คุณสมบัติของโพลิเมอร์จากเชื้อราในประเทศไทยและศักยภาพในการเป็นวัสดุปิดแผล

ศิริพร หมาดหล้า[2], ภาวดี เมธะคานนท์[1], มาลินี ประสิทธิ์ศิลป์[1] และ กัญญวิมว์ กีรติกร[2]

[1]ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

[2]ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

Abstract: Polymers Produced by Fungi of Thailand and their Potential as Wound Dressing Material

Siribhorn Madla[2], Pawadee Methacanon[1], Malinee Prasitsil[1] and Kanyawim Kirtikara[2]

[1]National Metal and Materials Technology Center, Klong Luang, Pathumthani 12120,
[2]National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Klong Luang, Pathumthani 12120

From our observations of fungi cultured in liquid media, we found 147 strains of fungi producing metabolites which increased viscosity of culture broth. It was hypothesized that this was caused by the production of biopolymers by the growing mycelia. In order to study the production and characteristics of these biopolymers, 16 strains of fungi were selected as representatives from 15 genera. Biopolymers in broth were purified and their physiological and biological properties were determined. The results indicated that most polymers mainly consisted of polysaccharides with protein in various amounts. For evaluation of their potential as wound dressing material, the ability to stimulate IL-8 production in human cells and the cytotoxicity of the polymers were tested. Polymers from four fungi were found to produce the highest level of IL-8 but only 3 were selected to determine their chemical structure due to their higher yield.

Key words: polymer, fungi, wound dressing material, exopolysaccharides, chemical structure

บทนำ

มีรายงานเป็นจำนวนมากที่แสดงว่าจุลินทรีย์ (ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา) จำนวนหนึ่ง สามารถสร้างสารประเภทโพลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymers) ได้เมื่อเจริญในสภาวะที่เหมาะสม (Carbonero et al., 2001; Kim et al., 2001; Navarini et al., 1997) สารโพลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้มีทั้งที่มีโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) โปรตีน (proteins) หรือไขมัน (lipid) เป็นองค์ประกอบ โพลิเมอร์ในกลุ่มโพลิแซคคาไรด์ได้รับความสนใจอย่างมากทั้งในส่วนของการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพและทางด้านอุตสาหกรรม ตัวอย่างของโพลิเมอร์ประเภทโพลิแซคคาไรด์ที่มีการศึกษาเพื่อการนำไปใช้ในด้านเสริมสร้างสุขภาพของมนุษย์ เช่น โพลิเมอร์จาก *Phellinus linteus* ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการลดปริมาณน้ำตาลในเลือด (Kim et al., 2001) โพลิแซคคาไรด์จำพวก (1$\rightarrow$3)-β-D-glucans มีสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) เชื้อไวรัส (antiviral) และสมบัติในการเร่งการหายของแผล (wound healing) (Bohn and Bemiller, 1995) นอกจากนี้โพลิเมอร์ชนิดอื่นๆ ที่มีสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างไป ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น เป็นสารตกตะกอน (flocculant) สารประกอบในการนำพายา (carrier) หรือใช้ในการขึ้นรูปอาหารให้มีความคงตัวมากขึ้น (Sutherland, 1998)

จากการสังเกตเบื้องต้นระหว่างการเลี้ยงเชื้อราในห้องวิจัยของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่าเชื้อราในหลายสกุลซึ่งรวมทั้ง *Aschersonia, Paecilomyces, Cordyceps* เช่น *Aschersonia oxystoma, Paecilomyces tenuipes* และ *Cordyceps sphecocephila* ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย และจัดอยู่ในกลุ่มราที่เจริญได้บนแมลง (entomopathogenic fungi) สามารถสร้างสารโพลิเมอร์ที่หลั่งออกมาภายนอก (exopolymers, EPS) ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเหนียวและหนืด ได้มีการรายงานว่าราจากสกุล *Paecilomyces*

เช่น *Paecilomyces japonica* สามารถสร้างโพลิเมอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และลดระดับน้ำตาลในเลือด (Bae et al., 2001) นอกจากนี้โพลิเมอร์จาก *Paecilomyces* บางชนิดสามารถสร้างสารตกตะกอนได้ในปริมาณสูง และทำงานได้ดีทั้งในที่ที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิที่ต่างกันไป (Takagi and Kadowaki, 1985)

จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ EPS ออกมาใน 2 รูปแบบ คือ ในรูปแคปซูล (capsule) ที่ห่อหุ้มและเกาะติดกับผนังเซลล์ เช่น แคปซูลของ *Bacillus anthracis* และในรูปของเมือก (slime) เช่น เด็กซ์แตรน ที่ผลิตโดย *Leuconostoc mesenteroides* ข้อแตกต่าง คือ แคปซูลมีรูปร่างที่แน่นอน ส่วนเมือกมีรูปร่างไม่แน่นอน มีความหนืดและละลายน้ำได้ดีกว่าทำให้หลุดจากเซลล์ได้ง่าย ตัวอย่างของ EPS ที่ได้จากราชนิดต่างๆ มีดังนี้ *Alcaligens faecalis* var. 10C3K, *Schizophyllan commune* และ *Sclerotum glucanicum* (Sutherland, 1998)

โพลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์หลายชนิดถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในด้านต่างๆ ขณะเดียวกันอีกหลายตัวอย่างก็ยังอยู่ในขั้นตอนของการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากโพลิเมอร์เหล่านี้มีหลากหลาย ผลิตภัณฑ์ด้านวัสดุตกแต่งแผลก็เป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าการใช้งานค่อนข้างสูง และการนำเข้าจากต่างประเทศของผลิตภัณฑ์จำพวกนี้มีสูงขึ้นในปัจจุบัน จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เชื้อราที่พบในประเทศไทยจึงน่าจะเป็นแหล่งของสารโพลิเมอร์ที่น่าสนใจและควรจะได้รับการศึกษาวิเคราะห์ ทั้งในด้านปริมาณการสร้าง ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง และองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งสมบัติทางชีวภาพของสารโพลิเมอร์เหล่านั้น ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกและพัฒนาโพลิเมอร์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้งานด้านการแพทย์

วิธีการ

เชื้อรา 16 ชนิดจาก 15 สกุลได้รับการคัดเลือกมาจาก BIOTEC Culture Collection โดยอาศัยข้อมูลจากการวิจัยเบื้องต้นว่าสามารถสร้างสารที่ทำให้น้ำเลี้ยงเชื้อมีความเหนียวเพิ่มขึ้นได้ เชื้อถูกนำมาเลี้ยงใน potato dextrose broth (PDB) ในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นแยกเฉพาะส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาตกตะกอนด้วยเอทานอล และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่อๆ มา ส่วนที่ตกตะกอนและได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วจะถูกนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การหาองค์ประกอบเพื่อดูปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และ amino sugar การหาน้ำหนักโมเลกุล และการหาความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างๆ ส่วนคุณสมบัติทางชีวภาพนั้น ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของไวรัส (herpes simplex virus type I) ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Candida albicans* ความเป็นพิษต่อเซลล์คนและเซลล์ลิง รวมทั้งศึกษาความสามารถการกระตุ้น interleukin-8 (IL-8) สุดท้ายโพลิเมอร์ที่ผ่านการคัดกรองว่ามีศักยภาพในการเป็นวัสดุปิดแผล จะถูกศึกษาองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมี

ผลการวิจัย

ในด้านอัตราการเจริญเติบโตและการสร้างโพลิเมอร์นั้น พบว่า เชื้อรามีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และมีความสามารถในการสร้างโพลิเมอร์ที่ต่างกัน เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของโพลิเมอร์ที่สร้างขึ้นนั้น พบว่า เชื้อราเกือบทุกตัวสร้างโพลิเมอร์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักในรูปของโพลิแซคคาไรด์ ยกเว้น *Fusarium coccophilum* BCC2415 ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่สูงกว่าเชื้ออื่นๆ (ภาพที่ 1) ส่วนคุณสมบัติทางการละลายในตัวทำละลายต่างๆ พบว่าโพลิเมอร์ไม่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่า DMSO แต่จะละลายน้ำและ DMSO ในระดับต่างๆ กัน (ตารางที่ 1) นอกจากนี้โพลิเมอร์ที่ศึกษามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 2.8×10^3-1.2×10^7 Da

ทางด้านคุณสมบัติทางชีวภาพนั้น (ตารางที่ 2) จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อต่างๆ รวมทั้งการยับยั้งการเจริญของเซลล์มนุษย์ทั้งที่เป็น cancer cell line และ primary cell line และเซลล์ของลิง พบว่า โพลิเมอร์จากรา 7 สาย

พันธุ์ มีความเป็นพิษ ซึ่งโพลิเมอร์จาก *F. coccophilum* BCC2415 เป็นพิษต่อทั้งเซลล์ลิง (Vero cells) และเซลล์มนุษย์ (NHF, NCI-H187) ในการหาศักยภาพการพัฒนาโพลิเมอร์เป็นวัสดุปิดแผลนั้นปริมาณการกระตุ้นการสร้าง IL-8 จะเป็นตัวกำหนดว่าสารชีวภาพนั้นจะมีส่วนกระตุ้นกระบวนการหายของแผลมากน้อยเพียงใด (Mori et al., 1997; Strieter et al., 1992) ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่ามีเชื้อราที่สร้างโพลิเมอร์ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-8 ได้ในปริมาณสูง (>0.5 ng/ml) อยู่ 12 ชนิด แต่เมื่อดูข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์และเซลล์ลิงประกอบด้วยแล้ว พบว่าโพลิเมอร์ที่จัดว่ามีศักยภาพในการที่จะเป็นวัสดุปิดแผลและควรได้รับการวิจัยเพิ่มเติมมาจากเชื้อราเพียง 4 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 โดยที่ *C. ipterigena* BCC2073 และ *P. tenuipes* BCC2656 มีฤทธิ์ยับยั้ง herpes simplex virus type I ด้วย

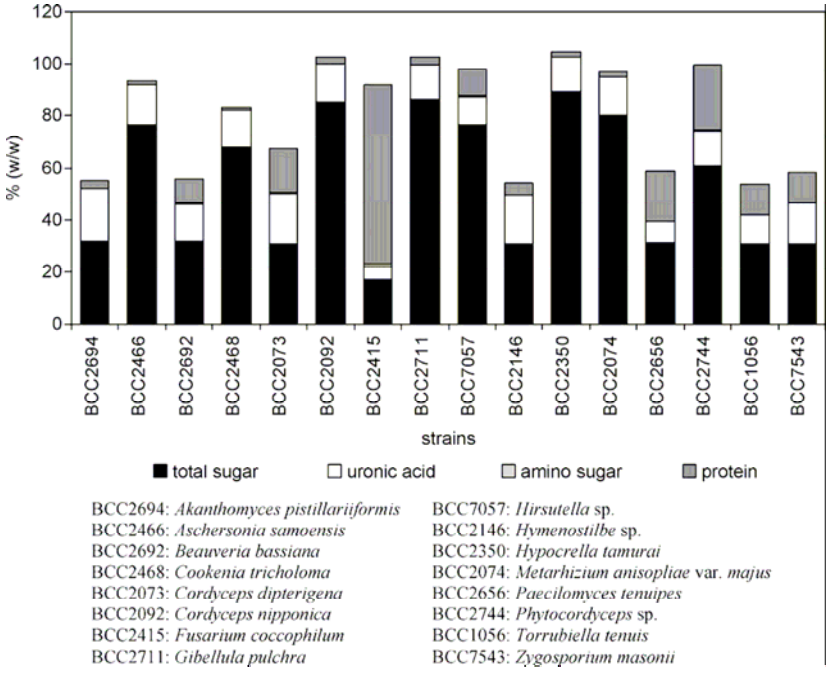
อย่างไรก็ตามในการพิจารณาความเป็นไปได้ในการพัฒนาโพลิเมอร์จากเชื้อราไปเป็นวัสดุปิดแผลนั้น ต้องคำนึงถึงความสามารถในการผลิตโพลิเมอร์ดังกล่าวในเชิงปริมาณด้วย จากงานวิจัยนี้พบว่าจากเชื้อราทั้ง 4 ชนิดที่ได้รับการคัดเลือกเบื้องต้นนั้น *P. tenuipes* BCC2656 สร้างโพลิเมอร์ได้ในปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับอีก 3 เชื้อที่เหลือในสภาวะที่ยังไม่มีการ optimization (0.41 g/l เทียบกับ >2 g/l) ดังนั้น *A. pistillariiformis* BCC2694, *C. dipterigena* BCC2073 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 จึงได้รับการคัดเลือกไปศึกษาต่อเพื่อหาองค์ประกอบ และโครงสร้างทางเคมีเพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกต่อไป

ผลการวิจัยทางด้านองค์ประกอบพบว่าโพลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 3 นี้มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า EPS นี้ส่วนใหญ่เป็นกลูแคน (glucan) และ EPS ทั้ง 3 นี้มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่แตกต่างกัน โดยที่ amino acid

ตารางที่ 1. น้ำหนักโมเลกุล และคุณสมบัติการละลายของโพลิเมอร์จากราสายพันธุ์ต่างๆ

Polymers produced from	MW (kDa)	Solubility	
		Water	DMSO
Akanthomyces pistillariiformis BCC2694	8.30	++	++
Aschersonia samoensis BCC2466	114.70	+	++
Beauveria bassiana BCC2692	13.80	++	+
Cookenia tricholoma BCC2468	28.50	+	++
Cordyceps dipterigena BCC2073	20.10	++	-
Cordyceps nipponica BCC2092	208.30	+	++
Fusarium coccophilum BCC2415	2.80	+	-
Gibellula pulchra BCC2711	73.20	+	++
Hirsutella sp. BCC7057	11941.00	+	++
Hymenostilbe sp. BCC2146	161.40	++	++
Hypocrella tamurai BCC2350	99.90	+	++
Metarhizium anisopliae var. *majus* BCC2074	120.40	+	++
Paecilomyces tenuipes BCC2656	4.80	++	+
Phytocordyceps sp. BCC2744	9162.00	+	++
Torrubiella tenuis BCC1056	21.80	++	++
Zygosporium masonii BCC7543	23.20	++	++

++ soluble; + partially soluble; - insoluble (ที่มา: Madla และคณะ, 2005)



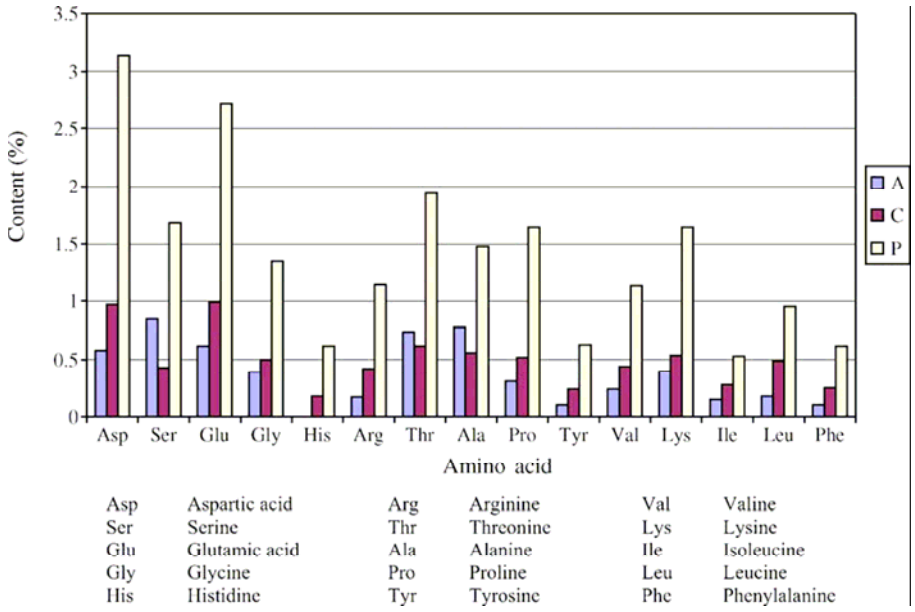
ภาพที่ 1. องค์ประกอบของโพลิเมอร์ที่ได้จากราสายพันธุ์ต่างๆ (ที่มา: Madla และคณะ, 2005)

ชนิดที่พบมากได้แก่ serine glutamic acid และ aspartic acid (ภาพที่ 2) และจากการศึกษาโครงสร้างของโพลิเมอร์เหล่านี้ ทำให้สามารถสรุปโครงสร้างของโพลิเมอร์ได้ดังภาพที่ 3

ตารางที่ 2. คุณสมบัติทางชีวภาพของโพลิเมอร์จากราสายพันธุ์ต่างๆ

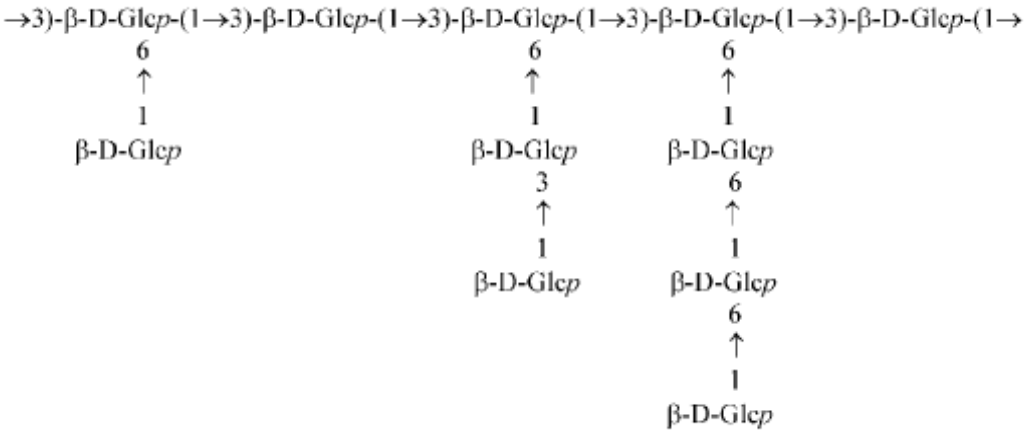
Polymers produced from	Biological activity	Cytotoxicity[a]		IL-8 production (ng/ml)
		Vero cell line	NHF	
Akanthomyces pistillariiformis BCC2694	-	-	-	>2.43
Aschersonia samoensis BCC2466	-	-	-	2.30
Beauveria bassiana BCC2692	-	-	-	1.58
Cookenia tricholoma BCC2468	**	-	+	>2.43
Cordyceps dipterigena BCC2073	IC_{50}=47.2 μg/ml against HSV-1	-	-	>2.43
Cordyceps nipponica BCC2092	-	-	-	0.14
Fusarium coccophilum BCC2415	IC_{50}=1 μg/ml against NCI-H187 IC_{50}=7.2 μg/ml against *C. albicans*	+	+	0.61
Gibellula pulchra BCC2711	-	-	-	0.46
Hirsutella sp. BCC7057	**	-	+	>2.43
Hymenostilbe sp. BCC2146	-	-	+	0.18
Hypocrella tamurai BCC2350	-	-	+	2.04
Metarhizium anisopliae var. *majus* BCC2074	**	-	+	>2.43
Paecilomyces tenuipes BCC2656	IC_{50}=34.2 μg/ml against HSV-1	-	-	>2.43
Phytocordyceps sp. BCC2744	-	-	-	>2.43
Torrubiella tenuis BCC1056	-	-	+	0.52
Zygosporium masonii BCC7543	**	-	-	0.13

-nontoxic; **low level of activity against HSV-1; [a]+ toxic/inhibit growth >25% at 50 μg/ml. (ที่มา: Madla และคณะ, 2005)



ภาพที่ 2. ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโพลิเมอร์จากรา *A. pistillariiformis* BCC2694(A), *C. dipterigena* BCC2073 (C) และ *Phytocordycesp* sp. BCC2744 (P) (ที่มา: Methacanon และคณะ, 2005)

จากการวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่า เชื้อราจากแหล่งในประเทศไทย มีคุณสมบัติที่บ่งชี้ว่ามีศักยภาพในการที่น่าจะได้รับการพัฒนาในการเป็นวัสดุปิดแผลได้ ในขั้นตอนการศึกษาวิจัยต่อไปจะต้องนำไปประยุกต์ให้อยู่ในรูปของวัสดุที่ต้องการและทำการทดสอบทั้งคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและชีวภาพเพิ่มเติม



ภาพที่ 3. โครงสร้างของโพลิเมอร์ (ที่มา: Methacanon และคณะ, 2005)

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R_645001

เอกสารอ้างอิง

Bae, J., J. Park, C. Song, C. Yu, M. Park and J. Yun. 2001. Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91: 522-524.

Bohn, J.A. and J.N. Bemiller. 1995. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28: 3-14.

Carbonero, E., G. Sassaki, P. Stuelp, P. Gorin, S. Woranovicz-Barreira and M. Iacomini. 2001. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. *FEMS Microbiology* 194: 65-69.

Kim, D., B. Yang, S. Jeong, J. Oark, S. Cho, D. Suralit, J. Yunand and C. Song. 2001. Production of hypoglycemic, extracellular polysaccharide from submerged culture of mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters* 23: 513-517.

Madla, S., P. Methacanon, M. Prasitsil and K. Kirtikara. 2005. Characterization of biocompatible fungi-derived polymers that induce IL-8 production. *Carbohydrate Polymers* 59: 275-280.

Methacanon, P., S. Madla, K. Kirtikara and M. Prasitsil. 2005. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. *Carbohydrate Polymers* 60: 199-203.

Mori, T., M. Okumura, M. Matsuura, K. Ueno, S. Tokura, Y. Okamoto, S. Minami and T. Fujinaga. 1997. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 18: 947-951.

Navarini, L., M. Stredansky, M. Matulova and C. Bertocchi. 1997. Production and characterization of an exopolysaccharide from *Rhizobium hedysari* HCNT1. *Biotechnology Letters* 19: 1231-1234.

Strieter, R.M., S.L. Kunkel, V.M. Elner, C.L. Martonyi, A.E. Koch, P.J. Polverini and S.G. Elner. 1992. Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *American Journal of Pathology* 141: 1279-1284.

Sutehrland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH* 16: 41-46.

Takagi, H. and K. Kadowaki. 1985. Flocculant production by *Paecilomyces* sp. taxonomic studies and culture condition for production. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 3051-3057.