

16 ส.ย. 2547.

รายงานฉบับสมบูรณ์

• โครงการ การศึกษาคุณสมบัติของโพลิเมอร์จากเชื้อราใน
ประเทศไทย และศักยภาพในการเป็นวัสดุปิดแผล

(The study of polymer produced by fungi of Thailand and its
potential as wound dressing material)

โดย นางสาวกัญญวิมว์ กীরติกร และคณะ

31 เมษายน 2547

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาคุณสมบัติของโพลิเมอร์จากเชื้อราและศักยภาพในการเป็นวัสดุปิดแผล

(The study of polymer produced by fungi of Thailand and its potential as wound dressing material)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|----------------------------|--|
| 1. นางสาวกัญญวิมว์ กิรติกร | ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ |
| 2. นางสาวภาวดี เมธะคานนท์ | ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ |
| 3. นางสาวศิริพร หมาดหล้า | ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ |
| 4. นางสาวปวีณา อุปนันต์ | ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ |

สนับสนุนโดย

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ
ในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการการพัฒนางานองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT_R645001

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

เชื้อราจำนวน 16 สายพันธุ์ จาก 15 สกุลที่แตกต่างกัน ซึ่งแยกได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย ได้ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนในการนำมาศึกษาการผลิต องค์ประกอบทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของโพลิเมอร์ที่สร้างขึ้น เพื่อศึกษาถึงศักยภาพในการนำไปใช้เป็นวัสดุปิดแผล ดังกล่าวให้ผลผลิตโพลิเมอร์ในช่วง 0.4 – 16.0 กรัมต่อลิตร การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ พบว่าโพลิเมอร์ที่ได้มีค่าน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.8×10^3 ถึง 1.19×10^7 ดาลตัน สามารถละลายในน้ำและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ยกเว้นโพลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Fusarium coccophilum* BCC2415 ที่สามารถละลายได้ในน้ำเท่านั้น การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พบว่าโพลิเมอร์ที่สร้างขึ้นเป็นชนิดโพลิแซคคาไรด์ (กลูแคน และเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์) ยกเว้นโพลิเมอร์ที่ได้จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 เป็นชนิด protein-polysaccharide complex

ผลจากการศึกษาโครงสร้างของกลูแคน พบว่ามีรูปแบบที่แตกต่างกัน 3 ลักษณะ คือ 1) (1→4)- α -D-glucan โครงสร้างแบบนี้พบในโพลิเมอร์ที่ผลิตจากรา *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Cookeia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hypocrella tamurai* BCC2350 และ *Hymenostible* sp. BCC2146 2) (1→3)- β -D-glucan เป็นสายโซ่หลัก โดยที่ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาล มีสายโซ่กิ่งสายสั้น ๆ และ/หรือ น้ำตาลกลูโคส มาเชื่อมต่อ โครงสร้างดังกล่าวนี้พบในโพลิเมอร์ที่ผลิตจากรา *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694 และ *Zygosporium masonii* BCC7543 และ 3) (1→2, 1→6)- β -D-glucan ซึ่งพบในโพลิเมอร์ที่ผลิตจากรา *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 ส่วนพวกเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยกลูแคน เป็นโพลิเมอร์หลัก นอกจากกลูแคนแล้ว โพลิเมอร์ในกลุ่มนี้ยังประกอบด้วย แมนแนน และกาแลคแตน มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน 2 ลักษณะ คือ 1) (1→3, 1→6)-linked glucan พบในโพลิเมอร์ที่ผลิตจากรา *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 and *Torrubiella tenuis* BCC1506 และ 2) (1→4)-linked glucan ซึ่งพบในโพลิเมอร์ที่ผลิตจากรา *Phytocordyceps* sp. BCC2744

ผลจากการทดสอบความเป็นพิษ และความสามารถในการเร่งการหายของแผล โดยการศึกษาความสามารถในการสร้าง interleukin (IL)-8 ของเซลล์ normal dermal human fibroblasts (NHF) หลังจากการสัมผัสกับสารตัวอย่าง พบว่าโพลิเมอร์จาก *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ และสามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้าง IL-8 ได้ในระดับสูง จึงมีศักยภาพในการเป็นวัสดุปิดแผล เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตโพลิเมอร์ที่ได้ *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 ให้ผลผลิตโพลิเมอร์ในระดับที่ต่ำ ดังนั้นจึงมีโพลิเมอร์เพียง 3 ตัวเท่านั้นที่นำไปศึกษาในงานขั้นพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผล

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

Sixteen strains of fungi isolated from natural habitats in Thailand were selected as a representative of 15 different genera to study their biopolymers. The polymer production, their chemical composition, and some physical and biological properties related to potential as wound dressing materials of the biopolymers were investigated. The polymers production was in the range of 0.4-16.0 g/L. Molecular weights of the polymers ranged from 2.8×10^3 – 1.19×10^7 Da. Apart from the polymers from *Fusarium coccophilum* BCC2415 and *Cordyceps dipterigena* BCC2073 that were only water soluble, those from other fungi were soluble in both water and DMSO. All polymers were shown to be composed of polysaccharides, divided into 2 groups: homopolysaccharide (glucan) and heteropolysaccharides, except polymer produced from *Fusarium coccophilum* BCC2415 which was a protein-polysaccharide complex.

From structure elucidation, it indicated that glucan produced from *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Cookeia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hypocrella tamurai* BCC2350 and *Hymenostible* sp. BCC2146 were a (1→4)- α -D-glucan. The possible structure of polymers from *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694 and *Zygosporium masonii* BCC7543 were (1→3)- β -D-glucan backbone substituted at O-6 with single and/or longer chains of glucose. Only polymer from *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 was possibly as (1→2, 1→6)- β -D-glucan. Heteropolysaccharide produced from *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 and *Torrubiella tenuis* BCC1506 were supposed to be (1→3, 1→6)-linked glucan, while the polymer from *Phytocordyceps* sp. BCC2744 possibly was (1→4)-linked glucan. In addition to glucan as major polysaccharide in this group, they comprised mannan and galactan.

Different biological assays including cytotoxicity test were conducted to investigate their biocompatibility. To evaluate the potential of these polymers as wound dressing materials, the levels of interleukin (IL)-8 produced by normal human dermal fibroblasts (NHF) cells exposed to the polymers were determined. Our results indicated that polymers produced by *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, and *Phytocordyceps* sp. BCC2744 are biocompatible and are inducers of high level of IL-8. However, the polymer from *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 will not be recommended for further investigation as wound dressing due to its low polymer yield.

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. รายชื่อเชื้อราซึ่งเก็บรักษาไว้ใน BIOTEC Culture Collection ที่คาดว่ามีการสร้างโพลิเมอร์ ซิวภาพ	7
2. การใช้ประโยชน์ของ microbial exopolysaccharides	12
3. Gradient system สำหรับ การวิเคราะห์หาชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ	17
4. สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ^{13}C NMR ของโพลิเมอร์	20
5. การละลายของโพลิเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ	22
6. ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA	23
7. การเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำหมักระหว่างการเลี้ยงเชื้อ	24
8. ลักษณะภายนอกของโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ	37
9. ความสามารถในการละลายของโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ	38
10. น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์	39
11. องค์ประกอบของโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ วิเคราะห์โดยใช้ Colorimetric Methods	40
12. ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลิเมอร์	42
13. ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโพลิเมอร์	43
14. Methylated products และ ชนิดของพันธะที่ได้จากการวิเคราะห์โดย Methylation analysis	47
15. Chemical shift ของโพลิเมอร์ จากการวิเคราะห์โดย ^{13}C -NMR	48
16. Methylated products ชนิดของพันธะที่ได้จากการวิเคราะห์โดย Methylation analysis, Reductive cleavage และ Chemical shift ของโพลิเมอร์จากการวิเคราะห์โดย ^{13}C -NMR	50
17. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ของโพลิเมอร์	54
18. สารตัวอย่างที่แสดงผลยับยั้งการเจริญของเซลล์	57
19. ผลการวัดปริมาณ IL-8 ใน culture medium	59

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างทางเคมีของ เคอร์ดแลน (curdlan)	9
2. โครงสร้างทางเคมีของสโคซิฟิลแลน (schizophyllan)	10
3. โครงสร้างทางเคมีของสเคลอโรกลูแคน (scleroglucan)	10
4. โครงสร้างทางเคมีของพลูลูแลน (pullulan)	11
5. ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเขี่ยตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์	33
6. ค่าเฉลี่ยผลผลิตโพลิเมอร์สูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเขี่ยตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์	34
7. ค่าเฉลี่ยค่าพีเอชของน้ำหมัก (วันที่เชื้อให้ผลผลิตโพลิเมอร์สูงสุด) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเขี่ยตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์	35
8. ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เชื้อใช้ในการเจริญและการสร้างโพลิเมอร์ (วันที่ 21) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเขี่ยตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์	36
9. โครงสร้างของ α -D-(1 \rightarrow 4)-glucan	44
10. β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucan (กิ่งก้านสั้น)	45
11. β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucan (กิ่งก้านยาว)	45
12. β -D-(1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 6)-linked glucan	46
13. β -D-(1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 6)-linked glucan	46
14. ผลการทดสอบจาก MTT assay ซึ่งทดสอบกับเซลล์ L929	55
15. ผลการทดสอบจาก MTT assay ซึ่งทดสอบกับเซลล์ NHF	56

บทนำ

ได้มีรายงานเป็นจำนวนมากที่แสดงว่าจุลินทรีย์จำนวนหนึ่ง (ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา) สามารถสร้างสารประเภทโพลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymers) ได้ เมื่อเจริญในสภาวะที่เหมาะสม (Carbonero et al., 2001; Kim et al., 2001; Navarini et al., 1997) สารโพลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้มีทั้งที่เป็นโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) โปรตีน (proteins) หรือไขมัน (lipid) เป็นองค์ประกอบ โพลิเมอร์ในกลุ่มโพลิแซคคาไรด์ ได้รับความสนใจอย่างมากทั้งในส่วนของนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ และทางด้านอุตสาหกรรม ตัวอย่างของโพลิเมอร์ประเภทโพลิแซคคาไรด์ ที่มีการศึกษาเพื่อการนำไปใช้ในด้านเสริมสร้างสุขภาพของมนุษย์ เช่น โพลิเมอร์จาก *Phellinus linteus* ซึ่งพบว่ามียุทธในการลดปริมาณน้ำตาลในเลือด (Kim et al., 2001) โพลิแซคคาไรด์จำพวก (1→3)-β-D-glucans มีสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มียุทธในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) เชื้อไวรัส (antiviral) และสมบัติในการเร่งการหายของแผล (wound healing) (Bohn & BeMiller, 1995) นอกจากนี้โพลิเมอร์ชนิดอื่นๆ ที่มีสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างไป ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น เป็นสารตกตะกอน (flocculant) สารประกอบในการนำพา (carrier) หรือใช้ในการขึ้นรูปอาหารให้มีความคงตัวมากขึ้น (Sutherland, 1998)

จากการสังเกตเบื้องต้น การเลี้ยงเชื้อราในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่าเชื้อราในหลายสกุล (ตารางที่ 1) ซึ่งรวมทั้ง *Aschersonia*, *Paecilomyces*, *Cordyceps* เช่น *Aschersonia oxystoma*, *Paecilomyces tenuipes*, *Cordyceps sphecocephila* ที่พบได้ในประเทศไทย และจัดอยู่ในกลุ่มราที่เจริญได้บนแมลง (insect pathogenic fungi) สามารถสร้างสารโพลิเมอร์ที่หลั่งออกมาภายนอก (exopolymers) ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเหนียวและเหนืด ได้มีการรายงานว่าสารจากสกุล *Paecilomyces* เช่น *Paecilomyces japonica* สามารถสร้างโพลิเมอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และลดระดับน้ำตาลในเลือด (Bae et al., 2001) นอกจากนี้โพลิเมอร์จาก *Paecilomyces* บางชนิดสามารถสร้างสารตกตะกอนได้ในปริมาณสูง และทำงานได้ดีทั้งในที่ที่มีความเป็นกรด -ต่าง (pH) และอุณหภูมิที่ต่างกันไป (Takagi and Kadowaki, 1985)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น เชื้อราที่พบในประเทศไทย จึงน่าจะเป็นแหล่งของสารโพลิเมอร์ที่น่าสนใจ และควรจะได้รับการศึกษาวิเคราะห์ ทั้งในด้านปริมาณการสร้าง ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง และองค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งสมบัติของสารโพลิเมอร์เหล่านั้น ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในหลายด้านต่อไป

โพลิเมอร์หรือโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) สามารถจำแนกออกเป็นประเภทต่างๆ ตามเกณฑ์การแบ่งที่ต่างกันดังนี้

1. การจำแนกตามโมโนเมอร์ (monomer) ที่เป็นองค์ประกอบ แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1.1) โฮโมโพลิแซคคาไรด์ (Homopolysaccharides) ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์เพียงชนิดเดียวเช่น พุลลูลแลน (pullulan) และเด็กซ์แทรน (dextran) ซึ่งมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ

1.2) เฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ (Heteropolysaccharides) เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ ประกอบด้วยโมโนเมอร์ต่างชนิดกัน คือ น้ำตาลที่เป็นกลาง (neutral sugar) และกรดยูโรนิก (uronic acid) หรือบางที

อาจจะพบน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) แทนที่กรดยูโรนิก นอกจากนี้อาจจะประกอบด้วยหมู่อะซิติลหรือหมู่เอซิล เช่น ฟอร์เมตและซักซิเนต

ตารางที่ 1 รายชื่อเชื้อราซึ่งเก็บรักษาไว้ใน BIOTEC Culture Collection ที่คาดว่ามีการสร้างโพลิเมอร์ ชีวภาพ

Scientific Name	Scientific Name
<i>Akanthomyces</i> on spider	<i>Gibellula</i> sp. 01
<i>Akanthomyces pistilatiformis</i>	<i>Gibellula</i> sp. 03
<i>Aschersonia badia</i>	<i>Halophytophthora</i>
<i>Aschersonia oxystoma</i>	<i>Hirsutella</i> -like
<i>Aschersonia placenta</i>	<i>Hypocrella raciborski</i>
<i>Aschersonia samoensis</i>	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>
<i>Beauveria bassisana</i>	<i>Paecilomyces javanicus</i>
<i>Cookeina tricholoma</i>	<i>Paecilomyces pistilatiformis</i>
<i>Cordyceps irangiensis</i>	<i>Paecilomyces tenuipes</i>
<i>Cordyceps neluboides</i>	<i>Pleurodesmospora coccorum</i>
<i>Cordyceps nipponica</i>	<i>Rhizopphila marina</i>
<i>Cordyceps sphecocephala</i>	<i>Torrubiella luteorostrata</i>
<i>Cordyceps unilateralis</i>	<i>Torrubiella petchii</i>
<i>Cryptophialoidea secunda</i>	Unidentified marine fungi
<i>Discomycete</i> on wood	<i>Xylaria</i> sp.
<i>Gibellula pulchra</i>	

2. การจำแนกตามประจุไฟฟ้าที่อยู่บนโมเลกุลของโพลิแซคคาไรด์ แบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่

2.1) โพลิแซคคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic หรือ acidic polysaccharides) เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่มีส่วนของกรดยูโรนิก กรดอินทรีย์หรือหมู่อะซิติล เป็นองค์ประกอบนอกเหนือจากน้ำตาล เช่น แซนแทน (xanthan) ประกอบด้วยกลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) ไพรูเวท (pyruvate) และหมู่อะซิติล อยู่บนโมเลกุล

2.2) โพลิแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharides) เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของโมโนแซคคาไรด์อย่างเดียว เช่น ลีแวน (levan) พูลลูแลน เด็กซ์ทราน สเคลอโรกลูแคน (scleroglucan) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคส ไม่ได้มีกรดยูโรนิก หรือหมู่อะซิติลอยู่ในโมเลกุล

2.3) โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic หรือ basic polysaccharides) โพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้พบน้อยมาก เช่น ไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของรา เช่น *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea* โพลีแซคคาไรด์นี้จะมีประจุบวกเนื่องจากหมู่อะมิโน

3. การจำแนกตามลักษณะการสร้าง ซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้างของเซลล์ แบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่

3.1) โพลีแซคคาไรด์ที่สร้างภายในเซลล์ เช่น แบ่งใน *Clostridium* sp. ไกลโคเจนในพวก Enterobacteriaceae

3.2) โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นโครงสร้าง เช่น ไลปิด เป็นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides) และกรดไทโคอิก (teichoic acid) หรือไคโตซาน ในผนังเซลล์ของรา เป็นต้น

3.3) โพลีแซคคาไรด์ที่สร้างภายนอกเซลล์ (exopolysaccharides, EPS) จุลินทรีย์จำนวนมากสามารถสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ชนิดนี้ออกมาใน 2 รูปแบบ คือ ในรูปแคปซูล (capsule) ที่ห่อหุ้มและเกาะติดกับผนังเซลล์ เช่น แคปซูลของ *Bacillus anthracis* และในรูปของเมือก (slime) เช่น เด็กซ์แทรน ที่ผลิตโดย *Leuconostoc mesenteroides* ข้อแตกต่าง คือ แคปซูลมีรูปร่างที่แน่นอน ส่วนเมือกมีรูปร่างไม่แน่นอน มีความหนืดและละลายน้ำได้ดีกว่า ทำให้หลุดจากเซลล์ได้ง่าย ตัวอย่างของ EPS ที่ได้จากรามีดังต่อไปนี้

เคอร์ดีแลน (Curdian) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์ในดินพวก *Alcaligenes faecalis* var. 10C3K โดยเคอร์ดีแลนเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นกลาง ไม่มีประจุ ไม่สามารถละลายในน้ำแต่ละลายในสารละลายต่างและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide : DMSO) เคอร์ดีแลนสามารถเกิดเจลได้ง่ายและเจลที่เกิดขึ้นเป็นแบบ thermal irreversible โครงสร้างทางเคมีของเคอร์ดีแลนเป็นโพลิเมอร์เส้นตรง ประกอบด้วยกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแบบ β -1,3-glycoside ดังรูป 1

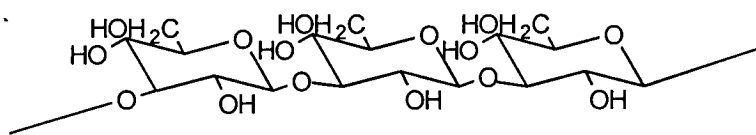
สโคซิฟิลแลน (Schizophyllan) เป็น EPS ที่เป็นกลาง (neutral polysaccharides) ได้จากราจำพวก *Schizophyllan commune* โครงสร้างทางเคมีของสโคซิฟิลแลน ประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,3-glycoside เหมือนกับเคอร์ดีแลนแต่ต่างกันว่า สโคซิฟิลแลนจะมีกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,6-glycoside เป็นกิ่งสายโซ่ (side chains) แสดงดังรูป 2 น้ำหนักโมเลกุลของสโคซิฟิลแลนประมาณ 10^6 Da โดยสายโซ่จะมีลักษณะเป็นเกลียว 3 ชั้นในน้ำซึ่งจะเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 145 องศาเซลเซียส

รา *Sclerotium glaucum* สามารถสร้าง สเคลอโรกลูแคน (scleroglucan) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลสูงที่มีกิ่งก้านคล้ายหวี โดยมี (1 \rightarrow 3)- β -D-glucose เป็นสายโซ่หลัก (backbone) และมี (1 \rightarrow 6)- β -D-glucose เพียงหนึ่งหน่วยเป็นกิ่งสายโซ่ที่ทุกๆ 3 หน่วยของสายโซ่หลัก (ดังรูป 3) โพลิเมอร์นี้ได้รับความสนใจอย่างมากในภาคอุตสาหกรรม เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นประโยชน์และน้ำหนักโมเลกุลที่สูงถึง 12×10^6 Da ทำให้สามารถใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น เป็นสารเพิ่มความข้น (thickener) สารช่วยกระจาย (suspending agent) หรือสารช่วยคงตัว (stabilizing agent) นอกจากนี้สเคลอโรกลูแคนยังมีบทบาทสำคัญในการเป็น biological response modifier ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แม้ว่ากลไกการทำงาน ยังไม่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้สเคลอโรกลูแคนยังมีความสามารถ antineoplastic activity มากกว่า β -D-glucans ชนิดอื่น

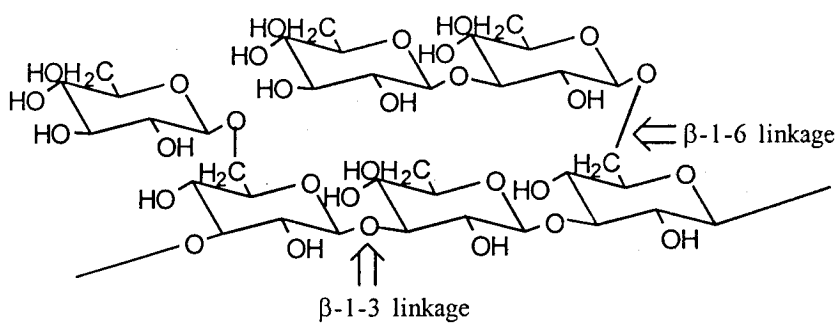
Aureobasidium pullulans สามารถสังเคราะห์อัลฟาดีกลูแคน (α -D-glucan) ที่เรียกว่า พูลูลแลน ซึ่งเป็น โพลิเมอร์เส้นตรง ประกอบด้วย maltotriose (กลูโคส 3 หน่วยต่อกันแบบ α -1,4) และ maltotetraose (กลูโคส 4 หน่วย

ต่อกันแบบ α -1,4) ซึ่งเชื่อมต่อกันแบบ α -1,6 (ดังรูป 4) น้ำหนักโมเลกุลของ พอลิกลูแลนอยู่ในช่วง 10^3 ถึง 3×10^6 ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะและสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ นอกจากนี้พอลิกลูแลนยังสามารถสังเคราะห์ได้จากเชื้อราหลายชนิด รวมทั้ง *Tremella mesenterica* และ *Cyrtaria hariatii* พอลิกลูแลนไม่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ อะไมเลส (amylases) ทั่วไป จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจง (pullulanase enzymes ซึ่งแยกมาจาก *Enterobacter aerogenes*) ที่สามารถย่อยโพลิแซคคาไรด์เป็น maltotriose และ maltotetraose พอลิกลูแลนสามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งสารละลายที่ได้จะค่อนข้างหนืด และคงตัวในสภาวะที่มีไอออนบวกโดยไม่เกิดเป็นเจล การใช้งานของพอลิกลูแลน เช่น ฟิล์มบรรจุภัณฑ์ที่คงทนต่อน้ำมัน (oil-resistant) ละลายน้ำและยอมให้ก๊าซออกซิเจนซึมผ่านได้น้อย ซึ่งฟิล์มชนิดใหม่นี้จะช่วยรักษาความสด ลักษณะของอาหาร รวมทั้งกลิ่นให้คงอยู่ และสามารถนำไปปรุงอาหารได้โดยตรง สารละลายของโพลิเมอร์นี้ยังสามารถใช้เคลือบอาหารได้โดยตรง โดยปราศจากกลิ่นและรสชาติ พอลิกลูแลนยังเป็นกาวยืดและใช้ในการเตรียมเส้นใย และถูกใช้เป็นสารมาตรฐาน (molecular-mass standards) ที่มีค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low polydispersity) สำหรับการ calibrating HPLC คอลัมน์ในเทคนิคของ size-exclusion chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำ การใช้งานใหม่ของพอลิกลูแลน คือเป็นตัว probiotic ในอาหารลดน้ำหนัก (dietary foods) ที่มีความสามารถเฉพาะเจาะจงในการเสริมการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium* spp. ช่วยการทำงานในส่วนของลำไส้ของมนุษย์ (Sutherland, 1998)

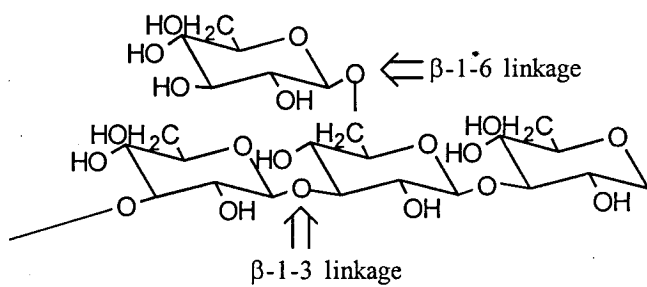
โพลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์หลายตัวเป็นที่ยอมรับ และถูกใช้อย่างแพร่หลาย ดังแสดงในตารางที่ 2 และขณะเดียวกันอีกหลายตัวก็ยังมีอยู่ในขั้นตอนของพัฒนา การใช้ประโยชน์จากโพลิเมอร์เหล่านี้มีหลากหลาย ผลิตภัณฑ์ด้านวัสดุตกแต่งผลก็เป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ ที่มีมูลค่าการใช้งานค่อนข้างสูง เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณการใช้งานสูงและหลากหลาย ซึ่งทำให้การนำเข้าจากต่างประเทศของผลิตภัณฑ์จำพวกนี้มีสูงขึ้นเป็นเงาตามตัว โพลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์มีศักยภาพ ในการนำมาใช้งานด้านการแพทย์ เนื่องจากสมบัติเฉพาะที่โดดเด่น หรือสมบัติทางกายภาพที่ดีกว่าโพลิแซคคาไรด์ที่ใช้อยู่เดิมซึ่งได้จากพืช แต่ผลิตภัณฑ์จาก จุลินทรีย์ก็ยังคงไม่สามารถแข่งขันกับโพลิเมอร์จากธรรมชาติอื่น หรือโพลิเมอร์สังเคราะห์ได้ในด้านของราคา ถึงแม้ว่าสมบัติด้านกายภาพและด้านสิ่งแวดล้อมจะเหนือกว่าก็ตาม อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดีในอนาคต ด้วยสมบัติทางชีวภาพที่โดดเด่นของโพลิเมอร์เหล่านี้ จะนำไปสู่การใช้ประโยชน์ที่แปลกใหม่ ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ และทำให้ตลาดของโพลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์ขยายตัวได้มากขึ้น



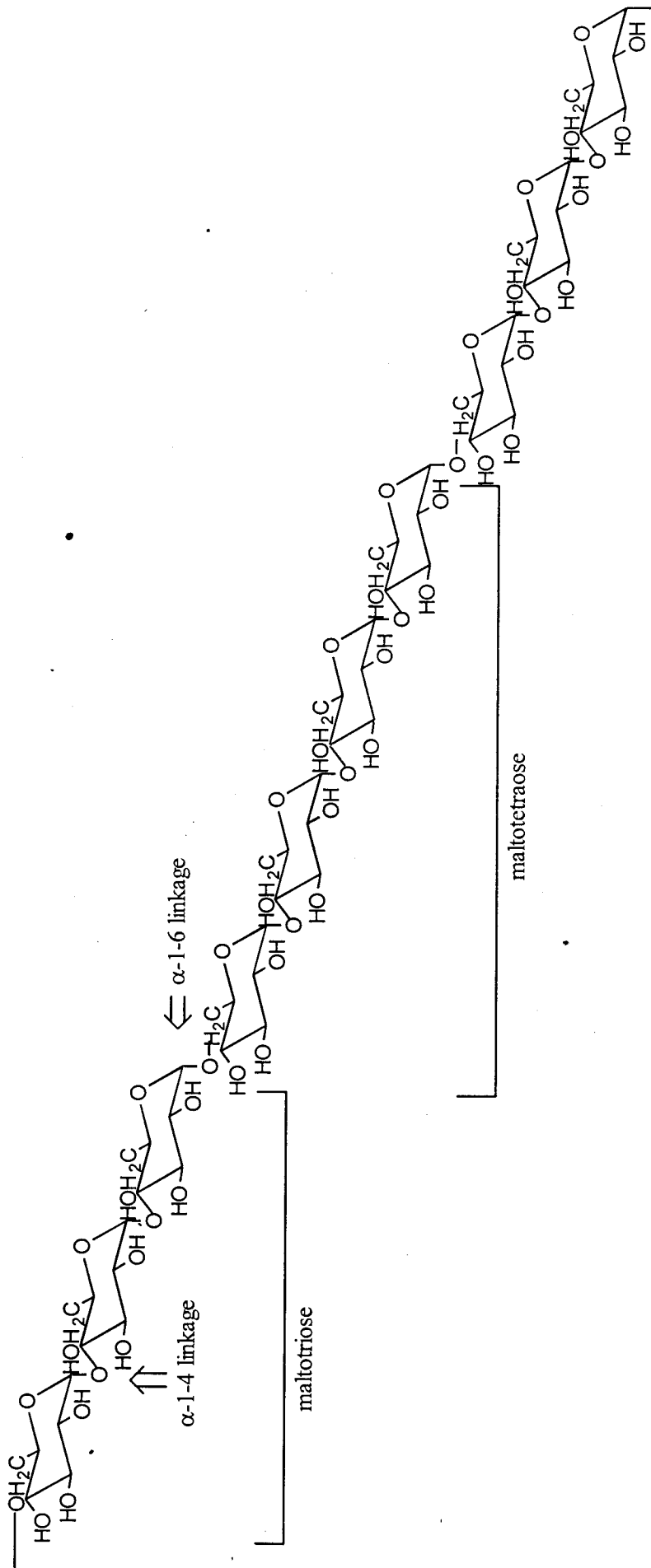
รูป 1 โครงสร้างทางเคมีของ เคอร์ดีแลน (curdlan)



รูป 2 โครงสร้างทางเคมีของสโคซิฟิลแลน (schizophyllan)



รูป 3 โครงสร้างทางเคมีของสเคลอโรกลูแคน (scleroglucan)



รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของพุลูลาน (pullulan)

ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์ของ microbial exopolysaccharides (Sutherland, 1998)

	การใช้งาน	โพลีเมอร์
สมบัติทางชีวภาพ (Biological properties)	Antitumour agents Eye and joint surgery Heparin analogues Wound dressings	β -D-Glucans Hyaluronic acid (<i>Streptococcus</i> EPS) <i>Escherichia coli</i> K5 EPS Bacterial cellulose
สมบัติทางเคมี (Chemical properties)	Enzyme substrates Oligosaccharide preparation	<i>Escherichia coli</i> K4 and K5 EPS Curdlan, pullulan, scleroglucan
สมบัติทางกายภาพ (Physical properties)		
-Emulsion stabilisation	Foods, thixotropic paints	Xanthan
-Fiber strength	Acoustic membranes	Bacterial cellulose
-Film formation	Food coatings	Pullulan
-Flocculant	Water clarification, ore extraction	Various
-Foam stabilisation	Beer, fire-fighting fluids	Xanthan
-Gelling agents	Cell and enzyme technology, Foods	Gellan Curdlan, gellan
	Oil recovery (blockage of permeable zones)	Curdlan, xanthan
-Hydrating agent	Cosmetics, pharmaceuticals	Hyaluronic acid
-Inhibitor of crystal formation	Frozen foods, pastilles and sugar syrups	Xanthan
-Shear thinning and viscosity control	Oil-drilling "muds"	Xanthan
-Suspending agent	Food Paper coatings	Xanthan Various
	Agrochemical pesticides and sprays	Xanthan
-Viscosity control	Jet printing	Xanthan

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกโพลิเมอร์ที่เชื้อราสร้างขึ้นที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์ (วัสดุปิดแผล)
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบ โครงสร้างทางเคมีและสมบัติของโพลิเมอร์เหล่านั้น

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกเชื้อราตัวแทนเพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตโพลิเมอร์

1.1 การคัดเลือกเชื้อราตัวแทน

จากการสังเกตการเลี้ยงเชื้อราในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เชื้อราจำนวนหนึ่งสามารถผลิตสารที่มีผลทำให้น้ำหมักมีความข้น และหนืดขึ้น ซึ่งคาดว่าสารดังกล่าวน่าจะเป็นสารในกลุ่มโพลิเมอร์ซึ่งถูกสร้างและขับออกมาจากเซลล์ ข้อมูลที่รวบรวมนี้สรุปได้ว่ามีเชื้อราทั้งสิ้นจำนวน 147 สายพันธุ์ ที่มีผลทำให้น้ำหมักมีความข้นหนืด (ภาคผนวก 2) แต่ทำการคัดเลือกเชื้อราตัวแทนจากแต่ละสกุลจำนวน 16 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อราที่เจริญได้ค่อนข้างเร็วเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cookeia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Fusarium coccophilum* BCC2415, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, *Phytocordyceps* sp. BCC2744, *Torrubiella tenuis* BCC1506 และ *Zygosporium masonii* BCC7543 เพื่อนำมาศึกษาการเจริญและการผลิตโพลิเมอร์

1.2 การเตรียมหัวเชื้อ

จากเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) (อายุ 7 วัน) ตัดเชื้อที่เจริญบนชิ้นวุ้นขนาด 1 ตารางเซนติเมตร จากบริเวณขอบนอกของเชื้อราที่เป็นส่วนที่กำลังเจริญอยู่ดี จากนั้นตัดชิ้นวุ้นนี้ให้เป็นชิ้นเล็กลง เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

1.3 การเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB (potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้หัวเชื้อความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ

150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน วัดค่าพีเอช บันทึกลักษณะของน้ำหมัก ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลผลิตโพลิเมอร์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid Assay (Chaplin and Kennedy, 1986)

1.4 การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight :DCW)

แยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยใช้กระดาษกรอง (Whatman No.1) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น อบเซลล์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักที่ได้

1.5 การหาค่าผลผลิตโพลิเมอร์ (polymer yield)

เติมเอธานอลที่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 4 เท่า ในน้ำหมักที่ผ่านการแยกเซลล์ออกแล้ว ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 8,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนของโพลิเมอร์ นำตะกอนของโพลิเมอร์ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้ freeze dryer และชั่งน้ำหนักที่ได้ (ดัดแปลงจาก Park, et al., 2001)

1.6 การทำโพลิเมอร์ให้บริสุทธิ์

นำโพลิเมอร์ที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วมาละลายน้ำ และกำจัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกโดยการปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลา 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำโพลิเมอร์ส่วนที่ละลายน้ำไปทำไดอะไลซิส (MWCO 2,000 Da) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในน้ำกลั่นปริมาตร 5 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการเปลี่ยนน้ำกลั่นทุก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโพลิเมอร์ที่ผ่านการไดอะไลซิสแล้วไปทำให้แห้งอีกครั้ง

2. การวิเคราะห์สมบัติของโพลิเมอร์

2.1 ความสามารถในการละลาย

ละลายสารตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิกรัม ในตัวทำละลาย (1 มิลลิลิตร) ดังต่อไปนี้ น้ำ, DMSO, acetronitrile, เอธานอล และเฮกเซน. คนทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นสังเกตความสามารถในการละลาย

2.2 น้ำหนักโมเลกุล

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

เครื่องมือ	Waters 600E
คอลัมน์	Linear Ultrahydrogel + guard column (Waters, USA)
อุณหภูมิคอลัมน์	อุณหภูมิห้อง
เฟสเคลื่อนที่	สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 M)
อัตราการไหล	0.6 mL/min
ดีเทคเตอร์	Refractive Index
สารมาตรฐาน	Pullulan (MW. $5.90 \times 10^3 - 7.88 \times 10^5$), 1 mg/mL
เวลาในการวิเคราะห์	25 นาที
สารตัวอย่าง	สารละลายโพลิเมอร์ใน 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ (2 mg/mL), 20 μ L injection volume

ในการเตรียมตัวอย่างโดยการละลายใน 0.1 M NaOH พบว่าโพลิเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Fusarium coccophilum* BCC2415, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506 ละลายได้บางส่วน ส่วนโพลิเมอร์จาก *Cordyceps nipponica* BCC2092 และ *Hirsutella* sp. BCC7057 เมื่อละลายแล้วเกิดเป็นเจลใส ในการวิเคราะห์จึงนำเฉพาะส่วนที่สามารถละลายเท่านั้น

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโพลิเมอร์

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโพลิเมอร์โดยใช้ Colorimetric Methods ได้แก่

- ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์โดยวิธี Folin – Lowry protein assay (Plummer, 1978)
- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด วิเคราะห์โดยวิธี Phenol – sulfuric acid assay (Chaplin and Kennedy, 1986)
- ปริมาณกรดยูโรนิก วิเคราะห์โดยวิธี Carbazole assay (Chaplin and Kennedy, 1986)
- ปริมาณน้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน วิเคราะห์โดยวิธี Morgan – Elson assay (Chaplin and Kennedy, 1986)

3.2 การหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ

หลักการคือ สายโซ่ของโพลิแซคคาไรด์จะถูกทำให้แตกออกเป็นโมโนแซคคาไรด์ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยมีกรดเป็นตัวเร่ง จากนั้นชนิดและปริมาณของโมโนแซคคาไรด์ที่ได้ จะถูกวิเคราะห์โดยเทคนิค gas chromatography (GC) โดยโมโนแซคคาไรด์ที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ alditol acetates เพื่อให้สามารถระเหยกลายเป็นก๊าซได้ง่าย

3.3.1 TFA Hydrolysis

- condition 1 : โพลีเมอร์ตัวอย่าง (25 mg) จะถูกแช่ใน trifluoroacetic acid (conc. TFA, 2 mL) เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจะถูกทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น (7 mL) เพื่อให้ความเข้มข้นของกรดเป็น 3 M TFA แล้วจึงทำการย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง hydrolysate ที่ได้จะถูกทำให้เป็นกลางโดยการระเหย TFA ออกและล้างน้ำกลั่น (ทำซ้ำ 4-5 ครั้ง) ด้วยเครื่อง rotary evaporator สุดท้ายน้ำกลั่น (5 mL) จะถูกเติมลงใน dried hydrolysate สำหรับการทำอนุพันธ์ alditol acetates (ตามหัวข้อ 3.3.2)

- condition 2 : โพลีเมอร์ตัวอย่าง (25 mg) จะถูกแช่ใน conc. TFA (2 mL) เป็นเวลา 1 คืน จากนั้น reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนเติมน้ำกลั่น (0.5 mL) เพื่อให้กรดเจือจางเหลือ 80 % ทำการ reflux ต่ออีก 30 นาที ก่อนเติมน้ำกลั่น (4 mL) อีกครั้ง เพื่อให้กรดเจือจางเหลือ 30 % ทำการ reflux ต่ออีก 3.5 ชั่วโมง hydrolysate ที่ได้จะถูกทำให้เป็นกลางด้วยวิธีเดียวกันกับ condition 1

หมายเหตุ: เนื่องจากโพลีเมอร์มีความทนต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไม่เท่ากัน สภาวะที่ใช้กับโพลีเมอร์แต่ละตัวจึงแตกต่างกัน

3.3.2 Alditol acetate derivatives

hydrolysate (0.5 mL) ถูกทำให้เป็นกลางด้วยแอมโมเนีย (0.08 mL) และเติมโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4 , 70 mg) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง (หรืออาจทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง) กำจัด borohydride ส่วนเกินโดยการเติม glacial acetic acid (0.2 mL) ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 1-methyl imidazole (1.5 mL) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม acetic anhydride (5 mL) ทิ้งไว้ 20 นาที (ควรจะเขย่าบ่อยๆ) เติมน้ำกลั่น (12 mL) เพื่อกำจัด anhydride ส่วนเกิน เขย่าและทิ้งไว้ให้เย็นใน ice bath ประมาณ 5 นาที แล้วทำการสกัดด้วย dichloromethane (2 mL) ทำซ้ำ 2 ครั้ง ดูดส่วนที่ต้องการซึ่งจะแยกตัวอยู่ในชั้นของ dichloromethane (ชั้นล่าง) เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไปด้วย GC (หัวข้อ 4.1.3) และทำการเตรียมอนุพันธ์ของสารมาตรฐาน (arabinose, xylose, mannose, galactose และ glucose 5 mg/mL) เช่นเดียวกันกับการเตรียมสารตัวอย่าง

3.3 การวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (Amino acid analysis)

สารตัวอย่าง (100 mg) ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (6 N HCl) ที่อุณหภูมิ 112 °C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นกรดอะมิโนที่ได้จะถูกทำให้เป็นอนุพันธ์ด้วย AccQ-Fluor reagent ตามวิธี AccQ-Tag method (Waters AccQ-Tag Instruction Manual No. WAT052874, REVO April, 1993) ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

HPLC (High Performance Liquid Chromatography):

เครื่องมือ	Waters Alliance 2695
คอลัมน์	AccQ – Tag column (150 x 3.9 mm ID, 4 μm film thickness)
ดีเทคเตอร์	Fluorescence detector (EX: 250, EM: 395)

เฟสเคลื่อนที่	Phosphate buffer pH 5.02 (sodium acetate, EDTA, TEA) และ 60% acetonitrile, gradient system (ตารางที่ 3)
Injection volume	5 μ L
สารมาตรฐาน	กรดอะมิโน 15 ชนิด

ตารางที่ 3 Gradient system สำหรับ การวิเคราะห์หาชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ

	Time (minute)	Flow rate (mL/min)	% Phosphate buffer	% Acetonitrile	% Water
1	0	1.00	100	0.0	0.0
2	0.50	1.00	99.0	1.0	0.0
3	21.00	1.00	95.0	5.0	0.0
4	22.00	1.00	91.0	9.0	0.0
5	32.50	1.00	83.0	17.0	0.0
6	38.00	1.00	0.0	60.0	40.0
7	41.00	1.00	100.0	0.0	0.0
8	50.00	1.00	100.0	0.0	0.0

4. การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของโพลิเมอร์

4.1 การวิเคราะห์ตำแหน่งพันธะของสายโซ่โพลิเมอร์โดยใช้เทคนิค Methylation Analysis

4.1.1 การเตรียม Methylated products เป็นการทำให้หมู่เมธิล (CH_3) เข้าไปแทนที่ในส่วนของ free hydroxyl group บนสายโซ่ของโพลิแซคคาไรด์ จากนั้นทำการตัดสายโซ่ตรงตำแหน่งที่น้ำตาลเชื่อมต่อกันด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เกิดหมู่ไฮดรอกซิลตรงตำแหน่งเชื่อมต่อ ทำให้ทราบถึงตำแหน่งพันธะที่เชื่อมต่อ

ละลายโพลิเมอร์ตัวอย่าง (150 mg) ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) (20 mL) และปรับสภาวะให้เป็นด่างด้วย NaOH (1.6 g) คนทิ้งไว้เพื่อให้โพลิเมอร์ละลาย เติม methyl iodide (4 mL) โดยทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะก๊าซไนโตรเจน ทิ้งไว้ข้ามคืน และปรับสภาวะให้เป็นกลางด้วยกรด HCl กำจัด DMSO โดยการไดอะไลซิส (MWCO 1,000 Da) ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปทำแห้งโดย freeze dryer ทำซ้ำ 3 ครั้ง จะได้ methylated product

4.1.2 Formic and sulphuric acid hydrolysis of methylated products (สำหรับโพลิเมอร์ชนิดกลูแคน)

Methylated product (50 mg) ถูกย่อยด้วย formic acid (90% w/w, 5 mL) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ระเหย formic acid ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำการย่อยซ้ำอีกครั้งด้วย sulphuric acid (0.125 M, 12.5 mL) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง hydrolysate ที่ได้จะถูกทำให้เป็นกลางโดยการเติม barium carbonate (0.5 g) กำจัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อ

นาที่ เป็นเวลา 10 นาที ระเหยน้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 5 mL จะได้ partially methylated monosaccharide สำหรับการทำอนุพันธ์ alditol acetate (ตามหัวข้อ 3.3.2) และใช้ในการวิเคราะห์ GC และ GC/MS

4.1.3 Reductive cleavage ด้วย Et_3SiH และ $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{Me}\cdot\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (Jun and Gray, 1987) (สำหรับเฮกเทอโรโพลีแซคคาไรด์)

ละลายตัวอย่าง methylated product (50 mg) ในสารละลายผสมของ dichloromethane (CH_2Cl_2) (2.5 mL), thiethylsilane (Et_3SiH) (225 μL), trimethylsilyltrifluoromethanesulfonate ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{Me}$) (255 μL) และ boron trifluoride diethyl etherate ($\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$) (40 μL) ผสมให้เข้ากัน และคนทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง เดิมเมทานอล (20 mL) คนทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เดิม mixed bed resin (Bio-Rad AG 501-x8, analytical-grade) คนทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำสารไประเหยให้แห้งหลังจากแยก resin ออกแล้ว

ละลายสารตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แห้งด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) (160 μL) และทำอนุพันธ์ alditol acetate โดยใช้ acetic anhydride (200 μL) และ 1-methylimidazole (40 μL) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คนทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นปรับสภาพให้เป็นกลางด้วย sat. NaHCO_3 (0.5 mL) คนให้เข้ากัน สกัดด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) (ชั้นล่าง) และนำไปวิเคราะห์ด้วย GC/MS

4.1.4 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ GC และ GC/MS (สำหรับโพลีเมอร์ชนิดกลูแคน)

GC condition

Equipment	Shimadzu GC-17A
Column	BPX-70 (70% cyanopropyl polysilphenylenesiloxane) capillary column, 25 m x 0.32 mm ID, 0.25 μm film thickness
Carrier gas	Helium
Pressure	180 kPa
Detector	FID (flame ionization detector) at 300 $^{\circ}\text{C}$
Temperature gradient	160 $^{\circ}\text{C}$ to 210 $^{\circ}\text{C}$ at 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, then 210 $^{\circ}\text{C}$ to 240 $^{\circ}\text{C}$ at 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Injection	1 μL with split mode ratio 25 : 1, at 260 $^{\circ}\text{C}$

GC/MS condition

Equipment	Agilent 6980N 973 Network mass selective detector
Column	BPX-70 (70% cyanopropyl polysilphenylenesiloxane) capillary column, 25 m x 0.32 mm ID, 0.25 μm film thickness
Carrier gas	Helium
Flow rate	1.5 mL/min
Detector	FID (flame ionization detector) at 300 $^{\circ}\text{C}$

Temperature gradient	160 °C to 210 °C at 2 °C/min, then 210 °C to 240 °C at 5 °C/min
Injection	1 µL with split mode ratio 25 : 1, at 260 °C

4.1.5 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ GC และ GC/MS (สำหรับเฮกเทอโรโพลีแซคคาไรด์)

GC condition

Equipment	Shimadzu GC-17A
Column	BPX-5 (5% phenyl polysilphenylene-siloxane) 0.25 mmID x 30 m., 0.25 µm film thickness
Carrier gas	Helium
Pressure	180 kPa
Detector	FID (flame ionization detector) at 360 °C
Temperature gradient	110 °C hold 2 min, then 110 °C to 250 °C at 6°C/min
Injection	1 µL with split mode ratio 100: 1, at 260 °C

GC/MS condition

Equipment	Agilent 6980N 973 Network mass selective detector
Column	BPX-5 (5% phenyl polysilphenylene-siloxane) 0.25 mmID x 30 m., 0.25 µm film thickness
Carrier gas	Helium
Flow rate	1.5 mL/min
Detector	FID (flame ionization detector) at 360 °C
Temperature gradient	110 °C hold 2 min, then 110 °C to 250 °C at 6°C/min
Injection	1 µL with split mode ratio 100: 1, at 260 °C

4.2 การวิเคราะห์ anomeric configuration ของโพลีเมอร์ โดยใช้ Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

ทำการวิเคราะห์โดย ^{13}C NMR (AVANCE 300 MHz Digital NMR Spectrometer รุ่น DPX-300 ของ Bruker) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์แตกต่างกัน เนื่องจากความสามารถในการละลายของโพลีเมอร์ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ^{13}C NMR ของโพลิเมอร์

Polymer produced from	สภาวะในการวิเคราะห์	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (mg/mL)
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	Solid	-	-
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	Liquid	Dimethylsulfoxide-D6	12.5
<i>Cookenia tricholoma</i> BCC2468	Liquid	Dimethylsulfoxide-D6	80
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	Liquid	Dimethylsulfoxide-D6	12.5
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	Liquid	Dimethylsulfoxide-D6	50
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	Liquid	Deuterium oxide	50
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	Liquid	Dimethylsulfoxide-D6	50
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	Liquid	Dimethylsulfoxide-D6	20
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	Solid	-	-

5. การทดสอบความเป็นพิษและการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ และการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ส่งตัวอย่างโพลิเมอร์ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ KB (Oral human epidermal carcinoma), BC (Breast cancer) และ NCI-H187 (Human, small lung cancer) และ เซลล์ของลิง คือ Vero cell line รวมทั้งตรวจฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ (*Candida albicans*) ไปห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

5.2 การทดสอบความเป็นพิษกับ mouse fibroblasts (L929) และ normal dermal human fibroblasts (NHF)

1. เตรียมตัวอย่างโดย ละลายตัวอย่างแต่ละชนิดในตัวทำละลายที่ละลายได้ดี ที่ความเข้มข้นสูงสุดของแต่ละตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 5 ตัวอย่างที่ละลายได้ใน DMSO จะนำมา centrifuge ก่อน และนำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายมาทำให้เจือจางลง 200 เท่า ด้วยสารละลายอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (growth medium) เพื่อให้ DMSO ที่เป็นตัวทำละลายมีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่นำมาทดสอบ ส่วนตัวอย่างที่ละลายในน้ำจะนำมาทำให้เจือจางลง 10 เท่าด้วย growth medium และทำให้ปลอดเชื้อโดยผ่านกระดาษกรอง (รูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน) และเก็บไว้ที่ 4°C เป็น stock solution

2. เซลล์ L929 (mouse fibroblasts; ECACC no. 85011425) และ normal dermal human fibroblasts (NHF) จาก foreskin เพาะเลี้ยงด้วย DMEM medium ซึ่งมี 10% FBS และ L-glutamine เป็นตัวเสริมอาหาร การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบจะ seed เซลล์ L929 และ NHF ลงใน 96-well plate ที่ความหนาแน่น 1×10^3 และ 3×10^3 เซลล์/หลุม ตามลำดับ เพาะเลี้ยงใน incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงจะเปลี่ยนเป็น growth medium ที่มีตัวอย่างผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่แสดงในตารางที่ 5

3. หลังจากเซลล์สัมผัสกับตัวอย่างนาน 48 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบด้วย MTT assay เพื่อวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

4. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Oneway ANOVA และ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างกับ Blank ซึ่งไม่มีสารตัวอย่างใน growth medium ค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างได้จากการอ่านค่า 8 หลุม ($n = 8$)

หมายเหตุ: เกณฑ์การตัดสินความเป็นพิษของสารตัวอย่าง คือ ถ้าสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 50 หรือ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถทำให้จำนวนเซลล์ลดลงเหลือร้อยละ 10 ของกลุ่มควบคุม ถือว่าสารตัวอย่างนั้นเป็นพิษต่อเซลล์ และจะต้องนำมาทดสอบความเป็นพิษอีกชั้นหนึ่ง เพื่อหาค่า IC_{50} (inhibition concentration) ของสารตัวอย่างนั้น และค่า IC_{50} เท่ากับ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ถือว่าสารนั้นเป็นพิษ (อ้างอิงตามเกณฑ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ Animal Cell Culture Laboratory, BIOTEC)

6. การทดสอบความสามารถในการสร้างสาร Interleukin (IL)-8 ของเซลล์ normal dermal human fibroblasts (NHF) หลังจากสัมผัสกับสารตัวอย่าง

วิธีการทดสอบ

1. เตรียมตัวอย่างโดยละลายสารตัวอย่างแต่ละชนิดในตัวทำละลายที่สามารถละลายได้ดี ที่ความเข้มข้นสูงสุดของแต่ละตัวอย่าง (ตารางที่ 5) ตัวอย่างที่ละลายได้ใน DMSO จะนำมา centrifuge ก่อน และนำเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายมาทำให้เจือจางลง 200 เท่าด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ความเข้มข้นของ DMSO มีค่าอยู่ที่ ร้อยละ 0.5 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่นำมาทดสอบ ส่วนตัวอย่างที่ละลายในน้ำจะทำให้เจือจางลง 10 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ตัวอย่างเหล่านี้จะถูก filter (0.2 micron) เพื่อให้ปลอดเชื้อ

2. Normal dermal human fibroblasts (NHF) จาก foreskin เพาะเลี้ยงด้วย DMEM medium ซึ่งมี 10% FBS และ L-glutamine เป็นตัวเสริมอาหาร การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบจะ seed cell ลงใน 96-well plate ที่ความหนาแน่น 3×10^3 เซลล์/หลุม เพาะเลี้ยงใน incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงจะเปลี่ยนเป็น growth medium ที่มีตัวอย่างผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตามที่แสดงในตารางที่ 5) โดยมี 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharide (LPS) เป็น positive control ที่จะกระตุ้นให้มีการสร้าง IL-8 ใน fibroblasts

3. หลังจากเซลล์สัมผัสกับตัวอย่างนาน 48 ชั่วโมง จึงเก็บอาหารในแต่ละหลุมไว้ที่ -80°C สำหรับทดสอบปริมาณ IL-8 ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป human IL-8 ELISA (Roche) โดยทดสอบตัวอย่างละ 2 หลุม ปริมาณ IL-8 ของแต่ละตัวอย่างคำนวณได้จาก standard curve ของ IL-8 ที่ทราบความเข้มข้น และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ซึ่งขั้นตอนการวัดปริมาณ IL-8 โดยสังเขปได้แสดงไว้ในภาคผนวก 3 หัวข้อ 2

4. เติม fresh medium ให้กับเซลล์ที่ยังคงอยู่ใน 96-well plate และนำมาทดสอบปริมาณเซลล์โดย MTT assay ในส่วนของ NHF cells เพื่อทดสอบว่าสารเหล่านี้ยับยั้งการเจริญของเซลล์หรือไม่

ตารางที่ 5 การละลายของโพลิเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

Code	Sample from	Max. concentration (mg/mL)	Final concentration (µg/mL)	Solvent
#1	<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	13	65	Water
#2	<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	1	50	Water
#3	<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	8	40	DMSO
#4	<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	10	50	DMSO
#5	<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	10	50	DMSO
#6	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	10	50	DMSO
#7	<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	10	50	DMSO
#8	<i>Cookeia tricholoma</i> BCC2468	10	50	DMSO
#9	<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	10	100	Water
#10	<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	10	50	DMSO
#11	<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	10	50	DMSO
#12	<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	10	50	DMSO
#13	<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	5	25	DMSO
#14	<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	10	50	DMSO
#15	<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	1	5	DMSO
#16	<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	10	100	Water

ผลการทดลอง และวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อราตัวแทนเพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตโพลีเมอร์

1.1 ลักษณะของเชื้อที่เจริญบนอาหาร PDA

ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่อายุ 7 วัน มีลักษณะแตกต่างกันไป ดังแสดงใน ตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA

เชื้อ	ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	ไมซีเลียมมีสีขาวฟู เป็นปุย
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	เชื้อมีสีเหลืองอมส้ม ไม่ฟู ผิวด้าน ไม่เห็นเส้นสายของไมซีเลียมเหมือนเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	ไมซีเลียมมีสีขาวปนเทา มีสีน้ำตาลปนอยู่เล็กน้อย ฟูเล็กน้อย
<i>Cookeia tricholoma</i> BCC2468	เป็นเชื้อราในกลุ่ม Basidiomycete ไมซีเลียมมีสีน้ำตาลอ่อน ฟูเล็กน้อย เส้นใยที่มีอายุมากจะมีสีเข้ม ส่วนเส้นใยที่ยังอ่อนอยู่จะมีสีอ่อนกว่า
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	ไมซีเลียมมีสีขาว ฟู ปุย
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	ไมซีเลียมมีสีขาว ฟู เป็นปุย
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	ไมซีเลียมมีสีน้ำตาลอ่อน อาหารมีสีเหลือง
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	ไมซีเลียมมีสีขาวอมเทา ฟูเล็กน้อย
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	ไมซีเลียมมีสีเหลืองนวล อาหารมีสีเหลืองนวล
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	ไมซีเลียมมีสีเทาอ่อน ปนสีน้ำตาลอ่อน ไม่ฟู
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	ไมซีเลียมไม่เป็นเส้นสาย เจริญรวมกันเป็นก้อนเล็ก ๆ มีสีเหลือง
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	ไมซีเลียมมีสีขาว ฟูเล็กน้อย บางส่วนของไมซีเลียมมีสีเทาปนอยู่ด้วย อาหารมีสีเหลือง
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	ไมซีเลียมมีสีขาวอมเขียวอ่อน ฟู ปุย
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	ไมซีเลียมมีสีส้มจนถึงสีเหลืองอ่อน ไล่ระดับกัน มี synnemata เจริญอยู่ด้วย อาหารมีสีเหลืองอมส้ม
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	ไมซีเลียมมีสีขาวปนน้ำตาล ไม่ฟูมากนัก
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	ไมซีเลียมมีสีครีม เจริญ และรวมตัวกันแน่น ไม่ฟู

1.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำหมักระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB โดยทำการเก็บเชื้อทุก 3 วัน พบว่าการเจริญของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในตารางที่ 7

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด ตลอดระยะเวลา 21 วัน พบว่าเชื้อจำนวนหนึ่งสร้างสารที่ทำให้น้ำหมักมีความหนืดอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่วันที่ 15 เป็นต้นไป ได้แก่ *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Fusarium coccophilum* BCC2415 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 ในขณะที่ *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Gibellula pulchra* BCC2711 สร้างสารที่ทำให้น้ำหมักมีความหนืดได้ตั้งแต่วันที่ 6-12 หลังจากเริ่มเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้ออีกจำนวนหนึ่ง เช่น *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cookeia trichcloma* BCC2468, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Torrubiella tenuis* BCC1506 และ *Zygosporium masonii* BCC7543 สร้างสารที่ให้ความหนืดน้อยซึ่งสังเกตเห็นได้จากการที่น้ำหมักค่อนข้างใส

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของน้ำหมักระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	3	น้ำหมักใส เชื้อรามีสีขาว มีขนาดเล็กและใหญ่เจริญผสมกัน กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
	6	น้ำหมักใส เชื้อรามีสีขาวเจริญเป็นเม็ดกลมๆ น้ำหมักหนืดเล็กน้อย มี wall growth
	9	น้ำหมักใส เชื้อรามีสีขาว รวมตัวกันเป็นเม็ด มี wall growth สีขาว
	12	น้ำหมักใส เชื้อรามีสีขาว มี wall growth สีเดียวกันกับสีของเชื้อ เชื้อราเจริญเป็นเม็ดกระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
	15	น้ำหมักใส เชื้อรามีสีขาว น้ำหมักหนืด มี wall growth สีเดียวกันกับสีของเชื้อ เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มที่มีขนาดโตขึ้น
	18	น้ำหมักใส หนืด เชื้อรามีสีขาว มี wall growth สีเดียวกันกับสีของเชื้อรา เชื้อราเจริญรวมตัวกันเป็นก้อนที่มีขนาดต่างกัน
	21	น้ำหมักใส หนืด ต้องเจือจางน้ำหมักด้วยน้ำกลั่น เชื้อรามีสีขาว มี wall growth เชื้อราเจริญเป็นเม็ดกระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก

เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	3	น้ำหมักใส เชื้อราเจริญเพียงเล็กน้อย น้ำหมักไม่หนืดมากนัก แต่พบว่าหลังจากเติมเอธานอล (4 vol.) ลงไป มีตะกอนเกิดขึ้นใน ปริมาณค่อนข้างมาก
	6	น้ำหมักใสมีสีเหลือง เชื้อราเจริญเป็นเม็ดเล็กๆ มีสีเดียวกันกับสี ของน้ำหมัก
	9	น้ำหมักใส มีสีเหลือง เชื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดเล็กๆ มี สีเดียวกันกับสีของน้ำหมัก
	12	น้ำหมักใส มีสีเหลือง เชื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดเล็กๆ เชื้อมี สีเดียวกันกับสีของน้ำหมัก
	15	น้ำหมักใส มีสีเหลือง เชื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดเล็กๆ มีสี เดียวกันกับสีของน้ำหมัก น้ำหมักเริ่มหนืดเพิ่มมากขึ้น ต้องเจือ จางน้ำหมักด้วยน้ำกลั่น (1 vol.)
	18	น้ำหมักใส น้ำหมักมีสีเหลือง เชื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ด เล็ก ๆ น้ำหมักหนืด ต้องเจือจางน้ำหมักด้วยน้ำกลั่น (1 vol.) มี เชื้อราบางส่วนเจริญและเกาะอยู่ข้างพลาสติก มีสีขาว และเหลืองปนกัน
21	น้ำหมักใส มีสีเหลือง เชื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดเล็ก ๆ บางส่วนรวมตัวกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ เชื้อรา มีสีเดียวกันกับสี ของน้ำหมัก มีเชื้อราบางส่วนเจริญ และเกาะอยู่ข้างพลาสติก มีสี ขาว และเหลืองปนกัน	
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	3	น้ำหมักมีสีเหลืองนวล ขุ่นขึ้น เชื้อราเจริญเป็นก้อนเล็กๆ น้ำหมัก มีลักษณะคล้ายกับน้ำแป้ง
	6	น้ำหมักมีสีเหลืองนวล เชื้อราเจริญเป็นแผ่นซึ่งต่างจากสายพันธุ์ อื่นที่เจริญเป็นก้อนเล็ก ๆ
	9	น้ำหมักมีสีเหลืองนวล น้ำหมักขุ่น เชื้อรา มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายทั่วน้ำหมัก
	12	น้ำหมักมีสีเหลืองนวล น้ำหมักขุ่น เชื้อรารวมตัวกันเป็นแผ่น
	15	น้ำหมักและเชื้อรา มีสีเหลืองนวล เชื้อราเจริญรวมตัวกันเป็นก้อน ขนาดใหญ่
	18	เชื้อราเจริญโดยรวมตัวกันเป็นแผ่น เชื้อราและน้ำหมักมีสีเหลือง

เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	21	น้ำหมักไม่เหนียว เชื้อราไม่มีสีเหลืองนวล เจริญและรวมตัวกันเป็นแผ่นขนาดใหญ่
<i>Cookeia tricholoma</i> BCC2468	3	น้ำหมักใส เชื้อราไม่มีสีครีม รวมตัวกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ ลักษณะนุ่มเหมือนแป้งที่สุกเนื่องจากโดนความร้อน
	6	น้ำหมักใส ไม่เหนียว สีของน้ำหมักเป็นสีเดิมของอาหาร เชื้อราไม่มีสีครีม รวมตัวเป็นก้อน
	9	น้ำหมักใส ไม่เหนียว น้ำหมักมีน้ำตาลอ่อนอมเขียว เชื้อราไม่มีสีน้ำตาลอ่อน ๆ เชื้อรารวมตัวกันเป็นก้อน
	12	น้ำหมักใส ไม่เหนียว น้ำหมักมีสีน้ำตาลอ่อนอมเขียว เชื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ เชื้อราเริ่มมีสีเข้มขึ้น
	15	น้ำหมักใส ไม่เหนียว น้ำหมักมีสีน้ำตาล อมเขียว เชื้อรารวมตัวกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ ผิวภายนอกของเชื้อราดูเมือก มีสีครีมจนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีไมซีเลียมเจริญตรงส่วนนอกของก้อนเชื้อรา
	18	น้ำหมักใส ไม่เหนียว น้ำหมักมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น เชื้อรารวมตัวกันเป็นก้อน โดยก้อนของเชื้อราจะมีสีเข้มขึ้น
	21	น้ำหมักใส ไม่เหนียว เชื้อรารวมตัวกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ มีสีครีม น้ำตาล และน้ำตาลเข้ม จากบริเวณส่วนกลางของก้อนเชื้อรา จนถึงรอบนอก และมีไมซีเลียมเจริญตรงบริเวณรอบนอก
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	3	น้ำหมักมีสีน้ำตาล เชื้อราเจริญเป็นก้อนเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก น้ำหมักไม่เหนียวมากนัก
	6	น้ำหมักมีสีน้ำตาล น้ำหมักเหนียว เชื้อราเจริญและกระจายทั่วน้ำหมัก
	9	น้ำหมักมีสีน้ำตาล น้ำหมักเหนียว เชื้อราเจริญเป็นก้อนเล็กๆ มีลักษณะเหมือนเมล็ดข้าว
	12	น้ำหมักมีสีน้ำตาล น้ำหมักเหนียว เชื้อราเจริญเป็นก้อน รูปร่างต่างกัน มีทั้งเป็นก้อนกลม ๆ และลักษณะคล้ายเมล็ดข้าว
	15	น้ำหมักมีสีน้ำตาล น้ำหมักเหนียว เชื้อราเจริญเป็นก้อน มีรูปร่างต่างกัน เป็นก้อนกลม ๆ และลักษณะคล้ายเมล็ดข้าว
	18	น้ำหมักและเชื้อราไม่มีสีน้ำตาล น้ำหมักเหนียว เชื้อราไม่มีรูปร่างต่างกัน เป็นก้อนกลม ๆ และมีลักษณะคล้ายเมล็ดข้าว

เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	21	น้ำหมัก และเชื้อรา มีสีน้ำตาล น้ำหมักค่อนข้างหนืดมาก เชื้อราเริ่มแตกตัวเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำหมัก
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	3	น้ำหมักใส ไม่ซีเลียมมีสีขาว เป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก ก่อนเชื้อรา มีไซเลียมคล้ายหนามอยู่รอบ ๆ
	6	น้ำหมักใส ไม่ซีเลียมมีสีขาว เป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก น้ำหมักหนืดเล็กน้อย
	9	น้ำหมักใส น้ำหมักหนืด มีสีน้ำตาลอ่อน เชื้อรา มีสีขาวนวล รวมตัวกันเป็นก้อนเล็ก ๆ มี wall growth
	12	น้ำหมักใส หนืด มี wall growth (สีเหลืองนวล) เชื้อรา มีสีเหลืองนวล เจริญเป็นก้อนกลมๆ
	15	น้ำหมักมีสีเหลืองนวล น้ำหมักหนืด เชื้อรา รวมตัวกันเป็นเม็ดที่มีขนาดโตขึ้น เชื้อรา มีสีเดียวกันกับสีของน้ำหมัก มี wall growth
	18	น้ำหมักมีสีเหลืองนวล น้ำหมักหนืดมาก มี wall growth เล็กน้อย เชื้อรา เจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดที่มีขนาดโตขึ้น เชื้อรา มีสีเดียวกันกับสีของน้ำหมัก
21	น้ำหมักมีสีเข้มขึ้น น้ำหมักหนืดมาก ต้องเจือจางด้วยน้ำกลั่น เชื้อรา เจริญเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำหมัก มี wall growth เล็กน้อย	
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	3	น้ำหมักใส ไม่หนืด เชื้อรา เจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดสีขาว มี wall growth เล็กน้อย
	6	น้ำหมักใส ไม่หนืด เชื้อรา เจริญเป็นเม็ดกลม เล็ก คล้ายเม็ดสาเก มีสีขาว มี wall growth เล็กน้อย
	9	น้ำหมักใส เชื้อรา เจริญเป็นเม็ดกลม มีสีขาวขุ่น น้ำหมักไม่หนืด มี wall growth
	12	น้ำหมักใส มีสีเหลือง เชื้อรา มีสีขาวเป็นเม็ดกลม น้ำหมักไม่หนืด มี wall growth
	15	น้ำหมักใส หนืดเล็กน้อย มี wall growth เชื้อรา เจริญเป็นเม็ดกลม
	18	น้ำหมักใส หนืดเล็กน้อย มีสีเหลือง เชื้อรา มีสีขาว เจริญเป็นเม็ดกลม มี wall growth สีขาว
21	น้ำหมักใส มีสีเหลือง หนืดเล็กน้อย เชื้อรา มีสีขาว เจริญเป็นเม็ดกลม มี wall growth สีขาว	

เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	3	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล ให้ตาเล เซื้อราเจริญเพียงเล็กน้อย ผลหลังจากการเติมเอธานอล (4 vol ผลเหมือนกันคือ มีตะกอนเกิดขึ้นในปริมาณค่อนข้างมาก
	6	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล เซื้อราเจริญ และรวมตัวกันเป็นก้อน
	9	น้ำหมักมีสีน้ำตาล ใส เซื้อราที่มีสีเดียวกันกับสีของน้ำหมัก เซื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นกลุ่ม และมีลักษณะคล้ายหนามเล็กๆ ออกมาจากก้อนของเซื้อรา คาดว่าอาจจะเป็นไมซีเลียมของเชื้อ
	12	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล น้ำหมักเริ่มหนืดเพิ่มมากขึ้น ต้องเจือจางน้ำหมักด้วยน้ำ (1 vol.) เซื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นก้อนเล็กๆ
	15	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล เซื้อราที่มีสีเดียวกันกับสีของน้ำหมัก เซื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดเล็กๆ น้ำหมักหนืด ต้องเจือจางน้ำหมักด้วยน้ำ (1 vol.)
	18	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล เซื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดเล็กๆ เซื้อราที่มีสีเดียวกันกับสีของน้ำหมัก เซื้อราบางส่วนเจริญ และรวมตัวเป็นก้อนขนาดใหญ่ น้ำหมักหนืด ต้องเจือจางน้ำหมักด้วยน้ำ (1 vol.)
21	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล น้ำหมักหนืด ต้องเจือจางน้ำหมักด้วยน้ำ (1 vol.) เซื้อราที่มีสีเดียวกันกับสีของน้ำหมัก รวมตัวกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดโตขึ้น	
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	3	น้ำหมักใส ไม่หนืด เซื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดสีขาว มี wall growth
	6	น้ำหมักใส เซื้อรากระจายทั่วน้ำหมัก มี wall growth
	9	น้ำหมักใส ไม่หนืด เซื้อรารวมตัวกันเป็นก้อนขนาดใหญ่มีสีขาวนวล มี wall growth สีขาวนวล
	12	น้ำหมักใส ไม่หนืด เซื้อราที่มีสีขาวนวล รวมตัวกันเป็นก้อน มี wall growth สีขาวนวล
	15	น้ำหมักใส ไม่หนืด มีสีเหลือง เซื้อรารวมตัวกันเป็นก้อน ก้อนเซื้อราที่มีสีเหลืองนวล
	18	น้ำหมักใส ไม่หนืด มีสีเหลือง เซื้อรารวมตัวกันเป็นก้อน และบางส่วนเป็นเศษเล็ก ๆ กระจายทั่วน้ำหมัก มี wall growth

เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	21	น้ำหมักใส ไม่หนืด มีสีเหลือง เชื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นก้อน มี wall growth เล็กน้อย
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	3	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล เชื้อราเจริญเป็นเม็ดเล็กๆ (เล็กมาก) กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
	6	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล น้ำหมักไม่หนืด เชื้อราเจริญเป็นเม็ดเล็กๆ มีสีน้ำตาลอมเทา
	9	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล เชื้อราเจริญเป็นเม็ดกลม มีขนาดเล็ก น้ำหมักไม่หนืด เชื้อราสีน้ำตาลอมเทา
	12	น้ำหมักใส มีสีน้ำตาล ไม่หนืด เชื้อราเจริญเป็นเม็ดเล็กๆ มีสีน้ำตาลอมเทา
	15	น้ำหมักมีสีน้ำตาล ใส ไม่หนืด เชื้อราเจริญเป็นเม็ดเล็ก ๆ มีสีน้ำตาลอมเทา
	18	น้ำหมักมีสีน้ำตาล ใส ไม่หนืด มี wall growth (สีน้ำตาลอมเทา) เชื้อราเจริญเป็นเม็ดเล็ก ๆ มีน้ำตาลอมเทา กระจายทั่วน้ำหมัก
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	3	น้ำหมักใส ไม่หนืด เชื้อราสีเหลือง เจริญเป็นเม็ดๆ มีขนาดเล็ก กระจายอยู่ในน้ำหมัก
	6	น้ำหมักใส ไม่หนืด เชื้อราสีเหลืองอมส้ม รวมตัวกันเป็นเม็ดที่มีขนาดเล็ก มี wall growth สีเหลืองอมส้มเช่นกัน
	9	น้ำหมักใส ไม่หนืด มีสีเหลืองอมส้ม เจริญเป็นเม็ดเล็กๆ มี wall growth สีเหลืองอมส้ม
	12	น้ำหมักใส ไม่หนืด เชื้อราสีเหลืองอมส้ม เจริญเป็นเม็ดเล็กๆ มี wall growth สีเดียวกัน
	15	น้ำหมักใส ไม่หนืด เชื้อราสีเหลืองอมส้ม มี wall growth สีเดียวกัน เชื้อราเจริญเป็นเม็ดกระจายทั่วน้ำหมัก
	18	น้ำหมักใส ไม่หนืด เชื้อราสีเหลืองอมส้ม รวมตัวกันเป็นเม็ด กระจายทั่วน้ำหมัก มี wall growth สีเดียวกัน
	21	น้ำหมักใส ไม่หนืด เชื้อราสีเหลืองอมส้ม เชื้อราเจริญเป็นเม็ด มี wall growth สีเหลืองอมส้ม

เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	3	น้ำหมักขุ่น เชื้อราไม่มีสีขาว กระจายทั่วน้ำหมัก มีลักษณะเป็นเส้นสายของไมซีเลียมเล็ก ๆ
	6	เชื้อราไม่มีสีขาวนวล น้ำหมักขุ่นเล็กน้อยเนื่องจากการกระจายตัวของไมซีเลียม มี wall growth
	9	น้ำหมักขุ่น มีสีขาวนวล เชื้อราเจริญเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำหมัก คล้ายน้ำแป้ง มี wall growth
	12	น้ำหมักขุ่น สีขาวนวล เชื้อราเจริญเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำหมัก มี wall growth สีขาวขุ่น
	15	น้ำหมักขุ่น สีขาวนวล เชื้อราเจริญเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำหมัก คล้ายน้ำแป้ง มี wall growth สีขาวขุ่น
	18	น้ำหมักขุ่น มีสีขาวนวล เชื้อราเจริญเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำหมัก มีบางส่วนรวมตัวกันเป็นก้อน มี wall growth
	21	น้ำหมักขุ่น มีสีขาวนวล น้ำหมักหนืดเล็กน้อย เชื้อราเจริญเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำหมัก มีบางส่วนจับตัวกันเป็นก้อน มี wall growth เล็กน้อย
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	3	น้ำหมักใส เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มก้อนเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก น้ำหมักไม่ข้น ไม่หนืด
	6	น้ำหมักใส เชื้อรากระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
	9	น้ำหมักมีสีขาวขุ่น เชื้อราเจริญเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก เชื้อราไม่มีสีขาว
	12	น้ำหมักมีสีขาวขุ่น เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มก้อนที่มีขนาดโตขึ้น เชื้อราไม่มีสีขาว
	15	น้ำหมักมีสีขาวขุ่น เชื้อราไม่มีสีขาว เจริญเป็นก้อนมีขนาดต่างกัน
	18	น้ำหมักมีสีขาวขุ่น เชื้อราไม่มีสีขาว รวมตัวกันเป็นก้อนขนาดต่างกัน กระจายทั่วน้ำหมัก
	21	น้ำหมักหนืดเล็กน้อย เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มก้อนมีสีขาวขุ่น กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	3	น้ำหมักใส ไม่หนืดมีสีเหลือง เชื้อราไม่มีสีเหลือง เจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ด
	6	น้ำหมักใส ไม่หนืด มีสีเหลือง เชื้อราไม่มีสีเหลือง เป็นเม็ดกลม มี wall growth

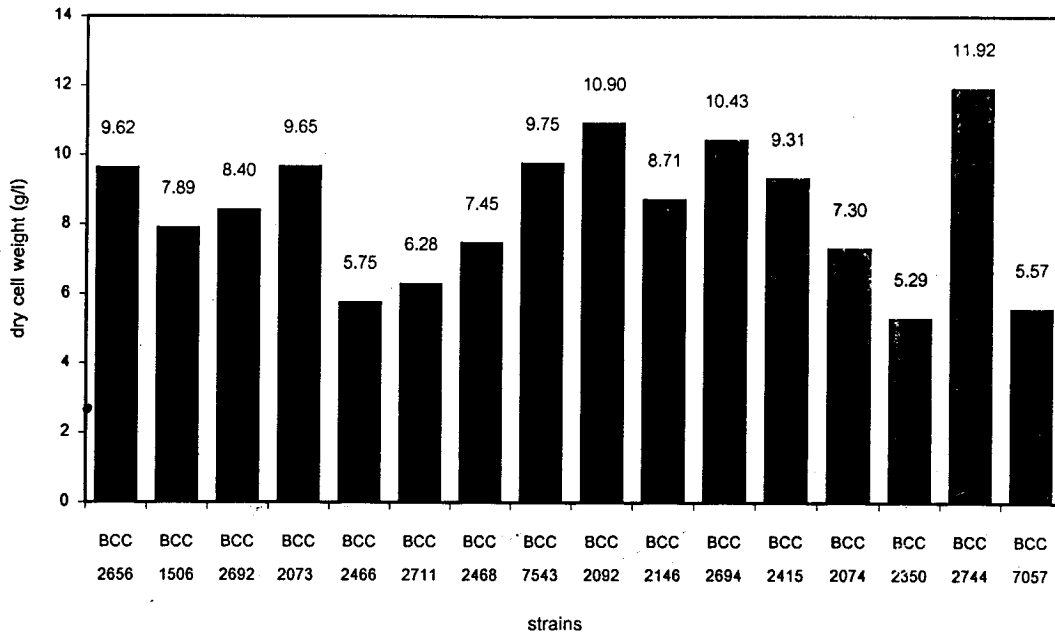
เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	9	น้ำหมักใส หนืดเล็กน้อย เชื้อราไม่มีสีเหลือง เป็นเม็ดกลม มี wall growth สีเหลือง
	12	น้ำหมักใส หนืดเล็กน้อย เชื้อราไม่มีสีเหลืองนวล เป็นเม็ดกลม มี wall growth
	15	น้ำหมักใส หนืดเล็กน้อย เชื้อราไม่มีสีเหลืองนวล เป็นเม็ดกลม มี wall growth
	18	น้ำหมักใส หนืดเล็กน้อย เชื้อราไม่มีสีเหลืองนวล เป็นเม็ดกลม มี wall growth
	21	น้ำหมักใส หนืดเล็กน้อย มีสีเหลืองนวล เป็นเม็ดกลม มี wall growth
<i>Torubiella tenuis</i> BCC1506	3	เชื้อราเจริญเป็นก้อนกระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก น้ำหมักไม่หนืด
	6	เชื้อราเจริญเป็นก้อนเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
	9	น้ำหมักมีสีน้ำตาล เชื้อราเจริญกระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
	12	น้ำหมักมีสีน้ำตาล เชื้อราไม่มีสีขาวเจริญเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
	15	น้ำหมักมีสีน้ำตาล เชื้อราไม่มีสีขาวเจริญเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
	18	น้ำหมักมีสีน้ำตาล น้ำหมักใส เชื้อราเจริญเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วน้ำหมัก
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	3	น้ำหมักใส เป็นสีเดิมของอาหาร น้ำหมักไม่หนืด เชื้อมีสีขาวขุ่น เจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายทั่วน้ำหมัก
	6	น้ำหมักใส เป็นสีเดิมของอาหาร ไม่หนืด เชื้อราไม่มีสีขาวขุ่น เป็นเม็ด มีขนาดต่างกัน
	9	น้ำหมักใส เป็นสีเดิมของอาหาร ไม่หนืด เชื้อราไม่มีสีขาวขุ่น เชื้อราเจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ด ที่มีขนาดต่างกัน
	12	น้ำหมักมีสีขาวขุ่น เชื้อราไม่มีสีขาวขุ่น เจริญและรวมตัวกันเป็นเม็ด มีขนาดต่างกัน น้ำหมักไม่หนืด

เชื้อ	อายุ (วัน)	ลักษณะการเจริญ
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	15	น้ำหมักขุ่น มีสีขาว เชื้อราเจริญเป็นเม็ดๆ บางเม็ดมีสีขาวขุ่น และบางเม็ดเป็นสีเขียวอมเทา น้ำหมักจะเหนียว เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เจริญบน PDA พบว่า เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น เชื้อที่เจริญจะมีลักษณะเหมือนกัน คือ มีสีขาวและสีเขียวอมเทา เจริญผสมกันอยู่
	18	น้ำหมักขุ่น ไม่เหนียว เชื้อราเจริญเป็นเม็ดๆ มี 2 สี ผสมกัน คือ สีขาวขุ่น และสีเขียวอมเทา
	21	น้ำหมักขุ่น ไม่เหนียว เชื้อราเจริญเป็นเม็ดๆ มี 2 สีผสมกัน คือ สีขาวขุ่น และสีเขียวอมเทา

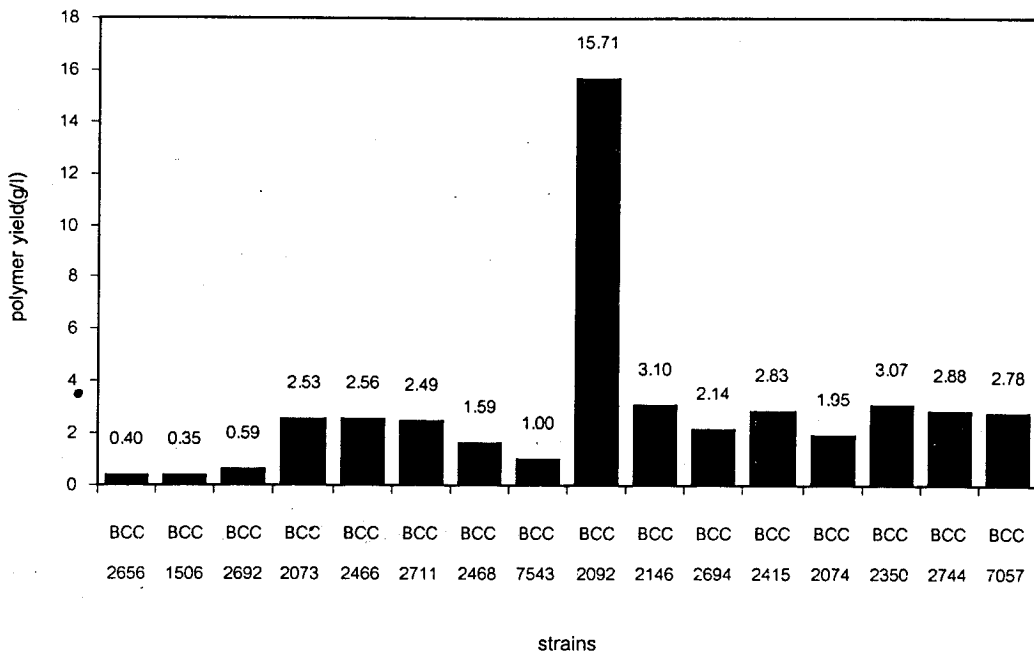
1.3 การเจริญและการผลิตโพลิเมอร์ของเชื้อ

เชื้อแต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญ (วัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง) และให้ผลผลิตโพลิเมอร์สูงสุดในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์ผลิตได้ มีค่าอยู่ในช่วง 5.3 – 11.9 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 5) เชื้อที่ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 (11.92 กรัมต่อลิตร, 15 วัน) ส่วนผลผลิตโพลิเมอร์สูงสุดที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์ผลิตได้ มีค่าอยู่ในช่วง 0.4 – 16 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 6) โดยเชื้อที่ให้ผลผลิตโพลิเมอร์สูงสุด คือ *Cordyceps nipponica* BCC2092 (15.71 กรัมต่อลิตร, 18 วัน) พบว่า ผลผลิตโพลิเมอร์จากเชื้อราบางสายพันธุ์มีค่าต่ำมาก โดยค่าที่ได้มีค่าต่ำกว่า 1 กรัมต่อลิตร ได้แก่ *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 (0.40 กรัมต่อลิตร, 18 วัน), *Torrubiella tenuis* BCC1506 (0.35 กรัมต่อลิตร, 18 วัน) และ *Beauveria bassiana* BCC2692 (0.59 กรัมต่อลิตร, 21 วัน) ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้อาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตโพลิเมอร์ของเชื้อ ถ้าหากมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องอาจทำให้ผลผลิตของโพลิเมอร์ที่ได้มีค่าสูงขึ้น

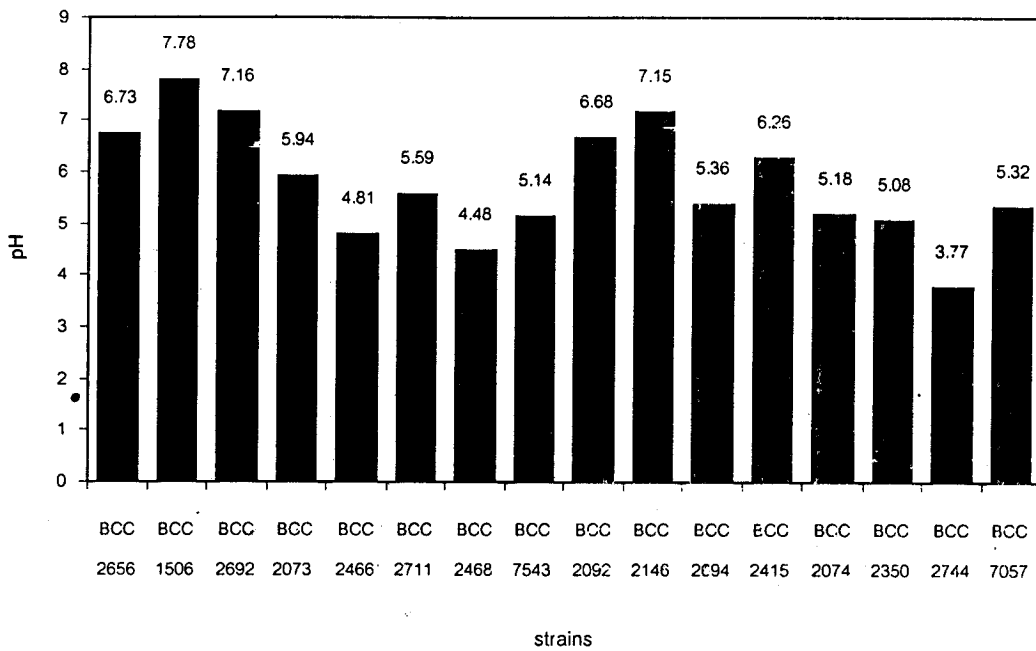
ค่าพีเอชของน้ำหมักของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (วันที่เชื้อให้ผลผลิตโพลิเมอร์สูงสุด) มีค่าอยู่ในช่วง 4.0 – 8.0 (รูปที่ 7) และปริมาณน้ำตาลที่เชื้อนำไปใช้ในการเจริญและการผลิตโพลิเมอร์ (วันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ) มีค่าอยู่ในช่วง 60 – 100 % ของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (รูปที่ 8) ซึ่งโดยทั่วไปพบว่าเมื่อจุลินทรีย์เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอน 50 – 55 เปอร์เซ็นต์ ไปใช้ในการสังเคราะห์เซลล์ (สมใจ ศิริโชค, 2537).



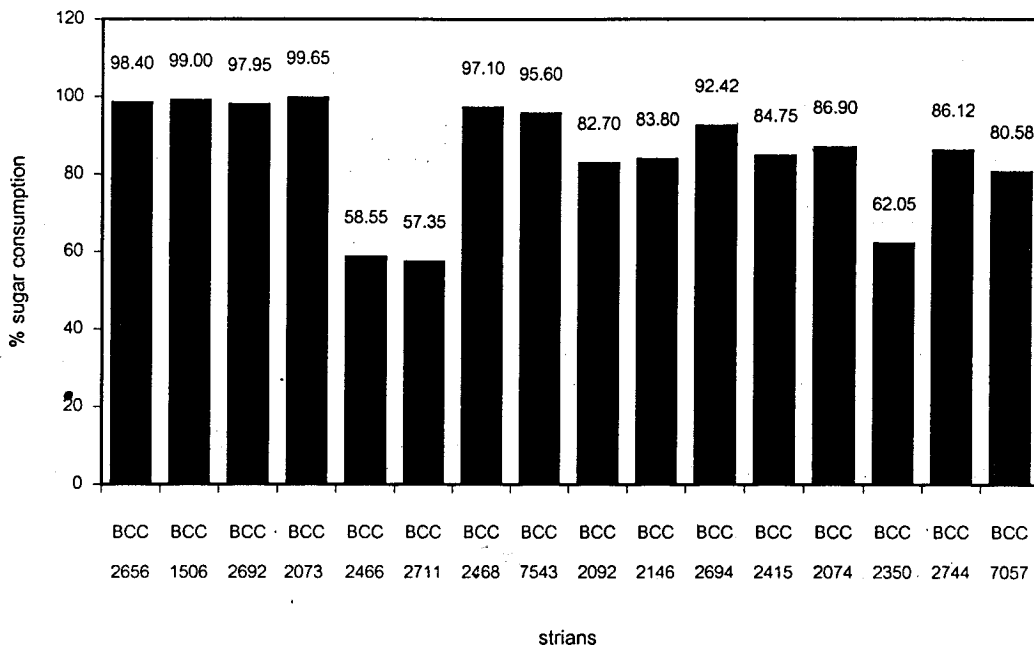
รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเขย่าตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 6 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโพลิเมอร์สูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเขย่าตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 7 ค่าเฉลี่ยค่าพีเอชของน้ำหมัก (วันที่เชื้อให้ผลผลิตโพลิเมอร์สูงสุด) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 8 ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เชื้อใช้ในการเจริญและการสร้างโพลีเมอร์ (วันที่ 21) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยใช้ หัวเขย่าตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์

1.4 ลักษณะของโพลิเมอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ลักษณะของโพลิเมอร์ที่ได้หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกันคือ ฟู นุ่ม แตกต่างกันเฉพาะสีของโพลิเมอร์ ซึ่งมีสีเขียวมากน้อยต่างกันและสีขาว ดังแสดงในตารางที่ 8 สีที่เกิดขึ้นมีความเข้มต่างกัน อาจเกิดจากรงควัตถุ (pigment) หรือสารอื่นที่เชื่อมต่อกับสายโซ่ของโพลิเมอร์ ซึ่งไม่สามารถถูกกำจัดออกในขั้นตอนการทำให้โพลิเมอร์บริสุทธิ์

ตารางที่ 8 ลักษณะภายนอกของโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ

เชื้อ	ลักษณะ
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	ฟู, สีขาว
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	ฟู, สีขาว
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	ฟู, สีเขียว (+)
<i>Cookenia tricholoma</i> BCC2468	ฟู, สีขาว
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	ฟู, สีเขียว (++)
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	ฟู, สีขาว
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	ฟู, สีขาว
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	ฟู, สีเขียว (+)
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	ฟู, สีขาว
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	ฟู, สีเขียว (+)
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	ฟู, สีเขียว (+++)
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	ฟู, สีขาว
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	ฟู, สีเขียว (+)
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	ฟู, สีขาว
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	ฟู, สีเขียว (+)
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	ฟู, สีเขียว (+)

หมายเหตุ: จำนวน (+) บ่งชี้ถึงความเข้มของสี

2. การวิเคราะห์สมบัติของโพลิเมอร์

2.1 ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายของโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ แสดงในตารางที่ 9 ทำให้ทราบว่า โพลิเมอร์ที่ได้ทั้งหมดเป็นโพลิเมอร์ที่มีขั้วค่อนข้างสูง เนื่องจากสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ และ

DMSO ได้ดี จากผลการทดลองนี้ สามารถทำการรูปแปลงโพลิเมอร์ออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามความสามารถในการละลายคือ

1) กลุ่มโพลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ดี เช่น โพลิเมอร์ที่ได้จาก *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Fusarium coccophilum* BCC2415 และ *Paecilomyces tenuipes* BCC2656

2) กลุ่มโพลิเมอร์ที่ละลายได้ดีใน DMSO ซึ่งมีขั้วน้อยกว่าน้ำ ได้แก่ โพลิเมอร์ที่ได้จาก *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Cookenia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744

3) กลุ่มโพลิเมอร์ที่ละลายได้ดีในทั้งสองตัวทำละลาย ได้แก่ โพลิเมอร์ที่ได้จาก *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Torrubiella tenuis* BCC1506 และ *Zygosporium masonii* BCC7543

ตารางที่ 9 ความสามารถในการละลายของโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อวาสาเส้นใยต่างๆ

เชื้อ	น้ำ	DMSO	Acetonitrile	เอทานอล	เฮกเซน
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	++	++	-	-	-
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	+	++	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	++	+	-	-	-
<i>Cookenia tricholoma</i> BCC2468	+	++	-	-	-
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	++	-	-	-	-
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	+	++	-	-	-
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	+	-	-	-	-
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	+	++	-	-	-
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	+	++	-	-	-
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	++	++	-	-	-
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	+	++	-	-	-
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	+	++	-	-	-
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	++	+	-	-	-
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	+	++	-	-	-
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	++	++	-	-	-
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	++	++	-	-	-

หมายเหตุ: ++ ละลาย, + ละลายได้บางส่วน, - ไม่ละลาย

2.2 น้ำหนักโมเลกุล

จากผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 10) พบว่าโพลิเมอร์จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 และ *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 มีค่าน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ คือ 2.8×10^3 และ 4.8×10^3 ดาลตัน ตามลำดับ โพลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุด คือ โพลิเมอร์จาก *Hirsutella* sp. BCC7057 คือ 1.19×10^7 ดาลตัน โดยที่ค่าที่ได้เป็นน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์ส่วนที่ละลายใน 0.1 M NaOH ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์ โพลิเมอร์จาก *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074, *Phytocordyceps* sp. BCC2744 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506 เป็นโพลิเมอร์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 1 ค่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการสังเคราะห์โพลิเมอร์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ในกระบวนการสังเคราะห์อาจได้สายโพลิเมอร์ที่มีสายโซ่โพลิเมอร์ที่มีความยาวแตกต่างกัน หรือมีสารมากกว่าหนึ่งชนิดรวมกันอยู่จึงทำให้น้ำหนักโมเลกุลที่อ่านได้มีหลายค่า

ตารางที่ 10 น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์

สายพันธุ์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	8.5
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	114.7 และ 11.5
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	13.8
<i>Cookeia tricholoma</i> BCC2468	28.5
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	20.1
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	208.3 และ 15.6
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	2.8
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	73.2 และ 12.8
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	11941 และ 2562 และ 13.8
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	161.4 และ 40.7
<i>Hypocrella tamurai</i>	99.9 และ 9.2
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	120.4 และ 14.2
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	4.8
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	9162 และ 9.3
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	21.8 และ 5.7
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	23.2

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโพลิเมอร์

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโพลิเมอร์โดยใช้ Colorimetric Methods

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโพลิเมอร์โดยใช้ Colorimetric Methods (ตารางที่ 11) สามารถแบ่งโพลิเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ

ตารางที่ 11 องค์ประกอบของโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ วิเคราะห์โดยใช้ Colorimetric Methods

เชื้อ	องค์ประกอบ (%)			
	น้ำตาลทั้งหมด	กรดยูโรนิก	น้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน	โปรตีน
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	31.74	20.30	0.20	2.81
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	76.42	15.42	0.12	1.44
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	31.59	14.58	0.18	9.18
<i>Cookenia tricholoma</i> BCC2468	67.88	14.28	n.d.	0.88
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	30.81	19.24	0.34	16.78
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	85.29	14.90	0.13	2.24
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	17.07	4.94	0.80	69.22
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	86.19	13.60	n.d.	2.71
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	76.82	10.46	0.44	10.57
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	30.52	18.78	0.25	4.74
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	89.37	13.52	n.d.	1.58
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	80.30	14.86	n.d.	1.93
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	31.16	8.14	0.22	19.43
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	60.87	13.35	0.24	24.91
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	30.53	11.20	0.07	12.02
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	30.68	15.68	0.08	11.67

หมายเหตุ n.d. = not detected

- โพลิเมอร์ชนิดโพลิแซคคาไรด์ โพลิเมอร์ในกลุ่มนี้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cookenia*

tricholoma BCC2468, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, *Phytocordyceps* sp. BCC2744, *Torrubiella tenuis* BCC1506 และ *Zygosporium masonii* BCC7543

- โพลีเมอร์ชนิดโปรตีน โพลีเมอร์ในกลุ่มนี้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก แต่ทั้งนี้โพลีเมอร์ที่ได้อาจอยู่ในรูปของน้ำตาลรวมกับโปรตีน ได้แก่ โพลีเมอร์จากเชื้อรา *Fusarium coccophilum* BCC2415

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Colorimetric Methods เป็นการแบ่งกลุ่มโพลีเมอร์อย่างหยาบๆ เท่านั้น ชนิดของน้ำตาล และกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโพลีเมอร์ ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธีที่ทำให้ผลการทดลองที่มีความละเอียดและแม่นยำสูงขึ้นในการทดลองขั้นต่อไป

3.2 การหาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลีเมอร์

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 12) พบว่าโพลีเมอร์จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงมาก (~70%) และเมื่อนำมาศึกษาองค์ประกอบในส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (~16%) พบว่า ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบิโนส (8.65 %mol) น้ำตาลไซโลส (14.88 %mol) น้ำตาลแมนโนส (22.84 %mol) น้ำตาลกาแลคโตส (38.06 %mol) และน้ำตาลกลูโคส (15.57 %mol) เป็นองค์ประกอบ

ส่วนในราอื่น ๆ พบว่าโพลีเมอร์จาก *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Cookenia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 และ *Zygosporium masonii* BCC7543 เป็นโพลีเมอร์ชนิด "กลูแคน" ทั้งนี้เนื่องจากประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก

โพลีเมอร์ที่ได้จาก *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, *Phytocordyceps* sp. BCC2744 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506 มีน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และ กาแลคโตส เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีสัดส่วนของน้ำตาลทั้งสามชนิดแตกต่างกันไป นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่าโพลีเมอร์ที่ได้จาก *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 นอกเหนือจากมีน้ำตาลทั้งสามชนิดแล้ว ยังมีโปรตีนปริมาณค่อนข้างสูง (~17 - 25 %, ตารางที่ 11) อยู่ในโมเลกุลด้วย จึงได้นำตัวอย่างดังกล่าวมาวิเคราะห์หาชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในขั้นต่อไป (หัวข้อ 3.3)

ตารางที่ 12 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลิเมอร์

สายพันธุ์	ปริมาณ (% mol)				
	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
<i>Akanthomyces pistilliformis</i> BCC2694	-	-	9.42	2.54	88.04
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	-	-	5.65	2.32	92.03
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	-	-	42.68	28.23	29.09
<i>Cookeia tricholoma</i> BCC2468	-	-	-	-	100
<i>Cordyceps dipterigena</i> * BCC2073	-	-	28.17	26.88	44.95
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	-	-	7.19	1.68	91.13
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	8.65	14.88	22.84	38.06	15.57
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	-	-	5.04	-	94.96
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	-	-	33.06	32.54	34.40
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	-	-	6.03	3.35	90.62
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	-	-	-	-	100
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	-	-	11.29	14.01	74.70
<i>Paecilomyces tenuipes</i> * BCC2656	-	-	48.09	25.94	25.97
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	-	-	35.40	55.88	8.72
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	-	-	27.72	72.28	-
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	-	-	26.28	23.60	50.12

หมายเหตุ :

*ใช้ condition 1 ในการไฮโดรไลซิส

% mol = เศษส่วนโมล x 100

เศษส่วนโมลขององค์ประกอบหนึ่งในสารละลาย คือ สัดส่วนโดยจำนวนโมลของสารองค์ประกอบนั้น ต่อจำนวนโมลรวมของสารทุกชนิดในสารละลาย

3.3 การวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโพลิเมอร์ (Amino acid analysis)

จากผลการทดลองการจำแนกกลุ่มของโพลิเมอร์โดยใช้ Colorimetric methods (ตารางที่ 11) พบว่าปริมาณโปรตีนในโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อรา *Fusarium coccophilum* BCC2415, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Phytocordyceps* sp. BCC2744 และ *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 มีค่าสูงกว่า 15 % (w/w) โพลิเมอร์ที่ได้

จากเชื้อราดังกล่าว จึงนำมาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณและชนิดของกรดอะมิโน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13 โพลีเมอร์ที่ได้จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไลซีนในปริมาณที่สูงมาก (42.19 %) รองลงมาคือ กรดกลูตามิก และ กรดแอสปาร์ติก (6.47 และ 4.05 %) ตามลำดับ ส่วนโพลีเมอร์จากเชื้อ *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Phytocordyceps* sp. BCC2744 และ *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 พบกรดอะมิโนชนิดกรดแอสปาร์ติก และกรดกลูตามิก ในปริมาณที่สูงกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 13 ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโพลีเมอร์

กรดอะมิโน	ปริมาณ (% w/w)			
	<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744
Alanine	0.56	0.64	2.18	1.48
Arginine	0.42	0.81	1.74	1.14
Aspartic acid	0.97	4.05	5.07	3.14
Glutamic acid	0.99	6.47	5.06	2.71
Glycine	0.50	1.22	2.07	1.35
Histidine	0.18	0.33	0.46	0.62
Isoleucine	0.28	0.35	0.68	0.53
Leucine	0.49	0.52	0.90	0.95
Lysine	0.54	42.19	1.27	1.64
Phenylalanine	0.25	0.33	1.22	0.62
Proline	0.52	1.04	1.92	1.64
Serine	0.43	0.95	3.08	1.68
Threonine	0.62	1.01	2.65	1.94
Tyrosine	0.24	0.36	0.69	0.63
Valine	0.44	0.61	1.00	1.13
Total	7.43	60.88	29.99	21.20

ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนโดยวิธีการย่อยตัวอย่าง และทำให้เป็นอนุพันธ์ ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้กรดอะมิโนมาตรฐาน 15 ชนิด พบว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่พบในโพลีเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Fusarium coccophilum* BCC2415, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 มีค่า 7.43, 60.88, 29.99 และ 21.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ

กับผลการทดลองที่ได้จากการหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Folin – Lowry protein assay ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้ในโพลีเมอร์จากเชื้อ 4 สายพันธุ์ ข้างต้น มีค่าเท่ากับ 16.78, 69.22, 19.43, 24.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าผลการทดลองที่ได้มีค่าแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดของกรดอะมิโนที่นำมาใช้เป็นมาตรฐานในการทดลองมีเพียง 15 ชนิด ผลการทดลองจึงไม่ครอบคลุมได้ทั้งหมด และนอกจากนั้นอาจจะเป็นผลมาจากความคลาดเคลื่อนของการทดลองโดยวิธีการวัดการดูดกลืนสีโดยวิธี Colorimetric Methods ซึ่งความคลาดเคลื่อนดังกล่าวอาจจะมาจากสารปนเปื้อน (interference) จึงทำให้ค่าดังกล่าวมีความแตกต่างกัน

4. การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของโพลีเมอร์

4.1 การวิเคราะห์ตำแหน่งพันธะของสายโซ่โพลีเมอร์ชนิดกลูแคนโดยใช้เทคนิค Methylation Analysis และ NMR Spectroscopy

จากผลการวิเคราะห์ตำแหน่งพันธะของสายโซ่โพลีเมอร์จากร่าง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Cookekia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 และ *Zygosporium masonii* BCC7543 ซึ่งเป็นราที่ผลิตโพลีแซคคาไรด์ชนิดกลูแคน โดยใช้เทคนิค methylation analysis (Carpita and Shea, 1989) ทำให้ทราบถึงตำแหน่งของพันธะที่น้ำตาลแต่ละหน่วยเชื่อมต่อกัน (ตารางที่ 14) และค่า chemical shift ที่ได้จาก ^{13}C -NMR spectra (ภาคผนวก 4) ของโพลีเมอร์เมื่อเปรียบเทียบกับค่า chemical shift ตามเอกสารอ้างอิง (Colson et al., 1974, Saito et al., 1997 และ Schmid et al., 2001) ทำให้ทราบถึง anomeric configuration (α หรือ β) ของน้ำตาลในสายโซ่โพลีเมอร์ (ตารางที่ 15) ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า โพลีแซคคาไรด์ชนิดกลูแคนที่ได้จากเชื้อราดังกล่าวข้างต้น มีโครงสร้างแตกต่างกัน โดยแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้คือ

1. α -D-(1 \rightarrow 4)-linked glucan

โครงสร้างของโพลีเมอร์ที่ได้จาก *Aschersonia samoensis** BCC2466, *Cookekia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra** BCC2711, *Hymenostilbe* sp.* BCC2146 และ *Hypocrella tamurai* BCC2350 เกิดจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glycosidic linkage ณ คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของตัวแรกและคาร์บอนตัวที่ 4 ของกลูโคสตัวถัดไป มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (รูปที่ 9)

หมายเหตุ: * พบสารอื่นเจือปน ซึ่งยังไม่ทราบว่าคืออะไร จาก NMR spectra

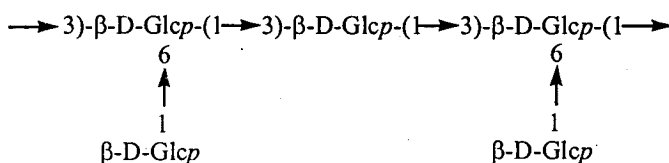


รูปที่ 9 โครงสร้างของ α -D-(1 \rightarrow 4)-glucan

2. β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucan

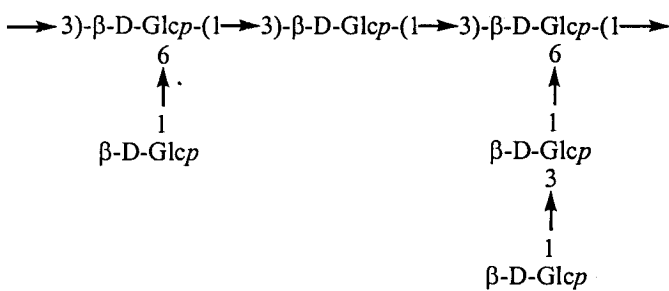
เกิดจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glycosidic linkage ณ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 ของตัวแรกและคาร์บอนตัวที่ 3 ของกลูโคสตัวถัดไป เป็นสายโซ่หลัก (backbone) ซึ่งบนสายโซ่หลัก (ณ ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 6) จะมีหมู่ หรือสายโซ่มาเชื่อมเกาะเป็น side chain ทำให้โพลิเมอร์นี้มีลักษณะเป็นกิ่งก้าน ได้แก่ โพลิเมอร์ที่ได้จาก *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694 และ *Zygosporium masonii* BCC7543 โครงสร้างของโพลิเมอร์ที่ได้มีความเป็นไปได้ 2 รูปแบบ คือ

2.1 มีสายโซ่หลักเป็น β -D-(1 \rightarrow 3)-linked glucan และมีน้ำตาลกลูโคสมาเกาะเป็น side chain เพียงหมู่เดียว ซึ่งเชื่อมต่อกับสายโซ่หลัก ณ ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 6 (รูปที่ 10) ทำให้โพลิเมอร์แบบนี้มีโครงสร้างแบบกิ่งก้านสั้น ๆ



รูปที่ 10 β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucan (กิ่งก้านสั้น)

2.2 มีสายโซ่หลักเป็น β -D-(1 \rightarrow 3)-linked glucan และอาจมีสายโซ่ของ β -D-(1 \rightarrow 3)-linked glucan มาเชื่อมต่อกับสายโซ่หลัก นอกเหนือจากน้ำตาลกลูโคสเพียงหมู่เดียว ทำให้โครงสร้างโพลิเมอร์นี้มีกิ่งก้านที่ยาวกว่าโครงสร้างแบบที่ 2.1 (รูปที่ 11)

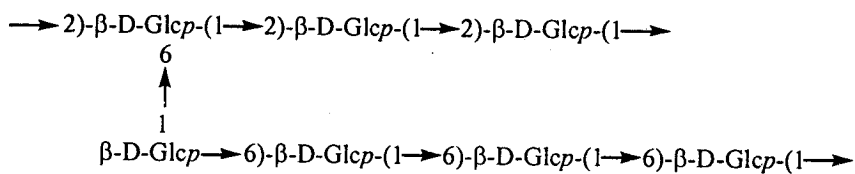


รูปที่ 11 β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucan (กิ่งก้านยาว)

3. β -D-(1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 6)-linked glucan โครงสร้างดังกล่าวพบในโพลิเมอร์ที่ได้จาก *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 ซึ่งเป็นโพลิเมอร์นี้มีลักษณะเป็นกิ่งก้านที่ยาวกว่าในกลุ่มที่ 2 และโครงสร้างที่ได้มีความเป็นไปได้ 2 รูปแบบ คือ

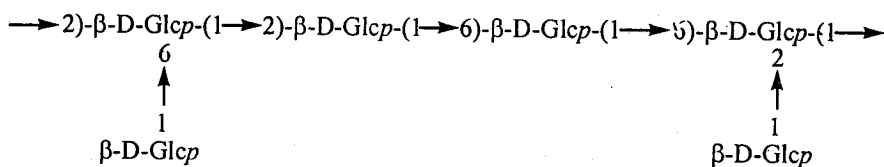
3.1 สายโซ่หลัก (backbone) เกิดจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glycosidic linkage ณ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 ของตัวแรกและคาร์บอนตัวที่ 2 ของน้ำตาลตัวถัดไป โดยที่บนสายโซ่หลักมีสายโซ่สั้น ๆ ของ (1 \rightarrow 6) มาเกาะเป็น side chain หรือในทางกลับกัน สายโซ่หลัก (backbone) อาจเกิดจากน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ

glycosidic linkage ณ คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของตัวแรกและคาร์บอนตัวที่ 6 ของกลูโคสตัวถัดไป และมีสายโซ่สั้นๆ ของ (1→2) มาเกาะเป็น side chain (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 $\beta\text{-D}\text{-}(1\rightarrow 2, 1\rightarrow 6)\text{-linked glucan}$

3.3 บนสายโซ่หลักประกอบด้วยพันธะทั้งสอง คือ (1→6) และ (1→2) โดยมีกิ่งก้าน ณ คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 6 (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 $\beta\text{-D}\text{-}(1\rightarrow 2, 1\rightarrow 6)\text{-linked glucan}$

ตารางที่ 14 Methylated products และ ชนิดของพันธะที่ได้จากการวิเคราะห์โดย Methylation analysis

Polymer produced from	Methylated products	Induced linkages
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl hexitol	(1,4) glucan
<i>Cookekia tricholoma</i> BCC2468	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl hexitol	(1,4) glucan
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl hexitol	(1,4) glucan
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl hexitol	(1,4) glucan
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl hexitol	(1,4) glucan
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl hexitol	(1,4) glucan
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl hexitol	(1,3) glucan (33.05 %mol)
	1,3,5,6-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl hexitol	(1,3,6) glucan (66.95 %mol)
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	1,2,5-tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl hexitol	(1,2) glucan (30.25 %mol)
	1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl hexitol	(1,6) glucan (35.66 %mol)
	1,2,5,6-tetra-O-acetyl-3,4-di-O-methyl hexitol	(1,2,6) glucan (34.09 %mol)
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl hexitol	(1,3) glucan (23.55 %mol)
	1,3,5,6-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl hexitol	(1,3,6) glucan (76.45 %mol)

ตารางที่ 15 Chemical shift ของโพลิเมอร์ จากการวิเคราะห์โดย $^{13}\text{C-NMR}$

Polymer produced from	Chemical shift (ppm)	Assignment
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694 β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucan	62.287	C6
	72.844	C2
	104.088	C1
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466 α -D-(1 \rightarrow 4)-linked glucan	60.483	C6
	71.727	C5
	71.996	C2
	73.266	C3
	78.762	C4
	100.835	C1
<i>Cookenia tricholoma</i> BCC2468 α -D-(1 \rightarrow 4)-linked glucan	60.498	C6
	71.630	C5
	71.979	C2
	73.241	C3
	78.793	C4
	100.098	C1
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092 α -D-(1 \rightarrow 4)-linked glucan	60.474	C6
	71.616	C5
	71.963	C2
	73.242	C3
	78.760	C4
	100.082	C1
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711 α -D-(1 \rightarrow 4)-linked glucan	60.461	C6
	71.576	C5
	71.988	C2
	73.234	C3
	78.744	C4
	100.062	C1

4.2 การวิเคราะห์ตำแหน่งพันธะของสายโซ่โพลีเมอร์ชนิดเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์โดยใช้เทคนิค Methylation analysis, Reductive cleavage และ NMR Spectrometry

จากผลการวิเคราะห์ตำแหน่งพันธะของสายโซ่โพลีเมอร์จากราทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, *Phytocordyceps* sp. BCC2744 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506 ซึ่งเป็นราที่ผลิตโพลีเมอร์ชนิดเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค methylation analysis, reductive cleavage และ NMR spectrometry สามารถจัดกลุ่มโพลีเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. (1→3, 1→6)-linked glucan ได้แก่ โพลีเมอร์จาก *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506 โดยโพลีเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 จะมีกิ่งก้านมากกว่าโพลีเมอร์จาก *Beauveria bassiana* BCC2692, *Hirsutella* sp. BCC7057 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506 โดยดูจากปริมาณของ (1,3,5) glucan ซึ่งเป็น branched point

2. (1→4)-linked glucan ได้แก่ โพลีเมอร์จาก *Phytocordyceps* sp. BCC2744

แต่อย่างไรก็ดี จะสังเกตเห็นว่า นอกจากโพลีเมอร์ในกลุ่มของกลูแคนแล้ว โพลีเมอร์ที่ได้จากเชื้อราในกลุ่มที่กล่าวข้างต้น (ทั้ง 1 และ 2) ยังประกอบด้วยโพลีเมอร์อื่น เช่น พวักแมนแนน (mannan) และกาแลคแทน (galactan) ในรูปแบบของพันธะและปริมาณที่แตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 16)

จากผลของ ^{13}C -NMR เพื่อใช้บ่งบอก anomeric configuration (β or α) ของน้ำตาลที่เชื่อมต่อกันนั้น ยังไม่สามารถบ่งได้อย่างแน่ชัด เนื่องจากโพลีเมอร์เหล่านี้ประกอบด้วยโพลีเมอร์มากกว่า 1 ชนิด โพลีเมอร์บางตัวยังประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณสูง และบางตัวมีความสามารถในการละลายต่ำ จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ในรูปของแข็ง (solid state NMR) ทำให้ได้ spectra ที่ไม่ละเอียดมากพอ แต่อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้คร่าวๆ ดังนี้คือ ค่า chemical shift ช่วง 25-40 ppm แสดงถึงคาร์บอนในหมู่อัลคิล (R) ของกรดอะมิโนในโปรตีน ช่วง 60-110 ppm แสดงถึงคาร์บอน (C1-C6) ของน้ำตาล และช่วง 130-180 ppm แสดงถึงหมู่คาร์บอนิลของโปรตีน

ตารางที่ 16 Methylated products ชนิดของพันธะที่ได้จากการวิเคราะห์โดย Methylation analysis, Reductive cleavage และ Chemical shift ของโพลิเมอร์ จากการวิเคราะห์โดย $^{13}\text{C-NMR}$

Polymer produced from	Methylated products	Induced linkages	Area (%)	Chemical shift (ppm)
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3) Glucan	22.49	24.48, 30.70, 33.44, 55.95,
	1,5-anhydro-3,6-di-O-acetyl- 2,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3,6) Glucan	12.24	63.77, 69.63, 72.46, 73.05,
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,6) Glucan	0.55	73.56, 75.26, 77.01, 78.62,
	1,5-anhydro-2-O-acetyl- 3,4,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,2) Mannan	8.43	96.79, 98.78, 172.62 และ
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,6) Mannan	8.67	176.00
	1,5-anhydro-4-O-acetyl- 2,3,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,4) Mannan	0.92	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-galacitol	(1,6) Galactan	0.56	
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3) Glucan	9.46	25.27, 30.69, 63.51, 74.17 และ 104.50
	1,5-anhydro-3,6-di-O-acetyl- 2,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3,6) Glucan	17.08	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,6) Glucan	1.90	
	1,5-anhydro-2-O-acetyl- 3,4,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,2) Mannan	8.08	
	1,5-anhydro-4-O-acetyl- 2,3,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,4) Mannan	2.40	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,6) Mannan	2.16	
	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-galacitol	(1,3) Galactan	0.71	

Polymer produced from	Methylated products	Induced linkages	Area (%)	Chemical shift (ppm)
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-galacitol	(1,6) Galactan	0.67	
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656 (protein content ca. 29.99% from amino acid analysis result)	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3) Glucan	19.30	63.20, 73.18, 104.48, 130.22 และ 172.88
	1,5-anhydro-3,6-di-O-acetyl- 2,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3,6) Glucan	30.22	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,6) Glucan	2.42	
	1,5-anhydro-4-O-acetyl- 2,3,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,4) Mannan	1.48	
	1,5-anhydro-2-O-acetyl- 3,4,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,2) Mannan	1.09	
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744 (protein content ca. 21.2% from amino acid analysis result)	1,5-anhydro-4-O-acetyl- 2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,4) Glucan	48.27	62.74, 69.35, 74.76, 86.97, 104.12 และ 173.71
	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3) Glucan	7.77	
	1,5-anhydro-3,6-di-O-acetyl- 2,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3,6) Glucan	3.59	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,6) Glucan	0.64	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,6) Mannan	0.87	
	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,3) Mannan	0.33	
	1,5-anhydro-2-O-acetyl- 3,4,6-tri-O-methyl-D-galacitol	(1,2) Galactan	1.06	
	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-galacitol	(1,3) Galactan	0.22	
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3) Glucan	21.43	61.03, 62.80, 68.62, 70.02, 70.98, 73.79,

Polymer produced from	Methylated products	Induced linkages	Area (%)	Chemical shift (ppm)
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	1,5-anhydro-3,6-di-O-acetyl- 2,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3,6) Glucan	11.89	76.20, 76.88, 86.33, 92.26, 96.84 และ 103.17
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,6) Glucan	0.84	
	1,5-anhydro-2-O-acetyl- 3,4,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,2) Mannan	4.02	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,6) Mannan	2.41	
	1,5-anhydro-4-O-acetyl- 2,3,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,4) Mannan	0.78	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-galacitol	(1,6) Galactan	3.40	
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	1,5-anhydro-3-O-acetyl- 2,4,6-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3) Glucan	8.66	24.59, 29.15, 30.71, 32.75, 34.43, 41.71, 56.40, 57.36, 63.93, 65.48, 69.55, 71.04, 72.17, 73.78, 79.45, 83.78, 84.84, 85.37, 101.18, 109.71, 110.70, 175.13, 175.99 และ 177.48
	1,5-anhydro-3,6-di-O-acetyl- 2,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,3,6) Glucan	7.72	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	(1,6) Glucan	0.57	
	1,5-anhydro-2-O-acetyl- 3,4,6-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,2) Mannan	6.25	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-mannitol	(1,6) Mannan	1.90	
	1,5-anhydro-6-O-acetyl- 2,3,4-tri-O-methyl-D-galacitol	(1,6) Galactan	1.27	

หมายเหตุ : ปริมาณสารแสดงอยู่ในรูป % Area เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐาน (Standard) ของสารแต่ละตัว

5. การทดสอบความเป็นพิษและการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ และการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากผลการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์และเซลล์ลิง (ตารางที่ 17) พบว่า โพลีเมอร์จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มนุษย์ (Human, small lung cancer (NCI-H187): strongly active: $IC_{50} = 1.0 \mu\text{g/mL}$) และเซลล์ลิง (vero cell line: cytotoxicity: $IC_{50} = 16.32 \mu\text{g/mL}$) และนอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans* (moderately active: $IC_{50} = 7.16 \mu\text{g/mL}$) ได้อีกด้วย

ส่วนโพลีเมอร์จากราสายพันธุ์อื่น ๆ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์และเซลล์ลิง รวมทั้งไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans*

เนื่องจากโพลีเมอร์จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์และเซลล์ลิง ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุปิดแผลได้ ส่วนโพลีเมอร์จากราสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่เป็นพิษอาจจะมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัสดุปิดแผล ซึ่งจะทำการศึกษาต่อไป

5.2 การทดสอบความเป็นพิษกับ mouse fibroblast (L929) และ normal dermal human fibroblasts (NHF)

เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการละลายที่แตกต่างกัน ทำให้ความเข้มข้นที่สามารถทดสอบได้กับเซลล์แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 และ NHF แสดงในรูปที่ 14 และ 15 ตามลำดับ (ค่า Absorbance จาก MTT assay แปลผันตามกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต)

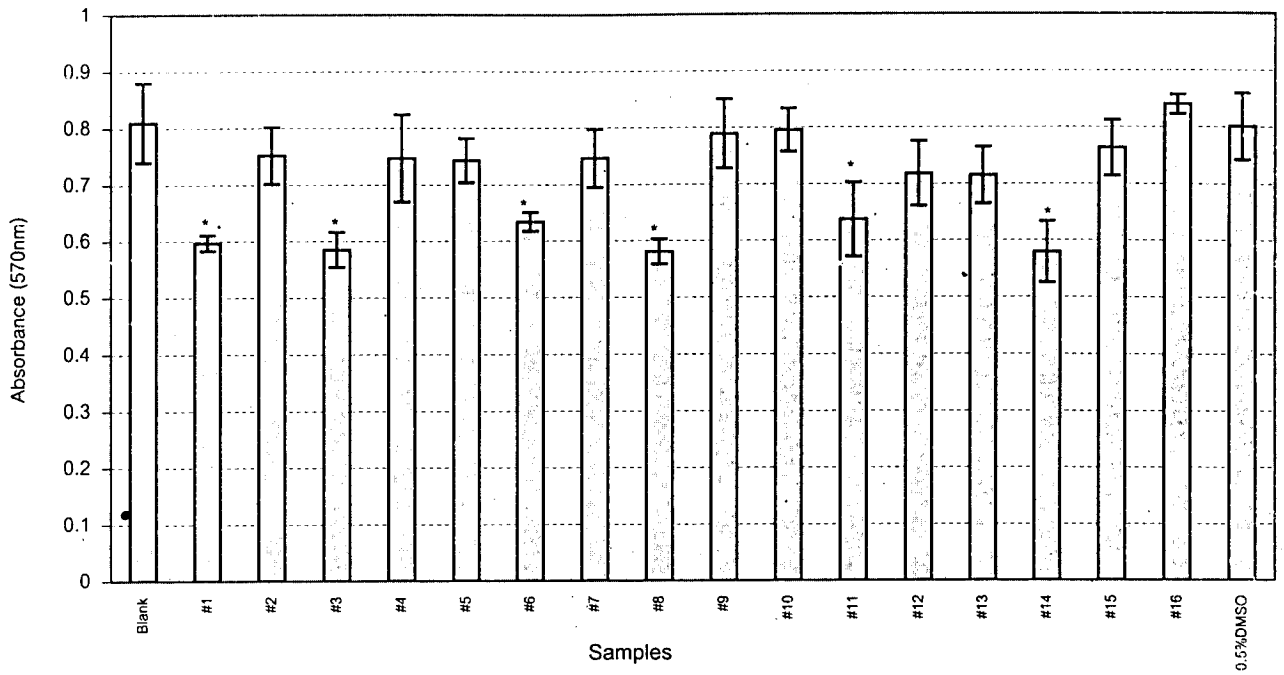
จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าสารตัวอย่างบางตัวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ L929 และ NHF ซึ่งได้แก่ ตัวอย่างที่มีค่า $p\text{-value} < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ blank และได้สรุปไว้ในตารางที่ 19

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของโพลีเมอร์จากราทั้ง 16 สายพันธุ์ ต่อเซลล์หนู (L929) และเซลล์มนุษย์จาก primary culture (NHF) พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิด ถึงแม้ว่าโพลีเมอร์จากราบางสายพันธุ์ ได้แก่ *Cookeia tricholoma* BCC2468, *Fusarium coccophilum* BCC2415, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 และ *Torribiella tenuis* BCC1506 แสดงผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้งสองชนิด อยู่ในช่วง 12 – 25 % ก็ตาม แต่ค่า IC_{50} ของทุกตัวอย่างมีค่ามากกว่า $50 \mu\text{g/mL}$ ส่วนโพลีเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* BCC2073 มีค่า IC_{50} มากกว่า $40 \mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ของโพลิเมอร์

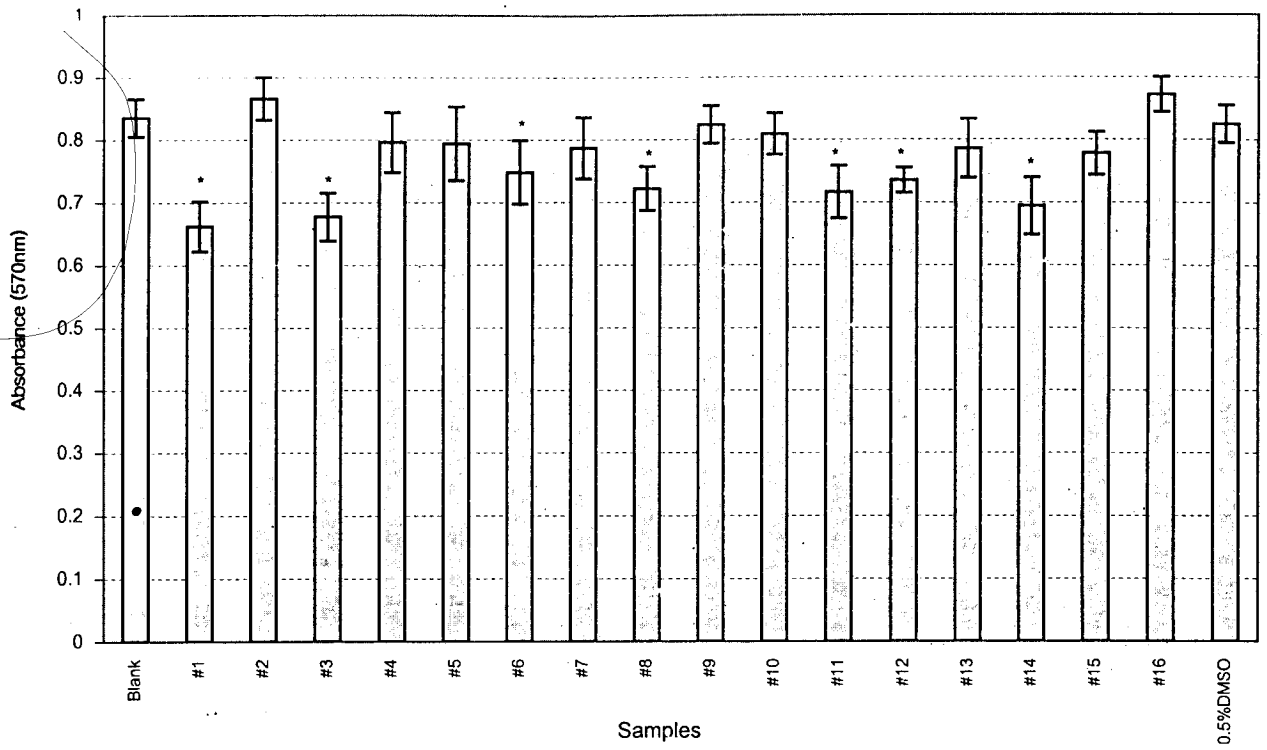
Strains	Cytotoxicity (IC ₅₀ : µg/mL)	Antifungal (IC ₅₀ : µg/mL)	Human cell lines		
			NCI-H187 (IC ₅₀ : µg/mL)	KB (IC ₅₀ : µg/mL)	BC (IC ₅₀ : µg/mL)
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Cookenia tricholoma</i> BCC2468	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	16.32	Moderately (7.16)	Strongly (1.00)	inactive	inactive
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	> 50	inactive	inactive	inactive	inactive

หมายเหตุ: การแปลผลการทดลองดังแสดงไว้ในภาคผนวก 4



รูปที่ 14 ผลการทดสอบจาก MTT assay ซึ่งทดสอบกับเซลล์ L929

(* = แตกต่างจาก blank อย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$)



รูปที่ 15 ผลการทดสอบจาก MTT assay ซึ่งทดสอบกับเซลล์ NHF

(* = แตกต่างจาก blank อย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$)

ตารางที่ 18 สารตัวอย่างที่แสดงผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ .

Code	Sample from	Final concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Tested with L929		Teste with NHF	
			p-value	% viability ^a	p-value	% viability ^a
#8	<i>Cookenia tricholoma</i> BCC2468	50	0.000	75%	0.001	85%
#1	<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	65	0.000	77%	0.000	78%
#3	<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	40	0.000	76%	0.000	79%
#12	<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	50	0.109	-	0.049	89.9%
#11	<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	50	0.000	83%	0.004	88%
#6	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	50	0.004	82%	0.022	87%
#14	<i>Torribiella tenuis</i> BCC1506	50	0.000	75%	0.000	85%

^a = % viability comparing with that of the blank.

- = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่างนี้ไม่แตกต่างจาก blank อย่างมีนัยสำคัญ จึงไม่ได้ระบุ % viability ไว้ตรงนี้

6. การทดสอบความสามารถในการสร้าง Interleukin (IL-8) ของเซลล์ normal dermal human fibroblasts (NHF) หลังจากสัมผัสกับสารตัวอย่าง

จากการทดสอบการสร้าง IL-8 โดย NHF หลังจากที่เซลล์สัมผัสกับโพลิเมอร์จากรา 16 สายพันธุ์ พบว่า โพลิเมอร์จากราที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้าง IL-8 ของ NHF และกระตุ้นในระดับที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 19) จะสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้าง IL-8 ของ NHF ได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่าง #5, #12 และ #15 มีปริมาณ IL-8 เฉลี่ยที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม คือประมาณ 126 – 180 pg/mL

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ กลุ่มที่มีการสร้าง IL-8 สูงกว่ากลุ่มควบคุม (blank medium หรือ 0.5% DMSO) น้อยกว่า 5 เท่า ได้แก่ ตัวอย่าง #1, #10 และ #14 มีปริมาณ IL-8 เฉลี่ย ประมาณ 465 – 615 pg/mL

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ กลุ่มที่มีการสร้าง IL-8 สูงกว่ากลุ่มควบคุม (blank medium หรือ 0.5% DMSO) มากกว่า 5 เท่า ได้แก่ ตัวอย่าง #2, #3, #4, #6, #7, #8, #9, #11, #13 และ #16 มีปริมาณ IL-8 เฉลี่ย มากกว่า 1,500 pg/mL

โดยทั่วไปเป็นที่ยอมรับกันว่าบทบาทที่สำคัญของ IL-8 คือ การกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ angiogenesis (กระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่) กระบวนการ angiogenesis นี้สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยปัจจัยหลายชนิดนอกจาก IL-8 แล้ว เช่น IL-4, IL-6, fibroblast growth factors, transforming growth factor α และ β 1 และ tumor necrosis factor α

(Black et al. 1999) IL-8 นั้นสามารถถูกสร้างได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น fibroblasts, monocytes และ endothelial cells (Baggiolini et al., 1994) งานวิจัยนี้ได้เลือกทดสอบผลของโพลีเมอร์กับการสร้าง IL-8 โดยเซลล์ fibroblasts ของคนเนื่องจากว่าจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้มุ่งไปที่การบ่งบอกศักยภาพของการพัฒนาโพลีเมอร์จากเชื้อราไปใช้เป็นวัสดุปิดแผล และในกระบวนการซ่อมแซมแผลนั้นเซลล์ชนิด fibroblasts จำนวนมากจะมีการเคลื่อนที่มายังบริเวณที่เป็นแผลและช่วยในกระบวนการรักษา (healing process) โดยการสร้าง structural proteins ต่างๆ ดังนั้น fibroblasts อาจมีโอกาสสัมผัสกับโพลีเมอร์ได้ จึงจำเป็นต้องวัดการตอบสนองของ fibroblast ในการสร้าง IL-8 ที่จะมีผลต่อการเร่ง angiogenesis

จากผลการวิจัยพบว่า fibroblasts ของคนที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับโพลีเมอร์ที่สกัดจากเชื้อราจำนวนหนึ่งสามารถสร้าง IL-8 ได้ที่ความเข้มข้นโดยประมาณระหว่าง 0.5 ng/mL - > 2.4 ng/mL การสร้าง IL-8 ในปริมาณนี้พบว่าใกล้เคียงกับความสามารถในการสร้าง IL-8 โดย fibroblasts ของคนที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และได้รับ platelet derived growth factor (PDGF, growth factor ที่ถูกสร้างในกระบวนการรักษาแผลเช่นกัน) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.4 - 1.7 ng/mL (Liächty et al., 1998) ส่วนในของเหลวที่พบบริเวณแผลของผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บจากการไหม้ภายใน 48 ชั่วโมงแรก พบว่ามีการสร้าง IL-8 ในระดับปริมาณอยู่ระหว่าง 5-15 ng/mL (Ono et al., 1995) ซึ่งสูงกว่าที่พบใน cell culture ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าในระยะแรกหลังจากการเกิดการบาดเจ็บ IL-8 ที่ถูกสร้างมานั้นเป็นผลจากการเกิดกระบวนการ inflammation ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อการบาดเจ็บอย่างเฉียบพลันก่อนที่จะเกิด healing process

จากผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าโพลีเมอร์ที่สามารถกระตุ้นให้ fibroblasts สร้าง IL-8 ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม เป็นโพลีเมอร์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นวัสดุปิดแผล เนื่องจากน่าจะช่วยเร่งกระบวนการ angiogenesis ได้ จากการวิจัยของกลุ่มอื่น ได้มีการรายงานไว้ว่า chitin และ chitosan ซึ่งมีผู้นำไปวิจัยและพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลนั้นสามารถเร่งกระบวนการ wound healing ได้ และปัจจัยหนึ่งในการเร่งกระบวนการนี้เกิดขึ้นจากการที่ fibroblasts สามารถสร้าง IL-8 ออกมาได้เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย chitin หรือ chitosan (Mori et al., 1997) ซึ่งคล้ายกับคุณสมบัติของโพลีเมอร์ที่รายงานไว้ในที่นี้

ตารางที่ 19 ผลการวัดปริมาณ IL-8 ใน culture medium

Sample	IL-8 (pg/mL)	± min/max
Blank medium	126.3	14.6
0.5%DMSO	249.5	12.1
#1 <i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	615.3	13.9
#2 <i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	>2427	486.1
#3 <i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	>2427	4.2
#4 <i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	>2427	136.4
#5 <i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	143.1	7.1
#6 <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	>2427	211.5
#7 <i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	2300.2	113.4
#8 <i>Cookeia tricholoma</i> BCC2468	>2427	87.3
#9 <i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	1576.4	70.3
#10 <i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	465.1	32.0
#11 <i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	2037.1	148.5
#12 <i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	179.5	8.7
#13 <i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	>2427	108.5
#14 <i>Torrubiella tenuis</i> BCC1506	521.7	32.2
#15 <i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	128.8	26
#16 <i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	>2427	97.0
10 ug/mL LPS	>2427	31.5

หมายเหตุ: IL-8 ที่มีค่า >2427 pg/mL ไม่สามารถระบุค่าที่ชัดเจนได้เนื่องจาก ค่าความเข้มของแสงที่อ่านมีค่ามากกว่าค่าสูงสุดของ standard ซึ่งมีค่า = 809 pg/mL ดังนั้นตัวอย่างใดที่อ่านค่าได้มากกว่า 2.8 จะประมาณได้ว่าตัวอย่างนั้นมีความเข้มข้นของ IL-8 มากกว่า 809pg/mL 3 เท่า ($809 \times 3 = 2427$) คูณ 3 เนื่องจากนำตัวอย่างมาทำให้เจือจางลง 3 เท่าก่อนจะนำมาวัดปริมาณ IL-8

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาการผลิตโพลิเมอร์จากเชื้อรา 16 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อราตัวแทนจากแต่ละสกุลที่มีรายงานจากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักว่าสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ที่มีผลทำให้น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้นนั้นทั้ง 16 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราที่เจริญได้ค่อนข้างเร็วเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ จากผลการทดลองสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราได้เป็น 2 กลุ่มตามปริมาณโพลิเมอร์ที่เชื้อผลิตขึ้น ได้แก่

- 1) กลุ่มเชื้อราที่ให้ผลผลิตโพลิเมอร์สูง (มากกว่า 3 กรัมต่อลิตร) ได้แก่ *Cordyceps nipponica* BCC2092 (15.71 g/L)
- 2) กลุ่มเชื้อราที่ให้ผลผลิตโพลิเมอร์ต่ำ (ต่ำกว่า 3 กรัมต่อลิตร) ได้แก่ *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cookekia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Fusarium coccophilum* BCC2415, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, *Phytocordyceps* sp. BCC2744, *Torrubiella tenuis* BCC1506 และ *Zygosporium masonii* BCC7543

2. สมบัติของโพลิเมอร์ ได้แก่

2.1 สมบัติการละลาย โดยศึกษาความสามารถในการละลายของโพลิเมอร์ในตัวทำละลายต่างชนิดกัน (น้ำ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ อะซิโตไนโตรล เอทานอล และเฮกเซน) พบว่าโพลิเมอร์จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 และ *Cordyceps dipterigena* BCC2073 สามารถละลายได้ในน้ำเท่านั้น ในขณะที่โพลิเมอร์จากเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ สามารถละลายได้ทั้งในน้ำ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ในระดับที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโพลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ เป็นโพลิเมอร์ที่มีขั้ว โดยมีค่า polarity ในระดับที่แตกต่างกัน

2.2 น้ำหนักโมเลกุล โพลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.8×10^3 ถึง 1.2×10^7 ดาลตัน โดยโพลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุด คือ โพลิเมอร์จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415 ส่วนโพลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุด คือ *Hirsutella* sp. BCC7057

2.3 ความเป็นพิษ ทดสอบความเป็นพิษของโพลิเมอร์จากเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ กับ Human cell line 4 ชนิด (KB (oral human epidermal carcinoma), BC (breast cancer), NCI-H187 (human small cell lung cancer) และเซลล์มนุษย์จาก primary culture (Normal dermal human fibroblasts cell: NHF)) เซลล์ลิง (Vero cell line) และเซลล์หนู (Mouse fibroblasts cell: L929) พบว่ามีเพียงโพลิเมอร์จากเชื้อรา *Fusarium coccophilum* BCC2415 ยับยั้งการเจริญของ Human small cell lung cancer (NCI-H187) และเซลล์ลิง (Vero cell line) ในขณะที่โพลิเมอร์จากเชื้อรา *Cookekia tricholoma* BCC2468, *Fusarium coccophilum* BCC2415, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์หนู (Mouse fibroblasts cell:

L929) และ เซลล์มนุษย์จาก primary culture (Normal dermal human fibroblasts cell:NHF) ที่ใช้ในการทดสอบด้วย

2.4 สมบัติในการเร่งการหายของแผล โดยการทดสอบความสามารถในการสร้างสาร Interleukin (IL)-8 ของเซลล์ normal dermal human fibroblasts (NHF) หลังจากสัมผัสสารตัวอย่าง พบว่า โฟลิเมอร์จากร่างทั้ง 16 สายพันธุ์ มีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์ทดสอบสร้าง IL-8 ในระดับที่แตกต่างกัน โดยโฟลิเมอร์จาก *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้าง IL-8 ในระดับที่สูง (มากกว่า 2,427 pg/mL) และไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ทดสอบ แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตโฟลิเมอร์ พบว่า *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 ให้ผลผลิตโฟลิเมอร์ในระดับที่ต่ำ (0.40 กรัมต่อลิตร) จึงไม่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลต่อไป

3. การจำแนกกลุ่มของโฟลิเมอร์

3.1 การจำแนกกลุ่มของโฟลิเมอร์โดย Colorimetric methods ได้แก่ Folin-Lowry protein assay (วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน), Phenol-sulfuric acid assay (วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด), Carbazole assay (วิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิก) และ Morgan-Elson assay (วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน) เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการวิเคราะห์ในระดับต่อไป จากผลการวิเคราะห์สามารถแบ่งโฟลิเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ

1) โฟลิเมอร์ชนิดโพลิแซคคาไรด์ โฟลิเมอร์ในกลุ่มนี้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cookekia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, *Phytocordyceps* sp. BCC2744, *Torribiella tenuis* BCC1506 และ *Zygosporium masonii* BCC7543

2) โฟลิเมอร์ชนิดโปรตีน โฟลิเมอร์ในกลุ่มนี้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก แต่ทั้งนี้โฟลิเมอร์ที่ได้อาจอยู่ในรูปของน้ำตาลรวมกับโปรตีน ได้แก่ โฟลิเมอร์จากเชื้อรา *Fusarium coccophilum* BCC2415

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโฟลิเมอร์ ได้แก่

- การวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ สำหรับโฟลิเมอร์ชนิดโปรตีน
- การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ สำหรับโฟลิเมอร์ชนิดโพลิแซคคาไรด์

การวิเคราะห์ด้วยวิธีการดังกล่าว จะได้ผลการทดลองที่มีความแม่นยำ และมีความละเอียดมากขึ้นกว่าการวิเคราะห์โดยใช้ Colorimetric method จากผลการวิเคราะห์ที่ได้สามารถแบ่งกลุ่มโฟลิเมอร์ได้เป็น 3 กลุ่มหลัก คือ

1) polysaccharide bound protein คือ โฟลิเมอร์ที่มีน้ำตาลและโปรตีนปริมาณสูงเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ได้แก่ โฟลิเมอร์จาก *Fusarium coccophilum* BCC2415

2) โยโมโพลิแซคคาไรด์ชนิดกลูแคน คือ โฟลิเมอร์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ โฟลิเมอร์จาก *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Cookekia*

tricholoma BCC2468, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 และ *Zygosporium masonii* BCC7543

3) เซพเทอโรโพลิแซคคาไรด์ คือ โพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมากกว่า 1 ชนิด ในโมเลกุล ได้แก่ โพลีเมอร์จาก *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลกาแลคโตส เป็นองค์ประกอบหลัก

4. การวิเคราะห์ตำแหน่งของพันธะที่น้ำตาลแต่ละหน่วยเชื่อมต่อกัน โดยใช้เทคนิค methylation analysis ร่วมกับการวิเคราะห์ anomeric configuration โดย $^{13}\text{C-NMR}$

4.1 ไฮโมโพลิแซคคาไรด์ชนิดกลูแคน พบว่ากลูแคนที่ได้มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 3 รูปแบบ คือ

1) $\alpha\text{-D-(1}\rightarrow\text{4)}$ -linked glucan ได้แก่ กลูแคนที่ผลิตจากรา *Aschersonia samoensis* BCC2466, *Cookenia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps nipponica* BCC2092, *Gibellula pulchra* BCC2711, *Hymenostilbe* sp. BCC2146 และ *Hypocrella tamurai* BCC2350

2) $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{3, 1}\rightarrow\text{6)}$ -linked glucan ได้แก่ กลูแคนที่ผลิตจากรา *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694 และ *Zygosporium masonii* BCC7543

3) $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{2, 1}\rightarrow\text{6)}$ linked glucan ได้แก่ กลูแคนที่ผลิตจากรา *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074

4.2 เซพเทอโรโพลิแซคคาไรด์

1) $(1\rightarrow\text{3, 1}\rightarrow\text{6})$ -linked glucan ได้แก่ โพลีเมอร์จาก *Beauveria bassiana* BCC2692, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506 โดยโพลีเมอร์จาก *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 จะมีกิ่งก้านมากกว่าโพลีเมอร์จาก *Beauveria bassiana* BCC2692, *Hirsutella* sp. BCC7057 และ *Torrubiella tenuis* BCC1506

2) $(1\rightarrow\text{4})$ -linked glucan ได้แก่ โพลีเมอร์จาก *Phytocordyceps* sp. BCC2744

งานวิจัยที่ควรดำเนินการต่อ

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตโพลิเมอร์ จากรา *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744

2. การนำโพลิเมอร์จากรา *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073 และ *Phytocordyceps* sp. BCC2744 ไปขึ้นรูปเพื่อนำไปทดลองใช้เป็นวัสดุปิดแผลในระดับสัตว์ทดลอง

ผลงาน (ภาคผนวก 1)

Madla, S., Methacanon, P., Prasitsil, M. & Kirtikara, K. Characterization of biocompatible fungi-derived polymers that induced IL-8 production. Submitted.

เอกสารอ้างอิง

- สมใจ ศิริโชค. (2537). อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับอุตสาหกรรมการหมัก. ใน *เทคโนโลยีการหมัก* (หน้า 84-109). สหมิตร
ออฟเซต : กรุงเทพฯ ฯ.
- Bae, J., Park, J., Song, C., Yu, C., Park, M., & Yun, J. (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.
- Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Advances in Immunology*, 55, 97-179.
- Black, A.F., Hudon, V., Damour, O., Germain, L. & Auger, F.A. (1999). A novel approach for studying angiogenesis: A human skin equivalent with a capillary-like network. *Cell Biology and Toxicology*, 15, 81-90.
- Bohn, J. A. & BeMiller, J. N. (1995). (1→3)-β-D-Glucans* as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28, 3-14.
- Carbonero, E., Sasaki, G., Stuelp, P., Gorin, P., Woranovicz-Barreira, S., & Iacomini, M. (2001). Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. *FEMS Microbiology*, 194, 65-69.
- Carpita, N. C. & Shea, E. M. (1989). Methylation: linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In C. J. Biermann & G. D. McGinnis (Eds.), *Analysis of Carbohydrates by GLS and MS*. (pp 157-216). USA: CRC Press, Inc.
- Chaplin, M. F. (1986). Monosaccharide. In M. F. Chaplin & J. F. Kennedy (Eds.), *Carbohydrate Analysis: a practical approach* (pp. 1-6). Washington DC: IRL Press.
- Colson, P., Jennings, H. J. & Smith, I. C. P. (1974). Composition, sequence, and conformation of polymers and oligomers of glucose as revealed by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 96 (26), 8081-8083.
- Jun, J. G. & Gray, G. R. (1987). A new catalyst for reductive cleavage of methylated glycans. *Carbohydrate Research*, 163, 247-261.
- Kim, D., Yang, B., Jeong, S., Oark, J., Cho, S., Suralit, D., Yun, J., & Song, C. (2001). Production of hypoglycemic, extracellular polysaccharide from submerged culture of mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters*, 23, 513-517.
- Liechty, K.W., Crombleholme, T.M., Cass, D.L., Martin, B. & Adzick, N.S. (1998). Diminished interleukin-8 (IL-8) production in the fetal wound healing response. *Journal of Surgical Research*, 77 (1), 80-84.

- Mori, T., Okumura, M., Matsuura, M., Ueno, K., Tokura, S., Okamoto, Y., Minami, S. & Fujinaga, T. (1997). Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 18(13), 947-951.
- Navarini, L., Stredansky, M., Matulova, M., and Bertocchi, C. 1997. Production and characterization of an exopolysaccharide from *Rhizobium hedysari* HCNT1. *Biotechnology Letters*, 19, 1231-1234.
- Ono, I., Gunji, H., Zhang, J.Z., Maruyama, K. & Kaneko, F. (1995). A study of cytokines in burn blister fluid related to wound healing. *Burns*, 21(5), 352-355.
- Park, J. P., Kim, S. W., Hwang, H. J. & Yun, J. W. (2001). Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 76 - 81.
- Plummer, D.T. (1978). *An Introduction to practical biochemistry*. (2nd ed.) (pp. 145-146). London: McGraw-Hill Book Co., Ltd.
- Saito, K., Ohki, T., Takasuka, N. & Sasaki, T. (1997). ¹³C-NMR Spectral study of a gel-forming, branched (1→3)- β-D-glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight. *Carbohydrate Research*, 58, 293-305.
- Schmid, F., Stone, B. A., McDougall, B. M., Bacic, A., Martin, K. L., Brownlee, R. T. C., Chai, E. & Seviour, R. J. (2001). Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3; 1→6)-β-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. Ex Schlecht. *Carbohydrate Research*, 331, 163-171.
- Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH*, 16, 41-46.
- Takagi, H. & Kadowaki, K. (1985). Flocculant production by *Paecilomyces* sp. Taxonomic studies and culture condition for production. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 3051 - 3057.

บทคัดย่อ 1

Characterization of biocompatible fungi-derived polymers that induce IL-8 production

Siribhorn Madla^a, Pawadee Methacanon^b, Malinee Prasitsil^b and Kanyawim Kirtikara^{a*}

^aNational Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 113 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Klong 1, Klongluang, Patumthani 12120, Thailand

^bNational Metal and Materials Technology Center, 114 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Klong 1, Klongluang, Patumthani 12120, Thailand

*Corresponding author. Tel.: +66-2-564-6700 ext. 3470; fax: +66-2-564-6707.

E-mail address: Kanyawim@biotec.or.th

Abstract

Sixteen strains of fungi from 15 different genera were isolated from natural habitats in Thailand to study their biopolymers. Polymer production, chemical composition, and physical and biological properties related to their potential as wound dressing materials were investigated. All polymers were shown to be composed of polysaccharides except those produced from *Fusarium coccophilum* BCC2415 which was a protein-polysaccharide complex. Molecular weights of the polymers ranged from 2.8×10^3 – 1.2×10^7 Da. Apart from the polymers from *Fusarium coccophilum* BCC2415 and *Cordyceps dipterigena* BCC2073 that were only water soluble, those from other fungi were soluble in both water and DMSO. Different biological assays including cytotoxicity tests were conducted to investigate their biocompatibility. To evaluate the potential of these polymers as wound dressing material, the level of interleukin (IL)-8 produced by normal human dermal fibroblasts (NHF) cells exposed to the polymers were determined. Our results indicated that polymers produced by *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, and *Phytocordyceps* sp. BCC2744 were biocompatible and inducers of high levels of IL-8.

Keywords: Fungi; Biopolymers; Biocompatible; Interleukin-8

1. Introduction

In the last decade interest in polymers produced by microorganisms has significantly increased. Many microorganisms synthesize exopolysaccharides (EPS), which either remain attached to the cell surface or are found in the extracellular medium in the form of amorphous slime (Sutherland, 1998). EPS in their natural environment are thought to play a role in the protection of the microbial cell against desiccation, phagocytosis and phage attack, antibiotics or toxic compounds, predation by protozoans, osmotic stress, as well as in cellular recognition (De Vuyst and Degeest, 1999). EPS occur widely among prokaryotic species, mostly microalgae but are less common among yeasts and fungi (Sutherland, 1990). Some of those isolated from fungi do possess interesting physical and pharmacological properties such as anti-tumor activity which are currently in clinical use (Franz, 1989), and hypoglycemic activity (Kiho et al., 1993). The EPS from fungi are also used as dietary supplements for enhancing stamina and as a remedy for blood circulatory problems (Bae et al., 2000). In addition, microbial EPS are employed in wide range of industries depending on their different properties (Sutherland, 1998; Selbmann et al., 2002).

At present, over 11,000 strains of fungi from diverse natural habitats of Thailand have been isolated, identified and deposited at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) Culture Collection (BCC). From our preliminary experiments, we have identified a group of fungi especially entomopathogenic fungi that can secrete exocellular substances resulting in increased viscosity of media. The objective of this study is to chemically and biologically characterize exocellular biopolymers produced from 15 genera of fungi isolated from different locations and evaluate their potential as wound dressing materials. In this report, we identified a selected group of fungi producing biopolymers that are both biocompatible as well as promoting the production of IL-8, a cytokine responsible for enhancing the wound healing process.

2. Materials and methods

2.1 *Microorganisms and culture condition*

Sixteen strains of fungi from 15 different genera were selected as a representative from a group of fungi that were fast growing and produced the exocellular substances resulting in increased viscosity of media. Fourteen strains belong to a group of entomopathogenic fungi, except *Cookeinia tricholoma* BCC2468 and *Zygosporim masonii* BCC7543 which are a basidiomycete fungus and a seed fungus, respectively. They were initially grown on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C for 7 days. The agar block (1 cm³) containing mycelia was cut into small pieces and then transferred to 25 mL potato dextrose broth

(PDB) in a 250 mL Erlenmyer flask and incubated at 25 °C on a rotary shaker at 150 rpm for 7 days. Five percent (v/v) of the seed culture was transferred into the 50 mL PDB in a 250 mL Erlenmyer flask and incubated at 25 °C on a rotary shaker at 150 rpm for 21 days.

2.2 *Isolation and purification*

Mycelia were separated from culture broth by centrifugation at 10,000 xg for 20 min. The supernatant was filtered through a membrane filter (Whatman No. 1). Subsequently, culture filtrate was mixed with four volumes of 95 % ethanol, stirred vigorously, and stored at -20°C for at least 12 h. The precipitated polymers were recovered by centrifugation at 10,000 xg for 20 min and the supernatant was discarded. The polymers were then lyophilized and kept at -20°C until further use.

During purification step, the polymer was re-dissolved in distilled water and any insoluble materials were discarded by centrifugation at 10,000 xg for 20 min. The supernatant was dialyzed (molecular weight cut off 2,000 Da, Spectrum Laboratories, Inc., USA) against 4 L of distilled water for 24 h and lyophilized until completely dry.

2.3 *Analytical methods*

2.3.1 *Estimation of mycelial growth and polymer production*

To determine the rate of mycelial growth and levels of polymer production, representative samples were collected every 3 days. The cells and polymers were separated and purified as described above. The mycelial dry weight was measured after repeated washing of the mycelial pellets with distilled water and dried at 80°C until achieving a constant weight. The polymer dry weight was measured after lyophilization.

2.3.2 *Colorimetric assays*

Carbohydrate, uronic acid and amino sugar contents were estimated by the phenol-sulfuric acid, the Carbazole-sulfate and the Morgan-Elson techniques using glucose, glucuronic acid and glucosamine as standards, respectively (Chaplin and Kennedy, 1986). The total protein was identified by the Folin-Lowry method using bovine serum albumin as a standard (Plummer, 1978).

2.3.3 *Molecular weight determination*

Average molecular weight of the polymers was determined with a gel permeation chromatography (GPC). The analysis was carried out using a PL-GPC 110 system (Polymer Lab, UK) equipped with a refractive index (RI) detector and an Ultrahydrogel linear column (300 x 7.8 mm ID, Waters, USA). The universal calibration $\log(M_p)$ versus V_R , where M_p is the peak molecular weight, was obtained by using pullulan standards with molecular weights ranging from 5,900 to 788,000. The injection volume was 20 μL and the flow rate of the mobile phase (0.1 M NaOH) was 0.6 mL/min.

2.3.4 Solubility

One milligram of the polymer was tested for its solubility in 1 mL of the following solvents: distilled water, dimethylsulfoxide (DMSO), acetonitrile, ethanol and hexane. Each polymer mixture was vigorously stirred and allowed to stand for 24 h before determining the solubility levels.

2.3.5 Biological activity and IL-8 production determination

2.3.5.1 Assay for anti-viral activity and cytotoxic effects

Antiviral activity was evaluated against herpes simplex virus type 1 (HSV-1, strain HF ATCC VR-260) employing a modified plaque reduction assay (Abou-Karam and Shier, 1990) and the colorimetric method described by Skehan et al. (1990). Briefly, HSV-1 (30 plaque forming units/ 60 μL of Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with heat inactivated 10% fetal bovine serum) was mixed with various concentrations of polymers in 10 μL of 10% DMSO. Subsequently, the mixtures were added to 96-well microtiter plates containing 1×10^5 cells/mL (130 μL /well) Vero cells (ATCC CCL-81) and incubated at 37°C for 72 h in a humidified incubator with 5% CO_2 . Cells were then fixed with 10% TCA, stained with 0.057 % (w/v) sulforhodamine B and the absorbance was measured at 510 nm to determine percent inhibition. Polymers were also tested for cytotoxic effects to Vero cells and anti-cancer cell proliferation effects against BCA cells (human breast cancer cell line), KB cells (human epidermal carcinoma of mouth, ATCC CCL-17), and small cell lung cancer cells (NCI-H187) using a method described previously (Skehan et al., 1990). Acyclovir was used as a positive control for HSV-1 bioassay with IC_{50} value of 1.5 $\mu\text{g/mL}$. Ellipticine was used as a positive control for assays of Vero cells, BCA cells, KB cells and NCI-H187 cells and the IC_{50} values were 0.40, 1.46, 1.33 and 0.39 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

2.3.5.2 Assay for anti-fungal activity

Biopolymers were dissolved in appropriate solvents and tested against *Candida albicans* (ATCC 90028) using a modified soluble formazan assay (Scudiero et al., 1988). In brief, 100 μL of 2×10^6 CFU/mL *C. albicans* in RPMI 1640 medium containing 34.53 g/mL 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOP) was added to each well of 96-well microtiter plates containing 100 μL of polymers in various concentrations. Subsequently, plates were incubated at 37°C for 4 h and 50 μL of 1 mg/mL 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonylphenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT tetrazolium) and 0.025 mM *N*-methylphenazolum methosulfate (PMS) was added. After 4 h of incubation at 37°C, the absorbance at 450 nm was determined to indicate activity of living cells. The IC_{50} value of the positive control in our system, Amphotericin B, was 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.3.5.3 Determination of IL-8 production

Normal dermal human fibroblasts were seeded in 96-well microtiter plates at a concentration of 3×10^3 cells/100 μL /well in Dubelco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with heat inactivated 10% fetal bovine serum and incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2 . After 48 h, the medium was replaced with fresh medium containing various concentrations of polymers and incubated for an additional 48 h. Media were then collected and the levels of IL-8 were determined using the h-IL-8 ELISA kit (Roche Applied Science, Germany).

3. Results and discussion

3.1 Mycelial and polymer productivity of 16 representative fungi

Phytocordyceps sp. BCC2744 gave the highest mycelial yield (11.9 g/L) after 15 days of cultivation while *Hypocrella tamurai* BCC2350 produced the lowest mycelial dry weight (5.3 g/L) when compared to other fungi (Table 1). Most of the fungi could produce polymers between 0.3 – 3.1 g/L. However, the highest polymer yield at 15.71 g/L was produced by *Cordyceps nipponica* BCC2092 after cultivation for 18 days, which was approximately 5-fold higher than the polymer produced by the next highest polymer producer, *Hymenostilbe* sp. BCC2146. The final pH after 21 days of cultivation ranged between 4.99 – 8.22.

3.2 Chemical composition and properties of the polymers from 16 selected fungi

The results indicated that, apart from *Fusarium coccophilum* BCC2415, all studied fungi produced polymers which were mainly composed of sugar and therefore defined as polysaccharides (Figure 1). In addition, some of these polysaccharides contained an acidic sugar, uronic acid, while amino sugar was not significantly detected (data not shown).

From the solubility test (Table 2), the polymers were insoluble in several solvents which possess less polarity than DMSO. They were soluble in water and DMSO at different levels, except those from *Cordyceps dipterigena* BCC2073 and *Fusarium coccophilum* BCC2415 which were only soluble in water.

The average molecular weights (M_p) of the polymers determined by GPC were in the range of $2.8 \times 10^3 - 1.2 \times 10^7$ Da. *Fusarium coccophilum* BCC2415 and *Hirsutella* sp. BCC7057 gave the lowest and the highest molecular weight polymers, respectively (Table 2).

When tested for biological activities, the polymer produced from *Fusarium coccophilum* BCC2415 showed anticancer (NCI-H187) and antifungal (*Candida albicans*) activities. Anti-HSV-1 activity was exhibited in polymers produced from *Cookekia tricholoma* BCC2468, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 and *Zygosporium masonii* BCC7543. When normal dermal human fibroblasts (NHF) were exposed to the polymers, IL-8 was produced in culture media at rates ranging from 0.5 – 2.4 ng/mL. The cytotoxicity of these exo-biopolymers was also studied in 2 different kinds of mammalian cell lines: vero and NHF. The polymers produced from *Cookekia tricholoma* BCC2468, *Hirsutella* sp. BCC7057, *Hymenostilbe* sp. BCC2146, *Hypocrella tamurai* BCC2350, *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC2074 and *Torrubiella tenuis* BCC1056 inhibited growth of NHF, whereas those from *Fusarium coccophilum* BCC2415 were toxic to both Vero and NHF cells.

Currently, chitin, a polysaccharide found in arthropod exoskeletons and fungal cell walls, and its derivatives such as chitosan have been widely investigated for applications as alternative biomaterials that accelerate the wound healing process (Mori et al., 1997; Ueno et al., 2001). Chitin and its derivatives have been shown to possess positive effects on the wound healing process by inducing production of different types of cytokines including IL-8, a cytokine that recruits neutrophils to the wounded site as well as stimulates vascularization (Strieter et al., 1992; Mori et al., 1997).

Our results indicated that the 16 fungi produced different levels of exopolysaccharides. From the composition analysis, it was concluded that polymers produced from the studied fungi except *Fusarium coccophilum* BCC2415 are polysaccharides which contain a variety of sugars and protein. The polymer produced by *Fusarium coccophilum* BCC2415 was classified as a polysaccharide-protein complex due to the high protein content (69.22%) detected in the assay. These results corresponded well with

previous work which reported that biopolymers from microorganisms can be substituted with pyruvate, acetate, formate, sulfate, phosphate and other groups (Sutherland, 1990). They can also contain a wide variety of sugars and, in some cases, several non-carbohydrate side groups such as fatty acids, proteins, hydrocarbons and other polymers of various sizes, as found in polymers produced from prokaryotic cells (Weiner, 1997).

When tested for cytotoxic effects, 9 fungal strains were shown to be non-toxic to human and primate cells while showing no growth enhancing activities (data not shown). These 9 strains induced IL-8 production at different levels with 6 strains producing IL-8 at rates higher than 0.5 ng/mL, above the level reported from normal human adult dermal fibroblasts but similar to levels produced when cells were treated with platelet-derived growth factor (Liechty, 1998). Four of the 9 fungal strains, *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073, *Paecilomyces tenuipes* BCC2656, and *Phytocordyceps* sp. BCC2744 induced IL-8 production at a level higher than 2.43 ng/mL (a maximum concentration allowed in our test system). It was reported that the blister fluids from burns of human skin produced IL-8 at the level of approximately 10 ng/mL (Ono et al., 1995). Therefore, IL-8 induction by these polymers should exhibit beneficial effects to the healing process relevant to actual physiological conditions. Similarly, chitin and its derivatives were shown to induce cytokine production in mammalian cells, but did not stimulate cell proliferation, and this is believed to accelerate wound healing (Mori et al., 1997).

Regarding the level of polymer production, *Akanthomyces pistillariiformis* BCC2694, *Cordyceps dipterigena* BCC2073 and *Phytocordyceps* sp. BCC2744 produced polymers at a similar level, 2.15, 2.53 and 2.89 g/L, respectively, while *Paecilomyces tenuipes* BCC2656 produced polymers at a much lower level (0.41 g/L). However, this level of productivity was obtained from standard culturing conditions using PDB without optimization.

4. Conclusion

We have studied the polymers produced from 16 strains of fungi representing 15 genera and have identified those of three strains which are biocompatible and produce a cytokine that is known to stimulate the wound healing process and have characterized basic chemical and physical properties of these polymers. These three fungal polymers warrant further investigation for future development into a wound dressing materials.

Acknowledgement

This work was supported by the Biodiversity Research and Training Programme (BRT), Thailand (BRT R_645001).

References

- Abou-Karam, M., & Shier, W. T. (1990). A simplified plaque reduction assay for antiviral agents from plants. Demonstration of frequent occurrence of antiviral activity in higher plants. *Journal of Natural Products*, 53(2), 340-344.
- Bae, J. T., Sinha, J., Park, J. P., Song, C. H., & Yun, J. W. (2000). Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 482-487.
- Chaplin, M. F. (1986). Monosaccharides. In M. F. Chaplin, & J. F. Kennedy (Eds.), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach* (pp. 1-6). Washington DC: IRL Press.
- De Vuyst, L. & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 23, 153-177.
- Franz, G. (1989). Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Medica*, 55, 493-497.
- Kiho, T., Hui, J., Yamane, A., & Ukai, S. (1993). Polysaccharide in fungi XXXII hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 16 (12), 1291-1293.
- Liechty, K. W., Crombleholme, T. M., Cass, D. L., Martin, B., & Adzick, N. S. (1998). Diminished interleukin-8 (IL-8) production in the fetal wound healing response. *Journal of Surgical Research*, 77(1), 80-84.
- Mori, T., Okumura, M., Matsuura, M., Ueno, K., Tokura, S., Okamoto, Y., Minami, S., & Fujinaga, T. (1997). Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblast in vitro. *Biomaterials*, 18(13), 947-951.
- Ono, I., Gunji, H., Zhang, J. Z., Maruyama, K., & Kaneko, F. (1995). A study of cytokines in burn blister fluid related to wound healing. *Burns*, 21(5), 352-355.
- Plummer, D. T. (1978). *An Introduction to Practical Biochemistry*. (2nd ed.) (pp. 145-146). London: McGraw-Hill Book Company, Ltd.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth

and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48, 4827-4833.

Selbmann, L., Onofri, S., Fenice, M., Federici, F., & Petruccioli, M. (2002). Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE5080. *Research in Microbiology*, 153, 585-592.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.

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

Sutherland, I. W. (1990). *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides* (pp. 1-11). London: Cambridge University Press.

Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH*, 16, 41-46.

Ueno, H., Nakamura, F., Murakami, M., Okumura, M., Kadosawa, T., & Fujinaga, T. (2001). Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials*, 22, 2125-2130.

Weiner, R. M. (1997). Biopolymers from marine prokaryotes. *TIBTECH*, 15, 390-394.

Table 1 Maximum mycelial and polymer yields of 16 selected fungi

Fungal name and BCC number	Dry cell weight (g/L)*	Polymer (g/L)*	Final pH
<i>Akanthomyces pistillariiformis</i> BCC2694	10.43 ± 0.32 (12)	2.15 ± 0.05 (3)	6.56 ± 0.11
<i>Aschersonia samoensis</i> BCC2466	5.75 ± 1.09 (18)	2.56 ± 0.03 (6)	5.14 ± 0.13
<i>Beauveria bassiana</i> BCC2692	8.40 ± 0.34 (15)	0.59 ± 0.15 (21)	7.17 ± 0.19
<i>Cookenia tricholoma</i> BCC2468	7.45 ± 0.12 (15)	1.59 ± 0.29 (3)	7.09 ± 0.20
<i>Cordyceps dipterigena</i> BCC2073	9.65 ± 0.12 (12)	2.53 ± 0.52 (6)	6.47 ± 0.06
<i>Cordyceps nipponica</i> BCC2092	10.90 ± 0.81 (21)	15.71 ± 0.51 (18)	6.83 ± 0.05
<i>Fusarium coccophilum</i> BCC2415	9.31 ± 0.01 (15)	2.83 ± 0.46 (9)	7.50 ± 0.16
<i>Gibellula pulchra</i> BCC2711	6.28 ± 0.23 (18)	2.49 ± 0.23 (9)	5.22 ± 0.21
<i>Hirsutella</i> sp. BCC7057	5.57 ± 0.11 (15)	2.78 ± 0.07 (3)	5.12 ± 1.22
<i>Hymenostilbe</i> sp. BCC2146	8.58 ± 0.46 (15)	3.10 ± 0.37 (18)	7.14 ± 0.06
<i>Hypocrella tamurai</i> BCC2350	5.29 ± 0.27 (18)	3.07 ± 0.17 (6)	4.99 ± 0.05
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> BCC2074	7.31 ± 0.67 (15)	2.32 ± 0.67 (6)	7.07 ± 0.01
<i>Paecilomyces tenuipes</i> BCC2656	9.96 ± 0.12 (21)	0.41 ± 0.09 (18)	5.88 ± 0.26
<i>Phytocordyceps</i> sp. BCC2744	11.92 ± 0.15 (15)	2.89 ± 0.06 (3)	5.04 ± 0.64
<i>Torrubiella tenuis</i> BCC1056	7.89 ± 0.52 (9)	0.35 ± 0.02 (18)	7.78 ± 0.09
<i>Zygosporium masonii</i> BCC7543	9.75 ± 0.45 (15)	1.00 ± 0.16 (3)	8.22 ± 0.07

*Values are mean ± S.D. of three replicates? .

Number in parenthesis indicates number of days in cultivation.

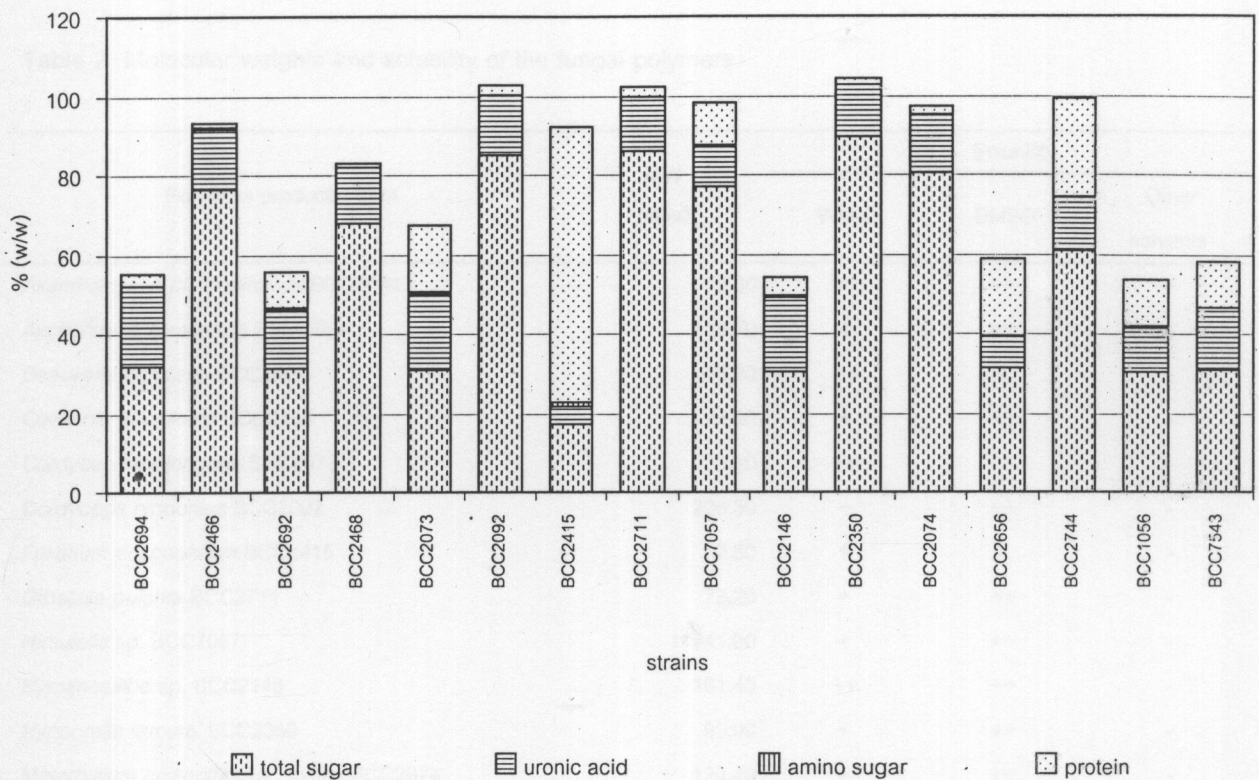


Fig 1 Composition of the polymers produced from 16 selected fungi

BCC2694: *Akanthomyces pistillariiformis*

BCC2466: *Aschersonia samoensis*

BCC2692: *Beauveria bassiana*

BCC2468: *Cookenia tricholoma*

BCC2073: *Cordyceps dipterigena*

BCC2092: *Cordyceps nipponica*

BCC2415: *Fusarium coccophilum*

BCC7057: *Hirsutella* sp.

BCC2146: *Hymenostilbe* sp.

BCC2350: *Hypocrella tamurai*

BCC2074: *Metarhizium anisopliae* var. *majus*

BCC2656: *Paecilomyces tenuipes*

BCC2744: *Phytocordyceps* sp.

BCC1056: *Torrubiella tenuis*

Table 2 Molecular weights and solubility of the fungal polymers

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

other solvents: acetonitrile, ethanol and hexane

++ soluble + partially soluble - insoluble

Table 3 Biological properties of the fungal polymers

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

+ toxic / inhibit growth >25% at 50 µg/mL

- nontoxic

** low level of activity against HSV-1

ภาคผนวก 2

ตารางที่ 1 เชื้อราในกลุ่มที่ผลิตสารโพลีเมอร์

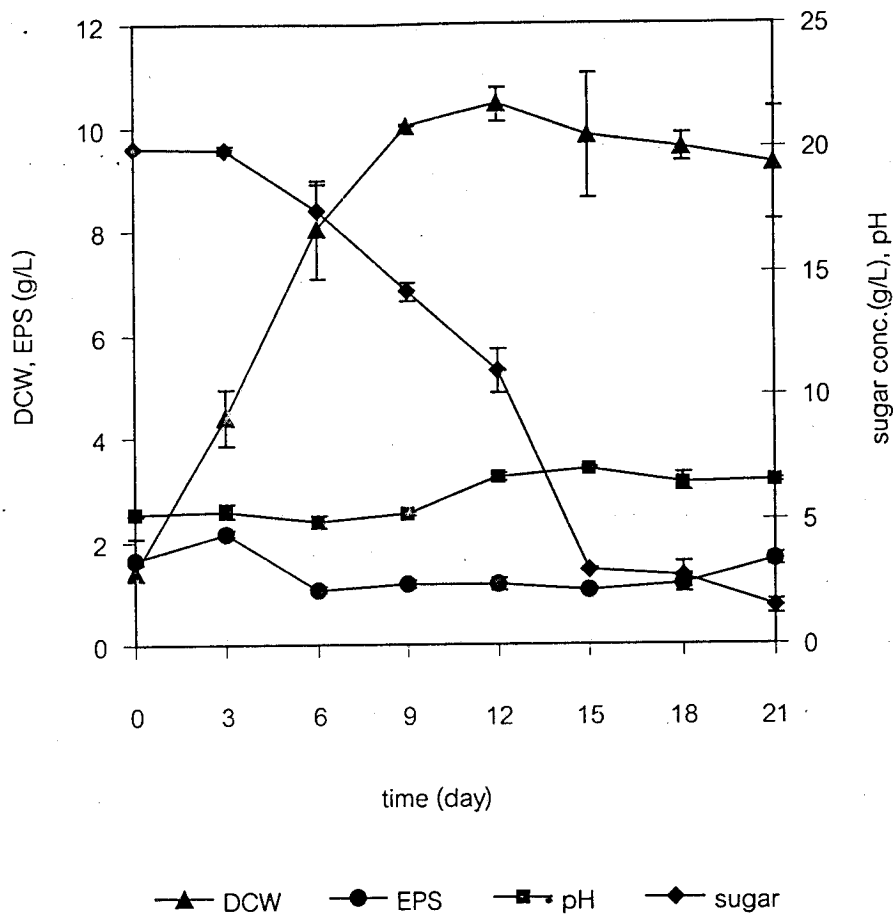
No.	BCC	Original code	Name	Group type
1	2107	NHJ 301.04	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	Insect pathogenic fungi
2	1452	NHJ 366.01	<i>Paecilomyces javanicus</i>	Insect pathogenic fungi
3	1867	NHJ 2361	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
4	1878	NHJ 3064	<i>Paecilomyces javanicus</i>	Insect pathogenic fungi
5	2108	NHJ 3068	<i>Paecilomyces javanicus</i>	Insect pathogenic fungi
6	2111	NHJ 3147	<i>Paecilomyces</i> sp.	Insect pathogenic fungi
7	2172	NHJ 5112.02	<i>Paecilomyces</i> sp.	Insect pathogenic fungi
8	2088	NHJ 6170	<i>Paecilomyces javanicus</i>	Insect pathogenic fungi
9	2215	NHJ 6939	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
10	2052	NHJ 7446	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
11	2254	NHJ 7617	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
12	2261	NHJ 7628	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
13	2252	NHJ 7629	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
14	2271	NHJ 7642	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
15	2608	NHJ 8034	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Insect pathogenic fungi
16	2666	NHJ 10439	<i>Paecilomyces</i> sp.	Insect pathogenic fungi
17	2685	NHJ 10460	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
18	2700	NHJ 10542	<i>Paecilomyces</i> sp.	Insect pathogenic fungi
19	2656	NHJ 10567	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
20	2658	NHJ 10599	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
21	2674	NHJ 10601	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
22	2687	NHJ 10646	<i>Paecilomyces amoeneroseus</i>	Insect pathogenic fungi
23	2683	NHJ 10700	<i>Paecilomyces</i> sp.	Insect pathogenic fungi
24	2724	NHJ 10741	<i>Paecilomyces javanicus</i>	Insect pathogenic fungi
25	2835	RN 472	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi
26	2836	RN 482	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Insect pathogenic fungi

No.	BCC	Original code	Name	Group type
27	7055	NHJ 831.02	<i>Beauveria</i> sp.	Insect pathogenic fungi
28	1507	NHJ 863.03	<i>Beauveria</i> sp.	Insect pathogenic fungi
29	2114	NHJ 3073	<i>Beauveria</i> sp.	Insect pathogenic fungi
30	1859	NHJ 4981	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
31	1906	NHJ 6455	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
32	6750	NHJ 7757	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
33	2497	NHJ 7772	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
34	2568	NHJ 10356	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
35	2692	NHJ 10511	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
36	2653	NHJ 10548	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
37	2657	NHJ 10568	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
38	2659	NHJ 10600	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
39	2783	RN 313	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
40	2784	RN 314	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
41	2794	RN 411	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
42	2795	RN 421	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
43	2796	RN 423	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
44	2797	RN 425	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
45	2798	RN 427	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
46	2802	RN 461	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
47	2804	RN 463	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
48	2805	RN 465	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
49	2806	RN 468	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
50	2807	RN 469	<i>Beauveria bassiana</i>	Insect pathogenic fungi
51	2166	NHJ 953.05	<i>Cordyceps irangiensis</i>	Insect pathogenic fungi
52	2106	NHJ 1413	<i>Cordyceps</i> sp.	Insect pathogenic fungi
53	2092	NHJ 4286	<i>Cordyceps nipponica</i>	Insect pathogenic fungi
54	2093	NHJ 5804	<i>Cordyceps nelumboides</i>	Insect pathogenic fungi
55	2583	NHJ 6217	<i>Cordyceps</i> sp.	Insect pathogenic fungi
56	2241	NHJ 6272	<i>Cordyceps irangiensis</i>	Insect pathogenic fungi
57	2142	NHJ 7023	<i>Cordyceps</i> sp.	Insect pathogenic fungi

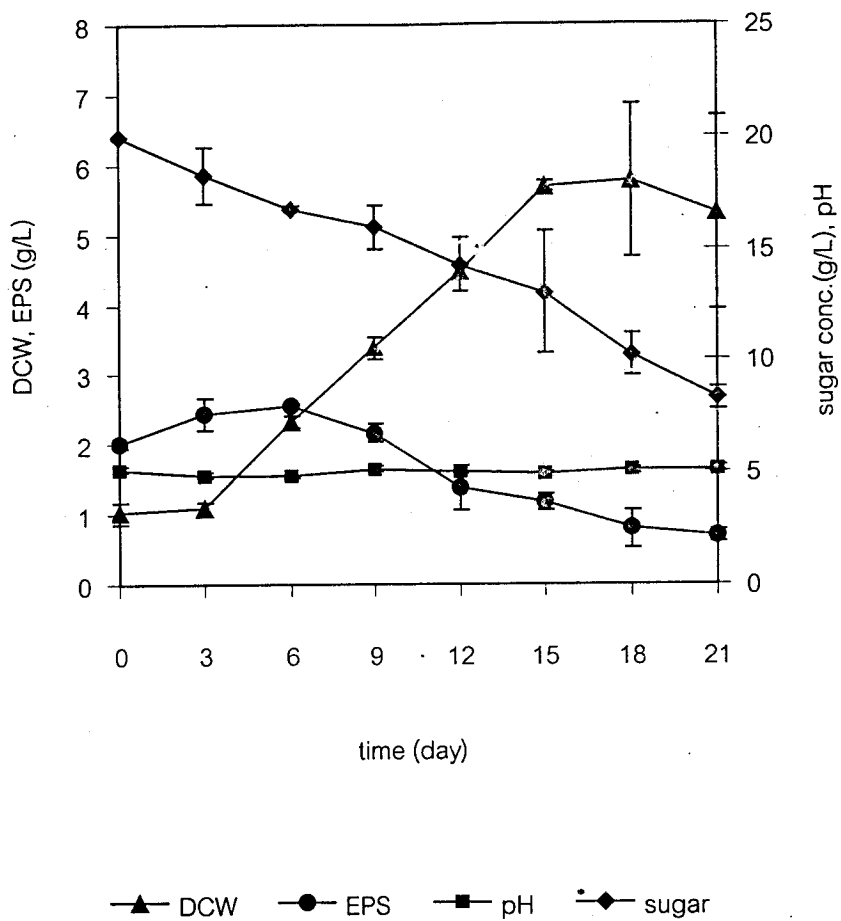
No.	BCC	Original code	Name	Group type
58	2073	NHJ 7497	<i>Cordyceps dipterigena</i>	Insect pathogenic fungi
59	2059	NHJ 7501	<i>Cordyceps unilateralis</i>	Insect pathogenic fungi
60	2058	NHJ 7502	<i>Cordyceps unilateralis</i>	Insect pathogenic fungi
61	2201	NHJ 7554	<i>Cordyceps sphecocephala</i>	Insect pathogenic fungi
62	2663	NHJ 10474	<i>Cordyceps obtuse</i>	Insect pathogenic fungi
63	2742	NHJ 10781	<i>Cordyceps nelumboides</i>	Insect pathogenic fungi
64	2819	RN 347	<i>Cordyceps militaris</i>	Insect pathogenic fungi
65	2800	RN 453	<i>Cordyceps sphaerocephala</i>	Insect pathogenic fungi
66	2814	RN 479	<i>Cordyceps militaris</i>	Insect pathogenic fungi
67	1486	NHJ 684.01	<i>Aschersonia placenta</i>	Insect pathogenic fungi
68	2149	NHJ 2839	<i>Aschersonia badia</i>	Insect pathogenic fungi
69	7016	NHJ 4723	<i>Aschersonia</i> sp.	Insect pathogenic fungi
70	2161	NHJ 5150	<i>Aschersonia samoensis</i>	Insect pathogenic fungi
71	1648	NHJ 5222	<i>Aschersonia samoensis</i>	Insect pathogenic fungi
72	2290	NHJ 6137	<i>Aschersonia samoensis</i>	Insect pathogenic fungi
73	2466	NHJ 6947	<i>Aschersonia samoensis</i>	Insect pathogenic fungi
74	1506	NHJ 858.01	<i>Torrubiella tenuis</i>	Insect pathogenic fungi
75	7084	NHJ 885.02	<i>Torrubiella</i> sp.	Insect pathogenic fungi
76	1824	NHJ 6200	<i>Torrubiella petchii</i>	Insect pathogenic fungi
77	2274	NHJ 6209	<i>Torrubiella petchii</i>	Insect pathogenic fungi
78	2331	NHJ 6240	<i>Torrubiella petchii</i>	Insect pathogenic fungi
79	2698	NHJ 10497	<i>Torrubiella luteorostrata</i>	Insect pathogenic fungi
80	7631	NHJ 10998.05	<i>Torrubiella luteorostrata</i>	Insect pathogenic fungi
81	2529	NHJ 3261	<i>Gibellula pulchra</i>	Insect pathogenic fungi
82	2234	NHJ 4115	<i>Gibellula</i> sp.	Insect pathogenic fungi
83	2297	NHJ 5828	<i>Gibellula</i> sp.	Insect pathogenic fungi
84	2216	NHJ 5970	<i>Gibellula</i> sp.	Insect pathogenic fungi
85	2711	NHJ 10808	<i>Gibellula pulchra</i>	Insect pathogenic fungi
86	2208	NHJ 4470	<i>Akanthomyces cinereus</i>	Insect pathogenic fungi
87	2694	NHJ 10422	<i>Akanthomyces pistillariiformis</i>	Insect pathogenic fungi
88	2650	NHJ 10434	<i>Akanthomyces pistillariiformis</i>	Insect pathogenic fungi

No.	BCC	Original code	Name	Group type
89	2771	NHJ 10789	<i>Akanthomyces</i> sp.	Insect pathogenic fungi
90	7057	NHJ 1884	<i>Hirsutella</i> sp.	Insect pathogenic fungi
91	2284	NHJ 6018	<i>Hirsutella</i> sp.	Insect pathogenic fungi
92	2226	NHJ 5782	<i>Hypocrella raciborski</i>	Insect pathogenic fungi
93	2350	NHJ 6227	<i>Hypocrella tamurai</i>	Insect pathogenic fungi
94	2612	NHJ 8066	<i>Hypocrella raciborski</i>	Insect pathogenic fungi
95	2415	NHJ 350.07	<i>Fusarium coccophilum</i>	Insect pathogenic fungi
96	2146	NHJ 1751.02	<i>Hymenostilbe</i> sp.	Insect pathogenic fungi
97	2074	NHJ 5858	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i>	Insect pathogenic fungi
98	2744	NHJ 10627	<i>Phytocordyceps</i> sp.	Insect pathogenic fungi
99	2665	NHJ 10552	Unidentified unidentified	Insect pathogenic fungi
100	2654	NHJ 10558	Unidentified unidentified	Insect pathogenic fungi
101	2791	RN 401	Unidentified unidentified	Insect pathogenic fungi
102	2468	NHJ 1466	<i>Cookeia tricholoma</i>	Basidiomycetes
103	2421	NHJ 1887	<i>Cyathus</i> sp.	Basidiomycetes
104	2512	NHJ 2102	Unidentified unidentified	Basidiomycetes
105	2512	NHJ 2102	Unidentified unidentified	Basidiomycetes
106	4005	SFC 309	<i>Dinemasporium</i> sp.	Seed fungi
107	3957	SFC 514	<i>Cryptophialoidea secunda</i>	Seed fungi
108	7553	SFC 587	<i>Graphium</i> sp.	Seed fungi
109	7543	SFC 607	<i>Zygosporium masonii</i>	Seed fungi
110	7549	SFC 649	<i>Memnoniella echinata</i>	Seed fungi
111	7551	SFC 842	<i>Myrothecium</i> sp.	Seed fungi
112	6173	GL 288	<i>Eutypa</i> sp.	Marine fungi
113	6175	GL 395	Unidentified unidentified	Marine fungi
114	6174	GL 435	<i>Rhizophila marina</i>	Marine fungi
115	4875	WK 375	Unidentified unidentified	Alkaline fungi
116	4878	WK 378	Unidentified unidentified	Alkaline fungi
117	4885	WK 385	Unidentified unidentified	Alkaline fungi
118	5536	WK 439	Unidentified unidentified	Alkalitolerant fungi
119	5556	WK 459	Unidentified unidentified	Alkalitolerant fungi

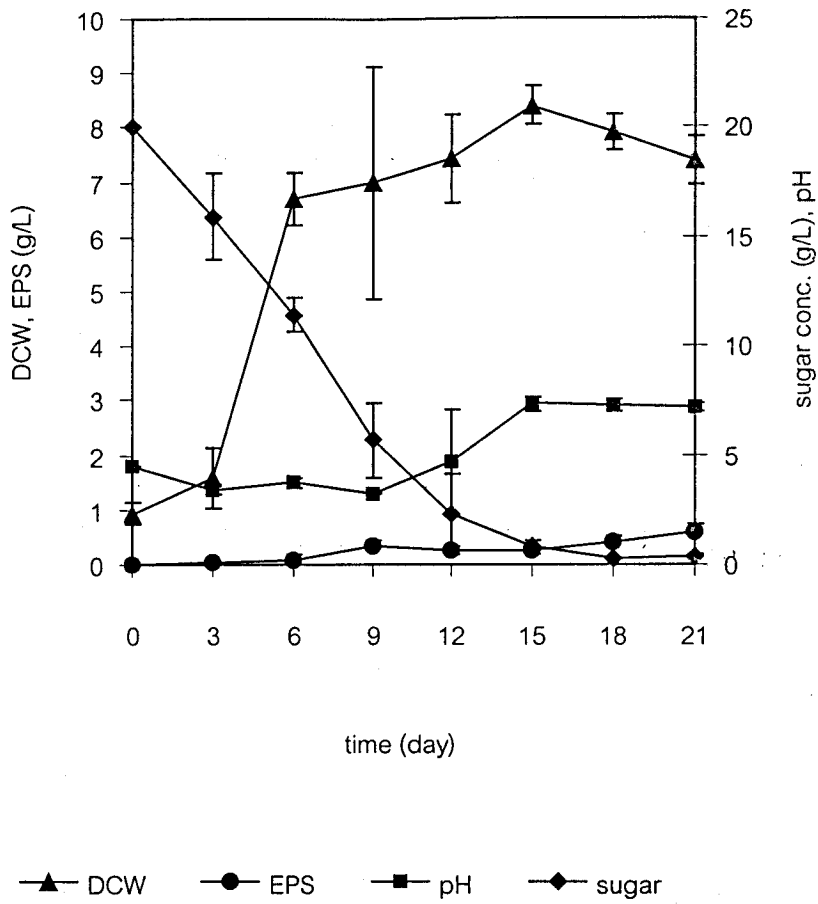
No.	BCC	Original code	Name	Group type
120	5581	WK 484	Unidentified unidentified	Alkalitolerant fungi
121	7532	SF 156	Unidentified unidentified	Sand fungi
122	4102	MUCU 10073	Unidentified unidentified	Endophytic fungi
123	4103	MUCU 10075	Unidentified unidentified	Endophytic fungi
124	4117	MUCU 10088	Unidentified unidentified	Endophytic fungi
125	8022	PP 1246	Unidentified unidentified	Endophytic fungi
126	5923	NP 14	Unidentified unidentified	Coelomycetes
127	5938	NP 33	Unidentified unidentified	Coelomycetes
128	5949	NP 51	Unidentified unidentified	Coelomycetes
129	5951	NP 53	Unidentified unidentified	Coelomycetes
130	2272	NHJ 7671	<i>Xylaria</i> sp.	Xylariaceae
131	680	F4b-11	<i>Streptomyces</i> sp.	Actinomycete
132	5874	Y3b-04	<i>Streptomyces</i> sp.	Actinomycete
133	5871	AD4b-01	<i>Streptomyces</i> sp.	Actinomycete
134	2376	NHJ 1041.38	Unidentified unidentified	Dung fungi
135	2424	NHJ 2108	Unidentified unidentified	Discomycetes
136	7072	NHJ 5907	Unidentified unidentified	Wood decaying fungi
137	3646	SS 634	Unidentified unidentified	Aquatic fungi
138	2632	NHJ 7844	Unidentified unidentified	
139	2546	NHJ 7981	Unidentified unidentified	
140	2553	NHJ 8056 NT	Unidentified unidentified	
141	2579	NHJ 8060	Unidentified unidentified	
142	2617	NHJ 8072 NT3	Unidentified unidentified	
143	2554	NHJ 8085 NT1	Unidentified unidentified	
144	2555	NHJ 8086 NT1	Unidentified unidentified	
145	2616	NHJ 8086 NT3	Unidentified unidentified	
146	5972	D1a-06	Unidentified unidentified	
147	8605	PP 129	Unidentified unidentified	



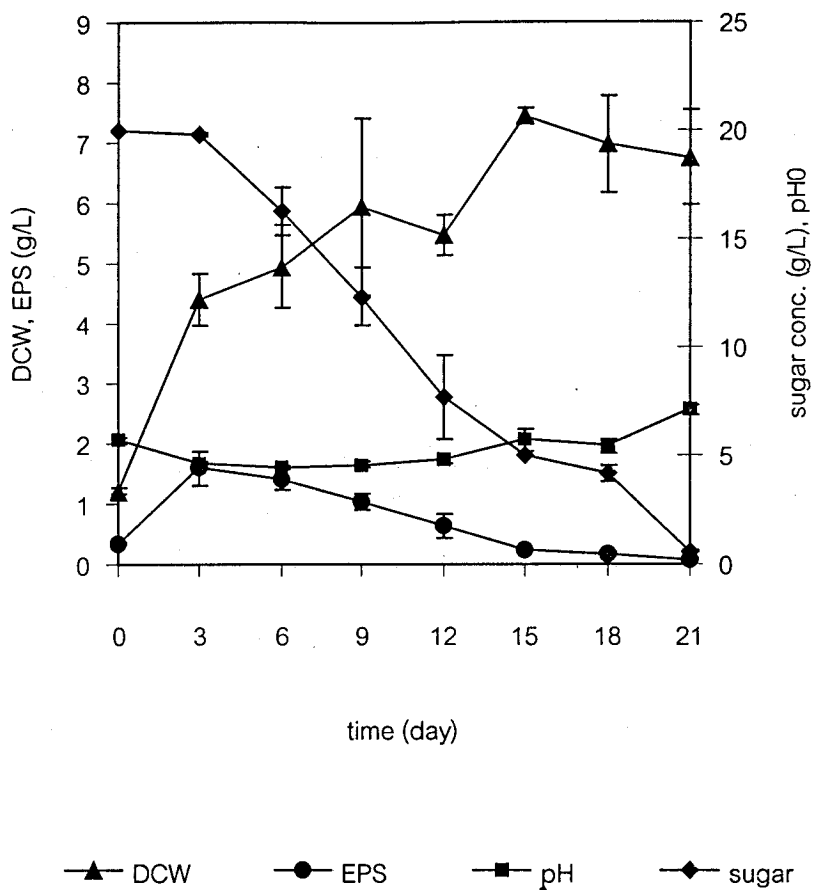
รูปที่ 1 การเจริญ การผลิตโพลีเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Akanthomyces pistillariiformis* BCC 2694 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



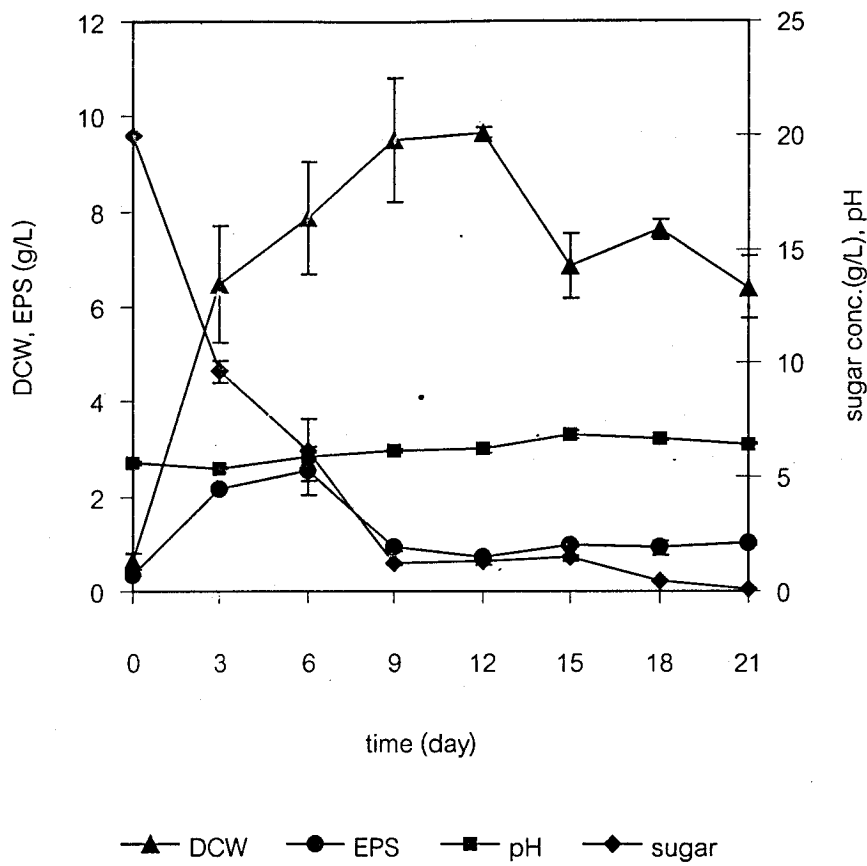
รูปที่ 2 การเจริญ การผลิตโพลีเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Aschersonia samoensis* BCC 2466 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



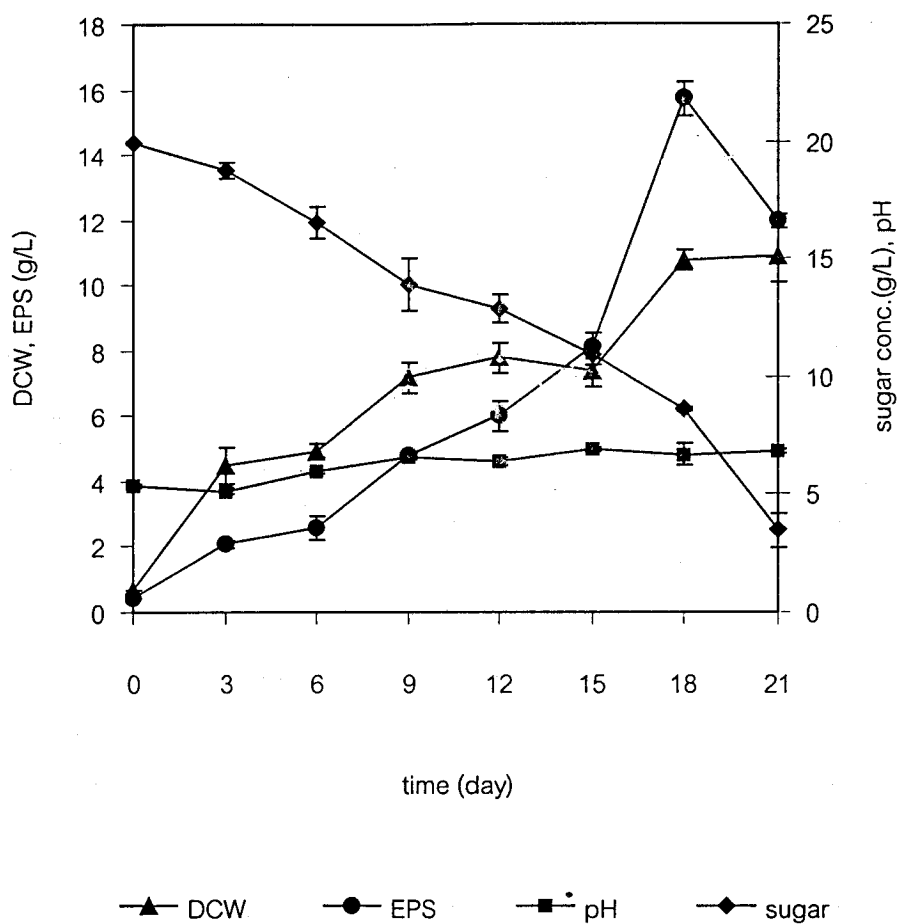
รูปที่ 3 การเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Beauveria bassiana* BCC 2692 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



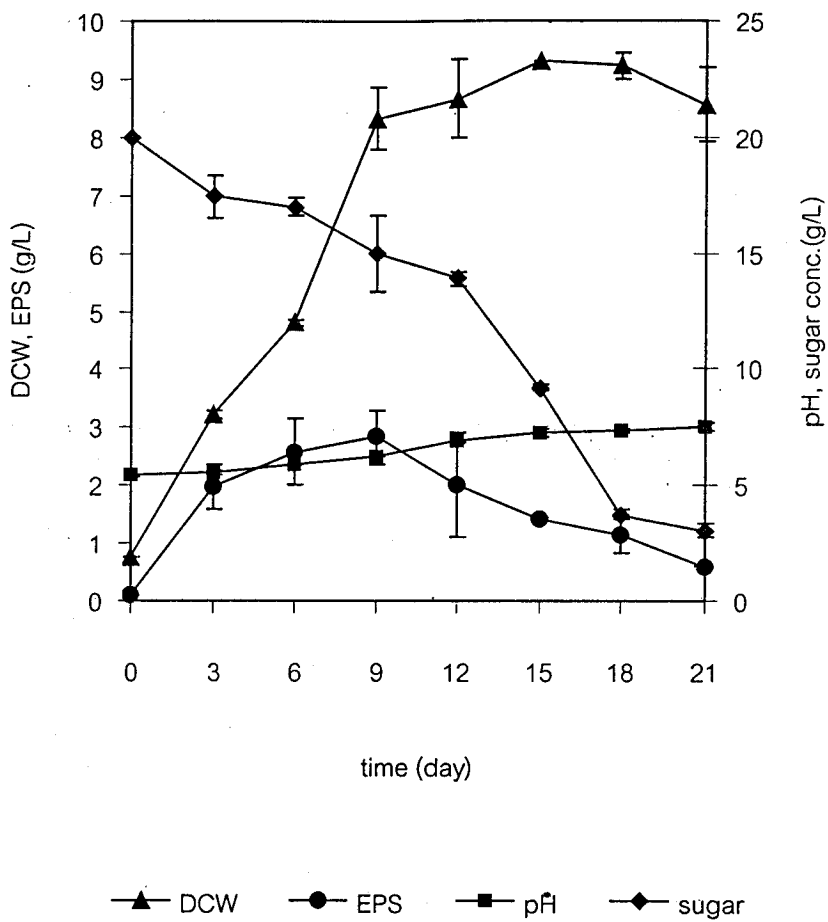
รูปที่ 4 การเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Cookenia tricholoma* BCC 2468 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



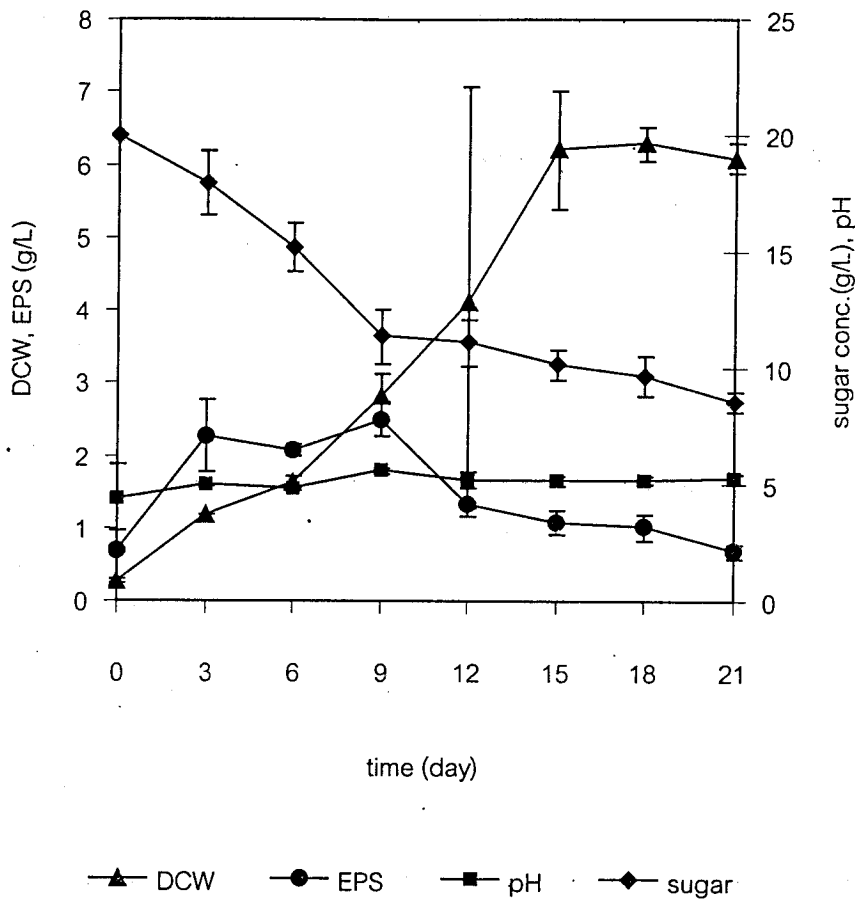
รูปที่ 5 การเจริญ การผลิตโพลีเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Cordyceps dipterigena* BCC 2073 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



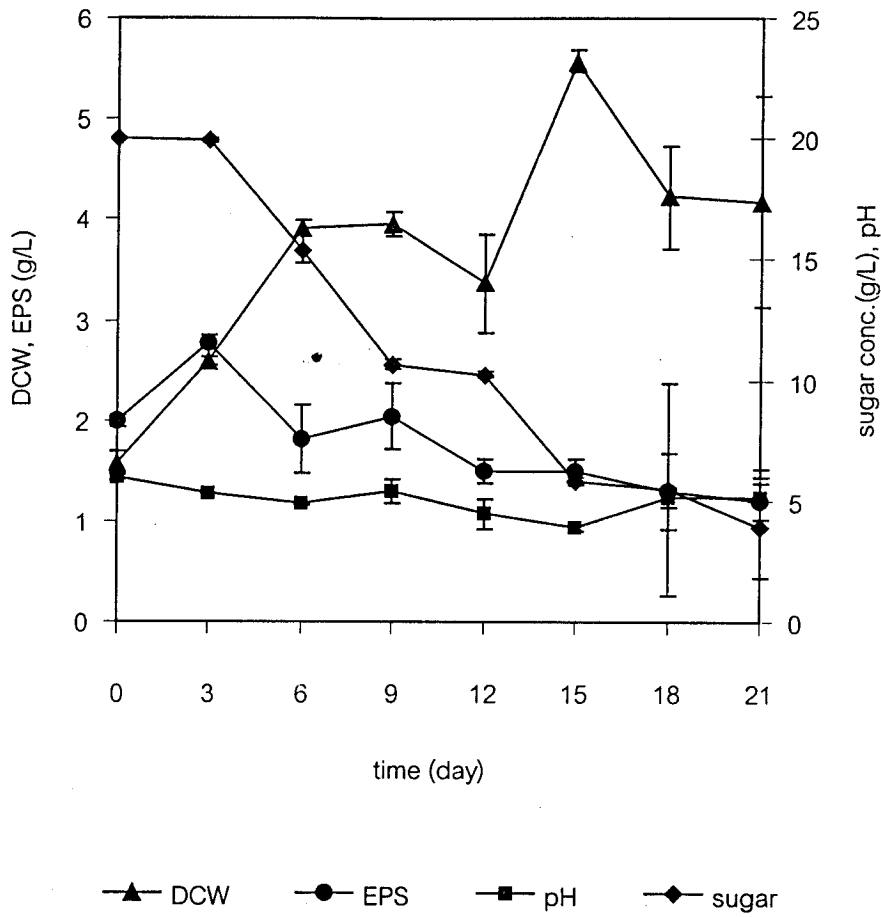
รูปที่ 6 การเจริญ การผลิตโพลีเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Cordyceps nipponica* BCC 2092 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



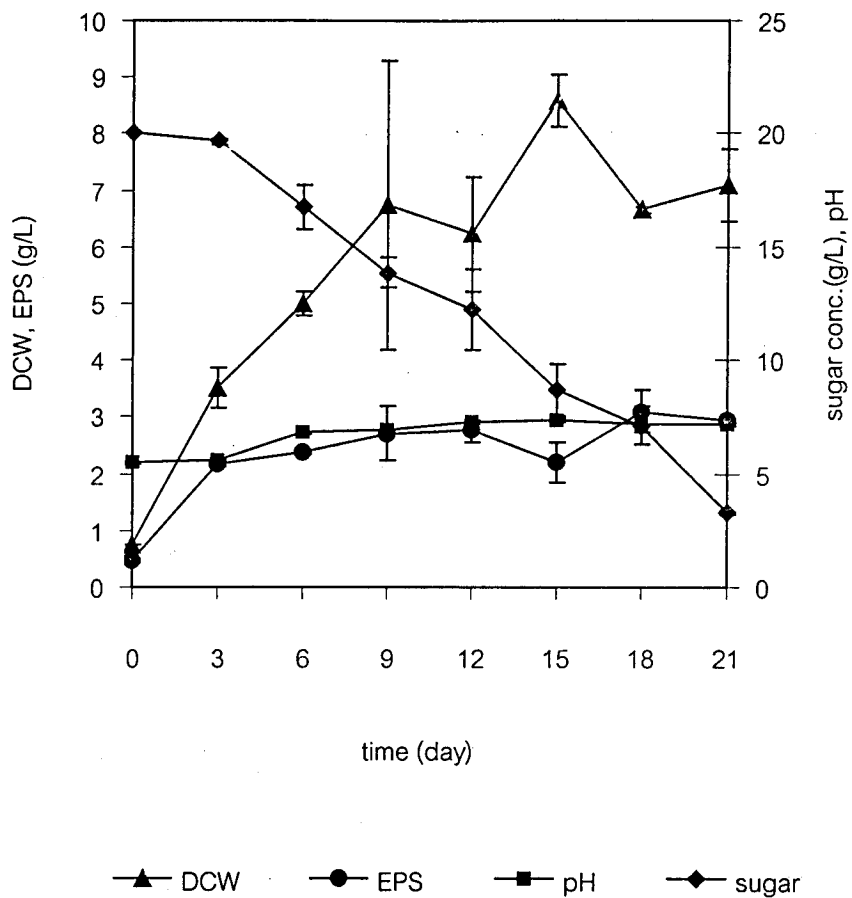
รูปที่ 7 การเจริญ การผลิตโพลีเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Fusarium coccophilum* BCC 2415 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



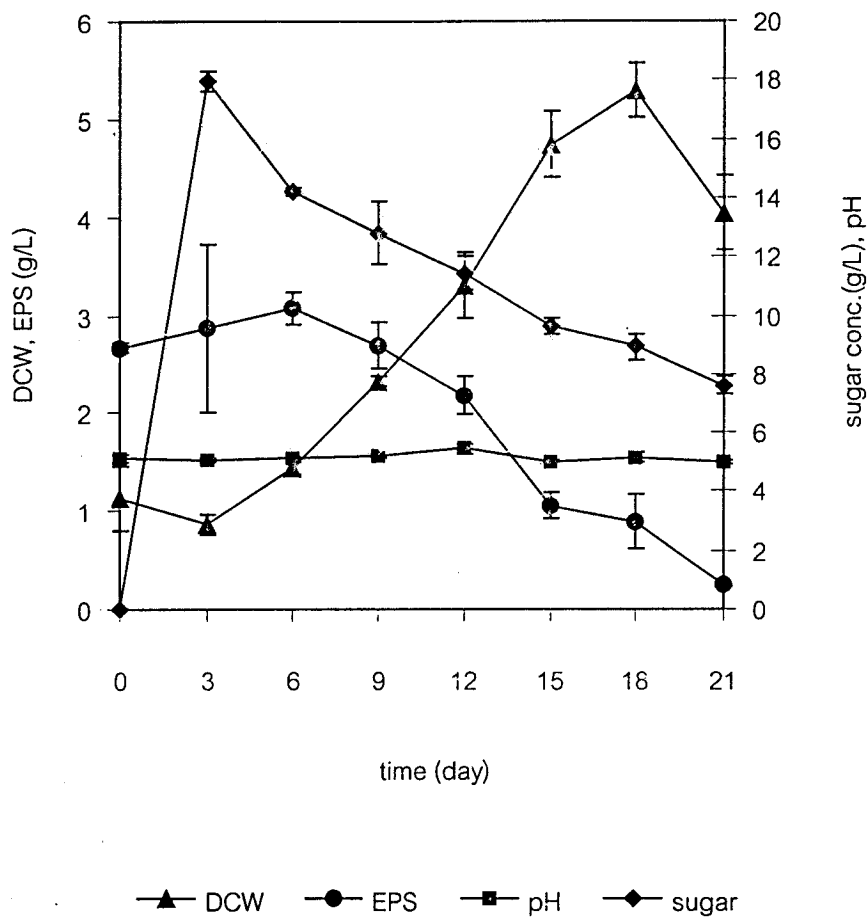
รูปที่ 8 การเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Gibellula pulchra* BCC 2711 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



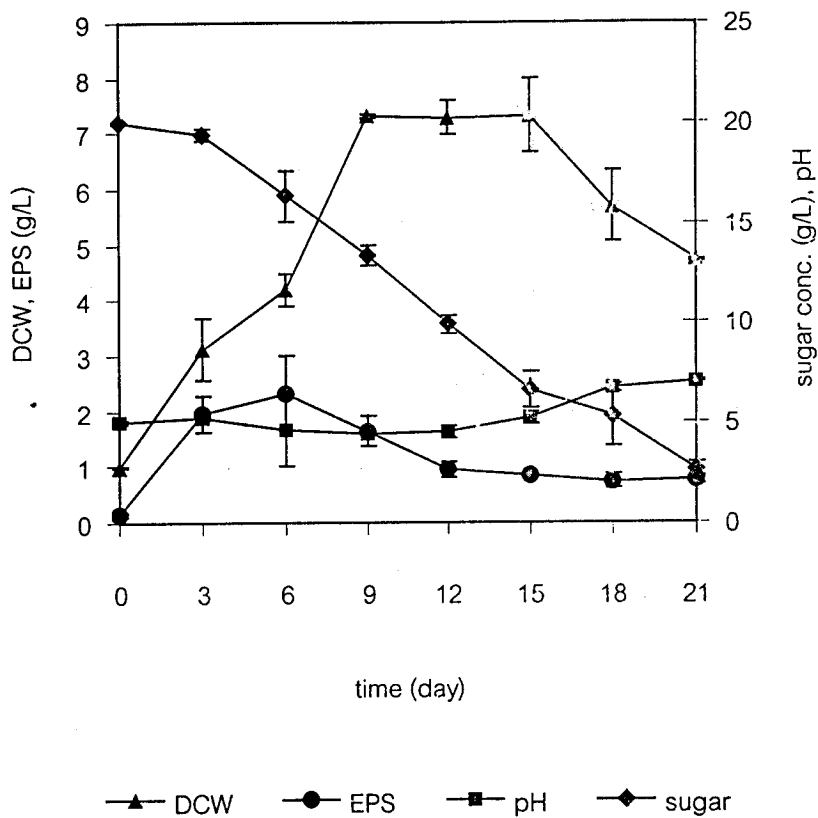
รูปที่ 9 การเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Hirsutella* sp. BCC 7057 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



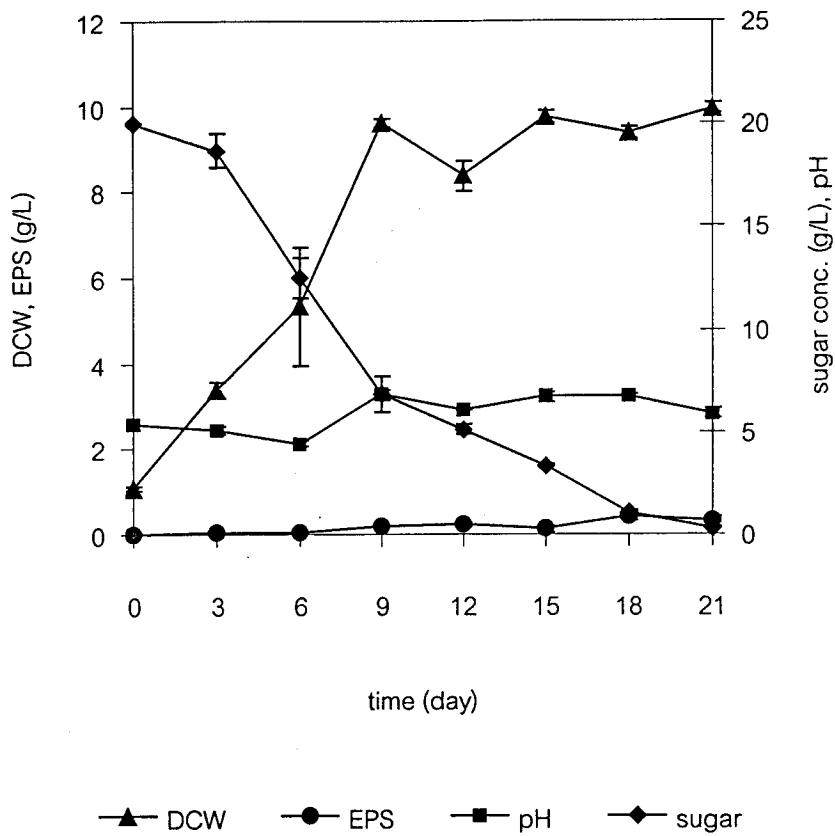
รูปที่ 10 การเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Hymenostilbe* sp. BCC 2146 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



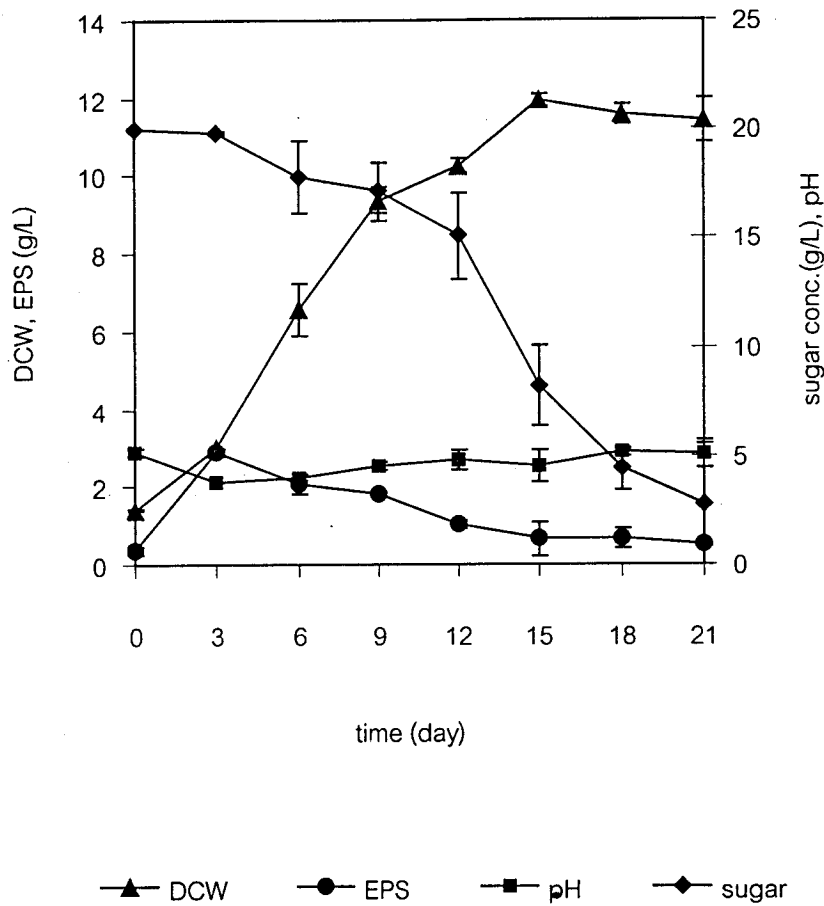
รูปที่ 11 การเจริญ การผลิตโพลีเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Hypocrella tamurai* BCC 2350 เมื่อเจริญในอาหาร RDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



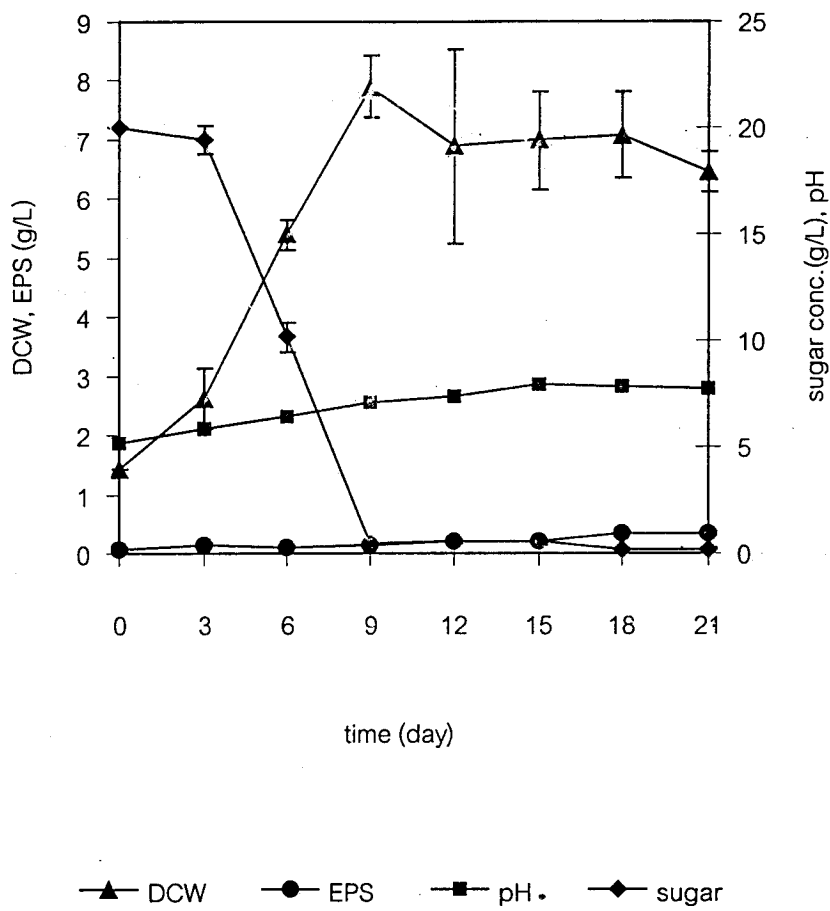
รูปที่ 12 การเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* var. *majus* BCC 2074 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



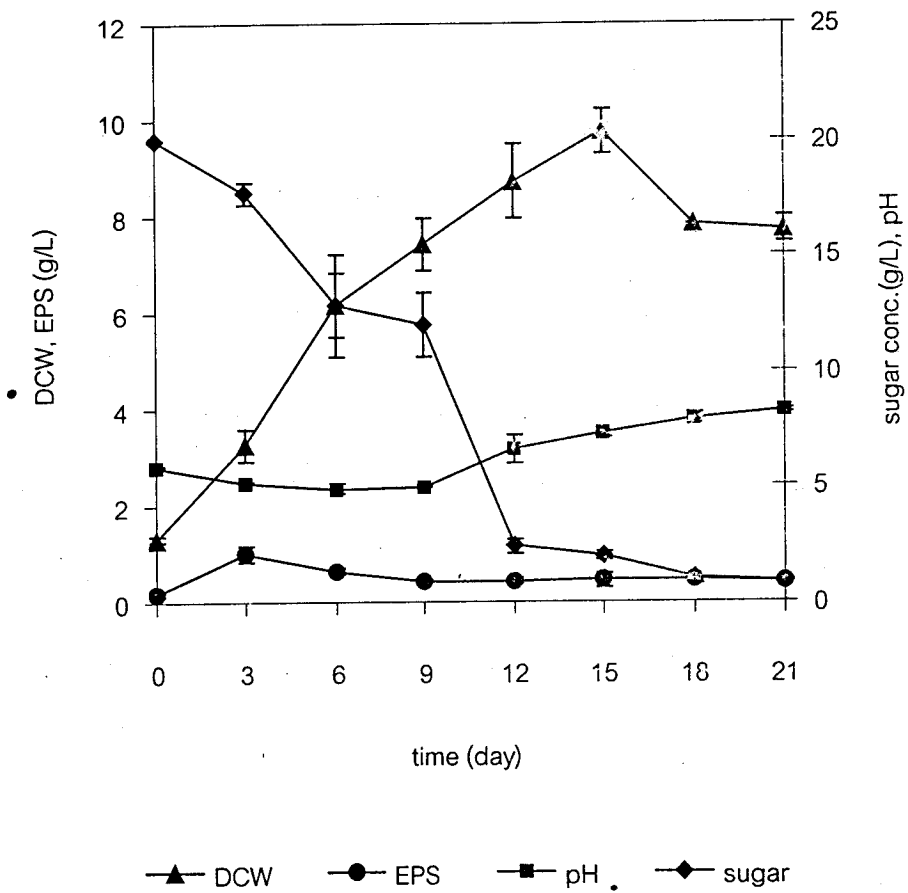
รูปที่ 13 การเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Paecilomyces tenuipes* BCC 2656 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 14 การเจริญ การผลิตโพลีเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Phytocordyceps* sp. BCC 2744 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 15 การเจริญ การผลิตโพลิเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Torribiella tenuis* BCC 1056 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 16 การเจริญ การผลิตโพลีเมอร์ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการใช้น้ำตาล ของเชื้อ *Zygosporium masonii* BCC 7543 เมื่อเจริญในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก 4

1. การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.1 การแปลผลการทดสอบ Cytotoxicity to vero cell & Anti-HSV-1

ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ คือ 50 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการแปลผลฤทธิ์ยับยั้งไวรัส (% inhibition) ที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ vero ตามหลักเกณฑ์ ดังนี้

<u>% inhibition at non-toxic concentration</u>	<u>Activity</u>
< 25 %	Inactive
25 – 35 %	Weakly active
> 35 – 50%	Moderately active
> 50 %	Active (ทำ serial dilution เพื่อหาค่า IC_{50})

1.2 Antifungal against *Candida albicans*

<u>% inhibition</u>	<u>Activity</u>
> 50 $\mu\text{g/mL}$	inactive
20 – 50 $\mu\text{g/mL}$	weakly
5 – 20 $\mu\text{g/mL}$	moderately
< 5 $\mu\text{g/mL}$	strongly

1.3 Anticancer

3.1 KB (oral human epidermal carcinoma)

3.2 BC (Brest cancer)

3.3 NCI-H187 (Human small cell lung cancer)

การแปลผลการทดสอบ : ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ คือ 20 $\mu\text{g/mL}$

<u>ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)</u>	<u>Activity</u>
> 20	inactive
> 10 – 20	weakly active
5 – 10	moderately active
< 5	strongly active

2. วิธีการวัดปริมาณ IL-8 ใน culture medium โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (h-Interleukin-8 ELISA จาก Roche)

Step	Action	Volume/well	Time
1	Pipette thoroughly in the appropriate well: -Solution 3a-3f (standard), -Solution 4 (control serum), -Sample (culture medium).	20 μ L	
2	-Add solution 9 (immunoreagent). -Cover the plate tightly with an adhesive cover foil and incubate under constant shaking at 350 rpm.	200 μ L	2 h
3	-Remove the solution by aspirating or tapping. -Wash 3 times with solution6 (washing buffer)	3 x 300 μ L	3 x 1 min.
4	-Remove the washing fluid by aspirating or tapping. -Add solution 7 (TMB substrate solution), fill in a separate vial, do not pipette from the bottle. -Cover the plate tightly with an adhesive cover foil and incubate in the dark on a plate shaker at 15-25°C	200 μ L	10-25 min
5	Photometric measurement -Add solution 8 (TMB stop solution) -Photometric measurement	50 μ L	1 min

ภาคผนวก 5

 ^{13}C -NMR Spectra

Current Data Parameters
NAME Akenthomyces

EXPNO 1

PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 201401

Time 01:17

INSTRUM dpr320

PROBHD 5 mm MuliMag

PULPROG zgpg30

TD 3274

SOLVENT NONE

DS 4000

SWH 37012.961 Hz

FIDRES 13.639141 Hz

AQ 0.02637192 sec

RG 4096

DW 17.920 usec

DE 4.75 usec

TE 300.2 K

P2 9.90 usec

RO 1872

D1 4.0000000 usec

PL1 -3.20 dB

PL2 -2.00 dB

PL3 3.00 usec

RF03 304.1133811 MHz

NUC1 100.000 usec

SFO1 75.4771470 MHz

NUC2 13C

PL12 -5.00 dB

F2 - Processing parameters

SF 75.467738 MHz

WDW EM

SSB 0

LB 25.00 Hz

GB 0

PC 1.00

ID NMR file parameters

CX 20.00 cm

F1P 307.350 ppm

F1 23198.03 Hz

F2 101.624 MHz

F2 4579.74 ppm

PRACM 1K-40373 pps/cm

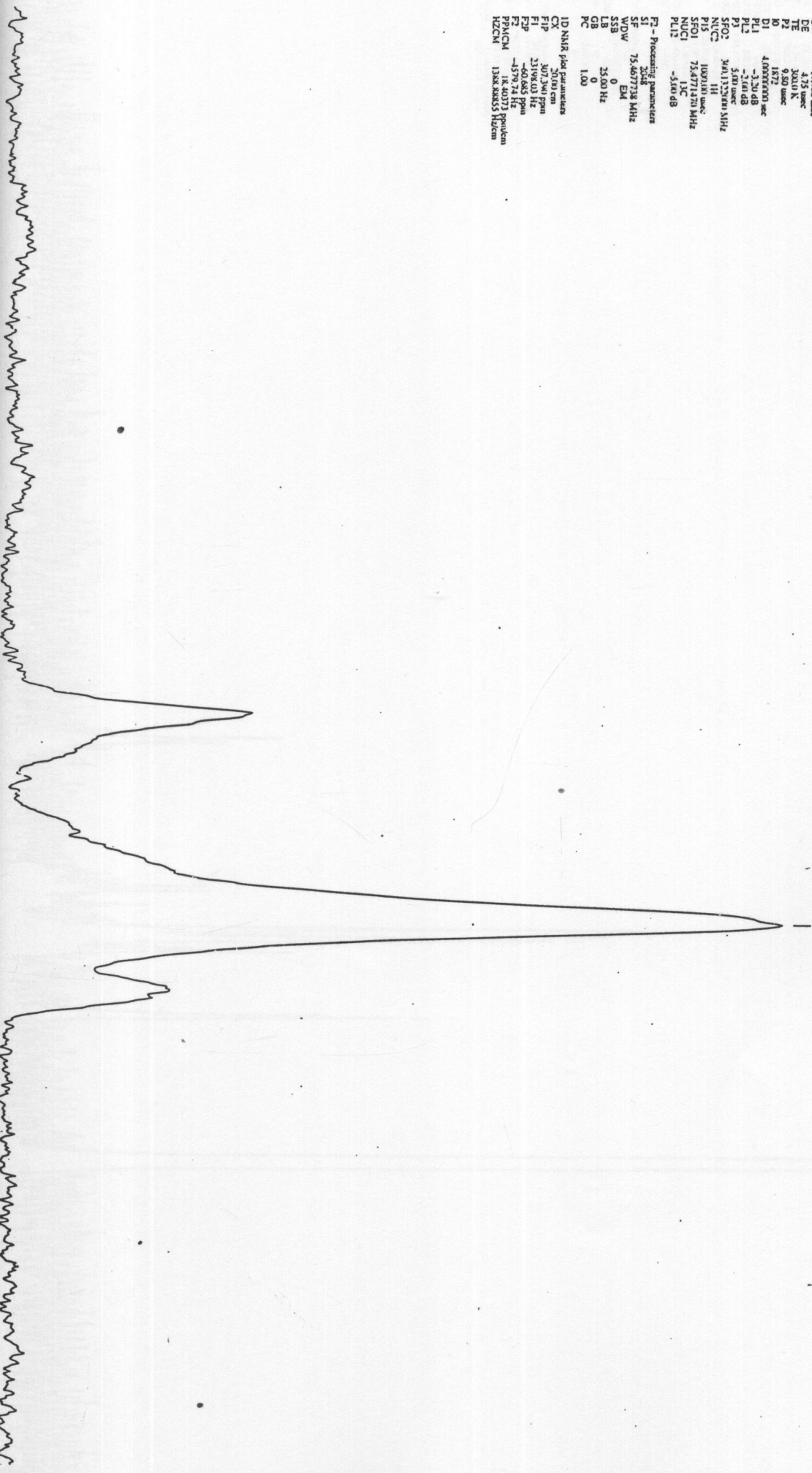
HZCM 138K.88835 Hz/cm

Akenthomyces pistillariformis

104.088

72.844

62.287



Current Data Parameters
NAME Aschersonia
PACNO 3
PROCON 1

F2 - Acquisition Parameters

Date: 9/20/81
Time: 17:48
INSTRUM dpa 3xi
PROBHD 5 mm Multinu
TURBO 127% spk
SOLVENT DMF-d6
NS 200K1

DS 0
SWH 21231.427 Hz
FIDRES 0.647925 Hz
AQ 0.771764 sec
RG 1024
DS 21.550 usec
DE 4.50 usec
TE 300.0 K
D11 0.03000000 sec
PL1 27.00 dB
SFO2 100.625 MHz
SFO1 300.1132005 MHz
NUC2 1H
PL2 130.00 dB
D1 1.00000000 sec
PI 4.50 usec
DE 4.50 usec
SFO 300.1132005 MHz
NUC1 13C
PL1 0.00 dB

F2 - Processing Parameters

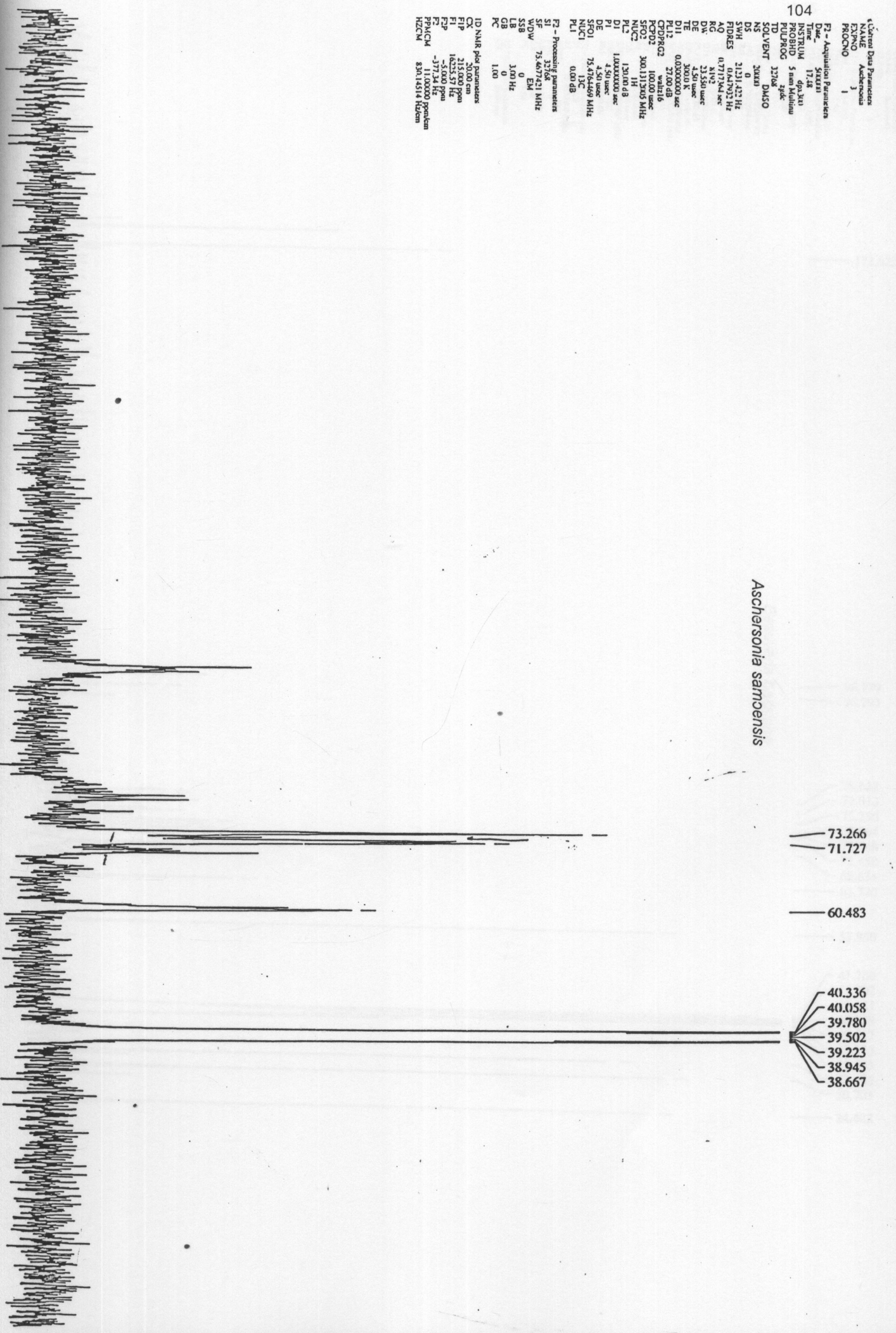
SI 32768
SF 75.4677421 MHz
WDW 0 EM
SSB 0
LB 3.00 Hz
GB 0
PC 1.00

ID NMR plus parameters

CV 100.000000 ppm
FIP 215.000 ppm
FI 1625.57 Hz
FPP -5.000 ppm
FALGM -377.24 Hz
FALGM 11.14500 ppm/cm
HZCM 831.14514 ppm/cm

Aschersonia sammensis

- 73.266
- 71.727
- 60.483
- 40.336
- 40.058
- 39.780
- 39.502
- 39.223
- 38.945
- 38.667



Current Data Parameters
NAME: Beauveria
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ Time: 20040524 09:30
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Muliim
PULPROG: zgpg
TD: 32768
SOLVENT: D2O
NS: 3000
DS: 4

SWH: 23673.736 Hz
FIDRES: 0.6693069 Hz
AQ: 0.7725844 sec
RG: 8192
DE: 22.050 usec
TE: 300.2 K
D11: 0.03000001 sec
PL12: 27.00 dB
CPEPRG2: waltz16
FREQ2: 100.625 MHz
NUC2: 300.13151515 MHz
PL2: 120.00 dB

D1: 1.20000000 sec
P1: 1.00000000 sec
DE: 4.50 usec
SFO1: 75.4759363 MHz
NUC1: 13C
PL1: 0.00 dB
F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 75.4673409 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 3.00 Hz
GB: 0
PC: 1.00
ID: NMR pilot parameters
CA: 20.00 cm

172.622

Beauveria bassiana

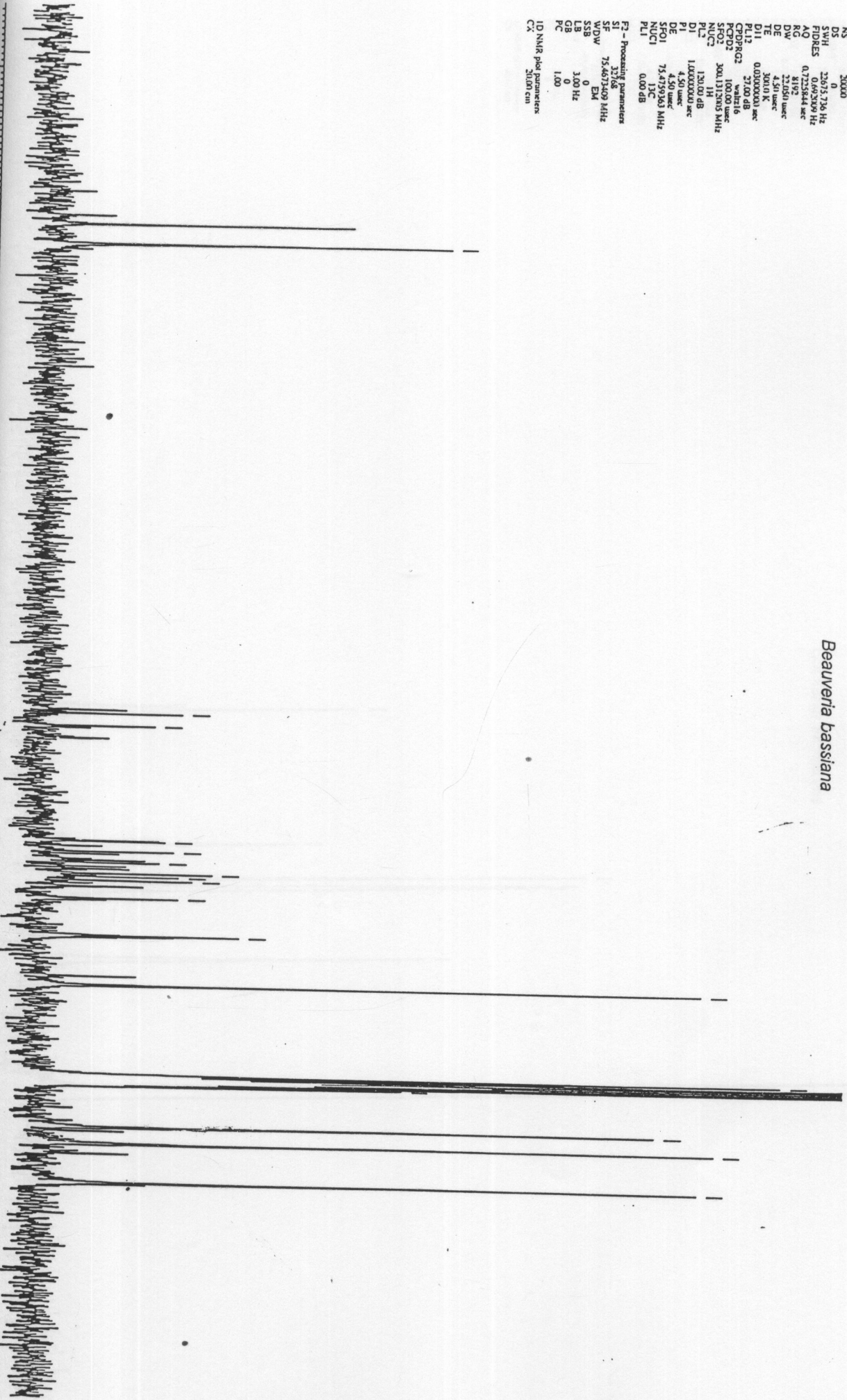
98.779
96.793

78.622
77.013
75.256
73.564
73.046
72.458
69.634
63.770

55.950

41.760
41.402
41.121
40.839
40.557
40.275
39.995
33.435
30.703

24.482



200 190 180

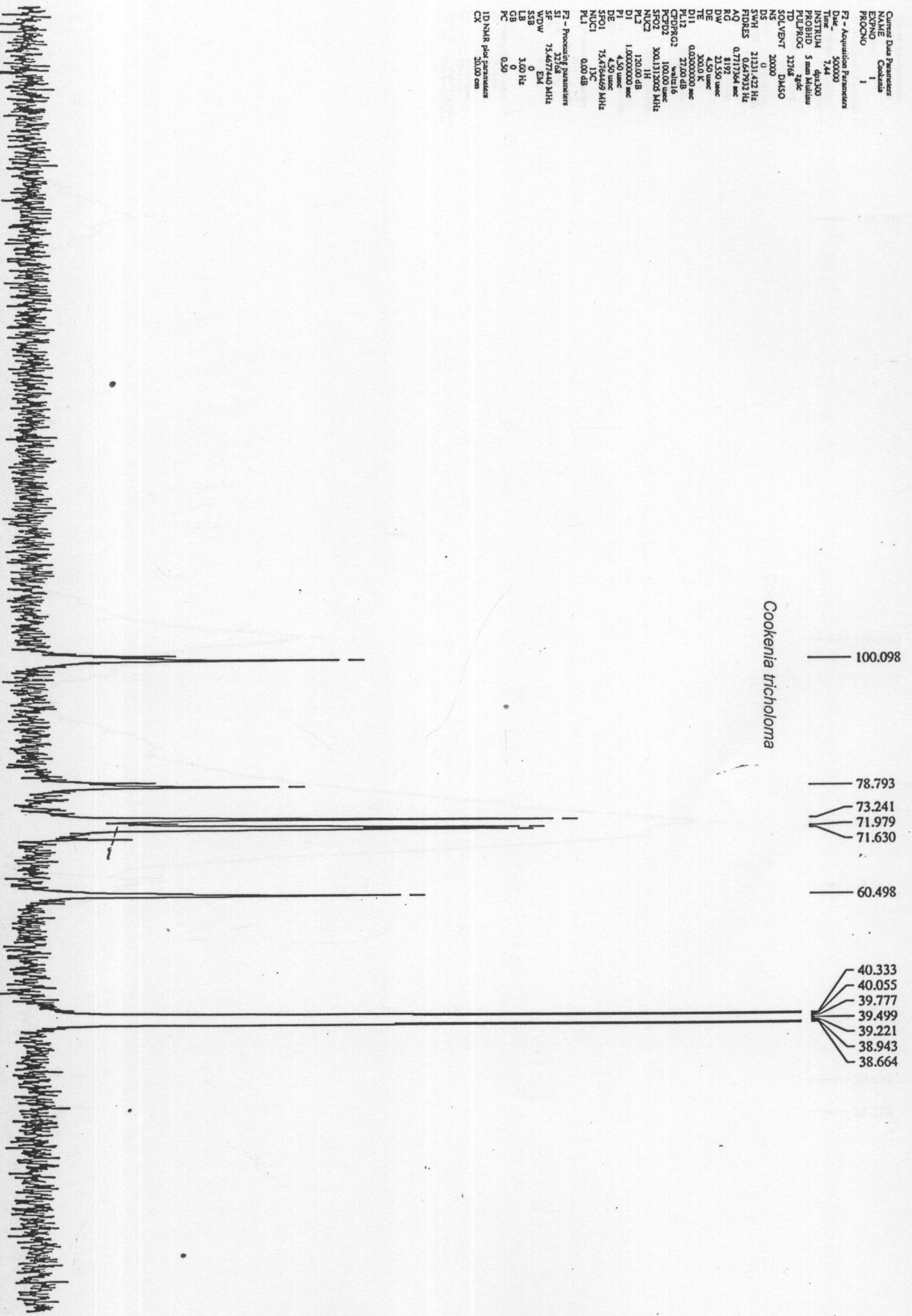
Current Data Parameters
 NAME Cookonia
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 500000
 Time 7.44
 INSTRUM dpx300
 PROBHID 5 mm Multinu
 PULPROG zgpg
 TD 32768
 SFO 500.136261
 NS 2000
 DS 0
 SWH 2121.422 Hz
 FIDRES 0.647932 Hz
 AQ 0.7171964 sec
 RG 4192
 DW 4.50 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 D11 0.02000000 sec
 PL12 27.00 dB
 CPDPRG2 waltz16
 SFO2 500.136261 MHz
 SFO3 300.1312005 MHz
 NUC2 1H
 PL2 120.00 dB
 D1 1.00000000 sec
 PI 4.50 usec
 DE 4.50 usec
 SFO1 75.471469 MHz
 NUC1 13C
 PL1 0.00 dB

F2 - Processing parameters

SI 32768
 SF 75.4677440 MHz
 NFOV 0 EM
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 0.50
 ID NMR plot parameters
 CX 30.00 cm

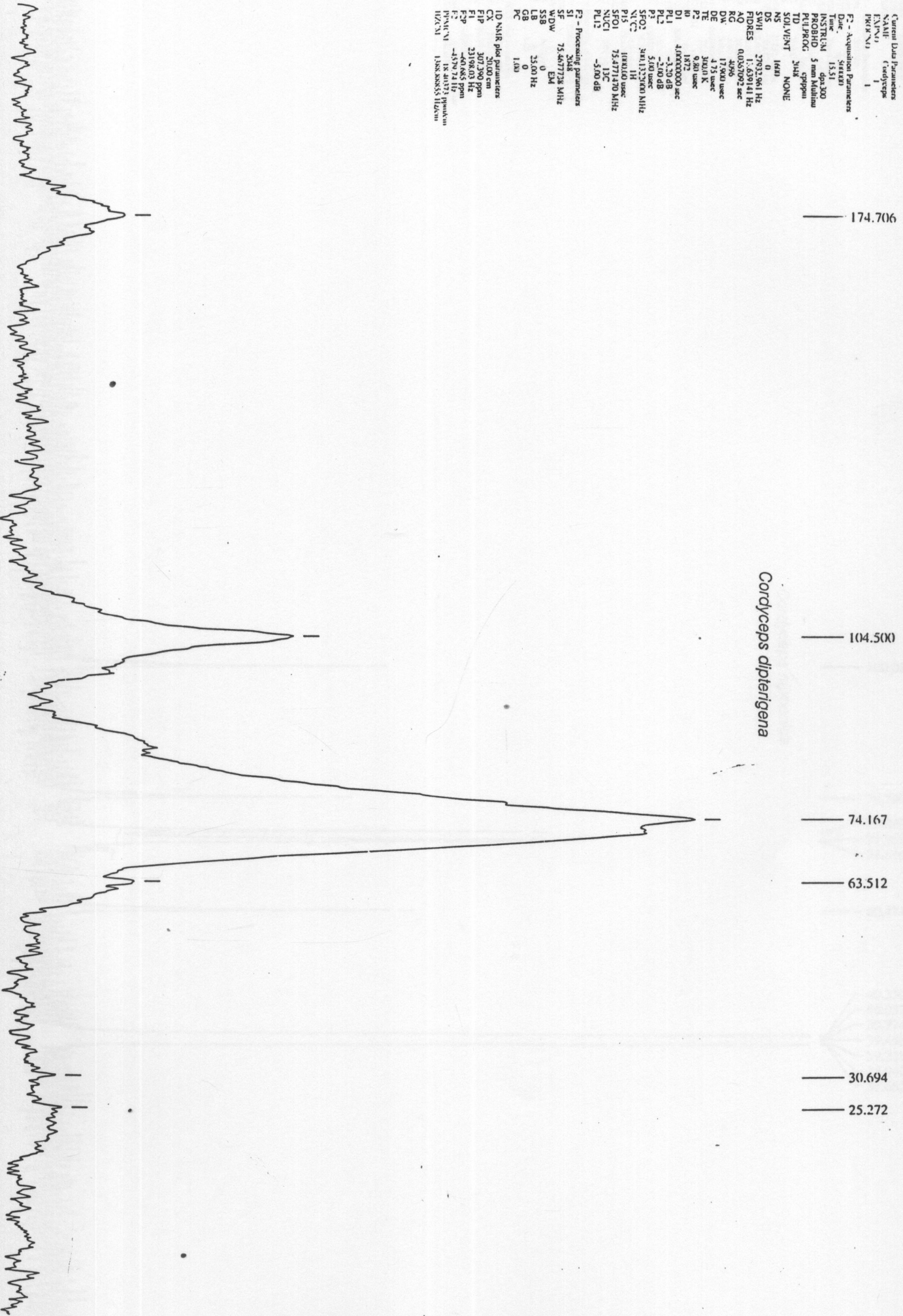


Current Data Parameters
 NAME Cordyceps
 INSTRUM 1
 INX 11

F2 - Acquisition Parameters
 Date: 198801
 Time: 15.51
 INSTRUM: gpc-300
 INSTRUM: 5 mm gpmhmu
 PULPROG: zgpg30
 TD: 314K
 SOLVENT: NONE
 NS: 1640
 DS: 0
 SWH: 2703.964 Hz
 FIDRES: 0.03339141 Hz
 AQ: 0.00000000 sec
 RG: 4096
 DE: 17.940 usec
 TE: 300.0 K
 F2: 9.801 usec
 M: 1.00000000
 DI: 4.00000000 usec
 PL1: -3.30 dB
 PL2: -2.00 dB
 P12: 5.00 usec
 SFO1: 304.1329000 MHz
 SFO2: 100.625000 MHz
 SFO3: 100.625000 MHz
 SFO4: 25.4771470 MHz
 NUCL1: 13C
 PL12: -5.00 dB

F3 - Processing parameters
 SI: 2448
 SF: 75.467738 MHz
 WIDW: 0 Hz
 SSB: 0 Hz
 LB: 35.00 Hz
 GB: 0 Hz
 PC: 1.00

ID NMR plot parameters
 CX: 20.00 cm
 FIP: 207.390 ppm
 FI: 23198.03 Hz
 F2P: -40.045 ppm
 F3: 45.714 Hz
 INSTRUM: gpc-300
 INX: 11
 IZC/N: 138.88555 Hz/cm



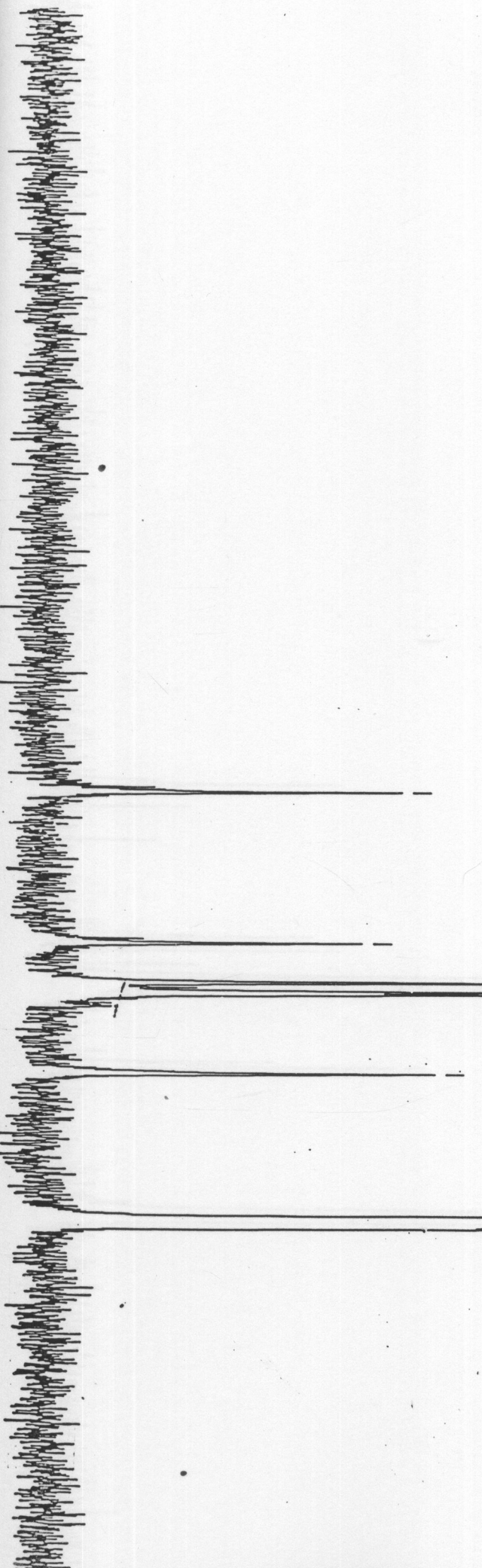
Cordyceps dipterigena

Current Data Parameters
NAME Cordyceps
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 200000
Time 15:59
INSTRUM dpc-300
PROBHD 5 mm Multinu
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 20000
DS 0
SWH 21231.422 Hz
FIDRES 0.647932 Hz
AQ 0.717264 sec
RG 213
DE 21.50 usec
TE 300.0 K
D11 0.03000000 sec
PCPD2 100.00 usec
SFO2 300.132000 MHz
NUC2 1H
PL2 120.00 dB
D1 1.00000000 sec
DE 4.50 usec
SFO1 75.4764469 MHz
NUC1 13C
PL1 0.00 dB

F2 - Processing parameters
SF 75.467446 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.00

ID NMR plot parameters
CX 20.00 um
FIP 215.000 ppm
FIP 1623.57 Hz
FIP 1623.57 Hz
F2 -377.34 ppm
PMCM 11.00000 ppm/cm
HZCM 820.14314 Hz/cm



Cordyceps japonica

- 100.082
- 78.760
- 73.242
- 71.963
- 71.616
- 60.474
- 40.330
- 40.052
- 39.774
- 39.496
- 39.218
- 38.940
- 38.662

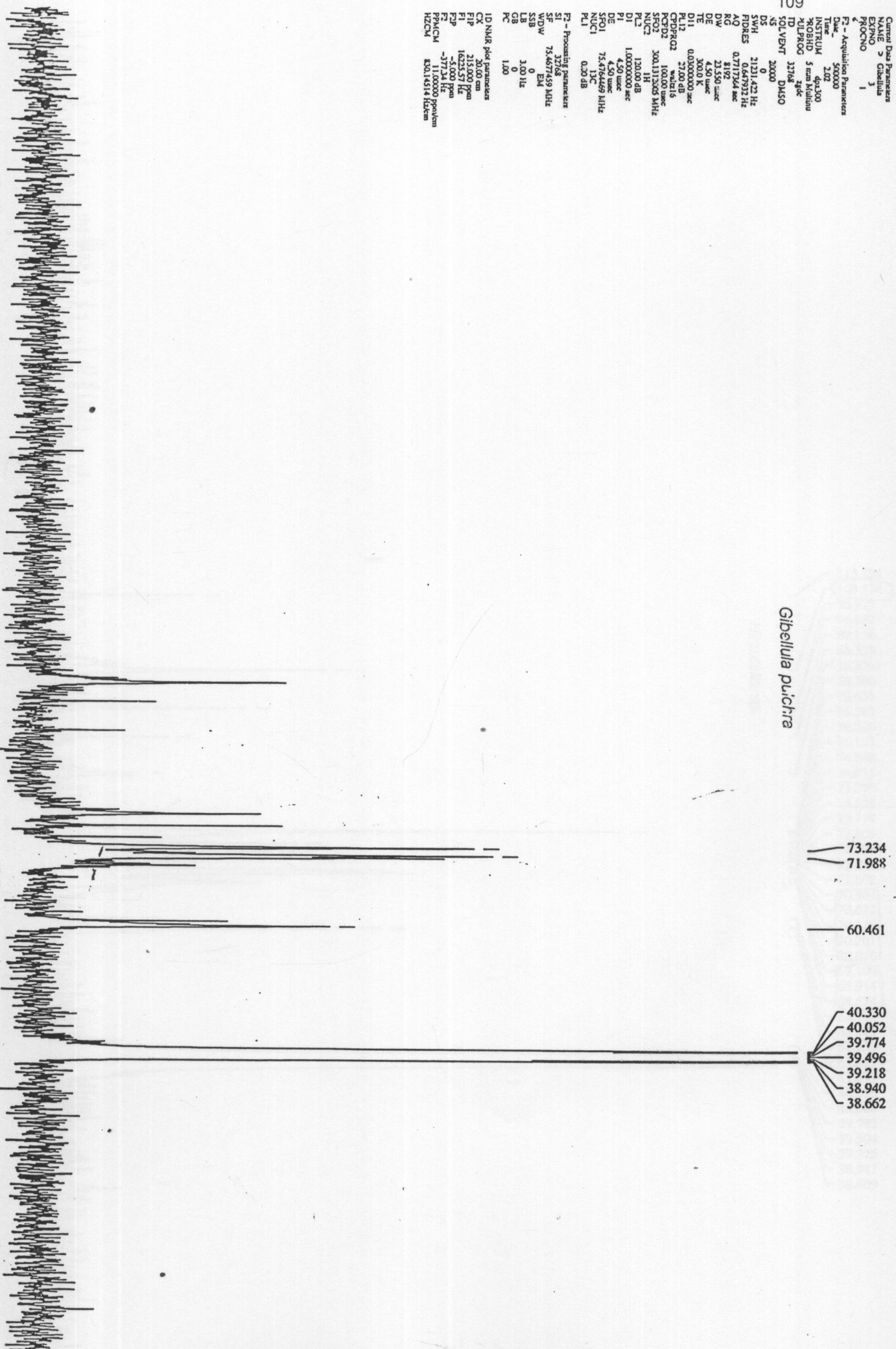
Current Data Parameters
NAME 3 Gibellula
PROONO 1

F1 - Acquisition Parameters
Date 500000
Time 2.02
INSTRUM 402300
SOLVPRG 5 mm Multibit
KILPROG 3776k
TD 1776k
SOLVBT DM50
NS 2000

F2 - Processing parameters
SI 213.422 Hz
SF 75.467749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 3.00 Hz
GB 0
PC 1.00

ID NMR plot parameters
CX 20.00 cm
FIP 213.000 ppm
F1 16233.57 Hz
F2 377.64 Hz
PRVCM 11.00000 pps/cm
HZCM 830.14514 Hz/cm

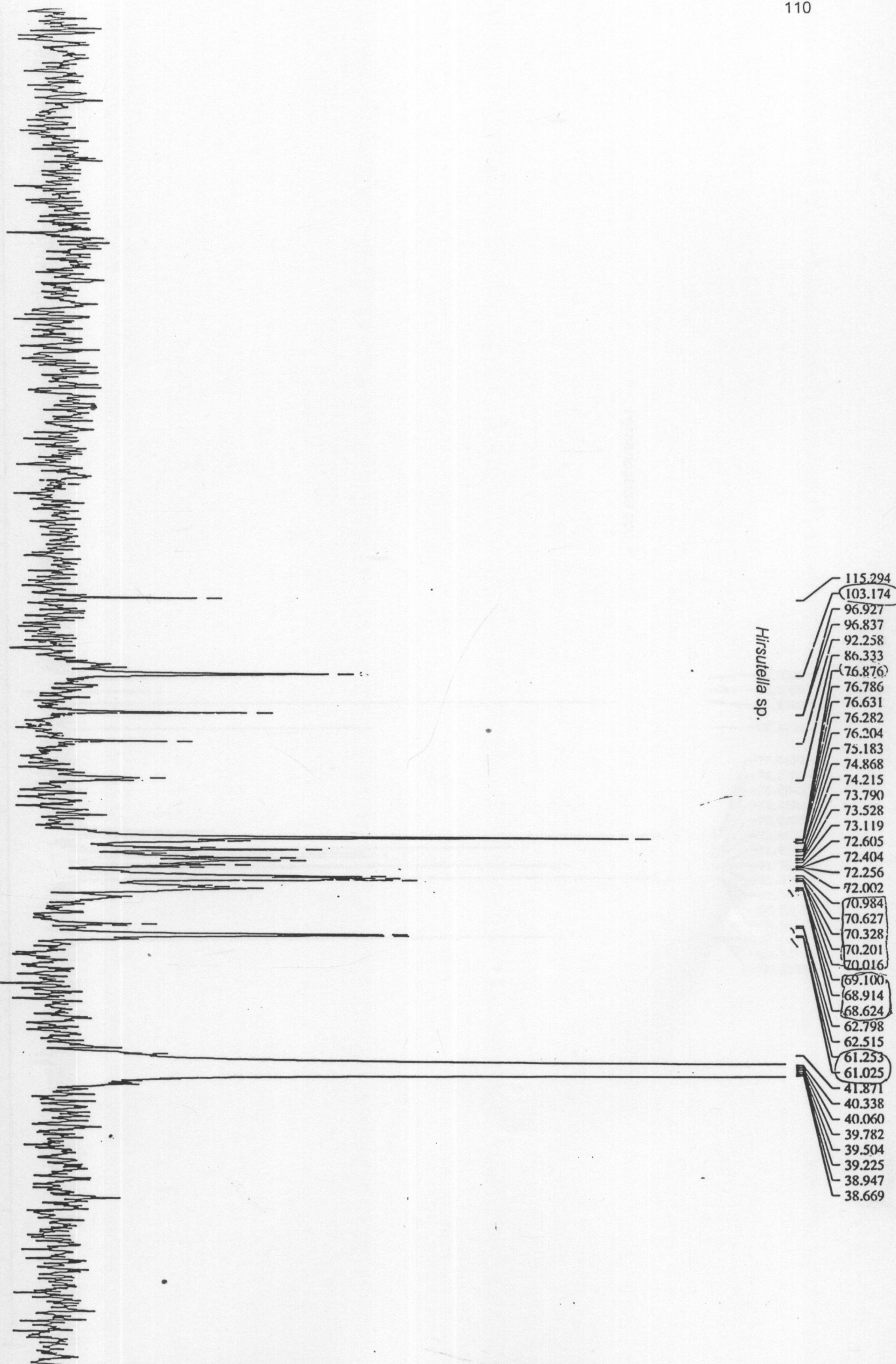
Gibellula puchra



73.234
71.988

60.461

40.330
40.052
39.774
39.496
39.218
38.940
38.662

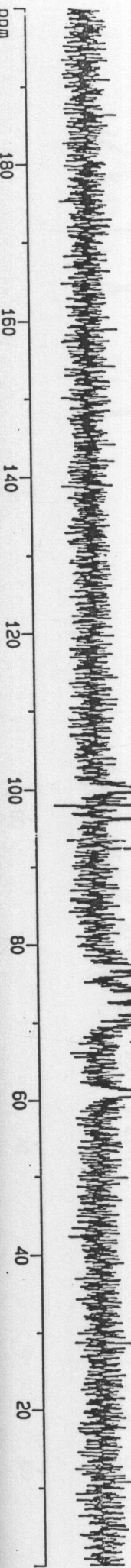


Hirsutella sp.

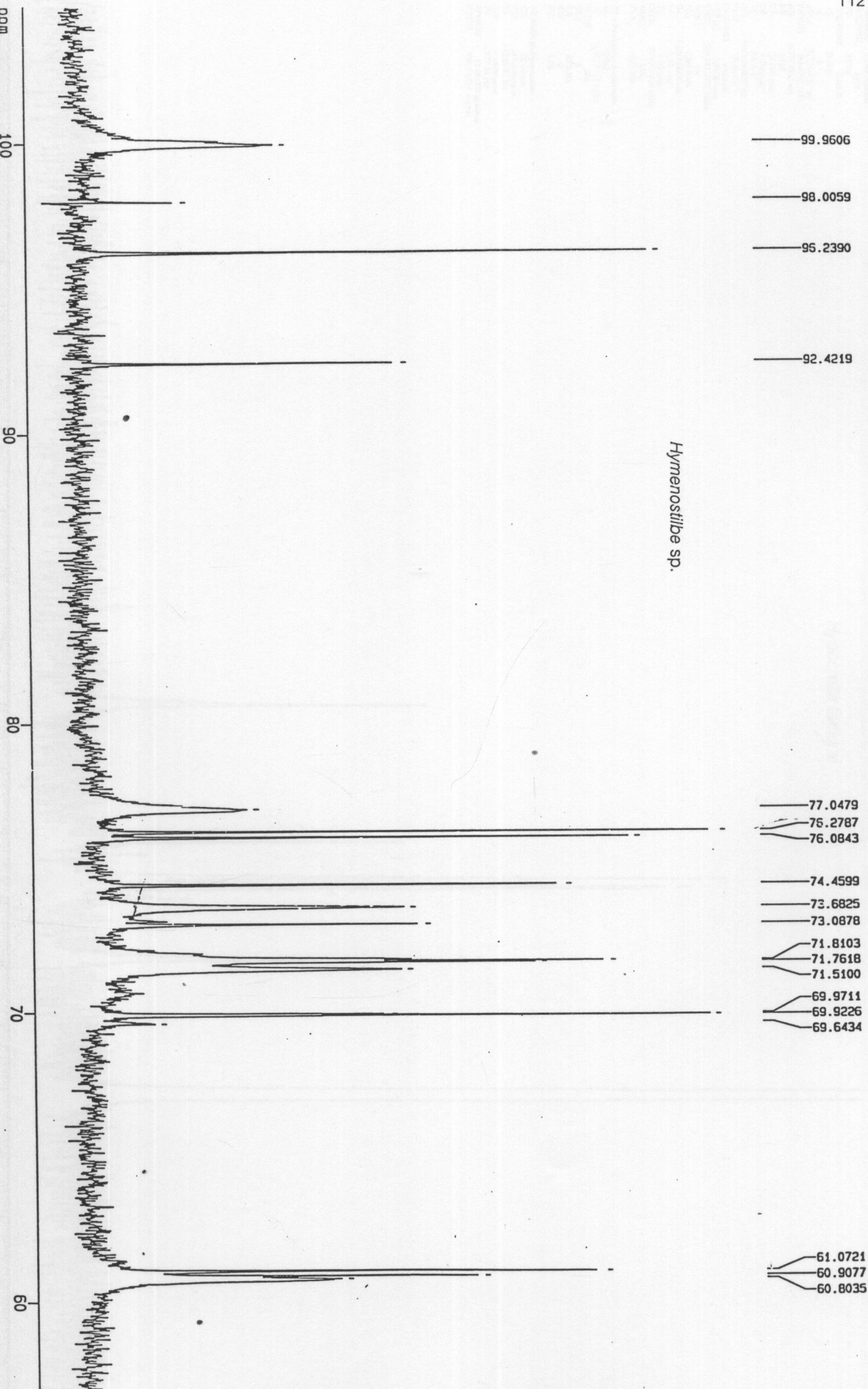
- 115.294
- 103.174
- 96.927
- 96.837
- 92.258
- 86.333
- 76.876
- 76.786
- 76.631
- 76.282
- 76.204
- 75.183
- 74.868
- 74.215
- 73.790
- 73.528
- 73.119
- 72.605
- 72.404
- 72.256
- 72.002
- 70.984
- 70.627
- 70.328
- 70.201
- 70.016
- 69.100
- 68.914
- 68.624
- 62.798
- 62.515
- 61.253
- 61.025
- 41.871
- 40.338
- 40.060
- 39.782
- 39.504
- 39.225
- 38.947
- 38.669

Sample #12 in D2O
KSAC0146002 22 (DPX300)
13C NMR

Hymenostilbe sp.



- 99.9606 ✓
- 98.0059
- 96.2390 ✓
- 92.4219 ✓
- 77.0479 ✓
- 76.2787 ✓
- 76.0843 ✓
- 74.4599 ✓
- 73.6825 ✓
- 73.0878 ✓
- 71.8103
- 71.7618
- 71.5100
- 69.9711
- 69.9226
- 69.6434
- 61.0721 ✓
- 60.9077
- 60.8035



Sample #12 in D2O
KSAC0146002 22 (DPX300)
13C NMR

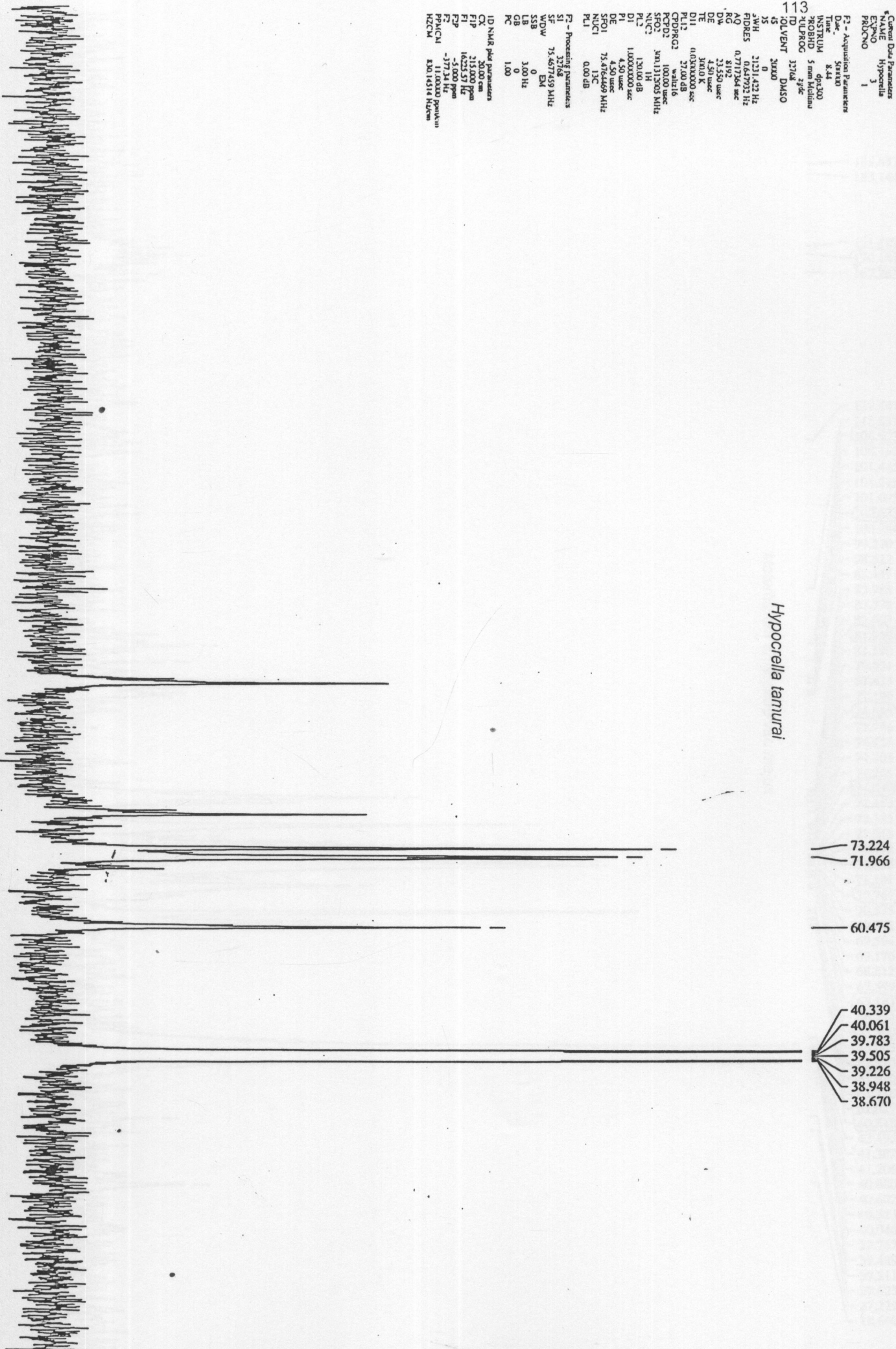
Current Data Parameters
EXPNO Hypocrella
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070103
Time 8:34
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm MSL400
PULPROG zgpg
TD 32768
FIDRES 0.3774
AQ 0.0011
RG 8192
DWT 23.550 usec
DE 4.50 usec
TE 300.2 K
DELTA 0.00000000 usec
PULP1 27.000 dB
CTDPRG2 waltz16
PCPD1 100.00 usec
SFO2 99.13205 MHz
NUC2 1H
D1 130.00 dB
D12 1.00000000 usec
P1 4.50 usec
DE 4.50 usec
SFO1 75.476469 MHz
NUC1 13C
PL1 0.00 dB

F3 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.477459 MHz
WDW EN
SSB 0
GB 3.00 Hz
CB 0
PC 1.00

ID NMR pulse parameters
CK 30.00 cm
F1 3.00000000 usec
F2 16.223333 usec
F3 5.00000000 usec
F4 -377.34 Hz
PPHACN 11.000000 pps/cm
HZCM 800.14518 MHz/cm

Hypocrella tanurai



- 73.224
- 71.966
- 60.475
- 40.339
- 40.061
- 39.783
- 39.505
- 39.226
- 38.948
- 38.670

184.853
183.144

171.449
170.186
167.263

139.847
 115.837
 106.903
 104.150
 101.445
 101.215
 101.095
 100.633
 100.284
 99.210
 98.522
 83.141
 82.981
 82.778
 82.607
 81.968
 81.190
 79.391
 77.433
 77.199
 76.695
 75.746
 74.925
 74.703
 74.268
 74.049
 72.483
 72.135
 71.913
 71.772
 71.292
 71.191
 70.767
 70.575
 69.842
 69.594
 69.176
 68.812
 67.599
 67.143
 66.774
 63.300
 63.063
 62.210
 61.926
 61.718
 61.029
 60.818
 42.495
 41.382
 41.206
 40.880
 40.602
 40.324
 40.046
 39.767
 39.489
 39.211
 29.625
 27.229
 18.660

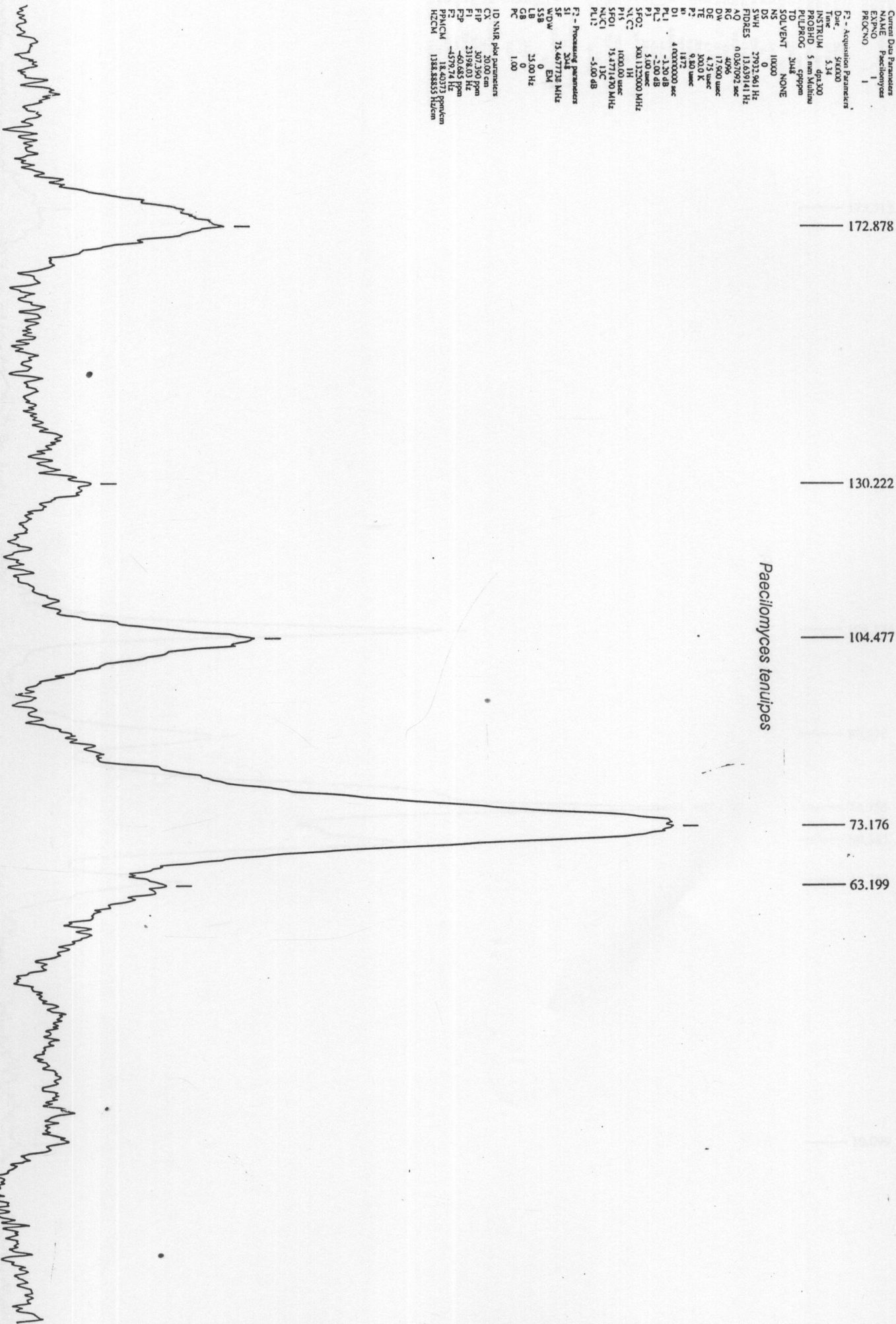
Metarrizium antisopliae var. *maius*



Current Data Parameters
 EXPNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 5/4/00
 Time 3:34
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm/Altium
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT NONE
 NS 1000
 DS 4
 SWH 3793.8641 Hz
 FIDRES 11.619141 Hz
 AQ 0.0267097 sec
 RG 4096
 DW 17.600 usec
 DE 4.75 usec
 TE 300.2 K
 F2 1872 usec
 M 1872 usec
 D1 4.0000000 sec
 PL1 -1.30 dB
 PL2 -100 dB
 SFO1 300.136000 MHz
 NUC1 1H
 P15 1000.00 usec
 SFO1 75.4771470 MHz
 NUC1 13C
 PL13 -5.00 dB

F3 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4677738 MHz
 WDW 0 EM
 SSB 0
 LB 25.0 Hz
 CB 0
 PC 1.00

ID NMR plot parameters
 CA 20.00 cm
 CX 3.70 cm
 F1 2319.801 Hz
 F2 -4579.74 Hz
 PPAICM 18.40373 ppm/cm
 HZCM 1388.8833 Hz/cm



Current Data Parameters
NAME Phyllocordyceps
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ SUN11

Time 17:49
INSTRUM dpx300
PROBHD 5 mm Multi
PULPROG zgpg30
SOLVENT NONE

NS 1600
DS 0
SWH 27912.961 Hz
FIDRES 13.639141 Hz
AQ 0.0267892 sec
RG 300.0 K

DW 1.7300 sec
DE 4.75 umec
TE 300.0 K
P2 9.80 umec
P3 1872

PL1 4.0000000 sec
PL2 2.0000000 sec
PL3 -2.00 dB

SFO2 300.1329800 MHz
NUC2 1H
PUS 10.0000 umec
SFO1 75.4711700 MHz
NUC1 13C
PL12 -5.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 3048
WDW 75.4607738 MHz
SSB 0
LB 23.00 Hz
GB 0
PC 1.00

ID NMR pulse parameters
CX 30.00 cm
FIP 307.390 ppm
F1 23198.013 Hz
F2 401.685 ppm
F3 130.133 ppm
F4 138.8855 Hz/cm
HZCM 138.8855 Hz/cm

173.712

104.123

86.971

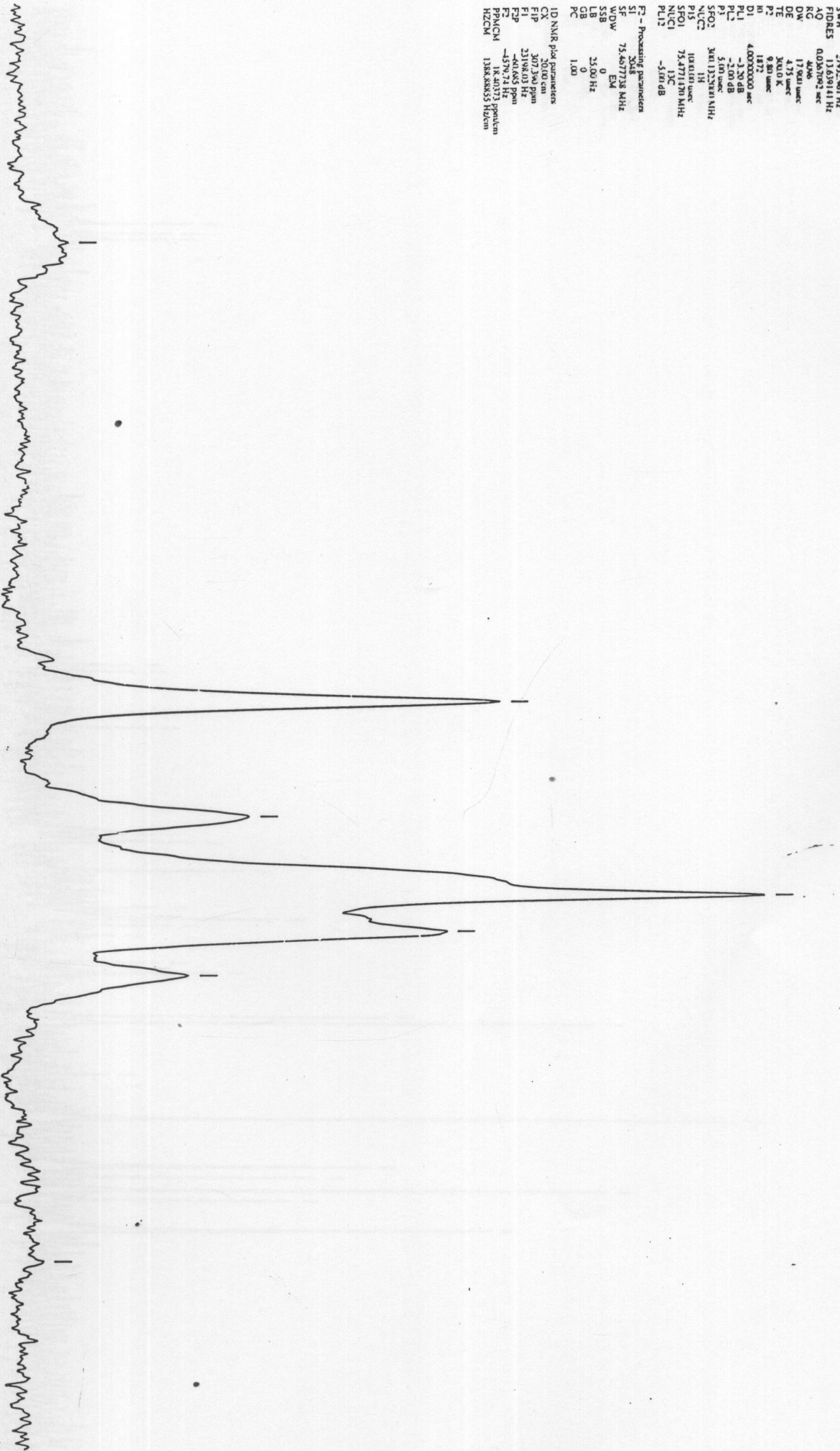
74.756

69.353

62.742

19.099

Phyllocordyceps sp.



Current Data Parameters
 NAME Torubiella
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 18-02-2008
 Time 18:42
 INSTRUM dos300
 PROBHID 5 mm Muliim
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT D2O
 NS 3000
 DS 0
 SWH 22615.736 Hz
 FIDRES 0.693009 Hz
 AQ 0.723544 sec
 RG 8192
 DM 22.050 usec
 DE 22.050 usec
 TE 300.2 K
 D1 0.0000000 sec
 PL1 37.00 dB
 CPDPRG2 waltz16
 FREQ2 100.00 MHz
 SFO2 300.1315005 MHz
 WQC 1.0000000 sec
 PL 1.0000000 sec
 D1 4.30 usec
 DE 4.30 usec
 SFO1 75.475263 MHz
 WQC 1.0000000 sec
 PL 0.00 dB
 F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.467309 MHz
 SWH 0 DM
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00
 ID NMR pld parameters
 CX 20.00 cm

177.482
 175.992
 175.132

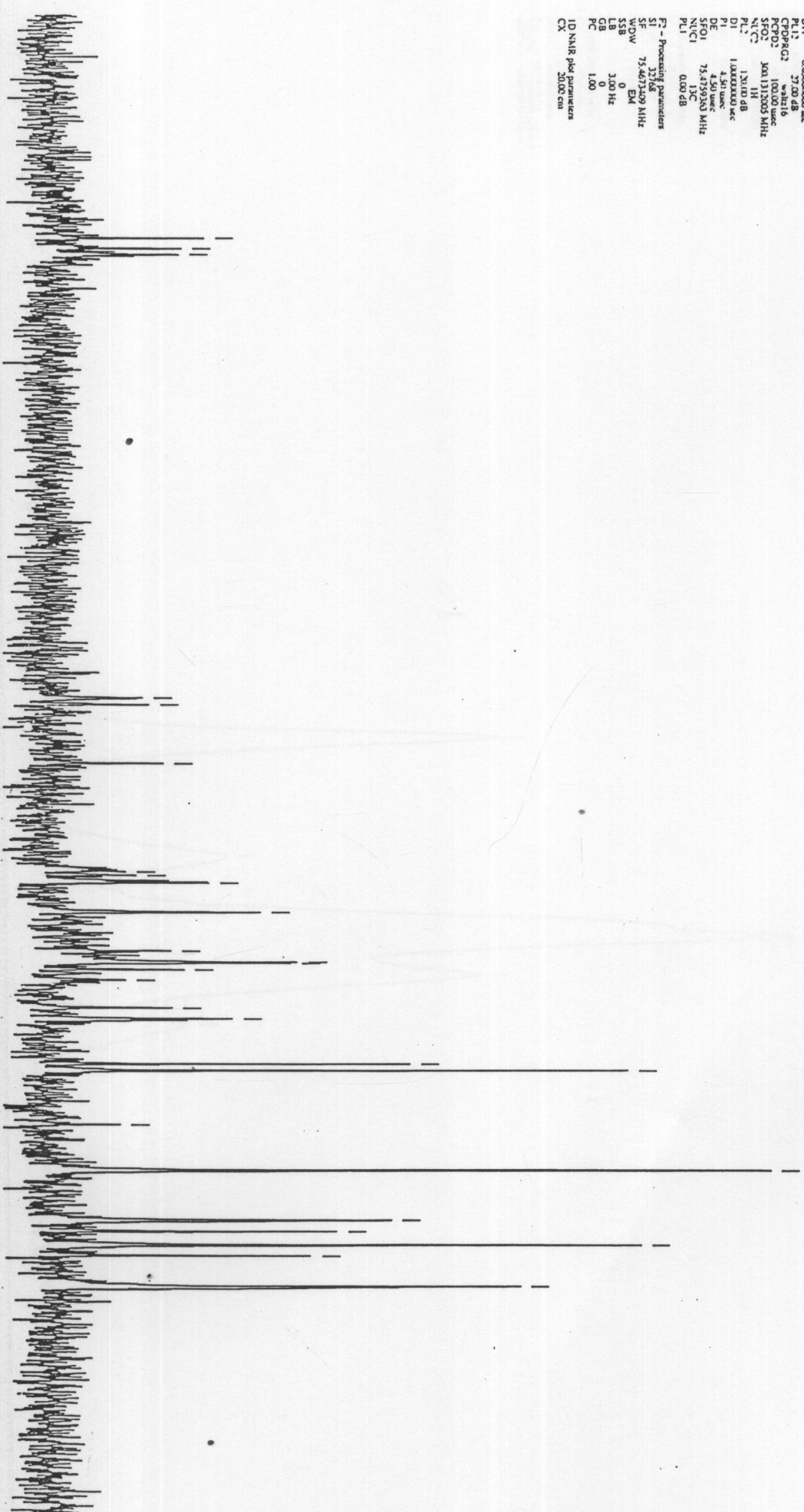
Torubiella tenuis

110.704
 109.707
 101.177

85.370
 84.843
 83.781
 79.450
 73.777
 72.168
 71.988
 71.043
 69.546
 65.479
 63.934
 57.356
 56.400

48.437
 41.712

34.426
 32.756
 32.607
 30.709
 29.146
 24.591



Control Data Parameters
 NAME Zygosporium
 EXNO 1
 PROCN 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date 10/10/83
 Time 19:15
 INSTRUM dca 141
 PROBMID 5 mm Mulsim
 PULPROG eppgm
 TD 248
 SOLVENT NONE
 NS 1600
 DS 0
 SWH 27912.961 Hz
 FIDRES 13.639111 Hz
 AQ 0.0767975 sec
 RG 4766
 DA 17.7481 usec
 DE 17.7481 usec
 TE 300.0 K
 TF 9.80 usec
 P2 1872
 ID 4.00000000 sec
 DI 1872
 PL1 -1.20 dB
 PL2 5.00 dB
 PL3 5.00 dB
 SFO2 300.132960 MHz
 SFO3 100.610 usec
 P15 75.4771470 MHz
 NUCL1 13C
 NUCL2 -510.0 dB
 PL12
 F2 - Processing parameters
 SI 3048
 SF 75.467718 MHz
 WDW 0 EM
 SSB 25.00 Hz
 CB 0
 PC 1.00
 ID NMR plot parameters
 CX 300.00 em
 CY 300.00 em
 F1 23198.03 Hz
 F2 -60.683 ppm
 -4579.74 Hz
 PPA/CW 18.40373 ppb/cm
 HZ/CW 13848853 Hz/cm

173.326

103.965

87.179

74.440

69.248

62.567

Zygosporium masonia

