQSTINQQSQEVGAMVDK 81

>pdb|1VCY|A Chain A, Vva2 Isoform
Length=213

Score = 53.7 bits (119), Expect = 3e-06
Identities = 16/19 (84%), Positives = 16/19 (84%), Gaps = 0/19 (0%)
Query 1 YDQSTINQQSQEVGAMVDK 19
      YDQSTINQ QEVG MVDK
Sbjct 77 YDQSTINQREQEVGSMVDK 95

```

(C) T24 FLHDAFAAVVDLSK

```

>gb|AAQ92757.1| volvatoxin A2 precursor [Volvariella volvacea]
Length=217

Score = 46.4 bits (102), Expect = 4e-04
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%), Gaps = 0/14 (0%)
Query 1 FLHDAFAAVVDLSK 14
      FLHDAFAAVVDLSK
Sbjct 103 FLHDAFAAVVDLSK 116

>pdb|1PP0|A Chain A, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP0|B Chain B, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP0|C Chain C, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
8 more sequence titles

pdb|1PP0|D Chain D, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP6|A Chain A, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|B Chain B, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|C Chain C, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|D Chain D, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|E Chain E, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1VGF|A Chain A, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
pdb|1VGF|B Chain B, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
Length=199

Score = 46.4 bits (102), Expect = 4e-04
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%), Gaps = 0/14 (0%)
Query 1 FLHDAFAAVVDLSK 14
      FLHDAFAAVVDLSK
Sbjct 85 FLHDAFAAVVDLSK 98

```

รูปที่ 3.49 (ต่อ) Tryptic peptides (A-F) ของเลิกดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่เปรียบเทียบกับการจัดให้ตำแหน่ง (alignment) กับลำดับ Peptides คู่เทียบที่มีในฐานข้อมูล GenBank (U.S.A.)

(D) T35 NFAVQIDALELVVKK

```

>gb|AAQ92757.1| volvatoxin A2 precursor [Volvariella volvacea]
Length=217

Score = 49.8 bits (110), Expect = 4e-05
Identities = 15/15 (100%), Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)

Query 1      NFAVQIDALELVVKK  15
           NFAVQIDALELVVKK
Sbjct 197    NFAVQIDALELVVKK  211

>pdb|1VCY|A S Chain A, Vva2 Isoform
Length=213

Score = 49.8 bits (110), Expect = 4e-05
Identities = 15/15 (100%), Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)

Query 1      NFAVQIDALELVVKK  15
           NFAVQIDALELVVKK
Sbjct 193    NFAVQIDALELVVKK  207

>pdb|1PP0|A S Chain A, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
  pdb|1PP0|B S Chain B, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
  pdb|1PP0|C S Chain C, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
  8 more sequence titles

  pdb|1PP0|D S Chain D, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
  pdb|1PP6|A S Chain A, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1PP6|B S Chain B, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1PP6|C S Chain C, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1PP6|D S Chain D, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1PP6|E S Chain E, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1VGF|A S Chain A, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
  pdb|1VGF|B S Chain B, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
Length=199

Score = 49.8 bits (110), Expect = 4e-05
Identities = 15/15 (100%), Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)

Query 1      NFAVQIDALELVVKK  15
           NFAVQIDALELVVKK
Sbjct 179    NFAVQIDALELVVKK  193

```

รูปที่ 3.49 (ต่อ) Tryptic peptides (A-F) ของเล็กตินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่เปรียบเทียบด้วยการจัดให้ตำแหน่ง (alignment) กับลำดับ Peptides คู่เทียบที่มีในฐานข้อมูล GenBank (U.S.A.)

(E) T12 DAFSAVVDLSK

```

>pdb|1VCY|A S Chain A, Vva2 Isoform
Length=213
Score = 35.8 bits (77), Expect = 0.64
Identities = 11/11 (100%), Positives = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)

Query 1 DAFSAVVDLSK 11
      DAFSAVVDLSK
Sbjct 102 DAFSAVVDLSK 112

>gb|AAQ92757.1| volvatoxin A2 precursor [Volvariella volvacea]
Length=217
Score = 33.3 bits (71), Expect = 3.8
Identities = 10/11 (90%), Positives = 10/11 (90%), Gaps = 0/11 (0%)

Query 1 DAFSAVVDLSK 11
      DAF AVVDLSK
Sbjct 106 DAFAAVVDLSK 116

>pdb|1PP0|A S Chain A, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
  pdb|1PP0|B S Chain B, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
  pdb|1PP0|C S Chain C, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
  8 more sequence titles

pdb|1PP0|D S Chain D, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
  pdb|1PP6|A S Chain A, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1PP6|B S Chain B, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1PP6|C S Chain C, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1PP6|D S Chain D, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1PP6|E S Chain E, Vva2 (Strip Crystal Form)
  pdb|1VGF|A S Chain A, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
  pdb|1VGF|B S Chain B, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
Length=199
Score = 33.3 bits (71), Expect = 3.8
Identities = 10/11 (90%), Positives = 10/11 (90%), Gaps = 0/11 (0%)

Query 1 DAFSAVVDLSK 11
      DAF AVVDLSK
Sbjct 88 DAFAAVVDLSK 98

```

รูปที่ 3.49 (ต่อ) Tryptic peptides (A-F) ของเล็กตินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่เปรียบเทียบด้วยการจัดให้ตำแหน่ง (alignment) กับลำดับ Peptides คู่เทียบที่มีในฐานข้อมูล GenBank (U.S.A.)

(F) T15 AYFDWPEFK

```

>pdb|1VCY|A S Chain A, Vva2 Isoform
Length=213

Score = 36.3 bits (78), Expect = 0.43
Identities = 9/9 (100%), Positives = 9/9 (100%), Gaps = 0/9 (0%)

Query 1 AYFDWPEFK 9
      AYFDWPEFK
Sbjct 53 AYFDWPEFK 61

>gb|AAQ92757.1| volvatoxin A2 precursor [Volvariella volvacea]
Length=217

Score = 31.2 bits (66), Expect = 15
Identities = 8/9 (88%), Positives = 8/9 (88%), Gaps = 0/9 (0%)

Query 1 AYFDWPEFK 9
      AYFDWP FK
Sbjct 57 AYFDWPGFK 65

>pdb|1PP0|A S Chain A, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP0|B S Chain B, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP0|C S Chain C, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
8 more sequence titles

pdb|1PP0|D S Chain D, Volvatoxin A2 In Monoclinic Crystal
pdb|1PP6|A S Chain A, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|B S Chain B, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|C S Chain C, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|D S Chain D, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1PP6|E S Chain E, Vva2 (Strip Crystal Form)
pdb|1VGF|A S Chain A, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
pdb|1VGF|B S Chain B, Volvatoxin A2 (Diamond Crystal Form)
Length=199

Score = 31.2 bits (66), Expect = 15
Identities = 8/9 (88%), Positives = 8/9 (88%), Gaps = 0/9 (0%)

Query 1 AYFDWPEFK 9
      AYFDWP FK
Sbjct 39 AYFDWPGFK 47

```

รูปที่ 3.49 (ต่อ) Tryptic peptides (A-F) ของเล็กตินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่เปรียบเทียบด้วยการจัดให้ตำแหน่ง (alignment) กับลำดับ Peptides คู่เทียบที่มีในฐานข้อมูล GenBank (U.S.A.)

3.5.9 การทดสอบกรรมวิธีการปลูกผลึกเล็กติน

3.4.9.1 การทดสอบหาสถานะเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดผลึก

นำเล็กตินที่บริสุทธิ์มาทดสอบหาสถานะเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดผลึกด้วย Commercial screening kit ซึ่งเป็นชุดสารละลายสำเร็จรูป คือ Crystal Screen HR2-110 และ Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research) และปลูกผลึกด้วยวิธี Microbatch under oil โดยใช้สารเล็กตินบริสุทธิ์ 1

ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ที่ละลายใน 10mM Tris-HCl, pH 8.0) ได้ผลการทดลองเป็นลำดับ ดังนี้

ก. การตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea*

MC133

คณะผู้วิจัยที่ได้ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับวิธีการตกผลึกของสารเล็กตินจากเห็ดฟางมาบ้างแล้ว จึงได้เปรียบเทียบวิธีการตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 กับข้อมูลเดิม โดยตกผลึกสารโปรตีนเล็กตินด้วยวิธี Hanging drop พบว่าในสภาวะสารละลาย 20% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 5% (v/v) 2-Propanol in 0.1M Sodium citrate tribasic dihydrate (pH 5.6); สารละลาย 18% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000, 0.2M Ammonium sulphate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6); และสารละลาย 16% PEG 20,000, 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES, pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 1 เดือน ไม่พบผลึกเล็กตินปรากฏเลย

จากนั้นได้ทดสอบการตกผลึกโปรตีน MC133 ซ้ำอีก โดยทำการบ่มเล็กตินที่ได้มาจากการทำบริสุทธิ์โดยวิธี Ion exchange chromatography (DEAE-sepharose) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ในสภาวะสารละลาย 30% (w/v) PEG 8,000, 0.2M Sodium acetate trihydrate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5); สารละลาย 20% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6), 20% (w/v) PEG 8,000, 0.05M Potassium phosphate monobasic; สารละลาย 30% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether (PME) 2,000, 0.2M Ammonium sulphate in 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6); และสารละลาย 12% (w/v) PEG 20,000 in 0.1M MES monohydrate (pH 6.5) พบว่าภายในระยะเวลาการบ่ม 2 เดือน ไม่ปรากฏผลการเกิดผลึกใดๆ ในทุกสภาวะสารละลายที่ทดสอบ

เนื่องจากผลการศึกษาของโครงการนี้ดังระบุในข้างต้นพบว่าเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* เป็นเห็ดรับประทานได้ที่สะสมสารเล็กตินใน Fruiting body ที่มีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ด้านอาหารและการแพทย์ ที่พบได้ง่ายในประเทศไทยทั้งในพื้นที่ธรรมชาติและและการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า รวมทั้งมีความแตกต่างของสมบัติทางชีวภาพในเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์ จึงเลือกเห็ดฟาง MC131 มาศึกษาเปรียบเทียบกับ MC133

ข. การตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea*

MC131 เพื่อเปรียบเทียบกับ MC133

ได้ทดสอบการตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 โดยวิธี Microbatch under oil ด้วยสารละลายตรวจสอบสำเร็จรูปชนิด Crystal Screen HR2-110 และ HR2-112 (Hampton Research) จำนวน 98 ชนิด พบว่าการบ่มเล็กตินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการบ่มนาน 1 วัน และ 3 วัน มีผลึกลักษณะ

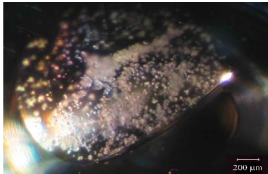

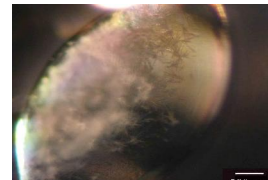

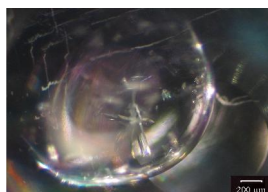
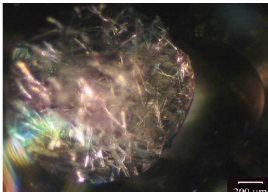
เข็มและเพลทเกิดขึ้นในสถานะสารละลายตรวจสอบ 6 ชนิด (ตารางที่ 3.17) ในขณะที่ไม่มีการเกิดผลึกของเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง MC133

การตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 เพื่อเปรียบเทียบกับ MC133 โดยวิธี Microbatch under oil ด้วยสารละลายตรวจสอบสำเร็จรูปชนิด Crystal Screen HR2-110 และ HR2-112 จำนวน 98 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น เมื่อใช้เล็กดินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการบ่มนาน 1 วัน และ 3 วัน นั้น พบว่าเกิดผลึกลักษณะเข็มและเพลทขึ้นในสถานะสารละลายตรวจสอบ 6 ชนิด (ตารางที่ 3.17) ดังนี้ (1) สารละลาย 30% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 0.2M Ammonium acetate in 1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6); (2) สารละลาย 30% (w/v) PEG 8,000, 0.2M Sodium acetate trihydrate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5); (3) สารละลาย 20% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6); (4) สารละลาย 20% (w/v) PEG 8,000 and 0.05M Potassium phosphate monobasic; (5) สารละลาย 30% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000, 0.2M Ammonium sulphate in 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6); และ (6) สารละลาย 12% (w/v) PEG 20,000 in 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate (pH 6.5)

ค. การตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188

ได้ทดสอบการตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 โดยวิธี Microbatch ด้วยสารละลายตรวจสอบชนิด Crystal Screen HR2-110 และ HR2-112 (Hampton Research) จำนวน 98 ชนิด พบว่าการบ่มเล็กดินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ได้สถานะสารละลายตรวจสอบ 5 ชนิด (ตารางที่ 3.18) ดังนี้ (1) สารละลาย 30% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 0.1M Tris-hydrochloride (pH 8.5) in 0.2M Magnesium chloride hexahydrate; (2) สารละลาย 0.8M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1M 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) sodium pH (7.5); (3) สารละลาย 10% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M HEPES sodium (pH 7.5); (4) สารละลาย 1.6M Magnesium sulphate heptahydrate in 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate (pH 6.5); และ (5) สารละลาย 10% (w/v) PEG 8,000, 8% (v/v) Ethylene glycol in 0.1M HEPES (pH 7.5) ที่ให้ผลึกของโปรตีนเล็กดินหลังจากการบ่มนาน 2 เดือน

ตารางที่ 3.17 สรุปสถานะที่น่าสนใจซึ่งมีแนวโน้มจะให้ผลึกเล็กเกินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 จากการทดลอง Microbatch

Crystallization screening reagent kits	Condition no.	Precipitant composition	Incubation time (day)	Crystal appearance
Crystal Screen HR2-110 (Hampton Research)	10	30% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 0.2M Ammonium acetate in 1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6)	1	 Small needle-like crystals
	28	30% (w/v) PEG 8,000, 0.2M Sodium acetate trihydrate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5)	1	 Large needle-like crystals
	40	20% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6)	1	 Small needle-like crystals
	42	20% (w/v) PEG 8,000 and 0.05M Potassium phosphate monobasic	1	 Small plate-like crystals
Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research)	13	30% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether (PME) 2,000, 0.2M Ammonium sulphate in 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6)	3	 Large plate-like crystals
	22	12% (w/v) PEG 20,000 in 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate (pH 6.5)	1	 Large needle-like crystals

ง. การศึกษาเปรียบเทียบการตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง

Schizophyllum commune MC322

จากการศึกษาเปรียบเทียบการตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 โดยวิธี Microbatch ด้วยสารละลายตรวจสอบชนิด Crystal Screen HR2-110 และ HR2-112 (Hampton Research) จำนวน 98 ชนิด พบว่าการบ่มเล็กตินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ได้สภาวะสารละลายตรวจสอบ 19 ชนิดที่น่าสนใจ เมื่อทดสอบต่อ พบสารละลายตรวจสอบ 11 ชนิด ทำให้เกิดลักษณะที่น่าจะเป็นผลึกของโปรตีนเล็กติน (ตารางที่ 3.19) จากนั้นเมื่อปรับสภาวะการเกิดผลึกด้วยเทคนิค Hanging drop vapor diffusion กับสารละลายทั้ง 11 ชนิด หลังจากบ่มสารละลายโปรตีนกับสารละลายทดสอบ 1 สัปดาห์ พบผลึกลักษณะเข็มและผลึกลักษณะแบนแผ่นหรือเพลท (plate) ขึ้นที่สารละลายตรวจสอบหมายเลข 18 และ 20 (Crystal Screen HR2-110) และ 46 (Crystal Screen HR2-112) ซึ่งเป็นสภาวะที่ควรปรับปรุงเพื่อให้ได้ผลึกของโปรตีนเล็กตินต่อไป

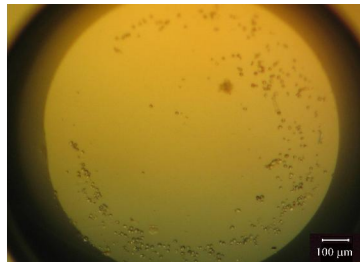
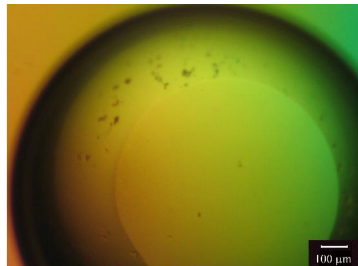
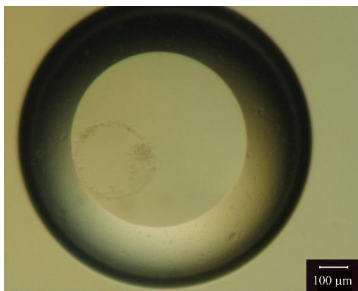
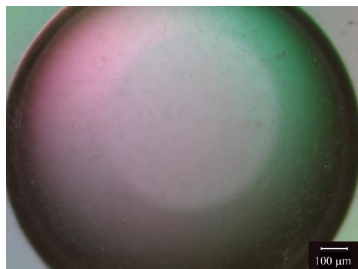
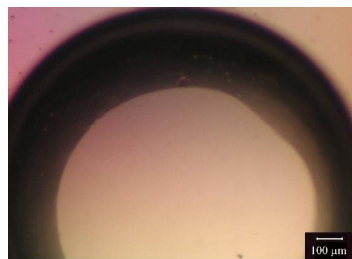
3.5.9.2 การปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึก

ปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึกในส่วนของความเข้มข้นของโปรตีน ความเข้มข้นและ pH ของสารละลายที่ใช้ และอุณหภูมิ เพื่อปรับปรุงให้ได้ผลึกที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น โดยปลูกผลึกด้วยวิธี Hanging drop vapour diffusion โดยเปิดสารเล็กตินบริสุทธิ์ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 2-5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ที่ละลายใน 10mM Tris-HCl, pH 8.0) และเปิดสารละลายที่ใช้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบน Glass plate จากนั้นนำไปวางบน 24-well VDX™ plate with sealant (Hampton Research) ขนาด 100×145×25 มิลลิเมตร ที่ประกอบด้วย 4×6 wells ลักษณะ Flat bottom ที่มีสารละลายที่ใช้ปริมาตร 1 มิลลิตร อยู่ใน well และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ต้องการทดสอบ สังเกตติดตามวัดขนาดและประเมินคุณภาพของผลึกอย่างต่อเนื่องด้วยกล้อง Stereomicroscope ได้ผลสำเร็จดังนี้

ก. การปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึกของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟางที่เลือกจากชนิดที่มีแนวโน้มการเกิดผลึก

จากผลการทดสอบการตกผลึกเบื้องต้นจึงได้นำสารละลายตรวจสอบ 3 ชนิดจาก 6 ชนิด (สารละลายตรวจสอบที่ 40 จาก Crystal Screen HR2-110 และสารละลายที่ตรวจสอบที่ 13 และ 22 จาก Crystal Screen HR2-112 ในตารางที่ 3.18) มาปรับสภาวะการเกิดผลึกด้วยเทคนิค Hanging drop vapor diffusion โดยบ่มสารละลายโปรตีนเล็กตินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร กับสารละลายที่ใช้ทดสอบที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส โดยได้ปรับสภาวะสารละลายที่ใช้ (ตารางที่ 3.20-3.22)

ตารางที่ 3.18 สรุปสภาวะที่น่าสนใจซึ่งมีแนวโน้มให้ผลึกเล็กดินของเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 จากการศึกษาทดลอง Microbatch

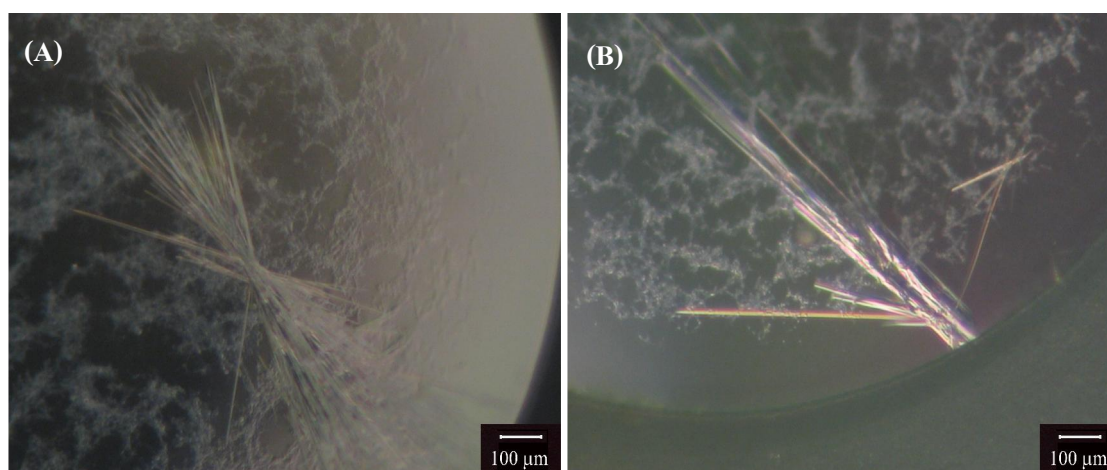
Crystallization screening reagent kits	Precipitant composition	Incubation time (month)	Crystal appearance
Crystal Screen HR2-110 (Hampton Research)	30% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 0.1M Tris-hydrochloride (pH 8.5) in 0.2M Magnesium chloride hexahydrate	2	 Small crystals
	0.8M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1M 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) sodium (pH 7.5)	2	 Light precipitates
	10% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M HEPES sodium (pH 7.5)	2	 Light precipitates
Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research)	1.6 M Magnesium sulphate heptahydrate in 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate (pH 6.5)	2	 Light precipitates
	10% (w/v) PEG 8,000, 8% (v/v) Ethylene glycol in 0.1M HEPES (pH 7.5)	2	 Light precipitates

ตารางที่ 3.19 สรุปสถานะที่น่าสนใจจากการใช้สารละลายตรวจสอบ 11 ชนิด ที่มีแนวโน้มให้ผลึกเล็กดินของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 จากการทดลอง Microbatch

Crystallization screening reagent kits	Condition no.	Precipitant composition	Crystal appearance (1 week)
Crystal Screen HR2-110 (Hampton Research)	6	30% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 0.2M Magnesium chloride hexahydrate in 0.1M Tris-hydrochloride (pH 8.5)	เข็มขนาดเล็ก
	9	30% (w/v) PEG 4,000, 0.2M Magnesium chloride hexahydrate in 0.1M Tris-hydrochloride (pH 8.5)	เข็มขนาดเล็ก
	10	30% (w/v) PEG 4,000, 0.2M Ammonium acetate in 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6)	ตะกอน
	18	20% (w/v) PEG 8,000 in 0.2M Magnesium acetate tetrahydrate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5)	เข็มขนาดเล็ก ^a
	20	25% (w/v) PEG 4,000, 0.2M Ammonium sulphate in 0.1M sodium acetate trihydrate (pH 4.6)	ตะกอน ^a
	28	30% (w/v) PEG 8,000, 0.2M Sodium acetate trihydrate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5)	ตะกอน
	30	30% (w/v) PEG 8,000, 0.2M Ammonium sulphate	ตะกอน
Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research)	31	30% (w/v) PEG 4,000, 0.2M Ammonium sulphate	ตะกอน
	37	8% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6)	เข็มขนาดเล็ก
	46	18% (w/v) PEG 8,000, 0.2M Calcium acetate hydrate in 0.1M sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5)	เข็มขนาดเล็ก ^a
	13	30% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000, 0.2M Ammonium sulphate in 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6)	เข็มขนาดเล็ก

^a สารละลายตรวจสอบที่นำไปปรับสภาวะต่อด้วย Hanging drop vapor diffusion method ทำให้ได้ผลึกรูปร่างเข็มและเพลาท

จากการปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 40 (เริ่มจากตารางที่ 3.18) พบว่าเกิดผลึกเล็กเล็กดิน ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 ลักษณะแบบแผ่นหรือเพลท (plate) ในสภาวะของสารละลาย 5% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 และ 2 เดือน (รูปที่ 3.50A และ 3.50B) ตามลำดับ แต่ผลึกที่ได้จากสภาวะดังกล่าวยังไม่เหมาะสมในการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction)



รูปที่ 3.50 ผลึกโปรตีนเล็กดินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 ในสภาวะ 5% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000 in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (A) และ 2 เดือน (B)

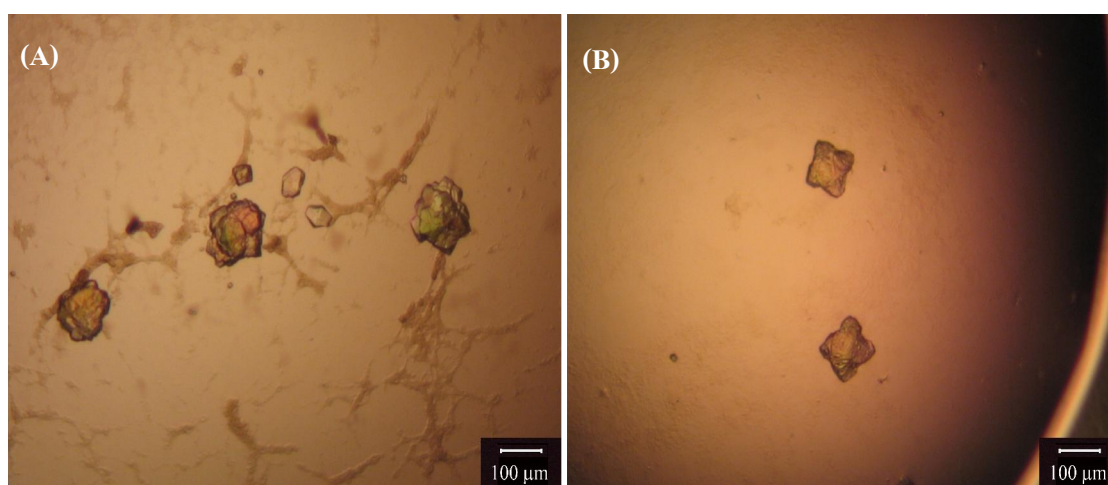
ตารางที่ 3.20 การปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 40 (เริ่มจากตารางที่ 3.18) ของการปลูกผลึกเล็กดินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131

2-Propanol concentration (mg/ml)	Concentration of PEG 4,000 (w/v)					
	6%	12%	16%	18%	20%	26%
5	5%	5%	5%	5%	5%	5%
15	15%	15%	15%	15%	15%	15%
20	20%	20%	20%	20%	20%	20%
25	25%	25%	25%	25%	25%	25%

ตารางที่ 3.21 การปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 13 (เริ่มจากตารางที่ 3.18) ของการปลูกผลึกเล็กดินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131

Solution/ pH	Concentration of PME 2,000 (w/v)					
	14%	18%	22%	26%	30%	34%
0.1M Acetate, pH 4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
0.1M Citrate, pH 5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
0.1M Citrate, pH 5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
0.1M 2-(<i>N</i> -Morpholino) ethanesulfonic acid (MES), pH 6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

จากการปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 13 (เริ่มจากตารางที่ 3.18) พบว่าเกิดผลึกเล็กดินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 ลักษณะ phase separation ในสภาวะของสารละลาย 18% (w/v) PME 2,000, 0.2M Ammonium sulphate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (รูปที่ 3.51A) และในสภาวะของสารละลาย 26% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether (PME) 2,000, 0.2M Ammonium sulphate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (รูปที่ 3.51B) แต่ผลึกที่ได้จากสภาวะดังกล่าวไม่ทนใน Cryosolution mother liquor ทำให้ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction)

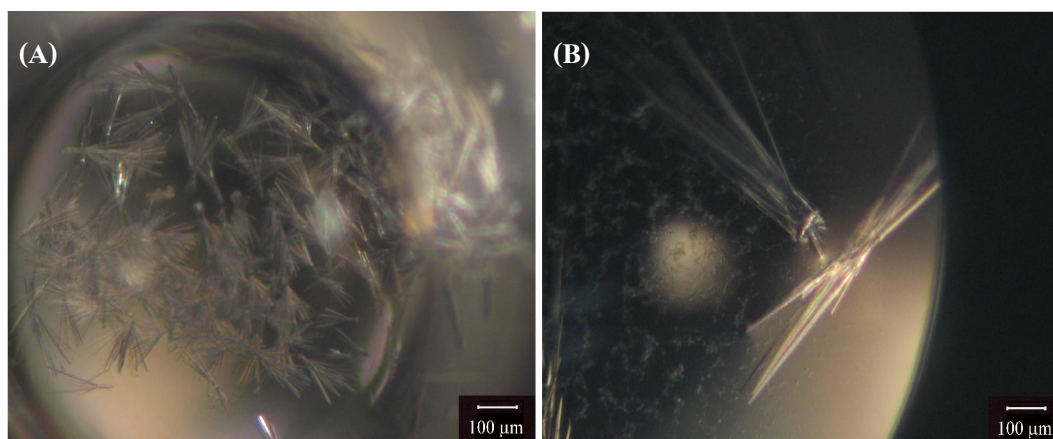


รูปที่ 3.51 ผลึกโปรตีนเล็กดินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 ในสภาวะ 18% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether (PME) 2,000, 0.2M Ammonium sulphate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (A) และ 26% (w/v) PME 2,000, 0.2M Ammonium sulphate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (B)

ตารางที่ 3.22 การปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 22 (เริ่มจากตารางที่ 3.18) ของการปลูกผลึกเล็กดินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131

Solution/ pH	Concentration of PEG 20,000 (w/v)					
	4%	8%	12%	16%	20%	24%
0.1M 2-(<i>N</i> -Morpholino) ethanesulfonic acid (MES), pH 5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
0.1M MES, pH 6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
0.1M MES, pH 6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
0.1M MOPS, pH 7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

จากการปรับสภาวะในสารละลายตรวจสอบที่ 22 (เริ่มจากตารางที่ 3.18) พบว่าเกิดผลึกเล็กดินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 ลักษณะแบบเข็ม (รูปที่ 3.52A) ในสภาวะของสารละลาย 20% (w/v) Polyethylene glycol 20,000 in 0.1M 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และในสภาวะของสารละลาย 16% (w/v) PEG 20,000 in 0.1M MES monohydrate (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เกิดผลึกเล็กดินของเห็ดฟาง MC131 ลักษณะแบบแผ่นหรือเพลท (รูปที่ 3.52B)



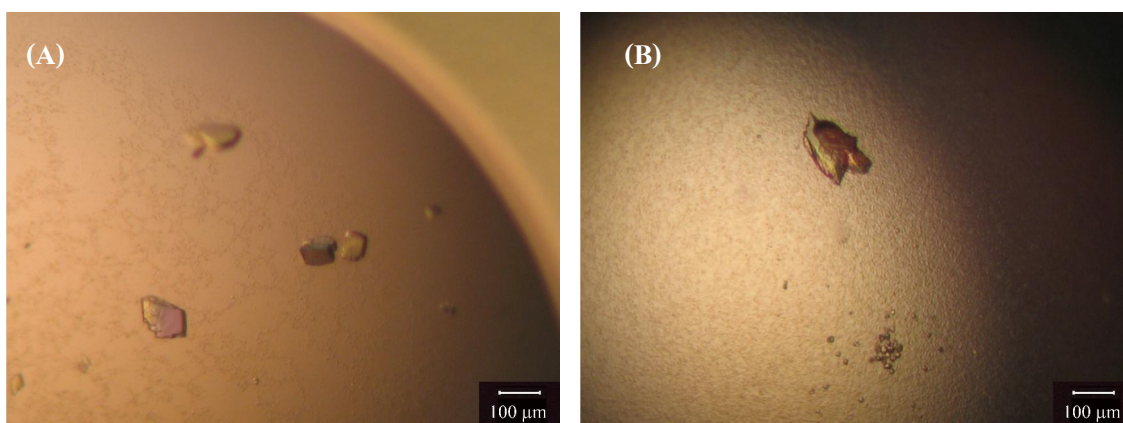
รูปที่ 3.52 ผลึกโปรตีนเล็กดินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 ในสภาวะ 20% (w/v) Polyethylene glycol 20,000 in 0.1M 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (A) และ 16% (w/v) Polyethylene glycol 20,000 in 0.1M MES monohydrate (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ (B)

**ข. การปรับปรุงสถานะของการเกิดผลึกของสารเล็กดินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง
Schizophyllum commune MC322 เพื่อเปรียบเทียบกับเห็ดชนิดอื่น**

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบตกผลึกเบื้องต้น ได้นำสารละลาย 11 ชนิด (ตารางที่ 3.19) ที่มีแนวโน้มการเกิดผลึกของโปรตีนเล็กดินมาปรับสภาวะการเกิดผลึกด้วยเทคนิค Hanging drop vapor diffusion โดยบ่มสารละลายโปรตีนเล็กดินกับสารละลายที่ใช้ทดสอบที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำให้ได้ผลึกลักษณะเข็มและเพลทขึ้นที่สารละลายตรวจสอบหมายเลข 18, 20 และ 46 (ตารางที่ 3.19) จึงได้ปรับสภาวะสารละลายหมายเลข 18 ในส่วนความเข้มข้นของ Polyethylene glycol (PEG) 4,000, PEG 8,000 ความเข้มข้นของโปรตีนเล็กดินเป็น 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้บ่มเป็น 4 และ 18 องศาเซลเซียส

นอกจากการปรับสภาวะจากสารละลายหมายเลข 18 ได้ทดลองด้วยเทคนิค Microseeding โดยบ่มโปรตีนสองความเข้มข้นคือ 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของ Seed stock ที่ความเจือจาง 1:100, 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 ในสภาวะสารละลายเหมือนกัน พบว่าทั้งสองวิธีไม่สามารถให้ผลึกเดี่ยวของเล็กดินได้

สภาวะที่ให้ผลึกเล็กดินที่มีคุณภาพดีที่สุดคือ การบ่มโปรตีนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน (รูปที่ 3.53A) ด้วยสารละลายซึ่งได้ปรับสภาวะจากสารละลายหมายเลข 9 (ตารางที่ 3.19) ได้ส่วนประกอบสุดท้ายคือ 18% (w/v) Polyethylene glycol 4,000, 0.2M Ammonium acetate in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6) และภายใน 2 สัปดาห์ (รูปที่ 3.53B) ด้วยสารละลายซึ่งได้ปรับสภาวะจากสารละลายหมายเลข 46 ได้องค์ประกอบสุดท้ายคือ 14% (w/v) Polyethylene glycol 8,000, 0.2M Calcium acetate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5)



รูปที่ 3.53 ผลึกโปรตีนเล็กดินของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 จากสารละลาย 18% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 0.2M Ammonium acetate in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate, pH 5.6 (A); 14% (w/v) Polyethylene glycol 8,000, 0.2M Calcium acetate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate, pH 6.5 (B)

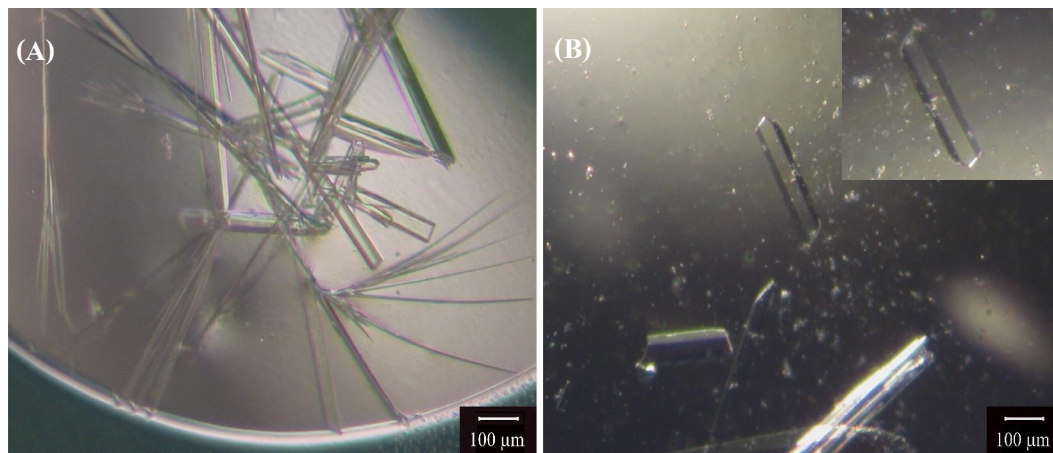
3.5.9.3 การทดสอบคุณภาพผลึกของเล็กติน

ทดสอบคุณภาพผลึกของเล็กติน โดยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction) ด้วย Microstar™ rotating-anode X-ray generator และ Mar165 charge-coupled device (CCD) Detector ที่ติดตั้ง ณ MX end station สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) จังหวัดนครราชสีมา เมื่อรังสีเอกซ์ที่มีความเข้มสูงไปกระทบผลึกของเล็กตินจะให้ข้อมูลในเชิงของแบบแผนการกระจายรังสีเอกซ์ นำข้อมูลการกระเจิงของรังสีเอกซ์ที่ได้จากผลึกเดี่ยวเล็กตินที่ให้ความละเอียดระดับ 2 อังสตรอม (Å) หรือดีกว่า มาคำนวณด้วยโปรแกรม เช่น MOSFLM หรือ Crystal-Clear/d*TREK เพื่อวิเคราะห์หากลุ่มสมมาตร และปริมาตรของ Unit cell ของผลึกเล็กติน

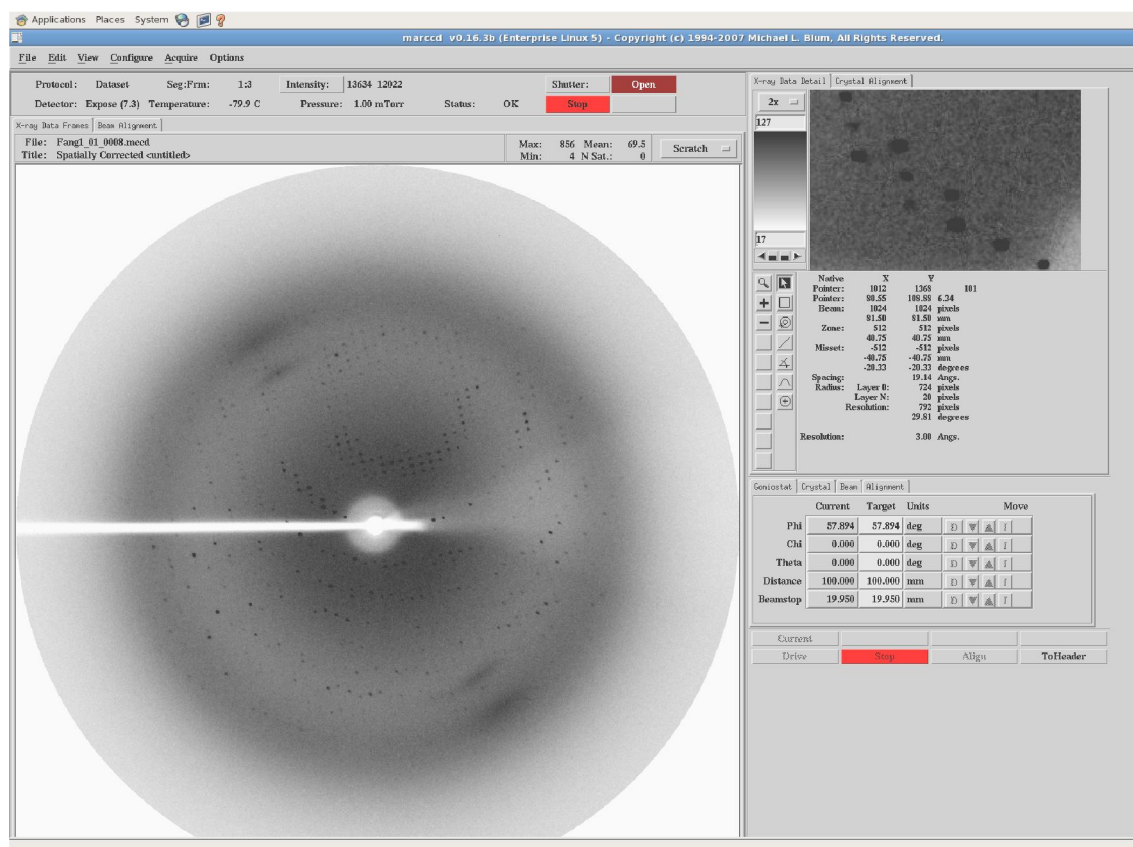
ผลึกเล็กตินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 ที่ได้เลือกไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค X-ray diffraction คือ ผลึกเล็กตินในสถานะ 20% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 20,000 in 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน (รูปที่ 3.54A และ B)

จากการนำผลึกโปรตีนเล็กตินดังกล่าวไปทดสอบคุณภาพผลึกของเล็กตินโดยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction) ด้วย Microstar™ rotating-anode X-ray generator และ Mar165 charge-coupled device (CCD) Detector พบว่าผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง MC131 มีการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction) ที่ 3 Å (รูปที่ 3.55) ผลึกโปรตีนเล็กตินอยู่ในรูป Monoclinic ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลอยู่ในกลุ่ม P2 โดย Unit cell ของผลึกมีขนาด ด้าน $a = 68.65$ Å, ด้าน $b = 80.03$ Å, และด้าน $c = 105.98$ Å, และมีมุม $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 106.4^\circ$, and $\gamma = 90.0^\circ$

ด้วยข้อจำกัดของเวลาและงบประมาณ จึงยังมิได้ดำเนินการศึกษาสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 แต่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลจากที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษาสารเล็กตินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* ML078 ซึ่งเป็นสารไกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 31.5 kDa มีความจำเพาะต่อน้ำตาล Galactose มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และเสถียรต่อ pH 3-10 ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ ผลึกเล็กตินที่ได้ให้แบบแผนการกระจายรังสีเอกซ์ที่มีการแจกแจงรายละเอียด 3.8 Å เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาคโครงสร้างของสารในเชิงลึก



รูปที่ 3.54 ผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 ในสภาวะ 20% (w/v) Polyethylene glycol 20,000 in 0.1M 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน (A) และผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง MC131 ที่เลือกไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (B)



รูปที่ 3.55 แบบแผนการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-ray diffraction pattern) ของผลึกโปรตีนเล็กตินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131

บทที่ 4

บทสรุป

4.1 สรุปผลการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัย “การศึกษาลักษณะเฉพาะของเห็ดกินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดที่รับประทานได้” ได้ผลดังนี้

4.1.1 การคัดเลือกเห็ดที่ผลิตสารเห็ดกินและเก็บรวบรวมดอกเห็ดที่ยังมีความสด

คัดเลือกเห็ดรับประทานได้เพื่อทดสอบผลการผลิตสารเห็ดกินจากข้อมูลตัวอย่างเห็ดที่ได้ศึกษาในเมืองต้นแล้วจำนวน 330 ตัวอย่าง (specimen) ของโครงการวิจัยเรื่อง เห็ดกินของเข็วรา (สุริยลักษณ์ รอดทอง, 2551) เลือกเห็ดรับประทานได้จาก 9 วงศ์ (Family) คือ Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Clavariaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae และ Tricholomataceae เพื่อการศึกษาของโครงการวิจัยนี้ จากนั้นได้เก็บรวบรวม Fruiting body ของเห็ดที่เลือกจากแหล่งที่ได้มีการสำรวจ สามารถรวบรวม Fruiting body ของเห็ดได้จำนวน 132 ตัวอย่าง ในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Boletellus*, *Gyroporus*, *Heimiella*, *Phylloporus*, *Strobilomyces*, *Tylopilus*, *Xerocomus*, *Cantharellus*, *Lentinus*, *Volvariella*, *Scytinopogon*, *Lactarius*, *Russula*, *Schizophyllum* และ *Termitomyces* นำมาคัดกรองให้ได้เห็ดอย่างน้อยสองชนิดเพื่อการศึกษาลักษณะเฉพาะของสารเห็ดกินเพื่อการใช้ประโยชน์ นำดอกเห็ดสดที่เก็บรวบรวมได้มาอบแห้งในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6-18 ชั่วโมง ทำให้ได้ตัวอย่างเห็ดมีความชื้นประมาณ 4-10% ขึ้นกับความชื้นเริ่มต้นและขนาดของตัวอย่างเห็ด ตามวิธีการที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นเพื่อการเตรียมตัวอย่างเห็ดที่ยังคงรักษาสมบัติของสารเห็ดกินและไม่มีเมือกจากโครงสร้างของดอกเห็ดสดออกมาปนเปื้อนในขั้นตอนการสกัดสารเห็ดกิน

4.1.2 การสกัด/แยกสารเห็ดกินในลักษณะสารสกัดหยาบและทดสอบสมบัติทางชีวภาพบางประการเพื่อคัดเลือกสารมาทำบริสุทธิ์

จากการสกัด/แยกเห็ดกินจาก Fruiting body ของเห็ดในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract) และทดสอบหาเห็ดกินที่สะสมในโครงสร้างของเห็ดนั้น เมื่อตรวจสอบแบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบนั้นด้วย Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ามีความแตกต่างกัน ตามแบบของแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 15 ถึง 95 กิโลดาลตัน (kDa) โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 25-40 kDa จากนั้นได้ศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของสารสกัดหยาบเห็ดกิน เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของเห็ดกินและอนุพันธ์ของเห็ดกินที่พบ และเพื่อคัดเลือกคัดเลือกลักษณะของสารสกัดหยาบของเห็ดกินจากเห็ดมาทำบริสุทธิ์ โดยทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) ของสัตว์ของสารสกัดหยาบเห็ดกิน ซึ่งจากตัวอย่างเห็ดที่คัดเลือกและรวบรวมได้มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มที่ให้ค่า Titer สูงสุดกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายและได้ค่า Titer

แตกต่างกันแม้ว่าจะเป็นเห็ดชนิดเดียวกันแต่รวบรวมได้จากต่างแหล่งกัน สารสกัดหยาบของเล็กดินที่ให้ค่า Titer สูงสุดได้จากเห็ดฟางที่รวบรวมจากต่างพื้นที่พบการสะสมสารเล็กดินในปริมาณแตกต่างกันทั้งที่ส่วนหมวก ก้าน และดอกเห็ดทั้งหมด ตามค่าความเจือจางสูงสุดของสารเล็กดินที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2,048, 2,048 และ 4,096 ตามลำดับ (ความเจือจางเริ่มต้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 1:10)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดรับประทานได้ที่เลือกจำนวน 59 ตัวอย่าง ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราที่ทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 และเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Candida albican* ATCC 10231, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896 และ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 ด้วยวิธี Disk-Diffusion Technique นั้น พบว่าสารเล็กดินจากดอกเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) โดยรวมดีกว่าสารจากเห็ดชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดที่คัดเลือกมาทดสอบ แตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ของเห็ด พบเพียงสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟางที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดย *Volvariella volvacea* MC131 และ MC133 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 ที่ความเข้มข้น 3.36 และ 3.57 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ (สารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ด MC131 มีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับสารมาตรฐาน ในขณะที่ MC133 มีความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมากกว่า 1.04550 เท่า เมื่อเทียบกับ Streptomycin ที่ใช้เป็น Positive control) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ยังมีสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟาง MC134, MC330 และ MC352 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟาง MC134, MC145 และ MC352 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 เช่นเดียวกัน

กรณีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188, เห็ดผึ้ง *Gyroporus* sp. MC359, เห็ดฟาง MC168, *Lactarius* sp. MC165 และ เห็ดหนวด *Scytinopogon* sp. MC157 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 สารเล็กดินจากเห็ด *Tyropilus* sp. MC161 และ MC360, *Phylloporus* sp. MC229, *Gyroporus* sp. MC359, *Boletus* sp. MC361 และ *Volvariella volvacea* MC145 และ MC168 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในขณะที่สารเล็กดินจากเห็ด *Leccinum* sp. MC187, *Russula* sp. MC164 และ *Volvariella volvacea* MC168 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Penicillium funiculosum* ATCC 36839 ส่วนสารสกัดหยาบเล็กดินจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC168 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ

ของ *Candida albican* ATCC และสารสกัดจากเห็ดหนวด *Scytinopogon* sp. MC157 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896 และ ATCC 18824

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดที่รับประทานได้ที่คัดเลือก ต่อเซลล์มะเร็งเยื่อหูช่องปาก (Human epidermoid carcinoma, KB) และมะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma, HeLa) และเซลล์ปกติ คือ เซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney epithelial cell line, Vero) ด้วยวิธี MTT Colorimetric assay บันทึกค่า IC_{50} (50% Inhibition concentration) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า IC_{50} มาตรฐานของสารสกัดเห็ดที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} มาตรฐานของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีเพียงสารสกัดเห็ดบางชนิดที่ให้ผลบวก คือ เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของชนิดเซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งเยื่อหูช่องปาก และเซลล์ไตของลิง (Vero cell line) ตามลำดับ สารสกัดเห็ดจากเห็ดขี้ผึ้ง *Xerocomus* sp. MC210 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อหูช่องปากและเซลล์จากไตของลิงที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 16.40 ± 2.05 และ 20.27 ± 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเห็ดจากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์จากไตของลิง แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อหูช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 54.783 ± 1.980 และ 59.11 ± 2.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ด้านความเสถียรต่อความร้อนของสารสกัดเห็ด (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของเห็ดที่รับประทานได้ที่คัดเลือกที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยตรวจสอบกิจกรรมของสารสกัดเห็ดที่ยังเหลืออยู่ด้วยปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย เปรียบเทียบกับสารสกัดเห็ดที่ไม่ให้ความร้อน (มีกิจกรรมการจับกลุ่ม 100%) พบว่าสารสกัดเห็ดของเห็ดที่คัดเลือกทุกตัวอย่างมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ตลอด 24 ชั่วโมง ที่ทดสอบ สารสกัดเห็ดจากเห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่สารสกัดเห็ดของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่คัดเลือกจำนวน 6 ตัวอย่าง (MC131 ถึง MC134, MC138 และ MC139) ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่กัน มี 4 ตัวอย่าง (MC131, MC133, MC134 และ MC138) มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 2 ตัวอย่าง (MC132 และ MC139) มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสารสกัดเห็ดบริสุทธิ์ของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ส่วนความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดเห็ดที่ทดสอบในช่วง pH 2-12 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดเห็ดจากเห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 มีความเสถียรที่ pH 7-11 เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ ในขณะที่สารสกัดเห็ดจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* จำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่าง (MC131 ถึง MC134, MC138 และ MC139) ที่เก็บรวบรวมจากต่างพื้นที่กันจำนวน 3

ตัวอย่าง (MC131, MC132 และ MC139) มีความเสถียรที่ pH 2-12 จำนวน 1 ตัวอย่าง (MC133) มีความเสถียรที่ pH 4-12 สารเล็กดิน 1 ตัวอย่าง (MC134) มีความเสถียรที่ pH 6-9 และสารเล็กดินจากเห็ดอีก 1 ตัวอย่าง (MC139) มีความเสถียรที่ pH 7 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับสารเล็กดินของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง ที่ 6-10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง

4.1.3 การทำบริสุทธิ์สารเล็กดินจากเห็ดรับประทานได้

จากผลการตรวจหาสารเล็กดินที่ผลิตจากเห็ดรับประทานได้ด้วยปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์และการทดสอบสมบัติทางชีวภาพด้านความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคน เลือกได้ตัวอย่างเห็ดฟาง *Vovariella vovacea* MC133 และเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 มาทำบริสุทธิ์สารเล็กดิน เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพ กายภาพ และทางเคมีของสารเล็กดินที่พบ ทดสอบควบคู่กับเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ซึ่งคณะผู้วิจัยมีผลสำเร็จด้านวิธีการทำบริสุทธิ์สารในเบื้องต้น และเริ่มทำบริสุทธิ์สารเล็กดินโดยอาศัยผลงานวิจัยพื้นฐานและจากเอกสารอ้างอิงด้วยวิธี Chromatography โดยทดลองใช้ Ion exchange chromatography และ Affinity chromatography

จากผลงานวิจัยพื้นฐานของคณะผู้วิจัยพบว่าเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ที่พบในพื้นที่ธรรมชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้ง/ทำลายเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดี แต่ด้วยข้อจำกัดที่ไม่สามารถรวบรวมตัวอย่างเห็ด (Specimen) ที่เจริญตามธรรมชาติได้มากเพียงพอต่อการสกัดและทำบริสุทธิ์สารเล็กดิน จึงได้ใช้ตัวอย่างเห็ดจากที่มีจำหน่ายในตลาดท้องถิ่นในต่างพื้นที่ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จากการตกตะกอนโปรตีนเล็กดินด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50-90% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง พบว่าเห็ดฟาง MC133 และเห็ดระโงก MC188 ตกตะกอนด้วย 70-90 และ 50% Ammonium sulphate ตามลำดับ และแยกเกลือออกด้วย Dialysis ใช้ Cellulose acetate dialysis-tubing membrane ที่มี Molecular weight cut-off (NMWC) ที่ 10 kDa เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 หลังจากตกตะกอนด้วย 70% Ammonium sulphate และทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Ion exchange chromatography ชนิด Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column ในคอลัมน์ (1.5×11 เซนติเมตร) ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) เมื่อชะสารละลายโปรตีนเล็กดินด้วย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มีความเข้มข้นของ Sodium chloride ตั้งแต่ 0-1M สามารถทำบริสุทธิ์สารเล็กดินจากเห็ด *Volvariella volvacea* MC133 ได้ดี สารโปรตีนถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของ Sodium chloride เท่ากับ 0.5M สารเล็กดินที่แยกบริสุทธิ์มีขนาดมวลโมเลกุลในสภาพเสียธรรมชาติของสารเล็กดินด้วย 15% SDS-PAGE พบว่าสารละลายโปรตีนเล็กดินที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 25 kDa และเมื่อทดลองตกตะกอนสารสกัดหยาบของเล็กดินจาก *Volvariella volvacea* MC133 ซ้ำด้วย 90% Ammonium sulphate กำจัดเกลือ Ammonium sulphate ด้วย Dialysis bag (Molecular weight cut-off 10 kDa) ที่ 4 องศา

เซลเซียส เตรียมสารละลายโปรตีนเล็กคินให้อยู่ใน 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ก่อนนำไปทำบริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sepharose resin ขนาด 1.5×5 เซนติเมตร Equilibrate คอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) และล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) (3 bed volumes) จะโปรตีนออกโดยใช้สารละลาย 10mM Tris-HCl (pH 7.3) ที่มีความเข้มข้นของ Sodium chloride (NaCl) ตั้งแต่ 0-0.5M (Stepwise concentration gradient) ใช้ 2 bed volumes อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที พบสารโปรตีนเล็กคินจากเห็ดฟาง MC133 เมื่อชะโปรตีนออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.2M NaCl ขนาดมวลโมเลกุลของสารเล็กคินที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเห็ดฟาง MC133 จาก Gel filtration chromatography ด้วย Superdex 75 column และ SDS-PAGE มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่มีขนาดมวลโมเลกุล 25 kDa เป็น Monomeric lecin

ส่วนการทำบริสุทธิ์สารเล็กคินจากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ด้วยวิธี Ion exchange chromatography ชนิด Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column จากการตกตะกอนโปรตีนเล็กคินจากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 ด้วย 50% Ammonium sulphate เมื่อนำมาแยกบริสุทธิ์สารเล็กคินโดยใช้ Anion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sepharose column จะแบบ Stepwise concentration gradient พบสารโปรตีนเล็กคินที่ 0.2M NaCl สารเล็กคินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก MC188 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 30 kDa

กรณีการทำบริสุทธิ์สารเล็กคินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 โดยวิธี Affinity chromatography ด้วย Mucin-Sepharose 4B column จากผลงานวิจัยพื้นฐานสามารถทำบริสุทธิ์สารละลายโปรตีนเล็กคินจากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 โดยตกตะกอนด้วย 70% Ammonium sulphate แล้วแยกบริสุทธิ์สารเล็กคินโดยใช้ Affinity chromatography ด้วยคอลัมน์ Mucin-Sepharose 4B จะสารละลายโปรตีนเล็กคินออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 1,3 Diaminopropane (DAP) ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 20mM ที่มีกิจกรรมการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายอยู่ในช่วงค่าความเจือจางระหว่าง 1:8 ถึง 1:64 และสารโปรตีนเล็กคินบริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 29 และ 32 kDa วิธีการทำบริสุทธิ์ที่ใช้ทำให้ได้ผลผลิต (Yield) 49.15 มิลลิกรัม จากโปรตีนในสารสกัดเห็ด 3,390 มิลลิกรัม

4.1.4 การศึกษาสมบัติทางชีวภาพและคุณลักษณะของเล็กคินบริสุทธิ์ที่คัดเลือก

ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา ความเป็นพิษของสารเล็กคินบริสุทธิ์กับเซลล์มะเร็งบางชนิดของคน และความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ของเล็กคินและอนุพันธ์ของเล็กคินที่พบ ได้ผลโดยสรุปเป็นลำดับดังนี้ ฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ของเล็กคินจากเห็ด 3 ตัวอย่าง (เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC 133, เห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดเห็ดเล็กคินนั้น สารบริสุทธิ์ของเล็กคินจากเห็ดทั้ง 3 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบชนิดใดเลย ในขณะที่สารสกัดเห็ดเล็กคินให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ตั้งระดับข้างต้น

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดที่รับประทานได้ที่เลือกนั้นต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก (KB) และเซลล์ไตของลิง (Vero) ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดเห็ดดินนั้น สารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 แสดงความเป็นพิษมากต่อเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก เซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์ปกติจากไตของลิงที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.562, 0.626, และ 0.225 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและเซลล์ปกติจากไตของลิงที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 16.08 และ 72.97, และ 81.46 และ 52.29 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

สารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดแครง MC322 ไม่มีฤทธิ์ทำลาย/ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่สารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก MC188 มีฤทธิ์ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 29.005 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ผลจากการทดสอบขั้นตอนนี้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกใช้ประโยชน์สารสกัดจากเห็ดรับประทานได้

ด้านความเสถียรต่อความร้อนและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดบริสุทธิ์ ที่ทดสอบโดยใช้สารสกัดบริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และให้ความร้อนเป็นเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ทั้งจากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133, เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีที่ทดสอบ สารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 เมื่อสัมผัสความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ยังคงเหลือสมบัติของสารสกัดดินราว 50% และสามารถเก็บสารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดทั้ง 3 ชนิด ไว้ที่อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส ได้นาน 24 ชั่วโมง โดยไม่สูญเสียสมบัติการจับกลุ่มกับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่จำเพาะ จากการศึกษาค่าความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารสกัดบริสุทธิ์ของเห็ดที่รับประทานได้ที่คัดเลือก 3 ชนิดข้างต้น ที่ pH 2-12 โดยตรวจหาสารสกัดดินที่เหลือด้วยปฏิบัติการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระด่าย พบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างที่ pH 7.0-9.0, 10.0-11.0, และ 7.0 ตามลำดับ ตลอดระยะเวลา 18 ชั่วโมงที่ทดสอบ

สารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 25 kDa และ 32 และ 29 kDa มีค่า Isoelectric point (pI) 5.4 และ 5.6-6.6

สารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 และเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 จัดเป็น Glycoprotein ที่ไม่แสดงความจำเพาะต่อน้ำตาลชนิดใดเลยจาก 32 ชนิด ที่ใช้ในการทดสอบ ในขณะที่สารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 เป็นสารประเภท Glycoprotein เช่นกันแต่มีความจำเพาะต่อน้ำตาล N-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc), L-Arabinose, D-Galactose, Lactose, Lactitol, Melibiose, Methyl- α -D-galactopyranoside, Methyl- β -D-galactopyranoside,

4-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, 4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, Raffinose, Rhamnose และ Ribose

เมื่อศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ โดยเลือกเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ที่มีโปรตีนเล็กตินขนาด 25 kDa เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินได้สาย Tryptic peptides ที่มีลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือน 88-100% กับโปรตีน Volvatoxin A2 precursor ที่มีขนาด 24.2 kDa ของ *Volvariella volvacea* (AAQ92757.1) ตามฐานข้อมูล GenBank (U.S.A.)

4.1.5 การทดสอบกรรมวิธีการปลูกผลึกเล็กติน

จากการทดสอบหาสภาวะเบื้องต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดผลึกด้วย Commercial screening kit (Crystal Screen HR2-110 และ Crystal Screen HR2-112; Hampton Research) ด้วยวิธี Microbatch under oil โดยตกผลึกสารโปรตีนเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง MC133 ด้วยวิธี Hanging drop พบว่ายังไม่มีผลสำเร็จในการกระตุ้นการเกิดผลึกเล็กติน จากสภาวะการบ่มเล็กตินความเข้มข้น 2.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ในสภาวะสารละลาย 20% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 5% (v/v) 2-Propanol in 0.1M Sodium citrate tribasic dihydrate (pH 5.6); สารละลาย 18 (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether (PME) 2,000, 0.2M Ammonium sulphate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6); และสารละลาย 16% PEG 20,000, 0.1M MES (pH 6.5) เมื่อทดสอบการตกผลึกโปรตีน MC133 ซ้ำโดยบ่มเล็กตินที่ได้มาจากการทำบริสุทธิ์โดยวิธี Ion exchange chromatography (DEAE-sepharose) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ในหลายสภาวะสารละลายของ Crystal Screen HR2-110 และ HR2-112 (Hampton Research) จำนวน 98 ชนิด บ่มเป็นเวลาสองเดือนยังไม่ปรากฏผลของการเกิดผลึกใดๆ จึงศึกษาการตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 เพื่อเปรียบเทียบกับ MC133 ด้วยวิธีการเดียวกัน พบว่าการบ่มเล็กตินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 3 วัน เกิดผลึกลักษณะเข็มและเพลทขึ้นในสภาวะสารละลายตรวจสอบ 6 ชนิด ดังนี้ (1) 30% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 4,000, 0.2M Ammonium acetate in 1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6); (2) 30% (w/v) PEG 8,000, 0.2M Sodium acetate trihydrate in 0.1M Sodium cacodylate trihydrate (pH 6.5); (3) 20% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6); (4) 20% (w/v) PEG 8,000 and 0.05M Potassium phosphate monobasic; (5) 30% (w/v) Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000, 0.2M Ammonium sulphate in 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6); และ (6) 12% (w/v) PEG 20,000 in 0.1M 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate (pH 6.5)

ส่วนการทดสอบการตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กตินบริสุทธิ์จากเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 โดยวิธี Microbatch ด้วยสารละลายตรวจสอบชนิด Crystal Screen HR2-110 และ HR2-112 (Hampton Research) จำนวน 98 ชนิด เช่นกัน พบว่าการบ่มเล็กตินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ได้สภาวะสารละลายตรวจสอบ 5 ชนิด ดังนี้ (1) 30% (w/v) Polyethylene glycol (PEG)

4,000, 0.1M Tris-hydrochloride pH 8.5 in 0.2M Magnesium chloride hexahydrate; (2) 0.8M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1M 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) sodium pH 7.5; (3) 10% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M HEPES sodium pH 7.5; (4) 1.6 M Magnesium sulphate heptahydrate in 0.1M 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate pH 6.5 และ (5) 10% (w/v) PEG 8,000, 8% (v/v) ethylene glycol in 0.1M HEPES pH 7.5 ที่ให้ผลึกของโปรตีนเล็กคินหลังจากการบ่มนาน 2 เดือน

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองตกผลึกเบื้องต้นของสารเล็กคินบริสุทธิ์จากเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 เพื่อเปรียบเทียบ ด้วยวิธี Microbatch ด้วยสารละลายตรวจสอบชนิด Crystal Screen HR2-110 และ HR2-112 (Hampton Research) จำนวน 98 ชนิด พบว่าการบ่มเล็กคินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ได้สภาวะสารละลายตรวจสอบ 19 ชนิดที่น่าสนใจ เมื่อทดสอบต่อ พบสารละลายตรวจสอบ 11 ชนิด ทำให้เกิดลักษณะที่น่าจะเป็นผลึกของโปรตีนเล็กคิน จากนั้นเมื่อปรับสภาวะการเกิดผลึกด้วยเทคนิค Hanging drop vapor diffusion กับสารละลายทั้ง 11 ชนิด หลังจากบ่มสารละลายโปรตีนกับสารละลายทดสอบ 1 สัปดาห์ พบผลึกลักษณะเข็มและผลึกลักษณะแบบแผ่นหรือเพลท (plate) ขึ้นที่สารละลายตรวจสอบ 2 สภาวะที่ควรปรับปรุงเพื่อให้ได้ผลึกของโปรตีนเล็กคิน

เมื่อปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึกทั้งความเข้มข้นของโปรตีน (1-5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ความเข้มข้นและ pH ของสารละลายที่ใช้ และอุณหภูมิ เพื่อให้ได้ผลึกที่มีคุณภาพดียิ่งขึ้น โดยการใช้การปลูกผลึกด้วยวิธี Hanging drop vapour diffusion ได้เลือกปรับปรุงสภาวะของการเกิดผลึกเล็กคินของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 พบ 3 สภาวะ ที่เห็นแนวโน้มการเกิดผลึกจากการใช้สารละลายโปรตีนเล็กคินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ลักษณะแรกเป็นผลึกลักษณะแบบแผ่นหรือเพลท (plate) ในสภาวะของสารละลาย 5% (v/v) 2-Propanol, 20% (w/v) PEG 4,000 in 0.1M Sodium citrate tribasic dehydrate (pH 5.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1-2 เดือน แต่ผลึกที่ได้จากสภาวะดังกล่าวยังไม่เหมาะสมที่จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-Ray diffraction)

สภาวะที่ 2 พบการเกิดผลึกเล็กคินของเห็ดฟาง MC131 ลักษณะ phase separation ในสภาวะของสารละลาย 18% (w/v) PME 2,000, 0.2M Ammonium sulphate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน และในสภาวะของสารละลาย 26% (w/v) PME 2,000, 0.2M Ammonium sulphate, 0.1M Sodium acetate trihydrate (pH 4.6) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน แต่ผลึกที่ได้จากสภาวะดังกล่าวไม่ทนใน Cryosolution mother liquor ทำให้ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค X-Ray diffraction

สภาวะสุดท้ายที่ศึกษาในโครงการนี้พบว่าเกิดผลึกเล็กคินของเห็ดฟาง MC131 ลักษณะแบบเข็มในสภาวะของสารละลาย 20% (w/v) Polyethylene glycol 20,000 ใน 0.1M MES monohydrate (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และในสภาวะของสารละลาย 16% (w/v) PEG 20,000 ใน 0.1M MES monohydrate (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เกิดผลึกเล็กคินของเห็ดฟาง MC131 ลักษณะแบบแผ่นหรือเพลท (plate) กรณีผลึกเล็กคินของเห็ดฟาง MC131 ในสภาวะ 20% (w/v)

Polyethylene glycol (PEG) 20,000 in 0.1M 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) monohydrate (pH 6.5) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เมื่อประมาณ 2 เดือน ทำให้ได้ผลึกที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค X-ray diffraction ด้วย Microstar™ rotating-anode X-ray generator และ Mar165 charge-coupled device (CCD) Detector ผลึกโปรตีนเล็กคินของเห็ดฟาง MC131 มีการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ที่ 3 อังสตรอม (3 Å) ซึ่งผลึกโปรตีนเล็กคินดังกล่าวอยู่ในรูป monoclinic มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลอยู่ในกลุ่ม P2 โดย unit cell ของผลึกมีขนาด ด้าน $a = 68.65$ Å, ด้าน $b = 80.03$ Å, และด้าน $c = 105.98$ Å, และมีมุม $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 106.4^\circ$, and $\gamma = 90.0^\circ$ เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาสารเล็กคินและโครงสร้างของสารในเชิงลึกต่อไป

กรณีเห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ยังไม่มีผลสำเร็จที่ได้ผลึกโปรตีนเล็กคินที่มีคุณภาพดีเพียงพอที่จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิค X-ray diffraction

กล่าวโดยสรุป สารสกัดเล็กคินจากเห็ดรับประทานได้ที่คัดเลือกเพื่อศึกษา 3 ชนิด คือ เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 เห็ดระโงก *Amanita* sp. MC188 และเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 (ตัวอย่างเปรียบเทียบ) เป็นสารไกลโคโปรตีนที่มีความจำเพาะคล้ายแอนติบอดีที่สามารถเกิดการจับกลุ่มของเซลล์แต่เป็นสารที่ได้จากแหล่งผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน สารเล็กคินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* หลายสายพันธุ์ สะสมสารเล็กคินในปริมาณแตกต่างกันทั้งที่แยกส่วนหมวกส่วนก้าน และรวมทุกส่วนของดอกเห็ด และมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียทดสอบหลายชนิด พร้อมทั้งได้วิจัยทำบริสุทธิ์สาร ศึกษาสมบัติและโครงสร้างทางเคมีและสามมิติของสารเล็กคินเหล่านี้เพื่อนำไปสู่การพัฒนาสารสกัดเล็กคินจากเห็ดรับประทานได้เพื่อประโยชน์ทางอาหารและการแพทย์ จากการทำบริสุทธิ์สาร ศึกษาสมบัติและโครงสร้างทางเคมีและสามมิติของสารเล็กคิน สามารถปลูกผลึกของสารเล็กคินบริสุทธิ์ที่ผลิตจากเห็ดฟางเฉพาะสายพันธุ์ และได้แบบแผนการกระจายรังสีเอกซ์ของผลึกเล็กคินบริสุทธิ์จากเห็ดสายพันธุ์นั้นด้วยลำแสงซินโครตรอน

4.2 ข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้มีผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่เป็นพื้นฐานสำคัญของการใช้ประโยชน์สารเล็กคินจากเห็ดรับประทานได้ในเขตร้อนที่พบได้ง่ายในประเทศไทย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อในเชิงลึกในส่วนที่เกี่ยวข้องในประเด็นดังต่อไปนี้

- 1) การพัฒนากรรมวิธีการปลูกผลึกของเล็กคินต่อเนื่อง เนื่องจากโครงการนี้มีข้อจำกัดทั้งระยะเวลาและงบประมาณ เพื่อให้สามารถได้ข้อมูลของโครงสร้างของสารเพื่อการใช้ประโยชน์สารเล็กคินอย่างแท้จริง
- 2) การศึกษาพันธุกรรมของเห็ดรับประทานได้ที่สะสมสารเล็กคินที่มีประโยชน์ เนื่องจากมีความต่างของสายพันธุ์และศักยภาพในการสร้างสารเล็กคิน รวมถึงความแตกต่างของพื้นที่พบ/เพาะเลี้ยงเห็ดที่สร้างเล็กคินเหล่านี้
- 3) การพัฒนากรรมวิธีเพิ่มผลผลิตเห็ดรับประทานได้ที่เพาะเลี้ยงได้ยาก สายพันธุ์ที่สะสมสารเล็กคินที่มีประโยชน์

4) กรรมวิธีการเตรียมอาหารของมนุษย์จากเห็ดรับประทานได้ที่มีศักยภาพสูงในการสร้างสารเล็กตินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ที่ให้โทษต่อมนุษย์และ/หรือเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของคน ซึ่งหลายชนิดเป็นที่นิยมบริโภคกันแพร่หลายเนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารและรสชาติดี จากการศึกษาของโครงการเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ที่พบเจริญตามธรรมชาติและเพาะเลี้ยงได้โดยทั่วไปอย่างน้อย 3 ชนิด คือ เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) หลายสายพันธุ์ เห็ดระโงก (*Amanita* sp.) และเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) หลายสายพันธุ์ มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียทดสอบหลายสายพันธุ์ได้ ยังพบว่า สารสกัดยับยั้งการเจริญของเห็ดข้างต้น ยังคงมีความเสถียรหากกระบวนการปรุงอาหารใช้ความร้อนที่ไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 30 นาที และความเสถียรจะน้อยลงที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังพบว่ามีความเสถียรต่อค่า pH โดยเฉลี่ย 2-12 ตลอดระยะเวลาที่ทดสอบนานถึง 18 ชั่วโมง จึงมีความสามารถทนกรดในกระเพาะอาหาร ประกอบกับสารเล็กตินในเห็ดทั้งสองชนิดเป็นโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน (kDa) จึงมีแนวโน้มในการถูกดูดซึมและร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ได้ พร้อมทั้งได้ผลการศึกษาสารเล็กตินบริสุทธิ์ ที่เป็นข้อมูลสู่การพัฒนาสารสกัดเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้เพื่อประโยชน์ทางอาหารและการแพทย์

บรรณานุกรม

- เกษม สร้อยทอง. 2537. *เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดวอร์ดเม ดิก. 222 หน้า
- อนงค์ จันทรศรีกุล. 2539. *เห็ดเมืองไทย*. กรุงเทพฯ: บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. 161 หน้า.
- สุรียะลักษณ์ รอดทอง. 2551. *เล็กดินของเชื้อรา*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ รหัสโครงการ SUT 1-104-46-24-08. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 146 หน้า.
- สุรียะลักษณ์ รอดทอง หนึ่ง เตียอำรุง และพินิจ ชุกคล้าย. 2541. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 58 หน้า.
- สุรียะลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เขียวหิรัญ หนึ่ง เตียอำรุง และพินิจ ชุกคล้าย. 2542. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 157 หน้า.
- สุรียะลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เขียวหิรัญ และหนึ่ง เตียอำรุง. 2543. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา*. นครราชสีมา: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 133 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 Edition. Berkeley: Ten Speed Press.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., and Edelstein, S.J. 1996. *Protein Methods*, 2nd Edition. New York: Wiley-Liss.
- Bovi, M., Carrizo, M.E., Capaldi, S., Perduca, M., Chiarelli, L.R., Galliano, M., and Monaco, H.L. 2011. Structure of a lectin with antitumoral properties in king bolete (*Botetus edulis*) mushroom. *Glycoconjugation Journal*. 21(8): 1000-1009.
- 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*. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 20104-20109.
- 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 a N-acetyl galactosamine-

- specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1760: 326-332.
- 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.
- Ei Enshasy, H.A., and Hatti-Kaul, R. 2013. Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*. 31(12): 668-677.
- 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.
- Grahn, E., Holmner, A., Cronet, C., Tateno, H., Winter, H.C., Goldstein, I.J., and Krenzel, U. 2004. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a lectin from the mushroom *Marasmius oreades*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 60: 2038-2039.
- Guillot, J. and Kanska, G. 1997. Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*. 25: 203-230.
- 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.
- Jiang, S., Chen, Y., Wang, M., Yin, Y., Pan, Y., Gu, B., Yu, G., Li, Y., Wong, B.H.C., Liang, Y., and Sun, H. 2012. A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine. *Biochemical Journal*. 443: 369-378.
- 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.

- 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.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Laessle, T. and Conte, A.D. 1996. *The Mushroom Book*. London: Dorling Kindersley. 256 pp.
- 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.
- Liu, Q., Ng, T., and Wang, H. 2013. Isolation and characterization of a novel lectin from the wild mushroom *Oudemansiella radicata* (Rehman: Fr.) Sing. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 18: 465-471.
- Matsushita, M., Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., and Mizuochi, T. 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.
- Mo, H., Winter, H.C., and Goldstein, I.J. 2000. Purification and characterization of Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the Fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(14): 10623-10629.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edition. Washington: American Society for Microbiology.
- 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.
- Pemberton, R.T. 1994. Agglutinins (lectins) from some British higher fungi. *Mycological Research*. 98: 277-290.
- 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.
- 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 α 1-3 manno-*bio*se. *Journal of Molecular Biology*. 290: 185-199.
- Sharon, N. and Lis, H. 1989. *Lectins*. Rehovot: Department of Biophysics, The Weizmann Institute of Science, Israel.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 68: 850-858.
- Singh, R., Kaur, H.P., Kumar, P., and Kaur, H. 2013. Purification and characterization of a thermostable mycelial lectin from basidiomycete *Lentinus squarrosulus*. *Biologia*. 68(6): 1034-1040.
- Turnbull, E. and Watling, R. 1999. Taxonomic and floristic notes on Malaysian larger fungi III. *Malayan Nature Journal*. 53(3): 189-200.
- Van Damme, E.J., Peumans, W.J., Puszta, A., and Bardocz, S. 1997. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. Chichester: John Wiley & Sons.
- 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.
- 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. and Ng, T.B. 2005. First report of an arabinose-specific fungal lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 337:621-625.
- Weis, W.I. and Drickamer, K. 1996. Structure basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*. 65: 441-443.
- Wibulpolprasert, S. 2002. *Thailand Health Profile 1999-2000*. Bangkok: Bureau of Policy and Strategy, Ministry of Public Health.
- 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.
- Watling, R. 2003. *Fungi*. London: The Natural History Museum.
- 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.
- 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.
- 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., Geraimenk, 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 acetate (10mM, pH 4.5)

Ammonium acetate 770 กรัม

ละลาย Ammonium acetate ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ตามต้องการด้วย Glacial acetic acid ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และกรองด้วยเยื่อกรอง (0.45 μ m) เพื่อให้สารละลายปลอดเชื้อ

2. Ammonium hydroxide (10%)

Ammonium hydroxide 10.00 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. Bradford reagent

Coomassie brilliant blue G-250 10.00 มิลลิกรัม

Ethanol (95%) 5.00 มิลลิลิตร

Phosphoric acid (85%, w/v) 10.00 มิลลิลิตร

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 มิลลิกรัม ใน 99.8% Ethanol 4.7 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งสีข้อมละลายหมด แล้วจึงเติม 85% Phosphoric acid 8.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บใส่ขวดสีชาไว้ในที่ 4 องศาเซลเซียส

4. Calcium chloride (CaCl₂, 1M)

Calcium chloride (CaCl₂·6H₂O) 54.00 กรัม

ละลาย CaCl₂·6H₂O 54.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และกรองด้วยเยื่อกรอง (0.22 ไมโครเมตร) เพื่อให้สารละลายปลอดเชื้อ เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

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

DAP (1,3-Diaminopropane) 1.48 กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

6. Glycine/ HCl (0.1M, pH 2.0)

Glycine (Molecular weight 75.07) 1.50 กรัม

ชั่ง Glycine ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 2.0 ด้วยสารละลาย HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร และกรองด้วยเยื่อกรอง (0.22 ไมโครเมตร) เพื่อให้สารละลายปลอดเชื้อ

7. Glycine/ NaOH (0.1M, pH 9.0)

Glycine (Molecular weight 75.07)	1.50	กรัม
----------------------------------	------	------

ซึ่ง Glycine ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.0 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 200 มิลลิลิตร และกรองด้วยเยื่อกรอง (0.22 ไมโครเมตร) เพื่อให้สารละลายปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. 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)

9. McFarland scale 0.5

Sulphuric acid, 0.18M	99.5	มิลลิลิตร
-----------------------	------	-----------

Barium chloride, 0.048M	0.5	มิลลิลิตร
-------------------------	-----	-----------

10. Magnesium chloride (MgCl₂, 1M)

Magnesium (III) chloride (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	203.30	กรัม
---	--------	------

ละลาย MgCl₂·6H₂O 203.30 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. Melzer's reagent

Iodine	1.50	กรัม
--------	------	------

Potassium iodide	5.00	กรัม
------------------	------	------

Chloral hydrate	100.00	กรัม
-----------------	--------	------

น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร
----------	--------	-----------

12. Sodium hydroxide (NaOH, 1M)

Sodium hydroxide (NaOH, Molecular weight 40.0)	4.00	กรัม
--	------	------

ละลาย NaOH 4 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

13. Periodic Acid Schiff (PAS) สำหรับย้อม Polyacrylamide gel**13.1 Fixation/destaining solution**

Acetic acid	10.00	มิลลิลิตร
-------------	-------	-----------

Methanol	35.00 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	55.00 มิลลิลิตร

13.2 Meta-bisulfite solution

ละลาย Sodium meta-bisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 0.2 กรัม ใน 5% (v/v) Acetic acid (เตรียมก่อนใช้) 100 มิลลิลิตร

14. Phosphate buffer saline (PBS) สำหรับสกัดเล็คติน (Lectin extraction)

Sodium chloride (NaCl)	8.00 กรัม
Potassium chloride (KCl)	0.20 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1.15 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.20 กรัม
Sodium bisulphite (NaHSO_3 , 0.02M)	22.80 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน โดยให้ความร้อน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วยสารละลาย HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

15. Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) สำหรับการสกัดในการวิเคราะห์ Antimicrobial assay และการทำให้เล็คตินบริสุทธิ์

Sodium chloride (NaCl)	8.00 กรัม
Potassium chloride (KCl)	0.20 กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1.15 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.20 กรัม
Benzamidine (1mM)	0.15 กรัม
2-Mercaptoethanol (0.1%)	2.00 มิลลิลิตร
Poly(vinylpyrrolidone) (PVPP, 1.5%)	7.50 กรัม
Sodium azide (NaN_3)	0.20 กรัม

ปรับ pH เท่ากับ 7.4 ด้วย HCl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

16. Phosphate buffer saline (PBS)

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

สารละลาย A: 0.2M Monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 31.20 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2M Dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 53.65 กรัม หรือ 71.70 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

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

17. Resolving gel SDS-PAGE (17.5%)

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

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

Tris (2M stock solution Tris-Base, pH 8)	5.00	มิลลิลิตร
Calcium chloride (CaCl ₂)	0.15	กรัม
Magnesium chloride (MgCl ₂ , 1mM)	1.00	มิลลิลิตร
Sodium azide (NaN ₃)	0.20	กรัม

ปรับ pH เท่ากับ 7.4 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

19. Running buffer สำหรับ SDS-PAGE

Glycine	14.40	กรัม
Tris-Base	3.03	กรัม
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	0.50	กรัม

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

20. Running buffer สำหรับ Ion-exchange chromatography (DEAE-Sepharose)

Tris (10mM, prepared from 2M stock solution Tris-HCl, pH 8) 5.00 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

21. SDS-gel loading buffer

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

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

22. Stacking gel SDS-PAGE (5%)

Tris-HCl (1M, pH 6.8)	3.75	มิลลิลิตร
Bis-acrylamide (1%)	3.90	มิลลิลิตร
Deionized water	4.00	มิลลิลิตร
Sodium dodecyl sulphate (SDS) (20%)	0.15	มิลลิลิตร
Acrylamide (30%)	2.50	มิลลิลิตร
Bromophenol blue (0.1%)	0.60	มิลลิลิตร
Ammonium persulphate (10%)	100.00	ไมโครลิตร
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine (TEMED)	20.00	ไมโครลิตร

23. Sodium acetate buffer (0.2M, pH 4.0)

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

สารละลาย A: 0.2M Sodium acetate trihydrate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 27.22 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2M Acetic acid

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH ที่ 18 องศาเซลเซียส
10.0	90.0	3.7
12.0	88.0	3.8
18.0	82.0	4.0
26.5	73.5	4.2
37.0	63.0	4.4
49.0	51.0	4.6
59.0	41.0	4.8
70.0	30.0	5.0
79.0	21.0	5.2
86.0	14.0	5.4
91.0	9.0	5.6

24. Staining/Destaining solution

24.1 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 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น		

24.2 Destaining solution สำหรับ Coomassie stain

Methanol	450.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.00	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น		

24.3 Destaining solution สำหรับ Protein blotting

Methanol	50.00	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น		

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

25.1 Acrylamide solution (48%)

Acrylamide	240.00	กรัม
<i>N,N'</i> -Methylene bisacrylamide	7.00	กรัม
ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น		

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

Tris-HCl	181.00	กรัม
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	1.50	กรัม
ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น		

25.3 Glycerol solution (50%)

Glycerol	250.00	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น		

25.4 Resolving gel SDS-PAGE (12%)

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

25.5 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		

25.6 Stacking gel (4%)

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

26. Tris-HCl (1M, pH 6.8)

Tris-Hydrochloride (Tris-HCl)	121.14	กรัม
(Molecular weight 157.56)		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม Concentrated HCl (37.2% หรือ 12.1M) เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

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

Tris-Base (Molecular weight 121.14) 121.14 กรัม

เติม Concentrated HCl (37.2% หรือ 12.1M) เพื่อปรับ pH เท่ากับ 7.0 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

28. Tris-HCl (1M, pH 7.3)

Tris-Base (Molecular weight 121.14) 121.14 กรัม

เติม Concentrated HCl (37.2% หรือ 12.1M) ประมาณ 70 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH เท่ากับ 7.3 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

29. Tris-HCl (10mM, pH 7.3)

เตรียมจาก 1M Tris-HCl, pH 7.3

30. Tris-HCl (1M, pH 8.0)

Tris-Base (Molecular weight 121.14) 121.14 กรัม

เติม Concentrated HCl (37.2% หรือ 12.1M) ประมาณ 42 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH เท่ากับ 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

31. Tris-HCl (10mM, pH 8.0)

เตรียมจาก 1M Tris-HCl, pH 8.0

32. Tris-HCl (50mM, pH 8.0)

เตรียมจาก 1M Tris-HCl, pH 8.0

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Malt extract broth สำหรับเลี้ยงเชื้อราที่เป็นเชื้อทดสอบสารเล็กดิน

Malt extract 30.00 กรัม

Peptone 5.00 กรัม

ปรับ pH 5.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลาย สมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Malt extract agar สำหรับเลี้ยงเชื้อราที่เป็นเชื้อทดสอบสารเล็กดิน

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 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลาย สมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Mueller-Hinton agar สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียที่เป็นเชื้อทดสอบสารเล็กดิน

Beef extract, dehydrated infusion form 30.00 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 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลาย สมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient broth (NB) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียที่เป็นเชื้อทดสอบสารเล็กดิน

Beef extract 3.00 กรัม

Peptone 5.00 กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น ปรับ pH สุดท้ายเท่ากับ 7.4 ± 0.2 ด้วย HCl แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

5. Nutrient agar (NA) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียที่เป็นเชื้อทดสอบสารเล็กดิน

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 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลาย

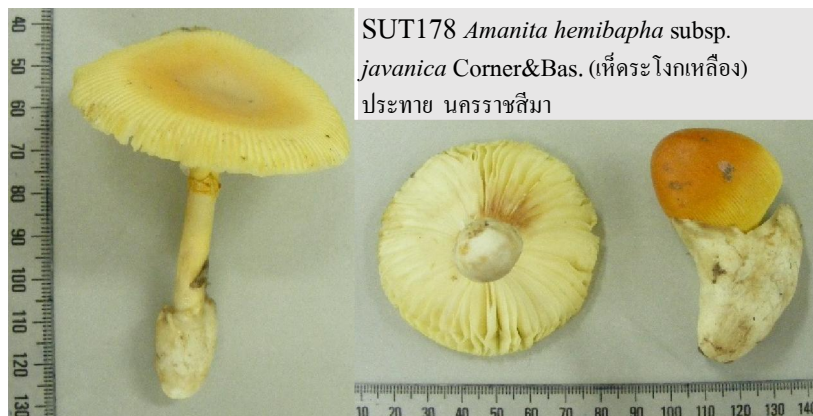
สมบูรณ์ ผ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ก ตารางผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การตกตะกอนสารละลายโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate precipitation)

		Solid ammonium sulphate (g) to be added to 1 liter of solution to desired final ammonium sulphate percent saturation																		
		%	10	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100		
Initial ammonium sulphate percent saturation	0	56	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767			
	10		57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694			
	20			29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619			
	25				30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583			
	30					30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546			
	35						31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506			
	40							31	63	97	132	168	205	245	285	375	469			
	45								32	65	99	134	171	210	250	339	431			
	50									33	66	101	137	176	214	302	392			
	55										33	67	103	141	179	264	353			
	60											34	69	105	143	227	314			
	65												34	70	107	190	272			
	70													35	72	153	237			
	75															36	115	198		
	80																	77	157	
	90																			79

ภาคผนวก ง รูปผนวก



รูปผนวกที่ 1 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Amanitaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Amanitaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกลักษณะ



รูปผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Amanitaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Amanitaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกรส



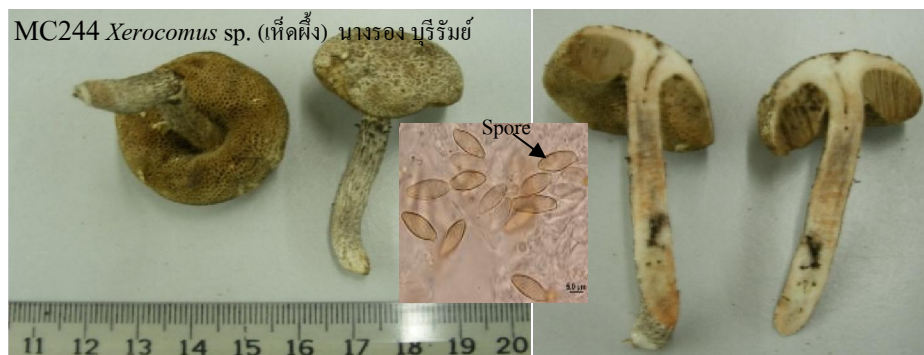
รูปผนวกที่ 2 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกรส



รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



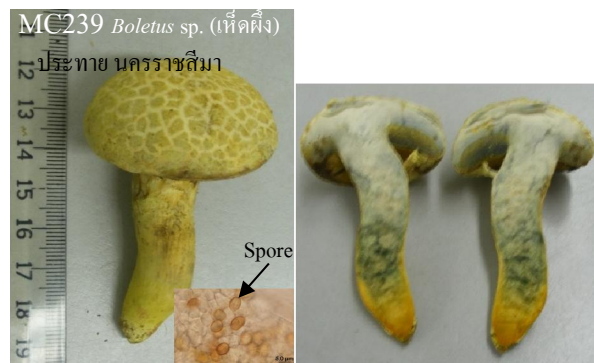
รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดแยกสาร



รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดแยกสาร



รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 3 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดขมิ้นวงศ์ Cantharellaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Cantharellaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงค์ Cantharellaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 4 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pleurotaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 4 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pleurotaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 5 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pleurotaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 5 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pluteaceae ที่พบการสะสมสารเด็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเด็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 5 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pluteaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 5 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pluteaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 6 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อ
 ตรวจสอบสารเล็กดิน และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อ
ตรวจสอบสารเล็กดิน และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



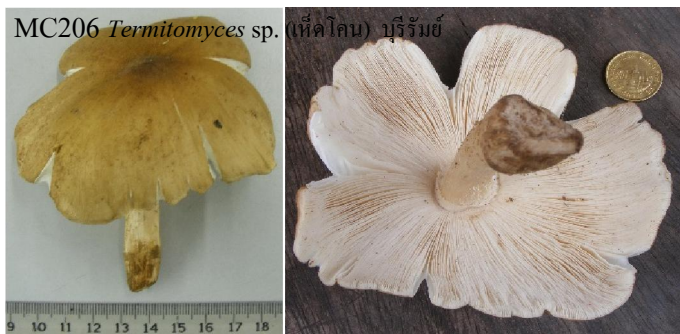
รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อ
 ตรวจสอบสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 6 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อ
ตรวจหาสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 7 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Tricholomaraceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน
Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



รูปผนวกที่ 7 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Tricholomataceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



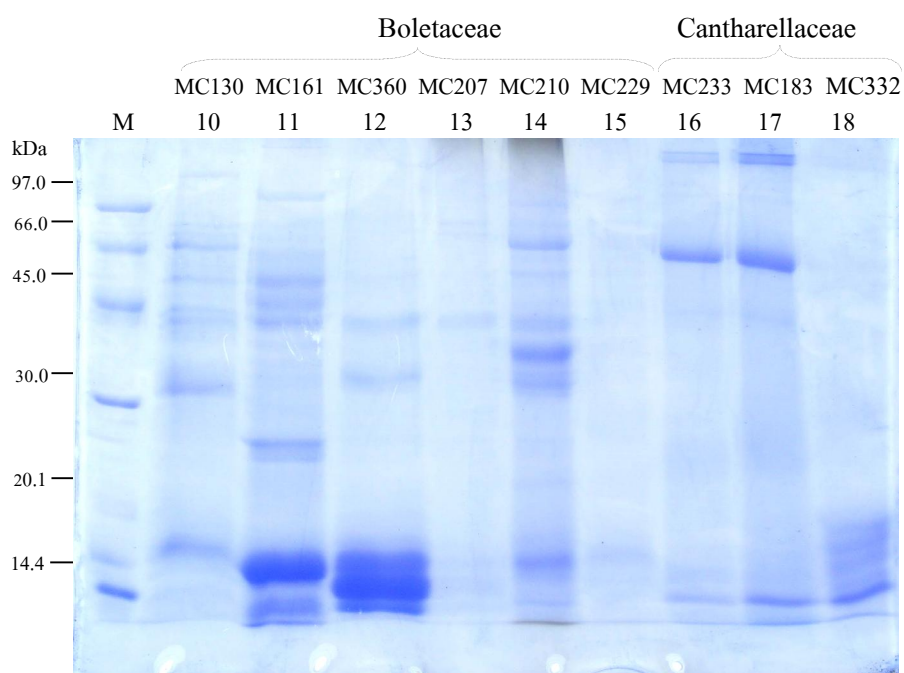
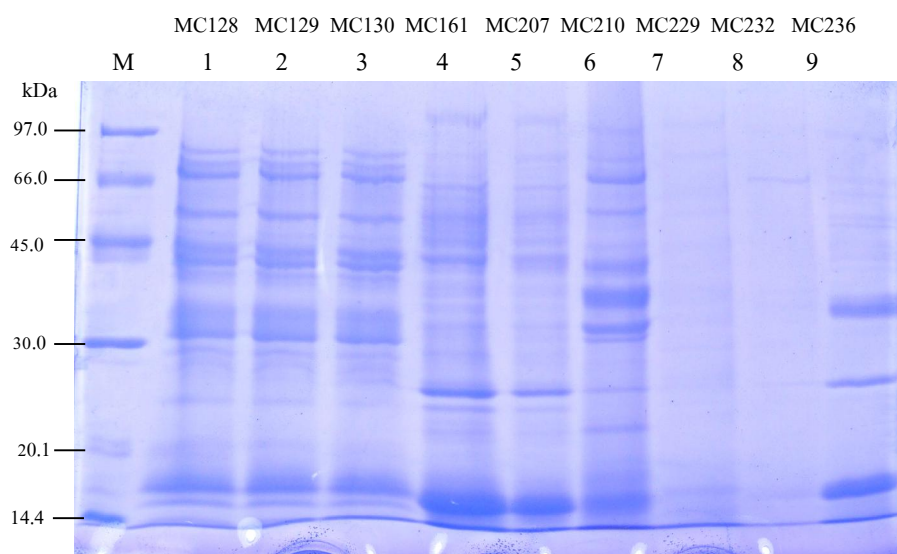
รูปผนวกที่ 7 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Tricholomataceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



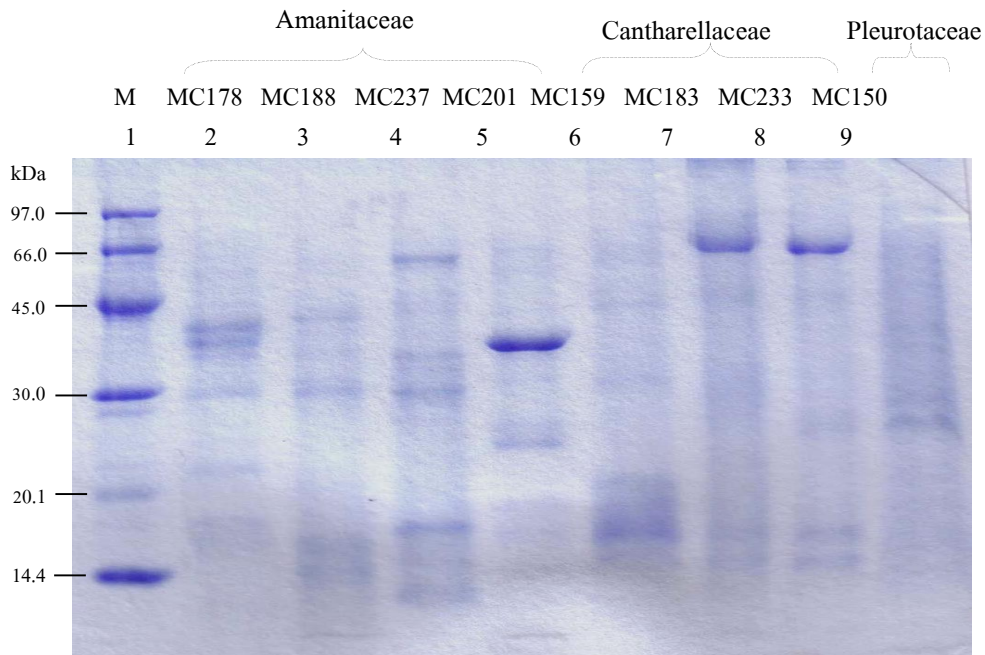
รูปผนวกที่ 7 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Tricholomataceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



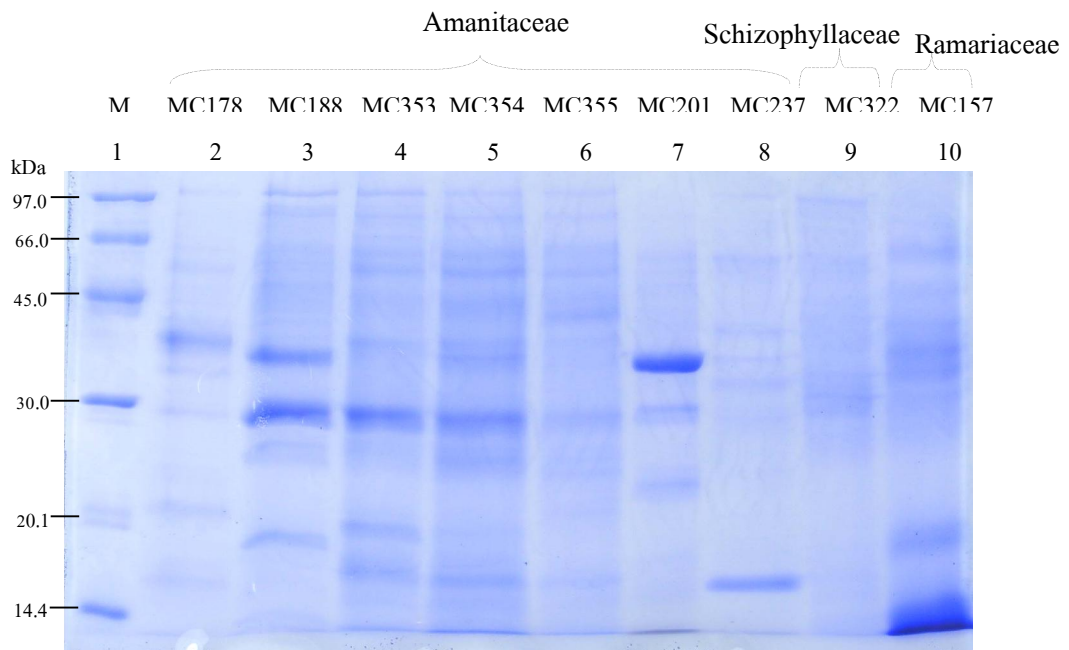
รูปผนวกที่ 7 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Tricholomaraceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาสกัดสารเล็กดินเพื่อการคัดเลือกสาร



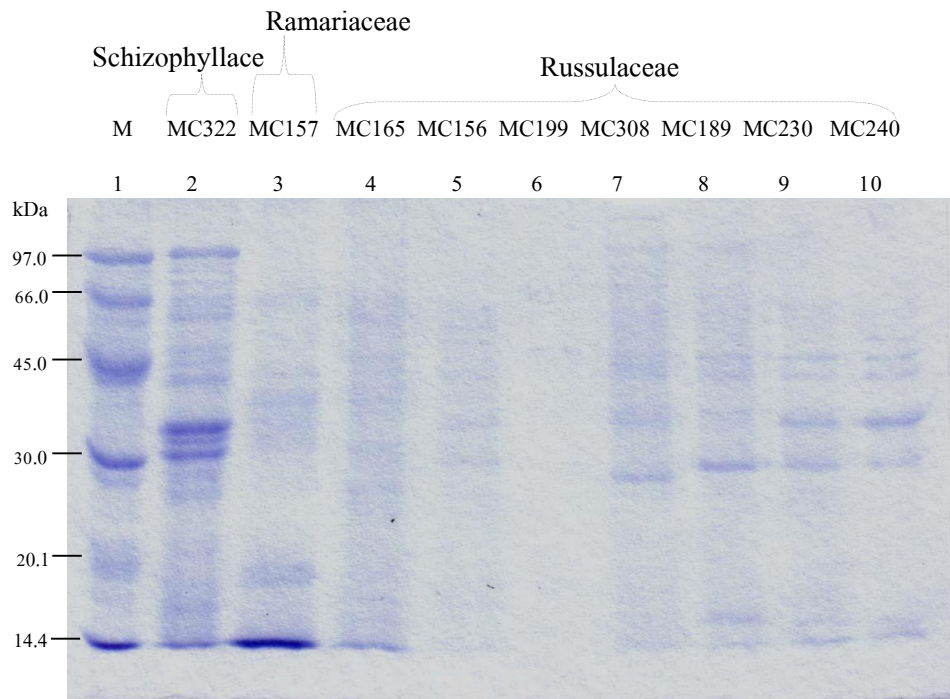
รูปผนวกที่ 8 แบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเห็ดดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Boletaceae และ Cantharellaceae ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel)
 Lanes: M, LMW standards (GE Healthcare); 1-15, สารสกัดหยาบของเห็ดดินจากเห็ด Boletaceae รหัส MC128, MC129, MC130, MC161, MC207, MC210, MC229, MC232, MC236, MC161, MC360, MC207, MC210 และ MC229; 16-18, สารสกัดหยาบของเห็ดดินจากเห็ด Cantharellaceae รหัส MC233, MC183 และ MC332 ตามลำดับ



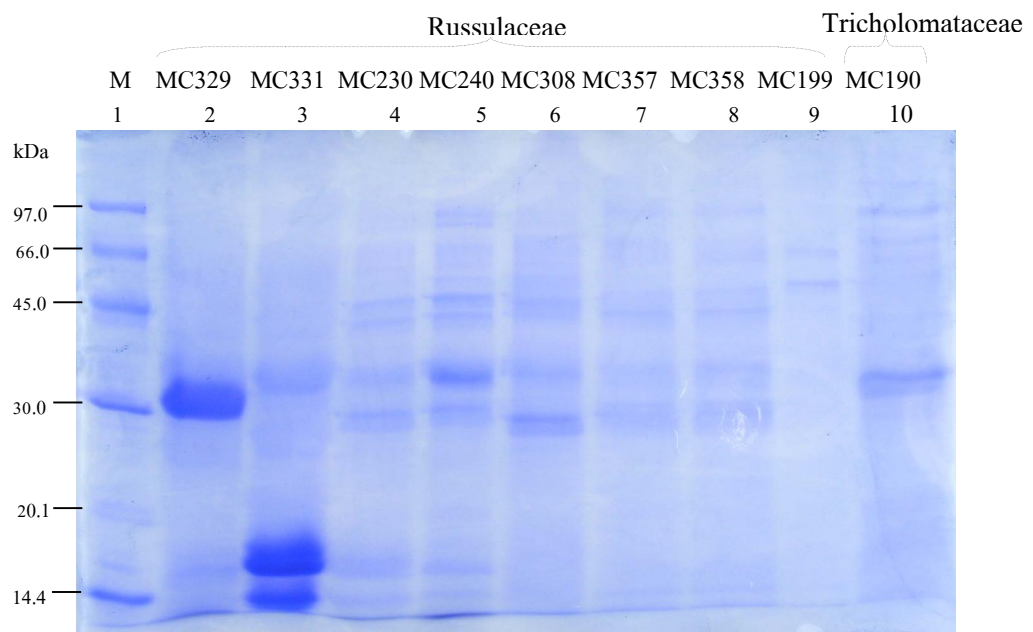
รูปผนวกที่ 9 แบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเห็ดดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Amanitaceae, Cantharellaceae และ Pleurotaceae ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel) Lanes: 1, LMW standards (GE Healthcare); 2-9, สารสกัดหยาบของเห็ดดินจากเห็ด MC178, MC188, MC237, MC201, MC183, MC233, MC233 และ MC150 ตามลำดับ



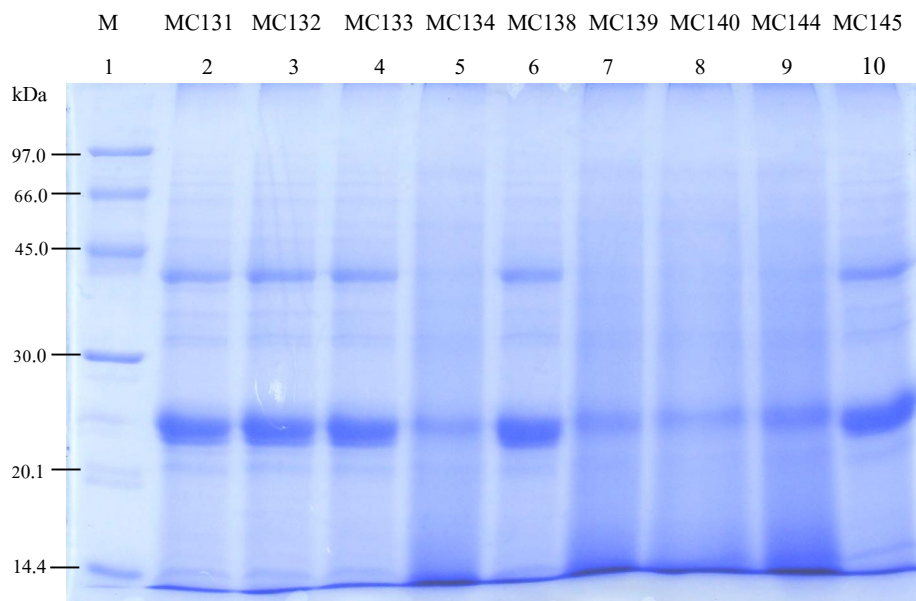
รูปผนวกที่ 10 แบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเห็ดดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Amanitaceae, Schizophyllaceae และ Ramariaceae ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel) Lanes: 1, LMW standards (GE Healthcare); 2-10, สารสกัดหยาบของเห็ดดินจากเห็ด MC178, MC188, MC353, MC354, MC355, MC201, MC237, MC322 และ MC157 ตามลำดับ



รูปผนวกที่ 13 แบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเห็ดดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Schizophyllaceae, Ramariaceae และ Russulaceae ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel)
Lanes: 1, LMW standards (GE Healthcare); 2-10, สารสกัดหยาบของเห็ดดินจากเห็ด MC322, MC157, MC165, MC156, MC199, MC308, MC189, MC230 และ MC240 ตามลำดับ

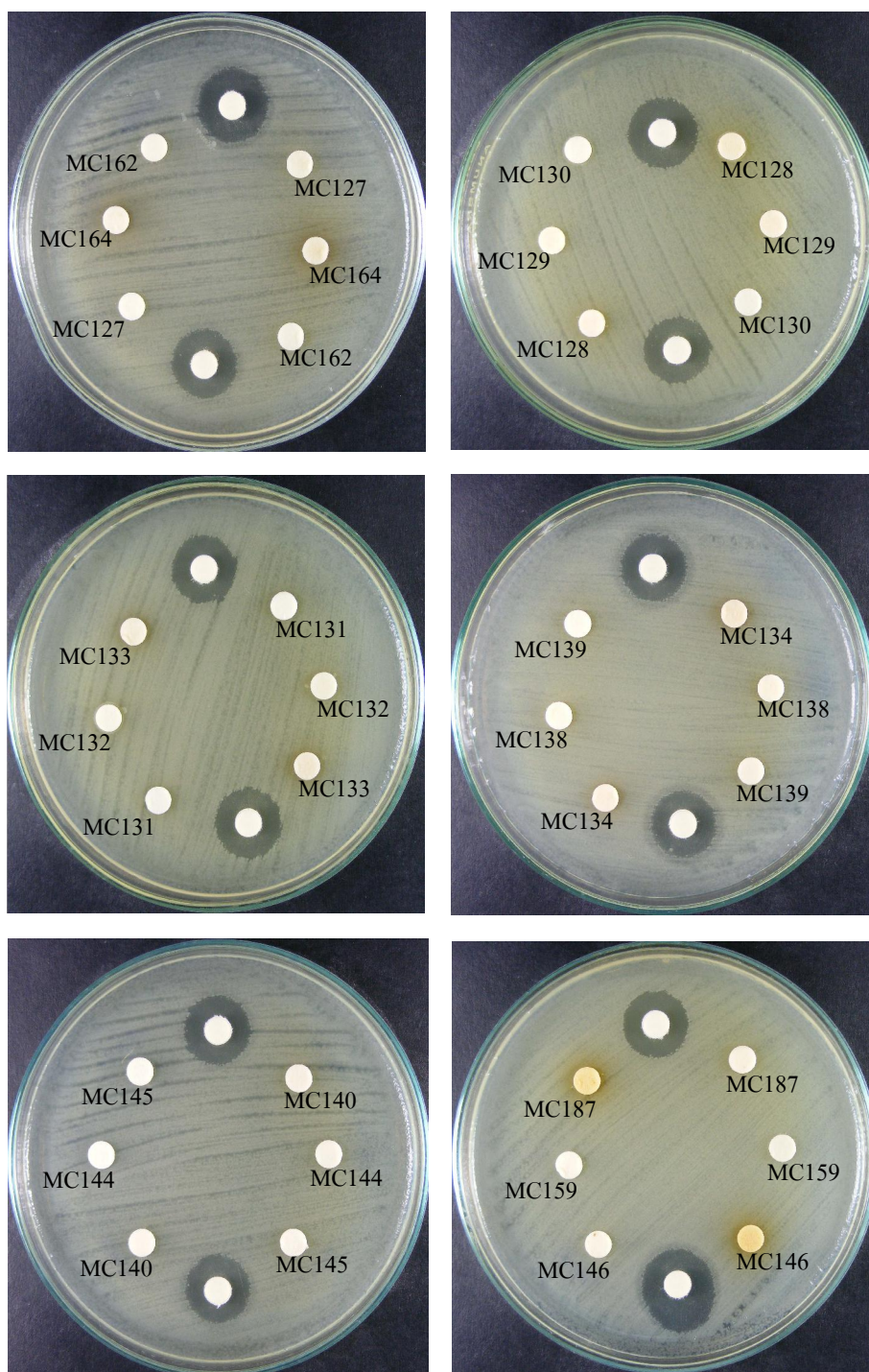


รูปผนวกที่ 14 แบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเห็ดดินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Russulaceae และ Tricholomataceae ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel)
Lanes: 1, LMW standards (GE Healthcare); 2-10, สารสกัดหยาบของเห็ดดินจากเห็ด MC322, MC157, MC165, MC156, MC199, MC308, MC189, MC230 และ MC240 ตามลำดับ

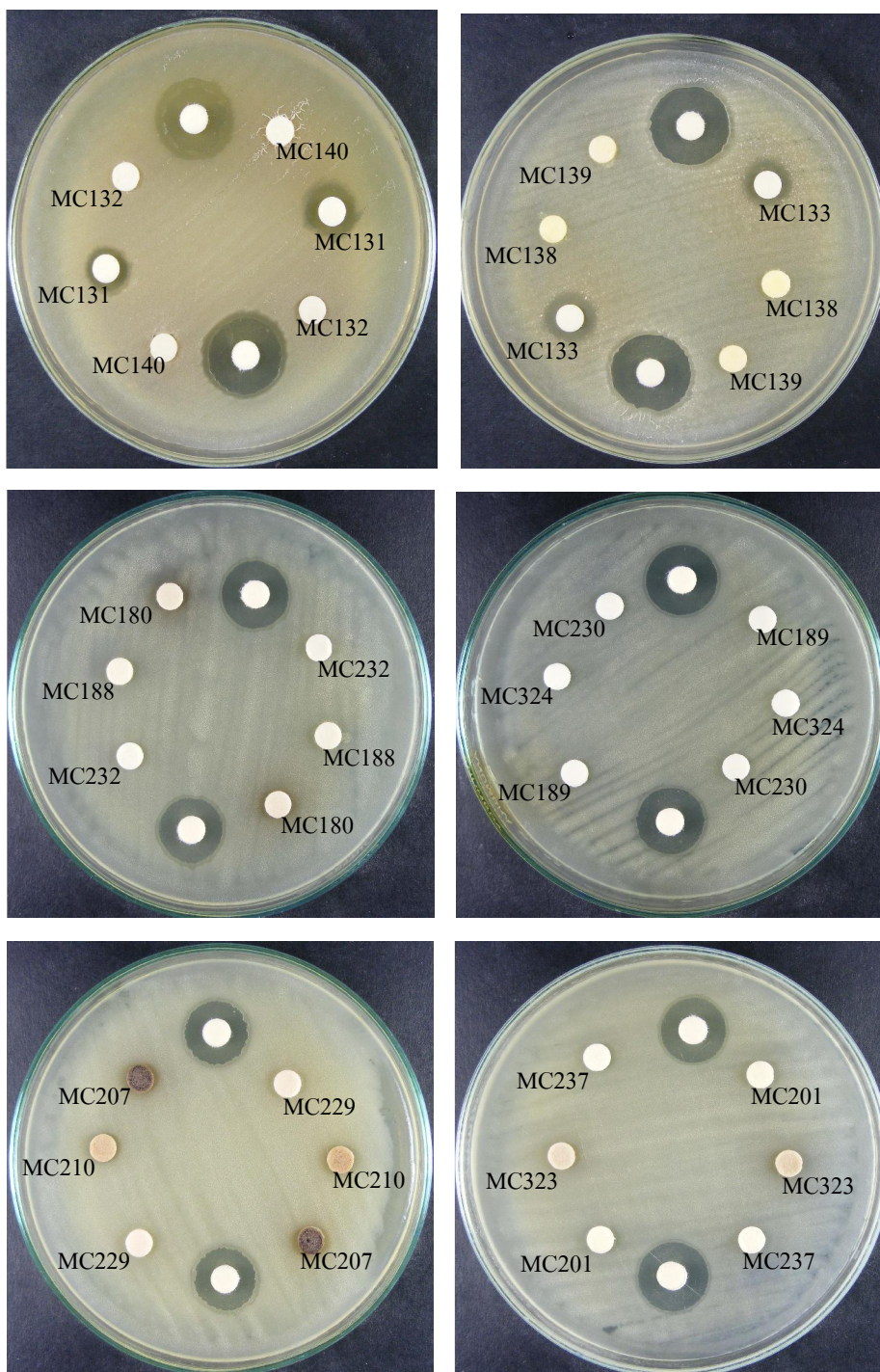


รูปผนวกที่ 15 แบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Pluteaceae ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel)

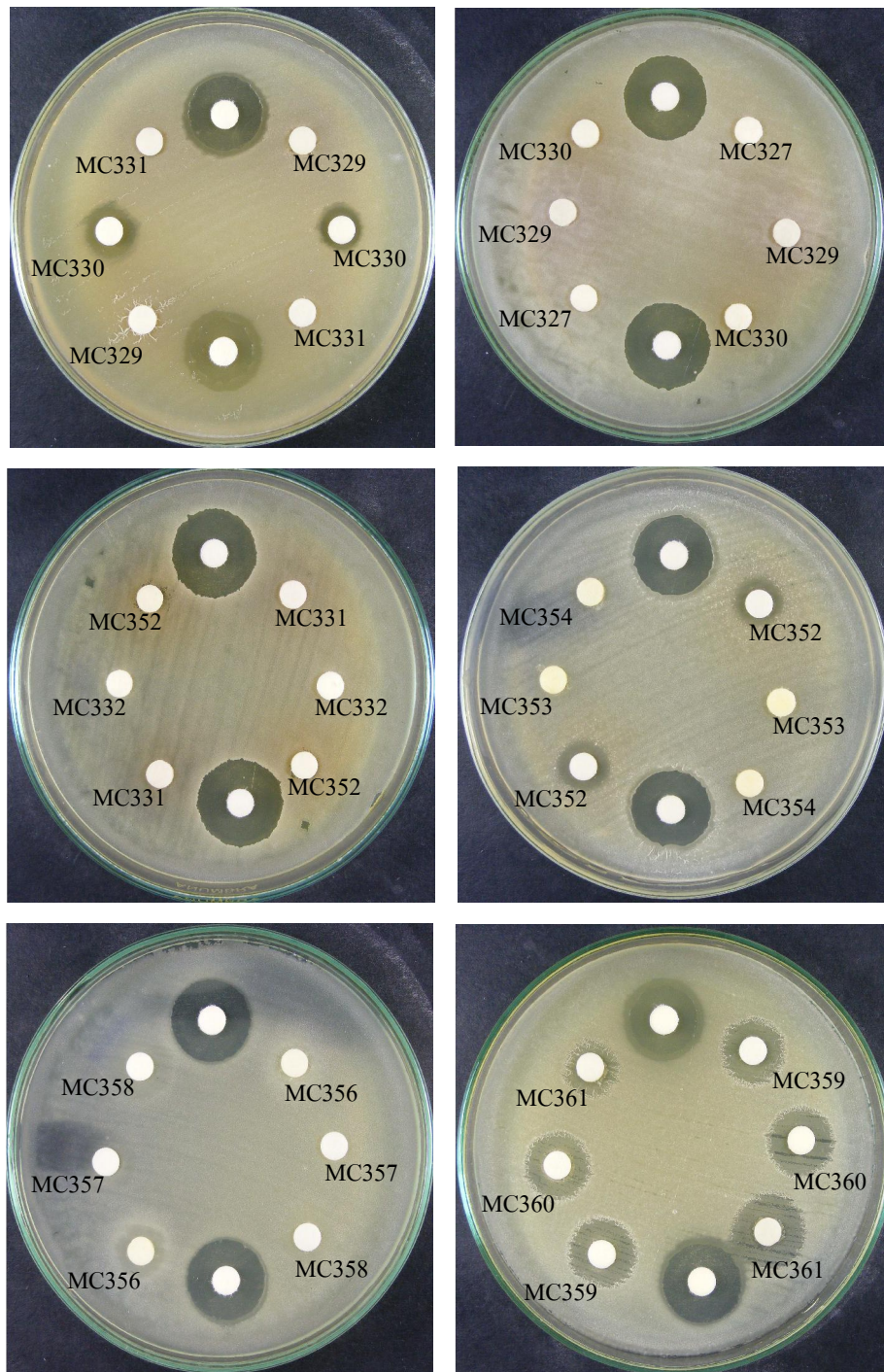
Lanes: 1, LMW standards (GE Healthcare); 2-10, สารสกัดหยาบของเล็กตินจากเห็ด MC131, MC132, MC133, MC134, MC138, MC139, MC140, MC144 และ MC145 ตามลำดับ



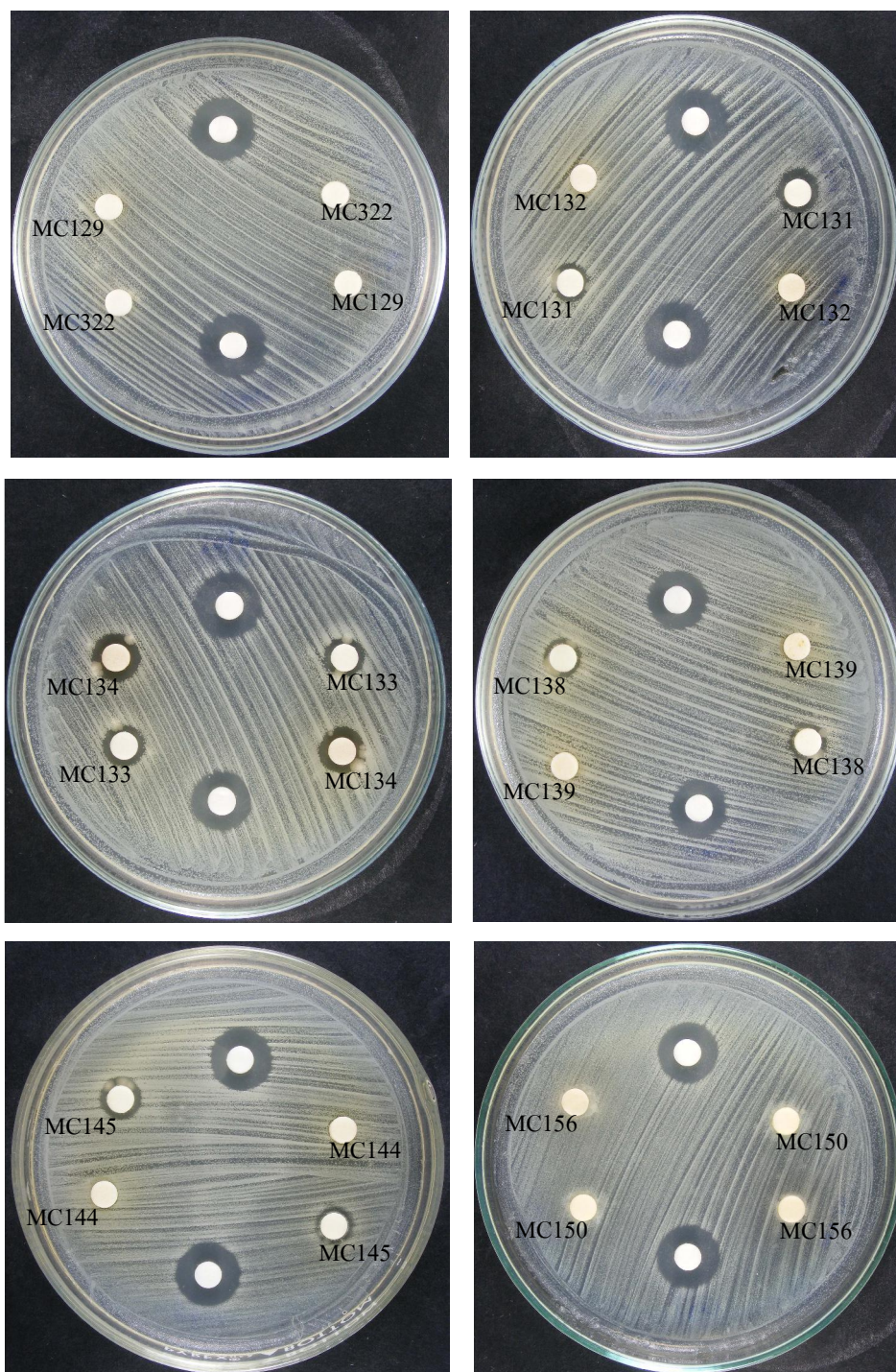
รูปผนวกที่ 16 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ATCC 11778 ของสารสกัดหยาดเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



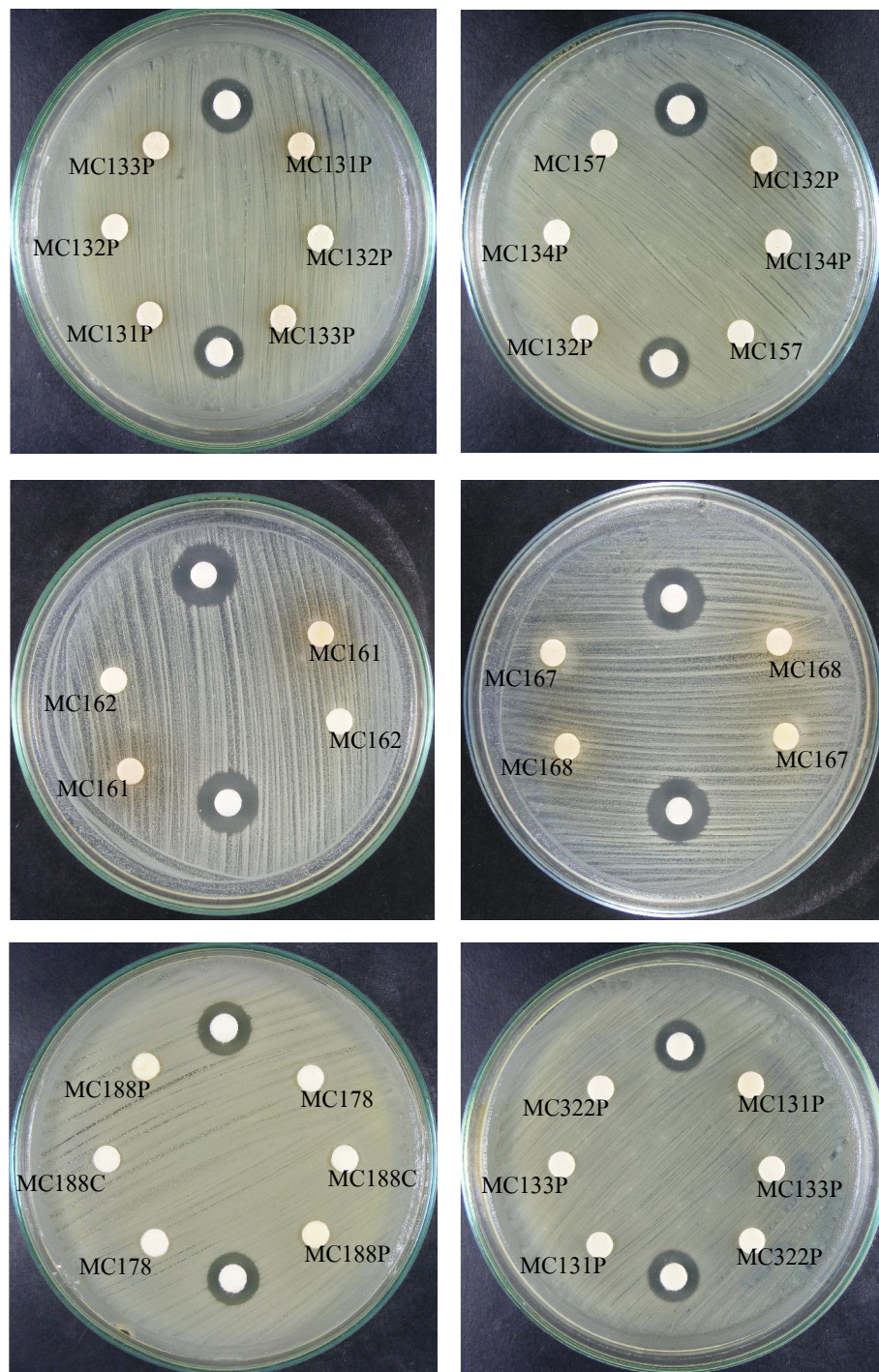
รูปผนวกที่ 17 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดขยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



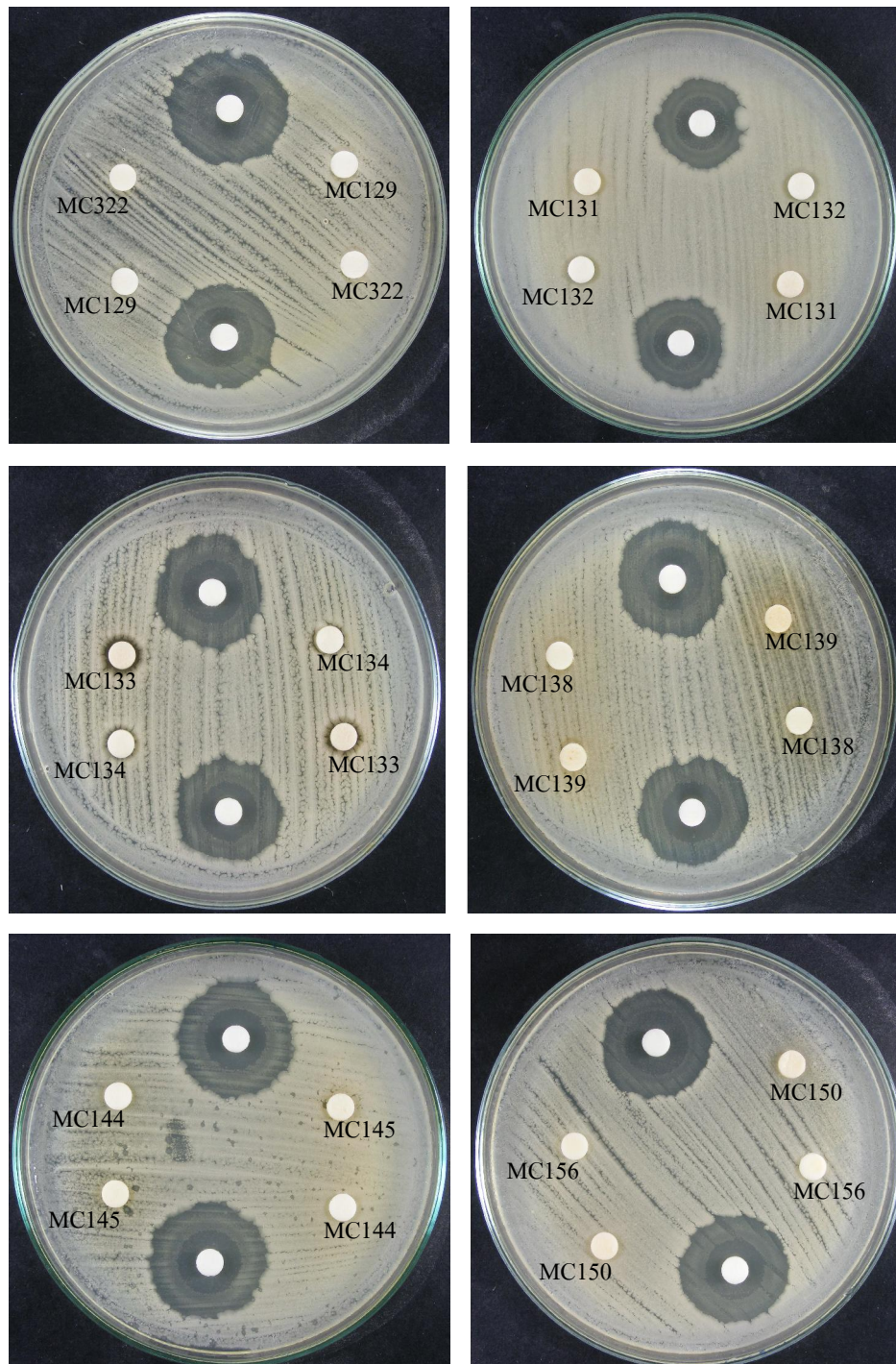
รูปผนวกที่ 17 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



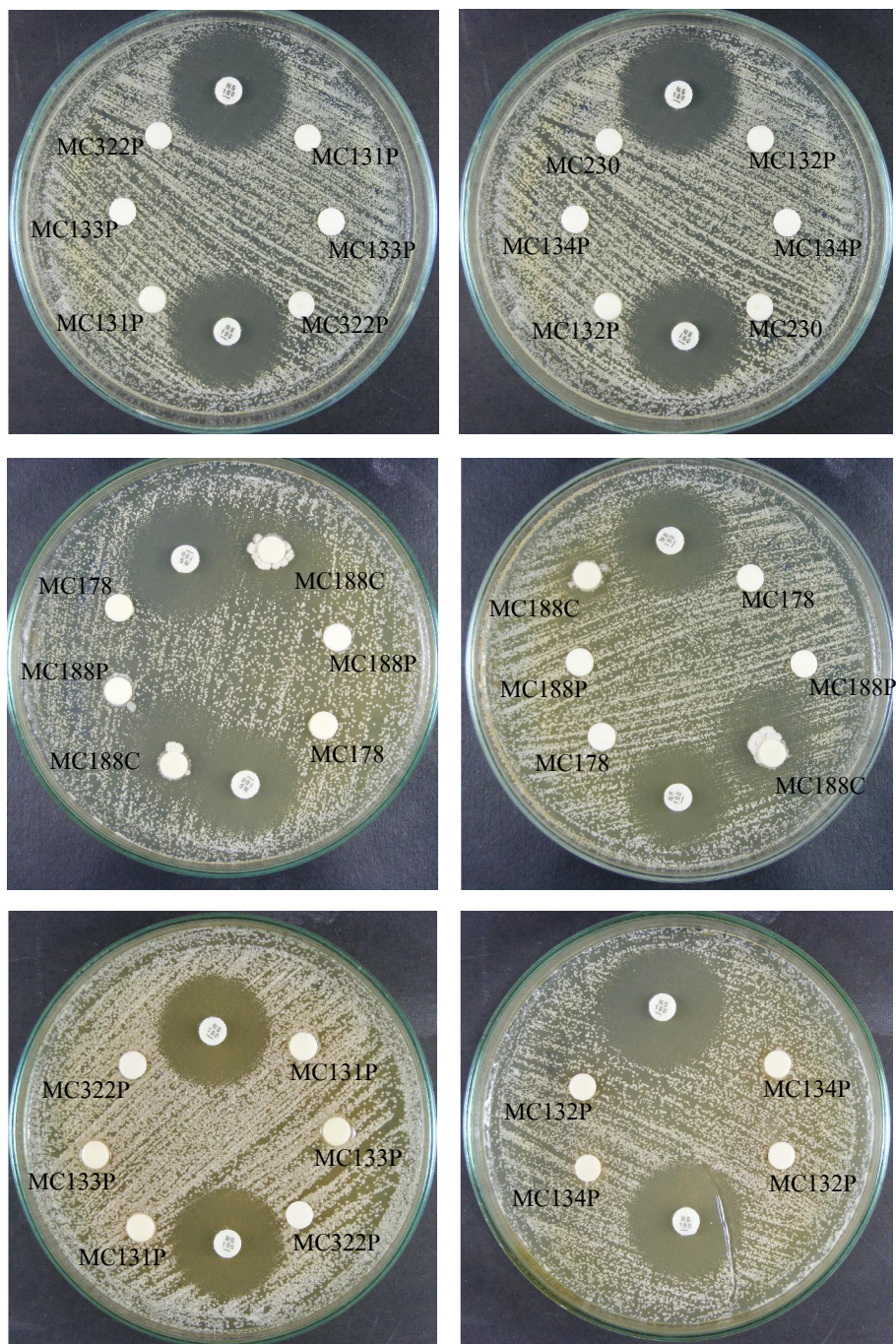
รูปผนวกที่ 18 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20c ไมโครลิตร) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



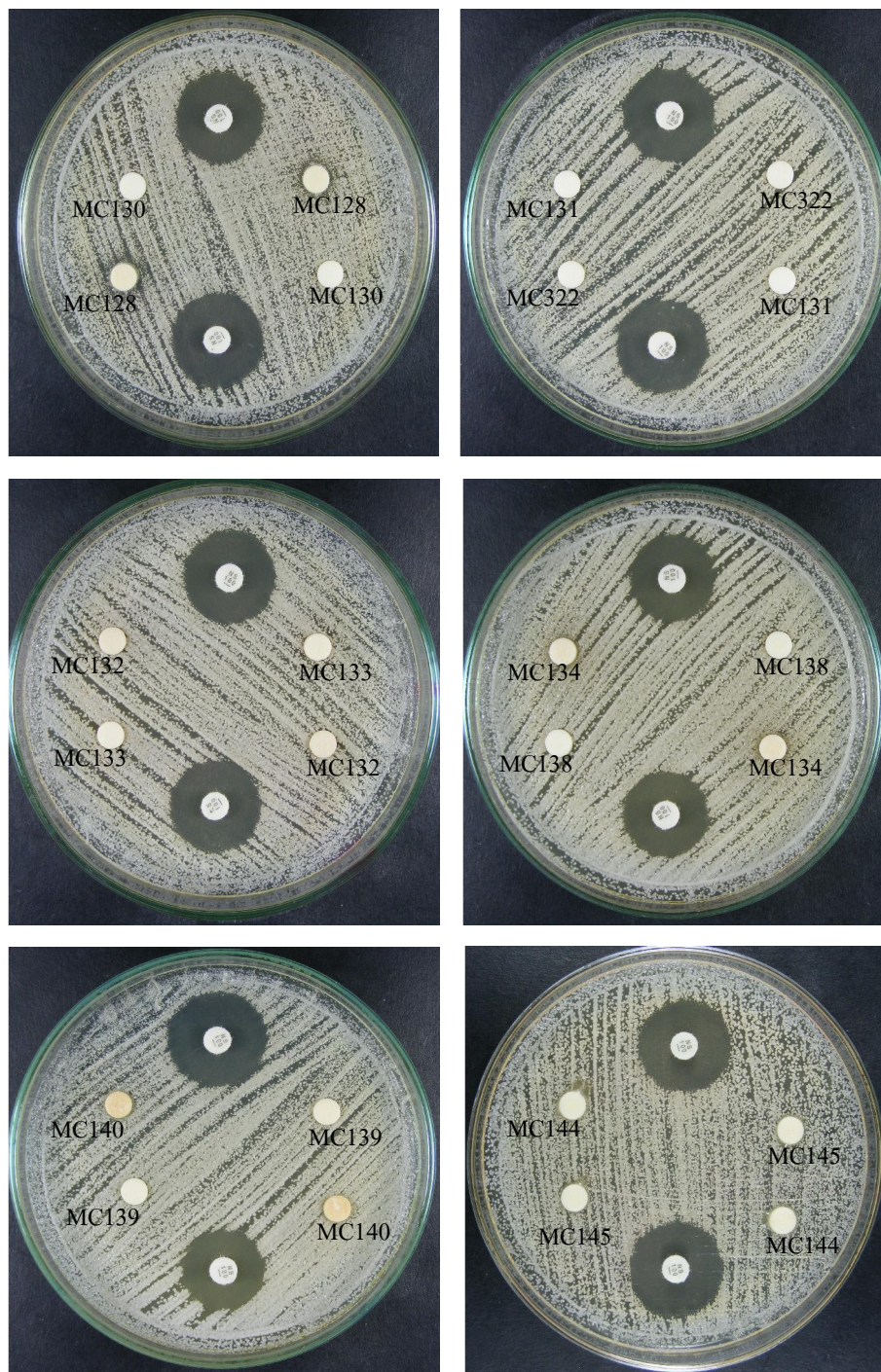
รูปผนวกที่ 18 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ของสารสกัดขยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ Streptomycin (10 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



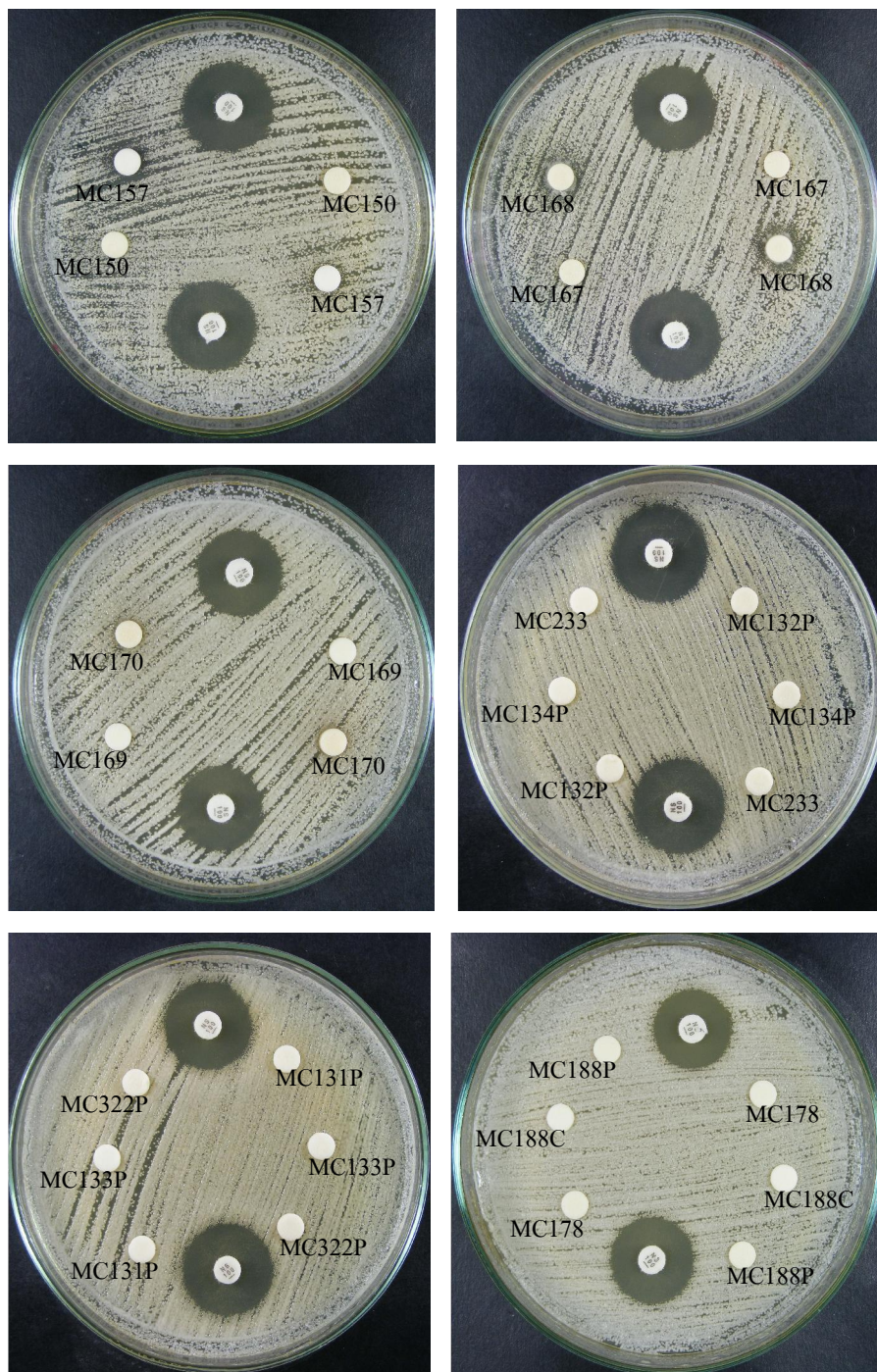
รูปผนวกที่ 19 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 ของสารสกัดขยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ Streptomycin (10 ไมโครกรัม 20 ต่อไมโครลิตร) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



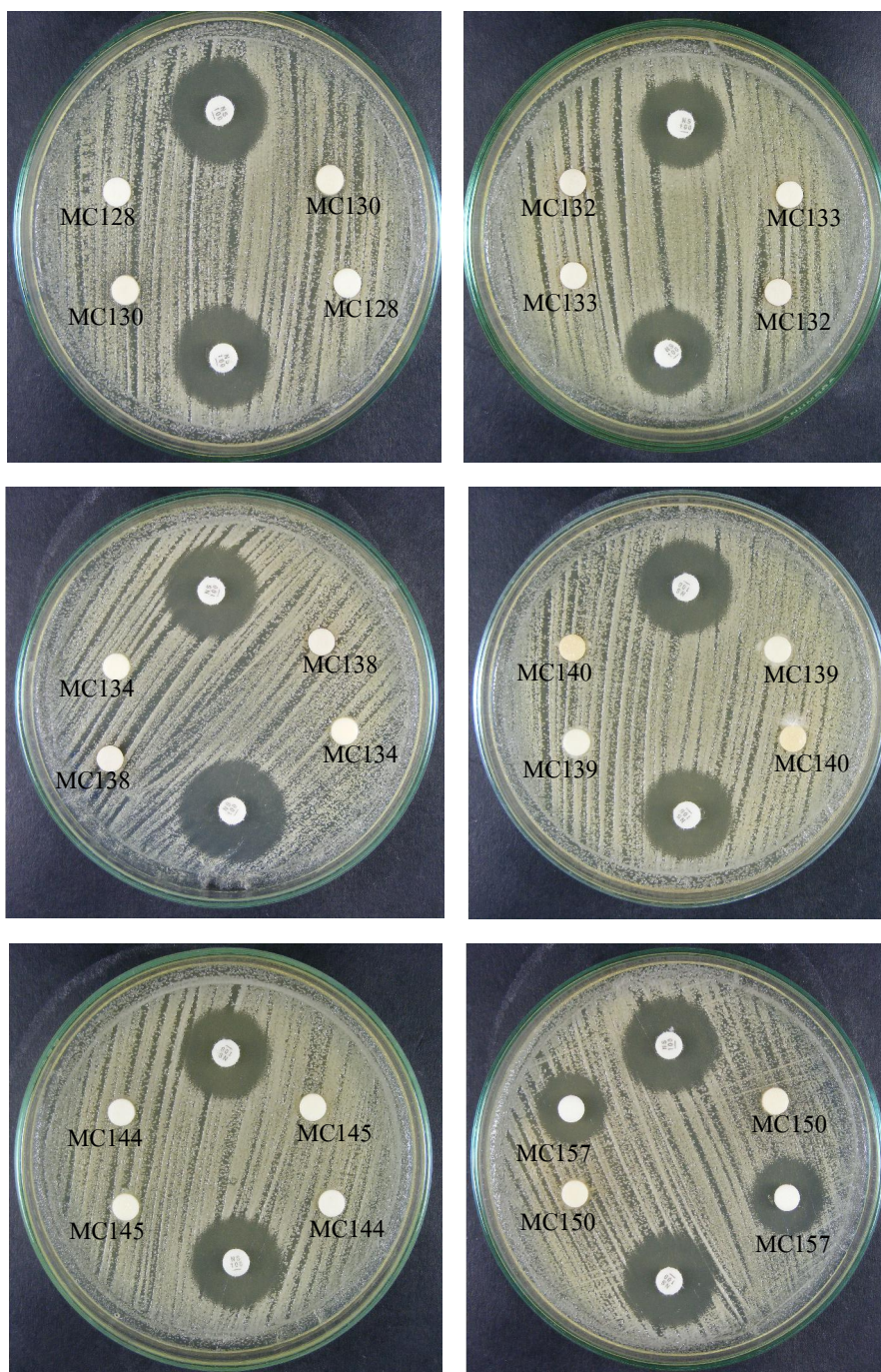
รูปผนวกที่ 20 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ยีสต์) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824 ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ Nystatin (100 Units) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



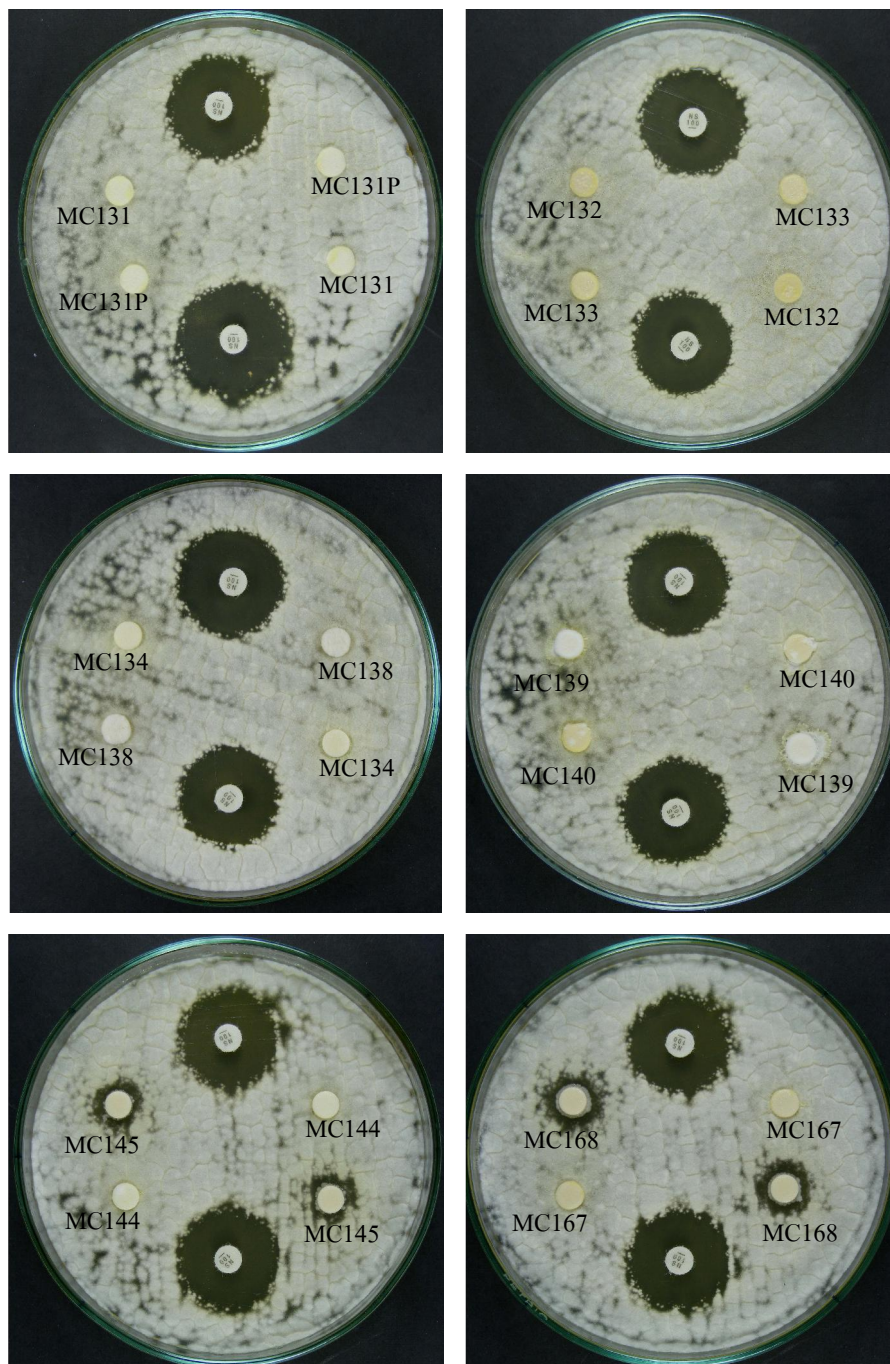
รูปผนวกที่ 21 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ยีสต์) *Candida albicans* ATCC 1023 ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ Nystatin (100 Units) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



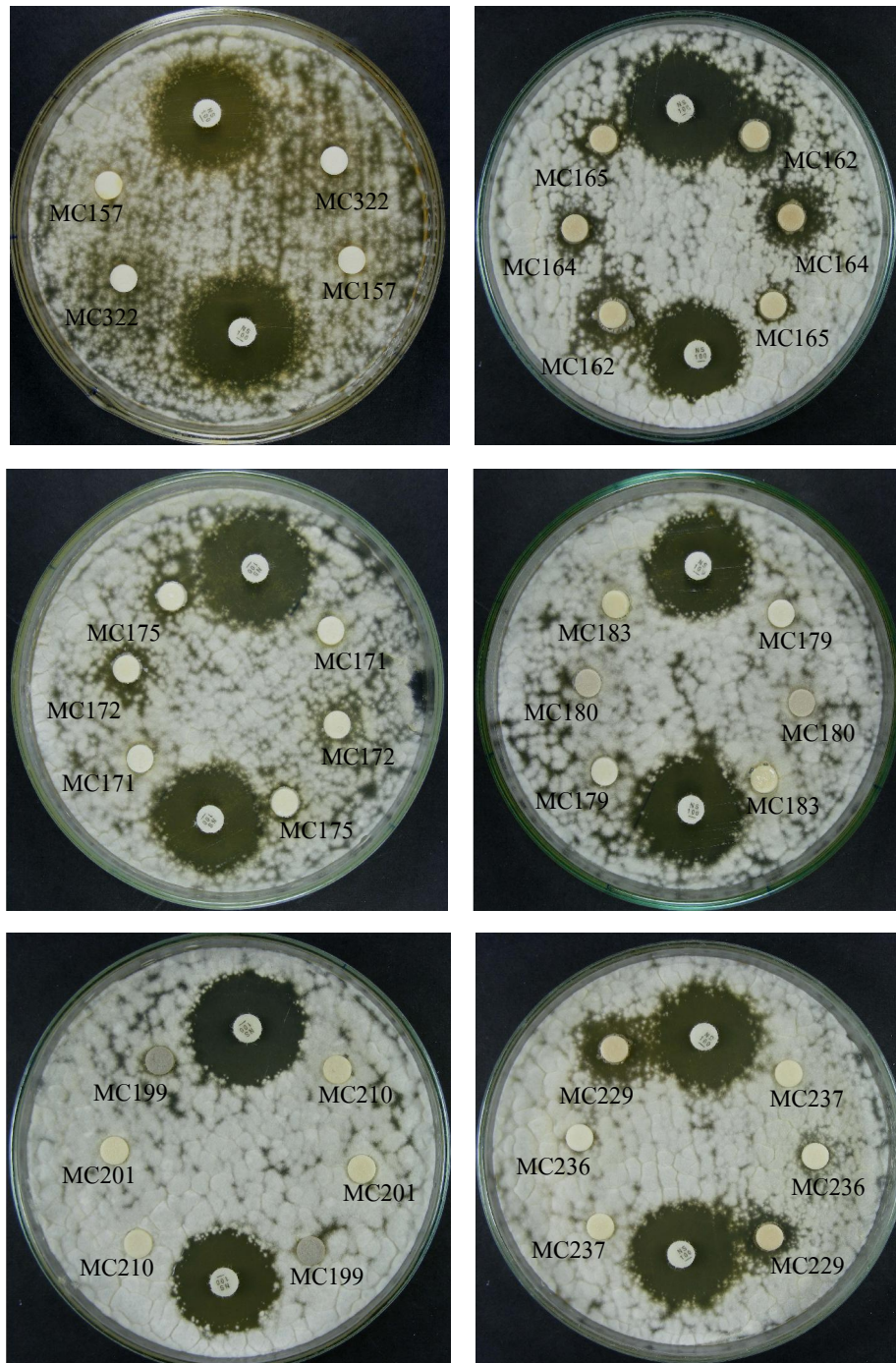
รูปผนวกที่ 21 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ยีสต์) *Candida albicans* (ต่อ) ATCC 1023 ของสารสกัดขยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ Nystatin (100 Units) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



รูปผนวกที่ 22 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (ยีสต์) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9896 ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ ปมที่อุณหภูมิตั้งไว้ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ Nystatin (100 Units) เป็นสารมาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



รูปผนวกที่ 23 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (รา) *Aspergillus niger* ATCC 6275 ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ Nystatin (100 Units) เป็นสาร มาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)



รูปผนวกที่ 23 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (รา) *Aspergillus niger* (ต่อ) ATCC 6275 ของสารสกัดหยาบเล็กดินจาก Fruiting body ของเห็ดรับประทานได้ บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ Nystatin (100 Units) เป็นสาร มาตรฐานให้ผลบวก (Positive control)

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรียลักษณ์ 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

ประวัติการศึกษาและฝึกอบรม

วุฒิการศึกษา	สถาบัน	ประเทศ
วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
PGDip.Sci. (Biotechnology) with Credit	University of Otago	นิวซีแลนด์
Ph.D. (Microbiology)	University of Otago	นิวซีแลนด์
Post-Doc (Molecular Biology)	University of Guelph	แคนาดา
Certificate (International Training Programme in Biotechnology, ITP 12)	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)	เยอรมนี
Certificate (Proficiency in English)	Victoria University of Wellington	นิวซีแลนด์
Certificate (Laboratory Safety Course)	The Laboratory Safety Institute (LSI)	สหรัฐอเมริกา
Certificate (Quality Management of Culture Collection for Curators)	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)	ประเทศไทย
Certificate (Culture Collection Techniques)	Bangkok MIRCEN	ประเทศไทย
วุฒิปัตร์ (หลักสูตรการออกแบบและพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ก๊าซชีวภาพ)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (ปัจจุบันคือมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี)	ประเทศไทย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) และความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อรา

ผลงานทางวิชาการ

- ตำรา หนังสือ/เอกสารประกอบการสอน จำนวน 13 เรื่อง (เล่ม)
- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
วารสารระดับชาติ จำนวน 18 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 40 เรื่อง
- ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน Proceedings จำนวน 26 เรื่อง
- ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 88 เรื่อง
- ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 94 เรื่อง
- สิทธิบัตรที่ยื่นคำขอจดทะเบียน จำนวน 6 คำขอ

2. ดร. ชมภูนุช สังกสิริทธิกุล

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 087-8684748 โทรสาร 044-217047, 044-224785

e-mail: chomphunuch@slri.or.th

ประวัติการศึกษา

2550 ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สาขาวิชาชีวเคมี

2540 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล สาขาวิชาเคมีวิเคราะห์และเคมีอินทรีย์ประยุกต์

2537 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาวิชาเคมี

ทุนที่เคยได้รับ ได้แก่

2547–2549 ทุนสนับสนุนการวิจัยเรื่องการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคนเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* จากศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

2539–2540 ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์เรื่องการแยกกรดอะมิโนโดยเทคนิค Capillary Electrophoresis จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

2537–2539 ทุนเสริมสร้างนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับผลงานวิจัย

1) Publication ได้แก่

Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan, R.R., Svasti, J., and Fothergill-Gilmore, L.A. 2004. An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: Cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 424: 171-180.

Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Svasti, J., and Prinz, H. 2005. Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. 272: 3376-3386.

Songsiriritthigul, C., Yuvaniyama, J., Robinson, R.C., Vongsuwan, A., Prinz, H., Suginta, W. 2005. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. *Acta Crystallographica*. F61: 895–898.

Suginta, W., Songsiriritthigul, C., Kobdej, A., Opasiri R., and Svasti, J. 2007. Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1770: 1151-1160.

Songsiriritthigul, C., Aguda, A., Robinson, R.C., and Suginta, W. 2007. Crystal structures of *Vibrio carchariae* chitinase A and mutant E315M complexed with chitooligosaccharides: implications for the catalytic mechanism. *Journal of Structural Biology*. 162(3): 491-499.

Songsiriritthigul, C., Pesatcha, P., Eijsink, Vincent G.H., and Yamabhai, M. 2009. Directed evolution of a *Bacillus chitinase*. *Biotechnology Journal*. 4(4): 501-509.

Songsiriritthigul, C., Buranabanyat, B., Haltrich, D., and Yamabhai, M. 2010. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4-β-

mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 9.20.

Songsiriritthigul, C., Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P., and Yamabhai, M. 2010. Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. *Bioresource Technology*. 101: 4096-4103.

2) Presentation ใต้แก้ว

Songsiriritthigul, C., Yuvaniyama, J., Robinson, R.C., Vongsuwan, A., Prinz, H., and Suginta, W. 2004. Primary X-ray crystal structure of chitinase A from *Vibrio carchariae*. *The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Chiang Mai, Thailand, 2-6 February 2004*.

Suginta, W., Vongsuwan, A., Krittanai, C., and Songsiriritthigul, C. 2005. Study of substrate specificity of chitinase A from *Vibrio carchariae*. *The 31st Congress on Science and technology of Thailand, Nakhon Ratchasima, Thailand, 18-20 October 2005*.

Songsiriritthigul, C., Yuvaniyama, J., Robinson, R.C., Vongsuwan, A., Prinz, H., and Suginta, W. 2005. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of Chitinase A from *Vibrio carchariae*. *The 31st Congress on Science and technology of Thailand, Nakhon Ratchasima, Thailand, 18-20 October 2005*.

Songsiriritthigul, C., Aguda, A., Robinson, R.C., and Suginta, W. 2006. Structural of Chitinase A from *Vibrio carchariae*. *Workshop on Synchrotron Protein Crystallography (Diffraction Data and Phase Analyses) and its Application. National Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, Thailand, 20-23 July 2006*.

Songsiriritthigul, C., Aguda, A., Robinson, R.C., and Suginta, W. 2006. Structural analysis of *Vibrio carchariae* Chitinase A reveals conformational changes during substrate hydrolysis. *First Annual Symposium of the Protein Society of Thailand. Bangkok, Thailand, 24-25 October 2006*.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2010. Crystallization of a monomeric lectin from straw mushroom for structural analysis. *TSB 2010 International conference on Biotechnology for Health Living, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand, 20th-22nd October 2010*.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2010. Crystallization and X-ray diffraction studies of a low molecular weight-monomeric lectin from straw mushroom. *The 5th Annual Symposium of Protein Society of Thailand "Protein Research: From Basic Approaches to Modern Technologies"; Bangkok, Thailand, 23rd-25th June 2010*.

Songsiriritthigul, C., Sophon, M., Phanak, M., and Songsiriritthigul, P. 2011. Optical design of the BL7.3 beamline for multi X-ray techniques at SLRI. *The 6th Annual Conference of the Thai Physics Society, Siam Physics Congress 2011, Ambassador City Jomtien Hotel, Pattaya, Thailand, 23th-26th March 2011*.

เอกสารแนบ

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่ มีดังนี้

สุรียลักษณ์ รอดทอง ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ นฤมล ไม้ทอง และชมภูณูช ส่งศิริฤทธิกุล. 2554. สารสกัดเล็กคิน จากเห็ดรับประทานได้ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง. ผลงานร่วมจัดแสดงนิทรรศการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในงานการนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2554 (Thailand Research Expo 2011), 26-30 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ ราชประสงค์ กรุงเทพมหานคร

สุรียลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เขียวหิรัญ ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ นฤมล ไม้ทอง และชมภูณูช ส่งศิริฤทธิกุล. 2554. เห็ดรา: ความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์. ผลงานร่วมจัดแสดงนิทรรศการถาวรของหน่วยงานร่วมสนองพระราชดำริ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ในการประชุมวิชาการและนิทรรศการ “ทรัพยากรไทย: ก้าวสู่โลกกว้างอย่างมั่นใจ”, 1-7 พฤศจิกายน 2554 ณ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดนครราชสีมา.

เมษา นันธิษา สุรียลักษณ์ รอดทอง นฤมล ไม้ทอง และชมภูณูช ส่งศิริฤทธิกุล. 2556. นักวิจัยไทยพบเห็ด แครงและเห็ดฟางมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง. แสงสยามสาร ปีที่ 15 ฉบับที่ 2: มีนาคม-เมษายน 2556. หน้า 2-3.

Rodtong, S. 2010. Lectins from edible mushrooms. *Abstracts of the International Symposium on “Fungal Biodiversity and Resources”, 12-13 November 2010, Wangcome Hotel, Chiang Rai, Thailand*: 15. Invited speaker.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2008. Purification and characterization of lectin from straw mushroom. *Abstract of the 3rd Annual Meeting of Thai Mycological Association and Conference on Mycology in Thailand, 11 October 2008, Khon Kaen, Thailand*. 45.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., Roytrakul, S., and Rodtong, S. 2010. Crystallization of lectin from *Schizophyllum commune*. *The 2nd Southeast Asian Crystallography Workshop: A Taste of Protein Crystallography, 5-8 April 2010, Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima, Thailand*.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2010. Crystallization and X-ray diffraction studies of a low molecular weight-monomeric lectin from straw mushroom. *Proceedings of the 5th Annual Symposium of Protein Society of Thailand “Protein Research: From Basic Approaches to Modern Technologies”, 23-25 June 2010, Bangkok, Thailand*: 102-105.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., Roytrakul, S., Siripong, P., and Rodtong, S. 2010. Biological activity of straw mushroom lectin. *National Science and Technology Fair 2010, 7-22 August 2010, International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Bangkok, Thailand*.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2010. Crystallization of a monomeric lectin from straw mushroom for structural analysis. *Proceedings of the TSB 2010 International Conference on Biotechnology for Healthy Living, 20-22 October 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand*: 750-757.